

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036882**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.30**

**(21)** Номер заявки  
**201792589**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.06.09**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/5513* (2006.01)  
*A61K 31/5517* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 47/48* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD123 И КОНЬЮГАТЫ УКАЗАННЫХ АНТИТЕЛ**

---

**(31)** 62/175,121

**(32)** 2015.06.12

**(33)** US

**(43)** 2018.05.31

**(86)** PCT/US2016/036631

**(87)** WO 2016/201065 2016.12.15

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СИЭТЛ ДЖЕНЕТИКС, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Сазерленд Мэй Кунг, Вестендорф  
Лори, Сассман Джанго (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** US-A1-20140227173

US-A1-20120189540

WO-A1-2014057119

KUNG SUTHERLAND et al. "SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML". Blood, 14 June 2013 (14.06.2013), Vol. 122, Pgs. 1455-1463, entire document

US-B2-8920803

SUTHERLAND et al. "SGN-CD123A, a Pyrrolobenzodiazepine Dimer Linked Anti-CD123 Antibody Drug Conjugate, Demonstrates Effective Anti-Leukemic Activity in Multiple Preclinical Models of AML", 57th American Society of Hematology Meeting Abstracts, Blood, 03 December 2015 (03.12.2015), Vol. 126, Iss. 23, Pg. 330, entire document

---

**(57)** В изобретении предложены антитела мыши, химерные и гуманизированные антитела, которые специфично связываются с CD123, а также конъюгаты указанных антител.

---

**B1**

**036882**

**036882**

**B1**

### Уровень техники

CD123 представляет собой белок, имеющий молекулярную массу 70 кДа, который представляет собой трансмембранную альфа-цепь рецептора ИЛ-3 (интерлейкина 3); данный белок также называют IL3R-альфа. Известно, что CD123 экспрессируется в образцах первичного ОМЛ (острого миелоидного лейкоза); сообщалось о присутствии CD123 на множестве злокачественных клеток. В настоящем изобретении предложены антитела против CD123 и конъюгаты указанных антител.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела против CD123 и нацеленные на CD123 конъюгаты антитела с лекарственным средством. В частности, в настоящем изобретении предложены нацеленные на CD123 конъюгаты антитела с лекарственным средством на основе пирролобензодиазепина ("PBD"), а также способы применения таких конъюгатов для лечения нарушений, при которых экспрессируется CD123. Предпочтительные антитела против CD123 представляют собой химерные или гуманизированные формы антитела 7G3 мыши (Sun et al., Blood, 1996, 87(1):83-92). Антитело 7G3 мыши содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

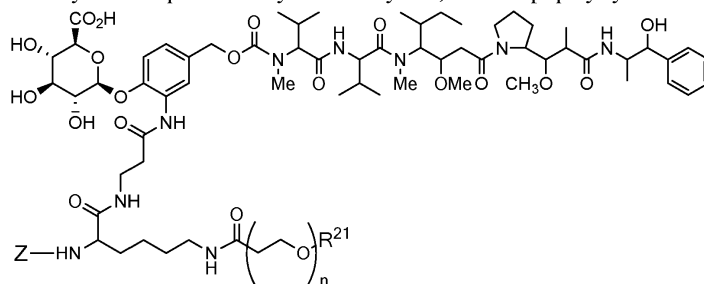
Предпочтительные гуманизированные антитела 7G3 для применения в настоящем документе представляют собой антитела, сконструированные с использованием последовательности hIGHv1-2 зародышевой линии человека и J экзона J<sub>H</sub>-1 для вариабельной области тяжелой цепи и последовательности зародышевой линии человека hIGKv4-1 и J экзона J<sub>K</sub>-2 для вариабельной области легкой цепи. В особенности предпочтительные гуманизированные антитела 7G3 содержат вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 2.

Антитела для применения в настоящем изобретении могут представлять собой интактные антитела или антигенсвязывающие фрагменты указанных антител. Гуманизированное антитело 7G3 может содержать зрелую вариабельную область тяжелой цепи, слитую с константной областью тяжелой цепи, и зрелую вариабельную область легкой цепи, слитую с константной областью легкой цепи. Константная область тяжелой цепи может являться существующей в природе или мутантной формой константной области человека (например, SEQ ID NO: 5, константная область тяжелой цепи IgG1 с цистеином, заменяющим серию в положении 239 (S239C), или SEQ ID NO: 6). Константная область тяжелой цепи может относиться к изотипу IgG1. Иллюстративная аминокислотная последовательность константной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 7.

Химерные или гуманизированные антитела 7G3, описанные в настоящем документе, конъюгируют с лекарственными средствами-линкерами, включая лекарственные средства-линкеры на основе PBD, для обеспечения конъюгатов антитела против CD123 с лекарственным средством. Присоединение может осуществляться посредством общепринятых или сайт-специфичных способов конъюгации. Иллюстративное присоединение осуществляют посредством сконструированного цистеина в положении 239 константной области тяжелой цепи согласно EU-индексу согласно Kabat. Нацеленные на CD123 конъюгаты антитела с лекарственным средством применяют для лечения заболевания, при котором экспрессируется CD123, включая типы рака, экспрессирующие CD123, такие как ОМЛ.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения химерные или гуманизированные антитела 7G3, описанные в настоящем документе, конъюгируют с лекарственными средствами-линкерами, включая лекарственные средства-линкеры на основе глюкуронида - пегилированного MMAE (мометилауристината E), для обеспечения конъюгатов антитела против CD123 с лекарственным средством.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения лекарственное средство-линкер, присоединенный к гуманизированному антителу 7G, имеет формулу



или представляет собой фармацевтически приемлемую соль указанного соединения, где Z представляет собой органический остаток, содержащий реакционноспособный участок, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе с образованием ковалентного присоединения к указанному антителу;

n варьирует от 8 до 36;

R<sup>PR</sup> представляет собой водород или защитную группу;

R<sup>21</sup> представляет собой кэппирующую группу для остатка полиэтиленгликоля.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения значение n может варьировать от 8 до 14. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения значение n варьирует от 10 до 12. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения значение n составляет 12. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения R<sup>21</sup> представляет собой -CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения любой из раскрытых конъюгатов антитела с лекарственным средством на основе пегилированного MMAE характеризуется значением p, составляющим 8. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения лекарственное средство-линкер присоединен к антителу посредством остатков цистеина межпептидных дисульфидных связей антитела.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен результат анализа цитотоксичности *in vitro*, в котором исследовали конъюгат гуманизированного антитела 7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством в отношении МЛУ+(множественная лекарственная устойчивость)-положительной линии клеток ОМЛ, KG-1, которая экспрессирует незначительное количество копий CD123 по сравнению с CD33. Несмотря на незначительное количество копий, конъюгат антитела h7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством продемонстрировал мощную активность.

На фиг 2 представлен результат анализа цитотоксичности *in vitro*, в котором исследовали конъюгат гуманизированного антитела 7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством в отношении МЛУ+-положительной линии клеток ОМЛ, Kasumi-1, которая экспрессирует незначительное количество копий CD123 по сравнению с CD33. Несмотря на незначительное количество копий, конъюгат антитела h7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством продемонстрировал мощную активность.

На фиг 3 представлены результаты, полученные на ксенотрансплантатной модели ОМЛ, THP-1, демонстрирующие, что конъюгат гуманизированного антитела 7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством продемонстрировал мощную активность, несмотря на незначительное количество копий. Несмотря на незначительное количество копий, активность была сравнима с активностью конъюгатов антитела против CD33 с лекарственным средством.

На фиг 4 представлены результаты, полученные на ксенотрансплантатной модели ОМЛ, KG1-INV, демонстрирующие, что конъюгат гуманизированного антитела 7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством продемонстрировал мощную активность и активность, сравнимую с активностью конъюгата антитела против CD33 с лекарственным средством, несмотря на незначительное количество копий.

На фиг 5 представлены аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи антитела 7G3 мыши и гуманизированной тяжелой цепи vHA, vHB и vHC, а также выбранные акцепторные последовательности варибельной области зародышевой линии человека.

На фиг 6 представлены аминокислотные последовательности варибельной области легкой цепи антитела 7G3 мыши и гуманизированной легкой цепи vLA и vLB, а также выбранные акцепторные последовательности варибельной области зародышевой линии человека.

На фиг 7 представлены результаты, полученные на ксенотрансплантатной модели ОМЛ, HNT-34, демонстрирующие, что конъюгат гуманизированного антитела 7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством продемонстрировал мощную цитотоксическую активность.

На фиг 8 представлены результаты, полученные на ксенотрансплантатной модели ОМЛ, модели диссеминированного ОМЛ Molm-13, демонстрирующие, что конъюгат гуманизированного антитела 7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством продемонстрировал мощную цитотоксическую активность.

На фиг 9 представлены результаты, полученные на ксенотрансплантатной модели ОМЛ, модели диссеминированного первичного МЛУ+ ОМЛ, демонстрирующие, что конъюгат гуманизированного антитела 7G3ec SGD-1910 с лекарственным средством продемонстрировал мощную цитотоксическую активность.

#### Определения

Термин "моноклональное антитело" в настоящем описании означает антитело, полученное из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, содержащиеся в популяции, являются идентичными, за исключением возможных существующих в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Модификатор "моноклональное" указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требование получения антитела любым конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые согласно настоящему изобретению, могут быть получены посредством способа гибридомы, впервые описанного в публикации Kohler et al. (1975), Nature, 256:495, или могут быть получены способами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методик, например, описанных в публикациях Clackson et al. (1991), Nature, 352:624-628 и Marks et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581-597, или могут быть получены другими способами. Антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой моноклональные антитела.

Антитела, как правило, представлены в выделенной форме. Это означает, что антитело, как правило, является по меньшей мере на 50% мас./мас., чистым от interfering белков и других загрязняющих веществ, образующихся в результате получения или очистки антитела, но не исключает возможности, что антитело объединяют с избытком фармацевтически приемлемого носителя (носителей) или другого наполнителя, предназначенного для облегчения применения антитела. Иногда антитела являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95 или 99% мас./мас. чистыми от interfering белков и загрязняющих веществ, образующихся в результате получения или очистки. Антитела, включая выделенные антитела, можно конъюгировать с цитотоксическими агентами и предложить в форме конъюгатов антитела с лекарственным средством.

"Выделенный" полинуклеотид означает полинуклеотид, который был идентифицирован и отделен и/или восстановлен из компонентов его природного окружения.

Специфичное связывание моноклонального антитела со своим антигеном-мишенью означает аффинность, составляющую по меньшей мере  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Специфичное связывание является обнаруживаемым большим по интенсивности и отличающимся от неспецифичного связывания, возникающего в отношении по меньшей мере одной неродственной мишени. Специфичное связывание может являться результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретным пространственным состоянием (например, типа ключ-замок), тогда как неспецифичное связывание обычно является результатом сил Ван-дер-Ваальса. Конъюгаты нацеленного на CD123 антитела с лекарственным средством, а также антитела против CD123 специфично связываются с CD123.

Основной структурной единицей антитела является тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область, состоящую из приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, главным образом, отвечающую за распознавание антигена. Данная вариабельная область первоначально экспрессируется связанной с отщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельную область без сигнального пептида иногда называют зрелой вариабельной областью. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Легкие цепи классифицируют как каппа либо ламбда. Тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон; тяжелые цепи определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях индекс и константные области соединены областью "J", состоящей из приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также содержит область "D", состоящую приблизительно из 10 или более аминокислот (См. в общем смысле руководство *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7), которое полностью включено в настоящее описание посредством ссылки для всех целей). Зрелые вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют связывающий сайт антитела. Таким образом, интактное антитело содержит два связывающих сайта. Все цепи демонстрируют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных участков (framework regions, FR), соединенных тремя гипервариабельными участками, также называемыми участками, определяющими комплементарность, или CDR (complementarity determining regions). CDR из двух цепей каждой пары выровнены по каркасным участкам, что обеспечивает связывание со специфичным эпитопом. От N-конца до C-конца как легкая, так и тяжелая цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Распределение аминокислот к каждому домену осуществляется в соответствии с определениями согласно публикациям Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Kabat также предлагает широко применяемую систему нумерации (нумерация согласно Kabat), в которой соответствующим остаткам между различными вариабельными областями тяжелой цепи или между различными вариабельными областями легкой цепи присваивают одинаковый номер. Нумерацию константной области тяжелой цепи осуществляют посредством EU-индекса по Kabat (*Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)).

Термин "антитело" включает интактные антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител. "Интактное антитело" представляет собой таковое, которое содержит антигенсвязывающую вариабельную область, а также константный домен легкой цепи ( $C_L$ ) и константные домены тяжелой цепи,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  и  $C_{H4}$ , в зависимости от класса антитела. Константные домены могут представлять собой константные домены с природной последовательностью (например, константные домены с природной последовательностью человека) или вариант аминокислотной последовательности указанных последовательностей. Фрагменты антитела конкурируют с интактным антителом, из которого были получены данные фрагменты, за специфичное связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>c</sub>, диатела, Dab, нанотела и Fv. Фрагменты могут быть получены с помощью методик рекомбинантной ДНК или посредством ферментативного или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также включает диатело (гомодимерный Fv-фрагмент) или минитело ( $V_L$ - $V_H$ - $C_{H3}$ ), биспецифичное антитело или т.п. Биспецифичное или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две различные пары тяжелой/легкой це-

пи и два различных связывающих сайта (см., например, публикации Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Rostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)).

Термин "пациент" включает человека и других субъектов-млекопитающих, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

С целью классификации аминокислотных замен на консервативные или неконсервативные аминокислоты разделяют следующим образом:

- группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile;
- группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr;
- группа III (кислые боковые цепи): asp, glu;
- группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg;
- группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro;
- группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe.

Консервативные замены включают замены между аминокислотами одного класса. Неконсервативные замены представляют собой замены члена одного из данных классов членом другого класса.

Процент идентичностей последовательности определяют на последовательностях антитела, максимально выровненных согласно системе нумерации Kabat. После выравнивания, если область представляющего интерес антитела (например, полную зрелую вариабельную область тяжелой или легкой цепи) сравнивают с той же областью эталонного антитела, процент идентичности последовательности между областями представляющего интерес и эталонного антитела представляет собой количество положений, занятых одинаковыми аминокислотами в области как представляющего интерес, так и эталонного антитела, разделенное на общее количество выровненных положений двух областей, без подсчета разрывов, умноженное на 100 для преобразования в проценты.

Композиции или способы, "содержащие" или "включающие" один или несколько из указанных элементов, могут содержать или включать другие элементы, не указанные специально. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать антитело отдельно или в комбинации с другими компонентами.

Термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" означает количество конъюгата антитела с лекарственным средством, которое является эффективным для лечения заболевания или нарушения у млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество конъюгата может уменьшить количество раковых клеток; уменьшить размер опухоли; ингибировать (т.е. до определенной степени замедлить и предпочтительно остановить) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. до определенной степени замедлить и предпочтительно остановить) метастазирование опухоли; ингибировать рост опухоли; и/или ослабить один или несколько симптомов, связанных с раком. В случае терапии рака эффективность можно, например, измерить посредством оценки времени до прогрессирования заболевания (time to disease progression, TTP) и/или посредством определения частоты ответа (response rate, RR). Термин "эффективный режим" означает комбинацию количества вводимого конъюгата и частоты введения доз, достаточных для осуществления лечения нарушения.

Термины "лечить" или "лечение", если контекст не указывает обратное, означают терапевтическое лечение, при котором целью является ингибирование или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как развитие или распространение рака. Преимущественные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничены указанными, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, отсрочивание или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную), будь то обнаруживаемые или не обнаруживаемые. "Лечение" также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в случае отсутствия лечения. Лица, которые нуждаются в лечении, включают таковых, которые страдают от обнаруживаемого заболевания. Лица, которые нуждаются в лечении, также могут включать таковых, которые страдают от не обнаруживаемого заболевания, например, пациентов, которые достигли полного ответа после лечения CD123-экспрессирующего нарушения, но нуждаются в терапии с целью предотвращения рецидива.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный или подлежащий одобрению регуляторным органом федерального правительства или правительства штата либо приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей.

Термин "фармацевтически совместимый компонент" означает фармацевтически приемлемый разбавитель, вспомогательное средство, вспомогательное вещество или наполнитель, с которым антитело против CD123 или конъюгат антитела с лекарственным средством вводят субъекту.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль" означает фармацевтически приемлемые органические или неорганические соли. Иллюстративные соли включают соли сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, иодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуроонат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бен-

золсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может охватывать включение другой молекулы, такой как ион ацетата, ион сукцината или другой противоион. Противоион может представлять собой любой органический или неорганический фрагмент, который стабилизирует заряд родительского соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может содержать в своей структуре более одного заряженного атома. В случаях, когда множество заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, данная соль может содержать множество противоионов. Вследствие этого фармацевтически приемлемая соль может содержать один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Сольваты в контексте настоящего изобретения представляют собой такие формы соединений согласно настоящему изобретению, которые образуют комплекс в твердом или жидком состоянии посредством координации с молекулами растворителя. Гидраты представляют собой конкретную форму сольватов, в которых координация происходит с водой. Предпочтительными сольватами в контексте настоящего изобретения являются гидраты.

Если обратное не является очевидным из контекста, термин "приблизительно" охватывает значения в пределах стандартного отклонения от указанного значения.

### Подробное описание изобретения

#### I. Общая часть.

Настоящее изобретение основано, частично, на обнаружении того, что конъюгаты антитела с лекарственным средством, включая конъюгаты антитела с лекарственным средством на основе PBD, нацеленные на CD123, являются в особенности эффективными при уничтожении CD123+-экспрессирующих клеток. В частности, было обнаружено, что высокоаффинное гуманизованное антитело 7G3 может быть сконструировано с применением в качестве акцепторной последовательности варибельной области тяжелой цепи hIGHv1-2 зародышевой линии и J экзона J<sub>H</sub>-1, а в качестве акцепторной последовательности варибельной области легкой цепи - hIGKv4-1 зародышевой линии и J экзона J<sub>K</sub>-2, а также посредством мутирования остатков в одном или нескольких ключевых участках обратно к последовательности антитела мыши или зародышевой линии мыши. В случае тяжелой цепи данные ключевые участки включали одно или несколько положений из H20, H38, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H81, H82A и H93. В случае легкой цепи данные ключевые участки включали одно или несколько положений из L2, L19, L21, L22 и L38. Примечательно, что высокоаффинное гуманизованное антитело 7G3 было сконструировано без необходимости в осуществлении созревания аффинности с одновременным сохранением идентичности CDR антитела мыши. Высокоаффинное гуманизованное антитело 7G3 также являлось эффективным при доставке лекарственных средств в качестве части конъюгата антитела с лекарственным средством. При конъюгации с лекарственным средством-линкером SGD-1910 PBD полученный в результате конъюгат h7G3ec PBD являлся в высокой степени активным в отношении панели линий клеток ОМЛ и образцов первичного ОМЛ, несмотря на незначительное количество копий CD123 и статус МЛУ+. Обозначение "ec" после h7G3 означает, что антитело содержит замену цистеина в положении 239 тяжелой цепи (нумерация согласно EU-индексу по Kabat).

#### II. Молекулы-мишени.

Если не указано обратное, CD123 и IL-3R альфа применяются взаимозаменяемо и обозначают CD123 или IL-3R альфа человека. Иллюстративной последовательности человека присвоен учетный номер UniProtKB/Swiss-Prot P26951.

#### III. Антитела согласно настоящему изобретению.

Гуманизованное антитело представляет собой созданное способами генетической инженерии антитело, в котором CDR от "донорного" антитела, отличного от антитела человека, перенесены в "акцепторные" последовательности антитела человека (см., например, патенты США Queen, 5530101 и 5585089; Winter, 5225539; Carter, 6407213; Adair, 5859205; и Foote, 6881557). Акцепторные последовательности антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, смесь таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антитела человека или последовательность области зародышевой линии.

Таким образом, гуманизованное антитело представляет собой антитело, содержащее некоторые или все CDR полностью или по существу из донорного антитела, отличного от антитела человека, и последовательности каркасного участка варибельной области и константных областей, в случае их наличия, полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизованная тяжелая цепь содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и последовательность каркасного участка варибельной области тяжелой цепи и константной области тяжелой цепи, в случае их наличия, по существу из последовательности каркасного участка варибельной области и последовательностей константной области тяжелой цепи человека. Аналогично, гуманизованная легкая цепь содержит по меньшей мере один, два и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела и последовательности каркасного участка варибельной области легкой цепи и константной области легкой цепи, в случае их наличия, по существу из последовательности каркасного участка варибельной области и константной области легкой цепи человека. За исключением нанотел и диател, гуманизованное анти-

тело, как правило, содержит гуманизованную тяжелую цепь и гуманизованную легкую цепь. CDR в гуманизованном антителе или антителе человека по существу происходит из соответствующего CDR в антителе, отличном от антитела человека, когда по меньшей мере 60, 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков (как определено согласно Kabat) идентичны между соответствующими CDR, или по существу идентичен указанному CDR. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения CDR в гуманизованном антителе или антителе человека по существу происходит из соответствующего CDR в антителе, отличном от антитела человека, когда в каждом CDR присутствуют не более трех консервативных замен аминокислот, или по существу идентичен указанному CDR. Последовательности каркасного участка варибельной области цепи антитела или константной области цепи антитела по существу происходят из последовательности каркасного участка варибельной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 95 или 100% соответствующих остатков, определенных согласно Kabat, идентичны. В некоторых гуманизованных антителах согласно настоящему изобретению существует по меньшей мере шесть обратных мутаций 7G3 мыши в каркасном участке варибельной области тяжелой цепи антитела и по меньшей мере две обратные мутации 7G3 мыши в варибельной области легкой цепи антитела.

Несмотря на то, что гуманизованные антитела часто содержат все шесть CDR (предпочтительно, как определено согласно Kabat) из антитела мыши, гуманизованные антитела также могут быть получены с меньшим количеством, чем все CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5) CDR из антитела мыши (например, публикации Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320:415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

Определенные аминокислоты из остатков каркасного участка варибельной области человека могут быть выбраны для замещения на основании возможного влияния данных аминокислот на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний проводят посредством моделирования, исследования характеристик аминокислот в определенных положениях или эмпирического наблюдения за эффектами замещения или мутагенеза конкретных аминокислот.

В настоящем изобретении предложены антитела, нацеленные на антиген CD123. Предпочтительные антитела представляют собой химерные или гуманизованные антитела, полученные из антитела 7G3 мыши. Предпочтительная акцепторная последовательность для варибельной области тяжелой цепи представляет собой экзон hIGHv1-2 зародышевой линии V<sub>H</sub> и для J экзона (J<sub>H</sub>) -экзон J<sub>H</sub>-1. Для варибельной области легкой цепи предпочтительная акцепторная последовательность представляет собой экзон hIGKv4-1, и для J экзона - J<sub>K</sub>-2.

Иллюстративное антитело против CD123 представляет собой гуманизованное антитело, которое содержит CDR тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 1, и CDR легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 2, и дополнительно содержит зрелую варибельную область тяжелой цепи по меньшей мере с 90, 91, 92, 93, 94 или 95% идентичностью SEQ ID NO: 1, и зрелую варибельную область легкой цепи по меньшей мере с 90, 91, 92, 93, 94 или 95% идентичностью SEQ ID NO: 2. CDR определены согласно Kabat. Предпочтительно сохраняют следующие остатки аминокислот каркасного участка варибельного домена тяжелой цепи: H48 занят I, H67 занят A, H69 занят L, H71 занят V, H73 занят R, H93 занят T, и сохраняют следующие остатки аминокислот легкой цепи: L2 занят F, L38 занят L. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения сохраняют следующие остатки аминокислот тяжелой цепи: H20 занят M, H38 занят K, H48 занят I, H66 занят K, H67 занят A, H69 занят L, H71 занят V, H73 занят R, H81 занят H, H82A занят N и H93 занят T, и сохраняют следующие остатки аминокислот каркасного участка варибельного домена легкой цепи: L2 занят F, L38 занят L. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения присутствуют следующие остатки аминокислот каркасного участка варибельного домена тяжелой цепи: H20 занят M или V, H38 занят K или R, H48 занят I, H66 занят K или R, H67 занят A, H69 занят L, H71 занят V, H73 занят R, H81 занят E или H, H82A занят S или N и H93 занят T, и присутствуют следующие остатки аминокислот каркасного участка варибельного домена легкой цепи: L2 занят F, L19 занят A или V, L21 занят I или M, L22 занят N или S, L38 занят L.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены гуманизованные антитела, которые содержат варибельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 1, и варибельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 2, при условии, что H20 занят M или V, H38 занят K или R, H48 занят I, H66 занят K или R, H67 занят A, H69 занят L, H71 занят V, H73 занят R, H81 занят E или H, H82A занят S или N, и H93 занят T, и присутствуют следующие остатки аминокислот легкой цепи: L2 занят F, L19 занят A или V, L21 занят I или M, L22 занят N или S, и L38 занят L.

Гуманизованные формы антитела m7G3 мыши включают три представленные в качестве примера гуманизованные зрелые варибельные области тяжелой цепи (HA-HC) и две представленные в качестве примера гуманизованные зрелые варибельные области легкой цепи (LA-LB). Пермутации данных цепей включают HALA, HALB, HBLA, HBLB, HCLA и HCLB. Среди данных пермутации HCLA является предпочтительной. HCLA содержит тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 2. Однако вместо HCLA можно использовать любые из HALA, HALB, HBLA, HBLB и HCLB.

Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения кажущаяся константа диссоциации ( $k_d$ ) гуманизованного антитела 7G3 в отношении CD123 человека, предпочтительно находится в диапазоне от 0,1 до 10 нМ, еще более предпочтительно находится в диапазоне от 0,1 до 5 нМ, более предпочтительно находится в диапазоне от 1 до 3 нМ или от 2 до приблизительно 3 нМ. Согласно некоторому аспекту настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению характеризуются кажущейся константой диссоциации, которая в 0,1-1,5 раза или даже в 0,5-2 раз выше кажущейся константы диссоциации антитела 7G3 мыши в отношении CD123 человека. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения кажущаяся константа диссоциации ( $k_d$ ) антитела в отношении CD123 человека составляет приблизительно 2,7.

#### А. Выбор константной области.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей гуманизованных антител 7G3 могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области человека. Выбор константной области может зависеть, отчасти, от того, требуются ли антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изоотипы IgG1 и IgG3 человека обладают сильной комплементзависимой цитотоксичностью, изотип IgG2 человека - слабой комплементзависимой цитотоксичностью, и IgG4 человека не обладает комплементзависимой цитотоксичностью. IgG1 и IgG3 человека также вызывают более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константные области легкой цепи могут являться лямбда или каппа. Антитела могут быть экспрессированы в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv или в виде одноцепочечных антител, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей связаны посредством спейсера.

Константные области человека демонстрируют аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между различными индивидуумами, говоря другими словами, константные области могут отличаться у различных индивидуумов в одном или нескольких полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с непалиморфной областью одного или нескольких других изоотипов.

Одна или несколько аминокислот на амино- или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, таких как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или могут быть представлены в виде производного в части или во всех молекулах. Замены могут быть сделаны в константных областях для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, см., например, публикации Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597 и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для увеличения периода полужизни у людей (см., например, публикации Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

Константную область можно модифицировать для обеспечения сайт-специфичной конъюгации лекарственного средства-линкера. Такие методики включают применение существующих в природе или сконструированных остатков цистеина, дисульфидных мостиков, полигистидиновых последовательностей, гликоконструированных меток и последовательностей, распознаваемых трансклутаминой. Иллюстративная замена для сайт-специфичной конъюгации с применением трансклутамины бактерий представляет собой N297S или N297Q. Иллюстративная замена для сайт-специфичной конъюгации с применением сконструированного цистеина представляет собой S239C. Фрагменты антитела можно также модифицировать для сайт-специфичной конъюгации лекарственного средства-линкера, см., например, публикацию Kim et al., Mol. Cancer Ther. 2008; 7(8).

#### В. Экспрессия рекомбинантных антител.

Гуманизованные или химерные антитела 7G3 можно получить посредством рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные конструкции полинуклеотидов, как правило, содержат последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антитела, включая ассоциированные в природе или гетерологичные области промотора. Предпочтительно последовательности контроля экспрессии являются эукариотическими системами промоторов в векторах, способных к трансформации или трансфекции эукариотических клеток-хозяев. После того как вектор был встроен в соответствующего хозяина, хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и для сбора и очистки перекрестно-реагирующих антител.

Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или фрагменты иммуноглобулинов. См. руководство Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). В данной области техники было разработано множество подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, включая линии клеток CHO (например, DG44), различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и миеломы, не нарабатывающие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки отличны от клеток человека.



Экспрессирующие векторы для данных клеток могут содержать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), а также необходимые сайты, обрабатывающие информацию, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего вируса папилломы и т.п. См. публикацию Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами данной области техники, включая очистку способом ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии), колоночной хроматографии, гель-электрофореза и т.п. (см. в общем смысле руководство Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)).

#### IV. Нуклеиновые кислоты.

В настоящем изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любую из гуманизированных тяжелых и легких цепей, описанных в настоящем документе. Как правило, нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, слитый со зрелыми переменными областями тяжелых и легких цепей. Кодирующие последовательности на нуклеиновых кислотах могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, с такими как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут встречаться в выделенной форме или могут быть клонированы в одном или нескольких векторах. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, посредством твердофазного синтеза или ПЦР (полимеразной цепной реакции) на основе перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены в виде одной непрерывной нуклеиновой кислоты, например, в векторе экспрессии, или могут быть разделены: например, каждая цепь будет клонирована в собственном векторе экспрессии.

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в HA, HB или HC. Например, выделенный полинуклеотид может кодировать переменную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Данный выделенный полинуклеотид может также кодировать константную область тяжелой цепи IgG человека. Изотип константной области IgG представляет собой, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения изотип константной области IgG представляет собой IgG1. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения кодируемая константная область IgG1 содержит аминокислотную последовательность, содержащую замену в остатке 239 согласно EU-индексу, представленному в системе Kabat, т.е. S239C. В настоящем изобретении также предложен вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в HA, HB или HC (например, SEQ ID NO: 1 или вариант указанной последовательности), а также клетка-хозяин, содержащая данный вектор экспрессии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина млекопитающего, например, клетку CHO.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в LA или LB, например выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Данный выделенный полинуклеотид может также кодировать константную область легкой цепи IgG человека. Изотип константной области легкой цепи IgG представляет собой, например, константную область каппа. В настоящем изобретении также предложен вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность, представленную в LA или LB (например, SEQ ID NO: 2 или вариант указанной последовательности), а также клетка-хозяин, содержащая данный вектор экспрессии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина млекопитающего, например, клетку CHO.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложен выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие переменную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, образующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с CD123 человека. В настоящем изобретении также предложен вектор экспрессии, содержащий выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые кодируют переменную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность

довательность SEQ ID NO: 2. Также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор или векторы экспрессии. Клетка-хозяин, предпочтительно представляет собой клетку млекопитающего, например, клетку CHO.

Согласно другому варианту реализации в настоящем изобретении предложены первый и второй векторы, содержащие полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи антитела, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, образующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с CD123 человека. Предложена клетка-хозяин, содержащая векторы, предпочтительно клетки-хозяева млекопитающих, такие как клетка CHO.

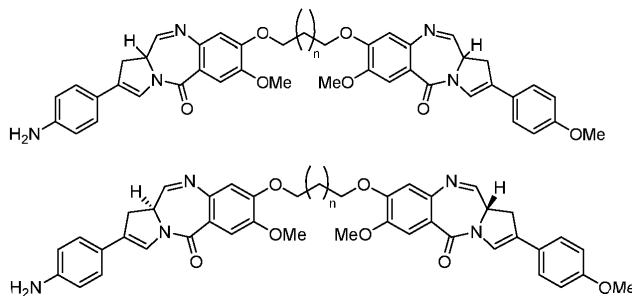
#### V. Конъюгаты антитела с лекарственным средством.

Антитела против CD123 можно конъюгировать с цитотоксическими фрагментами или цитостатическими фрагментами с образованием конъюгатов антитела с лекарственным средством (antibody-drug conjugates, ADC). В особенности подходящими фрагментами для конъюгации с антителами являются цитотоксические агенты (средства) (например, химиотерапевтические средства), ферменты, преобразующие пролекарства, радиоактивные изотопы или соединения либо токсины (данные фрагменты в совокупности называют терапевтическим средством). Например, антитело против CD123 можно конъюгировать с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент или токсин (например, цитостатическое или разрушающее клетки средство, такое как, например, абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин). Примеры пригодных классов цитотоксических агентов включают, например, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, средства, алкилирующие ДНК, и средства, разрушающие микротрубочки. Иллюстративные цитотоксические агенты включают, например, ауристатины, камптотецины, калихимицины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды (например, DM1, DM2, DM3, DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пирроло[1,4]бензодиазепины, индолинбензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины) и алкалоиды барвинка. Иллюстративные конъюгаты антитела с лекарственным средством включают конъюгаты антитела с лекарственным средством на основе ауристатина, что означает, что компонент-лекарственное средство представляет собой лекарственное средство ауристатин, конъюгаты антитела с лекарственным средством на основе майтанзиноида, что означает, что компонент-лекарственное средство представляет собой лекарственное средство майтанзиноид, и конъюгаты антитела с лекарственным средством на основе бензодиазепина, что означает, что компонент-лекарственное средство представляет собой бензодиазепин (например, пирроло[1,4]бензодиазепины, индолинбензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины).

Методики конъюгации терапевтических средств с антителами хорошо известны. (См., например, публикации Alley et al., *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010, 14:1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008, 14(3):154-169.) Терапевтическое средство можно конъюгировать способом, который снижает активность данного средства до тех пор, пока данное средство не отщепляется от антитела (например, посредством гидролиза, протеолитической деградации или с помощью расщепляющего средства). Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения терапевтическое средство присоединено к антителу посредством отщепляемого линкера, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточном окружении CD123-экспрессирующей раковой клетки, но по существу не чувствителен к внеклеточному окружению, так что конъюгат отщепляется от антитела после поглощения CD123-экспрессирующей раковой клеткой (например, в эндосомальном окружении или, например, вследствие чувствительности к pH или к протеазе, в лизосомальном окружении или в кавеоларном окружении). Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения терапевтическое средство может также являться присоединенным к антителу посредством неотщепляемого линкера.

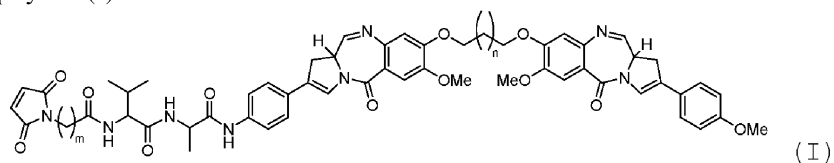
Авторы настоящего изобретения обнаружили, что нацеленный на CD123 ADC, содержащий лекарственное средство-линкер PBD, является в особенности эффективным для лечения CD123-экспрессирующих нарушений.

Предпочтительные PBD для применения в настоящем изобретении также являются следующими:



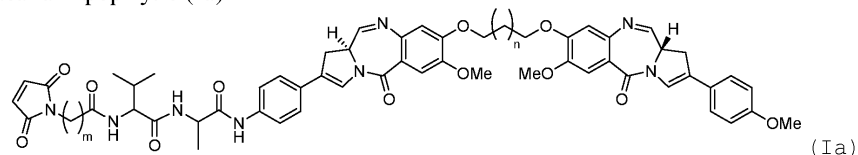
или представляют собой фармацевтическую соль, сольват или сольват соли указанных соединений, где индекс n представляет собой 1 или 3.

Предпочтительное лекарственное средство-линкер PBD для применения в настоящем изобретении представлено формулой (I)

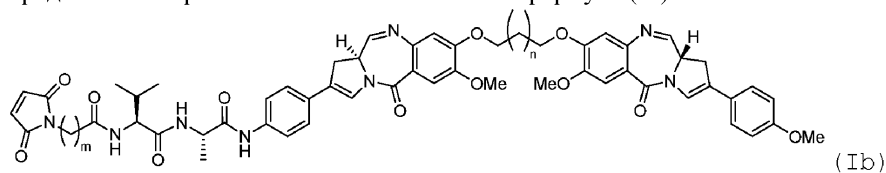


или представляет собой фармацевтическую соль, сольват или сольват соли указанного соединения; где индекс n представляет собой 1 или 3 и индекс m представляет собой целое число от 2 до 5.

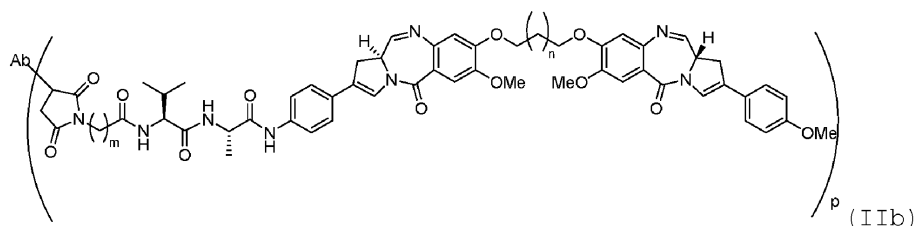
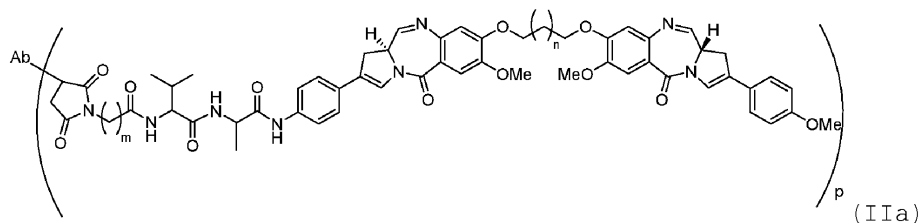
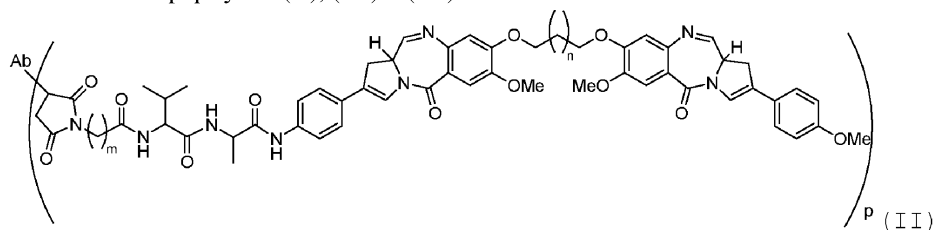
Предпочтительная стереохимия компонента-лекарственного средства PBD в лекарственном средстве-линкере показана в формуле (Ia)



Предпочтительная стереохимия компонента-лекарственного средства PBD и компонента-линкера в лекарственном средстве-линкере SGD-1910 PBD показана в формуле (Ib)

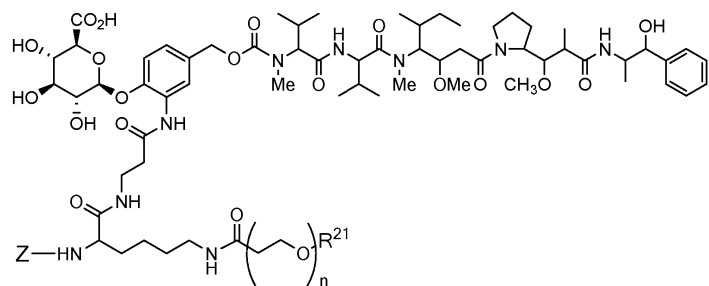


Лекарственное средство-линкер PBD конъюгирован с гуманизированным антителом CD123 согласно настоящему изобретению для получения нацеленного на CD123 конъюгата антитела с лекарственным средством, как показано в формулах (II), (IIa) и (IIb).



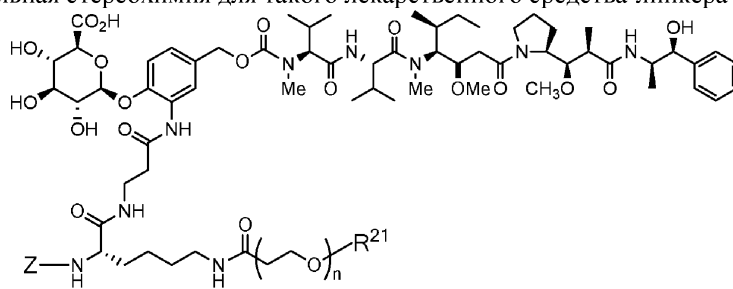
или фармацевтической соли, сольвата или сольвата соли указанных соединений; где индекс n представляет собой 1 или 3; индекс m представляет собой целое число от 2 до 5 и индекс p представляет собой целое число от 1 до 4.

Иллюстративные лекарственные средства-линкеры включают лекарственные средства-линкеры на основе MMAE. Введение полимера полиэтиленгликоля в качестве боковой цепи в отщепляемый лекарственный средство-линкер  $\beta$ -глюкуронид-MMAE обеспечивает конъюгаты антитела с лекарственным средством с уменьшенным клиренсом в плазме и увеличенной противоопухолевой активностью на ксенотрансплантатных моделях по сравнению с негликозилированным контролем. Соответственно, в особенности предпочтительные лекарственные средства-линкеры для присоединения к антителам согласно настоящему изобретению являются следующими:



или представляют собой фармацевтически приемлемую соль указанного соединения.

Предпочтительная стереохимия для такого лекарственного средства-линкера показана ниже:



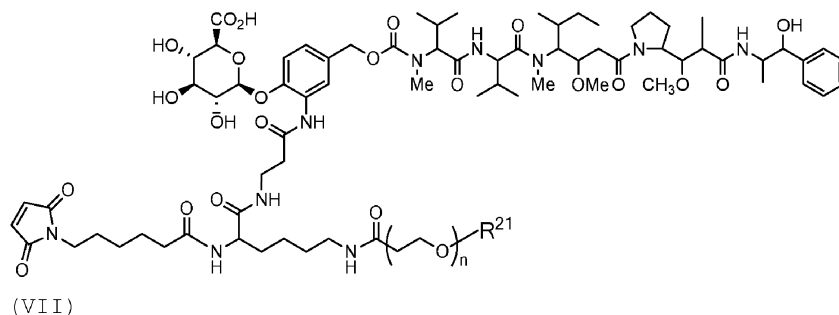
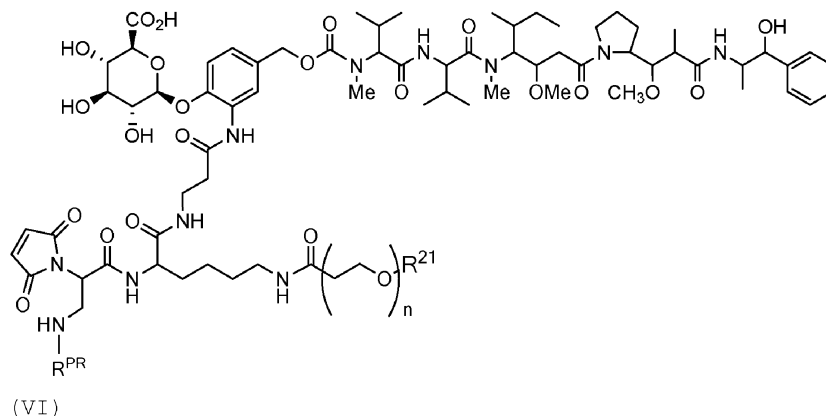
или фармацевтически приемлемая соль указанного соединения, где для формул (V) и (Va)

Z представляет собой органический фрагмент, содержащий реакционноспособный участок, способный вступать в реакцию с функциональной группой на антителе с образованием ковалентного присоединения к указанному антителу;

n варьирует от 8 до 36 и наиболее предпочтительно варьирует от 8 до 14 (наиболее предпочтительно 12);

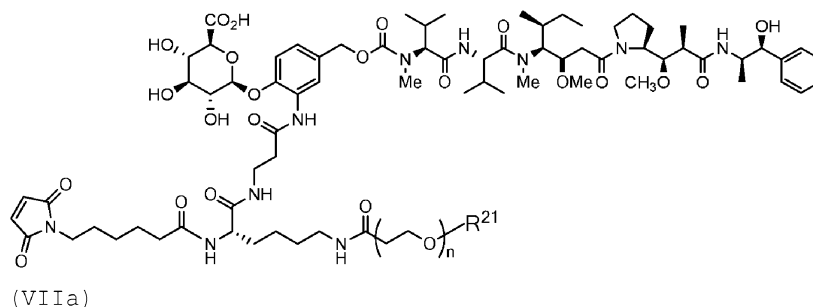
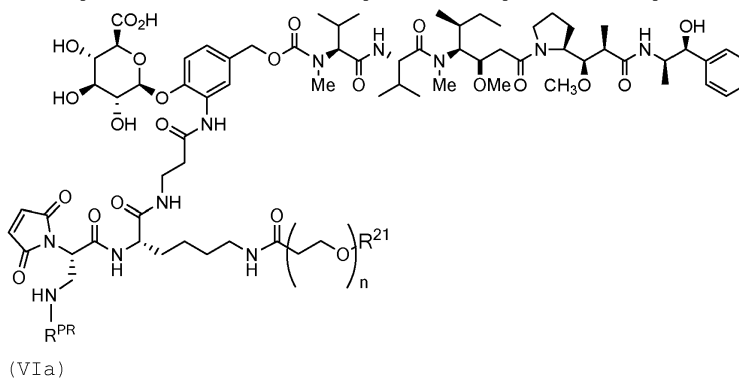
R<sup>21</sup> представляет собой кэпирующую группу для фрагмента полиэтиленгликоля, предпочтительно -CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H.

Предпочтительный фрагмент Z представляет собой малеимид-содержащий фрагмент. В особенности предпочтительные фрагменты Z показаны в лекарственных средствах-линкерах ниже:



или фармацевтически приемлемая соль указанных соединений.

Предпочтительная стереохимия для таких лекарственных средств-линкеров показана ниже:



или фармацевтически приемлемая соль указанных соединений, где для формул (VI), (VIa), (VII) и (VIIa)

$n$  варьирует от 8 до 36 и наиболее предпочтительно варьирует от 8 до 14 (наиболее предпочтительно 12);

$R^{PR}$  представляет собой водород или защитную группу, например кислото-неустойчивую защитную группу, например BOC;

$R^{21}$  представляет собой кэспирующую группу для фрагмента полиэтиленгликоля, предпочтительно  $-CH_3$  или  $CH_2CH_2CO_2H$ .

Как отмечается выше,  $R^{PR}$  может представлять собой водород или защитную группу. Защитные группы в настоящей заявке означают группы, которые селективно блокируют, временно или постоянно, реакционноспособный участок в многофункциональном соединении. Защитная группа представляет собой подходящую защитную группу, если указанная защитная группа способна предотвращать или избегать нежелательных побочных реакций или преждевременной утраты защищаемой группы в условиях реакции, необходимых для осуществления желаемого химического преобразования где-либо в молекуле и в течение очистки новообразованной молекулы, при необходимости, и может быть удалена в условиях, которые не оказывают отрицательного воздействия на структуру или стереохимическую целостность данной новообразованной молекулы. Подходящие аминозащитные группы включают кислото-неустойчивые защитные группы азота, включая таковые, предложенные в публикации Isidro-Llobel et al. "Amino acid-protecting groups", Chem. Rev. (2009), 109:2455-2504. Как правило, кислото-неустойчивая защитная группа азота преобразует первичную или вторичную аминогруппу в соответствующий карбамат и включает *t*-бутил-, аллил- и бензилкарбаматы.

Как отмечается выше,  $R^{21}$  представляет собой кэспирующую группу для фрагмента полиэтиленгликоля. Как очевидно специалисту в данной области техники, единицы полиэтиленгликоля можно блокировать на конце с применением широкого разнообразия органических фрагментов, как правило, таких, которые являются относительно нереакционноспособными. Алкильные и замещенные алкильные группы являются предпочтительными, включая, например,  $-C_{1-10}$ алкил,  $-C_{2-10}$ алкил- $CO_2H$ ,  $-C_{2-10}$ алкил- $OH$ ,  $C_{2-10}$ алкил- $NH_2$ ,  $C_{2-10}$ алкил- $NH$  ( $C_{1-3}$ алкил) или  $C_{2-10}$ алкил- $N(C_{1-3}$ алкил) $_2$ .

Как правило, в случае лекарственных средств-линкеров на основе пегелированных MMAE к каждому антителу присоединяют от 1 до 16 лекарственных средств-линкеров.

Нагрузка лекарственного средства - "p".

В случае нацеленных на CD123 конъюгатов антитела с лекарственным средством формул (II), (IIa) и (IIb) индекс  $p$  представляет собой нагрузку лекарственного средства для молекулы антитела (число молекул лекарственного средства, присоединенных к молекуле антитела) и представляет собой целое число. В композиции, содержащей популяцию молекул конъюгата антитела с лекарственным средством, средняя нагрузка лекарственного средства (например, среднее количество молекул лекарственного средства-линкера на антитело в популяции) представляет собой важный показатель качества, поскольку данный параметр определяет количество лекарственного средства, которое может быть доставлено в клетку-мишень. Средняя нагрузка лекарственного средства может представлять собой целое число или нецелое

число, но, как правило, представляет собой нецелое число. Оптимальная средняя нагрузка лекарственного средства будет варьировать в зависимости от характерных черт лекарственного средства или комбинации лекарственное средство-линкер.

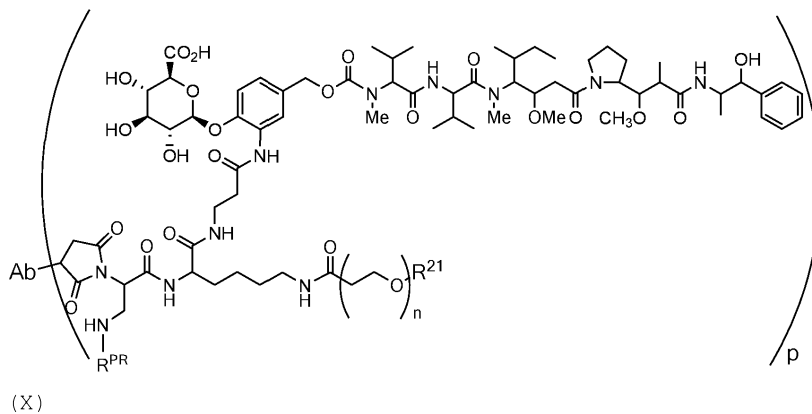
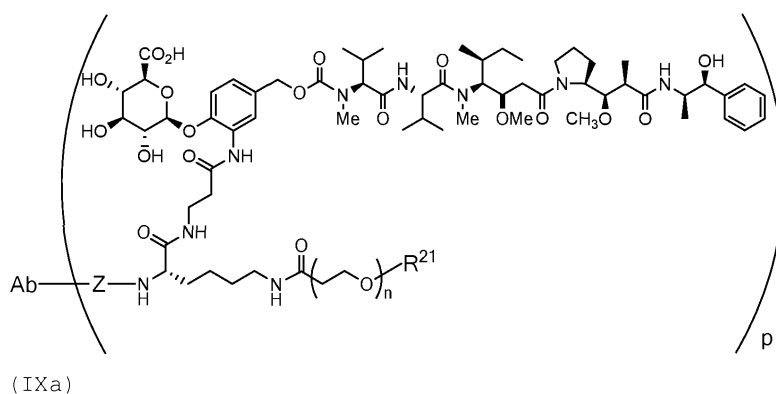
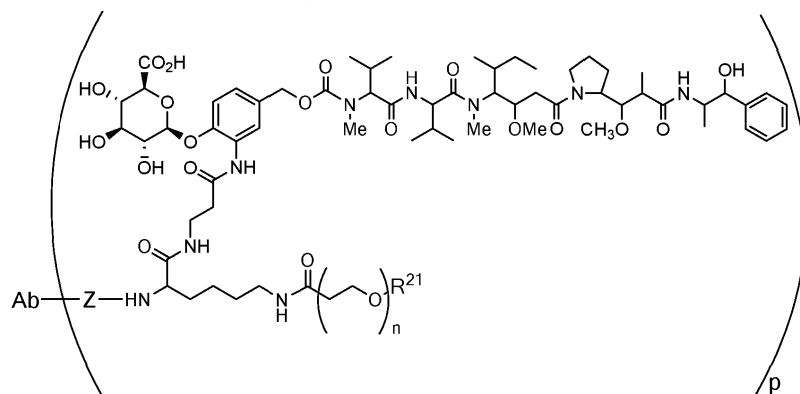
Гетерогенность композиции конъюгата антитела с лекарственным средством согласно некоторым аспектам настоящего изобретения будет зависеть от технологии конъюгации, используемой для конъюгации молекул лекарственного средства-линкера с молекулами антитела. Например, согласно некоторым аспектам настоящего изобретения технология конъюгации, используемая для конъюгации молекул лекарственного средства-линкера с молекулами антитела, приведет к получению композиции конъюгата антитела с лекарственным средством, которая является гетерогенной в отношении распределения молекул лекарственного средства-линкера на антителе и/или в отношении количества лекарственных средств-линкеров на молекулах антитела (например, при конъюгации посредством межцепочечных дисульфидов с применением не сайт-специфичной технологии). Согласно другим аспектам настоящего изобретения технология конъюгации, используемая для конъюгации молекул лекарственного средства-линкера, приведет к получению композиции конъюгата антитела с лекарственным средством, которая является по существу гомогенной в отношении распределения молекул лекарственного средства-линкера на молекулах лиганда и/или в отношении количества молекул лекарственных средств-линкеров на молекулах антитела (например, при применении сайт-специфичной технологии конъюгации). При применении как сайт-специфичных, так и не сайт-специфичных способов, как правило, также будет присутствовать незначительный процент неконъюгированных молекул антитела. Процент неконъюгированных молекул антитела включен в среднее значение нагрузки лекарственного средства.

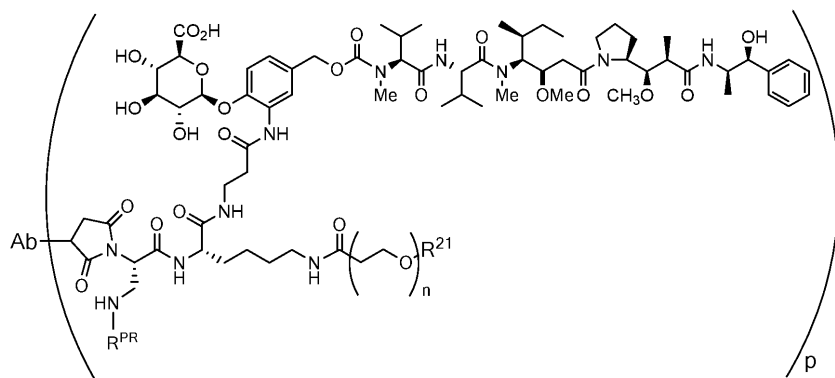
Согласно предпочтительным аспектам настоящего изобретения средняя нагрузка лекарственного средства в случае композиции, содержащей популяцию соединений конъюгата антитела с лекарственным средством, составляет от приблизительно 2 до приблизительно 14, предпочтительно от приблизительно 2 до приблизительно 10. В случае конъюгатов антитела с лекарственным средством на основе PBD, таких как таковые, примеры которых приводятся в настоящей заявке, в особенности предпочтительная средняя нагрузка лекарственного средства составляет приблизительно 2. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фактическая нагрузка лекарственного средства для индивидуальных молекул антитела в популяции соединений конъюгата антитела с лекарственным средством составляет от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2 с доминирующей нагрузкой лекарственного средства, составляющей 2. Согласно предпочтительным аспектам настоящего изобретения среднюю нагрузку лекарственного средства, составляющую приблизительно 2, достигают посредством сайт-специфичных методик конъюгации (например, введением в антитело сконструированных цистеинов).

Согласно некоторым другим аспектам настоящего изобретения средняя нагрузка лекарственного средства в отношении композиции, содержащей популяцию соединений конъюгата антитела с лекарственным средством, составляет приблизительно 3 или приблизительно 4, и фактическая нагрузка лекарственного средства для индивидуальных молекул антитела в популяции соединений конъюгата антитела с лекарственным средством составляет от 1 до 8.

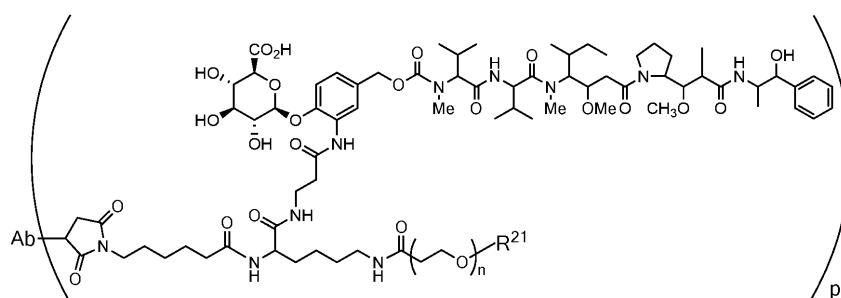
В случае ADC на основе пегилированного MMAE, таких как таковые, примеры которых приведены в настоящем документе, в особенности предпочтительная средняя нагрузка лекарственного средства составляет приблизительно 8. Согласно иллюстративным вариантам реализации настоящего изобретения лекарственные средства-линкеры конъюгируют с остатками цистеина восстановленных внутрицепочечных дисульфидов. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения фактическая нагрузка лекарственного средства для индивидуальных молекул антитела в популяции соединений конъюгата антитела с лекарственным средством составляет от 1 до 10 (или от 6 до 10, или от 6 до 8) с доминирующей нагрузкой лекарственного средства, составляющей 8. Более высокой нагрузки лекарственного средства можно достичь, например, если дополнительно к межцепочечным дисульфидам лекарственное средство-линкер конъюгируют с введенными остатками цистеина (такими как остаток цистеина, введенный в положение 239 согласно EU-индексу).

Иллюстративные ADC включают следующие:

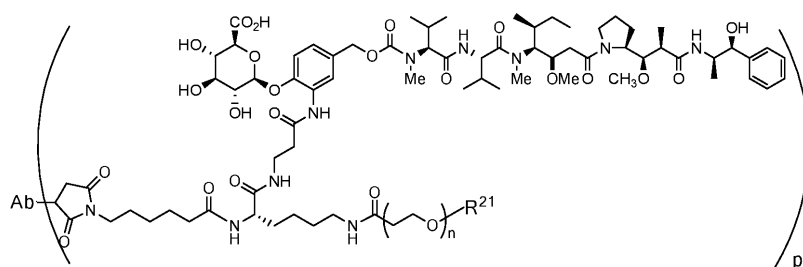




(Xa)



(XI)



(XIa)

или фармацевтически приемлемые соли указанных соединений, где  $n$  варьирует от 8 до 36 и наиболее предпочтительно варьирует от 8 до 14 (наиболее предпочтительно 12);

$R^{PR}$  представляет собой водород или защитную группу, например кислото-неустойчивую защитную группу, например BOC;

$R^{21}$  представляет собой кэппирующую группу для фрагмента полиэтиленгликоля, предпочтительно  $-CH_3$  или  $-CH_2CH_2CO_2H$ ;

Ab представляет собой антитело против CD48;

$p$  представляет собой целое число, варьирующее от 1 до 16, предпочтительно от 1 до 14, от 6 до 12, от 6 до 10 или от 8 до 10, когда идет речь об индивидуальных молекулах антитела или средней нагрузке лекарственного средства, составляющей от приблизительно 4 или от приблизительно 6 до приблизительно 14, предпочтительно приблизительно 8, в отношении популяции молекул антитела.

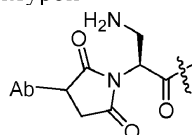
Как отмечается выше, часть ПЭГ (полиэтиленгликоля) лекарственного средства-линкера может варьировать от 8 до 36, однако было обнаружено, что ПЭГ, состоящий из 12 единиц этиленоксида, является в особенности предпочтительным. Было обнаружено, что более длинные цепи ПЭГ могут привести к более медленному клиренсу, тогда как более короткие цепи ПЭГ могут привести к уменьшению активности. Соответственно, индекс  $n$  во всех вариантах реализации настоящего изобретения, описанных выше, составляет предпочтительно от 8 до 14, от 8 до 12, от 10 до 12 или от 10 до 14 и наиболее предпочтительно составляет 12.

Полидисперсные ПЭГ, монодисперсные ПЭГ и отдельные ПЭГ можно использовать для получения конъюгатов пегилированного антитела с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Полидисперсные ПЭГ представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные ПЭГ, как правило, очищают из гетерогенных смесей и вследствие этого обеспечивают одну длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительные единицы ПЭГ представляют собой отдельные ПЭГ, соединения, которые синтезированы поэтапным способом, а не посредством процесса полимеризации. Отдельные ПЭГ обеспечивают одну молекулу с определенной и указанной длиной цепи.

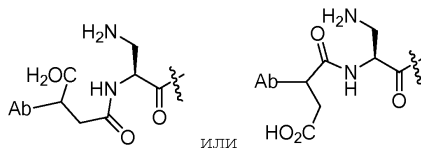


Как и в случае индекса "p", когда идет речь о популяциях конъюгатов антитела с лекарственным средством, значение для индекса "n" может представлять собой среднее количество и может представлять собой количество, которое является целым числом или нецелым числом.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения ковалентное присоединение антитела к лекарственному средству-линкеру осуществляют посредством сульфгидрильной функциональной группы антитела, взаимодействующей с малеимидной функциональной группой лекарственного средства-линкера с образованием тиозамещенного сукцинимиды. Сульфгидрильная функциональная группа может присутствовать на единице лиганда в природном состоянии лиганда, например в существующем в природе остатке (межцепочечные дисульфидные остатки), или может быть введена в лиганд посредством химической модификации или посредством биологического конструирования либо посредством комбинации двух указанных способов. Следует понимать, что антителозамещенный сукцинимид может существовать в гидролизованной форме (формах). Например, согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения ADC содержит фрагмент сукцинимиды, который при присоединении к антителу представлен структурой



или содержит соответствующий фрагмент амида кислоты, который при присоединении к антителу представлен структурой



Волнистая линия показывает связь с остатком лекарственного средства-линкера.

Среднее количество единиц лекарственного средства-линкера на единицу лиганда в средстве из реакции конъюгации можно охарактеризовать общепринятыми способами, такими как масс-спектропия, анализ способом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, твердофазного иммуноферментного анализа), ИС (hydrophobic interaction chromatography, хроматография на основе гидрофобного взаимодействия) и ВЭЖХ. Также можно определить количественное распределение конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство в отношении p. В некоторых случаях разделение, очистку и характеризацию гомогенных конъюгатов лиганда с лекарственным средством, где p представляет собой определенное значение из конъюгата лиганда с лекарственным средством с другими нагрузками лекарственного средства, можно достичь способами, такими как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез.

#### VI. Терапевтические применения.

Нацеленные на CD123 конъюгаты антитела с лекарственным средством, описанные в настоящем документе, можно применять для лечения CD123-экспрессирующего нарушения, такого как CD123-экспрессирующий рак. Как правило, при таких вариантах рака наблюдаются обнаруживаемые уровни CD123, измеряемые на уровне белка (например, посредством иммуноанализа) или РНК. При некоторых из таких вариантов рака наблюдаются увеличенные уровни CD123 относительно нераковой ткани того же типа, предпочтительно от того же пациента. Необязательно, уровень CD123 при раке измеряют перед проведением лечения.

Примеры вариантов рака, связанных с экспрессией CD123, включают миелоидные заболевания, такие как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелодиспластический синдром (МДС). Другие варианты рака включают В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), волосатоклеточный лейкоз, анемию Фанкони, новообразования бластных плазмацитоидных дендритных клеток (blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm, BPDCN), болезнь Ходжкина, незрелый Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (незрелый Т-ОЛЛ), лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) или мантийноклеточную лимфому.

Способы согласно настоящему изобретению включают лечение пациента, страдающего от рака, который экспрессирует CD123, причем указанное лечение включает введение пациенту конъюгата антитела с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Рак может представлять собой любой CD123-экспрессирующий рак, включая, например, ОМЛ, МДС, В-ОЛЛ, волосатоклеточный лейкоз, анемию Фанкони, BPDCN, болезнь Ходжкина, незрелый Т-ОЛЛ, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, ХЛЛ или мантийноклеточную лимфому.

У некоторых раковых клеток развивается резистентность к терапевтическому средству после увеличения экспрессии белка, который увеличивает отток терапевтического средства из раковой клетки. Такие белки включают Р-гликопротеин, белок, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью, белок, ассоциированный с устойчивостью в легких, и белок устойчивости рака молочной железы. Обнаружение лекарственной устойчивости в раковых клетках может провести специалист. Анти-

тела или анализы, которые обнаруживают белки оттока, являются коммерчески доступными, например, от компаний Promega, Millipore, Abeam и Sigma-Aldrich. Рак, который подлежит лечению способами согласно настоящему изобретению, может представлять собой рак с множественной устойчивостью, который экспрессирует CD123. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения рак будет представлять собой CD123+ОМЛ с множественной лекарственной устойчивостью.

Нацеленные на CD123 конъюгаты антитела с лекарственным средством вводят в эффективном режиме, что означает дозу, путь введения и частоту введения, которые отсрочивают манифестацию, уменьшают тяжесть, ингибируют последующее ухудшение и/или улучшают по меньшей мере один признак или симптом рака.

Иллюстративные дозы нацеленных на CD123 конъюгатов включают от приблизительно 1,0 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг, от 1,0 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от 1,0 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 1,0 мкг/кг до приблизительно 1,0 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 1,0 мкг/кг до 1,0 мг/кг, или от приблизительно 1,0 до 500,0 мкг/кг, или от приблизительно 1,0 до 80,0, 100,0 или 200,0 мкг/кг.

Иллюстративные дозы нацеленных на CD123 конъюгатов PBD составляют, как правило, от приблизительно 1,0 мкг/кг до 1,0 мг/кг, или от приблизительно 1,0 до 500,0 мкг/кг, или от приблизительно 1,0 до 80,0, 100,0 или 200,0 мкг/кг, несмотря на то, что также предусмотрены альтернативные дозы.

Введение можно осуществлять посредством множества путей введения. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения конъюгаты вводят парентеральным способом, например, внутривенным, внутримышечным или подкожным. Для введения ADC для лечения рака доставку можно осуществлять в системное кровообращение посредством внутривенного или подкожного введения. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения введение осуществляют посредством внутривенной доставки. Внутривенное введение можно осуществить, например, посредством инфузии в течение периода времени, такого как 30-90 мин, или посредством единичной болюсной инъекции. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения введение будут осуществлять посредством медленного ВВ струйного введения (т.е. в течение 30-60 с) в периферически вводимый центральный катетер.

Частота введения зависит от различных факторов, включая пути введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, то, является ли пациент человеком или животным, а также другие вводимые лекарственные средства. Частота может являться ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование рака, лечение которого проводят. Типичная частота внутривенного введения находится в интервале от двух раз в неделю до одного раза в квартал при непрерывном курсе лечения, хотя также возможно более или менее частое введение доз. Другие типичные частоты внутривенного введения представляют собой введение один раз в три недели или находятся в интервале от одного раза в неделю или одного раза в месяц при непрерывном курсе лечения, хотя также возможно более или менее частое введение доз. Для подкожного введения типичной частотой введения доз является введение от одного раза в день до одного раза в месяц, хотя также возможно более или менее частое введение доз.

Фармацевтические композиции для парентерального введения, предпочтительно являются стерильными и по существу изотоническими и изготовленными в условиях, соответствующих надлежащей производственной практике (Good Manufacturing Practices, GMP). Фармацевтические композиции могут быть представлены в единичной дозированной форме (т.е. дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в состав с применением одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, вспомогательных веществ или вспомогательных средств. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекции конъюгаты могут быть приготовлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнка, раствор Рингера, либо в физиологическом солевом растворе или ацетатном буфере (чтобы уменьшить дискомфорт в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В качестве альтернативы антитела могут находиться в лиофилизированной форме для восстановления перед использованием подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой. Концентрация конъюгата в жидком составе может варьировать в широких пределах. Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения ADC присутствует в концентрации от приблизительно 0,5 до приблизительно 30 мг/мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/мл, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мг/мл или от приблизительно 2 до приблизительно 5 мг/мл.

Лечение конъюгатами согласно настоящему изобретению можно сочетать с химиотерапией, ионизирующим излучением, лечением стволовыми клетками, хирургией, другими способами лечения, эффективными против нарушения, лечение которого проводят, включая стандарт лечения конкретного нарушения, лечение которого проводят. Соответственно, настоящее изобретение охватывает способы лечения заболевания и нарушений, описанных в настоящем документе, в качестве монотерапии или в комбинированной терапии, например, со стандартом лечения или исследуемыми лекарственными средствами для лечения таких заболеваний и/или нарушений. Способы лечения рака включают введение пациенту, кото-

рый нуждается в таком введении, эффективного количества нацеленного на CD123 конъюгата антитела с лекарственным средством согласно настоящему изобретению в комбинации с дополнительным противоопухолевым средством или другим средством для лечения рака.

Пример комбинированной терапии включает режим 7+3, включающий семь дней цитарабина и три дня антрациклина, такого как (но не ограничиваясь указанными) даунорубин или идарубин. Согласно варианту реализации настоящего изобретения режим 7+3 цитарабина и антрациклина вводят в комбинированной терапии с нацеленным на CD123 конъюгатом антитела с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения режим 7+3 цитарабина и антрациклина вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированного антитела 7G3 с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения режим 7+3 цитарабина и антрациклина вводят в комбинированной терапии с h7G3EC-SGD-1910 согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинацию нацеленного на CD123 конъюгата антитела с лекарственным средством и режим 7+3 применяют в отношении пациентов, возраст которых составляет 60 лет или менее.

Другой пример комбинированной терапии включает режим 7+3, описанный выше, плюс кладрибин. Согласно варианту реализации настоящего изобретения режим 7+3 плюс кладрибин вводят в комбинированной терапии с нацеленным на CD123 конъюгатом антитела с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения режим 7+3 плюс кладрибин вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированного антитела 7G3 с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения режим 7+3 плюс кладрибин вводят в комбинированной терапии с h7G3EC-SGD-1910 согласно настоящему изобретению.

Другой пример комбинированной терапии включает гипометилирующее средство, такое как (но не ограничиваясь указанными) децитабин или азациитидин. Согласно варианту реализации настоящего изобретения гипометилирующее средство вводят в комбинированной терапии с нацеленным на CD123 конъюгатом антитела с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения гипометилирующее средство вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированного антитела 7G3 с лекарственным средством согласно настоящему изобретению. Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения гипометилирующее средство вводят в комбинированной терапии с h7G3EC-SGD-1910 согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинацию нацеленного на CD123 конъюгата антитела с лекарственным средством и гипометилирующее средство применяют в отношении пациентов, которые не получали лечения, которые не восприимчивы к общепринятым вариантам лечения или у которых развился рецидив после ответа на такие варианты лечения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинацию нацеленного на CD123 конъюгата антитела с лекарственным средством и гипометилирующего средства применяют для лечения пациентов пожилого возраста, например пациентов в возрасте 60 лет или более. С применением комбинации нацеленного на CD123 конъюгата антитела с лекарственным средством и гипометилирующего средства можно лечить других слабых или непригодных по состоянию здоровья пациентов, например, пациентов, страдающих от ухудшения состояния, или пациентов, которые не являются кандидатами для стандартного лечения посредством индукции/консолидации. Кроме того, пациентов пожилого возраста с низкими характеристиками риска заболевания можно также лечить с применением комбинации с учетом отсутствия пользы, наблюдаемой при интенсивной химиотерапии. Низкие характеристики риска заболевания известны и описаны в публикации, например, Hou et al., *Leukemia*, 28:50-58 (2014).

Другие средства и режимы комбинированной терапии включают цитарабин, высокие дозы цитарабина, гидроксимочевину, клофарабин, митоксантрон, флударабин, топотекан, этопозид, MEC (митоксантрон, этопозид и цитарабин), CLAG-M (кладрибин, цитарабин, митоксантрон и филграстим) и FLAG-IDA (флударабин, цитарабин, идарубин и филграстим). Согласно варианту реализации настоящего изобретения одно или несколько средств, которые выбраны из гидроксимочевины, клофарабина, митоксантрона, флударабина, топотекана, этопозиды, MEC (митомидин, этопозид и цитарабина), CLAG-M (кладрибин, цитарабина, митоксантрона и филграстима) и FLAG-IDA (флударабина, цитарабина, идарубина и филграстима), вводят в комбинированной терапии с нацеленным на CD123 конъюгатом антитела с лекарственным средством согласно настоящему изобретению.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения одно или несколько средств, которые выбраны из цитарабина, высоких доз цитарабина, гидроксимочевины, клофарабина, митоксантрона, флударабина, топотекана, этопозиды, MEC (митоксантрона, этопозиды и цитарабина), CLAG-M (кладрибин, цитарабина, митоксантрона и филграстима) и FLAG-IDA (флударабина, цитарабина, идарубина и филграстима), вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированного антитела 7G3 с лекарственным средством согласно настоящему изобретению.

Согласно следующему варианту реализации настоящего изобретения одно или несколько средств, которые выбраны из цитарабина, высоких доз цитарабина, гидроксимочевины, клофарабина, митоксантрона, флударабина, топотекана, этопозида, МЕС (митоксантрона, этопозида и цитарабина), CLAG-M (кладрибина, цитарабина, митоксантрона и филграстима) и FLAG-IDA (флударабина, цитарабина, ида-рубидина и филграстима), вводят в комбинированной терапии с h7G3EC-SGD-1910 согласно настоящему изобретению.

Любое свойство, этап, элемент, вариант реализации или аспект настоящего изобретения можно применять в сочетании с любым другим, если конкретно не указано обратное. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано более подробно путем иллюстрации и примера в целях ясности и понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

### Примеры Способы

Анализы конкурентного связывания.

100000 CD123-положительных клеток переносили в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 1 ч на льду с 5 нМ m7G3, меченного AlexaFluor-488, и увеличивающимися концентрациями (от 0,01 до 680 нМ) немеченного гибридного, гуманизованного МАТ (моноклонального антитела) 7G3 или МАТ 7G3 мыши. Клетки центрифугировали, промывали 3 раза ФБР (фосфатным буферным раствором) и ресуспендировали в 125 мкл раствора ФБР+1% БСА (бычий сывороточный альбумин). Флуоресценцию анализировали с применением проточного цитометра, и процент насыщенного сигнала флуоресценции использовали для определения процента связанного меченного МАТ 7G3. EC<sub>50</sub> экстраполировали посредством аппроксимации данных на сигмоидальную кривую доза-ответ с переменным наклоном.

Анализы насыщающего связывания.

100000 CD123-положительных клеток (клетки НЕК-293F, трансфицированные для экспрессии CD123 человека или яванского макака) переносили в 96-луночные планшеты. Добавляли МАТ против CD123, меченное AlexaFluor-488, в концентрациях, варьирующих от 1250 нМ до 13,5 пМ, и клетки инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки осаждали центрифугированием, промывали 3 раза раствором ФБР+1% БСА и ресуспендировали в 125 мкл ФБР+1% БСА. Флуоресценцию анализировали с применением проточного цитометра и процент насыщенного сигнала флуоресценции использовали для определения процента связанного антитела, а затем - для расчета кажущейся K<sub>d</sub>.

Анализ цитотоксичности *in vitro*.

Линии клеток ОМЛ или клетки первичного ОМЛ обрабатывали конъюгатами антитела с лекарственным средством (ADC) в течение 96 ч при температуре 37°C. В некоторые эксперименты были включены не связывающие антиген ADC в качестве отрицательных контролей. Жизнеспособность клеток для линий клеток измеряли с применением набора CelltiterGlo (Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин) согласно инструкциям производителя. Клетки инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре с реагентами CelltiterGlo, и люминесценцию измеряли на считывающем устройстве для планшетов Envision (Perkin Elmer, Уолтем, Массачусетс). Для клеток первичного ОМЛ жизнеспособность blastов ОМЛ измеряли способом проточной цитометрии с применением окрашивания аннексином V и иодидом пропидия. Результаты представлены в виде IC<sub>50</sub>, концентрации соединения, необходимой для получения 50% уменьшения жизнеспособности, по сравнению с клетками, обработанными наполнителем (контроль=100%).

Исследование активности *in vivo*.

Подкожные модели ОМЛ.

Мышам SCID подкожным способом инокулировали опухолевые клетки ОМЛ: 5×10<sup>6</sup> ТНР-1 или 2×10<sup>6</sup> КГ-1. Рост опухоли контролировали с помощью циркуля, и средний объем опухоли рассчитывали с применением формулы (0,5×[длина×ширина<sup>2</sup>]). Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 100 мм<sup>3</sup>, мышам (n=8/группу) не проводили введение или проводили интраперитонеальное введение одной дозы ADC против CD123 или несвязывающегося контрольного ADC. В случае модели КГ-1 мышам вводили ВВ Ig (внутривенный иммуноглобулин) человека (единичная интраперитонеальная инъекция 10 мг/кг) приблизительно за 4 ч до введения терапевтического средства для минимизации взаимодействия исследуемого ADC с Fc-рецепторами на клетках ОМЛ. Мышам проводили эвтаназию, когда объемы опухолей достигали приблизительно 1000 мм<sup>3</sup>. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с протоколом, одобренным Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных, в учреждении, аккредитованном Международной ассоциацией по оценке и аккредитации лабораторных исследований на животных.

Получение конъюгатов антитела с лекарственным средством.

Конъюгаты антитела с лекарственным средством получали, как описано в международной заявке WO 2011/130613, с применением антител против CD123, описанных в настоящем документе. Получение мутантов МАТ IgG1 по цистеину, как правило, описано в заявке США US20100158909. Лекарственное средство-линкер SGD-1910 конъюгировали с антителом против CD123 посредством тиольной группы

остатка цистеина, введенного в положение 239 цепи IgG1 антитела, и средняя нагрузка лекарственного средства составляла приблизительно 2 лекарственных средства на антитело. Антитела с цистеином в положении 239 обозначали "ЕС".

### Результаты

Разработка и исследование гуманизированных МАТ.

Несколько гуманизированных антител 7G3 конструировали с применением варибельной области тяжелой цепи зародышевой линии человека hIGHv1-2.02/LGHJ1.01 и варибельной области легкой цепи зародышевой линии человека hIGKV4-1.01/LGHJ2.01 в качестве акцепторных последовательностей человека. Антитела отличались выбором остатков аминокислот, которые подвергали обратной мутации к антителу мыши или последовательности зародышевой линии мыши. Антитело, обозначенное HCLA (тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 1 (vHC), и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 2 (vLA)), выбрали в качестве ведущего гуманизированного антитела 7G3 на основании его (i) характеристик связывания, (ii) способности доставлять лекарственное средство и (iii) количества обратных мутаций по сравнению с другими вариантами.

Антитела, обозначенные HALA (антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и варибельную область легкой цепи, обозначенную vLA), HALB (антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и варибельную область легкой цепи, обозначенную vLB), HBLA (антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи, обозначенную vHB, и варибельную область легкой цепи, обозначенную vLA), HBLB (антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи, обозначенную vHB, и варибельную область легкой цепи, обозначенную vLB), HCLB (антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи, обозначенную vHC, и варибельную область легкой цепи, обозначенную vLB) можно применять в настоящем изобретении вместо антитела HCLA. См. последовательности vHA, vHB, vHC, vLA и vLB на фиг. 5 и 6. Аффинности связывания химерных и различных гуманизированных форм 7G3 являются подобными вне зависимости от исследования в отношении CD123-экспрессирующей линии клеток ОМЛ (табл. 1) или клеток HEK293, сверхэкспрессирующих CD123 человека или яванского макака (табл. 2).

Таблица 1. Определение EC<sub>50</sub> связывания для гуманизированных вариантов МАТ против CD123 на клетках ОМЛ Molm-13, экспрессирующих CD123 человека.

Вариант 7G3	Molm-13
	EC50 (нМ)
m7G3	4,3
Химерное 7G3	2,0
HALA	5,5
HALB	4,1
HBLA	2,8
HBLB	3,5
HCLA	2,6
HCLB	2,1

Таблица 2. Измерения аффинности гуманизированных МАТ против CD123 в отношении CD123-экспрессирующих клеток человека и яванского макака.

Вариант 7G3	HEK293F-CD123	HEK293F-CD123
	человека	яванского макака
m7G3	2,7 нМ	4,6 нМ
Химерное 7G3	2,7	4,7
h7G3, G1	2,7	5,3
h7G3EC	2,7	6,6

Противоопухолевая активность h7G3EC-SGD-1910 *in vitro*.

Цитотоксическую активность антитела h7G3EC, конъюгированного с SGD-1910 (лекарственное средство-линкер на основе димера пирролобензодиазапина), оценивали в отношении панели линий клеток ОМЛ, которые экспрессировали как CD123, так и CD33. Активность сравнивали с таковой антитела против CD33, конъюгированного с SGD-1910 (CD33-SGD-1910). Как показано в Таблице 3, линии клеток ОМЛ, как правило, экспрессировали меньшее количество копий CD123 по сравнению с CD33. ADC h7G3EC-SGD-1910 являлся активным в отношении 10 из 11 CD123-положительных линий клеток ОМЛ (средняя IC<sub>50</sub> для отвечающих линий клеток - 7 нг/мл с диапазоном от 0,02 до 38 нг/мл), тогда как CD33-SGD-1910 обладал мощной активностью в отношении 12 из 12 исследованных линий клеток ОМЛ (средняя IC<sub>50</sub>-26 нг/мл с диапазоном от 0,04 до 181 нг/мл). На фиг. 1 и 2 представлена мощная активность

h7G3EC-SGD-1910 в отношении двух МЛУ-положительных линий клеток ОМЛ, которые экспрессируют незначительное количество копий CD123 по сравнению с CD33. Линия клеток KG1-INV экспрессирует 5000 копий CD123 по сравнению с 7300 копий CD33. Линия клеток Kasumi-1 экспрессирует 2000 копий CD123 по сравнению с 16000 копий CD33. Цитотоксическая активность h7G3EC-SGD-1910 не наблюдалась в отношении линии клеток ОМЛ HEL9217, которая не экспрессирует CD123. Также было обнаружено, что h7G3EC-SGD-1910 является активным в отношении 15 из 17 первичных образцов, выделенных от пациентов с ОМЛ (см. табл. 4, средняя IC<sub>50</sub> для отвечающих образцов - 1 нг/мл с диапазоном от 0,06 до 6,5 нг/мл). Для сравнения, CD33-SGD-1910 являлся активным в отношении 10 из 17 первичных образцов ОМЛ (средняя IC<sub>50</sub> для отвечающих образцов - 2 нг/мл с диапазоном от 0,23 до 7,7 нг/мл). Не наблюдалась активность в случае несвязывающихся ADC, которые исследовали в отношении линий клеток ОМЛ или первичных образцов ОМЛ (IC<sub>50</sub>>1000 нг/мл). Взятые вместе, полученные данные демонстрируют, что h7G3EC-SGD-1910 селективно нацеливается на CD123-экспрессирующие клетки и демонстрирует мощную цитотоксическую активность в отношении линий клеток ОМЛ и образцов пациентов, страдающих от первичного ОМЛ, вне зависимости от статуса МЛУ.

Таблица 3. Активности конъюгатов лекарственных средств h7G3EC-SGD-1910 и CD33-SGD-1910 в отношении линий клеток ОМЛ in vitro.

Линия клеток	Количество рецептора CD123	Количество рецептора CD33	Статус МЛУ	IC <sub>50</sub> , нг/мл	
				h7G3EC-SGD-1910	CD33-SGD-1910
HNT-34	24400	< 20000	-	0,35	76
Molm-13	20000	38000	-	0,08	0,25
THP-1	8000	18000	-	24	5
NOMO-1	7000	15000	-	38	12
SKM-1	6600	24000	-	2,5	3,5
MV4-11	26100	18500	+/-	0,02	0,04
KG-1	9400	29000	+	0,8	1
KG1-INV	5000	7300	+	0,6	9
GDM-1	5500	5900	+	3,5	181
Kasumi-1	2000	16000	+	1	3,5
TF1a	2600	17000	+	>1000	3
HEL9217	0	19000	+	>1000	17

МЛУ, множественная лекарственная устойчивость;

+, отток красителя более чем в 2 раза выше фона.

Таблица 4. Активности конъюгатов лекарственных средств h7G3EC-1910 и CD33-SGD-1910 в отношении образцов первичного ОМЛ in vitro.

Обозначение образца	Экспрессия CD123 (СИФ)	Экспрессия CD33 (СИФ)	Статус МЛУ	IC <sub>50</sub> (нг/мл)	
				h7G3EC-SGD-1910	CD33-SGD-1910
FH037	483	1593	+	0,68	> 2,5
FH016	596	137	+	1,4	>2,5
FH025	1190	2527	+	6,5	7,7
FH034	1204	4125	+	0,22	1
FH023	2277	4987	Данные отсутствуют	0,06	0,23
FH038	2947	4031	+	0,18	1,3
FH018	3142	2435	+	0,12	0,34
FH036	3262	5068	+	0,16	0,31
FH026	4599	3999	+	0,22	0,39
FH028	828	549	-	2	>2,5
FH019	1480	472	-	>2,5	>2,5
FH022	1485	257	Данные отсутствуют	0,56	>2,5
FH020	1517	1603	+	2,5	2,8

FN027	418	2841	-	>2,5	>2,5
FN021	1558	99	+	1,6	>2,5
FN029	1824	1356	+	0,46	3
FN024	2403	897	+	2	3

СИФ, средняя интенсивность флуоресценции;

МЛЮ, множественная лекарственная устойчивость;

+, отток красителя более чем в 2 раза выше фона.

Противоопухолевая активность h7G3EC-SGD-1910 *in vivo*.

Активность h7G3EC-SGD-1910 исследовали на двух подкожных ксенотрансплантатных моделях ОМЛ, ТНР-1 и КГ-1. Мышам SCID, несущим развившиеся (~100 мм<sup>3</sup>) опухоли, вводили h7G3EC-SGD-1910 или несвязывающийся контрольный ADC (h00EC-SGD-1910), как представлено на фиг. 3 для МЛЮ-отрицательной модели ТНР-1 (8000 копий CD123; 18000 копий CD33) и на фиг. 4 для МЛЮ-положительной модели опухоли КГ-1 (7000 копий CD123, 20000 копий CD33). Лечение h7G3EC-SGD-1910 значительно уменьшало рост опухоли по сравнению с мышами, не получавшими лечение, и мышами, получавшими несвязывающийся контрольный ADC ( $p < 0,0001$ ). Противоопухолевая активность, наблюдаемая в случае нацеленных на CD123 ADC, являлась дозозависимой. В случае опухолей ТНР-1 однократная доза 0,1 мг/кг приводила к полной и устойчивой регрессии опухоли у 2 из 8 мышей, получавших лечение (фиг. 3). Более высокая доза 0,3 мг/кг приводила к полной и устойчивой регрессии у 8 из 8 мышей, получавших лечение, и медианный день увеличения опухоли вчетверо не был достигнут до конца исследования в день 85. На МЛЮ-положительной модели опухоли КГ-1 (фиг. 4) однократная доза 0,1 мг/кг h7G3EC-SGD-1910 приводила к полной и устойчивой регрессии опухоли у 1 из 8 мышей, получавших лечение. С другой стороны, однократная доза 0,3 мг/кг приводила к 1 полной регрессии и 3 полным и устойчивым регрессиям опухоли у 8 мышей, получавших лечение ( $p < 0,008$  по сравнению с мышами, не получавшими лечение). Напротив, опухоли у мышей, которым аналогично вводили несвязывающийся контрольный ADC (h00EC-SGD-1910), увеличивались вчетверо по объему к дню 35 и значительно не отличались от опухолей мышей, не получавших лечение. Противоопухолевые ответы мышей, которым вводили 0,1 мг/кг или 0,3 мг/кг CD33-SGD-1910, являлись аналогичными таковым в случае h7G3EC-SGD-1910 (фиг. 4). Данные подтверждают, что h7G3EC-SGD-1910 демонстрирует значительную дозозависимую противоопухолевую активность на ксенотрансплантатных моделях ОМЛ, которые экспрессируют меньшие уровни антигена CD123 по сравнению с CD33.

Дополнительные модели ОМЛ *in vivo*.

### Способы

Подкожная модель ОМЛ.

Мышам SCID подкожным способом инокулировали  $5 \times 10^6$  опухолевых клеток ОМЛ HNT-34. Рост опухоли контролировали с помощью циркуля и средний объем опухоли рассчитывали с применением формулы ( $0,5 \times [\text{длина} \times \text{ширина}^2]$ ). Когда средний объем опухоли достигал приблизительно 100 мм<sup>3</sup>, мышам ( $n=8/\text{группу}$ ) не проводили введение или проводили интраперитонеальное введение одной дозы ADC против CD123 или несвязывающегося контрольного ADC. Мышам проводили эвтаназию, когда объемы опухолей достигали приблизительно 1000 мм<sup>3</sup>. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с протоколом, одобренным Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных, в учреждении, аккредитованном Международной ассоциацией по оценке и аккредитации лабораторных исследований на животных.

Диссеминированные модели ОМЛ.

В случае модели Molm-13  $5 \times 10^6$  клеток инъецировали в латеральную хвостовую вену мышей SCID и не проводили лечение или проводили интраперитонеальное введение одной дозы ADC против CD123 или несвязывающегося контрольного ADC через 7 дней. Мышам вводили BV Ig человека (единичная интраперитонеальная инъекция 10 мг/кг) приблизительно за четыре часа до введения терапевтического средства для минимизации взаимодействия взаимодействия исследуемого ADC с Fc-рецепторами на клетках ОМЛ. За животными наблюдали и проводили эвтаназию для получения доказательства прогрессирования заболевания, таких как паралич задних конечностей или утрата более 15% массы тела.

В случае ксенотрансплантатной модели первичного ОМЛ мышей NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ null (NSG; The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, Мэн) облучали 1 Гр за один день до внутривенной инъекции  $7 \times 10^5$  клеток первичного лейкоза от пациента, страдающего от рецидивирующего ОМЛ (06227; AllCells, Эмервилл, Калифорния). Бремя заболевания в крови и костном мозгу периодически контролировали посредством окрашивания способом проточной цитометрии клеток CD45<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> человека, и лечение начинали, когда опухолевая нагрузка достигла 65%. Для мониторинга эффектов лечения от мышей под наркозом отбирали небольшие количества костного мозга из области бедренной ямки между надмышечками и анализировали способом проточной цитометрии. Данные откладывали на графике и анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism.

### Результаты

Активность h7G3EC-SGD-1910 также исследовали на одной подкожной ксенотрансплантатной модели ОМЛ, HNT-34 и двух диссеминированных моделях ОМЛ, Molm-13 и модели первичного ОМЛ. Мышам SCID, несущим развившиеся (~100 мм<sup>3</sup>) МЛЮ-отрицательные HNT-34 опухоли (CD123 количество копий ~24,000), вводили h7G3EC-SGD-1910 или несвязывающийся контрольный ADC, как представлено на фиг. 7. Лечение h7G3EC-SGD-1910 значительно уменьшало рост опухоли по сравнению с мышами, не получавшими лечение, и мышами, получавшими несвязывающийся контрольный ADC (p<0,0001). Противоопухолевая активность, наблюдаемая с нацеленными на CD123 ADC, являлась дозозависимой. Однократная доза 0,025 мг/кг приводила к полной и устойчивой регрессии опухоли у 2 из 8 мышей, получавших лечение (фиг. 7). Более высокая доза 0,075 мг/кг приводила к полной и устойчивой регрессии у 7 из 8 мышей, получавших лечение. Медианный день увеличения опухоли вчетверо для групп CD123-ADC не был достигнут до конца исследования в день 62.

На МЛЮ-отрицательной диссеминированной модели ОМЛ Molm-13 (фиг. 8, количество копий CD123 ~ 20000) однократная доза 0,01 мг/кг или 0,03 мг/кг h7G3EC-SGD-1910, введенная в день 7, значительно улучшала выживаемость мышей. Выживаемость мышей CD123-ADC, получавших лечение, составила более 80 дней по сравнению с 22-25 днями для контрольных групп (p<0,0001 по сравнению с мышами, не получавшими лечение, получавшими BB Ig человека или несвязывающийся контрольный ADC).

Противолейкозный ответ CD123-ADC был также продемонстрирован на ксенотрансплантатной модели с применением первичных лейкозных клеток (МЛЮ+) от пациента с рецидивирующим ОМЛ. Первичные лейкозные клетки человека трансплантировали мышам NSG и позволяли расти до 65% опухолевой нагрузки в костном мозге (количество копий CD123 ~ 2200). Мышам вводили 0,3 мг/кг CD123-SGD-1910 в день 0 и день 11 (фиг. 9). Опухолевая нагрузка у мышей, получавших лечение, значительно уменьшалась к дню 24 и сохранялась на уменьшенном уровне до конца исследования в день 64.

Данные демонстрируют, что h7G3EC-SGD-1910 обладает значительной дозозависимой противоопухолевой активностью на нескольких ксенотрансплантатных моделях ОМЛ, включая модели с применением первичных опухолевых клеток от пациентов-людей, страдающих от ОМЛ, которые экспрессируют различные уровни антигена CD123, и вне зависимости от статуса МЛЮ.

#### Неформальный перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1, Вариабельная область тяжелой цепи для HC:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDY<sup>Y</sup>MKWVKQAPGGLEWIGDI<sup>I</sup>IPSN<sup>G</sup>ATF

YNQKFKGKATLTVDRSISTAYMHLNRLRSDDTAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 2, Вариабельная область легкой цепи для LA:

dfvmtqspdslavslgeratinckssqsl<sup>l</sup>lnsgnqknyltwylqkpgppklliywast

resgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyyccndysypytfgqgk<sup>l</sup>kleikr

SEQ ID NO: 3, Тяжелая цепь для HC с мутантным IgG1, содержащим замену цистеина в положении 239 согласно EU-индексу по Kabat:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTDY<sup>Y</sup>MKWVKQAPGGLEWIGDI<sup>I</sup>IPSN<sup>G</sup>ATF

YNQKFKGKATLTVDRSISTAYMHLNRLRSDDTAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSSAST

KGPSVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK<sup>K</sup>VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLFPPKPK

DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD

IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC<sup>S</sup>VMHEALHNHYTQKS

LSLSPGK

SEQ ID NO: 4, Легкая цепь для LA:

DFVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSL<sup>l</sup>lnsgnqknyltwylqkpgppklliywast

RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGT<sup>K</sup>LEIKRTVAAPSVFI

FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK<sup>D</sup>STYLSLSTLT

SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 5, Мутантная константная область тяжелой цепи (содержащая замену цистеина в положении 239 согласно EU-индексу по Kabat):



astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdypfepvtvswngaltsgvhtfpavlqs  
 sglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcapellggpCv  
 flfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvs  
 vltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvvtlppsrdeltknqvsltcl  
 vkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal  
 hnhytqkslsispsg

SEQ ID NO: 6, Существующая в природе константная область тяжелой цепи:

astkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdypfepvtvswngaltsgvhtfpavlqs  
 sglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcapellggpSv  
 flfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvs  
 vltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvvtlppsrdeltknqvsltcl  
 vkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmheal  
 hnhytqkslsispsg

SEQ ID NO: 7, Константная область легкой цепи:

tvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfybreakvqkvdnalqsgnsgesvteqd  
 skdstyslsstltlskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

SEQ ID NO: 8, Варибельная область тяжелой цепи антитела 7G3 мыши:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGATF  
 YNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTUSA

SEQ ID NO: 9, Варибельная область легкой цепи антитела 7G3 мыши:

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLVKPGQPPKLLIYWAST  
 RESGVPRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKR

SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность CDR-H1 гуманизованного 7G3:

DYYMK

SEQ ID NO: 11. Аминокислотная последовательность CDR-H2 гуманизованного 7G3:

DIIPSNGATFYNQKFKG

SEQ ID NO: 12. Аминокислотная последовательность CDR-H3 гуманизованного 7G3:

SHLLRASWFAY

SEQ ID NO: 13. Аминокислотная последовательность CDR-L1 гуманизованного 7G3:

KSSQSLNSGNQKNYLT

SEQ ID NO: 14. Аминокислотная последовательность CDR-L2 гуманизованного 7G3:

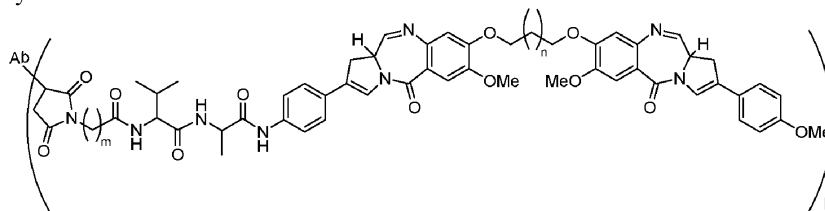
WASTRES

SEQ ID NO: 15. Аминокислотная последовательность CDR-L3 гуманизованного 7G3:

QNDYSYPYT

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение-конъюгат антитела против CD123 с лекарственным средством для лечения рака, имеющее формулу



или его фармацевтическая соль, сольват или сольват указанной соли, где

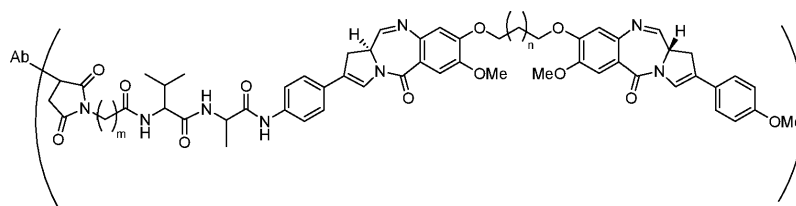
индекс n представляет собой 1 или 3;

индекс m представляет собой от 2 до 5;

Ab представляет собой интактное антитело против CD123 или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, при этом указанное антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

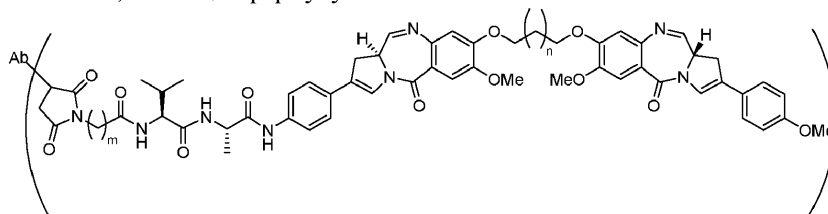
индекс p представляет собой целое число от 1 до 4.

2. Соединение по п. 1, имеющее формулу



или его фармацевтическая соль, сольват или сольват указанной соли.

3. Соединение по п.1, имеющее формулу



или его фармацевтическая соль, сольват или сольват указанной соли.

4. Соединение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что  $n$  представляет собой 1.

5. Соединение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что  $n$  представляет собой 3.

6. Соединение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что  $m$  представляет собой 5.

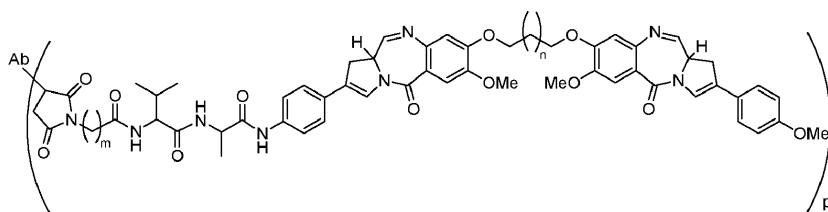
7. Соединение по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что присоединение к Ab осуществляется посредством атома серы сконструированного остатка цистеина Ab.

8. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что Ab содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, слитую с константной областью тяжелой цепи человека; и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, слитую с константной областью легкой цепи человека.

9. Соединение по п.8, отличающееся тем, что Ab содержит тяжелую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, которая имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и присоединение к Ab осуществляется посредством атома серы или сконструированного остатка цистеина в положении 239 указанной константной области тяжелой цепи согласно системе нумерации EU-индекс.

10. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что  $p$  представляет собой 2.

11. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая популяцию молекул конъюгата антитела против CD123 с лекарственным средством, имеющих формулу



или его фармацевтической соли, сольвата или сольвата указанной соли, где

индекс  $n$  представляет собой от 1 до 3;

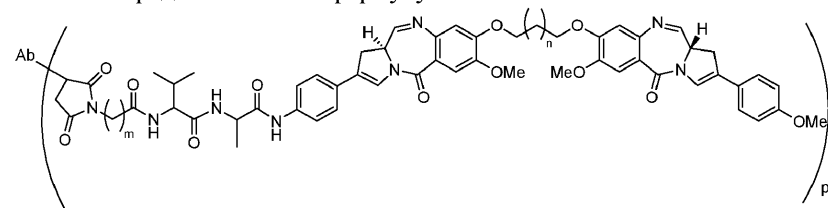
индекс  $m$  представляет собой от 2 до 5;

Ab представляет собой интактное антитело против CD123 или антигенсвязывающий фрагмент указанного антитела, при этом указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

индекс  $p$  представляет собой целое число от 1 до 4;

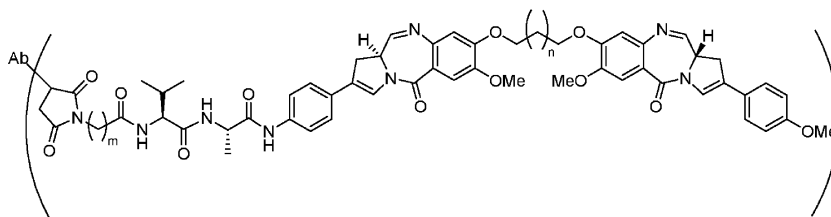
средняя нагрузка лекарственного средства в указанной композиции составляет приблизительно 2.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, отличающаяся тем, что молекулы указанного конъюгата антитела с лекарственным средством имеют формулу



или представляют собой его фармацевтическую соль, сольват или сольват указанной соли.

13. Фармацевтическая композиция по п.11, отличающаяся тем, что молекулы указанного конъюгата антитела с лекарственным средством имеют формулу



или представляют собой его фармацевтическую соль, сольват или сольват указанной соли.

14. Фармацевтические композиции по любому из пп.11-13, отличающиеся тем, что  $n$  представляет собой 1.

15. Фармацевтические композиции по любому из пп.11-13, отличающиеся тем, что  $n$  представляет собой 3.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-15, отличающаяся тем, что  $m$  представляет собой 5.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-16, отличающаяся тем, что присоединение к Ab осуществляется посредством атома серы сконструированного остатка цистеина Ab.

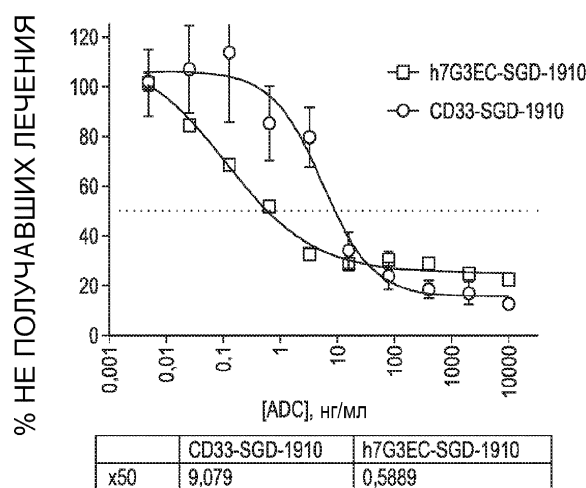
18. Фармацевтическая композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что Ab содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, слитую с константной областью тяжелой цепи человека; и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, слитую с константной областью легкой цепи человека.

19. Фармацевтическая композиция по п.18, отличающаяся тем, что Ab содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и присоединение к Ab осуществляется посредством атома серы или сконструированного остатка цистеина в положении 239 указанной константной области тяжелой цепи согласно системе нумерации EU-индекс.

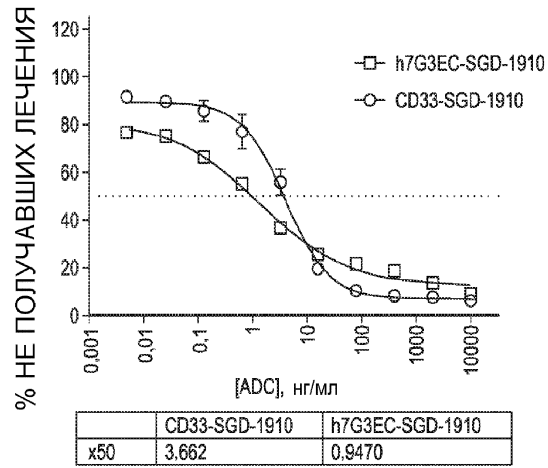
20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-19, отличающаяся тем, что  $p$  представляет собой 1 или 2.

21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-20 в водной форме.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.11-20 в лиофилизированной форме.



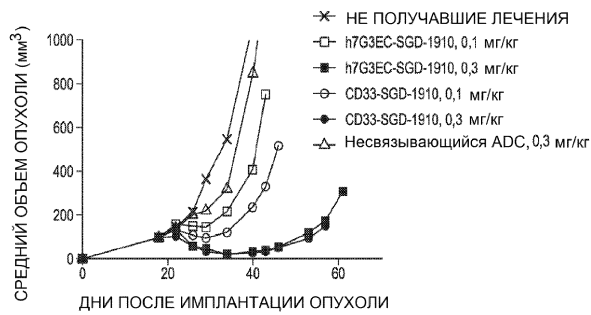
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

	20*	38	48	66	67	69	71	73	81	82A	93	Отличия с FW человека
НА	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	6
НВ	<b>M</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	9
НС	<b>M</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>H</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	11

Жирный шрифт – человек

Нежирный шрифт – мышь

	10	20	30	40	50	60	70
7G3MSv6 vH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLIEWIGDIIPSNGATFYNQKFKGKATL						
hIGHV1-2/IGHJ1	Q...V...A.VK...V...G...H...R.AP.QG...M.W.N.NS.G.N.A...Q.RV.M						
h7G3MSv6 vHA	Q...V...A.VK...V...R.AP.QG...R...						
h7G3MSv6 vHB	Q...V...A.VK...R.AP.QG...R...						
h7G3MSv6 vHC	Q...V...A.VK...AP.QG...						

	80	90	100	110	120
7G3MSv6 vH	TVDRSSSTAYMHLNLSITSEDSAVYYCTRSHELLRASWFAIYWGQGLVTVSA				
hIGHV1-2/IGHJ1	.R.T.I...E.SR.R.D.T...A.....S				
h7G3MSv6 vHA	.....I.....E.SR.R.D.T.....S				
h7G3MSv6 vHB	.....I.....R.R.D.T.....S				
h7G3MSv6 vHC	.....I.....R.R.D.T.....S				

Фиг. 5

	2	19	21	22	38	Отличия с FW человека
LA	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	2
LB	<b>F</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>L</b>	5

Жирный шрифт – человек

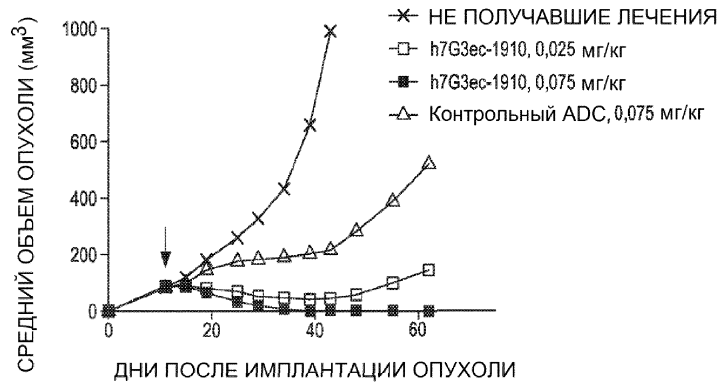
Нежирный шрифт – мышь

	10	20	30	40	50	60	70
7G3MS vL	DFVMTQSPSSSLVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYVLPKPGQPPKLLIYWASTRESGVDRFTG						
IGKV4-1/IGKJ2	.I.....D..A.SL..RA.IN.....V.Y.S.N...A..Q.....S.						
h7G3MS vLA	.....D..A.SL..RA.IN.....S.						
h7G3MS vLB	.....D..A.SL..R.....S.						

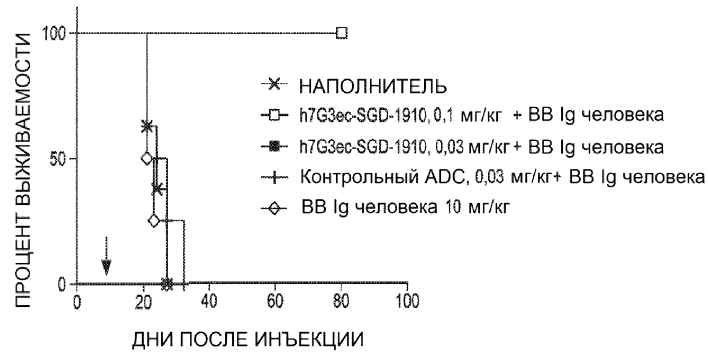
  

	80	90	100	110
7G3MS vL	SGSGTDFTLTISVQAEIDLAVYYQNDYSYPYTFGGGTRKLEIKR			
IGKV4-1/IGKJ2	.....L...V...QY..T...Q.....			
h7G3MS vLA	.....L...V...Q.....			
h7G3MS vLB	.....L...V...Q.....			

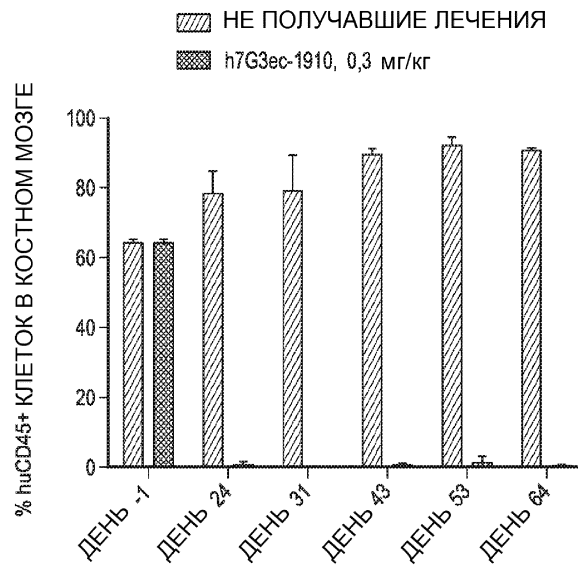
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

