



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106938051 B

(45)授权公告日 2019.10.11

(21)申请号 201710125244.6

(22)申请日 2017.03.03

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106938051 A

(43)申请公布日 2017.07.11

(66)本国优先权数据  
201610704559.1 2016.08.22 CN

(73)专利权人 复旦大学  
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号  
专利权人 中国科学院上海药物研究所  
上海美雅珂生物技术有限责任公司

(72)发明人 余科 沈竞康 孟韬 马兰萍  
张学赛 李晴柔

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266  
代理人 崔佳佳 马莉华

(51)Int.Cl.  
C07K 16/36(2006.01)

(56)对比文件  
CN 104892763 A,2015.09.09,  
CN 103119065 A,2013.05.22,  
CN 101195659 A,2008.06.11,

WO 2005025623 A2,2005.03.24,  
WO 2015075201 A1,2015.05.28,  
CN 106467574 A,2017.03.01,  
Yoshikatsu Koga et al.Antitumor  
effect of antitissue factor antibody-MMAE  
conjugate in human pancreatic tumor  
xenografts.《International Journal of  
Cancer》.2015,第137卷

Esther C.W. Breij et al.An Antibody-  
Drug Conjugate That Targets Tissue Factor  
Exhibits Potent Therapeutic Activity  
against a Broad Range of Solid Tumors.  
《American association for cancer  
research》.2014,第74卷(第4期),

曹睿,等.肿瘤靶向治疗抗体药物的研究进  
展.《中国生化药物杂志》.2016,(第6期),

Xuesai Zhang et a.Pathological  
expression of tissue factor confers  
promising antitumor response to a novel  
therapeutic antibody SC1 in triple  
negative breast cancer and pancreatic  
adenocarcinoma.《Oncotarget》.2017,第8卷(第  
35期),

审查员 许慧

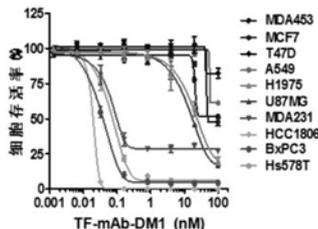
权利要求书2页 说明书21页  
序列表8页 附图11页

(54)发明名称

靶向于组织因子的抗体-药物偶联物

(57)摘要

本发明公开了靶向于组织因子的抗体-药物偶联物。本发明还公开了制备所述的抗体-药物偶联物(ADC)的方法。本发明的ADC能够高特异性地结合TF抗原,其具有很高的亲和力、很低的免疫原性,以及很高细胞毒性,并且具有的显著的抗肿瘤作用。



IC <sub>50</sub> (TF-mAb-DM1)	
细胞株	浓度 (nM)
MDA453	>100
A549	>100
MCF7	100
T47D	>100
U87MG	17.203±0.928
H1975	25.395±4.482
MDA231	0.098±0.025
HCC1806	0.022±0.006
BxPC3	0.038±0.005
Hs578T	0.074±0.009

1. 一种抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体药物偶联物含有:

(a) 抗体部分;和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合;

其中,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

(H1) SEQ ID NO.:1所示的CDR1,

(H2) SEQ ID NO.:2所示的CDR2,和

(H3) SEQ ID NO.:3所示的CDR3;且

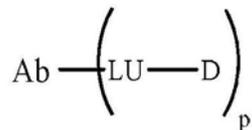
所述抗体的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

(L1) SEQ ID NO.:4所示的CDR1',

(L2) SEQ ID NO.:5所示的CDR2',和

(L3) SEQ ID NO.:6所示的CDR3'。

2. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体药物偶联物ADC如下分子式所示:



其中:

Ab是抗TF的抗体,

LU是接头;

D是药物;

而且下标p是选自1-10的值。

3. 如权利要求2所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述的下标p是选自1-8的值。

4. 如权利要求2所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,LU选自下组:6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基MC-val-cit-PAB、6-马来酰亚氨基己酰基-丙氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基MC-ala-phe-PAB、马来酰亚氨基丙酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基MP-val-cit-PAB、马来酰亚氨基丙酰基-丙氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基MP-ala-phe-PAB、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯SPP、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯SMCC、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯SPDB或N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯SIAB。

5. 如权利要求2所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,其中D选自下组:

(i) 美登素衍生物,auristatin和多拉司他汀,

(ii) Monomethyl auristatin E, Monomethylauristatin F, Monomethyl Dolastatin 10衍生物或其组合。

6. 如权利要求2所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,与D相连的氨基酸残基为半胱氨酸氨基酸或赖氨酸。

7. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述的抗体包括完整抗体或其活性片段。

8. 如权利要求7所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述片段选自下组:Fab、F(ab')

2、Fv或scFv片段。

9. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述的抗体是单克隆抗体。

10. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述的抗体包括:双链抗体、单链抗体。

11. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。

12. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体对人TF蛋白的亲合力的 $EC_{50}$ 为0.005-0.10nM。

13. 如权利要求12所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体对人TF蛋白的亲合力的 $EC_{50}$ 为0.005-0.05nM。

14. 如权利要求13所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体对人TF蛋白的亲合力的 $EC_{50}$ 为0.01-0.03nM或0.01-0.02nM。

15. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体不结合于野生型的鼠TF蛋白。

16. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体具有选自下组的一个或多个特性:

(a) 抑制肿瘤细胞迁移或转移;

(b) 抑制肿瘤生长。

17. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体的重链可变区序列选自下组:SEQ ID NO.:7、9、10、11、12、或13;和/或

所述的抗体的轻链可变区序列选自下组:SEQ ID NO.:8、14、15、16、或17。

18. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物,其特征在于,所述抗体选自下组:TF-mAb-SC1、TF-mAb-Ch、TF-mAb-H29、TF-mAb-H30、TF-mAb-H31、TF-mAb-H32、TF-mAb-H33、TF-mAb-H34、TF-mAb-H35、TF-mAb-H36、TF-mAb-H37、TF-mAb-H38、TF-mAb-H39、TF-mAb-H40、TF-mAb-H41、TF-mAb-H42、TF-mAb-H43、TF-mAb-H44、TF-mAb-H45、TF-mAb-H46、TF-mAb-H47、TF-mAb-H48。

19. 一种权利要求1所述的抗体-药物偶联物的应用,其特征在于,所述抗体用于(i)制备诊断试剂;和/或(ii)制备预防和/或治疗TF相关的疾病的药物。

20. 如权利要求19所述的应用,其特征在于,所述TF相关的疾病选自下组:肿瘤的发生、生长和/或转移、血栓类相关疾病、炎症、代谢相关疾病、或其组合。

21. 如权利要求20所述的应用,其特征在于,所述肿瘤为TF高表达的肿瘤。

22. 一种药物组合物,其特征在于,它含有:

(i) 活性成分,所述活性成分为如权利要求1所述的抗体药物偶联物或其组合;以及

(ii) 药学上可接受的载体。

23. 如权利要求22所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物为液态制剂。

24. 一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,其特征在于,包括步骤:将所述肿瘤细胞与权利要求1所述的抗体药物偶联物接触。

## 靶向于组织因子的抗体-药物偶联物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体地涉及一种靶向于组织因子的抗体及其抗体-药物偶联物、以及制法和用途。

### 背景技术

[0002] 组织因子(Tissue factor,TF)是一个47kDa的跨膜糖蛋白。正常生理状态下TF表达主要屏蔽于血管内皮下细胞层,一旦机体血管受到创伤,TF暴露于血流,通过结合并激活VII因子从而启动外源性凝血反应。

[0003] 研究发现,TF在众多肿瘤组织中异常激活表达,在肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用。特别是在癌症晚期,病人大多伴随自发性血栓,如深度静脉血栓(Deep-vein thrombosis,DVT)、弥漫性血管内凝血(Disseminated intravascular coagulation,DIC)和肺栓塞(Pulmonary embolism,PE)等(Thrombosis research,2013,131:S59-S62; Journal of Thrombosis and Haemostasis,2011,9(s1):306-315)。TF在肿瘤细胞中的异常表达则是这些症状发生的主要诱因。对众多肿瘤临床样本分析表明,TF的表达水平直接影响肿瘤的转移、病人血栓的发生等恶化指标,如在乳腺癌中TF异常表达率为85.8%,在胰腺癌中为88.5%,在肺癌中为83.6%,食道癌中为91.3%等(Blood,2012,119:924-932)。

[0004] 研究表明,首先,TF与FVII形成TF-FVIIa复合物,能直接结合并诱导跨膜G蛋白偶联受体Protease-activated receptor 2(PAR2)的活化。PAR2是调控炎症反应的重要信号通路,虽然对PAR2在肿瘤领域的研究目前还比较少,但可以想象,TF通过PAR2能影响细胞内一系列肿瘤功能信号。如TF-FVIIa-PAR2通过MAPK/ERK磷酸化,诱导关键生长因子、免疫调节因子和趋化因子的基因表达(如VEGF、CSF1/2、IL8、CXCL1等),促进新生血管的形成,为肿瘤的生长提供了充足的养分、能量和适宜的微环境。其次,TF还可以通过与Rac1、β1家族相关整合素的相互作用,以提高肿瘤细胞的迁移性和粘附性,从而在整体上增强肿瘤细胞的血行转移能力。再次,TF起始的凝血作用也是肿瘤性血栓发生的重要诱因,导致多种癌症恶化。同时,TF诱导的高凝状态又直接有助于肿瘤细胞逃离机体免疫系统的攻击,并增加了肿瘤细胞与内皮细胞的相互作用,导致肿瘤细胞的血行转移能力的提高,这也正是当前癌症难治疗的重要原因。

[0005] 抗体-药物偶联物(antibody-drug conjugate,ADC),是利用单克隆抗体特异性识别肿瘤细胞表面特定抗原的特点,从而实现精准地将抗肿瘤药物(如小分子化疗药物等)递送到肿瘤靶细胞并释放,达到精准杀伤肿瘤的目的。ADC也因为其分子量大小合适,稳定性高,靶向性强,毒副作用小被认为是最具潜力的抗肿瘤药物。但成功开发ADC也存在诸多必须考虑且必须解决的问题,如抗体要特异性的识别病变部位,免疫致敏性低,能够高效迅速的发生细胞内吞作用;抗体-药物接头,在血液中稳定性要高并能在靶向细胞中特异的被激活并高效释放小分子药物;所偶联的小分子药物细胞杀伤能力要强等。

[0006] 可见,TF在肿瘤发生发展过程中起着重要作用,而抗体-药物偶联物因其独具的特点和优势,然而,目前尚缺乏高特异性的针对人TF的抗体药物偶联物。

## 发明内容

[0007] 本发明目的就是提供了一种特异性针对人TF的抗体-药物偶联物,它具有特异性靶向于人TF、具有抑制肿瘤生长和转移活性等特性。

[0008] 在本发明第一方面,提供了一种抗体-药物偶联物,所述抗体药物偶联物含有:

[0009] (a) 抗体部分;和

[0010] (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合;

[0011] 其中,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0012] SEQ ID NO.:1所示的CDR1,

[0013] SEQ ID NO.:2所示的CDR2,和

[0014] SEQ ID NO.:3所示的CDR3;

[0015] 其中,上述重链可变区氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留TF结合亲和力的衍生序列;

[0016] 所述抗体的轻链可变区包括以下三个的互补决定区CDR:

[0017] SEQ ID NO.:4所示的CDR1',

[0018] SEQ ID NO.:5所示的CDR2',和

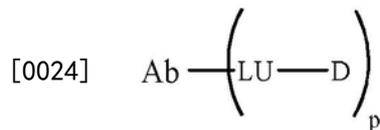
[0019] SEQ ID NO.:6所示的CDR3';

[0020] 其中,上述轻链可变区氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的衍生序列。

[0021] 在另一优选例中,所述的抗体包括完整抗体或其活性片段。

[0022] 在另一优选例中,所述的活性片段保留了结合于组织因子的结合活性。

[0023] 在另一优选例中,抗体药物偶联物ADC如下分子式所示:



[0025] 其中:

[0026] Ab是抗TF的抗体,

[0027] LU是接头;

[0028] D是药物;

[0029] 而且下标p是选自1-10,较佳地1-8的值。

[0030] 在另一优选例中,LU选自下组:6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-val-cit-PAB)、6-马来酰亚氨基己酰基-丙氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-ala-phe-PAB)、马来酰亚氨基丙酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MP-val-cit-PAB)、马来酰亚氨基丙酰基-丙氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基(MP-ala-phe-PAB)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、4-(2-吡啶基二硫代)丁酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDB)或N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。

[0031] 在另一优选例中,其中LU是SMCC、SPP、SPDB或6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-val-cit-PAB)。

[0032] 在另一优选例中,其中D选自下组:美登素衍生物(DM1,DM4),auristatin和多拉司他汀。

[0033] 在另一优选例中,所述的D选自下组:Monomethyl auristatin E(MMAE), Monomethylauristatin F(MMAF), Monomethyl Dolastatin 10(MMAD)类衍生物或其组合。

[0034]

D1	DM1	
D2	DM4	
D3	Monomethyl Auristatin E (MMAE)	
D4	Monomethyl Auristatin F (MMAF)	
D5	Monomethyl Dolastatin 10 (MMAD)	

[0035] 在另一优选例中,所述的与D相连的氨基酸残基是原本存在于抗体(亲本抗体)或外源引入的。

[0036] 在另一优选例中,所述的与D相连的氨基酸残基为半胱氨酸氨基酸。

[0037] 在另一优选例中,所述半胱氨酸氨基酸是在亲本抗体中在依照Kabat编号规则的轻链的一个或多个位置处和/或在依照Kabat编号规则的重链的一个或多个位置处和在依照EU编号规则的重链的一个或多个位置处所引入的一个或多个游离半胱氨酸氨基酸。

[0038] 在另一优选例中,所述的与D相连的氨基酸残基为赖氨酸。

[0039] 在另一优选例中,所述片段选自下组:Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或scFv片段。

[0040] 在另一优选例中,所述的抗体是单克隆抗体。

[0041] 在另一优选例中,所述的抗体包括:双链抗体、单链抗体。

[0042] 在另一优选例中,所述抗体是重组的。

[0043] 在另一优选例中,所述抗体是在细菌(如大肠杆菌)中生成的。

[0044] 在另一优选例中,所述抗体是在真核细胞(如CHO细胞)中生成的。

[0045] 在另一优选例中,述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合;更加地,所述抗体是人源化抗体。

- [0046] 在另一优选例中,所述抗体对人TF蛋白的亲力的EC<sub>50</sub>为0.005-0.10nM,较佳地为0.005-0.05nM,更佳地0.01-0.03nM或0.01-0.02nM。
- [0047] 在另一优选例中,所述抗体不结合于野生型的鼠TF蛋白。
- [0048] 在另一优选例中,所述抗体具有选自下组的一个或多个特性:
- [0049] (a) 抑制肿瘤细胞迁移或转移;
- [0050] (b) 抑制肿瘤生长。
- [0051] 在另一优选例中,所述抗体的重链可变区序列选自下组:SEQ ID NO.:7、9、10、11、12、或13;和/或
- [0052] 所述的抗体的轻链可变区序列选自下组:SEQ ID NO.:8、14、15、16、或17。
- [0053] 在另一优选例中,所述抗体选自下组:TF-mAb-SC1、TF-mAb-Ch、TF-mAb-H29、TF-mAb-H30、TF-mAb-H31、TF-mAb-H32、TF-mAb-H33、TF-mAb-H34、TF-mAb-H35、TF-mAb-H36、TF-mAb-H37、TF-mAb-H38、TF-mAb-H39、TF-mAb-H40、TF-mAb-H41、TF-mAb-H42、TF-mAb-H43、TF-mAb-H44、TF-mAb-H45、TF-mAb-H46、TF-mAb-H47、TF-mAb-H48。
- [0054] 在本发明的第二方面,提供了本发明第一方面的抗体-药物偶联物的应用,所述抗体用于(a) 制备诊断试剂;和/或(b) 制备预防和/或治疗TF相关的疾病的药物。
- [0055] 在另一优选例中,所述TF相关的疾病选自下组:肿瘤的发生、生长和/或转移;血栓类相关疾病;炎症;代谢相关疾病;或其组合。
- [0056] 在另一优选例中,所述肿瘤为TF高表达的肿瘤。
- [0057] 在另一优选例中,所述的TF高表达指肿瘤组织中TF转录本和/或蛋白的水平L1与正常组织中转录本和/或蛋白的水平L0之比, $L1/L0 \geq 2$ ,较佳地 $\geq 3$ 。
- [0058] 在另一优选例中,所述的肿瘤选自下组:三阴性乳腺癌、胰腺癌、肺癌和恶性胶质瘤。
- [0059] 在本发明的第三方面,提供了一种药物组合物,它含有:
- [0060] (i) 活性成分,所述活性成分为如权利要求1所述的抗体药物偶联物或其组合;以及
- [0061] (ii) 药学上可接受的载体。
- [0062] 在另一优选例中,所述的药物组合物为人用单位剂量形式。
- [0063] 在另一优选例中,所述药物组合物为液态制剂。
- [0064] 在另一优选例中,所述药物组合物中,所述抗体药物偶联物的含量为0.005-50wt%,较佳地0.05-10wt%。
- [0065] 在另一优选例中,所述的药物还包括(iii) 额外的治疗剂。
- [0066] 在另一优选例中,所述的额外治疗剂包括化疗剂。
- [0067] 在本发明的第四方面,提供了一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,包括步骤:将所述肿瘤细胞与第一方面的抗体药物偶联物接触。
- [0068] 在本发明的第五方面,提供了一种治疗肿瘤的方法,包括步骤:给需要的对象使用第一方面的抗体-药物偶联物。
- [0069] 在另一优选例中,所述对象为哺乳动物,包括人。
- [0070] 在另一优选例中,所述的接触是在体外培养体系中进行。
- [0071] 在本发明的第六方面,提供了一种减缓治疗对象中肿瘤生长的方法,包括步骤:联

用有效量的第一方面的抗体药物偶联物与一种或多种选自下组的治疗：辐射治疗、化疗剂治疗、生物治疗、或其组合。

[0072] 在本发明的第七方面，提供了一种抑制治疗对象中细胞迁移的方法，包括步骤：联用有效量第一方面的抗体药物偶联物与一种或多种选自下组的治疗：辐射治疗、化疗剂治疗、生物治疗、或其组合。

[0073] 在本发明的第八方面，提供了一种抑制治疗对象中细胞粘附的方法，包括步骤：联用有效量的第一方面的抗体药物偶联物与一种或多种选自下组的治疗：辐射治疗、化疗剂治疗、生物治疗、或其组合。

[0074] 在本发明的第九方面，提供了一种制备人源化或嵌合抗体的方法，包括步骤：

[0075] 将本发明的鼠源抗体可变区的核苷酸序列克隆入含有人抗体恒定区的表达载体后，通过转染动物细胞表达人-鼠嵌合抗体。

[0076] 将本发明的含人源FR区的抗体可变区的核苷酸序列克隆入含有人抗体恒定区的表达载体后，通过转染动物细胞表达人源化抗体。

[0077] 在另一优选例中，所述的抗体是部分或全人源化的单克隆抗体。

[0078] 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文（如实施例）中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

## 附图说明

[0079] 图1显示了TF-mAb-DM1能显著的抑制TF高表达的肿瘤细胞的生长，并且其抑制作用与细胞表面的TF分子数成正比。左图为TF-mAb-DM1能较好抑制TF高表达的肿瘤细胞生长的曲线，右表为TF-mAb-DM1在不同细胞株上的IC<sub>50</sub>值。

[0080] 图2显示了TF-mAb-MMAE能显著的抑制TF高表达的肿瘤细胞的生长，并且其抑制作用与细胞表面的TF分子数成正比。左图为TF-mAb-MMAE能较好抑制TF高表达的肿瘤细胞生长的曲线，右表为TF-mAb-MMAE在不同细胞株上的IC<sub>50</sub>值。

[0081] 图3A和图3B显示了TF-mAb-DM1（见图3A）和TF-mAb-MMAE（见图3B）对不同肿瘤细胞生长的抑制作用与各细胞表面TF的分子数成正比。通过CCLE数据库（Arrays\_2013-03-18.tar.gz, Broad-Novartis Cancer Cell line Encyclopedia）分析不同细胞表面TF的相对分子数，结果表明TF-mAb-DM1和TF-mAb-MMAE对不同细胞生长的抑制作用与各细胞表面TF的分子数成正比。

[0082] 图4A显示了TF-mAb-DM1能有效的抑制HCC1806原位移植瘤的生长，并呈一定的剂量依赖性。而且与Docetaxel组相比，TF-mAb-DM1组小鼠体重没有下降，说明TF-mAb-DM1毒副作用较小。图4B为裸鼠的体重变化曲线。

[0083] 图5A显示了TF-mAb-MMAE在不同的剂量下均能有效的抑制HCC1806原位移植瘤的生长，并呈一定的剂量依赖性。尤其是TF-mAb-MMAE在3.75mg/kg的剂量，几乎可以完全抑制HCC1806原位移植瘤的生长。而且与Docetaxel组相比，TF-mAb-MMAE组小鼠体重没有下降，说明TF-mAb-MMAE毒副作用较小。图5B为裸鼠的体重变化曲线。

[0084] 图6显示了TF-mAb-MMAE在更低的剂量下也能有效的抑制HCC1806原位移植瘤的生长，且本实验显示，最低有效剂量为0.7mg/kg。

[0085] 图7A显示TF-mAb-MMAE能有效的抑制BxPC-3皮下移植瘤生长,并呈一定的剂量依赖性。而且与Docetaxel组相比,TF-mAb-MMAE组小鼠体重没有下降,说明TF-mAb-MMAE毒副作用较小。图7B为裸鼠的体重变化曲线。

[0086] 图8显示了TF-mAb-H39-MMAE的分子筛高效液相色谱结果。

[0087] 图9为TF-mAb-H39-MMAE的疏水层析色谱结果。

[0088] 图10为TF-mAb-H39-MMAE的质谱表征结果。

[0089] 图11显示了TF-mAb-H44-MMAE的分子筛高效液相色谱结果。

[0090] 图12为TF-mAb-H44-MMAE的疏水层析色谱结果。

[0091] 图13为TF-mAb-H44-MMAE的质谱表征结果。

[0092] 图14显示TF-mAb-H39-MMAE能显著的抑制TF高表达肿瘤细胞的生长,并与细胞表面的TF分子数成正比,右表为相应的IC<sub>50</sub>值。

[0093] 图15显示TF-mAb-H44-MMAE能显著的抑制TF高表达肿瘤细胞的生长,并与细胞表面的TF分子数成正比,右表为相应的IC<sub>50</sub>值。

[0094] 图16A和图16B显示通过CCLE数据库 (Arrays\_2013-03-18.tar.gz, Broad-Novartis Cancer Cell line Encyclopedia) 分析不同细胞表面TF的相对分子数,结果表明TF-mAb-H39-MMAE (见图16A) 和TF-mAb-H44-MMAE (见图16B) 对不同细胞的杀伤作用与各细胞表面TF的分子数成正比。

[0095] 图17显示TF-mAb-H44-MMAE能有效的抑制HCC1806原位移植瘤的生长,并且在3mg/kg剂量下即可完全抑制HCC1806肿瘤的生长。

[0096] 图18显示TF-mAb-H39-MMAE能有效的抑制HCC1806原位移植瘤的生长,且其最低有效剂量为1mg/kg。

[0097] 图19TF-mAb-H44-MMAE能有效的抑制BxPC-3皮下移植瘤生长,并且在1mg/kg剂量下即可完全抑制BxPC-3皮下移植瘤生长。

[0098] 图20TF-mAb-H39-MMAE能有效的抑制BxPC-3皮下移植瘤生长,且其最低有效剂量为0.3mg/kg。

## 具体实施方式

[0099] 本发明人通过广泛而深入的研究,经过大量筛选,意外地获得一种抗TF单克隆抗体TF-mAb-SC1,实验结果表明,该针对TF蛋白的单克隆抗体为IgG2b型抗体。所述的抗体能够高特异性地结合TF抗原,其具有很高的亲和力(ELISA测定其EC<sub>50</sub>约为0.019nM),并且所述的抗体具有显著的抗肿瘤活性,而对于哺乳动物本身没有可见的毒副作用。基于该TF-mAb-SC1而获得的嵌合抗体、人源化抗体以及相应的ADC也具有优异的特性。在此基础上完成了本发明。

[0100] 术语

[0101] 如本文所用,术语“抗体药物偶联物”、“抗体偶联物”、“抗体药物偶联物”、“抗体-药物偶联物”“免疫偶联物”可互换使用,指(a)抗体或其活性片段与(b)药物形成的偶联物。

[0102] 如本文所用,术语“本发明的抗体药物偶联物”、“本发明的抗体与药物偶联物”或“本发明的ADC”可互换使用,指具有针对组织因子的本发明抗体或其活性片段与药物形成的偶联物。

[0103] 除非另外定义,否则本文中所有的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。如本文所用,在提到具体列举的数值中使用术语“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如,表述“约100”包括99和101之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0104] 抗体

[0105] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0106] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 $\beta$ -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 $\beta$ 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0107] 脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为 $\kappa$ 和 $\lambda$ )中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有5类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、和 $\mu$ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

[0108] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 $\beta$ 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0109] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0110] 在本发明中,抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体,例如嵌合的和人源化的单克隆抗体,包括人的和非人的部分,可以通过标准的DNA重组技术获得,它们都是有用的抗体。嵌合抗体是一个分子,其中不同的部分来自不同的动物种,例如具有来自鼠的单克隆抗体的可变区,和来自人免疫球蛋白的恒定区的嵌合抗体(见例如美国专利4,816,567和美国专利4,816,397,在此通过引用

方式整体引入本文)。人源化的抗体是指来源于非人物种的抗体分子,具有一个或多个来源于非人物种的互补决定区(CDRs)和来源于人免疫球蛋白分子的框架区域(见美国专利5,585,089,在此通过引用方式整体引入本文)。这些嵌合和人源化的单克隆抗体可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

[0111] 在本发明中,抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

[0112] 在本发明中,本发明的抗体还包括其保守性变异体,指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多10个,较佳地至多8个,更佳地至多5个,最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0113] 表A

[0114]

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg (R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn (N)	Gln;His;Lys;Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro;Ala	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe	Leu
Leu (L)	Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys (K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met (M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe (F)	Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala	Leu

[0115] 本发明的抗TF的抗体

[0116] 本发明提供一种针对TF的高特异性和高亲和力的抗体,其包括重链和轻链,所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列,所述轻链含有轻链可变区(VL)氨基酸序列。

[0117] 优选地,重链可变区(VH)氨基酸序列和轻链可变区(VL)氨基酸序列的各自CDR选自下组:

[0118] a1) SEQ ID No.:1;

[0119] a2) SEQ ID No.:2;

[0120] a3) SEQ ID No.:3;

[0121] a4) SEQ ID No.:4;

[0122] a5) SEQ ID No.:5;

[0123] a6) SEQ ID No.:6;

[0124] a7) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列。

[0125] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%,较佳地至少85%,更佳地至少为90%,最佳地至少95%的氨基酸序列。

[0126] 优选地,所述的抗体具有抑制TF相关信号通路的活性;具有抗凝血活性;具有抗FXa生成活性、或其组合。

[0127] 典型地,本发明提供了一种抗TF的抗体,所述抗体具有:本发明的重链可变区;和/或本发明的轻链可变区;

[0128] 其中,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0129] SEQ ID NO.:1所示的CDR1,

[0130] SEQ ID NO.:2所示的CDR2,和

[0131] SEQ ID NO.:3所示的CDR3;

[0132] 其中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留TF结合亲和力的衍生序列;

[0133] 所述抗体的轻链可变区包括以下三个的互补决定区CDR:

[0134] SEQ ID NO.:4所示的CDR1',

[0135] SEQ ID NO.:5所示的CDR2',和

[0136] SEQ ID NO.:6所示的CDR3';

[0137] 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的衍生序列。

[0138] 较佳地,所述抗体的重链可变区序列选自下组:SEQ ID NO.:7、9、10、11、12、或13;和/或所述的抗体的轻链可变区序列选自下组:SEQ ID NO.:8、14、15、16、或17。

[0139] 本发明中,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。在另一优选例中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%。

[0140] 在另一优选例中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为1-7个。

[0141] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代的至少一个氨基酸序列为同源性为至少80%的氨基酸序列。

[0142] 在另一优选例中,,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代的至少一个氨基酸具有抑制TF相关信号通路的活性、抗凝血活性、抗FXa生成活性中的任意一种或几种。

[0143] 本发明所述抗体可以是双链或单链抗体,并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体,更优选为全人源化抗体。

[0144] 本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段,如:Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>或该领域内其他已知的抗体衍生物等,以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗

体中的任意一种或几种。

[0145] 其中,所述动物优选为哺乳动物,如鼠。

[0146] 本发明抗体可以是靶向人TF的嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

[0147] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID No.:1-SEQ ID No.:3中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列,位于重链可变区(VH)的CDR区。

[0148] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID No.:4-SEQ ID No.:6中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列,位于轻链可变区(VL)的CDR区。

[0149] 在本发明的一种更优选实施例中,VH CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID No.:1-SEQ ID No.:3中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列;VL CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID No.:4-SEQ ID No.:6中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列。

[0150] 本发明上述内容中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0151] 本发明上述内容中,更优选地,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,可以是1-7个,更优选为1-5个,更优选为1-3个,更优选为1-2个。

[0152] 在另一优选例中,所述靶向TF的抗体为TF-mAb-SC1(原名称为TF-mAb)。

[0153] 在另一优选例中,所述抗体TF-mAb-SC1的重链可变区(VH)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:7所示的氨基酸序列。

[0154] 在另一优选例中,所述抗体TF-mAb-SC1的轻链可变区(V-Kappa)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:8所示的氨基酸序列。

[0155] 抗体的制备

[0156] 本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术,比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外,还可将轻链和重链的编码序列融合在一起,形成单链抗体。

[0157] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0158] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0159] 目前,已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本发明的抗体(或其片段,或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外,还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0160] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0161] 宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括(但并不限于):CHO-S、HEK-293细胞。

[0162] 通常,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的

免疫球蛋白纯化步骤,如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

[0163] 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如,单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。单克隆抗体的结合亲和力例如可用Munson等,Anal.Biochem.,107:220(1980)的Scatchard分析来测定。

[0164] 本发明的抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0165] 细胞毒剂

[0166] 可用于构成本发明ADC的药物包括但不限于:细胞毒剂。

[0167] 术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞表达活性、细胞功能和/或造成细胞破坏的物质。该术语包括放射性同位素、化学治疗剂以及毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。细胞毒剂的例子包括但不限于:耳他汀类(例如,耳他汀E、耳他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ -八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂以及糖皮质激素和其它化学治疗剂,以及放射性同位素,如At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212或213、P32和包括Lu177在内的Lu的放射性同位素。抗体也可与能够将前药转化成其活性形式的抗癌前药活化酶偶联。

[0168] 优选的小分子药物为具有高细胞毒性的化合物,优选单甲基澳瑞他汀(monomethylauristatin)、加利车霉素、美登素类、或其组合;更佳地选自:单甲基澳瑞他汀-E(MMAE)、单甲基澳瑞他汀-D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀-F(MMAF)、或其组合。

[0169] 抗体-药物偶联物(ADC)

[0170] 本发明还提供了基于本发明抗体的抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)。

[0171] 典型地,所述抗体偶联药物包括所述抗体、以及效应分子,所述抗体与所述效应分子偶联,并优选为化学偶联。其中,所述效应分子优选为具有治疗活性的药物。此外,所述效应分子可以是毒蛋白、化疗药物、小分子药物或放射性核素中的一种或多种。

[0172] 本发明抗体与所述效应分子之间可以通过偶联剂进行偶联。所述偶联剂的例子可以是非选择性偶联剂、利用羧基的偶联剂、肽链、利用二硫键的偶联剂中的任意一种或几种。所述非选择性偶联剂是指使效应分子和抗体形成共价键连接的化合物,如戊二醛等。所述利用羧基的偶联剂可以是顺乌头酸酐类偶联剂(如顺乌头酸酐)、酰基脲类偶联剂(偶联

位点为酰基胺)中的任意一种或几种。

[0173] 抗体上某些残基(如Cys或Lys等)用于与多种功能基团相连,其中包括成像试剂(例如发色基团和荧光基团),诊断试剂(例如MRI对比剂和放射性同位素),稳定剂(例如乙二醇聚合物)和治疗剂。抗体可以被偶联到功能剂以形成抗体-功能剂的偶联物。功能剂(例如药物,检测试剂,稳定剂)被偶联(共价连接)至抗体上。功能剂可以直接地、或者是通过接头间接地连接于抗体。

[0174] 典型的适用于本发明的偶联方式,包括K-Lock和C-Lock两种偶联方式。在K-Lock偶联方式中,药物分子偶联于抗体序列中赖氨酸(K)残基,在C-Lock偶联方式中,药物分子偶联于抗体序列中的半胱氨酸(C)残基。

[0175] 抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物(ADCs)。典型地,ADC包含位于药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细胞内环境下容易降解,例如在目标位点处接头发生降解,从而使药物从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括,例如酶降解的接头,其中包括可以被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或者内体蛋白酶)降解的含有肽基的接头,或者糖接头例如,可以被葡萄糖苷酸酶降解的含葡萄糖苷酸的接头。肽基接头可以包括,例如二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸,苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括,例如,pH敏感接头(例如pH小于5.5时水解的接头,例如脘接头)和在还原条件下会降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

[0176] 连接到抗体之前,接头具有能够和某些氨基酸残基反应的活性反应基团,连接通过活性反应基团实现。巯基特异性的活性反应基团是优选的,并包括:例如马来酰亚胺类化合物,卤代酰胺(例如碘、溴或氯代的);卤代酯(例如碘、溴或氯代的);卤代甲基酮(例如碘、溴或氯代),苄基卤代物(例如碘、溴或氯代的);乙烯基砜,吡啶基二硫化物;汞衍生物例如3,6-二-(汞甲基)二氧六环,而对离子是醋酸根、氯离子或者硝酸根;和聚亚甲基二甲基硫醚硫代磺酸盐。接头可以包括,例如,通过硫代丁二酰亚胺连接到抗体上的马来酰亚胺。

[0177] 药物可以是任何细胞毒性,抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中,接头连接抗体和药物,而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如,药物可以具有可以和连接物成键的氨基,羧基,巯基,羟基,或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下,药物在连接到抗体之前,具有反应的活性基团。

[0178] 特别有用的药物类别包括,例如,抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。特别有用的细胞毒性药物类的例子包括,例如,DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs),吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑啉烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))和长春花生物碱(vinca alkaloids)。

[0179] 在本发明中,药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成ADC。在其它实施方式中,

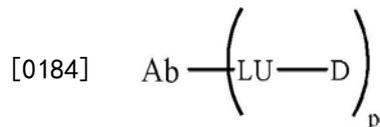
双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成ADC。例如，半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应，并且在随后的步骤中，接头上的功能性基团与药物反应，从而形成ADC。

[0180] 通常，选择接头上功能性基团，以利于特异性地与药物部分上的合适的反应活性基团进行反应。作为非限制性的例子，基于叠氮化合物的部分可以用于特异性地与药物部分上的反应性炔基基团反应。药物通过叠氮和炔基之间的1,3-偶极环加成，从而共价结合于接头。其它的有用的功能性基团包括，例如酮类和醛类（适合与酰肼类和烷氧基胺反应），磷（适合与叠氮反应）；异氰酸酯和异硫氰酸酯（适合与胺类和醇类反应）；和活化的酯类，例如N-羟基琥珀酰亚胺酯（适合与胺类和醇类反应）。这些和其它的连接策略，例如在《生物偶联技术》，第二版 (Elsevier) 中所描述的，是本领域技术人员所熟知的。本领域技术人员能够理解，对于药物部分和接头的选择性反应，当选择了一个互补对的反应活性功能基团时，该互补对的每一个成员既可以用于接头，也可以用于药物。

[0181] 本发明还提供了制备ADC的方法，可进一步地包括：将抗体与药物-接头化合物，在足以形成抗体偶联物 (ADC) 的条件下进行结合。

[0182] 在某些实施方式中，本发明方法包括：在足以形成抗体-接头偶联物的条件下，将抗体与双功能接头化合物进行结合。在这些实施方式中，本发明方法还进一步地包括：在足以将药物部分通过接头共价连接到抗体的条件下，将抗体接头偶联物与药物部分进行结合。

[0183] 在一些实施方式中，抗体药物偶联物ADC如下分子式所示：



[0185] 其中：

[0186] Ab是抗体，

[0187] LU是接头；

[0188] D是药物；

[0189] 而且下标p是选自1-10，较佳地1-8的值。

[0190] 应用

[0191] 本发明还提供了本发明抗体的用途，例如用于制备诊断制剂、或制备用于预防和/或治疗TF相关的疾病的药物。所述TF相关的疾病包括肿瘤发生、生长和/或转移、血栓类相关疾病、炎症、代谢相关疾病等。

[0192] 本发明抗体、ADC或CAR-T等的用途，包括（但不限于）：

[0193] (i) 诊断、预防和/或治疗肿瘤发生、生长和/或转移，尤其是TF高表达的肿瘤。所述肿瘤包括（但不限于）：乳腺癌（如三阴性乳腺癌）、胰腺癌、肺癌、恶性胶质瘤、胃癌、肝癌、食道癌、肾癌、结直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、白血病、骨髓癌、血管肉瘤等；尤其是三阴性乳腺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤和肺癌，更优选为三阴性乳腺癌和/或胰腺癌。

[0194] (ii) 诊断、预防和/或治疗血栓类相关疾病。所述血栓类相关疾病包括（但不限于）：动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合症、急性心肌梗塞、中风、高血压、深静脉血栓、肺栓

塞、肾栓塞及动脉手术、冠状动脉旁路移植引起的血栓等。

[0195] (iii) 诊断、预防和/或治疗炎症。所述炎症包括(但并不限于): 风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎、痛风、莱特尔综合征、牛皮癣性关节炎、感染性关节炎、结核性关节炎、病毒性关节炎、真菌性关节炎、肾小球性肾炎、全身性红斑狼疮、克罗恩病、溃疡性结肠炎、急性肺损伤、慢性阻塞性肺疾病、特发性肺纤维化。

[0196] (iv) 诊断、预防和/或治代谢相关疾病。所述代谢相关疾病包括(但并不限于): 糖尿病、食源性肥胖和脂肪炎症等。

[0197] 药物组合物

[0198] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于): 瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0199] 本发明的药物组合物可直接用于结合TF蛋白分子,因而可用于预防和治疗肿瘤等疾病。此外,还可同时使用其他治疗剂,例如,各种细胞因子,如TNF、IFN、IL-2等;各种肿瘤化疗药物,如5-FU、氨甲喋呤等影响核酸生物合成的药物;氮芥、环磷酰胺等烷化剂类药物;阿霉素、放线菌素D等干扰转录过程阻止RNA合成的药物;长春新碱、喜树碱类。

[0200] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0201] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0202] 本发明的主要优点包括:

[0203] (a) 本发明抗体具有优异的生物活性和特异性,并具有很高的亲和力(ELISA测定其EC<sub>50</sub>可高达为约0.01-0.03nM)。此外,对细胞表面TF具有良好的结合亲和力,可用做靶向TF的抗体。

[0204] (b) 本发明的人源化抗体不仅具有与鼠源抗体相当的活性,而且具有更低的免疫原性。

[0205] (c) 本发明抗体和ADC均具有显著的抗肿瘤活性,而对于哺乳动物本身没有可见的毒副作用。

[0206] (d) 本发明抗体和ADC不仅在多个肿瘤模型中有显著的治疗效应,而且还适用于其他与TF高表达有关的疾病。

[0207] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。细胞株为常规的市售产品或购自ATCC,质粒均为市售产品。

[0208] 实施例1靶向人TF单克隆抗体的发现和制备

[0209] 步骤①,杂交瘤细胞的制备:

[0210] 首先将人TF蛋白的胞外区部分(UniProtKB/Swiss-Prot:P13726.1,从第34位到第251位氨基酸)免疫8周龄Balb/c雌性小鼠,TF胞外区蛋白的用量为100 $\mu$ g/只,以制备免疫脾细胞;适时的制备鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)和饲养细胞以备融合之需。

[0211] 待上述三种细胞准备完毕,通过PEG介导融合免疫脾细胞和SP2/0细胞,去除PEG,用含有饲养细胞的HAT完全培养基重悬,接种到96孔板中培养,通过ELISA法进行阳性孔筛选。最后再对阳性孔的细胞通过有限稀释法进行克隆化培养,通过ELISA或免疫荧光法筛选效价高、形态好、呈单克隆生长的细胞继续进行亚克隆筛选,直到连续三次筛选阳性克隆率全为100%,即可对该细胞株进行扩大培养和建库。

[0212] 步骤②,靶向人TF鼠源单克隆抗体腹水的制备:

[0213] 将步骤①中筛选出来的杂交瘤细胞扩大培养,小鼠适应性培养后腹腔注射降植烷(0.5mL/只)以为杂交瘤细胞生长提供有利环境,7-10d后,每只腹腔注射 $10 \times 10^6$ 的杂交瘤细胞,自第7天起,每天观察小鼠腹水产生状况和精神状态,采取腹水,离心去除油脂-80 $^{\circ}$ C冻存,以备纯化。

[0214] 步骤③,靶向人TF鼠源单克隆抗体的纯化:

[0215] 将步骤②中冻存的腹水于冰上融化,经0.45 $\mu$ m滤膜过滤后,用PBS于4 $^{\circ}$ C透析过夜,最后通过FPLC技术对该抗体进行纯化并超滤浓缩至所需浓度,分装、-80 $^{\circ}$ C冻存备用。

[0216] 步骤④,靶向人TF鼠源单克隆抗体的生物活性和靶向特异性确定:

[0217] 经过初步筛选,选定约30个杂交瘤细胞进行二次有限稀释克隆筛选,然后在其中选定6个抗体,进行大量表达纯化,并在10 $\mu$ g/mL的浓度下利用流式细胞仪测定各个抗体对人乳腺癌细胞MDA-MB-231,人胰腺癌细胞BxPC-3和鼠黑色素瘤细胞B16-F10的亲合力。

[0218] 结果表明测试的抗体可以特异性的靶向结合人源TF(MDA-MB-231和BxPC-3细胞)而不靶向结合鼠源TF(B16-F10细胞),其中TF-mAb-SC1对人TF的亲合力比其他5个抗体都要高。

[0219] 随后,将TF胞外区蛋白包被ELISA板,0.05 $\mu$ g/孔,进行ELISA实验,结果表明,TF-mAb-SC1对TF胞外区蛋白有很强的亲和性;细胞结合亲和力实验表明,TF-mAb-SC1对TF高表达的三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231、胰腺癌细胞BxPC-3细胞有非常高的结合亲和力;而且TF-mAb-SC1可以显著抑制TF-PAR2下游MAPK/ERK的磷酸化水平并呈一定的剂量依赖性。

[0220] 基于TF-mAb-SC1表现出非常高的特异性、非常高的亲和力以及对MAPK/ERK的磷酸化水平的显著抑制作用,故被选定用于测序以及后续研究。

[0221] 采用常规测序,并通过Kabat数据库分析,得到以下序列信息:

[0222] 重链可变区的CDR氨基酸序列为:

[0223] SEQ ID No.:1:SYWMN;

[0224] SEQ ID No.:2:MIYPADSETRLNPKFKD;

[0225] SEQ ID No.:3:EDYGSSDY。

[0226] 完整的VH氨基酸序列如SEQ ID NO.:7所示。

[0227] QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFISYWMNWVKRPGQGLEWIGMIYPADSETRLNPKFKDKA  
TLTVDKSSSTAYMQLSSPTSESAVYYCAREDYGSSDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO.:7)

[0228] 轻链可变区的CDR氨基酸序列为:

[0229] SEQ ID No.:4:SASSSVSYMN;

[0230] SEQ ID No.:5:GISNLAS;

[0231] SEQ ID No.:6:QQKSSFPWT。

[0232] 完整的VL氨基酸序列如SEQ ID NO.:8所示:

[0233] EILLTQSPAIIAASPGEKVTITCSASSSVSYMNWYLQKPGSSPKIWIYGISNLASGVPARFSGSGSGT  
SFSFTINSMETEDVATYYCQQKSSFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.:8)

[0234] 实施例2人-鼠嵌合抗体的制备

[0235] 在已获得的活性高、特异性强的鼠源TF-mAb-SC1的基础上,构建人-鼠嵌合抗体。

[0236] 设计引物在重链可变区引入EcoR I和Nhe I,在轻链可变区引入Age I和BsiW I限制性内切酶酶切位点,然后将上述所获得抗体重链和轻链的可变区序列分别克隆入含有人IgG1重链恒定区和Kappa链恒定区的载体,经鉴定无误后,利用转染技术和哺乳动物表达系统(CHO-S或HEK-293细胞)将构建的嵌合型抗体表达、纯化,所获得的人-鼠嵌合型抗体,命名为TF-mAb-Ch。

[0237] 实施例3TF-mAb-SC1的人源化及活性测定

[0238] 参照TF-mAb-SC1的抗体重链可变区序列(SEQ ID NO.:7)和轻链可变区序列(SEQ ID NO.:8),在Germline数据库中选取与其非CDR区匹配最好的人源化模板。然后将鼠源抗体TF-mAb-SC1的CDR区移植到所选择的人源化模板上,替换人源模板的CDR区,再与IgG1恒定区重组,同时以鼠源抗体的三维结构为基础,对包埋残基、与CDR区有直接相互作用的残基,以及对VL和VH的构象有重要影响的残基进行回复突变,得到5个人源化重链的可变区(SEQ ID NO.:9,SEQ ID NO.:10,SEQ ID NO.:11,SEQ ID NO.:12,SEQ ID NO.:13)及4个人源化轻链的可变区(SEQ ID NO.:14,SEQ ID NO.:15,SEQ ID NO.:16,SEQ ID NO.:17)。

[0239] 表B

[0240]

SEQ ID NO.:	序列	可变区
9	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGL EWMGMIYPADSETRLNPKFKDQATLSVDKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCAREDYGSSDYWGQGTTLTVSS	VH
10	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGL	VH

[0241]

	EWMGMIYPADSETRLNQKFKDKATLSVDKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	
11	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVKQMPGKGL EWMGMIYPADSETRLNQKFKDKATLSVDKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYSFISYWMNWVRQAPGQG LEWIGMIYPADSETRLNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
13	QVQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYSFISYWMNWVRQAPGQGL EWIGMIYPADSETRLNQKFKDRAVLSVDKSVSTAYLQICSLKAEDTA VYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
14	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRIWI YGISNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQKSSFPWT FGGGTKVEIK	VL
15	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQSPRIWIY GISNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQKSSFPWT FGGGTKVEIK	VL
16	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKSPKIWIY GISNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQKSSFPWTF GGGTKVEIK	VL
17	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMNWYQQKPDQSPKIWIY GISNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQKSSFPWT FGGGTKVEIK	VL

[0242] 基于所述改造的VH和VL,分别组合表达这些人源化的重链及轻链,最终共得到的20个人源化抗体,即TF-mAb-H29至TF-mAb-H48。各抗体相应的重链和轻链组合如下表所示:

[0243] 表C

[0244]

序列编号	SEQ ID NO.:9	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:13
SEQ ID NO.:14	TF-mAb-H29	TF-mAb-H30	TF-mAb-H31	TF-mAb-H32	TF-mAb-H33
SEQ ID NO.:15	TF-mAb-H34	TF-mAb-H35	TF-mAb-H36	TF-mAb-H37	TF-mAb-H38
SEQ ID NO.:16	TF-mAb-H39	TF-mAb-H40	TF-mAb-H41	TF-mAb-H42	TF-mAb-H43
SEQ ID NO.:17	TF-mAb-H44	TF-mAb-H45	TF-mAb-H46	TF-mAb-H47	TF-mAb-H48

[0245] 首先通过ELISA结合实验测定这20个人源化抗体对TF胞外区蛋白的亲合活性(实验方法参照实施例1,步骤④),结果如表1所示。

[0246] 表1人源化抗体对TF胞外区蛋白的结合亲和力

[0247]

抗体	EC <sub>50</sub> (nM)	抗体	EC <sub>50</sub> (nM)
TF-mAb-Ch	0.0100	TF-mAb-H39	0.0125
TF-mAb-H29	0.0178	TF-mAb-H40	0.0131
TF-mAb-H30	0.0147	TF-mAb-H41	0.0134
TF-mAb-H31	0.0145	TF-mAb-H42	0.0128
TF-mAb-H32	0.0168	TF-mAb-H43	0.0116
TF-mAb-H33	0.0189	TF-mAb-H44	0.0120
TF-mAb-H34	0.0154	TF-mAb-H45	0.0138
TF-mAb-H35	0.0105	TF-mAb-H46	0.0119
TF-mAb-H36	0.0234	TF-mAb-H47	0.0130
TF-mAb-H37	0.0173	TF-mAb-H48	0.0153
TF-mAb-H38	0.0178	IgG (阴性对照)	>6.67

[0248] 通过流式细胞仪测定这20个人源化抗体分别在10 $\mu$ g/mL和1 $\mu$ g/mL浓度下,对1 $\times$ 10<sup>5</sup>个MDA-MB-231细胞的结合亲和力,结果如表2所示。

[0249] 表2人源化抗体对MDA-MB-231的结合亲和力;

[0250]

抗体	MFI	
	10 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL
TF-mAb-Ch	3544	3369
TF-mAb-H29	3584	2958
TF-mAb-H30	3240	2930
TF-mAb-H31	3468	3079
TF-mAb-H32	3009	2400
TF-mAb-H33	2837	2420
TF-mAb-H34	3272	2462
TF-mAb-H35	3015	2931
TF-mAb-H36	3094	3037
TF-mAb-H37	2989	2459
TF-mAb-H38	3152	2871
TF-mAb-H39	3383	3177
TF-mAb-H40	3311	3182
TF-mAb-H41	3613	3004
TF-mAb-H42	3350	2968
TF-mAb-H43	3302	2818
TF-mAb-H44	3428	3195
TF-mAb-H45	3478	3101
TF-mAb-H46	3410	3115
TF-mAb-H47	3151	2995
TF-mAb-H48	2903	2611
IgG (阴性对照)	0	0

[0251] 实施例4抗体药物偶联物,TF-mAb-MMAE的制备

[0252] 在TF-mAb-SC1原液中加入PBS/D (pH=7.4) 缓冲液使其浓度在20mg/ml,然后用

2.6eq的TCEP于25℃还原2小时,取出后置于冰上冷却,未纯化直接加入6eq的MMAE,0℃反应1小时,加Cyst终止反应。采用G25脱盐柱除去过量的小分子,并置换至10mM PBS溶液中(pH 7.4),-80℃保存备用,所得的抗体药物偶联物命名为TF-mAb-MMAE。

[0253] 实施例5抗体药物偶联物,TF-mAb-DM1的制备

[0254] ①一步法的制备

[0255] 首先利用G25脱盐柱将TF-mAb-SC1原液置换至反应缓冲液(50mM磷酸钾盐/50mM NaCl/2mM EDTA,pH7.5)中,终浓度7.8mg/ml;然后加入9eq的11mg/ml的MCC-DM1(溶解在DMA中,反应体系中DMA含量小于5%),室温反应6小时。离心,上清经Q柱,阳离子柱纯化去除过量的小分子,最后经G25脱盐柱或超滤置换至10mM PBS溶液中,-80℃保存备用,所得的抗体药物偶联物命名为TF-mAb-DM1。

[0256] ②二步法的制备

[0257] 利用G25脱盐柱将TF-mAb-SC1原液置换至反应缓冲液(50mM磷酸钾盐/50mM NaCl/2mM EDTA,pH6.5)中,终浓度10mg/ml;然后加入8eq的SMCC(溶解在DMSO中),10-12℃反应3小时,过G25脱盐柱去除过量的SMCC。再于P-MCC中加入12eq的DM1,于25℃反应18小时,最后经G25脱盐柱置换至10mM PBS溶液中,-80℃保存备用,所得的抗体药物偶联物命名为TF-mAb-DM1。

[0258] 实施例6TF-mAb-ADCs针对TF高表达的三阴性乳腺癌细胞、胰腺癌的体外抗肿瘤活性

[0259] 本实例所使用细胞系购自于美国典型培养物保藏中心(ATCC)或中国科学院细胞库,并按照相应的说明进行培养,包括:MCF7,MDA-MB-453,T47D,A549,U87MG,H1975,MDA-MB-231,BxPC-3,HCC1806,Hs578T。

[0260] 将上述处于对数生长期的细胞,分别以每孔1,000-3,000个细胞的密度(依不同细胞的生长速率而定)接种至96孔细胞培养板中,150μL/孔,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养约16h后,分别加入不同浓度的TF-mAb-ADCs(即TF-mAb-DM1和TF-mAb-MMAE),每个药物浓度设置3个复孔,及相应的溶媒对照和空白对照孔,作用4天后,倾去培养液,加入MTS反应液(购自Promega,cat#G3581),100μL/孔,于37℃反应至预期颜色深浅,测定每组的细胞活力(OD490nm),并按照以下公式计算细胞存活率:

[0261] 存活率 = (OD给药-OD空白) / (OD对照-OD空白) × 100%。

[0262] 通过GraphPad Prism 5软件分析上述数据,并分别计算TF-mAb-DM1和TF-mAb-MMAE在不同细胞株上的IC<sub>50</sub>值。

[0263] 实验结果表明,在体外,TF-mAb-DM1和TF-mAb-MMAE均能较好抑制TF高表达的肿瘤细胞的生长,并且其抑制作用与细胞表面的TF分子数成正比。如图1,左图为TF-mAb-DM1能较好抑制TF高表达的肿瘤细胞生长的曲线,右表为TF-mAb-DM1在不同细胞株上的IC<sub>50</sub>值。如图2,左图为TF-mAb-MMAE能较好抑制TF高表达的肿瘤细胞生长的曲线,右表为TF-mAb-MMAE在不同细胞株上的IC<sub>50</sub>值。

[0264] 通过CCLE(Broad-Novartis Cancer Cell line Encyclopedia)数据库分析不同细胞表面TF的相对分子数,结果表明TF-mAb-DM1和TF-mAb-MMAE对不同细胞生长的抑制作用与各细胞表面TF的分子数成正比,分别如图3A和图3B。

[0265] 实施例7TF-mAb-ADCs针对TF高表达的三阴性乳腺癌、胰腺癌模型的体内抗肿瘤活

性

[0266] 将处于对数生长期的HCC1806和BxPC-3细胞分别按照每200 $\mu$ L无血清培养基含 $3 \times 10^6$ 和 $10 \times 10^6$ 的密度接种到6周龄Balb/c雌性裸鼠背部皮下或乳垫(Balb/c裸鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司),待肿瘤生长至100-200mm<sup>3</sup>后,将动物随机分组,每组8个肿瘤。将TF-mAb-DM1按照3.75mg/kg和15mg/kg,TF-mAb-MMAE按照0.7mg/kg,2mg/kg,3.75mg/kg,7mg/kg和15mg/kg的剂量,每周一次通过尾静脉给药,正常小鼠IgG(IgG)和多烯紫杉醇(Docetaxel)分别作为阴性和阳性对照药物。每周测量2-3次肿瘤体积及裸鼠重量并记录以绘制肿瘤生长曲线。肿瘤体积(V)计算公式为:

[0267]  $V=1/2 \times a \times b^2$ 其中a、b分别表示肿瘤的长、宽。

[0268] 如图4所示,图4A为TF-mAb-DM1抑制HCC1806原位移植瘤生长曲线,并呈一定的剂量依赖性。图4B为裸鼠体重变化曲线。

[0269] 图5A和图6为TF-mAb-MMAE在不同剂量下抑制HCC1806原位移植瘤生长曲线,图5B为裸鼠体重变化曲线。由结果可知TF-mAb-MMAE在0.7mg/kg剂量下即可有效抑制HCC1806肿瘤生长,而在3.75mg/kg的剂量,几乎可以完全抑制HCC1806肿瘤的生长。

[0270] 如图7A所示,TF-mAb-MMAE能有效的抑制BxPC-3皮下移植瘤生长,并呈一定的剂量依赖性。而且与Docetaxel组相比,TF-mAb-MMAE组小鼠体重没有下降,说明TF-mAb-MMAE毒副作用较小。图7B为裸鼠体重变化曲线。

[0271] 实施例8人源化抗体的ADC

[0272] 重复实施例4-7,不同点在于用如下人源化抗体替换TF-mAb:TF-mAb-H29、TF-mAb-H30、TF-mAb-H31、TF-mAb-H32、TF-mAb-H33、TF-mAb-H34、TF-mAb-H35、TF-mAb-H36、TF-mAb-H37、TF-mAb-H38、TF-mAb-H39、TF-mAb-H40、TF-mAb-H41、TF-mAb-H42、TF-mAb-H43、TF-mAb-H44、TF-mAb-H45、TF-mAb-H46、TF-mAb-H47、TF-mAb-H48。

[0273] 然后,分别制得这些人源化抗体与MMAE的偶联物,其中TF-mAb-H39-MMAE和TF-mAb-H44-MMAE表征结果如下。

[0274] 图8为TF-mAb-H39-MMAE的分子筛高效液相色谱;图9为TF-mAb-H39-MMAE的疏水层析色谱;图10为TF-mAb-H39-MMAE的质谱图。图11为TF-mAb-H44-MMAE的分子筛高效液相色谱;图12为TF-mAb-H44-MMAE的疏水层析色谱;图13为TF-mAb-H44-MMAE的质谱图。

[0275] 上述实验结果表明,TF-mAb-H39-MMAE和TF-mAb-H44-MMAE的药物-抗体偶联比(DAR)主要为2和4,平均DAR约为4。

[0276] 测试结果表明,基于这些人源化抗体的ADC同样具有高亲和力(与TF-mAb-MMAE相比,较佳地人源化抗体的ADC的相对亲和力为60-140%之间)、高细胞毒性,和低的毒副作用,并表现出显著的抗肿瘤作用。

[0277] 两种优选的人源化抗体TF-mAb-H39-MMAE和TF-mAb-H44-MMAE的体外、体内抗肿瘤活性结果分别如图14-20所示。

[0278] 如图14所示,实验结果表明TF-mAb-H39-MMAE能显著的抑制TF高表达肿瘤细胞的生长,并与细胞表面的TF分子数成正比,右表为TF-mAb-H39-MMAE在不同细胞株上的IC<sub>50</sub>值。

[0279] 如图15所示为TF-mAb-H44-MMAE能显著的抑制TF高表达肿瘤细胞的生长,并与细胞表面的TF分子数成正比,右表为TF-mAb-H44-MMAE在不同细胞株上的IC<sub>50</sub>值。

[0280] 通过CCLE数据库分析不同细胞表面TF的相对分子数,结果表明TF-mAb-H39-MMAE

和TF-mAb-H44-MMAE对不同细胞的杀伤作用与各细胞表面TF的分子数成正比,分别如图16A和图16B。

[0281] 如图17所示,TF-mAb-H44-MMAE能有效的抑制HCC1806肿瘤的生长,且呈剂量依赖性,并且在3mg/kg剂量下即可完全抑制HCC1806肿瘤生长,最低有效剂量(MED)为1mg/kg。

[0282] 如图18所示,TF-mAb-H39-MMAE能有效的抑制HCC1806肿瘤的生长,且最低有效剂量(MED)为1mg/kg。

[0283] 如图19所示,TF-mAb-H44-MMAE能显著的抑制BxPC-3肿瘤生长,且呈剂量依赖性,并且在1mg/kg剂量下即可完全抑制BxPC-3肿瘤生长。

[0284] 如图20所示TF-mAb-H39-MMAE能显著的抑制BxPC-3肿瘤生长,且最低有效剂量(MED)为0.3mg/kg。

[0285] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 复旦大学
- [0003] <120> 靶向于组织因子的抗体-药物偶联物
- [0004] <130> P2017-0162
- [0005] <150> CN2016107045591
- [0006] <151> 2016-08-22
- [0007] <160> 17
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 5
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> Mus musculus
- [0013] <400> 1
- [0014] Ser Tyr Trp Met Asn
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 17
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> Mus musculus
- [0020] <400> 2
- [0021] Met Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Lys
- [0022] 1 5 10 15
- [0023] Asp
- [0024] <210> 3
- [0025] <211> 8
- [0026] <212> PRT
- [0027] <213> Mus musculus
- [0028] <400> 3
- [0029] Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr
- [0030] 1 5
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 10
- [0033] <212> PRT
- [0034] <213> Mus musculus
- [0035] <400> 4
- [0036] Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
- [0037] 1 5 10
- [0038] <210> 5

[0039] <211> 7  
 [0040] <212> PRT  
 [0041] <213> Mus musculus  
 [0042] <400> 5  
 [0043] Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser  
 [0044] 1 5  
 [0045] <210> 6  
 [0046] <211> 9  
 [0047] <212> PRT  
 [0048] <213> Mus musculus  
 [0049] <400> 6  
 [0050] Gln Gln Lys Ser Ser Phe Pro Trp Thr  
 [0051] 1 5  
 [0052] <210> 7  
 [0053] <211> 117  
 [0054] <212> PRT  
 [0055] <213> Mus musculus  
 [0056] <400> 7  
 [0057] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
 [0058] 1 5 10 15  
 [0059] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Ser Tyr  
 [0060] 20 25 30  
 [0061] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 [0062] 35 40 45  
 [0063] Gly Met Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe  
 [0064] 50 55 60  
 [0065] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 [0066] 65 70 75 80  
 [0067] Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0068] 85 90 95  
 [0069] Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 [0070] 100 105 110  
 [0071] Leu Thr Val Ser Ser  
 [0072] 115  
 [0073] <210> 8  
 [0074] <211> 106  
 [0075] <212> PRT  
 [0076] <213> Mus musculus  
 [0077] <400> 8



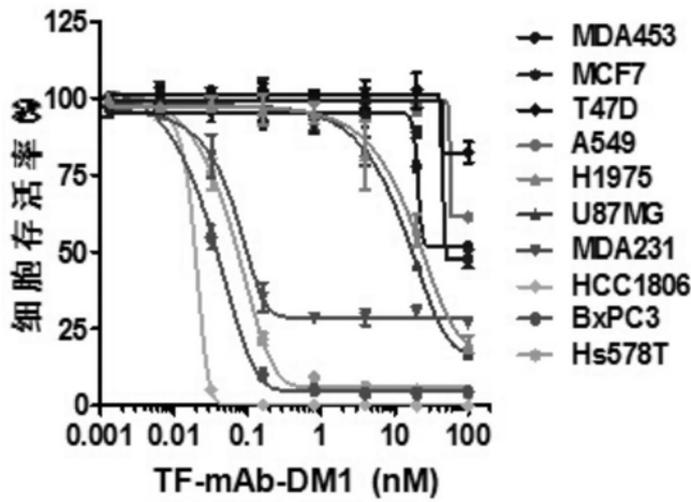
[0117] <212> PRT  
 [0118] <213> 人工序列  
 [0119] <220>  
 [0120] <223> VH  
 [0121] <400> 10  
 [0122] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 [0123] 1 5 10 15  
 [0124] Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 [0125] 20 25 30  
 [0126] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [0127] 35 40 45  
 [0128] Gly Met Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe  
 [0129] 50 55 60  
 [0130] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 [0131] 65 70 75 80  
 [0132] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0133] 85 90 95  
 [0134] Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 [0135] 100 105 110  
 [0136] Val Thr Val Ser Ser  
 [0137] 115  
 [0138] <210> 11  
 [0139] <211> 117  
 [0140] <212> PRT  
 [0141] <213> 人工序列  
 [0142] <220>  
 [0143] <223> VH  
 [0144] <400> 11  
 [0145] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 [0146] 1 5 10 15  
 [0147] Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 [0148] 20 25 30  
 [0149] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [0150] 35 40 45  
 [0151] Gly Met Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe  
 [0152] 50 55 60  
 [0153] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 [0154] 65 70 75 80  
 [0155] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys



[0195]	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0196]	35 40 45
[0197]	Gly Met Ile Tyr Pro Ala Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
[0198]	50 55 60
[0199]	Lys Asp Arg Ala Val Leu Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
[0200]	65 70 75 80
[0201]	Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0202]	85 90 95
[0203]	Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
[0204]	100 105 110
[0205]	Val Thr Val Ser Ser
[0206]	115
[0207]	<210> 14
[0208]	<211> 106
[0209]	<212> PRT
[0210]	<213> 人工序列
[0211]	<220>
[0212]	<223> VL
[0213]	<400> 14
[0214]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0215]	1 5 10 15
[0216]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0217]	20 25 30
[0218]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Ile Trp Ile Tyr
[0219]	35 40 45
[0220]	Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0221]	50 55 60
[0222]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0223]	65 70 75 80
[0224]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Ser Ser Phe Pro Trp Thr
[0225]	85 90 95
[0226]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0227]	100 105
[0228]	<210> 15
[0229]	<211> 106
[0230]	<212> PRT
[0231]	<213> 人工序列
[0232]	<220>
[0233]	<223> VL

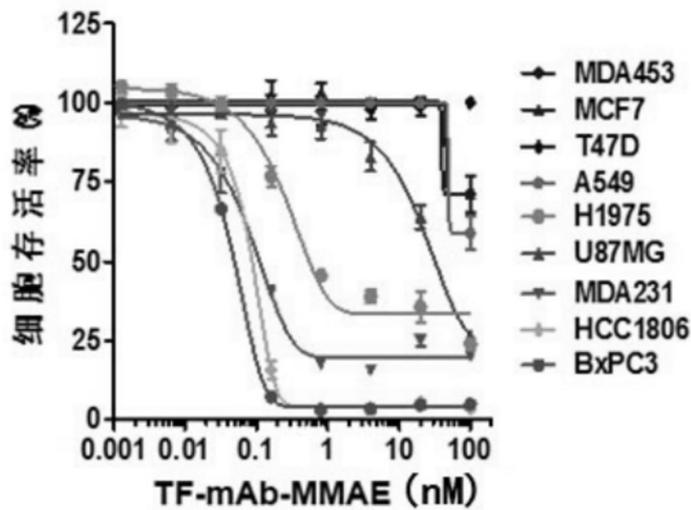
[0234]	<400> 15
[0235]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0236]	1                    5                    10                    15
[0237]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0238]	20                    25                    30
[0239]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Ile Trp Ile Tyr
[0240]	35                    40                    45
[0241]	Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0242]	50                    55                    60
[0243]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0244]	65                    70                    75                    80
[0245]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Ser Ser Phe Pro Trp Thr
[0246]	85                    90                    95
[0247]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0248]	100                    105
[0249]	<210> 16
[0250]	<211> 106
[0251]	<212> PRT
[0252]	<213> 人工序列
[0253]	<220>
[0254]	<223> VL
[0255]	<400> 16
[0256]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0257]	1                    5                    10                    15
[0258]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0259]	20                    25                    30
[0260]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr
[0261]	35                    40                    45
[0262]	Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[0263]	50                    55                    60
[0264]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
[0265]	65                    70                    75                    80
[0266]	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Ser Ser Phe Pro Trp Thr
[0267]	85                    90                    95
[0268]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0269]	100                    105
[0270]	<210> 17
[0271]	<211> 106
[0272]	<212> PRT

[0273] <213> 人工序列  
 [0274] <220>  
 [0275] <223> VL  
 [0276] <400> 17  
 [0277] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys  
 [0278] 1 5 10 15  
 [0279] Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 [0280] 20 25 30  
 [0281] Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr  
 [0282] 35 40 45  
 [0283] Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 [0284] 50 55 60  
 [0285] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
 [0286] 65 70 75 80  
 [0287] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Ser Ser Phe Pro Trp Thr  
 [0288] 85 90 95  
 [0289] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0290] 100 105



IC <sub>50</sub> (TF-mAb-DM1)	
细胞株	浓度 (nM)
MDA453	>100
A549	>100
MCF7	100
T47D	>100
U87MG	17.203±0.928
H1975	25.395±4.482
MDA231	0.098±0.025
HCC1806	0.022±0.006
BxPC3	0.038±0.005
Hs578T	0.074±0.009

图1



IC <sub>50</sub> (TF-mAb-MMAE)	
细胞株	浓度 (nM)
MDA453	>100
MCF7	>100
T47D	>100
A549	>100
H1975	0.549±0.065
U87MG	32.491±5.362
MDA231	0.112±0.014
HCC1806	0.088±0.01
BxPC3	0.049±0.003

图2

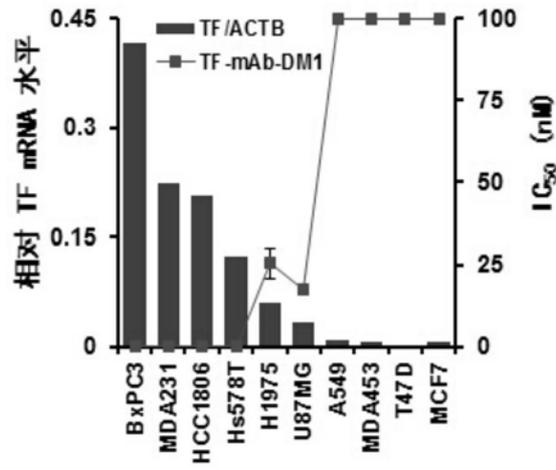


图3A

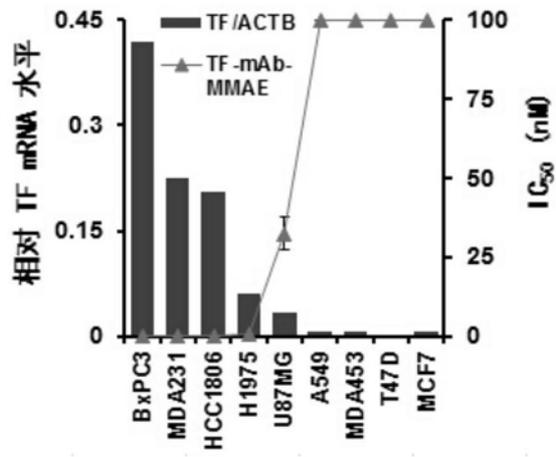


图3B

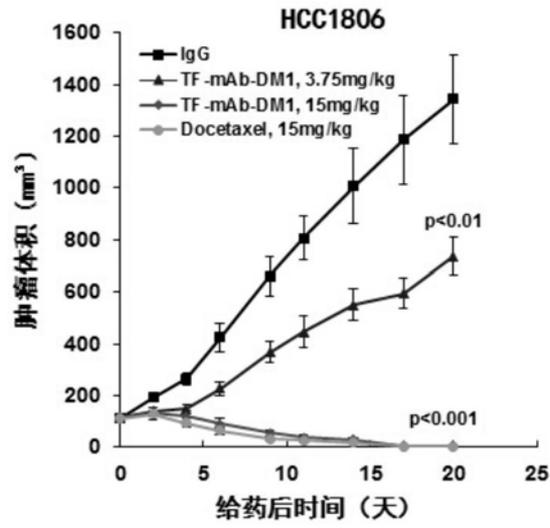


图4A

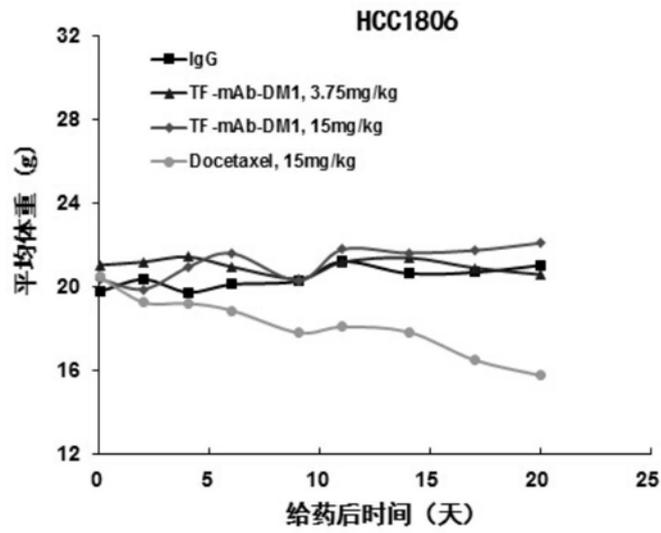


图4B

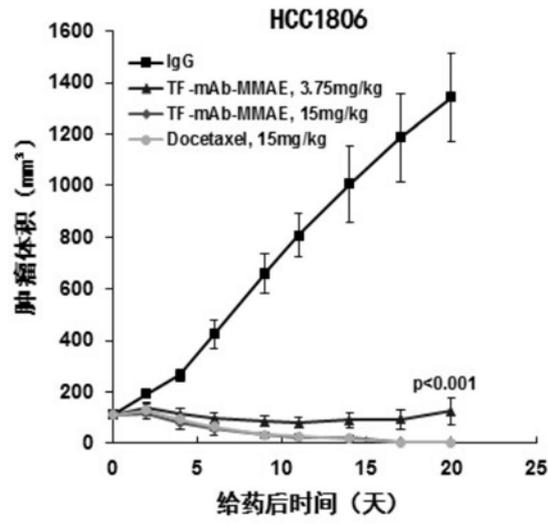


图5A

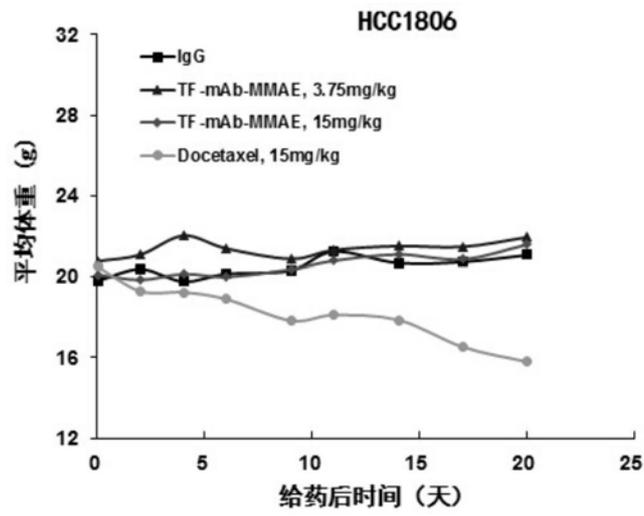


图5B

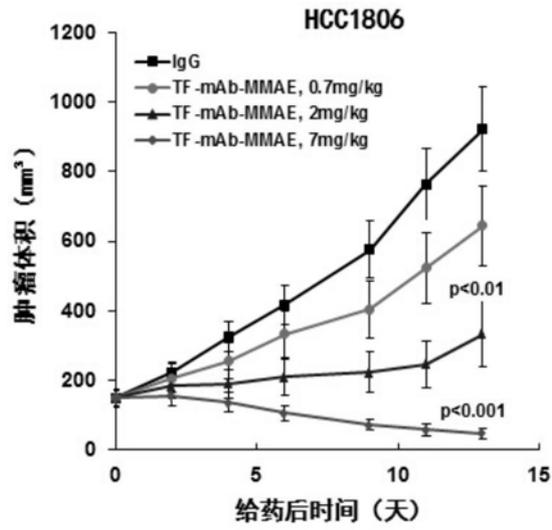


图6

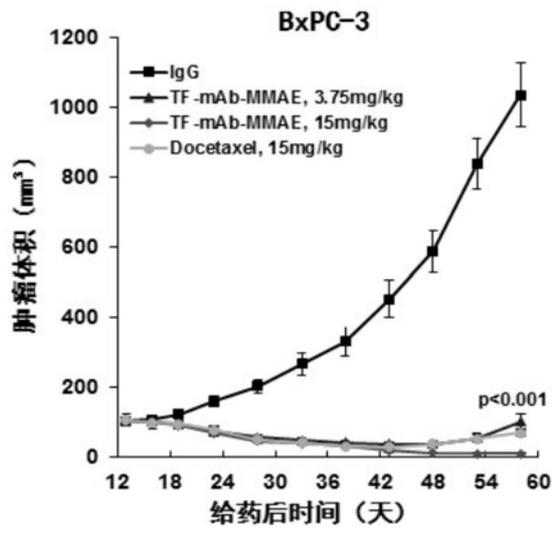


图7A

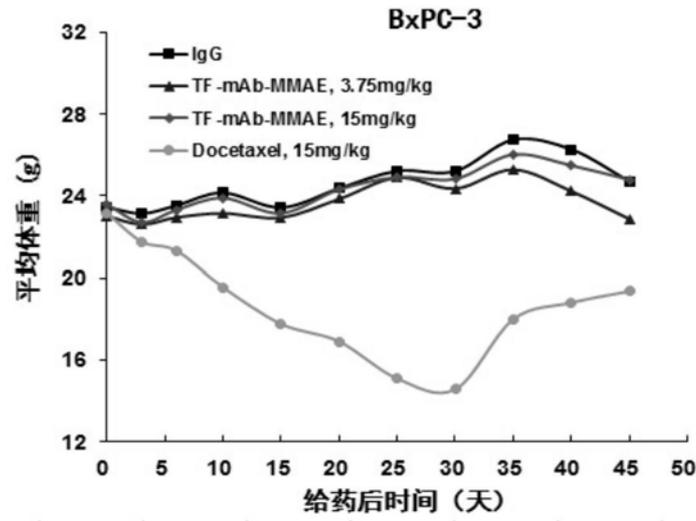


图7B

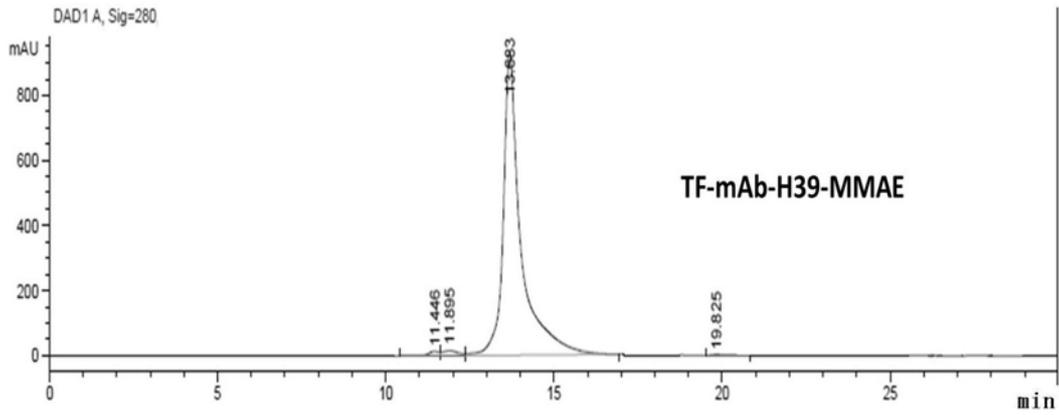


图8

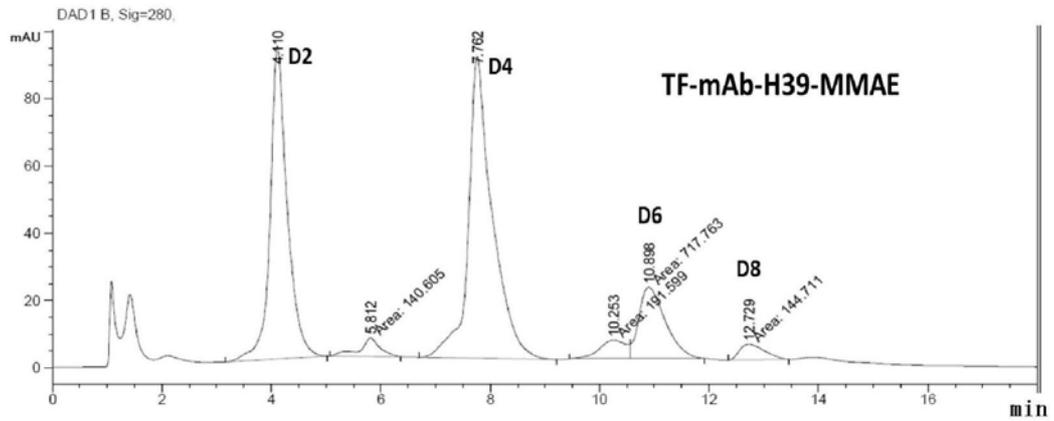


图9

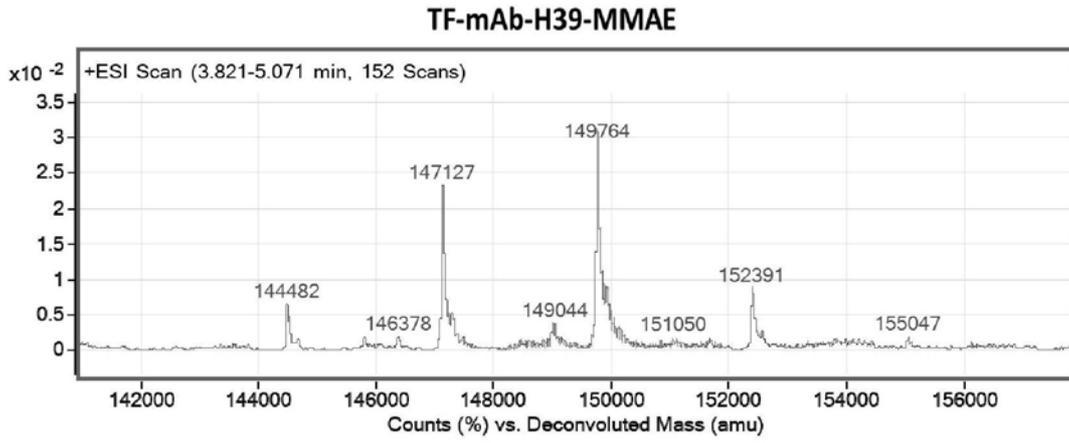


图10

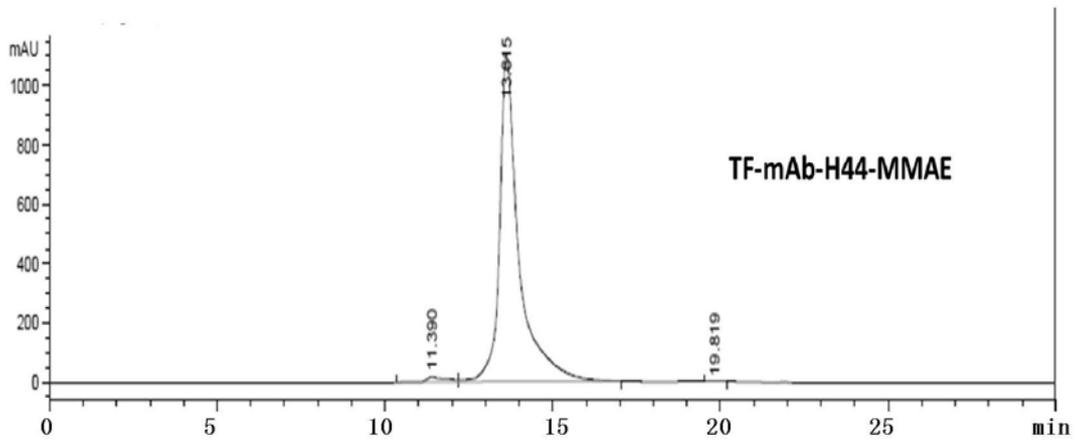


图11

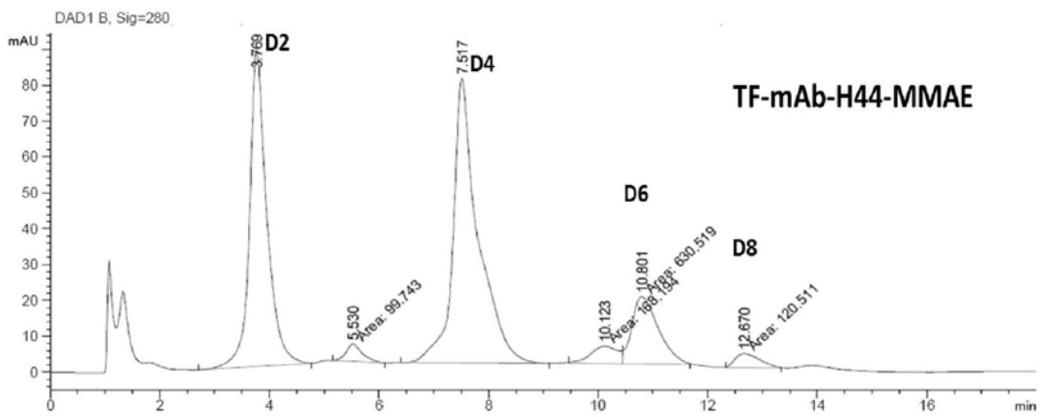


图12

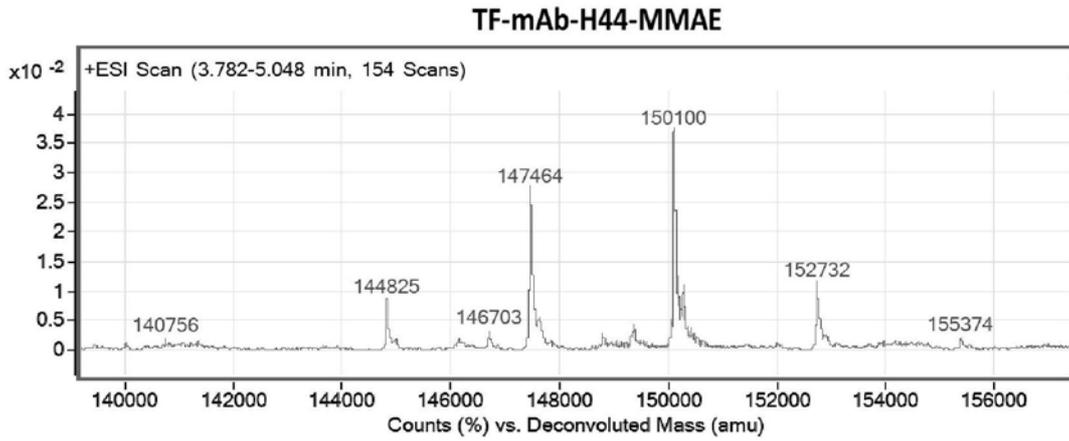
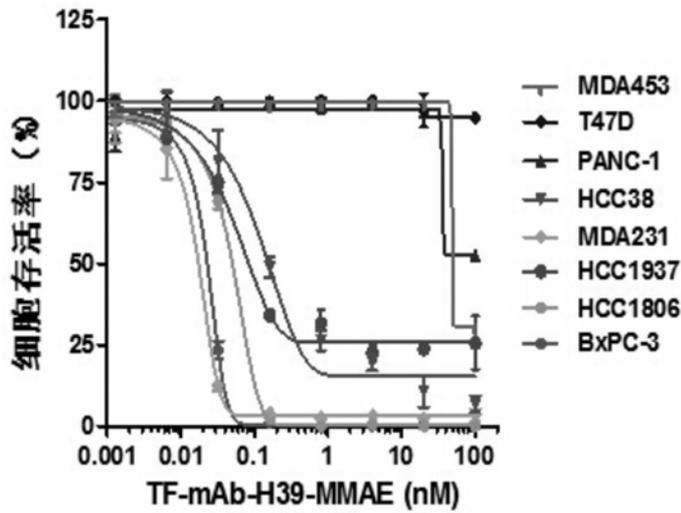


图13



<b>IC<sub>50</sub> (TF-mAb-H39-MMAE)</b>	
细胞株	浓度 (nM)
MDA453	>100
T47D	>100
PANC-1	>100
HCC38	0.180±0.028
MDA231	0.024±0.006
HCC1937	0.053±0.019
HCC1806	0.046±0.01
BxPC3	0.023±0.001

图14

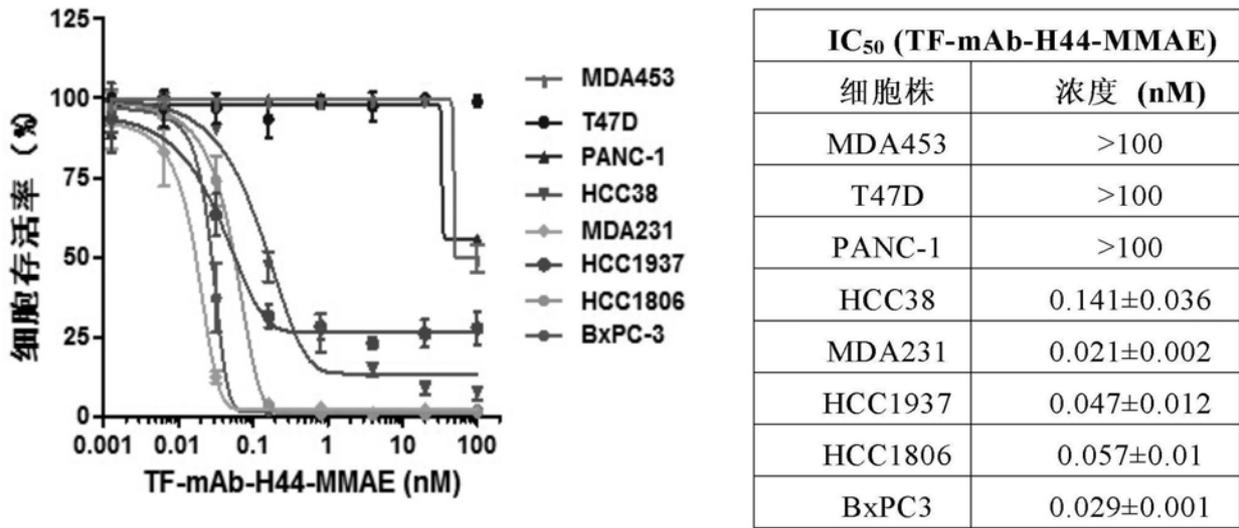


图15

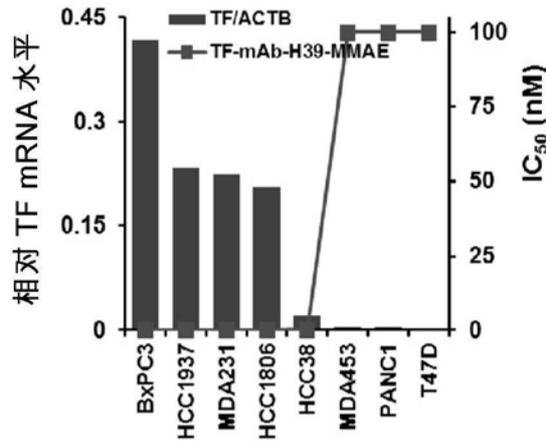


图16A

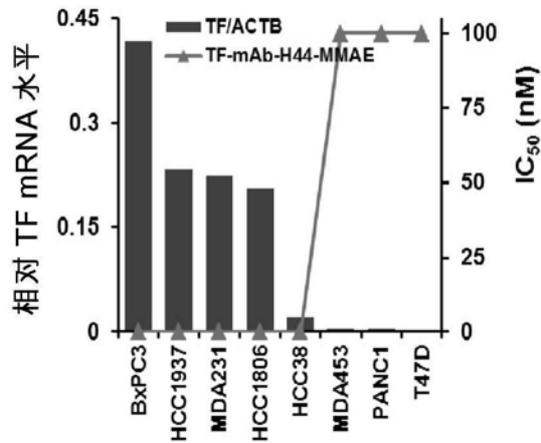


图16B

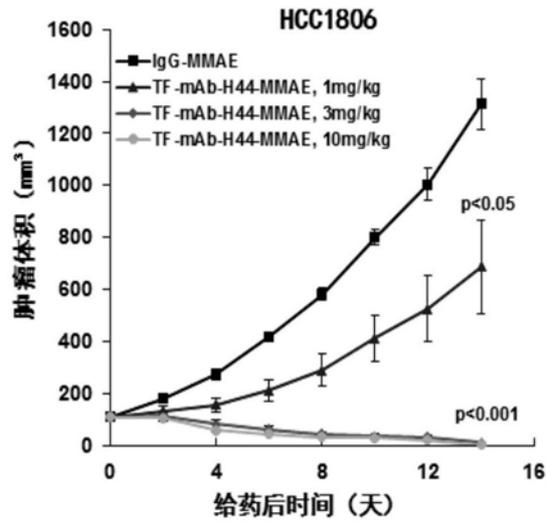


图17

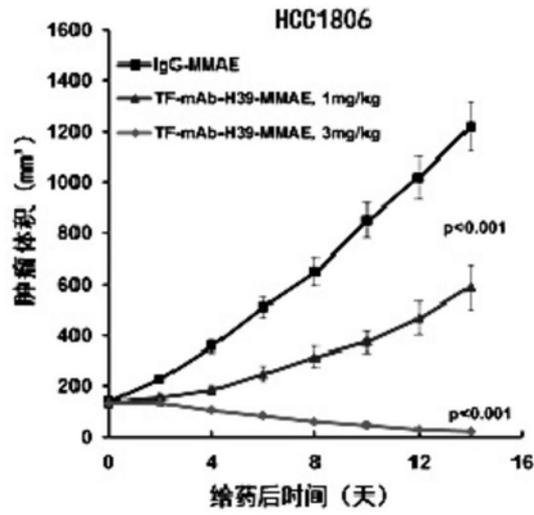


图18

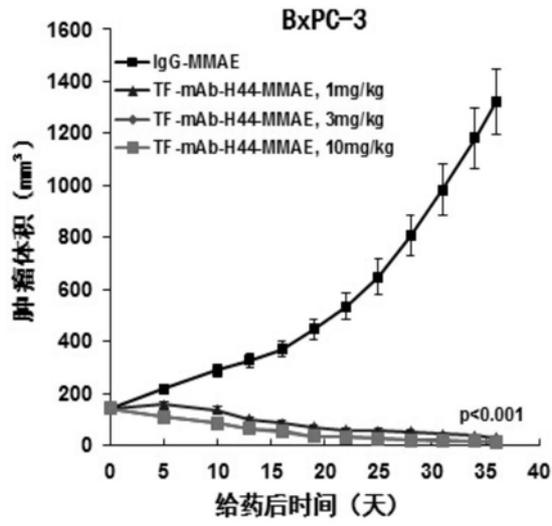


图19

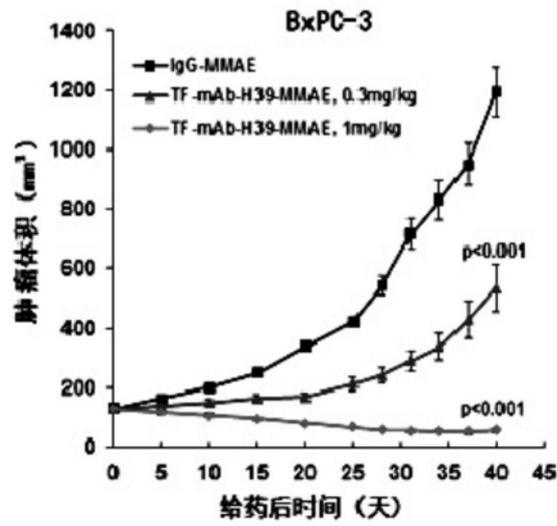


图20