



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112156184 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(21) 申请号 202010928244.1

(22) 申请日 2020.09.07

(71) 申请人 上海中医药大学附属曙光医院
地址 200021 上海市黄浦区普安路185号

(72) 发明人 潘亚敏 张林曦 常文军 朱江波

(74) 专利代理机构 上海申浩律师事务所 31280
代理人 赵建敏

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

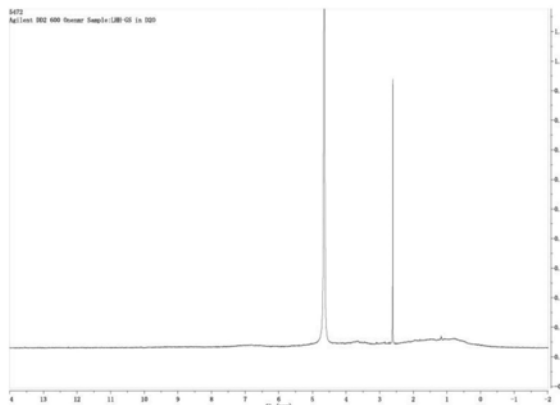
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54) 发明名称

靶向于EGFR的抗体偶联药物、制备方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术和药物领域,具体涉及一种靶向于EGFR的抗体偶联药物、制备方法。该抗体偶联药物由抗体、细胞毒性药物以及连接子组成,抗体为西妥昔单抗抗体,细胞毒性药物为雷公藤红素,连接子为琥珀酰亚胺酯接头。雷公藤红素先被改造成雷公藤红素琥珀酰亚胺酯形式,再与西妥昔单抗抗体的酰胺键反应制得抗体偶联药物。该偶联物具有西妥昔单抗和雷公藤红素两者的协同生物学功能,既能够靶向EGFR抗原,又有强烈的杀伤肿瘤细胞的活性。且相较于Cetuximab本身,并未影响抗体的亲和力,抑制性和靶向性,较好的保留了其生物学功能。在体外活性评价中,相较于CTX与CLS单用以及联用,等浓度的Cetuximab-SE-Celastrol效果更佳,在二者的协同作用下,表现出明显的抗肿瘤效果。



1. 一种靶向于EGFR的抗体偶联药物,其特征在于,该抗体偶联药物由抗体、细胞毒性药物以及连接子组成,所述抗体为西妥昔单抗克隆抗体,所述细胞毒性药物为雷公藤红素,所述连接子为琥珀酰亚胺酯接头,

所述雷公藤红素先被改造成雷公藤红素琥珀酰亚胺酯形式,再与西妥昔单抗克隆抗体的酰胺键反应制得抗体偶联药物。

2. 根据权利要求1所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物,其特征在于,所述的药物抗体偶联比为4。

3. 权利要求1所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物的制备方法,包括以下步骤:

(A) 雷公藤红素羧基集团活化

将雷公藤红素溶于干燥的DMF,加入1.2当量的琥珀酰亚胺酯接头和三乙胺,室温反应;检测反应完全后,加入乙醚沉降析出,得到雷公藤红素琥珀酰亚胺酯形式;

(B) 将步骤(A)中活化后的雷公藤红素溶于DMSO中,将西妥昔单抗用双蒸水溶解,再加入1/10体积的pH为8.8的碳酸钠溶液,而后将其加入至雷公藤红素溶液中;

(C) 4℃条件下孵育溶液4小时,孵育过程中每间隔一定时间轻轻翻动瓶子使两种反应物混合均匀,然后室温再孵育溶液4小时。

4. 根据权利要求3所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物的制备方法,其特征在于,还包括(D)抗体偶联药物的纯化步骤:

(D1) 将步骤(C)得到的产物,先透析去除雷公藤红素,然后加入至sepharose 4B层析柱中,置于摇床上室温反应2~4小时后,用0.01M tris base洗涤柱子三次以上,洗掉未结合的杂蛋白,而后用0.1mol/L、pH 2.5甘氨酸洗脱结合在柱子上的偶联药物;

(D2) 采用1mol/LNaHCO₃溶液中中和洗脱的偶联药物,而后将偶联药物溶液装入透析袋经PEG20000或者蔗糖浓缩8~10倍后,于0.01mol/L PBS中透析四次以上,每次换液间隔时间为1小时以上;

(D3) 将透析好的偶联药物用紫外可见分光光度计测定其在波长280nm处的吸光值,用吸光值除以1.35即为药物浓度,而后将所纯化的抗体加入30%-50%的甘油,并置于-20℃或者-80℃保存。

5. 根据权利要求3所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物的制备方法,其特征在于:

其中,步骤B中,雷公藤红素与西妥昔单抗间的摩尔比为1:1。

步骤C中,4℃条件孵育过程中,每10~15min轻轻翻动瓶子使两种反应物混合均匀。

6. 一种如权利要求1或2所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物在制备抗肿瘤药物中的应用。

7. 根据权利要求6所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物在制备抗肿瘤药物中的应用,其特征在于,所述的肿瘤为EGFR阳性实体肿瘤。

8. 一种抗肿瘤药物组合物,其特征在于,以权利要求1或2所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物为活性组分,还包括药学上可接受的载体。

9. 雷公藤红素在制备西妥昔单抗克隆抗体增敏剂中的应用。

靶向于EGFR的抗体偶联药物、制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体涉及靶向于EGFR的抗体偶联药物、制备方法及应用。

背景技术

[0002] 肿瘤的发病率和死亡率一直位于各种疾病前列,根据世界卫生组织国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC) 2018年的资料显示,2018年全世界约1800万癌症患者。目前针对肿瘤的内科治疗主要有三大块:放化疗、分子靶向治疗、免疫治疗。但耐药机制的产生,以及毒副作用较大,大大的降低了以上治疗方案的临床疗效。随着分子生物学的发展,抗体偶联药物治疗成为了肿瘤治疗的新方向。

[0003] 表皮生长因子受体(EGFR)是一种跨膜酪氨酸激酶受体,在大多数结直肠癌(CRC)细胞中呈高表达,当EGFR与体内的配体结合后会激活多条信号通路。其中明确的与肿瘤相关的信号通路有Ras/Raf/MEK/MAPK和PI3K/Akt等,激活可导致肿瘤细胞的增殖、抑制其凋亡、促进侵袭以及转移的发生,因此EGFR一直是结直肠癌肿瘤研究和治疗的一个重要靶点。

[0004] 西妥昔单抗抗体(Cetuximab, CTX)是针对EGFR受体的人-鼠嵌合的IgG1单克隆抗体,通过竞争性的与EGFR特异性结合,从而阻断EGFR下游信号通路,发挥抗肿瘤的作用。在靶向治疗过程中,由于基因突变以及多靶点以及多条信号通路的代偿性激活等原因,导致其运用受到局限,因此针对以上原因,联合其他药物或多细胞毒性药物有可能解决CRC耐药。

[0005] 雷公藤红素(Celastrol, CLS)是中药雷公藤的主要活性成分之一,对多种肿瘤均有较强的抑制作用。然而,雷公藤难溶于水,制成药物制剂有一定困难。此外,虽然CLS对肿瘤的抑制具有许多潜在靶点,但雷公藤对细胞的凋亡作用是非组织、器官和细胞特异的,且具有免疫抑制性以及细胞毒性,极大限制了其临床应用。靶向给药系统或许是解决雷公藤非特异性的有效方法。

[0006] ADC是以抗体作为载体(antibody),通过连接子(linker)连接细胞毒性药物(warhead),既提高了细胞毒药物的靶向性,减少其对其他组织的细胞毒性,又增加抗体的抗肿瘤活性,从整体上提高了治疗效果,实现“精准医疗”。目前已有三个ADC药物经FDA批准上市,即Gemtuzumab ozogamicin(MyloTarg),bretuximab vedotin(Adcetris),ado-trastuzumabemtansine(Kadcyla(T-DM1)),其中基因泰克研发的Trastuzumab Emtansine(Kadcyla),利用经典的曲妥珠单抗作为抗体,联合微管蛋白抑制剂DM1能达到曲妥珠单抗联合紫杉醇的协同治疗效应,上市之后取得了很好的销售业绩。

[0007] 借助CTX与CLS合成的抗体偶联药(Antibody-drug conjugate, ADC),增强CTX对肿瘤细胞的抑制作用,提高CLS的靶向性,减少CLS对周围健康细胞的毒性,将细胞毒性定点作用于肿瘤细胞,这无疑是CTX以及CLS的临床应用的新机会。

发明内容

[0008] 本发明的目的之一在于提供由西妥昔单抗克隆抗体 (Cetuximab, CTX) 和雷公藤红素 (Celastrol, CLS) 偶联形成的抗体偶联药物 Cetuximab-SE-Celastrol 及其制备方法。

[0009] 本发明的目的之二在于提供上述抗体偶联药物在制备抗肿瘤药物中的用途, 以及以其作为活性组分的抗肿瘤药物。

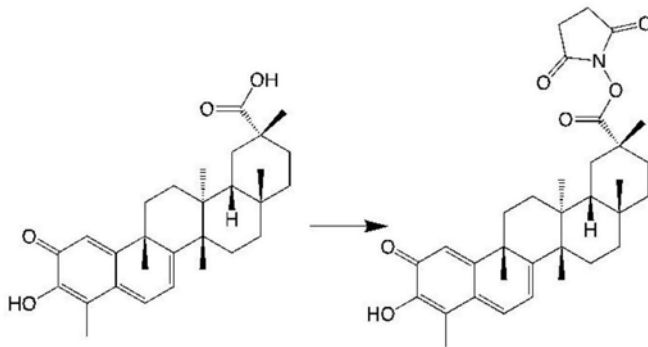
[0010] 本发明的目的之三在于提供雷公藤红素在制备西妥昔单抗克隆抗体增敏剂中的应用。

[0011] 为了实现目的一, 发明人先前期进行实验, 对二者的结合可能性进行探索, 实验发现 CLS 与 CTX 联用对多种 CRC 细胞有协同致死效应, 尤其对耐药性的 CRC 细胞, 提示 CLS 具有增敏 CTX 的作用 (图 1)。利用 CTX 与 CLS 各自的优势, 借助 CTX 与 CLS 合成的抗体偶联药能够增强 CTX 对肿瘤细胞的抑制作用, 并提高 CLS 的靶向性, 减少 CLS 对周围健康细胞的毒性, 将细胞毒性定点作用于肿瘤细胞。

[0012] 本发明提供的靶向于 EGFR 的抗体偶联药物, 命名为 Cetuximab-SE-Celastrol, 由抗体、作为弹头分子的细胞毒性药物以及连接子组成, 抗体为西妥昔单抗克隆抗体, 细胞毒性药物为雷公藤红素, 连接子为琥珀酰亚胺酯接头。

[0013] 连接子用于实现抗体与雷公藤红素间的连接, 将雷公藤红素 (式 I) 改造成雷公藤红素琥珀酰亚胺酯 (活化酯) 形式 (式 II), 然后抗体通过还原抗体链间酰胺键的化学方法与 SE-Celastrol 偶联。活化酯与西妥昔单抗克隆抗体的胺类具有很高的反应活性, 克服雷公藤红素与蛋白反应活性低, 结合效果差的缺陷。

[0014]



[0015]

式 I

式 II

[0016] 本发明的第二方面, 提供了上述靶向于 EGFR 的抗体偶联药物的制备方法, 包括如下工序:

[0017] 1、雷公藤红素羧基集团活化

[0018] 雷公藤红素与抗体之间的反应活性低, 难以直接结合。采用连接子将雷公藤红素的羧基基团活化, 改造成上述所述的雷公藤红素琥珀酰亚胺酯 (活化酯) 形式。

[0019] 将雷公藤红素溶于干燥的 DMF, 加入 1.2 当量的琥珀酰亚胺酯接头和三乙胺, 室温反应; 检测反应完全后, 加入乙醚沉降析出, 得到雷公藤红素琥珀酰亚胺酯形式。

[0020] 2、Celastrol 活化酯与抗体偶联

[0021] 目的: Celastrol 活化酯与抗体进行缩合反应, 获得抗体和 Celastrol 复合物。琥珀酰亚胺酯 (SE 或 NHS) 已被证明是最好的氨基修饰试剂, 因为它与氨基形成的酰胺键与天然蛋白中的酰胺键一样。

[0022] 反应过程:

[0023] (A) 反应溶液混合:将活化后的雷公藤红素溶于DMSO中,将西妥昔单抗用双蒸水溶解,再加入1/10体积的pH为8.8的碳酸钠溶液,而后将其加入至雷公藤红素溶液中。该过程中,雷公藤红素与西妥昔单抗间的摩尔比为1.5:1。

[0024] (B) 孵育:4℃条件下孵育溶液4小时,孵育过程中每间隔一定时间(如10~15min)轻轻翻动瓶子使两种反应物混合均匀,然后室温再孵育溶液4小时。

[0025] (C) 纯化:通过透析-层析-透析的方式进行,先透析去除未反应的雷公藤红素,然后层析纯化,再经透析浓缩。

[0026] 根据上述方法制备出Cetuximab-SE-Celastrol,其平均药物抗体偶联比率(DAR)在4左右,裸抗及偶联率为8的组分均低于5%,单体含量大于95%,且质量稳定可控,重复性好,收率可观,且并未影响抗体的稳定性。

[0027] 本发明的第三方面,提供了上述抗体偶联药物在制备抗肿瘤药物中的用途。

[0028] 通过体外细胞的增殖和克隆实验,与单独使用CLS与CTX单药,偶联药物对CTX耐药的CRC细胞存在较强的协同抑制作用。相对于CLS与CTX单药联用,偶联药物的用药量极低,对机体的毒副作用小。

[0029] 所述肿瘤为EGFR阳性实体肿瘤,包括食管癌,鳞状上皮细胞癌,肺癌,乳腺癌,胰腺癌,头颈癌,结肠癌,前列腺癌,骨肉瘤癌,在这些肿瘤中,EGFR均呈阳性表达,且作用机理类似。

[0030] 本发明的第四方面,提供了以上述抗体偶联药物作为活性组分的抗肿瘤药物,还包括药学上允许的佐剂。抗肿瘤药物形式不限,如可以为片剂、注射剂、冻干剂、滴剂等。

[0031] 本发明的有益效果为:

[0032] 1、本发明偶联物具有西妥昔单克隆抗体和雷公藤红素两者的协同生物学功能,既能够靶向EGFR抗原,又有强烈的杀伤肿瘤细胞的活性。且相较于Cetuximab本身,并未影响抗体的亲和力,抑制性和靶向性,较好的保留了其生物学功能。在体外活性评价中,相较于CTX与CLS单用以及联用,等浓度的Cetuximab-SE-Celastrol效果更佳,在二者的协同作用下,表现出明显的抗肿瘤效果。

[0033] 2、本发明偶联物通过西妥昔单克隆抗体与肿瘤细胞表面的EGFR受体特异结合,发生内吞作用将雷公藤红素转运到肿瘤细胞内释放发挥作用。本发明制备的抗体偶联物对EGFR阳性细胞具有靶向作用,既可以增强对EGFR阳性肿瘤细胞的杀伤,也可减少雷公藤红素单独给药对正常细胞产生的毒副作用,对EGFR阳性表达的肿瘤细胞引起的癌症有巨大潜在治疗应用价值。

附图说明

[0034] 图1为雷公藤红素(CLS)与西妥昔单克隆抗体(CTX)联合使用对CTX耐药结直肠癌细胞的协同抑制作用结果,其中(A)为对细胞增殖的抑制结果,(B)为克隆形成实验结果;

[0035] 图2为本发明靶向于EGFR的抗体偶联药物的合成路径示意图;

[0036] 图3为抗体偶联药物的核磁检测结果;

[0037] 图4为西妥昔单抗标记前后的核磁报告,其中(A)为单独西妥昔单抗的核磁,(B)为标记后的核磁;

[0038] 图5为抗体偶联药物的紫外吸收检测结果,其中(A)为整体检测结果,扫描范围200~800nm,(B)为有效截取区段,效截取区段 $\lambda_{\max}=425\text{nm}$;

[0039] 图6为CLS+CTX偶联药物、CLS、CTX以及两者单药联用对Caco-2细胞的抑制作用。

具体实施方式

[0040] 下面结合实施例对本发明提供的具体实施方式作详细说明。

[0041] 实施例1:雷公藤红素(CLS)对西妥昔单抗克隆抗体(CTX)的增敏作用

[0042] 选取人结肠癌细胞系HCT116、SW480以及人结直肠癌细胞系Caco2作为实验细胞。按照供应商提供的条件进行细胞培养,并将每组细胞系分别分为四组:对照组、CLS组、CTX组、联用组(CLS+CTX)。

[0043] HCT116细胞采用含10%FBS的DMEM培养基进行培养;SW480采用含10%FBS的1640培养基进行培养;人Caco2细胞采用含10%FBS的DMEM培养基进行培养,皆放于37℃、5%二氧化碳培养箱中培养。

[0044] 克隆形成:将上述细胞按2000个/孔接种于6孔板,按照选定浓度分别加入CLS、CTX及其联合,每天观察克隆形成状态,1-2周后用甲醛固定,结晶紫染色,利用Image J软件计数克隆形成情况,并比较。

[0045] 增殖实验:用CCK8试剂盒并按照说明操作,1-3天后用酶标仪测量并计算增殖情况。

[0046] 根据图1(A)中的细胞增殖实验以及图1(B)中的克隆形成实验结果,0.5 μM CLS和10nM CTX均对于癌细胞存在一定抑制率,但效果不及0.5 μM CLS和10nM CTX联用,二者联用对癌细胞的增值率具有明显抑制作用,尤其对SW480细胞和HCT116细胞。说明CLS和CTX联用对CRC细胞具有协同抑制作用,尤其对耐药性的CRC细胞,提示CLS具有增敏CTX的作用。

[0047] 实施例2:Cetuximab-SE-Celastrol偶联抗体合成

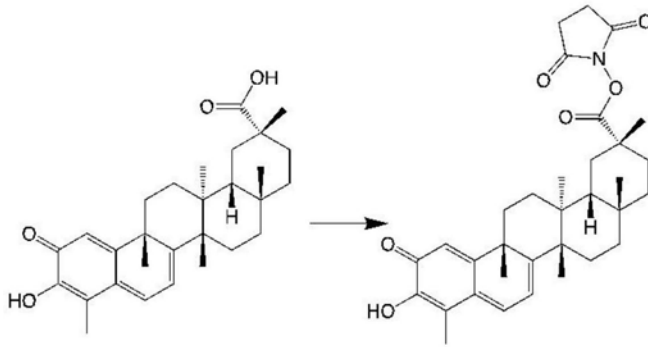
[0048] 1、原料

[0049] 该偶联抗体由西妥昔单抗克隆抗体(Cetuximab)、细胞毒性药物雷公藤红素(Celastrol)和连接子组成。Cetuximab单克隆抗体为人鼠嵌合抗体,分子量约为1190kDa,购自上海中医药大学附属曙光医院;雷公藤红素(Celastrol),购自MCE公司;连接子为琥珀酰亚胺酯(SE)接头。

[0050] 2、雷公藤红素羧基集团活化

[0051] 雷公藤红素与抗体之间的反应活性低,难以直接结合。采用连接子将雷公藤红素(式I)的羧基集团活化,改造成式II所示的雷公藤红素琥珀酰亚胺酯(活化酯)形式。琥珀酰亚胺酯(SE或NHS)已被证明是最好的氨基修饰试剂,因为它与氨基形成的酰胺键与天然蛋白中的酰胺键一样。

[0052]



[0053]

式 I

式 II

[0054] 将1eq雷公藤红素溶于干燥的DMF,而后加入1.2eq的琥珀酰亚胺酯接头和三乙胺0.1mL,室温4反应;检测反应完全后,加入乙醚沉降析出,得到雷公藤红素琥珀酰亚胺酯(Celastrol-SE)形式。

[0055] 3、Celastrol活化酯与抗体偶联

[0056] (A) 反应溶液混合:将活化后的雷公藤红素溶于DMSO中,将西妥昔单抗用双蒸水溶解,再加入1/10体积的pH为8.8的碳酸钠溶液,而后将其加入至雷公藤红素溶液中。西妥昔单抗(MW=2756.23)与雷公藤红素(MW=450.61)摩尔比优选为1.5:1。

[0057] (B) 孵育:4℃条件下孵育溶液4小时,孵育过程中每间隔一定时间(如10~15min)轻轻翻动瓶子使两种反应物混合均匀,然后室温再孵育溶液4小时,完成偶联反应。

[0058] (C) 纯化:通过透析-层析-透析的方式进行,先透析去除未反应的雷公藤红素,然后层析纯化,再经透析浓缩。具体步骤如下:

[0059] (1) 透析:用1L缓冲液常温透析4小时除去未标记上的雷公藤红素;更换1L新鲜缓冲液,在4℃冰箱里,透析过夜,进一步去除残留的雷公藤红素;更换1L新鲜缓冲液,常温透析4小时。根据缓冲液的颜色深浅,自行缩短或延长透析时间。

[0060] (2) 制备sepharose 4B层析柱,称取经CNBr活化的sepharose 4B 0.5g,溶于2mM的HCL溶液中,4℃过夜,使其充分溶胀;将溶胀好了的sepharose 4B预装于层析柱中,用10倍体积的2mM HCL溶液洗涤三次后用0.1M NaHCO₃溶液对柱子进行平衡;将5mg proteinA/G溶于0.1M NaHCO₃溶液中,加入至已平衡好的柱子上,置于摇床上轻轻混合,2~8℃过夜或者室温2~4小时;用0.1MNaHCO₃溶液洗涤已经结合了蛋白的柱子三次,事先留取已经结合过的上清,用紫外可见分光光度计测定结合后上清中蛋白的浓度,以确定结合率;用0.01M tris base平衡柱子三次,加入0.5%BSA封闭sepharose 4B上未结合的位点,置于摇床上在室温反应2到4小时,最后用0.01M tris base平衡柱子3次。

[0061] (3) 将上步骤得到的产物,先加入至sepharose 4B层析柱中,置于摇床上室温反应2~4小时后,用0.01M tris base洗涤柱子三次以上,洗掉未结合的杂蛋白,而后用0.1mol/L、pH2.5甘氨酸洗脱结合在柱子上的偶联药物。

[0062] (4) 采用1mol/LNaHCO₃溶液中和洗脱的偶联药物,而后将偶联药物溶液装入透析袋经PEG20000或者蔗糖浓缩8~10倍后,于0.01mol/LPBS中透析四次以上,每次换液间隔时间为1小时以上。

[0063] (5) 将透析好的偶联药物用紫外可见分光光度计测定其在波长280nm处的吸光值,用吸光值除以1.35即为药物浓度,而后将所纯化的抗体加入30%-50%的甘油,并置于-20

℃或者-80℃保存。

[0064] 根据上述方法制备出Cetuximab-SE-Celastrol偶联抗体,其平均药物抗体偶联比率(DAR)在4左右,裸抗及偶联率为8的组分均低于5%,单体含量大于95%,质量稳定可控,重复性好,收率可观,并未影响抗体的稳定性。

[0065] 偶联药物的核磁检测结果如图3所示,图4(A)为单独西妥昔单抗的核磁,图4(B)是标记后的核磁。根据图3和图4的两份核磁报告的对比,可以验证出已将雷公藤红素标记到西妥昔单抗。

[0066] 再结合图5的紫外吸收检测结果,检测在425nm处雷公藤红素有最大吸收峰,可以验证出已将雷公藤红素标记到西妥昔单抗。

[0067] 实施例3:偶联抗体对Caco-2细胞的抑制作用

[0068] Caco2细胞的培养方式同实施例一,将细胞分为五组:对照组、CLS组、CTX组、联合用药组(CLS+CTX)以及偶联抗体用药组。对照组不添加任何药物,其余四组各至少包括两个浓度条件:CLS组分别添加0.25nmol/mL和0.5nmol/mL CLS;CTX组分别添加400μg/mL和600μg/mL的CTX;联合用药组分为四组组合,如下:0.25nmol/mLCLS+400μg/mLCTX、0.25nmol/mLCLS+600μg/mLCTX、0.5nmol/mLCLS+400μg/mLCTX、0.5nmol/mLCLS+600μg/mLCTX;偶联药物组分别添加20nmol/mL和40nmol/mL的偶联药物。

[0069] 克隆形成实验结果如图6(A)所示,图中不同克隆实验结果对应的药物浓度如图6(B)所示。根据图6(A),癌细胞抑制率与药物浓度正相关;单独用药时,CLS对癌细胞的抑制率优于CTX单独给药;相对于单独给药,联合用药的细胞抑制效果更好,但次于偶联药物组,且偶联药物组的药物用量更低。

[0070] 综上所述,本发明所述的靶向于EGFR的抗体偶联药物Cetuximab-SE-Celastrol具有明显的抗EGFR阳性肿瘤活性,且具有良好的靶向性,能将小分子毒性药物转运到肿瘤部位,提供了一种新型的用于治疗EGFR阳性的实体肿瘤的抗体偶联药物。

[0071] 以上已对本发明创造的较佳实施例进行了具体说明,但本发明创造并不限于所述实施例,熟悉本领域的技术人员在不违背本发明创造精神的前提下还可做出种种的等同的变型或替换,这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

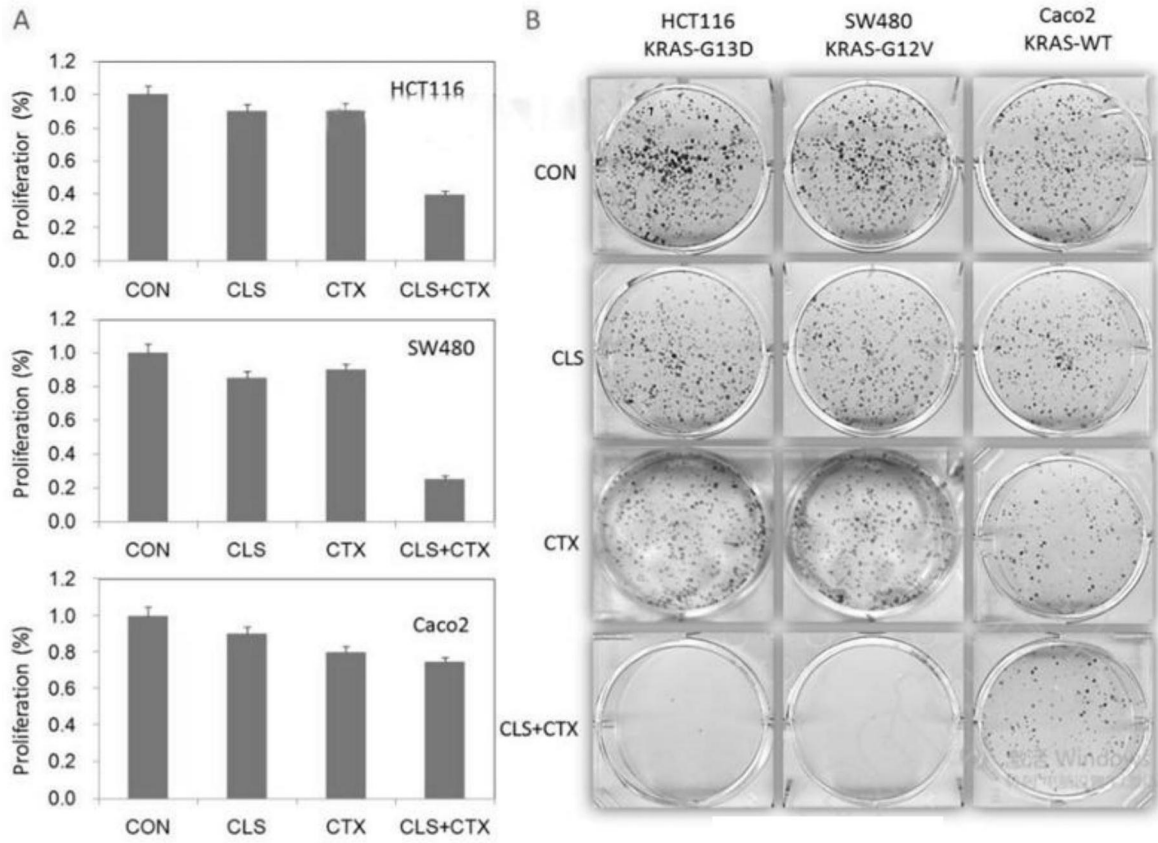


图1

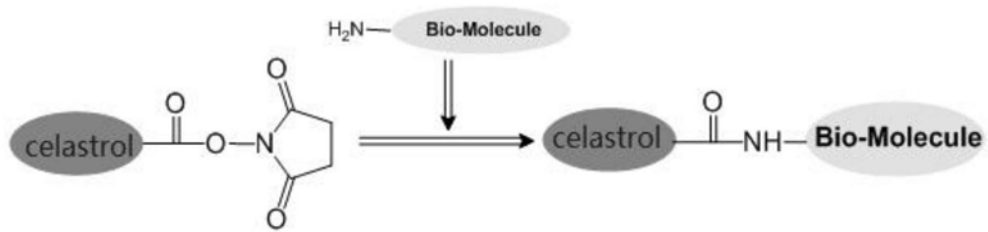


图2

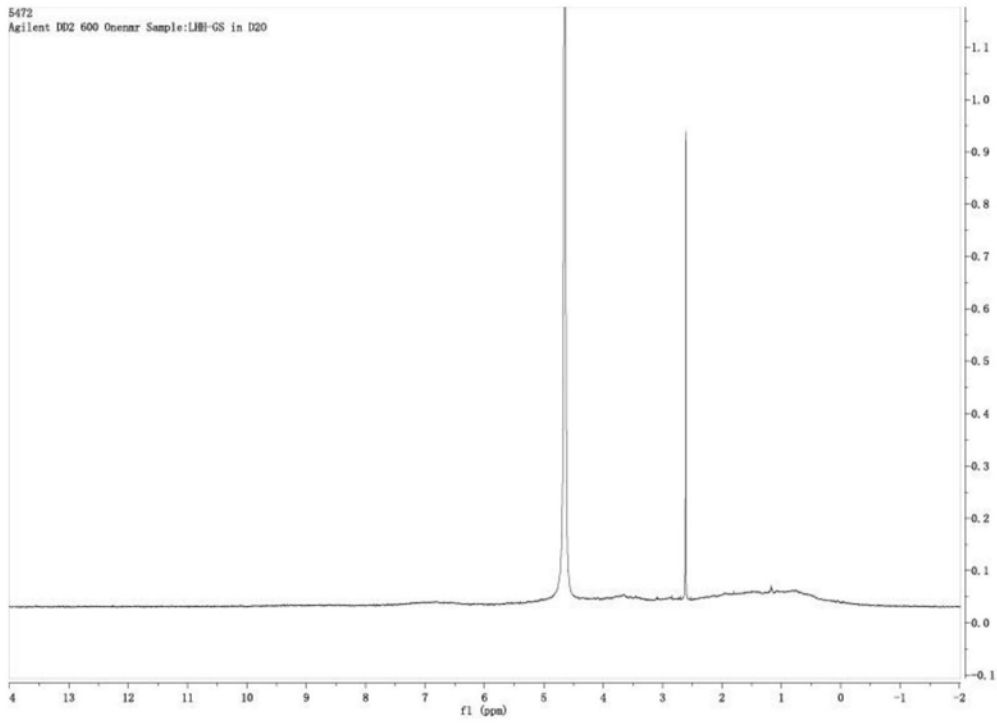


图3

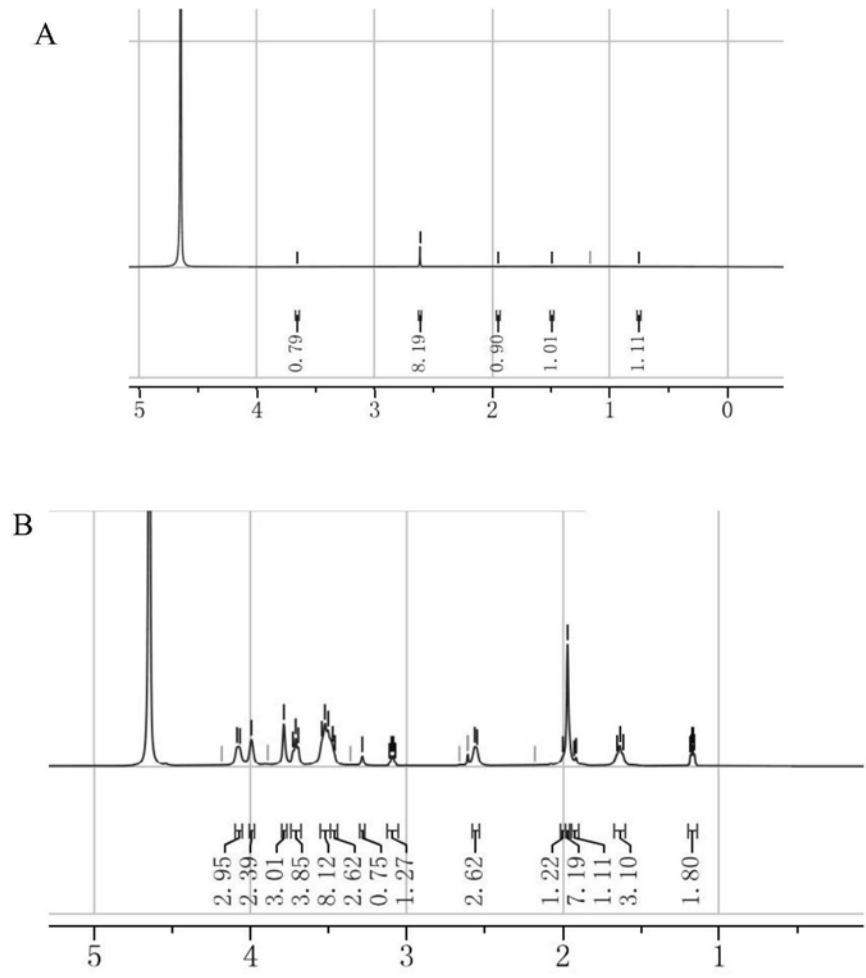
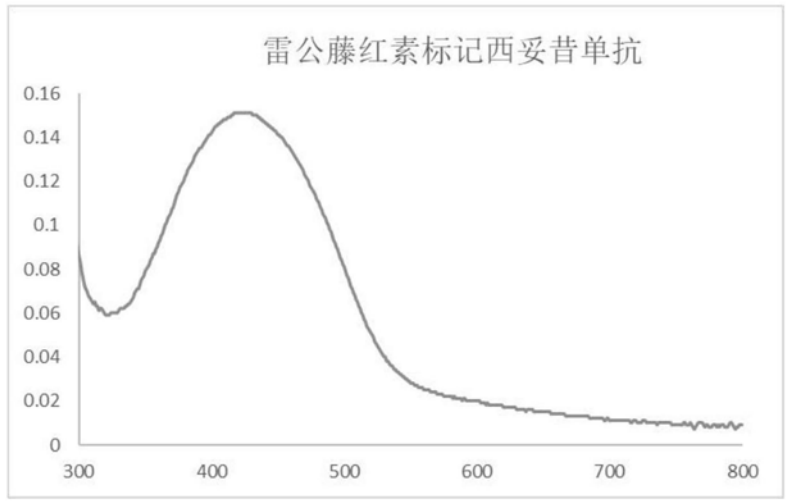
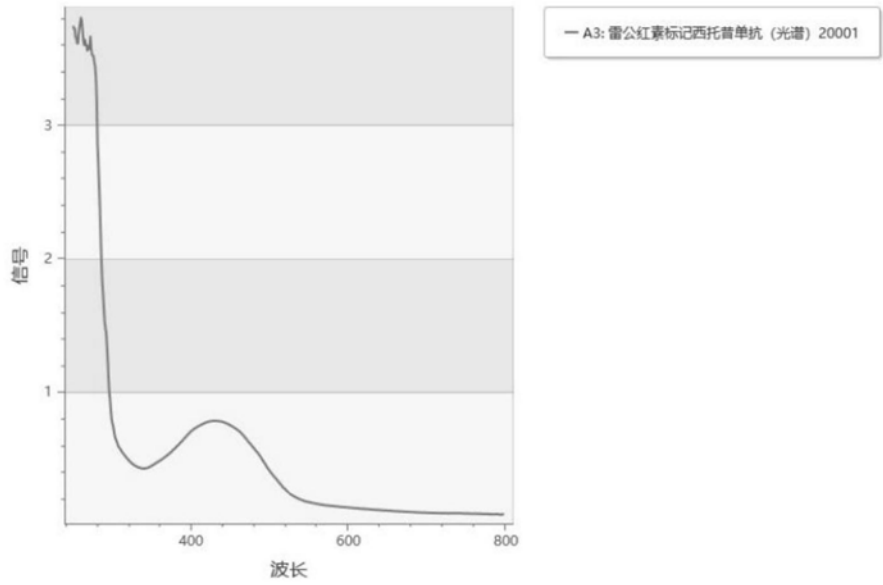


图4

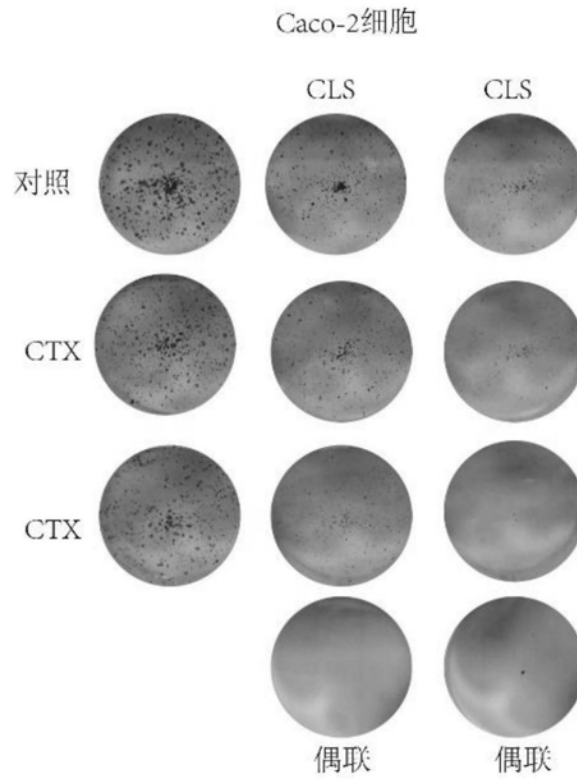


(A)



(B)

图5



(A)

CTX 组 (μg/mL)	0	0.25	0.5	} CLS 组(nmol/mL)
	400	0.25+400	0.5+400	
	400	0.25+600	0.5+600	} 联合用药组
		20	40	

(B)

图6