



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108066772 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201611000747.2 *A61K 31/704* (2006.01)

(22) 申请日 2016.11.14 *A61K 31/551* (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号 *A61K 45/00* (2006.01)

申请公布号 CN 108066772 A *A61P 35/00* (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.05.25 审查员 齐丹丹

(73) 专利权人 中国科学院上海药物研究所
地址 201203 上海市浦东新区张江祖冲之
路555号

(72) 发明人 王春河

(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 陆凤 马莉华

(51) Int. Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 31/40 (2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表2页 附图7页

(54) 发明名称

靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体 (ADC) 分子

(57) 摘要

本发明涉及靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体 (ADC) 分子。具体地,本发明公开了一种靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体,实验结果表明,所述抗体与药物偶联体具有显著的抗肿瘤效果。本发明还公开了所述靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体的制药用途,及其在抑制或预防肿瘤中的作用。

1. 一种抗体与药物偶联体 (ADC) 或其药学上可接受的盐, 其特征在于, 所述抗体与药物偶联体结构如下式所示:



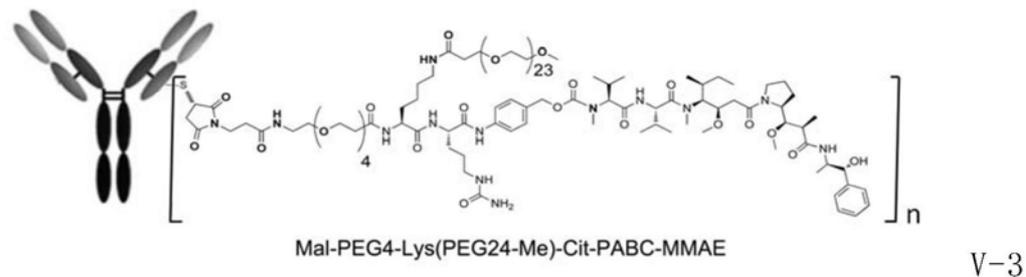
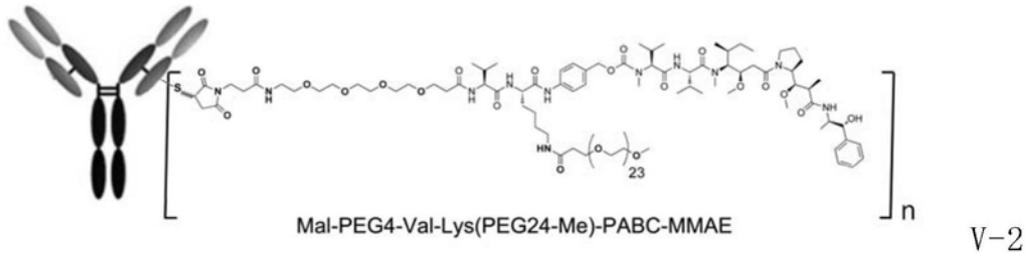
其中,

Ab表示抗体, 且Ab为hRS7;

D为具有细胞毒性的小分子药物单甲基澳瑞他汀;

L为连接所述抗体和所述药物的接头;

所述抗体与药物偶联体 (ADC) 如式V-2或V-3所示:



PEG_x为PEG28;

n为偶联于所述抗体的所述药物的平均偶联数量, 可以是整数或非整数的正数, 且 $1 \leq n \leq 8$;

“-”为键或接头。

2. 如权利要求1所述的抗体与药物偶联体, 其特征在于, n为1-7的整数或非整数的正数。

3. 如权利要求1所述的抗体与药物偶联体, 其特征在于, 所述抗体hRS7具有以下特征:

(a) 所述抗体hRS7的轻链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO.:1所示的序列; 和/或

(b) 所述抗体hRS7的重链可变区的氨基酸序列为SEQ ID NO.:2所示的序列。

4. 一种药物组合物, 其特征在于, 所述药物组合物包含权利要求1-3任一项所述的抗体与药物偶联体, 以及药学上可接受的载体。

5. 如权利要求1-3任一项所述的抗体与药物偶联体或如权利要求4所述的药物组合物的用途, 其特征在于, 用于制备抗肿瘤的药物。

6. 如权利要求5所述的用途, 其特征在于, 所述肿瘤选自下组: 乳腺癌、胃癌、卵巢癌、小细胞和非小细胞肺癌、宫颈癌、子宫癌, 食道癌、头颈癌、胰腺癌、大肠癌、膀胱癌、肝癌、前列腺癌以及其它高表达TACSTD2的实体肿瘤。

7. 一种制备权利要求1所述的抗体与药物偶联体的方法, 其特征在于, 所述方法包括步骤:

(1) 提供一反应体系, 所述反应体系中包括抗体和药物分子, 所述药物分子连接有接

头；

(2) 在所述反应体系中,将所述抗体和药物分子进行偶联反应,从而制得权利要求1所述的抗体与药物偶联体。

8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述反应体系的pH为6.0-8.0。

9. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述抗体与药物分子的摩尔比为1:1~1:20。

10. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,反应时间为1h~48h。

靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体(ADC)分子

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体地说,本发明涉及靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体(ADC)分子。

背景技术

[0002] 肿瘤相关的钙信号传导者2(Tumor associated calcium signal transducer 2, TACSTD2),又称Trop-2、EGP-1、MS-1、Gp-15、T-16和GA733-1,是一个分子量为45kDa的呈单体形式的一型跨膜糖蛋白。根据基因序列推测,它的蛋白序列含有信号肽(26个氨基酸残基)、胞外区(248个氨基酸残基)、跨膜区(23个氨基酸残基)和胞内区(26个氨基酸残基)。

[0003] 在多种上皮源性的实体肿瘤(如乳腺癌、宫颈癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、胰腺癌和前列腺癌等)组织中,TACSTD2均高比例地过量表达。比如有76%的乳腺癌、55%的胰腺癌和56%的胃癌病人的病灶细胞过量表达该抗原。临床资料表明TACSTD2的表达水平与肿瘤的侵袭性呈正相关,而与患者的预后呈负相关。在癌变细胞上,TACSTD2是一个具有信号传导功能的致癌基因。它可能通过抗体交联或胞内片段部分的剪切而被激活。激活以后,它的胞内区被磷酸激酶C磷酸化,并介导钙信号的传递。钙信号可以激活或上调多种促进细胞分裂和生长的信号传导分子,如NF κ B、cyclin D-1和ERKs等,从而加速细胞的生长、侵袭和转移。另外,还有大量的TACSTD2表达在癌变细胞内部,表达量因细胞种类的不同而差异很大,可能是一种对TACSTD2功能的调控手段。TACSTD2在肿瘤细胞与正常细胞之间表达量和功能的巨大差异使它成为一个理想的药物作用靶点。

[0004] 抗体与药物偶联体(Antibody-Drug Conjugate,ADC)是应用单克隆抗体来引导小分子化合物载荷(payload)靶向性地杀伤癌变细胞或肿瘤组织的一类生物大分子药物。

[0005] 本领域技术人员致力于开发新的、更有效的靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体(ADC)分子。

[0007] 在本发明的第一方面中,提供了一种抗体与药物偶联体(ADC)或其药学上可接受的盐,所述抗体与药物偶联体结构如式I所示:

[0008] Ab-(L-D) $_n$ I

[0009] 其中,

[0010] Ab表示抗体,且Ab为hRS7;

[0011] D为具有细胞毒性的小分子药物,所述小分子药物选自下组:单甲基澳瑞他汀(monomethyl auristatin)、加利车霉素、美登素类、多柔比星(阿霉素)、吡咯苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiazepine)(PBD)、多卡霉素(duocarmycin),或其组合;

[0012] L为连接所述抗体和所述药物的接头;

[0013] n为偶联于所述抗体的所述药物的平均偶联数量,可以是整数或非整数的正数,且 $0.8 \leq n \leq 8$;

[0014] “-”为键或接头。

[0015] 在另一优选例中,式I中,n为偶联于所述抗体的所述药物的平均偶联数量,也是药物与抗体的比率(drug antibody ratio),又称DAR值。

[0016] 在另一优选例中,n为1-7的整数或非整数的正数。

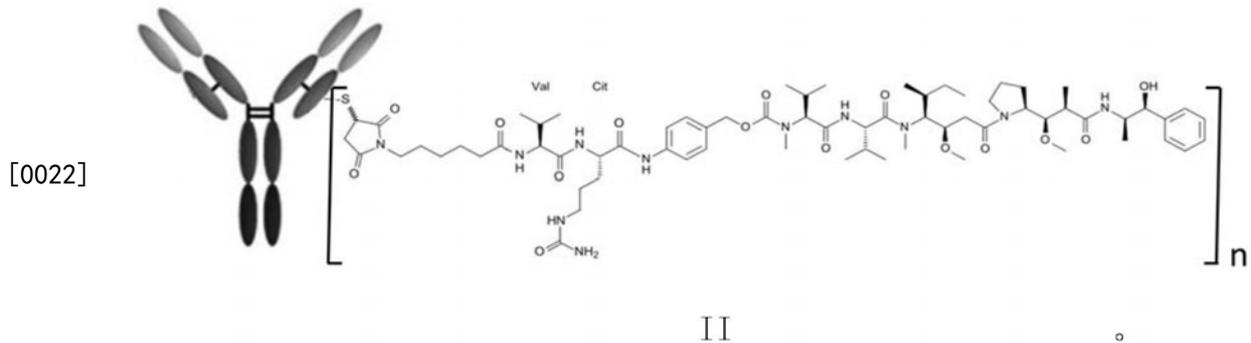
[0017] 在另一优选例中,n为1-6的整数或非整数的正数;较佳地,为2-6的整数或非整数的正数;更佳地,为2-4的整数或非整数的正数。

[0018] 在另一优选例中,D为单甲基澳瑞他汀-E(MMAE)、单甲基澳瑞他汀-D(MMAD)、单甲基澳瑞他汀-F(MMAF)、多柔比星、吡咯苯并二氮杂卓、多卡霉素,或其组合。

[0019] 在另一优选例中,L为mc (maleimidocaproyl, 马来酰亚胺己酰基) -vc (valine-citrulline, 缬氨酸-瓜氨酸) -PABC (para-aminobenzoyloxycarbonyl, 对氨基苄氧羰基)。

[0020] 在另一优选例中,L为MCC (maleimidomethyl cyclohexane-I-carboxylate, 马来酰亚胺甲基环己基-I-羧酸酯基) -vc-PABC。

[0021] 在另一优选例中,L为mc-vc-PABC,D为MMAE时,所述的抗体与药物偶联体为hRS7-[mc-vc-PABC-MMAE]_n(可简略为hRS7-[vc-MMAE]_n或hRS7-vc-MMAE),其中,n为1-8的正数,其结构如式II所示:



[0023] 在另一优选例中,L中包含x个寡聚的聚乙二醇PEG(可用PEG_x表示,其中,x为聚乙二醇PEG的重复个数),且x为1-28的整数。

[0024] 在另一优选例中,当L中包含x个寡聚的聚乙二醇PEG时,所述抗体与药物偶联体可以表示为Ab-(L(PEG_x)-D)_n。

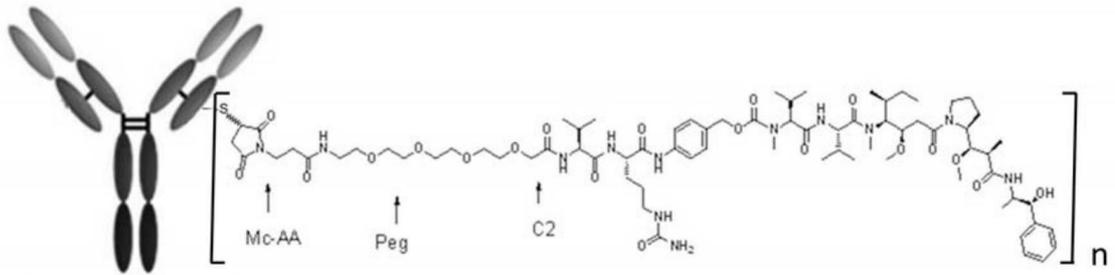
[0025] 在另一优选例中,所述PEG_x可选自下组的一个或多个:PEG2、PEG4、PEG6、PEG8、PEG12、PEG16、PEG24、PEG28等,其中,PEG后的数字代表PEG的重复个数。

[0026] 在另一优选例中,所述抗体与药物偶联体为hRS7-[L(PEG_x)-MMAE]_n,其中x为PEG的重复个数,优选为1-28的整数;较佳地,为4-24的整数。

[0027] 在另一优选例中,所述抗体与药物偶联体为hRS7-[mc-PEG_x-vc-PABC-MMAE]_n(可简略为hRS7-vc(PEG_x)-MMAE),其中x为PEG的重复个数,优选为1-64的整数;较佳地,为4-24的整数。

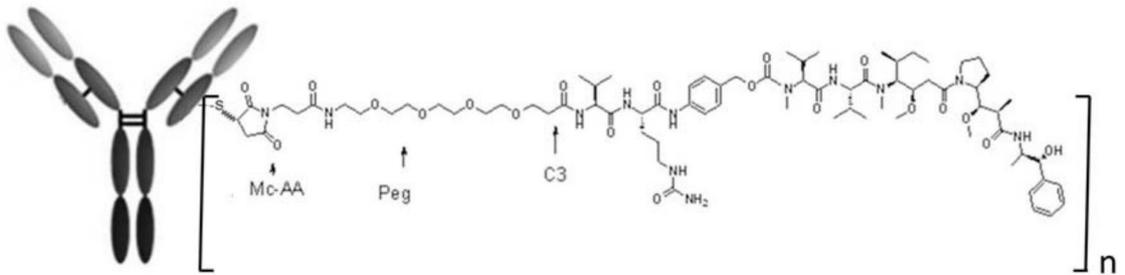
[0028] 在另一优选例中,PEG可以与马来酸连接。

[0029] 在另一优选例中,所述抗体与药物偶联体(ADC)如式III或IV所示:



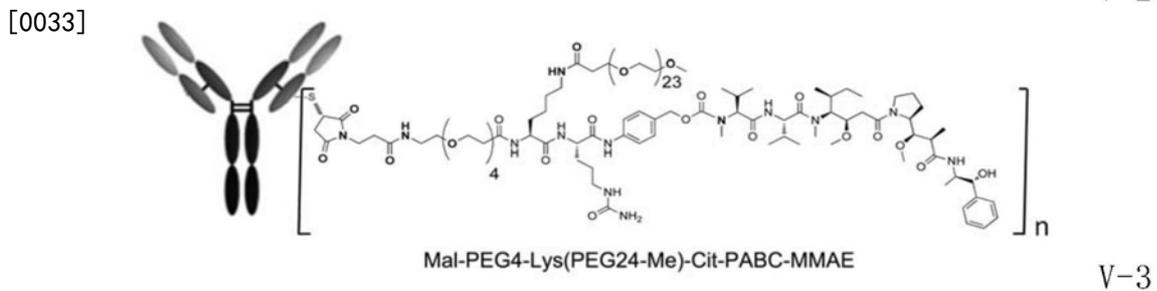
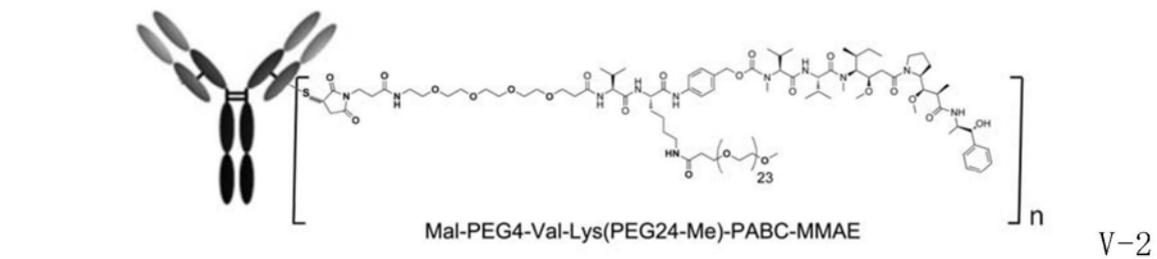
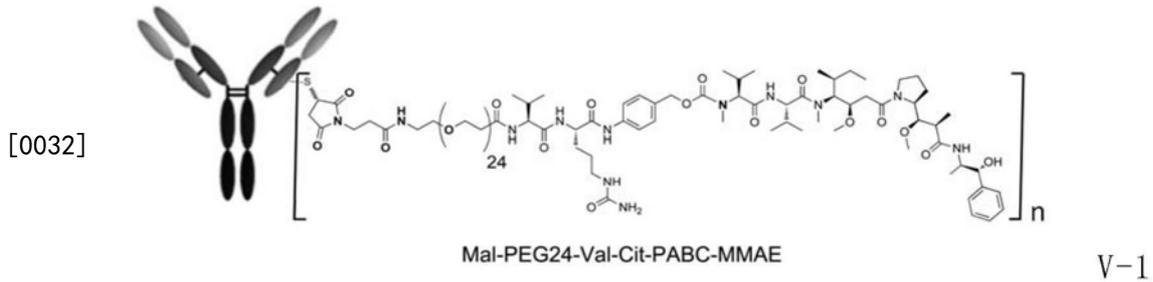
III

[0030]

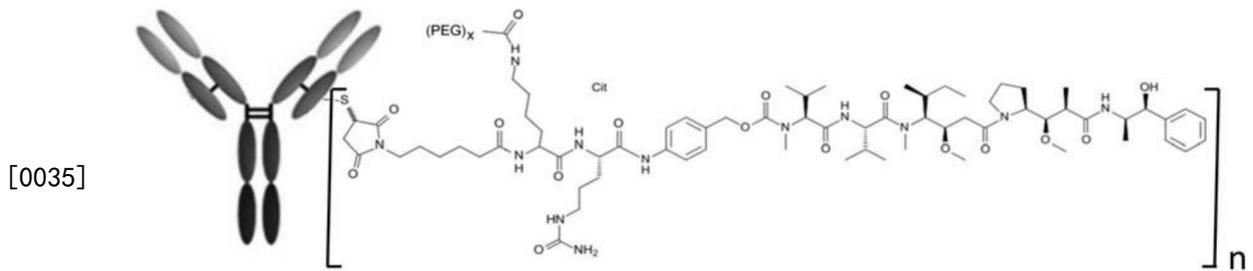


IV

[0031] 在另一优选例中,L中可以嵌入更多聚的聚乙二醇(PEG)以改善分子的亲水性质,所述抗体与药物偶联体(ADC)如式V-1、V-2、V-3所示:



[0034] 在另一优选例中,式II中,当L中的缬氨酸被带有活性基团的氨基酸残基如精氨酸或天冬氨酸所替代,然后将(PEG)n连接到该氨基酸侧链的活性基团上,所述抗体与药物偶联体如结构式VI所示,其中x为1-28的整数;n为1-8的正数;



[0036] 在另一优选例中,所述抗体hRS7具有以下特征:

[0037] (a) 所述抗体hRS7的轻链可变区的氨基酸序列包含或为如SEQ ID NO.:1所示的序列;和/或

[0038] (b) 所述抗体hRS7的重链可变区的氨基酸序列包含或为如SEQ ID NO.:2所示的序列。

[0039] 本发明第二方面提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含本发明第一方面所述的抗体与药物偶联体,以及药学上可接受的载体。

[0040] 本发明第三方面提供了本发明第一方面所述的抗体与药物偶联体或本发明第二方面所述的药物组合物的用途,用于制备抗肿瘤的药物。

[0041] 在另一优选例中,所述肿瘤包括但不限于乳腺癌(三阴及非三阴)、胃癌、卵巢癌、小细胞和非小细胞(鳞癌、腺癌、腺鳞癌、大细胞癌)肺癌、宫颈癌、子宫癌,食道癌、头颈癌、胰腺癌、大肠癌、膀胱癌、肝癌、前列腺癌以及其它高表达TACSTD2的实体肿瘤。

[0042] 本发明第四方面提供了一种制备本发明第一方面所述的抗体与药物偶联体的方法,所述方法包括步骤:

[0043] (1) 提供一反应体系,所述反应体系中包括抗体和药物分子,所述药物分子连接有接头;

[0044] (2) 在所述反应体系中,将所述抗体和药物分子进行偶联反应,从而制得所述的抗体与药物偶联体。

[0045] 在另一优选例中,所述反应体系的pH为6.0-8.0;较佳地,为6.0-7.0。

[0046] 在另一优选例中,所述抗体与药物分子的摩尔比为1:1~1:20;较佳地,为1:10~1:20。

[0047] 在另一优选例中,反应时间为1h~48h;较佳地,为3h~36h。

[0048] 本发明第五方面提供了一种治疗或预防肿瘤的方法,所述方法包括步骤:给需要的对象施用本发明第一方面所述的抗体与药物偶联体或本发明第二方面所述的药物组合物。

[0049] 在另一优选例中,所述对象为哺乳动物,包括人。

[0050] 在另一优选例中,所述抗体与药物偶联体的给药浓度为0.3-10毫克/千克;较佳地,为1-6毫克/千克;更佳地,为1-4毫克/千克。

[0051] 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

[0052] 图1显示了hRS7-vc-MMAE在体外对胰腺癌细胞BxPC-3的杀伤效力显著高于hRS7-CL2A-SN38。尽管MMAE本身对肿瘤细胞的杀伤力要强于SN38,然而在与hRS7配伍以后,这种增强的杀伤力被急剧的放大,因此抗体hRS7与MMAE具有明显的协同作用。

[0053] 图2显示了hRS7-vc-MMAE在移植了 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 BxPC3的BALB/c-Nu肿瘤裸鼠模型上显示强力的药效趋势。Rx:3毫克/千克,QW,i.v.。肿瘤体积=长 \times 宽²/2。

[0054] 图3显示了hRS7-vc-MMAE在移植了MBA-MB-468的BALB/c-Nu肿瘤裸鼠模型上显示强力的药效。QW,i.v.。肿瘤体积=长 \times 宽²/2。n=5。其中1和3毫克/千克剂量组药效显著,而0.3毫克/千克剂量组则效果不佳。

[0055] 图4显示了不同DAR值的hRS7-vc-MMAE在乳腺癌细胞MBA-MB-468上的杀伤效率。其中DAR值为2,4和6的分子药效相似,而当DAR值低于2时,细胞杀伤效果不佳。

[0056] 图5显示了在接头(或连接链)中嵌入PEG4的ADC分子hRS7-mc-PEG4-vc-PABC-MMAE(简略为hRS7-vc(PEG4)-MMAE)具有更加显著的药效。

[0057] 图6显示了各个ADC分子的稳定性实验结果。

[0058] 图7显示了各个ADC分子的稳定性实验结果。

[0059] 图8显示了各个ADC分子的分子疏水性。

[0060] 图9显示了各个ADC分子的分子疏水性。

[0061] 图10显示了各个ADC分子的细胞杀伤活性。

具体实施方式

[0062] 本发明人通过广泛而深入的研究,提供大量筛选,获得一种高效的,负载量、稳定性和疏水性经过优化的,靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体。实验结果表明,本发明的抗体与药物偶联体通过将抗体hRS7与小分子药物(如MMAE)的合理配伍,从而取得了异常显著的抗肿瘤效果;另一方面,采用优化的负载量,显著降低了本发明抗体与药物偶联体对其它细胞(如正常细胞)的毒副作用。另外,在偶联体的载体中以特定的、经过优化的方式嵌入适当聚合数目的聚乙二醇,更进一步改善了分子的理化性质,提高了药效。在此基础上完成了本发明。

[0063] 定义

[0064] 如本文所用,术语“本发明的抗体与药物偶联体”、“本发明的抗体与药物偶联物”、“本发明的偶联体”或“本发明的ADC”可互换使用,指具有式I结构所示的抗体-药物偶联体。

[0065] 另外,本发明中,同一种或同一类ADC分子可以用多种形式表示。

[0066] 例如,其中一类ADC分子,hRS7-[mc-vc-PABC-MMAE]_n,当n为不同数值时,可以通称为hRS7-vc-PAB-MMAE或hRS7-mc-vc-PABC-MMAE或hRS7-vc-MMAE或hRS7-mal-vc-PABC-MMAE。hRS7-[mc-vc-PABC-MMAE]_n中的n数值即为ADC分子的DAR值。例如,在上下文中,DAR为2的hRS7-mc-vc-PABC-MMAE或hRS7-vc-MMAE,即hRS7-[mc-vc-PABC-MMAE]₂。

[0067] 又例如,hRS7-vc(PEG4)-MMAE可以表示为hRS7-mc-PEG4-vc-PABC-MMAE或hRS7-PEG4-vc-PAB-MMAE。

[0068] 又例如,Mal-Peg4-Val-Lys(m-dPEG24)-PAB-MMAE也可表示为Mal-Peg4-Val-Lys

(PEG24-Me)-PABC-MMAE, 尤其和hRS7形成的ADC分子可表示为hRS7-PEG4-VL(m-dPEG24)-PAB-MMAE;

[0069] Mal-Peg4-Lys(Peg24-Me)-Cit-PAB-MMAE也可表示为Mal-Peg4-Lys(PEG24-Me)-Cit-PABC-MMAE, 尤其和hRS7形成的ADC分子可表示为hRS7-PEG4-L(m-dPEG24)-C-PAB-MMAE;

[0070] Mal-PEG24-VC-PAB-MMAE也可表示为Mal-PEG24-Val-Cit-PABC-MMAE, 尤其和hRS7形成的ADC分子可表示为hRS7-PEG24-vc-PAB-MMAE。

[0071] 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)。

[0072] 抗体

[0073] 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。

[0074] 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 β -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 β 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。

[0075] 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 κ 和 λ)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 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、和 μ 。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。

[0076] 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 β 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 表A

[0080]

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

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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并不限于: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。

[0090] 在另一优选例中,所述靶向TACSTD2的抗体为抗体hRS7。

[0091] 在另一优选例中,所述抗体hRS7的轻链可变区(V-Kappa)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列(DIQLTQSPSSLSASVGRVSIITCKASQD VSI(AVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLT(ISS)LPEDFAVYYCQQ)。

[0092] 在另一优选例中,所述抗体hRS7的重链可变区(VH)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:2所示的氨基酸序列(QVQLQQSGSELKPKGASVKVCKASG YFTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGPEYTYDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQ(ISS)LKADDTAVYFCARGGFGSSYWFYFDVWGQGLVTVSS)。

[0093] 小分子药物

[0094] 适用于本发明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、多柔比星(阿霉素)、吡咯苯并二氮杂卓(pyrralobenzodiazepine)(PBD)、多卡霉素(duocarmycin),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)、吡咯苯并二氮杂卓、多卡霉素,或其组合。

[0095] 接头

[0096] 适用于本发明的接头(L)用于连接本发明的小分子药物和抗体。

[0097] 在另一优选例中,L为mc-vc-PABC(可简称为vc)。

[0098] 在另一优选例中,L为MCC-vc-PABC。

[0099] 本发明的L中可以包含x个寡聚的聚乙二醇(可用PEG_x表示,其中,x为聚乙二醇(PEG)的重复个数)。其中,x可以为1-28的整数。

[0100] 在另一优选例中,所述PEG_x可选自下组的一个或多个:PEG2、PEG4、PEG6、PEG8、PEG12、PEG16、PEG24、PEG28等,其中,PEG后的数字代表PEG的重复个数。

[0101] 在另一优选例中,PEG可以与马来酸连接。

[0102] 抗体与药物偶联体及其制备

[0103] 本发明提供了一种抗体与药物偶联体(ADC),它包括通过接头(L)连接在一起的

(a) 靶向TACSTD2的抗体与 (b) 具有细胞毒性的小分子药物。

[0104] 本发明提供了偶联方法, 将小分子药物通过特定连接物偶联到抗体上, 在不改变抗体亲和性的基础上大幅提高抗体对肿瘤细胞的杀伤力。

[0105] 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。

[0106] 在另一优选例中, 本发明采用一种特定的接头(L) 部分, 使之能够偶联至特定的赖氨酸上, 从而获得定点偶联的、且负载量优化的抗体偶联药物。

[0107] 在另一优选例中, 本发明的抗体与药物偶联体的制备方法如下:

[0108] 吸取一定量(如0.5毫克)的抗体, 加入2倍物质当量的三(2-羧乙基)膦(Tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP), 37°C条件下反应一段时间(如2.5小时)。反应完毕以后, 我们通过离心超滤法把反应混合物浓缩到0.5毫升以下, 并用偶联溶液(75mM NaAc, pH6.5, 1mM DTPA, 10%DMSO)加满, 再离心浓缩到0.5毫升以下, 重复三次。我们然后加入抗体10倍物质当量的vc-MMAE, 4°C过夜反应(17小时以上)。我们最后通过Amicon微升tra 4 10K超滤管把缓冲液置换成pH7.0的PBS溶液。

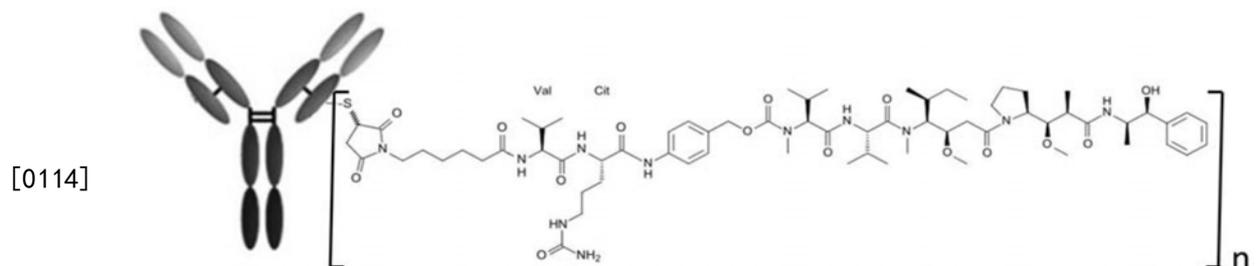
[0109] 在另一优选例中, 本发明的抗体与药物偶联体的制备方法如下:

[0110] 吸取一定量(如0.5毫克)的抗体, 加入3倍物质当量的三(2-羧乙基)膦(Tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP), 37°C条件下反应一段时间(如2.5小时)。然后直接加入抗体20倍物质当量的vc-MMAE, 4°C过夜反应(17小时以上)。我们最后通过Amicon Ultra 4 10K超滤管把缓冲液置换成pH7.0的PBS溶液。

[0111] 在另一优选例中, 本发明的抗体与药物偶联体的制备方法如下:

[0112] 吸取一定量(如0.5毫克)的抗体, 加入3倍物质当量的二硫苏糖醇(DTT), 37°C条件下反应一段时间(如2小时)。反应完毕以后, 我们通过离心超滤法把反应混合物浓缩到0.5毫升以下, 并用偶联溶液(75mM NaAc, pH6.5, 1mM DTPA, 10%DMSO)加满, 再离心浓缩到0.5毫升以下, 重复三次。我们然后加入抗体10倍物质当量的vc-MMAE, 4°C过夜反应(17小时以上)。我们最后通过Amicon Ultra 4 10K超滤管把缓冲液置换成pH7.0的PBS溶液。

[0113] 在另一优选例中, L为mc-vc-PABC, D为MMAE时, 所述的抗体与药物偶联体为hRS7-[mc-vc-PABC-MMAE]_n(可简略为hRS7-[vc-MMAE]_n或hRS7-vc-MMAE), 其中, n为1-8的正数, 其结构如式II所示:

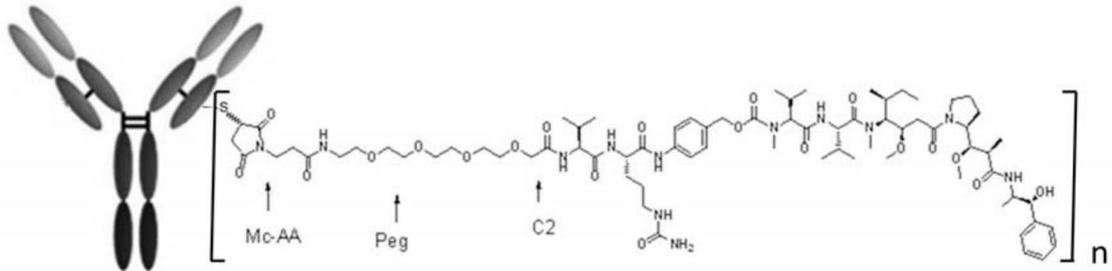


[0115] 在另一优选例中, 当L中包含x个寡聚的聚乙二醇PEG时, 所述抗体与药物偶联体可以表示为Ab-(L(PEG_x)-D)_n。

[0116] 在另一优选例中,所述抗体与药物偶联体为hRS7-[L(PEG_x)-MMAE]_n,其中x为PEG的重复个数,优选为1-28的整数;较佳地,为4-24的整数。

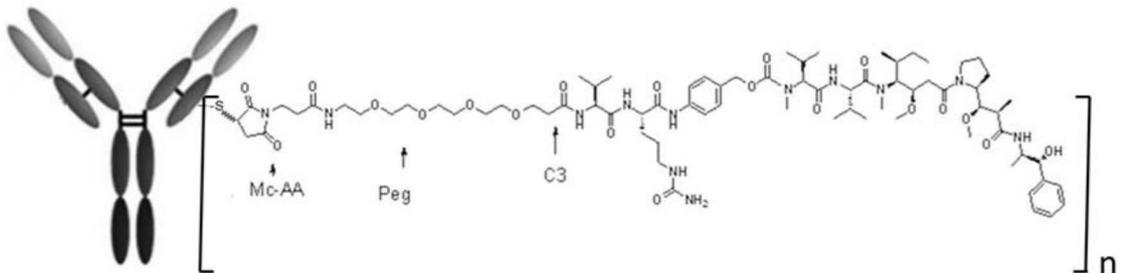
[0117] 在另一优选例中,所述抗体与药物偶联体为hRS7-[mc-PEG_x-vc-PABC-MMAE]_n(可简略为hRS7-vc(PEG_x)-MMAE),其中x为PEG的重复个数,优选为1-64的整数;较佳地,为4-24的整数。

[0118] 在另一优选例中,所述抗体与药物偶联体(ADC)如式II I或IV所示:



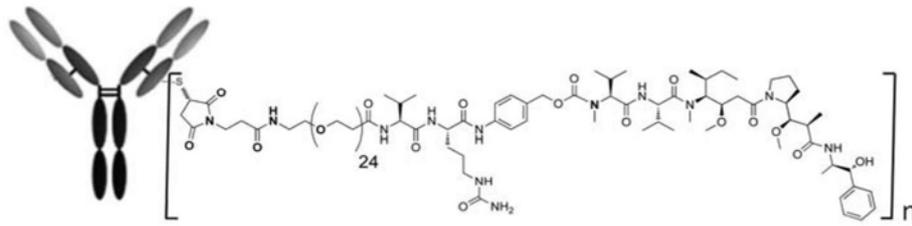
III

[0119]



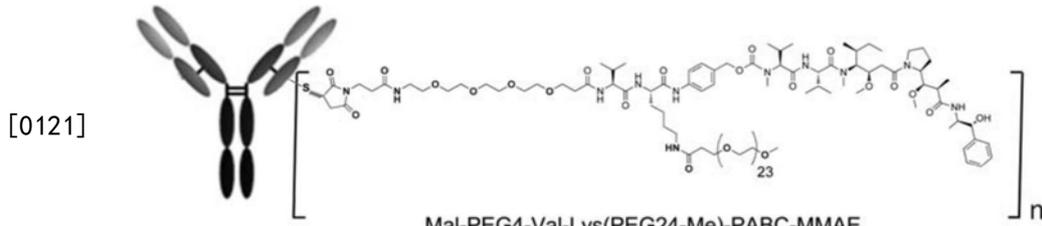
IV

[0120] 在另一优选例中,L中可以嵌入更多聚的聚乙二醇(PEG)以改善分子的亲水性质,所述抗体与药物偶联体(ADC)如式V-1、V-2、V-3所示:



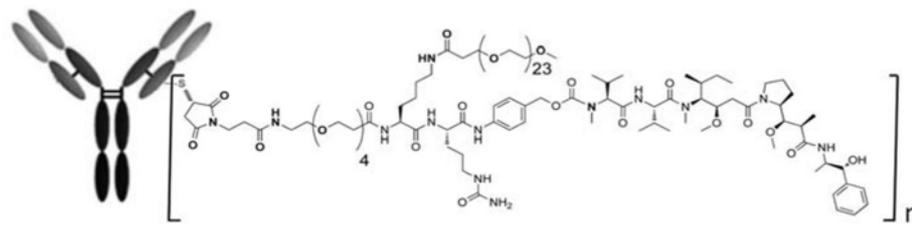
Mal-PEG24-Val-Cit-PABC-MMAE

V-1



Mal-PEG4-Val-Lys(PEG24-Me)-PABC-MMAE

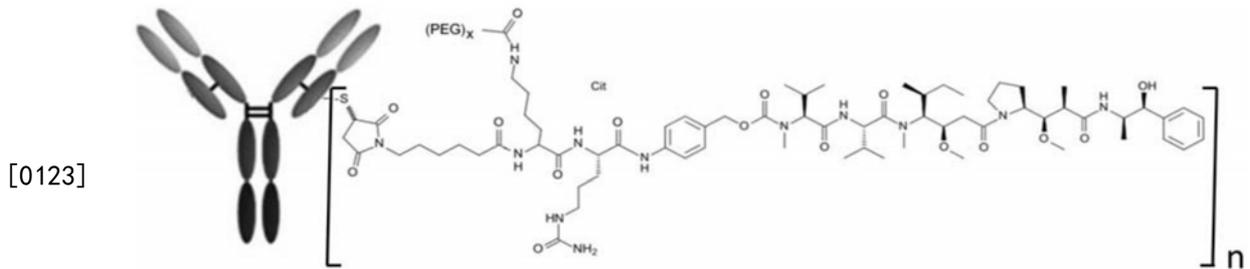
V-2



Mal-PEG4-Lys(PEG24-Me)-Cit-PABC-MMAE

V-3

[0122] 在另一优选例中,式II中,当L中的缬氨酸被带有活性基团的氨基酸残基如精氨酸或天冬氨酸所替代,然后将(PEG)n连接到该氨基酸侧链的活性基团上,所述抗体与药物偶联体如结构式VI所示,其中x为1-28的整数;n为1-8的正数;



VI。

[0124] 药物组合物和施用方法

[0125] 本发明还提供了含有本发明ADC的药物组合物,以及使用本发明ADC治疗哺乳动物疾病的方法。优选地,所述的疾病是以TACSTD2靶向的疾病,如肿瘤。

[0126] 本发明还提供了所述抗体与药物偶联体在制备抗肿瘤药物中的应用。

[0127] 在本发明中,所述药物组合物包括有效量的根据本发明的ADC(作为活性成分),以及至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。制备时,通常将活性成分与赋形剂混合,或用赋形剂稀释,或包在可以胶囊或药囊形式存在的载体中。当赋形剂起稀释剂作用时,它可采用固体、半固体或液体材料作为赋形剂、载体或活性成分的介质。因此,组合物可以是溶液剂、灭菌注射溶液等。

[0128] 合适的赋形剂包括:乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、微晶纤维素、聚乙

烯吡咯烷酮、纤维素、水等；制剂还可包括：湿润剂、乳化剂、防腐剂（如羟基苯甲酸甲酯和丙酯）等。所述抗肿瘤药物可制成单元或多元剂型，各剂型包含为了产生所期望的疗效而计算出预定量的本发明的ADC，以及合适的药剂学赋形剂。

[0129] 所述的抗肿瘤药物可以通过常规途径进行给药，包括（但并不限于）：肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、局部给药等。

[0130] 使用该药物时，是将安全有效量的所述抗体与药物偶联体施用于人，其中该安全有效量的范围优选为0.5~50毫克/千克体重，更优选为1~10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。

[0131] 此外，本发明的偶联体还可与其他治疗药物联用，其中包括（但并不限于）：各种细胞因子，如TNF、IFN、IL-2等；各种肿瘤化疗药物，如5-FU、氮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、喜树碱类等影响蛋白质合成的药物及某些激素类药物，等等。

[0132] 与现有技术相比，本发明的主要有益效果包括：

[0133] (1) 本发明提供的抗体与药物偶联体对肿瘤细胞具有显著杀灭肿瘤细胞的活性。

[0134] (2) 本发明提供的抗体与药物偶联体具有经优化的DAR值和更优的载荷，使得本发明ADC的治疗窗口更大。

[0135] (3) 本发明首次发现了抗体hRS7与MMAE的搭配具有协同作用，可以显著地扩大MMAE对肿瘤细胞的杀伤活性。

[0136] (4) 本发明提供的抗体与药物偶联体具有经优化的DAR值2-4，与高DAR值的ADC相比，更多地保留了抗体中的二硫键，使得本发明ADC具有更高的稳定性。

[0137] (5) 本发明在连接链中引入多聚的聚乙二醇，从而改善分子的理化性质，提高药效。

[0138] (6) 本发明提供的抗体与药物偶联体具有更好的药代性能以及更低的毒副作用。

[0139] 下面结合具体实施例，进一步详陈本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如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，否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0140] 材料和通用方法

[0141] isotype指同型对照抗体，此处为人源化的靶向Toxin B的抗体，属于人IgG1抗体类型。

[0142] MDA-MB-468细胞为常规的三阴乳腺癌细胞，购自中科院上海细胞库。

[0143] BxPC-3为常规的胰腺癌细胞，可购自中科院上海细胞库。

[0144] HEK293F细胞购自赛默飞中国有限公司。

[0145] CHO-K1细胞购自兰州健顺生物责任有限公司。

[0146] mc-vc-PABC-MMAE购自上海皓元生物医药科技有限公司。

[0147] hRS7-CL2A-SN38: 制备方法参见专利文献US 8,758,752 B2。

[0148] 实施例1抗体与药物偶联体制备

[0149] I、制备抗体蛋白溶液：

[0150] 利用分子克隆技术，首先将hRS7抗体的轻链(氨基酸序列如SEQ ID NO.:1所示)和重链(氨基酸序列如SEQ ID NO.:2所示)克隆到表达载体pcDNA3.1上。然后在大肠杆菌中扩增出分别带有抗体轻链和重链的cDNA序列的质粒，随后用转染试剂PEI转染在无血清培养基中悬浮培养的HEK293或CHO细胞，并在37℃、5%CO₂条件下震荡培养4-10天。在GE AKTA Purifier上使用Protein A和Superdex 200分子排阻层析柱对细胞培养上清中的抗体进行分离纯化，最后通过超滤浓缩得到1毫克/毫升以上浓度的抗体蛋白溶液。

[0151] II、制备抗体与药物偶联体：

[0152] 如下实验可以通过改变还原以及偶联的条件，制备出不同DAR值的ADC分子hRS7-vc-MMAE(即hRS7-[mc-vc-PABC-MMAE]_n,n即表示分子的DAR值)。下文中,vc-MMAE即mc-vc-PABC-MMAE。

[0153] (1) 利用超滤法在PBS (pH7.0) 缓冲液中将抗体浓缩至5-10毫克/毫升。按实测浓度计算,吸取1毫克抗体,加入1.5倍物质当量的三(2-羧乙基)膦(Tris(2-carboxyethyl)phosphine,TCEP) 37℃条件下反应2.5小时。反应完毕以后,我们通过离心超滤法把反应混合物浓缩到0.5毫升以下,并用偶联溶液(75mM NaAc,pH6.5,1mM DTPA,10%DMSO)加满,再离心浓缩到0.5毫升以下,重复三次。我们然后加入抗体10倍物质当量的vc-MMAE,4℃过夜反应(17小时以上)。我们最后通过Amicon Ultra 4 10K超滤管把缓冲液置换成pH7.0的PBS溶液。用此方法制备的ADC分子hRS7-vc-MMAE(1),DAR值约为2。

[0154] (2) 利用超滤法在PBS (pH7.0) 缓冲液中将抗体浓缩至5-10毫克/毫升。按实测浓度计算,吸取1毫克抗体,加入10倍物质当量的三(2-羧乙基)膦(Tris(2-carboxyethyl)phosphine,TCEP) 37℃条件下反应2.5小时。反应完毕以后,我们通过离心超滤法把反应混合物浓缩到0.5毫升以下,并用偶联溶液(75mM NaAc,pH6.5,1mM DTPA,10%DMSO)加满,再离心浓缩到0.5毫升以下,重复三次。我们然后加入抗体20倍物质当量的vc-MMAE,4℃过夜反应(17小时以上)。我们最后通过Amicon Ultra 4 10K超滤管把缓冲液置换成pH7.0的PBS溶液。用此方法制备的ADC分子hRS7-vc-MMAE(2),DAR值约为4。

[0155] (3) 利用超滤法在PBS (pH7.0) 缓冲液中将抗体浓缩至5-10毫克/毫升。按实测浓度计算,吸取1毫克抗体,加入25倍物质当量的三(2-羧乙基)膦(Tris(2-carboxyethyl)phosphine,TCEP) 37℃条件下反应2.5小时。反应完毕以后,我们通过离心超滤法把反应混合物浓缩到0.5毫升以下,并用偶联溶液(75mM NaAc,pH6.5,1mM DTPA,10%DMSO)加满,再离心浓缩到0.5毫升以下,重复三次。我们然后加入抗体20倍物质当量的vc-MMAE,4℃过夜反应(17小时以上)。我们最后通过Amicon Ultra 4 10K超滤管把缓冲液置换成pH7.0的PBS溶液。用此方法制备的ADC分子hRS7-vc-MMAE(3),DAR值约为6。

[0156] (4) 利用超滤法在PBS (pH7.0) 缓冲液中将抗体浓缩至5-10毫克/毫升。按实测浓度计算,吸取1毫克抗体,加入0.5倍物质当量的三(2-羧乙基)膦(Tris(2-carboxyethyl)phosphine,TCEP) 37℃条件下反应2.5小时。反应完毕以后,我们通过离心超滤法把反应混合物浓缩到0.5毫升以下,并用偶联溶液(75mM NaAc,pH6.5,1mM DTPA,10%DMSO)加满,再离心浓缩到0.5毫升以下,重复三次。我们然后加入抗体5倍物质当量的vc-MMAE,4℃过夜反应(17小时以上)。我们最后通过Amicon Ultra 4 10K超滤管把缓冲液置换成pH7.0的PBS溶

液。用此方法制备的ADC分子hRS7-vc-MMAE (4), DAR值约为0.5。

[0157] (5) 参照上述方法制备ADC分子hRS7-vc-MMAE (5), DAR值约为2.8, 不同点在于加入抗体的6倍物质当量的TCEP还原, 加入10倍物质当量的vc-MMAE。

[0158] 对照ADC分子的制备

[0159] isotype-vc-MMAE, DAR值约为2.8, 制备方法参照实施例1步骤II的实验(5), 不同之处在于使用hRS7同型对照抗体(人源的toxin B抗体)代替hRS7。

[0160] 实施例2肿瘤细胞抑制实验

[0161] 实验步骤如下:

[0162] 在96孔的细胞培养板中种入大约1-2万个细胞/100微升/孔(细胞数因肿瘤细胞系不同而异, 胰腺癌细胞BxPC3是1万个细胞/孔, 乳腺癌MDA-MB-468是2万/孔)。

[0163] 药物分子按不同初始浓度用培养基精心1:4等比稀释, 每个浓度3个复孔加药(总体积200微升)。

[0164] 给药组:hRS7-vc-MMAE (DAR值约为2.8)

[0165] 对照组:hRS7-CL2A-SN38 (DAR值约为2.8)

[0166] MMAE

[0167] SN-38

[0168] hRS7

[0169] isotype-vc-MMAE (DAR值约为2.8)

[0170] 37°C培养96小时以后, 加入10微升CCK8(细胞计数试剂盒-8), 继续培养1-4小时, 然后测定在450nm的吸光度。我们用双尾的Student's t-test的统计方法来比较各给药组与对照组。

[0171] 实验结果如下: 对给药组和各个对照组在体外对胰腺癌细胞BxPC3的杀伤效力进行了初步的对比(结果如图1所示)。

[0172] 由结果可知:MMAE比SN38更强力, 两者的EC₅₀值分别是0.27和6.9nM, 相差20多倍。出人意料的是, 当构建于以hRS7为抗体的ADC分子中时, MMAE与SN38的药效差别被急剧放大。hRS7-vc-MMAE杀伤BxPC3细胞的EC₅₀值是0.27nM, 而hRS7-CL2A-SN38则大于300nM。两者相比, hRS7-vc-MMAE的肿瘤细胞杀伤效力提高了1111倍(表1)。

[0173] 表1. 不同药物对BxPC3细胞杀伤效力的比较。

药物	EC50 (nM)
MMAE	0.27
SN38	6.9
hRS7-vc-MMAE	0.27
hRS7-CL2A-SN38	>300

[0175] 实验结果表明: 从体外药效上看, MMAE与抗体hRS7构成ADC分子时具有显著的, 但是难以预测的协同作用, 即该协同作用是基于实验观察的, 无法根据MMAE与SN38的药效不同而推测出来。

[0176] 实施例3体内抗肿瘤活性

[0177] 实验步骤如下:

[0178] 把胰腺癌细胞BxPC-3或乳腺癌细胞MDA-MB-468用生理盐水稀释到需要的细胞浓

度,经皮下在4-6周年齡的雌性BALB/c-nu裸鼠的腋窝部位注射 $1-5 \times 10^6$ 个/300微升的肿瘤细胞。接种以后每天用游标卡尺测量肿瘤的尺寸。

[0179] 肿瘤体积= $L \times \omega^2/2$

[0180] 式中,L为最长的直径, ω 是最短的直径。

[0181] 当接种后36天或当肿瘤体积接近 0.25cm^3 时,开始治疗实验。ADC分子一般每周注射一次(QW),0.3-3毫克/千克体重。当肿瘤大于 1.0cm^3 时,该小鼠被视为死亡。治疗效果可分为部分反应(肿瘤缩小30%或以上),稳定(肿瘤缩小29%或以下,或增长不超过20%)。TTP(肿瘤增长时间)是从治疗开始到肿瘤增长20%体积的时间。对于肿瘤生长的统计分析是基于曲线下面积(AUC)。统计方法为双尾的Student's t-测验来比较各给药组与对照组。

[0182] 给药组:ADC(hRS7-vc-MMAE,DAR值在胰腺癌和乳腺癌中分别约为2.8和4)

[0183] 对照组:isotype-ADC(isotype-vc-MMAE,DAR值在胰腺癌和乳腺癌中分别约为2.8和4)

[0184] MMAE

[0185] hRS7

[0186] hRS7-CL2A-SN38(DAR值在胰腺癌和乳腺癌中分别约为2.8和4)

[0187] PBS

[0188] 实验结果如下:

[0189] 1) 相对于isotype-vc-MMAE,hRS7-vc-MMAE在BxPC3细胞接种的胰腺癌模型上显示了非常强力的抑癌趋势。如图2所示。

[0190] 2) 相对于isotype-vc-MMAE,hRS7-vc-MMAE在MDA-MB-468细胞接种的三阴乳腺癌模型上显示了非常强力的抑癌效果,其中在1和3毫克/千克剂量组的药效明显,而0.3毫克/千克的药效不明显。如图3所示。

[0191] 实验结果表明:hRS7-vc-MMAE在体内具有突出的肿瘤抑制活性。

[0192] 实施例4不同DAR值的ADC(hRS7-vc-MMAE)分子在MBA-MB-468细胞上的杀伤力比较

[0193] 分别测试了实施例1制备的ADC分子的体内抗肿瘤活性。实验方法同实施例4,不同点在于,本次实验所用的肿瘤细胞为乳腺癌细胞MBA-MB-468。

[0194] 实验结果如下:在MBA-MB-46细胞上,DAR值为2、4和6的ADC分子的肿瘤杀伤效力没有显著的区别,而DAR值低于2的ADC分子的药效较差。见图4。

[0195] 结果表明:本发明制备的ADC分子在4以上具备优良的肿瘤杀伤效力。

[0196] 实施例5嵌入PEG4的hRS7-vc-MMAE分子在MBA-MB-468细胞上的杀伤力

[0197] hRS7-vc(PEG4)-MMAE(也称为hRS7-PEG4-vc-PAB-MMAE)的制备:

[0198] Ma1-PEG4-NHS活化脂(26毫克,50 μmol ,从Quanta Biodesign,USA购买)溶解于1毫升N,N-二甲基甲酰胺。在搅拌下,加入vc-PAB-MMAE(45毫克,40 μmol ,从Levena Biopharma购买,按W0 2004/010957报道的方法合成)和9微升DIEA。反应液在室温(22 $^{\circ}\text{C}$)下搅拌一小时,反相高压液相制备纯化,冷冻干燥后得到白色固体产品Ma1-PEG4-vc-PABC-MMAE(47毫克,78%)。MS:m/z 1521.0(M+H⁺)。

[0199] 将抗体与小分子Ma1-PEG4-vc-PABC-MMAE偶联成为不同的DAR值的hRS7-vc(PEG4)-MMAE,偶联方法见实施例1。

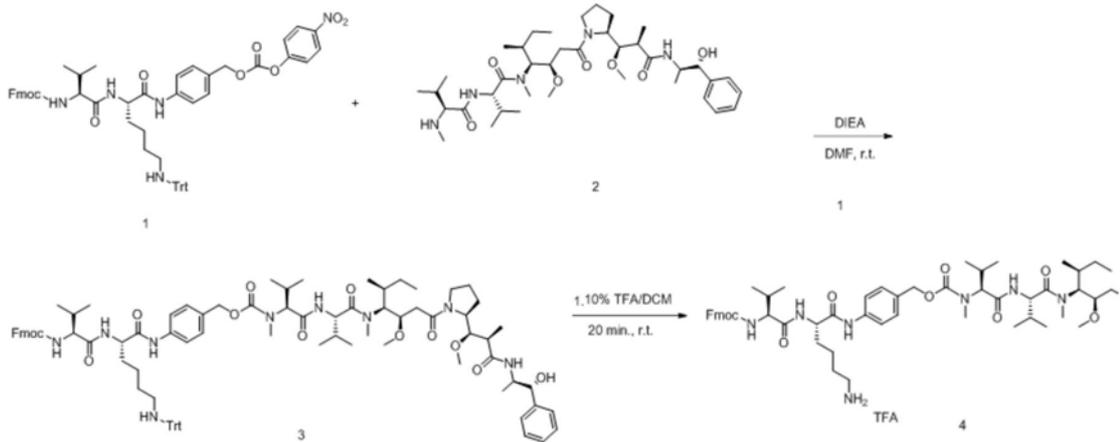
[0200] 通过MDA-MB-468肿瘤细胞抑制实验(实验方法见实施例4),对hRS7-vc(PEG4)-

MMAE和hRS7-vc-MMAE (两者的DAR值均为4) 的药效进行了对比。

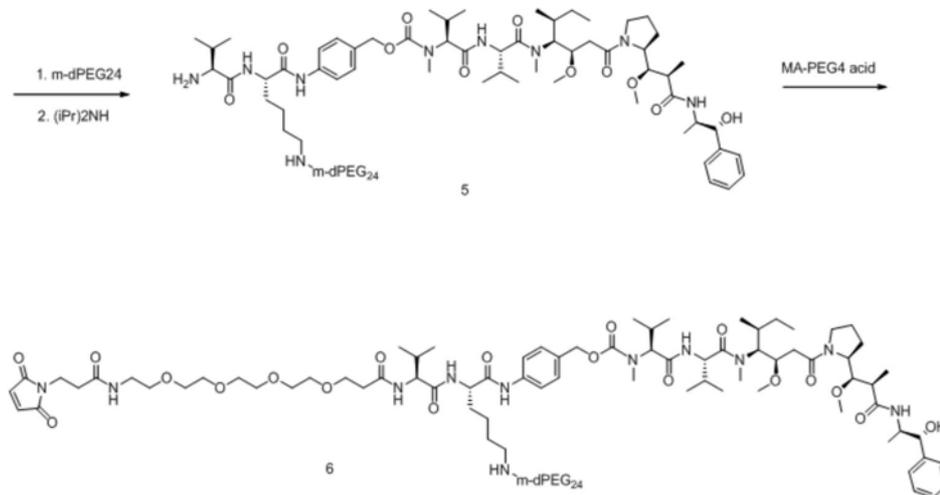
[0201] 结果表明:在接头(或连接链)中嵌入PEG可以显著提高hRS7-vc-MMAE分子的药效。见图5。

[0202] 实施例6在连接链中引入24个聚乙二醇(PEG24)以及制备含有这些连接链的ADC分子的制备:

[0203] 1) 合成Ma1-Peg4-Val-Lys(m-dPEG24)-PAB-MMAE



[0204]



[0205] 将Fmoc-Val-Lys(Trt)-PAB-PNP(100mg,0.102mmol,购买自Levena Biopharma,美国)和MMAE(78mg,0.102mmol,购买自Levena Biopharma,美国)溶解于无水DMF(5mL),并在溶液中加入DIEA(7mg)。混合物在室温(22℃)下反应2小时,并通过反向HPLC直接纯化出目的产物Fmoc-Val-Lys(Trt)-PAB-MMAE(3)。产物(3)在冷冻干燥后形成为白色粉末(123mg,77%)。MS:m/z 1559.2(M+H⁺)。

[0206] 将化合物3(120mg)溶于10%TFA/DCM(4mL)溶液并在室温下搅拌20分钟。混合物反应后通过减压浓缩和反向HPLC纯化,得到化合物4(88mg)。MS:m/z 1316.7(M+H⁺)。

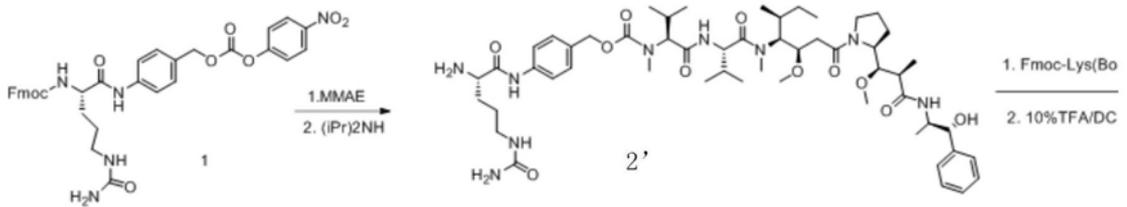
[0207] 将Fmoc-val-Lys-PAB-MMAE TFA盐(即化合物4)(80mg),m-dPEG24酸(69mg)和HATU

(23mg) 溶于DMF (3m1), 加入DIEA (20mg), 并于室温下搅拌30分钟, 获得所需产物[MS:m/z 1208.8 (M/2+H⁺)]。将二异丙胺(1mL) 加入到反应混合物中, 并室温搅拌3小时。混合物反应后进行浓缩和反向HPLC纯化, 在冻干后获得蜡状的化合物5 (53mg)。MS:m/z 1097.3 (M/2+H⁺)。

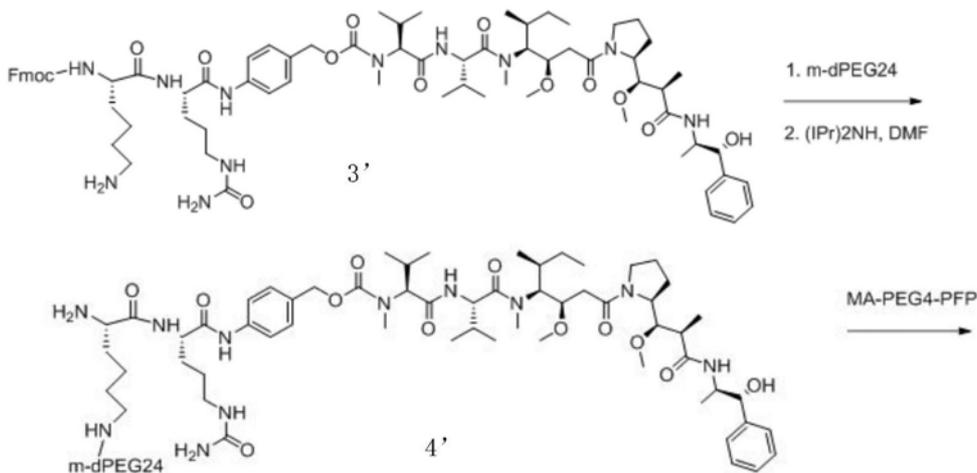
[0208] 将化合物5 (50mg), Ma1-PEG4-酸 (10mg, 购买自Quanta Biodesign, 美国) 和HATU溶于DMF (3mL), 加入DIEA (9mg), 并搅拌20分钟。之后通过反向HPLC纯化及冷冻干燥, 最终获得所需化合物Ma1-Peg4-Val1-Lys (m-dPEG24) -PAB-MMAE化合物6 (21mg)。MS:m/z 1296.1 (M/2+H⁺)。

[0209] 参照实施例1的方法, 将抗体与化合物6偶联成ADC分子hRS7-PEG4-VL (m-dPEG24) -PAB-MMAE。

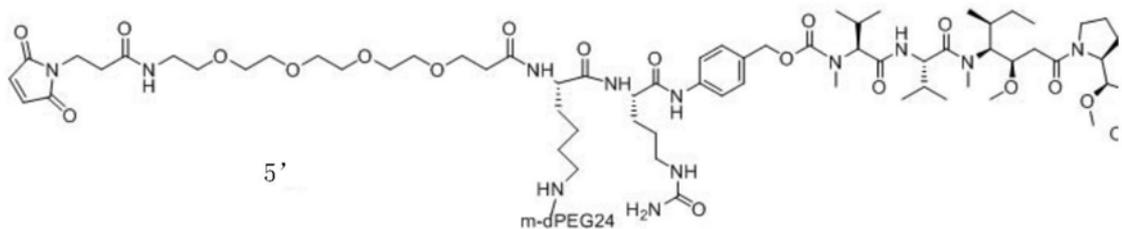
[0210] 2) 合成Ma1-Peg4-Lys (Peg24-Me) -Cit-PAB-MMAE



[0211]



[0212]



[0213] 将化合物1 (80mg, 购买自Levena Biopharma, 美国), MMAE (60mg, 购买自Levena Biopharma, 美国), 和DIEA (8mg) 溶于干燥的DMF (3mL), 并于室温搅拌16小时。LC/MS检测反应产物生成[MS:m/z 1246.6 (M+H⁺)]。在反应溶液中加入二异丙胺 (1mL) 并室温搅拌3小时。通过HPLC纯化并冻干获得白色粉末状的H-Cit-PAB-MMAE TFA盐 (化合物2') (92mg)。MS:m/z 1024.8 (M+H⁺)。

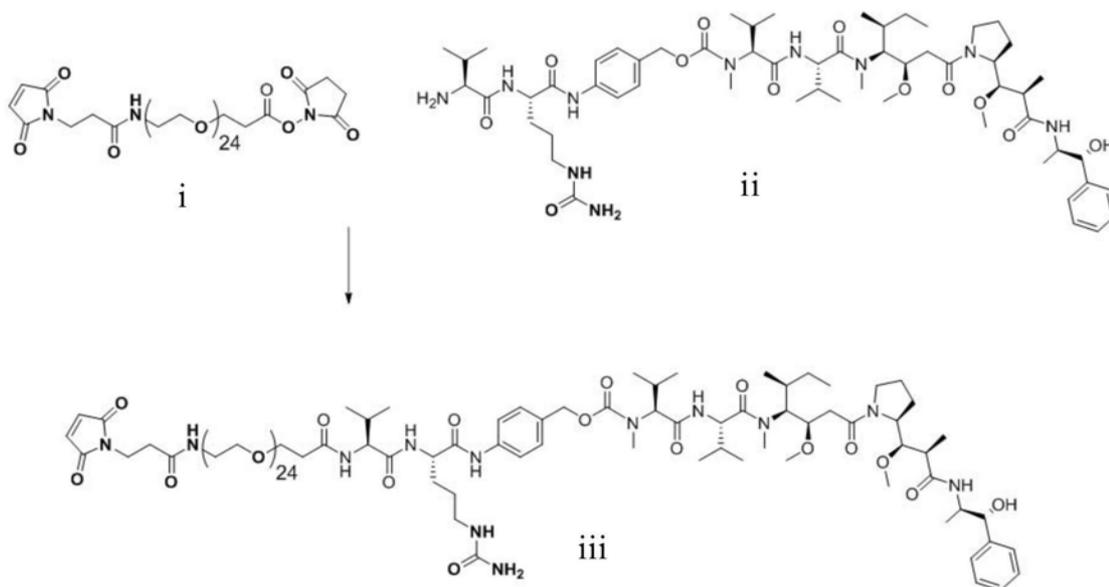
[0214] 将H-Cit-PAB-MMAE (即化合物2') (40mg), Fmoc-Lys (Boc) -OH (18mg, 购买自Chem-Impex Inc., 美国) 和HATU (15mg) 溶于DMF (3mL) 并加入DIEA (15mg), 于室温下搅拌20分钟。粗产物通过HPLC纯化成为所需产物Fmoc-Lys (Boc) -Cit-PAB-MMAE (41mg)。MS:m/z 1474.3 (M+H⁺)。将生成的产物溶于10% TFA/DCM (5mL), 并于室温下搅拌20分钟。浓缩干燥获得粗产物, 并进一步通过HPLC纯化分离获得白色粉末状的Fmoc-Lys-Cit-PAB-MMAE (31mg) (化合物3')。MS:m/z 1374.2 (M+H⁺)。

[0215] 将化合物3' (31mg), m-dPEG24 (23mg, 购买自Quanta Biodesign, 美国) 和HATU (8mg) 溶于DMF (3mL) 并加入DIEA (10mg), 于室温下搅拌20分钟。再加入二异丙胺 (1mL) 继续搅拌3小时。通过减压除去多余的碱, HPLC纯化后获得白色粉末状的H-Lys (m-dPEG24) -Cit-PAB-MMAE TFA盐 (化合物4')。MS:m/z 1126.9 (M/2+H⁺)。

[0216] 将化合物4' (29mg) 和Mal-PEG4-PFP (8mg, 购买自Levena Biopharma, 美国) 溶于DMF (3mL) 并加入DIEA (10mg), 于室温下搅拌10分钟。之后直接通过反向HPLC进行纯化, 冻干后获得蜡状的目的分子Mal-PEG4-Lys (m-dPEG24) -Cit-PAB-MMAE (化合物5') (19mg)。MS:m/z 1325.6 (M/2+H⁺)。

[0217] 参照实施例1的方法, 将抗体与化合物5' 偶联成ADC分子hRS7-PEG4-L (m-dPEG24) -C-PAB-MMAE。

[0218] 3) 合成Mal-PEG24-VC-PAB-MMAE



[0220] 将Mal-PEG24-NHS酯 (化合物i) (70mg, 50 μ mol, 购买自Quanta Biodesign, 美国), vc-PAB-MMAE (化合物ii) (45mg, 40 μ mol, 购买自Levena Biopharma, 依据WO 2004/010957发表的方法合成) 和DIEA (9 μ L) 溶于无水DMF (1mL)。将混合物在室温 (22 $^{\circ}$ C) 下搅拌反应1小时, 并通过反向HPLC直接进行纯化, 冻干后获得无色浆状的目标产物Mal-PEG24-vc-PAB-MMAE

(化合物iii) (70mg, 73%)。MS:m/z 1202.1 (M+2H⁺)/2。

[0221] 参照实施例1的方法,将抗体与化合物iii偶联成ADC分子hRS7-PEG24-vc-PAB-MMAE。

[0222] 实施例7稳定性检测

[0223] 由于hRS7-CL2A-SN38分子的DAR质偏高,导致分子的多个二硫键被打开,该分子的稳定性必然会受到影 响。本发明制备的hRS7-vc-MMAE的DAR值更为合理,所以我们预测它的分子稳定性将更好,并使用了抗体稳定性试验验证这一假设。

[0224] 我们将待储存于4℃的分析样品用室温下的PBS稀释至浓度为1毫克/毫升,取50μL直接进行测试(4℃储存条件)或放置于60℃水浴锅中孵育1小时(加速稳定性实验)之后再进行测试。我们在Thermo微升tiMate 3000UHPLC高压液相仪上采用Thermo MAbPac SEC-1 (7.8*300mm)分子排阻色谱柱对样品中的正常结构抗体或ADC分子(主峰)、聚合分子以及解链或降解的分子的含量进行定量分析。

[0225] UHPLC的流动相为50mM磷酸盐缓冲液(pH 7.0)+150mM NaCl,柱温25℃,进样体积为20μL,流速1毫升/min,UV检测波长214nm和280nm。我们最后通过Chromleon软件进行数据采集和分析。

[0226] 结果如图6所示,我们发现ADC分子的稳定性由于小分子的偶联而降低,与抗体hRS7(A与B)相比,出现更多的聚合和解链后的分子。其中,DAR=6的分子在4℃储存条件下,有大量的解链或降解分子(I),而在加速稳定性实验中则出现了大量的聚合体(J),表明这个分子不够稳定。DAR=4的ADC分子(E和F)与DAR=2的ADC分子(C和D)相比,稳定性并没有显著的减低。另外,在4℃储存条件下,带有PEG4的ADC分子(G)的稳定性要优于不带PEG的ADC分子(E),尽管在加速稳定性实验中两者的表现无显著差别。从图6的数据综合来看,DAR=4,而连接链中加入PEG4的分子的稳定性最优。

[0227] 接下来我们对在连接链中引入了PEG4和PEG24的ADC分子进行了稳定性的分析,hRS7-vc-MMAE和hRS7-PEG4-vc-PAB-MMAE作为对照。比较的分子包括:

[0228] 1. hRS7-PEG24-vc-PAB-MMAE

[0229] 2. hRS7-PEG4-VL(m-dPEG24)-PAB-MMAE

[0230] 3. hRS7-PEG4-L(m-dPEG24)-C-PAB-MMAE

[0231] 4. hRS7-PEG4-vc-PAB-MMAE

[0232] 5, hRS7-vc-PAB-MMAE(即hRS7-vc-MMAE)

[0233] 如图7所示,在60℃条件下孵育1小时后,hRS7-vc-MMAE出现了51%的聚合体。PEG4的插入(hRS7-PEG4-vc-PAB-MMAE)使得聚集分子的部分降低到33%。然而,在连接链中直接加入PEG24后,分子出现了两个聚合峰,并且聚合分子比例占蛋白总量的45.1%,对分子的稳定性改善低于PEG4。然而当PEG24通过侧链连入ADC分子时,分子的稳定性得到了显著的改善,其中hRS7-PEG4-VL(m-dPEG24)-PAB-MMAE的聚合比例降低到24.2%,hRS7-PEG4-L(m-dPEG24)-C-PAB-MMAE的聚合比例降低到27.2%。从图7的数据综合来看,hRS7-PEG4-L(m-dPEG24)-C-PAB-MMAE的分子的稳定性最优。

[0234] 实施例8疏水性检测

[0235] 由于MMAE等小分子的疏水性非常高,导致分子的成药性较差。本发明在连接链中加入多个PEG以减低了分子的疏水性。PEG可以通过多种方式加入连接链。我们使用了疏水

柱,即hydrophobic interaction chromatography (HIC),在HPLC上验证了这一假设并对PEG接入的方式进行了优化。

[0236] 我们将待分析样品用色谱流动相A稀释至浓度为1毫克/千克,然后采用HIC进行样品疏水性分析。应用Agilent 1260Infinity HPLC进行检测,采用TOSOH TSKgel Butyl-NPR 4.6*35mm色谱柱,并通过Agilent OpenLAB软件进行数据采集分析。

[0237] 色谱条件:流动相A为2M(NH₄)₂SO₄in 50mM磷酸缓冲液(pH 7.0),流动相B为50mM磷酸缓冲液(pH 7.0),梯度为0min 100%缓冲液A,5min 100%缓冲液A,25min 100%缓冲液B,30min 100%缓冲液B。柱温37℃,进样体积为10μL,流速1mL/min,UV检测波长214nm。

[0238] 分子疏水性越高,在HIC柱中流出时间就越晚,在X轴上就越靠右。结果如图8的结果所示,不同DAR值的hRS7-vc-MMAE分子的疏水性随着DAR的增加而增加。由于DAR=4与DAR=6的药效相似,而DAR=4的分子从疏水性上看优于DAR=6,因此4是更优的DAR值选择。

[0239] 图9中的数据显示,PEG化可以改变ADC分子的疏水性。其中hRS7-PEG4-vc-PAB-MMAE,hRS7-PEG4-VL(m-dPEG24)-PAB-MMAE以及hRS7-PEG4-L(m-dPEG24)-C-PAB-MMAE的疏水性相对于hRS7-vc-PAB-MMAE都有降低。然而hRS7-PEG24-vc-PAB-MMAE对分子亲水性的改良效果不佳。

[0240] 疏水性降低可以减少ADC分子在溶液中通过疏水的小分子部分相互作用而聚集的倾向。另外,疏水性的降低可以降低ADC分子被肝脏代谢排出的速度,从而延长分子在体内的半衰期、增强药效,并降低对肝脏的毒副作用。

[0241] 实施例9连接链的PEG化不影响ADC分子的肿瘤杀伤效率

[0242] 我们对在连接链中引入了PEG4和PEG24的ADC分子进行了体外药效学比较,以确定PEG化不影响ADC分子的靶点识别、内吞、转运和载荷释放。

[0243] 结果如图10和表2所示,在胰腺癌细胞BxPC3和乳腺癌细胞SK-BR-3上,hRS7-PEG24-vc-PAB-MMAE与hRS7-vc-MMAE相比的药效有明显的下降,可能与该分子较差的理化性质有关。而hRS7-PEG4-vc-PAB-MMAE、hRS7-PEG4-VL(m-dPEG24)-PAB-MMAE以及hRS7-PEG4-L(m-dPEG24)-C-PAB-MMAE与hRS7-vc-MMAE相比,细胞杀伤效率有提高或接近,表明PEG化不影响ADC分子的靶点识别、内吞、转运和载荷释放。

[0244] 表2.不同PEG修饰的ADC分子对BxPC3和SK-BR-3的细胞杀伤效力(EC50值,nM)的比较。

细胞	hRS7- PEG24 -VC-MMAE	hRS7-PEG4 -VL-(m-dPEG24) -MMAE	hRS7-PEG4 -L-(m-dPEG24) -C-MMAE	hRS7-VC- MMAE	hRS7-PEG4 -VC-MMAE
[0245] BxPC3	1.659	0.1010	0.08563	0.1496	0.09024
SK-BR-3	0.1378	0.04589	0.06019	0.08453	0.04446

[0246] 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> 中国科学院上海药物研究所
 [0003] <120> 靶向TACSTD2的抗体与药物偶联体(ADC)分子
 [0004] <130> P2016-0520
 [0005] <160> 2
 [0006] <170> PatentIn version 3.5
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 90
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 智人
 [0011] <400> 1
 [0012] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
 [0015] 20 25 30
 [0016] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0017] 35 40 45
 [0018] Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 [0019] 50 55 60
 [0020] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0021] 65 70 75 80
 [0022] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 [0023] 85 90
 [0024] <210> 2
 [0025] <211> 121
 [0026] <212> PRT
 [0027] <213> 智人
 [0028] <400> 2
 [0029] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 [0030] 1 5 10 15
 [0031] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 [0032] 20 25 30
 [0033] Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 [0034] 35 40 45
 [0035] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
 [0036] 50 55 60
 [0037] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 [0038] 65 70 75 80

[0039]	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
[0040]					85					90					95	
[0041]	Ala	Arg	Gly	Gly	Phe	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly
[0042]					100					105					110	
[0043]	Gln	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
[0044]					115					120						

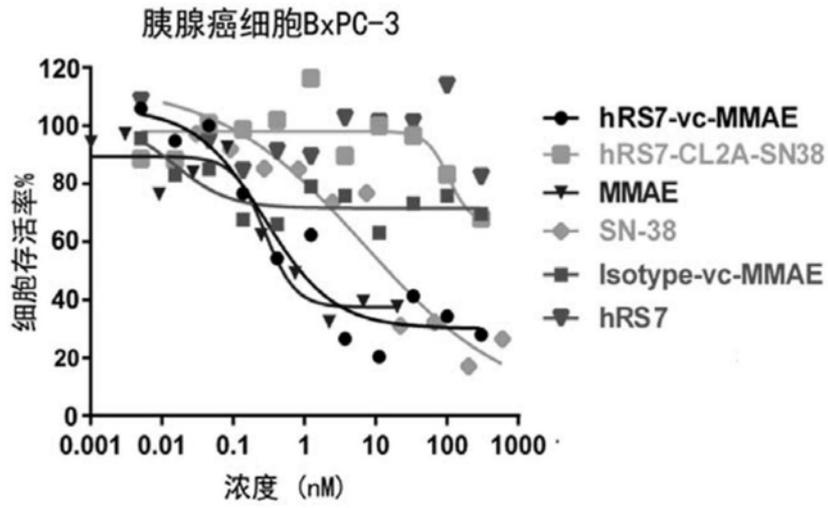


图1

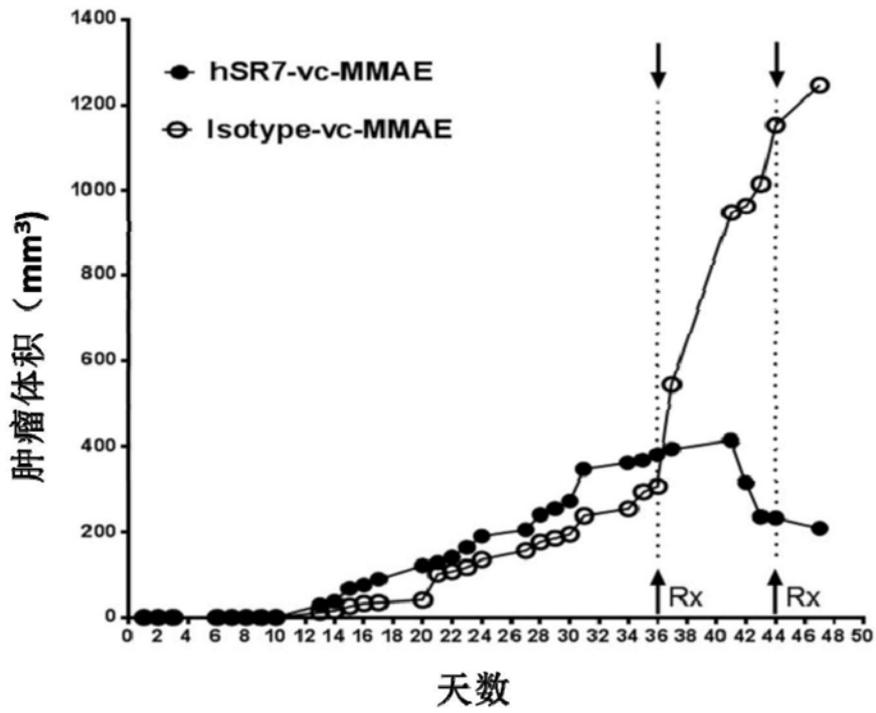


图2

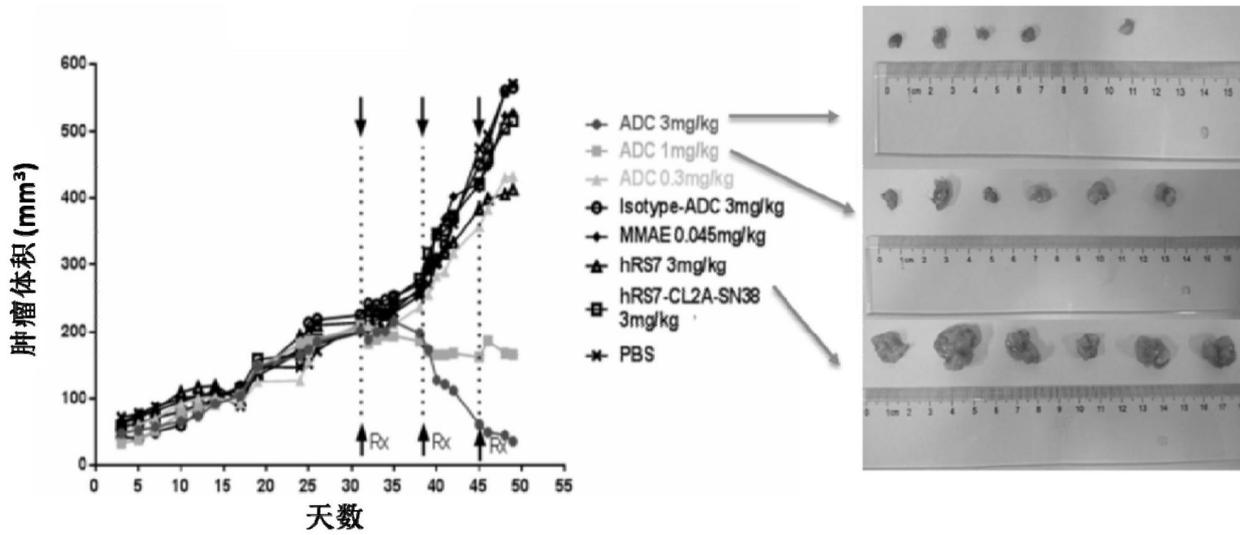


图3

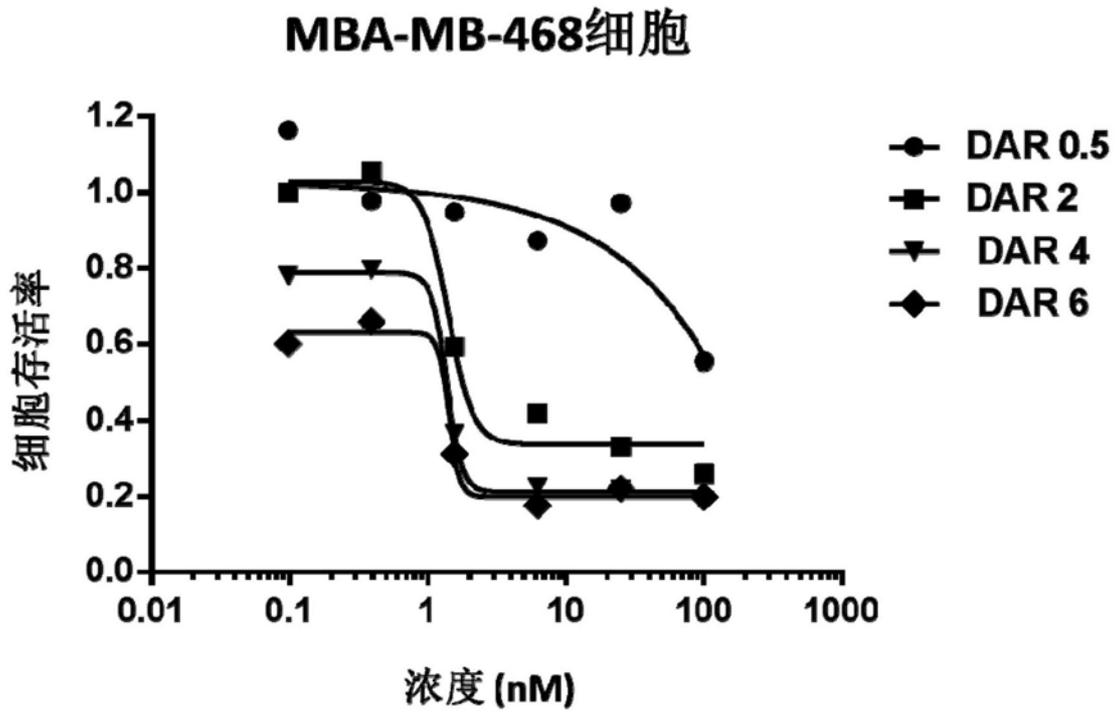


图4

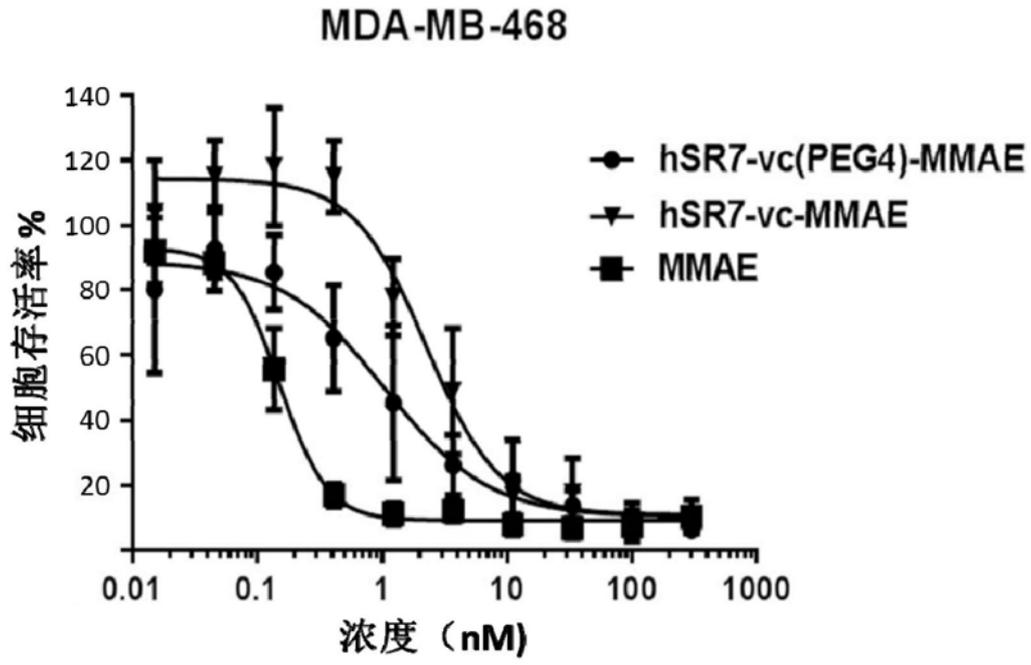


图5

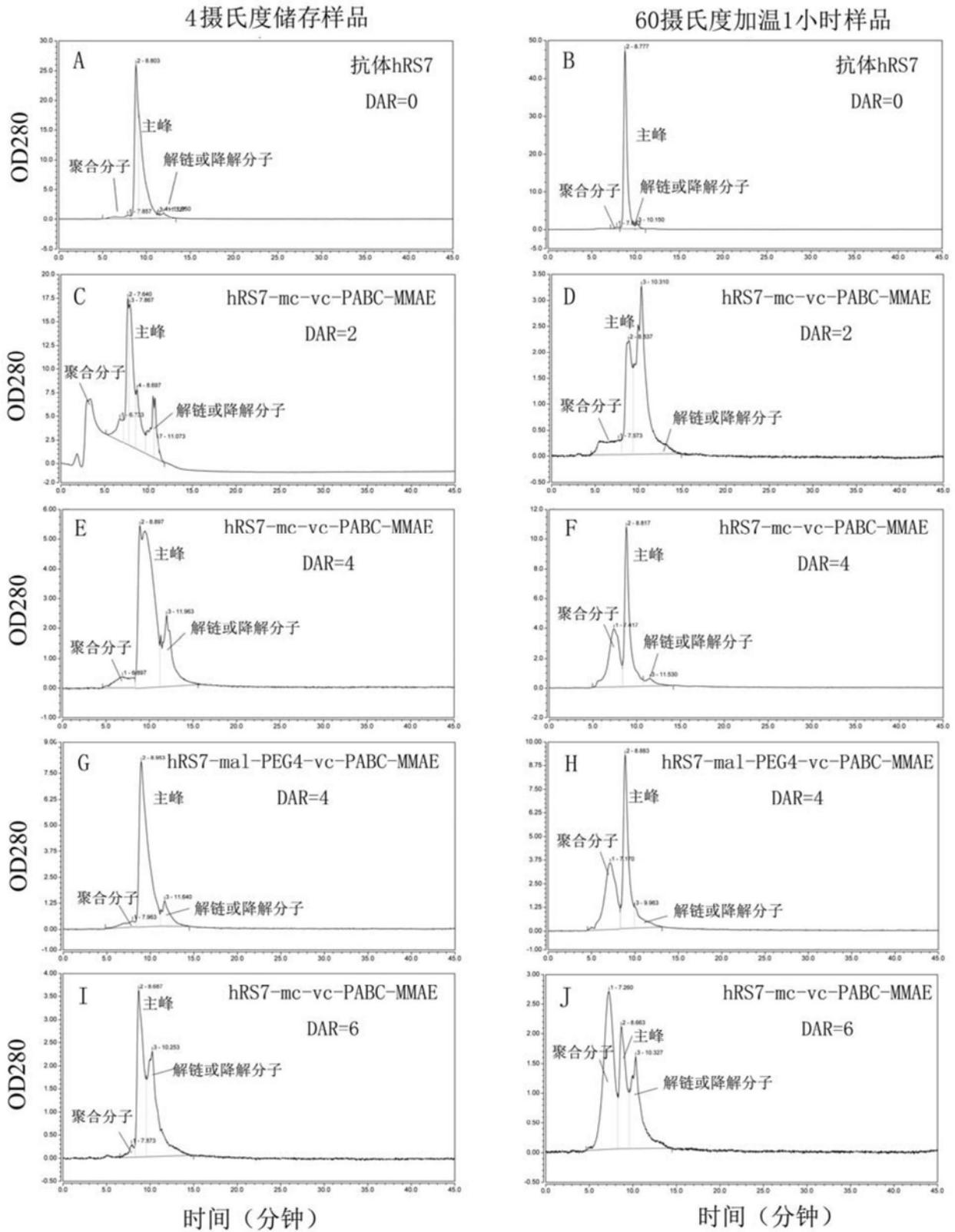
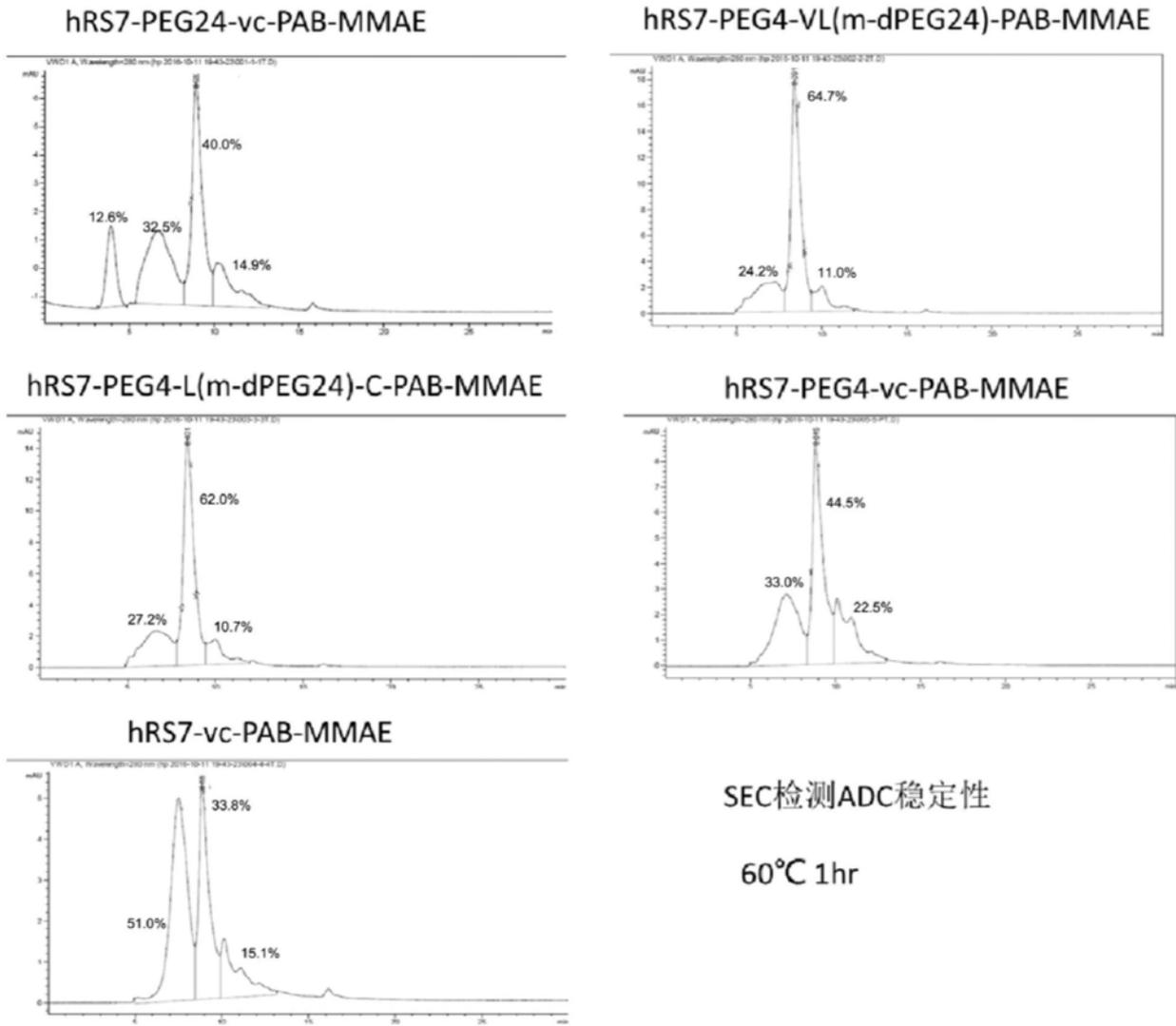


图6



SEC检测ADC稳定性
60°C 1hr

图7

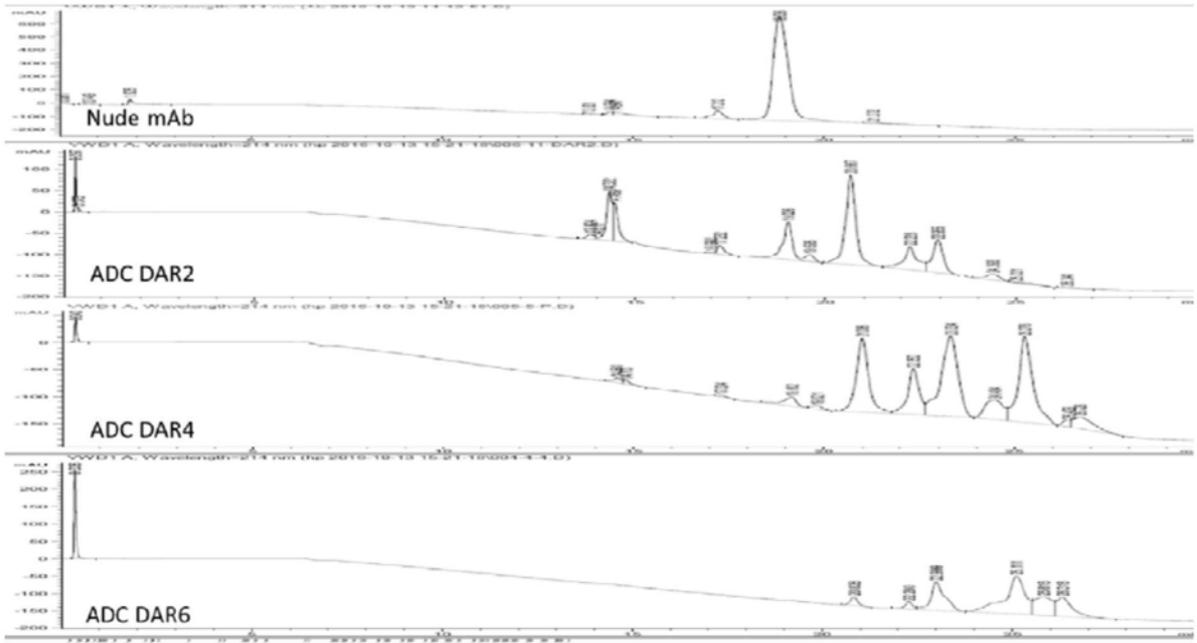


图8

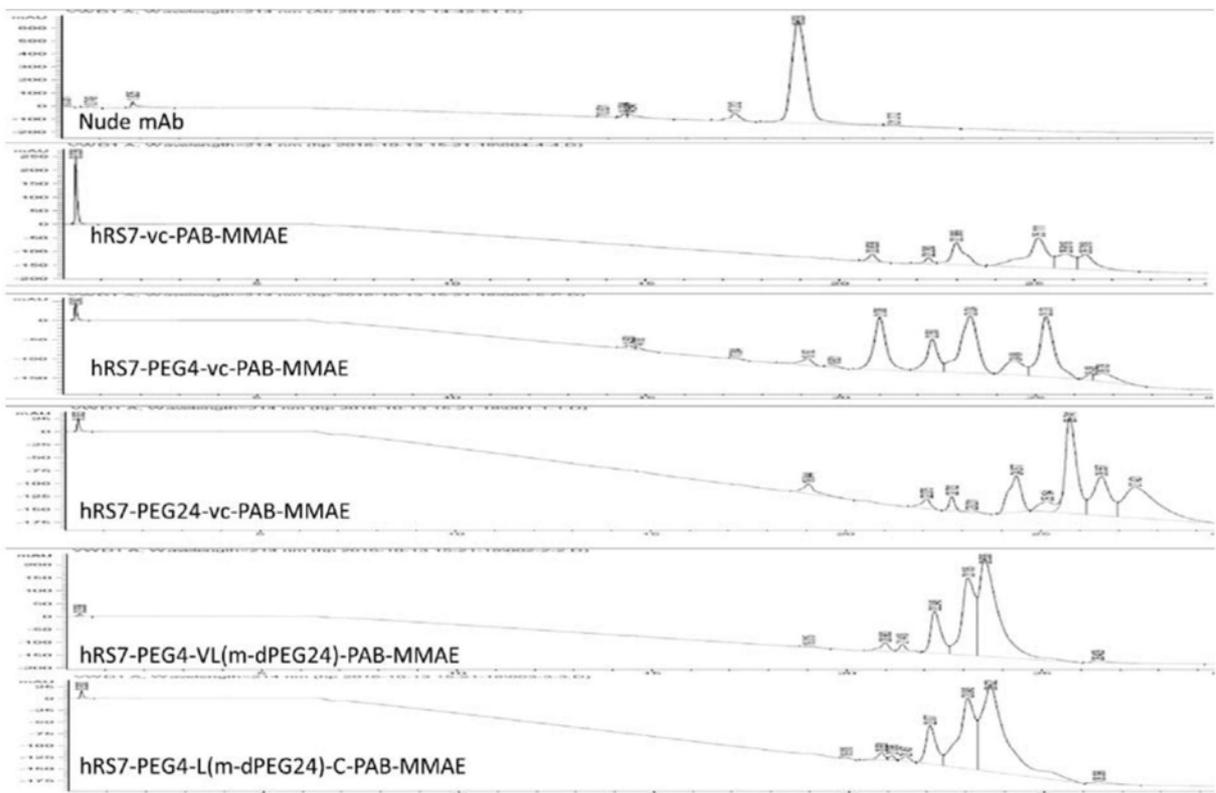


图9

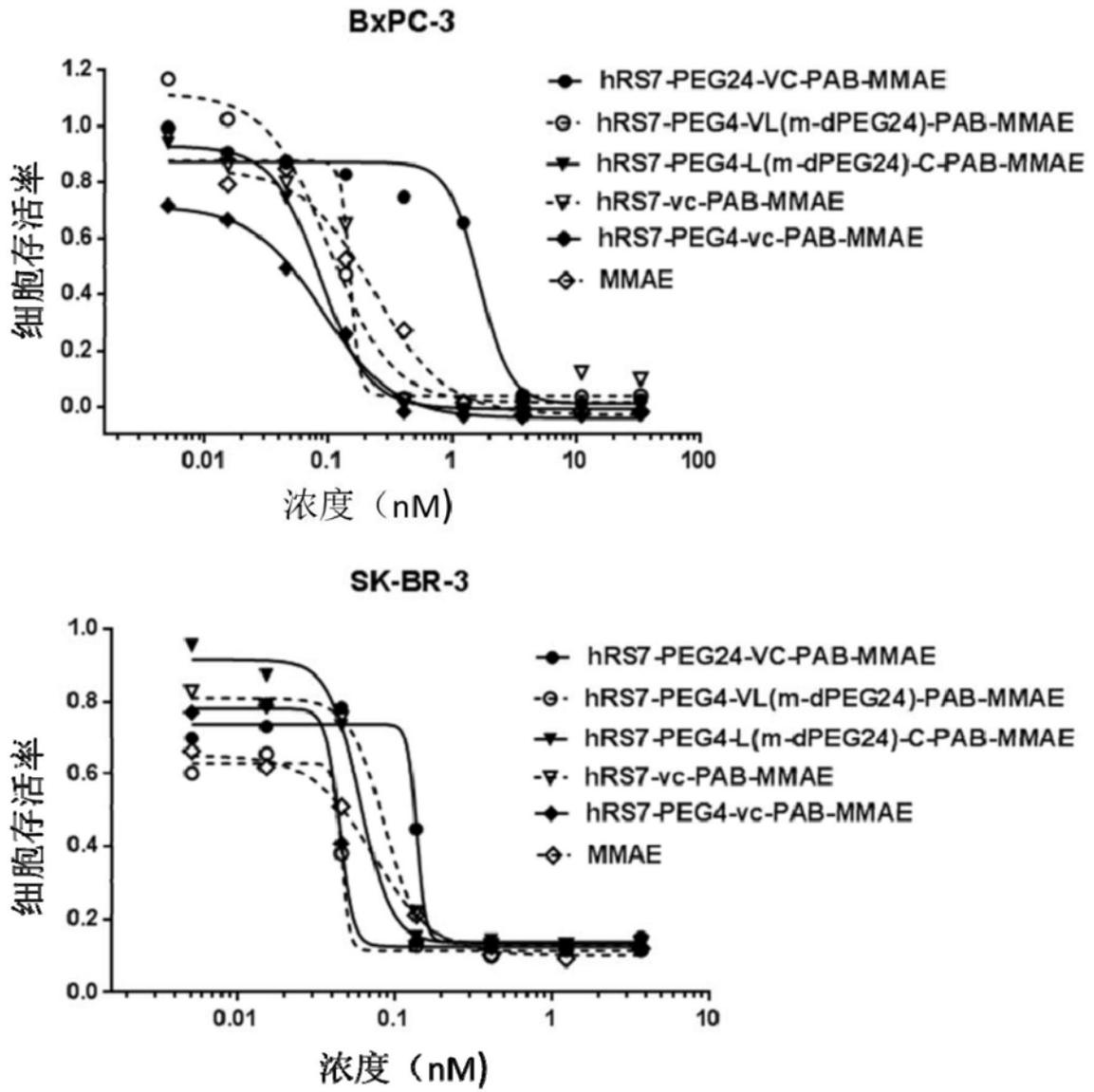


图10