(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115515642 A
(43)申请公布日 2022.12.23

(21)申请号 202180017269.9
(22)申请日 2021.02.26
(30)优先权数据
FR2001974 2020.02.27 FR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.08.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2021/050332 2021.02.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/170961 FR 2021.09.02
(71)申请人 麦克萨夫内部肿瘤公司
地址 法国图尔
(72)发明人 鲁多维奇·琼
克里斯汀·巴尔图斯
奥黛丽·德格兰奇 安托万·图泽
蒂博·克瓦雷克
瓦蕾莉·莱布隆德
马赫塔布·萨米米
(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
专利代理师 董世豪 张淑珍
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书28页
序列表7页 附图10页

(54)发明名称

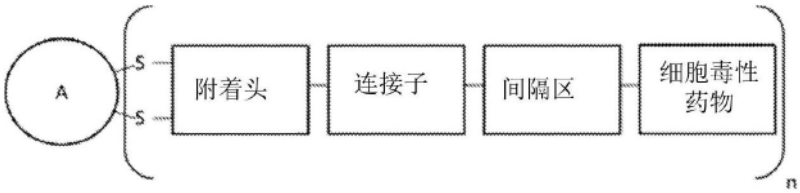
抗CD56抗体-药物偶联物及其在治疗中的用途

(57)摘要

本发明涉及抗体-药物偶联物,并涉及其在治疗中的用途,特别是用于治疗CD56+癌症的用途。

CN 115515642 A

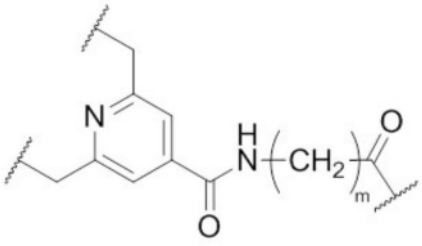
1.一种具有下述式(I)的抗体-药物偶联物：



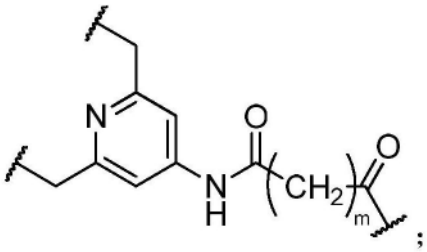
其中：

A为抗CD56抗体或抗体片段；

所述附着头由下式中的一个表示：

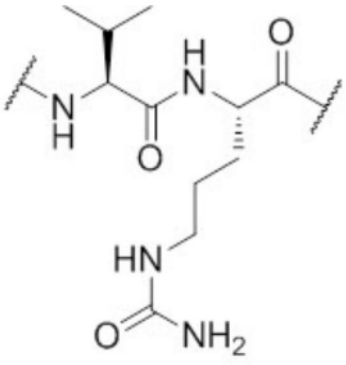


和

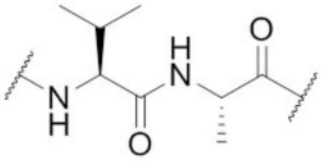


；

所述连接子为由下式表示的可裂解的连接子：

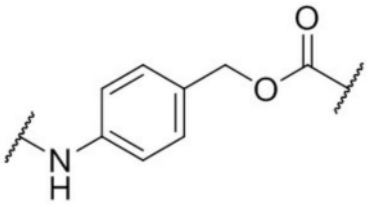


或



；

所述间隔区由下式表示：



；

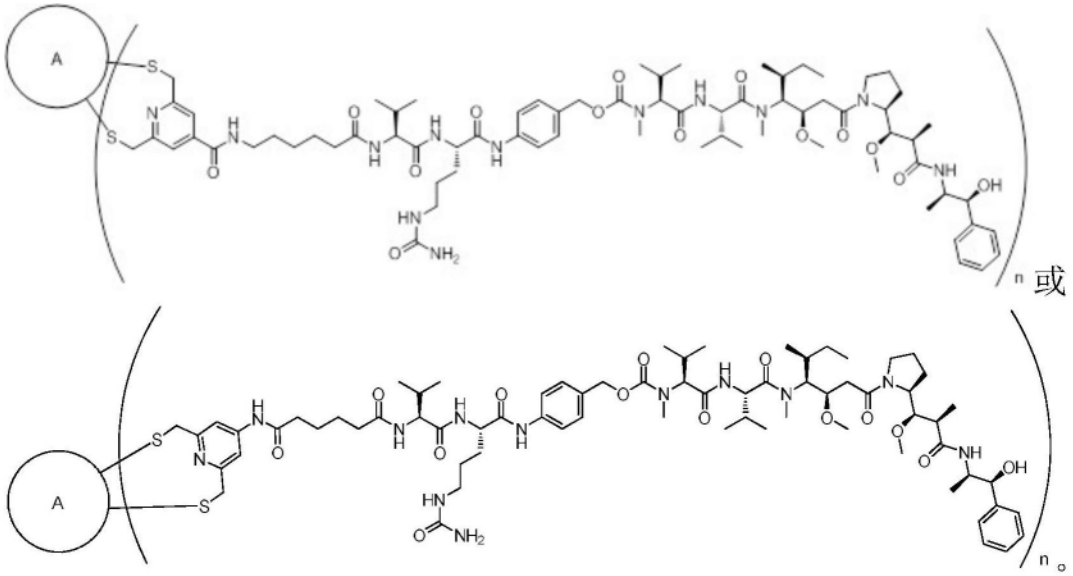
m为1-10的整数；

n为1-4的整数。

2.如权利要求1所述的抗体-药物偶联物，其中，m等于4或5。

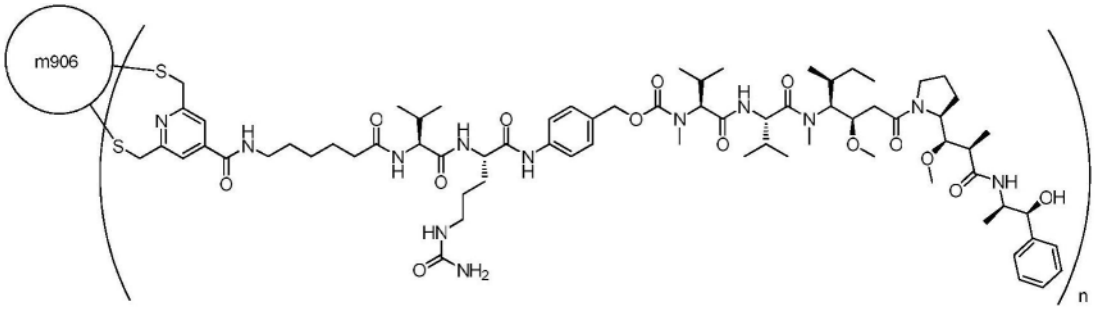
3.如权利要求1或2所述的抗体-药物偶联物，其中，所述细胞毒性药物选自甲氨蝶呤、IMID、倍癌霉素、考布他汀、卡奇霉素、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF)、美登素、DM1、DM4、SN38、鹅膏蕈碱、吡咯并苯并二氮䓬、吡咯并苯并二氮䓬二聚体、吡咯并吡啶并二氮䓬、吡咯并吡啶并二氮䓬二聚体、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和蓖麻毒素，优选MMAE。

4.如权利要求1-3中任一项所述的抗体-药物偶联物，所述抗体-药物偶联物具有下式：

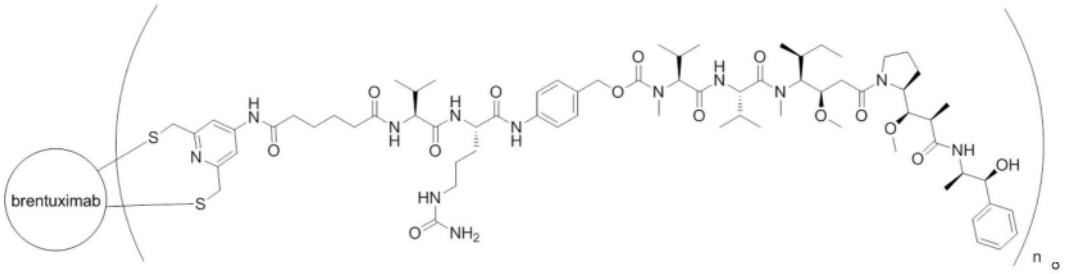


5.如权利要求1-4中任一项所述的抗体-药物偶联物,其中,A为m906。

6.如权利要求1-5中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述抗体-药物偶联物具有下式(Ia):



或具有下式(Ia'):



7.一种组合物,所述组合物包含如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种抗体-药物偶联物。

8.如权利要求7所述的组合物,其中,所述抗体-药物偶联物的至少50%、优选约60%具有的n等于4。

9.如权利要求7或8所述的组合物,其中,A为抗体,并且平均药物抗体比(平均DAR)在3.5到4之间、优选在3.8到4之间,例如等于3.9±0.1。

10.如权利要求7-9中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含:紫杉醇、多西他赛、多柔比星和/或环磷酰胺、来那度胺、地塞米松、卡铂、依托泊苷、和/或用于抗癌免疫治疗的抗体例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体。

11.用作药物的如权利要求1-6中任一项所述的抗体-药物偶联物或如权利要求7-10中

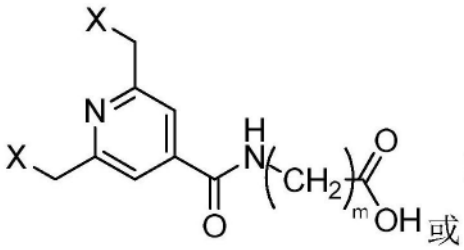
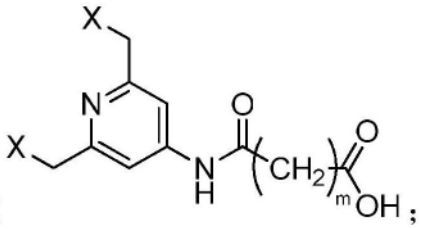
任一项所述的组合物。

12.用于CD56+癌症的治疗中的如权利要求1-6中任一项所述的抗体-药物偶联物或如权利要求7-10中任一项所述的组合物，所述CD56+癌症优选：黑色素瘤、胚芽瘤；血液病，例如急性髓系白血病、骨髓瘤、母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤；和神经内分泌癌。

13.如权利要求12所述的用于所述用途的抗体-药物偶联物，其中，CD56+癌症选自神经内分泌癌，例如小细胞肺癌或Merkel细胞癌，优选Merkel细胞癌。

14.一种用于制备如权利要求1-13中任一项所述的抗体-药物偶联物的方法，所述方法包括以下步骤：

(i)通过将附着头偶合至化合物来制备细胞毒性偶联物，所述附着头具有下式：

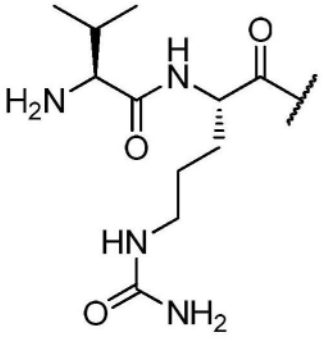
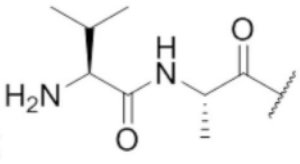

或

；

所述化合物具有下式：

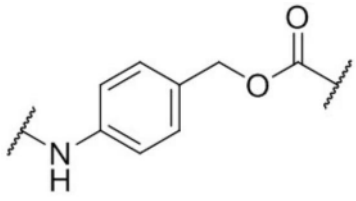


其中：

所述连接子为选自下式的可裂解的连接子：


或

；

所述间隔区由下式表示：


；

X为Br、Cl、I或F；

m为1-10的整数，有利地为从2至7、从3至6，有利地等于4或5；以及

(ii)使步骤(i)中获得的细胞毒性偶联物与抗CD56抗体或抗CD56抗体片段进行反应。

15.如权利要求14所述的用于制备抗体-药物偶联物的方法，所述方法包括以下的步骤，所述步骤包括：使MMAE 6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)酰胺基-N-己酰胺-缬氨酸-瓜氨

酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯或MMAE 6-((2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基)-6-氧代己酰胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯与抗CD56抗体或抗CD56抗体片段进行反应。

抗CD56抗体-药物偶联物及其在治疗中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及新型抗体-药物偶联物,所述抗体-药物偶联物包含与细胞毒性药物偶合的针对CD56抗原的抗体,并涉及其作为药物的用途,特别是在抗癌治疗中的用途。

背景技术

[0002] 抗体-药物偶联物(ADC)构成了用于选择性递送细胞毒性药物的手段。因此,抗体-药物偶联物可用于将抗体靶向的特异性与其所偶联的试剂的强力的新的效应功能相结合。

[0003] 抗体-药物偶联物的一般结构为式(I)的结构。连接抗体和药物的部分被称为连接子。其可以通过形成四个链间二硫桥键的八个半胱氨酸中的至少一个来接枝到抗体上。接枝到抗体上的细胞毒性药物分子的数量决定了被称为药物抗体比(DAR)的比例。

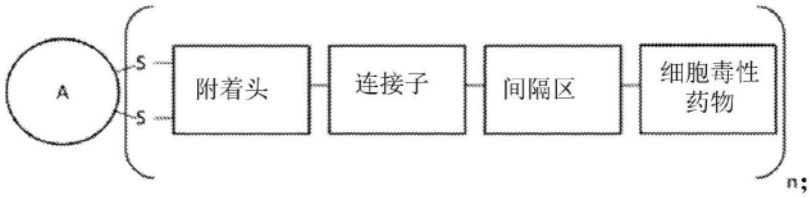
[0004] 在固定至其靶抗原后,抗体通过受体介导的内吞在细胞中被内化。囊泡与溶酶体融合,在该处,细胞毒性药物通过不同的机制从抗体释放。然后,活化的细胞毒性药物作用于细胞,诱导细胞死亡,并且有时经由转运或扩散到环境中而作用于邻近的癌细胞。因此,抗体主要用作载体并将细胞毒性药物递送到细胞。

[0005] Merkel细胞癌(MCC)是一种侵袭性皮肤癌,发生在老年受试者中。直到最近,无法手术的转移性患者的治疗采用基于铂盐的综合化疗,没有生存益处。使用靶向PD-L1(avelumab)作为一线治疗的免疫疗法已经能够在大约50%的患有无法手术CCM的患者中获得客观反应,并且在有反应的患者的一半中获得持久反应。然而,没有反应的患者的持久存在促使了新的治疗策略的发展。在这种情况下,开发在CCM方面的靶向治疗看起来构成了有前途的策略。

[0006] 在这种情况下,CD56由大多数CCM强烈表达,已被确定为治疗靶点。事实上,IMGN901是通过第一代技术偶合到mertansine(DM1)的抗CD56 ADC,抑制微管蛋白的聚合。在具有表达CD56的实体瘤的患者(包括CCM的情况)中进行的多项I期研究可表明,IMGN901具有可接受的耐受性。此外,已经提出了在小细胞肺癌中使用相同分子并结合化疗(顺铂-依托泊苷)的II期研究。该研究没有证明任何生存益处,因为IMGN901治疗组中经常发生继发效应,尤其是发热性中性粒细胞减少症(与中性粒细胞降低相关的感染),表明该物质具有非特异性毒性。因此,需要开发更均匀、更稳定并因此更有效和/或产生更少继发效应的细胞毒性抗CD56药物偶联物。此外,本专利中描述的技术可用于将细胞毒性分子特异性地递送至肿瘤细胞,同时限制其非特异性释放到血液循环中,从而限制药物诱导的非特异性毒性。

发明内容

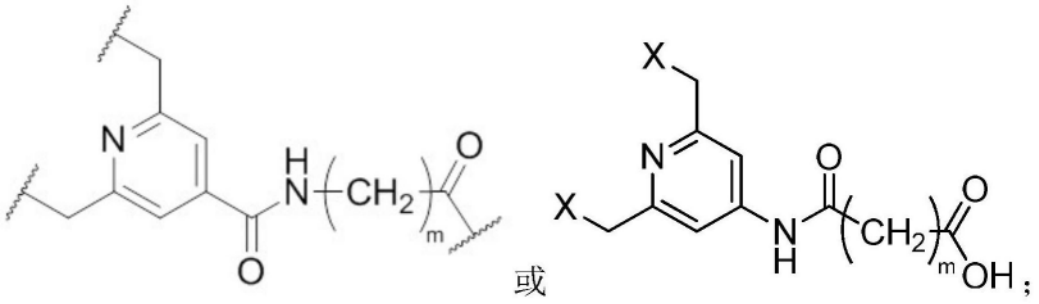
[0007] 本发明的第一目的关注具有下述式(I)的抗体-药物偶联物:

[0008] 

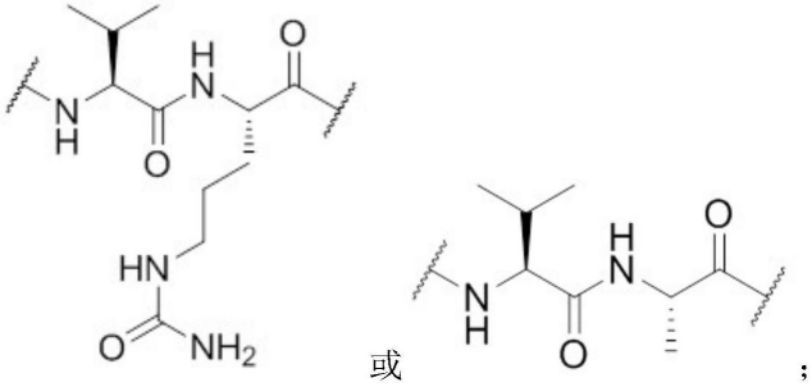
[0009] 其中：

[0010] A为抗CD56抗体或抗体片段；

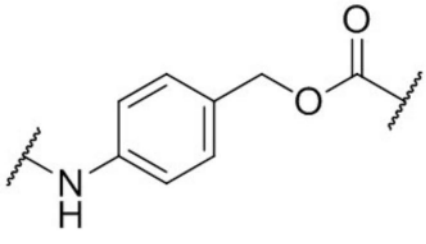
[0011] 所述附着头由下式中的一个表示：

[0012] 

[0013] 所述连接子为选自下式的可裂解的连接子：

[0014] 

[0015] 所述间隔区由下式表示：

[0016] 

[0017] m为1-10的整数；

[0018] n为1-4的整数。

[0019] 本发明的第二目的关注包含一种或多种根据本发明的抗体-药物偶联物的组合物。

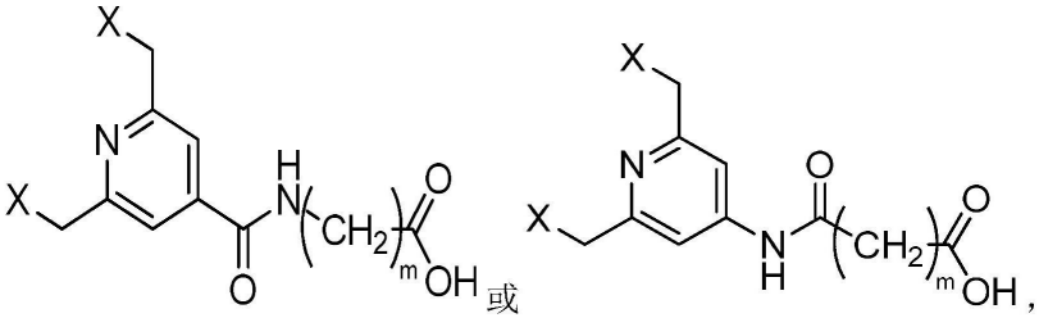
[0020] 本发明的第三目的关注用作药物的根据本发明的抗体-药物偶联物或根据本发明的组合物。

[0021] 本发明的第四目的关注用于CD56+癌症的治疗中的根据本发明的抗体-药物偶联物或根据本发明的组合物。

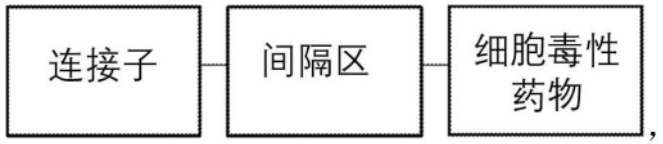
[0022] 本发明的第五目的关注用于制备根据本发明的抗体-药物偶联物的方法,所述方

法包括包含以下步骤：

[0023] (i)通过将附着头偶合至化合物来制备细胞毒性偶联物，所述附着头具有下式：

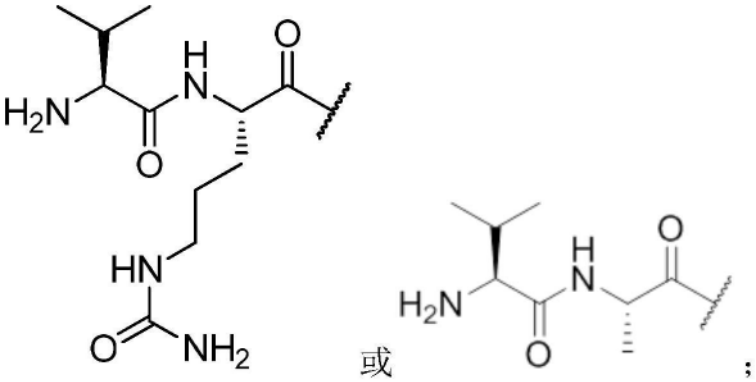
[0024] 

[0025] 所述化合物具有下式：

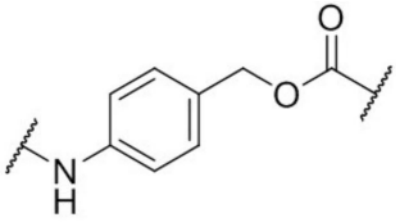
[0026] 

[0027] 其中：

[0028] 所述连接子为选自下式的可裂解的连接子：

[0029] 

[0030] 所述间隔区由下式表示：

[0031] 

[0032] X为Br、Cl、I或F；

[0033] m为1-10的整数，有利地为2到7、3到6的整数，有利地等于4或5；以及

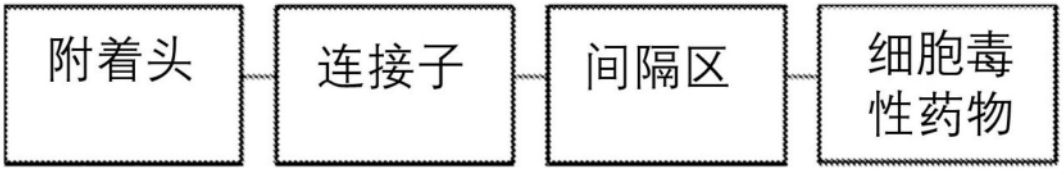
[0034] (ii)使步骤(i)中获得的细胞毒性偶联物与抗CD56抗体或抗CD56抗体片段反应。

[0035] 优选地，用于制备根据本发明的抗体-药物偶联物的方法包括以下的步骤，所述步骤包括：使MMAE 6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)酰胺基-N-己酰胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯或MMAE 6-((2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基)-6-氧代己酰胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯与抗CD56抗体或抗CD56抗体片段进行反应。

具体实施方式

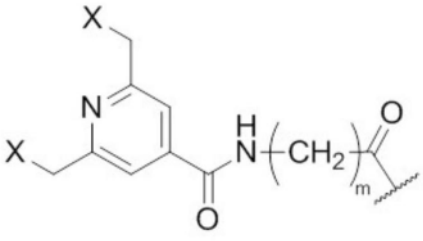
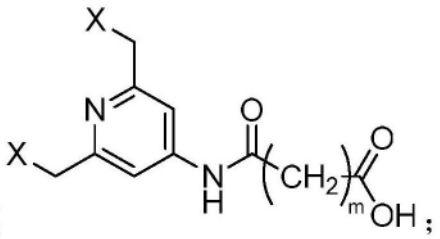
[0036] 定义

[0037] 术语“细胞毒性偶联物”是指包含细胞毒性药物的偶联物。在本发明的上下文中，细胞毒性偶联物是指具有下式(II)的偶联物：

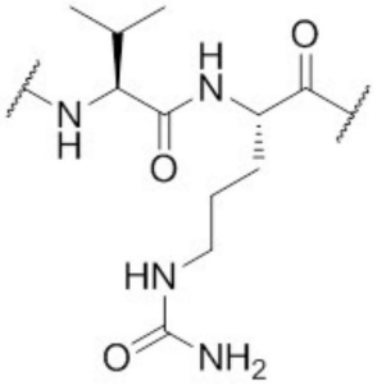
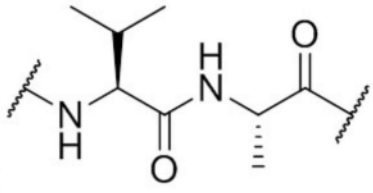
[0038] 

[0039] 其中：

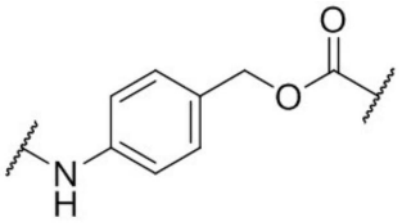
[0040] 所述附着头由下式中的一个表示：

[0041] 
或 
；

[0042] 所述连接子为选自下式的可裂解的连接子：

[0043] 
或 
；

[0044] 所述间隔区由下式表示：

[0045] 
；

[0046] X为Br、Cl、I或F；

[0047] m为1-10的整数。

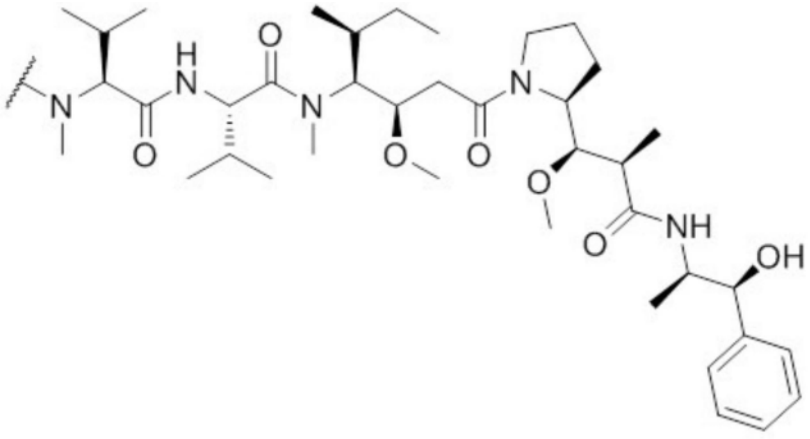
[0048] 术语“细胞毒性药物”表示能够抑制或阻止细胞功能和/或发育的任何天然或合成分子。术语“细胞毒性”意指化学或生物试剂改变细胞、可能直至细胞被破坏的特性。

[0049] 在本发明的具体实施方式中，细胞毒性药物选自已获得上市许可并用于抗癌或抗炎治疗的任何化合物，或正在经历抗癌或抗炎治疗方面的临床评价的任何分子。例如，细胞毒性药物将选自紫杉醇(Taxol®)或多西他赛(Taxotère®)或其衍生物之一、拓扑替康、硼替佐米、柔红霉素、柔红霉素类似物、长春新碱、丝裂霉素C、视黄酸、甲氨蝶呤、伊洛前列

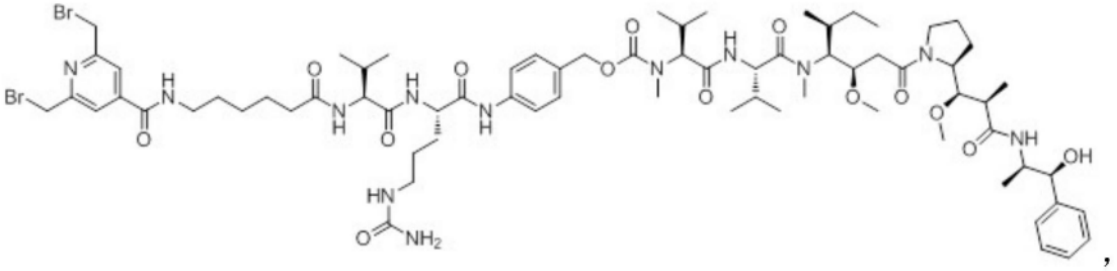
素(Ilomédine®)、阿司匹林、IMID(免疫调节酰亚胺药物)、来那度胺、泊马度胺(pomalidomide)。

[0050] 在本发明的另一具体实施方式中,细胞毒性药物选自于由如下所组成的组:倍癌霉素及其类似物、dolastatins、考布他汀及其类似物、卡奇霉素、N-乙酰基-γ-卡奇霉素(CMC)、卡奇霉素的衍生物、美登素及其类似物(例如maytansinoid类的衍生物,例如DM1和DM4)、奥瑞他汀及其衍生物(例如奥瑞他汀E、奥瑞他汀EB(AEB)、奥瑞他汀EFP(AEFP)、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF))、tubulysin、disorazole、埃博霉素、棘霉素、雌莫司汀、西马多丁、eleutherobin、甲氨蝶呤、放线菌素、丝裂霉素A、喜树碱、喜树碱的衍生物、SN38、TK1、鹅膏蕈碱、吡咯并苯并二氮䓬、吡咯并苯并二氮䓬二聚体、吡咯并吡啶并二氮䓬、吡咯并吡啶并二氮䓬二聚体、DNA嵌入剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂或酪氨酸激酶抑制剂。在本发明的另一具体实施方式中,药物M选自假单胞菌外毒素(PE)、deBouganin、Bouganin、白喉毒素(DT)和蓖麻毒素。

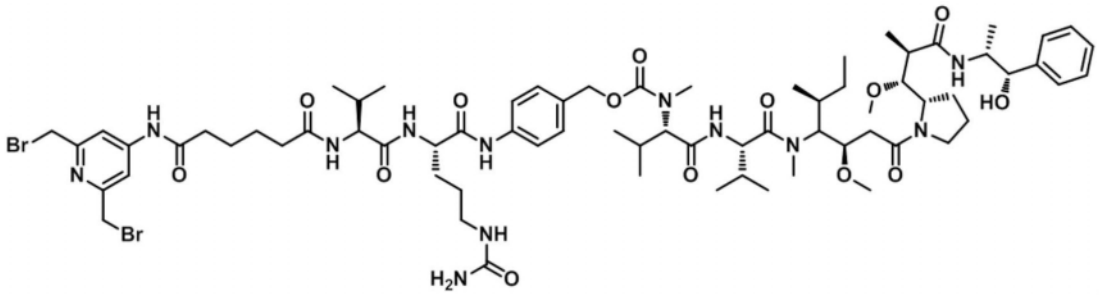
[0051] 在具体的实施方式中,细胞毒性药物选自甲氨蝶呤、IMID、倍癌霉素、考布他汀、卡奇霉素、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF)、美登素、DM1、DM4、SN38、鹅膏蕈碱、吡咯并苯并二氮䓬、吡咯并苯并二氮䓬二聚体、吡咯并吡啶并二氮䓬、吡咯并吡啶并二氮䓬二聚体、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和蓖麻毒素;优选MMAE,由下式表示:

[0052] 

[0053] 因此,在本发明的特别优选的实施方式中,细胞毒性偶联物具有下式(IIa):

[0054] 

[0055] 或下式(IIa'):

[0056] 

[0057] 术语“抗体”(也称为“免疫球蛋白”)表示由两条各约50-70kDa的重链(重链称为H链)和两条各约25kDa的轻链(轻链称为L链)通过链内和链间二硫键桥连接在一起所组成的异四聚体。每条链在N末端位置由可变区或可变结构域(对于轻链称为VL,对于重链称为VH)组成,并在C末端位置由恒定区组成,所述恒定区由对于轻链而言称为CL的单个结构域以及对于重链而言称为CH1、CH2、CH3、CH4的三个或四个结构域组成。

[0058] 术语“嵌合抗体”意指其中轻链可变区和重链可变区的序列与轻链恒定区和重链恒定区的序列属于不同物种的抗体。为了本发明的目的,重链可变区和轻链可变区的序列优先来自鼠类来源,而重链恒定区和轻链恒定区的序列属于非鼠类物种。在这方面,对于恒定区,可以使用任意的非鼠类哺乳动物物种,并且特别是人、猿、猪类(猪科)、牛科、马科、猫科、犬科或甚至鸟类,该列表并非穷举。优选地,根据本发明的嵌合抗体包含人源的重链恒定区和轻链恒定区序列以及鼠源的重链可变区和轻链可变区序列。

[0059] 术语“人源化抗体”意指如下抗体:其参与抗原识别的区域的所有或部分序列(高变区或CDR:互补决定区)和有时FR区(框架区)的某些氨基酸为非人源的,而不参与抗原识别的恒定区和可变区的序列为人源的。

[0060] 术语“人抗体”意指对于轻链的可变区和恒定区以及重链的可变区和恒定区而言均仅包含人序列的抗体。

[0061] 术语“抗体片段”意指通过酶促消化获得或通过生物生产获得并包含至少一个二硫键桥的免疫球蛋白的任何部分,例如Fab、Fab′、$F(ab')_2$、Fab′-SH、scFv-Fc或Fc。

[0062] 木瓜蛋白酶对免疫球蛋白的酶促消化产生两个相同的片段,它们被称为Fab片段(抗原结合片段)和Fc片段(可结晶片段)。胃蛋白酶对免疫球蛋白的酶促消化产生分裂成多个肽的Fc片段和$F(ab')_2$片段。$F(ab')_2$由通过链间二硫键桥连接的两个Fab′片段形成。Fab部分由可变区以及CH1和CL结构域形成。Fab′片段由Fab区和铰链区组成。Fab′-SH指其中铰链区的半胱氨酸残基带有游离硫醇基团的Fab′片段。scFv(单链可变片段)是通过对蛋白质进行工程化获得的片段,并且其仅由VH和VL可变结构域组成。该结构由位于两个结构域之间的称为连接子的短的柔性肽臂稳定。scFv片段可以连接到Fc片段以提供scFv-Fc。

[0063] 术语“CD56”表示“分化簇56”,它是膜糖蛋白,是免疫球蛋白(Ig)超家族的成员,在其细胞外部分含有5个Ig型结构域和两个3型纤连蛋白结构域。CD56也经常被称为“神经细胞粘附分子1(NCAM 1)”。

[0064] 术语“CD56+癌症”或“CD56阳性癌症”表示表达CD56的癌症。特别是,术语“CD56+癌症”表示其中癌细胞呈现出CD56表达的任何癌症病例。在神经内分泌癌、儿科肿瘤和某些血液病中经常观察到CD56的表达。在某些黑色素瘤和软组织肉瘤中也有报道。优选地,在本发明的上下文中,CD56+癌症选自黑色素瘤、胚芽瘤、血液病(例如急性髓系白血病、骨髓瘤、母

细胞性浆细胞样树突状细胞瘤)和神经内分泌癌(例如小细胞肺癌和Merkel细胞癌)。在优选的实施方案中,CD56+癌症是选自神经内分泌癌(例如小细胞肺癌或Merkel细胞癌,优选Merkel细胞癌)的恶性肿瘤。

[0065] 在本发明的上下文中,“同一性”或“同源性”通过比较在对比窗口中比对的两个序列来计算。序列的比对意味着可以确定在对比窗口中两个序列共有的位点(核苷酸或氨基酸)的数量。因此,共有位点数除以对比窗口中的位点总数,然后乘以100,以获得同一性百分比。序列同一性百分比的确定可以通过手动或借助于众所周知的计算机程序进行。

[0066] 在本发明的特定实施方式中,同一性或同源性对应于氨基酸残基的至少一个取代,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个取代,优选地以保守方式进行氨基酸残基的至少一个取代。“以保守方式进行的氨基酸残基的取代”包括用具有相似特性的侧链的另一个氨基酸残基取代一个氨基酸残基。具有相似特性的侧链的氨基酸家族是众所周知的。可以引用的实例有:碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、极性不带电侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如甘氨酸、半胱氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、β-支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0067] 因此,抗体或抗体片段的同源物或“抗体或抗体片段变体”(即具有相同功能的抗体或抗体片段)在恒定区和/或可变区具有可以被其他氨基酸取代的某些氨基酸,而不会失去与抗原结合的能力。优选这种替换在编码抗体或抗体片段的DNA序列内进行,即替换本质上是保守的。本领域技术人员将利用他/她的一般知识来确定可以进行取代的数目和它们的位置,以便能够保存抗体或抗体片段的功能。为了确定一种或多种抗体或抗体片段变体与抗原特异性结合的能力,可以使用本领域技术人员熟知的和在现有技术中已描述的一些合适的方法。因此,抗体或抗体片段可以使用结合方法进行测试,例如ELISA方法、亲和色谱法等。抗体或抗体片段变体例如可以使用“噬菌体展示”方法生成,这个方法能使噬菌体库得以生成。已知大量的方法以生成“噬菌体展示”文库并靶向具有期望功能特征的抗体或抗体片段变体。

[0068] 当提及根据本发明的抗体时,术语“纯化的”和“分离的”意指该抗体以基本上不存在其它相同类型的生物大分子的情况存在。如本文所用的术语“纯化的”表示相对于存在的大分子的总量,抗体优选为至少75重量%、更优选为至少85重量%、甚至更优选为至少95重量%、并且最优选为至少98重量%。

[0069] 术语“药学上可接受的”意指经联邦或州管理机构批准或者列入美国药典或欧洲药典或其它公认的药典,旨在用于动物和人。“药物组合物”表示包含药学上可接受的辅料的组合物。例如,药学上可接受的辅料可为与治疗剂一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或辅料。这些辅料可为无菌液体,例如水和油(包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)。当药物组合物静脉内给予时,水是优选的辅料。右旋糖和甘油的水溶液和盐水溶液也可用作液体辅料,特别是用于可注射溶液。药学上可接受的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。当药物组合物适合于口服给予时,片剂或胶囊剂可通过常规手段使用药学上可接受的赋形剂制备,所述药学上可接受的赋形剂例如粘合剂(例如预糊化的玉

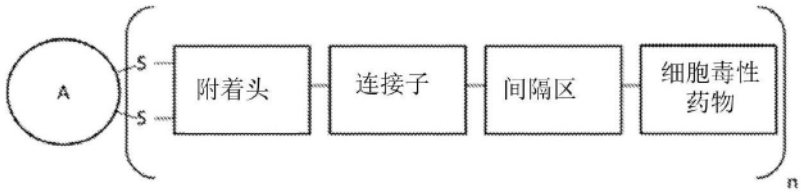
米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素)；填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙)；润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石或二氧化硅)；崩解剂(例如马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠)；或润湿剂(例如十二烷基硫酸钠)。片剂可以通过现有技术中众所周知的方法进行包衣。用于口服给予的液体制剂可以采用例如溶液剂、糖浆剂或悬浮剂的形式，或者可以以在使用前用水或另一合适的辅料重构的干燥产品的形式存在。此类液体制剂可以通过常规手段使用药学上可接受的辅料制备，所述药学上可接受的辅料例如助悬剂(例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化的食用脂肪)；乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶(acacia))；非水性辅料(例如杏仁油、油性酯、乙醇或分馏的植物油)；和防腐剂(例如山梨酸或者对羟基苯甲酸甲酯或丙酯)。视情况而定，药物组合物还可包含缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。根据本发明的组合物优选为药物组合物。

[0070] 术语“治疗”涵盖对病状或病理状态的症状的任何有益或期望的效果，并且甚至可以包括病状或病理状态的一种或多种可测量标志物的最小减少。例如，治疗可以涉及减轻或改善病状或病理状态的症状，或延迟疾病或病理状态的进展。术语“治疗”并不一定意味着完全根除或治愈疾病或相关症状。

[0071] 术语“原生质谱”意指在不使蛋白质变性的条件下进行的质谱分析，这意味着可以保留非共价键。原生质谱方法已在文献中得到广泛描述，例如参考文献[4]。

[0072] 抗体-药物偶联物

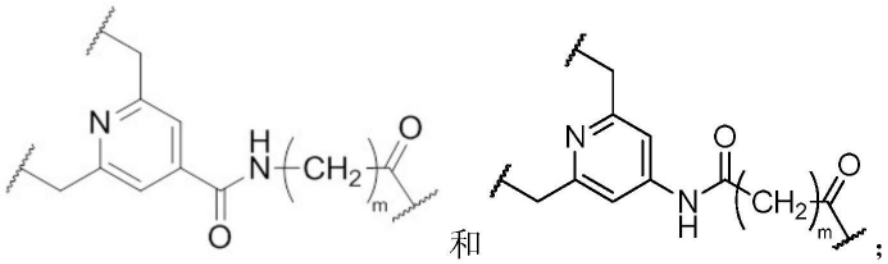
[0073] 本发明关注具有下式(I)的抗体-药物偶联物：

[0074] 

[0075] 其中：

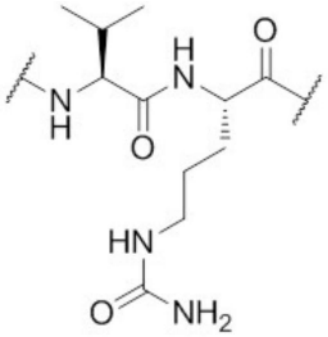
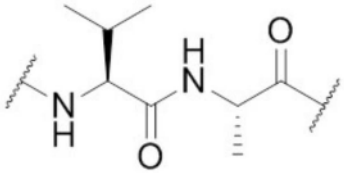
[0076] A为抗CD56抗体或抗体片段；

[0077] 所述附着头由下式中的一个表示：

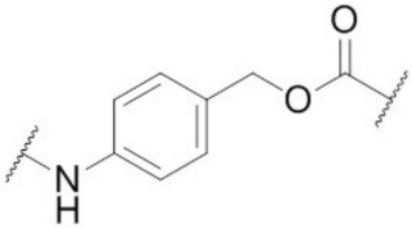
[0078] 

；

[0079] 所述连接子为选自下式的可裂解的连接子：

[0080]  或 ；

[0081] 所述间隔区由下式表示：

[0082] ；

[0083] m为1-10的整数，有利地为2-7、3-6的整数，有利地等于4或5；

[0084] n为1-4的整数。

[0085] 根据本发明的抗CD56抗体或抗体片段可为哺乳动物来源的(例如人或小鼠)、人源化的或嵌合的。优选使用现有技术中广泛描述的技术通过遗传修饰的细胞以重组的方式产生的单克隆抗体。

[0086] 当A为抗CD56抗体时，其优选为人IgG，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0087] 在具体的实施方式中，A是抗CD56抗体或抗体片段，其包含：

[0088] -轻链的可变结构域，其包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的CDR1、氨基酸序列SEQ ID NO:2的CDR2和氨基酸序列SEQ ID NO:3的CDR3；和

[0089] -重链的可变结构域，其包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的CDR1、氨基酸序列SEQ ID NO:5的CDR2和氨基酸序列SEQ ID NO:6的CDR3。

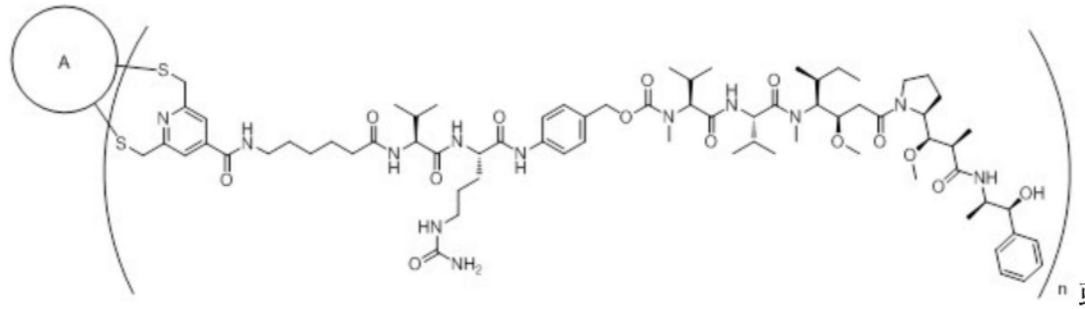
[0090] 在这一具体的实施方式中，轻链的可变结构域与氨基酸序列SEQ ID NO:15具有至少80％的同源性，优选至少90％的同源性，例如至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或甚至100％的同源性；并且重链的可变结构域与氨基酸序列SEQ ID NO:16具有至少80％的同源性，优选至少90％的同源性，例如至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或甚至100％的同源性。

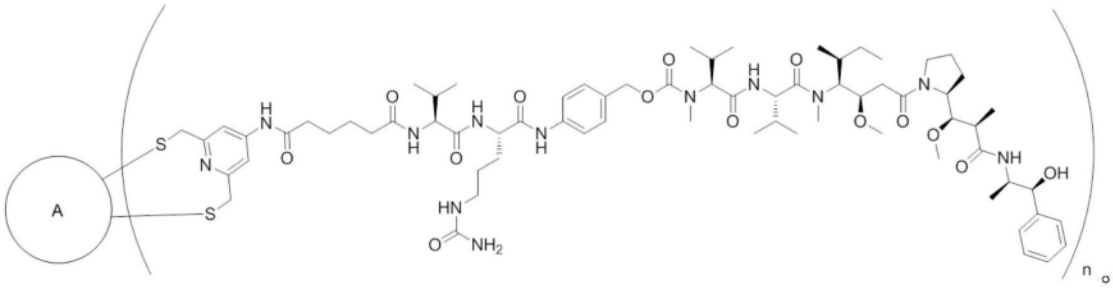
[0091] 因此，A可以是具有氨基酸序列SEQ ID NO:15作为轻链可变结构域并且具有氨基酸序列SEQ ID NO:16作为重链可变结构域的抗体或抗体片段。

[0092] 在具体的实施方式中，A是抗体，该抗体具有氨基酸序列SEQ ID NO:7的轻链并具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的重链。具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的重链在C末端位置还可具有额外的赖氨酸。

[0093] 在特别优选的实施方式中，A是申请US 2018/0214568 A1和参考文献[1]中描述的具有参考号m906的抗体。抗体m906是IgG1型抗CD56嵌合抗体，其具有氨基酸序列SEQ ID NO:7的轻链并具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的重链。

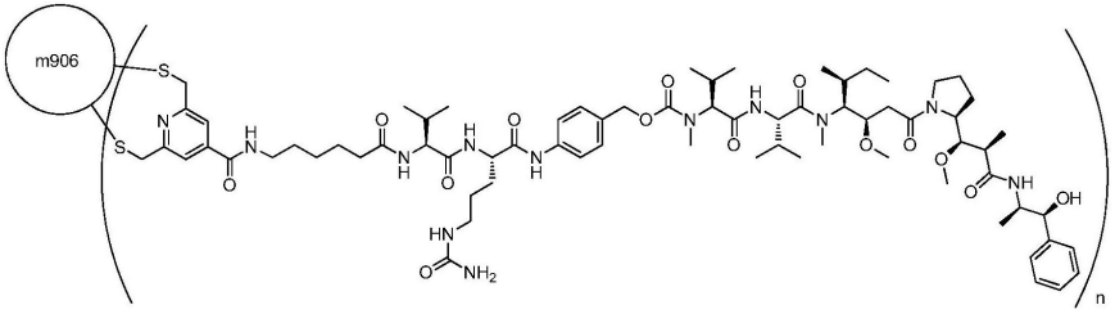
[0094] 在具体的实施方式中，本发明的抗体-药物偶联物具有下式中的一个：

[0095] 

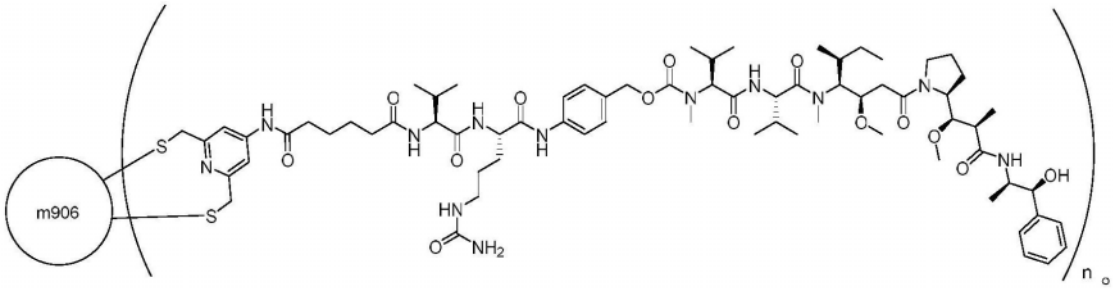
或


。

[0096] 在具体实施方式中，当A是m906时，本发明的抗体-药物偶联物具有下式(Ia)：

[0097] 

[0098] 或者具有下式(Ia')：

[0099] 

。

[0100] 在实施例中用参考号“MF-m906-MMAE”标识的抗体-药物偶联物对应于式(Ia)的抗体-药物偶联物。“m906”对应于抗体m906，即IgG1型人抗CD56抗体，该抗体具有氨基酸序列SEQ ID NO:7的轻链和具有氨基酸序列SEQ ID NO:8的重链。

[0101] 有利地，根据本发明的抗体-药物偶联物通过实施已知的纯化技术、例如色谱柱纯化和/或亲和柱纯化来进行纯化(或分离)。

[0102] 当n等于1时，所述抗体-药物偶联物通常被称为“DAR1”。当n等于2时，所述抗体-药物偶联物通常被称为“DAR2”。当n等于3时，所述抗体-药物偶联物通常被称为“DAR3”。当n等于4时，所述抗体-药物偶联物通常被称为“DAR4”。

[0103] 在具体的实施方式中，所述抗体-药物偶联物具有由减弱的Fc部分介导的一种或多种效应功能。优选地，由Fc部分介导的一种或多种效应功能选自ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)和CDC(补体依赖性细胞毒性)。就现有技术的教导而言，本领域技术人员在

减弱由Fc部分介导的一种或多种效应功能方面将没有困难，例如通过对Fc部分进行突变。已知许多用于降低由Fc部分介导的效应功能的突变。例如，其可以是旨在使Fc部分去糖基化的突变，特别是阻抑第297位天冬酰胺的糖基化的突变。

[0104] 在具体的实施方式中，所述抗体-药物偶联物在Fc部分被去糖基化，例如所述抗体-药物偶联物在第297位天冬酰胺处不再具有糖基化。

[0105] 组合物

[0106] 本发明还关注组合物，所述组合物包含具有如上定义的式(I)的一种或多种抗体-药物偶联物，例如具有式(Ia)或式(Ia')的抗体-药物偶联物。所述组合物可为包含具有如上定义的式(I)(例如具有式(Ia)或式(Ia'))的一种或多种抗体-药物偶联物和药学上可接受的辅料的药物组合物。

[0107] 根据本发明的组合物具有特别均质的特征，与非均质的组合物相比，这可引起组合物具有更好的稳定性、更好的功效和/或继发效应的减少。

[0108] 有利地，当A为抗体(例如m906)时，将根据本发明的组合物通过以下特征进行表征：

[0109] a)所述组合物的抗体-药物偶联物的至少50％、优选至少55％、至少60％、至少65％(例如至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％)具有的n等于4；

[0110] b)平均药物抗体比(平均DAR)在3到4.5之间；优选在3.5到4之间、在3.7到4之间、在3.8到4之间；例如等于3.9±0.1、例如等于3.89。平均DAR通常通过HIC(疏水相互作用色谱)方法或通过原生质谱确定。文献中广泛描述了HIC方法和原生质谱法。可以提及关于HIC方法的参考文献[3]和关于原生质谱法的参考文献[4]；

[0111] c)至少95％，优选至少96％、至少97％、至少98％、至少99％的抗体-药物偶联物以单体形式存在。单体百分比通常通过SEC(尺寸排阻色谱)方法确定。SEC方法在文献中广泛描述，例如在参考文献[2]中；

[0112] d)下文定义的n的比率的一个或多个；或者

[0113] e)选自a)、b)、c)和d)中的两个、三个或四个特征的组合。

[0114] 当A为抗体时，例如m906，根据本发明的组合物可通过以下的n的比率进行表征：

[0115] -少于5％、少于4％、少于3％、少于2％、少于1％、少于0.75％、少于0.5％、少于0.25％、少于0.2％、少于0.1％、例如约0％的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于1，

[0116] -少于10％、少于9％、少于8％、少于7％、少于6％、少于5％、少于4％、少于3％、少于2％、少于1％的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于2，

[0117] -少于25％、少于20％、少于18％、少于17％的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于3，和/或

[0118] -至少50％、至少55％、至少56％、至少57％、至少58％、至少59％、至少60％、至少65％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于4。

[0119] 当A为抗体(例如m906)时，根据本发明的组合物还可通过以下的n的比率进行表征：

[0120] -0％-5％之间、0％-2％之间、0％-1％之间、0％-0.75％之间、0％-0.5％之间、

0%-0.25%之间、0%-0.1%之间的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于1；

[0121] -0%-10%之间、0%-7%之间、0%-6%之间、3%-6%之间、5%-6%之间、0%-5%之间、0%-4%之间、0%-3%之间、0%-2%之间、0%-1%之间的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于2；

[0122] -0%-25%之间、5%-20%之间、10%-20%之间、15%-17%之间的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于3；和

[0123] -50%-85%之间、50%-80%之间、50%-75%之间、70%-85%之间、70%-80%之间、70%-75%之间、50%-60%之间、55%-60%之间的组合物的组合物抗体-药物偶联物具有的n等于4。

[0124] n的比率可以通过HIC(疏水相互作用色谱)方法或通过原生质谱来确定。

[0125] 在第一具体实施方式中，当A为抗体(例如m906)时，根据本发明的组合物可由通过HIC(疏水相互作用色谱)方法确定的以下的n的比率进行表征：

[0126] -少于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%、少于0.75%、少于0.5%、少于0.25%、少于0.2%、少于0.1%的组合物的抗体-药物偶联物的n等于1；

[0127] -少于10%、少于9%、少于8%、少于7%、少于6%、例如约5.5%的组合物的抗体-药物偶联物的n等于2；

[0128] -少于25%、少于20%、少于18%、少于17%、例如约16%的组合物的抗体-药物偶联物的n等于3；和/或

[0129] -至少50%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、例如约60%的组合物的抗体-药物偶联物的n等于4。

[0130] 因此，当A为抗体(例如m906)时，根据本发明的组合物还可由通过HIC(疏水相互作用色谱)方法确定的以下的n的比率进行表征：

[0131] -0%-5%之间、0%-2%之间、0%-1%之间、0%-0.75%之间、0%-0.5%之间、0%-0.25%之间、0%-0.1%之间的组合物的抗体-药物偶联物的n等于1；

[0132] -0%-10%之间、0%-7%之间、0%-6%之间、3%-6%之间、5%-6%之间的组合物的抗体-药物偶联物的n等于2；

[0133] -0%-25%之间、5%-20%之间、10%-20%之间、15%-17%之间的组合物的抗体-药物偶联物的n等3；和

[0134] -50%-75%之间、50%-60%之间、55%-60%之间的组合物的抗体-药物偶联物的n等于4。

[0135] 在第二具体实施方式中，当A为抗体(例如m906)时，根据本发明的组合物可由通过原生质谱确定的以下的n的比率进行表征：

[0136] -少于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%、少于0.75%、少于0.5%、少于0.25%、少于0.2%、少于0.1%、例如约0%的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于1；

[0137] -少于10%、少于9%、少于8%、少于7%、少于6%、少于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%、例如约0%的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于2；

[0138] -少于25%、少于20%、少于18%、少于17%的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于3；和/或

[0139] -至少50%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少

65％、至少70％、至少71％、至少72％、至少73％、至少74％的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于4。

[0140] 因此，当A是抗体(例如m906)时，根据本发明的组合物还可由通过原生质谱确定的以下的n的比率进行表征：

[0141] -0％-5％之间、0％-2％之间、0％-1％之间、0％-0.75％之间、0％-0.5％之间、0％-0.25％之间、0％-0.1％之间的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于1；

[0142] -0％-10％之间、0％-7％之间、0％-6％之间、0％-5％之间、0％-4％之间、0％-3％之间、0％-2％之间、0％-1％之间的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于2；

[0143] -0％-25％之间、5％-20％之间、10％-20％之间、15％-17％之间的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于3；和

[0144] -50％-85％之间、50％-80％之间、50％-75％之间、70％-85％之间、70％-80％之间、70％-75％之间的组合物的抗体-药物偶联物具有的n等于4。当A为抗体时，根据本发明的组合物还可包含DAR0，即不具有细胞毒性偶联物的抗体。优选存在少于10％、少于9％、少于8％、少于7％、少于6％、少于5％、少于4％、少于3％、少于2％、少于1％、少于0.5％、少于0.4％、少于0.2％、少于0.1％的DAR0，例如约0％的DAR0。DAR0百分比可以通过HIC(疏水相互作用色谱)方法或通过原生质谱来确定。

[0145] 根据本发明的组合物还可包含DAR5，即具有5个细胞毒性偶联物的抗体-药物偶联物。优选，存在少于25％、少于20％、少于15％、少于10％、少于9％、少于8％、少于7％、少于6％、少于5％的DAR5。文献中广泛描述了抗体-药物偶联物的组合物中的DAR5的存在，但对DAR5的确切结构研究甚少。因此，考虑了组合物中存在的所有DAR，即DAR0、DAR1(即n＝1)、DAR2(即n＝2)、DAR3(即n＝3)、DAR4(即n＝4)、DAR5等，来计算平均DAR。优选地，当A为抗体时，根据本发明的组合物不包含高于DAR5的任何DAR，例如DAR6、DAR7等。DAR5以上的百分比可通过HIC(疏水相互作用色谱)方法或通过原生质谱来确定。在非常具体的实施方式中，根据本发明的组合物具有图1的HIC谱图、或者图3的原生质谱谱图。

[0146] 治疗用途

[0147] 本发明还关注用作药物的根据本发明的式(I)的抗体-药物偶联物或包含根据本发明的式(I)的抗体-药物偶联物的组合物，例如用于CD56+癌症的治疗中，所述CD56+癌症例如黑色素瘤、胚芽瘤、血液病(例如急性髓系白血病、骨髓瘤、母细胞性浆细胞样树突状细胞瘤)和神经内分泌癌。有利地，CD56+癌症选自神经内分泌癌，例如小细胞肺癌或Merkel细胞癌，优选Merkel细胞癌。

[0148] 根据本发明的抗体-药物偶联物或组合物优选被配制用于肠胃外给予，例如血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌内给予。如本文所用，术语“肠胃外给予”表示除肠和局部给予之外的给予方式(通常通过注射)，并且包括但不限于血管内给予、静脉内给予、肌内给予、动脉内给予、intrathapsal给予、囊内给予、眶内给予、瘤内给予、心内给予、皮内给予和腹膜内给予、通过注射给予、经气管灌注给予、皮下给予、关节内给予、囊下给予、蛛网膜下给予、脊柱内给予和胸骨内给予。在本发明的上下文中优选静脉内给予，例如通过静脉内灌注。

[0149] 向有需要的受试者给予的抗体-药物偶联物的剂量将作为许多因素的函数而变化，包括但不限于给药方式、所治疗疾病的类型和严重程度、患者的状况、患者的肥胖水平、

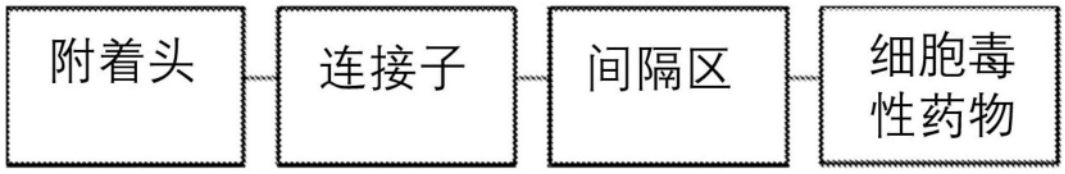
患者的年龄等。本领域技术人员基于他们在该领域的知识将容易地确定作为这些和其它因素的函数所需的剂量范围。也可以使用动物模型或临床试验来确定适当的剂量。例如，根据本发明的抗体-药物偶联物的典型剂量可为从5mg/m^2到250mg/m^2、如从30mg/m^2到150mg/m^2、从5mg/m^2到75mg/m^2、从75mg/m^2到120mg/m^2、例如等于100mg/m^2、75mg/m^2、60mg/m^2。给予可以一次全部完成，或更普遍地，可以以多剂量进行。给予方案可包括初始剂量，随后是维持剂量(例如每周、每两周、每三周、每月或更长)。治疗的持续时间可以作为所治疗的疾病和受试者的函数而变化。

[0150] 根据本发明的抗体-药物偶联物或组合物可用于单一疗法或与对所考虑疾病具有公认治疗效果的药物联合使用。例如，它可以是紫杉醇、多西他赛、多柔比星、环磷酰胺、来那度胺、地塞米松、卡铂、依托泊苷或用于抗癌免疫疗法的抗体(例如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体)。

[0151] 本说明书还关注用于治疗受试者中的CD56+癌症的方法，所述方法包括向所述受试者给予治疗有效量的根据本发明的式(I)的抗体-药物偶联物或包含根据本发明的式(I)的抗体-药物偶联物的组合物。

[0152] 制备方法

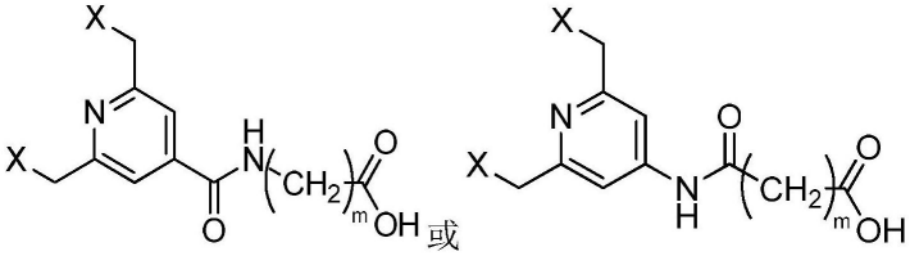
[0153] 本说明书还关注用于制备如上定义的式(I)的抗体-药物的方法，其中具有如上定义的下式(II)的细胞毒性偶联物与如上定义的抗CD56抗体或抗体片段反应：

[0154] 

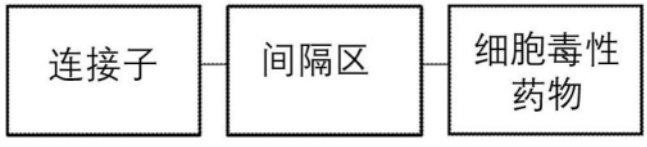
。

[0155] 本发明关注用于制备根据本发明的抗体-药物偶联物的方法，所述方法包括以下步骤：

[0156] (i)通过将附着头偶合至化合物来制备细胞毒性偶联物，所述附着头具有下式：

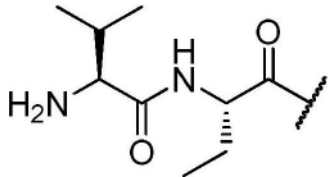
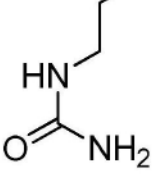
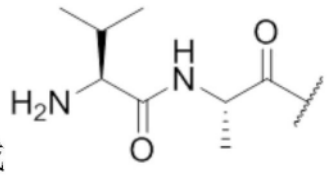
[0157] 

[0158] 所述化合物具有下式：

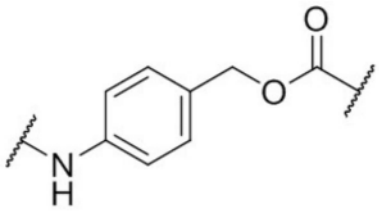
[0159] 

[0160] 其中：

[0161] 所述连接子为选自下式的可裂解的连接子：

[0162]   或  ；

[0163] 所述间隔区由下式表示：

[0164]  ；

[0165] X为Br、Cl、I或F；

[0166] m为1-10的整数，有利地为从2至7、从3至6的整数，有利地等于4或5；和

[0167] (ii)使步骤(i)中获得的细胞毒性偶联物与抗CD56抗体或抗CD56抗体片段反应。在上文的“细胞毒性偶联物”和“抗体-药物偶联物”的定义部分更详细地描述了附着头，不同之处在于该方法中使用的附着头包含末端羧酸官能团。

[0168] 在上文的“细胞毒性偶联物”的定义和“抗体-药物偶联物”部分更详细地描述了连接子，不同之处在于该方法中使用的连接子包含末端胺官能团。

[0169] 在上文的“细胞毒性偶联物”定义和“抗体-药物偶联物”部分更详细的描述了间隔区。

[0170] 在上文的“细胞毒性偶联物”定义和“抗体-药物偶联物”部分中更详细地描述了细胞毒性药物。

[0171] 在上文的“细胞毒性偶联物”和“抗体-药物偶联物”定义部分中更详细地描述了抗-CD56抗体。

[0172] 当细胞毒性药物是MMAE时，可以使用步骤(i)来获得具有式(IIa)或式(IIa')的细胞毒性偶联物。

[0173] 在具体的实施方式中，用于制备根据步骤(i)的细胞毒性偶联物的方法包括包含如下的步骤，所述步骤包括：将6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基己酸或6-((2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基)-6-氧代己酸偶合至MMAE缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯或所述化合物的盐。在该具体的实施方式中，根据本发明的用于制备细胞毒性偶联物的方法可分别用于获得MMAE 6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)酰胺基-N-己酰胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯或MMAE 6-((2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基)-6-氧代己酰胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯。

[0174] 在具体的实施方式中，制备根据本发明的抗体-药物偶联物的方法包括如下的步骤，所述步骤包括：使MMAE 6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)酰胺基-N-己酰胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯或MMAE6-((2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基)-6-氧代己酰

胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯与抗CD56抗体或抗CD56抗体片段进行反应。

附图说明

[0175] 图1表示根据本发明的抗体-药物偶联物组合物的HIC(疏水相互作用色谱)谱图。该图显示出所述组合物富含DAR4,具有多于50％的DAR4。

[0176] 图2表示根据本发明的抗体-药物偶联物组合物的SEC(尺寸排阻色谱)分析。该图显示出所述组合物极其均质,具有多于99％的单体。

[0177] 图3表示根据本发明的抗体-药物偶联物的原生质谱分析,该原生质谱分析是在与来自Waters(Wilmslow,UK)的Acquity UPLC H-Class系统联合的Vion IMS Qtof质谱仪上进行的。这种方法可用于清楚地鉴别每种类型的DAR。该图显示出所述组合物富含DAR4,具有接近75％的DAR4。

[0178] 图4表示在使用以荧光团FITC(异硫氰酸荧光素)标记的抗CD56抗体孵育后,通过流式细胞术确定不同细胞系(4个MCC和一个乳腺癌对照系)的CD56表达。

[0179] 图5A、图5B、图5C、图5D、图5E表示相比于m906对照(非偶联抗体)、MF-TTZ-MMAE(偶联至MMAE的ADC曲妥珠单抗)和MMAE(仅毒素),ADC MF-m906-MMAE针对MCC细胞系(图5A:WaGa,图5B:PeTa,图5C:MS-1和图5D:MKL-2)和乳腺癌细胞系(图5E:SK-BR3)的性能的评价。实验以二重复独立进行(6个生物学重复/实验)。结果表示为所获得百分比的平均值(+/-SEM)。

[0180] 图6A-图6C表示在敲低CD56后,MF-m906-MMAE在WaGa细胞系中的特异性的评价。用慢病毒载体独立转导WaGa细胞,该慢病毒载体含有两种不同的shRNA,该shRNA可由强力霉素(Dox)(A、B和C)诱导并靶向CD56序列。进行抗生素选择(嘌呤霉素)后,在评估前将细胞暴露于强力霉素7天。(A-B-C):通过实时RT-qPCR(A)(*:$p<0.05$,没有暴露于强力霉素的对照细胞用作参照)和蛋白质印迹(CD56的衰减质量＝140KDa)(B),确认CD56的敲低。(C)通过使用三种不同的shRNA(Sh RNA A、Sh RNA B和Sh RNA C)评价MF-m906-MMAE对表达CD56(-Dox)或不表达CD56(+Dox)的细胞的细胞毒作用。实验以二重复独立进行(6个生物学重复/实验)。结果表示为所获得百分比的平均值(+/-SEM)。

[0181] 图7表示偶联物MF-m906-MMAE和对照(PBS和MF-TTZ-MMAE(偶联至MMAE的曲妥珠单抗ADC))在MCC异种移植模型中的性能的评价。图7表示在研究期间的相对肿瘤体积(平均值+/-SEM)的图。使用研究开始时的肿瘤体积(d0时的体积＝100％)作为参照来计算相对肿瘤体积(RTV)。每个点代表分别用MF-m906-MMAE、MF-TTZ-MMAE和PBS处理后的组的RTV的平均值,灰色箭头表示注射时间。

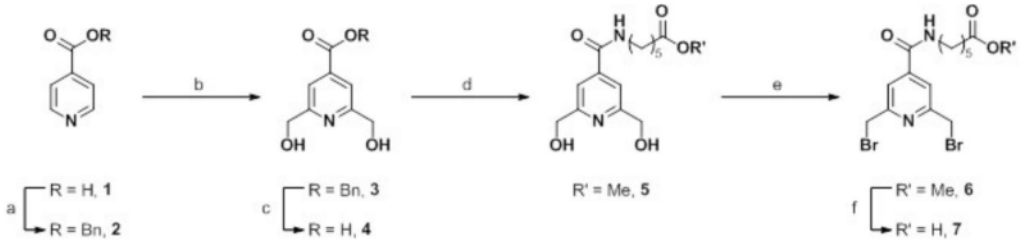
[0182] 图8表示偶联物MF-m906-MMAE和对照(PBS和MF-TTZ-MMAE(偶联至MMAE的曲妥珠单抗ADC))在MCC异种移植模型中的性能的评价。图8表示实验组和对照组在研究结束时的肿瘤重量(*:$p<0.05$)。水平线是均值、四分位数和限值。

[0183] 图9表示相比于对照m906(非偶联抗体)、MF-TTZ-MMAE(偶联至MMAE的曲妥珠单抗ADC)和MMAE(仅毒素),ADC MF-m906-MMAE针对小细胞肺癌的细胞系H69的性能的评价。实验以三重复独立进行(6个生物学重复/实验)。结果表示为所获得的百分比的平均值(+/-SEM)。

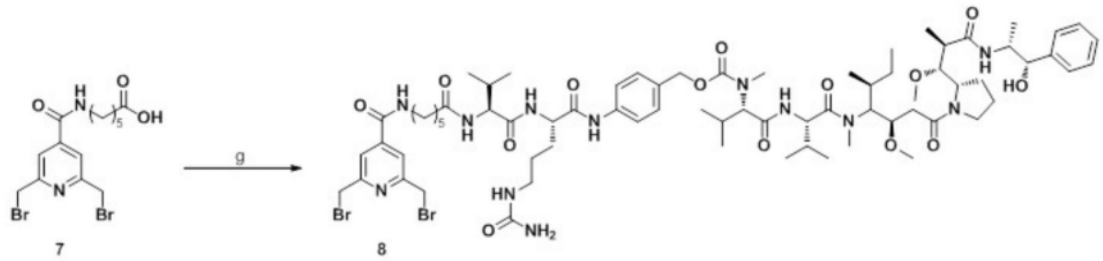
[0184] 实施例

[0185] 实施例1:根据本发明的细胞毒性偶联物的合成

[0186] 一般反应方案



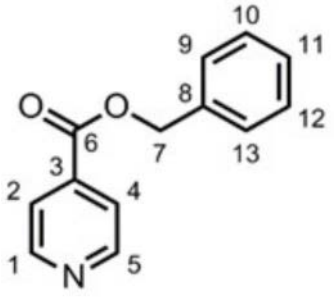
[0187]



[0188] (a)BnOH,$SOCl_2$,DCM,18h,75℃;(b)APS,MeOH,H_2O,H_2SO_4,1h,50℃;(c)H_2,Pd/C,MeOH,2h,TA;(d)HATU,2,6-二甲基吡啶,DMF,H_2N-$(CH_2)_5$-COOMe,15h,0℃,然后TA;(e)PBr_3,MeCN,2h,45℃;(f)LiOH,THF,H_2O,8.5h,TA;(g)EEDQ,DIPEA,DMF,MeCN,H_2N-VCPABC-MMAE,2h20,25℃。

[0189] 详细反应方案

[0190] 苄基异烟酸酯(2)的制备

[0191] 

(2)

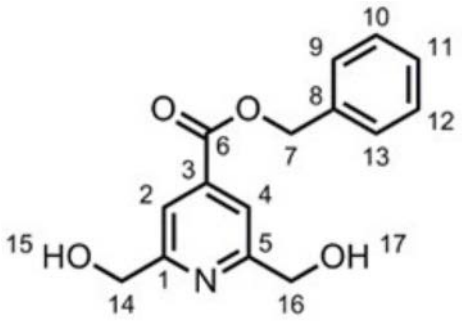
[0192] 将异烟酸(1)(5.00g;40.614mmol;1.0eq)溶解在亚硫酰氯(15mL;206.77mmol;5.1eq)中并在回流下加热过夜。回到室温后,通过减压下蒸发来除去过量的亚硫酰氯,然后将所得残留物溶解在无水二氯甲烷(55mL)中。加入苯甲醇(4.2mL;40.614mmol;1.0eq)并将混合物回流搅拌10h。回到室温后,将反应介质用饱和碳酸氢钠溶液中和并用二氯甲烷(3×100mL)萃取。将有机相合并,用饱和氯化钠溶液洗涤,用硫酸镁干燥并减压浓缩。将获得的产物通过快速色谱(SiO_2,环己烷/乙酸乙酯50:50)进行纯化,以得到无色油状的(2)(6.97g;80%)。

[0193] ^1H NMR(300MHz,DMSO)δ8.80(dd;J=6.1;1.6Hz;$2H_{1,5}$),7.86(dd;J=6.1;1.6Hz,$2H_{2,4}$),7.56-7.29(m;$5H_{9-13}$),5.39(s;$2H_7$)。

[0194] ^{13}C NMR(75MHz,DMSO)δ165.0($1C_6$);151.3($2C_{1,5}$);137.2($1C_3$);136.1($1C_8$);129.0($2C_{10,12}$);128.8($1C_{11}$);128.6($2C_{9,13}$);123.0($2C_{2,4}$);67.4($1C_7$)。

[0195] HRMS(ESI):$C_{13}H_{11}NO_2$的计算的中性质量[M]:213.0790;观测值:213.0796。

[0196] 苄基2,6-双(羟甲基)异烟酸酯(3)的制备

[0197] 

(3)

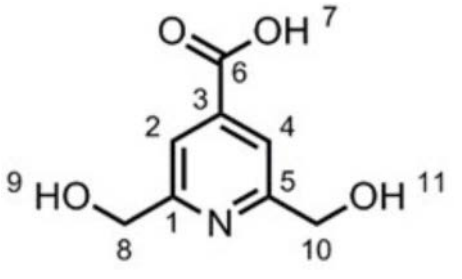
[0198] 将苄基异烟酸酯(2)(2.48g;11.630mmol;1.0eq)溶于甲醇(43mL)中,在50℃下搅拌并加入浓硫酸(320μL;6.016mmol;0.52eq)。分两步添加处于水(43mL)中的过硫酸铵(26.500g;116.000mmol;10.0eq)溶液:首先快速添加30滴,形成白色悬浮液,然后快速滴加5min。反应上升至75℃,然后将获得的黄色溶液在50℃下再搅拌1h。回到室温后,减压下蒸发甲醇。添加50mL乙酸乙酯并通过添加饱和碳酸氢钠溶液来中和介质。用乙酸乙酯(3×100mL)萃取水相,并将合并的有机相用饱和氯化钠溶液洗涤,硫酸镁干燥,然后减压浓缩。通过快速色谱(SiO_2,二氯甲烷/甲醇,95:5)纯化粗产物,以得到米色固体状的(3)(1.56g;49%)。

[0199] ^1H NMR(300MHz,DMSO)δ7.81(s;$2H_{2,4}$);7.55-7.32(m;$5H_{9-13}$);5.60(t;J=5.9Hz;$2H_{15,17}$);5.40(s;$2H_7$);4.59(d;J=5.9Hz;$4H_{14,16}$)。

[0200] ^{13}C NMR(75MHz,DMSO)δ165.0($1C_6$);162.8($2C_{1,5}$);138.0($1C_3$);135.7($1C_8$);128.6($2C_{10,12}$);128.4($1C_{11}$);128.3($2C_{9,13}$);117.0($2C_{2,4}$);66.9($1C_7$);63.9($2C_{14,16}$)。

[0201] HRMS(ESI):$C_{15}H_{15}NO_4$的计算的中性质量[M]:273.1001;观测值:273.1001。

[0202] 2,6-双(羟甲基)异烟酸(4)的制备

[0203] 

(4)

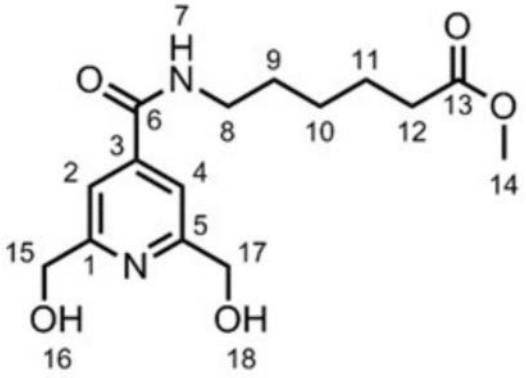
[0204] 将苄基2,6-双(羟甲基)异烟酸酯(3)(1.33g;4.867mmol;1.0eq)溶于甲醇(50mL)中,并将溶液用氩脱气15min。添加10wt%的钯/炭(133mg)并将反应介质在氢气氛下于室温搅拌2h。将反应介质经dicalite过滤(用甲醇冲洗)反应介质。在减压下浓缩滤液,以得到米色固体状的(4)(849mg;95%)。

[0205] ^1H NMR(300MHz,DMSO)δ7.78(s;$2H_{2,4}$);5.54(s宽峰;$2H_{9,11}$);4.59(s;$4H_{8,10}$)。

[0206] ^{13}C NMR(75MHz,DMSO)δ166.7($1C_6$);162.5($2C_{1,5}$);139.4($1C_3$);117.3($2C_{2,4}$);64.0($2C_{8,10}$)。

[0207] HRMS(ESI):$C_8H_9NO_4$的计算的中性质量[M]:183.0532;观测值:183.0526。

[0208] 6-((2,6-双(羟甲基)吡啶-4-基)氨基己酸甲酯(5)的制备

[0209] 

(5)

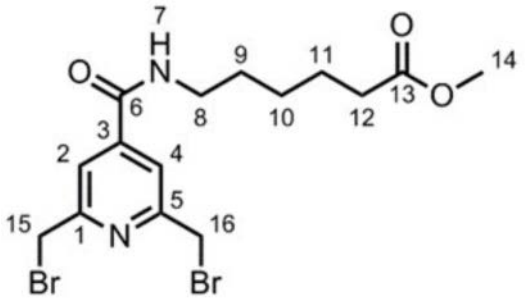
[0210] 将2,6-双(羟甲基)异烟酸(4)(50mg;0.273mmol;1eq)溶于无水N,N-二甲基甲酰胺(3.0mL)中,将溶液冷却至0℃,然后添加HATU(156mg;0.410mmol;1.5eq)和2,6-二甲基吡啶(147.0μL;1.260mmol;4.7eq)。将活化溶液在0℃搅拌15min,然后添加6-氨基己酸甲酯(59mg;0.322mmol;1.2eq)。用2mL无水N,N-二甲基甲酰胺冲洗烧瓶的壁,并将反应介质在室温下搅拌15h。将反应混合物稀释于乙酸乙酯中,用饱和氯化钠溶液洗涤3次,用硫酸镁干燥,过滤并减压浓缩。通过快速色谱(二氯甲烷/甲醇,90:10)纯化产物,以得到灰白色固体状的(5)(76mg;91%)。

[0211] ^{1}H NMR(300MHz,DMSO)δ8.79(t;J=5.6Hz;1H$_{7}$);7.71(s;2H$_{2,4}$);5.50(t;J=5.8Hz;2H$_{16,18}$);4.57(d;J=5.8Hz;4H$_{15,17}$);3.57(s;3H$_{14}$);3.25(m;2H$_{8}$);2.30(t;J=7.4Hz;2H$_{12}$);1.62-1.45(m;4H$_{9,11}$);1.37-1.21(m;2H$_{10}$)。

[0212] ^{13}C NMR(75MHz,DMSO)δ173.3(1C$_{13}$);165.1(1C$_{6}$);161.8(2$_{1,5}$);142.9(1C$_{3}$);115.8(2C$_{2,4}$);64.1(2C$_{15,17}$);51.2(1C$_{14}$);在DMSO峰下38.5(1C$_{8}$);33.2(1C$_{12}$);28.6(1C$_{9}$);25.9(1C$_{11}$);24.2(1C$_{10}$)。

[0213] HRMS(ESI):$C_{15}H_{22}N_2O_5$的计算的中性质量[M]:310.1529;观测值:310.1526。

[0214] 6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基己酸甲酯(6)的制备

[0215] 

(6)

[0216] 使6-((2,6-双(羟甲基)吡啶-4-基)氨基己酸甲酯(5)(55mg;0.177mmol;1eq)悬浮在无水乙腈(10.5mL)中,然后滴加三溴化磷(50μL;0.532mmol;3.0eq)。将反应介质在45℃下搅拌2h。将溶液冷却至0℃,用水(10mL)中和并用乙酸乙酯(3×15mL)萃取。将合并的有机相用饱和氯化钠溶液洗涤,用硫酸镁干燥并减压浓缩。通过快速色谱(SiO_2,环己烷/乙酸乙酯60:40)纯化产物,以得到白色固体状的(6)(57mg;74%)。

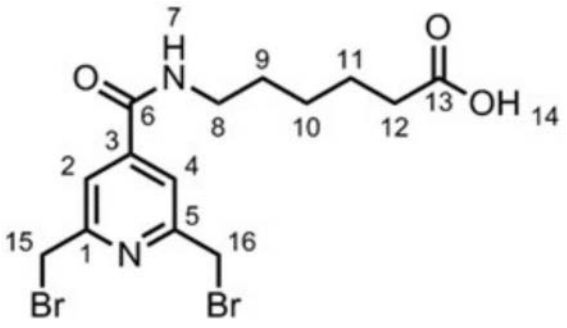
[0217] ^{1}H NMR(300MHz;DMSO)δ8.83(t,J=5.6Hz;1H$_{7}$);7.84(s;2H$_{2,4}$);4.74(s;4H$_{15,16}$);3.57(s,3H$_{14}$);3.31-3.20(m;2H$_{8}$);2.31(t;J=7.4Hz;2H$_{12}$);1.64-1.45(m;4H$_{9,11}$);1.39-1.22(m,2H$_{10}$)。

[0218] ^{13}C NMR(75MHz,DMSO)δ173.3(1C$_{13}$);163.8(1C$_{6}$);157.5(2C$_{1,5}$);144.2(1C$_{3}$);120.8

($2C_{2,4}$)；51.2($1C_{14}$)；在DMSO峰下38.9($1C_{8}$)；34.1($2C_{15,16}$)；33.2($1C_{12}$)；28.5($1C_{9}$)；25.9($1C_{11}$)；24.2($1C_{10}$)。

[0219] HRMS(ESI)：$C_{15}H_{20}Br_2N_2O_3$的计算的中性质量[M]：433.9841；观测值：433.9832。

[0220] 6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基己酸(7)的制备

[0221] 

(7)

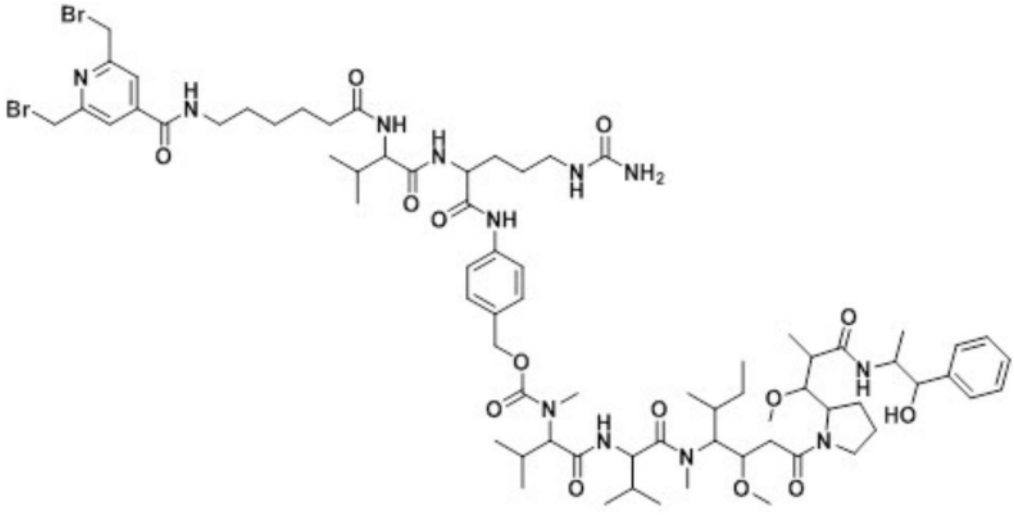
[0222] 将6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基己酸甲酯(6)(57mg；0.131mmol；1.0eq)溶于四氢呋喃(4mL)，并缓慢添加处于水中的水合氢氧化锂(8mg；0.327mmol；2.5eq)溶液(4mL)。将反应介质在室温下搅拌8.5h。将四氢呋喃减压蒸发，并且将水性残留物用1N盐酸水溶液处理并用乙酸乙酯(3×10mL)萃取。将合并的有机相用饱和氯化钠溶液洗涤，用硫酸镁干燥并减压浓缩。产物通过快速色谱(二氯甲烷/甲醇，90:10)进行纯化，以得到白色固体状的(7)(44mg；80％)。

[0223] ^{1}H NMR(300MHz；DMSO)δ12.00(s；$1H_{14}$)；8.83(t；J＝5.5Hz；$1H_{7}$)；7.84(s；$2H_{2,4}$)；4.74(s；$4H_{15,17}$)；3.31-3.21(m；$2H_{8}$)；2.21(t；J＝7.3Hz；$2H_{12}$)；1.60-1.46(m；$4H_{9,11}$)；1.39-1.25(m；$2H_{10}$)。

[0224] ^{13}C NMR(75MHz；DMSO)δ174.4($1C_{13}$)；163.8($1C_{6}$)；157.5($2C_{1,5}$)；144.1($1C_{3}$)；120.8($2C_{2,4}$)；在DMSO峰下39.0($1C_{8}$)；34.1($2C_{15,16}$)；33.6($1C_{12}$)；28.6($1C_{9}$)；26.0($1C_{11}$)；24.2($1C_{10}$)。

[0225] HRMS(ESI)：$C_{14}H_{19}Br_2N_2O_3$的计算的m/z[M+H]+：420.9757；观测值：420.9752。

[0226] MMAE[6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)酰胺基-N-己酰胺-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯(8)的制备

[0227] 

(8)

[0228] 在非活性气氛、黑暗和无水条件下，将6-(2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)氨基己酸

(7)(13.2mg;0.0313mmol;2.28eq)溶于无水乙腈(1.2mL)中,然后添加N-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉(EEDQ)(21.2mg;0.0857mmol;6.25eq)。将活化介质在25℃搅拌1h20。将在N,N-二异丙基乙胺(9.4μL;0.0537mmol;3.92eq)的存在下溶解在无水N,N-二甲基甲酰胺(300μL)中的MMEA缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苯甲酰基氨基甲酸酯的三氟乙酸盐(17.0mg;0.0137mmol;1.0eq)溶液加入到活化介质中。将所获得的反应介质在25℃下搅拌1h。将混合物用N,N-二甲基甲酰胺稀释两倍,并通过半制备型高压液相色谱进行纯化(t_R=22.1min;在Gilson PLC 2050系统[ARMEN V2(泵)和ECOM TOYDAD600(UV检测器)]上,在254nm、25℃下UV检测;Waters XBridge™C-18柱;5μm(250mm×19.00mm);用处于水中的0.1%三氟乙酸(以体积计)(溶剂A)和乙腈(溶剂B)进行洗脱;梯度20%至100%的B持续32min,然后100%的B持续6min,以17.1mL/min),以得到白色固体状的(8)(18.2mg;87%)。

[0229] ^{1}H NMR(300MHz,DMSO)δ(ppm)10.04-9.95(m;1H);8.94-8.79(m;1H);8.20-8.06(m;2H);7.98-7.87(m;1H);7.84(s;2H);7.81(s;1H);7.70-7.61(m;1H);7.58(d;J=8.2Hz;2H);7.38-7.11(m;6H);6.07-5.92(m;1H);5.47-5.37(m;1H);5.15-4.96(m;1H);4.73(s;4H);4.54-4.29(m;2H);4.32-4.12(m;1H);4.05-3.92(m;1H);3.30-3.08(m;9H);3.06-2.93(m;2H);2.91-2.77(m;2H);2.24-2.05(m;2H);2.21-2.11(m;3H);2.02-1.88(m;1H);1.60-1.44(m;5H);1.36-1.13(m;4H);1.08-0.93(m;6H);0.93-0.67(m;28H)。

[0230] HRMS(ESI):$C_{72}H_{111}Br_2N_{12}O_{14}$的计算的m/z[M+H]+:1525.6704;观测值:1525.6700。

[0231] 实施例2:根据本发明的抗体-药物偶联物的合成

[0232] 合成的产物的代码:MF-m906-MMAE(对应于式(Ia),在下文中也称为“根据本发明的抗体-药物偶联物”或通常称为“ADC”)。

[0233] 用于产生根据本发明的抗体药物偶联物的抗体:m906。

[0234] 溶液的制备

[0235] 生物偶联缓冲液:1×盐水缓冲液,例如磷酸盐、硼酸盐、乙酸盐、甘氨酸、三(羟甲基)氨基甲烷、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸,pH范围在6-9之间,NaCl终浓度在50-300mM之间,并且EDTA终浓度在0.1-10mM之间。

[0236] 生物偶联缓冲液中的m906的浓度在1-10mg/mL之间。

[0237] 还原剂:还原剂溶液选自在生物偶联缓冲液中的浓度为0.1-10mM之间的二硫苏糖醇、β-巯基乙醇、三(2-羧乙基)膦盐酸盐、三(羟丙基)膦。

[0238] 连接溶液:在有机溶剂混合物中浓度为0.1-10mM之间的化合物(8),所述有机溶剂选自二甲亚砜、N,N-二甲基甲酰胺、甲醇、四氢呋喃、乙腈、N,N-二甲基乙酰胺、二噁烷。

[0239] 生物偶联反应

[0240] 在非活性气氛下,将还原剂(4-100eq)加入处于生物偶联缓冲液中的m906(1mg;1eq),然后将它全部在15℃至40℃之间孵育0.25h-3h,然后在非活性气氛下添加化合物8的溶液(4-100eq),并将反应介质在15℃至40℃之间搅拌0.5-15h。将该反应以平行的方式在必要时重复尽量多的次数(即,18次),以获得所需的最终量的ADC。

[0241] ADC的纯化

[0242] 使用pH 7.4的PBS Gibco缓冲液经PD-10(GE Healthcare)对反应混合物进行纯化,必要时纯化尽量多的次数(即,纯化3次),以去除残留的化学试剂,。

[0243] 结果

[0244] 上述步骤使得能够获得12.87mg的MF-m906-MMAE(71%)。

[0245] 实施例3:抗体-药物偶联物(MF-m906-MMAE)的分析

[0246] HIC(疏水相互作用色谱)分析

[0247] 方法与装置

[0248] 在经0.22μm过滤之前,用PBS(pH 7.4)将ADC MF-m906-MMAE稀释至1mg/mL。将50μg产物注射到MAbPac HIC-Butyl柱(5μm,4.6×100mm,ThermoScientific)上,该柱与配备有PDA(e2998)的Waters Alliance HPLC系统(e2695)相连,所述PDA被设置用于在280nm处检测。通过如下梯度以1mL/min的速度洗脱ADC MF-m906-MMAE:在2分钟内从100%的缓冲液A(1.5M硫酸铵、50mM磷酸二氢钠、5%异丙醇(v/v),pH 7.0)至20%的缓冲液B(50mM磷酸二氢钠、20%异丙醇(v/v),pH 7.0),然后在30分钟内至85%的处于缓冲液A中的缓冲液B,然后将该梯度保持1min。在整个分离过程中温度保持在25℃。

[0249] 将针对MF-m906-MMAE获得的结果示于图1和下表1中

[0250] 表1

[0251]

MF-m906-MMAE	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 3	DAR 4	DAR 5
保留时间(min)	8.65	10.87	12.39	18.36	21.47	25.9
面积(%)	0.39	0.09	5.45	16.20	59.69	18.17
平均 DAR	3.89					

[0252] SEC(尺寸排阻色谱)分析

[0253] 方法与装置

[0254] 在经0.22μm过滤之前,用PBS(pH 7.4)将ADC MF-m906-MMAE稀释至1mg/mL。将50μg产品注射到AdvanceBio SEC柱(2.7μm,7.8×300mm,Agilent Technologies)上,该柱与配备有PDA(2998)的Waters Alliance HPLC系统(e2695)相连,所述PDA被设置用于在280nm处检测。通过等度缓冲液C(1mM磷酸二氢钠、155mM氯化钠、3mM磷酸氢二钠、3mM叠氮化钠,pH 7.0)在24分钟内以1mL/min的速度洗脱ADC MF-m906-MMAE。在整个分离过程中温度保持在25℃。

[0255] 将结果示于图2和下表2中。

[0256] 表2

[0257]

MF-m906-MMAE	聚集体	单体
保留时间(min)	4.862	8.253
面积(%)	0.64	99.36

[0258] 原生MS(原生质谱)分析

[0259] 方法与装置

[0260] 在与来自Waters(Wilmslow,UK)的Acquity UPLC H-Class系统相连的Vion IMS Qtof质谱仪上进行质谱分析。在MS分析之前,将样品(20μg)在BEH SEC 2.1×150mm 300 Å脱盐柱上用等度梯度(50mM醋酸铵,pH 6.5)以40μL/min进行脱盐。对旁通阀进行编程以允许溶剂仅在6.5-9.5min之间进入光谱仪。在正离子模式下用ESI源在500-8000的m/z范围内以1Hz获取MS数据,并使用用于去卷积的MaxEnt算法和UNIFI 1.9软件进行分析。

[0261] 将结果示于图3和下表3中。

[0262] 表3

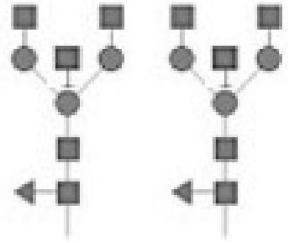
[0263]

MF-m906-MMAE	DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 3	DAR 4	DAR 5
MW（Da）[1]	n.o.[2]	n.o.[2]	152572	153945	155315	156686
面积（%）	0	0	0.7	17.0	74.5	7.7
平均 DAR	3.89					

[0264] 1:G0F/G0F糖基化

[0265] 2:n.o.＝未观测到

[0266] G0F/G0F



[0267] 实施例4:抗体-药物偶联物MF-m906-MMAE的体外评价

[0268] 4.1.m906对肿瘤细胞的识别:Merkel细胞癌

[0269] 针对来自患者的肿瘤的免疫组织化学

[0270] 方法与装置

[0271] 使用benchMark XT平台并按照供应商的说明,用商业化的抗CD56抗体(123C3,Ventana,预稀释的)对包含在微阵列组织中的90个MCC肿瘤的群组进行免疫组织化学标记。本领域技术人员使用以下的半定量评分来评价CD56的表达:0:不表达,1:弱和/或异源阳性;2:强且弥漫性的阳性。

[0272] 结果:总体上,66％的病例为阳性(n＝59),在37％的病例(n＝33)中检测到强且弥漫性的表达(分数2)。

[0273] 针对MCC细胞系的流式细胞术和免疫组织化学

[0274] 方法与装置

[0275] 为了评价细胞系的CD56表达,根据制造商提供的说明,将肿瘤细胞在偶联至FITC(BioLegend,克隆:HCD56)的抗CD56抗体的存在下或对照同种型的存在下进行孵育。然后将细胞在加有1％胎牛血清的PBS中洗涤两次,然后进行分析。

[0276] 为了评价m906和曲妥珠单抗(抗HER2抗体对照)对肿瘤细胞的固定作用,使用浓度为650ng/mL的m906抗体或浓度为40ng/mL的曲妥珠单抗抗体(赫赛汀150mg Roche)进行免疫细胞化学标记,然后借助与过氧化物酶偶联的二抗进行显示。

[0277] 受试细胞系

[0278] WaGa(RRID:CVCL_E998);

[0279] MS-1(RRID:CVCL_E995);

[0280] PeTa(RRID:CVCL_LC73);

[0281] MKL-2(RRID:CVCL_D027);

[0282] 结果:

[0283] WaGa、MS-1、PeTa和MKL-2细胞是Merkel细胞癌细胞系(以下称MCC)。以上所有细胞系均为CD56阳性的(图4)。

[0284] SK-BR-3(RRID:CVCL_0033):HER2阳性乳腺癌细胞系,因其不表达CD56而被选作对照组。

[0285] m906和被作为对照包括的曲妥珠单抗(TTZ)的固定通过免疫组织化学研究而针对细胞系进行测试。该分析展示出m906在所有MCC细胞系上的固定,而TTZ未观察到固定(表4:m906在MCC细胞系上的固定的确认)。

[0286] 表4

[0287]

细胞系	WaGa	MS-1	PeTa	MKL-2	SKBR3
m906的固定	+	+	+	+	-
曲妥珠单抗的固定	-	-	-	-	+

[0288] +:存在通过过氧化物酶显示的抗体对靶细胞的固定;-:不存在固定

[0289] 成像流式细胞术-m906和细胞内区室的着色及图像采集

[0290] 方法与装置

[0291] 为了确认其内化到肿瘤细胞中,按照制造商提供的说明,使用“SAIVI快速抗体标记试剂盒”(Thermoscientific)将抗体m906与Alexa Fluor 750偶联。将WaGa细胞(500000个细胞)与偶联物m906-Alexa Fluor 750在缓冲溶液(PBS 1×,2%胎牛血清,0.1%叠氮化钠)中于室温下孵育30分钟。根据来自制造商的说明,将细胞在BD Cytofix/Cytoperm(BD Biosciences)的帮助下固定并用Permwash(BD Biosciences,稀释至1/10e)进行透化。细胞核和溶酶体区室分别用Hoechst 33342(BD Pharmigen,1/10000)和偶联至藻红蛋白-花青5(BD Phrmigen,H4A3)的抗LAMP1抗体标记。经标记的细胞的分析借助于配备有4个激光器(375nm、488nm、642nm和785nm(SSC))的Amnis® ImageStream®X Mark II流式细胞仪成像仪(Amnis公司,EMD Millipore的一部分,Seattle,WA)进行。WaGa细胞的图像是使用Inspire™成像流式细胞仪软件以60倍的放大倍率和扩展的景深(EDF)捕获的。

[0292] 在每次分析之前进行补偿。使用亮场图像(BF:白光)的“梯度RMS”工具识别感兴趣的细胞。根据BF图像的区域的纵横比,碎片和细胞双峰被排除在分析之外。使用IDEAS® v6.2软件,借助“surface mask”和“cytoplasm mask”工具,对与Alexa Fluor 750(通道12)偶联的m906的细胞内荧光(IMF)的平均强度和表面积在2个不同孵育时间(5分钟和30分钟)下进行评价。使用内化函数确定与Alexa Fluor 750(通道12)偶联的m906的内化分数,从而允许细胞内荧光强度与整个细胞强度的比率得以限定。具有内化抗体的细胞具有正得分。采用使用“Bright Detail Similarity”(BDS)函数的共定位助手,以量化与藻红蛋白-花青5(通道5)偶联的抗LAMP1抗体同与Alexa Fluor 750(通道12)偶联的m906之间的共定位水平。BDS(n.1)的正得分表明m906的溶酶体定位。

[0293] 结果

[0294] m906抗CD56抗体在表达CD56的WaGa细胞的溶酶体中内化(表5)。这是ADC释放药物的关键步骤,这使得m906成为开发ADC的良好候选抗体。

[0295] 表5

[0296]

孵育时间(分钟)	病灶中的细胞数	m906荧光表面(MFI*1)	m906细胞内荧光(MFI*1)	m906的内化分数	BDS*2分数(LAMP1/m906)
5	8617	930	50046	7.08	1.4
30	5223	580	50464	7.96	1.4

[0297] *1平均荧光强度

[0298] *2 Bright Detail Similarity

[0299] 4.2.MF-m906-MMAE在体外对细胞系的细胞毒性

[0300] 活力评价(增殖试验)

[0301] 方法与装置

[0302] 为了评价细胞活力,使用XTT进行了细胞毒性测试。将细胞以7重复放置在96孔板(50000个细胞/孔)中。以递增的浓度添加ADC MF-m906-MMAE和MF-TTZ-MMAE(ADC对照)。培养基充当阴性对照。暴露至药物4天后,每孔加入25μL试剂XTT,并在37℃孵育4小时后在450nm处测量吸光度。将620nm处的吸光度用作参照。

[0303] 结果

[0304] 对细胞系的细胞毒性的评价显示出,对于所有MCC系,ADC MF-m906-MMAE与游离MMAE(IC_{50}介于1-10nM之间)一样具有细胞毒性。此外,无论是抗体m906(即,未偶联至MMAE)还是ADC MF-TTZ-MMAE(ADC对照)在所测试的最低有效浓度下对这些相同的细胞系都没有细胞毒性作用,证明了构建体不存在固有毒性(图5)。

[0305] 对作为小细胞肺癌细胞系的H69细胞系(RRID:CVCL_1579)的细胞毒性的评价显示出,ADC MF-m906-MMAE与游离MMAE一样具有细胞毒性(IC_{50}在1-2nM之间)。此外,在所测试的最低有效浓度下,抗体m906(即,未偶联至MMAE)和ADC MF-TTZ-MMAE(ADC对照)对该细胞系均没有细胞毒性作用,证明构建体不存在固有毒性(图9)。

[0306] 4.3.m906特异性的确认:观察到的细胞毒作用取决于CD56(图6)

[0307] 质粒和慢病毒转导

[0308] 方法与装置

[0309] 生成靶向CD56序列的三个shRNA(从Consortium RNAi获得的序列;A:TRCN0000373085(SEQ ID NO:9-10),B:TRCN0000373034(SEQ ID NO:11-12),C:TRCN0000073460(SEQ ID NO:13-14)),并克隆到FH1tUTG慢病毒载体中,如上所述[5]。注意在此构建体中,可通过强力霉素诱导控制shRNA序列转录的启动子的活性。如上所述[6-7],慢病毒上清液在HEK293T(RRID:CVCL_0063)细胞中产生。收获的上清液通过过滤(0.45μm)进行灭菌,并在感染前加入聚凝胺(1μg/mL)。在与含有慢病毒的上清液孵育14-20个小时后,将靶细胞进行洗涤,然后进行抗生素筛选(嘌呤霉素)。为了使肿瘤细胞系中的CD56的表达失效(敲低),将细胞在分析前于强力霉素中暴露7天。

[0310] 结果

[0311] 在CD56敲低期间,MF-m906-MMAE诱导的细胞毒性实质上降低,并且三个shRNA的情况都是如此(图6),证实了m906对CD56的识别是至关重要的,以诱导MF-M90-MMAE的细胞毒性。

[0312] 实施例5:抗体-药物偶联物(MF-m906-MMAE)的体内评价

[0313] m906在NOD/SCID小鼠的MCC细胞系异种移植模型中的治疗性能

[0314] 方法与装置

[0315] 小鼠模型

[0316] 将20只7周龄的雌性NOD/SCID小鼠(Janvier Labs)保持在无菌条件下。所有与动物有关的程序均经当地伦理委员会批准(Apafis-10076-2017053015488124 v4)。将CD56阳性MCC细胞系“WaGa”[8]用于肿瘤诱导。将小鼠用异氟醚麻醉,接受处于Matrigel中的10^7个细胞的皮下注射(注射部位:背部)。通过用卡尺测量宽度、长度和高度确定的肿瘤大小,并在整个过程中每2天监测动物的一般状况。使用以下公式确定肿瘤体积:宽度×长度×高度×π/6。当肿瘤体积达到50mm^3时,将小鼠纳入研究并随机分配到实验组或对照组。

[0317] 实验程序

[0318] 纳入后,动物接受ADC(MF-m906-MMAE或MF-TTZ-MMAE,10mg/kg)的静脉内注射或用于对照小鼠的等体积的PBS的注射。在实验组中的肿瘤体积加倍的情况下进行新的注射。在纳入后30天或如果达到关键节点(肿瘤溃疡、体重减轻20%或极度虚弱)时处死小鼠。对动物进行尸检,并由病理学家对所有器官进行宏观检查。解剖后评价肿瘤的重量和体积。对肿瘤、肺和肝进行显微镜检查,以检测任何潜在的转移进展。

[0319] 统计分析

[0320] 使用平均值和限值描述连续数据。分类数据通过可解释的情况的数量和百分比来描述。采用用于分类数据的Fisher精确检验活通过用于连续数据的Mann-Whitney或Kruskall-Wallis检验,对组合进行评价。使用XLStat软件(Addinsoft,Paris,法国)进行统计分析。$p<0.05$被认为是统计学上显著的。

[0321] 结果

[0322] MF-m906-MMAE在MCC细胞系的鼠异种移植模型中减缓了肿瘤生长。

[0323] 10mg/kg的MF-m906-MMAE、MF-TTZ-MMAE或PBS的三倍剂量给予的结果在图7(相对肿瘤体积)和图8(研究结束时的肿瘤质量)中示出。在用作对照的最后两组中,观察到类似的肿瘤生长,PBS和MF-TTZ-MMAE组的生长曲线斜率的平均系数分别为每天初始肿瘤体积的105%(限值35-166)和每天初始肿瘤体积的108%(限值33-318)。对于用MF-m906-MMAE治疗的实验组,肿瘤生长显著延缓(生长曲线斜率的平均系数为每天初始肿瘤体积的18%(限值1-53);Kruskal Wallis检验:$p=0.01$)。结果,与对照动物相比,用MF-m906-MMAE治疗的组中的肿瘤的最终中位重量减少(图8)(平均重量0.7g(限值:0.4-1.3),而不是2.03g(限值:1.3-3.7)和1.78g(限值:1-2.7),Kruskal Wallis测试:p-0.02))。处死后,实验组和对照组均未观察到转移。在尸检期间于取出的非肿瘤组织上未观察到MF-m906-MMAE毒性迹象。

[0324] 序列表

[0325] 表6

[0326]

序列编号	序列类型	氨基酸序列
SEQ ID NO: 1	m906 轻链 CDR1	QSLLHSNGYN
SEQ ID NO: 2	m906 轻链 CDR2	YLG
SEQ ID NO: 3	m906 轻链 CDR3	CMQSLQTPWT
SEQ ID NO: 4	m906 重链 CDR1	GGTFTGYYMHW
SEQ ID NO: 5	m906 重链 CDR2	NSGGTNYAQ
SEQ ID NO: 6	m906 重链 CDR3	LSSGYSGYFDYWGQG
SEQ ID NO: 7	m906 轻链	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGYNFLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEADDVGVYYCMQSLQTPWTFGHGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
SEQ ID NO: 8	m906 重链	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG GTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCARDLSSGYS GYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO: 9	RNAi TRCN0000373085 正向	TCCCAGCGTTGGAGAGTCCAAATTCT CGAGAATTTGGACTCTCCAACGCTTT TTTCGGG
SEQ ID NO: 10	RNAi TRCN0000373085 反向	AAAAAAGCGTTGGAGAGTCCAAATTC TCGAGAATTTGGACTCTCCAACGCT

[0327]

SEQ ID NO: 11	RNAi TRCN0000373034 正向	TCCCCGTTCCCTGAAACCGTTAAACT CGAGTTTAACGGTTTCAGGGAACGTT TTT
SEQ ID NO: 12	RNAi TRCN0000373034 反向	CGGGAAAAACGTTCCCTGAAACCGTT AAACTCGAGTTTAACGGTTTCAGGGA ACG
SEQ ID NO: 13	RNAi TRCN0000073460 正向	TCCCCATGTACCTTGAAGTGCAATCT CGAGATTGCACTTCAAGGTACATGTT TTT
SEQ ID NO: 14	RNAi TRCN0000073460 反向	CGGGAAAAACATGTACCTTGAAGTGC AATCTCGAGATTGCACTTCAAGGTAC ATG
SEQ ID NO: 15	m906 轻链可变域	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQ SLLHSNGYNFLDWYLQKPGQSPQLLIY LGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEADDVGVYYCMQSLQTPWTFGHGT KVEIKR
SEQ ID NO: 16	m906 重链可变域	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG GTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCARDLSSGYS GYFDYWGQGTLVTVS

[0328] 以“[参考编号]”格式引用的参考文献：

[0329] 1.Feng,Y.et al.,MAbs,May-Jun;8(4):799-810,2016

[0330] 2.Goyon,A et al.,J.Chromatogr.B,1065-1066,35-43,2017

[0331] 3.Fekete,S.et al.,J.Pharm.BiomedAnal.,130,3-18,2016

[0332] 4.Barran,P.et al.,EuPA Open Proteomics,11,23-27,2016

[0333] 5.Houben,R..et al.,International journal of Cancer,130,847-856,2012

[0334] 6.Angermeyer S.et al.,J.Invest.Dermatol.,133(8):2059-2064,2013

[0335] 7.Aragaki M.et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.,368(4):923-929,2008

[0336] 8.Houben R,et al.,J.Virol.;84(14):7064-7072,2010

序列表
<110> 麦克萨夫内部肿瘤公司(MC SAF)
<120> 抗CD56抗体-药物偶联物及其在治疗中的用途
<130> 1H317490 003 WO/PCT
<160> 16
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906轻链CDR1
<400> 1
Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn
1 5 10
<210> 2
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906轻链CDR2
<400> 2
Tyr Leu Gly
1
<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906轻链CDR3
<400> 3
Cys Met Gln Ser Leu Gln Thr Pro Trp Thr
1 5 10
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> m906重链CDR1
<400> 4
Gly Gly Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp
1 5 10
<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906重链CDR2
<400> 5
Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln
1 5
<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906重链CDR3
<400> 6
Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
1 5 10 15
<210> 7
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906轻链
<400> 7
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95
Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly His Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 8
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906重链
<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 9

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi TRCN0000373085正向

<400> 9

tcccagcgtt ggagagtcca aattctcgag aatttggact ctccaacgct tttttcggg 59

<210> 10

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi TRCN0000373085反向

<400> 10

aaaaaagcgt tggagagtcc aaattctcga gaatttggac tctccaacgc t 51

<210> 11

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi TRCN0000373034正向

<400> 11

tccccgttcc ctgaaaccgt taaactcgag tttaacggtt tcagggaacg ttttt 55

<210> 12

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> RNAi TRCN0000373034反向

<400> 12

cgggaaaaac gttccctgaa accgttaaac tcgagtttaa cggtttcagg gaacg 55

<210> 13

<211> 55

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RNAi TRCN0000073460正向
<400> 13
tccccatgta ccttgaagtg caatctcgag attgcacttc aaggtacatg ttttt 55
<210> 14
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> RNAi TRCN0000073460反向
<400> 14
cgggaaaaac atgtaccttg aagtgcaatc tcgagattgc acttcaaggt acatg 55
<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> m906轻链可变域
<400> 15

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5				10						15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Tyr	Asn	Phe	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ser
				85					90					95	
Leu	Gln	Thr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	His	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

Arg
<210> 16
<211> 120
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> m906重链可变域

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ser Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

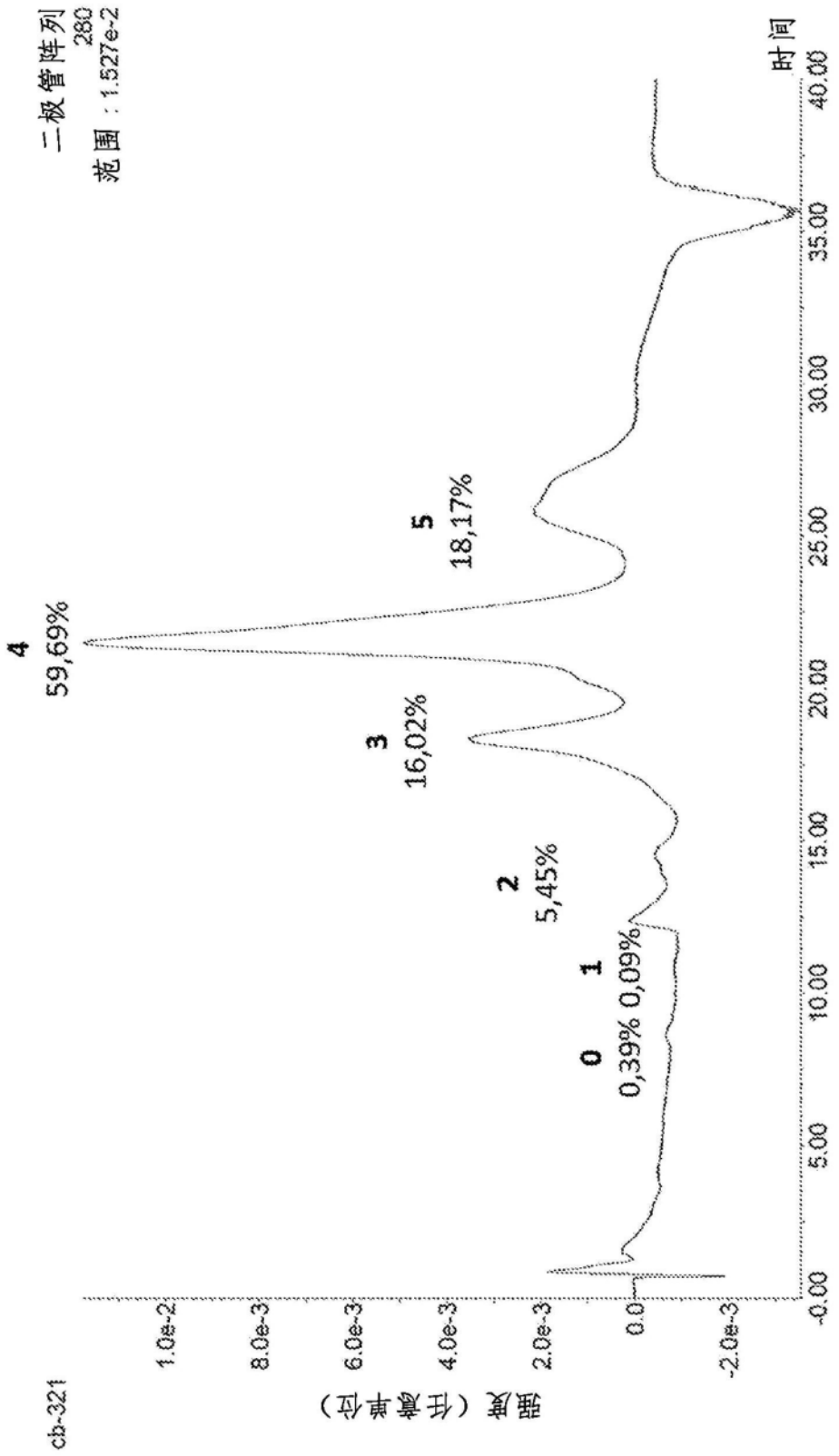

二极管阵列
280
范围：1.527e-2
时间
强度（任意单位）
cb-321
0
0,39%
1
0,09%
2
5,45%
3
16,02%
4
59,69%
5
18,17%
-0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
40.00
1.0e-2
8.0e-3
6.0e-3
4.0e-3
2.0e-3
0.0
-2.0e-3

图1

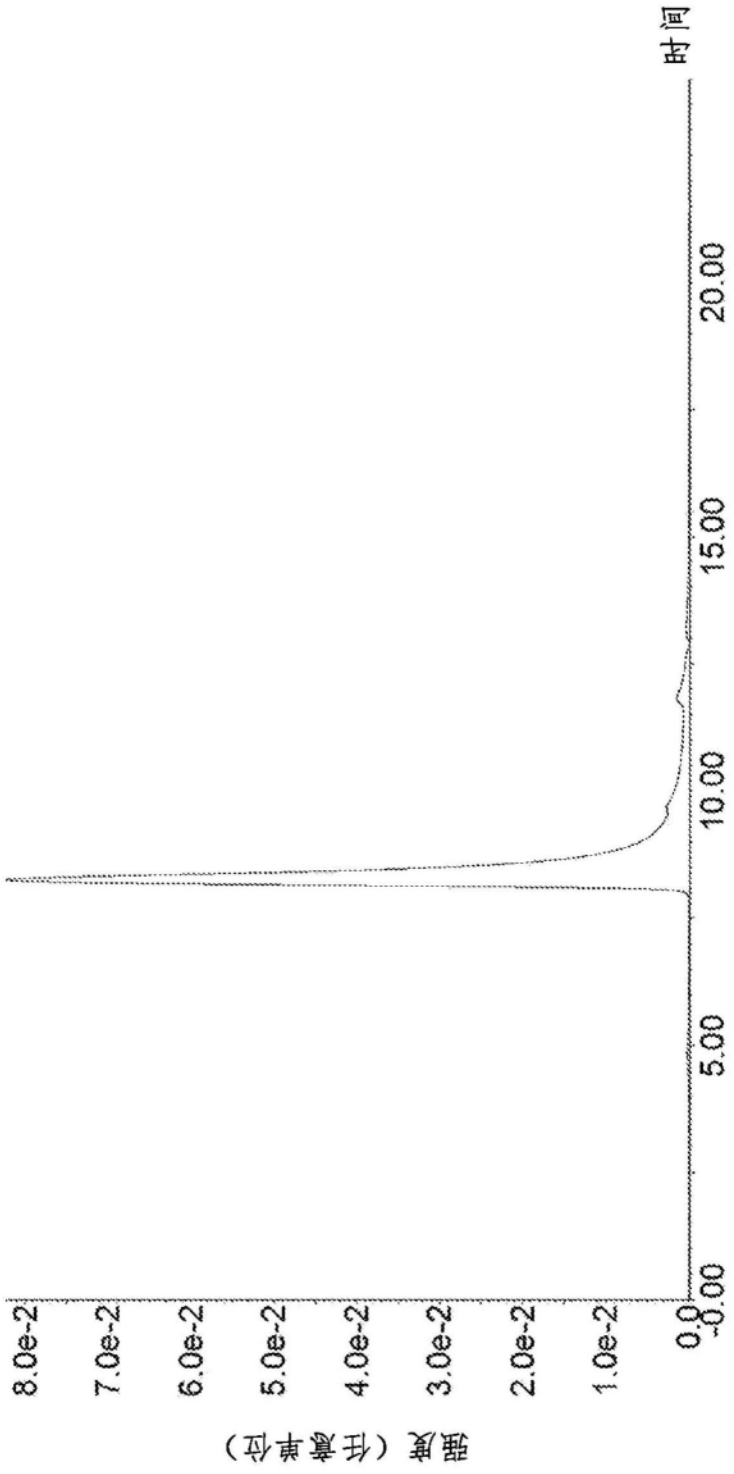

时间
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
强度（任意单位）
0.0
1.0e-2
2.0e-2
3.0e-2
4.0e-2
5.0e-2
6.0e-2
7.0e-2
8.0e-2

图2

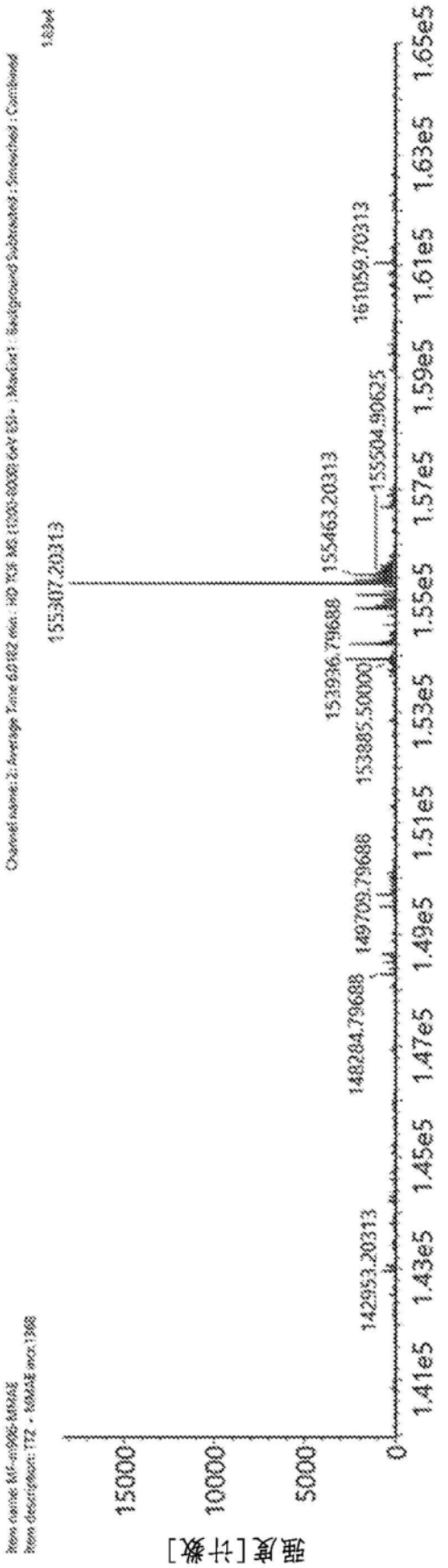

强度[计数]
15000
10000
5000
0
1.41e5
1.43e5
1.45e5
1.47e5
1.49e5
1.51e5
1.53e5
1.55e5
1.57e5
1.59e5
1.61e5
1.63e5
1.65e5
质量[Da]
1553037.20313
1553936.79688
1555463.20313
1555504.90625
1610559.70313
1423953.20313
1482284.79688
1497093.79688
1538885.50000

图3

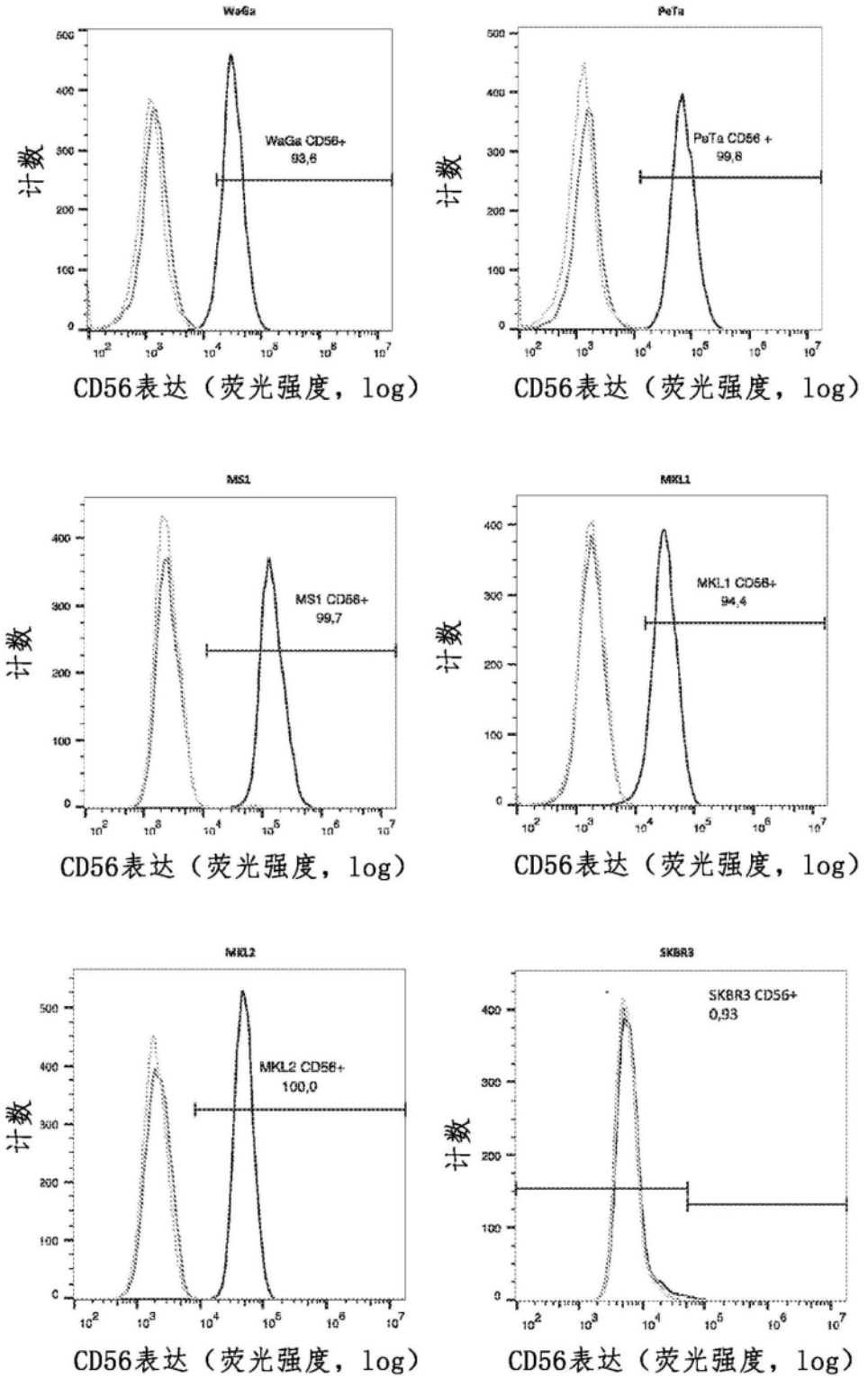

WaGa
WaGa CD56+
93,6
计数
CD56表达（荧光强度，log）
PeTa
PeTa CD56 +
99,8
计数
CD56表达（荧光强度，log）
MS1
MS1 CD56+
99,7
计数
CD56表达（荧光强度，log）
MKL1
MKL1 CD56+
94,4
计数
CD56表达（荧光强度，log）
MKL2
MKL2 CD56+
100,0
计数
CD56表达（荧光强度，log）
SKBR3
SKBR3 CD56+
0,93
计数
CD56表达（荧光强度，log）
未标记细胞
细胞+同种型对照
细胞+抗CD56抗体

图4

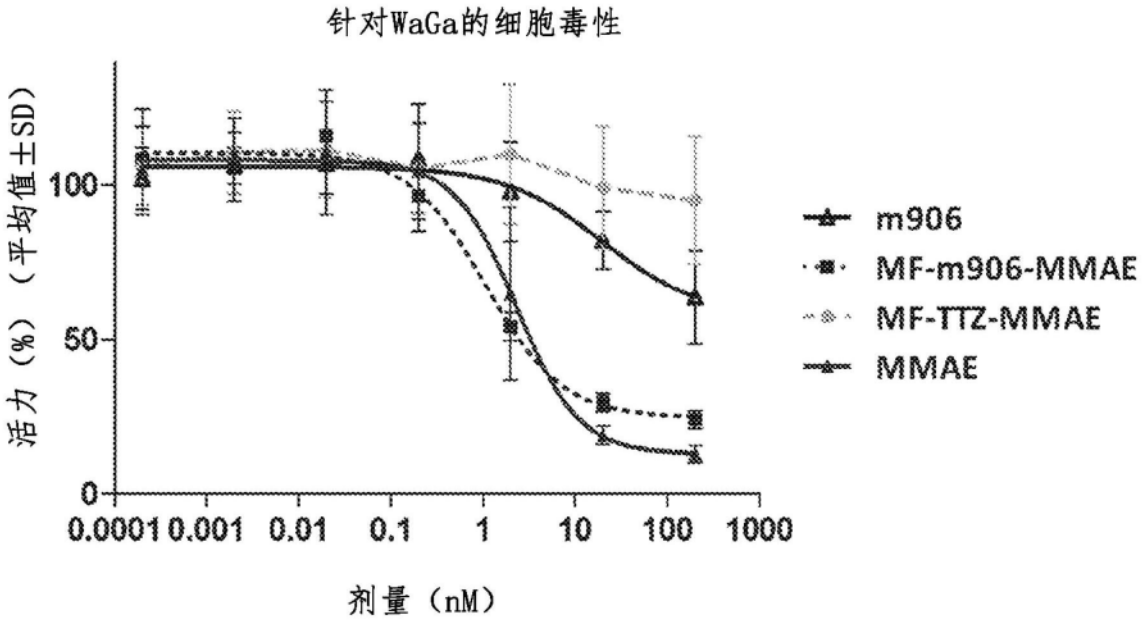

针对WaGa的细胞毒性
活力（%）（平均值±SD）
100
50
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
剂量（nM）
m906
MF-m906-MMAE
MF-TTZ-MMAE
MMAE

图5A

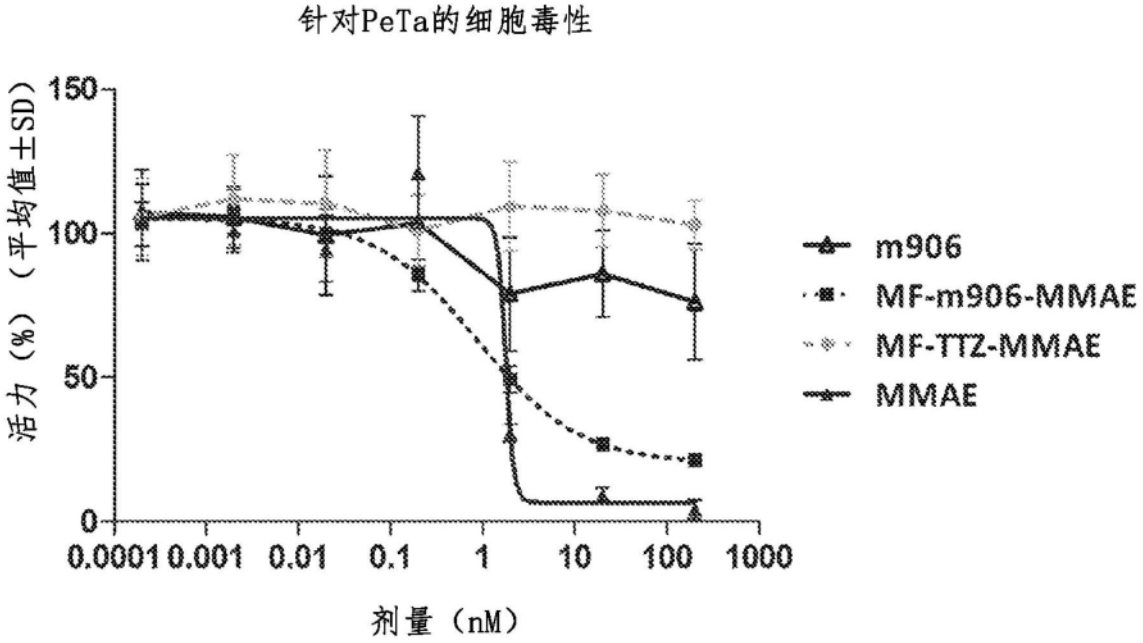

针对PeTa的细胞毒性
活力（%）（平均值±SD）
150
100
50
0
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
剂量（nM）
m906
MF-m906-MMAE
MF-TTZ-MMAE
MMAE

图5B

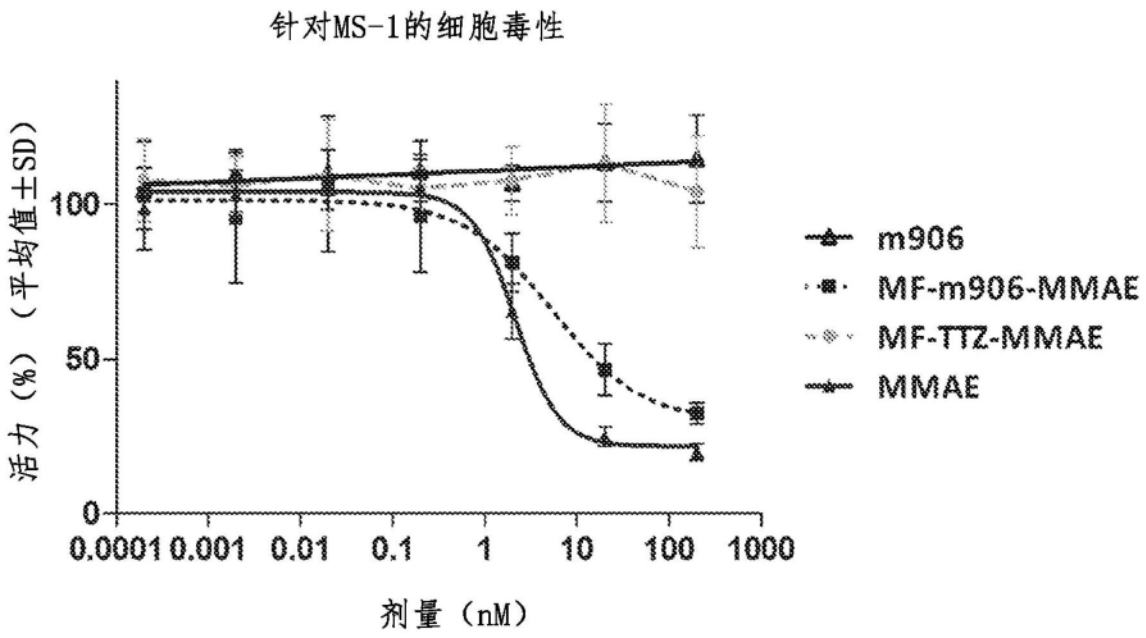

针对MS-1的细胞毒性
活力（%）（平均值±SD）
0
50
100
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
剂量（nM）
m906
MF-m906-MMAE
MF-TTZ-MMAE
MMAE

图5C

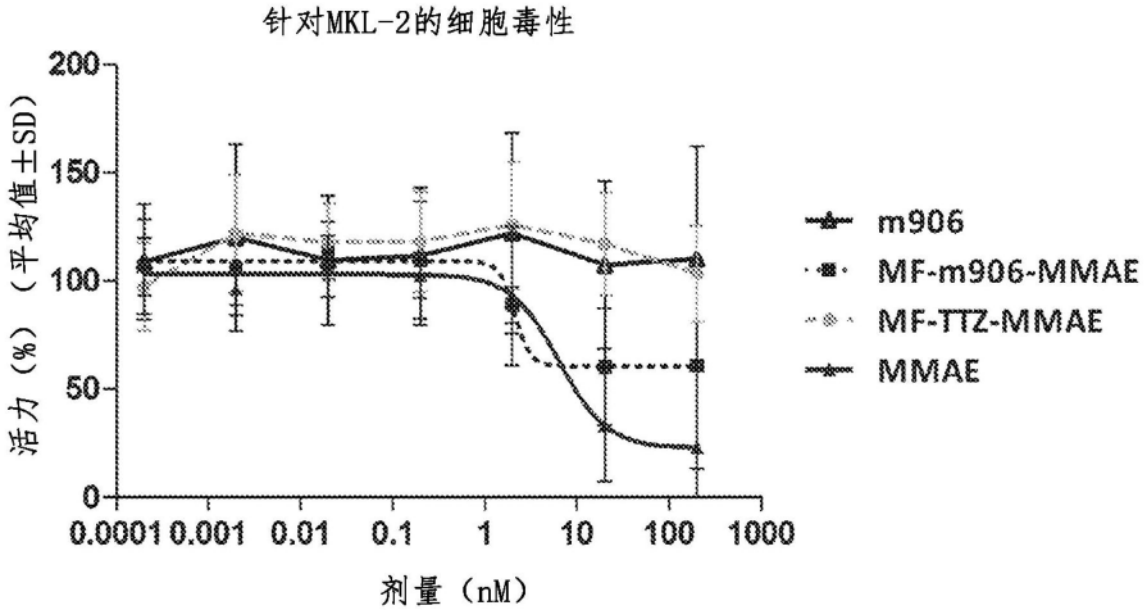

针对MKL-2的细胞毒性
活力（%）（平均值±SD）
0
50
100
150
200
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
剂量（nM）
m906
MF-m906-MMAE
MF-TTZ-MMAE
MMAE

图5D

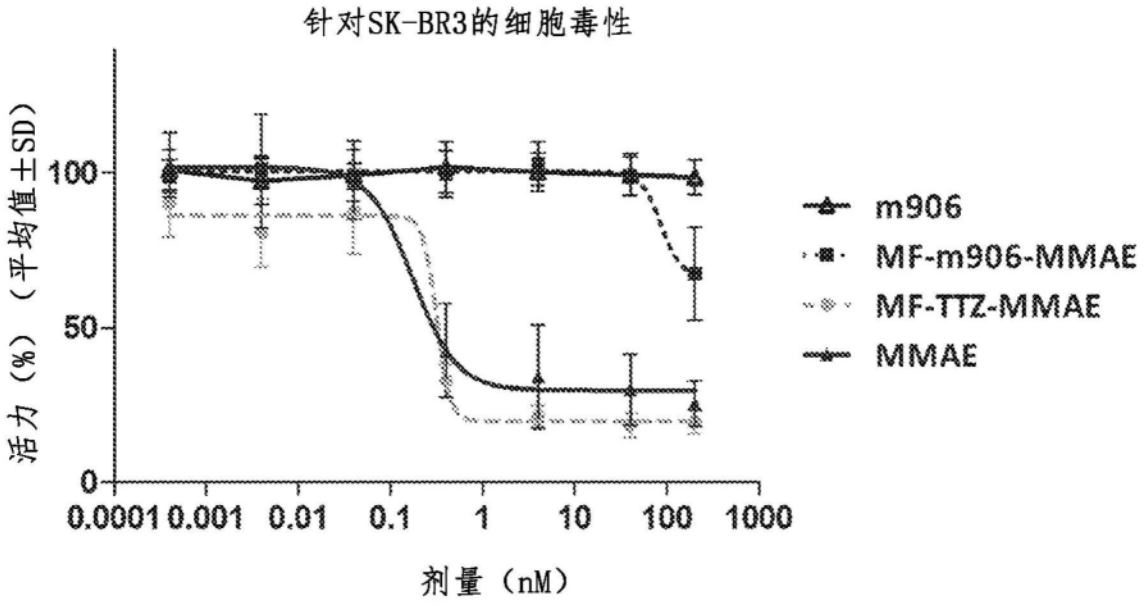

针对SK-BR3的细胞毒性
活力（%）（平均值±SD）
100
50
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
剂量（nM）
m906
MF-m906-MMAE
MF-TTZ-MMAE
MMAE

图5E

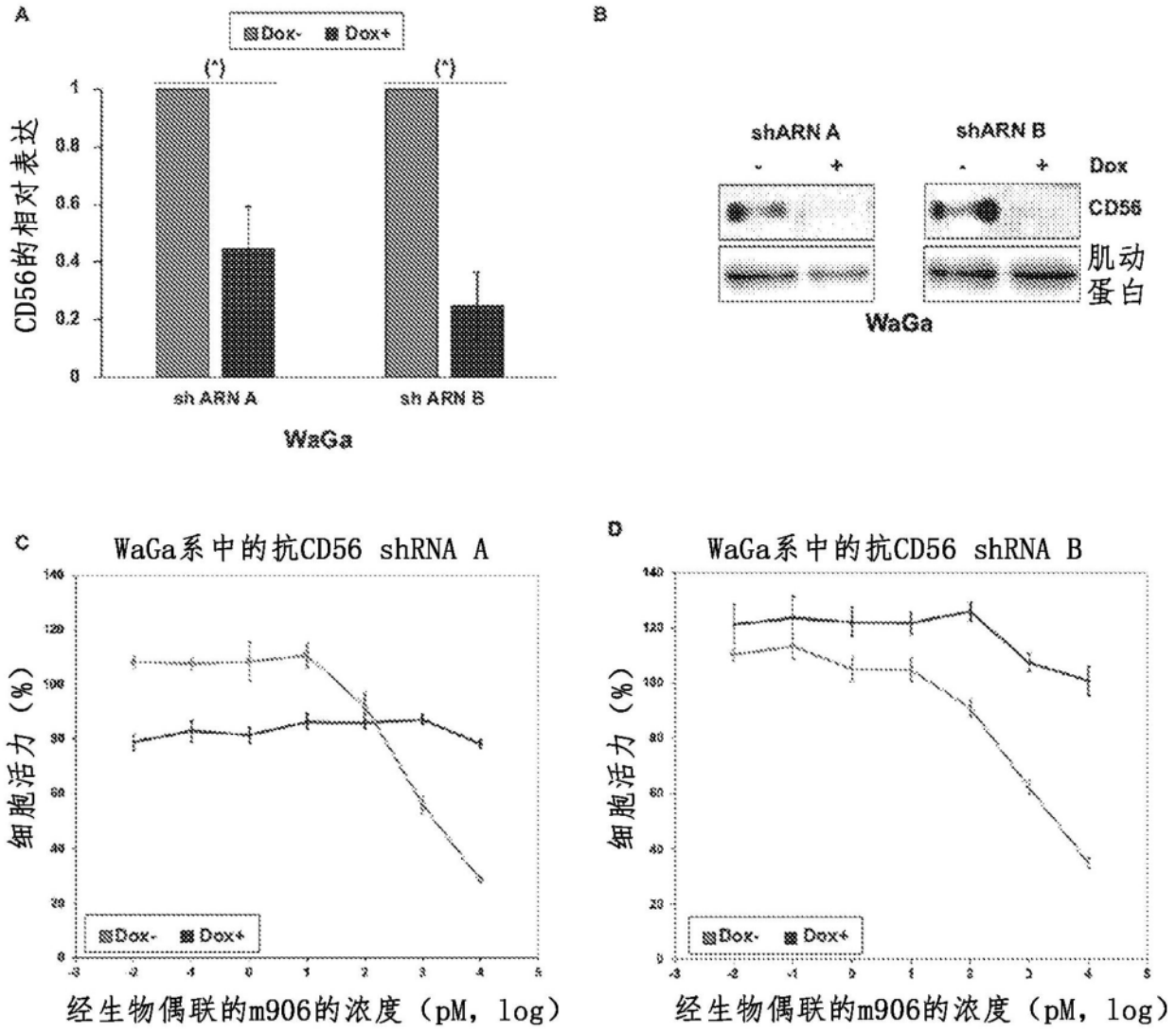

A
Dox- Dox+
(*)
(*)
CD56的相对表达
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
sh ARN A
sh ARN B
WaGa
B
shARN A
shARN B
- + - +
Dox
CD56
肌动蛋白
WaGa
C
WaGa系中的抗CD56 shRNA A
细胞活力（%）
Dox- Dox+
经生物偶联的m906的浓度（pM，log）
D
WaGa系中的抗CD56 shRNA B
细胞活力（%）
Dox- Dox+
经生物偶联的m906的浓度（pM，log）

图6A-C

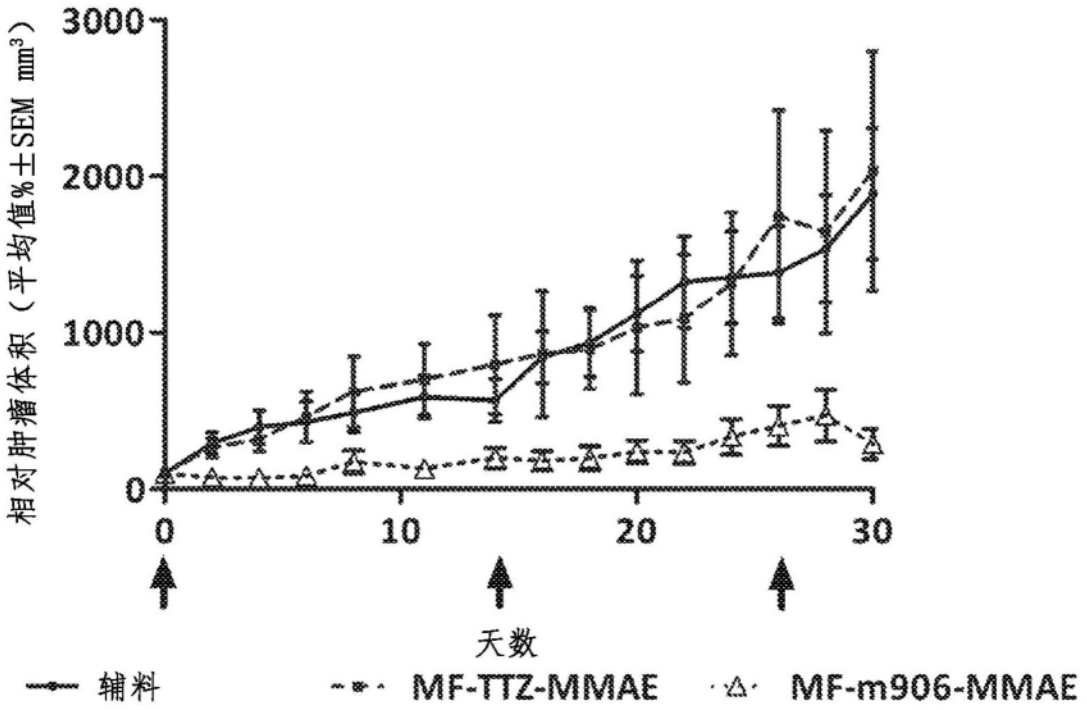

相对肿瘤体积（平均值%±SEM mm³）
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
天数
辅料
MF-TTZ-MMAE
MF-m906-MMAE

图7

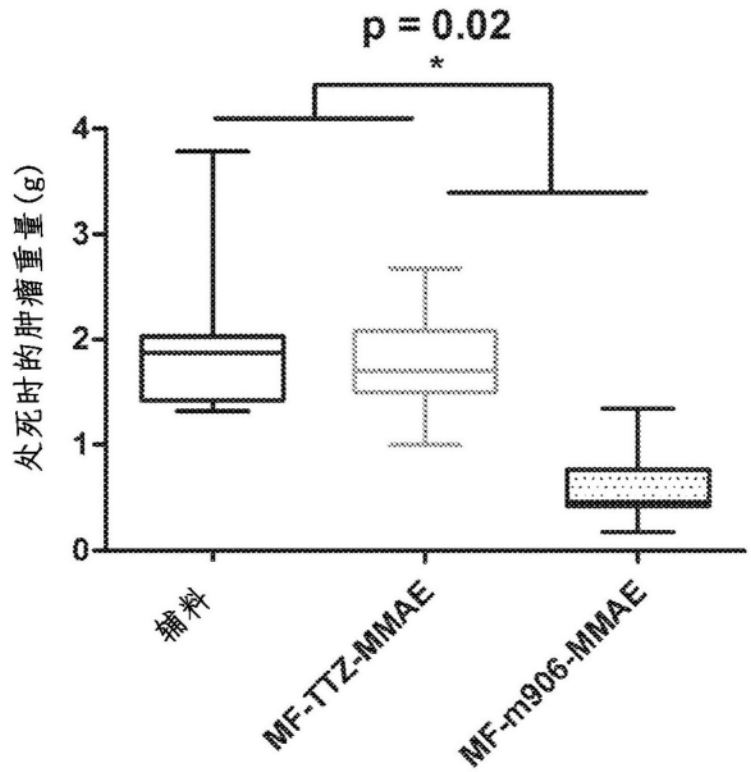

p = 0.02
*
处死时的肿瘤重量(g)
4
3
2
1
0
辅料
MF-TTZ-MMAE
MF-m906-MMAE

图8

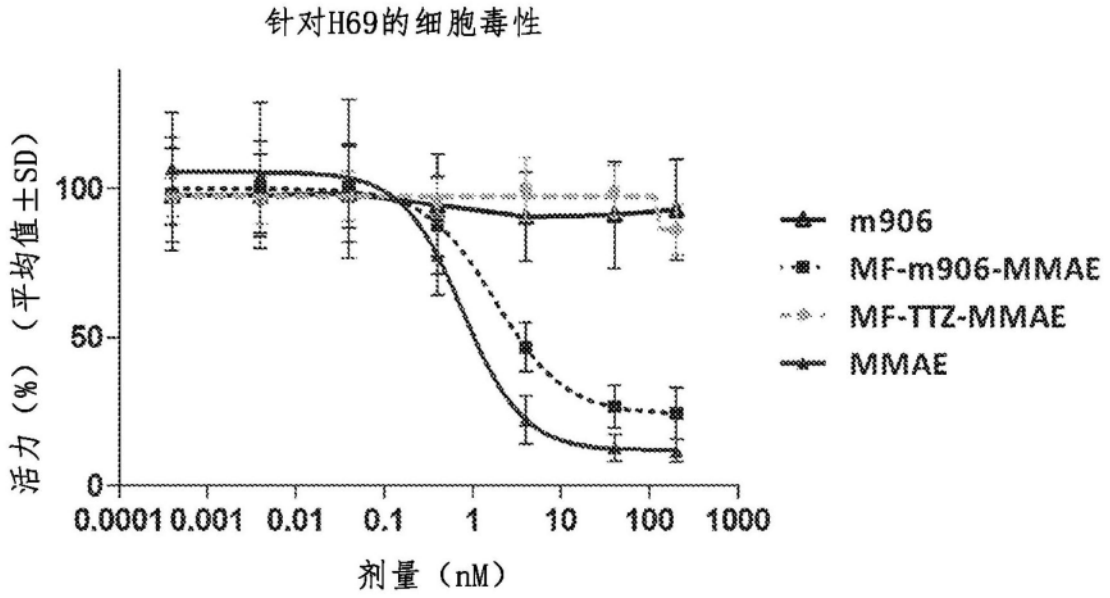

针对H69的细胞毒性
活力（%）（平均值±SD）
100
50
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
剂量（nM）
m906
MF-m906-MMAE
MF-TTZ-MMAE
MMAE

图9