(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119487076 A
(43)申请公布日 2025.02.18

(21)申请号 202380039417.6
(22)申请日 2023.03.09
(30)优先权数据
22161191.6 2022.03.09 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/056081 2023.03.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/170240 EN 2023.09.14
(71)申请人 默克专利股份公司
地址 德国达姆施塔特
(72)发明人 J·安德尔 S·赫克特 N·拉舍 S·迪克吉瑟 M·单 C·多伊奇 W·斯洛特 S·拉布-韦斯特法尔 F·哈特 L·托莱基斯 N·伯格
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 段菊兰 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 16/30(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书96页
序列表（电子公布） 附图39页

(54)发明名称

抗CEACAM5抗体及其缀合物和用途

(57)摘要

本发明提供了结合人CEACAM5蛋白的抗体，以及包含编码所述抗体的序列的分离核酸和宿主细胞。本发明还提供了包含与生长抑制剂连接的所述抗体的免疫缀合物，和包含本发明的抗体或免疫缀合物的药物组合物。本发明还提供了本发明的抗体、免疫缀合物和药物组合物用于治疗癌症或用于诊断目的的用途。

CN 119487076 A

1.一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白;

并且其中所述分离的抗体包含:

(i)至少一个轻链恒定区(CL),其包含选自GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP和TLQSA的序列,并优选在所述轻链恒定区的C端包含所述序列;

和/或

(ii)至少一个重链恒定区(CH),其包含以下氨基酸取代中的一种或多种:

(a)L234A和L235A(LALA突变);

(b)L234A和L235A和P329G(LALA-PG突变);

(c)L235A和G237A(LAGA突变);

(d)M252Y和S254T和T256E(YTE突变);

(e)K222R;

并且其中Eu编号用于所述氨基酸取代;

并且其中所述分离的抗体包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的CDR1-H、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的CDR2-H、由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的CDR3-H、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的CDR1-L、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2-L、和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3-L。

2.权利要求1所述的分离的抗体,其中所述分离的抗体包含具有结构FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-H-FR4和FR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8的框架区FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7和FR8;其中

FR1由SEQ ID NO:54组成,FR2由SEQ ID NO:55组成,FR3由SEQ ID NO:56组成,FR4由SEQ ID NO:57组成,FR5由SEQ ID NO:58组成,FR6由SEQ ID NO:59组成,FR7由SEQ ID NO:60组成以及FR8由SEQ ID NO:61组成。

3.一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白;

并且其中所述分离的抗体包含:

(i)至少一个轻链恒定区(CL),其包含选自GGTLQSPP、TLQSPP、TLQSA和TLQSG的序列,并优选在所述轻链恒定区的C端包含所述序列;

和/或

(ii)至少一个重链恒定区(CH),其包含以下氨基酸取代中的一种或多种:

(a)L234A和L235A(LALA突变);

(b)L234A和L235A和P329G(LALA-PG突变);

(c)L235A和G237A(LAGA突变);

(d)M252Y和S254T和T256E(YTE突变);

(e)K222R;

并且其中Eu编号用于所述氨基酸取代;

并且其中优选所述分离的抗体包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的CDR1-H、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的CDR2-H、由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的CDR3-H、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的CDR1-L、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2-L、和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3-L;

并且其中所述分离的抗体包含具有结构FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-H-FR4和

FR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8的框架区FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7和FR8;其中FR1由SEQ ID NO:54组成,FR2由SEQ ID NO:55组成,FR3由SEQ ID NO:56组成,FR4由SEQ ID NO:57组成,FR5由SEQ ID NO:58组成,FR6由SEQ ID NO:59组成,FR7由SEQ ID NO:60组成以及FR8由SEQ ID NO:61组成。

4.权利要求1-3任一项所述的分离的抗体,其中两个重链恒定区(CH)均包含所述氨基酸取代(a)至(e)中的一个或多个和/或其中两个轻链恒定区均包含所述序列GGTLQSPP。

5.权利要求1-3任一项的分离的抗体,其中至少一个重链恒定区(CH)包含SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32的氨基酸序列和/或其中至少一个所述轻链恒定区(CL)包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

6.权利要求1-3任一项所述的分离的抗体,其中所述重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)具有以下序列组合中的任一种:

(1)两个CH均包含SEQ ID NO:31的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:12的序列;或

(2)两个CH均包含SEQ ID NO:31的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:33的序列;或

(3)两个CH均包含SEQ ID NO:32的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:33的序列;或

(4)两个CH均包含SEQ ID NO:50的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:12的序列;或

(5)两个CH均包含SEQ ID NO:50的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:33的序列;或

(6)一个CH包含SEQ ID NO:31的序列且一个CL包含SEQ ID NO:12的序列;或

(7)一个CH包含SEQ ID NO:31的序列且一个CL包含SEQ ID NO:33的序列;或

(8)一个CH包含SEQ ID NO:32的序列且一个CL包含SEQ ID NO:33的序列;或

(9)一个CH包含SEQ ID NO:50的序列且一个CL包含SEQ ID NO:12的序列;或

10)一个CH包含SEQ ID NO:50的序列且一个CL包含SEQ ID NO:33的序列。

7.根据权利要求1至6任一项所述的抗体,其包含含有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

8.根据权利要求7所述的抗体,其包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

9.根据权利要求1至8任一项所述的抗体,其包含:

(i)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链(LC);或

(ii)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC);或

(iii)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC);或

(iv)包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链(LC);或

(v)包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC)。

10.一种分离的抗体,其与包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区(VH)和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区(VL),并且其中所述重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)

如权利要求1-9任一项所定义的抗体竞争结合人CEACAM5蛋白的A2-B2结构域。

11.根据权利要求10所述的抗体,其中所述抗体还与包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区(VH)和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区(VL),并且其中所述重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)如权利要求1-9任一项所定义的抗体竞争结合食蟹猕猴CEACAM5蛋白的A2-B2结构域。

12.根据权利要求1至11任一项所述的抗体,其中所述抗体不与人CEACAM1、人CEACAM6、人CEACAM7、人CEACAM8和食蟹猕猴CEACAM6显著地交叉反应。

13.根据权利要求1至12任一项所述的抗体,其中所述抗体是抗体片段。

14.根据权利要求13所述的抗体,其中所述抗体是选自Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2和双抗体的抗体片段。

15.根据权利要求1至14任一项所述的抗体,其是双特异性或多特异性抗体。

16.一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且:

其由两个相同的包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链(LC)组成;或

其由两个相同的包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC)组成;或

其由两个相同的包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC)组成;或

其由两个相同的包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链(LC)组成;或

其由两个相同的包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC)组成。

17.一种分离的核酸,其包含编码根据权利要求1至16任一项所述的抗体的核酸序列。

18.一种宿主细胞,其已经用根据权利要求17所述的核酸转化。

19.一种免疫缀合物,其包含经由接头共价连接到至少一种生长抑制剂上的根据权利要求1至16任一项所述的抗体。

20.根据权利要求19所述的免疫缀合物,其中所述生长抑制剂是细胞毒性药物或放射性部分。

21.根据权利要求19或20所述的免疫缀合物,其中所述生长抑制剂选自化疗剂、酶、抗生素、毒素,诸如小分子毒素或酶活性毒素、类毒素、长春花类、紫杉烷类、美登木素生物碱或美登木素生物碱类似物、托马霉素或吡咯并苯并二氮杂䓬衍生物、念珠藻素衍生物、来普霉素衍生物、澳瑞他汀或海兔毒素类似物、前药、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、DNA烷化剂、抗微管蛋白剂、CC-1065和CC-1065类似物。

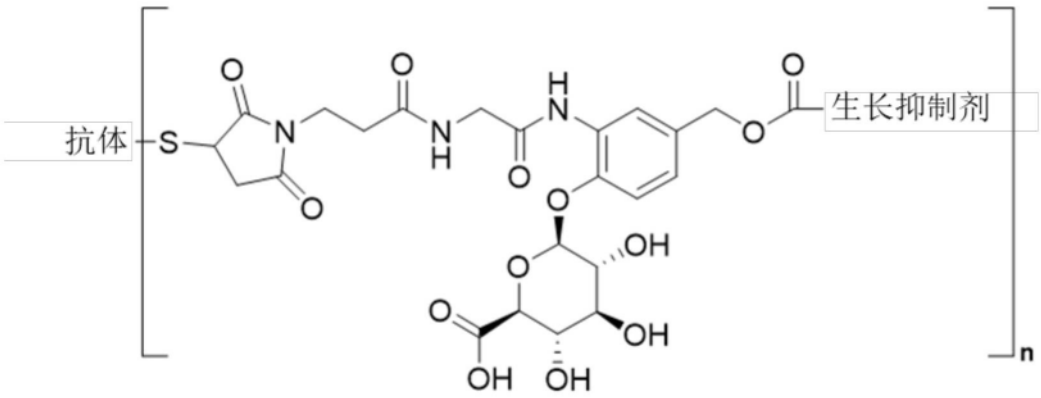
22.根据权利要求19至21任一项所述的免疫缀合物,其中所述生长抑制剂是依沙替康。

23.根据权利要求19至22任一项所述的免疫缀合物,其中接头是可裂解接头。

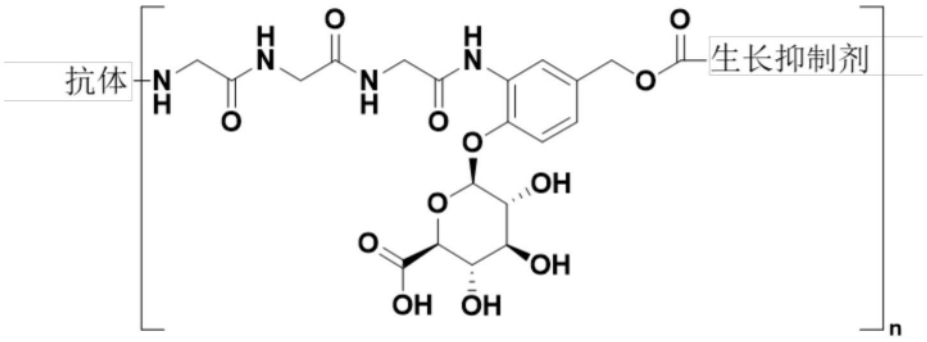
24.根据权利要求19至23任一项所述的免疫缀合物,其中所述接头是在哺乳动物细胞的核内体中可裂解的接头。

25.根据权利要求19至24任一项所述的免疫缀合物,其中所述接头是可通过人酶葡萄糖醛酸酶裂解的接头。

26.根据权利要求19至25任一项所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物具有下式(II)或式(IIA):



(II),

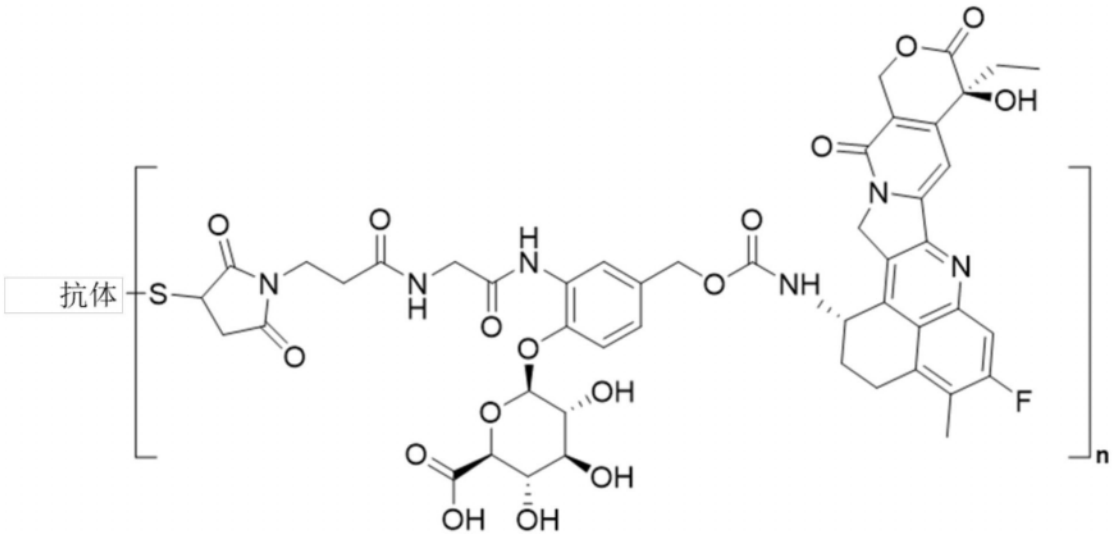


(IIA),

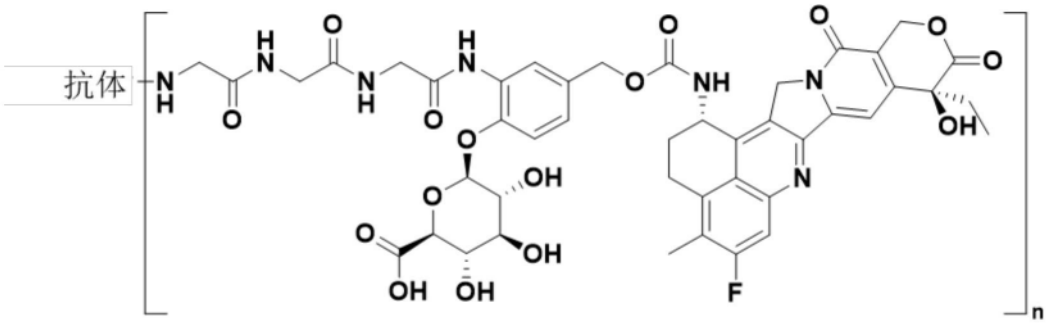
其中S是所述抗体的硫原子,并且其中n是共价连接至所述抗体的[(接头)-(生长抑制剂)]部分的数量。

27.根据权利要求26所述的免疫缀合物,其中n为1至10,且优选为4。

28.根据权利要求19至26任一项所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物具有下式(IV)或式(IVA):



(IV),



(IVA),其中S是所述抗体的硫原子,并且其中n是共价连接至所述抗体的[(接头)-(依沙替康)]部分的数量。

29.根据权利要求28所述的免疫缀合物,其中所述免疫缀合物具有式(IVA)且n为1至10,且优选为4。

30.根据权利要求19至29任一项所述的免疫缀合物,其中S是所述抗体的半胱氨酸的硫原子。

31.根据权利要求30所述的免疫缀合物,其中所述抗体的半胱氨酸是能够形成链间二硫键的半胱氨酸之一。

32.根据权利要求26至31任一项所述的免疫缀合物,其中对于式(II)和(IV),n为7至8;并且其中对于式(IIA)和(IVA),n为3至5。

33.根据权利要求26至32任一项所述的免疫缀合物,其中对于式(II)和(IV),n为7.5至8.0;并且其中对于式(IIA)和(IVA),n为3.5至4.5,且优选对于式(IIA)和(IVA),n为4。

34.包含根据权利要求1至16任一项所述的抗体或根据权利要求19至33任一项所述的免疫缀合物的药物组合物,其进一步包含可药用载体、稀释剂和/或赋形剂。

35.根据权利要求1至16任一项所述的抗体或根据权利要求19至33任一项所述的免疫缀合物或根据权利要求34所述的药物组合物,其用作药物。

36.根据权利要求1至16任一项所述的抗体或根据权利要求19至33任一项所述的免疫缀合物或根据权利要求34所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

37.用于根据权利要求36所述使用的抗体、免疫缀合物或药物组合物,其中所述癌症是表达CEACAM5的癌症。

38.用于根据权利要求36或37所述使用的抗体、免疫缀合物或药物组合物,其中所述癌症是结肠直肠癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、食管癌或前列腺癌。

39.治疗癌症的方法,其包括向受试者施用根据权利要求1至16任一项所述的抗体或根据权利要求19至33任一项所述的免疫缀合物或根据权利要求34所述的药物组合物。

40.根据权利要求39所述的方法,其中所述癌症是表达CEACAM5的癌症。

41.根据权利要求39或40所述的方法,其中所述癌症是结肠直肠癌、胃癌、肺癌、胰腺癌、食管癌或前列腺癌。

42.使用根据权利要求1至16任一项所述的抗体在来自受试者的生物样品中离体检测CEACAM5表达的方法。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述抗体用可检测分子标记。

44.根据权利要求1至16任一项所述的抗体用于在来自受试者的生物样品中离体检测CEACAM5表达的用途。

45.根据权利要求44所述的用途,其中所述抗体用可检测分子标记。

抗CEACAM5抗体及其缀合物和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及结合人CEACAM5蛋白的抗体,以及包含编码所述抗体的序列的分离核酸和宿主细胞。本发明还涉及包含与生长抑制剂连接的所述抗体的免疫缀合物,以及包含本发明的抗体或免疫缀合物的药物组合物。本发明还涉及本发明的抗体、免疫缀合物和药物组合物用于治疗癌症或用于诊断目的的用途。

背景技术

[0002] 癌胚抗原(CEA)是一种参与细胞粘附的糖蛋白。CEA在1965年(Gold和Freedman,J Exp Med,121,439,1965)首次被鉴定为在妊娠的前六个月期间由胎儿肠道正常表达的蛋白,并且在许多癌症,诸如结肠直肠癌或胰腺癌中被发现。CEA家族属于免疫球蛋白超家族。由18个基因组成的CEA家族细分为两个蛋白亚组:癌胚抗原相关的细胞粘附分子(CEACAM)亚组和妊娠特异性糖蛋白亚组(Kammerer&Zimmermann,BMC Biology 2010,8:12)。

[0003] 在人类中,CEACAM亚组由7个成员组成:CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7和CEACAM8。与最初鉴定的CEA相同的CEACAM5据报道在癌细胞(诸如结肠直肠、胃、肺和胰腺肿瘤细胞)的表面上高度表达,并且在正常组织中的表达限于一些正常上皮细胞,诸如结肠和食管上皮细胞。由此,CEACAM5可以构成适合于肿瘤特异性靶向方法的治疗靶标,诸如免疫缀合物。

[0004] CEACAM家族成员的胞外结构域由重复的免疫球蛋白样(Ig样)结构域构成,所述Ig样结构域已经根据序列同源性分为3种类型A、B和N。CEACAM5含有七个此类结构域,即N、A1、B1、A2、B2、A3和B3。一方面CEACAM5 A1、A2和A3结构域,以及另一方面B1、B2和B3结构域显示出高序列同源性,人CEACAM5的A结构域呈现84％至87％的成对序列相似性,并且B结构域呈现69％至80％的成对序列相似性。此外,在它们的结构中呈现A和/或B结构域的其它人CEACAM成员,即CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7和CEACAM8,显示出与人CEACAM5的同源性。特别地,人CEACAM6蛋白的A和B结构域分别显示出与人CEACAM5的A1和A3结构域以及B1至B3结构域中的任一种的序列同源性,其甚至高于在人CEACAM5的A结构域和B结构域中观察到的那些序列同源性。

[0005] 已经产生了用于CEA靶向的诊断或治疗目的的抗CEA抗体。对相关抗原的特异性一直作为该领域的关注点被提及,例如Sharkey等人(1990,Cancer Research 50,2823)。由于上述提及的同源性,一些先前描述的抗体可表现出例如与存在于不同免疫球蛋白结构域中的CEACAM5的重复表位的结合,并显示出与其它CEACAM家族成员,诸如CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7或CEACAM8的交叉反应性,由此缺乏对CEACAM5的特异性。然而,对于CEA靶向疗法来说需要抗CEACAM5抗体的特异性,使得其与表达人CEACAM5的肿瘤细胞结合,但不与表达其它CEACAM家族成员的某些正常组织结合。值得注意的是,CEACAM1、CEACAM6和CEACAM8已被描述为由人和非人灵长类动物的嗜中性粒细胞表达(Ebrahimmnejad等人,2000,Exp Cell Res,260,365;Zhao等人,2004,J Immunol Methods 293,207;Strickland等人,2009J Pathol,218,380),其中已经显示它们调节粒细胞生成并在免疫反应中起作用。出于治疗目

的,抗CEACAM5抗体与CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7或CEACAM8的交叉反应性可因此由于在正常组织中提高的毒性而降低该化合物的治疗指数。因此,需要不与CEACAM家族的其它分子交叉反应的特异性针对CEACAM5的抗体,例如用作抗体药物缀合物(ADC)的一部分或以导致杀死靶细胞的任何其它方式使用。

[0006] 此外,由于CEACAM5被描述为在一些正常细胞组织中表达,因此合意的是开发能够结合人CEACAM5以及食蟹猴(食蟹猕猴(Macaca fascicularis))CEACAM5的抗CEACAM5抗体,因为此类抗体可以在食蟹猴的临床前毒理学研究中容易地测试以评估其安全性概况。

[0007] 对a)物种交叉反应性和b)对人与食蟹猕猴CEACAM5的特异性(即与其它食蟹猕猴和人CEACAM家族成员没有交叉反应性)的需要的组合进一步增加了开发新抗CEACAM5抗体的复杂程度,尤其是考虑到人与食蟹猕猴CEACAM蛋白之间的总体序列同源性。

[0008] 此外,CEACAM5在文献中被描述为内化不良的表面蛋白(综述在Schmidt等人,2008,Cancer Immunol.Immunother.57,1879中),这为针对该靶蛋白的抗体药物缀合物提出了进一步的挑战。

[0009] 已知的抗CEACAM5抗体包括Immunomedics的拉贝妥珠单抗(labetuzumab)(也称为hMN14;Sharkey等人,1995,Cancer Research 55,5935)。已经显示该抗体不与相关抗原结合,但也不与来自食蟹猕猴的CEACAM5交叉反应。拉贝妥珠单抗也已用作抗体-药物缀合物(ADC)的一部分,即作为戈维替康-拉贝妥珠单抗。戈维替康-拉贝妥珠单抗是一种由经由接头(称为CL2A)与抗CEACAM5抗体拉贝妥珠单抗缀合的细胞毒性药物SN38构成的ADC,所述接头包含pH敏感性碳酸酯和短聚乙二醇(PEG)链。戈维替康-拉贝妥珠单抗的特征在于所用接头结构的显著不稳定性,这导致肠胃外施用后细胞毒性有效负载的早期全身性损失。这种降解过程可限制抗肿瘤活性并提高副作用的风险。另一种已知的抗CEACAM5ADC是Sanofi的SAR408701(tusamitamab ravtansine),其包含经由N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)接头与细胞毒性剂DM4(一种强效微管去稳定美登木素类生物碱)共价连接的抗CEACAM5抗体SAR408377(特赛妥单抗(tusamitamab);也称为huMab2-3)。SAR408701与对几种器官和组织(包括眼角膜)的毒性副作用(包括角膜炎和角膜病)相关。此外,基于微管抑制剂的ADC的有效性可能在某些癌症适应症,诸如结肠直肠癌中受到限制。迄今为止,还没有抗CEACAM5抗体或ADC被批准用于临床中的任何治疗用途;总体来说,几乎没有ADC被批准用于治疗实体瘤。

[0010] 一些ADC在患者中可能是剂量受限的,因为通过细胞分解代谢释放的有效负载的副作用,导致在骨髓和循环血细胞中的毒性(例如中性粒细胞减少症、网织红细胞减少症、淋巴细胞减少症)。

[0011] 由于药物与抗体偶联,ADC在循环中通常具有仅几天的在人类中的次优半衰期,这与相应的未缀合抗体的半衰期相比明显更低。这些ADC的相对较高的清除率与靶标非依赖性摄取后的细胞降解有关,并导致毒性药物有效负载的大量释放,这可以引发副作用。由此,本文中公开的ADC的目的是改善它们的半衰期以减少不想要的副作用。

[0012] 鉴于上述情况,仍然需要用于治疗癌症,例如用于不同的实体瘤适应症,包括例如CRC、胰腺癌、胃癌、NSCLC、食管癌和前列腺癌的新的和改善的治疗剂。

发明内容

[0013] 本发明尤其通过提供针对CEACAM5的单克隆抗体(与人和食蟹猕猴蛋白二者均反应)和通过提供包含所述抗体的免疫缀合物(在本文中也称为抗体-药物缀合物(ADC))来解决该需求和本领域的其它需求;这些免疫缀合物具有细胞毒性作用,在体外杀死肿瘤细胞并在体内抑制肿瘤生长。本发明涉及权利要求书以及下文的进一步描述中所述的实施方案。

[0014] 为了产生用于治疗目的的具有最佳特性的针对CEACAM5的新抗体,特别是以免疫缀合物的形式的抗体,发明人已经进行了广泛的研究和开发,以选择具有有利概况的抗体并在此基础上开发免疫缀合物。

[0015] 本发明人能够选择和产生出乎意料地包含若干所需特征的优化IgG。这些抗体以高亲和力结合人CEACAM5的A2-B2结构域,并且不识别人CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7和CEACAM8蛋白。在细胞背景下,这些抗体显示出对表达CEACAM5的肿瘤细胞的高亲和力并且被内化。此外,这些抗体还与食蟹猕猴CEACAM5蛋白结合,对猴和人蛋白的亲和力在彼此的10倍以内。本发明的抗体与食蟹猕猴CEACAM5的A2-B2结构域结合,但它们不识别另一食蟹猕猴CEACAM蛋白CEACAM6。

[0016] 本发明人还已经显示他们产生的抗体当在免疫缀合物中与细胞毒性药物组合时,能够在体外诱导对肿瘤细胞的细胞毒性作用。与细胞毒性药物缀合的抗体(即本发明的免疫缀合物)也能够在携带表达CEACAM5的肿瘤的小鼠中显著抑制肿瘤生长。设计连接药物与抗体的接头以使肠胃外施用后的全身稳定性最大化。靶细胞内依沙替康(exatecan)从本发明的免疫缀合物中释放导致非常高的效力和突出的旁观者效应。强效的旁观者效应可有益于治疗具有异质靶标表达的患者。

[0017] 通常,高全身性暴露是期望。与具有较低全身性暴露的化合物相比,ADC药物的高全身性暴露导致在肿瘤组织和细胞中更有效的肿瘤靶向和改善的细胞毒性有效负载分布,并最终导致增强的肿瘤细胞杀伤。

[0018] 此外,本发明的抗体-药物-缀合物通过包括分子修饰来改善,以减少靶标非依赖性细胞降解,产生具有较低的清除率、较高的全身性暴露和减少的有效负载释放的分子。

[0019] 本发明涉及抗体修饰和有效负载缀合策略,其显著降低此类ADC的脱靶细胞分解代谢,由此降低释放的有效负载的水平,同时改善由较高的ADC暴露驱动的效力。因此,这些修饰将通过减少副作用和提高抗肿瘤活性而为药物提供改善的治疗窗口。

[0020] 如本文中所述,将通过例如以下来改善根据本发明的ADC的暴露和半衰期:

(1)通过包括YTE突变并使用链间半胱氨酸缀合将其与药物连接来修饰抗体重链,或

(2)通过用YTE突变修饰抗体重链并使用创新的酶促缀合方法,该方法使用微生物谷氨酰胺转胺酶(本文也称为“TGase”和“mTG”)酶将药物附接至抗体。

[0021] 出乎意料地,通过上述方法(2)获得了在人类预测动物模型中导致低清除率值的高暴露。采用此类修饰,ADC的暴露与不包含这些修饰的变体相比改善至约10倍,这因此导致释放的有效负载水平的显著降低和循环中抗肿瘤活性ADC浓度的显著提高。改善的ADC与不包含药物接头的原始YTE抗体的PK概况相似,并且表现出超越现有技术ADC的改善的半衰期。

[0022] 与现有技术分子相比,这些结果将降低毒性并改善临床癌症疗法的效力。

附图说明

[0023] 图1:ELISA测定中mAb1与重组人(rh)CEACAM5 ECD或其结构域N-A1-B1、A2-B2、A3-B3或与重组食蟹猕猴(mf)CEACAM5 ECD的结合。

[0024] 图2:抗CEACAM5抗体与MKN-45细胞结合的EC50:与抗体huMab2-3和hmn-14相比,mAb1在表达CEACAM5的MKN45细胞系上的细胞结合。

[0025] 图3:pHrodo标记的抗体内化到细胞的晚期内体和溶酶体中(每个细胞的总荧光强度,一式三份的平均值)。

[0026] 图4:从700分钟到1200分钟的时间每个细胞的荧光强度,其是曲线的线性部分。测量线性斜率并在样品之间进行比较(参见实施例1.6.5)。

[0027] 图5:用抗体rb8G4对FFPE癌细胞系的IHC染色。

[0028] 图6:104种癌细胞系的CEACAM5 mRNA表达和IHC染色的相关性。

[0029] 图7:用抗体rb8G4对正常人体组织的IHC染色。

[0030] 图8:正常人体组织中的CEACAM5 mRNA表达。

[0031] 图9:用抗体rb8G4对人结肠直肠癌组织的IHC染色。

[0032] 图10:用抗体rb8G4对人胃癌组织的IHC染色。

[0033] 图11:用抗体rb8G4对人食管癌组织的IHC染色。

[0034] 图12:用抗体rb8G4对人非小细胞肺癌组织的IHC染色。

[0035] 图13:通过蛋白印迹研究的癌细胞系裂解物中mAb1(图13A)和rb8G4(图13B)与CEACAM5的结合。

[0036] 图14:显示储备mAb、UF后的缀合物和最终的原料药(BDS)的纯度的典型SEC色谱图。

[0037] 图15:显示轻链与重链的分离的典型RP-HPLC色谱图。该色谱图显示了储备mAb、粗品ADC和最终BDS的重叠。

[0038] 图16:显示NAC标准品和最终BDS的游离药物水平的典型色谱图。

[0039] 图17:显示储备mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱图。

[0040] 图18:显示轻链与重链的分离的典型RP-HPLC色谱图。该色谱图显示了储备mAb和最终BDS的重叠。

[0041] 图19:显示NAC标准品和最终BDS的游离药物水平的典型色谱图。

[0042] 图20:人、小鼠和食蟹猴血清的ADC稳定性。使用游离依沙替康(归一化数据)计算缀合的依沙替康浓度(初始剂量约10μM)。

[0043] 图21:小鼠血清和缓冲液的ADC3对照稳定性。使用游离的SN38(未归一化)计算缀合的SN38浓度(初始剂量50μg/mL ADC蛋白浓度)。

[0044] 图22:人肝溶酶体中ADC1和ADC2的有效负载释放曲线(pH 5.0)。使用例如游离依沙替康(初始浓度约10μM依沙替康)归一化数据计算缀合药物浓度。

[0045] 图23:ADC分解代谢物分析证实游离依沙替康为溶酶体释放产物。

[0046] 图24:ADC1、ADC2和游离有效负载针对抗原阳性SK-CO-1(图24A)和SNU-16(图24B)细胞系与抗原阴性MDA-MB-231(图24C)细胞系相比的体外效力。显示了一个代表性实验,一

式三份的平均值±SD。如图24C中所示,将三个不同系列的数据点分别分配给ADC1、ADC2和有效负载的图例也适用于图24A和图24B。

[0047] 图25:ADC1和ADC2与相应的同型对照在SK-CO-1细胞系上的比较。显示了一个代表性实验,一式三份的平均值±SD。

[0048] 图26:ADC1、ADC2、ADC SAR DM4、ADC mAb1 DM4和游离有效负载针对抗原阳性SK-CO-1(图26A)与抗原阴性MDA-MB-231(图26B)细胞系相比的体外效力。显示了一个代表性实验,一式三份的平均值±SD;图26B中显示的图例也适用于图26A。

[0049] 图27:ADC1和ADC2对与抗原阳性SK-CO-1细胞共培养的抗原阴性MDA-MB-231细胞的强效旁观者效应(图27A)。ADC1或ADC2对单独的MDA-MB-231细胞没有非特异性效应(图27B)。显示了一个代表性实验,一式两份的平均值±SD。

[0050] 图28:ADC1和ADC2对与抗原阳性SK-CO-1细胞共培养的抗原阴性MDA-MB-231细胞的旁观者效应比ADC SAR DM4更强效(图28A和图28B)。测试的ADC对单独的MDA-MB-231细胞没有非特异性效应(图28C)。显示了一个代表性实验,一式两份的平均值±SD。

[0051] 图29:单次治疗后ADC1和ADC2在CRC PDX模型(COPF217)中的效力。

[0052] 图30:单次治疗后ADC1在NSCLC PDX模型(LUPF160151)中的效力。

[0053] 图31:单次治疗后ADC1在胃癌PDX模型(GAX066)中的效力。

[0054] 图32:ADC1与ADC3相比在胰腺异种移植模型(HPAF-II)中的效力。

[0055] 图33:ADC1与ADC SAR DM4相比在CRC PDX模型(COPF230)中的效力。

[0056] 图34:ADC 1与ADC SAR DM4相比在CRC PDX模型(REPF210)中的效力。

[0057] 图35:ADC1与ADC SAR DM4相比在胃PDX模型GAPF313(正在进行的实验的中期分析)中的效力。

[0058] 图36:显示mAb1-M/ADC1-M的输入mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱图。

[0059] 图37:示出mAb1-M/ADC1-M的最终BDS的DAR测定的典型RP-HPLC色谱图。

[0060] 图38:显示ADC7-M、ADC2-M和ADC5-M的输入mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱图。

[0061] 图39:示出ADC7-M、ADC2-M和ADC5-M的最终BDS的DAR测定的典型RP-HPLC色谱图。

[0062] 图40:ADC1-M、ADC4-M和游离有效负载针对抗原阳性SK-CO-1(图40a)、SNU-16(图40b)、MKN-45(图40c)和LS174T(图40d)细胞系与抗原阴性MDA-MB-231(图40e)细胞系相比的体外效力。显示了一个代表性实验,一式两份的平均值±SD。

[0063] 图41:ADC2-M、ADC5-M和游离有效负载针对抗原阳性SK-CO-1(图41a)、SNU-16(图41b)、MKN-45(图41c)和LS174T(图41d)细胞系与抗原阴性MDA-MB-231(图41e)细胞系相比的体外效力。显示了一个代表性实验,一式两份的平均值±SD。

[0064] 图42:huFcRn Tg276小鼠中ADC1、ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M的药代动力学曲线(总抗体)。

[0065] 图43:用ADC1-M和ADC2-M治疗相对于媒介物对照治疗后的肿瘤体积变化。

[0066] 图44:与ADC SAR DM4相比ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M对与抗原阳性SK-CO-1细胞共培养的抗原阴性MDA-MB-231细胞的更强效的旁观者效应。显示了一个代表性实验,一式两份的平均值±SD。

[0067] 图45:在HPAF-II异种移植模型中ADC1-M和ADC3-M与ADC8相比的效力。

[0068] 图46:单次治疗后在CRC PDX模型(COPF230)中ADC1-M、ADC3-M与ADC SAR DM4相比的效力。

[0069] 图47:多次治疗后在GC PDX模型(GAPF313)中ADC1-M、ADC3-M与ADC SAR DM4相比的效力。

具体实施方式

定义

[0070] 如本文中使用的“CEACAM5”是指“癌胚抗原相关的细胞粘附分子5”,也称为“CD66e”(分化簇66e)。CEACAM5是一种参与细胞粘附的糖蛋白。CEACAM5尤其在例如结肠直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、食管癌、前列腺癌和其它实体瘤的表面上高度表达。包括信号肽(位置1-34)和前肽(位置686-702)的全长人CEACAM5的参考序列可以以登录号AAA51967.1获自GenBank数据库;该氨基酸序列读取如下:

MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLPQHLF
GYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKS
DLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSP
RLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRS
GENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTT
VTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDN
RTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCH
AASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELP
KPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTR
NDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYS
WRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATV
GIMIGVLVGVALI (SEQ ID NO: 1)。已经鉴定了五种非同义SNP,其在高加索人群中的频率高于2%,它们中的四种定位在人CEACAM5的N结构域中(在位置80、83、112、113处),最后一种定位在人CEACAM5的A2结构域中(在位置398处)。GenBank AAA51967.1含有主要单倍型(I80、V83、I112、I113和E398)。

[0071] “结构域”或“区域”可以是蛋白的任何区域,其通常基于序列同源性来定义,并通常与特定结构或功能实体相关。已知CEACAM家族成员由Ig样结构域构成。术语结构域在本文中用于表示单独的Ig样结构域,诸如“N结构域”,或表示连续结构域的组,诸如“A2-B2结构域”。

[0072] 人CEACAM5的结构域组序如下(基于GenBank AAA51967.1序列;SEQ ID NO:1):

人CEACAM5结构域	在SEQ ID NO:1中的位置
N	35-142
A1	143-237
B1	238-320
A2	321-415
B2	416-498
A3	499-593

B3	594-685

因此,人CEACAM5的A2-B2结构域由SEQ ID NO:1的氨基酸321-498组成。

[0073] 可获得食蟹猕猴CEACAM5蛋白的参考序列(NCBI参考序列XP_005589491.1),并且该氨基酸序列读取如下:mgspsaplhrwcipwqtllltaslltfwnpptaqltiesrpfnvaegkevllla hnvsqnlfgyiwykgervdasrrigscvirtqqitpgpahsgretidfnasllihnvtqsdtgsytiqvikedlvn eeatgqfrvypelpkpyissnnsnpvedkdavaltcepetqdttylwwvnnqslpvsprlelssdnrtltvfnipr ndttsykcetqnpvsvrrsdpvtlnvlygpdaptisplntpyragenlnlschaasnptaqyfwfvngtfqqstqe lfipnitvnnsgsymcqahnsatglnrttvtaitvyaelpkpyitsnnsnpiedkdavtltcepetqdttylwwvn nqslsvssrlelsndnrtltvfniprndttfyecetqnpvsvrrsdpvtlnvlygpdaptisplntpyragenlnl schaasnpaaqyswfvngtfqqstqelfipnitvnnsgsymcqahnsatglnrttvtaitvyvelpkpyissnnsn piedkdavtltcepvaenttylwwvnnqslsvsprlqlsngnriltllsvtrndtgpyecgiqnsesakrsdpvtl nvtygpdtpiisppdlsyrsganlnlschsdsnpspqyswlingtlrqhtqvlfiskitsnnngayacfvsnlatg rnnsivknisvssgdsapgssglsaratvgiiigmlvgvalm(SEQ ID NO:2)(信号肽为斜体;A2-B2结构域为黑体字;GPI锚为下划线;N-A1-B1结构域为信号肽与A2-B2结构域之间的常规字体;A3-B3结构域为A2-B2结构域与GPI锚之间的常规字体)。

[0074] “编码序列”或“编码”表达产物,诸如多肽、蛋白或酶的序列是在表达时导致产生该多肽、蛋白或酶的核苷酸序列,即该核苷酸序列编码该多肽、蛋白或酶的氨基酸序列。蛋白的编码序列可包括起始密码子(通常为ATG)和终止密码子。

[0075] 如本文中所用,提及特定蛋白(例如抗体)可包括具有天然氨基酸序列的多肽,以及与其来源或制备模式无关的变体和修饰形式。具有天然氨基酸序列的蛋白是具有与获自自然界的相同氨基酸序列的蛋白。此类天然序列蛋白可以从自然界分离,或者可以使用标准重组和/或合成方法来制备。天然序列蛋白特别包括天然存在的截短或可溶形式、天然存在的变体形式(例如可变剪接形式)、天然存在的等位基因变体和包括翻译后修饰的形式。天然序列蛋白包括携带翻译后修饰的蛋白,所述翻译后修饰诸如糖基化或磷酸化,或某些氨基酸残基的其它修饰。

[0076] 术语“基因”是指编码或对应于包含一种或多种蛋白或酶的全部或部分的特定氨基酸序列的DNA序列,并且可以包括或不包括调节性DNA序列,诸如启动子序列,其决定例如表达基因的条件。一些并非结构基因的基因可以从DNA转录成RNA,但不翻译成氨基酸序列。其它基因可以充当结构基因的调节子(regulator)或DNA转录的调节子。特别地,术语基因可以用于编码蛋白的基因组序列,即包含调节子、启动子、内含子和外显子序列的序列。

[0077] 在本文中,与参考序列“具有至少85%同一性”的序列是在其全长上与参考序列的全长具有85%或更高,例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的序列。“序列同一性”的百分比由此可以通过使用Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.48:443(1970)),例如使用具有BLOSUM62矩阵的程序NeedlE(EMBOSS)和以下参数的全局双序列比对通过在其全长上比较两个此类序列来确定:空位开放=10,空位延伸=0.5,末端空位罚分=假,末端空位开放=10,末端空位延伸=0.5(其为标准设置)。

[0078] “保守氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被具有化学性质(例如电荷、尺寸或疏水性)类似的侧链的另一氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代基本不会改变蛋白的功能性质。具有化学性质类似的侧链的氨基酸组的实例包括1)脂族侧链:甘氨酸、

丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;2)脂族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸;和7)含硫侧链:半胱氨酸和蛋氨酸。保守氨基酸取代组也可基于氨基酸尺寸来定义。

[0079] “抗体”(也称为“免疫球蛋白”)可以例如是天然或常规类型的抗体,其中两条重链通过二硫键彼此连接,并且每条重链通过二硫键与轻链连接。存在两种类型的轻链,λ(I)和κ(k)。存在五种主要的重链类别(或同种型),其决定抗体分子的功能活性的方面:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每种抗体链含有不同的序列结构域(或区域)。典型的IgG抗体的轻链包括两个区域,可变区(VL)和恒定区(CL)。典型的IgG抗体的重链包括四个区域,即可变区(VH)和恒定区(CH),后者由三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)构成。轻链和重链的可变区决定了与抗原的结合和特异性。轻链和重链的恒定区可提供重要的生物学性质,诸如抗体链缔合、分泌、经胎盘移动性、补体结合和与Fc受体(FcR)的结合。Fv片段是抗体的Fab片段的N-端部分,并且由一条轻链和一条重链的可变部分组成。

[0080] 抗体的特异性在于抗体结合位点和抗原决定簇之间的结构互补性。抗体结合位点由主要来自所谓高变区或互补决定区(CDR)的残基构成。互补决定区(CDR)因此是指一起限定了抗体的Fv区域的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。抗体的轻(L)链和重(H)链各自具有三个CDR,分别命名为CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L和CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H。因此,常规抗体的抗原结合位点包括六个CDR,其包含来自重链和轻链可变区的每一个的CDR组。

[0081] “框架区”(FR)是指插在CDR之间的氨基酸序列,即在单一物种中的不同免疫球蛋白中相对保守的免疫球蛋白轻链和重链可变区的那些部分。免疫球蛋白的轻链和重链各自具有四个FR,分别命名为FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L和FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。如本文中使用的“人框架区”是与天然存在的人抗体的框架区基本相同(约85%或更高,例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)的框架区。

[0082] 在本发明的背景下,免疫球蛋白轻链或重链中的CDR/FR定义基于IMGT定义(Lefrnc等人,Dev.Comp.Immunol.,2003,27(1):55-77;www.imgt.org)来确定。

[0083] 如本文中使用的术语“抗体”包括常规抗体及其片段,以及单结构域抗体及其片段,诸如单结构域抗体的可变重链;如本文中使用的术语“抗体”还包括嵌合、人源化、双特异性或多特异性抗体,以及其它类型的工程化抗体。术语“抗体”包括单克隆抗体。

[0084] 如本文中使用的术语“单克隆抗体”或“mAb”是指针对特定抗原的具有单一氨基酸序列的抗体分子,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生该抗体。单克隆抗体可以例如通过B细胞或杂交瘤的单克隆产生,但也可以是重组的,例如通过涉及遗传或蛋白工程的方法产生。

[0085] 术语“嵌合抗体”是指工程化抗体,其在最广泛的意义上含有来自一种抗体的一个或多个区域和来自一种或多种其它抗体的一个或多个区域。在一个实施方案中,嵌合抗体包含与另一抗体(在一些实施方案中其为人抗体)的CH和CL缔合的来源于非人动物的抗体的VH和VL。作为非人动物,可以使用任何动物诸如小鼠、大鼠、仓鼠、兔等。嵌合抗体还可以表示对至少两种不同的抗原具有特异性的多特异性抗体。

[0086] 术语“人源化抗体”是指完全或部分非人来源,并且已经过修饰以替换某些氨基酸(例如VH和VL的框架区中的氨基酸)以避免或最小化在人体中的免疫反应的抗体。人源化抗

体的恒定区通常是人CH和CL区。

[0087] 抗体(例如常规抗体)的“片段”包含完整抗体诸如IgG的一部分,特别是完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、双抗体以及由抗体片段形成的双特异性和多特异性抗体。常规抗体的片段也可以是单结构域抗体,诸如重链抗体或VHH。

[0088] 术语“Fab”表示具有约50,000Da的分子量和抗原结合活性的抗体片段,其中重链的N-端侧的约一半和整个轻链通过二硫键结合在一起。其通常通过用蛋白酶——木瓜蛋白酶处理IgG在片段中获得。

[0089] 术语“F(ab')2”是指具有约100,000Da的分子量和抗原结合活性的抗体片段,其稍大于2个经由铰链区的二硫键结合的相同Fab片段。其通常通过用蛋白酶——胃蛋白酶处理IgG在片段中获得。

[0090] 术语“Fab'”是指具有约50,000Da的分子量和抗原结合活性的抗体片段,其通过切割F(ab')2的铰链区的二硫键获得。

[0091] 单链Fv(“scFv”)是共价连接的VH::VL异二聚体,其通常由包括通过编码肽的接头连接的编码VH和VL的基因的基因融合来表达。本发明的人scFv片段包括例如通过使用基因重组技术保持在适当构象的CDR。二价和多价抗体片段可通过单价scFv的缔合自发地形成,或者可以通过经由肽接头偶联单价scFv(诸如二价sc(Fv)2)而生成。“dsFv”是通过二硫键稳定的VH::VL异二聚体。“(dsFv)2”表示通过肽接头偶联的两个dsFv。

[0092] 术语“双特异性抗体”或“BsAb”表示包含两个不同的抗原结合位点的抗体。由此,BsAb能例如同时结合两种不同的抗原。遗传工程已经越来越多地用于设计、修饰和产生具有期望的结合性质和效应功能组的抗体或抗体衍生物,如例如在EP 2 050 764 A1中描述的那样。

[0093] 术语“多特异性抗体”表示包含两个或更多个不同的抗原结合位点的抗体。

[0094] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段在同一多肽链(VH-VL)中包含连接到轻链可变结构域(VL)的重链可变结构域(VH)。通过使用太短以至于不允许在同一链的两个结构域之间配对的接头,迫使该结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0095] 术语“杂交瘤”表示通过对经由用抗原免疫非人哺乳动物制备的B细胞进行与产生具有抗原特异性的所需单克隆抗体的来源于小鼠等的骨髓瘤细胞的细胞融合而获得的细胞。

[0096] 当涉及多肽(例如抗体)或核苷酸序列时,“纯化的”或“分离的”是指所示分子在基本不存在相同类型的其它生物大分子的情况下存在。如本文中使用的术语“纯化的”是指存在至少75重量%、85重量%、95重量%、96重量%、97重量%或98重量%的相同类型的生物大分子。编码特定多肽的“分离的”核酸分子是指基本不含不编码主题多肽的其它核酸分子的核酸分子;然而,该分子可以包括一些另外的碱基或部分,其不会有害地影响组合物的基本特性。

[0097] 如本文中使用的术语“受试者”表示哺乳动物,诸如啮齿类动物、猫、犬、灵长类动物或人。在本发明的实施方案中,受试者(或患者)是人。

本发明的抗体

[0098] 本发明人已成功产生、筛选和选择了特异性抗CEACAM5抗体,所述抗CEACAM5抗体出乎意料地表现出使它们理想地适用于癌症治疗,特别是作为免疫缀合物(抗体-药物缀合物)的一部分的几种特性的组合。例如,本发明的抗体对人和食蟹猕猴CEACAM5蛋白二者均表现出高亲和力,并且它们不与人CEACAM1、CEACAM6、CEACAM7和CEACAM8蛋白或食蟹猕猴CEACAM6蛋白明显地交叉反应。本发明人已经确定了根据本发明的此类单克隆抗体的氨基酸序列。

[0099] 本发明提供了一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白;并且其中该分离的抗体包含:

(i)至少一个轻链恒定区(CL),其包含选自GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP和TLQSA(优选GGTLQSPP)的序列,并优选在所述轻链恒定区的C端包含该序列;

和/或

(ii)至少一个重链恒定区(CH),其包含以下氨基酸取代中的一种或多种:

(a)L234A和L235A(LALA突变);

(b)L234A和L235A和P329G(LALA-PG突变);

(c)L235A和G237A(LAGA突变);

(d)M252Y和S254T和T256E(YTE突变);

(e)K222R;

并且其中Eu编号用于所述氨基酸取代;

并且其中所述分离的抗体包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的CDR1-H、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的CDR2-H、由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的CDR3-H、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的CDR1-L、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2-L、和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3-L。

[0100] 本发明进一步提供了一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白;并且其中该分离的抗体包含:

(i)至少一个轻链恒定区(CL),其包含选自GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP和TLQSA(优选GGTLQSPP)的序列,并优选在所述轻链恒定区的C端包含该序列;

和

(ii)至少一个重链恒定区(CH),其包含以下氨基酸取代中的一种或多种:

(a)L234A和L235A(LALA突变);

(b)L234A和L235A和P329G(LALA-PG突变);

(c)L235A和G237A(LAGA突变);

(d)M252Y和S254T和T256E(YTE突变);

(e)K222R;

并且其中Eu编号用于所述氨基酸取代;

并且其中所述分离的抗体包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的CDR1-H、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的CDR2-H、由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的CDR3-H、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的CDR1-L、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2-L、和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3-L。

[0101] 优选地,本发明的分离的抗体包含具有结构FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-

H-FR4和FR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8的框架区FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7和FR8;其中FR1由SEQ ID NO:54组成,FR2由SEQ ID NO:55组成,FR3由SEQ ID NO:56组成,FR4由SEQ ID NO:57组成,FR5由SEQ ID NO:58组成,FR6由SEQ ID NO:59组成,FR7由SEQ ID NO:60组成以及FR8由SEQ ID NO:61组成。

[0102] 本发明进一步提供了一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,

其中所述分离的抗体优选包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的CDR1-H、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的CDR2-H、由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的CDR3-H、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的CDR1-L、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2-L、和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3-L;

并且其中所述分离的抗体包含具有结构FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-H-FR4和FR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8的框架区FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7和FR8;其中FR1由SEQ ID NO:54(EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS)组成,FR2由SEQ ID NO:55(LTWIRQHPGKGLEWIGY)组成,FR3由SEQ ID NO:56(YFNPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC)组成,FR4由SEQ ID NO:57(WGQGTLVTVSS)组成,FR5由SEQ ID NO:58(EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTS)组成,FR6由SEQ ID NO:59(LAWYQQKPGQAPRLLIY)组成,FR7由SEQ ID NO:60(TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC)组成以及FR8由SEQ ID NO:61(FGPGTKVDIK)组成。

[0103] 本发明还提供了一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,其中该分离的抗体包含:

(i)至少一个轻链恒定区(CL),其包含选自GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP和TLQSA的序列,且最优选序列GGTLQSPP,并优选在所述轻链恒定区的C端包含该序列;

和/或

(ii)至少一个重链恒定区(CH),其包含以下氨基酸取代中的一种或多种:

(a)L234A和L235A(LALA突变);

(b)L234A和L235A和P329G(LALA-PG突变);

(c)L235A和G237A(LAGA突变);

(d)M252Y和S254T和T256E(YTE突变);

(e)K222R;

并且其中Eu编号用于所述氨基酸取代;

并且其中优选所述分离的抗体包含由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的CDR1-H、由SEQ ID NO:4的氨基酸序列组成的CDR2-H、由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的CDR3-H、由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的CDR1-L、由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR2-L、和由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR3-L;

并且其中优选所述分离的抗体包含具有结构FR1-CDR1-H-FR2-CDR2-H-FR3-CDR3-H-FR4和FR5-CDR1-L-FR6-CDR2-L-FR7-CDR3-L-FR8的框架区FR1、FR2、FR3、FR4、FR5、FR6、FR7和FR8;其中FR1由SEQ ID NO:54组成,FR2由SEQ ID NO:55组成,FR3由SEQ ID NO:56组成,FR4由SEQ ID NO:57组成,FR5由SEQ ID NO:58组成,FR6由SEQ ID NO:59组成,FR7由SEQ ID NO:60组成以及FR8由SEQ ID NO:61组成。

[0104] 本发明还提供了一种分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其包含由氨基酸序列DGSVSRGGYY(SEQ ID NO:3)组成的CDR1-H、由氨基酸序列IYYSGST(SEQ ID NO:4)组成的CDR2-H、由氨基酸序列ARGIAVAPFDY(SEQ ID NO:5)组成的CDR3-H、由氨基酸序列QSVRSN(SEQ ID NO:6)组成的CDR1-L、由氨基酸序列AAS(SEQ ID NO:7)组成的CDR2-L、和由氨基酸序列QQYTNWPFT(SEQ ID NO:8)组成的CDR3-L;并且其中该分离的抗体包含:

(i)至少一个重链恒定区(CH),其包含以下氨基酸取代中的一种或多种:

(a)L234A和L235A(LALA突变);

(b)L234A和L235A和P329G(LALA-PG突变);

(c)L235A和G237A(LAGA突变);

(d)M252Y和S254T和T256E(YTE突变);

(e)K222R;

和/或

(ii)至少一个轻链恒定区(CL),其包含序列GGTLQSPP,并优选在所述轻链恒定区的C端包含该序列;

并且其中Eu编号用于所述氨基酸取代。EU编号体系是公知的(参见Edelman等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA1969,63,78-85和Kabat,E.A.等人,National Institutes of Health(U.S.)Office of the Director.Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版;DIANE Publishing:Collingdale,PA,USA,1991),并且示出的氨基酸取代的位置遵循该编号体系。使用单字母氨基酸代码指定氨基酸取代。GGTLQSPP也可以多次包含在轻链恒定区(CL)中,并且也可以替代地或另外地包含在重链恒定区(CH)中。优选地,在本发明的抗体的两个轻链恒定区(CL)中,每个轻链恒定区(CL)包含GGTLQSPP一次。

[0105] 本发明的抗体优选也可结合食蟹猕猴CEACAM5蛋白。

[0106] 在本发明的分离的抗体的一个实施方案中,两个重链恒定区(CH)均包含所述氨基酸取代(a)至(e)中的一个或多个和/或其中两个轻链恒定区均包含所述序列GGTLQSPP。优选的CL和CH链的修饰组合概括在下表4中,其示出了抗体mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M和mAb7-M的修饰组合。优选地,本发明的抗体包含以下重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)修饰中的任一种:

(a)CH包含氨基酸取代L234A、L235A(LALA突变)以及M252Y、S254T和T256E(YTE突变);或

(b)CH包含氨基酸取代L234A、L235A(LALA突变)以及M252Y、S254T和T256E(YTE突变);以及轻链恒定区(CL)包含序列GGTLQSPP(优选在C端);或

(c)CH包含氨基酸取代L234A、L235A(LALA突变)以及M252Y、S254T和T256E(YTE突变)以及K222R;以及轻链恒定区(CL)包含序列GGTLQSPP(优选在C端);或

(d)CH包含氨基酸取代L234A、L235A(LALA突变);或

(e)CH包含氨基酸取代L234A、L235A(LALA突变);以及轻链恒定区(CL)包含序列GGTLQSPP(优选在C端)。

[0107] 优选地,本发明的抗体的两个CL区和两个CH区均包含如上文(a)至(e)中概述的修饰。

[0108] 在本发明的分离的抗体的另一实施方案中,至少一个重链恒定区(CH)包含氨基酸

序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVF
LFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 31)或

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD**R**THTCPPCPAPE**AA**GGPSVF
LFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 32)和/或至少一个所述轻链恒定区(CL)包含氨基酸序列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGTLQSPP** (SEQ ID
NO: 33)。

[0109] 在本发明的分离的抗体的又一实施方案中,所述重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)具有以下序列组合中的任一种:

(1)两个CH均包含SEQ ID NO:31的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:12的序列;或
(2)两个CH均包含SEQ ID NO:31的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:33的序列;或
(3)两个CH均包含SEQ ID NO:32的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:33的序列;或
(4)两个CH均包含

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 50)的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:12的序列;或

(5)两个CH均包含SEQ ID NO:50的序列且两个CL均包含SEQ ID NO:33的序列;或
(6)至少一个CH包含SEQ ID NO:31的序列且一个CL包含SEQ ID NO:12的序列;或
(7)至少一个CH包含SEQ ID NO:31的序列且一个CL包含SEQ ID NO:33的序列;或
(8)至少一个CH包含SEQ ID NO:32的序列且一个CL包含SEQ ID NO:33的序列;或
(9)至少一个CH包含SEQ ID NO:50的序列且一个CL包含SEQ ID NO:12的序列;或
10)至少一个CH包含SEQ ID NO:50的序列且一个CL包含SEQ ID NO:33的序列。

[0110] 在本发明的实施方案中,具有上述提及的六个CDR序列的抗体包含含有与氨基酸序列

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS**DGSVSRGGYY**LTWIRQHPGKGLEWIGY**IYYSGST**YF
NPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC**ARGIAVAPFDY**WGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 9)(CDR以粗体字显示)具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有与氨基酸序列

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTS**QSVRSN**LAWYQQKPGQAPRLLIY**AAS**TRATGIPARFS
GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC**QQYTNWPFT**FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 10)

(CDR以粗体字显示)具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0111] 在本发明的实施方案中,具有上述提及的六个CDR序列的抗体包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区(VH)和含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0112] 在本发明的实施方案中,该抗体进一步包含含有与氨基酸序列

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 11)具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链恒定区(CH)和含有与氨基酸序列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12)

具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链恒定区(CL)。

[0113] 在本发明的实施方案中,该抗体包含含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链恒定区(CH)和含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链恒定区(CL)。

[0114] 已知抗体的重链恒定区(CH)可以包含C端赖氨酸(K),而不丧失任何结合功能。因此,在本发明的抗体的本文中所述序列中,重链恒定区(CH)可以任选在C端包含另外的赖氨酸(K)。不具有赖氨酸的重链恒定区(CH)对本文中公开的抗体-药物缀合物是优选的。

[0115] 在更特别的实施方案中,本发明的抗体是分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其包含含有与氨基酸序列

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 13)具有至少85%同一性的氨基酸序列的重链(HC)和含有与氨基酸序列

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSG

SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK

HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 14)具有至少85%同一性的氨基酸序列的轻链(LC)。在本发明的甚至更特别的实施方案中,该抗体包含(i)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链(LC);或(ii)包含氨基酸序列

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN

PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTK

GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPK

PKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 34)的重链(HC)和包含氨基酸序列(SEQ ID NO:36)的轻链(LC);或(iii)包含氨基酸序列

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN

PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTK

GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD**R**THTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPK

PKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 35)的重链(HC)和包含氨基酸序列

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSG

SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK

HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGTLQSPP** (SEQ ID NO: 36)的轻链(LC);或

(iv)包含

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN

PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTK

GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS

VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPK

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC

LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM

HEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 51)的氨基酸序列的重链(HC)和包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链(LC);或(v)包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链

(HC)和包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC)。

[0116] 在本发明的再更特别的实施方案中,该抗体由以下组成:(i)两个相同的包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列轻链(LC);或(ii)两个相同的包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC);或(iii)两个相同的包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC);或(iv)两个相同的包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链(LC);或(v)两个相同的包含SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链(HC)和两个相同的包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链(LC)。在一些实施方案中,本发明的抗体的一个或多个单个氨基酸可在一个或多个上述提及的序列(包括CDR序列)中通过取代,特别是通过保守取代来改变。此类改变可以意在例如去除糖基化位点或脱酰胺位点,例如与该抗体的人源化有关。

[0117] 在一些实施方案中,本发明的抗体是分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其由两个相同的由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的重链(HC)和两个相同的由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的轻链(LC)组成;这种特定的抗体在本文中也被称为“mAb1”。

[0118] 在一些实施方案中,本发明的抗体是分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其由两个相同的由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成的重链(HC)和两个相同的由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的轻链(LC)组成;这种特定的抗体在本文中也被称为“mAb1-M”。

[0119] 在一些实施方案中,本发明的抗体是分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其由两个相同的由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成的重链(HC)和两个相同的由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的轻链(LC)组成;这种特定的抗体在本文中也被称为“mAb2-M”。

[0120] 在一些实施方案中,本发明的抗体是分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其由两个相同的由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的重链(HC)和两个相同的由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的轻链(LC)组成;这种特定的抗体在本文中也被称为“mAb3-M”。

[0121] 在一些实施方案中,本发明的抗体是分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其由两个相同的由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成的重链(HC)和两个相同的由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的轻链(LC)组成;这种特定的抗体在本文中也被称为“mAb6-M”。

[0122] 在一些实施方案中,本发明的抗体是分离的抗体,其结合人CEACAM5蛋白,并且其由两个相同的由SEQ ID NO:51的氨基酸序列组成的重链(HC)和两个相同的由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的轻链(LC)组成;这种特定的抗体在本文中也被称为“mAb7-M”。

[0123] 在一些实施方案中,本发明的抗体结合人和食蟹猕猴CEACAM5的A2-B2结构域。本发明还提供了一种与包含mAb1的重链和轻链可变区(即分别对应于SEQ ID NO:9和10的VH和VL)和来自mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M中的任一种的重链恒定区(CH)和轻链恒定区(CL)的抗体竞争结合人和/或食蟹猕猴CEACAM5蛋白的A2-B2结构域的抗体。

[0124] 候选抗体与包含mAb1的VH和VL的抗体(下文中,在与候选抗体竞争的情况下,称为“参考”抗体)竞争结合人和/或食蟹猕猴CEACAM5蛋白的A2-B2结构域的能力可以例如通过竞争性ELISA容易地测定,在竞争性ELISA中,抗原(即人或食蟹猕猴CEACAM5的A2-B2结构域,或包含包括A2-B2结构域,特别是人或食蟹猕猴CEACAM5的胞外结构域的人或食蟹猕猴CEACAM5的片段或由所述片段组成的多肽)结合到固体支持物上,并且分别添加含有候选抗

体和参考抗体的两种溶液,并使抗体竞争结合抗原。随后可以测量结合抗原的参考抗体的量,并与针对阴性对照(例如不含抗体的溶液)测量时结合抗原的参考抗体的量进行比较。与阴性对照存在的情况下结合的参考抗体的量相比,在候选抗体存在的情况下结合的参考抗体的量减少,指示候选抗体与参考抗体竞争。方便地,可以标记(例如荧光标记)参考抗体以便于检测结合的参考抗体。可以用候选抗体和/或参考抗体的系列稀释物进行重复测量。

[0125] 在一些实施方案中,本发明的抗体不结合人CEACAM1、人CEACAM6、人CEACAM7、人CEACAM8和食蟹猕猴CEACAM6蛋白或不与它们显著地交叉反应。在一些实施方案中,该抗体不结合除CEACAM5以外的前述人和食蟹猕猴CEACAM蛋白的胞外结构域或不与其显著地交叉反应。

[0126] "亲和力"在理论上定义为整个抗体和抗原之间的平衡缔合。其可以通过多种已知方法进行实验评估,诸如用表面等离子体共振测量缔合和解离速率,或在免疫化学测定(ELISA、FACS)中测量EC_{50}(或表观K_D)。在这些测定中,EC_{50}是通过ELISA(酶联免疫吸附测定)针对限定浓度的抗原或通过FACS(荧光激活细胞分选)针对表达该抗原的细胞,在一些特定暴露时间后诱导基线与最大值之间一半的反应的抗体浓度。

[0127] 当对两种抗原的EC_{50}在相似范围内时,结合抗原1(Ag1)的单克隆抗体与抗原2(Ag2)是"交叉反应的"。在本申请中,当结合Ag1的单克隆抗体对Ag2的亲和力在其对Ag1的亲和力的10倍以下(例如5倍)之内时,该结合Ag1的单克隆抗体与Ag2是交叉反应的,对两种抗原的亲和力用相同的方法测量。

[0128] 当对两种抗原的亲和力非常不同时,结合Ag1的单克隆抗体与Ag2是"不显著交叉反应的"。如果结合反应过低,对Ag2的亲和力可能无法测得。在本申请中,在相同的实验设置中和在相同的抗体浓度下,当单克隆抗体对Ag2的结合反应小于相同单克隆抗体对Ag1的结合反应的5%时,结合Ag1的单克隆抗体与Ag2是不显著交叉反应的。实际上,所用抗体浓度可以是EC_{50}或达到用Ag1获得的饱和平台所需的浓度。当单克隆抗体与Ag2不显著地交叉反应时,该单克隆抗体"特异性结合"Ag1(或对Ag1"具有特异性")。

[0129] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体对食蟹猕猴CEACAM5具有亲和力,所述亲和力在其对人CEACAM5的亲和力的10倍以下(例如5倍)之内。由此,根据本发明的抗体可用于在猴中进行的毒理学研究,因为在猴中观察到的毒性概况将与预期在人中的潜在不良反应相关。

[0130] 在一些实施方案中,本发明的抗体具有对人CEACAM5和/或食蟹猕猴CEACAM5的亲和力,其为≤10nM;例如,本发明的抗体可以具有对人CEACAM5的亲和力,其为1至10nM,诸如对人CEACAM5的亲和力为约6nM。

[0131] 对人CEACAM5或对食蟹猕猴CEACAM5的亲和力可以例如作为使用可溶性重组CEACAM5作为捕获抗原的ELISA中的EC_{50}值来测定。

[0132] 备选地,对于本发明的抗体,可以通过FACS分析,例如在肿瘤细胞系MKN45(DSMZ,ACC 409)上测定表观解离常数(表观K_D)。

[0133] 此外,根据本发明的抗体已显示能够通过免疫组织化学,例如在冷冻和福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)的组织切片中检测CEACAM5表达。

[0134] 上文和下文中描述的实施方案的任意组合构成本发明的部分。

[0135] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体是常规抗体,诸如常规单克隆抗体、或抗体

片段、双特异性或多特异性抗体。

[0136] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体包含IgG或其片段,或由IgG或其片段组成。

[0137] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以是例如鼠抗体、嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。用于抗体序列的人源化的许多方法是本领域已知的;参见例如Almagro&Fransson(2008)Front Biosci.13:1619-1633的综述。一种常用的方法是CDR移植或抗体改型,其包括将供体抗体(通常是小鼠抗体)的CDR序列移植到不同特异性的人抗体的框架支架(framework scaffold)中。由于CDR移植可降低CDR移植的非人抗体的结合特异性和亲和力,并由此降低其生物学活性,可以在CDR移植抗体的所选位置处引入回复突变,以保持亲本抗体的结合特异性和亲和力。可以使用文献和抗体数据库中可得的信息进行可能的回复突变的位置的鉴定。作为回复突变候选物的氨基酸残基通常是位于抗体分子表面的那些,而被埋藏或具有低表面暴露程度的残基通常不会被改变。CDR移植和回复突变的替代人源化技术是表面重建,其中保留非人来源的非表面暴露残基,而表面残基被改变为人残基。另一种替代技术称为“定向选择(guided selection)”(Jespers等人(1994)Biotechnology 12,899),并且可用于从鼠抗体获得保留亲本抗体的表位和结合特性的完整的人抗体。

[0138] 对于嵌合抗体,人源化通常涉及可变区序列的框架区的修饰。

[0139] 作为CDR的一部分的氨基酸残基通常不因人源化而改变,尽管在某些情况下可能合意的是改变单个CDR氨基酸残基,例如以去除糖基化位点、脱酰胺位点或不期望的半胱氨酸残基。N-连接的糖基化通过将寡糖链附接至三肽序列Asn-X-Ser或Asn-X-Thr中的天冬酰胺残基来发生,其中X可以是除Pro外的任何氨基酸。N-糖基化位点的去除可以通过使Asn或Ser/Thr残基突变为不同的残基来实现,例如通过保守取代。天冬酰胺和谷氨酰胺残基的脱酰胺可取决于诸如pH和表面暴露之类的因素而发生。天冬酰胺残基特别容易脱酰胺,主要是当以序列Asn-Gly存在时,而以其它二肽序列诸如Asn-Ala存在时的脱酰胺程度较低。当在CDR序列中存在此类脱酰胺位点,例如Asn-Gly时,可因此合意的是去除该位点,通常通过保守取代以去除相关残基中的一个。本发明也意在包括去除相关残基中的一个的在CDR序列中的取代。

[0140] 在人源化抗体或其片段中,重链和轻链的可变结构域可包含人受体构架区。当存在时,人源化抗体可进一步包含人恒定重链和轻链结构域。

[0141] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体可以是选自Fv、Fab、F(ab')2、Fab'、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2和双抗体的抗体片段(例如人源化抗体片段)。

[0142] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体可以是由抗体片段形成的双特异性或多特异性抗体,至少一个抗体片段是根据本发明的抗体的片段。多特异性抗体是多价蛋白复合物,如例如在EP 2 050 764 A1或US2005/0003403 A1中描述的。

[0143] 根据本发明的双特异性或多特异性抗体可以对(a)人和食蟹猕猴CEACAM5蛋白和(b)至少一种其它抗原具有特异性。在一些实施方案中,至少一种其它抗原不是人或食蟹猕猴CEACAM家族成员。在另一些实施方案中,至少一种其它抗原可以是人或食蟹猕猴CEACAM5上除mAb1靶向的表位之外的表位。

[0144] 本发明的抗体可以通过本领域已知的任何技术来产生。根据本发明的抗体可以例如以分离的(例如纯化的)形式使用或包含在载体中,所述载体诸如膜或脂囊泡(例如脂质体)。

本发明的核酸和宿主细胞

[0145] 本发明的另一方面涉及分离的核酸,其包含编码如上定义的本发明的抗体的核酸序列或由所述核酸序列组成。

[0146] 通常,所述核酸是DNA或RNA分子,其可以包含在任何合适的载体中,所述载体诸如质粒、粘粒、游离体、人工染色体、噬菌体或病毒载体。

[0147] 术语“载体”、“克隆载体”和“表达载体”是指载体,通过该载体可以将DNA或RNA序列(例如外源基因)引入宿主细胞,以便转化宿主并促进所引入序列的表达(例如转录和翻译)。

[0148] 因此,本发明的另一方面涉及包含如上定义的本发明的核酸的载体。

[0149] 此类载体可包含调控元件,诸如启动子、增强子、终止子等,以在施用于受试者后引起或引导所述多肽的表达。用于动物细胞的表达载体中使用的启动子和增强子的实例包括SV40的早期启动子和增强子(Mizukami T等人,1987)、莫洛尼氏小鼠白血病病毒的LTR启动子和增强子(Mizukami T等人,1987)、免疫球蛋白H链的启动子(Mason JO等人,1985)和增强子(Gillies SD等人,1983)等。

[0150] 可以使用任何用于动物细胞的表达载体,只要可以插入并表达编码人抗体C区的基因即可。合适的载体的实例包括pAGE107(Miyaji H等人,1990)、pAGE103(Mizukami T等人,1987)、pHSG274(Brady G等人,1984)、pKCR(O'Hare K等人,1981)、pSG1βd2-4-(Miyaji H等人,1990)等。

[0151] 质粒的其它实例包括包含复制起点的复制质粒,或整合质粒,诸如pUC、pcDNA、pBR等。

[0152] 病毒载体的其它实例包括腺病毒、逆转录病毒、疱疹病毒和AAV载体。此类重组病毒可通过本领域已知的技术,诸如通过转染包装细胞或通过用辅助质粒或病毒的瞬时转染来产生。病毒包装细胞的典型实例包括PA317细胞、PsiCRIP细胞、GPenv+细胞、293细胞等。用于产生此类复制缺陷型重组病毒的详细方案例如可见于WO 95/14785、WO 96/22378、US 5,882,877、US 6,013,516、US 4,861,719、US 5,278,056和WO 94/19478。

[0153] 本发明的另一目的涉及已用根据本发明的核酸和/或载体转染、感染或转化的宿主细胞。

[0154] 术语“转化”是指将“外源”(即外来的)基因、DNA或RNA序列引入宿主细胞,使得宿主细胞将表达引入的基因或序列以产生所需物质,通常是由引入的基因或序列编码的蛋白或酶。接受并表达引入的DNA或RNA的宿主细胞被“转化”。

[0155] 本发明的核酸可用于在合适的表达系统中产生本发明的抗体。术语“表达系统”是指在合适的条件下(例如适于由载体携带并引入宿主细胞的外源DNA编码的蛋白的表达)的宿主细胞和相容载体。

[0156] 常见的表达系统包括大肠杆菌(E.coli)宿主细胞和质粒载体、昆虫宿主细胞和杆状病毒载体,以及哺乳动物宿主细胞和载体。宿主细胞的其它实例包括但不限于原核细胞(诸如细菌)和真核细胞(诸如酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等)。具体实例包括大肠杆菌、克鲁维酵母或酿酒酵母、哺乳动物细胞系(例如Vero细胞、CHO细胞、3T3细胞、COS细胞等)以及原代或已建立的哺乳动物细胞培养物(例如由成淋巴细胞、成纤维细胞、胚胎细胞、上皮细胞、神经细胞、脂肪细胞等产生)。实例还包括小鼠SP2/0-Ag14细胞

(ATCC CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653细胞(ATCC CRL1580)、其中二氢叶酸还原酶基因(下文称为“DHFR基因”)为缺陷型的CHO细胞(Urlaub G等人;1980)、大鼠YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20细胞(ATCC CRL1662,下文称为“YB2/0细胞”)等。在一些实施方案中,使用YB2/0细胞,因为当在该细胞中表达时,嵌合或人源化抗体的ADCC活性增强。

[0157] 为了表达人源化抗体,表达载体可以是其中编码抗体重链的基因和编码抗体轻链的基因存在于分开的载体上的类型,或者其中两种基因存在于同一载体上的类型(串联型)。就构建人源化抗体表达载体的容易性、引入动物细胞的容易性、动物细胞中抗体H和L链的表达水平之间的平衡而言,人源化抗体表达载体为串联型(Shitara K等人,J Immunol Methods.1994Jan.3;167(1-2):271-8)。串联型人源化抗体表达载体的实例包括pKANTEX93(WO 97/10354)、pEE18等。

[0158] 本发明还涉及产生表达根据本发明的抗体的重组宿主细胞的方法,所述方法包括由以下组成的步骤:(i)将如上所述的重组核酸或载体体外或离体引入感受态宿主细胞,(ii)体外或离体培养获得的重组宿主细胞,和(iii)任选地,选择表达和/或分泌所述抗体的细胞。

[0159] 此类重组宿主细胞可用于产生本发明的抗体。

产生本发明的抗体的方法

[0160] 本发明的抗体可以通过本领域已知的任何技术产生,诸如但不限于任何单独或组合的化学、生物学、遗传学或酶技术。

[0161] 知晓所需抗体的氨基酸序列,本领域技术人员可以使用用于生产多肽的标准技术容易地生产所述抗体或免疫球蛋白链。例如,它们可以使用公知的固相方法,使用市售可得的肽合成设备(诸如由AApplied Biosystems,Foster City,California制造)并按照制造商的说明书来合成。备选地,如本领域公知的那样,本发明的抗体和免疫球蛋白链可通过重组DNA技术产生。例如,在将编码所需多肽的DNA序列掺入到表达载体中并将此类载体引入将表达所需多肽的合适的真核或原核宿主后,可以获得作为DNA表达产物的这些多肽(例如抗体),随后可以使用公知的技术从中分离它们。

[0162] 例如,本发明提供了以下编码抗体mAb1的DNA序列:

mAb1重链核苷酸序列

其中mVk信号肽为下划线,

起始和终止密码子为斜体,

VH区序列为粗体,且

CDR用双下划线表示:

*ATG*GAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGGTCGACCGGT**GAGGTG**
CAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCACAGACCCTGTCCCTCACCTGCACT
GTCTCTGATGGCTCCGTCAGCAGGGGTGGTTACTACTTGACCTGGATCCGCCAGCACCCAGGG
AAGGGCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTTCAACCCGTCCCTCA
GGAGTCGGGTTACCATGTCAGTAGACACGTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG
TGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGATAGCAGTGGCTCCCTTTGACT
ACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCC
CTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAGCGGAGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC
TTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCG
CCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCAAGCAGCAGCCTGG
GAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGG
AGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCATACCTGTCCACCCTGCCCAGCCCCCCCAGTGGCCGGACCCTC
CGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAATTGGTATGTGGACGGCGTGGAG
GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTG
CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCC
CTGCCCTCCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC
ACACTGCCCCCATCTCGGGAAGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCT
TTTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCA
CCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAG
GTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACACA
GAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCTGA

(SEQ ID NO:15)

mAb1轻链核苷酸序列

其中uPA信号肽为下划线,

起始和终止密码子为斜体,

VL区序列为粗体,且

CDR用双下划线表示:

*ATG*AGGGCCCTGCTGGCTAGACTGCTGCTGTGCGTGCTGGTCGTGTCCGACAGCAAGGG
CGAAATCGTACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGA
GCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAGAGTGTTCGCAGCAACTTAGCCTGGTACC
AGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTGCATCCACCAGGGC
CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTC
ACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATACT
AACTGGCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGACATCAAACGTACGGTGGC
TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC
TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTGT*TGATAG*

(SEQ ID NO: 16)

本发明还提供了以下编码抗体mAb1-M、mAb2-M和mAb3-M、mAb6-M、mAb7-M的DNA序列：

SEQ ID NO 37:HC mAb1-M&mAb2-M(HC-LALA-YTE)(核苷酸)

信号肽为下划线，

起始和终止密码子为斜体，

VH区序列为粗体,且

CDR用双下划线表示：

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCCGAG
GTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGACTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTC
TGACCTGCACCGTGTCTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTACCTGACCTG
GATCAGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACTACTCCG

GCTCCACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACAC
CTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCC
GTGTACTACTGC**GCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTAT**TGGGGCCAGG
GCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGC
TCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCAC
ACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGT
GCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCA
ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC
CTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGC
CTAAGGACACCCTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
TCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGT
GCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTA
GGGAACCCCAGGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGT
GTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGA
GCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGG
CTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACG
TGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGTCTG
TCCCTGTCTCCTGGC*TGATGA*

SEQ ID NO 38:HC mAb3-M(HC-K222R-LALA-YTE)(核苷酸)

信号肽为下划线,

起始和终止密码子为斜体,

VH区序列为粗体,且

CDR用双下划线表示:

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCC**GAG**
GTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGACTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTC
TGACCTGCACCGTGTCTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTAC**CTGACCTG**
GATCAGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACTACTCCG
GCTCCACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACAC
CTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTAT**TGGGGCCAGG**

GCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGC
TCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCAC
ACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGT
GCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCA
ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAGAACCCACACCTGTC
CTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGC
CTAAGGACACCCTGTACATCACCCGCGAGCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
TCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGT
GCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTA
GGGAACCCCAGGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGT
GTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGA
GCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGACTCCGACGG
CTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACG
TGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGTCTG
TCCCTGTCTCCTGGC*TGATGA*

SEQ ID NO 39:LC mAb2-M、mAb3-M和mAb7-M(LC-标签)(核苷酸)
信号肽为下划线,
起始和终止密码子为斜体,
VL区序列为粗体,且
CDR用双下划线表示:

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCAGCCTGTCC**GA**
GATCGTGCTGACTCAATCTCCCGCCACACTGTCTGTGTCTCCCGGCGAAAGAGCT
ACCCTGTCTTGCCGGACATCTCAGTCCGTGCGGTCTAACCTGGCCTGGTATCAGCA
GAAGCCTGGACAGGCTCCTCGGCTGCTGATCTACGCTGCTTCTACCAGAGCCACA
GGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCACCGAGTTTACCCTGACCAT
CTCCAGCCTGCAGTCCGAGGATTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTATACCAACT
GGCCCTTCACCTTCGGACCCGGCACAAAGGTGGACATCAAGAGAACCGTGGCCGCT
CCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGT
CGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGAT
AACGCCCTGCAGAGCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACA
AGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTC
AACAGAGGCGAGTGCGGCGGCACCTTGCAGTCTCCACCT*TGATAA*

SEQ ID NO 52:HC mAb6-M&HC mAb7-M(核苷酸)

信号肽为下划线，
起始和终止密码子为斜体，
VL区序列为粗体，且
CDR用双下划线表示：

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCC**GAG**
GTCCAGCTGCAAGAATCTGGCCCTGGACTGGTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTC
TGACCTGCACCGTGTCTGACGGCTCTGTTTCTAGAGGCGGCTACTACCTGACCTG
GATCAGACAGCATCCTGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCTACTACTCCG
GCTCCACCTACTTCAACCCCAGCCTGAGATCCAGAGTGACCATGTCCGTGGACAC
CTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTCCGTGACCGCTGCTGATACCGCC
GTGTACTACTGCGCCAGAGGAATCGCCGTGGCTCCCTTTGATTATTGGGGCCAGG
GCACCCTGGTCACCGTGTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGC
TCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCAC
ACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACCGT
GCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCA
ACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC
CTCCATGTCCTGCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGC
CTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTG
TCTCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA
ACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGT
GCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC
AACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTA
GGGAACCCCAGGTTTACACCCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGT
GTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCTGTGGAATGGGAGA
GCAATGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGG
CTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACG
TGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGAGTCTG
TCCCTGTCTCCTGGC*TGATGA*

SEQ ID NO 53:LC mAb1-M&LC mAb6-M(核苷酸)
信号肽为下划线，
起始和终止密码子为斜体，
VL区序列为粗体，且
CDR用双下划线表示：

*ATG*GAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCCGGGTCGACCGG
TGAAATCGTACTCACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGA
GCCACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAGAGTGTTCGCAGCAACTTAGCCTGGTACC
AGCAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGCTGCATCCACCAGGGC
CACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTC
ACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATACT
AACTGGCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGACATCAAACGTACGGTGGC
AGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTC
TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG
ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGA
CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTGT*TGATAG*

CD20同型对照

SEQ ID NO 40:HC mAb5-M(抗CD20-HC)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTS
YNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVT
VSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 41:LC mAb5-M(抗CD20-LC)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSG
SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**GGTLQSPP**

SEQ ID NO 42:HC mAb5-M(抗CD20-HC)(核苷酸)

信号肽为下划线

起始和终止密码子为斜体

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCAGCCTGTCTCAG
GTCCAGTTGCAACAACCTGGCGCCGAGCTTGTGAAGCCTGGCGCTTCTGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGACCC
CTGGCAGAGGCCTGGAATGGATCGGCGCTATCTATCCTGGCAACGGCGACACCTCCTAC
AACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCTACCCTGACCGCCGACAAGTCCTCTTCCACCGCTT
ACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTCTGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTCT
ACCTATTATGGCGGCGACTGGTACTTCAACGTGTGGGGCGCTGGCACCACCGTGACAGT
TTCTGCCGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTAC
CTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGA
CCGTGTCCTGGAACTCTGGCGCTCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTG
CAGTCCTCCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCTGTCGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGA
ACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGA
GAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA
AGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGAT
CTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCAGAA
GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTA
GAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCT
CCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAGGTTTACAC
CCTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTG
AAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAA
CAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCA
AGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT
GCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAG*T*
GATGA

SEQ ID NO 43:LC mAb5-M(抗CD20-LC)(核苷酸)

信号肽为下划线

起始和终止密码子为斜体

*ATG*AAGCTGCCTGTCAGACTGCTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCGCCTCTCTGTCCCAG
ATCGTGCTGTCTCAGTCTCCCGCCATCCTGAGTGCTAGCCCTGGCGAGAAAGTGACAAT
GACCTGCAGAGCCTCCTCCTCCGTGTCCTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCTGGCA
GCTCCCCTAAGCCTTGGATCTACGCCACCTCCAATCTGGCCTCTGGCGTGCCAGTCAGAT
TCTCCGGATCTGGCTCCGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCTAGAGTGGAAGCCGAG
GATGCCGCCACCTACTACTGTCAGCAGTGGACCAGCAATCCTCCTACCTTTGGCGGAGG
CACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTT
CCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTAC
CCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCTCTGCAGTCCGGCAACTCCC
AAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTCTCTGAGCAGCACCCT
GACACTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCAT
CAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACAGAGGCGAGTGTGGCGGCACCC
TGCAGTCTCCACCT*TGATAA*

SEQ ID NO 64:利妥昔单抗HC

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTS
YNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVT
VSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO 65:利妥昔单抗LC

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSG
SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

本发明进一步涉及产生本发明的抗体的方法,该方法包括由以下组成的步骤:(i)培养根据本发明的转化的宿主细胞;(ii)表达抗体;和(iii)回收表达的抗体。

[0163] 本发明的抗体可以通过常规免疫球蛋白纯化方法(诸如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法)从培养基中适当地分离。

[0164] 在一些实施方案中,本发明的人源化嵌合抗体可以通过以下产生:如前所述获得编码人源化VL和VH区的核酸序列,通过将它们插入到具有编码人抗体CH和人抗体CL的基因的用于动物细胞的表达载体中来构建人嵌合抗体表达载体,并通过将表达载体引入动物细胞来表达编码序列。

[0165] 作为人嵌合抗体的CH结构域,可以使用属于人免疫球蛋白重链的任何区域,例如IgG类的那些是合适的,并且可以使用属于IgG类的任一亚类,诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。同样,作为人嵌合抗体的CL,可以使用属于人免疫球蛋白轻链的任何区域,并且可以使用κ类或λ类的那些。

[0166] 用于产生人源化或嵌合抗体的方法可包括本领域公知的常规重组DNA和基因转染技术(参见例如Morrison SL等人,(1984)和专利文献US5,202,238;和US5,204,244)。

[0167] 基于常规重组DNA和基因转染技术的用于产生人源化抗体的方法是本领域中公知的(参见例如Riechmann L等人,1988;Neuberger MS等人,1985)。可以使用本领域中已知的多种技术将抗体人源化,所述技术包括例如申请WO2009/032661中公开的技术、CDR移植(EP 239,400;PCT公开WO91/09967;美国专利号5,225,539;5,530,101;和5,585,089)、镶面(veneering)或表面重建(EP 592,106;EP 519,596;Padlan EA(1991);Studnicka GM等人(1994);Roguska MA等人(1994))和链改组(美国专利号5,565,332)。用于制备此类抗体的一般重组DNA技术也是已知的(参见欧洲专利申请EP 125023和国际专利申请WO 96/02576)。

[0168] 本发明的Fab可通过用蛋白酶诸如木瓜蛋白酶处理本发明的抗体(例如IgG)来获得。此外,Fab可以通过将编码抗体的Fab的两条链的DNA序列插入用于原核表达或用于真核表达的载体中,并将该载体引入原核或真核细胞(视情况而定)以表达Fab来产生。

[0169] 本发明的F(ab')2可通过用蛋白酶——胃蛋白酶处理本发明的抗体(例如IgG)来获得。此外,F(ab')2可以通过经由硫醚键或二硫键结合下述Fab'来产生。

[0170] 本发明的Fab'可通过用还原剂诸如二硫苏糖醇处理本发明的F(ab')2来获得。此外,Fab'可通过将编码抗体的Fab'链的DNA序列插入用于原核表达的载体或用于真核表达的载体中,并将该载体引入原核或真核细胞(视情况而定)以进行其表达来产生。

[0171] 本发明的scFv可通过以下来产生:取本发明抗体的如前所述的CDR或VH和VL结构域的序列,随后构建编码scFv片段的DNA,将该DNA插入原核或真核表达载体,并随后将该表达载体引入原核或真核细胞(视情况而定)以表达scFv。为了产生人源化scFv片段,可以使用称为CDR移植的公知技术,其包括选择根据本发明的互补决定区(CDR),并将它们移植到具有已知三维结构的人scFv片段框架上(参见例如WO98/45322;WO87/02671;US5,859,205;US5,585,089;US4,816,567;EP0173494)。

本发明的抗体的修饰

[0172] 设想了本文中描述的抗体的氨基酸序列修饰。例如,可合意的是改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学性质。

[0173] 可以对本发明的抗体的结构和编码它们的DNA序列进行修饰和改变,并仍然产生具有所需特性的功能性抗体或多肽。

[0174] 在多肽的氨基序列中进行改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数(hydropathic index)。氨基酸亲水指数对于蛋白的相互作用生物功能的重要性是本领域中通常理解的。公认的是,氨基酸的相对亲水性特征有助于所得蛋白的二级结构,这转而限定了该蛋白与其它分子,例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。根据其疏水性和电荷特性,给每个氨基酸分配了亲水指数,其为:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0175] 本发明的另一方面还包括本发明的多肽的功能保守性变体。

[0176] 例如,蛋白结构中的某些氨基酸可以被其它氨基酸取代而没有明显的活性损失。由于蛋白的相互作用能力和性质限定了其生物学功能活性,因此可以在蛋白序列中,并且当然也可以在其编码DNA序列中进行某些氨基酸取代,同时仍然获得具有类似性质的蛋白。由此可以设想的是,可以对本发明的抗体序列或编码所述多肽的相应DNA序列进行各种改变,而不会明显损失它们的生物学活性。

[0177] 本领域已知的是,某些氨基酸可以被具有类似亲水指数或评分的其它氨基酸取代,并仍产生具有类似生物学活性的蛋白,即仍获得生物学功能等同的蛋白。还可以使用已确立的技术,诸如丙氨酸扫描方法,来鉴定本发明的抗体或多肽中所有可以被取代而不显著丧失与抗原的结合的氨基酸。此类残基可以被认为是中性的,因为它们不参与抗原结合或维持抗体的结构。这些中性位置中的一个或多个可以被丙氨酸或另一氨基酸取代,而不会改变本发明的抗体或多肽的主要特性。

[0178] 中性位置可以看作是可以并入任何氨基酸取代的位置。实际上,在丙氨酸扫描的原理中,选择丙氨酸,因为这种残基不携带特定的结构或化学特征。通常认为如果丙氨酸可以取代特定的氨基酸而不改变蛋白的性质,则许多其它的氨基酸取代(即使不是全部)也可能是中性的。在丙氨酸是野生型氨基酸的相反情况下,如果特定的取代可显示为中性,则其它取代也可能是中性的。

[0179] 如上所述,氨基酸取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如它们的疏水性、亲水性、电荷、尺寸等。考虑任何前述特性的示例性取代是本领域技术人员公知的并包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0180] 可同样合意的是在效应功能方面修饰本发明的抗体,例如以增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),或者例如以改变与Fc受体的结合。这可以通过在抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸取代来实现。备选地或此外,可在Fc区中引入半胱氨酸残基,由此使得能够在该区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可具有改善的内化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)(Caron PC等人,1992;和Shopes B.1992)。在一些实施方案中,本发明的抗体可以是具有修饰的氨基酸序列的抗体,所述修饰的氨基酸序列导致减少或消除了与大多数Fcγ受体的结合,这可以减少在表达此类受体的正常细胞和组织(例如巨噬细胞、肝窦细胞等)中的摄取和毒性。此类抗体的一个实例是包括在位置234和235处将两个亮氨酸(L)残基取代为丙氨酸(A)(即LALA)的抗体;这种双取代已被证明降低Fc与FcγR的结合,并因此降低ADCC以及降低补体结合/激活。此类抗体的另一实例是除LALA双取代外还包括取代P329G(即PG-LALA;参见例如Schlothauer等人,Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions,Protein Engineering,Design and Selection,第29卷,第10期,2016年10月,第457-466页)的抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体由此可以是具有氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列:(i)含有例如LALA或PG-LALA取代组,和(ii)在其它方面与上文参照相应SEQ ID NO描述的本发明抗体之一的氨基酸序列相同。

[0181] 本发明的抗体的另一种类型的氨基酸修饰可用于改变抗体的原始糖基化模式,即通过删除抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加抗体中不存在的一个或多

个糖基化位点。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)中任一种的存在产生了潜在的糖基化位点。通过改变氨基酸序列,使其含有一个或多个上述三肽序列(对于N-连接的糖基化位点),可以方便地实现向抗体添加或删除糖基化位点。

[0182] 另一种类型的修饰包括在计算机上或经实验去除鉴定为可能导致降解产物或抗体制备的异质性的序列。作为实例,天冬酰胺和谷氨酰胺残基的脱酰胺可取决于诸如pH和表面暴露之类的因素而发生。天冬酰胺残基特别容易脱酰胺,主要是当以序列Asn-Gly存在时,而以其它二肽序列诸如Asn-Ala存在时的脱酰胺程度较低。当抗体或多肽中存在此类脱酰胺位点,特别是Asn-Gly时,可因此考虑去除该位点,通常通过保守取代去除相关残基之一。本发明也意在包括去除相关残基中的一个或多个的在序列中的此类取代。

[0183] 另一类型的共价修饰包括将糖苷化学或酶促偶联至抗体。这些方法的优点在于它们不需要在具有N-或O-连接糖基化的糖基化能力的宿主细胞中生产抗体。取决于所用的偶联方式,糖可以附接至(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基,(c)游离巯基诸如半胱氨酸的那些,(d)游离羟基诸如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的那些,(e)芳族残基诸如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些,或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。例如,在WO87/05330中描述了此类方法。

[0184] 可以化学或酶促地实现抗体上存在的碳水化合物部分的去除。化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种处理导致除连接糖(N-乙酰葡糖胺或N-乙酰半乳糖胺)外的大部分或全部糖的切割,而保留抗体完整。Sojahr H等人(1987)和Edge,AS等人(1981)描述了化学去糖基化。抗体上碳水化合物部分的酶促切割可以如Thotakura,NR.等人(1987)所述那样通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现。

[0185] 抗体的另一类型的共价修饰包括将抗体连接到多种非蛋白聚合物(例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)中的一种上,例如以美国专利号4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337中阐述的方式。

[0186] 本领域已知的其它氨基酸序列修饰也可应用于本发明的抗体。

本发明的免疫缀合物

[0187] 本发明提供免疫缀合物,其在本文中也称为抗体-药物缀合物,或更简单地称为缀合物。如本文中所用,所有这些术语具有相同的含义,并且是可互换的。适于制备免疫缀合物的方法是本领域中已知的。本发明的免疫缀合物可通过体外方法(例如如本文中所述)来制备。

[0188] 本发明提供了一种免疫缀合物,其包含经由接头共价连接至至少一种生长抑制剂的本发明的抗体(诸如mAb1,或具有与mAb1相同的六个CDR的抗体)。

[0189] 术语“生长抑制剂”(也称为“抗增殖剂”)是指在体外和/或体内抑制细胞(诸如肿瘤细胞)生长的分子或化合物或组合物。

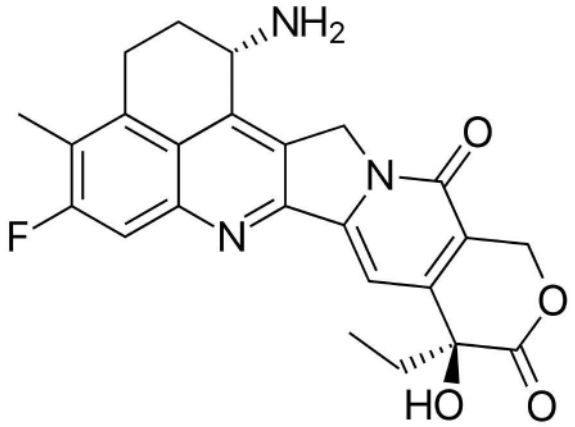
[0190] 在一些实施方案中,生长抑制剂是细胞毒性药物(也称为细胞毒性剂)。在一些实施方案中,生长抑制剂是放射性部分。

[0191] 如本文中所用的术语“细胞毒性药物”是指直接或间接抑制或阻碍细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。术语“细胞毒性药物”包括例如化疗剂、酶、抗生素、毒素诸如小分子毒素或酶活性毒素、类毒素、长春花类(vincas)、紫杉烷类、美登木素生物碱或美登木素生物碱类似物、托马霉素或吡咯并苯并二氮杂䓬衍生物、念珠藻素衍生物、来普霉素衍生

物、澳瑞他汀或海兔毒素类似物、前药、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、DNA烷化剂、抗微管蛋白剂、CC-1065和CC-1065类似物。

[0192] 拓扑异构酶I抑制剂是抑制人酶拓扑异构酶I的分子或化合物,所述拓扑异构酶I通过催化DNA单链的瞬时断裂和再连接而参与改变DNA的拓扑结构。拓扑异构酶I抑制剂对例如哺乳动物的分裂细胞具有高度毒性。合适的拓扑异构酶I抑制剂的实例包括喜树碱(CPT)及其类似物,诸如拓扑替康、伊立替康、silatecan、cositecan、依沙替康、勒托替康、吉马替康、贝洛替康和卢比替康。

[0193] 在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含细胞毒性药物依沙替康作为生长抑制剂。依沙替康具有化学名称(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氢-9-羟基-4-甲基-10H,13H-苯并(脱)吡喃并(3',4':6,7)吲哚嗪并(1,2-b)喹啉-10,13-二酮。依沙替康由以下结构式(I)来表示:



(I)

在本发明的另一些实施方案中,可以使用其它CPT类似物和其它细胞毒性药物,例如如上文所列举。在通过引用并入的申请WO2008/010101中进一步给出了一些细胞毒性药物和缀合方法的实例。

[0194] 术语"放射性部分"是指包含适于治疗癌症的放射性同位素或由其组成的化学实体(诸如分子、化合物或组合物),所述放射性同位素诸如At^{211}、Bi^{212}、Er^{169}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、In^{111}、P^{32}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Sr^{89}、或Lu的放射性同位素。此类放射性同位素通常主要发射β-辐射。在一些实施方案中,放射性同位素是α放射性同位素,例如发射α辐射的钍227。免疫缀合物可以例如如申请WO2004/091668中所述来制备。

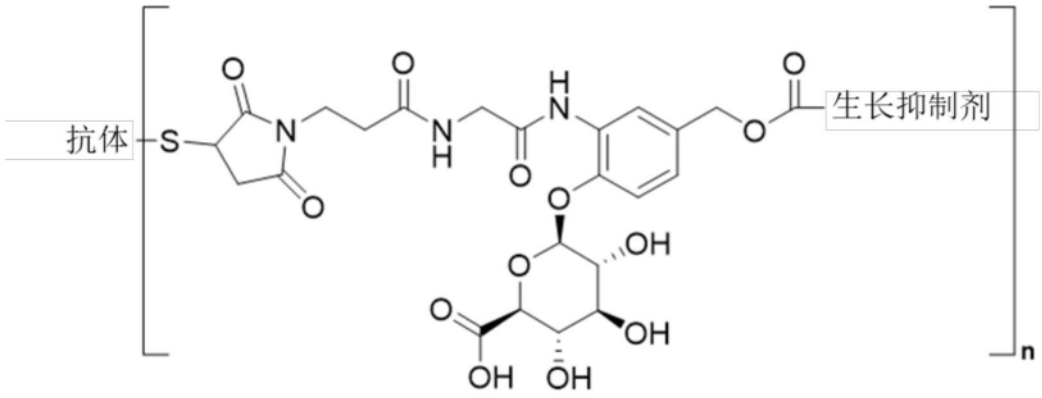
[0195] 在本发明的免疫缀合物中,本发明的抗体经由接头共价连接至至少一种生长抑制剂。如本文中使用的"接头"是指包含将生长抑制剂共价附接到抗体上的共价键和/或任何原子链的化学部分。接头是本领域中公知的,并且包括例如二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。本发明的抗体与细胞毒性药物或其它生长抑制剂的缀合可以例如使用多种双功能蛋白偶联剂进行,所述双功能蛋白偶联剂包括但不限于N-琥珀酰亚胺基吡啶基二硫代丁酸酯(SPDB)、丁酸4-[(5-硝基-2-吡啶基)二硫代]-2,5-二氧代-1-吡咯烷基酯(硝基-SPDB)、4-(吡啶-2-基二硫烷基)-2-磺基-丁酸(磺基-SPDB)、N-琥珀酰亚胺基(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物

(诸如己二酰亚胺酸二甲酯HCl)、活性酯(诸如二琥珀酰亚胺辛二酸酯)、醛类(诸如戊二醛)、双-叠氮化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)-己二胺)、双-重氮鎓衍生物(诸如双-(对重氮鎓苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta等人(1987)中所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳标记的1-异硫氰基苄基甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂(WO 94/11026)。

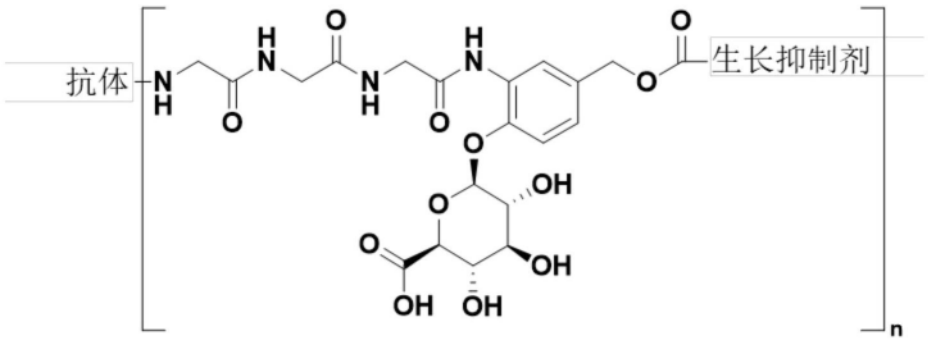
[0196] 在本发明的实施方案中,接头可以是"可裂解接头",其可以促进细胞毒性药物或其它生长抑制剂在细胞(例如肿瘤细胞)内部或附近的释放。在一些实施方案中,接头是在哺乳动物细胞的核内体中可裂解的接头。例如,可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、酯酶不稳定接头、光不稳定接头或含二硫化物的接头(参见例如美国专利号5,208,020)。

[0197] 当提及代表免疫缀合物的结构式时,本文还使用以下命名法:生长抑制剂和接头一起也被称为[(接头)-(生长抑制剂)]部分;例如,依沙替康分子和接头一起也被称为[(接头)-(依沙替康)]部分。

[0198] 在本发明的一些特别的实施方案中,接头是可通过人酶葡萄糖醛酸酶裂解的接头。例如,本发明的免疫缀合物可由此具有下式(II)或式(IIA),其包括可通过葡萄糖醛酸酶裂解的接头:



(II),



(IIA),

其中抗体是本发明的抗体,其中S是抗体的硫原子,并且其中n是共价连接至抗体的[(接头)-(生长抑制剂)]部分的数量。数字n可以为例如1至10;在包含上式(II)的更特别的实施方案中,n为7至8;在使用上式(II)的甚至更特别的实施方案中,n为7.5至8.0(即约8)。在使用上式IIA的实施方案中,n优选为3至4且最优选为3.5至4.0(即约4)。在一些实施

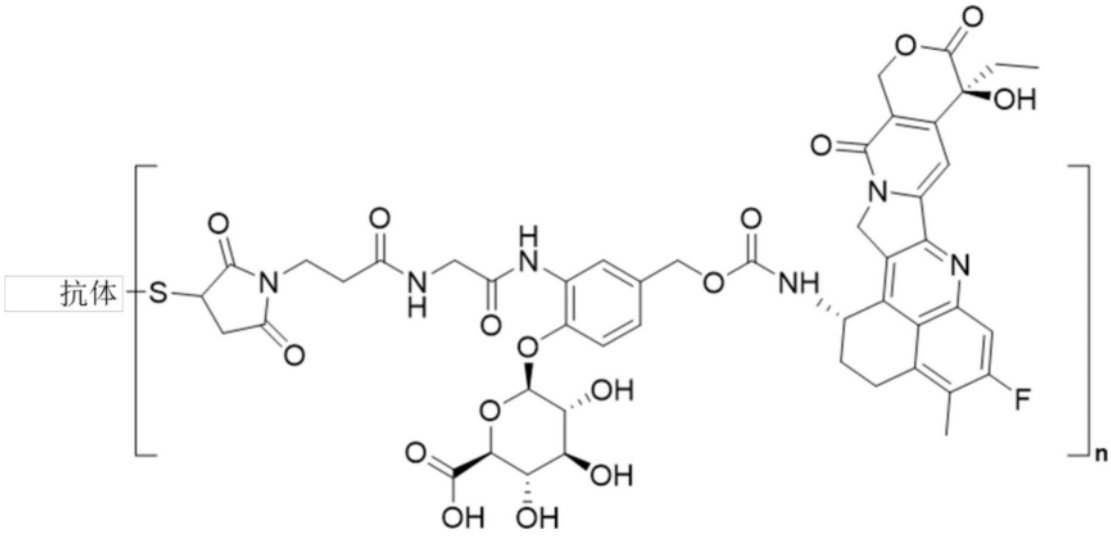
方案中,S是抗体的半胱氨酸的硫原子。在一些实施方案中,抗体是mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M。

[0199] 数字n也被称为“药物/抗体比”(或“DAR”);该数字n始终应理解为任何给定免疫缀合物(的制剂)的平均数。

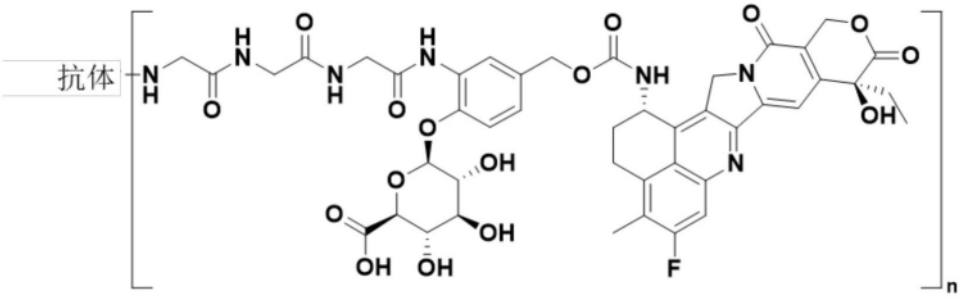
[0200] 在上式(II)中,抗体的硫原子与生长抑制剂之间的化学结构是接头。这些接头之一也包含在下文进一步描绘的式(IV)至(VIIIA)的每一个中。

[0201] 在具有可通过葡萄糖醛酸酶裂解的接头的实施方案的任一个中,如上所述,生长抑制剂例如可以是依沙替康。

[0202] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含经由接头共价连接至依沙替康的根据本发明的抗体的免疫缀合物,其中该缀合物具有下式(IV)或式(IVA):



(IV),



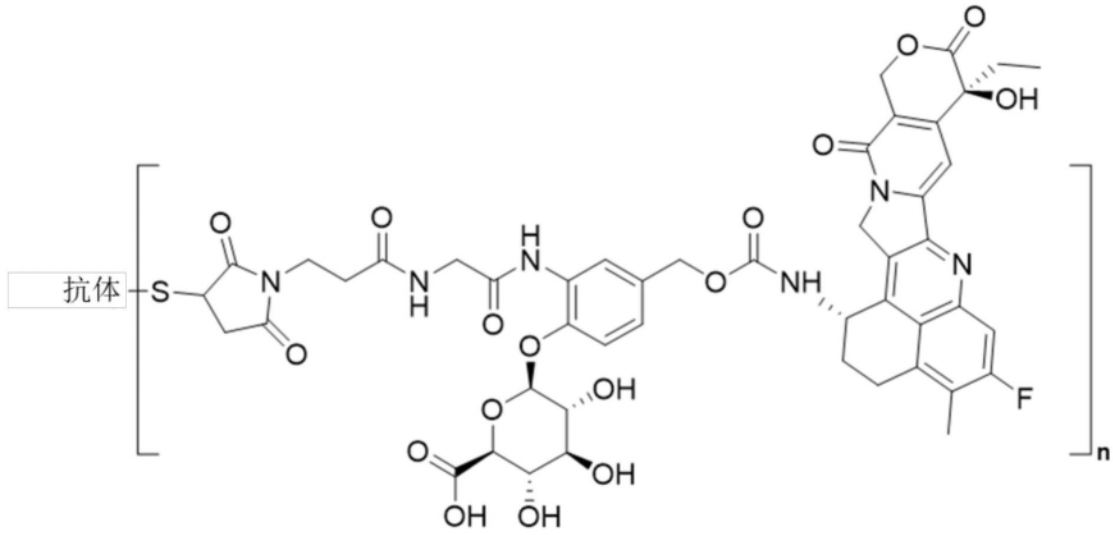
(IVA),

其中S是抗体的硫原子,并且其中n是共价连接至抗体的[(接头)-(依沙替康)]部分的数量。数字n(也称为DAR)可以为例如1至10;在包含式IV的更特别的实施方案中,n为7至8;在基于式IV的甚至更特别的实施方案中,n为7.5至8.0(即约8)。在使用上式IVA的实施方案中,n优选为3至4且最优选为3.5至4.0(即约4)。在一些实施方案中,抗体是mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M。

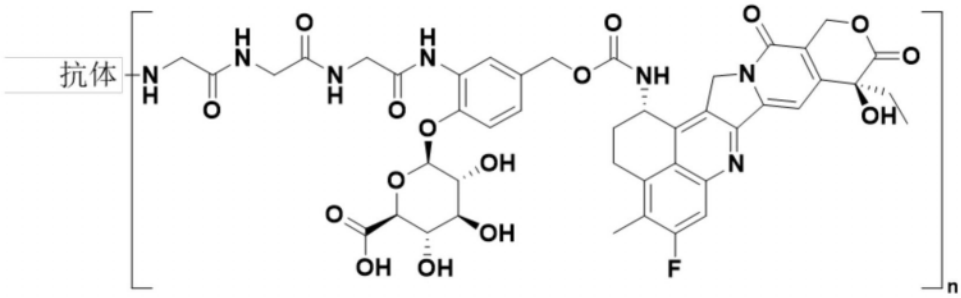
[0203] 在一些实施方案中,在本发明的免疫缀合物(诸如如上所述的具有葡萄糖醛酸酶可裂解接头的依沙替康缀合物)中,接头在抗体的半胱氨酸残基的硫原子处共价附接到抗体上。例如,抗体的该半胱氨酸残基可以是能够形成链间二硫键(在本文中也称为链间二硫

桥)的半胱氨酸残基之一。由于在IgG1抗体中存在四个链间二硫键,涉及总计八个半胱氨酸残基,因此在此类半胱氨酸残基的硫原子处将接头附接至抗体提供了可最高达8的DAR,并且在此类情况下,DAR通常为7至8,诸如7.5至8.0(即约8),条件是抗体是IgG1或具有与IgG1相同数量的链间二硫键。

[0204] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含经由接头共价连接至依沙替康的根据本发明的抗体的免疫缀合物,其中该缀合物具有下式(VI)或式(VIA):



(VI),

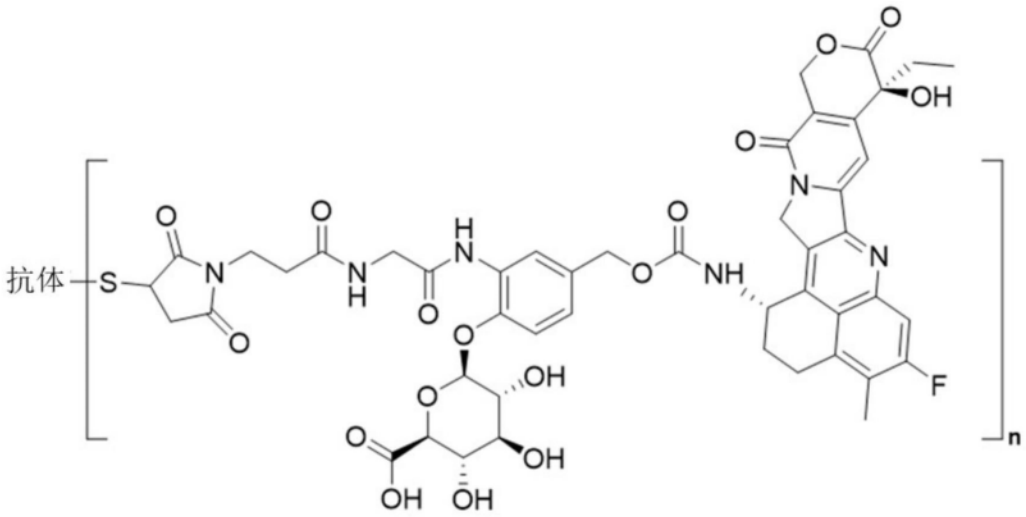


(VIA),

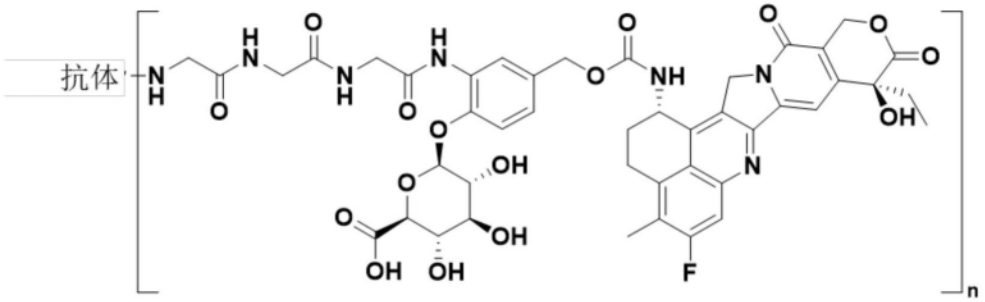
其中S是抗体的半胱氨酸的硫原子,并且其中n是共价连接至抗体的[(接头)-(依沙替康)]部分的数量。数字n(也称为DAR)可以为例如1至10;在基于上式VI的更特别的实施方案中,n为7至8;在使用式VI的甚至更特别的实施方案中,n为7.5至8.5(优选8)。在使用上式VIA的实施方案中,n优选为3至5,且更优选为3.5至4.5,且最优选为4。

[0205] 在任何上述免疫缀合物中,可以使用任何本发明的抗体(如上文和下文所描述的)。在一些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M作为抗体。

[0206] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含经由接头共价连接至依沙替康的根据本发明的抗体(优选选自mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M和mAb7-M)的免疫缀合物,其中该缀合物具有下式(VIII)或式(VIIIA):



(VIII),



(VIIIA),

其中S是抗体(优选mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M)的半胱氨酸的硫原子,并且其中n是共价连接至抗体(优选mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M)的[(接头)-(依沙替康)]部分的数量。数字n(也称为DAR)可以为例如1至10;在更特别的实施方案中,n为7至8;在甚至更特别的实施方案中,n为7.5至8.0(即约8)。在一些实施方案中,S是能够形成链间二硫桥的抗体(优选mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M或mAb7-M)的半胱氨酸的硫原子,并且DAR为约8。此类免疫缀合物的一个实例(即“ADC1”)进一步描述在实施例中。下面列举了优选的本发明的免疫缀合物:

免疫缀合物名称	缀合物具有下式	缀合物中的抗体	DAR
A1	VIII	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变 YTE 突变	7.5 至 8.0
A2	VIIIA	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变 YTE 突变 MTG 标签	3.5 至 4.5
A3	VIIIA	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变	3.5 至 4.5

		YTE 突变 K222R 突变(MTG 优化) MTG 标签	
A4	VIII	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变	7.5 至 8.0
A5	VIIIA	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变 MTG 标签	3.5 至 4.5
A6	VIII	mAb1-M	8
A7	VIIIA	mAb2-M	4
A8	VIIIA	mAb3-M	4
A9	VIII	mAb6-M	8
A10	VIIIA	mAb7-M	4

在另一优选实施方案中,本发明提供了抗体-药物缀合物,其中药物是依沙替康,并且其中抗体-药物缀合物包含以下(i)至(v)中的任一种:

(i)抗CEACAM5单克隆抗体,其包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链和含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链并且其中依沙替康经由表4中对ADC1-M显示的接头类型和缀合类型连接到所述抗体上;或

(ii)抗CEACAM5单克隆抗体,其包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链和含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的重链并且其中依沙替康经由表4中对ADC2-M显示的接头类型和缀合类型连接到所述抗体上;或

(iii)抗CEACAM5单克隆抗体,其包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链和含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的重链并且其中依沙替康经由表4中对ADC3-M显示的接头类型和缀合类型连接到所述抗体上;或(iv)抗CEACAM5单克隆抗体,其包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链和含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链并且其中依沙替康经由表4中对ADC6-M显示的接头类型和缀合类型连接到所述抗体上;或(v)抗CEACAM5单克隆抗体,其包含含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的轻链和含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的重链并且其中依沙替康经由表4中对ADC7-M显示的接头类型和缀合类型连接到所述抗体上。

[0207] 在另一优选实施方案中,本发明提供了选自ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M和ADC7-M的抗体-药物缀合物,其具有如表4中概述的相应ADC的所有特征,包括如表4中所示的相应DAR。

[0208] 在本发明的另一些实施方案中,接头可以是“不可裂解接头”(例如SMCC接头)。生长抑制剂从抗体的释放可以在抗体的溶酶体降解时发生。

[0209] 在本发明的另一些实施方案中,免疫缀合物可以是包含本发明抗体和细胞毒性或生长抑制多肽(作为生长抑制剂)的融合蛋白;此类融合蛋白可以通过重组技术或通过肽合成,即本领域中公知的方法来制备。编码DNA的分子可包含编码缀合物的两个部分(分别为抗体和细胞毒性或生长抑制多肽)的相应区域,所述区域彼此相邻或被编码接头肽的区域分开。

[0210] 本发明的抗体也可通过将抗体缀合到前药活化酶上来用于导向酶前药疗法,诸如抗体导向酶前药疗法,所述前药活化酶将前药(例如肽基化疗剂,参见WO81/01145)转化为活性细胞毒性药物(参见例如WO 88/07378和美国专利号4,975,278)。可用于ADEPT的免疫缀合物的酶组分可包括能够以将前药转化为其更具活性的细胞毒性形式的方式作用于前

药的任何酶。在这种情况下有用的酶包括但不限于可用于将含磷酸酯的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶;可用于将含硫酸酯的前药转化为游离药物的芳基硫酸酯酶;可用于将无毒的氟胞嘧啶转化为抗癌药物5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;蛋白酶,诸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(诸如组织蛋白酶B和L),其可用于将含肽前药转化为游离药物;可用于转化含有D-氨基酸取代基的前药的D-丙氨酰羧肽酶;碳水化合物裂解酶,诸如可用于将糖基化前药转化为游离药物的O-半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可用于将用P-内酰胺衍生的药物转化为游离药物的P-内酰胺酶;和青霉素酰胺酶,诸如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶,其可用于将在药物的胺氮处分别用苯氧基乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转化为游离药物。酶可以通过本领域公知的技术,诸如使用上述接头共价结合到本发明的抗体上。

[0211] 适于制备本发明的免疫缀合物的方法是本领域中公知的(参见例如Hermanson G.T.,Bioconjugate Techniques,第三版,2013,Academic Press)。例如,将细胞毒性药物经由共价附接到抗体的链间二硫桥的半胱氨酸残基上的接头缀合至抗体的方法是公知的。

[0212] 通常,本发明的免疫缀合物可以例如通过包括以下步骤的方法来获得:

(i)制备包含接头和生长抑制剂(例如细胞毒性药物)的化合物,在本文中也称为“药物-接头化合物”;

(ii)使根据本发明的抗体的任选缓冲的水溶液与该药物-接头化合物的溶液接触;

(iii)随后任选将(ii)中形成的缀合物与未反应的抗体和/或药物-接头化合物分离。

[0213] 抗体的水溶液可以用缓冲液缓冲,所述缓冲液诸如组氨酸、磷酸钾、乙酸盐、柠檬酸盐或N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes缓冲液)。可以根据抗体的性质选择缓冲液。药物-接头化合物可溶解在例如有机极性溶剂诸如二甲亚砜(DMSO)或二甲基乙酰胺(DMA)中。

[0214] 为了缀合至抗体的半胱氨酸残基,在步骤(ii)之前对抗体进行还原(例如使用TCEP)。适于仅还原链间二硫键的还原条件是本领域中已知的。

[0215] 用于缀合的反应温度通常为20至40℃。反应时间可以不等,且通常为1至24小时。抗体和药物-接头化合物之间的反应可以通过带有折射计和/或UV检测器的尺寸排阻色谱法(SEC)来监测。如果缀合物产率过低,则可以延长反应时间。

[0216] 本领域技术人员可以采用许多不同的色谱法来进行步骤(iii)的分离:缀合物可以例如通过SEC、吸附色谱法(诸如离子交换色谱法,IEC)、疏水相互作用色谱法(HIC)、亲和色谱法、混合载体色谱法诸如羟基磷灰石色谱法、或高效液相色谱法(HPLC)诸如反相HPLC来纯化。也可以使用通过透析或过滤或渗滤的纯化。

[0217] 在步骤(ii)和/或(iii)之后,可以对含有缀合物的溶液进行另外的纯化步骤(iv),例如通过色谱法、超滤和/或渗滤。在其中在缀合之前进行还原的情况下,此类例如通过色谱法、超滤和/或渗滤进行的另外的纯化步骤也可以在还原反应之后用含有抗体的溶液来进行。

[0218] 在此类过程结束时,在水溶液中回收缀合物。药物/抗体比(DAR)是可以随所用抗体和药物-接头化合物的性质以及用于缀合的实验条件(诸如(药物-接头化合物)/(抗体)的比、反应时间、溶剂和助溶剂(如果有的话)的性质)而改变的数值。由此,抗体与药物-接

头化合物之间的接触可导致包含通过不同的药物/抗体比而彼此不同的若干种缀合物的混合物。由此,确定的DAR是平均值。

[0219] 使用具有四个链间二硫桥的抗体(例如mAb1或任何IgG1抗体)在链间二硫桥的半胱氨酸残基处进行缀合(这是本领域中公知的方法)提供了可以通过选择允许缀合进行至完成(或至少接近完成)的反应条件来实现约8的相对均一DAR的优点。

[0220] 可用于测定DAR的示例性方法由以下组成:用分光光度法测量纯化缀合物的溶液在λ_D和280nm处的吸光度的比率。280nm是通常用于测量蛋白浓度,诸如抗体浓度的波长。选择波长λ_D以使得能够将药物与抗体区分开,即如本领域技术人员容易知晓的那样,λ_D是药物具有高吸光度的波长,并且λ_D距离280nm足够远以避免药物和抗体的吸收峰的显著重叠。例如,对于依沙替康(或对于喜树碱或其它喜树碱类似物),λ_D可以选择为370nm,或者对于美登木素生物碱分子,λ_D可以选择为252nm。

[0221] DAR计算的方法可以例如推导自Antony S.Dimitrov(编辑),LLC,2009,Therapeutic Antibodies and Protocols,第525卷,445,Springer Science:在尺寸排阻色谱法(SEC)分析的单体峰上(允许计算"DAR(SEC)"参数)或使用经典的分光光度计装置(允许计算"DAR(UV)"参数)测量缀合物在λ_D($A_{\lambda D}$)和在280nm(A_{280})处的吸光度。吸光度可以表示如下:$A_{\lambda D} = (C_D \times \varepsilon_{D\lambda D}) + (C_A \times \varepsilon_{A\lambda D})$

$A_{280} = (C_D \times \varepsilon_{D280}) + (C_A \times \varepsilon_{A280})$

其中:

- C_D和C_A分别是药物和抗体在溶液中的浓度
- $\varepsilon_{D\lambda D}$和ε_{D280}分别是药物在λ_D和280nm处的摩尔消光系数
- $\varepsilon_{A\lambda D}$和ε_{A280}分别是抗体λ_D和280nm处的摩尔消光系数。

[0222] 这两个具有两个未知数的方程的求解得到以下等式:

$C_D = [(\varepsilon_{A280} \times A_{\lambda D}) - (\varepsilon_{A\lambda D} \times A_{280})] / [(\varepsilon_{D\lambda D} \times \varepsilon_{A280}) - (\varepsilon_{A\lambda D} \times \varepsilon_{D280})]$

$C_A = [A_{280} - (C_D \times \varepsilon_{D280})] / \varepsilon_{A280}$

随后由药物浓度与抗体浓度的比计算平均DAR:$DAR = C_D/C_A$。

[0223] 用于制备本发明的免疫缀合物的替代方法描述在下文中。该方法可以特别用于在其轻链恒定区(CL)的至少一个和/或在其重链恒定区(CH)的至少一个中包含选自GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP和TLQSA的氨基酸序列的抗体。因此,本发明的另一方面涉及一种用于产生抗体-接头-缀合物的方法,其包括以下步骤:

(1)提供在其轻链恒定区(CL)的至少一个且优选两个和/或在其重链恒定区(CH)的至少一个且优选两个中包含选自GGTLQSPP、LLQGA、GGLLQGPP、TLQSG、TLQSPP和TLQSA的氨基酸序列且更优选氨基酸序列TLQSPP或GGTLQSPP(最优选序列GGTLQSPP)的抗体;

(2)在反应缓冲液中将至少以下组分混合在一起:

(a)步骤(1)中提供的所述抗体;

(b)微生物谷氨酰胺转胺酶,优选包含以下氨基酸序列的谷氨酰胺转胺酶:

MGSGSGSGTGEEKRSYAETHRLTADDVDDINALNESAPAASSAGPSFRAPDSDERVTPPA
EPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGVTW
VNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEAKGFQRARDV
ASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPSFKDRNGGNH
DPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRDRNIPRSPTSPGE
SFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSDGYSDFDR
GAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP (SEQ ID NO: 44) ;或

FRAPDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQ
REWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDS
FDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALR
NTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMS
RDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESK
FRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWPLE (SEQ ID NO: 47) ; 或

FRAPDSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQ
REWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDS
FDEAKGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALR
NTPSFKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMS
RDRNIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESK
FRNWSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP (SEQ ID NO: 45); 或

DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWL
SYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEA
KGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPS
FKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRDR
NIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRN
WSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWPLE (SEQ ID NO: 48); 或

DSDERVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETIVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWL
SYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFAFFDEDKYKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKDSFDEA
KGFQRARDVASVMNKALENAHDEGAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYSALRNTPS
FKDRNGGNHDPSKMKAVIYSKHFWSGQDRSGSSDKRKYGDPEAFRPDRGTGLVDMSRDR
NIPRSPTSPGESFVNFDYGWFGAQTEADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRN
WSDGYSDFDRGAYVVTFVPKSWNTAPDKVTQGWP (SEQ ID NO: 49);以及

(c)接头,其包含能够在所述谷氨酰胺转胺酶的存在下与来自步骤(1)的抗体反应的H_2N-部分,并且其中该接头优选是药物-接头,其中所述接头共价附接至药物;

(3)将步骤(2)中产生的抗体-接头-缀合物与未反应的接头和所述谷氨酰胺转胺酶分离,优选通过对所述来自步骤(2)的混合物进行尺寸排阻色谱法。

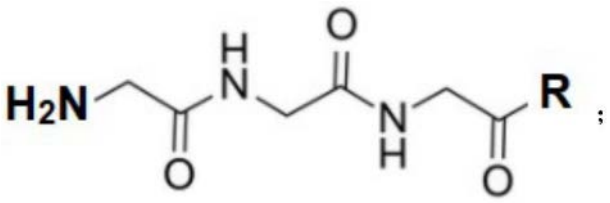
[0224] 在一个实施方案中,谷氨酰胺转胺酶由以下多核苷酸编码:

ATGGGTAGCGGTAGCGGTTCAGGCACCGGTGAAGAAAAACGTAGCTATGCAGAAA
CCCATCGTCTGACCGCAGATGATGTTGATGATATTAATGCACTGAATGAAAGCGCA
CCGGCAGCAAGCAGCGCAGGTCCGAGCTTTCGTGCACCGGATAGTGATGAACGTGTT
ACCCCTCCGGCAGAACCGCTGGATCGTATGCCGGATCCGTATCGTCCGAGCTATGGTCGT
GCCGAAACCATTGTTAATAACTATATTCGTAAGTGGCAGCAGGTTTATAGCCATCGTGATG
GTCGTAAACAGCAGATGACCGAAGAACAGCGTGAATGGCTGAGTTATGGTTGTGTTGGT
GTTACCTGGGTTAATAGCGGTCAGTATCCGACCAATCGTCTGGCATTTGCATTTTTCGATG
AGGACAAATACAAGAACGAGCTGAAAAATGGTCGTCCGCGTAGCGGTGAAACCCGTGC
AGAATTTGAAGGTCGTGTTGCAAAAGATAGCTTTGATGAAGCAAAAGGTTTTCAGCGTG
CACGTGATGTTGCAAGCGTTATGAATAAAGCACTGGAAAATGCACATGATGAAGGTGCC
TATCTGGACAACCTGAAAAAAGAACTGGCAAATGGTAATGATGCCCTGCGTAATGAAGA
TGCACGTAGCCCGTTTTATAGCGCACTGCGTAATACCCCGAGCTTTAAAGATCGTAATGG
TGGTAATCATGACCCGAGCAAAATGAAAGCAGTGATCTATAGCAAACACTTTTGGAGCG
GTCAGGATCGTAGTGGTAGCAGCGATAAACGTAAATATGGTGATCCGGAAGCATTTCGTC
CGGATCGTGGCACCGGTCTGGTTGATATGAGCCGTGATCGTAATATTCCGCGTAGTCCGA
CCAGTCCGGGTGAAAGCTTTGTTAATTTTGATTATGGTTGGTTTGGCGCACAGACCGAA
GCAGATGCAGATAAAACCGTTTGGACCCATGGCAATCATTATCATGCACCGAATGGTAGC
CTGGGTGCAATGCATGTTTATGAAAGCAAATTTCGCAATTGGAGCGACGGCTATAGCGAT
TTTGATCGTGGTGCCTATGTTGTTACCTTTGTTCCGAAAAGCTGGAATACCGCTCCGGAT
AAAGTTACCCAAGGTTGGCCG*TAA* (SEQ ID NO: 46)。

[0225] 在该方法的一个优选实施方案中,所述反应缓冲液是7％ DMSO,24mM HEPES,pH 7.0。

[0226] 优选地,本发明的方法中使用的抗体在其轻链恒定区(CL)的至少一个和/或其重链恒定区(CH)的至少一个中进一步包含LLQGA和/或GGLLQGPP序列。

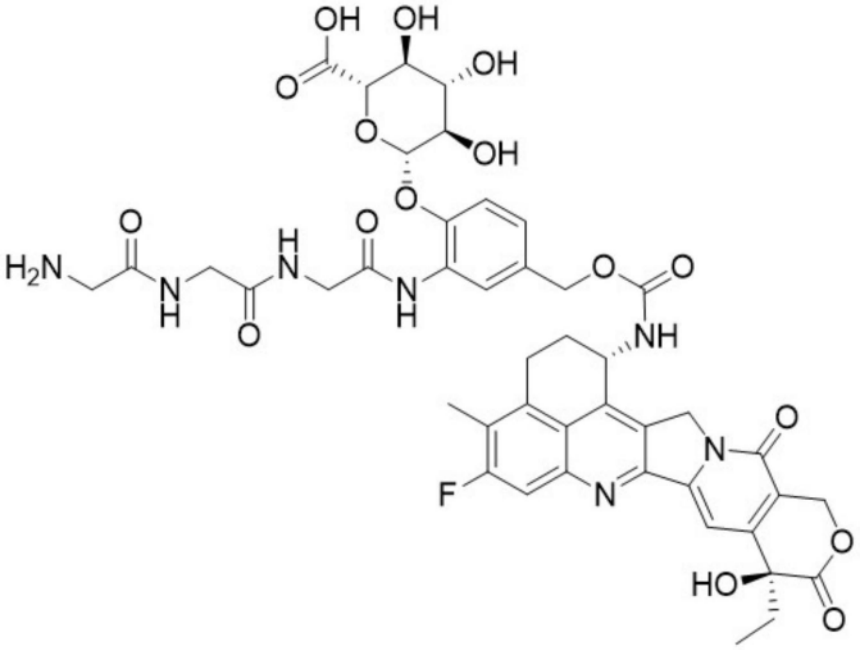
[0227] 在本发明的方法中,所述接头是具有下式的接头:



;

其中R是接头的其余部分,并且可以任选还包含药物,其中药物优选是依沙替康。在本发明的方法的更优选的实施方案中,接头是NH_2-GGG-β-葡糖苷酸。

[0228] 在本发明的方法的优选实施方案中,在步骤(2)中,混合物包含以下药物-接头:



在本发明的方法的另一实施方案中,步骤(2)中的混合物包含每个缀合位点分别5摩尔当量的接头或药物-接头,其中缀合位点是包含在所述抗体的轻链恒定区(CL)和/或重链恒定区(CH)中的序列LLQGA、GGLLQGPP、GGTLQSPP、TLQSG、TLQSPP或TLQSA。

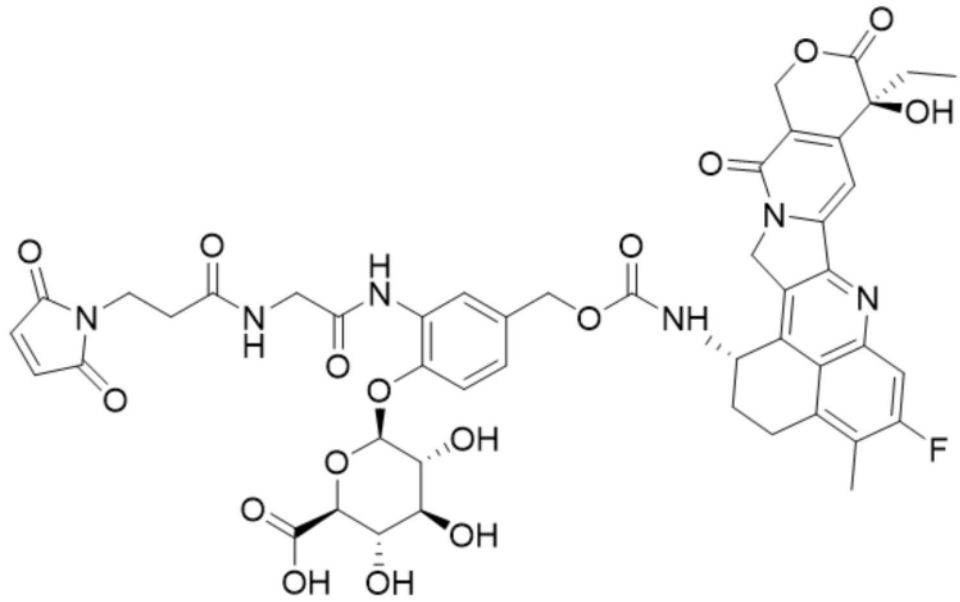
[0229] 在本发明的方法的另一实施方案中,抗体是如本文中描述的本发明的抗CEACAM5抗体和/或药物是如本文中定义的生长抑制剂。

[0230] 本发明的另一方面涉及可以根据本发明的方法产生的抗体-接头缀合物,其中接头优选是如本文中在本发明的ADC的背景下描述的接头或药物-接头。

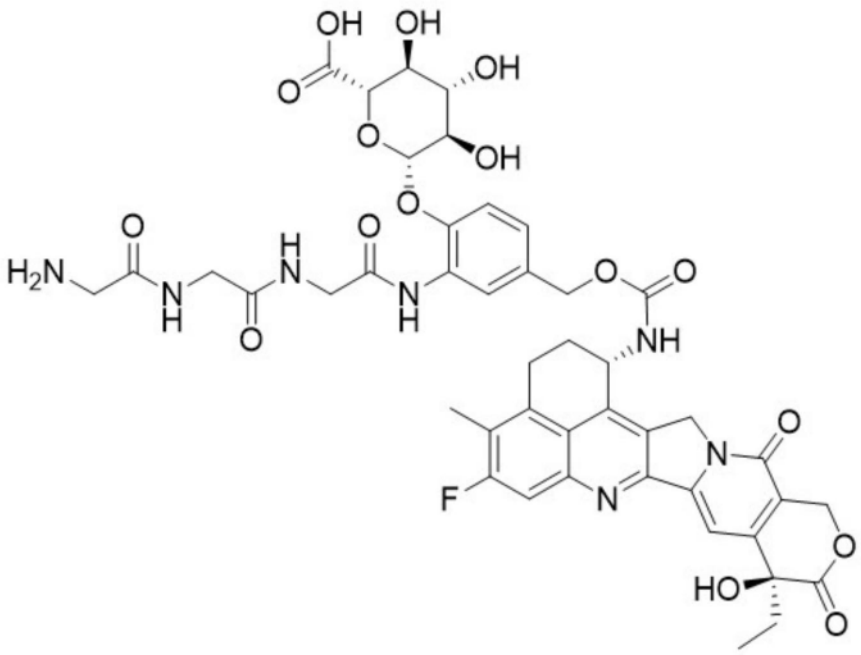
[0231] 用于制备本发明的免疫缀合物的示例性方法描述在实施例中。

药物-接头化合物

[0232] 本发明还提供了包含接头和生长抑制剂(例如细胞毒性药物)的化合物,其在本文中也称为“药物-接头化合物”。例如,本发明提供了下式(X)或式(XA)的化合物:



(X),



(XA),

或其生理上可接受的盐;根据式X的化合物在本文中也称为“药物-接头化合物1”、“化合物DL1”或“DL1”,并且根据式XA的化合物在本文中也称为“药物-接头化合物1-M”、“化合物DL1-M”或“DL1-M”。

[0233] 这些药物-接头化合物可用于制备如上文和下文中描述的本发明的免疫缀合物。

[0234] 本发明的药物-接头化合物(例如上文描绘的式(X)或(XA)的那些)可以通过化学合成制备,例如如下文的实施例中进一步描述的那样。

药物组合物

[0235] 本发明的抗体或免疫缀合物可以与可药用的载体、稀释剂和/或赋形剂组合,以及任选与持续释放基质组合以形成药物组合物,所述持续释放基质包括但不限于可生物降解

的聚合物、不可生物降解的聚合物、脂质或糖的类别。

[0236] 由此,本发明的另一方面涉及包含本发明的抗体或免疫缀合物和可药用的载体、稀释剂和/或赋形剂的药物组合物。

[0237] “药物的”或“可药用的”是指在适当情况下当施用于哺乳动物,尤其是人时不产生不利的、过敏的或其它不想要的反应的分子实体和组合物。可药用的载体、稀释剂或赋形剂是指任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂。

[0238] 如本文中使用的“可药用的载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂等。合适的载体、稀释剂和/或赋形剂的实例包括但不限于以下的一种或多种:水、氨基酸、盐水、磷酸盐缓冲盐水、缓冲磷酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐;氨基酸和衍生物,诸如组氨酸、精氨酸、甘氨酸、脯氨酸、甘氨酰甘氨酸;无机盐,诸如NaCl或氯化钙;糖或多元醇,诸如右旋糖、甘油、乙醇、蔗糖、海藻糖、甘露醇;表面活性剂,诸如聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、泊洛沙姆188;等,以及其组合。在许多情况下,在药物组合物中包括等渗剂,诸如糖、多元醇或氯化钠将是有用的,并且制剂还可以含有抗氧化剂,诸如色胺和/或稳定剂,诸如吐温20。

[0239] 药物组合物的形式、施用途径、剂量和方案自然取决于待治疗的病况、疾病的严重程度、患者的年龄、体重和性别等。

[0240] 本发明的药物组合物可以配制用于局部、口服、肠胃外、鼻内、静脉内、肌内、皮下或眼内施用等。

[0241] 在一个实施方案中,药物组合物含有对注射制剂而言可药用的媒介物。这些可以是等渗的、无菌的、盐水溶液(磷酸二氢钠或磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等,或此类盐的混合物),或干燥的,尤其是冷冻干燥的组合物,其在添加无菌水或生理盐水(视情况而定)时使得能够构成可注射溶液。

[0242] 药物组合物可通过药物组合装置来施用。

[0243] 用于施用的剂量可以随各种参数,且例如随采用的施用方式、相关病理学、或备选地,所需治疗持续时间来进行调整。

[0244] 为了制备药物组合物,可以将有效量的本发明的抗体或免疫缀合物溶解或分散在可药用的载体或水性介质中。

[0245] 适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体;包括芝麻油、花生油或丙二醇水溶液的制剂;和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末;在所有此类情况下,形式必须是无菌的,并且可用适于递送的装置或系统注射而不降解,并且其必须在制造和储存条件下是稳定的,并且必须防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。

[0246] 作为游离碱或可药用盐的活性化合物的溶液可以在适当地混有表面活性剂的水中制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中和在油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制剂可含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0247] 本发明的抗体或免疫缀合物可以配制为中性或盐形式的药物组合物。可药用盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成),其与无机酸诸如盐酸或磷酸,或有机酸诸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸等形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,诸如异丙胺、三甲胺、甘氨酸、组氨酸、普鲁卡因等。

[0248] 载体还可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、以及植物油。例如,通过使用包衣(诸如卵磷脂)、在分散体的情况下通过保持所需的粒度、以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在一些情况下,可合意的是包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的药剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0249] 通过将活性化合物以所需量混入适当的溶剂以及上文所列的任何其它成分(视需要而定),随后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过将各种灭菌的活性成分混入无菌媒介物来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自上文所列的那些的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥技术,所述技术从先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何另外的所需成分的粉末。

[0250] 还设想了制备用于直接注射的更浓缩或高度浓缩的溶液,其中设想使用DMSO作为溶剂以产生极快的渗透,将高浓度的活性剂递送至小肿瘤区域。

[0251] 在配制时,可以以与剂量制剂相容的方式并以诸如治疗有效的量施用溶液。制剂易于以多种剂型施用,诸如上述可注射溶液的类型,但也可使用药物释放胶囊等。

[0252] 例如,对于以水溶液肠胃外施用,如果需要的话,溶液可以适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释液等渗。这些水溶液尤其适于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这方面,鉴于本公开,可以使用的无菌水性基质是本领域技术人员已知的。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中,并添加到1000ml皮下输注液中或者在建议的输注部位注射(参见例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”,第15版,第1035-1038和1570-1580页)。取决于治疗的受试者的病况,剂量必然发生一定变化。在任何情况下,负责施用的人员将确定用于个体受试者的适当剂量。

[0253] 本发明的抗体或免疫缀合物可以在治疗混合物中配制以包含每剂例如约0.01至100毫克左右。

[0254] 除了配制用于肠胃外施用,诸如静脉内或肌内注射的抗体或免疫缀合物外,其它可药用形式包括例如用于口服施用的片剂或其它固体、定时释放胶囊、以及目前使用的任何其它形式。

[0255] 在一些实施方案中,设想了使用脂质体和/或纳米颗粒用于将多肽引入宿主细胞。脂质体和/或纳米颗粒的形成和使用是本领域技术人员已知的。

[0256] 纳米胶囊通常可以以稳定和可重现的方式捕获化合物。为了避免由细胞内聚合物过载引起的副作用,通常使用能够在体内降解的聚合物来设计此类超细颗粒(尺寸为约0.1μm)。设想了用于在本发明中使用的满足这些要求的可生物降解的聚烷基-氰基丙烯酸酯纳米颗粒或可生物降解的聚乳酸或聚乳酸聚乙醇酸共聚物纳米颗粒,并且此类颗粒可以由本领域技术人员容易地制得。

[0257] 脂质体可以由分散在水性介质中并自发形成多层同心双层囊泡(也称为多层囊泡(MLV))的磷脂形成。MLV通常具有25nm至4μm的直径。超声处理MLV导致形成在核心中含有水溶液的直径范围为200至500Å的小单层囊泡(SUV)。脂质体的物理特性取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在情况。

[0258] 除了上述提及的实例外,还设想了其它药物形式诸如纳米颗粒、微颗粒和微胶囊、植入物(例如脂质植入物)、或自凝固或自乳化体系。

治疗方法和用途

[0259] 本发明人已经发现,本发明的抗体(例如mAb1)在结合后能够作为CEACAM5-抗体复合物的一部分内化。此外,他们已经显示,与细胞毒性药物(依沙替康)缀合的此类抗体在体外介导对肿瘤细胞的细胞毒性作用。本发明人还已经显示,在单次注射的情况下,本发明的这些免疫缀合物在以10mg/kg的剂量使用时在体内,例如在源于患者的人结肠直肠癌的鼠异种移植模型中诱导显著的抗肿瘤活性。事实上,本发明的免疫缀合物在一大组体外和体内模型中显示出广泛的活性。细胞毒性效力与靶标(CEACAM5)表达密切相关,并且在靶标阴性细胞中低得多。在不同癌症类型的几种细胞系来源的异种移植(CDX)和患者来源的异种移植(PDX)模型中,证实了非常好的抗肿瘤活性。在非人灵长类动物剂量范围发现研究中,免疫缀合物耐受良好,具有拓扑异构酶-I抑制剂化疗典型的副作用概况。临床前数据指示了用于随后临床测试的良好治疗窗口。本发明的抗体、免疫缀合物和药物组合物由此可用于治疗癌症。

[0260] 因此,本发明提供了用作药物的本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物。例如,本发明提供了用于治疗癌症的本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物。本发明进一步提供了治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物。

[0261] 与相同组织来源的正常(即非肿瘤)细胞相比,待用本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物治疗的癌症优选是表达CEACAM5的癌症,更优选过表达CEACAM5的癌症。细胞的CEACAM5表达可以容易地测定,例如通过使用根据本发明的抗体(或市售可得的抗CEACAM5抗体),例如如在下文的“诊断用途”部分中所述,和例如通过免疫组织化学方法。

[0262] 在一些实施方案中,待用本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物治疗的癌症是结肠直肠癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胃癌、子宫颈癌、食管癌(例如食管腺癌)、胆管癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌、膀胱癌,或胃、子宫、子宫内膜、甲状腺或皮肤的癌症。在一些具体实施方案中,待用本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物治疗的癌症是结肠直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、食管癌或前列腺癌。

[0263] 本发明的抗体或免疫缀合物可单独或与任何合适的生长抑制剂组合用于癌症疗法。

[0264] 如上所述,本发明的抗体可以缀合(连接)至生长抑制剂。本发明的抗体由此可用于将所述生长抑制剂靶向至在其表面上表达或过表达CEACAM5的癌细胞。

[0265] 同样公知的是,治疗性单克隆抗体可导致耗尽携带由该抗体特异性识别的抗原的细胞。此类耗尽可以通过至少三种机制介导:抗体介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性裂解和通过由抗体靶向的抗原介导的信号直接抑制肿瘤生长。

[0266] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞毒性的一种形式,其中与存在于某些细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)结合的抗体使这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞,并随后杀死该靶细胞。为了评估感兴趣分子的ADCC活性,可进行体外ADCC测定,诸如美国专利号5,500,362或5,821,337中描述的测定。

[0267] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体的存在下裂解靶细胞。经典补体途径的激活通过补体系统的第一组分与抗体(所述抗体结合至其同源抗原)的结合来引发。为了评估补体激活,可以进行CDC测定,例如如Gazzano-Santoro等人(Journal of Immunological Methods.1997年3月;202(2):163-171)中所述。

[0268] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以是具有修饰的氨基酸序列的抗体,所述修饰的氨基酸序列导致减少或消除了对大多数Fcγ受体的结合,这可以减少表达此类受体的正常细胞和组织(例如巨噬细胞、肝窦细胞等)的摄取和毒性。

[0269] 本发明的一个方面涉及治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物。

[0270] 在本发明的背景下,如本文中使用的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指逆转、减轻、抑制此类术语适用的病症或病况的进展,或预防所述病症或病况,或逆转、减轻、抑制所述病症或病况的一种或多种症状,或预防所述病症或病况的一种或多种症状。如本文中使用的术语“治疗癌症”是指抑制肿瘤的恶性细胞的生长和/或所述肿瘤的转移进展。此类治疗还可以导致肿瘤生长的消退,即,可测量肿瘤的尺寸减小。例如,此类治疗可以导致肿瘤或转移的完全消退。

[0271] 在本发明的治疗应用的背景下,术语“受试者”或“患者”或“有需要的受试者”或“有需要的患者”是指受肿瘤影响或可能受肿瘤影响的受试者(例如人或非人哺乳动物)。例如,所述患者可以是例如根据如下文中所述的方法已确定对靶向CEACAM5的治疗剂、特别是根据本发明的抗体或免疫缀合物易感的患者。

[0272] “治疗有效量”是指足以以适用于任何医学治疗的合理收益/风险比治疗所述癌症疾病的量。然而,要理解的是,本发明的抗体、免疫缀合物和药物组合物(统称为“治疗剂”)的每日总用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何特定患者的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的病症和病症的严重程度;所用具体治疗剂的活性;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间、施用途径和所用具体治疗剂的排泄率;治疗的持续时间;与所用具体治疗剂组合或同时使用的药物;以及医学领域中公知的类似因素。例如,在本领域技术人员中公知的是,以低于实现期望治疗效果所需的水平开始化合物的剂量,并逐渐增加剂量直至达到期望效果。

[0273] 本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物还可用于抑制癌症转移的进展。

[0274] 本发明的抗体、免疫缀合物或药物组合物还可以与用于治疗癌症(例如辅助疗法)和/或用于减少转移性癌症的生长的任何其它治疗干预组合使用。例如,用于此类组合的其它治疗干预可以是用于待治疗的癌症的标准治疗(SOC)治疗剂。

[0275] 采用根据本发明的抗体或免疫缀合物或药物组合物的治疗的效力可以容易地在体内(例如在癌症的小鼠模型中)并通过测量例如治疗组与对照组之间的肿瘤体积的改变、%肿瘤消退、部分消退或完全消退来测定。

诊断用途

[0276] CEACAM5已经报道在癌细胞诸如结肠直肠、胃、肺和胰腺肿瘤细胞的表面上高度表达,并且在正常组织中的表达限于少数正常上皮细胞诸如结肠和食管上皮细胞。

[0277] 因此,CEACAM5构成癌症标志物,并具有例如用于指示抗癌疗法的有效性或检测疾病复发的潜力。

[0278] 在一个实施方案中,本发明的抗体在靶向表达CEACAM5的肿瘤的疗法的背景下可用作测定的组分,以确定患者对治疗剂的易感性、监测抗癌疗法的有效性或检测治疗后疾病的复发。在一些实施方案中,相同的本发明的抗体可以用作治疗剂的组分和诊断测定的组分。

[0279] 由此,本发明的另一方面涉及根据本发明的抗体用于在来自受试者的生物样品中离体检测CEACAM5表达的用途。本发明的另一方面涉及本发明的抗体用于在受试者中体内检测CEACAM5表达的用途。当用于检测CEACAM5时,该抗体可用可检测分子诸如荧光团或酶来标记。

[0280] 检测CEACAM5可以意在通过检测肿瘤细胞上表面蛋白CEACAM5的表达用于例如:

a)诊断受试者中癌症的存在情况,或

b)测定患有癌症的患者对靶向CEACAM5的治疗剂,特别是根据本发明的抗体或免疫缀合物的易感性,或

c)监测抗CEACAM5癌症疗法的有效性或检测抗CEACAM5癌症疗法(特别是其中所述疗法是使用根据本发明的抗体或免疫缀合物的疗法)后的癌症复发。

[0281] 在实施方案中,该抗体意在用于体外或离体诊断用途。例如,CEACAM5可使用本发明的抗体在获自受试者的生物样品中体外或离体检测。根据本发明的用途也可以是体内用途。例如,可以将根据本发明的抗体施用于受试者,并且可以检测和/或定量抗体-细胞复合物,其中所述复合物的检测指示癌症。

[0282] 本发明进一步涉及在受试者中检测癌症的存在情况的体外或离体方法,其包括以下步骤:

(a)使来自受试者的生物样品与根据本发明的抗体接触,特别是在适于该抗体与所述生物样品形成复合物的条件下;

(b)测量结合所述生物样品的抗体的水平;以及

(c)通过将测得的结合抗体的水平与对照进行比较来检测癌症的存在情况,与对照相比结合抗体的水平提高指示癌症。

[0283] 本发明还涉及测定患有癌症的患者对靶向CEACAM5的治疗剂,特别是根据本发明的抗体或免疫缀合物的易感性的体外或离体方法,该方法包括以下步骤:

(a)使来自患有癌症的患者的生物样品与根据本发明的抗体接触,特别是在适于该抗体与所述生物样品形成复合物的条件下;

(b)测量结合所述生物样品的抗体的水平;以及

(c)将测得的结合所述生物样品的抗体的水平与结合对照的抗体的水平进行比较;

其中与对照相比结合所述生物样品的抗体水平升高指示患者对靶向CEACAM5的治疗剂易感。

[0284] 在上述方法中,所述对照可以是相同类型的正常非癌生物样品,或确定为代表相同类型的正常生物样品中的抗体结合水平的参考值。

[0285] 在一个实施方案中,本发明的抗体可用于诊断表达CEACAM5的癌症,诸如结肠直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、食管癌、前列腺癌或其它表达CEACAM5的实体瘤。

[0286] 本发明进一步涉及监测抗CEACAM5癌症疗法的有效性的体外或离体方法,其包括

以下步骤:

(a)使来自经历抗CEACAM5癌症疗法的受试者的生物样品与根据本发明的抗体接触,特别是在适于该抗体与所述生物样品形成复合物的条件下;

(b)测量结合所述生物样品的抗体的水平;以及

(c)将测得的结合抗体的水平与结合对照的抗体的水平进行比较;

其中与对照相比,结合所述生物样品的抗体水平降低指示所述抗CEACAM5癌症疗法有效。在所述方法中,与对照相比,结合所述生物样品的抗体水平升高将指示所述抗CEACAM5癌症疗法无效。在监测有效性的这种方法的一个实施方案中,所述对照是与进行分析的生物样品相同类型的生物样品,但其在抗CEACAM5癌症疗法过程期间在较早的时间点获自受试者。

[0287] 本发明进一步涉及在抗CEACAM5癌症疗法后检测癌症复发的体外或离体方法,其包括以下步骤:

(a)使来自受试者(所述受试者已完成抗CEACAM5癌症疗法)的生物样品与根据本发明的抗体接触,特别是在适于该抗体与所述生物样品形成复合物的条件下;

(b)测量结合所述生物样品的抗体的水平;以及

(c)将测得的结合抗体的水平与结合对照的抗体的水平进行比较;

其中与对照相比,结合所述生物样品的抗体水平升高指示抗CEACAM5癌症疗法后癌症复发。所述对照特别可以是与进行分析的生物样品相同类型的生物样品,但其先前,即在完成抗CEACAM5癌症疗法之时或之后获自受试者。

[0288] 所述抗CEACAM5癌症疗法是例如使用根据本发明的抗体或免疫缀合物的疗法。所述抗CEACAM5癌症疗法靶向表达CEACAM5的癌症,诸如结肠直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、食管癌、前列腺癌或表达CEACAM5的其它实体瘤。

[0289] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以用可检测的分子或物质标记,所述可检测的分子或物质诸如荧光分子或荧光团、放射性分子、酶或任何(直接或间接)提供信号的本领域已知的其它标记。

[0290] 就根据本发明的抗体而言,如本文中使用的术语"标记的"意在包括通过将可检测物质诸如放射性试剂或荧光团(例如异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE)或吲哚菁(Cy5))偶联(即物理连接)到多肽上来直接标记抗体,以及通过与可检测物质反应而间接标记多肽。

[0291] 本发明的抗体可以通过本领域已知的任何方法用放射性分子标记。例如,放射性分子包括但不限于用于闪烁显像研究的放射性原子,诸如I^{123}、I^{124}、In^{111}、Re^{186}、Re^{188}、Tc^{99}。本发明的抗体也可以用用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记物(诸如碘-123、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁)来标记。

[0292] "生物样品"包括可用于诊断或监测测定的获自受试者的多种样品类型。生物样品包括但不限于血液和生物来源的其它液体样品、固体组织样品诸如活检标本或组织培养物或源自其的细胞,及其后代。因此,生物样品包括临床样品、培养中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体和组织样品,诸如肿瘤样品。

[0293] 在一些实施方案中,生物样品可以是福尔马林固定和石蜡包埋(FFPE)的组织样品。

[0294] 本发明还涉及在受试者中检测癌症的存在情况的体内方法,其包括以下步骤:

a)向患者施用根据本发明的抗体,其中该抗体用可检测分子标记;

b)通过成像,例如通过检测可检测分子,检测所述抗体在患者体内的定位。

[0295] 在所述方法中,癌症可以是表达CEACAM5的癌症,诸如结肠直肠癌、胃癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、食管癌、前列腺癌或表达CEACAM5的其它实体瘤。

[0296] 本发明的抗体还可用于癌症的分期(例如在放射成像中)。它们可以单独使用或与其它癌症标志物组合使用。

[0297] 如本文中使用的术语“检测”或“检测的”包括参照或不参照对照的定性和/或定量检测(即测量水平)。

[0298] 在本发明的背景下,如本文中使用的术语“诊断”是指基于许多收集的数据确定医学病况的性质,其旨在鉴定影响受试者的病理。

试剂盒

[0299] 最后,本发明还提供了包含至少一种本发明的抗体或免疫缀合物的试剂盒。含有本发明的抗体的试剂盒可用于检测表面蛋白CEACAM5,或用于治疗或诊断测定。本发明的试剂盒可以含有与固体支持物例如组织培养板或珠粒(例如琼脂糖珠珠粒)偶联的抗体。可以提供试剂盒,其含有用于在体外,例如在ELISA或蛋白印迹中检测和定量表面蛋白CEACAM5的抗体。可用于检测的此类抗体可以具有标记,诸如荧光或放射性标记。

序列简述

[0300] 氨基酸序列:

SEQ ID NO:1根据GenBank登录号AAA51967.1的人CEACAM5蛋白序列

SEQ ID NO:2食蟹猕猴CEACAM5蛋白序列(NCBI参考序列XP_005589491.1)

SEQ ID NO:3mAb1的CDR1-H

SEQ ID NO:4mAb1的CDR2-H

SEQ ID NO:5mAb1的CDR3-H

SEQ ID NO:6mAb1的CDR1-L

SEQ ID NO:7mAb1的CDR2-L

SEQ ID NO:8mAb1的CDR3-L

SEQ ID NO:9mAb1的VH

SEQ ID NO:10mAb1的VL

SEQ ID NO:11mAb1的CH

SEQ ID NO:12mAb1、mAb1-M和mAb6-M的CL

SEQ ID NO:13mAb1的HC

SEQ ID NO:14mAb1、mAb1-M和mAb6-M的LC

核酸序列:

SEQ ID NO:15编码mAb1的HC的DNA序列

SEQ ID NO:16编码mAb1的LC的DNA序列

氨基酸序列:

SEQ ID NO:17抗体hu8G4的HC

SEQ ID NO:18抗体hu8G4的LC

SEQ ID NO:19优化抗体变体1的HC
SEQ ID NO:20优化抗体变体1的LC
SEQ ID NO:21优化抗体变体2的LC
SEQ ID NO:22优化抗体变体4的LC
SEQ ID NO:23优化抗体变体5的LC
SEQ ID NO:24优化抗体变体6的HC
SEQ ID NO:25huMab2-3(同种异型)的HC
SEQ ID NO:26huMab2-3的LC
SEQ ID NO:27hmn-14的HC
SEQ ID NO:28hmn-14的LC
SEQ ID NO:29rb8G4的HC
SEQ ID NO:30rb8G4的LC
SEQ ID NO:31mAb1-M&mAb2-M的CH(CH-LALA-YTE)
SEQ ID NO:32mAb3-M的CH(CH-K222R-LALA-YTE)
SEQ ID NO:33mAb2-M、mAb3-M和mAb7-M的CL(CL-标签)
SEQ ID NO:34mAb1-M和mAb2-M的HC(HC-LALA-YTE)
SEQ ID NO:35mAb3-M的HC(HC-K222R-LALA-YTE)
SEQ ID NO:36mAb2-M、mAb3-M和mAb7-M的LC(LC-标签)
SEQ ID NO:40mAb5-M的HC(抗CD20-HC)
SEQ ID NO:41mAb5-M的LC(抗CD20-LC)
SEQ ID NO:44谷氨酰胺转胺酶
SEQ ID NO:45谷氨酰胺转胺酶(活化,版本1)
SEQ ID NO:47谷氨酰胺转胺酶(活化,版本2)
SEQ ID NO:48谷氨酰胺转胺酶(活化,版本3)
SEQ ID NO:49谷氨酰胺转胺酶(活化,版本4)
SEQ ID NO:50mAb6-M和mAb7-M的CH(CH-LALA)
SEQ ID NO:51mAb6-M和mAb7-M的HC(HC-LALA)
SEQ ID NO:54框架区FR1
SEQ ID NO:55框架区FR2
SEQ ID NO:56框架区FR3
SEQ ID NO:57框架区FR4
SEQ ID NO:58框架区FR5
SEQ ID NO:59框架区FR6
SEQ ID NO:60框架区FR7
SEQ ID NO:61框架区FR8

核酸序列:

SEQ ID NO:37编码mAb1-M和mAb2-M的HC(HC-LALA-YTE)的DNA序列
SEQ ID NO:38编码mAb3-M的HC(LC-K222R-LALA-YTE)的DNA序列
SEQ ID NO:39编码mAb2-M、mAb3-M和mAb7-M的LC(LC-标签)的DNA序列

SEQ ID NO:42编码mAb5-M的HC(抗CD20-HC)的DNA序列

SEQ ID NO:43编码mAb5-M的LC(抗CD20-LC)的DNA序列

SEQ ID NO:46编码谷氨酰胺转胺酶的DNA序列

SEQ ID NO:52编码mAb6-M和mAb7-M的HC(HC-LALA)的DNA序列

SEQ ID NO:53编码mAb1-M和mAb6-M的LC的DNA序列

氨基酸序列:

SEQ ID NO:62拉贝妥珠单抗重链

SEQ ID NO:63拉贝妥珠单抗轻链

SEQ ID NO:64利妥昔单抗HC

SEQ ID NO:65利妥昔单抗LC

实施例

实施例1:抗CEACAM5抗体

1.1转基因大鼠的免疫和杂交瘤的分离

[0301] 为了产生针对人CEACAM5蛋白(癌胚抗原相关细胞粘附分子5;CD66e)的单克隆抗体,人免疫球蛋白基因转基因大鼠(OmniRat™)获自CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC(WILMINGTON,MA)。用克隆到Aldevron专有免疫载体(pB8-CEA-hum-MC)中并使用基因枪瞬时转染到OMT大鼠细胞中的CEACAM5 cDNA(用UniProt ID no.P06731编码人CEACAM5蛋白序列的氨基酸35-675;P06731的序列与SEQ ID NO:1相同,除了SEQ ID NO:1的E398被K398取代)将5只动物免疫4次。

[0302] 通过基于细胞的ELISA(CELISA)测定,使用在它们的细胞膜上表达CEACAM5的细胞评估抗CEACAM5效价(效价结果显示在下文中)。在4轮遗传物质免疫(IS31d-4)后,在免疫方案的第31天采集免疫动物血清。在PBS+3% FBS中稀释的血清通过流式细胞术在用克隆到Aldevron专有表达载体(pB1-CEA-hum-MC)中的CEACAM5 cDNA瞬时转染的哺乳动物细胞上测试。10μg/ml的山羊抗大鼠IgG R-藻红蛋白缀合物(Southern Biotech,#3030-09)用作二抗。

[0303] 将所有动物处死,并汇集来自淋巴结的淋巴细胞,并冷冻保存以备将来使用。使细胞与Ag8小鼠骨髓瘤细胞系融合以产生活的杂交瘤。然后将来自该融合的杂交瘤细胞转移至十个96孔板。

1.2CEACAM5特异性

[0304] 使用基于细胞的ELISA(CELISA)测定筛选杂交瘤上清液,以检测不结合CEACAM1(BGP)、CEACAM3(CGM1a)、CEACAM4(CGM7)、CEACAM6(NCA)和CEACAM8(NCA-95)的抗CEACAM5抗体。10μg/ml的山羊抗大鼠IgG R-藻红蛋白缀合物(Southern Biotech,#3030-09)用作二抗。

[0305] 将对人CEACAM5显示特异性而对其相关蛋白不显示特异性的克隆转移到一个96孔板中,并在ELISA测定中评估杂交瘤上清液的特异性和交叉反应性。在该测定中,8G4杂交瘤克隆及其亚克隆对人CEACAM5显示特异性,并对食蟹猕猴CEACAM5显示交叉反应性。

1.3检测抗体序列和克隆

[0306] 根据RNeasy 96方案,Qiagen从每个杂交瘤克隆制备总RNA。随后使用随机六聚体和SuperScript©III将总RNA转录成cDNA。

[0307] 通过qPCR对所得cDNA进行质量控制,并通过PCR来扩增VH和Vk。PCR产物使用AMpure XP PCR纯化试剂盒结合KingFisher仪器来纯化。

[0308] 使用同源重组程序(所谓“Lucigen克隆”)将8G4亚克隆的VH和Vk基因分别克隆到目标载体hi00_pTT5_VH_ccdB和hh00_pTT5_Vk_ccdB中。在One Shot®Mach1™-T1R化学感受态大肠杆菌中转化反应混合物。通过Sanger测序证实正确重组的克隆。

1.4命中的人源化和生化表征,以及候选物选择

[0309] 将8G4和其它克隆重构(reformat)并表达为人IgG1分子。通过SDS-PAGE、尺寸排阻色谱法(SEC)、选择性、亲和力、细胞结合和效力对它们进行评估。基于结果,选择一种人源化候选抗体(其命名为hu8G4)用于氨基酸序列优化以改善可制造性和亲和力。

[0310] 人源化候选抗体hu8G4的氨基酸序列如下:

重链:

EVQLVESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

轻链:

ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO: 18)

1.5尤其导致mAb1的hu8G4的生物物理改善策略

[0311] hu8G4的可变区序列的评估鉴定了轻链框架中的六个非种系氨基酸残基和重链框架中的两个非种系氨基酸残基。对可能倾向于翻译后修饰的氨基酸和序列基序,诸如脱酰胺基序、表面可及的蛋氨酸和游离半胱氨酸的评估并未鉴定任何具有提高的易感性(liability)的氨基酸残基。生成了几种设计的抗体序列,其中某些氨基酸被在该位置处的种系相关氨基酸替代。随后使不同的VH和VL优化设计在HEK 293 6E细胞中共表达为Fab和完整IgG1分子,纯化并测试(参见例如下面的优化变体1-10)。

[0312] 完整IgG1形式的10种优化抗体变体的氨基酸序列如下:

变体1(VH1.00/VL1.00)

HC:

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRLTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

LC:

ETTLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 20)

变体2(VH1.00/VL1.01)

HC:SEQ ID NO:19

LC:

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 21)

变体3(VH1.00/VL1.02)

HC:SEQ ID NO:19

LC:SEQ ID NO:14

变体4(VH1.00/VL1.03)

HC:SEQ ID NO:19

LC:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFS
GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22)

变体5(VH1.00/VL1.04)

HC:SEQ ID NO:19

LC:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFS
GSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)

变体6(VH1.02/VL1.00)

HC:

EVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCTVSDGSVS RGGYYLTWIR QHPGKGLEWI GYIYYSGSTY FNPSLRSRVT MSVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCARG IAVAPFDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)

LC:SEQ ID NO:20

变体7(VH1.02/VL1.01)

HC:SEQ ID NO:24

LC:SEQ ID NO:21

变体8(VH1.02/VL1.02)

HC:SEQ ID NO:24

LC:SEQ ID NO:14

变体9(VH1.02/VL1.03)

HC:SEQ ID NO:24

LC:SEQ ID NO:22

变体10(VH1.02/VL1.04)

HC:SEQ ID NO:24

LC:SEQ ID NO:23

[0313] 所有优化的变体1至10在以下方面类似地表现良好:保持如通过尺寸排阻色谱法由聚集百分比测定的质量、保持基于荧光监测的热解折叠(FMTU)的稳定性、保持结合MKN-45癌细胞系和保持对靶标的选择性。作为具有与种系特别相似的序列的优化变体,选择变体8(即包括VH1.02和VL1.02的变体)用于进一步开发。

[0314] 然后对所选变体8进行进一步的序列优化,尤其是为了降低IgG Fc效应功能。与亲本克隆相比,所得最终序列优化的(so)克隆(其命名为so8G4(在本文中也称为mAb1))显示出改善的亲和力和改善的可制造性,并还显示出与Fcγ RI、Fcγ RIIa、Fcγ RIIIa、Fcγ RIIIa/复合物、C1q、Fcγ RIIb和Fcγ RIIIb的减少的结合或不结合,同时保持对CEACAM5和FcRn的亲和力。这种最终序列优化的抗体so8G4(在本文中也称为mAb1)的氨基酸序列如下:

重链(HC):SEQ ID NO:13(如上文中所定义)

轻链(LC):SEQ ID NO:14(如上文中所定义)

1.6mAb1的体外表征

[0315] 用体外测定表征了抗体mAb1的几种特性,包括:结合亲和力、选择性和内化。

1.6.1结合亲和力

[0316] • 为了测定可溶性抗体分析物对捕获的靶蛋白CEACAM5(人或食蟹猴食蟹猕猴)的结合亲和力。在Octet Red仪器上使用以下实验条件:

• 涂覆有链霉抗生物素蛋白的生物传感器。

• 生物素化靶蛋白浓度(其中ECD代表胞外结构域):

○在1000rpm下以2.5μg/ml捕获人_CEACAM5_ECD-his-生物素R&D系统(使用常规方法生物素化)900秒。

○在1000rpm下以5μg/ml捕获获自Syngene的重组食蟹猕猴CEACAM5_ECD-His-生物素(使用常规方法生物素化)900秒。

• 分析物抗体浓度:200、100、50、25、12.5、6.25、0nM。

• 用Octet评估软件由测得的结合动力学缔合(ka)和解离(kd)速率常数确定结合亲和力KD(平衡解离常数)值,其中KD=kd/ka

• 使用Fab形式的抗体

[0317] 由mAb1产生的Fab的结果:

对人CEACAM5的结合亲和力KD为6.3±1.98nM。

对食蟹猴-CEACAM5的结合亲和力KD为14.1±2.53nM。

1.6.2.选择性

a)物种和结构域

[0318] mAb1的选择性测定通过在ELISA测定中滴定4nM至0.25pM的抗体,并将其施加于1μg/ml结合的重组人(rh)CEACAM5 ECD或其结构域N-A1-B1、A2-B2、A3-B3或结合的重组食蟹猕猴(mf)CEACAM5 ECD(均获自Syngene)来进行。结果显示在图1中并概括如下:

对rhCEACAM5的结合EC50为153.4pM。

对rhA2-B2结构域的结合EC50为166.9pM。

对mfCEACAM5的结合EC50为324.3pM。

没有检测到对rhN-A1-B1或rhA3-B3或BSA(牛血清白蛋白,用作阴性对照物)的结合。

b)不同的CEACAM蛋白

[0319] 在ELISA测定中进行mAb1的Fab对人CEACAM5和其它人CEACAM家族成员的选择性测定。将蛋白涂覆在96孔测定板上:huCEACAM5-His6(R&D Systems#4128-CM)、huCEACAM6-His6(3934-CM R&D Systems和获自Syngene的重组蛋白)、huCEACAM1-His6(2244-CM R&D Systems)、huCEACAM3-His6(C449 Novoprotein)、huCEACAM7-His6(C926Novoprotein)、huCEACAM8-His6(C583 Novoprotein)、huPSG1-His6(CC66 Novoprotein),每种蛋白以12nM浓度涂覆板。

结果:

[0320] 在ELISA测定中,mAb1的Fab结合人CEACAM5(EC50为3.04nM),但不结合其它人CEACAM家族成员,即使在使用1000nM的mAb1的Fab(这是结合人CEACAM5的EC50的超过300倍的浓度)时也如此。

[0321] 在ELISA测定中,mAb1的Fab在所有测试浓度下也不结合无关蛋白(BSA)。

1.6.3mAb1的细胞结合

[0322] 通过在表达靶标(例如人CEACAM5)的细胞上滴定抗体并测量该细胞的荧光MFI来测定抗体在细胞上结合其靶蛋白的能力。用于抗体结合比较的模型细胞是表达人CEACAM5的MKN45细胞系以及表达mfCEACAM5的CHO细胞系。滴定以10点×4稀释度进行,测定缓冲液(含有1% BSA的PBS×1)中的曲线起始浓度为2000nM。

[0323] 示例性数据:

mAb1结合表达人CEACAM5的MKN-45细胞系,EC50＝10.62±1.6nM。

mAb1结合表达mfCEACAM5的CHO细胞系,EC50＝4.8±0.6nM。

1.6.4与已知抗体的细胞结合比较

[0324] 在表达CEACAM5的MKN45细胞系上将我们的前导抗体mAb1的细胞结合与ADC相关的已知抗体huMab2-3(如在已知的ADC SAR408701中)和hMN14(在本文中也称为hman-14)(如在已知的ADC戈维替康-拉贝妥珠单抗或IMMU-130中)进行比较。

[0325] 在下文中描述的实验中,以下氨基酸序列用于上述提及的已知抗体:huMab2-3:

HC(同种异型):

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYAPS
TVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)

LC:

DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPSRF
SGSGSGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 26)

hmn-14:

HC:

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPDSSTINY
APSLKDRFTISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27)

LC:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 28)

[0326] 利妥昔单抗包括在比较中作为对照。抗体与细胞结合的结果显示在图2中并概括如下:

mAb1(so8G4)＝8.3nM

huMab2-3＝6nM

hmn-14＝11.8nM

[0327] 几个实验的平均值(EC50)：

mAb1(so8G4)＝10.4nM±1.6nM(n＝12)

huMab2-3＝4.9nM±1.6nM(n＝3)

hmn-14＝16nM(n＝2)

[0328] 抗CEACAM5抗体对MKN45细胞系的细胞结合显示mAb1的结合与已知抗体是相似的。

1.6.5使用Cell Discoverer的内化测定

[0331] ADC的相关特性是其内化到表达靶标的细胞和溶酶体中,并且由此内化是用作ADC的一部分的抗体的相关性质。通过用pH敏感染料(pHrodo)直接标记抗体可以监测抗体内化至晚期核内体和溶酶体(低pH囊泡)中的速率,所述pH敏感染料在激发后在低于6.0的pH下发射强荧光。这种荧光可以在Cell-Discoverer7(Zeiss)中成像,并可以计算内化速率。

[0329] 为了分析几种抗体的内化速率,将MKN45细胞以25,000个细胞/孔接种在96孔、深色、扁平透明底部板(Cellvis)中。用100μl/孔的RMPI-1640+10％ FBS(Thermo)培养细胞过夜。去除细胞培养基,并将细胞用100μl在PBS×1中稀释的10μg/ml Hoechst染料在室温(RT)下在黑暗中染色15min。随后用PBS×1洗涤细胞两次。

[0330] 抗CEACAM5人IgG抗体(so8G4(即mAb1)、humab2-3、hmn-14)和抗MerTK抗体(Merck)用pHrodo直接标记,在不含酚红的温热RPMI1640+10％ FBS中稀释至100nM的浓度并添加到其相应的孔中。将板在Cell Discoverer中在37℃、5％ CO_2下温育20小时,并且每20分钟获取图像,如下文进一步描述的那样。

[0332] pHrodo标记的抗体内化到细胞的晚期核内体和溶酶体中通过Cell-Discoverer7(Zeiss),使用在567nm激发下的荧光和592/25nm发射检测器来成像。细胞核用Hoechst标记,并在385nm激发和425/30nm发射检测器下成像。

[0333] 每20min记录每个孔的荧光,持续20小时。通过Zen SoftwarE(ZEN3.1)和线性回归的Excel分析计算每个细胞的总和荧光强度(SFI)的分析。

[0334] 结果显示在图3及图4中,并且曲线的线性部分的斜率(参见图4)也概括在下表中：

样品	曲线斜率	R^2
so8G4	28519	99.41
so8G4	29844	99.66
so8G4	28513	99.92
humab2-3	19154	99.42
humab2-3	17398	99.19
humab2-3	20201	99.68
hmn-14	24350	98.61
hmn-14	18754	99.56
hmn-14	23701	99.58

结论：

[0335] 1.so8G4(mAb1)具有高于humab2-3(18917±1416)和hmn-14(22268±3060)的平均结合速率(28958±766)。

[0336] 2.与humab2-3和hmn-14相比,so8G4(mAb1)还具有更高的内化强度。

[0337] 3.预期mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb6-M和mAb7-M显示与mAb1相对应的内化性质。

1.7产生mAb1(例如用于与药物-接头化合物缀合的mAb1)的示例性方法

[0338] 抗CEACAM5抗体mAb1在重组CHO-K1Sv细胞系中产生。细胞培养以分批模式在2001一次性生物反应器中进行。细胞在补充有葡萄糖的专有CHO分批补料生长培养基中在37℃下生长。在接种后第3、5、7和10天用专有补料组分的混合物对培养物进行补料。

[0339] 使用3×1.1m^2 Millistak+Pod DOHC(Millipore MDOHC10FS1)和1.1m^2 Millistak+Pod XOHC(Millipore#MXOHC01 FS1)过滤器净化来自生物反应器运行的粗调整培养基,接着用Millipore Opticap XL3 0.5/0.2μm过滤器(Millipore#KHGES03HH3)进行最终过滤。

[0340] 在净化后,使用标准抗体纯化方法纯化抗体mAb1,所述方法由蛋白A捕获步骤和离子交换色谱步骤组成。抗CEACAM5抗体mAb1用作产生ADC分子的中间体。

1.8mAb1的人/兔嵌合变体的表达和纯化及其在甲醛固定和石蜡包埋的细胞系和人肿瘤组织上的免疫组织化学(IHC)中的用途

[0341] 通过常规重组方法产生mAb1的人/兔嵌合变体。mAb1的人/兔嵌合变体(在本文中也称为“rb8G4”)具有以下氨基酸序列：

重链

EVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSDGSVSRGGYYLTWIRQHPGKGLEWIGYIYYSGSTYFN
PSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAPFDYWGQGTLVTVSSQPKA
PSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSS
VVSVTSSSQPVTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLRG
KEFKCKVHNKALPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISV
EWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQ
KSISRSPGK (SEQ ID NO: 29)

轻链

EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRTSQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGIPARFSG
SGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYTNWPFTFGPGTKVDIKRDPVAPSVLLFPPSKEELTT
GTATIVCVANKFYPSDITVTWKVDGTTQQSGIENSKTPQSPEDNTYSLSSTLSLTSAQYNSHS
VYTCEVVQGSASPIVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 30)

[0342] 抗体rb8G4通过瞬时转染在HEK细胞(Expi 293悬浮细胞)中表达,并使用MabSelect SuRe和柠檬酸盐缓冲液纯化。rb8G4随后用于甲醛固定的和石蜡包埋的细胞系和人肿瘤组织上的IHC：

材料和方法

细胞系和组织从Merck细胞库培养人癌细胞系,在4%缓冲的甲醛中固定,并包埋在石蜡中(FFPE)。将石蜡包埋的细胞系排列成细胞系微阵列(CMA)(Zytomed)。具有人器官的组织微阵列(TMA)的FFPE组织切片来自amsbio(FDAStandard Tissue Array,T8234701)。

FFPE人肿瘤样品由BioIVT和Indivumed GmbH提供。

方法

[0343] 对于用抗CEACAM-5抗体rb8G4进行IHC染色,将来自甲醛固定石蜡包埋(FFPE)癌细胞系微阵列(CMA)和人肿瘤组织的4μm切片固定在带电载玻片(SuperFrost Ultra Plus,Thermo Fisher Scientific或TOMO,Matsunami)上。使用Discovery XT(Roche Diagnostics)染色平台进行染色程序。在脱蜡后,在Tris-EDTA缓冲液pH 8(CC1,Roche Diagnostics)中加热切片用于表位修复。切片与在磷酸盐缓冲盐水(PBS)或抗体稀释缓冲液(DCS)中稀释至0.5或0.7μg/ml的单克隆一抗rb8G4一起温育。克隆DA1E(兔单克隆IgG,NEB)用作同种型对照抗体。一抗之后是HQ抗兔IgG检测试剂盒(Roche Diagnostics)。载玻片用苏木精复染,在自来水中洗涤,脱水,并在Entellan Neu(VWR)永久性封片剂中固定在玻璃盖玻片上。

[0344] 将CMA和具有人器官组织的TMA染色,并用NanoZoomeR(Hamamatsu)以0.46μm/像素的分辨率扫描。将人肿瘤切片染色并使用AxioScan.Z1(Zeiss)仪器,以0.44μm/像素的分辨率扫描。CMA的扫描用图象分析软件HALO(Indica Labs,USA)进行分析。为了确定存在的抗原量,阳性棕色染色面积计算为活组织面积的面积百分比。染色(任意单位)计算为抗体染色(AU)＝%阳性组织面积*棕色的平均光密度(OD范围为0至1)。抗体染色的最大值是100＝100%的组织区域为黑色(灰度OD值为1)。

[0345] 癌细胞系的CEACAM-5mRNA数据获自Cancer Cell Line EncyclopediA(CCLE;Broad Institute of MIT&Harvard)。

结果

癌细胞系和人正常组织的验证

[0346] 抗体rb8G4在FFPE癌细胞系上显示出在细胞质和质膜中的信号(图5)。

[0347] 通过比较104个癌细胞系的染色信号与这些细胞系的mRNA表达(CCLE数据集)显示了抗体rb8G4对FFPE组织/细胞的特异性。所得皮尔逊相关系数r＝0.88支持了抗体rb8G4(也称为SO8G4AB323)在FFPE组织/细胞中检测CEACAM-5表位的结论(图6)。该癌细胞系微阵列和单独选择的阳性和阴性细胞系在对人正常和肿瘤组织的染色操作中用作对照矩阵。

[0348] 在正常人体组织中用抗体rb8G4染色(图7)与CEACAM-5mRNA表达(图8)(来源:http://www.proteinatlas.org/ENSG00000105388-CEACAM5/tissue)一致,进一步支持了抗体对CEACAM-5的特异性。

人肿瘤组织

[0349] 如结肠直肠癌(图9)、胃癌(图10)、食管癌(图11)和非小细胞肺癌(图12)中显示的那样,抗体rb8G4在若干种人肿瘤适应症中染色呈阳性。信号定位在细胞质中和质膜处。

1.9使用mAb1和rb8G4的流式细胞术和蛋白印迹

[0350] 比较mAb1、rb8G4和市售可得的抗CEACAM5抗体对CEACAM5阳性和阴性细胞系的结合。

[0351] 所用方法:在5ml聚苯乙烯管中,将5E5至1E6细胞用于使用BD FACSCanto II(BD Biosciences)的流式细胞术分析。在50μL1% PBS/BSA中在4℃下进行用10μg/mL一抗(mAb1、rb8G4、小鼠单克隆Agilent Dako#M7072克隆#IL7)和相应的荧光标记二抗(驴抗人IgG Jackson-Dianova#709-116-149;驴抗小鼠IgG Jackson ImmunoResearch#715-116-

150;驴抗兔IgG Jackson-Dianova#711-116-152)的染色,持续20-30min。在染色步骤之间和之后,用1% PBS/BSA将细胞洗涤三次并重新悬浮在500μL 1% PBS/BSA(包含用于活细胞门控的0.2μg/mL DAPI)中用于流式细胞术分析。为了数据评估,使用FlowJo软件(BD Biosciences)。

[0352] 结果:mAb1和rb8G4显示出仅对应于CEACAM5阳性细胞系上的mRNA表达水平数据的结合(下表1;MKN-45,NCI-H441)。相比之下,对于商业抗体,结合较弱且限于高CEACAM5细胞系(下表1;MKN-45)。总之,mAb1和rb8G4特异性检测CEACAM5阳性癌细胞,并可用作检测剂。

细胞系	MAB1	RB8G4	AGILENT/DAKO M7072 克隆 IL7
MKN-45	23.2	36.2	3.8
NCI-H441	2.2	3.2	1.1
A549	1.1	1.1	1.0
MDA-MB-468	1.1	1.0	1.0

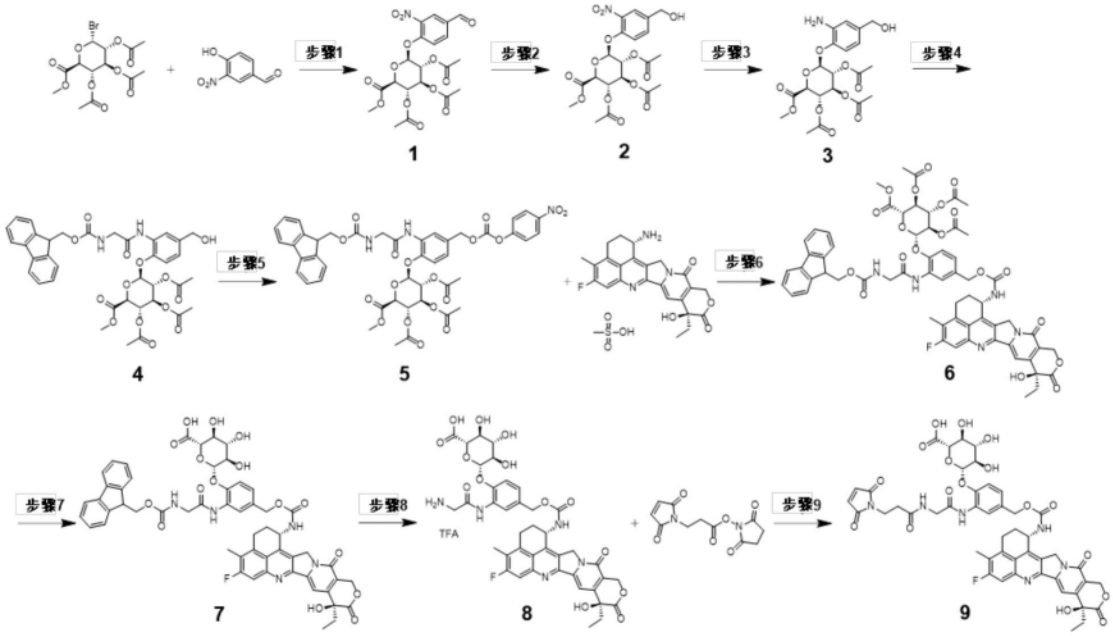
表1.不同抗体对CEACAM5阳性及CEACAM5阴性细胞系的结合。每个细胞系列举相应抗体的中值荧光强度(MFI)除以仅二抗对照的MFI的商。

[0353] 还通过蛋白印迹研究了人mAb1和rb8G4对CEACAM5阳性和阴性细胞系裂解物的结合。

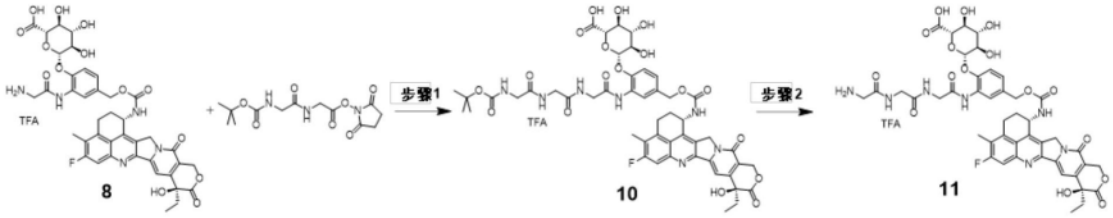
[0354] 所用方法:根据标准方案(Sambrook,J.&Russell,D.W.,2001.molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1卷,CSHL Press)进行蛋白印迹。对于SDS-PAGE和随后的膜湿印迹,每个泳道装载通过BCA试剂盒(Thermo Scientific,#23227)定量的RIPA细胞裂解物的15μg总蛋白。在标准电泳池(Bio-Rad,#1656001)中使用利用MOPS电泳缓冲液(Bio-Rad,#1610788)的标准XT 4-12%凝胶(Bio-Rad,#3450125)。通过丽春红染色证实蛋白的转移。在进行用0.5μg/mL至1μg/mL的一抗(mAb1或rb8G4)和二抗(抗人IgG,Jackson ImmunoResearch#109-035-098或抗兔IgG,CellSignaling#7074)的染色之前和所述染色之间对膜进行洗涤。使用Fusion FX成像系统(Vilber),通过ECL检测试剂使染色的膜可视化。

[0355] 结果显示在图13A和图13B中:两种抗体均以对应于高度糖基化的CEACAM5的预期迁移速度的类似模式结合。mAb1(图13A)和rb8G4(图13B)的CEACAM5检测对CEACAM5阳性细胞系具有特异性,且强度与mRNA表达水平相关。以较低强度观察到的第二条带对应于先前描述的潜在第二亚型(Hatakeyama等人:Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic,gastric and colorectal cancer cells.BMC Research Notes 2013 6:381)。

实施例2:合成具有基于葡糖苷酸的接头的药物-接头化合物:药物-接头化合物1(DL1)和药物-接头化合物1-M(DL1-M)



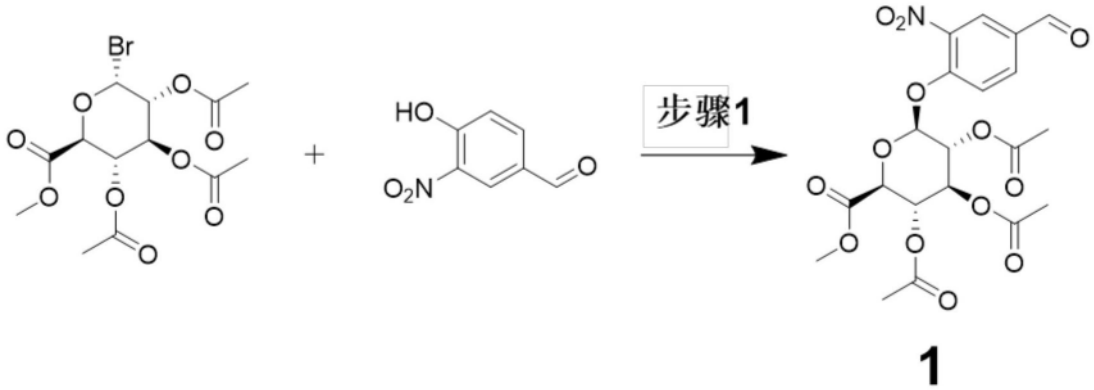
[0356] 到化合物9(在本文中也称为药物-接头化合物1(DL1))的合成途径



[0357] 到化合物11(在本文中也称为药物-接头化合物1-M(DL1-M))的合成途径

到化合物9的化学制备的方案

步骤1:化合物1



[0358] 向(2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-三乙酰氧基-6-溴-四氢-吡喃-2-甲酸甲酯(8.30g;20.90毫摩尔;1.00当量)和4-羟基-3-硝基-苯甲醛(5.24g;31.35毫摩尔;1.50当量)在乙腈(83.00ml;10.00V)中的搅拌溶液中加入氧化银(I)(9.69g;41.80毫摩尔;2.00当量)。反应混合物在室温下搅拌16小时。反应混合物经硅藻土过滤。滤液在真空下浓缩以获得固体。将固体溶解在EtOAc中并用$NaHCO_3$的10%水溶液洗涤以去除过量的4-羟基-3-硝基-苯甲醛。有机层在真空下浓缩以获得作为沙色固体的化合物1。

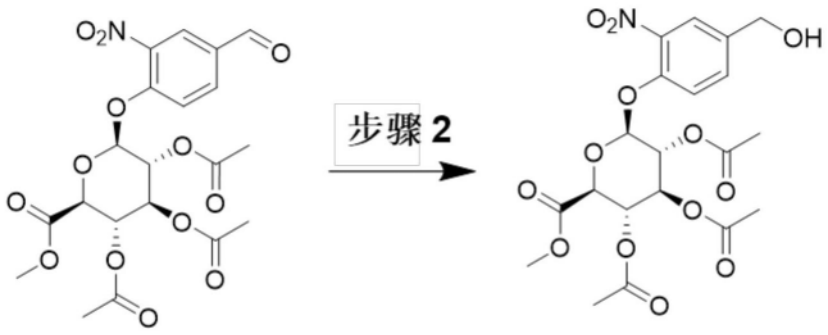
产量:9.0g

百分比产率:89.1%

分析数据:

NMR:^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d6):9.98(s,1H),8.46(s,1H),8.25-8.21(m,1H),7.64(d,J=11.60Hz,1H),5.94(d,J=10.00Hz,1H),5.51-5.44(m,1H),5.20-5.09(m,2H),4.80(d,J=13.20Hz,1H),3.64(s,3H),2.09(s,9H).

步骤2:化合物2



1 2

[0359] 向化合物1(9.00g;18.62毫摩尔;1.00当量)在丙烷-2-醇(33.00ml;3.67V)和$CHCl_3$(167.00ml;18.56V)中的搅拌溶液中加入硅胶60-120(3.60g;112.09毫摩尔;6.02当量),接着加入硼氢化钠(1.80g;46.55毫摩尔;2.50当量)。反应混合物在室温下搅拌1小时。完成后,反应混合物用冷却的H_2O猝灭并经硅藻土过滤。滤液用二氯甲烷萃取并经Na_2SO_4干燥。将溶剂浓缩以获得作为灰白色粉末的化合物2。

产量:8.70g

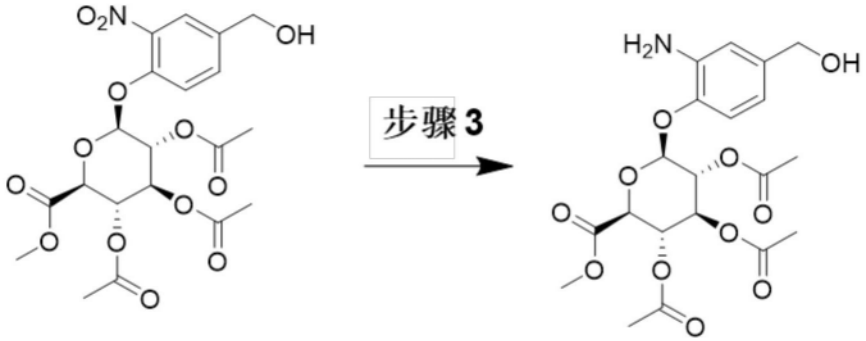
百分比产率:92.4%

分析数据

LCMS:柱:ATLANTIS dC18(50×4.6mm)5μm;流动相A:H_2O中的0.1% HCOOH:ACN(95:5);B:ACN

RT(min):2.05;M+H:503.2,纯度:96.6%

步骤3:化合物3



2 3

[0360] 向化合物2(8.70g;17.21毫摩尔;1.00当量)在乙酸乙酯(100.00ml;11.49V)和THF(100.00ml;11.49V)中的搅拌溶液中加入钯碳(10%w/w)(2.50g;2.35毫摩尔;0.14当量)。反应混合物在氢气氛下在室温下搅拌3小时。完成后,反应混合物经硅藻土过滤。将溶剂在真空下浓缩以获得作为灰白色固体的化合物3。

产量:8.5g

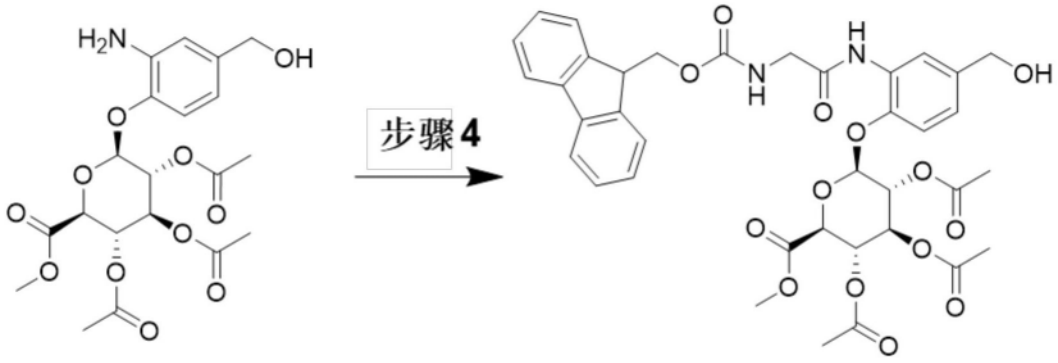
百分比产率:100%

分析数据:

LCMS:柱:ATLANTIS dC18(50×4.6mm)5μm;流动相A:H_2O中的0.1% HCOOH:ACN(95:5);B:ACN

RT(min):1.73;M+H:456.10,纯度:95.1%

步骤4:化合物4



3 4

[0361] 在0℃下向化合物3(10.00g;20.89毫摩尔;1.00当量)和(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-乙酸(7.60g;25.06毫摩尔;1.20当量)在DCM(250.00ml;25.00V)中的搅拌溶液中加入2-乙氧基-2H-喹啉-1-甲酸乙酯(15.65g;62.66毫摩尔;3.00当量)。反应混合物在室温下搅拌16小时。完成后,在减压下去除溶剂以获得粗产物。粗产物通过柱色谱法(56% EtOAc:石油醚)纯化以获得纯度80%的化合物。该化合物通过用30% EtOAc和石油醚洗涤进一步纯化以获得作为白色固体的化合物4。

产量:8.5g

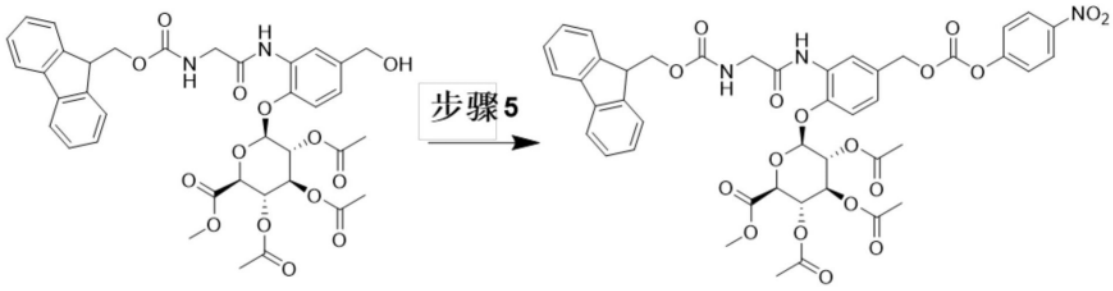
百分比产率:50.7%

分析数据:

LCMS:柱:ATLANTIS dC18(50×4.6mm)5μm;流动相A:H_2O中的0.1% HCOOH:ACN(95:5);B:ACN

RT(min):3.03;M+H:735.2,纯度:81.9%

步骤5:化合物5



4 5

[0362] 在0℃下向化合物4(2.00g;2.49毫摩尔;1.00当量)在THF(40.00ml;20.00V)中的搅拌溶液中加入碳酸双-(4-硝基-苯基)酯(3.06g;9.97毫摩尔;4.00当量)和DIPEA

(4.40ml;24.92毫摩尔;10.00当量)。反应混合物在室温下搅拌12小时。反应完成后,反应混合物在真空下浓缩。粗产物通过柱色谱法,使用硅胶(230-400)和作为洗脱液的石油醚/乙酸乙酯纯化以获得作为淡黄色固体的化合物5。

产量:2.0g

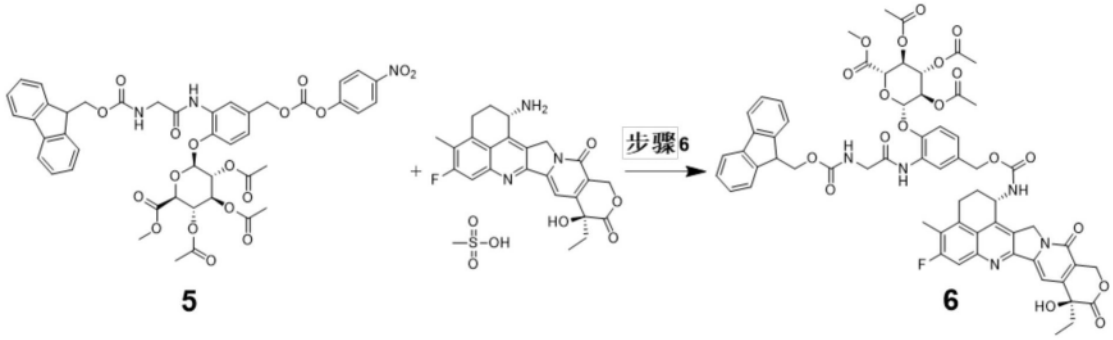
百分比产率:84.6%

分析数据:

LCMS:柱:X-Bridge C8(50×4.6)mm,3.5μm;流动相A:MilliQ水中的0.1% TFA;B:ACN

RT(min):3.24;M+H:900.20,纯度:94.9%

步骤6:化合物6



5 6

[0363] 将化合物5(1,369g;1,00当量)溶解在N,N-二甲基甲酰胺(15,00ml)中,加入甲磺酸依沙替康(679,7mg;1,00当量)、用于合成的4-甲基吗啉(0,422ml;3,00当量)和1-羟基苯并三唑(172,8mg;1,00当量)。反应混合物在室温下搅拌过夜。在搅拌时间后,反应悬浮液变为棕色溶液。通过LC-MS(其显示原材料的完全转化)监测反应。反应混合物经RP快速色谱法纯化。将含有产物的级分合并,在真空中浓缩并冻干过夜以获得作为黄色固体的化合物6。

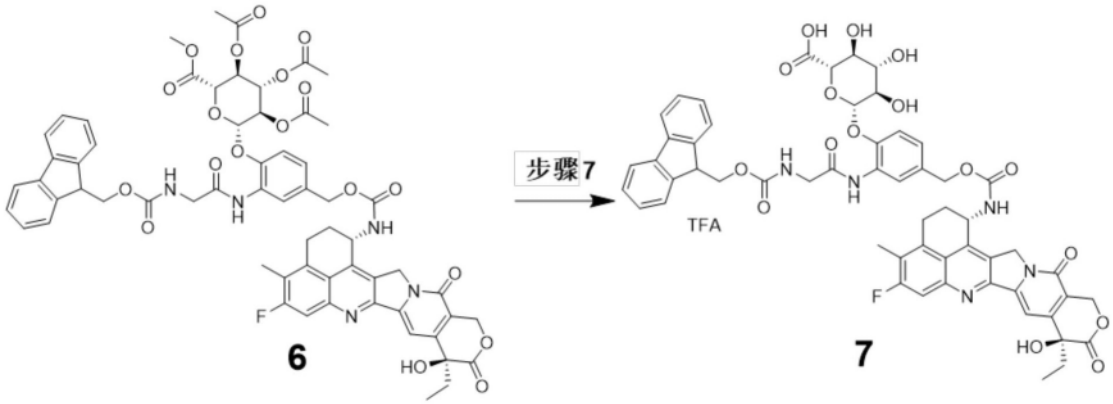
产量:1.59g

百分比产率:87.5%

分析数据:

LCMS:柱:Chromolith HR RP-18e(50-4,6mm);流动相A:H_2O中的0.05% HCOOH;B:ACN中的0.04% HCOOH和1% H_2O;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000,amu阳性;1%->100% B:0->2,0min;100% B:2,0->2,5min RT(min):1.95;M+H:1196.40,纯度:84.4%

步骤7:化合物7



6 7

[0364] 将化合物6(1,586g;1,00当量)溶解在四氢呋喃(50,00ml)中,并在0℃下逐滴添加

LiOH溶液(0.1M)(含有在水(67,100ml)中的氢氧化锂水合物(281,77mg;6,00当量)。在添加期间检查pH值。pH不应超过10。1.5小时后完成LiOH溶液的添加。通过LC-MS(其显示原材料的完全转化)监测反应。将反应用柠檬酸溶液猝灭,pH调节至5。反应混合物在减压下浓缩。粗品通过制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并并冻干以获得作为深黄色固体的化合物7。

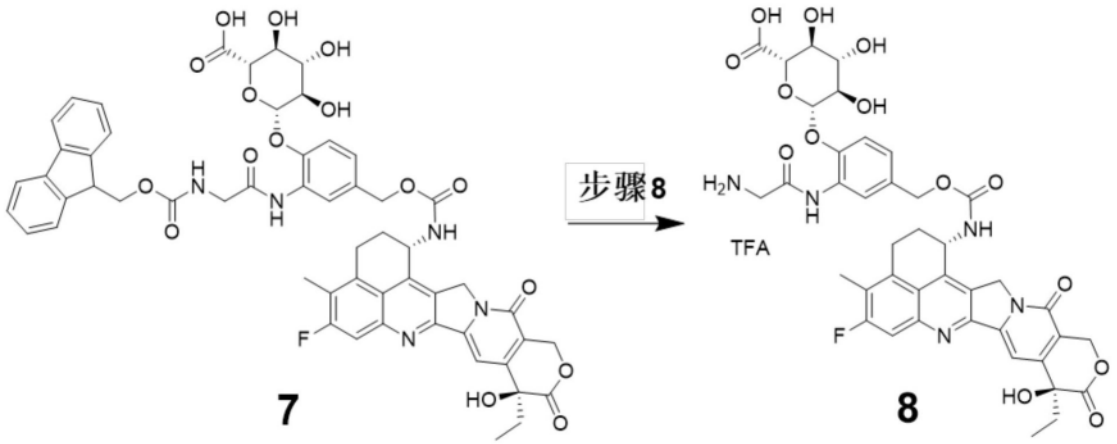
产量:728mg

百分比产率:54.8%

分析数据:

LCMS:柱:Chromolith HR RP-18e(50-4,6mm);流动相A:H_2O中的0.05% HCOOH;B:ACN中的0.04% HCOOH和1% H_2O;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000,amu阳性;1%->100% B:0->2,0min;100% B:2,0->2,5min RT(min):1.68;M+H:1056.30,纯度:98.5%。

步骤8:化合物8



[0365] 将化合物7(728,000mg;1,00当量)溶解在N,N-二甲基甲酰胺(20,00ml)中。加入哌啶(136,513μl;2,00当量),并将溶液在室温下搅拌总共4小时。通过LC-MS(其显示原材料的完全转化)监测反应。反应混合物在减压下浓缩,并将粗产物通过RP快速色谱法纯化。将含有产物的级分合并,部分去除溶剂,并将其冻干过夜以获得作为黄色固体的化合物8。

产量:706mg

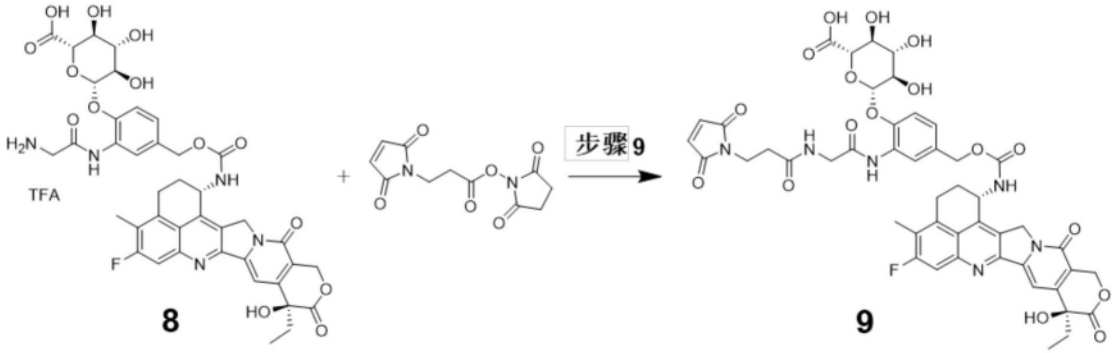
百分比产率:100%

分析数据:

LCMS:柱:Chromolith HR RP-18e(50-4,6mm);流动相A:H_2O中的0.05% HCOOH;B:ACN中的0.04% HCOOH和1% H_2O;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000,amu阳性;1%->100% B:0->2,0min;100% B:2,0->2,5min

RT(min):1.22;M+H:834.30,纯度:97.6%。

步骤9:化合物9



[0366] 向化合物8(854mg;1,00当量)在二甲基甲酰胺(30,00ml)中的溶液中加入N-乙基二异丙胺(149,234μl;1,00当量)和3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-吡咯-1-基)-丙酸2,5-二氧代-吡咯烷-1-基酯(233,61mg;1,00当量)。反应混合物在室温下搅拌3小时。通过LC-MS(其显示原材料的完全转化)监测反应。反应混合物在减压下浓缩,并将粗产物通过RP快速色谱法纯化。将含有产物的级分合并,浓缩并冻干以获得纯度为91%的所需产物。该材料再次通过RP色谱法纯化以获得作为黄色固体的化合物9。

产量:580mg

百分比产率:60.1%

分析数据:

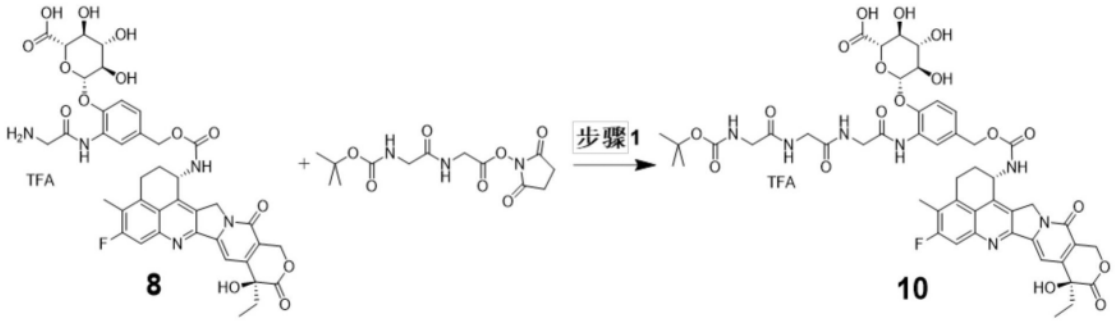
LCMS:柱:Chromolith HR RP-18e(50-4,6mm);流动相A:H_2O中的0.05% HCOOH;B:ACN中的0.04% HCOOH和1% H_2O;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000,amu阳性;1%->100% B:0->2,0min;100% B:2,0->2,5min

RT(min):1.38;M+H:985.30,纯度:90%(另外10%的异构体可通过HPLC去除)

^1H NMR(500MHz,DMSO-d_6)δ13.10-12.44(m,1H),9.08(s,1H),8.32(t,J=5.8Hz,1H),8.16(s,1H),8.02(d,J=8.8Hz,1H),7.76(d,J=10.9Hz,1H),7.31(s,1H),7.15-7.09(m,2H),6.98(s,2H),5.48-5.38(m,2H),5.32-5.22(m,3H),5.11-5.01(m,2H),4.87(d,J=7.6Hz,1H),3.92-3.88(m,1H),3.89-3.84(m,2H),3.65-3.61(m,2H),3.46-3.41(m,1H),3.42-3.37(m,1H),3.38-3.31(m,1H),3.28-3.20(m,1H),3.15-3.07(m,1H),2.48-2.44(m,2H),2.38(s,3H),2.24-2.13(m,2H),1.94-1.80(m,2H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

到化合物11的化学制备的方案

步骤1:化合物10



[0367] 向化合物8(289.00mg;1.00当量)在二甲基甲酰胺(10.00ml)中的溶液中加入N-乙基二异丙胺(0.104ml,2.00当量)和(叔丁氧基羰基)甘氨酰甘氨酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯(105.70mg;1.00当量)。反应混合物在室温下搅拌1小时,并通过LC-MS监测反应。完成后,

在真空中去除溶剂,并将粗产物通过制备型HPLC在Sunfire柱上纯化。将含有产物的级分合并并冻干以获得作为黄色固体的化合物10三氟乙酸盐。

产量:162.00mg,0.14mmol

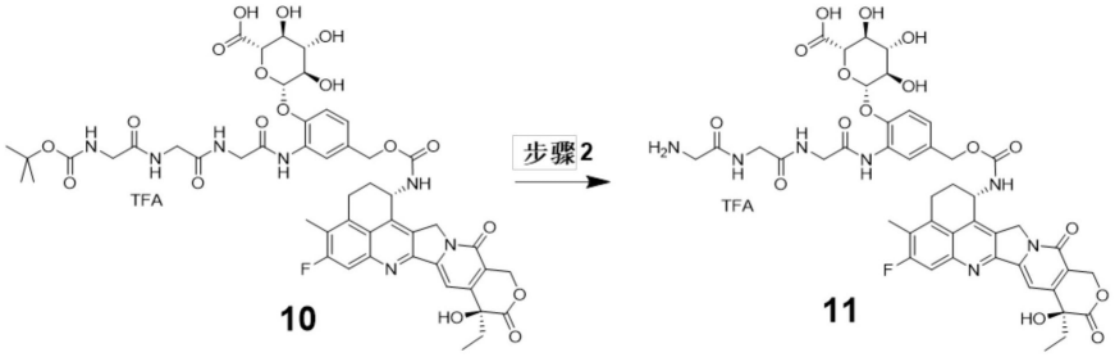
百分比产率:44.8%

分析数据:

LCMS:柱:Chromolith HR RP-18e(50-4,6mm);流动相A:H_2O中的0.05% HCOOH;B:ACN中的0.04% HCOOH和1% H_2O;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000,amu阳性;1%->100% B:0->2,0min;100% B:2,0->2,5min

RT(min):1.41;M+H:1048.1,纯度:97.9%

步骤2:化合物11



[0368] 向化合物10(162.00mg;1.00当量)在二氯甲烷(5.00ml)中的悬浮液中加入4.0M氯化氢在1,4-二氧杂环己烷中的溶液(682.43μl;20.00当量),并将其在室温下搅拌3.5小时,并通过LC-MS监测反应。完成后,在真空中浓缩反应混合物,并将粗产物通过制备HPLC纯化。将含有产物的级分合并并冻干以获得作为黄色固体的化合物11三氟乙酸盐。

产量:113mg;0.11mmol

百分比产量:77.0%

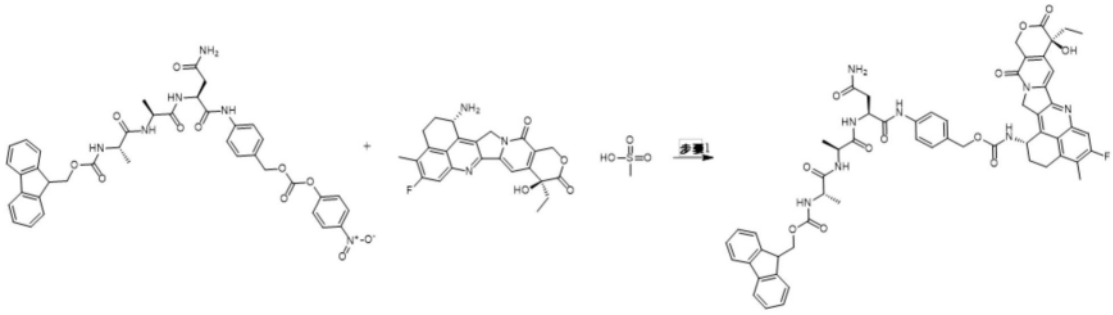
分析数据:

LCMS:柱:Chromolith HR RP-18e(50-4,6mm);流动相A:H_2O中的0.05% HCOOH;B:ACN中的0.04% HCOOH和1% H_2O;T:40℃;流速:3,3ml/min;MS:100-2000,amu阳性;1%->100% B:0->2,0min;100% B:2,0->2,5min

RT(min):1.22;M+H:948.0,M+2H:474.8;Purity:98.8%

^{1}H NMR(700MHz,DMSO-d6)δ12.93-12.79(m,1H),9.14(s,1H),8.61(t,J=5.8Hz,1H),8.41(t,J=5.9Hz,1H),8.14(s,1H),8.05(d,J=8.8Hz,1H),8.03-7.93(m,3H),7.79(d,J=10.8Hz,1H),7.31(s,1H),7.13(s,2H),6.58-6.47(m,1H),5.80-5.61(m,1H),5.48-5.40(m,2H),5.31-5.24(m,3H),5.08(d,J=12.2Hz,1H),5.03(d,J=12.3Hz,1H),4.91(d,J=7.7Hz,1H),3.96(d,J=5.8Hz,2H),3.95-3.86(m,3H),3.62(q,J=5.8Hz,2H),3.43(t,J=9.3Hz,1H),3.41(t,J=8.5Hz,1H),3.35(t,J=9.0Hz,1H),3.27-3.20(m,1H),3.15-3.09(m,1H),2.38(s,3H),2.23-2.13(m,2H),1.93-1.81(m,2H),0.88(t,J=7.3Hz,3H)。

实施例3:合成具有天冬酰胺内肽酶-可裂解接头的药物-接头化合物:药物-接头化合物2(DL2)



步骤1

将4-硝基苯基碳酸{4-[(2S)-3-氨基甲酰基-2-[(2S)-2-[(2S)-2-({[(9H-芴-9-基)甲氧基]羰基}氨基)丙酰胺基]丙酰胺基]丙酰胺基]苯基}甲酯(400mg;0,52毫摩尔;1,00当量)[可商购获得自Levena Biopharma US]溶解在N,N-二甲基甲酰胺(5,00ml)中。加入甲磺酸依沙替康(277,30mg;0,52毫摩尔;1,00当量)、N-乙基二异丙胺(0,27ml;1,57毫摩尔;3,00当量)和1-羟基苯并三唑(HOBT)(3,52mg;0,03毫摩尔;0,05当量)。反应混合物在室温下搅拌过夜。LC/MS指示完全转化。

[0369] 粗反应混合物经由制备HPLC纯化并冻干,获得365mg(0.343毫摩尔)的((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-氨基-1-((4-(((((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[脱]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1,4-二氧代丁烷-2-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯

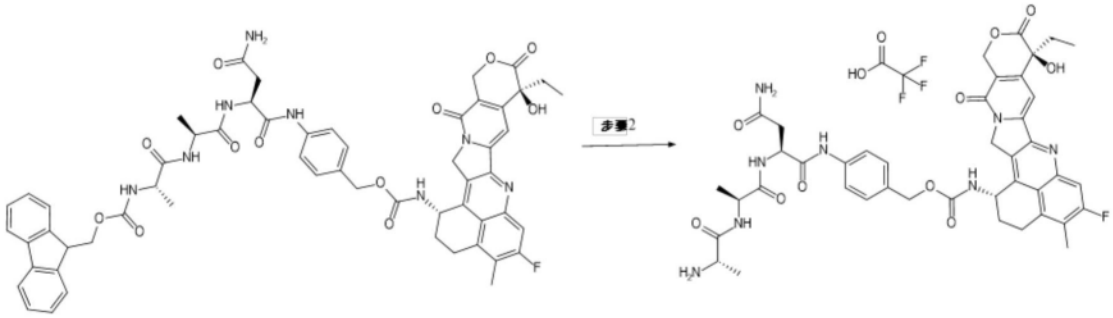
LC/MS:[M+H]＝1064.2

制备HPLC:

柱:sunfire prep c18 obd-75.0g(250bar)

溶剂A:Wasser 0.1%TFA 溶剂C:

溶剂B:乙腈0.1%TFA



步骤2

将((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-氨基-1-((4-(((((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[脱]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1,4-二氧代丁烷-2-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(365mg;0,34毫摩尔;1,00当量)溶解在N,N-(4,00ml)中。加入用于合成的哌啶(0,07ml;0,69毫摩尔;2,00当量),并将反应溶液在室温下搅拌1小时。

[0370] 反应混合物经由制备HPLC纯化,产生300mg(0.314毫摩尔)的((1S,9S)-9-乙基-5-

氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[脱]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸4-((S)-4-氨基-2-((S)-2-((S)-2-氨基丙酰胺基)丙酰胺基)-4-氧代丁酰胺基)苄酯。

[0371] LC/MS:[M+H]:841.3

用于纯化的制备HPLC:

RediSep Säule:C18 130g

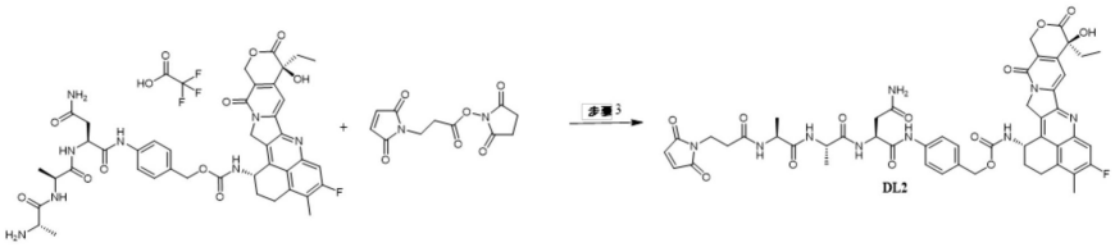
SN:E0410A0D24BE1批号:262118923W

流速:75ml/min

条件——体积:390,0ml

洗脱剂:A1水0.1%TFA

洗脱剂:B1乙腈0.1%TFA



步骤3

向((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[脱]吡喃并[3',4':6,7]吲嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基甲酸4-((S)-4-氨基-2-((S)-2-((S)-2-氨基丙酰胺基)丙酰胺基)-4-氧代丁酰胺基)苄酯(571mg;0,60毫摩尔;1,00当量)在N,N-二甲基甲酰胺(20ml)中的溶液中加入N-乙基二异丙胺(203µl;1,20毫摩尔;2,00当量)和3-马来酰亚胺基丙酸N-琥珀酰亚胺酯(162mg;0,60毫摩尔;1,00当量)。反应混合物随后搅拌10min并经由LC/MS监测。

[0372] 反应混合物经由制备HPLC纯化,获得378mg(0.35毫摩尔)的DL2。

[0373] LC/MS:[M+H]:992.4

用于纯化的制备HPLC:

RediSep柱:C18 86g

SN:E0410A8B46130批号:281729189W

流速:60ml/min

条件——体积:264,0ml

洗脱剂1:A1水0.1%TFA

洗脱剂2:B1乙腈0.1%TFA

序列分析:

方法信息:A:H_2O+0,05% HCOOH|B:MeCN+0,04% HCOOH+1% H_2O T:40℃|流速:3,3ml/min|MS:100-2000amu阳性

柱:Chromolith HR RP-18e 50-4,6mm0%->100% B:0->2,0min|100% B:2,0->2,5min

实施例4:制备免疫缀合物:mAb1的基于葡糖苷酸的缀合物(称为ADC1)和mAb1-M(所得免疫缀合物被称为ADC1-M)、mAb4-M(所得免疫缀合物被称为ADC4-M)和mAb6-M(所得

免疫缀合物被称为ADC6-M)的基于葡糖苷酸的缀合物尽管在mAb1(所得免疫缀合物被称为ADC1)的语境下描述以下方法,相同的方法也可用于mAb1-M(所得免疫缀合物被称为ADC1-M)、mAb4-M(所得免疫缀合物被称为ADC4-M)和mAb6-M(所得免疫缀合物被称为ADC6-M)。

4.1缀合方法

抗体制备

[0374] 在缀合前将抗体mAb1(如上文中所定义)在2-8℃下解冻最多3天,并在2-8℃下储存直至使用。在使用前,在缀合当天,将mAb(>10g)在室温下平衡。将mAb(9.6mg/ml)等分(10.0g,1041.7ml)并使用缀合缓冲液(200mM组氨酸,pH 6.5)稀释至5.59mg/ml。将mAb溶液添加到3L Chemglass夹套反应器中并设定为25±2℃,同时在50rpm下搅拌。

抗体的还原

[0375] 将7.0摩尔当量(9.7ml)的50mM TCEP溶液(在缀合缓冲液中的50mM TCEP)添加到mAb溶液小瓶中,并使反应在25±2℃下进行3小时。

缀合

[0376] 称量式(X)的药物-接头化合物1(DL1)并溶解在DMSO中以制备20mM溶液。将90%(148.6ml)的所需DMSO添加到反应器中。在加入DMSO后立即将10.0摩尔当量(38.2ml)的20mM药物-接头溶液添加到反应器中。随后,使用10%(18.2ml)的剩余的所需DMSO冲洗药物-接头小瓶以确保完全转移。在最终添加后,使反应在25±2℃下进行1小时。缀合期间的总体积为1997.0ml。

注意:反应的总DMSO浓度为10%(v/v)(DMSO+药物接头溶液)。

猝灭

[0377] 向反应器中加入35摩尔当量(48.5ml)的50mM NAC,并使反应在25±2℃下进行30分钟。

过滤

[0378] 将过滤的粗品缀合物溶液从反应器中转移并随后使用Millipak Gamma Gold 60(MPGL06GH2)过滤以获得1993.6ml(过滤器负载:324.7g/m^2[蛋白],66.5L/m^2[溶液])的过滤的粗品缀合物。

渗滤

[0379] 用Pellicon 3(30kDa)Biomax膜(1×0.11m^2,300LMH(550mL/min),16psi TMP,实际负载88.5g/m^2)对过滤的粗品缀合物溶液进行缓冲液交换(DV=1993.6mL)。渗滤缓冲液(10mM组氨酸,pH 5.5)用于将粗品缀合物缓冲液交换16个渗滤体积。在缓冲液交换后,将溶液浓缩至≥25mg/ml,转移到瓶中,并用渗滤缓冲液冲洗膜。从UF/DF回收的总体积为361.5ml。

配制

[0380] 用112.1ml的渗滤缓冲液(10mM组氨酸,pH 5.5)将浓缩的ADC(即ADC1)稀释至20.0mg/ml。用157.6ml的4×配制缓冲液(10mM组氨酸,12%(w/v)海藻糖二水合物,400mM NaCl,pH 5.5)将所得溶液稀释至15.0mg/ml,使最终目标原料药(BDS)浓度为15.0mg/ml。

过滤

[0381] 使用0.2μm Millipak Gamma Gold 40(MPGL04GH2)过滤器过滤最终配制的ADC以获得619.6ml(过滤器负载:464.6g/m^2[蛋白],31.0L/m^2[溶液])的ADC1 BDS。将该材料包装

到HDPE瓶中并在≤-65℃下储存。

4.2方法:药物物质表征:ADC1

[0382] 尺寸排阻色谱法(SEC)方法

SEC方法参数

波长 280nm

柱 Tosoh TSKgel 7.8mm×300mm,5μm(P/N 0008541)

流动相0.14M磷酸二氢钾

50mM磷酸二氢钠

0.06M磷酸氢二钾

0.25M氯化钾

5%IPA

注射体积 20μL

温度 25℃

流速 0.5mL/min

运行时间 30min

显示储备mAb、UF后缀合物和最终BDS的纯度的典型SEC色谱图:图14。

[0383] 对于上面显示的BDS材料,已经报道了1.7% HMWS和96.9%的单体纯度。

[0384] 反相HPLC(RP HPLC)方法

RP HPLC方法参数

波长 280nm

柱 PLRP-S1000 Å(50×2.1mm,8μm)柱,Agilent(P/N PL1912-1802)

流动相A含有0.01% TFA的水中的0.1%甲酸

流动相B含有0.01%TFA的ACN中的0.1%甲酸

梯度

时间 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	80	20
3.00	80	20
20.00	0	100
22.00	80	20
26.00	0	100
4 min平衡至80% A和20% B		

注射体积 10μL

柱温度 80℃

流速 1.0mL/min

运行时间 30min

样品制备 将样品稀释至2mg/ml,并将40μL加入到微量离心管中。加入60μL的~8M盐酸胍,~130mM Tris,~1mM EDTA,pH 7.6缓冲液。加入2μL的500mM DTT并涡旋混合。在37

±2℃下温育样品30±2分钟。

[0385] 显示轻链和重链的分离的典型RP-HPLC色谱图:图15。该色谱图显示了储备mAb、粗品ADC和最终BDS的重叠。

[0386] 对于上述ADC1 BDS材料,报道了7.9的DAR。

游离药物方法

游离药物方法参数

波长 254nm

柱 Phenomenex Gemini,C18,2×150mm,3μm(P/N 00F-4439-B0)

流动相A水中的0.1%甲酸

流动相B乙腈中的0.1%甲酸

梯度

时间 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射体积 10.00μL

柱温度 50℃

流速 0.75mL/min

样品制备 蛋白滴:100μL的药物物质+250μL的冷MeOH+50μL的3M $MgCl_2$。以20,000rpm旋转10min

标准品制备 混合20μL的20mM DL1(DMSO中的药物-接头化合物1)+20μLDMSO+40μL MeOH+20μL的渗滤缓冲液中的200mM NAC。温育过夜以获得4mM DL-NAC。在MeOH中稀释4mM DL-NAC以获得4μM DL-NAC标准品。

[0387] 显示NAC标准品和最终BDS的游离药物水平的典型色谱图:图16。

[0388] 对于上文显示的ADC1 BDS材料,已经报道了低于2.4%(以摩尔比计)的残余游离药物水平。

实施例5:制备免疫缀合物:mAb1的基于肽的缀合物(称为ADC2)

5.1缀合方法

抗体制备

[0389] 在缀合前将抗体mAb1(如上文中所定义)在2-8℃下解冻最多3天,并在2-8℃下储存直至使用。在使用前,在缀合当天,将mAb(>9.5g)在室温下平衡。将mAb(9.6mg/ml)等分(9.5g,989.6mL)并使用缀合缓冲液(200mM组氨酸,pH 6.5)稀释至5.59mg/ml。将mAb溶液添加到3L Chemglass夹套反应器中并设定为25±2℃,同时在50rpm下搅拌。

[0390] 抗体的还原

将8.0摩尔当量(10.5ml)的50mM TCEP溶液(在缀合缓冲液中的50mM TCEP)添加到mAb溶液小瓶中,并使反应在25±2℃下进行3小时。

渗滤

[0391] 使用Pellicon 3(30kDa)Biomax膜(1×0.11m^2,300LMH(550mL/min),16psi TMP,实际负载86.3g/m^2)将还原的mAb溶液对6DV(DV=1706.9mL)进行缓冲液交换。缀合缓冲液(200mM组氨酸,pH 6.5)用于将还原抗体缓冲液交换。在缓冲液交换后,将还原的mAb溶液回收回反应器中,并用缀合缓冲液冲洗膜。

缀合

[0392] 称量药物-接头化合物2(DL2)并溶解在DMSO中以制备20mM药物-接头溶液。将90%(142.6ml)的所需DMSO添加到反应器中。在加入DMSO后立即将9.5摩尔当量(31.2ml)的20mM药物-接头溶液添加到反应器中。随后,使用10%(15.8ml)的剩余的所需DMSO冲洗药物-接头小瓶以确保完全转移。在最终添加后,使反应在25±2℃下进行2小时。缀合反应期间的总体积为1894.5ml。

猝灭

[0393] 向反应器中加入35摩尔当量(46ml)的50mM NAC,并使反应在25±2℃下进行45分钟。

过滤

[0394] 将粗品缀合物溶液从反应器中转移并使用Millipak Gamma Gold 60(MPGL06GH2)过滤以获得1897.3ml(过滤器负载:308.9g/m^2[蛋白],63.2L/m^2[溶液])的过滤的粗品缀合物。

渗滤

[0395] 用Pellicon 3(30kDa)Biomax膜(1×0.11m^2,300LMH(550mL/min),16psi TMP,实际负载84.2g/m^2)对过滤的粗品缀合物溶液进行缓冲液交换(DV=1897.3mL)。使用缀合缓冲液(200mM组氨酸,pH 6.5)进行初始12DV,并随后切换至标准渗滤缓冲液(10mM组氨酸,pH 5.5)进行8个另外的DV。在缓冲液完成缓冲液交换后,随后将溶液浓缩至≥25mg/ml,转移到瓶中,并用渗滤缓冲液冲洗膜。从UF/DF回收的总汇集体积为335.7ml。

配制

[0396] 用84.7ml渗滤缓冲液(10mM组氨酸,pH 5.5)将浓缩的ADC(即ADC2)稀释至20.0mg/ml。用138.6ml的4×配制缓冲液(10mM组氨酸,12%(w/v)海藻糖二水合物,400mM NaCl,pH 5.5)稀释所得溶液,使最终目标BDS浓度为15.0mg/ml。

过滤

[0397] 使用Millipak Gamma Gold 60(MPGL06GH2)无菌过滤最终配制的ADC以获得549.3ml(过滤器负载:411.4g/m^2[蛋白],27.5L/m^2[溶液])的ADC2 BDS。将该材料包装到HDPE瓶中并在≤-65℃下储存。

5.2方法:药物物质表征:ADC2

尺寸排阻色谱法(SEC)方法

[0398] SEC方法参数

波长 280nm

柱 Tosoh TSKgel 7.8mm×300mm,5μm(P/N 0008541)

流动相 50mM磷酸二氢钾

0.4M 高氯酸钠

pH 6.3

注射体积 1μL

柱温度 25℃

流速 0.5mL/min

运行时间 30min

显示储备mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱图:图17。

[0399] 对于上面显示的ADC2 BDS材料,已经报道了4.2%HMWS和95.8%的单体纯度。

[0400] 反相HPLC(RP HPLC)方法

RP HPLC方法参数

波长 280nm

柱 PLRP-S1000 Å(50×2.1mm,8μm)柱,Agilent(P/N PL1912-1802)

流动相A含有0.01%TFA的水中的0.1%甲酸

流动相B含有0.01%TFA的ACN中的0.1%甲酸

梯度

时间(min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	80	20
3.00	80	20
20.00	0	100
22.00	80	20
26.00	0	100
4 min平衡至80% A和20% B		

注射体积 10μL

柱温度 80℃

流速 1.0mL/min

运行时间 30min

样品制备 将样品稀释至2mg/ml,并将40μL加入到微量离心管中。加入60μL的~8M盐酸胍,~130mM Tris,~1mM EDTA,pH 7.6缓冲液。加入2μL的500mM DTT并涡旋混合。在37±2℃下温育样品30±2分钟。

[0401] 显示轻链和重链的分离的典型RP-HPLC色谱图:图18。该色谱图显示了储备mAb和最终BDS的重叠。

[0402] 对于上述ADC2 BDS材料。报道了7.6的DAR。

游离药物方法

[0403] 游离药物方法参数

波长 254nm

柱 Phenomenex Gemini,C18,2×150mm,3μm(P/N 00F-4439-B0)

流动相A水中的0.1%甲酸

流动相B乙腈中的0.1%甲酸

梯度

时间 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射体积 10.00μL

柱温度 50℃

流速 0.75mL/min

样品制备 蛋白滴:100μL的药物物质+250μL的冷MeOH+50μL的3M $MgCl_2$。以20,000rpm旋转10min

标准品制备 混合20μL的20mM DL2(DMSO中的药物-接头化合物2)+20μL DMSO+40μL MeOH+20μL的渗滤缓冲液中的200mM NAC。温育过夜以获得4mM DL-NAC。在MeOH中稀释4mM DL-NAC以获得4μM DL-NAC标准品。

[0404] 显示NAC标准品和最终BDS的游离药物水平的典型色谱图:图19。

[0405] 对于上文显示的ADC2 BDS材料,已经报道了低于1.9%(以摩尔比计)的残余游离药物水平。

实施例6:ADC SAR408701的类似物

6.1抗体

[0406] 为了进一步的对比实验,基于具有以下序列的单克隆抗体制备Sanofi的抗CEACAM5 ADC SAR408701的类似物:

重链:SEQ ID NO:25

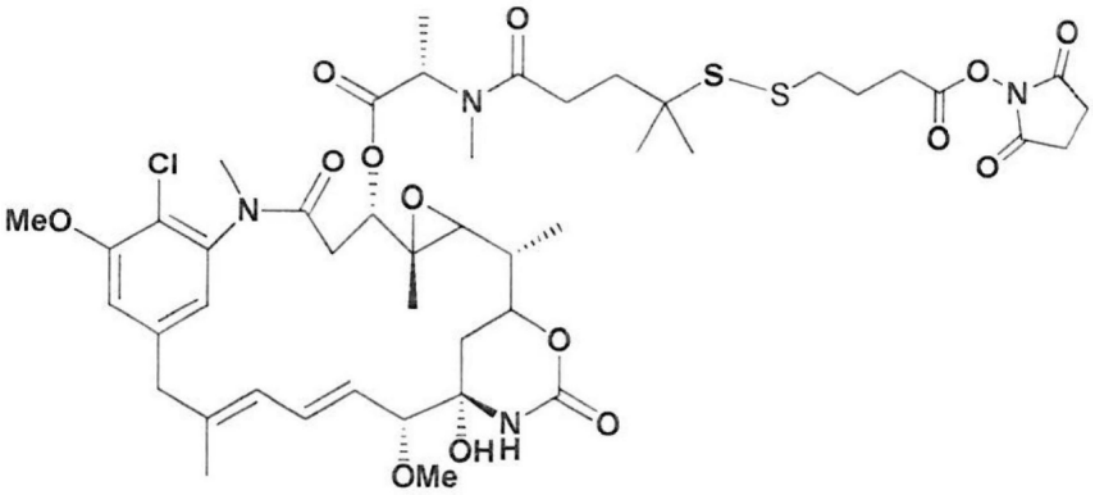
轻链:SEQ ID NO:26

6.2药物-接头化合物

作为待与上述提及的抗体缀合的药物-接头分子,使用SPDB-DM4(获自Levena Biopharma):

产品名:SPDB-DM4

结构:



预期质量:994.35

观察到的平均质量:995.5(Ms+H^+)

质谱分析:一致,表现出正确的MW

HPLC分析:纯度>95%

外观:白色粉末

6.3缀合

在缀合前将抗体在2-8℃下解冻最多3天,并在2-8℃下储存直至使用。在使用前,在缀合当天,将抗体(175mg)在室温下平衡。使用缀合缓冲液(PBS pH 7.4)和SPDB-DM4(Levena Biopharma)的5mM DMSO溶液(相对于抗体为8摩尔当量)将抗体(7.9mg/ml)稀释至5mg/ml。混合反应溶液并在25℃下温育4小时。

6.4制备型尺寸排阻色谱法,脱盐和过滤

[0407] 使用制备型尺寸排阻色谱法纯化反应混合物。将Superdex 200pg(50/60)柱连接到Äkta Avant 25系统(GE Healthcare)并根据制造商的说明书用PBS pH 7.4平衡。随后,注射反应混合物并以10ml/min的流速和PBS pH 7.4作为运行缓冲液运行通过该柱。经由280nm处的UV光吸收确定含有ADC的级分,汇集并浓缩。根据制造商的说明书使用15ml Amicon Ultra 50kDa截流离心设备(Merck Millipore)浓缩ADC材料。根据制造商的说明书,在Äkta Avant 25系统(GE Healthcare)上使用HiPrep 26/10脱盐柱(GE Healthcare)以10ml/min的流速将浓缩的ADC材料转移至配制缓冲液(10mM组氨酸,130mM甘氨酸,5%蔗糖,pH 5.5)中。使用0.2μm过滤器(Merck Millipore)过滤所得ADC材料,等分并随后在液氮中速冻。ADC材料的最终浓度为5.82mg/ml,并将该材料保持在-80℃下直到进一步使用。从该工作获得的ADC在本文中也称为“ADC SAR DM4”,或者简称为“ADC SAR”;该ADC是SAR408701的类似物。

实施例7:基于mAb1和SPDB-DM4的ADC

[0408] 基于抗体mAb1(如上所述)和药物-接头化合物SPDB-DM4(即与上述ADC SAR DM4中相同的药物-接头化合物)制备另一ADC。从该工作获得的ADC在本文中称为“ADC mAb1 DM4”,并如下制备:

7.1所用材料:

- 抗体:mAb1,在10mM HEPES中的1mg/ml,pH 5.8
- 缀合缓冲液:10mM HEPES,pH 5.8
- 药物-接头化合物:SPDB-DM4,在DMF中的2mg/ml

7.2方法:

- 缀合:约30倍摩尔过量的药物-接头分子用于缀合(75mL抗体+7.1mL SPDB-DM4药物-接头),在室温下在缓慢摇动下温育5小时
- 纯化:将ADC缓冲液交换至20mM组氨酸,150mM NaCl,pH 6.0中以去除游离药物
- 配制缓冲液:20mM组氨酸,150mM NaCl,pH 6.0

7.3纯化的ADC的分析细节:

- 最终产量:40mg
- 浓度:2.2mg/ml
- DAR:4.4

实施例8:来自ADC1和ADC2的药物释放的表征

8.1材料和方法

8.1.1测试制品

ADC 编号	ADC 的简述
ADC1	mAb1-葡糖苷酸-依沙替康(也参见上文实施例 4)
ADC2	mAb1-AAN-依沙替康(也参见上文实施例 5)
ADC3	抗 CEACAM5-CL2A-SN-38 ADC (Creative Biolabs, CAT#: ADC-091LCT, 类似经由 CL2A 接头缀合至 SN38 的拉贝妥珠单抗的人源化 IgG1 单克隆抗 CEACAM5 抗体)

8.1.2材料

根据制造商的说明书储存所有试剂和缓冲液并在批次有效期前使用。

缩写名称	来源和内容物
人肝脏溶酶体	Sekisui Xenotech, H0610.L
天冬酰胺内肽酶测定缓冲液	50mM MES, 250 mM NaCl
10×分解代谢缓冲液	Sekisui Xenotech
人血清	Biowest, S4200-100, Lot # S15594 S4200
小鼠血清	Biowest, S2160-100, Lot # S18169 S2160
食蟹猴血清	Abcam, cat: ab155109, lot: GR316568-1
HEPES	Sigma, cat: H3784-100g lot: SLBR6536V
PIC III	Calbiochem, 蛋白酶抑制剂混合物组 III, 不含 EDTA, #539134
甲醇	Merck, cat: 1060092500

8.1.3仪器

仪器	供应商
CO_2 培养箱	Heraeus
恒温混匀器	Eppendorf
HTC PAL 自动进样器	CTC Analytics
1200 HPLC	Agilent Technologies
API4000 三重四极杆	Sciex

8.1.4程序

8.1.4.1血清样品制备

[0409] 2M HEPES溶液:将52.1g HEPES溶解在75mL MiliQ水和15mL 25% HCl中,调节至pH 7.55,并添加至100ml。将该溶液以15%v/v与血清混合以获得pH为7.3-7.4的稳定化血清。将来自Biowest的人血清(批号S15594S4200)解冻。将100mL血清与15mL 2M HEPES缓冲

液混合。将来自Biowest的小鼠血清(批号S18169S2160)解冻。将100mL血清与15mL 2M HEPES缓冲液混合。将食蟹猴血清解冻,并将8.5mL血清与1.5mL 2M HEPES缓冲液混合。测量pH(7.37)并将血清无菌过滤。将2mL的等分试样在-20℃下冷冻。

[0410] 将制备的血清在室温下解冻。所需ADC蛋白浓度以180μg/mL一式三份制备,用于后续经由LC-MS进行游离有效负载分析。在将ADC添加到血清中之后,将单个批次混合并分成20μL等分试样。此外,对于每个ADC吸取一个20μL的96小时样品,并用于总后处理分析以测量回收率。将0小时样品在-80℃下直接冷冻,剩余样品在37℃和5% CO_2下温育,并经由-80℃下储存在2/4/6/24/48/72/96小时温育时停止反应。

8.1.4.2人肝脏溶酶体样品制备

[0411] 使用测定缓冲液将pH调节至pH 5.0或pH 4.0。溶酶体稳定性制备:如对ADC1(n=3)示例性显示的那样,制备80μL人肝脏溶酶体用于一式三份测量:2.76μL ADC1+6μL人肝脏溶酶体+71.2μL天冬酰胺内肽酶测定缓冲液。MeOH+PIC(1:200)的制备:10μL PIC III+1990μL MeOH。在将Eppendorf管转移到预热至37℃的Thermomix中时开始反应。随后,在0、1、2、4、24和48小时后抽取10μL等分试样并与40μL PIC III(1:200)混合。

8.2结果

[0412] 人、小鼠和食蟹猴血清的ADC稳定性(图20)。使用游离依沙替康(标准化数据)计算缀合的依沙替康浓度(初始剂量~10μM)。人、食蟹猴和小鼠血清获得了类似的概况。仅观察到少量弹头(warhead)释放,ADC2(在96小时初始缀合物有效负载的5.9%游离)和ADC1(1.4%)在小鼠血清中最显著。

[0413] 小鼠血清和缓冲液的ADC3对照稳定性(图21)。使用游离SN38(未标准化)计算缀合的SN38浓度(初始剂量50μg/mL ADC蛋白浓度)。对两种基质均观察到显著的SN-38释放。

[0414] ADC1和ADC2在人肝脏溶酶体(pH 5.0)中的有效负载释放概况(图22)。使用例如游离依沙替康(初始浓度~10μM依沙替康)的标准化数据计算缀合的药物浓度。对于ADC1和ADC2裂解介导的有效负载释放,观察到中等水平的有效负载释放(均为初始总缀合物有效负载的~40%)。

[0415] ADC分解代谢物分析证实游离的依沙替康为溶酶体释放产物(图23)。为了证实依沙替康为主要释放产物,在人溶酶体提取物中进行ADC1分解代谢物分析研究。这里,在不同时间点的TIC-MS和提取离子色谱图的比较显示,在温育期间(0小时、4小时、24小时)预期的依沙替康分解代谢物随后从ADC1释放。保留时间9.33分钟,所检测的代谢物的检测质量m/z 436.1671($[M+H]^+$,$C_{24}H_{23}O_4N_4$ F)和MS/MS图谱与依沙替康的那些一致。

实施例9:ADC1和ADC2以高效力在体外特异性杀伤癌细胞

[0416] 使用人癌细胞系评估ADC1和ADC2杀伤癌细胞的潜力。ADC1和ADC2对不同的CEACAM5阳性细胞系显示出亚纳摩尔的体外效力,而对CEACAM5阴性细胞系显示出较小的影响(下表2)。如示例性剂量-反应曲线中显示的那样(图24A/B),ADC1和ADC2对CEACAM5阳性细胞系SK-CO-1和SNU-16非常有效。相比之下,ADC1和ADC2对抗原阴性MDA-MB-231的作用限于测试的最高浓度(图24C)。

[0417] 使用与ADC1和ADC2相对应的接头和有效负载的利妥昔单抗同种型对照ADC显示出低得多的对SK-CO-1细胞系的影响(图25)。

[0418] 总之,ADC1和ADC2在体外以高效力特异性杀伤表达CEACAM5的人癌细胞系。

	MKN-45 IC50 [M]; N≥3	SNU-16 IC50 [M]; N≥3	SK-CO-1 IC50 [M]; N≥4	LS174T IC50 [M]; N≥3	MDA-MB-468 IC50 [M]; N≥2	MDA-MB-231 IC50 [M]; N≥3
ADC1	6.2E-10 (-78%)	3.2E-10 (-91%)	8.5E-11 (-97%)	3.8E-10 (-72%)	>1E-08 (-85%)	>1E-08 (-67%)
ADC2	4.7E-10 (-90%)	2.8E-10 (-96%)	6.9E-11 (-98%)	2.8E-10 (-81%)	6.7E-09 (-97%)	1.5E-08 (-84%)
有效负载	8.9E-10 (-96%)	4.4E-10 (-99%)	2.5E-10 (-99%)	5.3E-10 (-88%)	2.1E-10 (-99%)	9.3E-10 (-92%)
CEACAM5	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性

表2.ADC1、ADC2和游离有效负载对多种人细胞系的效力。在最高测试化合物浓度下与未处理对照相比的最大效果指示在括号中。对于每种细胞系,指示了CEACAM5表达。

方法——活力测定:

[0419] ADC对癌细胞系的细胞毒性效果通过细胞活力测定来测量。在处理前一天,将细胞以90μL的体积接种在96孔板中。将测试化合物(ADC或游离有效负载)以10倍起始浓度在细胞培养基中配制。将测试化合物连续稀释(1:4),并将10μL的每种稀释液一式三份添加到细胞中。将板在CO_2培养箱中在37℃下培养六天。为了细胞活力测量,将Cell Titer-Glo®试剂(Promega™Corp,Madison,WI)添加到每个孔中,并根据制造商的说明书处理板。使用Varioskan读板器(Thermo Fisher)测量发光信号。将发光读数转化为相对于未处理细胞的活力%。使用log(抑制剂)相对于反应、可变斜率、使用GraphPad Prism的4参数拟合方程,用非线性回归分析拟合数据。数据显示为相对细胞活力%相对于摩尔化合物浓度,误差条指示一式三份的标准偏差(SD)。计算源于多个实验的IC50的几何平均值。

[0420] 使用与上文相同的方法,还将ADC1和ADC2在它们对抗原阳性SK-CO-1和抗原阴性MDA-MB-231细胞系的细胞毒性效果方面与ADC SAR DM4进行比较。ADC1和ADC2针对SK-CO-1癌细胞分别显示出为ADC SAR DM4的2.9和2.7倍的效力(图26A)。与ADC1和ADC2相比,ADC SAR DM4针对抗原阴性MDA-MB-231的非特异性效果略高(图26B)。ADC SAR DM4和ADC mAb1 DM4针对SK-CO-1显示出相当的效力,其中ADC mAb1 DM4的效力略微倾向于更高(图26A)。

实施例10:ADC1和ADC2在与抗原阳性细胞的共培养中介导针对抗原阴性细胞的强效旁观者效应

[0421] 在旁观者测定中评估ADC1和ADC2介导针对紧邻抗原阳性细胞的抗原阴性细胞的旁观者效应的潜力。在CEACAM5阳性SK-CO-1的存在下,ADC1和ADC2显示了针对CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞的强效旁观者效应(图27A)。在1nM的ADC浓度下进行共培养实验,对于ADC1所述浓度引起CEACAM5阳性SK-CO-1细胞活力的最大抑制(图26A),但对CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞没有影响(图26B)。与这些发现一致,在仅MDA-MB-231对照的旁观者测定设置中没有观察到ADC1或ADC2的非特异性作用(图27B)。

[0422] 总之,ADC1和ADC2在与抗原阳性细胞的共培养中介导针对抗原阴性癌细胞的强效旁观者效应。这些发现指示了有效靶向具有异质靶标表达的肿瘤的潜力。

[0423] 鉴于利用了相同的药物-接头和Fv区,预期ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M和ADC6-M以及ADC7-M介导与ADC1和ADC2相似的强效旁观者效应。

[0424] 与ADC SAR相比,ADC1和ADC2在与抗原阳性细胞的共培养中对抗原阴性细胞介导强得多的旁观者效应(图28A,图28B)。使用与ADC1和ADC2中相同的抗体(即mAb1)以及用于ADC SAR DM4的药物-接头分子(即SPDB-DM4)的ADC mAb1 DM4也显示出比ADC SAR DM4更显著的旁观者效应(图28A,图28B)。这指示与使用不同抗体的ADC SAR相比,对于ADC1和ADC2,mAb1有助于观察到的更高的旁观者效应。因此预期ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M和ADC7-M也介导比ADC SAR更强效的旁观者效应。

[0425] 对于所有测试的ADC,旁观者效应的程度随着添加到恒定数量的抗原阴性细胞中的抗原阳性细胞数量的增加而提高(比较图28A和图28B)。不希望受理论束缚,这可能是更多ADC被更高数量的抗原阳性细胞加工以释放更多游离有效负载的结果,这是对抗原阴性细胞的旁观者效应的原因。

[0426] 没有观察到测试的ADC对单独的MDA-MB-231细胞的非特异性作用(图28C)。

方法——旁观者测定

[0427] 通过旁观者测定测量ADC对与抗原阳性癌细胞系共培养的抗原阴性癌细胞系的细胞毒性作用。将一千个CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞接种在每孔具有750或3000个CEACAM5阳性SK-CO-1细胞的共培养实验中。作为对照,平行接种仅1000个MDA-MB-231细胞。在处理前一天,将细胞以90μL的总体积接种在96孔板中。将测试化合物以1E-9M的10倍最终浓度在细胞培养基中配制,并一式两份将10μL添加到细胞中。将板在CO_2培养箱中在37℃下培养六天。

[0428] 在免疫荧光染色之前,去除培养基,并用100%甲醇(-20℃)处理细胞30分钟。在去除甲醇和一个PBS洗涤步骤后,用PBS中的2.5%多聚甲醛(PFA)以及0.2% Triton X-100在室温下处理细胞15分钟。在去除溶液和一个PBS洗涤步骤后,将细胞用PBS中的1%BSA/0.1%吐温/0.1%叠氮化钠在室温下处理至少一小时。通过用10μg/mL人抗CEACAM5(mAb1)一抗和1:2000稀释的驴抗人IgG荧光(藻红蛋白)标记的二抗(Jackson ImmunoResearch#709-116-149)的免疫荧光染色来区分抗原阳性和抗原阴性细胞。通过使用1μg/mL Hoechst33342(Life technologies,cat#H3570)染料的细胞核染色鉴定细胞。在室温下在1% BSA/0.1%叠氮化钠PBS溶液中进行染色30分钟。将二抗染色与Hoechst染料染色组合。在染色步骤之间和之后,用PBS洗涤细胞三次。

[0429] 用共焦定量图像细胞计数器CQ1(Yokogawa® Electric Corporation,Tokyo,Japan)对板进行成像。分析由CQ1软件(Yokogawa)模板“细胞核和假细胞体”调整,并且FCS输出文件使用FlowJo(BD)进行分析。基于细胞核周围荧光标记抗体的染色或未染色,区分并定量抗原阳性和抗原阴性细胞。柱状图显示了每种处理条件的鉴定的抗原阳性和抗原阴性细胞的数目。

实施例11:ADC1和ADC2在结肠直肠癌(CRC)患者来源的异种移植(PDX)小鼠模型中的效力

[0430] 已经在人患者来源的CRC异种移植模型COPF217(Shanghai LideBiotech CO.,

LTD)中评估了体内抗肿瘤效力。将COPF217肿瘤片段皮下移植到六至八周龄免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu,Charles River)的右侧腹。当肿瘤达到165mm^{3}的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)或用ADC1或ADC2(各自的剂量为10mg/kg;第0天)静脉内治疗6只小鼠/组一次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×(W^2)/2计算肿瘤体积。

[0431] 以10mg/kg的剂量用ADC1或ADC2的单次治疗产生显著的抗肿瘤效果。两种物质均显示了导致肿瘤停滞的相当效果(图29)。用ADC1或ADC2的治疗对体重没有显著影响(数据未显示)。

[0432] 用其它CRC PDX模型的进一步实验:

在对应于上文对COPF217所述的实验的另外实验中,用ADC1的单次治疗也导致在具有高CEACAM5表达的12个其它CRC PDX模型中的肿瘤停滞或肿瘤消退。

实施例12:ADC1在非小细胞肺癌(NSCLC)PDX小鼠模型中的效力

[0433] 已经在人患者来源的NSCLC异种移植模型LUPF160151(Shanghai LideBiotech CO.,LTD)中评估了体内抗肿瘤效力。将LUPF160151肿瘤片段皮下移植到六至八周龄免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu,Charles River)的右侧腹。当肿瘤达到180mm^{3}的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)或用ADC1(6mg/kg;第0天)静脉内治疗5只小鼠/组一次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×(W^2)/2计算肿瘤体积。

[0434] 以6mg/kg的剂量用ADC1的单次治疗产生显著的抗肿瘤效果(图30),对体重没有影响(数据未显示)。模型LUPF160151显示了异质CEACAM5表达,其中CEACAM5阴性肿瘤细胞与CEACAM5阳性肿瘤细胞相邻。ADC1在该模型中的良好效力由此指示ADC的强效旁观者效应。

实施例13:ADC1在胃癌PDX小鼠模型中的效力

[0435] 在人患者来源的胃癌异种移植模型GAX066(Shanghai ChemPartner Co.,Ltd)中评估了体内抗肿瘤效力。将肿瘤片段皮下移植到免疫缺陷雌性小鼠(Nu/Nu小鼠,Beijing Vital River Lab Animal Technology Co.Ltd,18-22g)的右侧腹。当肿瘤达到220mm^{3}的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)或用ADC1(3或10mg/kg;第0天)静脉内治疗6只小鼠/组一次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×(W^2)/2计算肿瘤体积。

[0436] 用3或10mg/kg ADC1的单次治疗引起显著的抗肿瘤效果(图31),对体重没有影响(数据未显示)。在六个肿瘤中的五个中,用10mg/kg的治疗导致完全的肿瘤消退。

实施例14:ADC1与ADC3相比在胰腺细胞系来源的肿瘤模型中的效力

[0437] 已经在人胰腺细胞系来源的异种移植模型HPAF-II(ATCC,CRL-1997)中评估了ADC1与ADC3相比的效力。将5×10^{6}个HPAF-II细胞皮下注射到六至八周龄免疫缺陷雌性小鼠(Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu,Envigo)的右侧腹。当肿瘤达到150mm^{3}的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)或用ADC1(1mg/kg或6mg/kg;第0天)或用ADC3(1mg/kg或6mg/kg;第0天)静脉内治疗10只小鼠/组一次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×(W^2)/2计算肿瘤体积。

[0438] 以6mg/kg的剂量用ADC1的单次治疗导致了显著的抗肿瘤效果。该效果是剂量依赖性的,因为用1mg/kg的单次治疗仅导致温和但显著的、短暂的抗肿瘤效果。相比之下,用相同剂量的ADC3的单次治疗在任一剂量下均未显示显著的抗肿瘤效果(图32)。所有治疗对体重均无显著影响(数据未显示)。预期ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M和ADC7-M与ADC1一样在这方面类似地比ADC3有利。

实施例15:ADC1与ADC SAR DM4相比在两种CRC PDX小鼠模型中的效力

[0439] 在人患者来源的CRC异种移植模型COPF230和REPF210(Shanghai LideBiotech CO.,LTD)中评估了体内抗肿瘤效力。将肿瘤片段皮下移植到六至八周龄免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu,Charles River)的右侧腹。当肿瘤达到约170mm^{3}的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)、ADC1(6mg/kg)或ADC SAR DM4(6mg/kg)静脉内治疗6只小鼠/组一次(第0天)。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×(W^2)/2计算肿瘤体积。

[0440] 用ADC1的单次治疗在PDX模型COPF230(图33)和REPF210(图34)二者中均导致显著的抗肿瘤效果。相比之下,用相同剂量的ADC SAR DM4的单次治疗在任一CRC PDX模型中均未显示抗肿瘤效果(图33,图34)。在任何治疗组中都没有观察到对体重的显著影响(数据未显示)。预期ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M和ADC7-M与ADC1一样在这方面类似地比ADC SAR DM4有利。

实施例16:ADC1相比ADC SAR DM4在胃PDX小鼠模型(GAPF313)中的效力

[0441] 在人患者来源的胃异种移植模型GAPF313(Shanghai LideBiotech CO.,LTD)中评估了体内抗肿瘤效力。将肿瘤片段皮下移植到六至八周龄免疫缺陷雌性小鼠(NU-Foxn1nu,Charles River)的右侧腹。当肿瘤达到约180mm^{3}的平均体积时,从第0天开始,每两周用媒介物(盐水溶液)、ADC1(4mg/kg或7mg/kg Q2W×3)或ADC SAR DM4(4.7mg/kg Q2W×3)静脉内治疗6只小鼠/组3次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×(W^2)/2计算肿瘤体积。

[0442] 正在进行的实验的中期数据分析证明ADC1在该模型中的明确抗肿瘤效力,并且ADC SAR DM4没有效果(图35)。所有治疗均耐受良好(数据未显示)。预期ADC1-M、ADC2-M、ADC3-M、ADC6-M和ADC7-M与ADC1一样在这方面类似地比ADC SAR DM4有利。

实施例17:ADC1的安全性概况——在食蟹猴中的初步毒性研究

[0443] 为了研究安全性概况,以0、3、10和30mg/kg的剂量通过30-min静脉内输注将ADC1施用于食蟹猴,以3周时间间隔(在第1、22和43天)施用三次,并在第50天处死动物用于肉眼检查和组织病理学检查。作为结果,发现ADC1具有相对有利的安全性概况,因为ADC1在某些受已知ADC的毒副作用影响的器官中没有毒性。

实施例18:修饰的抗体和谷氨酰胺转胺酶的表达和纯化

[0444] 在下文中,将描述修饰的抗体的表达和纯化。这些修饰的抗体可用于产生相应的抗体-药物-缀合物。修饰的抗体mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb4-M、mAb5-M、mAb6-M和mAb7-M的特征概述在下表4中:

抗体/抗体-药物缀合物名称	抗体特征	抗体-药物缀合物特征，包括优选的药物/抗体比、接头类型和药物	mAb 抗体的重链（HC）和轻链（LC）的氨基酸序列
mAb1-M, ADC1-M	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变 YTE 突变	链间半胱氨酸缀合 DAR=8 马来酰亚胺基-b-葡糖苷酸-依沙替康(DL1)	HC = SEQ ID NO: 34 LC = SEQ ID NO: 14
mAb2-M, ADC2-M	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变 YTE 突变 MTG 标签	MTG 偶联 DAR=4 NH2-GGG-b-葡糖苷酸-依沙替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 34 LC = SEQ ID NO: 36
mAb3-M, ADC3-M	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变 YTE 突变 K222R 突变(MTG 优化) MTG 标签	MTG 偶联 DAR=4 NH2-GGG-b-葡糖苷酸-依沙替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 35 LC = SEQ ID NO: 36
mAb4-M, ADC4-M	基于抗 CD20 利妥昔单抗的同型对照	链间半胱氨酸缀合 DAR=8 马来酰亚胺基-b-葡糖苷酸-依沙替康(DL1)	HC = SEQ ID NO: 64 LC = SEQ ID NO: 65 (利妥昔单抗 mAb)
mAb5-M, ADC5-M	基于抗 CD20 利妥昔单抗的同型对照 LALA 突变 MTG 标签	MTG 偶联 DAR=4 NH2-GGG-b-葡糖苷酸-依沙替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 40 LC = SEQ ID NO: 41
mAb6-M, ADC6-M	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变	链间半胱氨酸缀合 DAR=8 马来酰亚胺基 b-葡糖苷酸-依沙替康(DL1)	HC = SEQ ID NO: 51 LC = SEQ ID NO: 14
mAb7-M, ADC7-M	抗 CEACAM5 mAb LALA 突变 MTG 标签	MTG 偶联 DAR=4 NH2-GGG-b-葡糖苷酸-依沙替康(DL1-M)	HC = SEQ ID NO: 51 LC = SEQ ID NO: 36

表4

[0445] 合成编码抗体mAb1-M、mAb2-M、mAb3-M、mAb5-M、mAb6-M和mAb7-M的DNA序列并克隆到pTT5质粒上用于在GeneArt(Life Technologies)处的重组表达。使用ExpiCHO表达系统(GibcoTM,Thermo Fisher Scientific Inc.)将产生的质粒用于瞬时转染和在摇瓶中的重组蛋白表达。转染后7天,收获上清液并使用标准分步方法纯化表达的抗体,所述标准分步方法包括蛋白A亲和色谱(HiTrap MabSelect SuRe柱,Cytiva)和尺寸排阻色谱(HiLoad Superdex 200pg柱,Cytiva)。

[0446] 购买药品级品质的mAb4-M/利妥昔单抗(F.Hoffmann-La Roche Ltd.,Basel,Switzerland)。

谷氨酰胺转胺酶的表达和纯化

[0447] 合成编码谷氨酰胺转胺酶mTG的DNA序列(Seq ID 46)并克隆到pET30a质粒上用于在GeneArt(Life Technologies)处的重组表达。将用产生的质粒转化的大肠杆菌BL21(DE3)菌株在摇瓶中在补充有5g/l葡萄糖,10mL/100mL 10×磷酸盐缓冲盐水和30mg/l卡那霉素的溶原性肉汤培养基中在28℃和130rpm下培养过夜(50mm落差(throw))。该培养物用于接种含有9.5升生长培养基(50g/l酵母提取物,10g/l蛋白胨,0.5g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$和2ml 50%Desmophen(Rhein Chemie Rheinau的消泡剂))的发酵罐至0.00002的光密度。该发酵罐在28℃下以800U/min转速、5Nl/min通气量和pH 7.0-7.4运行过夜(16h)。在OD 5处,用0.1mM IPTG诱导培养物直到达到~30的OD(5-6小时)。在泡沫形成或氧浓度降至低于2mg/ml的情况下,分别添加更多的Desmophen或将转速提高至1000rpm。通过连续流通离心收获细胞团。

[0448] 将50g细胞沉淀重悬在250ml 50mM乙酸钠,1mM DTT,5mM $MgCl_2$,25U/ml Benzonase(Millipore)pH 5.5中,并使用弗氏压碎器破碎。通过离心和过滤(0.8/0.2μm孔隙尺寸)澄清上清液,将pH调节至5.5并装载到Fractogel®SO3-(M)85ml柱(Millipore)上,接着用20CV 0-1M NaCl的线性梯度洗脱。通过SDS-PAGE鉴定具有预期大小的纯化蛋白的级分,合并并在4℃下对50mM Tris/HCl,300mM NaCl,pH 8.0透析过夜。随后使用0.5U/ml Dispase®I(Sigma Aldrich)和2mM $CaCl_2$在37℃下以2mg/ml的最终浓度对谷氨酰胺转胺酶进行蛋白水解加工60分钟,接着加入5mM EDTA。将反应混合物在4℃下对50mM磷酸钠缓冲液pH 6.0透析过夜,装载到Fractogel®SO3-柱(Millipore)上,并用20CV 0-1M NaCl的线性梯度洗脱。通过SDS-PAGE鉴定具有有效裂解和纯化的蛋白的级分,合并,浓缩并使用HiLoad Superdex 75pg尺寸排阻柱(Cytiva),用24HEPES pH 7,100mM NaCl作为运行缓冲液来纯化。合并含有谷氨酰胺转胺酶的级分,浓缩至>20mg/ml,在液氮中快速冷冻并储存在-80℃下。使用ZediXclusive微生物谷氨酰胺转胺酶测定(Zedira)来测定酶活性。

实施例19:ADC1-M、ADC4-M和ADC6-M的ADC制备、缀合和表征

19.1.抗体制备和缀合

[0449] 将在50mM组氨酸,100mM NaCl,pH 6.5中配制的单克隆抗体(mAb)储存在-80℃下。在缀合之前,将mAb在室温下解冻,并经由用配制缓冲液稀释将蛋白浓度调节至5mg/ml。随后,添加10-12摩尔当量过量(相对于mAb)的TCEP来还原mAb,并在37℃下温育2-3小时。加入16-24摩尔当量(相对于mAb)的DL1(在DMSO中的10mM储备溶液中),并在25℃下温育60min。加入25摩尔当量(相对于mAb)的N-乙酰基-半胱氨酸(来自25mM DMSO储备溶液)猝灭反应混合物,并在25℃下温育30分钟。经由尺寸排阻色谱(SEC)将ADC与DL1和可能的高分子量种类(HMWS)分离。在SEC纯化之前,样品在4000×g下离心2分钟以去除可能的沉淀物。SEC使用与Äkta LC系统(Cytiva)组合的HiLoad Superdex 200 26/60Increase柱,以2.5mL/min的流速和50mM组氨酸,100mM NaCl,pH6.5作为运行缓冲液来进行。合并含有ADC材料的分级样品并使用Amicon Ultra 15 50K离心机(Millipore)浓缩至6mg/ml,接着使用与Äkta LC系统(Cytiva)组合的HiTrap脱盐柱最终缓冲液交换到10mM组氨酸,40mM NaCl、6%海藻糖、0.05%吐温,pH 5.5中。通过0.22μm无菌过滤单元(Millipore)过滤最终的原料药(BDS),并

在液氮中速冻直至进一步使用。

[0450] 19.2.品质属性

ADC1-M

浓度[mg/ml]	6.0
药物/抗体比	8.16
纯度SEC[%]	98.9
游离药物含量[%]	0.08
内毒素含量[EU/mg]	1.84

ADC6-M

浓度[mg/ml]	7.09
药物/抗体比	8.14
纯度SEC[%]	100
游离药物含量[%]	0.01
内毒素含量[EU/mg]	0.39

ADC4-M

浓度[mg/ml]	5.82
药物/抗体比	7.87
纯度SEC[%]	97.8
游离药物含量[%]	0.03
内毒素含量[EU/mg]	0.13

9.3原料药表征

尺寸排阻色谱(SEC)方法法

在Waters Bio Resolve SEC mAb柱上通过尺寸排阻色谱法评估单体含量和纯度。

[0451] 波长 214nm

柱 Waters Bio Resolve SEC mAb柱,200Å,2.5μm,4.6×150mm

流动相 50mM磷酸二氢钠

0.4M高氯酸钠,pH 6.3

注射体积 5μL

柱温度 25℃

流速 0.35mL/min

显示输入mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱图显示在图36中。

[0452] 反相HPLC(RP HPLC)方法

RP HPLC方法参数

波长 214nm

柱 PLRP-S1000 Å(50×2.1mm,8μm)柱,Agilent

流动相A Lichrosolv H_2O+0.1%TFA

流动相B 100% AcN+0.1%TFA

梯度 在7.5min内30-45%B

注射体积 10μL

柱温度 65℃

流速 1.0mL/min

样品制备 将40μL样品(2.2mg/ml)与4μl 0.5M TCEP混合,并在室温下温育5分钟。然后,加入40μL0.5M碘乙酰胺并在37℃下温育15分钟。注射10μl该反应。

[0453] 示出最终BDS的DAR测定的典型RP-HPLC色谱图显示在图37中。

[0454] 游离药物方法

波长 254nm

柱 Phenomenex Gemini,C18,2×150mm,3μm(P/N 00F-4439-B0)

流动相A 水中的0.1%甲酸

流动相B 乙腈中的0.1%甲酸

梯度

时间(min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射体积 10.00μL

柱温度 50℃

流速 0.75mL/min

样品制备 蛋白滴:100μL的原料药+250μL的冷MeOH+50μL的3M $MgCl_2$。在20,000rpm下旋转10min

标准品制备 混合20μL的20mM DL(DMSO中的MSC2702209A)+20μL DMSO+40μL MeOH+20μL的渗滤缓冲液中的200mM NAC。温育过夜以获得4mM DL-NAC。在MeOH中稀释4mM DL-NAC以获得4μM DL-NAC标准品。

内毒素表征

[0455] 使用Endosafe PTS内毒素系统(Charles River),通过动态显色LAL测定测定内毒素。将缓冲液和抗体在LAL试剂水中稀释10倍。将ADC在LAL试剂水中稀释10倍。在0.01-1EU/mL药筒上分析所有样品。通过除以ADC[P]mg/mL将EU/mL值转化为EU/mg。

实施例20:ADC7-M、ADC2-M、ADC5-M和ADC3-M的ADC制备、缀合和表征20.1.抗体制备和缀合

[0456] 将单克隆抗体(mAb)储存在-80℃下。在缀合之前,将mAb在室温下解冻,并使用与Äkta液相色谱(LC)系统(Cytiva)组合的HiTrap脱盐柱将缓冲液交换为24mM HEPES,pH7.0。为了将药物接头(DL)与抗体偶联,使用微生物谷氨酰胺转胺酶(mTG)。反应设置如下:5mg/ml mAb,每个缀合位点5摩尔当量的DL1-M,20U/ml mTG,7%DMSO,24mM HEPES,pH 7.0。反应在37℃下进行18小时。经由尺寸排阻色谱(SEC)将ADC与DL和mTG分离。在SEC纯化之前,使用5M NaCl储备溶液将样品的NaCl浓度调节至100mM。使用与Äkta LC系统(Cytiva)组合的HiLoad Superdex 200 26/60Increase柱,以2.5ml/min的流速和10mM组氨酸,100mM NaCl,pH 5.5作为运行缓冲液进行SEC。合并含有ADC材料的分级样品并使用Amicon Ultra 15

50K离心机(Millipore)浓缩至8mg/ml,接着使用与Äkta LC系统(Cytiva)组合的HiTrap脱盐柱最终缓冲液交换到10mM组氨酸,40mM NaCl,6%海藻糖,0.05%吐温,pH 5.5中。通过0.22μm无菌过滤单元(Millipore)过滤最终的原料药(BDS),并在液氮中速冻直至进一步使用。

[0457] 20.2品质属性

ADC7-M

浓度[mg/ml]	7.11
药物/抗体比	3.87
纯度SEC[%]	99.9
游离药物含量[%]	0.12
内毒素含量[EU/mg]	0.34

ADC2-M

浓度[mg/ml]	6.9
药物/抗体比	3.86
纯度SEC[%]	99.7
游离药物含量[%]	0.03
内毒素含量[EU/mg]	0.19

ADC3-M

浓度[mg/ml]	7.98
药物/抗体比	4.2
纯度SEC[%]	100
游离药物含量[%]	0.13
内毒素含量[EU/mg]	0.14

ADC5-M

浓度[mg/ml]	5.92
药物/抗体比	3.88

纯度 SEC [%]	99.8
游离药物含量[%]	0.15
内毒素含量[EU/mg]	>0.5

20.3.方法:原料药表征

[0458] 尺寸排阻色谱(SEC)方法

在TOSOH TSKgel柱上通过尺寸排阻色谱法评估单体含量和纯度。注射体积范围为1-5μl(至多10μg蛋白)。

波长 214nm

柱 Tosoh TSKgel 7.8mm×300mm,5μm

流动相 50mM磷酸二氢钠,0.4M高氯酸钠,pH 6.3

注射体积 1-5μL

柱温度 25℃

流速 0.5mL/min

显示输入mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱图显示在图38中。

[0459] 反相HPLC(RP HPLC)方法

RP HPLC方法参数

波长 214nm

柱 PLRP-S1000 Å(50×2.1mm,8μm)柱,Agilent

流动相A Lichrosolv H_2O+0.1%TFA

流动相B 100%AcN+0.1%TFA

梯度 在7.5min内30-45%B

注射体积 10μL

柱温度 65℃

流速 1.0mL/min

样品制备 将40μl样品(2.2mg/ml)与4μl 0.5M TCEP混合,并在室温下温育5分钟。然后,加入40μL0.5M碘乙酰胺并在37℃下温育15分钟。注射10μl该反应。

[0460] 示出最终BDS的DAR测定的典型RP-HPLC色谱图显示在图39中。

[0461] 游离药物方法

波长 254nm

柱 Phenomenex Gemini,C18,2×150mm,3μm(P/N 00F-4439-B0)

流动相A 水中的0.1%甲酸

流动相B 乙腈中的0.1%甲酸

梯度

时间 (min)	MP A (%)	MP B (%)
0.00	95	5
1.00	95	5
12.00	0	100
3 min平衡至95% A		

注射体积 10.00μL

柱温度 50℃

流速 0.75mL/min

样品制备 蛋白滴:100μL的原料药+250μL的冷MeOH+50μL的3M $MgCl_2$。在20,000rpm下旋转10min

标准品制备 混合20μL的20mM DL(DMSO中的MSC2702209A)+20μL DMSO+40μL MeOH+20μL的渗滤缓冲液中的200mM NAC。温育过夜以获得4mM DL-NAC。在MeOH中稀释4mM DL-NAC以获得4μM DL-NAC标准品。

内毒素表征

[0462] 使用Endosafe PTS内毒素系统(Charles River),通过动态显色LAL测定测定内毒素。将缓冲液和抗体在LAL试剂水中稀释10倍。将ADC在LAL试剂水中稀释10倍。在0.01-1EU/mL药筒上分析所有样品。通过除以ADC[P]mg/mL将EU/mL值转化为EU/mg。

实施例21:ADC1-M和ADC2-M在体外以高效力特异性杀伤癌细胞

[0463] 人癌细胞系用于评估ADC1-M和ADC2-M杀伤癌细胞的潜力。ADC1-M和ADC2-M针对不同CEACAM5阳性细胞系分别显示出亚纳摩尔和亚纳摩尔至个位数纳摩尔的体外效力(表3)。相比之下,ADC1-M和ADC2-M对CEACAM5阴性细胞系MDA-MB-231的影响较小(表3)。如示例性剂量-反应曲线所示,ADC1-M和ADC2-M对CEACAM5阳性细胞系SK-CO-1、SNU-16、MKN-45和LS174T非常强效(图40a-d和图41a-d)。相比之下,ADC1-M和ADC2-M对抗原阴性MDA-MB-231细胞活力仅具有较小影响(图40e和图41e)。

[0464] 使用与ADC1-M和ADC2-M相同的接头有效负载的同型对照ADC对测试的CEACAM5阳性细胞系显示出低得多的效果(图40和图41)。

[0465] 总之,ADC1-M和ADC2-M在体外以高效力特异性杀伤表达CEACAM5的人癌细胞系。

	SK-CO-1 IC50 [M]; N≥2	SNU-16 IC50 [M]; N≥2	MKN-45 IC50 [M]; N≥2	LS174T IC50 [M]; N≥2	MDA-MB-231 IC50 [M]; N≥3
ADC1-M	7.6E-11 (-95%)	3.6E-10 (-97%)	5.2E-10 (-96%)	6.0E-10 (-86%)	>1E-08 (-71%)
ADC2-M	1.1E-10 (-92%)	5.1E-9 (-78%)	1.2E-9 (-80%)	8.5E-10 (-67%)	n/a (-16%)
有效负载	2.2E-10 (-97%)	2.9E-10 (-99%)	6.6E-10 (-100%)	3.0E-10 (-91%)	6.0E-10 (-91%)
CEACAM5	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性

表3.ADC1-M、ADC2-M和游离有效负载对多种人细胞系的效力。括号中指示了在最高测试化合物浓度下与未处理对照相比的最大效应。效力报告的截止值为-50%效果,否则描述为“n/a”。对于每种细胞系,指示CEACAM5表达。

方法——活力测定:

[0466] ADC对癌细胞系的细胞毒性效果通过细胞活力测定来测量。在处理前一天,将细胞以90μL的体积接种在96孔板中。将测试化合物(ADC或游离有效负载)以10倍起始浓度在细胞培养基中配制。将测试化合物连续稀释(1:4),并一式三份将10μL的每种稀释液添加到细胞中。将板在CO_2培养箱中在37℃下培养六天。为了细胞活力测量,将Cell Titer-Glo®试剂(Promega™Corp,Madison,WI)添加到每个孔中,并根据制造商的说明书处理板。使用Varioskan读板器(Thermo Fisher)测量发光信号。将发光读数转化为相对于未处理细胞的活力%。使用loG(抑制剂)相对于反应、可变斜率、使用Genedata Screener或GraphPad Prism的4参数拟合方程,用非线性回归分析拟合数据。数据显示为相对细胞活力%相对于摩尔化合物浓度,误差条指示一式两份或一式三份的标准偏差(SD)。计算源于多个实验的IC50的几何平均值。

[0467] 还将ADC1-M和ADC2-M在它们对抗原阳性SK-CO-1和抗原阴性MDA-MB-231细胞系的

细胞毒性效果方面与ADC SAR DM4进行比较。针对SK-CO-1癌细胞,ADC1-M和ADC2-M显示出与ADC SAR DM4相似的效力(图40a和图41a,与图26a相比)。与ADC1-M和ADC2-M相比,ADC SAR DM4针对抗原阴性MDA-MB-231的非特异性作用更高(图40e和图41e,与图26b相比),并且ADC2-M的差异比ADC1-M更显著。

[0468] 还使用缺少YTE突变的抗体主链产生ADC1-M和ADC2-M。这些ADC(ADC6-M和ADC7-M)均显示出与具有YTE突变的相应ADC(ADC1-M和ADC2-M)相当的结果。

实施例23:ADC的药代动力学研究

[0469] 在单次静脉内施用3mg/kg的ADC1、ADC1-M、ADC6-M、ADC7-M、ADC2-M后,在人FcRn转基因(276个半合子模型)小鼠中进行药代动力学研究。对于ADC1-M、ADC6-M、ADC7-M和ADC2-M,在给药后1、24、48、72、144、168、240、336和504小时从每个治疗组的6只动物采集样品,并且对于ADC1,在给药后0.08(约5分钟)、4、24、48、72、168、240、336和504小时从9只动物采集样品。合并数据用于PK分析,每次治疗的血浆浓度参见图42。时间0时的血浆浓度(C0)的反向外推导致对于ADC1-M、ADC7-M和ADC2-M略低于理论最大浓度,并且对于ADC6-M和ADC1接近理论最大值(假定在40mL/kg血浆体积中稀释)。血浆浓度以双相曲线降低:在所有分子组中,最多24小时观察到急剧的血浆浓度降低,随后较慢降低直至最后一次采样时间(504小时),除了用ADC6-M治疗的动物,其直至336小时可定量。

[0470] 对ADC2-M(190小时)(DAR=4的Lala-YTE突变体)计算最长终末半衰期(t1/2)值,接着是ADC7-M(122小时)(DAR=4的Lala-突变体)、ADC1-M(64.5小时)(DAR=8的Lala-YTE突变体)和ADC6-M(33.8小时)(DAR=8的Lala-突变体)、以及最后的ADC1(29.6小时)(DAR=8的IgG1.4)。外推AUCinf的%低于20%,允许可靠地计算AUC0-inf和导出的参数(Cl、Vz和Vss)。在转基因小鼠中计算ADC2-M(Lala-YTE-突变体,DAR=4)的最高AUC0-inf和最低Cl值,接着计算ADC7-M、ADC6-M、ADC1-M和ADC1的最高AUC0-inf和最低Cl值。AUC0-inf和Cl值范围分别为1360000至10200000h*ng/mL和0.293至1.16mL/h/kg。没有观察到分布体积(Vss)的相关差异,其中Vss范围为49.8至113mL/kg。

[0471] 总之,在转基因小鼠中单次iv施用3mg/kg后,具有最高血浆暴露、最低Cl和最长t1/2的ADC2-M显示出最佳PK概况。通过从IgG1.4移动到Lala突变体,进一步通过包括YTE突变体来改善PK概况,通过将DAR从8降低到4观察到最强效果。

[0472] 表5:3mg/kg i.v.施用后Ceacam5备用分子的PK参数。还指示了抗体-药物缀合物(ADC)和药物/抗体比(DAR)。

剂量(mg/kg)	ADC	A 抗体主链	DAR	菌株	t1/2 (h)	C0 (ng/mL)	Tlast (h)	Clast (ng/mL)	AUClast (h*ng/mL)	AUCinf (h*ng/mL)	%_Ext (%)	Vz (mL/kg)	Cl (mL/h/kg)	Vss (mL/kg)
3	ADC 1	IgG1.4	8	HuFcRn	29.6	76800	240	74.4	1360000	1360000	0.2	93.9	2.20	65.8
3	ADC 1-M	Lala-YTE-突变体	8	HuFcRn	64.5	49900	504	1190	2580000	2590000	0.4	108	1.16	113
3	ADC 2-M	Lala-YTE-突变体	4	HuFcRn	190	56100	504	6810	8360000	10200000	18.4	80.2	0.293	87.7
3	ADC 6-M	Lala-突变体	8	HuFcRn	33.8	84100	336	52.0	2850000	2850000	0.1	51.3	1.05	49.8
3	ADC 7-M	Lala-突变体	4	HuFcRn	122	55800	504	2400	5720000	6140000	6.9	86.0	0.488	93.4

实施例24:ADC1-M和ADC2-M在胰腺细胞系来源的肿瘤模型中的效力

[0473] 已经在人胰腺细胞系来源的异种移植模型BxPC3(ATCC,CRL-1687)中评估了ADC1-M和ADC2-M的效力。将5×10^6个BxPC3细胞皮下注射到6至8周龄的免疫缺陷雌性小鼠(Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu,Envigo)的右侧腹中。当肿瘤达到85 mm^3的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)或ADC1-M(5 mg/kg;第0天)或ADC2-M(5 mg/kg或10 mg/kg;第0天)静脉内治疗10只小鼠/组一次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×(Wˆ2)/2计算肿瘤体积。

[0474] 以5 mg/kg的剂量用ADC1-M和以5 mg/kg或10 mg/kg的剂量用ADC2-M的单次治疗产生显著的抗肿瘤效果。两种ADC在该模型中具有相当的效力(图43)。治疗对体重没有显著影响(数据未显示)。

实施例25:制备ADC8,其为ADC戈维替康-拉贝妥珠单抗的类似物

25.1抗体

[0475] 出于进一步比较实验的目的,基于具有以下序列的单克隆抗体制备ADC戈维替康-拉贝妥珠单抗的另一类似物:

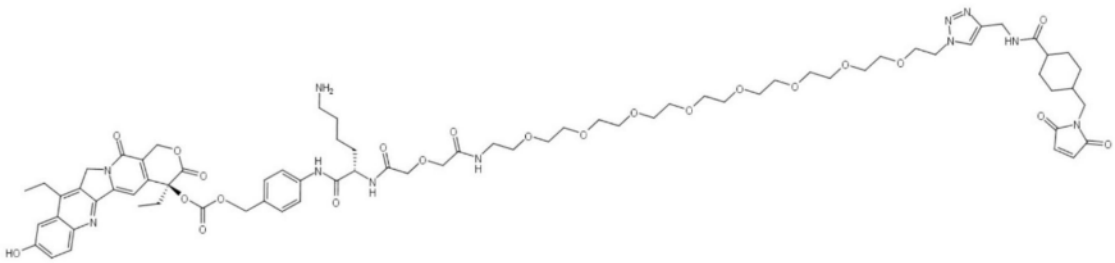
重链:DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TSVAWYQQKP GKAPKLLIYW

TSTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YSLYRSFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GECEVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCSASGF DFTTYWMSWV RQAPGKGLEW IGEIHPDSST INYAPSLKDR FTISRDNAKN TLFLQMDSLR PEDTGVYFCA SLYFGFPWFA YWGQGTPVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK (SEQ ID NO: 62)

轻链：DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TSVAWYQQKP GKAPKLLIYW TSTRHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ YSLYRSFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 63)

25.2药物-接头化合物

[0476] 作为待与上述提及的抗体缀合的药物-接头分子,使用以下结构的分子：



该药物-接头分子购自SyntaBio LLC,10239 Flanders Ct,San Diego,CA 92121.批号S041070422。

25.3缀合

[0477] 在缀合前将单克隆抗体(mAb)在2-8℃下解冻最多3天,并在2-8℃下储存在PBS pH6.8中直至进一步使用。在缀合当天,通过添加0.5 M Tris,0.025 M EDTA,pH 8.5将mAb溶液的pH调节至5％(v/v)的最终浓度。在pH调节后,使用10摩尔当量的TCEP还原mAb并在20℃下温育120 min。随后,将mAb溶液用20 mM组氨酸,80 mM NaCl,pH 5.5以1:1稀释,将DMSO浓度调节至10％(v/v)并加入16摩尔当量的上述提及的药物-接头以开始反应。将反应在20℃下温育60min,并且最后通过添加100mM NAC(N-乙酰基-半胱氨酸)来猝灭。然后,经由制备型尺寸排阻色谱法处理缀合的mAb(即ADC)。

25.4制备型尺寸排阻色谱法、脱盐和过滤

[0478] 使用制备型尺寸排阻色谱法纯化反应混合物。将GE HiLoad 26/60Superdex S200柱连接到Äkta Avant 25系统(GE Healthcare)上,并根据制造商的说明书用20mM组氨酸,80mM NaCl,pH 5.5平衡。随后,注射反应混合物并使用20mM组氨酸,80mM NaCl,pH5.5作为

运行缓冲液以5ml/min的流速运行通过该柱。经由280nm处的UV光吸收确定含有ADC的级分，汇集并浓缩。根据制造商的说明书使用Vivaspin VS2022装置(Sartorius UK Ltd.)浓缩ADC材料。根据制造商的说明书，在Äkta Avant 25系统(GE Healthcare)上使用HiPrep 26/10脱盐柱(GE Healthcare)以10ml/min的流速将浓缩的ADC材料转移至配制缓冲液(10mM组氨酸，100mM NaCl，3％海藻糖，0.05％(w/v)PS20，pH 5.5)中。使用0.2μm过滤器(0.2μm PES过滤器，Merck Millipore)过滤最终的ADC材料，等分并随后在液氮中速冻。ADC材料(原料药)的最终浓度为7.7mg/ml。将该材料保持在-80℃下直到进一步使用。从该工作获得的ADC在本文中也称为“ADC8”；该ADC是戈维替康-拉贝妥珠单抗的类似物。

25.5ADC8原料药的进一步表征

[0479] 通过(a)尺寸排阻色谱(SEC)(显示99.3％的单体纯度)、(b)反相HPLC(RP HPLC)(显示7.7的DAR)和(c)基于RP HPLC的游离药物方法(显示低于0.02％(按摩尔比计)的残留游离药物水平)进一步分析上文获得的ADC8原料药。

实施例26：ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M以高于ADC SAR DM4和ADC8的特异性杀伤癌细胞

[0480] 使用与实施例21中所述相同的方法，将人癌细胞系用于比较ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M以及ADC SAR DM4和ADC8相对于对缺少CEACAM5表达的癌细胞的效果，对具有CEACAM5表达的癌细胞的效果。通过将针对CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞的IC50除以针对每种CEACAM5阳性细胞系的IC50来计算定义为特异性因子的IC50的倍数减少(参见表6)。特异性因子的值越大，测试的ADC的特异性越高。ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M在CEACAM5阳性SK-CO-1、SNU-16和MKN-45细胞中显示出比在CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞中低得多的IC50，这导致了在116至874的范围内的特异性因子。由于在测试的浓度范围内缺少对MDA-MB-231细胞的影响，可能低估了ADC2-M和ADC7-M的特异性因子(如表3和图41e中对ADC2-M所示)。出于这一原因，仅对于ADC2-M和ADC7-M，将IC50设定为100nM的最高测试浓度来计算特异性因子。相比之下，ADC SAR DM4和ADC8分别显示出在26至73和1.8至4.8的范围内的较低特异性因子。总之，与ADC SAR DM4和ADC8相比，显示了体外ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M对CEACAM5阳性癌细胞的更具选择性的杀伤。

	SK-CO-1 N≥2	SNU-16 N≥2	MKN-45 N≥2	MDA-MB-231 N≥2
ADC1-M	874.4	241.9	201.2	1
ADC2-M	>631.9	>207.2	>166.6	1
ADC6-M	710.2	194.9	157.7	1
ADC7-M	>595.8	>178.9	>116.2	1
ADC SAR DM4	46.5	73.2	26.0	1
ADC8	4.8	1.8	2.5	1
CEACAM5	阳性	阳性	阳性	阴性

表6.与在CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞系中相比,ADC在CEACAM5阳性细胞系中的相对效力提高(特异性因子)。将在MDA-MB-231中的IC50除以在三种CEACAM5阳性细胞系的每一种中的IC50来计算每种ADC的相应特异性因子(仅用于说明,报道了MDA-MB-231的理论因子为1)。计算是基于2至4次单独实验的IC50几何平均值。

实施例27:针对与抗原阳性细胞共培养的抗原阴性细胞,ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M介导比ADC SAR DM4更强效的旁观者效应

[0481] 使用与实施例10中相同的方法,在旁观者测定中评估ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M和ADC SAR DM4介导针对紧邻抗原阳性细胞的抗原阴性细胞的旁观者效应的潜力。在CEACAM5阳性SK-CO-1的存在下,ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M显示出针对CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞的强效的旁观者效应(图44)。在1nM的ADC浓度下进行共培养实验,对于ADC1所述浓度引起CEACAM5阳性SK-CO-1细胞活力的最大抑制(图26A),但对单独的CEACAM5阴性MDA-MB-231细胞没有影响(图26B)。与这些发现一致,在仅MDA-MB-231对照的旁观者测定设置中没有观察到ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M和ADC SAR DM4的非特异性作用。

[0482] 总之,针对与抗原阳性细胞共培养的抗原阳性癌细胞,ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M、ADC7-M介导强效的旁观者效应。这些发现指示有效靶向具有异质靶标表达的肿瘤的潜力。

[0483] 与ADC SAR DM4相比,ADC1-M、ADC2-M、ADC6-M和ADC7-M在与抗原阳性细胞的共培养中对抗原阴性细胞介导强得多的旁观者效应(图44)。

[0484] 对于所有测试的ADC,旁观者效应的程度随着添加到恒定数量的抗原阴性细胞中的抗原阳性细胞数量的增加而提高。不希望受理论束缚,这可能是更多ADC被更高数量的抗原阳性细胞加工以释放更多游离有效负载的结果,这是对抗原阴性细胞的旁观者效应的原因。

[0485] 在旁观者测定中,在1E-9M测试浓度下对所有测试ADC均没有观察到对单独的MDA-MB-231细胞的测试ADC的非特异性作用。

实施例28:ADC1-M和ADC3-M与ADC8相比的效力

[0486] 在人胰腺腺癌细胞系来源的异种移植模型HPAF-II(ATCC,CRL-1997)中评估了

ADC1-M和ADC2-M与ADC8相比的效力。用5×10^6个HPAF-II细胞在右侧腹中对6至8周龄的免疫缺陷雌性小鼠(Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu,Envigo)进行皮下注射。当肿瘤达到150mm^3的平均体积时,用ADC1-M(1mg/kg或6mg/kg)或用ADC3-M(1mg/kg或6mg/kg)或用ADC8(1mg/kg或6mg/kg)静脉内治疗10只小鼠/组一次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×W^2/2计算肿瘤体积。

[0487] 与媒介物对照相比,以1或6mg/kg的剂量用ADC1-M或ADC3-M的单次治疗导致显著的抗肿瘤效果。该效果是剂量依赖性的,因为用1mg/kg的单次治疗仅导致轻微和暂时的抗肿瘤效果,而6mg/kg显示出强得多的抗肿瘤效果。相比之下,用ADC8的单次治疗在任一剂量下均未显示出显著的抗肿瘤效果(图45)。所有治疗对体重没有显著影响(数据未显示)。

实施例29:在CRC PDX小鼠模型中ADC1-M和ADC3-M与ADC SAR DM4相比的效力

[0488] 在人CRC异种移植模型COPF230中评估了ADC1-M和ADC3-M与ADC SAR DM4相比的抗肿瘤效力。用COPF230肿瘤片段在右侧腹中对6至8周龄的免疫缺陷雌性小鼠(Crl:NU-Foxn1nu)进行皮下移植。当肿瘤达到165mm^3的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)或ADC1-M、ADC3-M或ADC SAR DM4(各自为6mg/kg)静脉内治疗6只小鼠/组一次。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×W^2/2计算肿瘤体积。

[0489] 与媒介物对照组相比,用6mg/kg ADC1-M或ADC3-M的单次治疗导致相当且显著的抗肿瘤效果。相比之下,用6mg/kg ADC SAR DM4的单次治疗仅表现出较小的抗肿瘤效果(图46)。所有治疗对体重没有显著影响(数据未显示)。

实施例30:ADC1-M和ADC3-M与ADC SAR DM4相比在GC PDX小鼠模型中的效力

[0490] 在人GC异种移植模型GAPF313中评估了ADC1-M和ADC3-M与ADC SAR DM4相比的抗肿瘤效力。该研究在Lide BiotecH(Shanghai)进行。用GAPF313肿瘤片段在右侧腹中对6至8周龄的免疫缺陷雌性小鼠(Crl:NU-Foxn1nu)进行皮下移植。当肿瘤达到176mm^3的平均体积时,用媒介物(盐水溶液)或用4mg/kg ADC1-M或ADC3-M或4.7mg/kg ADC SAR DM4每隔一周静脉内治疗6只小鼠/组(3个周期)。用测径器测量肿瘤长度(L)和宽度(W),并使用式L×W^2/2计算肿瘤体积。

[0491] 与媒介物对照相比,用ADC1-M或ADC3-M的多次治疗导致相当且显著的抗肿瘤效果。与ADC1-M和ADC3-M相比,ADC SAR DM4的有效性明显较低(图47)。所有治疗对体重没有显著影响(数据未显示)。

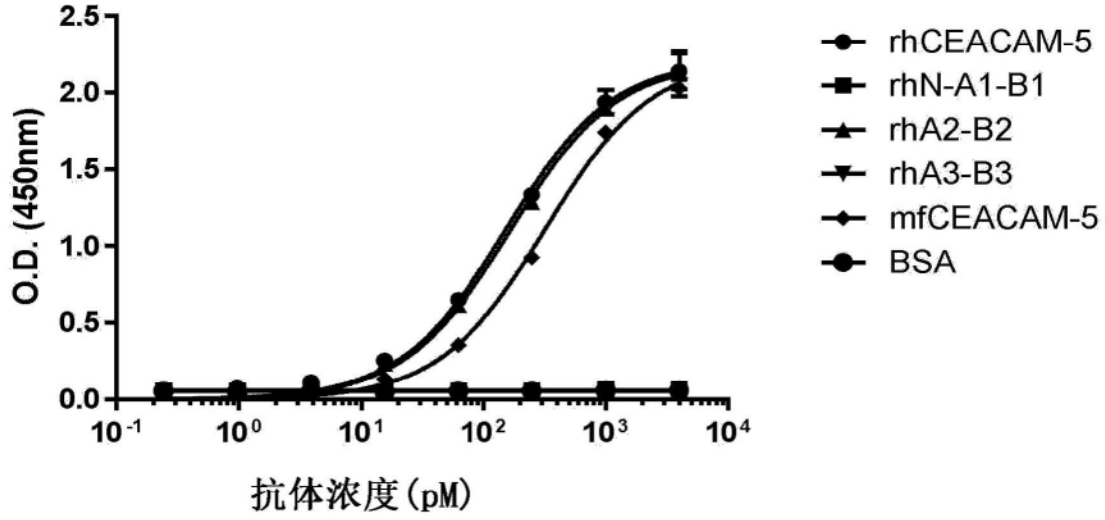

O.D. (450nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-1
100
101
102
103
104
抗体浓度(pM)
rhCEACAM-5
rhN-A1-B1
rhA2-B2
rhA3-B3
mfCEACAM-5
BSA

图1

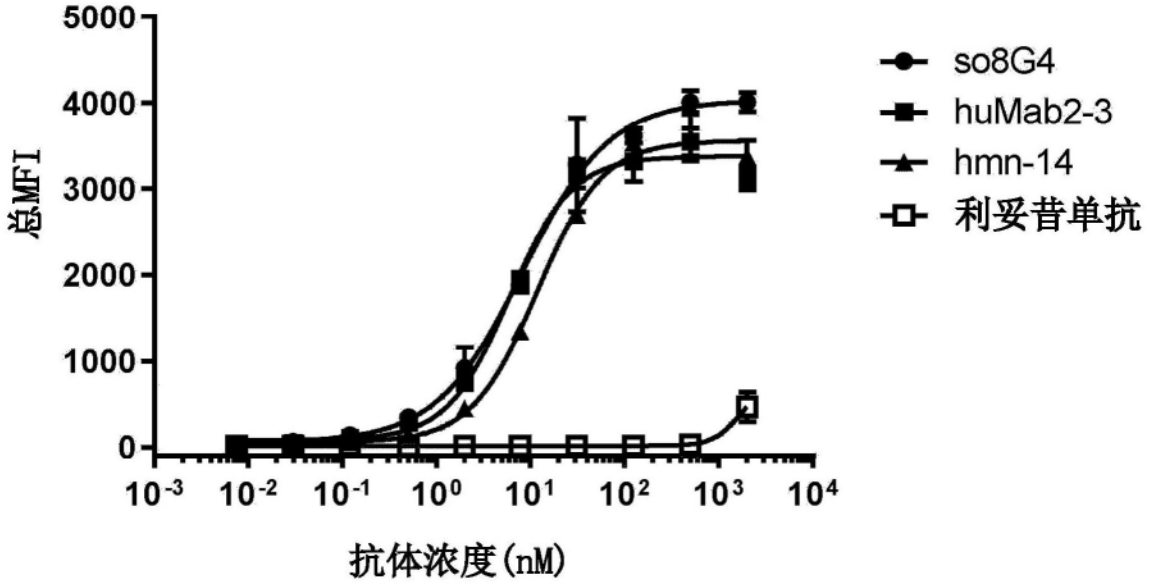

总MFI
5000
4000
3000
2000
1000
0
10-3
10-2
10-1
100
101
102
103
104
抗体浓度(nM)
so8G4
huMab2-3
hmn-14
利妥昔单抗

图2

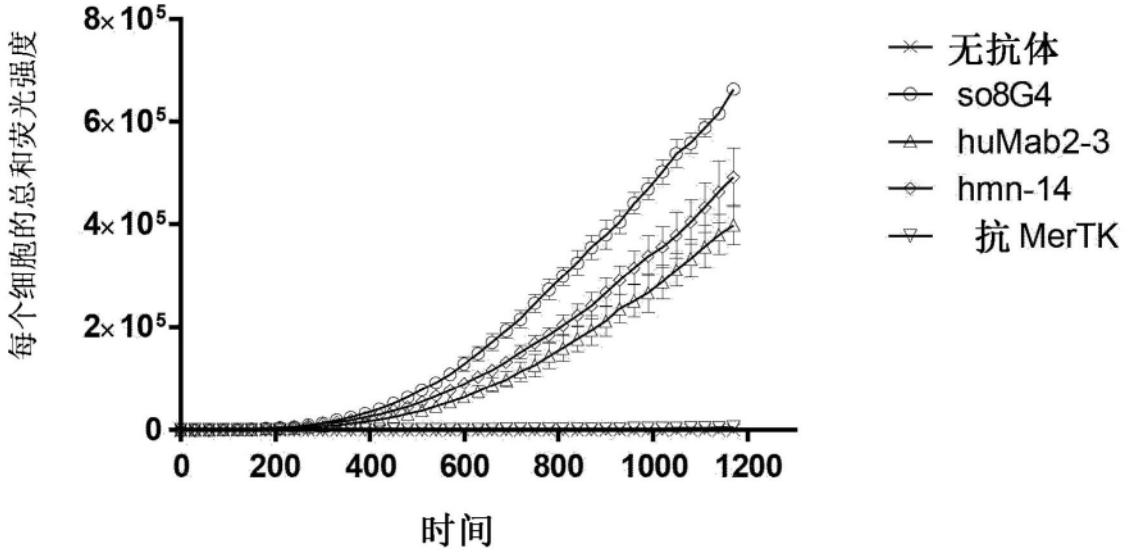

每个细胞的总和荧光强度
8×10^5
6×10^5
4×10^5
2×10^5
0
0
200
400
600
800
1000
1200
时间
无抗体
so8G4
huMab2-3
hmn-14
抗 MerTK

图3

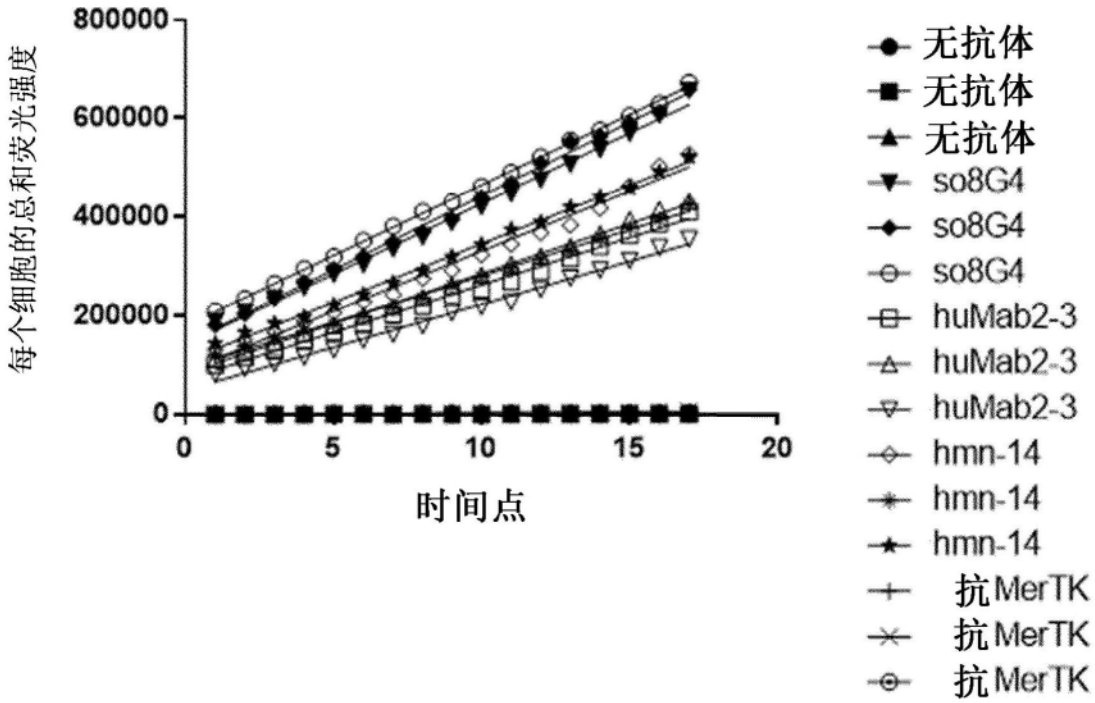

每个细胞的总和荧光强度
800000
600000
400000
200000
0
0
5
10
15
20
时间点
无抗体
无抗体
无抗体
so8G4
so8G4
so8G4
huMab2-3
huMab2-3
huMab2-3
hmn-14
hmn-14
hmn-14
抗MerTK
抗MerTK
抗MerTK

图4

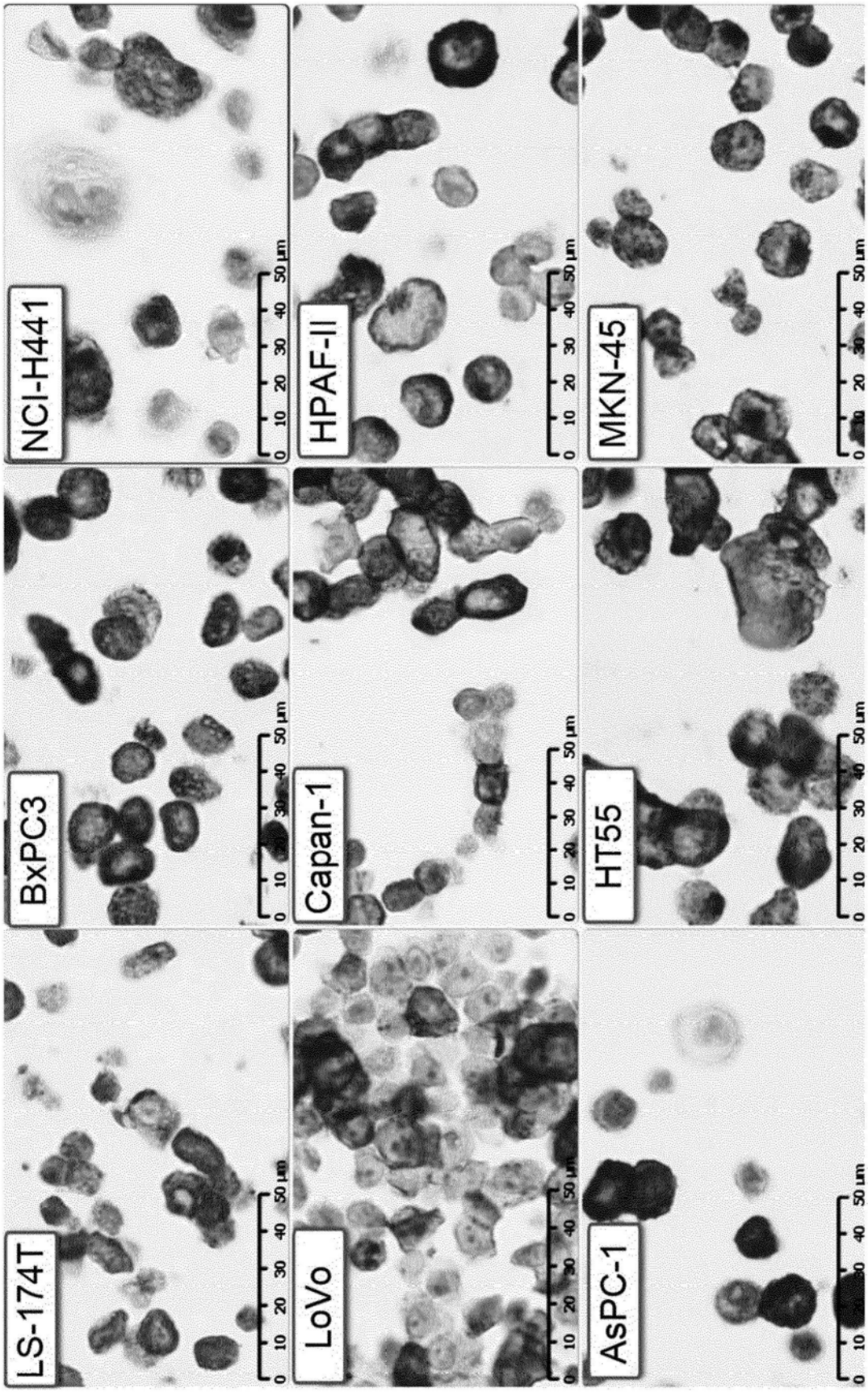

NCI-H441
BxPC3
HPAF-II
Capan-1
MKN-45
HT55
LS-174T
LoVo
AsPC-1
0 10 20 30 40 50 μm

图5

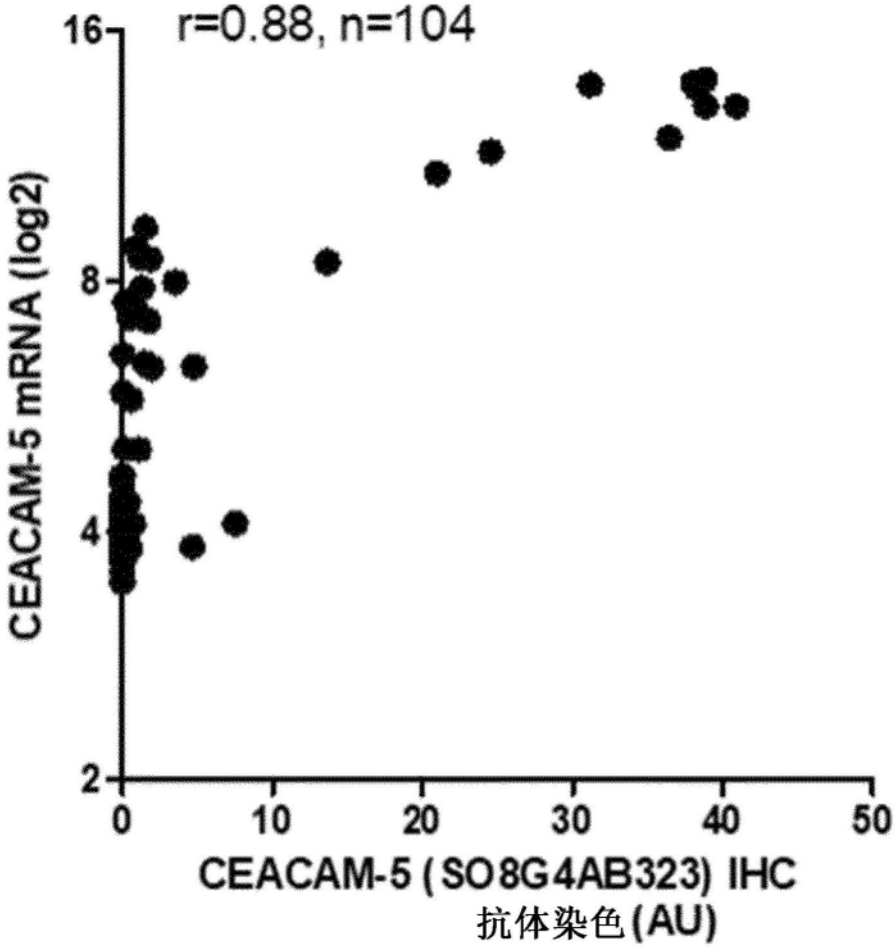

r=0.88, n=104
16
8
4
2
CEACAM-5 mRNA (log2)
0
10
20
30
40
50
CEACAM-5 (SO8G4AB323) IHC
抗体染色(AU)

图6

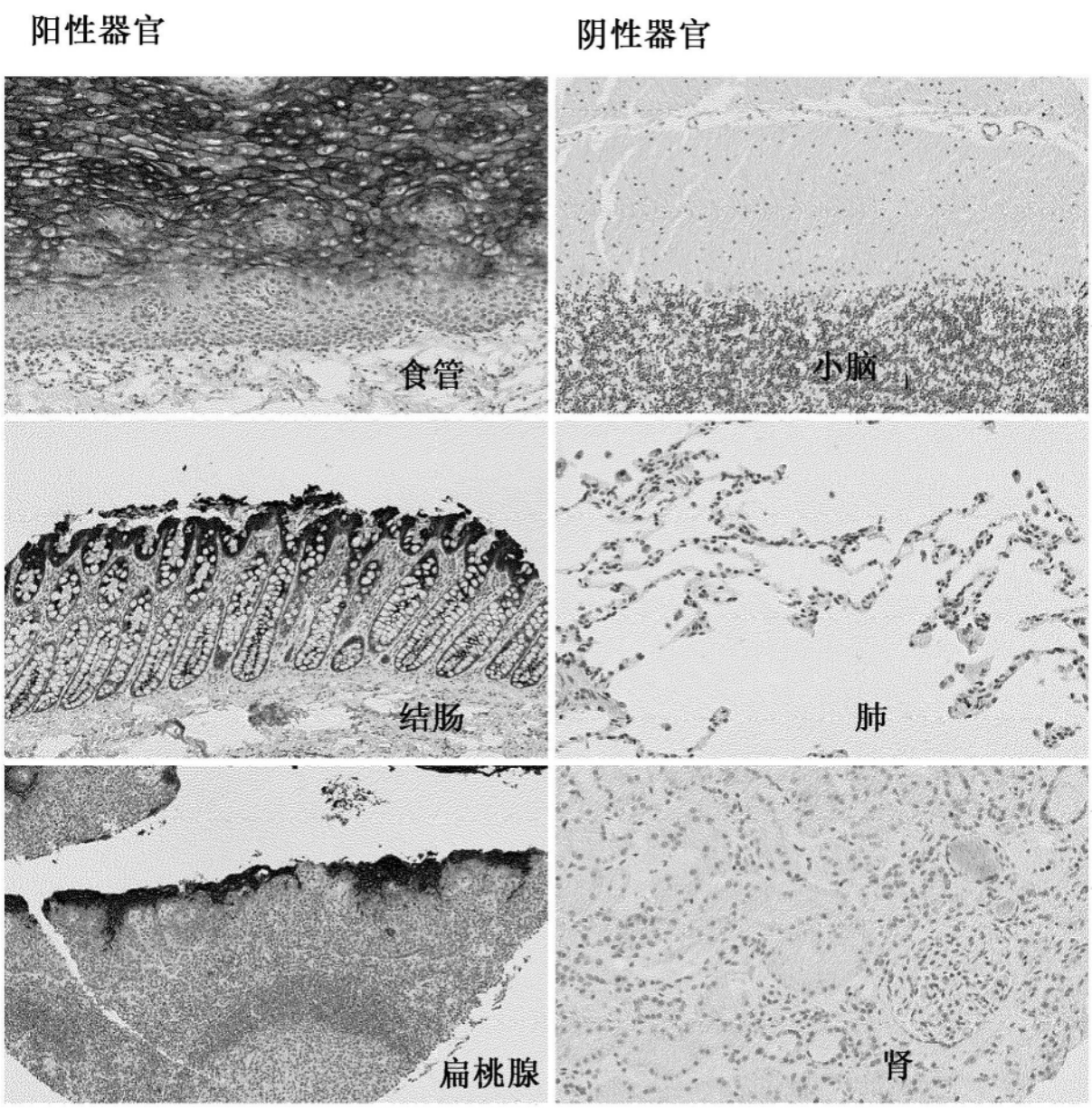


图7

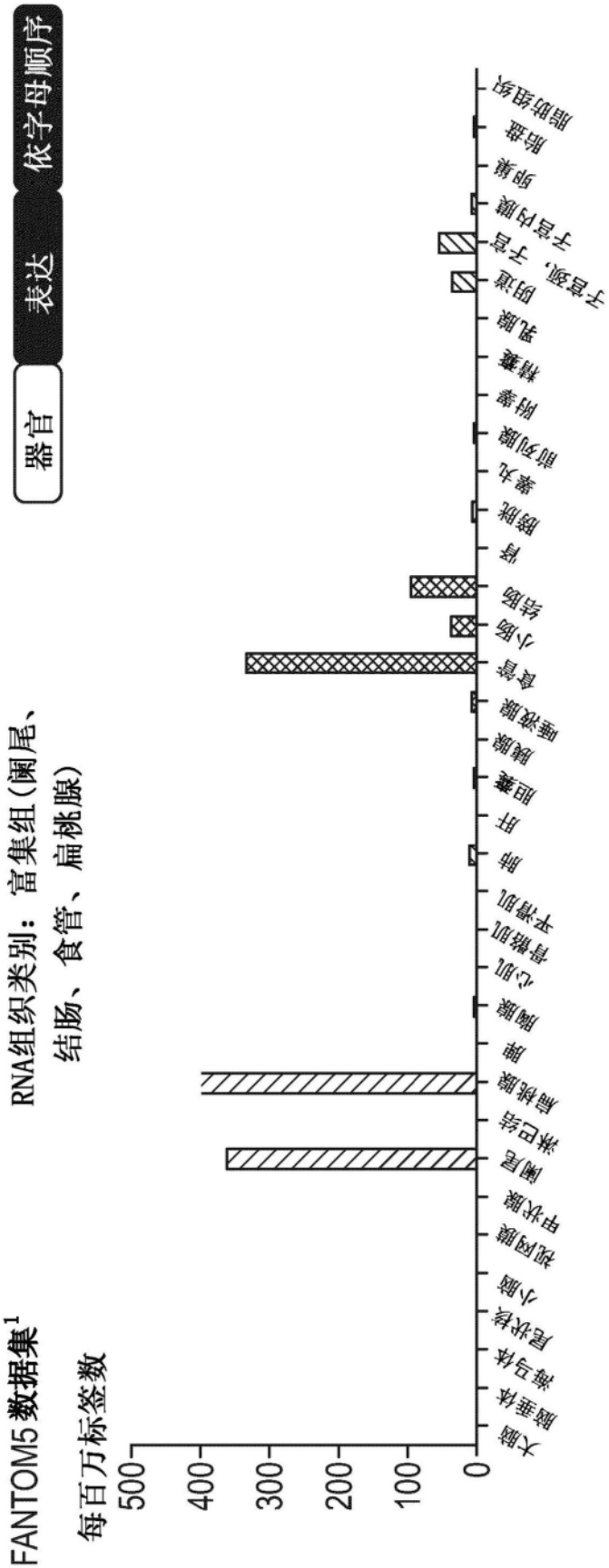
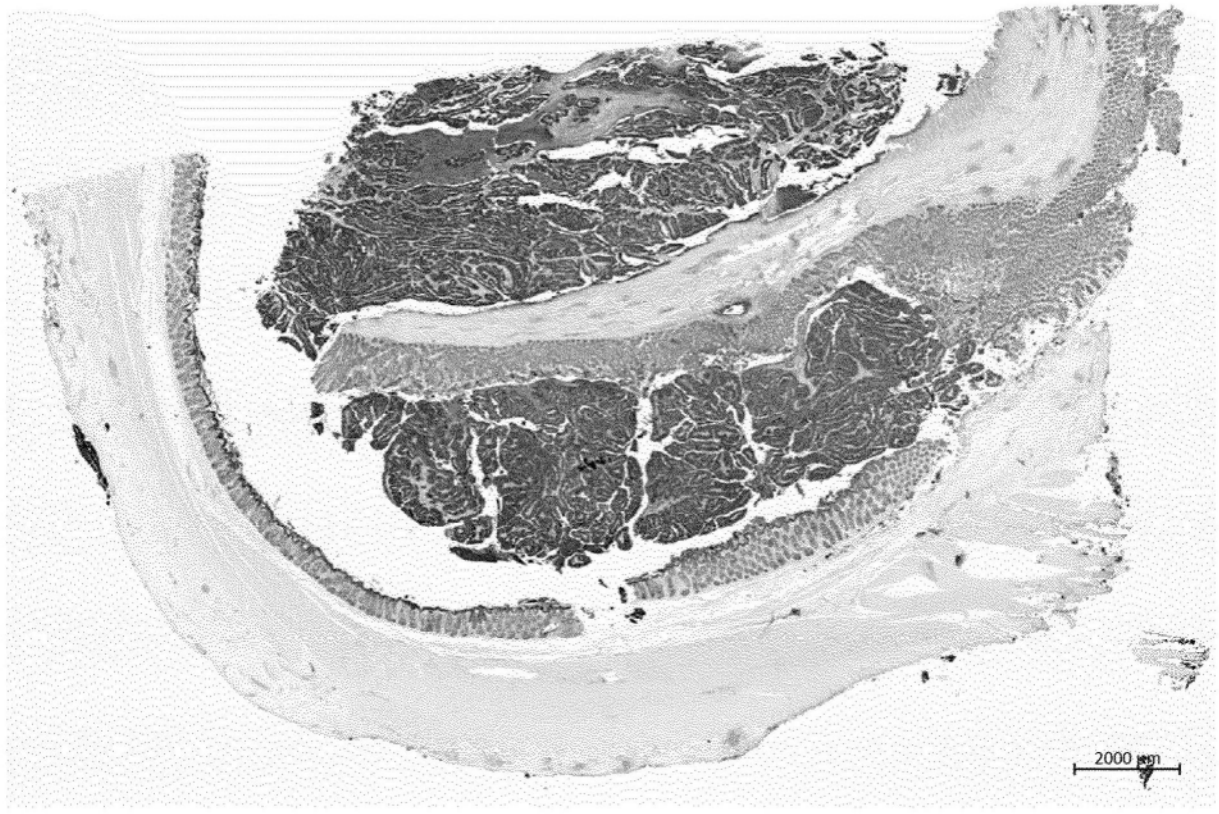

器官
表达
依字母顺序
RNA组织类别：富集组(阑尾、结肠、食管、扁桃腺)
FANTOM5数据集[1]
每百万标签数
500
400
300
200
100
0
大脑
脑垂体
海马体
尾状核
小脑
视网膜
甲状腺
阑尾
淋巴结
扁桃腺
脾
胸腺
心肌
骨骼肌
平滑肌
肺
肝
胆囊
胰腺
唾液腺
食管
小肠
结肠
肾
膀胱
睾丸
前列腺
附睾
精囊
乳腺
阴道
子宫颈，子宫
子宫内膜
卵巢
胎盘
脂肪组织

图8



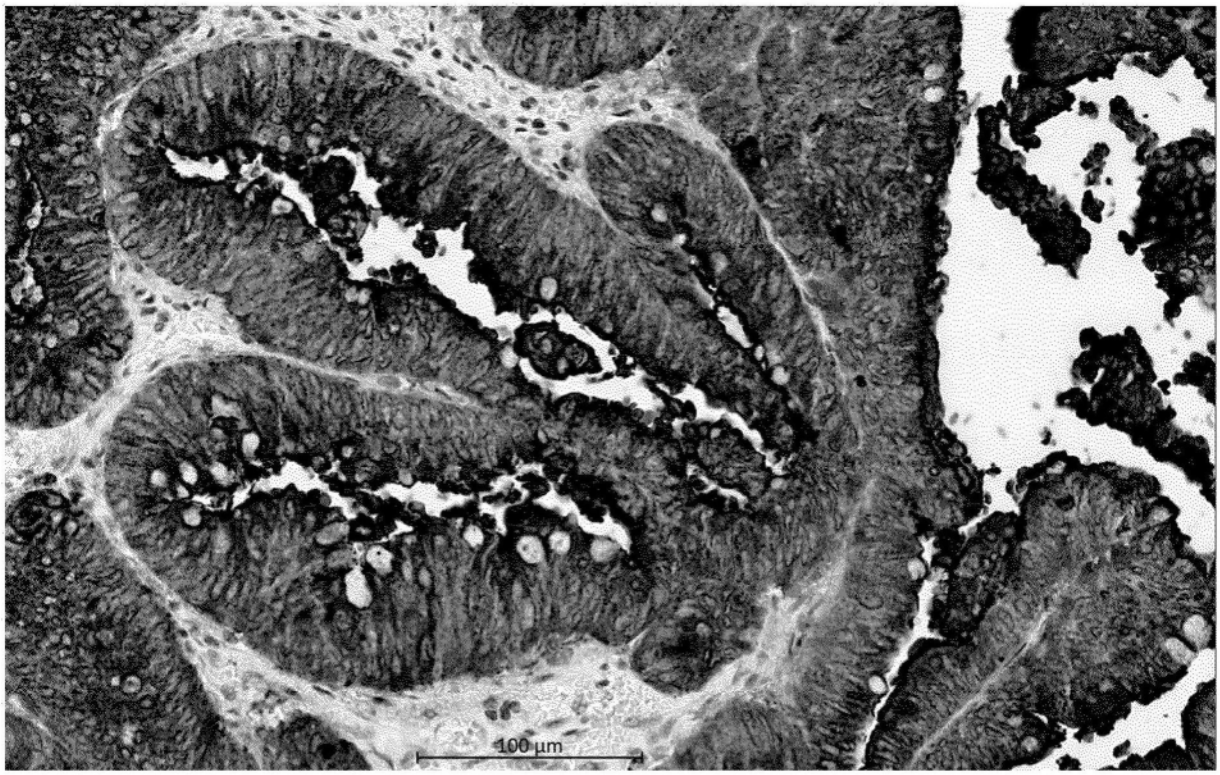
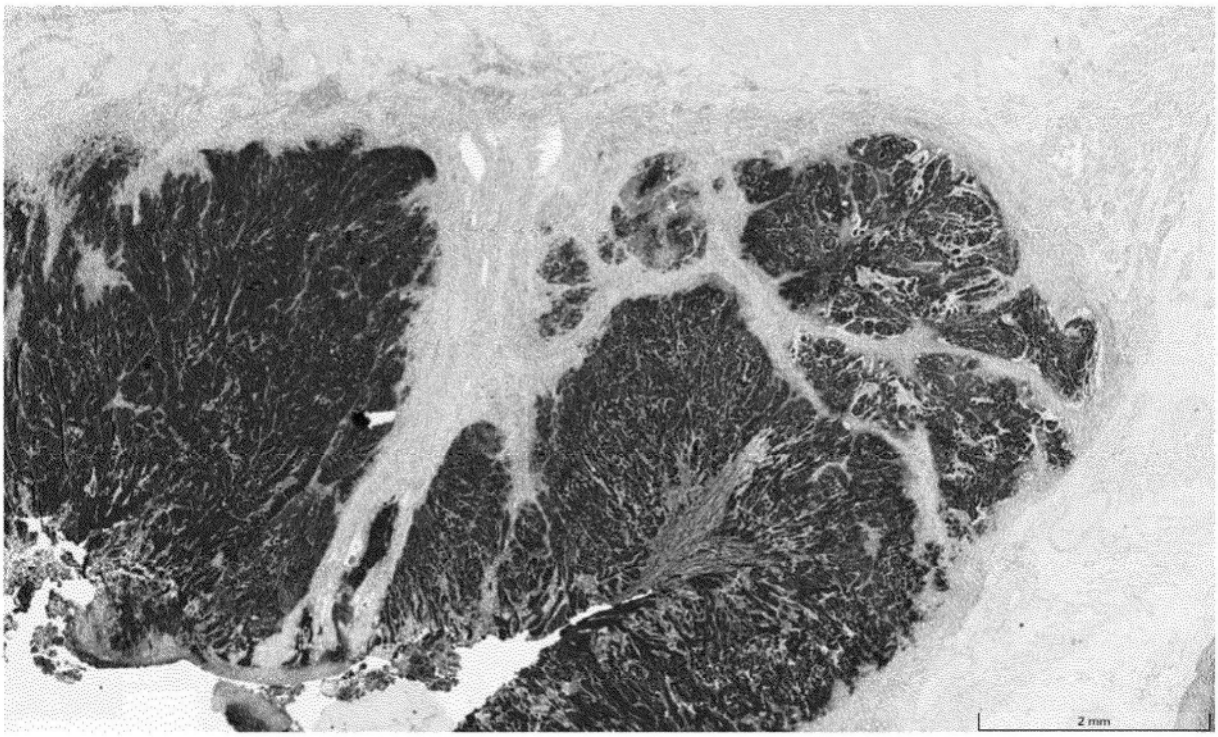


图9



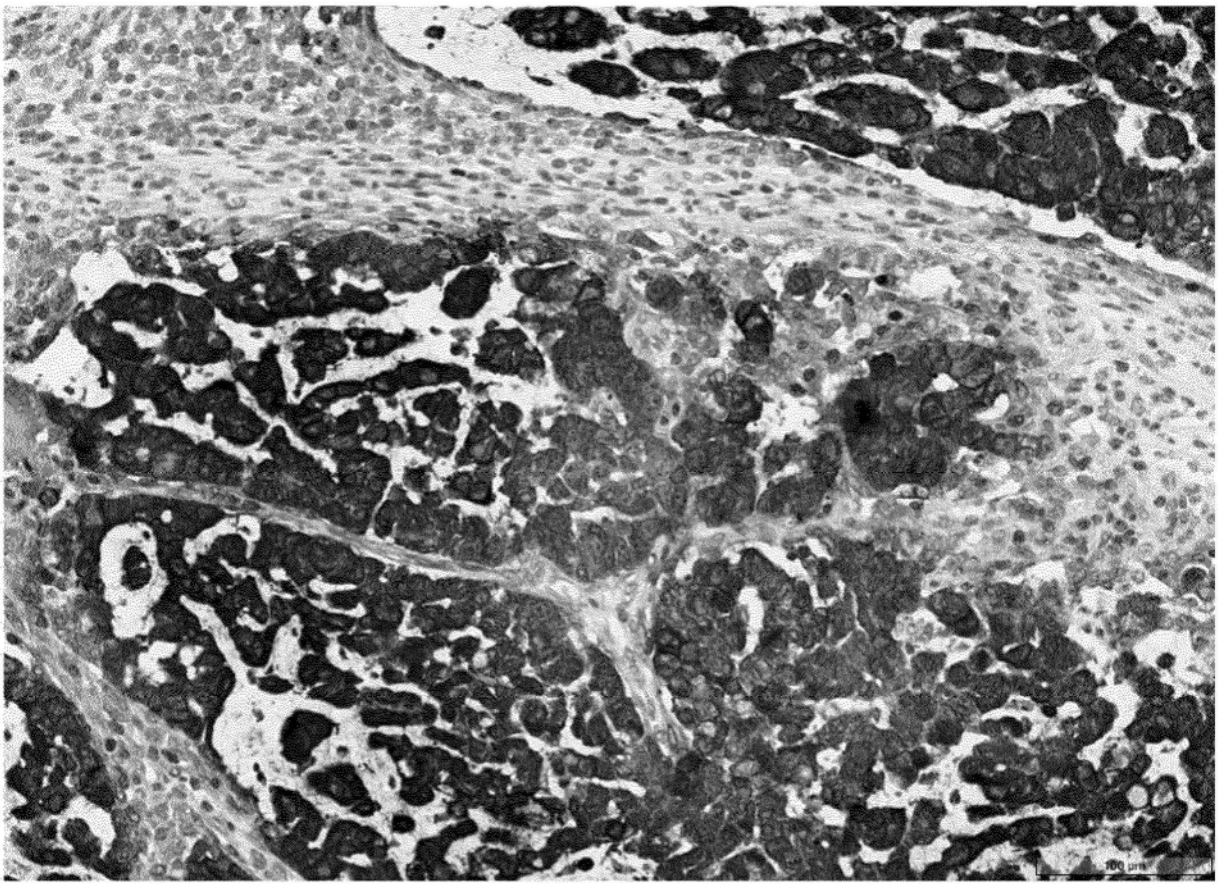


图10

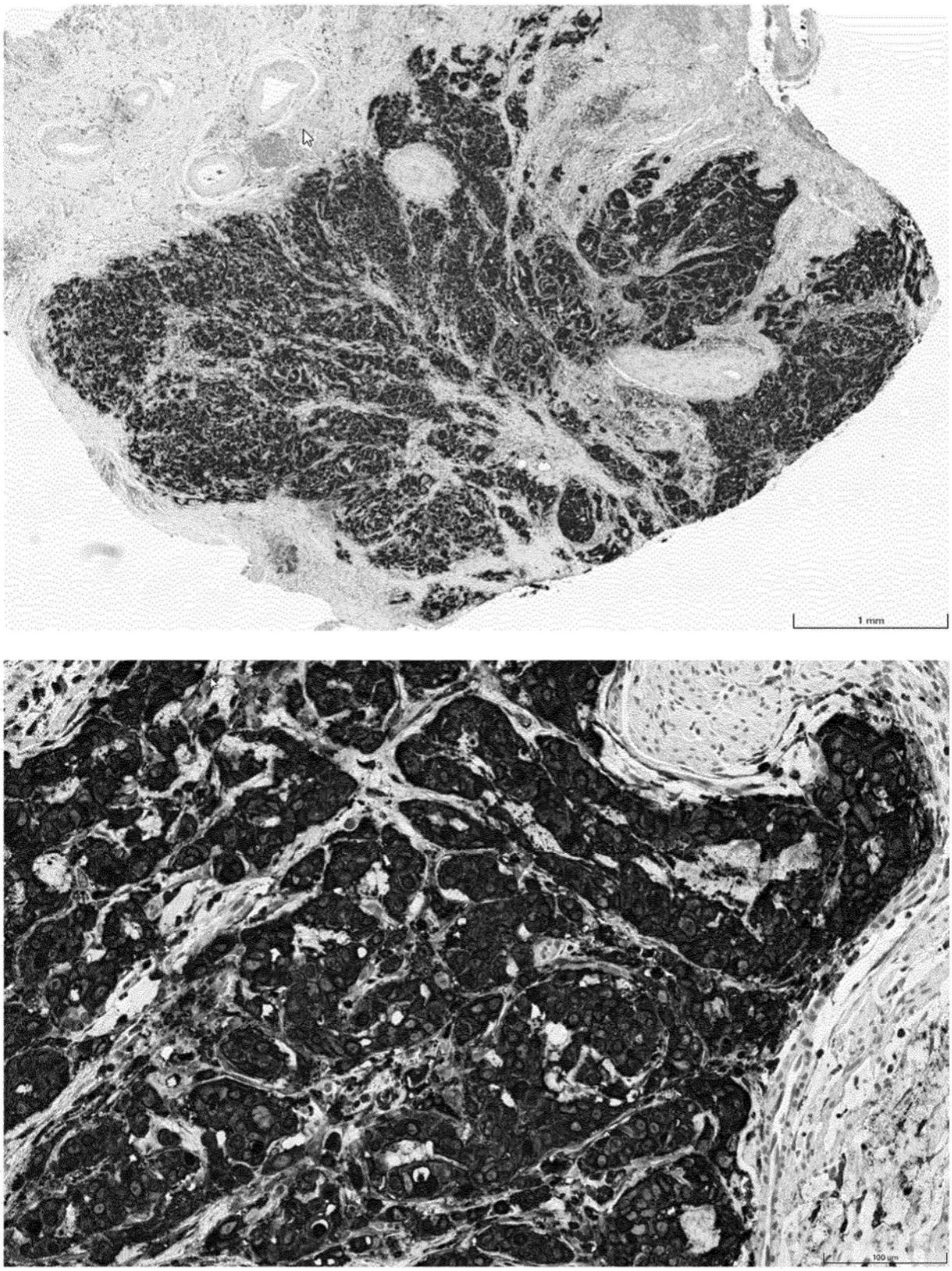


图11

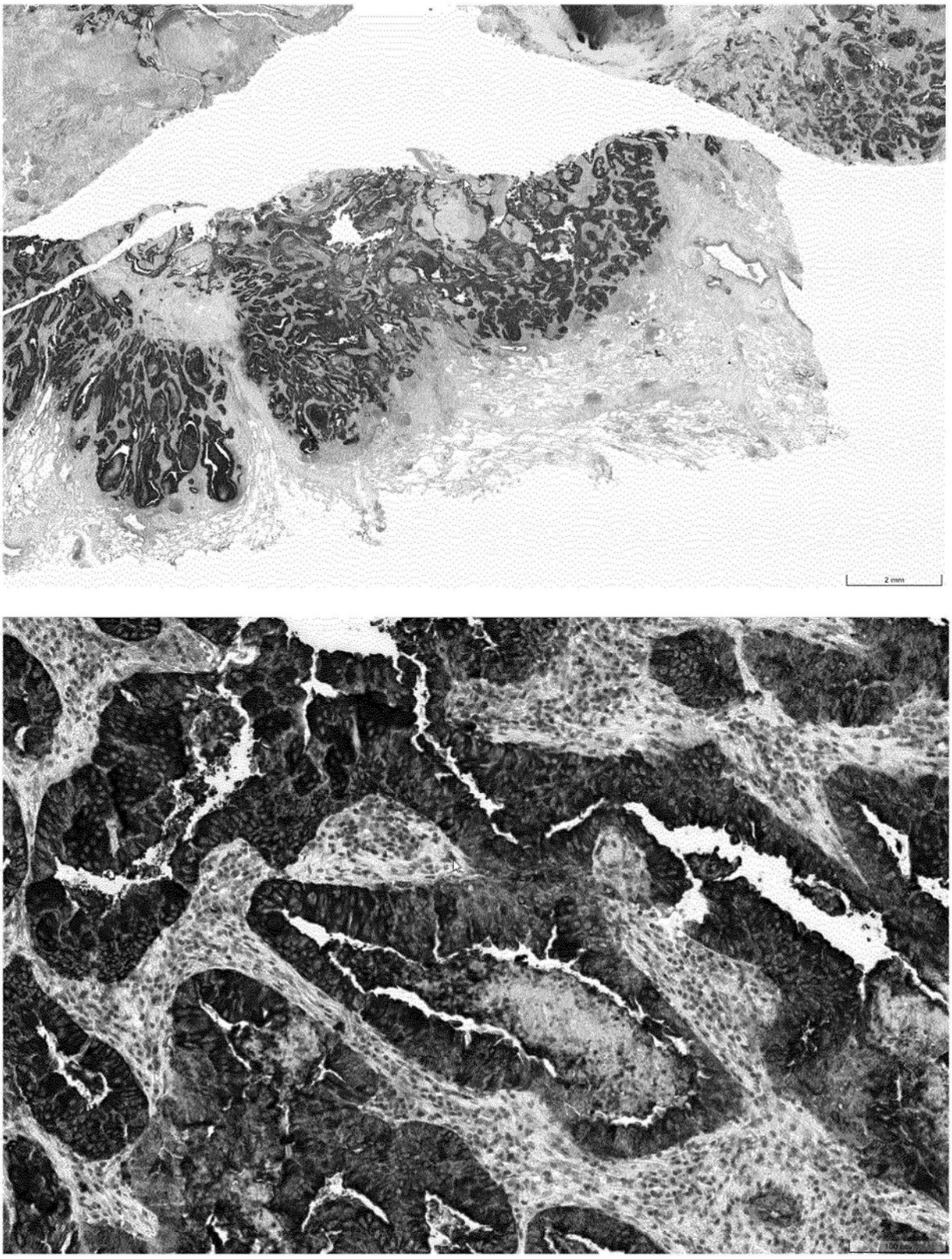


图12

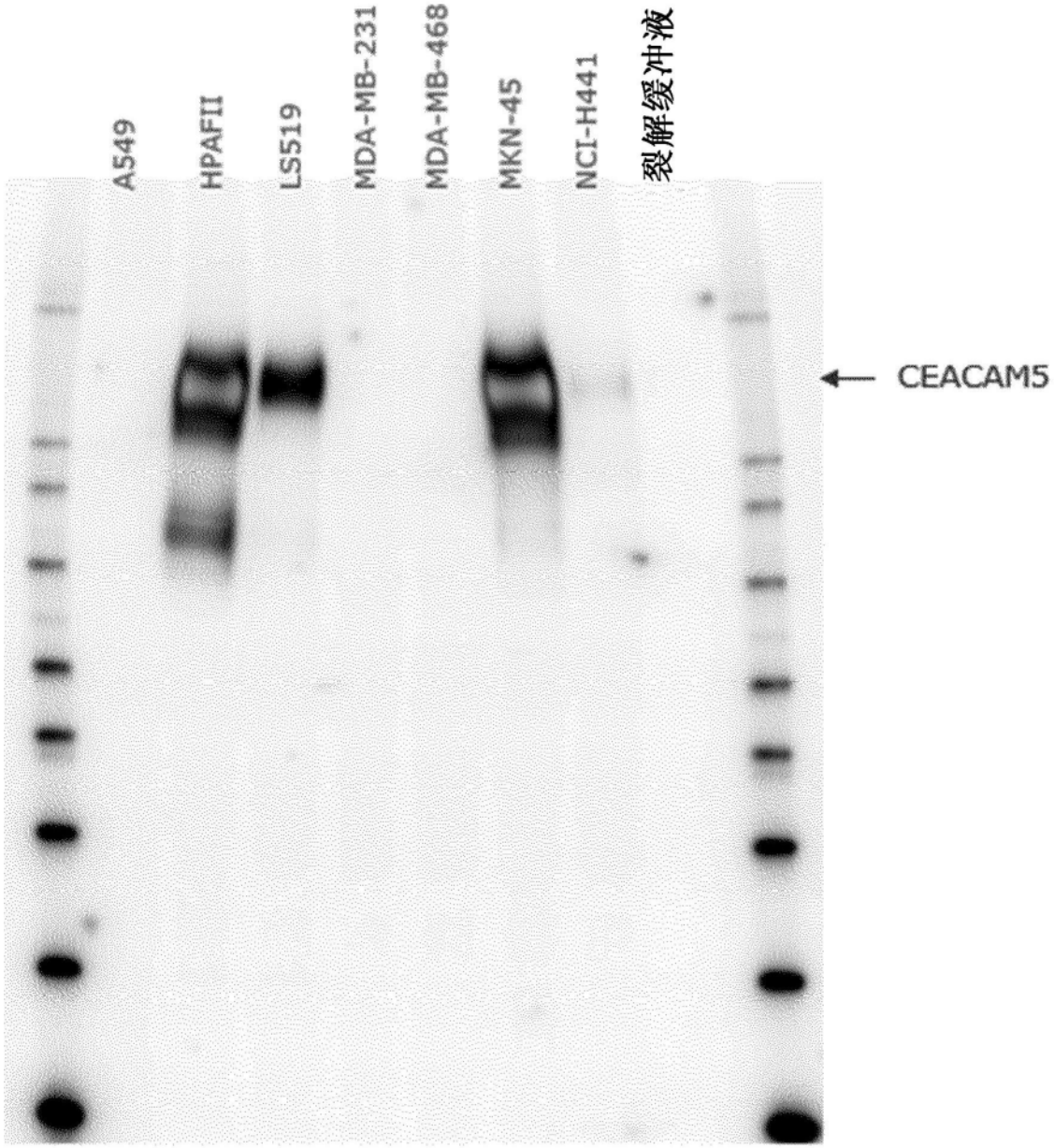

A549
HPAFII
LS519
MDA-MB-231
MDA-MB-468
MKN-45
NCI-H441
裂解缓冲液
CEACAM5

图13A

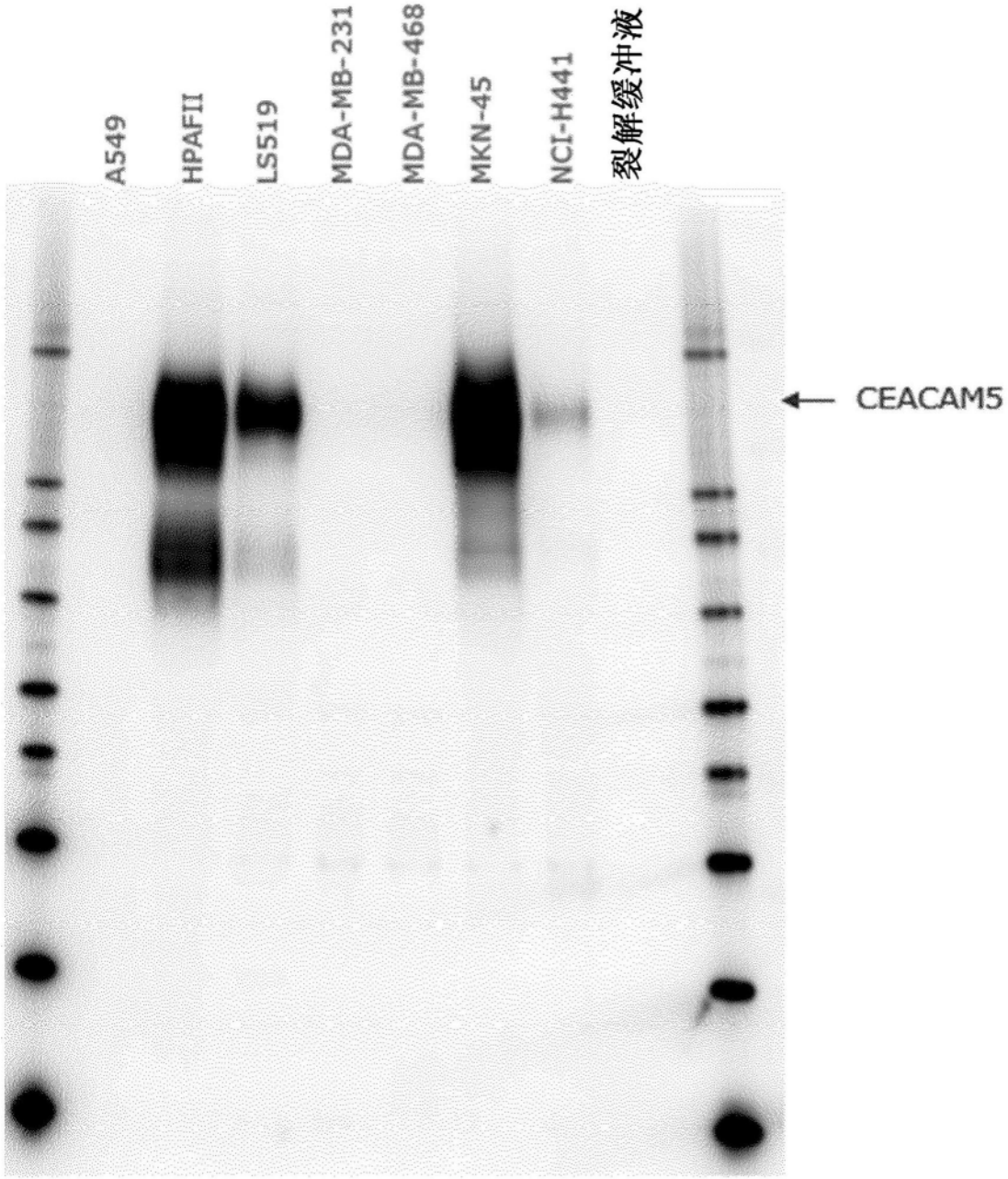

A549
HPAFII
LS519
MDA-MB-231
MDA-MB-468
MKN-45
NCI-H441
裂解缓冲液
CEACAM5

图13B

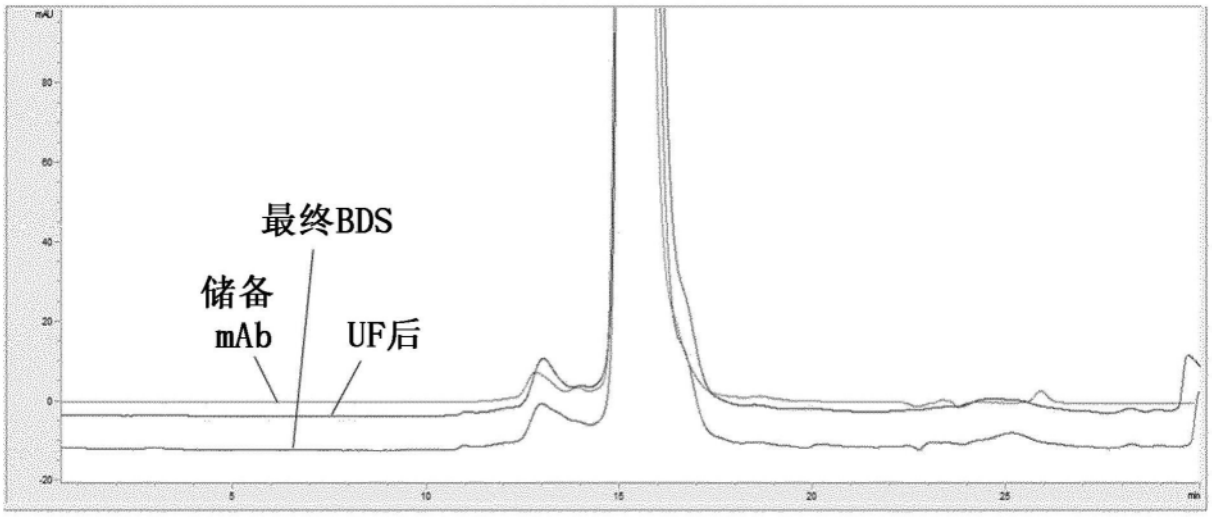

mAU
最终BDS
储备
mAb
UF后
min

图14

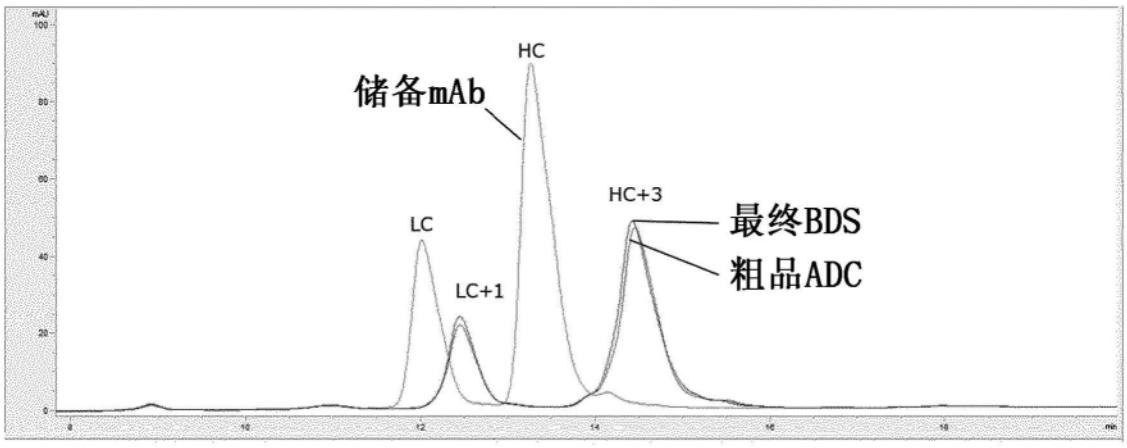

mAU
HC
储备mAb
HC+3
LC
最终BDS
粗品ADC
LC+1
min

图15

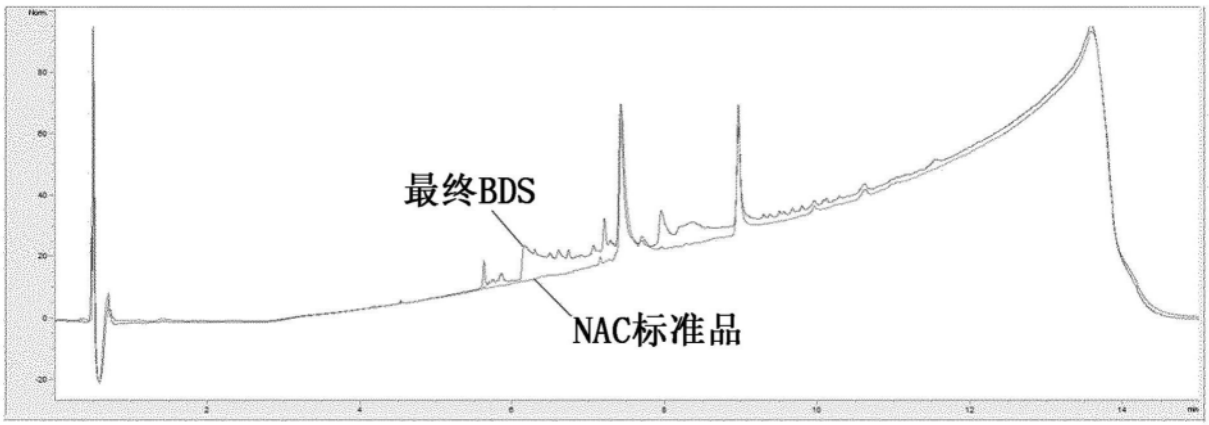

Norm.
最终BDS
NAC标准品
min

图16

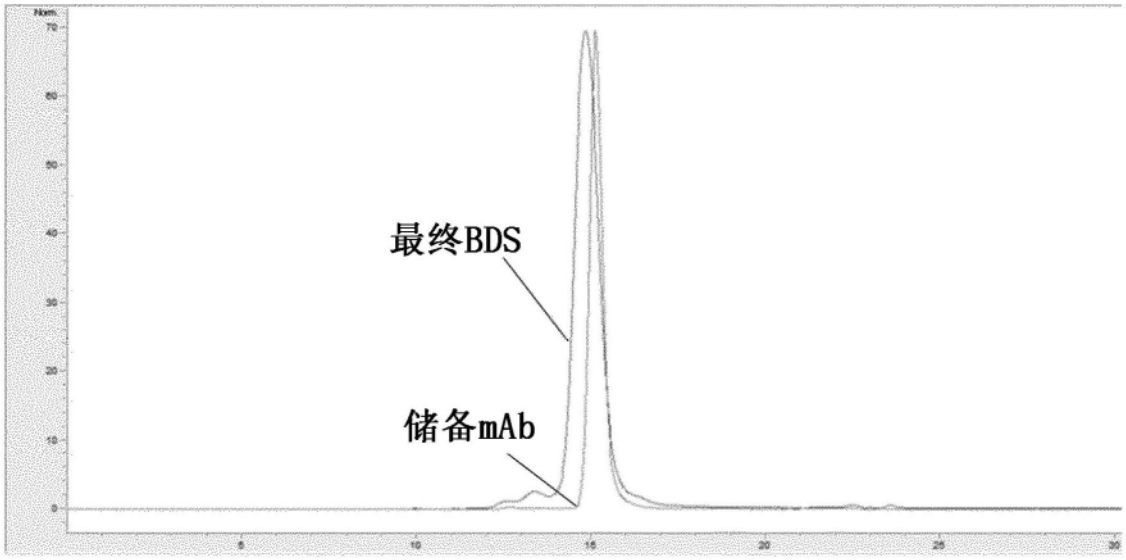


图17

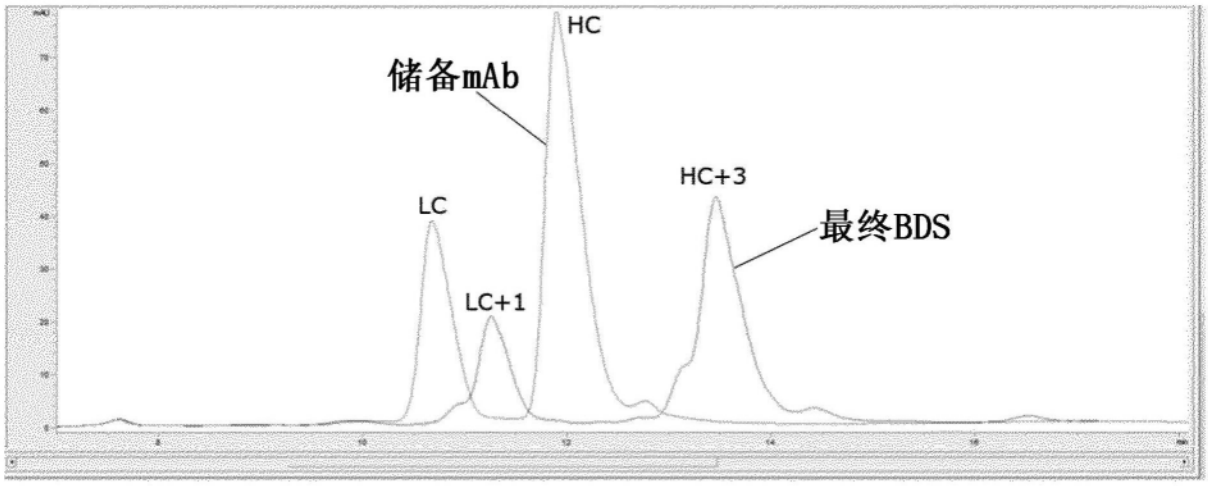


图18

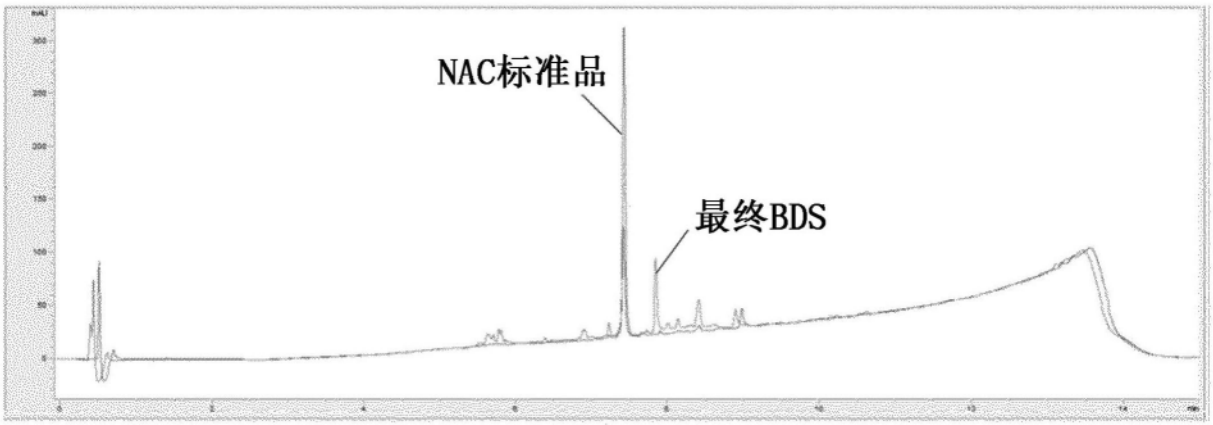

NAC标准品
最终BDS

图19

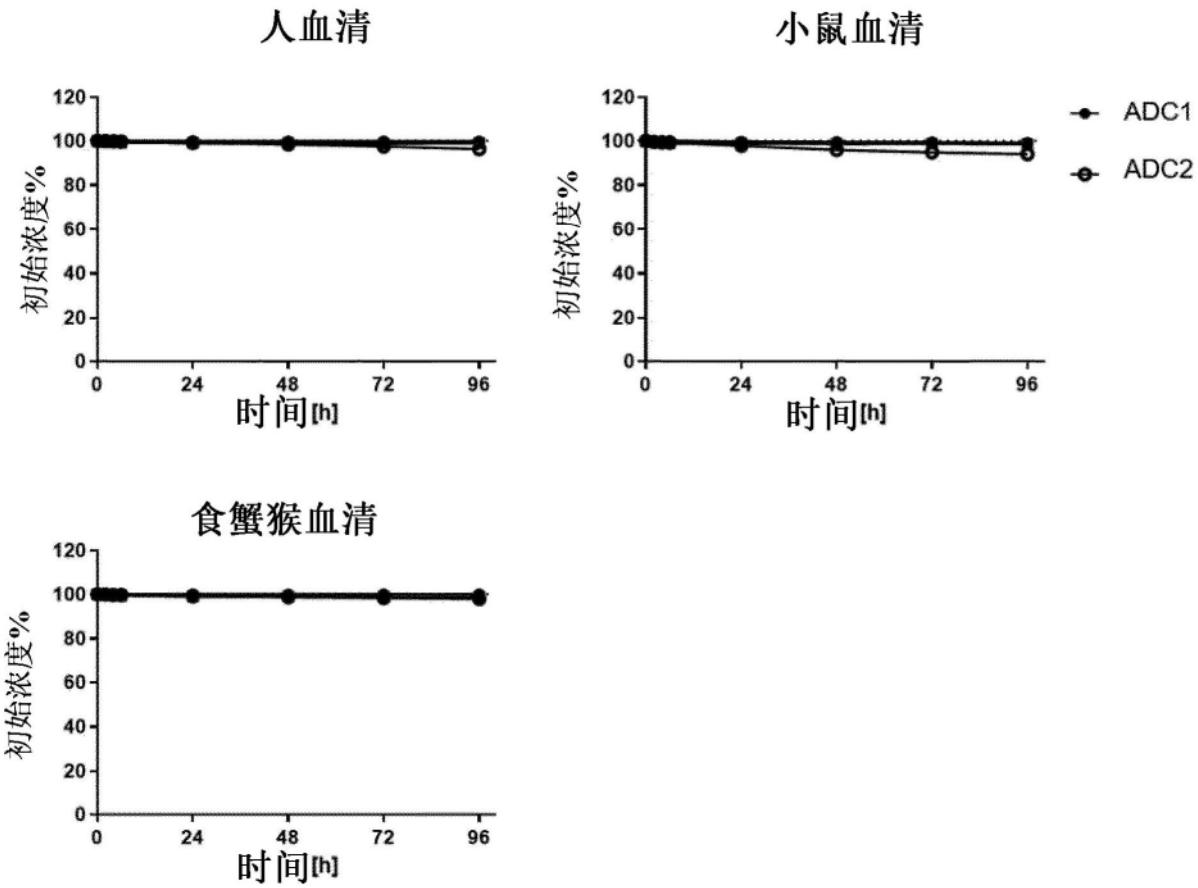

人血清
小鼠血清
食蟹猴血清
初始浓度%
时间[h]
0
24
48
72
96
20
40
60
80
100
120
ADC1
ADC2

图20

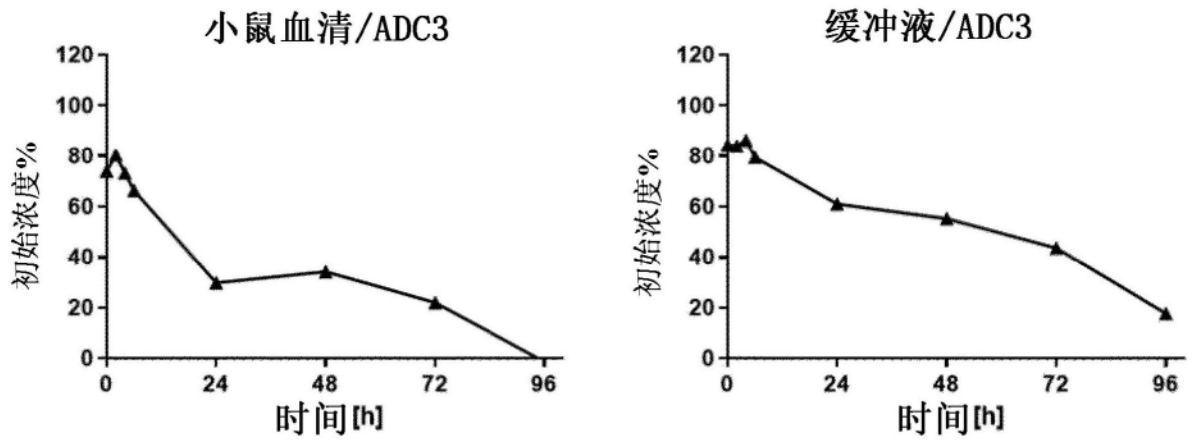

小鼠血清/ADC3
初始浓度%
120
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
时间[h]
缓冲液/ADC3
初始浓度%
120
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
时间[h]

图21

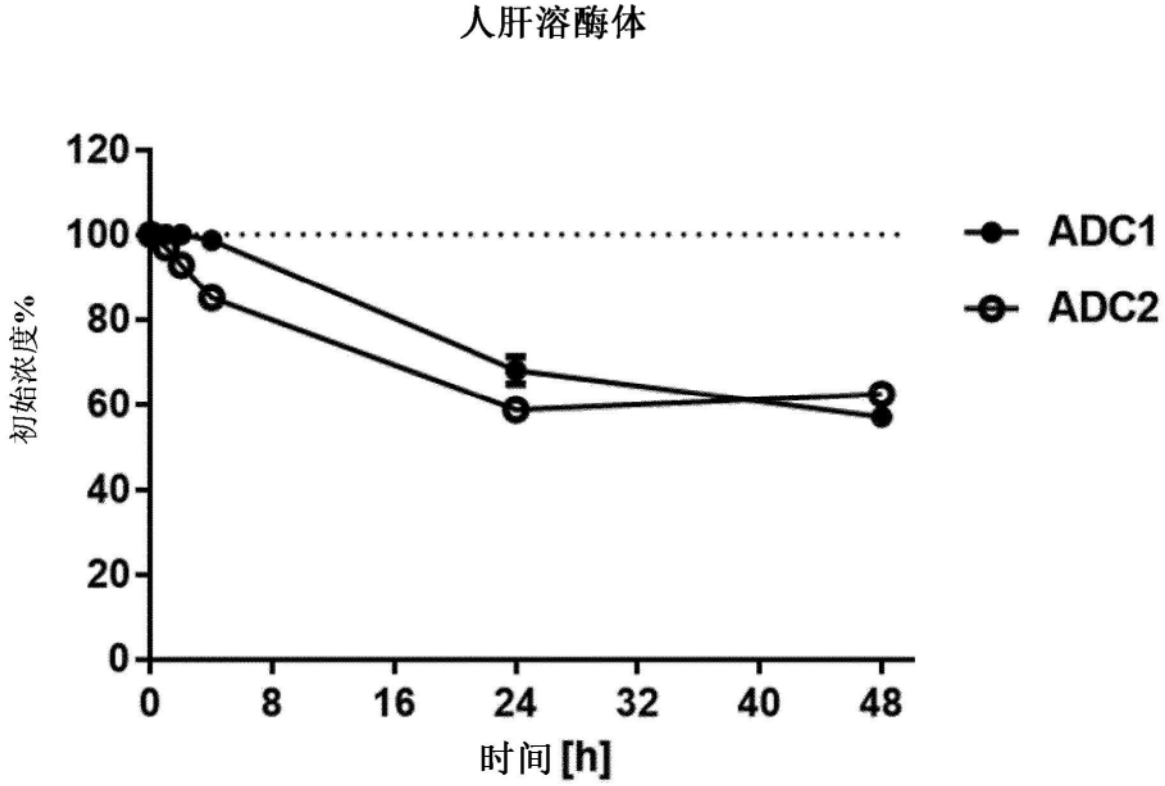

人肝溶酶体
初始浓度%
120
100
80
60
40
20
0
0
8
16
24
32
40
48
时间 [h]
ADC1
ADC2

图22

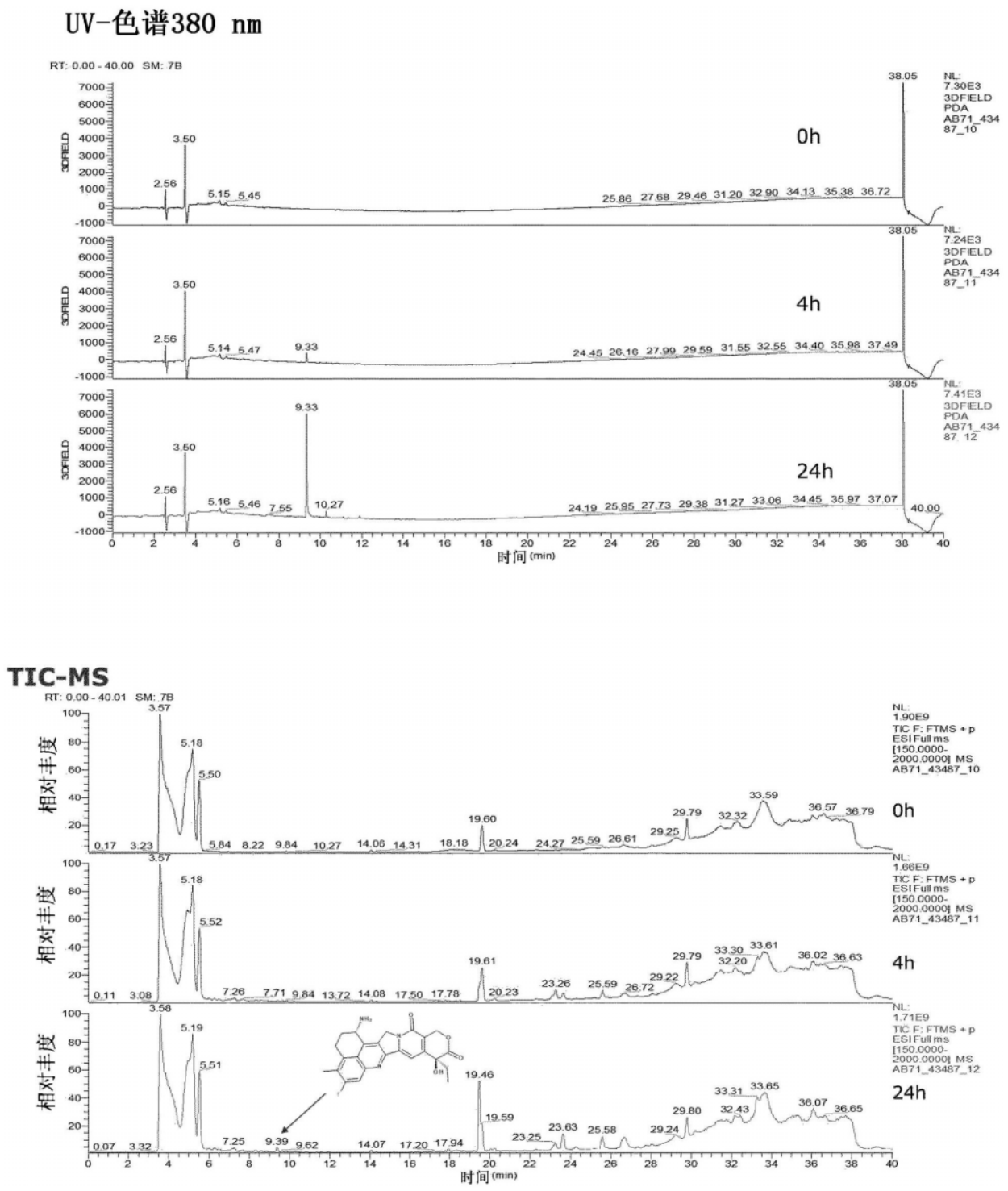


图23

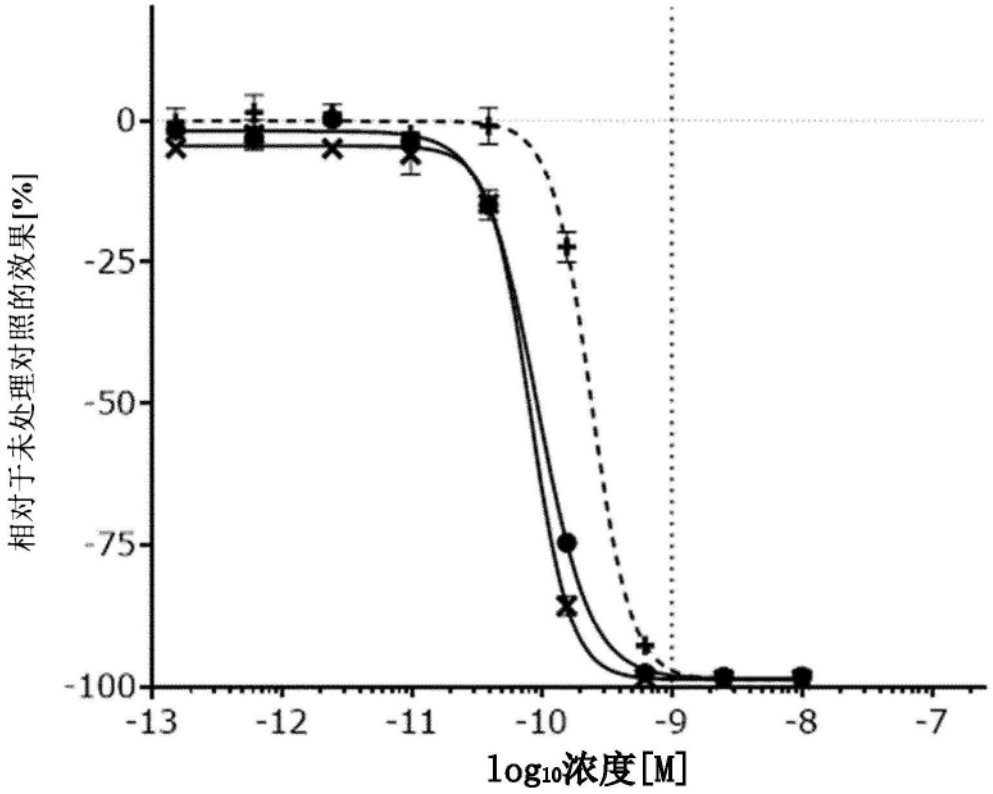

0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]

图24A

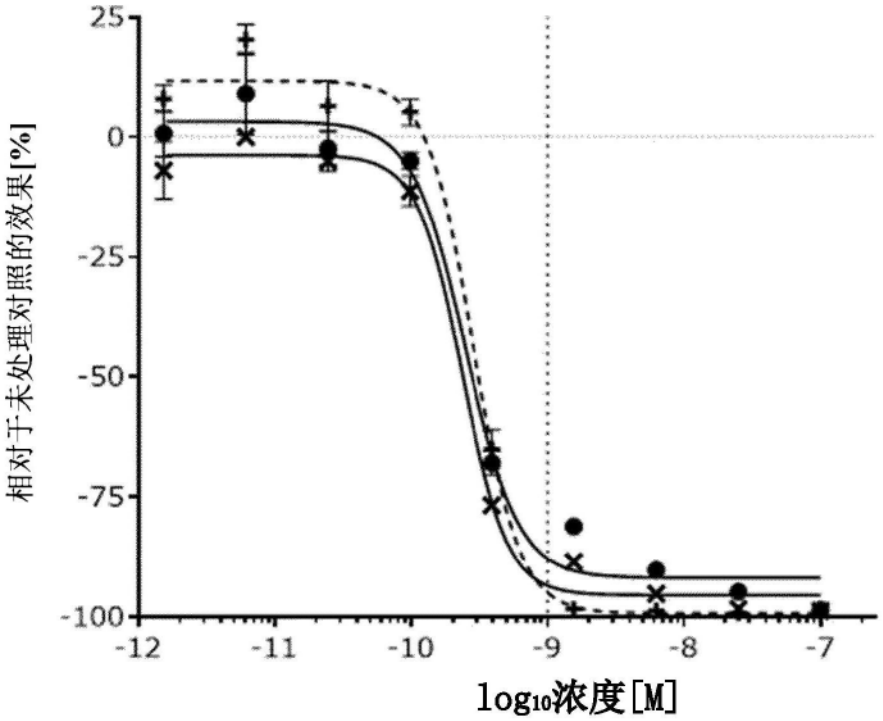

25
0
-25
-50
-75
-100
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]

图24B

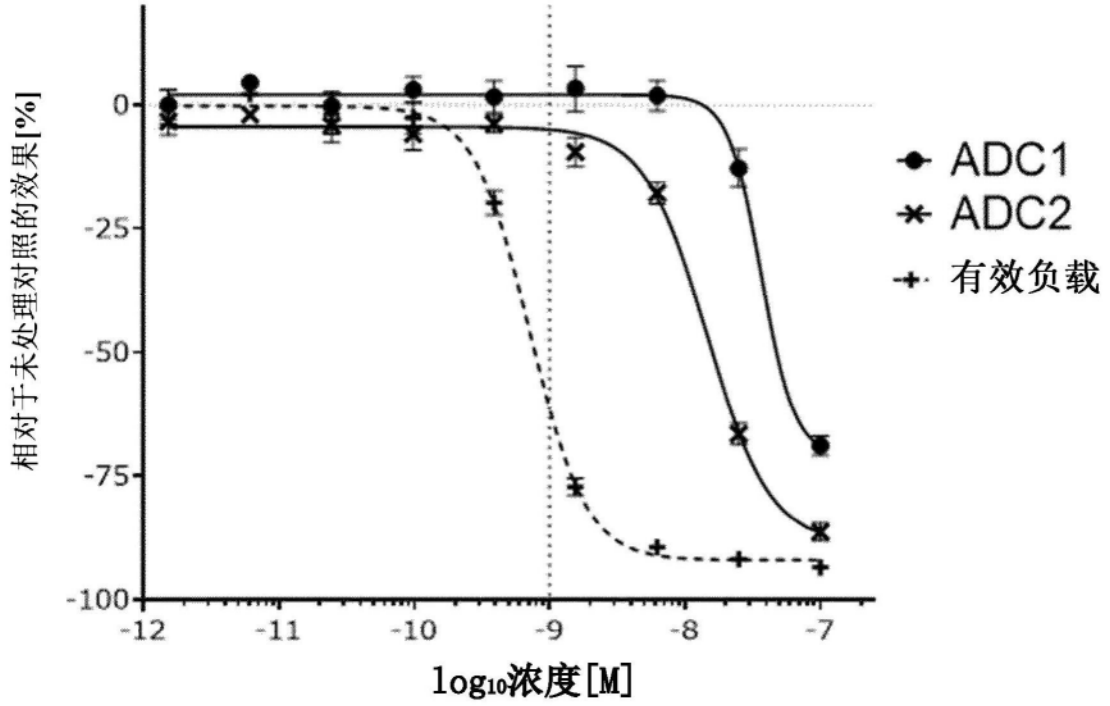

相对于未处理对照的效果[%]
0
-25
-50
-75
-100
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10浓度[M]
ADC1
ADC2
有效负载

图24C

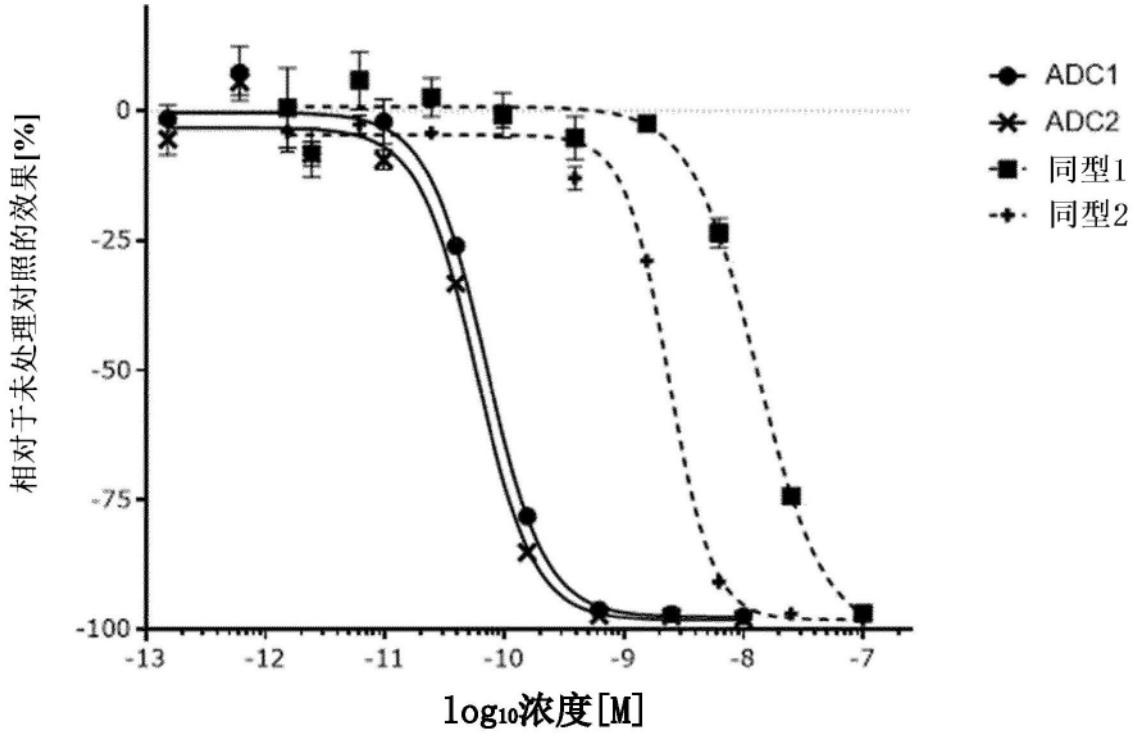

相对于未处理对照的效果[%]
0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10浓度[M]
ADC1
ADC2
同型1
同型2

图25

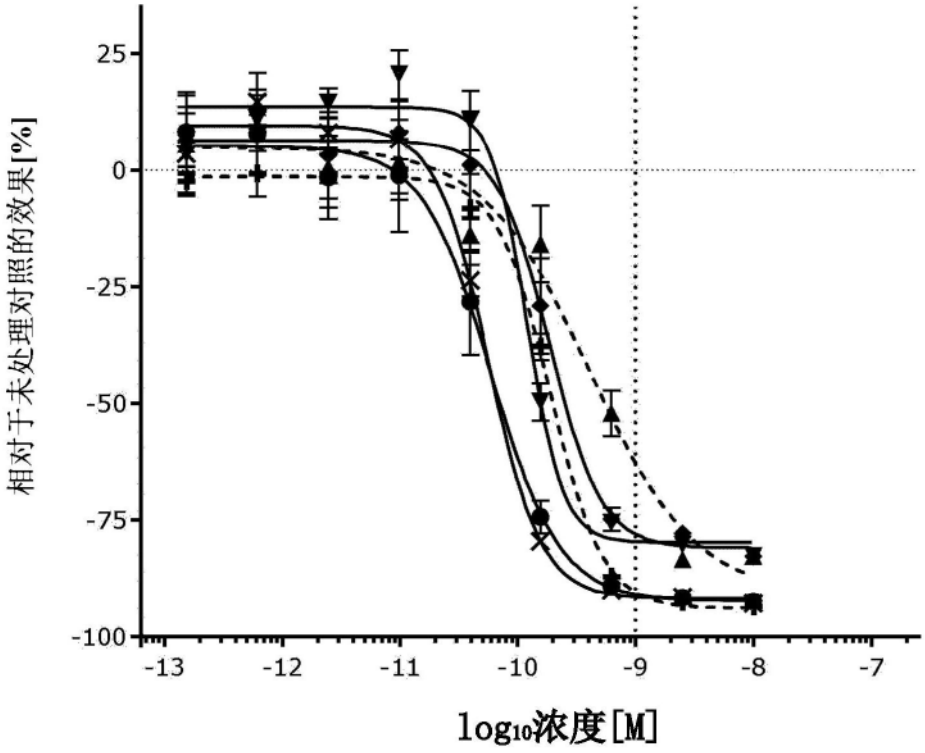

25
0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]

图26A

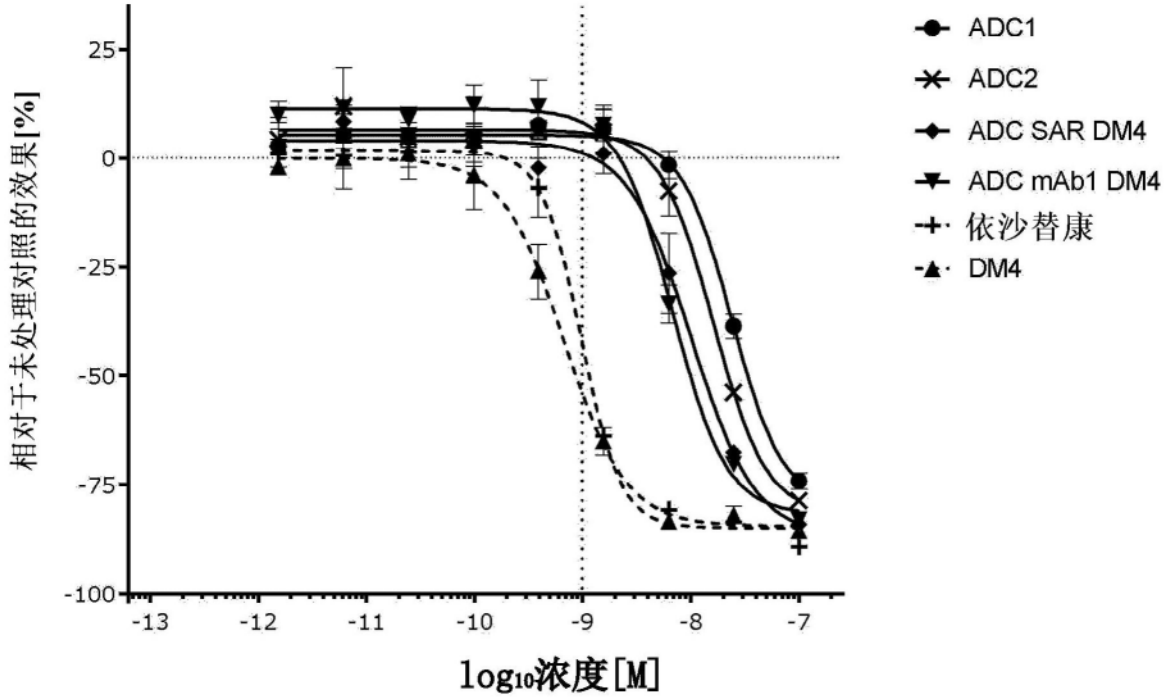

25
0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4
依沙替康
DM4

图26B

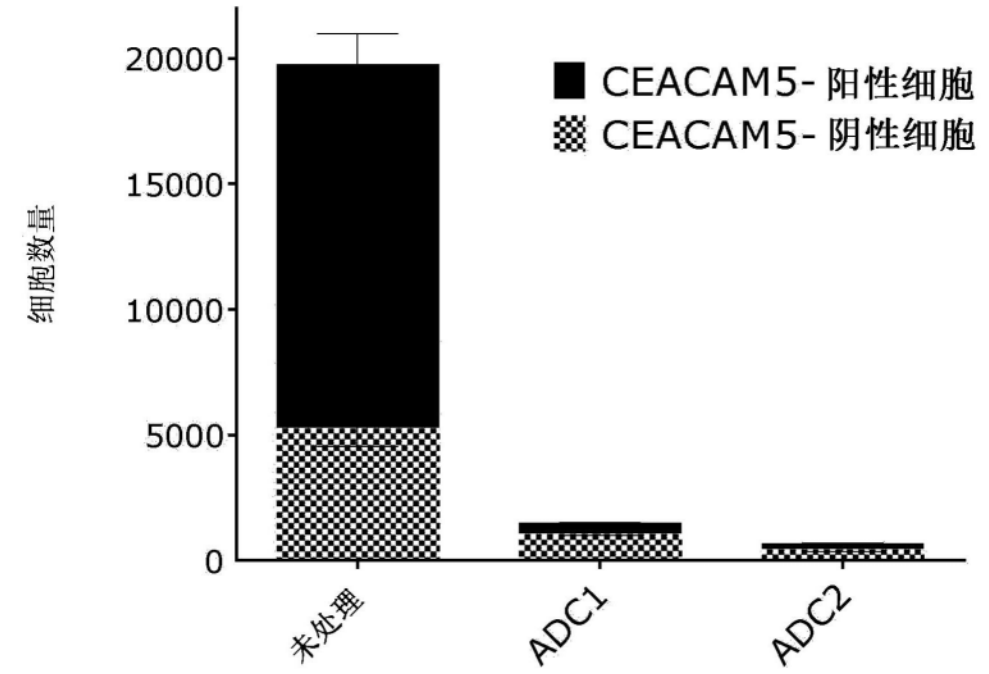

20000
15000
10000
5000
0
细胞数量
CEACAM5- 阳性细胞
CEACAM5- 阴性细胞
未处理
ADC1
ADC2

图27A

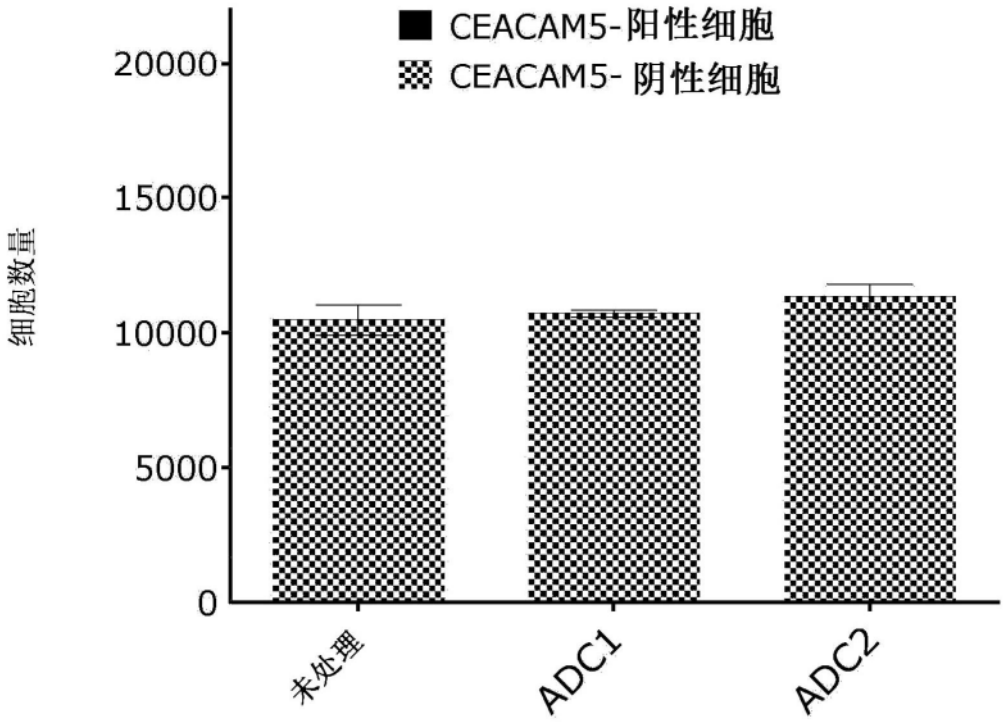

20000
15000
10000
5000
0
细胞数量
CEACAM5-阳性细胞
CEACAM5- 阴性细胞
未处理
ADC1
ADC2

图27B

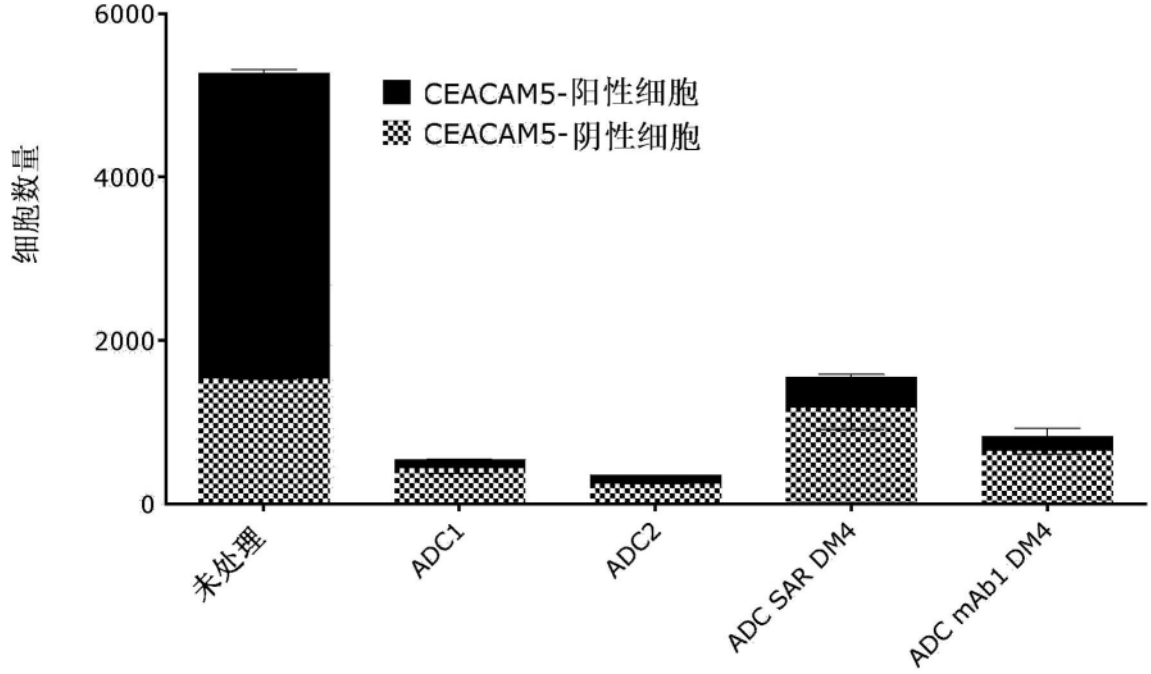

6000
4000
2000
0
细胞数量
CEACAM5-阳性细胞
CEACAM5-阴性细胞
未处理
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4

图28A

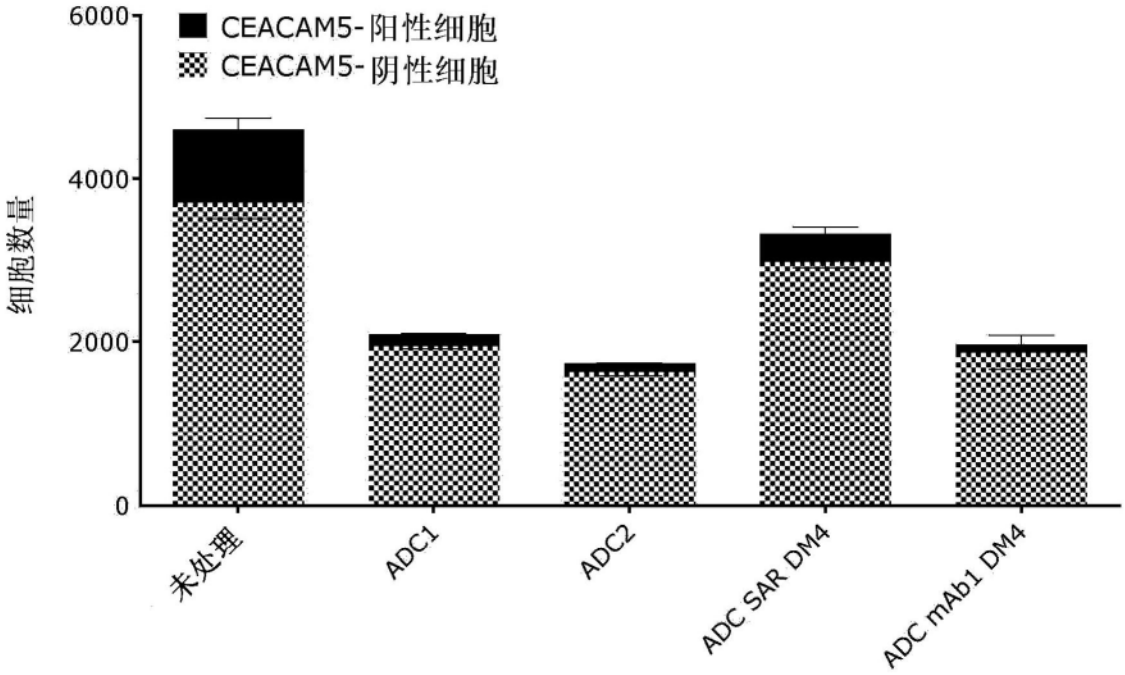

6000
4000
2000
0
细胞数量
CEACAM5-阳性细胞
CEACAM5-阴性细胞
未处理
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4

图28B

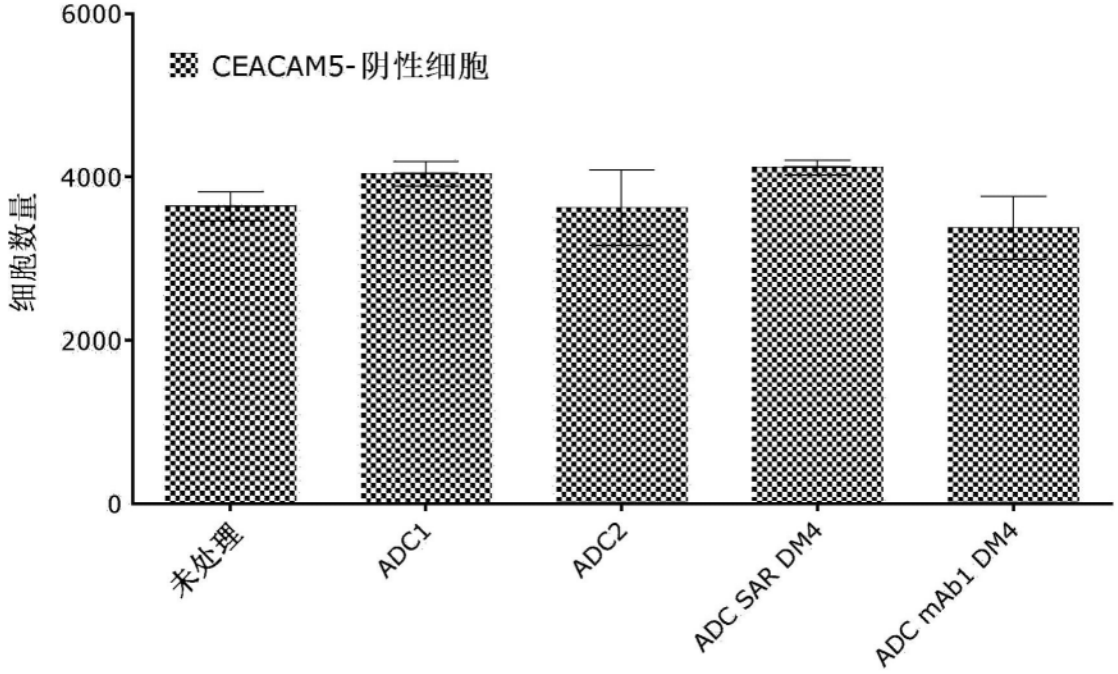

6000
4000
2000
0
细胞数量
CEACAM5-阴性细胞
未处理
ADC1
ADC2
ADC SAR DM4
ADC mAb1 DM4

图28C

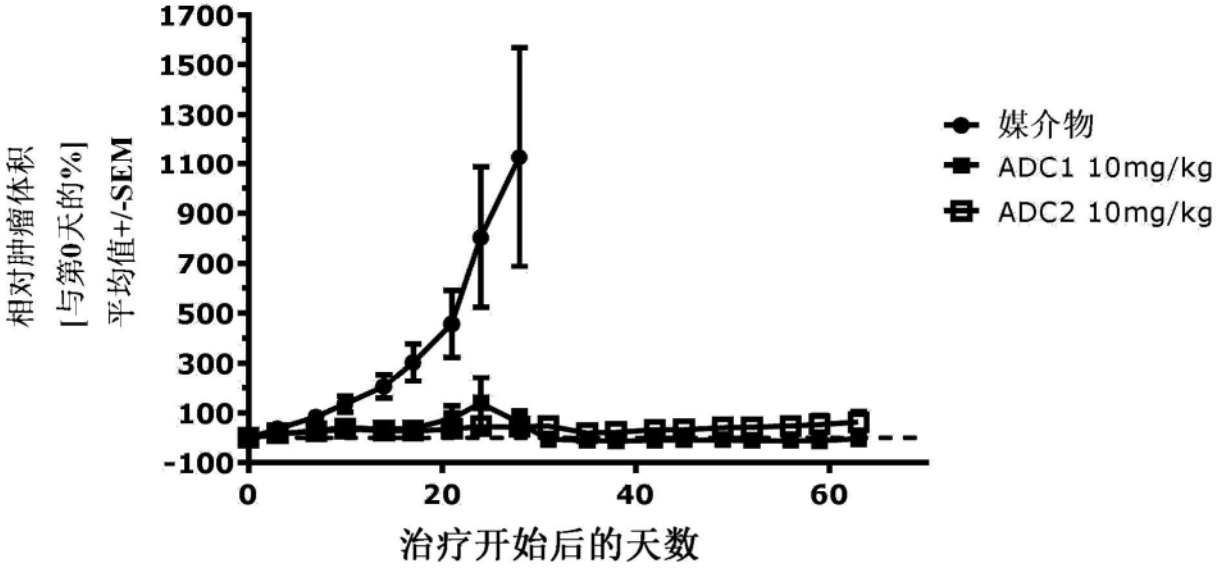

1700
1500
1300
1100
900
700
500
300
100
-100
0
20
40
60
相对肿瘤体积
[与第0天的%]
平均值+/-SEM
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1 10mg/kg
ADC2 10mg/kg

图29

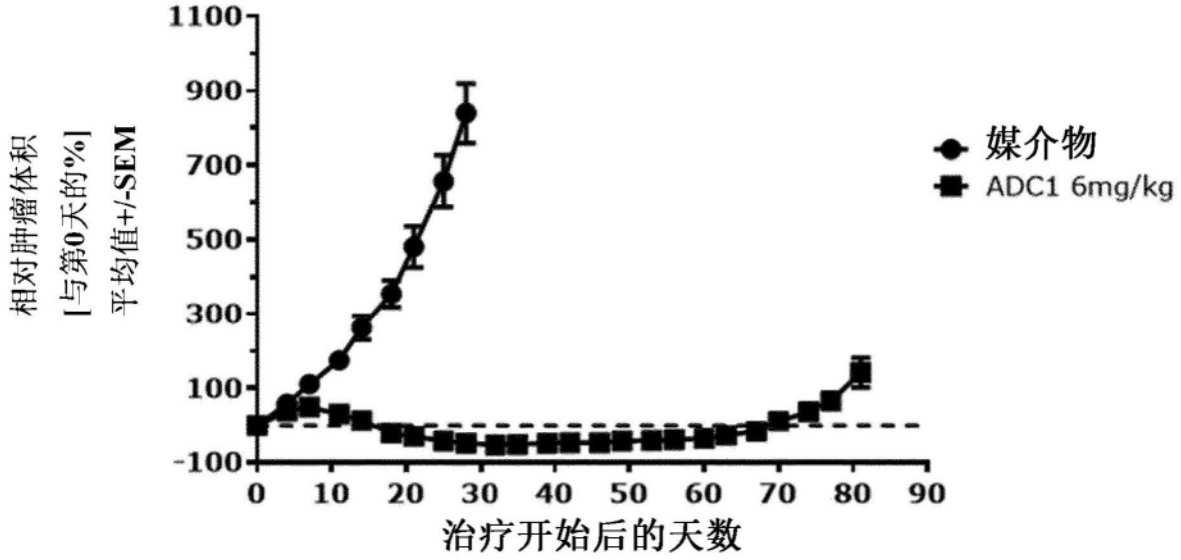

相对肿瘤体积
[与第0天的%]
平均值+/-SEM
1100
900
700
500
300
100
-100
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1 6mg/kg

图30

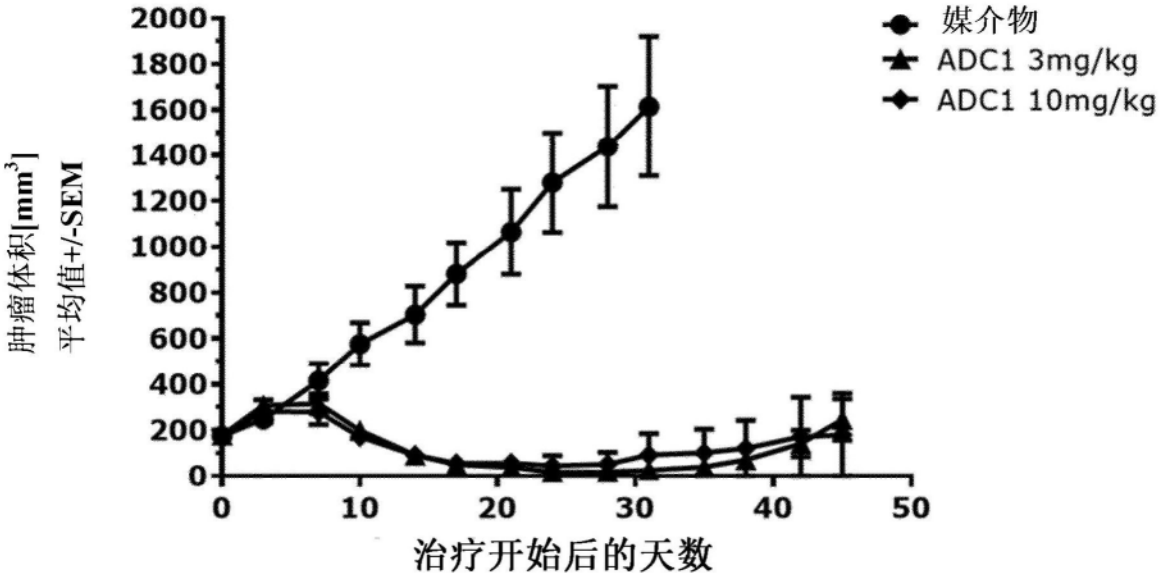

肿瘤体积[mm3]
平均值+/-SEM
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1 3mg/kg
ADC1 10mg/kg

图31

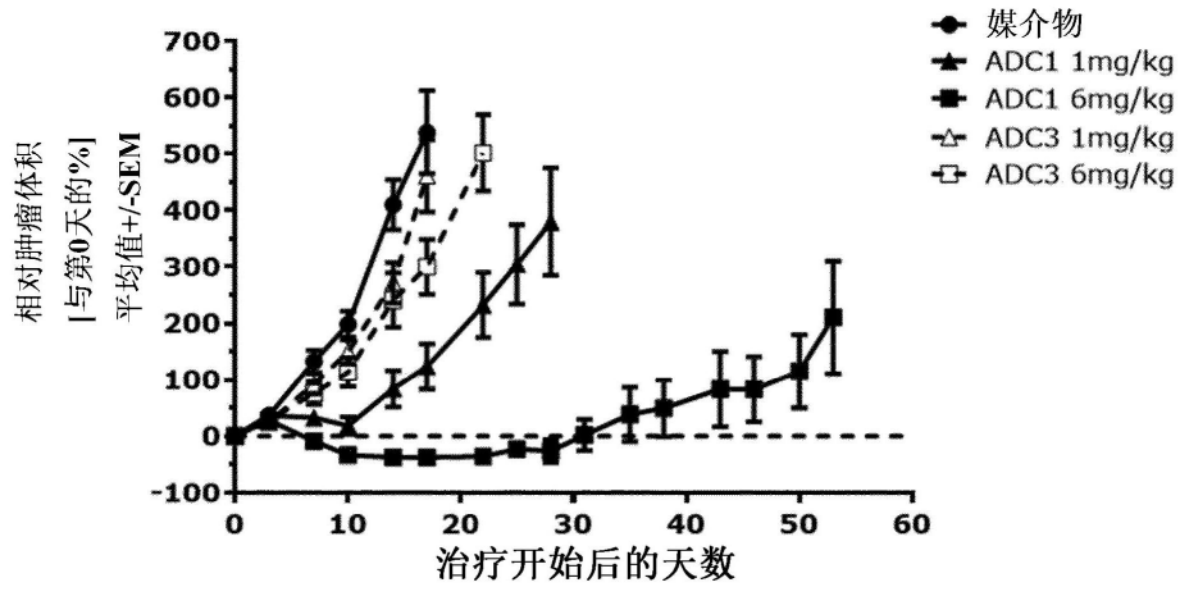

媒介物
ADC1 1mg/kg
ADC1 6mg/kg
ADC3 1mg/kg
ADC3 6mg/kg
相对肿瘤体积
[与第0天的%]
平均值+/-SEM
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
0
10
20
30
40
50
60
治疗开始后的天数

图32

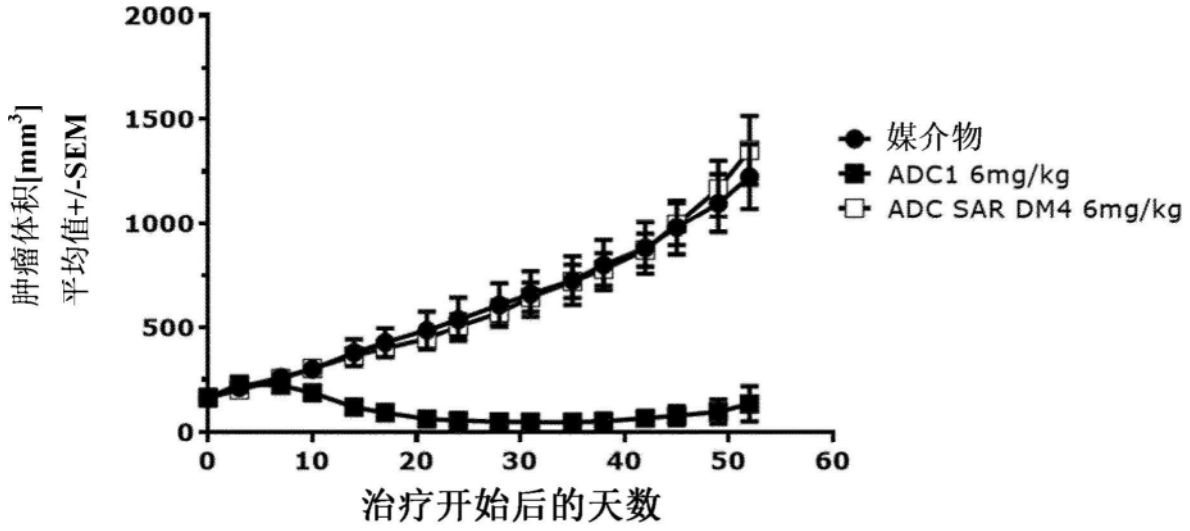

媒介物
ADC1 6mg/kg
ADC SAR DM4 6mg/kg
肿瘤体积[mm3]
平均值+/-SEM
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
治疗开始后的天数

图33

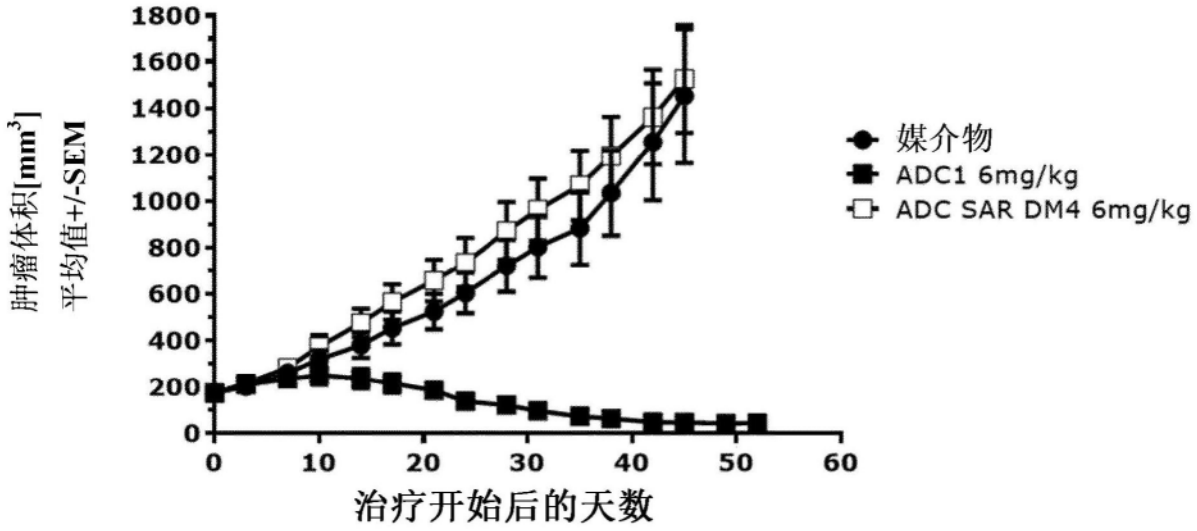

肿瘤体积[mm³]
平均值+/-SEM
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1 6mg/kg
ADC SAR DM4 6mg/kg

图34

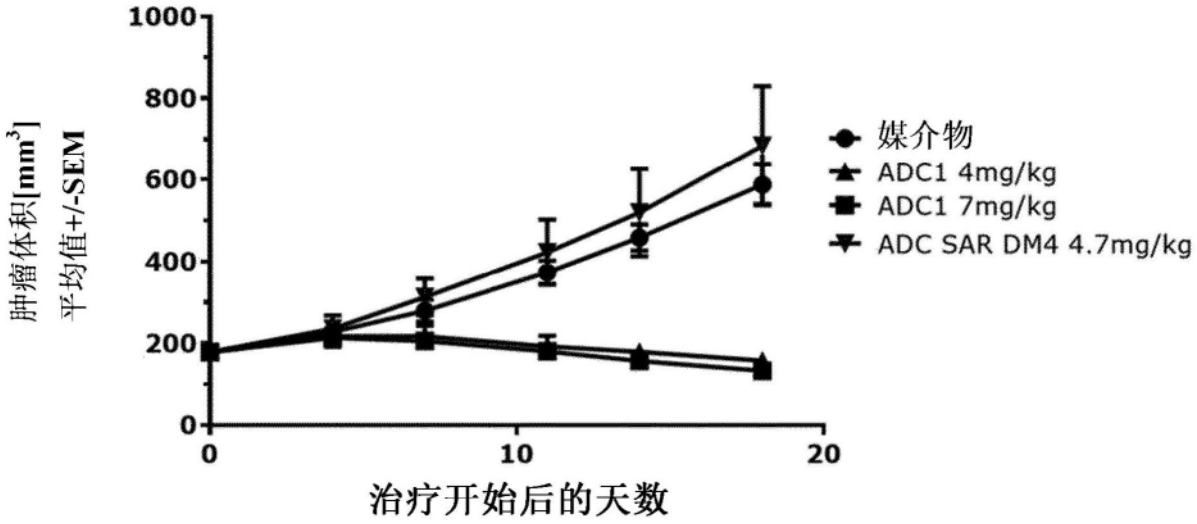
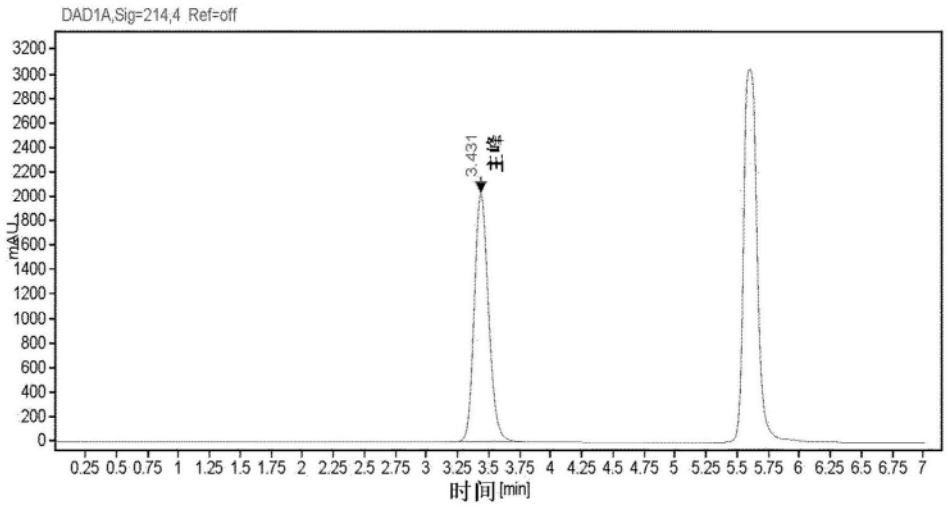

肿瘤体积[mm³]
平均值+/-SEM
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1 4mg/kg
ADC1 7mg/kg
ADC SAR DM4 4.7mg/kg

图35

显示输入mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱：

输入mAb

纯度: 100.0%



ADC BDS

纯度: 98.9%

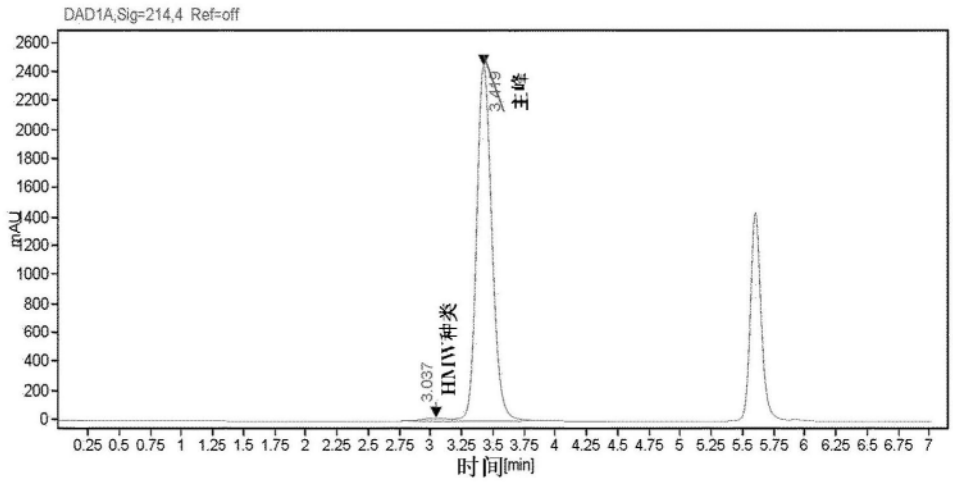


图36

示出最终BDS的DAR测定的典型RP-HPLC色谱：

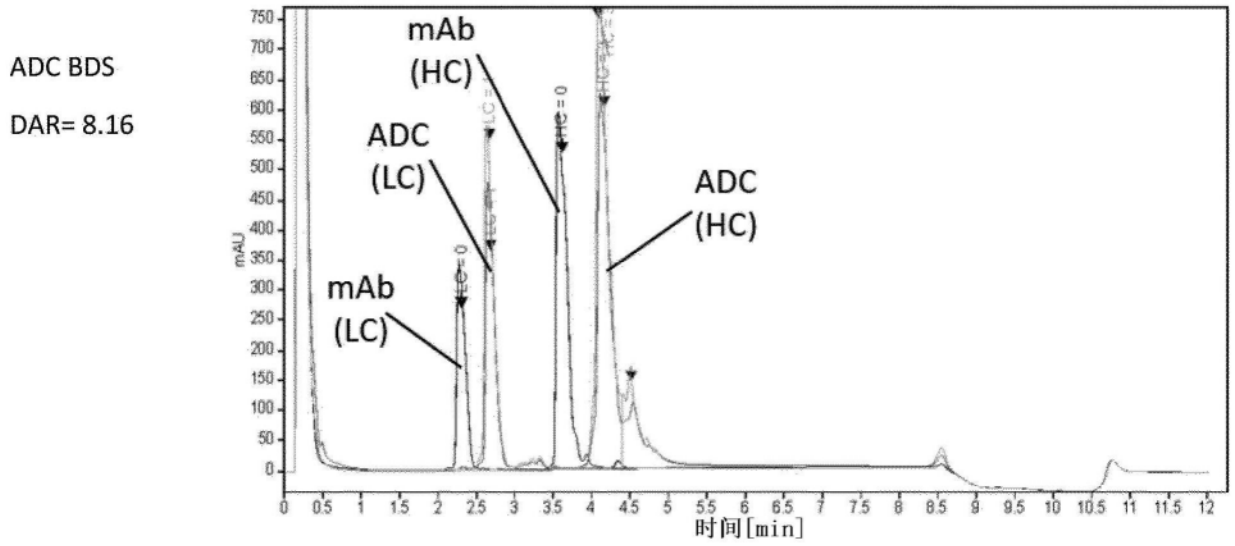
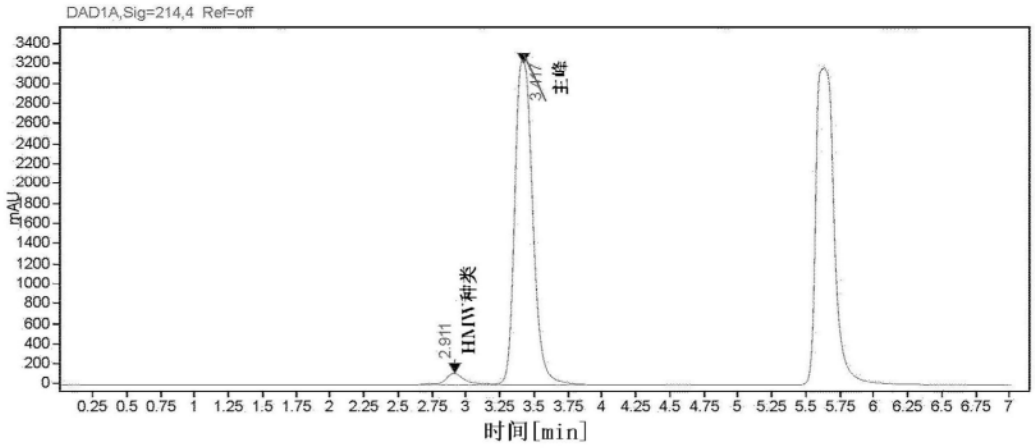


图37

显示输入mAb和最终BDS的纯度的典型SEC色谱：

输入mAb

纯度: 96,3%



ADC BDS

纯度: 99.9

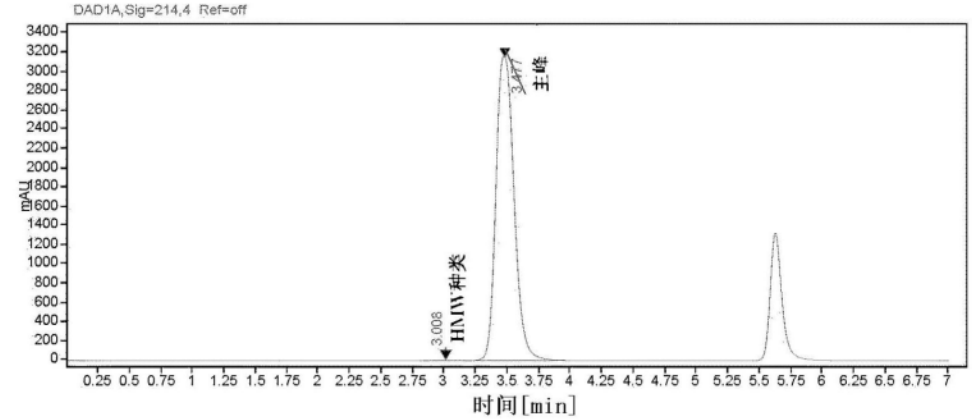
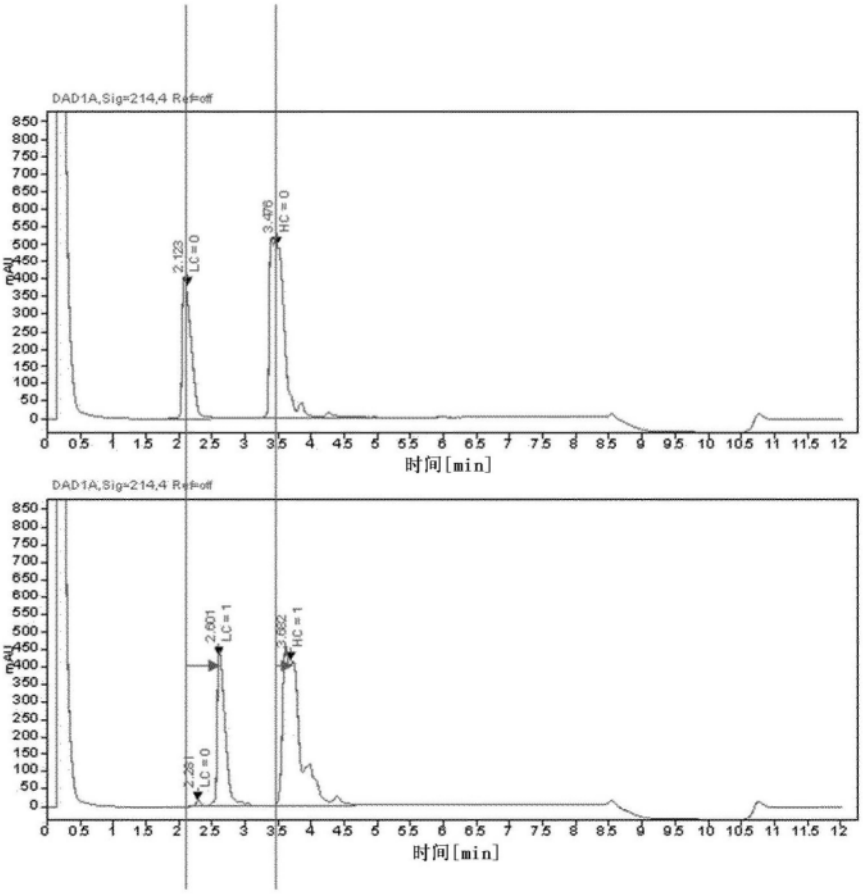


图38

示出最终BDS的DAR测定的典型RP-HPLC色谱：

输入mAb

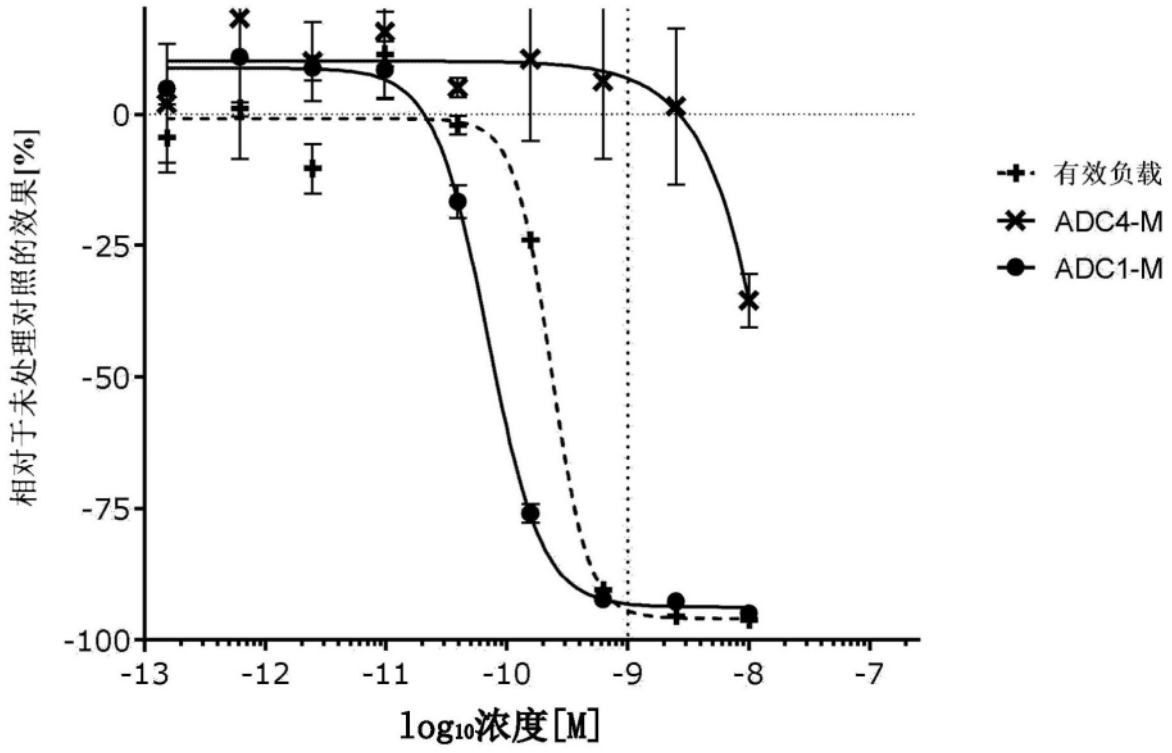


ADC BDS

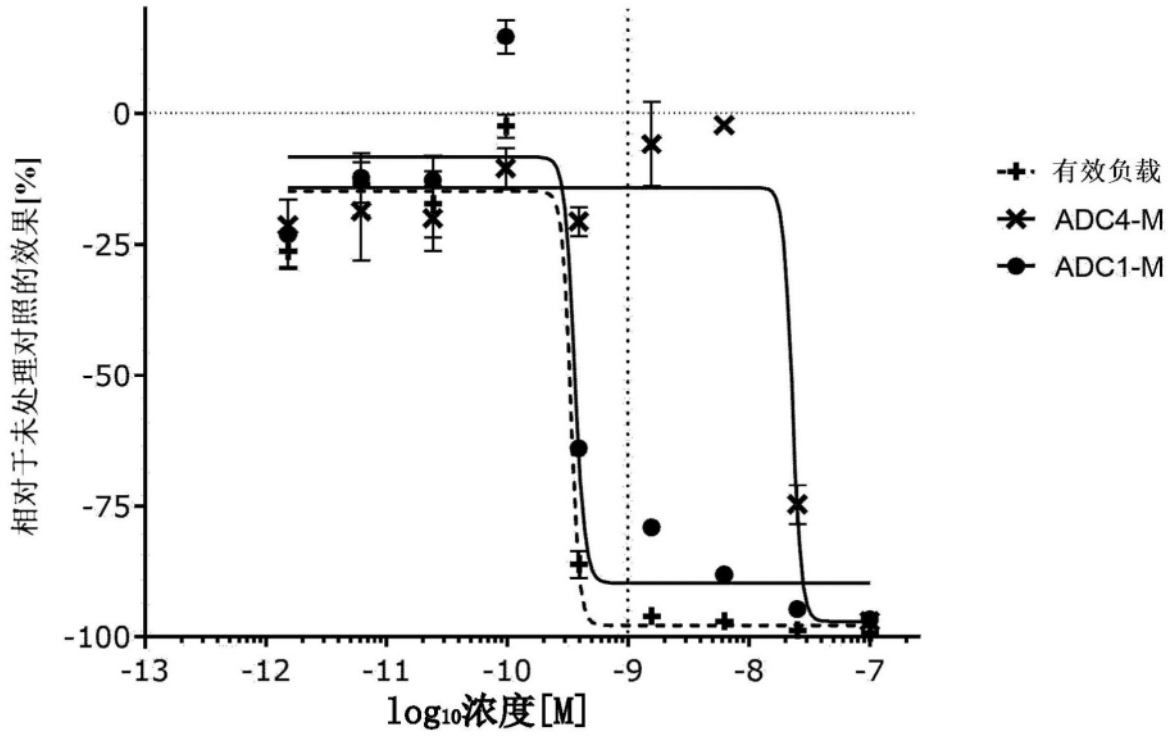
DAR= 3.87

图39

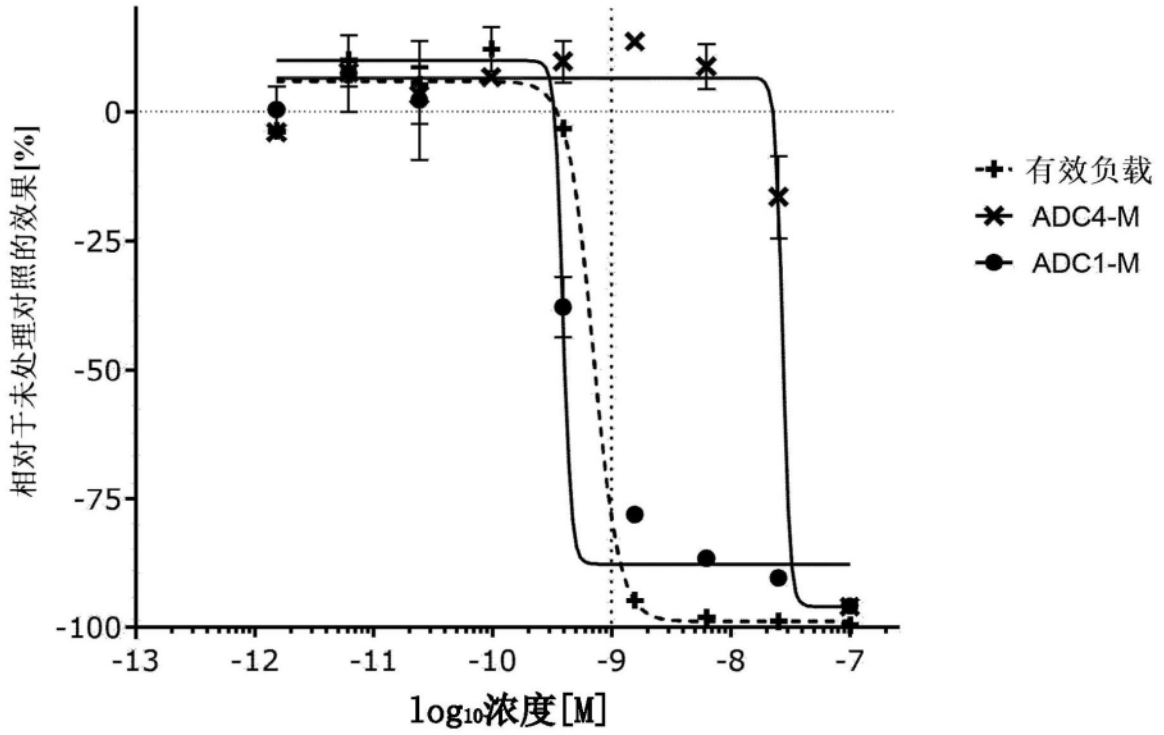
(a)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC4-M
ADC1-M

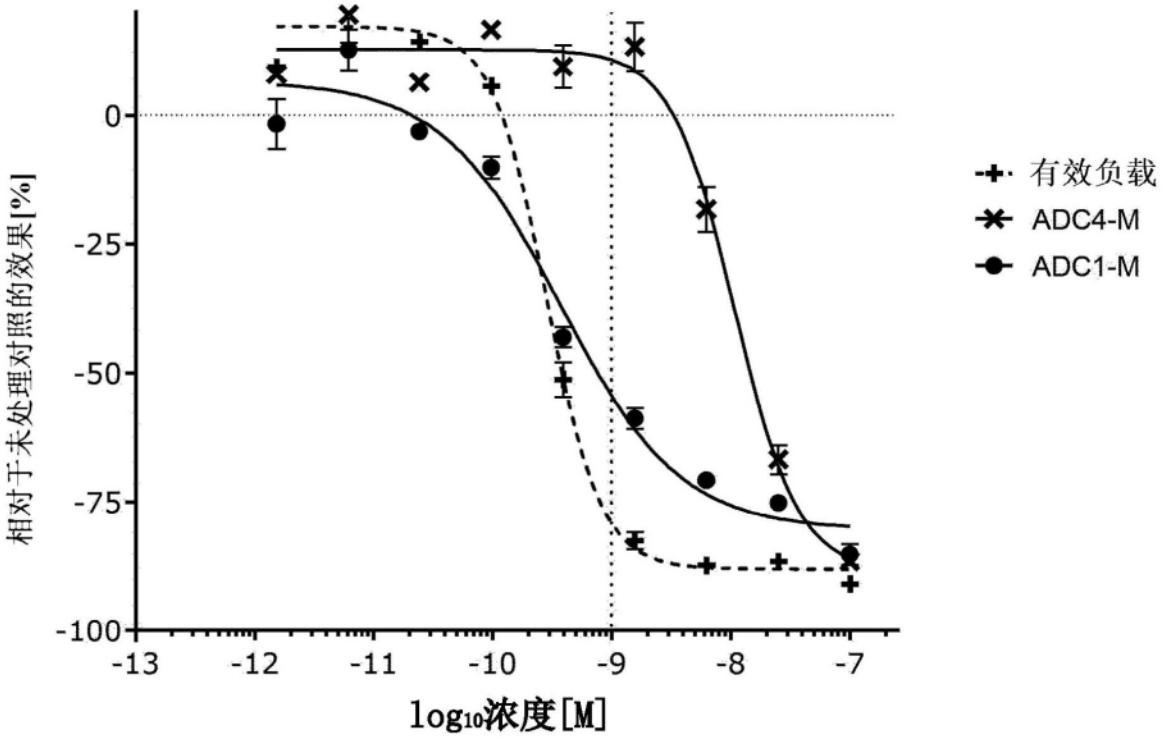
(b)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC4-M
ADC1-M

(c)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC4-M
ADC1-M

(d)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC4-M
ADC1-M

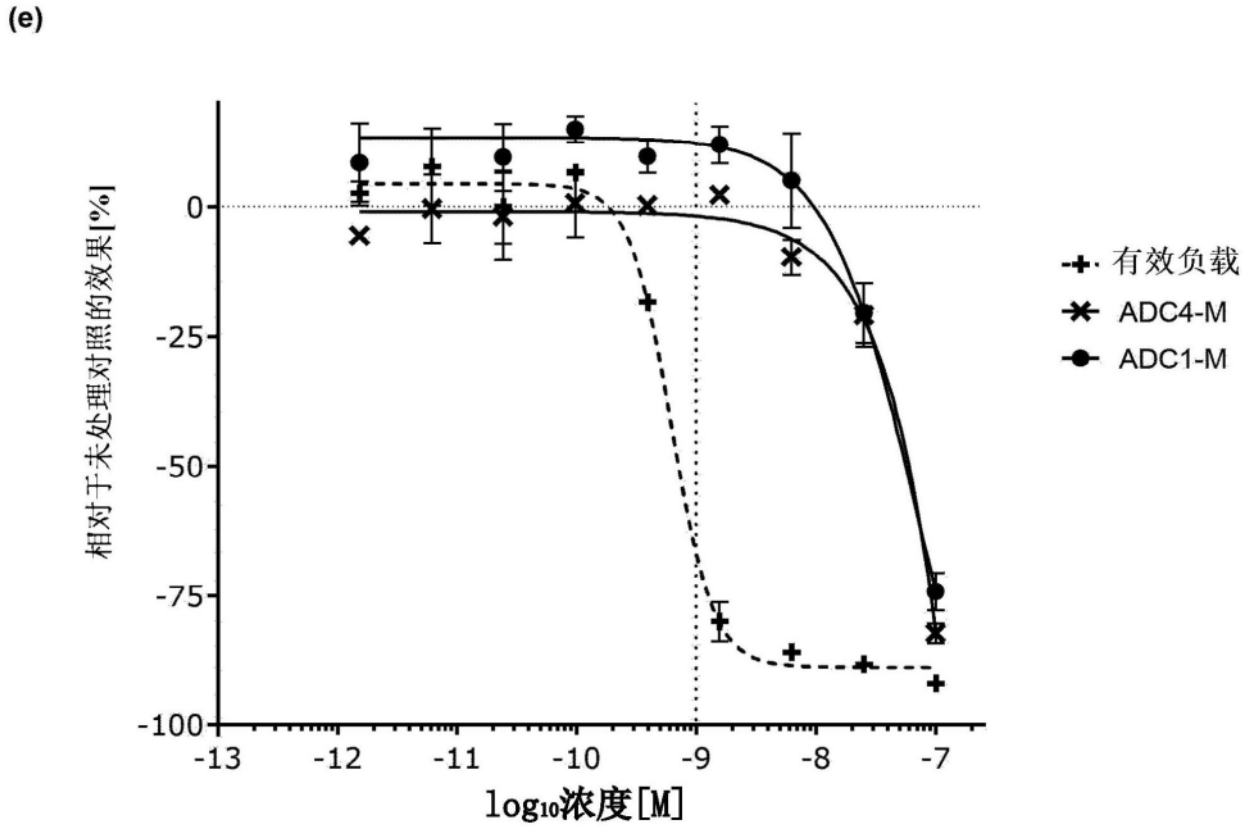
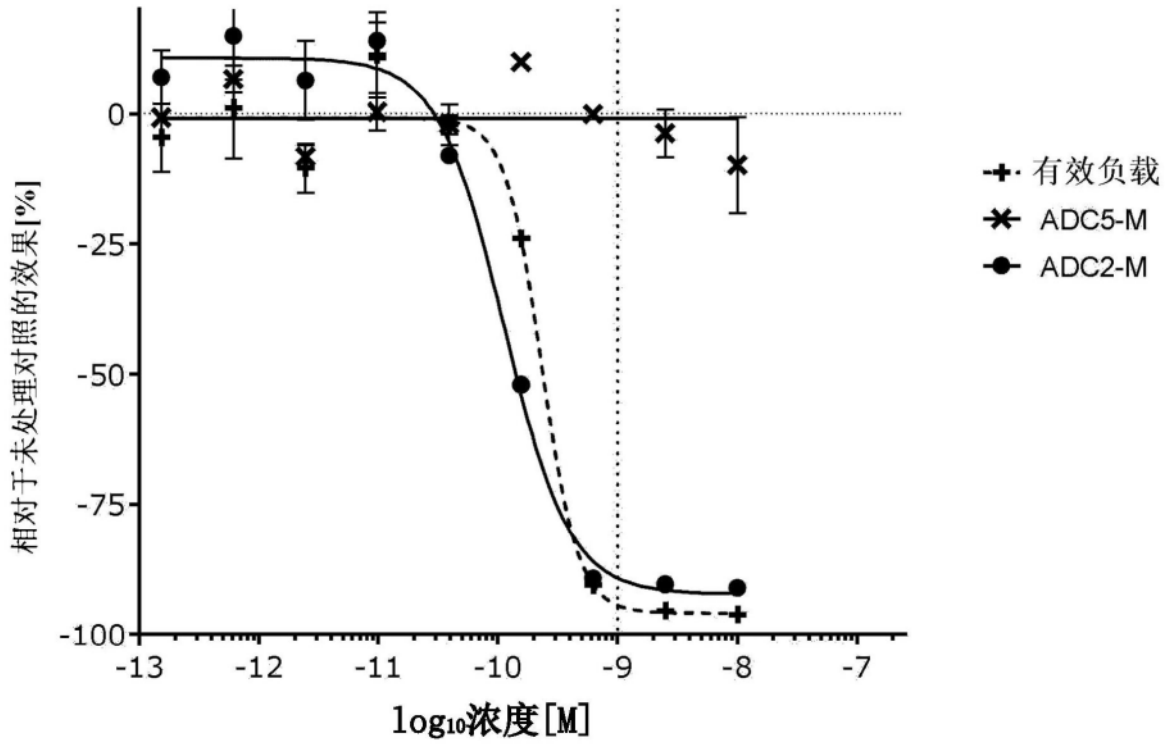
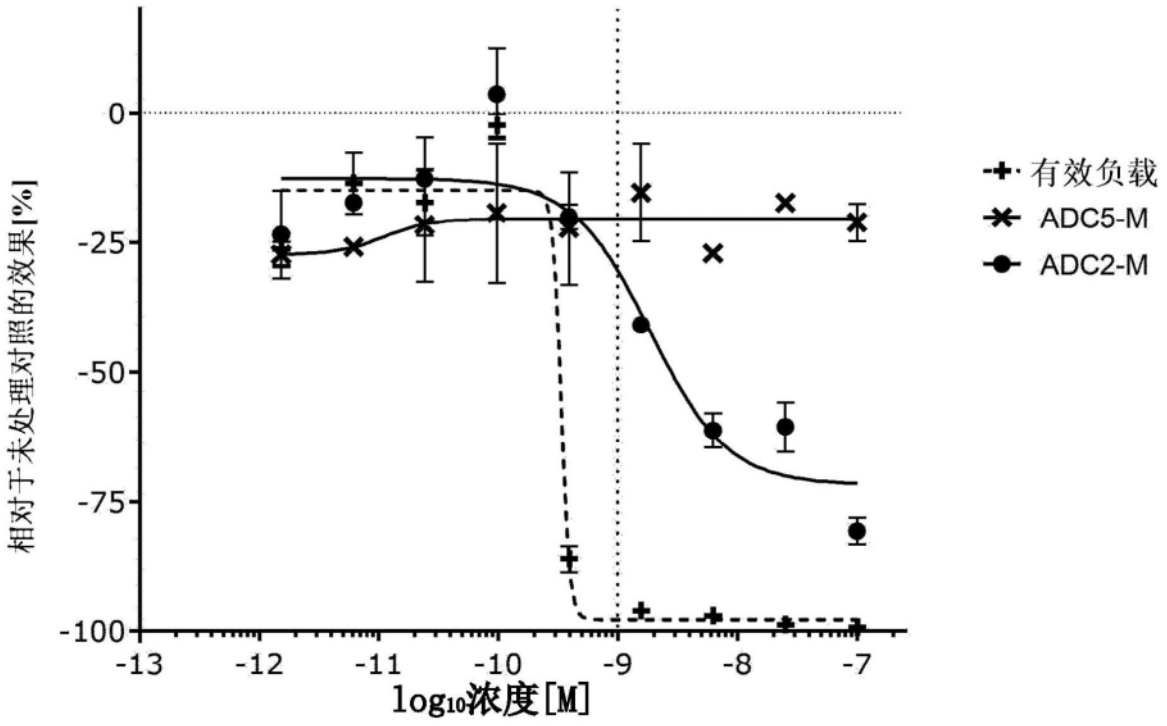

(e)
相对于未处理对照的效果[%]
0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log10浓度[M]
有效负载
ADC4-M
ADC1-M

图40

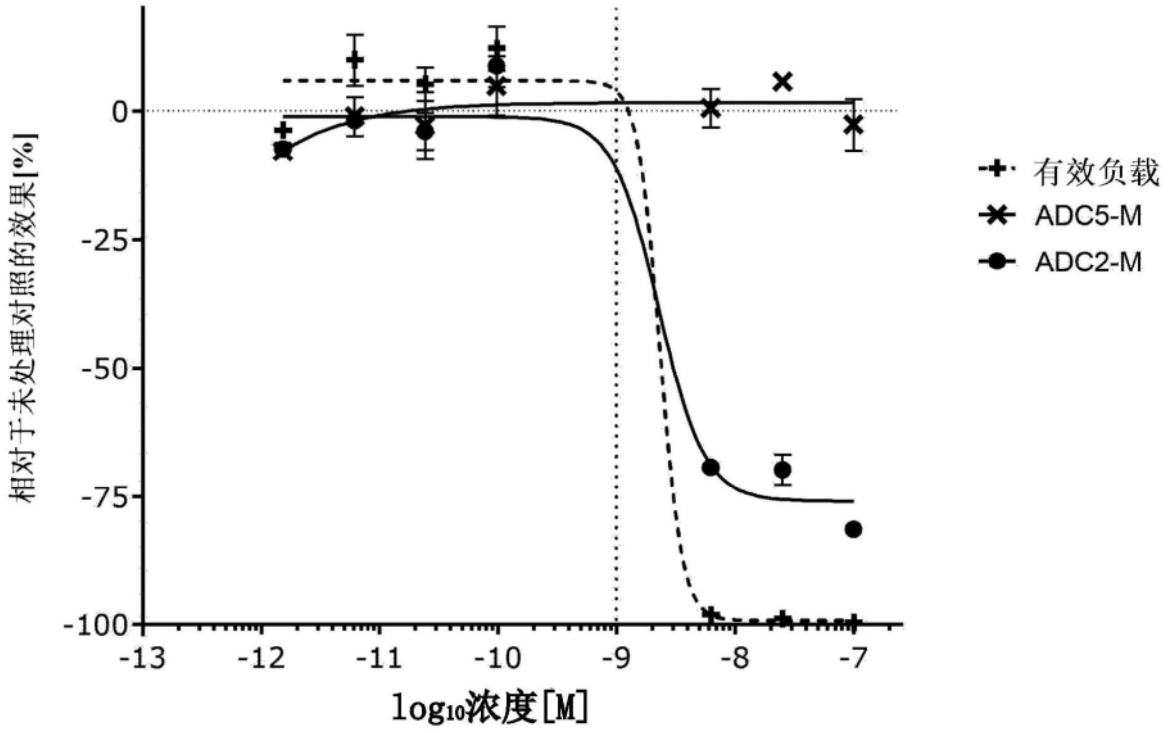
(a)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC5-M
ADC2-M

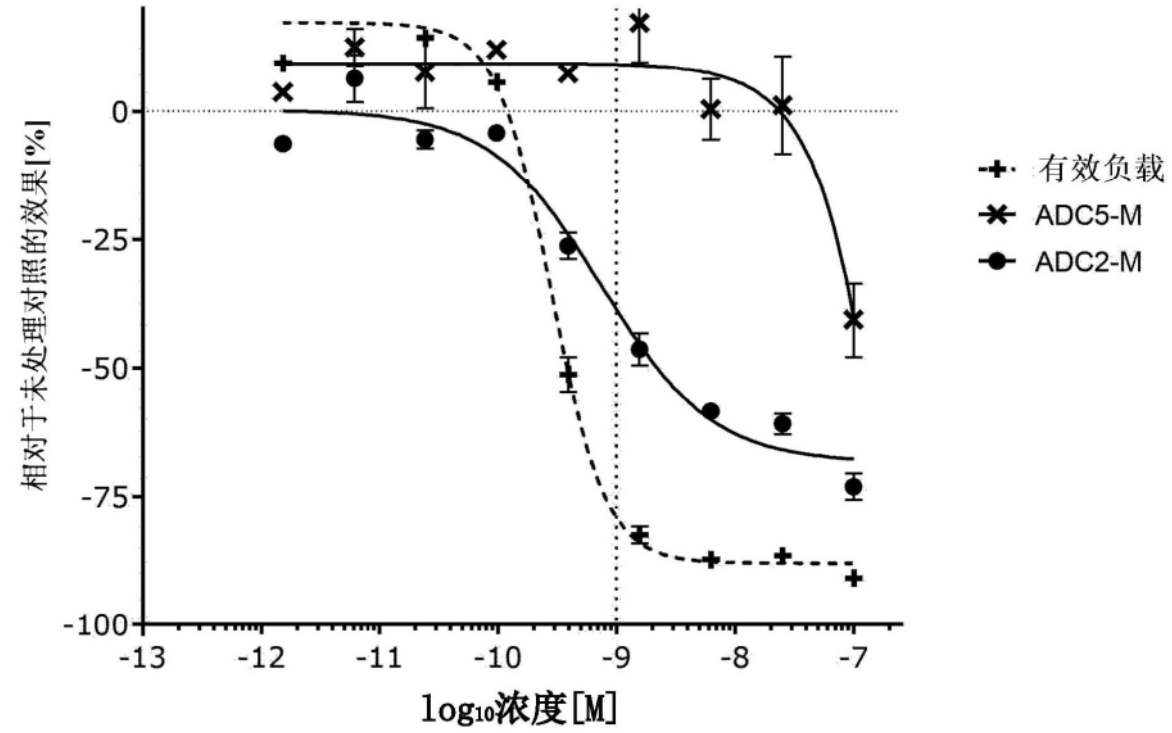
(b)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC5-M
ADC2-M

(c)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC5-M
ADC2-M

(d)


0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC5-M
ADC2-M

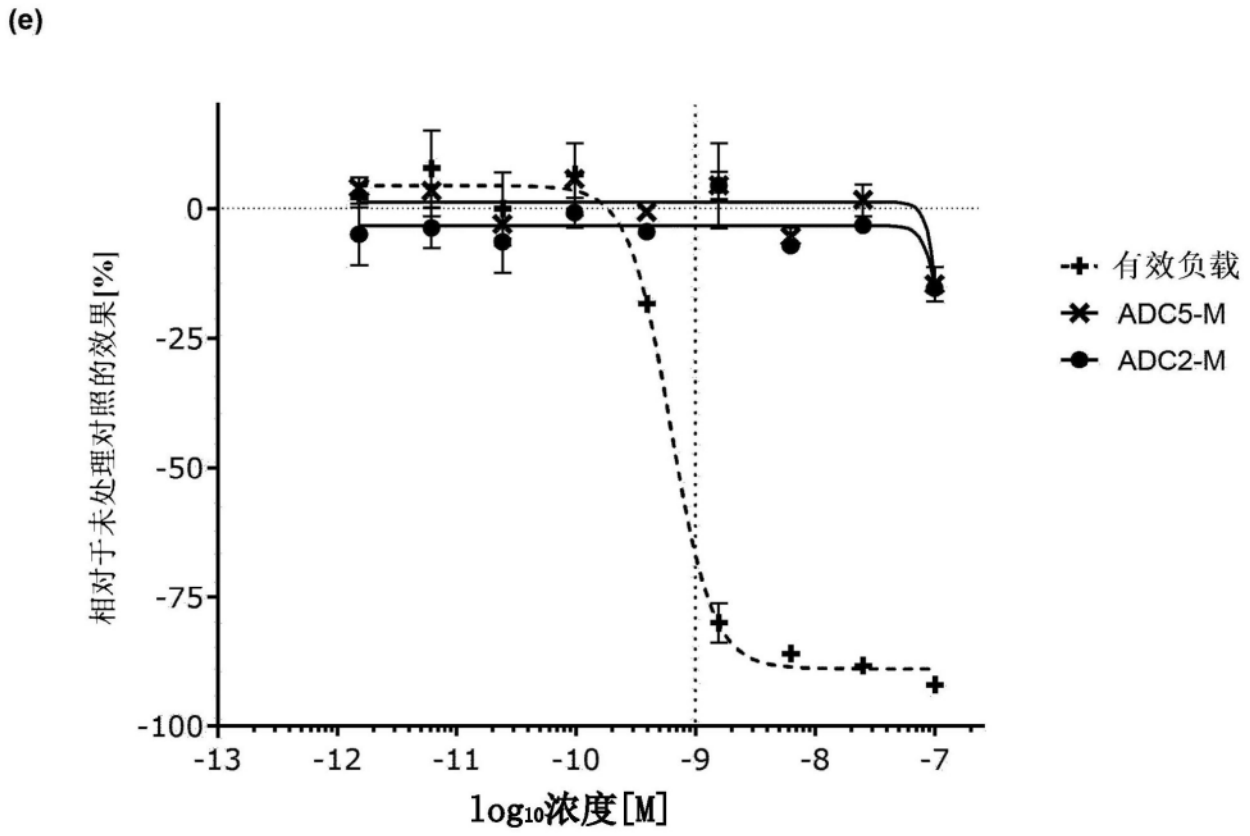

(e)
0
-25
-50
-75
-100
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
相对于未处理对照的效果[%]
log10浓度[M]
有效负载
ADC5-M
ADC2-M

图41

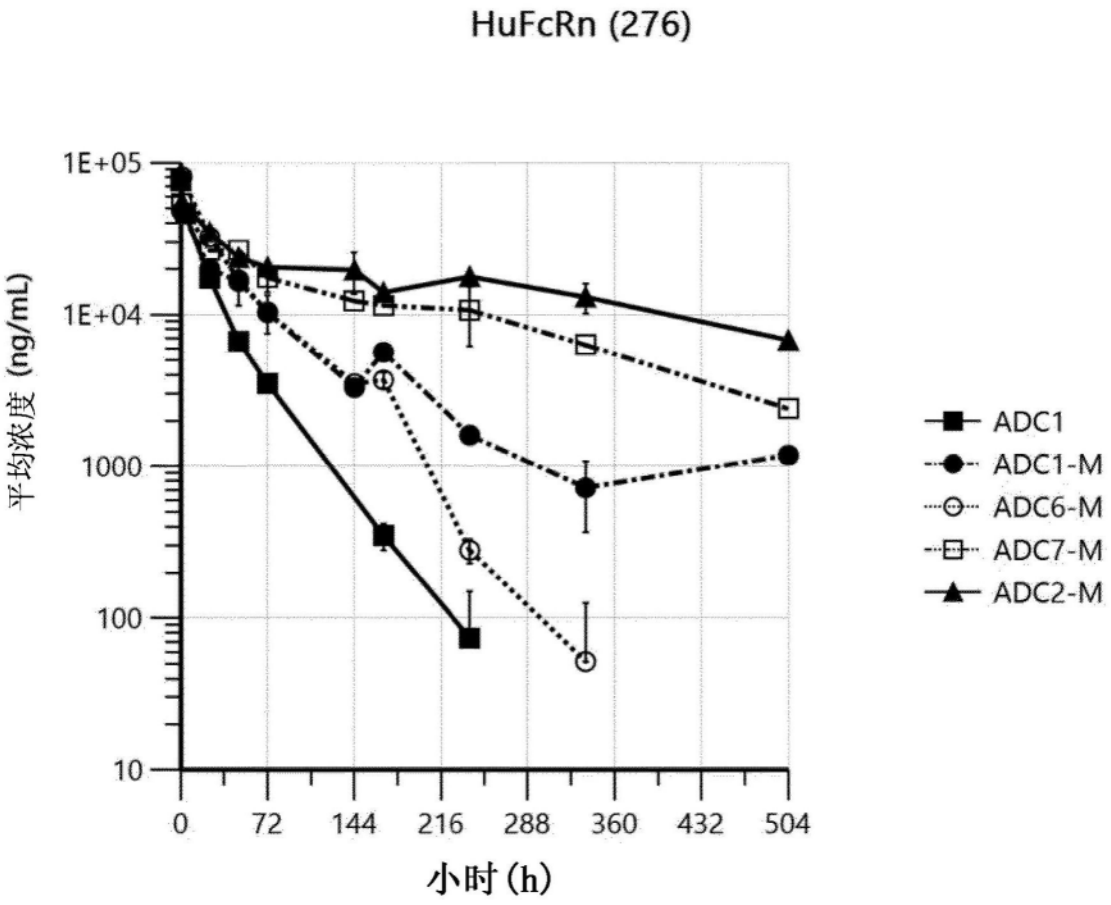

HuFcRn (276)
1E+05
1E+04
1000
100
10
平均浓度 (ng/mL)
0
72
144
216
288
360
432
504
小时 (h)
ADC1
ADC1-M
ADC6-M
ADC7-M
ADC2-M

图42

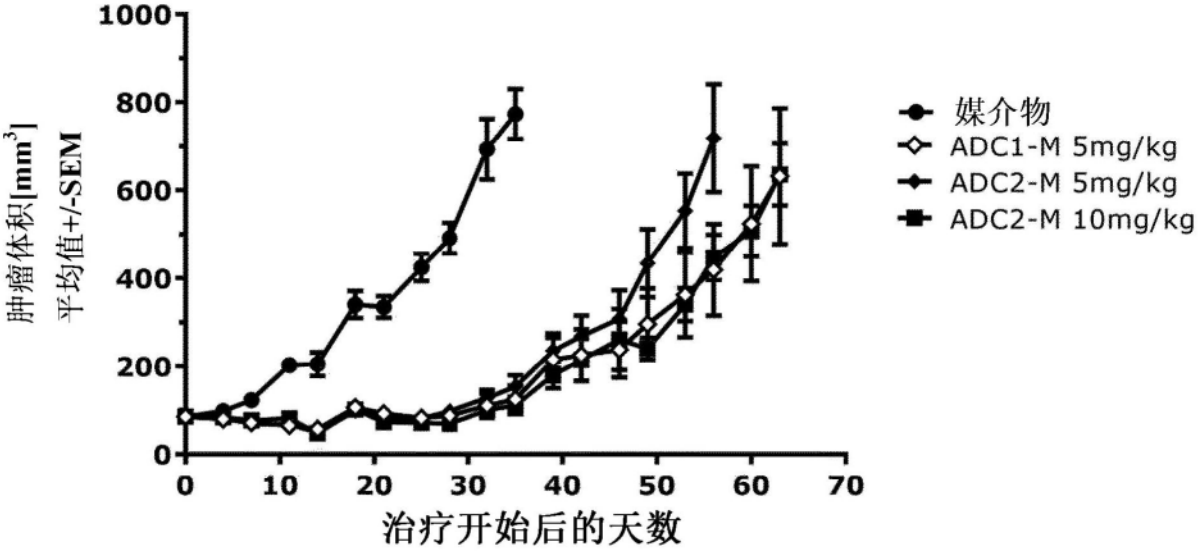

1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积[mm³]
平均值+/-SEM
0
10
20
30
40
50
60
70
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1-M 5mg/kg
ADC2-M 5mg/kg
ADC2-M 10mg/kg

图43

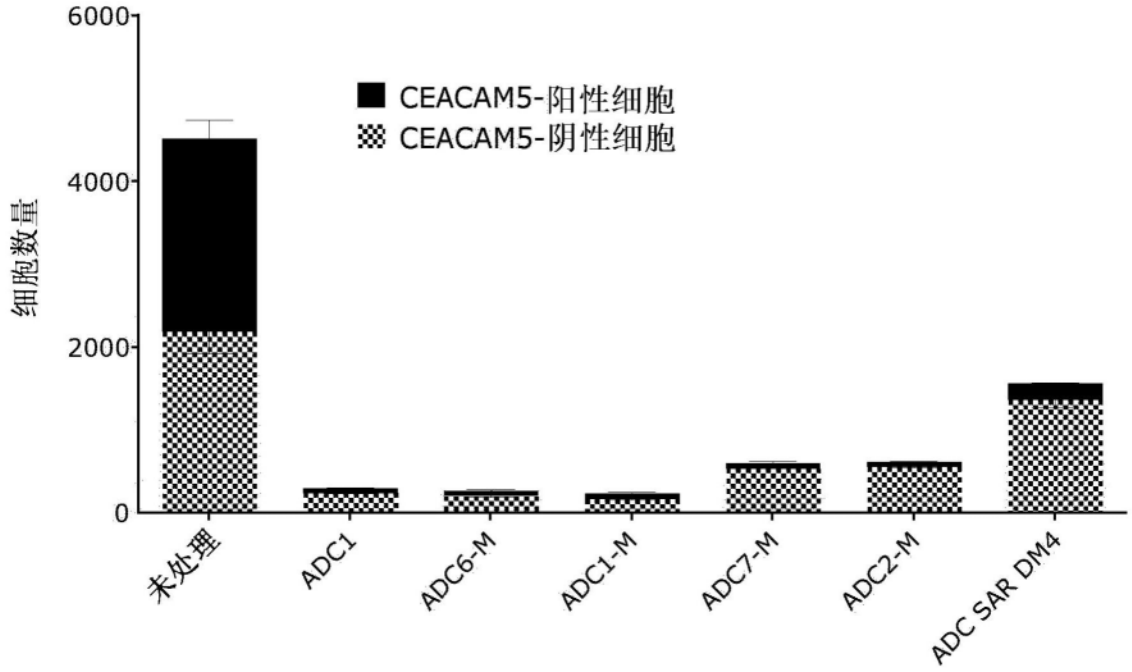

6000
4000
2000
0
细胞数量
CEACAM5-阳性细胞
CEACAM5-阴性细胞
未处理
ADC1
ADC6-M
ADC1-M
ADC7-M
ADC2-M
ADC SAR DM4

图44

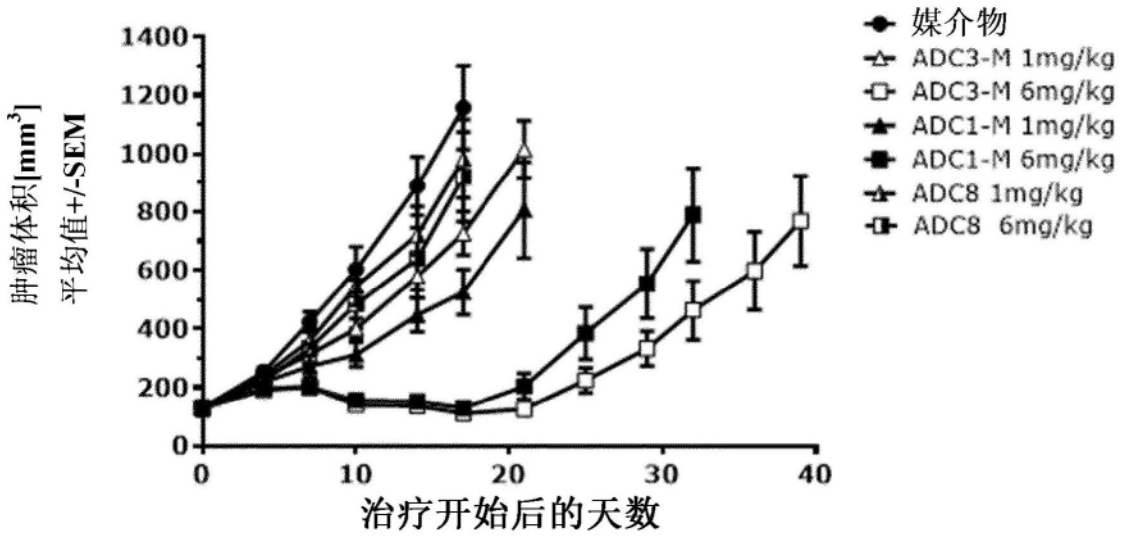

肿瘤体积[mm³]
平均值+/-SEM
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数
媒介物
ADC3-M 1mg/kg
ADC3-M 6mg/kg
ADC1-M 1mg/kg
ADC1-M 6mg/kg
ADC8 1mg/kg
ADC8 6mg/kg

图45

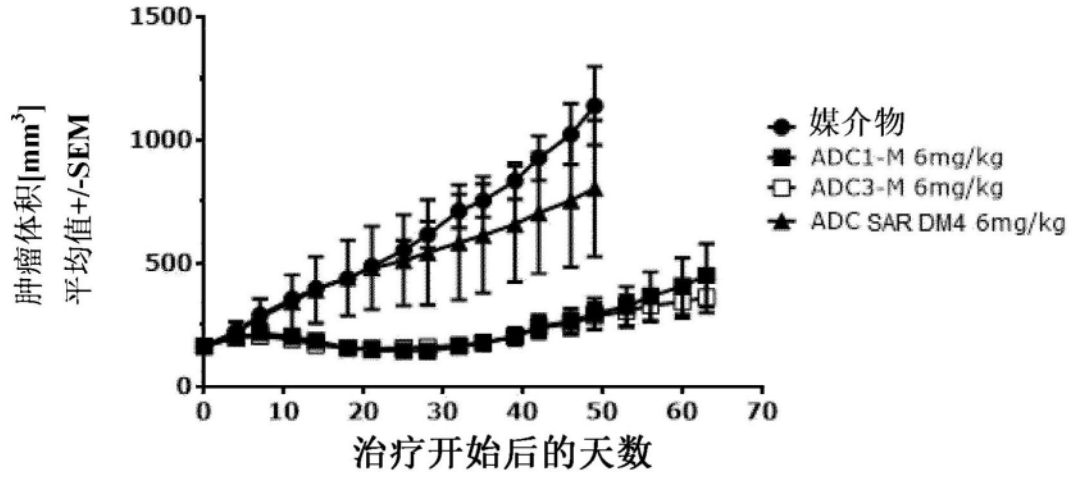

肿瘤体积[mm³]
平均值+/-SEM
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1-M 6mg/kg
ADC3-M 6mg/kg
ADC SAR DM4 6mg/kg

图46

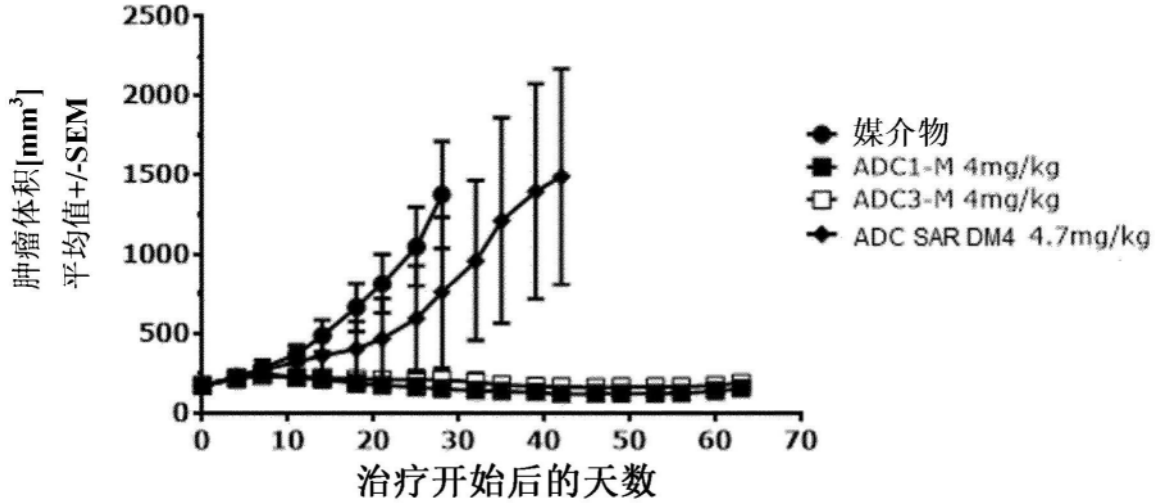

肿瘤体积[mm³]
平均值+/-SEM
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
治疗开始后的天数
媒介物
ADC1-M 4mg/kg
ADC3-M 4mg/kg
ADC SAR DM4 4.7mg/kg

图47