



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106456794 B

(45) 授权公告日 2023.02.17

(21) 申请号 201580026468.0

(22) 申请日 2015.05.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106456794 A

(43) 申请公布日 2017.02.22

(30) 优先权数据
14169493.5 2014.05.22 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.11.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/061456 2015.05.22

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/177360 EN 2015.11.26

(73) 专利权人 拜奥迪斯私人有限公司
地址 荷兰奈梅亨

(72) 发明人 赫拉尔杜斯·约瑟夫·安德烈亚

斯·阿里安斯

鲁迪·赫拉尔杜斯·伊丽莎白·库曼斯

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 彭鲲鹏 郑斌

(51) Int.Cl.
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2017.01)

(56) 对比文件
CN 101065151 A, 2007.10.31
WO 2013093809 A1, 2013.06.27
CN 103118679 A, 2013.05.22
CN 103517719 A, 2014.01.15
CN 101065151 A, 2007.10.31

审查员 张溪

权利要求书3页 说明书27页
序列表10页 附图7页

(54) 发明名称

接头药物与抗体的位点特异性缀合以及所得ADC

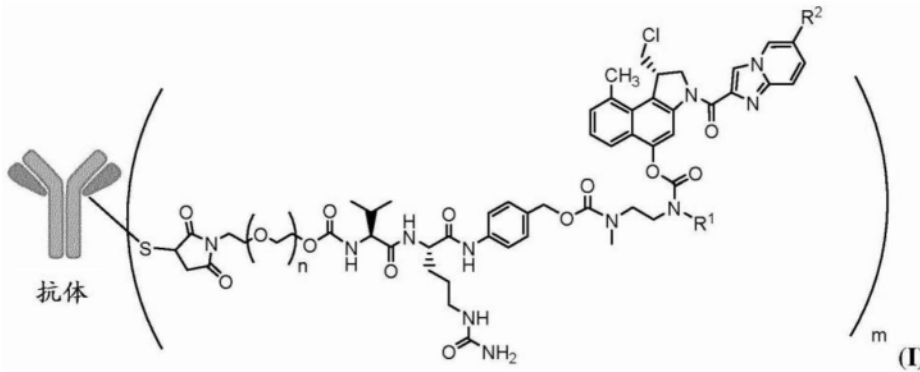
(57) 摘要

本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC),其中接头药物通过工程化半胱氨酸位点特异性地与抗体缀合;及其作为药物的用途,特别是用于治疗人实体瘤和血液学恶性肿瘤,尤其是乳腺癌、胃癌、结直肠癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫癌、肺癌、间皮瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌和白血病。

1. 抗体-药物缀合物化合物,其中接头药物通过在抗体或其抗原结合片段中根据Kabat编号的重链41位处的工程化半胱氨酸位点特异性地与所述抗体或其抗原结合片段缀合,其中所述接头药物包含倍癌霉素衍生物,其中所述抗体或其抗原结合片段是IgG1抗体或其抗原结合片段。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其还在所述抗体或其抗原结合片段的Fc部分中根据Eu编号的375位包含工程化半胱氨酸。

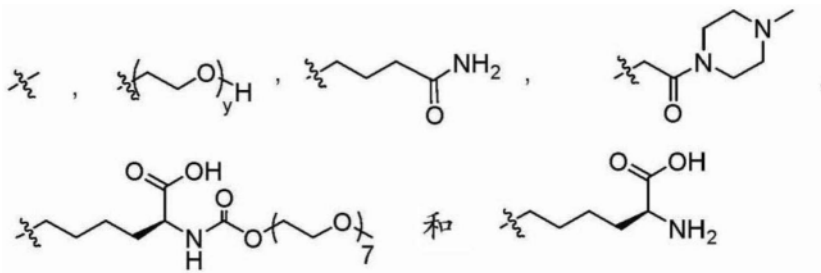
3. 式(I)的根据权利要求1或2所述的化合物,



其中所述抗体是在重链41位处包含工程化半胱氨酸的抗体或其抗原结合片段,
n为0至3,

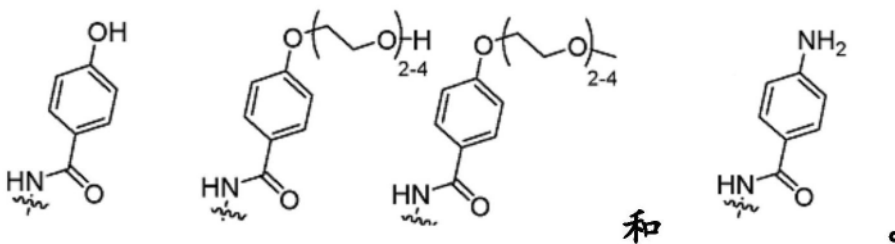
m表示1至6的平均DAR,

R¹选自



y为1至16,且

R²选自

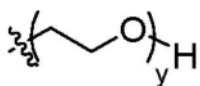


4. 根据权利要求3所述的化合物,其中

n为0至1,

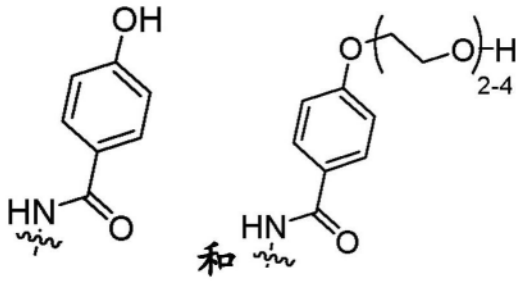
m表示1.5至2的平均DAR,

R¹为

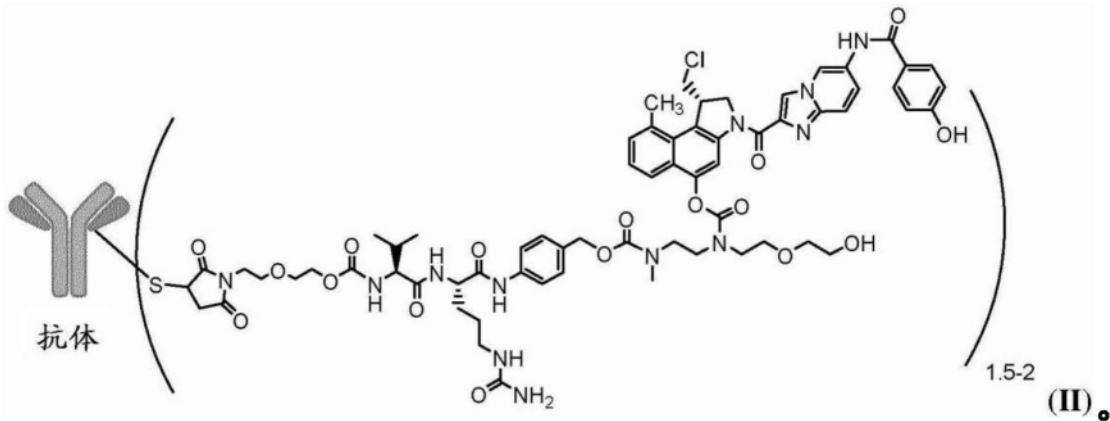


y为1至4,且

R²选自



5. 化学式 (II) 的根据权利要求1或2所述的化合物



6. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中所述抗体或其抗原结合片段与肿瘤细胞的细胞膜中或细胞膜上表达的抗原靶标结合,并且其中所述抗体在结合所述靶标后被所述细胞内化,之后药物在细胞内释放。

7. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中所述抗体是抗膜联蛋白A1抗体、抗CD115抗体、抗CD123抗体、抗CLL-1抗体、抗c-MET抗体、抗MUC1抗体、抗PSMA抗体、抗5T4抗体、或抗TF抗体。

8. 根据权利要求1或2中任一项所述的化合物,其中所述抗体是抗PSMA单克隆抗体或抗5T4单克隆抗体。

9. 根据权利要求8所述的化合物,其中所述抗体是抗PSMA单克隆抗体,其中所述抗PSMA抗体的重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,且所述抗PSMA抗体的轻链包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

10. 根据权利要求8所述的化合物,其中所述抗体是抗5T4单克隆抗体,其中所述抗5T4抗体的重链包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,且所述抗5T4抗体的轻链包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

11. 药物组合物,其包含根据权利要求1至10中任一项所述的化合物和一种或更多种可药用的赋形剂。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述组合物为冻干粉末或冷冻溶液的形式。

13. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或根据权利要求11或12所述的药物组合物在制造药物中的用途。

14. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或根据权利要求11或12所述的药物组

合物在制造用于治疗人实体瘤和血液学恶性肿瘤之药物中的用途。

15. 根据权利要求14所述的用途,其中所述人实体瘤选自乳腺癌、胃癌、结直肠癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫癌、肺癌、间皮瘤、肝癌、胰腺癌和前列腺癌。

16. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物或根据权利要求11或12所述的药物组合物与以下的组合在制造用于治疗人实体瘤和血液学恶性肿瘤之药物中的用途:一种或更多种治疗性抗体或化疗剂、或其组合。

接头药物与抗体的位点特异性缀合以及所得ADC

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体-药物缀合物 (antibody-drug conjugate, ADC), 其中接头药物通过工程化半胱氨酸位点特异性地与抗体缀合; 及其在治疗人实体瘤和血液学恶性肿瘤, 尤其是乳腺癌、胃癌、结直肠癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫癌、肺癌、间皮瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌和白血病的用途。

背景技术

[0002] 抗体-药物缀合物 (ADC) 是新兴的一类靶向治疗剂, 其具有比传统化疗更好的治疗指标。除了 (单克隆) 抗体 (monoclonal antibody, mAb) 和靶标选择之外, 药物和接头一直是 ADC 开发的焦点。然而, 最近意识到缀合物同质性的重要性。用于使药物连接 (attachment) 到抗体的常规方法会导致产生异质混合物, 并且该混合物的一些个别组分可具有不良的体内表现。位点特异性药物连接的较新方法导致产生更同质的缀合物并且允许控制药物连接位点。这些微妙的改善可以对体内功效和/或体内安全性以及由此对治疗指标具有深远的影响。位点特异性地使药物缀合至抗体的方法由 C.R. Behrens 和 B.Liu 在 mAbs, 第 6 卷, 第 1 期, 2014, 1-8 页进行了全面回顾。

[0003] 常规 ADC 通常如下产生, 通过表面暴露的赖氨酸的侧链或通过链间二硫键的还原产生的游离半胱氨酸的侧链将接头药物与抗体缀合。因为抗体含有许多赖氨酸残基和半胱氨酸二硫键, 所以常规缀合通常产生对分析表征和加工提出挑战的异质混合物。此外, 这些混合物的各组分对于其药代动力学、功效和安全特性方面表现出不同的物理化学性质和药理, 阻碍了优化该方式的合理方法。

[0004] 这两种用于抗体化学修饰的常规技术用于构建具有当前 FDA 销售批准的两种 ADC。Brentuximab vedotin (AdcetrisTM, Seattle Genetics) 由通过天然半胱氨酸侧链巯基的修饰与高度细胞毒性药物单甲基澳瑞他汀 E (monomethyl auristatin E, MMAE) 缀合的抗 CD30 单克隆抗体组成。该加工包括部分还原溶剂暴露的链间二硫键 (disulfide), 然后用含有马来酰亚胺的接头药物修饰所得的巯基。对于 brentuximab vedotin, 用 mc-vc-PAB-MMAE 修饰巯基, 其将马来酰亚胺基团 (mc, maleimidocaproyl, 马来酰亚胺基己酰) 和细胞毒性药物 (MMAE) 之间的组织蛋白酶 B 蛋白酶切割位点 (vc, 缬氨酸-瓜氨酸) 和自毁 (self-immolative) 接头 (PAB, para-aminobenzyloxycarbonyl, 对氨基苄氧基羰基) 合并。半胱氨酸连接策略最多产生每个还原的二硫键两个药物。大多数人 IgG 分子具有四个溶剂暴露的二硫键, 因此每个抗体可能有 0 至 8 个药物。每个抗体的药物的确切数目通过二硫键还原的程度和在随后的缀合反应中使用的接头药物的摩尔当量数来确定。所有四个二硫键的完全还原给出具有每个抗体八个药物的均质构建体, 而部分还原通常导致产生每个抗体具有零、二、四、六或八个药物的异质混合物。Brentuximab vedotin 具有平均每个抗体约 4 个药物。

[0005] 目前 FDA 批准的另一个 ADC 是 ado-曲妥珠单抗 emtansine (T-DM1, KadcylaTM, Roche/Genentech), 其通过将抗 HER2 单克隆抗体曲妥珠单抗通过赖氨酸侧链胺的修饰与细胞毒性

药物美登素偶联而构建。将该形式的美登素 (DM1) 修饰成包含可以连接到马来酰亚胺接头的巯基。在一端具有马来酰亚胺并且在另一端具有N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯的双功能接头 (SMCC, 4- (N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯) 与赖氨酸伯胺侧链反应以形成稳定的酰胺键。然后通过缀合到双功能接头的马来酰亚胺末端将修饰的美登素 (DM1) 与抗体连接。与brentuximab vedotin中使用的接头相反, 该接头不具有(蛋白酶)切割位点, 因此需要ADC的抗体部分的溶酶体降解以释放活性DM1-接头-赖氨酸代谢物。该连接方法产生具有每个抗体平均3.5个药物的缀合物的异质混合物。与上述半胱氨酸方法相比, 该策略给出更多的异质混合物, 因为发现修饰了20至40个赖氨酸残基, 而使用天然半胱氨酸修饰方法仅修饰了最多8个不同的半胱氨酸残基。

[0006] 最近, 据报道, 可通过应用位点特异性缀合技术来改进ADC的药理学谱, 该技术利用工程化并入抗体, 然后与接头药物缀合的表面暴露的半胱氨酸残基, 产生具有确定的药物抗体比 (drug-to-antibody ratio, DAR) 的位点特异性缀合的ADC。相对于使用常规赖氨酸和半胱氨酸缀合方法产生的异质混合物, 位点特异性缀合的ADC大体上证明了至少相当的体内效力、改善的PK和扩大的治疗窗口。

[0007] 在Genentech通过使用定点诱变在显示高巯基反应性的位置引入半胱氨酸残基开发了第一种位点特异性缀合方法, 如在W02006/034488中所详述的。蛋白质修饰中的这种常见实践在抗体中更复杂, 因为已经存在多种天然半胱氨酸残基。在不合适的位置引入额外的半胱氨酸残基可能导致链间二硫键的不当形成, 并因此导致抗体的不正确折叠。在突变的抗体中合适位置的工程化半胱氨酸残基通常被其它巯基如半胱氨酸或谷胱甘肽加帽, 形成二硫键。

[0008] 通过减少天然链间的和突变体二硫键两者来实现突变残基与药物连接, 然后使用温和氧化剂如CuSO₄或脱氢抗坏血酸将天然链间半胱氨酸重新氧化, 随后使释放的突变体半胱氨酸与接头药物标准缀合。在最佳条件下, 每个抗体将连接两个药物 (如果一个半胱氨酸被改造到mAb的重链或轻链中)。工程化半胱氨酸的方法证明适合于开发位点特异性ADC SGN-CD33A (Seattle Genetics), 其最近进入了I期剂量递增临床研究, 作为急性骨髓性白血病 (AML) 的治疗; 以及与包括阿糖胞苷和柔红霉素的标准护理化疗联合的Ib期临床试验。该ADC包含可切割的二肽接头 (即缬氨酸-丙氨酸) 和DNA交联剂, 吡咯并苯并二氮杂萘 (PBD) 二聚体作为药物连接到IgG1 mAb h2H12的Fc部分中的重链位置S239C (DAR 1.9; Sutherland等, Blood 2013;122 (8):1455-1463)。

[0009] 尽管在W02006/034488中明确了取代不涉及抗原结合相互作用且远离现有链间二硫键的表面可及的缬氨酸、丙氨酸和丝氨酸残基以获得具有高巯基反应性的工程化半胱氨酸残基, 但来自Novartis的W02014/124316尤其关注于在抗体重链和轻链的恒定区中表面可及位点的鉴定, 在该位点取代半胱氨酸残基使得有效负载 (payload) 能够有效缀合并提供具有高稳定性的缀合物。

[0010] 除了工程化半胱氨酸的缀合策略之外, 已经开发了用于药物的位点特异性连接的其它方法。辉瑞证明了一种使用微生物转谷氨酰胺酶将含胺药物偶联到抗体上的工程化谷氨酰胺进行缀合的新技术。转谷氨酰胺酶是催化谷氨酰胺侧链的酰基与赖氨酸侧链的伯胺之间的酰胺键形成的酶。

[0011] 除了酶促缀合之外, 正交化学缀合也已经用于使用非天然氨基酸位点特异性修饰

许多种蛋白质(尤其是来自Ambrx和Sutro Biopharma的技术)。特别地,选择对乙酰基苯基-丙氨酸和对叠氮甲基-L-苯丙氨酸作为非天然氨基酸,因为它们分别含有酮和叠氮化物官能团,其未在20种天然氨基酸侧链的任何一个中发现。这允许酮cq.叠氮基团的特异性修饰而不受其它氨基酸的干扰。该方法提供了构建具有每个抗体(每一种这样的非天然氨基酸)最多两个药物的ADC的另外的途径。

[0012] 在迄今为止公开的所有现有技术方法中,以改善均质性和药代动力学性质为目的,重点在于在表面/溶剂暴露位置、在显示高巯基反应性的位置和在特异性地在单克隆抗体的恒定区中的位置位点特异性地缀合接头药物。即使上述常规的赖氨酸和半胱氨酸缀合方法已导致了FDA批准的抗体-药物缀合物,并且它们被用于构建目前处于临床前和临床试验中的大量ADC中的大多数,但仍然需要新的缀合策略,目的是(进一步)改善ADC的物理化学、药代动力学、药理学和/或毒理学性质,以获得具有可接受的抗原结合性质、体内功效、治疗指标和/或稳定性的ADC。

[0013] 发明简述

[0014] 本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC),其中接头药物通过工程化半胱氨酸位点特异性地在抗体的一个或更多个特异性位置与所述抗体缀合;及其用于治疗人实体瘤和血液学恶性肿瘤,尤其是乳腺癌、胃癌、结直肠癌、尿路上皮癌、卵巢癌、子宫癌、肺癌、间皮瘤、肝癌、胰腺癌、前列腺癌和白血病的用途。

[0015] 附图简述

[0016] 图1A. 鉴定在抗体的Fab部分中合适的接头药物缀合位置

[0017] 图1B. 将倍癌霉素(duocarmycin)接头药物vc-seco-DUBA在抗体的Fab腔中对接(docking)(多个vc-seco-DUBA对接的叠加)

[0018] 图1C. 鉴定在抗体的Fc部分中合适的接头药物缀合位置

[0019] 图1D. 将倍癌霉素接头药物vc-seco-DUBA在抗体的Fc腔中对接(多个vc-seco-DUBA对接的叠加)

[0020] 图2A. 工程化半胱氨酸抗PSMA(VH S41C)ADC(SYD1091)相对于载剂对照、比较物(comparator)工程化半胱氨酸抗PSMA(CH T120C)ADC(SYD1035)和未工程化抗PSMA(野生型)wt ADC(SYD998)的体内功效,每种2mg/kg。

[0021] 图2B. 工程化半胱氨酸抗PSMA(VH S41C)ADC(SYD1091)相对于载剂对照、比较物工程化半胱氨酸抗PSMA(CH T120C)ADC(SYD1035)和未工程化抗PSMA wt ADC(SYD998)的体内功效,每种10mg/kg。

[0022] 图3. 工程化半胱氨酸抗PSMA(VH S41C)ADC(SYD1091)相对于载剂对照、比较物工程化半胱氨酸抗PSMA(CH T120C)ADC(SYD1035)和未经改造的抗PSMA wt ADC(SYD998)对体重的影响,每种10mg/kg。

[0023] 图4A. 工程化半胱氨酸抗5T4(VH P41C)H8 ADC(H8-41C-vc-seco-DUBA)相对于载剂对照和未经改造的抗5T4 wt H8 ADC(HS-vc-seco-DUBA)的体内功效,每种3mg/kg。

[0024] 图4B. 工程化半胱氨酸抗5T4(VH P41C)H8 ADC(H8-41C-vc-seco-DUBA)相对于载剂对照和未工程化抗5T4 wt H8 ADC(HS-vc-seco-DUBA)的体内功效,每种10mg/kg。

[0025] 发明详述

[0026] 抗体-药物缀合物(ADC)作为一类新的抗癌治疗剂出现,其将小分子治疗剂的功效

与抗体的靶向能力组合。通过将这两种组分组合成单个新的分子整体,可以将高度细胞毒性的小分子药物递送至癌性靶组织,从而增强功效,同时降低小分子的潜在的全身毒性副作用。

[0027] 抗体已经与多种细胞毒性药物缀合,包括结合DNA的小分子(例如蒽环类)、烷基化或交联DNA的小分子(例如分别为倍癌霉素或吡咯并苯并二氮杂二聚体)、引起DNA链断裂的小分子(例如卡里奇霉素(calicheamicins))或破坏微管的小分子(例如美登木素生物碱和澳瑞他汀)。

[0028] 本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中接头药物通过工程化半胱氨酸在抗体的选自以下的一个或多个位置处位点特异性地与所述抗体缀合:重链40、41、89(Kabat编号)、152、153、155、171、247、297、339、375和376(Eu编号);以及轻链40、41(Kabat编号)、165和168(Eu编号)。

[0029] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中接头药物通过工程化半胱氨酸在抗体的选自以下的一个或多个位置处位点特异性地与所述抗体缀合:重链40、41、89、152、153、155、171、247、297、339和375,以及轻链40、41和165。

[0030] 在一个特别优选的实施方案中,本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中接头药物通过工程化半胱氨酸在抗体的选自以下的一个或多个位置处位点特异性地与所述抗体缀合:重链40、41和89(根据Kabat编号)以及轻链40和41(根据Kabat编号)。

[0031] 因为关于位点特异性ADC的早期工作的焦点是找到显示与接头药物具有良好反应性并且同时在抗体之间形成二硫键(导致聚集)或干扰抗体结构(所谓的二硫桥打乱(shuffling))的低风险的缀合位置,所以尚未评估对与缀合位点有关的缀合物疏水性的作用。此外,焦点主要是在抗体的恒定区中找到合适的位点,因为抗体可变区的修饰通常被认为与部分或完全丧失抗原结合的高风险相关。

[0032] 然而,本发明人已经聚焦于影响位点特异性ADC的疏水性特征。

[0033] 一种使用YASARA软件包的计算机方法(www.yasara.org,见:Krieger等Proteins 2009;77 Suppl 9:114-122)被用于鉴定接头药物与抗体的强相互作用的位点。合适的位置表现为疏水表面的增加最小。在如此鉴定的相互作用位点附近鉴定了适于转化为半胱氨酸的残基(即具有足够的可及性)。在该方法中,对抗体的恒定区没有限制,如果不在抗原结合位点附近,也考虑可变区氨基酸。Fab部分的可变结构域中的位置证明是优选的。

[0034] 如在YASARA中实施的,使用常用的VINA算法(Trott O和Olson AJ.J.Comput.Chem.2010;31:455-461)模拟接头药物进入到多种抗体的Fab和Fc模型中的对接。使用的抗体Fab和Fc模型为从X射线结构或通过使用YASARA的同源性建模获得。

[0035] 倍癌霉素型接头药物,例如vc-seco-DUBA(即,SYD980;其ADC化合物描述于式II中)显示出对存在于所有抗体结构的腔中的结合具有强烈的偏好(分别参见图1B和1D的抗体的Fab和Fc部分)。在这些腔中和紧邻这些腔中鉴定了用于接头药物连接的多个合适的缀合位置,即在这些位置具有工程化半胱氨酸的良好可及性(分别参见图1A和1C的抗体的Fab和Fc部分)。

[0036] 在本发明的上下文中,Kabat编号用于指示重链(HC)和轻链(LC)可变区中工程化半胱氨酸的氨基酸位置,并且Eu编号用于指示抗体重链恒定区和轻链恒定区中的位置。鉴于抗体可变区的序列可变性,由半胱氨酸取代的确切氨基酸对于不同抗体可以是不同的。

对于大多数抗体,特别是IgG抗体,在重链可变区(VH)中,通常在40位具有A或S,在41位具有P且在89位具有V,并且在轻链可变区(VL)中,通常在40位具有P,在41位具有G。在重链恒定区(CH1、CH2和CH3)中,通常在152位具有E,在153位具有P,在155位具有T,在171位具有P,在247位具有P,在297位具有N,在339位具有A,在375位具有S,且在376位具有D,并且在轻链 κ 恒定区(CL)中,通常在165位具有E且在168位具有S。在五个 λ 轻链同种型恒定区(CL)中,通常在165位具有S且在168位具有S。

[0037] 表述“Kabat编号”是指用于汇编抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统,其描述于Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991)。使用该编号系统,实际的线性氨基酸序列可以包含较少或另外的氨基酸,其对应于可变结构域的框架区(framework region,FR)或互补决定区(complementary determining region,CDR)的缩短或插入。可通过在抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域比对,对于给定抗体确定残基的Kabat编号。

[0038] 表述“Eu编号”是指如Kabat,E.A.等Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.,NIH公开no.91-3242,662,680,689页(1991)中的Eu索引。“如在Kabat中的Eu索引”是指人IgG1 Eu抗体的残基编号(Edelman,GM.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,63,78-85(1969))。

[0039] 重链位置40、41和89位于抗体的可变区,位置152、153、155、171、247、297、339、375和376位于抗体的恒定区。轻链位置40和41位于抗体的可变区,位置165和168位于抗体的恒定区。

[0040] 重链位置40、41、89、152、153、155和171以及轻链位置40、41、165和168位于抗体的Fab部分,并且重链位置247、297、339、375和376位于抗体的Fc部分。

[0041] 根据本发明,术语“工程化半胱氨酸”是指用半胱氨酸替代抗体重链或轻链中的非半胱氨酸氨基酸。如本领域技术人员已知的,这可以在氨基酸水平或在DNA水平上进行,例如,通过使用定点诱变进行。

[0042] 本发明人出人意料地发现,与其中接头药物通过抗体的天然链间二硫键缀合的ADC相比,以及此外,与其中接头药物在现有技术公开的位置而非在本专利申请中具体要求保护的位置缀合的工程化半胱氨酸ADC相比,本发明的位点特异性缀合的ADC化合物表现出改善的物理化学、药理学和/或药代动力学性质。根据本发明的ADC化合物具有类似于裸抗体的结合特性、良好的体内功效、提高的治疗指标和/或改善的稳定性。尤其是,相比于在不同位置位点特异性缀合的ADC通常疏水性较小,发现该ADC化合物对组织蛋白酶B切割较不敏感,因此也可能对肿瘤块(肿瘤微环境)中的其它细胞内或细胞外酶/蛋白酶不敏感,但仍显示类似的体外细胞毒性。出乎意料地,与在其它位置位点特异性缀合的ADC相比,根据本发明的ADC在肿瘤异种移植动物模型中显示改善的体内功效。

[0043] 不希望被任何理论所束缚,本发明人发现,当接头药物在如本文要求保护的抗体的特定位置处缀合时,所述接头药物适合于由抗体的CH1、VH、VL和CL结构域形成的Fab腔或由抗体的两个CH2和两个CH3结构域形成的Fc腔。在IgG1抗体中,Fc腔的顶部由连接于重链位置N297的糖苷/碳水化合物形成。结果,接头药物(其通常比抗体更疏水)与抗体周围的亲水性水性环境隔离,并且此种ADC与其中接头药物通过抗体的天然二硫键缀合的ADC相比疏

水性较小,并且与其中接头药物在目前未要求保护的不同位置位点特异性缀合和其中接头药物被迫暴露到抗体外部(即,指向远离抗体的方向)的ADC相比疏水性小得多。

[0044] 在一个特定实施方案中,本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中接头药物通过工程化半胱氨酸在抗体的选自以下的一个或多个位置处位点特异性地与所述抗体缀合:重链40、41、152、153、247、339和375,以及轻链40、41和165。

[0045] 在另一个实施方案中,本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中接头药物通过工程化半胱氨酸在抗体的选自以下的一个或多个位置处位点特异性地与所述抗体缀合:重链40、41、89、247、297和376,与轻链40和41。

[0046] 在一个实施方案中,本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中接头药物通过工程化半胱氨酸在抗体的选自以下的一个或多个位置处位点特异性地与所述抗体缀合:所述抗体Fab部分中的重链40、41、89、152、153、155和171,以及轻链40、41、165和168。

[0047] 在另一个实施方案中,本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中接头药物通过工程化半胱氨酸在抗体的选自以下的一个或多个位置处位点特异性地与所述抗体缀合:所述抗体Fab部分中的重链40、41、152和153,以及轻链40、41和165。

[0048] 一般会避免修饰抗体的可变部分,因为其可导致抗原结合性质的部分或完全丧失。然而,与一般的预期相反,发现抗体重链和轻链两者的框架区中的特定残基都适合缀合,并且在接头药物缀合后不会导致(显著)抗原结合的减少。因此,在一个特别优选的实施方案中,本发明涉及抗体-药物缀合物(ADC)化合物,其中所述工程化半胱氨酸在所述抗体选自以下的一个或更多个位置处:所述抗体Fab部分中的重链40、41和89,以及轻链40和41。优选地,所述工程化半胱氨酸在重链位置40或41和/或轻链位置40或41,更优选在重链位置41和/或轻链位置40或41,最优选在重链位置41。从文献中已知肿瘤微环境中的肿瘤相关蛋白酶可以部分切割在铰链区下的Fc恒定结构域,所以Fab部分中的缀合优于Fc部分中的缀合。Fc恒定结构域的切割将导致Fc缀合的接头药物的丧失,这继而可导致体内ADC的活性降低(Fan等,Breast Cancer Res.2012;14:R116和Brezsky等PNAS 2009;106:17864-17869)。此外,与Fab部分中的这些位置缀合还使得能够使用抗原结合片段。

[0049] 在一个具体的实施方案中,上述优选实施方案的抗体-药物缀合物(ADC)化合物还可以在选自重链152、153、155、171、339和375以及轻链165和168的抗体的一个或更多个位置处包含另外的工程化半胱氨酸。优选地,所述其他工程化半胱氨酸在所述抗体的Fc部分中的重链位置375。

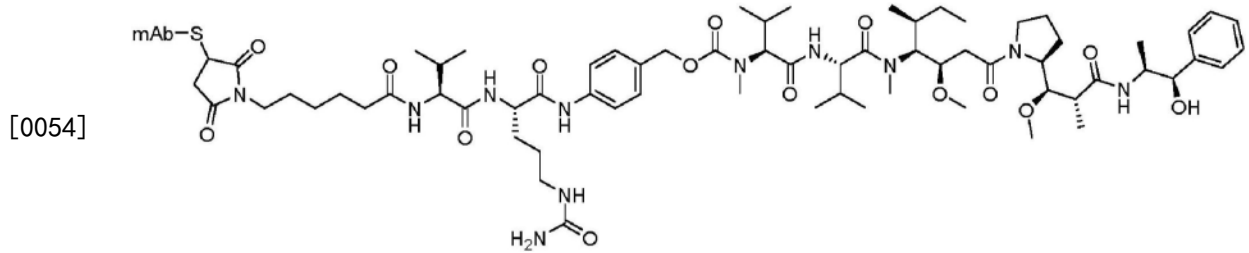
[0050] 根据本发明,可以通过使用常规分子克隆技术将一个或更多个半胱氨酸残基改造到抗体中;或这种携带半胱氨酸突变的抗体的重链或轻链结构域可以使用已知的(肽或DNA)合成设备和方法来合成。

[0051] 根据本发明,ADC领域中已知的任何接头药物可用于与抗体位点特异性缀合,条件是其具有可与工程化半胱氨酸巯基反应的化学基团(通常为马来酰亚胺或卤代乙酰基)。合适的接头药物可包含倍癌霉素、卡里奇霉素、吡咯并苯并二氮杂(PBD)二聚体、美登木素生物碱或澳瑞他汀衍生物作为细胞毒性药物。根据本发明可以使用可切割或不可切割的接头。美登木素生物碱药物的合适实例包括DM1和DM4。澳瑞他汀药物的合适实例包括MMAE和MMAF。

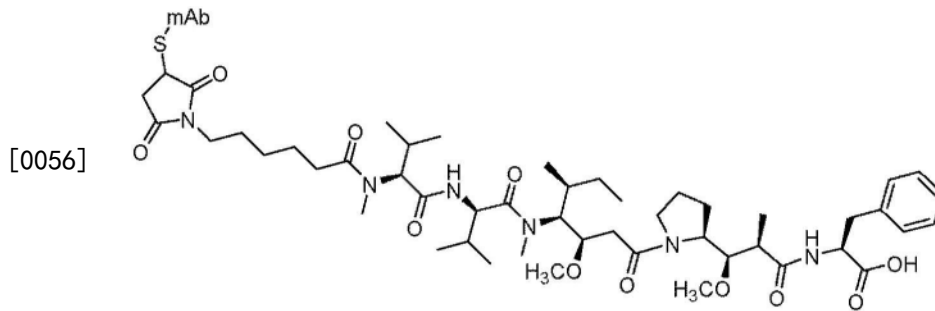
[0052] 这些缩写是技术人员公知的。本领域技术人员已知的合适的接头药物的实例包括

mc-vc-PAB-MMAE (也缩写为mc-vc-MMAE和vc-MMAE)、mc-MMAF和mc-vc-MMAF。优选地,所使用的接头是可切割接头,例如缬氨酸-瓜氨酸(vc)或缬氨酸-丙氨酸(va)。

[0053] vc-MMAE ADC和mc-MMAF ADC的通用分子结构如下所示。



[0055] 连接于mAb的vc-MMAE的分子结构



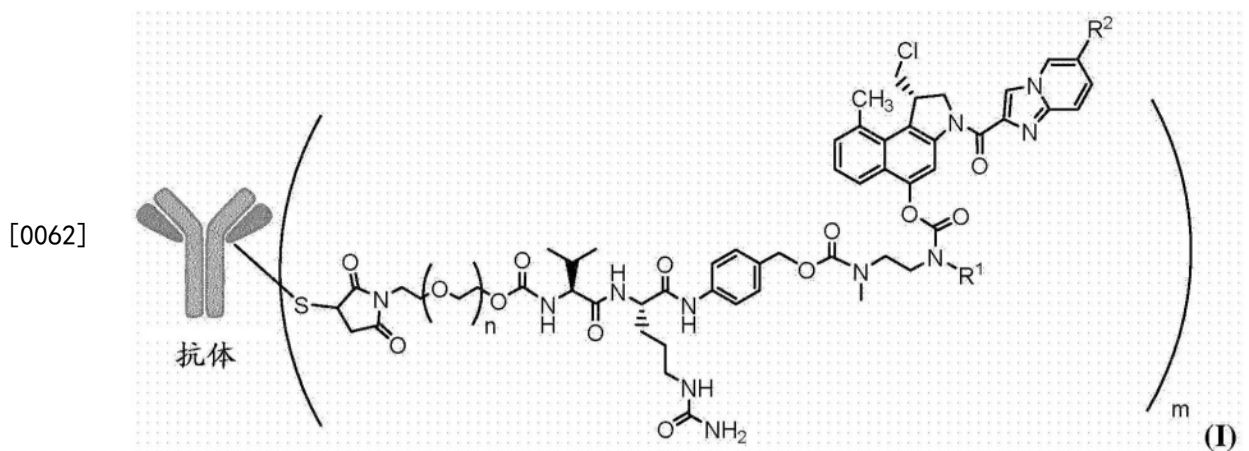
[0057] 连接于mAb的mc-MMAF的分子结构

[0058] 在一个实施方案中,本发明涉及ADC化合物,其中所述接头药物包含倍癌霉素衍生物。

[0059] 倍癌霉素首先从链霉菌属(*Streptomyces*)物种的培养液中分离,是抗肿瘤抗生素家族的成员,其包括倍癌霉素A、倍癌霉素SA和CC-1065。据称这些极有效的药剂的生物活性来源于其在小沟区中腺嘌呤的N3位置处序列选择性烷基化DNA的能力,这启动结局是凋亡细胞死亡机制的事件级联。

[0060] W02011/133039公开了一系列包含CC-1065的倍癌霉素衍生物的接头药物。根据本发明使用的合适的接头-倍癌霉素衍生物公开于182至197页。许多这些接头药物的化学合成描述于W02011/133039的实施例1至12中。

[0061] 在一个实施方案中,本发明涉及式(I)的化合物

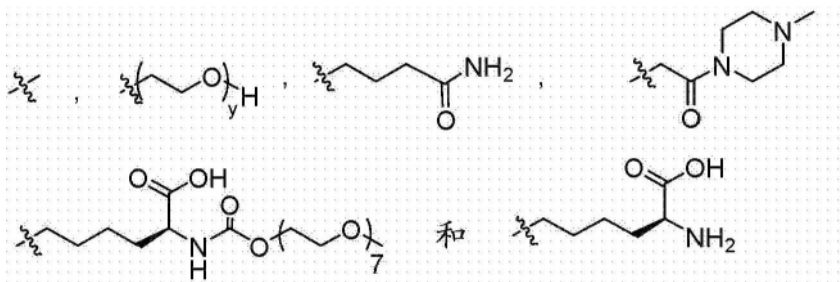


[0063] 其中

[0064] n为0至3,优选0至1,

[0065] m表示1至6的平均DAR,优选1至4,

[0066] R¹选自

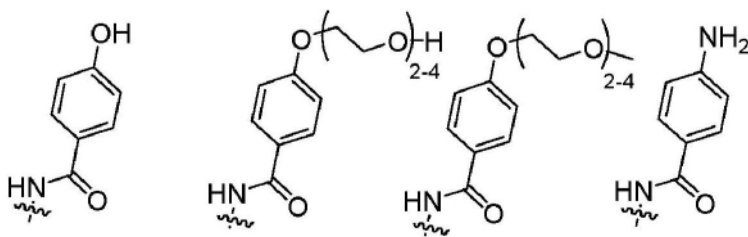


[0067]

[0068] y为1至16,且

[0069] R²选自

[0070]



[0071] 在本说明书所示的结构式中,n代表0至3的整数,而m代表1至6的平均药物-抗体比(drug-to-antibody ratio,DAR)。如本领域所公知的,DAR和药物负载分布可以通过例如使用疏水相互作用色谱(hydrophobic interaction chromatography,HIC)或反相高效液相色谱(reversed phase high-performance liquid chromatography,RP-HPLC)来测定。HIC特别适合于测定平均DAR。

[0072] 根据本发明的式(I)化合物可以根据本领域技术人员公知的方法和程序获得。用于位点特异性缀合接头药物的合适方法可以例如在W02005/084390的实施例7和8中找到,其描述了具有接头药物vc-MMAE之抗体的(部分)负载的完全还原策略;在W02006/034488的实施例11和12中,其描述了含有美登素(DM1)的接头药物的位点特异性缀合,以及在Doronina等Bioconjugate Chem.17(2006):114-124中,其描述了与mc-MMAF的缀合。

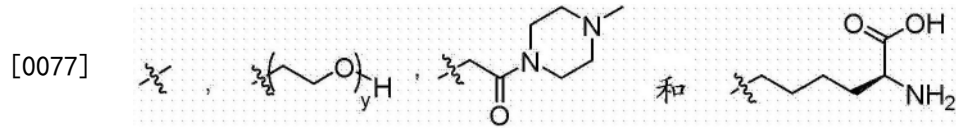
[0073] 与本发明的两个或更多个工程化半胱氨酸位点的缀合允许制备包含具有更高DAR,特别是DAR 4的疏水药物类的ADC,而不会获得太多的聚集体。

[0074] 根据本发明的一个特定实施方案,可以在最佳反应条件下将一个或两个工程化半胱氨酸并入抗体的重链和/或轻链中,分别得到DAR为2或4的ADC化合物。当引入一个工程化半胱氨酸时,其可以位于抗体的Fab部分中或Fc部分中。优选将所述半胱氨酸在以下位置处引入抗体的Fab部分:HC 40、41、89、152或153或者LC 40、41或165,优选HC 40、41或89或者LC 40、41或165,更优选HC 40或41或者LC 40或41,甚至更优选HC 41或者LC 40或41、最优选HC 41。当引入两个工程化半胱氨酸时,这两个半胱氨酸可以都位于抗体的Fab部分中或Fc部分中,或者优选地,一个可以在Fab部分中,优选HC 40、41、152或153或者LC 40、41或165,更优选HC 40或41或者LC 40或41,甚至更优选HC 41或者LC 40或41,最优选HC 41,并且另一个可以在抗体的Fc部分中,优选HC 247、297、339或375,更优选HC 339或375,最优选HC 375。当将两个工程化半胱氨酸引入抗体的Fab部分时,可以将一个半胱氨酸残基引入重链中,而将另一个半胱氨酸引入抗体的轻链中,例如,HC40或41以及LC 40或41。此外,当两

个工程化半胱氨酸引入抗体的Fab部分时,可以在本发明中鉴定的特定位置之一引入一个半胱氨酸残基,例如,HC 40或41或者LC 40或41,并且另一个可以位于表面暴露的(即,本文中未要求保护的)工程化半胱氨酸位置,导致更高的DAR和仍然可接受的疏水性。

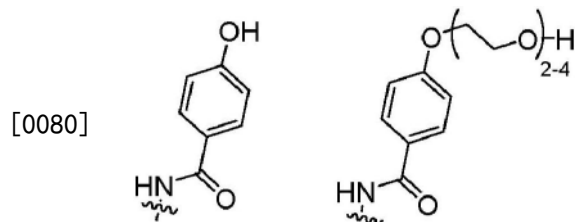
[0075] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及如上文所公开的式(I)的化合物,其中n为0至1,m表示1至6,优选1至4,更优选1至2,最优选1.5至2的平均DAR,

[0076] R^1 选自



[0078] y为1至16,优选1至4,且

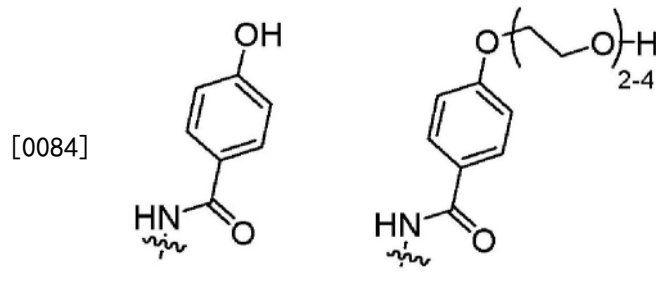
[0079] R^2 选自



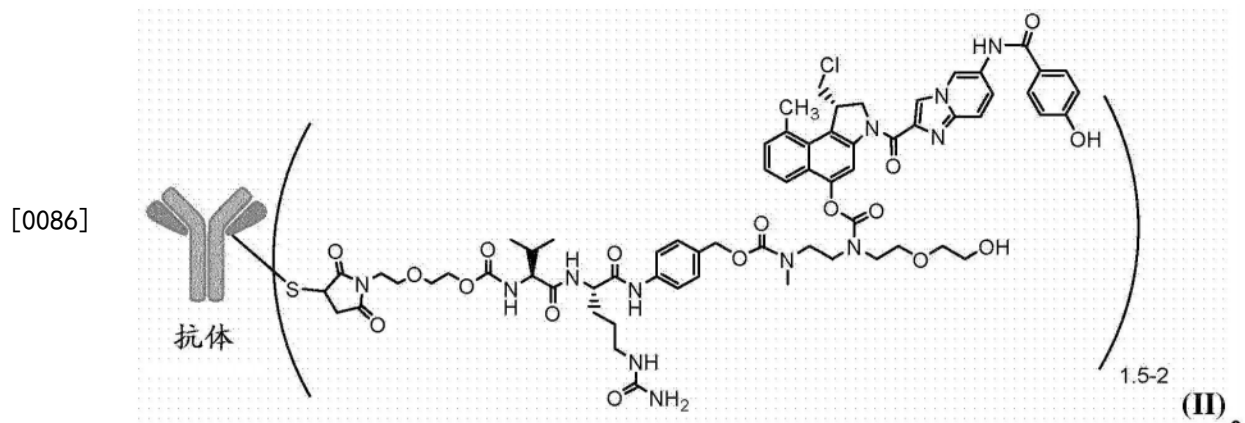
[0081] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及如上文所公开的结构式(I)的化合物,其中n为0至1,m表示1.5至2的平均DAR, R^1 为



[0083] y为1至4,且 R^2 选自



[0085] 在一个具体的优选实施方案中,本发明涉及式(II)的化合物



[0087] 根据本发明,任何抗体-特别是已知具有治疗活性的任何抗体或ADC领域中已知的

任何抗体-或其任何抗原结合片段可用于接头药物在本文要求保护的特异性抗体位置处的位点特异性缀合。所述抗体可以是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。所述抗体可以具有 κ (kappa) 轻链或 λ (lambda) 轻链。所述IgG抗体可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。优选地, 抗体结合肿瘤细胞的细胞膜内或细胞膜上(例如, 在细胞表面上)表达的(抗原)靶标, 更优选地, 抗体在与(抗原)靶标结合后被细胞内化, 之后毒素在细胞内释放。优选地, 抗体是IgG抗体, 更优选IgG1抗体, 最优选具有 κ 轻链的IgG1抗体。优选地, IgG抗体携带连接在抗体重链的N297处的天然糖苷/碳水化合物部分。

[0088] 适合的抗体包括抗膜联蛋白A1抗体、抗CD19抗体、抗CD22抗体、抗CD30抗体、抗CD33抗体、抗CD37抗体、抗CD38抗体、抗CD44抗体、抗CD47抗体、抗CD56抗体、抗CD70抗体、抗CD74抗体、抗CD79抗体、抗CD115抗体、抗CD123抗体、抗CD138抗体、抗CD203c抗体、抗CD303抗体、抗CEACAM抗体、抗CLL-1抗体、抗c-MET(或抗HGFR)抗体、抗Cripto抗体、抗DLL3抗体、抗EGFR抗体、抗EPCAM抗体、抗EphA2抗体、抗EDhB3抗体、抗ETBR抗体、抗FcRL5抗体、抗FOLR1抗体、抗GCC抗体、抗GPNMB抗体、抗Her2抗体、抗HMW-MAA抗体、抗整合素抗体、抗Lewis A类碳水化合物抗体、抗Lewis Y抗体、抗LIV1抗体、抗间皮素抗体、抗MN抗体、抗MUC1抗体、抗MUC16抗体、抗NaPi2b抗体、抗柄蛋白-4抗体、抗PSMA抗体、抗SIRP α 抗体、抗SLC44A4抗体、抗STEAP-1抗体、抗5T4(或抗TPBG、滋养层糖蛋白)抗体、抗Tag72抗体、抗TF(或抗组织因子)抗体、抗TROP2抗体和抗VLA抗体。

[0089] 优选地, 所述抗体为抗膜联蛋白A1抗体、抗CD115抗体、抗CD123抗体、抗CLL-1抗体、抗c-MET抗体、抗MUC1抗体、抗PSMA抗体、抗5T4抗体或抗TF抗体。更优选地, 所述抗体为抗PSMA抗体或抗5T4抗体。

[0090] 根据本发明使用的抗体优选是单克隆抗体(mAb), 并且可以是嵌合、人源化或人mAb。更优选地, 根据本发明, 使用人源化或人mAb, 甚至更优选人源化或人IgG抗体, 最优选人源化或人IgG1 mAb。优选地, 所述抗体具有 κ (kappa) 轻链, 即人源化或人IgG1- κ 抗体。

[0091] 在人源化抗体中, 可变区中的抗原结合CDR来源于来自非人物种(通常为小鼠, 大鼠或兔)的抗体。这些非人CDR置于人的可变区框架(FR1, FR2, FR3和FR4)内, 并与人恒定区组合。与人抗体一样, 这些人源化抗体可根据Kabat编号系统编号。本发明特别涉及这样的ADC化合物, 其中所述工程化半胱氨酸在选自人源化抗体人框架中的VH 40、VH 41、VH 89、VL 40或VL 41的位置处(即VH 40、VH 41、VL 40和VL 41在FR2的中间, VH98在FR3中), 更特别地在VH 40、VH 41、VL 40或VL 41处, 甚至更特别地在VH 41、VL 40或VL 41处, 尤其在VH 41处。

[0092] 根据本发明, 框架区中的这些特定残基都适合于接头药物的缀合, 并且在接头药物缀合后不会导致抗体的抗原结合特性的显著降低。此外, 这些位点不仅适用于抗体, 而且适用于其任何抗原结合片段。

[0093] 在一个特别的实施方案中, 本发明涉及如上文所述的ADC化合物, 其中所述抗体为抗膜联蛋白A1抗体、抗CD115抗体、抗CD123抗体、抗CLL-1抗体、抗c-MET抗体、抗MUC1抗体、抗PSMA抗体、抗5T4抗体或抗TF抗体, 且所述接头药物包含倍癌霉素衍生物, 优选为根据式(I)或(II)的ADC化合物。

[0094] 在另一个具体的实施方案中, 本发明涉及如上文所述的ADC化合物, 其中所述抗体为抗PSMA(单克隆)抗体或抗5T4(单克隆)抗体, 且所述接头药物包含倍癌霉素衍生物, 优选

为根据式 (I) 或 (II) 的ADC化合物。

[0095] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及如上文所述的ADC化合物,其中所述接头药物包含倍癌霉素衍生物且缀合至抗PSMA(单克隆)抗体或抗5T4(单克隆)抗体的重链可变区的41位处,最优选为根据式 (II) 的ADC化合物。合适的抗PSMA抗体描述于W098/03873(例如实施例12)、W002/098897(例如图1至2)、W02007/002222(例如表1)和W02011/069019(例如图2)。合适的抗5T4抗体包括W02008/031653中描述的H8和W02007/106744中描述的A1和A3抗体,以及与这些已知抗体结合相同表位的任何抗体。

[0096] 在一个更优选的实施方案中,抗PSMA抗体的重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且抗PSMA抗体的轻链包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。更优选地,抗PSMA抗体的重链包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且抗PSMA抗体的轻链包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0097] 在一个特别优选的实施方案中,本发明涉及式 (II) 的ADC化合物,其中所述抗体是抗PSMA抗体,所述抗PSMA抗体的重链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列,并且所述抗PSMA抗体的轻链包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。更优选地,所述抗PSMA抗体的重链包含SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且所述抗PSMA抗体的轻链包含SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0098] 在另一个更优选的实施方案中,抗5T4抗体的重链包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且抗5T4抗体的轻链包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。更优选地,抗5T4抗体的重链包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列,并且抗5T4抗体的轻链包含SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0099] 在一个特别优选的实施方案中,本发明涉及式 (II) 的ADC化合物,其中抗体是抗5T4抗体,所述抗5T4抗体的重链包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列,并且所述抗5T4抗体的轻链包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。更优选地,所述抗5T4抗体的重链包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9的氨基酸序列,并且所述抗5T4抗体的轻链包含SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0100] 本发明还涉及如上所述的ADC化合物,其用作药物。

[0101] 在一个实施方案中,本发明涉及如上所述的ADC化合物,其用于治疗人实体瘤和血液学恶性肿瘤。

[0102] 在另一个实施方案中,本发明涉及如上文所述的ADC化合物,其用于治疗选自以下的人实体瘤:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、尿路上皮癌(例如膀胱癌)、卵巢癌、子宫癌、肺癌(特别是非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、间皮瘤(特别是恶性胸膜间皮瘤)、肝癌、胰腺癌和前列腺癌。

[0103] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及如上所述的ADC化合物,特别是包含抗PSMA(单克隆)抗体和倍癌霉素衍生物接头药物的化合物,其用于治疗前列腺癌。

[0104] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及如上所述的ADC化合物,特别是包含抗5T4(单克隆)抗体和倍癌霉素衍生物接头药物的化合物,其用于治疗选自乳腺癌、胃癌、结直肠癌、卵巢癌、肺癌(特别是非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌(SCLC))和恶性胸膜间皮瘤的人实体瘤。

[0105] 在另一个实施方案中,本发明涉及如上所述的ADC化合物,其用于治疗人血液学恶

性肿瘤,特别是白血病,其选自急性成淋巴细胞白血病和急性骨髓性白血病(分别为ALL和AML)。

[0106] 本发明还涉及包含如上所述的ADC化合物和一种或更多种可药用赋形剂的药物组合物。治疗性蛋白质的典型药物制剂如单克隆抗体和(单克隆)抗体-药物缀合物采用需要在静脉内输注之前(水性)溶解(即重构)的冻干饼(冻干粉)的形式,或在使用前需要解冻的冷冻(水性)溶液形式。

[0107] 通常,药物组合物以冻干饼的形式提供。根据本发明(冷冻干燥前)包含在药物组合物中的合适的可药用赋形剂包括缓冲溶液(例如在水中的柠檬酸盐、组氨酸或含琥珀酸盐)、冻干保护剂(例如蔗糖、海藻糖)、张力调节剂(例如氯化钠)、表面活性剂(例如聚山梨酯)和填充剂(例如甘露醇、甘氨酸)。针对其在冷冻干燥过程中以及储存期间防止蛋白质变性的能力选择用于冷冻干燥的蛋白质制剂的赋形剂。作为实例,在以用于注射的抑菌或无菌水(BWFI或SWFI)重构后Kadcyla™(Roche)的无菌冻干粉末一次性制剂含有20mg/mL ado-曲妥珠单抗emtansine、0.02%w/v聚山梨酯20、10mM琥珀酸钠和6%w/v蔗糖,其pH为5.0。

[0108] 本发明还涉及如上所述的化合物或药物组合物用于治疗如上所述的人实体瘤和血液学恶性肿瘤的用途。

[0109] 本发明还涉及如上所述的化合物或药物组合物以及治疗性抗体和/或化疗剂顺序或同时施用的组合用于治疗如上所述的人实体瘤和血液学恶性肿瘤的用途。

[0110] 在本发明的一个实施方案中,治疗性抗体是阿德木单抗(adecatumumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、amatuximab、贝伐单抗(bevacizumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、地舒单抗(denosumab)、埃达珠单抗(etaracizumab)、farletuzumab、吉妥珠单抗(gemtuzumab)、labetuzumab、mapatumumab、明瑞莫单抗(minretumomab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、nivolumab、oregovomab、帕尼单抗(panitumumab)、pentumomab、帕妥珠单抗(pertuzumab)、雷莫芦单抗(ramucirumab)、西罗珠单抗(sibrotuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)或volociximab,且化疗剂是i)烷基化剂,特别是氮芥类,例如氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑,亚硝基脲类,例如链脲霉素、卡莫司汀和洛莫司汀,烷基磺酸盐类,如白消安、三嗪类,如达卡巴嗪和替莫唑胺,乙烯亚胺类如噻替派和六甲蜜胺,或铂药物如顺铂、卡铂和奥沙利铂,ii)抗代谢物,特别是5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿苷、氟达拉滨、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤或培美曲塞(pemetrexed),iii)抗肿瘤抗生素,特别是柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、放线菌素D、博莱霉素、丝裂霉素C或米托蒽醌,iv)拓扑异构酶抑制剂,特别是拓扑异构酶I抑制剂,例如拓扑替康和伊立替康,或拓扑异构酶II抑制剂,如依托泊苷、替尼泊苷和米托蒽醌,v)有丝分裂抑制剂,特别是紫杉烷类如紫杉醇、卡巴他赛(cabazitaxel)和多西他赛(docetaxel),埃坡霉素类(epothilones)如伊沙匹隆(ixabepilone),长春花生物碱类如长春碱、长春新碱和长春瑞滨、或雌莫司汀,vi)信号传导级联抑制剂,特别是mTOR(雷帕霉素的哺乳动物靶标)抑制剂如坦罗莫司和依维莫司,或酪氨酸激酶抑制剂如吉非替尼、厄洛替尼、伊马替尼、帕唑帕尼、色瑞替尼(ceritinib)、克唑替尼(crizotinib)、拉帕替尼(lapatinib)和阿法替尼(afatinib),vii)皮质类固醇,特别是泼尼松龙、甲基泼尼松龙或地塞米松,viii)激素治疗剂,特别是雄激素受体调节剂如比卡鲁胺(bicalutamide)、恩杂鲁胺(enzalutamide)和醋酸阿比特龙,抗雌激素如他莫昔芬,或芳香酶抑制剂或类固醇修饰剂如阿那曲唑、来曲唑、氟维司群

(fulvestrant) 和依西美坦 (exemestane), ix) PARP抑制剂,特别是奥拉帕尼 (olaparib), 或 x) 另一种化疗药物,特别是L-天冬酰胺酶或硼替佐米。本领域技术人员在选择用于治疗如上所述的人实体瘤和血液学恶性肿瘤的合适的联合疗法中没有困难。

[0111] 在本发明的另一个实施方案中,特别是在包含倍癌霉素衍生物接头药物的抗PSMA ADC化合物的情况下,治疗性抗体是贝伐单抗、地舒单抗、帕妥珠单抗或曲妥珠单抗,并且化疗剂是拓扑异构酶II抑制剂,特别是米托蒽醌;有丝分裂抑制剂,特别是紫杉烷,更特别是卡巴他赛或多西他赛;皮质类固醇,特别是强的松龙;或激素治疗剂,特别是雄激素受体调节剂,更特别是恩杂鲁胺或醋酸阿比特龙。

[0112] 在本发明的另一个实施方案中,特别是在包含倍癌霉素衍生物接头药物的抗5T4 ADC化合物的情况下,治疗性抗体是贝伐单抗、西妥昔单抗、尼伐单抗或雷莫芦单抗,并且化疗剂是烷基化剂,特别是铂药物,更特别是顺铂或卡铂;抗代谢物,特别是吉西他滨或培美曲塞;拓扑异构酶II抑制剂,特别是依托泊苷;有丝分裂抑制剂,特别是紫杉烷或长春花生物碱,更特别是紫杉醇或多西他赛或长春碱或长春瑞滨;或信号传导级联抑制剂,特别是酪氨酸激酶抑制剂,更特别是厄洛替尼、色瑞替尼、克唑替尼或阿法替尼。

[0113] 在本发明的另一个实施方案中,特别是在包含倍癌霉素衍生物接头药物的抗5T4 ADC化合物的情况下,治疗性抗体是贝伐单抗,并且化疗剂是烷基化剂,特别是氮芥、铂药物或三嗪,更特别是环磷酰胺、异环磷酰胺、顺铂或替莫唑胺;抗肿瘤抗生素,特别是多柔比星;抗代谢药,特别是吉西他滨;拓扑异构酶I或II抑制剂,特别是托泊替康、伊立替康或依托泊苷;或有丝分裂抑制剂,特别是紫杉烷或长春花生物碱,更特别是紫杉醇或多西他赛,或长春新碱或长春瑞滨。

[0114] 在本发明的另一个实施方案中,特别是在包含倍癌霉素衍生物接头药物的抗5T4 ADC化合物的情况下,治疗性抗体是amatumumab,并且化疗剂是烷基化剂,特别是铂药物,更特别是顺铂或卡铂;抗代谢物,特别是吉西他滨或培美曲塞;或有丝分裂抑制剂,特别是长春花生物碱,更特别是长春瑞滨。

[0115] 根据本发明的化合物的治疗有效量在约0.01至约15mg/kg体重的范围内,特别是在约0.1至约10mg/kg体重的范围内,更特别地在约0.3至约10mg/kg体重的范围内。后一范围大致对应于在20至800mg ADC化合物范围内的固定剂量 (flat dose)。本发明的化合物可以每周、每两周、每三周或每月施用,例如在前12周每周施用,然后每三周施用,直到疾病进展。可以根据疾病的严重程度、患者的年龄、所施用的化合物和治疗医师考虑的其它因素使用替代的治疗方案。

实施例

[0116] 工程化半胱氨酸 (突变体) 抗体的瞬时表达

[0117] 1a) cDNA的制备

[0118] 通过将组合的氨基酸序列反向翻译成为在人 (Homo sapiens) 细胞中表达而优化的cDNA序列 (SEQ ID NO:4), 从前导序列 (SEQ ID NO:1)、抗PSMA抗体的重链可变区 (SEQ ID NO:2, Kabat编号, 在位置41具有半胱氨酸残基) 和人IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO:3, 连续编号, 起始于丙氨酸118的Eu编号) 的氨基酸序列获得重链的cDNA序列。

[0119] 类似地, 通过将组合的氨基酸序列反向翻译成为在人细胞中表达而优化的cDNA序

列 (SEQ ID NO:7), 从分泌信号 (SEQ ID NO:1)、抗PSMA抗体的轻链可变区 (SEQ ID NO:5, Kabat编号) 和人 κ Ig轻链恒定区 (SEQ ID NO:6, 连续编号) 的氨基酸序列获得轻链的cDNA序列。

[0120] 类似地, 从前导序列 (SEQ ID NO:1)、H8抗体的重链可变区 (SEQ ID NO:8, 连续编号, 在位置41具有半胱氨酸残基) 和人IgG1重链恒定区 (SEQ ID NO:9, 连续编号, 起始于丙氨酸118的Eu编号) 的氨基酸序列获得抗5T4抗体H8-HC41的重链的cDNA序列 (SEQ ID NO:10)。

[0121] 从前导序列 (SEQ ID NO:1)、H8抗体的轻链可变区 (SEQ ID NO:11, Kabat编号) 和人 κ Ig轻链恒定区 (SEQ ID NO:6, 连续编号) 的氨基酸序列获得H8抗体轻链的cDNA序列 (SEQ ID NO:12)。

[0122] 从前导序列 (SEQ ID NO:13)、那他珠单抗 (natalizumab) 的重链可变区 (SEQ ID NO:14, Kabat编号) 和人IgG4重链恒定区 (SEQ ID NO:15, 连续编号, 起始于丙氨酸118的Eu编号; 在225位具有脯氨酸残基, 在375位具有半胱氨酸残基) 的氨基酸序列获得那他珠单抗重链的cDNA序列 (SEQ ID NO:16)。

[0123] 从前导序列 (SEQ ID NO:17)、那他珠单抗的轻链可变区 (SEQ ID NO:18, Kabat编号) 和人 κ Ig轻链恒定区 (SEQ ID NO:6, 连续编号) 的氨基酸序列获得那他珠单抗轻链的cDNA序列 (SEQ ID NO:19)。

[0124] 重链和轻链cDNA构建体由商业来源 (Life Technologies) 化学合成并从其获得。前导序列的切割对应于使用SignalP程序预测的切割位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

[0125] 1b) 载体构建和克隆策略

[0126] 为了表达抗体链, 如下构建哺乳动物表达载体0098。从pcDNA3.1(-) (Life Technologies) 质粒切下CMV:BGHpA表达盒, 并重新插入回相同的原始载体 (仍含有完整的CMV:BGHpA表达盒) 中, 从而复制CMV:BGHpA表达盒, 以允许从单个质粒载体表达HC和LC cDNA两者。随后, 从载体pOptiVEC-TOPO (Life Technologies) 分离IRES-DHFR片段, 并将其插入在CMV:BGHpA表达盒之一中的CMV启动子和BGHpA多腺苷酸化序列之间。

[0127] 使用SfiI限制性位点, 将重链 (HC) 和轻链 (LC) 的cDNA分别连接到pMA-RQ和pMA-T质粒载体 (Life Technologies) 中。转移至大肠杆菌 (E. coli) K12并扩增后, 使用AscI和HpaI限制性位点将LC cDNA转移至哺乳动物表达载体0098。所得载体用BamHI和NheI限制酶消化, 并与用相同的限制酶消化的HC cDNA片段连接。将含有HC和LC两者表达盒的最终载体 (分别为CMV:HC:BGHpA和CMV:LC-BGHpA) 转移至大肠杆菌NEB 5- α 细胞 (New England Biolabs) 并在其中扩增。

[0128] 使用Maxi-或Megaprep试剂盒 (Qiagen) 进行用于转染的最终抗体突变体表达载体大规模生产。

[0129] 2) 在哺乳动物细胞中的瞬时表达

[0130] 根据制造商的说明书, 使用ExpiFectamine转染试剂 (Life Technologies), 用根据上述1) 制备的抗体突变体表达载体如下转染市售的Expi293F细胞 (Life Technologies): 将 75×10^7 个细胞接种在300mL Expi293表达培养基中; 将300 μ g抗体突变体表达载体与800 μ l ExpiFectamine转染剂组合并添加至细胞。转染后一天, 向培养物中添

加1.5mL增强剂1和15mL增强剂2。转染后6天,通过以4,000g离心15分钟并通过MF 75过滤器(Nalgene)过滤澄清的收获物收获细胞培养物上清液。

[0131] 3) 所表达的蛋白质的纯化

[0132] 首先使用SDS-PAGE电泳检查澄清的收获物的表达水平。如认为产物足够,则使用商售的蛋白A树脂(MabSelect SuRe, GE Healthcare),使用Äkta 色谱设备(GE Healthcare)纯化抗体。使用20cm床高度的柱,其最大负载为25mg/mL的填装树脂。该过程在室温下进行。

[0133] 平衡(PBS pH 7.4)和加样后,纯化步骤采用两个洗涤步骤(分别是PBS pH 7.4和NaAc pH 5)和一个洗脱步骤(25mM NaAc, pH 3),随后分别是再生、冲洗和清洗步骤,之后开始新的循环。在洗脱步骤期间,在以0.05-0.1AU(池(cell)长度0.2cm)的吸光度开始和停止的峰中收集靶蛋白质。纯化后,将蛋白质储存在-20℃至-80℃。

[0134] 4) 对ADC缀合缓冲液进行浓缩和缓冲液交换

[0135] 如果需要,使用Vivaspin离心装置(截留值5或30kDa, Vivaproducts)将蛋白A洗脱液浓缩至20至25mg/mL。在获得所需浓度后,使用PD10柱(GE Healthcare)和4.2mM L-组氨酸+50mM海藻糖pH 6.0缓冲液将浓缩溶液(通常为25mg/mL)透析两次。或者,当蛋白A洗脱液浓度为约10mg/mL时,不使用浓缩步骤并且立即使用蛇皮透析管(截留值10kDa, Thermo Scientific)针对4.2mM L-组氨酸+50mM海藻糖pH 6.0缓冲液对洗脱液进行三次透析。在透析完成后通过过滤除去出现的任何沉淀。通过使用Nanodrop或比色皿UV分光光度计(均为Thermo Scientific)的UV光谱法测量浓度。质量分析显示该蛋白质具有>95%的纯度,并且含有可忽略量的如通过HPSEC测定的片段或二聚体。工程化半胱氨酸突变体的等电点与野生型相同。

[0136] 还使用与上述用于制备和纯化工程化半胱氨酸(VH 41C, Kabat编号)抗PSMA抗体、工程化H8-HC41(VH 41C, Kabat编号)和工程化半胱氨酸那他珠单抗(CH 225P, 375C, Kabat编号)抗体类似/相同的方法制备和纯化其他实施例的抗体。

[0137] 一般性的位点特异性缀合方案

[0138] 向半胱氨酸工程化的抗体溶液(5至10mg/mL, 含4.2mM组氨酸、50mM海藻糖, pH 6)加入EDTA(在水中25mM, 4% v/v)。使用TRIS(在水中1M, pH 8)将pH调节至约7.4, 然后加入TCEP(在水中10mM, 20当量), 并将所得混合物在室温下孵育1至3小时。通过PD-10脱盐柱或Vivaspin离心浓缩器(截留值30kDa, PES), 使用4.2mM组氨酸、50mM海藻糖、pH 6除去过量的TCEP。使用TRIS(在水中1M, pH 8)将所得抗体溶液的pH升至约7.4, 然后加入脱氢抗坏血酸(在水中10mM, 20当量), 并将所得混合物在室温下孵育1至2小时。加入DMA, 随后是接头药物的溶液(在DMA中10mM)。DMA的最终浓度为5-10%。将所得混合物在室温下在无光下孵育1至16小时。为了除去过量的接头药物, 加入活性炭, 并将混合物在室温下孵育1小时。使用0.2μm PES过滤器除去炭, 并使用Vivaspin离心浓缩器(截留值30kDa, PES)将得到的ADC配制于4.2mM组氨酸、50mM海藻糖、pH 6中。最后, 使用0.22μm PES滤器对ADC溶液进行无菌过滤。

[0139] 用于通过部分还原的内源性二硫键缀合(wt缀合)的一般缀合方案

[0140] 向抗体的溶液(5至10mg/mL, 于4.2mM组氨酸、50mM海藻糖、pH 6中)加入EDTA(在水中25mM, 4% v/v)。使用TRIS(在水中1M, pH 8)将pH调节至约7.4, 然后加入TCEP(在水中10mM, 1至3当量, 取决于抗体和期望的DAR), 并将所得混合物在室温下孵育1至3小时。加入

DMA,随后是接头药物(在DMA中10mM)的溶液。DMA的最终浓度为5-10%。将所得混合物在室温下在无光下孵育1至16小时。为了除去过量的接头药物,加入活性炭,并将混合物在室温下孵育1小时。使用0.2 μ m PES过滤器除去炭,并使用Vivaspin离心浓缩器(截留值30kDa, PES)将得到的ADC配制于4.2mM组氨酸、50mM海藻糖、pH 6中。最后,使用0.22 μ m PES过滤器对ADC溶液进行无菌过滤。

[0141] 使用上述一般性程序,基于vc-seco-DUBA (SYD980;即,W02011/133039的第209页的实施例10中的化合物18b,n=1)、vc-MMAE和mc-MMAF接头药物合成半胱氨酸工程化的和野生型ADC,并使用分析型疏水相互作用色谱(HIC)、尺寸排阻色谱(SEC)、屏蔽疏水相色谱(Shielded Hydrophobic Phase Chromatography, SHPC)、RP-HPLC和LAL内毒素测试对其进行表征。

[0142] 对于分析型HIC,将5至10 μ l样品(1mg/ml)注射到TSKgel Butyl-NPR柱(4.6mm ID \times 3.5cm L, Tosoh Bioscience, 目录号14947)上。洗脱方法由100%缓冲液A(25mM磷酸钠, 1.5M硫酸铵, pH 6.95)至100%缓冲液B(25mM磷酸钠, pH 6.95, 20%异丙醇)的线性梯度以0.4ml/分钟经20分钟组成。使用配备有PDA-检测器和Empower软件的Waters Acquity H-Class UPLC系统。在214nm下测量吸光度,并测定ADC的保留时间。

[0143] 如通过分析型HIC明显的,不同半胱氨酸工程化的ADC的DAR2种类与wt缀合物的保留时间(retention time, RT)存在差异(表1、2和3)。最有趣的是,将接头药物在Fab腔或Fc腔内部的特定位点处缀合(如通过分子模型算法所预测的),与通过部分还原的内源性二硫键缀合的ADC相比,引起保留时间(显著地)减少,这导致本发明人得出结论,基于HIC数据,其中接头药物与Fab或Fc腔中的特异性位点缀合的工程化ADC的疏水性比wt缀合物小。为了进一步量化该效应,引入术语相对疏水性,其定义为:

[0144] $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, wt-ADC} - RT_{DAR0, wt-ADC})$ 。

[0145] 本质上,相对疏水性是允许基于HIC数据在工程化ADC与wt-缀合的对应物的疏水性之间进行容易的比较的度量。该数据总结在表1、2和3中。

[0146] 表1.vc-seco-DUBA ADC在先前指定的分析型HIC柱上的相对疏水性:

[0147]

ADC (vc-seco-DUBA)	Cys 突变		DAR	HMW (%) ²	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	相对疏水性 ³
	HC	LC					
ADC-wt (SYD998) ¹	wt	wt	1.8	7.7	9.7	6.9	1.0
ADC-HC41 (SYD1091)	S41C	wt	1.7	1.4	8.5	6.8	0.6
ADC-HC120 (SYD1035) ⁶	T120C	wt	1.8	0.9	11.3	6.8	1.6
ADC-HC152	E152C	wt	1.5	1.2	8.5	6.5	0.7
ADC-HC153	P153C	wt	1.5	2.4	8.7	6.5	0.8
ADC-HC236 ⁶	G236C	wt	1.0	1.1	10.4	6.5	1.4
ADC-HC247	P247C	wt	1.3	1.3	9.2	7.3	0.7
ADC-HC339	A339C	wt	1.7	0.5	8.6	7.3	0.5
ADC-HC375	S375C	wt	1.8	1.0	7.5	6.6	0.3
ADC-HC376	D376C	wt	1.4	3.1	9.8	6.6	1.1
ADC-HC41-	S41C,	wt	3.3	40.0	12.3	7.3	0.9

[0148]

ADC (vc-seco-DUBA)	Cys 突变		DAR	HMW (%) ²	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	相对疏水性 ³
	HC	LC					
120 ⁷	T120C						
ADC-HC41-375	S41C, S375C	wt	3.0-4.3 ⁴	1.9	9.3 ⁵	7.3	0.4
ADC-LC40	wt	P40C	1.8	0.5	9.5	6.9	0.9
ADC-LC41	wt	G41C	1.8	0.6	8.7	6.9	0.6
ADC-LC109 ⁶	wt	T109C	1.0	-	12.4	7.2	1.9
ADC-LC154 ⁶	wt	L154C	1.7	6.4	12.4	6.8	2.0
ADC-LC157 ⁶	wt	G157C	1.1	-	12.5	7.1	1.9
ADC-LC165	wt	E165C	1.5	2.3	8.4	6.6	0.6
ADC-LC205 ⁶	wt	V205C	1.8	1.0	10.6	6.9	1.3
H8-wt ¹	wt	wt	2.0	4.4	9.9	6.4	1.0
H8-HC40	S40C	wt	1.7	1.2	8.8	6.2	0.7
H8-HC41	P41C	wt	1.7	0.4	7.4	6.2	0.3
那他珠单抗 - HC375	S375C ⁸	wt	1.7	26.0	7.8	6.8	0.4

[0149] ¹随机-非位点特异性-连接[0150] ²HMW是高分子量种类,反映形成的聚集体的量[0151] ³定义为 $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, wt-ADC} - RT_{DAR0, wt-ADC})$, RT为保留时间

[0152] ⁴基于MS-数据

[0153] ⁵RT,wt DAR4种类=12.2

[0154] ⁶具有与指向外部的半胱氨酸残基缀合的接头药物的比较物ADC

[0155] ⁷接头药物与Fab腔中的一个半胱氨酸和指向外部的一个半胱氨酸残基缀合的ADC;方法尚未优化

[0156] ⁸还有防止IgG4二聚化的225P突变

[0157] 表2.vc-MMAE ADC在先前指定的分析型HIC柱上的相对疏水性:

ADC (vc-MMAE)	Cys 突变		DAR	HMW (%) ¹	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	相对疏水性 ²
	HC	LC					
ADC-wt	wt	wt	1.7	0.6	9.6	7.2	1.0
ADC-HC41	S41C	wt	1.8	0.5	8.1	7.2	0.4
ADC-LC40	wt	P40C	1.8	0.6	8.5	7.2	0.5
ADC-LC41	wt	G41C	1.9	0.9	8.4	7.3	0.5
H8-HC40	S40C	wt	1.7	1.4	8.1	6.5	ND ³

[0159] ¹HMW是高分子量种类,反映形成的聚集体的量

[0160] ²定义为 $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2,wt-ADC} - RT_{DAR0,wt-ADC})$, RT为保留时间

[0161] ³ND未确定;未制备野生型H8-vc-MMAE

[0162] 表3.mc-MMAF ADC在先前指定的分析型HIC柱上的相对疏水性:

ADC (mc-MMAF)	Cys 突变		DAR	HMW (%) ¹	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	相对疏水性 ²
	HC	LC					
ADC-wt	wt	wt	1.8	0.6	8.0	7.2	1.0
ADC-HC41	S41C	wt	1.8	0.5	7.4	7.2	0.3
ADC-LC40	wt	P40C	1.8	0.5	7.6	7.2	0.5
ADC-LC41	wt	G41C	1.8	0.6	7.5	7.3	0.3
H8-wt	wt	wt	4.2	0.4	7.2	6.2	1.0
H8-HC40	S40C	wt	1.4	1.2	6.9	6.5	0.4

[0164] ¹HMW是高分子量种类,反映形成的聚集体的量

[0165] ²定义为 $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2,wt-ADC} - RT_{DAR0,wt-ADC})$, RT为保留时间

[0166] 细胞结合

[0167] 三种抗PSMA ADC SYD998 (wt)、SYD1091 (HC41) 和比较物SYD1035 (HC120) 对表达PSMA的LNCaP-C4.2细胞具有相等的结合亲和力 (EC_{50} 在0.1至0.2 μ g/ml范围内),和野生型抗体相似,并且所有三个ADC均不能结合PSMA阴性DU-145细胞 ($EC_{50} > 10\mu$ g/ml)。

[0168] 两种抗5T4 ADC H8-wt和H8-HC40对表达5T4的MDA-MB-468细胞具有相等的结合亲和力 (EC_{50} 在0.1至1.2 μ g/ml范围内),类似于野生型H8抗体,并且两种ADC都不能结合5T4阴性SK-MEL-30细胞 ($EC_{50} > 10\mu$ g/ml)。

[0169] 因此,ADC的抗原结合性质不受所连接的倍癌霉素衍生物接头药物的影响。

[0170] 体外细胞毒性

[0171] 在表达PSMA的LNCaP-C4.2细胞上,位点特异性缀合的抗PSMA ADC的效力与常规连接的野生型ADC (SYD998) 相似(基于药物当量, IC_{50} 在0.1至0.5nM的范围内,参见下表4)。所有ADC在PSMA阴性DU-145细胞上无活性 ($IC_{50} > 70nM$),表明通过PSMA选择性杀死肿瘤细胞。

[0172] 两种非结合对照ADC在每种评价的细胞系上比抗PSMA ADC的效力至少低50倍。

[0173] 表4. 抗PSMA-vc-seco-DUBA ADC在表达PSMA的人肿瘤细胞中的体外细胞毒性

ADC (vc-seco-DUBA)	Cys 突变		PSMA- 阳性细胞系 LNCaP-C4.2		
	HC	LC	IC_{50} (nM)	95% CI (nM) ¹	% 功效 ²
ADC-wt (SYD998)	wt	wt	0.23	0.20 – 0.27	82
ADC-HC41 (SYD1091)	S41C	wt	0.25	0.21 – 0.28	78

[0174]

ADC (vc-seco-DUBA)	Cys 突变		PSMA- 阳性细胞系 LNCaP-C4.2		
	HC	LC	IC_{50} (nM)	95% CI (nM) ¹	% 功效 ²
ADC-HC120 (SYD1035)	T120C	wt	0.14	0.13 – 0.16	82
ADC-HC152	E152C	wt	0.44	0.36 – 0.55	78
ADC-HC153	P153C	wt	0.34	0.28 – 0.41	79
ADC-HC236	G236C	wt	0.22	0.19 – 0.26	76
ADC-HC247	P247C	wt	0.10	0.09 – 0.12	82
ADC-HC339	A339C	wt	0.12	0.11 – 0.13	83
ADC-HC375	S375C	wt	0.25	0.22 – 0.28	81
ADC-HC376	D376C	wt	0.20	0.18 – 0.22	82
ADC-LC40	wt	P40C	0.30	0.23 – 0.37	80
ADC-LC41	wt	G41C	0.31	0.25 – 0.38	80
ADC-LC154	wt	L154C	0.24	0.19 – 0.29	82
ADC-LC165	wt	E165C	0.51	0.40 – 0.65	79
ADC-LC205	wt	V205C	0.17	0.15 – 0.19	83
非结合对照-wt	wt	wt	28.86	24.76 – 36.02	96
非结合对照-HC41	P41C	wt	>100	n.a.	n.a.
游离接头药物			0.02	0.02 – 0.03	98

[0175]

[0176] ¹95%CI为95%置信区间

[0177] ²在受测的最高浓度(约100nM)下给出百分比功效,并通过将每种药物或ADC的所

测量的发光除以未处理细胞 (仅生长培养基) 的平均值乘以100来计算。

[0178] vc-MMAE与抗PSMA抗体上的HC41、LC40和LC41位置的缀合在PSMA阳性LNCaP-C4.2细胞中导致的细胞毒性效力与在这些半胱氨酸位点上连接的抗PSMA-vc-seco-DUBA相似 (表4和5)。抗PSMA-vc-MMAE ADC在PSMA阴性DU-145细胞上缺乏活性 ($IC_{50} > 70nM$)。

[0179] 表5. 抗PSMA-vc-MMAE ADC在表达PSMA的人肿瘤细胞中的体外细胞毒性

ADC (vc-MMAE)	Cys 突变		PSMA- 阳性细胞系 LNCaP-C4.2		
	HC	LC	IC_{50} (nM)	95% CI (nM) ¹	% 功效 ²
ADC-wt	wt	wt	0.34	0.31 – 0.38	89
ADC-HC41	S41C	wt	0.39	0.35 – 0.43	91
[0180] ADC-LC40	wt	P40C	0.31	0.27 – 0.35	90
ADC-LC41	wt	G41C	0.33	0.29 – 0.37	90
非结合对照-wt	wt	wt	>100	n.a.	90
游离接头药物			0.23	0.18 – 0.28	94

[0181] ¹95%CI为95%置信区间

[0182] ²在受测的最高浓度 (约100nM) 下给出百分比功效, 并通过将每种药物或ADC的所测量的发光除以未处理细胞 (仅生长培养基) 的平均值乘以100来计算。

[0183] 工程化抗-5T4 ADC对表达5T4的MDA-MB-468细胞的功效与常规连接的ADC H8-wt相等 (IC_{50} 在0.07和0.09nM之间, 表6)。抗5T4 ADC在5T4-阴性SK-MEL-30细胞上无活性 ($IC_{50} > 90nM$)。

[0184] 表6. 抗5T4-vc-seco-DUBA ADC在表达5T4的人肿瘤细胞中的体外细胞毒性

ADC (vc-seco-DUBA)	Cys 突变		vc-seco-DUBA 5T4- 阳性细胞系 MDA-MB-468		
	HC	LC	IC_{50} (nM)	95% CI (nM) ¹	% 功效 ²
H8-wt	wt	wt	0.09	0.08 – 0.10	91
H8-HC40	S40C	wt	0.07	0.07 – 0.08	88
[0185] H8-HC41	P41C	wt	0.07	0.06 – 0.08	88
非结合对照-HC41	P41C	wt	40.18	34.24 – 47.16	85
游离接头药物			0.02	0.01 – 0.02	94

[0186] ¹95%CI为95%置信区间

[0187] ²在受测的最高浓度 (约100nM) 下给出百分比功效, 并通过将每种药物或ADC的所测量的发光除以未处理细胞 (仅生长培养基) 的平均值乘以100来计算。

[0188] 这些数据结合在一起表明用于位点特异性缀合的受测的半胱氨酸位置对包含两

种不同接头药物的ADC的肿瘤细胞杀伤效力没有影响。此外,接头药物的位点特异性连接在不同抗体的Fab部分的可变区中是一般性适用的。

[0189] 通过组织蛋白酶B的酶促切割

[0190] 存在于具有vc-seco-DUBA (SYD980) 和vc-MMAE的ADC的接头中的缬氨酸-瓜氨酸部分可以被半胱氨酸蛋白酶例如组织蛋白酶B切割,其导致(seco-) DUBA或MMAE药物随后在肿瘤溶酶体内的胞内释放或在肿瘤微环境中的胞外释放。为了评估对组织蛋白酶B的敏感性,将ADC用活化的组织蛋白酶B (Calbiochem) 处理2分钟和4小时。在PSMA阴性DU-145细胞上测量从抗PSMA ADC释放的药物的细胞毒活性。在5T4阴性SK-MEL-30细胞上测量从抗5T4 ADC释放的药物的细胞毒活性。在37°C的预孵育步骤中,将1mg/ml的每种ADC与在含有4mM DTT的0.1M乙酸钠pH 5中的5µg/ml组织蛋白酶B(0.04单位/孔)混合。作为对照,将1mg/ml的每种ADC直接稀释在培养基(RPMI 1640,10%定量的FBS)中。从这些ADC溶液在培养基中制备系列稀释液。为了分别测量游离毒素DUBA或MMAE的释放,用ADC培养PSMA-阴性DU-145细胞(1,000个细胞/孔)和5T4阴性SK-MEL-30细胞(2,000个细胞/孔)6天,并在6天后使用CellTiter-Glo™(CTG)测定试剂盒测量细胞生存力。

[0191] 释放的药物对PSMA阴性DU-145细胞和5T4阴性SK-MEL-30细胞的效力差异反映了从ADC切割的药物的量,从而反映组织蛋白酶B的缬氨酸-瓜氨酸切割位点的可及性。如表7所示,在暴露于活化的组织蛋白酶B四小时后,蛋白水解切割的敏感性在ADC中不同(见IC₅₀值),而在暴露于组织蛋白酶B经2分钟的短时间后没有ADC被切割(IC₅₀>10nM,数据未在表中显示)。

[0192] 这些数据结合在一起显示缀合位点影响接头药物对于酶促切割的可及性并且在抗PSMA ADC:ADC-HC41、ADC-HC152、ADC-HC339、ADC-HC375、ADC-LC41和ADC-LC165中的vc-seco-DUBA (SYD980) 接头药物最大程度地免受所述酶的切割。vc-MMAE与抗PSMA抗体的HC41和LC41位置的缀合导致缬氨酸-瓜氨酸切割位点的类似屏蔽(表7)。对于通过相同的HC41位点与vc-seco-DUBA (SYD980) 缀合的抗5T4抗体H8-HC41也观察到类似的趋势。

[0193] 这些数据结合在一起显示,特别是41C位置是用于接头药物与各种抗体的位点特异性缀合的合适位置。

[0194] 表7.由组织蛋白酶B切割的游离药物的细胞毒性

[0195]

ADC	Cys 突变		以组织蛋白酶B预孵育4小时		
	HC	LC	IC ₅₀ (nM)	95% CI (nM)	% 功效
与vc-seco-DUBA缀合的抗PSMA抗体					
ADC-wt (SYD998)	wt	wt	0.70	0.62 – 0.79	97
ADC-HC41 (SYD1091)	S41C	wt	~ 5.00	n.a.	59
ADC-HC120 (SYD1035)	T120C	wt	0.38	0.34 – 0.42	96
ADC-HC152	E152C	wt	>10	n.a.	50
ADC-HC153	P153C	wt	0.76	0.69 – 0.84	98
ADC-HC236	G236C	wt	2.08	1.64 – 2.65	100
ADC-HC247	P247C	wt	2.01	1.69 – 2.39	99
ADC-HC339	A339C	wt	5.00	3.50 – 7.15	99
ADC-HC375	S375C	wt	>10	n.a.	45
ADC-HC376	D376C	wt	0.60	0.52 – 0.68	98
ADC-LC40	wt	P40C	2.11	1.91 – 2.34	96
ADC-LC41	wt	G41C	>10	n.a.	n.a.
ADC-LC154	wt	L154C	0.26	0.22 0.30	98
ADC-LC165	wt	E165C	>10	n.a.	50
ADC-LC205	wt	V205C	0.48	0.41 – 0.58	97
非结合对照 -wt	wt	wt	0.32	0.28 – 0.35	97
非结合对照 -HC41	P41C	wt	1.56	1.36 – 1.79	98
与vc-MMAE缀合的抗PSMA抗体					
ADC-wt	wt	wt	0.63	0.31 – 0.38	96
ADC-HC41	S41C	wt	2.28	2.11 – 2.46	97
ADC-LC40	wt	P40C	0.60	0.55 – 0.64	96
ADC-LC41	wt	G41C	4.28	3.65 – 5.02	96

ADC	Cys 突变		以组织蛋白酶B预孵育4小时		
	HC	LC	IC ₅₀ (nM)	95% CI (nM)	% 功效
非结合对照 -wt	wt	wt	0.64	0.57 – 0.72	97
与vc-seco-DUBA缀合的抗5T4抗体					
[0196] H8-wt	wt	wt	0.35*	0.30 – 0.40	98
H8-HC40	S40C	wt	0.98	0.83 – 1.15	93
H8-HC41	P41C	wt	1.27*	0.98 – 1.67	98
非结合对照 -HC41	P41C	wt	1.86	1.42 – 2.45	85

[0197] * LNCaP-C4.2用作5T4阴性细胞系

[0198] 肿瘤异种移植动物模型

[0199] 在LNCaP C4-2前列腺癌异种移植模型中评价三种抗PSMA ADC的体内功效。LNCaP-C4.2细胞系是源自异种移植的人前列腺癌上皮细胞系,所述异种移植在阉割诱导退化的小鼠中经过连续扩增,并且复现亲代的雄性激素依赖性LNCaP-FGC异种移植细胞系。

[0200] 通过将含有基质胶的200 μ l RPMI 1640 (50:50, v:v) 中的 1×10^7 个LNCaP C4.2细胞注射到雄性CB 17-SCID小鼠的右肋中来皮下诱导肿瘤。在用 γ -源(1.44Gy, ⁶⁰Co, BioMep, Bretenières, 法国)全身辐照后24至72小时,进行LNCaP-C4.2肿瘤细胞植入。当肿瘤达到100至200mm³的平均体积时开始处理。将小鼠根据其各自的肿瘤体积随机分组,并接受在尾静脉中单次静脉内注射的抗PSMA ADC (2或10mg/kg) 或载剂。监测肿瘤体积(图2)和体重(图3)的变化。所有三个ADC具有约1.8的平均DAR。

[0201] 图2A证明在2mg/kg下,相比于天然的未工程化半胱氨酸SYD998,比较物工程化半胱氨酸抗PSMA ADC SYD1035活性较低。然而,根据本发明的工程化半胱氨酸ADC SYD1091的功效明显优于比较物SYD1035,并且优于天然的未工程化SYD998。如图2B所示,比较物SYD1035和SYD1091之间的差异在10mg/kg下甚至更显著。携带LNCaP C4.2肿瘤的小鼠发生恶病质,如图3所示。在施用有效治疗后,这种体重减轻通常恢复,并且被认为是敏感的功效生物标志物。用SYD1091处理导致比用比较物SYD1035或天然的未工程化SYD998所见的快得多的体重恢复(图3)。

[0202] 在PA-1卵巢癌异种移植模型中评估两种抗-5T4 ADC,即天然H8-vc-seco-DUBA(平均DAR 2.0)和工程化半胱氨酸(VH P41C)ADC H8-41C-vc-seco-DUBA(平均DAR 1.7)的体内功效。PA-1细胞系由从患有卵巢癌的女性收集的腹水采集的细胞建立(Zeuthen J.等 Iht. J. Cancer 1980;25 (1):19-32)。

[0203] 通过将含有基质胶的100 μ l RPMI 1640 (50/50, v/v) 中的 1×10^7 个细胞注射到雌性Balb/c裸鼠的右肋中来皮下诱导PA-1肿瘤。在用 γ -源(2Gy, ⁶⁰Co, BioMep, Bretenières, 法国)全身辐照后24至72小时,进行PA-1肿瘤细胞注射。当肿瘤达到200至300mm³的平均体积时开始处理。将小鼠根据其各自的肿瘤体积随机分组,并接受在尾静脉中单次静脉内注射的抗5T4 ADC (3或10mg/kg) 或载剂,并监测肿瘤体积的变化(图4A和4B)。尽管两种变体在较高剂量10mg/kg具有类似的功效(图4B),但在3mg/kg下,当与天然的、未工程化抗-5T4

ADC, H8-vc-seco-DUBA相比时, 工程化半胱氨酸抗-5T4 ADC H8-41C-vc-seco-DUBA显然更有活性(图4A)。

[0204] 这些发现结合在一起证明, 在体内, 根据本发明的位点特异性工程化半胱氨酸的ADC对于小鼠肿瘤模型中的功效显示出有利的性质。

[0205] SEQ ID NO:1 (HAVT20前导序列)

[0206] 1 MACPGFLWAL VISTCLEFSM A

[0207] SEQ ID NO:2 (抗PSMA抗体HC S41C)

[0208] 1 EVQLVQSGAE VKKPGASVKI SCKTSGYTFT EYTIHWVKQA CGKGLEWIGN
51 INPNNGGTTY NQKFEDRATL TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW
101 NFDYWGQGT VTVSS

[0209] SEQ ID NO:3 (人IgG1抗体HC恒定区)

[0210] 1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEVEP
101 KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVSV
151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
201 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCL
251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[0211] SEQ ID NO:4 (抗PSMA抗体HC S41C cDNA)

[0212] 1 ATGGCCTGTC CTGGATTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA ATTCAGCATG
61 GCCGAGGTGC AGCTGGTGCA GTCTGGCGCC GAAGTGAAGA AACCAGGCGC CAGCGTGAAG
121 ATCAGCTGCA AGACCAGCGG CTACACCTTC ACCGAGTACA CCATCCACTG GGTCAAGCAG
181 GCCTGTGGCA AGGGCCTGGA ATGGATCGGC AACATCAACC CCAACAACGG CGGCACCACC
241 TACAACCAGA AGTTCGAGGA CCGGGCCACC CTGACCGTGG ACAAGAGCAC AAGCACCGCC
301 TACATGGAAC TGAGCAGCCT GCGGAGCGAG GACACCGCCG TGTACTATTG TGCCGCCGGA
361 TGGAACCTCG ACTACTGGGG CCAGGGCACC ACCGTGACAG TGTCTAGCGC CAGCACAAAG
421 GGCCCCAGCG TGTTCCCTCT GGCCCCTAGC AGCAAGTCTA CCTCTGGCGG AACAGCCGCC
481 CTGGGCTGCC TCGTGAAGGA CTACTTTCCC GAGCCCCTGA CCGTGTCCCT GAACTCTGGC
541 GCTCTGACAA GCGGCGTGCA CACCTTTCCA GCCGTGCTGC AGAGCAGCGG CCTGTACTCT
601 CTGAGCAGCG TCGTGACTGT GCCCAGCAGC AGCCTGGGCA CCCAGACCTA CATCTGCAAC
661 GTGAACCACA AGCCCAGCAA CACCAAGGTG GACAAAAAGG TGGAACCCAA GAGCTGCGAC
721 AAGACCCACA CCTGTCCCCC TTGTCTGCTC CCTGAAGTGC TGGGCGGACC TTCCGTGTTT
781 CTGTTCCCCC CAAAGCCCAA GGACACCTG ATGATCAGCC GGACCCCGA AGTGACCTGC
841 GTGGTGGTGG ATGTGTCCCA CGAGGACCCT GAAGTGAAGT TCAATTGGTA CGTGGACGGC
901 GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG CACCTACCGG
961 GTGGTGTCCG TGCTGACAGT GCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAAGA GTACAAGTGC
1021 AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA GGCCAAGGGC
1081 CAGCCCCGCG AACCCAGGT GTACACACTG CCTCCAGCA GGGACGAGCT GACCAAGAAC
1141 CAGGTGTCCC TGACATGCCT CGTGAAGGC TTCTACCCCT CCGATATCGC CGTGGAAATGG
1201 GAGAGCAACG GCCAGCCCGA GAACAACACT AAGACCACC CCCCTGTGCT GGACAGCGAC
1261 GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACT GTGGATAAGT CCCGGTGGCA GCAGGGCAAC
1321 GTGTTCAAGT GCAGCGTAT GCACGAGGCC CTGCACAACC ACTACACCCA GAAAAGCCTG
1381 TCCCTGAGCC CCGGCAAG

[0213] SEQ ID NO:5 (抗PSMA抗体LC)

[0214] 1 DIVMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GKAPKLLIYW
51 ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISSLQP EDFADYFCQQ YNSYPLTFGG
101 GTKLEIK

[0215] SEQ ID NO:6 (人IgG抗体LC κ 恒定区)

[0216] 1 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
51 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLISKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
101 SFNRGEC

[0217] SEQ ID NO:7 (抗PSMA抗体LC cDNA)

- 1 ATGGCTTGTC CTGGATTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA ATTCAGCATG
61 GCCGACATCG TGATGACCCA GAGCCCCAGC TCTCTGAGCG CCAGCGTGGG CGACAGAGTG
121 ACCATCACAT GCAAGGCCAG CCAGGACGTG GGCACCGCCG TGGATTGTA TCAGCAGAAG
181 CCTGGCAAGG CCCCCAAGCT GCTGATCTAC TGGGCCAGCA CCAGACACAC CGGCGTGCCC
241 GATAGATTCA CAGGCAGCGG CTCCGGCACC GACTTCACCC TGACAATCAG CAGCCTGCAG
[0218] 301 CCCGAGGACT TCGCCGACTA CTTCTGCCAG CAGTACAACA GCTACCCCTT GACCTTCGGC
361 GGAGGCACCA AGCTGGAAAT CAAGCGGACA GTGGCCGCTC CCAGCGTGTT CATCTTCCCA
421 CCTAGCGACG AGCAGCTGAA GTCTGGCACC GCCTCTGTCT TGTGCCTGCT GAACAACCTC
481 TACCCCGCG AGGCCAAGGT GCAGTGGAAAG GTGGACAATG CCCTGCAGAG CGGCAACAGC
541 CAGGAAAGCG TGACCGAGCA GGACAGCAAG GACTCCACCT ACAGCCTGAG CAGCACCTTG
601 ACCCTGAGCA AGGCCGACTA CGAGAAGCAC AAGGTGTACG CCTGCGAAAGT GACCCACCAG
661 GGCCTGTCTA GCCCCGTGAC CAAGAGCTTC AACCGGGGCG AGTGC
- [0219] SEQ ID NO:8 (H8 HC P41C)
- 1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT GYMHVWKQS ~~Q~~GGGLEWIGR
[0220] 51 INPNNGVTLY NQKFKDRVIM TRDTSISTAY MELSLRSDD TAVYYCARST
101 MITNYVMDYW GQGTLVTVSS
- [0221] SEQ ID NO:9 (人IgG1抗体HC恒定区)
- 1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP
101 KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
[0222] 151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
201 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LKSDGTSFELY SKLTVDKSRW
301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
- [0223] SEQ ID NO:10 (H8 HC P41C cDNA)
- 1 ATGGCCTGTC CTGGATTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA ATTCAGCATG
61 GCCCAGGTGC AGCTGGTGCA GTCTGGCGCC GAAGTGAAGA AACCAGGCGC CAGCGTGAAG
121 GTGTCTGCA AGGCCAGCGG CTACAGCTTC ACCGGCTACT ACATGCACTG GGTCAAGCAG
181 AGCTGCGGCC AGGGCCTGGA ATGGATCGGC AGAATCAACC CCAACAACGG CGTGACCCTG
241 TACAACCAGA AATTCAAGGA CCGCGTGACC ATGACCCGGG ACACCAGCAT CAGCACCGCC
301 TACATGGAAC TGAGCCGGCT GAGAAGCGAC GACACCGCCG TGTACTACTG CGCCCGGTCC
361 ACCATGATCA CCAACTACGT GATGGACTAC TGGGGCCAGG GCACCCTCGT GACAGTGTCT
421 AGCGCCAGCA CAAAGGGCCC CAGCGTGTTT CCTCTGGCCC CTAGCAGCAA GAGCACATCT
481 GGCGGAACAG CCGCCCTGGG CTGCCTCGTG AAGGATTACT TCCCGAGCC CGTGACCCTG
541 TCCTGGAATA GCGGAGCCCT GACAAGCGGC GTGCACACCT TTCCAGCCCT GCTGCAGAGC
601 AGCGGCTGT ACTCTCTGAG CAGCTCGTG ACTGTGCCA GCAGCAGCTT GGGCACCCAG
[0224] 661 ACCTACATCT GCAACGTGAA CCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA GAAGGTGGAA
721 CCCAAGAGCT GCGACAAGAC CCACACCTGT CCCCCTTGTC CTGCCCTGA ACTGCTGGGC
781 GGACCTTCCG TGTTCTGTG CCCCCAAAAG CCCAAGGACA CCCTGATGAT CAGCCGGACC
841 CCCGAAGTGA CCTGCGTGGT GGTGGATGTG TCCCACGAGG ACCCTGAAGT GAAGTTCAAT
901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGG AGTGACAAAC GCCAAGACCA AGCCAGAGA GGAACAGTAC
961 AACAGCACCT ACCGGGTGGT GTCCTGCTG ACAGTGCTGC ACCAGGACTG GCTGAACGGC
1021 AAAGAGTACA AGTGCAAGGT GTCCAACAAA GCCCTGCCTG CCCCATCGA GAAAACCATC
1081 AGCAAGGCCA AGGGCCAGCC CCGCGAACC CAGGTGTACA CACTGCCTCC CAGCCGGGAA
1141 GAGATGACCA AGAACCAGGT GTCCCTGACA TGCCTCGTGA AAGGCTTCTA CCCCTCCGAT
1201 ATCGCCGTGG AATGGGAGAG CAACGCGCAG CCCGAGAACA ACTACAAGAC CACCCCCCTT
1261 GTGCTGGACA GCGACGGCTC ATTCTTCTG TACAGCAAGC TGACCGTGGG CAAGTCCCGG
1321 TGGCAGCAGG GCAACGTGTT CAGCTGCAGC GTGATGCACG AGGCCCTGCA CAACCACTAC
1381 ACCCAGAAGT CCCTGAGCCT GAGCCCCGGC AAA
- [0225] SEQ ID NO:11 (H8 LC)
- 1 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKLLISY
[0226] 51 TSSRYAGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYNSPPTFGG
101 GTKLEIK
- [0227] SEQ ID NO:12 (H8 LC cDNA)

1 ATGGCCTGTC CTGGATTTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA ATTCAGCATG
 61 GCCGACATCG TGATGACCCA GAGCCCCGAT AGCCTGGCCG TGTCCTGGG AGAGAGAGCC
 121 ACCATCAACT GCAAGGCCAG CCAGAGCGTG TCCAACGACG TGGCCTGGTA TCAGCAGAAG
 181 CCCGCCAGA GCCCTAAGCT GCTGATCTCC TACACCAGCA GCAGATATGC CGGCGTGCCC
 241 GACAGATTTT CCGGCAGCGG CTCTGGCACC GACTTCACCC TGACAATCAG CTCCCTGCAG
 [0228] 301 GCCGAGGACG TGGCCGTGTA CTTCTGTCTG CAAGACTACA ACAGCCCCC CACCTTCGGC
 361 GGAGGCACCA AGCTGGAAAT CAAGCGGACA GTGGCCGCTC CCAGCGTGT CATCTTCCCA
 421 CCTAGCGACG AGCAGCTGAA GTCCGGCACA GCCTCTGTG TGTGCTGCT GAACAACCTC
 481 TACCCCGCG AGGCCAAGGT GCAGTGGAA GTGGACAATG CCCTGCAGAG CGGCAACAGC
 541 CAGGAAAGCG TGACCGAGCA GGACAGCAAG GACTCCACCT ACAGCCTGAG CAGCACCTG
 601 ACCCTGAGCA AGGCCGACTA CGAGAAGCAC AAGGTGTACG CCTGCGAAGT GACCCACCAG
 661 GGA CTGAGCA GCCCTGTGAC CAAGAGCTTC AACCGGGGCG AGTGC

[0229] SEQ ID NO:13 (种系前导序列)

[0230] 1 MDWTWRILFL VAAATGAHS

[0231] SEQ ID NO:14 (那他珠单抗HC)

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGFNIK DTYIHWVRQA PGQRLEWMGR
 [0232] 51 IDPANGYTKY DPKFQGRVTI TADTSASTAY MELSSLRSED TAVYYCAREG
 101 YYGNYGVYAM DYWGQGLT VT VSS

[0233] SEQ ID NO:15 (那他珠单抗HC S225P,S375C)

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
 101 KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED
 [0234] 151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 201 CKVSNKGLPS SIEKTIKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
 251 GFYPCDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 301 NVFSCSVMH E ALHNHYTQKS LSLSLGK

[0235] SEQ ID NO:16 (那他珠单抗HC S225P,S375C cDNA)

1 ATGGACTGGA CCTGGCGCAT CCTGTTTCTG GTGGCCGCTG CTACCGGCGC TCACTCCAG
 61 GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG CGCCGAAGTG AAGAAACCTG GCGCCTCCGT GAAGGTGTCC
 121 TGCAAGGCCT CCGGCTTCAA CATCAAGGAC ACCTACATCC ACTGGGTCGG ACAGGCCCT
 181 GGACAGCGGC TGGAATGGAT GGGCAGAATC GACCCCGCCA ACGGCTACAC TAAGTACGAC
 241 CCCAAGTTCC AGGGCAGAGT GACCATCACC GCCGACACCT CCGCCTCCAC AGCCTACATG
 301 GAACTGTCTC CCCTGCGGAG CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAC AGAGGGCTAC
 361 TACGGCAACT ACGGCGTGTG CGCCATGGAC TACTGGGGCC AGGGCACCTT GGTACCCTG
 421 TCCTCCGCTT CCACCAAGGG CCCCTCCGTG TTCCCTCTGG CCCCTGTCTC CCGGTCCACC
 481 TCCGAGTCTA CCGCCGCTCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA GCCCGTGACC
 541 GTGTCTGGA ACTCTGGCGC CCTGACCTCT GCGGTGCACA CCTTCCCTGC TGTGCTGCAG
 601 TCCTCCGGCC TGTACTCCCT GTCCTCCGTC GTGACCGTGC CCTCCAGCTC CCTGGGCACC
 [0236] 661 AAGACCTACA CCTGTAACGT GGACCACAAG CCCTCCAACA CCAAGGTGGA CAAGCGGGTG
 721 GAATCTAAGT ACGGCCCTCC CTGCCCCCTG TGCCCTGCC CTGAATTTCT GGGCGGACCT
 781 TCCGTGTTCC TGTTCCCCC AAAGCCCAAG GACACCCTGA TGATCTCCCG GACCCCGAA
 841 GTGACCTGCG TGGTGGTGGG CGTGTCACAG GAAGATCCCG AGGTCCAGTT CAATTGGTAC
 901 GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG ACCAAGCCCA GAGAGGAACA GTTCAACTCC
 961 ACCTACCGGG TGGTGTCCGT GCTGACCGTG CTGACCAGG ACTGGCTGAA CGGCAAGAG
 1021 TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG CCCAGCTCCA TCGAAAAGAC CATCTCCAAG
 1081 GCCAAGGGAC AGCCTCGCGA GCCCAGGTG TACACCCTGC CTCCAAGCCA GGAAGAGATG
 1141 ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGTCTG GTCAAGGGCT TCTACCCCTG CGATATCGCC
 1201 GTGGAATGGG AGTCCAACGG CCAGCCCGAG AACAACCTACA AGACCACCC CCCTGTGCTG
 1261 GACTCCGACG GTCCTTCTT CCTGTACTCT CGGCTGACCG TGGACAAGTC CCGGTGGCAG
 1321 GAAGGCAACG TCTTCTCCTG CTCGTGATG CACGAGGCC TGCACAACCA CTACACCAG
 1381 AAGTCCCTGT CCCTGAGCCT GGGCAAG

[0237] SEQ ID NO:17 (种系前导序列)

[0238] 1 MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RC

[0239] SEQ ID NO:18 (那他珠单抗LC)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKTSQDIN KYMAWYQQTP GKAPRLLIHY
 [0240] 51 TSALQPGIPS RFSGSGSGRD YFTISSLQP EDIATYYCLQ YDNLWTFGQG
 101 TKVEIK

[0241] SEQ ID NO:19 (那他珠单抗LC cDNA)

```
1   ATGGACATGA GAGTGCCCGC CCAGCTGCTG GGACTGCTGC TGCTGTGGCT GAGAGGCGCC
61  AGATGCGACA TCCAGATGAC CCAGTCCCCC TCCAGCCTGT CCGCCTCCGT GGGCGACAGA
121 GTGACCATCA CATGCAAGAC CTCCCAGGAC ATCAACAAGT ACATGGCCTG GTATCAGCAG
181 ACCCCCGGCA AGGCCCCTCG GCTGCTGATC CACTACACCT CCGCTCTGCA GCCTGGCATC
241 CCCTCCAGAT TCTCCGGCTC CGGCTCTGGC CGGGACTATA CCTTCACCAT CTCCAGTCTG
[0242] 301 CAGCCCGAGG ATATCGCCAC CTACTACTGC CTGCAGTACG ACAACCTGTG GACCTTCGGC
361 CAGGGCACCA AGGTGGAAAT CAAGCGGACC GTGGCCGCTC CCTCCGTGTT CATCTTCCCA
421 CCCTCCGACG AGCAGCTGAA GTCCGGCACC GCCTCCGTCG TGTGCCTGCT GAACAACCTC
481 TACCCCGCG AGGCCAAGGT GCAGTGGAAG GTGGACAACG CCTGCAGTC CGGCAACTCC
541 CAGGAATCCG TCACCGAGCA GGACTCCAAG GACAGCACCT ACTCCCTGTC TCCACCCTG
601 ACCCTGTCCA AGGCCGACTA CGAGAAGCAC AAGGTGTACG CCTGCGAAGT GACCCACCAG
661 GGCCTGTCCA GCCCCGTGAC CAAGTCCTTC AACCGGGGCG AGTGC
```

序列表

<110> ARIAANS Gerardus Joseph Andreas
 COUMANS Rudy Gerardus Elisabeth
 Synthon Biopharmaceuticals B. V.

<120> 接头药物与抗体的位点特异性缀合以及所得ADC

<130> P1664PC00

<150> EP14169493.5
 <151> 2014-05-22

<160> 19

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 前导序列

<400> 1
 Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
 1 5 10 15
 Glu Phe Ser Met Ala
 20

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PSMA抗体的重链可变区

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Cys Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PSMA抗体的重链恒定区

<400> 3
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0001]

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

[0002]

<210> 4
 <211> 1398
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PSMA抗体之重链的cDNA序列

<400> 4
 atggcctgtc ctggatttct gtgggcccctc gtgatcagca cctgtctgga attcagcatg 60
 gccgaggtgc agctgggtgca gtctggcgcc gaagtgaaga aaccaggcgc cagcgtgaag 120
 atcagctgca agaccagcgg ctacacctc accgagtaca ccattcaactg ggtaagcag 180
 gcctgtggca agggcctgga atggatcggc aacatcaacc ccaacaacgg cggcaccacc 240
 tacaaccaga agttcagagga ccgggccacc ctgaccgtgg acaagagcac aagcaccgcc 300
 tacatggaac tgagcagcct gcggagcgag gacaccgccg tgtactattg tgccgccgga 360
 tggaacttcg actactgggg ccagggcacc accgtgacag tgtctagcgc cagcacaag 420
 ggccccagcg tgttcctct ggccccctagc agcaagtcta cctctggcgg aacagccgcc 480
 ctgggctgcc tcgtgaagga ctacttccc gagcccgtga cegtgtcctg gaactctggc 540
 gctctgacaa gcggcgtgca cactttcca gccgtgctgc agagcagcgg cctgtactct 600
 ctgagcagcg tcgtgactgt gccagcagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac 660
 gtgaaccaca agccccgcaa caccaaggtg gacaaaaagg tggaacccaa gagctgcgac 720

```

aagaceca cctgtceccc ttgtcctgcc cctgaactgc tgggcggacc ttcctgttc 780
ctgttceccc caaagcccaa ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga agtgacctgc 840
gtggtggtgg atgtgtccca cgaggacct gaagtgaagt tcaattgga cgtggacggc 900
gtggaagtgc acaagcccaa gaccaagccc agagaggaac agtacaacag cacetaccgg 960
gtggtgtccg tgctgacagt gctgcaccag gactggctga acggcaaaga gtacaagtgc 1020
aaggtgtcca acaagccct gctgtceccc atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc 1080
cagccccgg aacccccagt gtacacactg cctcccagca gggacgagct gaccaagaac 1140
caggtgtccc tgacatgct cgtgaaagge tctaccct cegatategc cgtggaatgg 1200
gagagcaacg gccagcccc gaacaactac aagaccacc cccctgtgct ggacagcgac 1260
ggctcattct tccgtacag caagetgact giggataagt cccggtggca gcagggcaac 1320
gtgttcagct gcagcgtgat gcacagggcc ctgcacaacc actacacca gaaaagcctg 1380
tcctgagccc ccggcaag 1398
    
```

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PSMA抗体的轻链可变区

[0003]

```

<400> 5
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30
Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
    
```

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PSMA抗体的轻链恒定区

```

<400> 6
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    
```

100105

<210> 7
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 抗PSMA抗体之轻链的cDNA序列

<400> 7
 atggcttgtc ctggatttct gtggccctc gigtacagca cctgtctgga attcagcatg 60
 gccgacatcg tgatgaccca gageccaccg tctctgagcg ccagcgtggg cgacagagtg 120
 accatcacat gcaaggccag ccaggacgtg ggcaccgccc tggattggtg tcagcagaag 180
 cctggcaagg cccccaagct gctgatctac tgggccagca ccagacacac eggcgtgccc 240
 gatagattca caggcagcgg ctccggcacc gacttcacc tgacaatcag cagcctgcag 300
 cccgaggact tcgcccacta cttctgccag cagtacaaca gtaccacct gaccttcggc 360
 ggaggcacca agctggaaat caagcgaca gtggccgctc ccagcgtgtt catcttccca 420
 cctagcgacg agcagctgaa gtctggcacc gcctctgtcg tgtgcctgct gaacaactc 480
 tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaatg ccttcagag cgcaacagc 540
 caggaaagcg tgaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcacctg 600
 accctgagca agcccacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gaccaccag 660
 ggctgtcta gccccgtgac caagagcttc aaccggggcg agtgc 705

[0004]

<210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H8 HC P41C

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Cys Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人IgG1抗体HC恒定区

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

[0005]

<210> 10
 <211> 1413
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H8 HC P41C cDNA

<400> 10
 atggcctgtc ctggatttct gtggccctc gtgatcagca cctgtctgga attcagcatg 60
 gccaggtgc agctggtgca gcttgccgcc gaagtgaaga aaccaggcgc cagcgtgaag 120
 gtgtcctgca aggccagcgg ctacagcttc accggtact acatgcaactg ggtcaagcag 180
 agctggcgcc agggcctgga atggatcggc agaatcaacc ccaacaacgg cgtgaccctg 240
 tacaaccaga aattcaagga ccgcgtgacc atgaccggg acaccagcat cagcaccgcc 300
 tacatggaac tgagccggct gagaagcgac gacaccgccg tgtactactg egcccgtcc 360
 accatgatca ccaactacgt gatggactac tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtct 420
 agcggcagca caaagggcc cagcgtgttc cctctggccc ctagcagcaa gagcacatct 480
 ggcggaacac ccgcctggg etgcctcgtg aaggattact tccccagcc cgtgaccgtg 540
 tectggaata gcggagcct gacaagcggc gtgcacacct ttccagcct gctgcagagc 600

```

agcggcctgt actctctgag cagcgtctg actgtgcca gcagcagcct gggcaccag 660
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacia gaaggtggaa 720
cccaagagct ggcacaagac ccacacctgt cccccctgtc ctgccccga actgctgggc 780
ggaccttcg tgttctctgt cccccaaaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 840
cccgaagtga cctgctgtgt ggtggatgtg tcccacgagg acctgaagt gaagtccaat 900
tggtaactgg acggcgtgga agtgcacaac gccaaagaca agcccagaga ggaacagtac 960
aacagcaact accgggtggt gtccctgctg acagtctctg accaggactg gctgaacggc 1020
aaagagtaca agtgcgaagt gtccaacaaa gcctgcctg ccccatcga gaaaaccatc 1080
agcaaggcca agggccagcc ccggaaccc caggtgtaca cactgcctcc cagccgggaa 1140
gagatgacca agaaccaggt gtccctgaca tgcctctgta aagcttcta cccctccgat 1200
atgcctgtgg aatgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1260
gtctctgaca ggcagcctc attctctctg tacagcaage tgacctgga caagtcccg 1320
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcage gtgatgcacg agccctgca caaccactac 1380
accagaagt ccctgagcct gagccccggc aaa 1413
    
```

<210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0006]

<220>
 <223> H8 LC

<400> 11
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Asn Ser Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 12
 <211> 705
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> H8 LC cDNA

```

<400> 12
atggcctgtc ctggatttct gtggccctc gtgatcagca cctgtctgga attcagcatg 60
gccgacatcg tgatgaccca gagecccgat agcctggccg tgtctctggg agagagagcc 120
accatecaact gcaaggccag ccagagcgtg tccaacgacg tggcctggta tcagcagaag 180
cccggccaga gccctaagct gctgatctcc tacaccagca gcagatatgc cggcgtgccc 240
    
```

gacagatttt ccggcagcgg ctctggcacc gacttcaccc tgacaatcag ctcctgcag 300
 gccgaggacg tggccgtgta cttctgtcag caagactaca acagcecccc caccttcggc 360
 ggaggcacca agctggaaat caageggaca gtggccgctc ccagcgtgtt catcttccca 420
 cctagegacg agcagctgaa gtccggcaca gcctctgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 480
 taccctcccg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaatg cctgcagag cggcaacagc 540
 caggaaagcg tgaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg 600
 accttgagca aggcgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gaccaccag 660
 ggactgagca gccctgtgac caagagcttc aaccggggcg agtgc 705

<210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 种系前导序列

<400> 13
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala His Ser

<210> 14
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0007]

<220>
 <223> 那他珠单抗HC

<400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Gly Val Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 那他珠单抗HC S225P, S375C

<400> 15
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 35 55 40 60 45
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

[0008]

<210> 16
 <211> 1407
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 那他珠单抗HC S225P, S375C cDNA

<400> 16
 atggactgga cctggcgeat cctgtttctg gtggccgctg ctaccggcgc tcactcccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgccaagtg aagaaacctg ggcctccgt gaaggtgtcc 120
 tgcaaggcct ccgcttcaa cateaaggac acctacatcc actgggtccg acaggeccct 180
 ggacagcggc tggaatgat gggcagaatc gaccccgcca acggctacac taagtacgac 240
 cccaagtcc agggcagagt gaccatcacc gccgacacct ccgctccac agcctacatg 300
 gaactgtcct cctgctggag cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag agagggtac 360
 tacggcaact acggcgtgta cgccatggac tactggggcc agggcacct ggtcaccgtg 420
 tctccgctt ccaccaaggg cccctccgtg ttcctctgg cccttgetc cgggtccacc 480
 tccgagteta ccgcgctct gggtgcctg gtaaggact actccccga gccctgacc 540
 gtgtcctgga actctggcgc cctgacctct ggcgtgcaca cttccctgc tgtgctgcag 600
 tctccggcc tgtactcct gtccctccgc gtgaccgtgc cctccagctc cctgggcacc 660
 aagactaca cctgtaactg ggaccacaag cctccaaca ccaaggtgga caagcgggtg 720

gaatctaagt acggccctcc ctgccccccc tgcctgccc ctgaatttct gggcggacct 780
 tccgtgttcc tgttcccccc aaageccaag gacaccctga tgatctcccg gacccecgaa 840
 gtgacctgcg tgggtggtgga cgtgtcccag gaagatcccg aggtccagtt caattggtac 900
 gtggaecggc tggaagtgca caacgccaag accaagccca gagaggaaca gttcaactcc 960
 acctaccggg tgggtgtccg gctgaccgtg ctgcaccagg actggetgaa cggcaaagag 1020
 tacaagtgca aggtgtccaa caaggcctg cccagctcca tggaaaagac catctccaag 1080
 gccaaaggac agcctcgcga gccccagggtg tacaccctgc ctccaagcca ggaagagatg 1140
 accaagaacc aggtgtccct gacctgtctg gtcaagggt tetaccctg cgatategcc 1200
 gtggaatggg agtccaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc cctgtgtctg 1260
 gactcggcag gctccttctt cctgtactct eggetgaccg tggacaagtc ccggtggcag 1320
 gaaggeaacg tcttctctg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 1380
 aagtccctgt cctgagcct gggcaag 1407

<210> 17
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 种系前导序列

[0009]

<400> 17
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Arg Gly Ala Arg Cys
 20

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 那他珠单抗LC

<400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Thr Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Met Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 His Tyr Thr Ser Ala Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Trp Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19
 <211> 704
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 那他珠单抗LC cDNA

	<400> 19	
	atggacatga gagtgcccgcc ccagctgctg ggactgctgc tgcgtggct gagagcgcc	60
	agatgcgaca tccagatgac ccagtcctcc tccagcctgt ccgctccgt gggcgacaga	120
	gtgacatca catgcaagac ctcccaggac atcaacaagt acatggcctg gtatcagcag	180
	accccgca aggcctctg gctgctgac cactacacct ccgctctgca gcctggcacc	240
	ccctccagat tctccggctc cggctctggc cgggactata ccttaccat ctccagtctg	300
[0010]	cagcccgagg atatgccac ctactactgc ctgcagtacg acaacctgtg gacctcggc	360
	cagggeacca aggtggaaat caagcggacc gtggccgctc cctccgtgtt catcttccca	420
	ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgctg tctgctgct gaacaactc	480
	taccccgcg aggcccaaggt gcagtggaag gtggacaacg cctgcagtc cggaactcc	540
	caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcaact actcctgctc tccacctga	600
	ccctgtcca ggcgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgcgaagtg acccaccagg	660
	gcctgtccag ccccgacc aagtcctca accggggcga gtgc	704

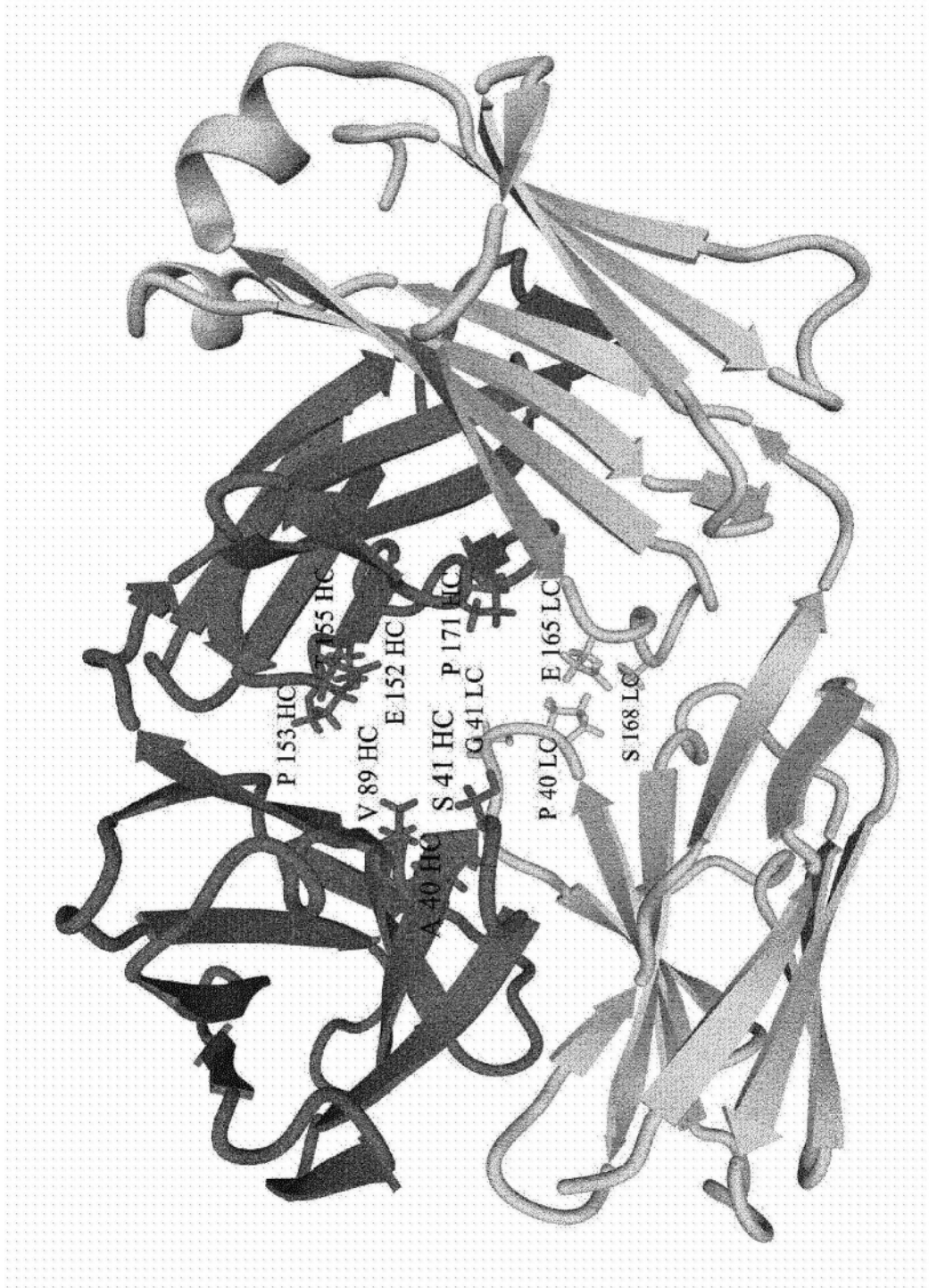


图1A

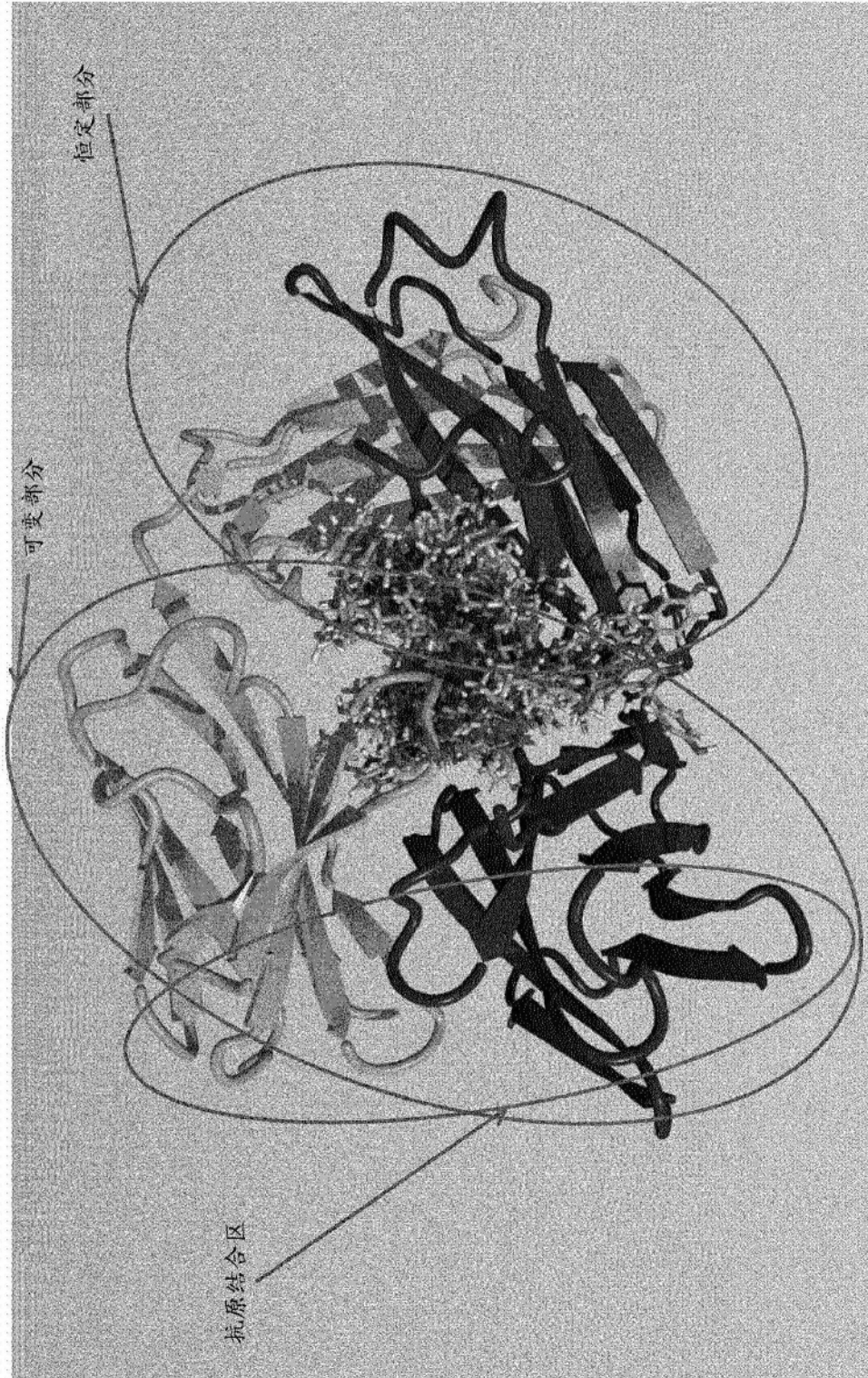


图1B

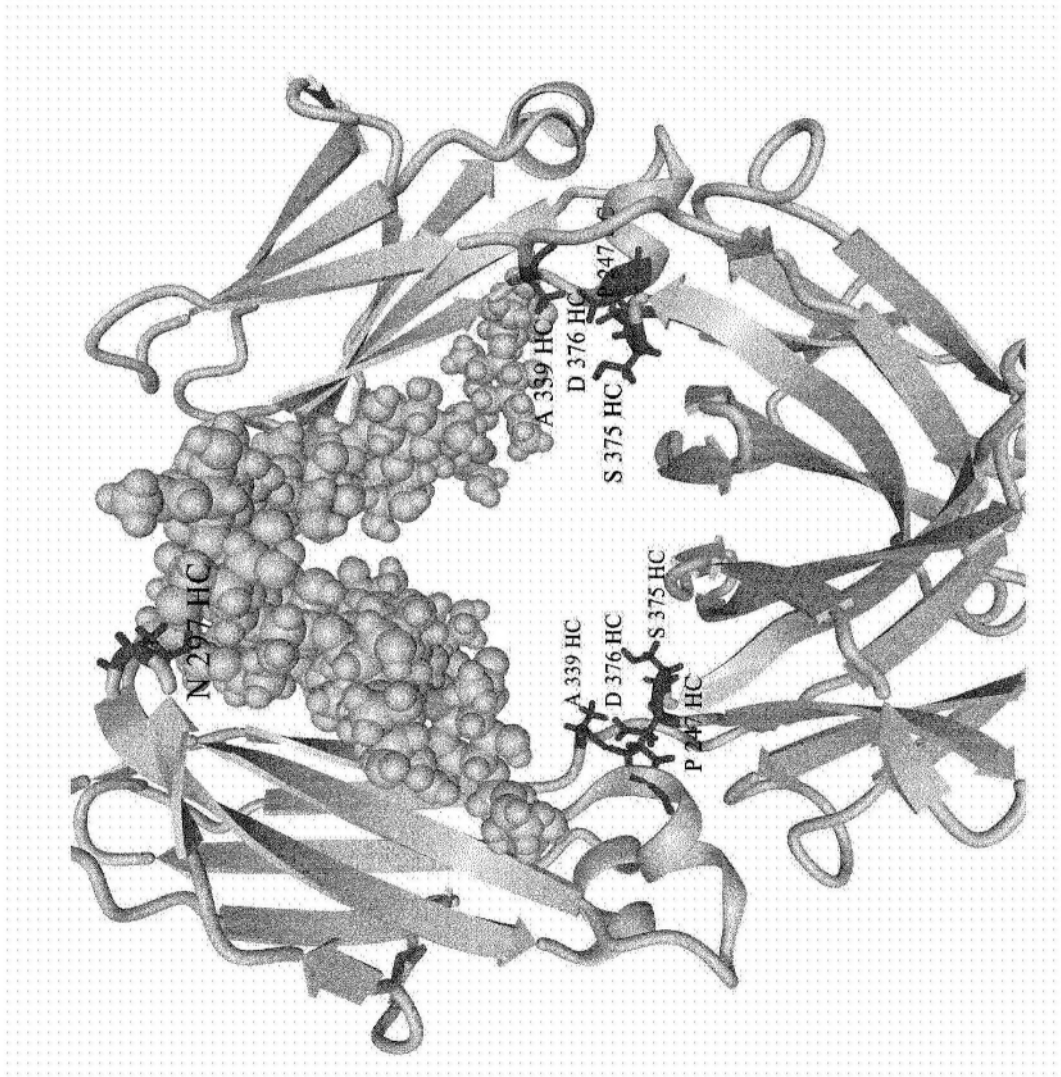


图1C

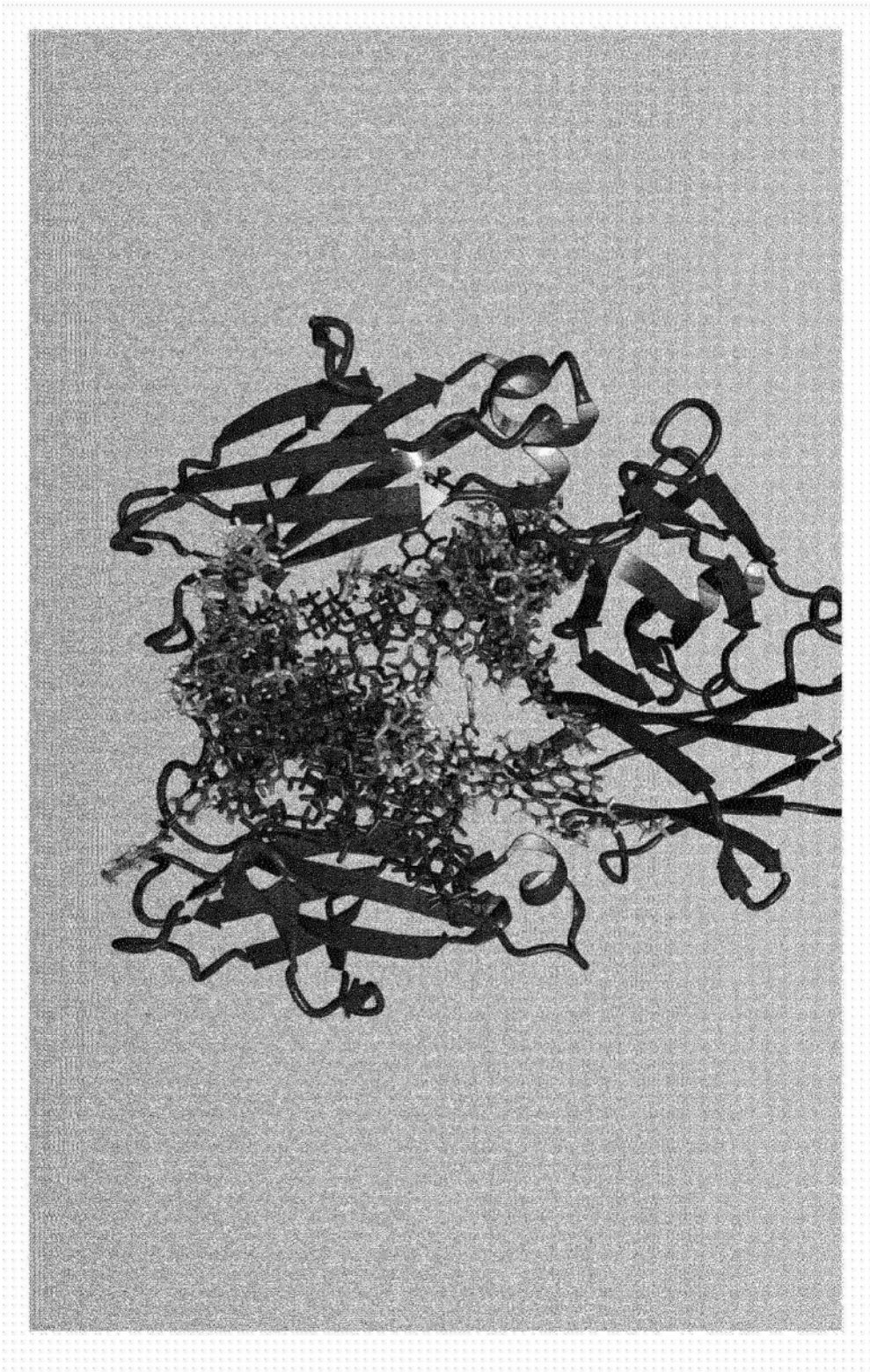


图1D

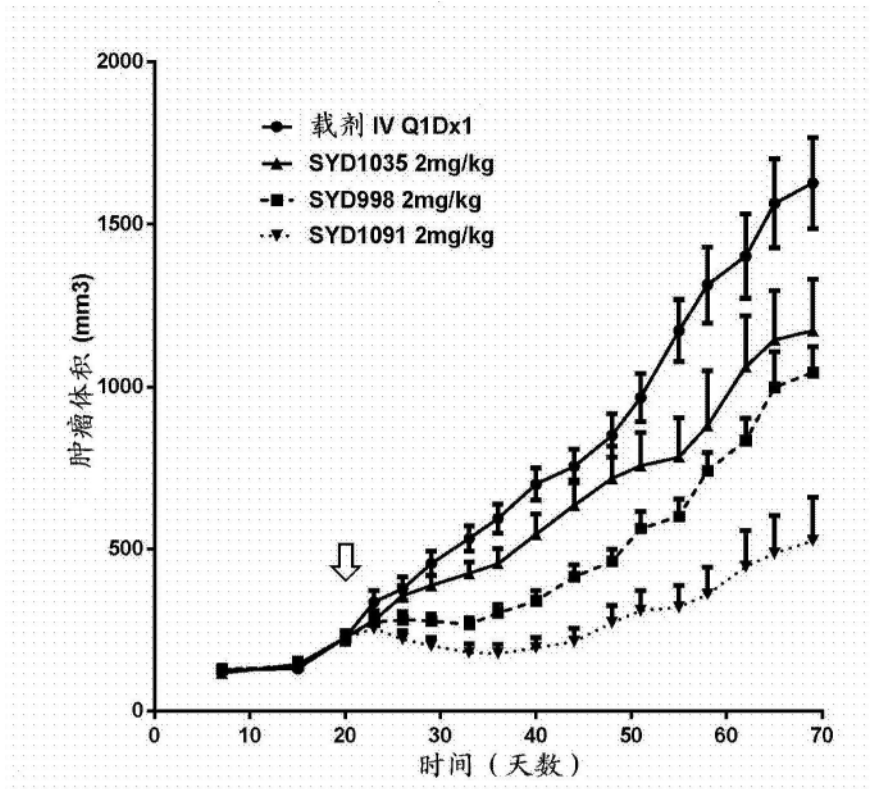


图2A

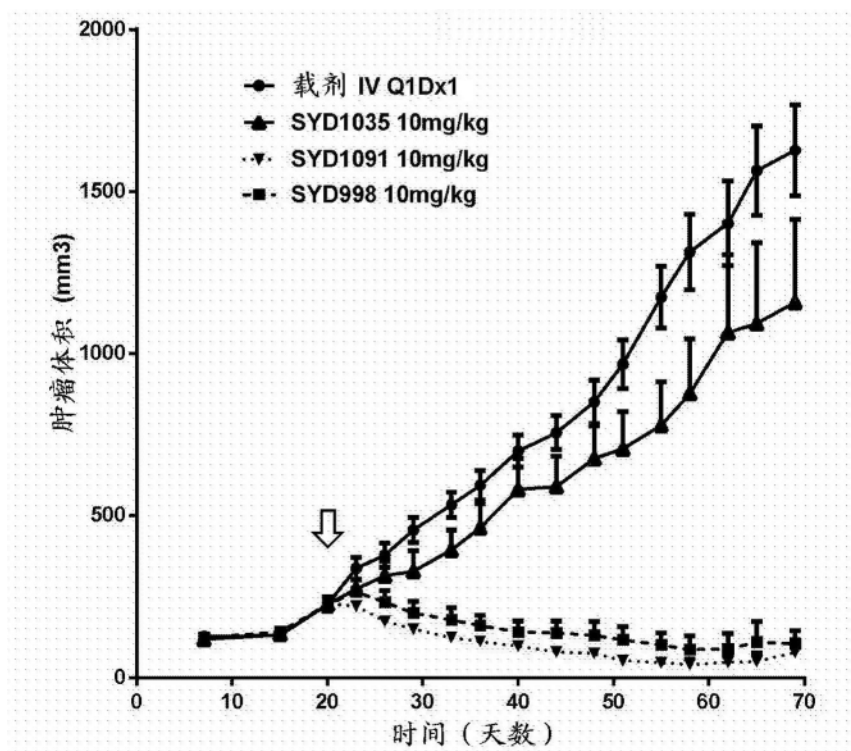


图2B

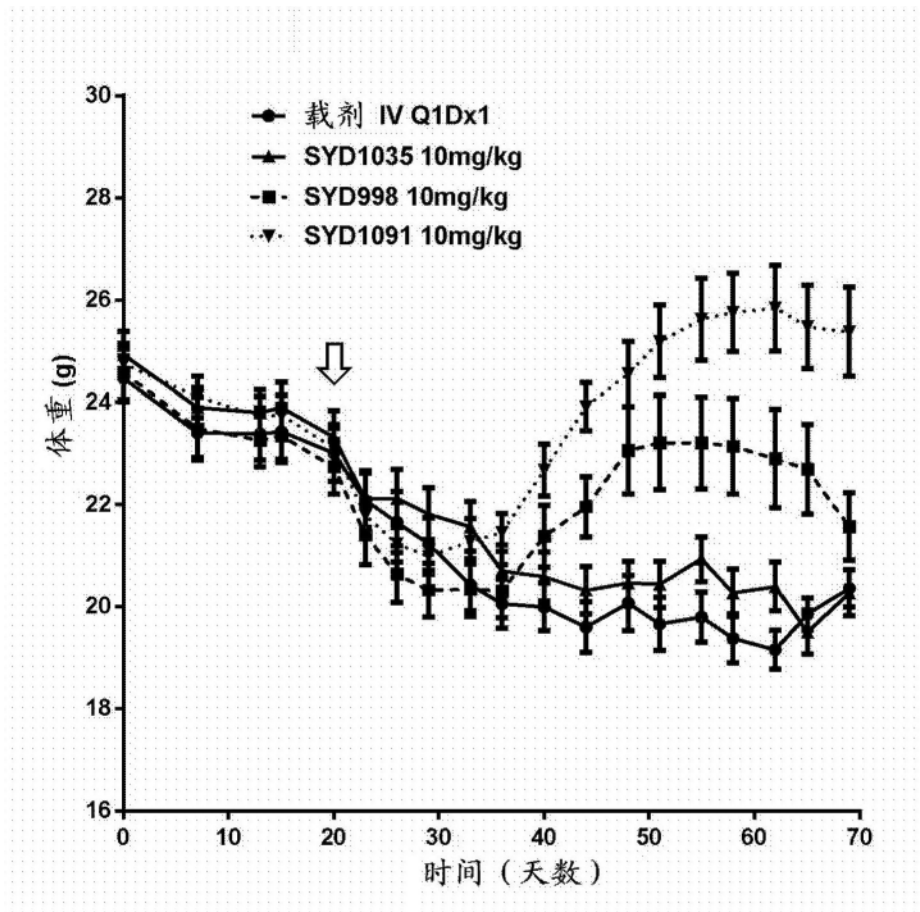


图3

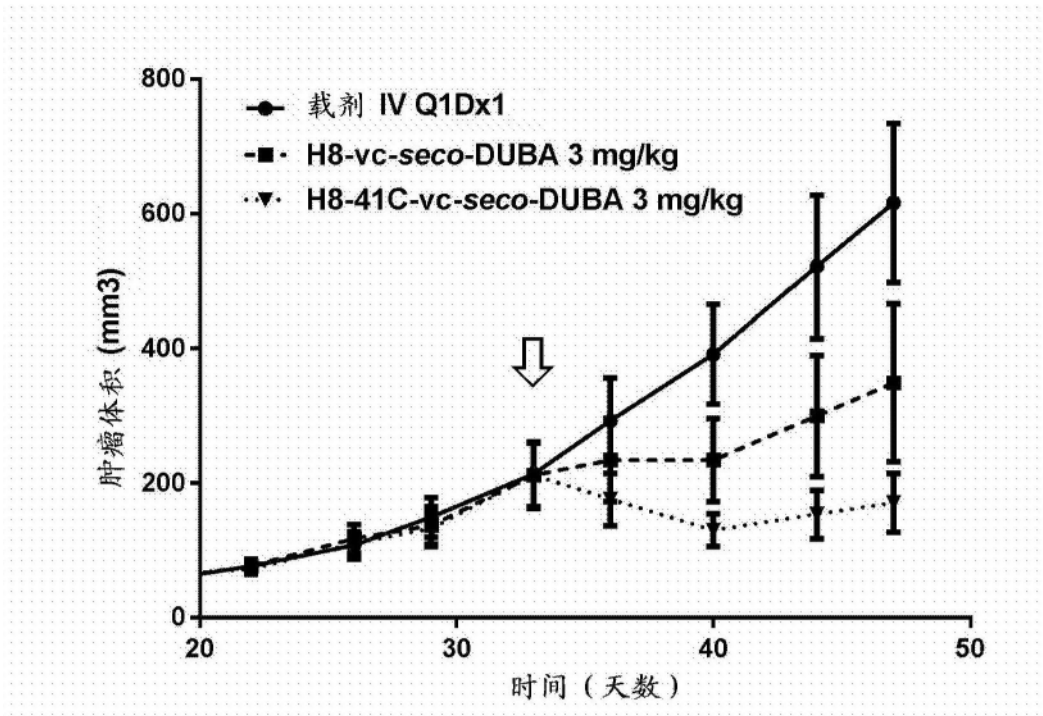


图4A

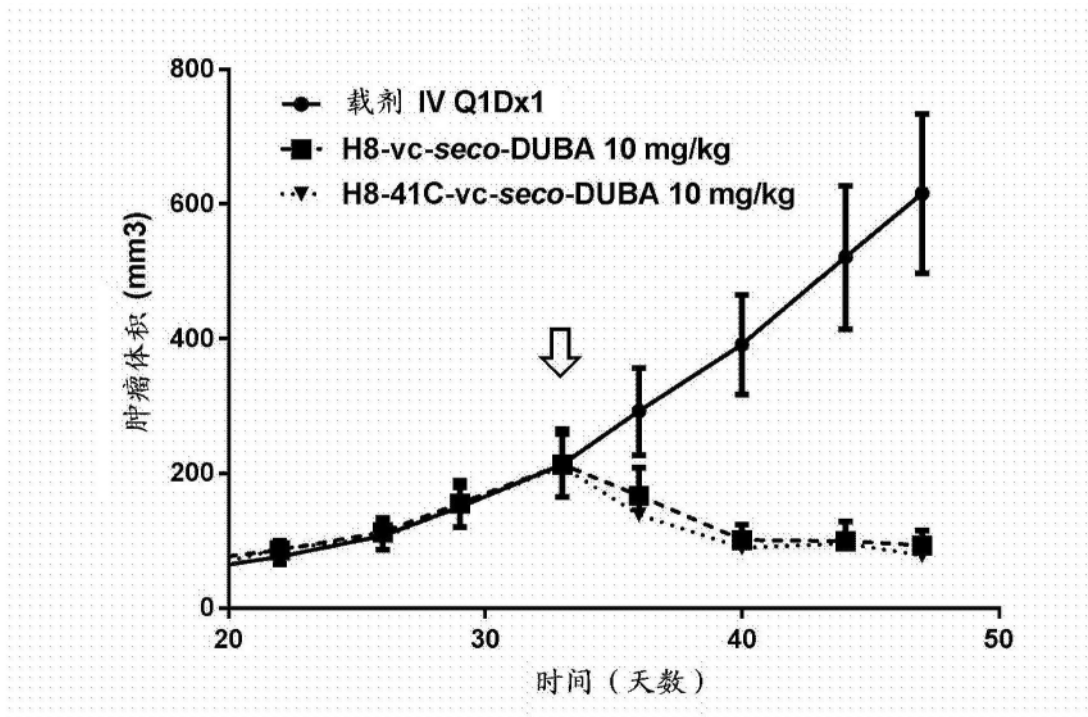


图4B