



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108778274 A

(43)申请公布日 2018. 11. 09

(21)申请号 201780016777.9

(22)申请日 2017.03.17

(30)优先权数据

15/075,008 2016.03.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/022993 2017.03.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/161288 EN 2017.09.21

(71)申请人 新泽西鲁特格斯州立大学

地址 美国新泽西州

申请人 乔治敦大学

(72)发明人 林尚有 J·R·贝尔蒂诺 林晨永

Z·塞凯伊

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

代理人 付文川 吴小瑛

(51)Int.Cl.

A61K 31/454(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

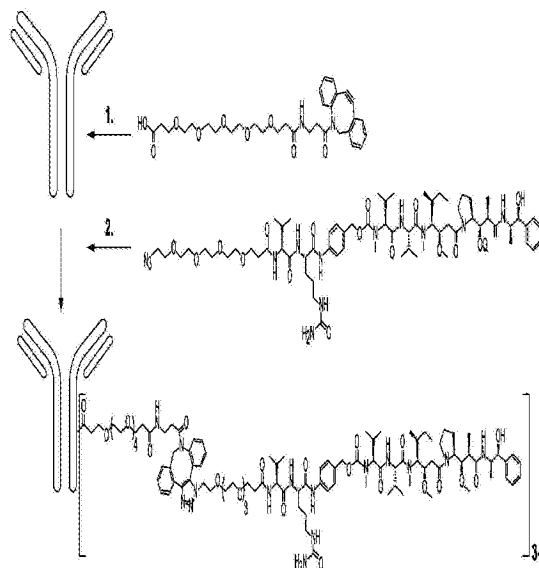
权利要求书2页 说明书25页 附图17页

(54)发明名称

用通过可体内裂解的连接部分与抗蛋白裂解酶抗体缀合的化学治疗剂靶向肿瘤细胞

(57)摘要

本发明涉及抗蛋白裂解酶抗体以及抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂的免疫缀合物,及其用于杀死或抑制表达蛋白裂解酶的癌细胞的生长的用途,这些癌细胞如多发性骨髓瘤和乳腺癌的那些。具体地,引入包含抗蛋白裂解酶单克隆抗体和抗癌剂的免疫缀合物,该抗癌剂如包括单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)和单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF)的奥瑞斯他汀,该免疫缀合物在体内具有有效的抗肿瘤活性。而且,重要地是,在动物中没有体重减轻或其他毒性证据,这表明没有显著的游离药物从缀合物释放到循环中。本发明还提供包含那些新的免疫缀合物的组合物,以及将这些组合物用于治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的用途。此外,将如沙利度胺或其类似物的免疫调节剂的给予同抗蛋白裂解酶抗体或抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂的免疫缀合物的组合给予提供对于那些癌症更有效的治疗。



1. 一种选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,该免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体或其抗原结合片段、以及细胞毒性剂,其中所述细胞毒性剂选自下组,该组由以下组成:单甲基奥瑞斯他汀E (MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F (MMAF) 和奥瑞斯他汀PE。

2. 如权利要求1所述的免疫缀合物,其中该抗蛋白裂解酶抗体包含M69单克隆抗体或其抗原结合部分。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的免疫缀合物,其中该免疫缀合物进一步包含接头。

4. 如权利要求3所述的免疫缀合物,其中该接头包含可裂解的连接部分。

5. 如权利要求4所述的免疫缀合物,其中该可裂解的连接部分包含Val-Cit连接部分或Phy-Lys连接部分,该连接部分可通过Capthesin B裂解。

6. 如权利要求3-5中任一项所述的免疫缀合物,其中该接头共价结合至该抗蛋白裂解酶抗体上的赖氨酸残基上。

7. 如权利要求3-6中任一项所述的免疫缀合物,其中该接头是含PEG的。

8. 如权利要求1-2中任一项所述的免疫缀合物,其中该免疫缀合物进一步包含接头,并且该接头包含第一连接组分和第二连接组分。

9. 如权利要求8所述的免疫缀合物,其中该第一连接组分共价结合至该抗蛋白裂解酶抗体上的赖氨酸残基上。

10. 如权利要求8-9中任一项所述的免疫缀合物,其中该第一连接组分通过三唑部分与该第二连接组分结合。

11. 如权利要求8-10中任一项所述的免疫缀合物,其中该第二连接组分包含可裂解的连接部分。

12. 如权利要求11所述的免疫缀合物,其中该可裂解的连接部分包含Val-Cit连接部分或Phy-Lys连接部分,该连接部分可通过Capthesin B裂解。

13. 如权利要求8-12中任一项所述的免疫缀合物,其中该第一连接组分是含PEG的。

14. 如权利要求8-13中任一项所述的免疫缀合物,其中该第二连接组分是含PEG的。

15. 如权利要求8-14中任一项所述的免疫缀合物,其中该细胞毒性剂与该第二连接组分结合。

16. 一种治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,该方法包括向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的组合物,该组合物包含如权利要求1-15中任一项所述的免疫缀合物。

17. 如权利要求16所述的方法,其中该恶性肿瘤包含血液恶性肿瘤。

18. 如权利要求17所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自下组,该组由以下组成:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(BL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、和多发性骨髓瘤(MM)。

19. 如权利要求16所述的方法,其中该恶性肿瘤包含上皮恶性肿瘤。

20. 如权利要求19所述的方法,其中该上皮恶性肿瘤选自下组,该组由以下组成:前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、脑肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、结肠肿瘤、膀胱肿瘤、皮肤肿瘤、甲状腺肿瘤、卵巢肿瘤和间皮瘤。

21. 如权利要求16-20中任一项所述的方法,该方法进一步包括共给予治疗有效量的、活化蛋白裂解酶的免疫调节剂。

22. 如权利要求21所述的方法,其中该免疫调节剂包含沙利度胺或沙利度胺类似物。

23. 一种免疫缀合物,该免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体或其抗原结合部分,该免疫缀合物通过接头与细胞毒性剂共价结合,该细胞毒性剂选自下组,该组由以下组成:单甲基奥瑞斯他汀E (MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F (MMAF)、和奥瑞斯他汀PE,并且该接头包含:

第一连接组分,该第一连接组分通过位于该抗蛋白裂解酶抗体或其抗原结合部分上的赖氨酸残基与该抗蛋白裂解酶抗体或其抗原结合部分结合;以及

第二连接组分,该第二连接组分包含可裂解的连接部分,该第二连接组分通过三唑部分与该第一连接组分结合,并且通过该可裂解的连接部分与该细胞毒性剂结合,

其中该可裂解的连接部分包含Val-Cit连接部分或Phy-Lys连接部分,该连接部分可通过Capthesin B裂解,

其中该第一连接组分包含在该抗蛋白裂解酶抗体或其抗原结合部分上的赖氨酸残基与三唑部分之间的酰胺键之间的约3个与约7个之间的聚(乙二醇) (PEG) 单元,并且

其中该第二连接组分包含在该三唑部分与该可裂解的连接部分之间的约3个与约7个之间的聚(乙二醇) (PEG) 单元。

24. 如权利要求23所述的免疫缀合物,其中该抗蛋白裂解酶抗体或其抗原结合部分包含M69或其抗原结合部分。

25. 如权利要求24所述的免疫缀合物,其中该细胞毒性剂包含单甲基奥瑞斯他汀E (MMAE)。

用通过可体内裂解的连接部分与抗蛋白裂解酶抗体缀合的化学治疗剂靶向肿瘤细胞

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求美国专利申请序列号15/075,008的优先权,其在35 U.S.C. §120下是于2012年5月18日提交的美国专利申请序列号13/510,801的部分继续申请,其是于2010年11月18日提交的PCT/US 10/57235的国家阶段申请,其反过来在35 U.S.C. §119(e)下要求于2010年1月7日提交的美国临时申请号61/293,030的以及于2009年11月18日提交的美国临时申请号61/262,373的优先权。所有前述参考文件通过引用以其全文结合在此。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含抗癌剂和单克隆抗体的新免疫缀合物,以及使用此类免疫缀合物用于杀死或抑制表达癌细胞的蛋白裂解酶(matriptase)的生长的用途,这些癌细胞包括但不限于恶性血液病和上皮癌,如多发性骨髓瘤和乳腺癌的那些。因此,本发明还涉及治疗表达蛋白裂解酶的癌症的新方法。

背景技术

[0003] 蛋白裂解酶是由上皮起源的细胞(包括乳腺和前列腺肿瘤细胞)表达的II型跨膜丝氨酸蛋白酶。除了保守的细胞外结构域之外,蛋白裂解酶的特征在于N-末端跨膜结构域和多个细胞外结构域(Lin C.Y.等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],1999,274(26):18237-18242)。蛋白裂解酶是需要通过蛋白水解切割活化成为双链活性酶的酶原。在正常生理条件下,存在过量的称为HGF活化剂抑制剂-I(HAI-1)的内源性抑制剂,其与蛋白裂解酶结合紧密调节蛋白酶活性(Lin,C.Y.等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],1999,274:18231-18236;Oberst,M.D.等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],2003,278:26773-26779)。除了发挥抑制功能外,HAI-1还在蛋白裂解酶的活化、正确表达和细胞内运输中起关键作用(Oberst,M.D.等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],2003,278:26773-26779;Oberst,M.D.等人,Am.J.Physiol.Cell Physiol.[美国生理学-细胞生理学杂志],2005,289:C462-C470)。

[0004] 已知蛋白裂解酶在体外蛋白水解地活化肝细胞生长因子(HGF)和尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)和蛋白酶激活的受体(Lee,S.L.等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],2000,275:36720-36725;Suzuki,M.等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志],2004,279:14899-14908)。HGF和uPA都与它们在细胞侵袭和转移以及细胞运动中的作用有关(Trusolino,L.和Comoglio,P.M.,Nat.Rev.Cancer[癌症自然综述],2002,2:289-300;Sidenius,N.和Blasi,F.,Cancer Metastasis Rev.[癌症与转移评论],2003,22:205-222)。HGF的同源受体是Met(受体酪氨酸激酶)。在HGF的结合后,Met可以触发多种信号传导途径(包括Ras-MAPK、PI3K、Src和Stat3)最终导致侵入性生长。与蛋白裂解酶的过表达组合的高水平的Met与患有乳腺癌的患者的不良结果相关。

[0005] 在过去的几年中已经对若干种实体上皮衍生的肿瘤(包括乳腺癌、前列腺癌和卵

巢癌)中的蛋白裂解酶水平进行了研究(综述参见Uhland,K.,Cell.Mol.Life Sci.[细胞与分子生命科学],2007,63(24):2968-78)。来自患有乳腺癌的患者的组织微阵列显示Met、蛋白裂解酶和HAI-1的高水平表达与不良患者结果相关(Kang,J.Y.等人,Cancer Res.[癌症研究],2003,63:1101-1105)。在前列腺肿瘤中,具有降低的HAI-1表达的蛋白裂解酶水平增加与肿瘤分级增加相关(Saleem,M.等人,Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.[癌症流行病学学生物标志物和预防],2006:15,217-227)。在患有卵巢癌的患者82%的II期和55%的III/VI期中也发现了蛋白裂解酶的过表达。

[0006] 考虑到蛋白裂解酶在肿瘤起始、进展和转移中的重要作用,已经在动物模型中研究了这种蛋白酶的若干种抑制剂的抗癌活性。已经在PC-3前列腺癌异种移植模型中显示了由蛋白裂解酶抑制剂(大肠杆菌素(ecotin))形成的肿瘤生长和转移减少(Takeuchi,N.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],1999,96,11054-11061)。CVS-3983(另一种蛋白裂解酶抑制剂)也在雄激素非依赖性前列腺癌的小鼠模型中减小肿瘤大小(Galkin,A.V.等人,Prostate[前列腺],2004,61,228-235)。

[0007] 单甲基奥瑞斯他汀E(Monomethyl auristatin E,“MMAE”)是FDA批准的合成抗肿瘤剂,其已在化疗基础治疗中显示出有希望的用途。MMAE是有效的抗有丝分裂化合物但当单独给药时它表现出高水平的细胞毒性,限制了其作为独立化合物的临床价值。单甲基奥瑞斯他汀F(“MMAF”) (也称为去甲基-奥瑞斯他汀F)是实验性合成抗肿瘤剂,与MMAE一样是抗有丝分裂剂。与MMAE一样,MMAF单独给药时表现出高水平的细胞毒性。因此,迫切需要利用MMAF和MMAE结合的免疫缀合物的治疗有效的基于抗体的治疗。

发明概述

[0008] 本发明提供以满足前述需要的用于治疗血液癌的新的治疗剂,这些血液癌包括急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(BL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、和多发性骨髓瘤(MM),以及用于治疗各种上皮癌的新的治疗剂,这些上皮癌包括前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、脑肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、结肠肿瘤、膀胱肿瘤、皮肤肿瘤、甲状腺肿瘤和卵巢肿瘤、以及间皮瘤。

[0009] 蛋白裂解酶(膜结合的丝氨酸II型蛋白酶)在多发性骨髓瘤(MM)和其他血液和上皮癌细胞的细胞系中表达。本发明提供与细胞毒性剂(例如,奥立抑素MMAE和MMAF)缀合的抗蛋白裂解酶抗体,用于选择性靶向表达蛋白裂解酶的细胞。与有效的抗癌药物缀合的抗体靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞具有各种优点。例如,将化学治疗剂选择性递送至过表达蛋白裂解酶的肿瘤细胞导致对正常组织的毒性较小。此外,由于已在其他器官(包括肾、肺、结肠、膀胱、胰腺、前列腺、皮肤、乳腺、甲状腺和卵巢)的肿瘤中发现了蛋白裂解酶mRNA的水平,因此这些免疫缀合物可用于治疗这些癌症。

[0010] 在一个实施例中,本发明提供抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂的免疫缀合物。在一些实施例中,该细胞毒性剂选自阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF))、卡里奇霉素和蓖麻毒蛋白。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAE。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAF。在一些实施例中,该细胞毒性剂与抗蛋白裂解酶抗体共价连接。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体是M69。因此,在一些实

施例中,该免疫缀合物是与M69共价连接的MMAE。在其他实施例中,该免疫缀合物是与M69共价连接的MMAF。

[0011] 在一个实施例中,本发明还提供用于免疫缀合物中的接头。在一些实施例中,该接头包含可裂解的连接部分。在一些实施例中,该可裂解的连接部分包含Val-Cit部分或Phy-Lys部分,该连接部分可通过Capthesin B裂解。在一些实施例中,该接头直接缀合至抗体的表面。在一些实施例中,该接头与赖氨酸侧链共价。在一些实施例中,该接头包含第一连接组分和第二连接组分。在一些实施例中,该第一连接组分通过三唑部分与第二连接组分结合。在一些实施例中,该第一连接组分与抗体的表面结合。在一些实施例中,该第二连接组分包含可裂解的连接部分。在一些实施例中,该第二连接组分包含治疗剂。在一些实施例中,该接头是PEG基的。在一些实施例中,该第一连接组分是PEG基的。在一些实施例中,该第二连接组分是PEG基的。在一些实施例中,该抗体包含抗蛋白裂解酶抗体。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体包含M69。在一些实施例中,该治疗剂包含细胞毒性剂。在一些实施例中,该细胞毒性剂选自阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF))、卡里奇霉素和蓖麻毒蛋白。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAE。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAF。

[0012] 此外,根据本发明已经发现沙利度胺(免疫调节剂)显著地诱导骨髓瘤细胞中的蛋白裂解酶的活化。因此,本发明提供用于给予与给予免疫调节剂(包括但不限于沙利度胺及其类似物)组合的靶向活化蛋白裂解酶的免疫缀合物,用于治疗MM和其他癌症。沙利度胺类似物是本领域已知的并包括例如来那度胺、CC-3052、CC-4047、CC-5103、IMiD3、EM12和ENMD0995。

[0013] 因此,在一方面,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,该方法包括向需要此类治疗的受试者给予包含治疗有效量的抗蛋白裂解酶抗体的组合物。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体是M69。

[0014] 在另一方面,本发明提供通过向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的组合物治疗血液恶性肿瘤的方法,该组合物含有与活化蛋白裂解酶的治疗有效量的免疫调节剂组合的抗蛋白裂解酶抗体。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体是M69。在一些实施例中,该免疫调节剂是沙利度胺或其类似物。

[0015] 在另一方面,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,通过向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量组合物,该组合物含有在抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂之间的免疫缀合物。在一些实施例中,该细胞毒性剂选自阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF))、和奥瑞斯他汀PE、卡里奇霉素和蓖麻毒蛋白。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAE。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAF。在一些实施例中,该细胞毒性剂与抗蛋白裂解酶抗体共价连接。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体是M69。因此,在一些实施例中,该免疫缀合物是与M69共价连接的MMAE。在其他实施例中,该免疫缀合物是与M69共价连接的MMAF。

[0016] 在另一方面,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,通过向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的组合物,该组合物含有在抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂之间的免疫缀合物,该细胞毒性剂与活化蛋白裂解酶的治疗有效量的免疫调节剂组合。在一些实施例中,该细胞毒性剂选自阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括单甲基奥

瑞斯他汀E (MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F (MMAF))、和奥瑞斯他汀PE、卡里奇霉素和蓖麻毒蛋白。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAE。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAF。在一些实施例中,该细胞毒性剂与抗蛋白裂解酶抗体共价连接。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体是M69。因此,在一些实施例中,该免疫缀合物是与M69共价连接的MMAE。在其他实施例中,该免疫缀合物是与M69共价连接的MMAF。在一些实施例中,该免疫调节剂是沙利度胺或其类似物。因此,在一些实施例中,该方法包括给予与沙利度胺或沙利度胺类似物组合的治疗有效量的M69-MMAE免疫缀合物。在其他实施例中,该方法包括给予与沙利度胺或沙利度胺类似物组合的治疗有效量的M69-MMAF免疫缀合物。在其他实施例中,该方法包括给予与沙利度胺或沙利度胺类似物组合的治疗有效量的M69-奥瑞斯他汀PE免疫缀合物。

[0017] 在另一方面,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,该免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体和细胞毒性剂。

[0018] 在另一方面,本发明提供含有选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物的组合物,根据以上描述的实施例中的任一项。

[0019] 在另一方面,本发明提供通过使含有来自哺乳动物的血液细胞的测试样品与抗蛋白裂解酶抗体接触,并检测抗体与蛋白裂解酶之间的络合物的形成来诊断血液恶性肿瘤的方法,其中络合物的形成是恶性肿瘤的象征。

[0020] 在另一方面,本发明提供通过用根据以上描述的实施例中的任一项的抗蛋白裂解酶抗体或免疫缀合物治疗造血细胞来抑制表达蛋白裂解酶的造血细胞的生长的方法。

[0021] 在另一方面,本发明提供用于检测哺乳动物的组织或细胞中蛋白裂解酶的表达的测定试剂盒,该测定试剂盒含有根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物。

[0022] 在另一方面,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的试剂盒,该试剂盒包含根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物。

[0023] 在另一方面,本发明提供根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物用于治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的用途。

[0024] 在另一方面,本发明提供根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物用于制造用于治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的药物的用途。

[0025] 通过参考以下附图和详细说明,将更好地理解本发明的这些和其他方面。

附图说明

[0026] 图1A-D代表人类淋巴瘤和骨髓瘤细胞中的蛋白裂解酶和HAI-1的蛋白质分析。图(A)中的细胞系包括Hs 445 (泳道2)、HuT 78 (泳道3)、Farage (泳道4)、Raji (泳道5)、Daudi (泳道6)、Namalwa (泳道7)、Ramos (泳道8)、ST486 (泳道9)、SU-DHL-4 (泳道10)、SU-DHL-6 (泳道11)、OCI-LY-3 (泳道12)、RPMI-8226 (泳道13)。图(B)中的细胞系包括HL-60 (泳道2)、Reh (泳道3)、Jurkat (泳道4)、SUP-T1 (泳道5)、CCRF-CEM (泳道6)、CCRF-HSB-2 (泳道7)、MOLT-3 (泳道8)、MOLT-4 (泳道9)、CCRF-SB (泳道10)、RS4-11 (泳道11)、THP-1 (泳道12)、U937 (泳道13)。图(C)显示了在如指示的三种MM细胞系中蛋白裂解酶水平的评估。GAPDH作为内部对照。图(D)显示了用蛋白裂解酶mAb M24、HAI-1mAb M19、和活化的蛋白裂解酶M69染色的石蜡包埋的多发性骨髓瘤的组织切片,分别如指示的。

[0027] 图2阐述M24-DOX对MM细胞的细胞毒性作用。将24孔板中的MM细胞(1×10^5 /孔)用

或不用不同浓度的M24-DOX处理48小时。通过Vi-Cell计数仪(贝克曼公司(Beckman))计算细胞数量。误差条表示SEM。统计比较:*,显著低于对照, $p < 0.036$ 。绘制的值代表来自三个独立实验的重复。

[0028] 图3A和B代表细胞内的M24-DOX的内化。将MM.1S细胞暴露于M24-DOX持续不同的时间后,并将细胞固定和染色。通过荧光显微镜观察免疫缀合物。将DAPI用于细胞核染色。

[0029] 图4A-C阐述M24-DOX对正常骨髓间充质细胞的降低的毒性。将骨髓来源的间充质基质细胞(5×10^4 /孔,24孔板)用不同浓度的M24-DOX或游离DOX治疗4天。通过Vi-Cell计数仪确定细胞数量。(A)显示了M24-DOX对基质细胞缺乏细胞毒性;(B)显示了对心肌细胞减少的细胞毒性;以及(C)显示了M24-DOX与DOX和对照的比较。

[0030] 图5阐述了沙利度胺诱导的MM细胞中蛋白裂解酶的活化。如指示的用不同浓度的沙利度胺治疗MM细胞(MM.1S)24小时,随后进行蛋白质分析以使用针对酶的活性形式的特异性单克隆抗体(M69)监测蛋白裂解酶的活化。还使用针对无活性形式酶的mAb(M24)检测潜在形式的蛋白酶。GAPDH作为对照。

[0031] 图6A和B阐述了沙利度胺使MM细胞对M69-DOX,但不对M24-DOX敏感:(A)通过单独使用M69-DOX治疗MM细胞与M69-DOX/沙利度胺组合治疗的比较;以及(B)通过单独使用M24-DOX治疗MM细胞与M24-DOX/沙利度胺组合治疗的比较。

[0032] 图7阐述了沙利度胺诱导的MM细胞中蛋白裂解酶的活化。如指示的用不同浓度的沙利度胺治疗MM细胞(MM.1S)24小时,随后进行蛋白质分析以使用针对酶的活性形式的特异性单克隆抗体(M69)监测蛋白裂解酶的活化。还使用针对无活性形式酶的mAb(M24)检测潜在形式的蛋白酶。GAPDH作为对照。

[0033] 图8阐述靶向活性蛋白裂解酶的M69-DOX缀合物抑制体内乳腺肿瘤生长,通过10mg/Kg和20mg/Kg剂量的M69-DOX治疗与通过2mg/Kg剂量的DOX以及对照的比较。

[0034] 图9阐述了通过用2mg/Kg剂量的DOX以及对照治疗比较,通过10mg/Kg和20mg/Kg剂量的M69-DOX的治疗减少了肿瘤重量。

[0035] 图10阐述与对照相比,通过20mg/Kg和2mg/Kg剂量的M69-DOX治疗期间或通过2mg/Kg剂量的DOX治疗期间小鼠的平均重量。

[0036] 图11阐述利用赖氨酸侧链与PEG₅-DBCO的MMAE与M69之间的缀合。

[0037] 图12阐述在应用图11中描绘的化学步骤之后,免疫缀合物M69-MMAE的MALDI-TOF分析。

[0038] 图13阐述了蛋白裂解酶-MMAE缀合物如何抑制TNBC MDA-MB-468的生长而不引起体重减轻或毒性迹象。将小鼠在右侧用1000万个肿瘤细胞皮下接种。当肿瘤明显(100mm^3 - 200mm^3)时,将小鼠随机分为两组($n=6$),并在通过箭头指示的时间腹膜内给予5mg(M69-MMAE)/kg(方形,底线)免疫缀合物治疗。对照小鼠接受盐水(菱形,顶线)。

[0039] 图14阐述M69-MMAE免疫缀合物针对前列腺癌细胞和非小细胞肺(NSCL)癌细胞中的蛋白裂解酶阳性和阴性细胞的IC₅₀。

[0040] 图15A-C阐述了M69-MMAE免疫缀合物针对三阴性乳腺癌(MDA-MB-468)(A)、非小细胞肺(NSCL)癌细胞(H322)(B)、和前列腺癌细胞(DU145)(C)的体内效力。菱形代表对照,方形线代表在5mg/mL的M69-MMAE,以及对于(B)三角形线表示代表在1mg/mL的M69-MMAE。箭头指示用免疫缀合物治疗的时间。

[0041] 图16阐述了DU145和PC3细胞暴露于如指示的不同浓度的M69-MMAE持续72小时,在pH 7.4(菱形)或pH 6.5(方形)、HCl-酸化的培养基下。活力测量为具有相应培养基的对照孔中细胞活力的百分比。

[0042] 图17阐述将泰索帝(Taxotere)抗性和敏感性前列腺癌细胞、PC3R(菱形)或PC3(方形)用在如指示的不同浓度的M69-MMAE治疗。活力测量为对照孔中细胞活力的百分比。

[0043] 图18阐述了实例11-13中使用的ADC组件的总体设计。八角形代表DBC0单元,箭头代表无铜点击化学。

[0044] 图19阐述了实例11-13中使用的叠氮基-PEG₄-Val-Cit-PABA-MMAE构建体的化学合成。

发明详述

[0045] 虽然蛋白裂解酶主要地由正常上皮细胞和多种上皮来源的癌细胞产生,但根据本发明已经发现,这种膜结合的蛋白酶也存在于血液恶性肿瘤的各种细胞中。本发明提供通过将抗体给予至蛋白裂解酶来治疗恶性血液病的方法。本发明进一步提供抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂的免疫缀合物,以及使用该免疫缀合物用于治疗其中细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法。在本发明的一个优选的实施例中,将奥瑞斯他汀(例如MMAE、MMAF、或奥瑞斯他汀PE)与蛋白裂解酶的单克隆抗体缀合用于靶向骨髓瘤细胞。在一些实施例中,该抗体是M69。因此,在一些实施例中,该免疫缀合物是M69-奥瑞斯他汀,例如M69-MMAE、M69-MMAF、和/或M69-奥瑞斯他汀PE。

[0046] 因此,在第一方面,本发明提供通过向需要此类治疗的受试者给予含有治疗有效量的抗蛋白裂解酶抗体的组合物来治疗血液恶性肿瘤的方法。

[0047] 在此方面的一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该血液恶性肿瘤是包含表达蛋白裂解酶的细胞的癌症。

[0048] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该血液恶性肿瘤选自白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[0049] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该血液恶性肿瘤选自急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(BL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、和多发性骨髓瘤。

[0050] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该血液恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0051] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该血液恶性肿瘤是其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的癌症。

[0052] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是单克隆抗体(mAb)。在一些实施例中,该单克隆抗体是M69。在另外的实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性化合物共价连接。在其他另外的实施例中,细胞毒性化合物是包括MMAE、MMAF和/或奥瑞斯他汀PE在内的奥瑞斯他汀。因此,在一些实施例中,本发明提供通过给予与MMAE、MMAF、和/或奥瑞斯他汀PE缀合的治疗有效量的抗蛋白裂解酶抗体治疗血液恶性肿瘤的方法,并且在另外的实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体是M69。

[0053] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体选自嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体。

[0054] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该组合物进一步包括药学上可接受的载体。

[0055] 在第二方面,本发明提供通过向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的组合物治疗血液恶性肿瘤的方法,该组合物含有与活化蛋白裂解酶的治疗有效量的免疫调节剂组合的抗蛋白裂解酶抗体。在一些实施例中,该免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0056] 在此方面的一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0057] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是特异性活化蛋白裂解酶的抗体。

[0058] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是mAb M69。

[0059] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是抗原结合片段。

[0060] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体选自下组,该组由以下组成:嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体。

[0061] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是单克隆抗体,并且该免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0062] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中将该免疫调节剂给予至受试者持续足够的时间,以便在给予包含抗蛋白裂解酶抗体的组合物之前活化蛋白裂解酶。

[0063] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中该组合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0064] 在第三方面,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,该方法包括向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的组合物,该组合物包含在抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂之间的免疫缀合物。

[0065] 在此方面的一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该血液恶性肿瘤是包含表达蛋白裂解酶的细胞的癌症。

[0066] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是癌症。

[0067] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是蛋白裂解酶阳性的恶性B细胞淋巴瘤或上皮癌。

[0068] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是选自下组的蛋白裂解酶阳性的恶性B细胞淋巴瘤,该组由以下组成:套细胞淋巴瘤(MCL)、伯基特淋巴瘤(BL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBL)。

[0069] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是选自下组的上皮癌,该组由以下组成:前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、脑肿瘤、肾肿瘤、肺肿瘤、结肠肿瘤、膀胱肿瘤、和卵巢肿瘤以及包括甲状腺肿瘤、皮肤肿

瘤、和间皮瘤的其他肿瘤类型。

[0070] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤选自下组,该组由以下组成:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、慢性髓细胞性白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMOL)、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和多发性骨髓瘤。

[0071] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0072] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是单克隆抗体(mAb)。在一些实施例中,该单克隆抗体是M69。

[0073] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是抗原结合片段。在一些实施例中,该抗原结合片段是M69的抗原结合片段。

[0074] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体选自下组,该组由以下组成:嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体。

[0075] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂选自毒素、抗生素、和包含放射性同位素的化合物。

[0076] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂选自阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括MMAE、MMAF、和奥瑞斯他汀PE)、卡里奇霉素、和蓖麻毒蛋白。

[0077] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂是阿霉素(DOX)。

[0078] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂是奥瑞斯他汀。

[0079] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂是MMAE。

[0080] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂是MMAF。

[0081] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂是奥瑞斯他汀PE。

[0082] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤阿霉素难以治疗的癌症。

[0083] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是奥瑞斯他汀难以治疗的癌症。

[0084] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是MMAE难以治疗的癌症。

[0085] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶

性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是MMAF难以治疗的癌症。

[0086] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是奥瑞斯他汀PE难以治疗的癌症。

[0087] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该免疫缀合物是M24-DOX或M69-DOX。

[0088] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该免疫缀合物是M24-奥瑞斯他汀或M69-奥瑞斯他汀。

[0089] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该免疫缀合物是M24-MMAE或M69-MMAE。

[0090] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该免疫缀合物是M24-MMAF或M69-MMAF。

[0091] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该免疫缀合物是M24-奥瑞斯他汀PE或M69-奥瑞斯他汀PE。

[0092] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该细胞毒性剂通过共价键与抗蛋白裂解酶抗体偶联。

[0093] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该受试者是哺乳动物患者。

[0094] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该受试者是人类。

[0095] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该组合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0096] 在第四方面,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,该方法包括向需要此类治疗的受试者给予治疗有效量的组合物,该组合物包含在抗蛋白裂解酶抗体与细胞毒性剂之间的免疫缀合物,该细胞毒性剂与活化蛋白裂解酶的治疗有效量的免疫调节剂组合。

[0097] 在此方面的一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。

[0098] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是抗体特异性活化蛋白裂解酶。

[0099] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是单克隆抗体(mAb)。在一些实施例中,该单克隆抗体是M69。

[0100] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是抗原结合片段。在一些实施例中,该抗原结合片段是M69的抗原结合片段。

[0101] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体选自下组,该组由以下组成:嵌合抗体、人源化抗体和人类抗体。

[0102] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶

性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是mAb M69,且该细胞毒性剂是阿霉素(DOX)。

[0103] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是mAb M69,且该细胞毒性剂是奥瑞斯他汀。

[0104] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是mAb M69,且该细胞毒性剂是MMAE。

[0105] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是mAb M69,且该细胞毒性剂是MMAF。

[0106] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该抗蛋白裂解酶抗体是mAb M69,且该细胞毒性剂是奥瑞斯他汀PE。

[0107] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中该免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0108] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗其中恶性细胞表达蛋白裂解酶的恶性肿瘤的方法,其中将该免疫调节剂是给予至受试者持续足够的时间,以便在给予包含免疫缀合物的组合物之前活化蛋白裂解酶。

[0109] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中:(a) 该恶性肿瘤是多发性骨髓瘤;(b) 免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体和DOX;以及(c) 免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0110] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中(a) 免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体和奥瑞斯他汀;以及(b) 免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0111] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中(a) 免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体和MMAE;以及(b) 免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0112] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中(a) 免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体和MMAF;以及(b) 免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0113] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供治疗血液恶性肿瘤的方法,其中(a) 免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体与奥瑞斯他汀PE;以及(b) 免疫调节剂是沙利度胺或沙利度胺类似物。

[0114] 在第五方面,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,该免疫缀合物包含抗蛋白裂解酶抗体和细胞毒性剂。

[0115] 在此方面的一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中该抗蛋白裂解酶抗体识别在癌细胞表面表达的抗原。

[0116] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中该抗蛋白裂解酶抗体是单克隆抗体(mAb)。在一些实施例中,该单克隆抗体是M69。

[0117] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中该抗蛋白裂解酶抗体是抗原结合片段。在一些实施例中,该抗原结合片段是M69的抗原结合片段。

[0118] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中该抗蛋白裂解酶抗体选自下组,该组由以下组成:嵌合抗体、人源化抗

体和人类抗体。

[0119] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中该抗蛋白裂解酶抗体是单克隆抗体,并且该细胞毒性剂选自下组,该组由以下组成:阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括MMAE、MMAF、和奥瑞斯他汀PE)、卡里奇霉素和蓖麻毒蛋白。

[0120] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中该缀合物通过抗蛋白裂解酶抗体与DOX部分之间的共价键而形成。

[0121] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子与DOX的高达15个分子偶联。

[0122] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子与DOX的约5个至10个分子偶联。

[0123] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子与DOX的7个分子偶联。

[0124] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中该缀合物通过抗蛋白裂解酶抗体与奥瑞斯他汀部分之间的共价键而形成。

[0125] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子与奥瑞斯他汀(包括MMAE、MMAF、和/或奥瑞斯他汀PE)的高达10个分子偶联。

[0126] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子约奥瑞斯他汀(包括MMAE、MMAF、和/或奥瑞斯他汀PE)的约5个至10个分子偶联。

[0127] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子与奥瑞斯他汀(包括MMAE、MMAF、和/或奥瑞斯他汀PE)的约3个至5个分子偶联。

[0128] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子与奥瑞斯他汀(包括MMAE、MMAF、和/或奥瑞斯他汀PE)的约3个分子偶联。

[0129] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,其中将抗蛋白裂解酶抗体的一个分子与奥瑞斯他汀(包括MMAE、MMAF、和/或奥瑞斯他汀PE)的约1个至3个分子偶联。

[0130] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,当不存在抗蛋白裂解酶抗体给药时,该免疫缀合物与细胞毒性剂相比具有降低的或没有心脏毒性。

[0131] 在此方面的另一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,该免疫缀合物对不表达蛋白裂解酶的骨髓来源的间充质基质细胞具有最小化或没有不利影响。

[0132] 在另一方面,本发明提供包含免疫缀合物的组合物,该免疫缀合物选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞,根据以上在第五方面描述的实施例中的任一项。

[0133] 在此方面的一个实施例中,本发明提供选择性地靶向表达蛋白裂解酶的癌细胞的免疫缀合物,该免疫缀合物进一步包含药学上可接受的载体。

[0134] 在另一方面,本发明提供包含接头的免疫缀合物。在一些实施例中,该抗体包含抗蛋白裂解酶抗体。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体包含M69。在一些实施例中,包含接头的该免疫缀合物包含治疗剂。在一些实施例中,该治疗剂是根据本披露的任何治疗剂。在一些实施例中,该治疗剂包含奥瑞斯他汀。在一些实施例中,该治疗剂包含MMAE。

[0135] 在一些实施例中,该接头包含可裂解的连接部分。在一些实施例中,该可裂解的连接部分包含Cit-Val连接部分。在一些实施例中,该可裂解的接头包含Phe-Lys连接部分。在一些实施例中,该可裂解的连接部分可通过Capthesin B裂解。

[0136] 在一些实施例中,该接头与抗体的表面缀合。在一些实施例中,该抗体包含抗蛋白裂解酶抗体。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体包含M69。在一些实施例中,该接头与暴露的氨基酸残基共价结合。在一些实施例中,该暴露的氨基酸残基包含半胱氨酸。在另外的实施例中,该接头通过巯基-马来酰亚胺偶联与半胱氨酸共价结合。在一些实施例中,该暴露的氨基酸残基包含赖氨酸。在另外的实施例中,该接头通过由酰化形成的酰胺键与赖氨酸共价结合。

[0137] 在一些实施例中,该接头包含第一连接组分和第二连接组分。在一些实施例中,该第一连接组分与抗体的表面缀合,根据本披露的任何方面。在一些实施例中,该第一连接组分与第二连接组分连接。在一些实施例中,该第一连接组分通过点击化学与第二连接组分连接。在一些实施例中,该第一连接组分通过三唑部分与第二连接组分连接。在一些实施例中,该第二连接组分包含可裂解的连接部分,根据本披露的任何方面。在一些实施例中,该第二连接组分包含治疗剂,根据本披露的任何方面。在一些实施例中,该治疗剂包含细胞毒性剂。在一些实施例中,该细胞毒性剂选自阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF))、卡里奇霉素和蓖麻毒蛋白。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAE。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAF。

[0138] 在一些实施例中,该接头是含PEG的。在一些实施例中,第一连接组分是含PEG的。在一些实施例中,第二连接组分是含PEG的。在一些实施例中,第一连接组分和第二连接组分是含PEG的。

[0139] 在另一方面,本发明提供包含通过氨酸侧链与第一连接组分共价结合的抗蛋白裂解酶抗体和治疗剂的免疫缀合物,该第一连接组分为含PEG的,且该第一连接组分通过三唑部分与第二连接组分结合,具有可裂解的连接部分的第二连接组分,且该第二连接组分为含PEG的。在一些实施例中,该抗蛋白裂解酶抗体包含M69。在一些实施例中,该第一连接组分含有在1个与10个之间的PEG单元。在一些实施例中,该第二连接组分含有在1个与10个之间的PEG单元。在一些实施例中,该可裂解的连接部分包含Val-Cit部分。在一些实施例中,该可裂解的连接部分包含Phe-Lys部分。在一些实施例中,该治疗剂包含细胞毒性剂。在一些实施例中,该细胞毒性剂选自阿霉素(DOX)、奥瑞斯他汀(包括单甲基奥瑞斯他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞斯他汀F(MMAF))、卡里奇霉素和蓖麻毒蛋白。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAE。在一些实施例中,该细胞毒性剂是MMAF。

[0140] 在另一方面,本发明提供诊断血液恶性肿瘤的方法,该方法包括使含有来自哺乳动物的血液细胞的测试样品与抗蛋白裂解酶抗体接触,并检测抗体与蛋白裂解酶之间的络

合物的形成,其中络合物的形成是恶性肿瘤的象征。

[0141] 在另一方面,本发明提供抑制表达蛋白裂解酶的造血细胞的生长的方法,该方法包括用根据以上描述的实施例中的任一项的抗蛋白裂解酶抗体或免疫缀合物治疗造血细胞。

[0142] 在另一方面,本发明提供用于检测哺乳动物组织或细胞中蛋白裂解酶的表达的测定试剂盒,该测定试剂盒包含根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物。

[0143] 在另一方面,本发明提供用于治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的试剂盒,该试剂盒包含根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物。

[0144] 在另一方面,本发明提供根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物用于治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤。

[0145] 在另一方面,本发明提供使用根据以上描述的实施例中的任一项的免疫缀合物用于制造用于治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的药物。

定义

[0146] 如本文所用,术语“生物样品”是指包含来自受试者(优选地人类受试者)的体液、细胞或组织的样品。样品也可以是自然地或通过人工方法(例如手术方式)与恶性细胞或癌前病变的细胞接触的体液。

[0147] 如本文所用,术语“蛋白裂解酶的表达”等是指包含表达一种或多种蛋白裂解酶形式的一种或多种细胞的任何生物样品。

[0148] 如本文所用,术语“受试者”是指动物,优选地哺乳动物,以及最优选地人类。

[0149] 如本文所用,术语“抗体”是指完整的未损的抗体、以及Fab片段和F(ab)、其片段。完整的未损的抗体包括单克隆抗体,如鼠单克隆抗体(mAb)、嵌合抗体、人源化抗体、和人类抗体。

[0150] “抗体片段”可以通过已知的方法来制备,例如由Goldenberg、美国专利号4,036,945和4,331,647披露的及其中包含的参考文献。抗体片段的另一种形式是编码互补决定区(CDR)的肽。CDR是抗体可变区的区段,其在结构上与抗体所结合的表位互补,并且比可变区的其余部分更可变。CDR肽可以通过构建编码目标抗体的CDR的基因来获得。例如,通过使用聚合酶链式反应从产生抗体的细胞的RNA合成可变区来制备这些基因。

[0151] 如本文所用,术语“免疫缀合物”是指抗体组分与分子或治疗剂或诊断剂的缀合物。该治疗剂或诊断剂可包含放射性或非放射性标记。用于制备免疫缀合物的抗体包括但不限于单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、和人类抗体。本文,优选的免疫缀合物是蛋白裂解酶单克隆抗体与细胞毒性剂之间的缀合,并且更优选的免疫缀合物是包含蛋白裂解酶单克隆抗体和FDA-批准的抗癌剂(包括但不限于阿霉素(DOX) 奥瑞斯他汀、卡里奇霉素、蓖麻毒蛋白)的免疫缀合物。

[0152] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指抑制或预防细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括化学治疗剂(如甲氨蝶呤、亚德里亚霉素(adriamycin)、长春花生生物碱(长春新碱、长春花碱、依托泊苷)、阿霉素、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、红比霉素)或其他嵌入剂、酶及其片段(如溶核酶)、抗生素、和毒素(如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物源的酶促的活性毒素,包括其片段和/或变体)以及以下披露的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。该术语还涵盖包含一种或多种放射性同位素(例如,At211、I131、I125、Y90、Re186、

Re188、Sm153、Bi212、P32,以及Lu的放射性同位素)的化合物。

[0153] 如本文所用,术语“阿霉素”(或“DOX”)是指具有(8S,10S)-10-(4-氨基-5-羟基-6-甲基-四氢-2H-吡喃-2-基氧基)-6,8,11-三羟基-8-(2-羟基乙酰基)-1-甲氧基-7,8,9,10-四氢并四苯-5,12-二酮E的系统(IUPAC)化学名称的蒽环类抗生素。

[0154] 如本文所用,术语“奥瑞斯他汀”包括但不限于抗有丝分裂剂单甲基奥瑞斯他汀E(“MMAE”)单甲基奥瑞斯他汀F(“MMAF”),也称为去甲基-奥瑞斯他汀F和奥瑞斯他汀PE。MMAE具有(S)-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羟基-1-苯基丙-2-基)氨基)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代丙基)吡咯烷-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰氨基)丁酰胺的系统的(IUPAC)化学名称。MMAF具有(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-二甲基-2-((S)-3-甲基-2-(甲基氨基)丁酰氨基)丁酰氨基)-3-甲氧基-5-甲基庚酰)吡咯烷-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酰胺)-3-苯基丙酸系统的(IUPAC)化学名称。奥瑞斯他汀PE具有2-[[(2S)-2-(二甲基氨基)-3-甲基丁酰基]氨基]-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-(2-苯基乙基氨基)丙基]吡咯烷-1-基]-5-甲基-1-氧代庚烷-4-基]-N,3-二甲基丁酰胺的系统的(IUPAC)化学名称。

[0155] 如本文所用,术语“载体”是指能够与治疗剂或诊断剂结合以促进药剂向靶细胞的递送的分子或更高度有序的结构。载体可包括如脂质或聚合物的分子(如两亲脂质或碳水化合物),或更高度有序的结构(如胶束、脂质体和纳米颗粒)。

[0156] 本文披露的免疫缀合物或组合物可根据已知方法配制,并可包括一种或多种药学上合适的赋形剂、一种或多种另外的成分、或其组合。

[0157] 本文披露的免疫缀合物或组合物可以配制用于经由例如快速浓注或连续输注而静脉内给药。用于注射的制品可以以单位剂型而存在,例如在添加有防腐剂的安瓿中或在多剂量容器中。组合物可以采取此类形式,如在油性或水性运载体中的悬浮液、溶液或乳液,且可以含有配制剂如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地,该活性成分在使用前可处于粉末形式以与合适的媒介物(例如无菌无热原质水)组构。

[0158] 免疫缀合物或组合物也可以皮下地或甚至通过其他肠胃外途径给予至哺乳动物。而且,可通过连续输注或通过单次或多次推注进行给药。一般而言,给予的免疫缀合物的剂量将取决于如患者的年龄、体重、身高、性别、通常身体状况和先前疾病史的此类因素而变化。

[0159] 可以采用另外的药学方法来控制治疗或诊断缀合物或裸抗体的作用持续时间。可以通过使用聚合物来络合或吸附免疫缀合物或裸抗体来制备控释制剂。

[0160] 如果给予的量是生理学上显著的,则称抗体制剂以“治疗有效量”给予。如果药剂的存在导致受体哺乳动物生理学的可检测变化,包括癌细胞数量的减少、肿瘤大小的减少或肿瘤生长的抑制,则该药剂具有生理学意义。具体地,如果抗体制剂的存在引起抗肿瘤响应或减轻自身免疫疾病状态的体征和症状,则该抗体制剂具有生理学意义。生理上显著的作用还可以是在受体哺乳动物中引起体液和/或细胞免疫响应。

[0161] 应当理解,在给定疗法中使用的药物组合物的实际优选的量将取决于所使用的具体形式、配制的具体组合物、给药方式、具体给药部位、患者体重、一般健康状况、性别等、所治疗的具体适应症等、以及本领域技术人员(包括主治医生或兽医)认可的其他此类因素而

变化。本领域技术人员使用常规剂量确定试验可以容易地确定给定给药方案的最佳给药速率。

免疫缀合物的制备

[0162] 本文描述的免疫缀合物可以通过将抗体与脂质、碳水化合物、蛋白质、或其他分子连接的已知的方法来制备。例如，本文描述的结合分子可以与本文描述的一种或多种载体（例如，脂质、聚合物、脂质体、胶束或纳米颗粒）缀合以形成免疫缀合物，并且该免疫缀合物可以共价地、非共价地或其他并入治疗剂或诊断剂。此外，本文描述的任何结合分子可进一步与本文描述的一种或多种治疗剂或诊断剂或另外的载体缀合。通常，一种治疗剂或诊断剂可以与每种结合分子附接，但是一种以上的治疗剂或诊断剂可以与相同的结合分子附接。此外，治疗剂不需要是相同的，而可以是不同的治疗剂。

[0163] 例如，为了合成抗体与DOX的免疫缀合物，DOX可以首先与琥珀酰亚胺基4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸酯(SMCC)反应，且针对蛋白裂解酶的该抗体可以与N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)反应，随后使这两种中间体偶联。可以用于制备免疫缀合物的另外的接头在下文在标题为“接头(可裂解的和不可裂解的)”的部分讨论。

治疗方法

[0164] 本发明涵盖蛋白裂解酶抗体、或免疫缀合物、或包含蛋白裂解酶抗体或免疫缀合物的组合物作为主要组合物用于治疗包含表达蛋白裂解酶的细胞的恶性肿瘤的用途。恶性肿瘤包括但不限于实体瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、B细胞恶性肿瘤和/或T细胞恶性肿瘤。实体瘤选自下组，该组由以下组成：黑素瘤、癌和肉瘤，并且癌选自下组，该组由以下组成：肾癌、肺癌、肠癌、胃癌和黑素瘤。B细胞恶性肿瘤选自下组，该组由以下组成：无痛形式的B细胞淋巴瘤、侵袭形式的B细胞淋巴瘤、慢性淋巴性白血病、急性淋巴性白血病、以及多发性骨髓瘤、B细胞障碍和其他疾病。具体的，本文描述的组合物可具体地用于治疗各种自身免疫以及无痛形式的B细胞淋巴瘤、侵袭形式的B细胞淋巴瘤、慢性淋巴性白血病、急性淋巴性白血病、多发性骨髓瘤、和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia)。治疗的方法包括向需要此类治疗的哺乳动物给予包含抗体或免疫缀合物的治疗有效量的组合物。

抗体

[0165] 针对蛋白裂解酶的抗体(“抗蛋白裂解酶抗体”)可以通过本领域已知的且披露的方法来制备，例如通过Lin C.Y., 等人, J.Biol.Chem. [生物化学杂志], 1999, 274 (26) : 18237-18242。针对蛋白裂解酶的抗体包括对潜在蛋白裂解酶特异性的抗体、对活化蛋白裂解酶特异性的抗体、识别潜在的或活化的蛋白裂解酶两者的抗体。

[0166] 本发明的抗体及其免疫原性部分以治疗有效的浓度给药，以预防或治疗任何上述的疾病状态。为了实现该目标，可以使用本领域已知的各种可接受的赋形剂配制抗体。典型地，优选地将抗体通过静脉内或腹膜内注射给药。完成此给药的方法是本领域普通技术人员已知的。组合物也可以局部或口服给药，或者使能够透过粘膜。

[0167] 在给患者给药之前，可以将配制品添加到抗体中。液体制剂是优选的。例如，这些配制品可以包括油、聚合物、维生素、碳水化合物、氨基酸、盐、缓冲剂、白蛋白、表面活性剂或填充剂。优选地，碳水化合物包括糖或糖醇，例如单糖、二糖或多糖、或水溶性葡聚糖。糖类或葡聚糖可包括果糖、右旋糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚

糖、短梗霉聚糖、糊精、 α -和 β -环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素、或其混合物。

[0168] 另外,可以通过与聚合物共价缀合来化学修饰抗体,以增加其循环半衰期。优选的聚合物和将它们附接到肽上的方法示于美国专利号4,766,106;4,179,337;4,495,285;和4,609,546中。优选的聚合物是聚氧乙烯化多元醇和聚乙二醇(PEG)。水溶性聚氧乙烯化多元醇也可用于本发明。它们包括聚氧乙烯山梨糖醇、聚氧乙烯葡萄糖、聚氧乙烯甘油(POG)等。

[0169] 本发明的抗蛋白裂解酶抗体可以包含嵌合或人源化抗体。嵌合和人源化抗体均包含最初衍生自非人类物种的抗体,该非人类物种经过化学修饰以增加与人类天然产生的抗体变体的相似性,并因此免疫原性较低。嵌合和人源化抗体均典型地重组产生并在哺乳动物细胞培养物中表达,例如通过CHO细胞。此类技术是本领域技术人员已知的。嵌合抗蛋白裂解酶抗体和人源化抗蛋白裂解酶抗体之间的主要区别在于嵌合抗蛋白裂解酶抗体通常包含用人类Fc区取代单克隆抗体的Fc区,而人源化抗体与人类免疫球蛋白相同(通常称为人抗体“支架”),除了互补决定区(CDR)与原始mAb“互换”外。

[0170] 用于增加循环半衰期的另一种药物递送系统是脂质体。制备脂质体递送系统的方法在以下中讨论:Gabizon等人,Cancer Res.[癌症研究]42:4734-9(1982);Szoka等人,Annu.Rev.Biophys.Bioeng.[生物物理与生物工程年度回顾]9:467-508(1980);Szoka等人,Meth.Enzymol.[酶学方法]149:143-7(1987);以及Langne等人,Pol.J.Pharmacol.[波兰药理学杂志]51:211-22(1999)。其他药物递送系统是本领域已知的。

接头(可裂解的和不可裂解的)

[0171] 本披露的抗蛋白裂解酶抗体(例如M69)可以与治疗剂或诊断剂(例如DOX、奥瑞斯他汀(包括但不限于MMAE/MMAF))共价连接,因此形成免疫缀合物。基于免疫缀合物接头的技术的综述在以下中发现:Jain N等人,Current ADC Linker Chemistry[当前ADC接头化学],Pharm Res.[药学研究]2015年11月;32(11):3526-40,通过引用以其整体结合在此。此类免疫缀合物中的共价连接可包含可裂解的连接部分,例如Val-Cit接头,其可被溶酶体内的组织蛋白酶B裂解。将可商购的Val-Cit接头修饰用于下文实例10。其他可裂解的连接部分可以包含Phe-Lys接头,其也可以被Cathepsin B裂解。一些最简单的可裂解的连接部分包括二硫键桥(S-S),其在还原环境(即细胞内)中是可裂解的。然而,可裂解的连接部分如Val-Cit接头提供比例如二硫键桥更多的特异性,该二硫键可以经受任意的裂解,因此提供了更好的选择,尽管任何这种可裂解的连接部分都被认为是在本发明的范围内。可适用于本发明的可裂解的连接部分的综述在以下中提供:Leriche等人,Cleavable linkers in chemical biology[化学生物学中的可裂解接头]Bioorg Med Chem.[生物有机化学与医药化学]2012年1月15;20(2):571-82,将其通过引用以其整体结合在此。可替代地,该接头可以是不可裂解的。不可裂解的接头比可裂解的接头更多样化,并且可以包含对细胞内环境中的裂解具有抗性的任何连接部分。例如,可能感兴趣的特定的不可裂解的接头包含SMCC接头,其在FDA批准的免疫缀合物曲妥珠单抗(emtansine)(商品名Kadcyla)中发现,并且还在下文的实例2中用于制备M69-DOX免疫缀合物。

[0172] 本披露的接头(以及与治疗剂结合的所述接头)可以直接与抗体缀合,即,与免疫球蛋白共价连接。共价连接可以直接发生在包含免疫球蛋白骨架的氨基酸之一上,理想地

位于恒定结构域之一内,与可变结构域内的相反。此类氨基酸可以是天然存在的(例如天然存在的赖氨酸或半胱氨酸残基),或者免疫球蛋白可以是人工突变的(例如非天然存在的赖氨酸或半胱氨酸残基),为了提供使接头连接具有最小的空间位阻的最佳的结合位点。可替代的,该接头可以与翻译后修饰的免疫球蛋白上发现的化学部分结合(例如与N-葡聚糖结合)。

[0173] 大多数免疫缀合物利用接头与位于抗体骨架中的半胱氨酸残基直接附接。这些接头被称为“马来酰亚胺型接头”,并利用与半胱氨酸(Cys)中发现的巯基侧链的反应性。两种最常见的马来酰亚胺接头包括马来酰亚胺己酰基(mc)和马来酰亚胺甲基环己烷-1-羧酸酯(mcc)接头。马来酰亚胺接头的缺点是在血浆中的不稳定性,包括逆-迈克尔反应,其导致药物-接头从免疫缀合物中过早损失。不同类型的直接缀合,以及下文实例10中使用的一种,是经由酰化与赖氨酸(Lys)侧链的 ϵ -氨基侧链直接缀合的(在接头和抗体之间产生酰胺键),其中接头由活化的羧基而不是叠氮官能团组成。

[0174] 可以使用如本文描述的两步缀合技术将接头和治疗剂于抗体缀合。此两步缀合技术可以利用“点击化学”,尤其是无铜点击化学。在抗体缀合中使用点击化学可以提供若干独特的益处,例如,基于UV的检测形成的点击环系统用于反应监测和ADR确定。接头最初可以由两种不同的连接组分组成,例如(但不是必须的)含有酰化剂(例如羧酸,酰卤或酸酐)(其与位于免疫球蛋白骨架中的赖氨酸侧链缀合(即,酰化作用)并进一步含有应变的炔烃(strained alkyne)(例如DBCO)的一种连接组分,以及含有叠氮(N_3)与治疗剂的第二连接组分,这使得当第一组分和第二组分彼此接近时,应变的炔烃与叠氮基团反应(形成三唑部分),以将第一连接组分连接到第二连接组分。第一连接部分或第二连接部分可以含有应变的炔烃和/或叠氮基团,反之亦然;即第一连接部分可包含应变的炔烃且第二连接部分包含叠氮基团,或者第一连接部分可以包含叠氮基团且第二连接部分可以包含应变的炔烃。因此,当通过“点击化学”结合时,本披露的接头可包含三唑部分,例如在DBCO与 N_3 的反应之间形成的三唑部分,如图11阐述。

[0175] 因此,在一些实施例中,免疫缀合物的总体结构将包含mAb—第一连接组分—第二连接组分—治疗剂,该第一连接组分经由三唑部分与第二连接组分缀合(通过点击化学形成),且该第一连接组分与位于免疫球蛋白骨架中的氨基酸残基缀合(例如半胱氨酸或优选地赖氨酸,如本文描述的)。在此类实施例中,将可裂解的连接部分并入第一和/或第二连接组分(例如Val-Cit接头)中的任一个中是可能的并显示在图11中。理想地,可裂解的连接部分将位于第二连接组分中(即,连接组分含有治疗剂,例如MMAE和/或MMAF)。

[0176] 在本披露的免疫缀合物中的接头可以是PEG基接头。例如,并且在图11中显示,在一些实施例中,第一连接组分和第二连接组分(并因此整个接头)均含有聚(乙烯)乙二醇(PEG)重复。与不含PEG的接头相比,PEG基接头可提供明显数量的优点。例如,PEG基接头可以提供更大的灵活性,因此,例如,在接头与抗原结合结构域(例如高变区)非常接近的氨基酸残基缀合的情况下,接头/治疗剂与抗原/受体的表面元件结合或相互作用的可能性降低,从而使整体免疫缀合物更具治疗效果。另外,在通过点击化学(例如使用DBCO和 N_3)产生接头的这样的实施例中,虽然不希望受理论束缚,但是在连接组分中使用PEG可以充当间隔物以防止在三唑部分中发现的四环结构与任何暴露的芳族侧链(尤其是色氨酸侧链)之间的非特异性相互作用(π - π 相互作用)。本披露的PEG基接头可以包含在利用第一连接组分和

第二连接组分的此类实施例中的每个第一连接组分和第二连接组分的每个中总共在1个至20个PEG单元之间(例如在1个至10个PEG单元之间)的任何地方的重复。更典型地,第一连接组分和第二连接组分的每个中3个至7个PEG单元。举例来说,下文的实例10显示M69-MMAE免疫缀合物含有用于第一连接组分的5个PEG单元以及用于第二连接组分的4个PEG单元。

奥瑞斯他汀、MMAE、MMAF

[0177] 包括MMAE的奥瑞斯他汀代表一类非常有效的细胞毒性剂。不希望受理论束缚,据信像MMAE这样的奥立抑素通过阻断微管蛋白的聚合来抑制细胞分裂,这对于正确的细胞分裂是关键。因此,如MMAE、MMAF和奥瑞斯他汀PE的化合物被归类为用于抑制有丝分裂的“抗有丝分裂剂”。此类细胞毒性剂的效力是显著的。例如,MMAE的效力比DOX有效100倍至1000倍,尽管DOX适用于本发明。由于这种有效的毒性,MMAE本身不适合作为药物给药。然而,当与抗体(如蛋白裂解酶抗体,例如M69)偶联时,细胞毒性有效负载能够被导向特定的恶性细胞。

[0178] 如上所述,本发明的抗体和组合物优选用于治疗人类患者以预防或治疗任何上述疾病状态。优选的给药途径是肠胃外。在肠胃外给药中,本发明的组合物将被配制成与药学上可接受的肠胃外载体联合的单位剂量可注射形式(如溶液、悬浮液或乳液)。此类载体是固有地无毒和非治疗性的。此类载体的实例是盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液和汉克斯氏液。也可使用非水性运载体,如固定油和油酸乙酯。

[0179] 包括mAb-奥瑞斯他汀和mAb-DOX缀合物的本文披露的抗蛋白裂解酶免疫缀合物,代表用于开发特异性靶向癌细胞的抗癌剂的实例。抗蛋白裂解酶mAb可以与其他类型的细胞毒性剂(如可以与某些类型的肿瘤更好地起作用的抗微管蛋白化合物)相连接,或者可以与裂解体或纳米颗粒偶联以用于任何类型的药剂(包括肽,shRNA/siRNA)的靶向递送和非常有毒的化合物,由于严重的副作用在癌症治疗中几乎没有潜力。

[0180] 以下非限制性实例进一步阐述本发明的某些方面。

实例

实例1

蛋白裂解酶在多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤细胞中的表达

[0181] 通过蛋白质印迹分析一组24个人类造血系统恶性肿瘤细胞系的蛋白裂解酶及其内源性抑制剂HGF活化剂抑制剂-1或HAI-1(图1)。从24个造血癌细胞(泳道2-14)和T-47D乳腺癌细胞(泳道1)制备细胞裂解物。通过SDS-PAGE解析等量的蛋白质。如指示的,使用抗蛋白裂解酶mAb和抗HAI-1mAb通过免疫印迹分析评估蛋白裂解酶和HAI-1的水平(图1A和1B)。

[0182] 蛋白裂解酶在大多数B细胞淋巴瘤以及多发性骨髓瘤细胞中表达,表明蛋白酶是这些癌症的重要标志物。相比之下,淋巴瘤和骨髓瘤中HAI-1水平似乎远低于癌症中的HAI-1水平,并且在高度侵袭性淋巴瘤中HAI-1表达通常缺失(表1)。

[0183] 为了进一步验证蛋白裂解酶在多发性骨髓瘤细胞中的表达,检测了六例石蜡包埋的MM样本。在四例中蛋白裂解酶为阳性,其中两例为HAI-1阳性且其他两例为阴性(图1D)。

[0184] 评估多发性骨髓瘤的中细胞系的蛋白裂解酶水平(图1C)。所有这三种MM细胞均产生蛋白酶。

实例2

DOX-免疫缀合物的制备

[0185] 通过使用蛋白质-蛋白质偶联试剂盒(英杰公司(Invitrogen)),根据制造商的说明书并具有某些微小修改,将针对蛋白裂解酶的单克隆抗体(M24或M69,获得自:CY Lin, University of Maryland, Baltimore, Md. [美国马里兰大学,巴尔的摩,马里兰州];Lin C.Y.等人, J.Biol.Chem. [生物化学杂志], 1999, 274 (26): 18237-18242; Chen, Y.W. 等人, J.Biol.Chem. [生物化学杂志], 2010, 285 (41): 31755-31762)与DOX(西格玛公司(Sigma))缀合。简而言之,在室温伴随不断搅拌,将DOX与交联剂SMCC(琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)在1:3与1:1.5 (DOX:SMCC)之间的摩尔比(MR)反应1小时。使约200mg M24mAb与SPDP(琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯)在室温反应1小时,然后使用离心过滤装置(Ultrafree, 密理博(Millipore))进行磷酸盐缓冲剂的交换。可替代地,可以通过Sephadex G50凝胶过滤将mAb与游离SPDP分离。然后将DOX马来酰亚胺衍生物与硫醇化的M24或M69mAb在室温缀合3小时,然后在磷酸盐缓冲液中透析以除去游离的DOX。如果制备规模是大于1克蛋白质,使用Sephadex G50进行凝胶过滤也可用于去除未偶联的DOX。通过荧光和蛋白质浓度测量DOX来确定蛋白质与DOX的摩尔比。

[0186] 由于DOX通过UV激发发射荧光,因此基于免疫缀合物产生的荧光测量DOX与抗体的偶联。1 μ g/ml的M24-DOX与在25nM的DOX大约具有相同的荧光强度。因此,1分子的mAb与近7分子的DOX偶联。

表1:在人类淋巴瘤和白血病细胞中表达的蛋白裂解酶和HAI-1的总结

细胞系	细胞类型	疾病/来源	病毒*	蛋白裂解酶	<i>HAI-1</i>
HL-60	早幼粒细胞	AML	—	—	+/-
Reh	淋巴母细胞	ALL	—	—	+++
Jurkat	T淋巴母细胞	ALL	—	—	+
SUP-T1	T淋巴母细胞	LL	—	+++	—

CCRF-CEM	T 淋巴母细菌	ALL	—	—	+ / —
CCRF-HSB-2	T 淋巴母细菌	ALL	—	—	++
MOLT-3	T 淋巴母细菌	ALL	—	—	—
MOLT-4	T 淋巴母细菌	ALL	—	—	—
CCRF-SB	B-淋巴母细胞	ALL	EBV+	—	+ / —
RS4;11	B-淋巴母细胞	ALL	—	—	+ / —
THP-1	单核细胞	急性单核细胞性白血病	—	++	+ / —
U-937	单核细胞	组织细胞淋巴瘤	—	—	—
Hs 445	B-淋巴母细胞	HL	EBV+	—	+ / —
HuT 78	皮肤 T 淋巴细胞	塞扎莱综合征	—	—	++
Farage	B-淋巴母细胞	EBV 转化的 B 细胞淋巴瘤	EBV+	+ / —	—
RPMI 8266	B-淋巴母细胞	MM	—	++++	+
Daudi	B-淋巴母细胞	BL	EBV+	++++	—
Namalwa	B-淋巴母细胞	BL	EBV+, SMRV+	++++	—
Raji	B-淋巴母细胞	BL	EBV+	++	—
Ramos	B-淋巴母细胞	BL	—	++++	—
ST486	B-淋巴母细胞	BL	—	++++	—
SU-DHL-4	B-淋巴母细胞	DLBL	—	++++	+ / —
SU-DHL-6	B-淋巴母细胞	DLBL	—	++++	+ / —
OCI-LY-3	B-淋巴母细胞	DLBL	—	++++	+ / —

[0187] 缩写: AML, 急性髓细胞性白血病; ALL, 急性淋巴细胞白血病; BL, 伯基特淋巴瘤; DLBL, 弥漫性大B细胞淋巴瘤; EBV, EB病毒; HL, 霍奇金氏淋巴瘤; LL, 淋巴细胞白血病; MM, 多发性骨髓瘤; SMRV, 松鼠猴逆转录病毒。

实例3

M24-DOX对多发性骨髓瘤细胞的细胞毒性

[0188] 为了评估免疫缀合物的细胞毒性作用, 将MM细胞用不同浓度的缀合的DOX治疗48小时。免疫缀合物以剂量依赖性方式抑制细胞增殖。免疫缀合物的EC50是5 μ g/ml (蛋白质)。用200nM的游离DOX治疗也观察到这种细胞毒性作用。基于荧光强度, 由于M24-DOX在5 μ g/ml的浓度相当于250nM的游离DOX, 因此缀合的DOX的效力与游离药物相似。将细胞暴露于未修饰的抗体对细胞生长没有影响, 证明M24-DOX诱导的细胞毒性作用是通过DOX活性介导的。还测试了包括OPM-2和RPMI-8226的两种其他MM细胞系的M24-DOX的细胞毒性活性, 如图2所示, 其中将24孔板中的MM细胞 (1×10^5 /孔) 用或不用不同浓度的M24-DOX处理48小时。通过

Vi-Cell计数仪(贝克曼公司(Beckman))计算细胞数量。

[0189] 两种类型的细胞也以与MM.1S相似的方式对药物起反应。

实例4

M24-DOX的核定位。

[0190] 为了证明MM.1S细胞中DOX的免疫缀合物的内化,将荧光显微术用于追踪细胞暴露于药物不同时间段后M24-DOX的亚细胞定位。将MM.1S细胞暴露于M24-DOX持续不同的时间后,将细胞固定和染色。通过荧光显微镜观察免疫缀合物。将DAPI用于细胞核染色。

[0191] 在暴露M24-DOX中3min后,在少量细胞中检测到痕量的核荧光。随着孵育时间长于30min,荧光染色细胞的数量和核中定位的信号强度均显著增加(图3A)。具有更高放大率的图片显示暴露于药物的细胞核肿胀60min或更长,表明典型的DOX诱导的细胞凋亡(图3B)。这些数据表明,在与抗原结合后,免疫缀合物迅速内化,并且在处理10min后观察到DOX的显著核定位。

实例5

骨髓间充质干细胞(MSC)对M24-DOX的耐受性。

[0192] 将缺乏蛋白裂解酶表达的人类骨髓来源的MSC用作对照以确定M24-DOX的细胞毒性选择性,如图4中所示,其中将骨髓来源的间充质基质细胞(5×10^4 /孔,24孔板)用不同浓度的M24-DOX或游离DOX处理4天。通过Vi-Cell计数仪确定细胞数量。

[0193] MSC对浓度高达20 μ g/ml的免疫缀合物不敏感,而游离DOX在5nM时能显著抑制细胞增殖。蛋白裂解酶的表达主要限于正常组织中的上皮细胞。心肌细胞中不存在这种蛋白酶表明M24-DOX将显示出显著降低的心脏毒性。

实例6

靶向活性蛋白裂解酶

[0194] DOX还与另一种特异性结合酶的活性双链的蛋白裂解酶mAb(M69)缀合。虽然在大多数乳腺肿瘤中发现了活性的蛋白裂解酶水平,但在乳腺的正常组织中几乎检测不到蛋白酶的活性形式(图5)。这些数据表明,与M69的DOX-缀合物(称为M69-DOX)在关于对正常组织的毒性方面靶向表达活化的蛋白裂解酶的肿瘤提供了另外的选择性。由于上皮组织表达蛋白裂解酶,M24-DOX对健康组织的毒性是个问题。例如,由于相当大的胃肠道(GI)毒性,先前在癌细胞中靶向Lewis-Y抗原的称为BR96的DOX-缀合物在II期试验中失败(Tolcher, A.W. 等人, J. Clin. Oncol. [临床肿瘤学杂志], 1999, 17:478-484)。与上皮组织中潜在形式的蛋白裂解酶的表达相反,通过免疫组织化学几乎不能检测到此蛋白酶的活性形式的水平。因此,M69-DOX对上皮细胞的毒性较小。

实例7

通过沙利度胺增强M69-DOX的细胞毒性作用

[0195] 沙利度胺是用于多发性骨髓瘤治疗的治疗剂,且沙利度胺和地塞米松的联合给药是用于治疗患有多发性骨髓瘤的患者的最常见方案之一,响应率高达60%-70%(Denz, U., Eur. J. Cancer. [欧洲癌症杂志], 2006, 42:1591-1600; Gieseler, F. 等人, Thromb. Haemost. [血栓形成和止血杂志], 2008, 99:1001-1007)。测试了DOX-缀合物与当前MM治疗剂(如沙利度胺)组合的效力。单独M69-DOX本身不如M24-DOX有效。令人惊讶的是,沙利度胺显著增强了M69-DOX治疗对细胞增殖的抑制作用,而M24-DOX的抑制活性没有改变

(图6A-B)。M69-DOX与沙利度胺组合的这种增强的抑制似乎是协同的,因为单独的沙利度胺对MM细胞增殖没有影响(图6A)。因此,这些研究表明沙利度胺导致增强的增殖抑制。

实例8

由沙利度胺诱导的MM细胞中的蛋白裂解酶活化

[0196] 为了检查由沙利度胺和M69-DOX缀合物引起的细胞毒性的增加,我们测量了沙利度胺对活化的蛋白裂解酶表达的影响。在用50 μ M沙利度胺治疗24小时后MM细胞中蛋白裂解酶的活化显著增强(图8)。已知沙利度胺通过干扰MM和骨髓基质细胞之间的相互作用发挥抗血管生成(antiangiogenic)活性,至少部分地通过抑制VGEF生产。虽然沙利度胺似乎对MM细胞的细胞增殖几乎没有影响(图7A-B),但其激活蛋白裂解酶的能力是一个重要的新颖的发现,提出了通过用M69-DOX缀合物靶向活性蛋白裂解酶阳性骨髓瘤细胞来利用MM细胞对沙利度胺治疗来响应的新颖的方法。

实例9

通过M69-DOX靶向活性蛋白裂解酶体内抑制乳腺肿瘤生长

[0197] 为了评估M69-DOX在体内抑制肿瘤生长的效力,使用人类乳腺异种移植肿瘤模型。将携带乳腺肿瘤(MDA-MB468)的NOD/SCID小鼠每周两次用20mg/kg或10mg/kg的M69-DOX治疗,以及用2mg/kg的DOX治疗。虽然在未治疗对照组中小鼠的肿瘤大小在第三周显著增加,但在整个治疗过程中,用任一剂量的M69-DOX治疗的和用DOX治疗的小鼠中的肿瘤生长被显著消除(图8)。当单个mAb与7分子DOX附接时,10mg/kg的M69-DOX的剂量相当于施用0.035mg/kg的DOX。这些结果证明了靶向活化的蛋白裂解酶的DOX缀合物在体内治疗乳腺肿瘤的强效力和功效。

[0198] 用M69-DOX治疗的小鼠中肿瘤质量减少。在疗程结束时,从实验小鼠收集肿瘤块并称重。来自用任一剂量的M69-DOX治疗的以及用DOX治疗的组的肿瘤的平均重量减少至来自未治疗对照组的肿瘤的约50%(图9)。由M69-DOX显著降低肿瘤重量进一步证实了DOX定点递送至表达活化的蛋白裂解酶的肿瘤细胞的功效。

经由M69-DOX治疗的最小毒性

[0199] 与来自未治疗的对照组的那些相比,用M69-DOX或DOX治疗的小鼠的平均重量没有显著降低(小于15%的损失),表明在此剂量下M69-DOX具有良好的耐受性(图10)。20mg/kg的M69-DOX的剂量不会导致明显的毒性,表明药物剂量可以升级到达到最大耐受剂量。

实例10

经由可释放的接头将MMAE与M69mAb偶联以形成缀合物:M69-MMAE。

[0200] MMAE偶联至M69以形成如本文描述的免疫缀合物。可释放的接头技术基于Seattle Genetics' Valine-Citrulline-PABA linker, the original Cathepsin B cleavable linker[Seattle Genetics的Valine-Citrulline-PABA接头,即原始组织蛋白酶B可裂解的接头],如描述在Bioconjugate Chem.[生物共轭化学]2002,13:855-869;Blood[血液]2003,102:1458-1465;Nature Biotech.[自然科学],2003,21:778-784,所有这些通过引用以其整体结合在此。通过(i)两步聚乙二醇化、(ii)经由无铜点击化学的缀合、和(iii)酰化mAb的赖氨酸侧链而不是半胱氨酸巯基-马来酰亚胺偶联来修饰缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基醇氨基甲酸酯接头。ADC组件的总体设计描绘在图18中。叠氮基-PEG₄-Val-Cit-PABA-MMAE构建体的化学合成如图19中描绘。本设计使用DBCO和N₃使用无铜点击化学改进了该接

头平台,使得能够在非常温和的条件下以化学计量控制的方式执行关键的药物加载步骤。赖氨酸侧链用于将接头-药物配体缀合到抗体表面上,而不是使用暂时还原的半胱氨酸残基的巯基基团(图11)。由于该方法不影响半胱氨酸之间的二硫桥键,因此抗蛋白裂解酶抗体在缀合过程中保持结构完整,消除了错折叠/解离的抗体链丧失活性的问题。此外,在mAb的表面上容易获得赖氨酸侧链,因此不需要减少Cys-Cys二硫桥键,从而消除了mAb的结构不稳定性以及马来酰亚胺缀合后氧化后形成的二硫桥键不匹配的问题。适当的分析程序(HR-MALDI-TOF质谱)证明最近批次的免疫缀合物符合工业标准(图11)。通过在点击化学的两种前体上使用缀合物的药物-接头部分中的PEG间隔物来实现进一步的改进,该点击化学有助于使用甚至非常疏水的药物分子。PEG链足够长以保持mAb和药物分离,降低了非特异性药物和抗体相互作用的可能性,并且接头的PEG₅-PEG₄构型补偿了由无铜点击化学引起的四环体系的疏水性。选择的细胞毒性化合物是单甲基奥瑞斯他汀E、或MMAE。聚乙二醇化的接头的灵活性和长度为组织蛋白酶B切割和释放MMAE提供了高可及性。通过MALDI-TOF质谱监测缀合反应,显示平均MW增加7000Da,其对应于与每mAb分子连接的3.5个药物。

[0201] 为了证明M69-MMAE的细胞毒性效力,评估了免疫缀合物(MDA-MB468)对三阴性乳腺癌的体外细胞毒性效力。乳腺癌细胞对MMAE连接的免疫缀合敏感,其中IC₅₀为3.4μg/ml。由于每个M69分子含有平均3.5个MMAE分子(图11),缀合物中对MMAE的敏感性为1.6nM。此实验还证明免疫缀合物是内化的并且细胞内释放毒素。

实例11

M69-MMAE免疫缀合物的体外细胞毒性

[0202] 为了评估如实例10中描述的M69-MMAE免疫缀合物的体外细胞毒性,将肿瘤细胞,如TNBC(MDA-MB-468、MDA-MB-231和BT549)、前列腺(DU145和PC3)、胰腺(PANC1和MiaPacal)、NSCL(H322和H1299)、卵巢(OVCAR5)、胃(AGS)、和套细胞淋巴瘤(Mino、Jeko、Maver和Z138)癌症暴露于具有如指示的各种浓度的M69-MMAE免疫缀合物中。在连续暴露于免疫缀合物72小时后,通过MTS(普洛麦格公司(Promega))测定评估细胞毒性如下:根据制造商的方案进行MTS比色测定(来自普洛麦格公司(Promega)的CellTiter 96)。将癌症细胞以8000个细胞/孔铺板在96孔板中,并在37℃暴露的M69-MMAE的分级滴定持续72小时。相对于未治疗的对照孔,将活力百分比相对于免疫缀合物浓度作图。每项研究的结果是五次测定的平均值。将M69-MMAE针对这些细胞的IC₅₀的值总结在以下表2中。如所述的,通过MTS比色法用96孔板确定M69-MMAE对指定肿瘤细胞的IC₅₀。考虑到ADC具有3.5MMAE/mAb的化学计量比,将IC₅₀值表示为ADC的平均值(μg/mL)+SD以及MMAE浓度的等效nM。

[0203] 这些癌细胞对免疫缀合物敏感,IC₅₀范围从低单个数字到十位μg/ml的缀合物。虽然胃癌细胞(AGS)对MMAE缀合物非常敏感,IC₅₀低至1.5μg/mL,但是套细胞淋巴瘤细胞(Maver)需要更高浓度(30μg/mL)的缀合物以达到IC₅₀。由于约三分子的MMAE与每个mAb连接,因此IC₅₀值也表示为如指示的携带MMAE浓度。还获得了蛋白裂解酶阴性细胞(如BT549和H1299)的IC₅₀,以证明缀合物的选择性细胞毒性(图14)。蛋白裂解酶阳性和阴性细胞的IC₅₀比例非常显著,范围从18到48(H1299对H322,BT549对MDA-MB231),表明M69-MMAE的选择性的度应该提供最小化副作用的好处。

表2.M69-MMAE对各种癌细胞的IC₅₀

癌症类型	细胞系	IC50 ($\mu\text{g/mL}$), M69-MMAE 浓度	IC50 (nM), MMAE 浓度
乳腺癌	MDA-MB231	2.6 ± 0.09	59.2
	MDA-MB468	3.4 ± 0.30	77.5
	BT549	125.0 ± 10.25	2847.5
前列腺癌	DU145	8.0 ± 3.4	182.2
	PC3	6.8 ± 0.65	154.9
非小细胞肺癌	H322	6.3 ± 0.20	143.5
	H1299	113 ± 5.20	2574.1
卵巢癌	Ovcar5	16.0 ± 0.4	364.5
胰腺癌	PANC1	12.0 ± 0.06	273.4
	MiaPacal	8.0 ± 0.83	182.2
胃癌	AGS	1.5 ± 0.03	34.2
套细胞淋巴瘤	Mino	6.2 ± 0.18	141.2
	JeKo-1	13.9 ± 3.9	316.6
	Z138	19.0 ± 1.9	432.8
	Maver	30.0 ± 2.8	683.4

实例12

涉及M69-MMAE免疫缀合物的体外异种移植研究

[0204] 使用如实例10中描述的M69-MMAE免疫缀合物进行中试异种移植研究。在测试嵌合M69-MMAE缀合物之前,在裸鼠中用每周腹膜内施用x3、10mg/kg小鼠缀合物(N=6)进行毒性研究。没有体重减轻或毒性迹象,表明构建体稳定并且不靶向正常组织。基于该信息,将携带人三阴性乳腺肿瘤MDA-MB-468的小鼠用M69-MMAE免疫缀合物治疗。图13显示缀合物对这种三阴性乳腺癌重要地具有有效的抗癌活性;在动物中没有体重减轻或其他毒性证据,表明没有显著的游离药物从缀合物释放到循环中。由于这是小鼠中的小鼠抗体,因此不期望对蛋白裂解酶的抗体响应。图14显示对照小鼠和用M69-MMAE免疫缀合物治疗的小鼠的中值肿瘤体积(以 mm^3 计)的结果;相对于用M69-MMAE治疗的那些,在对照组中观察到肿瘤大小的显著增加。

[0205] 基于这些结果,需要进一步的体内异种移植研究。进行这些另外的异种移植研究以评估M69-MMAE对各种类型癌症的体内效力。用胰蛋白酶溶液在指数生长期收获TNBC(MDA-MB-468和MDA-MB-231)、前列腺癌细胞(DU145)、和NSCL癌细胞(H322)并用PBS洗涤。将在100 μl 的PBS悬浮液中的活细胞(7×10^6)与100 μl 的人工基底膜(Matrigel)(BD生物科学公司(BD Biosciences))混合,并在动物的右侧皮下注射。一旦肿瘤可触知,将小鼠随机分成每组六只小鼠的治疗组。动物每两周腹膜内注射5mg/kg M69-MMAE或1mg/kg M69-MMAE。将肿瘤尺寸用数字卡尺测量,并使用式 $4/3\pi \times \text{长度} \times \text{宽度}^2$ 计算。结果显示通过M69-MMAE的治疗有效消退三阴性乳腺肿瘤(MDA-MB468和MDA-MB-231)(图15A)。与载体对照之一相比,NSCL和前列腺癌小鼠的肿瘤生长也极大地减轻(图15B、C)。M69-MMAE的抗肿瘤活性在低至1mg/kg的剂量下仍然有效(图15B)。令人惊讶的是,在动物中没有体重减轻或其他毒性证据,表明没有显著的游离药物从缀合物释放到循环中(图15A)。

实例13

在酸性细胞外pH下,前列腺癌细胞对M69-MMAE更敏感

[0206] 蛋白裂解酶的活化通过酸中毒诱导。因此,表达活化的蛋白裂解酶的癌细胞由于抗原水平增加而在酸性条件下对实例10中描述的M69-MMAE免疫缀合物的细胞毒性作用更敏感。这通过实验证明,其中DU145和PC3前列腺癌细胞在pH 6.5条件下用HCl酸化培养基对免疫缀合物变得更敏感。对于DU145和PC3细胞,IC₅₀分别从8μg/ml降至1μg/ml、从6.8μg/mL降至小于2μg/mL(图16)。酸性条件的暴露仅维持约30min,因为培养基的碳酸盐缓冲在CO₂培养箱中1小时后逐渐升高pH。

[0207] 肿瘤微环境的特征在于酸性细胞外pH(pHe),这是由于癌细胞的高乙醇酸活性导致的乳酸积累而不管氧化条件(也称为“瓦伯格效应”的现象)。越来越多的证据表明,高乳酸水平是肿瘤侵袭和转移过程以及肿瘤复发的主要驱动力。因此,M69-MMAE允许将有效毒素选择性递送至在酸性环境中表达活化的蛋白裂解酶的癌细胞(例如前列腺癌细胞)中。

实例14

泰索帝(taxotere)抗性前列腺癌细胞(PC3R)对M69-MMAE敏感

[0208] 为了确定如实例10中描述的M69-MMAE免疫缀合物对化疗抗性癌细胞的体外效力,将泰索帝抗性细胞用缀合物处理。尽管对有丝分裂抑制具有抗性,但PC3R细胞与亲本PC细胞对MMAE缀合物一样敏感(图17)。这突出了M69-MMAE如何有效治疗具有化疗抗性的前列腺癌患者。

[0209] 本领域技术人员将理解,在不脱离本发明的范围和精神的情况下,可以进行许多和各种修改。因此,应该理解的是,本文描述的本发明的各种实施例仅是说明性的,并不旨在限制本发明的范围。在此所引用的所有文献通过引用以其全文而结合。

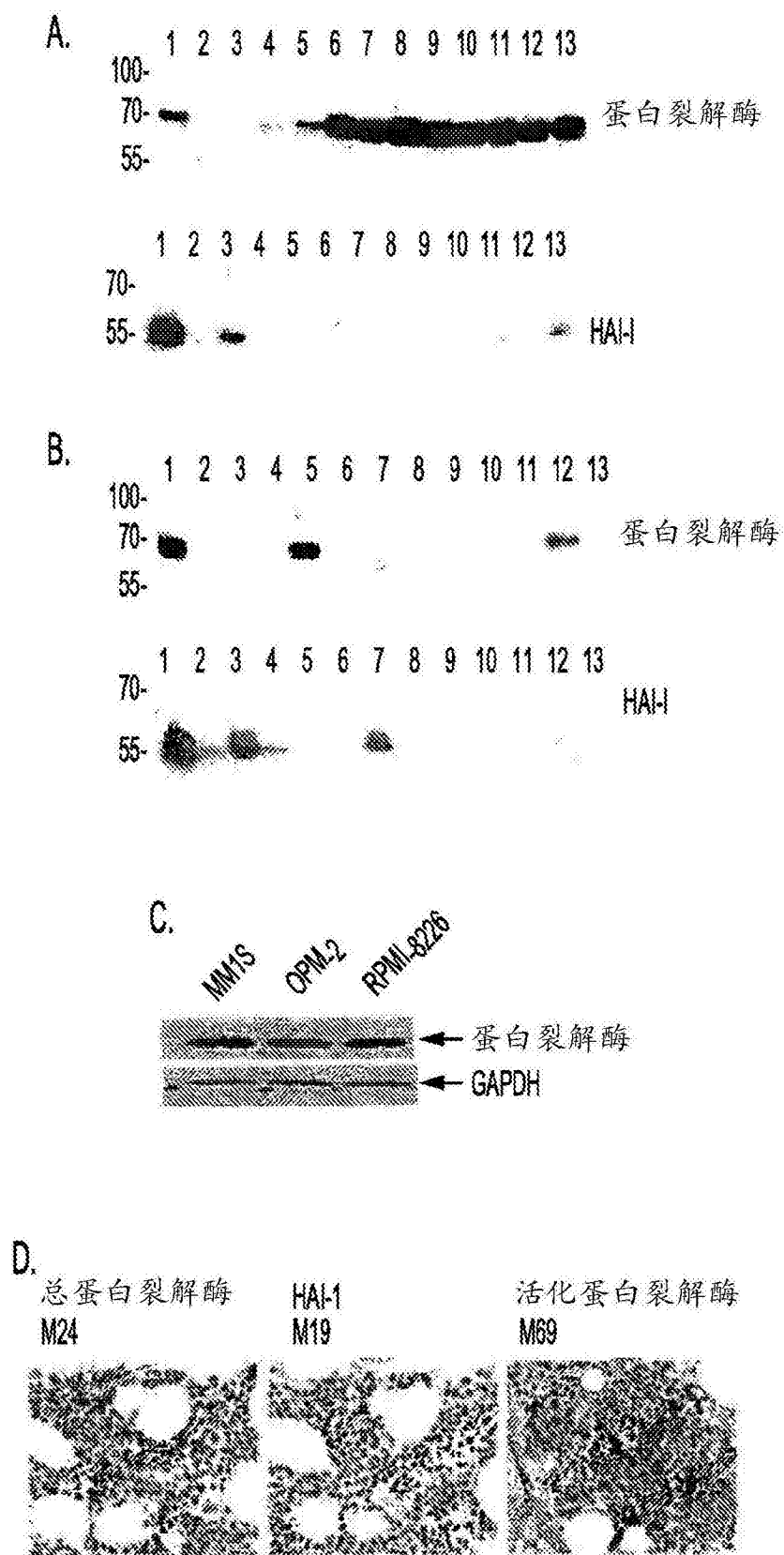


图1

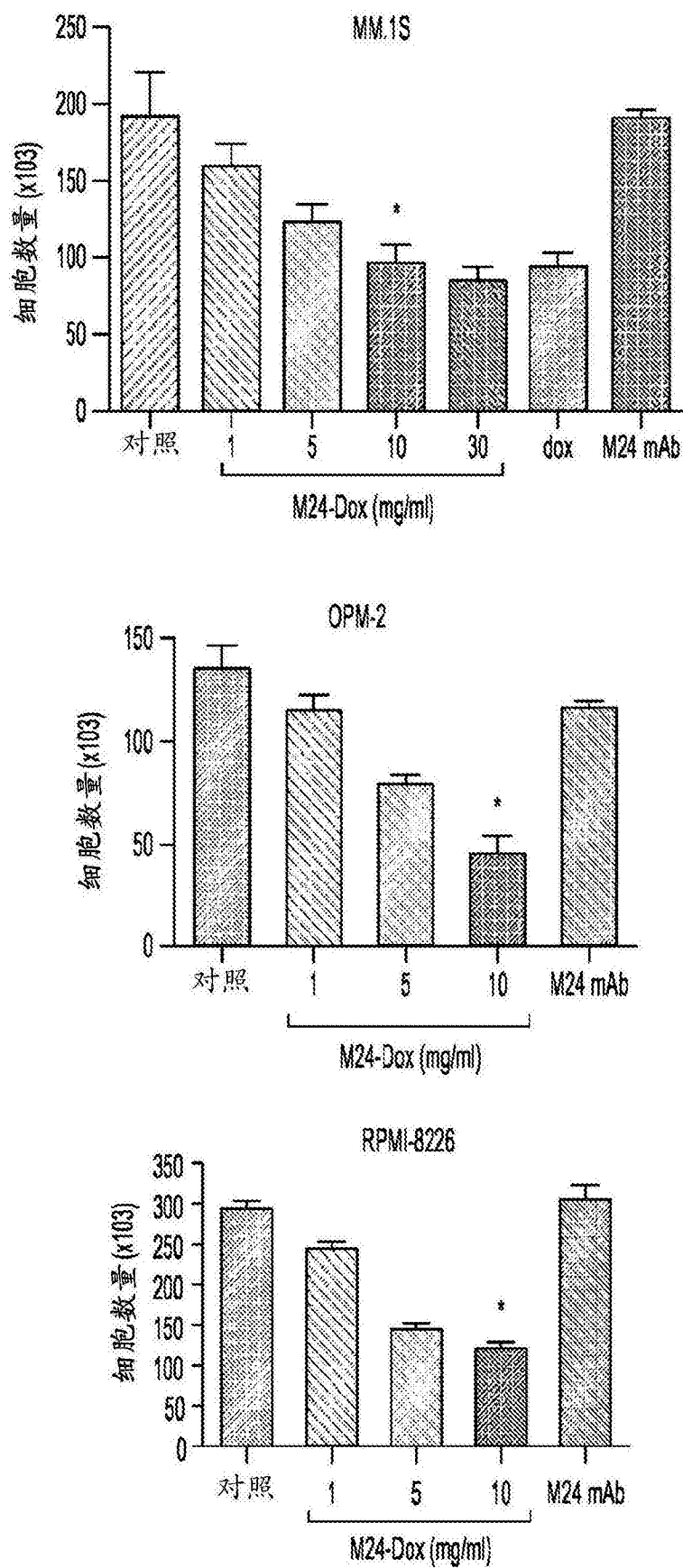


图2

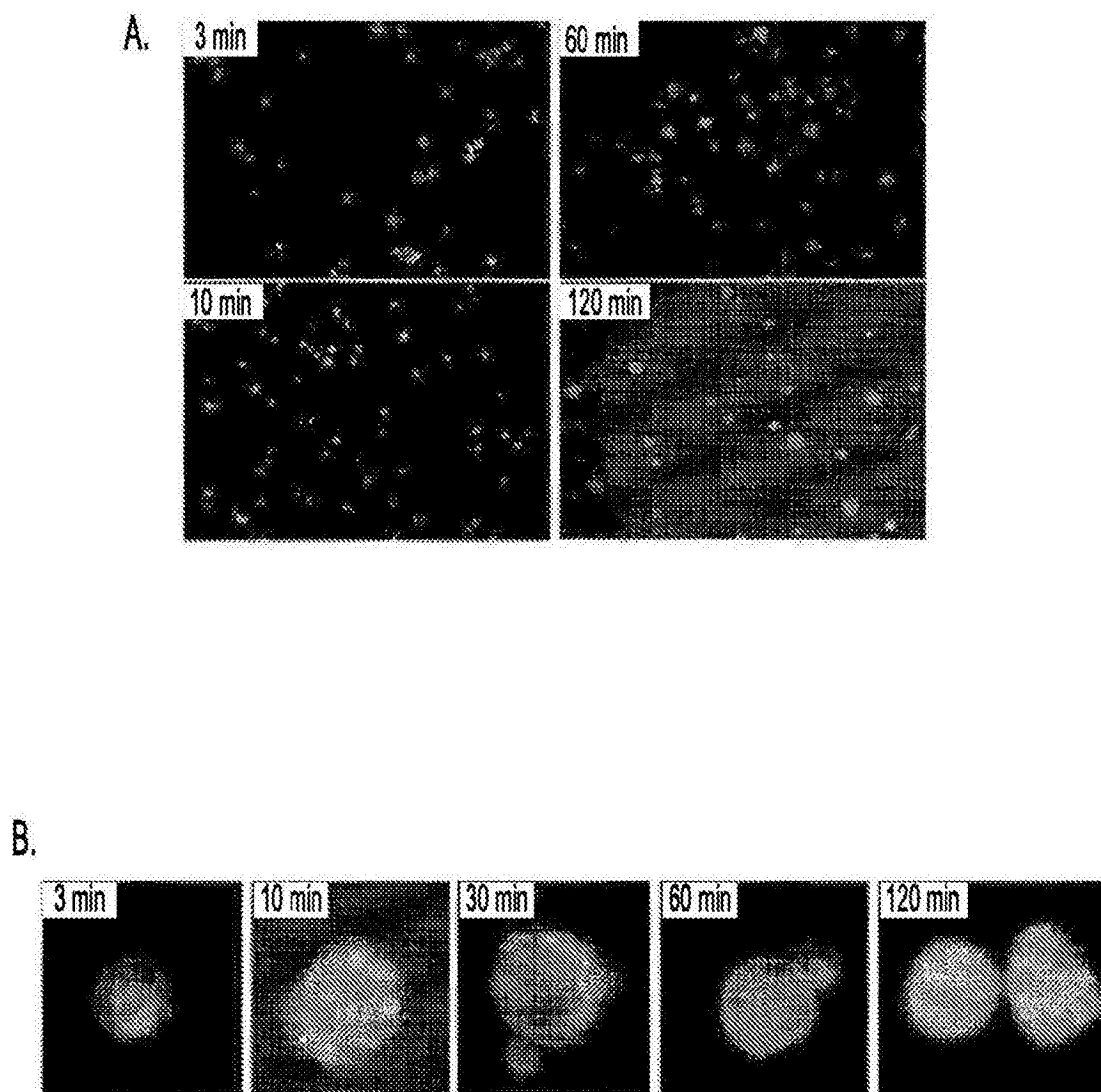


图3

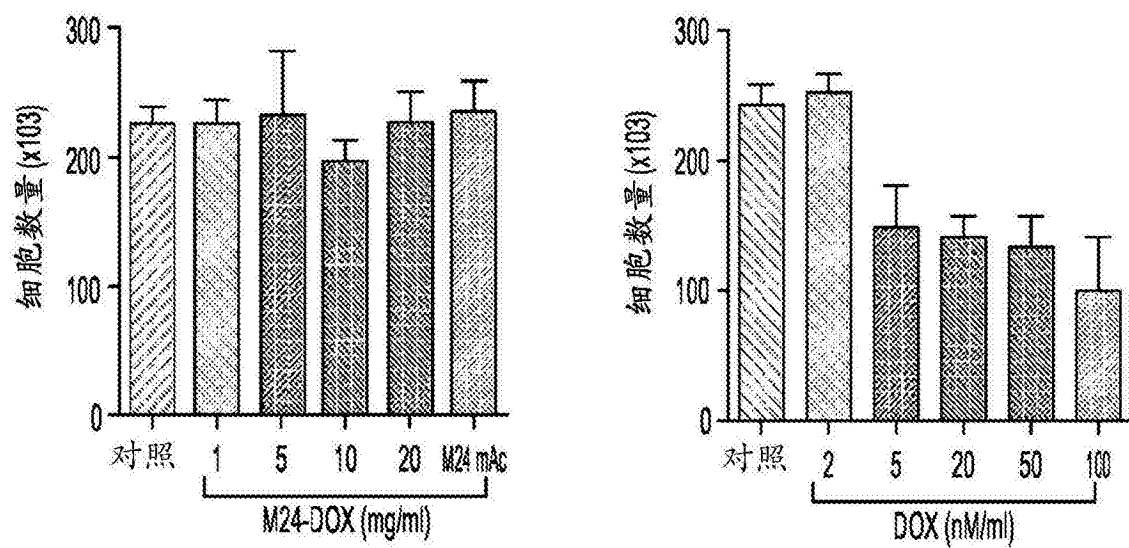


图4A

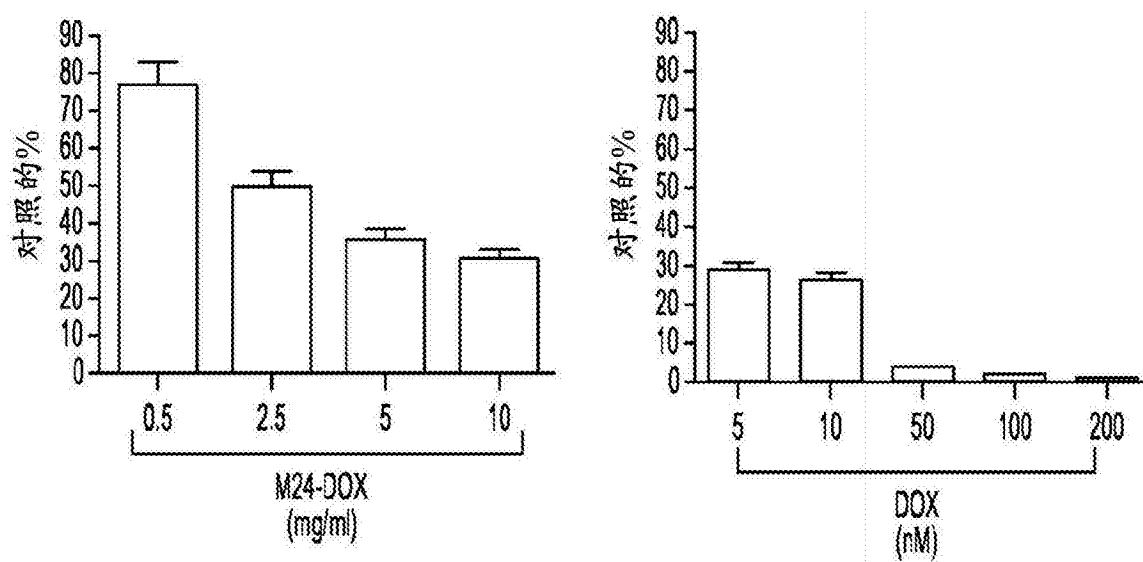


图4B

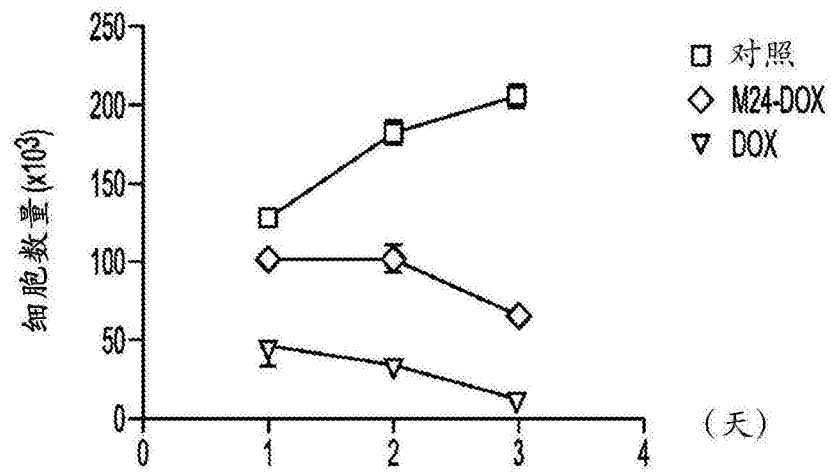
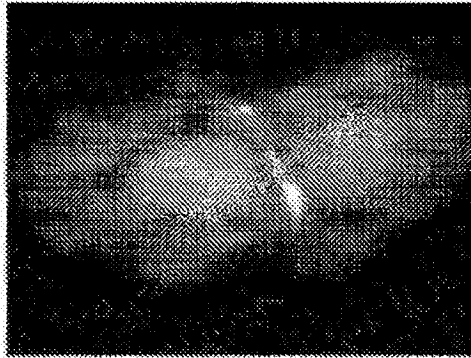
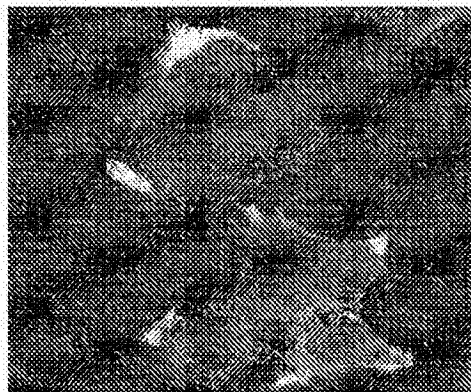


图4C

乳腺上皮细胞



乳腺癌细胞



红色: 纤维状肌动蛋白
绿色: 活化的蛋白裂解酶
黄色: 合并的图像

图5

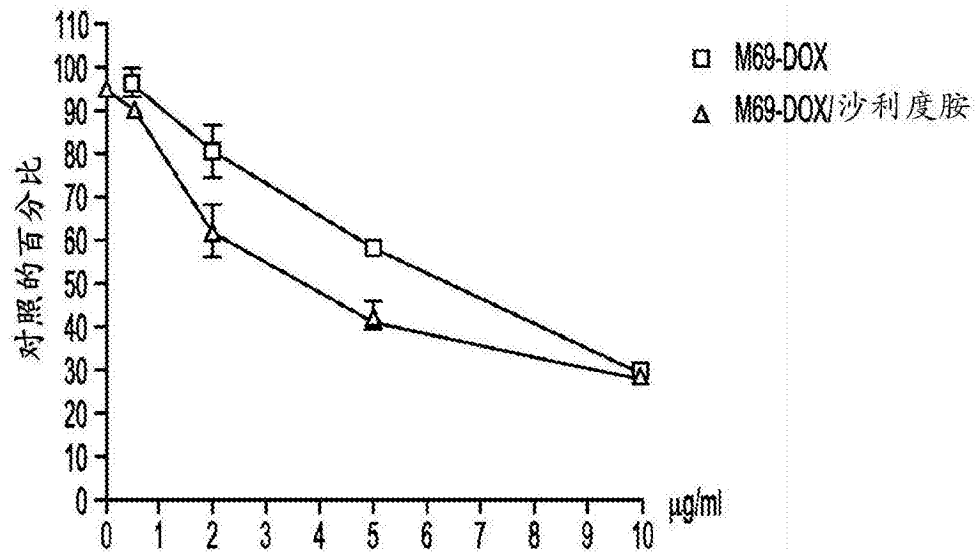


图6A

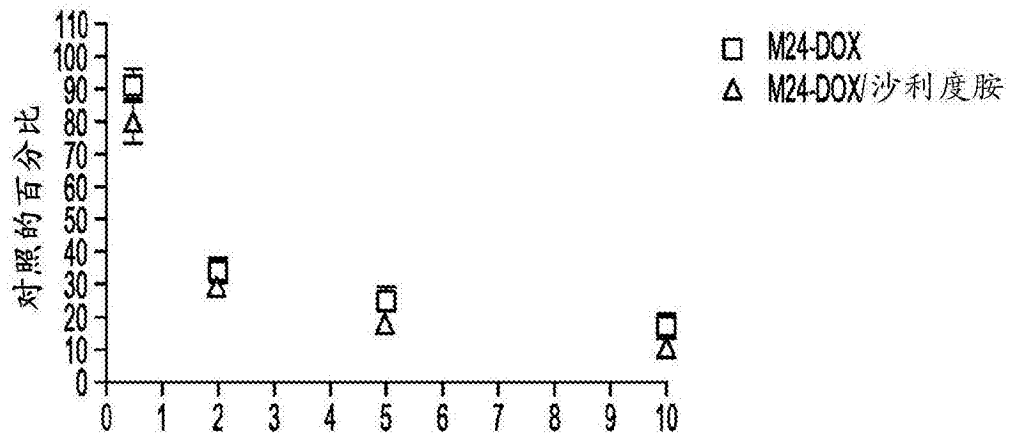


图6B

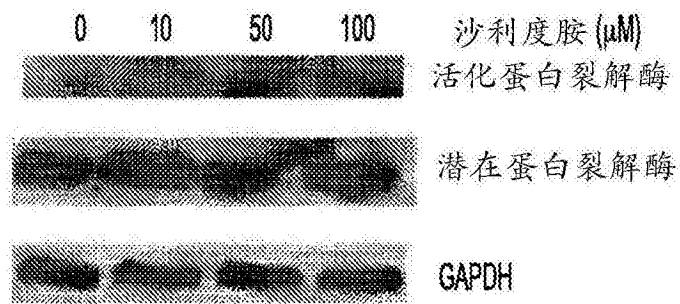
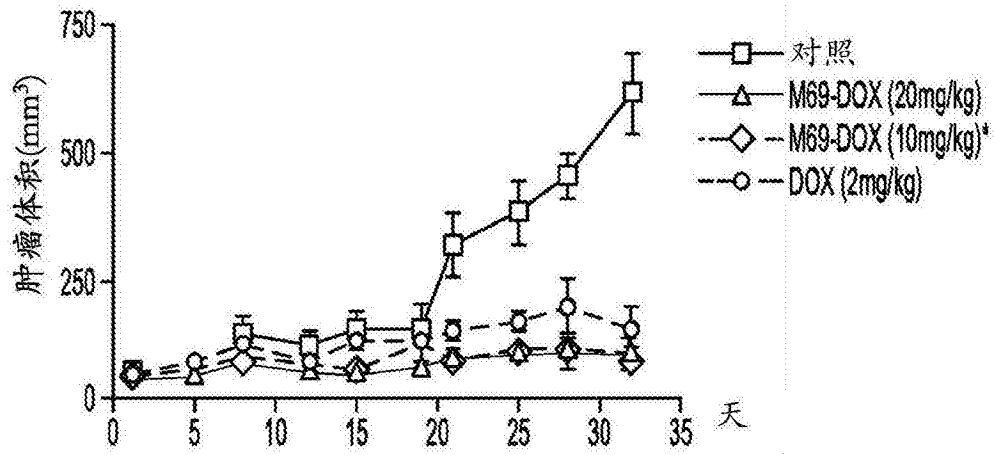


图7



*10 mg M69-DOX = 0.035 mg DOX

图8

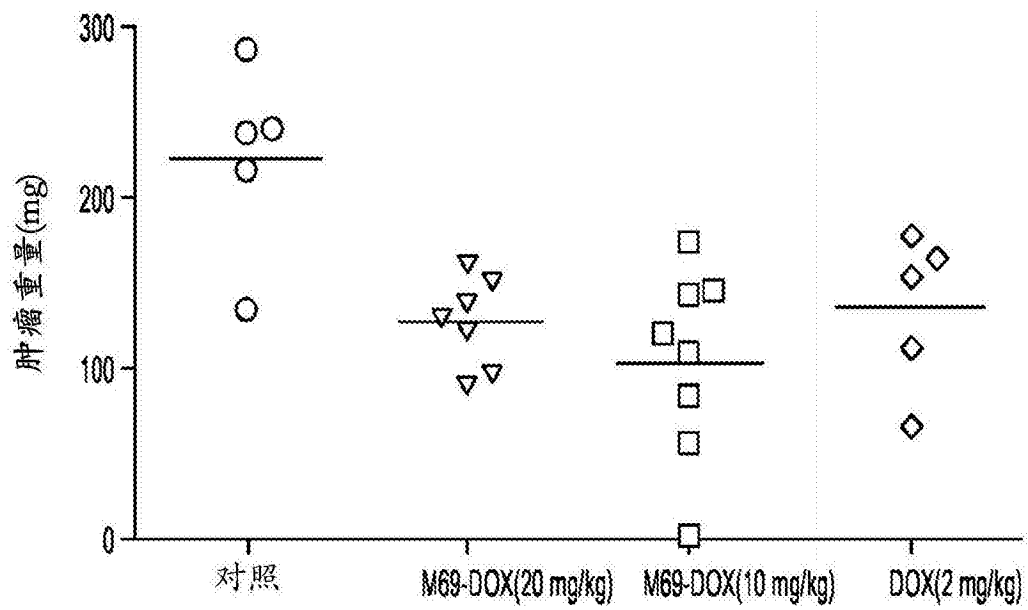


图9

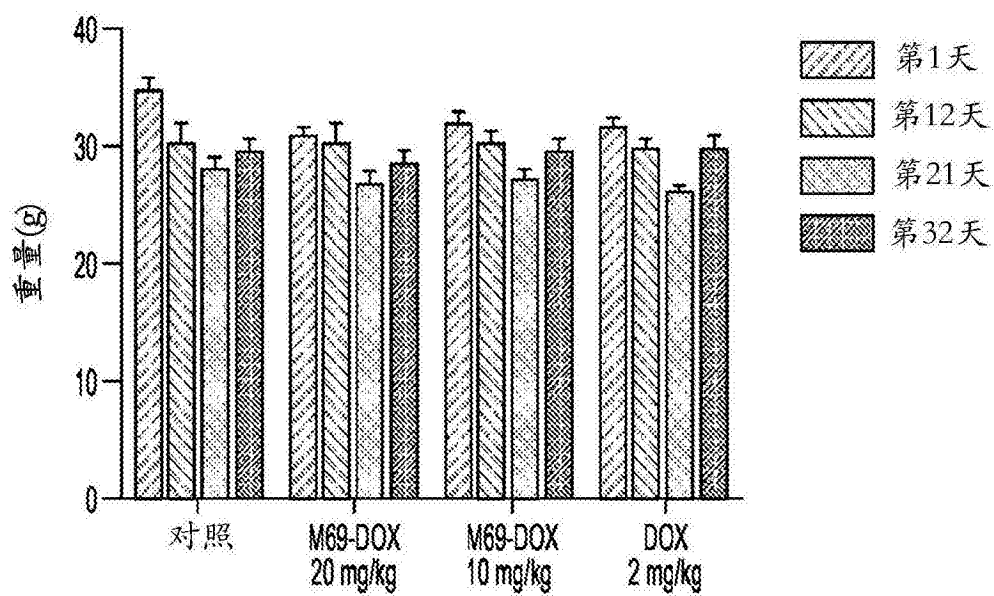


图10

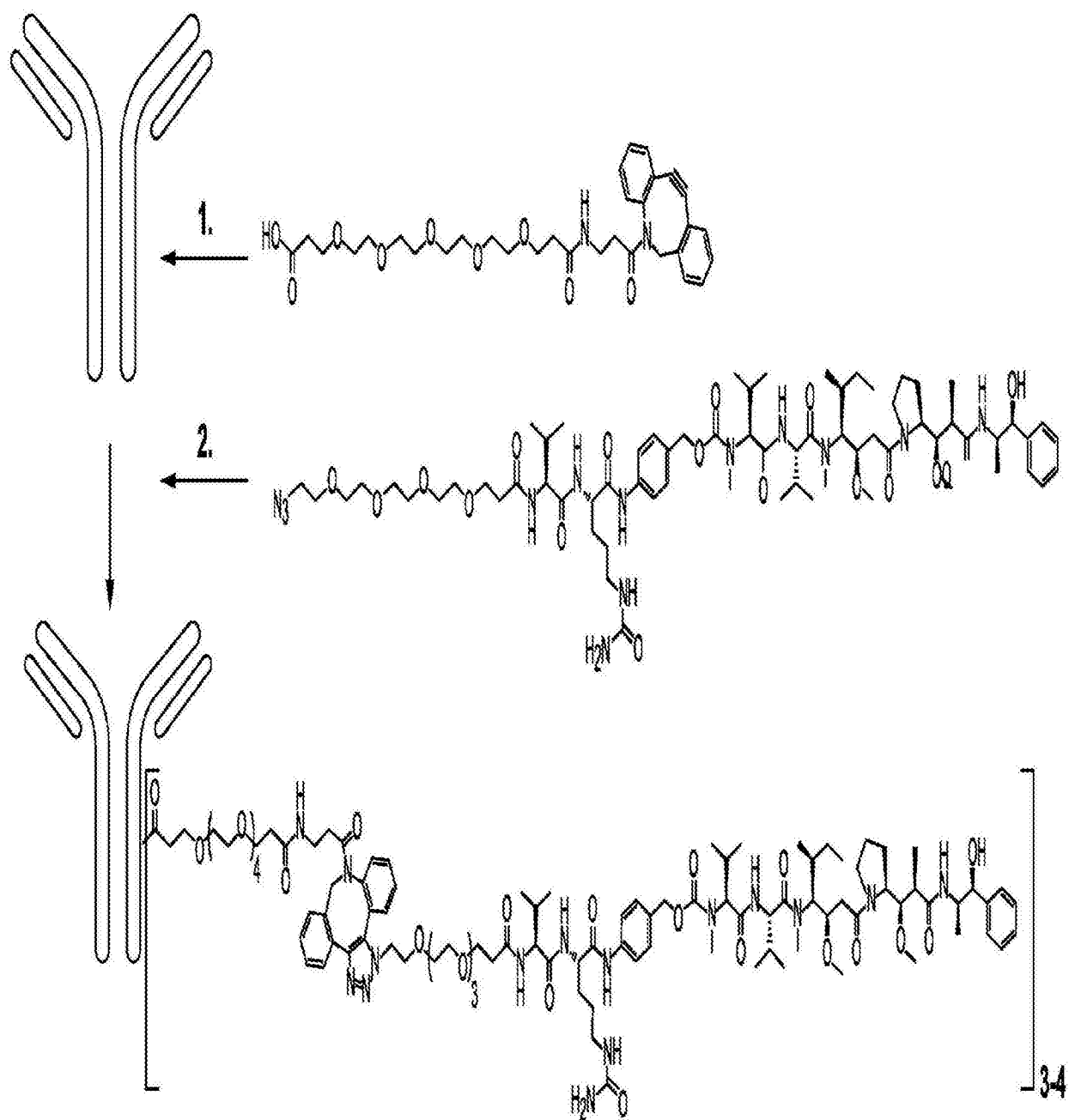


图11

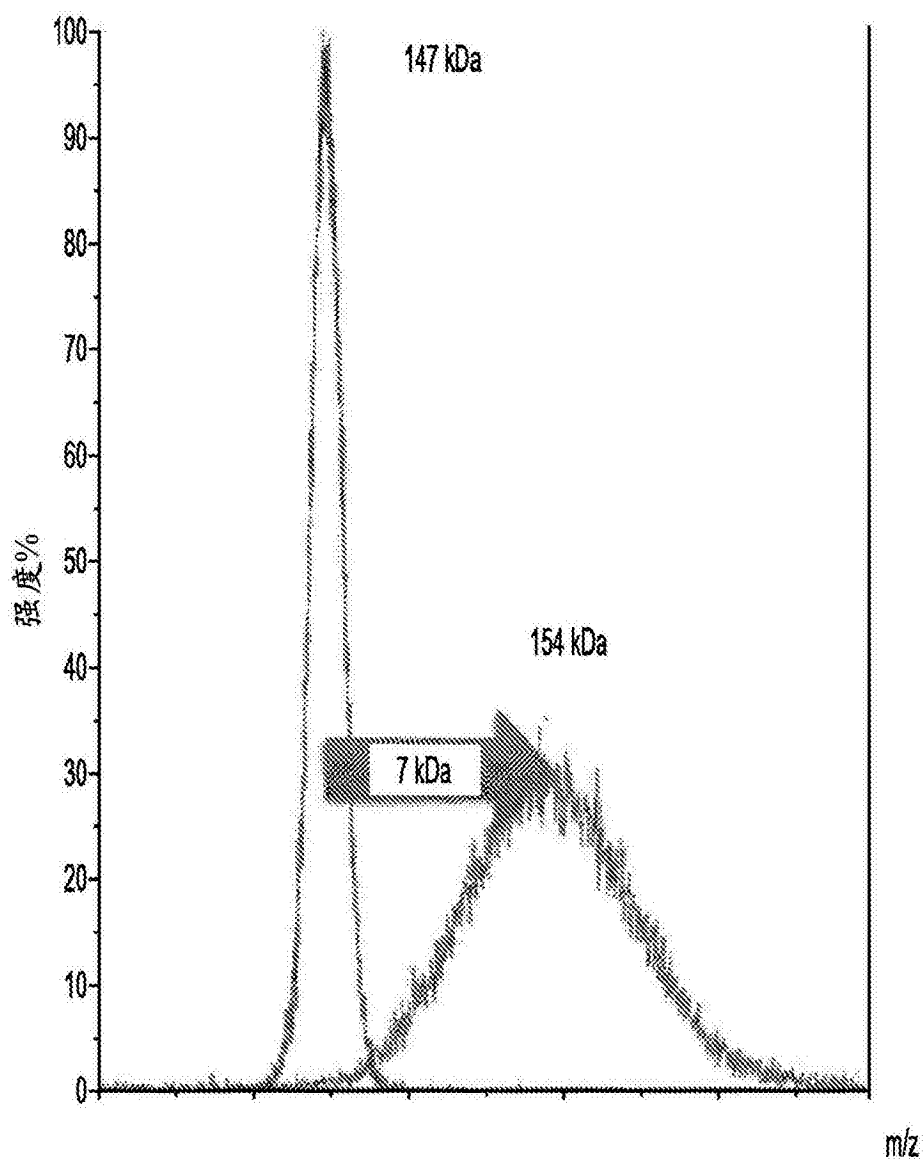


图12

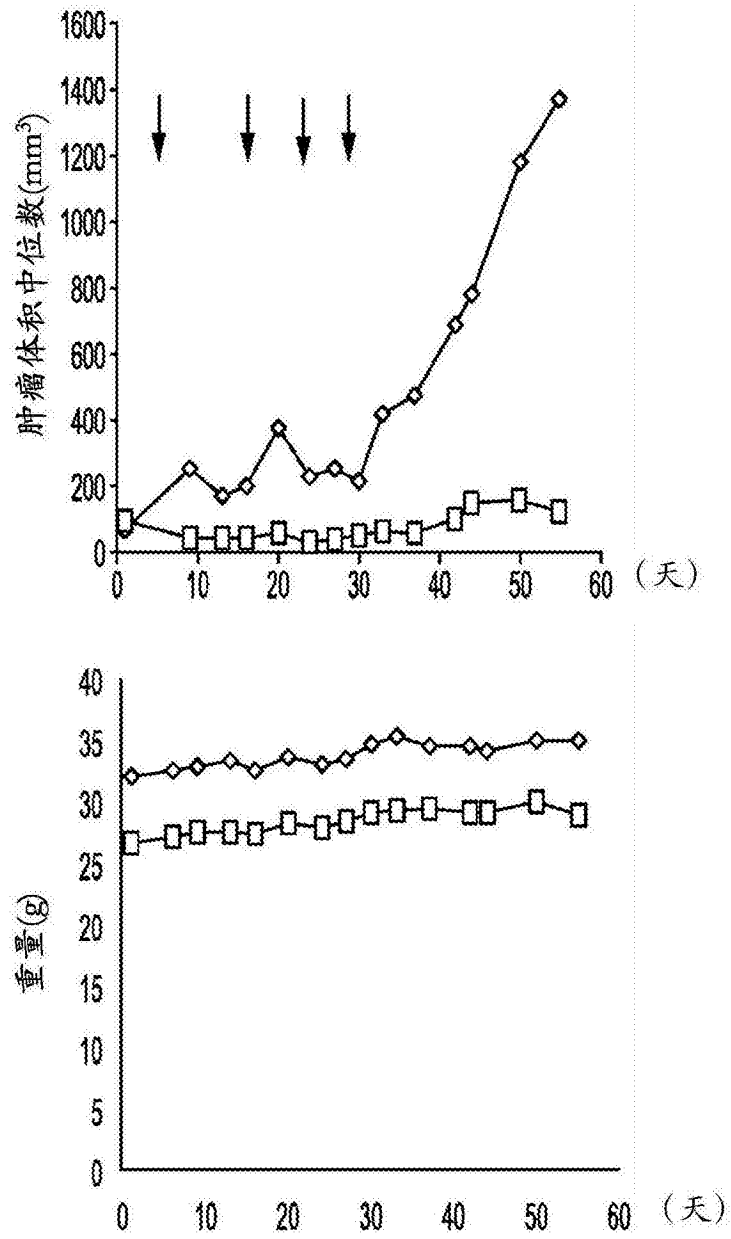
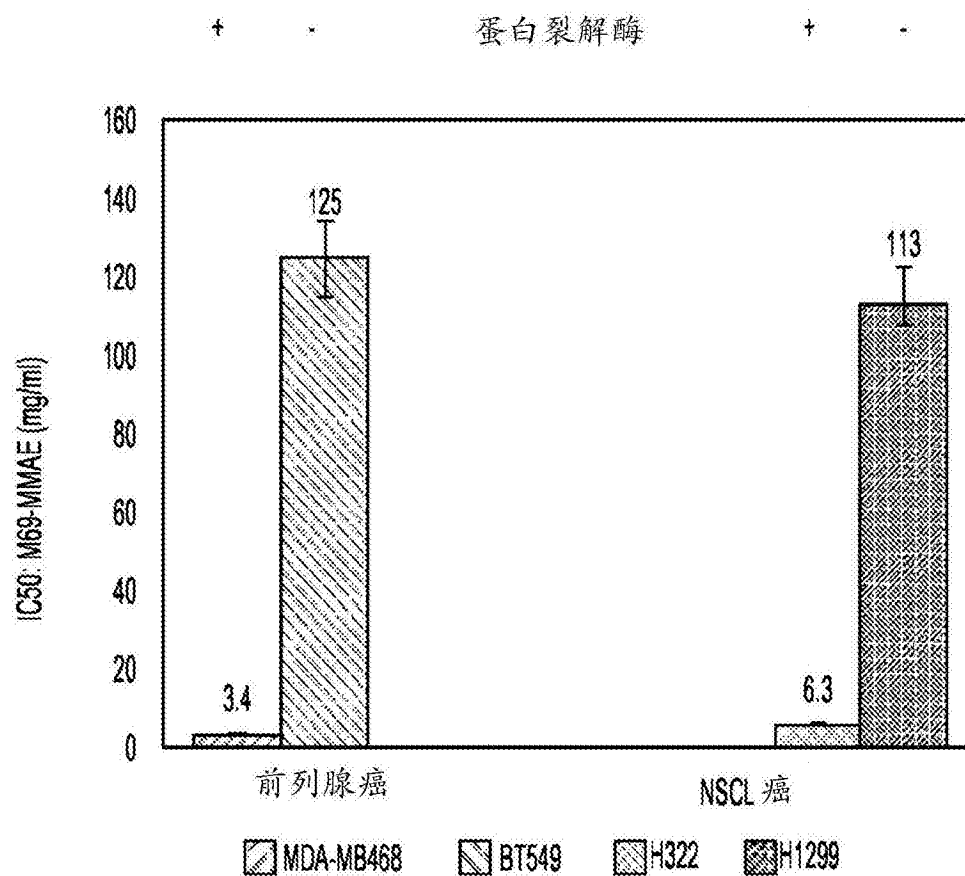


图13



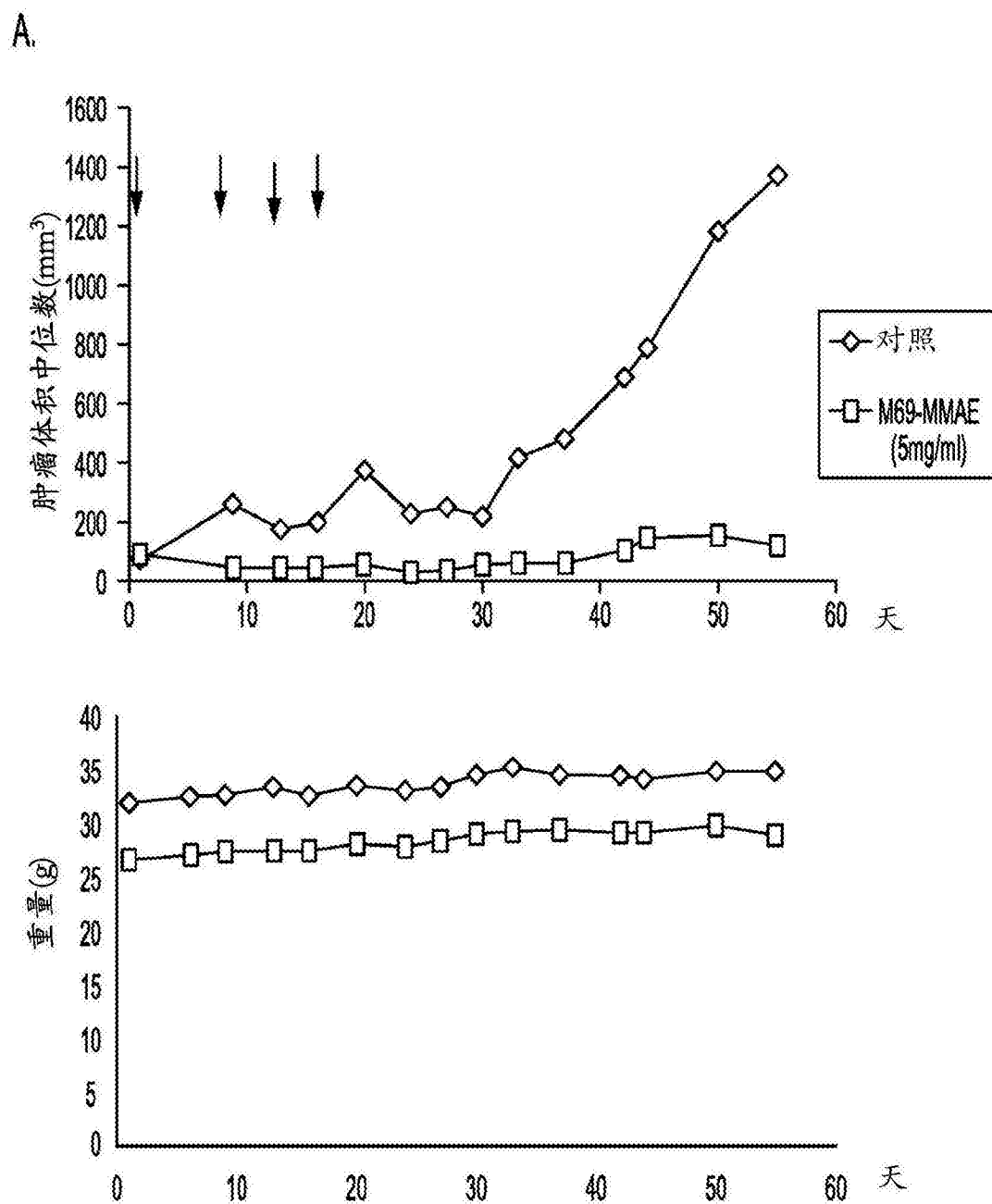


图15

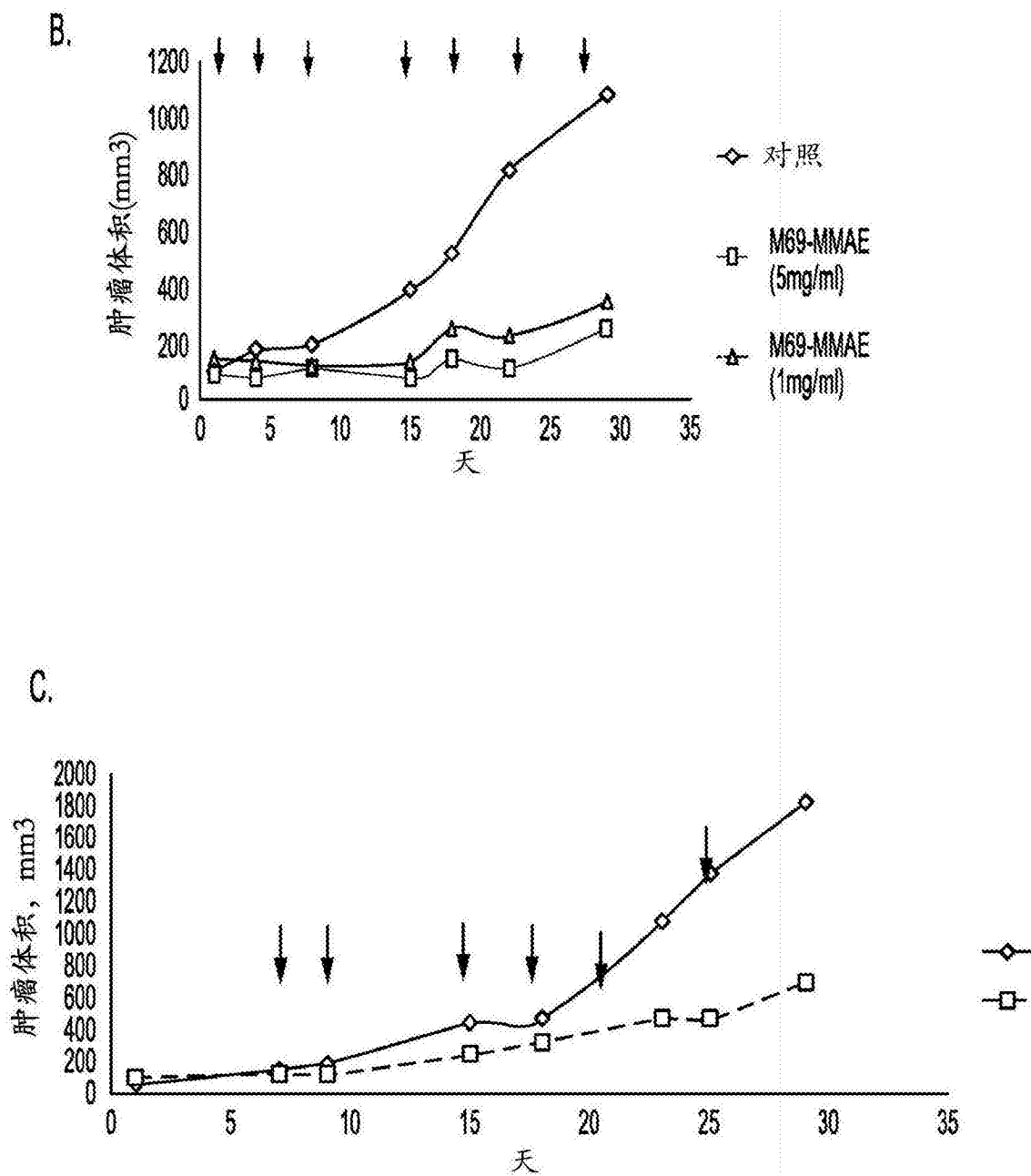


图15续

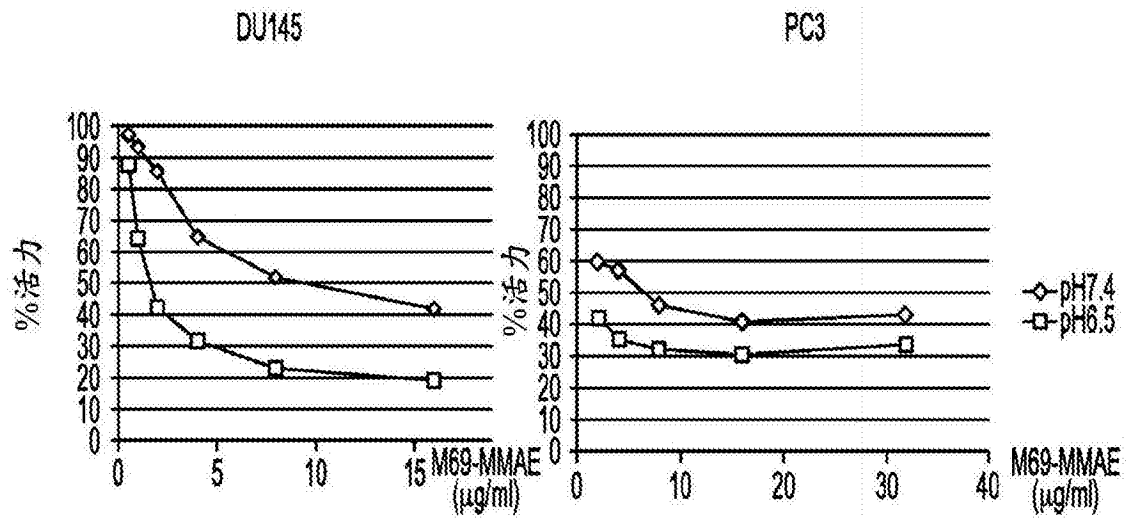


图16

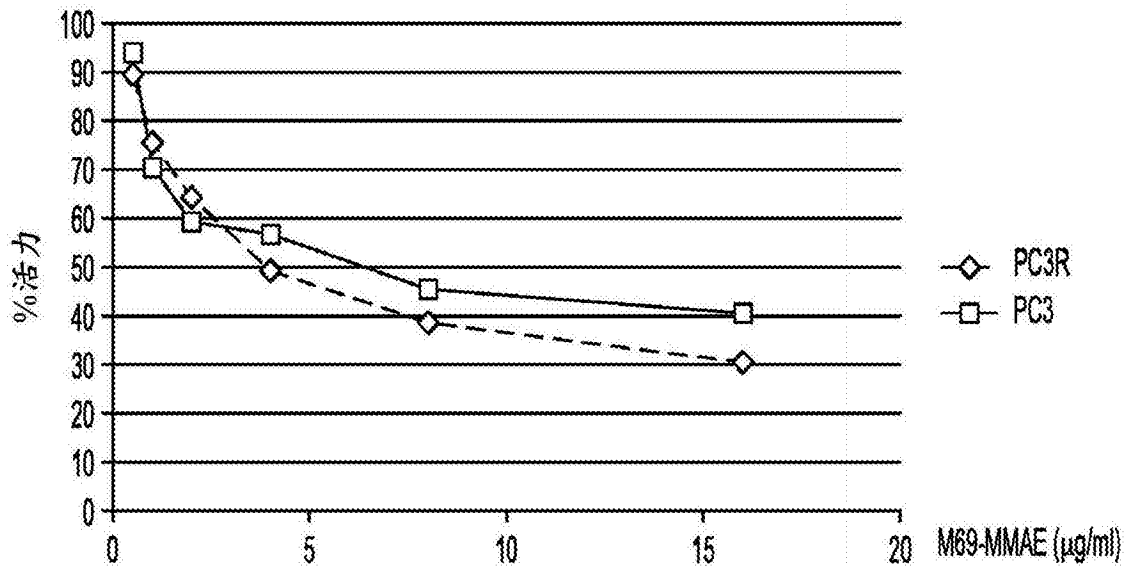


图17

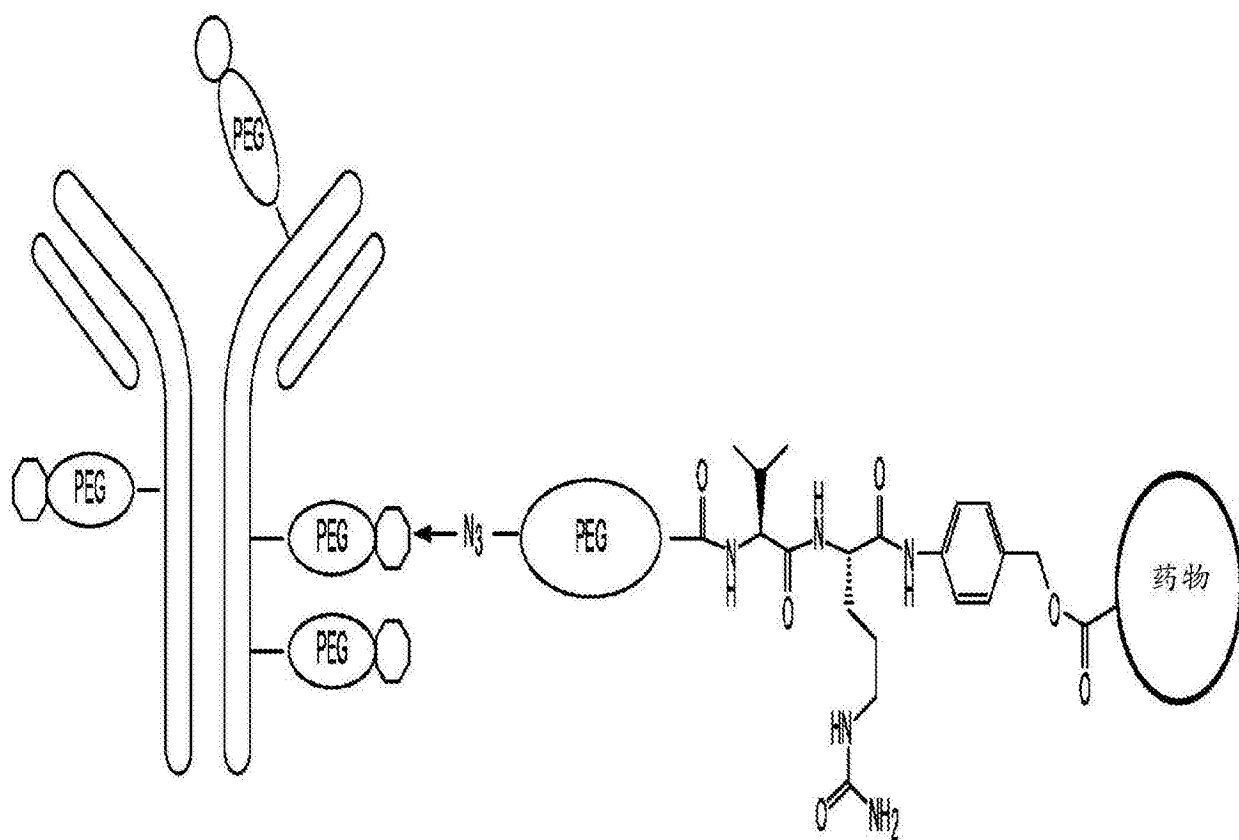


图18

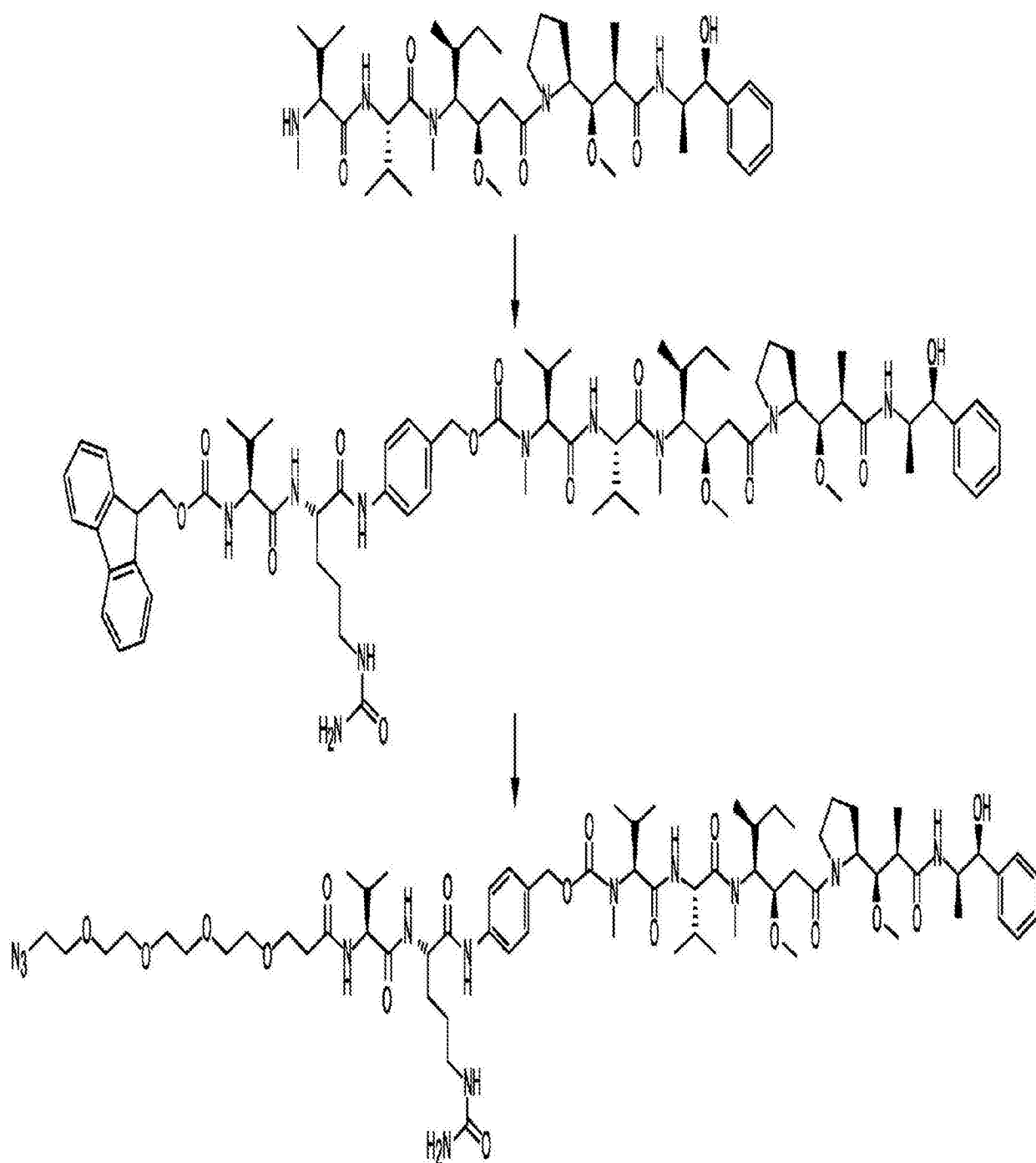


图19