



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110997009 B

(45) 授权公告日 2025.01.21

(21) 申请号 201880051692.9

(22) 申请日 2018.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110997009 A

(43) 申请公布日 2020.04.10

(30) 优先权数据

62/522,516 2017.06.20 US

62/553,438 2017.09.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/054564 2018.06.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/235024 EN 2018.12.27

(73) 专利权人 索伦托药业有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·朱 A·哈桑诺夫 G·陈
凯瑟琳·菲尔斯(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517

专利代理人 何等 顾云峰

(51) Int.CI.
A61K 47/68 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2016297888 A1, 2016.10.13

WO 2012092616 A1, 2012.07.05

WO 2016123412 A1, 2016.08.04

WO 2016127081 A1, 2016.08.11

审查员 王欣欣

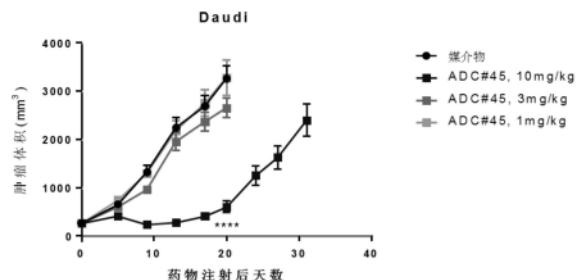
权利要求书7页 说明书34页 附图8页

(54) 发明名称

CD38抗体药物缀合物

(57) 摘要

本文公开了具有与CD38靶标结合的IgG抗体的抗体药物缀合物(ADC),所述IgG抗体在其铰链区中的Cys位点处缀合。本文还公开了治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括提供有效量的CD38 ADC。



* P < 0.05, 相比于媒介物对照组的单向ANOVA

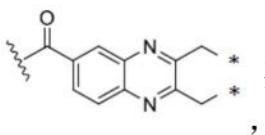
1. 一种抗-CD38 ADC组合物,所述组合物包含:

(a) 抗-CD38 IgG抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区具有SEQ ID NO.1所示的序列和所述轻链可变区具有SEQ ID NO.3所示的序列,或其中所述重链可变区具有SEQ ID NO.1所示的序列和所述轻链可变区具有SEQ ID NO.2所示的序列;

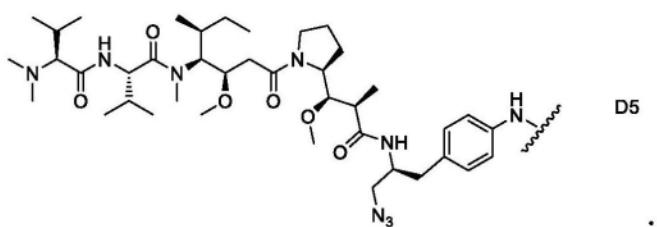
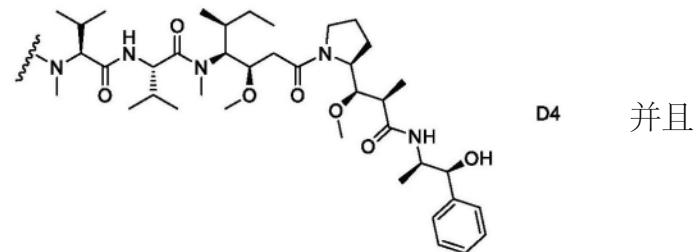
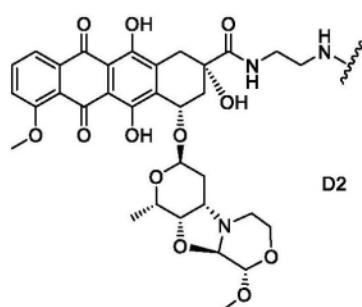
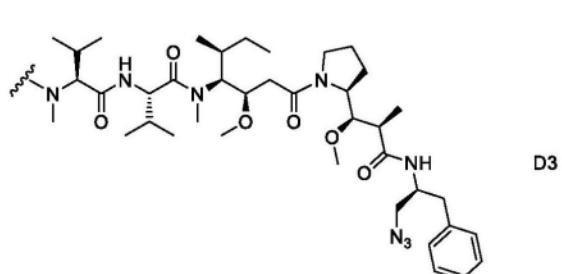
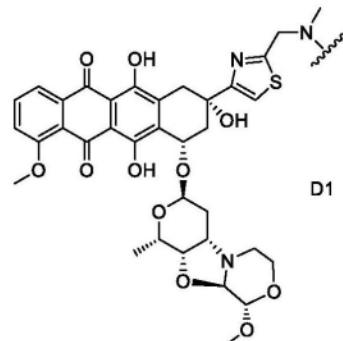
(b) 药物或毒性物质部分,所述药物或毒性物质部分为微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物,所述药物或毒性物质部分选自由D1、D2、D3、D4、D5及其组合组成的组;和

(c) 缀合连接子部分,其中所述缀合连接子包含连接子和缀合部分,所述缀合部分共价结合至所述抗体的两条重链中的每一者的铰链区中的单个Cys残基,

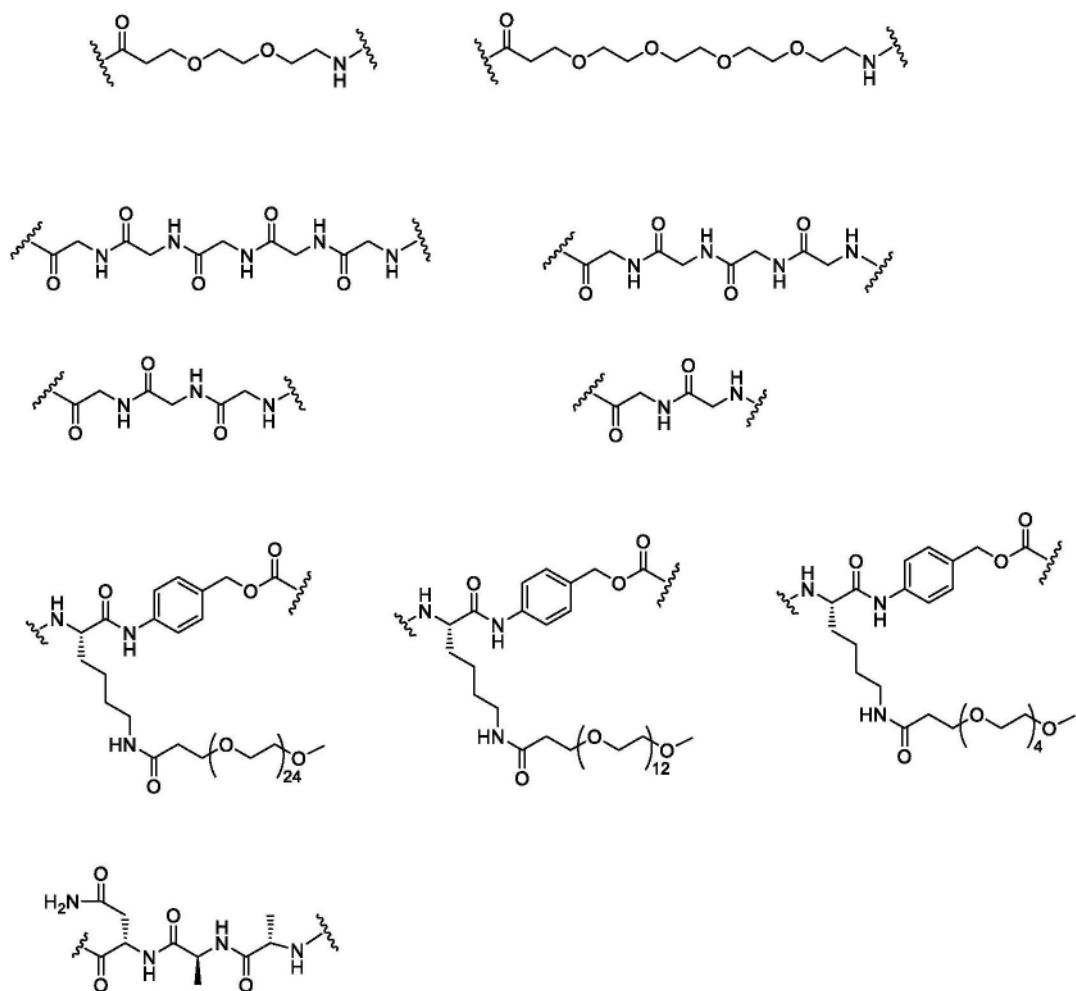
其中所述IgG抗体的重链铰链区经突变使得每一个所述重链铰链区仅含有一个Cys残基;

其中所述缀合部分为  * 其中波浪线表示连接至所述连接子的位点,并
且星号(*)表示连接至所述抗体的铰链区中的Cys残基的硫原子的位点;

其中D1、D2、D3、D4和D5的结构为:

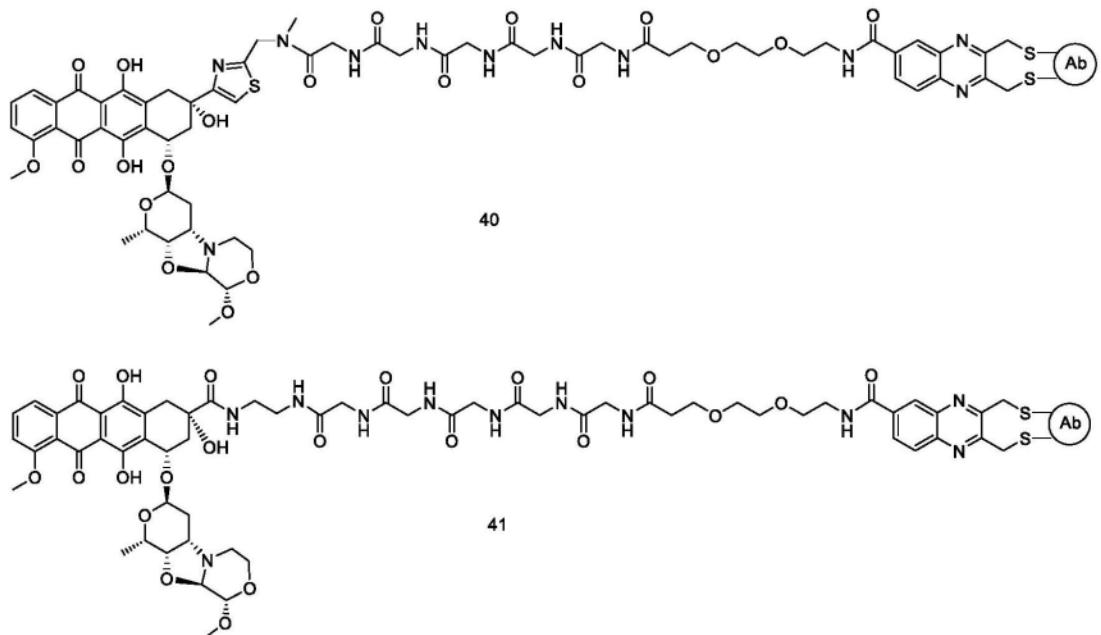


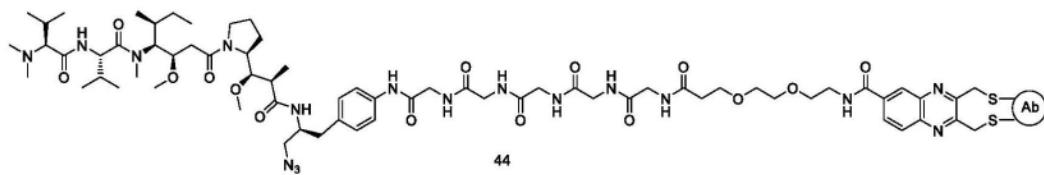
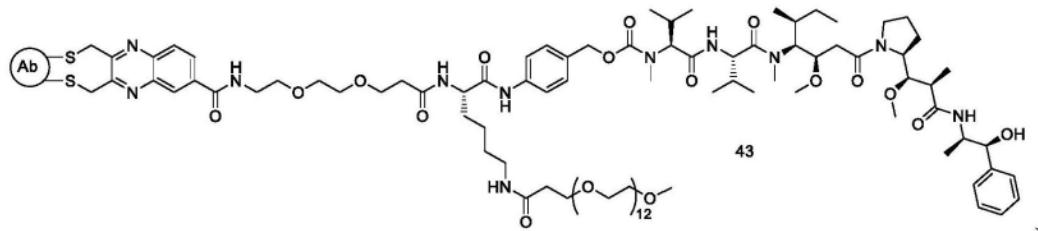
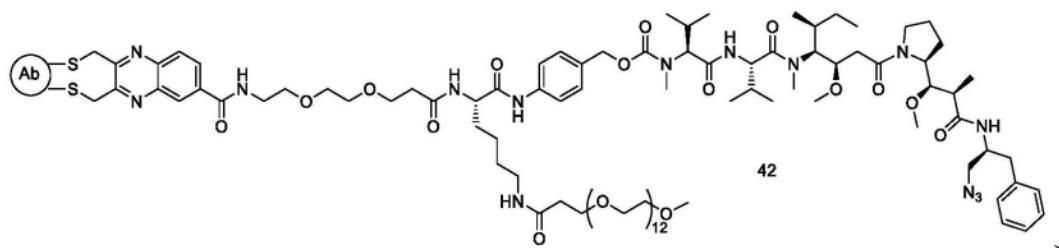
其中所述连接子选自:



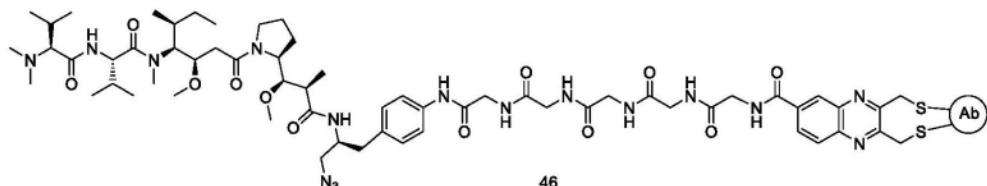
及其任意组合,其中波浪线表示连接至所述缀合部分和所述药物或毒性物质部分的位点。

2. 根据权利要求1所述的ADC组合物,其中所述ADC选自



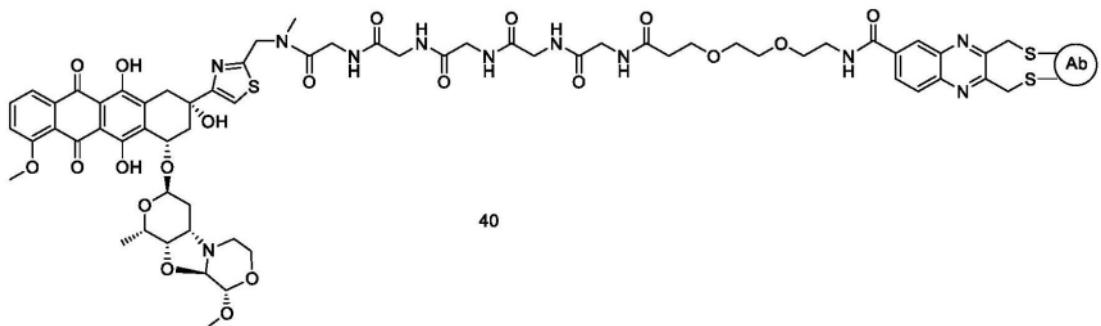


和



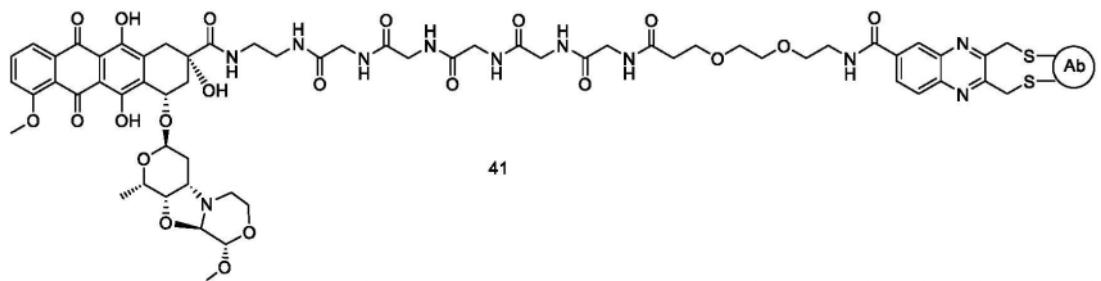
。

3. 根据权利要求1所述的ADC组合物,其中所述ADC为



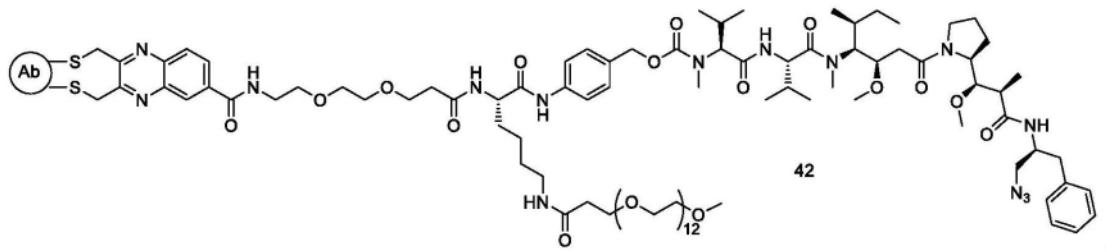
。

4. 根据权利要求1所述的ADC组合物,其中所述ADC为

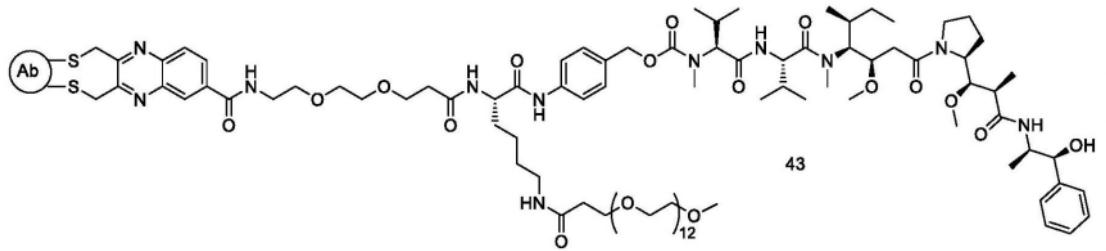


。

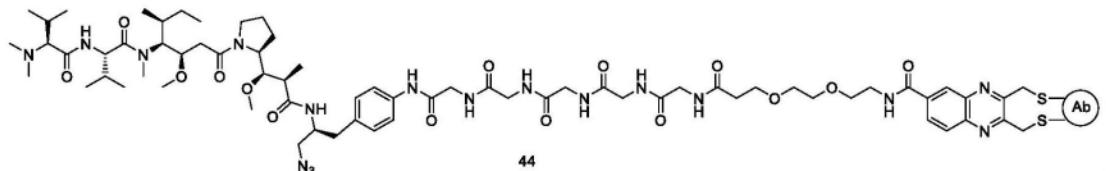
5. 根据权利要求1所述的ADC组合物,其中所述ADC为



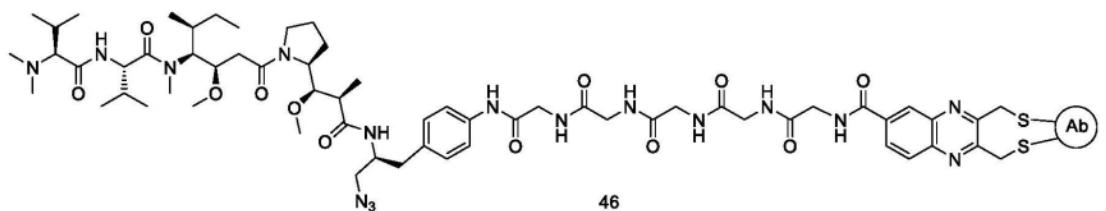
6. 根据权利要求1所述的ADC组合物,其中所述ADC为



7. 根据权利要求1所述的ADC组合物,其中所述ADC为



8. 根据权利要求1所述的ADC组合物,其中所述ADC为



9. 抗-CD38 ADC组合物在制备用于治疗多发性骨髓瘤的药物中的用途,所述治疗包括提供治疗有效量的抗-CD38 ADC组合物,所述抗-CD38 ADC组合物包含:

(a) 抗-CD38 IgG抗体,其包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区具有SEQ ID NO.1所示的序列和所述轻链可变区具有SEQ ID NO.3所示的序列,或其中所述重链可变区具有SEQ ID NO.1所示的序列和所述轻链可变区具有SEQ ID NO.2所示的序列;

(b) 药物或毒性物质部分,所述药物或毒性物质部分为微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物,所述药物或毒性物质部分选自由D1、D2、D3、D4、D5及其组合组成的组;和

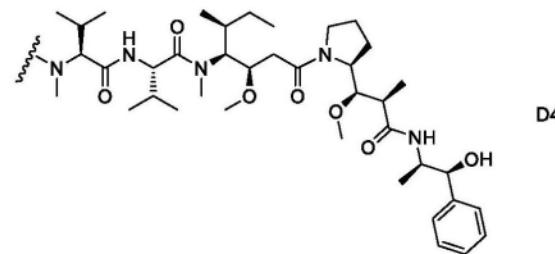
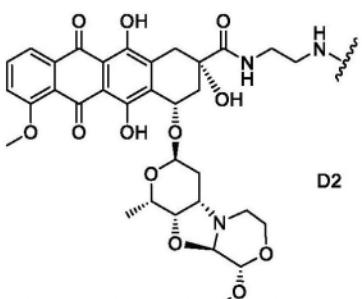
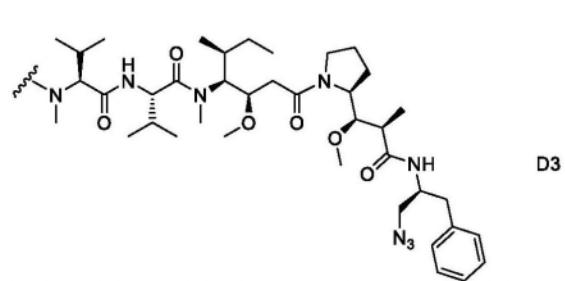
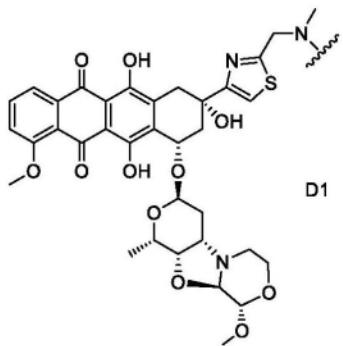
(c) 缀合连接子部分,其中所述缀合连接子包含连接子和缀合部分,所述缀合部分共价结合至所述抗体的两条重链中的每一者的铰链区中的单个Cys残基;

其中所述IgG抗体的重链铰链区经突变使得每一个所述重链铰链区仅含有一个Cys残基;

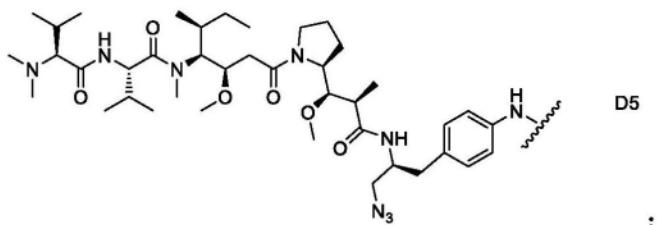
其中所述缀合部分为 * 其中波浪线表示连接至所述连接子的位点,并

且星号(*)表示连接至所述抗体的铰链区中的Cys残基的硫原子的位点;

其中D1、D2、D3、D4和D5的结构为：

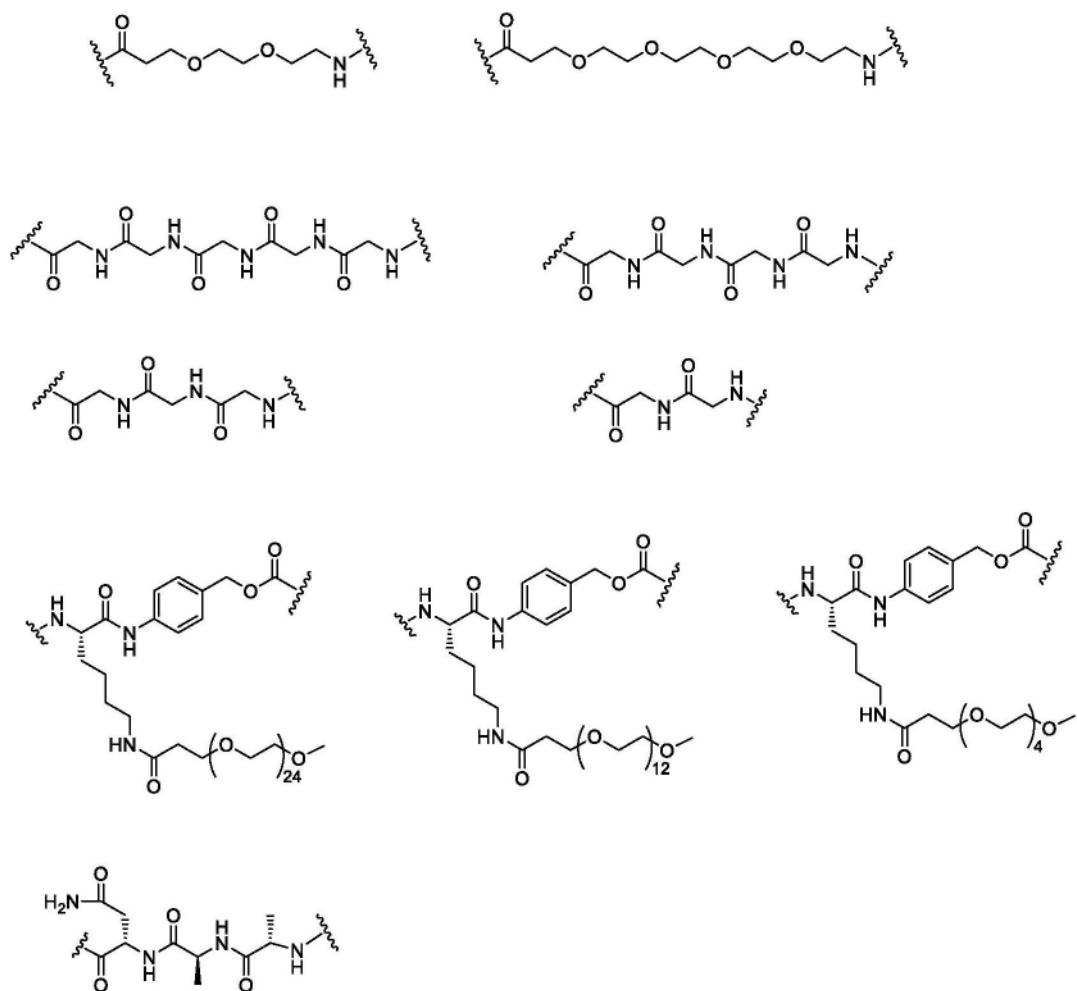


并且



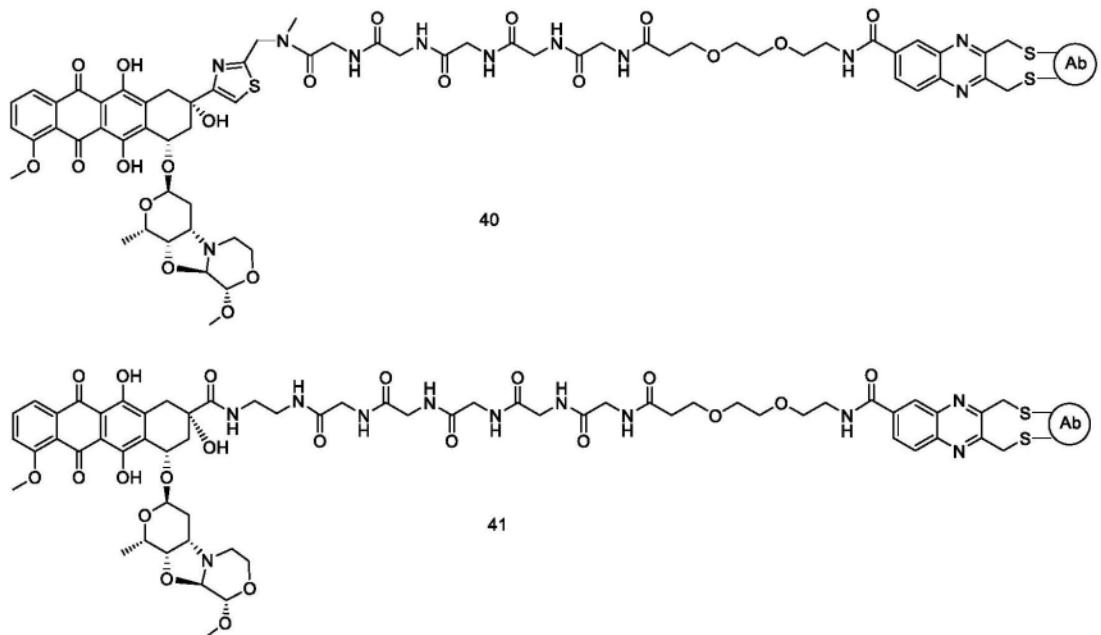
；

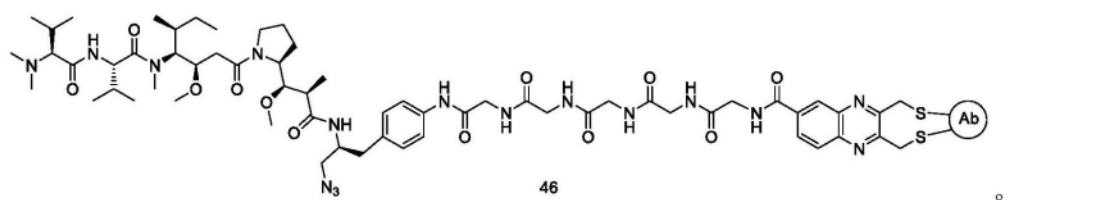
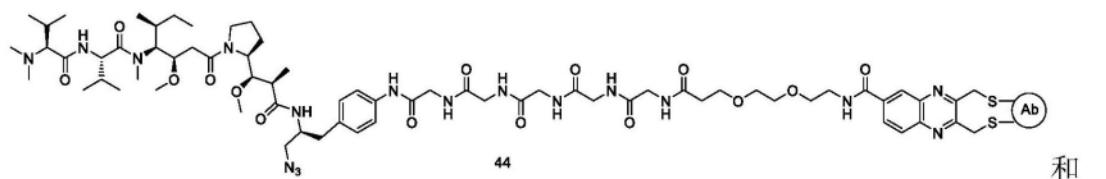
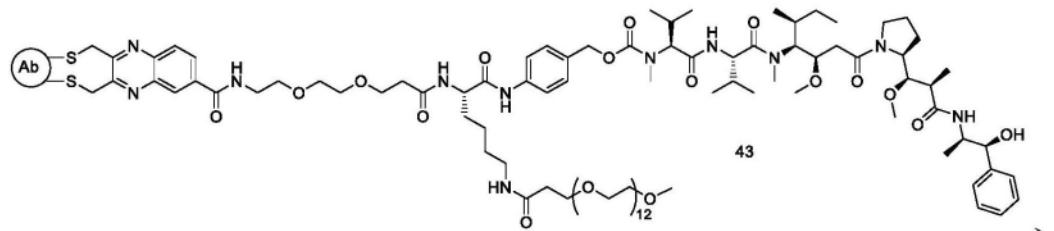
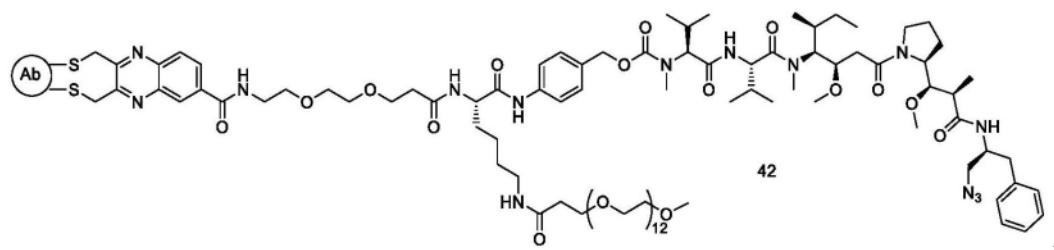
其中所述连接子选自：



及其任意组合,其中波浪线表示连接至所述缀合部分和所述药物或毒性物质部分的位点。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述ADC选自





CD38抗体药物缀合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2017年6月20日提交的美国临时专利申请62/522,516和于2017年9月1日提交的美国临时专利申请62/553,438的优先权。

技术领域

[0003] 本公开提供了具有与CD38靶标结合的IgG抗体的抗体药物缀合物(ADC),所述IgG抗体在其铰链区中的Cys位点处缀合。本公开还提供了治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括提供有效量的CD38 ADC。

背景技术

[0004] CD38是一种45kD的II型跨膜糖蛋白,具有长的C端胞外域和短的N端胞质域。CD38蛋白是一种双功能外切酶,其可以催化NAD⁺转化为环状ADP-核糖(cADPR),也可以将cADPR水解为ADP-核糖。在个体发育过程中,CD38出现在CD34⁺定向干细胞和淋巴样、红系和髓样细胞的谱系定型祖细胞上。CD38的表达主要在淋巴谱系中持续存在,并且在T细胞和B细胞发育的不同阶段具有不同的表达水平。

[0005] CD38在许多造血系统恶性肿瘤中和源自各种造血系统恶性肿瘤的细胞系中上调,所述造血系统恶性肿瘤包括非霍奇金淋巴瘤(NHL)、伯基特淋巴瘤(BL)、多发性肿瘤(MM)、B慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)、B和T急性淋巴细胞白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性骨髓性白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)和慢性骨髓性白血病(CML)。另一方面,造血系统中大多数的原始多能干细胞是CD38⁻。CD38在造血系统恶性肿瘤中的表达及其与疾病进展的相关性使得CD38成为抗-CD38抗体疗法的引人注目的靶标。

[0006] 据报道,CD38参与Ca²⁺的动员(Morra等人,1998,FASEB J.,12:581-592;Zilber等人,2000,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97:2840-2845),并参与淋巴和髓样细胞或细胞系中通过多种信号分子的酪氨酸磷酸化进行的信号转导,所述信号分子包括磷脂酶C-γ、ZAP-70、syk和c-cbl(Funaro等人,1993,Eur.J.Immunol.,23:2407-2411;Morra等人,1998,FASEB J.,12:581-592;Funaro等人,1990,J.Immunol.,145:2390-2396;Zubiaur等人,1997,J.Immunol.,159:193-205;Deaglio等人,2003,Blood 102:2146-2155;Todisco等人,2000,Blood,95:535-542;Konopleva等人,1998,J.Immunol.,161:4702-4708;Zilber等人,2000,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97:2840-2845;Kitanaka等人,1997,J.Immunol.,159:184-192;Kitanaka等人,1999,J.Immunol.,162:1952-1958;Mallone等人,2001,Int.Immunol.,13:397-409)。CD38被指出是淋巴和髓样细胞在正常发育期间成熟和活化的重要信号分子。

[0007] CD38功能的证据来自于CD38^{-/-}敲除小鼠,该小鼠具有先天免疫缺陷,并且由于树突状细胞迁移缺陷而具有降低的T细胞依赖性体液应答(Partida-Sanchez等人,2004,Immunity,20:279-291;Partida-Sanchez等人,2001,Nat.Med.,7:1209-1216)。然而,尚不清楚小鼠中CD38的功能是否与人类中的相同,因为造血过程中的CD38表达模式在人与小鼠之间存在很大差异:a)与人类中不成熟的祖干细胞不同,小鼠中类似的祖干细胞表达高水

平的CD38 (Randall等人, 1996, *Blood*, 87: 4057-4067; Dagher等人, 1998, *Biol. Blood Marrow Transplant*, 4: 69-74), b) 在人B细胞发育过程中, 发现了在生发中心B细胞和浆细胞中的高CD38表达水平 (Uckun, 1990, *Blood*, 76: 1908-1923; Kumagai等人, 1995, *J. Exp. Med.*, 181: 1101-1110), 而在小鼠中, 相应细胞中的CD38表达水平低 (Oliver等人, 1997, *J. Immunol.*, 158: 108-1115; Ridderstad and Tarlinton 1998, *J. Immunol.*, 160: 4688-4695)。

[0008] 在文献中已经描述了在各种肿瘤细胞和细胞系上的若干种具有不同增殖特性的抗人CD38抗体。例如, 在存在来自MM患者或正常个体的外周血单核效应细胞 (mononuclear effector cell) 的情况下, 具有小鼠Fab和人IgG1 Fc的嵌合OKT10抗体非常有效地介导针对淋巴细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) (Stevenson等人, 1991, *Blood*, 77: 1071-1079)。已经显示, 抗-CD38抗体AT13/5的CDR移植的人源化形式具有针对CD38阳性细胞系的有效ADCC活性。已经显示, 人类单克隆抗-CD38抗体通过ADCC和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 介导CD38阳性细胞系的体外杀灭, 并延迟带有MM细胞系RPMI-8226的SCID小鼠中的肿瘤生长 (W02005/103083A2)。另一方面, 若干抗-CD38抗体, IB4、SUN-4B7和OKT10, 而非IB6、AT1或AT2, 诱导来自正常个体的外周血单核细胞 (PBMC) 的增殖 (Ausiello等人2000, *Tissue Antigens*, 56: 539-547)。

[0009] 已经显示, 一些现有技术中的抗体能够触发CD38⁺ B细胞的凋亡。然而, 这些抗体仅能在存在基质细胞或基质来源的细胞因子的情况下触发CD38⁺ B细胞的凋亡。据报道, 一种激动性抗-CD38抗体 (IB4) 防止人类生发中心 (GC) B细胞凋亡 (Zupo等人, 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24: 1218-1222), 诱导KG-1和HL-60AML细胞增殖 (Konopleva等人, 1998, *J. Immunol.*, 161: 4702-4708), 但诱导Jurkat T淋巴母细胞凋亡 (Morra等人, 1998, *FASEB J.*, 12: 581-592)。另一抗-CD38抗体T16诱导来自ALL患者的未成熟淋巴样细胞和白血病淋巴母细胞的凋亡 (Kumagai等人, 1995, *J. Exp. Med.*, 181: 1101-1110), 以及来自AML患者的白血病成髓细胞的凋亡 (Todisco等人2000, *Blood*, 95: 535-542), 但T16仅在存在基质细胞或基质来源的细胞因子 (IL-7、IL-3、干细胞因子) 的情况下诱导凋亡。

[0010] 因此, 发明人认为采用抗-CD38抗体进行靶向的抗体药物缀合物 (ADC) 带来了提供有效的抗肿瘤活性的希望和潜力, 并同时具有减少副作用的优势。

[0011] 发明概述

[0012] 本公开提供了具有与CD38靶标结合的IgG抗体的抗体药物缀合物 (ADC), 所述IgG抗体在其铰链区中的Cys位点处缀合。本公开还提供了治疗多发性骨髓瘤的方法, 所述方法包括提供有效量的CD38 ADC。

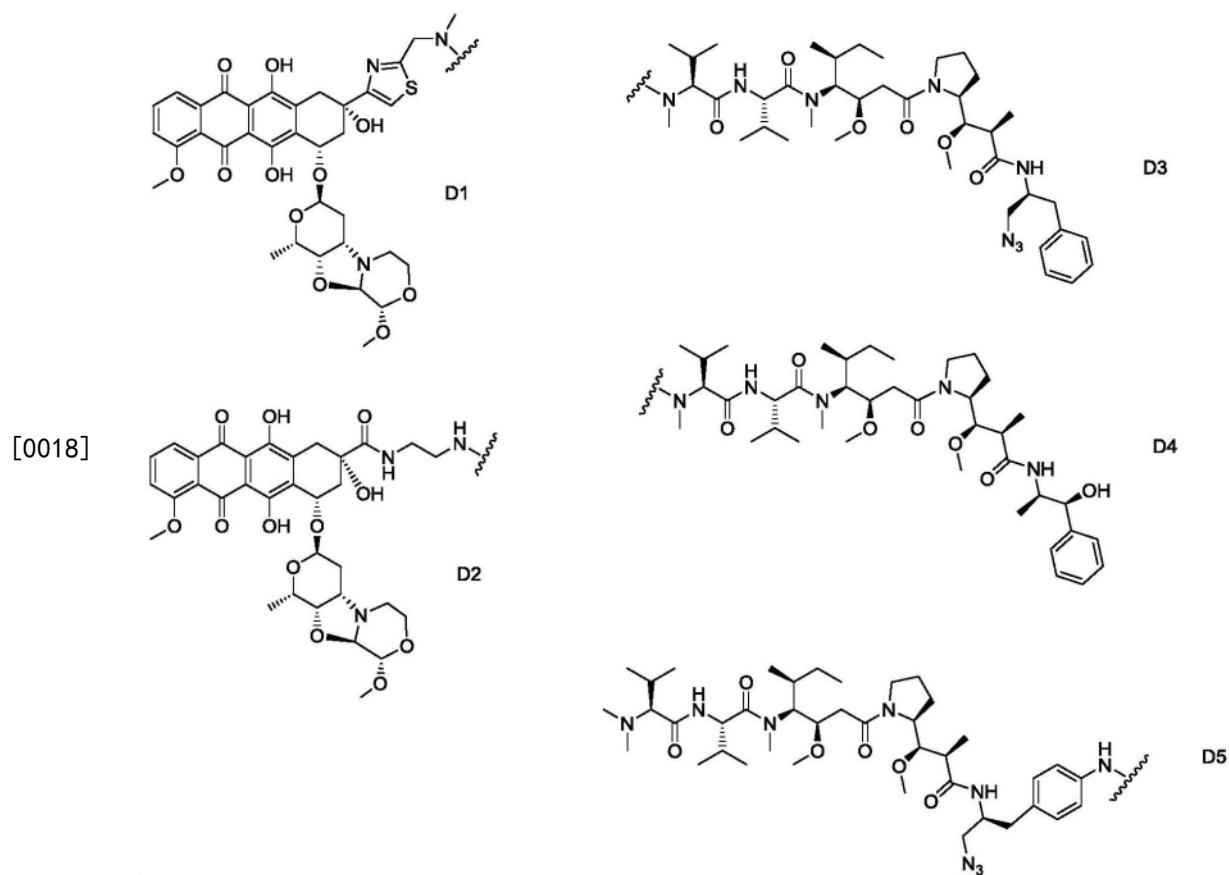
[0013] 更具体地, 本公开提供了一种抗-CD38 ADC组合物, 所述组合物包含:

[0014] (a) 抗-CD38 IgG抗体C38A2 (其重链/轻链可变区包含SEQ ID N0.1/2) 或C38D8 (其重链/轻链可变区包含SEQ ID N0.3/4);

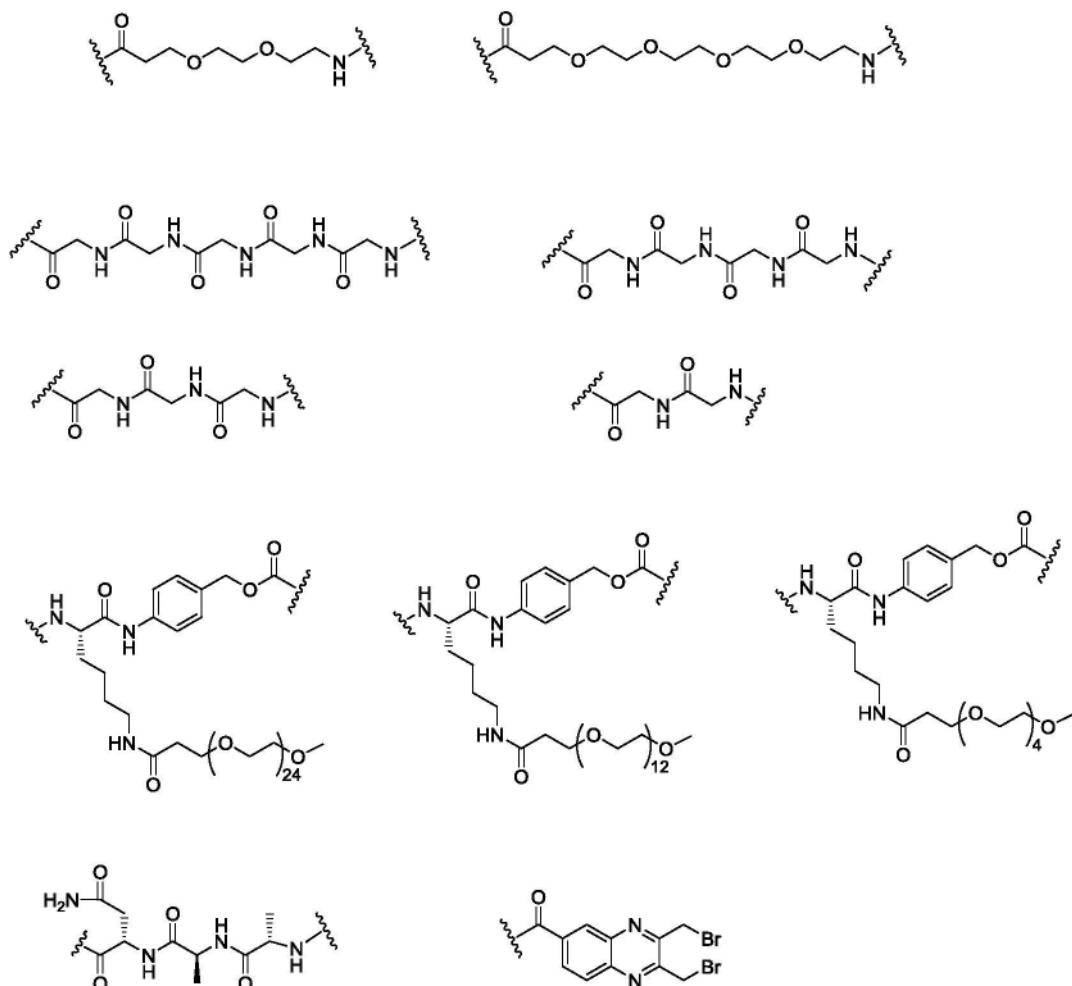
[0015] (b) 药物或毒性物质部分, 所述药物或毒性物质部分为微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物; 和

[0016] (c) 缀合连接子部分, 其中所述缀合连接子部分结合至IgG抗体的铰链区中的单个Cys残基, 并且其中IgG抗体的重链铰链区可以经突变以使得所述重链铰链区仅含有一个Cys残基。

[0017] 优选地,所述药物或毒性物质部分选自由D1、D2、D3、D4、D5及其组合组成的组,其中D1、D2、D3、D4和D5的结构为:

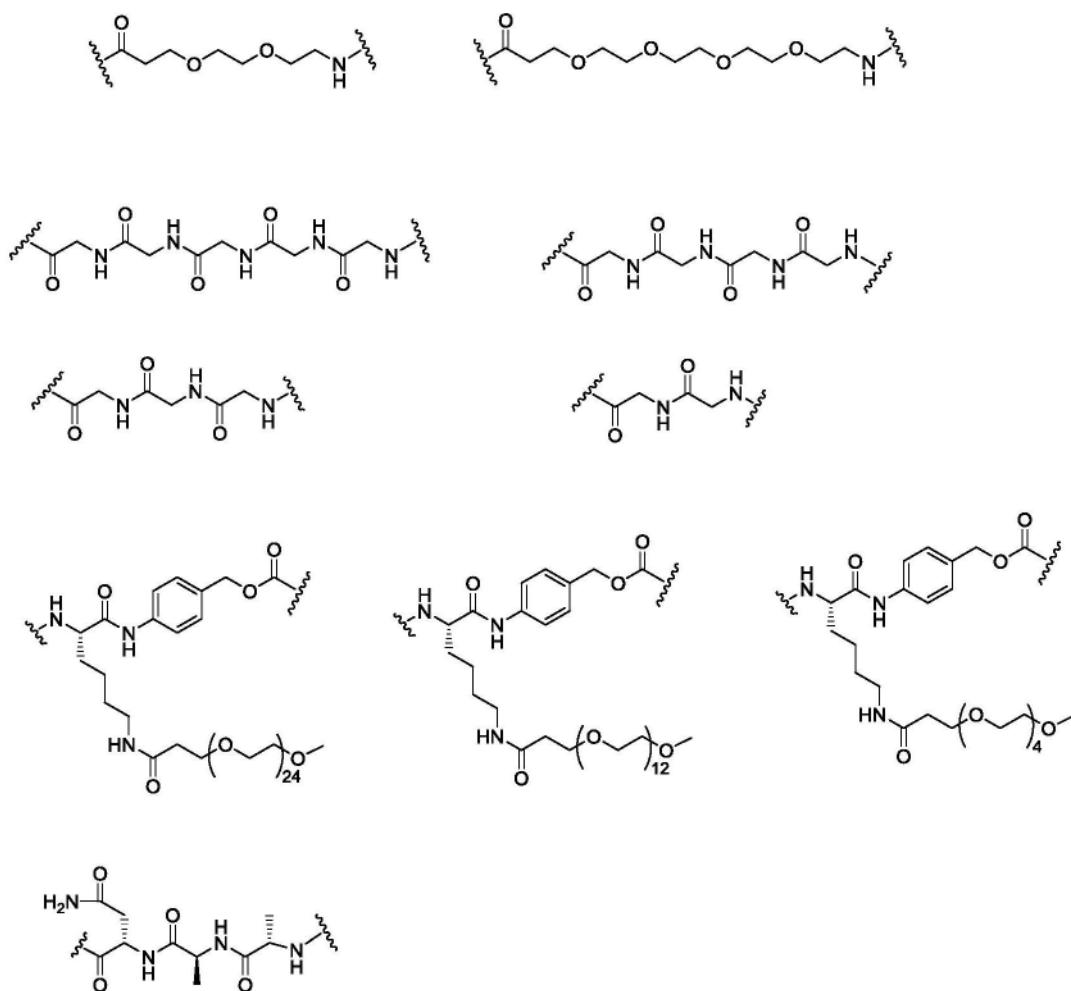


[0018] [0019] 在一些实施方式中,所述缀合连接子部分包含连接子部分和缀合部分。在一些实施方式中,所述缀合连接子部分包含以下结构中的一种或多种:



[0021] 其中波浪线表示连接至所述药物或毒性物质部分和所述缀合部分的位点。在一些实施方式中,所述缀合部分为 其中波浪线表示连接至所述缀合连接子部分的位点。

[0022] 优选地,所述缀合连接子部分选自:



[0026] 在另一方面中,提供了一种抗体药物缀合物(ADC)组合物,所述组合物包含与CD38结合的IgG抗体、连接子部分和与所述连接子部分缀合的毒性物质部分,所述连接子部分缀合至突变为仅具有一个Cys残基的IgG抗体的铰链区中的一个Cys残基。

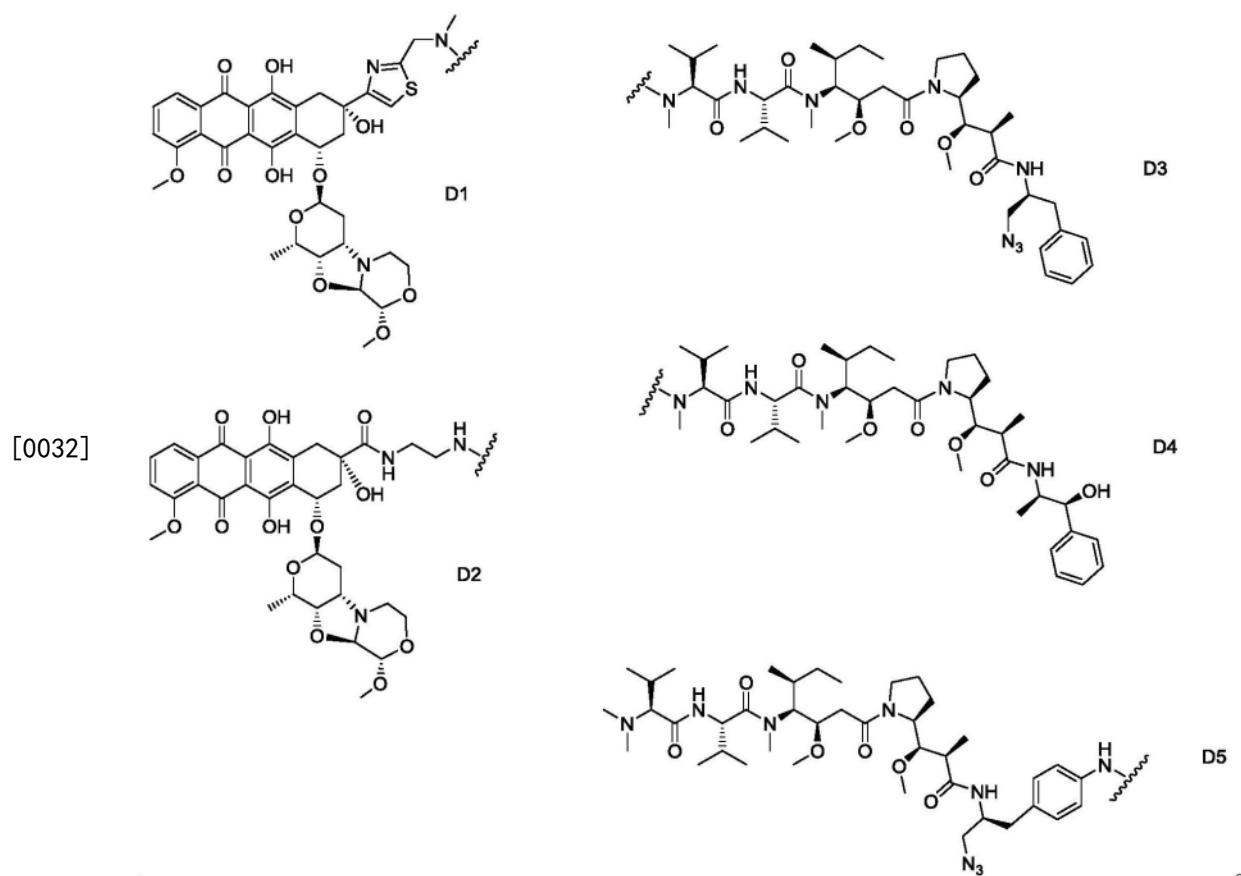
[0027] 在另一方面中,提供了一种抗-CD38 ADC组合物,所述组合物包含:

[0028] (a) 抗-CD38 IgG抗体C38A2-SV(其重链/轻链可变区包含SEQ ID NO.1/3)或C38A2(其重链/轻链可变区包含SEQ ID NO.1/2);

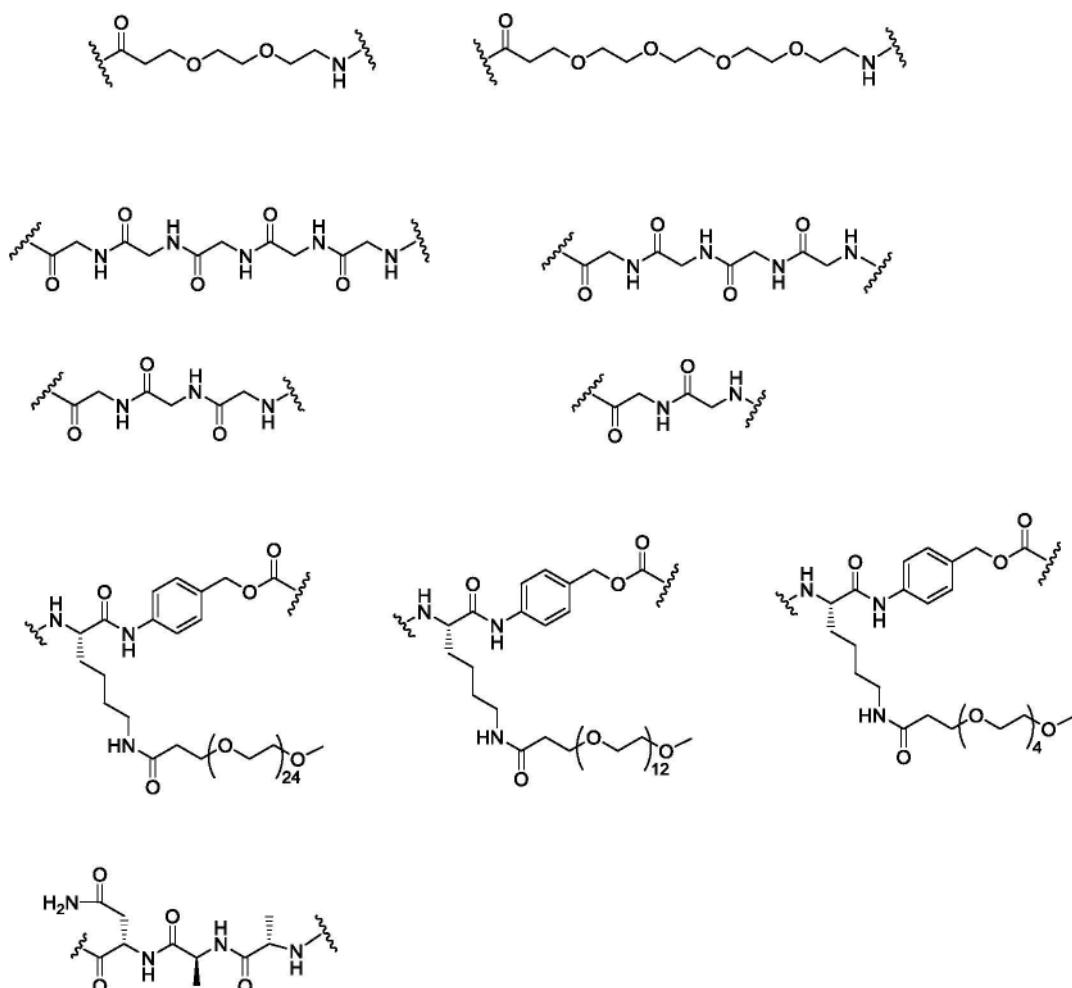
[0029] (b) 药物或毒性物质部分,所述药物或毒性物质部分为微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物;和

[0030] (c) 缀合连接子部分,其中所述缀合连接子包含连接子和缀合部分,所述缀合部分共价结合至IgG抗体的铰链区中的单个Cys残基,并且其中IgG抗体的重链铰链区可以经突变以使得所述重链铰链区仅含有一个Cys残基。

[0031] 在一些实施方式中,所述药物或毒性物质部分选自由D1、D2、D3、D4、D5及其组合组成的组,其中D1、D2、D3、D4和D5的结构为:

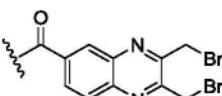


[0033] 在一些实施方式中,所述连接子选自:



[0034]

[0035] 其中波浪线表示连接至所述缀合部分和所述药物或毒性物质部分的位点。

[0036] 在一些实施方式中,所述缀合部分为  其中波浪线表示连接至所述连接子的位点。

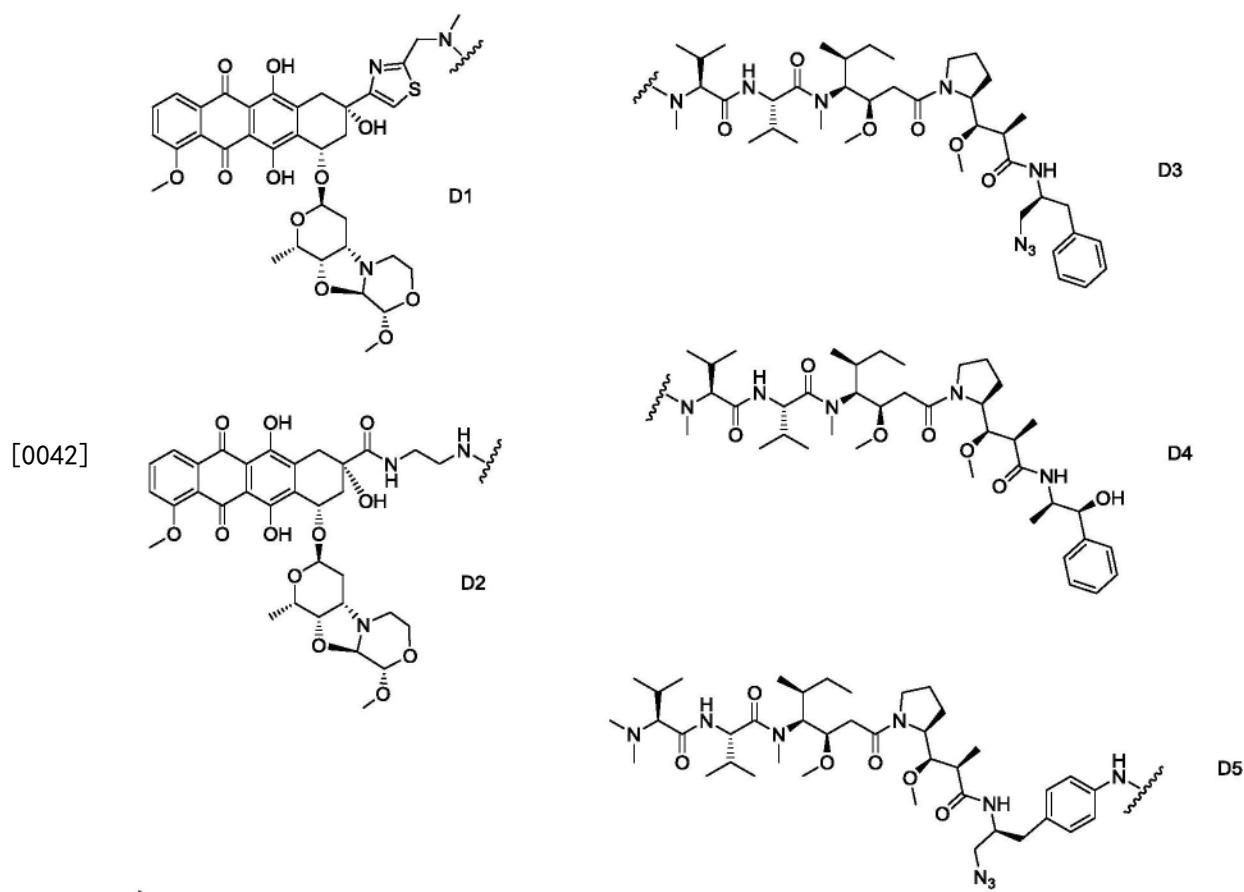
[0037] 本公开还提供了一种治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括施用治疗有效量的抗-CD38 ADC组合物,所述抗-CD38 ADC组合物包含:

[0038] (a) 抗-CD38 IgG抗体C38A2(其重链/轻链可变区包含SEQ ID NO.1/2)或C38D8(其重链/轻链可变区包含SEQ ID NO.3/4);

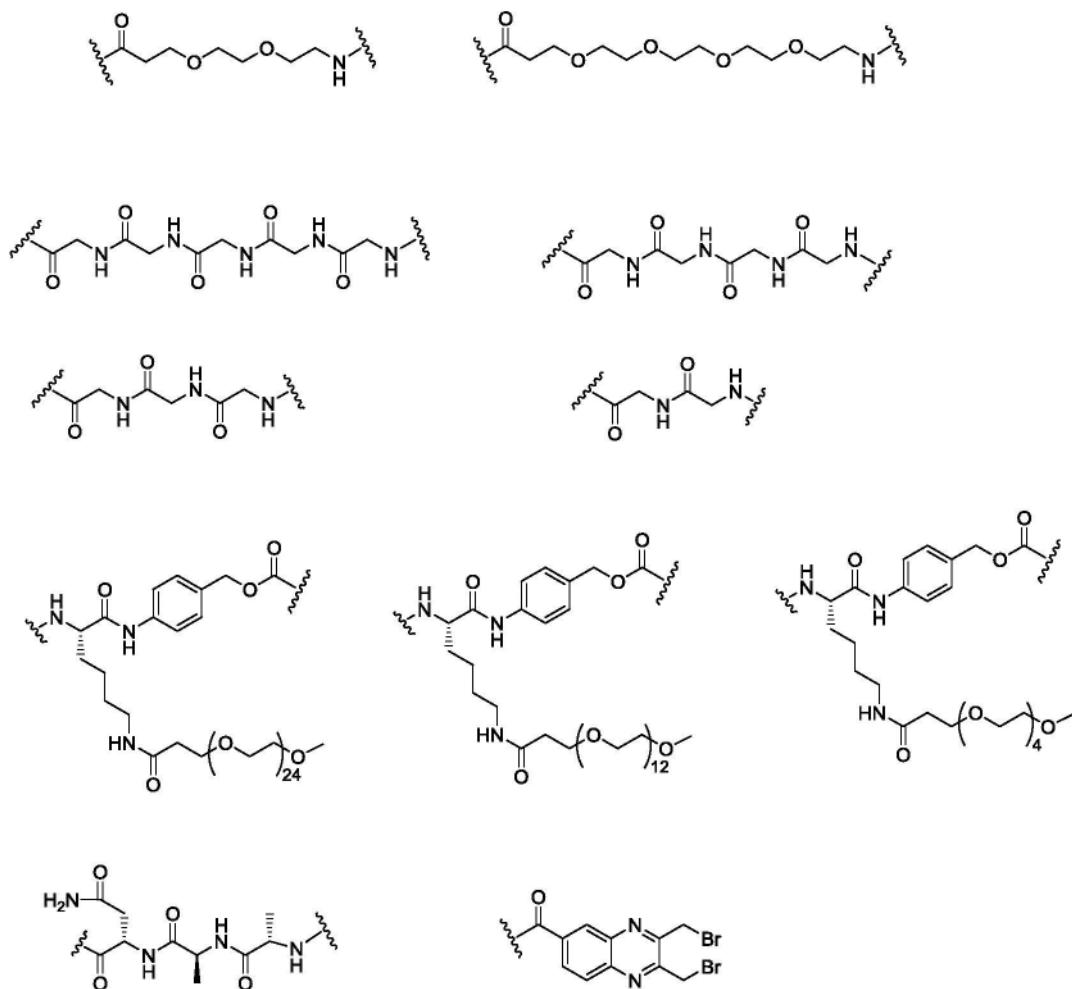
[0039] (b) 药物或毒性物质部分,所述药物或毒性物质部分为微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物;和

[0040] (c) 缀合连接子部分,其中所述缀合连接子部分结合至IgG抗体的铰链区中的单个Cys残基,并且其中IgG抗体的重链铰链区可以经突变以使得所述重链铰链区仅含有一个Cys残基。

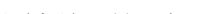
[0041] 优选地,所述药物或毒性物质部分选自由D1、D2、D3、D4、D5及其组合组成的组,其中D1、D2、D3、D4和D5的结构为:



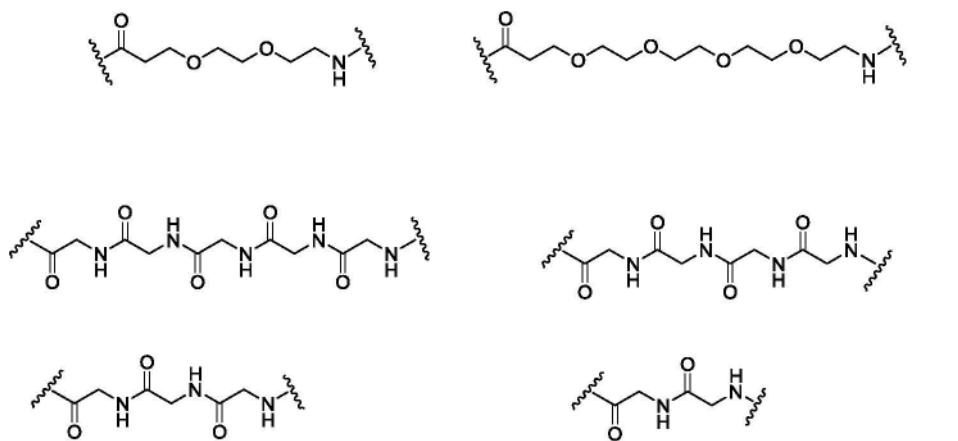
[0043] 在一些实施方式中，所述缀合连接子部分包含连接子部分和缀合部分。在一些实施方式中，所述缀合连接子部分包含以下结构中的一种或多种：



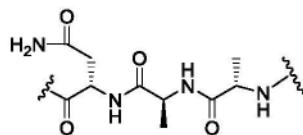
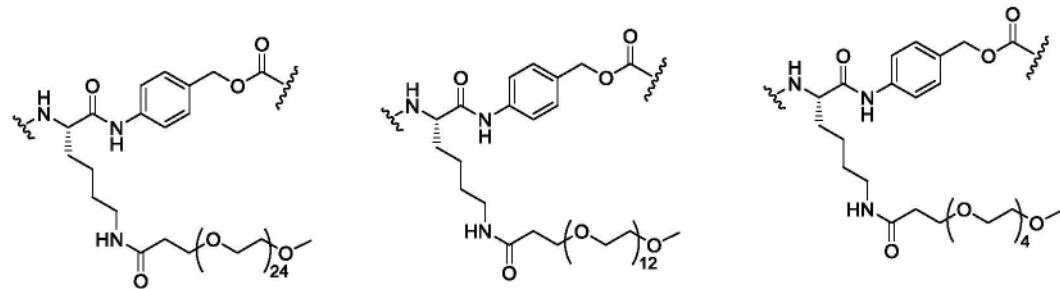
[0044]

[0045] 其中波浪线表示连接至所述药物或毒性物质部分和所述缀合部分的位点。在一些实施方式中,所述缀合部分为  其中波浪线表示连接至所述缀合连接子部分的位点。

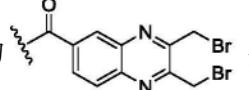
[0046] 优选地,所述缀合连接子部分的所述连接子部分选自:



[0047]



[0048] 其中波浪线表示连接点。

[0049] 优选地,所述缀合部分为 ，其中波浪线表示连接点。

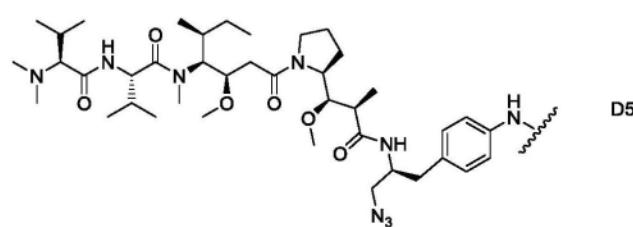
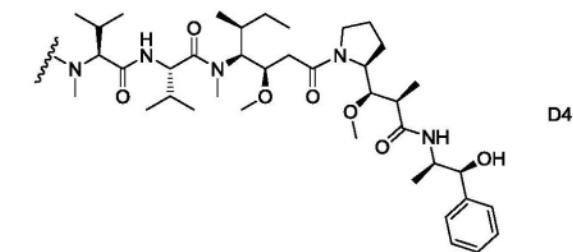
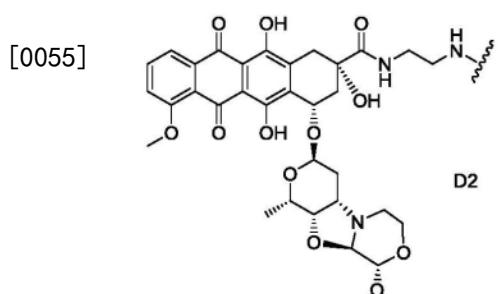
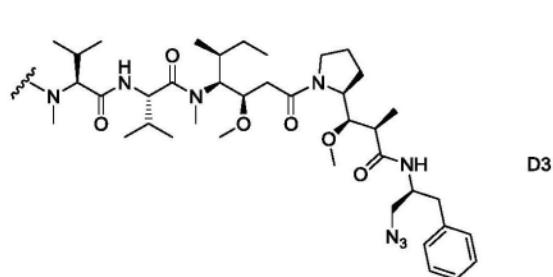
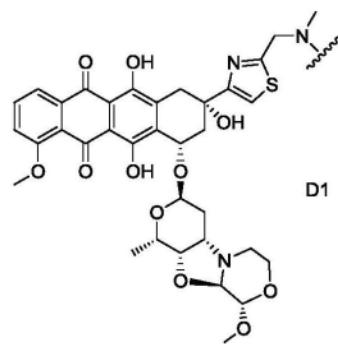
[0050] 在另一方面中,提供了一种治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括提供治疗有效量的抗-CD38 ADC组合物,所述抗-CD38 ADC组合物包含:

[0051] (a) 抗-CD38 IgG抗体C38A2-SV(其重链/轻链可变区包含SEQ ID NO.1/3)或C38A2野生型(其重链/轻链可变区包含SEQ ID NO.1/2)；

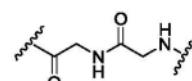
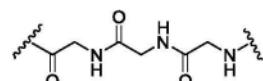
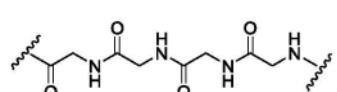
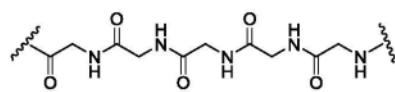
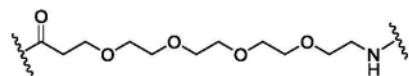
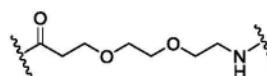
[0052] (b) 药物或毒性物质部分,所述药物或毒性物质部分为微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物;和

[0053] (c) 缀合连接子部分,其中所述缀合连接子包含连接子和缀合部分,所述缀合部分共价结合至IgG抗体的铰链区中的单个Cys残基,并且其中IgG抗体的重链铰链区可以经突变以使得所述重链铰链区仅含有一个Cys残基。

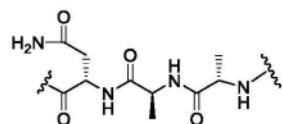
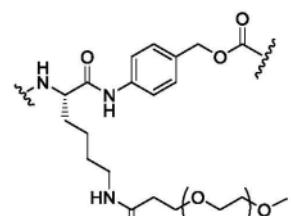
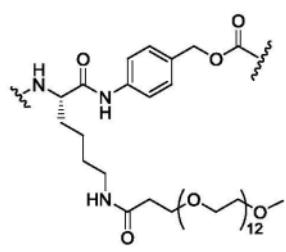
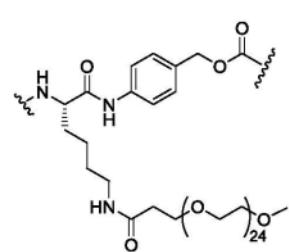
[0054] 在一些实施方式中,所述药物或毒性物质部分选自由D1、D2、D3、D4、D5及其组合组成的组,其中D1、D2、D3、D4和D5的结构为:



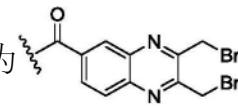
[0056] 在一些实施方式中,所述连接子选自:



[0057]



[0058] 其中波浪线表示连接至所述缀合部分和所述药物或毒性物质部分的位点。

[0059] 在一些实施方式中,所述缀合部分为  其中波浪线表示连接至所述连接子的位点。

[0060] 优选地,所述抗体部分是在2016年4月8日提交的美国序列号15/094,384中公开并要求保护的CD38A2野生型抗体的变体,其公开内容通过引用并入本文。CD38A2野生型可变区序列在本文中公开为重链SEQ ID N0.1和轻链SEQ ID N0.2。更具体地,变体序列改变自轻链可变区N末端起的第二和第三氨基酸。优选地,所述抗体部分包含具有重链SEQ ID N0.1和轻链SEQ ID N0.3的CD38A2-SV(SV变体)。

[0061] 附图简述

[0062] 图1A显示了在伯基特淋巴瘤模型中的抗-CD38 ADC的体内研究。在该研究中,将1000万个Daudi细胞皮下注射至Nu Nu小鼠。在荷瘤小鼠的平均肿瘤体积达到200mm³之后,将ADC#45静脉注射至荷瘤小鼠。

[0063] 图1B显示了用三种不同指示剂量的ADC#45治疗的小鼠的体重测量。

[0064] 图2A显示了在伯基特淋巴瘤模型中的抗-CD38 ADC的体内研究。在该研究中,将1000万个Ramos细胞皮下注射至Nu Nu小鼠。在荷瘤小鼠的平均肿瘤体积达到200mm³之后,以指示剂量将ADC#45静脉注射至荷瘤小鼠。

[0065] 图2B显示了用抗-CD38-ADC治疗的小鼠的体重测量。

[0066] 图3显示了在伯基特淋巴瘤模型中的抗-CD38 ADC的体内研究。在该研究中,将1000万个Daudi-1uc细胞静脉注射至NOD-SCID小鼠。注射肿瘤后14天,将抗-CD38抗体(A2)和由相同A2抗体制成的两种抗-CD38 ADC静脉注射至荷瘤小鼠。

[0067] 图4显示了在伯基特淋巴瘤模型中的抗-CD38 ADC的体内研究。在该研究中,将1000万个Daudi-1uc细胞静脉注射至NOD-SCID小鼠。在注射肿瘤14天后,将ADC#45和ADC#41静脉注射至荷瘤小鼠。

[0068] 图5显示了在伯基特淋巴瘤模型中的抗-CD38 ADC的体内研究。在该研究中,将1000万个Daudi-1uc细胞静脉注射至NOD-SCID小鼠。注射肿瘤后14天,将抗-CD38抗体和抗-CD38-ADC静脉注射至荷瘤小鼠。每周拍摄一次小鼠图像。

[0069] 图6显示了在伯基特淋巴瘤模型中的抗-CD38 ADC的体内研究。在该研究中,将1000万个Daudi-1uc细胞静脉注射至NOD-SCID小鼠。在注射肿瘤14天后,将ADC#45和ADC#41静脉注射至荷瘤小鼠。每周拍摄一次小鼠图像。

[0070] 图7显示了将表达CD38的癌细胞系Ramos、Raji和RPMI8226,以及CD38阴性细胞系PC-3接种在96孔板中,并从100nM开始,用系列稀释的ADC#45、ADC#41和ADC#46治疗。根据缀合的有效载荷的性质,将细胞处理3-5天。处理结束时,用来自Promega的CelltitreGloTM发光试剂盒对细胞进行染色,并通过发光板读数器捕获信号。ADC对肿瘤细胞生长抑制的活性表示为50%细胞生长抑制时所需的浓度,即所谓的EC50(以nM为单位)。数据表明,ADC#45、ADC#41和ADC#46对表面表达CD38的细胞显示出选择性抑制。

[0071] 图8显示了起始抗-CD38抗体和纯化的ADC46缀合物在280nm检测下的HIC-HPLC叠加图。

[0072] 图9显示了起始抗-CD38抗体和纯化的ADC41缀合物在280nm检测下的HIC-HPLC叠加图。

[0073] 图10A显示了在伯基特淋巴瘤模型中的抗-CD38 ADC46的体内研究。在该研究中, 将1000万个Daudi细胞皮下注射至Nu Nu小鼠。荷瘤小鼠的平均肿瘤体积达到200mm³后, 将ADC 46静脉注射至荷瘤小鼠。

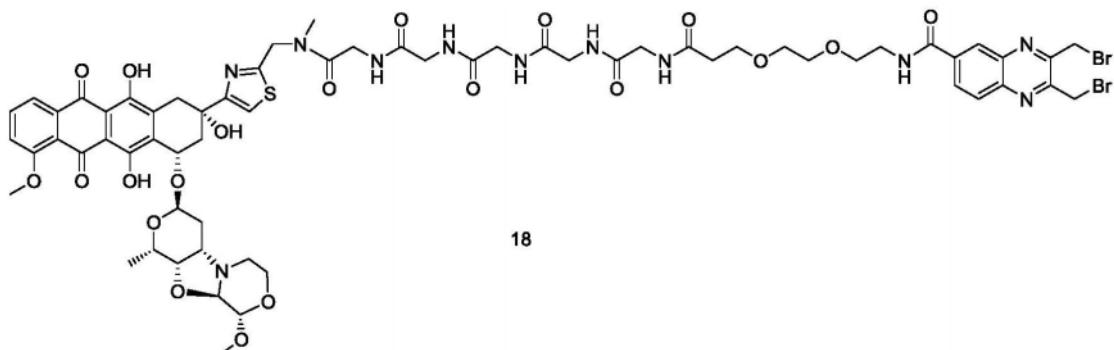
[0074] 图10B显示了用三种不同指示剂量的ADC 46治疗的小鼠的体重测量。

[0075] 发明详述

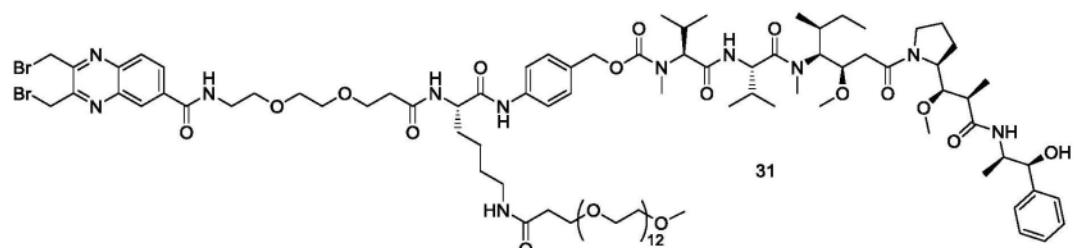
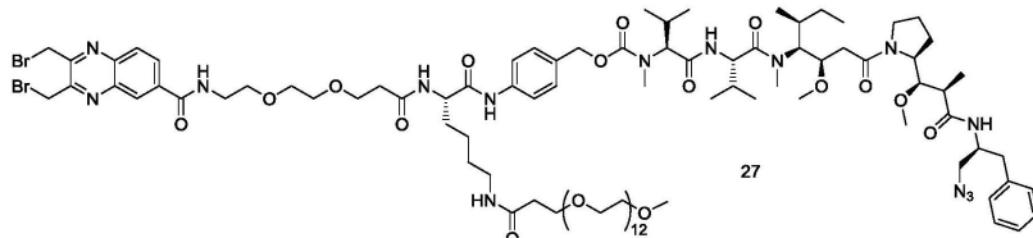
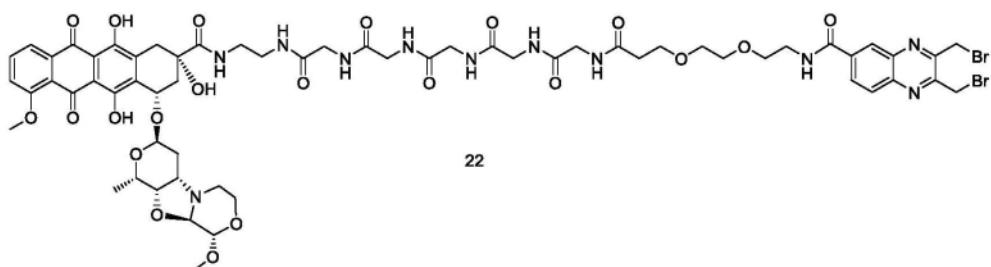
[0076] 本公开提供了含有新型人抗CD38抗体 (A2) (在2016年4月8日提交的美国专利申请2016/0297888, 序列号15/094,384中进行了描述, 其公开内容通过引用并入本文) 和本文所述的毒性物质部分 (包括微管蛋白抑制剂或DNA破坏剂, 例如多柔比星类似物) 的抗体药物缀合物。该ADC缀合物保留了结合亲和力, 并在多种CD38阳性细胞系和体内显示出有效的细胞杀力。

[0077] 本公开提供了一种抗体药物缀合物 (ADC) 组合物, 所述组合物包含与CD38结合的IgG抗体、缀合连接子部分 (其与IgG抗体的铰链区中的单个Cys残基结合, 其中所述铰链区可以经突变以使得重链铰链区仅含有一个而非两个Cys残基), 和选自蒽环类和尾海霉素的衍生物的毒性物质部分。优选地, 所述毒性物质部分是微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物。优选地, 所述抗体是称为人C38A2 (美国专利申请2016/0297888中的重/轻链SEQ ID NO 3/4 或本文的重链/轻链可变区SEQ ID NO.1/2) 家族的IgG抗体, 或为C38D8 (美国专利申请2016/0297888中的重/轻链SEQ ID NO 21/22或本文的重链/轻链可变区SEQ ID NO.3/4)。优选地, 具有连接子结构的缀合的毒性物质选自:

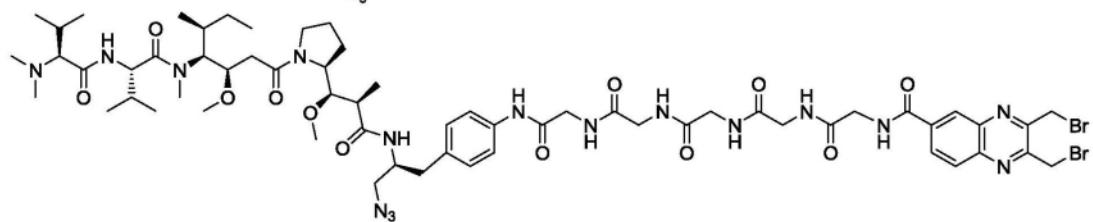
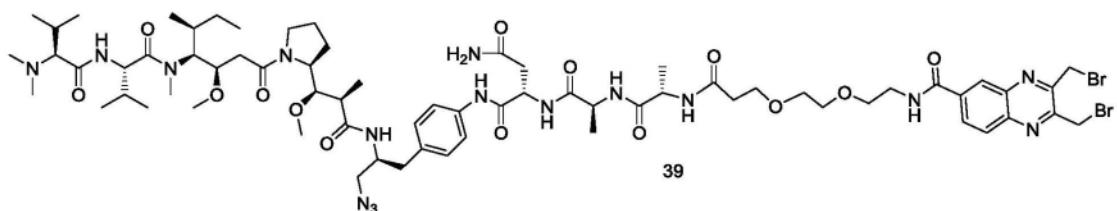
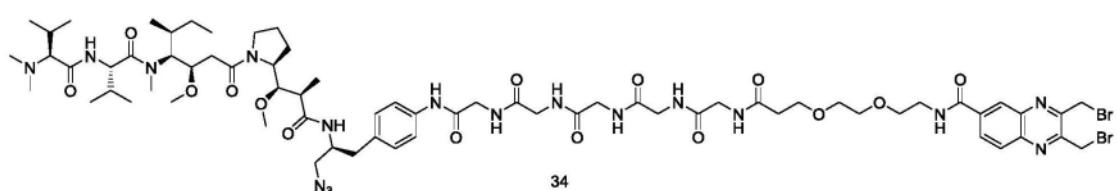
[0078]



18

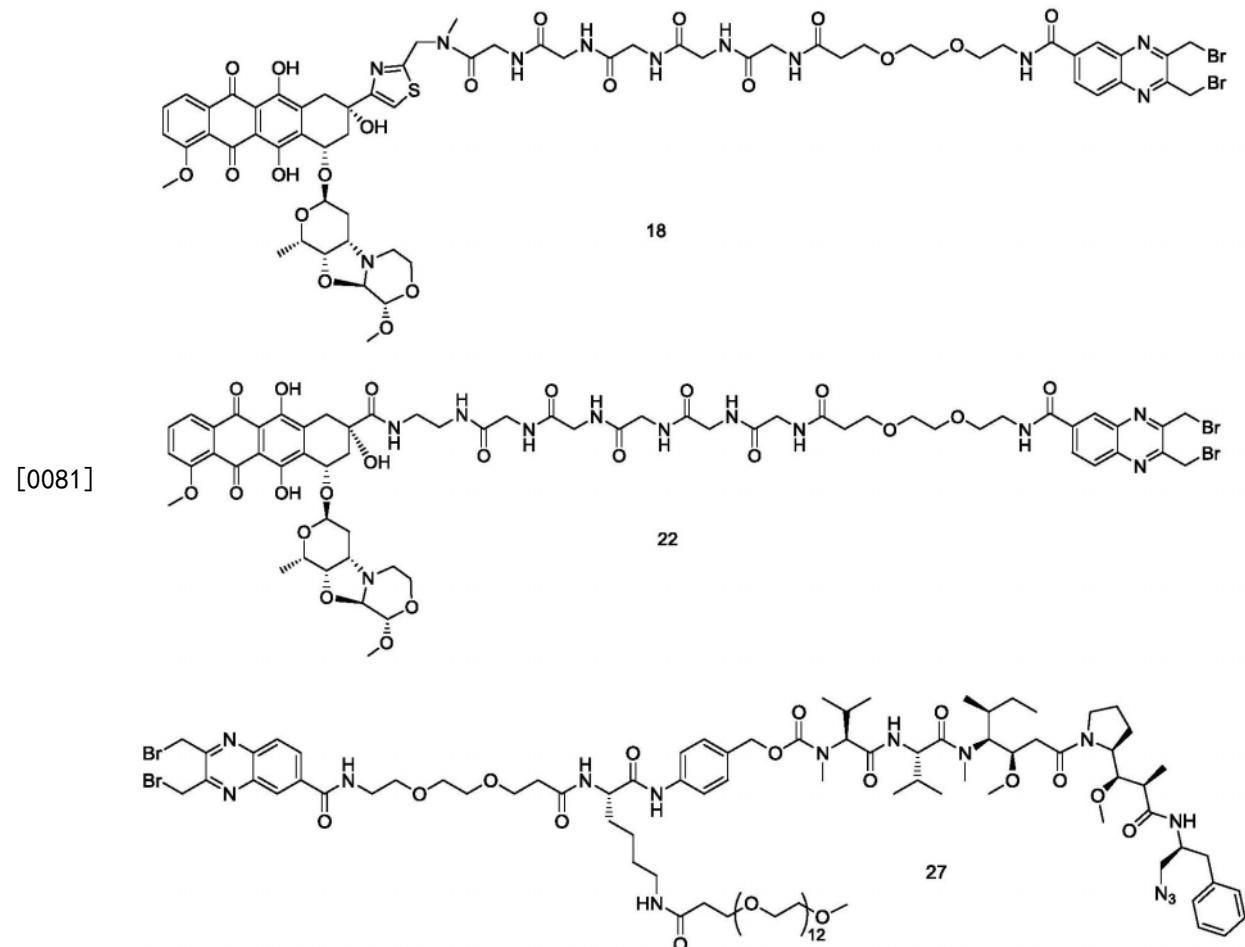


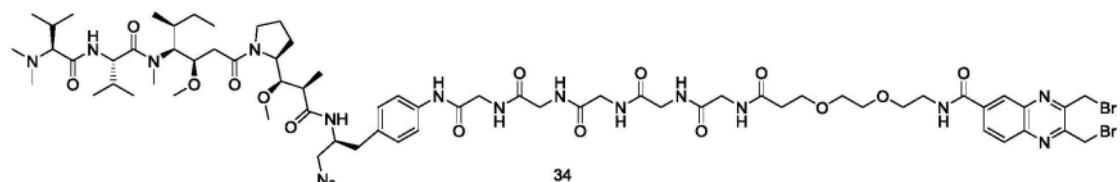
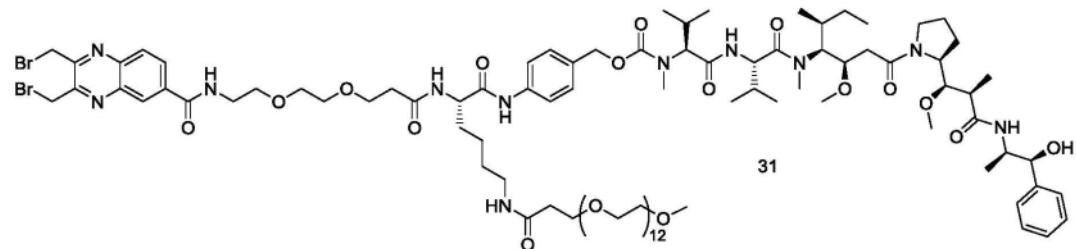
[0079]



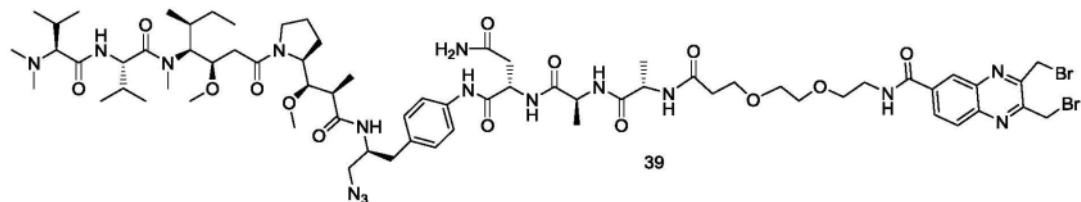
[0080] 本公开提供了一种治疗多发性骨髓瘤的方法,所述方法包括施用有效量的抗体药物缀合物(ADC)组合物,所述组合物包含与CD38结合的IgG抗体、与IgG抗体的铰链区中的Cys残基结合的缀合连接子部分和毒性物质部分。“与Cys残基结合”是指缀合连接子部分可以与IgG抗体的铰链区中的Cys残基的硫原子共价结合。优选地,所述毒性物质部分是微管蛋白抑制剂或多柔比星类似物。优选地,所述抗体是称为人C38A2(美国专利申请2016/0297888中的重/轻链SEQ ID NO 3/4或本文的重链/轻链可变区SEQ ID NO.1/2)家族的IgG抗体,或为C38D8(美国专利申请2016/0297888中的重/轻链SEQ ID NO 21/22或本文的重

链/轻链可变区SEQ ID NO.3/4)。本领域技术人员将认识到,与本文所公开的连接子和缀合部分缀合的本文所公开的毒性物质部分表示中间体毒性物质连接子缀合物,当其共价结合(缀合至)本文所公开的IgG抗体时,其为本文所公开的ADC。优选地,具有连接子结构的缀合的毒性物质选自(指明了每个化合物的编号):

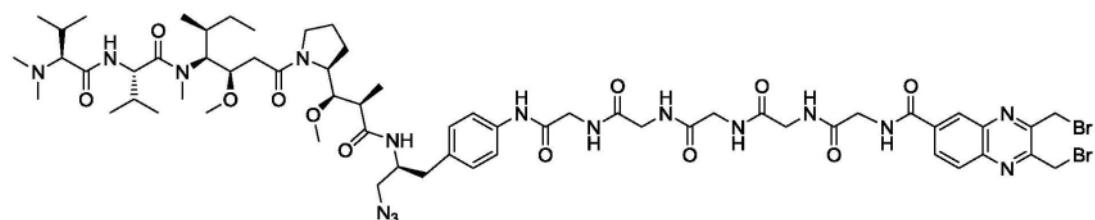




[0082]



和

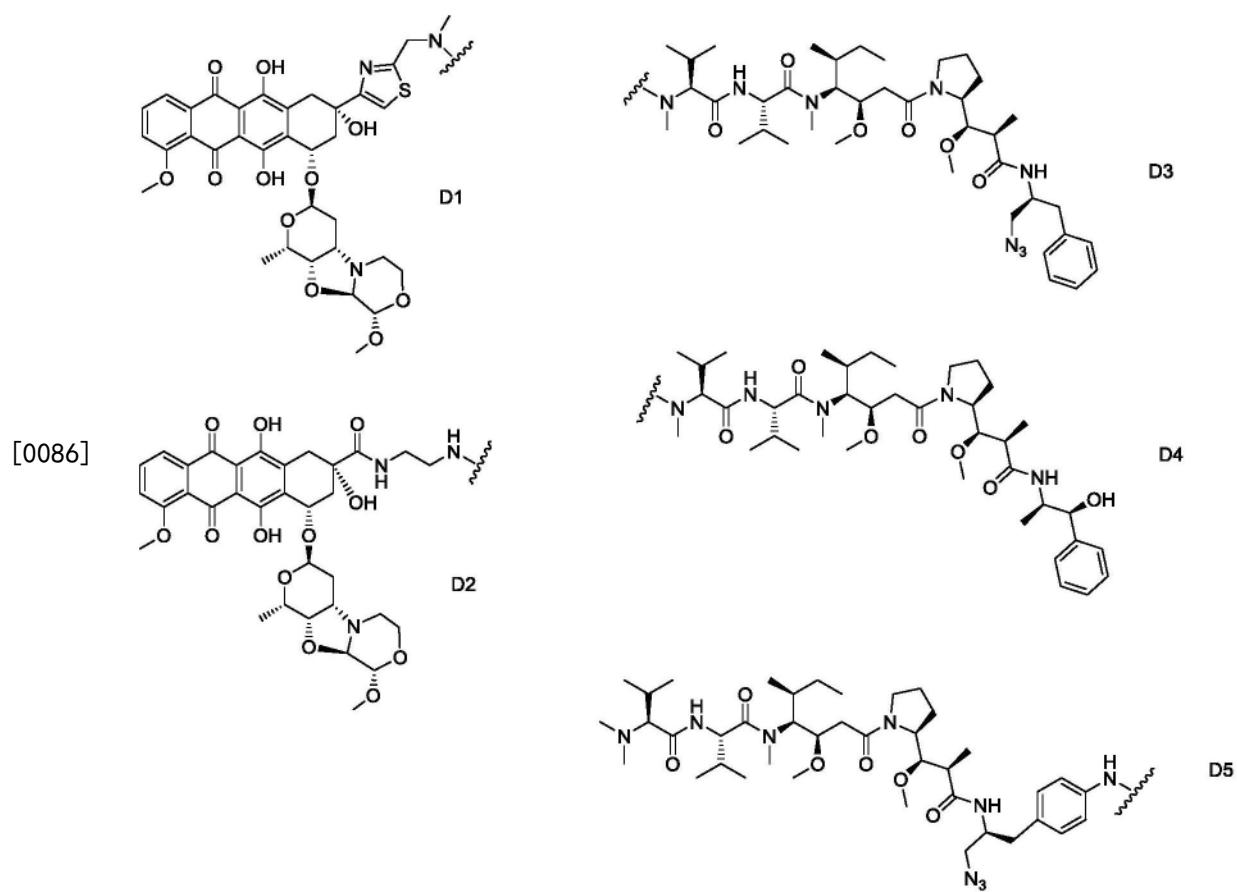


[0083]

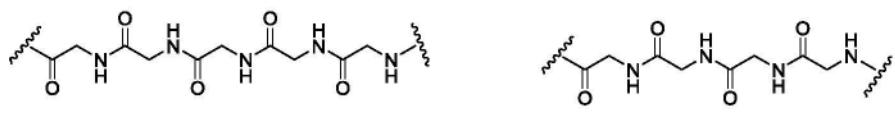
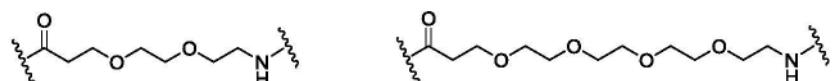
	细胞毒性药物 (D)	连接子 (L2)	缀合方法 (L1)
D1		-C(=O)、Gly、Ser、 Thr、 β -Ala、 $-(H_2CH_2O)_n-$ 、或其 组合，其中 n 为 1-24 的整数。	
D2		-C(=O)、Gly、Ser、 Thr、 β -Ala、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、或其 组合，其中 n 为 1-24 的整数。	

[0084]	D3		-C(=O)、 -(CH ₂ CH ₂ O) _n -、Val、 Phe、Lys、PAB、或 其组合，其中n为 1-24的整数。	
	D3		-C(=O)、 -(CH ₂ CH ₂ O) _n -、Val、 Phe、Lys、PAB、或 其组合，其中n为 1-24的整数。	
	D4		-C(=O)、Gly、Ser、 Thr、β-Ala、 -(CH ₂ CH ₂ O) _n -，或 其组合，其中n为 1-24的整数。	
	D5		-C(=O)、 -(CH ₂ CH ₂ O) _n -、 PAB、Val-Cit-PAB、 Val-Ala-PAB、 Ala-Ala-Asn-PAB、 或其组合，其中n 为1-24的整数。	

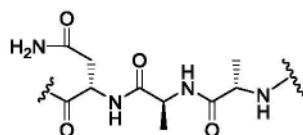
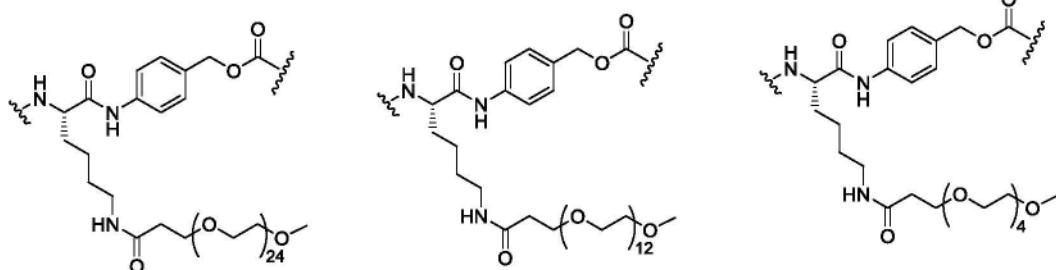
[0085] 毒性物质部分 (D) :D1和D2是蒽环类衍生物。D3、D4和D5是微管蛋白抑制剂。



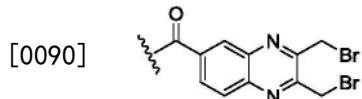
[0087] 连接子部分 (L2) :



[0088]



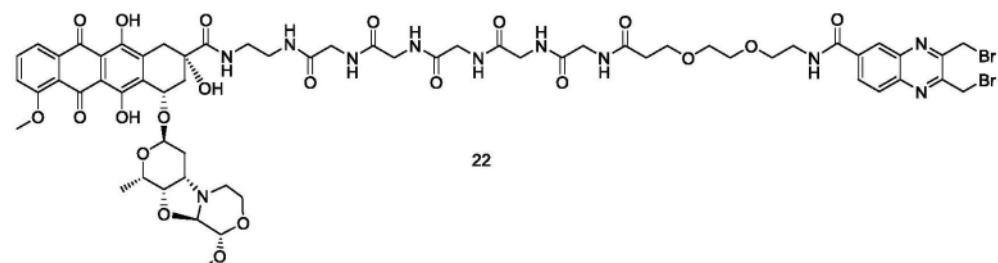
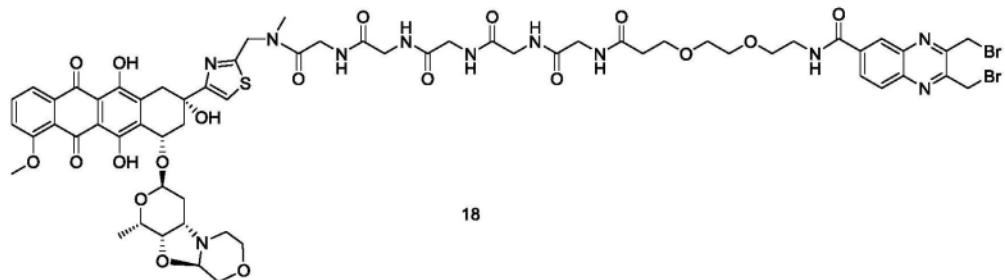
[0089] 缀合方法 (L1)



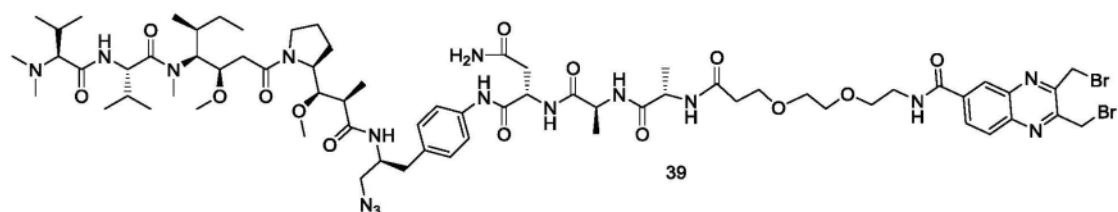
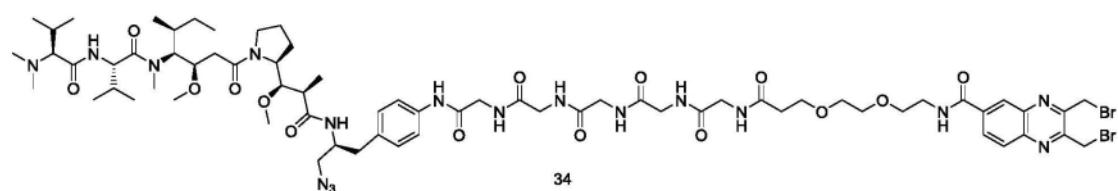
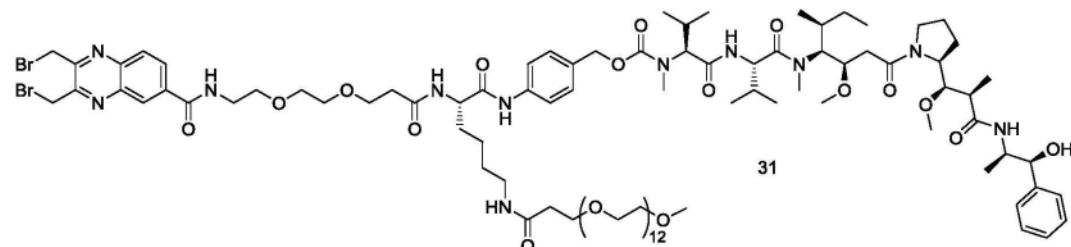
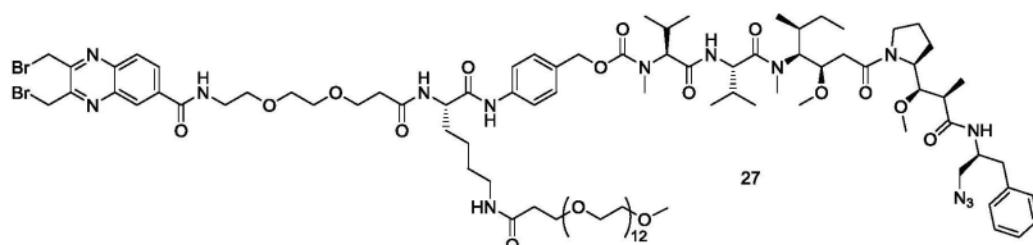
[0091] 波浪线表示连接至连接子的位点。

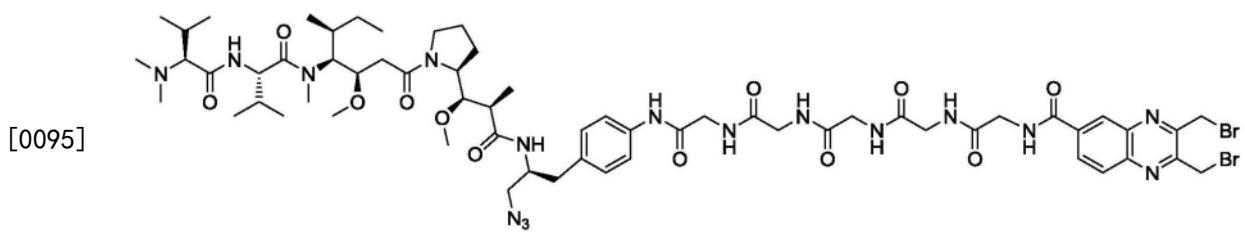
[0092] 在一些实施方式中,药物连接子缀合物包含连接子L2和缀合部分,其中连接子L2共价结合至缀合部分;缀合部分能够与IgG抗体的铰链区中的游离半胱氨酸巯基反应。在一些实施方式中,缀合部分具有结构 (“缀合方法L1”）。

[0093] 药物连接子缀合物的实例:

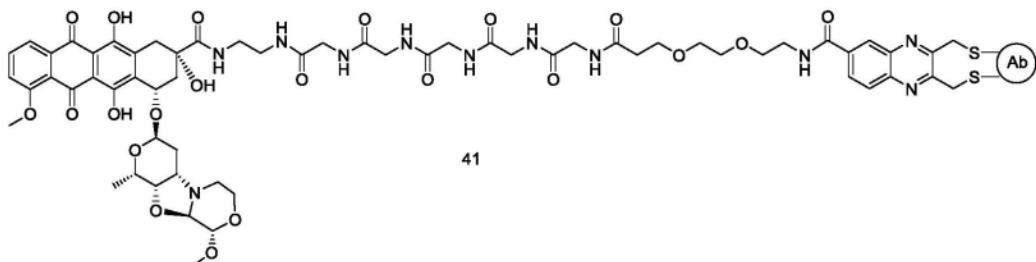
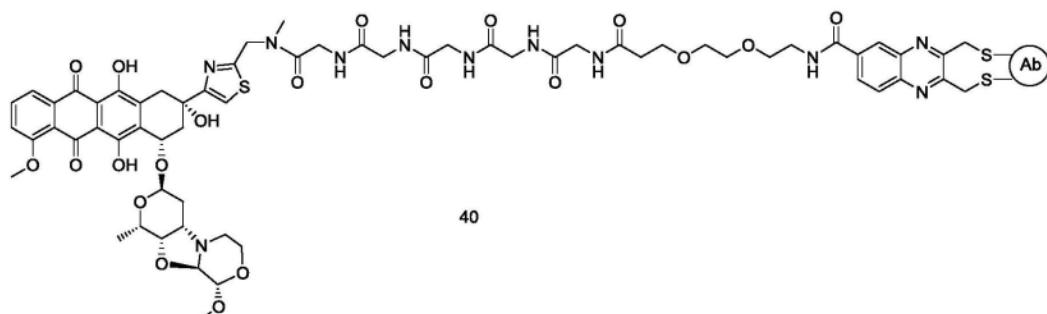


[0094]

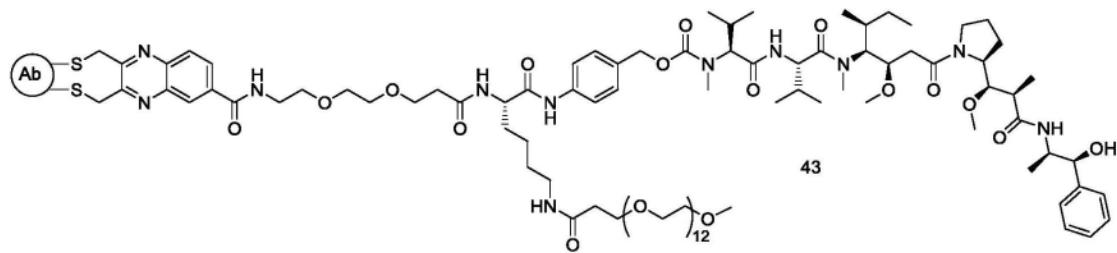
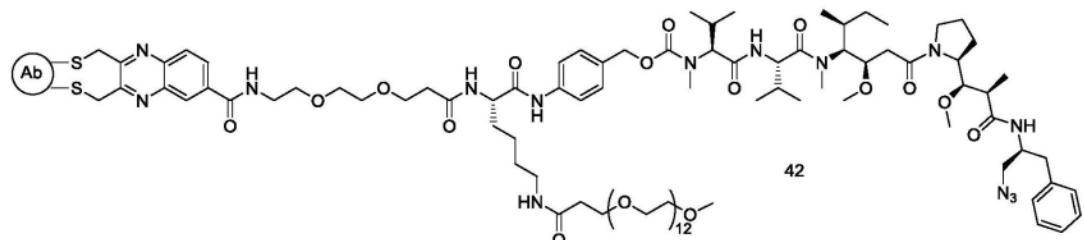


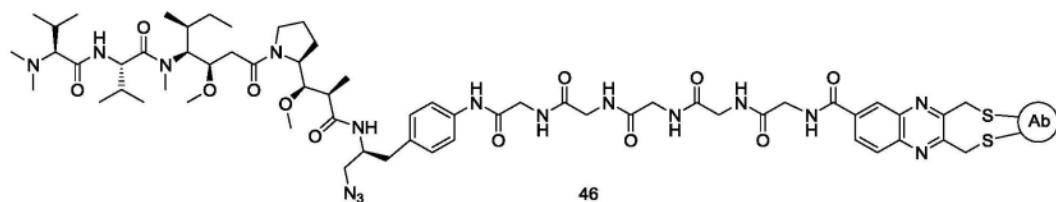
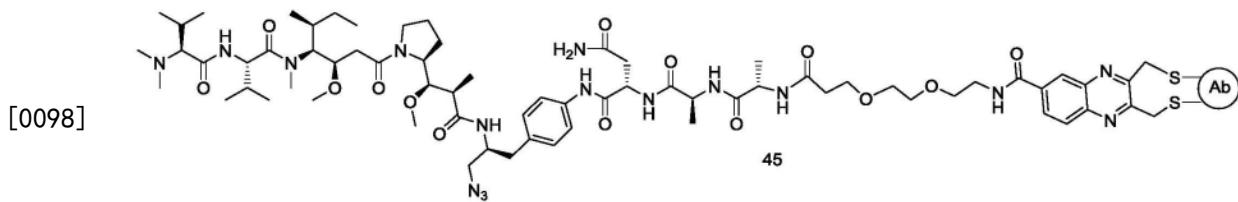
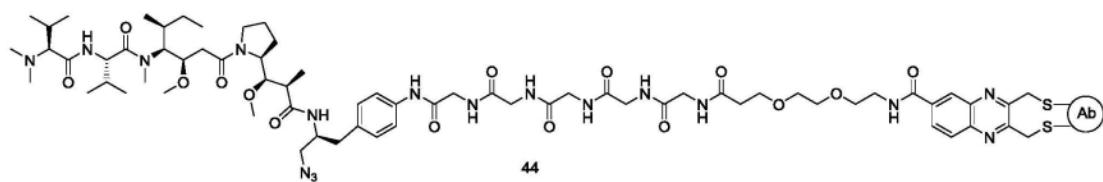


[0096] 抗-CD 38ADC的实例



[0097]



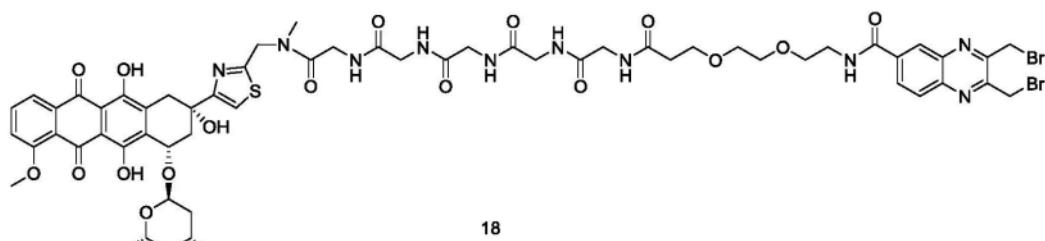


[0099] 定义

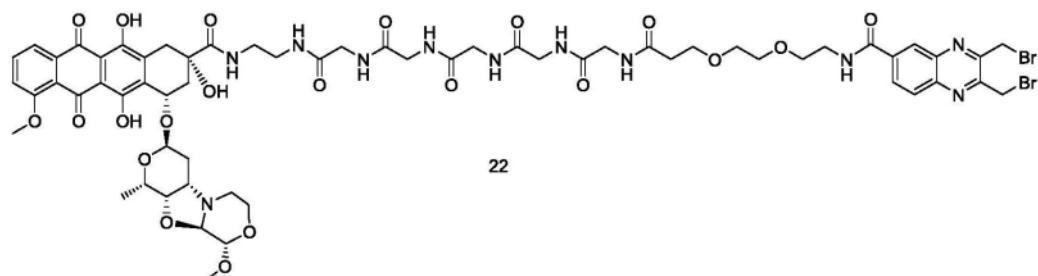
[0100] 如本文所用,常见的有机缩写定义如下:

[0101]	Ac	乙酰基
[0102]	ACN	乙腈
[0103]	Ala	丙氨酸
[0104]	Asn	天冬酰胺
[0105]	aq.	含水的
[0106]	BOC或Boc	叔丁氧羰基
[0107]	℃	摄氏度温度
[0108]	Cit	瓜氨酸
[0109]	DCM	二氯甲烷
[0110]	DIEA	二异丙基乙胺
[0111]	DMF	N,N'-二甲基甲酰胺
[0112]	EDC	1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺
[0113]	Et	乙基
[0114]	EtOAc	乙酸乙酯
[0115]	Eq	当量
[0116]	Fmoc	9-芴甲氧羰基
[0117]	g	克
[0118]	h	小时
[0119]	HATU	2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯
[0120]	HOEt	N-羟基苯并三唑
[0121]	HPLC	高效液相色谱
[0122]	LC/MS	液相色谱-质谱

[0123]	Me	甲基
[0124]	mg	毫克
[0125]	MeOH	甲醇
[0126]	mL	毫升
[0127]	$\mu\text{L}/\mu\text{L}$	微升
[0128]	mol	摩尔
[0129]	mmol	毫摩尔
[0130]	$\mu\text{mol}/\text{umol}$	微摩尔
[0131]	MS	质谱
[0132]	NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
[0133]	PAB	对氨基苄基
[0134]	Pip	哌啶
[0135]	RP-HPLC	反相HPLC
[0136]	rt	室温
[0137]	t-Bu	叔丁基
[0138]	Tert, t	叔
[0139]	TFA	三氟乙酸
[0140]	THF	四氢呋喃
[0141]	Val	缬氨酸
[0142]	药物连接子缀合物的实例：	

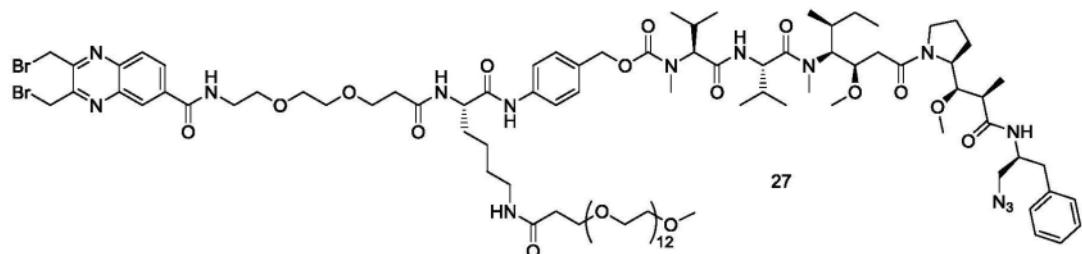


18

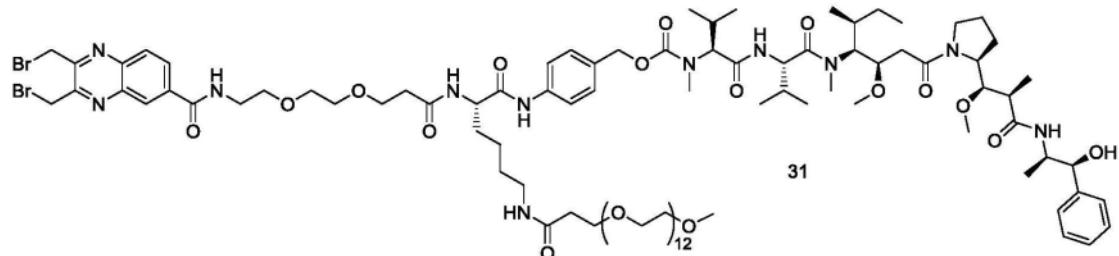


22

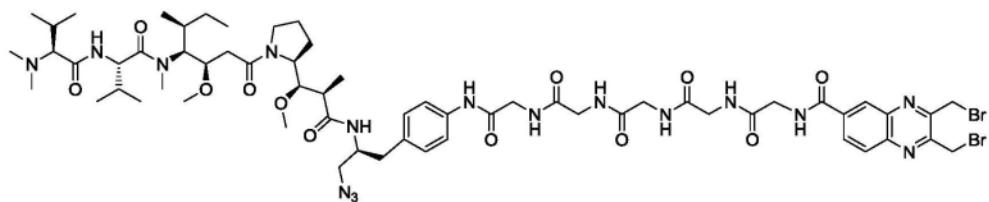
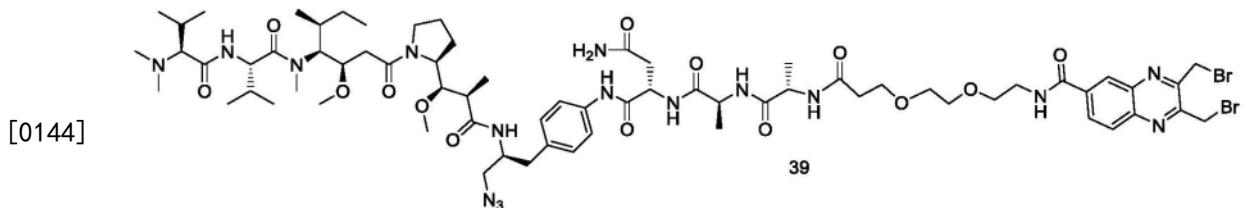
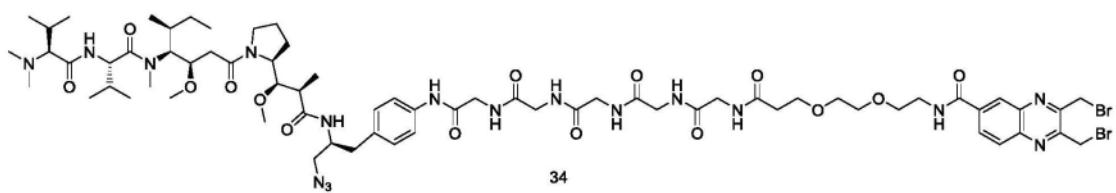
[0143]



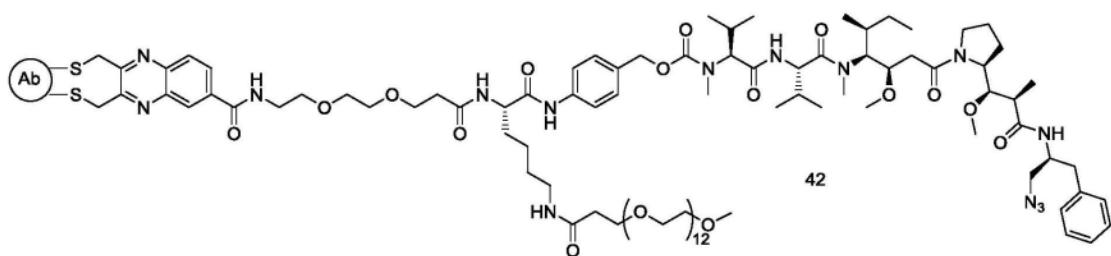
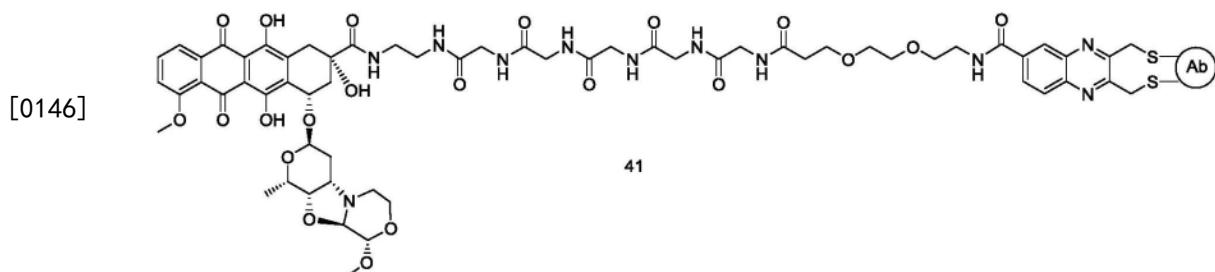
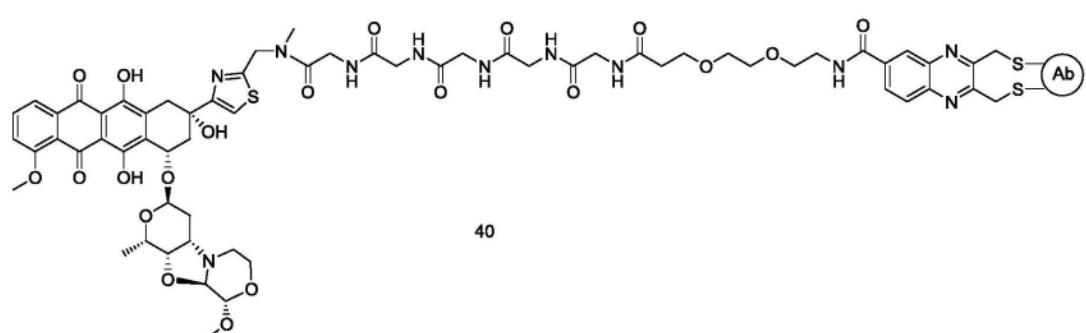
27

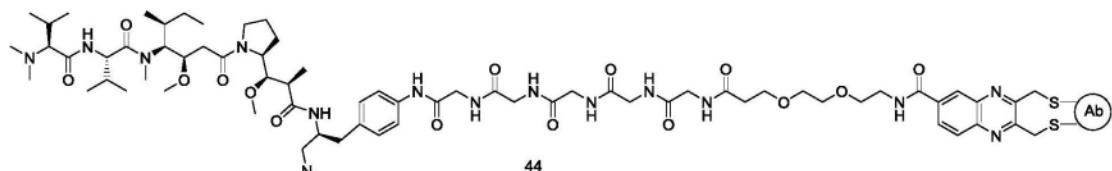
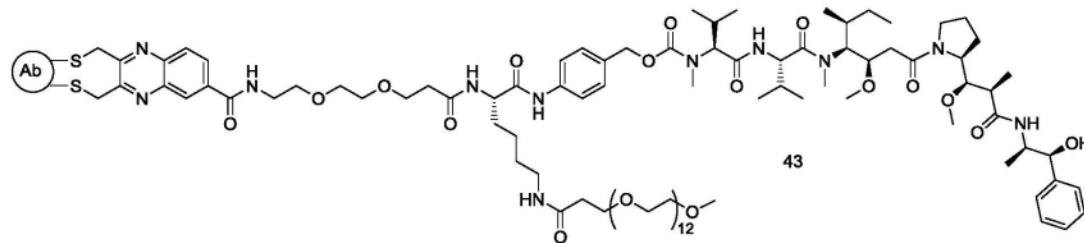


31

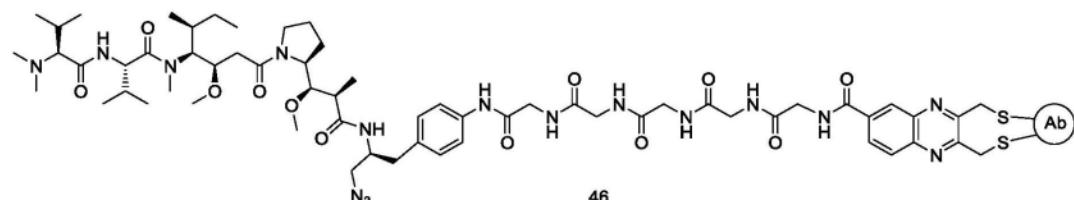
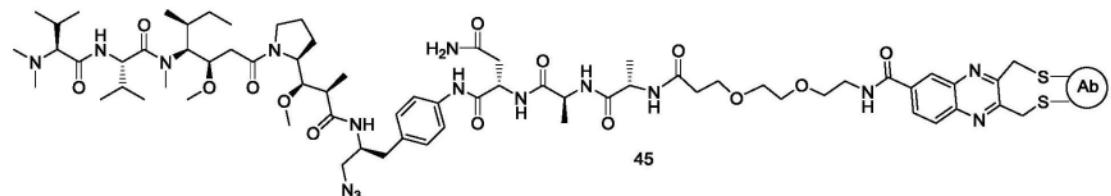


[0145] 抗-CD38 ADC的实例(抗体组分称为“Ab”):



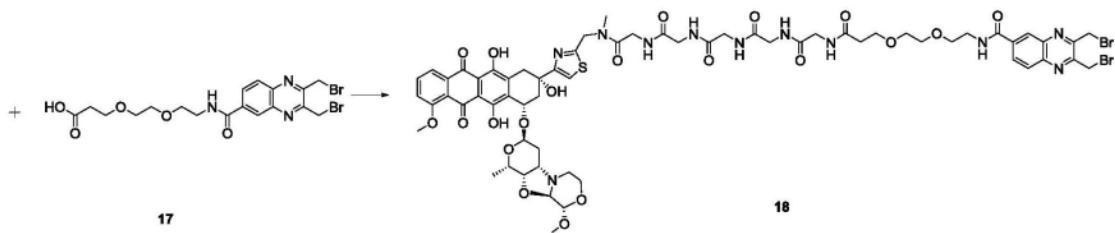
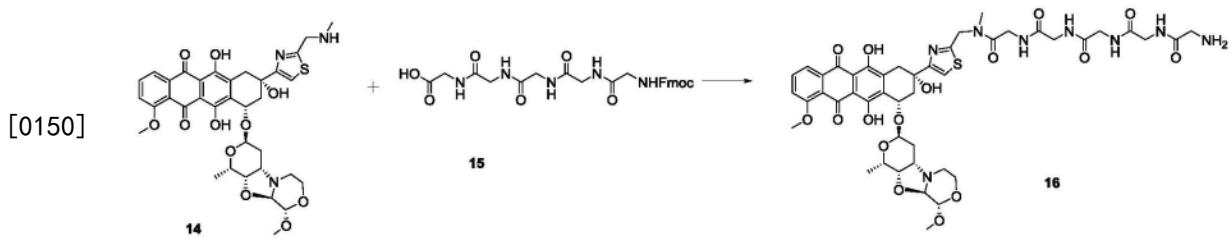
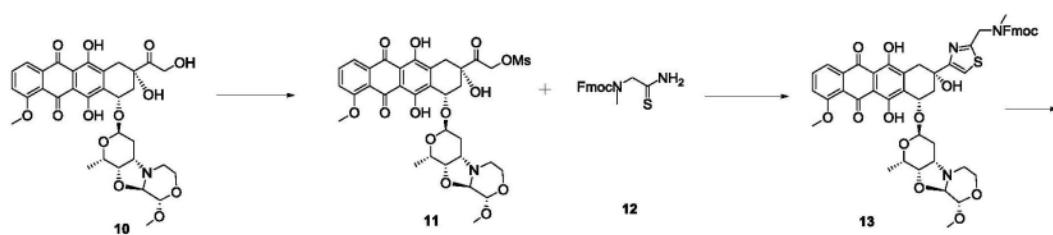


[0147]



[0148] 合成实施例1

[0149] 化合物18的合成：



[0151] 化合物11的合成:

[0152] 在氮气下将化合物10 (30mg, 46.8 μ mol) 溶于3mL无水DCM中。随后加入DIEA (24 μ L, 140 μ mol), 并用冰浴冷却反应混合物。随后加入甲烷磺酰氯 (7.2 μ L, 93.6 μ mol), 并搅拌混合物30分钟。用3mL DCM稀释反应并用4mL水洗涤, 经无水 Na_2SO_4 干燥并蒸发, 得到红色固体状的化合物11 (33mg, 98%)。MS $m/z = 720.5$ ($\text{M}+\text{H}$)。

[0153] 化合物13的合成:

[0154] 在氮气下将化合物11(20mg, 27.8 μ mol)溶于3mL无水乙醇中。随后加入硫代酰胺12(45mg, 139 μ mol), 并在40℃下加热混合物24小时。通过HPLC纯化混合物, 得到红色固体状的化合物13(15mg, 59%)。MS $m/z=932.6$ ($M+H$)。

[0155] 化合物14的合成:

[0156] 在氮气下将化合物13(15mg, 16.1 μ mol)溶于2mL无水DMF中。随后加入60 μ L哌啶，并在环境温度下搅拌混合物10分钟。通过HPLC纯化混合物，得到红色固体状的化合物14(6.9mg, 60%)。MS m/z =710.4(M+H)。

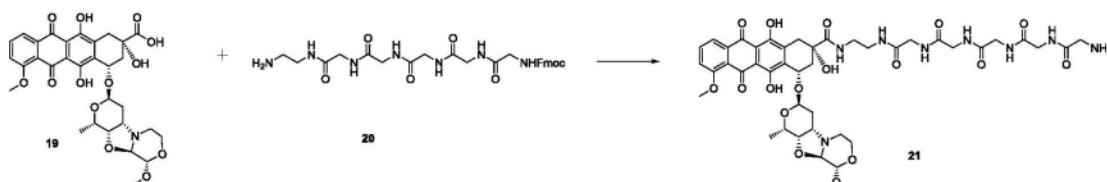
[0157] 化合物16的合成:

[0158] 将化合物15(8.9mg,16.9 μ mol)溶于2mL DMF中,随后加入HATU(6.4mg,16.8 μ mol)和DIEA(9 μ L,51.8 μ mol)。2分钟后,加入化合物14(10mg,14.1 μ mol),并在环境温度下搅拌混合物1小时。向混合物中加入40 μ L DBU并搅拌10分钟。随后通过HPLC纯化混合物,得到红色固体状的化合物16(12.2mg,87%)。MS m/z=995.4(M+H)。

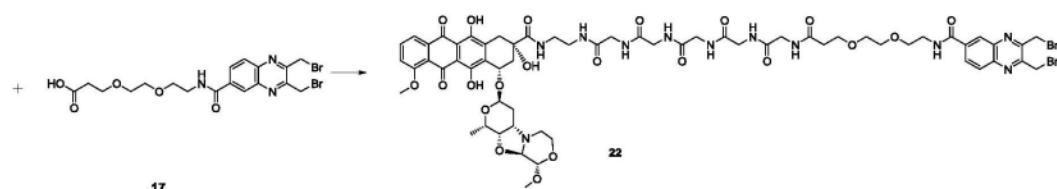
[0159] 化合物18的合成:

[0160] 将化合物17(12.5mg,24.2 μ mol)溶于2mL DCM中,随后加入DIC(1.6mg,12.7 μ mol)。10分钟后,加入溶于0.5mL DMF中的化合物16(12mg,12.1 μ mol),并在环境温度下搅拌混合物10分钟。随后通过HPLC纯化混合物,得到红色固体状的化合物18(12.8mg,71%)。MS m/z = 1494.4(M+H)。

[0161] 化合物22的合成:



[0162]



[0163] 化合物21的合成:

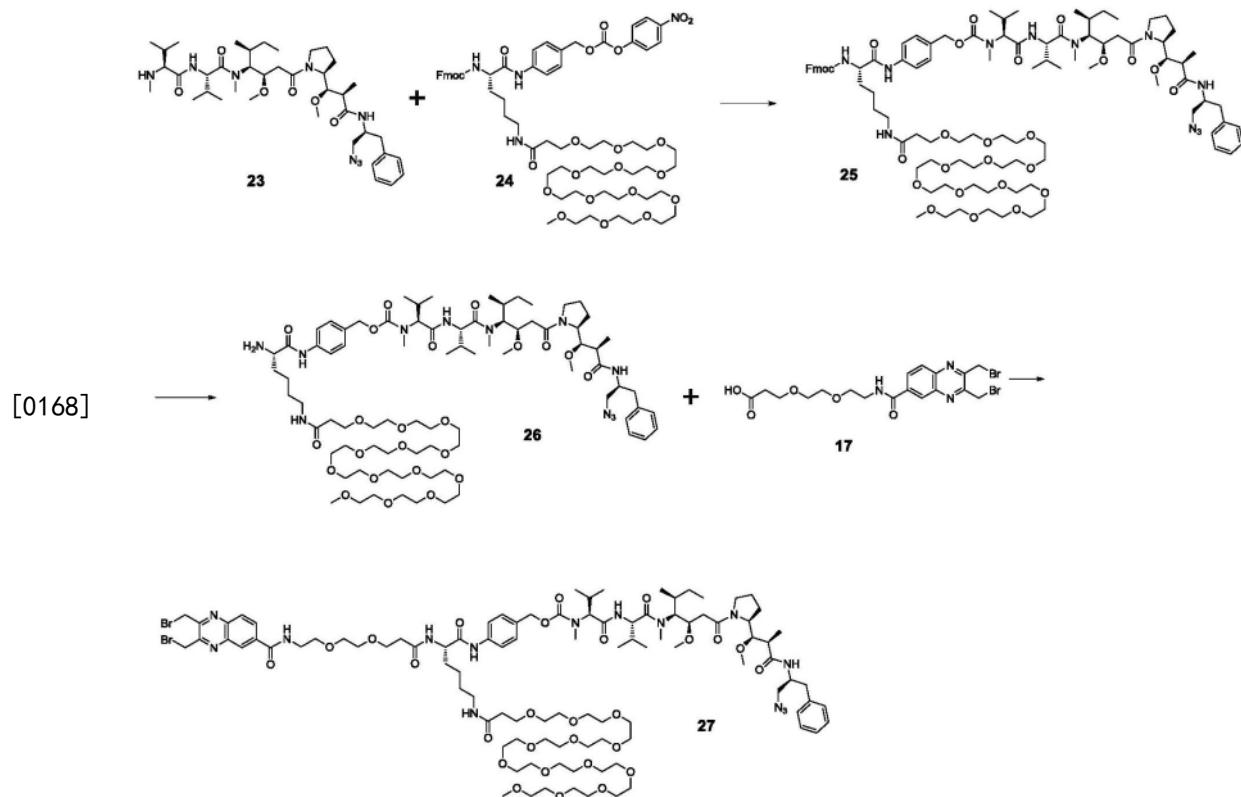
[0164] 向酸19(51mg,81 μ mol)的DCM(6mL)溶液中加入N-羟基琥珀酰亚胺(46mg,400 μ mol)和EDC(100mg,523 μ mol)。30分钟后,用水(2x6 mL)洗涤混合物,经 Na_2SO_4 干燥并蒸发。将残余物溶于2mL DMF中。随后加入胺20(55mg,81 μ mol,TFA盐形式),再加入DIEA(50 μ L)。搅拌混合物1小时。随后加入哌啶(40 μ L)并搅拌20分钟。通过HPLC纯化混合物,得到红色固体状的化

合物21(34mg,44%) ;MS m/z955.2(M+H)。

[0165] 化合物22的合成:

[0166] 将化合物17(12.5mg,24.2 μ mol)溶于2mL DCM中,随后加入DIC(1.6mg,12.7 μ mol)。10分钟后,加入溶于0.5mL DMF中的化合物21(11.5mg,12.1 μ mol),并在环境温度下搅拌混合物10分钟。随后通过HPLC纯化混合物,得到红色固体状的化合物22(7.0mg,42%)。MS m/z =1453.6(M+H)。

[0167] 化合物27的合成:



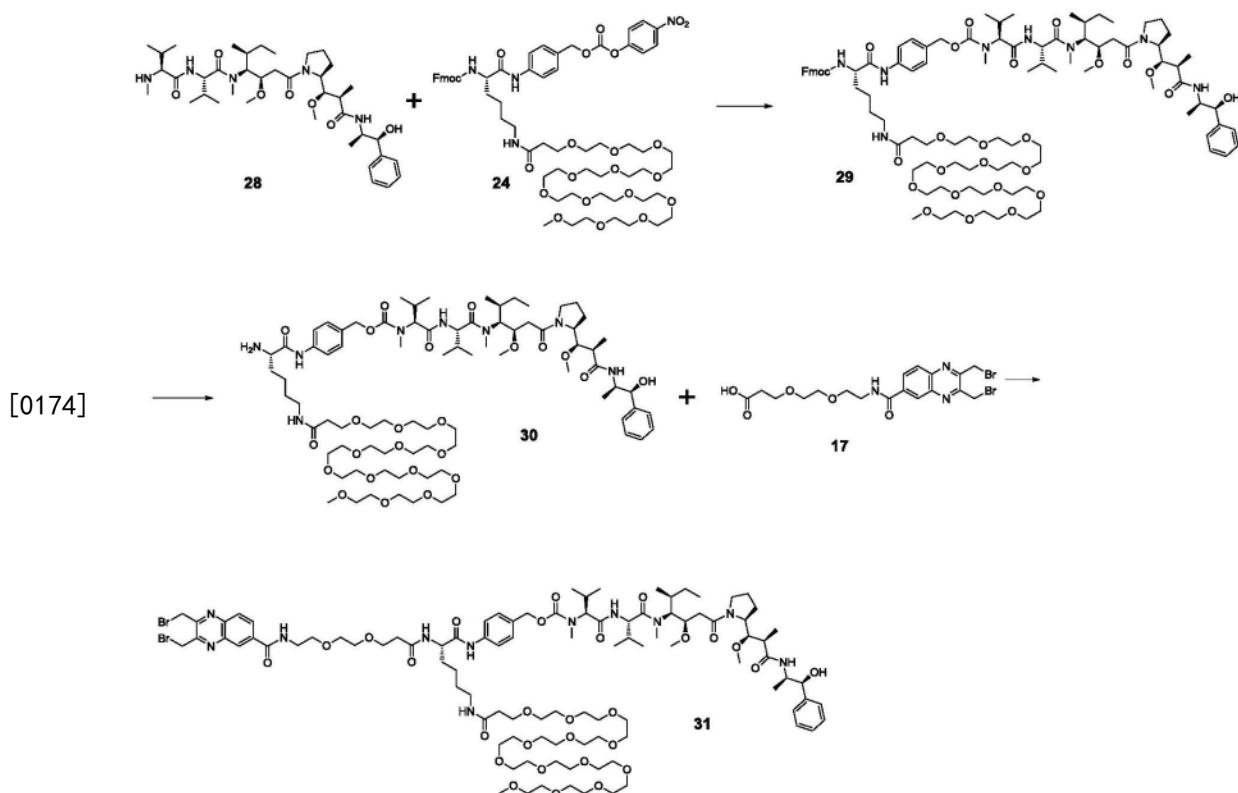
[0169] 化合物26的合成:

[0170] 向化合物23的TFA盐(84.2mg,96.3 μ mol)的DMF(2mL)溶液中加入化合物24(120.6mg,96.2 μ mol)、DIEA(50 μ L)、HOBr(13mg,96.3 μ mol)。24小时后,反应完成,随后加入哌啶(60 μ L)并搅拌10分钟。通过HPLC纯化混合物,得到白色固体状的化合物26(134mg,80%) ;MS m/z 1635.3(M+H)。

[0171] 化合物27的合成:

[0172] 将化合物17(25mg,48.4 μ mol)溶于2mL DCM中,随后加入DIC(3.2mg,25.4 μ mol)。10分钟后,加入溶于0.5mL DMF中的化合物26(39.5mg,24.2 μ mol),并在环境温度下搅拌混合物10分钟。随后通过HPLC纯化混合物,得到白色固体状的化合物27(32.0mg,62%)。MS m/z =2134.1(M+H)。

[0173] 化合物31的合成:



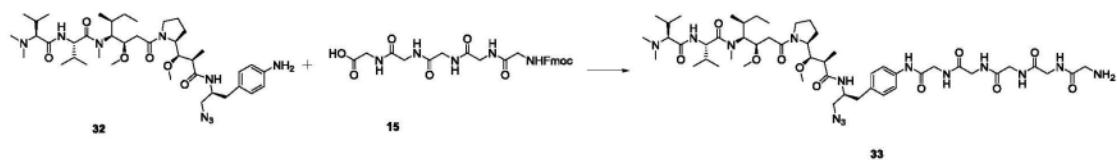
[0175] 化合物30的合成：

[0176] 向化合物28的TFA盐(30mg, 36μmol)的DMF(1mL)溶液中加入化合物24(45mg, 36μmol)、DIEA(20μL)、HOBr(5mg, 37μmol)。24小时后,反应完成,随后加入哌啶(20μL)并搅拌30分钟。通过HPLC纯化混合物,得到白色固体状的化合物30(46mg, 79%) ;MS m/z 1635.3 (M+H)。

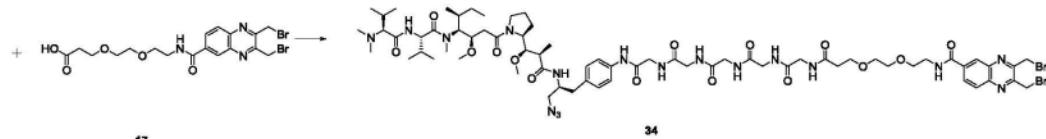
[0177] 化合物31的合成：

[0178] 将化合物17(30mg, 57.1μmol)溶于2mL DCM中,随后加入DIC(3.6mg, 28.6μmol)。10分钟后,加入溶于0.5mL DMF中的化合物30(46mg, 28.6μmol),并在环境温度下搅拌混合物10分钟。随后通过HPLC纯化混合物,得到白色固体状的化合物31(44.8mg, 59%)。MS m/z = 2109.2 (M+H)。

[0179] 化合物34的合成：



[0180]



[0181] 化合物33的合成：

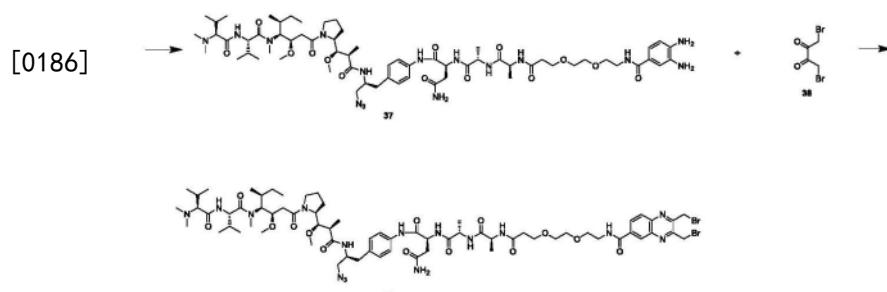
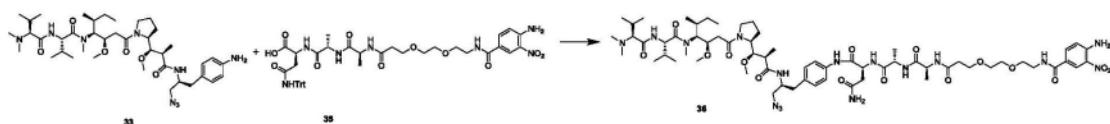
[0182] 将化合物15(17mg, 33μmol)溶于2mL DMF中,随后加入HATU(12.5mg, 32.9μmol)和DIEA(23μL)。2分钟后,加入化合物32的TFA盐(24mg, 27.6μmol),并在环境温度下搅拌混合

物1小时。向混合物中加入40 μ L DBU并搅拌10分钟。随后通过HPLC纯化混合物,得到白色固体状的化合物33(30.2mg,85%)。MS m/z=1057.8(M+H)。

[0183] 化合物34的合成:

[0184] 将化合物17(12.5mg,24.2 μ mol)溶于2mL DCM中,随后加入DIC(1.6mg,12.7 μ mol)。10分钟后,加入溶于0.5mL DMF中的化合物33(12.8mg,12.1 μ mol),并在环境温度下搅拌混合物10分钟。随后通过HPLC纯化混合物,得到白色固体状的化合物34(14.5mg,77%)。MS m/z=1556.8(M+H)。

[0185] 化合物39的合成:



[0187] 化合物36的合成:

[0188] 向圆底烧瓶中加入化合物33的TFA盐(88.6mg,0.1mmol)、化合物35(84mg,0.1mmol)、HOAt(41mg,0.3mmol)、DCM(5mL)、DIEA(104 μ L)和DIC(25mg,0.2mmol)。搅拌16小时后,用5mL DCM稀释反应混合物,随后用5mL水洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,在真空下蒸发溶剂以得到粗玻璃状固体,将其用于下一步骤。将获得的固体溶于由2mL DCM、2mL TFA和0.2mL三异丙基硅烷组成的混合物中,并搅拌1小时。在真空下蒸发溶剂并通过HPLC纯化,得到化合物36(81mg,60%),MS m/z 1351.5(M+H)。

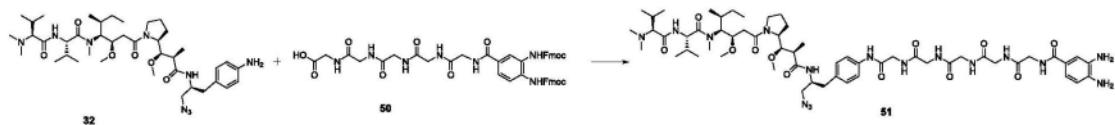
[0189] 化合物37的合成:

[0190] 向圆底烧瓶中加入化合物36(81mg,0.06mmol)、2mL CAN、1mL水和1mL饱和 NaHCO_3 水溶液,随后加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (42mg,0.24mmol)并继续搅拌20分钟。通过HPLC纯化混合物,得到化合物37(55mg,70%),MS m/z 1321.7(M+H)。

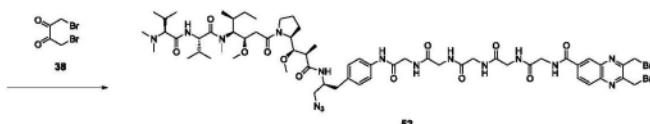
[0191] 化合物39的合成:

[0192] 将化合物37(53mg,0.04mmol)溶于2mL CAN中,并加入1,4-二溴-2,3-丁二酮(38)(29mg,0.12mmol)。搅拌20分钟后,通过HPLC纯化,得到化合物39(40mg,65%),MS m/z 1527.6(M+H)。

[0193] 化合物52的合成:



[0194]



[0195] 化合物51的合成：

[0196] 向胺32(875mg, 1.13mmol)和酸50(1000mg, 1.13mmol)的DMF(10mL)溶液中加入2-肟氰乙酸乙酯(Oxima-pure)(160mg, 1.13mmol),再加入DIC(428mg, 2.74mmol)。2小时后,偶联完成,随后加入1mL哌啶并搅拌20分钟。通过HPLC纯化混合物,得到白色固体状的化合物51的TFA盐(1020mg, 69%);MS m/z 1191.7(M+H)。

[0197] 化合物52的合成：

[0198] 将化合物51的TFA盐(200mg, 141μmol)溶于2mL CAN和1mL水中。随后加入1,4-二溴-2,3-丁二酮38(69mg, 282μmol)的ACN(1mL)溶液。搅拌15分钟后,通过HPLC纯化,得到白色固体状的化合物52(166mg, 84%)。MS m/z=1397.6(M+H)。

[0199] ADC制备实施例1

[0200] ADC46的制备

[0201] 将亲和纯化的抗-CD38抗体进行缓冲液交换至具有4mM EDTA的50mM磷酸钠缓冲液(pH 7.0-7.2),浓度为5-10mg/mL。向该抗体储备液的一部分中加入新制的10mM的三(2-羧乙基)膦(TCEP)水溶液,直至20倍摩尔过量。将所得混合物在4-8°C下孵育过夜。通过凝胶过滤色谱法或若干轮的离心过滤除去过量的TCEP。对回收的经还原的抗体材料进行UV-Vis定量分析,随后确认足够的游离巯基/抗体比。简言之,将新制的在50mM磷酸钠,pH 7.0-7.2,4mM EDTA中的(5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)的1mM等分试样与等体积的纯化抗体溶液混合。在412nm下测量所得吸光度,并使用14,150M⁻¹cm⁻¹的消光系数确定减少的半胱氨酸含量。

[0202] 为引发化合物52与抗-CD38抗体的缀合,首先将L014-077溶解于3:2的乙腈/水混合物中,浓度为5mM。然后将该新制的毒性物质-连接子溶液的等分试样以4.5-5倍摩尔过量加入到一部分经还原、纯化的抗-CD38抗体中间体中。充分混合并在环境温度下孵育≥1小时后,通过HIC-HPLC色谱分析粗缀合反应,在280nm波长检测下确认反应完成(起始抗体峰消失)。随后使用配有PBS平衡的Superdex 200pg柱(GE Healthcare)的AKTA系统,通过凝胶过滤色谱法进行ADC46的纯化。基于UV-VIS和HIC-HPLC计算药物/抗体比(DAR)。图8显示了起始抗-CD38抗体和纯化的ADC46的代表性的HIC-HPLC比较。使用分析型SEC-HPLC来确定所得ADC46为低百分数(<5%)高分子量(HMW)聚集体。

[0203] ADC41的制备

[0204] 采用与产生ADC46的步骤相同的方式进行ADC41的抗-CD38抗体的还原和分析。为引发最终的药物-连接子与抗体的缀合,首先将化合物22溶解于2:3的乙腈/水混合物中,浓度为5mM。随后将丙二醇(PG)加入经还原、纯化的抗-CD38抗体的等分试样中,以得到10-30%(v/v)PG终浓度,随后以4.5-5倍摩尔过量加入新制的化合物22溶液。随后采用与ADC46

中的步骤相同的方式进行ADC41的分析和纯化。图9显示了起始抗-CD38抗体和纯化的ADC41的代表的性HIC-HPLC比较。

[0205] 测试实施例1

[0206] 收到动物后,将其以每只笼子5只小鼠饲养在环境受控的房间里。随意给动物提供啮齿动物食物和水。在开始细胞施用和给药之前至少72小时,使小鼠适应实验室条件。在适应期间,确定动物的健康状况。仅使用在研究开始前被观察为健康的动物。

[0207] 该实施例提供了体内实验,比较了对小鼠使用对照(PBS)、抗-CD38 IgG1抗体(STI-0602和STI-0607)和两种抗体的ADC变体的治疗。该程序首先进行肿瘤细胞接种和肿瘤建立:

[0208] a. 用10%FBS U87培养基(EMEM)培养U87细胞,并用0.05%胰蛋白酶收获。将细胞用无血清EMEM洗涤2次,计数,以 5×10^6 细胞/0.2mL或 25×10^6 细胞/mL的浓度重悬于无血清EMEM和基质胶的1:1混合物中,并皮下注射至每只小鼠的右上腹。

[0209] b. 接种后第6-9天开始,使用数字卡尺测量肿瘤体积尺寸以监测肿瘤的生长,此后每周两次,直到研究终止。

[0210] c. 用数字卡尺测量肿瘤。测量长度(最长尺寸)和宽度(与长度垂直并在同一平面内的距离)。用于计算肿瘤体积的公式为 $TV(\text{mm}^3) = 1/2 \times L \times W^2$ 。

[0211] 治疗:

[0212] a. 一旦肿瘤被分期至所需的体积(平均200至300mm³),则将动物随机分组,并剔除具有很大或很小肿瘤的小鼠。按肿瘤体积随机将小鼠分成8组,每组10只。

[0213] b. 根据图4,用媒介物或测试物品治疗小鼠。小鼠共接受5剂。

[0214] c. 监测肿瘤反应,一旦建立了明确的治疗趋势和/或当媒介物治疗的小鼠中的肿瘤负荷达到IACUC协议限值(2000mm³),则终止研究。

[0215] 测试实施例2

[0216] 本实施例是在小鼠体内比较两种公开的CD38 ADC的体内实验。在体内研究中,将1000万Daudi-f1uc细胞静脉内注射入NOD-SCID小鼠中。小鼠肿瘤形成后4天,静脉(IV)注射抗-CD38抗体和ADC至小鼠。通过肿瘤的发光强度变化来监测抗体或ADC对肿瘤生长的抑制(图3、4、5和6)。

[0217] 测试了ADC#45和ADC#41。两种ADC使用相同的A2抗体。Daudi和Ramos细胞系获自ATCC。在含10%FBS的RPMI 1640 1X培养基中,在37°C和5%二氧化碳湿润的环境中培养细胞。将细胞培养2周时间,并在收获前传代3次。注射前,将Daudi或Ramos细胞重悬于1:1比例的HBSS(汉克平衡盐溶液)和Matrigel中,将1000万个细胞/0.2mL皮下注射至每只小鼠的右上腹中。

[0218] 在含10%FBS和0.2ug/ml嘌呤霉素的RPMI 1640 1X培养基中,在37°C和5%二氧化碳湿润的环境中培养Daudi-luc细胞。将细胞培养2周时间,并在收获前传代3次。注射前,将Daudi-luc细胞重悬于HBSS中。将1000万个细胞/0.2mL静脉内注射至每只小鼠的尾静脉中。

[0219] 将6周龄的雌性NOD SCID小鼠(Charles River)用于Daudi皮下异种移植和Daudi-luc静脉异种移植。在研究中,将6周龄的雌性Nu/Nu小鼠(Charles River)用于Ramos皮下异种移植。接收后,将小鼠以每只笼子5只小鼠饲养在环境受控的房间里。随意提供啮齿动物食物和水。在开始给药之前,使小鼠适应实验室条件72小时。在适应期间,监测动物的健康

状况。通过组号和研究号标识每个笼子,通过耳标分别标识小鼠。

[0220] 下表显示了研究设计和给药方案。

肿瘤模型	组	动物#	治疗	剂量/频率	体积/途径
NOD SCID 小鼠, Daudi 皮下异种移植	1	7	PBS	0 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	2	7	ADC#45	10 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	3	7	ADC#45	3 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	4	7	ADC#45	1 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
[0221] Nu/Nu 小鼠, Ramos 皮下异种移植	1	7	PBS	0 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	2	7	ADC#45	10 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	3	7	ADC#45	3 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	4	7	ADC#45	1 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
NOD SCID 小鼠, Daudi-luc 静脉内模型	1	8	PBS	0 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	2	8	Ab	3 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	3	8	ADC#45	3 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉
	4	8	ADC#41	3 mg/kg, 单次	0.2 ml/静脉

[0222] 接种后第5-7天开始,通过使用数字卡尺测量肿瘤的宽度和长度来监测肿瘤的生长,此后每周两次,直到肿瘤体积达到~100-250mm³。使用以下公式计算肿瘤体积:体积(mm³)=[长度(mm) x 宽度(mm)²]/2。

[0223] 一旦肿瘤被分期到所需的体积,则将动物随机分组,并剔除具有很大或很小肿瘤的小鼠。将小鼠分组,每组的动物数量如研究设计中所示。然后用PBS、Ab、ADC#45或ADC#41静脉治疗小鼠(0.2ml/动物)。治疗后,监测肿瘤生长、动物健康和体重。当该组的平均皮下肿瘤负荷超过2000mm³、动物体重减轻超过20%或研究结束时,处死测试动物。

[0224] 在整个实验期间,每周测量肿瘤体积两次。使用以下公式计算TGI(肿瘤生长抑制%):TGI=[(PBS组的上次体积尺寸-PBS对照的同一天的治疗组的体积)/(PBS组的上次体积尺寸)]x 100。通过电平衡每周测量每只小鼠的体重两次。

[0225] 计算个体的体重和肿瘤体积的原始数据。计算组的平均值和标准差,并进行统计分析(采用单向ANOVA和Dunnett多重比较检验;GraphPad Prism 6.0)。将所有治疗组与PBS组进行比较。P<0.05被认为具有统计学意义。

[0226] 与PBS治疗对照组相比,10mg/kg的ADC#45显著抑制Daudi肿瘤生长。尽管3周后肿瘤恢复生长,但单次10mg/kg治疗显著延迟了肿瘤生长。在这种情况下,可以测试多次治疗以实现持续的肿瘤抑制。而3mg/kg或1mg/kg的单剂量的ADC#45并未明显抑制肿瘤的生长。然而,尽管差异并不显著,但与PBS治疗对照组相比,单剂量的ADC#45确实显示出对肿瘤生长的轻微抑制。在这项研究中观察到剂量反应,其中较高剂量显示出更好的肿瘤生长抑制(图1A)。用10mg/kg或更低剂量的单剂量静脉内施用ADC#45的测试动物没有体重减轻(图1B)。

[0227] 同样,与PBS治疗对照组相比,10mg/kg的ADC#45显著抑制Ramos肿瘤的生长,并具有长达60天的持续肿瘤抑制作用。3mg/kg或1mg/kg的单剂量的ADC#45未显著抑制肿瘤生长。然而,尽管差异并不显著,但与PBS治疗对照组相比,3mg/kg或1mg/kg的单剂量的ADC#45

确实显示出对肿瘤生长的轻微抑制。在这项研究中观察到剂量反应,其中较高剂量显示出更好的肿瘤生长抑制(图2A)。用10mg/kg或更低剂量的单剂量静脉内施用ADC#45的测试动物没有体重减轻(图2B)。

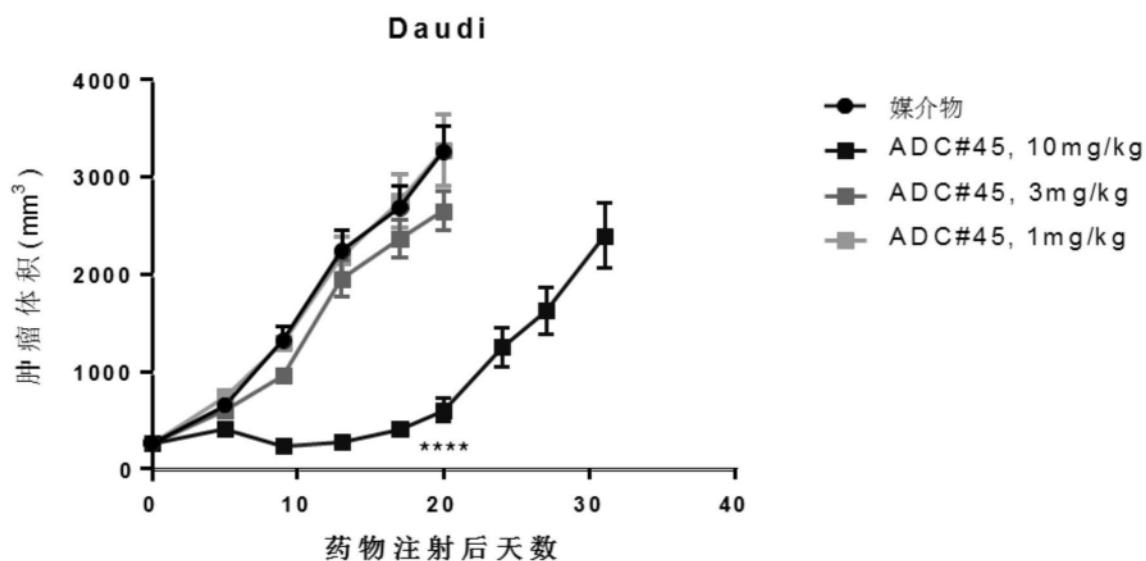
[0228] 3mg/kg的单剂量的ADC#45完全抑制肿瘤生长,且直至治疗后第48天,存活率为100%。与PBS对照组相比,3mg/kg的单剂量的ADC#41显著抑制肿瘤生长,并显著延长小鼠的存活期(图3和4)。

[0229] 10mg/kg单剂量的ADC#45和ADC#41显著抑制肿瘤生长,而在3mg/kg或1mg/kg剂量下,两者在Daudi和Ramos皮下注射异种移植肿瘤小鼠模型中均未显示出显著的肿瘤抑制。在雌性NOD SCID小鼠的Daudi-luc静脉注射肿瘤模型中,3mg/kg单剂量的ADC#45完全抑制肿瘤生长,且直至48天,存活率为100%。在雌性NOD SCID小鼠的Daudi-luc静脉注射肿瘤模型中,3mg/kg单剂量的ADC#41显著抑制肿瘤生长,并延长生存期。在本研究中观察到ADC#45和ADC#41的剂量反应。在相同(10mg/kg或3mg/kg)剂量方案下,相比于ADC#41,ADC#45显示出更好的肿瘤生长抑制作用。在研究期间,所有治疗组均未观察到与治疗相关的体重减轻。

[0230] 序列表

	结合剂	重链可变域区	轻链可变域区
[0231]	A2 wt	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVASVSNRPTTYADSVRGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREDWGGEFTDWGRGTLV TVSS SEQ ID NO. 1	QAGLTQPPSASGTSGQRTISCSGS SSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIY KNNQRPSGVPDFSGSKSGNSASL AISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG YVFGSGTKVTVL SEQ ID NO. 2
	A2-SV	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVASVSNRPTTYADSVRGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREDWGGEFTDWGRGTLV TVSS SEQ ID NO. 1	QSVLTQPPSASGTSGQRTISCSGS SSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIY KNNQRPSGVPDFSGSKSGNSASL AISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG YVFGSGTKVTVL SEQ ID NO. 3

图 1A



* $P < 0.05$, 相比于媒介物对照组的单向ANOVA

图 1B

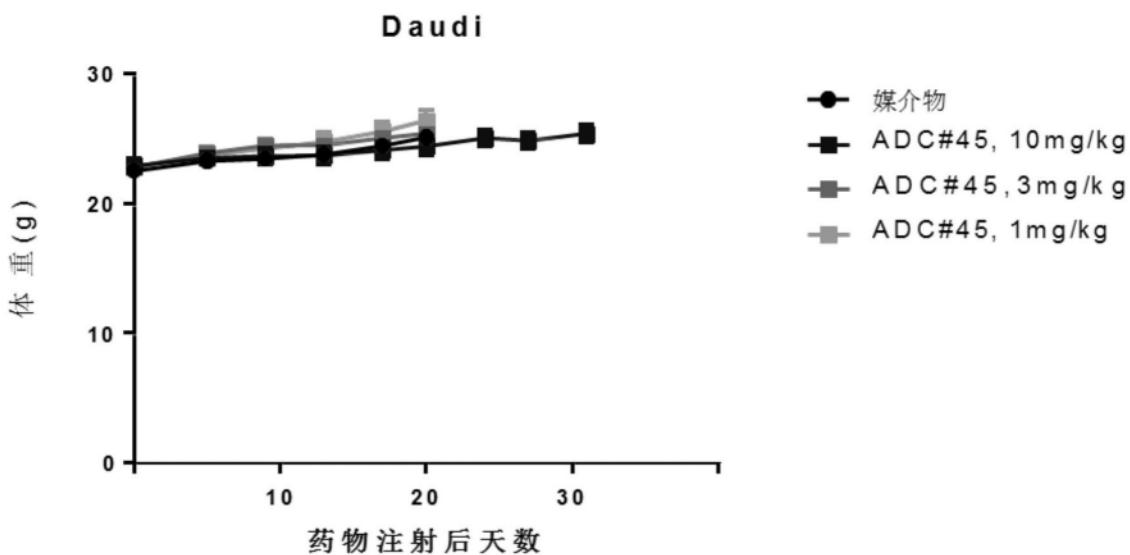


图1

图 2A

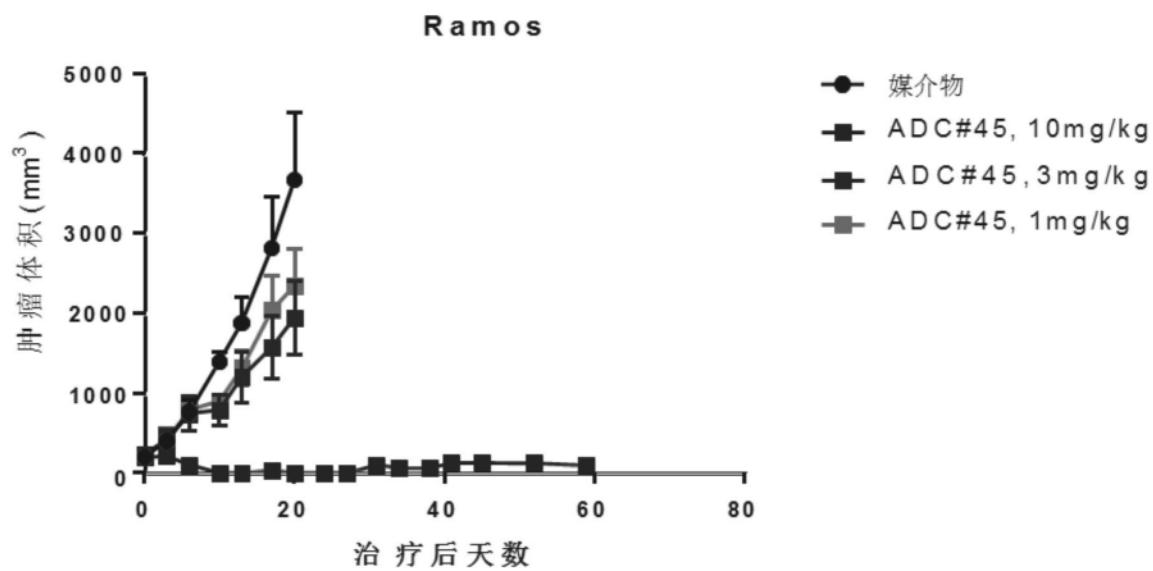


图 2B

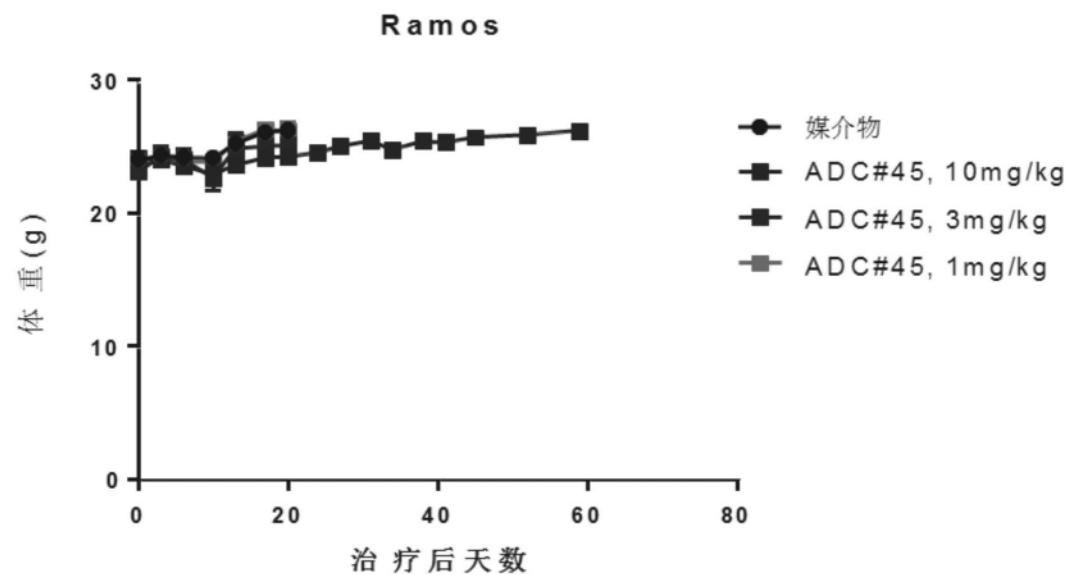


图2

Daudi-fluc

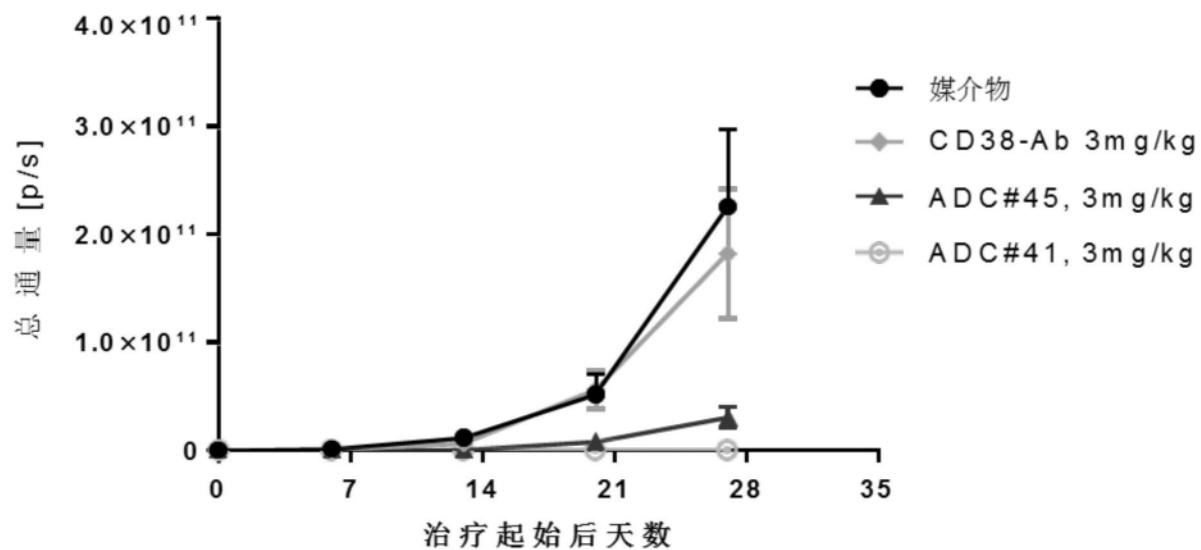


图3

Daudi-fluc

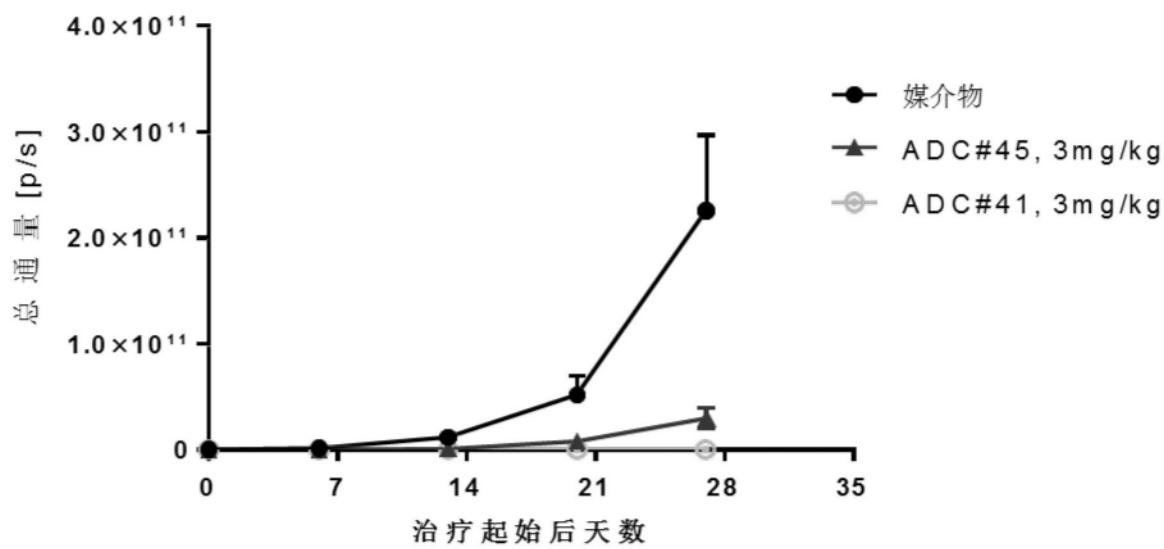


图4

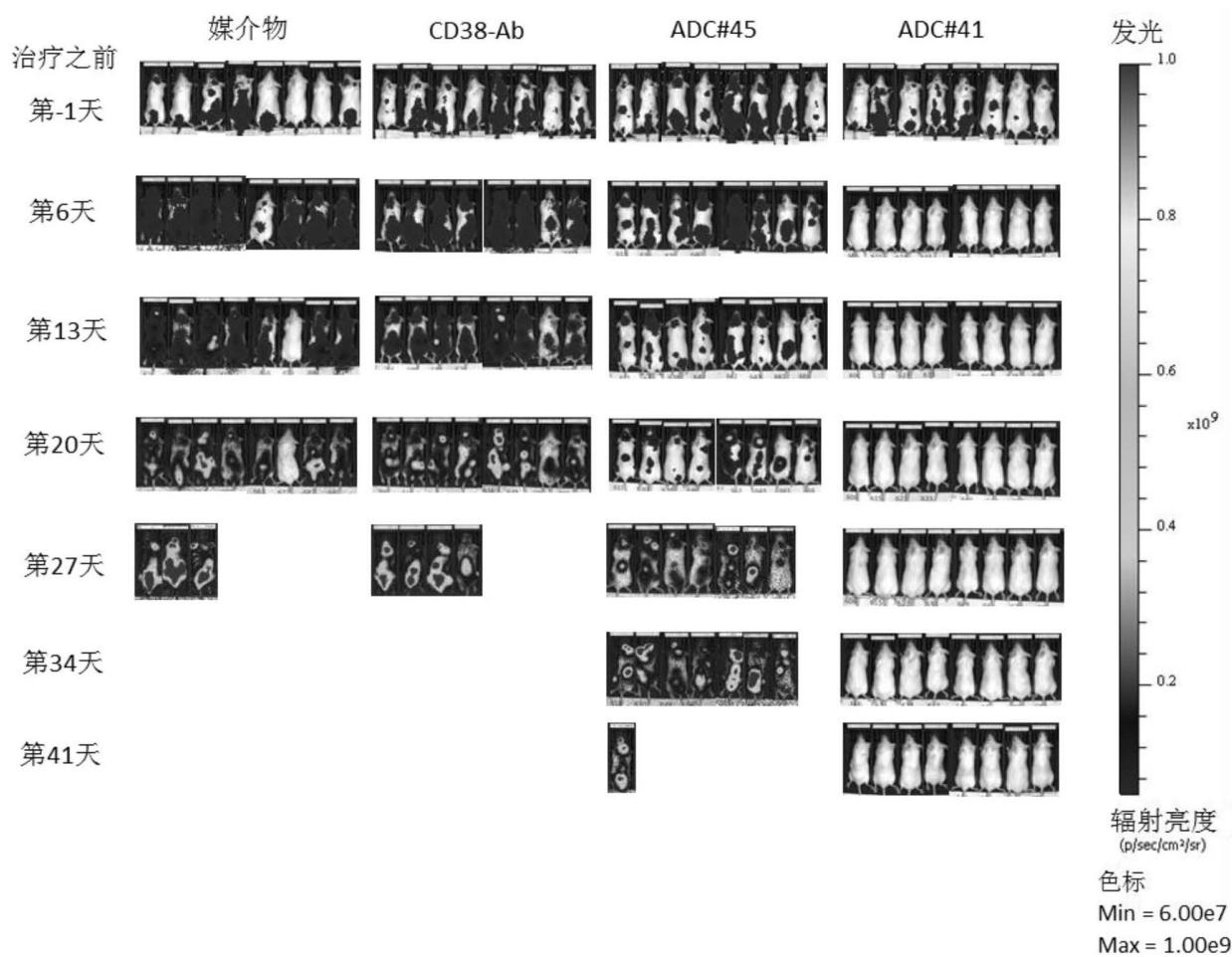


图5

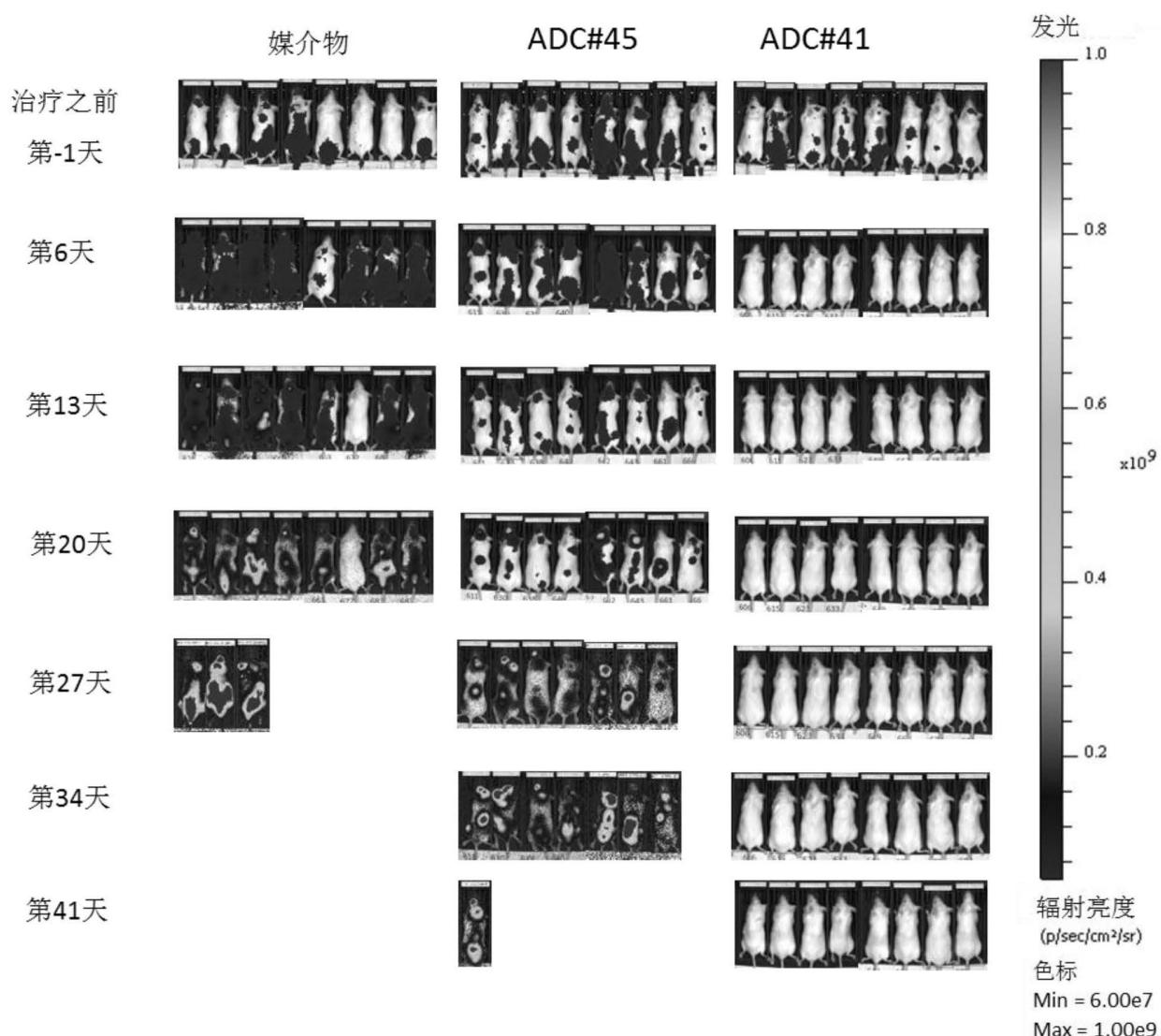


图6

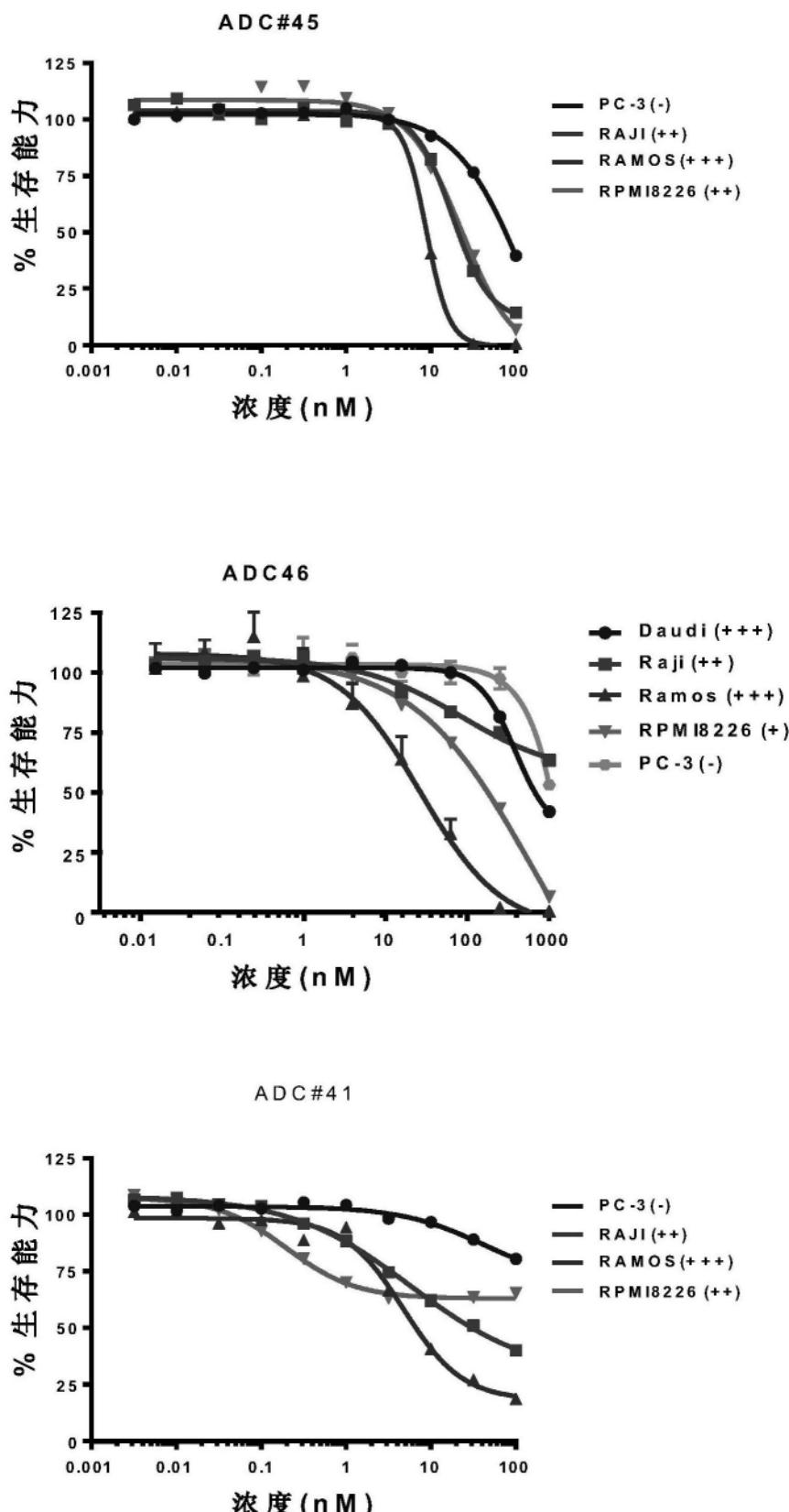


图7

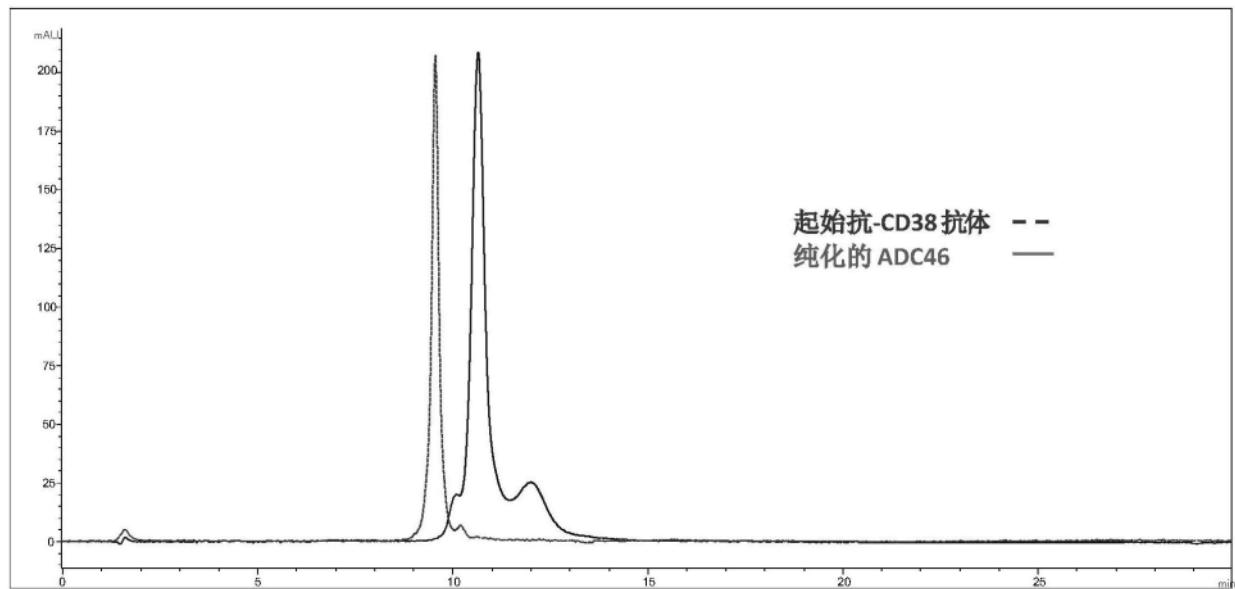


图8

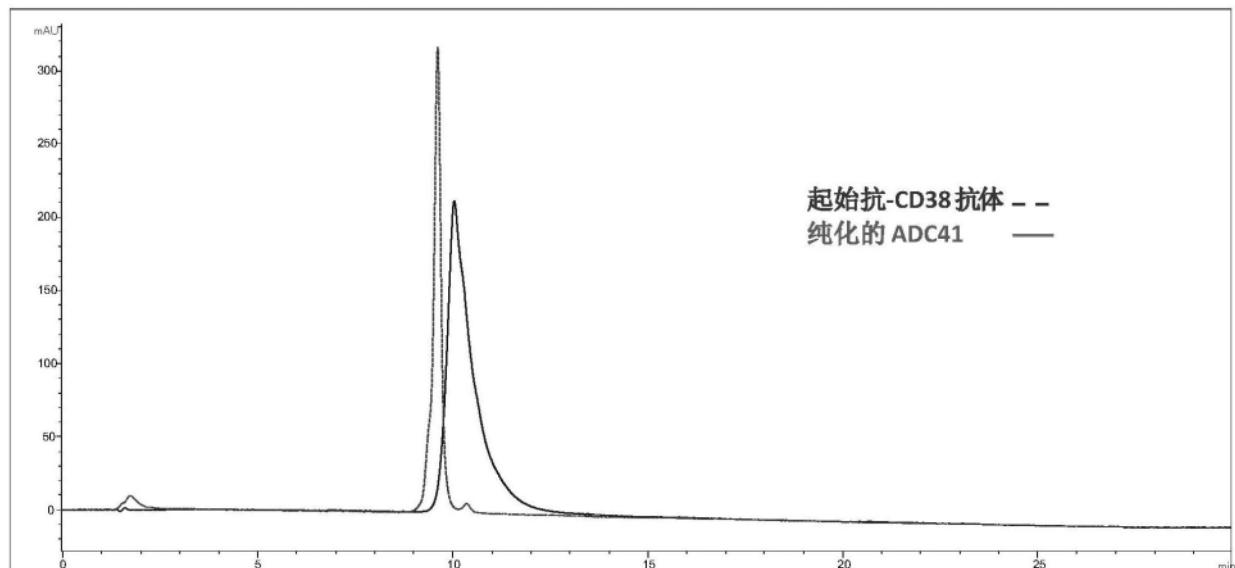


图9

图 10A

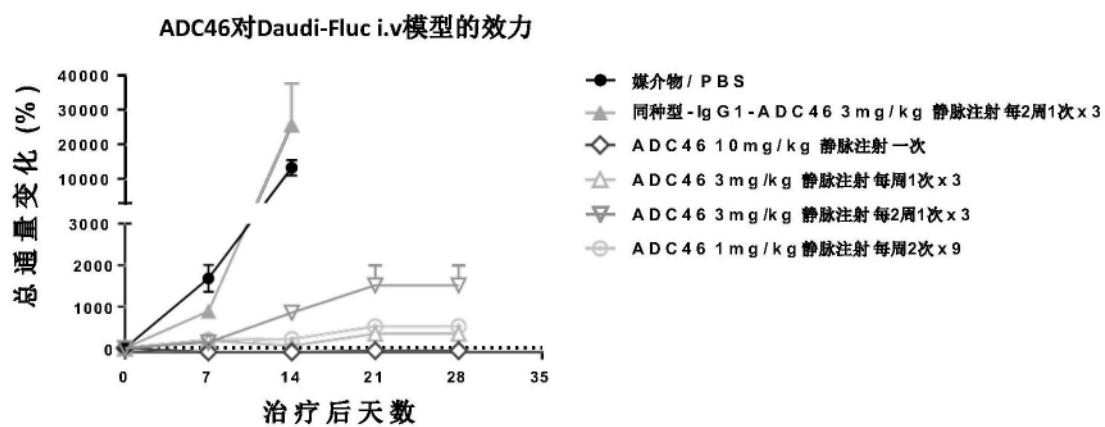


图 10B

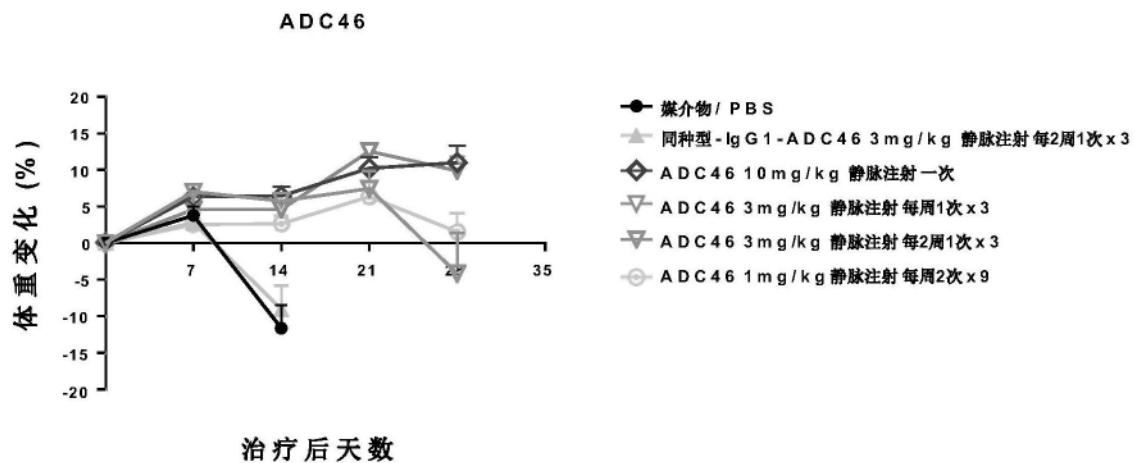


图10