



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120091834 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 03

(21) 申请号 202380073560.7

(22) 申请日 2023.10.18

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2022/126273 2022.10.19 CN

PCT/CN2023/118363 2023.09.12 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.04.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/125253 2023.10.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/083161 EN 2024.04.25

(71) 申请人 普众发现医药科技(上海)有限公司

地址 200233 上海市徐汇区田州路159号10

单元101、201、301、401

(72) 发明人 孟逊 刘淑惠 史静 翁炜宁

(74) 专利代理机构 北京市汉坤律师事务所

11602

专利代理师 彭柯峥 李英

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书6页 说明书41页

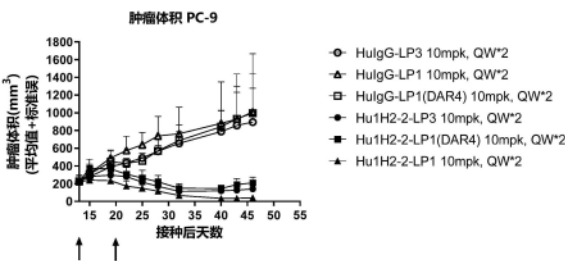
序列表(电子公布) 附图25页

(54) 发明名称

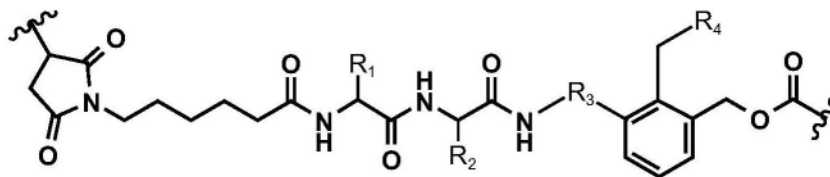
抗体-药物偶联物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本公开提供了抗体-药物偶联物及其制备方法和应用。抗体-药物偶联物中包括抗体、具有细胞毒性的有效荷载和式I所示的连接子,式I所示连接子通过琥珀酰亚胺基与抗体链间二硫键还原后的巯基部分形成硫醚键连接;连接子的酯基中的羰基与有效荷载中的氨基连接。抗体-药物偶联物具有在制备诊断、预防、治疗肿瘤疾病的治疗剂中的用途。



1. 抗体-药物偶联物,或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、溶剂化物,或其组合,包括抗MUC18或抗CD44v7/8抗体或其抗原结合片段、有效荷载和式I所示的连接子,其中:



式 I

所述式I所示连接子通过琥珀酰亚胺基与抗体或其抗原结合片段链间二硫键还原后的巯基部分形成硫醚键连接;

所述式I所示连接子的酯基中的羰基与有效荷载中的氨基连接;

R_1 、 R_2 各自独立地选自氢、甲基或异丙基;

R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或单键, R_5 选自氢或苯甲基, n^1 表示0~2的整数, n^2 表示0~2的整数;

R_4 表示甲氨基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。

2. 根据权利要求1所述的抗体-药物偶联物, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示8~15的整数。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体-药物偶联物, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示10~12的整数。

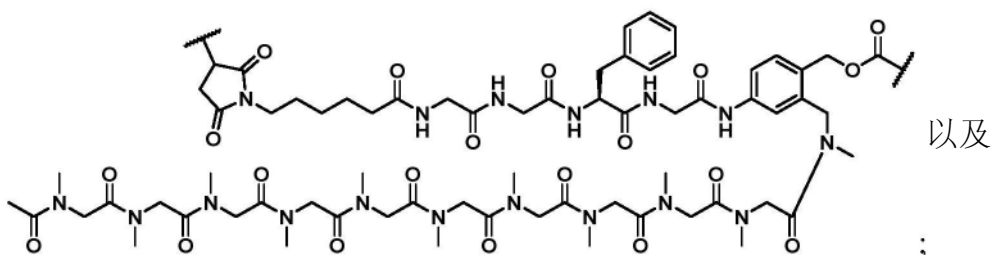
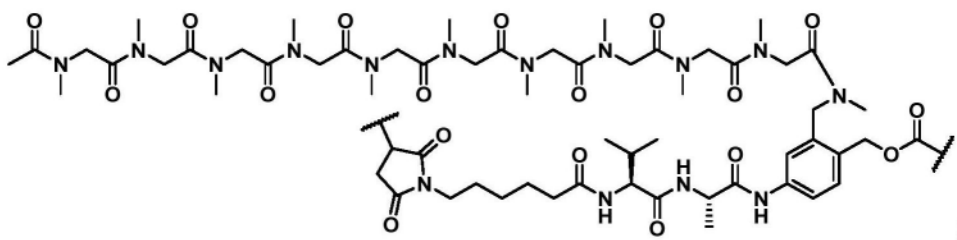
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的抗体-药物偶联物, R_3 表示 $-(CR_5H_2CONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或单键, R_5 选自苯甲基, n^1 表示1或2, n^2 表示1或2;

R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示8~15的整数。

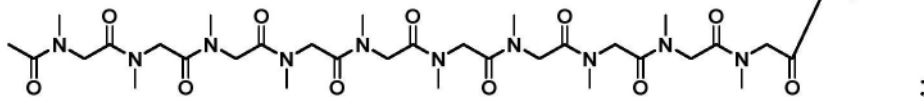
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体-药物偶联物, R_3 表示单键; R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示8~15的整数。

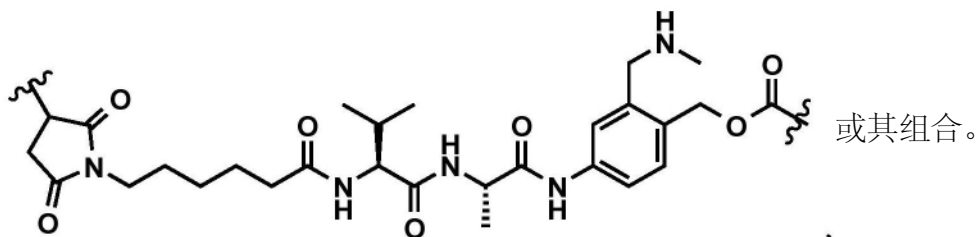
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的抗体-药物偶联物, R_3 表示单键; R_4 表示甲氨基。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述抗体-药物偶联物, 所述连接子选自以下组中的任一种:



以及

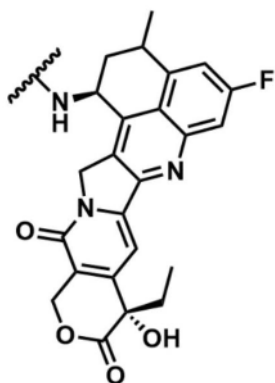




8. 根据权利要求1-7中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述有效荷载选自包括细胞毒剂,标记物,核酸,放射性核素,激素,免疫调节剂,前体药物转化酶,核糖核酸酶,激动性抗体,拮抗性抗体和其片段,融合蛋白或衍生物的组中的至少一种。

9. 根据权利要求8所述的抗体-药物偶联物,所述细胞毒剂包括微管蛋白抑制剂和/或拓扑异构酶抑制剂;所述微管蛋白抑制剂包括奥瑞他汀或其衍生物,美登素或其衍生物;所述拓扑异构酶抑制剂包括喜树碱及其衍生物。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述有效荷载为式II所示的依喜替康,以环己烷环上氨基的氮原子与连接子连接,



式 II。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括:

如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为STS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:34所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为LAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为LAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:36所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为NAK的轻链CDR2,如SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:37所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为FAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:49所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为STS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:50所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为STS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:40所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:41所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:42所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为RTS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:43所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的轻链CDR3;

如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:21所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:32所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的轻链CDR3;或者,

如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为LMS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:57所示氨基酸序列的轻链CDR3。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括:

如SEQ ID NO:84所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:85所示氨基酸序列的轻链可变区序列;

如SEQ ID NO:86所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:87所示氨基酸序列的轻链可变区序列;或者

如SEQ ID NO:88所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:89所示氨基酸序列的轻链可变区序列,或其保守变体。

13. 根据权利要求1-10中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段特异性结合人CD44 v7/8结合肽,所述结合肽包括如SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求1-10和13中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段不结合人CD44v7/8如SEQ ID NO:91,和/或如SEQ ID NO:92所示氨基酸序列的结合肽。

15. 根据权利要求13或14所述的抗体-药物偶联物,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段包括:如SEQ ID NO:93所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:94所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:95所示氨基酸序列的重链CDR3;以及如SEQ ID NO:96所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为RAN的CDR2,如SEQ ID NO:97所示氨基酸序列的轻链CDR3。

16. 根据权利要求13-15中任一项所述的抗体-药物偶联物,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段包括:

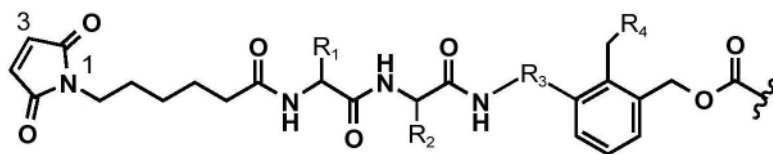
如SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:101所示氨基酸序列的轻链可变区序列;或

如SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:104所示氨基酸序列的轻链可变区序列,或其保守变体。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的抗体-药物偶联物,DAR为1~10。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的抗体-药物偶联物,DAR为4~10。

19. 权利要求1-18中任一项中所述的抗体-药物偶联物,或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、溶剂化物或其组合,以及药学上可接受的赋形剂的制备方法,包括以下步骤:抗MUC18或抗CD44v7/8抗体或其抗原结合片段经还原处理后二硫键至少部分被还原,与式III所示连接子的马来酰亚胺-N-基的3位碳原子进行反应,



式 III,

其中

所述连接子-有效荷载中,式III所示连接子的酯基中的羰基与有效荷载的氨基连接;

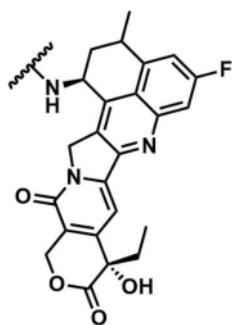
R_1 、 R_2 各自独立地选自氢、甲基或异丙基;

R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或单键, R_5 选自氢或苯甲基, n^1 表示0~2的整数, n^2 表示0~2的整数;以及

R_4 表示甲氨基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。

20. 根据权利要求19所述的制备方法,所述方法还包括:抗体或其抗原结合片段在含有螯合剂的缓冲溶液中与还原剂反应,加入连接子-有效荷载的溶解液,连接子具有式III的结构,调节反应溶液pH值。

21. 根据权利要求19或20所述的制备方法,所述方法还包括:所述有效荷载为式II所示的依喜替康,以其环己烷环上氨基的氮原子与式III中酯基的羰基连接,



式 II。

22. 根据权利要求19-21中任一项所述的制备方法, DAR为1~10。

23. 根据权利要求19-22中任一项所述的制备方法,

所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列的重链可变区序列, 以及如SEQ ID NO:85所示氨基酸序列的轻链可变区序列;

如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的重链可变区序列, 以及如SEQ ID NO:87所示氨基酸序列的轻链可变区序列; 或

如SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列的重链可变区序列, 以及如SEQ ID NO:89所示氨基酸序列的轻链可变区序列, 或其保守变体;

所述抗CD44v7/8抗体或其抗原结合片段包含如SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的重链可变区序列, 以及如SEQ ID NO:101所示氨基酸序列的轻链可变区序列; 或

如SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的重链可变区序列, 以及如SEQ ID NO:104所示氨基酸顺序的轻链可变区序列, 或其保守变体。

24. 药物组合物, 其包含权利要求1-18中任一项的抗体-药物偶联物, 或权利要求19-23中任一项所述的方法制备的抗体-药物偶联物, 或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、溶剂化物或其组合, 以及药学上可接受的赋形剂。

25. 试剂盒, 其包含权利要求1-18中任一项的抗体-药物偶联物, 或权利要求19-23中任一项所述的方法制备的抗体-药物偶联物, 权利要求24的药物组合物, 或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、溶剂化物或其组合。

26. 权利要求1-18中任一项的抗体-药物偶联物, 权利要求19-23中任一项所述的方法制备的抗体-药物偶联物, 权利要求24的药物组合物, 或权利要求25的试剂盒在制备用于诊断、预防和治疗肿瘤性疾病的治疗剂中的用途。

27. 根据权利要求26所述的用途, 其中所述肿瘤性疾病包括表达MUC18和/或CD44v7/8的良性肿瘤和恶性肿瘤。

28. 根据权利要求26或27所述的用途, 其中所述肿瘤性疾病包括黑色素瘤、咽癌、三阴性癌症、食管腺癌、食管鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌症、宫颈癌、尿路上皮癌、膀胱神经内分泌瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、皮肤鳞状细胞癌、胆管癌、转移性胰腺癌、肺鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌和/或食管鳞状细胞癌。

29. 权利要求1-18中任一项中所述的抗体-药物偶联物, 权利要求19-23中任一项所述方法制备的抗体-药物偶联物, 权利要求24的药物组合物, 或者权利要求25的试剂盒在制备靶向MUC18和/或CD44v7/8的治疗剂中的用途。

30. 诊断、预防和治疗肿瘤性疾病的方法, 包括向受试者给与治疗有效量的治疗剂, 所述治疗剂包括权利要求1-18中任一项中所述的抗体-药物偶联物, 权利要求19-23中任一项

所述方法制备的抗体-药物偶联物,或者权利要求24所述的药物组合物。

抗体-药物偶联物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本公开涉及抗体-药物偶联物,其通过连接子连接抗体和抗肿瘤活性的药物或毒素,以肿瘤细胞为靶标发挥抗肿瘤作用。

背景技术

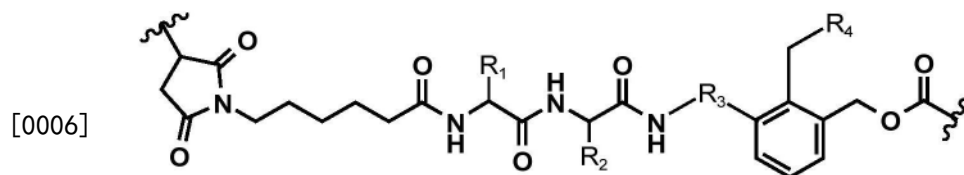
[0002] 本部分中的陈述仅提供与本公开相关的背景信息,并不一定构成现有技术。

[0003] 抗体-药物偶联物 (Antibody-Drug Conjugate; ADC) 是一种基于载体的化疗,能够选择性地向肿瘤/癌细胞递送有效的细胞毒性药物 (Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade, Nicolas Joubert等, Pharmaceuticals (Basel). 2020 Sep 14; 13(9):245.)。随着药物传递技术的发展, ADC靶向传递技术可有效克服喜树碱类药物的水溶性差, 组织分布不足等带来的副作用。已上市的ADC药物Enhertu和Sacituzumab govitecan在治疗肿瘤尤其是恶性肿瘤方面具有优越的效果。Enhertu和Sacituzumab govitecan均使用疏水性强于微管蛋白抑制剂 (例如MMAE, MMAF) 的DNA拓扑异构酶抑制剂喜树碱衍生物为细胞毒性药物。Sacituzumab govitecan以MCC-triazole spacer-PEG7-lysine-PABC为连接子, 在细胞溶酶体中分解释放喜树碱SN38 (US13/948, 732)。阿斯利康/第一三共研发的Enhertu以组织蛋白酶B活化的GGFG (由通过肽键连接的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸组成的氨基酸序列) 四肽作为连接子, 并引入自裂解结构, 释放出Exatecan衍生物Dxd (Yusuke Ogitani等, Clin Cancer Res (2016) 22(20):5097-5108.)。然而上述细胞毒性药物MMAE, SN38和Dxd均为P-糖蛋白 (P-gp) 的底物 (Front Pharmacol 2019; 10:749), 对于部分P-gp高表达的肿瘤可能存在药物耐药的问题。

[0004] 因此, 仍然存在向肿瘤/癌细胞递送细胞毒性药物的新的抗体-药物偶联物的需求。

发明内容

[0005] 本公开提供了一种抗体-药物偶联物, 或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、溶剂化物、或其组合, 包括抗MUC18或抗CD44v7/8抗体或其抗原结合片段, 有效荷载和式I所示的连接子,



式 I

[0007] 所述式I所示连接子通过琥珀酰亚胺基与抗体或其抗原结合片段链间二硫键还原后的巯基部分形成硫醚键连接;

[0008] 所述式I所示连接子的酯基中的羰基与有效荷载中的氨基连接;

[0009] R_1, R_2 各自独立地选自氢, 甲基或异丙基;

[0010] R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2$ 或单键, R_5 选自氢或苯甲基, n^1 表示0~2的整数, n^2 表示0~2的整数;

[0011] R_4 表示甲氨基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。

[0012] 在一些实施方式中, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示8~15的整数。

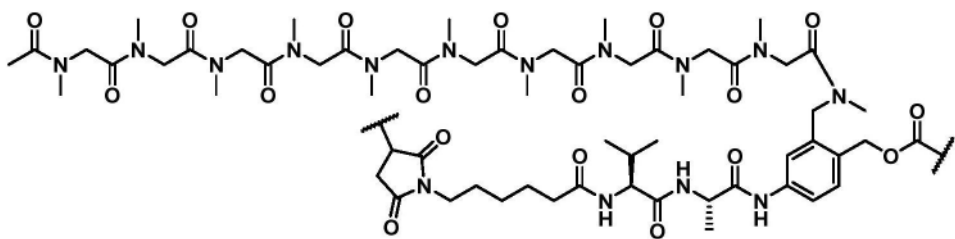
[0013] 在一些实施方式中, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示10~12的整数。

[0014] 在一些实施方式中, R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2$ 或单键, R_5 选自苯甲基, n^1 表示1或2, n^2 表示1或2, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示8~15的整数。

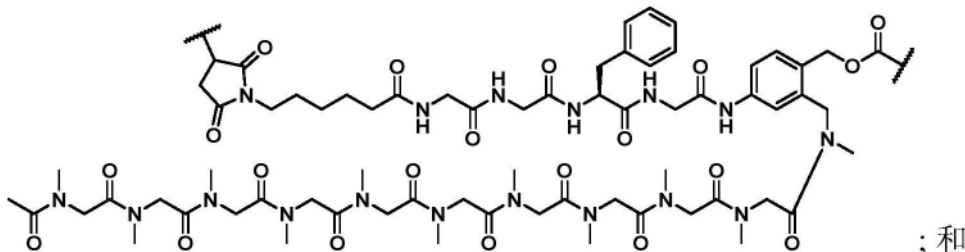
[0015] 在一些实施方式中, R_3 表示单键; R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示8~15的整数。

[0016] 在一些实施方式中, R_3 表示单键; R_4 表示甲氨基。

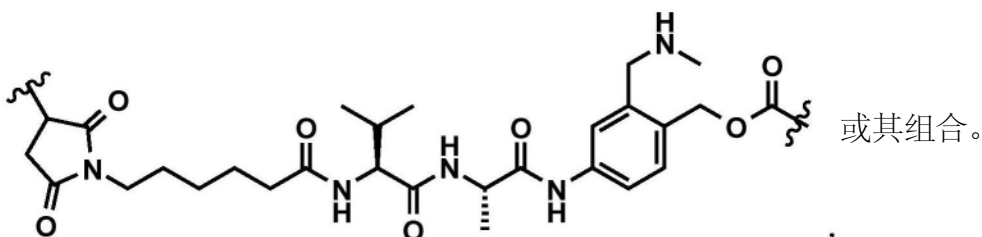
[0017] 在一些实施方式中,所述连接子选自以下组中的一种:



[0018]



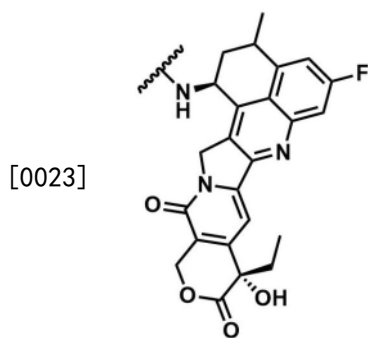
[0019]



[0020] 在一些实施方式中,所述有效荷载选自包括细胞毒剂,标记物,核酸,放射性核素,激素,免疫调节剂,前体药物转化酶,核糖核酸酶,激动性抗体,拮抗性抗体和其片段,融合蛋白或衍生物的组中的至少一种。

[0021] 在一些实施方式中,所述细胞毒剂包括微管蛋白抑制剂和/或拓扑异构酶抑制剂,所述微管蛋白抑制剂包括奥瑞他汀或其衍生物,美登素或其衍生物,所述拓扑异构酶抑制剂包括喜树碱及其衍生物。

[0022] 在一些实施方式中,所述有效荷载为式II所示的依喜替康,以环己烷环上氨基的氮原子与连接子连接,



式 II。

[0024] 在一些实施方式中,抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括以下结构的任一:

[0025] 如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为STS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0026] 如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:34所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为LAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0027] 如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:35所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为LAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0028] 如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:24所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:36所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为NAK的轻链CDR2,如SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0029] 如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:37所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为FAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:49所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0030] 如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为STS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:50所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0031] 如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:39所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为STS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0032] 如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:40所示氨基酸序

列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0033] 如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:41所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0034] 如SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:30所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:42所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为RTS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0035] 如SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:31所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:43所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的轻链CDR3;

[0036] 如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:21所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:32所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为WAS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的轻链CDR3;和

[0037] 如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ ID NO:33所示氨基酸序列的重链CDR3,和如SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为LMS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:57所示氨基酸序列的轻链CDR3。

[0038] 在一些实施方式中,所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括:

[0039] 如SEQ ID NO:84所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:85所示氨基酸序列的轻链可变区序列;

[0040] 如SEQ ID NO:86所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:87所示氨基酸序列的轻链可变区序列;或者

[0041] 如SEQ ID NO:88所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:89所示氨基酸序列的轻链可变区序列,或其保守变体。

[0042] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段特异性结合人CD44 v7/8结合肽,结合肽包括如SEQ ID NO:90所示的氨基酸序列。

[0043] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段不结合人CD44 v7/8如SEQ ID NO:91和/或如SEQ ID NO:92所示氨基酸序列的结合肽。

[0044] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段包括:如SEQ ID NO:93所示氨基酸序列的HCDR1,如SEQ ID NO:94所示氨基酸序列的HCDR2,如SEQ ID NO:95所示氨基酸序列的HCDR3;和如SEQ ID NO:96所示氨基酸序列的LCDR1,氨基酸序列为RAN的LCDR2,如SEQ ID NO:97所示氨基酸序列的LCDR3。

[0045] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段包括:

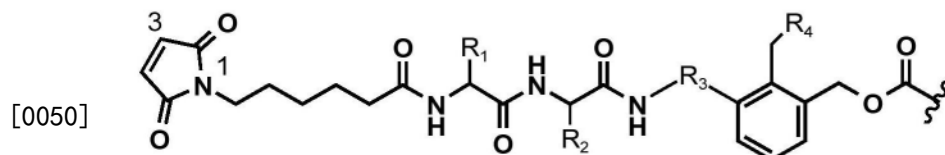
[0046] 如SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:101所示

氨基酸序列的轻链可变区序列;或

[0047] 如SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:104所示氨基酸序列的轻链可变区序列,或其保守变体。

[0048] 在一些实施方式中,DAR为1~10。在一些实施方式中,DAR为4~10。

[0049] 本申请提供了一种上述抗体-药物偶联物,或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、其溶剂化物或其组合的制备方法,包括以下步骤:抗MUC18抗体或CD44v7/8抗体或其抗原结合片段经还原处理后二硫键至少部分被还原,与式III所示连接子的马来酰亚胺-N-基的3位碳原子进行反应,



式 III

[0051] 所述连接子-有效荷载中,式III所示连接子的酯基中的羰基与有效荷载的氨基连接;

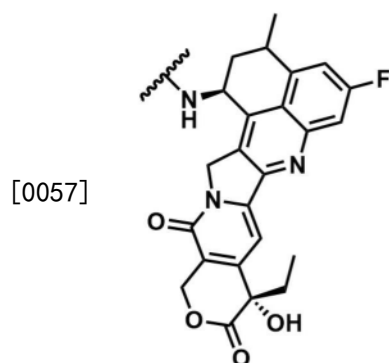
[0052] R_1, R_2 各自独立地选自氢,甲基或异丙基;

[0053] R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或单键, R_5 选自氢或苯甲基, n^1 表示0~2的整数, n^2 表示0~2的整数;

[0054] R_4 表示甲氨基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。

[0055] 在一些实施方式中,所述方法还包括:抗体或其抗原结合片段在含有螯合剂的缓冲溶液中与还原剂反应,加入式III所示连接子的连接子-有效荷载的溶解液,调节反应溶液pH。

[0056] 在一些实施方式中,所述有效荷载为式II所示的依喜替康,以环己烷环上氨基的氮原子与式III中酯基的羰基连接,



式 II。

[0058] 在一些实施方式中,DAR为1~10,可选择地,为4~10。

[0059] 本公开提供了药物组合物,包括上述的抗体-药物偶联物,或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、其溶剂化物或其组合,以及药学上可接受的赋形剂。

[0060] 本公开提供了试剂盒,其包括上述抗体-药物偶联物,或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、其溶剂化物或其组合。

[0061] 本公开提供了上述抗体-药物偶联物,通过上述方法制备的抗体-药物偶联物,含有上述抗体-药品偶联物的药物组合物或试剂盒在制造用于诊断、预防和治疗肿瘤疾病的

治疗剂中的用途。在一些实施方式中,肿瘤疾病包括表达MUC18和/或CD44v7/8的良性肿瘤和恶性肿瘤。

[0062] 在一些实施方式中,肿瘤疾病包括黑色素瘤,咽癌,三阴性乳腺癌,食管腺癌,食管鳞状细胞癌,肝癌,卵巢癌,宫颈癌,尿路上皮癌,膀胱神经内分泌肿瘤,小细胞肺癌,非小细胞肺癌,皮肤鳞状细胞癌,胆管癌,转移性胰腺癌,肺鳞状细胞癌,头颈部鳞状细胞癌和/或食管鳞状细胞癌。

[0063] 本公开提供了上述抗体-药物偶联物,通过上述方法制备的抗体-药物偶联物,含有上述抗体-药物偶联物的药物组合物或试剂盒在制备靶向MUC18和/或CD44v7/8的治疗剂中的用途。

[0064] 本公开提供了一种诊断,预防和治疗肿瘤性疾病的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的治疗剂,其中所述治疗剂包括上述抗体-药物偶联物,通过上述方法制备的抗体-药物偶联物或上述药物组合物。

附图说明

[0065] 图1A示出02-1裸抗的体积排阻色谱图;图1B示出Hu1H2-2裸抗的体积排阻色谱图。

[0066] 图2A示出02-1裸抗的疏水层析色谱图;图2B示出Hu1H2-2裸抗的疏水层析色谱图。

[0067] 图3A示出实施例5制备的抗体-药物偶联物02-1-LP1中的体积排阻色谱图;图3B示出该抗体-药物偶联物02-1-LP1的疏水层析检测图谱。

[0068] 图4A示出实施例6制备的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的体积排阻色谱图;图4B示出该抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的疏水层析检测图谱。

[0069] 图5A示出实施例7制备的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的体积排阻色谱图;图5B示出该抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的疏水层析检测图谱。

[0070] 图6A示出实施例8制备的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP2的体积排阻色谱图;图6B示出该抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP2的疏水层析检测图谱。

[0071] 图7A示出实施例9制备的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP3的体积排阻色谱图;图7B示出该抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP3的疏水层析检测图谱。

[0072] 图8A示出对比例1制备的抗体-药物偶联物02-1-vc-MMAE的体积排阻色谱图;图8B示出该抗体-药物偶联物02-1-vc-MMAE的疏水层析检测图谱。

[0073] 图9A示出对比例2制备的抗体-药物偶联物Rituximab-vc-MMAE的体积排阻色谱图;图9B示出该抗体-药物偶联物Rituximab-vc-MMAE的疏水层析检测图谱。

[0074] 图10A示出对比例3制备的抗体-药物偶联物Rituximab-LP1的体积排阻色谱图;图10B示出该抗体-药物偶联物Rituximab-LP1的疏水层析检测图谱。

[0075] 图11A示出对比例4制备的抗体-药物偶联物Human IgG-DXD的体积排阻色谱图;图11B示出该抗体-药物偶联物Human IgG-DXD的疏水层析检测图谱。

[0076] 图12A示出对比例5制备的抗体-药物偶联物Human IgG-LP1的体积排阻色谱图;图12B示出该抗体-药物偶联物Human IgG-LP1的疏水层析检测图谱。

[0077] 图13A示出对比例6制备的抗体-药物偶联物Human IgG-LP1的体积排阻色谱图;图13B示出该抗体-药物偶联物Human IgG-LP1的疏水层析检测图谱。

[0078] 图14A示出对比例7制备的抗体-药物偶联物Human IgG-LP2的体积排阻色谱图;图

14B示出抗体-药物偶联物Human IgG-LP2的疏水层析检测图谱。

[0079] 图15A示出对比例8制备的抗体-药物偶联物Human IgG-LP3的体积排阻色谱图;图15B示出抗体-药物偶联物Human IgG-LP3的疏水层析检测图谱。

[0080] 图16A示出对比例9制备的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-DXD的体积排阻色谱图;图16B示出抗体-药物偶联物Hu1H2-2-DXD的疏水层析检测图谱。

[0081] 图17示出A375细胞, HMVII细胞, SK-MEL-2细胞和GAK细胞对抗体-药物偶联物02-1-LP1内吞的时间-荧光强度统计图。

[0082] 图18A1示出黑色素瘤模型小鼠接受抗体-偶联药物Rituximab-vc-MMAE, 02-1-vc-MMAE, Rituximab-LP1和02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图;图18A2为图18A1的局部图, 示出02-1-LP1, 02-1-vc-MMAE和溶媒组的肿瘤体积-时间变化曲线图。

[0083] 图18B1示出黑色素瘤模型小鼠接受抗体-偶联药物Rituximab-vc-MMAE, 02-1-vc-MMAE, Rituximab-LP1和02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图;图18B2为图18B1的局部图, 示出02-1-LP1, 02-1-vc-MMAE和溶媒组的体重-时间变化曲线图。

[0084] 图19示出抗体-偶联药物对头颈部鳞癌细胞系Detroit562的体外杀伤曲线;图19A1为图19的局部图, 示出Hu1H2-2-LP2, Hu1H2-2-LP1和Hu1H2-2-DXD的体外杀伤曲线;图19A2为图19的局部图, 示出Human IgG-LP2, Human IgG-LP1和Human IgG-DXD的体外杀伤曲线。

[0085] 图20示出头颈部鳞癌模型小鼠接受抗体-偶联药物Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP2以及Human IgG-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。

[0086] 图21示出头颈部鳞癌模型小鼠接受抗体-偶联药物Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP2以及Human IgG-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图;

[0087] 图22示出肺癌模型小鼠接受抗体-偶联药物Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP1 (DAR4), Hu1H2-2-LP3, Human IgG-LP1, Human IgG-LP1 (DAR4) 和Human IgG-LP3治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。

[0088] 图23示出肺癌模型小鼠接受抗体-偶联药物Hu1H2-2-LP1, Hu1H2-2-LP1 (DAR4), Hu1H2-2-LP3, Human IgG-LP1, Human IgG-LP1 (DAR4) 和Human IgG-LP3治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0089] 图24A示出SCC-9人头颈鳞癌CDX模型接受抗体-偶联药物Rituximab-LP1和02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图24B示出SCC-9人头颈鳞癌CDX模型接受抗体-偶联药物Rituximab-LP1和02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0090] 图25A示出Huh-7人肝癌CDX模型接受抗体-偶联药物Human IgG-LP1和02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图25B示出Huh-7人肝癌CDX模型接受抗体-偶联药物Human IgG-LP1和02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0091] 图26A示出LD1-0015-200617人食管鳞状细胞癌PDX模型接受抗体-偶联药物IgG-LP1和02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图26B示出LD1-0015-200617人食管鳞状细胞癌PDX模型接受抗体-偶联药物Human IgG-LP1和02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0092] 图27A示出LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型接受抗体-偶联药物02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图27B示LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型接受抗

体-偶联药物02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0093] 图28A示出LD1-2025-362797人小细胞肺癌PDX模型接受抗体-偶联药物02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图28B示出LD1-2025-362797人小细胞肺癌PDX模型接受抗体-偶联药物02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0094] 图29A示出LD1-2009-362263人三阴乳腺癌PDX模型接受抗体-偶联药物02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图29B示出LD1-2009-362263人三阴乳腺癌PDX模型接受抗体-偶联药物02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0095] 图30A示出LD1-0060-200770人胆管癌PDX模型接受抗体-偶联药物02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图30B示出LD1-0060-200770人胆管癌PDX模型接受抗体-偶联药物02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

[0096] 图31A示出OV-10-0073人卵巢癌PDX模型接受抗体-偶联药物Human IgG-LP1和02-1-LP1治疗后的肿瘤体积-时间变化曲线图。图31B示出OV-10-0073人卵巢癌PDX模型接受抗体-偶联药物Human IgG-LP1和02-1-LP1治疗后的体重-时间变化曲线图。

具体实施方式

[0097] 除非另有说明,否则在本说明书和权利要求书中使用的表示含量,浓度,比例,质量,体积,时间,温度,厚度,技术效果等的所有数字在任何情况下均应理解为由术语“约”或“大致”修饰。因此,除非有相反的指示,否则以下说明书和所附权利要求书中列出的数字参数是近似值。对于本领域技术人员来说,其可以根据通过本公开寻求获得的期望性质和效果而变化,应根据有效数字位数和常规舍入方法或者本领域技术人员理解的方式来解释每个数值参数。

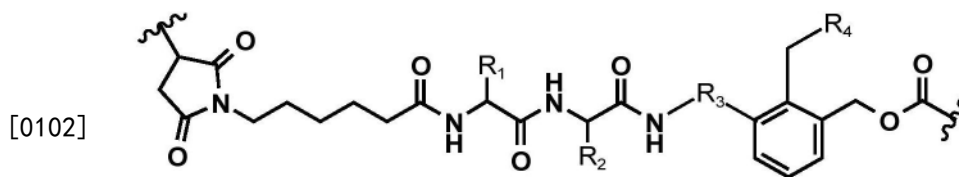
[0098] 尽管阐述了本公开的广泛范围的数值范围和参数是近似值,但是尽可能精确地提供了在具体实施例中阐述的数值。然而,任何数值都会固有地包含某些误差,这些误差由于在其相应的测试测量中发现的标准偏差而必然地导致的。本说明书给出的每个数值范围将包括落入该较宽数值范围内的每个较窄数值范围,就如同这些较窄数值范围均在本文中明确写出一样。

[0099] ADC分子中,连接子作为连接抗体及有效荷载的连接结构,是成功构建ADC分子的关键因素。就药代动力学(PK)/药效学(PD)和治疗窗口而言,连接子的分子设计和性质是ADC发挥功效的关键决定因素。为了发挥最佳的效力,理想的连接子应该具备如下特性:(1)连接子血浆中足够稳定,ADC分子可以在血流中循环并定位到肿瘤部位而不至于过早裂解。不稳定的连接子会导致毒性有效荷载过早释放,并损害非目标健康细胞,从而造成全身中毒和不良反应。(2)连接子需要具备快速被切割的能力,一旦ADC被内化到靶肿瘤细胞中,能够快速释放出游离的毒性有效荷载。(3)连接子设计还需考虑疏水性。疏水连接子与疏水有效荷载的结合通常会促进ADC分子的聚集,但不利于ADC药效,还可能导致肝中毒或是引发不希望的免疫反应(Kyoji Tsuchikama et al., Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistrie, Protein Cell. 2018 Jan; 9(1): 33-46)。

[0100] 抗体-药物偶联物

[0101] 本公开提供了一种抗体-药物偶联物(ADC),或其异构体、同位素变体、药学上可接

受的盐、前药、溶剂化物或其组合,包括抗体或其抗原结合片段,有效荷载和式I所示的连接子,



式 I

[0103] 所述式I所示连接子通过琥珀酰亚胺基与抗体或其抗原结合片段链间二硫键还原后的巯基部分形成硫醚键连接;

[0104] 所述式I所示连接子的酯基中的羰基与有效荷载中的氨基连接;

[0105] 式I中, R_1, R_2 各自独立地选自氢,甲基或异丙基;

[0106] R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$ 或单键, R_5 选自氢或苯甲基, n^1 表示0~2的整数, n^2 表示0~2的整数;

[0107] R_4 表示甲氨基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。

[0108] 术语“抗体-药物偶联物”或“ADC”是指本文所述的与有效荷载共价连接的抗MUC18/CD44v7/8抗体或其抗原结合片段的偶联物。通常,抗体-药物偶联物可以包括抗体或其抗原结合片段,有效荷载,以及任选地抗体或其抗体结合片段与有效荷载之间的连接子。ADC可以通过将有效荷载递送到抗体或其抗原结合片段靶向的MUC18和/或CD44v7/8细胞,特别是MUC18或CD44v4/8肿瘤细胞来提供治疗效果。抗体-药物偶联物可以通过本领域已知的用于制备抗体-药物偶联物的各种方法制备。

[0109] 如本文所用,“抗体”是指与抗原结合的免疫球蛋白(Ig)家族的多肽。例如,天然存在的IgG型“抗体”是一种四聚体,其包含至少两个通过二硫键相互连接的重(H)链和两个轻(L)链。每个重链由重链可变区(在此缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由CH1,CH2和CH3三个结构域组成。每个轻链由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区(本文简称为CL)组成。轻链恒定区由一个域组成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),中间穿插着更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。

[0110] 如本公开所用,术语“抗原结合片段”是指抗体片段,包括双抗体,Fab,Fab',F(ab')₂,Fv片段,二硫键稳定的Fv片段(dsFv),(dsFv)₂,双特异性dsFv(dsFv-dsFv'),二硫键稳定的双抗体(ds双抗体),单链Fv(scFv),scFv二聚体(二价双抗体),由抗体的一部分形成的多特异性抗体,所述抗体包括一个或多个CDR,骆驼化单结构域抗体,纳米体,结构域抗体,二价结构域抗体或与抗原结合但不包括完整抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够与亲本抗体或亲本抗体片段(例如,亲本scFv)结合的共同抗原。

[0111] “异构体”一词是指分子式相同但结构不同的化合物,也称为结构异构体,通常包括结构异构体和立体异构体。结构异构体是指由分子中原子的连接顺序不同或键合性质不同引起的异构体,优选包括互变异构体。互变异构体是指原子在分子中两个位置上快速移动产生的官能团异构体。立体异构体是指由分子中的原子或原子团以相同的顺序和键相互连接,但在空间排列上不同而引起的异构体,优选包括光学异构体。光学异构体是指由于分

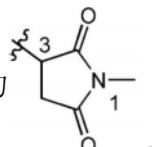
子中不存在反轴对称性而具有不同光学性质的立体异构体,如映异构体(enantiomer)、非映异构体(diastereomer)、外消旋体(racemate)和介孔异构体(mesomer)。

[0112] 术语“前药”是指通过改变药物的化学结构而获得的化合物,该化合物在体外是无活性的或活性较低的,并在体内通过酶促或非酶促转化释放活性药物以发挥药理作用。在本文中,前药可以是ADC分子或有效载荷。

[0113] 术语“有效荷载”包括从抗体-药物偶联物中释放后具有细胞毒性或能够杀死细胞的化合物,具有放射性标记的化合物、放射性核素或多肽,作为检测标记或细胞杀伤作用的荧光团、生色团,显像剂和/或金属离子,调节机体免疫活性(包括激活或抑制作用)的化合物、核酸、多肽或蛋白质、酶、激素或核酸。

[0114] 在一些理想情况下,抗体-药物偶联物中偶联的有效荷载几乎没有细胞毒性或细胞毒性小至有效治疗剂量的ADC给药后不会由于偶联的有效荷载引起受试者的全身毒性反应。所述有效荷载可以是已经经过临床验证的用于治疗特定疾病的药物,或者为在临床使用条件下具有可接受的药理活性的化合物、放射性核素、核酸、蛋白或多肽。

[0115] 本公开中,所述式I所示的端部琥珀酰亚胺基与抗体或其抗原结合片段链间二硫

链还原后的巯基部分形成硫醚键连接。所述琥珀酰亚胺基为  , 其在3位与抗体或其

抗原结合片段链间二硫链还原后的巯基部分形成硫醚键连接。本公开中,结构式中的带有  的键表示与其他基团连接的化学键。

[0116] 本公开中,抗体或其抗原结合片段的二硫键包括链间二硫键和链内二硫键,优选地,链间二硫键经过处理,例如,活化成为巯基后与连接子键合。抗体或其抗原结合片段中与连接子中的琥珀酰亚胺基进行化学键合的氨基酸包括赖氨酸、组氨酸、酪氨酸和半胱氨酸中的一种或其组合。任选地,抗体或其抗原结合片段中的化学结合氨基酸是半胱氨酸。在一些实施方式中,式I所示连接子可以连接于抗体的铰链区、可变区和/或恒定区。

[0117] 在一些实施方式中,式I所示的连接子中, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。所述 n^3 可以选取例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19和20中的任一整数。

[0118] 在一些实施方式中, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示8~15的整数。在一些实施方式中, R_4 表示 $-(NCH_3COCH_2)n^3-NCH_3COCH_3$, n^3 表示10~12的整数。在一些实施方式中, R_4 表示甲氨基。

[0119] 本公开中,式I所示的连接子中含有亲水性氨基集团 R_4 ,其包含有聚肌氨酸基团或甲氨基,增加了抗体-药物偶联物的亲水性。亲水性氨基基团的引入有利于改善与疏水性有效载荷偶联的ADC的亲水性。ADC分子的亲水性提高有助于降低制备过程中ADC分子的聚集,进而提高抗体-药物偶联物的稳定性、均一性和纯度。

[0120] 在一些实施方式中,式I所示的连接子中, R_3 表示单键。

[0121] 在一些实施方式中, R_3 表示 $-(CR_5HCONH)n^1-(CH_2CONH)n^2-$, R_5 为苯甲基, n^1 表示1~2的整数, n^2 表示1~2的整数。

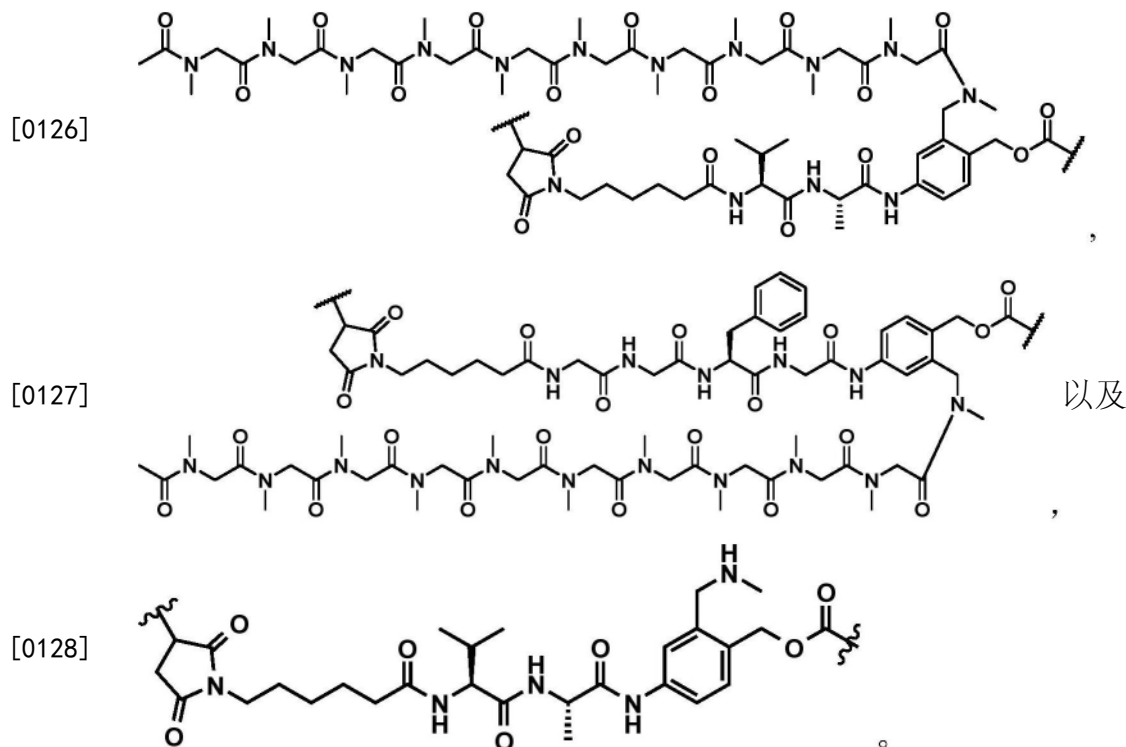
[0122] 在一些实施方式中, R_3 表示 $-CR_5HCONH-$, $-CH_2CONH-$, $-CR_5HCONH-CH_2CONH-$, $-$

$(\text{CR}_5\text{HCONH})_2\text{-CH}_2\text{CONH-}$, $-\text{CR}_5\text{HCONH-}(\text{CH}_2\text{CONH})_2\text{-}$, 或者, $-(\text{CR}_5\text{HCONH})_2\text{-(CH}_2\text{CONH})_2\text{-}$; R_5 为苯甲基。

[0123] 在一些实施方式中, R_1 为氢。在一些实施方式中, R_1 为异丙基。

[0124] 在一些实施方式中, R_2 为氢。在一些实施方式中, R_2 为甲基。

[0125] 在一些实施方式中, 所述抗体-药物偶联物中的连接子选自以下组



[0129] 在一些实施方式中, 所述抗体-药物偶联物中的有效荷载为含有放射性标记、荧光团、生色团、显像剂和/或金属离子为检测标记的标记物, 所述标记物包括但不限于化学合成的有机化合物、放射性核素、金属络合物或多肽。其中, 放射性标记是指用放射性核素取代化合物分子的一种或几种原子而使它能被识别并可用作示踪剂的标记化合物, 包括氨基酸、多肽、蛋白质、糖类、核苷酸、核苷、嘌呤、嘧啶、甾族、类脂化合物, 以及医学研究用的肿瘤抗原、激素、受体、维生素和药物等。放射性核素通常为能自发放出射线的核素, 包括但不限于氚、碘125、碘131、硫35、磷32和碳14。荧光团通常为包括共轭双键的基团, 当分子从激发态恢复到基态时, 荧光团会发出荧光。生色团是指分子中含有的, 能对光辐射产生吸收、具有跃迁的不饱和基团及其相关的化学键。显像剂通常指在核医学中指引入体内后能进行脏器、组织或分子显像的放射性药物。

[0130] 在一些实施方式中, 所述抗体-药物偶联物中的有效荷载为核酸, 所述核酸可以为核糖核酸和/或脱氧核糖核酸。

[0131] 在一些实施方式中, 所述抗体-药物偶联物中的有效荷载为激素、生长因子、凝血因子、纤溶蛋白酶(例如能够将前体药物转化为活性药物的前体药物转化酶、核糖核酸酶)。

[0132] 在一些实施方式中, 所述抗体-药物偶联物中的有效荷载为免疫调节剂(包括具有影响免疫作用的细胞因子和趋化因子), 具有生物活性的激动性抗体或拮抗性抗体。

[0133] 在一些实施方式中, 所述抗体-药物偶联物中有效荷载为细胞毒性化合物。在一些实施方式中, 所述抗体-药物偶联物中的有效荷载具有抗肿瘤活性, 或者为抗肿瘤药物。所

述有效荷载选自DNA拓扑异构酶抑制剂或选自微管蛋白抑制剂。所述DNA拓扑异构酶抑制剂可以为拓扑异构酶I抑制剂或拓扑异构酶II抑制剂。

[0134] 本公开中,术语“拓扑异构酶抑制剂”通常指抑制拓扑异构酶活性的化合物。拓扑异构酶I抑制剂的化合物对拓扑异构酶I具有活性,拓扑异构酶II抑制剂对拓扑异构酶II具有活性。一些化合物对拓扑异构酶I和拓扑异构酶II都有活性,称为拓扑异构酶I/II抑制剂。

[0135] 术语“微管蛋白抑制剂”通常指抑制真核细胞微管系统,干扰细胞分裂和抑制细胞增殖的化合物。

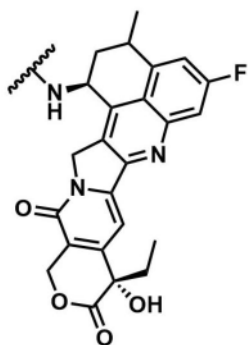
[0136] 在一些实施方式中,所述有效荷载为具有拓扑异构酶抑制作用的喜树碱或其衍生物。术语“衍生物”指母体化合物分子中的原子或原子团被其他原子或原子团取代所形成的化合物,称为该母体化合物的衍生物。术语“喜树碱及其衍生物”通常包括喜树碱(camptothecin)和喜树碱衍生物,喜树碱通过不可逆地抑制拓扑异构酶I发挥其药理作用。所述喜树碱衍生物包括依喜替康(exatecan)、伊立替康(irinotecan)、托泊替康(topotecan)、鲁托替康(lurtotecan)、斯兰替康(silatecan)、依替立替康聚乙二醇(etirinotecan pegol)、TAS 103、9-氨基喜树碱(9-aminocamptothecin)、7-乙基喜树碱(7-ethylcamptothecin)、10-羟基喜树碱(10-hydroxycamptothecin)、9-硝基喜树碱(9-nitrocamptothecin)、10,11-亚甲二氧基喜树碱(10,11-methylenedioxycamptothecin)、9-氨基-10,11-亚甲基二氧基喜树碱(9-amino-10,11-methylenedioxycamptothecin)、9-氯-10,11-亚甲基二氧基喜树碱(9-chloro-10,11-methylenedioxycamptothecin)、7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10,11-亚乙基二氧基-20(S)-喜树碱(7-(4-methylpiperazinomethylene)-10,11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin)、7-(4-甲基哌嗪亚甲基)-10,11-亚甲基二氧基-20(S)-喜树碱(7-(4-methylpiperazinomethylene)-10,11-methylenedioxy-20(S)-camptothecin)、7-(2-(N-异丙基氨基)乙基)-(20S)-喜树碱(7-(2-(N-isopropylamino)ethyl)-(20S)-camptothecin)等及其立体异构体、盐和酯。喜树碱和喜树碱类似物或衍生物的合成方法是已知的,并且在美国专利号5,244,903中进行了总结和阐述,该专利通过引用整体并入本文。

[0137] 在一些实施方式中,所述有效荷载为具有微管蛋白抑制作用的奥瑞他汀或其衍生物,美登素或其衍生物。术语“奥瑞他汀及其衍生物”通常包括奥瑞他汀F和奥瑞他汀F衍生物,所述奥瑞他汀F衍生物包括单甲基奥瑞他汀E(monomethyl auristatin E, MMAE)和单甲基奥瑞他汀F(monomethyl auristatin F, MMAF)。术语“美登素及其衍生物”通常包括美登素和美登素衍生物,所述美登素衍生物包括美登素DM1,美登素DM2和美登素DM4。

[0138] 在一些实施方式中,所述有效荷载为喜树碱衍生物依喜替康,作为拓扑异构酶抑制剂能够作用于整个细胞周期,对生长缓慢实体瘤具有强的穿透性和良好的疗效。而且,细胞内靶标数量远低于微管蛋白抑制剂的靶标数量,在ADC分子携带相同数量的有效荷载进入细胞时能够起到更好的杀伤效果。依喜替康(Exatecan)分子不是P-gp的底物,有利于降低或缓解药物耐药的问题。

[0139] 在一些实施方式中,所述有效荷载为式II所示的喜树碱,其通过环己烷环上氨基的氮原子与连接子连接,

[0140]



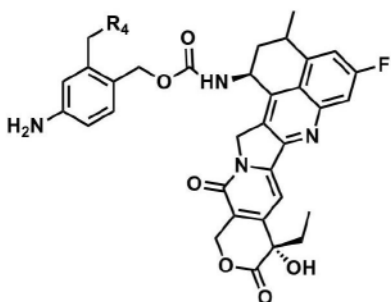
式 II。

[0141] 依喜替康分子的结构具有刚性且亲水性差,与现有技术中常用的GGFG四肽连接子连接后制备ADC时容易引起ADC分子间的聚合,不符合ADC药物的开发要求(Bioorg.Med.Chem.Lett.26(2016)1542-1545)。因此,连接子和有效荷载的选择和匹配对ADC药物的安全性和稳定性是有影响的。

[0142] 不受任何理论的束缚,本公开提供的抗体-药物偶合物中,由于连接子中具有多个亲水性基团,改善了连接子-有效荷载结构中的亲水性,可以在一定程度上降低由于疏水性有效荷载引起的ADC分子的聚集、沉淀等现象。

[0143] ADC分子内吞进入细胞后,根据连接子是否降解释放出有效荷载或连接子(或部分连接子)-有效荷载结构的化合物。在一些实施方式中,式II所示的依喜替康的环己烷环上氨基与式I所示的连接子的酯基中的羰基键合后形成包括氨基甲酸酯(carbamate)的连接子-有效荷载结构。不受任何理论的束缚,本公开提供的连接子-有效荷载结构中,ADC分子内吞进入细胞后,连接子经组织蛋白酶(例如,Cathepsin B)酶解后,形成如下式IV所示的中间体或活性代谢产物,

[0144]



式 IV

[0145] R_4 表示甲氨基或 $-(NCH_3COCH_2)_n-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。

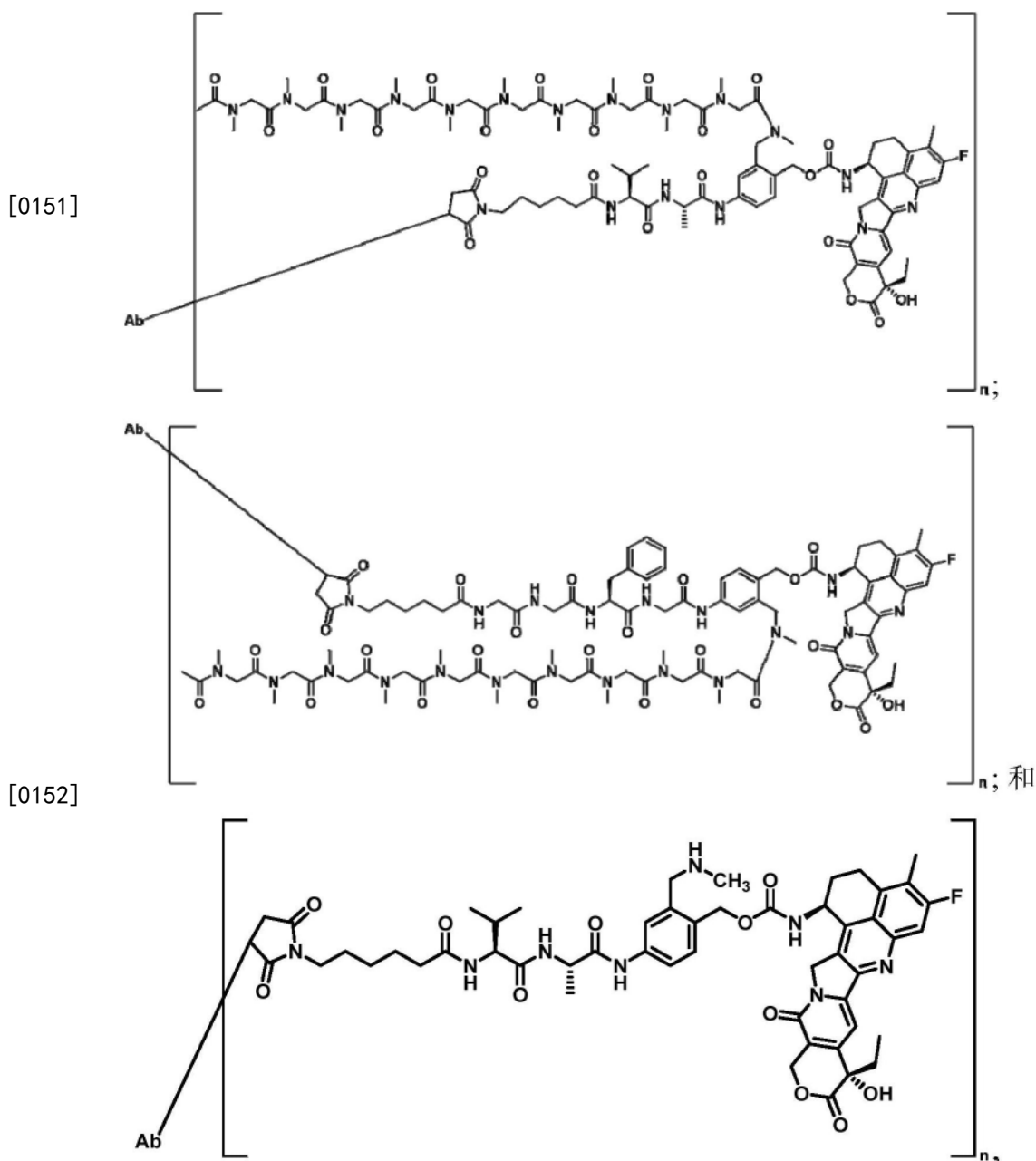
[0146] 所述式IV所示的中间体或活性代谢产物中的PABC(para-aminobenzoyloxycarbonyl)基团继而发生1,6-消除并释放出依喜替康(参见, Angew.Chem.Int.Ed.2015,54,7492-7509.)。因此,本公开提供的ADC分子中的连接子-有效荷载结构具有良好的体内稳定性与生物活性。

[0147] 连接子-有效荷载结构中的酶切位点,不受任何理论的束缚,可以是连接子中的酰胺键,例如, R_2 表示的取代基所在的碳原子和 R_3 表示的基团之间的酰胺键,或者, R_3 表示的基团中的酰胺键。

[0148] 在一些实施方式中,抗体-药物偶联物中,偶联的有效荷载的分子数相对每一分子抗体或抗原结合的比值(药物抗体比或DAR)为1~10。在一些实施方式中,DAR为1~2,2~4,4~6,2~8,4~8,4~10,6~10,7~10或者8~10,示例性的DAR值如4,6,7.8,9.2或者9.92。

[0149] DAR表示每个抗体分子的偶联有效荷载或药物分子数的平均值,即偶联药物分子数的平均值。在抗体-药物偶联物中,DAR是影响其疗效和安全性的关键因素。抗体-药物偶联物的生产是通过指定反应条件如反应所用的起始原料和试剂的量来进行的,以达到恒定的偶联有效荷载分子数。通常抗体-药物偶联物制备时会得到含有不同数量的偶联有效荷载分子的混合物。除非另有说明,本公开中DAR定义为平均值,即偶联有效荷载或药物分子的平均数。

[0150] 在一些实施方式中,所述抗体-药物偶联物包括具有以下结构中的任一种:



[0153] Ab表示抗体或抗原结合片段;n与DAR相同。

[0154] 抗体或其抗原结合片段通过还原的反应性巯基与连接子连接,任选地,抗体或其抗原结合片段的铰链区中的二硫键被还原为反应性巯基,然后连接至连接子。

[0155] 在一些实施方式中,抗体-药物偶联物中的抗体或其抗原结合片段靶向MUC18。MUC18,也称为CD146或黑色素瘤细胞粘附分子(MCAM),是一种跨膜糖蛋白,主要在细胞粘附

中起作用。它在血管组织(包括血管平滑肌)内的内皮细胞中以可检测的水平表达。值得注意的是,MUC18在人类恶性黑色素瘤中过度表达,特别是在转移性病变和晚期原发性肿瘤中。

[0156] 在本公开中,抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括重链(H)和轻链(L),重链和轻链的CDR如表1所示。

[0157] 表1:CDR序列(采用IMGT方案编号)

[0158]	抗体编号	H/L	CDR1	CDR2	CDR3
	CL070336	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	MHYSATP (SEQ ID NO: 11)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO: 23)
		L	KSVRTSGYNY (SEQ ID NO: 34)	LAS	QHSREFPFT (SEQ ID NO: 46)
	CL070335	H	GYSITSGYS (SEQ ID NO: 1)	IHYSTTT (SEQ ID NO: 12)	SRSLNWDVLDY (SEQ ID NO: 23)

[0159]

	L	KSVRTSGYSY (SEQ ID NO: 35)	LAS	QHTREFPFT (SEQ ID NO: 47)
CL070333	H	GFTFTGYY (SEQ ID NO: 2)	IYPGNVNT (SEQ ID NO: 13)	ARSGYFASSYEFAY (SEQ ID NO: 24)
	L	ENIYSY (SEQ ID NO: 36)	NAK	QHHYGTPLT (SEQ ID NO: 48)
CL070319	H	GYTFTEYA (SEQ ID NO: 3)	ITAYSGDA (SEQ ID NO: 14)	ARGLGRPNYGMDY (SEQ ID NO: 25)
	L	QSLNSRYQKNY (SEQ ID NO: 37)	FAS	QQHYGTPFT (SEQ ID NO: 49)
CL070321	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDDYYAFDY (SEQ ID NO: 26)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSSYPST (SEQ ID NO: 50)
CL070320	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGGT (SEQ ID NO: 15)	ARSGYDNYALDY (SEQ ID NO: 27)
	L	STVGY (SEQ ID NO: 39)	STS	HQWSSYPCT (SEQ ID NO: 51)
CL070324	H	GYTFTDYN (SEQ ID NO: 4)	INPNNGAT (SEQ ID NO: 16)	TRSGYDDYYALDY (SEQ ID NO: 28)
	L	SSVGY (SEQ ID NO: 38)	STS	HQWSNYPST (SEQ ID NO: 52)
CL070341	H	GFTFSTYG (SEQ ID NO: 5)	INSRASYT (SEQ ID NO: 17)	ARHRRDWDSYYAMDY (SEQ ID NO: 29)
	L	QSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 40)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070350	H	GFTFNNGY (SEQ ID NO: 6)	INRGGSYT (SEQ ID NO: 18)	ARHRRDWDSYYAMDY (SEQ ID NO: 29)
	L	RSVLYNSNQKNY (SEQ ID NO: 41)	WAS	HQYLSSWT (SEQ ID NO: 53)
CL070349	H	GYSITSGFY (SEQ ID NO: 7)	INFGGTN (SEQ ID NO: 19)	ARGGNDGGFTY (SEQ ID NO: 30)
	L	SSVSSTY (SEQ ID NO: 42)	RTS	HQWSGYPYT (SEQ ID NO: 54)
CL070348	H	GYSITSDYA (SEQ ID NO: 8)	ITYSGST (SEQ ID NO: 20)	ARRIRRTGDWYFDV (SEQ ID NO: 31)
	L	QNLLNSVNQKNF (SEQ ID NO: 43)	WAS	QNDYIYPYT (SEQ ID NO: 55)
CL070370	H	GYTFTDYS (SEQ ID NO: 9)	INTETGEP (SEQ ID NO: 21)	VSYDYDAVS (SEQ ID NO: 32)
	L	QYVGAA (SEQ ID NO: 44)	WAS	QQYGNRYT (SEQ ID NO: 56)
J253	H	GYTFTSYD (SEQ ID NO: 10)	IFPGDGST (SEQ ID NO: 22)	ARYHFFDN (SEQ ID NO: 33)
	L	KSLLYKDGKTY (SEQ ID NO: 45)	LMS	QQLVEYPYT (SEQ ID NO: 57)

[0160] 如本公开所用,术语“CDR”或“互补性决定区”是指重链和/或轻链可变区内的非连续抗原结合位点。CDR残基编号遵循IMGT的命名法,参见Lefranc M.P.et al., Dev.Comp.Immunol.,27:55-77(2003),当相互比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或亚群。然而,应用任何一个定义来指代抗体或其抗原结合片段或其移植抗体或变体的CDR旨在本文定义和使用的术语的范围内。

[0161] 在一些实施方式中,所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包含编号为CL070336、

CL070335、CL070333、CL070319、CL070321、CL070320、CL070324、CL070341、CL070350、CL070349、CL070348、CL070370或J253的抗体中的重链CDR和轻链CDR。

[0162] 在一些实施方式中,抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的HCDR1 (heavy chain CDR1)、如SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的HCDR2 (heavy chain CDR2)、如SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的HCDR3 (heavy chain CDR3);和如SEQ ID NO:38所示氨基酸序列的LCDR1 (light chain CDR1),氨基酸序列为STS的轻链CDR2,如SEQ ID NO:52所述氨基酸序列的LCDR3 (light chain CDR3)。

[0163] 在一些实施方式中,所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括与表2中示出的参考抗体序列中的任一VH具有至少85%或者90%同一性的重链可变区 (VH, heavy chain variable region),和/或,与表2中示出的参考抗体序列中的任一VL具有至少85%或者90%同一性的轻链可变区 (VL, light chain variable region)。

[0164] 所述同一性可以使用Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68, 1990的算法来确定,该算法如在Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77, 1993中进行了修改。此类算法并入至Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-10, 1990的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)中。可以用BLAST程序(分数=50,字长=3)来进行BLAST蛋白质搜索,以获得与感兴趣的蛋白质分子同源的氨基酸序列。在两个序列之间存在缺口的情况下,可以如在Altschul等人,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402, 1997中所描述的那样采用Gapped BLAST。当采用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各自程序(例如, XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0165] 在一些实施方式中,在框架区内不存在突变或存在不影响抗体可变区与抗原结合的突变,该突变可以提高抗体与抗原的结合亲和力,或者保持大致不变。在一些实施方式中,抗MUC18或CD44v7/8抗体或其抗原结合片段还包含保守修饰的变体,所述保守修饰的变体包括对多肽序列的单独取代、缺失或添加,其导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能相似的氨基酸的保守置换表是本领域熟知的。这种保守修饰的变体是对多态性变体、种间同源物和等位基因的补充且不排除这些变体。以下八组含有相互保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、蛋氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见,例如,Creighton,Proteins(1984))。在一些实施方式中,术语“保守序列修饰”用于指不显著影响或改变包含氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

[0166] 表2参考抗体序列

[0167]

抗体编号	VH	VL	Antibody Code 抗体编号	VH	VL
CL070336	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	CL070341	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
CL070335	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61	CL070350	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
CL070333	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	CL070349	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 77
CL070319	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	CL070348	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79
CL070321	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	CL070370	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81
CL070320	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69	J253	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83
CL070324	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	/	/	/

[0168] 在一些实施方式中,所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包含的VH序列与表3中示出的VH序列至少具有85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一性;VL序列与表3中示出的VL序列至少具有85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%,99%同一性。表3中所示的抗体分别是CL070324和J253的人源化序列。

[0169] 表3人源化抗体序列

[0170]

抗体编号	VH	VL
人源化CL070324 (02-1)	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:85
人源化hJ253-03-1	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87
人源化hJ253-03-7	SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:89

[0171] 在一些实施方式中,所述抗MUC18抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:84所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:85所示氨基酸序列的轻链可变区序列。

[0172] 在一些实施方式中,抗MUC18抗体或其抗原结合片段是人源化CL070324、人源化hJ253-03-1、或人源化hJ253-03-7,或其保守变体。

[0173] 其中,SEQ ID NO:1~89所示的抗MUC18抗体的CDR序列和抗体可变区序列已记载在美国专利US2022041749 (SEQ ID NO:8~90,SEQ ID NO:1~6)中,该专利通过引用整体并入本公开。

[0174] 在一些实施方式中,所述抗体或抗原结合片段靶向CD44v7/8.CD44,也被称为HCAM (归巢细胞粘附分子)、Pgp-1 (吞噬糖蛋白-1)、Hermes抗原、淋巴细胞归巢受体、ECM-III或HUTCH-1,是一种细胞表面糖蛋白,其主要在细胞粘附和细胞间相互作用中发挥功能。已知CD44的若干剪接变体,包括CD44 v7/8,其是一种包含外显子7和外显子8的变体。CD44是透明质酸的蛋白受体,并且已进一步显示与骨桥蛋白、胶原蛋白、基质金属蛋白酶和其它类似配体结合或以其它方式相互作用。

[0175] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段特异性结合人CD44 v7/8中包括QAGRRMDMDSSHSIT (SEQ ID NO:90)的氨基酸序列的结合肽。

[0176] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段不结合人CD44 v7/8中PIS HPMGRGHQAGRR (SEQ ID NO:91)和/或SHSITLQPTANPNTG (SEQ ID NO:92)的氨基酸序列的结合肽。

[0177] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段的重链包括:如SEQ ID NO:93所示氨基酸序列的重链CDR1,如SEQ ID NO:94所示氨基酸序列的重链CDR2,如SEQ

ID NO:95所示氨基酸序列的重链CDR3;轻链包括:如SEQ ID NO:96所示氨基酸序列的轻链CDR1,氨基酸序列为RAN的CDR2,如SEQ ID NO:97所示氨基酸序列的轻链CDR3。抗CD44v7/8抗体或其抗原结合片段的CDR序列如表4所示:

[0178] 表4CDR序列(采用IMGT方案编号)

抗体		CDR1	CDR2	CDR3
[0179] HIS1H2-2	重链	GYTFTNYW (SEQ ID NO: 93)	IYPSDSYT (SEQ ID NO: 94)	TKWGDSYD (SEQ ID NO: 95)
	轻链	QDINRY (SEQ ID NO: 96)	RAN	LQYDEFPFT (SEQ ID NO: 97)

[0180] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段包括与表5中示出的参考抗体序列的VH具有至少85%或者90%同一性的VH,和/或,与表5中示出的参考抗体序列的VL具有至少85%或者90%同一性的VL。

[0181] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段包括与表5中示出的参考抗体人源化序列的HIS1H2-2a或HIS1H2-2的VH具有至少具有85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%,99%的同一性的VH;和与HIS1H2-2a或HIS1H2-2的VL序列具有至少85%,90%,92%,94%,95%,96%,97%,98%,99%的同一性的VL。

[0182] 表5抗CD44 v7/8抗体的轻/重链可变区序列

抗体编号	VH	VL
参考抗体HIS1H2-2	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:99
人源化抗体HIS1H2-2a	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:101
人源化抗体HIS1H2-2	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:104

[0184] 在一些实施方式中,所述抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段包括如SEQ ID NO:100所示氨基酸序列的重链可变区序列,以及如SEQ ID NO:101或SEQ ID NO:104所示氨基酸序列的轻链可变区序列,或其保守变体。

[0185] 结合肽序列,不结合的肽序列,CDR序列和SEQ ID NO:90~101所示的抗CD44 v7/8抗体或其抗原结合片段的抗体可变区序列已记载在PCT专利申请W02020159754 (SEQ ID NO:2~14)中,该专利通过引用整体并入本文。

[0186] 本公开提供的抗体-药物偶联物对肿瘤细胞显示出优异的杀伤活性,并且对具有高表达MUC18或CD44v7/8的肿瘤细胞显示极高的杀伤活性。

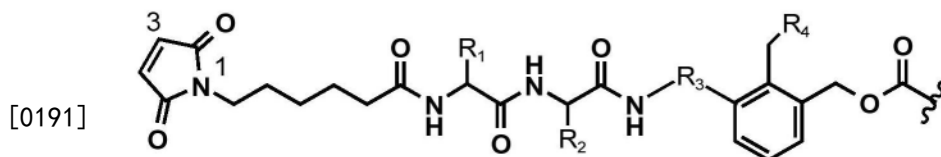
[0187] 本公开提供的抗体-药物偶联物显示出优异的抗肿瘤活性。在一些实施方案中,抗体-药物偶联物对患有具有不同MUC18表达水平(低、中、高)的肿瘤性疾病的受试者显示出优异的抗肿瘤活性。MUC18的表达水平可以通过本领域技术人员已知的H-Score方法来测量。分数范围为0-300,分数越高,表达越高。例如,低(H-Score=10-99)、中等(H-Score=100-99)和高(H-Score=200-300)。此外,抗体-药物偶联物在体内没有显示出明显的不良反应。

[0188] 需要说明的是,本公开的抗体-药物偶联物由于在大气中放置、或进行重结晶而有吸收水分、保持吸附的水的情况、或成为水合物的情况,这样的含有水的化合物及盐也包含在本公开之内。另外,本公开中也包括用各种放射性或非放射性同位素标记的同位素变体化合物。构成本公开的抗体-药物偶联物的原子中的一种以上,也可以含有非天然比例的原子同位素。作为原子同位素,可举出例如氘(2H)、氚(3H)、碘-125(125I)或碳-14(14C)等。

另外,本公开化合物可以用例如氚(3H)、碘-125(125I)或碳-14(14C)之类的放射性同位素进行放射性标记。经放射性标记的化合物作为治疗或预防剂、研究试剂例如检验试剂、及诊断剂、例如体内图像诊断剂。对于本公开的抗体-药物偶联物的所有同位素变体而言,无论是否具有放射性,均包含于本公开的范围內。

[0189] 制备方法

[0190] 本公开提供了一种抗体-药物偶联物的制备方法,或其异构体、同位素变体、药学上可接受的盐、前药、其溶剂化物或其组合,以及药学上可接收的赋形剂,包括以下步骤:抗体或其抗原结合片段经还原处理后链间二硫键至少部分被还原,与连接子-有效荷载中的式III所示连接子的马来酰亚胺-N-基的3位碳原子进行反应,



式 III

[0192] 所述式III所示连接子的酯基中的羰基与抗体-药物偶联物中有效荷载的氨基连接;

[0193] R_1 、 R_2 各自独立地选自氢、甲基或异丙基;

[0194] R_3 表示 $-(CH_2CHCONH)n^1-$ $-(CH_2CONH)n^2-$ 或单键, R_5 选自氢或苯甲基, n^1 表示0~2的整

[0195] 数, n^2 表示0~2的整数;

[0196] R_4 表示甲氨基或 $-(NCH_3COCH_2)n^3-$ $-NCH_3COCH_3$, n^3 表示1~20的整数。

[0197] 在抗体-药物偶联物中,链间二硫键被还原为巯基,然后与连接子-有效荷载中由式III表示的连接子的反应基团反应。在很多实际情况下,带有有效荷载的上述式III所示结构的连接子连接到具有反应活性巯基的同一个抗体或其抗原结合片段分子上。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与还原剂反应如二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇或三(2-羧乙基)盐酸盐磷(TCEP)反应,使抗体或其抗原结合片段上的二硫键形成活性巯基。所述还原剂的用量可以为抗体或其抗原结合片段摩尔数的0.3~10倍当量,例如,1~10,3~10,5~10,7~10倍抗体或其抗原结合片段摩尔当量。

[0198] 在一些实施方式中,所述方法还包括:抗体或其抗原结合片段在含有螯合剂的缓冲溶液中与还原剂反应,之后加入连接子-有效荷载的溶解液,进行反应。连接子-有效荷载具体为式III所示连接子和有效荷载键合后形成的化合物,其中有效荷载中的氨基(伯氨基)与III所示连接子的酯基中的羰基连接。在连接子-有效荷载中,有效荷载选自[抗体-药物偶联物]部分中描述的有效荷载。术语“螯合剂”是指能够与金属原子或离子通过配位键结合,生成具有环状结构的络合物。

[0199] 在一些实施方式中,还原剂在含有螯合剂的缓冲溶液中与抗体或其抗原结合片段反应,得到链间二硫键被部分或者完全还原的抗体或其抗原结合片段。所述螯合剂包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)和二乙三胺五乙酸(DTPA)。螯合剂的使用浓度为1mM~20mM,例如,2mM~20mM,5mM~20mM,8mM~20mM,1mM~15mM或者1mM~10mM。所述缓冲溶液的成分可以是本领域常用的缓冲盐,例如磷酸钠、硼酸钠、乙酸钠或者类似缓冲盐。

[0200] 抗体或其抗原结合片段与还原剂的反应在调节的pH条件下进行。在一些实施方式

中,抗体或其抗原结合片段与还原剂反应时溶液的pH为5~9,可选为pH 6~8,pH 6~7,pH6.5~7.5或者pH 7~8,例如在溶液约为pH7时进行反应。可以使用具有酸性或碱性的化学物质调节溶液pH值,示例性的具有酸性或碱性的化学物质包括醋酸、盐酸、磷酸、硫酸、碳酸氢钠、碳酸钠、氢氧化钠和三乙胺。

[0201] 抗体或其抗原结合片段与还原剂的反应在调节的温度条件下进行,示例性的反应温度为-10~40℃,-10~10℃,5~40℃,10~40℃,25~40℃,30~40℃,35~38℃,如约37℃。

[0202] 连接子-有效荷载可以溶解于有机溶剂,所述有机溶剂选自二甲亚砜(DMSO,dimethyl sulfoxide)、二甲基甲酰胺(DMF,dimethylformamide)、二甲基乙酰胺(DMA,dimethylacetamide)和N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP,N-methyl-2-pyrrolidone)中的任意一种或组合。

[0203] 在一些实施方式中,连接子-有效荷载的溶解液以1%至20%体积比的量加入到经还原处理或含有具有活性巯基的抗体或其抗原结合片段的缓冲溶液中,基于抗体或其抗原结合片段缓冲液的体积计。在一些实施方式中,加入的连接子-有效荷载的溶解液的体积比为1~20%,2~20%,5~20%,10~20%,15~20%,1~18%,1~15%,1~13%,1~10%或者5~15%,基于抗体或其抗原结合片段缓冲液的体积计。

[0204] 在一些实施方式中,连接子-有效荷载的与抗体或其抗原结合片段的摩尔用量比值为4~20,可选为8~20。在一些实施方式中,连接子-有效荷载的与抗体或其抗原结合片段的摩尔用量比值为10~20,14~20,16~20或者18~20。

[0205] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与连接子-有效荷载进行反应的温度为-10~40℃或者0~37℃。在一些实施方式中,反应温度为-10~10℃,5~40℃,5~37℃,10~37℃,10~25℃或者15~30℃。

[0206] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与连接子-有效荷载进行反应的时间为0.5~2小时。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与连接子-有效荷载进行反应的时间为0.5~1.75小时,0.5~1.5小时,0.5~1.25小时,0.75~2小时或者1~2小时。

[0207] 该反应可以通过使用含巯基的试剂使未反应的连接子-有效荷载的反应活性失活而终止。所述含有巯基的试剂包括但不限于半胱氨酸或者N-乙酰-(L)-半胱氨酸(NAC)。更具体的说,向反应溶液中加入摩尔当量为连接子-有效荷载摩尔当量1~2倍的含有巯基的试剂,并在室温(10~30℃)下孵育10~30分钟,如此可以终止反应。

[0208] 在抗体或抗原结合片段具有巯基的情况下,抗体-药物偶联物还可以通过使用已知方法反应化合物获得(例如,可通过专利公开文献US2016/297890中描述的方法获得(例如,可通过段落[0336]至[0374]中描述的方法获得))。具有巯基的抗体或其抗原结合片段可以通过本领域技术人员熟知的方法获得(Hermanson,G.T,Bioconjugate Techniques,pp.56-136,pp.456-493,Academic Press(1996))。

[0209] 通过上述制备方法可以获得本公开提供的抗体-药物偶联物。在一些实施方式中,制备的抗体-药物偶联物经过纯化处理,所述纯化处理包括但不限于凝胶过滤,例如使用凝胶柱进行纯化。

[0210] 试剂盒

[0211] 本公开提供了一种试剂盒,其包括上述抗体-药物偶联物,或其异构体、同位素变

体、药学上可接受的盐、前药、溶剂化物或其组合。试剂盒可以进一步包括本公开所述的抗体-药物偶联物在本公开的方法中的使用说明,例如在治疗肿瘤性疾病的方法中的使用说明。

[0212] 该试剂盒还可包括容器。合适的容器包括,例如,瓶子、小瓶(例如,双腔小瓶)、注射器(例如单腔或双腔注射器)和试管。容器可以由诸如玻璃或塑料的各种材料形成。容器中装有制剂。容纳制剂的容器可以是一次性小瓶或多次用小瓶,允许重复施用重构制剂。

[0213] 试剂盒可以进一步包括标签或包装插入物,其在容器上或与容器有关,可以标示复溶和/或使用制剂的用法说明。标签或包装插入物可以进一步标示该制剂用于或打算用于皮下、静脉内(例如,静脉内输注),或用于治疗受试者的肿瘤性疾病(例如,癌症)的其他给药模式。试剂盒还可以包括从商业、治疗和用户的角度出发所需的材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和带有使用说明的包装插入物。

[0214] 药物组合物

[0215] 本公开提供了一种药物组合物,包括上文所述的抗体-药物偶联物,或其异构体,同位素变体,药学上可接受的盐、前药、溶剂化物或其组合,以及药学上可接受的辅料。

[0216] 本公开的抗体-药物偶联物或药物组合物可以根据药学上可接受的辅料的具体适用形式、理化特征等,选择合适的给予方式。在一些实施方式中,所述药物组合物可以以冷冻干燥制剂或液状制剂的形式形成制剂,所述制剂中可以含有本领域中适当的制剂添加物。例如,上述药物组合物中,代表性地,含有1种以上的药学载体,例如灭菌的液体,如水及油(包含石油、动物、植物、或合成来源的油(例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等))。在静脉内给予上述药物组合物的情况下,水是更具有代表性的载体。另外,食盐水溶液、葡萄糖水溶液及甘油溶液也可作为液体载体,尤其是可用于注射用溶液。适当药学赋形剂在该领域中是已知的。根据需要,上述组合物中还可以含有微量的润湿剂或乳化剂、或pH缓冲剂。所述药物组合物的给药方式通常选用肠胃外的给药,可以为皮内、肌肉内、腹腔内、静脉内或皮下注射,但不限于这些,例如可以利用输液或快速浓注(bolus injection)进行给予药物。参见例如,the Handbook of Pharmaceutical Excipients,Third Edition,A.H.Kibbe(Pharmaceutical Press,London,UK,2000),其全部内容通过引用并入本文。Remington's Pharmaceutical Sciences,Sixteenth Edition,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980),其全部内容通过引用并入本文。

[0217] 本发明的药物组合物,可以是仅含有本申请的抗体-药物偶联物的药物组合物,也可以是含有抗体-药物偶联物及至少一种其他治疗剂(例如癌治疗剂)的药物组合物。在一些实施方式中,也可将本公开的抗体-药物偶联物与其他癌治疗剂一同给予以增强抗癌效果。出于这种目的使用的其他抗癌剂,可与抗体-药物偶联物同时地、分别地或序贯地向个体给予,也可改变给予间隔而进行给予。示例性的其他癌治疗剂如紫杉醇、顺铂、长春碱等,只要是具有抗肿瘤活性的药剂,就不受限制。

[0218] 关于本公开,活性剂或包含活性剂的药物组合物可以通过任何合适的给药途径给药于受试者。例如,活性剂可以通过胃肠外、鼻腔、口腔、肺部、局部、阴道或直肠给药而给药于受试者。提供以下关于给药途径的讨论仅仅是为了说明各种实施方案,而不应被解释为以任何方式限制范围。

[0219] 在一些实施方案中,将本公开的抗体-药物偶联物给予受试者。如本文所用,术语

“受试者”是指人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物,如老鼠、兔子、猫、狗、猪、猴子、黑猩猩、大猩猩等。在一些实施例中,受试者是人。

[0220] 使用方法

[0221] 本公开提供了抗体-药物偶联物、通过上述方法制备的抗体-药物偶联物、包括抗体-药物偶联物的药物组合物或本文提供的试剂盒在制备用于诊断、预防和治疗肿瘤性疾病的治疗剂中的用途。

[0222] 肿瘤性疾病包括良性肿瘤和恶性肿瘤(例如癌症)。在一些实施方式中,良性肿瘤和恶性肿瘤表达MUC18和/或CD44v7/8。

[0223] 应用抗体-药物偶联物的肿瘤性疾病的类型不限于上述癌症细胞,只要其是表达抗体-药物偶联物的抗体或其抗原结合片段可识别的蛋白质的癌症细胞即可。在一些实施方案中,肿瘤性疾病是表达MUC18和/或CD44v7/8的实体瘤。

[0224] 在一些实施方式中,肿瘤性疾病包括黑色素瘤、咽癌、三阴乳腺癌、食管腺癌、食管鳞状细胞癌、肝癌、卵巢癌、宫颈癌、尿路上皮癌、膀胱神经内分泌肿瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、皮肤鳞状细胞癌、胆管癌、转移性胰腺癌、肺鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌和/或食管鳞状细胞癌。

[0225] 本公开提供抗体-药物偶联物、通过上述方法制备的抗体-药物偶联物、包括抗体-药物偶联物的药物组合物,或试剂盒在制备靶向MUC18和/或CD44v7/8的治疗剂中的用途。

[0226] 本公开提供了诊断、预防和治疗肿瘤性疾病的方法,包括给受试者施用治疗有效量的上述治疗剂。

[0227] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指本文所述的ADC足以诱导预期效果的活性成分的量,包括但不限于本文所定义的疾病治疗。抗体-药物偶联物的治疗剂量根据所治疗的特定病况、病况的严重程度、个体患者参数(包括年龄、身体状况、体格、性别和体重)、治疗持续时间、联合疗法(如有)的性质、具体的施用途径、以及健康执业医师的知识等因素而变化。在一些实施方式中,可以在已给予一次或多次抗体或其抗原结合片段施用的个体中根据经验来确定上述抗体-药物偶联物的剂量。在一些实施方式中,抗体-药物偶联物的可接受的治疗剂量为0.1~30mg/kg,0.5~30mg/kg,1~30mg/kg,1~25mg/kg,0.1~25mg/kg,0.1~20mg/kg,1~20mg/kg或者0.5~20mg/kg。在一些实施方式中,给药频率为每12小时一次、每天一次、每周一次、每2周一次、每隔4周一次、每隔5周一次、每隔6周一次、每隔7周一次、每隔8周一次、每隔9周一次或每隔10周一次;或每月一次、每2个月一次或每3个月一次,或更长时间。所述治疗剂量和给药频率可以随治疗方案的变化而改变。

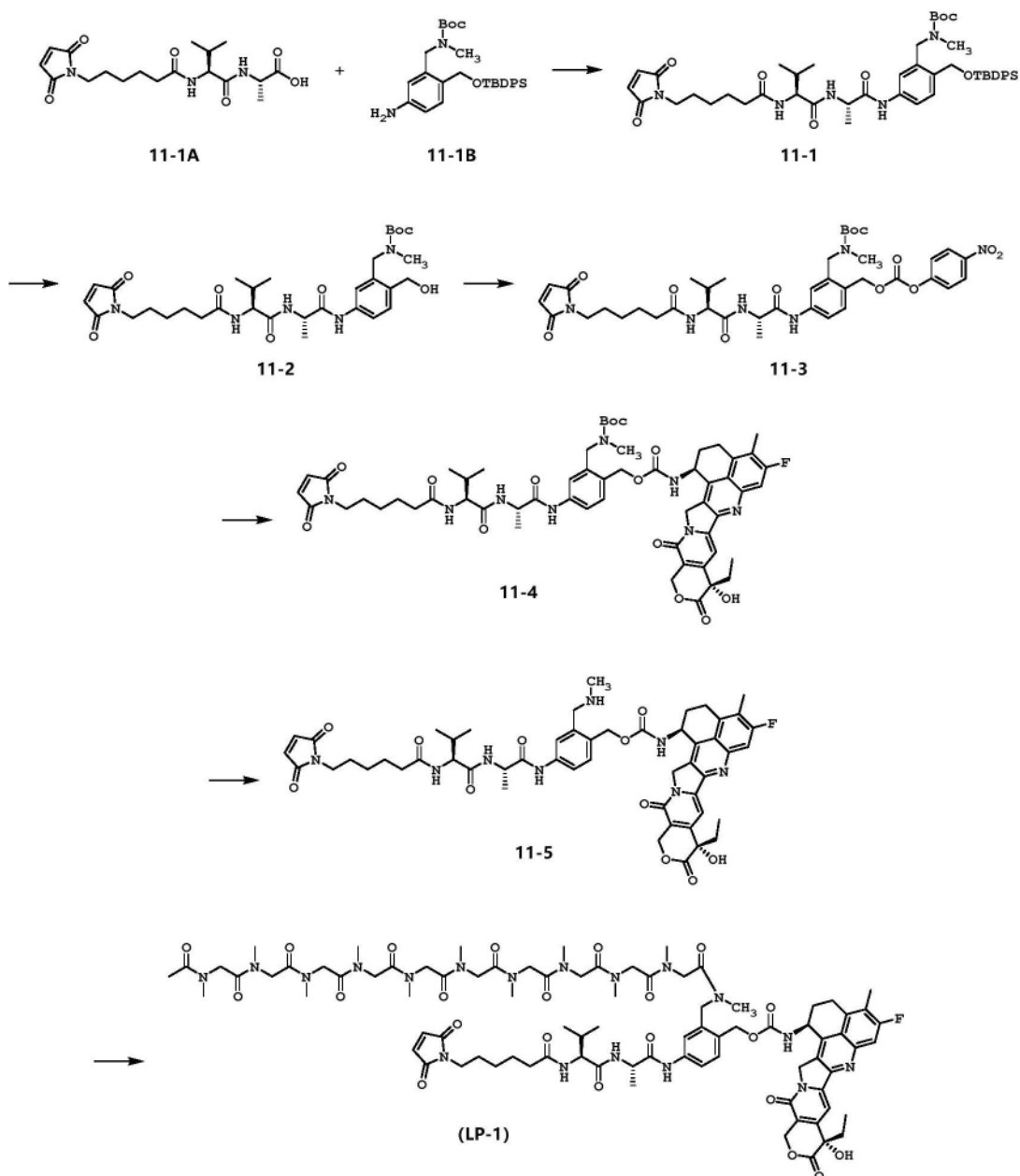
[0228] 本公开的各种实施方式和优选项可以相互组合,只要它们彼此之间不是内在矛盾的,由此组合而形成的各种实施方式都视为本申请公开的一部分。

[0229] 下面将结合实施例以例证的方式更清楚、明确地阐述本公开的技术方案。应该理解的是,这些实施例仅用于例证的目的,绝不旨在限制本公开的保护范围。本公开的保护范围仅通过权利要求来限定。

[0230] 实施例

[0231] 通过以下所示的实施例具体地说明本公开,但本公开不受它们的限制。另外,不对这些实施例进行任何方式的限定性解释。另外,本说明书中,没有特别记载的试剂、溶剂及起始材料可由市售的供给源容易地获得。

[0232] 实施例1:制备化合物LP-1



[0233]

[0234] 步骤1:合成中间体11-1

[0235] 化合物11-1A (Mc-Val-Ala-OH, 购自上海皓元生物医药科技有限公司, 2.4g, 6.29mmol) 以及化合物11-1B (3.18g, 6.29mmol) 混合溶液中, 在室温下加入DCM (二氯甲烷): MeOH (甲醇) (v:v=2:1, 90mL) 以及EEDQ (2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉) (1.86g, 7.55mmol)。将反应溶液在室温搅拌24小时, 真空除去溶剂, 粗残余物通过快速色谱法 (flash chromatography) 进一步纯化, 得到化合物11-1 (3.9g, 71%)。LC-MS (ESI, m/z): 868.49 (M+H)。

[0236] 步骤2:合成中间体11-2

[0237] 将化合物11-1 (2g, 2.3mmol) 溶解于无水四氢呋喃THF (50mL) 中, 在氩气环境下于0℃加入氟化氢-吡啶 (4.6g, 46mmol), 然后将反应混合物于0℃搅拌, 持续2个小时。通过加入水淬灭反应, 用DCM萃取, 干燥有机相, 浓缩。残余物通过硅胶色谱法纯化, 得到化合物11-2

(1.1g, 76%)。LC-MS (ESI, m/z): 630.31 (M+H)。

[0238] 步骤3:合成中间体11-3

[0239] 将化合物11-2 (700mg, 1.11mmol) 溶解在无水N,N-二甲基甲酰胺DMF (4mL) 中, 在氩气环境下于室温加入N,N-二异丙基乙胺DIPEA (0.39mL, 2.23mmol) 以及4,4'-碳酸二硝基二苯酯 (406mg, 1.33mmol), 然后将反应混合物在环境温度下搅拌过夜。浓缩除去溶剂, 获得甲基叔丁基醚MTBE沉淀产物, 过滤收集黄色固体, 乙醚洗涤, 干燥得到化合物11-3。LC-MS (ESI, m/z): 795.41 (M+H)。

[0240] 步骤4:合成中间体11-4

[0241] 将化合物11-3 (300mg, 0.44mmol) 溶解于无水DMF (4mL) 中, 加入干燥的吡啶 (1mL), 然后加入甲磺酸依喜替康 (购自上海皓元生物医药科技有限公司, 234mg, 0.44mmol) 和1-羟基苯并三唑HOBt (60mg, 0.44mmol)。将反应混合物在氩气下于室温搅拌过夜。产物通过pre-HPLC纯化, 得到中间体11-4 (230mg, 48%)。LC-MS (ESI, m/z): 1091.53 (M+H)。

[0242] 步骤5:合成中间体11-5

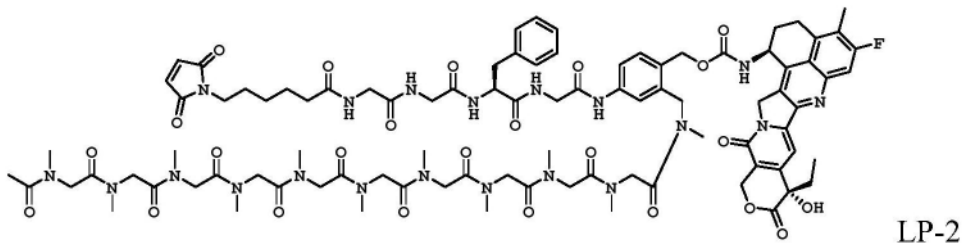
[0243] 将化合物11-4 (200mg, 0.183mmol) 溶于1mL无水DCM中, 0°C加入300μL TFA (trifluoroacetic acid), 反应混合物室温搅拌30min, 浓缩除去溶剂, 得到中间体11-5的TFA盐, 无需进一步纯化即可用于下一步。LC-MS (ESI, m/z): 991.47 (M+H)。

[0244] 步骤6:合成化合物LP-1

[0245] 将化合物11-5 (120mg, 0.109mmol) 溶解在1mL无水DMF中, 加入Ac-Sar10-COOH (N-Acetyl Decasarcosine, 84mg, 0.109mmol), 然后加入2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯HATU (50mg, 0.130mmol) 和DIPEA (38μL, 0.22mmol), 将反应混合物在室温搅拌过夜, 浓缩除去溶剂, 粗产物通过制备型高效液相色谱 (pre-HPLC) 纯化, 得到化合物LP-1 (74mg, 38%)。LC-MS (ESI, m/z): 1743.85 (M+H)。

[0246] 实施例2:制备化合物LP-2

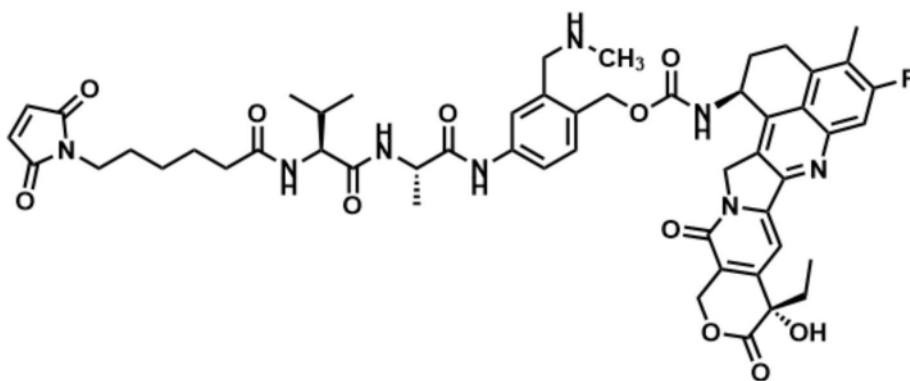
[0247]



[0248] 化合物LP-2的合成按照化合物LP-1的步骤, 将起始原料11-1A替换为Mc-GGFG-OH (购自上海皓元生物医药科技有限公司, GGFG表示由通过肽键连接的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸组成的氨基酸序列), 得到化合物LP-2, 为米色无定形固体。LC-MS (ESI, m/z): 1891.90 (M+H)。

[0249] 实施例3:制备化合物LP-3

[0250]



LP-3

[0251] 化合物LP-3为LP-1的中间体,去除步骤6,中间体11-5即为LP-3。

[0252] 实施例4:抗体-药物偶联物的检测方法

[0253] 抗体-药物偶联物按照以下方法进行浓缩、换液、纯化以及测量抗体浓度、计算每个抗体所携带的药物分子的平均分子数以鉴别抗体-药物偶联物。

[0254] 操作A:抗体或抗体-药物偶联物的浓缩

[0255] 取超滤管 (Amicon Ultra, 50000MWC0, 密理博公司), 加入需要浓缩的抗体或者抗体-药物偶联物的溶液, 离心至抗体或者抗体-药物偶联物溶液达到需要体积后取出。

[0256] 操作B:抗体浓度的测量

[0257] 使用酶标仪 (Multiskan GO, 赛默飞世尔公司), 根据制造商定义的方法测量抗体的吸收值, 该吸收值与抗体在该波长下的吸收系数的比值即为抗体的浓度。

[0258] 操作C:抗体的换液

[0259] 根据制造商 (赛默飞公司) 提供的说明书, 将zeba脱盐柱 (5mL, 40K MWC0) 事先用含有氯化钠 (50mM) 和EDTA (2mM) 的磷酸盐缓冲液 (简称“PBS7.0/EDTA”, 50mM, pH 7.0) 平衡。每个zeba脱盐柱上样2mL, 离心 (1000g, 4分钟), 收集流穿组分并通过操作A进行浓缩, 通过操作B测定抗体浓度, 用PBS7.0/EDTA对抗体浓度进行调整。

[0260] 操作D:抗体-药物偶联物的纯化

[0261] 根据制造商 (赛默飞公司) 提供的说明书, 将zeba脱盐柱 (5mL, 40K MWC0) 事先用存储缓冲液进行平衡。存储缓冲液使用含有150mM氯化钠的组氨酸-醋酸缓冲液 (20mM组氨酸, pH5.5) 或含有50mM氯化钠的磷酸缓冲液 (50mM, pH 7.0)。将含有抗体-药物偶联物的反应液 (大约2mL) 加入zeba脱盐柱, 离心 (1000g, 4分钟) 后收集流穿组分 (大约2mL), 重复两次洗脱过程, 除去未结合的连接子-有效荷载和包括还原剂的低分子量化合物。

[0262] 操作E:测量抗体-药物偶联物中抗体的浓度以及平均每个抗体上连接的药物分子个数 (DAR值) - (1)

[0263] 抗体-药物偶联物上偶联的药物浓度可以通过测量抗体-药物偶联物水溶液在280nm和370nm下的紫外吸收值并通过下面的公式计算而得到。

[0264] 在任何给定的波长下, 一个体系的总吸光度等于该系统中存在的所有吸光化学物质的吸光度之和 (吸光度的可加和性)。因此, 假设抗体与药物在偶联前后, 抗体与药物的摩尔吸收系数不变, 则抗体-药物偶联物中的抗体浓度和药物浓度可以用如下公式表示。

$$[0265] \quad A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280} C_D + \epsilon_{A,280} C_A \quad \text{等式 (1)}$$

$$[0266] \quad A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370} C_D + \epsilon_{A,370} C_A \quad \text{等式 (2)}$$

[0267] A_{280} 代表抗体-药物偶联物水溶液在280nm下的总吸收值, A_{370} 代表抗体-药物偶联物水溶液在370nm下的总吸收值。 $A_{A,280}$ 代表抗体在280nm下的吸收值, $A_{A,370}$ 代表抗体在370nm下的吸收值, $A_{D,280}$ 代表结合前体(药物)在280nm下的吸收值, $A_{D,370}$ 代表结合前体在370nm下的吸收值, $\epsilon_{A,280}$ 代表抗体在280nm下的摩尔消光系数, $\epsilon_{A,370}$ 代表抗体在370nm下的摩尔消光系数, $\epsilon_{D,280}$ 代表结合前体在280nm下的摩尔消光系数, $\epsilon_{D,370}$ 代表结合前体在370nm下的摩尔消光系数, C_A 代表抗体-药物偶联物中抗体的浓度, C_D 代表抗体-药物偶联物中药物分子的浓度。

[0268] 在这种情况下, $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$ 和 $\epsilon_{D,370}$ 都是已知的数值(通过抗体的序列计算得到或者化合物的UV吸收测量得到)。比如, $\epsilon_{A,280}$ 可以通过抗体的氨基酸序列利用一种已知的方法计算得到(蛋白质科学(Protein Science),1995年,第4卷,第2411-2423页)。抗体在370nm下通常没有吸收,所以 $\epsilon_{A,370}$ 通常是0。 $\epsilon_{D,280}$ 和 $\epsilon_{D,370}$ 的值可以通过测量结合前体分别在280nm和370nm下吸光度随浓度的变化值,利用朗伯-比尔定律(吸光度=摩尔浓度×摩尔消光系数×光程)计算得到。 C_A 和 C_D 可以通过测量抗体-药物偶联物在280nm和370nm下的吸光值 A_{280} 和 A_{370} ,然后解二元一次方程组等式(1)和(2)得到。另外,通过 C_D 除以 C_A ,可以得到平均每个抗体上连接的药物分子的数量(DAR值)。

[0269] 操作F:平均每个抗体上连接的药物分子个数(DAR值)-(2)

[0270] 抗体-药物偶联物中每个抗体分子平均偶联的药物分子数,除前述“操作E”外,还可以采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析方法进行测定,如下:

[0271] 高效液相色谱-质谱(LC-MS)分析样品的制备(抗体-药物偶联物的还原)

[0272] 向抗体-药物偶联物(大约5mg/mL,6 μ L)中加入3 μ L 100mM的还原剂二硫苏糖醇(DTT)以及21 μ L的去离子水。反应液在37°C水浴锅中温育30分钟,抗体-药物偶联物中轻重链间以及重链间的二硫键被完全打开,所得样品可用于LC-MS检测分析。

[0273] 高效液相色谱参数

[0274] 色谱柱型号:Agilent PLRP-S,1000 Å,50×2.1mm,8 μ m

[0275] 检测波长:280nm

[0276] 波段宽度:4nm

[0277] 色谱柱温度:80°C

[0278] 样品盘温度:5°C

[0279] 流速:0.5mL/min

[0280] 进样体积:5 μ L

[0281] 流动相A:0.05% TFA,H₂O

[0282] 流动相B:0.05% TFA,ACN

[0283] 洗脱程序(B%:25%-34%(0-0.7分钟),34%-45%(0.7-5分钟),45%-90%(5-6分钟),90%(6-7分钟),90%-25%(7-7.10分钟),25%(7.10-10分钟)

[0284] MS参数

[0285] 雾化气温度:350°C

[0286] 雾化气气流:13L/min

[0287] 喷雾器:45psig

[0288] 毛细管电压:5000V

[0289] 碎裂电压:350V

[0290] 质荷比范围:500-8000m/z

[0291] 采集速率:1spectra/s

[0292] 数据分析

[0293] 轻链偶联*i*个药物分子表示为Li,重链偶联*i*个小分子表示为Hi,可以根据质谱的ESI扫描图确定。

[0294] 将各链的峰面积百分比(%)带入到下式中可以得到修正后的峰面积比。

[0295] 轻链偶联*i*个药物分子的峰面积比= $100\% \times A_{Li} / (A_{L0} + A_{Li})$

[0296] 重链偶联*i*个药物分子的峰面积比= $100\% \times A_{Hi} / (A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3})$

[0297] 每个抗体上平均偶联的药物分子的个数可以通过下面的公式进行计算。

[0298] 平均偶联药物分子数=(L0峰面积比×0+L1峰面积比×1+H0峰面积比×0+H1峰面积比×1+H2峰面积比×2+H3峰面积比×3)×2

[0299] 操作G:平均每个抗体上连接的药物分子个数(DAR值)-(3)

[0300] 抗体-药物偶联物中每个抗体分子平均偶联的药物分子数,除了前面提到的“操作E”和“操作F”可以测量,还可以采用下述疏水层析色谱图(HIC)分析方法进行测定。

[0301] 抗体-药物偶联物在疏水层析柱上的洗脱是基于洗脱液中盐离子浓度的差异而分离的一随着盐离子浓度的降低,洗脱出的抗体-药物偶联物中小分子药物的结合数目增多,既低DAR值的抗体-药物偶联物优先被洗脱。各组分的出峰顺序依次为D0(未偶联上任何连接子-有效荷载的抗体)、D2(偶联2个连接子-有效荷载的抗体)、D4(偶联4个连接子-有效荷载的抗体)、D6(偶联6个连接子-有效荷载的抗体)、D8(偶联8个连接子-有效荷载的抗体)。可以通过测量各个峰的峰面积占比来获得各个组分的百分含量。则相应的样品的HIC-DAR的计算方式如下:

[0302] 平均偶联药物分子数=D0峰面积比×0+D2峰面积比×2+D4峰面积比×4+D6峰面积比×6+D8峰面积比×8

[0303] 操作H:抗体-药物偶联物中聚集体的测量

[0304] 使用高效液相色谱中体积排阻色谱检测抗体-药物偶联物中的聚集体,方法如下:

[0305] 高效液相色谱系统:Agilent 1260Infinity II HPLC system

[0306] 检测器:Ultraviolet absorption spectrometer(检测波长:280nm)

[0307] 色谱柱型号:TOSOH TSKgel G3000SWXL(7.8×300mm,5μm)

[0308] 流动相:200mmol/L KHP0₄,150mmol/L NaCl,15%(v/v)异丙醇,pH7.0

[0309] 流速:0.75mL/min

[0310] 分析时间:18min

[0311] 柱温:室温

[0312] 进样量:50μg

[0313] 数据分析:

[0314] 质控品(QC,02-1裸抗,即没有偶联连接子-有效荷载的编号为02-1的抗体)的体积排阻色谱图如图1A所示;质控品(QC,Hu1H2-2裸抗,即没有偶联连接子-有效荷载的编号为hu1H2-2的抗体)的体积排阻色谱图如图1B所示,Hu1H2-2裸抗的聚集体含量为1.17%。150kDa的质控品的主峰(单峰)的保留时间在9.5-10.5分钟之间。聚集体的保留时间应该早

于上述单体的保留时间。

[0315] 操作I:抗体-药物偶联物疏水性的比较

[0316] 使用高效液相色谱疏水层析色谱法 (HIC) 分析抗体-药物偶联物的疏水性,方法如下:

[0317] 高效液相色谱系统:Agilent 1260Infinity II HPLC system

[0318] 检测器:Ultraviolet absorption spectrometer (检测波长:280nm)

[0319] 色谱柱型号:TOSOH TSKgel Butyl-NPR(4.6mm I.D.×3.5cm,2.5μm)

[0320] 流动相A:mol/L(NH₄)₂SO₄,50mmol/L KHP0₄,pH7.0

[0321] 流动相B:50mmol/L KHP0₄,25% (v/v) 异丙醇,pH7.0

[0322] 分析时间:25min

[0323] 柱温:室温

[0324] 洗脱程序(B%):0%-25%(0-1分钟),25%(1-3分钟),25%-80%(3-13分钟),80%(13-17分钟),80%-0%(17-17.10分钟),0%(17.10-25分钟)

[0325] 进样量:10μL

[0326] 数据分析:质控品(QC,02-1裸抗)的疏水层析色谱图如图2A所示。质控品(QC,Hu1H2-2裸抗)的疏水层析色谱图如图2B所示,其保留时间为3.387min。保留时间越短的样品的疏水性越弱,相比于未偶联药物分子的裸抗,抗体-药物偶联物的疏水性更高,因此其保留时间更长。

[0327] 实施例5:制备抗体-药物偶联物02-1-LP1(DAR 8)

[0328] 抗体的还原:通过实施例4中操作B(抗体在280nm下的消光系数采用1.523mLmg⁻¹cm⁻¹)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为23.2mg/mL。在2.155mL的02-1抗体的水溶液中加入0.482mL的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的7倍当量),同时加入4.31mL的50mM的磷酸盐缓冲液(pH7.0,PBS7.0)以及69.47μL 200mM的EDTA溶液。在确认溶液pH为7.0±0.1后,将混合液置于37℃环境中反应2小时。

[0329] 02-1抗体的VH序列为SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列,VL序列为SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列。出于实施例制备和/或检测的目的,02-1抗体的恒定区使用人IgG1恒定区序列,重链恒定区序列选用SEQ ID NO:102所示的氨基酸序列;轻链恒定区序列选用SEQ ID NO:103所示的氨基酸序列。

[0330] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃环境中孵育10分钟,实施例1制备的连接子-有效荷载LP-1溶解在N,N二甲基乙酰胺(DMA)后加入混合液中,加入体积为0.489mL(相当于抗体含量的14.2倍当量),混合液于22℃条件下继续反应30分钟。

[0331] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物02-1-LP1。

[0332] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中操作E($\epsilon_{D,280}=6384$ 和 $\epsilon_{D,370}=16180$),操作F,操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0333] 通过操作E测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为12.13mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为7.78。通过操作F测量得到每个抗体上平均偶联的有效荷载个数为7.80。图3A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物02-1-LP1的聚集体含量为1.18%。图3B示出抗体-药物偶联物02-1-LP1的疏水

层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物02-1-LP1的保留时间为6.499min。

[0334] 实施例6:制备抗体-药物偶联物Hu1H2-LP1 (DAR 8)

[0335] 抗体的还原:通过实施例4的操作B(抗体在280nm下的消光系数采用 $1.54\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为9.37mg/mL。在640.34 μL 的Hu1H2-2 (HIS1H2-2) 抗体的水溶液中加入80 μL 的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的10倍当量),同时加入0.2mL的50mM的PBS7.0以及79.66 μL 的去离子水。在确认溶液PH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中反应2小时。

[0336] Hu1H2-2抗体的VH序列为SEQ ID NO:100所示的氨基酸序列,VL序列为SEQ ID NO:104所示的氨基酸序列。出于实施例制备和/或检测的目的,Hu1H2-2抗体的重链恒定区序列选用SEQ ID NO:102所示的氨基酸序列;轻链恒定区序列选用SEQ ID NO:103所示的氨基酸序列。

[0337] 抗体与连接子-有效荷载之间的偶联:将上述混合液置于4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育10分钟,实施例1制备的连接子-有效荷载LP-1溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为72 μL (相当于抗体含量的18倍当量),混合液于22 $^{\circ}\text{C}$ 环境中继续反应30分钟。

[0338] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1。

[0339] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4的操作E($\epsilon_{\text{D},280}=6384$ 和 $\epsilon_{\text{D},370}=16180$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0340] 通过操作E测量计算得到抗体药物偶联物的浓度为6.74mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为9.20。图4A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的聚集体含量为1.24%。图4B示出抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的保留时间为6.239min。

[0341] 实施例7:制备抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1 (DAR 4)

[0342] 抗体的还原:通过实施例4的操作B(抗体在280nm下的消光系数采用 $1.54\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为23mg/mL。在456.52 μL 的Hu1H2-2抗体的水溶液中加入23.52 μL 的5mM的TCEP溶液,同时加入0.28mL的50mM的PBS7.0以及639.96 μL 的去离子水。在确认溶液PH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中反应2小时。

[0343] 抗体与连接子-有效荷载之间的偶联:将上述混合液置于4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育10分钟,实施例1制备的连接子-有效荷载LP-1溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为112 μL (相当于抗体含量的8倍当量),混合液于22 $^{\circ}\text{C}$ 环境中继续反应30分钟。

[0344] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4的操作E($\epsilon_{\text{D},280}=6384$ 和 $\epsilon_{\text{D},370}=16180$)和操作H对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0345] 制备得到的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1 (DAR4) 通过操作E测量计算得到抗体药物偶联物的浓度为6.14mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为3.59。图5A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1 (DAR4) 的聚集体含量为0.44%。图5B示出抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP1的疏水层析检测图谱。

[0346] 实施例8:制备抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP2 (DAR 8)

[0347] 抗体的还原:实施例8还原方法与实施例6中抗体的还原方法相同。实施例8中的Hu1H2-2抗体的氨基酸序列与实施例6中Hu1H2-2抗体的氨基酸序列相同。

[0348] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将抗体还原步骤中的混合液置于4℃环境中孵育10分钟,实施例2制备的连接子-有效荷载LP-2溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为72 μL (相当于抗体含量的18倍当量),混合液于22℃环境中继续反应30分钟。

[0349] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP2。

[0350] 抗体-药物偶联物的表征:采用上述的操作E ($\epsilon_{D,280}=5814$ 和 $\epsilon_{D,370}=14742$),操作F,操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0351] 通过操作E测量计算得到抗体药物偶联物的浓度为6.64mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为9.92。图6A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP2的聚集体含量为1.37%。图6B示出抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP2的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP2的保留时间为6.561min。

[0352] 实施例9:制备抗体-药物偶联物Hu029-LP3 (DAR 8)

[0353] 抗体的还原:通过实施例4的操作B (抗体在280nm下的消光系数采用 $1.54\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为23.07mg/mL。在325.10μL的Hu1H2-2抗体的水溶液中加入70μL的5mM的TCEP溶液 (相当于抗体含量的7倍当量),同时加入0.3mL的50mM的PBS7.0以及804.90μL的去离子水。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37℃环境中反应2小时。

[0354] Hu1H2-2抗体的氨基酸序列与实施例6中Hu1H2-2抗体的氨基酸序列相同。

[0355] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃环境中孵育10分钟,实施例3制备的连接子-有效荷载LP-3溶解在DMA中后加入到混合液中,加入体积为90μL (相当于抗体含量的18倍当量),混合液于22℃环境中继续反应30分钟。

[0356] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述的反应液采用操作D中描述的方法进行纯化,最终获得抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP3。

[0357] 抗体-药物偶联物的表征:采用上述的操作E ($\epsilon_{D,280}=5186$ 和 $\epsilon_{D,370}=13688$),操作F,操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0358] 通过操作E测量计算得到抗体药物偶联物的浓度为4.10mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为8.50。图7A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP3的聚集体含量为3.37%。图7B示出抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP3的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-LP3的保留时间为5.878min。

[0359] 对比例1:制备抗体-药物偶联物02-1-vc-MMAE (DAR 4)

[0360] 抗体的还原:通过实施例4中的操作B (抗体在280nm下的消光系数采用 $1.523\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为31.6mg/mL。在0.759mL的02-1抗体的水溶液中加入0.076mL的5mM的TCEP溶液 (相当于抗体含量的2.3倍当量),同时加入0.48mL的50mM的PBS7.0以及1.084mL的去离子水。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混

合液置于37℃环境中反应2小时。02-1抗体序列与实施例5中02-1抗体的序列相同。

[0361] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃环境中孵育10分钟,连接子-有效荷载vc-MMAE (DC Chemicals,DC50025)溶解在DMA中后加入到混合液中,加入体积为0.322mL(相当于抗体含量的7倍当量),混合液于22℃条件下继续反应30分钟。

[0362] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物02-1-vc-MMAE。

[0363] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中的操作B,操作G,操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0364] 通过操作B测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为9.71mg/mL。图8A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物02-1-vc-MMAE的聚集体含量为2.74%。图8B示出抗体-药物偶联物02-1-vc-MMAE的疏水层析检测图谱,通过操作G和操作I计算出抗体-药物偶联物02-1-vc-MMAE中每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为3.99 (HIC-DAR)。

[0365] 对比例2:制备抗体-药物偶联物Rituximab-vc-MMAE (DAR 4)

[0366] 抗体的还原:通过实施例4中的操作B(抗体在280nm下的消光系数采用 $1.5\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为12mg/mL。在0.438mL的Rituximab抗体(购自上海旻凯生物科技有限公司)的水溶液中加入0.015mL的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的2.2倍当量),同时加入0.14mL的50mM的PBS7.0以及0.107mL的去离子水。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37℃环境中反应2小时。

[0367] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃条件下孵育10分钟,连接子-有效荷载vc-MMAE溶解在DMA后加入到混合液中,加入体积为0.049mL(相当于抗体含量的7倍当量),将混合液于22℃条件下继续反应30分钟。

[0368] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中的操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Rituximab-vc-MMAE。

[0369] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中的操作B,操作G,操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0370] 通过操作B测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为3.78mg/mL。图9A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Rituximab-vc-MMAE的聚集体含量为3.78%。图9B示出抗体-药物偶联物Rituximab-vc-MMAE的疏水层析检测图谱,通过操作G和操作I计算出抗体-药物偶联物Rituximab-vc-MMAE中每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为4.39 (HIC-DAR)。

[0371] 对比例3:制备抗体-药物偶联物Rituximab-LP1 (DAR 8)

[0372] 抗体的还原:通过实施例4中的操作B(抗体在280nm下的消光系数采用 $1.5\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为11.8mg/mL。在6.05mL的Rituximab抗体的水溶液中加入0.667mL的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的7倍当量),同时加入1.02mL的100mM的PBS7.0以及2.46mL的去离子水。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37℃环境中反应2小时。

[0373] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃条件下孵育10分钟,连接子-有效荷载LP-1溶解在DMA后加入混合液中,加入体积为0.667mL(相当于抗体含量的14倍当

量),将混合液于22℃条件下继续反应30分钟。

[0374] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中的操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Rituximab-LP1。

[0375] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中操作E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 和 $\epsilon_{D,370}=16180$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0376] 通过操作E测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为6.23mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为7.30。图10A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Rituximab-LP1的聚集体含量为4.70%。图10B示出抗体-药物偶联物Rituximab-LP1的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Rituximab-LP1的保留时间为7.094min。

[0377] 对比例4:制备抗体-药物偶联物Human IgG-GGFG-DXd (DAR 8)

[0378] 抗体的还原:通过实施例4中的操作B(抗体在280nm下的消光系数采用 $1.35\text{Lmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为10mg/mL。在2.45mL的human IgG蛋白(购自北京索莱宝科技有限公司,产品号:SP001)的水溶液中加入0.327mL的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的10倍当量),同时加入0.7mL的50mM的PBS7.0以及23uL的去离子水。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37℃环境中反应2小时。

[0379] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃条件下孵育10分钟,连接子-有效荷载GGFG-DXd(购自DC Chemicals,DC50025)溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为0.294mL(相当于抗体含量的18倍当量),将混合液于22℃条件下继续反应30分钟。

[0380] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中的操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Human IgG-GGFG-DXd(简称“Human IgG-DXD”)。Human IgG和HuIgG在本公开中可互换使用。

[0381] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中操作E ($\epsilon_{D,280}=5178$ 和 $\epsilon_{D,370}=20217$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0382] 通过操作E测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为8.20mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为7.08。图11A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Human IgG-DXD的聚集体含量为4.25%。图11B示出抗体-药物偶联物Human IgG-DXD的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Human IgG-DXD的保留时间为8.222min。

[0383] 对比例5:制备抗体-药物偶联物Human IgG-LP1 (DAR 8)

[0384] 抗体的还原:通过实施例4中的操作B(抗体在280nm下的消光系数采用 $1.35\text{Lmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为10mg/mL。在1.33mL的human IgG蛋白(购自北京索莱宝科技有限公司,产品号:SP001)的水溶液中加入0.267mL的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的10倍当量),同时加入0.4mL的50mM的PBS7.0。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37℃环境中反应2小时。

[0385] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃条件下孵育10分钟,连接子-有效荷载LP-1溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为0.2mL(相当于抗体含量的15倍当量),将混合液于22℃条件下继续反应30分钟。

[0386] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中的操作D的方法进行纯化,

获得抗体-药物偶联物Human IgG-LP1。

[0387] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中操作E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 和 $\epsilon_{D,370}=16180$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0388] 通过操作E测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为11.08mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为9.15。图12A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Human IgG-LP1的聚集体含量为4.38%。图12B示出抗体-药物偶联物Human IgG-LP1的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Human IgG-LP1的保留时间为6.213min。

[0389] 对比例6:制备抗体-药物偶联物Human IgG-LP1 (DAR 4)

[0390] 抗体的还原:抗体的还原:通过实施例4中的操作B (抗体在280nm下的消光系数采用 $1.35\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为15mg/mL。在0.7mL的human IgG蛋白(购自北京索莱宝科技有限公司,产品号:SP001)的水溶液中加入34.02 μL 的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的2.43倍当量),同时加入0.28mL的50mM的PBS7.0。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37°C环境中反应2小时。

[0391] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4°C条件下孵育10分钟,连接子-有效荷载LP-1溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为0.112mL(相当于抗体含量的8倍当量),将混合液于22°C条件下继续反应30分钟。

[0392] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中的操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Human IgG-LP1 (DAR4)。

[0393] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中操作E ($\epsilon_{D,280}=6384$ 和 $\epsilon_{D,370}=16180$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0394] 通过操作E测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为5.75mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为3.53。图13A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Human IgG-LP1 (DAR4)的聚集体含量为1.90%。图13B示出抗体-药物偶联物Human IgG-LP1 (DAR4)的疏水层析检测图谱。

[0395] 对比例7:制备抗体-药物偶联物Human IgG-LP2 (DAR 8)

[0396] 抗体的还原:通过实施例4中的操作B (抗体在280nm下的消光系数采用 $1.35\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为10mg/mL。在0.467mL的人IgG蛋白(购自北京索莱宝科技有限公司,产品号:SP001)的水溶液中加入0.093mL的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的10倍当量),同时加入0.2mL的50mM的PBS7.0以及0.24mL的去离子水。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37°C环境中反应2小时。

[0397] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4°C条件下孵育10分钟,连接子-有效荷载LP-2溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为0.07mL(相当于抗体含量的15倍当量),将混合液于22°C条件下继续反应30分钟。

[0398] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中的操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Human IgG-LP2。

[0399] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中操作E ($\epsilon_{D,280}=5814$ 和 $\epsilon_{D,370}=14742$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0400] 通过操作E测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为4.68mg/mL,通过操作E测量计

算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为9.18。图14A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Human IgG-LP2的聚集体含量为2.92%。图14B示出抗体-药物偶联物Human IgG-LP2的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Human IgG-LP2的保留时间为6.506min。

[0401] 对比例8:制备抗体-药物偶联物Human IgG-LP3 (DAR 8)

[0402] 抗体的还原:通过实施例4中的操作B(抗体在280nm下的消光系数采用 $1.35\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$)和操作C将抗体用PBS7.0/EDTA进行换液,换液后的抗体浓度为18mg/mL。在4mL的人IgG蛋白(购自北京索莱宝科技有限公司,产品号:SP001)的水溶液中加入0.672mL的5mM的TCEP溶液(相当于抗体含量的7倍当量),同时加入1.44mL的50mM的PBS7.0以及1.088mL的去离子水。在确认溶液pH为 7.0 ± 0.1 后,将混合液置于37℃环境中反应2小时。人IgG1蛋白的来源与对比例4中人IgG蛋白的来源相同。

[0403] 抗体与连接子-有效荷载的偶联:将上述混合液于4℃条件下孵育10分钟,连接子-有效荷载LP-3溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为0.672mL(相当于抗体含量的14倍当量),将混合液于22℃条件下继续反应30分钟。

[0404] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述反应液采用实施例4中的操作D的方法进行纯化,获得抗体-药物偶联物Human IgG-LP3。

[0405] 抗体-药物偶联物的表征:采用实施例4中操作E($\epsilon_{D,280}=5186$ 和 $\epsilon_{D,370}=13688$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0406] 通过操作E测量计算得到抗体-药物偶联物的浓度为7.42mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为7.28。图15A示出聚集体的检测图谱,通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Human IgG-LP3的聚集体含量为5.37%。图15B示出抗体-药物偶联物Human IgG-LP3的疏水层析检测图谱,通过操作I测量的抗体-药物偶联物Human IgG-LP3的保留时间为6.450min。

[0407] 对比例9:制备抗体-药物偶联物Hu1H2-2-GGFG-DXD (DAR 8)

[0408] 抗体的还原:对比例9中抗体的还原方法与实施例6中相同。Hu1H2-2抗体的序列与实施例6中Hu1H2-2抗体的序列相同。

[0409] 抗体与药物连接子之间的偶联:将上述混合液置于4℃上孵育10分钟。连接子-有效荷载GGFG-DXd溶解在DMA中后加入混合液中,加入体积为72uL(相当于抗体含量的18倍当量)。将混合液放置于22℃环境中继续反应30分钟。

[0410] 抗体-药物偶联物的纯化:将上述的反应液采用操作D中描述的方法进行纯化,最终获得抗体-药物偶联物Hu1H2-2-GGFG-DXd(简称“Hu1H2-2-DXD”)。

[0411] 抗体-药物偶联物的表征:采用上述的操作E($\epsilon_{D,280}=5178$ 和 $\epsilon_{D,370}=20217$),操作H和操作I对获得的抗体-药物偶联物进行表征。

[0412] 通过操作E测量计算得到抗体药物偶联物的浓度为6.53mg/mL,通过操作E测量计算得到每个抗体上平均偶联的有效荷载的个数为6.75。通过操作H测量得到抗体-药物偶联物Hu1H2-2-DXD的聚集体含量为1.70%,如图16A所示。通过操作I测量的抗体-药物偶联物Hu1H2-2-DXD的保留时间为7.764min,如图16B所示。

[0413] 试验例1:高表达MUC18的肿瘤细胞对02-1-LP1的内吞

[0414] 将50μg/mL 02-1-LP1分别与A375细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院)、

HMVII细胞(购自Biovector NTCC典型培养物保藏中心)、SK-MEL-2细胞(购自上海勋庆生物科技有限公司)和GAK细胞(购自Biovector NTCC典型培养物保藏中心)结合,洗去多余的ADC后,将细胞放在37℃培养箱中培养。在0,0.5,1,2,4,8小时时,利用流式实验检测中位荧光强度(MFI)。如图17所示,02-1-LP1能够被A375(A),HMVII(B),SK-MEL-2(C),GAK(D)细胞内吞。

[0415] 试验例2:A375移植瘤的体内抑制效果及小鼠体重变化的影响

[0416] 6周龄的Balb/c小鼠购买自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,每只小鼠皮下接种四百万A375细胞构建MUC18阳性的A375黑色素瘤小鼠移植瘤模型。在接种后第24天(平均肿瘤体积约230mm³),分别静脉注射对比例2制备的Rituximab-vc-MMAE(6mpk(mg/kg));对比例1制备的02-1-vc-MMAE(1.5,3,6mpk);对比例3制备的Rituximab-LP1(2.5,5mpk)以及实施例5制备的02-1-LP1(2.5,5mpk);并设置溶媒组作为阴性对照。给药后利用游标卡尺每周测量两次肿瘤体积,并按照如下公式计算肿瘤体积:TV=(长×宽)²/2。由于A375细胞几乎不表达CD20,此时Rituximab作为02-1抗体的同型对照。

[0417] 图18A1及18A2显示了靶向MUC18的抗体-偶联药物02-1-LP1和02-1-vc-MMAE对于A375移植瘤的生长抑制作用。图18A1显示,02-1-vc-MMAE降低了肿瘤生长速度;而02-1-LP1引起了肿瘤体积明显消除。图18A2为图18A1的局部图,示出02-1-LP1、02-1-vc-MMAE和溶媒组的曲线,以使活性成分的趋势图更清晰。

[0418] 图18B1及18B2显示靶向MUC18的抗体-偶联药物02-1-LP1和02-1-vc-MMAE未对小鼠体重造成明显影响。图18B2为18B1的局部图,示出02-1-LP1、02-1-vc-MMAE和溶媒组的曲线,以使活性成分的趋势图更清晰。

[0419] 试验例3:02-1-LP1及02-1-vc-MMAE对于食蟹猴的毒理实验

[0420] 02-1-LP1(实施例5制备)食蟹猴重复给药实验:6只食蟹猴(购自广西前沿生物技术有限公司)被随机分为3组,每组雄雄各一只。在第1天,第22天和第43天,分别静脉输注溶媒、10mg/kg 02-1-LP1和30mg/kg 02-1-LP1。在实验期间,观察动物是否有任何异常;并采集血样进行血液学以及血液生化指标分析。在第50天,对动物进行安乐死并取样进行病理分析。如表6所示,在本实验中,所有剂量的供试物都没有引起动物死亡,供试物相关的靶器官为网织红细胞、消化道、肾和脾。HNSTD(未见严重毒性最大剂量)为30mg/kg。

[0421] 02-1-vc-MMAE(对比例1制备)食蟹猴重复给药实验:6只食蟹猴被随机分为3组,每组雄雄各一只。在第1天,第22天分别静脉输注3mg/kg 02-1-vc-MMAE、6mg/kg 02-1-vc-MMAE和10mg/kg 02-1-vc-MMAE。在实验期间,观察动物是否有任何异常;并采集血样进行血液学以及血液生化指标分析。在第43天,对动物进行安乐死并取样进行病理分析。如表6所示,在本实验中,高剂量组(10mg/kg)的两只动物在第一次给药后第10天死亡,3mg/kg和6mg/kg两个组的动物未出现死亡,供试物相关的靶器官为网织红细胞、白细胞和皮肤。HNSTD(未见严重毒性最大剂量)为6mg/kg。

[0422] 表6.02-1-LP1和02-1-vc-MMAE在食蟹猴重复给药毒理实验结果汇总

	实验动物	食蟹猴	食蟹猴
[0423]	受试物	02-1-vc-MMAE	02-1-LP1
		3, 6 和 10 mg/kg	0, 10 和 30 mg/kg
		静脉注射	静脉注射
		第 1 天和第 22 天给药(共 2 次)	第 1 天, 第 22 天和第 43 天给药(共 3 次)
[0424]	动物数量	每组雌雄各一只	每组雌雄各一只
	至死剂量	10 mg/kg	> 30 mg/kg
	体重变化	ADC 未引起动物体重变化	ADC 未引起动物体重变化
	血液学指标	3 mg/kg: 网织红细胞轻微增加	
		6 mg/kg: 白细胞、血红蛋白轻微降低; 网织红细胞数量波动	≥10 mg/kg: 网织红细胞数量波动
	血液生化	≤6 mg/kg: 正常	≤30 mg/kg: 正常
	HNSTD 剂量	6 mg/kg: 胸骨骨髓	
	时靶向毒性器官	10 mg/kg: 消化道, 腹股沟淋巴结和皮肤	30 mg/kg: 消化道器官、肾和脾
[0425]	HNSTD*	6 mg/kg	30 mg/kg

[0425] HNSTD*: 未见严重毒性最大剂量

[0426] 结果表明, 实施例5制备的02-1-LP1的安全性明显优于对比例1制备的02-1-vc-MMAE。

[0427] 结合试验例2可知, 02-1-LP1比02-1-vc-MMAE的耐受剂量更高, 安全性更好; 同时更低剂量的02-1-LP1就能达到更好的抗肿瘤效果。

[0428] 试验例4: ADC对Detroit562细胞的体外杀伤实验

[0429] 培养Detroit562细胞(购自南科佰生物技术有限公司)使细胞密度达到80%, 收集细胞, 铺96孔板, 调整细胞密度至 $2-5 \times 10^4/\text{ml}$ 。每孔铺100 μL , ADC分子以300nM为起始浓度进行3倍梯度稀释, 稀释完成后将ADC分子加入细胞培养液中, 静置培养5天, 期间定期观察细胞凋亡情况。5天后, 向96孔板中加入15 μL CCK-8试剂盒原液, 37°C培养箱反应0.5-2h, 测量450nm处吸光度, 根据光密度OD(optical density)读数值以及ADC稀释梯度绘制细胞存活曲线。

[0430] ADC分子选用对比例4制备的Human IgG-DXD, 对比例5制备的Human IgG-LP1, 对比例7制备的Human IgG-LP2, 实施例6制备的Hu1H2-2-LP1, 实施例8制备的Hu1H2-2-LP2和对比例9制备的Hu1H2-2-DXD。其中, Human IgG作为Hu1H2-2抗体的同型对照; DXD作为阳性药物。

[0431] 图19示出上述ADC分子对头颈部鳞癌细胞系Detroit562的体外杀伤作用,图19A1和图19A2为图19的局部图。图19A1表明,和阳性对照Hu1H2-2-DXD相比,本公开的Hu1H2-2-LP2以及Hu1H2-2-LP1对Detroit562的体外杀伤作用更为优秀。图19A2显示,Human IgG-LP2和Human IgG-LP1具有比Human IgG-DXD更优秀的体外杀伤作用,表明相较GGFG-DXd,连接器-有效荷载LP-1和LP-2对Detroit562的体外杀伤作用更为优秀。

[0432] 试验例5:ADC对于Detroit562构建的CDX小鼠模型体内药效及小鼠体重变化的影响

[0433] 6周龄的Balb/c裸鼠购买自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。每只小鼠皮下接种五百万Detroit562细胞构建CDX(cell derived xenograft)小鼠模型,在接种后第10天(平均肿瘤体积约 150mm^3),分别静脉注射对比例5制备的Human IgG-LP1(10mg/kg);实施例6制备的Hu1H2-2-LP1(10mg/kg);实施例8制备的Hu1H2-2-LP2(10mg/kg)。给药之后利用游标卡尺每周测量两次肿瘤体积,并按照如下公式计算肿瘤体积: $TV = (\text{长} \times \text{宽})^2 / 2$ 。

[0434] 图20显示Hu1H2-2-LP1,Hu1H2-2-LP2以及Human IgG-LP1对Detroit562细胞构建的头颈部鳞癌模型小鼠的体内药效数据。结果表明,Hu1H2-2-LP1和Hu1H2-2-LP2可以有效抑制小鼠肿瘤增长。

[0435] 图21显示Hu1H2-2-LP1,Hu1H2-2-LP2以及Human IgG-LP1对于小鼠体重的影响。在实验周期内,Hu1H2-2-LP1组和Hu1H2-2-LP2组的小鼠体重持续上升;而对照组Human IgG-LP1体重存在波动变化,结果表明,Hu1H2-2-LP1和Hu1H2-2-LP2对小鼠体重变化的影响比较小。

[0436] 试验例6:ADC对于PC-9构建的CDX小鼠模型体内药效及小鼠体重变化的影响

[0437] 6周龄的Balb/c裸鼠购买自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。每只小鼠皮下接种五百万PC-9细胞(购自浙江美森细胞科技有限公司)以得到CDX模型。在接种后第13天(平均肿瘤体积约 200mm^3),分别静脉注射对比例5制备的Human IgG-LP1,对比例6制备的Human IgG-LP1(DAR4),对比例8制备的Human IgG-LP3,实施例6制备的Hu1H2-2-LP1;实施例7制备的Hu1H2-2-LP1(DAR4),实施例9制备的Hu1H2-2-LP3。给药剂量均为10mpk(mg/kg),每周1次,给药2次(QW×2)。给药之后利用游标卡尺每周测量两次肿瘤体积,并按照如下公式计算肿瘤体积: $TV = (\text{长} \times \text{宽})^2 / 2$ 。

[0438] 图22显示上述ADC对于PC-9细胞构建的肺癌模型小鼠的体内药效数据。结果表明,Hu1H2-2-LP1、Hu1H2-2-LP1(DAR4)和Hu1H2-2-LP3可以有效抑制小鼠肿瘤的增长。

[0439] 图23显示上述ADC对于PC-9细胞构建的肺癌模型小鼠体重的影响。结果表明Hu1H2-2-LP1、Hu1H2-2-LP1(DAR4)和Hu1H2-2-LP3对小鼠体重影响不大,无明显的消化道毒性作用。

[0440] 试验例7:对SCC-9人头颈部鳞状细胞癌CDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0441] 6周龄Balb/c裸鼠购自上海必凯科翼生物科技有限公司。每只小鼠皮下接种800万个SCC-9细胞(购自ATCC)以获得CDX模型。在接种后第29天(平均肿瘤体积约为 200mm^3),分别静脉注射对比例3中制备的Rituximab-LP1(10mpk)和实施例5中制得的02-1-LP1(2.5, 5, 10mpk)。DPBS(Dulbecco磷酸盐缓冲盐水)为阴性对照。每周给药1次,共2次(QW×2)。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积: $TV = (\text{长} \times \text{宽})^2 / 2$ 。

[0442] 图24A显示02-1-LP1在SCC-9CDX模型中可以有效抑制肿瘤生长。图24B显示02-1-LP1对SCC-9模型小鼠的体重几乎没有影响。

[0443] 试验例8:对Huh-7人癌症CDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0444] 6周龄Ba1b/c裸鼠购自上海必凯科翼生物科技有限公司。每只小鼠皮下接种500万Huh-7细胞(购自上海生物基因生物技术有限公司),获得CDX模型。在接种后第9天(平均肿瘤体积约为 230mm^3),分别静脉注射对比例5中制备的人IgG-LP1和实施例5中制成的02-1-LP1。给药剂量均为 10mpk ,每周1次,共2次($\text{QW} \times 2$)。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积: $\text{TV} = (\text{长} \times \text{宽})^2 / 2$ 。

[0445] 图25A显示02-1-LP1可以有效抑制Huh-7 CDX模型中的肿瘤生长。图25B显示02-1-LP1对Huh-7模型中小鼠的体重几乎没有影响。

[0446] 试验例9:对LD1-0015-200617人食管鳞状细胞癌PDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0447] LD1-0015-200617(LideBiotech CO.,LTD)是表达人MUC18(H-Score=75)的人食管鳞状细胞癌患者来源的异种移植物模型。6-8周Nu/Nu小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将LD1-0015-200617的肿瘤切成约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的片段,并皮下植入小鼠的侧翼。在植入后第39天(平均肿瘤大小 $\sim 171\text{mm}^3$),分别静脉注射对比例5中制备的Human IgG-LP1和实施例5中制备的02-1-LP1。给药剂量均为 10mpk ,每周1次,共3次($\text{QW} \times 3$)。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积: $\text{TV} = (\text{长} \times \text{宽})^2 / 2$ 。

[0448] 图26A显示02-1-LP1在LD1-0015-200617PDX模型中可以有效抑制肿瘤生长。图26B显示,在LD1-0015-200617PDX模型中,02-1-LP1对小鼠体重几乎没有影响。

[0449] 试验例10:对LD1-0016-390730人食管腺癌PDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0450] LD1-0016-390730(LideBiotech CO.,LTD)是表达人MUC18(H-Score=115)的人食管腺癌患者来源的异种移植物模型。6-8周Nu/Nu小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将LD1-0016-390730的肿瘤切成约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的片段,并皮下植入小鼠的侧翼。在植入后第45天(平均肿瘤大小 $\sim 191\text{mm}^3$),静脉注射实施例5中制备的02-1-LP1。给药剂量为 10mpk ,每周1次,共2次($\text{QW} \times 2$)。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积: $\text{TV} = (\text{长} \times \text{宽})^2 / 2$ 。

[0451] 图27A显示02-1-LP1在LD1-0016-390730PDX模型中可以有效抑制肿瘤生长。图27B显示,在LD1-0016-390730PDX模型中,02-1-LP1对小鼠体重几乎没有影响。

[0452] 试验例11:LD1-2025-362797人小细胞肺癌癌症PDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0453] LD1-2025-362797(LideBiotech CO.,LTD)是表达人MUC18(H-Score=110)的人小细胞肺癌患者来源的异种移植物模型。6-8周Nu/Nu小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将LD1-2025-362797的肿瘤切成约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的片段,并皮下植入小鼠的侧翼。在植入后第21天(平均肿瘤大小 $\sim 144\text{mm}^3$),静脉注射第一剂量的实施例5中制备的 10mpk 02-1-LP1。当肿瘤体积恢复到约 700mm^3 时(第一次给药后第49天),静脉注射 10mpk 02-1-LP1的第二次给药。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积: $\text{TV} = (\text{长} \times \text{宽})^2 / 2$ 。

[0454] 图28A显示,在LD1-2025-362797PDX模型中,02-1-LP1可以有效抑制肿瘤生长。值得注意的是,在第二剂02-1-LP1后,肿瘤再次减少,表明02-1-LP1对再生肿瘤仍然具有活性。图28B显示,在LD1-2025-362797PDX模型中,02-1-LP1对小鼠体重几乎没有影响。

[0455] 试验例12:对LD1-2009-362263人三阴乳腺癌PDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0456] LD1-2009-362263(LideBiotech CO.,LTD)是表达人MUC18(H-Score=240)的人三阴性乳腺癌患者来源的异种移植物模型。6-8周Nu/Nu小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将LD1-2025-362797的肿瘤切成约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的片段,并皮下植入小鼠的侧翼。植入后第49天(平均肿瘤大小 $\sim 152\text{mm}^3$),静脉注射实施例5中制备的02-1-LP1。给药剂量为10mpk,每周1次,共2次(QW $\times$ 2)。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积:TV=(长 $\times$ 宽) $^2/2$ 。

[0457] 图29A显示02-1-LP1在LD1-2009-362263PDX模型中可以有效抑制肿瘤生长。图29B显示,在LD1-2009-362263PDX模型中,02-1-LP1对小鼠体重几乎没有影响。

[0458] 试验例13:对LD1-0060-200770人胆管癌PDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0459] LD1-0060-200770(LideBiotech CO.,LTD)是表达人MUC18(H-Score=15)的人胆管癌患者来源的异种移植物模型。6-8周Nu/Nu小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将LD1-0060-200770的肿瘤切成约 $3\text{mm} \times 3\text{mm} \times 3\text{mm}$ 的片段,并皮下植入小鼠的侧翼。在植入后第42天(平均肿瘤大小 $\sim 155\text{mm}^3$),静脉注射实施例5中制备的02-1-LP1。给药剂量为10mpk,每周1次,共2次(QW $\times$ 2)。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积:TV=(长 $\times$ 宽) $^2/2$ 。

[0460] 图30A显示02-1-LP1在LD1-0060-200770PDX模型中可以有效抑制肿瘤生长。图30B显示02-1-LP1对LD1-0060-200770PDX模型中小鼠的体重几乎没有影响。

[0461] 试验例14:对OV-10-0073人卵巢癌PDX模型的体内抑制作用及其对小鼠体重变化的影响

[0462] OV-10-0073(药明康德(上海)有限公司)是一种表达人MUC18(H-Score=40)的人卵巢癌患者来源的异种移植物模型。6-8周小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将OV-10-0073的肿瘤切成约 30mm^3 的片段,并皮下植入小鼠的侧翼。在植入后第34天(平均肿瘤大小 $\sim 185\text{mm}^3$),分别静脉注射单剂量的对比例5中制备的Human IgG-LP1(2.5, 5mpk)和实施例5中备的02-1-LP1(1.25, 2.5, 5mpk)。给药后,每周用游标卡尺测量两次肿瘤体积,并根据以下公式计算肿瘤体积:TV=(长 $\times$ 宽) $^2/2$ 。

[0463] 图31A显示02-1-LP1可以有效抑制OV-10-0073PDX模型中的肿瘤生长。图31B显示02-1-LP1对OV-10-0073PDX模型中小鼠的体重几乎没有影响。

[0464] 由上述实验结果可知,本公开提供的ADC中,连接子与依喜替康健合后,通过简单的化学方法与靶向MUC18或CD44v7/8的抗体偶联。与传统的随机偶联方式相比,应用这种连接子得到的抗MUC18或CD44v7/8抗体药物偶联物的DAR值更高(DAR8)。通过HIC检测显示本公开的ADC色谱峰较连接子-有效荷载为vc-MMAE或GGFG-DXd的色谱峰更窄,提示生成的产品均一性和亲水性高。和传统的vc-MMAE和GGFG-DXd偶联物相比,此公开偶联物的体外肿瘤细胞增殖抑制活性在生物学活性和安全性方面改善或维持。

[0465] 本公开中制备的ADC具有特异性MUC18或CD44v7/8依赖性抗肿瘤活性,并且对具有高表达MUC18或者CD44v7/8的肿瘤细胞具有极高的杀伤活性。本公开中制备的具有MUC18特异性的ADC具有增加的HNSTD,表明安全性提高并且毒性和副作用减少。令人惊讶的是,试验例9-14的结果还显示,本公开中制备的具有MUC18特异性的ADC对具有不同MUC18表达水平(低、中、高)的肿瘤细胞显示出优异的杀伤活性。

[0466] 本公开制备的ADC具有较偶联vc-MMAE或GGFG-DXd的ADC具有更为优异的体内抗肿瘤药效,同时在安全性方面表现出明显优于vc-MMAE的ADC,并与GGFG-DXd ADC具有相似的MTD(maximum tolerated dose) (Yusuke Ogitani Clin, et al., Cancer Res. 2016 Oct 15; 22(20):5097-5108.)。预期该药物偶联物将比现有临床分子vc-MMAE或GGFG-DXd具有更高的治疗窗口。

[0467] 本公开提供的ADC在体外具有更好的稳定性,并且在制备过程中的聚集体减少。具有式I连接体的ADC在血浆中具有更好的稳定性,预计ADC在体内可能具有更好的药物代谢特性,例如更长的半衰期、较低量的游离小分子毒素等。

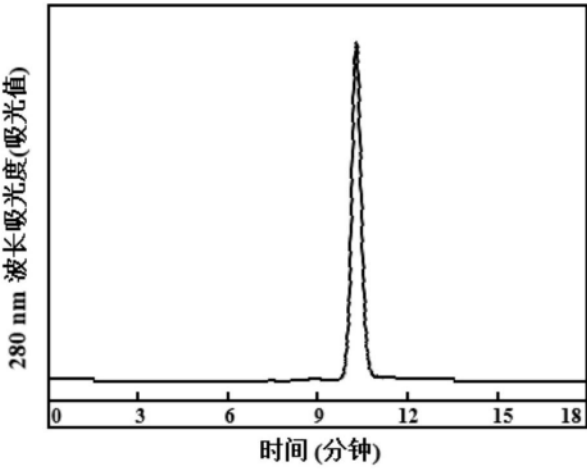


图1A

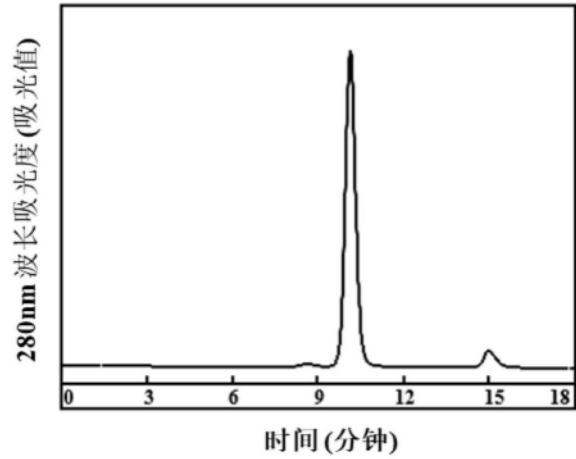


图1B

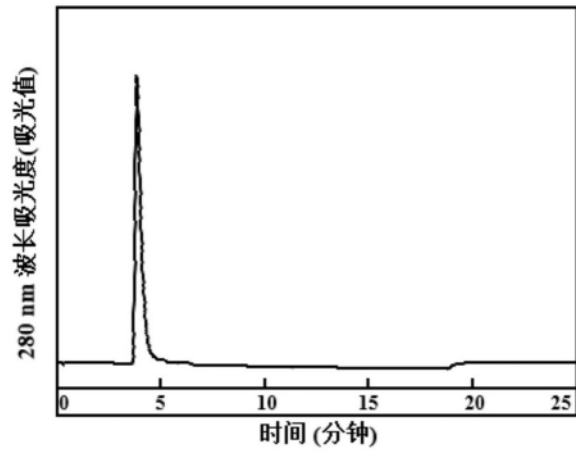


图2A

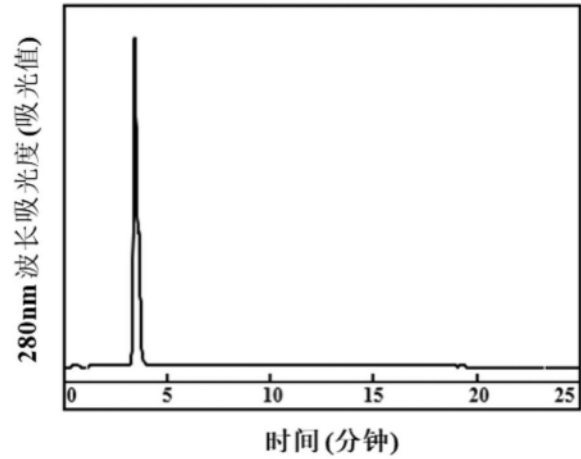


图2B

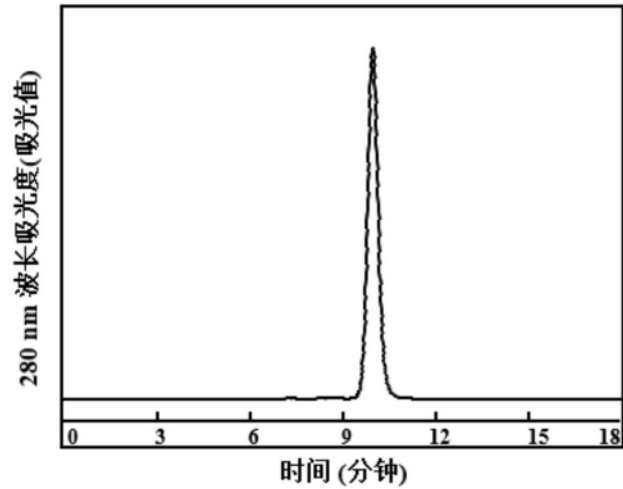


图3A

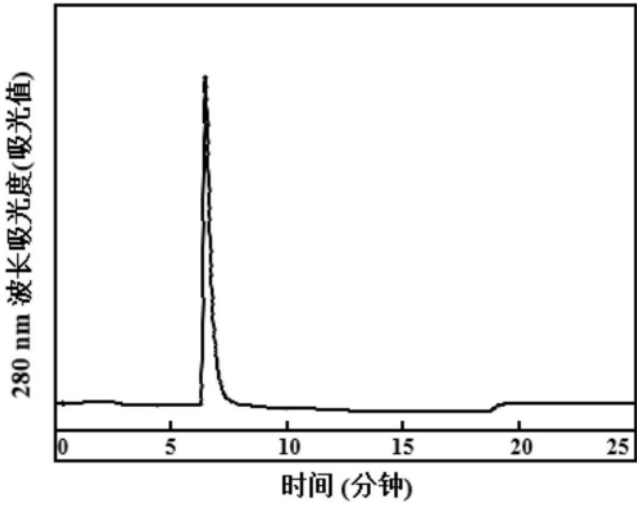


图3B

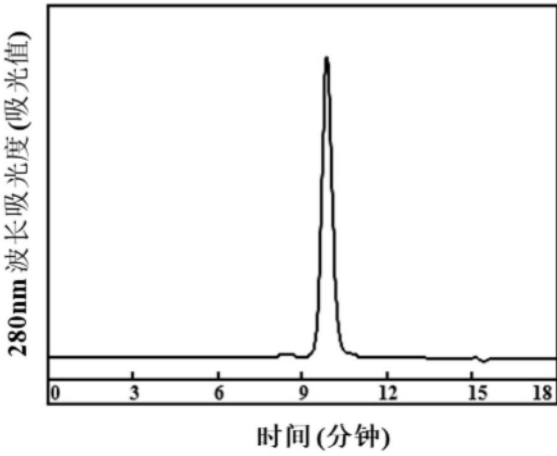


图4A

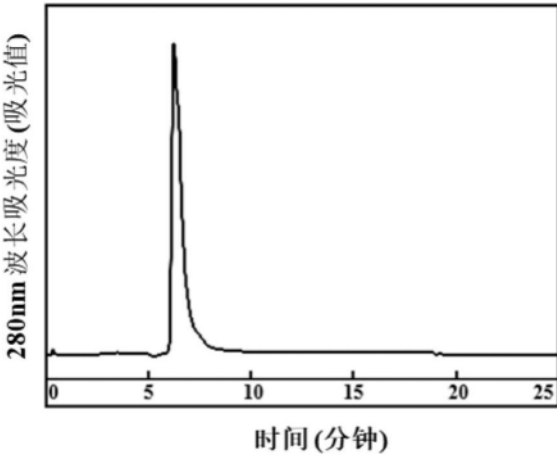


图4B

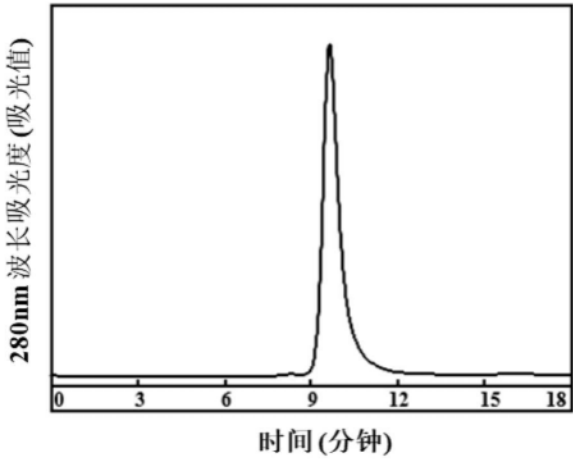


图5A

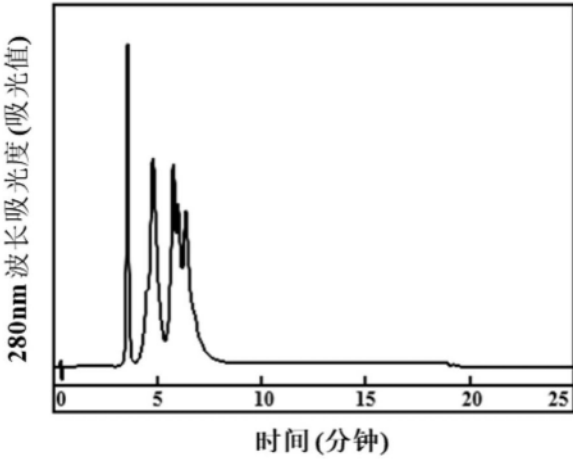


图5B

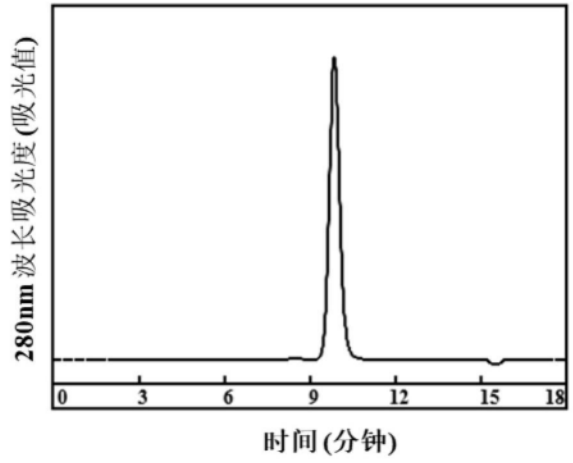


图6A

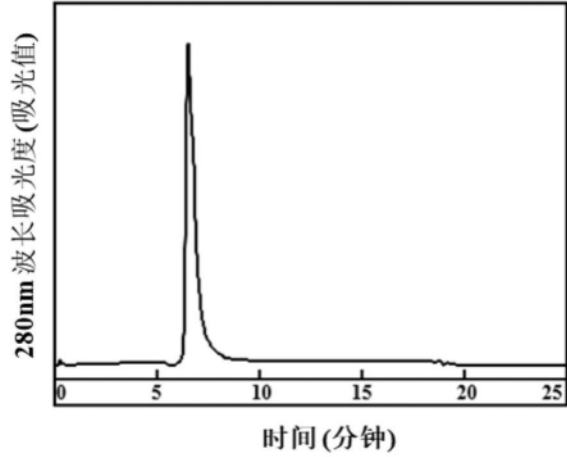


图6B

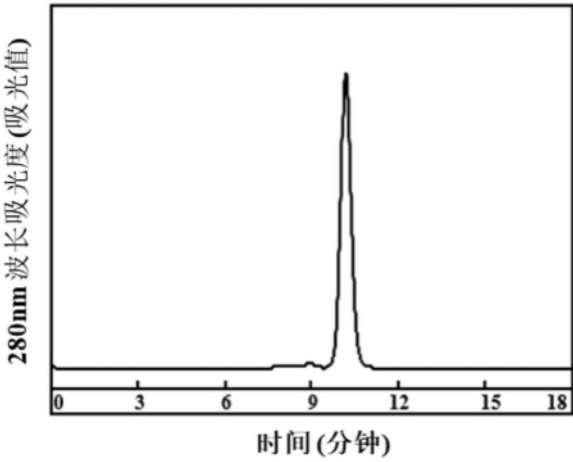


图7A

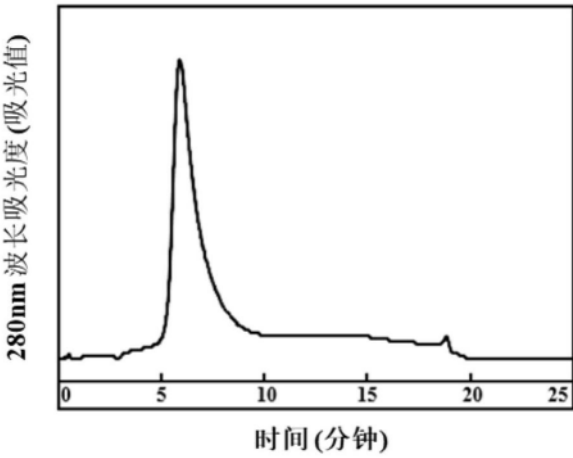


图7B

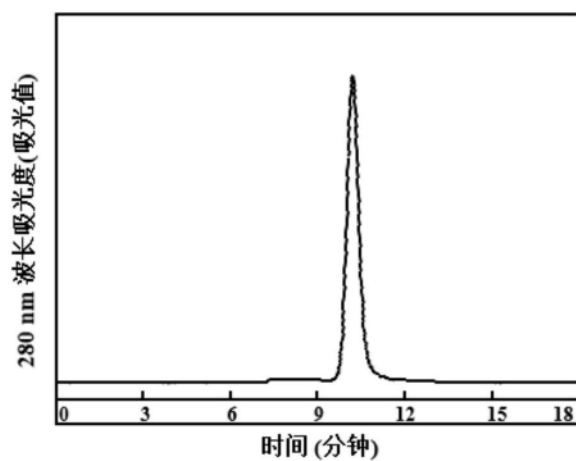


图8A

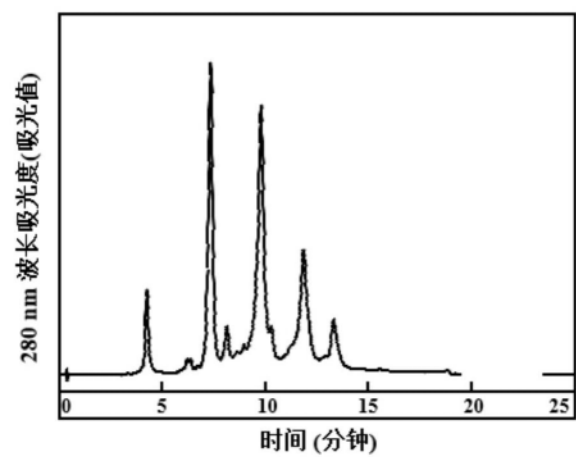


图8B

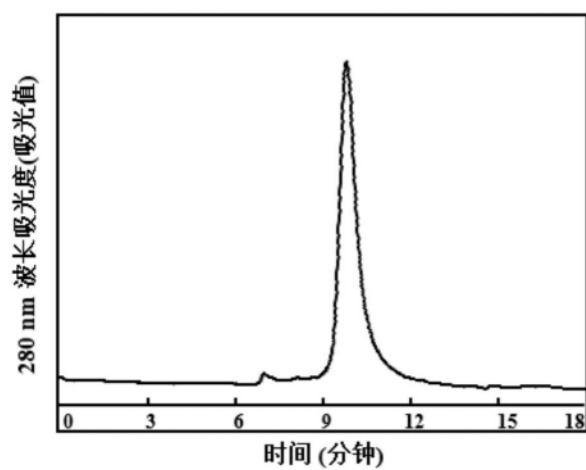


图9A

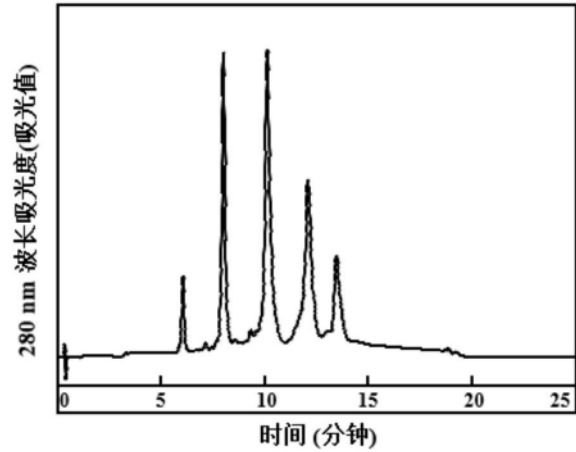


图9B

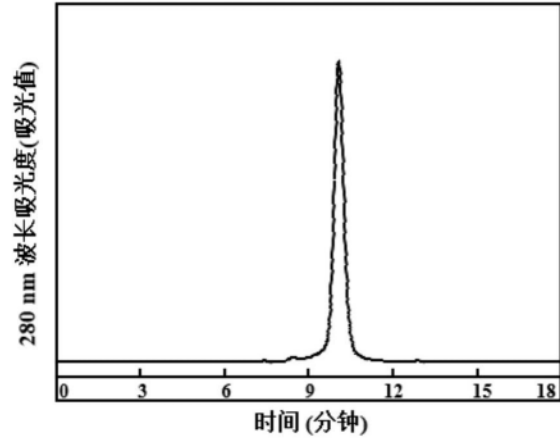


图10A

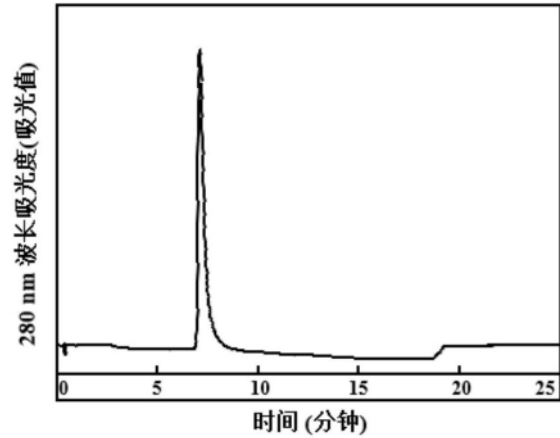


图10B

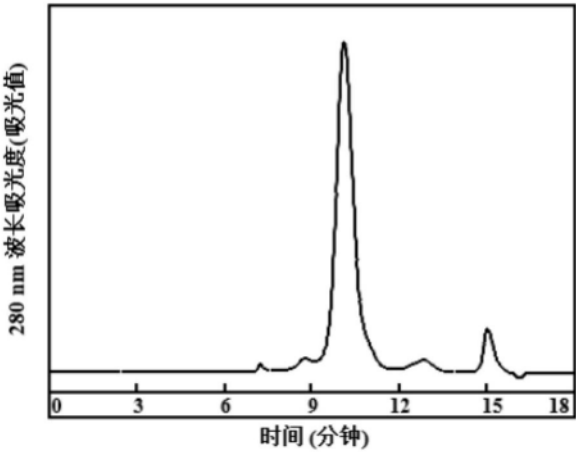


图11A

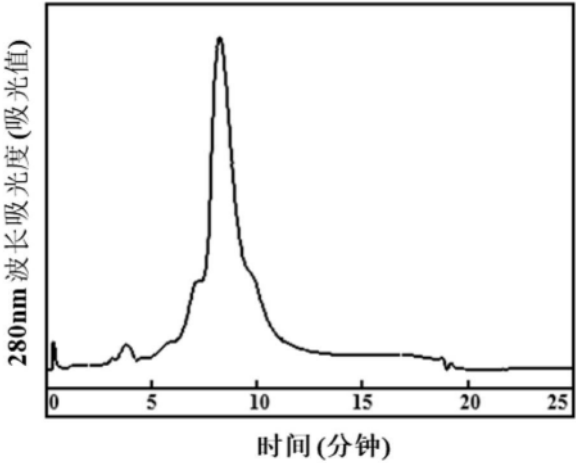


图11B

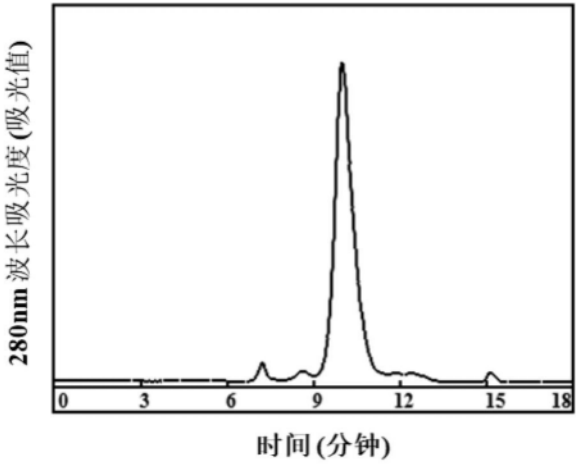


图12A

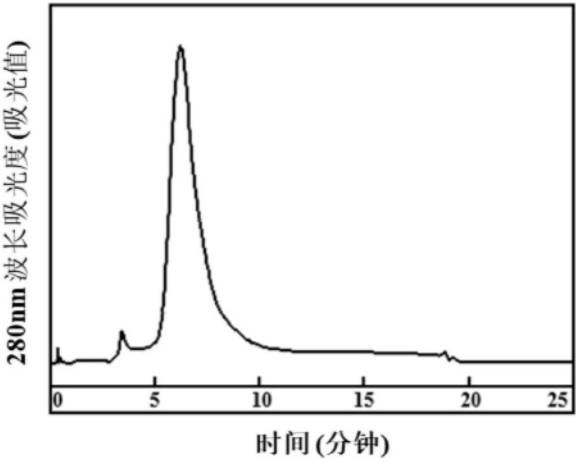


图12B

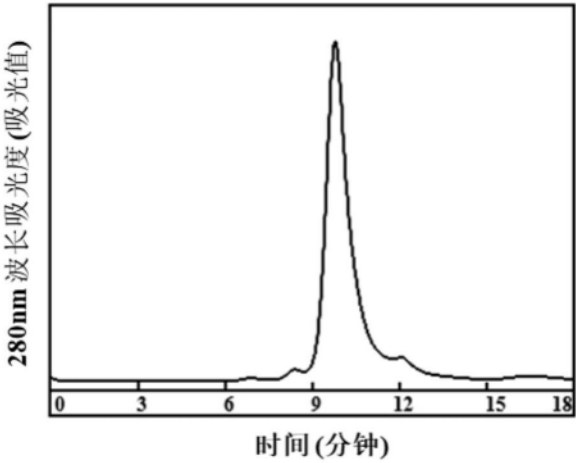


图13A

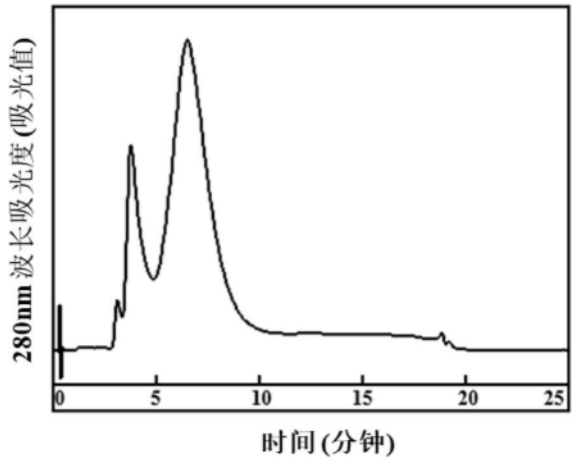


图13B

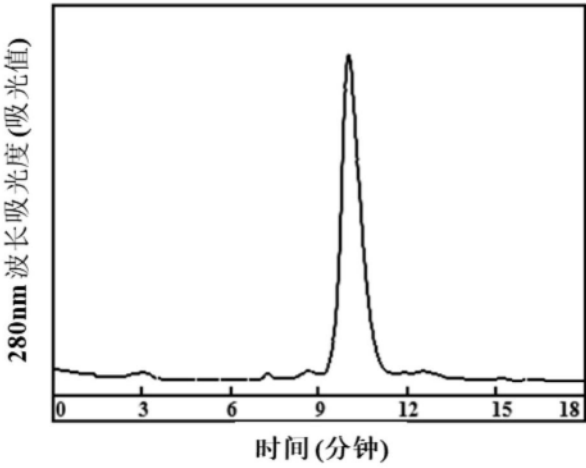


图14A

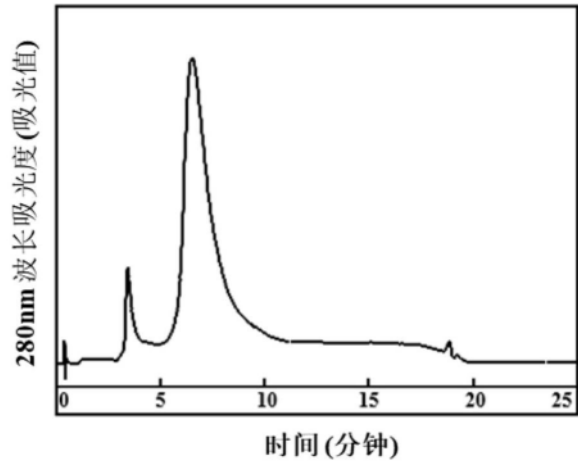


图14B

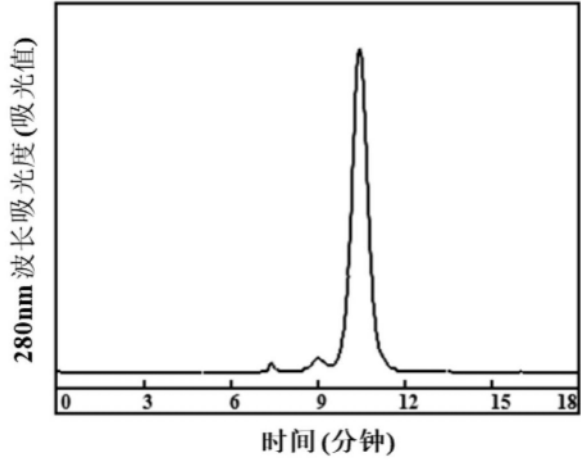


图15A

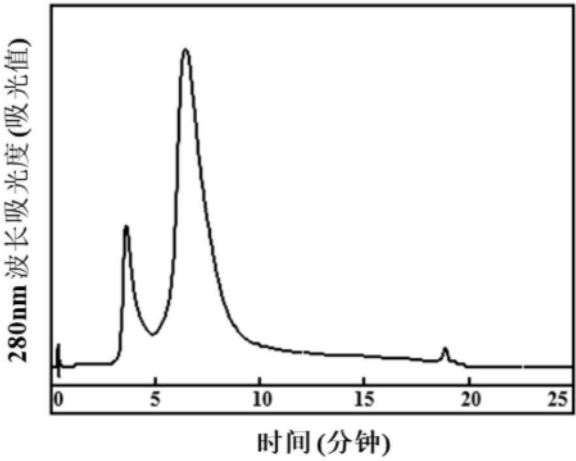


图15B

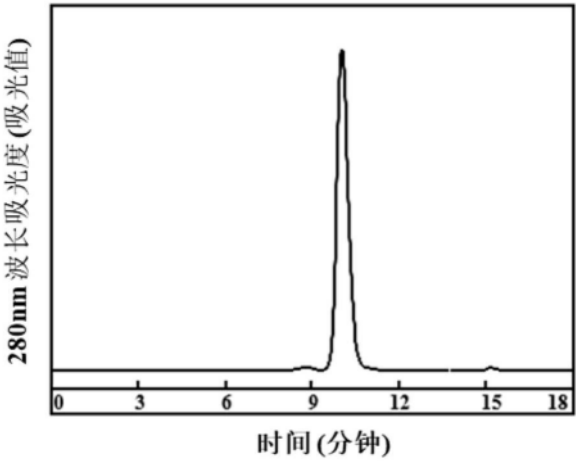


图16A

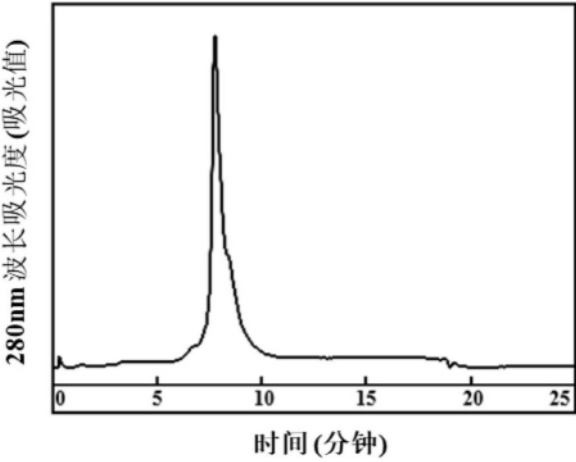


图16B

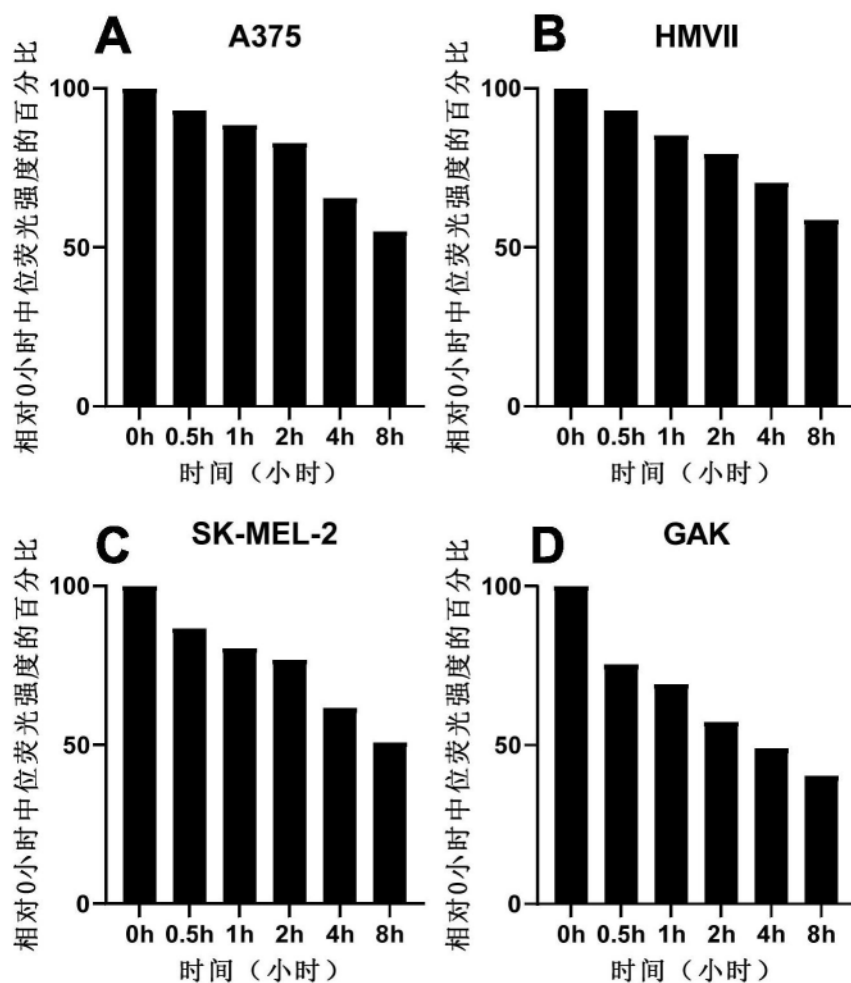


图17

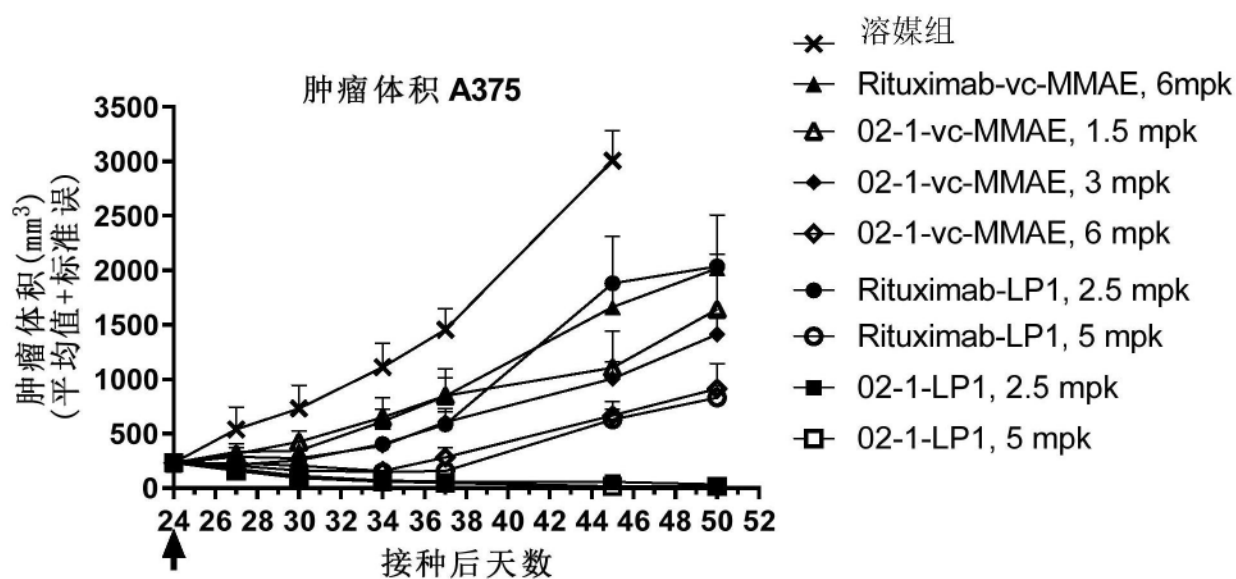


图18A1

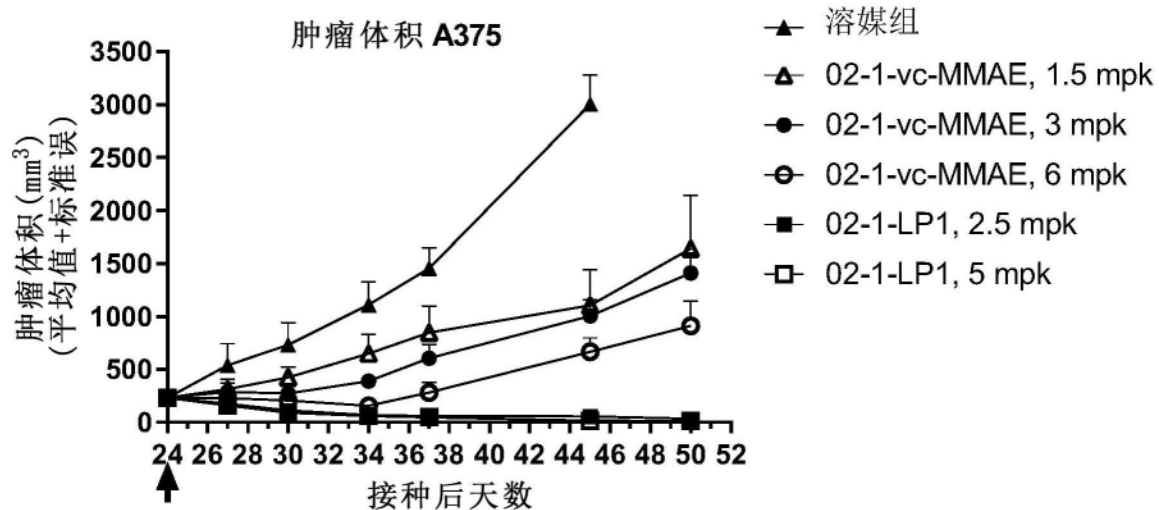


图18A2

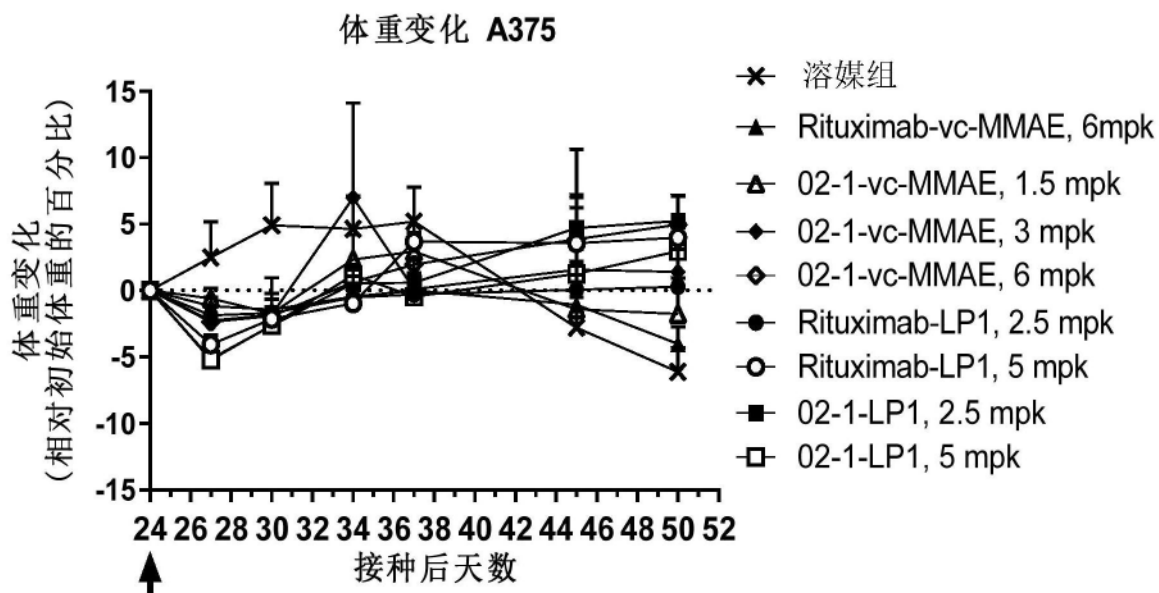


图18B1

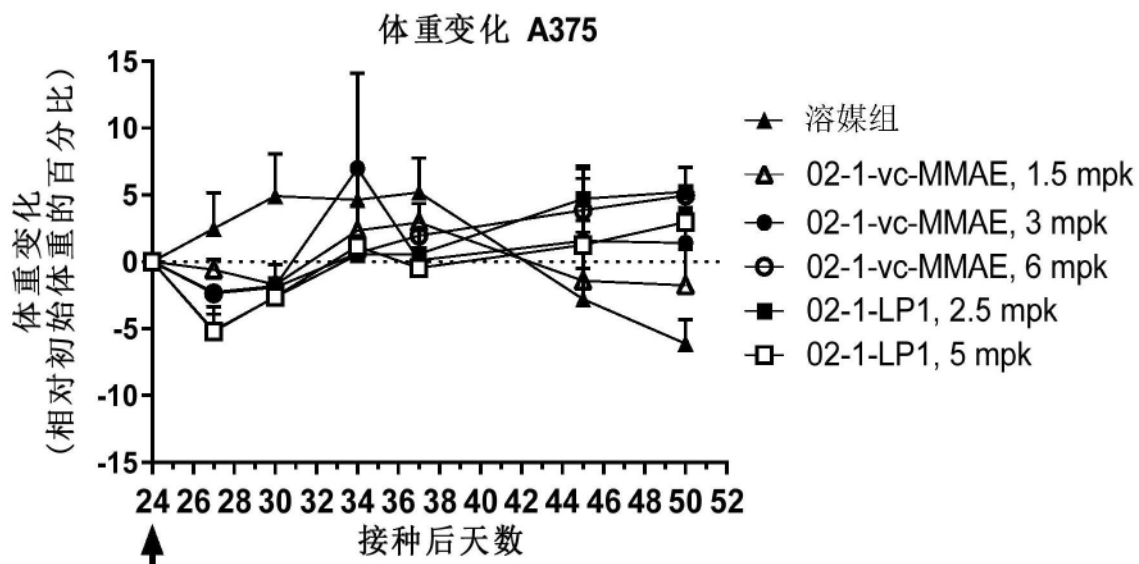


图18B2

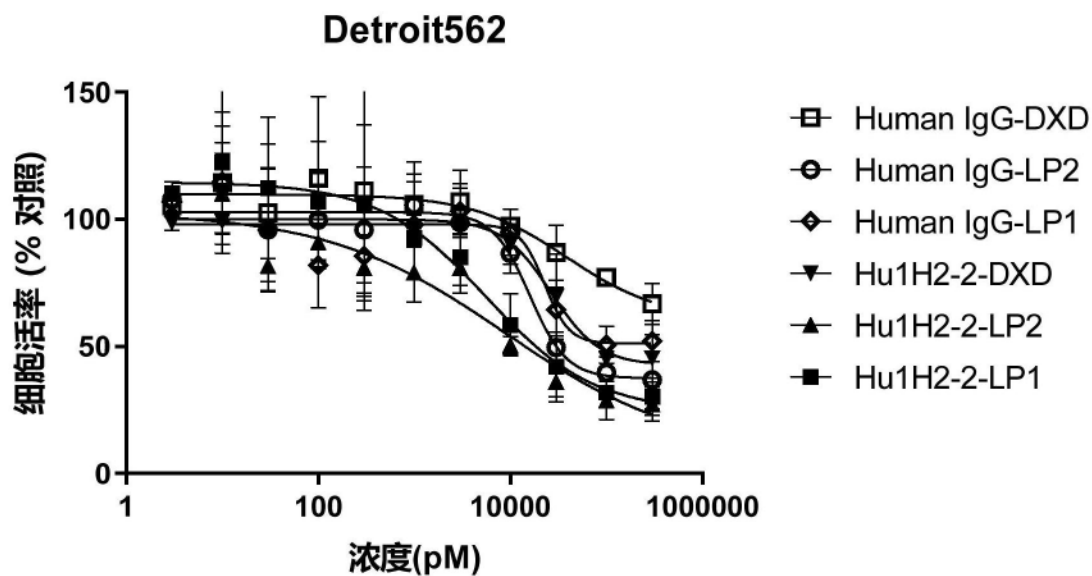


图19

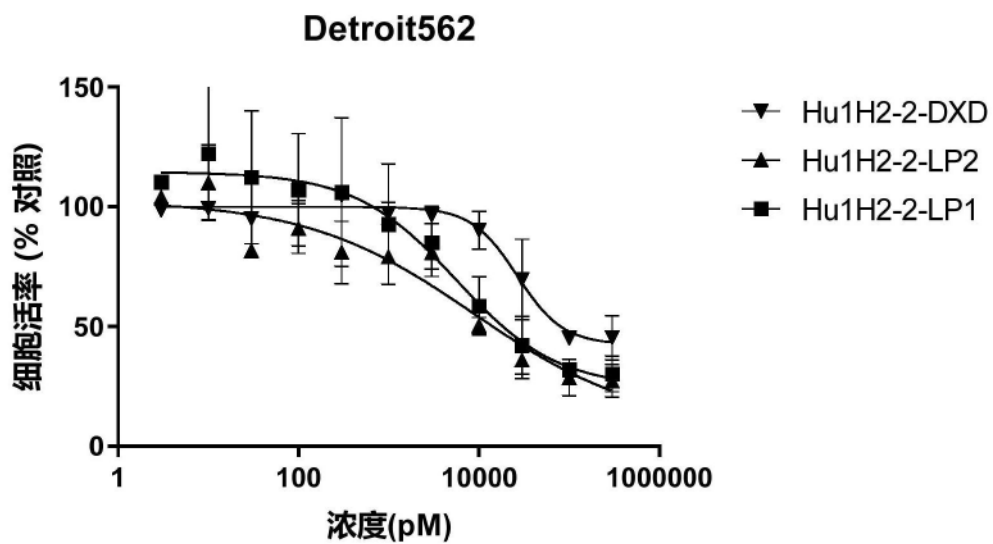


图19A1

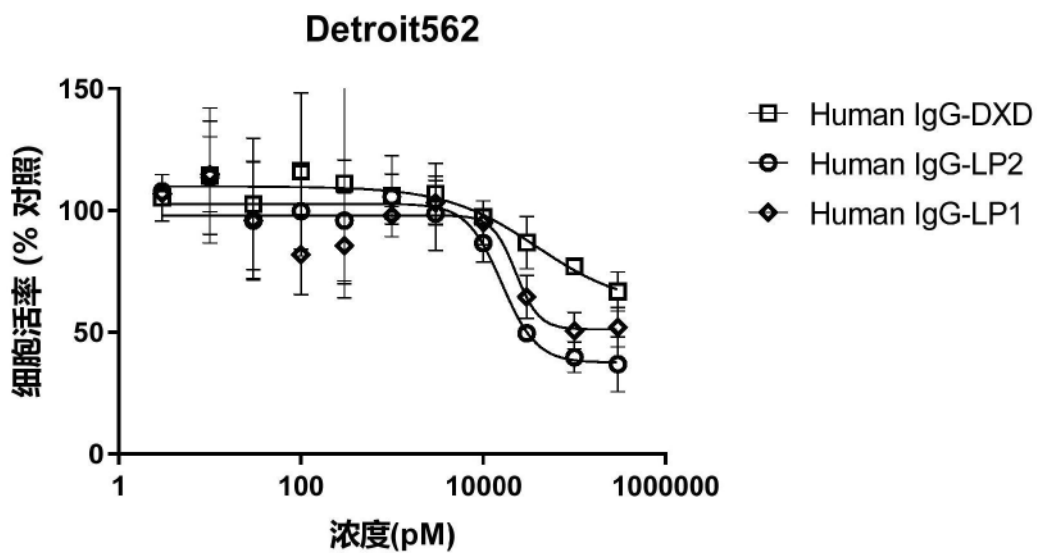


图19A2

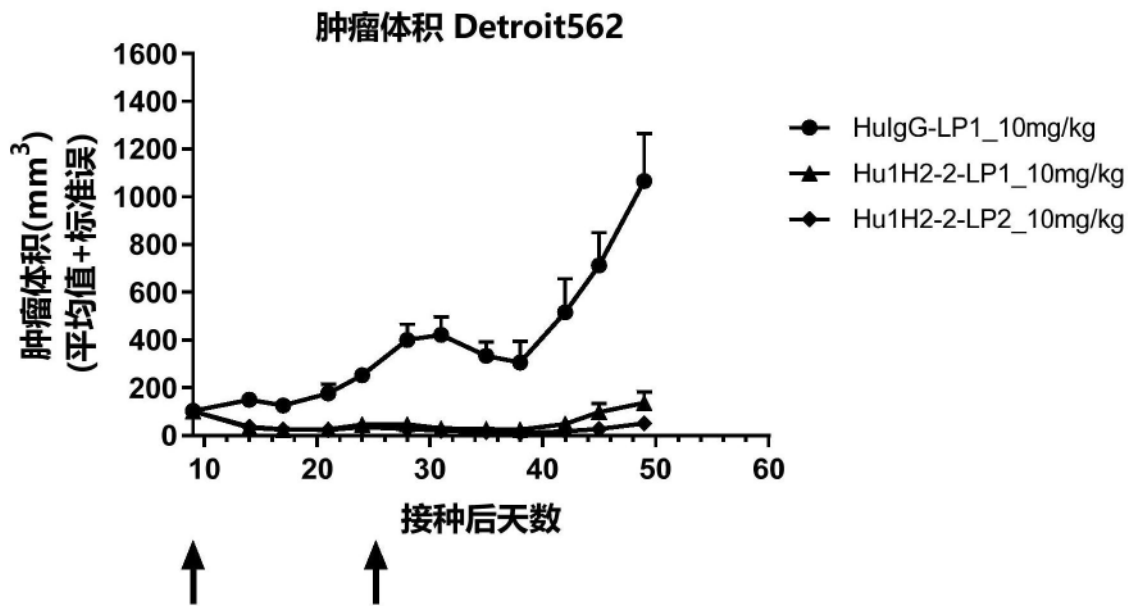


图20

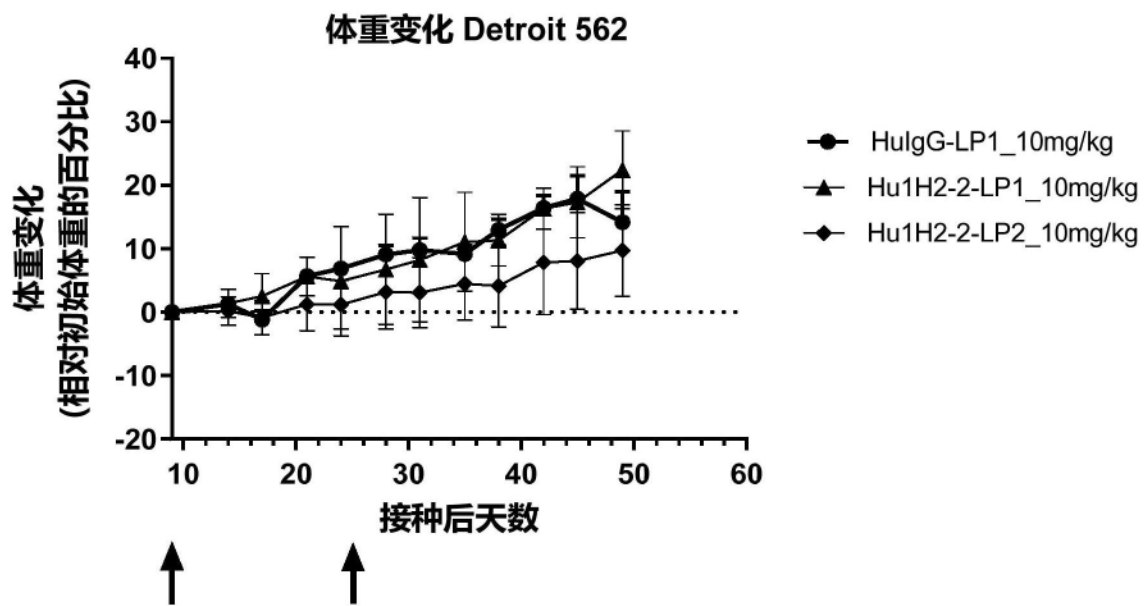


图21

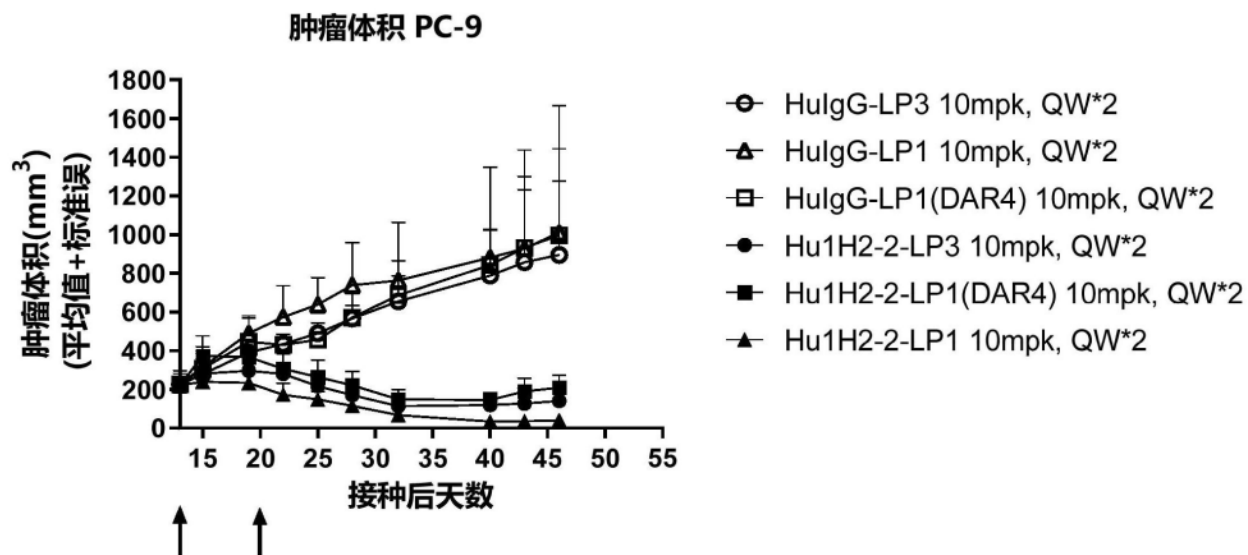


图22

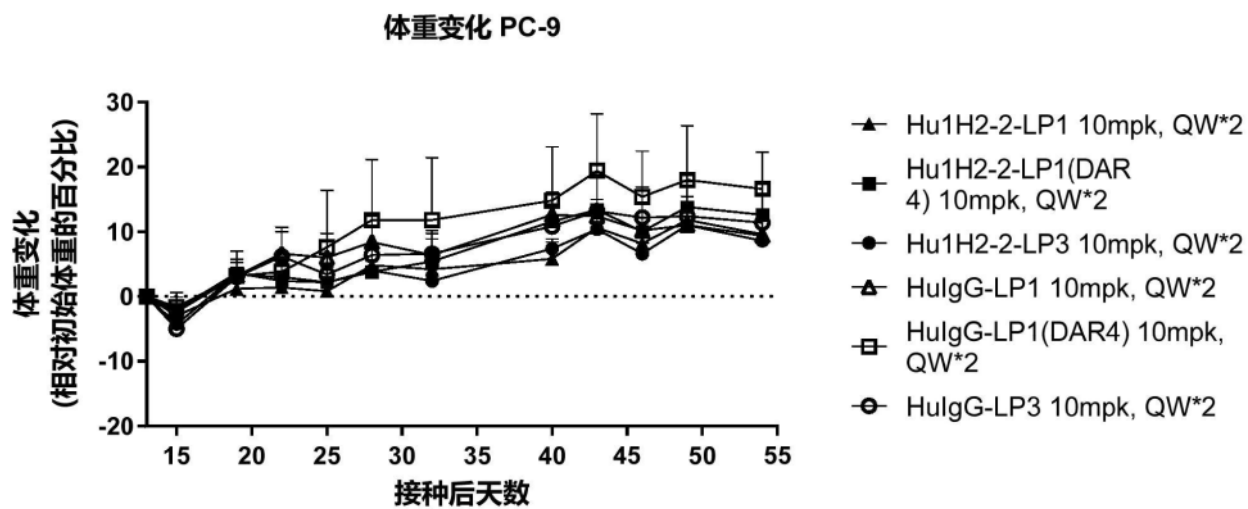


图23

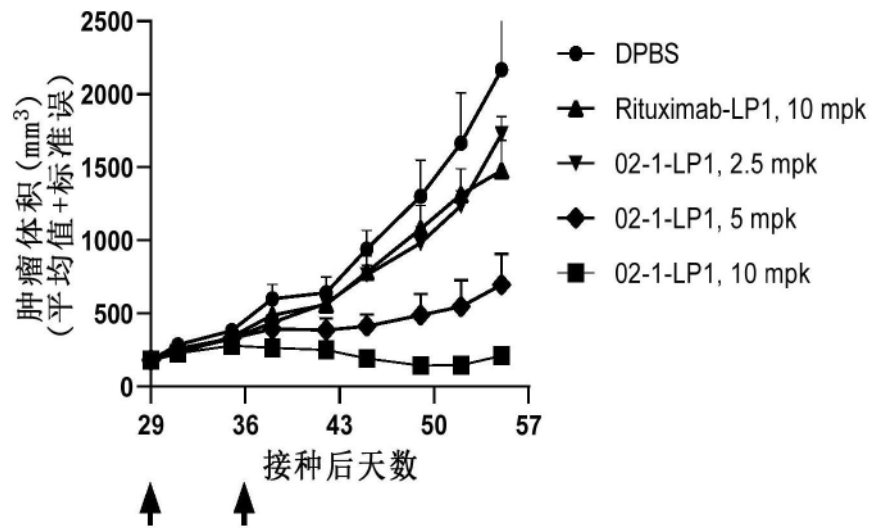


图24A

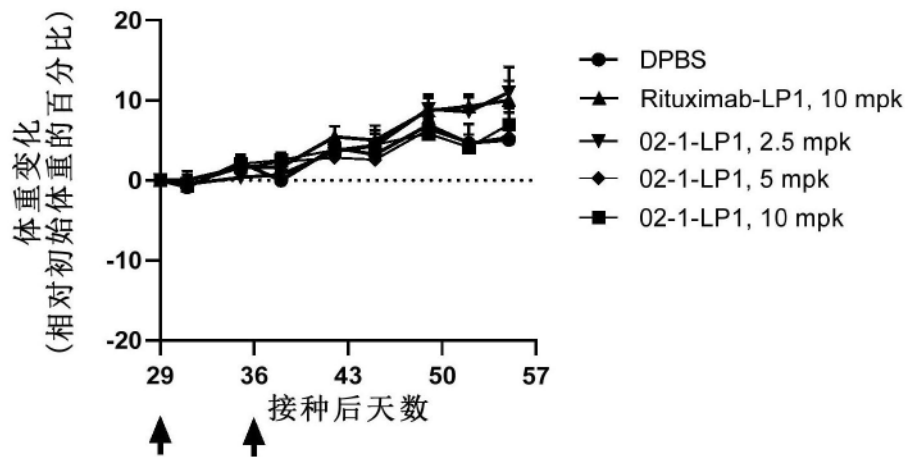


图24B

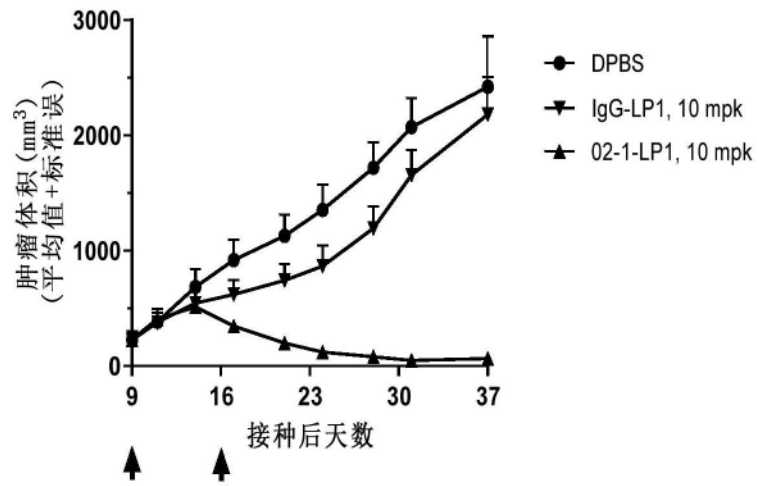


图25A

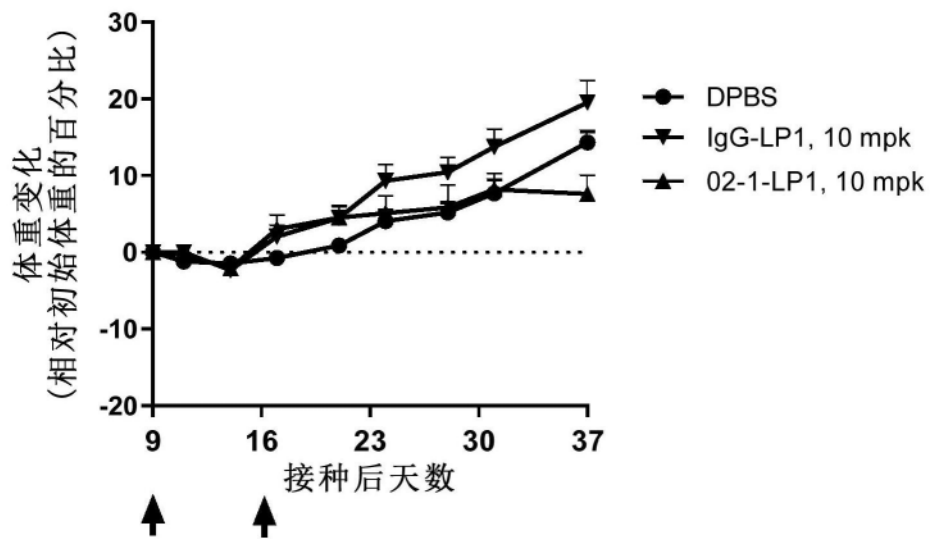


图25B

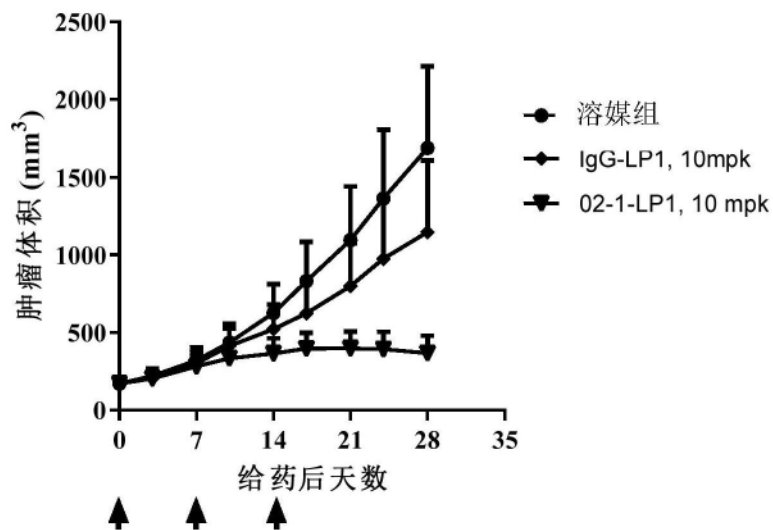


图26A

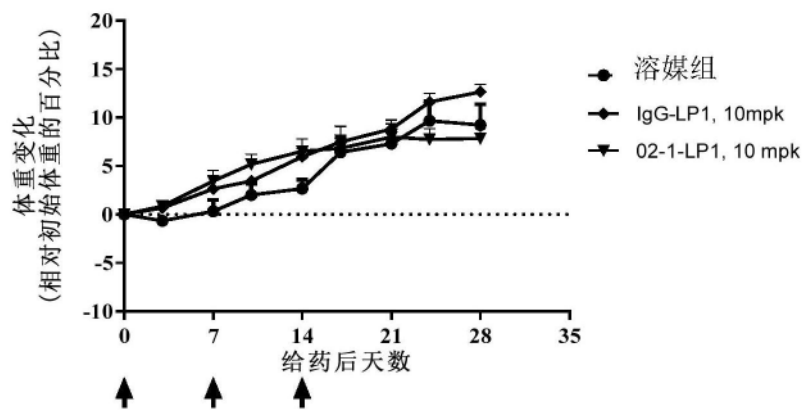


图26B

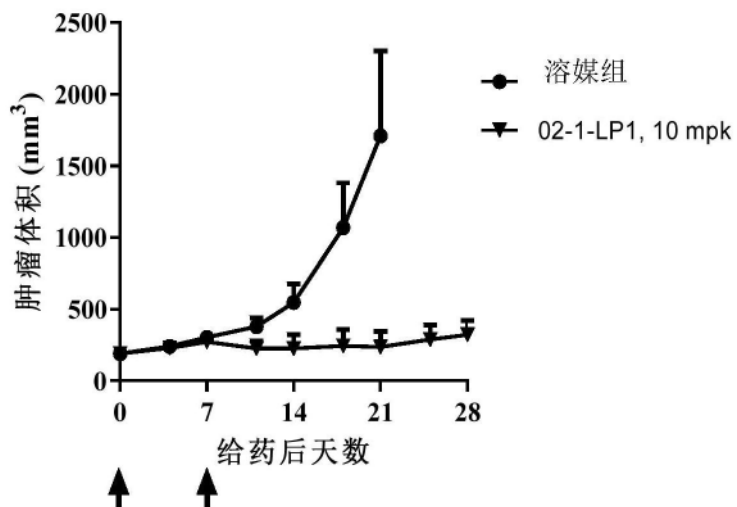


图27A

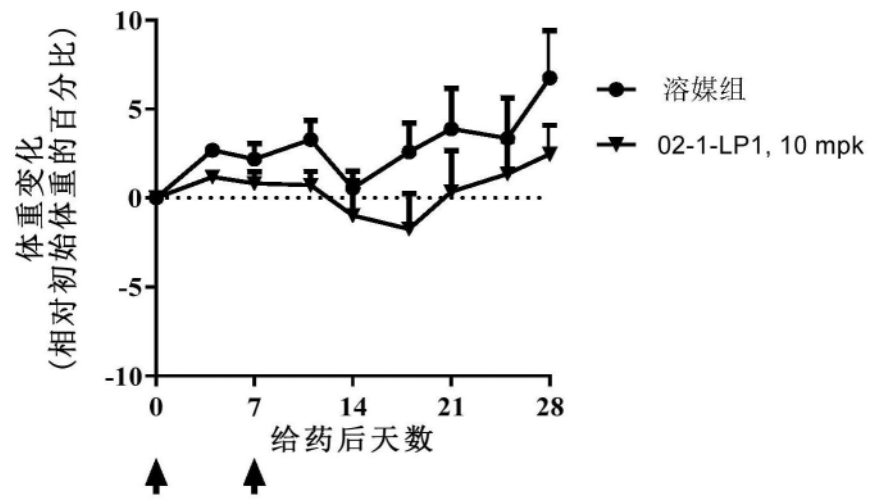


图27B

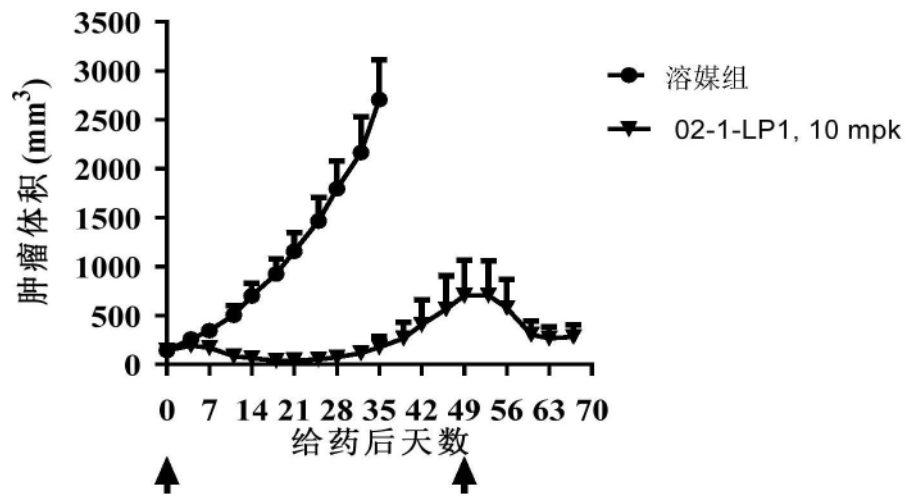


图28A

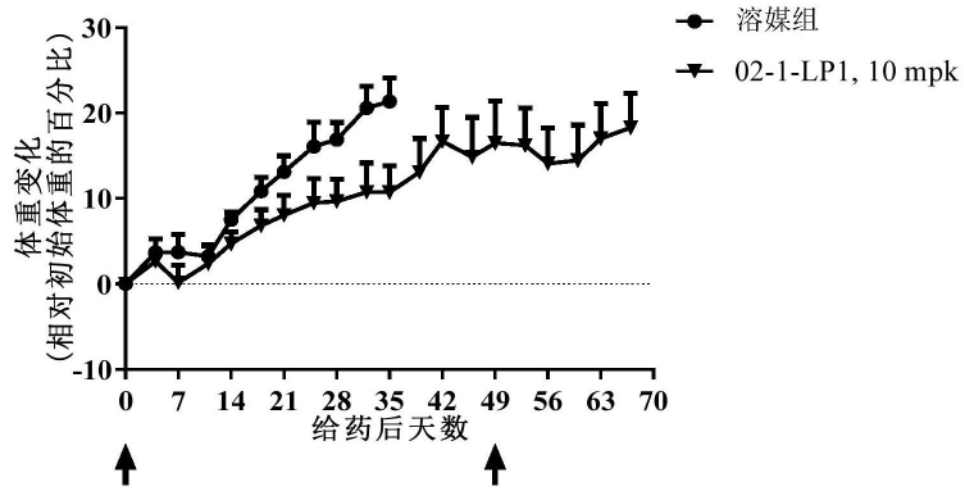


图28B

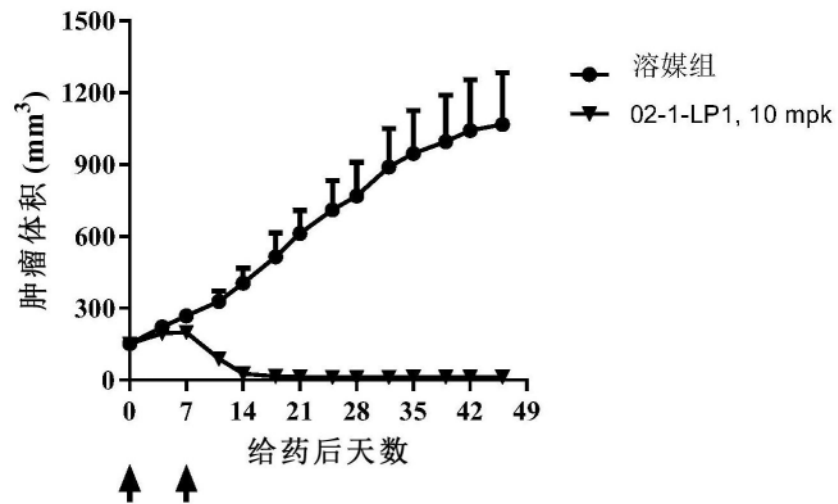


图29A

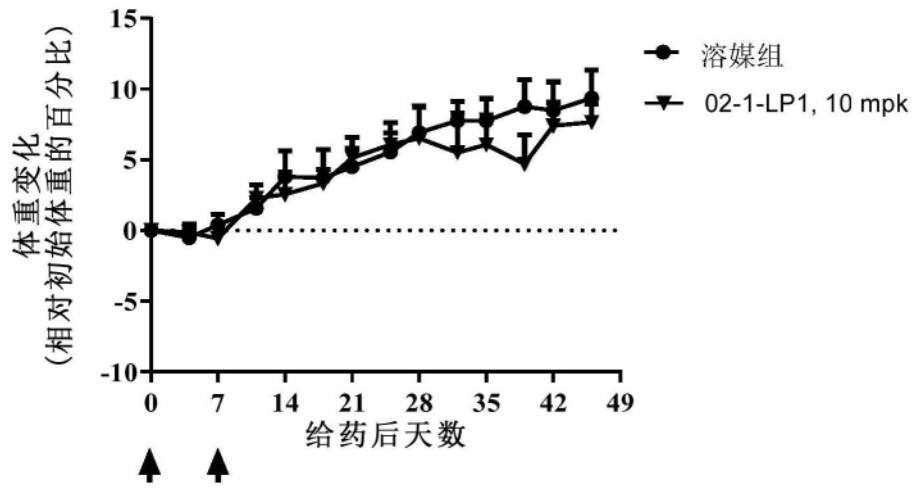


图29B

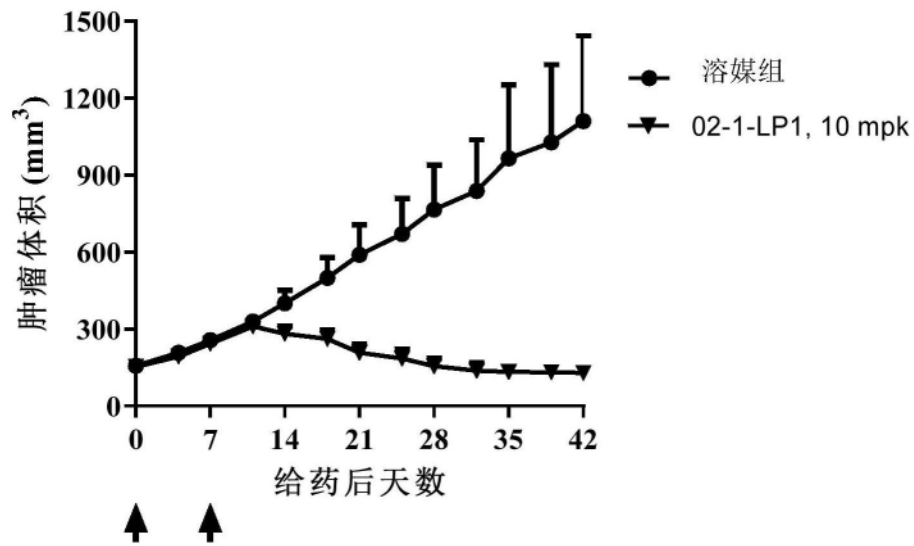


图30A

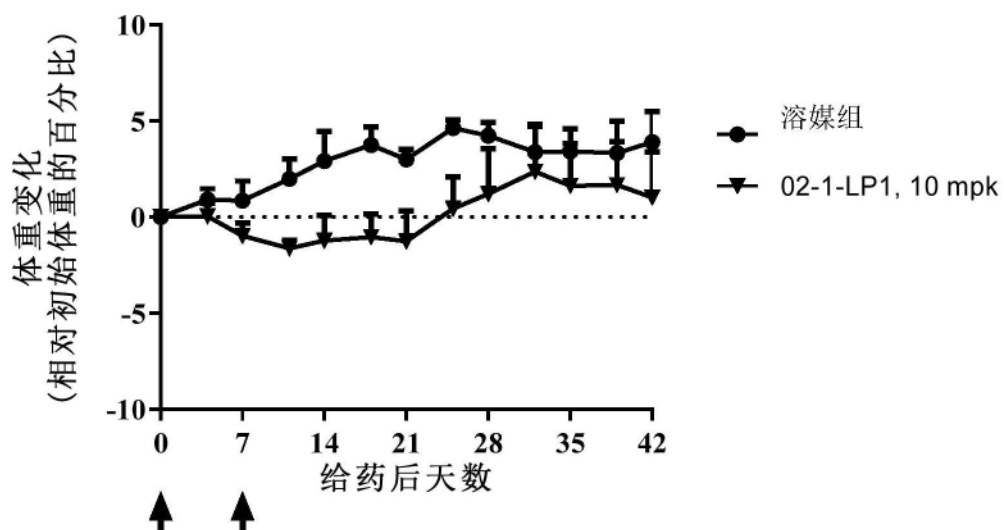


图30B

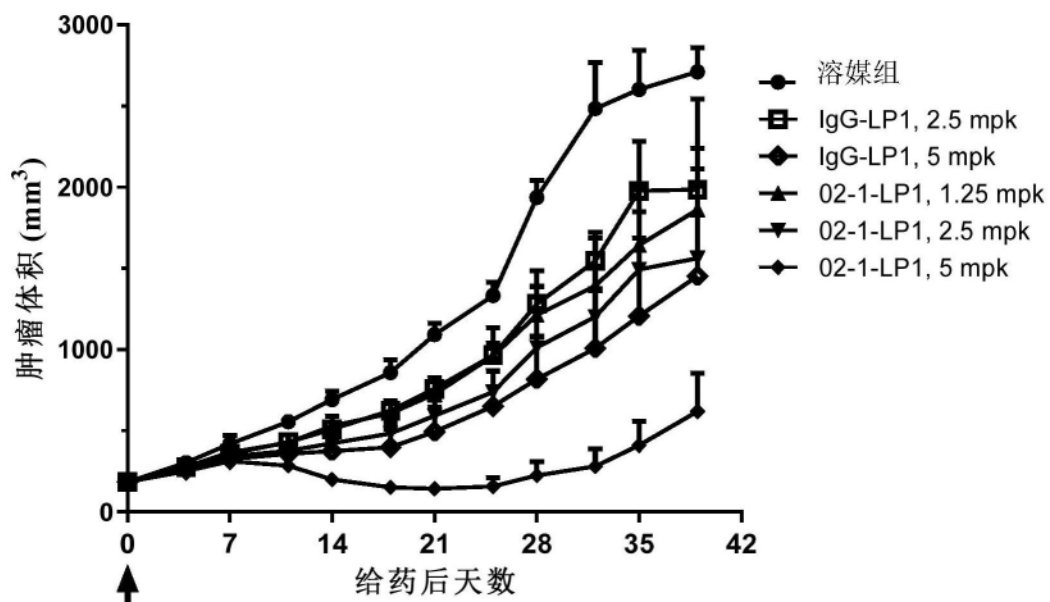


图31A

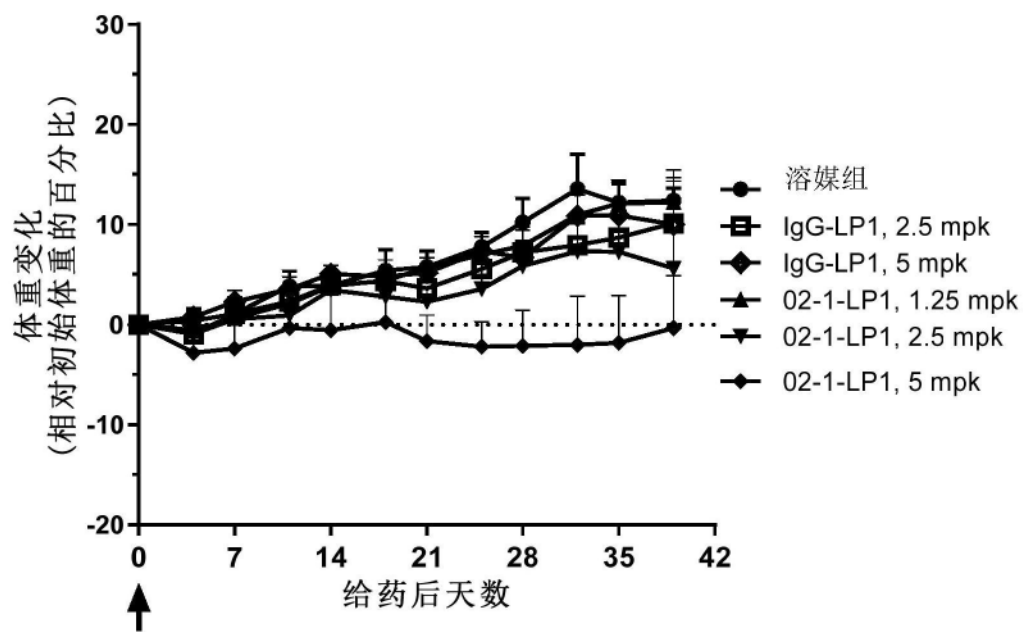


图31B