



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110141666 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201810150818.X

(22)申请日 2018.02.13

(71)申请人 和元生物技术(上海)股份有限公司

地址 201321 上海市浦东新区国际医学园
区紫萍路908弄19号楼

(72)发明人 郑德先 张书永 潘讴东 郑超
朱婉 夏清梅

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 崔佳佳 徐迅

(51)Int.Cl.

A61K 47/68(2017.01)

A61K 38/07(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书25页
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

抗TRAILR2抗体-毒素-偶联物及其在抗肿瘤
治疗中的药物用途

(57)摘要

本发明提供一种广谱、高效、抗肿瘤的抗TRAILR2抗体-毒素-偶联物(ADC,命名为Zapadcine-2(a,b,c,d,e)。本发明采用二硫键桥连或常规偶联技术和化学连接子(Linker)将具有细胞毒作用的毒素与抗TRAILR2人源化单克隆抗体以共价键连接,形成一种抗TRAILR2人源化抗体-毒素-偶联物。本发明ADC具有TRAILR2阳性肿瘤的特异性,其与TRAILR2结合后,可被内吞并进入肿瘤细胞的溶酶体,经溶酶体内的蛋白酶降解而释放出游离的小分子毒素,从而特异性地杀死多种TRAILR2阳性的肿瘤细胞,抑制肿瘤生长,甚至完全清除肿瘤细胞,治愈肿瘤。

1. 一种抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其特征在于,所述抗体药物偶联物含有:

(a) 抗体部分;和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合;

其中,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

(H1) SEQ ID NO.:1所示的CDRH1,

(H2) SEQ ID NO.:2所示的CDRH2,和

(H3) SEQ ID NO.:3所示的CDRH3;

其中,上述重链可变区氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留TRAILR2结合亲和力的衍生序列;和/或所述抗体的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

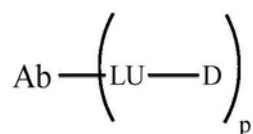
(L1) SEQ ID NO.:4所示的CDRL1,

(L2) SEQ ID NO.:5所示的CDRL2,和

(L3) SEQ ID NO.:6所示的CDRL3;

其中,上述轻链可变区氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TRAILR2结合亲和力的衍生序列。

2. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其特征在于,所述抗体药物偶联物ADC如下分子式所示:



其中:

Ab为抗TRAILR2的抗体,

LU为无或连接所述抗体和所述药物的接头;

D为药物;

p为偶联于所述抗体的所述药物的数量;p是选自1-10,较佳地1-8的值,更佳地2-4的值;

“—”为键或接头。

3. 如权利要求2所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其特征在于,所述LU选自下组: MAL-EBE-MAL、Py-BEA、Py-MAA-EBE-MAL、Py-MAA-EBE-SPDP或其组合;其中:

MAL-EBE-MAL为1,1'-((ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(1H-pyrrole-2,5-dione);

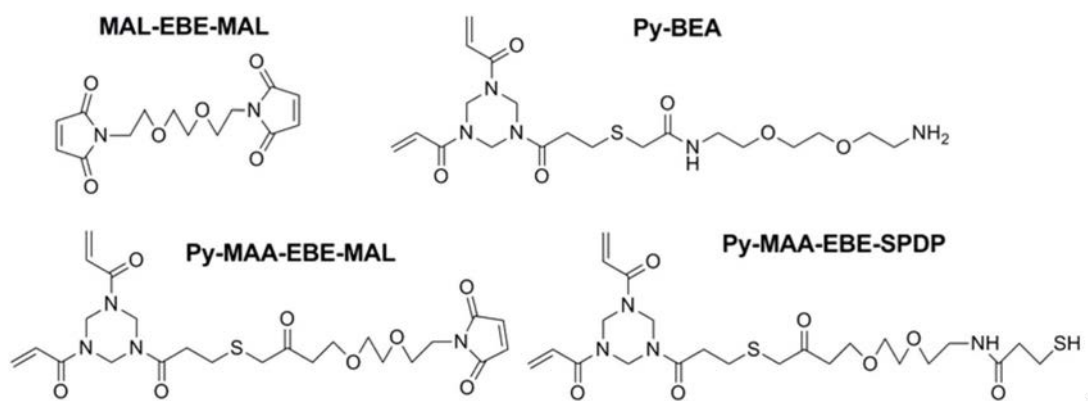
Py-BEA为N-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-2-((3-(3,5-diacryloyl-1,3,5-triazinan-1-yl)-3-oxopropyl)thio)acetamide;

Py-MAA-EBE-MAL为1-(2-(2-(4-((3-(3,5-diacryloyl-1,3,5-triazinan-1-yl)-3-oxopropyl)thio)-3-oxobutoxy)ethoxy)ethyl)-1H-pyrrole-2,5-dione;

Py-MAA-EBE-SPDP为N-(2-(2-(4-((3-(3,5-diacryloyl-1,3,5-triazinan-1-yl)-3-

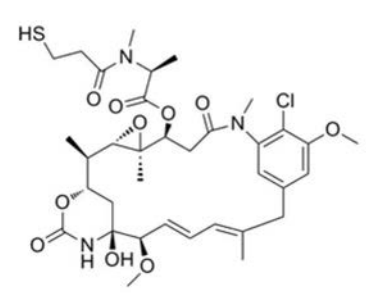
oxopropyl) thio)-3-oxobutoxy) ethoxy) ethyl)-3-mercaptopropanamide;

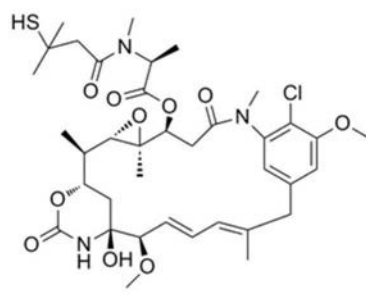
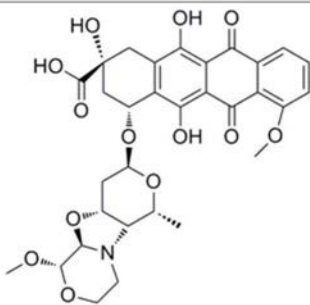
其分子结构式如下:



4. 如权利要求2所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其特征
在于,所述D选自下组:化疗剂、放射性物质、毒素、能够将前药转化成其活性形式的抗癌前
药的活化酶、或其组合。

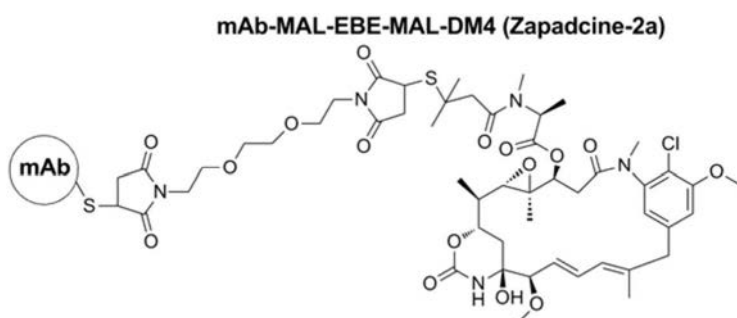
5. 如权利要求2所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其特征
在于,所述药物D选自下组:Maytansinoid DM 1 (DM1), Maytansinoid DM 4 (DM4),
Duomycin7类衍生物或其组合:

D1	Maytansinoid DM 1 (DM1)	
----	-------------------------	---

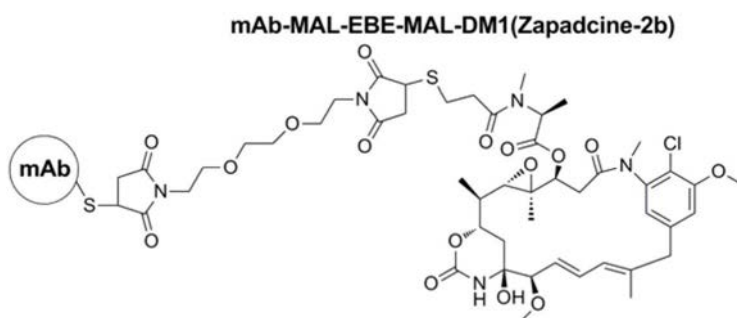
D2	Maytansinoid DM 4 (DM4)	
D3	Duomycin7	

6. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其特征
在于,所述抗体-药物偶联物(ADC)选自下组:Zapadcine-2a、Zapadcine-2b、Zapadcine-2c、
Zapadcine-2d、Zapadcine-2e;其中,

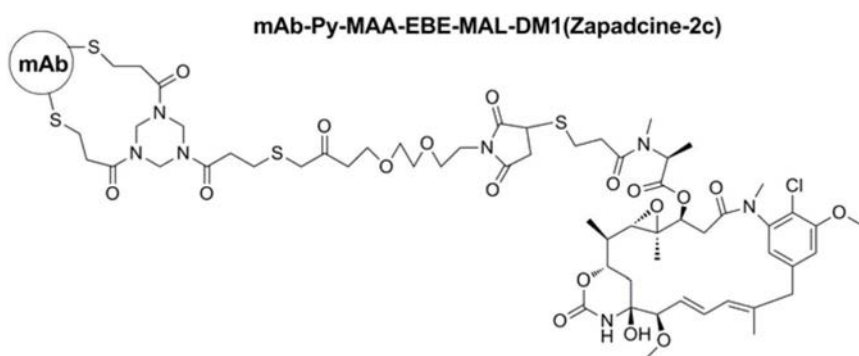
偶联物Zapadcine-2a的结构如下:



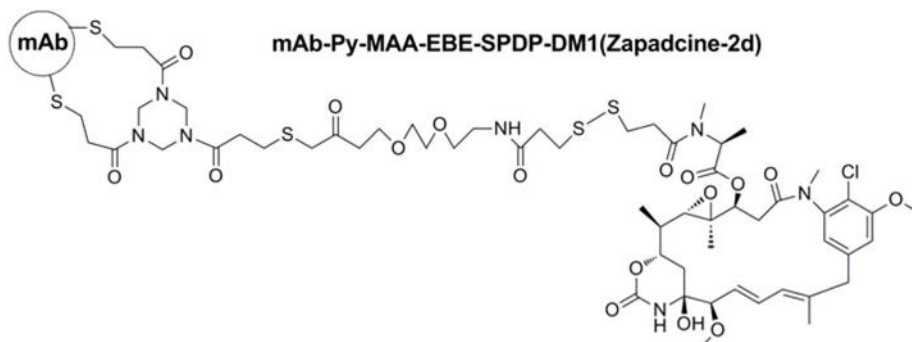
偶联物Zapadcine-2b的结构如下:



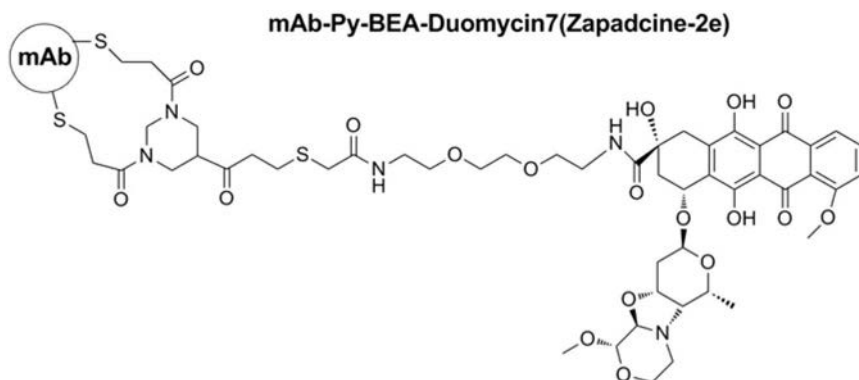
偶联物Zapadcine-2c的结构如下:



偶联物Zapadcine-2d的结构如下：



偶联物Zapadcine-2e的结构如下：



7. 如权利要求1所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其特征在于,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.7所示;和/或,所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示;

其中,上述重链可变区的氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并与SEQ ID No.7所示的氨基酸序列具有至少80%同源性或序列相同性的衍生序列;

其中,上述轻链可变区的氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并与SEQ ID No.8所示的氨基酸序列具有至少80%同源性或序列相同性的衍生序列。

8. 一种权利要求1所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物的应用,其特征在于,所述抗体-药物偶联物用于 (i) 制备诊断试剂;和/或 (ii) 制备预防和/或治疗TRAILR2相关的疾病的药物。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述TRAILR2相关的疾病选自下组:肿瘤

(例如TRAILR2阳性表达的肿瘤)的发生、生长和/或转移。

10. 一种药物组合物,其特征在于,它含有:

(i) 活性成分,所述活性成分为如权利要求1所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物或其组合;以及

(ii) 药学上可接受的载体。

11. 一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,其特征在于,包括步骤:将所述肿瘤细胞与权利要求1所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物接触。

抗TRAILR2抗体-毒素-偶联物及其在抗肿瘤治疗中的药物用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学、免疫化学、有机化学和药物化学技术领域,具体地说,本发明涉及一种抗体-毒素-偶联物(ADC,命名为Zapadcine-2)及其治疗肿瘤的药物用途。

背景技术

[0002] 根据WHO发表的《全球癌症报告2014》显示全球癌症病例增长快速,从2012年的1400万人到2025年的1900万人和2035年的2400万人,全球癌症患者和死亡病例都在令人不安地增加,新增癌症病例有近一半出现在亚洲,其中大部分在中国,中国新增癌症病例高居第一位。2012年全球最多人罹患的3大癌症为肺癌(180万)、乳癌(170万)、大肠癌(140万),致死率前3名的癌症则是肺癌、肝癌、胃癌。白血病是我国十大高发恶性肿瘤之一,死亡率在各类肿瘤中排在第六位。2008年至2015年间我国抗肿瘤药物的市场规模稳步增长,市场规模由289.86亿元增长到970.01亿元。预计至2018年该类别用药市场销售额可达1,447.42亿元。

[0003] 自从1986年第一个治疗性抗体(OKT3)上市以来,至今已有许多治疗性抗体及其衍生物用于临床治疗,超过1000个抗体及其衍生物处于研发阶段。全球治疗性抗体从起初微乎其微的市场份额增长到可用来治疗多种癌症、自身免疫病、移植排异反应、心血管疾病和各种传染病等安全、特异、有效的重大疾病治疗药物。2016年,美国FDA批准上市的16个新药中,其中6个是抗体药物。目前还有多个处于临床试验II、III期,估计2017年美国FDA还将批准8-10个抗体药物上市。每个抗体药物上市后的年销售额平均约达10亿美元。现在年销售额10亿美元以上的所谓“重磅炸弹”都是抗体药物。因此,治疗性抗体是全世界生物技术药物研发的主攻方向,方兴未艾,很多学者认为治疗性抗体药物就是“未来医学”。但是,我国在治疗抗体研发和产业化方面还很落后,至今除了几个仿制的治疗性抗体药物面世外,具有自主知识产权的、创新性治疗性抗体药物寥寥无几。

[0004] 肿瘤坏死因子超家族(TNFSF)可诱导细胞凋亡,其中FasL/Fas(CD95L/CD95)、TNF/TNFR、TRAIL/TRAILR等三种配体及其受体在诱导肿瘤细胞凋亡中发挥重要作用。TRAIL属于2型跨膜蛋白,与前二者不同,TRAIL与其相对应的死亡受体结合后可特异性诱导肿瘤细胞凋亡,对正常细胞无损伤。TRAIL及其死亡受体的这一特性引起了研究者的高度重视,希望据此找到一种新的治疗肿瘤方法。TRAIL受体有5种:TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4和OPG。TRAILR1与TRAILR2为死亡受体(DR),死亡受体胞内区具有完整的死亡结构域(DD),可诱导靶细胞的凋亡,TRAILR3与TRAILR4为诱骗受体(DcR1、DcR2),诱骗受体胞内区缺失完整的死亡结构域,不能传递细胞凋亡信号,这是保护正常细胞逃避凋亡的机制之一。TRAIL与其死亡受体结合后,可激发细胞内一系列天冬氨酸蛋白酶的级联反应,最终杀死TRAILR1或TRAILR2阳性的肿瘤细胞。

[0005] 针对TRAILR1或TRAILR2为靶点的肿瘤治疗,包括应用重组可溶性TRAIL、抗TRAILR1或抗TRAILR2的激动性单克隆的治疗,已进入人体临床试验阶段(I/II期),用于治

疗多种肿瘤患者。临床试验的结果显示其安全性良好,但单独用药的疗效不能令人满意。其原因可能与重组可溶性TRAIL的体内半衰期短、所用治疗性抗体的亲和力小、TRAILR1或TRAILR2介导的信号途径复杂以及未使用有效的分子标记对患者进行选择有关。因此,目前针对TRAILR1或TRAILR2为靶点的肿瘤治疗药物研发以提高TRAILR1或TRAILR2激动剂稳定性和生物学活性为目标,包括与化药、靶向药、抗体药和小分子抑制剂等联合用药,以及应用纳米载体等技术等,并已取得了一定进展。

[0006] 因此,国际上有些药物研发公司和实验室正在采用联合用药的方案进行多种肿瘤治疗的临床试验研究,已获得了良好效果。但是,联合用药的成本高,特别是与化药物联用时,没有根本解决化药毒性大的问题,病人依从性差,对病人的毒副作用仍然很大。

发明内容

[0007] 针对上述缺点,本发明创造性地采用制备抗体-毒素-偶联物(ADC)的策略,使ADC既保留了抗体的高度肿瘤特异性,又利用连接子将抗体与小分子毒素偶联形成一个偶联复合物,当ADC特异性地与肿瘤细胞表面的特异抗原结合后,可将小分子毒素带入肿瘤细胞内的溶酶体,经溶酶体内的蛋白酶水解作用再将毒素释放出来,从而特异性地杀死肿瘤细胞,极大地提高疗效,同时降低了小分子毒素的毒副作用,大大地提高了安全性,因此而备受青睐。

[0008] 在本发明的第一方面,提供了一种抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗体药物偶联物含有:

[0009] (a) 抗体部分;和

[0010] (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合;

[0011] 其中,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0012] (H1) SEQ ID NO.:1所示的CDRH1,

[0013] (H2) SEQ ID NO.:2所示的CDRH2,和

[0014] (H3) SEQ ID NO.:3所示的CDRH3;

[0015] 其中,上述重链可变区氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留TRAILR2结合亲和力的衍生序列;和/或

[0016] 所述抗体的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

[0017] (L1) SEQ ID NO.:4所示的CDRL1,

[0018] (L2) SEQ ID NO.:5所示的CDRL2,和

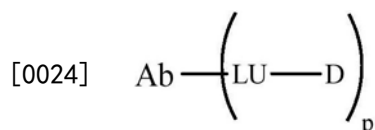
[0019] (L3) SEQ ID NO.:6所示的CDRL3;

[0020] 其中,上述轻链可变区氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TRAILR2结合亲和力的衍生序列。

[0021] 在另一优选例中,所述的抗体包括完整抗体或其活性片段。

[0022] 在另一优选例中,所述的活性片段保留了结合于TRAILR2的结合活性。

[0023] 在另一优选例中,所述抗体药物偶联物ADC如下分子式所示:



[0025] 其中：

[0026] Ab为抗TRAILR2的抗体，

[0027] LU为无或连接所述抗体和所述药物的接头；

[0028] D为药物；

[0029] p为偶联于所述抗体的所述药物的数量；p是选自1-10，较佳地1-8的值，更佳地2-4的值；

[0030] “—”为键或接头。

[0031] 在另一优选例中，所述的药物D为毒素。

[0032] 在另一优选例中，所述的毒素为小分子毒素。

[0033] 在另一优选例中，所述的LU为化学连接头。

[0034] 在另一优选例中，所述接头是可被组织蛋白酶切割的连接头。

[0035] 在另一优选例中，所述接头是不可被组织蛋白酶切割的连接头。

[0036] 在另一优选例中，所述LU选自下组：MAL-EBE-MAL、Py-BEA、Py-MAA-EBE-MAL、Py-MAA-EBE-SPDP或其组合；其中：

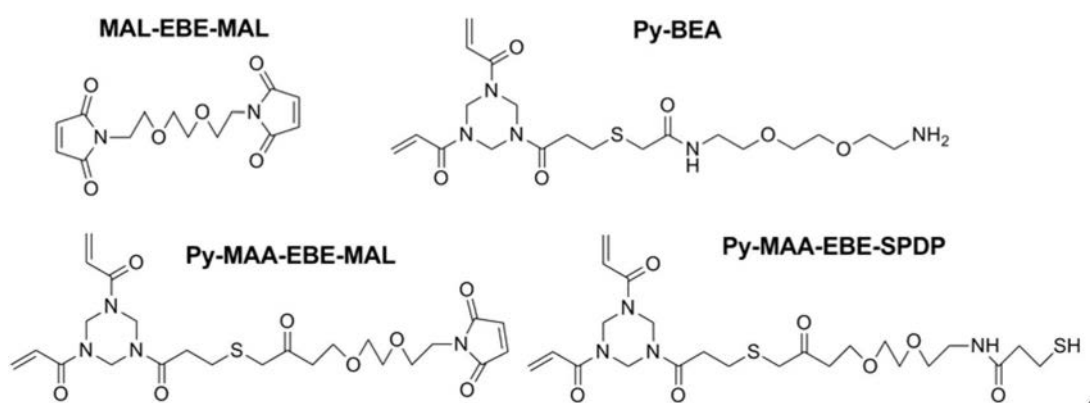
[0037] MAL-EBE-MAL为1,1'-((ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(1H-pyrrole-2,5-dione)；

[0038] Py-BEA为N-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl)-2-((3-(3,5-diacryloyl-1,3,5-triazinan-1-yl)-3-oxopropyl)thio)acetamide；

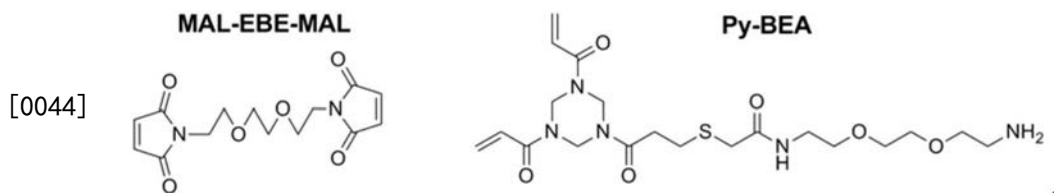
[0039] Py-MAA-EBE-MAL为1-(2-(2-(4-((3-(3,5-diacryloyl-1,3,5-triazinan-1-yl)-3-oxopropyl)thio)-3-oxobutoxy)ethoxy)ethyl)-1H-pyrrole-2,5-dione；

[0040] Py-MAA-EBE-SPDP为N-(2-(2-(4-((3-(3,5-diacryloyl-1,3,5-triazinan-1-yl)-3-oxopropyl)thio)-3-oxobutoxy)ethoxy)ethyl)-3-mercaptopropanamide；

[0041] 其分子结构式如下：



[0043] 在另一优选例中，所述LU选自下组：MAL-EBE-MAL、Py-BEA，其分子结构式如下：



[0045] 在另一优选例中,所述的药物D(如DM1、DM4或Duomycin7)通过接头LU与抗体(如Zaptuzumab)的连接方式选自下组:桥接偶联、常规偶联。

[0046] 在另一优选例中,所述的桥接偶联为巯基桥接偶联(例如二硫键桥连)。

[0047] 在另一优选例中,所述的常规偶联为巯基常规偶联。

[0048] 在另一优选例中,所述接头LU以可被蛋白酶裂解的方式与所述药物D连接。

[0049] 在另一优选例中,所述接头LU以不可裂解的方式与所述药物D连接。

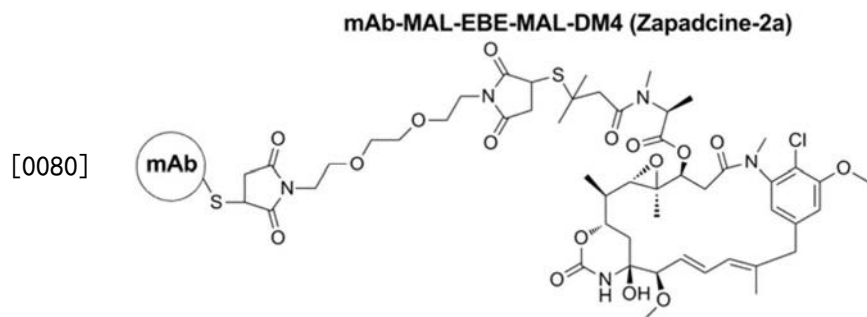
[0050] 在另一优选例中,所述D选自下组:化疗剂、放射性物质、毒素、能够将前药转化成其活性形式的抗癌前药的活化酶、或其组合。

[0051] 在另一优选例中,所述药物D选自下组:Maytansinoid DM 1 (DM1), MaytansinoidDM 4 (DM4), Duomycin7类衍生物或其组合:

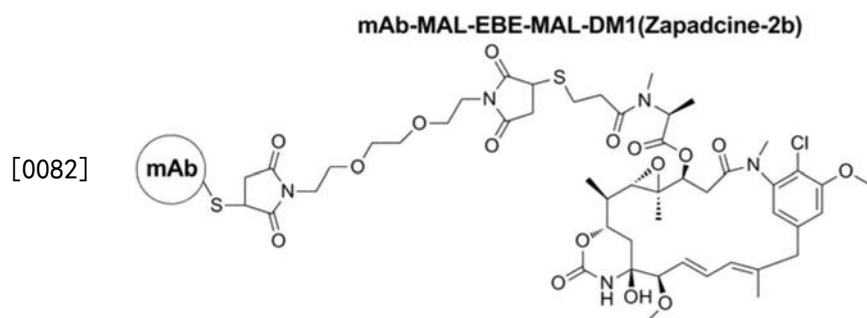
	D1 Maytansinoid DM 1 (DM1)	
[0052]	D2 Maytansinoid DM 4 (DM4)	
	D3 Duomycin7	

[0053] 在另一优选例中,所述的与D相连的氨基酸残基是原本存在于抗体(亲本抗体)或外源引入的。

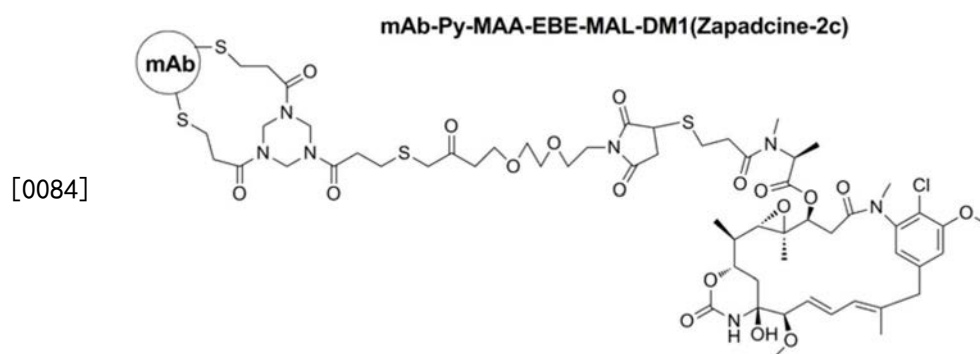
- [0054] 在另一优选例中,所述的与D相连的氨基酸残基为半胱氨酸氨基酸。
- [0055] 在另一优选例中,所述半胱氨酸氨基酸是在亲本抗体中在依照Kabat编号规则的轻链的一个或多个位置处和/或在依照Kabat编号规则的重链的一个或多个位置处和在依照EU编号规则的重链的一个或多个位置处所引入的一个或多个游离半胱氨酸氨基酸。
- [0056] 在另一优选例中,所述的与D相连的氨基酸残基为赖氨酸。
- [0057] 在另一优选例中,所述活性片段选自下组:Fab、F(ab')₂、Fv或scFv片段。
- [0058] 在另一优选例中,所述的抗体是单克隆抗体(mAb)。
- [0059] 在另一优选例中,所述抗体为抗TRAILR2人源化单克隆抗体。
- [0060] 在另一优选例中,所述的抗体包括:双链抗体、单链抗体。
- [0061] 在另一优选例中,所述抗体是重组的。
- [0062] 在另一优选例中,所述抗体是在细菌(如大肠杆菌)中生成的。
- [0063] 在另一优选例中,所述抗体是在真核细胞(如CHO细胞)中生成的。
- [0064] 在另一优选例中,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、或其组合。
- [0065] 在另一优选例中,所述抗体为人源化抗体或全人抗体。
- [0066] 在另一优选例中,所述抗体为抗肿瘤的特异性抗体。
- [0067] 在另一优选例中,所述抗体为在肿瘤细胞上特异性表达的受体TRAILR1或TRAILR2的抗体。
- [0068] 在另一优选例中,所述抗体选自下组:抗人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的受体1(TRAILR1)、或抗人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的受体2(TRAILR2)的抗体、或其组合。
- [0069] 在另一优选例中,所述抗体为抗人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的受体2(TRAILR2)的人源化单克隆抗体。
- [0070] 在另一优选例中,所述抗人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的受体2(TRAILR2)的人源化单克隆抗体为Zapadczumab。
- [0071] 在另一优选例中,所述抗体对人TRAILR2蛋白的亲活力的EC₅₀为0.1-10nM,较佳地为0.1-1.0nM,更佳地为0.1-0.5nM。
- [0072] 在另一优选例中,所述抗体不结合于野生型鼠的TRAILR2蛋白。
- [0073] 在另一优选例中,所述抗体具有选自下组的一个或多个特性:
- [0074] (a) 与TRAILR2特定的抗原决定簇结合;
- [0075] (b) 与细胞表面TRAILR2结合形成的抗原抗体复合物可被内吞至溶酶体;
- [0076] (c) 抑制肿瘤形成与生长;
- [0077] (d) 抑制肿瘤细胞迁移或转移。
- [0078] 在另一优选例中,所述抗体-药物偶联物(ADC)选自下组:Zapadcine-2a、Zapadcine-2b、Zapadcine-2c、Zapadcine-2d、Zapadcine-2e;其中,
- [0079] 偶联物Zapadcine-2a的结构如下:



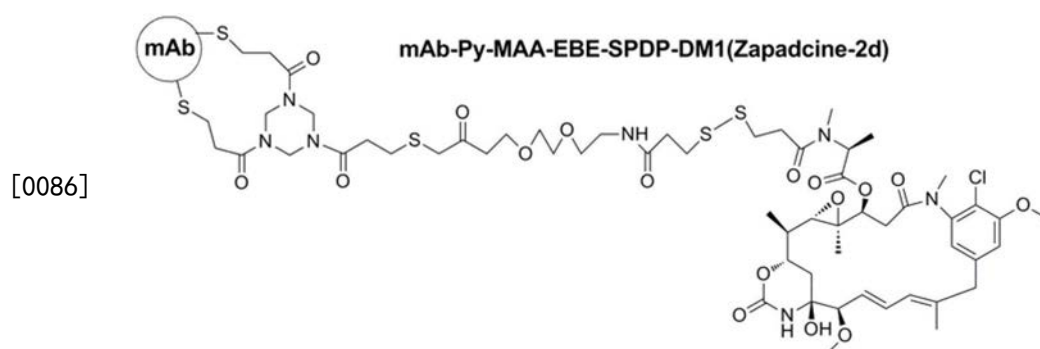
[0081] 偶联物Zapadcine-2b的结构如下：



[0083] 偶联物Zapadcine-2c的结构如下：

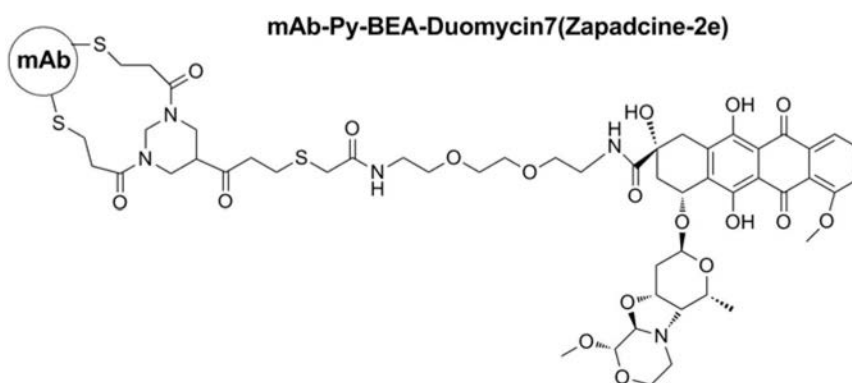


[0085] 偶联物Zapadcine-2d的结构如下：



[0087] 偶联物Zapadcine-2e的结构如下：

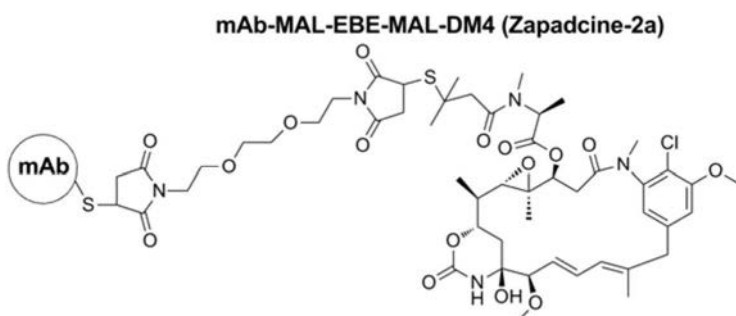
[0088]



[0089] 在另一优选例中,所述抗体-药物偶联物(ADC)选自下组:Zapadcine-2a、Zapadcine-2e;其中,

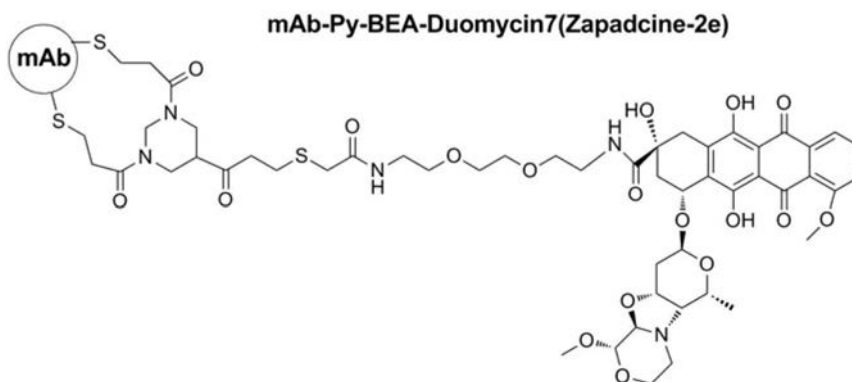
[0090] 偶联物Zapadcine-2a的结构如下:

[0091]



[0092] 偶联物Zapadcine-2e的结构如下:

[0093]



[0094] 在另一优选例中,所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.7所示;和/或,所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示;

[0095] 其中,上述重链可变区的氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并与SEQ ID No.7所示的氨基酸序列具有至少80%同源性或序列相同性的衍生序列;

[0096] 其中,上述轻链可变区的氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并与SEQ ID No.8所示的氨基酸序列具有至少80%同源性或序列相同性的衍生序列。

[0097] 在本发明的第二方面,提供了一种本发明的第一方面所述的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物的应用,所述抗体-药物偶联物用于(i)制备诊断试剂;和/或(ii)制备预防和/或治疗TRAILR2相关的疾病的药物。

[0098] 在另一优选例中,所述TRAILR2相关的疾病选自下组:肿瘤(例如TRAILR2阳性表达

的肿瘤)的发生、生长和/或转移。

[0099] 在另一优选例中,所述TRAILR2阳性表达的肿瘤为TRAILR2阳性表达的癌症。

[0100] 在另一优选例中,所述癌症选自T淋巴细胞白血病、B淋巴细胞白血病、非T非B淋巴细胞白血病、非小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈部鳞状细胞癌、食管鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、宫颈部鳞状细胞癌、胰腺鳞状细胞癌、结肠鳞状细胞癌、胃鳞状细胞癌、前列腺癌、骨肉瘤或软组织肉瘤。

[0101] 在另一优选例中,所述的TRAILR2阳性表达是指肿瘤组织和/或细胞中TRAILR2转录本和/或蛋白的水平L1与正常组织和/或细胞中转录本和/或蛋白的水平L0之比, $L1/L0 \geq 2$, 较佳地 ≥ 3 。

[0102] 在本发明的第三方面,提供了一种药物组合物,它含有:

[0103] (i) 活性成分,所述活性成分为如本发明的第一方面所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物或其组合;以及

[0104] (ii) 药学上可接受的载体。

[0105] 在另一优选例中,所述的药物组合物为人用单位剂量形式。

[0106] 在另一优选例中,所述药物组合物为液态制剂。

[0107] 在另一优选例中,所述药物组合物中,所述抗体药物偶联物的含量为0.005-50wt%, 较佳地0.05-10wt%。

[0108] 在另一优选例中,所述的药物还包括(iii)额外的治疗剂。

[0109] 在另一优选例中,所述的额外治疗剂包括化疗剂。

[0110] 在本发明的第四方面,提供了一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,包括步骤:将所述肿瘤细胞与本发明的第一方面所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物接触。

[0111] 在另一优选例中,所述的接触是在体外培养体系中进行。

[0112] 在本发明的第五方面,提供了一种预防和/或治疗肿瘤的方法,包括步骤:给需要的对象施用本发明的第一方面所述的抗体-药物偶联物或本发明的第三方面所述的药物组合物。

[0113] 在另一优选例中,所述对象为哺乳动物,包括人。

[0114] 在本发明的第六方面,提供了一种减缓治疗对象中肿瘤生长的方法,包括步骤:联用有效量的本发明的第一方面所述的抗体药物偶联物与一种或多种选自下组的治疗:辐射治疗、化疗剂治疗、生物治疗、或其组合。

[0115] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0116] 图1为本发明的化学连接头的分子结构式。

[0117] 图2为本发明的抗TRAILR2抗体-毒素-偶联物的分子结构式。

[0118] 图3为本发明的化学毒素的分子结构式。

[0119] 图4为本发明的Zapadcin-2a与TRAILR2重组蛋白(抗原)的亲合力。

[0120] 图5为本发明的Zapadcine-2a单次给药正常小鼠的最大耐受剂量。

具体实施方式

[0121] 本发明人通过广泛而深入的研究,设计了靶向TRAILR2的抗体药物偶联物,所述抗体-药物偶联物具有显著的抗肿瘤效果。本发明还提供了所述抗TRAILR2抗体-药物偶联物的制药用途,及其在抑制或预防肿瘤中的作用。

[0122] 本发明涉及的抗TRAILR2 (TRAILR2或CD262) 的人源化单克隆抗体,与国内外已经进入人体临床试验的、针对TRAILR2靶点的其他抗体相比,具有独特的基因序列、抗原决定簇以及很强的抗原亲和力,在体内外均能特异性地杀死多种TRAILR2阳性的肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长,但对正常细胞和组织几乎没有毒性,安全性良好。

[0123] 在本发明的一个优选的实施方式中,采用的是抗TRAILR2人源化单克隆抗体(Zaptuzumab),采用二硫键桥连偶联技术,将Zaptuzumab通过不同的化学连接子与小分子毒素偶联,获得了多种化学结构不同的ADC,经过体内和体外抗肿瘤活性的反复筛选,获得了一个成药性优良的ADC候选药物(命名为Zapadcine-2),将可用于TRAILR2阳性的多种肿瘤的治疗。

[0124] 术语

[0125] 本发明核心术语的解释

[0126]

ADC	antibody-drug-conjugate	抗体-毒素-偶联物
	linker	连接子
MC	Maleimidocaproyl	马来酰亚胺己酰基
VC	Valine-Citrulline	缬氨酸-瓜氨酸
MMAD	monomethylauristatin D	单甲基阿里他汀D
MMAE	monomethylauristatin E	单甲基阿里他汀E
MMAF	monomethylauristatin F	单甲基阿里他汀F
DM1	Maytansinoid DM1	美登素
DM4	Maytansinoid DM4	美登素
	calicheamicin	卡奇霉素
	duocarmycin	倍癌霉素
	Duomycin7	金霉素
TNFSF	tumor necrosis factor superfamily	肿瘤坏死因子超家族
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子

[0127]

TNFR	tumor necrosis factor receptor	肿瘤坏死因子受体
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand	肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体
TRAILR	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor	肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的受体
DR	death receptor	死亡受体
DD	death domain	死亡结构域
DcR	decoy receptor	诱骗受体
	caspases	天冬氨酸蛋白酶
	epitope	抗原决定簇
SPF	specific pathogen free	无特定病原体
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	外周单个核细胞
	surviving rate	存活率
PBS	phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
NOD-SCID	no obese diabetic/severe combined immunodeficiency	非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷
	vincristin	新长春碱
	paclitaxel	紫杉醇
	epirubicin-HCl	表柔比星
Q3D	every three days	每隔两天一次
QW (Q7D)	once a week	一周一次
i.v.	intravenous(ly)	静脉
ANOVA	analysis of variance	方差分析
RT	room temperature	室温
BW	body weight	体重
TV	tumor volume	肿瘤体积
TW	tumor weight	肿瘤重量
TGI	tumor growth inhibition	肿瘤生长抑制率
FFPE	formalin fixed paraffin embedded	福尔马林固定石蜡包埋
N/A	not available or not applicable	不可用或不适用
SD	standard deviation	标准差
SEM	standard error of mean	平均数标准误
IC50	half maximal inhibitory concentration	被测量的药物的半抑制浓度
Eff.	Efficacy	效价
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
	vehicle	阴性对照

[0128] 如本文所用,术语“抗体药物偶联物”、“抗体偶联物”、“抗体药物偶联物”、“抗体-药物偶联物”“免疫偶联物”可互换使用,指 (a) 抗体或其活性片段与 (b) 药物形成的偶联物。

[0129] 如本文所用,术语“本发明的抗体药物偶联物”、“本发明的抗体与药物偶联物”或“本发明的ADC”可互换使用,指具有针对TRAILR2的本发明抗体或其活性片段与药物形成的偶联物。

[0130] 除非另外定义,否则本文中所用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。如本文所用,在提到具体列举的数值中使用时,术语

“约”意指该值可以从列举的值变动不多于1%。例如,表述“约100”包括99和101和之间的全部值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0131] 抗体

[0132] 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0133] 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ.No.91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0134] 脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为 κ 和 λ)中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有5类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

[0135] 一般,抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述,称为可变区域(CDR),将该段间隔成4个框架区域(FR),4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构,通过其间的FR形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近,重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

[0136] 本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段(如抗原结合片段)或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0137] 在本发明中,抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体,例如嵌合的和人源化的单克隆抗体,包括人的和非人的部分,可以通过标准的DNA重组技术获得,它们都是有用的抗体。嵌合抗体是一个分子,其中不同的部分来自不同的动物种,例如具有来自鼠的单克隆抗体的可变区,和来自人免疫球蛋白的恒定区的嵌合抗体(见例如美国专利4,816,567和美国专利4,816,397,在此通过引用方式整体引入本文)。人源化的抗体是指来源于非人物种的抗体分子,具有一个或多个来源

于非人物种的互补决定区 (CDRs) 和来源于人免疫球蛋白分子的框架区域 (见美国专利5, 585, 089, 在此通过引用方式整体引入本文)。这些嵌合和人源化的单克隆抗体可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

[0138] 在本发明中, 抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

[0139] 在本发明中, 本发明的抗体还包括其保守性变异体, 指与本发明抗体的氨基酸序列相比, 有至多10个, 较佳地至多8个, 更佳地至多5个, 最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0140] 表A

[0141]	最初的残基	代表性的取代	优选的取代
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
	Asp (D)	Glu	Glu
	Cys (C)	Ser	Ser
	Gln (Q)	Asn	Asn
	Glu (E)	Asp	Asp
	Gly (G)	Pro; Ala	Ala
[0142]	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
	Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0143] 本发明的抗TRAILR2的抗体

[0144] 本发明提供一种针对TRAILR2的高特异性和高亲和力的抗体, 其包括重链和轻链, 所述重链含有重链可变区 (VH) 氨基酸序列, 所述轻链含有轻链可变区 (VL) 氨基酸序列。

[0145] 优选地, 重链可变区 (VH) 氨基酸序列和轻链可变区 (VL) 氨基酸序列的各自CDR选自下组:

- [0146] a1) SEQ ID No.1:CDRH1,DFSMN;
- [0147] a2) SEQ ID No.2:CDRH2,WINTETGEPTYADDFKG;
- [0148] a3) SEQ ID No.3:CDRH3,IDY;
- [0149] a4) SEQ ID No.4:CDRL1,RSSQSLVHSNGNTYLH;
- [0150] a5) SEQ ID No.5:CDRL2,KVSNRFS;
- [0151] a6) SEQ ID No.6:CDRL3,FQSTHPHT;
- [0152] a7) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列。
- [0153] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%,较佳地至少85%,更佳地至少为90%,最佳地至少95%的氨基酸序列。
- [0154] 优选地,所述的抗体具有激活TRAILR2相关信号通路的活性;具有促进细胞凋亡的活性;具有抑制细胞增殖的活性;具有促进细胞自噬的活性、或其组合。
- [0155] 典型地,本发明提供了一种抗TRAILR2的抗体,所述抗体具有:本发明的重链可变区;和/或本发明的轻链可变区;
- [0156] 其中,所述抗体的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:
- [0157] SEQ ID NO.:1所示的CDRH1,
- [0158] SEQ ID NO.:2所示的CDRH2,和
- [0159] SEQ ID NO.:3所示的CDRH3;
- [0160] 其中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并能够保留TRAILR2结合亲和力的衍生序列;
- [0161] 所述抗体的轻链可变区包括以下三个的互补决定区CDR:
- [0162] SEQ ID NO.:4所示的CDRL1,
- [0163] SEQ ID NO.:5所示的CDRL2,和
- [0164] SEQ ID NO.:6所示的CDRL3;
- [0165] 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TRAILR2结合亲和力的衍生序列。
- [0166] 较佳地,所述抗体的重链可变区序列为SEQ ID NO.:7;和/或所述的抗体的轻链可变区序列为SEQ ID NO.:8。
- [0167] 本发明中,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体或其组合。
- [0168] 在另一优选例中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%。
- [0169] 在另一优选例中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为1-7个。
- [0170] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代的至少一个氨基酸序列为同源性为至少80%的氨基酸序列。
- [0171] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代的至少一个氨基酸具有激活TRAILR2相关信号通路的活性;具有促进细胞凋亡、抑制细胞增殖、促进细胞自噬的活性中的任意一种或几种。

[0172] 本发明所述抗体可以是双链或单链抗体,并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体(如人-鼠嵌合抗体),更优选为全人抗体。

[0173] 本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段,如:Fab、Fab'、(Fab')₂或该领域内其他已知的抗体衍生物等,以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

[0174] 其中,所述动物优选为哺乳动物,如鼠。

[0175] 本发明抗体可以是靶向人TRAILR2的嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

[0176] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID No.:1-SEQ ID No.:3中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TRAILR2结合亲和力的序列,位于重链可变区(VH)的CDR区。

[0177] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID No.:4-SEQ ID No.:6中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TRAILR2结合亲和力的序列,位于轻链可变区(VL)的CDR区。

[0178] 在本发明的一种更优选实施例中,VH CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID No.:1-SEQ ID No.:3中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TRAILR2结合亲和力的序列;VL CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID No.:4-SEQ ID No.:6中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TRAILR2结合亲和力的序列。

[0179] 本发明上述内容中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0180] 本发明上述内容中,更优选地,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,可以是1-7个,更优选为1-5个,更优选为1-3个,更优选为1-2个。

[0181] 在另一优选例中,所述靶向TRAILR2的抗体为Zaptuzumab。

[0182] 在另一优选例中,所述抗体Zaptuzumab的重链可变区(VH)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:7所示的氨基酸序列。

[0183] 在另一优选例中,所述抗体Zaptuzumab的轻链可变区(V-Kappa)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:8所示的氨基酸序列。

[0184] 在另一优选例中,所述抗体重链可变区的氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并与SEQ ID No.7所示的氨基酸序列具有至少80%同源性或序列相同性的衍生序列。

[0185] 在另一优选例中,所述抗体轻链可变区的氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的,并与SEQ ID No.8所示的氨基酸序列具有至少80%同源性或序列相同性的衍生序列。

[0186] 在具体的实施方式中,所述同源性或序列相同性可以是80%以上,优选90%以上,更优选95%-98%,最优选99%以上。

[0187] 本领域普通技术人员公知的测定序列同源性或相同性的方法包括但不限于:计算

机分子生物学 (Computational Molecular Biology), Lesk, A.M. 编, 牛津大学出版社, 纽约, 1988; 生物计算: 信息学和基因组项目 (Biocomputing: Informatics and Genome Projects), Smith, D.W. 编, 学术出版社, 纽约, 1993; 序列数据的计算机分析 (Computer Analysis of Sequence Data), 第一部分, Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编, Humana Press, 新泽西, 1994; 分子生物学中的序列分析 (Sequence Analysis in Molecular Biology), von Heinje, G., 学术出版社, 1987 和序列分析引物 (Sequence Analysis Primer), Gribskov, M. 与 Devereux, J. 编 M Stockton Press, 纽约, 1991 和 Carillo, H. 与 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)。测定相同性的优选方法要在测试的序列之间得到最大的匹配。测定相同性的方法编译在公众可获得的计算机程序中。优选的测定两条序列之间相同性的计算机程序方法包括但不限于: GCG 程序包 (Devereux, J. 等, 1984)、BLASTP、BLASTN 和 FASTA (Altschul, S. F. 等, 1990)。公众可从 NCBI 和其它来源得到 BLASTX 程序 (BLAST 手册, Altschul, S. 等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S. 等, 1990)。熟知的 Smith Waterman 算法也可用于测定相同性。

[0188] 抗体的制备

[0189] 本发明抗体或其片段的 DNA 分子的序列可以用常规技术, 比如利用 PCR 扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外, 还可将轻链和重链的编码序列融合在一起, 形成单链抗体。

[0190] 一旦获得了有关的序列, 就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体, 再转入细胞, 然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0191] 此外, 还可用人工合成的方法来合成有关序列, 尤其是片段长度较短时。通常, 通过先合成多个小片段, 然后再进行连接可获得序列很长的片段。

[0192] 目前, 已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本发明的抗体 (或其片段, 或其衍生物) 的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子 (或如载体) 和细胞中。此外, 还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

[0193] 本发明还涉及包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞, 以使其能够表达蛋白质。

[0194] 宿主细胞可以是原核细胞, 如细菌细胞; 或是低等真核细胞, 如酵母细胞; 或是高等真核细胞, 如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括 (但并不限于): CHO-S、HEK-293 细胞。

[0195] 通常, 在适合本发明抗体表达的条件下, 培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤, 如蛋白 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

[0196] 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如, 单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验 (如放射性免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA)) 来测定。单克隆抗体的结合亲和力例如可用 Munson 等, Anal. Biochem., 107:220 (1980) 的 Scatchard 分析来测定。

[0197] 本发明的抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要, 可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于: 常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理 (盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析 (凝胶过滤)、吸附层析、离

子交换层析、高效液相层析 (HPLC) 和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0198] 细胞毒剂

[0199] 可用于构成本发明ADC的药物包括但不限于：细胞毒剂。

[0200] 术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞表达活性、细胞功能和/或造成细胞破坏的物质。该术语包括放射性同位素、化学治疗剂以及毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或变体。细胞毒剂的例子包括但不限于：耳他汀类（例如，耳他汀E、耳他汀F、MMAE和MMAF）、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙 (tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素 (PE) A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、 α -八叠球菌、白树毒素、迈托毒素 (mitogellin)、局限曲菌素 (retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白 (curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草 (Sapaonaria officinalis) 抑制剂以及糖皮质激素和其它化学治疗剂，以及放射性同位素，如At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212或213、P32和包括Lu177在内的Lu的放射性同位素。抗体也可与能够将前药转化成其活性形式的抗癌前药活化酶偶联。

[0201] 优选的小分子药物为具有高细胞毒性的化合物，优选单甲基溴瑞他汀 (monomethylauristatin)、加利车霉素、美登素类、或其组合；更佳地选自：单甲基阿里他汀-E (MMAE)、单甲基阿里他汀-D (MMAD)、单甲基阿里他汀-F (MMAF)、或其组合。

[0202] 抗体-药物偶联物 (ADC)

[0203] 本发明还提供了基于本发明抗体的抗体偶联药物 (antibody-drug conjugate, ADC)。

[0204] 典型地，所述抗体偶联药物包括所述抗体、以及效应分子，所述抗体与所述效应分子偶联，并优选为化学偶联。其中，所述效应分子优选为具有治疗活性的药物。此外，所述效应分子可以是毒蛋白、化疗药物、小分子药物或放射性核素中的一种或多种。

[0205] 本发明抗体与所述效应分子之间可以通过偶联剂进行偶联。所述偶联剂的例子可以是非选择性偶联剂、利用羧基的偶联剂、肽链、利用二硫键的偶联剂中的任意一种或几种。所述非选择性偶联剂是指使效应分子和抗体形成共价键连接的化合物，如戊二醛等。所述利用羧基的偶联剂可以是顺乌头酸酐类偶联剂（如顺乌头酸酐）、酰基脲类偶联剂（偶联位点为酰基脲）中的任意一种或几种。

[0206] 抗体上某些残基（如Cys或Lys等）用于与多种功能基团相连，其中包括成像试剂（例如发色基团和荧光基团），诊断试剂（例如MRI对比剂和放射性同位素），稳定剂（例如乙二醇聚合物）和治疗剂。抗体可以被偶联到功能剂以形成抗体-功能剂的偶联物。功能剂（例如药物，检测试剂，稳定剂）被偶联（共价连接）至抗体上。功能剂可以直接地、或者通过接头间接地连接于抗体。

[0207] 典型的适用于本发明的偶联方式，包括K-Lock和C-Lock两种偶联方式。在K-Lock偶联方式中，药物分子偶联于抗体序列中赖氨酸 (K) 残基，在C-Lock偶联方式中，药物分子偶联于抗体序列中的半胱氨酸 (C) 残基。

[0208] 抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物 (ADCs)。典型地，ADC包含位于药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细

胞内环境下容易降解,例如在目标位点处接头发生降解,从而使药物从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括,例如酶降解的接头,其中包括可以被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或者内体蛋白酶)降解的含有肽基的接头,或者糖接头例如,可以被葡萄糖苷酸酶降解的含葡萄糖苷酸的接头。肽基接头可以包括,例如二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸,苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括,例如,pH敏感接头(例如pH小于5.5时水解的接头,例如脲接头)和在还原条件下会降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

[0209] 连接到抗体之前,接头具有能够和某些氨基酸残基反应的活性反应基团,连接通过活性反应基团实现。巯基特异性的活性反应基团是优选的,并包括:例如马来酰亚胺类化合物,卤代酰胺(例如碘、溴或氯代的);卤代酯(例如碘、溴或氯代的);卤代甲基酮(例如碘、溴或氯代),苄基卤代物(例如碘、溴或氯代的);乙烯基砷,吡啶基二硫化物;汞衍生物例如3,6-二-(汞甲基)二氧六环,而对离子是醋酸根、氯离子或者硝酸根;和聚亚甲基二甲基硫醚硫代磺酸盐。接头可以包括,例如,通过硫代丁二酰亚胺连接到抗体上的马来酰亚胺。

[0210] 药物可以是任何细胞毒性,抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中,接头连接抗体和药物,而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如,药物可以具有可以和连接物成键的氨基,羧基,巯基,羟基,或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下,药物在连接到抗体之前,具有反应的活性基团。

[0211] 特别有用的药物类别包括,例如,抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。特别有用的细胞毒性药物类的例子包括,例如,DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs),吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑啉并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))和长春花生物碱(vinca alkaloids)。

[0212] 在本发明中,药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成ADC。在其它实施方式中,双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成ADC。例如,半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应,并且在随后的步骤中,接头上的功能性基团与药物反应,从而形成ADC。

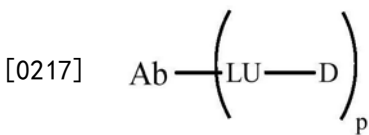
[0213] 通常,选择接头上功能性基团,以利于特异性地与药物部分上的合适的反应活性基团进行反应。作为非限制性的例子,基于叠氮化合物的部分可以用于特异性地与药物部分上的反应性炔基基团反应。药物通过叠氮和炔基之间的1,3-偶极环加成,从而共价结合于接头。其它的有用的功能性基团包括,例如酮类和醛类(适合与酰肼类和烷氧基胺反应),膦(适合与叠氮反应);异氰酸酯和异硫氰酸酯(适合与胺类和醇类反应);和活化的酯类,例如N-羟基琥珀酰亚胺酯(适合与胺类和醇类反应)。这些和其它的连接策略,例如在《生物偶联技术》,第二版(Elsevier)中所描述的,是本领域技术人员所熟知的。本领域技术人员能够理解,对于药物部分和接头的选择性反应,当选择了一个互补对的反应活性功能基团时,

该互补对的每一个成员既可以用于接头,也可以用于药物。

[0214] 本发明还提供了制备ADC的方法,可进一步地包括:将抗体与药物-接头化合物,在足以形成抗体偶联物(ADC)的条件下进行结合。

[0215] 在某些实施方式中,本发明方法包括:在足以形成抗体-接头偶联物的条件下,将抗体与双功能接头化合物进行结合。在这些实施方式中,本发明方法还进一步地包括:在足以将药物部分通过接头共价连接到抗体的条件下,将抗体接头偶联物与药物部分进行结合。

[0216] 在一些实施方式中,抗体药物偶联物ADC如下分子式所示:



[0218] 其中:

[0219] Ab为抗TRAILR2的抗体,

[0220] LU为无或连接所述抗体和所述药物的接头;

[0221] D为药物;

[0222] p为偶联于所述抗体的所述药物的数量;p是选自1-10,较佳地1-8的值,更佳地2-4的值;

[0223] “—”为键或接头。

[0224] 典型地,本发明的5种ADC的药物部分(例如毒素)、连接头、连接方式以及裂解方式如下表1:

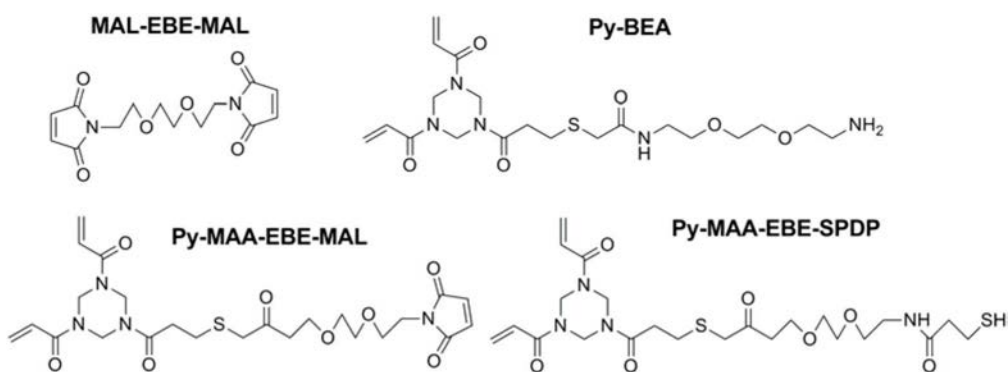
[0225] 表1

[0226]

名称	Zapadcine-2a	Zapadcine-2b	Zapadcine-2c	Zapadcine-2d	Zapadcine-2e
毒素	DM4	DM1	DM1	DM1	Duomycin7
连接头	Mal-EBE-MAL	Mal-EBE-MAL	PY-MAA-EBE-MAL	PY-MAA-EBE-SPDP	PY-BEA
连接方式	巯基常规偶联	巯基常规偶联	巯基桥接偶联	巯基桥接偶联	巯基桥接偶联
裂解方式	不可裂解	不可裂解	不可裂解	可裂解	不可裂解

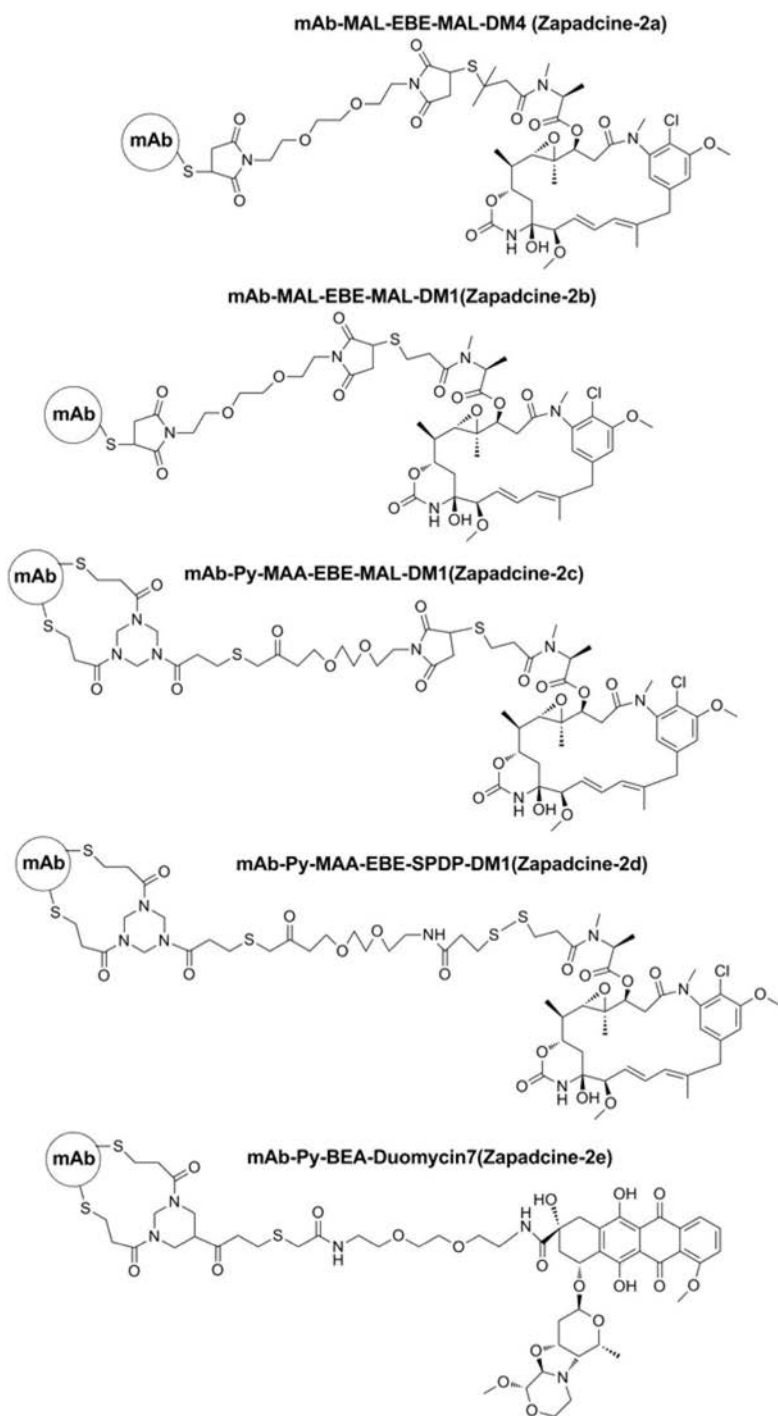
[0227] 典型地,本发明ADC中的接头结构如下(图1):

[0228]

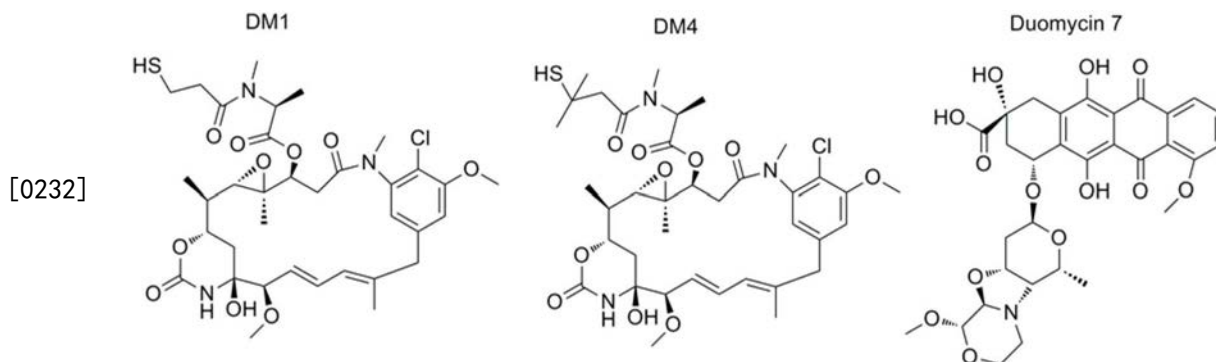


[0229] 典型地,本发明的5种ADC结构式如下(图2):

[0230]



[0231] 典型地,本发明的药物的结构式如下(图3):



[0233] 应用

[0234] 本发明还提供了本发明抗体的用途,例如用于制备诊断制剂、或制备用于预防和/或治疗TRAILR2相关的疾病的药物。所述TRAILR2相关的疾病包括肿瘤发生、生长和/或转移、血栓类相关疾病、炎症、代谢相关疾病等。

[0235] 本发明抗体、ADC或CAR-T等的用途,包括(但不限于):

[0236] (i) 诊断、预防和/或治疗肿瘤发生、生长和/或转移,尤其是TRAILR2阳性表达的实体肿瘤。所述肿瘤包括(但不限于):非小细胞肺癌、肝癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈部鳞状细胞癌、食管鳞状细胞癌、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、宫颈部鳞状细胞癌、胰腺鳞状细胞癌、结肠鳞状细胞癌、胃鳞状细胞癌、前列腺癌、骨肉瘤或软组织肉瘤,更优选为非小细胞肺癌、肝癌、卵巢癌和胰腺癌等。

[0237] (ii) 诊断、预防和/或治疗血液系统的肿瘤。所述肿瘤包括(但不限于):淋巴细胞白血病、粒细胞白血病、非T非B淋巴细胞白血病、滤泡型淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、弥漫大B细胞淋巴瘤、非何杰金氏病、外周T细胞淋巴瘤、血管免疫母T细胞性淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤等。更优选为急性T淋巴细胞白血病、B淋巴细胞白血病、非T非B淋巴细胞白血病。

[0238] 典型地,本发明涉及通式Ab-(LU-D)p所示的Zapadcine-2(Zapadcine-2a、Zapadcine-2b、Zapadcine-2c、Zapadcine-2d、Zapadcine-2e、或其组合)或其药学上可接受的盐、溶剂合物、立体异构体、互变异构体、前药以及它们的混合物为有效成分在制备预防和/或治疗癌症的药物中的应用。

[0239] 药物组合物

[0240] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0241] 本发明的药物组合物可直接用于结合TRAILR2蛋白分子,因而可用于预防和治疗肿瘤等疾病。此外,还可同时使用其他治疗剂,例如,各种细胞因子,如TNF、IFN、IL-2等;各种肿瘤化疗药物,如5-FU、氨甲喋呤等影响核酸生物合成的药物;氮芥、环磷酰胺等烷化剂类药物;阿霉素、放线菌素D等干扰转录过程阻止RNA合成的药物;长春新碱、喜树碱类。靶向

药、抗体药、抑制剂,例如,抗PD-1或PD-L1的抗体、抗Fas抗体,以及Bcl-2抑制剂等。

[0242] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0243] 使用药物组合物时,是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0244] 典型地,本发明提供一种药物组合物,其包含治疗有效量的通式Ab-(LU-D)_p所示的Zapadcine-2(Zapadcine-2a、Zapadcine-2b、Zapadcine-2c、Zapadcine-2d、Zapadcine-2e、或其组合)或其药学上可接受的盐、溶剂合物、立体异构体、互变异构体、前药和药学上可接受的载体。

[0245] 在某些实施方式中,本发明药物组合物使用通式mAb-(LU-D)_p所示的Zapadcine-2(Zapadcine-2a、Zapadcine-2b、Zapadcine-2c、Zapadcine-2d或Zapadcine-2e)或其药学上可接受的盐、酯、溶剂合物、立体异构体、互变异构体、前药作为活性成分,单独或组合使用或与其它药物、辅料等配制成各种剂型,包括但不限于片剂、散剂、丸剂、注射剂、胶囊剂、膜剂、栓剂、膏剂、冲剂等多种形式。

[0246] 本发明的主要优点包括:

[0247] (1) 本发明的ADC为全新、广谱、高效、特异的抗肿瘤的抗TRAILR2抗体-毒素-偶联物(ADC),用于TRAILR2阳性的肿瘤治疗,并可根治肿瘤,特别是可用于治疗淋巴细胞白血病、肝癌、肺癌、胰腺癌和卵巢癌等。

[0248] (2) 本发明的ADC的治疗剂量低,大大提高了药物安全性。

[0249] 下面结合具体实施例,进一步详陈本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如美国Sambrook.J等著《分子克隆实验室指南》(黄培堂等译,北京:科学出版社,2002年)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件(例如商品说明书)。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

[0250] 在下文中,将参照附图,结合举例说明本发明的实施例来更加详细地描述本发明,但本发明并不局限于此。下述实施例中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述试剂和生物材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0251] 通用方法

[0252] 本发明拟解决的技术问题是如何吸取前人的临床试验经验教训,解决抗TRAILR2单克隆抗体用于肿瘤治疗的疗效问题,为此,本发明人采用制备ADC复合物的策略,通过下述一系列研究步骤,获得了本发明的ADC候选药物。即:

[0253] (1) 建立表达Zaptuzumab的CHO原始细胞库、主细胞库和生产细胞库,完成了小试工艺研究,在5升生物反应器中的表达水平达到3.5g/L。

[0254] (2) 经小鼠尾静脉注射的¹³¹I标记的Zaptuzumab,可特异性地靶向肺癌移植瘤等TRAILR2阳性的肿瘤。

[0255] (3) 采用免疫细胞化学技术,显示荧光标记的Zaptuzumab与肺癌等肿瘤细胞表面的TRAILR2受体结合后可被迅速内吞,进入溶酶体,从而证明Zaptuzumab具备制备抗体-毒素-偶联物的两个关键特点:即肿瘤特异的靶向性和可被肿瘤细胞内吞进入溶酶体并释放小分子毒素。

[0256] (4) 采用二硫键桥连偶联技术,将Zaptuzumab通过不同的化学连接子与毒素偶联,获得了多种化学结构不同的ADC。经过体内和/或体外抗肿瘤活性的反复筛选,获得了一个成药性优良的ADC候选药物(命名为Zapadcine-2),将可用于TRAILR2阳性的多种肿瘤的治疗。

[0257] 材料与方法

[0258] 实验动物

[0259] BALB/c雌鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司(上海,中国)并饲养于SPF级实验动物室,维持光-暗12小时循环交替,给以充足的食料和洁净饮水,至8周龄开始实验。所有动物实验均获得批准并按照上海市动物管理与使用委员会的指导进行。

[0260] 细胞株和试剂

[0261] 人淋巴细胞白血病、肺癌细胞、胰腺癌细胞等肿瘤细胞、正常细胞均购自ATCC或中国医学科学院基础医学研究所细胞中心或中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心或赛齐(上海)生物工程有限公司或赛百慷(上海)生物技术股份有限公司或妙通(上海)生物科技有限公司。紫杉醇、长春新碱和表柔比星等均购自Selleck。CellTiter-Glo®发光法细胞活力检测试剂盒购自Promega。

[0262] 实施例1 Zapadcine-2体外抗肿瘤活性

[0263] 采用各类TRAILR2高表达的淋巴细胞白血病细胞系(Jurkat E6-1)、肺癌细胞系(MSTO-211H、NCI-H1975)、肝癌细胞系(SMCC-7721)和胰腺癌MiaPaCa-2以及人正常细胞系或外周血细胞,如人正常外周血单核细胞(PBMC)、人正常结肠上皮细胞(NCM-460)、人正常结肠组织细胞(CCD-18Co)和人正常肺上皮细胞(BEAS-2B),评价Zapadcine-2对各类肿瘤细胞和正常细胞的细胞毒作用。具体研究过程如下:采用胰蛋白酶(0.25%,V/V)消化贴壁培养的细胞(如MSTO-211H等),使细胞剥离和/或直接收集悬浮培养的细胞(Jurkat E6-1),重悬于100μL完全培养基中。取5,000个贴壁细胞或16000个悬浮细胞接种于96孔板进行培养,37℃过夜。再加入100μL含有不同浓度的抗TRAILR2裸抗或Zapadcine-2的培养基,置培养箱中72h后,采用CellTiter-Glo®荧光素酶活性检测试剂盒(Promega,批号:0000217738)测定受试药物对体外培养的各种不同肿瘤细胞的细胞毒作用。

[0264] 细胞存活率用公式: $V_{\text{sample}}/V_{\text{vehicle control}} \times 100\%$ 计算。其中 V_{sample} 为药物处理组的读数, $V_{\text{vehicle control}}$ 为溶剂对照组的平均值。应用GraphPad Prism 5.0软件,使用非线性回归模型绘制S型剂量-存活率曲线并计算IC₅₀值。IC₅₀值是通过细胞存活率(%)对样品浓度的对数值X通过下面公式进行非线性拟合计算得到。

[0265] 表2本发明的Zapadcine-2对各类肿瘤细胞和正常细胞的细胞毒作用

[0266]

药物	Zapadcine-2a		Zapadcine-2b		Zapadcine-2c		Zapadcine-2d		Zapadcine-2e		Zaptuzumab	
细胞	IC50	eff.	IC50	eff.	IC50	eff.	IC50	eff.	IC50	eff.	IC50	eff.
SMMC-7721	26.89	98.95	304.3	97.69	733.9	57.25	2393	83.41	37.76	98.17	6122	47.96
Jurkat E6-1	5.432	98.66	4.602	97.25	5.185	98.26	73.55	98.15	14.16	99.29	200.9	90.71
MSTO-211H	235.3	99.75	2380	95.62	1244	94.39	3467	94.09	79.47	99.87	514.2	47.82
NCI-H1975	75.01	96.77	636.4	58.89	225.6	42.31	1819	93.09	163.2	73.73	542.1	62.36
Mia CaPa-2	129.6	93.45	1077	76.54	1594	72.45	1704	91.45	106.7	84.25	2341	29.56
NCM-460	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
CCD-18Co	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BEAS-2B	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
PBMC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

[0267] 其中,NR为no response,eff.为efficacy(%),IC50单位为ng/ml

[0268] 具体结果见表2。研究结果表明:Zapadcine-2比抗TRAILR2裸抗Zaptuzumab能更有效地抑制多种TRAILR2阳性的肿瘤细胞(如Jurkat E6-1,SMMC-7721,MSTO-211H、NCI-H1975和Mia PaCa-2等)增殖,而Zaptuzumab和Zapadcine-2对TRAILR2阴性的细胞(如人正常PBMC,BEAS-2B,NCM-460和CCD-18Co等)均没有细胞毒作用。

[0269] 实施例2 ELISA技术检测Zapadcine-2a与TRAILR2的亲合力情况

[0270] 利用ELISA方法评价Zapadcine-2a与人源化重组蛋白TRAILR2的结合情况,具体过程如下:用1×PBS缓冲液(pH 7.4)将2μg/ml人源化重组蛋白TRAILR2以100μl/孔的体积包被96孔板,4℃放置过夜。弃去上清,用PBST(PH 7.4PBS含0.05%Tween20)缓冲液洗板3次,每次5min,按240μl/孔加入含5%脱脂奶粉的PBS,37℃孵育3h,进行封闭。弃去封闭液,用300μl/孔PBST洗板3次后,每次5min,按50μl/孔加入用含1%脱脂奶粉或BSA的PBS梯度稀释的待测抗体(一抗)或ADC,浓度从4μg/ml开始2倍梯度稀释,共12个浓度,3个复孔,室温孵育1h。弃去上清,用PBST洗板3次后,每次5min,按50μl/孔加入用含1%脱脂奶粉或BSA的PBS稀释二抗,浓度为1μg/ml,37℃孵育40min。弃去上清,用PBST洗板3次后,每次5min,按50μl/孔加入TMB显色剂,于室温孵育5-10min。根据显色效果加入50μl/孔1M H₂SO₄终止反应。用SPARK 10M多功能微孔板检测仪在450nm处读取OD值。应用GraphPad Prism 5.0软件进行数据分析。具体结果见图4。

[0271] 结果表明:与人源化单抗Zaptuzumab相比,Zapadcine-2a与Zaptuzumab的亲合力保持在同一个数量级,这证明了Zapadcine-2a可以与TRAILR2有效结合,保留了人源化单抗的抗原结合能力。

[0272] 实施例3 Zapadcine-2a对正常小鼠的急性毒性作用

[0273] Zapadcine-2a的急性毒性作用是通过考察正常小鼠给药后身体状态和生化指标的变化进行评价的。具体研究过程如下:随机挑选健康的BALB/c雌性小鼠36只(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司),鼠龄为出生后6-7周,体重18~22g。分为6组,每组6只。按常

规饲养一周后,开始给药。Zapadcine-2a给药剂量为15mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg和50mg/kg,以空白溶剂作为正常对照。经尾静脉缓慢注射,单次给药,每天观察小鼠包括死亡、饮食和运动等情况,每3天按时记录小鼠的体重,并分别于第5天和第15天采取血样进行血生化检测,检测项目包括ALT和UREA。给药后第21天,动物实施过量麻醉法安乐死。具体结果见图5。

[0274] 结果表明,与对照组相比,Zapadcine-2a 15mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg和50mg/kg 5个剂量组的小鼠正常生长,运动状态良好,体重变化正常,肝肾功能正常,没有死亡,表明Zapadcine-2a单次给药,小鼠的最大耐受剂量为不小于50mg/kg,安全性良好。

[0275] 讨论

[0276] 在ADC药物中,小分子部分主要由化学毒素以及化学连接头组成。比较常用的化学毒素包括微管蛋白聚合酶抑制剂,如单甲基阿里他汀D、E、F(简称为MMAD、MMAE、MMAF)、美登素和破坏DNA双螺旋结构的毒素,如卡奇霉素和倍癌霉素等。目前在研的或在临床上应用的ADC药物多使用MMAE、MMAF、微管蛋白解聚剂美登素DM1和DM4等。国内外公认的化学连接键是胺键、二硫键等可降解以及硫醚键等不可降解的化学键。在第一代ADC药物美罗塔中,使用了二硫键以及胺键这两个可降解的二硫键连接抗体与卡奇霉素,由于其不稳定的化学键以及有限的治疗效果,已于2010年由辉瑞公司召回。第二代ADC药物Kadcyla利用了不可降解的硫醚键,具有良好的活性和较低的生物学毒性。然而,由于硫醚键的体内氧化作用,化学键仍有可能在血液循环中断裂,因此可能具有较强的肝毒性。自Adcetris和Kadcyla上市以来,至今国际上已有100多个ADC候选药物进入人体临床试验。但我国只有两个ADC被批准进入人体临床试验,大部分均处于临床前研究阶段,还没有一个完全创新的、具有自主知识产权的ADC抗体药物上市。因此,开发拥有自主知识产权、安全性良好、疗效显著的抗TRAILR2抗体-毒素-偶联物具有极其诱人的临床应用前景。

[0277] 用于制备ADC的抗体必须具备两个基本的特点,即抗体的肿瘤特异性和抗体与抗原结合后形成的抗原-抗体复合物能够被内吞进入溶酶体,并在溶酶体内降解释放出小分子毒素,从而小分子毒素特异性地杀死肿瘤细胞。

[0278] 本发明涉及的具有自主知识产权的抗TRAILR2 (TRAILR2或CD262)的人源化单克隆抗体,与国内外已经进入人体临床试验的、针对TRAILR2靶点的其他抗体相比,具有独特的基因序列、抗原决定簇以及很强的抗原亲和力,在体内外均能特异性地杀死多种TRAILR2阳性的肿瘤细胞,抑制肿瘤细胞生长,但对正常细胞和组织几乎没有毒性。国际上,针对TRAILR2为靶点的肿瘤治疗,临床试验的结果显示其安全性良好,但单独用药的疗效不能令人满意。

[0279] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0280] 本发明的序列信息:

[0281] Zaptuzumab重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID No.7):

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 [0282] Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110
 [0283] Zaptuzumab轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID No.8) :
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 [0284] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg

序列表

<110> 和元生物技术(上海)股份有限公司

<120> 抗TRAILR2抗体-毒素-偶联物及其在抗肿瘤治疗中的药物用途

<130> P2018-0123

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 1

Asp Phe Ser Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 3

Ile Asp Tyr

1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 6

Phe Gln Ser Thr His Val Pro His Thr

1 5

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<400> 8

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
35				40				45							
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
50				55				60							
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70				75				80			
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Ser
85				90				95							
Thr	His	Val	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
100				105				110							
Arg															

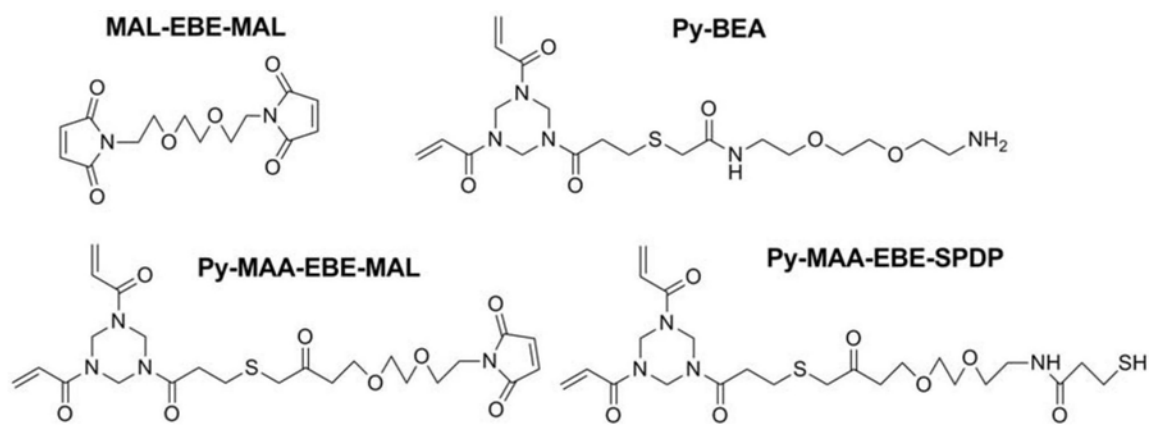


图1

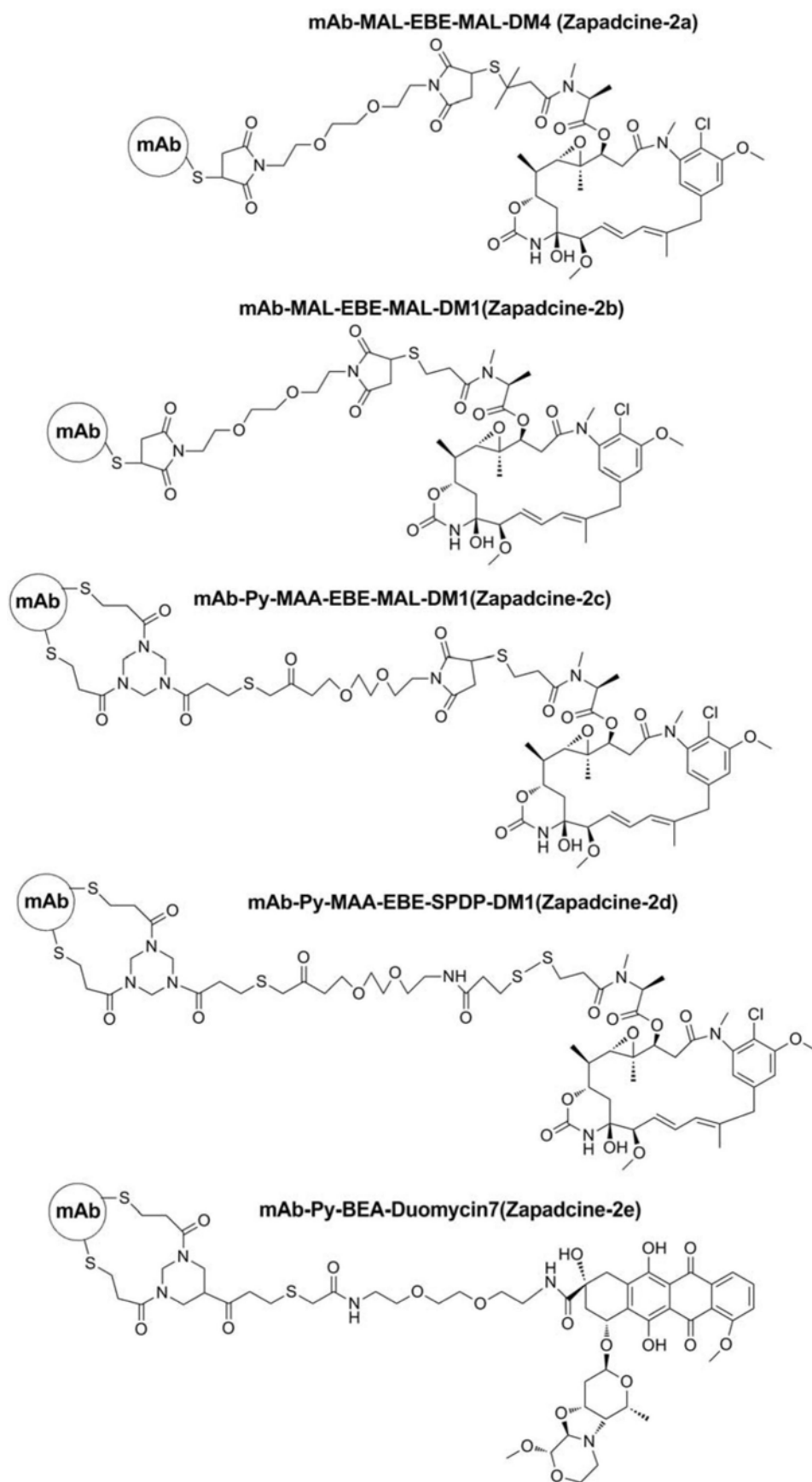


图2

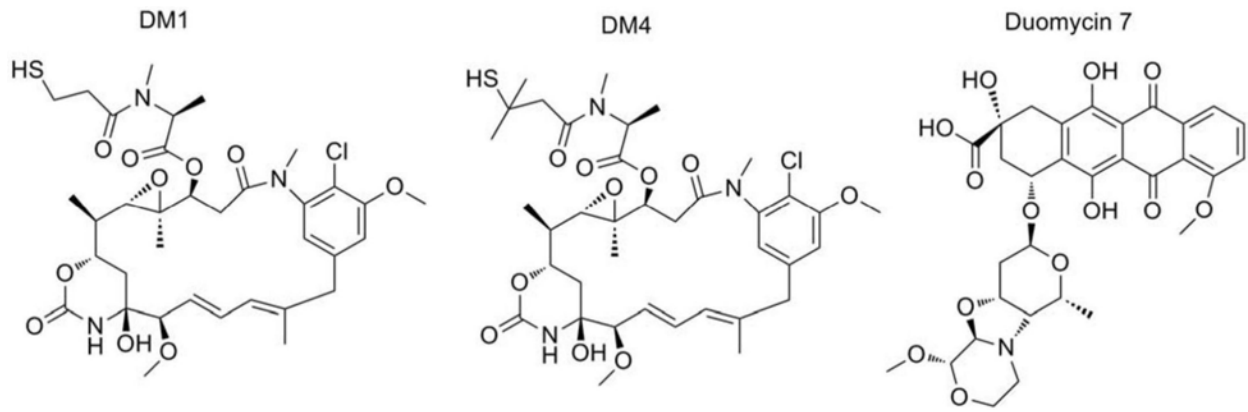


图3

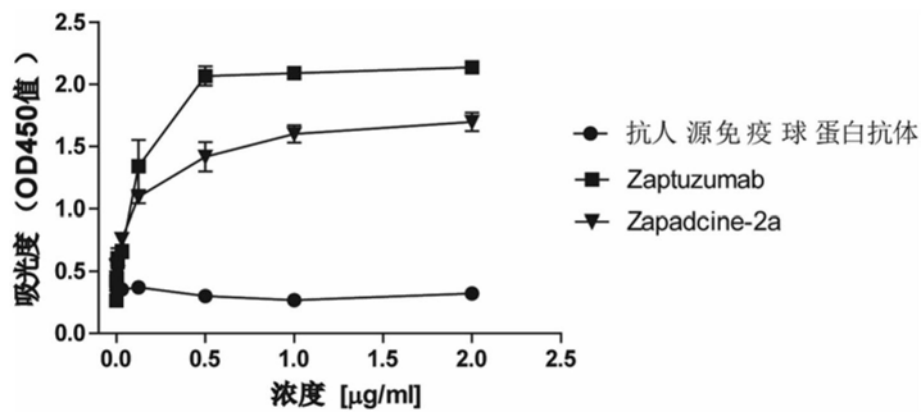


图4

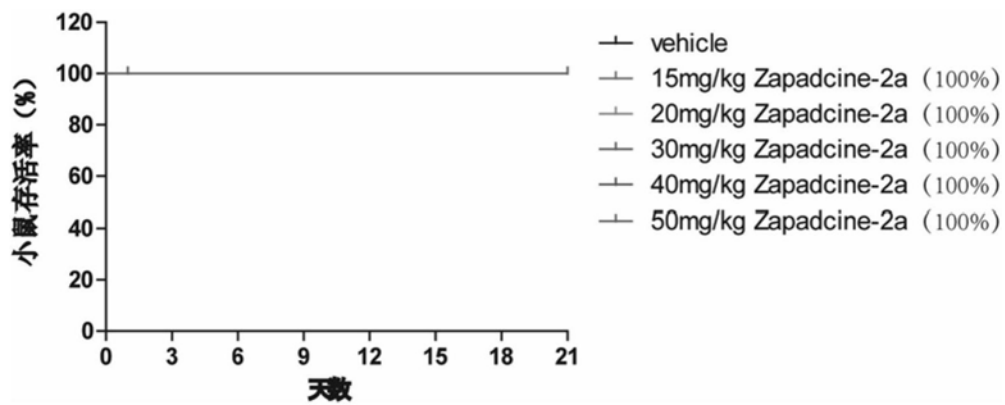


图5