

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/CN2016/073844
International filing date:	16 February 2016 (16.02.2016)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: CN
	Number: 201510085038.8
	Filing date: 17 February 2015 (17.02.2015)
Date of receipt at the International Bureau:	08 March 2016 (08.03.2016)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)

CERTIFICATE OF AVAILABILITY OF A CERTIFIED PATENT DOCUMENT IN A DIGITAL LIBRARY

The International Bureau certifies that a copy of the patent application indicated below has been available to the WIPO Digital Access Service since the date of availability indicated, and that the patent application has been available to the indicated Office(s) as of the date specified following the relevant Office code:

Document details: Country/Office: CN

Filing date: 17 Feb 2015 (17.02.2015)

Application number: 2015100850388

Date of availability of document: 27 Jan 2016 (27.01.2016)

The following Offices can retrieve this document by using the access code:

JP, US, SE, KR, ES, GB, AU, IB, CN, FI

Date of issue of this certificate: 08 Mar 2016 (08.03.2016)



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请文件副本。

申 请 号：201510085038.8

申 请 类 型：发明专利

发 明 创 造 名 称：抗体药物偶联物

申 请 日：2015年02月17日

申 请 人：上海美雅珂生物技术有限责任公司

发明人或设计人：胡朝红

局长

申长雨

2016年01月27日

CSPC Exhibit 1030

Page 3 of 40

权 利 要 求 书

1. 抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其包含与细胞毒剂共价连接的抗表皮生长因子受体抗体。

2. 权利要求 1 的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体包括重链和轻链，其中重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 5~7 所示的序列或其突变体，轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 12~14 所示的序列或其突变体。

3. 权利要求 2 的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 8~11 所示的序列或其突变体。

4. 权利要求 2 的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 15~18 所示的序列或其突变体。

5. 权利要求 1-4 任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区选自人源性 IgG、IgM、IgA、IgD、IgA 恒定区或上述恒定区的突变体。

6. 权利要求 5 的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。



7. 权利要求 5 的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体重链恒定区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 3 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO: 3 所示序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列。

8. 权利要求 1-7 任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区为人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区、或上述恒定区的突变体。

9. 权利要求 8 的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体轻链恒定区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 4 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO: 4 所示序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、95%、99% 的序列。

10. 权利要求 1-9 任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其具有式 I: $Ab-(L-D)_p$ 所示的结构，其中：

Ab 代表抗表皮生长因子受体抗体；

L 代表接头；

D 代表细胞毒剂；

p 代表 1-9，例如 2-6，例如 3-5。

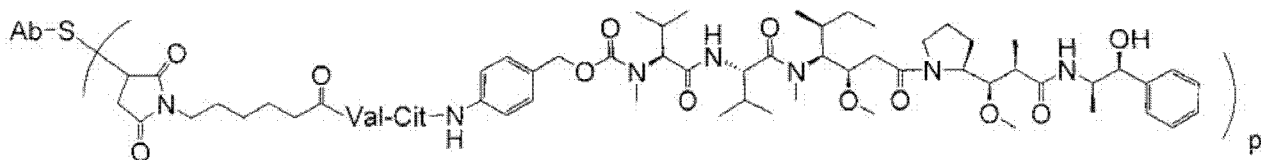
11. 权利要求 1-10 任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的细胞毒剂选自化疗药物、毒素、放射性同位素、细胞因子、抗生素、酶、纳米颗粒或生物活性肽。

12. 权利要求11的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的细胞毒剂选自 Monomethyl auristatin E (MMAE)、 Monomethyl auristatin F (MMAF)、美登木素生物碱(例如 Maytansine DM1、Maytansine DM4)、卡奇霉素(calicheamicin)、duocarmycin MGBA、阿霉素(doxorubicin)、蓖麻毒素、白喉毒素等毒素、I131、白介素类、肿瘤坏死因子、趋化因子、纳米颗粒等。

13. 权利要求10的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的接头为可切割的或不可切割的。

14. 权利要求13的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其中所述的接头选自 6-马来酰亚氨基己酰基(MC)、马来酰亚氨基丙酰基(MP)、缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)、对氨基苄氧羰基(PAB)、N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、和 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)。

15. 权利要求1-14任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，其为：



其中Ab为抗表皮生长因子受体抗体，p为1-9，例如2-6，例如3-5。

16. 组合物，其含有权利要求1-15任一项的抗体药物偶联物、其药



学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，任选地，还含有至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

17. 权利要求1-15任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在制备预防和/或治疗与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病的药物中的用途。

18. 权利要求16的用途，其中所述的与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病为与EGFR相关的肿瘤，例如与EGFR高表达相关的肿瘤，例如选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

19. 权利要求1-15任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在制备抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长、抑制肿瘤细胞增殖的药物中的用途。

20. 权利要求19的用途，其中所述的肿瘤选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

说明书

抗体药物偶联物

技术领域

本发明涉及抗体药物偶联物，具体涉及抗表皮生长因子受体抗体药物偶联物。本发明还涉及包含该抗体药物偶联物的组合物，以及该抗体药物偶联物的医药用途。

背景技术

表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR, 也称为 HER1, c-ErbB1) 是表皮生长因子家族的细胞表面受体, 是由 1186 个氨基酸残基构成, 分子量为 170kD 的一种跨膜糖蛋白 (Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res*, 2003; 284 : 31-53)。EGFR 属于 I 型酪氨酸激酶受体 ErbB 亚族 (ErbB 1-4), 具有酪氨酸激酶的活性。EGFR 稳定的表达于许多上皮组织, 包括皮肤和毛囊。表皮生长因子受体异常表达或因受体突变而活化会导致癌变。有很多实体瘤发现高表达表皮生长因子受体, 如直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌和食管癌等 (Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, et al. The ErbB Signaling network : receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO J*, 2000 ; 19 : 3159-3167)。转化生长因子 α 和表皮生长因子等生长因子是表皮生长因子受体的内源性配体。这些配体与表皮生长因子受体结合, 激活受体胞内酪氨酸蛋白激酶的活性, 启动下游多条信号转导途径, 从而调节正常细胞的生长和分化, 增加肿瘤细胞的侵袭力、促进血管生成、抑制肿瘤细胞的凋亡 (Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, 2001; 7 : 2958-2970)。表皮生长因子受体在肿瘤中的高度表达及其在肿瘤细

胞生长、分化中起重要作用的这些特点，使表皮生长因子受体成为具有良好前景的肿瘤治疗靶点。

目前市场上已有两个抗表皮生长因子受体的治疗性抗体，一个是人鼠嵌合抗体 C225 抗体（爱必妥，Erbix 或 Cetuximab，ImClone(现在 Eli Lilly) 公司），与表皮生长因子受体有特异亲和性，可阻断 EGF 和 TGF 等配体与表皮生长因子受体的结合，抑制其磷酸化和下游信号传导，从而抑制肿瘤细胞的生长，诱导凋亡，减少基质金属蛋白酶和血管上皮生长因子的产生。2004 年美国 FDA 批准爱必妥治疗结直肠癌，2006 批准治疗头颈部癌，目前有更多临床试验用于其它肿瘤适应症。在临床上爱必妥和伊立替康合用治疗结直肠癌有效率（ORR）为 23%，与氟嘧啶等化疗药合用治疗头颈部癌有效率为 13%-30%。因为是人鼠嵌合抗体，爱必妥抗体在临床试验中有 3.7% 的病人产生了抗体反应。

另一个抗表皮生长因子受体的治疗性抗体是帕尼单抗（Vectibix, panitumumab, Amgen 公司），是采用转基因小鼠技术制备的全人化单克隆抗体，无鼠源蛋白序列，靶向作用于表皮生长因子受体（EGFR），2006 年 9 月被 FDA 批准上市，与氟嘧啶、奥沙利铂和伊立替康合用或在化疗后用于治疗 EGFR 阳性的转移性直结肠癌。2006 年 FDA 批准其单药治疗化疗耐受的转移性结直肠癌(mCRC)。然而帕尼单抗是 IgG2 亚型抗体，与 IgG1 相比，IgG2 的 CDC 活性及 ADCC 等生物学活性明显减低；另外，IgG2 亚型抗体稳定性较差，这可能是临床效果上全人抗体帕尼单抗与嵌合抗体爱必妥相比没有明显优势的主要原因。在临床上治疗结直肠癌的总体生存率（OR）才达到 8%，非进展生存期只延长了 3.6 个月。

目前大量的临床数据显示爱必妥单抗和帕尼单抗只对 EGFR 表达的 KRAS 野生型（KRAS wild type）有疗效，而对 KRAS 突变体没有肿瘤生长抑制活性，因此，美国临床肿瘤协会发表的指导原则中明确指出抗 EGFR 单抗药物只适用于 KRAS 野生型的结肠癌病人（Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF,

et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor monoclonal antibody therapy. *J. Clin Oncol.* 2009; 27:2091-2096; Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28:1254-1261)。

因此，本领域亟需具有更高生物学活性的抗人源化抗表皮生长因子受体的抗体类药物，尤其是对 KRAS 突变体有疗效的药物，例如抗体药物偶联物以进一步提高疗效，降低副作用。

由于单抗癌症药物的引领，近年来在欧美快速发展的抗体药物偶联物 (antibody drug conjugate, ADC) 成为目前世界最前沿的医药技术。

抗体药物偶联物一般由三个部分组成：

1. 专一性结合靶点的单抗；
2. 细胞毒性的小分子化学药物；
3. 链接小分子药物和单抗的连接体，也叫接头。

抗体药物偶联物利用单抗的靶点专一性和化药的细胞毒性来杀死肿瘤细胞。它的作用机制是：（1）抗体药物偶联物利用单抗特异地结合到肿瘤细胞上的靶点；（2）抗体药物偶联物和靶点的复合物转移进入细胞内；（3）抗体药物偶联物在细胞内降解，释放细胞毒的化药；（4）细胞毒的化药杀死肿瘤细胞。

抗体药物偶联物的作用机制看似简单，但是一个抗体药物偶联物是否能成为安全有效的药物是非常复杂和不可预测的，依赖多种因素，例如：

1) 靶点的特性：靶点是否能内吞噬 (internalize)，靶点的表达水平，靶点是否在癌细胞和正常细胞中有足够的表达水平差异，靶点是否会脱落细胞外部分 (extracellular domain, ECD) 到血液中；

2) 单抗的特性：单抗对靶点的特异性是否足够好 (与其它蛋白无交叉反应)，单抗的稳定性如何，单抗和靶点的复合物是否能内

吞噬入细胞;

3) 小分子化药的特性: 化药的细胞毒性是否足够强, 化药在血液里的稳定性, 化药成为 ADC 后在体内的代谢产物的毒性;

4) 接头的特性: 接头是可切割的 (cleavable) 还是不可切割的 (non-cleavable), 接头在血液里的稳定性;

5) ADC 的特性: ADC 和靶点的复合物是否能内吞噬, ADC 在血液里的稳定性, ADC 上用什么链接体和链接几个化药, ADC 杀癌细胞的活性和生物毒性。

可以看出, ADC 药物的研发需要大量的实验摸索和验证, 其安全性和有效性是无法在实验前预测的。

发明内容

本发明的发明人通过大量实验和创造性劳动, 制备得到了抗表皮生长因子受体抗体药物偶联物, 并证实其具有良好的生物学活性, 由此完成了本发明。

本发明第一方面涉及抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物, 其包含与细胞毒剂共价连接的抗表皮生长因子受体抗体。

在本发明的一个实施方案中, 其中所述的抗表皮生长因子受体抗体包括重链和轻链, 其中重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 5~7 所示的序列或其突变体, 轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 分别包含如 SEQ ID NO: 12~14 所示的序列或其突变体。

在本发明的实施方案中, 其中所述的抗表皮生长因子受体抗体轻链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 区分别包含如 SEQ ID NO: 12~14 所示的序列或者与 SEQ ID NO: 12~14 所示的序列的同一性大于 70%, 例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列, 例如具有 3 个、2 个或 1 个突变、缺失或添加氨基酸的序列。



在本发明的实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体重链可变区 CDR1、CDR2、CDR3 区分别包含如 SEQ ID NO: 5~7 所示的序列或者与 SEQ ID NO: 5~7 所示的序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列，例如具有 3 个、2 个或 1 个突变、缺失或添加氨基酸的序列。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 8~11 所示的序列或其突变体。

在本发明的实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 8~11 所示的序列，或者包含与上述序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 15~18 所示的序列或其突变体。

在本发明的实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 区分别包含如 SEQ ID NO: 15~18 所示的序列，或者包含与上述序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

在本发明的一个实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区的序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

在本发明的一个实施方案中，所述抗表皮生长因子受体抗体的轻链可变区的序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体的重链恒定区选自人源性 IgG、IgM、IgA、IgD、IgA 恒定区或上述恒定区的突变体。

在本发明的一个实施方案中，其中所述 IgG 选自 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体重链恒定区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 3 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO: 3 所示序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区为人源性 lambda 恒定区、kappa 恒定区、或上述恒定区的突变体。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的抗表皮生长因子受体抗体轻链恒定区的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 4 所示的序列，或者包含与 SEQ ID NO: 4 所示序列的同一性大于 70%，例如大于 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列。

在本发明的一个实施方案中，其具有式 I : Ab-(L-D)_p 所示的结构，其中：

Ab 代表抗表皮生长因子受体抗体；

L 代表接头；

D 代表细胞毒剂；

p 代表 1-8，例如 2-6，例如 3-5。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的细胞毒剂选自化疗药物、毒素（例如细菌、真菌、植物、或动物源性的酶活性毒素或其片段）、放射性同位素、细胞因子、抗生素、酶、纳米颗粒或生物活性肽。

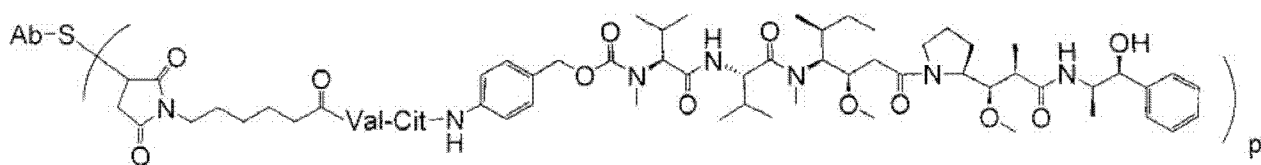
在本发明的一个实施方案中，其中所述的细胞毒剂选自 Monomethyl auristatin E (MMAE)、 Monomethyl auristatin F (MMAF)、美登木素生物碱（例如 Maytansine DM1、Maytansine DM4）、卡奇霉素 (calicheamicin)、duocarmycin MGBA、阿霉素 (doxorubicin)、蓖麻毒素、白喉毒素等毒素、I131、白介素类、肿瘤坏

死因子、趋化因子、纳米颗粒等。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的接头为可切割的或不可切割的。

在本发明的一个实施方案中，其中所述的接头选自 6-马来酰亚氨基己酰基(MC)、马来酰亚氨基丙酰基(MP)、缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)、对氨基苄氧羰基(PAB)、N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、和 6-马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-vc-PAB)。

在本发明的一个具体实施方案中，其为：



其中Ab为抗表皮生长因子受体抗体，p为1-8，例如2-6，例如3-5。

本发明第二方面涉及组合物（例如药物组合物），其含有本发明第一方面任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物，任选地，还含有至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在本发明的一个实施方案中，所述组合物中还包含已知的用于治疗肿瘤的化疗药物，所述化疗药物例如为阿霉素(Adriamycin)、环磷酰胺和紫杉烷类[紫杉醇(Taxol)和多西他赛(Taxotere)]、卡培他滨(Xeloda)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂(瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康(camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌(Novantrone)、泼尼松、长春新碱(Oncovin)等，或它们的组合。

本发明还涉及本发明第一方面任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在制备预防和/或治疗与表面生长因子受体（EGFR）相关的疾病的药物中的用途。

在本发明的实施方案中，其中所述的与表面生长因子受体（EGFR）相关的疾病为与EGFR相关的肿瘤，例如与EGFR高表达相关的肿瘤，例如选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

本发明还涉及本发明第一方面任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在制备抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长、抑制肿瘤细胞增殖的药物中的用途。

在本发明的实施方案中，其中所述的肿瘤选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

本发明还涉及预防和/或治疗与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病的方法，所述方法包括给予有需要的受试者预防和/或治疗有效量的本发明第一方面任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

本发明还涉及抑制肿瘤血管生成、延缓肿瘤进展、抑制肿瘤生长、抑制肿瘤细胞增殖的方法，所述方法包括给予有需要的受试者预防和/或治疗有效量的本发明第一方面任一项的抗体药物偶联物、其药学上可接受的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物。

在本发明的实施方案中，其中所述的与表皮生长因子受体（EGFR）相关的疾病为与EGFR相关的肿瘤，例如与EGFR高表达相关的肿瘤，例如选自结肠癌、直肠癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食管癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌和脑胶质瘤。

本发明的抗表皮生长因子受体抗体药物偶联物、其药学上可接受

的盐、溶剂合物或所述盐的溶剂合物在体内和体外都具有良好的抑制肿瘤细胞生长活性，特别是对 EGFR 中度和低度表达的肿瘤细胞也显示出明显的细胞生长抑制活性，且细胞毒性低，因而具有良好的应用前景。

以下对本发明做进一步描述：

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

在本发明中，术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体的轻链可分为 κ 和 λ 两类。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 五种，依据重链的不同可将抗体分为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE 五类。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区 (V_H) 和重链恒定区 (C_H) 组成。重链恒定区由 3 个结构域 (C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3}) 组成。各轻链由轻链可变区 (V_L) 和轻链恒定区 (C_L) 组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和补体系统的组分 C1q 的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域（称为互补决定区 (CDR)），其间散布有较保守的称为骨架区（FR）的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区 (V_H 和 V_L) 分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia 等人 (1989) Nature 342:878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的

产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同类型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

在本发明中，所述 IgG 重链恒定区包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在本发明的实施方案中，所述 IgG 重链恒定区为 IgG1 型。

在本发明中，所述 κ 轻链恒定区包括各种同种异型，如 Km1、Km1,2 或 Km3。

关于抗体的氨基酸序列

在本发明的实施方案中，抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区氨基酸序列是 SEQ ID NO:1。在本发明的实施方案中，抗表皮生长因子受体抗体的轻链可变区氨基酸序列是 SEQ ID NO:2。

另一方面，本发明所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 的序列相似性至少达 70%，优选是至少 75%，优选是至少 80%，优选是 85%，再优选是至少 90%，最好的是至少 95%。

另一方面，本发明所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的序列相似性至少达 70%，优选是至少 75%，优选是至少 80%，优选是 85%，再优选是至少 90%，最好的是至少 95%。

在本发明的实施方案中，抗表皮生长因子受体抗体的重链和轻链可变区的 CDR 的氨基酸序列确定如下：

重链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO: 5-7；轻链的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别 SEQ ID NO: 12-14。

另一方面，抗表皮生长因子受体抗体的重链的 CDR 含有的氨基酸序列可能是在 SEQ ID NO: 5-7 上出现一个或多个氨基酸的突变或增添或缺失。优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 3 个氨基酸。更优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 2 个氨基酸。最优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 1 个氨基酸。

另一方面，抗表皮生长因子受体抗体的轻链的 CDR 含有的氨基酸序列可能是在 SEQ ID NO: 12-14 上出现一个或多个氨基酸的突变、增添或缺失。优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 3 个氨基酸。

更优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 2 个氨基酸。最优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 1 个氨基酸。

在本发明的实施方案中，抗表皮生长因子受体抗体的重链和轻链可变区的 FR 的氨基酸序列确定如下：

重链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别为 SEQ ID NO: 8-11。轻链可变区 FR1、FR2、FR3、FR4 的序列分别为 SEQ ID NO: 15-18。

另一方面，抗表皮生长因子受体抗体的重链或轻链可变区 FR 的氨基酸序列可能是在 SEQ ID NO: 8-11、SEQ ID NO: 15-18 上出现一个或多个氨基酸的突变、增添或缺失。优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 3 个氨基酸。更优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 2 个氨基酸。最优选的是，突变、添加或缺失的氨基酸不超过 1 个氨基酸。

上述抗体或 CDR 区或框架区的氨基酸发生突变、添加或缺失之后的变异体仍然保留特异性结合 EGFR 的能力。

在本发明的实施方案中，抗表皮生长因子受体抗体重链恒定区氨基酸序列是 SEQ ID NO:3。在本发明的实施方案中，抗表皮生长因子受体抗体的轻链恒定区氨基酸序列是 SEQ ID NO:4。

另一方面，本发明所述的抗体的重链恒定区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:3 的序列相似性至少达 70%，优选是至少 75%，优选是至少 80%，优选是 85%，再优选是至少 90%，最好的是至少 95%，如 96%、97%、98%、99%。

另一方面，本发明所述的抗体的轻链恒定区的氨基酸序列与 SEQ ID NO:4 的序列相似性至少达 70%，优选是至少 75%，优选是至少 80%，优选是 85%，再优选是至少 90%，最好的是至少 95%，如 96%、97%、98%、99%。

本发明所述的单抗变异体可以通过传统的基因工程方法获得。本领域的技术人员完全知晓利用核酸突变改造 DNA 分子的方法。另外，编码重链和轻链变异体的核酸分子也可以通过化学合成获得。

在本发明中，用于确定序列同一性（同源性）和序列相似性百分数的算法是例如 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，它们分别描述在 Altschul 等 (1977) Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402 和 Altschul 等 (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410。采用例如文献中所述或者默认参数，BLAST 和 BLAST 2.0 可以用于确定本发明的氨基酸序列同一性百分数。执行 BLAST 分析的软件可以通过国立生物技术信息中心为公众所获得。

在本发明中，所述与氨基酸序列具有至少 70% 的序列同一性的氨基酸序列包括与所述氨基酸序列基本同一的多肽序列，例如当采用本文所述方法（例如采用标准参数的 BLAST 分析）时，与本发明多肽序列相比含有至少 70% 序列同一性、优选至少 75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的序列同一性的那些序列。

在本发明中，用于抗体药物偶联物的毒素包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链（来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)）、蓖麻毒蛋白 (ricin) A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A 链、 α -帚曲霉素 (sarcin)、油桐 (*Aleutites fordii*) 毒蛋白、香石竹 (dianthin) 毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolaca americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (*saponaire officinalis*) 抑制物、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin)、和单端孢菌素 (trichothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公布的 WO 93/21232。

多种放射性核素可用于生成抗体药物偶联物。例子包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、和 ^{186}Re 。

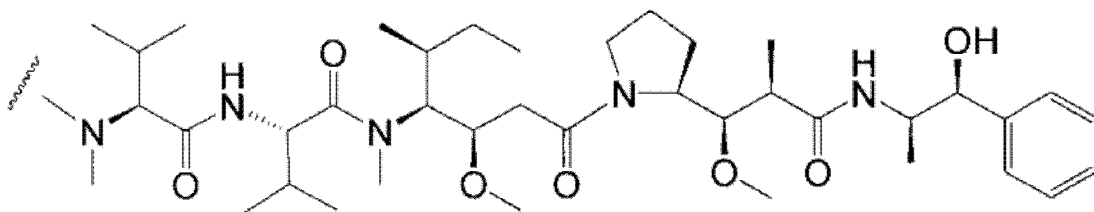
抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备，诸如 N-琥珀酰亚氨基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP)，亚氨基硫烷 (IT)，亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸

二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异硫氰酸酯(诸如甲苯 2, 6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如, 可如 Vitetta 等在 (1987)Science, 238: 1098 中所述制备的含蓖麻毒的免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性整合剂(WO94/11026)。

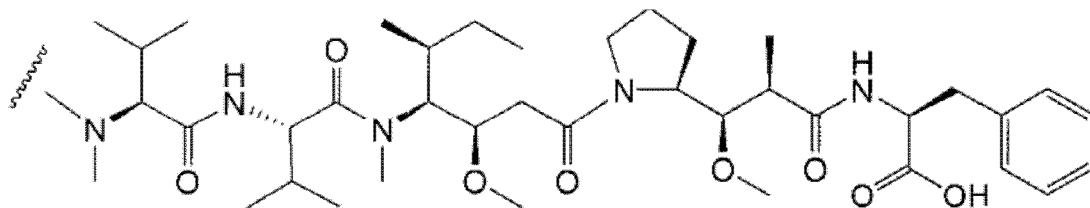
本发明还涵盖抗体和一种或多种小分子毒素(诸如加利车霉素(calicheamicin)、美登素生物碱(maytansinoid)、多拉司他汀(dolastatin)、auristatin、单端孢霉素(trichothecene)、和 CC 1065 及这些毒素的具有毒素活性的衍生物的偶联物。

在有些实施方案中, 抗体药物偶联物包含与多拉司他汀(dolastatin)或多拉司他汀肽类似物和衍生物 auristatin(美国专利 No.5,635,483; 5,780,588)偶联的抗表皮生长因子受体抗体。多拉司他汀和 auristatin 已经显示出干扰微管动力学、GTP 水解、及核和细胞分裂等活性(Woyke 等(2001)Antimicrob.Agents and Chemother.45(12): 3580-3584)且具有抗癌 (US 5,663,149) 和 抗 真 菌 活 性 (Pettit 等 (1998) Antimicrob.Agents Chemother.42: 2961-2965)。多拉司他汀或 auristatin 药物模块可经由肽药物模块的 N(氨基)末端或 C(羧基)末端附着于抗体 (WO 02/088172)。

在本发明中, 其中 MMAE 的结构为:



在本发明中, 其中 MMAF 的结构为:



在本发明中，作为细胞毒剂的酶可以为具有核酸降解活性的化合物（例如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶，诸如脱氧核糖核酸酶；DNA 酶）。

在本发明中，药物载荷 (loading) 由 p 表示，即式 I：Ab-(L-D) $_p$ 的分子中每个抗体的平均药物模块（即细胞毒剂）数。药物载荷的范围可以为每个抗体 1-20 个药物模块 (D)。通式 I 的 ADC 包括偶联有一定范围 (1-20 个) 药物模块的抗体的集合。来自偶联反应的 ADC 制备物中每个抗体的平均药物模块数可以通过常规手段来验证，诸如质谱、ELISA 测定法、和 HPLC。还可以测定 ADC 在 p 方面的定量分布。在有些情况中，将 p 为某数值的同质 ADC 从具有其它药物载荷的 ADC 中分离、纯化和验证可以通过诸如反相 HPLC 或电泳的手段来实现。

对于有些抗体-药物偶联物， p 可能受到抗体上附着位点数目的限制。例如，若附着是半胱氨酸硫醇，抗体可能只有一个或数个半胱氨酸硫醇基，或者可能只有一个或数个有足够反应性的硫醇基，可附着接头。在某些实施方案中，较高的药物载荷，例如 $p > 5$ ，可引起某些抗体-药物偶联物的聚集、不溶性、毒性、或丧失细胞通透性。

在某些实施方案中，本发明 ADC 的药物载荷范围为 1 到约 8；约 2 到约 6；约 3 到约 5；约 4 到约 5；约 3.5 到 4.5。事实上，对于某些 ADC 已经显示了每个抗体的药物模块的最佳比率可以为小于 8，可以为约 2 到约 5。参见 US2005-0238649A1 (完整收入本文作为参考)。

在某些实施方案中，在偶联反应中少于理论最大值的药物模块偶联至抗体。抗体可包含例如赖氨酸残基，其不与药物-接头中间物或接头试剂起反应。一般而言，抗体不包含许多游离的和反应性的半胱氨酸硫醇基，其可连接药物模块；事实上，抗体中的大多数半胱氨酸硫醇基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中，可以在部分或完全还原性条件下用还原剂诸如二硫苏糖醇 (DTT) 或三羰基乙基膦 (TCEP) 还原抗体以产生反应性半胱氨酸硫醇基。在某些实施方案中，将抗体置于变性条件以暴

露反应性亲核基团，诸如赖氨酸或半胱氨酸。

ADC 的载荷(药物/抗体比率)可以以不同方式来控制，例如通过：(i) 限制药物-接头中间物或接头试剂相对于抗体的摩尔数，(ii) 限制偶联反应的时间或温度，(iii) 半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制还原性条件，(iv) 通过重组技术对抗体的氨基酸序列进行工程改造，使得半胱氨酸残基的数目和位置为了控制接头-药物附着的数目和/或位置而进行改变。应当理解，若超过一个亲核基团与药物-接头中间物或者与接头试剂和接下来的药物模块试剂起反应，则所得产物是具有一个或多个药物模块附着于抗体的 ADC 化合物混合物。可以通过对抗体特异性和对药物特异性的双重 ELISA 抗体测定法自混合物计算每个抗体的平均药物数。混合物中的各种 ADC 分子可以通过质谱来鉴定，并通过 HPLC 来分离，例如疏水相互作用层析。在某些实施方案中，可以通过电泳或层析从偶联混合物中分离具有单一载荷值的同质 ADC。

在本发明中，抗体药物偶联物的药学上可接受的盐包括无机酸、羧酸和磺酸的酸加成盐，例如以下酸的盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、萘二磺酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸柠檬酸、富马酸、马来酸和苯甲酸。

本发明的抗体药物偶联物的药学上可接受的盐还包括常规碱的盐，例如(仅为示例性并优选)碱金属盐(例如钠盐和钾盐)、碱土金属盐(例如钙盐和镁盐)和衍生自氨或含有1-16个碳原子的有机胺的铵盐，所述有机胺例如(仅为示例性并优选)乙胺、二乙胺、三乙胺、乙基二异丙胺、单乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、二环己胺、二甲基氨基乙醇、普鲁卡因、二苯甲酰胺、N-甲基哌啶、N-甲基吗啉、精氨酸、赖氨酸和1,2-乙二胺。

在本发明中，溶剂合物表示这些形式的本发明的抗体药物偶联物：所述抗体药物偶联物通过与溶剂分子配位而形成的固态或液态形式的复合物。水合物是溶剂合物的一种具体形式，其具有配位的水分子。在本发明中，水合物是优选的溶剂合物。

可以优选地使用本发明的抗体药物偶联物进行治疗的与EFGR相关

的肿瘤包括过表达EGFR的肿瘤、呼吸道肿瘤(例如小细胞癌和非小细胞癌、支气管癌),其中特别优选非小细胞肺癌;消化道(例如食道、胃、胆囊、小肠、大肠、直肠)的肿瘤,其中特别优选肠肿瘤;内分泌腺和外分泌腺(例如甲状腺和甲状旁腺、胰腺和唾液腺)的肿瘤,其中特别优选胰腺肿瘤;头颈区域(例如喉、下咽、鼻咽、口咽、唇、口腔、舌和食道)的肿瘤;和/或神经胶质瘤。

本发明的抗体药物偶联物可以与已知的用于治疗肿瘤的化疗药物联用,所述化疗药物例如为阿霉素(Adriamycin)、环磷酰胺和紫杉烷类[紫杉醇(Taxol)和多西他赛(Taxotere)]、卡培他滨(Xeloda)、吉西他滨(Gemzar)、长春瑞滨(Navelbine)、他莫昔芬、芳香酶抑制剂(瑞宁得、弗隆、阿诺新)、5-FU 加亚叶酸、伊立替康(camptosar)、奥沙利铂、顺铂、卡铂、雌莫司汀、米托蒽醌(Novantrone)、泼尼松、长春新碱(Oncovin)等,或它们的组合。

在本发明中,“治疗”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预,可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在有些实施方案中,本发明的抗体或抗体药物偶联物用于延迟疾病或病症的发生,或用于减缓疾病或病症的进展。用于评估疾病的成功治疗和改善的上述参数可以容易的通过内科医师所熟悉的常规规程来测量。对于癌症治疗,可通过例如评估疾病进展前时间(TTP)和/或测定反应率(RR)来测量功效。

在本发明中,“受试者”指脊椎动物。在某些实施方案中,脊椎动物指哺乳动物。哺乳动物包括,但不限于,牲畜(诸如牛)、宠物(诸如猫、犬、和马)、灵长类动物、小鼠和大鼠。在某些实施方案中,哺乳动物指人。

在本发明中,“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的

能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量会低于治疗有效量。在癌症的情况中，药物的治疗有效量可减少癌细胞数；缩小肿瘤体积；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)癌细胞浸润到周围器官中；抑制(即一定程度的减缓，优选停止)肿瘤转移；一定程度的抑制肿瘤生长；和/或一定程度的减轻与癌症有关的一种或多种症状。

对于疾病的预防或治疗，本发明的抗体药物偶联物的适宜剂量(在单独地或联合一种或多种其它别的治疗剂诸如化疗剂地使用)会取决于待治疗疾病的类型、抗体药物偶联物的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体药物偶联物是出于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体药物偶联物的反应性、及主治医师的判断。合适的是，一次性或通过一系列治疗将抗体药物偶联物施用于患者。根据疾病的类型和严重程度，施用于患者的初始候选剂量可以是约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $20\text{mg}/\text{kg}$)抗体药物偶联物，例如或是通过一次或多次分开施药或是通过连续输注。根据上文所述因素，典型日剂量的范围可以是约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多。对于持续数天或更长时间的重复施药，根据状况，通常持续治疗直至疾病症状发生期望的抑制。抗体药物偶联物的例示剂量的范围可以是约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 。如此，可以对患者施用一剂或多剂约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或其任意组合)的抗体药物偶联物。此类剂量可间歇施用，例如每周或每三周(例如使得患者接受约 2 剂至约 20 剂，或例如约 6 剂抗体药物偶联物)。可施用一剂较高的初始加载剂量，后续一剂或多剂较低剂量。这种疗法的进程易于通过常规技术和测定法来监测。“长期”施用指与短期模式相反，以连续模式施用药剂，从而将初始治疗效果(活性)维持较长一段时间。“间歇”施用指不是无间断连续进行的治疗，而是本质上周期性的。“联合”一种或多种其它治疗剂的施用包括同时(共同)施用和任意次序的序贯施用。

“药学上可接受的载体”在用于本发明时包括药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常，生理学可接受的载体是 pH 缓冲水溶液。生理学可接受载体的例子包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量(少于约 10 个残基)多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖，蔗糖，海藻糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖醇，诸如甘露醇或山梨醇；成盐反荷离子，诸如钠；和/或非离子表面活性剂，诸如 TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和 PLURONICSTM。

在本发明中，20 种常规氨基酸和其缩写遵从常规用法。参见 Immunology-A Synthesis (第 2 版, E.S. Golub 和 D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), 其通过引用合并入本文。

附图说明

图 1 测定抗体药物偶联物的药物/抗体比例的 HIC-HPLC 图。

图 2 单抗及抗体药物偶联物的体外细胞活性测定，其中○代表 JMT101 单克隆抗体，▲代表 MRG003 抗体药物偶联物。

图 3 MRG003 对结肠癌细胞 HT-29 的生长抑制活性，其中○代表 JMT101 单克隆抗体，▲代表 MRG003 抗体药物偶联物。

图 4 MRG003 对脑胶质瘤癌细胞 U87-MG 的生长抑制活性，其中○代表 JMT101 单克隆抗体，▲代表 MRG003 抗体药物偶联物。

图 5 MRG003 对肺癌细胞 A549 的生长抑制活性，其中○代表 JMT101 单克隆抗体，▲代表 MRG003 抗体药物偶联物。

图 6 MRG003 对 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo 的生长抑制活性，其中◇代表爱必妥单克隆抗体，▲代表 MRG003 抗体药物偶联物。

图 7 单抗及抗体药物偶联物对小鼠 HT-29 结肠癌移植瘤体积的影响。图中数据用平均值±标准差表示；与缓冲液对照组相比，*表示 $P < 0.05$ ，**表示 $P < 0.01$ ，***表示 $P < 0.001$ 。

图 8 单抗及抗体药物偶联物对小鼠 HT-29 结肠癌移植瘤模型的体重的影响。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

本发明中的抗体 JMT-101 即中国发明专利申请 CN 103772504A 中的 BA03，其制备方法参考该专利申请中的实施例 3，该抗体各部分的序列如下：

重链可变区序列为：

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLSNYDVHWVRQAP
GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTRLTISVDTSKNQFSLKLSSVT
AADTAVYYCARALDYDYEFAYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:
1)。**

其中下划线部分分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 5)、CDR2 (SEQ ID NO: 6)、CDR3 (SEQ ID NO: 7)；

未下划线部分分别为 FR1 (SEQ ID NO: 8)、FR2 (SEQ ID NO: 9)、FR3 (SEQ ID NO: 10)、FR4 (SEQ ID NO: 11)。

轻链可变区序列为：

**EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQS
PKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQ
NEWPTSFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 2)。**

其中下划线部分分别为 CDR1 (SEQ ID NO: 12)、CDR2 (SEQ ID NO: 13)、CDR3 (SEQ ID NO: 14)；

未下划线部分分别为 FR1 (SEQ ID NO: 15)、FR2 (SEQ ID NO: 16)、FR3 (SEQ ID NO: 17)、FR4 (SEQ ID NO: 18)。。

重链恒定区序列为：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 3)。

轻链恒定区序列为：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 4)。

实施例 1 抗体药物偶联物的制备方法

取 10 毫克的 JMT-101 抗体，使用 15mL 的 30KD 超滤装置置换到还原缓冲液 (25mM 硼酸钠, pH8.0, 25mM NaCl, 5 mM EDTA)中，共三次置换；终体积约为 1mL,转移至新的 Eppendorf 离心管 (称重)中，并称重；检测蛋白浓度，计算蛋白总量。向抗体中加入 2.5 倍摩尔数的 DTT，室温保温 2 小时，连续混匀；使用 15ml 的 30KD 超滤装置置换到偶联缓冲液 (50mM Tris, pH7.2, 150mM NaCl, 5 mM EDTA)中，共三次置换。取浓缩液，以 A280 测定蛋白浓度，并称重，计算蛋白总量；取 10μl 样品，以 Ellman's 方法测定自由巯基数；

并以下列公式计算其自由巯基的摩尔浓度：

$$C_{\text{thiol}} = \frac{A_{412} \times 112}{b \times 14150} \text{ (M)}$$

b: 比色皿光路长度 (通常 1cm)。

根据自由巯基的摩尔浓度和总蛋白溶液体积计算自由巯基摩尔数。

向还原后的抗体中加入 1.1 倍于自由巯基摩尔数的 vc-MMAE (购上海皓元化学科技有限公司) (溶于 DMSO), 混匀后室温反应 2 小时, 间断混匀。向反应体系中加入 20 倍于所投入之 vc-MMAE 摩尔数的 N-乙酰半胱氨酸于反应液中, 混匀, 静置 5 分钟。使用 15ml 的 30KD 超滤装置置换到偶联物储存液 (20mM 柠檬酸钠(Na-citrate), 0.3% NaCl, 5% 海藻糖 (Trehalose), 0.05% Tween-80, pH6.0) 中, 共三次置换, 即得到抗体药物偶联物 MRG003; 样品于 4℃ 保存。

药物/抗体比例的测定:

将制备好的抗体药物偶联物 MRG003 经过 HIC-HPLC 分析 (Jun Ouyang, Drug-To-Antibody(DAR) Ratio and Drug Distribution by Hydrophobic Interaction Chromatography and Reverse Phase High Performance Chromatography, Laurent Ducry(ed.), Antibody Drug Conjugates, Chapter 17, Methods in Molecular Biology, Vol 1045, p275-283) 以测定药物/抗体比例 (drug antibody ratio, DAR), 见图 1, 根据图谱峰面积计算得到平均载药数 DAR 为 4.1。

实施例 2 抗体药物偶联物 MRG003 体外细胞活性的测定

细胞活性检测方法:

1.1 复苏后的细胞株经过 3-4 代细胞传代之后, 先倒去培养基, 用 5ML DPBS 润洗一遍, 再用 3mL 胰蛋白酶消化细胞, 分别用培养基重悬, 离心机离心, 弃上清, 再用培养基再次重悬, 取出 0.5mL 用细胞计数仪计数。在 96 孔细胞培养板上进行铺板 (DiFi 细胞以 10000 个细胞/孔 HT-29 细胞以 5000 个细胞/孔, A549 细胞以 2000 个细胞/孔, U87-MG 细胞以 3000 个细胞/孔, LoVo 细胞以 4000 个细胞/孔), 培养 24 小时后, 加入系列稀释浓度的单克隆抗体 JMT-101 以及抗体药物偶联物 MRG003 保温 72 小时, 之后每孔加入 20ul CCK8 显色试剂 在波长 450-650nm 用酶标仪检测 OD450-650, 并进行四参数拟合。

体外细胞活性实验结果:

以下各细胞株购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

在 EGFR 高表达的 DiFi 细胞 (人结直肠癌细胞) 中的活性:

MRG003 比单抗 JMT-101 有显著增高的细胞生长抑制活性, EC50 降低了大约 10 倍 (JMT-101 的 EC50 是 51.9 ng/ml, MRG003 的 EC50 是 5.1 ng/ml), 如图 2 所示。

在 EGFR 中度表达和低度表达的其它肿瘤细胞中的活性:

MRG003 相对于单抗本身对 EGFR 中度表达和低度表达的癌细胞 (人结肠癌细胞 HT29、人肺癌细胞 A549、人脑星形胶质母细胞瘤细胞 U87-MG) 也显示了明显的细胞生长抑制活性 (如图 3、图 4、图 5 所示), 其中 HT-29 的 EC50 是 611 ng/ml, A549 的 EC50 是 28.3 μ g/ml, U87-MG 的 EC50 是 5.3 μ g/ml。

另外, 我们还测试了在 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo (Dunn EF, Ilda M, Myers RA, Hintz KA, Campbell DA, Armstrong EA, Li C and Wheeler DL. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab. *Oncogene* 2011; 30:561-574) 中的活性, 发现 MRG003 对 KRAS 突变体结肠癌细胞 LoVo 显示了明显的肿瘤生长抑制活性 (如图 6 所示, EC50 是 3.2 μ g/ml)。

实施例 3 小鼠体内移植瘤实验

小鼠体内移植瘤实验方法:

HT-29 结肠癌细胞是 EGFR 低表达的细胞株, 目前已在市场上销售的治疗结直肠癌的 EGFR 靶向单抗爱必妥 (Erbix) 对 HT-29 细胞株没有生长抑制活性。

HT-29 细胞移植模型: 收集对数生长期的肿瘤细胞, 计数后重悬于 1 \times PBS, 调整细胞悬液浓度至 3 \times 10⁷/ml。用 1ml 注射器 (4 号针头) 在裸鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞, 3 \times 10⁶/0.1ml/鼠, 当肿瘤体积达到 150-200mm³ 后用随机区组法分组, 每组 8 只小鼠, 保证各组间肿瘤体积和小鼠体重均一。各组肿瘤体积的均值与所有实验动物肿瘤体积的均

值差异不超过 $\pm 10\%$ 。尾静脉给药，每四天给一次药（第 1、5、9、13 天），一共给药 4 次，定期测量肿瘤体积和小鼠体重。每一个给药组分别有 8 只小鼠。

小鼠移植瘤实验结果

小鼠 HT-29 结肠癌移植瘤实验：实验共分五组，包括缓冲液组（20 mM 柠檬酸钠，0.3%氯化钠，5%海藻糖，0.05%吐温 80，pH6），JMT-101 单抗组（5mg/kg）、MRG003 组（1mg/kg）、MRG003 组（5mg/kg）和非结合 ADC 组（5mg/kg）（人源 IgG-vcMMAE 偶联物，其中 IgG 是从健康人血清纯化的 IgG，该偶联物制备方法与 MRG003 相同）。MRG003 给药的小鼠移植肿瘤体积与对照组比较显著降低，显示了明显的抗肿瘤生长效应（图 7）。在第 18 天，MRG003 在 5mg/Kg 的给药剂量组与缓冲液组相比肿瘤生长抑制率达到 54%，与单抗 JMT-101 的同等剂量组相比肿瘤生长抑制率达到 46%，与非结合 ADC 相比肿瘤生长抑制率达到 42%。

小鼠体重：MRG003 给药的小鼠体重与对照组比较没有变化（见图 8），说明 MRG003 没有使小鼠体重降低的毒性作用

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。



说明书附图

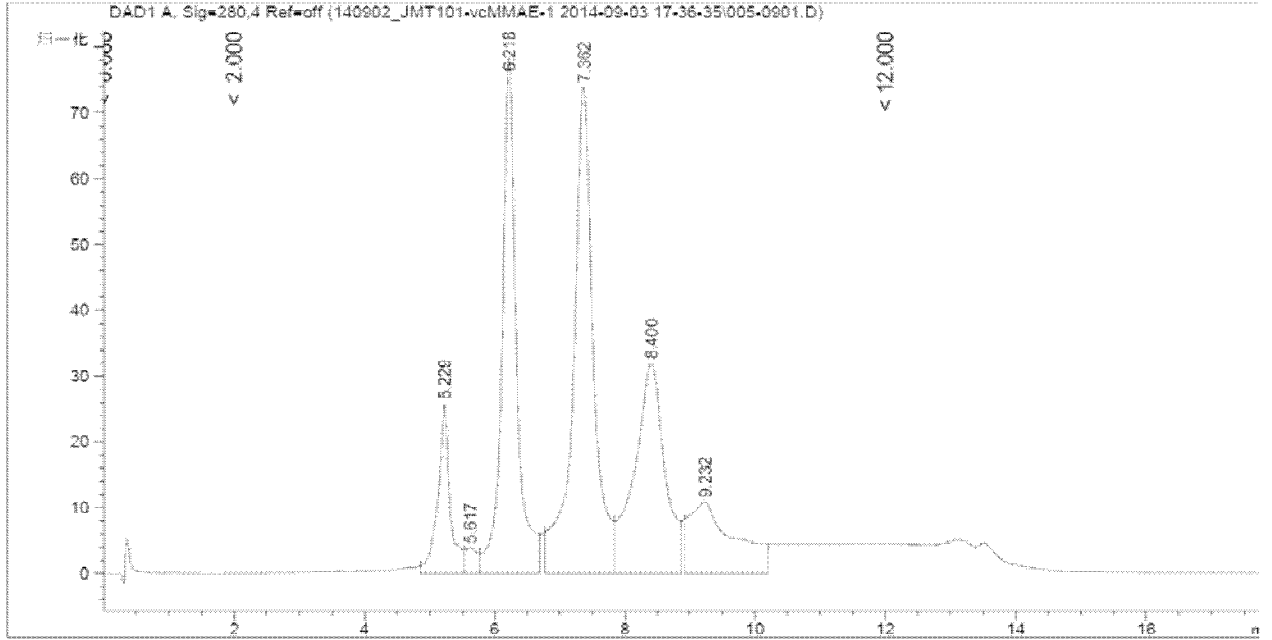


图1

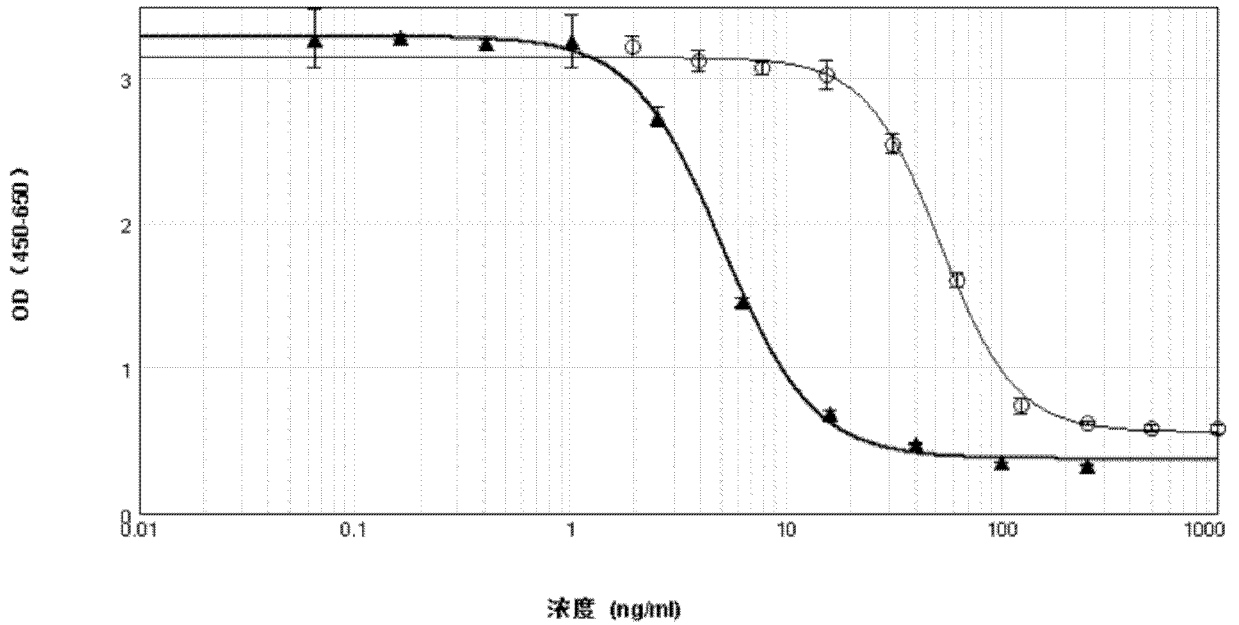


图2

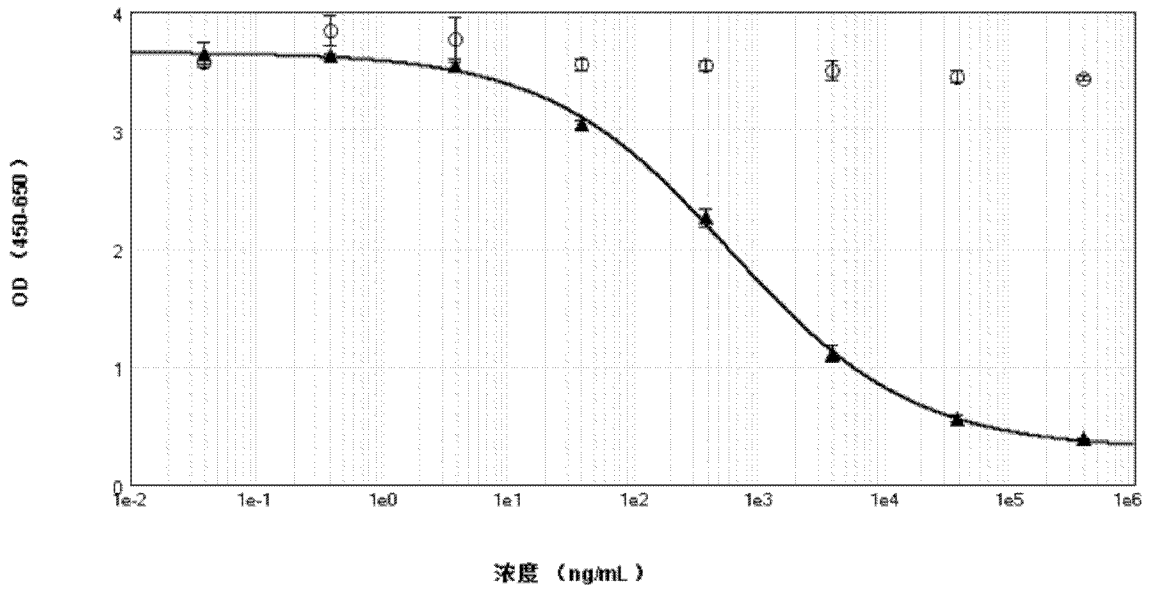


图3

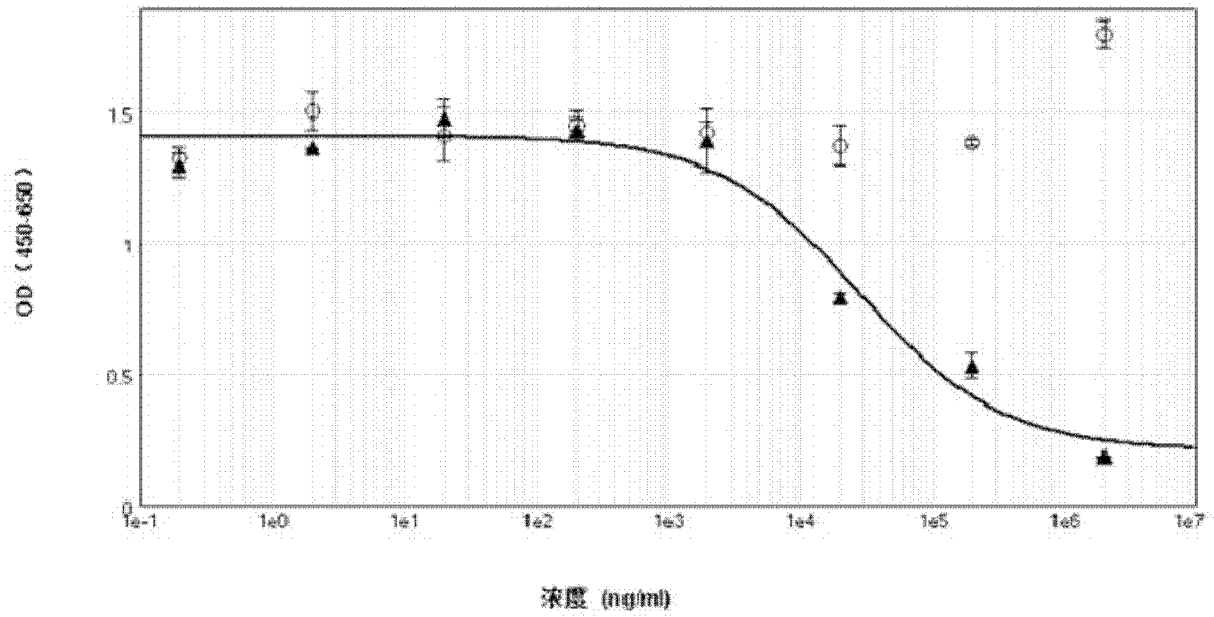


图4

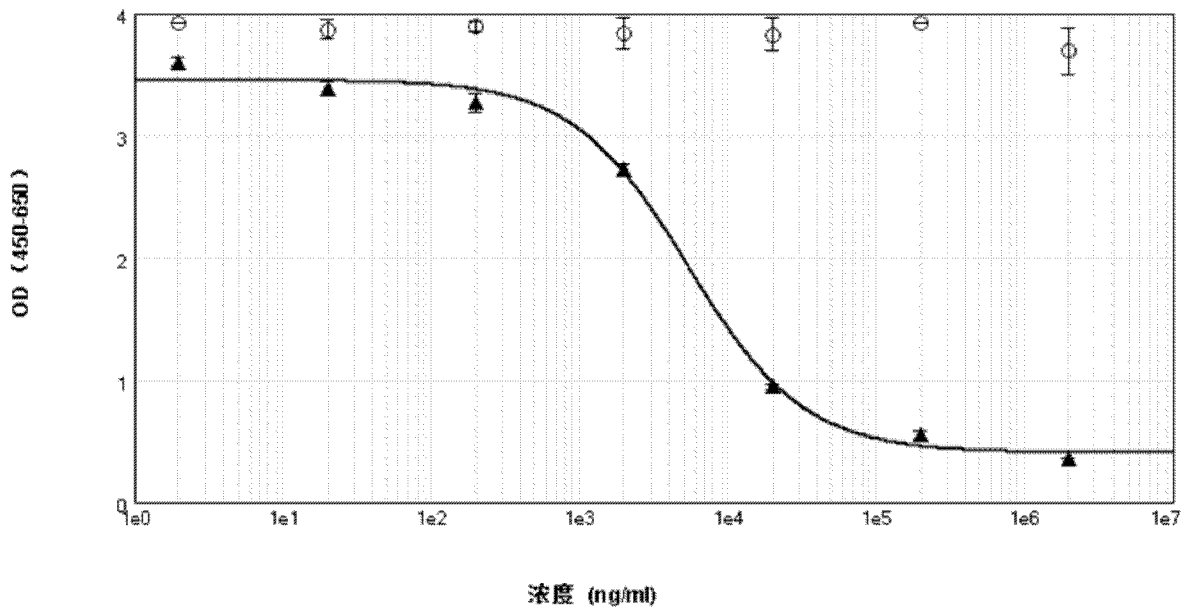


图5

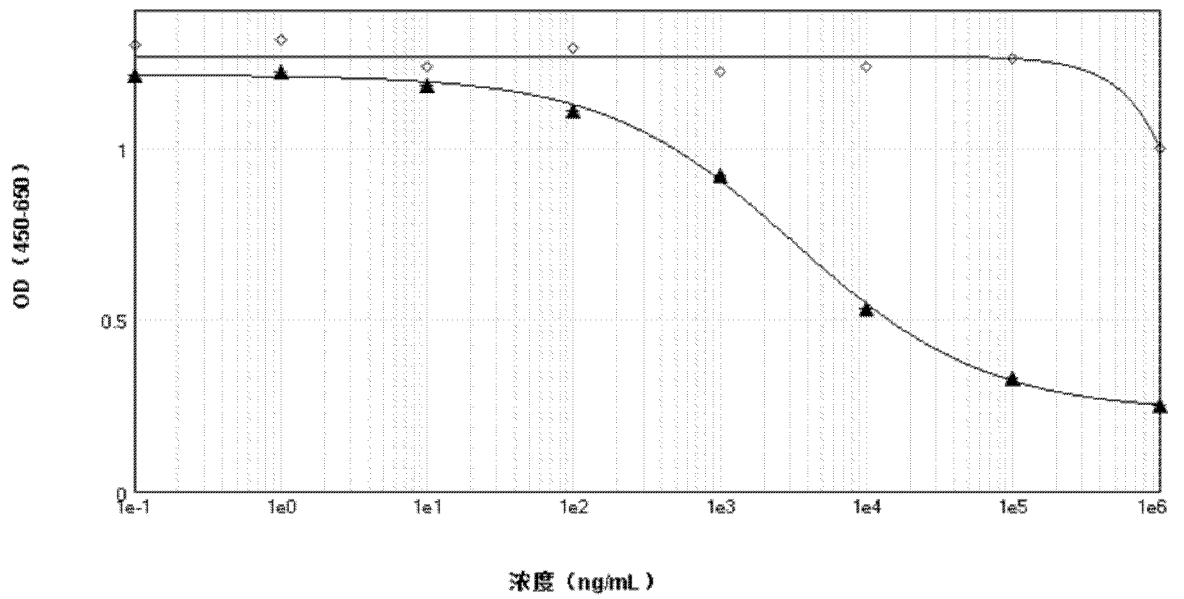


图6

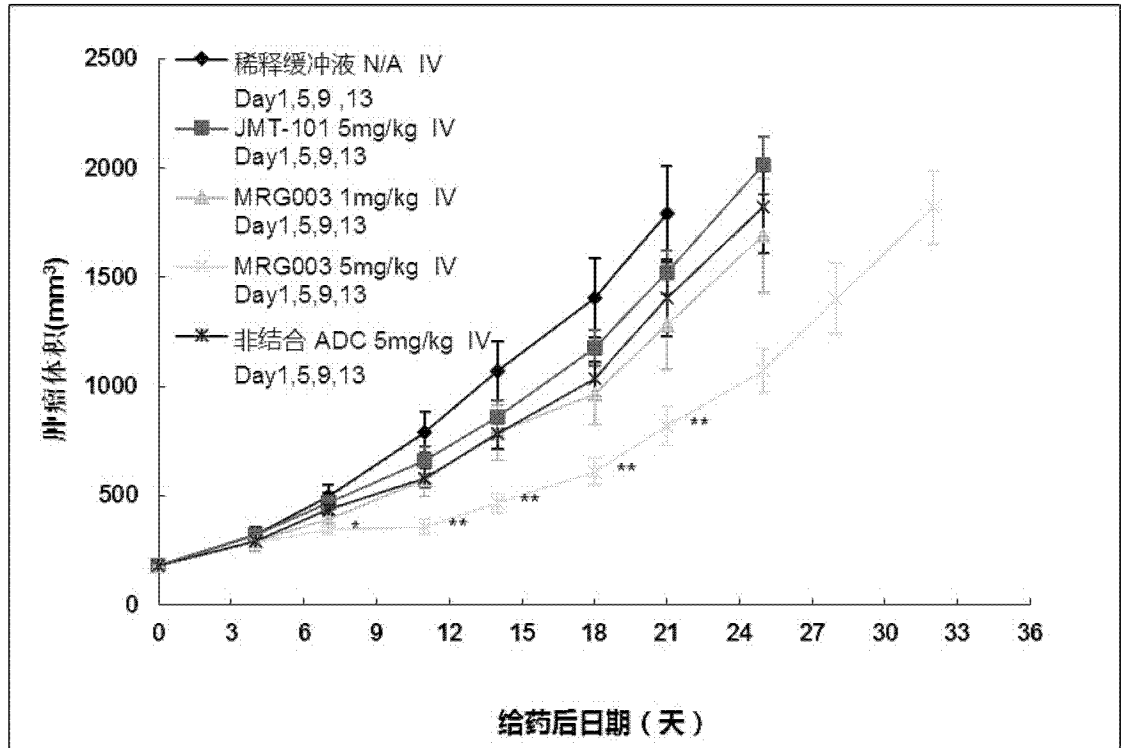


图 7

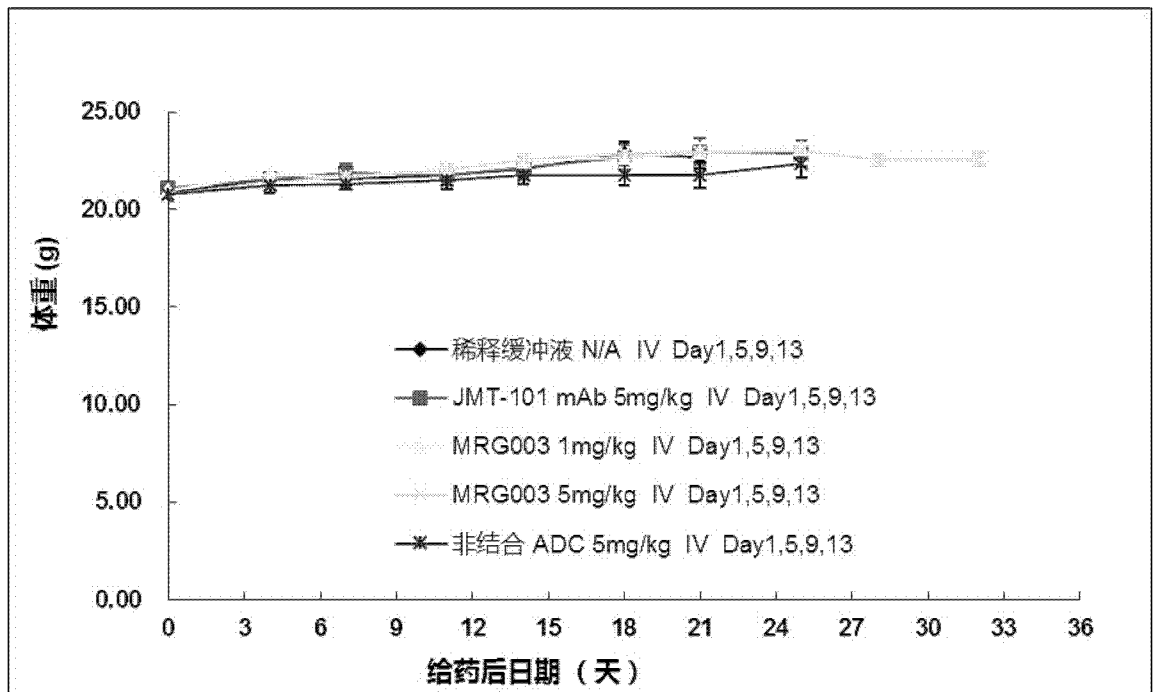


图 8

SEQUENCE LISTING

<110> 上海美雅珂生物技术有限责任公司
 <120> 抗体药物偶联物
 <130> IDC140176
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 1

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

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

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

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Asn Tyr Asp Val His
 1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT



<213> 人工序列

<400> 6

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser
1 5 10 15

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Ala Leu Asp Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 9

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 11

<211> 11



<212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 11
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 12
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 13
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 14
 Gln Gln Asn Asn Glu Trp Pro Thr Ser Phe
 1 5 10

<210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <400> 15
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT



<213> 人工序列

<400> 16

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys
1				5					10					15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 17

Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 18

Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
1				5				