



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116963782 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 27

(21) 申请号 202180046682.8

(22) 申请日 2021.04.30

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2020/088565 2020.05.03 CN

PCT/CN2021/086849 2021.04.13 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/030198 2021.04.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/225892 EN 2021.11.11

(71) 申请人 联宁(苏州)生物制药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区

星湖街218号B8-301

申请人 上海诗健生物科技有限公司

(72) 发明人 朱同 A·B·卡萨诺夫 李辉

郭茂君 李海泓 许传营 何峰

周清

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 赵昊 张璐

(51) Int. Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 15/14 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

权利要求书10页 说明书60页

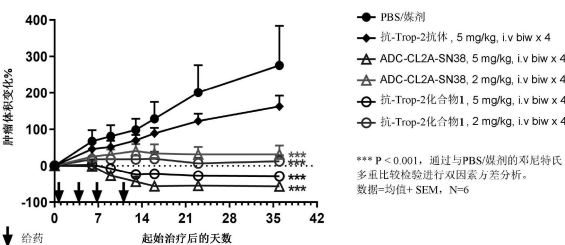
序列表4页 附图14页

(54) 发明名称

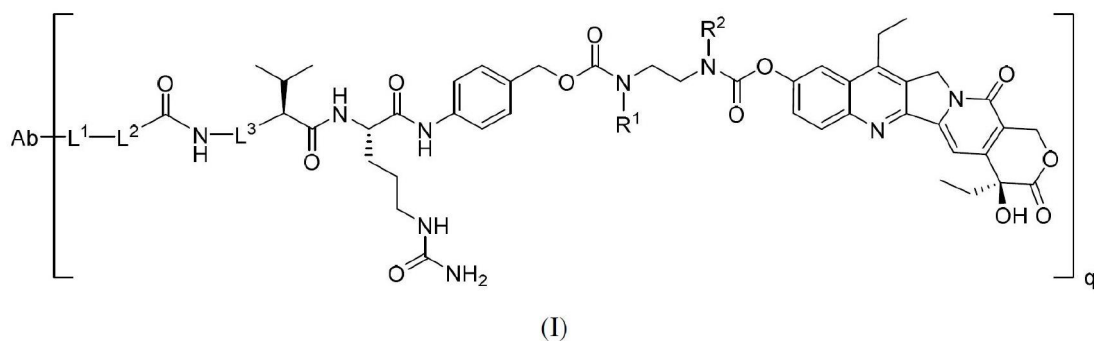
包含抗TROP-2抗体的抗体药物偶联物

(57) 摘要

本公开涉及包含抗Trop-2抗体的抗体药物偶联物(ADC)。本文提供包含此ADC的组合物,以及其制造和使用的方法。



1. 一种抗体药物偶联物(ADC), 其具有式(I):



或是其药学上可接受的盐, 其中:

Ab是抗Trop-2抗体;

q是介于1至20范围内的值;

L¹是结合至所述抗Trop-2抗体的连接子;

L²是-(CH₂)_p-, 其中p是4、5、6、7或8;

L³是键或基于聚氧乙烯的二价连接子; 以及

R¹和R²各自独立地是C₁₋₆烷基。

2. 根据权利要求1所述的ADC, 其中L¹是结合至所述抗Trop-2抗体的硫的连接子。

3. 根据权利要求1或2所述的ADC, 其中-L¹-L²-是

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的ADC, 其中q是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20, 介于1至10范围内的值或介于6至8范围内的值。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的ADC, 其中p是4、5或6, 优选地是5。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的ADC, 其中L³是键。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的ADC, 其中L³是基于聚氧乙烯的二价连接子。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的ADC, 其中R¹是C₁₋₄烷基或C₁₋₃烷基。

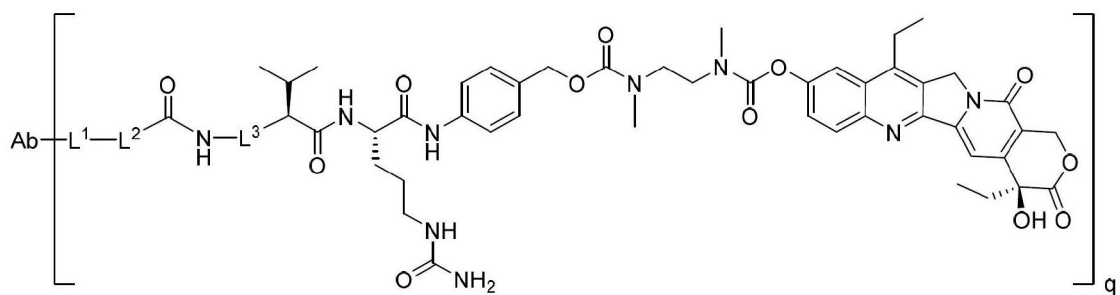
9. 根据权利要求8所述的ADC, 其中R¹是甲基或乙基。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的ADC, 其中R²是C₁₋₄烷基或C₁₋₃烷基。

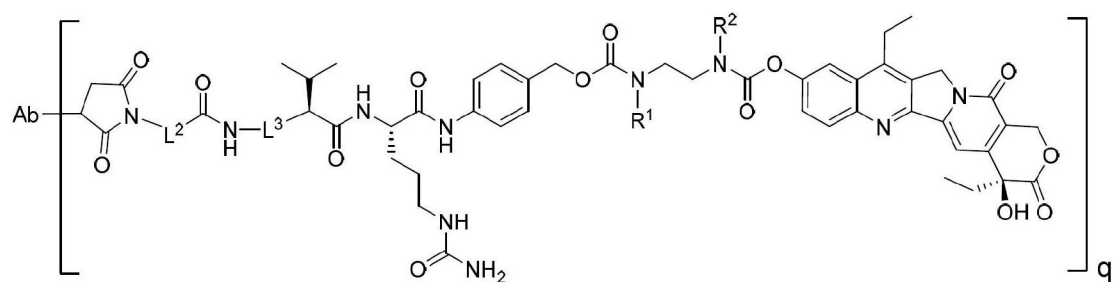
11. 根据权利要求10所述的ADC, 其中R²是甲基或乙基。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的ADC, 其中R¹与R²相同。

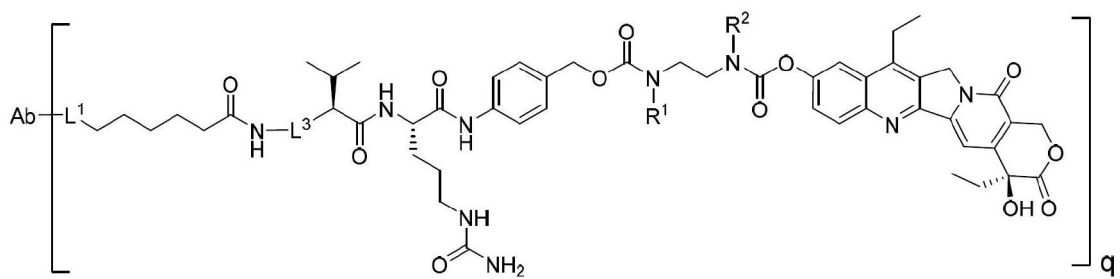
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的ADC, 其中所述ADC具有式(IIa)、(IIb)、(IIc)、(IIIa)、(IIIb)或(IIIc):



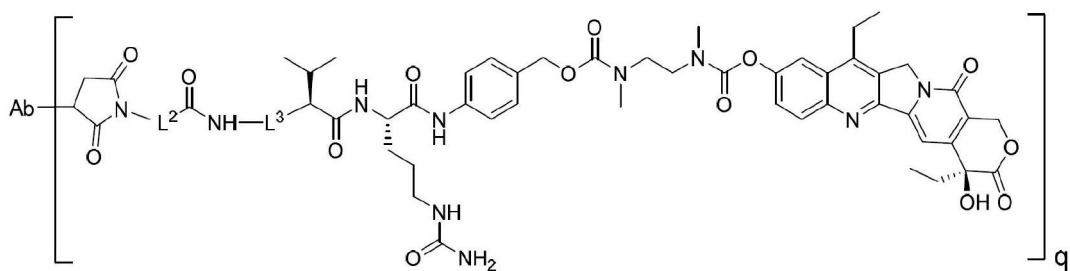
(IIa) 、



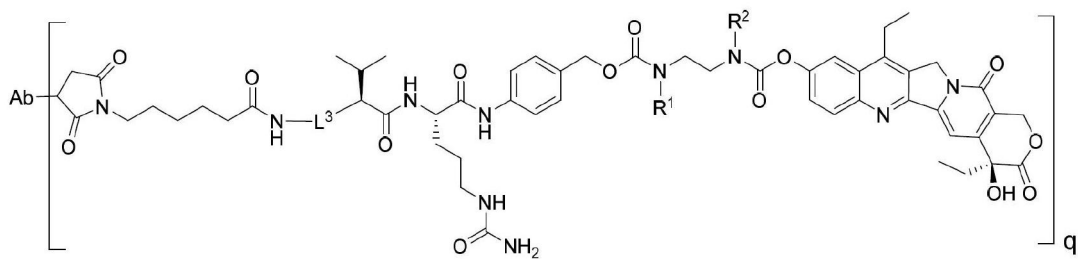
(IIb) 、



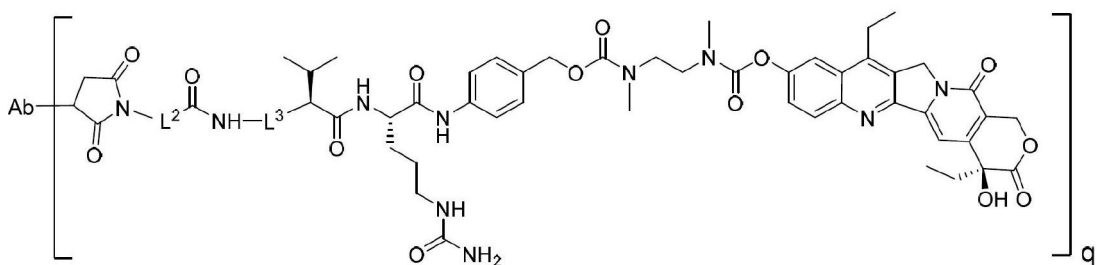
(IIc) 、



(IIIa) 、



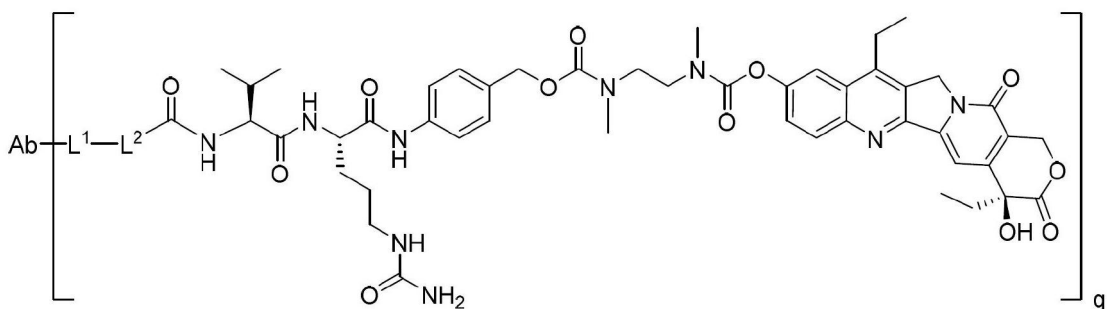
(IIIb) 、



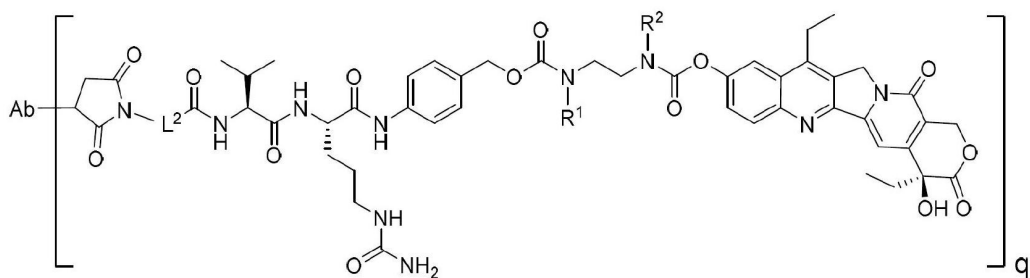
(IIIc)

或其药学上可接受的盐。

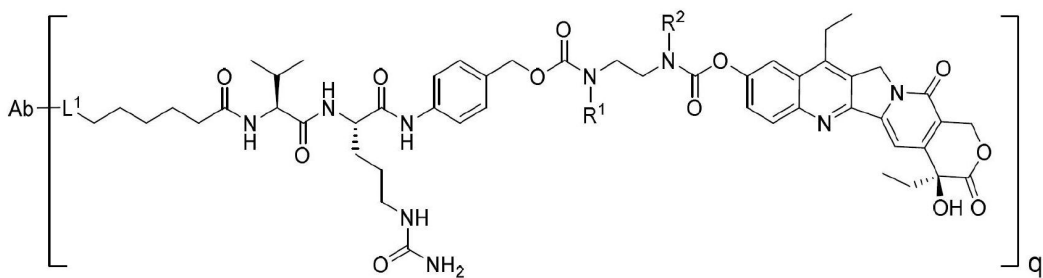
14. 根据权利要求13所述的ADC, 其中所述ADC具有式(IIa-1)、(IIb-1)、(IIc-1)、(IIIa-1)、(IIIb-1)或(IIIc-1) :



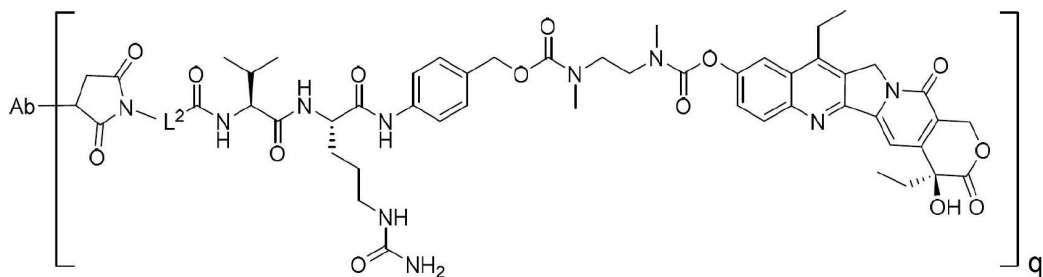
(IIa-1) 、



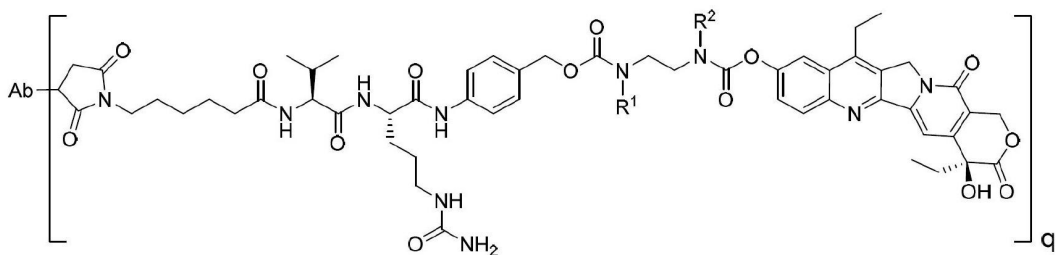
(IIb-1) 、



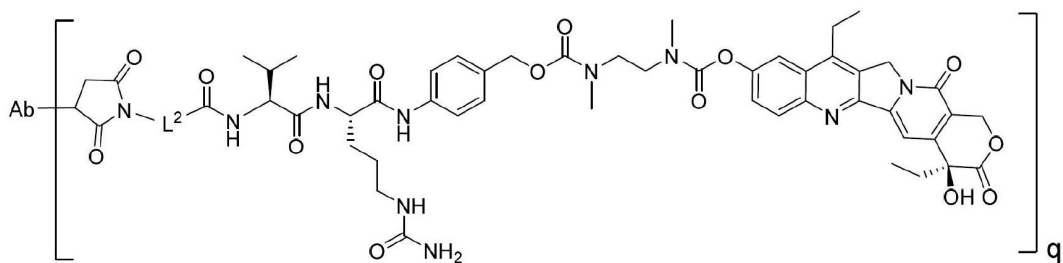
(IIc-1) 、



(IIIa-1) 、



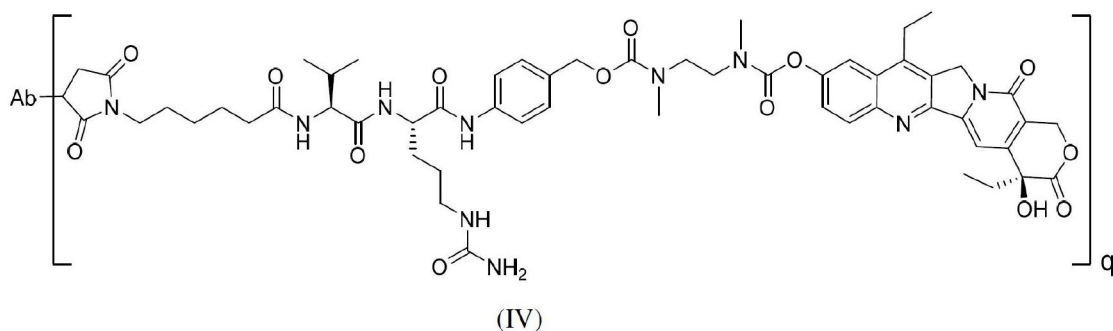
(IIIb-1) 、



(IIIc-1)

或其药学上可接受的盐。

15. 根据权利要求1所述的ADC, 其中所述ADC具有式(IV) :



或其药学上可接受的盐。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的ADC, 其中所述抗Trop-2抗体包含: 包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1、包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2、包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3、包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1、包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2和包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的ADC, 其中所述抗Trop-2抗体包含: 具有与SEQ ID NO:7具有至少95%、96%、97%、98%、或99%同一性的序列的VL; 具有与SEQ ID NO:8具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VH; 具有SEQ ID NO:7的序列的VL; 和/或具有SEQ ID NO:8的序列的VH。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的ADC, 其中所述抗Trop-2抗体包含: κ 轻链, 和/或IgG抗体, 任选地其中所述抗Trop-2抗体是IgG1抗体。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的ADC, 其中所述抗Trop-2抗体结合人类Trop-2, 任选地其中所述人类Trop-2具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的ADC, 其用于治疗, 任选地用于治疗表达Trop-2的癌症。

21. 一种在受试者中治疗表达Trop-2的癌症的方法, 所述方法包括向有此需要的受试者施用权利要求1至19中任一项所述的ADC。

22. 一种根据权利要求1至19中任一项所述的ADC用于制造药剂的用途, 任选地用于制造供治疗表达Trop-2的癌症的药剂。

23. 根据权利要求20、21或22任一所述的供使用的ADC、方法或用途, 其中所述表达Trop-2的癌症是上皮细胞衍生的癌症, 任选地其中所述表达Trop-2的癌症是癌(Carcinoma)。

24. 根据权利要求23所述的供使用的ADC、方法或用途, 其中所述癌是基底细胞癌、鳞状细胞癌、肾细胞癌、导管原位癌、浸润性导管癌或腺癌。

25. 根据权利要求23或24所述的供使用的ADC、方法或用途, 其中所述表达Trop-2的癌症包含实体肿瘤。

26. 根据权利要求23至25中任一项所述的供使用的ADC、方法或用途, 其中所述表达Trop-2的癌症是转移性和/或复发性癌症。

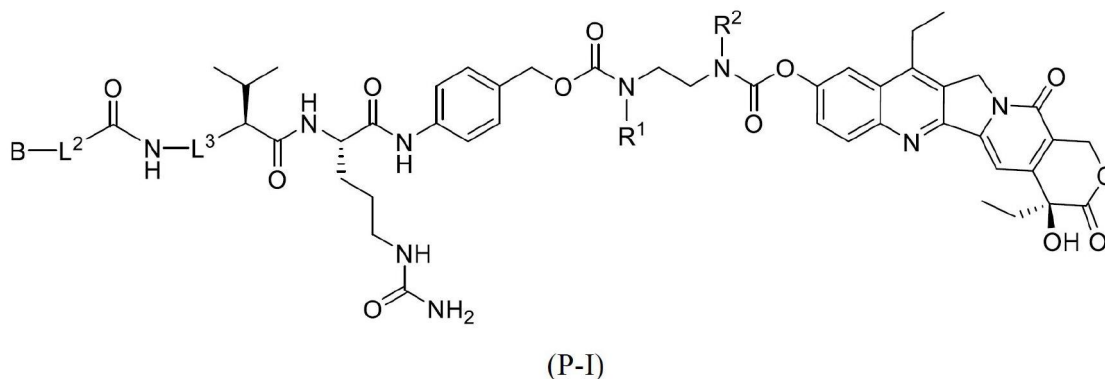
27. 根据权利要求20至26中任一项所述的供使用的ADC、方法或用途, 其中所述表达Trop-2的癌症是胰腺癌、胃癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌、结直肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌、尿路上皮癌、神经胶质母细胞瘤、肺癌、子宫颈癌、食道癌或卵巢癌。

28. 根据权利要求27所述的供使用的ADC、方法或用途, 其中所述表达Trop-2的癌症是

胰腺癌、胃癌或乳腺癌,任选地其中所述癌症是转移性的。

29. 根据权利要求28所述的供使用的ADC、方法或用途,其中所述表达Trop-2的癌症是三阴性乳腺癌,任选地其中所述癌症是转移性的。

30. 一种制备根据权利要求1所述的ADC的方法,其包含使抗Trop-2抗体与式(P-I)的分子:



或其药学上可接受的盐反应,其中:

B是能够与所述抗Trop-2抗体形成键的反应性部分;

L^2 是 $-(CH_2)_p-$,其中p是4、5、6、7或8;

L^3 是键或基于聚氧乙烯的二价连接子;以及

R^1 和 R^2 各自独立地是 C_{1-6} 烷基。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中B是能够与所述抗Trop-2抗体的巯基形成键的反应性部分。

32. 根据权利要求30或31所述的方法,其中B是N-顺丁烯二酰亚胺基。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述ADC是根据权利要求1至19中任一项所述的ADC。

34. 根据权利要求30至33中任一项所述的方法,其中p是4、5或6,优选地是5。

35. 根据权利要求30至34中任一项所述的方法,其中 R^1 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-3} 烷基。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中 R^1 是甲基或乙基。

37. 根据权利要求30至36中任一项所述的方法,其中 R^2 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-3} 烷基。

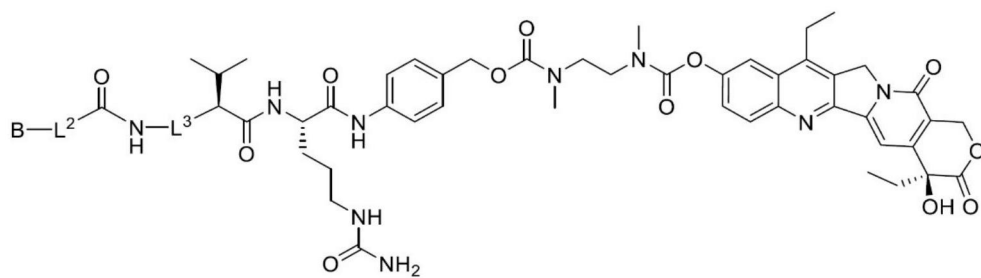
38. 根据权利要求37所述的方法,其中 R^2 是甲基或乙基。

39. 根据权利要求30至38中任一项所述的方法,其中 R^1 与 R^2 相同。

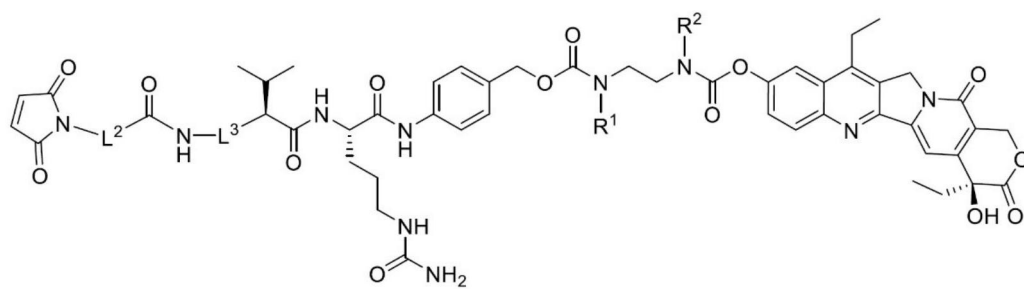
40. 根据权利要求30至39中任一项所述的方法,其中 L^3 是一个键。

41. 根据权利要求30至39中任一项所述的方法,其中 L^3 是基于聚氧乙烯的二价连接子。

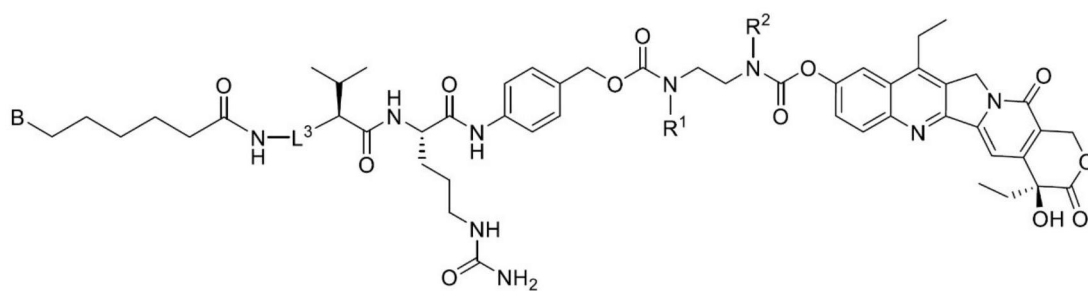
42. 根据权利要求30至41中任一项所述的方法,其中所述分子具有式(P-IIa)、(P-IIb)、(P-IIc)、(P-IIIa)、(P-IIIb)或(P-IIIc):



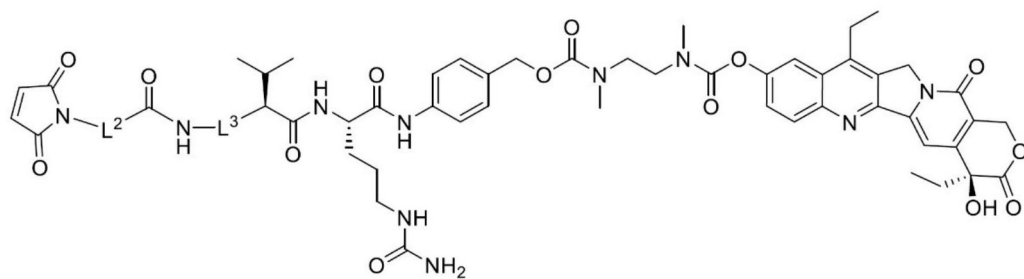
(P-IIa) 、



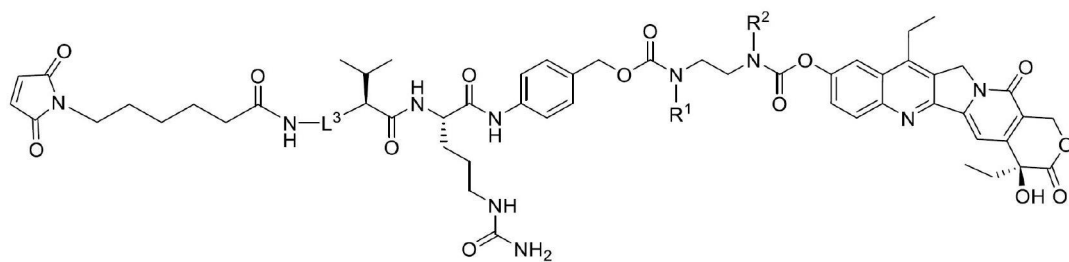
(P-IIb) 、



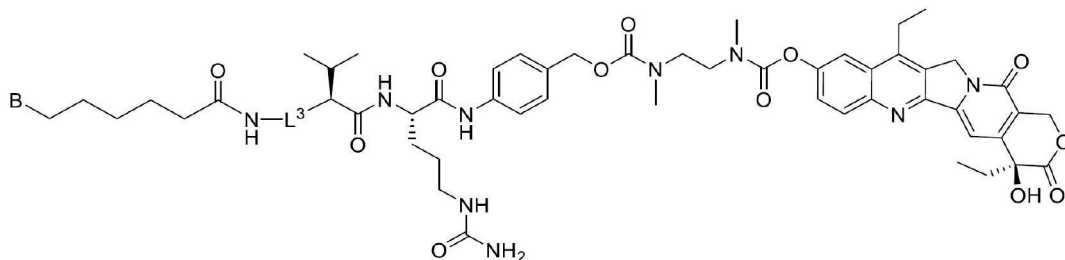
(P-IIc) 、



(P-IIIa) 、



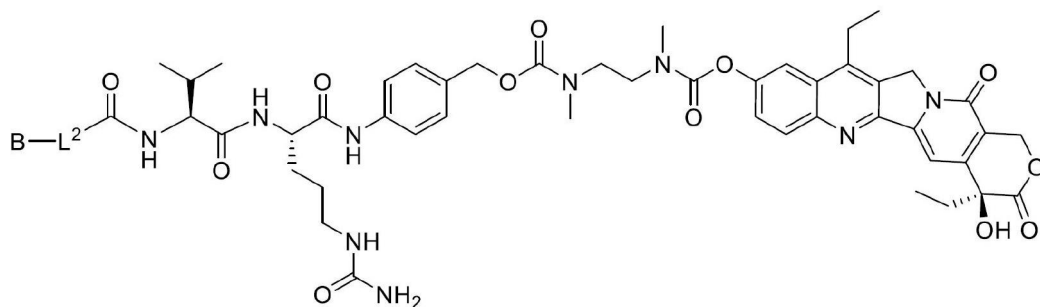
(P-IIIb) 、



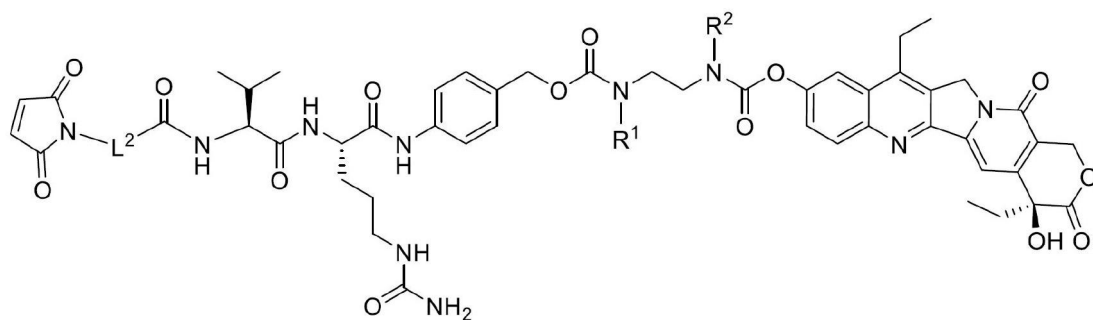
(P-IIIc)

或其药学上可接受的盐。

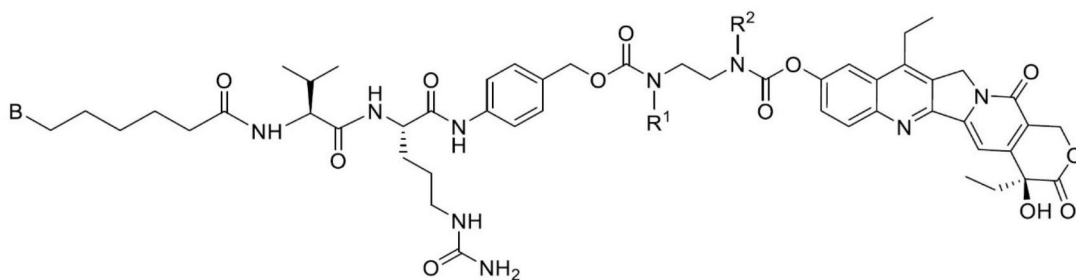
43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述分子具有式 (P-IIa-1)、(P-IIb-1)、(P-IIc-1)、(P-IIId-1)、(P-IIIf-1) 或 (P-IIIg-1) :



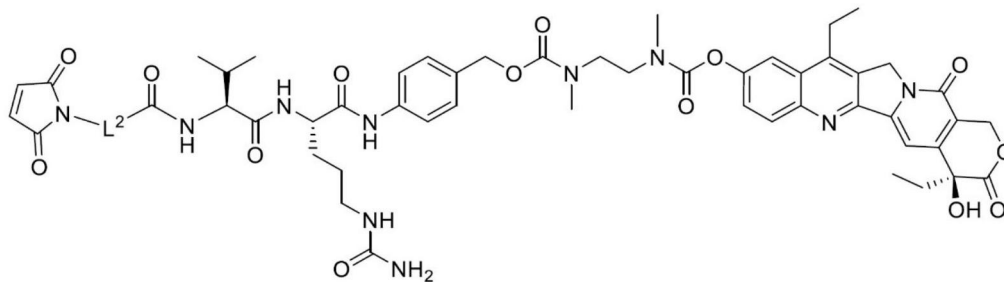
(P-IIa-1) 、



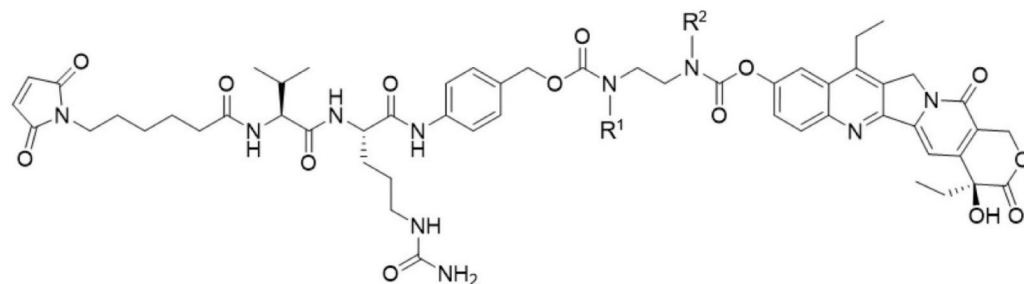
(P-IIb-1) 、



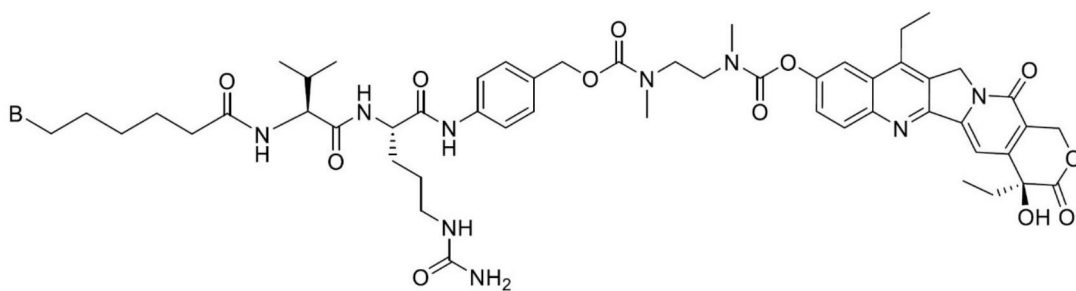
(P-IIc-1) 、



(P-IIIa-1) 、



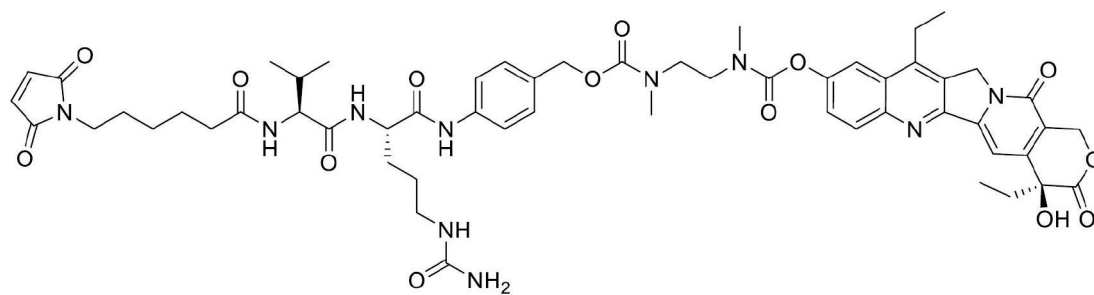
(P-IIIb-1) 、



(P-IIIc-1)

或其药学上可接受的盐。

44. 根据权利要求43所述的方法, 其中所述分子具有式(P-IV) :



(P-IV)

或其药学上可接受的盐。

包含抗TROP-2抗体的抗体药物偶联物

[0001] 相关申请的交叉引用

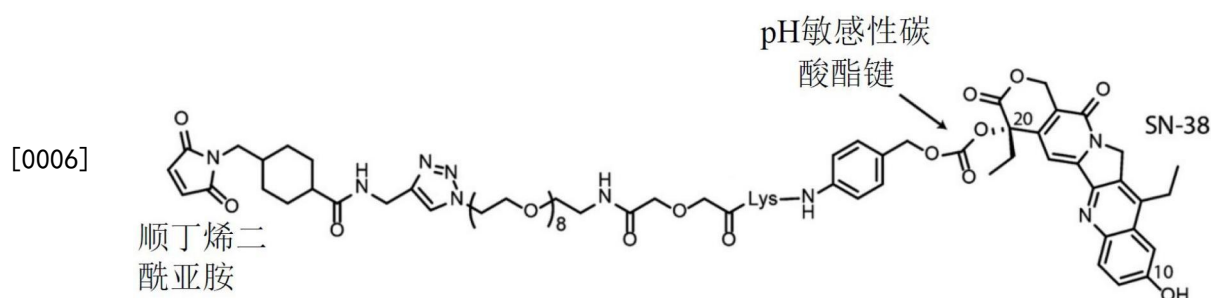
[0002] 本申请要求于2020年5月3日提交的国际申请申请号PCT/CN2020/088565和于2021年4月13日提交的国际申请申请号PCT/CN2021/086849的优先权,其中每一者的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 本公开涉及包含抗Trop-2抗体的抗体药物偶联物(ADC)以及其制造和使用的方法。

[0004] ADC可使药物靶向特定细胞,诸如癌细胞,由此允许递送在单独使用时将具有高毒性的药物。SN-38(7-乙基-10-羟基喜树碱)是作为伊立替康(irinotecan)(CPT-11)的活性组分的喜树碱,一种拓扑异构酶I抑制剂。人们一直在努力研发包含SN-38和抗Trop-2抗体的ADC。Trop-2(滋养细胞表面抗原;也称为上皮糖蛋白-1或EGP-1)是被许多上皮癌高度表达的糖蛋白。关于SN-38和Trop-2的其他背景,参见例如Ocean等人,Cancer 123:3843-54(2017)和其中所引用的参考文献。

[0005] 提供有效同时保持有利的安全性的包含SN-38的抗Trop-2 ADC具有挑战性。以上述Ocean等人报道用IMMU-132(萨西土珠单抗戈维替康(sacituzumab govitecan);也称为ADC-CL2A-SN38)ADC进行的临床试验为例。尽管该ADC被表征为提供了“令人振奋的总体反应”,但仍存在高频的不良事件——接受8mg/kg剂量的81名患者中有80名和10mg/kg剂量的97名患者中有89名(参见Ocean等人的表2和相应正文)。值得注意的是,据报道ADC-CL2A-SN38中的连接子允许“SN-38从血清中的偶联物解离,半衰期为大致1天”,其也许可以解释或其造成了较高的不良事件频率。参见Govindan等人,Mol Cancer Ther 12:968-978(2013)。CL2A-SN38连接子-药物部分的化学结构展示于下文(描绘为用于与抗体结合的反应性顺丁烯二酰亚胺形式)。



[0007] 包含SN-38的另一ADC,ADC-CL2E-SN38,使用含氨基甲酸酯的连接子而非pH敏感性碳酸酯键,并且具有与ADC-CL2A-SN38不同的SN38附接点。据报道具有CL2E连接子的偶联物具有87.5天的血清半衰期,而且表现出“减弱的体内功效”,被认为“不如不太稳定的CL2A连接的SN-38”。Govindan等人,同前文献,第972页和第977页。

发明内容

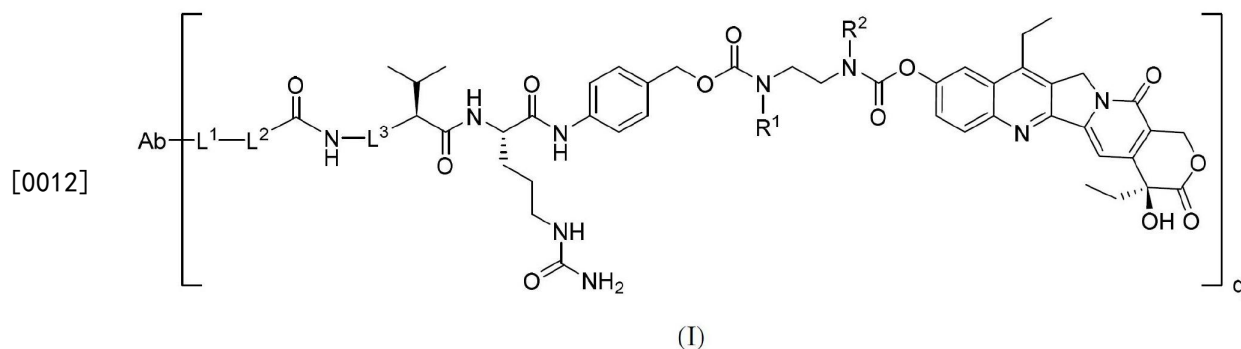
[0008] 本文涵盖通过在ADC中使用一种能减缓在离开癌细胞后SN-38的非预期释放,同时

允许有效的靶上释放的连接子,用以提高用包含SN-38的抗Trop-2 ADC治疗后的安全性和/或降低不良事件的频率。

[0009] 因此,本公开提供式(I)的ADC,其包含经由连接子部分结合至SN-38的抗Trop-2抗体。相比于某些其他SN-38ADC,式(I)的ADC化合物可提供更多稳定性并且提供更佳的毒性数据。本文所描述的ADC化合物的改良活性归因于式(I)的连接子部分,其准许在目标表达Trop-2的细胞处选择性释放SN-38。在一些实施例中,本文所描述的ADC展现出比ADC-CL2A-SN38更大的稳定性(例如,在中性pH下,诸如实例B3中的示例性条件,或在体内,诸如实例B4中的示例性条件)和/或比ADC-CL2E-SN38更大的体内功效。在一些实施例中,本文所描述的ADC展现出相对于ADC-CL2A-SN38提高的安全性(例如,降低不良事件的频率)和/或比ADC-CL2E-SN38更大的体内功效。在一些实施例中,本文所描述的ADC展现出比ADC-CL2A-SN38更好的稳定性(例如,在中性pH下,诸如实例B3中的示例性条件,或在体内,诸如实例B4中的示例性条件)和相对于ADC-CL2A-SN38提高的安全性(例如,降低不良事件的频率),并且可进一步展现出比ADC-CL2E-SN38更大的体内功效。

[0010] 本公开涵盖以下实施例。

[0011] 实施例1是一种抗体药物偶联物(ADC),其具有式(I):



[0013] 或是其药学上可接受的盐,其中:

[0014] Ab是抗Trop-2抗体;

[0015] q是介于1至20范围内的值;

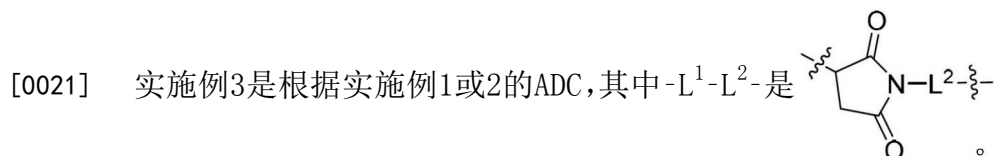
[0016] L¹是结合至该抗Trop-2抗体的连接子;

[0017] L²是-(CH₂)_p-,其中p是4、5、6、7或8;

[0018] L³是键或基于聚氧乙烯的二价连接子;以及

[0019] R¹和R²各自独立地是C₁₋₆烷基。

[0020] 实施例2是根据实施例1的ADC,其中L¹是结合至抗Trop-2抗体的硫的连接子。



[0022] 实施例4是根据实施例1至3中任一项的ADC,其中q是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。

[0023] 实施例5是根据实施例1至3中任一项的ADC,其中q是介于1至10范围内的值。

[0024] 实施例6是根据实施例5的ADC,其中q是介于6至8范围内的值。

[0025] 实施例7是根据实施例1至6中任一项的ADC,其中p是4、5或6。

[0026] 实施例8是根据实施例7的ADC,其中p是5。

[0027] 实施例9是根据实施例1至8中任一项的ADC,其中L³是键。

[0028] 实施例10是根据实施例1至8中任一项的ADC,其中L³是基于聚氧乙烯的二价连接子。

[0029] 实施例11是根据实施例1至10中任一项的ADC,其中R¹是C₁₋₄烷基。

[0030] 实施例12是根据实施例11的ADC,其中R¹是C₁₋₃烷基。

[0031] 实施例13是根据实施例12的ADC,其中R¹是甲基。

[0032] 实施例14是根据实施例12的ADC,其中R¹是乙基。

[0033] 实施例15是根据实施例1至14中任一项的ADC,其中R²是C₁₋₄烷基。

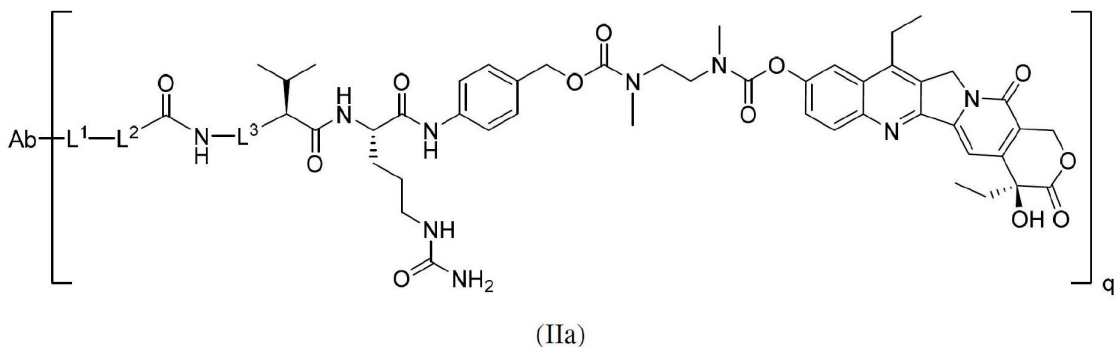
[0034] 实施例16是根据实施例15的ADC,其中R²是C₁₋₃烷基。

[0035] 实施例17是根据实施例16的ADC,其中R²是甲基。

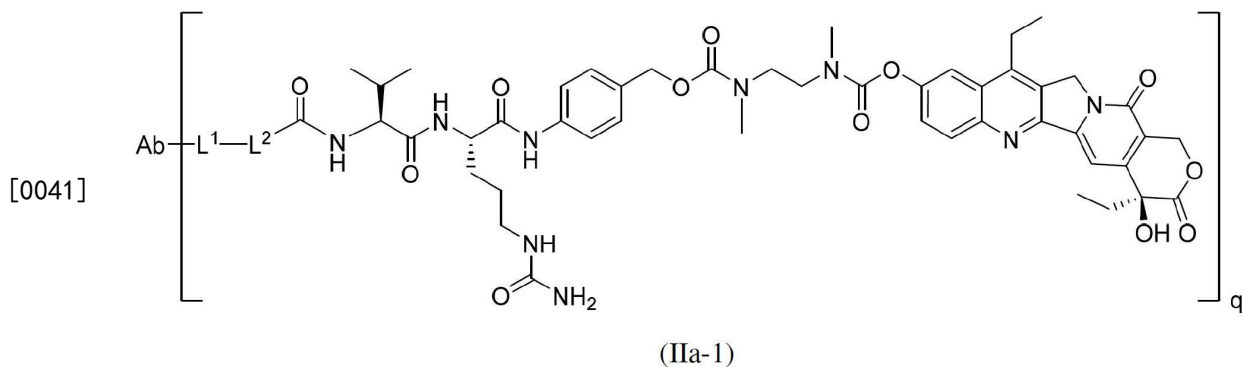
[0036] 实施例18是根据实施例16的ADC,其中R²是乙基。

[0037] 实施例19是根据实施例1至18中任一项的ADC,其中R¹与R²相同。

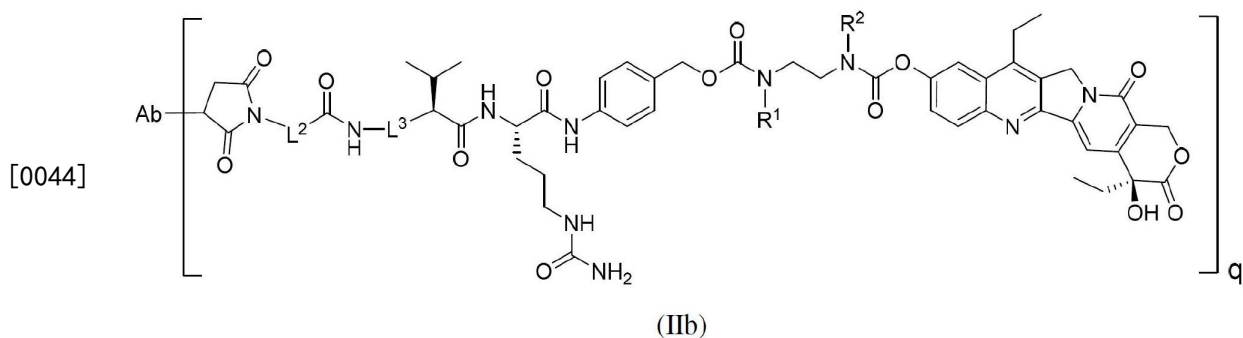
[0038] 实施例20是根据实施例1至13和15至17中任一项的ADC,其中ADC具有式(IIa):



[0039] 或其药学上可接受的盐。

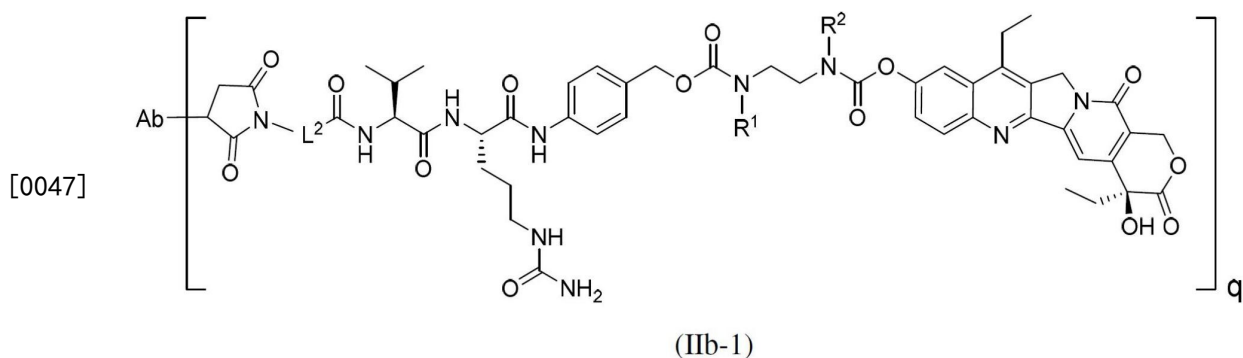


[0042] 或其药学上可接受的盐。



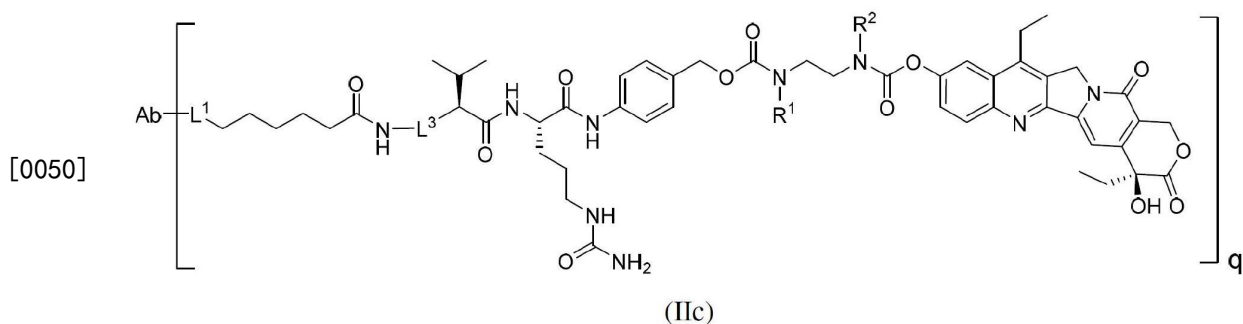
[0045] 或其药学上可接受的盐。

[0046] 实施例23是根据实施例22的ADC,其中ADC具有式(IIb-1) :



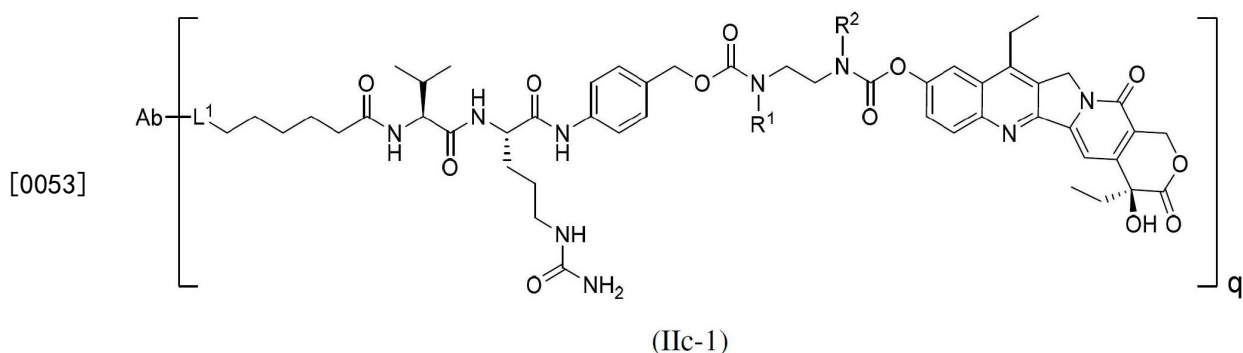
[0048] 或其药学上可接受的盐。

[0049] 实施例24是根据实施例1至19中任一项的ADC,其中ADC具有式(IIc) :



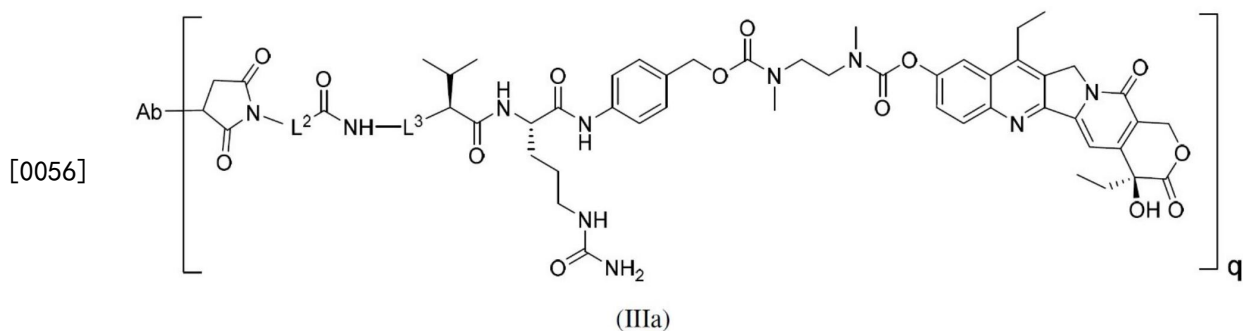
[0051] 或其药学上可接受的盐。

[0052] 实施例25是根据实施例24的ADC,其中ADC具有式(IIc-1) :



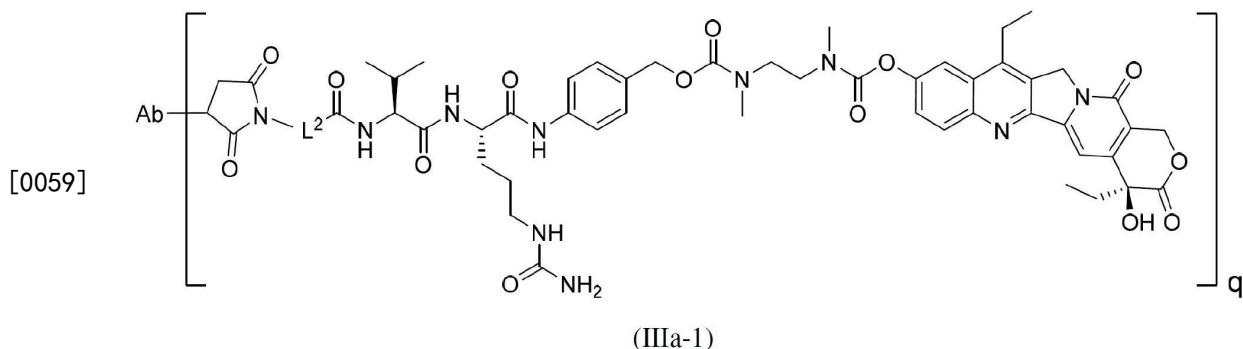
[0054] 或其药学上可接受的盐。

[0055] 实施例26是根据实施例20的ADC,其中ADC具有式(IIIa) :



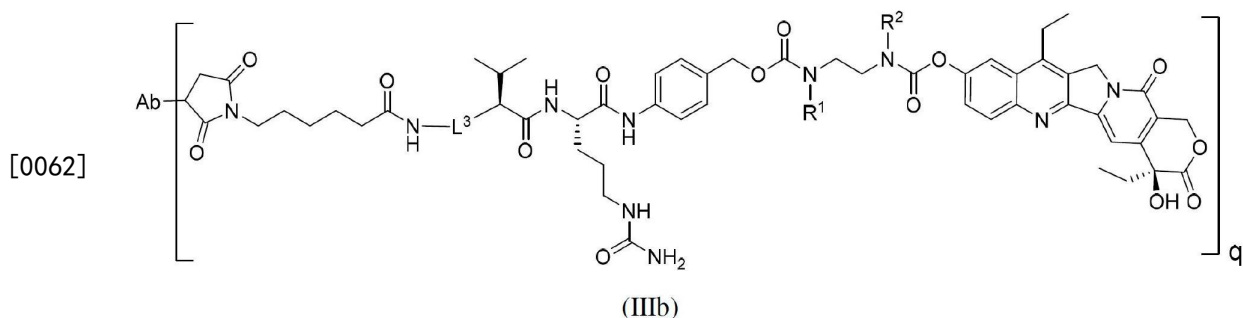
[0057] 或其药学上可接受的盐。

[0058] 实施例27是根据实施例26的ADC,其中ADC具有式(IIIa-1):



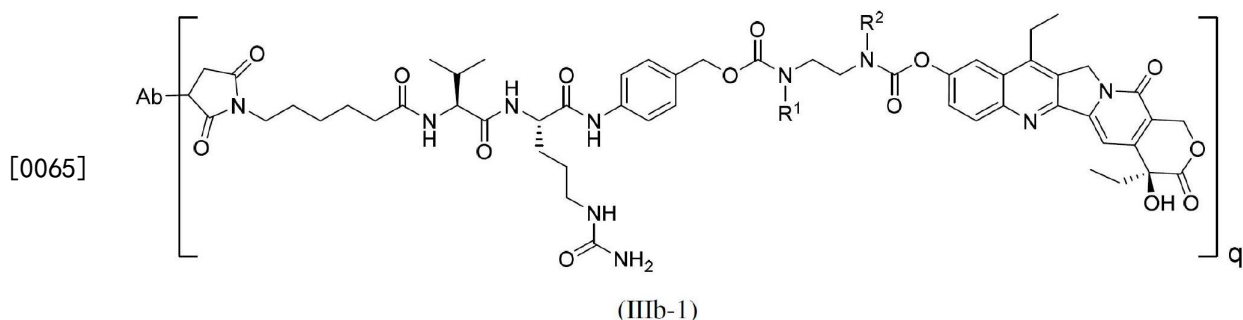
[0060] 或其药学上可接受的盐。

[0061] 实施例28是根据实施例22的ADC,其中ADC具有式(IIIb):



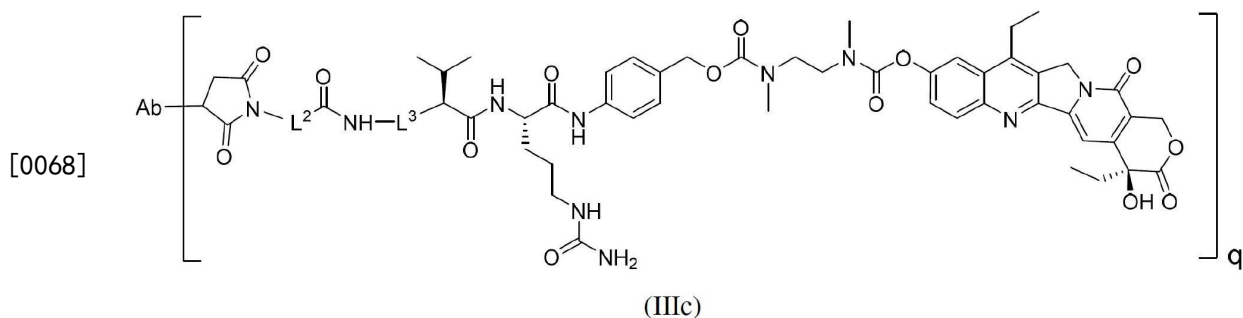
[0063] 或其药学上可接受的盐。

[0064] 实施例29是根据实施例28的ADC,其中ADC具有式(IIIb-1):



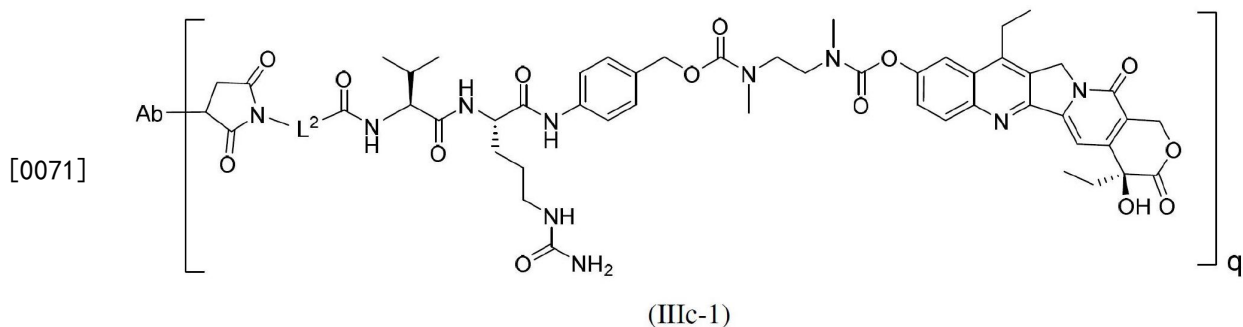
[0066] 或其药学上可接受的盐。

[0067] 实施例30是根据实施例22的ADC,其中ADC具有式(IIIc):



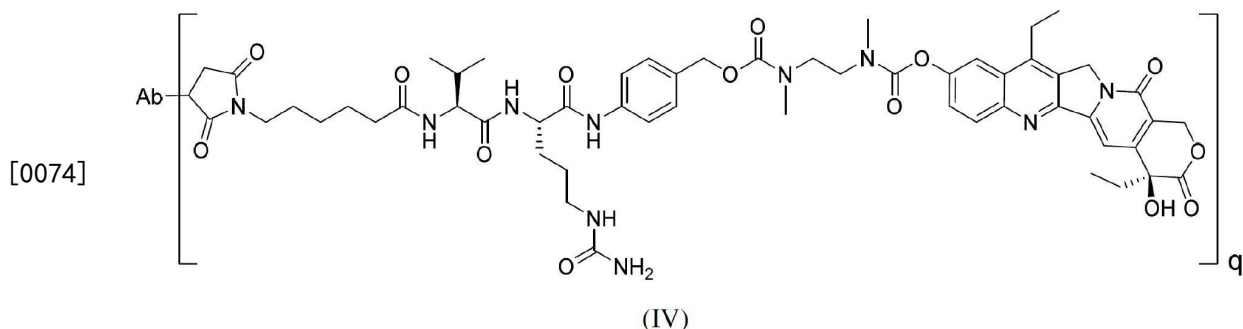
[0069] 或其药学上可接受的盐。

[0070] 实施例31是根据实施例30的ADC,其中ADC具有式(IIIc-1) :



[0072] 或其药学上可接受的盐。

[0073] 实施例32是根据实施例1的ADC,其中ADC具有式(IV) :



[0075] 或其药学上可接受的盐。

[0076] 实施例33是根据实施例1至32中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体包含:包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1、包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2、包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3、包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1、包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2和包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。

[0077] 实施例34是根据实施例1至33中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体包含具有与SEQ ID NO:7具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VL。

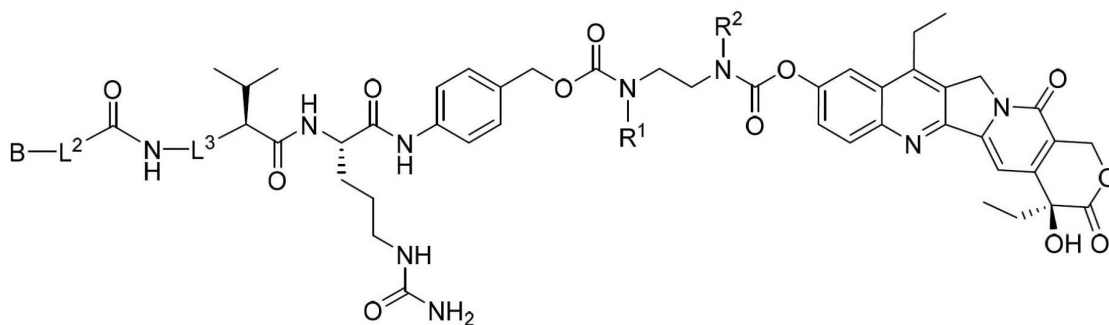
[0078] 实施例35是根据实施例1至34中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体包含具有与SEQ ID NO:8具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VH。

[0079] 实施例36是根据实施例1至35中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体包含具有SEQ ID NO:7的序列的VL。

[0080] 实施例37是根据实施例1至36中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体包含具有SEQ ID NO:8的序列的VH。

- [0081] 实施例38是根据实施例1至37中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体包含κ轻链。
- [0082] 实施例39是根据实施例1至38中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体是IgG抗体,任选地其中抗Trop-2抗体是IgG1抗体。
- [0083] 实施例40是根据实施例1至39中任一项的ADC,其中抗Trop-2抗体结合人类Trop-2,任选地其中所述人类Trop-2具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列。
- [0084] 实施例41是根据实施例1至40中任一项的ADC,其用于治疗。
- [0085] 实施例42是根据实施例41的ADC,其用于治疗表达Trop-2的癌症。
- [0086] 实施例43是一种治疗受试者的表达Trop-2的癌症的方法,其包含向有需要的受试者施用根据实施例1至40中任一项的ADC。
- [0087] 实施例44是一种根据实施例1至40中任一项的ADC的用途,其用于制造药剂。
- [0088] 实施例45是一种根据实施例1至40中任一项的ADC的用途,其用于制造供治疗表达Trop-2的癌症的药剂。
- [0089] 实施例46是根据实施例42、43或45中任一项的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是上皮细胞衍生的癌症。
- [0090] 实施例47是根据实施例46的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是癌(Carcinoma)。
- [0091] 实施例48是根据实施例47的供使用的ADC、方法或用途,其中癌是基底细胞癌、鳞状细胞癌、肾细胞癌、导管原位癌、浸润性导管癌或腺癌。
- [0092] 实施例49是根据实施例46至48中任一项的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症包含实体肿瘤。
- [0093] 实施例50是根据实施例46至49中任一项的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是转移性的。
- [0094] 实施例51是根据实施例46至50中任一项的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是复发性癌症。
- [0095] 实施例52是根据实施例42、43和45至51中任一项的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是胰腺癌、胃癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌、结直肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌、尿路上皮癌、神经胶质母细胞瘤、肺癌、子宫颈癌、食道癌或卵巢癌。
- [0096] 实施例53是根据实施例52的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是胰腺癌。
- [0097] 实施例54是根据实施例52的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是胃癌。
- [0098] 实施例55是根据实施例52的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是乳腺癌。
- [0099] 实施例56为根据实施例55的供使用的ADC、方法或用途,其中表达Trop-2的癌症是三阴性乳腺癌。
- [0100] 实施例57是根据实施例52至56中任一项的供使用的ADC、方法或用途,其中癌症是转移性的。
- [0101] 实施例58是一种制备根据实施例1的ADC的方法,其包含使抗Trop-2抗体与式(P-I)的分子:

[0102]



(P-I)

[0103] 或其药学上可接受的盐反应,其中:

[0104] B是能够与抗Trop-2抗体形成键的反应性部分;

[0105] L^2 是 $-(CH_2)_p-$,其中p是4、5、6、7或8;[0106] L^3 是键或基于聚氧乙烯的二价连接子;以及[0107] R^1 和 R^2 各自独立地是 C_{1-6} 烷基。

[0108] 实施例59是根据实施例58的方法,其中B是能够与抗Trop-2抗体的巯基形成键的反应性部分。

[0109] 实施例60是根据实施例58或59的方法,其中B是N-顺丁烯二酰亚胺基。

[0110] 实施例61是根据实施例58至60中任一项的方法,其中ADC是根据实施例1至40中任一项的ADC。

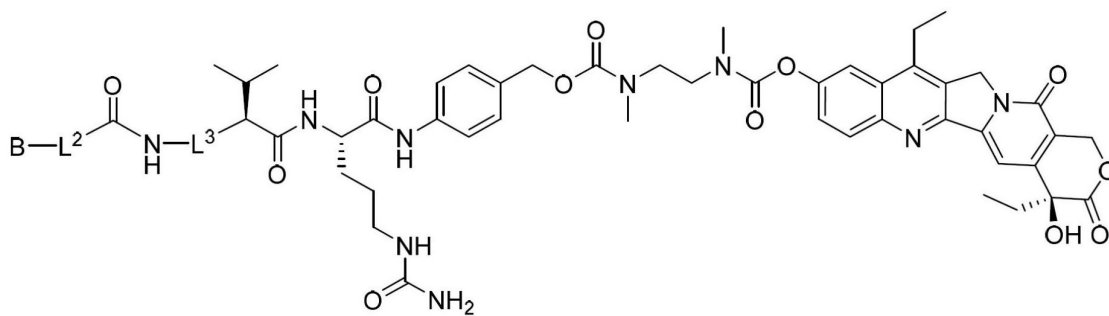
[0111] 实施例62是根据实施例58至61中任一项的方法,其中p是4、5或6。

[0112] 实施例63是根据实施例62的方法,其中p是5。

[0113] 实施例64是根据实施例58至63中任一项的ADC,其中 R^1 是 C_{1-4} 烷基。[0114] 实施例65是根据实施例64的方法,其中 R^1 是 C_{1-3} 烷基。[0115] 实施例66是根据实施例65的方法,其中 R^1 是甲基。[0116] 实施例67是根据实施例65的方法,其中 R^1 是乙基。[0117] 实施例68是根据实施例58至67中任一项的方法,其中 R^2 是 C_{1-4} 烷基。[0118] 实施例69是根据实施例68的方法,其中 R^2 是 C_{1-3} 烷基。[0119] 实施例70是根据实施例69的方法,其中 R^2 是甲基。[0120] 实施例71是根据实施例69的方法,其中 R^2 是乙基。[0121] 实施例72是根据实施例58至71中任一项的方法,其中 R^1 与 R^2 相同。[0122] 实施例73是根据实施例58至72中任一项的方法,其中 L^3 是键。[0123] 实施例74是根据实施例58至72中任一项的方法,其中 L^3 是基于聚氧乙烯的二价连接子。

[0124] 实施例75是根据实施例58至66、68至70、73和74中任一项的方法,其中分子具有式(P-IIa):

[0125]

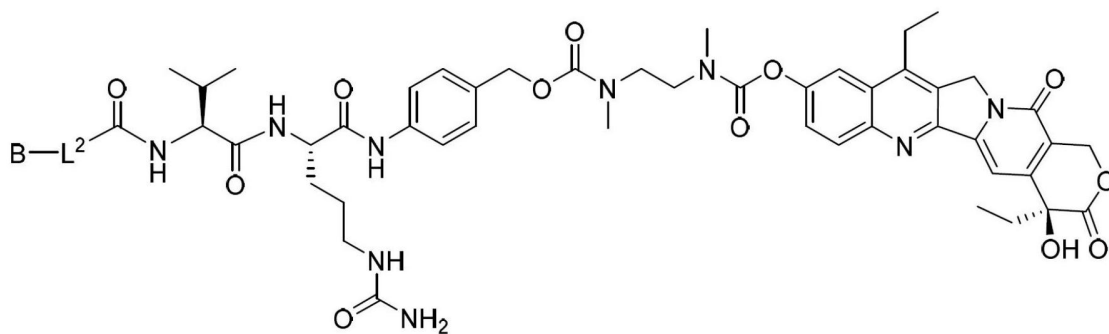


(P-IIa)

[0126] 或其药学上可接受的盐。

[0127] 实施例76是根据实施例75的方法,其中分子具有式(P-IIa-1):

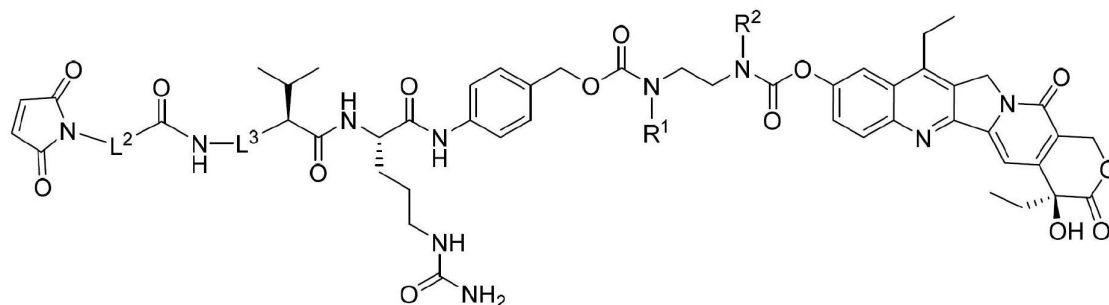
[0128]



(P-IIa-1)

[0129] 或其药学上可接受的盐。

[0130] 实施例77是根据实施例58至74中任一项的方法,其中分子具有式(P-IIb):

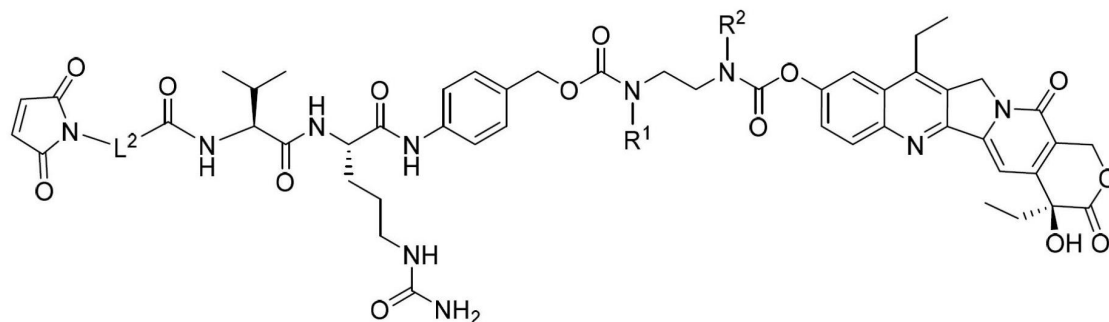


(P-IIb)

[0131] 或其药学上可接受的盐。

[0132] 实施例78是根据实施例77的方法,其中分子具有式(P-IIb-1):

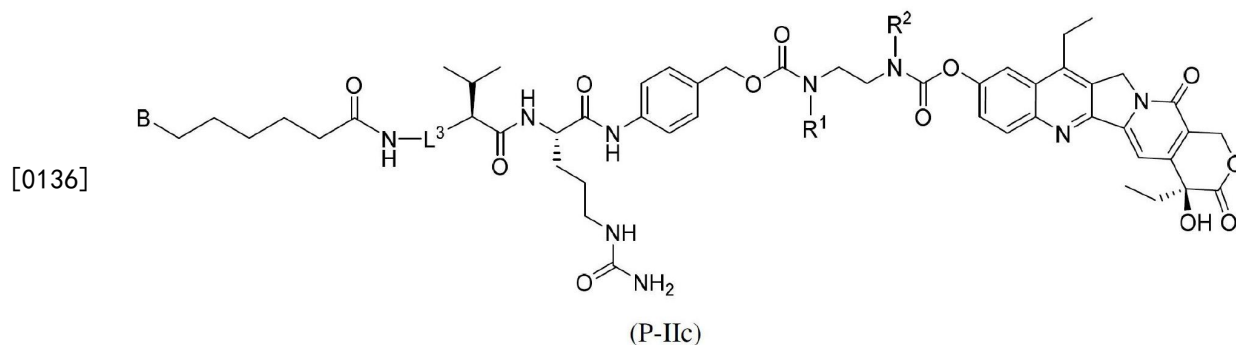
[0133]



(P-IIb-1)

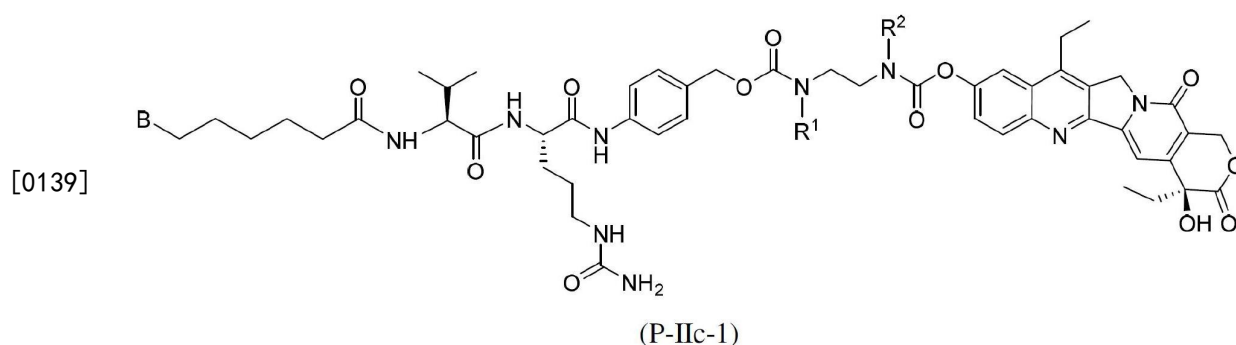
[0134] 或其药学上可接受的盐。

[0135] 实施例79是根据实施例58至74中任一项的方法,其中分子具有式(P-IIc) :



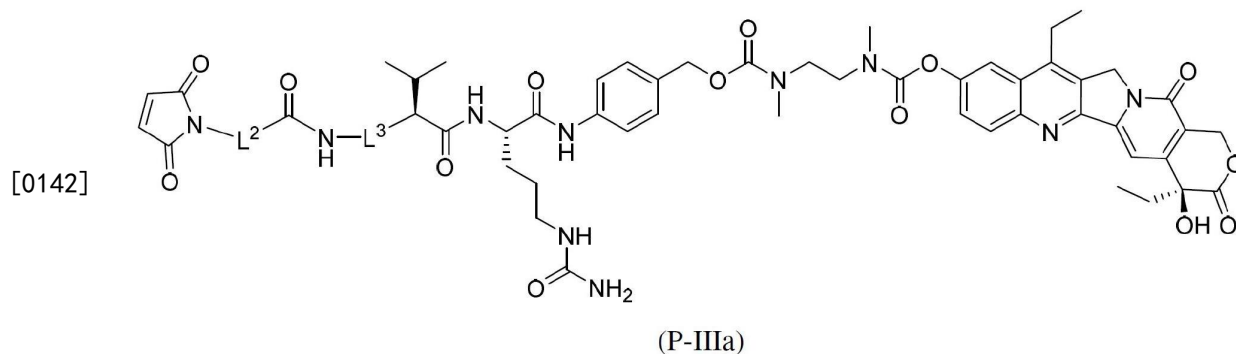
[0137] 或其药学上可接受的盐。

[0138] 实施例80是根据实施例79的方法,其中分子具有式(P-IIc-1) :



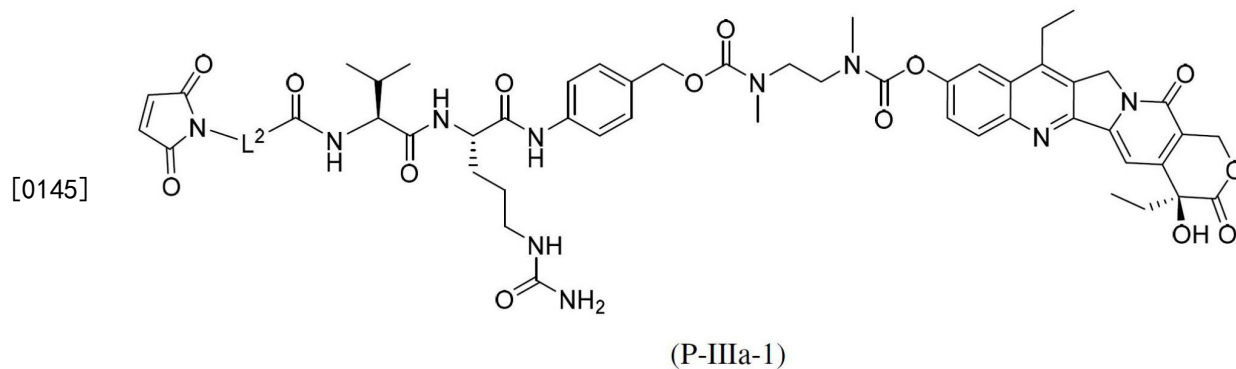
[0140] 或其药学上可接受的盐。

[0141] 实施例81是根据实施例58至74中任一项的方法,其中分子具有式(P-IIIa) :



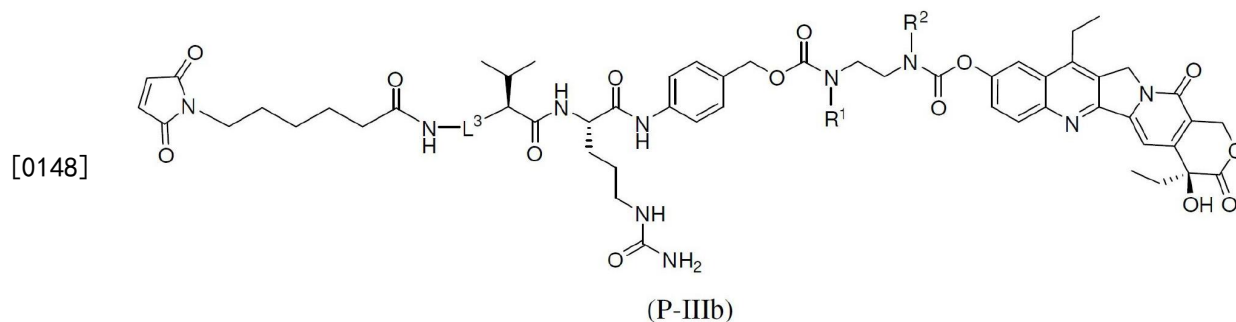
[0143] 或其药学上可接受的盐。

[0144] 实施例82是根据实施例81的方法,其中分子具有式(P-IIIa-1) :



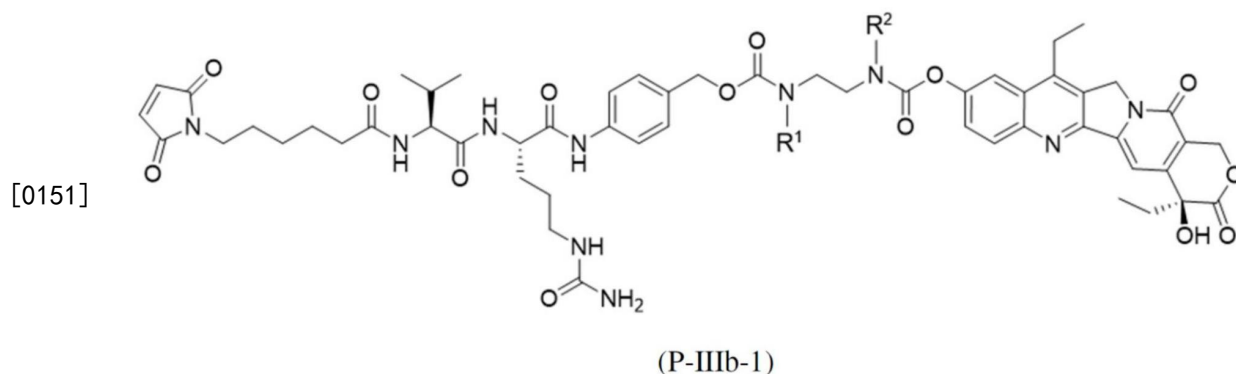
[0146] 或其药学上可接受的盐。

[0147] 实施例83是根据实施例58至74中任一项的方法,其中分子具有式(P-IIIb):



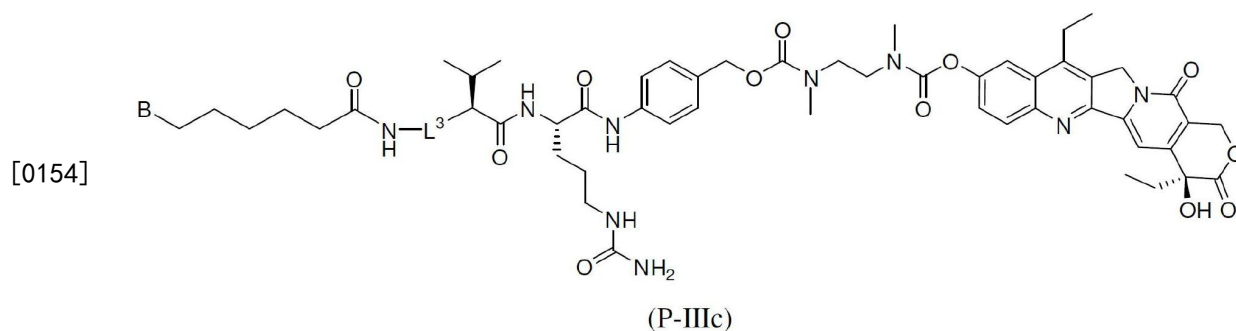
[0149] 或其药学上可接受的盐。

[0150] 实施例84是根据实施例83的方法,其中分子具有式(P-IIIb-1):



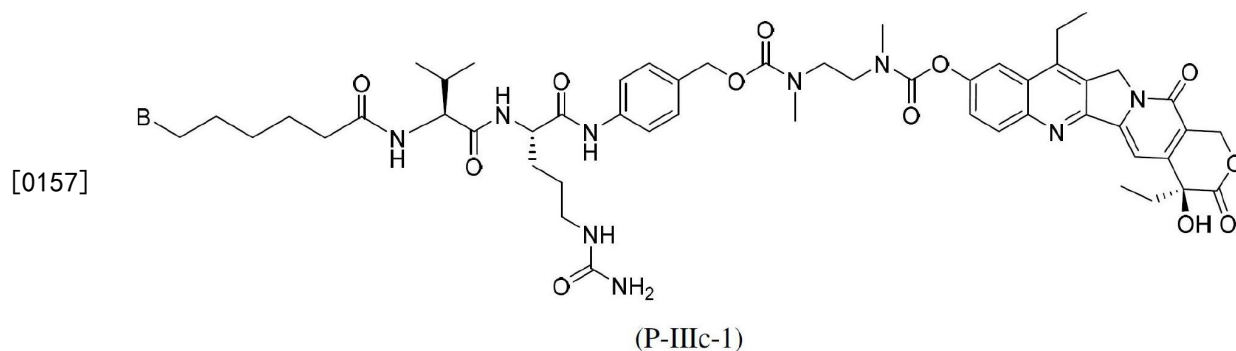
[0152] 或其药学上可接受的盐。

[0153] 实施例85是根据实施例75的方法,其中分子具有式(P-IIIc):



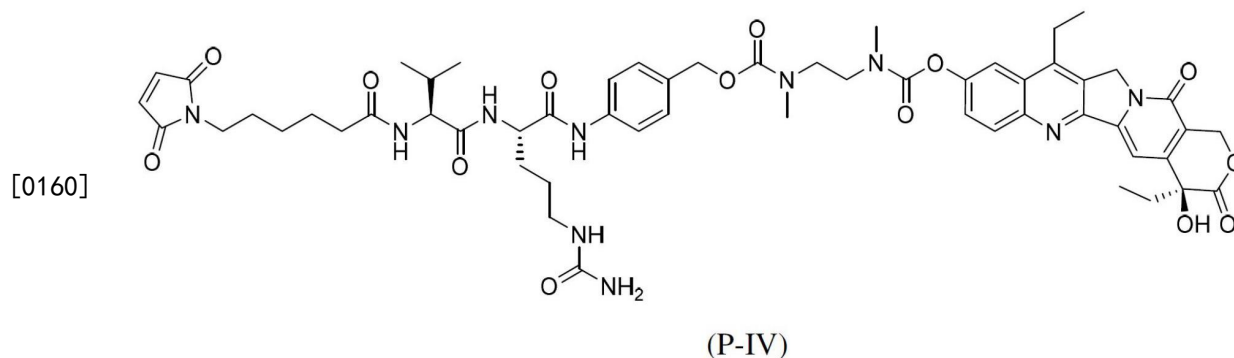
[0155] 或其药学上可接受的盐。

[0156] 实施例86是根据实施例85的方法,其中分子具有式(P-IIIc-1):



[0158] 或其药学上可接受的盐。

[0159] 实施例87是根据实施例58的方法,其中分子具有式(P-IV):



[0161] 或其药学上可接受的盐。

附图说明

[0162] 图1示出使用A) BxPC-3 (Trop-2+) 细胞; B) MDA-MB-468 (Trop-2+) 细胞; 和C) L-540 (Trop-2-) 细胞对抗Trop-2化合物1(用三角形展示) 和抗Trop-2化合物2(用圆形展示) 的体外功效研究的结果。

[0163] 图2示出使用A) BxPC-3 (Trop-2+) 细胞; B) MDA-MB-468 (Trop-2+) 细胞; 和C) L-540 (Trop-2-) 细胞对抗Trop-2化合物1(用三角形展示) 和抗Trop-2化合物3(用正方形展示) 的体外功效研究的结果。

[0164] 图3示出使用A) BxPC-3 (Trop-2+) 细胞; B) MDA-MB-468 (Trop-2+) 细胞; 和C) L-540 (Trop-2-) 细胞对抗Trop-2化合物1(用三角形展示) 和抗Trop-2化合物4(用圆形展示) 的体外功效研究的结果。

[0165] 图4示出使用A) BxPC-3 (Trop-2+) 细胞; B) MDA-MB-468 (Trop-2+) 细胞; 和C) L-540 (Trop-2-) 细胞对抗Trop-2化合物1(用三角形展示) 和抗Trop-2化合物5(用正方形展示) 的体外功效研究的结果。

[0166] 图5示出使用A) BxPC-3 (Trop-2+) 细胞; B) MDA-MB-468 (Trop-2+) 细胞; 和C) L-540 (Trop-2-) 细胞对抗Trop-2化合物1(用三角形展示) 和抗Trop-2化合物6(用正方形展示) 的体外功效研究的结果。

[0167] 图6A示出抗Trop-2化合物1 (2mg/kg: 用灰色空心圆展示; 5mg/kg: 用黑色空心圆展示) 和ADC-CL2A-SN38 (2mg/kg: 用灰色空心三角形展示; 5mg/kg: 用黑色空心三角形展示) 的裸小鼠中的MDA-MB-468异种移植的体内功效研究的结果。PBS/媒剂(用实心圆展示) 和单独的抗Trop-2抗体 (5mg/kg, 用实心菱形展示) 用作对照。*** $p < 0.001$, 通过与PBS/媒剂的邓尼特氏多重比较检验 (Dunnett's multiple comparison test) 进行双因素方差分析 (two way ANOVA); 数据=均值+SEM, $N=6$ 。图6B展示抗Trop-2化合物1 (3mg/kg: 用空心菱形展示; 10mg/kg: 用空心圆展示) 和ADC-CL2A-SN38 (3mg/kg: 用灰色空心三角形(倒置) 展示; 10mg/kg: 用黑色空心三角形展示) 的体内功效研究的结果。PBS/媒剂(用实心圆展示) 和单独的抗Trop-2抗体 (3mg/kg, 用灰色实心三角形展示; 10mg/kg: 用黑色实心三角形展示) 用作对照。*** $p < 0.001$, 通过与抗体对照的邓尼特氏多重比较检验进行双因素方差分析; 数据=均值+SEM, $N=6$ 至8。数据表明抗Trop-2化合物1显著地抑制裸小鼠中的MDA-MB-468异种移植肿瘤生长。

[0168] 图7示出抗Trop-2化合物1 (5mg/kg:用空心菱形展示;15mg/kg:用空心圆展示) 和ADC-CL2A-SN38 (5mg/kg:用灰色空心三角形(倒置)展示;15mg/kg:用黑色空心三角形展示) 的裸小鼠中NCI-N87异种移植的体内功效研究的结果。PBS/媒剂(用实心圆展示) 和单独的抗Trop-2抗体 (5mg/kg, 用灰色实心三角形(倒置)展示;15mg/kg, 用黑色实心三角形展示) 用作对照。 $*p<0.05$, $***P<0.001$, 通过与PBS/媒剂的邓尼特氏多重比较检验进行双因素方差分析;数据=均值+SEM, $N=8$ 。数据表明抗Trop-2化合物1显著地抑制裸小鼠中的NCI-N87异种移植肿瘤生长。

[0169] 图8示出抗Trop-2化合物1 (3mg/kg:用空心菱形展示;10mg/kg:用空心圆展示;25mg/kg, 用空心三角形(倒置)展示) 和ADC-CL2A-SN38 (10mg/kg:用空心三角形展示) 的裸小鼠中BxPC3异种移植的体内功效研究的结果。PBS/媒剂(用实心圆展示) 和单独的抗Trop-2抗体 (10mg/kg, 用实心菱形展示) 用作对照。 $***p<0.001$, $**p<0.01$, 通过与PBS/媒剂的邓尼特氏多重比较检验进行双因素方差分析;数据=均值+SEM, $N=6$ 。数据表明抗Trop-2化合物1显著地抑制裸小鼠中的BxPC3异种移植肿瘤生长。

[0170] 图9示出在168小时的时程内ADC-CL2A-SN38和抗Trop-2化合物1于PBS中的稳定性研究的结果。在370nm下监测游离药物释放的检测。数据表明抗Trop-2化合物1在此时程内并不释放大量的游离化合物1且显著地比ADC-CL2A-SN38更稳定。

[0171] 图10示出使用瑞士韦伯斯特小鼠 (Swiss Webster mice) 的血浆稳定性研究。未结合抗Trop-2 (用圆形展示)、ADC抗Trop-2化合物1的总抗体内容物 (用正方形展示) 和ADC抗Trop-2化合物1 (用三角形展示) 在500小时的时程内的浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 指示抗Trop-2化合物1是稳定的且并不显著地自ADC中释放药物。

具体实施方式

[0172] 本说明书描述本发明的示例性实施例和应用。然而, 本发明不限于这些示例性实施例和应用或示例性实施例和应用的运作或在本文中所描述的方式。除非上下文另有规定, 否则术语“或”是依包括性意义使用, 即, 等效于“和/或”。应注意, 如本说明书和随附权利要求书中所用, 除非明确地且肯定地限于一个指示物, 否则单数形式“一 (a/an)”与“该”和任何字语的任何单数使用形式包括多个指示物。如本文所用, 术语“包含”、“包括”及其文法变异形式意欲具有非限制性, 因此列表中的各项的叙述不排除可以取代或添加至所列项中的其他类似项。本说明书中的部分划分仅出于读者方便起见而提供且并不限制所论述的部件的任何组合。在以引入方式并入的材料与本文所提供的明确描述内容之间存在任何抵触或冲突的情况下, 以明确描述的内容为准。

[0173] 定义

[0174] “亲和力”是指分子 (例如抗体) 的单一结合位点与其结合搭配物 (例如抗原) 之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示, 否则如本文所用, “结合亲和力”是指反映结合对 (例如, 抗体与抗原) 成员之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其搭配物Y的亲和力通常可由解离常数 (K_d) 表示。可通过所属技术领域中的已知常用方法 (包括本文所描述的那些方法) 来测量亲和力。用于测量结合亲和力的特定说明性和示例性实施例描述于下文中。

[0175] “亲和力成熟”抗体是指相较于在一个或多个高变区 (HVR) 中不具有一个或多个变

化的亲本抗体,具有此类变化的抗体,这些变化使抗体对抗原的亲合力得到改良。

[0176] 术语“抗Trop-2抗体”和“结合Trop-2的抗体”是指能够以充足亲和力结合Trop-2,使得抗体适用作靶向Trop-2的治疗剂的抗体。在一个实施例中,抗Trop-2抗体与无关的、非Trop-2的蛋白的结合程度小于该抗体与Trop-2的结合的约10%,例如通过放射免疫分析(RIA)所测量。在某些实施例中,结合于Trop-2的抗体的解离常数(Kd) $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 5\text{nM}$ 、 $\leq 4\text{nM}$ 、 $\leq 3\text{nM}$ 、 $\leq 2\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在某些实施例中,抗Trop-2抗体结合来自不同物种的Trop-2当中的保守性Trop-2的表位。

[0177] 术语“抗体”在本文中以最广泛意义使用并且涵盖各种抗体结构,所述抗体结构包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要所述抗体片段展现所需抗原结合活性即可。

[0178] “抗体片段”是指除完整抗体之外的分子,其包含完整抗体的一部分,并且结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双功能抗体;直链抗体;单链抗体分子(例如,scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0179] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常特征为不受调控细胞生长/增殖的生理病状。癌症的实例包括但不限于黑色素瘤、癌(Carcinoma)、淋巴瘤(例如霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和非霍奇金氏淋巴瘤)、母细胞瘤、肉瘤和白血病。特定非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、神经胶质母细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝肿瘤、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、尿路上皮癌、食道癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病和其他淋巴增生病症,和各种类型的头颈癌。

[0180] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同来源或物种的抗体。

[0181] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定域或恒定区的类型。存在五个主要抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的数个类别可进一步分成子类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0182] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指抑制或妨碍细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、²¹²Pb和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如甲氨喋呤(methotrexate)、阿德里霉素(adriamycin)、长春花生物碱(长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、小红莓(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道诺霉素(daunorubicin)或其他插入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,包括其片段和/或变异体;以及以下所公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0183] “化学治疗剂”是适用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的实例包括烷基化剂,诸如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(CYTOXAN®);磺酸烷基酯,诸如白消安(busulfan)、英丙

舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,诸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);亚乙亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三甲基三聚氰胺;多聚乙酰(尤其布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚(dronabinol), MARINOL®); β -拉帕醌(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙碱(colchicines);桦木酸(betulinic acid);喜树碱(包括合成类似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康,CAMPTOSAR®)、乙酰基喜树碱、东莨菪素(scopolectin)和9-氨基喜树碱);苔藓虫素(bryostatin);海洋抑素(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素(podophyllotoxin);鬼臼酸(podophyllinic acid);替尼泊苷(teniposide);念珠藻素(尤其念珠藻素1和念珠藻素8);海兔毒素(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素(spongistatin);氮芥(nitrogen mustard),诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofوسفamide)、尿嘧啶芥(uracil mustard);亚硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如,卡奇霉素(calicheamicin),尤其系卡奇霉素 γ 1I(calicheamicin γ 1I)和卡奇霉素 Ω 1I(calicheamicin Ω 1I)(参见,例如,Nicolaou et al,Angew.Chem Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新抑癌蛋白发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C、卡拉比辛(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素、道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、小红莓(doxorubicin)(包括N-吗啉基-小红莓、氰基(N-吗啉基)-小红莓、2-吡咯啉基-小红莓和脱氧小红莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾达霉素(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)(诸如丝裂霉素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他汀(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲氨蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如迪诺特宁(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧

氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素,诸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺药物,诸如胺鲁米特(aminogluthetimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸;乙酰葡萄糖酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);贝斯布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);艾弗利散(elformthine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素;依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;磨菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);类美登素(maytansinoid),诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);丙脒脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);尼曲吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);苯来美特(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西索菲兰(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢菌素(trichothecenes)(尤其T-2毒素、疣孢菌素(verracurin)A、杆孢菌素(roridin)A和蛇行菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine)(ELDISINE®, FILDESIN®);达卡巴肼(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);甲托辛(gacytosine);阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara-C”);噻替派;类紫杉醇(taxoids),例如紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®;Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANETM紫杉醇的不含可列莫佛(Cremophor)的白蛋白改造的纳米粒子制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumburg,Illinois)和多西他赛(docetaxel)(TAXOTERE®;Rhône-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥(chloranbucil);吉西他滨(gemcitabine)(GEMZAR®);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨喋呤;铂类似物,诸如顺铂和卡铂;长春碱(VELBAN®);铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(ONCOVIN®);奥沙利铂(oxaliplatin);卢考弗文(leucovorin);长春瑞滨(NAVELBINE®);诺凡蒽醌(novantrone);依达曲沙;道诺霉素(daunomycin);氨基喋呤;伊班膦酸盐(ibandronate);拓朴异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄素,诸如视黄酸;卡培他滨(capecitabine)(XELODA®);和上述任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及上述两者或更多者的组合,诸如CHOP,环磷酰胺、小红莓、长春新碱和泼尼松龙(prednisolone)的组合疗法的缩写;CVP,环磷酰胺、长春新碱和泼尼松龙的组合疗法的缩写;和FOLFOX,使用奥沙利铂(ELOXATIN™)与5-FU和甲酰四氢叶酸的组合的治疗方案的缩写。

[0184] “效应功能”是指可归因于抗体的Fc区的生物活性,其因抗体同种型而异。抗体效应功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;和B细胞活化。

[0185] 药剂(例如药物制剂)的“有效量”是指以必要剂量和持续必要时段有效达成所需

治疗或预防结果的量。

[0186] 术语“表位”是指抗体结合的抗原分子上的特定位点。

[0187] 在本文中,术语“Fc区”用以定义含有至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C端区。该术语包括天然序列Fc区和变异Fc区。在一个实施例中,人类IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文另外说明,否则Fc区或恒定区氨基酸残基的编号是依据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991中所述。

[0188] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变域残基。可变域的FR一般由四个FR域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列一般以以下序列出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0189] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,并且是指结构实质上类似于天然抗体结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0190] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已向其中引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转型体”和“转型细胞”,其包括初代转型细胞和来源于其的后代(不考虑传代次数)。后代的核酸含量与母细胞可能不完全相同,但可能含有突变。本文包括针对原始转型细胞筛选或选择具有相同功能或生物活性的突变型后代。

[0191] “人类抗体”是氨基酸序列对应于由人类或人类细胞产生或来源于利用人类抗体谱系或其他人类抗体编码序列的非人类来源的抗体的氨基酸序列的抗体。此人类抗体的定义特定地排除包含非人类抗原结合残基的人源化抗体。

[0192] “人类共同框架”是表示所选人类免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常出现的氨基酸残基的框架。一般而言,人类免疫球蛋白VL或VH序列选自可变域序列的子组。通常,序列子组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),第1-3卷中的子组。在一个实施例中,对于VL,子组是如Kabat等人(见上文)中的子组κI。在一个实施例中,对于VH,子组是如Kabat等人(见上文)中的子组III。

[0193] “人源化”抗体是指包含来自非人类HVR的氨基酸残基和来自人类FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施例中,人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变域的实质上全部,其中全部或实质上全部HVR(例如CDR)均对应于非人类抗体的HVR,并且全部或实质上全部FR皆对应于人类抗体的FR。人源化抗体任选地可包含来源于人类抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如,非人类抗体)的“人源化形式”是指已经历人源化的抗体。

[0194] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变域中在序列上具有高变性和/或形成结构上定义的环(“高变环”)的各区域。一般而言,天然四链抗体包含六个HVR;三个位于VH中(H1、H2、H3),并且三个位于VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自高变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列可变性和/或与抗原识别相关。示例性高变环出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处。(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。示例性CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)出现在L1的氨基酸残基24-34、L2的氨基酸残基50-

56、L3的氨基酸残基89-97、H1的氨基酸残基31-35B、H2的氨基酸残基50-65和H3的氨基酸残基95-102处。(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。除VH中的CDR1之外, CDR一般包含形成高变环的氨基酸残基。CDR也包含“特异性决定残基”或“SDR”, 这是接触抗原的残基。SDR包含于简称为-CDR或a-CDR的CDR区域内。示例性a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2和a-CDR-H3) 出现在L1的氨基酸残基31-34、L2的氨基酸残基50-55、L3的氨基酸残基89-96、H1的氨基酸残基31-35B、H2的氨基酸残基50-58和H3的氨基酸残基95-102处。(参见Almagro和Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008))。除非另外指示, 否则在本文中, 根据Kabat等人(见上文) 对可变域中的HVR残基和其他残基(例如FR残基) 进行编号。

[0195] “抗体药物偶联物”或“ADC”是与一种或多种异源分子(包括但不限于细胞毒性剂) 结合的抗体。

[0196] “个体(individual)”或“受试者(subject)”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物(例如牛、羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如人类和非人类灵长类动物, 诸如猴)、兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。在某些实施例中, 该个体或受试者是人类。在某些实施例中, 受试者是成人、青少年、儿童或婴儿。在一些实施例中, 使用术语“个体(individual)”或“患者”且预期可与“受试者(subject)”互换。

[0197] 如本文中所使用, 除非另有指示, 否则术语“Trop-2”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然Trop-2, 该脊椎动物来源包括哺乳动物, 诸如灵长类动物(例如人类、食蟹猕猴(cyno)) 和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。该术语涵盖未处理的“全长”Trop-2以及在细胞中处理而产生的任何Trop-2形式。该术语也涵盖天然存在的Trop-2变异体, 例如剪接变异体、等位基因变异体和同功异型物。示例性人类Trop-2蛋白质的氨基酸序列展示于SEQ ID NO: 9中。

[0198] 术语“表达Trop-2的癌症”是指包含在表面上表达Trop-2的细胞的癌症。

[0199] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”是指从实质上均质的抗体群体获得的抗体, 即除可能的变异抗体(例如含有天然产生的突变或在制造单克隆抗体制剂期间出现的变异抗体, 此类变异体通常以较小量存在) 以外, 构成该群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。相比于典型地包括针对不同决定基(表位) 的不同抗体的多克隆抗体制剂, 单克隆抗体制剂的各单克隆抗体是针对抗原上的单一决定基。因此, 修饰语“单克隆”指示抗体的特征是从实质上均质的抗体群体获得, 并且不应解释为需要通过任何特定方法产生该抗体。举例而言, 根据本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术制得, 包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有所有或部分人类免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法、本文所描述的制造单克隆抗体的此类方法和其他示例性方法。

[0200] “天然抗体”是指具有不同结构的天然产生的免疫球蛋白分子。举例而言, 天然IgG抗体是约150,000道尔顿(dalton) 的杂四聚体糖蛋白, 其由形成二硫键的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N端至C端, 各重链具有可变区(VH), 也称为可变重链域或重链可变域, 继而为三个恒定域(CH1、CH2和CH3)。类似地, 从N端至C端, 各轻链具有可变区(VL), 也称为可变轻链域或轻链可变域, 继而为恒定轻链(CL) 域。抗体轻链可基于其恒定域的氨基酸序列而归为两种类型之一, 称为 κ 和 λ 。

[0201] 术语“药品说明书”用于指通常包括于治疗性产品的商业包装中的说明书,其含有关于与使用此类治疗性产品有关的适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0202] 相对于参考多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在比对序列和引入空位(必要时)以得到最大序列同一性百分比之后,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的,可以所属技术领域中的各种方式实现比对,例如使用实施适合的算法(诸如Smith和Waterman (Add.APL.Math.2:482,1981)的局部同源性算法的公开可用的计算机软件,通过Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.48:443,1970)的全域同源性比对算法)。所属领域的技术人员可确定适用于比对序列的参数,包括在所比较序列的全长内实现最大比对所需的任何算法。如本文中所使用,“序列同一性百分比”或“[序列]同一性百分比(%)”是通过在由两个序列之间的局部比对长度限定的比较窗内比较两个最佳局部比对序列来确定。(这也可视为同源性百分比或“同源性百分比(%)”)。针对两个序列的最佳比对,相比于参考序列,比较窗中的氨基酸序列可包含添加或缺失(例如,空位或突出物)。两个序列之间的局部比对仅包括各序列的片段,根据视用以执行比对的算法而定的准则,所述片段视为充分类似。通过以下来计算同一性百分比:通过测定两个序列中存在的相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数获得匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗中的总位置数且将结果乘以100。举例而言,GAP和BESTFIT可用于测定针对比较已鉴别的两个序列的最佳比对。典型地,使用默认值:针对空位权数为5.00和针对空位权数长度为0.30。

[0203] 术语“药物制剂”是指所呈形式允许其中所含活性成分的生物活性有效发挥的制剂,并且其不含对制剂将施用的受试者具有不可接受毒性的其他组分。

[0204] “药学上可接受的载剂”是指药物制剂中的除活性成分外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载剂包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0205] “药学上可接受的盐”是指药学上可接受的盐。本文所描述的化合物可以药学上可接受的盐的形式施用。

[0206] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变化形式,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指临床介入以试图改变所治疗个体的自然病程,并且可以为实现预防或在临床病理学病程中进行。所需治疗作用包括但不限于预防疾病发生或复发、缓解症状、减轻疾病的任何直接或间接病理性后果、预防转移、降低疾病进展速率、改善或缓和疾病病况以及缓解或改善预后。在一些实施例中,如本文所描述的ADC用于延迟疾病发生或减缓疾病进展。

[0207] 术语“可变区”或“可变域”是指涉及抗体结合至抗原的抗体重链或轻链域。天然抗体的重链和轻链可变域(分别是VH和VL)一般具有类似结构,其中各域均包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见例如Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单一VH或VL域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可使用来自结合抗原的抗体的VH域或VL域分别筛选互补VL域或VH域的库来分离。参见例如Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0208] 如本文所使用,术语“载体”是指能够传播其所连接的另一核酸的核酸分子。该术

语包括呈自我复制核酸结构的载体以及并入其已引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够导引可操作地连接其的核酸的表达,此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0209] 如本文所用,术语“C₁₋₆烷基”是指具有1至6个碳原子的直链或分支链、饱和或不饱和和烃。代表性直链C₁₋₆烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基和正己基;代表性分支链C₁₋₆烷基包括但不限于异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、2-甲基丁基;代表性不饱和C₁₋₆烷基包括但不限于乙烯基、烯丙基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基、1-己基、2-己基、3-己基、乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基。除非特定指示,否则应了解C₁₋₆烷基是指未经取代的基团。

[0210] 如本文所用,术语“C₁₋₄烷基”是指具有1至4个碳原子的直链或分支链、饱和或不饱和和烃。代表性“C₁₋₄烷基”包括甲基、乙基、正丙基、正丁基;代表性分支链C₁₋₄烷基包括但不限于异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基;代表性不饱和C₁₋₄烷基包括但不限于乙烯基、烯丙基、1-丁烯基、2-丁烯基和异丁烯基。除非特定指示,否则应了解C₁₋₄烷基是指未经取代的基团。

[0211] “连接子”是指包含共价键或共价附接抗体于药物部分的原子链的化学部分。在各种实施例中,连接子包括二价基。在各种实施例中,连接子可包含一个或多个氨基酸残基。

[0212] 术语“保护基”是指通常用以封端或保护特定官能团同时使化合物上的其他官能团反应的取代基。举例而言,“氨基保护基”是附接于氨基,封端或保护化合物中的氨基官能团的取代基。适合的氨基保护基包括但不限于乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、苯甲氧基羰基(CBZ)和9-苄基亚甲氧基羰基(Fmoc)。关于保护基及其用途的一般描述参见T.W.Greene,Protective Groups in Organic Synthesis,John Wiley&Sons,New York,1991或后续版本。

[0213] 如本文中所使用,“实质上”和其他文法形式意谓足以有效于预期目的。术语“实质上”因此允许相对于绝对或完全状态、维度、测量值、结果等发生微小、不显著(诸如所属领域中的一般技术者所预期)、但对总体效能的影响不明显的变化。当关于数值或可表示为数值的参数或特性使用时,“实质上”意谓在百分之十内。

[0214] 概述

[0215] 抗体药物偶联物(ADC)允许将药物部分靶向递送至肿瘤,并且在一些实施例中允许其中的细胞内积聚,其中全身性施用未结合药物可能引起对正常细胞的不可接受程度的毒性(Polakakis P. (2005)Current Opinion in Pharmacology 5:382-387)。ADC是靶向化学治疗性分子,其通过使强效细胞毒性药物靶向表达抗原的肿瘤细胞来组合抗体与细胞毒性药物两者的特性(Teicher,B.A. (2009)Current Cancer Drug Targets 9:982-1004),从而通过功效最大化和脱靶毒性最小化而增强治疗指数(Carter,P.J.和Senter P.D. (2008)The Cancer Jour:14(3):154-169;Chari,R.V. (2008)ACC.Chen.Res.41.98-107)。

[0216] 本发明提供ADC,其包含经由连接子部分结合至药物部分SN-38的抗Trop-2抗体。抗Trop-2抗体可结合至表达Trop-2的癌细胞且允许将ADC选择性摄取至所述癌细胞中。在一些实施例中,本文提供的ADC用以将有效量的SN-38选择性递送至肿瘤组织,同时避免与其中使用不同连接子结合SN-38与抗Trop-2抗体的其他ADC相关的毒性。本文所描述的ADC化合物包括那些具有抗癌活性的化合物。

[0217] 在一个方面,本文提供包含抗Trop-2抗体的抗体药物偶联物(ADC)。在另一方面,

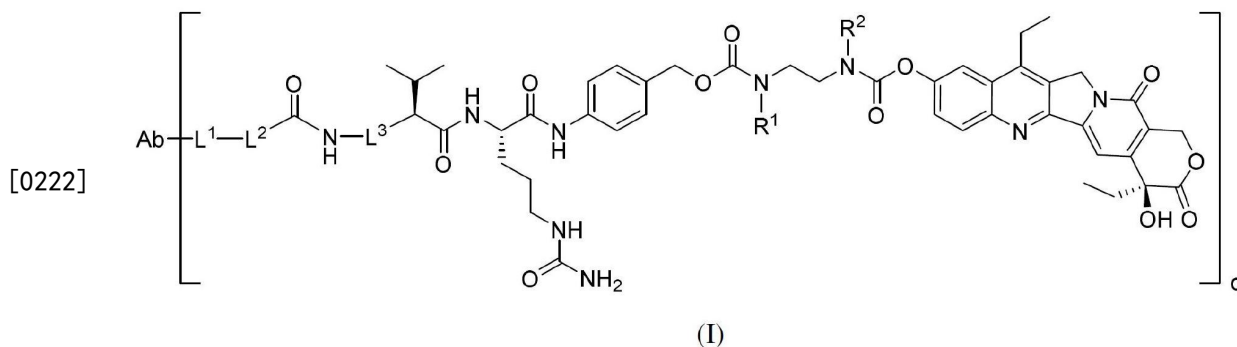
本文提供制备包含抗Trop-2抗体的ADC的方法。本文中还提供使用本文所公开的ADC治疗癌症(诸如表达Trop-2的癌症)的方法。

[0218] I. 组合物

[0219] 抗体药物偶联物

[0220] 在一个方面,本文提供一种抗体药物偶联物(ADC),其包含抗Trop-2抗体(Ab)、药物部分SN-38和将抗Trop-2抗体共价附接至SN-38的连接子部分。

[0221] 在一些实施例中,ADC具有式(I):



[0223] 或是其药学上可接受的盐,其中:

[0224] Ab是抗Trop-2抗体;

[0225] q是介于1至20范围内的值;

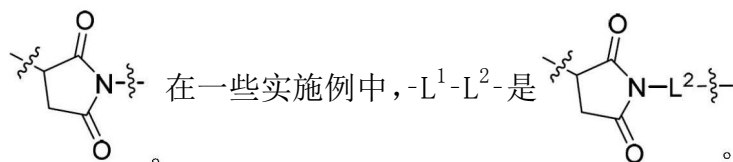
[0226] L^1 是结合至抗Trop-2抗体的连接子;

[0227] L^2 是 $-(CH_2)_p-$,其中p是4、5、6、7或8;

[0228] L^3 是键或基于聚氧乙烯的二价连接子;以及

[0229] R^1 和 R^2 各自独立地是 C_{1-6} 烷基。

[0230] 在一些实施例中, L^1 是结合至抗Trop-2抗体的硫的连接子。在一些实施例中, L^1 是



[0231] 在一些实施例中,q是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在一些实施例中,q是介于1至10范围内的值。在一些实施例中,q是介于6至8范围内的值。在一些实施例中,q是介于6至7范围内的值。在一些实施例中,q是介于7至8范围内的值。在一些实施例中,q是6、7或8。在一些实施例中,q是6。在一些实施例中,q是7。在一些实施例中,q是8。

[0232] 在一些实施例中,p是4、5或6。在一些实施例中,p是4。在一些实施例中,p是5。在一些实施例中,p是6。在一些实施例中,p是7或8。在一些实施例中,p是7。在一些实施例中,p是8。

[0233] 在一些实施例中, L^3 是键。在其他实施例中, L^3 是基于聚氧乙烯的二价连接子。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分和亚烷基部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分和亚芳基部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分、亚烷基部分和亚芳基部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的

二价连接子包含聚氧乙烯部分、烷基部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分、亚芳基部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分、亚烷基部分、亚芳基部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含至多24个 $-(CH_2CH_2O)-$ 单元。

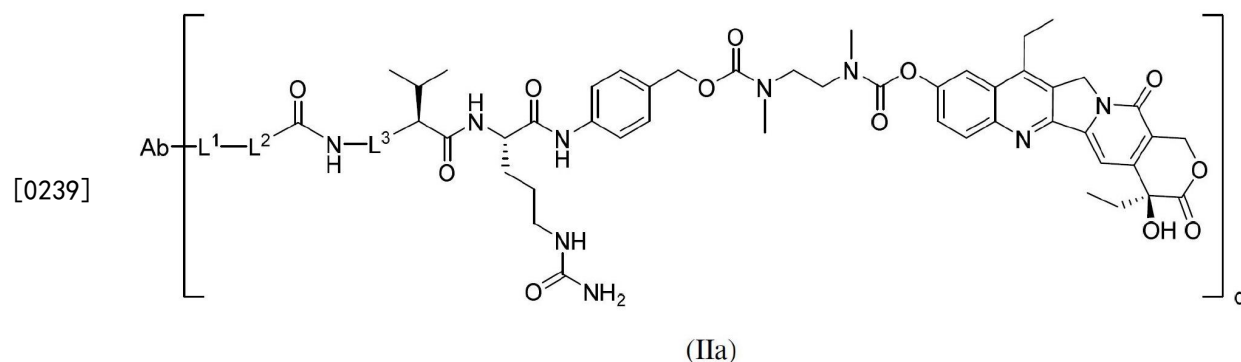
[0234] 在一些实施例中, R^1 是 C_{1-4} 烷基。在一些实施例中, R^1 是 C_{1-3} 烷基。在一些实施例中, R^1 是甲基。在一些实施例中, R^1 是乙基。在一些实施例中, R^1 是丙基,诸如正丙基或异丙基。在一些实施例中, R^1 是丁基,诸如正丁基或叔丁基。在其他实施例中, R^1 是戊基或己基。

[0235] 在一些实施例中, R^2 是 C_{1-4} 烷基。在一些实施例中, R^2 是 C_{1-3} 烷基。在一些实施例中, R^2 是甲基。在一些实施例中, R^2 是乙基。在一些实施例中, R^2 是丙基,诸如正丙基或异丙基。在一些实施例中, R^2 是丁基,诸如正丁基或叔丁基。在其他实施例中, R^2 是戊基或己基。

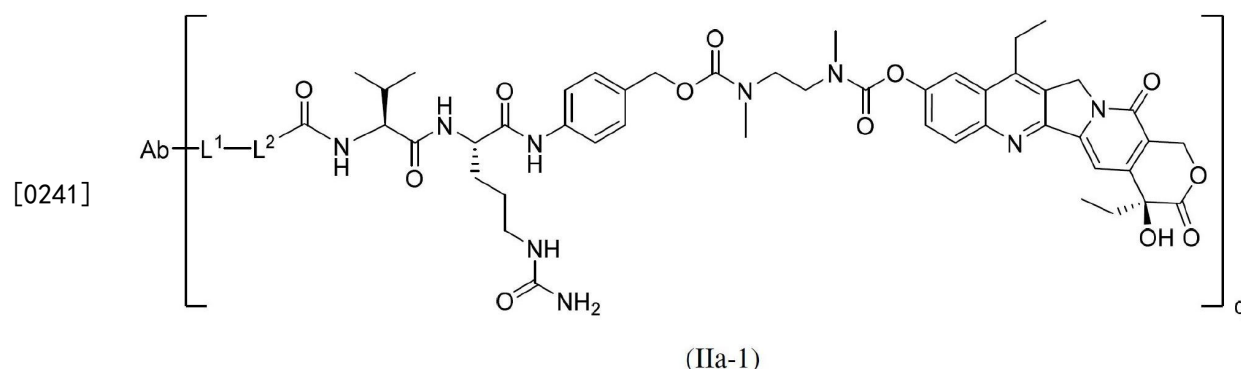
[0236] 在一些实施例中, R^1 与 R^2 相同。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是甲基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是乙基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是丙基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是丁基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是戊基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是己基。

[0237] 在一些实施例中, R^1 与 R^2 不同。在一些实施例中, R^1 是甲基且 R^2 是乙基。在一些实施例中, R^1 是乙基且 R^2 是甲基。在一些实施例中, R^1 是甲基且 R^2 是 C_{2-6} 烷基。在一些实施例中, R^1 是 C_{2-6} 烷基且 R^2 是甲基。

[0238] 在一些实施例中,ADC具有式(IIa):

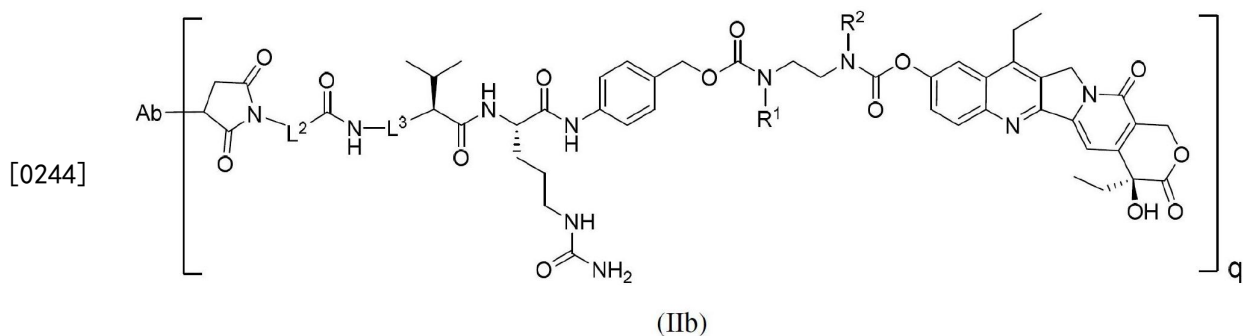


[0240] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L^3 是键并且ADC具有式(IIa-1):

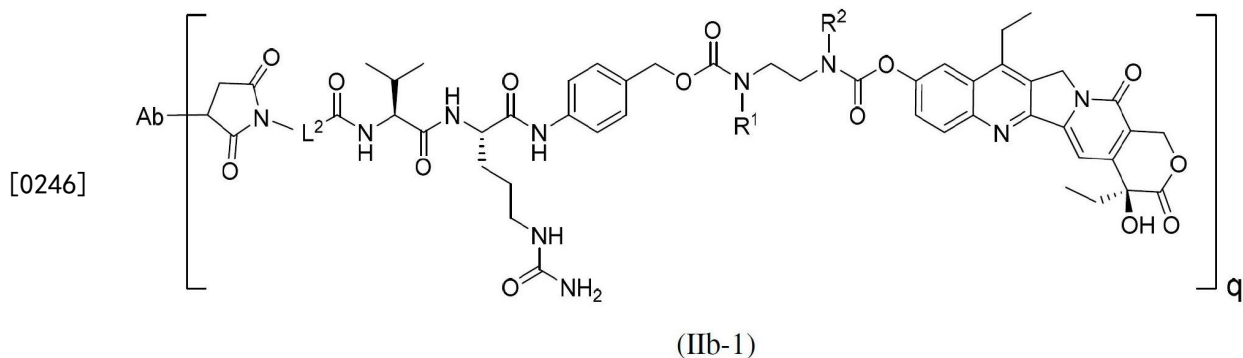


[0242] 或其药学上可接受的盐。

[0243] 在一些实施例中,ADC具有式(IIb):

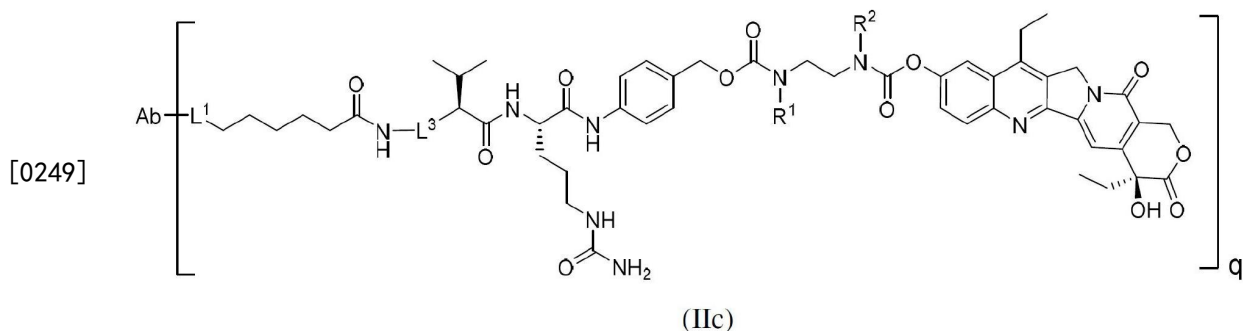


[0245] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L³是键并且ADC具有式(IIb-1):

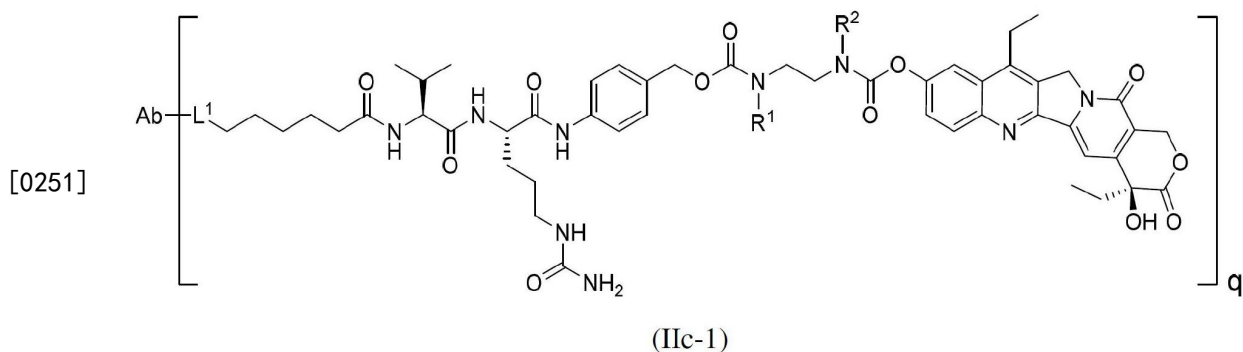


[0247] 或其药学上可接受的盐。

[0248] 在一些实施例中,ADC具有式(IIc):



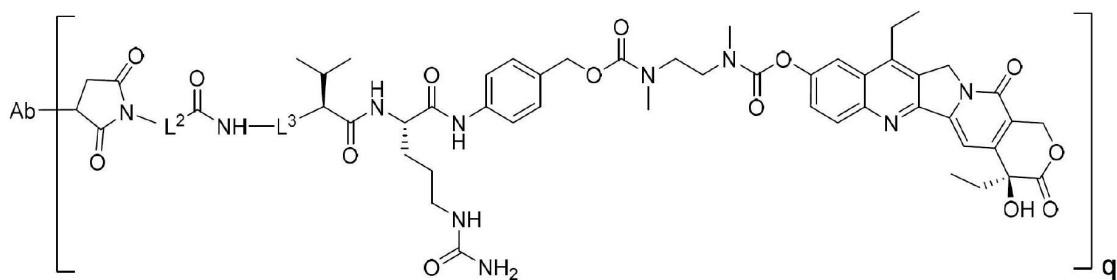
[0250] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L³是键并且ADC具有式(IIc-1):



[0252] 或其药学上可接受的盐。

[0253] 在一些实施例中,ADC具有式(IIIa):

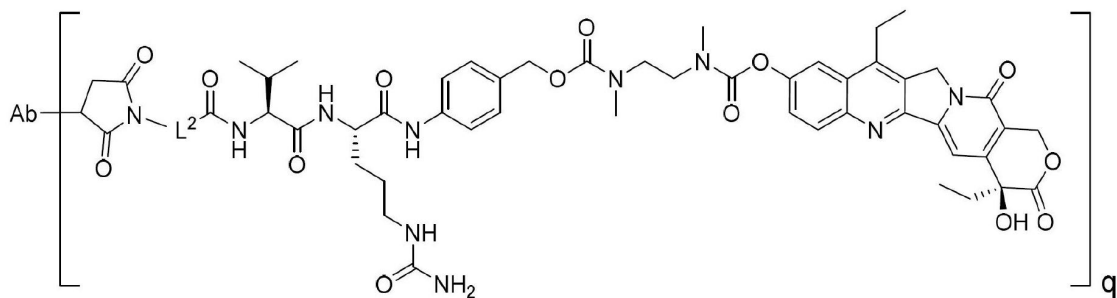
[0254]



(IIIa)

[0255] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L^3 是键并且ADC具有式 (IIIa-1) :

[0256]

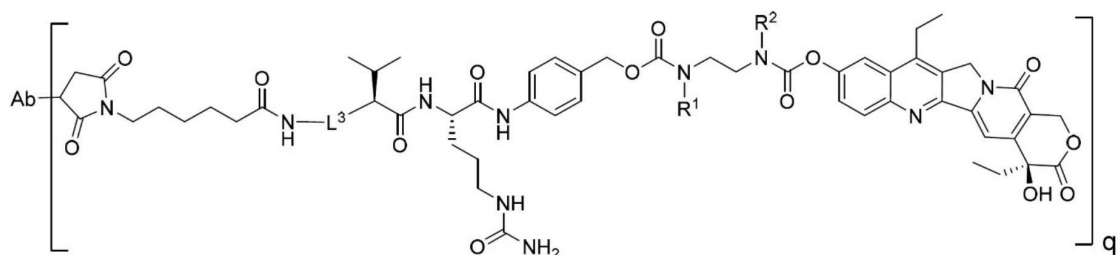


(IIIa-1)

[0257] 或其药学上可接受的盐。

[0258] 在一些实施例中, ADC具有式 (IIIb) :

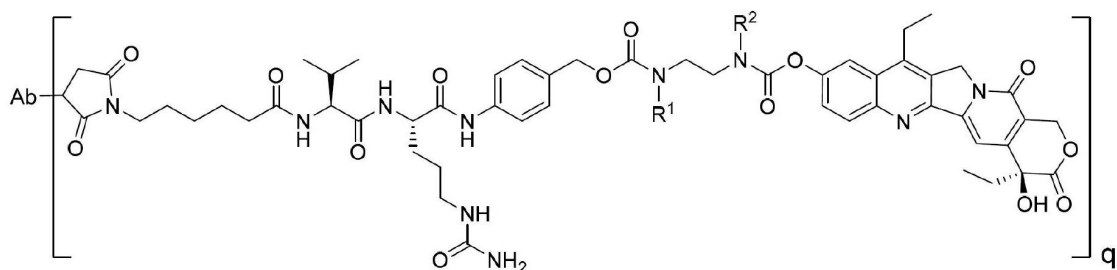
[0259]



(IIIb)

[0260] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L^3 是键并且ADC具有式 (IIIb-1) :

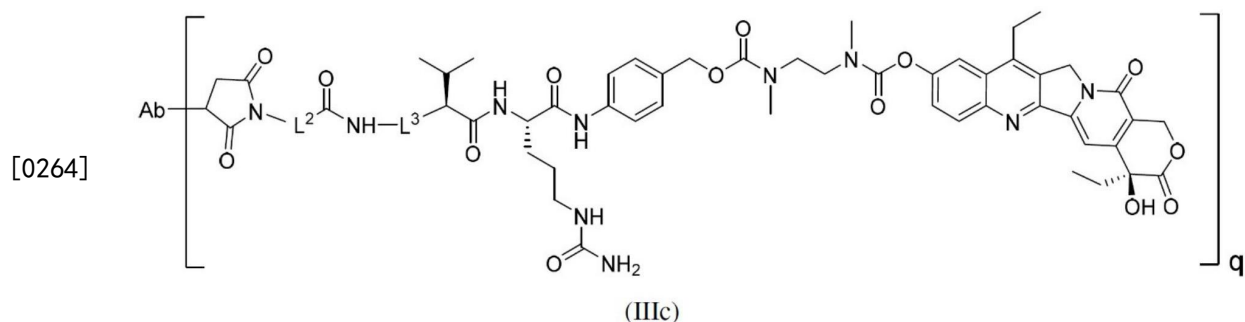
[0261]



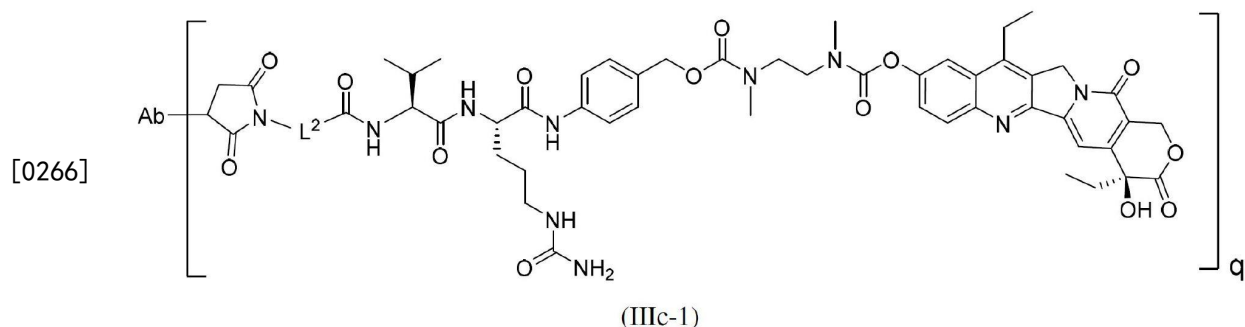
(IIIb-1)

[0262] 或其药学上可接受的盐。

[0263] 在一些实施例中, ADC具有式 (IIIc) :



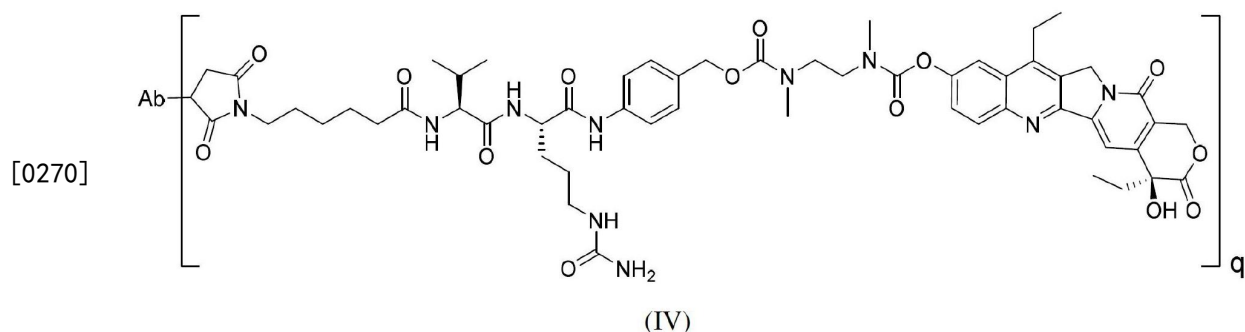
[0265] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中， L^3 是键并且ADC具有式(IIIc-1)：



[0267] 或其药学上可接受的盐。

[0268] 在本文中的描述中，应理解，一个部分的各个描述、变化形式、实施例或方面可与其他部分的各个描述、变化形式、实施例或方面组合，如同描述的各个和每一组合特定且单独列出一一般。举例而言，本文所提供的关于式(I)的 L^1 的各个描述、变化形式、实施例或方面可与 L^2 、 L^3 、p、 R^1 、 R^2 、Ab和q的各个描述、变化形式、实施例或方面组合，如同特定且个别地列举了每一个组合一般。还应理解，适用时，式(I)的所有描述、变化形式、实施例或方面同样适用于本文中详述的其他化学式，且同等地加以描述，如同针对所有化学式单独且个别地列举了每一个描述、变化形式、实施例或方面一般。举例而言，适用时，式(I)的所有描述、变化形式、实施例或方面同样适用于本文中详述的诸如式(IIa)、(IIa-1)、(IIb)、(IIb-1)、(IIc)、(IIc-1)、(IIIa)、(IIIa-1)、(IIIb)、(IIIb-1)、(IIIc)和(IIIc-1)的所述式中的任一者，且同等地加以描述，如同针对所有化学式单独且个别地列举了每一个描述、变化形式、实施例或方面一般。

[0269] 在一个实施例中，ADC具有式(IV)：



[0271] 或其药学上可接受的盐。

[0272] 药物负载量

[0273] 药物负载量由q(式(I)分子及其变化形式中每个抗Trop-2抗体的药物部分(即，

SN-38)的平均数目)表示。药物负载量可在每个抗体1至20个药物部分的范围内。式(I)的ADC及其任何实施例、变化形式或方面包括与1至20个范围的药物部分结合的抗体集合。在由结合反应制备ADC时,每个抗体的药物部分的平均数目可通过诸如质谱分析、ELISA分析和HPLC的常规方式表征。还可测定就q而言的ADC的定量分布。在一些情况下,可通过诸如反相HPLC或电泳的方式来实现从其他药物负载量的ADC中分离、纯化和表征得到特定q值的均质ADC。

[0274] 对于一些ADC,可通过抗体上的附接位点的数目来限制q。举例而言,在附接是半胱氨酸硫醇的情况下,如在本文所描述的某些示例性实施例中,抗体可仅具有一个或若干个半胱氨酸巯基,或可仅具有一个或若干个可附接连接子的具有足够反应性的巯基。在某些实施例中,ADC的平均药物负载量在1至约10个或约6至约8个的范围内。

[0275] 在某些实施例中,在结合反应中,少于理论最大值的药物部分结合于抗体。抗体可含有例如不与药物-连接子中间物或连接子试剂反应的赖氨酸残基。一般而言,抗体不含许多可连接至药物部分的游离和反应性半胱氨酸巯基;实际上,抗体中的大多数半胱氨酸巯基残基以二硫桥键形式存在。在某些实施例中,抗体可用诸如二硫苏糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)的还原剂在部分或完全还原条件下还原,产生反应性半胱氨酸巯基。在某些实施例中,抗体经历变性条件,以显出反应性亲核基团,诸如赖氨酸或半胱氨酸。ADC的负载(药物/抗体比率或“dar”)可以不同方式控制,并且例如通过如下来控制:(i)限制药物-连接子中间物或连接子试剂相对于抗体的摩尔过量;(ii)限制结合反应时间或温度;和(iii)对半胱氨酸硫醇部分修饰或限制修饰的还原条件。

[0276] 应了解在超过一个亲核性基团与药物-连接子中间物或连接子试剂反应的情况下,所得产物是具有一个或多个药物部分附接于抗体的分布的ADC化合物的混合物。每个抗体的平均药物数目可通过对抗体具有特异性且对药物具有特异性的双重ELISA抗体分析由混合物计算。可通过质谱分析鉴别出混合物中的个别ADC分子并且通过HPLC,例如疏水性相互作用色谱分离(参见例如McDonagh等人(2006)Prot. Engr. Design&Selection19(7):299-307;Hamblett等人(2004)Clin. Cancer Res.10:7063-7070;Hamblett, K.J., 等人“Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate”, Abstract No.624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, Proceedings of the AACR, 第45卷, 2004年3月; Alley, S.C. 等人. “Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates”, Abstract No.627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日, Proceedings of the AACR, 第45卷, 2004年3月)。在某些实施例中,具有单一负载值的均质ADC可通过电泳或色谱从结合混合物分离。

[0277] 抗Trop-2抗体

[0278] i. 示例性抗体和抗体序列

[0279] 在一些实施例中,ADC包含结合于Trop-2的抗体。已报道Trop-2在许多与Trop-2表达的基线水平无关的癌症类型中上调。本文所描述的ADC化合物包含抗Trop-2抗体。

[0280] 在一些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体包含半胱氨酸。在一些实施例中,抗Trop-2抗体经由半胱氨酸残基的硫结合至药物。示例性抗Trop-2抗体包括美国专利第7,

238,785号中所公开的hRS7抗体或其变化形式中的任一者。

[0281] 在一些实施例中,本文中所提供的ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含至少一个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含至少两个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含至少三个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含至少四个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含至少五个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含至少六个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。

[0282] 在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含一个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含两个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含三个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在

一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含四个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含五个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,ADC包含抗Trop-2抗体,该抗Trop-2抗体包含六个选自以下的HVR:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。

[0283] 在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含:包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1、包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2、包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3、包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1、包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2和包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含有包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含有包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含有包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含有包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含有包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含有包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。

[0284] 在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含具有与SEQ ID NO:7具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VL。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含具有SEQ ID NO:7的序列的VL。在某些实施例中,与SEQ ID NO:7具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列含有相对于参考序列的取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗Trop-2抗体保留结合Trop-2的能力。在某些实施例中,SEQ ID NO:7中已取代、插入和/或缺失总计1至10个氨基酸。在某些实施例中,SEQ ID NO:7中已取代、插入和/或缺失总计1至5个氨基酸。在某些实施例中,取代、插入或缺失发生在HVR外部的区中(即,在FR中)。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含SEQ ID NO:7的VL序列,并且包括该序列的翻译后修饰。

[0285] 在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含具有与SEQ ID NO:8具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VH。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含具有SEQ ID NO:8的序列的VH。在某些实施例中,与SEQ ID NO:8具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列含有相对于参考序列的取代(例如保守性取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗Trop-2抗体保留结合Trop-2的能力。在某些实施例中,SEQ ID NO:8中已取代、插入和/或缺失总计1至10个氨基酸。在某些实施例中,SEQ ID NO:8中已取代、插入和/或缺失总计1至5个氨基酸。在某些实施例中,取代、插入或缺失发生在HVR外部的区中(即,在FR中)。在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含SEQ ID NO:8的VH序列,并且包括该序列的翻译后修饰。

[0286] 在一些实施例中,抗Trop-2抗体包含κ轻链。在一些实施例中,抗Trop-2抗体是IgG抗体。在一些实施例中,抗Trop-2抗体是IgG1抗体。

[0287] 在一些实施例中,抗Trop-2抗体结合人类Trop-2。在一些实施例中,人类Trop-2具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0288] 在任一以上实施例中,抗Trop-2抗体经人源化。在一个实施例中,抗Trop-2抗体包含如任一以上实施例中的HVR并且进一步包含人类受体架构,例如人类免疫球蛋白框架或人类共同框架。在某些实施例中,人类受体框架是人类VL_{KI}共同(VL_{KI})框架和/或VH框架VH_{III}。在一些实施例中,人源化抗Trop-2抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:1的序列的VL HVR1;(b)包含SEQ ID NO:2的序列的VL HVR2;(c)包含SEQ ID NO:3的序列的VL HVR3;(d)包含SEQ ID NO:4的序列的VH HVR1;(e)包含SEQ ID NO:5的序列的VH HVR2;和(f)包含SEQ ID NO:6的序列的VH HVR3。

[0289] 在一些实施例中,抗Trop-2抗体是单克隆抗体,包括嵌合、人源化或人类抗体。在一个实施例中,抗Trop-2抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双功能抗体或F(ab')₂片段。在另一实施例中,抗体是实质上全长抗体,例如如本文中所定义的IgG1抗体或其他抗体类别或同种型。

[0290] ii. 抗体亲和力

[0291] 在一些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体以 $\leq 10\text{nM}$ 、或 $\leq 5\text{nM}$ 、或 $\leq 4\text{nM}$ 、或 $\leq 3\text{nM}$ 、或 $\leq 2\text{nM}$ 的亲和力结合人类Trop-2。在一些实施例中,抗Trop-2抗体以 $\geq 0.0001\text{nM}$ 、或 $\geq 0.001\text{nM}$ 、或 $\geq 0.01\text{nM}$ 的亲和力结合人类Trop-2。所属领域的技术人员已知的标准分析可用于测定结合亲和力。举例而言,可使用利用非线性曲线拟合程序(参见例如Munson等人, Anal Biochem, 107:220-239, 1980)的标准Scatchard分析测定抗Trop-2抗体是否以 $\leq 10\text{nM}$ 、或 $\leq 5\text{nM}$ 、或 $\leq 4\text{nM}$ 、或 $\leq 3\text{nM}$ 、或 $\leq 2\text{nM}$ 的“亲和力结合”。

[0292] 在一些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$,且任选地 $\geq 10^{-13}\text{M}$ (例如 10^{-8}M 或更小,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0293] 在一些实施例中,Kd是通过用相关抗体的Fab形式及其抗原进行的放射性标记的抗原结合分析法(RIA)测量,如由以下分析法所描述。Fab对抗原的溶液结合亲和力通过以下来测量:在未标记抗原的一系列滴定物存在下用最低浓度的(^{125}I)标记抗原平衡Fab,随后用经抗Fab抗体涂布的培养板捕捉结合抗原(参见例如,Chen等人, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999))。为了确定分析条件,将MICROTITER®多孔板(Thermo Scientific)用含 $5\mu\text{g/ml}$ 捕捉抗Fab抗体(Cappel Labs)的 50mM 碳酸钠(pH 9.6)涂布过夜,并且随后在室温(约 23°C)下用含 2% (w/v)牛血清白蛋白的PBS阻断二至五小时。在无吸附剂板(Nunc#269620)中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]抗原与相关Fab的连续稀释液混合(例如与Presta等人, Cancer Res. 57:4593-4599(1997)中的抗VEGF抗体Fab-12的评估一致)。随后将相关Fab培育过夜;然而,培育可持续较长时段(例如长达约65小时)以确保达到平衡。此后,在室温下将混合物转移至捕捉培养板中以用于培育(例如持续一小时)。随后去除溶液且用含 0.1% 聚山梨醇酯20(TWEEN-20®)的PBS洗涤板八次。当板已经干燥时,添加 $150\mu\text{L}$ /孔的闪烁剂(MICROSCINT-20TM; Packard),并且在TOPCOUNT TMγ计数器(Packard)上对板计数十分钟。选择提供小于或等于 20% 最大结合的各Fab的浓度以用于竞争性结合分析。

[0294] 根据另一实施例,Kd是使用表面等离子体共振分析,使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在 25°C 下利用约10个反应单位(RU)的固定抗原CM5芯片来测量。简而言之,根据供应商说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片

(CM5, BIAcore, Inc.)。用10mM乙酸钠(pH 4.8)将抗原稀释至5 μ g/ml(约0.2 μ M),随后以5微升/分钟的流动速率注射以获得大约10个反应单位(RU)的偶合蛋白质。在注入抗原后,注入1M乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,在25 $^{\circ}$ C下以大约25 μ l/min的流动速率注射Fab于含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20TM)表面活性剂的PBS(PBST)中的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用简单的一对一朗格缪尔结合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIAcore[®]评估软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离感测图谱来计算缔合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)按比率koff/kon来计算。参见例如Chen等人, J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果根据上文表面等离子体共振分析,缔合速率(on-rate)超过10⁶M⁻¹s⁻¹,则可通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率,该荧光淬灭技术存在如(诸如)具有搅拌式比色皿的停流装备型分光光度计(Aviv Instruments)或8000-系列SLM-AMINCOTM分光光度计(ThermoSpectronic))的光谱仪中所测量的渐增浓度的抗原的情况下,在25 $^{\circ}$ C下测量含20nM抗抗原抗体(Fab形式)的PBS(pH 7.2)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或降低。

[0295] iii. 抗体片段

[0296] 在某些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人, Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如 Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg和Moore 编, (Springer-Verlag, New York), 第269-315页(1994); 还参见WO 93/16185; 以及美国专利第5,571,894号和第5,587,458号。关于包含救助受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的论述,参见美国专利第5,869,046号。

[0297] 双功能抗体是其中两个抗原结合位点可以是二价或双特异性的抗体片段。参见例如EP404,097; WO 1993/01161; Hudson等人, Nat.Med.9:129-134(2003); 和Hollinger等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三功能抗体和四功能抗体也描述于 Hudson等人, Nat.Med.9:129-134(2003)中。

[0298] 单域抗体是包含抗体的重链可变域的全部或一部分或轻链可变域的全部或一部分的抗体片段。在某些实施例中,单域抗体为人类单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见(例如)美国专利第6,248,516B1号)。

[0299] 抗体片段可通过各种技术制得,包括但不限于蛋白分解消化完整抗体以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌(E.coli)或噬菌体)产生,如本文所描述。

[0300] iv. 嵌合和人源化抗体

[0301] 在某些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体例如描述于美国专利第4,816,567号; 和Morrison等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:6851-6855(1984)中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人类可变区(例如,来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人类灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人类恒定区。在另一实例中,嵌合抗体是“类别转换”抗体,其中类别或子类已自亲本抗体的类别或子类变化。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0302] 在某些实施例中,嵌合抗体是人源化抗体。典型地,对非人类抗体进行人源化以降低对人类的免疫原性,同时保留亲本非人类抗体的特异性和亲和力。一般而言,人源化抗体

包含一个或多个可变域,其中HVR(例如CDR)(或其部分)来源于非人类抗体,并且FR(或其部分)来源于人类抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人类恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基经来自非人类抗体(例如HVR残基所来源的抗体)的对应残基取代以例如恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0303] 人源化抗体和制造其的方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且进一步描述于例如Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号和第7,087,409号;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述“表面再塑”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述“FR改组”);和Osbourne等人,Methods36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的“引导选择”方法)中。

[0304] 可用于人源化的人类框架区包括但不限于:使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区(参见例如Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993));来源于具有轻链或重链可变区的特定子组的人类抗体的共同序列的框架区(参见例如Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等人,J.Immunol.,151:2623(1993));人类成熟(体细胞突变)框架区或人类生殖系框架区(参见例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和来源于筛选FR库的框架区(参见例如Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0305] v. 人类抗体

[0306] 在某些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体是人类抗体。可使用所属技术领域中已知的各种技术产生人类抗体。人类抗体通常描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。

[0307] 人类抗体可通过将免疫原施用于已经改造可响应于抗原攻击而产生完整人类抗体或具有人类可变区的完整抗体的转基因动物来制备。此类动物通常含有人类免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其置换内源性免疫球蛋白基因座,或存在于染色体外或随机整合至动物染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座一般已失活。对于从转基因动物获得人类抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。另外,参见例如美国专利第6,075,181号和第6,150,584号,描述XENOMOUSE™技术;美国专利第5,770,429号,描述HUMAB®技术;美国专利第7,041,870号,描述K-M MOUSE®技术;和美国专利申请公开第US 2007/0061900号,描述VELOCIMOUSE®技术。由此类动物产生的完整抗体的人类可变区可进一步加以修饰,例如通过与不同人类恒定区组合。

[0308] 人类抗体也可通过基于杂交瘤的方法制备。用于产生人类单克隆抗体的人类骨髓瘤和小鼠-人类融合骨髓瘤细胞系已有描述。(参见例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等人,J.Immunol.,147:86(1991))。经由人类B细胞杂交瘤技术产生的人类抗体也描述于Li等人,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)中。其他方法包括例如美国专利第7,189,826号(描述自杂交瘤细胞系产生单克隆人类IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue 26(4):265-268(2006)(描述人类-人类杂交瘤)中所描述的那些方法。人类杂交瘤技术(三源杂交瘤技术(Trioma technology))也描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中。

[0309] 人类抗体也可通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变域序列产生。此类可变结构域序列随后可与所需人类恒定域组合。下文描述用于自抗体库选择人类抗体的技术。

[0310] vi.库源抗体

[0311] 在某些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体来源于抗体库。抗体可通过筛选组合库中具有一种或多种所需活性的抗体来分离。举例而言,用于生成噬菌体展示库和筛选此类库中具有所需结合特征的抗体的各种方法在所属技术领域是已知的。此类方法综述于Hoogenboom等人的Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,Totowa,NJ,2001)中并且进一步描述于例如McCafferty等人,Nature 348:552-554; Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992); Marks和Bradbury的Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004)和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)中。

[0312] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因的谱系分别通过聚合酶链反应(PCR)克隆且在噬菌体库中随机重组,其随后可如Winter等人,Ann.Rev.Immunol.12:433-455(1994)中所述,筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或Fab片段形式展示抗体片段。来自免疫来源的库提供针对免疫原的高亲和力抗体而无需构建杂交瘤。替代地,可克隆(例如自人类)原生谱系以提供针对广泛范围的非自体抗原以及自体抗原的单一抗体来源而无需任何免疫接种,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)中所描述。最后,从干细胞克隆未重排V基因区段,并且使用含有编码高度可变CDR3区的随机序列的PCR引物和实现体外重排,也可以合成制备原始文库,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)中所描述。描述人类抗体噬菌体库的专利公开包括例如:美国专利第5,750,373号和美国专利公开第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号和第2009/0002360号。

[0313] 从人类抗体库分离的抗体或抗体片段在本文中视为人类抗体或人类抗体片段。

[0314] vii.多特异性抗体

[0315] 在某些实施例中,本文所提供的抗Trop-2抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。双特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施例中,结合特异性之一是针对Trop-2且另一者是针对任何其他抗原。在某些实施例中,双特异性抗体可结合至Trop-2的两个不同表位。双特异性抗体也可用于使细胞毒性剂定位至表达Trop-2的细胞。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段。

[0316] 用于制造多特异性抗体的技术包括但不限于重组共表达具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对(参见Milstein和Cuello, Nature 305:537(1983)), WO 93/08829, 和Traunecker等人, EMBO J. 10:3655(1991)), 和“杵-臼结构(knob-in-hole)”工程改造(参见例如美国专利第5,731,168号)。多特异性抗体也可通过以下来制备:用于制备抗体Fc-杂二聚分子的工程化静电导向效应(WO 2009/089004A1);使两种或更多种抗体或片段交联(参见例如美国专利第4,676,980号和Brennan等人, Science, 229:81(1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如Kostelny等人, J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992));使用用于制备双特异性抗体片段的“双功能抗体”技术(参见例如Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993));和使用单链Fv (sFv) 二聚体(参见例如Gruber等人, J. Immunol., 152:5368(1994));和如例如Tutt等人, J. Immunol. 147:60(1991)中所述制备三特异性抗体。

[0317] 本文还包括具有三个或更多个功能抗原结合位点的经工程改造的抗体, 包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576A1)。

[0318] 本文中的抗体或片段还包括包含结合至Trop-2以及另一不同抗原的抗原结合位点的“双作用FAB”或“DAF”(参见例如美国2008/0069820)。

[0319] viii. 抗体变异体

[0320] 在某些实施例中, 涵盖本文所提供的抗体的氨基酸序列变异体。举例而言, 可能需要改进抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变异体可通过将适当修饰引入编码该抗体的核苷酸序列中或通过肽合来制备。此类修饰包括例如在抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体, 其限制条件是最终构建体具有所需特征, 例如抗原结合。

[0321] a) 取代、插入和缺失变异体

[0322] 在某些实施例中, 本文所提供的抗Trop-2抗体具有一个或多个氨基酸取代。用于取代型突变诱发的相关位点包括HVR和FR。保守性取代展示于表1中“优选取代”的标题下。更实质性变化提供于表1中“示例性取代”的标题下, 并且如下文关于氨基酸侧链类别进一步描述。氨基酸取代可引入相关抗体中, 并且针对如下所需活性筛选产物: 例如保留/改进的抗原结合、降低的免疫原性或改进的ADCC或CDC。

[0323] 表1. 示例性氨基酸取代。

[0324]	原始残基	示例性取代	优选取代
	Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
	Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
	Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln

[0325]	Asp (D)	Glu; Asn	Glu
	Cys (C)	Ser; Ala	Ser
	Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
	Glu (E)	Asp; Gln	Asp
	Gly (G)	Ala	Ala
	His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
	Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
	Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
	Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
	Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
	Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Val; Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
	Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0326] 氨基酸可根据共有侧链特性来进行分组：

[0327] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0328] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0329] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0330] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0331] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0332] (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0333] 非保守取代将引起这些类别中的一者的成员换成另一个类别。

[0334] 一种类型的取代型变异体涉及取代亲本抗体（例如人源化或人类抗体）的一个或多个高变区残基。一般而言，选用于进一步研究的所得变异体相对于亲本抗体将在某些生物特性方面具有修饰（例如改良）（例如亲和力提高、免疫原性降低）和/或将实质上保留亲本抗体的某些生物特性。示例性取代型变异体是亲和力成熟抗体，其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术（诸如本文所描述的技术）便利地产生。简而言之，使一个或多个HVR残基突变，且在噬菌体上展示变异抗体并针对特定生物活性（例如结合亲和力）进行筛选。

[0335] 改变（例如取代）可发生于HVR中，例如以改良抗体亲和力。此类改变可在HVR“热点”（即在体细胞成熟过程中经历高频突变由密码子编码的残基）（参见例如Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)）和/或SDR(a-CDR)中进行，其中测试所得变异体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级库和从二级库再选择来达成亲和力成熟已描述于Hoogenboom等人的Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施例中，通过多种方法（例如易错PCR、链改组或寡核苷酸引导的突变诱发）中的任一者将多样性引入至选用于成熟的可变基因中。随后产生二级库。随后筛选该库以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变异体。另一种引入多样性的方法涉及HVR引导方法，其中将若干HVR残基（例如，一次4至6个残基）随机分组。可例如使用丙氨酸扫描突变诱发或模型化来特异性地鉴别抗原结合所涉及的HVR残基。常常尤其以CDR-H3和CDR-L3为目标。

[0336] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要这些变化不实质上降低抗体结合抗原的能力即可。举例而言,可在HVR中进行不实质上降低结合亲和力的保守改变(例如如本文所提供的保守取代)。此类变化可在HVR“热点”或SDR外。在上文所提供的变异VH和VL序列的某些实施例中,各HVR未改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0337] 如Cunningham和Wells(1989)Science,244:1081-1085所描述,适用于鉴别可针对突变诱发进行靶向的抗体残基或区的方法称为“丙氨酸扫描突变诱发”。在此方法中,残基或目标残基的群(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)被鉴别出,并且经中性或带负电氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)置换以确定抗体与抗原的相互作用是否受影响。可在对初始取代展现功能敏感性的氨基酸位置处引入其他取代。替代地或另外,抗原-抗体复合物的晶体结构用于鉴别抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可作为取代候选物的标靶或排除在取代候选物之外。可筛选变异体以确定其是否含有所需特性。

[0338] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽范围内的氨基末端和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变异体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如对于ADEPT而言)或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0339] b)糖基化变异体

[0340] 在某些实施例中,对本文所提供的抗Trop-2抗体进行改变以增加或降低抗体糖基化的程度。向抗体中添加糖基化位点或使抗体缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以便产生或去除一个或多个糖基化位点来便利地实现。

[0341] 在抗体包含Fc区的情况下,可改变连接于其上的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支链双触角寡糖,其通常通过N键连接至Fc区的CH2域的Asn297。参见例如Wright等人.TIBTECH 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接至双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,抗体中的寡糖可经修饰以便产生具有某些改进的特性的抗体变异体。

[0342] 在一个实施例中,提供无岩藻糖连接(直接或间接)至Fc区的碳水化合物结构的抗体变异体。举例而言,此类抗体中的岩藻糖量可为1%至80%、1%至65%、5%至65%,或20%至40%。岩藻糖的量是通过计算糖链内Asn297处的岩藻糖的平均量来确定,此平均量是相对于如通过MALDI-TOF质谱法所测量的连接至Asn 297的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和而言,如例如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约位置297(Fc区残基的EU编号)处的天冬酰胺残基;然而,归因于抗体的较小序列变化,Asn297也可位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处,即位置294与300之间。此类岩藻糖基化变异体可具有改良的ADCC功能。参见例如美国专利公开第US 2003/0157108号(Presta,L.);第US 2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。关于“去岩藻糖基化”或“缺乏岩藻糖”的抗体变异体的公开的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,

J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质岩藻糖基化的Lec13 CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请第US 2003/0157108A1号,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,尤其实例11),和基因敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8基因敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0343] 抗体变异体进一步具备平分寡糖,例如其中连接于抗体的Fc区的双触角寡糖通过GlcNAc平分。此类抗体变异体可具有减少的岩藻糖基化和/或经改良的ADCC功能。此类抗体变异体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利第6,602,684号(Umana等人);以及US 2005/0123546(Umana等人)中。还提供寡糖中的至少一个半乳糖残基与Fc区附接的抗体变异体。此类抗体变异体可具有经改良的CDC功能。此类抗体变异体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0344] c)Fc区变异体

[0345] 在某些实施例中,可将一个或多个氨基酸修饰引入至本文所提供的抗Trop-2抗体的Fc区中,从而产生Fc区变异体。Fc区变异体可包含人类Fc区序列(例如人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0346] 在某些实施例中,本发明涵盖具有一些而非所有效应功能的抗体变异体,此使得该抗体成为合乎应用需要的候选物,在所述应用中,体内抗体半衰期至关重要,而某些效应功能(诸如补体和ADCC)是不必要或有害的。可进行体外和/或体内细胞毒性分析以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消耗。举例而言,可进行Fc受体(FcR)结合分析以确保抗体不具有Fc γ R结合能力(因此可能不具有ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于调节ADCC的初级细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达概述于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页的表3中。评估相关分子的ADCC活性的体外分析的非限制性实例描述于美国专利第5,500,362号(参见例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986)和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985));第5,821,337号(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中。替代地,可采用非放射性分析方法(参见例如用于流式细胞测量术的ACTITM非放射性细胞毒性分析(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);和CytoTox 96®非放射性细胞毒性分析(Promega,Madison,WI))。适用于此类分析的效应细胞包括周边血液单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外,可例如在动物模型中,诸如Clynes等人,Proc Nat'l Acad Sci USA 95:652-656(1998)中所公开的动物模型中体内评定相关分子的ADCC活性。也可进行C1q结合分析以证实抗体不能结合C1q且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可进行CDC分析(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。还可使用所属技术领域已知的方法(参见例如Petkova,S.B.等人,Int.Immunol.18(12):1759-1769(2006))进行FcRn结

合和体内清除率/半衰期测定。

[0347] 效应功能减小的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一者或多者的取代的抗体(美国专利第6,737,056号)。此类Fc突变体包括具有氨基酸位置265、269、270、297和327中的两者或更多者的取代的Fc突变体,包括残基265和297取代是丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利第7,332,581号)。

[0348] 描述具有提高或降低的与FcR的结合的某些抗体变异体。(参加例如美国专利第6,737,056号;WO 2004/056312和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0349] 延长半衰期且提高与负责将母体IgG转移至胎儿的新生儿Fc受体(FcRn)(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))的结合的抗体描述于US2005/0014934A1(Hinton等人)中。那些抗体包含具有一个或多个取代的Fc区,在其中Fc区与FcRn的结合得以改良。此类Fc变异体包括在以下Fc区残基中的一者或多者处具有取代的那些变异体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如Fc区残基434的取代(美国专利第7,371,826号)。

[0350] 关于Fc区变异体的其他实例,还参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号;和WO 94/29351。

[0351] ix. 抗体衍生物

[0352] 在某些实施例中,本文中所提供的抗Trop-2抗体可进一步经修饰以含有所属技术领域已知且可易于获得的额外非蛋白质部分。适用于抗体的衍生作用的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三噁环辛烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)和聚葡萄糖或聚(正乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其在水中的稳定性而可在制造中具有优势。聚合物可具有任何分子量,并且可为分支链或非分支链的。附接于抗体上的聚合物的数目可变化,并且如果附接超过一个聚合物,则其可为相同或不同分子。一般而言,用于衍生作用的聚合物的数目和/或类型可基于包括但不限于待改良抗体的特殊特性或功能,抗体衍生物是否将用于指定病症下的疗法等考虑因素来确定。

[0353] x. 重组方法和组合物

[0354] 可使用例如如美国专利第4,816,567号中所述的重组方法和组合物产生抗体。所属领域的技术人员将熟悉适用于抗体表达的宿主细胞。示例性宿主细胞包括真核细胞,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。

[0355] 对于重组产生抗Trop-2抗体,编码例如如上文所描述的抗体的核酸被分离且插入至一种或多种载体中以用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可容易使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合至编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)分离和测序。

[0356] 适合于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文所描述的原核或真核细胞。举例而言,抗体可在细菌中产生,在不需要糖基化和Fc效应功能时尤其如此。对于细菌中抗体片段和多肽的表达,参见例如美国专利第5,648,237号、第5,789,199号和第5,840,523号(另参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编,Humana

Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254页, 其描述大肠杆菌中抗体片段的表达)。在表达之后, 抗体可以可溶性洗脱份从细菌细胞糊状物分离在并且可进一步进行纯化。

[0357] 除原核生物外, 诸如丝状真菌或酵母的真核微生物是抗体编码载体的适合克隆或表达宿主, 包括糖基化路径已经“人源化”, 从而使得产生具有部分或完全人类糖基化型态的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) 和Li等人, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

[0358] 适用于表达糖基化抗体的宿主细胞还来源于多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴别出多种杆状病毒株, 其可与昆虫细胞结合使用, 尤其用于转染草地粘虫(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0359] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如美国专利第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号和第6,417,429号(描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0360] 脊椎动物细胞也可用作宿主。举例而言, 适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可为适用的。适用哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40转型的猴肾脏CV1细胞系(COS-7); 人类胚肾细胞系(如例如Graham等人, J. Gen. Virol. 36:59 (1977) 中所描述的293或293); 幼仓鼠肾细胞(BHK); 小鼠塞特利氏细胞(mouse sertoli cell) (如例如Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) 中所描述的TM4细胞); 猴肾细胞(CV1); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76); 人类宫颈癌细胞(HELA); 犬肾细胞(MDCK); 水牛鼠肝细胞(BRL 3A); 人类肺细胞(W138); 人类肝细胞(Hep G2); 小鼠乳房肿瘤(MMT 060562); 如例如Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) 中所描述的TRI细胞; MRC 5细胞; 和FS4细胞。其他适用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, 包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 和骨髓瘤细胞系, 诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适用于产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述, 参见例如Yazaki和Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C.Lo, 编, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。

[0361] xi. 分析

[0362] 可通过所属技术领域已知的各种分析, 针对其物理/化学特性和/或生物活性鉴别、筛选或表征本文所描述的抗Trop-2抗体。

[0363] 在一个方面, 例如通过已知方法, 诸如ELISA、BIACore®、FACS或蛋白质印记(Western Blot)法测试抗体的抗原结合活性。

[0364] 在另一方面, 可使用竞争分析来鉴别与本文中描述的抗体中的任一者竞争结合于Trop-2的抗体。在某些实施例中, 此类竞争抗体结合于由本文中描述的抗体所结合者相同的表位(例如线性或构形表位)。用于定位抗体结合的表位的详述示例性方法提供于Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols”, Methods in Molecular Biology, 第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。

[0365] 在示例性竞争分析中, 在包含结合于Trop-2的第一标记抗体和第二未标记抗体的溶液中培育固定Trop-2, 其中测试该第二未标记抗体与第一抗体竞争结合于Trop-2的能力。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照, 在包含第一标记抗体但无第二未标记抗体的溶液中培育固定Trop-2。在允许第一抗体结合至Trop-2的条件下培育之后, 去除过量

的未结合抗体,并且测量与固定Trop-2缔合的标记的量。如果测试样品中的与固定Trop-2缔合的标记的量相对于对照样品而言实质上降低,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合至Trop-2。在某些实施例中,固定Trop-2存在于细胞表面上或自表面上表达Trop-2的细胞获得的膜制剂中。参见Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

[0366] II. 制备抗体药物偶联物的方法

[0367] 式I的ADC可通过若干途径,采用所属领域的技术人员已知的有机化学反应、条件和试剂制备,包括:(1) 抗体的亲核性基团与二价连接子试剂(L)反应,经由共价键形成Ab-L,接着与药物部分(即,SN-38部分)反应;和(2) 药物部分D(即,SN-38部分)的亲核性基团与二价连接子试剂(L)反应,经由共价键形成D-L,接着与抗体的亲核性基团反应。经由后一途径制备ADC的示例性方法描述于美国专利第7,498,298号中。

[0368] 抗体上的亲核性基团包括但不限于:(i) N端氨基;(ii) 侧链氨基,例如赖氨酸;(iii) 侧链巯基,例如半胱氨酸;和(iv) 糖羟基或氨基,其中抗体发生糖基化。胺、硫醇和羟基的亲核性的并且能够与连接子部分和连接子试剂上的亲电子基反应形成共价键,所述亲电子基包括:(i) 活性酯,诸如NHS酯、HOBt酯、卤基甲酸酯和酸卤化物;(ii) 烷基和苯甲基卤化物,诸如卤乙酰胺;和(iii) 醛、酮、羧基和顺丁烯二酰亚胺基。除了NHS酯之外,用于结合细胞表面赖氨酸的官能团可包括五氟苯基、四氟苯基、四氟苯磺酸酯、硝苯基、异氰酸酯、异硫氰酸酯和磺酰氯作为非限制性实例。

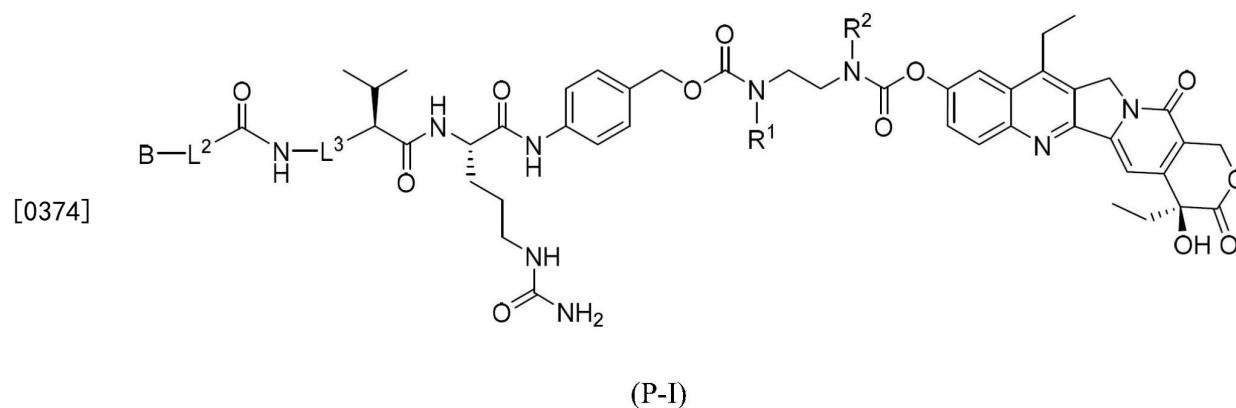
[0369] 某些抗体具有可还原链间二硫键,即半胱氨酸桥键。通过用诸如DTT(二硫苏糖醇)或三羰基乙基膦(TCEP)的还原剂处理,使得抗体完全或部分还原,可使抗体具有反应性,以与连接子试剂结合。理论上各半胱氨酸桥键将因此形成两个反应性硫醇亲核体。可经由修饰赖氨酸残基,而将额外亲核性基团引入至抗体中,例如使赖氨酸残基与2-亚氨基硫杂环戊烷(妥特氏试剂(Traut's reagent))反应,使氮转化为硫醇。也可通过引入一个、两个、三个、四个或更多个半胱氨酸残基(例如通过制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的变异抗体),而将反应性巯基引入至抗体中。可与反应性硫醇反应的官能团的非限制性实例包括但不限于顺丁烯二酰亚胺、吡啶基二巯基、溴乙酰基、碘乙酰基、溴苯甲基、碘苯甲基和4-(氰基乙炔基)苯甲酰基。

[0370] 本文所描述的ADC也可通过抗体上的亲电子基(诸如醛或酮羰基)与连接子试剂或药物上的亲核性基团之间发生反应来产生。连接子试剂上的适用亲核性基团包括但不限于酰肼、肟、氨基、肼、硫半卡胺、肼羧酸酯和芳基酰肼。在一个实施例中,抗体经修饰以引入能够与连接子试剂或药物上的亲核性取代基反应的亲电子部分。在另一实施例中,糖基化抗体的糖可例如用过碘酸盐氧化试剂氧化,以形成醛基或酮基,其可与连接子试剂或药物部分的氨基反应。所得亚氨基希夫碱(Schiff base)基团可形成稳定键联,或可例如通过硼氢化物试剂还原,以形成稳定的氨键联。在一个实施例中,糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏过碘酸钠反应可在抗体中产生羰基(醛和酮),其可与药物(Hermanson, *Bioconjugate Techniques*)上的适当基团反应。在另一实施例中,含有N端丝氨酸或苏氨酸残基的抗体可与偏过碘酸钠反应,产生醛代替第一氨基酸(Geoghegan和Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852)。此类醛可与药物部分或连接子亲核试剂反应。

[0371] 药物部分上的示例性亲核性基团包括但不限于:能够与连接子部分和连接子试剂上的亲电子基反应形成共价键的氨、硫醇、羟基、酰肼、肟、肟、硫半卡胺、肟羧酸酯和芳基酰肼基团,所述亲电子基包括:(i)活性酯,诸如NHS酯、HOBT酯、卤基甲酸酯和酸卤化物;(ii)烷基和苯甲基卤化物,诸如卤乙酰胺;和(iii)醛、酮、羧基和顺丁烯二酰亚胺基。

[0372] 在又一实施例中,抗体可偶联于“受体”(诸如链霉亲和素),以用于肿瘤预先靶向,其中将抗体受体偶联物施用患者,接着使用清除剂将未结合的偶联物从循环中去除且随后施用偶联于细胞毒性剂(例如药物或放射性核苷酸)的“配位体”(例如抗生物素)。

[0373] 在一个方面,式(I)的ADC可通过使抗Trop-2抗体(Ab)与式(P-I)的分子:



[0375] 或其药学上可接受的盐反应来制备,其中:

[0376] B是能够与抗Trop-2抗体形成键的反应性部分;

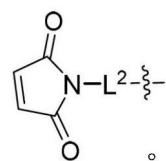
[0377] L^2 是 $-(CH_2)_p-$,其中p是4、5、6、7或8;

[0378] L^3 是键或基于聚氧乙烯的二价连接子;以及

[0379] R^1 和 R^2 各自独立地是 C_{1-6} 烷基。

[0380] 在一些实施例中,B是能够与抗Trop-2抗体的巯基形成键的反应性部分。在一些实

施例中,B是N-顺丁烯二酰亚胺基。在一些实施例中,B是 在一些实施例中, $B-L^2-$ 是 。



[0381] 在一些实施例中,p是4、5或6。在一些实施例中,p是4。在一些实施例中,p是5。在一些实施例中,p是6。在一些实施例中,p是7或8。在一些实施例中,p是7。在一些实施例中,p是8。

[0382] 在一些实施例中, L^3 是键。在其他实施例中, L^3 是基于聚氧乙烯的二价连接子。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分和亚烷基部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分和亚芳基部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分、亚烷基部分和亚芳基部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分、烷基部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二

价连接子包含聚氧乙烯部分、亚芳基部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含聚氧乙烯部分、亚烷基部分、亚芳基部分和酰胺部分。在一些实施例中,基于聚氧乙烯的二价连接子包含至多24个 $-(CH_2CH_2O)-$ 单元。

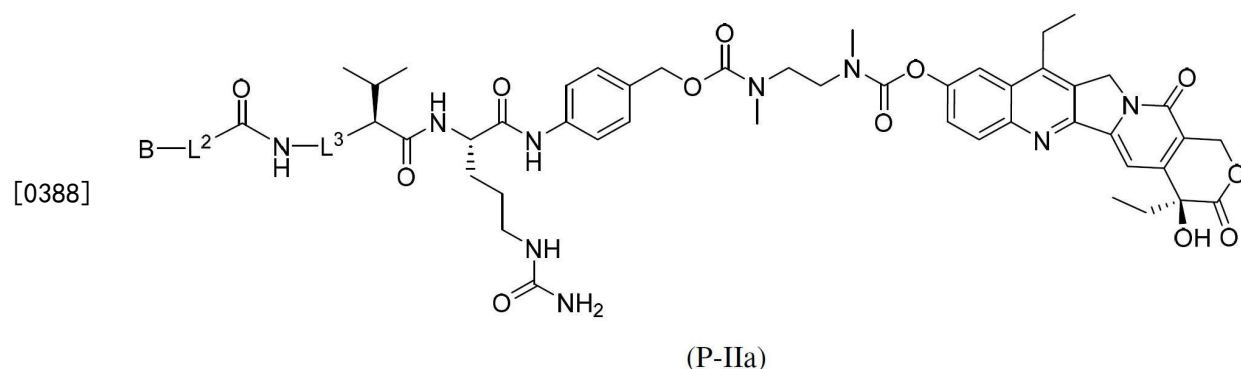
[0383] 在一些实施例中, R^1 是 C_{1-4} 烷基。在一些实施例中, R^1 是 C_{1-3} 烷基。在一些实施例中, R^1 是甲基。在一些实施例中, R^1 是乙基。在一些实施例中, R^1 是丙基,诸如正丙基或异丙基。在一些实施例中, R^1 是丁基,诸如正丁基或叔丁基。在其他实施例中, R^1 是戊基或己基。

[0384] 在一些实施例中, R^2 是 C_{1-4} 烷基。在一些实施例中, R^2 是 C_{1-3} 烷基。在一些实施例中, R^2 是甲基。在一些实施例中, R^2 是乙基。在一些实施例中, R^2 是丙基,诸如正丙基或异丙基。在一些实施例中, R^2 是丁基,诸如正丁基或叔丁基。在其他实施例中, R^2 是戊基或己基。

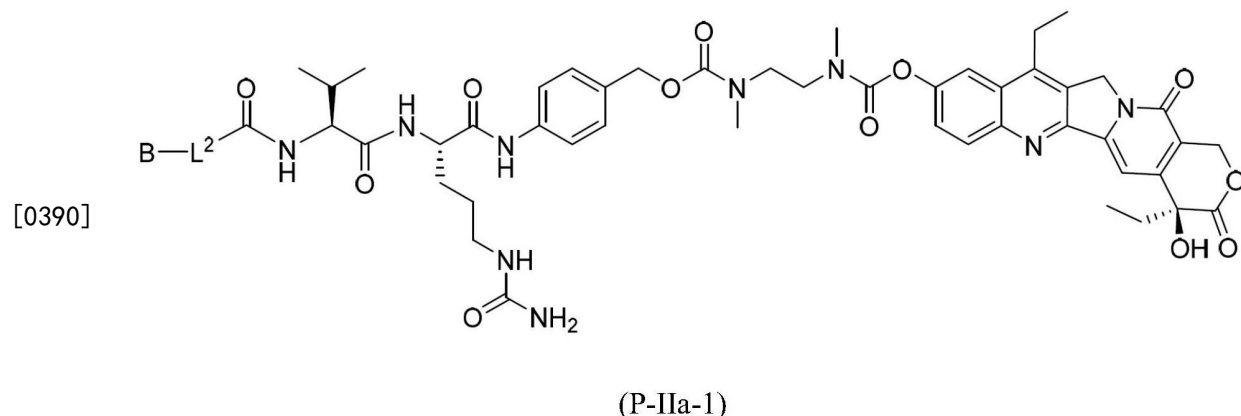
[0385] 在一些实施例中, R^1 与 R^2 相同。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是甲基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是乙基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是丙基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是丁基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是戊基。在一些实施例中, R^1 和 R^2 各自是己基。

[0386] 在一些实施例中, R^1 与 R^2 不同。在一些实施例中, R^1 是甲基且 R^2 是乙基。在一些实施例中, R^1 是乙基且 R^2 是甲基。在一些实施例中, R^1 是甲基且 R^2 是 C_{2-6} 烷基。在一些实施例中, R^1 是 C_{2-6} 烷基且 R^2 是甲基。

[0387] 在一些实施例中,式(P-I)的分子为式(P-IIa)的分子:



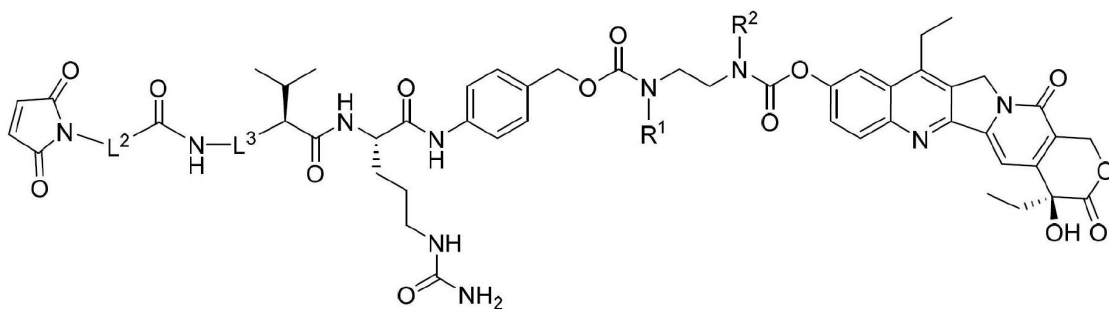
[0389] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L^3 是键并且分子具有式(P-IIa-1):



[0391] 或其药学上可接受的盐。

[0392] 在一些实施例中,分子具有式(P-IIb):

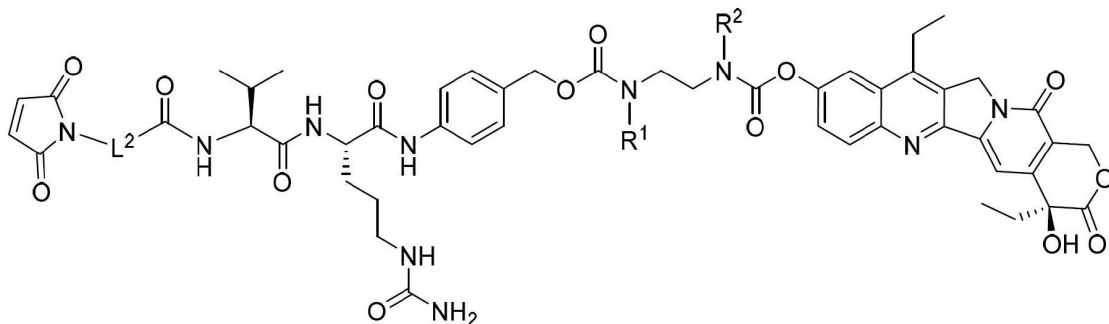
[0393]



(P-IIb)

[0394] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L^3 是键并且分子具有式 (P-IIb-1) :

[0395]

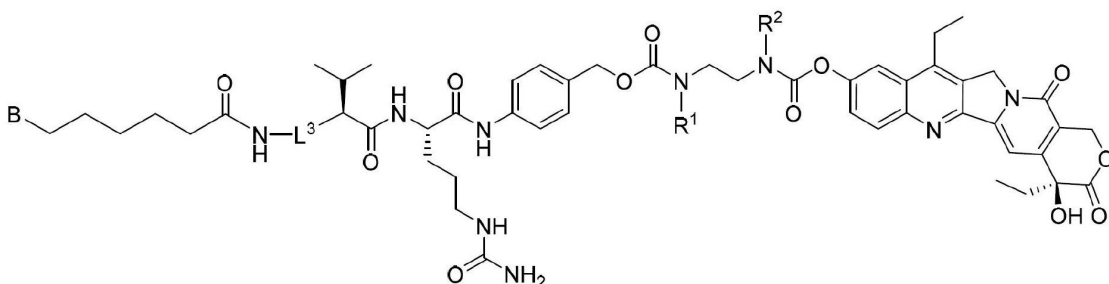


(P-IIb-1)

[0396] 或其药学上可接受的盐。

[0397] 在一些实施例中, 分子具有式 (P-IIc) :

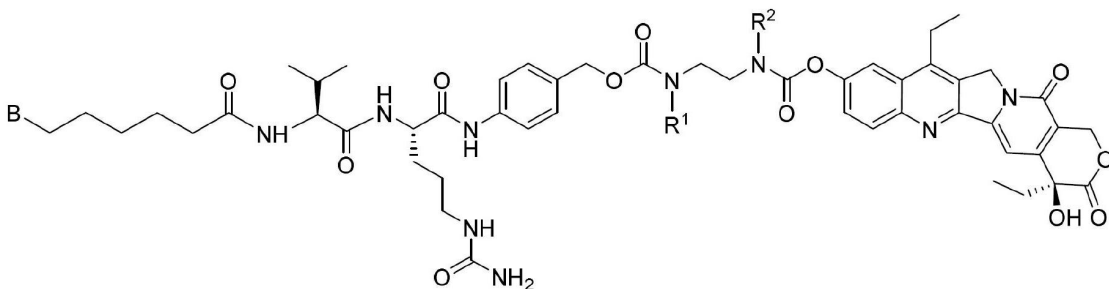
[0398]



(P-IIc)

[0399] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L^3 是键并且分子具有式 (P-IIc-1) :

[0400]

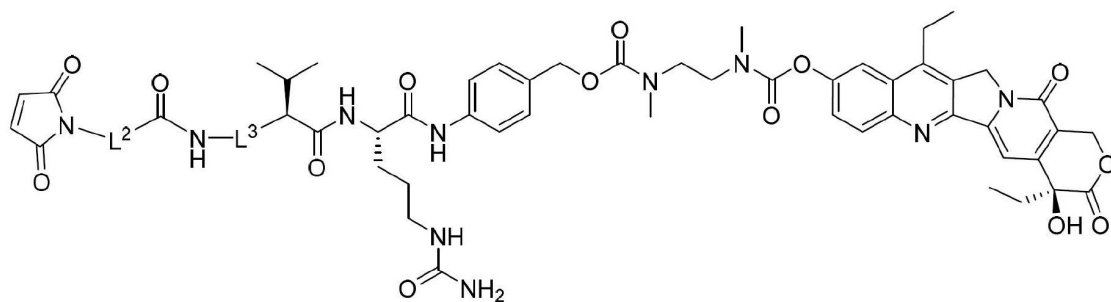


(P-IIc-1)

[0401] 或其药学上可接受的盐。

[0402] 在一些实施例中, 分子具有式 (P-IIIa) :

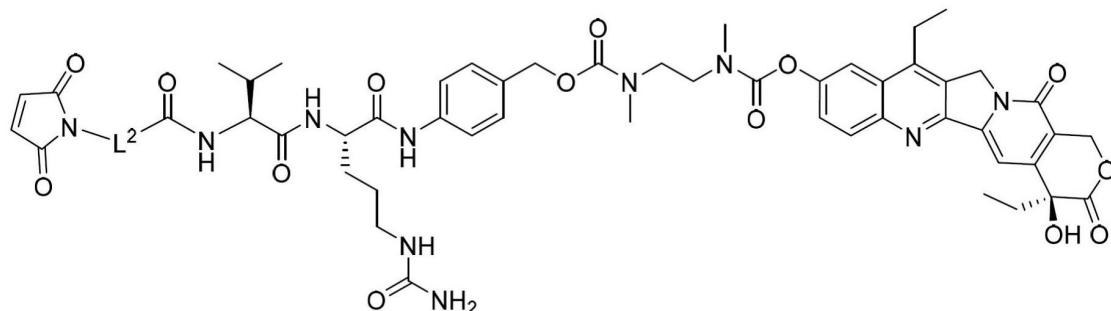
[0403]



(P-IIIa)

[0404] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L³是键并且分子具有式(P-IIIa-1):

[0405]

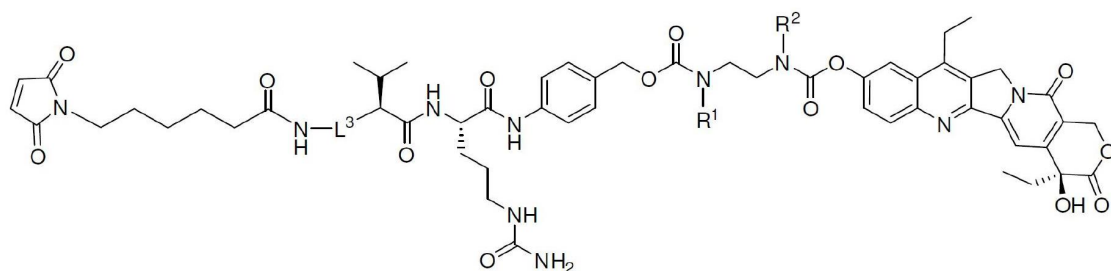


(P-IIIa-1)

[0406] 或其药学上可接受的盐。

[0407] 在一些实施例中, 分子具有式(P-IIIb):

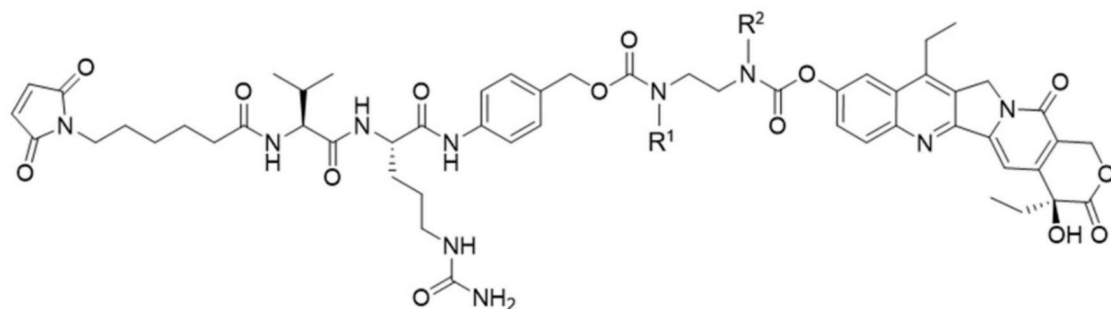
[0408]



(P-IIIb)

[0409] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L³是键并且分子具有式(P-IIIb-1):

[0410]

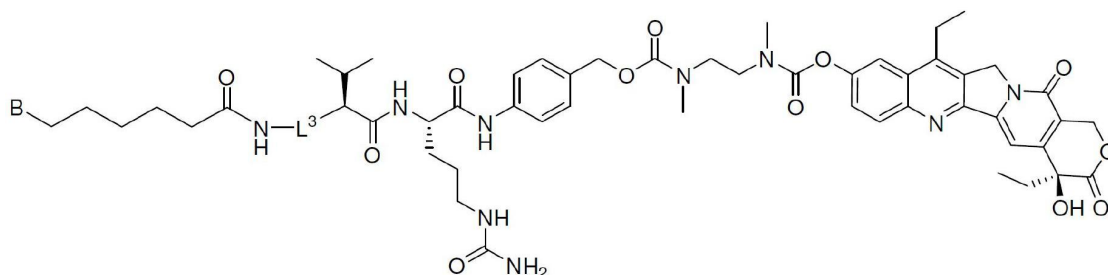


(P-IIIb-1)

[0411] 或其药学上可接受的盐。

[0412] 在一些实施例中, 分子具有式(P-IIIc):

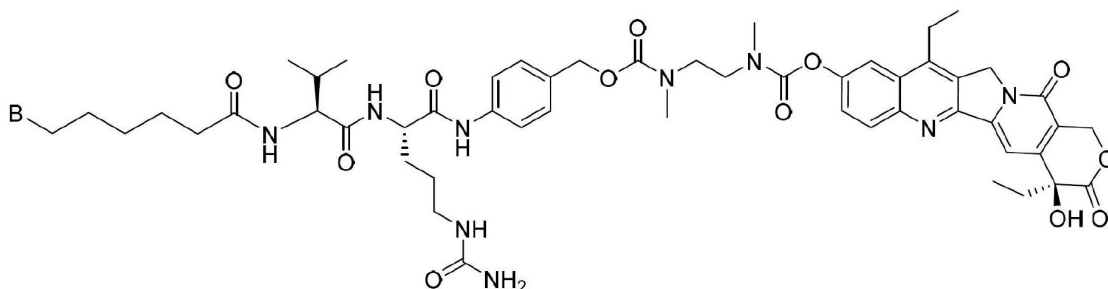
[0413]



(P-IIIc)

[0414] 或其药学上可接受的盐。在一个变化形式中, L^3 是键并且分子具有式 (P-IIIc-1) :

[0415]

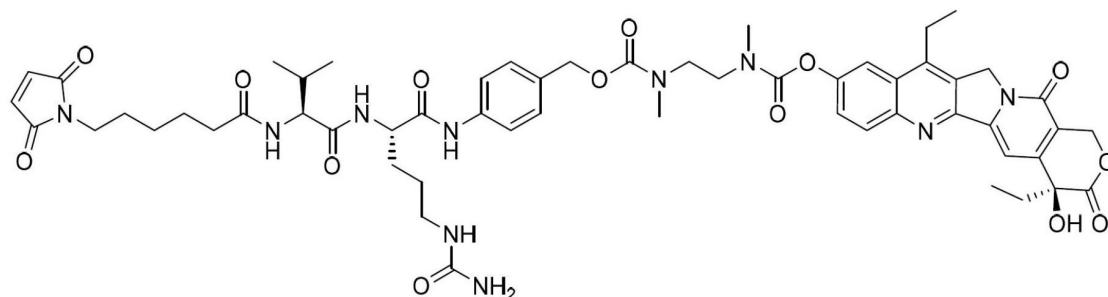


(P-IIIc-1)

[0416] 或其药学上可接受的盐。

[0417] 在一些实施例中, 分子具有式 (P-IV) :

[0418]



(P-IV)

[0419] 或其药学上可接受的盐。

[0420] 在上文所描述的制备方法中, 应理解, 一个部分的各个描述、变化形式、实施例或方面可与其他部分的各个描述、变化形式、实施例或方面组合, 如同描述的每一个组合特定且单独列出一一般。举例而言, 本文所提供的关于式 (P-I) 的 L^2 的各个描述、变化形式、实施例或方面可与 L^3 、 p 、 R^1 、 R^2 和 B 的各个描述、变化形式、实施例或方面组合, 如同特定且个别地列举了每一个组合一般。也应理解, 适用时, 式 (P-I) 的所有描述、变化形式、实施例或方面同样适用于本文中详述的其他化学式, 并且同等地加以描述, 如同针对所有化学式单独且个别地列举了每一个描述、变化形式、实施例或方面一般。举例而言, 适用时, 式 (P-I) 的所有描述、变化形式、实施例或方面同样适用于本文中详述的诸如式 (P-IIa)、(P-IIa-1)、(P-IIb)、(P-IIb-1)、(P-IIc)、(P-IIc-1)、(P-IIIa)、(P-IIIa-1)、(P-IIIb)、(P-IIIb-1)、(P-IIIc) 和 (P-IIIc-1) 的所述式中的任一者, 并且同等地加以描述, 如同针对所有化学式单独且个别地列举了每一个描述、变化形式、实施例或方面一般。

[0421] III. 药物制剂

[0422] 本文所描述的ADC的药物制剂是通过将具有所要纯度的此ADC与一种或多种任选的药学上可接受的载剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980)), 以冻干制剂或水溶液形式来制备。药学上可接受的载剂在所采用的剂量和浓度下一般对接受者无毒性, 并且包括但不限于: 缓冲液, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 保存剂(诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵; 氯化六羟季铵; 氯苄烷铵; 氯化苯索铵; 苯酚、丁基或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(小于约10个残基)多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白、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、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、双糖和其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如EDTA; 糖, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐相对离子, 诸如钠; 金属复合物(例如, Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性药学上可接受的载剂进一步包括间质药物分散剂, 诸如可溶性中性活性玻尿酸酶糖蛋白(sHASEGP), 例如人类可溶性PH-20玻尿酸酶糖蛋白, 诸如rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP(包括rHuPH20)和使用方法描述于美国专利公开第2005/0260186号和第2006/0104968号中。在一个方面, sHASEGP与一种或多种其他葡萄糖胺聚糖酶, 诸如软骨素酶组合。

[0423] 示例性冻干ADC制剂描述于美国专利第6,267,958号中。水性ADC制剂包括美国专利第6,171,586号和WO 2006/044908中所描述的那些制剂, 后一制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0424] 视治疗的特定适应症所需要, 本文中所提供的制剂也可含有多于一种活性成分, 优选地具有不会有害地影响彼此的互补活性的那些活性成分。

[0425] 活性成分可包覆于微胶囊中, 例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微胶囊, 例如分别是羟基甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊; 包覆于胶态药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或巨乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980)中。

[0426] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有ADC的固体疏水性聚合物的半渗透基质, 所述基质呈成形物品形式, 例如膜或微胶囊。

[0427] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌性可容易地通过例如经由无菌过滤膜过滤来实现。

[0428] IV. 治疗方法和组合物

[0429] 本文中所提供的ADC中的任一者可用于方法, 例如治疗方法中。

[0430] 在一个方面, 本文提供的ADC用于抑制表达Trop-2的细胞增殖的方法中, 该方法包含在容许ADC的抗Trop-2抗体结合于细胞表面上的条件下将该细胞暴露于ADC, 由此抑制该细胞增殖。在某些实施例中, 该方法是体外或体内方法。在一些实施例中, 细胞是B细胞。在一些实施例中, 细胞是赘生性B细胞, 诸如淋巴瘤细胞或白血病细胞。

[0431] 体外细胞增殖的抑制可使用可购自Promega (Madison, WI) 的CellTiter-Glo[™]发光细胞存活率分析来分析。该分析基于存在的ATP(其指示代谢活性细胞)的定量, 确定培养物中活细胞的数目。参见Crouch等人. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、美国专利第

6602677号。分析可以96或384孔格式进行,易于进行自动化高通量筛选(HTS)。参见Cree等人.(1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404。分析程序涉及向培养细胞中直接添加单一试剂(CellTiter-Glo[®]试剂)。这导致细胞溶解和由荧光素酶反应产生的发光信号的产生。发光信号与存在的ATP的量成比例,ATP的量与培养物中存在的活细胞数目成正比。数据可通过光度计或CCD相机成像装置记录。发光输出以相对光单位(RLU)表示。

[0432] 在另一方面,提供一种用作药剂的ADC。在其他方面,提供一种用于治疗方法中的ADC。在某些实施例中,提供一种用于治疗癌症的ADC。在一些实施例中,癌症与Trop-2的过度表达相关。在某些实施例中,本文提供一种用于治疗患有表达Trop-2的癌症的个体的方法中的ADC,该方法包含向个体施用有效量的ADC。在一个此类实施例中,该方法进一步包含向个体施用有效量的至少一种例如如下文所描述的其他治疗剂。

[0433] 在另一方面,本发明提供ADC在制造或制备药物中的用途。在一个实施例中,药剂是用于治疗表达Trop-2的癌症。在又一实施例中,药剂是用于治疗表达Trop-2的癌症的方法中,该方法包含向患有该疾病表达Trop-2的癌症的个体施用有效量的药剂。在一个此类实施例中,该方法进一步包含向个体施用有效量的至少一种例如如下文所描述的其他治疗剂。

[0434] 在另一方面,本发明提供一种治疗表达Trop-2的癌症的方法。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是上皮细胞衍生的癌症。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是癌(Carcinoma)。在一些实施例中,该癌是基底细胞癌、鳞状细胞癌、肾细胞癌、导管原位癌、浸润性导管癌或腺癌。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症包含实体肿瘤。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是转移性的。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是复发性癌症。

[0435] 在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是胰腺癌、胃癌、乳腺癌、黑色素瘤、肾癌、结直肠癌、子宫内膜癌、前列腺癌、尿路上皮癌、神经胶质母细胞瘤、肺癌、子宫颈癌、食道癌或卵巢癌。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是胰腺癌。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是胃癌。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是乳腺癌。在一些实施例中,乳腺癌是三阴性乳腺癌。在这些实施例中的任一者中,癌症可以是转移性癌症。在某些实施例中,癌症是复发性癌症。

[0436] 在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是接受抗Trop-2免疫组织化学(IHC)或原位杂交(ISH)评分大于“0”的癌症,其对应于>90%的肿瘤细胞中的极弱或无染色。在另一实施例中,表达Trop-2的癌症以1+、2+或3+水平表达Trop-2,其中1+对应于>50%的赘生性细胞中的弱染色,2+对应于>50%赘生性细胞中的中度染色,且3+对应于>50%赘生性细胞中的强染色。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症是根据检测Trop-2mRNA的逆转录酶PCR(RT-PCR)分析表达Trop-2的癌症。在一些实施例中,RT-PCR是定量RT-PCR。

[0437] 在一些实施例中,提供一种治疗患有表达Trop-2的癌症的个体的方法,其中表达Trop-2的癌症对第一治疗剂具有抗性。在一些实施例中,该方法包括向个体施用有效量的如本文所描述的ADC。在一些实施例中,表达Trop-2的癌症选自胰腺癌、胃癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、子宫颈癌、食道癌或卵巢癌。在一些实施例中,第一治疗剂包含除SN-38以外的第一细胞毒性剂。在一些实施例中,第一治疗剂包含结合除Trop-2以外的抗原的第一抗体。在一些实施例中,第一治疗剂是包含结合除Trop-2以外的抗原的第一抗体和第一细胞毒性剂的第一ADC。

[0438] 根据任一以上实施例的“个体”可以是人类。

[0439] 在另一方面,本文提供包含本文所提供的ADC中的任一者的药物制剂,其例如用于上述治疗方法中的任一者中。在一个实施例中,药物制剂包含本文中所提供的ADC中的任一者和药学上可接受的载剂。在另一实施例中,药物制剂包含本文中所提供的ADC中的任一者和至少一种其他治疗剂。

[0440] 本文中所描述的ADC可单独或与其他药剂组合用于疗法中。举例而言,如本文所描述的ADC可与至少一种其他治疗剂共同施用。在一些实施例中,其他治疗方案可与施用ADC组合,包括但不限于放射线疗法和/或骨髓和末梢血液移植和/或细胞毒性剂。在一些实施例中,细胞毒性剂是药剂或药剂的组合,诸如环磷酰胺、羟基道诺霉素、阿德力霉素、阿霉素、长春新碱(OncovinTM)、泼尼松龙、CHOP(环磷酰胺、小红莓、长春新碱和泼尼松龙的组合)或CVP(环磷酰胺、长春新碱和泼尼松龙的组合)。

[0441] 上述此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包括于相同或对应制剂中)和各自施用,在此情况下,ADC的施用可在其他治疗剂和/或佐剂施用之前、同时和/或之后进行。本文所描述的ADC也可与放射疗法组合使用。

[0442] 如本文所描述的ADC(和任何其他治疗剂)可通过任何适合的手段施用,包括肠胃外、肺内和鼻内施用,并且必要时针对局部治疗,包括病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。部分地视施用的短期或长期性而定,给药可通过任何适合的途径(例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射)来进行。本文中涵盖各种给药时程,包括但不限于单次施用或经各个时间点多次施用、快速施用和脉冲式输注。本发明的ADC将以与良好医疗实务一致的方式调配、给药和施用。在此情形下,考虑因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个别患者的临床病状、病症的病因、药剂递送部位、施用方法、施用时程和医学从业者已知的其他因素。ADC无需但任选地可与一种或多种当前用于预防或治疗所述病症的药剂一起调配。此类其他药剂的有效量视存在于制剂中的ADC的量、病症或治疗的类型和如上文所述的其他因素而定。这些药剂通常是以相同剂量并且以如本文所描述的施用途径使用,或以约1至99%的本文所描述的剂量,或以凭经验/在临床上确定适当的任何剂量和任何途径使用。

[0443] 为了预防或治疗疾病,如本文所描述的ADC的适当剂量(当单独或与一种或多种其他额外治疗剂组合使用时)将视治疗疾病的类型、ADC的类型、疾病的严重程度和病程、是出于预防还是出于治疗目的施用ADC、先前疗法、患者的临床病史和对ADC的反应以及主治医师的判断而定。一次性或历经一系列治疗向患者适当地施用ADC。视疾病的类型和严重程度而定,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg至10mg/kg)的ADC可以是用于施用患者的初始候选剂量,无论例如通过一次或多次独立施用或通过连续输注。一种典型日剂量可在约1 μ g/kg至100mg/kg或更多的范围内,视上文所提及的因素而定。经历数日或更长时间重复施用时,视病状而定,治疗一般持续至疾病症状发生所需抑制为止。ADC的一种示例性剂量将在约0.05mg/kg至约10mg/kg范围内。因此,可向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任何组合)的一种或多种剂量。此类剂量可间歇地施用,例如每周或每三周(例如以使得患者接受约二至约二十,或例如约六个剂量的抗体)。最初可施用较高起始剂量,随后可施用一种或多种较低剂量。然而,其他给药方案可为适用的。此疗法的进程容易通过常规技术和分析来监视。

[0444] V. 制品

[0445] 在另一方面,本文提供一种含有适用于治疗、预防和/或诊断上文所述的病症的材料的制品。制品包含容器和容器上或容器随附的标签或药品说明书。适合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多种材料(诸如玻璃或塑料)形成。容器容纳有本身或与有效治疗、预防和/或诊断病症的另一组合物组合的组合物,并且可具有无菌接取口(例如容器可以是具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是如本文所描述的ADC。标签或药品说明书指示组合物用于治疗所选病状。此外,制品可包含(a)内含组合物的第一容器,其中该组合物包含如本文所描述的ADC;和(b)内含组合物的第二容器,其中该组合物包含另一细胞毒性剂或其他治疗剂。本发明的此实施例中的制品可进一步包含指示组合物可用于治疗特定病状的药品说明书。可替代地或另外,制品可进一步包含第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲剂,诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)或右旋糖溶液。其可进一步包括就商业和用户观点而言所期望的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0446] 本说明书和示例性实施例不应视为限制性的。出于本说明书和所附权利要求书的目的,除非另外说明,否则表示数量、百分比或比例的所有数字,和说明书和权利要求书中所用的其他数值均应理解为在所有情况下通过术语“约”修饰至其尚未如此修饰的程度。“约”表示实质上不影响所述主题的特性的变化程度,例如在10%、5%、2%或1%内。因此,除非有相反指示,否则本说明书和所附权利要求书中所阐述的数值参数是可视设法获得的所需特性而变化的近似值。至少,且不试图将均等论的应用限于权利要求书的范畴,各数值参数至少应根据所报告的有效数字的个数且通过应用普通舍入技术来解释。

[0447] 实例

[0448] 提供以下实例以说明某些所公开实施例并且不应视为以任何方式限制本发明的范畴。

[0449] 实例中所描述的化学反应可容易调适以制备本发明的许多其他化合物,并且认为制备本发明化合物的替代方法在本发明的范畴内。举例而言,通过对所属领域的一般技术人员显而易见的修改可成功地合成根据本发明的未举例说明化合物,例如通过使用所属技术领域中已知的除那些试剂之外的其他适合试剂,或通过对反应条件、试剂和起始物质进行常规修改。替代地,将认为本文所公开或所属技术领域中已知的其他反应适用于制备本发明的其他化合物。

[0450] 以下缩写可与本申请相关。

[0451] 缩写

[0452] BOC或Boc:叔丁氧基羰基

[0453] DCM:二氯甲烷

[0454] DIEA:二异丙基乙胺

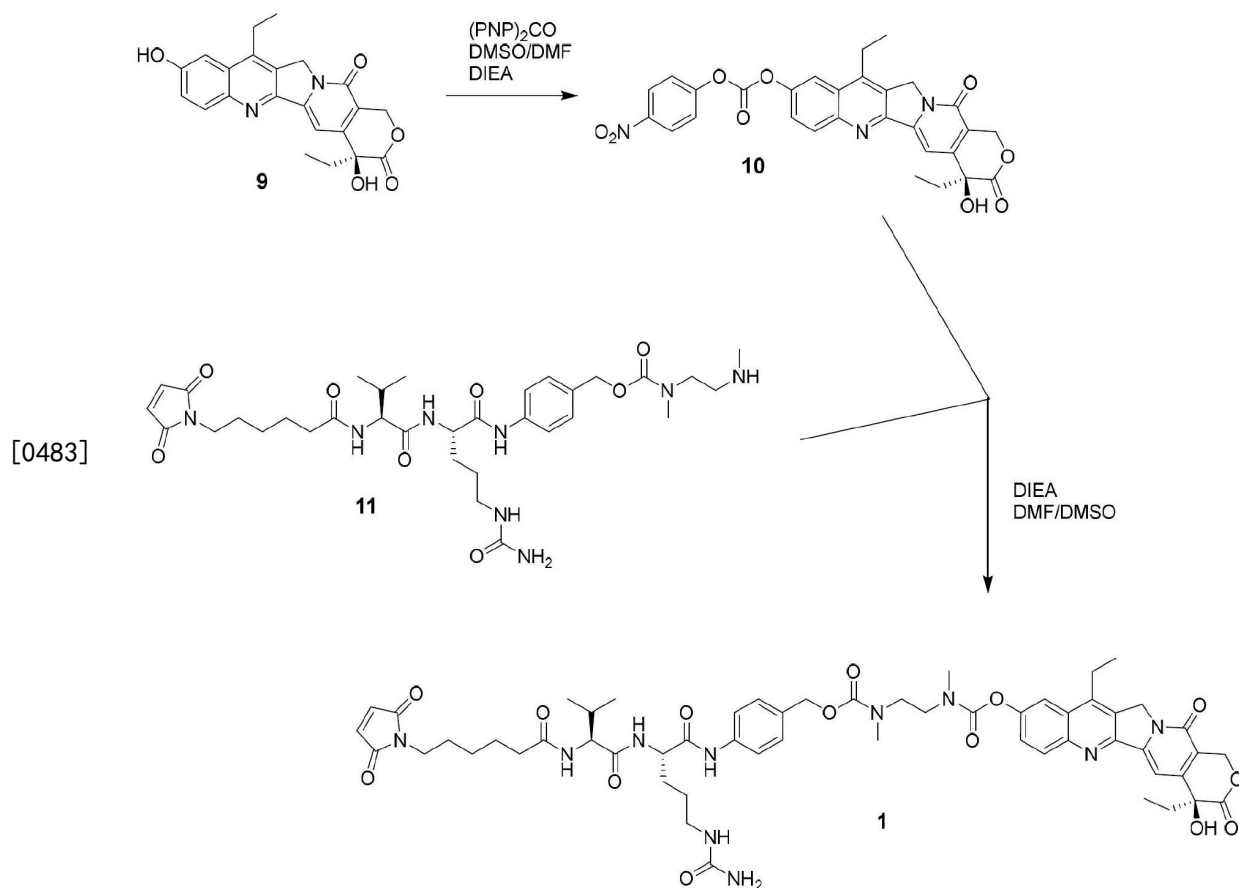
[0455] DMF:N,N'-二甲基甲酰胺

[0456] DMSO:二甲亚砜

[0457] FBS:胎牛血清

[0458] Fmoc:9-苄基甲氧基羰基

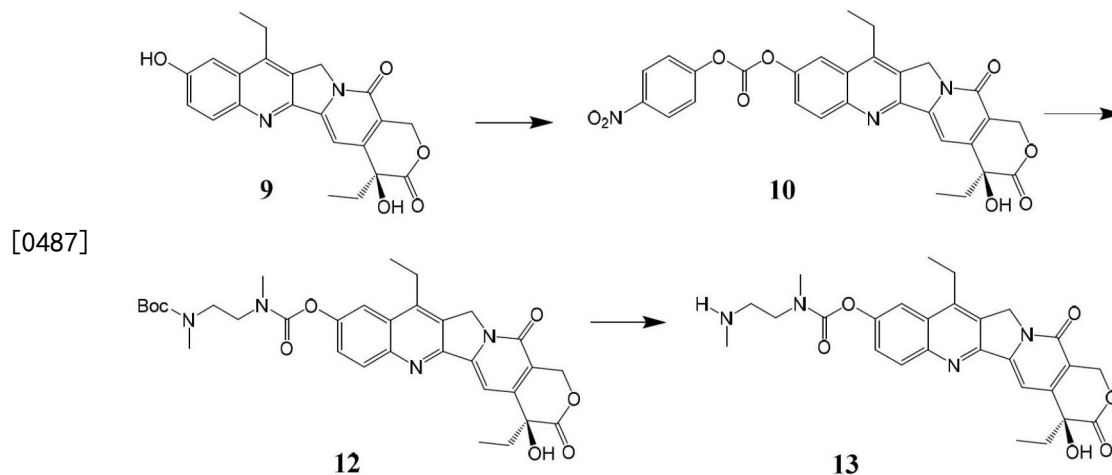
- [0459] Fmoc-AAN-PAB-PNP:9-苄基甲氧基羰基-丙氨酰基-丙氨酰基-天冬酰胺-(4-氨基苯甲基)-(4-硝苯基)碳酸酯
- [0460] Fmoc-Ala-PAB-PNP:9-苄基甲氧基羰基-丙氨酰基-(4-氨基苯甲基)-(4-硝苯基)碳酸酯
- [0461] h:小时
- [0462] HIC:疏水相互作用色谱法
- [0463] HMW:高分子量
- [0464] HPLC:高效液相色谱
- [0465] LC/MS:液相色谱-质谱法
- [0466] LC-MS/MS:液相色谱联合质谱法
- [0467] LLOQ:定量下限
- [0468] m或min:分钟
- [0469] Mal-C6-OH:6-顺丁烯二酰亚胺基己酸
- [0470] Mal-C6-VA-PAB-PNP:6-顺丁烯二酰亚胺基己酰基-缬氨酰基-丙氨酰基-(4-氨基苯甲基)-(4-硝苯基)碳酸酯
- [0471] PAB:对氨基苯甲基
- [0472] PBS:磷酸盐缓冲生理盐水
- [0473] PG:丙二醇
- [0474] (PNP)₂CO:双(4-硝苯基)碳酸酯
- [0475] PyAOP:(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷磷六氟磷酸盐
- [0476] RP-HPLC:反相HPLC
- [0477] SEC:尺寸排阻色谱
- [0478] TCEP:三(2-羧乙基)膦
- [0479] TFA:三氟乙酸
- [0480] THF:四氢呋喃
- [0481] 合成实例
- [0482] 实例S1:合成化合物1。



[0484] 将化合物9 (Sigma-Aldrich目录号:H0165-50MG;392mg,1mmol) 溶解于DMSO (3mL) 和DMF (3mL) 的混合物中,接着添加 $(\text{PNP})_2\text{CO}$ (912mg,3mmol) 于DMF (3mL) 中的溶液。将所得混合物在冰浴中冷却。接着,添加DIEA (174 μL ,1mmol),且将反应混合物搅拌15min。将反应混合物添加至200mL的二乙醚中。收集所得沉淀物并用醚(100mL)洗涤,且干燥,得到10 (333mg,60%)。

[0485] 向10 (55.7mg,0.1mmol) 于DMSO (1mL) 中的溶液中添加含11 (根据美国专利第9,814,784号中所描述的步骤合成) (TFA盐,80mg,0.1mmol) 的DMF (2mL)。接着,添加DIEA (35 μL ,0.2mmol) 且将所得反应混合物搅拌30min。通过HPLC (含0.1% TFA的水/乙腈) 执行所得材料的纯化,并冻干收集的洗脱份,得到1 (84.6mg,77%)。

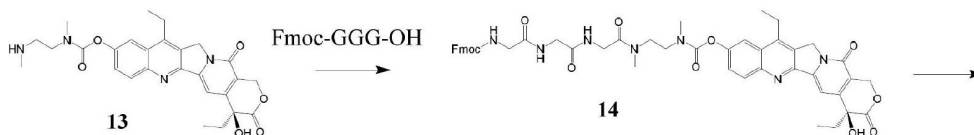
[0486] 实例S2:合成化合物13。



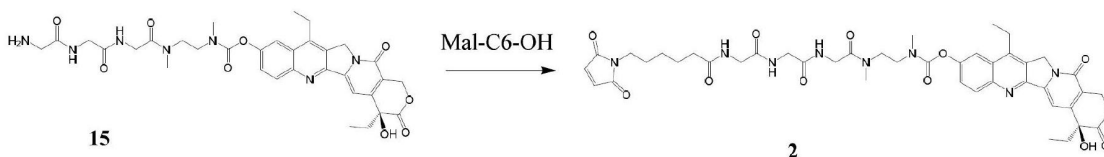
[0488] 向9 (534mg, 1.36mmol) 和双(4-硝苯基)碳酸酯(900mg, 2.96mmol) 于DMF (10mL) 中的混合物中添加DIEA (0.237mL, 1.36mmol)。在室温下搅拌所得反应混合物直至9耗尽为止。通过LC/MS监测反应。接着, 添加N-Boc-N,N'-二甲基乙二胺 (640mg, 3.40mmol), 接着添加DIEA (0.525mL, 3.00mmol)。在室温下搅拌所得混合物2小时。通过制备型HPLC获得化合物12 (400mg)。

[0489] 用含25% TFA的DCM (5mL) 处理化合物12持续1小时。在真空下去除溶剂并且粗物质13不经进一步纯化即使用。

[0490] 实例S3: 合成化合物2。



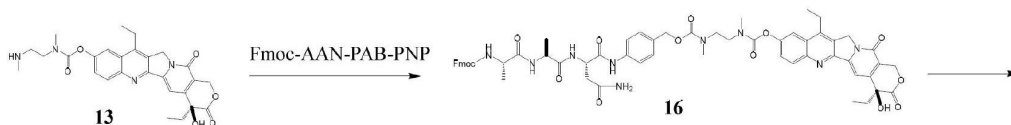
[0491]



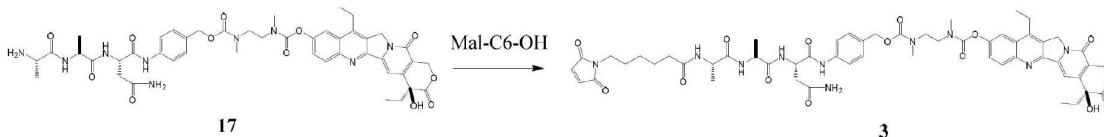
[0492] 向13 (31mg, 0.042mmol)、Fmoc-GGG-OH (17.4mg, 0.042mmol) 和PyAOP (22mg, 0.126mmol) 于DMF (2mL) 中的混合物中添加DIEA (25μL, 1.36mmol)。在室温下搅拌所得反应混合物直至13耗尽为止。通过LCMS监测反应。接着, 添加哌啶 (200μL) 并且在室温下搅拌所得混合物15分钟。通过制备型HPLC获得化合物15 (25mg)。

[0493] 向15 (25mg, 0.028mmol)、Mal-C6-OH (6.7mg, 0.028mmol) 和PyAOP (15mg, 0.028mmol) 于DMF (2mL) 中的混合物中添加DIEA (15μL, 0.084mmol)。在室温下搅拌所得混合物1小时。通过制备型HPLC获得化合物2。

[0494] 实例S4: 合成化合物3。



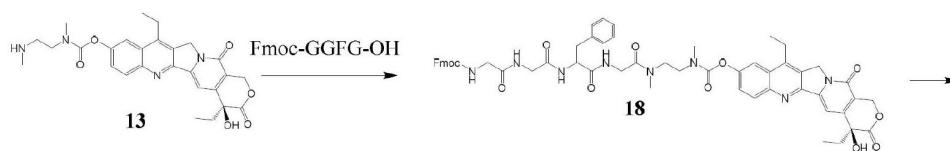
[0495]



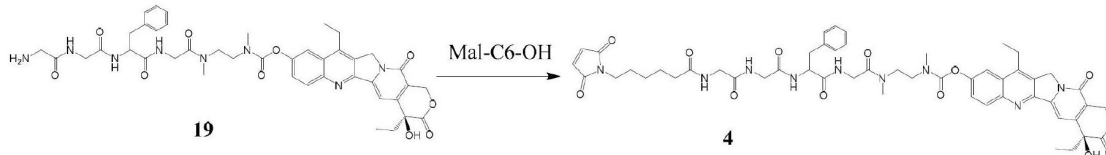
[0496] 向13 (31mg, 0.042mmol) 和Fmoc-AAN-PAB-PNP (31mg, 0.042mmol) 于DMF (1mL) 中的混合物中添加DIEA (15μL, 0.084mmol)。在室温下搅拌所得反应混合物过夜, 接着添加哌啶 (50μL)。在室温下搅拌所得混合物15分钟。通过制备型HPLC获得化合物17 (16mg)。

[0497] 向17 (16mg, 0.014mmol)、Mal-C6-OH (4.6mg, 0.022mmol) 和PyAOP (11.4mg, 0.022mmol) 于DMF (2mL) 中的混合物中添加DIEA (16μL, 0.088mmol)。在室温下搅拌所得混合物1小时。通过制备型HPLC获得化合物3。

[0498] 实例S5: 合成化合物4。

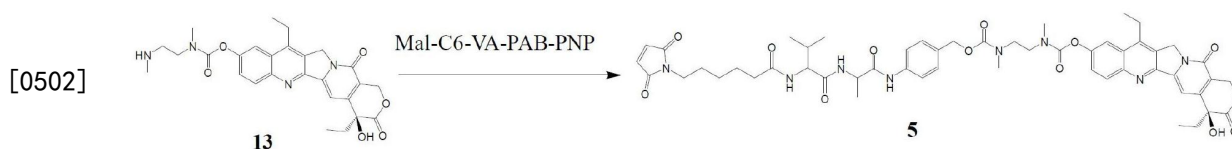


[0499]



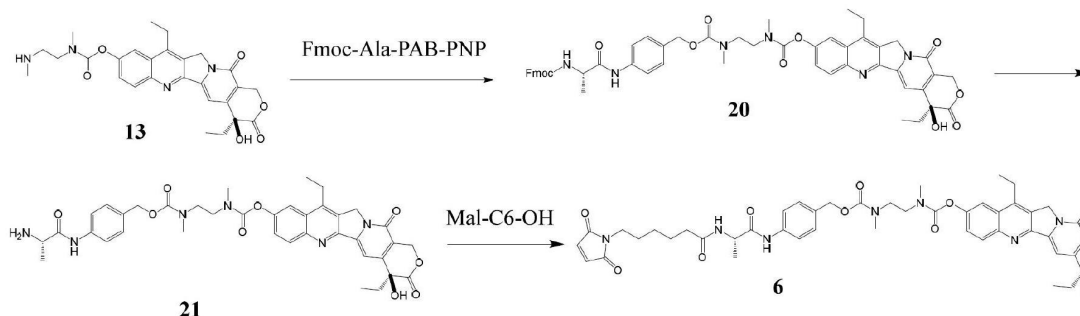
[0500] 根据制备2 (实例S3) 所概述的合成且如以上流程中具体展示来合成化合物4 (10mg, 20%)。

[0501] 实例S6: 合成化合物5。

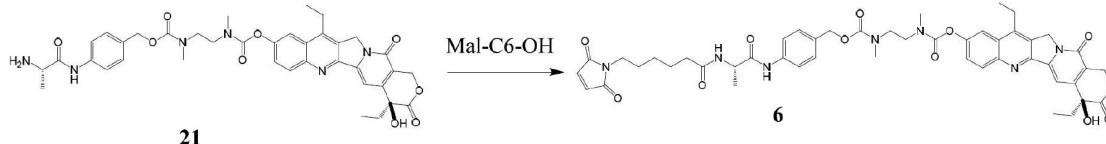


[0503] 根据制备3 (实例S4) 所概述的合成且如以上流程中具体展示使用Mal-C6-VA-PAB-PNP来合成化合物5 (8mg, 25%)。

[0504] 实例S7: 合成化合物6。



[0505]



[0506] 根据制备3 (实例S4) 所概述的合成且如以上流程中具体展示使用Fmoc-Ala-PAB-PNP来合成化合物6 (12mg, 23%)。

[0507] 实例S8: 制备抗体药物偶联物 (ADC) 抗Trop-2化合物1。

[0508] 此实例中使用的抗Trop-2抗体具有美国专利第7,238,785号中描述的hRS7抗体的抗体序列。通过EDTA (4mM) 将浓度为3至10mg/mL的亲和力纯化抗Trop-2抗体缓冲更换至磷酸钠缓冲液 (50mM, pH 7.0-7.2) 中。向此抗体储备液的一部分中添加新制备的至多20倍摩尔过量的TCEP (10mM) 水溶液。在4-8℃下培育所得混合物过夜。通过凝胶过滤色谱或数轮离心过滤去除过量TCEP。对回收的还原抗体进行UV-Vis定量, 接着证实足够的游离巯醇与抗体 (SH/Ab) 摩尔比。简而言之, 将新制备的5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸) 于磷酸钠中的溶液 (50mM, pH 7.0-7.2, 4mM EDTA) 的1mM等分试样与等体积的纯化抗体溶液混合。测量412nm下的所得吸光度且使用 $14,150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的消光系数测定还原的半胱氨酸含量。所得SH/Ab测量为约8, 表明链间半胱氨酸巯醇残基完全还原。

[0509] 为了起始化合物1与抗Trop-2抗体的结合, 首先将1以5mM的浓度溶解于3:2乙腈/水混合物中。随后将丙二醇 (PG) 添加至经还原纯化的抗Trop-2抗体的等分试样中, 得到最终浓度为10-30% (v/v) PG, 之后添加新制备的12-15倍摩尔过量的1溶液。在充分混合且在

环境温度下培育 ≥ 1.5 h之后,通过HIC-HPLC分析粗物质结合反应以确认280nm波长检测下的反应完成(起始抗体峰消失)。随后通过凝胶过滤色谱使用配备有用PBS平衡的Superdex 200pg柱(GEHealthcare)的AKTA系统实施ADC抗Trop-2化合物1的纯化。基于UV-VIS和HIC-HPLC计算药物与抗体比率(DAR)为6至8。所得纯化样品的HIC-HPLC进一步指示 $<1\%$ (未检测到)起始抗体材料。低百分比($<5\%$)HMW聚集物的确认也使用分析型SEC-HPLC来确定。在最后表征之后,将无菌海藻糖和Tween-80溶液于水中的等分试样添加至含纯化的ADC抗Trop-2化合物1的PBS中,得到最终组成6%海藻糖/0.02%Tween-80/94% PBS(v/v/V)。随后将这些混合物在液氮中快速冷冻且储存于 -80°C 下直至进一步使用。

[0510] 实例S9:制备抗体药物偶联物(ADC)抗Trop-2化合物2、抗Trop-2化合物3、抗Trop-2化合物4、抗Trop-2化合物5、抗Trop-2化合物6和ADC-CL2A-SN38。

[0511] 如实例S8中所概述分别使用2、3、4、5或6代替1来制备额外的ADC抗Trop-2化合物2、抗Trop-2化合物3、抗Trop-2化合物4、抗Trop-2化合物5和抗Trop-2化合物6。如实例S8中所概述使用SN38部分(根据J. Med. Chem., 2008, 51, 6916-6926中所概述的步骤制备)代替1来制备比较性ADC分子ADC-CL2A-SN38。

[0512] 生物学实例

[0513] 实例B1:抗体药物偶联物(ADC)抗Trop-2化合物2、抗Trop-2化合物3、抗Trop-2化合物4、抗Trop-2化合物5和抗Trop-2化合物6的体外功效。

[0514] 使用以下细胞系来评估ADC抗Trop-2化合物1、抗Trop-2化合物2、抗Trop-2化合物3、抗Trop-2化合物4、抗Trop-2化合物5和抗Trop-2化合物6的体外功效:BxPC-3(胰腺癌)、MDA-MB-468(乳腺癌/乳腺癌)和L-540(霍奇金氏淋巴瘤)。如下进行体外分析。将细胞接种(针对MDA-MB-468和BxPC-3为375个细胞/孔;针对L-540为2,500个细胞/孔)于384孔白色透明底板(2个板/细胞系)的12.5微升/孔中且在 37°C 下保持2至4小时。接着,仅将25 μL 培养基添加至未使用的孔中。单独地,制备 $2\times$ 最终浓度的工作溶液。通过添加12.5 μL 的对应工作溶液来处理细胞且将细胞在 37°C 下保持120小时。随后通过CTG(CellTiter-Glo®发光细胞活力分析,Promega)来测量细胞存活率。

[0515] 抗Trop-2化合物1、抗Trop-2化合物2、抗Trop-2化合物3、抗Trop-2化合物4、抗Trop-2化合物5和抗Trop-2化合物6的细胞存活率展示于图1至图5中。数据表明所测试的ADC具有 EC_{50} 值介于大致46至340nM范围内的体外功效。

[0516] 实例B2:抗体药物偶联物(ADC)抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38的体内功效。

[0517] 肿瘤的肿瘤细胞接种和建立

[0518] 人类肿瘤细胞系MDA-MB-468(三阴性乳腺癌)、NCI-N87(胃癌)和BxPC-3(胰腺癌)用10% FBS RPMI 1640培养基培养且扩增。用0.05%胰蛋白酶采集细胞。接着,将各肿瘤细胞系的 5×10^6 个细胞(于总计0.1mL,1:1比率的PBS和基质胶中)皮下注射至各小鼠(来自Charles River的6周龄雌性Nu/Nu小鼠)的右上侧腹中。通过在接种之后5至7天开始使用数字卡尺测量肿瘤体积来监测肿瘤生长,且遵循每周1至2次直至肿瘤体积达到约100-250 mm^3 为止。

[0519] 治疗

[0520] 在将肿瘤分段成所需体积后,将动物随机分组且剔除具有极大或极小肿瘤的小鼠。将小鼠随机分配至对照组或治疗组中,其中每组6至8只动物。随后用PBS/媒剂、抗Trop-

2抗体或ADC化合物抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38治疗小鼠。通过每周两次尾部静脉注射2、3、5、10、15和25mg/kg剂量的不同组合来给予治疗,持续总共四个体积分别为0.2mL的治疗。

[0521] 肿瘤生长测量

[0522] 每周监测肿瘤生长反应一次或两次。在整个实验时段中,每周通过使用数字卡尺来测量肿瘤体积一次或两次。使用下式计算体积:

[0523] $\text{体积}(\text{mm}^3) = [\text{长度}(\text{mm}) \times \text{宽度}(\text{mm})^2] / 2。$

[0524] 使用下式计算TGI% (肿瘤生长抑制的百分比):

[0525] $\text{TGI}\% = \{1 - [\text{TV}_{\text{td}} - \text{TV}_{\text{t0}}] / \text{CV}_{\text{td}} - \text{CV}_{\text{t0}}\} \times 100$

[0526] 其中:

[0527] TV=治疗组的肿瘤体积,

[0528] CV=对照组的肿瘤体积,

[0529] td=起始治疗之后的天数,和

[0530] t0=在第0天治疗时。

[0531] 当肿瘤负荷达到IACUC方案限制(2000mm³)或预定时间时,通过CO₂窒息处死小鼠。

[0532] 结果

[0533] MDA-MB-468异种移植

[0534] 在不同给药方案的两个研究中,在裸小鼠的MDA-MB-468皮下异种移植中评估ADC抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38的功效。在一项研究中,相比于PBS/媒剂和单独抗-CD38抗体(5mg/kg)的对照,以2和5mg/kg i.v biw×4给予ADC抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38的治疗(图6A)。抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38皆展示对MDA-MB-468肿瘤生长的极强和剂量依赖性抑制。在5mg/kg下,抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38皆完全抑制MDA-MB-468肿瘤生长并且分别使肿瘤大小减小28.8%和56.6%。在2mg/kg的低剂量治疗中,ADC抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38在起始治疗之后至多36天仍分别展现对肿瘤生长的较强抑制,其中TGI持续为95.4%和88.6%。

[0535] 在第二项研究中,测试3和10mg/kg,i.v biw×4的给药方案。根据对应的TGI为90-100%和减小的肿瘤大小,在3和10mg/kg的抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38两者的治疗中同样明显可见较强抑制(图6B)。在此研究中,在起始治疗之后,抑制作用持续长达约100天。数据表明ADC抗Trop-2化合物1显著地抑制裸小鼠中的MDA-MB-468异种移植肿瘤生长。

[0536] NCI-N87异种移植

[0537] 在裸小鼠的NCI-N87皮下异种移植中通过5和15mg/kg i.v biw×4的给药方案相比于PBS/媒剂和单独的抗Trop-2抗体的对照来评估ADC抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38的功效(图7)。数据表明抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38两者皆以剂量依赖性方式抑制肿瘤生长。在15mg/kg下,抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38显著地抑制肿瘤生长,其中在起始治疗之后的第22天,TGI分别为66.6%和99.7%。在5mg/kg下,抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38两者在NCI-N87异种移植模型中皆展示约45.0%的非显著肿瘤生长抑制。数据表明抗Trop-2化合物1显著地抑制裸小鼠中的NCI-N87异种移植肿瘤生长。

[0538] BxPC3异种移植

[0539] 在裸小鼠的BxPC3皮下异种移植中通过3、10和25mg/kg i.v biw×4的给药方案相

比于ADC-CL2A-SN38 (10mg/kg)、PBS/媒剂和单独的抗Trop-2抗体 (10mg/kg) 来评估抗Trop-2化合物1的功效 (图8)。所有三种剂量的抗Trop-2化合物1显著地抑制肿瘤生长, 其中在起始治疗之后第21天, TGI为85-100%。在BxPC3异种移植模型中未观测到抗Trop-2化合物1治疗的剂量反应。数据表明抗Trop-2化合物1显著地抑制裸小鼠中的BxPC3异种移植肿瘤生长。

[0540] 以上异种移植研究的肿瘤生长抑制 (TGI) 显示于表2中。

[0541] 表2.ADC在异种移植肿瘤模型中的肿瘤生长抑制 (TGI)。

ADC	所测试的剂量 (i.v. biw x 4)	异种移植肿瘤模型中的 TGI%		
		MDA-MB-468	NCI-N87	BxPC3
ADC-CL2A-SN38	15 mg/kg	n/a	*99.7% (第 22 天)	n/a
	10 mg/kg	*100% (第 77 天)	n/a	*85.4% (第 14 天)
	5 mg/kg	*100% (第 36 天)	45.1% (第 22 天)	n/a
	3 mg/kg	*87.3% (第 77 天)	n/a	n/a
	2 mg/kg	*88.6% (第 36 天)	n/a	n/a
抗 Trop-2 化合物 1	25 mg/kg	n/a	n/a	*86.4% (第 14 天)
	15 mg/kg	n/a	*66.6% (第 22 天)	n/a
	10 mg/kg	*100% (第 77 天)	n/a	*89.4% (第 14 天)
	5 mg/kg	*100% (第 36 天)	42.5% (第 22 天)	n/a
	3 mg/kg	*100% (第 77 天)	n/a	*82.6% (第 14 天)
	2 mg/kg	*95.4% (第 36 天)	n/a	n/a

[0543] $TGI\% = \{1 - [TV_{td} - TV_{t0}] / CV_{td} - CV_{t0}\} \times 100$

[0544] TV=治疗组的肿瘤体积, CV=对照组的肿瘤体积,

[0545] td=起始治疗之后的天数, t0=在第0天治疗时

[0546] *P<0.05, 通过与媒剂/PBS的邓尼特氏多重比较进行单因素或双因素方差分析

[0547] 实例B3: ADC抗Trop-2化合物1的体外稳定性。

[0548] 使用分析型SEC (Tosoh TSKgel G3000SW-X1柱) 在含有中性磷酸盐缓冲液和15%异丙醇的等度洗脱条件下, 监测ADC-CL2A-SN38的高分子量 (HMW) 聚集物和经裂解/释放的药物-连接子片段两者随时间推移的存在。在280nm吸光度 (用于检测蛋白质和药物-连接子) 和370nm (仅检测含药物的物种) 下监测样品。起始时间点定义为在纯化期间在主峰洗脱之后<1h且包括常规最终处理所需要的时间。全部在室温下实施的最终处理步骤包括部分浓缩至>2mg/mL (经由离心超滤)、无菌过滤和最终ADC稀释至6%海藻糖/PBS。在起始时间点之后, 将ADC混合物在4°C下储存24h, 之后在室温 (避光) 下再培育144小时 (6天)。与ADC-CL2A-SN38并行且以相同方式实施抗Trop-2化合物1的SEC分析和监测。数据表明关于蛋白质聚集和自发性药物释放, 抗Trop-2-Co化合物1比ADC-CL2A-SN38显著更稳定 (图9)。稳定性研究的结果概述于表3中。

[0549] 表3.ADC的稳定性数据。

培育时间(小时)	ADC-CL2A-SN38		抗 Trop-2 化合物 1	
	HMW 聚集物% (280 nm)	游离药物释放% (370 nm)	HMW 聚集物% (280 nm)	游离药物释放% (370 nm)
<1	1.9	0.0	0.0	1.0
24	2.3	0.9	0.7	0.8
96	4.7	17.0	1.1	0.8
168	5.3	33.5	1.1	0.9

[0551] 实例B4:ADC抗Trop-2化合物1的体内稳定性。

[0552] 使用瑞士韦伯斯特小鼠在21天中的14个时间点评估血清中ADC抗Trop-2化合物1的体内稳定性。简而言之,抗Trop-2化合物1以10mg/mL静脉内施用。分别在5min、30min、1小时、5小时、24小时、48小时、72小时、96小时、120小时、168小时、240小时、336小时、408小时和504小时经由眶后静脉神经丛收集全血样品(约150μL)。每个时间点用3只小鼠一式三份地进行实验(n=3)。随后通过在4℃下静置血液样品40min之后在8000rpm下离心10分钟来收集血清并储存于-80℃下。

[0553] 比较抗Trop-2化合物1与未结合抗Trop-2的血浆稳定性。发现经结合抗Trop-2化合物1的量与ADC抗Trop-2化合物1的总抗体量紧密匹配,此表明SN-38未显著地自ADC释放至血浆中(图10)。因此,抗Trop-2化合物1在血浆中是稳定的。

[0554] 实例B5:抗体药物偶联物(ADC)抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38的药代动力学/药效学。

[0555] 此研究的目的是评估ADC抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38在重复静脉内输注至食蟹猕猴之后的药代动力学参数。

[0556] 实验设计. 此研究中使用总共12只食蟹猕猴(*cynomolgus macaques*/Macaca fascicularis)。将食蟹猕猴(6只雄性、6只雌性)分成3个组。各组具有2只雌性和2只雄性。第1组用ADC-CL2A-SN38治疗,且第2组和第3组用抗Trop-2化合物1治疗。在第1天和第4天施用ADC的重复静脉内输注。ADC是以剂量60mg/kg(药物浓度:6mg/mL)施用。如下自动物中获得血液样品:第1组和第2组-第1天(ADC施用之前)、第4天(ADC施用之前)、第4天ADC施用后5min、30min、2h、4h、8h、24h、48h、72h、120h和168h;第3组-第1天(ADC施用之前)、第4天(ADC施用之前)、第4天ADC施用后的5min、30min、2h、4h、8h、24h、48h、72h、120h、168h、240h和336h。

[0557] 在各时间点自后肢或前肢的静脉获得约0.8mL血液的样品。在室温下将各血液样品转移至含有分离凝胶和凝血剂的样品管中,并且在2小时内离心(1500g,室温、10min)。将离心血清转移至新制离心管中并且储存在低于-70℃下。

[0558] 使用人类TROP2/TACSTD2蛋白质(His Tag)抗原以及山羊抗人类IgG Fc交叉吸附的二级抗体-HRP作为检测抗体(LL0Q:19.5ng/mL)来测定总抗体浓度。使用抗-SN38抗体和山羊-抗-人类IgG猴抗体(LL0Q:19.5ng/mL)的组合来测量ADC-CL2A-SN38的结合抗体的浓度。使用抗-SN38抗体和山羊抗-人类IgG猴抗体(LL0Q:19.5ng/mL)的组合来测定ADC抗Trop-2化合物1的结合抗体的浓度。使用LC-MS/MS(LL0Q:0.200ng/mL)来定量测量游离或未结合SN-38。

[0559] 使用Watson LIMS v.7.5SP1(Thermo Science Inc.)软件处理数据。使用基于拟合分析批量标准曲线而获得的等式的Watson计算模块来计算样品浓度。使用WinNonLin v 5.2.1(Pharsight Inc.)软件来分析药物代谢参数(非隔室分析)。

[0560] 结果. 总抗体、经结合抗体和游离SN-38的量概述于下表4中。数据表明将ADC-CL2A-SN38施用于食蟹猕猴使得释放大量的游离SN-38(即,未结合药物),而仅少量游离SN-38从ADC抗Trop-2化合物1中释放。

[0561] 表4. 血液样品中的总抗体、经结合抗体和游离SN-38。

[0562]

天数	时间	ADC-CL2A-SN38 (n=4)*			抗 Trop-2 化合物 1 (n=8)*		
		总抗体 ($\mu\text{g/mL}$)	经结合抗 体($\mu\text{g/mL}$)	SN-38 ($\mu\text{g/mL}$)	总抗体($\mu\text{g/mL}$)	经结合抗 体($\mu\text{g/mL}$)	SN-38 ($\mu\text{g/mL}$)
1	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
4	0	486 \pm 39.6	115 \pm 76.7	216 \pm 70.1	74.9 \pm 28.3	49.9 \pm 19.1	BQL
4	5 m	1930 \pm 370	1610 \pm 156	2145 \pm 186.3	1810 \pm 145	1480 \pm 313	3.4 \pm 0.9
4	30 m	1720 \pm 193	1520 \pm 243	1930 \pm 331.3	1610 \pm 112	1320 \pm 266	3.8 \pm 1.7
4	2 h	1820 \pm 392	1590 \pm 257	1710 \pm 340.9	1330 \pm 106	1110 \pm 198	9.3 \pm 5.4
4	4 h	1470 \pm 190	1560 \pm 296	1668 \pm 443.7	1040 \pm 77.8	893 \pm 119	10.0 \pm 3.8
4	8 h	1340 \pm 161	1540 \pm 340	1388 \pm 252.6	770 \pm 63.6	690 \pm 119	15.2 \pm 9.4
4	24 h	1100 \pm 62.9	1360 \pm 334	771 \pm 146.2	330 \pm 73.6	274 \pm 61.2	1.3 \pm 0.5
4	48 h	972 \pm 105	566 \pm 171	566 \pm 79.9	182 \pm 66.6	148 \pm 38.7	0.3 \pm 0.1
4	72 h	810 \pm 91.0	148 \pm 52.7	142 \pm 92.1	130 \pm 44.5	96.1 \pm 41.4	0.2 \pm 0.0
4	120 h	487 \pm 22.3	8.96 \pm 3.99	12 \pm 2.9	64.9 \pm 30.6	53.1 \pm 23.4	BQL
4	168 h	209 \pm 178	1.40 \pm 0.447	2 \pm 0.3	41.4 \pm 20.6	26.3 \pm 10.4	BQL
4	240h	N.A.	N.A.	N.A.	20.8 \pm 13.1	10.1 \pm 8.81	BQL
4	336 h	N.A.	N.A.	N.A.	6.72 \pm 6.23	2.22(0.218~ 9.48) ^{&}	BQL

[0563]

4	408 h	N.A.	N.A.	N.A.	0.401(0.0212~7.10) ^{&}	0.219(BQL ~2.52) ^{&}	BQL
4	504 h	N.A.	N.A.	N.A.	BQL(BQL~2.49) ^{&}	BQL(BQL~ 1.30) ^{&}	BQL

[0564] *数据显示为均值 \pm 标准差;BQL=低于定量极限;N.A.=不适用/未测量到。[0565] [&]C.V. % (变化系数) 大于100%, 以中值指示;

[0566] 在向食蟹猕猴施用ADC-CL2A-SN38 ADC和抗Trop-2化合物1后,总抗体、经结合抗体和游离SN-38的药代动力学参数的概述提供于表5中。

[0567] 表5.ADC的药代动力学参数。

[0568]

PK 参数	单位	ADC-CL2A-SN38			抗 Trop-2 化合物 1		
		总抗体	经结合抗体	SN-38	总抗体	经结合抗体	SN-38
K _{el}	1/h	0.0137 \pm 0.00851	0.0508 \pm 0.00332	0.0438 \pm 0.00769	0.0154 \pm 0.00383	0.0178 \pm 0.00650	0.0607 \pm 0.0348
t _{1/2}	小时	62.1 \pm 25.8	13.7 \pm 0.854	16.2 \pm 2.53	47.1 \pm 10.2	43.2 \pm 13.9	16.1 \pm 10.8
T _{max} [#]	小时	0.0833~2	0.0833~8	2.63 \pm 1.70	0.0833	0.0833	6.75 \pm 2.38
C _{max}	$\mu\text{g/mL}$	2010 \pm 332	1690 \pm 277	2018 \pm 295 ^a	1810 \pm 145	1480 \pm 313	15.7 \pm 7.82 ^a
AUC ₍₀₋₁₆₈₎	hr* $\mu\text{g/mL}$	122000 \pm 6850	71100 \pm 17200	57935 \pm 12326 ^a	34900 \pm 7110	28800 \pm 5700	235 \pm 122 ^a
AUC ₍₀₋₅₀₄₎	hr* $\mu\text{g/mL}$	N.A.	N.A.	N.A.	39700 \pm 9710	34600 \pm 2080	243 \pm 89.7 ^a
AUC _(0-inf)	hr* $\mu\text{g/mL}$	151000 \pm 18500	71200 \pm 17300	58039 \pm 12432 ^a	38400 \pm 9270	30800 \pm 6580	246 \pm 98.3 ^a
AUC _(t-inf)	%	18.3 \pm 13.3	0.103 \pm 0.115	0.159 \pm 0.133	3.64 \pm 4.11	3.06 \pm 3.74	3.31 \pm 3.24
V _d	mL/kg	34.5 \pm 11.7	17.4 \pm 4.33	N.A.	108 \pm 19.7	124 \pm 43.3	N.A.
CL	mL/h/kg	0.401 \pm 0.0553	0.876 \pm 0.184	N.A.	1.64 \pm 0.361	2.04 \pm 0.527	N.A.
MRT _{inf}	小时	93.5 \pm 27.8	26.4 \pm 1.43	N.A.	53.6 \pm 13.3	47.4 \pm 12.2	N.A.

[0569] N.A.=不适用;

[0570] [#]通过值范围指示;

[0571] ^a SN-38的单位是h*ng/mL。

[0572] 讨论。

[0573] 在向食蟹猕猴静脉内施用60mg/kg ADC-CL2A-SN38之后,总抗体和经结合抗体的峰值浓度(C_{max})略微高于以相同剂量施用的抗Trop-2化合物1的峰值浓度。另外,针对ADC-CL2A-SN38的总抗体和经结合抗体的暴露水平(AUC)显著大于抗Trop-2化合物1的暴露水平。

[0574] 相比于抗Trop-2化合物1,从ADC-CL2A-SN38释放的游离SN-38显著更高。具体地,从ADC-CL2A-SN38释放游离SN-38提供高于抗Trop-2化合物1的对应峰值浓度约129倍的峰值浓度(C_{max}),和大于抗Trop-2化合物1的对应AUC参数约247倍的AUC值。此外,ADC-CL2A-SN38总抗体的半衰期($t_{1/2}$)略微长于抗Trop-2化合物1的半衰期,但由于游离SN-38的快速释放,ADC-CL2A-SN38结合抗体的半衰期显著短于抗Trop-2化合物1结合抗体的半衰期。抗Trop-2化合物1总抗体和经结合抗体的半衰期相似,为约40小时。此外,针对ADC-CL2A-SN38的总抗体与经结合抗体的AUC_(0-inf)比率为2.1,而针对抗Trop-2化合物1的对应值为1.2。

[0575] 总之,数据显示抗Trop-2化合物1具有比ADC-CL2A-SN38更大的体内稳定性且释放较少的游离SN-38。由于SN-38的解离与用基于SN-38的ADC治疗的个体中的较高不良事件频率相关,抗Trop-2化合物1提供相比于ADC-CL2A-SN38提高的安全性。

[0576] 实例B6:抗体药物偶联物(ADC)抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38的毒性研究。

[0577] 此研究的目的是评估ADC抗Trop-2化合物1和ADC-CL2A-SN38在重复静脉内输注至食蟹猕猴之后的毒性概况。

[0578] 实验设计。

[0579] 此研究中使用总共12只食蟹猕猴(*cynomolgus macaques/Macaca fascicularis*)。根据动物的重量将食蟹猕猴随机分成3个组(4只动物/组,雄性和雌性)。

[0580] 在第1天和第4天施用ADC的重复静脉内输注。ADC是以剂量60mg/kg施用。

[0581] 在第1天和第4天用ADC-CL2A-SN38治疗第1组动物。在第1天和第4天用抗Trop-2化合物1治疗第2组和第3组动物。使用10mL/kg的给药容量和大致0.33mL/min/kg的给药速度向动物静脉内施用ADC。在最后ADC治疗之后一周(第12天)使第1组和第2组动物安乐死。在最后ADC治疗之后四周(第30天)使第3组动物安乐死。在研究期间,检测临床观测结果、体重、体温、心电图、血球计数、凝血功能、血液生物化学、一般解剖结构、病理组织学和毒理动力学。

[0582] 结果。

[0583] 死亡/濒临死亡。在研究期间,发现1只用ADC-CL2A-SN38治疗的雄性动物在第11天死亡。死亡动物的一般解剖结构展示小胸腺;组织病理学检查展示胸腺中的分散皮质和骨髓细胞的数目减少(与一般解剖结构的结果一致)且脾白浆多灶性细胞的数目略微减少。死亡动物在临床上观测到在第8天和第9天具有少量黄色松散大便,且在第9天显示缺乏能量、倾向于躺卧、减少自发性活动和面颊苍白。用抗Trop-2化合物1治疗的动物中无一者死亡且无一者出现濒临死亡。

[0584] 临床观测结果。在研究期间,用ADC-CL2A-SN38治疗的动物组从第7天开始展示异常的临床表现,诸如黄色松散大便、面颊和牙龈苍白、牙龈出血。用抗Trop-2化合物1治疗的动物组从第7天开始展示异常的临床症状:牙龈和面颊苍白、牙龈出血和生殖器肿胀。

[0585] 体重. 相对于治疗前(第-3天), 第1组中一只用ADC-CL2A-SN38治疗的雄性动物的体重减轻约9.2%(第7天), 且一只雌性动物的体重减轻约9.9%(第7天)。用抗Trop-2化合物1治疗的动物并未显示体重有显著异常的变化。

[0586] 体温和心电图. 在研究期间, 用ADC-CL2A-SN38或抗Trop-2化合物1治疗的动物中无一者展示体温或心电图参数和波形的显著异常变化。

[0587] 血球计数. 相对于治疗前(第-2天), 用ADC-CL2A-SN38治疗的动物显示白细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞减少。这些细胞在用抗Trop-2化合物1治疗的雄性和雌性动物中尚未显著地减少。相对于治疗前(第-2天), 用ADC-CL2A-SN38治疗的动物展示红细胞、血红蛋白和红血球比容(第5天和/或第12天)减少。这些细胞在用抗Trop-2化合物1治疗的雄性和雌性动物中尚未显著地减少。这些细胞计数的变化可与骨髓抑制相关。相对于治疗前(第-2天), 用ADC-CL2A-SN38治疗的两只雌性动物的血小板计数增加(105.7%和44.6%, 第12天)。

[0588] 凝血功能. 相对于治疗前(第-2天), 用ADC-CL2A-SN38治疗的动物中的血纤维蛋白原的量在第12天增加。血纤维蛋白原的量在用抗Trop-2化合物1治疗的动物中也增加, 且活化部分凝血酶时间(aPTT)也增加。

[0589] 血液生物化学. 相对于治疗前(第-2天), 用ADC-CL2A-SN38或抗Trop-2化合物1治疗的动物展示总胆红素(TBil)在第2天和第5天增加, 且白蛋白在第12天减少。

[0590] 一般和组织学病变检查. 用ADC-CL2A-SN38治疗的3只动物的治疗结束安乐死(第12天)展示动物具有小胸腺, 对应于显微镜观测结果: 胸腺中皮质细胞计数的略微至中度减少和髓鞘细胞计数的减少。胸腺的一般病灶有可能与ADC-CL2A-SN38相关, 因为其高发生率和程度的病变。用抗Trop-2化合物1治疗的2只雌性动物的治疗结束安乐死(第12天)和用抗Trop-2化合物1治疗的1只雄性动物的治疗结束安乐死(第30天)显示胸腺中皮质分散细胞的略微减少。由于此类病变通常作为背景病变在食蟹猕猴中进行观测且病变的程度相对较轻, 所以其可能或可能不与抗Trop-2化合物1相关。

[0591] 讨论.

[0592] 向食蟹猕猴重复静脉内输注剂量为60mg/kg的ADC-CL2A-SN38可导致动物死亡。主要毒性作用是: (i) 体重减轻; (ii) 白细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、红血球、血红蛋白、HCT、Retic和白蛋白的减少; 和(iii) 血小板、血纤维蛋白原和总胆红素增加。具有毒性的主要目标器官是胸腺和脾脏。相比之下, 给药抗Trop-2化合物1使得毒性作用显著减少。因此, 相较于ADC-CL2A-SN38, 抗Trop-2化合物1提供在毒性方面的改良(即, 具有较少毒性)。

[0593] 虽然出于清楚理解的目的, 已借助于说明和实例相当详细地描述前述本发明, 但描述和实例不应解释为限制本发明的范畴。本文所引用的所有专利和科学文献的公开内容以全文引用的方式明确并入本文中。

[0594] 序列表

[0595]

SEQ ID NO	描述	序列
1	抗 Trop-2 抗体 VL HVR1	KASQDVSIABA
2	抗 Trop-2 抗体 VL HVR2	SASYRYT
3	抗 Trop-2 抗体 VL HVR3	QQHYITPLT
4	抗 Trop-2 抗体 VH HVR1	NYGMN
5	抗 Trop-2 抗体 VH HVR2	WINTYTGEPTYTDDFKG
6	抗 Trop-2 抗体 VH HVR3	GGFGSSYWYFDV
7	抗 Trop-2 抗体 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIABAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKR
8	抗 Trop-2 抗体 VH	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMN WVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFA FSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYW YFV

[0596]

9	示例性人类 Trop-2 序列(UniProt 寄存 编号 P09758)	MARGPGLAPPPLRLPLLLVLAAVTGHTAAQDNCTC PTNKMTVCSPDGPGRQCRCALGSGMAVDCSTLTS KCLLLKARMSAPKNARTLVRPSEHALVDNDGLYDP DCDPEGRFKARQCNQTSVCWCVNSVGVRRTDKGD LSLRCDELVRTHHILIDLRHRPTAGAFNHSDLDAELR RLFRERYRLHPKFVAAVHYEQPTIQIELRQNTSQKAA GDVDIGDAAYYFERDIKGESLFQGRGGLDLRVRGEP LQVERTLIYYLDEIPPKFSMKRLTAGLIAVIVVVVVAL VAGMAVLVITNRRKSGKYKKVEIKELGELRKEPSL
---	---	---

【序列表】

<110> 联宁(苏州)生物制药有限公司 (Levena (Suzhou) Biopharma Co., Ltd.)

上海诗健生物科技有限公司 (Escugen Biotechnology Co. Ltd.)

<120> 包含抗TROP-2抗体的抗体药物偶联物

<150> PCT/CN2020/088565

<151> 2020-05-03

<150> PCT/CN2021/086849

<151> 2021-04-13

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VL HVR1

<400> 1

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VL HVR2

<400> 2

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VL HVR3

<400> 3

Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VH HVR1

<400> 4

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VH HVR2

<400> 5

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

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VH HVR3

<400> 6

Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VL

<400> 7

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

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

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗TROP-2抗体VH

<400> 8

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

<210> 9

<211> 323

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性人类Trop-2序列(UniProt寄存编号P09758)

<400> 9

Met Ala Arg Gly Pro Gly	Leu Ala Pro Pro Pro	Leu Arg Leu Pro Leu
1	5	10
		15

Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Val	Thr	Gly	His	Thr	Ala	Ala	Gln	Asp
20				25				30							
Asn	Cys	Thr	Cys	Pro	Thr	Asn	Lys	Met	Thr	Val	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly
35				40				45							
Pro	Gly	Gly	Arg	Cys	Gln	Cys	Arg	Ala	Leu	Gly	Ser	Gly	Met	Ala	Val
50				55				60							
Asp	Cys	Ser	Thr	Leu	Thr	Ser	Lys	Cys	Leu	Leu	Leu	Lys	Ala	Arg	Met
65				70				75				80			
Ser	Ala	Pro	Lys	Asn	Ala	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Glu	His	Ala
85				90				95							
Leu	Val	Asp	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro	Asp	Cys	Asp	Pro	Glu	Gly
100				105				110							
Arg	Phe	Lys	Ala	Arg	Gln	Cys	Asn	Gln	Thr	Ser	Val	Cys	Trp	Cys	Val
115				120				125							
Asn	Ser	Val	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Leu	Arg
130				135				140							
Cys	Asp	Glu	Leu	Val	Arg	Thr	His	His	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Arg	His
145				150				155				160			
Arg	Pro	Thr	Ala	Gly	Ala	Phe	Asn	His	Ser	Asp	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu
165				170				175							
Arg	Arg	Leu	Phe	Arg	Glu	Arg	Tyr	Arg	Leu	His	Pro	Lys	Phe	Val	Ala
180				185				190							
Ala	Val	His	Tyr	Glu	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln	Ile	Glu	Leu	Arg	Gln	Asn
195				200				205							
Thr	Ser	Gln	Lys	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Asp	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Tyr
210				215				220							
Tyr	Phe	Glu	Arg	Asp	Ile	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Phe	Gln	Gly	Arg	Gly
225				230				235				240			
Gly	Leu	Asp	Leu	Arg	Val	Arg	Gly	Glu	Pro	Leu	Gln	Val	Glu	Arg	Thr
245				250				255							
Leu	Ile	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Lys	Phe	Ser	Met	Lys	Arg
260				265				270							
Leu	Thr	Ala	Gly	Leu	Ile	Ala	Val	Ile	Val	Val	Val	Val	Val	Ala	Leu
275				280				285							
Val	Ala	Gly	Met	Ala	Val	Leu	Val	Ile	Thr	Asn	Arg	Arg	Lys	Ser	Gly
290				295				300							
Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Glu	Leu	Arg	Lys	Glu
305				310				315				320			
Pro Ser Leu															

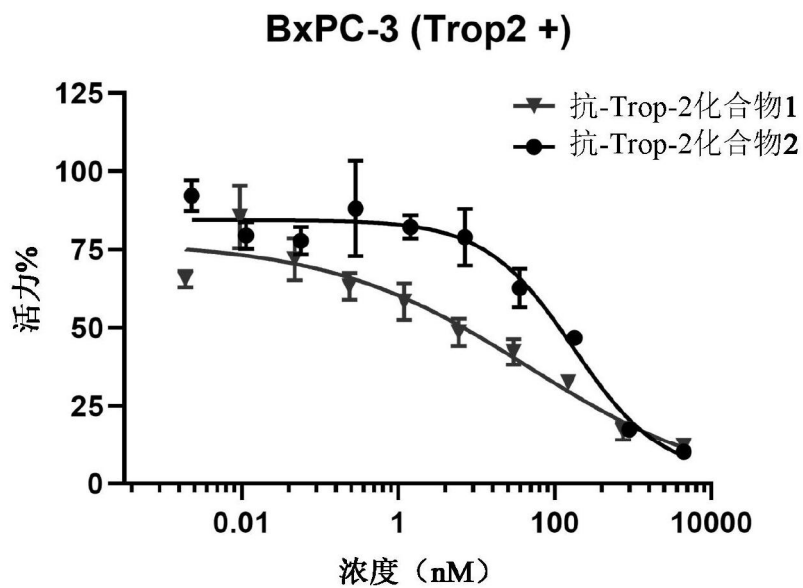


图1A

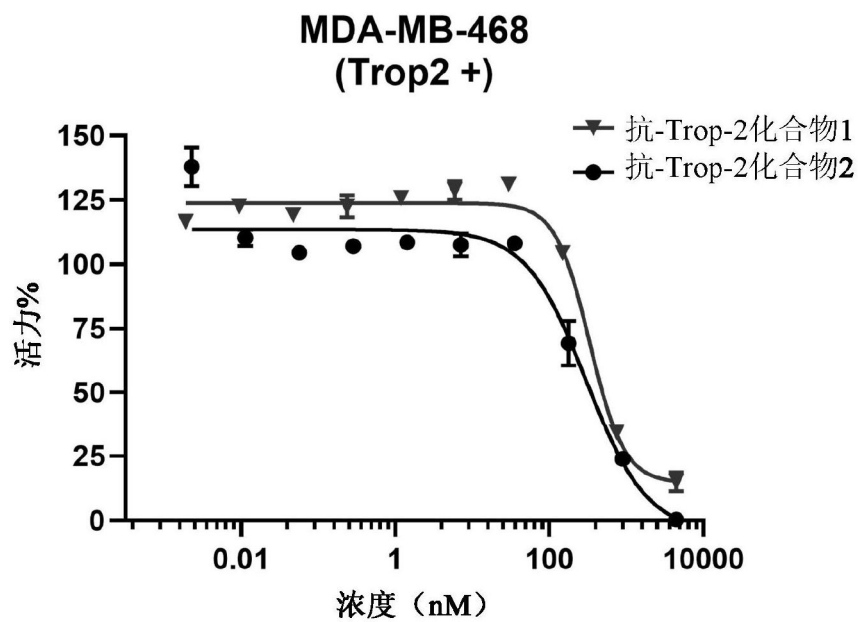


图1B

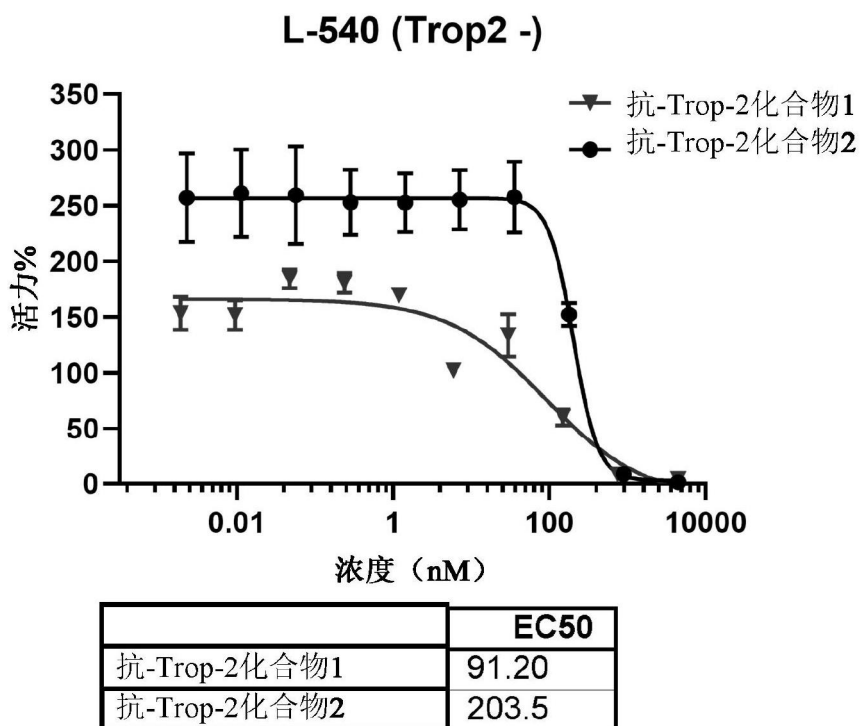


图1C

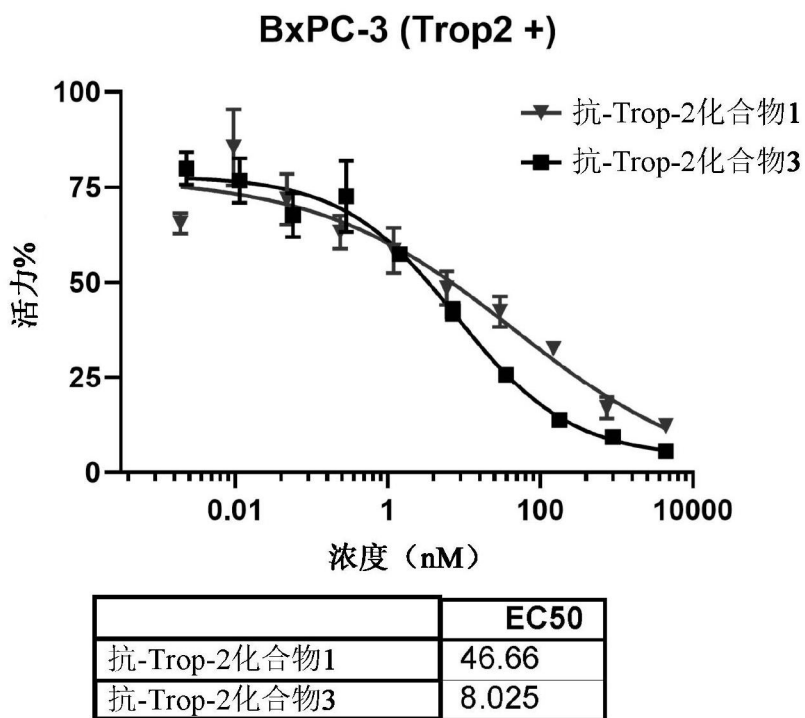


图2A

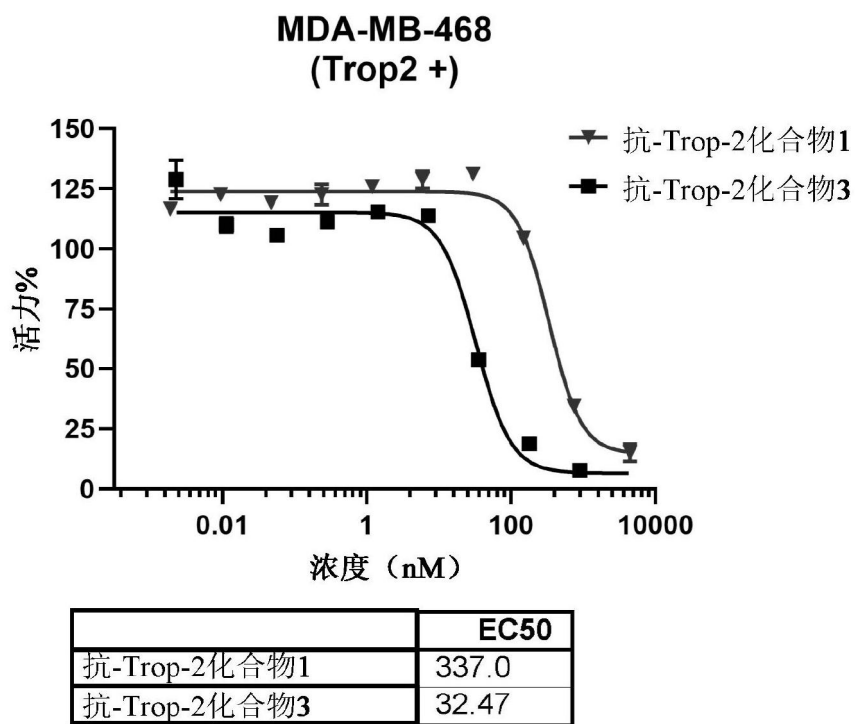


图2B

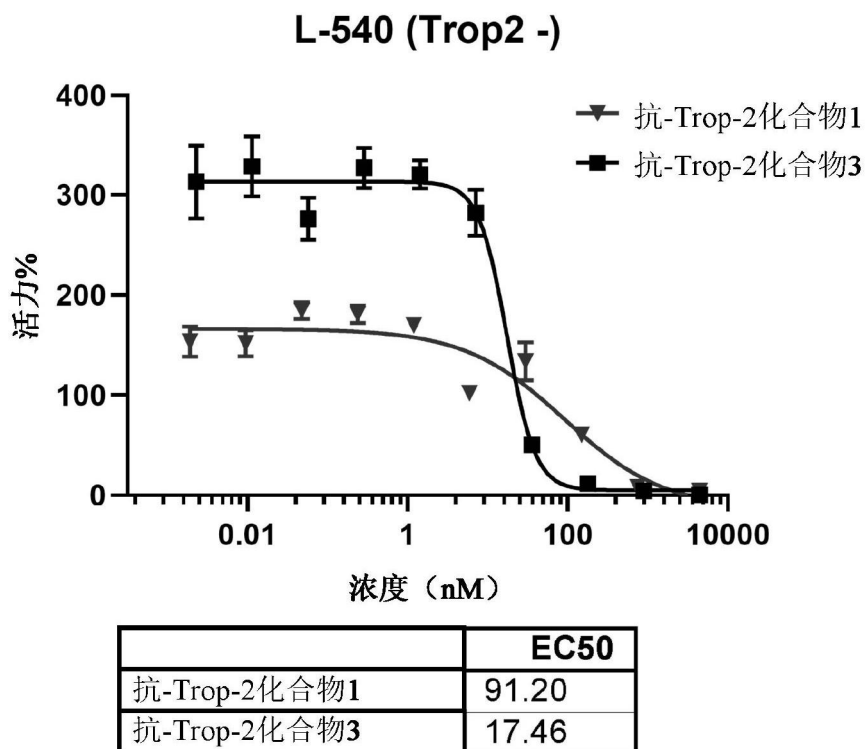


图2C

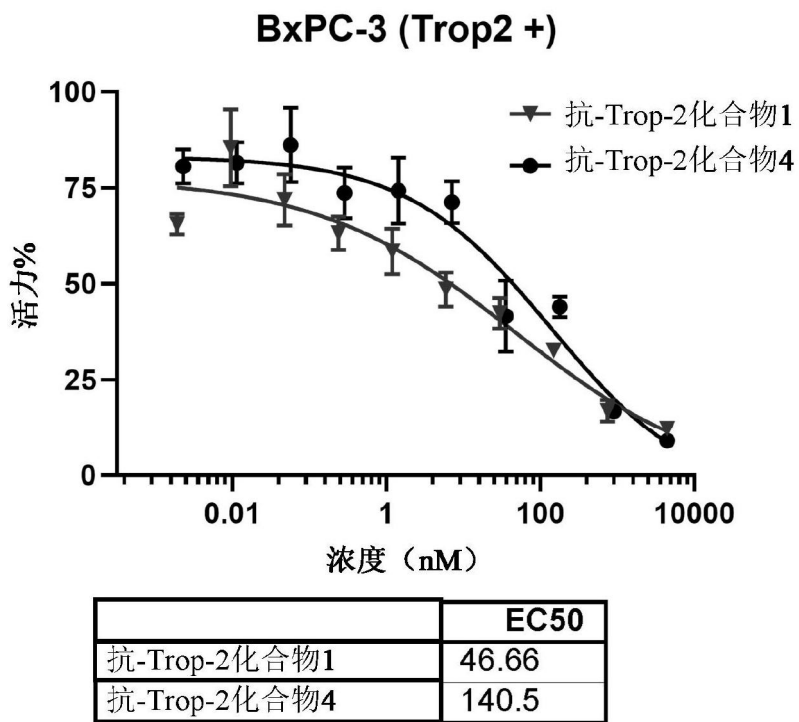


图3A

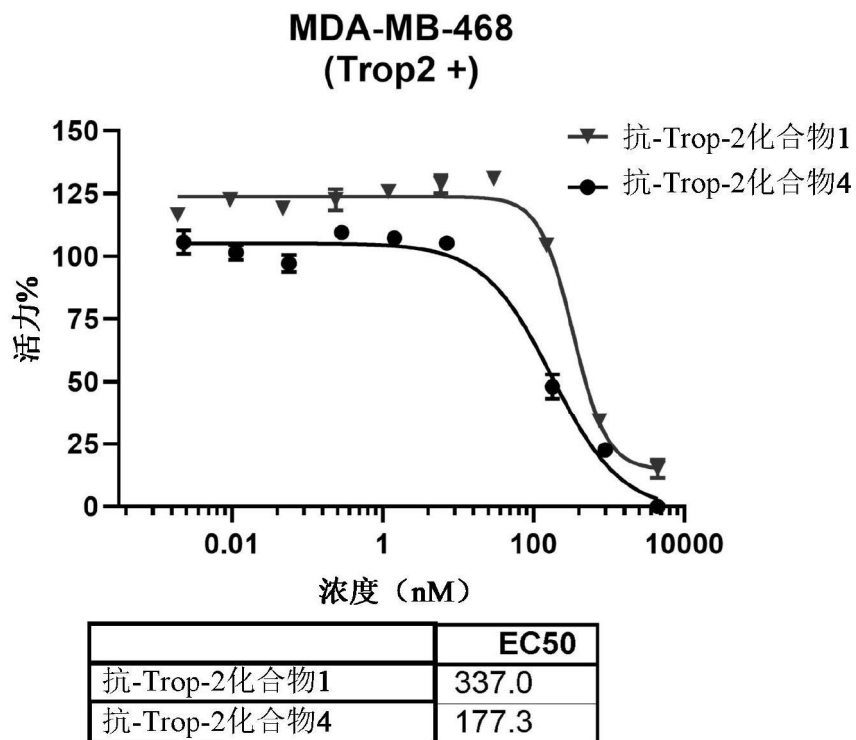


图3B

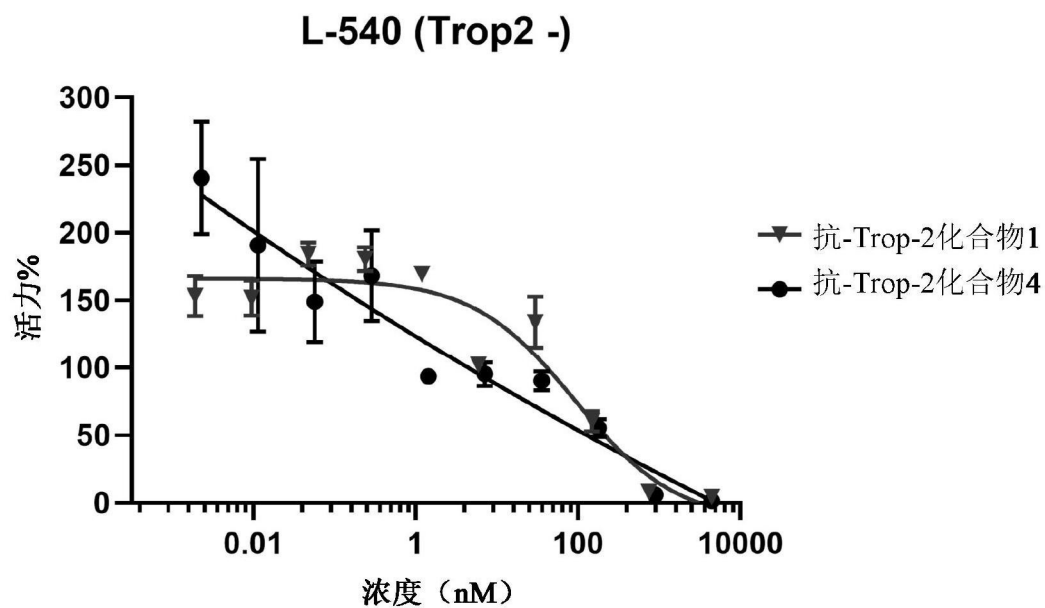


图3C

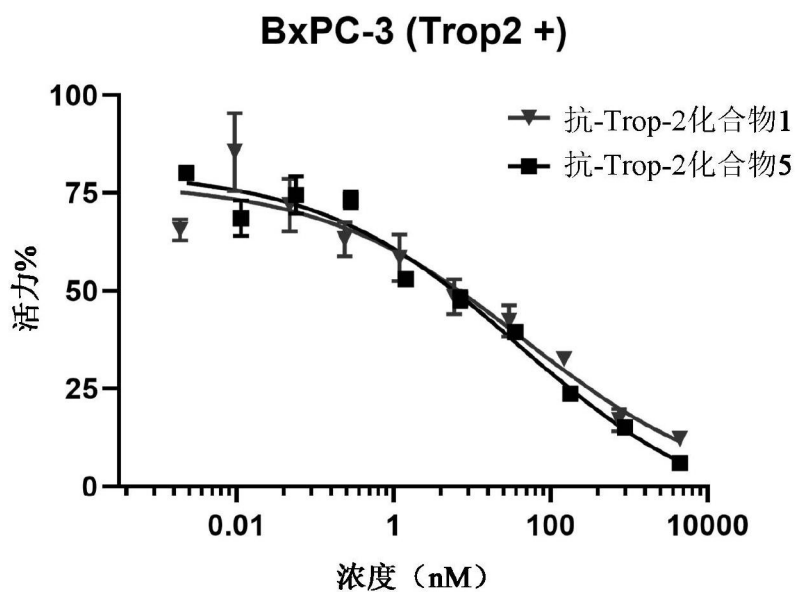


图4A

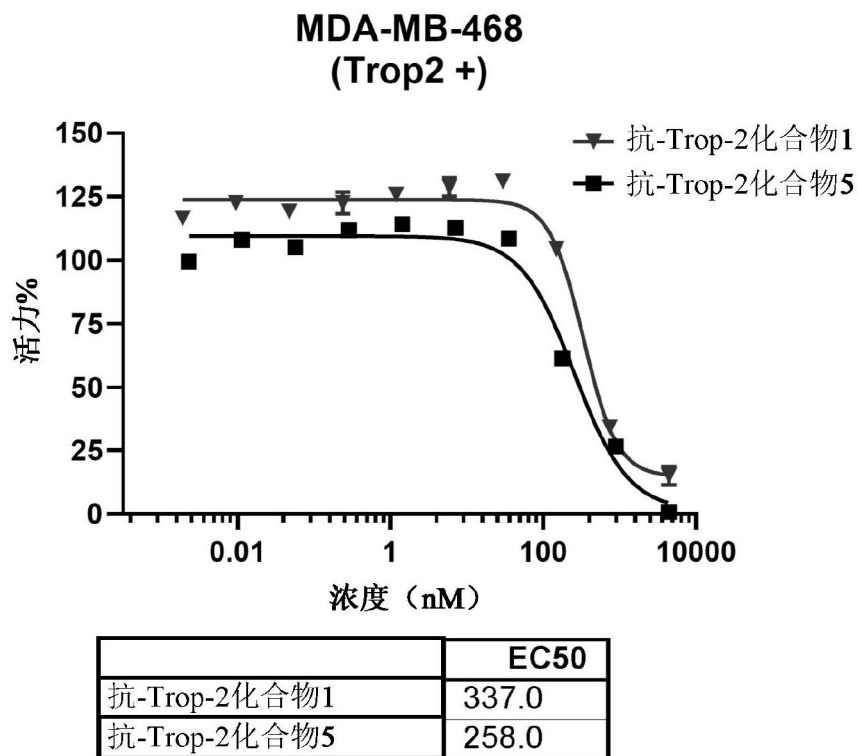


图4B

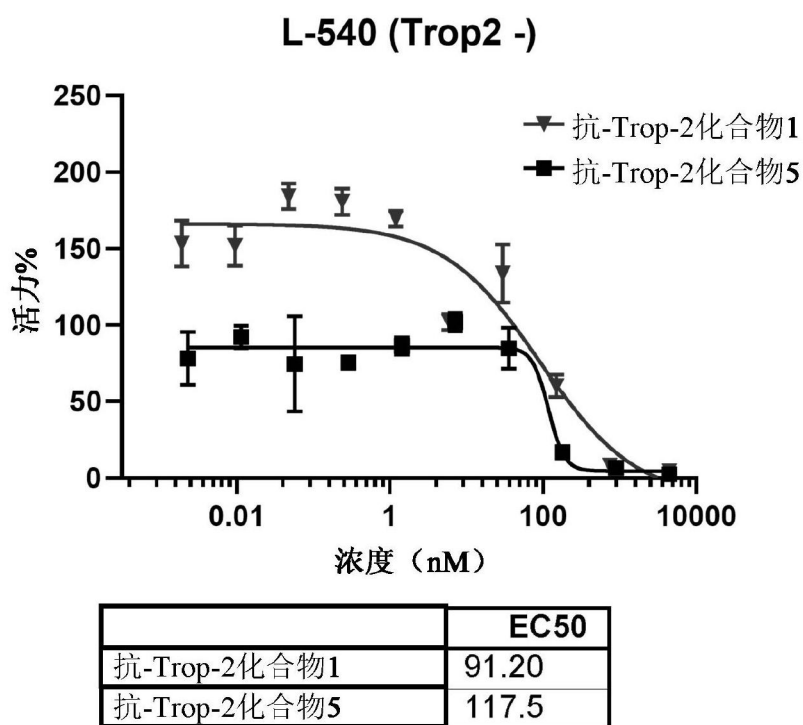


图4C

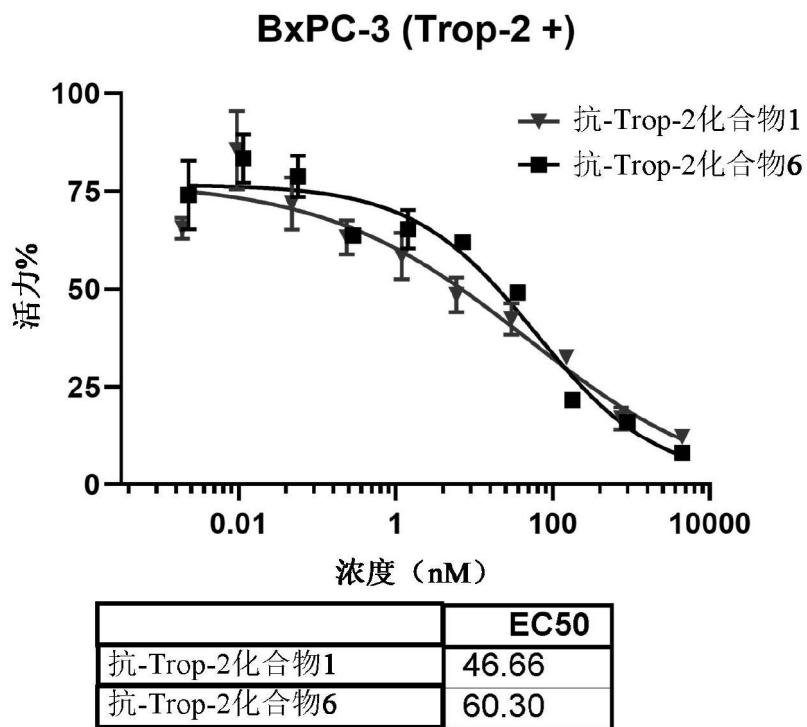


图5A

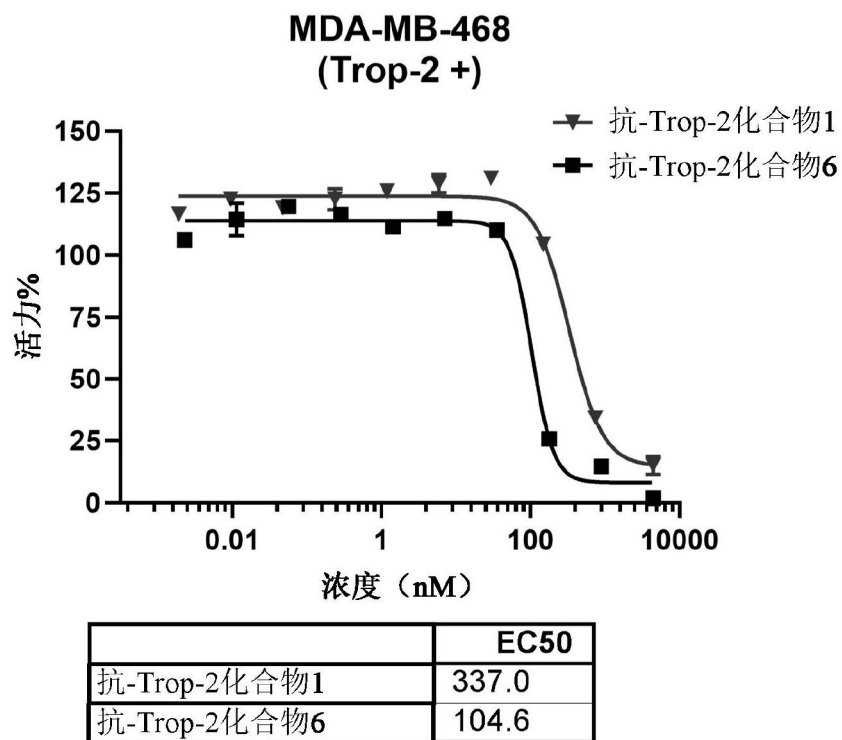
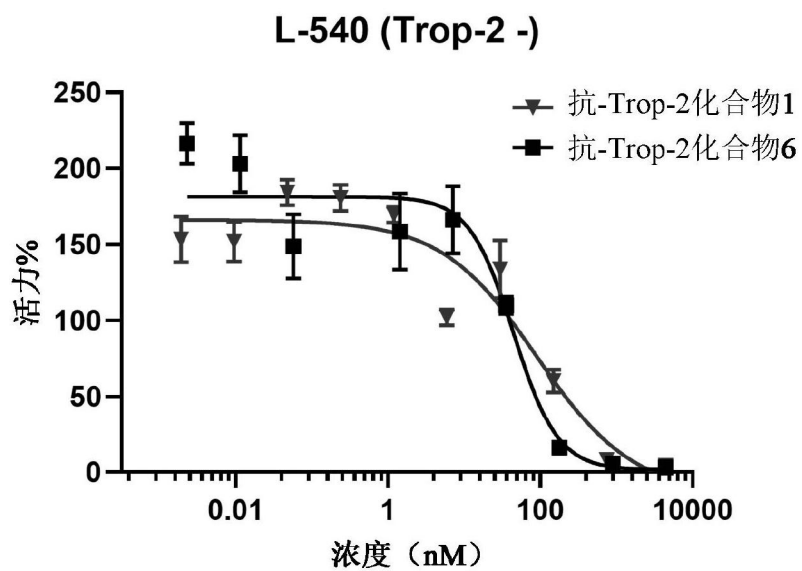


图5B



	EC50
抗-Trop-2化合物1	91.20
抗-Trop-2化合物6	44.75

图5C

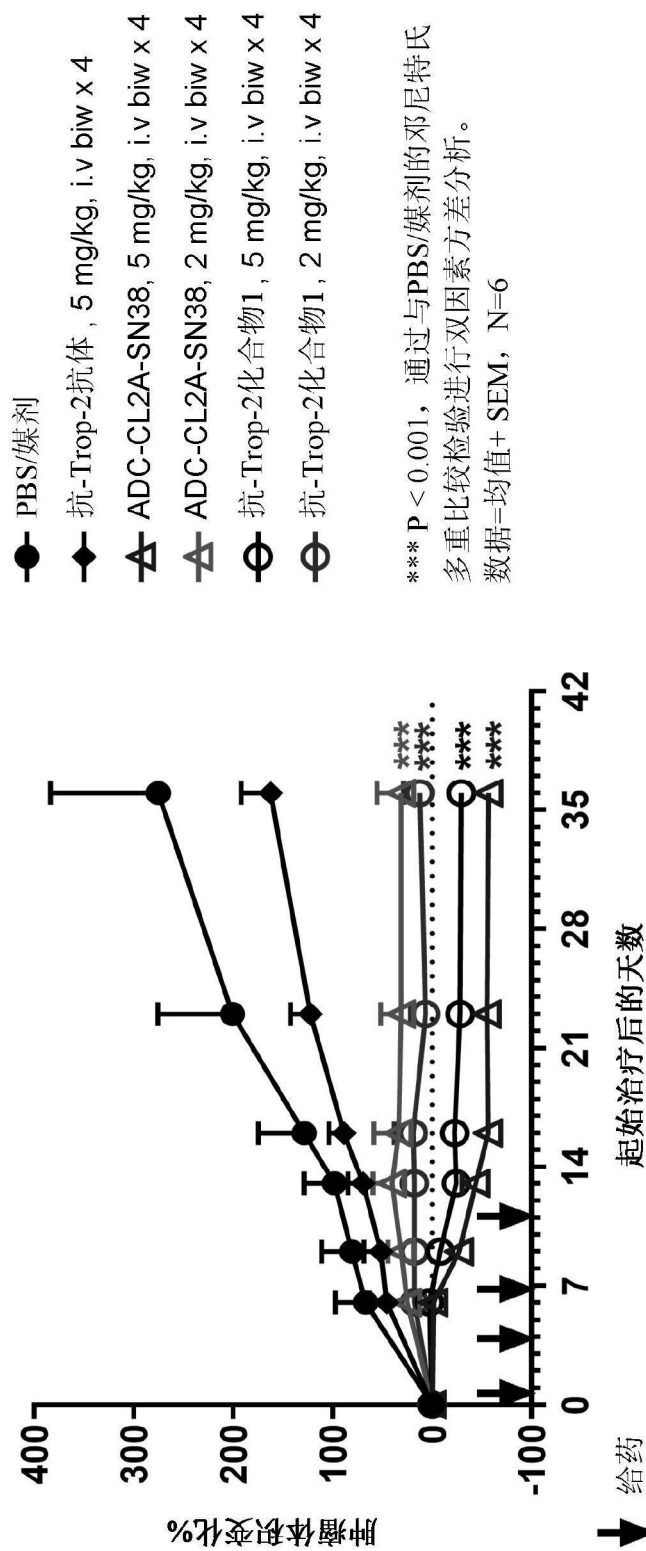


图6A

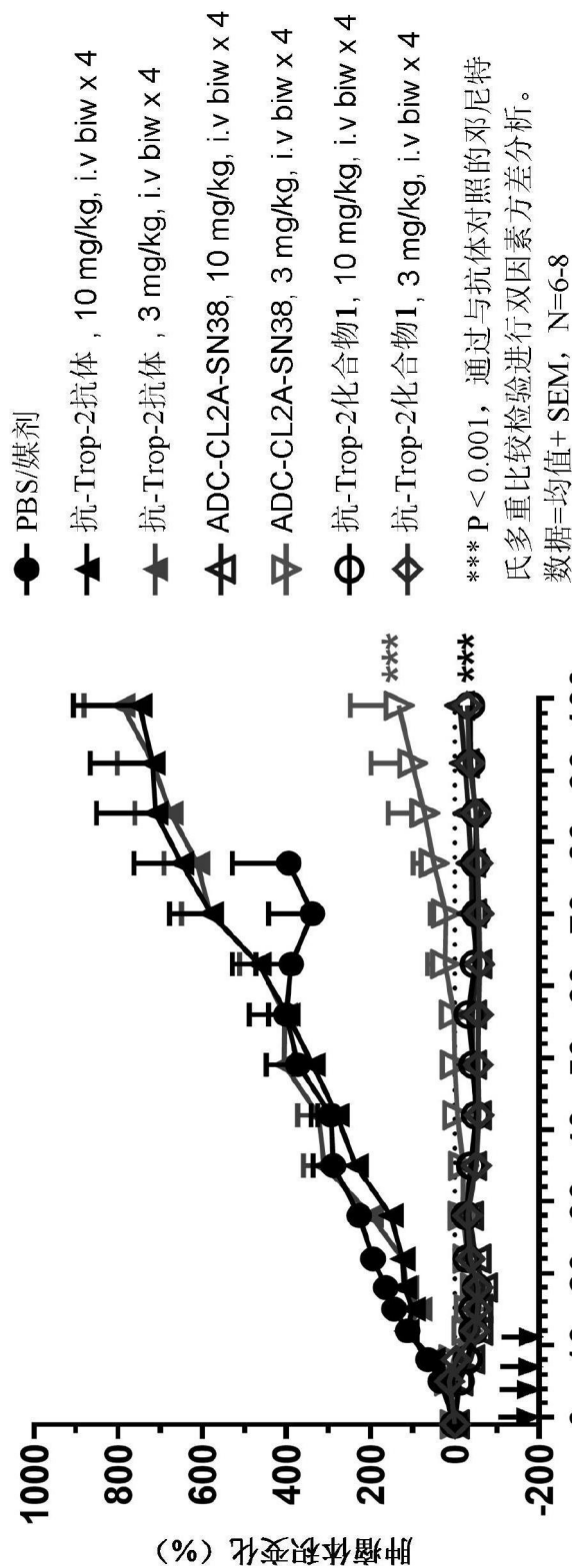


图6B

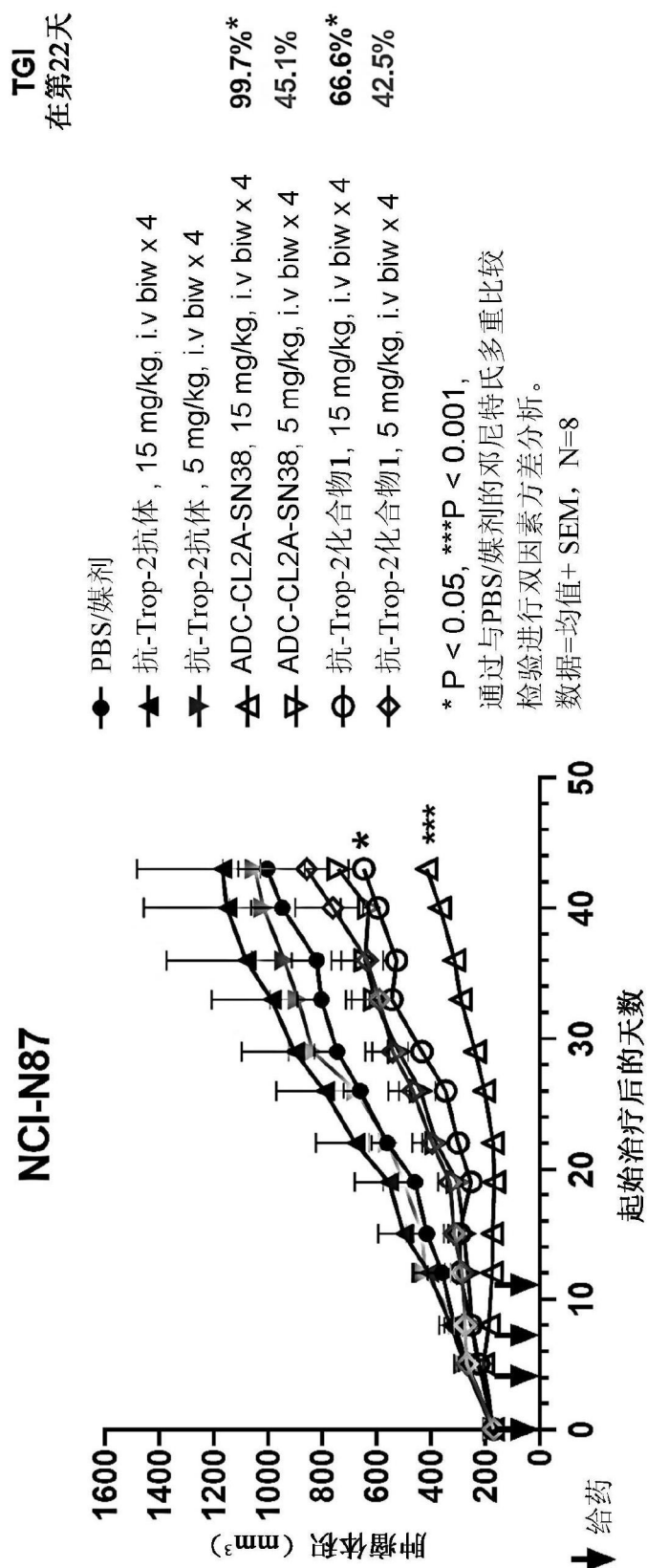


图7

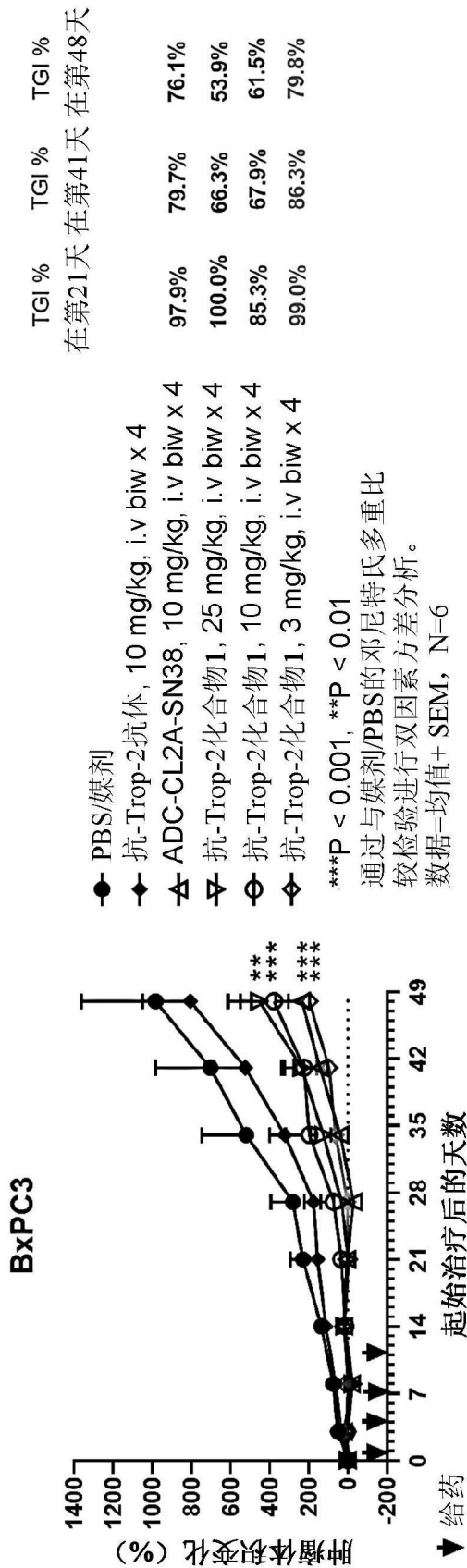


图8

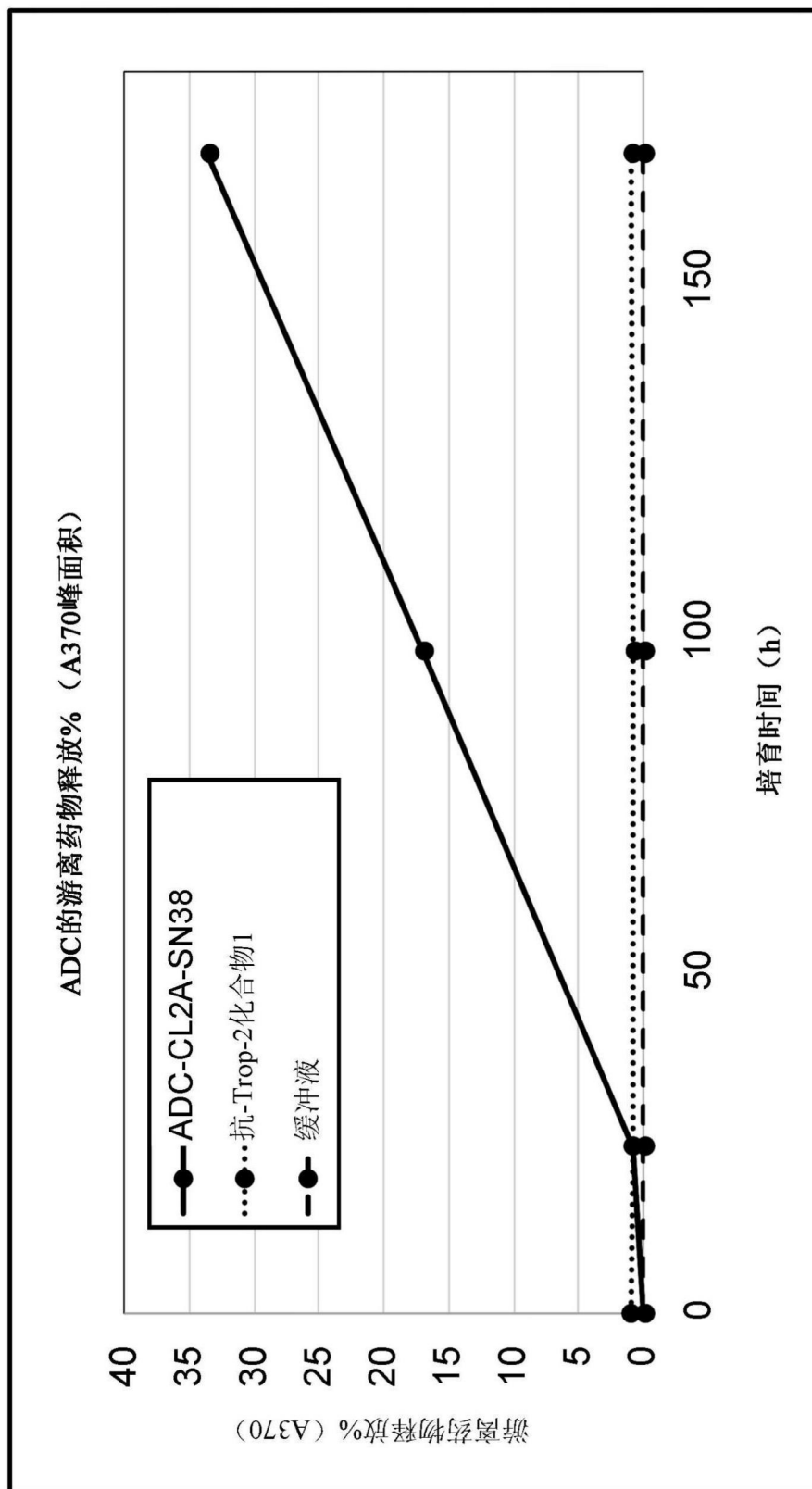


图9

瑞士韦伯斯特小鼠的抗-Trop-2抗体和ADC PK,
10 mg/ml IV, n=3

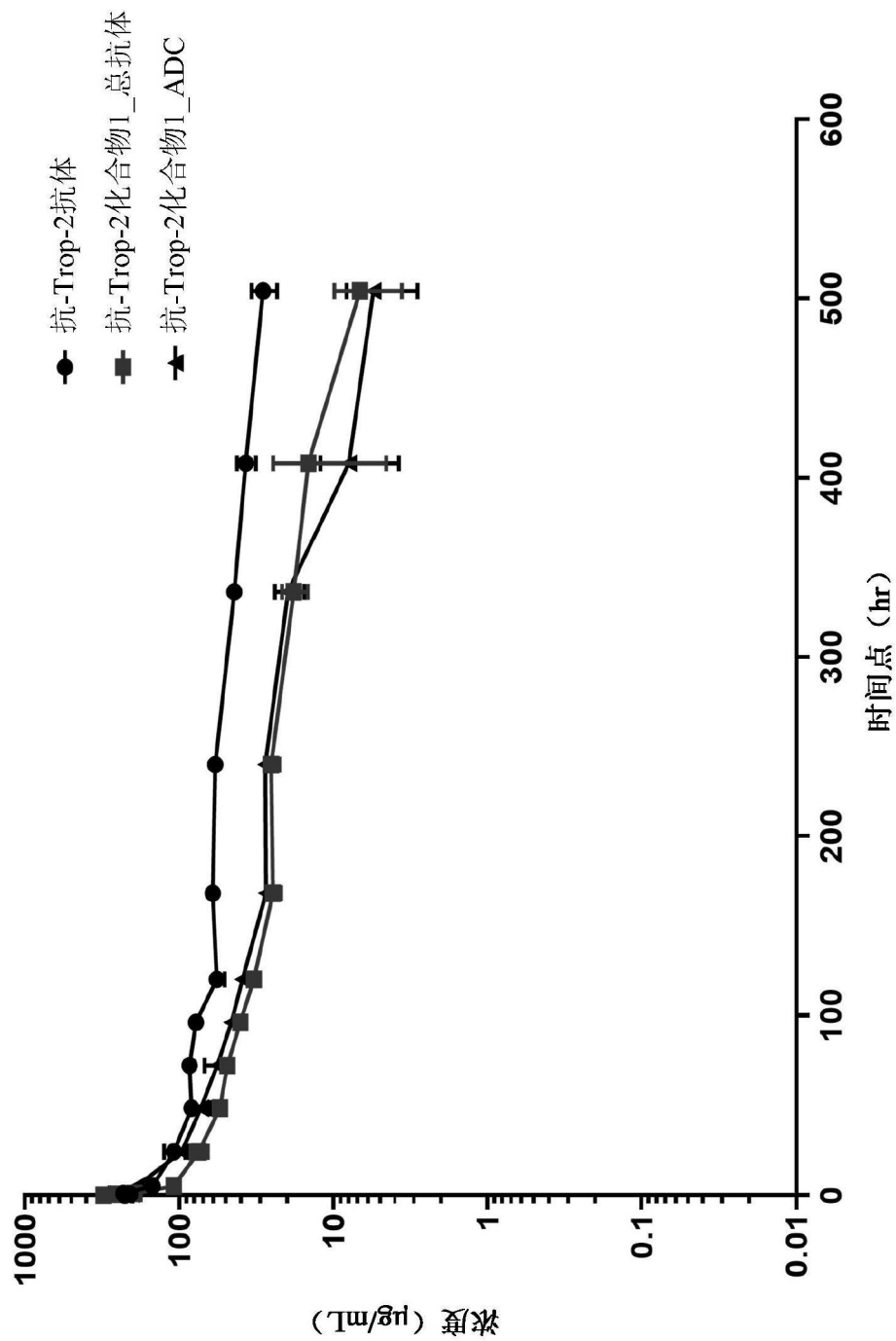


图10