

一种抗间皮素抗体及其抗体药物缀合物

技术领域

- 5 [01] 本发明涉及一种抗间皮素抗体或其功能性片段。本发明还涉及包含抗间皮素抗体和小分子药物的抗体药物缀合物。本发明还涉及本发明的抗体和缀合物在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

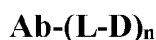
背景技术

- 10 [02] MSLN（间皮素、Mesothelin）是由单克隆抗体 CAK1 在间皮细胞、间皮瘤和卵巢癌中识别的抗原，是一种分子为 40kDa 的细胞表面糖蛋白，其高表达于多种肿瘤组织中，为一个非常好的治疗型抗体的靶向标志物。
- [03] 虽然单克隆抗体治疗靶点特异性高，副作用低，但是单独使用时疗效比较有限。抗体药物缀合物是将毒素通过连接子与抗体相连，其同时具有
- 15 较强的靶向性和高效的细胞毒性两大特点，使得 ADC 新药成为最有前景的免疫治疗方法之一，在癌症免疫治疗中备受关注。
- [04] 已有一些研究小组构建了靶向 MSLN 的抗体药物缀合物，但是这些抗体药物缀合物仍然存在着诸多缺点，例如：通过抗体上半胱氨酸的巯基进行偶联会导致抗体的肽链之间原本的二硫键丧失，得到的 ADC 不稳定，
- 20 一旦进入循环，ADC 的半衰期会缩短，毒副作用较大；利用抗体上赖氨酸的氨基进行偶联使得偶联位点随机，影响抗体的靶向性。
- [05] 因此，本领域中仍然需要开发具有更加优越性质的 MSLN 抗体以及包含该抗体的抗体药物缀合物。

25 发明内容

- [06] 本发明提供了一种抗间皮素抗体或其功能性片段，以及包含该抗体或其功能性片段的抗体药物缀合物。特别地，本发明的抗体药物缀合物具有更高的稳定性和更低的毒副作用，和/或对间皮素具有更高的亲和力。
- [07] 具体的：
- 30 [08] 一方面，本发明提供了一种抗体药物缀合物，其中所述抗体药物缀合

物的结构通式为：



[09] 其中：

[10] 所述 Ab 为特异性结合 MSLN 的抗体或其功能性片段；

5 [11] 所述 L 为空或任一连接子；

[12] 所述 D 为任一治疗剂；

[13] n 为选自 1 到 8 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8 或其任意两者的区间。

10 [14] 进一步的，本发明的抗体或其功能性片段包含重链和轻链，其中 (i) 所述重链包含至少三个 CDR 区，其中所述 CDR 区中至少一个的氨基酸序列具有如 SEQ ID NO: 1、2 或 3 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98% 或者 99%) 序列同一性的序列；并且 (ii) 所述轻链包含至少三个 CDR 区，其中所述 CDR 区中至少一个的氨基酸序列具有如 SEQ ID NO: 4、5 或 6 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98% 或者 99%) 序列同一性的序列。优选的，本发明的抗体或其功能性片段包含重链和轻链，其中 (i) 所述重链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区分别具有如 SEQ ID NO: 1、2 或 3 所示的氨基酸序列；和/或 (ii) 所述轻链可变区包含三个 CDR 区，其中所述 CDR 区分别具有如 SEQ ID NO: 4、5 或 6 所示的氨基酸序列。最优选的，本发明公开的抗间皮素抗体重链的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示，其轻链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 所示。

20 [15] 更进一步的，本发明提供了一种抗间皮素抗体或其功能性片段，其包括重链可变区和轻链可变区，其中 (i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98% 或者 99%) 序列同一性的序列；并且 (ii) 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98% 或者 99%) 序列同一性的序列。优选的，所述抗体包含重链和轻链，其中 (i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列，和/或 (ii) 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。最优选的本发明公开的抗间皮素抗体重链可变区包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨

基酸序列，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

[16] 在某些具体实施方案中，本发明的抗体包含重链和轻链，其中所述重链包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列，所述轻链包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列。

5 [17] 另一方面，本发明提供了抗体药物缀合物，其包含抗间皮素抗体或其功能性片段以及治疗剂。优选地，本发明的抗体药物缀合物还包含连接子，其将所述抗间皮素抗体或其功能性片段与治疗剂相连。

10 [18] 在某些实施方案中，本发明的连接子 L 可通过本领域已知的任何方式与抗体连接，优选地通过巯基和/或氨基连接。在一个优选的方案中，本发明的抗体通过抗体上的巯基与连接子连接。本发明中的连接子 L 可以不存在（即抗体与治疗剂 D 直接相连）或者任一可裂解（即可在体内环境下发生断裂的接头）或者不可裂解的连接子或者其组合，优选的，所述连接子可以选自下表 1 中所列出的那些。

表 1 本发明的抗体缀合物中可用的连接子

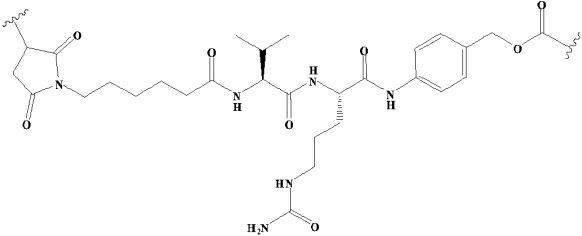
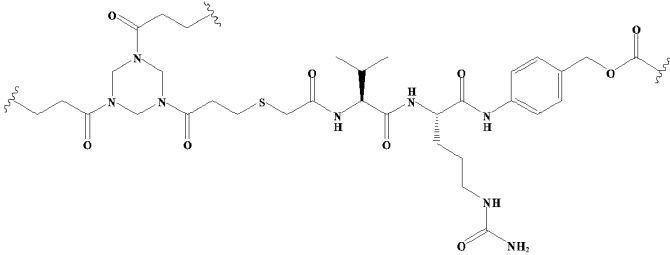
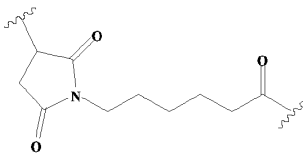
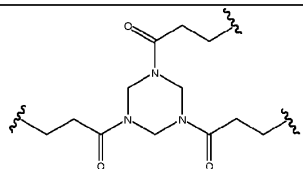
缩写	全称中/英文全称
Mc	马来酰亚胺基己酰基 Maleimidocaproyl
Mc-Val-Cit-PAB	马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苯甲氧羰基 Maleimidocaproyl -valine -citrulline p-amino-benzyloxycarbonyl
Py	1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪 Triacryloylhexahydro triazine
Py-MAA-Val-Cit-PAB	1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪-巯基乙酸-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苯甲氧羰基 Triacryloylhexahydro triazine-mercaptoacetic acid-valine-citrulline-p-amino-benzyloxycarbonyl
3-MPA	3-马来酰亚胺丙酸 3-Maleimidopropionic acid
Mal-di-EG-OPFP	Perfluorophenyl-3-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-Pyrrol-1-yl)propanamido) ethoxy)ethoxy)propanoate

Mal-di-EG-OSu	2,5-dioxoPyrrolidin-a-yl 3-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-Pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)propanoate
Mal-Tri-EG-OSu	2,5-dioxoPyrrolidin-a-yl 3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-Pyrrol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate
Mal-Tetra-EG-OSu	2,5-dioxoPyrrolidin-a-yl 1-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-Pyrrol-1-yl)-3-oxo-7,10,13,16-tetraoxa-4-azanonadecan-19-oate
Br-di-EG-OSu	2,5-dioxoPyrrolidin-a-yl 3-(2-(2-(2-bromoacetamido)ethoxy)ethoxy)propanoate
Py-ds-Prp-OSu	2,5-dioxoPyrrolidin-1-yl 3-(Pyridin-2-ylidisulfanyl)propanoate
Py-ds-Prp-OPFP	perfluorophenyl 3-(Pyridin-2-ylidisulfanyl)propanoate
Py-ds-dmBut-OSu	2,5-dioxoPyrrolidin-a-yl 4-methyl-4-(Pyridin-2-ylidisulfanyl)pentanoate
Py-ds-dmBut-OPF	perfluorophenyl 4-methyl-4-(Pyridin-2-ylidisulfanyl)propanoate
SMcC	(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate
MBS	3-马来酰亚胺基苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯 3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester
SATA	N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯 S-(N-succinimidyl)thioacetate
SPDP	3-(2-吡啶二巯基)丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 N-succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio)propionate
SMPT	琥珀酰亚胺基 4-[p-马来酰亚胺苯基]丁酸盐 (N-succinimidyloxy carbonyl)-1-methyl-1-(2-Pyridyldithio)toluene

[19] 在一些实施方案中,本发明的连接子优选的选自下表2中所列出的那

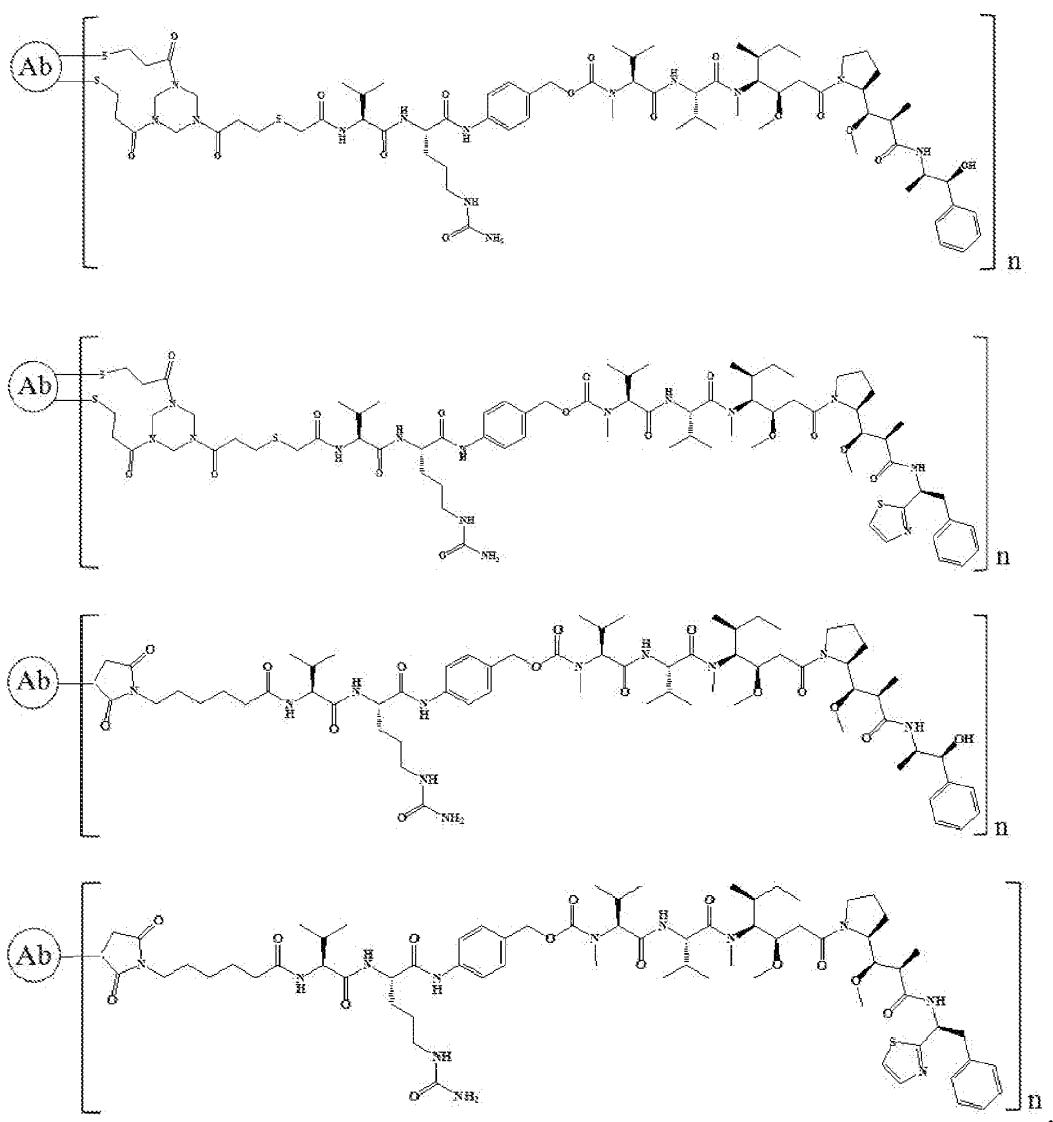
些连接子。

表 2 本发明的抗体缀合物中可用的优选连接子

缩写	结构/中文名/英文名
Mc-Val-Cit-PAB	 马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苯甲氧羰基 maleimidocaproyl-valine-citrulline-p-aminobenzyloxycarbonyl
Py-MAA-Val-Cit-PAB	 1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪-硫基乙酸-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苯甲氧羰基 Triacryloylhexahydro triazine-mercaptoacetic acid-valine-citrulline-p-aminobenzyloxycarbonyl
Mc	 马来酰亚胺基己酰基 maleimidocaproyl
Py	 1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪

	Triacryloylhexahydro triazine
--	-------------------------------

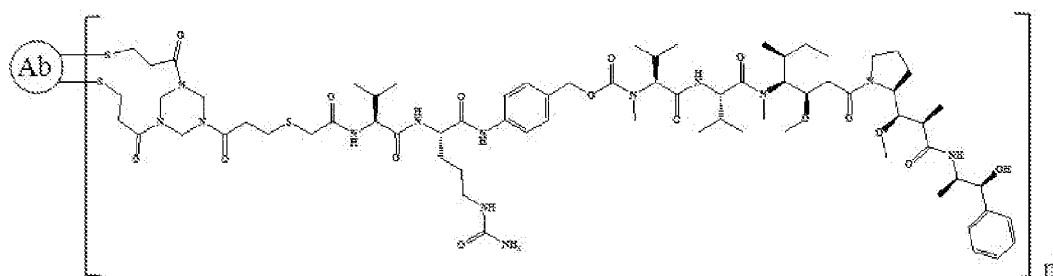
- [20] 在本发明的一些实施方案中，所述治疗剂 D 选自：美坦生类化合物、V-ATP 酶抑制剂、促凋亡剂、Be 12 抑制剂、McL1 抑制剂、HSP90 抑制剂、IAP 抑制剂、mTOR 抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、阿里他汀 (auristatin)、多拉司他汀 (dolastatin)、MetAP (甲硫氨酸氨肽酶)、蛋白质 CRM1 的核输出抑制剂、DPPIV 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中磷酸基转移反应的抑制剂、蛋白质合成抑制剂、激酶抑制剂、CDK2 抑制剂、CDK9 抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC 抑制剂、DNA 损伤剂、DNA 烷基化剂、DNA 嵌入剂、DNA 小沟结合剂、DHFR 抑制剂、以及海兔毒素肽。
- [21] 在本发明的一些优选实施方案中，所述治疗剂 D 为细胞毒类物质 (例如抗代谢药、抗肿瘤抗生素、生物碱)、免疫增强剂或放射性同位素。优选地，所述治疗剂 D 可选自 MMAD (单甲基溴瑞他汀 D, Monomethyl auristatin D) 及其衍生物、MMAE (单甲基溴瑞他汀 E, Monomethyl auristatin E) 及其衍生物、MMAF (单甲基溴瑞他汀 F, Monomethyl auristatin F) 及其衍生物、美登素类衍生物 DM1 (Mertansine derivative M1)、美登素类衍生物 DM4 (Mertansine derivative M4)、Duocarmycine、Calicheamicin、PBDA (Pyrrolobenzodiazepines)、Doxorubicin、Vinca Alkaloids、Metrotrexate、Vinblastine、Daunorubicin，更优选地所述治疗剂选自美登素类 (maytansinoids) (例如安丝菌素 (Ansamitocin) 或者美登素 (Mertansine))、海兔毒素肽 (dolastatin) 及其衍生物，最优选地所述治疗剂选自 MMAD 和 MMAE。
- [22] 在某些具体实施方案中，本发明涉及结构通式为 $Ab-(L-D)_n$ 的抗体药物缀合物，Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，L 选自 Py-MAA-Val-Cit-PAB、Mc-Val-Cit-PAB，D 选自 MMAD 或 MMAE，以及 n 为选自 1 到 8 的整数，例如 1、2、3、4、5、6、7、8 或其任意两者的区间。
- [23] 在某些具体实施方案中，本发明的抗体药物缀合物具有如下式任一所示的结构：



5 其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8。

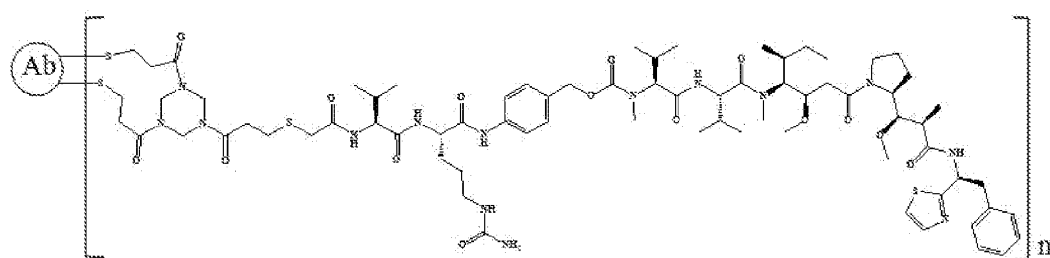
[24] 特别地，本发明涉及结构通式为 $\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_n$ 的抗体药物缀合物，其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，所述抗体的重链可变区的 CDR 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示，所述抗体的轻链可变区的 CDR 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示；L 为 Py-MAA-Val-Cit-PAB，D 为 MMAE。

10 更特别地，本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE，其具有下式所示的结构，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8：



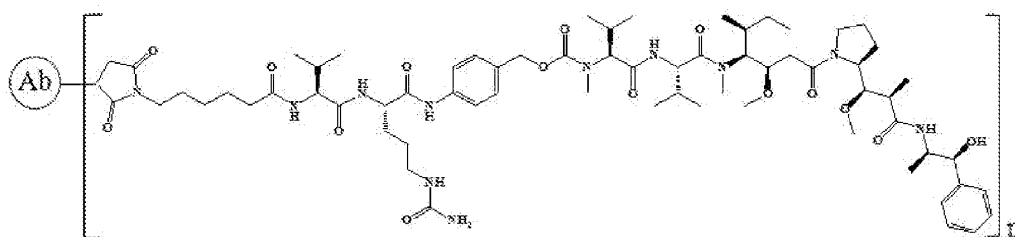
RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE

[25] 特别地，本发明涉及结构通式为 $Ab-(L-D)_n$ 的抗体药物缀合物，其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，所述抗体的重链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示，所述抗体的轻链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示；L 为 Py-MAA-Val-Cit-PAB，D 为 MMAD。更特别地，本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD，其具有下式所示的结构，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8：



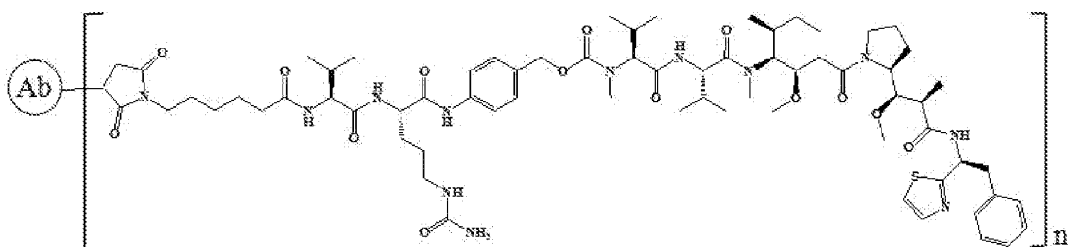
RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD

[26] 特别地，本发明涉及结构通式为 $Ab-(L-D)_n$ 的抗体药物缀合物，其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，所述抗体的重链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示，所述抗体的轻链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示；L 为 Mc-Val-Cit-PAB，D 为 MMAE。更特别地，本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE，其具有下式所示的结构，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8：



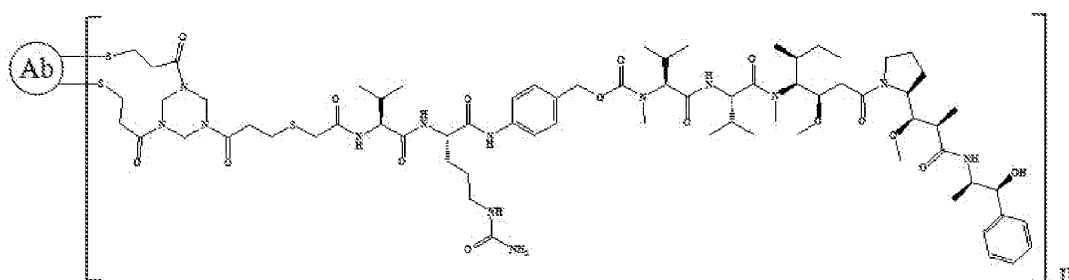
RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE

[27] 特别地，本发明涉及结构通式为 $\text{Ab}-(\text{L-D})_n$ 的抗体药物缀合物，其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，所述抗体的重链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示，所述抗体的轻链可变区的 CDR 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6 所示；L 为 Mc-Val-Cit-PAB，D 为 MMAD。更特别地，本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD，其具有下式所示的结构，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8：



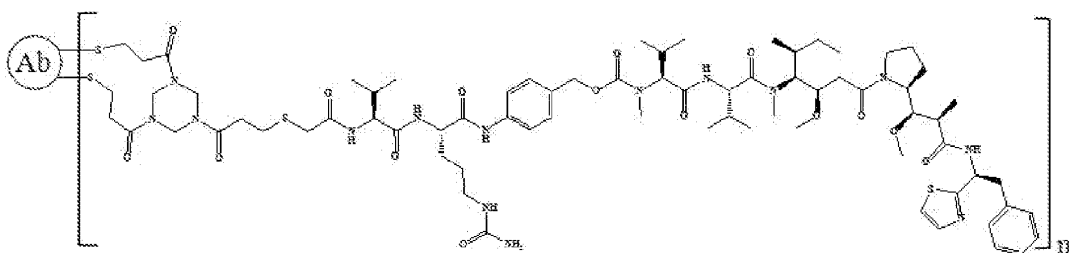
RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD

[28] 特别地，本发明涉及结构通式为 $\text{Ab}-(\text{L-D})_n$ 的抗体药物缀合物，其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，所述抗体具有 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区序列；L 为 Py-MAA-Val-Cit-PAB，D 为 MMAE。更特别地，本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE，其具有下式所示的结构，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8：



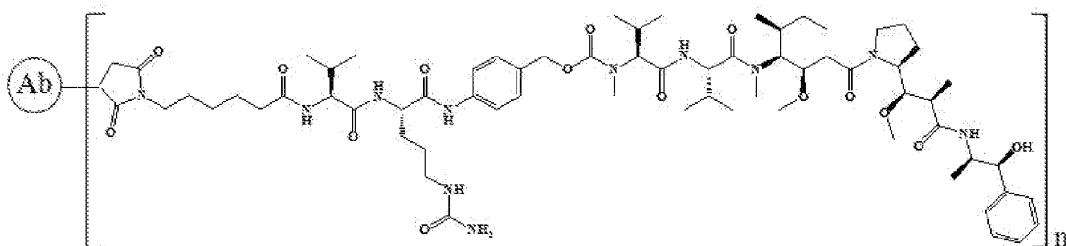
RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE

- [29] 特别地，本发明涉及结构通式为 $Ab-(L-D)_n$ 的抗体药物缀合物，其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，所述抗体具有 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区序列；L 为 Py-MAA-Val-Cit-PAB，D 为 MMAD。更特别地，本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD，其具有下式所示的结构，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8：



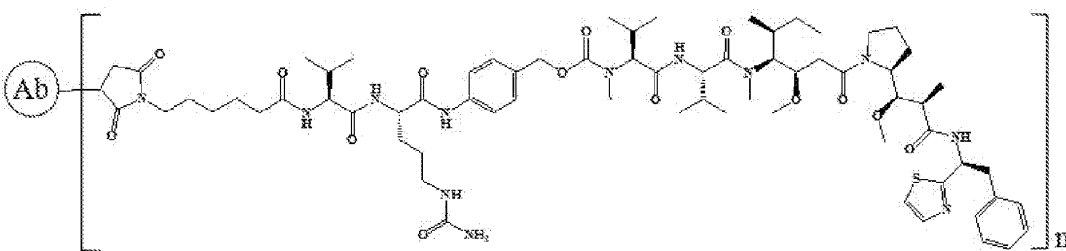
RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD

- [30] 特别地，本发明涉及结构通式为 $Ab-(L-D)_n$ 的抗体药物缀合物，其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体，所述抗体具有 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区序列；L 为 Mc-Val-Cit-PAB，D 为 MMAE。更特别地，本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE，其具有下式所示的结构，其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8：



RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE

[31] 特别地, 本发明涉及结构通式为 $Ab-(L-D)_n$ 的抗体药物缀合物, 其中 Ab 为本发明所述的任一抗间皮素抗体, 所述抗体的具有 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:8 所示的轻链可变区序列; L 为 Mc-Val-Cit-PAB, D 为 MMAD。更特别地, 本发明的抗体药物缀合物为 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD, 其具有下式所示的结构, 其中 n 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8:



RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD

[32] 另一方面, 本发明提供了一种能够结合间皮素的抗体或其功能性片段, 所述的抗体或其功能性片段包含重链和轻链, 其中

[33] (i) 所述重链包含至少三个 CDR 区, 其中所述 CDR 区中至少一个的氨基酸序列具有如 SEQ ID NO: 1、2 或 3 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98% 或者 99%) 序列同一性的序列; 和/或

[34] (ii) 所述轻链包含至少三个 CDR 区, 其中所述 CDR 区中至少一个的氨基酸序列具有如 SEQ ID NO: 4、5 或 6 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98% 或者 99%) 序列同一性的序列。

[35] 在某些具体的实施方案中,本发明的抗间皮素抗体或其功能性片段包含重链和轻链,其中:

[36] (i) 所述重链可变区包含三个 CDR 区,其中所述 CDR 区分别具有如 SEQ ID NO: 1、2 或 3 所示的氨基酸序列;和/或

5 [37] (ii) 所述轻链可变区包含三个 CDR 区,其中所述 CDR 区分别具有如 SEQ ID NO: 4、5 或 6 所示的氨基酸序列。

[38] 特别地,本发明公开的抗间皮素抗体重链的 CDR 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示。

10 [39] 特别地,本发明公开的抗间皮素抗体轻链的 CDR 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 所示。

[40] 更特别地,本发明公开的抗间皮素抗体重链的 CDR 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 所示,其轻链可变区的 CDR 区的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 所示。

15 [41] 又一方面,本发明提供了一种抗间皮素抗体或其功能性片段,其包含重链和轻链,其中所述重链和轻链分别包含重链可变区和轻链可变区:

[42] (i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98%或者 99%) 序列同一性的序列;并且

20 [43] (ii) 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或者与其具有至少 80% (优选 85%、90%、95%、98%或者 99%) 序列同一性的序列。

[44] 在某些具体的实施方案中,所述抗体包含重链和轻链,其中所述重链和轻链分别包含重链可变区和轻链可变区,其中

25 [45] (i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列,和/或

[46] (ii) 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

[47] 特别地,本发明的抗间皮素抗体包含重链和轻链,其中所述重链和轻链分别包含 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列。

30 [48] 在某些具体的实施方案中,所述抗间皮素抗体或其功能性片段是分离的。

[49] 在某些具体的实施方案中,所述抗间皮素抗体或其功能性片段是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、单链抗体(scFv)或者双特异性抗体,在某些具体的实施方案中,所述抗间皮素抗体或其功能性片段是单克隆抗体;在某些具体的实施方案中,所述抗间皮素抗体或其功能性片段是人源化抗体;在某些具体的实施方案中,所述抗间皮素抗体或其功能性片段是 IgG1 κ 抗体。

[50] 又一方面,本发明提供了一种编码本发明涉及抗体的分离的多核苷酸。

[51] 又一方面,本发明提供了分离的多核苷酸的组合,所述组合包括编码本发明抗体或其功能性片段之轻链的多核苷酸和编码本发明抗体或其功能性片段之重链的多核苷酸。

[52] 又一方面,本发明提供了表达载体或者表达载体的组合,其包含根据本发明的多核苷酸或者根据本发明的多核苷酸的组合,所述多核苷酸与允许其所编码的多肽在宿主细胞或无细胞表达系统中表达的调节序列有效连接。

[53] 又一方面,本发明提供了药物组合物,其包含根据本发明的抗体或其功能性片段和/或根据本发明的缀合物,以及可药用载体。

[54] 又一方面,本发明提供了一种治疗或预防癌症的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的根据本发明的抗体、多核苷酸、多核苷酸组合、表达载体、缀合物和/或药物组合物。

[55] 又一方面,本发明提供了根据本发明的抗体、多核苷酸、多核苷酸组合、表达载体、缀合物和/或药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的用途。

[56] 又一方面,本发明提供了根据本发明的抗体、多核苷酸、多核苷酸组合、表达载体、缀合物和/或药物组合物,其用于治疗或预防癌症。

[57] 又一方面,本发明提供了任何上述实施方案中的抗体药物缀合物在制备治疗癌症药物中的用途。

[58] 在某些具体的实施方案中,本发明所述的癌症为间皮素阳性癌症。

附图说明

[59] 图 1 显示了 RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 和

RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE 的 SDS-PAGE 表征图, 该图对 RC88 抗体与连接子和药物缀合物的偶联情况进行了表征。

[60] 图 2 显示了本发明缀合物的偶联情况, 其中 A 图显示了利用疏水高效液相色谱 (HIC-HPLC) 法对 RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 的偶联情况的检测结果; B 图显示了利用疏水高效液相色谱 (HIC-HPLC) 法对 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE 的偶联情况的检测结果。

[61] 图 3 显示了本发明缀合物的细胞毒作用, 其中 A 图显示了本发明的 RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD) 在 MSLN 高表达的 Oval-Citar-3 细胞中的细胞毒作用曲线; B 图显示了未偶联抗体的连接子和细胞毒素偶联物 (Py-Val-Cit-PAB-MMAE、Py-Val-Cit-PAB-MMAD、Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、Mc-Val-Cit-PAB-MMAD) 在 MSLN 高表达的 Oval-Citar-3 细胞中的细胞毒作用曲线; C 图显示了单独的细胞毒素 MMAE、MMAD 和阳性对照 PTX (Paclitaxel, 紫杉醇) 在 MSLN 高表达的 Oval-Citar-3 细胞中的细胞毒作用曲线。其中横坐标代表了药物的对数浓度, 纵坐标代表了在对应药物对数浓度下的最大抑制率。

[62] 图 4 显示了施用 RC88 抗体 (2mg/kg)、RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD, 2mg/kg) 及 MMAE (0.0716mg/kg) 的 (每周给药 1 次, 共给药 3 次) 荷瘤鼠的体重随天数变化的曲线图, 其中横坐标代表了天数, 纵坐标代表了荷瘤鼠在实施药物对应天数下的体重。本试验中, 对照组为生理盐水 (control) 和 MMAE。

[63] 图 5 显示了施用 RC88 抗体 (2mg/kg)、RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD, 2mg/kg) 及 MMAE (0.0716mg/kg) 的 (每周给药 1 次, 共给药 3 次) 荷瘤鼠肿瘤体积随天数变化的曲线图, 其中横坐标代表了天数, 纵坐标代表了荷瘤鼠的肿瘤在实施药物对应天数下的体积。本试验中, 对照组为生理盐水 (control) 和 MMAE。

[64] 图 6 显示了施用 RC88 抗体 (2mg/kg)、RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、

RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD, 2mg/kg) 及 MMAE (0.0716mg/kg), 每周给药 1 次, 共给药 3 次后荷瘤鼠肿瘤的重量, 对照组为生理盐水 (control) 和 MMAE。

5 [65] 图 7 显示了施用 RC88 抗体 (3mg/kg)、RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 3mg/kg、1.5mg/kg、0.75mg/kg)、MMAE (0.06mg/kg)、RC88 抗体 (3mg/kg)+MMAE(0.06mg/kg)、IgG-MMAE 3mg/kg、PTX (紫杉醇, 10mg/kg) (每周给药 1 次, 共给药 3 次 (PTX 每周给药 2 次, 共给药 6 次)) 的荷瘤鼠的体重随天数变化的
10 的曲线图, 其中横坐标代表了天数, 纵坐标代表了荷瘤鼠在实施药物对应天数下的体重。本试验中, 对照组为生理盐水 (control) 和 MMAE。

[66] 图 8 显示了施用 RC88 抗体 (3mg/kg)、RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 3mg/kg、1.5mg/kg、0.75mg/kg)、MMAE (0.06mg/kg)、RC88 抗体 (3mg/kg)+MMAE(0.06mg/kg)、
15 IgG-MMAE 3mg/kg、PTX (紫杉醇, 10mg/kg) (每周给药 1 次, 共给药 3 次 (PTX 每周给药 2 次, 共给药 6 次)) 的荷瘤鼠的肿瘤体积随天数变化的曲线图, 其中横坐标代表了天数, 纵坐标代表了荷瘤鼠的肿瘤在实施药物对应天数下的体积。本试验中, 对照组为生理盐水 (control) 和 MMAE。

20 [67] 图 9 显示了 RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE) 对 MSLN 高表达的 Oval-Citar-3 人卵巢癌荷瘤鼠模型的抑瘤作用。

[68] 图 10 显示了通过 ELISA 实验测定 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE) 与 MSLN 阳性肿瘤细胞的亲和
25 力曲线。

[69] 图 11 显示了本发明缀合物与靶标的亲和力, 其中 A 图显示了通过酶标法测定 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE) 与 MSLN 阳性肿瘤细胞的亲和力曲线; B 图显示了 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物
30 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE) 与重组人 MSLN 蛋白竞争结合曲线。

[70] 图 12 显示了 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物

(RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE) 和 CA125 与重组人 MSLN 蛋白的竞争结合曲线。

具体实施方式

定义

- 5 [71] 除非另有定义,本文使用的所有科技术语具有本领域普通技术人员所理解的相同含义。关于本领域的定义及术语,专业人员具体可参考 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel)。氨基酸残基的缩写是本领域中所用的指代 20 个常用 L-氨基酸之一的标准 3 字母和/或 1 字母代码。
- 10 [72] 尽管本发明的广义范围所示的数字范围和参数近似值,但是具体实施例中所示的数值尽可能准确的进行记载。然而,任何数值本来就必然含有一定的误差,其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外,本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的“1 至 10”的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围;也就是说,所有以最小值 1 或更大起始的子范围,例如 1
- 15 至 6.1,以及以最大值 10 或更小终止的子范围,例如 5.5 至 10。另外,任何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。
- [73] 另外应注意,如本说明书中所使用的,单数形式包括其所指对象的复数形式,除非清楚且明确的限于一个所指对象。术语“或”可与术语“和/或”互换使用,除非上下文另有清楚指明。
- 20 [74] 本文使用的术语“间皮素”,也称 Mesothelin、MSLN,指源自细胞中间皮素前体蛋白加工的任何天然、成熟间皮素。该术语包括来自任何脊椎动物来源的间皮素,包括哺乳动物诸如灵长类动物(例如人和猿猴)和啮齿类动物(例如小鼠和大鼠),除非另有说明,该术语还包括间皮素的天然存在变体,例如剪接变体或等位变体。
- 25 [75] 本文使用的术语“药物组合物”、“组合药物”和“药物组合”可互换地使用,其表示组合在一起以实现某种特定目的的至少一种药物以及任选地可药用载体或辅料的组合。在某些实施方案中,所述药物组合物包括在时间和/或空间上分开的组合,只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如,所述药物组合物中所含的成分(例如根据本发明的抗体、核酸分子、
- 30 核酸分子组合和/或缀合物)可以以整体施用于对象,或者分开施用于对象。当所述药物组合物中所含的成分分开地施用于对象时,所述成分可以同时或依次施用于对象。优选地,所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐

溶液如 PBS(磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤其依赖于根据本发明的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉施用。根据本发

[76] 根据本发明的药物组合物、疫苗或者药物制剂可通过任何适宜的途径施用，例如可口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉内施用。

[77] 本文使用的术语“治疗剂”表示能够起到治疗作用(例如治疗、预防、缓解或抑制任何疾病和/或病症)的任何物质或实体(entity)，其包括但不限于：化学治疗剂、放射治疗剂、免疫治疗剂、热治疗剂(thermally therapeutic agent)等。

[78] 本文使用的“CDR 区”或“CDR”是指免疫球蛋白的重链和轻链的高变区，如 Kabat et al. 所定义 (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S.Department of Health and Human Services, NIH, 1991, 以及以后版本)。存在三个重链 CDR 和三个轻链 CDR。根据情况，本文所用术语 CDR 或 CDRs 是为了指示这些区域之一、或者这些区域的几个或者甚至全部，所述区域包含通过抗体对抗原或其识别表位的亲和力而负责结合的大部分氨基酸残基。

[79] 对本发明来说，两种核酸或者氨基酸序列间的“一致性”、“同一性”或“相似性”是指，在最佳比对(最优比对)后所获得的、待比较的两序列之间相同核苷酸或相同氨基酸残基的百分数，该百分数是纯粹统计学的并且两种序列间的差异随机分布并覆盖其全长。两种核酸或者氨基酸序列之间的序列比较通常是在以最优方式使它们匹配以后，通过比较这些序列而进行，所述比较能够通过区段或者通过“比较窗”实施。除了能够手工实施外，用于比较序列的最优比对，还能够通过 Smith 和 Waterman(1981)[Ad.App.Math.2: 482] 的局部同源性算法、通过 Needleman 和 Wunsch 的(1970)[J.Mol.Biol.48: 443]局部同源性算法、通过 Pearson 和 Lipman 的(1988)[Proc. Natl.Acad.Sci.USA 85: 2444]相似性搜索方法、通过使用这些算法的计算机软件实施(GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575Science Dr., Madison, WI, 或者通过 BLAST N or BLAST P 比较软件)。

[80] 本文使用的“治疗有效量”或“有效量”是指足以显示其对于所施用对象益处的剂量。施用的实际量，以及施用的速率和时间过程会取决于所治疗者的自身情况和严重程度。治疗的处方(例如对剂量的决定等)最终是全科医生及其它医生的责任并依赖其做决定，通常考虑所治疗的疾病、患者个体的情况、递送部位、施用方法以及对于医生来说已知的其它因素。

[81] 本文所使用的术语“对象”是指哺乳动物，如人类，但也可以是其它动物，如野生动物(如苍鹭、鹤、鸪等)，家畜(如鸭、鹅等)或实验动物(如猩猩、猴子、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠、土拨鼠、地松鼠等)。

[82] 本文所使用的“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，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，特别的，本文所使用的“抗体”指包含通过二硫键而互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的蛋白。每条重链包含一重链可变区(缩写为VH)和一重链恒定区。该重链恒定区包含三个域(domain)，CH1、CH2和CH3。每条轻链包含一轻链可变区(缩写为VL)和一轻链恒定区。该轻链恒定区包含一个域，CL。VH和VL区域还可再细分为具有高可变性的多个区，被称为互补决定区(CDR)，其间散布有更为保守的被称为框架区(FR)的多个区域。每个VH和VL均由三个CDR和四个FR构成，按照以下顺序从氨基端至羧基端排布：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的这些可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主的组织或因子结合，包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q)。嵌合或人源化抗体也涵盖在根据本发明的抗体中。

[83] 术语“人源化抗体”是指一种抗体，其包含来源于非人源抗体的CDR区、并且该抗体分子的其他部分来源于一种(或几种)人抗体。而且，为了保留结合亲和力，可以修饰骨架(称为FR)区段的一些残基(Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332: 323-327, 1988)。通过本领域技术人员已知的技术可以制备根据本发明的人源化抗体或其片段(例如，描述于文件 Singer et al., J.Immun.150: 2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol.Genet.Eng.Rev., 10: 1-142, 1992; 或 Bebbington et al., Bio/Technology, 10: 169-175, 1992)。

[84] 术语“嵌合抗体”系指以下抗体，其中的可变区序列来自一物种而恒定区序列来自另一物种，例如可变区序列来自小鼠抗体而恒定区序列来自人

抗体的抗体。通过使用基因重组技术可以制备根据本发明的嵌合抗体或其片段。例如，所述嵌合抗体可以通过克隆重组 DNA 来生产，所述重组 DNA 包含启动子和编码根据本发明的非人尤其是鼠单克隆抗体可变区的序列、以及编码人抗体恒定区的序列。由这种重组基因编码的本发明嵌合抗体将是，例如，鼠-人嵌合体，该抗体的特异性由来源于鼠 DNA 的可变区确定，并且其同种型由来源于人 DNA 的恒定区来确定。对于制备嵌合抗体的方法，例如，可以参考文件 Verhoeyn et al.(BioEssays, 8: 74, 1988)。

[85] 术语“单克隆抗体”系指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和性。

[86] 本文所使用的术语“功能性片段”是指抗体片段由其来源抗体的重或轻可变链的部分序列构成或者包含它们，所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，优选至少等于其来源抗体亲和力的 1/100，在更优选方式中至少等于 1/10。这种功能片段将包含最少 5 个氨基酸，优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

[87] 本文所使用的术语“DAR”是指在抗体药物缀合物中的药物-抗体比 (Drug-Antibody Ratio)，其表示与一个抗体相缀合的药物的平均数量。优选地，本发明的抗体药物缀合物具有约 2 至约 6 的 DAR 值，例如约 2、2.5、3、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、5、5.5、6 或其任意两者的区间。

[88] 通常，为了制备单克隆抗体或其功能片段，尤其是鼠源的单克隆抗体或其功能片段，可以参考尤其描述在手册“Antibodies”中的技术 (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp.726, 1988) 或者参考 Kohler 和 Milstein 描述的从杂交瘤细胞制备的技术 (Nature, 256: 495-497, 1975)。

[89] 根据本发明的单克隆抗体或者抗体药物缀合物可以是纯化的，例如可以在亲和柱上纯化，已经预先在所述亲和柱上固定了 MSLN 抗原或其包含可被根据本发明所述抗体特异性识别的表位的片段之一。更具体而言，所述单克隆抗体可以如此纯化，通过蛋白质 A 和/或 G 色谱，接或不接目的在于消除残留蛋白质污染物以及 DNA 和 LPS 的离子交换色谱，其本身接或不接在 Sepharose 凝胶上的排阻色谱以消除由于二聚体或其他多聚体存在而潜在的聚集体。在更优选的方式中，全部这些技术可以同时或者连续使用。

[90] 本文使用的术语“海兔毒素肽(dolastatin)”是指分离自一种海洋生物截尾海兔(*Dolabella auricularia*)的多肽,其包括但不限于海兔毒素肽 10(dolastatin 10)和海兔毒素肽 15(dolastatin 15)。海兔毒素肽是有丝分裂抑制剂,其表现出强的抗癌活性,因此被作为抗癌药物的候选。研究人员进一步发现和合成了许多海兔毒素肽的衍生物,例如 MMAE 和 MMAF。

[91] 本文使用的术语“连接子”是指抗体药物缀合物(即 ADC)中将抗体与药物相连接的部分,其可以是可切割的或者不可切割的。可切割的连接子(即可断裂的连接子或生物可降解连接子)可以在靶标细胞内或其上断裂,从而释放药物。在某些实施方案中,本发明的连接子具有非常好的稳定性,大大减少了药物在递送到靶标过程中(例如在血液中)的释放,从而减少了副作用和毒性。在一些特定实施方案中,本发明的连接子选自可切割的连接子,例如基于二硫化物的连接子(其在巯基浓度更高的肿瘤细胞中选择性断裂)、肽连接子(其被肿瘤细胞中的酶所切割)、脘连接子。在另一些特定实施方案中,本发明的接头选自不可切割的连接子(即,不可断裂的连接子),例如硫醚连接子。在又一些实施方案中,本发明的连接子为可断裂连接子与不可断裂连接子的组合。优选地,本发明的连接子选自 Mc-Val-Cit-PAB 和 Py-MAA-Val-Cit-PAB。

[92] 抗 MSLN 抗体

[93] 本发明的抗体药物缀合物中的抗体的特征在于特异性结合人 MSLN。优选的是,该抗体以高亲和力结合 MSLN,例如,以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D 。抗 MSLN 抗体优选显示以下特性的一或多种:

[94] (a) 以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D (例如, $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小、 $2 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小、 $4 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小、 $3 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小、 $2 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小) 结合人 MSLN;

[95] (b) 结合 MSLN 高表达的 Oval-Citar-3 细胞,例如以 2000ng/ml 或更小的 EC_{50} (例如, 1000ng/ml 或更小、500ng/ml 或更小、400ng/ml 或更小、300ng/ml 或更小、250ng/ml 或更小、200ng/ml 或更小、150ng/ml 或更小、100ng/ml 或更小、50ng/ml 或更小、40ng/ml 或更小、30ng/ml 或更小、20ng/ml 或更小、10ng/ml 或更小、5ng/ml 或更小), 优选地所述 EC_{50} 使用流式细胞术或酶标法进行测定; 和

[96] (c) 抑制表达 MSLN 细胞的体内生长。

[97] 单克隆抗体 RC88

[98] 优选用于本发明的抗体药物缀合物中的抗体为人单克隆抗体 RC88。RC88 的 VH 和 VL 氨基酸序列分别显示在 SEQIDNO: 7 和 8。

[99] 在另一方面中, 本发明的抗体可包括 RC88 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3, 或它们的组合。RC88 的 VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3 的氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 1-3 中。RC88 的 VLCDR1、VLCDR2、VLCDR3 的氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 4-6 中。CDR 区系用 Kabat 系统进行说明(Kabat, E.A., et al., (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO:91-3242; 以下称之为“Kabat‘3242”)。

实施例

[100] 以下是本发明的方法和组合物的实施例。应当理解, 鉴于上文提供的定义及一般描述, 可以实施各种其他实施方案。

实施例 1 抗间皮素抗体

[101] 使用标准方法产生免疫动物, 从而产生本发明的抗间皮素抗体, 例如可参见 Kohler & Milstein, (1975) Nature 256:495- 497, Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72 以及 Cole, et al. in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96。

[102] 使用已知技术从细胞中分离并纯化间皮素, 并将其作为免疫原来免疫动物, 例如可参见 Zola, MONOCLONAL ANTIBODIES: PREPARATION AND USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND ENGINEERED ANTIBODY DERIVATIVES (BASICS: FROM BACKGROUND TO BENCH) Springer-Verlag Ltd., New York, 2000; BASIC METHODS IN ANTIBODY PRODUCTION AND CHARACTERIZATION, Chapter 11, "Antibody Purification Methods," Howard and Bethell, Eds., CRC Press, 2000; ANTIBODY ENGINEERING (SPRINGER LAB MANUAL.), Kontermann and Dubel, Eds., Springer- Verlag, 2001。

[103] 从免疫动物中取出脾细胞, 将其与骨髓瘤细胞系融合, 得到杂交瘤。然后, 通过筛选获得高结合亲和力的抗 MSLN 抗体。

[104] 通过移植轻链或重链 CDR 到人的 IgG1 或重链框架区来人源化鼠抗 MSLN 单克隆抗体。鼠源抗 MSLN 抗体轻链和重链的 CDR 用 Kabat 系

统确定。通过对抗体可变区数据库比对，我们确定了与鼠源 MSLN 抗体具有很高同源性的 IgG1 框架区。由此，我们设计了不同的人源化 MSLN 抗体的轻链可变区序列和不同的人源化抗 MSLN 的重链可变区序列。根据这样的设计，我们合成了人源化重链和轻链可变区序列，将人源化 MSLN 抗体轻链可变区与人 kappa 恒定区通过 PCR 融合，得到人源化 MSLN 轻链全长；将人源化 MSLN 重链可变区与 IgG 恒定区用 PCR 方法融合，得到人源化 MSLN 重链全长。不同轻重链组合并表达，纯化后的人源化抗体与人-鼠嵌合抗体进行 ELISA 结合亲和力比较，筛选得到候选人源化抗体（命名为 RC88 抗体）。

[105] 下面表 3 示出了 RC88 抗体轻链和重链的 CDR 氨基酸序列。

表 3.RC88 抗体重链和轻链的氨基酸序列

重链	CDR1	SEQ ID NO:1	Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser
	CDR2	SEQ ID NO:2	Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Val Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Asp
	CDR3	SEQ ID NO:3	Arg Gly Ser His Tyr Tyr Gly Tyr Arg Thr Gly Tyr Phe Asp
轻链	CDR1	SEQ ID NO:4	Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
	CDR2	SEQ ID NO:5	Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
	CDR3	SEQ ID NO:6	Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

[106] RC88 抗体重链可变区氨基酸序列（SEQ ID NO:7）：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Val Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Arg Gly Ser His Tyr Tyr Gly Tyr Arg Thr Gly Tyr Phe Asp
 100 105 110
Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

[107] RC88 抗体轻链可变区氨基酸序列（SEQ ID NO:8）：

```

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

```

[108]RC88 抗体的轻链和重链氨基酸序列分别如序列 9 (SEQ ID NO:9) 和序列 10 (SEQ ID NO:10) 所示。

[109]RC88 抗体的轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO:9):

```

Met Val Ser Pro Leu Gln Phe Leu Arg Leu Leu Leu Leu Trp Val Pro
1      5      10      15
Ala Ser Arg Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser
20      25      30
Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
35      40      45
Val Ser Tyr Met Tyr Trp His Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys
50      55      60
Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
65      70      75      80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Arg
85      90      95
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
100     105     110
Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115     120     125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130     135     140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145     150     155     160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165     170     175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180     185     190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195     200     205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210     215     220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225     230

```

[110]RC88 抗体的重链氨基酸序列 (SEQ ID NO:10):

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1      5      10      15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20      25      30

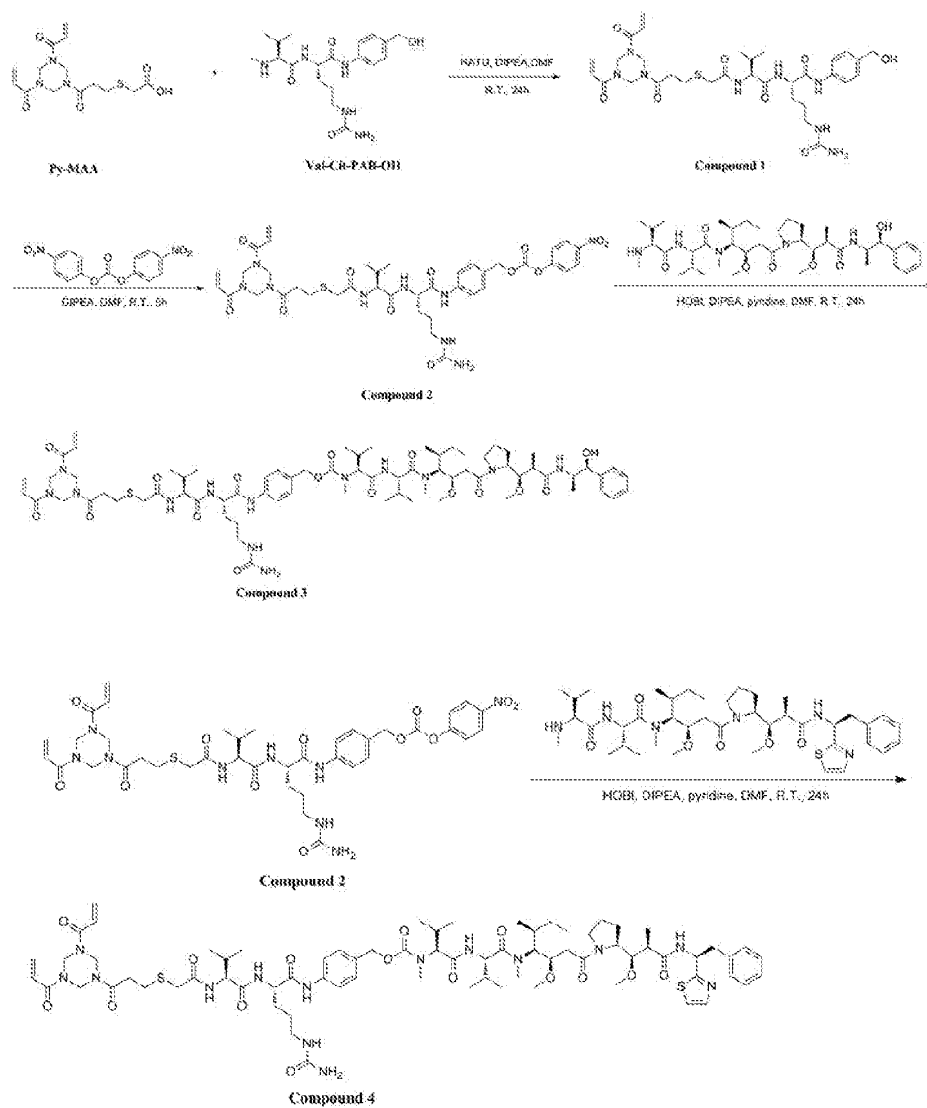
```

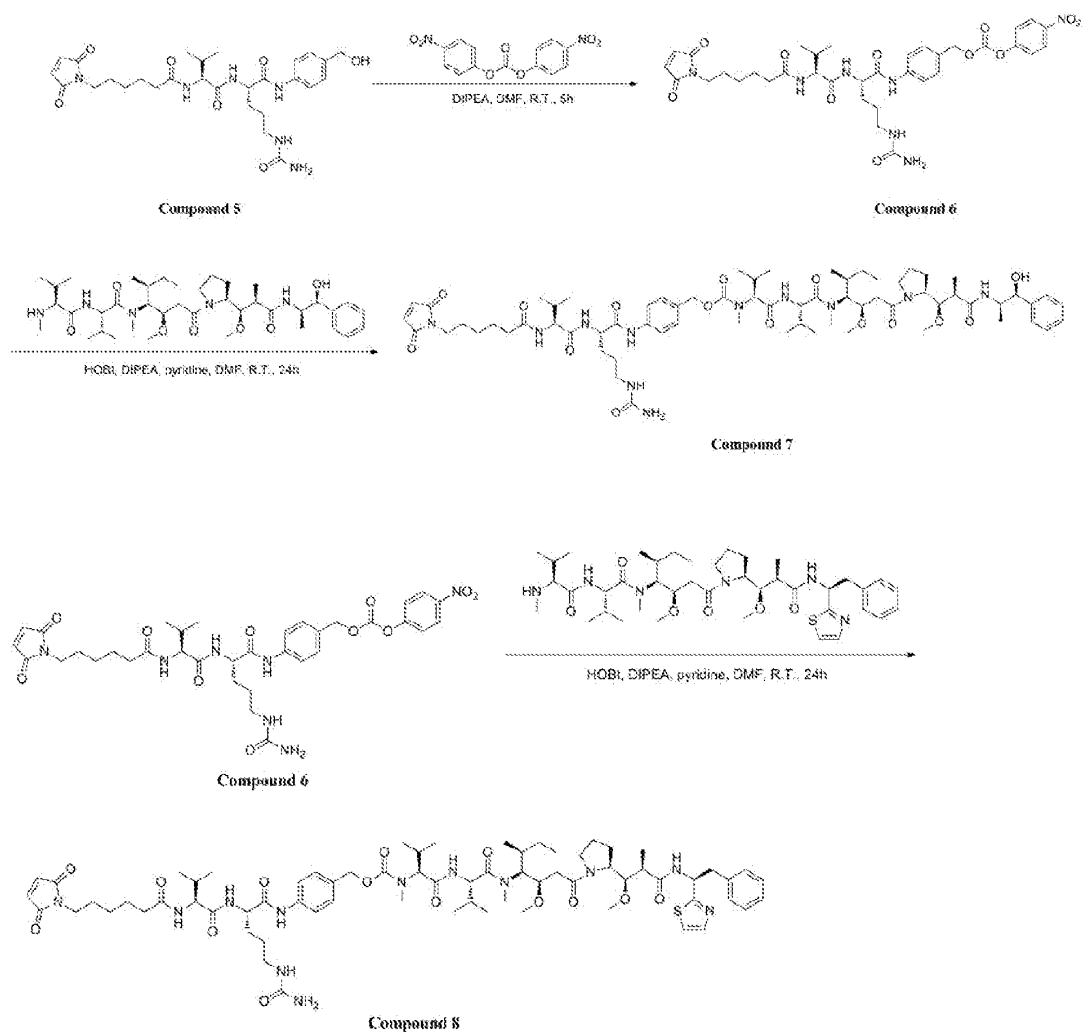
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe
 35 40 45
 Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Val Tyr Thr
 65 70 75 80
 Pro Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95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

 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

实施例2 抗体药物缀合物(ADC)的制备

实施例2a. 连接子-药物缀合物的制备





5

[111] ① 化合物 1(Py-MAA-Val-Cit-PAB-OH)的合成

[112] 将化合物 Py-MAA (1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪-巯基乙酸, 10.00 g, 29.3 mmol) 溶于 DMF (200 mL) 中, 加入 HATU (16.73 g, 44.0 mmol), Val-Cit-PAB-OH (9.20 g, 23.4 mmol), DIPEA (15.32 mL, 87.9 mmol), 室温搅拌 24 小时, TLC 监测反应进程。反应完后, 减压旋蒸除去溶剂, 粗品用制备型高效液相进行纯化, 制备液减压旋蒸后得到化合物 1 (6.67 g, 32.4%, 白色固体粉末)。

10

[113] ② 化合物 2(Py-MAA-Val-Cit-PAB-PNP)的合成

[114] 化合物 1 (7.02 g, 10.0 mmol) 溶于 DMF (200 mL) 中, 加入 NPC (二(对硝基苯)碳酸酯), 4.56 g, 15.0 mmol) 和 DIPEA (2.09 mL, 12 mmol), 室温反应 5 小时, TLC 检测反应进程。反应完成后, 将反应液倒入石油醚 (1500 mL) 中, 搅拌, 过滤, 所得滤饼用石油醚洗涤 (150 mL×3), 抽干, 得到类白色固体粉末 (6.57g, 75.7%)。

[115] ③ 化合物 3 (Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE) 的合成

[116] 化合物 2 (1.74 g, 2.2 mmol) 溶于 20 mL DMF 中, 氮气保护下加入 MMAE (1.44 g, 2.0 mmol), HOBt (0.27 g, 2.0 mmol), DIPEA (0.70 mL, 4.0 mmol) 和吡啶 (4 mL)。室温搅拌 24 小时, TLC 监测反应进程。反应结束后, 用制备型高效色谱进行纯化, 制备液减压旋蒸后得到化合物 3 (白色固体粉末, 1.35 g, 46.7%)。LC-MS m/z (ES+), 1446.35(M+H)+, IR (3334.32 cm⁻¹, 2965.9 cm⁻¹, 1652.70 cm⁻¹, 1538.92 cm⁻¹, 1436.71 cm⁻¹)。

[117] ④ 化合物 4 (Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD) 的合成

[118] 化合物 2 (0.87 g, 1.1 mmol) 溶于 10 mL DMF 中, 氮气保护下加入 MMAD (0.77 g, 1.0 mmol), HOBt (0.14 g, 1.0 mmol), DIPEA (0.35 mL, 2.0 mmol) 和吡啶 (2 mL)。室温搅拌 24 小时, TLC 监测反应进程。反应结束后, 用制备型高效色谱进行纯化, 制备液减压旋蒸后得到化合物 4 (白色固体粉末, 0.65 g, 43.5%)。LC-MS m/z (ES+), 1499.76(M+H)+。

[119] ⑤ 化合物 6 (Mc-Val-Cit-PAB-PNP) 的合成

[120] 化合物 5 (Mc-Val-Cit-PAB, 4.58 g, 8.0 mmol) 溶于 DMF (100 mL) 中, 加入 NPC (二(对硝基苯)碳酸酯), 3.65 g, 12.0 mmol) 和 DIPEA (1.70 mL, 9.6 mmol), 室温反应 5 小时, TLC 检测反应进程。反应完成后, 将反应液倒入石油醚 (1000 mL) 中, 搅拌, 过滤, 所得滤饼用石油醚洗涤 (60 mL×3), 抽干, 得到类白色固体粉末 (5.04 g, 85.2%)。

[121] ⑥ 化合物 7 (Mc-Val-Cit-PAB-MMAE) 的合成

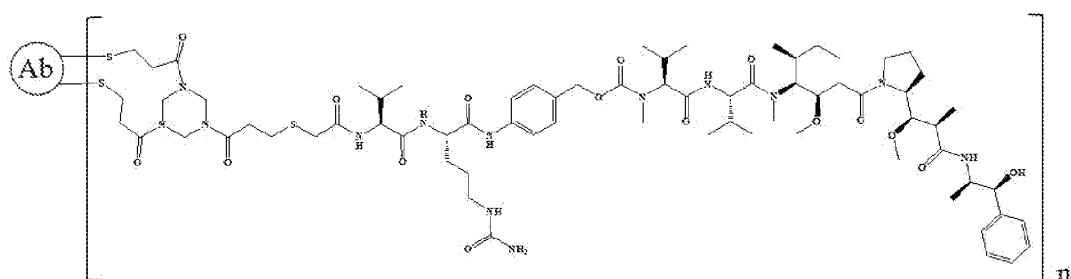
[122] 化合物 6 (1.19 g, 1.6 mmol) 溶于 12 mL DMF 中, 氮气保护下加入 MMAE (1.08 g, 1.5 mmol), HOBt (0.21 g, 1.5 mmol), DIPEA (0.55 mL, 3.0 mmol) 和吡啶 (2.5 mL)。室温搅拌 24 小时, TLC 监测反应进程。反应结束后, 用制备型高效色谱进行纯化, 制备液减压旋蒸后得到化合物 7 (白色固体粉末, 0.891 g, 45.1%)。LC-MS m/z (ES+),

1316.18(M+H)⁺。

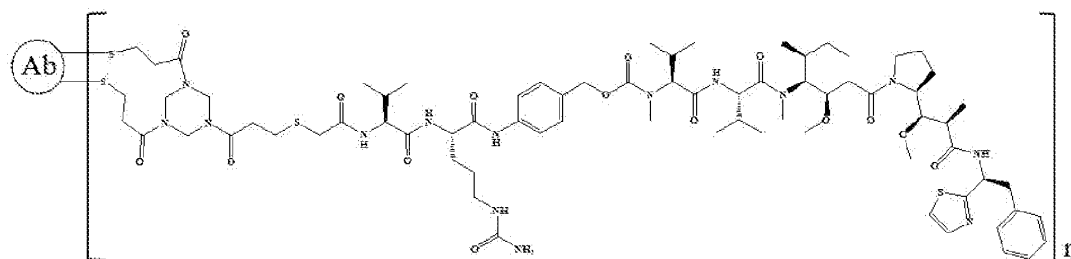
[123] ⑦ 化合物 8 (Mc-Val-Cit-PAB-MMAD) 的合成

[124] 化合物 6 (0.74 g, 1.1 mmol) 溶于 10 mL DMF 中, 氮气保护下加入 MMAD (0.77 g, 1.0 mmol), HOBt (0.14 g, 1.0 mmol), DIPEA (0.35 mL, 2.0 mmol) 和吡啶 (2 mL)。室温搅拌 24 小时, TLC 监测反应进程。反应结束后, 用制备型高效色谱进行纯化, 制备液减压旋蒸后得到化合物 8 (白色固体粉末, 0.59 g, 42.8%)。LC-MS m/z (ES⁺), 1369.38(M+H)⁺。

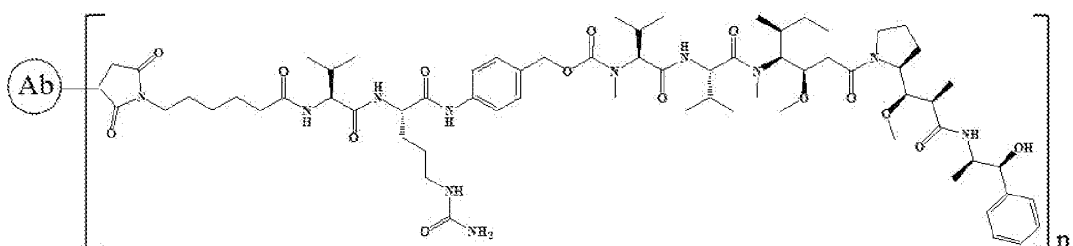
实施例 2b. 抗体药物缀合物的制备



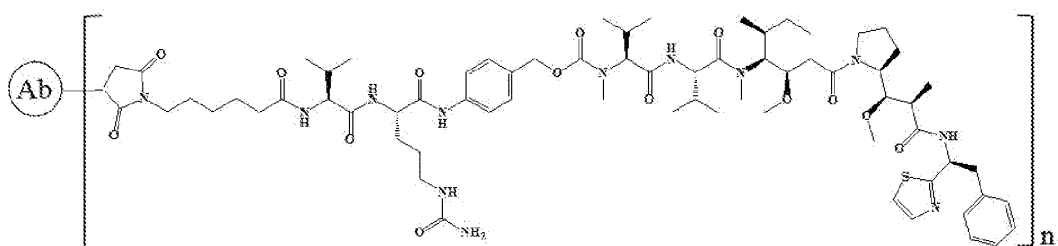
RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE



RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD



RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE



RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD

- 5 [125] 将 10 mg/mL 的 RC88 抗体、10 mmol/L 的 DTPA (Diethylene triamine pentacetate acid, 二乙基三胺五乙酸) 以及 5 摩尔倍数的 5 mmol/L 的 TCEP (Tris-2-carboxyethyl-phosphine, 三(2-羧乙基)膦) 加入 PCR 管中, 25℃ 搅拌反应 2 h, 再于 0℃ 下加入 25% 的 DMSO (dimethyl sulfoxide, 二甲亚砜) 以及 5 摩尔倍数的 5 mmol/L 的药物 (化合物 3、4、7 或 8), 25℃
- 10 搅拌反应 10 h。反应结束后, 用 PBS 缓冲液离心超滤 3 次, 纯化去除残余未反应药物以及 DMSO 等游离小分子, 并且利用 SDS-PAGE 电泳和疏水高效液相色谱 (HIC-HPLC) 法检测偶联情况。对 RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 和 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE
- 15 用还原 SDS-PAGE 进行表征, 此次实验采用 Novex 公司的 NuPAGE 预制胶, 每个样品总上样体积为 10 μL, 其结果如图 1 所示。RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 由于桥接连接子将还原后的二硫键又用共价键连接起来, 因此存在不同情形的条带, 其中 150 kDa 为完整抗体 (LHHL), 125 kDa 表示有一个轻链没有被偶联起来 (LHH), 100 kDa 为偶联了两个重链 (HH), 75 kDa 为偶联了一个轻链一个重链 (LH),

50kDa 和 25kDa 分别为重链和轻链。由于 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE 不是桥接的连接子，二硫键还原成两个巯基后分别与两个连接子-毒素偶联，因此还原 SDS-PAGE 仅显示 50kDa 和 25kDa 两个条带。用疏水高效液相色谱（HIC-HPLC）法对 RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 和 RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE 的偶联情况进行了检测，结果分别如图 2A 和图 2B 所示，结果显示 DAR 值分别为 3.95（RC88-PY-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE）和 3.9（RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE）。

实施例 3 高表达 MSLN 的 Oval-Citar-3 细胞的构建

[126] 将生长状态良好的 Oval-Citar-3 细胞（ATCC）以 3×10^5 /个孔接种至 6 孔板，贴壁过夜后，弃掉原培养基，加入含 10 μ g/mL Polybrene (sigma) 的新鲜培养基 400 μ L，同时加入合适浓度的含有人 MSLN 编码序列的慢病毒载体（pRRL-cmv）600 μ L，混匀后继续培养 24hr。培养结束后，更换新鲜培养基继续扩大培养，使用流式细胞仪选择阳性细胞。将所选的阳性细胞扩大培养，经流式细胞仪对 MSLN 表达量的分析后，选取 MSLN 表达量最高的细胞用于后续实验（下文称其为 Oval-Citar-3-MSLN）。

实施例 4 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物及相应连接子-药物、药物的细胞毒活性检测

[127] 取生长状态良好的 Oval-Citar-3-MSLN 细胞加入 96 孔细胞培养板（ 5×10^4 个/mL，100 μ L/孔），CO₂ 恒温培养箱 37℃ 孵育过夜。RC88 抗体、RC88 抗体药物缀合物（RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD）及相应连接子-药物（Py-Val-Cit-PAB-MMAE、Py-Val-Cit-PAB-MMAD、Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、Mc-Val-Cit-PAB-MMAD）、药物（MMAE、MMAD）、PTX（Paclitaxel，紫杉醇）用完全培养基分别稀释，稀释浓度分别为：RC88 抗体、RC88 抗体药物缀合物（RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD）的终浓度为：0.32、1.6、8、16、32、64、128、640、3200ng/mL，连接子-药物（Py-Val-Cit-PAB-MMAE、Py-Val-Cit-PAB-MMAD、Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、Mc-Val-Cit-PAB-MMAD）的终浓度为：0.4、2、10、20、40、80、160、

800、4000ng/mL，药物(MMAE、MMAD)的终浓度为：0.0016、0.008、0.04、0.2、0.4、0.8、1.6、8、40ng/mL，PTX (Paclitaxel，紫杉醇)的终浓度：0.004、0.02、0.098、0.3、0.89、2.67、8、40、200ng/mL。稀释后加入 96 板 (100μL/孔)，设置空白组 (未加药的等量培养基) 和三个对照

5 照组，CO₂ 恒温培养箱 37℃ 孵育 72h。加入含 CCK-8 10μL 的培养基 (不含 FBS) 100μL/孔，CO₂ 恒温培养箱 37℃ 孵育 2-4hr，酶标仪读取 450nm 处 OD 值，抑制率计算公式为：IR%=(OD 空白-OD 药物)×100/OD 空白。使用 Prism 软件将抑制率作为 y 值，药物浓度作为 x 值进行四参数曲线拟合，并记录抑制率为介于最大抑制率和最小抑制率中间的值所对应的

10 药物浓度值 (软件默认为 IC₅₀ 值)，结果见图 3 和表 4。结果显示，RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE 均能够有效抑制 Oval-Citar-3-MSLN) 的生长。

表 4 RC88 抗体、RC88 抗体药物缀合物及相应连接子-药物、药物细胞毒作用 IC₅₀ 值、最大抑制率结果 (N=3)

15

Samples	OVal-CitAR3-MSLN		
	ng/mL	nM	抑制率%
RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD	6.5±1.6	0.043±0.011	95.6±1.9
RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE	14.1±1.4	0.093±0.009	95.0±2.0
RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE	14.5±1.5	0.0956±0.010	95.8±1.0
RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD	7.8±1.7	0.0158±0.011	96.2±0.9
RC88 抗体	—	—	-4.2±1.2
Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD	40.9±22.9	27.30±15.27	95.7±0.6
Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE	~684.6	—	94.9±0.8
Mc-Val-Cit-PAB-MMAE	~663.4	—	94.5±0.8
Mc-Val-Cit-PAB-MMAD	5.6±0.03	4.39±0.0179	96.9±0.6
MMAD	0.1169±0.0074	0.1517±0.010	98.1±2.4
MMAE	0.3199±0.0284	0.4458±0.0395	96.9±0.7
PTX	1.087±0.2623	1.27±0.31	92.8±1.5

实施例 5 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物对 MSLN 高表达的

Oval-Citar-3 人卵巢癌荷瘤鼠模型的抑瘤实验

[128] 取生长状态良好的 Oval-Citar-3-MSLN 细胞 (2×10^6 个), 接种于裸鼠 (常州卡文斯实验动物有限公司, 合格证编号: 201611240, 许可证号: SCXK(苏)2011-0003) 皮下, 待肿瘤体积生长至约 $100-400\text{mm}^3$ 后将动物随机分组。施用 RC88 抗体 (2mg/kg)、RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD, 2mg/kg) 及 MMAE (0.0716mg/kg), 每周给药 1 次, 共给药 3 次, 阴性对照组同时给等量的生理盐水, 结果见图 4、5 和 6。

[129] 结果显示 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物不影响荷瘤鼠体重增加; RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAD、RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAE、RC88-Mc-Val-Cit-PAB-MMAD, 2mg/kg) 均表现出明显的抑制荷瘤鼠移植瘤作用, 而 RC88 抗体的抑瘤作用不明显。

实施例 6 RC88 抗体药物缀合物对 MSLN 高表达的 Oval-Citar-3 人卵巢癌荷瘤鼠模型的抑瘤实验

[130] 取正常生长的 Oval-Citar-3-MSLN 细胞 (2×10^6 个), 接种于裸鼠 (常州卡文斯实验动物有限公司, 合格证编号: 201611240, 许可证号: SCXK(苏)2011-0003) 皮下, 待肿瘤体积生长至约 $100-400\text{mm}^3$ 后将动物随机分组。实施所测试药物 RC88 抗体 (3mg/kg)、RC88 抗体药物缀合物 (RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE 3mg/kg 、 1.5mg/kg 、 0.75mg/kg) MMAE 0.06mg/kg 、RC88 抗体 (3mg/kg)+MMAE(0.06mg/kg)、人血清 IgG-MMAE 3mg/kg 、PTX (Paclitaxel, 紫杉醇) 10mg/kg , 每周给药 1 次, 共给药 3 次 (PTX 每周给药 2 次, 共给药 6 次), 阴性对照组同时给等量的生理盐水, 结果见图 7、8、9。试验结果显示 RC88 抗体药物缀合物给药剂量为 3mg/kg 组和 1.5mg/kg 组荷瘤鼠肿瘤在第一次给药 7 天后明显减小, 3mg/kg 组至给药 10 天后无可见肿瘤, 1.5mg/kg 组至给药 17 天后无可见肿瘤, 0.75mg/kg 组在给药 3 次的情况下, 肿瘤生长依然比较快, 至给药 21 天, 肿瘤体积与对照 (生理盐水) 组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 且 $T/C > 40\%$ 。紫杉醇 (PTX) 组至给药 21 天, 有两只荷瘤鼠的肿瘤完全消除 (CR), 肿瘤体积和 RTV 与对照 (生理盐水) 组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 且 $T/C < 40\%$ 。紫杉醇 (PTX) 组与 RC88 抗体药物缀合物给

药剂量 3mg/kg 组和 1.5mg/kg 组比较无统计学差异。RC88 抗体、MMAE、RC88 抗体+ MMAE、IgG-MMAE 与对照（生理盐水）组比较无统计学差异（ $P>0.05$ ）。

实施例 7 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物与 MSLN 阳性肿瘤细胞的亲和力检测

[131] 用流式细胞仪检测 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物（RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE）与 MSLN 阳性肿瘤细胞的亲和力，取对数生长期 Oval-Citar-3-MSLN 细胞于 1.5mL EP 管中（每组 4×10^5 个），1500rpm 离心 5min，PBS 充分洗涤一次，弃去上清液部分；用多聚甲醇（200 μ L 4%）重悬细胞，25 $^{\circ}$ C 固定 15min，PBS 充分洗涤一次，2500rpm 离心 3min，弃去上清液部分；用冷的 1% BSA-PBS（牛血清白蛋白-PBS）缓冲液将 RC88 抗体以及 RC88 抗体药物缀合物从 10000ng/mL 3 倍梯度稀释至 1.52ng/mL，并分别取用各浓度溶液 200 μ L 重悬细胞，空白对照组直接用冷的 1%BSA-PBS 重悬，阴性对照组用 1%BSA 配制的浓度为 5 μ g/mL 的 hIgG（中科晨宇）重悬细胞，4 $^{\circ}$ C 孵育 30min，每 10 min 颠倒混匀一次，使细胞孵育均匀；孵育结束，用冷的 PBS 洗一次，2500rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 3 min，弃上清；每管加入冷的 PBS 1:200 稀释的 FITC(fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素)标记的羊抗人 IgG Fcy（Jackson ImmunoResearch）200 μ L，4 $^{\circ}$ C 孵育 30min，每 10min 颠倒混匀一次，使细胞孵育均匀。孵育结束，用冷的 PBS 洗一次，2500rpm，4 $^{\circ}$ C 离心 5min，弃上清；400 μ L PBS 重悬细胞，转移到流式细胞仪(BD Calibur)进行检测，其结果见图 10。结果表明，RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物（RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE）均与 MSLN 阳性肿瘤细胞有强结合亲和力，EC50 值分别为 153.5ng/mL 和 251.4ng/mL。

实施例 8 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物与 MSLN 阳性肿瘤细胞的结合活性检测

[132] 用酶标法检测 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物（RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE）与 MSLN 阳性肿瘤细胞的结合活性，取对数生长期 Oval-Citar-3-MSLN，加入 96 孔细胞培养板（ 4×10^5 个/mL，100 μ L/孔），CO2 恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜，弃去上清液部分，以 0.05%PBST 缓冲液洗板 3 次（250 μ L/孔）；每孔加入 4%多聚甲醛 100 μ L，25 $^{\circ}$ C 固定 30 分钟后，以 0.05%PBST 缓冲液洗板 3 次（250 μ L/孔）；每孔加入 250 μ L 3%BAS-PBST（牛血清白蛋白-PBST）缓冲液，室

温封闭 2 小时后, 以 0.05%PBST 缓冲液充洗板 3 次 (250 μ L/孔); 加样:
1) 结合曲线: 用 1%BAS-PBST 缓冲液将 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物
从 3000ng/mL 3 倍梯度稀释至 0.05ng/mL 后加入 96 孔板 (100 μ L/孔);
2) 竞争曲线: 将重组人 MSLN 蛋白 (义翘神州) 用 1%BAS-PBST
5 从 10000ng/mL 稀释至 0.51ng/mL, RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物
稀释为 20ng/mL 后, 与 MSLN 蛋白稀释液等体积混合后, 以 100 μ L/孔加入
96 孔板; 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后, 洗板 3 次; 每孔加入 1%BAS-PBST 稀
释的 HRP (Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶) 标记的羊抗人 IgG
Fc (Bethyl) (1:2000), 25 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后, 洗板 3 次; TMB 显色试剂
10 盒 (康为世纪) 避光显色 5-10 分钟, 2M 硫酸终止, 用酶标仪读板, 其结
果见图 11。试验结果表明 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物均与 MSLN
阳性肿瘤细胞有较强结合, RC88 抗体药物缀合物较 RC88 抗体略有下降,
但并没有显著性差异, EC50 值分别为 11.0 $\pm$ 0.81ng/mL 和 19.7 $\pm$ 5.80ng/mL。
通过与重组人 MSLN 蛋白的竞争实验可证明 RC88 抗体及 RC88 抗体药
15 物缀合物与 Oval-Citar-3-MSLN 细胞表面的 MSLN 结合具有特异性。

实施例 9 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物、CA125 与 MSLN 的竞争
性结合

[133] 利用 ELISA 法检测 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物
(RC88-Py-MAA-Val-Cit-PAB-MMAE)、CA125 与 MSLN 的竞争性结合
20 能力。用重组蛋白 MSLN (义翘神州, 200ng/mL) 包被 ELISA 板。加样:
将 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物用 1%BAS-PBST (牛血清白蛋白
-PBST) 缓冲液从 20 μ g/mL 起梯度稀释 10 个点 (50 μ L/孔), 将重组蛋白
CA125 (his tag, R&D) 用 1%BAS-PBST 缓冲液稀释至 200ng/mL (50 μ L/
孔), 反应总体积 100 μ L/孔, 稀释二抗 (小鼠抗 his 单抗, R&D) 5000 倍,
25 100 μ L/孔, TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 3,3',5,5'-四甲基联苯胺)
显色 5-7min, 之后 2M 硫酸终止反应, 用酶标仪 450nm 处读板, 其结果
见图 12。结果显示, 随着 RC88 抗体及 RC88 抗体药物缀合物浓度的升高,
重组 CA125 蛋白与重组人 MSLN 蛋白的结合降低, 表明 RC88 抗体及
RC88 抗体药物缀合物可以阻断重组人 CA125 蛋白与重组人 MSLN 蛋白
30 的结合。

[134] 以上描述地仅是优选实施方案, 其只作为示例而不限实施本发明所
必需特征的组合。所提供的标题并不意指限制本发明的多种实施方案。术
语例如“包含”、“含”和“包括”不意在限制。此外, 除非另有说明, 没有数

词修饰时包括复数形式，以及“或”、“或者”意指“和/或”。除非本文另有定义，本文使用的所有技术和科学术语的意思与本领域技术人员通常理解的相同。

5 [135] 本申请中提及的所有公开物和专利通过引用方式并入本文。不脱离本发明的范围和精神，本发明的所描述的方法和组合物的多种修饰和变体对于本领域技术人员是显而易见的。虽然通过具体的优选实施方式描述了本发明，但是应该理解所要求保护的本发明不应该被不适当地局限于这些具体实施方式。事实上，那些对于相关领域技术人员而言显而易见的用于实施本发明的所描述的模式多种变体意在包括在随附的权利要求的范围
10 内。

15

序列表

<110> 荣昌生物制药（烟台）有限公司

<120> 一种抗间皮素抗体及其抗体药物缀合物

<130> RC088-001

<160> 10

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 1

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 2

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Val Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 3

Arg Gly Ser His Tyr Tyr Gly Tyr Arg Thr Gly Tyr Phe Asp
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 5

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<400> 6
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Val Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Gly Ser His Tyr Tyr Gly Tyr Arg Thr Gly Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT

<400> 8
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp His Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<400> 9

```

Met Val Ser Pro Leu Gln Phe Leu Arg Leu Leu Leu Leu Trp Val Pro
1      5      10      15
Ala Ser Arg Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser
20      25      30
Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser
35      40      45
Val Ser Tyr Met Tyr Trp His Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys
50      55      60
Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg
65      70      75      80
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Arg
85      90      95
Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
100     105     110
Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115     120     125
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130     135     140
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145     150     155     160
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165     170     175
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180     185     190
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195     200     205
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210     215     220
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225     230

```

<210> 10

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<400> 10

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1      5      10      15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20      25      30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe
35      40      45
Ser Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50      55      60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Val Tyr Thr
65      70      75      80
Pro Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85      90      95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100     105     110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ser His Tyr Tyr Gly Tyr Arg Thr Gly
115     120     125
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
130     135     140

```

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 145 150 155 160
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165 170 175
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 180 185 190
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 195 200 205
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 225 230 235 240
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470