



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120187458 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 20

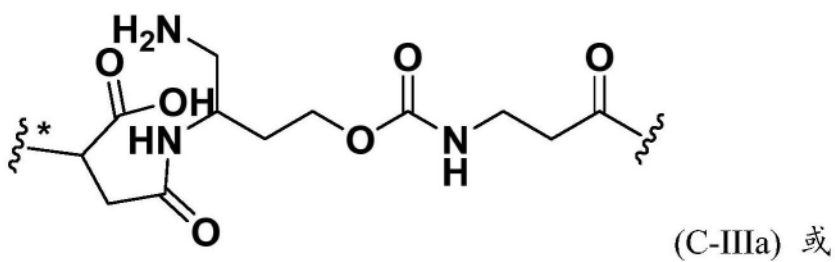
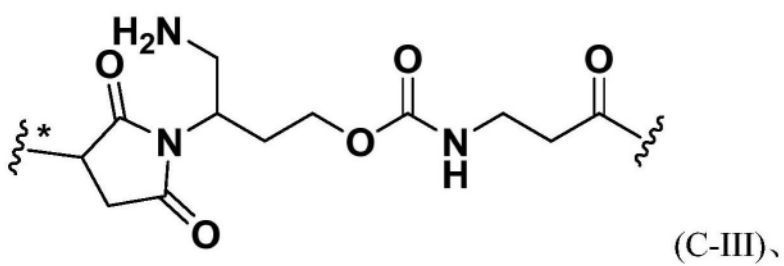
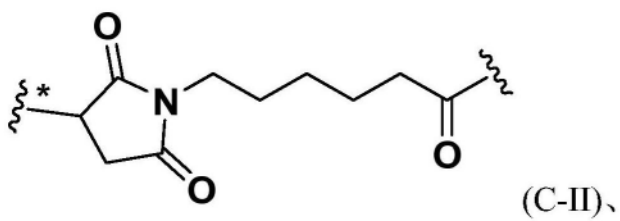
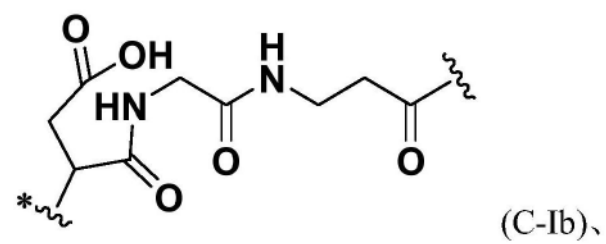
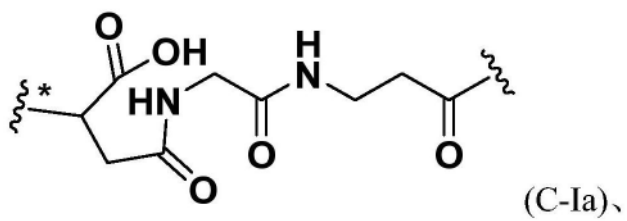
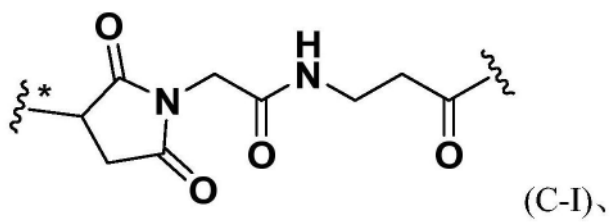
(21) 申请号 202380077578.4	王泽韦 罗炜 何毛毛 李卓
(22) 申请日 2023.11.22	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
(66) 本国优先权数据	专利代理师 陈桢
PCT/CN2022/134067 2022.11.24 CN	(51) Int.Cl.
PCT/CN2023/107003 2023.07.12 CN	A61K 47/68 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61P 35/00 (2006.01)
2025.05.07	C07K 16/30 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	
PCT/IB2023/061813 2023.11.22	
(87) PCT国际申请的公布数据	
W02024/110905 EN 2024.05.30	
(71) 申请人 广州百济神州生物制药有限公司	
地址 510555 广东省广州市黄埔区康耀南	
路83号	
(72) 发明人 蔡长昇 蔡孜烜 曲亮 卫小东	权利要求书14页 说明书179页
	序列表(电子公布) 附图28页

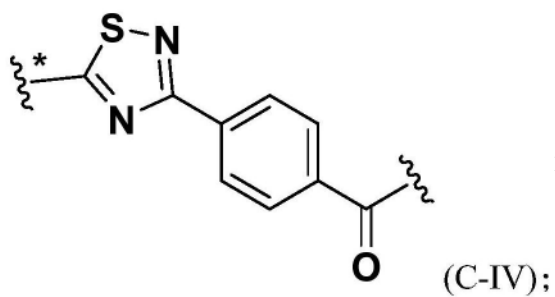
(54) 发明名称
抗CEA抗体药物缀合物和使用方法

(57) 摘要
本披露提供了包含与人CEA结合的抗体及其抗原结合片段和接头-有效载荷的抗体药物缀合物、包含抗CEA抗体药物缀合物的药物组合物以及该抗CEA抗体药物缀合物用于治疗CEA相关疾病或障碍的用途。

1. 一种抗体药物缀合物,该抗体药物缀合物包含:
抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段与人CEA结合并且包含:
 - (i) 三个重链CDR:
包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,
包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,
包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及
三个轻链CDR:
包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,
包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,
包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者
 - (ii) 三个重链CDR:
包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,
包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,
包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及
三个轻链CDR:
包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,
包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,
包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者
 - (iii) 三个重链CDR:
包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,
包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,
包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及
三个轻链CDR:
包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,
包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,
包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3;以及
细胞毒性剂(D)。
2. 如权利要求1所述的抗体药物缀合物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,
该抗体药物缀合物具有式 $Ab-(C-L-(D))_m)_n$,其中
Ab是该抗体或其抗原结合片段;
C是缀合部分;
L是接头;
D是该细胞毒性剂;
m是1至8的整数;并且
n是1至10。
3. 如权利要求2所述的抗体药物缀合物,其中m是1。
4. 如权利要求2或权利要求3所述的抗体药物缀合物,其中n是3至10。
5. 如权利要求4所述的抗体药物缀合物,其中n是约8。
6. 如权利要求2至4中任一项所述的抗体药物缀合物,其中C是选自(C-I)、(C-Ia)、(C-

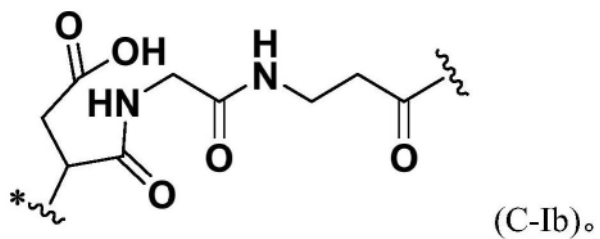
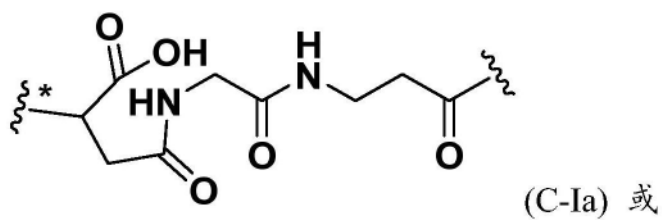
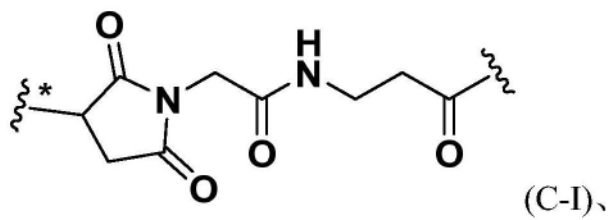
Ib)、(C-II)、(C-III)、(C-IIIa)或(C-IV)的式:



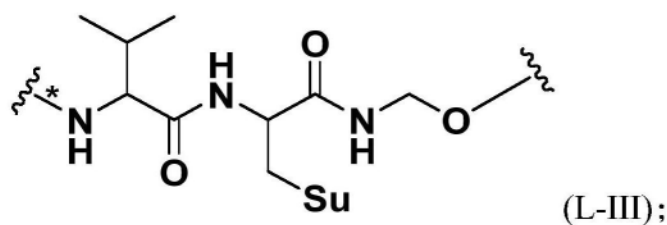
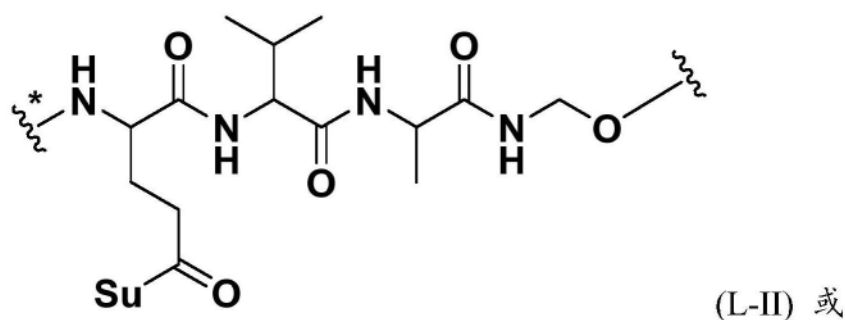
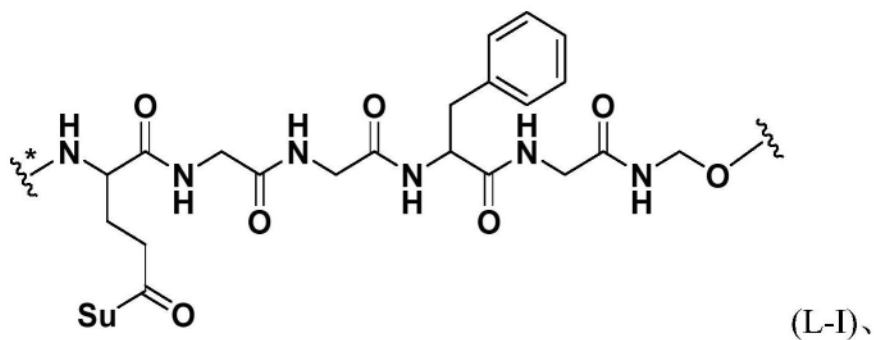


*标记C与Ab连接的键。

7. 如权利要求6所述的抗体药物缀合物, 其中C是



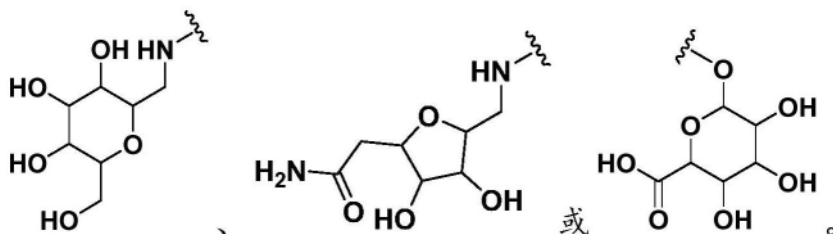
8. 如权利要求2至7中任一项所述的抗体药物缀合物, 其中L是选自 (L-I)、(L-II) 或 (L-III) 的式:



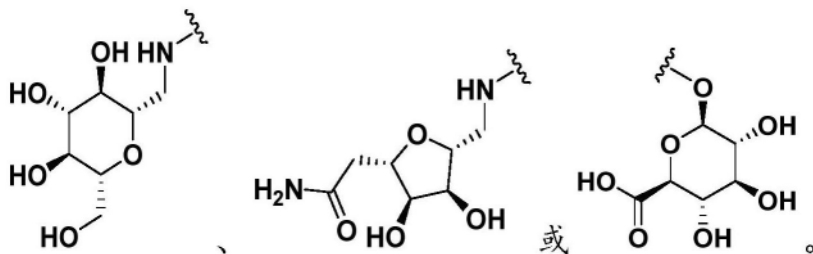
其中Su是亲水性残基;并且

*标记L与C连接的键。

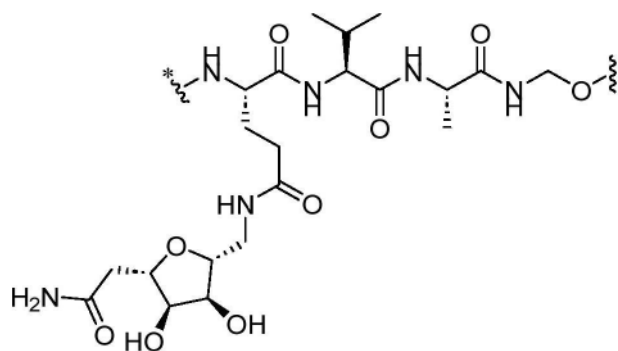
9. 如权利要求8所述的抗体药物缀合物, 其中Su是



10. 如权利要求9所述的抗体药物缀合物, 其中Su是



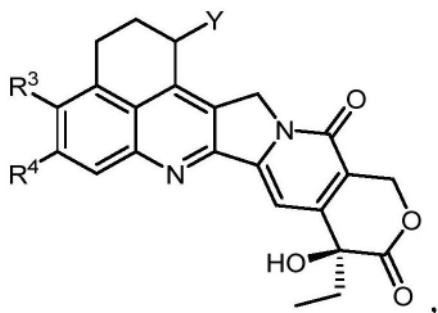
11. 如权利要求2至7中任一项所述的抗体药物缀合物,其中L是



其中*标记L与C连接的键。

12.如权利要求1至11中任一项所述的抗体药物缀合物,其中该细胞毒性剂是拓扑异构酶抑制剂。

13. 如权利要求2-12中任一项所述的抗体药物缀合物, 其中D是:



其中

Y是-A-B-C'-D'-*,其中*标记D与L连接的键;

A是键、 CR^1R^2 或 N-R^1 ;

B是键、 $-C(=O)-$ 或 $-C(=O)O-$ ；

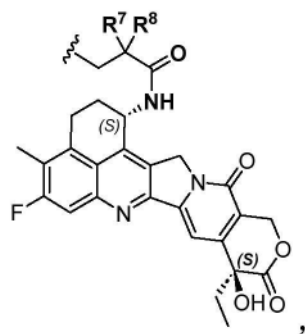
C'是键或二价基团,其中该二价基团是未取代或取代的C₁₋₈烷基、未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基;

D'是键、NH或0;

R^1 和 R^2 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基；或者 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基；

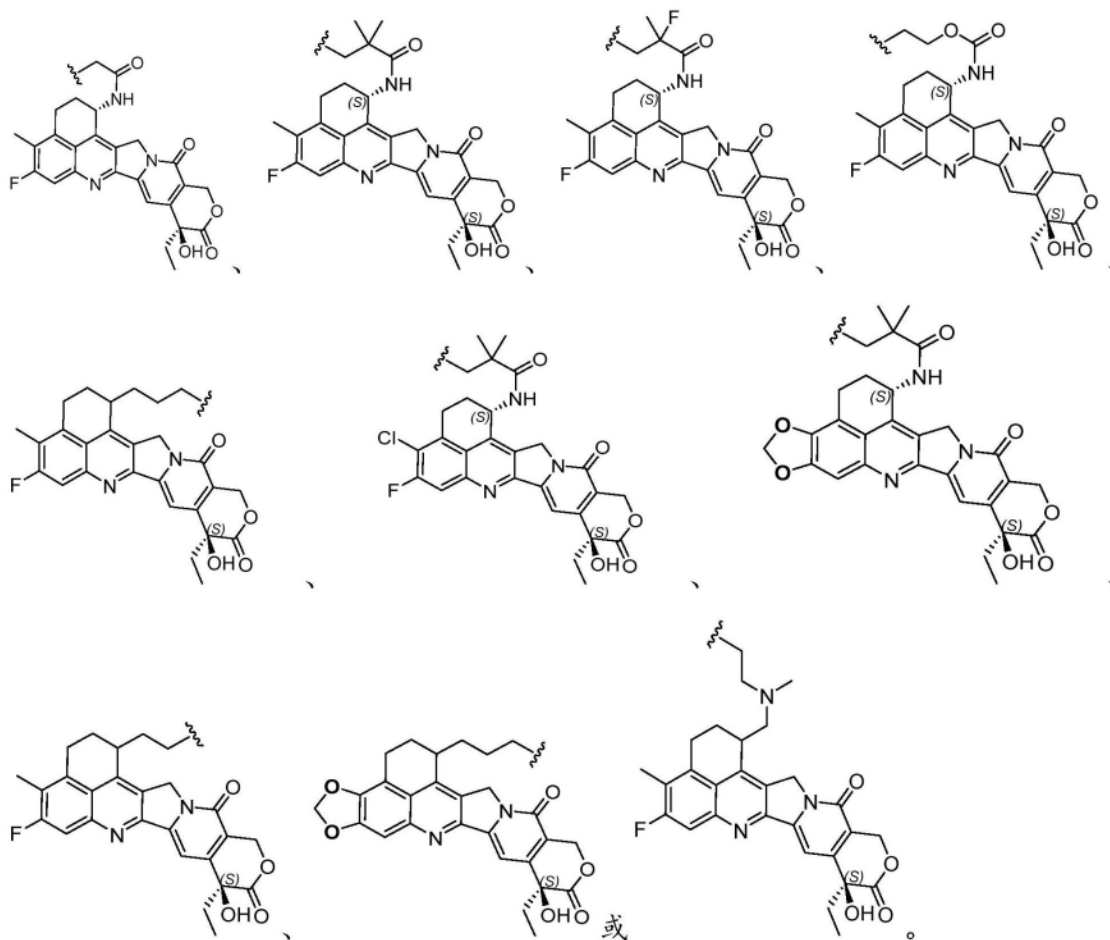
R^3 和 R^4 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基;或者 R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的抗体药物缀合物,其中D是:

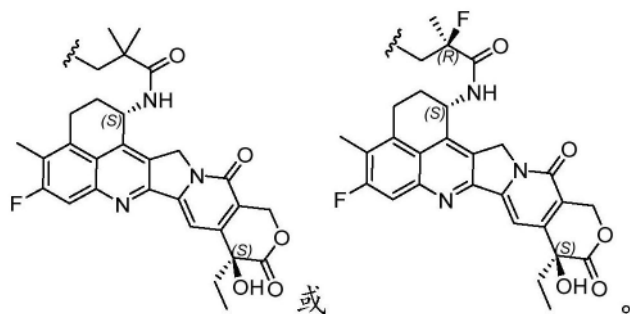


其中 R^7 和 R^8 各自独立地是氢、卤素或烷基。

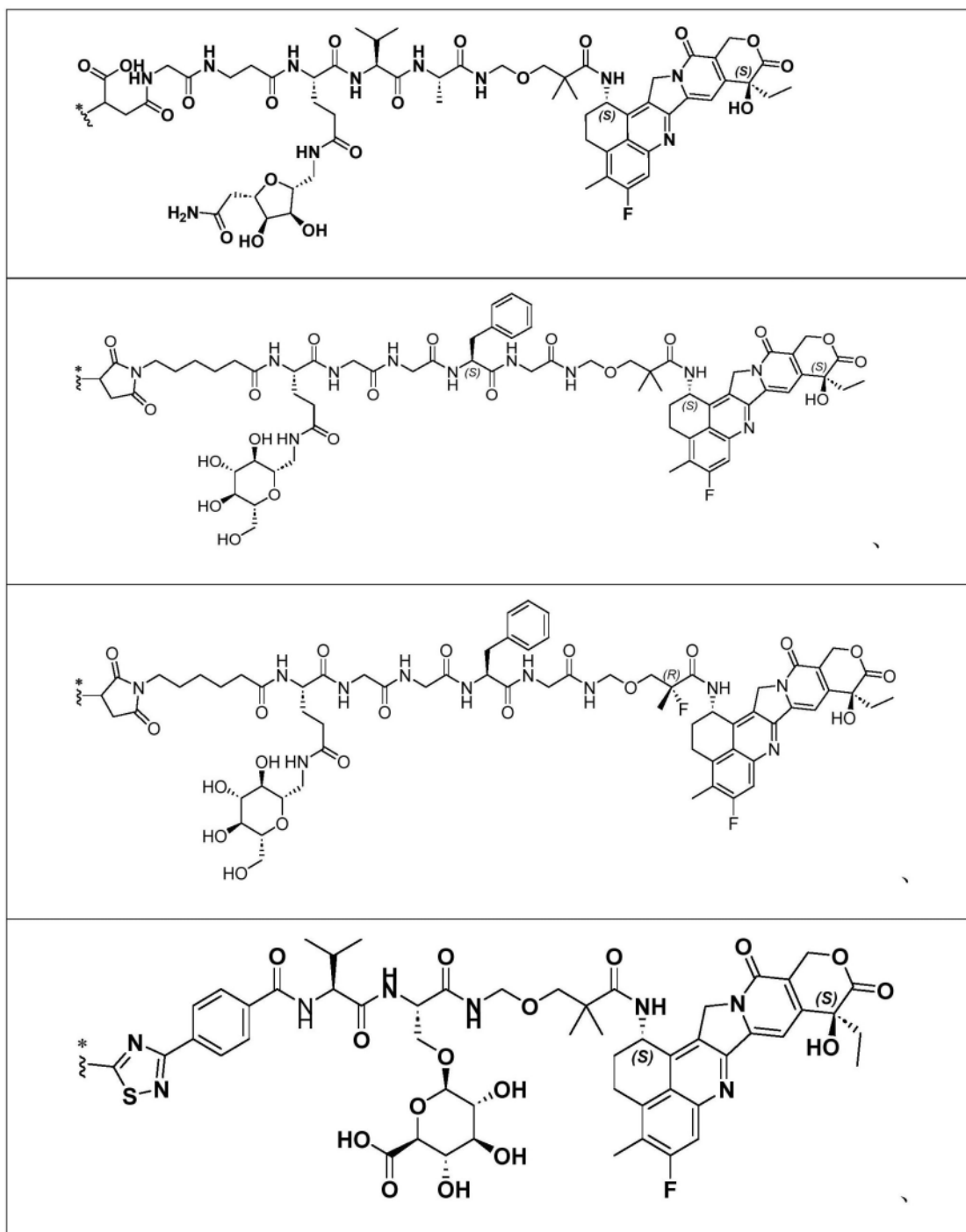
15. 如权利要求2-12中任一项所述的抗体药物缀合物,其中D选自:

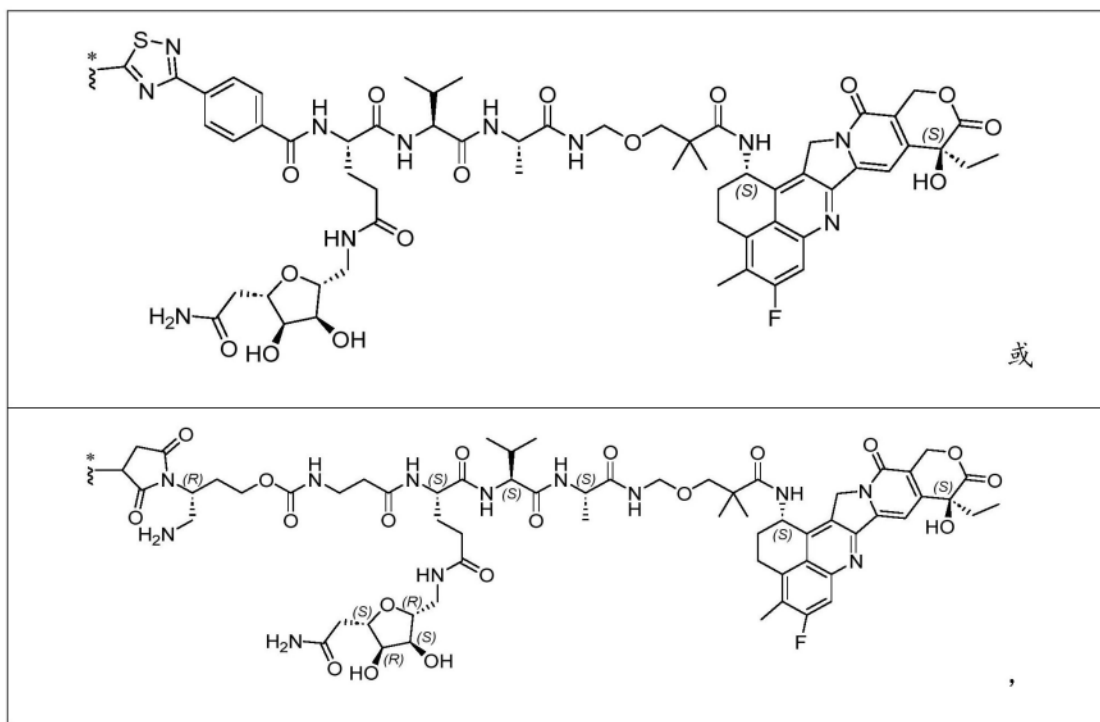


16. 如权利要求15所述的抗体药物缀合物,其中D是



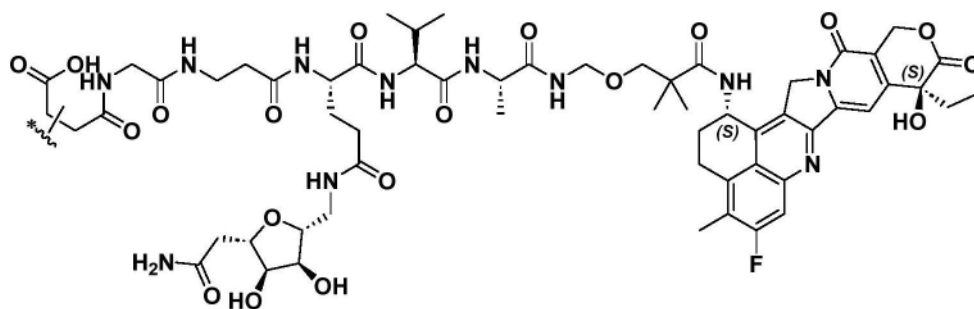
17. 如权利要求2至5中任一项所述的抗体药物缀合物,其中C-L-(D)_m是:



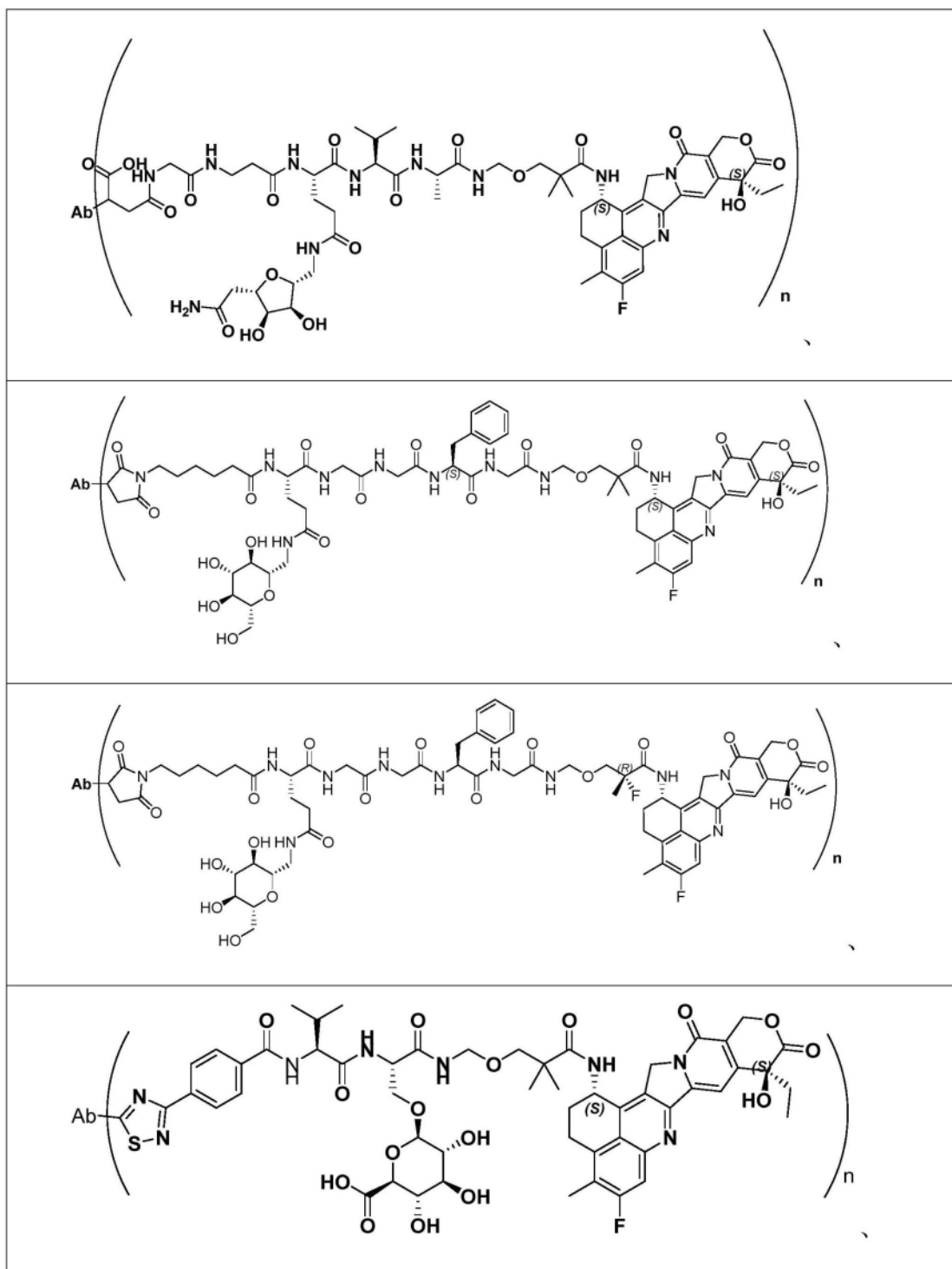


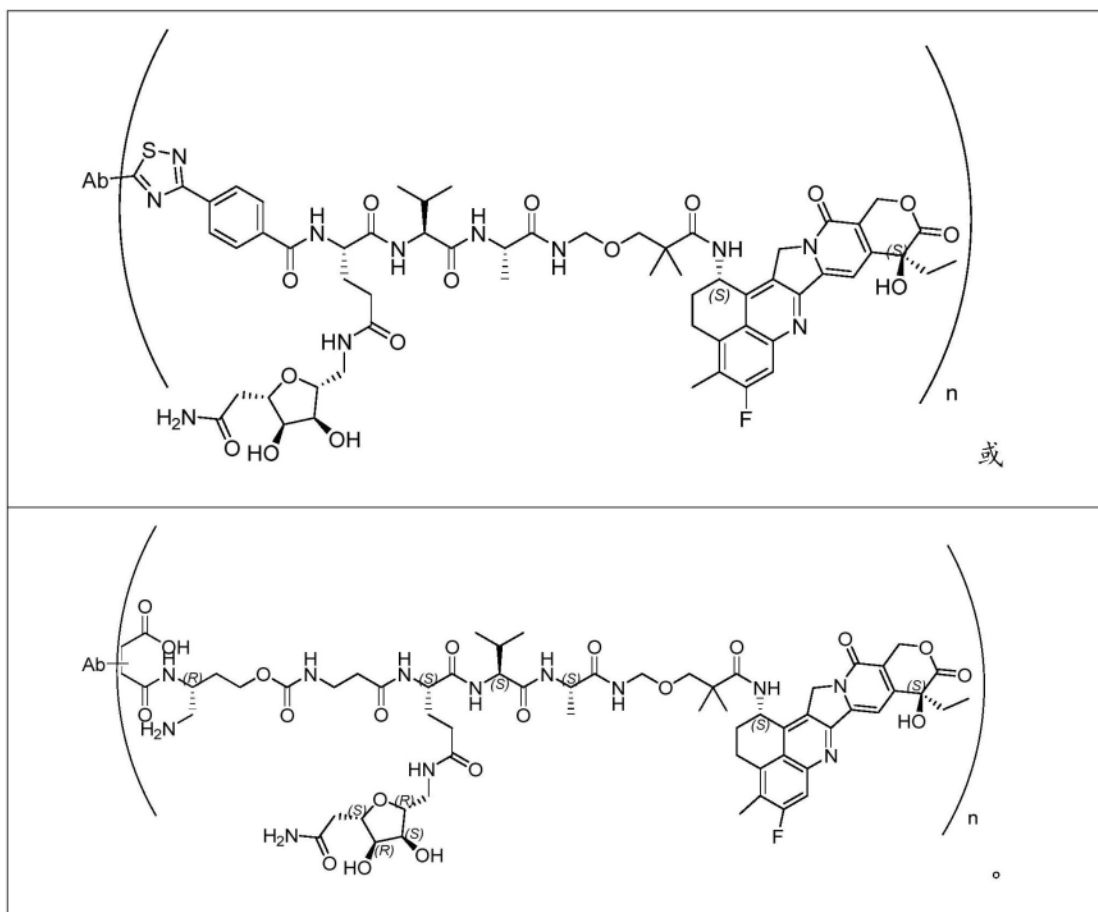
其中*标记C与Ab连接的键。

18. 如权利要求17所述的抗体药物缀合物,其中C-L-(D)_m是:



19. 如权利要求2-5中任一项所述的抗体药物缀合物,或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中该抗体药物缀合物具有下式中的一种:





20. 如权利要求1至19中任一项所述的抗体药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含:

- (i) 包含SEQ ID NO:31的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的轻链可变区;
- (ii) 包含SEQ ID NO:48的重链可变区和包含SEQ ID NO:49的轻链可变区;以及
- (iii) 包含SEQ ID NO:14的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的轻链可变区。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的抗体药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是单克隆抗体、人工程化抗体、单链抗体(scFv)、Fab片段、Fab'片段或F(ab')₂片段。

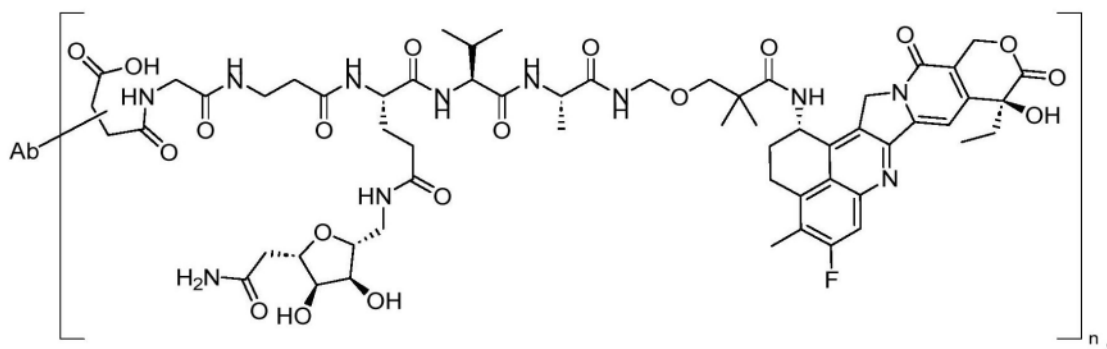
22. 如权利要求1至21中任一项所述的抗体药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含scFv,该scFv包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL。

23. 如权利要求1至21中任一项所述的抗体药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的scFv。

24. 如权利要求1至23中任一项所述的抗体药物缀合物,其中该抗体或其抗原结合片段包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的重链恒定区和/或κ或λ类型的轻链恒定区。

25. 如权利要求24所述的抗体药物缀合物,其中该抗体或其抗原结合片段包含IgG1亚类的重链恒定区和κ类型的轻链恒定区。

26. 一种下式的抗体药物缀合物:



或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中:

n是4至10;并且

Ab是抗体或其抗原结合片段,其结合CEA并且

包含:

(i) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(ii) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(iii) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

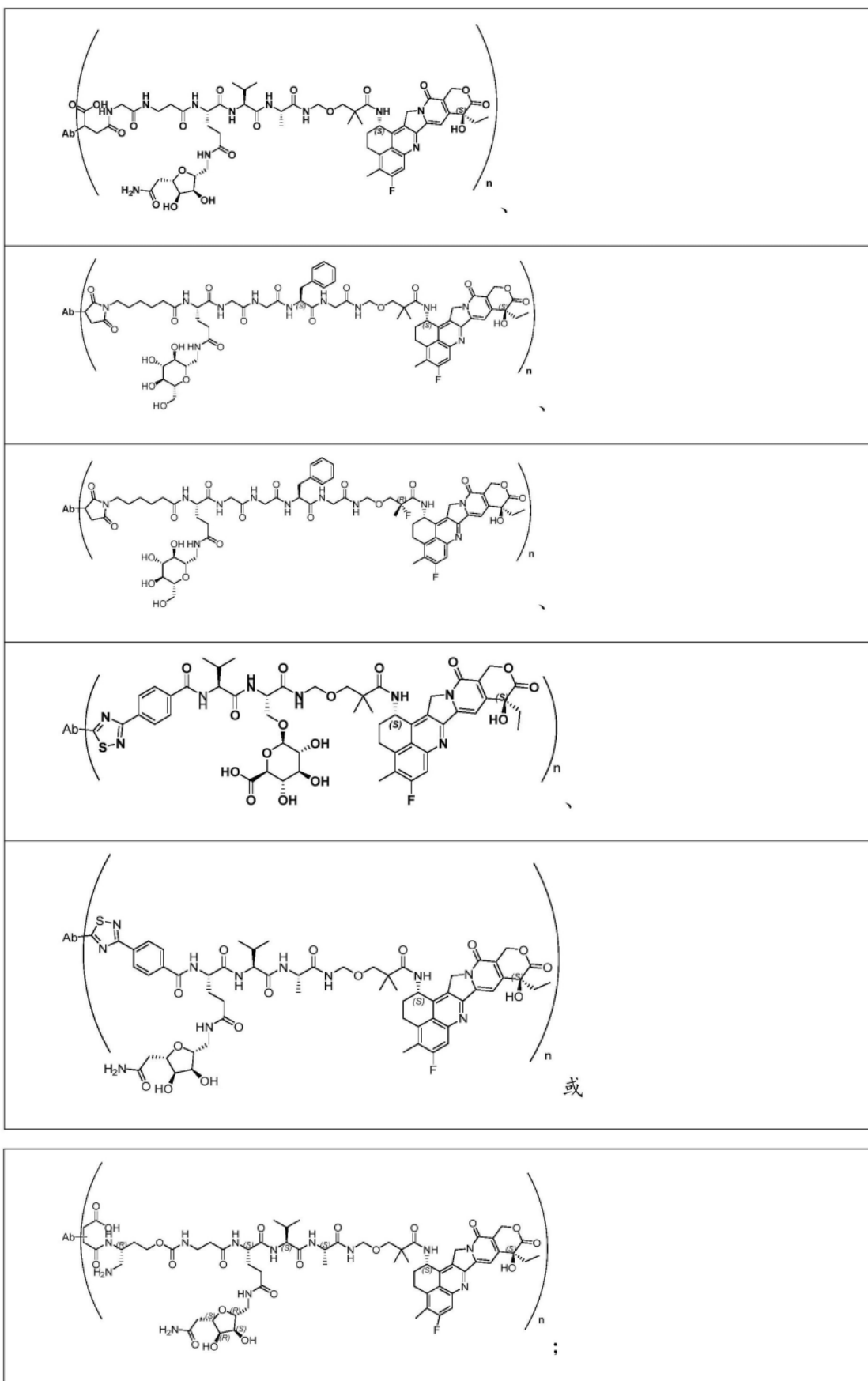
包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3。

27. 一种抗体药物缀合物,或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中

该抗体药物缀合物具有下式:



n是4至10;并且

Ab是抗体或其抗原结合片段,其结合CEA并且

包含:

(i) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(ii) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(iii) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3。

28. 一种药物组合物, 该药物组合物包含如权利要求1至27中任一项所述的抗体药物缀合物以及药学上可接受的载剂。

29. 一种治疗表达CEA的癌症的方法, 该方法包括向有需要的受试者施用有效量的如权利要求1至27中任一项所述的抗体药物缀合物或如权利要求28所述的药物组合物。

30. 如权利要求29所述的方法, 其中该表达CEA的癌症是肺癌、胃肠癌或结直肠癌。

31. 如权利要求30所述的方法, 其中该肺癌是非小细胞肺癌。

32. 如权利要求30所述的方法, 其中该胃肠癌是胃癌。

33. 如权利要求30所述的方法, 其中该结直肠癌是直肠癌。

34. 一种产生如权利要求1至27中任一项所述的抗体药物缀合物的方法, 该方法包括:

(i) 培养已被分离的核酸转化的宿主细胞, 该分离的核酸包含编码该抗体或其抗原结合片段的序列, 其中该抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链;

(ii) 表达该抗体或其抗原结合片段;

(iii) 回收所表达的抗体或其抗原结合片段; 以及

(iv) 使用接头将该细胞毒性剂缀合到该抗体或其片段,使得形成该抗体药物缀合物。

35. 一种抗CEA抗体药物缀合物,该抗CEA抗体药物缀合物包含以下中的任一种:如表18所示的BGA2588、BGA9962、BGA8357、BGA0084、BGA7413、BGA2490和BGA0179。

抗CEA抗体药物缀合物和使用方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年11月24日提交的标题为“Anti-CEA Antibody Drug Conjugates and Methods of Use[抗CEA抗体药物缀合物和使用方法]”的PCT申请号PCT/CN2022/134067和2023年7月12日提交的标题为“Anti-CEA Antibody Drug Conjugates and Methods of Use[抗CEA抗体药物缀合物和使用方法]”的PCT申请号PCT/CN2023/107003的优先权权益,这些PCT申请特此通过援引以其全文并入。

电子序列表的引用

[0002] 本申请包含已经以.XML格式电子提交的序列表并且该序列表特此通过援引以其全文并入。创建于2023年11月20日的所述.XML副本被命名为“01368-0008-00PCT.xml”并且大小为156,334字节。包含在此.XML文件中的序列表是说明书的一部分并且特此通过援引以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本文披露了包含与人CEA结合并与生长抑制剂共价连接的抗体或其抗原结合片段的抗CEA抗体药物缀合物(ADC),以及其治疗用途。

背景技术

[0004] 抗体药物缀合物(ADC)是嵌合分子,其组合了抗体特异性(以识别抗原诸如肿瘤相关抗原(TAA)并以高亲和力与其结合)与药物(诸如毒素)的强效酶活性(以诱导靶细胞死亡)。目前的ADC存在一些治疗局限性,因此需要开发具有优化特性的新原型。

[0005] 癌胚抗原(CEA,也称为CEACAM5或CD66e)是一种糖蛋白,其分子量为约70-100kDa,取决于所存在的糖基化的量。CEA是一种TAA,最初被描述为结直肠癌中的癌胚蛋白。CEA在上皮来源的成人组织诸如结肠、胃、舌、子宫颈和前列腺中以低水平存在。CEA在非肿瘤细胞中限于顶端表面,但在癌细胞中遍布整个细胞膜。已经在许多类型的癌症(包括结直肠癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、肝细胞癌、乳腺癌和甲状腺癌)中观察到CEA过表达。例如,在结肠的柱状上皮细胞和杯状细胞中发现CEA。在由这些组织类型产生的肿瘤中,CEA表达从顶端膜到细胞表面增加,并且一旦从细胞表面除去,就进入血流。CEA从肿瘤细胞中持续释放,在外周血中达到可检测的浓度,因此CEA定量经常用于诊断癌症。因此,在癌症的预后和管理中,CEA可用作诊断性肿瘤标志物来确定癌症患者血液中升高的CEA水平。

[0006] CEA也被认为是用于靶向疗法的一种有用肿瘤相关抗原。已经产生了展示抗CEA scFv的逆转录病毒构建体,以将一氧化氮合酶(iNOS)基因递送到表达CEA的癌细胞。已经使用与放射性同位素缀合的抗CEA抗体来证明辐射特异性针对表达CEA的肿瘤。放射性同位素方法已经扩展成抗CEA抗体药物缀合物(ADC),诸如通过将抗CEA抗体缀合到一甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

[0007] 然而,抗CEA抗体遇到的问题之一是交叉反应性。CEA与其他CEACAM家族成员高度同源。例如,人CEA显示与CEACAM6有84%的同源性,与CEACAM8有77%的同源性,并且与

CEACAM1有73%的同一性。因此,需要对CEA特异并且不与人CEACAM1、人CEACAM6、人CEACAM7或人CEACAM8发生显著交叉反应的抗CEA抗体。此外,仍然需要具有高效抗肿瘤活性以及强效且非交叉反应性抗CEA靶向特异性的抗CEAACDC。

发明内容

[0008] 本披露涵盖至少以下实施例。

[0009] 本披露涉及抗体药物缀合物(ADC),这些抗体药物缀合物包含能够与人CEA特异性结合的抗体或其抗原结合片段(Ab)以及细胞毒性剂(D)。

[0010] 在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段(Ab)包含:

(i)

三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(ii)

三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(iii)

三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3。

[0011] 在某些实施例中,本披露涉及一种包含下式的抗体药物缀合物: $Ab-(C-L-(D))_n$ 或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物;其中

Ab是该抗体或其抗原结合片段;

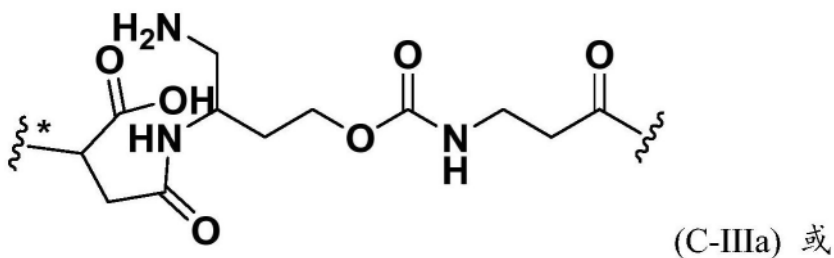
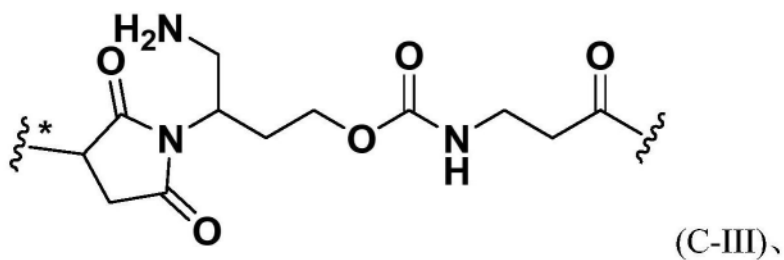
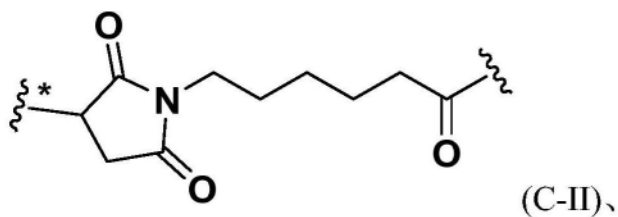
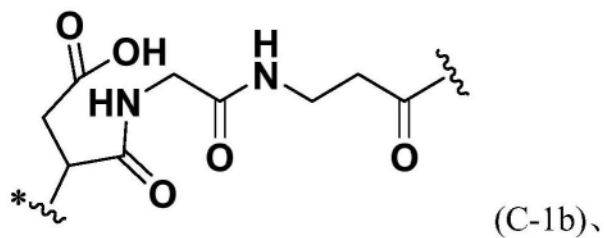
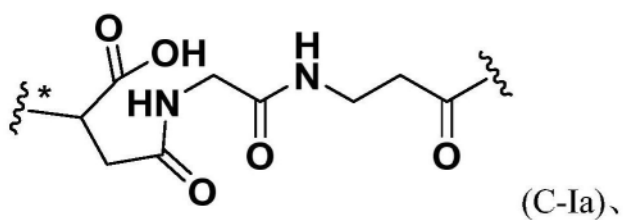
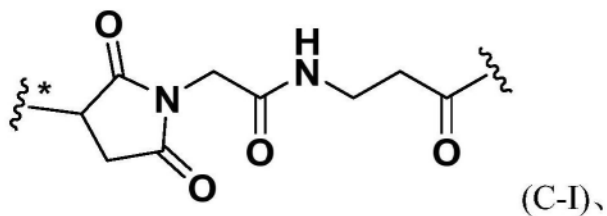
C是缀合部分;

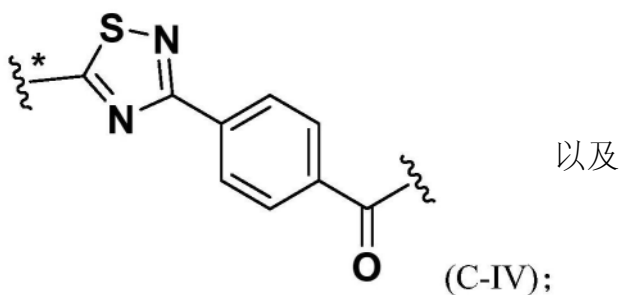
L是接头;

D是细胞毒性剂；
m是1至8的整数；以及
n是1至10。

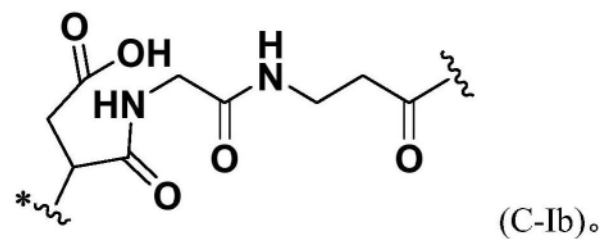
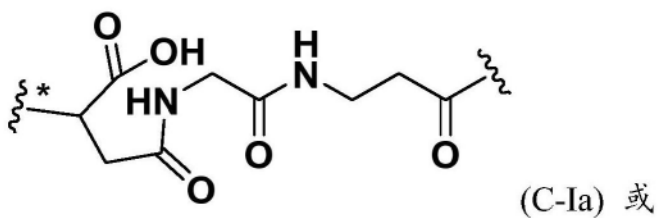
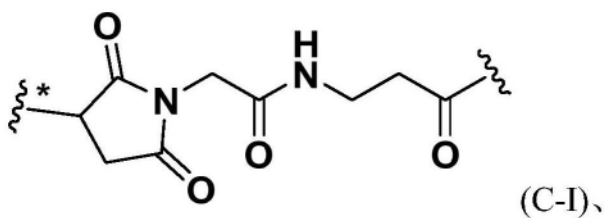
[0012] 在某些实施例中,m是1。应当理解,当m是1时,抗体药物缀合物包含(例如,具有)下式:Ab-(C-L-D)_n。

[0013] 在某些实施例中,C是选自(C-I)、(C-Ia)、(C-Ib)、(C-II)、(C-III)、(C-IIIa)或(C-IV)的式:

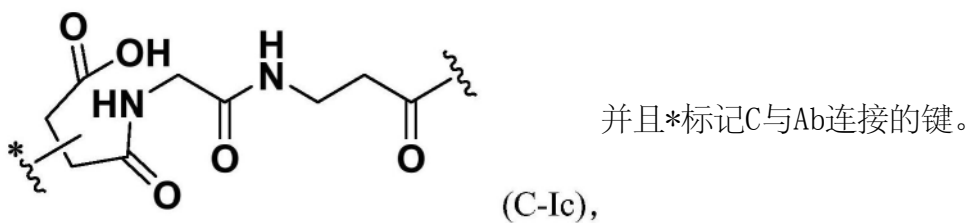




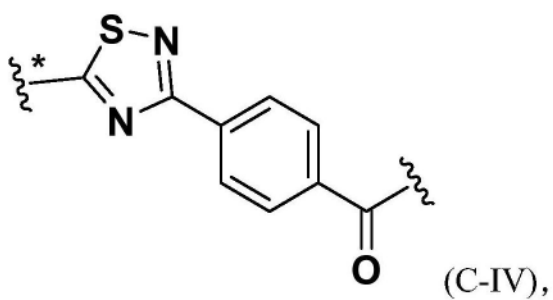
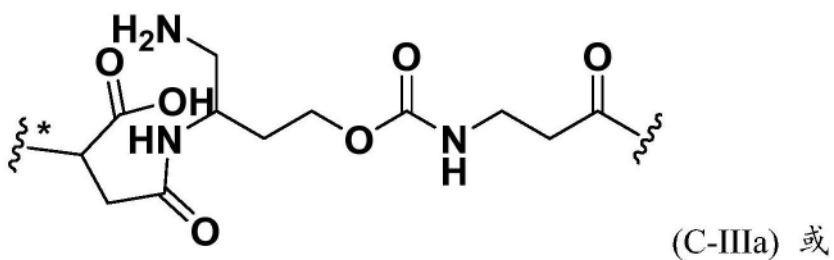
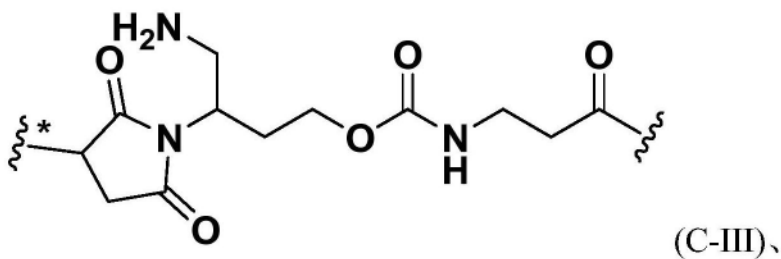
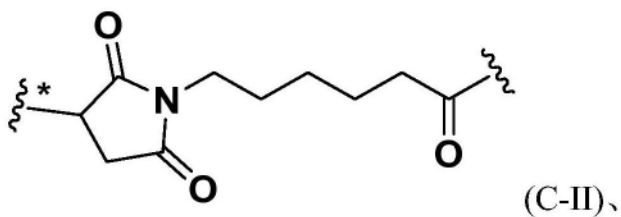
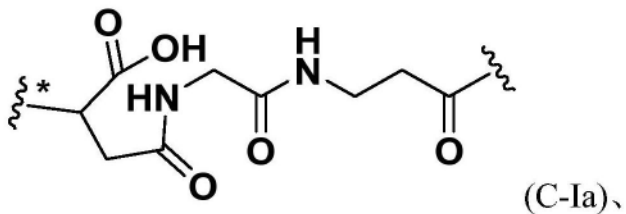
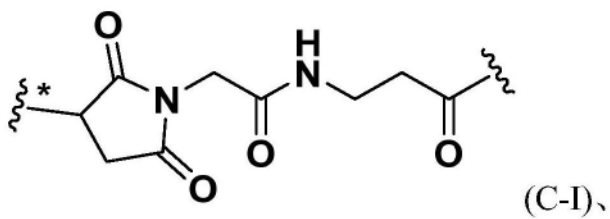
*标记C与Ab连接的键。在某些实施例中,C是选自以下的式:



[0014] 在某些实施例中,C是 (C-Ic) :

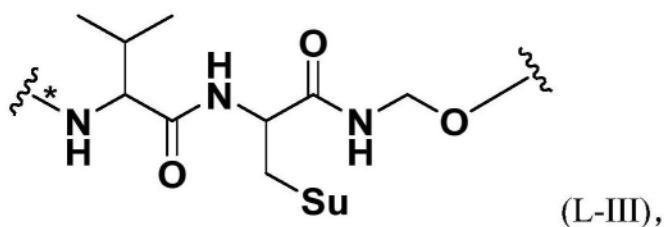
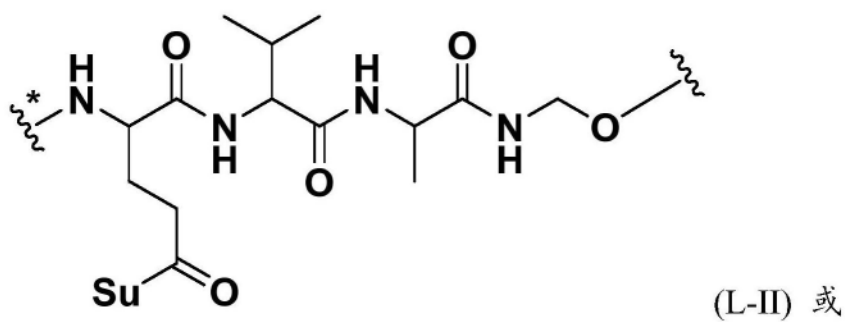
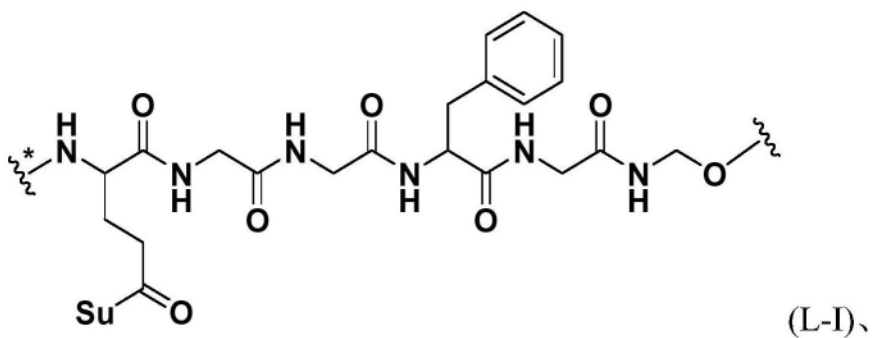


[0015] 在某些实施例中,C包含(例如,具有)下式 (C-I)、(C-Ia)、(C-II)、(C-III)、(C-IIIa) 或 (C-IV) :



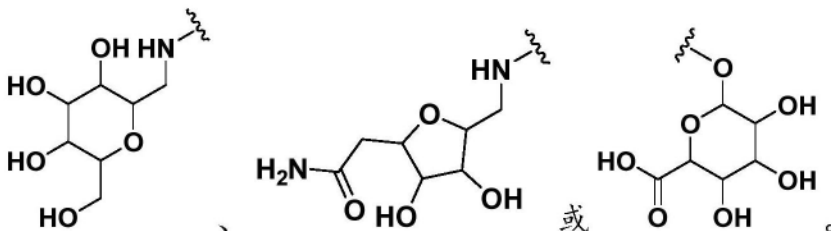
其中*标记缀合部分与Ab连接的键。

[0016] 在某些实施例中,L包含(例如,具有)下式(L-I)、(L-II)或(L-III):

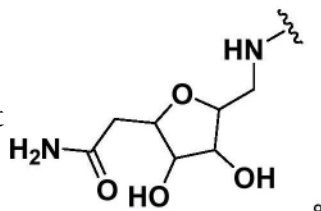


其中Su是亲水性残基;以及
*标记接头与缀合部分连接的键。

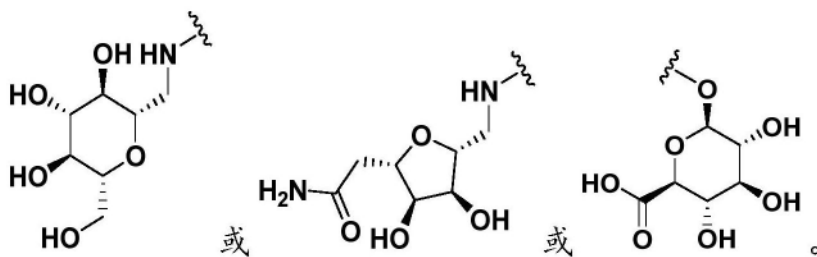
[0017] 在某些实施例中,Su是



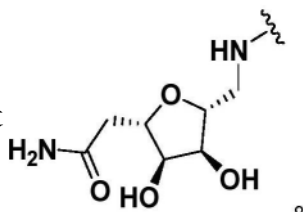
[0018] 在某些实施例中,Su是



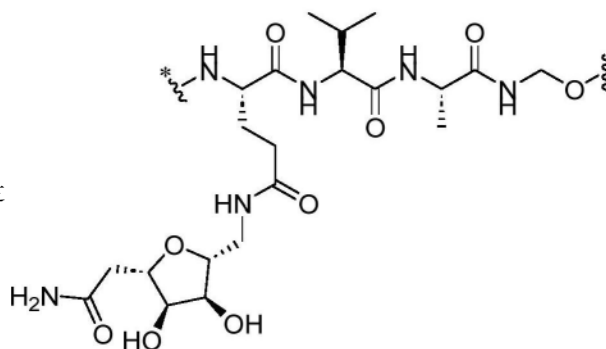
[0019] 在某些实施例中,Su是



[0020] 在某些实施例中,Su是



[0021] 在某些实施例中,L是

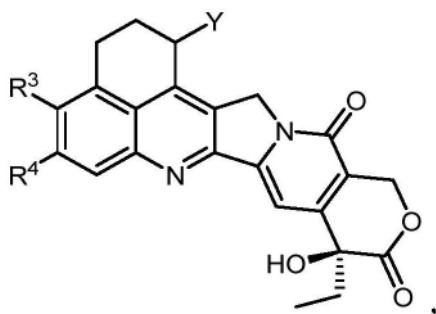


其中*标记L与

C连接的键。

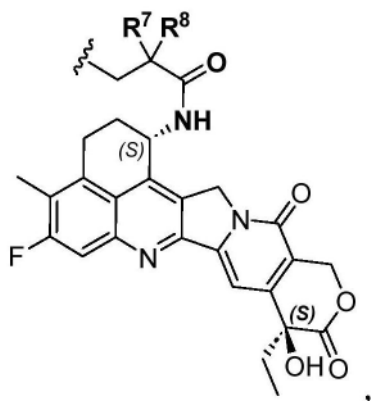
[0022] 在某些实施例中,细胞毒性剂(D)是拓扑异构酶抑制剂。

[0023] 在某些实施例中,D是:



其中变量(例如,Y、R³、R⁴)的值如本文所述。

[0024] 在某些实施例中,D具有以下结构式:

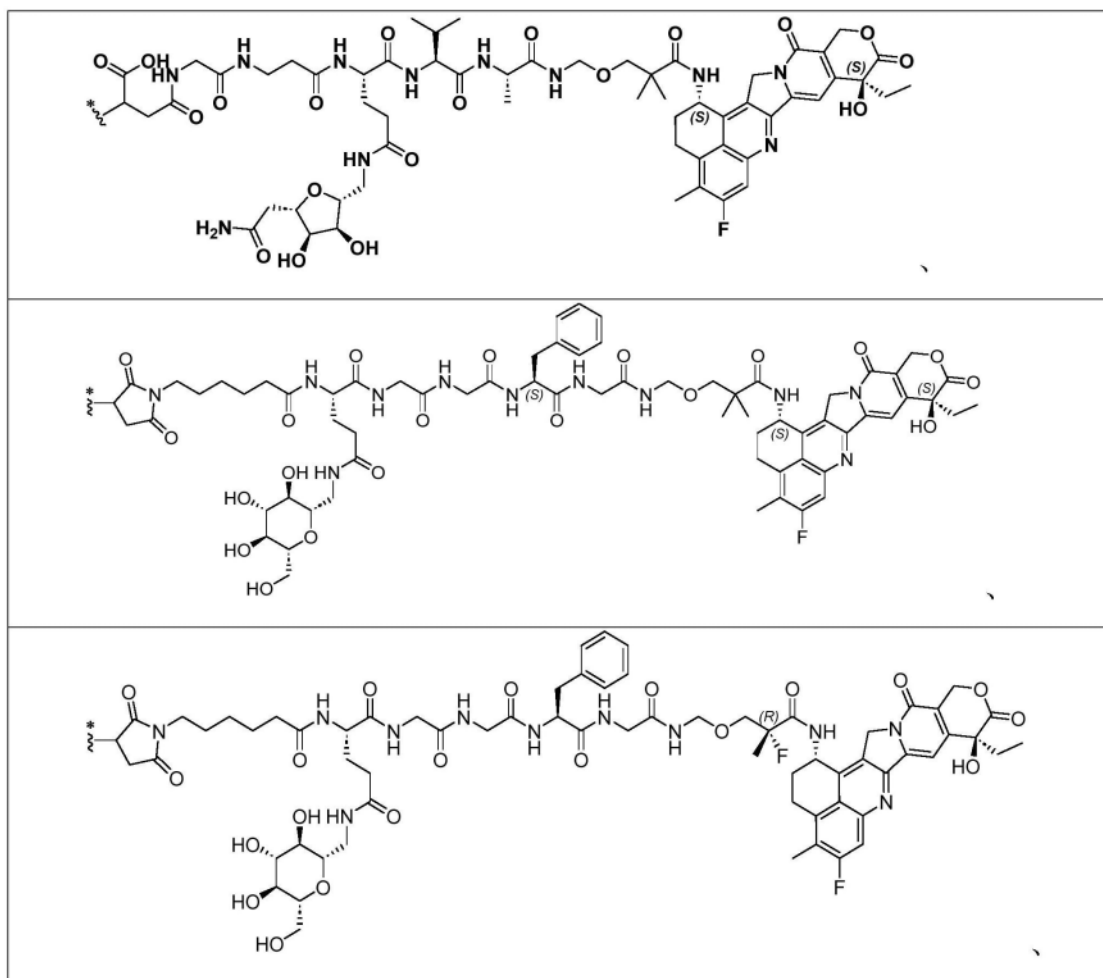


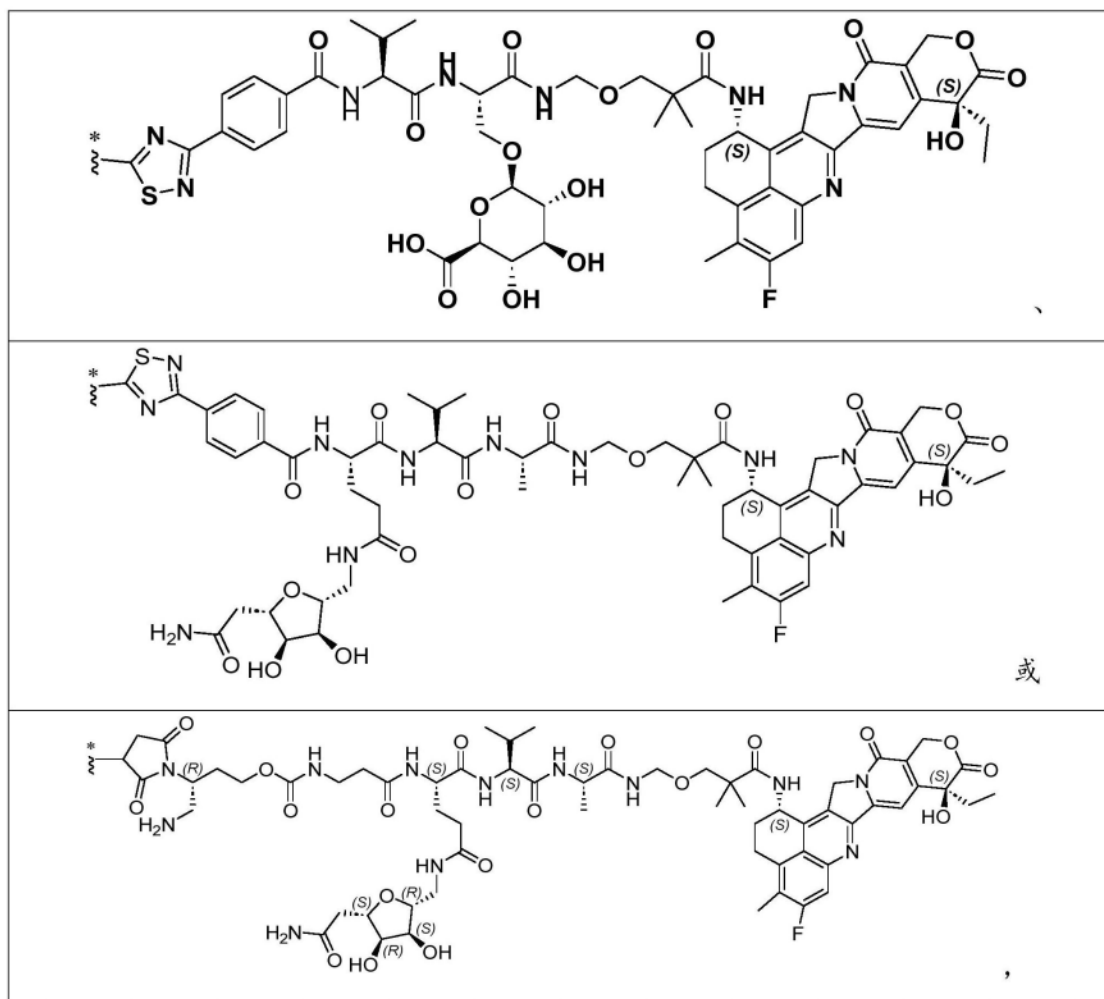
其中变量(例如,R⁷、R⁸)的值如本文所述。

The image displays seven chemical structures of various compounds, including substituted quinolines and indoles. The structures are arranged in three rows. The first row contains four structures, the second row contains three, and the third row contains two. Each structure features a complex polycyclic core with various substituents, including fluorine, methyl, and wavy lines indicating further substitution. Stereochemical labels (S) are present on several chiral centers, and wavy lines indicate points of attachment for other groups. The structures are separated by commas, and the last structure in the third row is followed by a period.

The chemical structure shows a complex molecule. It features a fluorinated benzene ring (with a fluorine atom at the 6-position) fused to a quinuclidine-like system. This system is further fused to a lactone ring (a five-membered ring with an oxygen atom and a carbonyl group). Stereochemistry is indicated with (S) labels and wedged bonds. A wavy line is present on a side chain.

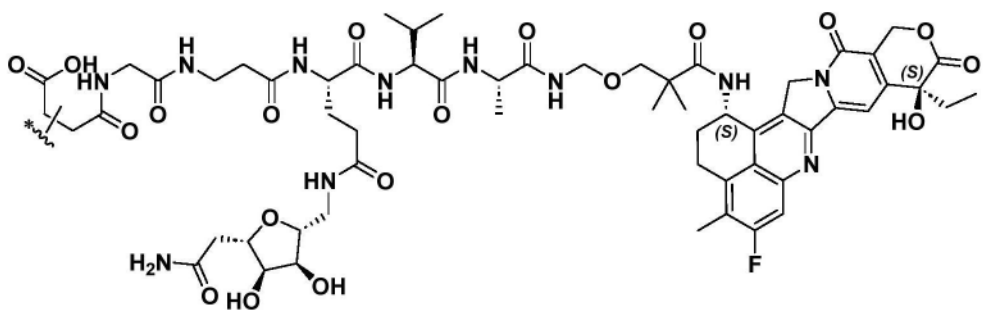
23





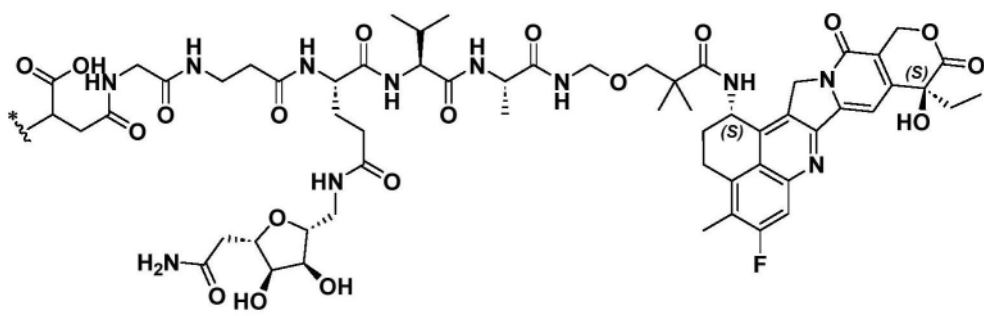
其中*标记C与Ab连接的键。

[0029] 在某些实施例中,C-L- (D)_m是:



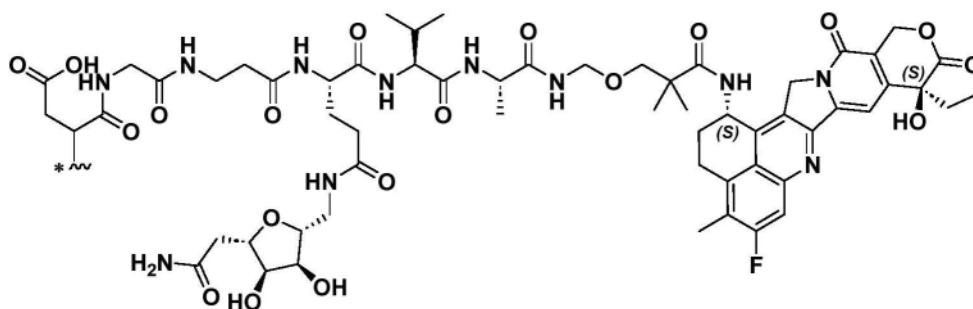
其中*标记C与Ab连接的键。

[0030] 在某些实施例中,C-L- (D)_m是:



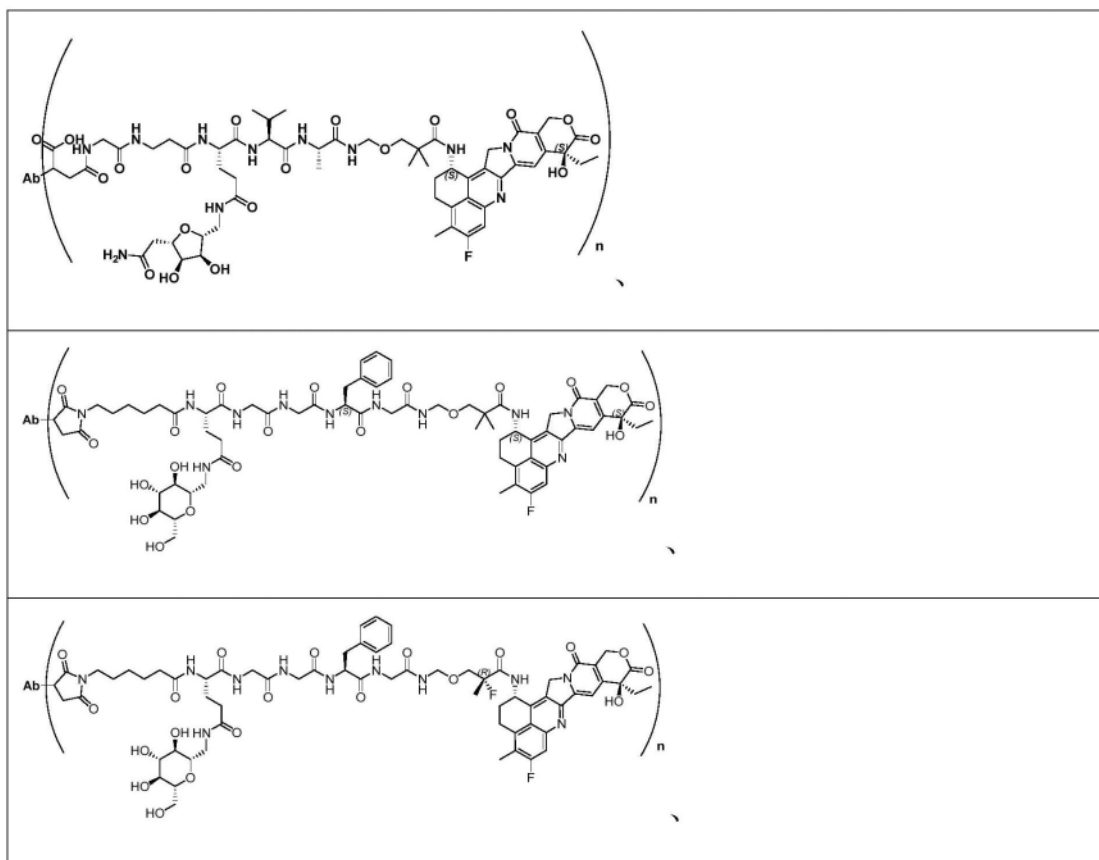
其中*标记C与Ab连接的键。

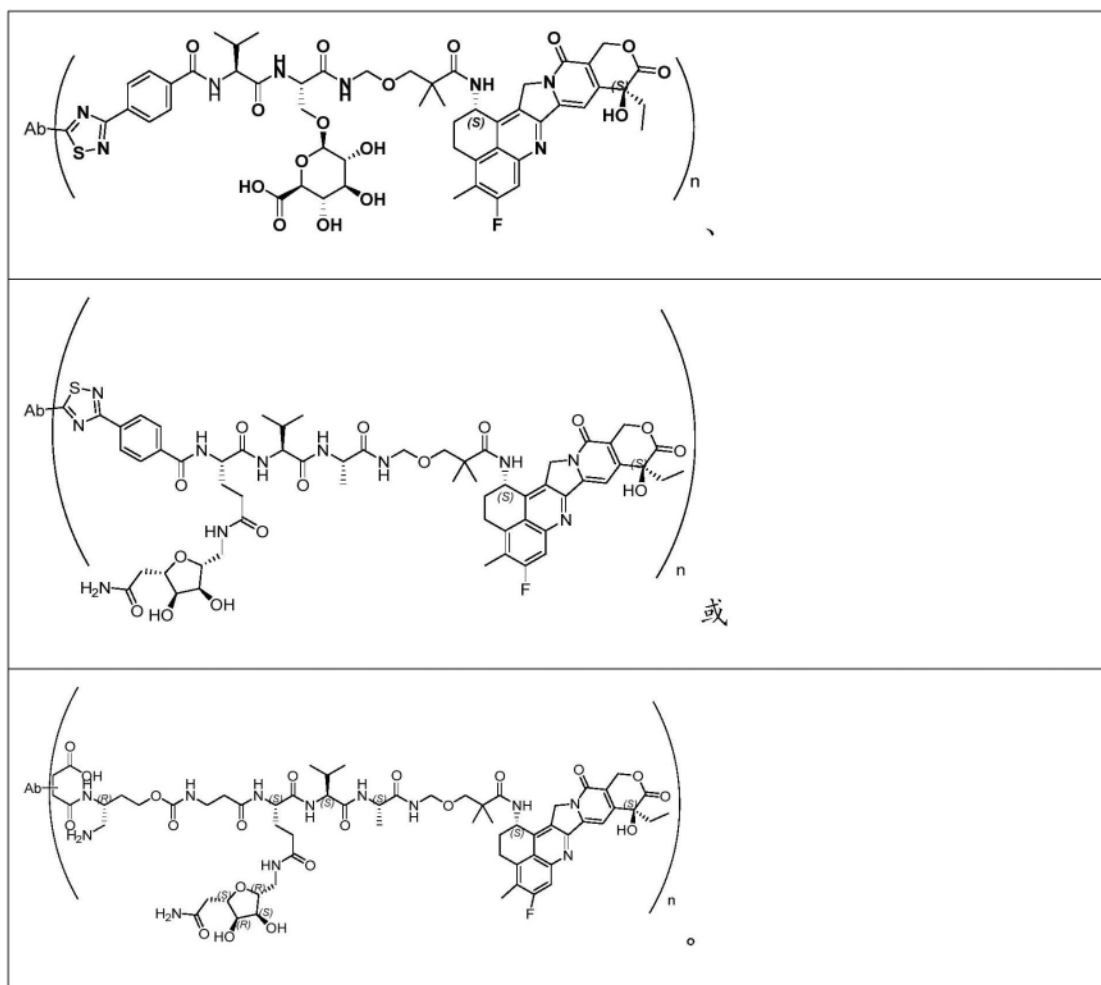
[0031] 在某些实施例中, C-L- (D)_m 是:



其中*标记C与Ab连接的键。

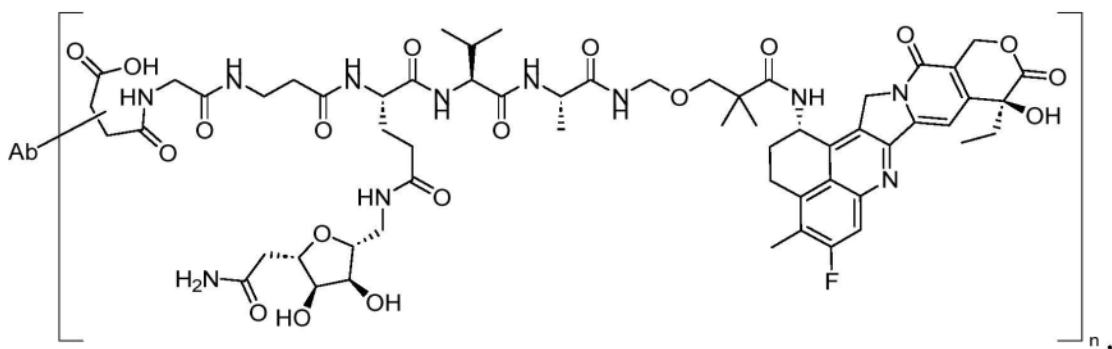
[0032] 在某些实施例中, 抗体药物缀合物是:





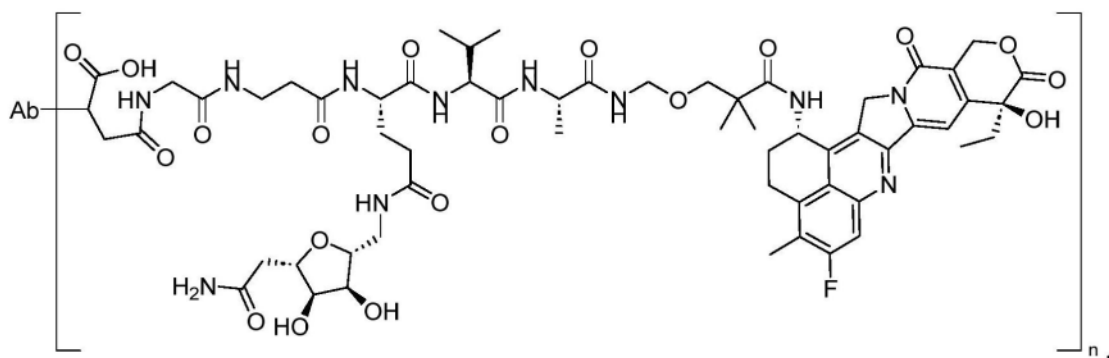
或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中Ab是如本文所述的抗CEA抗体或其抗原结合片段,并且 n 如本文所述,例如介于1与10之间,优选地是约7、8或9。

[0033] 在某些实施例中,抗体药物缀合物具有下式:



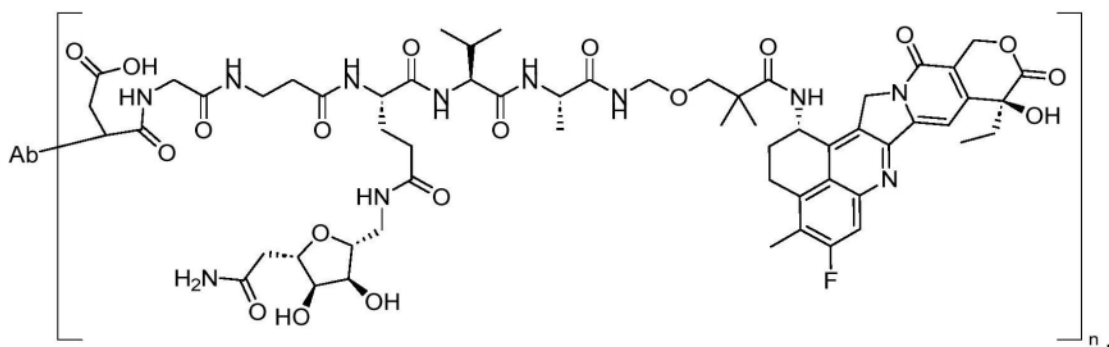
或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中Ab和 n 如本文所述。

[0034] 在某些实施例中,抗体药物缀合物具有下式:



或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中Ab和 n 如本文所述。

[0035] 在某些实施例中,抗体药物缀合物具有下式:



或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中Ab和 n 如本文所述。

[0036] 在某些实施例中, n 是3至10,例如4至10、5至10、6至10或7至9。在某些实施例中, n 是约8。

[0037] 在某些实施例中,本披露涉及一种包含抗CEA抗体或抗原结合片段的抗体药物缀合物,其中抗体或抗原结合片段包含:

(i) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(ii) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(iii) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(iv) 包含SEQ ID NO:31的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的轻链可变区;

(v) 包含SEQ ID NO:48的重链可变区和包含SEQ ID NO:49的轻链可变区;或者

(vi) 包含SEQ ID NO:14的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的轻链可变区;或者

(vii) 包含与SEQ ID NO:31具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:32具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;或者

(viii) 包含与SEQ ID NO:48具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:49具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;或者

(ix) 包含与SEQ ID NO:14具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:15具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区。

[0038] 在某些实施例中,抗体或抗原结合片段是单克隆抗体、人工程化抗体、单链抗体(scFv)、Fab片段、Fab'片段或F(ab')₂片段。

[0039] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含scFv,该scFv包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VL。

[0040] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含scFv,该scFv包含具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的VL。

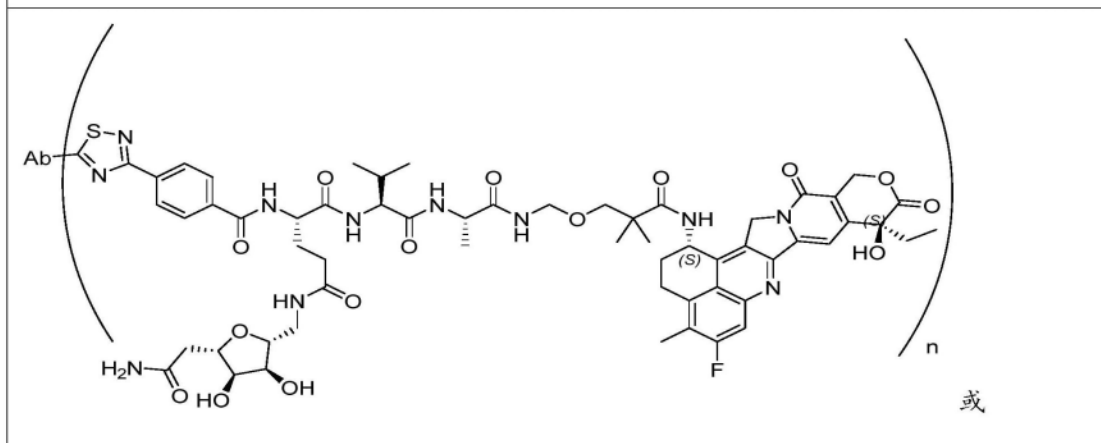
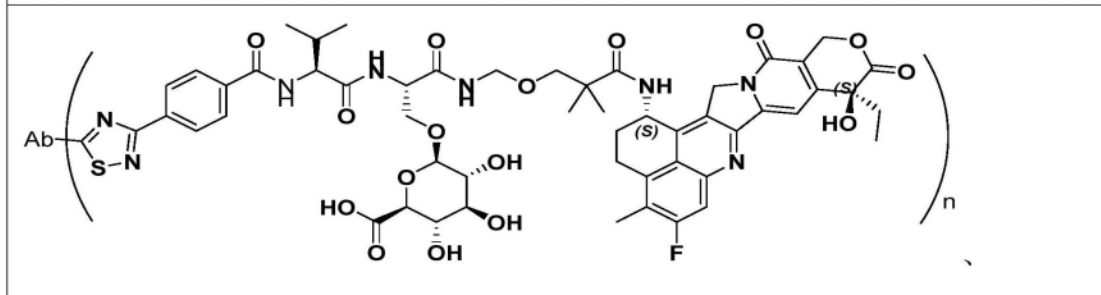
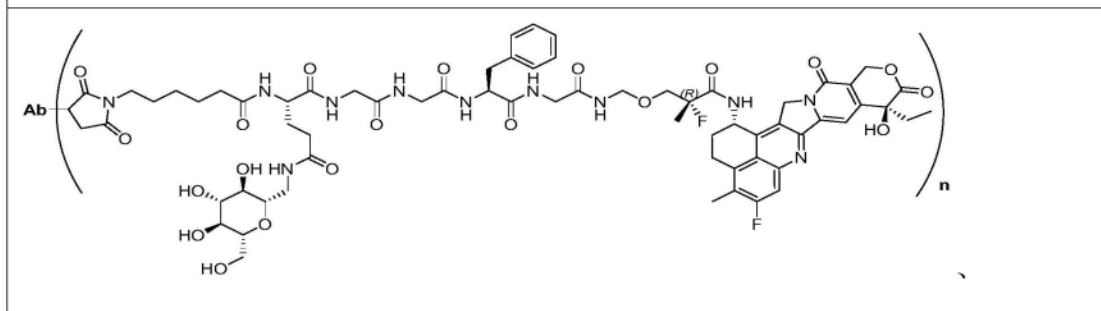
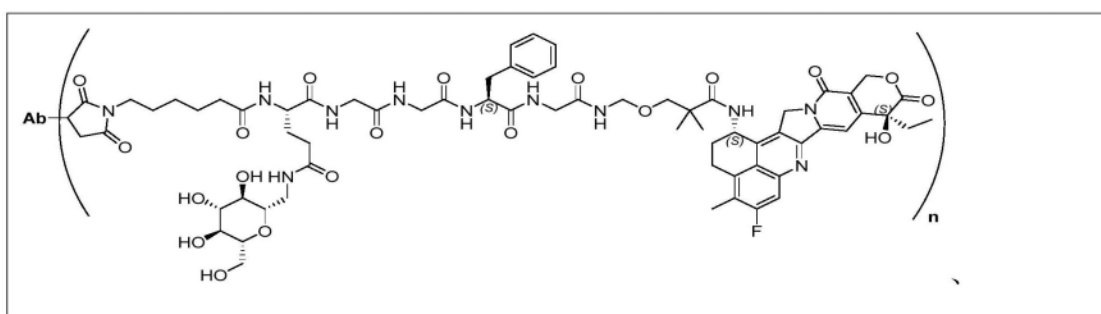
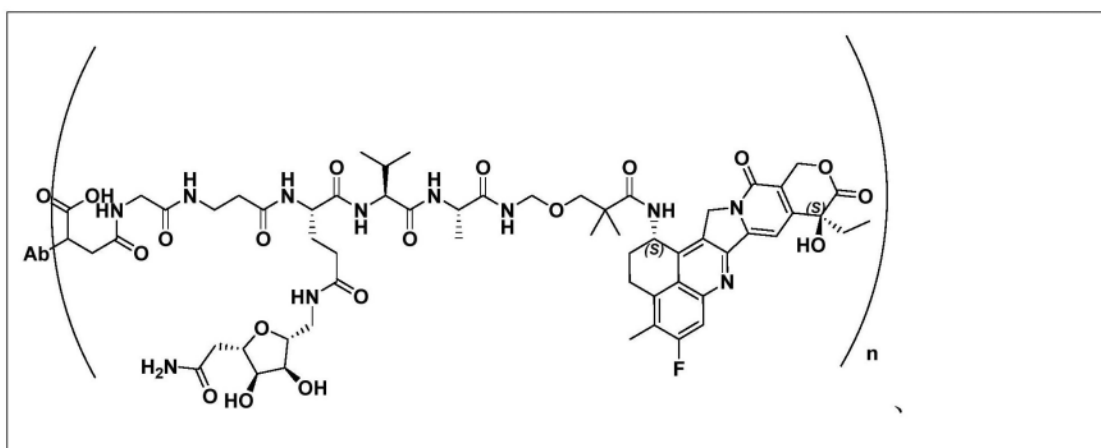
[0041] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含scFv,该scFv包含具有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的VL。

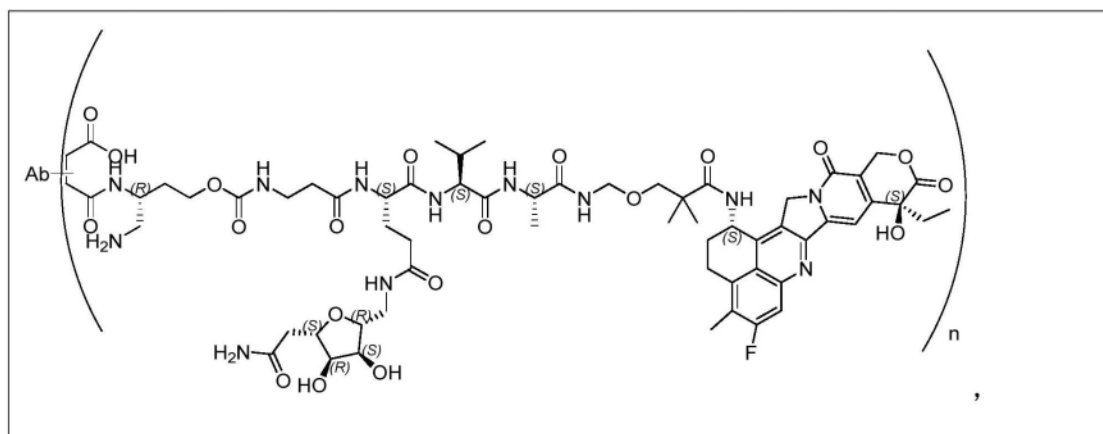
[0042] 在某些实施例中,抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:48的氨基酸序列的scFv。

[0043] 在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚类的重链恒定区和/或κ或λ类型的轻链恒定区。

[0044] 在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段包含IgG1亚类的重链恒定区和κ类型的轻链恒定区。

[0045] 在某些实施例中,本披露涉及一种下式中的任一种的抗体药物缀合物:





或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物；其中n是4至10，例如4、5、6、7、8、9或10；Ab是结合CEA的抗体或其抗原结合片段；以及

该抗体或抗原结合片段包含：

(i)

三个重链CDR：

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1，包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2，包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3，以及三个轻链CDR：

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1，包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2，包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3；或者

(ii)

三个重链CDR：

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1，包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2，包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3，以及三个轻链CDR：

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1，包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2，包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3；或者

(iii)

三个重链CDR：

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1，

包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2，

包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3，以及

三个轻链CDR：

包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1，

包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2，

包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3；或者

(iv) 包含SEQ ID NO:31的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的轻链可变区；

(v) 包含SEQ ID NO:48的重链可变区和包含SEQ ID NO:49的轻链可变区；或者

(vi) 包含SEQ ID NO:14的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的轻链可变区；或者

(vii) 包含与SEQ ID NO:31具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:32具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区；或者

(viii) 包含与SEQ ID NO:48具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:49具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;或者

(ix) 包含与SEQ ID NO:14具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:15具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区。

[0046] 在某些实施例中,n是约8。

[0047] 在某些实施例中,本披露涉及一种药物组合物,该药物组合物包含如上文和本文所述的抗体药物缀合物以及药学上可接受的载剂。

[0048] 在某些实施例中,本披露涉及一种治疗患有CEA相关疾病或障碍(例如,表达或积累CEA的细胞)的受试者(例如,患者)的方法,该方法包括向有需要的受试者(例如,患者)施用有效量的本文所述的抗体药物缀合物或包含该抗体药物缀合物的药物组合物。在一些实施例中,表达或积累CEA的细胞是癌细胞。

[0049] 在某些实施例中,本披露涉及一种与包含下式的化合物缀合的抗CEA抗体:

C-L-D

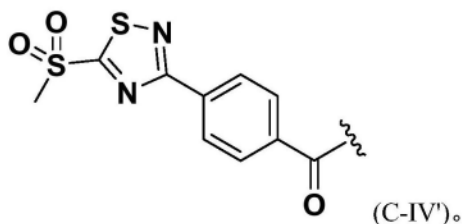
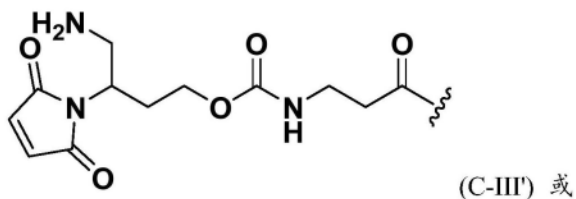
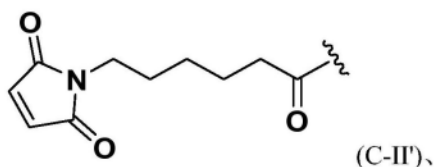
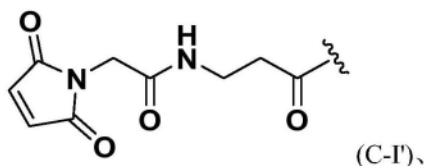
或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物;其中

C是缀合部分;

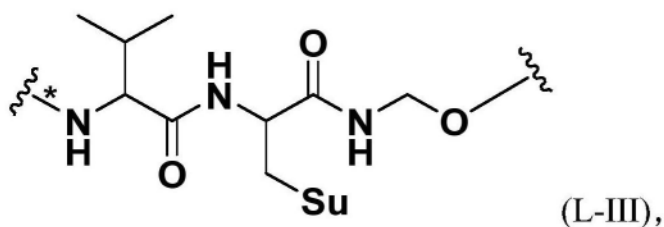
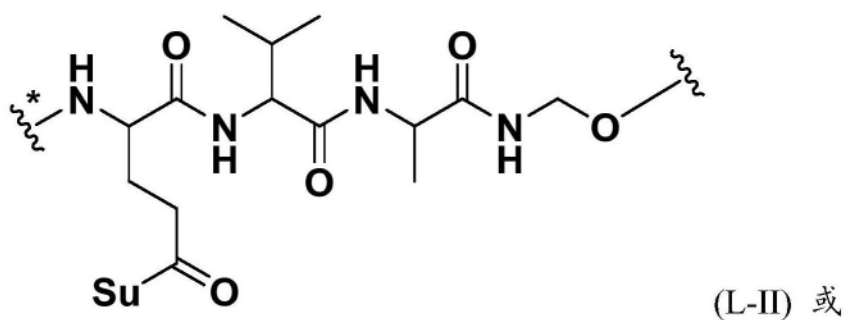
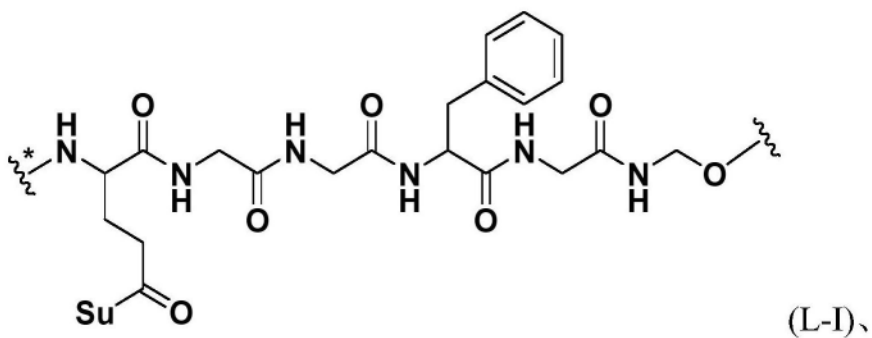
L是接头;以及

D是细胞毒性剂。

[0050] 在某些实施例中,C包含下式(C-I')、(C-II')、(C-III')或(C-IV'):

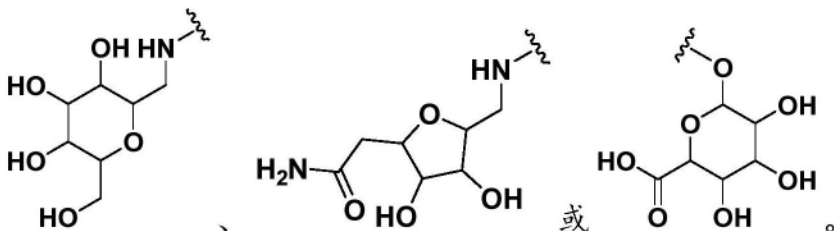


[0051] 在某些实施例中,L包含下式(L-I)、(L-II)或(L-III):

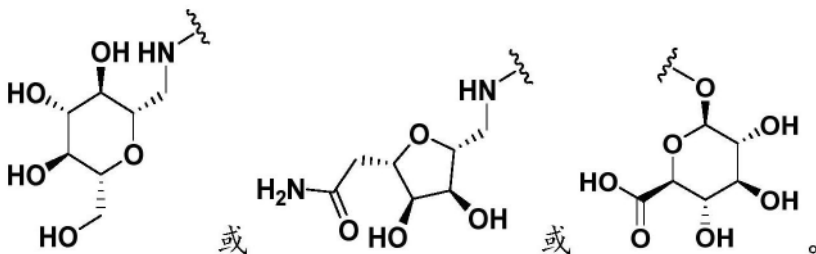


其中Su是亲水性残基;以及
*标记接头与缀合部分连接的键。

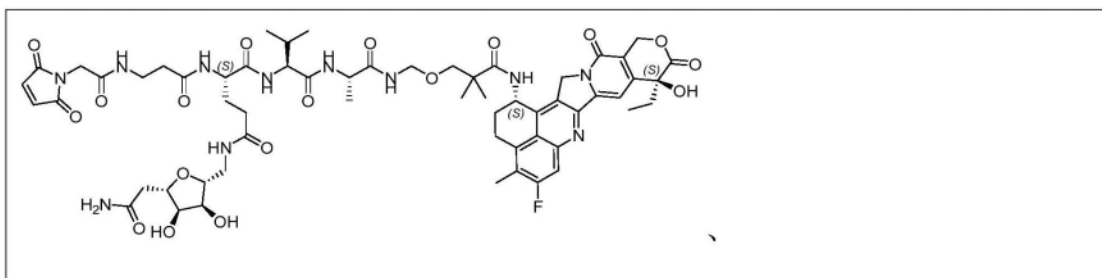
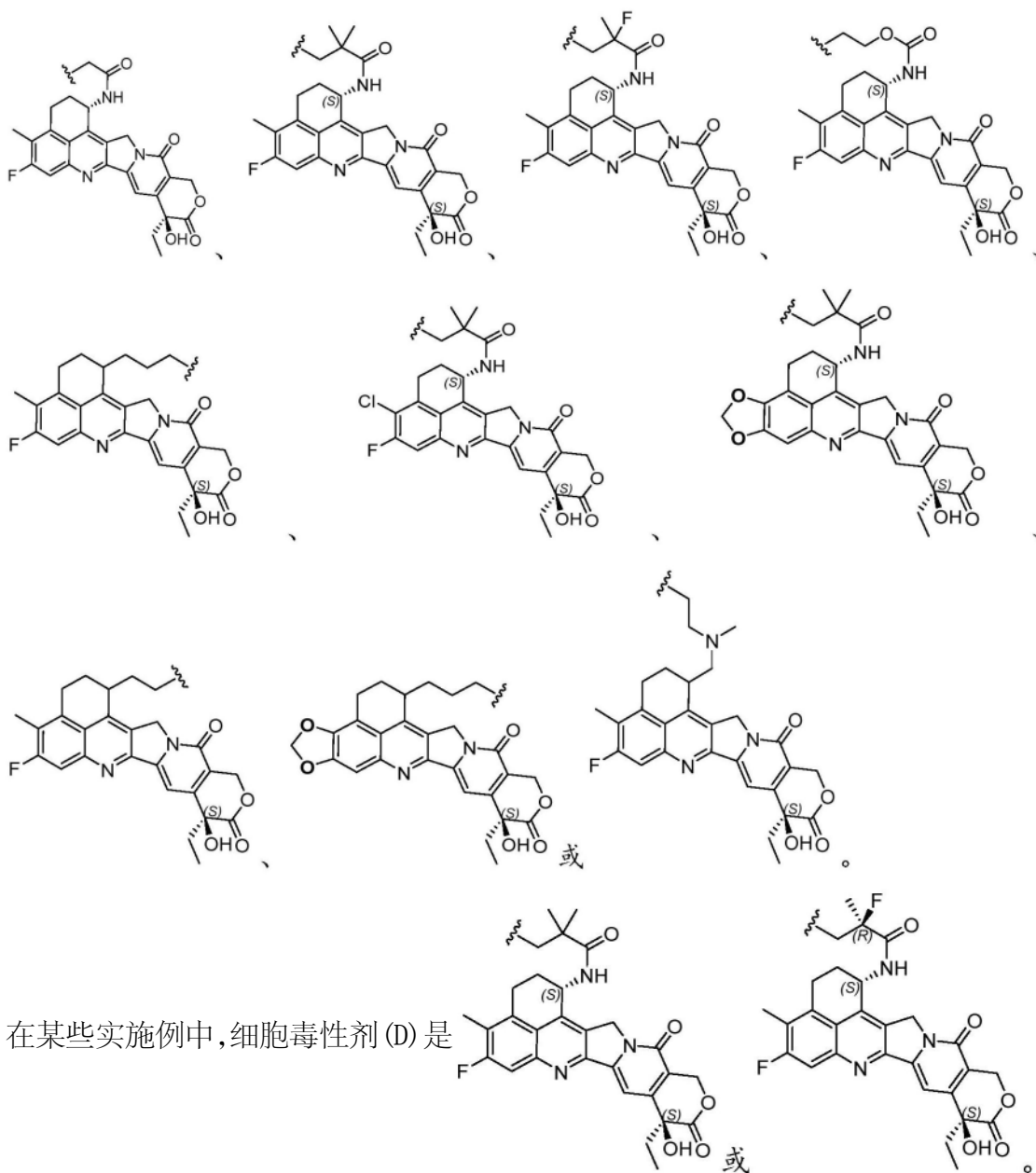
[0052] 在某些实施例中,Su是

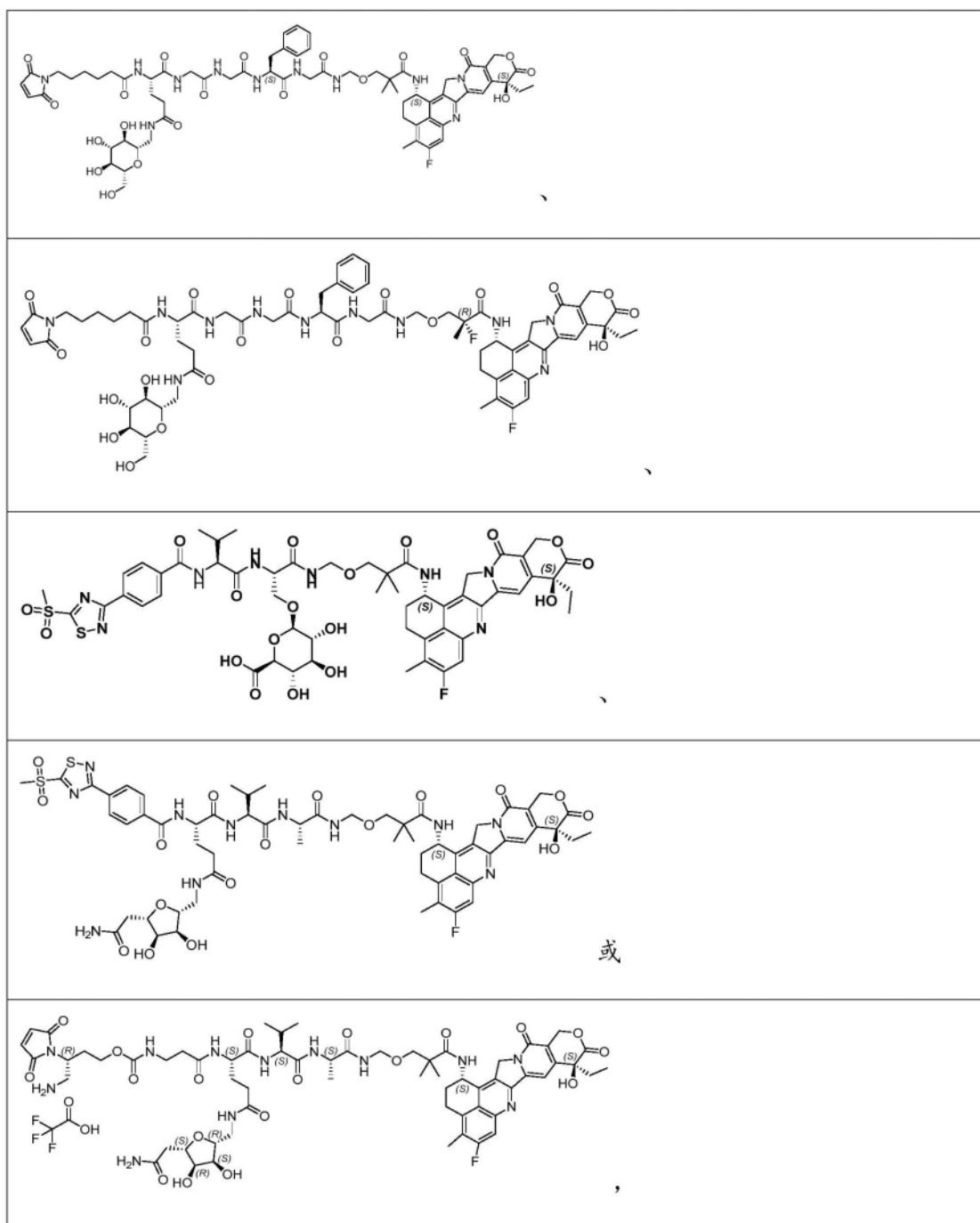


[0053] 在某些实施例中,Su是



[0054] 在某些实施例中,细胞毒性剂(D)是





或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物。

[0057] 在某些实施例中,本披露涉及一种产生如上所述的抗CEA抗体药物缀合物的方法,该方法包括:

(i) 培养已被分离的核酸转化的宿主细胞,该分离的核酸包含编码抗CEA抗体或其抗原结合片段的序列,其中该抗体或其片段包含

a) 包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链,或者与包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列,其中表20中以粗体/下划线显示的重链和轻链的某些CDR被保留;或者

b) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,
包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,
包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及
三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,
包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,
包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

c) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,
包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,
包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及
三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,
包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,
包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

d) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,
包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,
包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及
三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,
包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,
包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

e) 包含SEQ ID NO:31的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的轻链可变区;

f) 包含SEQ ID NO:48的重链可变区和包含SEQ ID NO:49的轻链可变区;或者

g) 包含SEQ ID NO:14的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的轻链可变区;或者

h) 包含与SEQ ID NO:31具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:32具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;或者

i) 包含与SEQ ID NO:48具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:49具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;或者

j) 包含与SEQ ID NO:14具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:15具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;以及

(ii) 表达所述抗体或其抗原结合片段;

(iii) 回收所表达的抗体或其抗原结合片段;以及

(iv) 任选使用接头将至少一种化合物缀合或连接到该抗体或其片段,使得形成抗体药物缀合物。

[0058] 在某些实施例中,提供了本文所述的抗体药物缀合物中的任一种(例如,呈药物组合物的形式)用于本文所述的治疗(例如,治疗具有表达和/或积累CEA的细胞的受试者)的用途。

[0059] 在某些实施例中,提供了用于如本文所述的用途(例如,用于治疗具有表达和/或积累CEA的细胞的受试者)的本文所述的抗体药物缀合物(例如,呈药物组合物的形式)。

[0060] 在某些实施例中,提供了本文所述的抗体药物缀合物中的任一种(例如,呈药物组合物的形式)在制造用于本文所述的治疗(例如,治疗具有表达和/或积累CEA的细胞的受试者)的药物中的用途。

[0061] 在某些实施例中,提供了一种试剂盒,该试剂盒包含本文披露的任何一种或多种抗体药物缀合物(例如,呈组合物的形式)及其使用说明书。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含用于检测测定的说明书,其中抗体药物缀合物与CEA形成复合物,该复合物通过包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)和/或蛋白质印迹的测定来检测。

[0062] 在某些实施例中,本披露涉及一种试剂盒,该试剂盒包含抗CEA抗体药物缀合物及其使用说明书,该抗体药物缀合物包含抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包含:

(i)

三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(ii)

三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

(iii)

三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,
包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,
包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3;或者
(iv) 包含SEQ ID NO:31的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的轻链可变区;
(v) 包含SEQ ID NO:48的重链可变区和包含SEQ ID NO:49的轻链可变区;或者
(vi) 包含SEQ ID NO:14的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的轻链可变区;或者
(vii) 包含与SEQ ID NO:31具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:32具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;或者
(viii) 包含与SEQ ID NO:48具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:49具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区;或者
(ix) 包含与SEQ ID NO:14具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链可变区和包含与SEQ ID NO:15具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链可变区。

[0063] 在某些实施例中,本披露涉及一种试剂盒,该试剂盒包含抗CEA抗体药物缀合物及其使用说明书,其中该抗体药物缀合物包含抗体,该抗体包含:

a. 包含SEQ ID NO:31所示的序列的VH序列,或包含与SEQ ID NO:31具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VH序列,以及包含SEQ ID NO:32所示的序列的VL序列,或包含与SEQ ID NO:32具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VL序列;

b. 包含SEQ ID NO:48所示的序列的VH序列,或包含与SEQ ID NO:48具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VH序列,以及包含SEQ ID NO:49所示的序列的VL序列,或包含与SEQ ID NO:49具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VL序列;或者

c. 包含SEQ ID NO:14所示的序列的VH序列,或包含与SEQ ID NO:14具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VH序列,以及包含SEQ ID NO:15所示的序列的VL序列,或包含与SEQ ID NO:15具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的VL序列。

[0064] 本发明内容既不旨在也不应被解释为代表本披露的全部程度和范围。此外,本文对“本披露”或其各方面的提及应被理解为意指本披露的某些实施例,并且不应被解释为将所有实施例限制于特定描述。本披露在本发明内容以及具体实施方式和附图中以各种详细程度进行阐述,并且本发明内容中包括或不包括元件、组件等并不旨在限制本披露的范围。来自所披露的实施例中的任一个的特征可彼此组合使用,而没有限制。另外,通过考虑以下具体实施方式和附图,本披露的其他特征和优点对于本领域普通技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0065] 图1示出了脱落CEA(sCEA)、嵌合CEA(CHIM)、CEACAM6和CEA变体(CEA-v)的示意图。

在CEA中,标记了结构域N、A1、B1、A2、B2、A3、B3和GPI接头(GPI);在CEACAM6中,标记了结构域N'、A'和B'。

[0066] 图2A-B描绘了抗CEA结构域B3抗体VH(图2A)和VL(图2B)区的系统发生树。使用DNASTAR的MegalignTM软件对候选抗CEA抗体的VH和VL序列进行比对。序列同源性在系统发生树中显示。

[0067] 图3A示出了通过表面等离子共振(SPR)进行的纯化的鼠抗CEA抗体BGA7592对嵌合构建体(CHIM)的亲合力测定。不同线表示BGA7592与CHIM在不同浓度下的结合能力,其中最上面的线示出了BGA7592与CHIM在最高浓度下的结合能力,并且CHIM的连续稀释液形成其他线。每条线的上升曲线示出了缔合速率,并且下降曲线示出了解离速率。

[0068] 图3B描绘了通过抗原ELISA得到的BGA7592的结合概况。

[0069] 图4A-B示出了可溶性CEA(sCEA)对CEA抗体与患者来源的MKN45胃癌癌细胞结合的影响。图4A示出了在可溶性CEA(sCEA)存在或不存在下抗结构域B3抗体的结合概况;图4B以直方图的形式示出了图4A的抗体结合概况。

[0070] 图5A-B示出了产生用于人源化BGA7592抗体轻链CDR(LCDR)区(图5A)(分别为SEQ ID NO:82、83、84)和重链CDR(HCDR)区(图5B)(分别为SEQ ID NO:80、81和3)的亲合力成熟的抗体文库的随机化位点。

[0071] 图6示出了四轮选择后BGA7592轻链CDR区的氨基酸改变。

[0072] 图7示出了通过流式细胞术得到的亲合力成熟的人源化BGA7592变体与LOVO细胞的结合。

[0073] 图8示出了如通过流式细胞术测量的抗CEA抗体与MKN45细胞的结合。

[0074] 图9A和9B是示出通过抗原ELISA(图9A)和流式细胞术(图9B)得到的抗体BGA5384与各种CEACAM家族成员的脱靶结合的条形图。

[0075] 图10示出了在各种浓度的可溶性CEA存在下可溶性CEA对BGA5384与表达CEA的MKN45细胞结合的影响。

[0076] 图11是示出抗体BGA6710在体外的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的图。

[0077] 图12示出了BGA6710抗体对鼠癌症模型中的肿瘤体积的影响。

[0078] 图13示出了与美登素化合物DM4缀合的CEA抗体对具有不同CEA表达水平的细胞的杀伤曲线。

[0079] 图14示出了与澳瑞他汀MMAE缀合的CEA抗体对具有不同CEA表达水平的细胞的杀伤曲线。

[0080] 图15示出了与拓扑异构酶抑制剂DXD缀合的CEA抗体对具有不同CEA表达水平的细胞的杀伤曲线。

[0081] 图16示出了各种游离细胞毒性剂对具有~200K的CEA特异性抗体结合能力(SABC)的MKN45细胞(CEA高)的杀伤曲线。

[0082] 图17示出了八种ADC对MKN45细胞(CEA高)的细胞杀伤作用。

[0083] 图18示出了八种ADC对H2122患者来源的细胞(肺腺癌)(CEA中等)的细胞杀伤作用。

[0084] 图19示出了八种ADC对LS174T患者来源的细胞(结直肠腺癌)(CEA低)的细胞杀伤作用。

[0085] 图20示出了八种ADC对MB-231患者来源的细胞(乳腺腺癌)(CEA阴性)的细胞杀伤作用。

[0086] 图21示出了在使用MKN-45细胞(CEA高)的细胞系来源的异种移植(CDX)模型中不同浓度的BGA-7650和BGA-9962相对于对照的抗肿瘤功效。

[0087] 图22示出了在使用SW-1463细胞(CEA中等)(直肠腺癌)的CDX模型中不同浓度的BGA-7650和BGA-9962相对于对照的抗肿瘤功效。

[0088] 图23示出了在使用H2122细胞(CEA低)(肺腺癌)的CDX模型中不同浓度的BGA-7650和BGA-9962相对于对照的抗肿瘤功效。

[0089] 图24示出了在胃癌(GC)的患者来源的异种移植(PDX)模型中不同浓度的BGA-9962和BGA-7650相对于对照的抗肿瘤功效。

[0090] 图25是在Balb/c裸小鼠(非荷瘤)中各种抗体、ADC和游离细胞毒性剂的浓度相对于时间的图。

[0091] 图26是示出两种ADC在小鼠中随时间的体内DAR的图(单剂量, iv 3mpk Balb/c裸小鼠, 每组n=3)。

缩略词列表

TEA	三乙胺
THF	四氢呋喃
MeOH	甲醇
PhI(Oac) ₂	(二乙酰氧基碘)苯
PyBOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基鎓
HOBt	1-羟基苯并三唑
DIEA	N,N-二异丙基乙胺
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
NH ₄ Cl	氯化铵
LiOH	氢氧化锂
HCl	盐酸
NPC	双(4-硝基苯基)碳酸酯
TFA	三氟乙酸
K ₂ CO ₃	碳酸钾

MeCN	乙腈
MeI	甲基碘
Na ₂ SO ₄	硫酸钠
EtOAc	乙酸乙酯
MeONa	甲醇钠
Prep-HPLC	制备型高效液相色谱法
TBSCl	叔丁基二甲基氯硅烷
Cu(Oac) ₂	无水乙酸铜
Pb(Oac) ₄	四乙酸铅
TSTU	2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲四氟
PE	石油醚
Et ₂ NH	二乙胺
r.t.	室温
MS	质谱分析法
ESI	电喷雾电离
FA	甲酸
FCC	快速柱色谱法
NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
MTBE	甲基叔丁基醚
Fmoc	9-芴基甲氧基羰基保护基团
DBU	1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一-7-烯
DCC	二环己基碳二亚胺
UPLC	超高效液相色谱法
Mc-Osu	马来酰亚胺基己酰基 N-羟基琥珀酰亚胺基酯
DMSO	二甲基亚砷
TCEP	磷酸三(2-氯乙基)酯

定义

[0092] 除非在本文件在下文或其他地方具体定义,否则本文所用的所有技术和科学术语具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0093] 如本文(包括所附权利要求)所用,词语的单数形式诸如“一个”、“一种”和“该”包括它们相应的复数形式,除非上下文另有明确指示。

[0094] 除非具体说明或从上下文中明显看出,否则如本文所用,术语“约”是指在如由本领域普通技术人员所确定的特定值或组成的可接受误差范围内的值或组成,这将部分取决于如何测量或确定该值或组成,即,测量系统的局限性。例如,“约”可以意指在本领域实践的一个或多于一个标准偏差内。“约”可以意指高达10%(即,±10%)的范围。因此,“约”可以理解为比规定值大或小10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%或0.001%之内。例如,约5mg可以包括介于4.5mg至5.5mg之间的任何量。此

外,特别是对于生物系统或过程,这些术语可以意指值的高达一个数量级或高达5倍。当在本披露中提供特定值或组成时,除非另有说明,否则“约”的含义应被假定在该特定值或组成的可接受的误差范围内。

[0095] 术语“或”用于意指术语“和/或”并且可与术语“和/或”互换使用,除非上下文另有明确指示。

[0096] 术语“癌胚抗原”或“CEA”是指大约70-100kDa的糖蛋白,也称为CEACAM5或CD66e。人CEA的氨基酸序列SEQ ID NO:52也可以在登录号P06731或NM_004363.2中找到。

[0097] 如本文所用的术语“施用”当应用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体时意指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与该动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。细胞的处理涵盖试剂与细胞的接触以及试剂与流体的接触,其中该流体与细胞接触。

[0098] 本文的术语“受试者”或“患者”包括任何生物体、优选动物、更优选哺乳动物(例如,大鼠、小鼠、狗、猫、兔、灵长类动物)并且最优选人(例如,患上本文所述的障碍或处于患上本文所述的障碍的风险中的患者)。

[0099] 在一方面,“治疗”任何疾病或障碍是指改善该疾病或障碍(即,减缓或阻止或减少该疾病或其至少一种临床症状的发展)。在另一方面,“治疗”是指缓解或改善至少一个身体参数,包括患者可能无法辨别的那些参数。在又另一方面,“治疗”是指在身体上(例如,可辨别症状的稳定)、在生理上(例如,身体参数的稳定)或两者上调节疾病或障碍。

[0100] 如本文所用的术语“亲和力”是指抗体与抗原之间相互作用的强度。在抗原内,抗体的可变区通过非共价力与抗原在许多位点相互作用。一般来讲,相互作用越多,亲和力越强。

[0101] 如本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白家族的多肽,其可以非共价地、可逆地和以特异性方式结合相应的抗原。例如,天然存在的IgG抗体是包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的四聚体。每条重链由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为VL或Vκ)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间插有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)以及经典补系统的第一组分(C1q))的结合。

[0102] CDR和框架区的位置可以使用本领域熟知的多种定义确定,例如Kabat、Chothia、AbM和IMGT(参见,例如Johnson等人,Nucleic Acids Res.[核酸研究],29:205-206(2001); Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901-917(1987); Chothia等人,Nature[自然],342:877-883(1989); Chothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],227:799-817(1992); Al-Lazikani等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],273:927-748(1997); Lefranc,M.-P.,The Immunologist[免疫学家],7,132-136(1999); Lefranc,M.-P.等人,Dev.Comp.Immunol.[发育与比较免疫学],27,55-77(2003))。

[0103] 术语“抗体”包括但不限于单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和抗独特型

(抗Id)抗体。抗体可以是任何同种型/类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)或亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。

[0104] 在一些实施例中,抗CEA抗体包含至少一个抗原结合位点。在一些实施例中,抗CEA抗体包含来自本文所述的CEA抗体的抗原结合片段。在一些实施例中,抗CEA抗体是分离的或重组的。

[0105] 本文的术语“单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”意指基本上同质的抗体的群体,即,除了可能少量存在的可能天然发生的突变外,该群体中的抗体分子在氨基酸序列上是相同的。相比之下,常规(多克隆)抗体制剂典型地包括在其可变结构域中具有不同氨基酸序列的多种不同抗体,特别地其CDR,它们通常对不同的表位具有特异性。修饰语“单克隆”指示获得自基本上均质的抗体群体的抗体的特征并且不应理解为要求通过任何特定方法产生抗体。可以通过本领域技术人员已知的方法获得单克隆抗体。参见例如Kohler等人,Nature [自然]1975 256:495-497;美国专利号4,376,110;Ausubel等人,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY[分子生物学现代方法]1992;Harlow等人,ANTIBODIES:a LABORATORY MANUAL[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室]1988;以及Colligan等人,CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY[当代免疫学方案]1993。本文披露的抗体可以是任何免疫球蛋白类别(包括IgG、IgM、IgD、IgE、IgA),及其任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。产生单克隆抗体的杂交瘤可以在体外或在体内培养。高效价的单克隆抗体可以在体内产生中获得,其中将来自单个杂交瘤的细胞腹膜内注射到小鼠中,例如原始引发的Balb/c小鼠,以产生含有高浓度所需抗体的腹水。可以使用本领域技术人员熟知的柱层析方法从这样的腹水,或从培养物上清液中纯化同种型IgM或IgG的单克隆抗体。

[0106] 除非另外说明,否则“抗原结合片段”意指抗体的抗原结合片段,即保留与全长抗体结合的抗原特异性结合的能力的抗体片段,例如保留一个或多个CDR区的片段。抗原结合片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子,例如单链Fv(ScFv);纳米抗体和由抗体片段形成的抗体;以及双环肽(Hurov, K. 等人, 2021. Journal for ImmunoTherapy of Cancer[癌症免疫治疗杂志], 9(11))。

[0107] 如本文所用,抗体或抗原结合抗体片段与抗原(例如,蛋白质)“特异性结合”或“选择性结合”意指与其他蛋白质相比,抗体表现出与该靶标的优先结合,但这种特异性不需要绝对的结合特异性。“特异性”或“选择性”结合反应决定了蛋白质和其他生物制品的异质群体中(例如,血液、血清、血浆或组织样品中)抗原的存在。因此,在某些指定的免疫测定条件下,抗体或其抗原结合片段与特定抗原特异性结合是背景水平的至少两倍,并且不以显著量与样品中存在的其他抗原特异性结合。在一方面,在指定的免疫测定条件下,抗体或其抗原结合片段与背景结合水平相比以至少十倍的值与特定抗原特异性结合,并且不以显著量与样品中存在的其他抗原特异性结合。

[0108] 本文的术语“人抗体”意指仅包含人免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如果在小鼠、小鼠细胞或源自小鼠细胞的杂交瘤中产生,人抗体可以包含鼠碳水化合物链。类似地,“小鼠抗体”或“大鼠抗体”意指分别仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。

[0109] 术语“人源化”或“人源化抗体”意指含有来自非人(例如鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。一般来讲,人源化抗体将包含至少一个并且通常两个可变结构域中的基本上全部,其中高变环中的全部或基本上全部

对应于非人免疫球蛋白的那些,并且FR中的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。当有必要区分人源化抗体与亲本啮齿动物抗体时,将前缀“hum”、“hu”、“Hu”或“h”添加到抗体克隆名称中。啮齿动物抗体的人源化形式一般将包含亲本啮齿动物抗体的相同CDR序列,但是可以包括某些氨基酸取代以增加亲和力、增加人源化抗体的稳定性、除去翻译后修饰或出于其他原因。

[0110] 术语“平衡解离常数”或“ K_d ”或“ M ”是指解离速率常数(k_d ,时间 $^{-1}$)除以缔合速率常数(k_a ,时间 $^{-1}$, M^{-1})。平衡解离常数可以使用本领域任何已知的方法测量。本披露的抗体通常将具有小于约 10^{-7} 或 $10^{-8}M$ (例如,小于约 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$,在一些方面,小于约 $10^{-11}M$ 、 $10^{-12}M$ 或 $10^{-13}M$)的平衡解离常数。

[0111] 本文所用的术语“癌症”或“肿瘤”具有如本领域理解的最广泛的含义,并且是指哺乳动物中通常以不受调控的细胞生长为特征的生理病症。在本披露的上下文中,癌症或肿瘤不限于某个类型或位置。

[0112] 在本披露的上下文中,当提及氨基酸序列时,术语“保守取代”意指原始氨基酸被新氨基酸取代,该新氨基酸基本上不改变抗体或片段的化学、物理和/或功能性质,例如其与CEA的结合亲和力。氨基酸的常见保守取代是本领域熟知的。

[0113] 术语“改善”、“增加”、“抑制”和“减少”表示相对于基线或其他参考测量的值。在一些实施例中,适当的参考测量可包括在不存在药剂或治疗(例如,之前和/或之后)的情况下或者在存在适当的相当参考药剂的情况下在其他方面相当的条件下在某个系统中(例如,在单个个体中)的测量。在一些实施例中,适当的参考测量可包括在已知或预期在存在相关药剂或治疗的情况下以相当的方式响应的相当系统中的测量。

[0114] 如本文所用的术语“杵臼(knob-into-hole)”技术是指在体外或体内通过在两个多肽相互作用的界面处将空间突起(杵)引入一个多肽中并将穴袋或空腔(臼)引入另一个多肽中来指导将两个多肽配对在一起的氨基酸。例如,已经在抗体的Fc:Fc结合界面、 $C_L:C_HI$ 界面或 V_H/V_L 界面中引入杵臼(参见例如US2011/0287009、US2007/0178552、WO 96/027011、WO 98/050431和Zhu等人,1997,Protein Science[蛋白质科学]6:781-788)。在一些实施例中,杵臼确保在抗体制造期间将两条不同重链正确配对在一起。例如,在其Fc区中具有杵臼氨基酸的抗体还可包含与每个Fc区连接的单个可变结构域,或者进一步包含与相似或不同轻链可变结构域配对的不同重链可变结构域。杵臼技术还可以在 V_H 或 V_L 区中使用,以确保正确配对。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的实例是BLAST算法,这些算法描述于Altschul等人,Nuc.Acids Res.[核酸研究]25:3389-3402,1977;以及Altschul等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]215:403-410,1990。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)披露获得。此算法包括首先通过鉴定查询序列中短字长 W 鉴定高得分序列对(HSP),当与数据库序列中相同字长比对时,其匹配或满足一些正值阈值得分 T 。 T 被称为邻域字得分阈值。这些初始邻域字命中作为开始搜索以找到包含它们的较长HSP的值。字命中沿着每个序列在两个方向上延伸,直到累积比对得分可以增加为止。对于核苷酸序列,使用参数 M (一对匹配残基的奖励得分;始终 >0)和 N (错配残基的罚分;始终 <0)来计算累积得分。对于氨基酸序列,使用得分矩阵来计算累积得分。当累积比对得分从其最大实现值下降数量 X 时,停止每个方向上的

字命中延伸;由于一个或多个负得分残基比对的累积,累积得分趋于零或更低;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)默认使用字长(W) 11,期望值(E) 10, $M=5$, $N=-4$ 并比较两条链。对于氨基酸序列, BLAST程序默认使用字长3,期望值(E) 10和BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff和Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院学报] 89: 10915) 比对(B) 50, $M=5$, $N=-4$ 并比较两条链。

[0115] BLAST算法还对两个序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [美国国家科学院学报] 90: 5873-5787, 1993)。BLAST算法提供的一种相似性度量是最小总和概率($P(N)$), 其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如, 如果测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约0.2, 更优选小于约0.01, 最优选小于约0.001, 则认为该核酸与参考序列相似。

[0116] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比还可使用以下的算法来确定: E. Meyers和W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* [生物科学中的计算机应用] 4: 11-17, (1988), 其已并入ALIGN程序(2.0版本), 使用PAM120权重残基表, 空位长度罚分为12, 空位罚分为4。此外, 可以使用以下确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比: Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* [分子生物学杂志] 48: 444-453 (1970) 的算法, 其已并入GCG软件包中的GAP程序中, 使用BLOSUM62矩阵或PAM250矩阵, 空位权重为16、14、12、10、8、6或4, 并且长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0117] 术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用, 并且是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语涵盖含有已知的核苷酸类似物或经修饰的主链残基或连接的核酸, 它们是合成的、天然存在的或非天然存在的, 具有与参考核酸相似的结合特性, 并且以与参考核苷酸相似的方式代谢。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。

[0118] 在核酸的上下文中的术语“可操作地连接”是指两个或更多个多核苷酸(例如, DNA) 区段之间的功能关系。典型地, 它是指转录调节序列与转录序列的功能关系。例如, 启动子或增强子序列如果在合适的宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录, 则可操作地连接至编码序列。通常, 可操作地连接至转录序列的启动子转录调节序列与转录序列在物理上邻接, 即它们是顺式作用的。然而, 一些转录调节序列(如增强子) 不需要在物理上邻接或紧邻它们增强其转录的编码序列。

[0119] 在一些方面, 本披露提供了组合物, 例如药学上可接受的组合物, 其包含与至少一种药学上可接受的赋形剂一起配制的如本文所述的抗CEA抗体。如本文所用, 术语“药学上可接受的赋形剂”包括生理学上相容的任何和所有溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。赋形剂可以适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊柱或表皮施用(例如通过注射或输注)。

[0120] 如本文所用的术语“治疗有效量”或“有销量”是指当施用于受试者以治疗疾病或者疾病或障碍的至少一种临床症状时足以实现对该疾病、障碍或症状的这种治疗的药剂的量。“治疗有效量”可以随药剂、疾病、障碍和/或疾病或障碍的症状、疾病、障碍和/或疾病或障碍的症状的严重程度、待治疗的受试者的年龄和/或待治疗的受试者的体重而变化。在任

何给定情况下的合适量对于本领域技术人员而言是显而易见的,或者可以通过常规实验确定。在组合疗法的情况下,“治疗有效量”是指组合组分的总量。

[0121] 术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂以治疗治疗性病症或障碍。这种施用涵盖以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂。这种施用还涵盖在多个容器或制剂(例如,胶囊、粉末和液体)中或者在每种活性成分的独立容器或制剂中共同施用。可以将粉末和/或液体在施用之前重构或稀释到所需剂量。另外,“组合疗法”涵盖在大致相同的时间或在不同的时间以顺序方式使用每种类型的治疗剂。在任何一种情况下,治疗方案将在治疗本文所述的病症或障碍方面提供药物组合的有益作用。

[0122] 如本文所用,短语“与…组合”意指将抗CEA ADC在施用另外的治疗剂的同时、就在该施用前或就在该施用后施用于受试者。在某些实施例中,将抗CEA ADC作为与另外的治疗剂的共同制剂来施用。

[0123] 术语“毒素”或“有效载荷”或“细胞毒性剂”在本文中用于指抑制或减少细胞中分子表达、抑制或减少细胞功能、诱导细胞凋亡和/或引起细胞死亡的分子。该术语包括放射性同位素、化疗剂和毒素,诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。细胞毒性剂的实例包括但不限于奥瑞他汀类(auristatins)(例如,奥瑞他汀E、奥瑞他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素类(auromycins)、马坦霉素类(maytansinoids)、吡咯并苯并二氮杂革(PBD)、蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、康普瑞汀(combrestatin)、倍癌霉素类(duocarmycins)、多拉司他汀类(dolastatins)、多柔比星、道诺霉素、紫杉醇、顺铂、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、二羟基蒽二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、莫迪素(modeccin)A链、 α -八叠球菌素(alpha-sarcin)、白树毒素(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)、麻疯树逆境蛋白(curicin)、巴豆毒素(crotonin)和卡利奇霉素(calicheamicin)以及放射性同位素诸如At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212或213、P32和Lu177。

[0124] “烷基”基团是具有1至10个碳原子、通常1至8个碳原子或在一些实施例中1至6个、1至4个或2至6个碳原子的饱和直链或支链非环状烃。代表性烷基基团包括-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基和-正己基;而饱和支链烷基包括-异丙基、-仲丁基、-异丁基、-叔丁基、-异戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基基团可以是取代的或未取代的。在某些实施例中,当本文所述的烷基基团被说成是“取代的”时,它们可被如在本文披露的示例性化合物和实施例中发现的任何一个或多个取代基以及以下项取代:卤素(氯、碘、溴或氟);羟基;烷氧基;烷氧基烷基;氨基;烷基氨基;羧基;硝基;氰基;硫醇;硫醚;亚胺;酰亚胺;脒;胍;烯胺;氨基羰基;酰氨基;膦酸基;膦;硫代羰基;磺酰基;砜;磺酰胺;酮;醛;酯;脲;氨基甲酸酯;脞;羟胺;烷氧基胺;芳烷氧基胺;N-氧化物;肼;酰肼;脎;叠氮化物;异氰酸酯;异硫氰酸酯;氰酸酯;硫氰酸酯; $B(OH)_2$;或O(烷基)氨基羰基。

[0125] “烯基”基团是具有2至10个碳原子、通常2至8个碳原子并且包括至少一个碳-碳双键的直链或支链非环状烃。代表性直链和支链(C_2 - C_8)烯基包括-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-己烯基、-2-己烯基、-3-己烯基、-1-庚烯基、-2-庚烯基、-3-庚烯基、-1-辛烯基、-2-辛烯基、3-辛烯基等。烯基基团的双键可以不共轭或与另一个不饱和

基团共轭。烯基基团可以是未取代的或取代的。

[0126] “环烷基”基团是具有可以任选地被1至3个烷基基团取代的单个环状环或者多个缩合环或桥接环的3至10个碳原子的饱和或部分饱和环状烷基基团。在一些实施例中,环烷基基团具有3至8个环成员,而在其他实施例中,环碳原子的数量在3至5、3至6或3至7的范围内。举例来说,此类环烷基基团包括单环结构(诸如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、1-甲基环丙基、2-甲基环戊基、2-甲基环辛基等)或者多环或桥接环结构(诸如金刚烷基等)。不饱和环烷基基团的实例包括环己烯基、环戊烯基、环己二烯基、丁二烯基、戊二烯基、己二烯基等。环烷基基团可以是取代的或未取代的。举例来说,此类取代的环烷基基团包括环己酮等。

[0127] “芳基”基团是具有单个环(例如,苯基)或多个缩合环(例如,萘基或蒽基)的6至14个碳原子的芳族碳环基团。在一些实施例中,芳基基团含有6-14个碳原子,并且在其他实施例中在基团的环部分中含有6至12或甚至6至10个碳原子。特定芳基包括苯基、联苯基、萘基等。芳基基团可以是取代的或未取代的。短语“芳基基团”还包括含有稠合环的基团,诸如稠合芳族-脂族环系统(例如,茚满基、四氢萘基等)。

[0128] “杂芳基”基团是在杂芳环系统中具有一至四个杂原子作为环原子的芳基环系统,其中其余的原子是碳原子。在一些实施例中,杂芳基基团含有5至6个环原子,并且在其他实施例中在基团的环部分中含有6至9个或甚至6至10个原子。合适的杂原子包括氧、硫和氮。在某些实施例中,杂芳基环系统是单环的或双环的。非限制性实例包括但不限于诸如以下项的基团:吡咯基、吡唑基、咪唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、吡咯基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、噻吩基、苯并噻吩基、呋喃基、苯并呋喃基(例如,异苯并呋喃-1,3-二亚胺)、吡啶基、氮杂吡啶基(例如,吡咯并吡啶基或1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基)、吡唑基、苯并咪唑基(例如,1H-苯并[d]咪唑基)、咪唑并吡啶基(例如,氮杂苯并咪唑基、3H-咪唑并[4,5-b]吡啶基或1H-咪唑并[4,5-b]吡啶基)、吡唑并吡啶基、三唑并吡啶基、苯并三唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、异噁唑并吡啶基、噻萘基、嘌呤基、黄嘌呤基、腺嘌呤基、鸟嘌呤基、喹啉基、异喹啉基、四氢喹啉基、喹喔啉基和喹唑啉基基团。

[0129] “杂环基”是其中一至四个环碳原子独立地被独立地选自由O、S和N组成的组的杂原子替代的非芳族环烷基。在一些实施例中,杂环基基团包括3至10个环成员,而其他此类基团具有3至5个、3至6个或3至8个环成员。杂环基也可以与任何环原子处(即,杂环的任何碳原子或杂原子处)的其他基团键合。杂环基基团可以是取代的或未取代的。杂环基基团涵盖不饱和、部分饱和和饱和环系,诸如咪唑基、咪唑啉基和咪唑烷基基团。短语杂环基包括稠合环种类,包括包含稠合芳族和非芳族基团的那些种类,诸如苯并三唑基、2,3-二氢苯并[1,4]二噁英基和苯并[1,3]二氧杂环戊烯基。该短语还包括含有杂原子的桥接多环系统,例如但不限于奎宁环基。杂环基基团的代表性实例包括但不限于吡丙啶基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、噻唑烷基、四氢噻吩基、四氢呋喃基、二氧杂环戊烯基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡咯啉基、咪唑基、咪唑啉基、吡唑基、吡唑啉基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、噻唑啉基、异噻唑基、噻二唑基、噁二唑基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、四氢吡喃基(例如,四氢-2H-吡喃基)、四氢噻喃基、氧硫杂环己烷、二氧基、二噻烷基、吡喃基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、三嗪基、二氢吡啶基、二氢二噻英基(dihydrodithiynyl)、二氢二亚硫酰基(dihydrodithionyl)、高哌嗪基、奎宁环基、吡啶基、

二氢吡啶基、异吡啶基、氮杂吡啶基(吡咯并吡啶基)、吡啶基、吡嗪基、苯并三唑基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁二唑基、苯并噁唑基、苯并二噻英基(benzodithiiny1)、苯并噁噻吩基(benzoxathiiny1)、苯并噻嗪基、苯并噻唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[1,3]二氧杂环戊烯基、吡啶并吡啶基、咪唑并吡啶基(氮杂苯并咪唑基;例如,1H-咪唑并[4,5-b]吡啶基或1H-咪唑并[4,5-b]吡啶-2(3H)-酮基)、三唑并吡啶基、异噻唑并吡啶基、嘌呤基、黄嘌呤基、腺嘌呤基、鸟嘌呤基、喹啉基、异喹啉基、喹嗪基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、酞嗪基、茶啉基、蝶啶基、噻茶基、二氢苯并噻嗪基、二氢苯并呋喃基、二氢吡啶基、二氢苯并二噻英基、四氢吡啶基、四氢咪唑基、四氢苯并咪唑基、四氢苯并三唑基、四氢吡咯并吡啶基、四氢吡啶并吡啶基、四氢咪唑并吡啶基、四氢三唑并吡啶基和四氢喹啉基基团。代表性取代的杂环基基团可被各种取代基(诸如下文列出的那些)单取代或取代多于一次(诸如但不限于吡啶基或吗啉基基团,它们是2-、3-、4-、5-或6-取代的)或双取代。

[0130] “环烷基烷基”基团是下式的基团: -烷基-环烷基,其中烷基和环烷基在上文定义。取代的环烷基烷基基团可在该基团的烷基、环烷基或烷基和环烷基部分两者处被取代。代表性环烷基烷基基团包括但不限于环戊基甲基、环戊基乙基、环己基甲基、环己基乙基和环己基丙基。代表性取代的环烷基烷基基团可以是单取代的或取代多于一次的。

[0131] “芳烷基”基团是下式的基团: -烷基-芳基,其中烷基和芳基如上所定义。取代的芳烷基基团可在该基团的烷基、芳基或烷基和芳基部分两者处被取代。代表性芳烷基基团包括但不限于苄基和苯乙基基团以及稠合的(环烷基芳基)烷基基团,诸如4-乙基-茚满基。

[0132] “杂环基烷基”基团是下式的基团: -烷基-杂环基,其中烷基和杂环基如上所定义。取代的杂环基烷基基团可在该基团的烷基、杂环基或烷基和杂环基部分两者处被取代。代表性杂环基烷基基团包括但不限于4-乙基-吗啉基、4-丙基吗啉基、呋喃-2-基甲基、呋喃-3-基甲基、吡啶-3-基甲基、(四氢-2H-吡喃-4-基)甲基、(四氢-2H-吡喃-4-基)乙基、四氢呋喃-2-基甲基、四氢呋喃-2-基乙基和吡啶-2-基丙基。

[0133] “卤素”是氯、碘、溴或氟。

[0134] “烷氧基”基团是-O-(烷基),其中烷基在上文定义。

[0135] “烷氧基烷基”基团是-(烷基)-O-(烷基),其中每个烷基独立地如上所定义。

[0136] “胺”基团是下式的基团: -NH₂。

[0137] “羟胺”基团是下式的基团: N(R[#])OH或NHOH,其中R[#]是如本文所定义的取代或未取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基或杂环基烷基基团。

[0138] “烷氧基胺”基团是下式的基团: -N(R[#])O-烷基或-NHO-烷基,其中R[#]如上所定义。

[0139] “芳烷氧基胺”基团是下式的基团: N(R[#])O-芳基或NHO芳基,其中R[#]如上所定义。

[0140] “烷基胺”基团是下式的基团: NH烷基或N(烷基)₂,其中每个烷基独立地如上所定义。

[0141] “氨基羰基”基团是下式的基团: -C(=O)N(R[#])₂、-C(=O)NH(R[#])或C(=O)NH₂,其中每个R[#]如上所定义。

[0142] “酰胺基”基团是下式的基团: NHC(=O)(R[#])或N(烷基)C(=O)(R[#]),其中每个烷基和R[#]独立地如上所定义。

[0143] “O(烷基)氨基羰基”基团是下式的基团: -O(烷基)C(=O)N(R[#])₂、-O(烷基)C(=O)

NH(R[#]) 或 -O(烷基)C(=O)NH₂, 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0144] “N-氧化物”基团是下式的基团: -N⁺-O⁻。

[0145] “羧基”基团是下式的基团: C(=O)OH。

[0146] “酮”基团是下式的基团: C(=O)(R[#]), 其中每个R[#]如上所定义。

[0147] “醛”基团是下式的基团: -CH(=O)。

[0148] “酯”基团是下式的基团: C(=O)O(R[#]) 或 OC(=O)(R[#]), 其中R[#]如上所定义。

[0149] “脲”基团是下式的基团: -N(烷基)C(=O)N(R[#])₂、-N(烷基)C(=O)NH(R[#])、-N(烷基)C(=O)NH₂、-NHC(=O)N(R[#])₂、-NHC(=O)NH(R[#]) 或 NHC(=O)NH₂, 其中每个烷基和R[#]独立地如上所定义。

[0150] “亚胺”基团是下式的基团: -N=C(R[#])₂ 或 -C(R[#])=N(R[#]), 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0151] “酰亚胺”基团是下式的基团: -C(=O)N(R[#])C(=O)(R[#]) 或 N((C(=O)(R[#]))₂), 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0152] “氨基甲酸酯”基团是下式的基团: -OC(=O)N(R[#])₂、-OC(=O)NH(R[#])、-N(R[#])C(=O)O(R[#]) 或 -NHC(=O)O(R[#]), 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0153] “脘”基团是下式的基团: -C(=N(R[#]))N(R[#])₂、-C(=N(R[#]))NH(R[#])、-C(=N(R[#]))NH₂、-C(=NH)N(R[#])₂、-C(=NH)NH(R[#])、-C(=NH)NH₂、-N=C(R[#])N(R[#])₂、-N=C(R[#])NH(R[#])、-N=C(R[#])NH₂、-N(R[#])C(R[#])=N(R[#])、-NHC(R[#])=N(R[#])、-N(R[#])C(R[#])=NH 或 -NHC(R[#])=NH, 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0154] “胍”基团是下式的基团: -N(R[#])C(=N(R[#]))N(R[#])₂、-NHC(=N(R[#]))N(R[#])₂、-N(R[#])C(=NH)N(R[#])₂、-N(R[#])C(=N(R[#]))NH(R[#])、-N(R[#])C(=N(R[#]))NH₂、-NHC(=NH)N(R[#])₂、-NHC(=N(R[#]))NH(R[#])、-NHC(=N(R[#]))NH₂、-NHC(=NH)NH(R[#])、-NHC(=NH)NH₂、-N=C(N(R[#]))₂、-N=C(NH(R[#]))₂ 或 -N=C(NH₂)₂, 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0155] “烯胺”基团是下式的基团: -N(R[#])C(R[#])=C(R[#])₂、-NHC(R[#])=C(R[#])₂、-C(N(R[#]))₂=C(R[#])₂、-C(NH(R[#]))=C(R[#])₂、-C(NH₂)=C(R[#])₂、-C(R[#])=C(R[#])(N(R[#]))₂、C(R[#])=C(R[#])(NH(R[#])) 或 -C(R[#])=C(R[#])(NH₂), 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0156] “肟”基团是下式的基团: -C(=NO(R[#]))(R[#])、-C(=NOH)(R[#])、-CH(=NO(R[#])) 或 -CH(=NOH), 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0157] “酰肼”基团是下式的基团: -C(=O)N(R[#])N(R[#])₂、-C(=O)NHN(R[#])₂、-C(=O)N(R[#])NH(R[#])、-C(=O)N(R[#])NH₂、-C(=O)NHNH(R[#])₂ 或 -C(=O)NHNH₂, 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0158] “胼”基团是下式的基团: -N(R[#])N(R[#])₂、-NHN(R[#])₂、-N(R[#])NH(R[#])、-N(R[#])NH₂、-NHNH(R[#])₂ 或 -NHNH₂, 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0159] “脞”基团是下式的基团: -C(=N-N(R[#]))₂(R[#])₂、-C(=NNH(R[#]))(R[#])₂、-C(=N-NH₂)(R[#])₂、-N(R[#])(N=C(R[#]))₂ 或 -NH(N=C(R[#]))₂, 其中每个R[#]独立地如上所定义。

[0160] “叠氮化物”基团是下式的基团: -N₃。

[0161] “异氰酸酯”基团是下式的基团: N=C=O。

[0162] “异硫氰酸酯”基团是下式的基团: N=C=S。

[0163] “氰酸酯”基团是下式的基团: OCN。

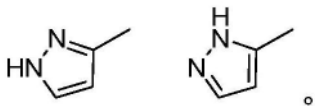
- [0164] “硫氰酸酯”基团是下式的基团:SCN。
- [0165] “硫醚”基团是下式的基团: $-S(R^{\#})$,其中 $R^{\#}$ 如上所定义。
- [0166] “硫代羰基”基团是下式的基团: $-C(=S)(R^{\#})$,其中 $R^{\#}$ 如上所定义。
- [0167] “亚磺酰基”基团是下式的基团: $-S(=O)(R^{\#})$,其中 $R^{\#}$ 如上所定义。
- [0168] “磺”基团是下式的基团: $-S(=O)_2(R^{\#})$,其中 $R^{\#}$ 如上所定义。
- [0169] “磺酰基氨基”基团是下式的基团: $-NHSO_2(R^{\#})$ 或 $-N(烷基)SO_2(R^{\#})$,其中每个烷基和 $R^{\#}$ 如上所定义。
- [0170] “磺酰胺”基团是下式的基团: $-S(=O)_2N(R^{\#})_2$ 或 $-S(=O)_2NH(R^{\#})$ 或 $-S(=O)_2NH_2$,其中每个 $R^{\#}$ 独立地如上所定义。
- [0171] “磷酸酯”基团是下式的基团: $-P(=O)(O(R^{\#}))_2$ 、 $-P(=O)(OH)_2$ 、 $-OP(=O)(O(R^{\#}))(R^{\#})$ 或 $-OP(=O)(OH)(R^{\#})$,其中每个 $R^{\#}$ 独立地如上所定义。
- [0172] “膦”基团是下式的基团: $-P(R^{\#})_2$,其中每个 $R^{\#}$ 独立地如上所定义。
- [0173] 当本文所述的基团(除烷基基团外)被说成是“取代的”时,它们可被任何适当的一个或多个取代基取代。取代基的说明性实例是在本文披露的示例性化合物和实施例中发现的那些,以及卤素(氯、碘、溴、或氟);烷基;羟基;烷氧基;烷氧基烷基;氨基;烷基氨基;羧基;硝基;氰基;硫醇;硫醚;亚胺;酰亚胺;脘;胍;烯胺;氨基羰基;酰氨基;磷酸酯;膦;硫代羰基;亚磺酰基;磺;磺酰胺;酮;醛;酯;脲;氨基甲酸酯;脞;羟胺;烷氧基胺;芳烷氧基胺;N-氧化物;肼;酰肼;脘;叠氮化物;异氰酸酯;异硫氰酸酯;氰酸酯;硫氰酸酯;氧(=O);B(OH)₂;O(烷基)氨基羰基;环烷基,其可以是单环的或者稠合或非稠合多环的(例如,环丙基、环丁基、环戊基或环己基);或杂环基,其可以是单环的或者稠合或非稠合多环的(例如,吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基或噻吩基);单环或者稠合或非稠合多环芳基或杂芳基(例如,苯基、萘基、吡咯基、呋喃基、咪唑基、噻吩基、咪唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、苯并咪唑基、苯并噻吩基或苯并呋喃基);芳基氧基;芳烷基氧基;杂环基氧基;以及杂环基烷氧基。
- [0174] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指由药学上可接受的无毒酸或碱(包括无机酸和碱以及有机酸和碱)制备的盐。
- [0175] 如本文所用并且除非另有说明,术语“溶剂化物”意指进一步包括通过非共价分子间力结合的化学计量或非化学计量的溶剂的化合物或其盐。在一个实施例中,溶剂化物是水合物。
- [0176] 如本文所用并且除非另有说明,否则术语“水合物”意指进一步包括通过非共价分子间力结合的化学计量或非化学计量的水的化合物或其盐。
- [0177] 本文描绘的化合物的所有药学上可接受的盐、溶剂化物和/或水合物都在本披露的范围内。
- [0178] 如本文所用并且除非另有说明,否则术语“前药”意指可以在生物条件(体外或体内)下水解、氧化或以其他方式反应以提供活性化合物、特别是化合物的化合物衍生物。前药的实例包括但不限于化合物的衍生物和代谢物,其包括可生物水解的部分,诸如可生物水解的酰胺、可生物水解的酯、可生物水解的氨基甲酸酯、可生物水解的碳酸酯、可生物水解的脲和可生物水解的磷酸酯类似物。在某些实施例中,具有羧基官能团的化合物的前药是羧酸的低级烷基酯。通过酯化分子上存在的任何羧酸部分方便地形成羧酸酯。通常可

以使用众所周知的方法来制备前药,诸如Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery[伯格药物化学和药物发现]第6版(Donald J.Abraham编辑,2001,Wiley[威立出版社])以及Design and Application of Prodrugs[前药的设计和应用](H.Bundgaard编辑,1985,Harwood Academic Publishers Gmfh[哈伍德学术出版公司])中描述的那些方法。

[0179] 如本文所用并且除非另有说明,否则术语“立体异构体”或“立体异构纯”意指化合物的一种立体异构体,其基本上不含该化合物的其他立体异构体。例如,具有一个手性中心的立体异构纯化合物将基本上不含该化合物的相对映异构体。具有两个手性中心的立体异构纯化合物将基本上不含该化合物的其他非对映异构体。典型的立体异构纯化合物包含按重量计大于约80%的该化合物的一种立体异构体和按重量计小于约20%的该化合物的其他立体异构体,按重量计大于约90%的该化合物的一种立体异构体和按重量计小于约10%的该化合物的其他立体异构体,按重量计大于约95%的该化合物的一种立体异构体和按重量计小于约5%的该化合物的其他立体异构体,或按重量计大于约97%的该化合物的一种立体异构体和按重量计小于约3%的该化合物的其他立体异构体。这些化合物可以有手性中心,并且可以以外消旋体、单独的对映异构体或非对映异构体、以及其混合物的形式存在。所有这些异构形式(包括其混合物)都包括在本文披露的实施例。此类化合物的立体异构纯形式的用途以及这些形式的混合物的用途都涵盖在本文披露的实施例中。例如,包含特定化合物的等量或不等量对映异构体的混合物可以用于本文披露的方法和组合物中。可以使用标准技术(如手性柱或手性拆分剂)来不对称地合成或拆分这些异构体。参见例如Jacques,J.等人,Enantiomers,Racemates and Resolutions[对映异构体、外消旋体及拆分](WileyInterscience,New York[纽约威利国际科学出版社],1981);Wilens,S.H.等人,Tetrahedron[四面体]33:2725(1977);Eliel,E.L.,Stereochemistry of Carbon Compounds[碳化合物的立体化学](McGrawHill,NY[纽约州麦格劳希尔出版社],1962);以及Wilens,S.H.,Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions[拆分剂和光学拆分表]第268页(E.L.Eliel编辑,Univ.of Notre Dame Press,Notre Dame,IN[印第安纳州圣母大学圣母大学出版社],1972)。

[0180] 还应注意的,化合物可以包括E和Z异构体或它们的混合物,以及顺式和反式异构体或它们的混合物。在某些实施例中,化合物被分离为顺式或反式异构体。在其他实施例中,化合物是顺式和反式异构体的混合物。

[0181] “互变异构体”是指化合物的彼此平衡的异构形式。这些异构形式的浓度将取决于该化合物所处的环境,并且可根据例如该化合物是固体还是在有机溶液或水溶液中而不同。例如,在水溶液中,吡唑可表现出以下异构形式,它们被称为彼此的互变异构体:



[0182] 如本领域技术人员容易理解的,各种各样的官能团和其他结构可表现出互变异构并且化合物的所有互变异构体都在本披露的范围内。

[0183] 还应注意的,化合物可以在一个或多个原子处含有非天然比例的原子同位素。例如,化合物可用放射性同位素(诸如氚(^3H)、碘-125(^{125}I)、硫-35(^{35}S)或碳-14(^{14}C))进行

放射性标记,或者可进行同位素富集,诸如富集氘(^2H)、碳-13(^{13}C)或氮-15(^{15}N)。如本文所用,“同位素体”是同位素富集的化合物。术语“同位素富集的”是指具有不同于原子的天然同位素组成的同位素组成的原子。“同位素富集的”也可指如下化合物,该化合物含有具有不同于原子的天然同位素组成的同位素组成的至少一个原子。术语“同位素组成”是指给定原子的每种同位素的量。放射性标记的和同位素富集的化合物可用作治疗剂(例如,癌症和炎症治疗剂)、研究试剂(例如,结合测定试剂)和诊断剂(例如,体内显像剂)。本文所述的化合物的所有同位素变化(无论是否具有放射性)都应涵盖在本文所提供的实施例的范围内。在一些实施例中,提供了化合物的同位素体,例如,这些同位素体是氘、碳-13或氮-15富集的化合物。

[0184] 应注意的是,如果在所描绘的结构与该结构的名称之间存在差异,则所描绘的结构将被给予更大的权重。

[0185] 如本文所用,“炔基”是指含有至少两个碳原子和一个或多个碳-碳三键的单价烃基部分。炔基任选被取代,并且可以是直链、支链或环状的。炔基包括但不限于具有以下的那些基团:具有2-20个碳原子,即 C_{2-20} 炔基;具有2-12个碳原子,即 C_{2-12} 炔基;具有2-8个碳原子,即 C_{2-8} 炔基;具有2-6个碳原子,即 C_{2-6} 炔基;以及具有2-4个碳原子,即 C_{2-4} 炔基。炔基部分的实例包括但不限于乙炔基、丙炔基和丁炔基。

[0186] 如本文所用,“卤代烷基”是指如上所定义的烷基,其中该烷基包括至少一个选自卤素(例如氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I))的取代基。卤代烷基的实例包括但不限于 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CCl}_2\text{F}$ 和 $-\text{CCl}_3$ 。

[0187] 如本文所用,“卤代烷氧基”是指如上所定义的烷氧基,其中该烷氧基包括至少一个选自卤素(例如F、Cl、Br或I)的取代基。

[0188] 如本文所用,“芳基烷基”是指作为烷基化合物的基团的单价部分,其中烷基化合物被芳族取代基取代,即芳族化合物包括与烷基基团的单键,并且其中该基团位于烷基基团上。芳基烷基基团经由烷基基团与所示的化学结构键合。芳基烷基可以由以下结构表示,例如 $\text{B}-\text{CH}_2-$ 、 $\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $\text{B}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$,其中B是芳族部分,例如苯基。芳基烷基任选地被取代,即芳基基团和/或烷基基团可以如本文所披露那样被取代。芳基烷基的实例包括但不限于苄基。

[0189] 如本文所用,“烷基芳基”是指作为芳基化合物的基团的单价部分,其中芳基化合物被烷基取代基取代,即芳基化合物包括与烷基基团的单键,并且其中该基团位于芳基基团上。烷基芳基经由芳基基团与所示的化学结构键合。烷基芳基可以由例如 $-\text{B}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{B}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{B}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 的结构表示,其中B是芳族部分,例如苯基。烷基芳基任选地被取代,即芳基基团和/或烷基基团可以如本文所披露那样被取代。烷基芳基的实例包括但不限于甲苯酰基。

[0190] 如本文所用,“芳氧基”是指作为芳族化合物的基团的单价部分,其中环原子是碳原子,并且其中环被氧基团取代,即芳族化合物包括与氧原子的单键并且其中该基团位于氧原子上,例如对于苯氧基为 $\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}-$ 。芳氧基取代基通过该氧原子与它们取代的化合物键合。芳氧基任选地被取代。芳氧基包括但不限于具有以下的那些基团:6至20个环碳原子,即 C_{6-20} 芳氧基;6至15个环碳原子,即 C_{6-15} 芳氧基;以及6至10个环碳原子,即 C_{6-10} 芳氧基。芳氧基部分的实例包括但不限于苯氧基、萘氧基和蒽氧基。

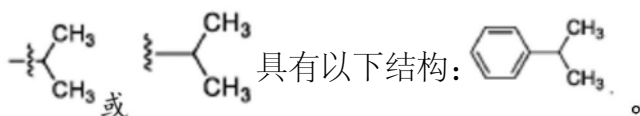
[0191] 如本文所用,术语“残基”是指化合物内在化学反应后保留的化学部分。例如,术语“氨基酸残基”或“N-烷基氨基酸残基”是指氨基酸或N-烷基氨基酸与合适的偶联配偶体的酰胺偶联或肽偶联的产物;其中例如水分子在氨基酸或N-烷基氨基酸的酰胺或肽偶联后被排出,产生具有掺入其中的氨基酸残基或N-烷基氨基酸残基的产物。

[0192] 如本文所用,“糖”或“糖基团”或“糖残基”是指可包含3-碳(三糖)单元、4-碳(四糖)单元、5-碳(戊糖)单元、6-碳(己糖)单元、7-碳(庚糖)单元或它们的组合的碳水化合物部分,并且可以是单糖、二糖、三糖、四糖、五糖、寡糖或任何其他多糖。在一些情况下,“糖”或“糖基团”或“糖残基”包括呋喃糖(例如,呋喃核糖、呋喃果糖)或吡喃糖(例如,吡喃葡萄糖、吡喃半乳糖)或它们的组合。在一些情况下,“糖”或“糖基团”或“糖残基”包括醛糖或酮糖或它们的组合。单糖的非限制性实例包括核糖、脱氧核糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖和果糖。二糖的非限制性实例包括蔗糖、麦芽糖、乳糖、乳果糖和海藻糖。其他“糖”或“糖基团”或“糖残基”包括多糖和/或寡糖,包括但不限于直链淀粉、支链淀粉、糖原、菊粉和纤维素。在一些情况下,“糖”或“糖基团”或“糖残基”是氨基糖。在一些情况下,“糖”或“糖基团”或“糖残基”是经由其氨基基团与分子的其余部分连接以与分子的其余部分形成酰胺键(即,葡萄糖酰胺)的葡萄糖胺残基(1-氨基-1-脱氧-D-葡萄糖醇)。

[0193] 如本文所用,“无机酸残基”是指正磷酸和焦磷酸、磷酸和硫酸残基。

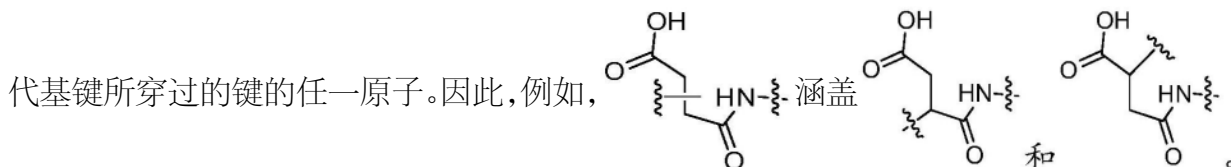
[0194] 如本文所用,“有机酸残基”是指烷烃羧酸、氨基酸或寡肽的残基。在一个实施例中,烷烃羧酸是甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、十二烷酸、十三烷酸、十四烷酸、十五烷酸、十六烷酸、十七烷酸、十八烷酸、十九烷酸或二十烷酸。在一个实施例中,烷烃羧酸是甲酸、乙酸、丙酸或丁酸。

[0195] 某些基团、部分、取代基和原子用与一个或多个键相交的弯曲线描绘,以指示通过其键合这些基团、部分、取代基、原子的原子。例如,被丙基基团取代的苯基基团被描绘为:



[0196] 如本文所用,除非另有规定,否则显示通过环原子之间的键键合到环状基团(例如,芳族、杂芳族、稠合环以及饱和或不饱和环烷基或杂环烷基)的取代基的说明旨在表明环状基团可根据本文阐述的技术或本披露所属领域中已知的技术在环状基团中的任何环位置处或在稠合环基团中的任何环上被该取代基取代。

[0197] 除非另有规定,否则显示通过两个原子之间的键键合到非环状基团的取代基的说明旨在表明该取代基可根据本文阐述的技术或本披露所属领域中已知的技术键合到该取代基键所穿过的键的任一原子。因此,例如,



具体实施方式

[0198] 本披露提供了抗CEA抗体药物缀合物(ADC)。本披露还提供了包含具有期望药代动力学特征和其他期望属性的抗体的抗CEA ADC,并且因此可以用于降低具有表达或积累CEA

的细胞的可能性或治疗具有该细胞(诸如以表达或积累CEA为特征的癌症)的受试者。本披露进一步提供了包含抗CEA ADC的药物组合物以及制备和使用该抗CEA ADC或包含该抗CEA ADC的药物组合物的方法。在一些实施例中,抗CEA ADC可用于治疗CEA相关疾病和障碍。

抗CEA抗体

[0199] 本披露提供了包含与CEA特异性结合的抗CEA抗体或其抗原结合片段的抗CEA ADC。本披露的抗体或抗原结合片段包括但不限于如下所述产生的抗体或其抗原结合片段。

[0200] 本披露提供了与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:14、31或48的氨基酸序列的VH结构域(表1)。本披露还提供了与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有表1中列出的HCDR中的任一个的氨基酸序列的重链CDR(HCDR)。在一方面,本披露提供了与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体包含具有表1中列出的HCDR中的任一个的氨基酸序列的一个、两个、三个或更多个HCDR(或替代性地,由这些HCDR组成)。

[0201] 本披露提供了与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含如表1中所述的VH结构域或表1的HCDR组中的任一组,以及具有SEQ ID NO:15、32或49的氨基酸序列(表1)的VL结构域。本披露还提供了与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含具有表1中列出的轻链CDR(LCDR)中的任一个的氨基酸序列的LCDR。具体地,本披露提供了与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段包含具有表1中列出的LCDR中的任一个的氨基酸序列的一个、两个、三个或更多个LCDR(或替代性地,由这些LCDR组成)。

[0202] 本披露提供了与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含

- (i) 包含SEQ ID NO:31的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的轻链可变区;或者
- (ii) 包含SEQ ID NO:48的重链可变区和包含SEQ ID NO:49的轻链可变区;或者
- (iii) 包含SEQ ID NO:14的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的轻链可变区;或者
- (iv) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的LCDR3;或者

- (v) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的HCDR3,以及

三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的LCDR3;或者
(vi) 三个重链CDR:

包含如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的HCDR1,

包含如SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的HCDR2,

包含如SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的HCDR3,以及
三个轻链CDR:

包含如SEQ ID NO:44所示的氨基酸序列的LCDR1,

包含如SEQ ID NO:45所示的氨基酸序列的LCDR2,

包含如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的LCDR3。

[0203] 本披露提供了包含与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段的ADC,其中所述抗体或抗原结合片段包含与SEQ ID NO:14、31或48(表1)所示的序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH结构域。

[0204] 本披露提供了包含与CEA特异性结合的抗体或抗原结合片段的ADC,其中所述抗体或抗原结合片段包含与(i)、(ii)或(iii)的VH序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH结构域;以及与(i)、(ii)或(iii)的VL序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL结构域:

(i) 包含SEQ ID NO:31的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的轻链可变区;

(ii) 包含SEQ ID NO:48的重链可变区和包含SEQ ID NO:49的轻链可变区;以及

(iii) 包含SEQ ID NO:14的重链可变区和包含SEQ ID NO:15的轻链可变区。

[0205] 在一些方面,当与表1中所述的序列中描绘的CDR区相比时,在这些CDR区中已经改变不超过1、2、3、4或5个氨基酸(例如,经由插入、缺失或取代)。

[0206] 本披露的其他抗体包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已经改变但与表1中所述的可变区序列具有至少60%、70%、80%、90%、95%或99%百分比同一性的那些。在一些方面,当与表1中所述的序列中描绘的可变区相比时,在这些可变区中已经改变不超过1、2、3、4或5个氨基酸(例如,经由插入、缺失或取代),同时保留基本上相同的治疗活性。

[0207] 本披露还提供了编码与CEA特异性结合的抗体的VH、VL、全长重链和全长轻链的核酸序列。可以优化此类核酸序列以在哺乳动物细胞中表达。

表1.氨基酸和核酸序列

抗体	SEQ ID NO		序列
BGA5384 (IMGT)	SEQ ID NO:1	HCDR1 (IMGT)	GYIFTSYY
	SEQ ID NO:2	HCDR2 (IMGT)	INPQTGKT
	SEQ ID NO:3	HCDR3 (IMGT)	AREYGNINYPLDY
	SEQ ID NO:4	LCDR1 (IMGT)	ENQYGY
	SEQ ID NO:5	LCDR2 (IMGT)	NY
	SEQ ID NO:6	LCDR3 (IMGT)	QHHLGTPYT
BGA5384 (Kabat)	SEQ ID NO:7	HCDR1 (Kabat)	SYYLH
	SEQ ID NO:8	HCDR2 (Kabat)	YINPQTGKTSYAQKFQG
	SEQ ID NO:9	HCDR3 (Kabat)	EYGNINYPLDY

	SEQ ID NO:10	LCDR1 (Kabat)	RASENQYGYLA
	SEQ ID NO:11	LCDR2 (Kabat)	NYKNLVE
	SEQ ID NO:6	LCDR3 (Kabat)	QHHLGTPYT
BGA5384 (Chothia)	SEQ ID NO:12	HCDR1 (Chothia)	GYIFTSY
	SEQ ID NO:13	HCDR2 (Chothia)	NPQTGK
	SEQ ID NO:9	HCDR3 (Chothia)	EYGNVNYPLDY
	SEQ ID NO:10	LCDR1 (Chothia)	RASENQYGYLA
	SEQ ID NO:11	LCDR2 (Chothia)	NYKNLVE
	SEQ ID NO:6	LCDR3 (Chothia)	QHHLGTPYT
BGA5384	SEQ ID NO:14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVR QAPGQGLEWIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMEISSLRSEDTAVYYCAREYGNVNYPLDYWGQG TLVTVSS
	SEQ ID NO:15	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENQYGYLAWYQQ KPGKVPKLLIYNYKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFLTISL QPEDVATYYCQHHLGTPYTFGQGTKVEIK
	SEQ ID NO:16	VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAA AAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCG AGCGGCTATATTTTACCAGCTATTACCTGCATTGGGTG CGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCT ATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCA GAAATTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACC AGCACCAGCACCGTGTATATGGAAGTGAGCAGCCTGC GCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAA TATGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAG

			GGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC
	SEQ ID NO:17	VL DNA	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCAGCAGCCTGAGCG CGAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGC GAGCGAAAACCAGTATGGCTATCTGGCGTGGTATCAGC AGAAACCGGGCAAAGTGCCGAAACTGCTGATTATAA CTATAAAACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAGCCGCTTT AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCA TTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGCGACCTATTAT TGCCAGCATCATCTGGGCACCCCGTATACCTTTGGCCA GGGCACCAAAGTGGAATTTAA
BGA3715 (也称为 BGA190) (IMGT)	SEQ ID NO:18	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSFG
	SEQ ID NO:19	HCDR2 (IMGT)	ISIGSDII
	SEQ ID NO:20	HCDR3 (IMGT)	TRRSYRSYWYFDV
	SEQ ID NO:21	LCDR1 (IMGT)	ENIYSY
	SEQ ID NO:22	LCDR2 (IMGT)	NA
	SEQ ID NO:23	LCDR3 (IMGT)	QHHFLSPWM
BGA3715 (BGA190) (Kabat)	SEQ ID NO:24	HCDR1 (Kabat)	SFGMH
	SEQ ID NO:25	HCDR2 (Kabat)	YISIGSDIIYYADTVKG
	SEQ ID NO:26	HCDR3 (Kabat)	RSYRSYWYFDV
	SEQ ID NO:27	LCDR1 (Kabat)	RTSENIYSYLA
	SEQ ID NO:28	LCDR2 (Kabat)	NAKTLAE
	SEQ ID NO:23	LCDR3 (Kabat)	QHHFLSPWM
BGA3715	SEQ ID	HCDR1	GFTFSSF

(BGA190) (Chothia)	NO:29	(Chothia)	
	SEQ ID NO:30	HCDR2 (Chothia)	SIGSDI
	SEQ ID NO:26	HCDR3 (Chothia)	RSYRSYWYFDV
	SEQ ID NO:27	LCDR1 (Chothia)	RTSENIYSYLA
	SEQ ID NO:28	LCDR2 (Chothia)	NAKTLAE
	SEQ ID NO:23	LCDR3 (Chothia)	QHHFLSPWM
BGA3715 (BGA190)	SEQ ID NO:31	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRLESCAASGFTFSFGMHWVR QAPERGLEWVAYISIGSDIYYADTVKGRFTISRDNPKNT LFLQMTSLRSEDTAVYYCTRRSYRSYWYFDVWGAGTT VTVSS
	SEQ ID NO:32	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYSYLAWYQQK QGKSPHLLVYNAKTLAEGVPSRFGSGSGTQFSLKIISLQ PEDFGTYCQHHFLSPWMFGGGTKLEIK
	SEQ ID NO:33	VH DNA	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGC AGCCTGGAGGGTCCCGGGAACCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTC GTCAGGCTCCAGAGAGGGGGCTGGAGTGGGTGCGATA CATTAGTATTGGCAGTGATATCATCTACTATGCAGACAC AGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCC AAGAACACCCTGTTCTGCAAATGACCAGTCTGAGGT CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACAAGAAGGTC TTATAGGTCCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAG GGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	SEQ ID NO:34	VL DNA	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGC ATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAACA AGTGAGAATATTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAG AAACAGGGAAAATCTCCTCATCTCCTGGTCTATAATGC AAAAACCTTAGCAGAGGGTGTGCCATCAAGGTTCACT GGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAT CAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGACTTATTACTGTC AGCATCATTTTCTTAGTCCGTGGATGTTCTGGTGGAGGC

			ACCAAGCTGGAAATCAAA
BGA288 (IMGT)	SEQ ID NO:35	HCDR1 (IMGT)	GYTFTDYN
	SEQ ID NO:36	HCDR2 (IMGT)	IGPNYGGT
	SEQ ID NO:37	HCDR3 (IMGT)	ARRGSIPRAVDY
	SEQ ID NO:38	LCDR1 (IMGT)	QDIHNY
	SEQ ID NO:39	LCDR2 (IMGT)	RA
	SEQ ID NO:40	LCDR3 (IMGT)	LQYDEFPTYT
BGA288 (Kabat)	SEQ ID NO:41	HCDR1 (Kabat)	DYNID
	SEQ ID NO:42	HCDR2 (Kabat)	DIGPNYGGTIYNQKFKG
	SEQ ID NO:43	HCDR3 (Kabat)	RGSIPRAVDY
	SEQ ID NO:44	LCDR1 (Kabat)	KASQDIHNYLS
	SEQ ID NO:45	LCDR2 (Kabat)	RANRLVD
	SEQ ID NO:40	LCDR3 (Kabat)	LQYDEFPTYT
BGA288 (Chothia)	SEQ ID NO:46	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDY
	SEQ ID NO:47	HCDR2 (Chothia)	GPNYGG
	SEQ ID NO:43	HCDR3 (Chothia)	RGSIPRAVDY
	SEQ ID NO:44	LCDR1 (Chothia)	KASQDIHNYLS
	SEQ ID NO:45	LCDR2 (Chothia)	RANRLVD

	SEQ ID NO:40	LCDR3 (Chothia)	LQYDEFPYT
BGA288	SEQ ID NO:48	VH	EVLLQQSGPELVKPGASVKIFCKASGYFTDYNIDWVQQ SHGKSLEWIGDIGPNYGGTIYNQKFKGKATLTVAKSSSTA YMELRSLTSEDYAVYYCARRGSIPRAVDYWGQGTSTVTV SS
	SEQ ID NO:49	VL	DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDIHNYLSWFQPK PGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSE YEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTGLEIK
	SEQ ID NO:50	VH DNA	GAGGTCCTGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATTTTCTGTAAGGCTTCT GGATACACATTCACTGACTACAACATAGACTGGGTGCA GCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGAT ATTGGTCCTAATTATGGTGGTACTATCTACAACCAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGCCAAGTCC TCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACAT CTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGCGG TAGCATCCCGAGGGCTGTGGACTACTGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
	SEQ ID NO:51	VL DNA	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGC ATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCG AGTCAGGACATTCACTAATACTATTAAAGCTGGTTCAGCA GAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTG CAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAG TGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCA GCAGCCTGGAGTATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTC TACAGTATGATGAGTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGG ACCAAGCTGGAAATAAAA

[0208] 本披露提供了包含抗体及其抗原结合片段和本文所述的任何有效载荷的ADC,这些抗体及其抗原结合片段与人CEA的表位结合。

[0209] 本披露还提供了包含抗体及其抗原结合片段的ADC,这些抗体及其抗原结合片段与具有表1中披露的一个或多个序列的抗CEA抗体结合相同的表位。因此,另外的抗体及其抗原结合片段可以基于它们在结合测定中与其他抗体交叉竞争(例如,以统计学显著的方式竞争性抑制其他抗体的结合)的能力来鉴定。测试抗体抑制表1的抗体及其抗原结合片段与CEA结合的能力证明该测试抗体可以与表1的该抗体或其抗原结合片段竞争结合CEA。不受任何一种理论的束缚,这样的抗体可以结合CEA与其竞争的抗体或其抗原结合片段相同或相关(例如,在结构上相似或在空间上邻近)的表位。在某些方面,与表1的抗体或其抗原结合片段结合CEA上的相同表位的抗体是人或人源化单克隆抗体。这种人或人源化单克隆抗体可以如本文所述制备和分离。

抗体接头

[0210] 还应理解,本文披露的抗体的多肽链的结构域和/或区可以被各种长度的接头区分开。在一些实施例中,抗原结合结构域通过接头区与CL、CH1、铰链、CH2、CH3或整个Fc区彼此分开。例如,VL1-CL-(接头)-VH2-CH1。这样的接头区可以包含随机分类的氨基酸,或一组受限的氨基酸。此类接头区可以是柔性的或刚性的(参见US2009/0155275)。

[0211] 在一些实施例中,接头可以用于缀合毒素或有效载荷与所披露的抗体之间的化合物。在一些实施例中,接头在细胞内条件下是可切割的,使得接头的切割在细胞内环境中从抗体释放毒素/有效载荷。在又其他实施例中,接头单元是不可切割的,并且毒素例如通过抗体降解被释放。接头可以是但不限于可切割接头、不可切割接头、亲水性接头、预带电荷接头或基于二羧酸的接头。

特异性氨基酸的二聚化

[0212] 在一个实施例中,本文披露的抗体包含至少一种二聚化特异性氨基酸改变。二聚化特异性氨基酸改变产生“杵臼”相互作用,并且增加正确抗体的组装。二聚化特异性氨基酸可以在CH1结构域或CL结构域或它们的组合内。用于将CH1结构域与其他CH1结构域(CH1-CH1)和CL结构域与其他CL结构域(CL-CL)配对的二聚化特异性氨基酸的实例至少可以在WO 2014082179、WO 2015181805家族和WO 2017059551的披露内容中找到。二聚化特异性氨基酸也可以在Fc结构域内,并且可以与CH1或CL结构域内的二聚化特异性氨基酸组合。在一个实施例中,本披露提供了一种包含至少一个二聚化特异性氨基酸对的抗体。

Fc区的框架的改变

[0213] 在各方面,通过用不同的氨基酸残基替代至少一个氨基酸残基来改变Fc区,以改变抗体的效应子功能。例如,可以用不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸,使得抗体对效应配体具有改变的亲和力,但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可以是例如Fc受体或补体的C1组分。此方法描述于例如Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260中。

[0214] 在另一方面,可以用一个或多个不同的氨基酸残基替代一个或多个氨基酸残基,使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低的或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法描述于例如Idusogie等人的美国专利号6,194,551中。

[0215] 在另一方面,改变一个或多个氨基酸残基从而改变抗体固定补体的能力。此方法描述于例如Bodmer等人的公布WO 94/29351中。在特定的方面,本披露的抗体或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸被IgG1亚类和 κ 同种型的一个或多个同种异型氨基酸残基替代。同种异型氨基酸残基还包括但不限于IgG1、IgG2和IgG3亚类的重链恒定区以及 κ 同种型的轻链恒定区,如Jefferis等人,MAbs.[单克隆抗体]1:332-338(2009)所述。

[0216] 在另一方面,通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区以增加抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fc γ 受体的亲和力。此方法描述于例如Presta的公布WO 00/42072中。此外,已经绘制了在人IgG1上Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和FcRn的结合位点,并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见Shields等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276:6591-6604,2001)。

[0217] 在另一方面,抗体的糖基化被修饰。例如,可以制备无糖基化抗体(即,抗体缺乏或具有降低的糖基化)。例如,可以改变糖基化以增加抗体对“抗原”的亲和力。这种碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如,可以进行一

个或多个氨基酸取代,其导致消除一个或多个可变区框架糖基化位点,从而消除该位点的糖基化。这种无糖基化可以增加抗体对抗原的亲和力。此方法描述于例如Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[0218] 另外地或替代性地,可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如具有减少量的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体或具有增加的二等分GlcNac结构的抗体。已经证明此类改变的糖基化模式增加抗体的ADCC能力。这种碳水化合物修饰可通过例如在具有改变的糖基化途径的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化途径的细胞已经在本领域中描述并且可以用作宿主细胞,在其中表达重组抗体从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如, Hang等人的EP 1,176,195描述了具有功能破坏的FUT8基因的细胞系,该基因编码岩藻糖基转移酶,使得在这种细胞系中表达的抗体显示出低岩藻糖基化。Presta的公布WO 03/035835描述了变体CHO细胞系Lec13细胞,其具有降低的将岩藻糖连接至Asn(297)-连接的碳水化合物的能力,也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields等人, (2002) J. Biol. Chem. [生物化学杂志] 277:26733-26740)。Umana等人的WO 99/54342描述了被工程化以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如, $\beta(1,4)$ -N乙酰氨基葡萄糖转移酶III (GnTIII))的细胞系,使得在工程化的细胞系中表达的抗体表现出增加的二等分GlcNac结构,这导致抗体的ADCC活性增加(还参见Umana等人, Nat. Biotech. [自然生物技术] 17:176-180, 1999)。

[0219] 在另一方面,如果期望降低ADCC,许多先前的报道显示人抗体亚类IgG4仅具有适度的ADCC并且几乎没有CDC效应子功能(Moore G.L.等人, 2010MAbs[单克隆抗体], 2:181-189)。然而,发现天然IgG4在应激条件下(诸如在酸性缓冲液中或在升高的温度下)较不稳定(Angal, S. 1993Mol Immunol[分子免疫学], 30:105-108; Dall'Acqua, W.等人, 1998Biochemistry[生物化学], 37:9266-9273; Aalberse等人, 2002Immunol[免疫学], 105:9-19)。降低ADCC可以通过将抗体可操作地连接到用降低Fc γ R结合或C1q结合活性的改变的组合工程化的IgG4 Fc从而降低或消除ADCC和CDC效应子功能来实现。考虑到抗体作为生物药物的物理化学特性, IgG4的较不期望的固有特性之一是其两条重链在溶液中动态分离以形成半抗体,这导致经由称为“Fab臂交换”的过程在体内产生双特异性抗体(Van der Neut Kolfschoten M.等人, 2007Science[科学], 317:1554-157)。228位(EU编号系统)丝氨酸突变为脯氨酸表现出对IgG4重链分离的抑制作用(Angal, S. 1993Mol Immunol[分子免疫学], 30:105-108; Aalberse等人, 2002Immunol[免疫学], 105:9-19)。据报道,铰链区和 γ Fc区中的一些氨基酸残基对抗体与Fc γ 受体的相互作用具有影响(Chappel S.M.等人, 1991Proc. Natl. Acad. Sci. USA[美国国家科学院学报], 88:9036-9040; Mukherjee, J.等人, 1995FASEB J[美国实验生物学学会联合会杂志], 9:115-119; Armour, K.L.等人, 1999Eur J Immunol[欧洲免疫学杂志], 29:2613-2624; Clynes, R.A.等人, 2000Nature Medicine[自然医学], 6:443-446; Arnold J.N., 2007Annu Rev Immunol[免疫学年鉴], 25:21-50)。此外,在人群中一些罕见的IgG4同种型也可引起不同的物理化学特性(Brusco, A.等人, 1998Eur J Immunogenet[欧洲免疫遗传学杂志], 25:349-55; Aalberse等人, 2002Immunol[免疫学], 105:9-19)。为了产生具有低ADCC和CDC但具有良好稳定性的抗体,可以修饰人IgG4的铰链区和Fc区并引入许多改变。这些经修饰的IgG4 Fc分子可以在SEQ ID NO:83-88、授予Li等人的美国专利号8,735,553中找到。

抗体产生

[0220] 所披露的ADC的抗体及其抗原结合片段可以通过本领域已知的任何手段来产生,包括但不限于抗体四聚体的重组表达、化学合成和酶消化,而全长单克隆抗体可以通过例如杂交瘤或重组产生来获得。重组表达可以来自本领域已知的任何适当的宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞、细菌宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞等。

[0221] 本披露进一步提供了编码本文所述的抗体的多核苷酸,例如编码包含如本文所述的互补决定区的重链或轻链可变区或区段的多核苷酸。在一些方面,编码重链可变区的多核苷酸与由SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:50表示的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。在一些方面,编码轻链可变区的多核苷酸与选自SEQ ID NO:17、34或51的多核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列同一性。

[0222] 本披露的多核苷酸可以编码抗CEA抗体的可变区序列。它们还可以编码抗体的可变区和恒定区。一些多核苷酸序列编码包含示例性抗CEA抗体的重链和轻链的可变区的多肽。

[0223] 本披露还提供了用于产生抗CEA抗体的表达载体和宿主细胞。表达载体的选择取决于表达载体的预期宿主细胞。典型地,表达载体含有可操作地连接至编码抗CEA抗体链或抗原结合片段的多核苷酸的启动子和其他调节序列(例如,增强子)。在一些方面,除了在诱导条件的控制下,使用诱导型启动子来防止插入序列的表达。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可以在非诱导条件下、而不在偏向宿主细胞更好耐受其表达产物的编码序列的群体的情况下扩大经转化的生物体的培养。除了启动子外,还可以包括其他调控元件以有效表达抗CEA抗体或其抗原结合片段。这些元件可包括ATG起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其他序列。另外,表达的效率可以通过包含适于所使用的细胞系统的增强子来提高(参见例如Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.[细胞分化中的结果和问题]20:125,1994;以及Bittner等人,Meth.Enzymol.[酶学方法],153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可以用于增加哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0224] 用于携带并表达抗CEA抗体载体的宿主细胞可以是原核或真核的。大肠杆菌是一种可用于克隆和表达本披露多核苷酸的原核宿主。其他适用的微生物宿主包括杆菌(诸如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*))和其他肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*) (诸如沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)和各种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种)。在这些原核宿主中,还可以制备通常含有与宿主细胞相容的表达控制序列(例如,复制起点)的表达载体。另外,可存在任何数量的各种众所周知的启动子,诸如乳糖启动子系统、色氨酸(*trp*)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常任选地用操纵子序列控制表达,并且具有核糖体结合位点序列等以启动和完成转录和翻译。其他微生物诸如酵母也可以用于表达抗CEA抗体。也可以使用昆虫细胞与杆状病毒载体的组合。

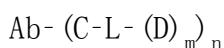
[0225] 在其他方面,哺乳动物宿主细胞用于表达和产生本披露的抗CEA抗体。实例包括表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系或携带外源性表达载体的哺乳动物细胞系。这些包括任何正常死亡或正常或异常永生化动物或人细胞。例如,已经开发了几种能够分泌完

整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种COS细胞系、HEK 293细胞、骨髓瘤细胞系、转化的B细胞和杂交瘤。使用哺乳动物组织细胞培养物来表达多肽在例如以下中进行了一般性讨论:Winnacker, From Genes to Clones[从基因到克隆], VCH Publishers[VCH出版社], 纽约州, 纽约市, 1987。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可以包括表达控制序列, 如复制起点、启动子和增强子(参见例如Queen等人, Immunol. Rev. [免疫学综述] 89: 49-68, 1986) 和必要的加工信息位点, 如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止子序列。这些表达载体通常含有衍生自哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异性的、阶段特异性的、和/或可调控的或可调节的。有用的启动子包括但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素诱导型CMV启动子(如入立即早期CMV启动子)、组成型CMV启动子和本领域已知的启动子-增强子组合。

抗体药物缀合物

[0226] 本文披露的抗体可与细胞毒性剂(本文的“D”或“P”)组合以形成抗体药物缀合物。细胞毒性剂可以是抑制或减少细胞中分子表达、抑制或减少细胞功能、诱导细胞凋亡和/或引起细胞死亡的任何分子。细胞毒性剂的实例包括本文所述的那些。在实施例中, 细胞毒性剂是拓扑异构酶抑制剂。

[0227] 在实施例中, 抗体药物缀合物具有式A:



(A),

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物, 其中:

Ab是该抗体或其抗原结合片段;

C是缀合部分;

L是接头;

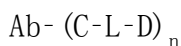
D是细胞毒性剂;

m是1至8的整数; 以及

n是1至10。

在具体的实施例中, m是1。

[0228] 在实施例中, 抗体药物缀合物具有式A-1:



(A-1),

或其药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物, 其中:

Ab是该抗体或其抗原结合片段;

C是缀合部分;

L是接头;

D是细胞毒性剂;

m是1至8的整数; 以及

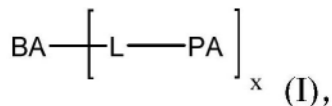
n是1至10。

[0229] 在实施例中, n是3至10, 例如4至10、5至10、6至10或7至9。在某些实施例中, n是约

8。

[0230] 国际公布号W0 2023/125530 (其全部内容通过援引并入本文) 披露了其接头有效载荷部分适用于本披露的上下文中的抗体药物缀合物, 以及适用于本披露的上下文中的接头有效载荷。在一些实施例中, 接头有效载荷是W0 2023/125530中披露的接头有效载荷。

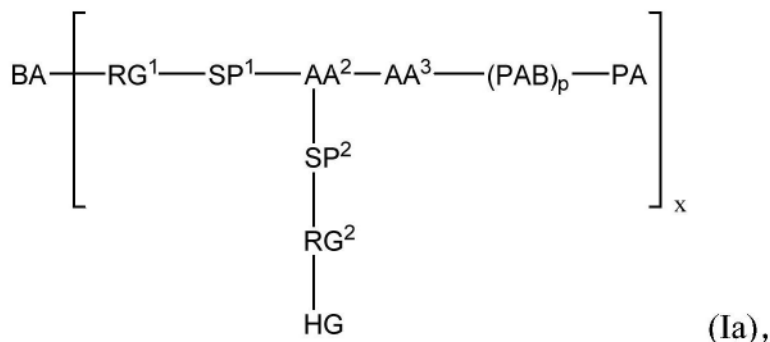
[0231] 在实施例中, 抗体药物缀合物具有式 (I) :



或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药,

其中BA是Ab, 该变量关于本披露的抗体药物缀合物 (例如, 式A或A-1的抗体药物缀合物) 进行描述; L是共价接头; PA是有效载荷残基 (例如, 细胞毒性剂 (D)), 该变量关于本披露的抗体药物缀合物 (例如, 式A或A-1的抗体药物缀合物) 进行描述; 并且下标x是1至30 (例如, n), 该变量关于本披露的抗体药物缀合物 (例如, 式A或A-1的抗体药物缀合物) 进行描述。在一些情况下, x是1至4。在一些情况下, x是约1。在一些情况下, x是约2。在一些情况下, x是约3。在一些情况下, x是约4。

[0232] 在另外的实施例中, 抗体药物缀合物具有式 (Ia) :

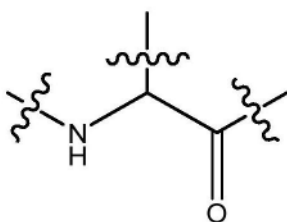


或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药,

其中RG¹是反应基团残基; RG²是任选的反应基团残基; SP¹和SP²在每种情况下独立地是任选的间隔基团残基; HG是亲水性残基; PAB是任选的自消单元; 下标p是0或1; 并且下标x是1至30。其余变量 (例如, AA²、AA³) 的值和变量 (例如, x、p、PAB、HG、RG¹、RG²、SP¹、SP²、BA) 的替代值如本文别处所述。

[0233] 在一些实施例中, x是1至15。在一些实施例中, x是2至10。在一些实施例中, x是3至9。在一个实施例中, x是约3。在一个实施例中, x是约4。在一个实施例中, x是约5。在一个实施例中, x是约6。在一个实施例中, x是约7。在一个实施例中, x是约8。在一个实施例中, x是约9。

[0234] 在式 (Ia) 的化合物的一些实施例中, AA²包含式 (W) :

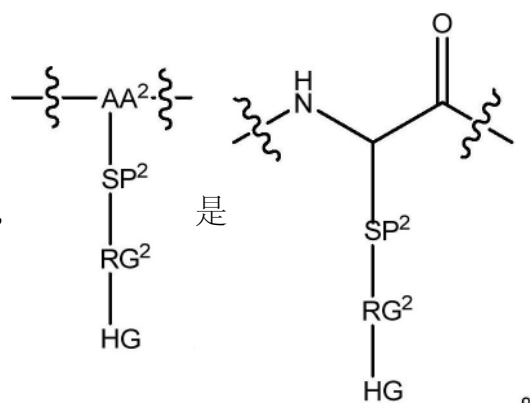


(W);以及

AA³是-缬氨酸-丙氨酸-、-缬氨酸-瓜氨酸-或的二肽残基;其中

R⁶是-CH₃或-(CH₂)₃-NHC(=O)NH₂。

[0235] 在一些实施例中,

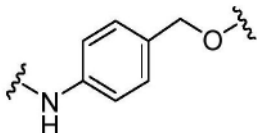


是

[0236] 在一些实施例中,AA³是其中R⁶是-CH₃或-(CH₂)₃-NHC(=O)NH₂。

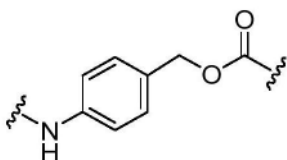
在另外的实施例中,R⁶是-CH₃。

[0237] 在一些实施例中,PAB表示-NH-CH₂-O-,式(Y1):



(Y1),或

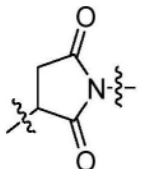
式(Y2):

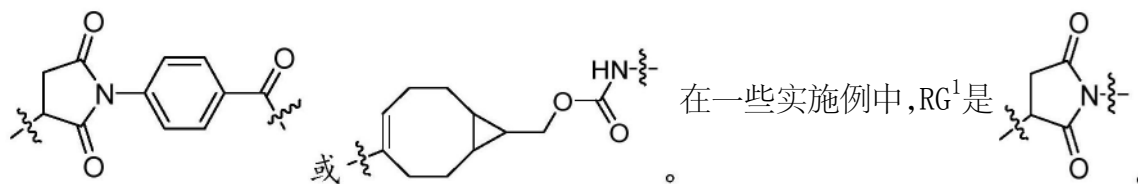


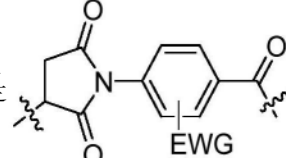
(Y2),

其中表示PAB通过其与式中的相邻基团键合的键。

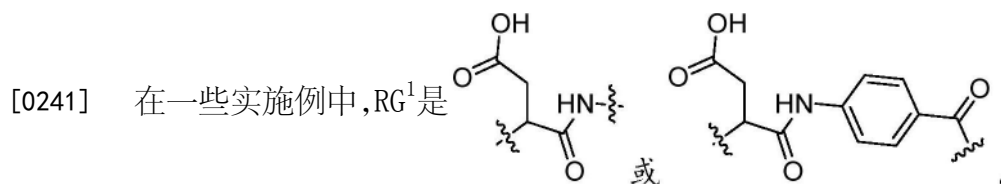
[0238] 在一些实施例中,PAB是-NH-CH₂-O-。

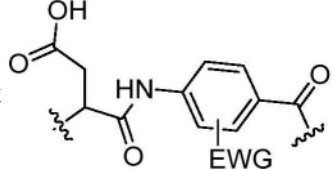
[0239] 在一些实施例中, RG^1 是  - (琥珀酰亚胺 - 3 - 基 - N) - 、



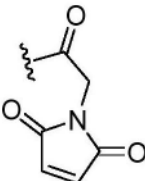
[0240] 在一些实施例中, RG^1 是  , 其中EWG是吸电子基团, 例如-CN、-

NO_2 、卤素、 $-CF_3$ 、 $-C(=O)OR^1$ 或 $-C(=O)R^1$, 并且 R^1 是取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环烷基或者取代或未取代的杂芳基。

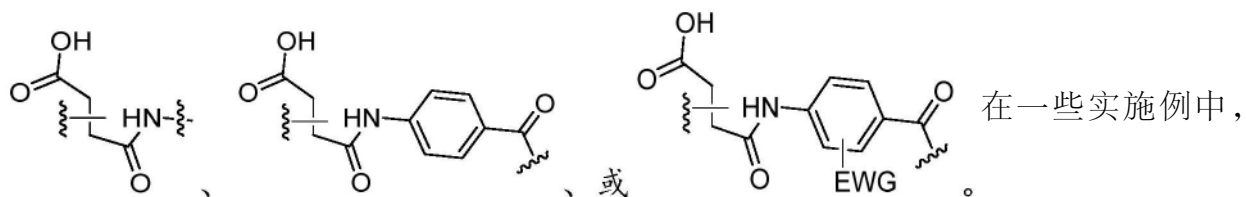


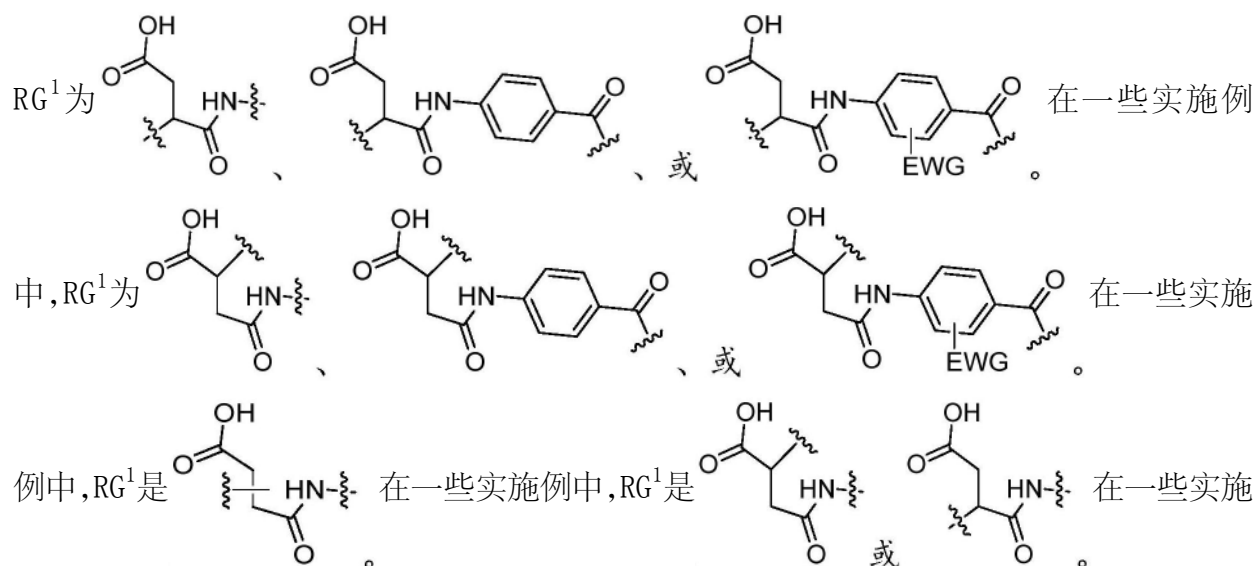
[0242] 在一些实施例中, RG^1 是  , 其中EWG是吸电子基团, 例如-

CN、 $-NO_2$ 、卤素、 $-CF_3$ 、 $-C(=O)OR^1$ 或 $-C(=O)R^1$, 并且 R^1 是取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环烷基或者取代或未取代的杂芳基。

[0243] 在一些实施例中, RG^1 是开放的杂环, 诸如由  的马来酰亚胺环与抗体的

缀合产生的产物。就这一点而言, 应当理解, 抗体与马来酰亚胺环的缀合可以发生在马来酰亚胺的碳-碳双键中的两个碳中的任一个处。类似地, 在开环的情况下, 缀合可以发生在双键中的两个碳原子中的任一个处。在一些实施例中, RG^1 为

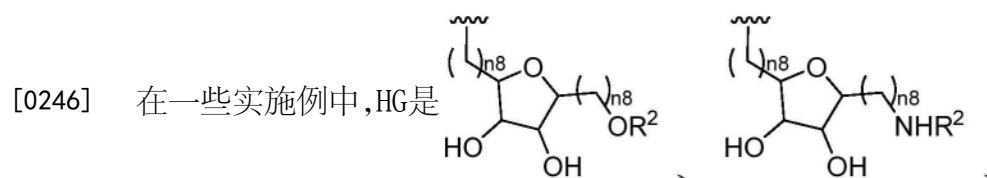


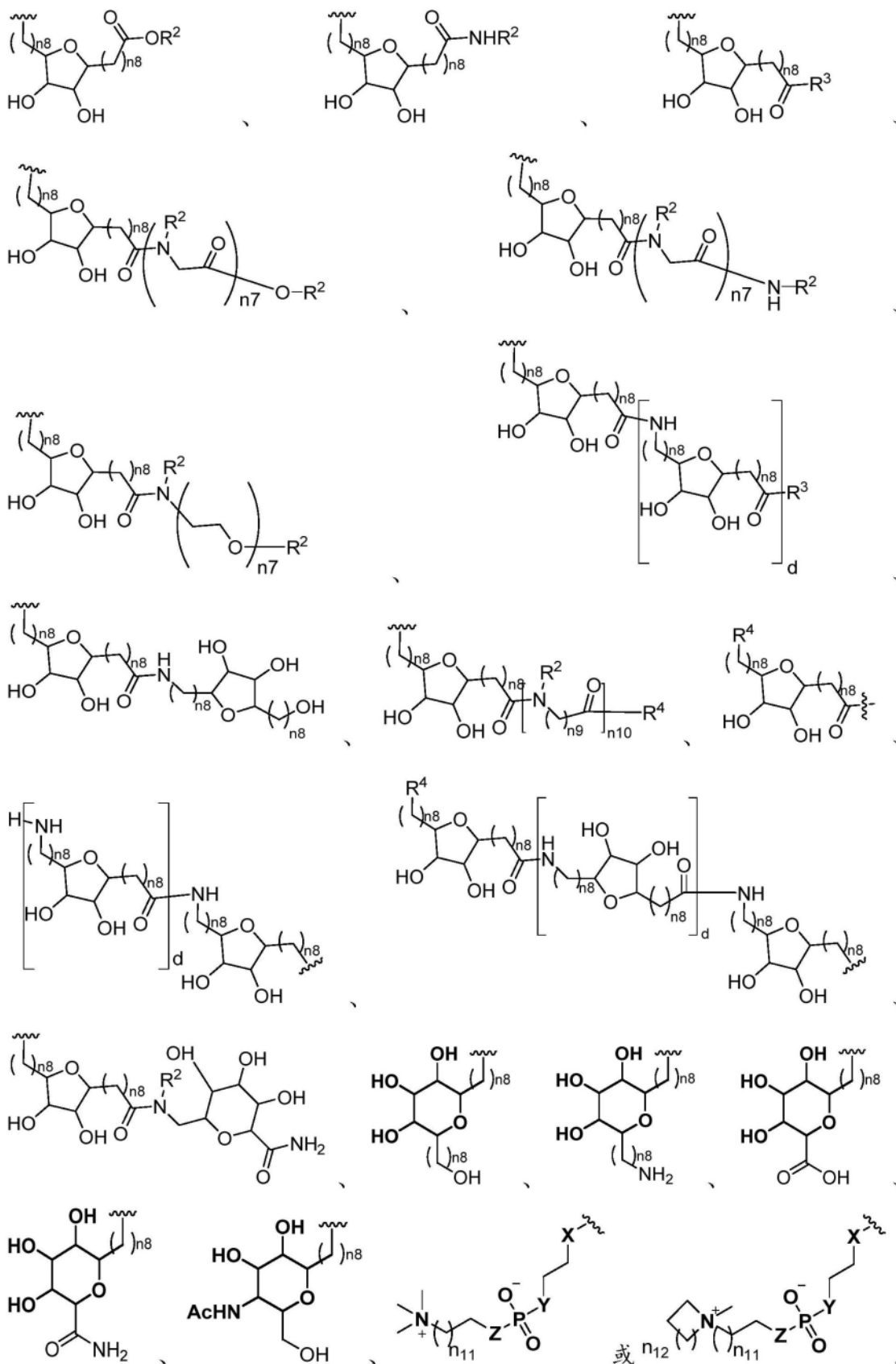


例中， RG^2 是键、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 或 $-\text{NHC}(=\text{O})-$ 。在一些实施例中， RG^2 是 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ 。

[0244] 在一些实施例中， SP^1 是 $-(\text{CH}_2)_{n1}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n2}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}[-(\text{CH}_2)_{n3}-\text{COOH}]-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n4}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n3}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n4}-\text{C}(=\text{O})-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n5}-\text{C}(=\text{O})-$ ，其中 $n1$ 、 $n2$ 、 $n3$ 、 $n4$ 和 $n5$ 中的每一者独立地表示 1 至 8 的整数。在一些实施例中， SP^1 是 $^*\text{-CH}_2\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ ，其中星号标记与 RG^1 连接的键。在一些实施例中， SP^1 是 $^*(\text{CH}_2)_5\text{C}(\text{O})-$ ，其中星号标记与 RG^1 连接的键。在一些实施例中， SP^1 是 $^*\text{-C}(\text{H})(\text{CH}_2\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})-$ ，其中星号标记与 RG^1 连接的键。

[0245] 在一些实施例中， SP^2 是 $-(\text{CH}_2)_{n6}-$ ；并且 $n6$ 表示 1 至 8 的整数。在一些实施例中， $n6$ 是 2。

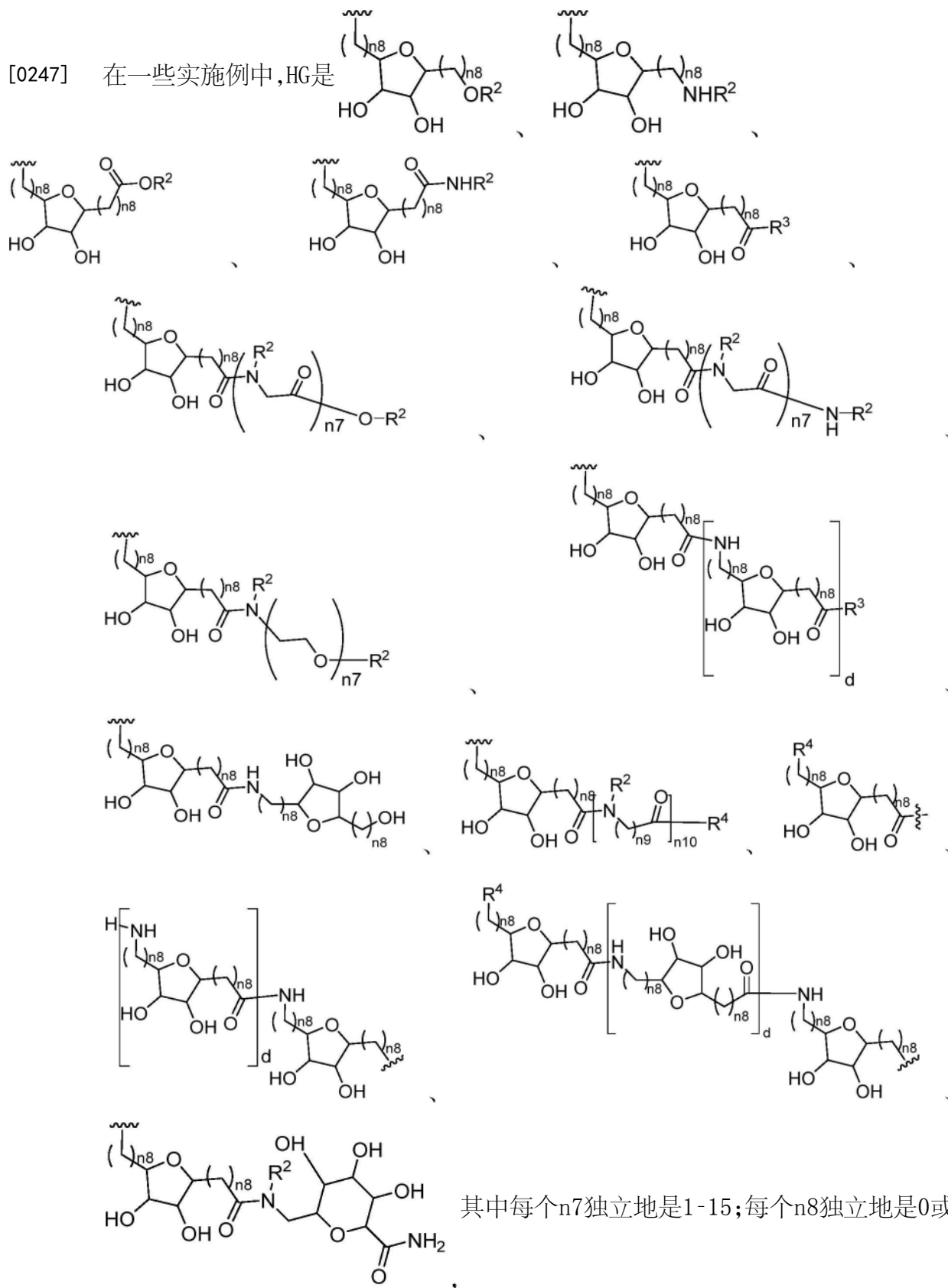




其中每个n₇独立地是1-15;每个n₈独立地是0或1;每个n₉独立地是1或2;每个n₁₀独立地是4至16的整数,诸如4、8或12;每个n₁₁独立地是0至5的整数;n₁₂是0至3的整数;d是0-3;R²是H或Me;R³是-OH、-NH₂、-NHCH₂-CH₂-(PEG)_x-OH或-NHCH₂-CH₂-(PEG)_x-OMe;R⁴是OH或NH₂;并且X、

Y和Z中的每一者独立地是-CH₂-、-NH-、-S-或-O-。

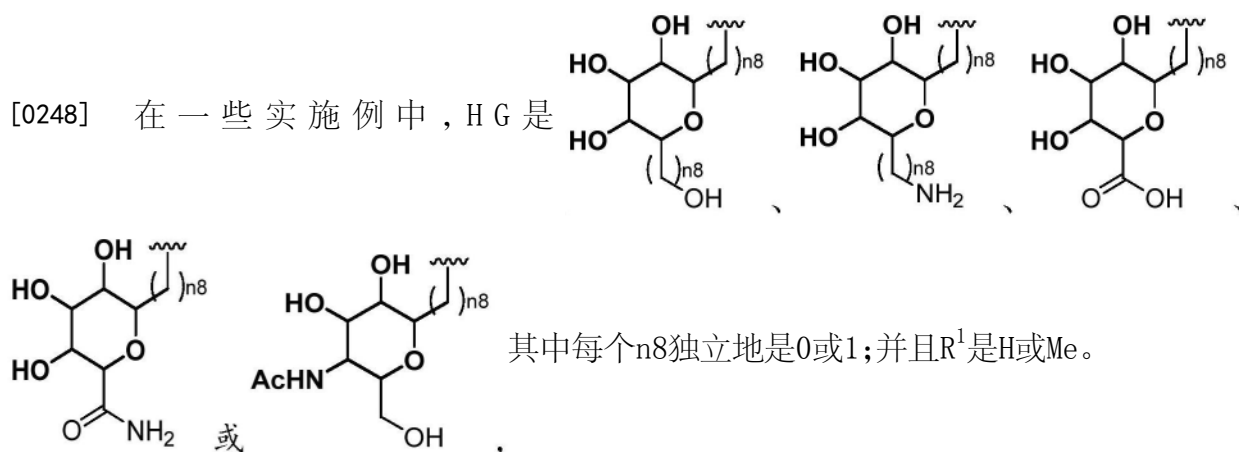
[0247] 在一些实施例中, HG是



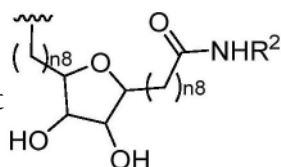
其中每个n₇独立地是1-15;每个n₈独立地是0或

1;每个n₉独立地是1或2;每个n₁₀独立地是4至16的整数,诸如4、8或12;d是0-3;R²是H或Me;R³是-OH、-NH₂、-NHCH₂-CH₂-(PEG)_x-OH或-NHCH₂-CH₂-(PEG)_x-OMe;R⁴是OH或NH₂。

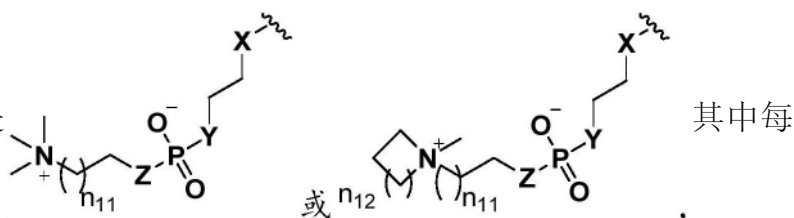
[0248] 在一些实施例中, HG 是



[0249] 在一些实施例中, HG 是



[0250] 在一些实施例中, HG 是



个 n_{11} 独立地是0至5的整数; n_{12} 是0至3的整数;并且X、Y和Z中的每一者独立地是 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-$ 或 $-\text{O}-$ 。

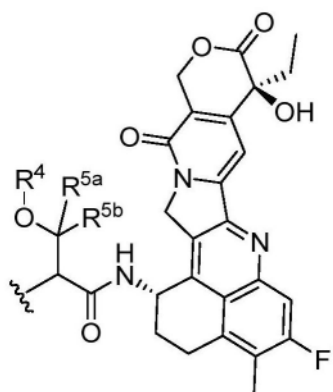
[0251] 在一些实施例中, HG 是 $-\text{NHSO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$, 并且 RG^2 是键。

[0252] 在一些实施例中, 每个PA独立地表示发色团官能团。

[0253] 在一些实施例中, 每个发色团官能团独立地是选自以下项的官能团: 黄色素细胞(xanthophore)、红色素细胞(erythrophore)、虹色素细胞(iridophore)、白色素细胞(leucophore)、载黑素细胞(melanophore)和蓝色素细胞(cyanophore)的类或亚类; 荧光团分子的类或亚类, 它们是在光下再发射光的荧光化合物; 视觉光转导分子的类或亚类; 发光器(photophore)分子的类或亚类; 发光分子的类或亚类; 以及荧光素化合物的类或亚类。

[0254] 在一些实施例中, 每个PA独立地选自由以下组成的组: 一甲基澳瑞他汀E(MMAE)、一甲基澳瑞他汀F(MMAF)、一甲基澳瑞他汀D(MMAD)、美登素(马坦霉素DM1/DM4)、紫杉醇、多西他赛、埃博霉素B、埃博霉素A、CYT997、澳瑞他汀酪胺磷酸盐、澳瑞他汀氨基喹啉、卤代康普瑞汀、卡利奇霉素0、7-乙基-10-羟基-喜树碱(SN-38)、吡咯并苯二氮革(PBD)、潘克拉他汀(Pancratistatin)、环磷酸盐、Cribrostatin-6、吉他汀(Kitastatin)、Turbostatin 1-4、卤代康普瑞汀、艾日布林(Eribulin)、哈密特林(Hemiasterlin)、PNU和Silstatin。

[0255] 在一些实施例中, 每个PA独立地表示式(D1):

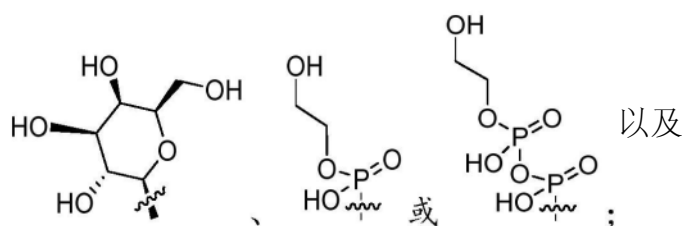
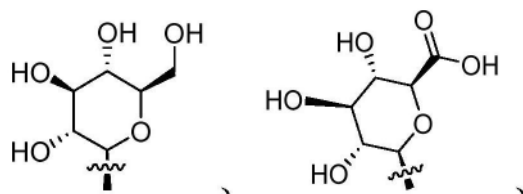


(D1),

其中 R^4 、 R^{5a} 和 R^{5b} 中的每一者独立地是氢、糖残基、取代或未取代的无机或有机酸残基、取代或未取代的 C_{1-8} 烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的非芳族杂环基、取代或未取代的环烷基烷基或者取代或未取代的杂环基烷基；

R^{5a} 和 R^{5b} 与它们所附接的原子一起形成取代或未取代的环烷基、取代或未取代的非芳族杂环基。

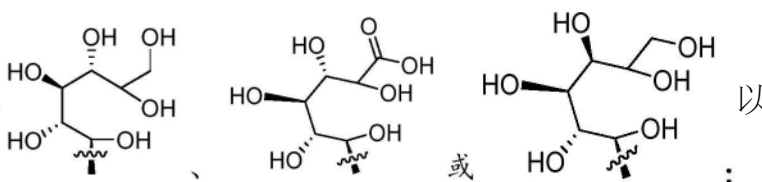
[0256] 在一些实施例中， R^4 是氢、



其中 R^{5a} 和 R^{5b} 中的每一者独立地是H、 CH_3 或 CF_3 ；或者

R^{5a} 和 R^{5b} 与它们所附接的原子一起形成取代或未取代的环烷基、取代或未取代的非芳族杂环基。

[0257] 在一些实施例中， R^4 是氢、

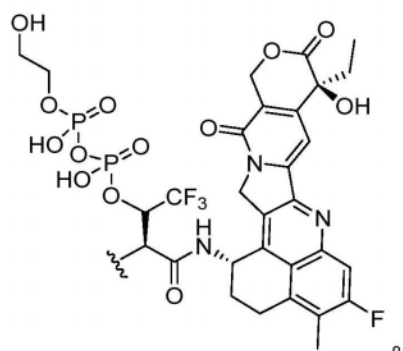
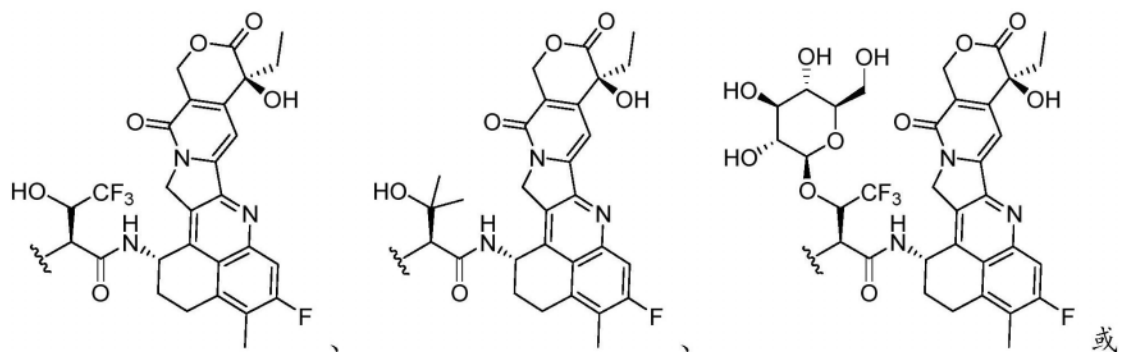
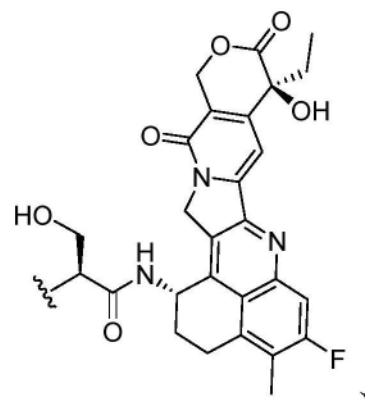


及

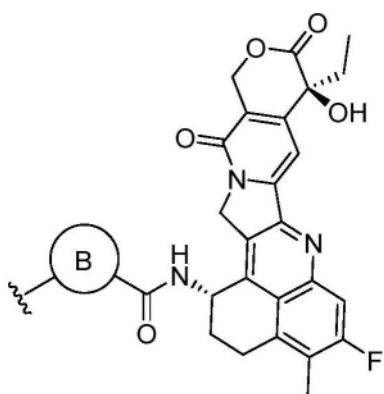
其中 R^{5a} 和 R^{5b} 中的每一者独立地是H、 CH_3 或 CF_3 ；或者

R^{5a} 和 R^{5b} 与它们所附接的原子一起形成取代或未取代的环烷基、取代或未取代的非芳族杂环基。

[0258] 在一些实施例中, 每个 PA 独立地表示



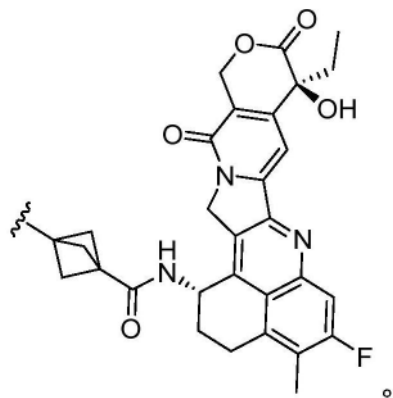
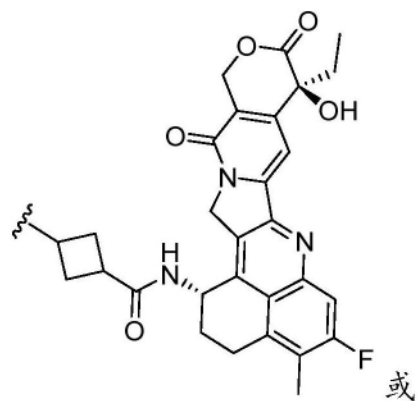
[0259] 在一些实施例中, 每个 PA 独立地表示式 (D2):



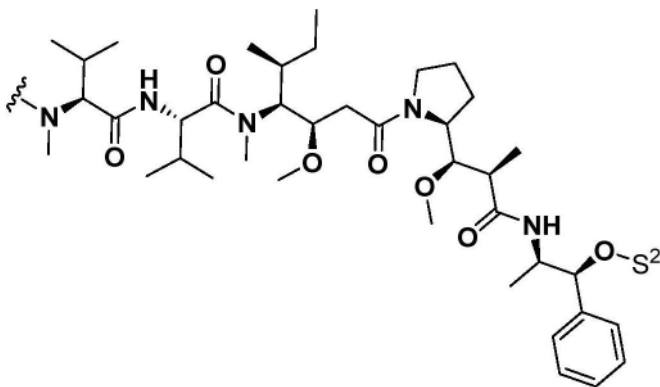
(D2)

其中环 B 是取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基或者取代或未取代的杂芳基。

[0260] 在一些实施例中, 每个 PA 独立地表示



[0261] 在一些实施例中, 每个 PA 独立地表示式 (D3):

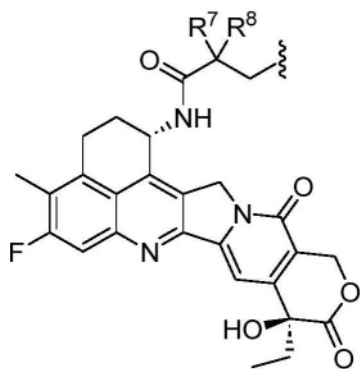


(D3)

其中 S^2 是酶可水解的亲水性基团。

[0262] 在一些实施例中, S^2 基团是氢或表示下式中的一种: --SO_3^- 、 $\text{--P(=O)}_2\text{O--P(=O)}_2\text{O--}$ 和 $\text{--P(=O)}_2\text{O--}$ 。

[0263] 在一些实施例中, 每个 PA 独立地表示式 (E1):



(E1),

其中 R^7 和 R^8 中的每一者独立地是氢、卤素或烷基。

[0264] 在一些实施例中, R^7 和 R^8 是氢。

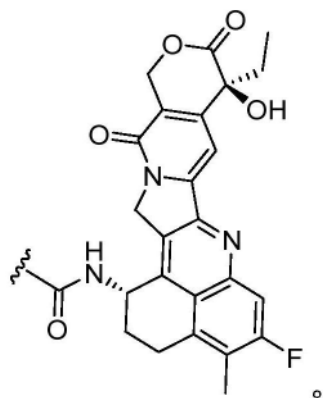
[0265] 在一些实施例中, R^7 和 R^8 是甲基。

[0266] 在一些实施例中, R^7 是甲基并且 R^8 是F。

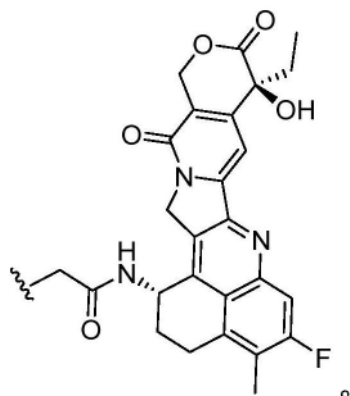
[0267] 在一些实施例中, R^7 和 R^8 所连接的碳为S构型。

[0268] 在一些实施例中, R^7 和 R^8 所连接的碳为R构型。

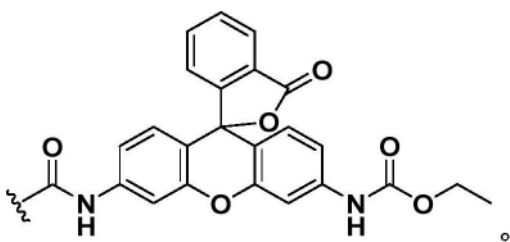
[0269] 在一些实施例中,每个PA独立地表示下式:



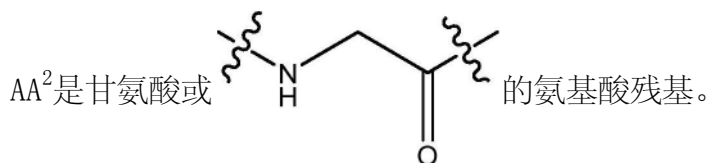
[0270] 在一些实施例中,每个PA独立地是Dxd,或独立地表示下式:



[0271] 在一些实施例中,每个PA独立地表示下式:

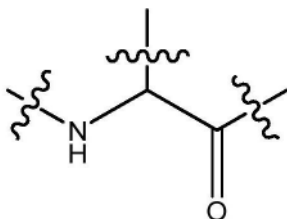


[0272] 在一些实施例中,

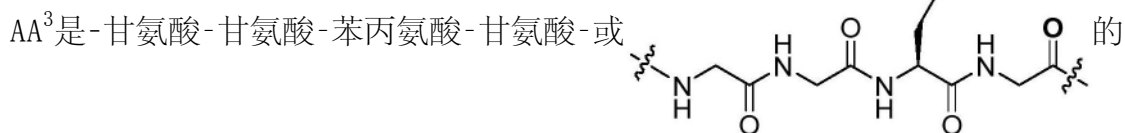


[0273] 在式 (Ia) 的化合物或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药的一些实施例中,

AA²包含式 (W) :

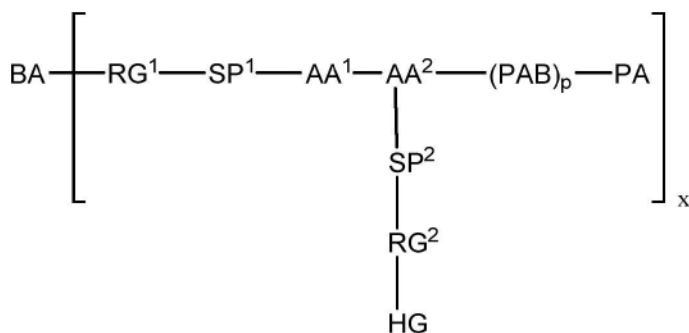


(W); 以及



四肽残基。

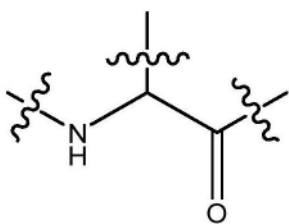
[0274] 在另外的实施例中, 抗体药物缀合物具有式 (Ib) :



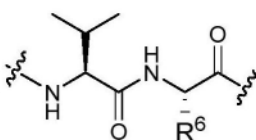
(Ib)

或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药,

其中AA²包含式 (W) :

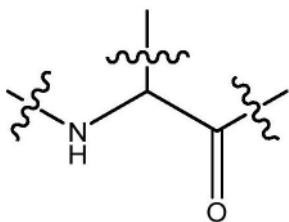


(W);以及

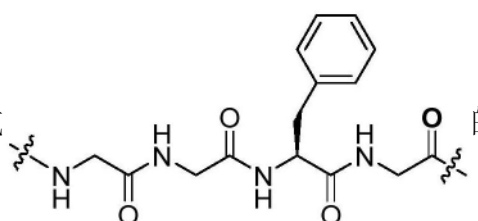
AA¹是-缬氨酸-丙氨酸-、-缬氨酸-瓜氨酸-或的二肽残基;其中

R⁶是-CH₃或-(CH₂)₃-NHC(=O)NH₂。其余变量(例如,x、p、BA、HG、RG¹、RG²、SP¹、SP²、PAB、PA)的值和变量(例如,AA¹、AA²)的替代值如本文别处例如关于式Ia的化合物所述。

[0275] 在一些实施例中,AA²包含式(W):

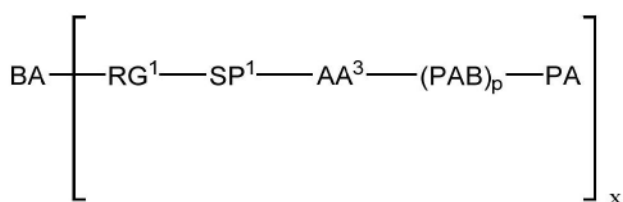


(W);以及

AA¹是-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-或的

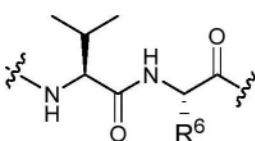
四肽残基。

[0276] 在另外的实施例中,抗体药物缀合物具有式(Ic):



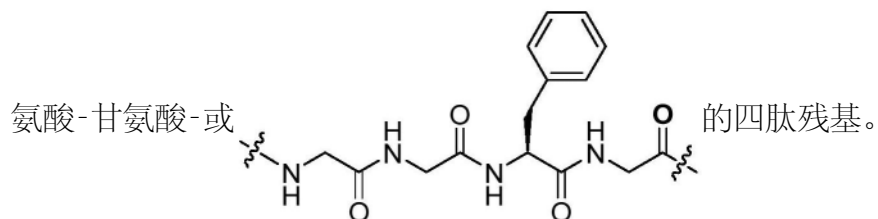
(Ic)

或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药,

其中AA³是-缬氨酸-丙氨酸-、-缬氨酸-瓜氨酸-或的二肽残基;

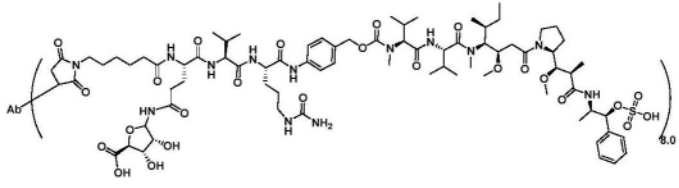
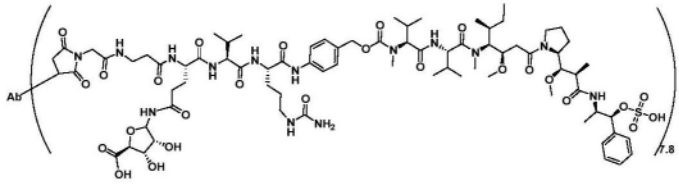
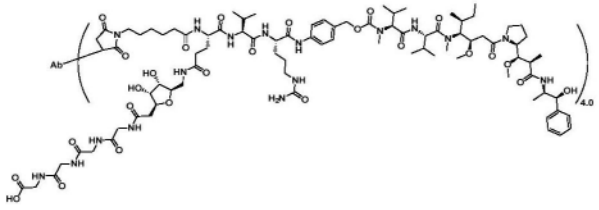
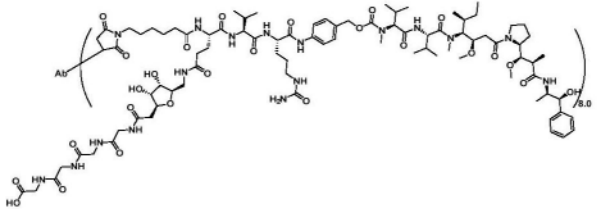
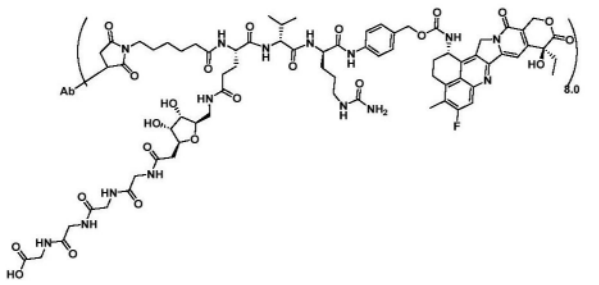
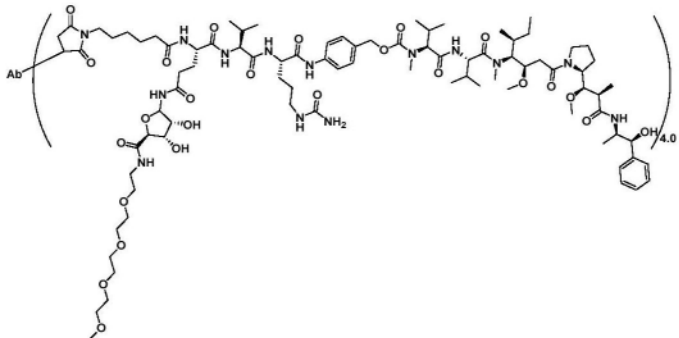
其中R⁶是-CH₃或-(CH₂)₃-NHC(=O)NH₂。其余变量(例如,BA、RG¹、SP¹、PAB、p、PA、x)的值和变量(AA³、R⁶)的替代值如本文别处例如关于式Ia的化合物所述。

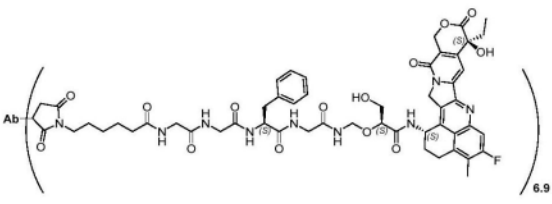
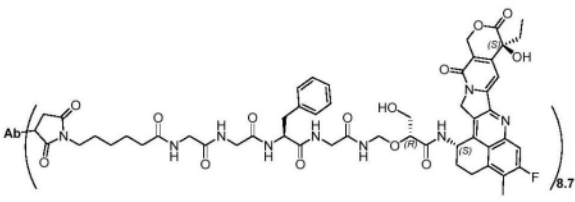
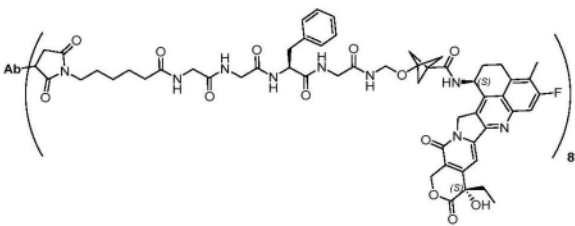
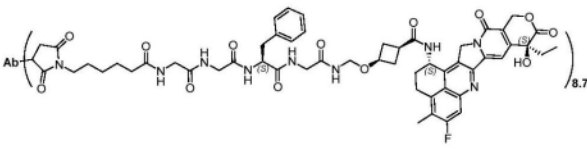
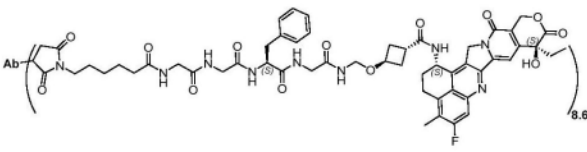
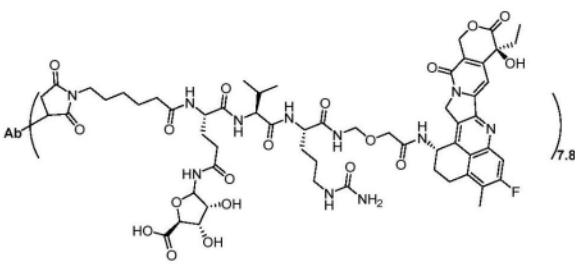
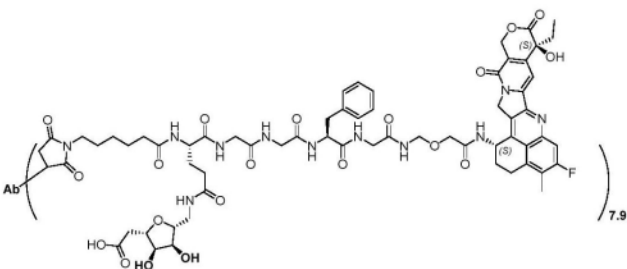
[0277] 在一些实施例(例如,式(Ic)的化合物的实施例)中,AA³是-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-或

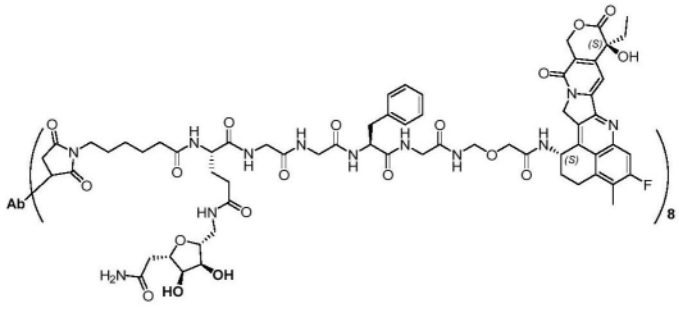
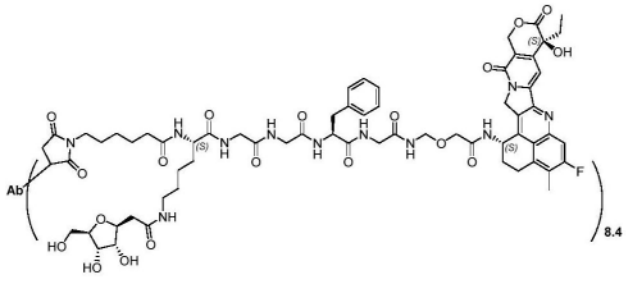
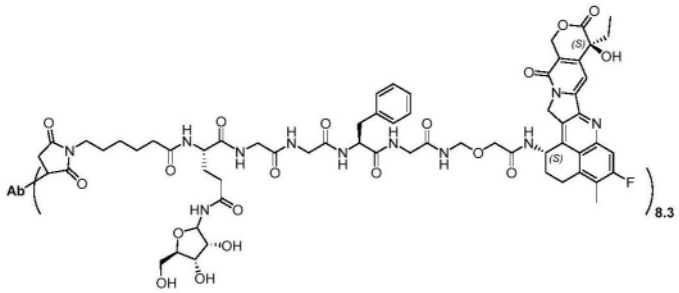
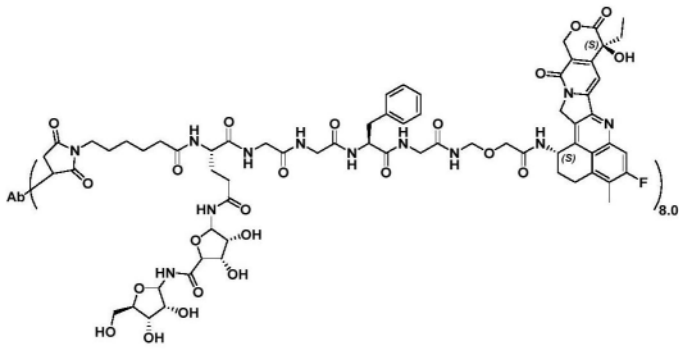
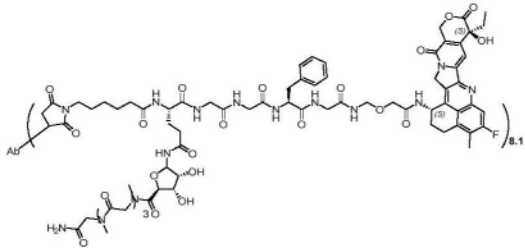


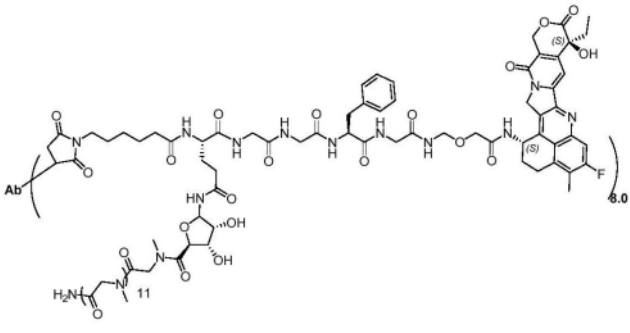
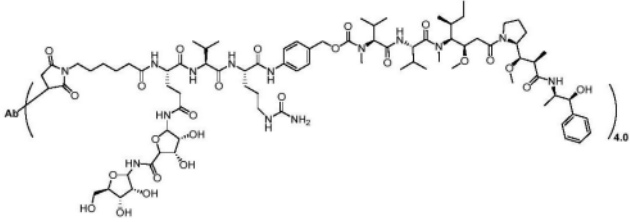
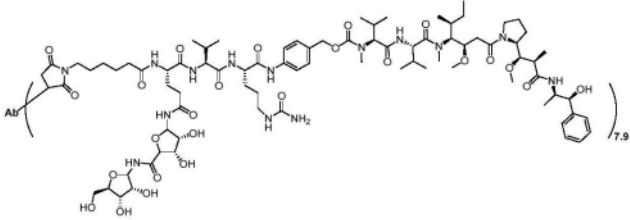
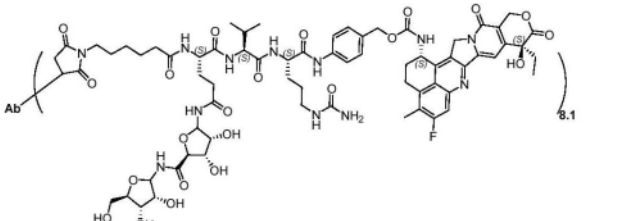
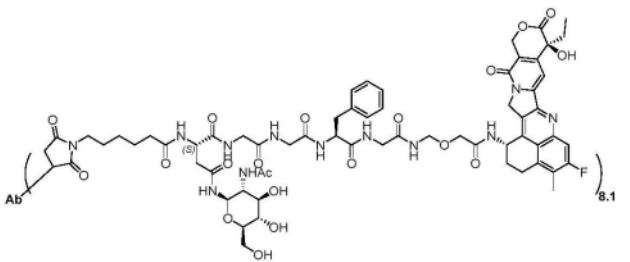
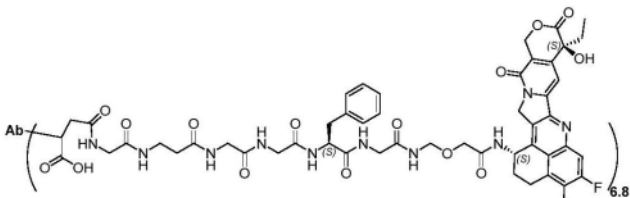
[0278] 在一些实施例中,抗体药物缀合物选自以下化合物中的一种,或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药:

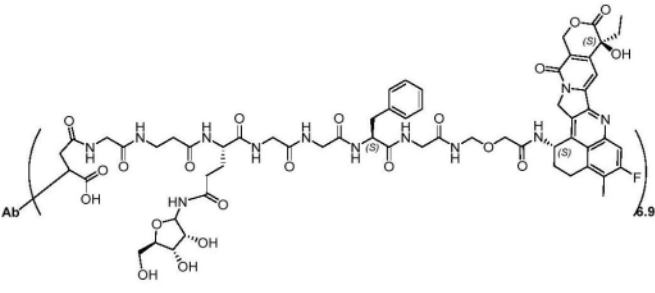
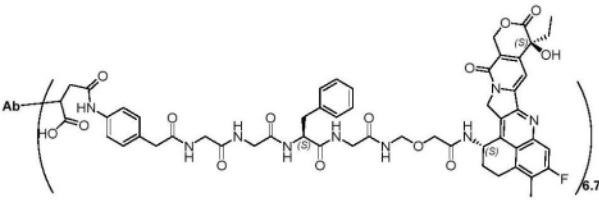
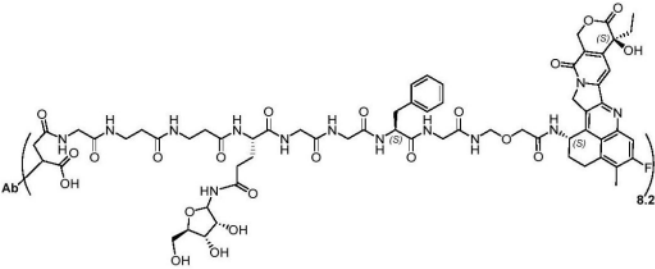
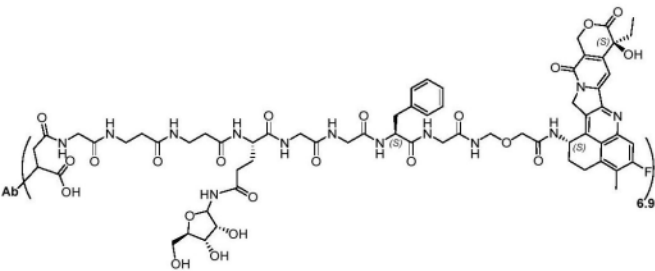
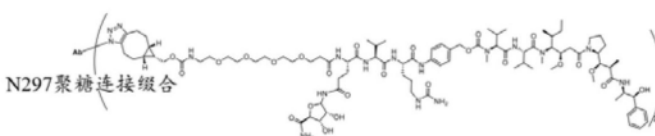
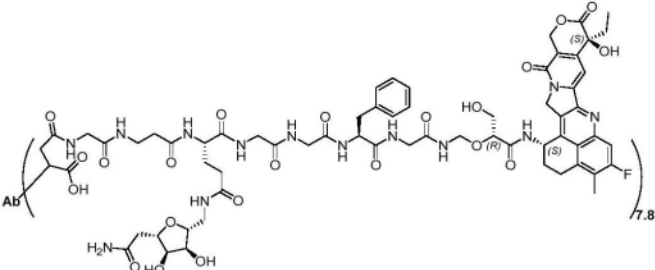
实例编号	抗体药物缀合物
ADC1-2	
ADC1-4	
ADC1-11	
ADC2-2	
ADC2-4	

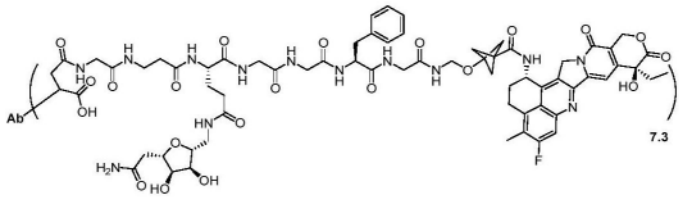
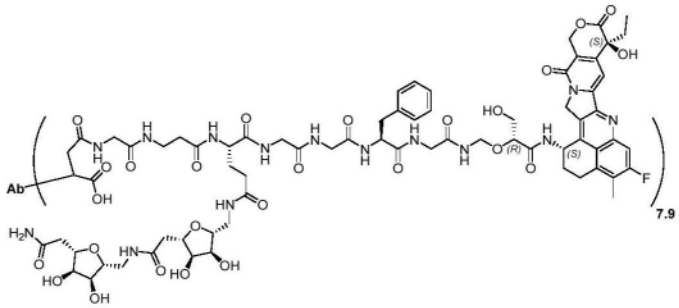
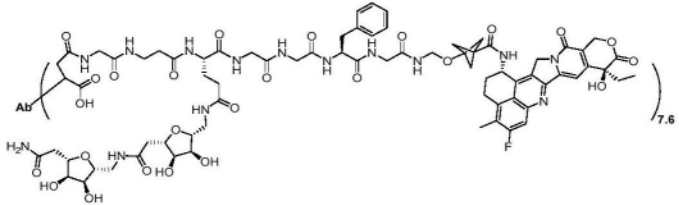
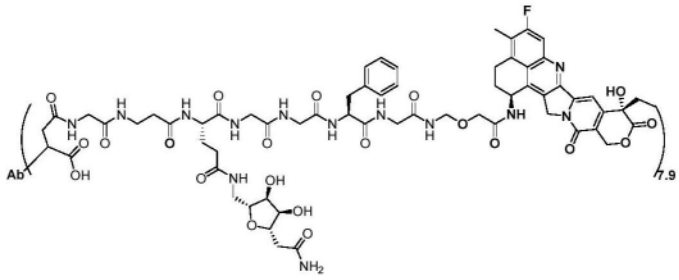
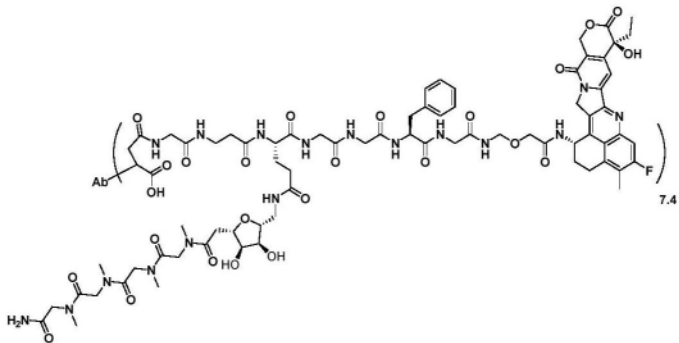
ADC2-6-2	
ADC2-7-2	
ADC2-9-1	
ADC2-9-2	
ADC2-10	
ADC2-11	

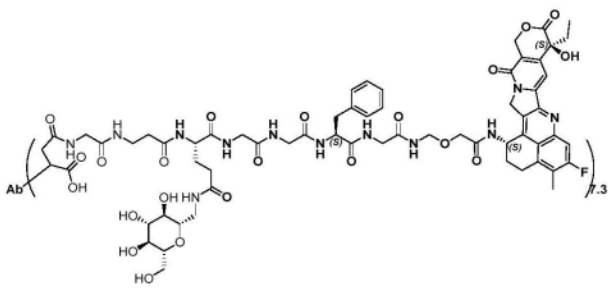
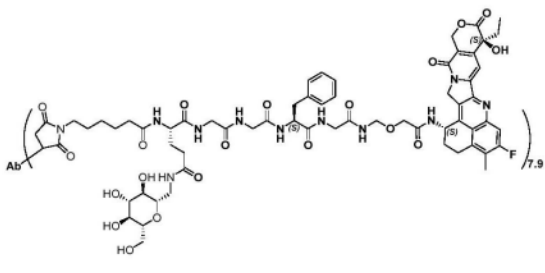
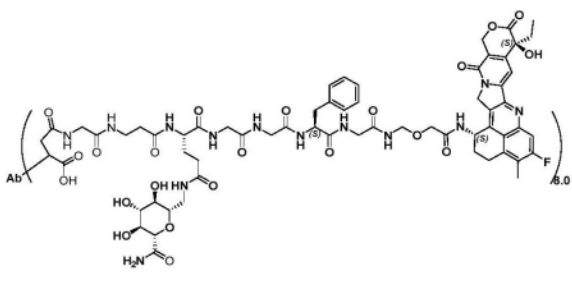
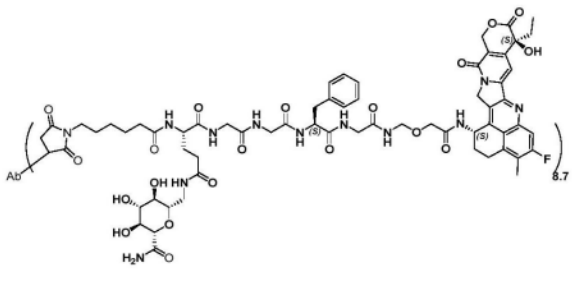
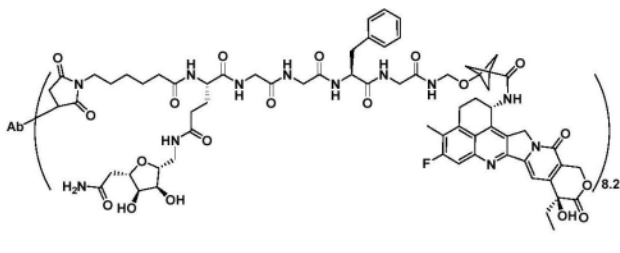
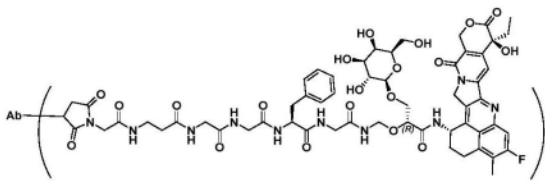
ADC2-22	
ADC2-23	
ADC2-24	
ADC2-25	
ADC2-26	
ADC2-27	
ADC2-29	

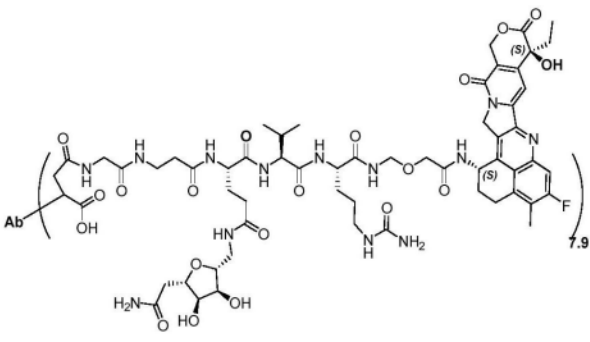
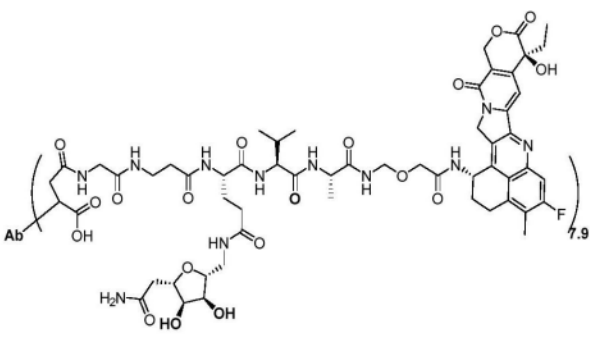
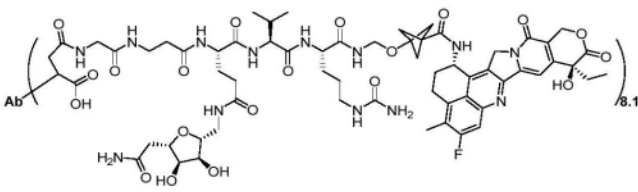
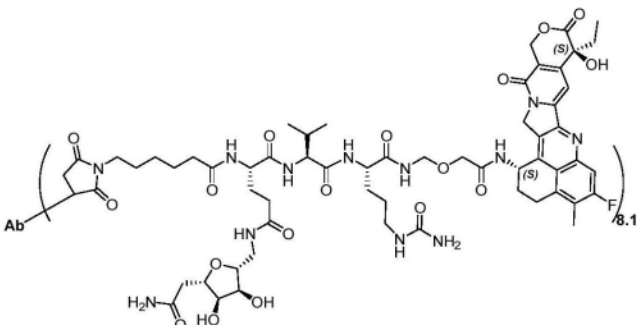
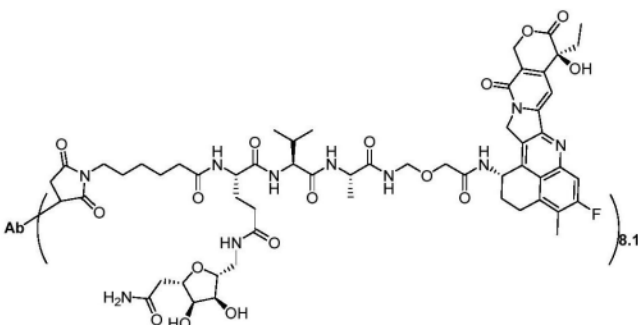
ADC2-30	
ADC2-31	
ADC2-32	
ADC2-33	
ADC2-34	

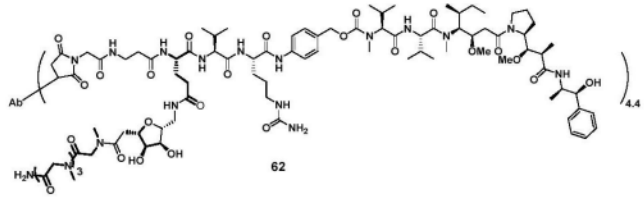
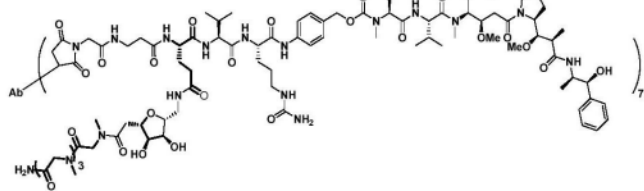
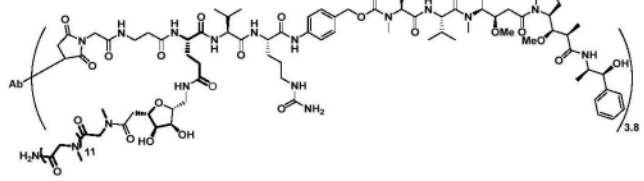
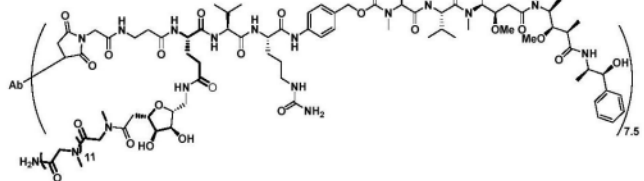
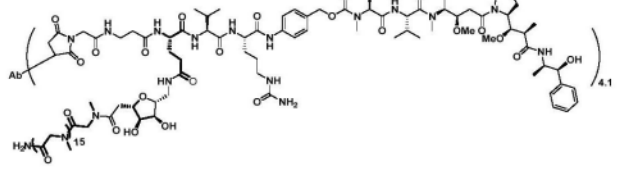
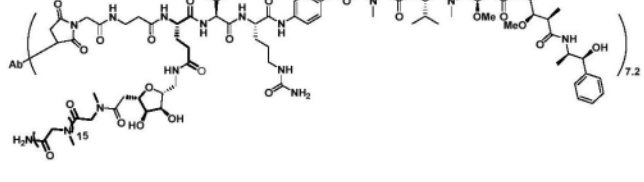
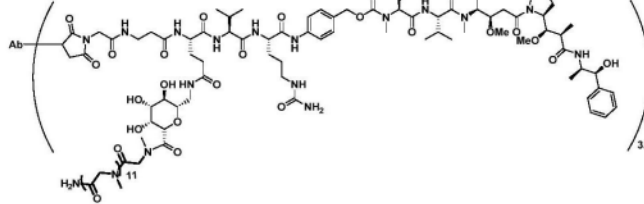
ADC2-35	
ADC2-36-1	
ADC2-36-2	
ADC2-37	
ADC2-38	
ADC2-39	

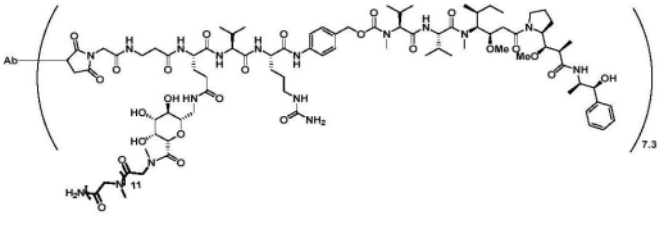
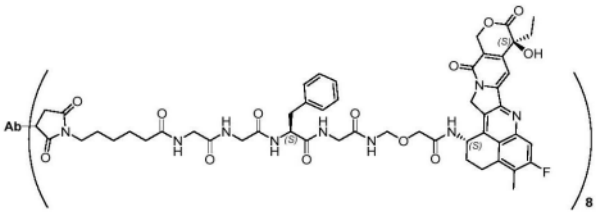
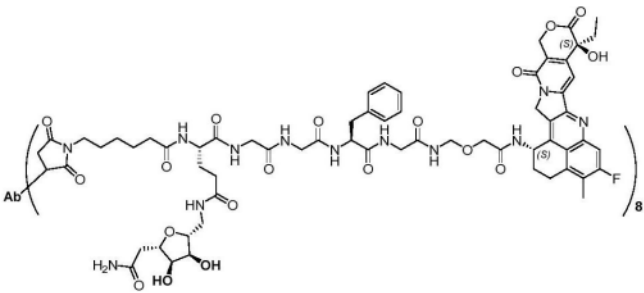
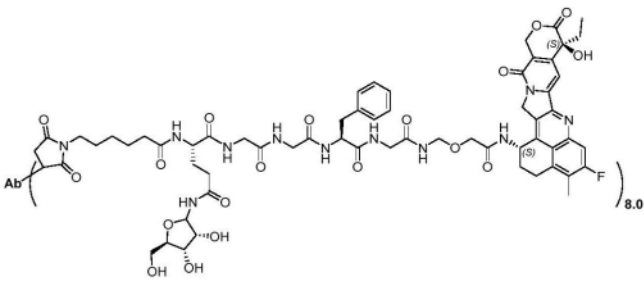
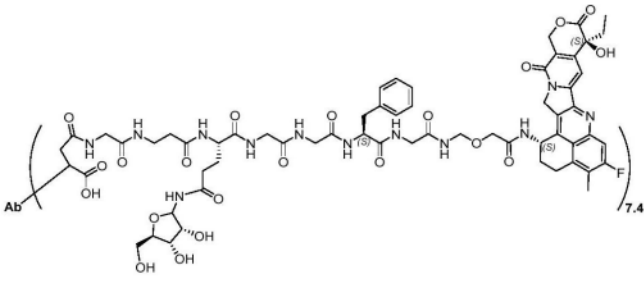
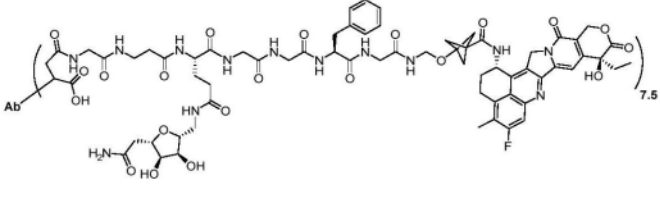
ADC2-40	
ADC2-41	
ADC2-42	
ADC2-42-R O	
ADC2-43	
ADC2-44	

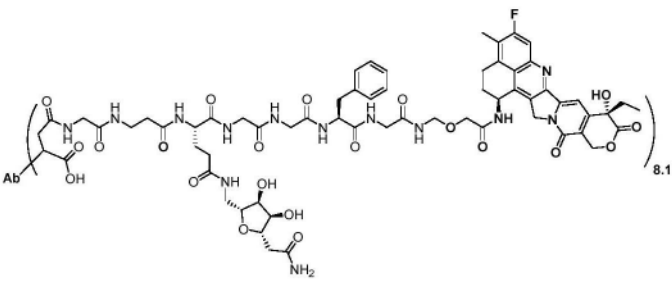
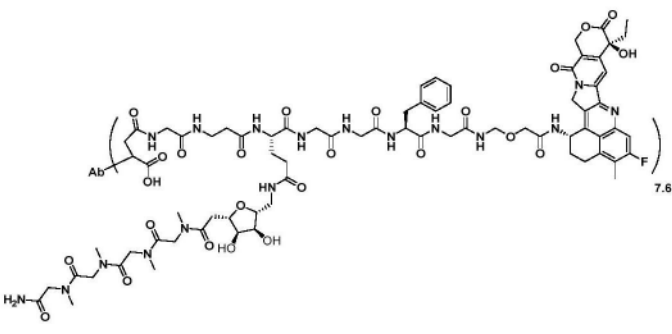
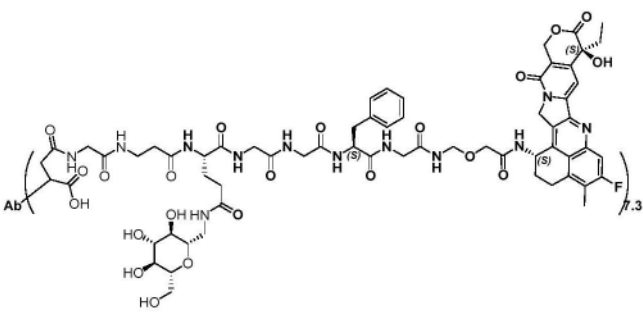
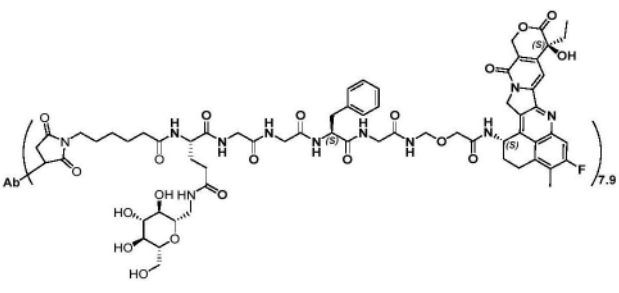
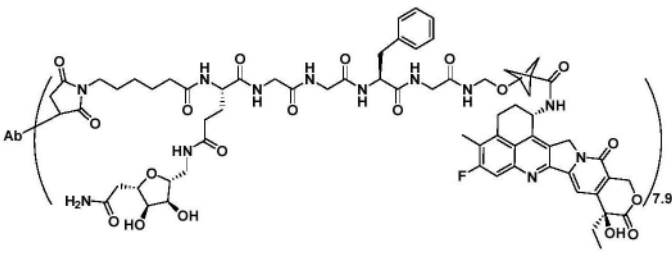
ADC2-45	
ADC2-46	
ADC2-47	
ADC2-48	
ADC2-49	

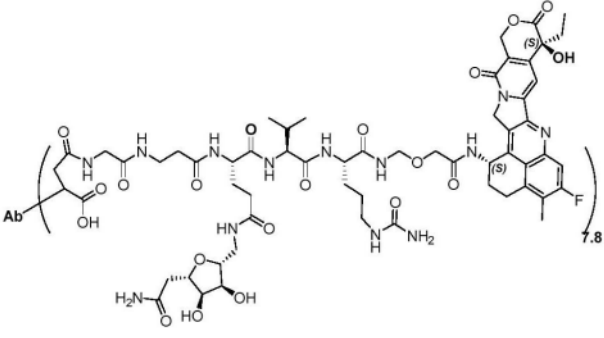
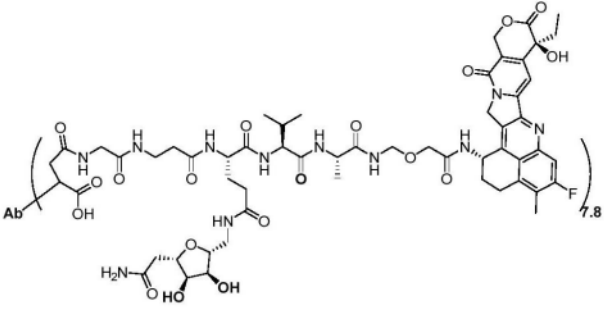
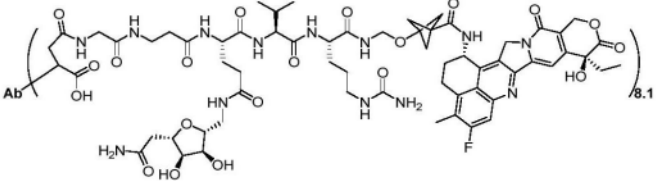
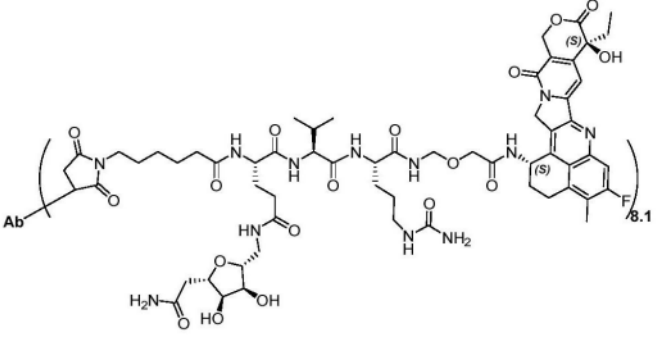
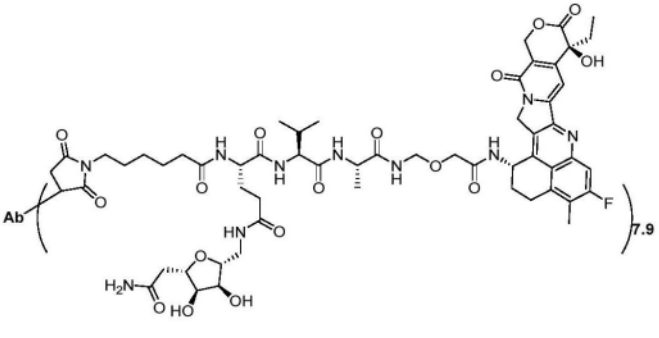
ADC2-50	
ADC2-51	
ADC2-53	
ADC2-54	
ADC2-55	
ADC2-56	

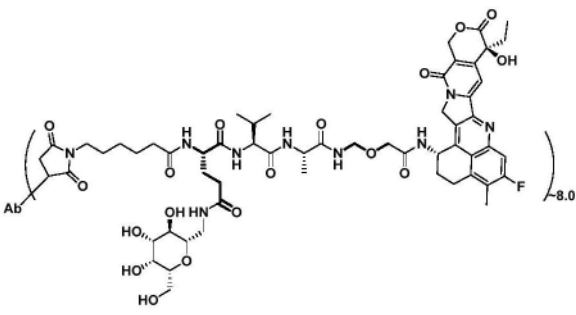
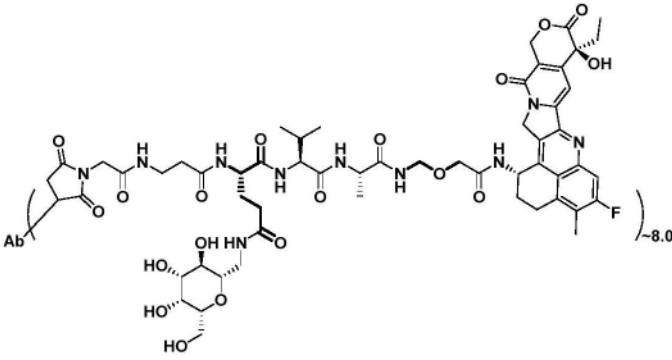
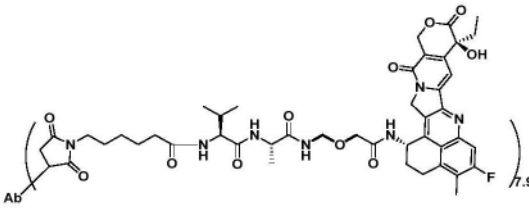
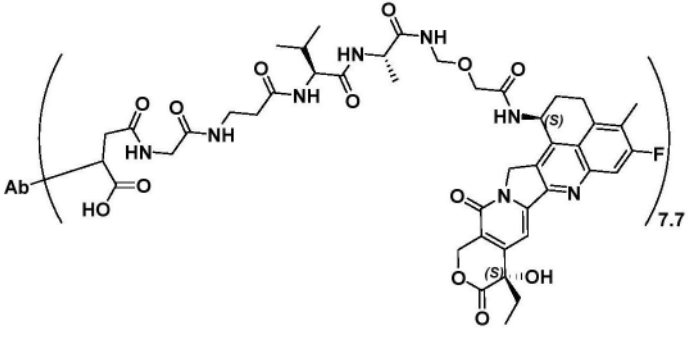
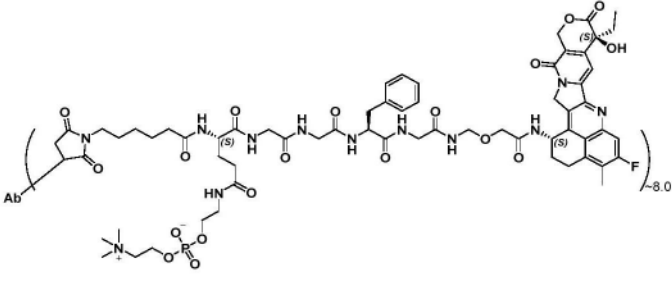
ADC2-57	 Chemical structure of ADC2-57, a conjugate of an antibody (Ab) and a fluorophore (7.9). The structure shows a polypeptide chain with a fluorophore (7.9) attached via a linker. The fluorophore is a complex molecule containing a fluorine atom and a hydroxyl group. The polypeptide chain is linked to the antibody (Ab) via a linker.
ADC2-58	 Chemical structure of ADC2-58, a conjugate of an antibody (Ab) and a fluorophore (7.9). The structure shows a polypeptide chain with a fluorophore (7.9) attached via a linker. The fluorophore is a complex molecule containing a fluorine atom and a hydroxyl group. The polypeptide chain is linked to the antibody (Ab) via a linker.
ADC2-59	 Chemical structure of ADC2-59, a conjugate of an antibody (Ab) and a fluorophore (8.1). The structure shows a polypeptide chain with a fluorophore (8.1) attached via a linker. The fluorophore is a complex molecule containing a fluorine atom and a hydroxyl group. The polypeptide chain is linked to the antibody (Ab) via a linker.
ADC2-60	 Chemical structure of ADC2-60, a conjugate of an antibody (Ab) and a fluorophore (8.1). The structure shows a polypeptide chain with a fluorophore (8.1) attached via a linker. The fluorophore is a complex molecule containing a fluorine atom and a hydroxyl group. The polypeptide chain is linked to the antibody (Ab) via a linker.
ADC2-61	 Chemical structure of ADC2-61, a conjugate of an antibody (Ab) and a fluorophore (8.1). The structure shows a polypeptide chain with a fluorophore (8.1) attached via a linker. The fluorophore is a complex molecule containing a fluorine atom and a hydroxyl group. The polypeptide chain is linked to the antibody (Ab) via a linker.

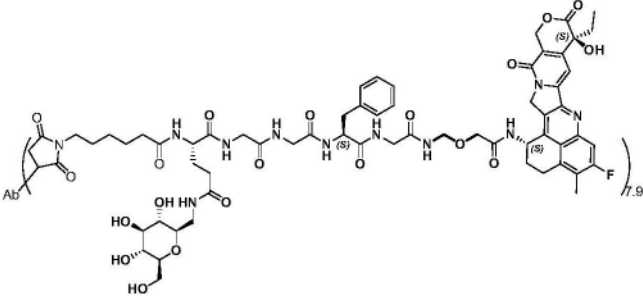
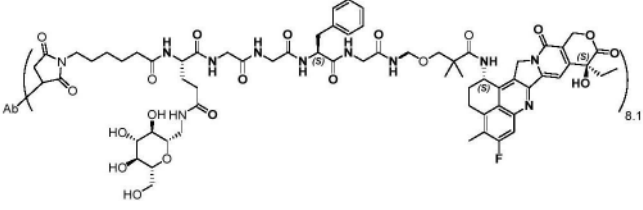
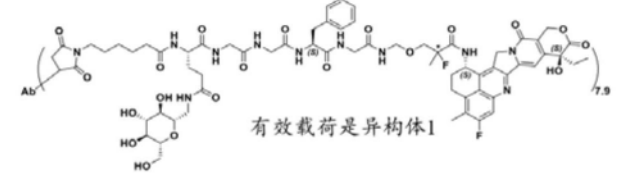
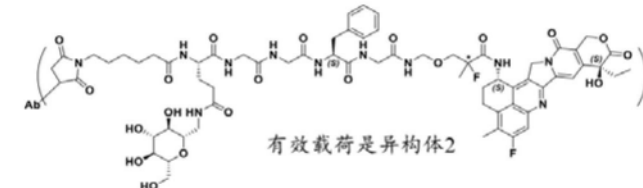
ADC-2-62-1	
ADC-2-62-2	
ADC-2-63-1	
ADC-2-63-2	
ADC-2-64-1	
ADC-2-64-2	
ADC2-65-1	

ADC2-65-2	
ADC3-1	
ADC3-2	
ADC3-3	
ADC3-4	
ADC3-5	

ADC3-6	
ADC3-7	
ADC3-8	
ADC3-9	
ADC3-10	

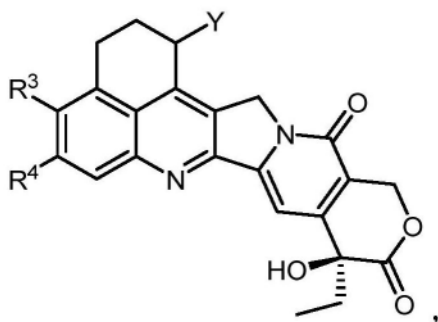
ADC3-11	
ADC3-12	
ADC3-13	
ADC3-14	
ADC3-15	

ADC3-16	
ADC3-17	
ADC3-18	
ADC3-19	
ADC3-20	

ADC-C2	
ADC-C3	
ADC-C4	 有效载荷是异构体1
ADC-C5	 有效载荷是异构体2

[0279] PCT申请号PCT/CN2022/123665 (其全部内容通过援引并入本文) 披露了其接头有效载荷部分适用于本披露的上下文中的抗体药物缀合物, 以及适用于本披露的上下文中的接头有效载荷。在一些实施例中, 接头有效载荷是PCT/CN2022/123665中披露的接头有效载荷。

[0280] 在一些实施例 (例如, 式I的化合物的实施例) 中, PA是以下的残基:



其中

Y是-A-B-C'-D'-H;

A是键、CR¹R²或N-R¹;

B是键、 $-C(=O)-$ 或 $-C(=O)O-$;

C'是键或二价基团,其中该二价基团是未取代或取代的 C_{1-8} 烷基、未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基;

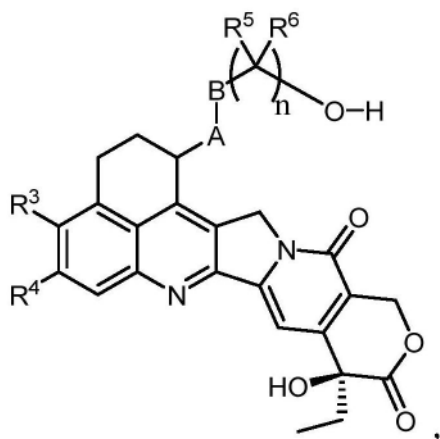
D'是键、NH或O;

R^1 和 R^2 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基;或者 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基;以及

R^3 和 R^4 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基;或者 R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基。在一些实施例中,当 R^3 是甲基并且 R^4 是F时,Y不是 $-NH-C(=O)-C-D-H$ 。

[0281] 在实施例中,在上文描绘的有效载荷的残基中,Y是 $-A-B-C'-D'-$,是从 $-A-B-C'-D'-H$ 移除-H的结果。应当理解,虽然有效载荷残基可以由从本文描绘的有效载荷移除氢原子产生,但它也可以由移除羟基基团(诸如在上文描绘的有效载荷中当D'是O时形成的羟基基团(或在本文描绘的任何其他有效载荷结构中的对应羟基基团))产生。

[0282] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



其中

A是 CR^1R^2 、NH或 $N-R^1$;

B是键、 $-C(=O)-$ 或 $-C(=O)O-$;

R^1 和 R^2 中的每一者独立地是H或 C_{1-4} 烷基;

R^3 和 R^4 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基;或者 R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基;

R^5 和 R^6 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基;以及

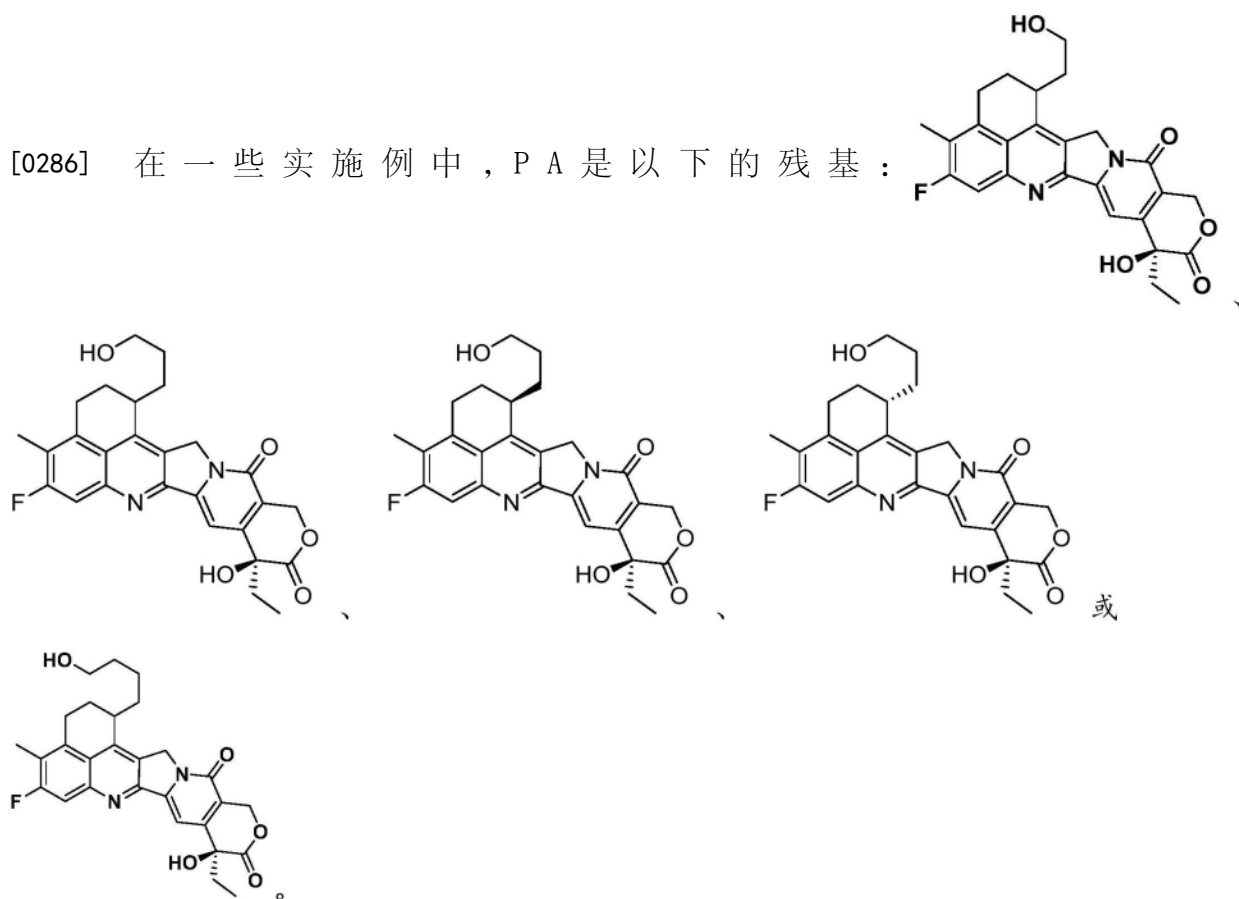
n是1、2、3、4或5。

[0283] 在一些实施例中,A是 $-CH_2-$,并且B是键。

[0284] 在一些实施例中, R^5 和 R^6 是氢,并且n是1、2或3。

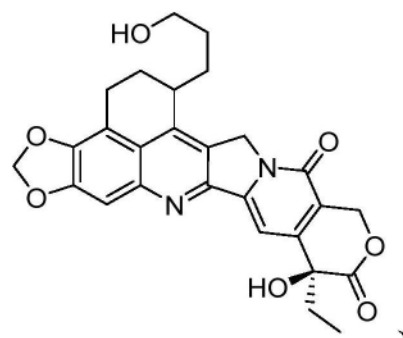
[0285] 在一些实施例中, R^3 是甲基,并且 R^4 是F。

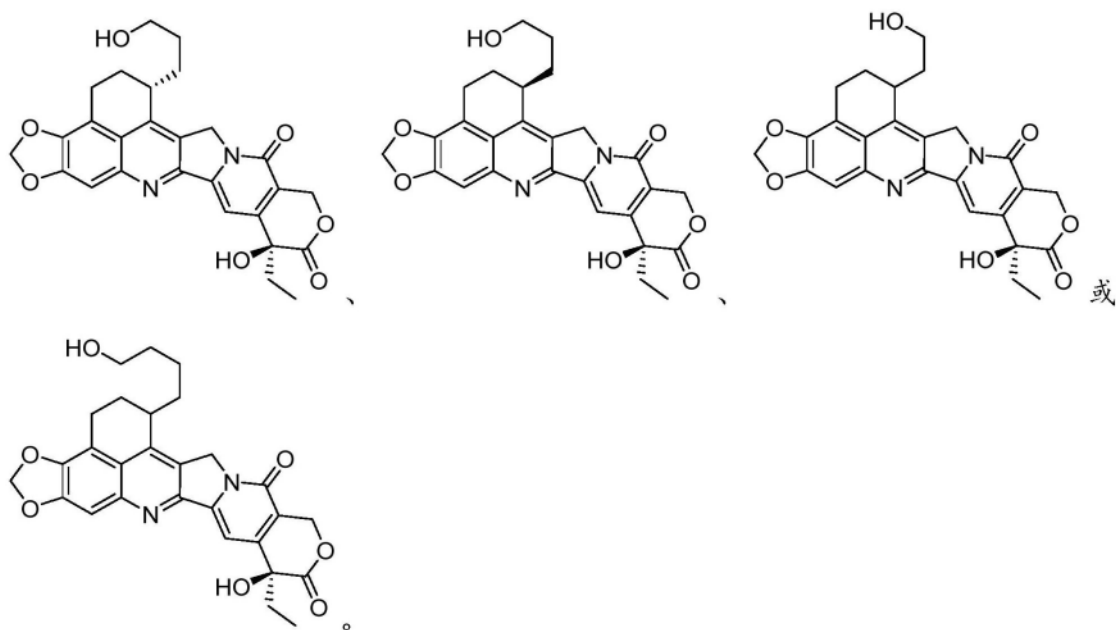
[0286] 在一些实施例中，PA 是以下的残基：



[0287] 在一些实施例中， R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的间二氧杂环戊烯环。

[0288] 在一些实施例中，PA 是以下的残基：

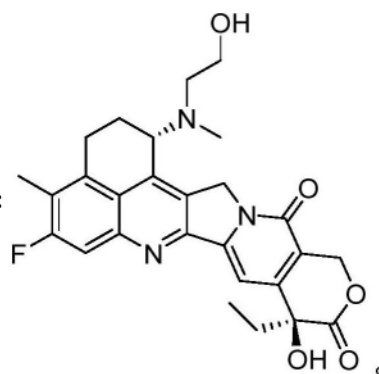




[0289] 在一些实施例中,A是-N(CH₃)-,并且B是键。

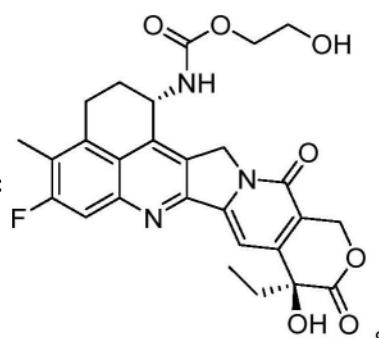
[0290] 在一些实施例中,R⁵和R⁶是氢,并且n是2。

[0291] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



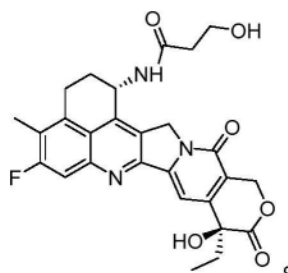
[0292] 在一些实施例中,A是-NH-,并且B是-C(=O)O-。在另外的实施例中,R⁵和R⁶是氢,并且n是2。

[0293] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



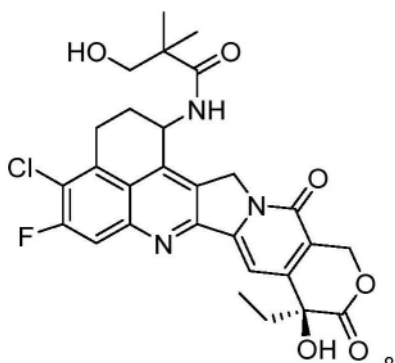
[0294] 在一些实施例中,A是-NH-,并且B是-C(=O)-。在另外的实施例中,R⁵和R⁶是氢,并且n是2。

[0295] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



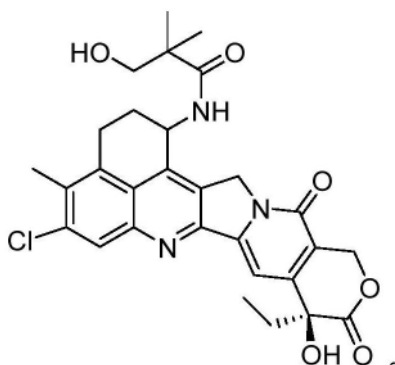
[0296] 在一些实施例中, R^3 是Cl, R^4 是F,并且B是 $-C(=O)-$ 。

[0297] 在一些实施例中,PA是以下的残基



[0298] 在一些实施例中, R^3 是甲基, R^4 是Cl,并且B是 $-C(=O)-$ 。

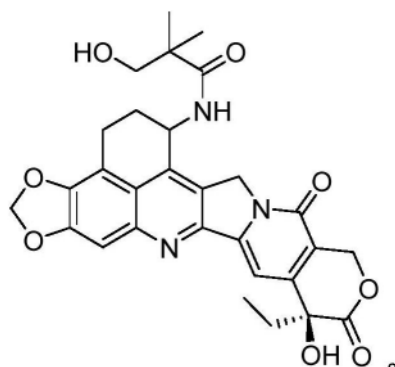
[0299] 在一些实施例中,PA是以下的残基



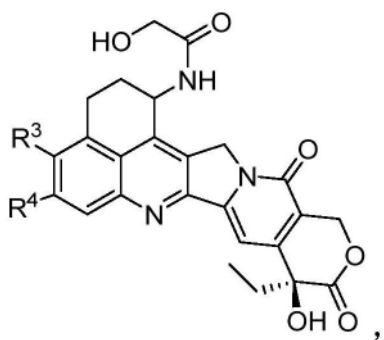
[0300] 在一些实施例中, R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的杂环基。

[0301] 在一些实施例中, R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的间二氧杂环戊烯环,并且B是 $-C(=O)-$ 。

[0302] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



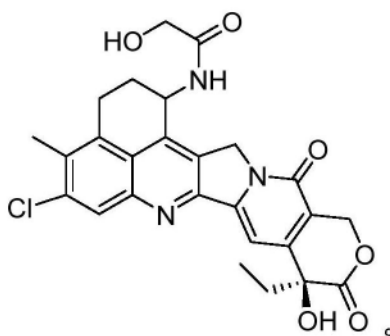
[0303] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



其中变量(例如,R³、R⁴)的值和替代值如本文别处所述。

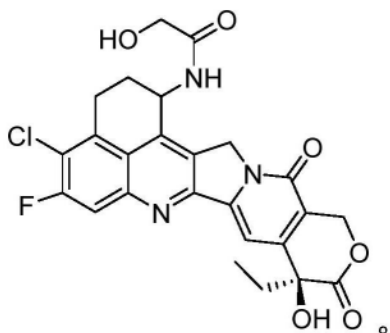
[0304] 在一些实施例中,R³是甲基;并且R⁴是Cl。

[0305] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



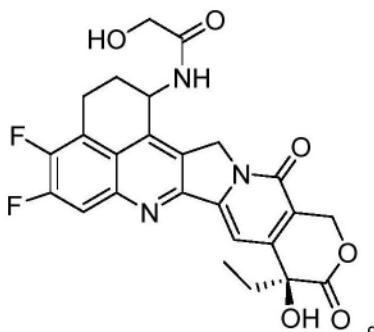
[0306] 在一些实施例中,R³是Cl;并且R⁴是F。

[0307] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



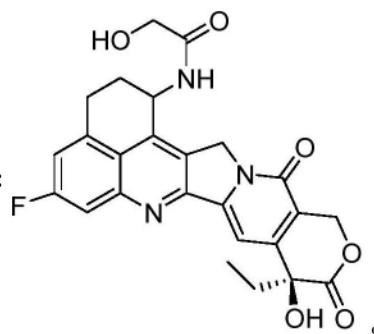
[0308] 在一些实施例中,R³是F;并且R⁴是F。

[0309] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



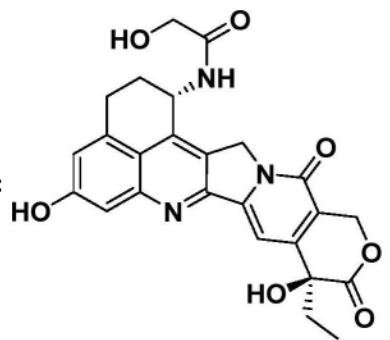
[0310] 在一些实施例中,R³是H;并且R⁴是F。

[0311] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



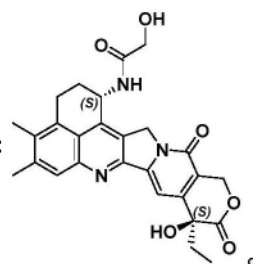
[0312] 在一些实施例中, R^3 是H;并且 R^4 是OH。

[0313] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



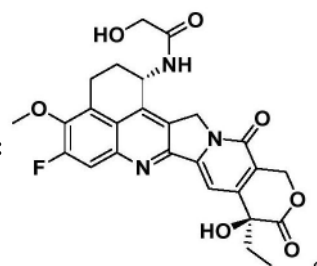
[0314] 在一些实施例中, R^3 是甲基;并且 R^4 是甲基。

[0315] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



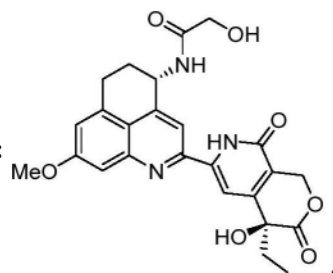
[0316] 在一些实施例中, R^3 是甲氧基;并且 R^4 是F。

[0317] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



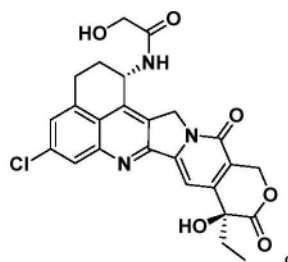
[0318] 在一些实施例中, R^3 是H;并且 R^4 是甲氧基。

[0319] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



[0320] 在一些实施例中, R^3 是H;并且 R^4 是Cl。

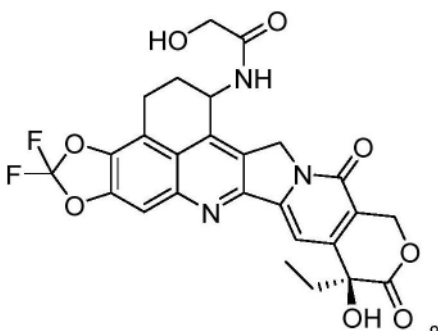
[0321] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



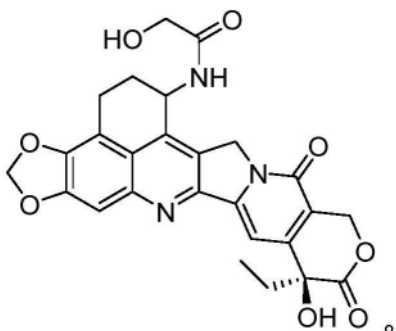
[0322] 在一些实施例中, R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的杂环基。

[0323] 在一些实施例中, R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的间二氧杂环戊烯环。

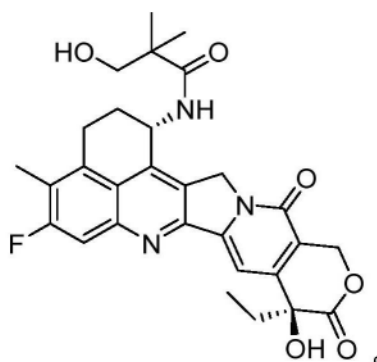
[0324] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



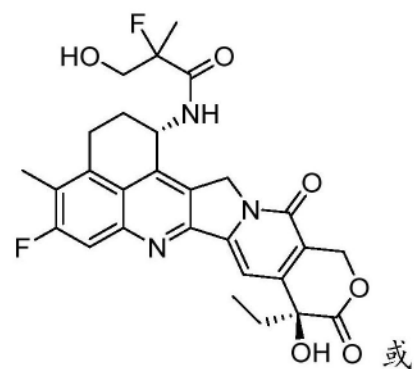
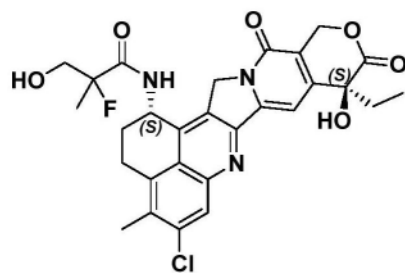
[0325] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



[0326] 在一些实施例中,PA是以下的残基:

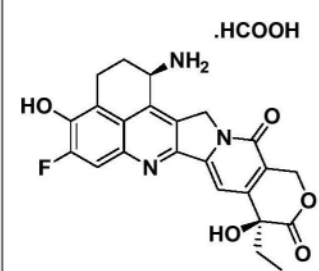
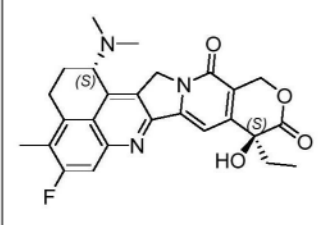
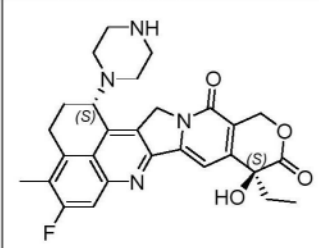
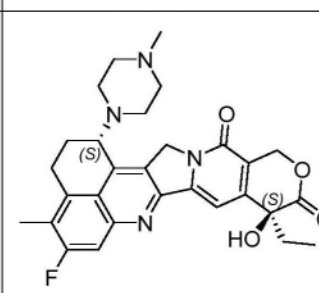
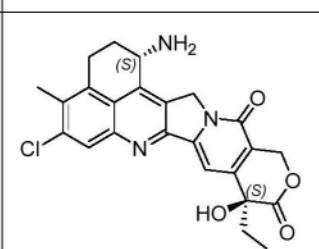
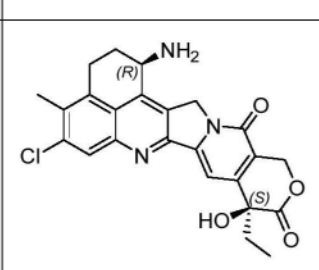


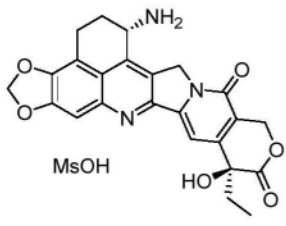
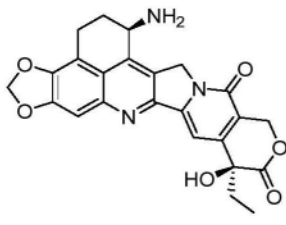
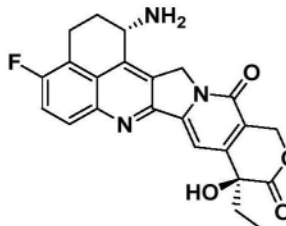
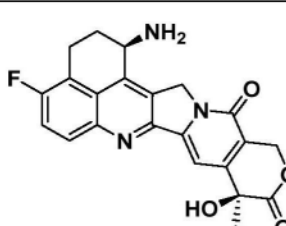
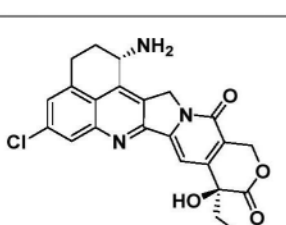
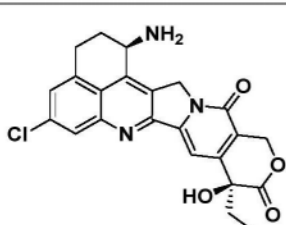
[0327] 在一些实施例中, PA 是以下的残基:

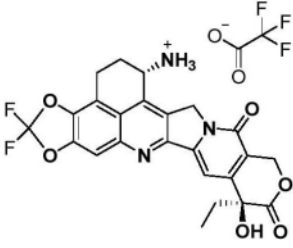
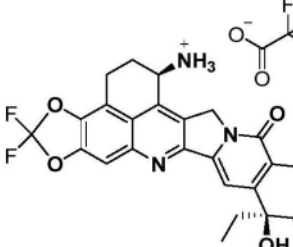
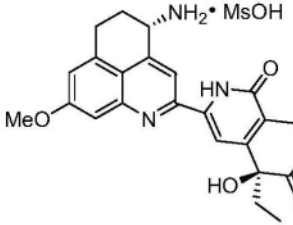
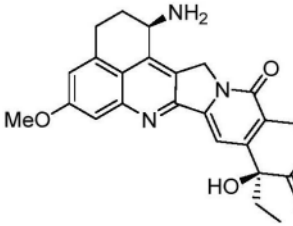
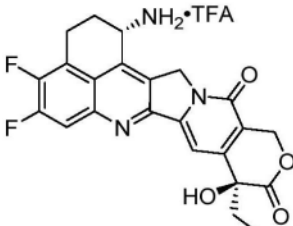
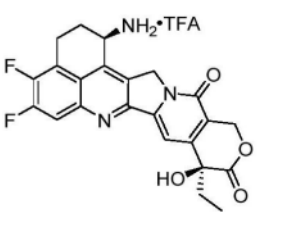


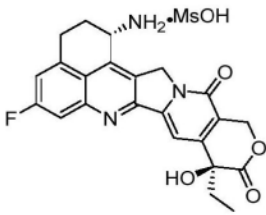
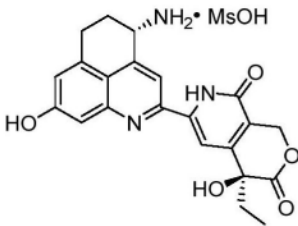
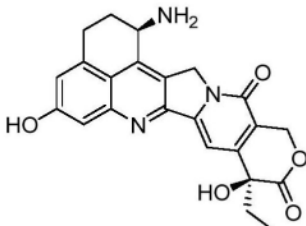
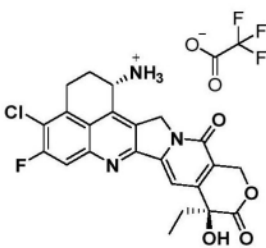
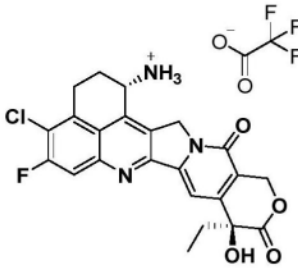
[0328] 在一些实施例中, PA 是以下的残基:

实例	有效载荷结构
1-A	
1-B	
1-C	
1-1	
1-2	
1-3	

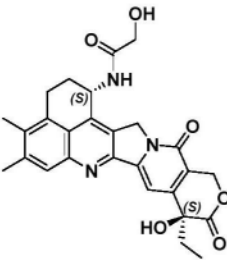
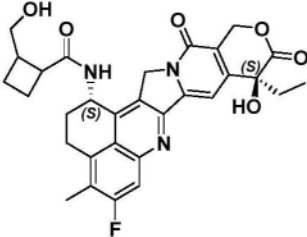
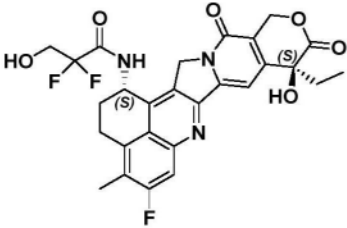
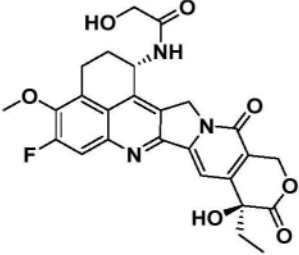
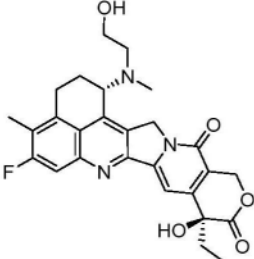
1-4	 .HCOOH
1-5	
1-6	
1-7	
1-8	
1-9	

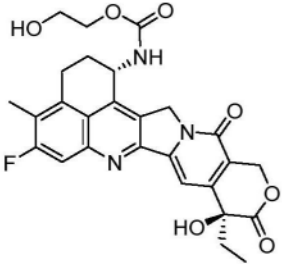
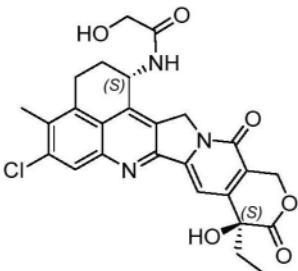
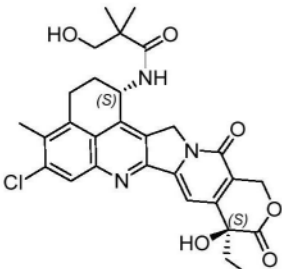
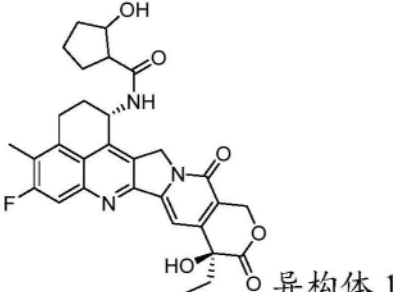
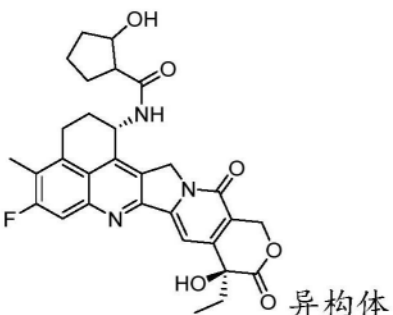
1-10	
1-11	
1-12	
1-13	
1-14	
1-15	

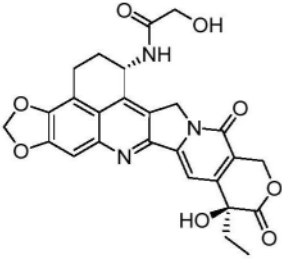
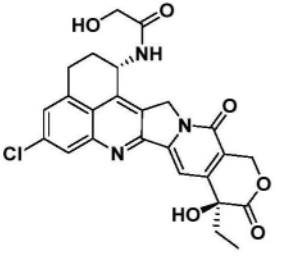
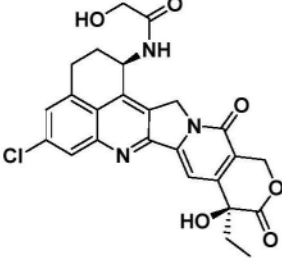
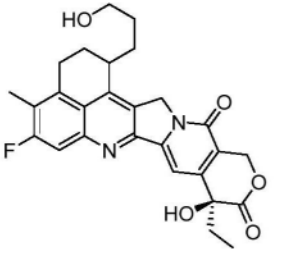
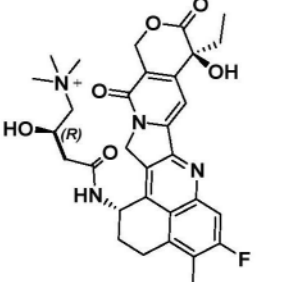
1-16	
1-17	
1-18	
1-19	
1-20	
1-21	

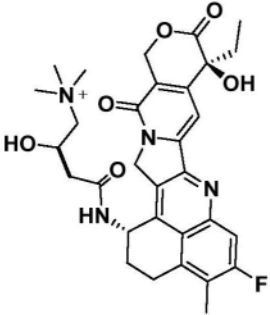
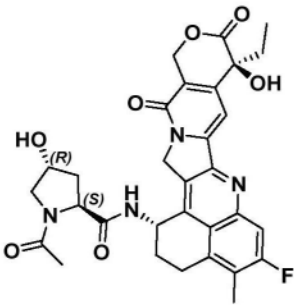
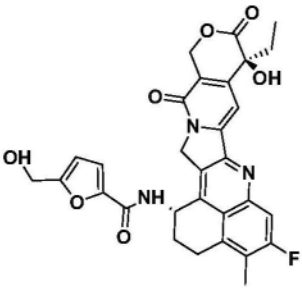
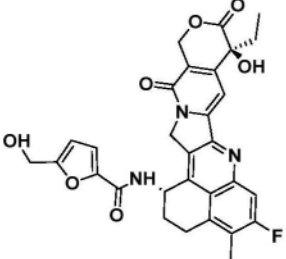
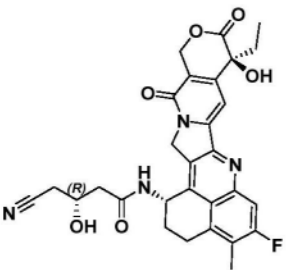
1-22	
1-23	
1-24	
1-25	
1-26	
1-27	

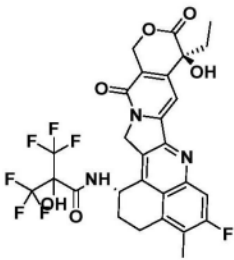
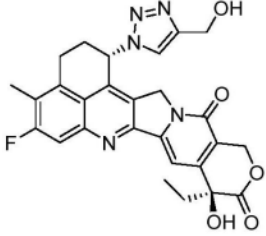
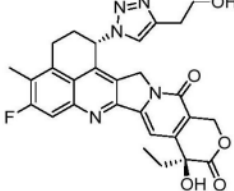
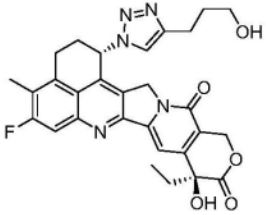
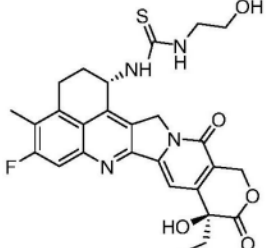
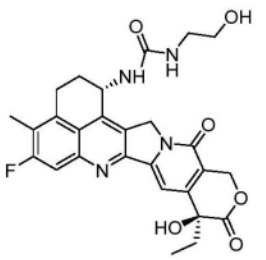
[0329] 在一些实施例中,PA是以下的残基:

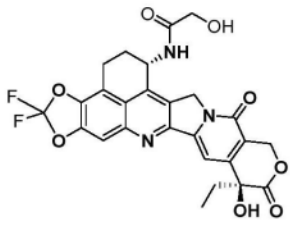
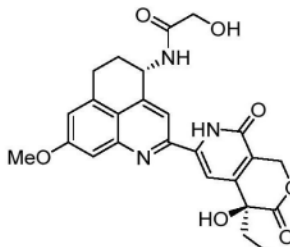
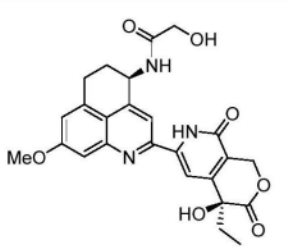
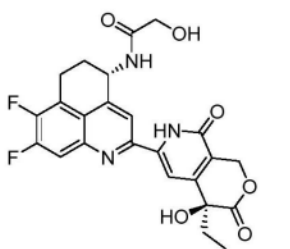
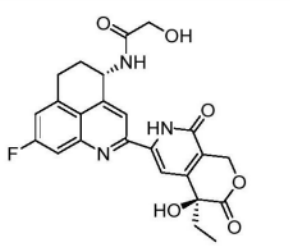
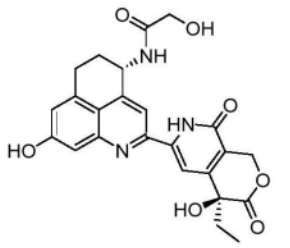
化合物 编号	有效载荷结构
2-1	
2-2	
2-3	
2-4	
2-5	

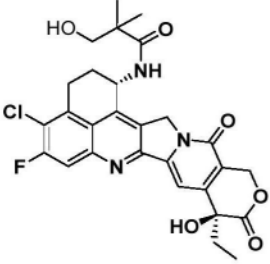
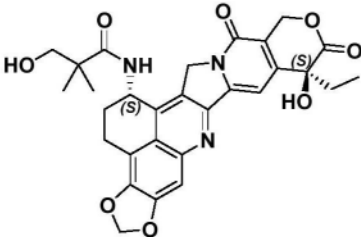
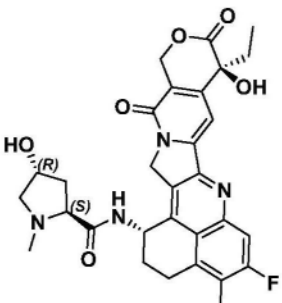
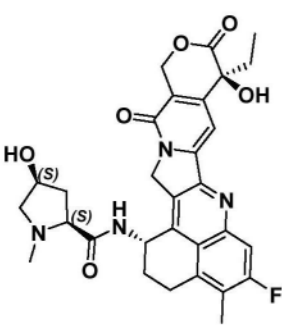
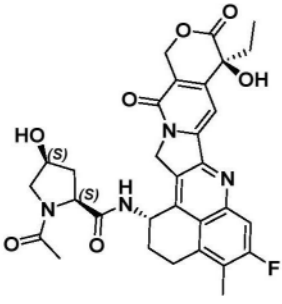
2-6	
2-7	
2-8	
2-9	 异构体 1
2-10	 异构体 2

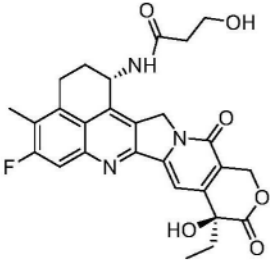
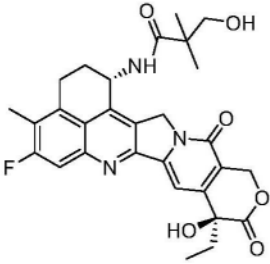
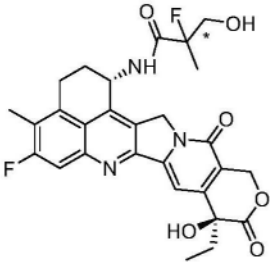
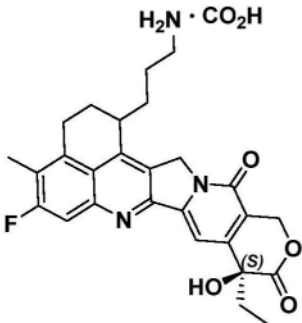
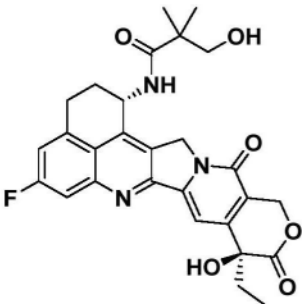
2-11	
2-12	
2-13	
2-14	
2-15	

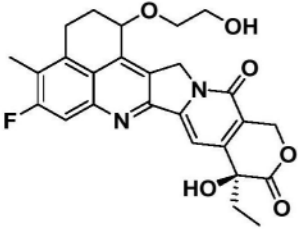
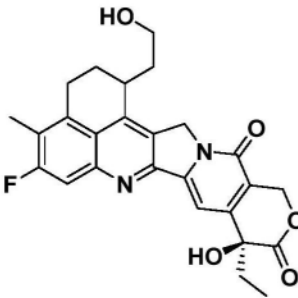
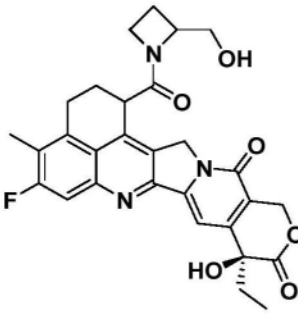
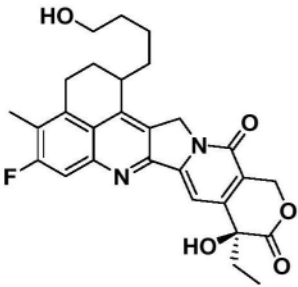
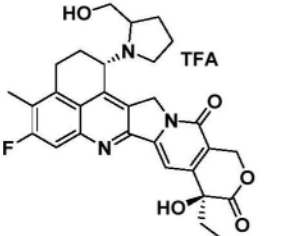
2-16	
2-17	
2-18	
2-19	
2-20	

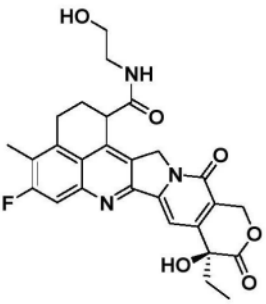
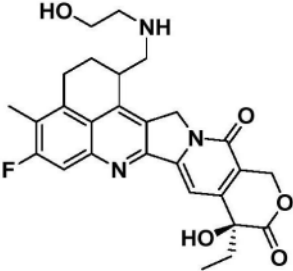
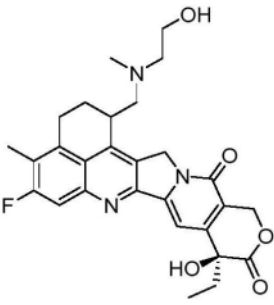
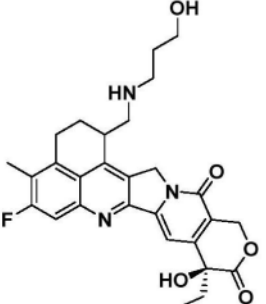
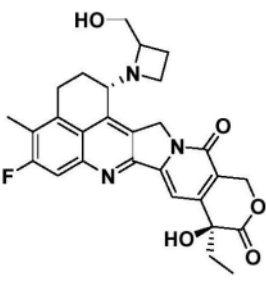
2-21	
2-22	
2-23	
2-24	
2-25	
2-26	

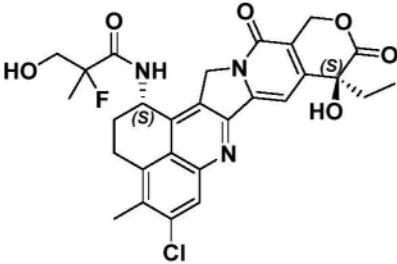
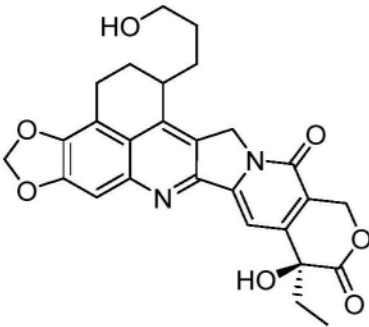
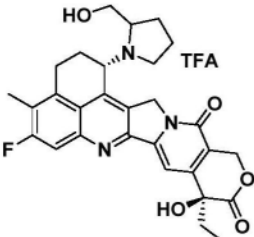
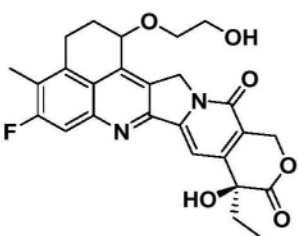
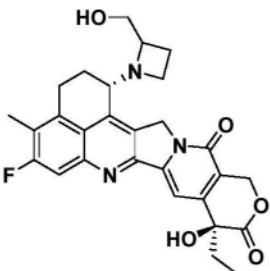
2-27	
2-28	
2-29	
2-30	
2-31	
2-32	

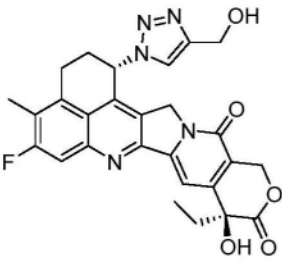
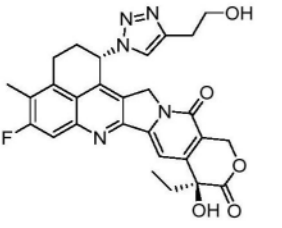
2-34	
2-35	
2-36	
2-37	
2-38	

2-39	
2-40	
2-41	
2-42	
2-43	

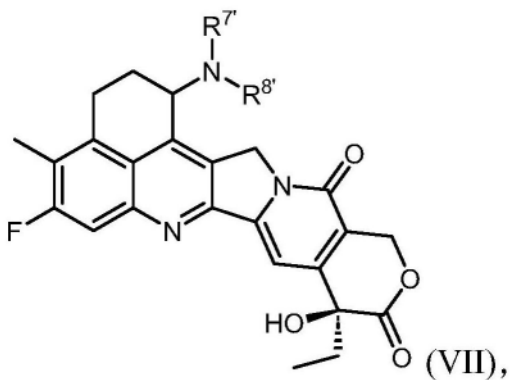
2-44 (异构体 1) 2-45 (异构体 2)	
2-46	
2-47	
2-48	
2-49 (异构体 1) 2-50 (异构体 2)	

2-51 (异构体 1) 2-52 (异构体 2)	
2-53	
2-54	
2-55	
2-56 (异构体 1) 2-57 (异构体 2)	

2-58	
2-59 (异构体 1) 2-60 (异构体 2)	
2-61	
2-62	
2-63	

2-64	
2-65	

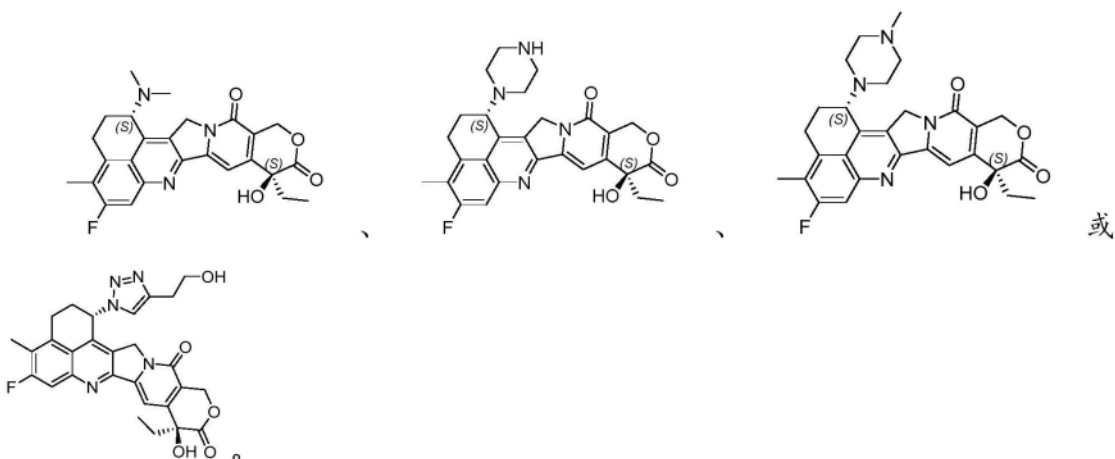
[0330] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



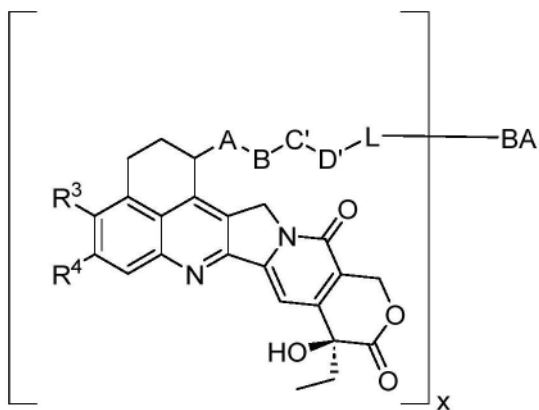
其中

$R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 中的每一者独立地是氢或者取代或未取代的烷基;或者 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 连同它们所附接的氮原子一起形成未取代或取代的杂环基或者未取代的或取代的杂芳基。

[0331] 在一些实施例中,PA是以下的残基:



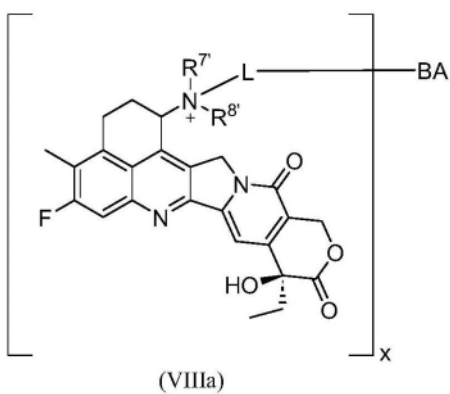
[0332] 在一些实施例中,抗体药物缀合物具有式 (V) :



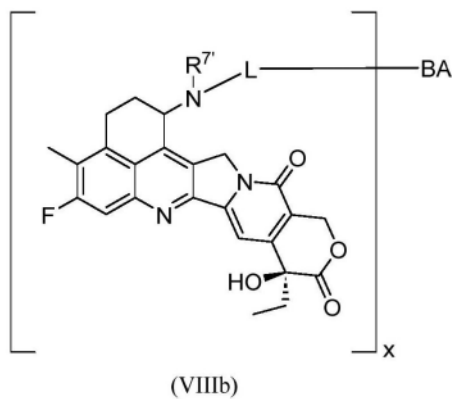
(V),

或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药,其中变量(例如,A、B、C'、D'、L、R³、R⁴和x)的值和替代值如本文别处所述。

[0333] 在一些实施例中,抗体药物缀合物具有式(VIIIa)、(VIIIb)或(VIIIc)的结构:

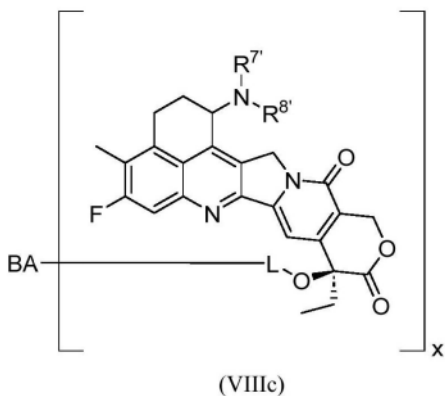


(VIIIa)



(VIIIb)

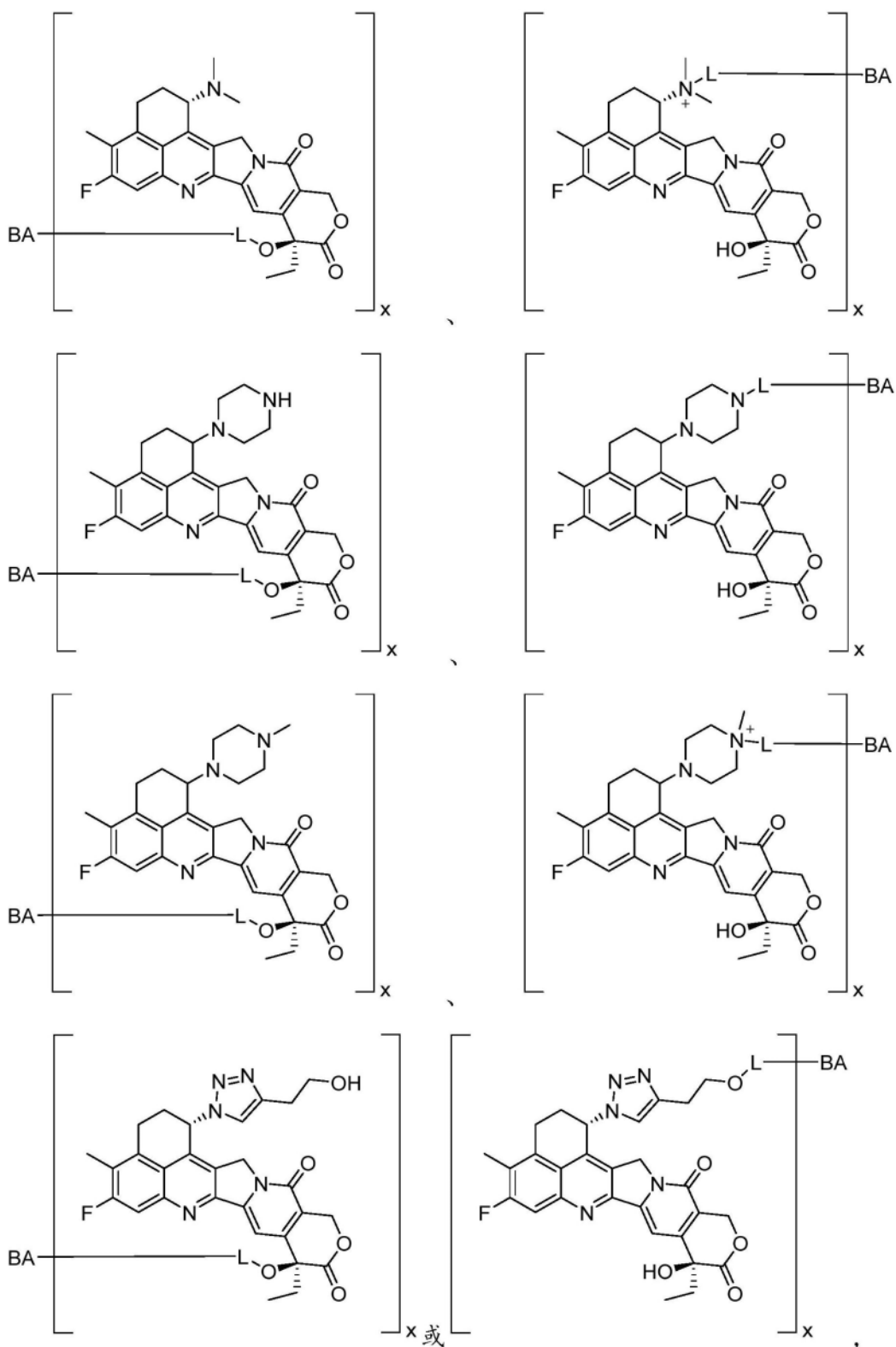
或

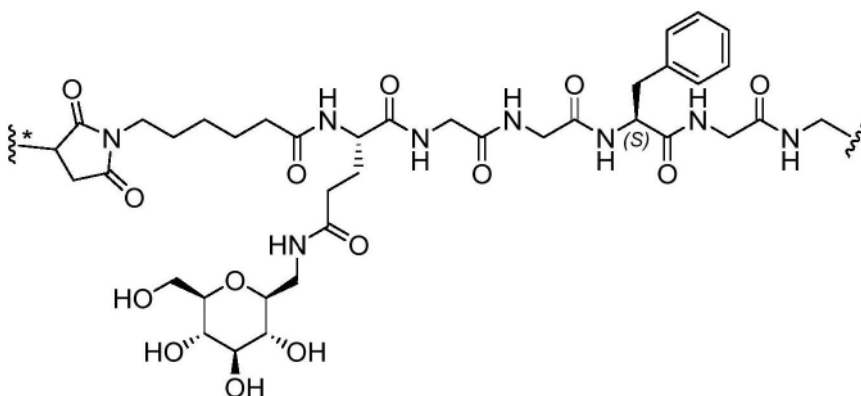
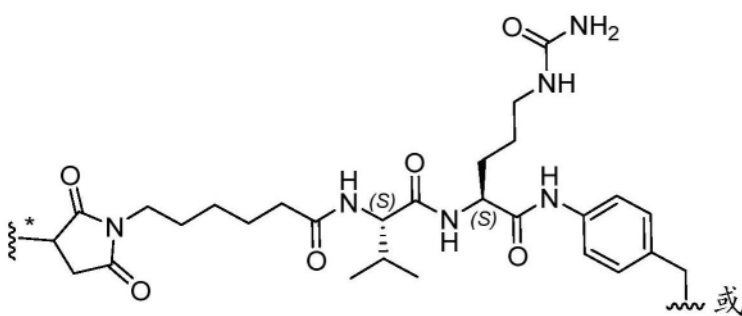
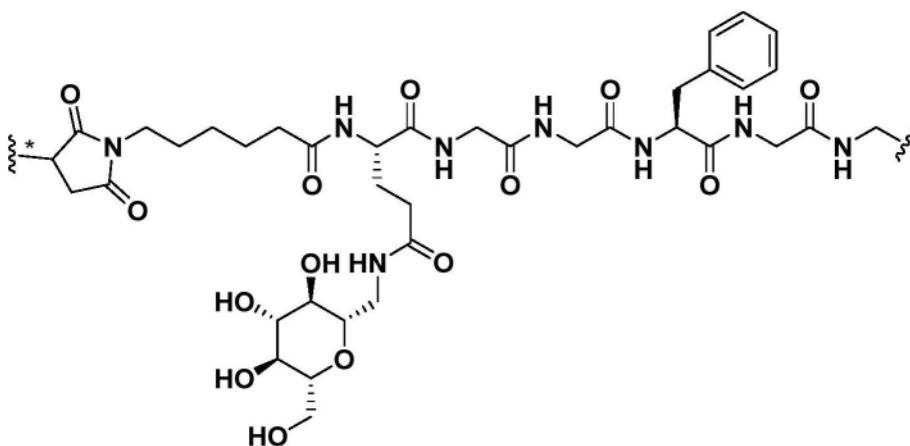


(VIIIc)

或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药,其中变量(例如,L、R⁷、R⁸和x)的值和替代值如本文别处所述。

在一些实施例中,抗体药物缀合物具有下式中的任一种的结构:

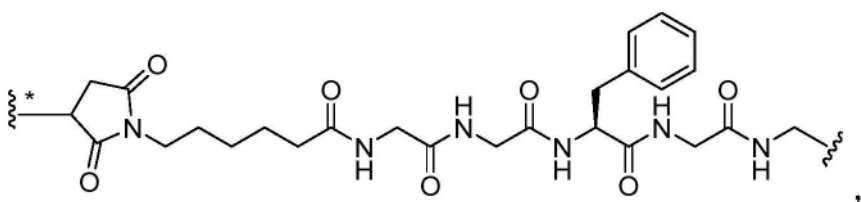




其中用星号标记

的键与BA连接。

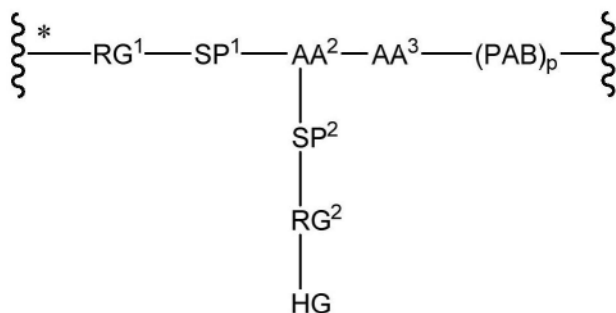
[0335] 在一些实施例中,L是



其中用星号标记

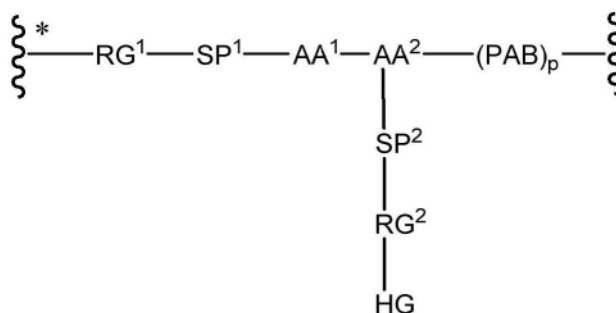
的键与BA连接。

[0336] 在一些实施例中,L是:



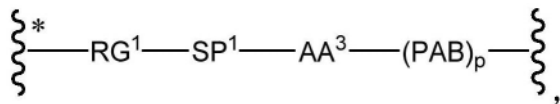
其中变量(例如, RG^1 、 SP^1 、 AA^2 、 AA^3 、 PAB 、 p 、 SP^2 、 RG^2 和 HG)的值和替代值如本文所述。

在一些实施例中, L 是:



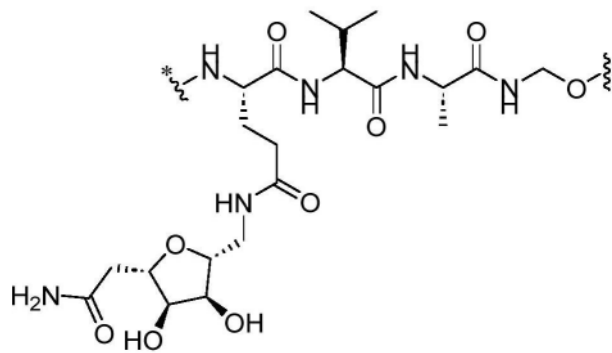
其中变量(例如, RG^1 、 SP^1 、 AA^1 、 AA^2 、 PAB 、 p 、 SP^2 、 RG^2 和 HG)的值和替代值如本文别处所述。

[0337] 在一些实施例中, L 是:



其中变量(例如, RG^1 、 SP^1 、 AA^3 、 PAB 和 p)的值和替代值如本文别处所述。

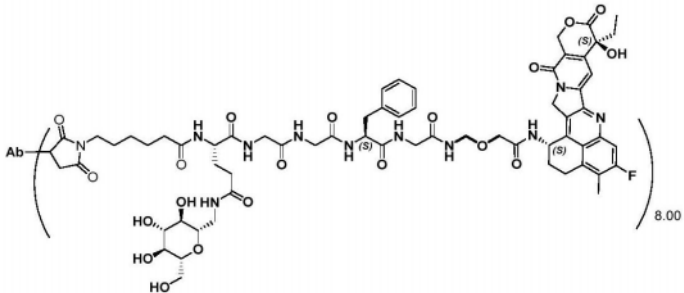
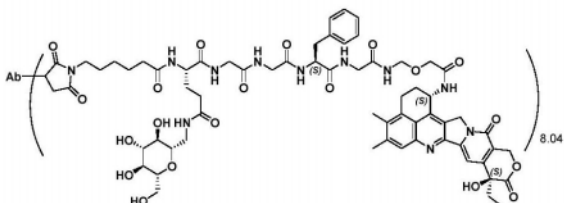
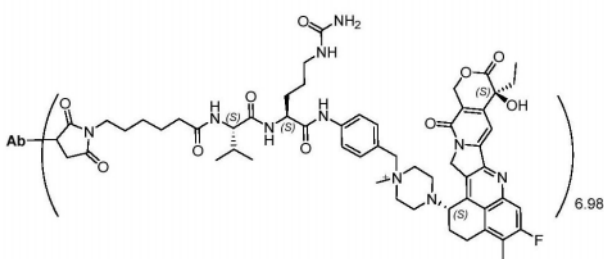
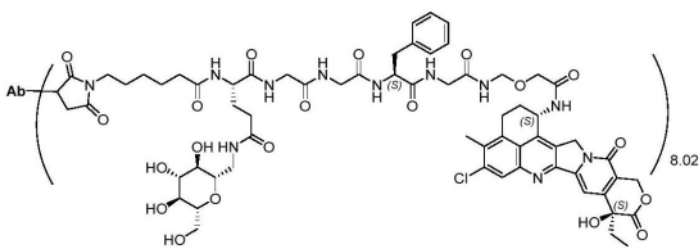
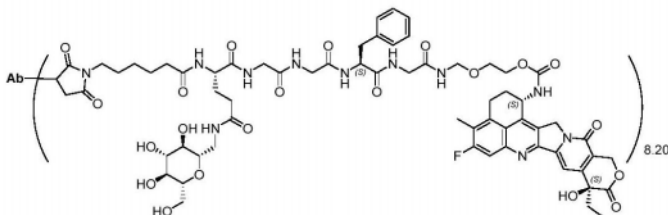
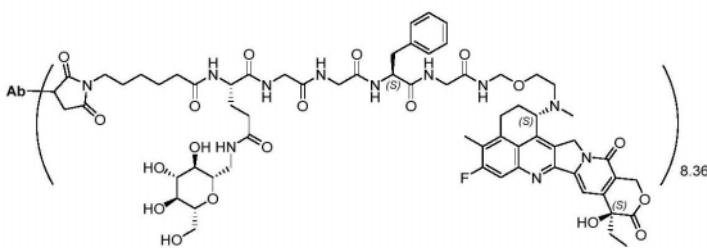
[0338] 在一些实施例中, $-\text{AA}^2(\text{SP}^2-\text{RG}^2-\text{HG})-\text{AA}^3-(\text{PAB})_p-$ 是

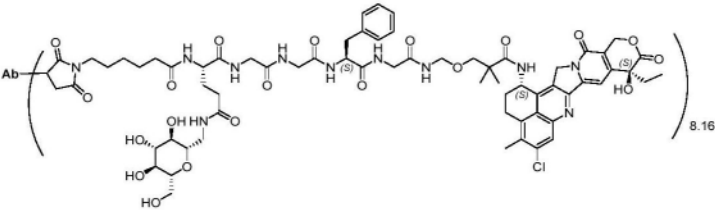
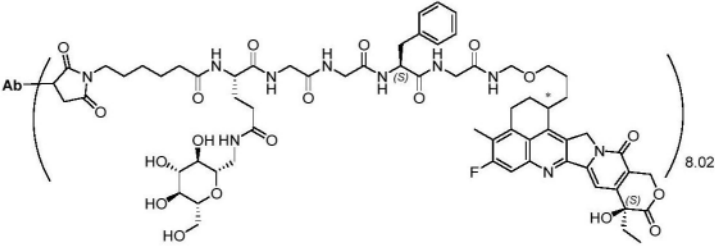
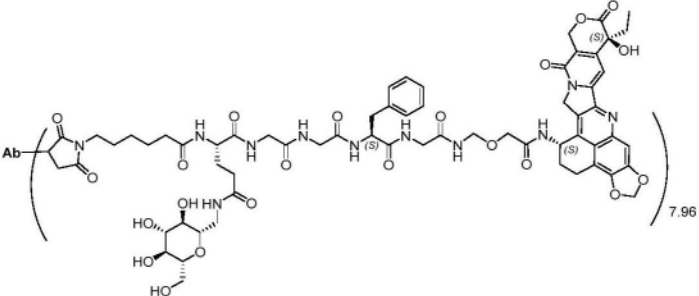
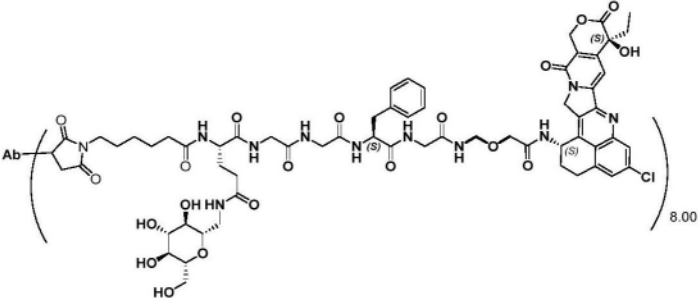
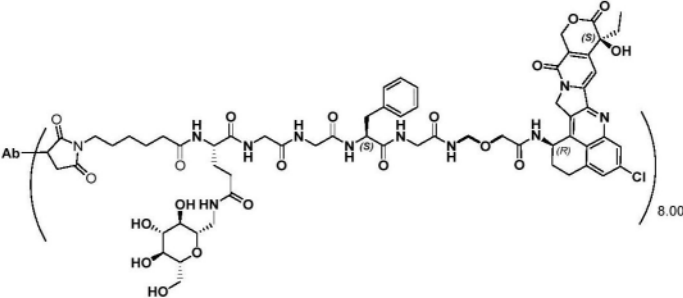


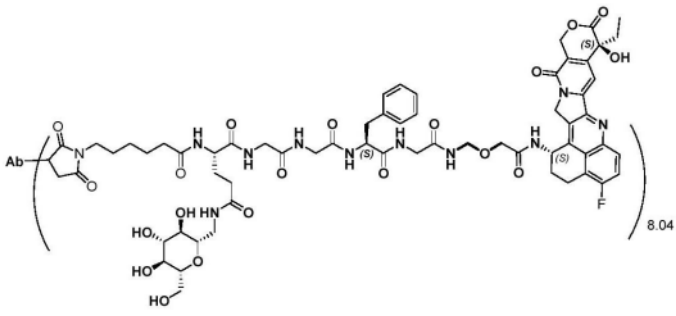
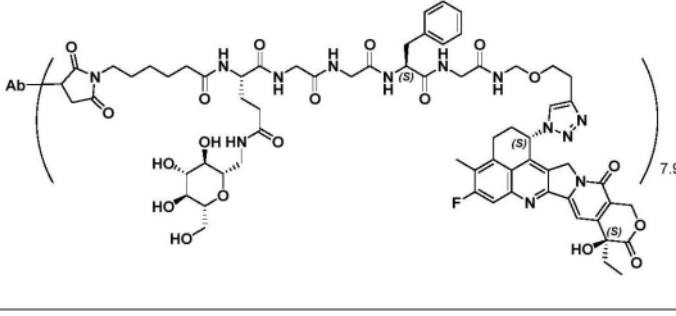
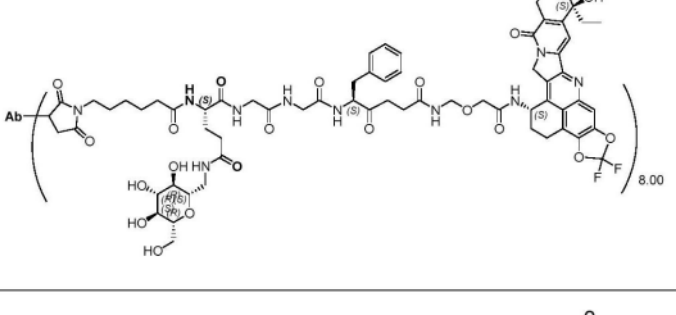
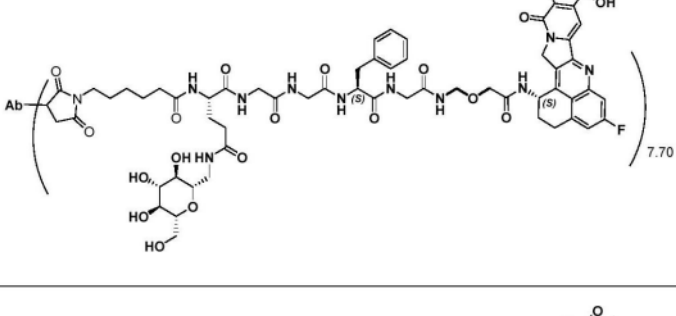
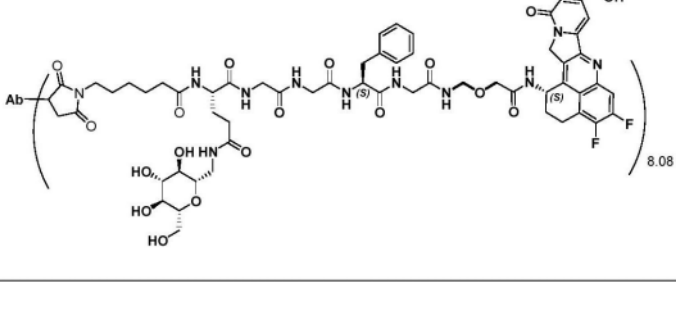
其中*标记与 SP^1 连接的键。

[0339] 在一些实施例中, 抗体药物缀合物选自以下项, 或其药学上可接受的盐、互变异构体、溶剂化物、立体异构体、对映异构体、同位素体或前药, 其中 Ab 是本文披露的抗 CEA 抗体中的任一种:

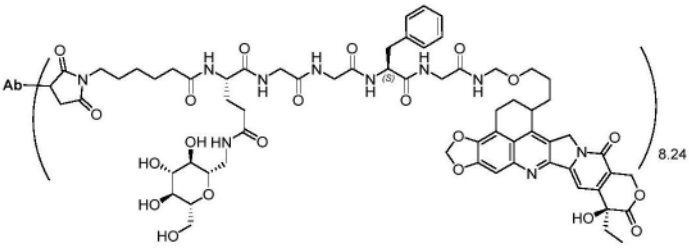
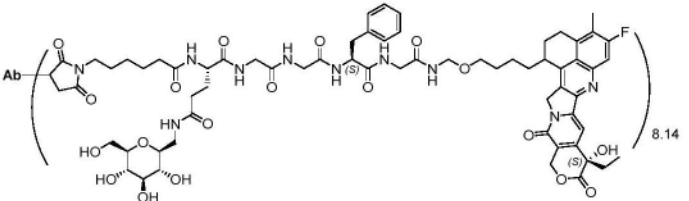
实例	结构
ADC-P1 BGB-C-269	
ADC-P2 BGB-C-276	
ADC-P3 BGB-C-290	
ADC-1 BGB-C-81	
ADC-2 BGB-C-115	

ADC-3 BGB-C-245	
ADC-4 BGB-C-318	
ADC-5 BGB-C-277	
ADC-6 BGB-C-306	
ADC-7 BGB-C-329	
ADC-8 BGB-C-323	

ADC-9 BGB-C-331	
ADC-10 BGB-C-325	
ADC-11 BGB-C-307	
ADC-12 BGB-C-287	
ADC-13 BGB-C-288	

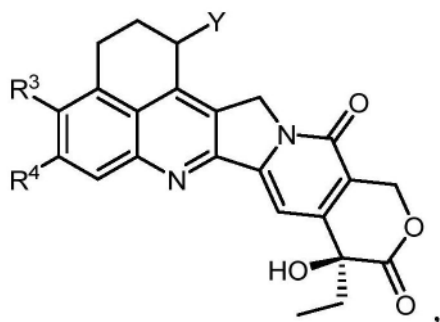
ADC-14 BGB-C-317	 8.04
ADC-15 BGB-C-292	 7.90
ADC-16 BGB-C-348	 8.00
ADC-17 BGB-C-319	 7.70
ADC-18 BGB-C-343	 8.08

ADC-19 BGB-C-302	
ADC-20 BGB-C-320	
ADC-21 BGB-C-330	
ADC-22 BGB-C-346	
ADC-23 BGB-C-358	
ADC-24 BGB-C-373	

ADC-25 BGB-C-421	
ADC-26 BGB-C-395	

[0340] 本文设想了接头和有效载荷的所有可能组合。就这一点而言,应当理解,本文在式 I-VIII 的上下文中使用的 L 涵盖式 A 或 A-1 的化合物的 C-L。另外,应当理解,在式 A 或 A-1 的上下文中使用的 C 对应于 RG^1-SP^1 。

[0341] 在实施例中, D 是:



其中

Y 是 -A-B-C-D-*, 其中 * 标记 D 与 L 连接的键;

A 是键、 CR^1R^2 或 $N-R^1$;

B 是键、 $-C(=O)-$ 或 $-C(=O)O-$;

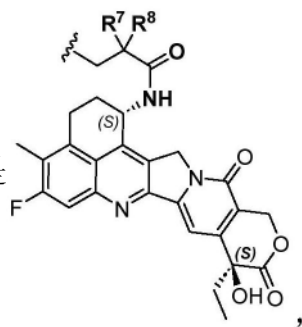
C 是键或二价基团, 其中该二价基团是未取代或取代的 C_{1-8} 烷基、未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基;

D 是键、NH 或 O;

R^1 和 R^2 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基; 或者 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基;

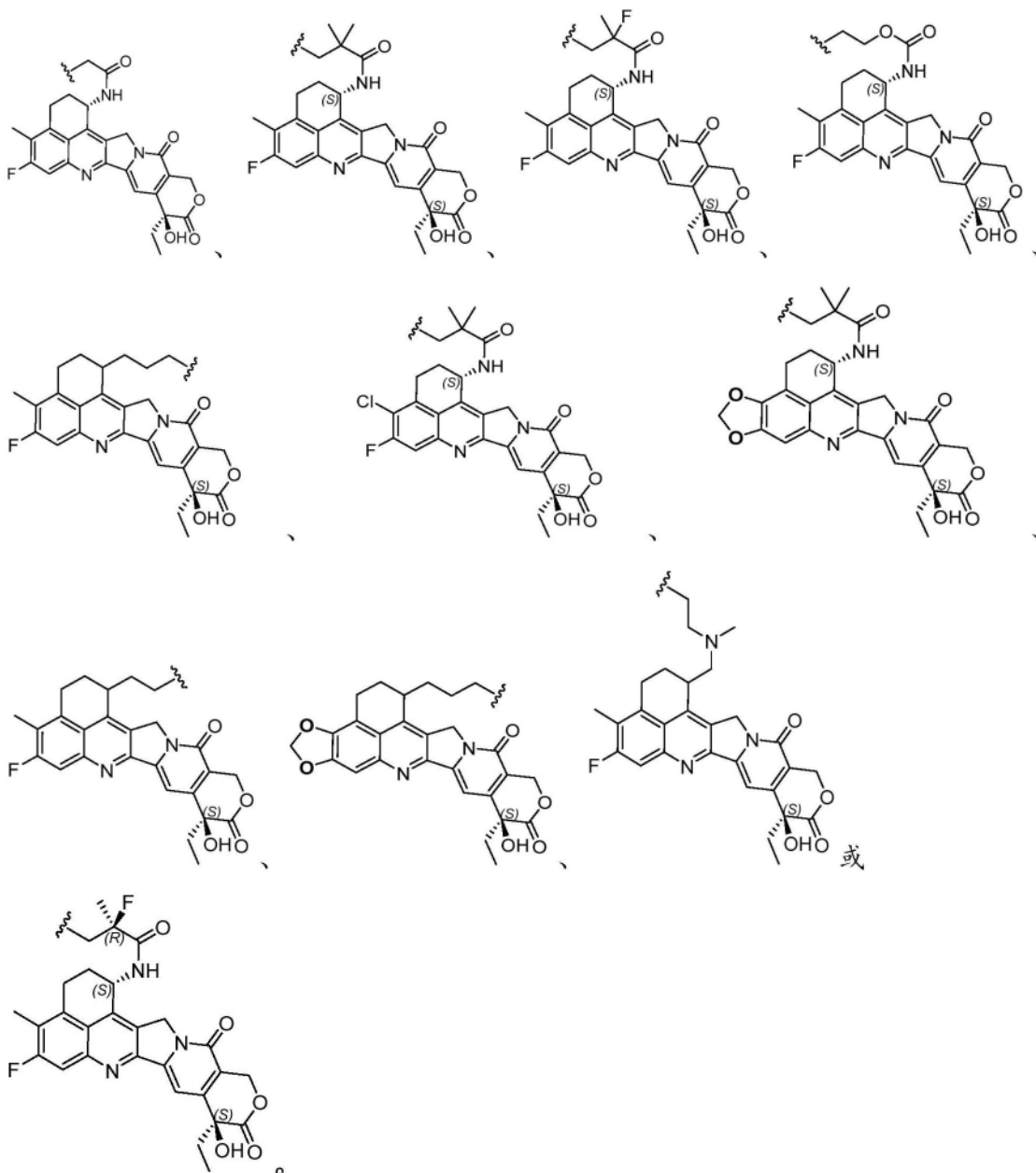
R^3 和 R^4 中的每一者独立地是氢、卤素、取代或未取代的烷基或者取代或未取代的烷氧基; 或者 R^3 和 R^4 与它们所附接的原子一起形成未取代或取代的环烷基、未取代或取代的杂环基、未取代或取代的芳基或者未取代或取代的杂芳基。

[0342] 在实施例中,D是

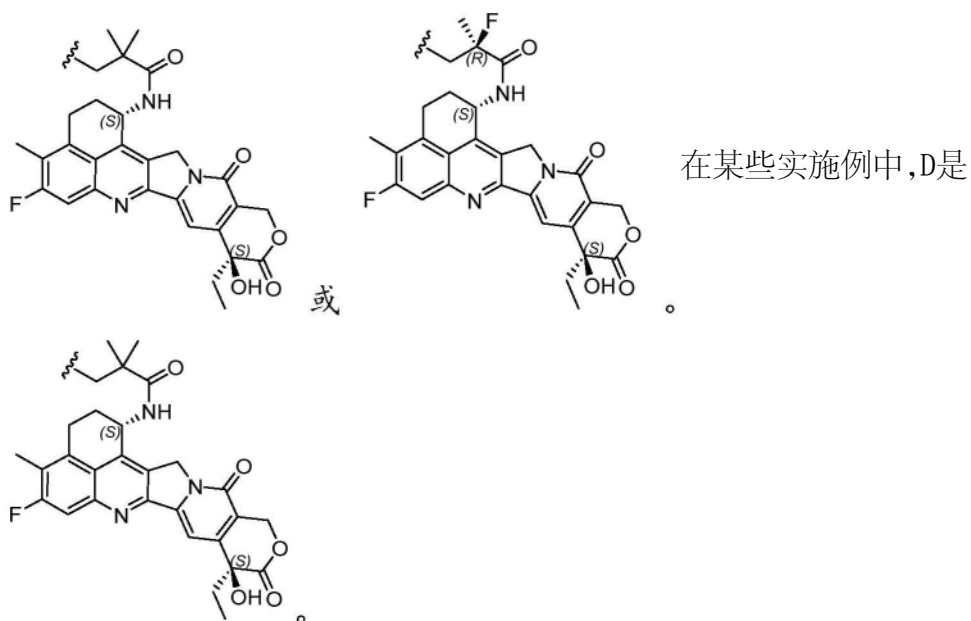


其中 R^7 和 R^8 各自独立地是氢、卤素或烷基。

[0343] 在实施例中,细胞毒性剂具有下式:

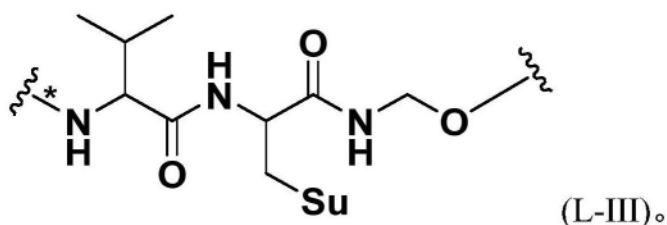
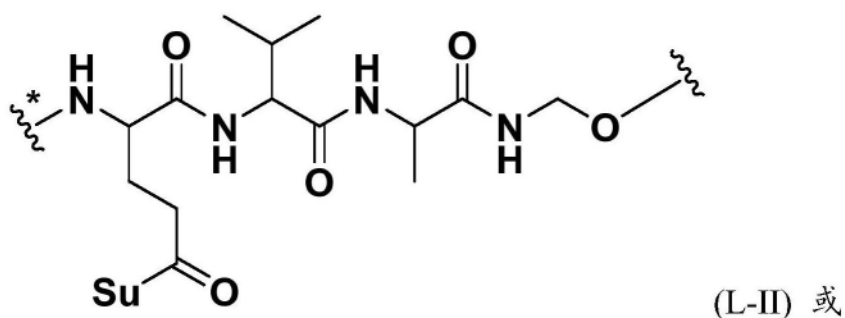
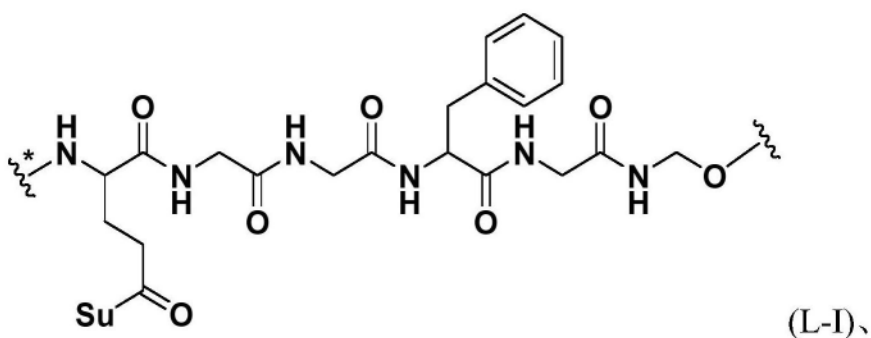


[0344] 在某些实施例中,细胞毒性剂(D)是



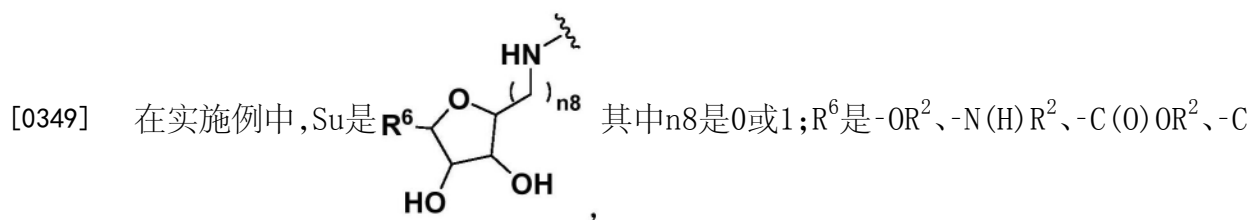
[0345] 每个抗体药物缀合物可包括一个或多个细胞毒性剂分子,诸如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个分子。与单个抗体或抗体片段缀合的细胞毒性剂分子的数量可被描述为药物与抗体比率(DAR)。在式 $Ab-(C-L-(D)_m)_n$ 中,DAR是m和n的乘积。

[0346] 细胞毒性剂可与抗CEA抗体直接接合或经由接头(L)与抗CEA抗体间接接合。在实施例中,接头是可切割的,诸如通过酶切割,以释放细胞毒性剂。在实施例中,诸如当细胞毒性剂是疏水性的时,接头是亲水性的。在实施例中,接头具有下式,其中*标记L可与缀合部分(C)接合的键:

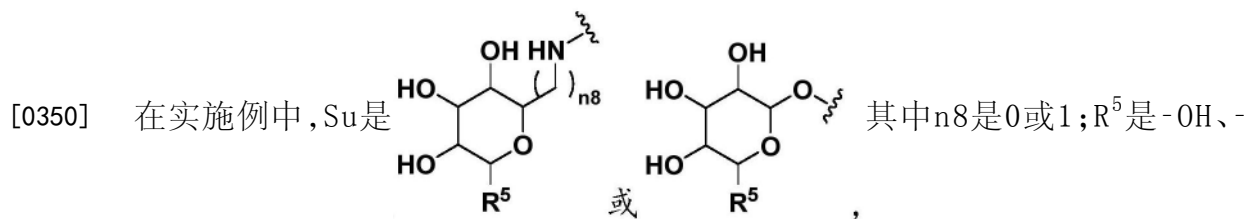


[0347] 在前述式中,Su可以是糖样部分。该部分可衍生自天然或非天然糖。该部分可以是亲水性的。在实施例中,诸如当细胞毒性剂是疏水性的时,包括亲水性Su部分可降低抗体药物缀合物聚集的可能性,并由此降低体内清除率。

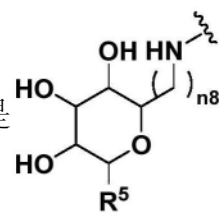
[0348] 在实施例中,Su是亲水性残基。



(O)N(H)R²、-CH₂-OR²、-CH₂-N(H)R²、-CH₂-C(O)OR²或-CH₂-C(O)N(H)R²；并且R²是氢或甲基。在某些实施例中，n8是1。在某些实施例中，n8是0。在某些实施例中，R²是氢。在某些实施例中，R²是甲基。在某些实施例中，R⁶是-OR²、-N(H)R²、-C(O)OR²或-C(O)N(H)R²。在某些实施例中，R⁶是-CH₂-OR²、-CH₂-N(H)R²、-CH₂-C(O)OR²或-CH₂-C(O)N(H)R²。在某些实施例中，R⁶是-CH₂-C(O)N(H)R²，例如-CH₂-C(O)NH₂。

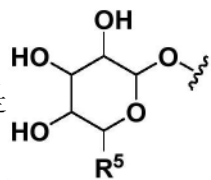


NH_2 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 。在某些实施例中,Su是



在某些

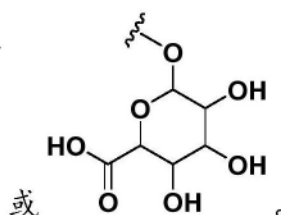
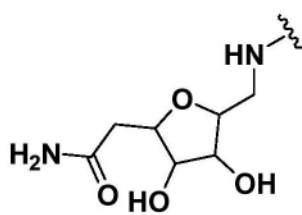
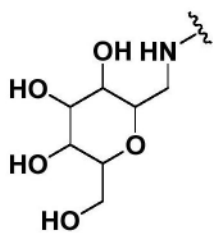
实施例中,Su是



在某些实施例中, n_8 是0。在某些实施例中, n_8 是1。在某些实

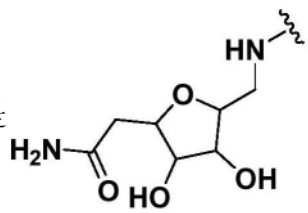
施例中, R^5 是 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 。在某些实施例中, R^5 是 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 。

[0351] 在实施例中,Su是

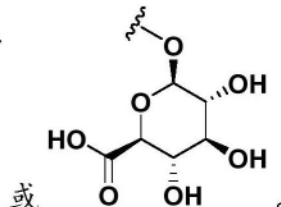
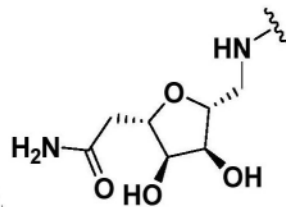
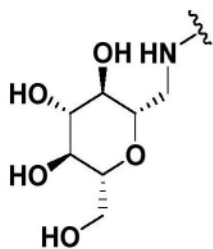


在某些实施例中,Su

是

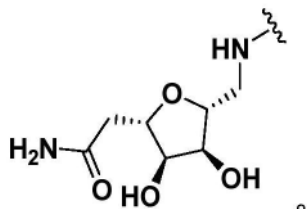


[0352] 在实施例中,Su是

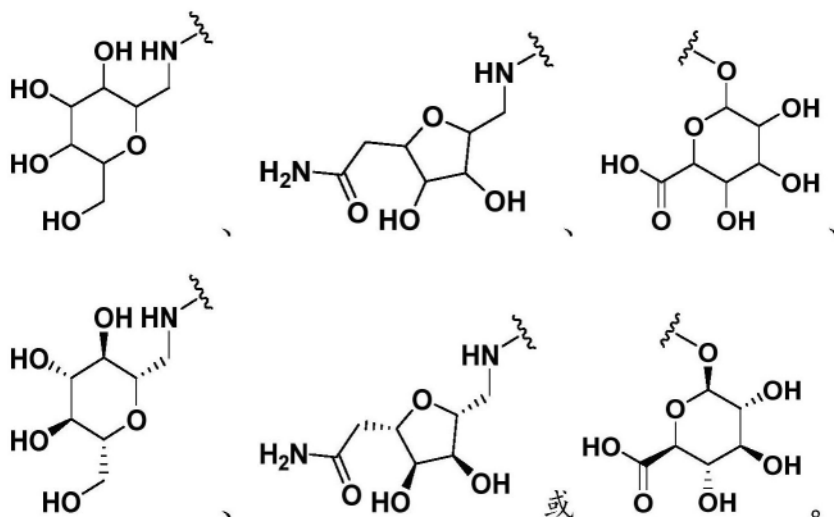


在某些实施例中,Su

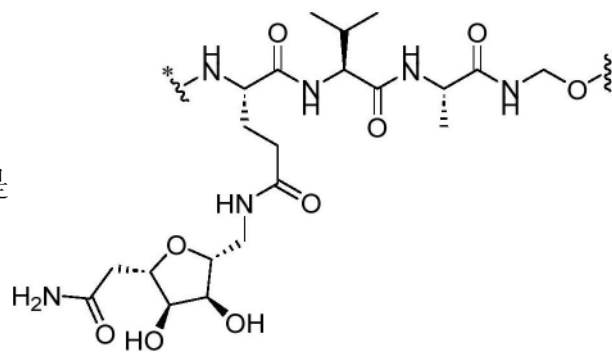
是



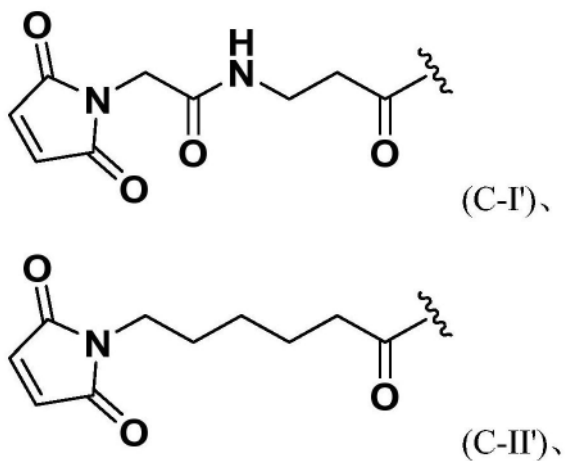
[0353] 在实施例中,Su是:

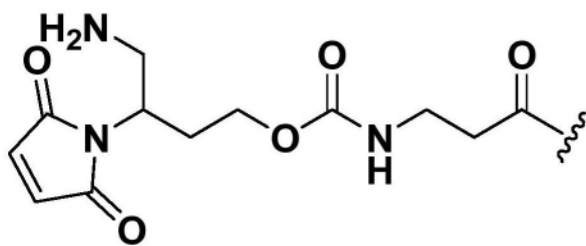


[0354] 在实施例中,L是

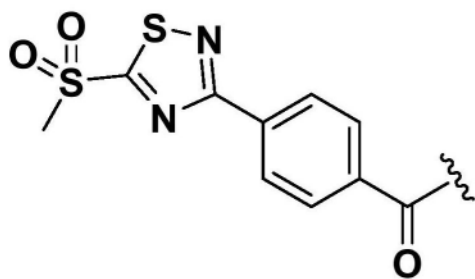


[0355] 本文披露的抗体药物缀合物可包括缀合部分(C)。缀合部分可经由接头与细胞毒性剂间接接合。缀合部分可帮助避免或减少细胞毒性剂在体内的解缀合,这可帮助维持稳定的药物与抗体比率(DAR)。缀合部分例如在与抗体缀合之前可具有下式:



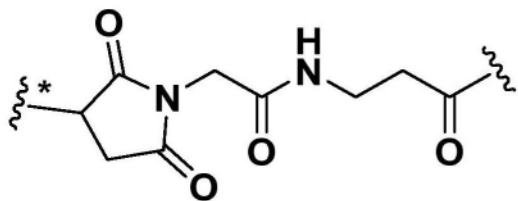


(C-III') 或

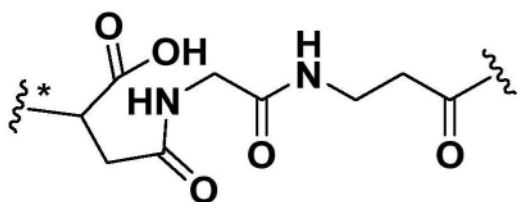


(C-IV')。

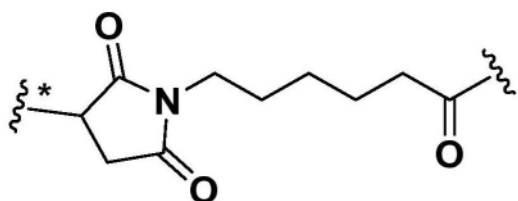
[0356] 当缀合部分与抗CEA抗体直接接合时,缀合部分可具有下式,其中*标记缀合部分与抗体连接的键:



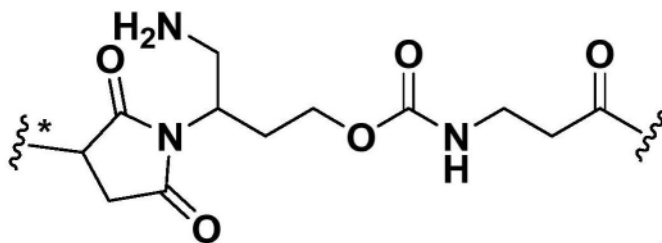
(C-I)、



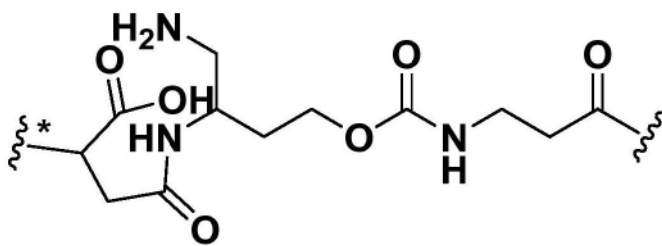
(C-Ia)、



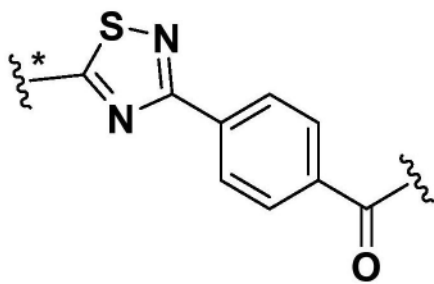
(C-II)、



(C-III)、

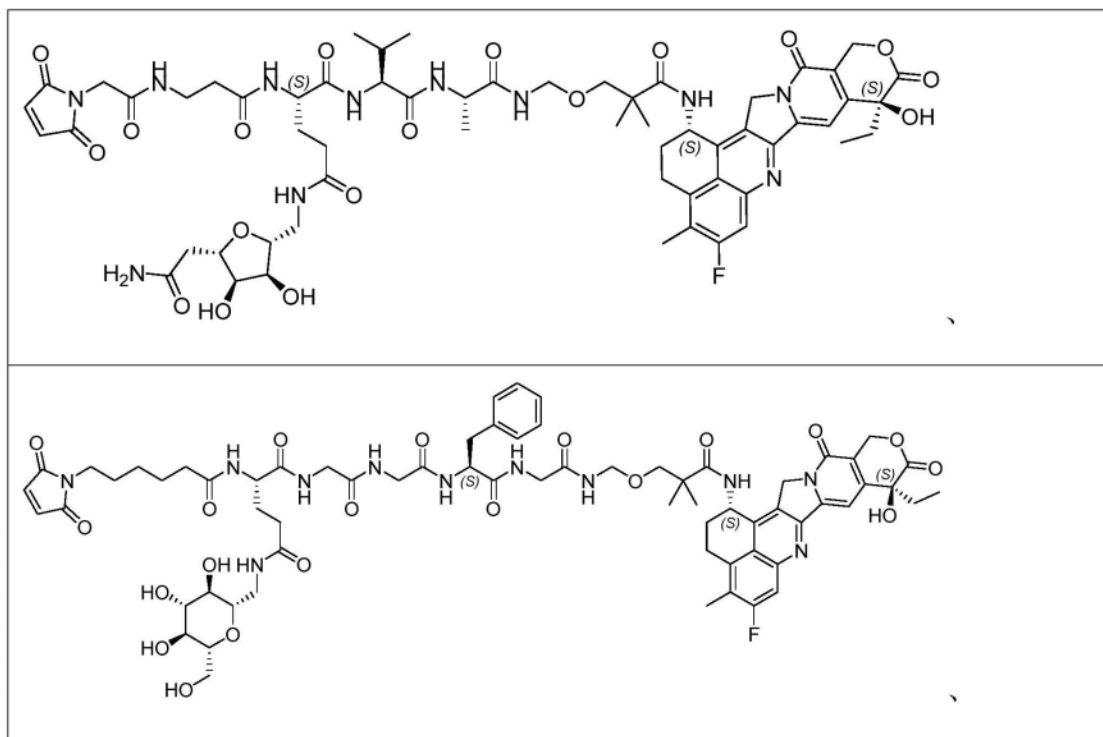


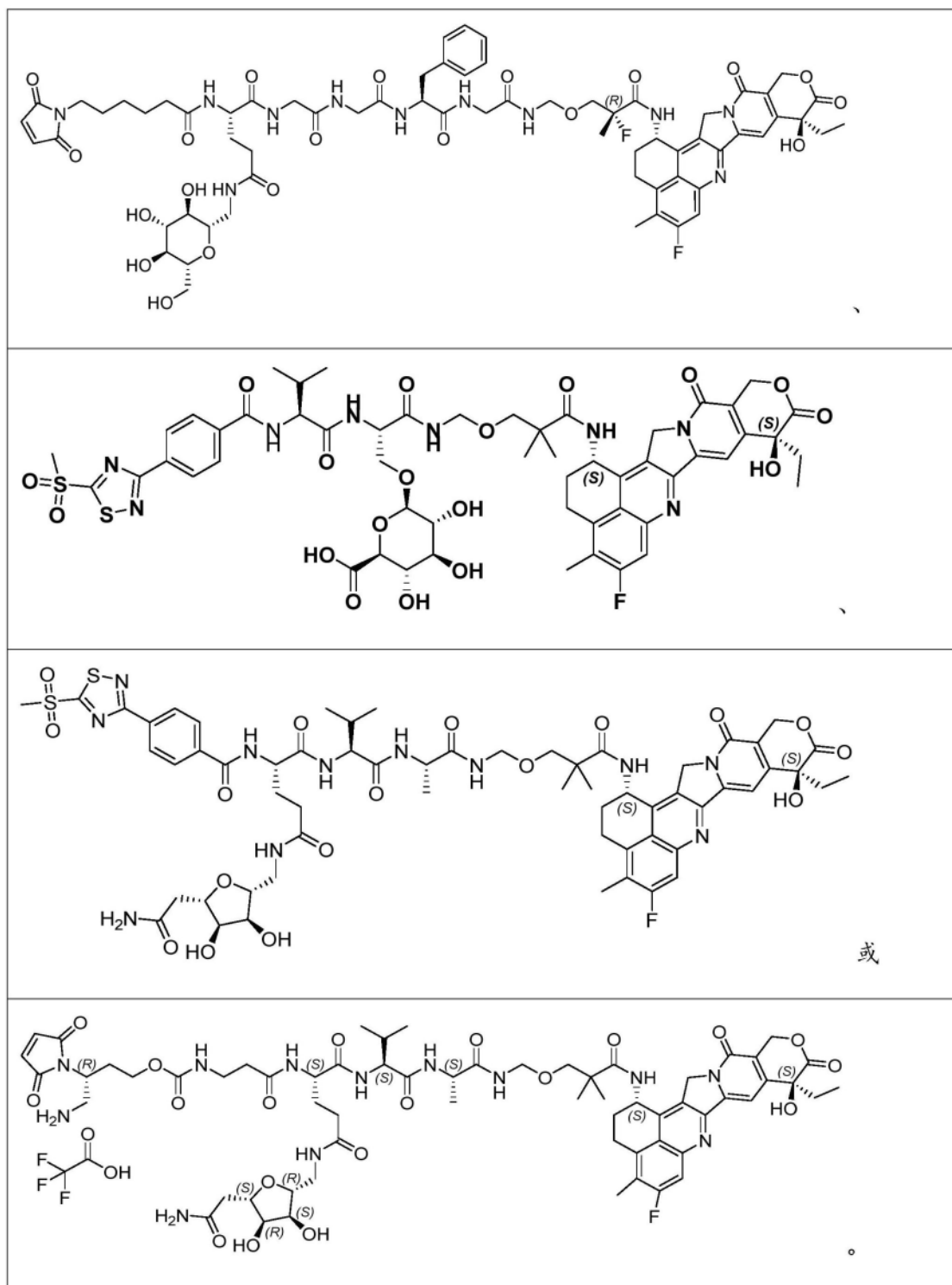
(C-IIIa) 或



(C-IV)。

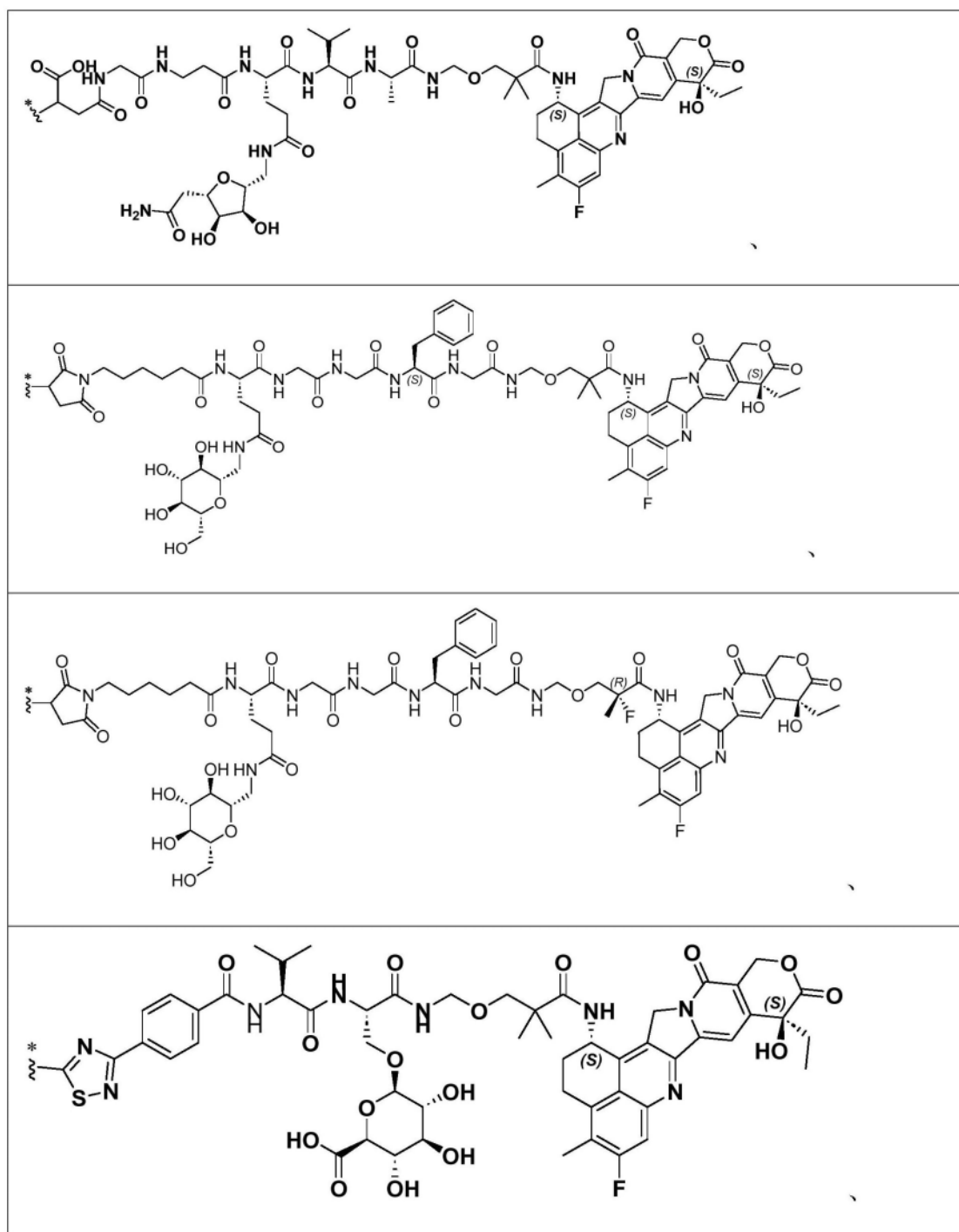
[0357] 缀合部分、接头、糖部分和细胞毒性剂可以任何组合包括在本发明披露的抗体药物缀合物中。缀合部分(缀合前)-接头-细胞毒性剂组合的非限制性实例包括以下这些：

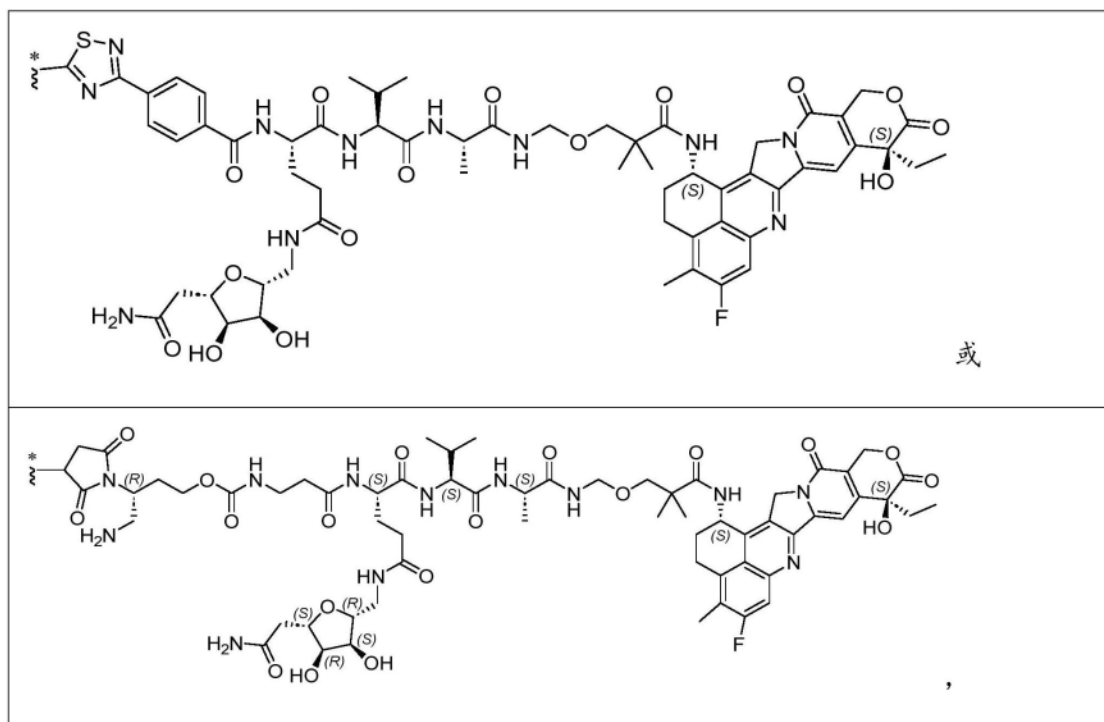




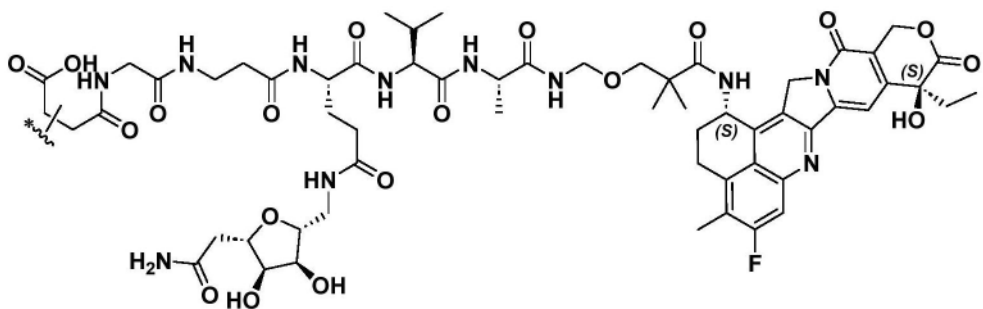
[0358] 每个抗体药物缀合物可包括多于一个缀合部分-接头-细胞毒性剂化合物(C-L-D), 诸如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个C-L-D。在实施例中, 每个抗体药物缀合物包括1至10个, 例如3至10个、4至10个、5至10个、6至10个、7至9个或约8个。

[0359] 在某些实施例中, -C-L-(D)_m 是:

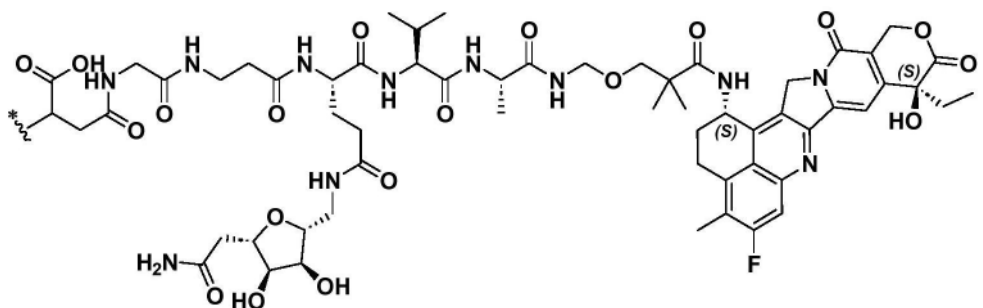




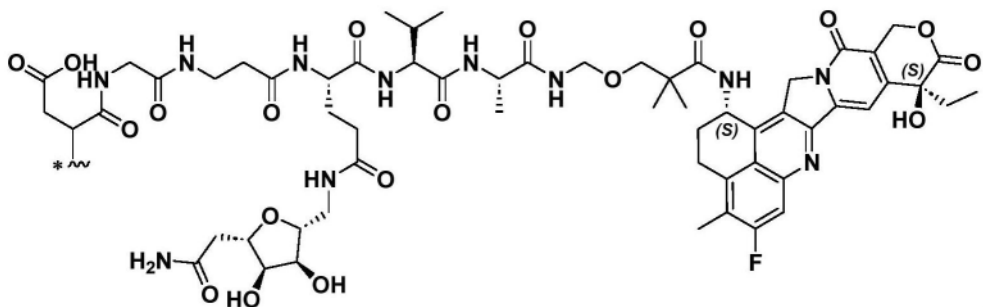
其中*标记C与Ab连接的键。在某些实施例中，-C-L-(D)_m是：



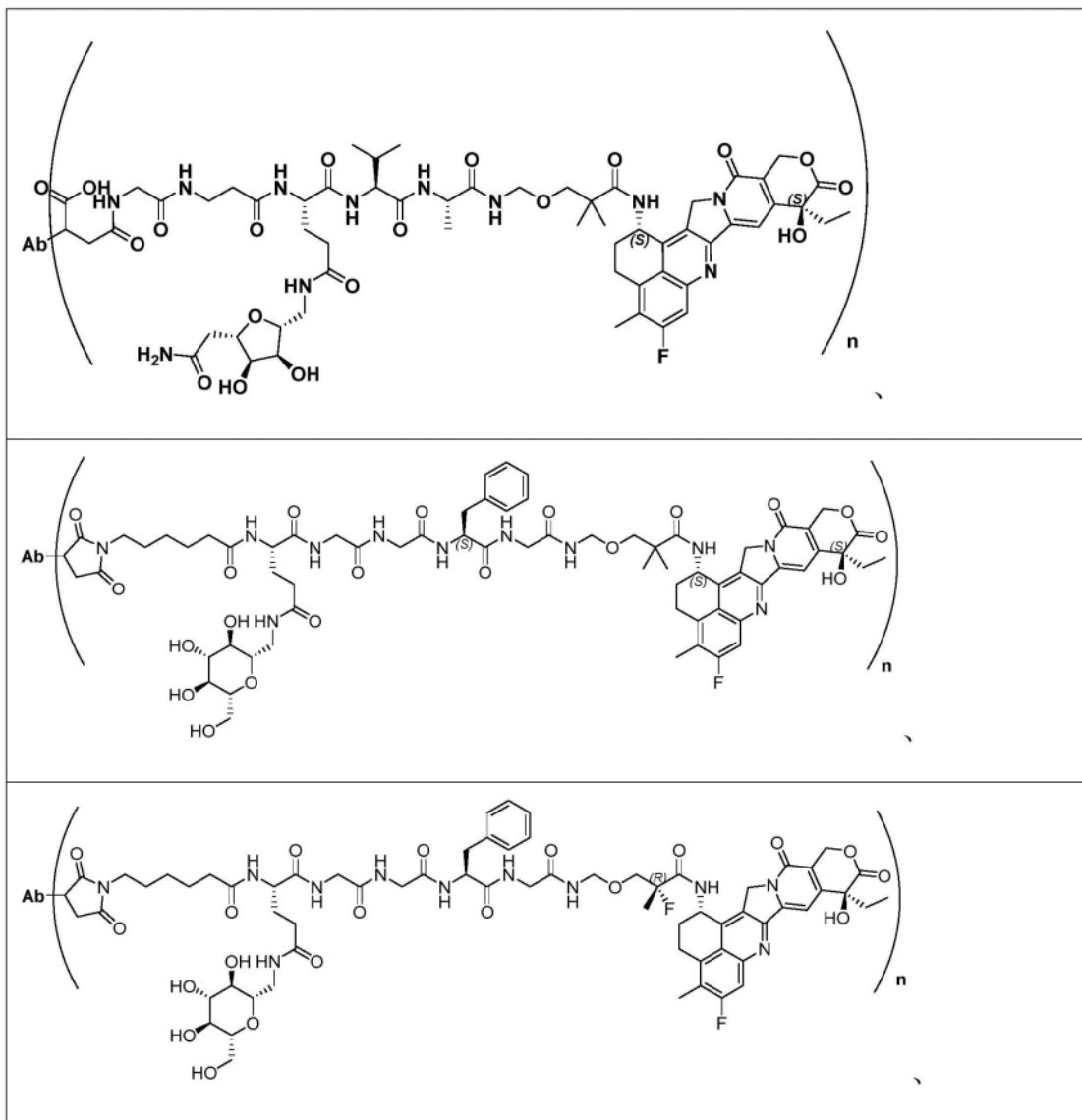
记C与Ab连接的键。在某些实施例中，-C-L-(D)_m是：

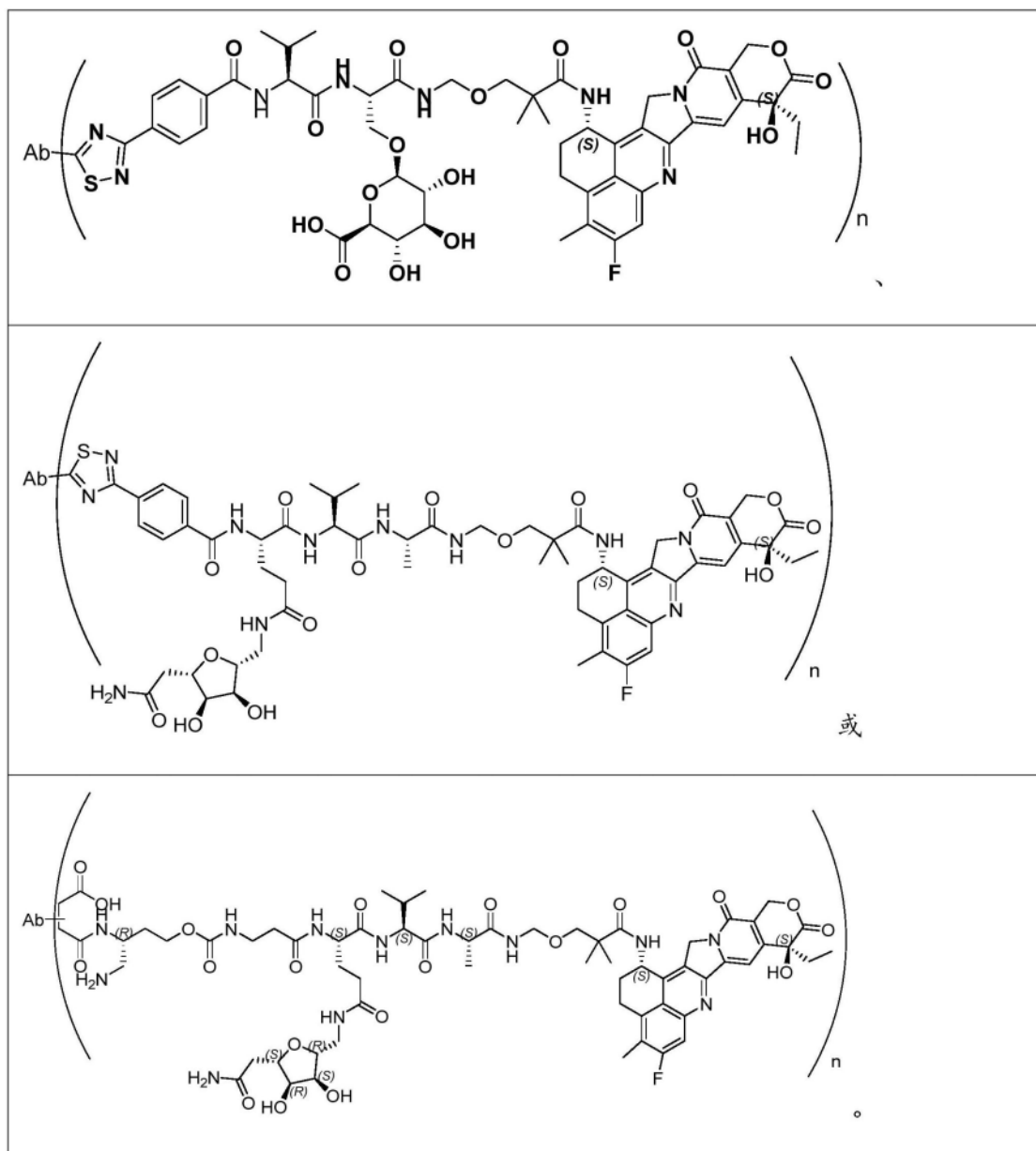


实施例中，C-L-(D)_m是：

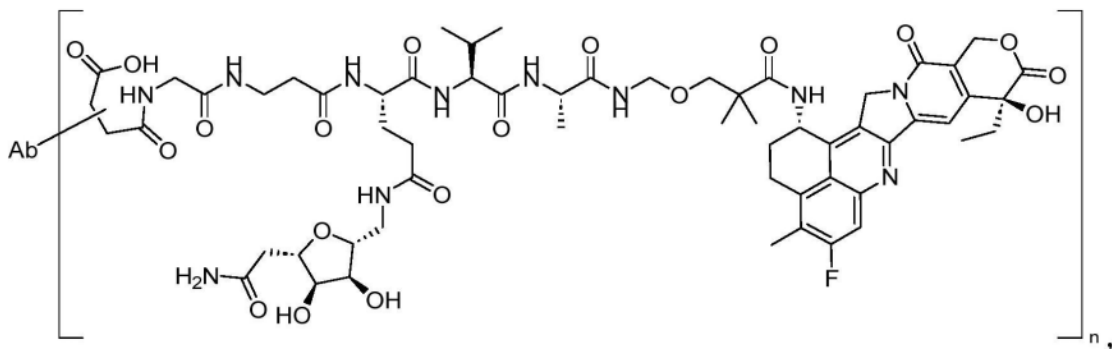


[0360] 在实施例中,抗体药物缀合物是

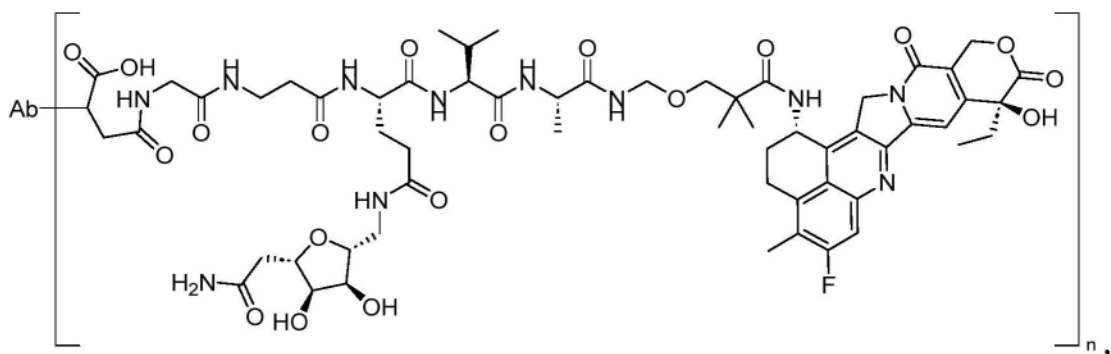




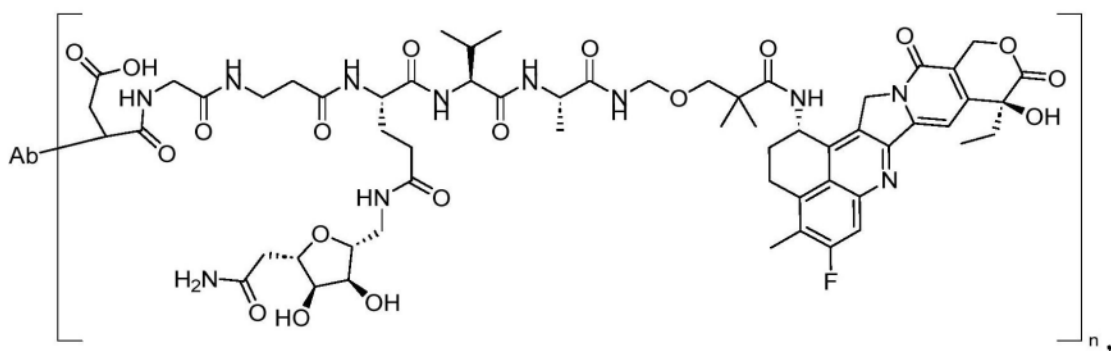
[0361] 在某些实施例中,抗体药物缀合物具有下式:



或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中Ab和n如本文所述。
在某些实施例中,抗体药物缀合物具有下式:



或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中Ab和n如本文所述。在某些实施例中,抗体药物缀合物具有下式:



或其互变异构体、药学上可接受的盐、溶剂化物或水合物,其中Ab和n如本文所述。

制备抗体药物缀合物的方法

[0362] 本文披露的抗体药物缀合物可通过本领域已知的任何方法产生。在一个实施例中,在合适的培养条件下培养已被分离的核酸转化的宿主细胞,该分离的核酸包含编码抗CEA抗体或其抗原结合片段的序列。抗体或其抗原结合片段由此被表达,并且可从细胞培养物中回收。

[0363] 使用本文披露的接头将细胞毒性剂缀合到抗体或其抗原结合片段以产生抗体药物缀合物。在实施例中,还将缀合部分接合到接头,诸如在抗体与接头之间。

治疗方法

[0364] 本披露的抗体药物缀合物可用于多种应用,包括但不限于用于治疗CEA相关障碍或疾病的方法。在一方面,CEA相关障碍或疾病以过表达或积累CEA的细胞为特征。在一些实施例中,该细胞是癌性的。

[0365] 在某些方面,该方法包括向有需要的受试者(例如,患者)施用有效量的抗CEA抗体药物缀合物。受试者可以包括但不限于患有表达CEA的癌症、积累CEA的癌症、CEA反应性癌症以及胃癌或直肠癌及其转移的受试者。在实施例中,癌症是肺癌(例如,非小细胞肺癌)、胃肠癌(例如,胃癌)或结直肠癌(例如,直肠癌)。

[0366] 本文披露的抗体药物缀合物可以通过任何合适的手段施用,包括肠胃外、肺内和鼻内以及(如果期望用于局部治疗)病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,这部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑了多种给药方案,包括但不限于单次施用或在不同时间点的多次施用、推注施用、和脉冲输注。

[0367] 本披露的抗体或抗原结合片段或抗体药物缀合物可以以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用。关于这点要考虑的因素包括治疗的特定障碍、治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、障碍的起因、药剂的递送位点、施用方法、施用方案、和医疗从业者已知的其他因素。抗体不需要但任选地与目前用于预防或治疗所研究的障碍的一种或多种药剂一起配制。此类其他药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量、障碍或治疗的类型、以及上文讨论的其他因素。这些通常以与如本文所述相同的剂量和施用途径使用,或以本文所述剂量的约1%-99%使用,或以经验/临床确定为合适的任何剂量和任何途径使用。

组合疗法

[0368] 在一方面,抗CEA抗体药物缀合物可以与其他治疗剂组合使用。可以与本披露的抗CEA抗体药物缀合物一起使用的其他治疗剂包括但不限于化疗剂(例如紫杉醇或紫杉醇药剂(例如**Abraxane®**)、多西他赛;卡铂;拓扑替康;顺铂;伊立替康、多柔比星、来那度胺、5-氮杂胞苷、异环磷酰胺、奥沙利铂、培美曲塞二钠、环磷酰胺、依托泊苷、地西他滨、氟达拉滨、长春新碱、苯达莫司汀、苯丁酸氮芥、白消安、吉西他滨、美法仑、喷司他丁、米托蒽醌、培美曲塞二钠)、酪氨酸激酶抑制剂(例如EGFR抑制剂)(例如厄洛替尼)、多激酶抑制剂(例如MGCD265、RGB-286638)、CD-20靶向剂(例如利妥昔单抗、奥法木单抗、R05072759、LFB-R603)、CD52靶向剂(例如阿仑单抗)、泼尼松龙、达贝泊汀 α 、来那度胺、Bcl-2抑制剂(例如奥利默森钠)、极光激酶抑制剂(例如MLN8237、TAK-901)、蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米)、CD-19靶向剂(例如MEDI-551、MOR208)、MEK抑制剂(例如ABT-348)、JAK-2抑制剂(例如INCB018424)、mTOR抑制剂(例如坦罗莫司、依维莫司)、BCR/ABL抑制剂(例如伊马替尼)、ET-A受体拮抗剂(例如ZD4054)、TRAIL受体2(TR-2)激动剂(例如CS-1008)、EGEN-001或Polo样激酶1抑制剂(例如BI 672)。

[0369] 在另一方面,抗CEA抗体药物缀合物可以与抗PD1抗体组合使用。抗PD1抗体可以包括但不限于替雷利珠单抗(tislelizumab)、帕博利珠单抗(pembrolizumab)和纳武利尤单抗(nivolumab)。替雷利珠单抗披露于US 8,735,553中。如由默克公司(Merck)披露于US 8,354,509和US 8,900,587中的帕博利珠单抗(以前称为MK-3475)是人源化IgG4-K免疫球蛋白,其靶向PD1受体并抑制PD1受体配体PD-L1和PD-L2的结合。帕博利珠单抗已被批准用于转移性黑色素瘤和转移性非小细胞肺癌(NSCLC)的适应症,并且正在进行用于治疗头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)和难治性霍奇金淋巴瘤(cHL)的临床研究。纳武利尤单抗(如由百时美施贵宝公司(Bristol-Meyers Squibb)所披露的)是全人IgG4-K单克隆抗体。纳武利尤单抗(克隆5C4)披露于美国专利号US 8,008,449和WO 2006/121168中。纳武单抗被批准用于治疗黑色素瘤、肺癌、肾癌、和霍奇金淋巴瘤。

药物组合物和制剂

[0370] 还提供了组合物(包括药物制剂),这些组合物包含:包含抗CEA抗体或其抗原结合片段的抗CEA抗体药物缀合物,或者包含编码抗CEA抗体或抗原结合片段的序列的多核苷酸,以及毒性药物缀合物。这些组合物还可包含合适的载剂,如本领域熟知的药学上可接受的赋形剂,包括缓冲液。

[0371] 如本文所述的抗CEA抗体药物缀合物的药物制剂通过以冻干制剂或水溶液的形式将具有所需纯度的这种抗体或抗原结合片段和抗体药物缀合物与一种或多种任选的药学上可接受的载剂混合来制备(Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学])

第16版, Osol, A. 编辑(1980))。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, 并且包括但不限于: 缓冲剂, 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; 防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化六甲双铵; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 苯酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 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(少于约10个残基)的多肽; 蛋白质, 如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 如EDTA; 糖, 如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐反离子, 如钠; 金属络合物(例如Zn-蛋白络合物); 和/或非离子型表面活性剂, 如聚乙二醇(PEG)。本文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, 例如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP), 例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白, 如rHuPH20 (HYLENEX[®], 百特国际有限公司(Baxter International, Inc.))。在美国专利号US 7, 871, 607和2006/0104968中描述了某些示例性sHASEGP和使用方法, 包括rHuPH20。在一方面, 将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶如软骨素酶组合。

[0372] 示例性冻干抗体制剂描述于美国专利号6, 267, 958中。水性抗体制剂包括美国专利号6, 171, 586和WO 2006/044908中所述的那些, 后者的制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0373] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有该抗体或抗体药物缀合物的固体疏水性聚合物的半透性基质, 这些基质呈成形制品的形式, 例如膜或微胶囊。

[0374] 用于体内施用的制剂一般是无菌的。无菌性可以例如通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

实例

实例1: 抗CEA单克隆抗体的产生

用于免疫和结合测定的CEA重组蛋白

[0375] 设计并表达了几种重组蛋白用于抗体筛选(参见表2)。抗CEA的抗体与人和猕猴(Macaca mulatta)CEA在含有结构域B3(SEQ ID NO: 52的氨基酸596-674, 参见Beauchemin等人, "Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen[人癌胚抗原的全长功能cDNA克隆的分离和表征]." Mol. Cell Biol. [分子与细胞生物学], 1987, 7 (9): 3321-3330)的膜周边区域中发生交叉反应。这些抗体缺乏与其他人CEACAM成员的脱靶结合。

[0376] 基于GenBank序列订购全长人CEA(SEQ ID NO: 52)、猕猴CEA(SEQ ID NO: 53)和全长人CEACAM6(SEQ ID NO: 54)的cDNA编码区。对于人CEA(登录号: NM_004363.2), 该基因可获自欣百诺公司(Sinobio), 目录号HG11077-UT。对于猕猴CEA(登录号: NM_001047125), 该基因可获自金斯瑞公司(GenScript[™]), 目录号OMb23865D。对于人CEACAM6(登录号: NM_002483.4), 该基因可获自欣百诺公司, 目录号HG10823-UT。CEA融合蛋白的示意图如图1所示。据报道, 人CEA的剪接变体与全长CEA在肿瘤上同时表达(Peng等人, PloS one [公共科学图书馆: 综合], 7, e36412-e36412(2012)), 因此制备了变体(CEA-v)。为了产生该构建体, 对由huCEA(SEQ ID NO: 55)的氨基酸(AA)1-687组成的细胞外结构域(ECD)的编码区、猴CEA(SEQ ID NO: 56)的氨基酸(AA)1-690的区域和CEACAM6(SEQ ID NO: 57)的氨基酸(AA)1-320的区域进行PCR扩增。对CEA氨基酸(AA)1-78(SEQ ID NO: 58)和CEA的氨基酸398-687(SEQ

ID NO:59)的区域进行PCR扩增,然后通过重叠PCR缀合以制备CEA变体(CEA-v)(SEQ ID NO:60)。替代性地,将CEACAM6氨基酸(AA)1-273(SEQ ID NO:61)的区域和含有CEA氨基酸(AA)596-687的结构域B3(SEQ ID NO:62)的膜周围区域进行PCR扩增,然后通过重叠PCR缀合以制备嵌合构建体(CHIM)(SEQ ID NO:63)。然后将所有构建体克隆到基于pcDNA3.1的表达载体(美国加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA))中,其C末端分别与6xHis标签融合,从而产生五个重组融合蛋白表达质粒CEA、猴CEA、CEACAM6、CEA-v和CHIM。为了产生重组融合蛋白,将CEA、猴CEA、CEACAM6、CEA-v和CHIM质粒瞬时转染到基于HEK293的哺乳动物细胞表达系统(内部产生)中,并在装备有旋转振荡器的CO₂培养箱中培养5-7天。收集含有重组蛋白的上清液并离心澄清。使用Ni-NTA琼脂糖(目录号R90115,英杰公司)纯化重组蛋白。将所有重组蛋白用磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析,并以小等分试样保存在-80℃冰箱中。

在细胞系中稳定表达

[0377] 为了建立表达全长人CEA的稳定细胞系(登录号:NM_004363.2),将表达CEA的cDNA克隆到逆转录病毒载体pFB-Neo(目录号217561,美国安捷伦公司(Agilent, USA))中。根据先前的方案(Zhang等人, Blood. [血液]2005 106(5):1544-51)产生双嗜性逆转录病毒载体。将含有人CEA的病毒载体转导到L929(美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA))和CT26细胞(美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心)中,以产生人CEA表达细胞系。通过在含有10% FBS和G418的完全RPMI1640培养基中培养来选择高表达细胞系,然后通过FACS结合测定来验证。

免疫、杂交瘤融合和克隆

[0378] 用500μL含有或不含水溶性佐剂(目录号KX0210041,中国北京的康碧泉公司(KangBiQuan, Beijing, China))的 1×10^7 个L929/huCEA细胞腹膜内(i.p.)免疫八至十二周龄Balb/c小鼠(中国北京的华阜康生物科技有限公司(HFK BIOSCIENCE CO., LTD, Beijing, China))。两周后重复该过程以促进抗体产生。第三次免疫后两周,通过ELISA和FACS评估小鼠血清的可溶性CEA(sCEA)结合。使用标准技术(Colligan JE等人, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY[免疫学实验手册], 1993)分离脾细胞并与鼠骨髓瘤细胞系SP2/0细胞(美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心)融合。

通过ELISA和FACS评估抗体的CEA结合活性

[0379] 为了筛选结合人CEA但不结合CEACAM6或sCEA的抗体,筛选并反筛选结合CHIM但不结合sCEA、CEACAM6和CEA-v的抗体,以及结合CHIM、sCEA和CEA-v但不结合CEACAM6的抗体。杂交瘤克隆的上清液最初通过(Methods in Molecular Biology[分子生物学方法](2007) 378:33-52)中所述的ELISA(略作修改)进行筛选。简而言之,将sCEA、CHIM、CEACAM6或CEA-v分别以3μg/ml的低浓度包被在96孔板中。使用HRP-连接的抗小鼠IgG抗体(目录号7076S,美国细胞传导技术公司(Cell Signaling Technology, USA))和底物(目录号00-4201-56,美国伊生物技术公司(eBioscience, USA))进行显色,并使用酶标仪(SpectraMax Paradigm™, 美国分子设备公司(Molecular Devices, USA))测量450nm波长处的吸光度信号。使用L929/huCEA和/或MKN45细胞(ATCC)通过FACS进一步验证ELISA阳性克隆。MKN45细胞来源于人胃癌。将表达CEA的细胞(10^5 个细胞/孔)与ELISA阳性杂交瘤上清液一起孵育,随后与Alexa Fluoro-647标记的山羊抗小鼠IgG抗体(目录号A0473,中国碧云天生物技术公司(Beyotime

Biotechnology, China)) 结合。使用流式细胞仪 (Guava easyCyte™8HT, 美国默克密理博公司 (Merck-Millipore, USA)) 定量细胞荧光。

[0380] 对来自杂交瘤的在FACS筛选中表现出阳性信号并且与CHIM而不是CEACAM6和sCEA结合的条件培养基进行功能测定,以评估sCEA的存在对CEA抗体与CEA表达细胞的结合的影响(参见下面的实例)。对具有所需结合特异性和功能活性的抗体进一步亚克隆和表征。

杂交瘤亚克隆和对无血清或低血清培养基的适应

[0381] 主要通过ELISA、FACS和功能测定进行初步筛选后,通过有限稀释亚克隆阳性杂交瘤克隆。通过功能测定而验证的靠前抗体亚克隆在含3% FBS的CDM4MAb培养基(目录号SH30801.02,美国海克隆公司 (Hyclone, USA)) 中适应生长。

单克隆抗体的表达和纯化

[0382] 将杂交瘤细胞在CDM4MAb培养基(目录号SH30801.02,海克隆公司)中培养,并在37℃下在CO₂培养箱中孵育5至7天。通过离心收集条件培养基并在纯化前通过0.22μm膜过滤。依照制造商的指导中的方案应用含有鼠抗体的上清液并结合到蛋白A柱(目录号17127901,通用生命科学公司 (GE Life Sciences))。该程序通常产生纯度高于90%的抗体。将蛋白A亲和纯化的抗体用PBS透析或使用HiLoad16/60Superdex™200柱(目录号17531801,通用生命科学公司)进一步纯化以去除聚集物。通过测量280nm处的吸光度来确定蛋白质浓度。将最终的抗体制剂以等分试样储存在-80℃冰箱中。

表2:氨基酸和核酸序列

SEQ ID NO:	构建体	序列
SEQ ID NO:52	全长人 CEA	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVL LLVHNLPQHLEFGYSWKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIYPN ASLLIQNIQNNDTGFTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPV EDKDAVAFTCEPETQDATYLWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTR NDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSC HAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNR TTVTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWVNNQS LPVSPRLQLSNDNRTLTLSSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYG PDDPTISPSYTYRPGVNLSSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNI TEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAV AFTCEPEAQNTTYLWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAY VCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSSCHSASNPS PQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI
SEQ ID NO:53	猕猴 CEA	MGSPSAPLHRWCIPWQTLTLLTASLLTFWNPPTAQLTIESRPFNVAEGKEVL LLAHNVSQNLFGYIWKGERVDASRRIGSCVIRTQQITGPAHSGRETIDFN ASLLIHNVTSQDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFRVYPELPKPYISSNNSNPV EDKDAVALTCEPETQDTTYLWVNNQSLPVSPRLELSSDNRTLTVFNIPRN DTTSYKCETQNPVSVRRSDPVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLTC HAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLN RTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQDTTYLWVNNQ SLSVSSRLELSDNRTLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSVRRSDPVTNLNVLY GPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSSCHAASNPAQYSWFVNGTFQQSTQELFI PNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYVELPKPYISSNNSNPIEDK DAVTLTCEPVAENTTYLWVNNQSLSVSPRLQLSNGNRILTLLSVTRNDTG PYECGIQNSESAQRSDPVTNLNVLYGPDTPHSPDLSYRSGANLNLSSCHSDS NPSPQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNSGAYACFVSNLATGRNNSIVKN ISVSSGDSAPGSSGLSARATVGIIIGMLVGVALM
SEQ ID NO:54	全长人 CEACA M6	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVL LLAHNLPQNRIGYSWKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYP NASLLIQNVNQNDTGFTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSN PVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWVNGQSLPVSPRLQLSNGNMTLTLSSV KRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTNLNVLYGPDVPTISPSKANYRPGENLN LSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATG LNRTTVTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI
SEQ ID	huCEA	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVL

NO:55	的 1-687	LLVHNLPQHLEFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIHPN ASLLIQNIIQNNDTGFTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPV EDKDAVAFTCEPETQDATYLWVWNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTR NDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLS HAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNR TTVTITVYAEPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWVWNNQS LPVSPRLQLSNDNRTLTLSSVTRNDVGPYECGIQNELSVDHSDPVILNVLYG PDDPTISPSYTYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNI TEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAV AFTCEPEAQNTTYLWVWNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAY VCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPDSSYLSGANLNLSCHSASNPS PQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITV SASGTSPGLSAGAHHHHHH
SEQ ID NO:56	猴 CEA 的 1-690	MGSPSAPLHRWCIPWQTLTLLTASLLTFWNPPTAQLTIESRPFNVAEGKEVL LLAHNVSQNLFGYIWKGERVDASRRIGSCVIRTQQITPGPAHSGRETIDFN ASLLIHNVQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFRVYPELPKPYISSNNSNPV EDKDAVALTCEPETQDTTYLWVWNNQSLPVSPRLELSSDNRTLTVFNIPRN DTTSYKCETQNPVSVRRSDPVTNLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLT HAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLN RTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPEDKDAVTLTCEPETQDTTYLWVWNNQ SLSVSSRLELSDNRTLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSVRRSDPVTNLNVLY GPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPAQYSWFVNGTFQQSTQELFI PNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRRTTVTAITVYVELPKPYISSNNSNPEDK DAVTLTCEPVAENTTYLWVWNNQSLVSPRLQLSNGNRILTLLSVTRNDTG PYECGIQNSAKRSDPVTNLNVTYGPDTPHSPDLSYRSGANLNLSCHSDS NPSPQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNSGAYACFVSNLATGRNNSIVKN ISVSSGDSAPGSSGLSARAHHHHHH
SEQ ID NO:57	CEACA M6 的 1-320	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTISTPFNVAEGKEVL LLAHNLPQNRIQYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYP NASLLIQNVQNDTGFTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSN PVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWVWNGQSLPVSPRLQLSNGNMTLLSV KRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTNLNVLYGPDVPTISPSKANYRGENLN LSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATG LNRTTVTMITVSGHHHHHHH
SEQ ID NO:58	huCEA 的 1-78	MESPSAPPHRWCIPWQRLTLLTASLLTFWNPPTAKLTISTPFNVAEGKEVL LLVHNLPQHLEFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIHPN ASLLIQNIIQN
SEQ ID NO:59	huCEA 的 398-687	ELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYS WLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAEL PKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWVWNGQSLPVSPRLQLSN GNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPHSPD SYLSGANLNLSCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNGTYAC FVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGA

SEQ ID NO:60	CEA-v	MESPSAPPHRWCIWQRLLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVL LLVHNLPQHFLFGYSWYKGERVDGNGRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIPN ASLLIQNIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYRPGVNLSSLCHA ASNPPAQYSWLIDGNIQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTV KTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLP VSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGP DTPIISPPDSSYLSGANLNLCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITP NNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGAHHHHHH
SEQ ID NO:61	CEACA M6 的 1-273	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVL LLAHNLPQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYP NASLLIQNVTQNDTGfYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSN PVEDKDAVFTCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNMTLTLSSV KRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTNLNVLYGPDVPTIS
SEQ ID NO:62	huCEA 的 596-687	PIISPPDSSYLSGANLNLCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNN NGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGA
SEQ ID NO:63	CHIM	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTAKLTIESTPFNVAEGKEVL LLAHNLPQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRETIYP NASLLIQNVTQNDTGfYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNSN PVEDKDAVFTCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNMTLTLSSV KRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTNLNVLYGPDVPTISPIISPPDSSYLSGAN LNLCHSASNPSQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLAT GRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGAHHHHHH
SEQ ID NO:64	CEACA M1	MGHLSAPLHRVRVPWQGLLLTASLLTFWNPPTAQLTTESMPFNVAEGKEV LLLHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNGRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIY PNASLLIQNVTQNDTGfYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNS NPVEDKDAVFTCEPETQDTTYLWWINNQLSPVSPRLQLSNGNRTLTLSSV TRNDTGfYECEIQNPVSANRSDPVTNLNVTYGPDPTISPSDTYYRPGANLSL SCYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCHANNSVTGC NRTTVKTHIVTELSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFF KNQSLPSSERMKLSQGNNTLSINPVKREDAGTYWCEVFNPIKSNQSDPIML NVNYNALPQENGLSPGAIGIVIGVVALVALIAVALACFLHFGKTGSSGPLQ
SEQ ID NO:65	CEACA M3	MGPPSASPHRECIPWQGLLLTASLLNFWNPPTAKLTIESMPLSVAEGKEVL LLVHNLPQHFLFGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGAAYS GRETIYT NASLLIQNVTQNDIGfYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYQENAPGLPVGAVA GIVTGVLVGVALVAALVCFLLLAKTGRTSIQRDLKEQQPQALAPGRGPHS SAFSMSPLSTAQAPLPNPRTAASIYEELLKHDTNIYCRMDHKAEVAS
SEQ ID NO:66	CEACA M7	MGSPSACPYRVCIPWQGLLLTASLLTFWNLPSAQTNIDVVPFNVAEGKEV LLVVHNESQNLGYNWKGERVHANYRIIGYVKNISQENAPGPAHNGRET IYPNGTLLIQNVTHNDAGIYTLHVIKENLVNEEVTRQfYVFSEPPKPSITSNN FNPVENKDIVVLTCPETQNTTYLWWVNNQSLVSPRLLLSTDNRTLVLSS ATKNDIGPYECEIQNPVGASRSDPVTNLNVRYESVQASSPDLSAGTAVSIMIG VLGMALI

SEQ ID NO:67	CEACA M8	MGPISAPSCRWRIPWQGLLLTASLFTFWNPPTTAQLTIEAVPSNAAEGKEVL LLVHNLPQDPRGYNWYKGETVDANRRIGYVISNQITPGPAYSNRETIYPN ASLLMRNVTRNDTGSYTLQVIKLNLMSEEV TGQFSVHPETPKPSISSNNSN PVEDKDAVAFTCEPETQNTTYLWVWNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLSSVT RNDVGPYECEIQNPASANFSDPVTNLNLYGPDAPTISPSDTYYHAGVNLNL SCHAASNPPSQYSWSVNGTFQQYTQKLFIPNITTKNSGSYACHTTNSATGR NRTTVRMITVSDALVQGSSPGLSARATVSIMIGVLARVALI
SEQ ID NO:68	全长人 CEA DNA	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGA GGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAG GAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAG CTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATAT GTAATAGGAAC TACAAGCTACCCCAGGGCCCCGCATACAGTGGTCGA GAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATCATCCAGAA TGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAAT GAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCC TCCATCTCCAGCAACAAC TCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTG GCCTTACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGG GTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATG GCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACACAGCAA GCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGCCAGGCGCAGTGATT CAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCCCGGATGCCCCACCATTTCCTCT CTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACG CAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTC CAGCAATCCACCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAG TGGATCCTATACGTGCCAAGCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGG ACCACAGTCACGACGATCACAGTCTATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCA TCACCAGCAACAAC TCAAACCCGTGGAGGATGAGGATGCTGTAGCCTT AACCTGTGAACCTGAGATT CAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAAT AATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAAC AGGACCCTCACTCTACTCAGTGT CACAAGGAATGATGTAGGACCCTATG AGTGTGGAATCCAGAACGAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCAT CCTGAATGTCCTCTATGGCCAGACGACCCCACTTTCCCCCTCATACA CCTATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCT AACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAAC ACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGAC TCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTAC AGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCC AGCAACAAC TCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTACC TGTGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTC AGAGCCTCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGA CCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGT GGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTG

		GATGTCCTCTATGGGCGGACACCCCATCATTTCCCCCCCAGACTCGTC TTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAAC CCATCCCCGCAGTATTCTTGCGGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACAC ACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATG CCTGTTTTGTCTCTAACTTGCTACTGGCCGCAATAATCCATAGTCAAG AGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACCTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGG CCACTGTGCGCATCATGATTGGAGTGCTGGTTGGGGTTGCTCTGATATAG
SEQ ID NO:69	猴 CEA DNA	ATGGGGTCTCCCTCAGCCCCTCTTCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGA CGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCACCAC TGCCCAGCTCACTATTGAATCCAGGCCGTTCAATGTTGCAGAGGGGAAG GAGGTTCTTCTACTTGCCACAATGTGTCCAGAATCTTTTTGGCTACAT TTGGTACAAGGGAGAAAGAGTGGATGCCAGCCGTCGAATTGGATCATGT GTAATAAGAACTCAACAAATTACCCCAGGGCCCCGCACACAGCGGTCTGA GAGACAATAGACTTCAATGCATCCCTGCTGATCCACAATGTACCCAGA GTGACACAGGATCCTACACCATAACAAGTCATAAAGGAAGATCTTGTGAA TGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCGCGGTATACCCGAGCTGCCAAGCC CTACATCTCCAGCAACAACCTCAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGT GGCCTTAACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTG GGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGGAGCTGTCCAG TGACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAATGACACAACA TCCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGTGACACGACGCGAC CCAGTCACCCTGAACGTCCTCTATGGCCCGGATGCGCCCACCATTTCCTC CTCTAAACACACCTTACAGAGCAGGGGAAAATCTGAACCTCACCTGCC ACGCAGCCTCTAACCCAACTGCACAGTACTTTTGGTTTGTCAATGGGAC GTTCCAGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAAT AATAGCGGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAA TAGGACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTACGCGGAGCTGCCAAGCC CTACATCACCAGCAACAACCTCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTG ACCTTAACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAACAATCAGAGCCTCTCGGTCACTTCCAGGCTGGAGCTGTCCAATG ACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAACGACACAACGTT CTACGAATGTGAGACCCAGAACCCAGTGAGTGTGACACGACGCGACCC AGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGCCCGGATGCGCCCACCATTTCCTC TAAACACACCTTACAGAGCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACG CAGCCTCTAACCCAGCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACGTT CCAGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATA GCGGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGG ACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTATGTGGAGCTGCCAAGCCCTACA TCTCCAGCAACAACCTCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTGACCTT AACCTGTGAACCTGTGGCTGAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAA CAATCAGAGCCTCTCGGTCACTCCAGGCTGCAGCTCTCCAATGGCAAC AGGATCCTCACTCTACTCAGTGTACACGGAATGACACAGGACCCTATG AATGTGGAATCCAGAACTCAGAGAGTGCAAAACGCAGTGACCCAGTCA

		CCCTGAATGTCACCTATGGCCCAGACACCCCCATCATATCCCCCCCAGAC TTGTCTTACCGTTCGGGAGCAAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGACT CTAACCCATCCCCGAGTATTCTTGGCTTATCAATGGGACACTGCGGCAA CACACACAAGTTCTCTTTATCTCCAAAATCACATCAAACAATAGCGGGG CCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACCGGTGCGAATAACTCCATA GTCAAGAACATCTCAGTCTCCTCTGGCGATTGAGCACCTGGAAGTTCTG GTCTCTCAGCTAGGGCTACTGTGCGCATCATAATTGGAATGCTGGTTGGG GTTGCTCTGATGTAG
SEQ ID NO:70	全长人 CEACA M6 DNA	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAGG AGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAG GAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACA GCTGGTACAAAGGCGAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATA TGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATACAGTGGTCTGA GAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGTCACCCAGA ATGACACAGGATTCTATACCCTACAAGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAAT GAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCC TCCATCTCCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTG GCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTTCAAGACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAATGGTCAGAGCCTCCCGGTGAGTCCAGGCTGCAGCTGTCCAATG GCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTCAAAAGGAACGATGCAGGATC CTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTGCCAACCGCAGTGACCC AGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGCCCAGATGTCCCCACCATTTCCCCCT CAAAGGCCAATTACCGTCCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGC AGCCTCTAACCCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTATCAATGGGACGTTCC AGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGC GGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGGAC CACAGTCACGATGATCACAGTCTCTGGAAGTGCTCCTGTCTCTCAGCT GTGGCCACCGTCGGCATCACGATTGGAGTGCTGGCCAGGGTGGCTCTGA TATAG
SEQ ID NO:71	huCEA DNA 的 1-687	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGA GGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAG GAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAG CTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATAT GTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATACAGTGGTCTGA GAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATCATCCAGAA TGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAAT GAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCC TCCATCTCCAGCAACAACCTCAAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTG GCCTTCACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGG GTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTGAGTCCAGGCTGCAGCTGTCCAATG GCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACACAGCAA

		GCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGCCAGGCGCAGTGATT CAGTCATCCTGAATGTCTCTATGGCCCGGATGCCCCACCATTTCCTT CTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACG CAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTC CAGCAATCCACCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAG TGGATCCTATACGTGCCAAGCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGG ACCACAGTCACGACGATCACAGTCTATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCA TCACCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGAGGATGAGGATGCTGTAGCCTT AACCTGTGAACCTGAGATTGAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAAT AATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAAC AGGACCCCTCACTCTACTCAGTGTGACAAGGAATGATGTAGGACCCTATG AGTGTGGAATCCAGAACGAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCAT CCTGAATGTCTCTATGGCCAGACGACCCCAACATTTCCCCCTCATACA CCTATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCT AACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAAC ACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGAC TCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTAC AGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCTCC AGCAACAACCTCAAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTACC TGTGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTC AGAGCCTCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGA CCCTCACTCTATTCAATGTGACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGT GGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTG GATGTCTCTATGGGCCCGGACACCCCATCATTTCCCCCCCAGACTCGTC TTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAAC CCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACAC ACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATG CCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAG AGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACCTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGG CCCATCACCATCACCATCAC
SEQ ID NO:72	猴 CEA DNA 的 1-690	ATGGGGTCTCCCTCAGCCCCTCTTCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGA CGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCACCAC TGCCCAGCTCACTATTGAATCCAGGCCGTTCAATGTTGCAGAGGGGAAG GAGGTTCTTCTACTTGCCCACAATGTGTCCAGAATCTTTTTGGCTACAT TTGGTACAAGGGAGAAAGAGTGGATGCCAGCCGTCGAATTGGATCATGT GTAATAAGAACTCAACAAATTACCCCAGGGCCCGCACACAGCGGTCGA GAGACAATAGACTTCAATGCATCCCTGCTGATCCACAATGTACCCAGA GTGACACAGGATCCTACACCATAACAAGTCATAAAGGAAGATCTTGTGAA TGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCGGGTATACCCGGAGCTGCCAAGCC CTACATCTCCAGCAACAACCTCAAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGT GGCCTTAACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTG GGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGGAGCTGTCCAG TGACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAATGACACAACA

		TCCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGTGTCAGACGCAGCGAC CCAGTCACCCTGAACGTCCTCTATGGCCCGGATGCGCCACCATTTCCC CTCTAAACACACCTTACAGAGCAGGGGAAAATCTGAACCTCACCTGCC ACGCAGCCTCTAACCCAACTGCACAGTACTTTTGGTTTGTCAATGGGAC GTTCCAGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAAT AATAGCGGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAA TAGGACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTACGCGGAGCTGCCCAAGCC CTACATCACAGCAACAACCTCCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTG ACCTTAACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAACAATCAGAGCCTCTCGGTCTAGTTCAGGCTGGAGCTGTCCAATG ACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATATTCCAAGAAACGACACAACGTT CTACGAATGTGAGACCCAGAACCCAGTGAGTGTGTCAGACGCAGCGACCC AGTCACCCTGAATGTCTCTATGGCCCGGATGCGCCACCATTTCCCCTC TAAACACACCTTACAGAGCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACG CAGCCTCTAACCCAGCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACGTT CCAGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATA GCGGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGG ACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTATGTGGAGCTGCCCAAGCCCTACA TCTCCAGCAACAACCTCCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTGACCTT AACCTGTGAACCTGTGGCTGAGAACAACCTACCTGTGGTGGGTAAA CAATCAGAGCCTCTCGGTCTAGTCCCAGGCTGCAGCTCTCCAATGGCAAC AGGATCCTCACTCTACTCAGTGTACACGGAATGACACAGGACCCTATG AATGTGGAATCCAGAACTCAGAGAGTGCAAAACGCAGTGACCCAGTCA CCCTGAATGTACCTATGGCCAGACACCCCATCATATCCCCCCCAGAC TTGTCTTACCGTTCGGGAGCAAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGACT CTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCTTATCAATGGGACACTGCGGCAA CACACACAAGTTCTCTTTATCTCCAAAATCACATCAAACAATAGCGGGG CCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACCGGTGCAATAACTCCATA GTCAAGAACATCTCAGTCTCCTCTGGCGATTGAGCACCTGGAAGTTCTG GTCTCTCAGCTAGGGCTCATCACCATCACCATCAC
SEQ ID NO:73	CEACA M6 DNA 的 1-320	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAGG AGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTGCGCAGAGGGGAAG GAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACA GCTGGTACAAAGGCGAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATA TGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCAGGGCCCGCATACAGTGGTCTGA GAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGTCACCCAGA ATGACACAGGATTCTATACCCTACAAGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAAT GAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCC TCCATCTCCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTG GCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTTCTAGAACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAATGGTCTAGAGCCTCCCGGTCTAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATG GCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTCAAAAGGAACGATGCAGGATC

		CTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTGCCAACCGCAGTGACCC AGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGCCCAGATGTCCCCACCATTTCCCCCT CAAAGGCCAATTACCGTCCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGC AGCCTCTAACCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTATCAATGGGACGTTCC AGCAATCCACACAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGC GGATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGGAC CACAGTCACGATGATCACAGTCTCTGGACATCACCATCACCATCAC
SEQ ID NO:74	huCEA DNA 的 1-78	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGA GGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAG GAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAG CTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATAT GTAATAGGAACCAACAAGCTACCCCAGGGCCCCGCATACAGTGGTCGA GAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATCATCCAGAA T
SEQ ID NO:75	huCEA DNA 的 398-687	GAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATG GCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATACACCTATTACCGTCCAGGG GTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGT ATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCTT TATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCC AATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAAGACAATCACA GTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAAC CCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGCTC AGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCAGTCA GTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAA TGTCACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCA GTGAGTGCAAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCTCTATGGGC CGGACACCCCCATCATTTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCCGGAGC GAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATT CTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATC GCCAAAATCACGCCAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAA CTTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTG CATCTGGAACCTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCC
SEQ ID NO:76	CEA-v DNA	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGA GGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAG GAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAG CTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTATAGGATAT GTAATAGGAACCAACAAGCTACCCCAGGGCCCCGCATACAGTGGTCGA GAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACATCATCCAGAA TGAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATG GCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATACACCTATTACCGTCCAGGG GTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGT

		ATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACAAGAGCTCTT TATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCC AATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAAGACAATCACA GTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACCTCCAAAC CCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGCTC AGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCAGTCA GTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAA TGTCACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCA GTGAGTGCAAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCTCTATGGGC CGGACACCCCCATCATTTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTTCGGGAGC GAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATT CTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACAAGTTCTCTTTATC GCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAA CTTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTG CATCTGGAACCTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCCATCACCATCACCAT CAC
SEQ ID NO:77	CEACA M6 DNA 的 1-273	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAGG AGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTGCGCAGAGGGGAAG GAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACA GCTGGTACAAAGGCGAAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATA TGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATACAGTGGTCGA GAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGTCACCCAGA ATGACACAGGATTCTATACCCCTACAAGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAAT GAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCC TCCATCTCCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTG GCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTTCAAGAACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAATGGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATG GCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTCAAAAGGAACGATGCAGGATC CTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTGCCAACCGCAGTGACCC AGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGCCAGATGTCCCCACCATTTC
SEQ ID NO:78	huCEA DNA 的 596-687	CCCATCATTTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTTCGGGAGCGAACCTCA ACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGT ATCAATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAA TCACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCT ACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGG AACTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCC
SEQ ID NO:79	CHIM DNA	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAGG AGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACCAC TGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTGCGCAGAGGGGAAG GAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGGTTACA GCTGGTACAAAGGCGAAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTGTAGGATA TGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATACAGTGGTCGA

		GAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACGTCACCCAGA ATGACACAGGATTCTATACCCCTACAAGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAAT GAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCC TCCATCTCCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTG GCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTTACAGAACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAATGGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATG GCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTCAAAAGGAACGATGCAGGATC CTATGAATGTGAAATACAGAACCCAGCGAGTGCCAACCGCAGTGACCC AGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGCCAGATGTCCCCACCATTTCCCCCA TCATTTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTTCGGGAGCGAACCTCAACCT CTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCA ATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCAC GCCAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAATTGGCTACTG GCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAAC TCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCCATCACCATCACCATCAC
--	--	--

实例2.CEA抗体的克隆和序列分析

[0383] 根据制造商的方案,使用Ultrapure RNA试剂盒(目录号74104,德国凯杰公司(QIAGEN, Germany))收获鼠杂交瘤细胞以制备总RNA。使用来自英杰公司的cDNA合成试剂盒(目录号18080-051)合成第1条链cDNA,并使用PCR试剂盒(目录号CW0686,中国北京的康为世纪公司(CWBio, Beijing, China))进行鼠单克隆抗体的VH和VL基因的PCR扩增。基于先前报道的序列(Brocks等人, Mol Med. [分子医学] 2001 7 (7): 461-9)合成用于重链可变区(VH)和κ轻链可变区(VL)的抗体cDNA克隆的寡核苷酸引物。然后将PCR产物亚克隆到pEASY-Blunt克隆载体(目录号CB101-02,中国全式金公司(TransGen, China))中,并测序。从DNA测序结果确定VH和VL区的氨基酸序列。

[0384] 单克隆抗体通过比较序列同源性来分析,并基于序列相似性分组(图2)。根据IMGT (Lefranc等人, 1999 Nucleic Acids Research [核酸研究] 27: 209-212)系统通过序列注释来定义互补决定区(CDR)。代表性克隆BGA7592的氨基酸序列在表3中列出。

表3:氨基酸序列

BGA7592 (IMGT)	SEQ ID NO:80	HCDR1 (IMGT)	GYIFTSYW
	SEQ ID	HCDR2	INPNTGYT

	NO:81	(IMGT)	
	SEQ ID NO:3	HCDR3 (IMGT)	AREYGNYNPLDY
	SEQ ID NO:82	LCDR1 (IMGT)	ENIYGY
	SEQ ID NO:83	LCDR2 (IMGT)	NA
	SEQ ID NO:84	LCDR3 (IMGT)	QHHYGTPYT
BGA7592	SEQ ID NO:85	VH	QVQLQQSGAELAKSGASVKMSCKASGYIFTSYWLHW VKQRPQGQGLEWIGYINPNTGYTNYSQKFKDKATLTAD KSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREYGNYNPLDYW GQGTSVTVSS
	SEQ ID NO:86	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYGYLAWYQQ KQGKSPQLLVFNANKNLVEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINS LQPEDFGSYQCQHHYGTPYTFGGGTKLEIK

实例3.纯化的鼠抗CEA抗体的结合概况测定

[0385] 通过使用BIAcore™ T-200(通用生命科学公司)的表面等离子共振 (SPR) 测定来表征特异性结合CEA(如通过ELISA和FACS所示)以及没有sCEA干扰的CEA抗体的结合动力学(图3A)。简言之,将抗鼠IgG抗体固定在活化的CM5生物传感器芯片(目录号BR100530,通用生命科学公司)上。使纯化的鼠抗体流过芯片表面并被抗鼠IgG抗体捕获。然后使纯化的CHIM、CEA-v、CEA或猴CEA重组蛋白的连续稀释液(6.0nM至2150nM)流过芯片表面,并通过使用一对一Langmuir结合模型(BIA评估软件,通用生命科学公司)分析表面等离子共振信号的变化以计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_D)计算为比率 k_{off}/k_{on} 。BGA7592的结合亲和力概况在下表4中示出。

表4:通过SPR比较BGA7592结合亲和力

抗原	K_D (M)
sCEA	ND
sCEA-v	1.50E-07
CHIM	1.20E-07
猴CEA	ND(由于结合较弱,无法检测到)

[0386] 经由抗原ELISA检查BGA7592的结合概况。观察到纯化的BGA7592与huCEA和猴CEA的结合,表明BGA7592是可溶性huCEA和猴CEA的弱结合剂,或者可溶性CEA在固定时具有不同的构象(图3B)。对于该实验,将sCEA、CHIM、猴CEA(“cynoCEA”)、CEA-v或牛血清白蛋白(BSA)以10 μ g/ml的高浓度在96孔板中在4℃下包被过夜。将BGA7592或对照抗体ab4451(目录号ab4451,美国艾博抗公司(abcam,USA))以2 μ g/ml的浓度孵育1小时。使用HRP-连接的抗小鼠IgG抗体(目录号7076S,美国细胞传导技术公司)和底物(目录号00-4201-56,美国伊生物技术公司)进行显色,并使用酶标仪(SpectraMax Paradigm,美国分子设备公司)测量450nm波长处的吸光度信号。

实例4.重组可溶性CEA对BGA7592与CEA表达细胞的结合的影响

[0387] 通过流式细胞术评估可溶性CEA的存在对各种CEA抗体与CEA表达细胞的特异性结

合的影响。简言之,在20 μ g/ml额外的重组可溶性CEA蛋白的存在下,将表达人CEA的细胞(10^5 个细胞/孔)与2 μ g/ml纯化的CEA鼠单克隆抗体一起孵育,随后与Alexa Fluor-647标记的山羊抗小鼠IgG抗体(目录号A0473,中国碧云天生物技术公司)结合。使用流式细胞仪(Guava easyCyteTM8HT,美国默克密理博公司(Merck-Millipore,USA))定量细胞荧光。如图4A和4B所示,BGA7592与CEA表达细胞的结合不受可溶性CEA存在的影响。

实例5. 鼠抗人CEA抗体的人源化

mAb人源化和工程化

[0388] 对于BGA7592的人源化,通过在IMGT和NCBI的人免疫球蛋白基因数据库中进行序列比较,搜索人种系IgG基因中与BGA7592可变区的cDNA序列具有高度同源性的序列。选择以高频率存在于人抗体库(Glanville等人,2009PNAS[美国国家科学院院刊]106:20216-20221)中并且与BGA7592高度同源的人IGVH和IGVL基因作为人源化的模板。在人源化之前,将BGA7592重链和轻链可变结构域分别与命名为人IgG1wt的野生型人IgG1恒定区(SEQ ID NO:87)和人 κ 恒定(CL)区(SEQ ID NO:88)(表5)融合。

表5:氨基酸序列

SEQ ID	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV	IgG1wt
NO:87	HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
SEQ ID NO:88	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	CL

[0389] 通过CDR移植进行人源化(Methods in Molecular Biology[分子生物学方法],第248卷:antibody Engineering,Methods and Protocols[抗体工程化、方法和方案],Humana Press[胡马纳出版社])并将BGA7592抗体以人IgG1形式工程化。在首轮人源化中,框架区中从鼠到人氨基酸残基的突变由模拟的3D结构指导,并且在人源化抗体BGA7592的第1版本BGA7592-1中保留了对于维持CDR的规范结构具有结构重要性的鼠框架残基(重链和轻链的氨基酸序列在SEQ ID NO:89和90中示出)(表6)。

表6:氨基酸序列

SEQ ID NO:89	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGLEWI GYINPNTGYTNYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR EYGNYNPLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	BGA759 2-1 重链
SEQ ID NO:90	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYGILAWYQQKPGKVPKLLIYNA KNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHHYGTPYTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	BGA759 2-1 轻链

[0390] 具体地,将BGA7592-1 VL的CDR移植到保留了2个鼠框架残基(N66和V68)的人种系可变基因IGVK1-27的框架中(轻链可变结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:92中示出)。将BGA7592-1 VH的CDR移植到保留了5个鼠框架(L39、I53、Y55、N66、S68)残基的人种系可变基因IGVH1-46的框架中(重链可变结构域的氨基酸序列在SEQ ID NO:91中示出)(表7)。

表7:氨基酸序列

SEQ ID NO:91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGLE WIGYINPNTGYTNYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVY YCAREYGNYNPLDYWGQGLTVTVSS	BGA7592 -1 VH
SEQ ID NO:92	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYGILAWYQQKPGKVPKLLI YNAKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHHYGTPYT FGQGTKVEIK	BGA7592 -1 VL

[0391] 使用公司内部开发的表达载体将BGA7592-1构建为人全长抗体形式,这些表达载体含有野生型人IgG1的恒定区,具有容易适应的亚克隆位点。通过将上述两种构建体共转染到293G细胞中并通过使用蛋白A柱(目录号17543802,通用生命科学公司)纯化来实现BGA7592-1抗体的表达和制备。将纯化的抗体在PBS中浓缩至0.5-5mg/mL并以等分试样储存在-80℃冰箱中。

[0392] 使用BGA7592-1,进行额外数量的单个或多个氨基酸改变,将VH和VL框架区中的人残基转化为相应的鼠种系残基,其分别包括VH中的V68A、R72A和V79A以及VL中的V43S。这产生BGA7592-2(VH中的V68A、R72A)、BGA7592-3(VH中的V79A)、BGA7592-4(VH中的V68A、R72A、V79A)、BGA7592-5(VL中的V43S)、BGA7592-6(VH中的V68A、R72A和VL中的V43S)、BGA7592-7(VH中的V79A、VL中的V43S)和BGA7592-8(VH中的V68A、R72A、V79A和VL中的V43S)。含有修饰的所有抗体都具有相似的与BGA7592-1的结合活性,并且没有一种改变消除结合。

[0393] 为了去除翻译后修饰(PTM)位点,通过基于BGA75921序列在CDR和框架区中引入突变来进行进一步工程化,这些突变包括VH区中的N52T、N54Q、N59S、N102G、N104Q和S61A氨基酸改变。这产生BGA7592-1A(N52T(VH))、BGA7592-1B(N54Q(VH))、BGA7592-1C(N59S(VH))、BGA7592-1D(N102G(VH))、BGA7592-1E(N104Q(VH))和BGA7592-1F(N54Q、N59S、S61A(VH))、

并且所有抗体都具有与BGA7592-1相似的结合特异性,没有一种改变消除结合。在保持特异性的同时,还考虑了氨基酸组成和表达水平。使用在特定位置含有突变的引物和定点诱变试剂盒(目录号FM111-02,中国北京的全式金公司)进行所有人源化突变。通过序列分析验证所需的突变。与BGA7592-1相比,BGA7592-1F具有显著降低的结合亲和力,没有糖基化位点,但具有高表达水平(表8)。

表8:氨基酸序列

SEQ ID NO:93	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYGYLAWYQQKPGKVPKLL IYNAKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQHHYGTP YTFGQGGTKVEIK	BGA7592-1 和-1F VL
SEQ ID NO:94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWLHWVRQAPGQG LEWIGYINPQTGYTSYAQKFQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAREYGNYNPLDYWGQGLTVTVSS	BGA7592-1 F VH

实例6. 亲和力成熟文库的产生

[0394] 通过标准分子生物学技术使用噬菌粒载体pCANTAB 5E(通用电气医疗集团(GE Healthcare))构建噬菌粒,该噬菌粒被设计成在M13噬菌体的表面上展示BGA7592-1F Fab片段作为与基因-3次要外壳蛋白片段的N末端的融合体。在基因-3序列之前有一个琥珀终止密码子,以允许直接从噬菌粒克隆表达Fab片段。使用噬菌粒作为模板来构建含有 10^8 个独特成员的噬菌体展示文库。

[0395] 构建两个文库(H-AM、L-AM),分别随机化重链和轻链中的CDR位置。所有三个CDR在每个文库中随机化,但每个CDR在每个克隆中具有最多一个突变,HCDR3除外,其可具有两个同时突变。每个位置用编码任何氨基酸的NNK密码子(IUPAC编码)或琥珀终止密码子随机化。组合的重链和轻链文库设计具有 5.0×10^6 个独特全长克隆的潜在多样性,没有终止密码子或半胱氨酸密码子,并且预期分布分别为约0.02%、1.1%、17%和82%的克隆分别具有0、1、2和3个突变。由于HCDR3区域中的引物设计,预期一小部分重链克隆具有4个突变。作为第一步,使用pCANTAB 5E(作为模板)和含有随机化CDR3位置的引物扩增DNA片段(参见图5A和5B)。然后将PCR产物凝胶纯化并与含有随机化CDR2位置的引物组装。用针对随机CDR1位置的引物重复该过程。然后通过重叠PCR将所得的重链或轻链的PCR产物与其相应的CH片段或CL片段组装。通过重叠PCR将片段进一步与没有突变的轻链或重链组装。然后将所得片段凝胶纯化,并在NcoI/NotI消化后与pCANTAB 5E连接。通过电穿孔将纯化的连接物转化到TG1细菌中。来自每个文库的48个克隆的测序证实了每个位置的随机化(数据未示出),尽管由于取样深度有限,并非在每个位置都观察到所有的氨基酸突变。约52%和55%的轻链和重链文库具有全长随机克隆,足以覆盖设计的所有潜在多样性,即使在寡核苷酸合成和文库构建中存在适度的掺入偏差,也会产生 10^8 个独立克隆。

实例7. 亲和力成熟的人源化BGA7592变体的产生

文库选择和筛选

[0396] 使用标准方案通过噬菌体展示进行亲和力成熟的人源化BGA7592 Fab的产生(Silacci等人,(2005) Proteomics[蛋白质组学],5,2340-50;Zhao等人,(2014) PLoS One[公共科学图书馆:综合],9,e111339)。对于第一轮和第二轮选择,在免疫管(目录号

470319,赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher))中对固定化的CHIM进行竞争选择。简而言之,将免疫管用1ml CHIM(在PBS中为5 μ g/ml)在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。在各种浓度的BGA7592-1F IgG(第1轮,1 μ g/ml;第2轮,5 μ g/ml)存在下,将所有亲和力成熟文库与包被的免疫管一起孵育1小时。对于第三轮和第四轮选择,使用L929/huCEA细胞(第3轮)或LOV0细胞(ATCC CCL-229)(第4轮)进行细胞淘选,其中HEK293细胞作为耗竭细胞。在四轮选择之后,挑选单个克隆并使用标准方案制备含有噬菌体的上清液。对ELISA阳性克隆测序,并分析突变位点。

CDR中的突变频率分析

[0397] 在四轮选择之后,每个CDR中的突变频率相对较高,范围从HCDR3中的17%到LCDR2中的95%。关于重链,在H-AM文库中鉴定的约一半克隆与亲本克隆相同。其他克隆在HCDR2中的Q54N处含有一个回复突变。

[0398] 在分析轻链时,突变更加多样化。两个位点分别在LCDR1的几乎所有克隆中都发生了突变。轻链残基29和31分别在47.09%和35.29%的克隆中从Ile突变为Gln和从Gly突变为Gln。位置29不仅具有高频率的Gln突变,而且具有突变为酪氨酸的克隆子集。位置31不仅具有高频率的Gln突变,而且有约12.5%的机会突变为Leu。由于文库设计限制,没有发现位置29和31的突变彼此结合。然而,这两个位点中的每一个中的突变通常与其他CDR中的突变组合。关于LCDR2,只有A51在至少64.71%的克隆中发生突变,但没有任何明显的模式,其包括大的疏水和极性残基,诸如Tyr、Phe、Thr和Asn。关于LCDR3,两个位点在至少50%的克隆中发生了突变。轻链残基90和92分别在11.76%和47.06%的克隆中从His突变为Leu和从Tyr突变为Leu。图6示出了四轮选择后轻链CDR区的序列差异。

所选择的人源化BGA7592变体的表达

[0399] 进行了突变的组合。将来自所选噬菌体克隆的轻链可变区亚克隆到人 κ 轻链表达哺乳动物表达载体中。将轻链表达载体与表达BGA7592-1F(在本文中也描述为BGA5366)重链的哺乳动物表达载体以1:1的比例共转染到293G细胞中。通过蛋白A亲和色谱法(目录号17543802,通用生命科学公司)从培养上清液中纯化CEA抗体形式。将纯化的抗体在PBS中浓缩至0.5-5mg/mL并以等分试样储存在-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

亲和力成熟的人源化BGA7592变体的表征

[0400] 通过使用BIAcoreTMT-200(通用生命科学公司)的SPR测定(表9)和流式细胞术(图7)进行BGA7592-1F(BGA5366)和其他亲和力成熟克隆的亲和力比较。对于该实验,将抗人IgG(Fc)抗体固定在活化的CM5生物传感器芯片(目录号BR100839,通用生命科学公司)上。抗CEA抗体流过芯片表面并被抗人Fab抗体捕获。然后使CHIM的连续稀释液(1.37nM至333nM)流过芯片表面,并通过使用一对一Langmuir结合模型(BIA评估软件,通用生命科学公司)分析表面等离子共振信号的变化以计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。对于流式细胞术,将表达CEA的细胞(10^5 个细胞/孔)与各种浓度的纯化的亲和力成熟抗体一起孵育,随后与Alexa Fluoro-647标记的抗hu IgG Fc抗体(目录号409320,美国百进生化技术公司(BioLegend,USA))结合。使用流式细胞仪(Guava easyCyteTM8HT,美国默克密理博公司(Merck-Millipore,USA))定量细胞荧光。将平衡解离常数(K_D)计算为比率 k_{off}/k_{on} 。显示出BGA7592-1F-ph-L(BGA3676)(SEQ ID NO:95)和BGA7592-1F-ph-M(BGA2433)(SEQ ID NO:96)对huCEA表面蛋白的亲和力提高(表10)。

表9:通过SPR比较结合亲和力

样品 ID	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
BGA7592-1F-ph-E (BGA7637)	3.4E+3	3.5E-3	1.0E-6	284
BGA7592-1F-ph-F (BGA9521)	1.0E+2	1.2E-2	1.2E-4	4162
BGA7592-1F-ph-G (BGA8232)	6.4E+1	2.6E-3	4.1E-5	3487
BGA7592-1F-ph-H (BGA5893)	1.1E+2	2.8E-3	2.5E-5	1983
BGA7592-1F-ph-I (BGA4429)	2.0E+2	2.2E-3	1.1E-5	2248
BGA7592-1F-ph-L (BGA3676)	6.7E+3	3.0E-4	4.6E-8	184
BGA7592-1F-ph-M (BGA2433)	2.5E+3	2.5E-4	9.9E-8	224
BGA7592-1F-ph-N (BGA1334)	1.1E+3	1.0E-2	9.2E-6	1267
BGA7592-1F (BGA5366)	1.9E+3	1.5E-3	7.9E-7	367

表10:氨基酸序列

SEQ ID NO:95	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVP KLLIYNFKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQH HLGTPYTFGQGTKVEIK	BGA7592-1F-ph- L (BGA3676) VL
SEQ ID NO: 96	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVP KLLIYNTKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQH HLGTPYTFGQGTKVEIK	BGA7592-1F-ph- M (BGA2433) VL

实例8.亲和力和成熟的人源化BGA7592变体的进一步工程化

[0401] 通过在基于BGA7592-1F-ph-M(BGA2433)模板的CDR中引入突变进行了进一步的工程化,该模板包括VH中的W33Y、Q54N和S59N以及VL中的T51Y。这产生BGA8179(W33Y(VH))、BGA2107(Q54N(VH))、BGA0089(S59N(VH))、BGA1789(T51Y(VL)),它们与BGA7592-1F-ph-F(BGA9521)相比都具有改进的结合活性,其中改进最大的抗体最终产生具有(W33Y(VH)、T51Y(VL))改变的BGA6710抗体(表11),序列在表12中示出。

表11:通过SPR比较与CHIM的结合亲和力

样品ID	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
BGA7592-1F-ph-M(BGA2433)	1.97E+04	2.48E-04	1.26E-08	97.2
BGA8179	1.99E+04	2.82E-04	1.42E-08	129.1
BGA2107	1.98E+04	3.80E-04	1.92E-08	71.1
BGA0089	1.84E+04	3.94E-04	2.15E-08	59.4
BGA1789	3.21E+04	4.63E-04	1.44E-08	92.9
BGA6710	3.15E+04	4.75E-04	1.51E-08	112.4

表12:BGA6710的氨基酸和核酸序列

BGA6710	SEQ ID NO:97	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLH WVRQAPGQGLEWIGYINPQTGYTSYAQKFQGRVTM TRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREYGNYNYP LDYWGGQGLTVTVSS
	SEQ ID NO:15	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENQYGYLAWY QQKPGKVPKLLIYNYKNLVEGVPSRFSGSGSGTDF LTISLQPEDVATYYCQHHLGTPYTFGQGTKVEIK
	SEQ ID NO:98	VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGA AAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCA AAGCGAGCGGCTATATTTTACCAGCTATTACCTGC ATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGA ATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCTATAC CAGCTATGCCAGAAATTCAGGGCCGCGTGACCA TGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCCTGTATATG GAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGG TGTATTATTGCGCGCGCAATATGGCAACTATAACT ATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTG ACCGTGAGCAGC
	SEQ ID NO:17	VL DNA	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAG CGCGAGCGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCC GCGCGAGCGAAAACAGTATGGCTATCTGGCGTG GTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGTGCCGAAACTG CTGATTTATAACTATAAAAACCTGGTGGAAGGCGT GCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC GATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGA AGATGTGGCGACCTATTATTGCCAGCATCATCTGGG CACCCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGG AAATTAAA

实例9. BGA6710的优化

[0402] 为了进一步改善生物化学/生物物理学性质,通过在CDR和框架区中引入取代对BGA6710进行优化(表13)。选择大的疏水残基并将其改变为极性残基,K13和Q53除外,它们是基于观察到的人VH种系之间的差异而选择的。考虑因素包括氨基酸组成、热稳定性(T_m)、表面疏水性和等电点(pI),同时保持功能活性。如实例6所述,通过克隆到载体pCANTAB-5E中以Fab形式表达变体。然后通过ELISA和SPR分析筛选含有Fab的上清液的CEA结合。选择没有显著亲和力降低的变体并鉴定出可耐受取代的残基。证明轻链中的L92E,重链中的K13E、Q54E、Y57D/E和Y57K对亲和力的影响极小。

[0403] 因此,表达和纯化具有单个鉴定出的突变或组合的IgG形式的BGA6710变体,如实例8中所述。进行SPR研究和FACS分析并总结在表14中。证实了特异性和表位没有由于引入

的氨基酸取代而发生改变(数据未示出)。总之,结果表明这些单一或组合突变(重链中的K13E、Q54E、Y57D和Y57K,轻链中的L92E)对亲和力的影响极小,L92E除外,它略微降低了与CEA的结合亲和力。总之,Y57K改变优化了BGA6710抗体的表达、CEA结合和亲和力,从而产生BGA5384(表1)。

表13:用于取代的残基的总结

残基	AA取代
H:K13	E
H:Y32	H、N、Q、D、E、K
H:Y33	H、N、Q、D、E、K
H:Q53	A、D、G、N、S、T、Y、R、H
H:Y57	H、N、Q、D、E、K
H:Y100	H、N、Q、D、E、K
H:Y105	H、N、Q、D、E、K
L:V15	T、P、L
L:Y30	H、N、Q、D、E、K
L:Y32	H、N、Q、D、E、K
L:Y49	H、N、Q、D、E、K
L:P80	S、T、A
L:L92	H、N、Q、D、E、K

表14:通过SPR对BGA6710变体的亲和力测量的总结

BGA6710 变体	动力学 (huCEA)			亲和力 (MKN45 细胞)	
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	最高	EC ₅₀ (μg/ml)
L92E、Y57K	3.34E+04	1.77E-04	5.29E-09	969.9	1.09
L92E	4.17E+04	1.88E-04	4.50E-09	945.4	1.19
Q54E、Y57K	1.10E+05	2.60E-04	2.36E-09	901.9	0.58
Y57K (BGA5384)	1.02E+05	1.81E-04	1.77E-09	934.6	0.52
K13E、Y57K	1.28E+05	1.72E-04	1.34E-09	959.9	0.48
Q54E、Y57E	1.17E+05	2.50E-04	2.14E-09	926.9	0.65
Y57D	1.07E+05	1.95E-04	1.82E-09	949.3	0.56
BGA6710	1.13E+05	1.69E-04	1.49E-09	919.3	0.49

实例10. 抗CEA抗体BGA5384的结合概况

[0404] BGA5384和先前披露的CEA抗体(在美国专利申请公布号2012/0251529中命名为抗体2F1)以人IgG1形式产生并使用BIAcore™ T-200(通用生命科学公司)通过SPR测定表征它们的结合动力学。

[0405] 为了获得这些数据,将抗人IgG (Fc) 抗体固定在活化的CM5生物传感器芯片(目录号BR100839,通用生命科学公司)上。BGA5384抗体流过芯片表面并被抗人Fab抗体捕获。然后使可溶性huCEA或cynoCEA(目录号:CE5-C52H5,北京百普赛斯生物科技股份有限公司(Acrobiosystem))的连续稀释液(1.37nM至2150nM)流过芯片表面,并通过使用一对一

Langmuir结合模型(BIA评估软件,通用生命科学公司)分析表面等离子共振信号的变化以计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(K_D)计算为比率 k_{off}/k_{on} 。BGA5384和2F1对照抗体展示出不同的结合亲和力。BGA5384对人CEA具有非常高的亲和力,并且对cynoCEA也具有相当的亲和力,如表15所示。

表15:通过SPR比较抗CEA抗体的结合亲和力

	BGA5384			2F1 抗体		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
huCEA	1.02E+05	1.81E-04	1.77E-09	4.50E+4	3.00E-3	6.50E-8
cynoCEA	2.67E+04	5.34E-04	1.99E-08	ND	ND	ND

[0406] 对于流式细胞术,将表达CEA的MKN45细胞(10^5 个细胞/孔)与各种浓度的纯化的亲和成熟抗体一起孵育,随后与Alexa Fluor-647标记的抗hu IgG Fc抗体(目录号409320,美国百进生化技术公司)结合。使用流式细胞仪(Guava easyCyte™8HT,美国默克密理博公司(Merck-Millipore,USA))定量细胞荧光。如图8所示,BGA5384以剂量反应方式表现出与活细胞上的天然CEA特异性结合(如通过平均荧光强度MFI所测量), EC_{50} 为2.92 μ g/ml。

实例11.脱靶特异性的评价

[0407] 经由ELISA和流式细胞术评价BGA5384的脱靶特异性。对于流式细胞术,将CEACAM3(SEQ ID NO:65)、CEACAM7(SEQ ID NO:66)或CEACAM8(SEQ ID NO:67)瞬时转染到HEK293细胞(10^5 个细胞/孔)中,然后与2 μ g/ml纯化的BGA5384一起孵育,随后与Alexa Fluor-647标记的抗huIgG Fc抗体(目录号409320,美国百进生化技术公司)结合。使用流式细胞仪(Guava easyCyte™8HT,美国默克密理博公司(Merck-Millipore,USA))定量细胞荧光。对于抗原ELISA,将CEACAM1(SEQ ID NO:64)(目录号10822-H08H,中国义翘神州公司(Sino Biological,China))、CHIM(SEQ ID NO:63)、CEA(SEQ ID NO:55)或CEACAM6(SEQ ID NO:57)以10 μ g/ml的浓度在96孔板中在4℃下包被过夜。使用HRP-连接的抗人Fc(Fc特异性)IgG抗体(目录号A0170,美国西格马公司(Sigma,USA))和底物(目录号00-4201-56,美国伊生物技术公司)进行显色,并使用酶标仪(SpectraMax Paradigm,美国分子设备公司)测量450nm波长处的吸光度信号。如图9A-9B所示,没有观察到与其他CEACAM家族成员的交叉反应性;BGA5384仅对CEA(图9A-B中的CEACAM3)表现出特异性。

实例12.可溶性huCEA对BGA5384与CEA表达细胞的结合的影响

[0408] 为了确定可溶性CEA(sCEA)是否对BGA5384的特异性结合有任何影响,将不同浓度(0、0.5、1或2 μ g/ml)的重组可溶性CEA与(0.01-100 μ g/ml)BGA5384预混合并孵育5分钟。然后将混合物与 2×10^5 个CEA表达细胞(诸如MKN45细胞)在4℃下孵育30分钟。用第二抗体抗huFc-APC(目录号409320,美国百进生化技术公司)对细胞进行染色,并通过流式细胞术进行分析。在2 μ g/ml重组sCEA存在下,BGA5384与CEA表达细胞的结合不受影响。该结果针对MKN45细胞示出(图10),并且表明BGA5384对CEA的膜结合形式具有特异性。

实例13.BGA6710诱导对CEA⁺肿瘤细胞的强效ADCC作用

[0409] 为了确定野生型IgG1形式的BGA6710是否可以诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC),将表达CD16(V158)的NK92MI细胞(NK92MI/CD16V)用作效应细胞并与表达CEA的小鼠结肠癌细胞(CT26-ATCC CRL-2638)共培养。在指定浓度(0.00005-5 μ g/ml)的BGA6710存在下,以1:1的E:T比率进行共培养5小时,并通过乳酸脱氢酶(LDH)释放确定细胞毒性。使用

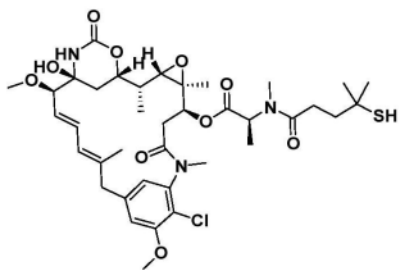
CytoToxTM96非放射性细胞毒性测定试剂盒(威斯康星州麦迪逊的普洛麦格公司(Promega, Madison, WI))测量上清液中LDH的量,并根据制造商的说明计算特异性裂解的量。如图11所示,BGA6710可以在体外诱导ADCC,EC₅₀为约6.7ng/ml。

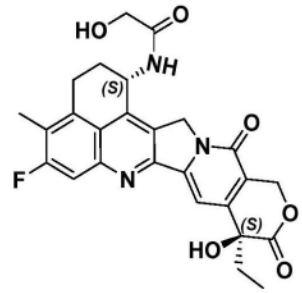
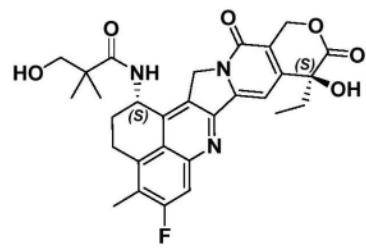
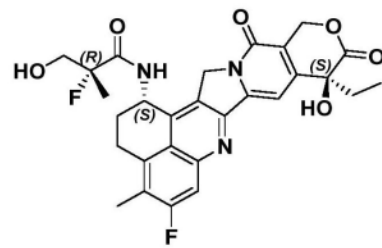
实例14.BGA6710的体内抗肿瘤功效

[0410] 为了确定BGA6710对CEA⁺肿瘤细胞的体内功效,将NK92MI/CD16V细胞(5x 10⁶个)与CT26/CEA细胞(10⁶个)混合并皮下注射到NCG小鼠体内。从肿瘤注射当天开始,每周两次给予BGA6710(0.12、0.62或3.1mg/kg)或媒介物对照(每组7只小鼠)。与媒介物相比,3.1mg/kg剂量的BGA6710显示出少量的肿瘤抑制,尽管与媒介物对照的差异在统计学上不显著(P>0.05)(图12)。

实例15.细胞毒性剂(有效载荷)的合成

表16:有效载荷列表

实例	结构
P1 (DM4)	

P2 (DXD)	
P3	
P4	

UPLC分析方法:

[0411] 方法A:流动相A:0.1% FA的水溶液,B:MeCN;梯度:10%B维持0.2min,10%-95%B维持5.8min,95%B维持0.5min;流速:0.6mL/min;柱:ACQUITY UPLC®BEH C18 1.7μm。

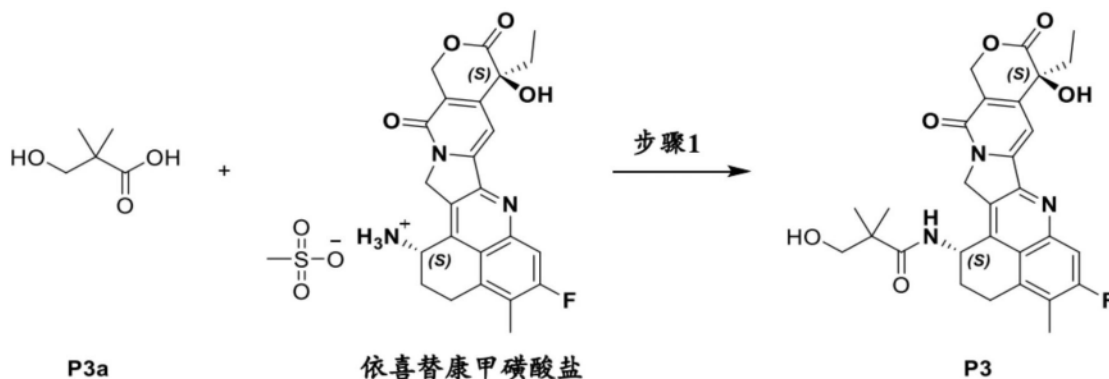
[0412] 方法B:流动相A:0.1% FA的水溶液,B:MeCN;梯度:10%B维持0.5min,10%-90%B维持2.5min,90%B维持0.2min;流速:0.6mL/min;柱:ACQUITY UPLC®BEH C18 1.7μm。

[0413] 方法C:流动相A:0.1% FA的水溶液,B:MeCN;梯度:10%B维持0.2min,10%-90%B维持1.3min,90%B维持0.3min;流速:0.6mL/min;柱:ACQUITY UPLC®BEH C18 1.7μm。

[0414] P1和P2(表16)可商购获得并且购自上海MedChemExpress有限公司。

有效载荷P3和P4的合成程序

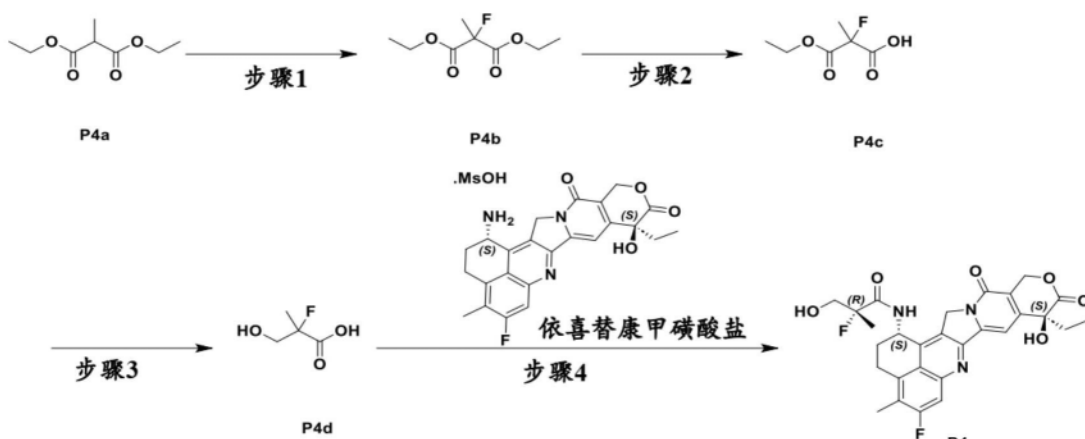
[0415] 有效载荷P3



[0416] 步骤1:N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,

15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)-3-羟基-2,2-二甲基丙酰胺(P3)。向P3a(5.0mg,0.042mmol)和HATU(16mg,0.042mmol)在DMF(1mL)中的混合物中添加DIEA(21 μ L,16mg,0.13mmol)和依喜替康(Exatecan)甲磺酸盐(23mg,0.043mmol,购自MedChemExpress有限公司)。将所得棕色混合物在室温下搅拌2小时。反应完成后,通过制备型HPLC(TFA)纯化混合物(方法:柱:XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19*150mm;流动相:A-水(0.1% TFA):B-乙腈;流速:20mL/min),将级分冻干,得到P3(15mg,65.5%产率),为白色粉末。MS(ESI)m/z:536.4[M+H]⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 8.00(d,J=8.4Hz,1H),7.79(d,J=11.2Hz,1H),7.31(s,1H),6.52(s,1H),5.59-5.54(m,1H),5.42(s,2H),5.18(q,J=19.2Hz,2H),4.87(t,J=5.2Hz,1H),3.45(dd,J=10.2,4.8Hz,1H),3.41-3.28(m,1H),3.15(t,J=5.6Hz,2H),2.40(s,3H),2.24-2.07(m,2H),1.92-1.80(m,2H),1.11(d,J=7.6Hz,6H),0.87(t,J=7.2Hz,3H)。

有效载荷P4



[0417] 步骤1:2-氟-2-甲基丙二酸二乙酯(P4b)。将化合物P4a(10.00g,57.40mmol)在THF(200mL)中的溶液冷却至0℃。将油中的60% NaH(3.21g,80.37mmol)分批添加到混合物中,在0℃下搅拌30分钟。然后在0℃下将N-氟-N-(苯磺酰基)苯磺酰胺(NSFI,19.91g,63.20mmol)分批添加到混合物中,然后升温至室温并搅拌16小时。反应完成后,过滤悬浮液并浓缩滤液。将PE(100mL)添加到残余物中,将沉淀物过滤并将滤液浓缩,得到化合物P4b(12.50g,粗品),为浅黄色油状物。¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ 4.30(q,J=7.2Hz,4H),1.79(d,J=22.0Hz,3H),1.31(t,J=7.2Hz,6H)。¹⁹F NMR(376MHz,CDC1₃) δ -157.50。

[0418] 步骤2:3-乙氧基-2-氟-2-甲基-3-氧代丙酸(P4c)。在0℃下向化合物P4b(1.00g,5.20mmol)在EtOH(5mL)中的溶液中逐滴添加H₂O(50 μ L)和EtOH(2mL)中的KOH溶液(321mg)。将混合物在室温下搅拌2小时。将混合物用20(mL)稀释,用DCM(20mL*3)洗涤。用1N HCl将水溶液调节至pH=3,然后用EtOAc(50mL*3)萃取。将有机层干燥,合并并经无水Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩,得到化合物P4c(470mg,55.0%产率),为无色油状物。¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ 8.31(br s,1H),4.32(q,J=7.2Hz,2H),1.83(d,J=22.0Hz,3H),1.33(t,J=7.2Hz,3H)。¹⁹F NMR(376MHz,CDC1₃) δ -157.59。

[0419] 步骤3:2-氟-3-羟基-2-甲基丙酸(P4d)。在0℃下向化合物P4c(200mg,1.22mmol)在异丙醇(4mL)中的溶液中添加2M LiBH₄(1.22mL,2.44mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时。在0℃下用2N HCl(1.22mL)逐滴淬灭混合物。将混合物用H₂O(10mL)稀释,用EtOAc

(50mL*3) 萃取。将有机层合并并经无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩,得到化合物P4d (92mg, 61.7%产率),为无色油状物。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.01-3.81 (m, 2H), 1.58 (d, $J=21.2\text{Hz}$, 3H)。 ^{19}F NMR (376MHz, CDCl_3) δ -163.98。

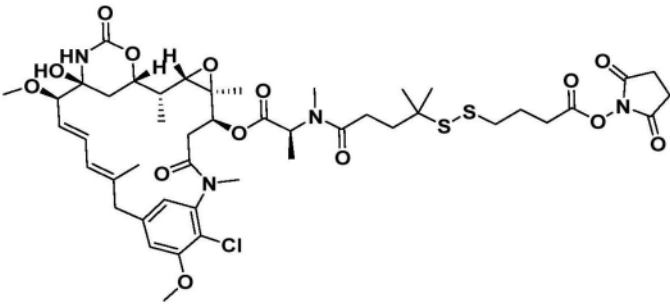
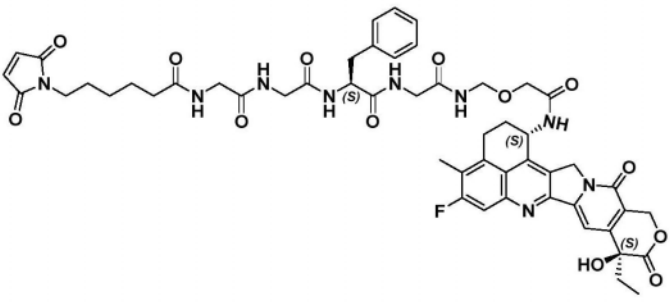
[0420] 步骤4: N-((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10, 13-二氧代-2, 3, 9, 10, 13, 15-六氢-1H, 12H-苯并[d']吡喃并[3', 4': 6, 7]吡啶并[1, 2-b]喹啉-1-基)-2-氟-3-羟基-2-甲基丙酰胺 (P4)。向化合物P4d (23mg, 0.19mmol) 在DMF (2mL) 中的溶液中添加依喜替康甲磺酸盐 (50mg, 0.094mmol)、HATU (54mg, 141mmol) 和DIEA (36mg, 0.28mmol)。将混合物在室温下搅拌1小时。通过制备型HPLC (FA) 纯化混合物 (方法: 柱: XBridge Prep C18 OBD 5um 19*150mm; 流动相: A-水 (0.1%甲酸): B-乙腈; 流速: 20mL/min), 将级分冻干, 得到两种异构体:

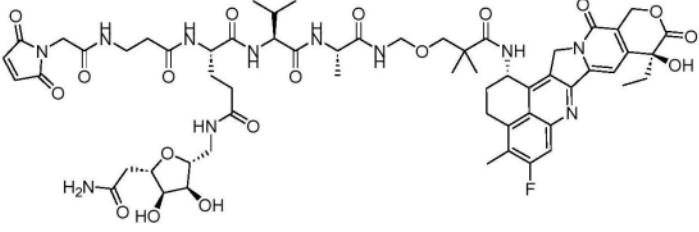
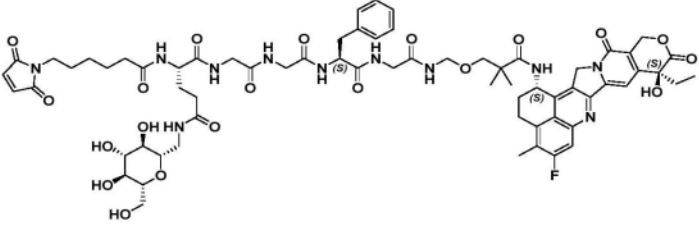
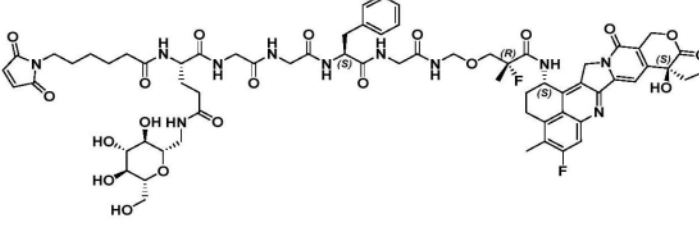
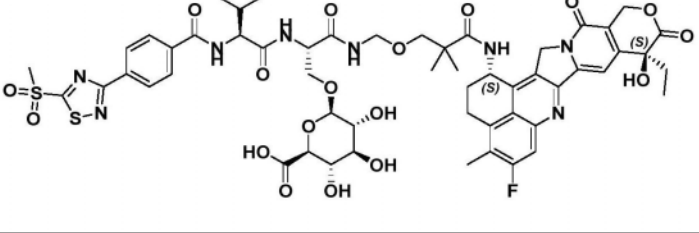
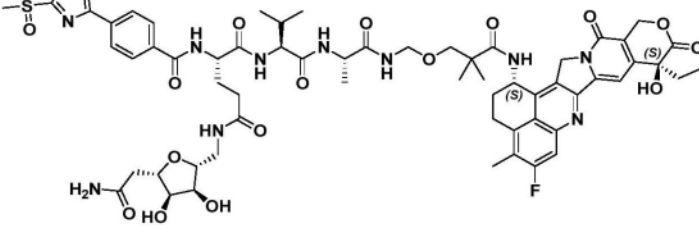
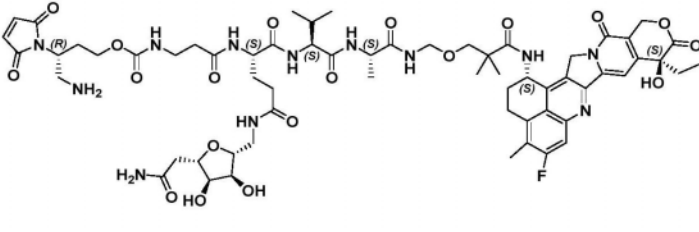
[0421] 异构体1: P4: 白色固体, (11mg, 21.9%产率)。UPLC-MS, $\text{RT}=3.52\text{min}$ 。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.06 (dd, $J=9.0, 2.8\text{Hz}$, 1H), 8.00 (d, $J=10.9\text{Hz}$, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.82 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 5.65 (s, 2H), 5.43 (dt, $J=77.8, 12.4\text{Hz}$, 3H), 4.17-3.91 (m, 1H), 3.83 (ddd, $J=18.0, 12.4, 5.6\text{Hz}$, 1H), 3.40-3.27 (m, 1H), 2.62 (s, 3H), 2.50-2.34 (m, 2H), 2.22-1.98 (m, 2H), 1.81 (d, $J=21.4\text{Hz}$, 3H), 1.11 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H); MS (ESI) m/z : 540.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0422] 异构体2: P4-1: 白色固体, (8.4mg, 16.6%产率)。UPLC-MS, $\text{RT}=3.86\text{min}$ 。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.72 (dd, $J=8.4, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.78 (d, $J=11.2\text{Hz}$, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.58 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.32-5.05 (m, 3H), 3.83 (dd, $J=26.8, 12.0\text{Hz}$, 1H), 3.61 (dd, $J=21.6, 12.0\text{Hz}$, 1H), 3.22-3.07 (m, 2H), 2.46-2.30 (m, 3H), 2.28-2.05 (m, 2H), 2.02-1.74 (m, 2H), 1.45 (d, $J=21.4\text{Hz}$, 3H), 0.87 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H); MS (ESI) m/z : 540.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实例16. 接头-有效载荷的合成

表17: 接头-有效载荷列表

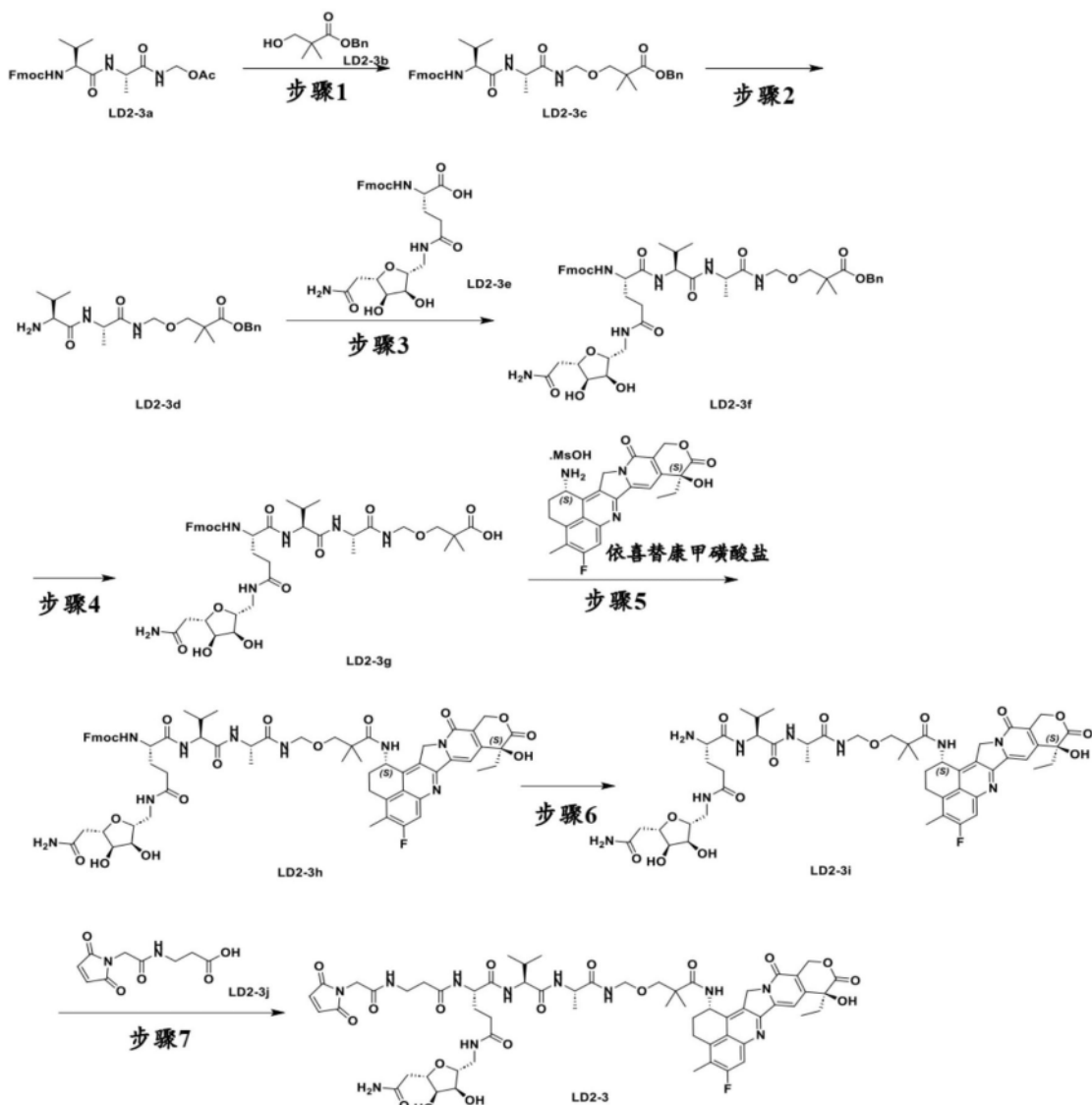
接头-有效载荷	结构
LD2-1	 The chemical structure of LD2-1 shows a complex molecule. On the left, there is a substituted cyclohexane ring with a methoxy group, a hydroxyl group, and a side chain containing a double bond and a carbonyl group. This side chain is linked to a nitrogen atom, which is part of a larger structure including a chlorine atom and another methoxy group. This structure is connected via an ester linkage to a chiral center, which is further linked to a chain containing a carbonyl group, a nitrogen atom, and a disulfide bridge. The disulfide bridge is connected to a chain ending in a succinimide ring.
LD2-2	 The chemical structure of LD2-2 shows a molecule with a long chain of amide linkages. The chain starts with a succinimide ring, followed by a long alkyl chain, and then a series of amide bonds. The chain ends with a complex polycyclic structure, which includes a fluorine atom, a hydroxyl group, and a carbonyl group. The polycyclic structure is a derivative of a purine or similar heterocyclic system.

LD2-3	
LD2-4	
LD2-5	
LD2-6	
LD2-7	
LD2-8	

[0423] LD2-1和LD2-2 (表17) 可商购获得并且购自上海MedChemExpress有限公司。

接头-细胞毒性剂LD2-3至LD2-8的合成程序

接头-细胞毒性剂LD2-3



步骤1: (5S,8S)-1-(9H-芴-9-基)-5-异丙基-8,14,14-三甲基-3,6,9-三氧代-2,12-二氧杂-4,7,10-三氮杂十五烷-15-酸苄酯(LD2-3c)。将LD2-3a(300mg,0.62mmol,根据报告程序合成:ACS Med.Chem.Lett.[ACS药物化学快报]2019,10,1386-1392和US 9808537B2)、LD2-3b(260mg,1.25mmol)和4Å分子筛在无水THF(10mL)中的白色悬浮液混合物在室温下搅拌10分钟。添加Sc(OTf)₃(368mg,0.75mmol),并将所得黄色悬浮液在室温下搅拌4小时。将黄色悬浮液混合物通过硅藻土垫过滤并用EtOAc(30mL)洗涤。将合并的有机层用饱和NaHCO₃(30mL)和盐水(30mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤,并将滤液在真空下浓缩,得到残余物。通过硅胶柱(MeOH/DCM=0%~5%)对其进行纯化,将级分在真空下浓缩,得到LD2-3c(274mg,69.8%产率),为白色固体。MS(ESI)m/z:652.6[M+Na]⁺。

[0424] 步骤2:3-(((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)甲氧基)-2,2-二甲基丙酸苄酯(LD2-3d)。向LD2-3c(274mg,0.44mmol)在DMF(5mL)中的溶液中添加Et₂NH(477mg,5.53mmol)。将混合物在室温下搅拌20分钟。将反应混合物在真空下浓缩并与甲苯共蒸发两次,得到LD2-3d(275mg,粗品),为棕色油状物。MS(ESI)m/z:430.4[M+Na]⁺。

[0425] 步骤3:(5S,8S,11S)-5-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-氨基-2-氧代乙基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基)氨基)-3-氧代丙基)-1-(9H-芴-9-基)-8-异丙基-11,17,17-三

甲基-3,6,9,12-四氧代-2,15-二氧杂-4,7,10,13-四氮杂十八烷-18-酸苄酯(LD2-3f)。向LD2-3d(275mg,粗品)和LD2-3e(282mg,0.52mmol,购自无锡药明康德公司(WuXi AppTec))在DMF(5mL)中的溶液中添加HATU(198mg,0.52mmol)和DIPEA(168mg,1.30mmol)。将混合物在室温下搅拌10分钟。将混合物通过反相(C18,60g,30%~70%)纯化,将级分冷冻干燥,得到LD2-3f(370mg,91.5%产率),为棕色固体。MS(ESI)m/z:953.8[M+Na]⁺。

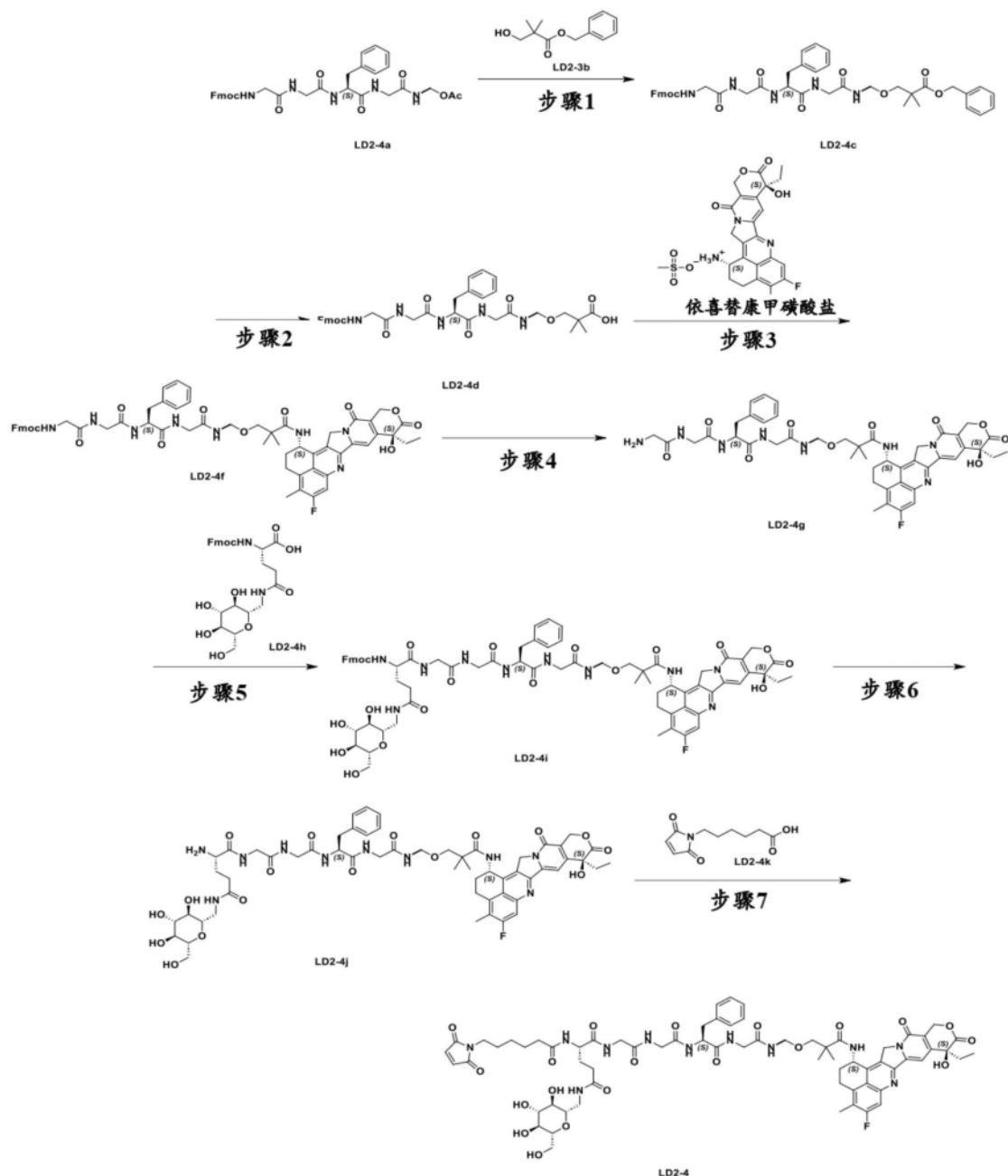
[0426] 步骤4: (5S,8S,11S,17R)-5-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-氨基-2-氧代乙基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基)氨基)-3-氧代丙基)-1-(9H-茚-9-基)-17-氟-8-异丙基-11,17-二甲基-3,6,9,12-四氧代-2,15-二氧杂-4,7,10,13-四氮杂十八烷-18-酸(LD2-3g)。向化合物LD2-3f(3.01g,3.21mmol)在共溶剂DMF-MeOH(40mL,1:1,v:v)中的溶液中添加Pd/C(10%,600mg)。将混合物在H₂气氛(15psi)下搅拌7小时。将混合物通过硅藻土垫过滤,浓缩,得到化合物LD2-3g(2.50g,粗品),为白色固体。MS(ESI)m/z:863.7[M+Na]⁺。

[0427] 步骤5: ((6S,9S,12S)-1-((2R,3S,4R,5S)-5-(2-氨基-2-氧代乙基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)-19-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-9-异丙基-12,18,18-三甲基-3,7,10,13,19-五氧代-16-氧杂-2,8,11,14-四氮杂十九烷-6-基)氨基甲酸(9H-茚-9-基)甲酯(LD2-3h)。向化合物依喜替康甲磺酸盐(1000mg,1.18mmol,购自MedChemExpress有限公司)在DMF(20mL)中的溶液中添加化合物LD2-3g(692mg,1.30mmol)、HATU(675mg,1.78mmol)和DIEA(459mg,3.55mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟。将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法(洗脱剂:DCM/MeOH=0%至20%)纯化,得到标题化合物LD2-3h(1.32g,88.6%产率),为灰白色固体。MS(ESI)m/z:1282.1[M+Na]⁺。

[0428] 步骤6: (S)-2-氨基-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-氨基-2-氧代乙基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基)-N1-((S)-1-(((S)-1-(((3-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2,2-二甲基-3-氧代丙氧基)甲基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)戊二酰胺(LD2-3i)。向化合物LD2-3h(1000mg,0.79mmol)在DMF(20mL)中的溶液中添加Et₃NH(580mg,7.93mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟。将混合物在高真空下浓缩,得到化合物LD2-3i(825mg,粗品),为灰白色固体,其无需进一步纯化直接使用。MS(ESI)m/z:1036.9[M+H]⁺。

[0429] 步骤7: (S)-N5-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-氨基-2-氧代乙基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基)-2-(3-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酰胺基)丙酰氨基)-N1-((S)-1-(((S)-1-(((3-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2,2-二甲基-3-氧代丙氧基)甲基)氨基)-1-氧代丙烷-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)戊二酰胺(LD2-3)。向LD2-3j(15mg,0.067mmol)在无水DMF(1.0mL)中的溶液中添加HATU(26mg,0.067mmol)和DIEA(0.017mL,0.097mmol),在室温下搅拌15分钟。然后向上述混合物中添加LD2-3i(50mg,0.048mmol),在室温下搅拌10分钟。通过制备型HPLC纯化所得溶液(方法:柱:XBridge Prep C18 OBD 5um 19*150mm;流动相:A-水(0.1% TFA):B-乙腈;流速:20mL/min),将级分冻干,得到LD2-3(37mg,50.9%产率),为黄色固体。MS(ESI)m/z:1266.7[M+Na]⁺。

接头-细胞毒性剂LD2-4



[0430] 步骤1: (S)-11-苄基-1-(9H-苻-9-基)-20,20-二甲基-3,6,9,12,15-五氧代-2,18-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂二十一烷-21-酸苄酯(LD2-4c)。向LD2-4a(250mg, 0.40mmol)和LD2-3b(83mg, 0.40mmol)在THF(5mL)中的溶液中添加4Å分子筛。将混合物在室温下搅拌10分钟,然后添加Sc(OTf)₃(195mg, 0.40mmol)并使其在室温下进一步再反应16小时。将悬浮液混合物通过硅藻土垫过滤,并用THF(10mL)洗涤滤饼,然后通过添加饱和NaHCO₃(10mL)淬灭滤液,用EtOAc(30mL*2)萃取。分离后,将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤,并将滤液在真空中浓缩,得到残余物,通过硅胶柱色谱法进一步纯化该残余物(A-DCM;B-MeOH, MeOH/DCM=0%~5%),得到LD2-4c(90mg, 29.2%产率),为白色固体。MS(ESI)m/z: 800.5[M+Na]⁺。

[0431] 步骤2: (S)-11-苄基-1-(9H-苻-9-基)-20,20-二甲基-3,6,9,12,15-五氧代-2,

18-二氧杂-4,7,10,13,16-五氮杂二十一烷-21-酸(LD2-4d)。向LD2-4c(80mg,0.10mmol)在MeOH(3mL)中的溶液中添加湿Pd/C(20mg)。将黑色悬浮液用H₂气球吹扫三次,然后在室温下在H₂气球下反应2小时。反应完成后,将黑色悬浮液通过硅藻土垫滤出,并将滤饼用MeOH洗涤,将合并的有机层在真空下浓缩,得到LD2-4d(61mg,84.8%产率)。MS(ESI)m/z:710.4[M+Na]⁺。

[0432] 步骤3:((S)-7-苄基-17-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-16,16-二甲基-2,5,8,11,17-五氧代-14-氧杂-3,6,9,12-四氮杂十七烷基)氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(LD2-4f)。向LD2-4d(60mg,0.087mmol)和HATU(33mg,0.087mmol)在DMF(2mL)中的混合物中添加DIEA(43μL,34mg,0.26mmol)。使混合物在室温下反应10分钟。添加依喜替康甲磺酸盐(46mg,0.087mmol),并使其在相同温度下再反应1小时。反应完成后,过滤混合物,并使用制备型HPLC纯化滤液(方法:柱:XBridge Prep C18 OBD 5μm 19*150mm;流动相:A-水(0.1%甲酸):B-乙腈;流速:20mL/min),得到LD2-4f(85mg,88.2%产率)。MS(ESI)m/z:1105.5[M+H]⁺。

[0433] 步骤4:3-(((S)-13-氨基-7-苄基-3,6,9,12-四氧代-2,5,8,11-四氮杂十三烷基)氧基)-N-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)-2,2-二甲基丙酰胺(LD2-4g)。向LD2-4f(85mg,0.062mmol)在DMF(2mL)中的溶液中添加Et₃NH(64μL,46mg,0.62mmol)。将混合物在室温下搅拌0.5小时。反应完成后,将混合物在真空下浓缩,得到LD2-4g(86mg,粗品),为黄色固体。MS(ESI)m/z:883.5[M+H]⁺。

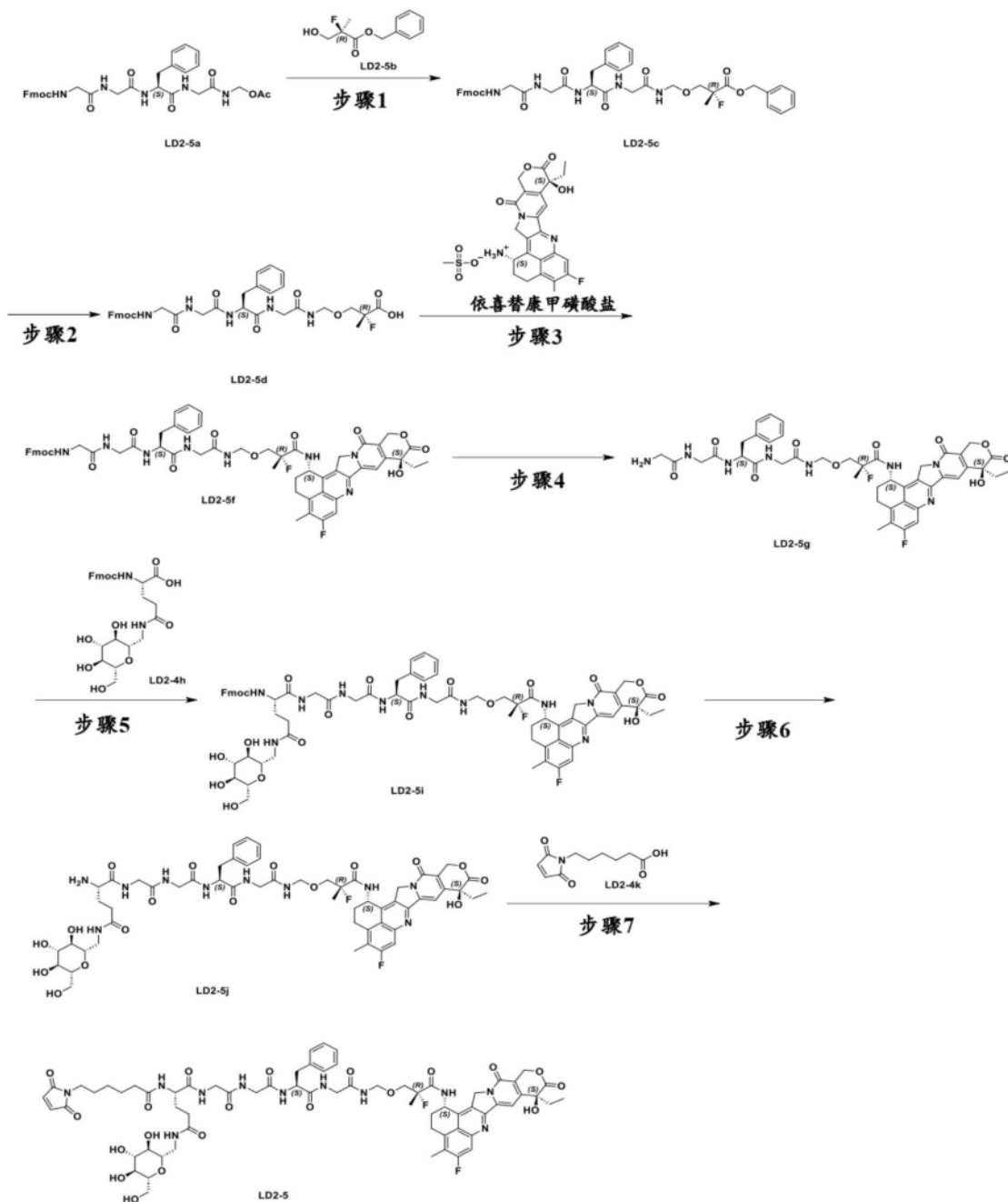
[0434] 步骤6:((6S,15S)-15-苄基-25-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-24,24-二甲基-3,7,10,13,16,19,25-七氧代-1-((2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)-22-氧杂-2,8,11,14,17,20-六氮杂二十五烷-6-基)氨基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(LD2-4i)。向LD2-4g(86mg,粗品)和LD2-4h(43mg,0.079mmol,购自无锡药明康德公司)在DMF(1.5mL)中的溶液中添加DIEA(26μL,21mg,0.16mmol)。将混合物在室温下搅拌1.5小时。反应完成后,通过制备型HPLC(FA)纯化混合物(方法:柱:XBridge Prep C18 OBD 5μm 19*150mm;流动相:A-水(0.1%甲酸):B-乙腈;流速:20mL/min),将级分冻干,得到LD2-4i(70mg,62.6%产率),为白色粉末。MS(ESI)m/z:1410.7[M+H]⁺。

[0435] 步骤7:(S)-2-氨基-N1-((S)-7-苄基-17-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-16,16-二甲基-2,5,8,11,17-五氧代-14-氧杂-3,6,9,12-四氮杂十七烷基)-N5-(((2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基)戊二酰胺(LD2-4j)。向LD2-4i(70mg,0.050mmol)在DMF(1mL)中的溶液中添加Et₃NH(51μL,36mg,0.50mmol)。将混合物在室温下搅拌0.5小时。反应完成后,将混合物在真空下浓缩,得到LD2-4j(71mg,粗品),为黄色固体。MS(ESI)m/z:1188.2[M+H]⁺。

[0436] 步骤8:(S)-N¹-((S)-7-苄基-17-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]

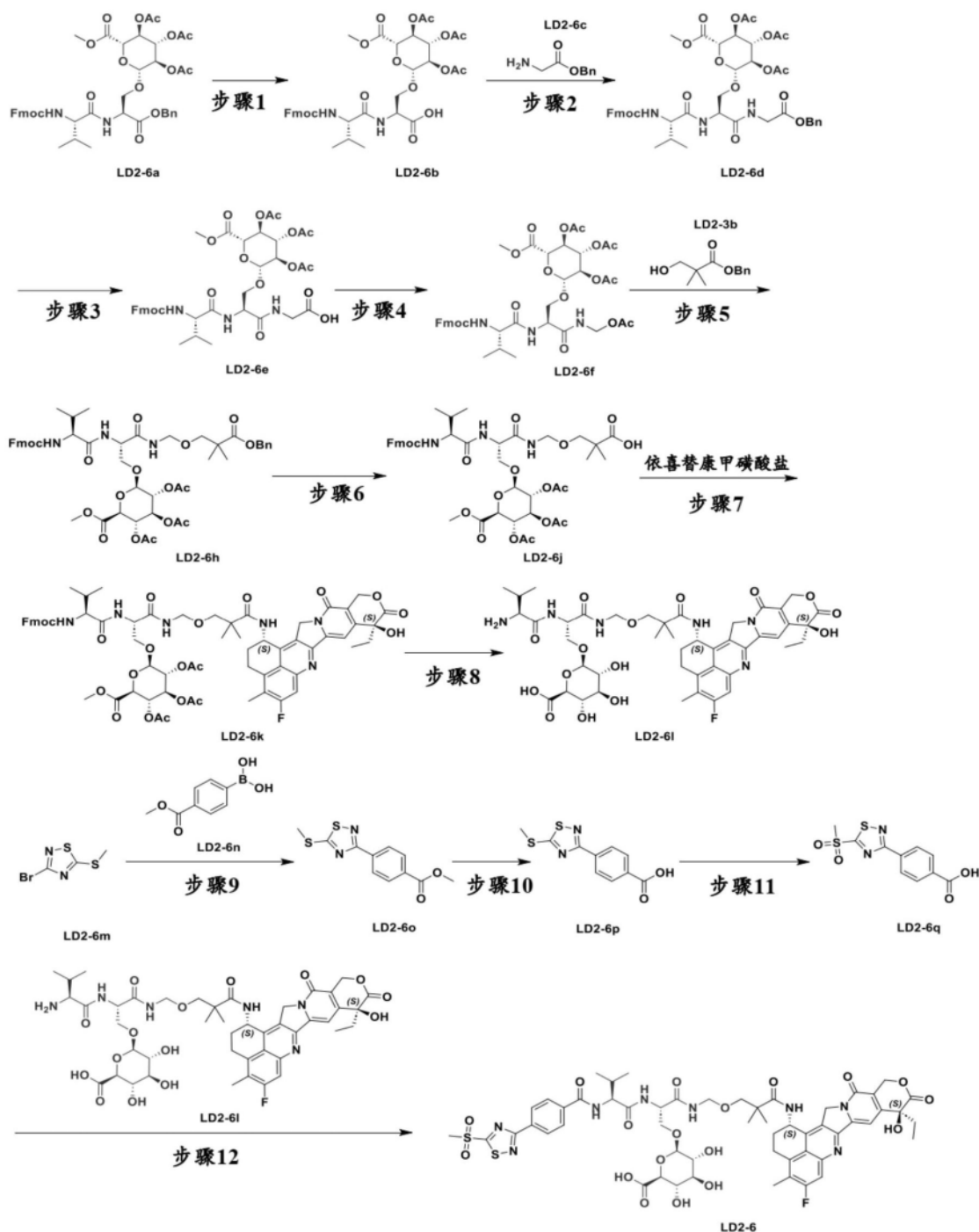
喹啉-1-基)氨基)-16,16-二甲基-2,5,8,11,17-五氧代-14-氧杂-3,6,9,12-四氮杂十七烷基)-2-(6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-N⁵-(((2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)甲基)戊二酰胺(LD2-4)。向LD2-4k(19mg)在DMF(3mL)中的溶液中添加HATU(34mg,0.088mmol)和DIEA(10μL,7.6mg,0.059mmol)。将所得黄色溶液在室温下搅拌5分钟,然后添加LD2-4j(71mg,粗品)。将混合物在室温下搅拌60分钟。反应完成后,通过制备型HPLC(FA)纯化混合物(方法:柱:XBridge Prep C18 OBD 5um 19*150mm;流动相:A-水(0.1%甲酸):B-乙腈;流速:20mL/min),将级分冻干,得到LD2-4(32mg,26.3%产率),为白色粉末。MS(ESI)m/z:1381.1[M+H]⁺。

接头-细胞毒性剂LD2-5



[0437] 根据LD2-4的合成程序合成LD2-5(30mg,50.7%产率)。MS(ESI)m/z:1408.1[M+Na]⁺。

接头-细胞毒性剂LD2-6



[0438] 步骤1: N-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)-L-缬氨酰基)-O-((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-三乙酰氧基-6-(甲氧基羰基)四氢-2H-吡喃-2-基)-L-丝氨酸(LD2-6b)。向LD2-6a(4.10g, 4.92mmol, 购自MedChemExpress有限公司)在MeOH(50mL)、THF(100mL)和DCM(20mL)中的混合物中添加湿Pd/C(400mg, 10%纯度)。将黑色悬浮液用H₂气球吹扫三次, 然后在室温下搅拌1小时。将黑色悬浮液通过硅藻土垫过滤, 用MeOH(200mL)洗涤。合并有机层并在真空下浓缩, 得到LD2-6b(3.65g, 99.8%产率), 为灰白色固体。MS(ESI)m/z: 743.6[M+H]⁺。

[0439] 步骤2: (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-苄-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)-3-((2-(苄氧基)-2-氧代乙基)氨基)-3-氧代丙氧基)-6-(甲氧基羰基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯(LD2-6d)。向LD2-6b(3.65g, 4.92mmol)和LD2-6c

(1.66g, 4.92mmol) 在 DMF (50mL) 中的溶液中添加 HATU (1.87g, 4.92mmol) 和 DIEA (1.59g, 12.29mmol)。将混合物在室温下搅拌 30 分钟。将混合物通过 FCC (MeOH/DCM=0%~10%) 纯化, 将级分在真空下浓缩, 得到 LD2-6d (3.80g, 86.9% 产率), 为灰白色泡沫状固体。MS (ESI) m/z : 890.7 [M+H]⁺。

[0440] 步骤3: N-(((9H-茛-9-基)甲氧基)羰基)-L-缬氨酰基)-O-((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-三乙酰氧基-6-(甲氧基羰基)四氢-2H-吡喃-2-基)-L-丝氨酰甘氨酸 (LD2-6e)。向 LD2-6d (3.80g, 4.27mmol) 在 MeOH (150mL) 和 DCM (50mL) 中的混合物中添加湿 Pd/C (400mg, 10% 纯度)。将黑色悬浮液用 H₂ 气球吹扫三次, 然后在室温下搅拌 40 分钟。将黑色悬浮液通过硅藻土垫过滤, 用 MeOH (150mL) 洗涤。合并有机层并在真空下浓缩, 得到 LD2-6e (3.30g, 96.6% 产率), 为灰白色固体。MS (ESI) m/z : 800.7 [M+H]⁺。

[0441] 步骤4: (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-茛-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)-3-((乙酰氧基甲基)氨基)-3-氧代丙氧基)-6-(甲氧基羰基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯 (LD2-6f)。向 LD2-6e (3.30g, 4.13mmol) 在 DMF (30mL) 中的溶液中添加 Pb(OAc)₄ (2.74g, 6.19mmol)、Cu(OAc)₂ (74.9mg, 0.41mmol) 和 HOAc (247.8mg, 4.13mmol)。将所得深色混合物用 N₂ 气球吹扫三次, 然后在 65℃ 下搅拌 40 分钟, 混合物变为深蓝色。将混合物用 EtOAc (300mL) 稀释, 用盐水 (100mL*3) 洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并在真空下浓缩, 得到残余物。通过 FCC (MeOH/DCM=0~10%) 对其进行纯化, 将级分在真空下浓缩, 得到 LD2-6f (2.81g, 83.4% 产率), 为淡黄色固体。MS (ESI) m/z : 836.6 [M+Na]⁺。

[0442] 步骤5: (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-茛-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)-3-(((3-(苄氧基)-2,2-二甲基-3-氧代丙氧基)甲基)氨基)-3-氧代丙氧基)-6-(甲氧基羰基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯 (LD2-6h)。将 LD2-6f (300mg, 0.37mmol)、LD2-3b (154mg, 0.74mmol) 和 4Å 分子筛 (200mg) 在无水 THF (10mL) 中的白色悬浮液混合物在室温下搅拌 10 分钟。添加 Sc(OTf)₃ (218mg, 0.44mmol), 并将所得黄色悬浮液在室温下搅拌 4 小时。将黄色悬浮液混合物通过硅藻土垫过滤并用 EtOAc 洗涤。将合并的有机层用饱和 NaHCO₃ (30mL) 和盐水 (30mL) 洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 并将滤液在真空下浓缩, 得到残余物。通过硅胶柱 (MeOH/DCM=0%~5%) 对其进行纯化, 将级分在真空下浓缩, 得到 LD2-6h (275mg, 77.5% 产率), 为白色泡沫状固体。MS (ESI) m/z : 984.8 [M+Na]⁺。

[0443] 步骤6: (5S,8S)-1-(9H-茛-9-基)-5-异丙基-14,14-二甲基-3,6,9-三氧代-8-(((2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-三乙酰氧基-6-(甲氧基羰基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)甲基)-2,12-二氧杂-4,7,10-三氮杂十五烷-15-酸 (LD2-6j)。向 LD2-6h (275mg, 0.29mmol) 在 MeOH (10mL) 中的溶液中添加湿 Pd/C (55mg, 10% 纯度)。将黑色悬浮液用 H₂ 气球吹扫三次, 然后在室温下搅拌 2 小时。将混合物通过注射器头过滤并用 MeOH (15mL) 洗涤, 在真空下浓缩, 得到 LD2-6j (230mg, 粗品), 为白色泡沫状固体。MS (ESI) m/z : 894.6 [M+Na]⁺。

[0444] 步骤7: (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((S)-2-((S)-2-(((9H-茛-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰氨基)-3-(((3-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2,2-二甲基-3-氧代丙氧基)甲基)氨基)-3-氧代丙氧基)-6-(甲氧基羰基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯 (LD2-6k)。向 LD2-6j (230mg, 粗品)、依喜替康甲磺酸盐 (140mg, 0.26mmol) 和 HATU (100mg, 0.26mmol) 在 DMF (5mL) 中的混合物中添加 DIEA (102mg,

0.79mmol)。将所得棕色混合物在室温下搅拌1小时。将混合物用EtOAc (20mL) 稀释,用盐水 (20mL*3) 洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤,并在真空下浓缩,得到残余物。通过FCC (MeOH/DCM=0% ~ 3%) 对其进行纯化,在真空下浓缩,得到LD2-6k (325mg, 95.6%产率),为灰白色泡沫状固体。MS (ESI) m/z: 1289.9 [M+H]⁺。

[0445] 步骤8: (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -6-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰氨基)-3-(((3-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2,2-二甲基-3-氧代丙氧基)甲基)氨基)-3-氧代丙氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-羧酸 (LD2-6l)。向LD2-6k (325mg, 0.25mmol) 在DMF (5mL) 中的溶液中添加Et₂NH (523mg, 5.06mmol)。将混合物在室温下搅拌20分钟。LCMS显示反应完成,然后在真空下浓缩,得到粗产物。将其溶解于MeOH (6mL) 中,添加K₂CO₃ (174.7mg, 1.26mmol) 并在室温下搅拌10分钟,然后将H₂O (2mL) 添加到混合物中并在室温下搅拌30分钟。将混合物用饱和KHSO₄在0℃下酸化至pH=3,过滤并通过制备型HPLC (0.1%FA) 纯化,将级分冻干,得到LD2-6l (140mg, 59.7%产率),为淡黄色固体。MS (ESI) m/z: 927.4 [M+H]⁺。 ¹H NMR (400MHz, d₆-DMSO) δ 9.56 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.07 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.77 (d, J=11.2Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.54 (dd, J=13.2, 7.2Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.18 (dd, J=41.6, 18.8Hz, 2H), 5.09-5.02 (m, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.62 (dd, J=10.0, 6.8Hz, 1H), 4.56-4.44 (m, 2H), 4.19 (d, J=7.6Hz, 1H), 3.82 (dd, J=10.8, 6.8Hz, 1H), 3.61 (dd, J=11.6, 6.4Hz, 2H), 3.17-3.05 (m, 4H), 2.94 (t, J=8.0Hz, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.11 (dt, J=21.3, 7.6Hz, 2H), 2.03-1.93 (m, 2H), 1.92-1.78 (m, 3H), 1.12 (d, J=8.0Hz, 6H), 0.87 (dd, J=13.0, 6.6Hz, 9H)。

[0446] 步骤9: 4-(5-(甲硫基)-1,2,4-噻二唑-3-基)苯甲酸甲酯 (LD2-6m)。向化合物LD2-6n (100mg, 0.47mmol) 在甲苯 (4mL) 和H₂O (1mL) 中的溶液中添加化合物LD2-6n (110mg, 0.57mmol)、K₂CO₃ (168mg, 0.95mmol) 和Pd (dppf) Cl₂·DCM (35mg, 0.047mmol)。将混合物在110℃下在N₂气氛下搅拌3小时。将混合物通过硅藻土垫过滤,用EtOAc (100mL) 稀释,用盐水 (50mL*4) 洗涤。将有机层经无水Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。将粗品通过快速柱色谱法 (用PE/EtOAc=0%~40%洗脱) 纯化。得到化合物LD2-6o (56mg, 44.4%产率),为灰白色固体。MS (ESI) m/z: 267.1 [M+H]⁺。

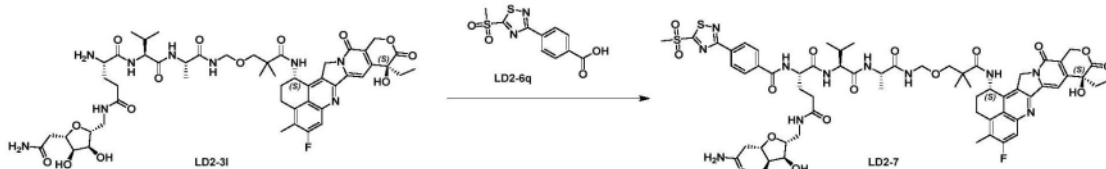
[0447] 步骤10: 4-(5-(甲硫基)-1,2,4-噻二唑-3-基)苯甲酸 (LD2-6p)。向化合物LD2-6o (54mg, 0.20mmol) 在MeOH (3mL) 和H₂O (1mL) 中的溶液中添加LiOH (17mg, 0.41mmol)。将混合物在室温下搅拌2小时。将混合物调节至pH 7并通过制备型HPLC (FA条件) 纯化,得到化合物LD2-6p (36mg, 70.3%产率),为白色固体。MS (ESI) m/z: 253.1 [M+H]⁺。

[0448] 步骤11: 4-(5-(甲基磺酰基)-1,2,4-噻二唑-3-基)苯甲酸 (LD2-6q)。向化合物LD2-6p (35mg, 0.14mmol) 在DCM (3mL) 和THF (3mL) 中的溶液中添加m-CPBA (96mg, 0.55mmol)。将混合物在室温下搅拌16小时。将混合物浓缩并通过制备型HPLC纯化 (方法: 柱: XBridge Prep C18 OBD 5um 19*150mm; 流动相: A-水 (0.1% TFA): B-乙腈; 流速: 20mL/min)。得到化合物LD2-6q (12mg, 99%纯度),为白色固体。MS (ESI) m/z: 284.8 [M+H]⁺。

[0449] 步骤12: (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -6-((S)-3-(((3-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[d']吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基)氨基)-2,2-二甲基-3-氧代丙氧基)甲基)氨基)-2-((S)-3-甲基-2-

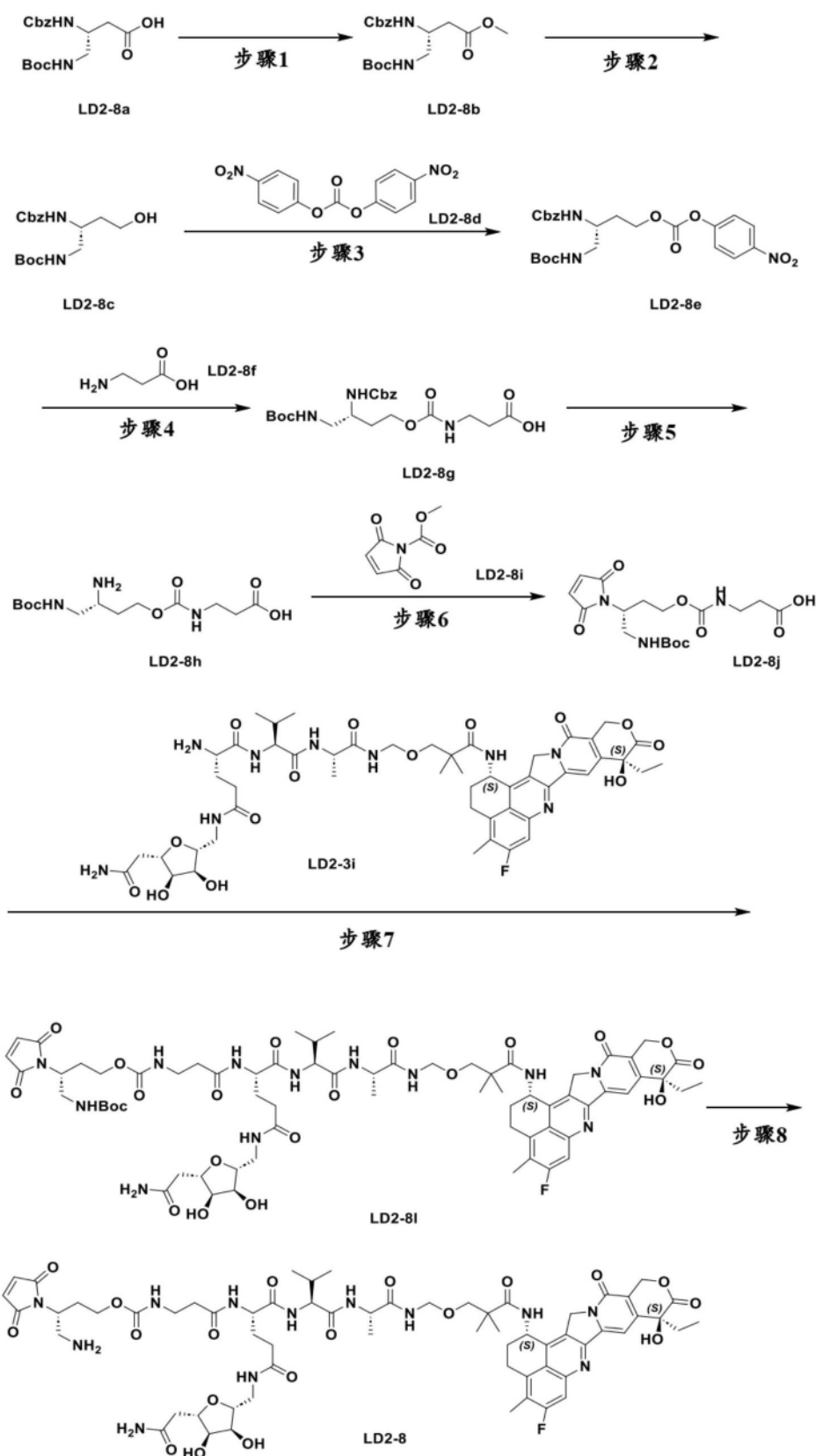
(4-(5-(甲基磺酰基)-1,2,4-噻二唑-3-基)苯甲酰胺基)丁酰胺基)-3-氧代丙氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-羧酸(LD2-6)。向化合物LD2-6q(7.4mg,0.026mmol)在DMF(2mL)中的溶液中添加HATU(9.4mg,0.024mmol)和DIEA(5.6mg,0.043mmol)。将混合物在室温下搅拌30分钟。将化合物LD2-6l(20mg,0.022mmol)添加到混合物中并在室温下搅拌15分钟。将反应通过制备型HPLC纯化(方法:柱:XBridge Prep C180BD 5um 19*150mm;流动相:A-水(0.1% TFA):B-乙腈;流速:20mL/min),得到化合物LD2-6(7.6mg,29.5%产率),为白色固体。MS(ESI)m/z:1193.5[M+H]⁺。

接头-细胞毒性剂LD2-7



[0450] 根据LD2-3的步骤7的程序合成LD2-7(32mg,50.9%产率)。MS(ESI)m/z:1303.0[M+H]⁺。

接头-细胞毒性剂LD2-8



[0451] 步骤1: (R)-3-(((苄氧基)羰基)氨基)-4-(((叔丁氧基羰基)氨基)丁酸甲酯 (LD2-8b)。将LD2-8a (2.00g, 5.68mmol) 和 K_2CO_3 (863mg, 6.24mmol) 添加到DMF (10mL) 中, 随后在0℃下逐滴添加 CH_3I (1.61g, 11.35mmol)。将所得混合物在0℃下搅拌20分钟, 并使其升温至25℃并在25℃下进一步搅拌60分钟。通过TLC (PE/EA) 和LCMS监测反应过程。完全反应后, 将反

应混合物用EA (80mL) 稀释并用盐水 (30mL*3) 和H₂O (30mL*2) 洗涤。将有机层经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩, 得到LD2-8b的甲酯 (2.08g, 定量), 为浅黄色固体。MS (ESI) m/z: 267.2 [M-Boc+H]⁺。

[0452] 步骤2: (4-羟基丁烷-1,2-二基) (R)-二氨基甲酸苄基叔丁酯 (LD2-8c)。将LD2-8b (1.00g, 2.73mmol) 溶解于MeOH (15mL) 中, 随后在0℃下添加LiBH₄ (THF中的2M储备溶液, 6.80mL)。将所得混合物在25℃下搅拌2小时。通过LCMS和TLC监测反应过程。完全反应后, 添加饱和NH₄Cl水溶液 (10mL) 以淬灭反应。将反应混合物用H₂O (80mL) 稀释并用EA (50mL*3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (40mL*2) 和水 (40mL*2) 洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩, 并通过快速柱色谱法 (PE/EA) 进一步纯化, 得到LD2-8c (760mg, 82.3%产率), 为白色固体。MS (ESI) m/z: 239.2 [M-Boc+H]⁺。

[0453] 步骤3: (4-(((4-硝基苯氧基) 羰基) 氧基) 丁烷-1,2-二基) (R)-二氨基甲酸苄基叔丁酯 (LD2-8e)。将LD2-8c (300mg, 0.89mmol) 和LD2-8d (405mg, 1.33mmol) 溶解于DMF (5mL) 中, 随后添加DIEA (229mg, 1.77mmol)。将所得混合物在25℃下搅拌1.5小时。完全反应后, 将反应混合物用EA (100mL) 稀释并用盐水 (35mL*2) 和水 (35mL*2) 洗涤。将有机层经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩, 得到LD2-8e, 为白色固体 (371mg, 83.1%产率)。MS (ESI) m/z: 404.4 [M-Boc+H]⁺。

[0454] 步骤4: (4-(((3-(二甲基氨基)-3-氧代丙基) 氨基甲酰基) 氧基) 丁烷-1,3-二基) (S)-二氨基甲酸 (9H-芴-9-基) 甲酯 (LD2-8g)。将LD2-8e (420mg, 0.83mmol) 和LD2-8f (149mg, 1.67mmol) 溶解于DMF (5mL) 中, 随后添加NaHCO₃水溶液 (1M, 5mL)。将所得混合物在25℃下搅拌2.5小时。完全反应后, 将反应混合物浓缩并通过快速柱色谱法 (DCM/MeOH) 纯化, 得到LD2-8g, 为淡黄色固体 (365mg, 96.5%产率)。MS (ESI) m/z: 354.4 [M-Boc+H]⁺。

[0455] 步骤5: (R)-7-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2,2-二甲基-4,11-二氧代-3,10-二氧杂-5,12-二氮杂十五烷-15-酸 (LD2-8h)。将LD2-8g (360mg, 0.79mmol) 溶解于MeOH (18mL) 中, 随后添加Pd/C (湿碱, 108mg)。将所得混合物在室温下在H₂ (15psi) 下搅拌2小时。完全反应后, 将反应混合物过滤并在减压下浓缩, 得到LD2-8h, 为澄清糖浆 (252mg, 99.4%产率)。粗产物无需纯化直接用于下一步骤。MS (ESI) m/z: 320.3 [M+H]⁺。

[0456] 步骤6: (R)-7-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2,2-二甲基-4,11-二氧代-3,10-二氧杂-5,12-二氮杂十五烷-15-酸 (LD2-8j)。将LD2-8h (250mg, 0.78mmol) 和LD2-8i (243mg, 1.57mmol) 溶解于ACN (8mL) 和NaHCO₃水溶液 (1M, 16mL) 的混合溶剂中。将所得混合物在0℃下搅拌1小时, 并在25℃下进一步搅拌, 直至反应完成。然后将反应混合物用KHSO₄水溶液 (20mL) 酸化并用EA (35mL*3) 萃取。将合并的有机层经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩, 得到黄色油状物, 为粗产物, 通过快速柱色谱对其进行纯化, 得到LD2-8j (280mg, 89.6%产率), 为白色固体。MS (ESI) m/z: 422.3 [M+Na]⁺。 ¹H NMR (400MHz, d₆-DMSO) δ 12.48 (s, 1H), 7.03-7.01 (m, 2H), 6.99 (s, 2H), 4.08-4.03 (m, 3H), 3.86-3.83 (m, 2H), 3.14-3.11 (m, 2H), 2.35 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.16-2.09 (m, 1H), 1.9LD2-8.84 (m, 1H), 1.32 (s, 9H)。

[0457] 步骤7: ((8S, 11S, 14S)-14-(3-(((2R, 3S, 4R, 5S)-5-(2-氨基-2-氧代乙基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲基) 氨基)-3-氧代丙基)-1-(((1S, 9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H'12'-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-1-基) 氨基)-11-异丙基-2,2,8-三甲基-1,7,10,13,16-五氧代-4-氧杂-6,

9,12,15-四氮杂十八烷-18-基) 氨基甲酸(R)-4-((叔丁氧基羰基) 氨基)-3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基) 丁酯(LD2-81)。根据实例LD2-3的步骤7的程序合成LD2-81(32mg, 50.9%产率)。MS (ESI)m/z:1418.1[M+H]⁺。

[0458] 步骤8: ((8S,11S,14S)-14-(3-(((2R,3S,4R,5S)-5-(2-氨基-2-氧代乙基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲基) 氨基)-3-氧代丙基)-1-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H'12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基) 氨基)-11-异丙基-2,2,8-三甲基-1,7,10,13,16-五氧代-4-氧杂-6,9,12,15-四氮杂十八烷-18-基) 氨基甲酸(R)-4-氨基-3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基) 丁酯(LD2-8)。将LD2-81(22mg,0.016mmol) 溶解于DCM(2mL) 的混合溶剂中,随后添加ZnBr₂(151mg,0.67mmol)。将所得悬浮液在40℃下搅拌12小时。完全反应后,将反应混合物过滤并浓缩。将残余物用CH₃CN/0.1% FA水溶液的混合溶剂稀释并通过制备型HPLC纯化(方法:柱:XBridge Prep C18 OBD 5μm 19*250mm;流动相:A-水(0.1% TFA):B-乙腈;流速:20mL/min),得到化合物LD2-8(13mg,61.7%产率),为白色固体。MS (ESI)m/z:1318.1[M+H]⁺。

实例17. 抗体药物缀合物(ADC)的制备和评价方法

[0459] 参考ADC BGA7650(表18)的制备。在0-37℃下在0.5-48小时内将有机溶剂(例如,DMSO、DMF、DMA、PG、乙腈,0-25%v/v)和接头-有效载荷(2-25当量,有机溶剂中的10mM储备液)逐步添加到具有抗CEA抗体特赛妥单抗(tusamitamab)(1-20mg/mL)的反应缓冲液(PBS缓冲液,pH 6.0-9.0)中。将溶液缓冲液交换(旋转脱盐柱、超滤和透析)到储存缓冲液(例如,pH 5.5-6.5组氨酸乙酸盐缓冲液,具有任选的添加剂诸如蔗糖、海藻糖、吐温20、60、80)中。

[0460] 药物与抗体比率(DAR)测定:LCMS方法。在以下测量条件下进行LC-MS分析:

LC-MS系统:Vanquish Flex UHPLC和Orbitrap Exploris 240质谱仪

柱:MAbPacTMRP,2.1*50mm,4μm,1,500 Å,Thermo ScientificTM

柱温:80℃

流动相A:0.1%甲酸(FA)水溶液;流动相B:含有0.1%甲酸(FA)的乙腈溶液;梯度程序:25%B-25%B(0min-2min)、25%B-50%B(2min-18min)、50%B-90%B(18min-18.1min)、90%B-90%B(18.1min-20min)、90%B-25%B(20min-20.1min)、25%B-25%B(20.1min-25min)

进样量:2μg;MS参数:在HMR模式下在R=15k的设置下获得完整和变性MS数据,并且在Thermo ScientificTM BioPharma FinderTM 4.0软件中使用ReSpectTM算法和滑动窗口积分进行去卷积。

[0461] DAR 8抗体药物缀合物的制备。将缀合缓冲液中的抗体(浓度为0.5-25mg/mL,PBS缓冲液pH 6.0-8.5)在还原温度(0-40℃)下孵育10分钟,并将8-15当量TECP溶液(PBS缓冲液中的5mM储备液)添加到反应混合物中,并使还原反应在还原温度下保持1-8小时。在将还原混合物冷却至0-25℃后,逐步添加有机溶剂(例如,DMSO、DMF、DMA、PG、乙腈,0-25%v/v)和接头-有效载荷储备液(10-25当量,有机溶剂中的10mM储备液)。将缀合溶液在0-25℃下放置1-3小时,并用N-乙酰基半胱氨酸(1mM储备液)淬灭反应。将溶液缓冲液交换(旋转脱盐柱、超滤和透析)到储存缓冲液(例如,pH 5.5-6.5组氨酸乙酸盐缓冲液,具有任选的添加剂

诸如蔗糖、海藻糖、吐温20、60、80)中。

[0462] 缀合后的马来酰亚胺水解。在缀合步骤后,将ADC缓冲液交换到开环缓冲液(pH 7.0-9.0,PBS,硼酸盐或Tris缓冲液)中,并将溶液在22或37℃下放置5-48小时。经由还原LCMS监测开环过程。一旦缀合的马来酰亚胺水解完成,就经由透析将所得ADC缓冲液交换到碱性Tris pH 8.0-8.5缓冲液或酸性组氨酸-乙酸盐pH5.0-6.5缓冲液中。

[0463] ADC表征。通过遵循DAR 8概况的上述程序制备ADC实例。经由以下分析方法表征所有ADC。通过LCMS方法或疏水性相互作用柱(HIC)方法测定ADC的药物与抗体比率(DAR)。构建的ADC的SEC纯度均>95%。

DAR测定

[0464] LCMS方法。在以下测量条件下进行LC-MS分析:

LC-MS系统:Vanquish Flex UHPLC和Orbitrap Exploris 240质谱仪

柱:MABPacTMRP,2.1*50mm,4μm,1,500 Å,Thermo ScientificTM

柱温:80℃

流动相A:0.1%甲酸(FA)水溶液

流动相B:含有0.1%甲酸(FA)的乙腈溶液

梯度程序:25%B-25%B(0min-2min)、25%B-50%B(2min-18min)、50%B-90%B(18min-18.1min)、90%B-90%B(18.1min-20min)、90%B-25%B(20min-20.1min)、25%B-25%B(20.1min-25min)

进样量:1μg

MS参数:在HMR模式下在R=15k的设置下获得完整和变性MS数据,并且在Thermo ScientificTM BioPharma FinderTM 4.0软件中使用ReSpectTM算法和滑动窗口积分进行去卷积。

[0465] HIC方法。在以下测量条件下进行HPLC分析:

HPLC系统:Waters ACQUITY ARC HPLC系统

检测器:测量波长:280nm

柱:Tosoh Bioscience 4.6μm ID×3.5cm,2.5μm丁基-无孔树脂柱

柱温:25℃

流动相A:1.5M硫酸铵、50mM磷酸盐缓冲液,pH 7.0

流动相B:50mM磷酸盐缓冲液、25%(V/V)异丙醇,pH 7.0

梯度程序:0%B-0%B(0min-2min)、0%B-100%B(2min-15min)、100%B-100%B(15min-16min)、100%B-0%B(16min-17min)、0%B-0%B(17min-20min)进样量:20μg

ADC纯度:SEC方法

[0466] 在以下测量条件下进行HPLC分析:

HPLC系统:Waters H-Class UPLC系统

检测器:测量波长:280nm

柱:ACQUITY UPLC BEH200 SEC 1.7um 4.6x150mm,Waters

柱温:室温

流动相A:200mM磷酸盐缓冲液、250mM氯化钾、15%异丙醇,PH 7.0

梯度程序:在10min等度洗脱下,流动速率为0.3mL/min

进样量:20 μ g

ADC疏水性评价:HIC

[0467] 具有更大疏水特性的ADC在HIC色谱法的稍后保留时间出现。

[0468] 在以下测量条件下进行HPLC分析:

方法1

HPLC系统:Waters ACQUITY ARC HPLC系统

检测器:测量波长:280nm

柱:Tosoh Bioscience 4.6 μ m ID $\times$ 3.5cm,2.5 μ m丁基-无孔树脂柱

柱温:25 $^{\circ}$ C

流动相A:1.5M硫酸铵、50mM磷酸盐缓冲液,pH 7.0

流动相B:50mM磷酸盐缓冲液、25% (V/V) 异丙醇,pH 7.0

梯度程序:0%B-0%B(0min-2min)、0%B-100%B(2min-15min)、100%B-100%B(15min-16min)、100%B-0%B(16min-17min)、0%B-0%B(17min-20min)

进样量:20 μ g

方法2

[0469] HPLC系统:Waters ACQUITY ARC HPLC系统

检测器:测量波长:280nm

柱:MABPac HIC-10,5 μ m,4.6 $\times$ 10mm(热电公司(Thermo))

柱温:25 $^{\circ}$ C

流动相A:1.5M硫酸铵、50mM磷酸钠,pH 7.0

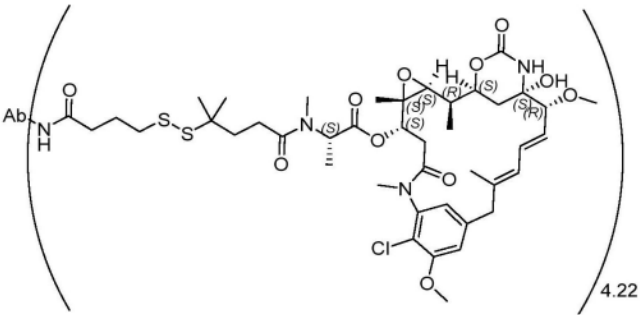
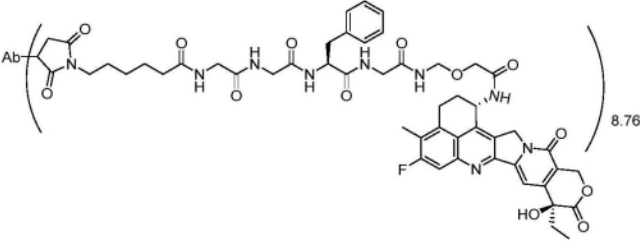
流动相B:50mM磷酸钠,pH 7.0

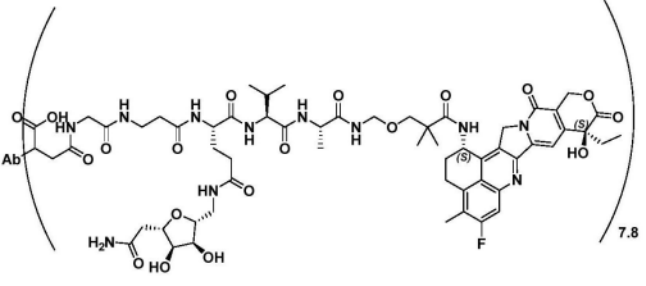
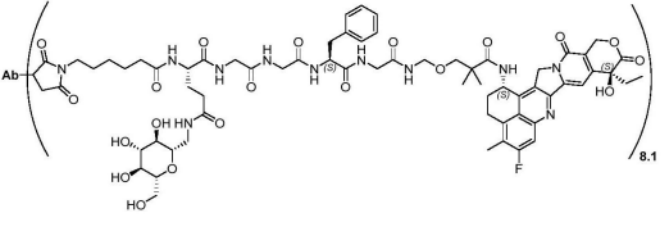
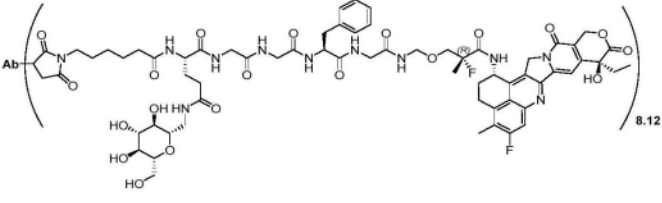
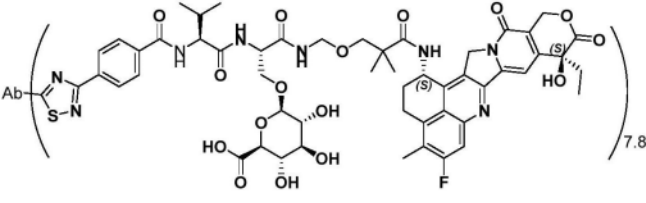
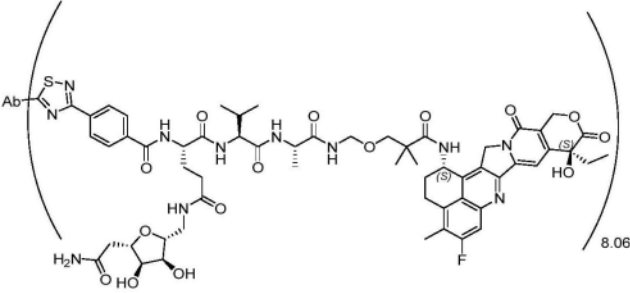
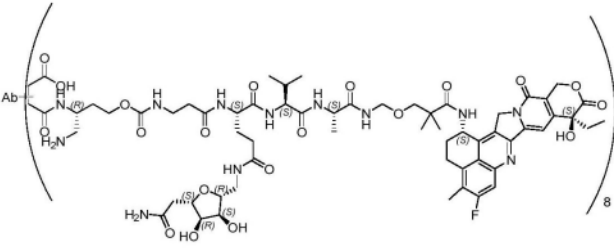
梯度程序:20%B-20%B(0min-1min)、0%B-0%B(1min-35min)、20%B-20%B(35min-40min)

流速:0.5mL/min

样品制备:将样品用初始流动相稀释至0.5mg/mL。

表18:所构建的缀合物

ADC 编号	抗体	ADC 结构
BGA7650	特赛妥单抗 (参考抗体)	
BGA2588	BGA5384	

BGA9962	BGA5384	
BGA8357	BGA5384	
BGA0084	BGA5384	
BGA7413	BGA5384	
BGA2490	BGA5384	
BGA0179	BGA5384	

特赛妥单抗序列

>LC

DIQMTQSPASLSASVGDRTTTCRASENIFSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNTRTLAEGVPSRFSGSGSG

TDFSLTISSLQPEDFATYYCQHGYGTPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:105)

>HC

EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSYDMSWVRQTPERGLEWVAYISSGGGITYAPSTVKGRF
TVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSP
GK (SEQ ID NO:106)

细胞系信息

MKN45 (JCRB, JCRB0254)

[0470] MKN45是一种表现出圆形形态的细胞系。它松散地附着到1998年从一名62岁胃癌女性的胃组织中分离出来的基质上。MKN45购自JCRB。MKN45的基础培养基是RPMI-1640培养基(吉毕科公司(Gibco)22400089)。为了制备完全生长培养基,将以下组分添加到基础培养基中:胎牛血清,使最终浓度为10%(吉毕科公司,10099-141C)。使细胞系在湿润的5% CO₂气氛中在37℃下生长,并且用MycoAlert™ PLUS支原体检测试剂盒(龙沙公司(Lonza), LT07-710)定期测试支原体的存在。

SNU-16 (ATCC, CRL-5974)

[0471] SNU-16是一种表现出上皮形态的细胞系,于1987年从一名33岁女性亚洲胃癌患者化疗前的腹水中分离出来,并且SNU16购自ATCC。SNU16的基础培养基是RPMI-1640培养基(吉毕科公司(Gibco)22400089)。为了制备完全生长培养基,将以下组分添加到基础培养基中:胎牛血清,使最终浓度为10%(吉毕科公司,10099-141C)。使细胞系在湿润的5% CO₂气氛中在37℃下生长,并且用MycoAlert™ PLUS支原体检测试剂盒(龙沙公司(Lonza), LT07-710)定期测试支原体的存在。

NCI-H2122 (ATCC, CRL-5985)

[0472] NCI-H2122细胞是1989年从一名46岁女性吸烟者的胸腔积液转移瘤中分离出来的淋巴母细胞,并且NCI-H2122购自ATCC。NCI-H2122的基础培养基是RPMI-1640培养基(吉毕科公司(Gibco)22400089)。为了制备完全生长培养基,将以下组分添加到基础培养基中:胎牛血清,使最终浓度为10%(吉毕科公司,10099-141C)。使细胞系在湿润的5% CO₂气氛中在37℃下生长,并且用MycoAlert™ PLUS支原体检测试剂盒(龙沙公司(Lonza), LT07-710)定期测试支原体的存在。

LS174T (ATCC, CL-188)

[0473] LS174T是一种表现出上皮形态的细胞系,从一名患有结直肠癌的白人58岁女性腺癌患者的结肠中分离出来,并且LS174T购自ATCC。LS174T的基础培养基是ATCC配制的伊格尔氏最低必需培养基(30-2003)。为了制备完全生长培养基,将以下组分添加到基础培养基中:胎牛血清,使最终浓度为10%(吉毕科公司,10099-141C)。使细胞系在湿润的5% CO₂气氛中在37℃下生长,并且用MycoAlert™ PLUS支原体检测试剂盒(龙沙公司(Lonza), LT07-

710) 定期测试支原体的存在。

MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26)

[0474] MDA-MB-231是一种上皮样细胞,从一名患有腺癌的40岁白人女性的乳腺中分离出来,并且MDA-MB-231购自ATCC。MDA-MB-231的基础培养基是RPMI-1640培养基(吉毕科公司(Gibco) 22400089)。为了制备完全生长培养基,将以下组分添加到基础培养基中:胎牛血清,使最终浓度为10% (吉毕科公司,10099-141C)。使细胞系在湿润的5% CO₂气氛中在37℃下生长,并且用MycoAlert™ PLUS支原体检测试剂盒(龙沙公司(Lonza), LT07-710) 定期测试支原体的存在。

HCT116 (ATCC, CCL-247)

[0475] HCT116细胞系从一名患有结肠癌的成年男性的结肠中分离出来,在ras原癌基因的密码子13中具有突变,并且购自ATCC。MDA-MB-231的基础培养基是RPMI-1640培养基(吉毕科公司(Gibco) 22400089)。为了制备完全生长培养基,将以下组分添加到基础培养基中:胎牛血清,使最终浓度为10% (吉毕科公司,10099-141C)。使细胞系在湿润的5% CO₂气氛中在37℃下生长,并且用MycoAlert™ PLUS支原体检测试剂盒(龙沙公司(Lonza), LT07-710) 定期测试支原体的存在。

另外的细胞系

[0476] SW1463细胞来源于人结直肠腺癌并且表达中等水平的CEA。

[0477] NCI-N87表达低水平的CEA并且来源于胃癌。

[0478] HT29细胞的CEA表达低甚至为阴性并且来源于人结直肠腺癌。

表19:细胞系及其CEA表达水平

细胞系	供应商	目录号	CEA 水平 (分子量 (达科公司 (Dako) 试剂盒))
MKN45	JCRB	JCRB0254	~200K
SNU16	ATCC	CRL-5974™	~100K
Ls174T	ATCC	CL-188™	~13K
NCI-H2122	ATCC	CRL-5985™	~18K
MDA-MB-231	ATCC	HTB-26™	0
HCT116	ATCC	CCL-247™	0

实例18. 与各种有效载荷缀合的CEA抗体的体外细胞杀伤

[0479] 根据实例17,使用公司内部产生的接头和各种有效载荷缀合BGA5384抗体(表20)。将BGA5384与马坦霉素DM4(图13)、奥瑞他汀MMAE(图14)和拓扑异构酶DXD(BGA2588)(图15)缀合。

表20:BGA5384的氨基酸序列

SEQ ID NO:99	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT SYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREYGNINYPLDYGQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	BGA5384 (BGA7592 -1K) 重链
SEQ ID NO:100	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASENQYGYLA WYQQKPGKVPKLL IY NYKNLVE GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHHLGTPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	BGA5384 (BGA7592 -1K) 轻链

[0480] 为了测定每种ADC的细胞杀伤量,将具有不同CEA表达水平的细胞系(实例17;表20)接种在96孔板中并在37℃下孵育过夜。添加系列稀释的ADC,然后将细胞培养6天并进行细胞活力测定。如图13-15所示,所有CEA抗体药物缀合物在低浓度的CEAADC下在高至中等CEA表达细胞中都显示出良好的细胞杀伤。在低至低-阴性至阴性表达的CEA细胞中,需要高浓度的CEA ADC才能显示出细胞杀伤。这些数据表明,BGA5384抗体可以与各种有效载荷缀合并且在一系列CEA表达细胞中实现细胞杀伤。

实例19.有效载荷灵敏度:MKN45

[0481] 有效载荷对MKN45细胞的影响在图16中示出。在第0天,用0.25%胰蛋白酶-EDTA收获细胞,将其以5,000个细胞/孔铺板在96孔板(655090,格瑞纳公司(Greiner))中,并在37℃、5% CO₂下孵育过夜。在第1天,将有效载荷化合物(5倍稀释液)添加到板中。将细胞和化合物混合物在37℃、5% CO₂下孵育6天。在第6天用100μL检测试剂(G7573, Promega®)收集存活细胞信号;通过Tecan Spark®读取信号。通过GraphPad Prism 9.0.0分析数据。所有杀伤浓度均重复两次或重复三次(表21和图16)。“SABC”是指特异性抗体结合能力。

表21:有效载荷对MKN45细胞的影响

有效载荷	MKN45	
	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
P1	97.6	1.16
P2	98.1	2.08
P3	97.0	0.89

实例20.ADC直接细胞杀伤测定

[0482] 图17-20分别示出了8种不同构建的ADC(参见表18)在MKN45(胃癌)、H2122(肺腺

癌)、LS174T(结直肠腺癌)和MB-231(乳腺癌)患者来源的细胞系中的细胞活性。

[0483] 在第0天,用0.25%胰蛋白酶-EDTA收获细胞,将其以5,000个细胞/孔(MKN45或Ls174T)或2,000个细胞/孔(NCI-H2122或MDA-MB-231)铺板在96孔板(655090,格瑞纳公司)中,并在37℃、5% CO₂下孵育过夜。在第1天,将ADC(5倍稀释液)添加到板中。将细胞和ADC混合物在37℃、5% CO₂下孵育6天。在第6天用100μL检测试剂(G7573, Promega®)收集存活细胞信号;通过Tecan Spark®读取信号。通过GraphPad Prism 9.0.0分析数据。所有的杀伤浓度均重复两次或重复三次。呈现了MKN45(表22和图17)、NCI-H2122(表23和图18)、Ls174T(表24和图19)和MDA-MB0231(表25和图20)细胞中的每一种的结果。

表22:ADC对MKN45细胞系的细胞活性

ADC	MKN45	
	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
BGA7650	78.2	0.55
BGA2588	85	0.46
BGA9962	87.1	0.39
BGA8357	89.1	0.38
BGA0084	88.8	0.38
BGA7413	87.2	0.46
BGA2490	89	0.44
BGA0726	89.1	0.3

表23:ADC对NCI-H2122细胞系的细胞活性

ADC	NCI-H2122	
	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
BGA7650	99	0.16
BGA2588	74	0.22
BGA9962	80	0.17
BGA8357	83.9	0.14
BGA0084	83.8	0.19
BGA7413	81.5	0.16
BGA2490	82.8	0.19
BGA0726	81.2	0.16

表24:ADC对Ls147T细胞系的细胞活性

ADC	LS174T	
	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
BGA7650	82.5	1.44
BGA2588	69.7	1.12
BGA9962	66.7	0.83
BGA8357	71.8	0.67
BGA0084	69.9	0.85
BGA7413	66.9	0.88
BGA2490	70.3	0.76
BGA0726	69.7	0.62

表25:ADC对MDA-MB-231细胞系的细胞活性

ADC	MDA-MD-231	
	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
BGA7650	61.6	20
BGA2588	23.6	>100
BGA9962	5.2	27

BGA8357	42.4	26
BGA0084	27.4	25
BGA7413	0.4	28
BGA2490	16.9	21
BGA0726	10.7	24

实例21.ADC BGA7650和BGA9962在细胞系来源的异种移植模型中的功效。

[0484] 如下所述产生使用MKN-45 (CEA高表达) (胃腺癌)、SW-1463 (CEA中等) (直肠腺癌) 和NCI-H2122 (CEA低) (肺腺癌) 的细胞系来源的异种移植 (CDX) 模型。

[0485] 在补充有10% (v/v) 胎牛血清、100U/ml青霉素和100μg/mL链霉素的RPMI-1640培养基中培养细胞。在植入当天,收集细胞并将其重悬于冷(4℃)无血清RPMI-1640培养基中。将细胞密度调整为2 (MKN-45)、1.5 (SW1463) 或4 (NCI-H2122) × 10⁷个细胞/mL,并在接种前将细胞置于冰上。

[0486] 购买六至八周龄雌性小鼠并将其饲养在通风的笼子中,随意给予食物和水,并在接种前使其适应大约1周。分别通过将2.0 (MKN-45)、3.0 (SW1463) 或8.0 (NCI-H2122) × 10⁶

个细胞皮下注射到NCG、NCG和Balb/c裸小鼠体内在右肋腹上诱导MKN-45、SW-1463和NCI-H2122肿瘤。

[0487] 在注射癌细胞后大约2-3周进行实验。对于肿瘤体积测量,用卡尺测量所有肿瘤,并且使用公式 $V=0.5(a \times b^2)$ 计算肿瘤体积,其中“a”是肿瘤长度,并且“b”是肿瘤宽度和/或高度。当肿瘤体积的大小达到大约200mm³时,在第0天将小鼠随机分成5组,媒介物、BGA7650和BGA9962组中分别有8只、9只和9只动物。确保所有队列开始时的平均肿瘤体积大致相等后,在治疗第1天向动物静脉内施用媒介物、BGA7650(1.3mg/kg或4mg/kg;或“mpk”)和BGA9962(2mg/kg或6mg/kg)。每周两次测量动物体重和肿瘤体积。数据表示为平均肿瘤体积±平均值的标准差(SEM)。使用以下公式计算肿瘤生长抑制(TGI):

$$\%TGI = [1 - (\text{治疗}T_t - \text{治疗}T_0) / (\text{媒介物}T_t - \text{媒介物}T_0)] \times 100\%$$

治疗 T_t = 第 t 天给药组的平均肿瘤体积

治疗 T_0 = 第0天给药组的平均肿瘤体积

媒介物 T_t = 第 t 天媒介物组的平均肿瘤体积

媒介物 T_0 = 第0天媒介物组的平均肿瘤体积

结果

[0488] 在使用MKN-45(图21)、SW-1463(图22)和NCI-H2122(图23)的细胞系来源的异种移植(CDX)模型中,与媒介物组相比,BGA9962和BGA7650治疗组减缓了肿瘤生长。

在这三种CDX模型中,BGA9962和BGA7650均显示出剂量依赖性功效(图21、22和23)。4mg/kg而不是1.3mg/kg的BGA7650诱导了显著的抗肿瘤功效。2mg/kg的BGA9962与1.3mg/kg的BGA7650相比表现出优异的抗肿瘤功效,并且与4mg/kg的BGA7650的功效相当。另外,6mg/kg的BGA9962显著减少了肿瘤生长,并且表现出比两种剂量(1.3和4mg/kg)的BGA7650更高的抗肿瘤效果。所有动物均能很好地耐受治疗,没有显著的体重下降或异常的临床观察结果。

实例22.BGA7650和BGA9962在人患者来源的胃癌异种移植模型中的功效。

[0489] 在如实例21所述启动的人患者来源的胃癌(“GC”)异种移植模型(图24)中评价BGA7650和BGA9962的抗肿瘤作用。用4mg/kg BGA7650、2mg/kg BGA9962或6mg/kg BGA9962进行单剂量治疗分别在治疗第24天诱导了22%($P=0.8444$)、106%($P<0.0001$)和107%($P<0.0001$)的肿瘤生长抑制(TGI)率。两种剂量(2mg/kg和6mg/kg)的BGA9962表现出比4mg/kg的BGA7650显著更高的抗肿瘤活性(图24和表26)。所有动物均能很好地耐受治疗,没有显著的体重下降或异常的临床观察结果。

表26:治疗第24天时BGA7650和BGA9962的TGI测量结果。

ADC	T24时的TGI (%)
BGA7650 4mg/kg	22
BGA9962 2mg/kg	106
BGA9962 6mg/kg	107

实例23.非荷瘤小鼠中3mg/kg(i.v.)的单剂量PK

[0490] 如实例21所述向Balb/c裸(非荷瘤)小鼠施用3mg/kg(i.v.)的单剂量的BGA9962或BGA7650,并评价药代动力学。与BGA7650相比,BGA9962在Balb/c裸(非荷瘤)小鼠($n=3$)中显示出强药代动力学(PK)特征(图25)。BGA9962表现出优于比较物BGA7650的PK。与BGA7650

(由实线连接的三角形)相比,BGA9962(由虚线连接的三角形)在血浆中产生较低的无血清有效载荷。

[0491] 对于比较物BGA7650(实线连接空心圆),在TAb(总抗体)与ADC之间观察到分离,但对于BGA9962(实线连接空心正方形),没有观察到分离。这些结果证实了与BGA7650相比,BGA9962随时间具有稳定的DAR。在体外,BGA9962在小鼠和人血浆中是稳定的,在孵育336小时后DAR没有变化(数据未示出)。

实例24. 体内DAR定量和比较稳定性

[0492] 通过完整LC-MS分析BGA7650和BGA9962的体内药物与抗体比率(DAR)。将血清样品(来自用3mg/k的单次i.v.剂量的ADC处理的Ba1b/c裸小鼠,每组n=3)加工成来自ADC的重链(HC)和轻链(LC)的有效载荷缀合的肽。分析DAR质谱以计算每条链的平均DAR,并且使用下式计算完整ADC的平均DAR: $DAR = (DAR(LC) + DAR(HC)) \times 2$ 。

[0493] 由于BGA7650在非特定位置处通过赖氨酸具有有效载荷缀合,因此难以进行完整的LC-MSDAR分析。相反,通过使用免疫捕获随后使用抗Fc(用于总抗体检测)和LC-MS(用于缀合的有效载荷检测)分析总缀合的有效载荷与总抗体浓度的比率来间接测量BGA7650的体内DAR。因此,图26示出了BGA9962在体内将稳定的DAR保持在8,解缀合最小,而BGA7650随时间稳定地解缀合。

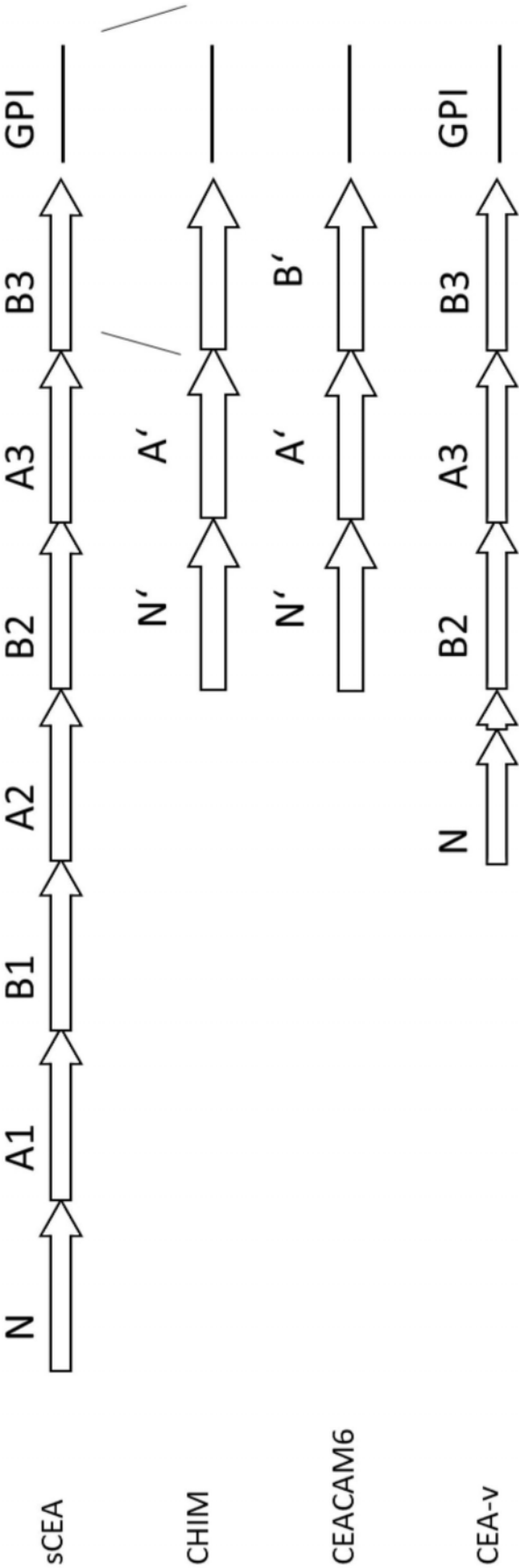


图1

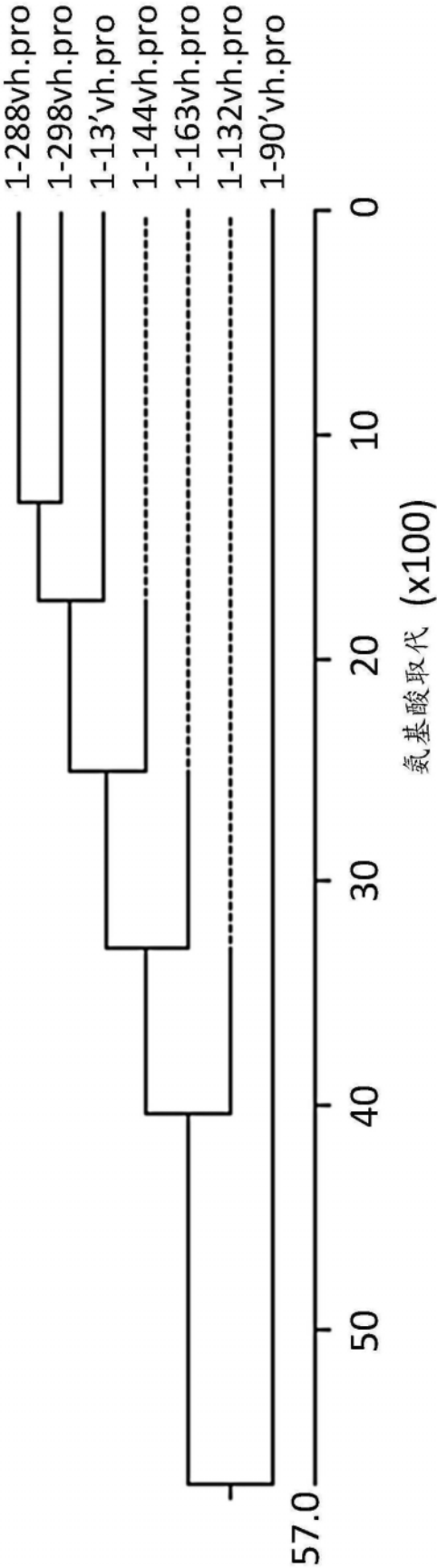


图2A

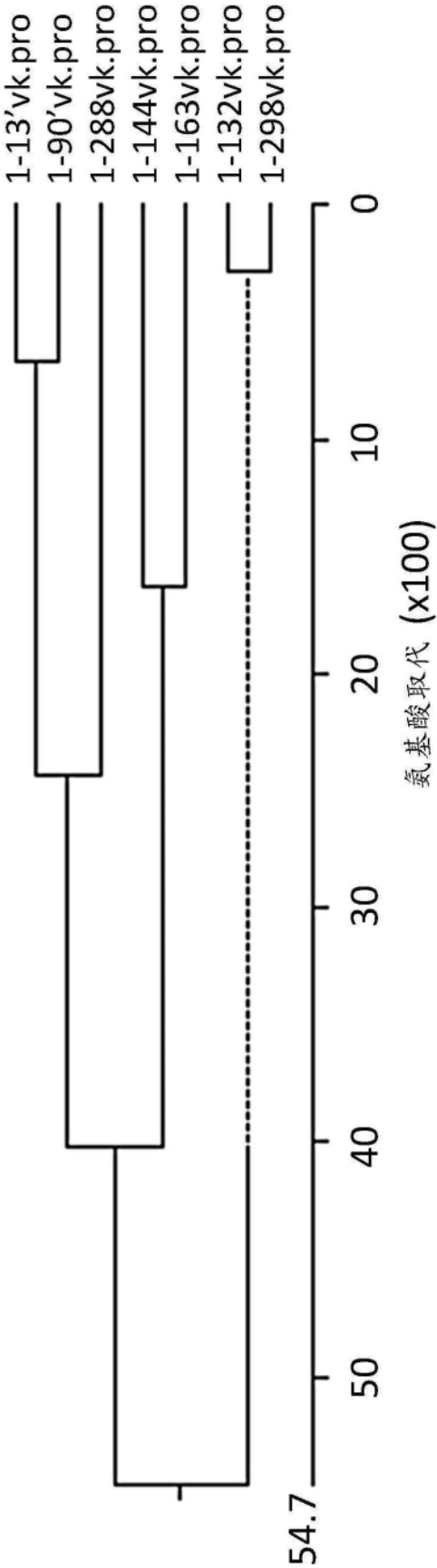


图2B

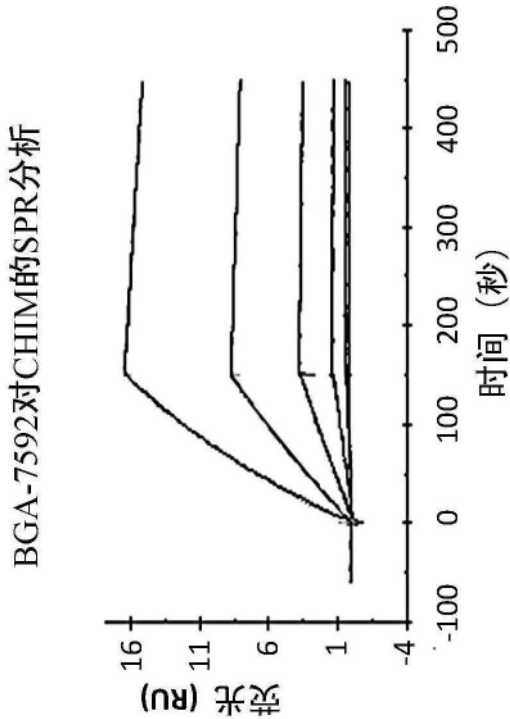


图3A

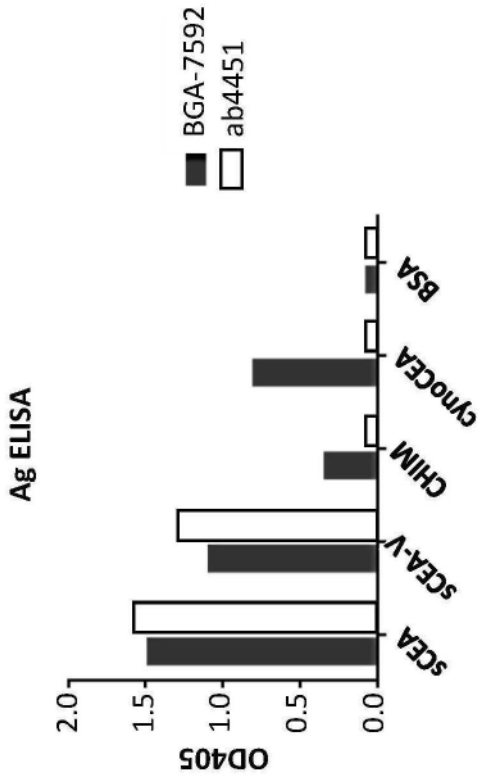


图3B

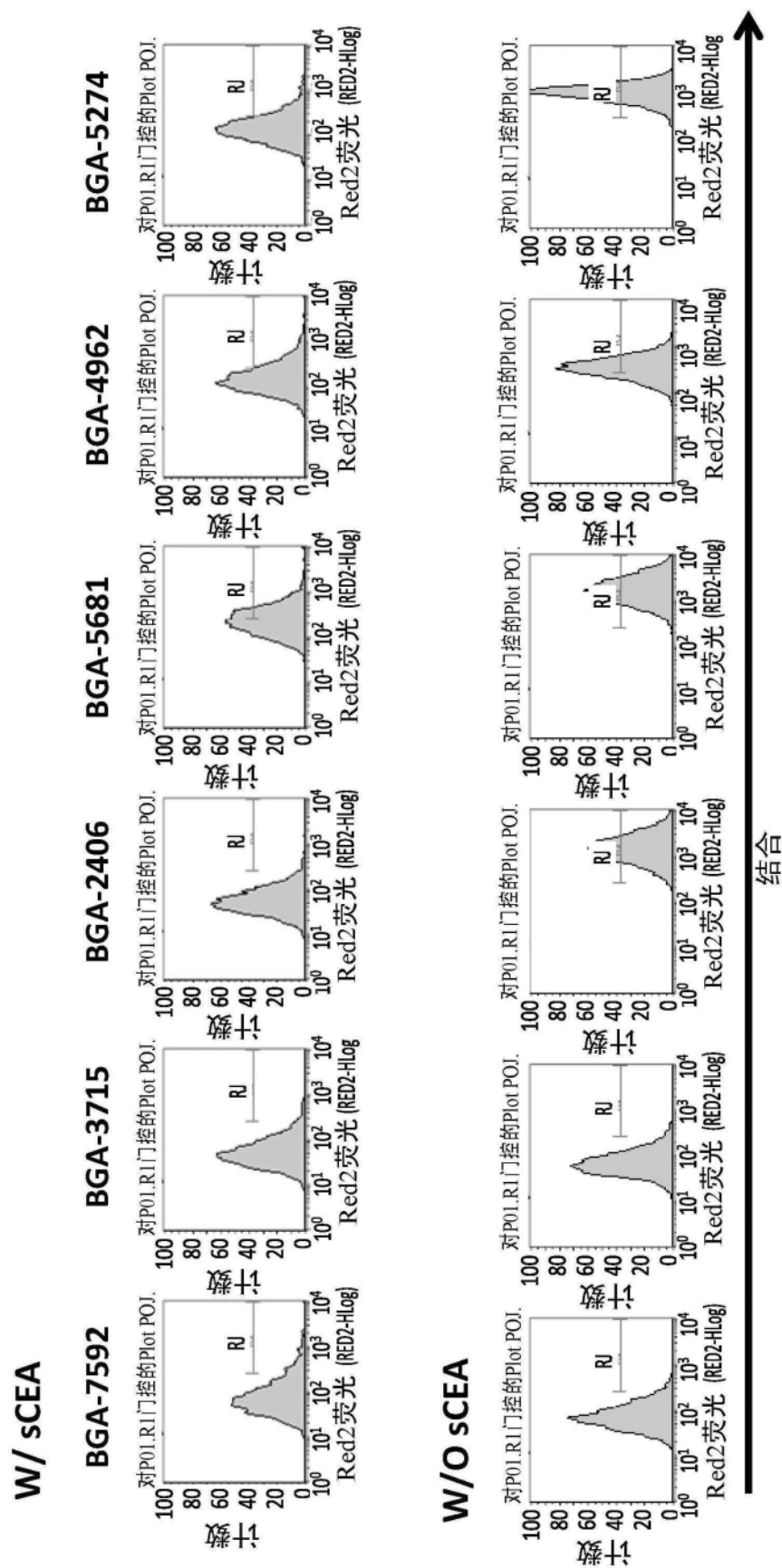


图4A

可溶性CEA对CEA抗体与MKN45细胞结合的影响

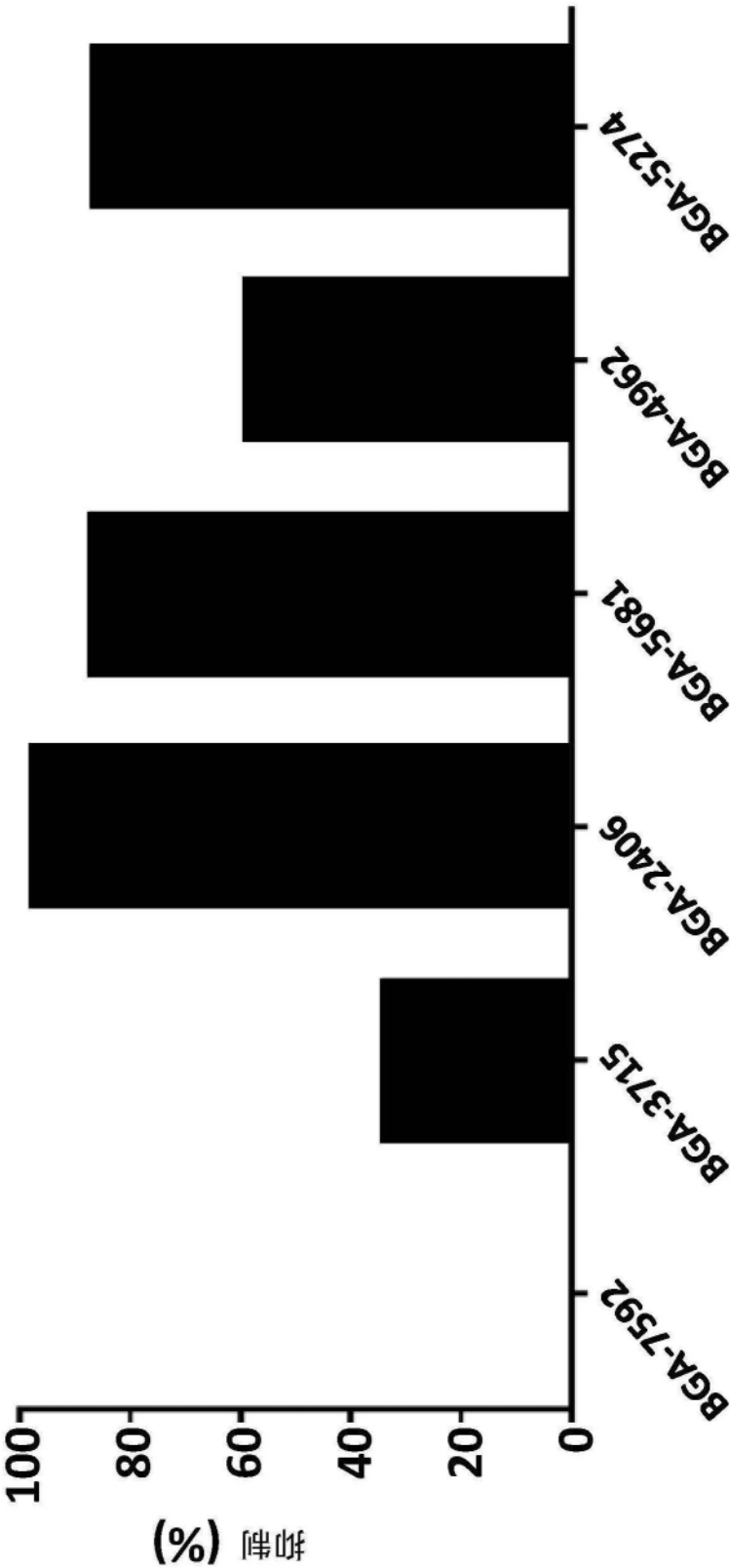


图4B

LCDR1						LCDR2				LCDR3								
31	32	33	40	41	42	70	71	72	73	130	131	132	133	134	135	136	137	138
E	N	I	Y	G	Y	N	A	K	N	Q	H	H	Y	G	T	P	Y	T

图5A

HCDR1						HCDR2						HCDR3															
31	32	33	39	40	41	60	61	65	66	67	68	69	70	71	72	74	75	76	119	120	127	128	129	130	131	132	133
Y	I	F	T	S	Y	G	Y	I	N	P	Q	T	G	Y	T	S	Y	A	E	Y	G	N	Y	N	Y	P	L

图5B

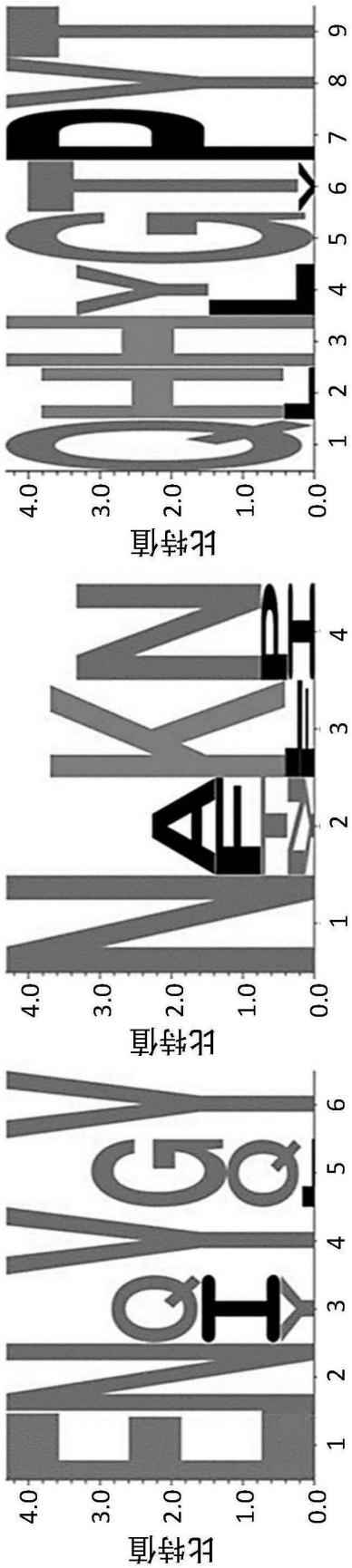


图6

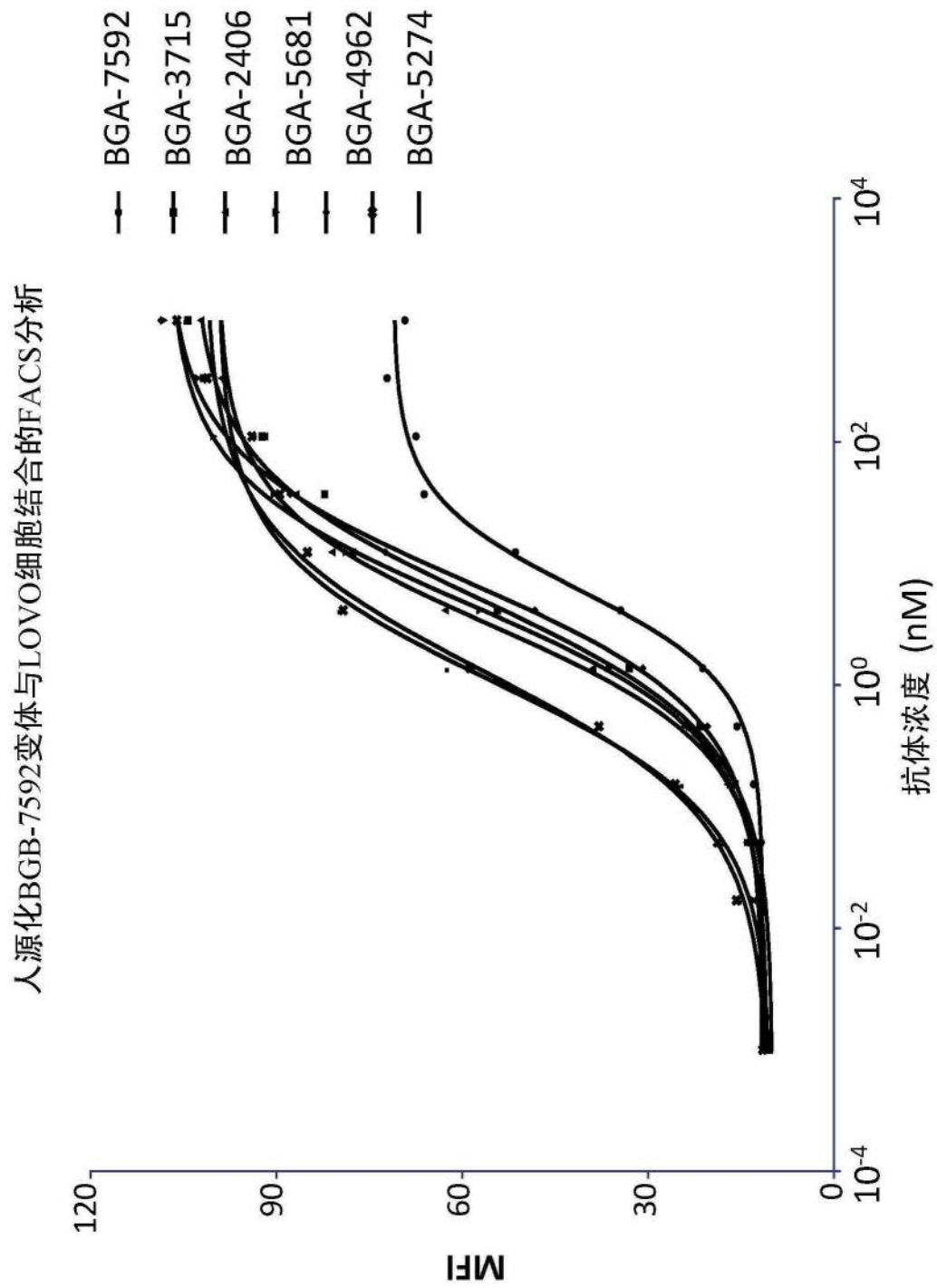


图7

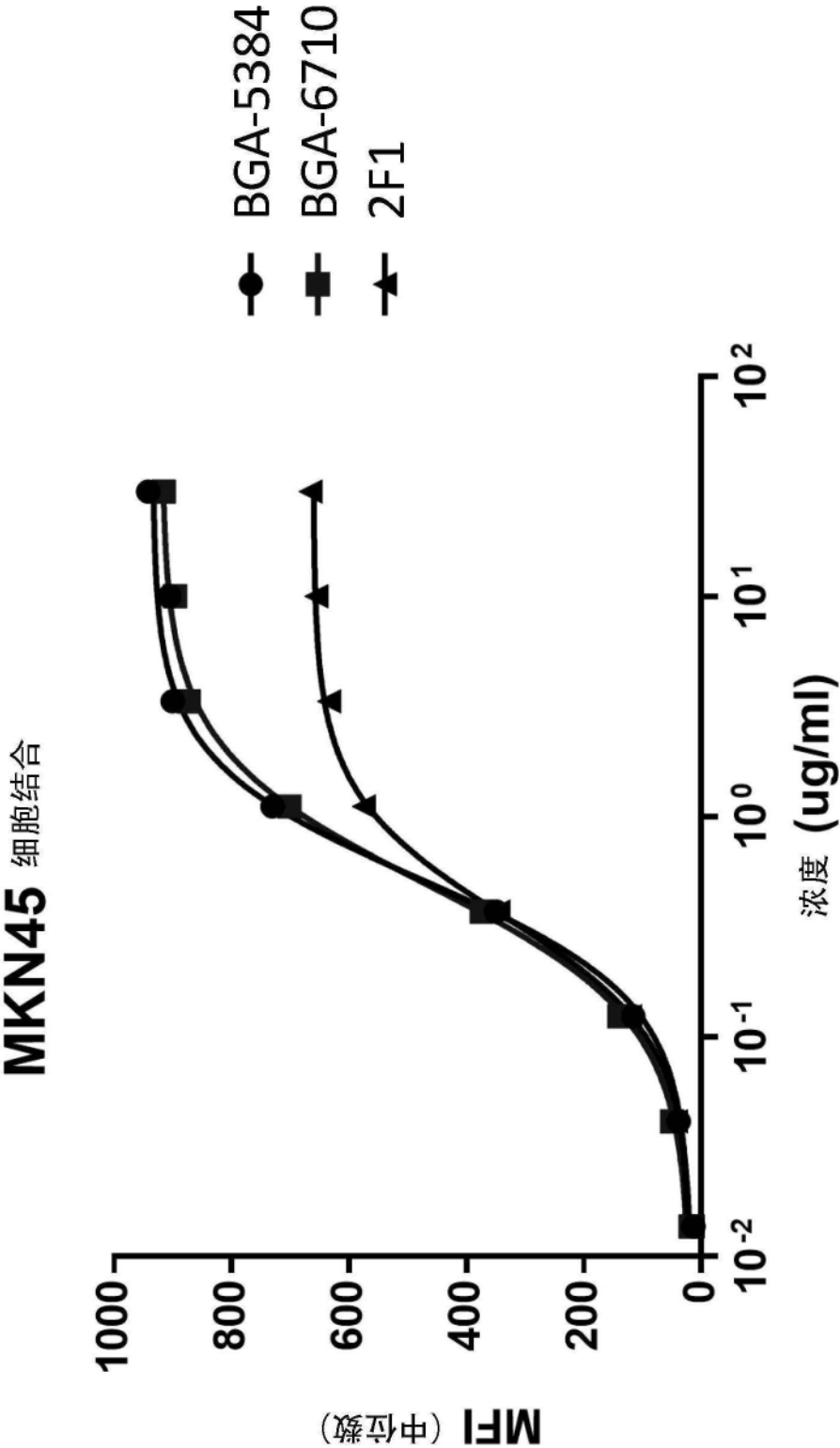


图8

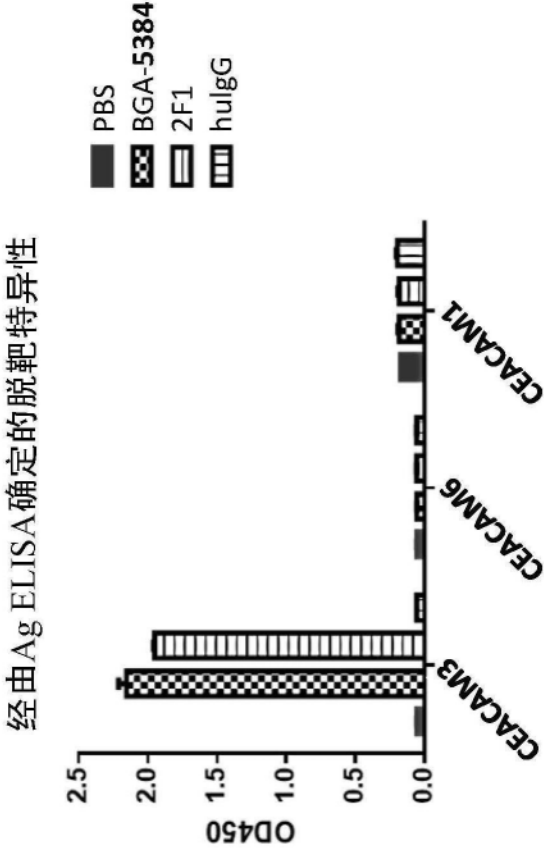


图9A

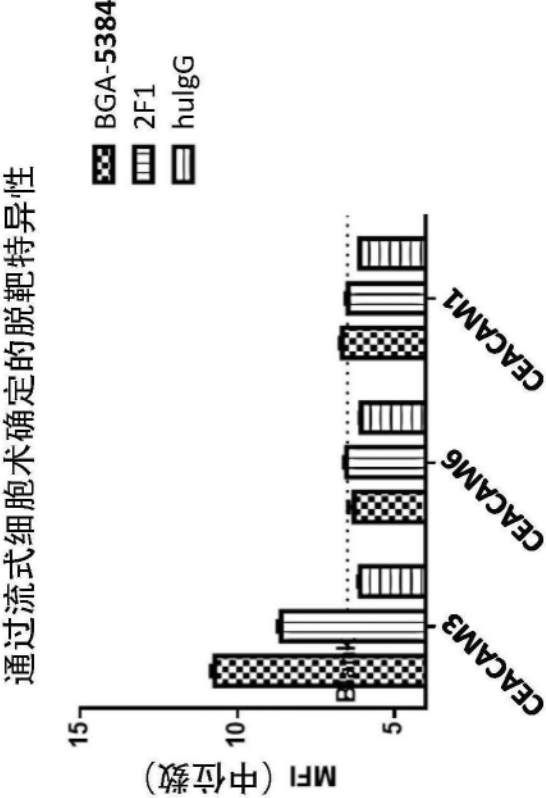


图9B

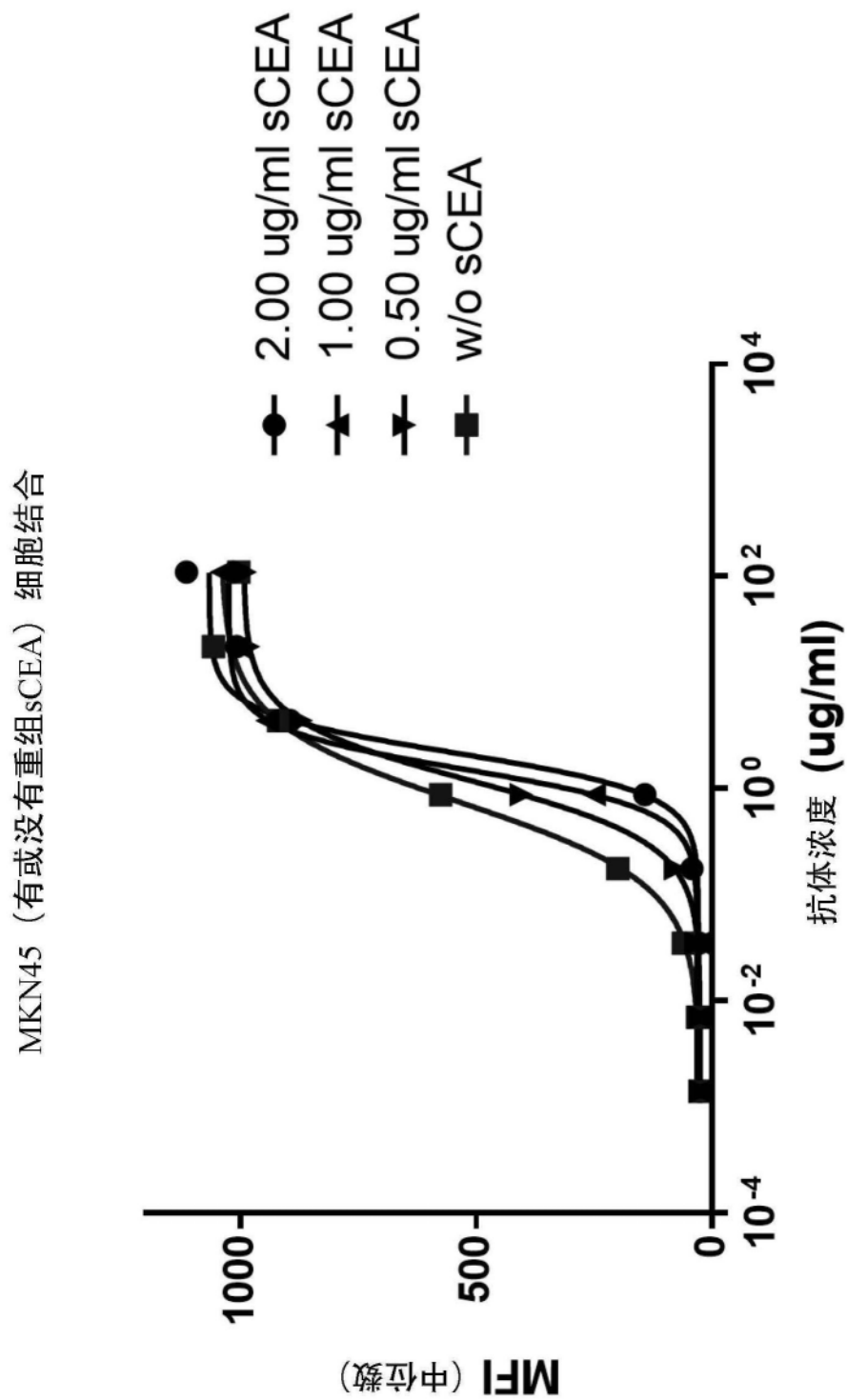


图10

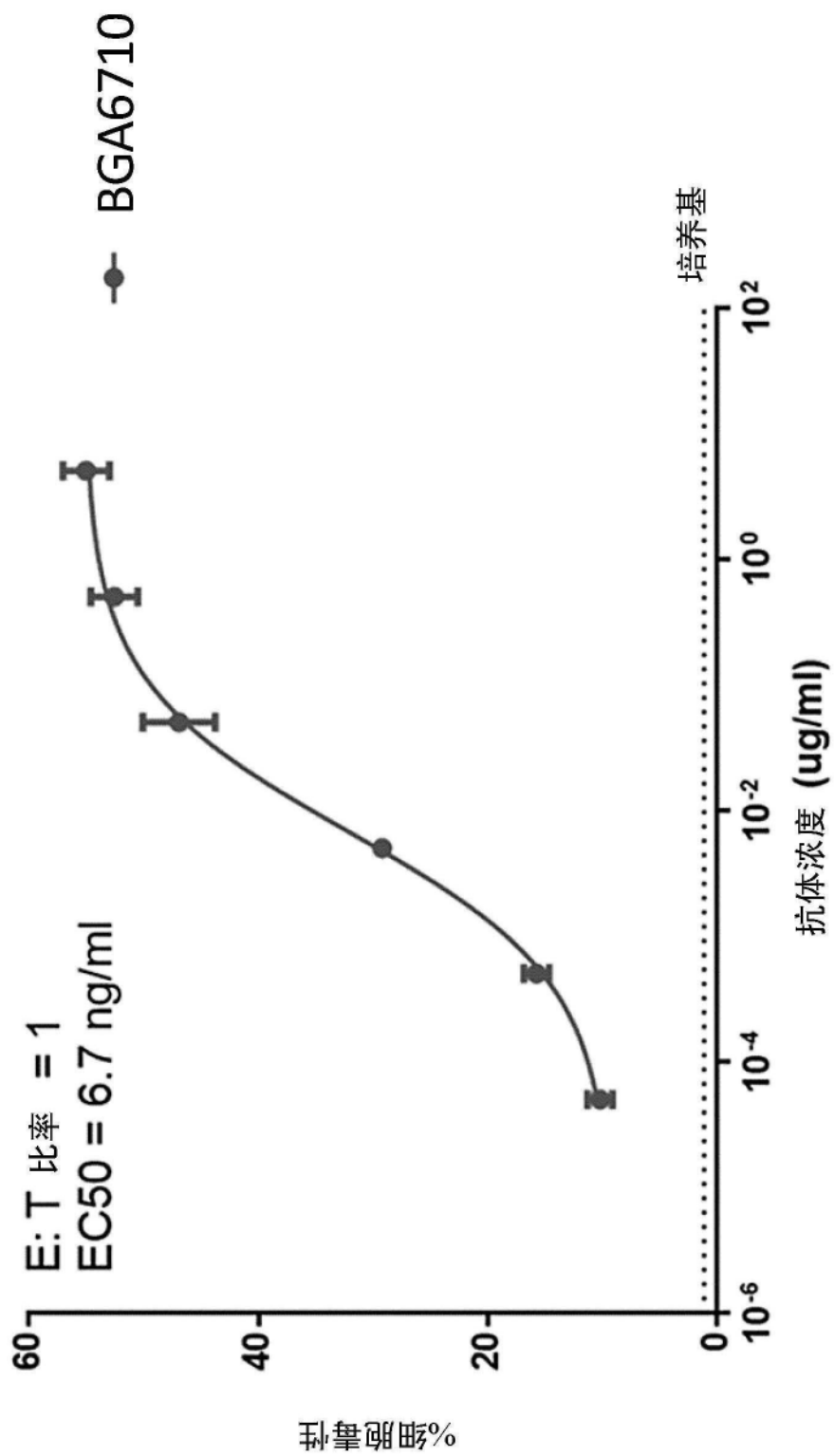


图11

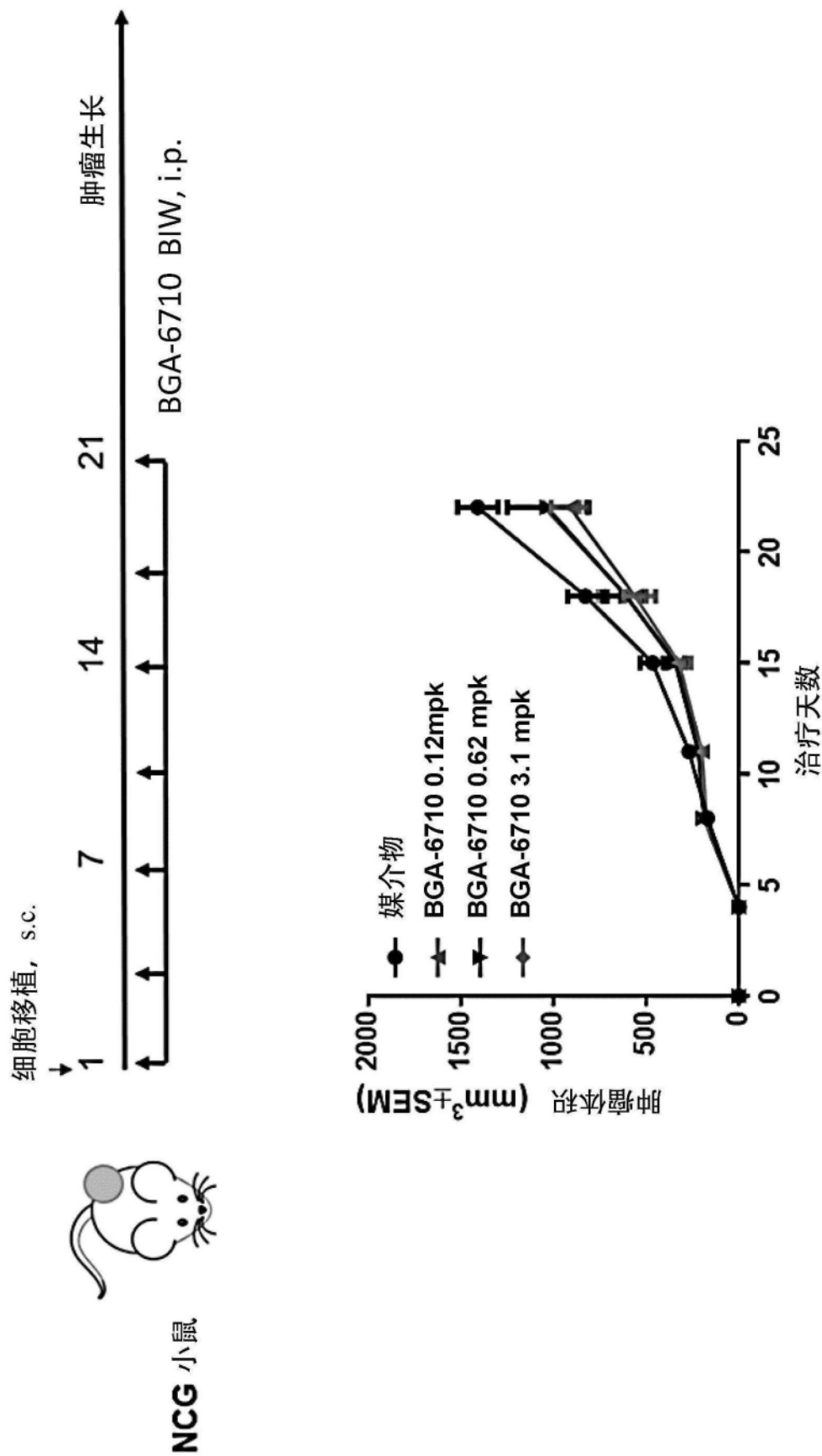


图12

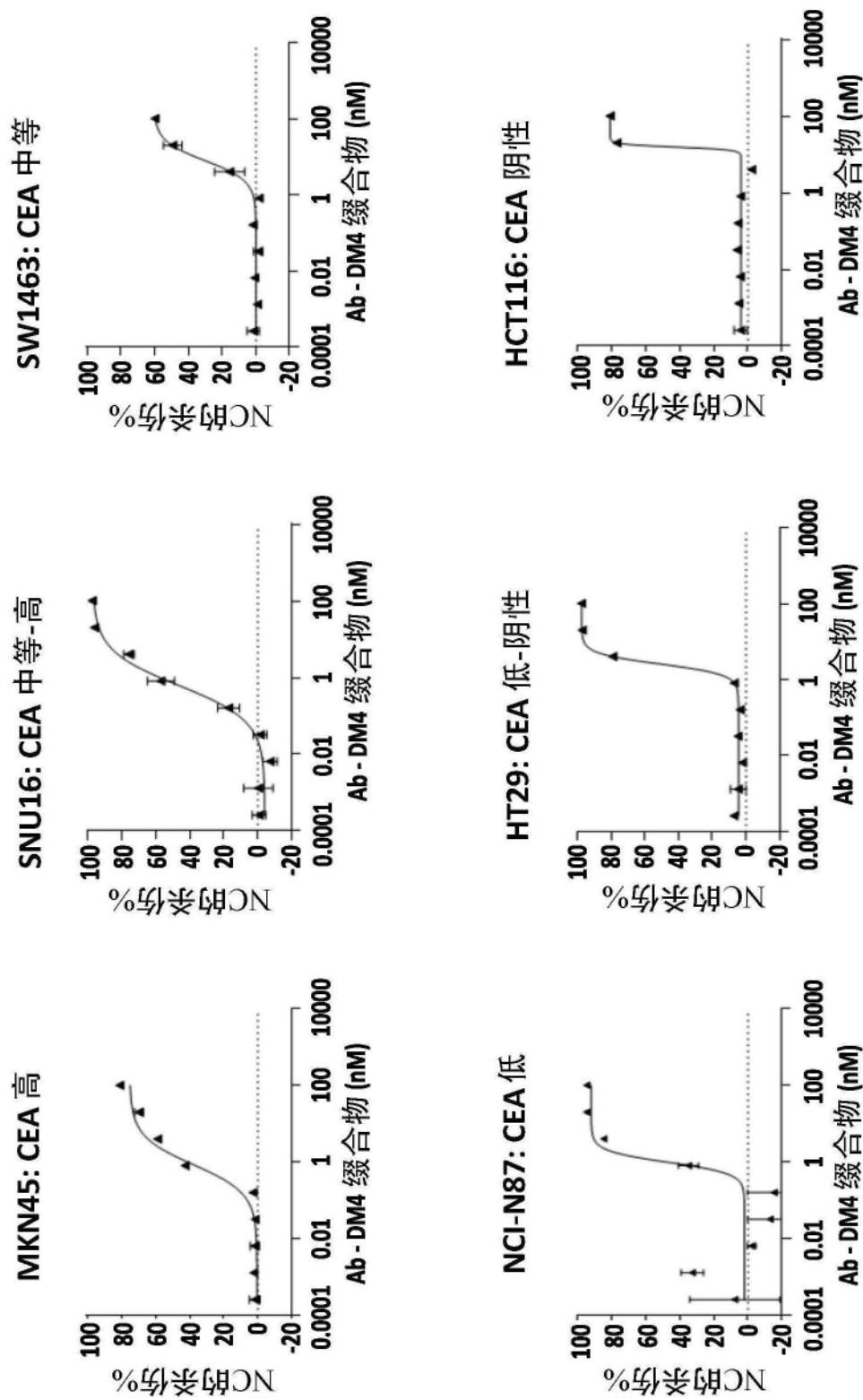


图13

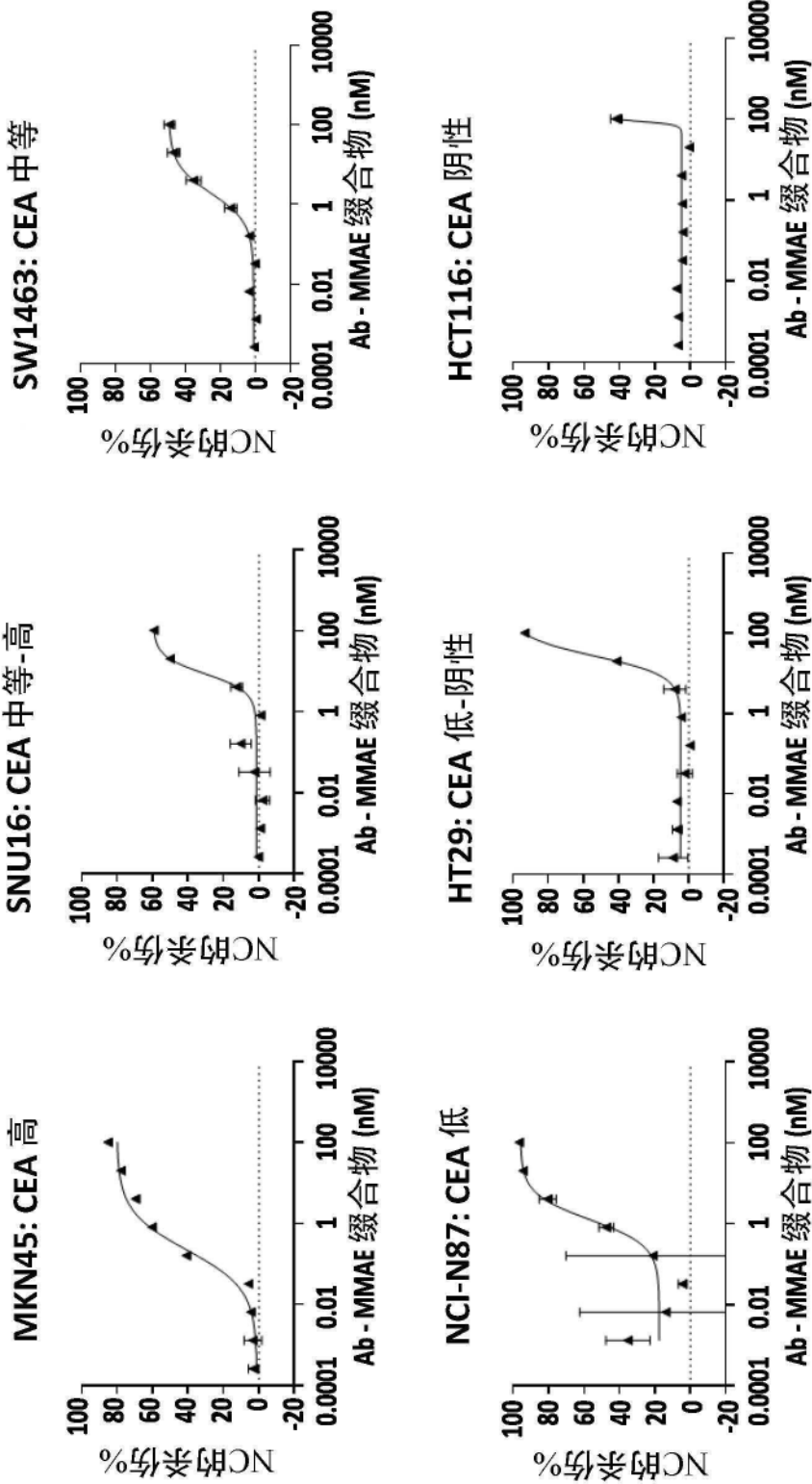


图14

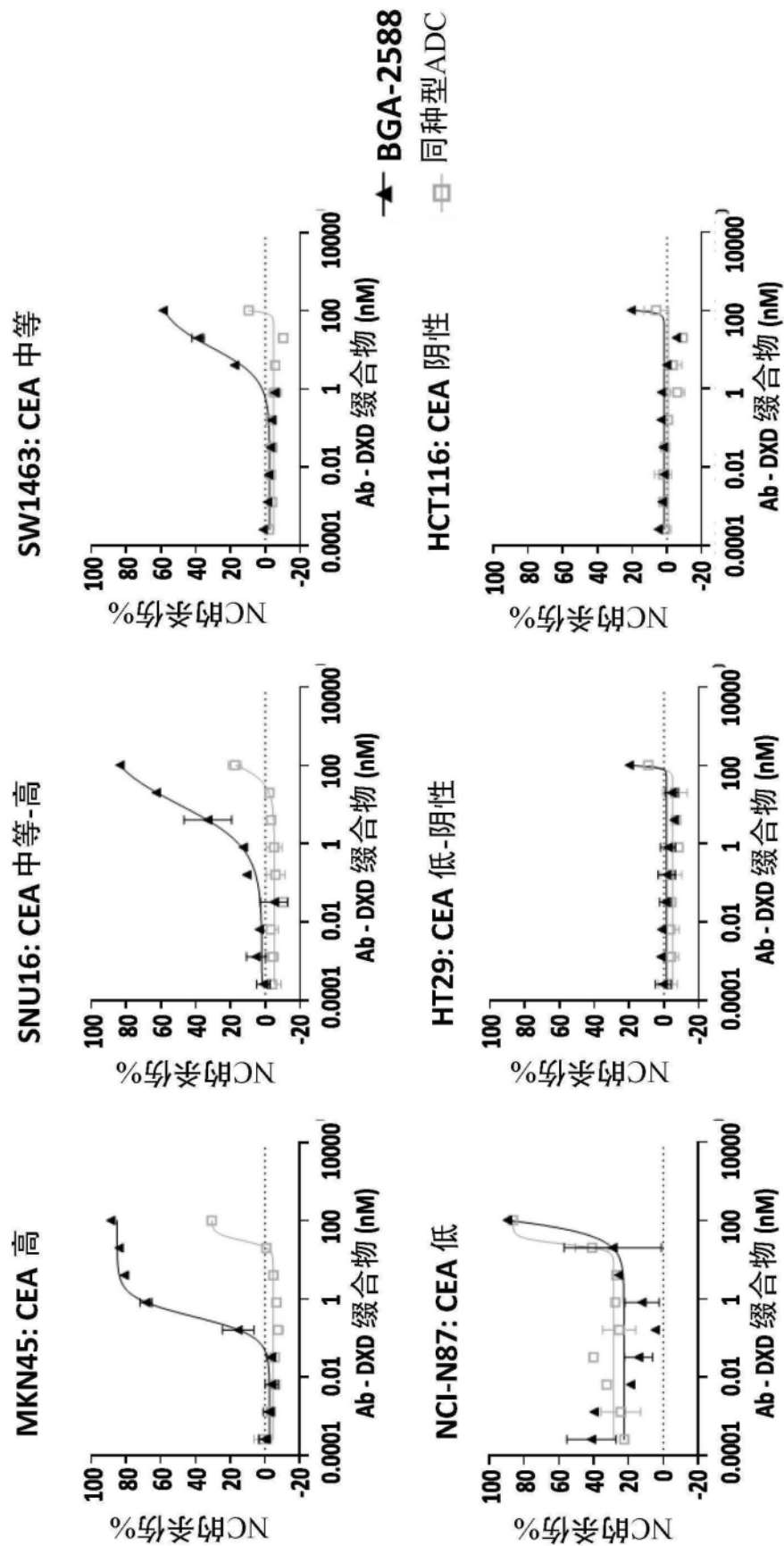


图15

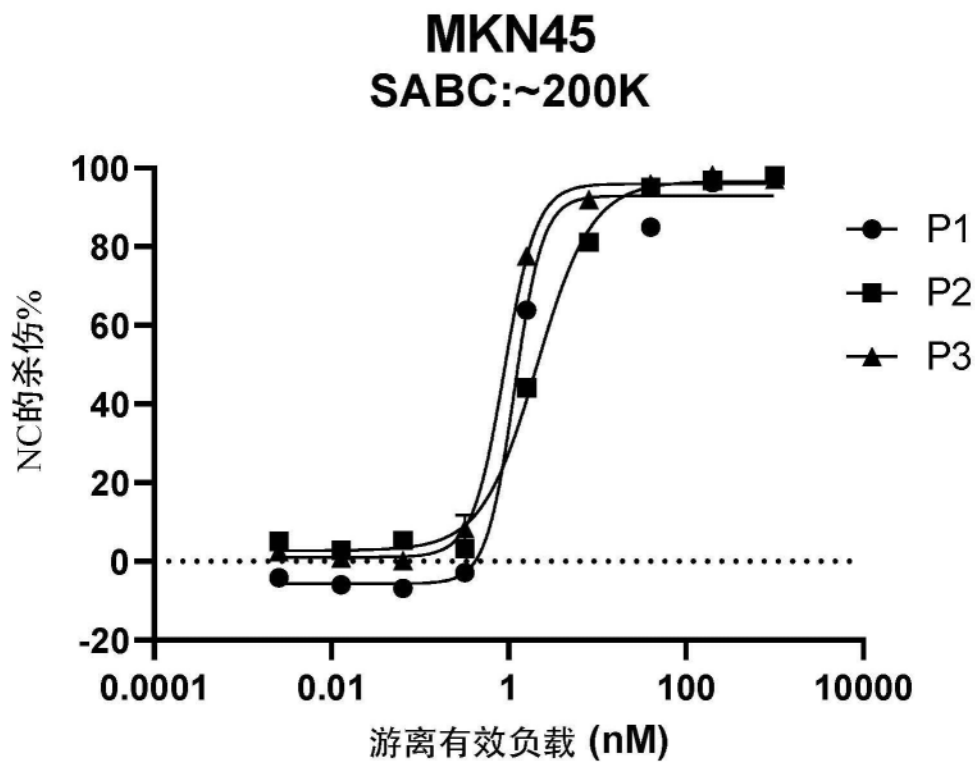


图16

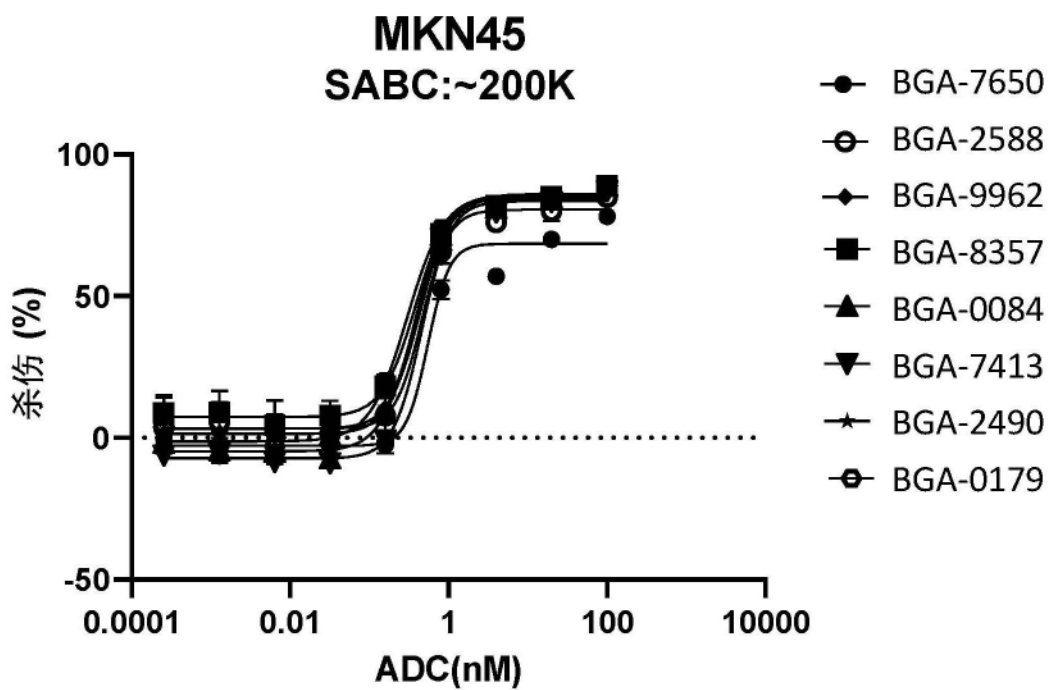


图17

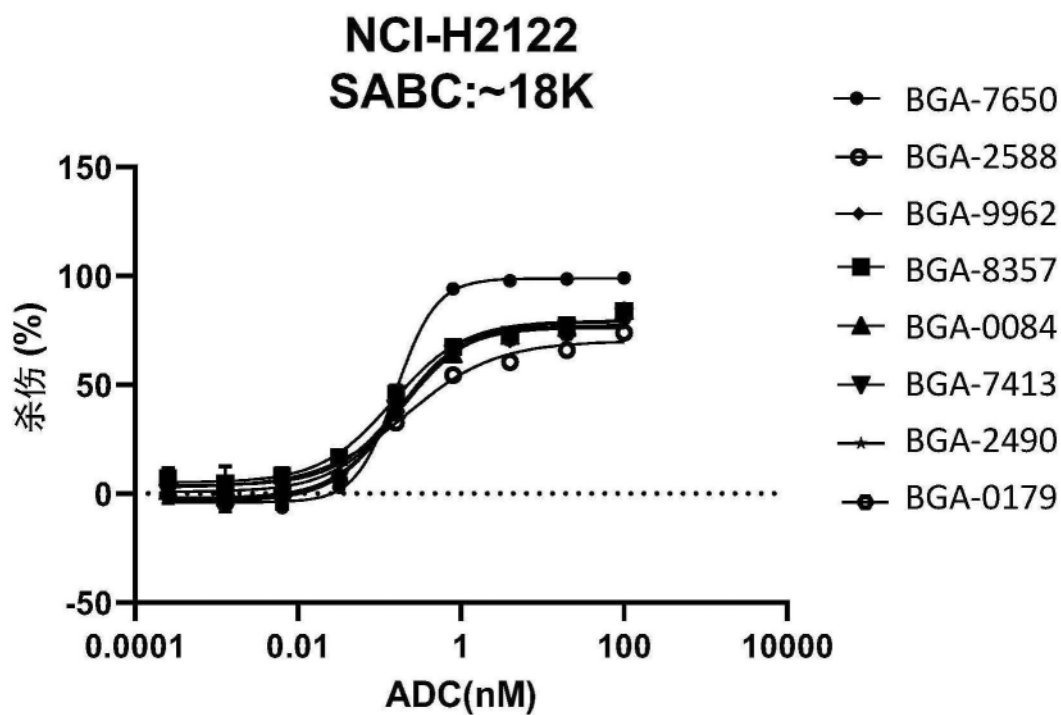


图18

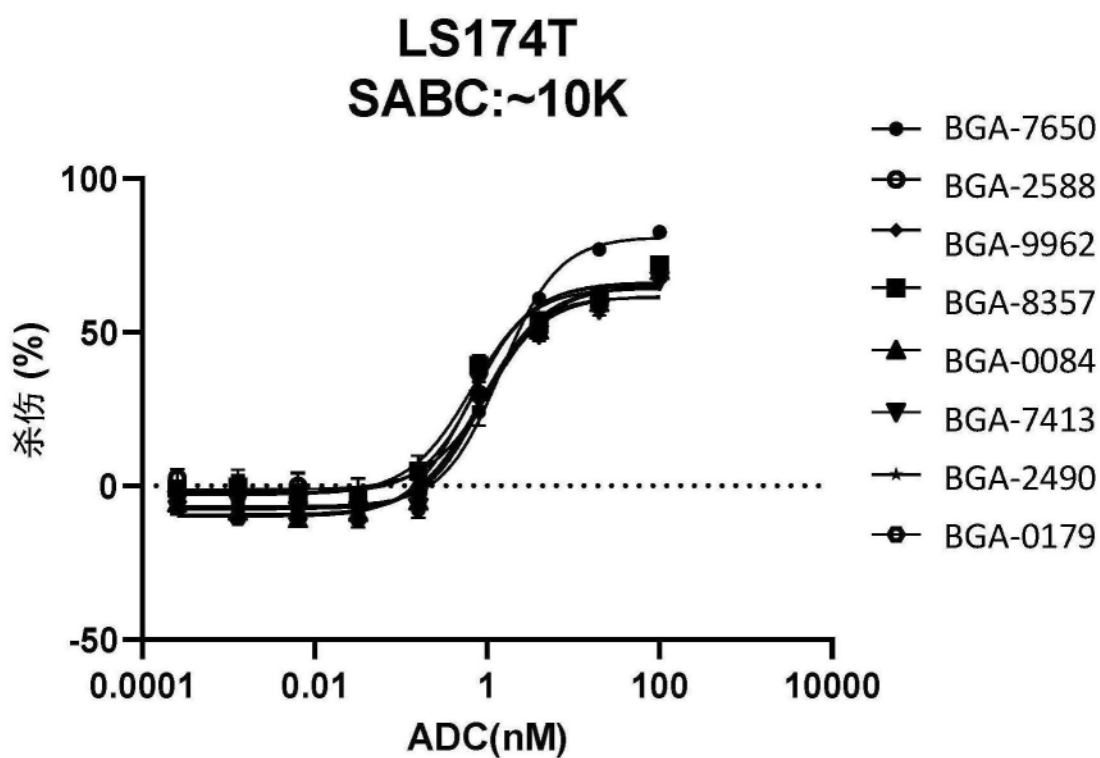


图19

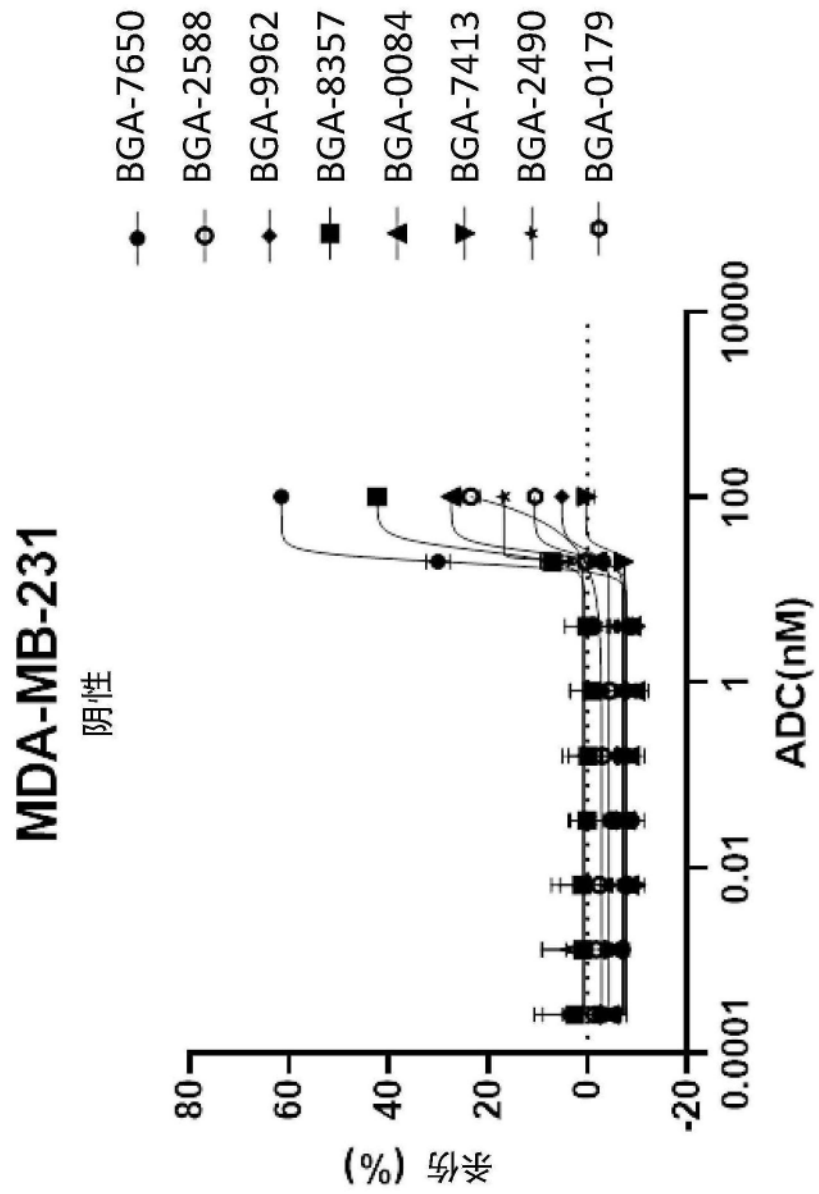


图20

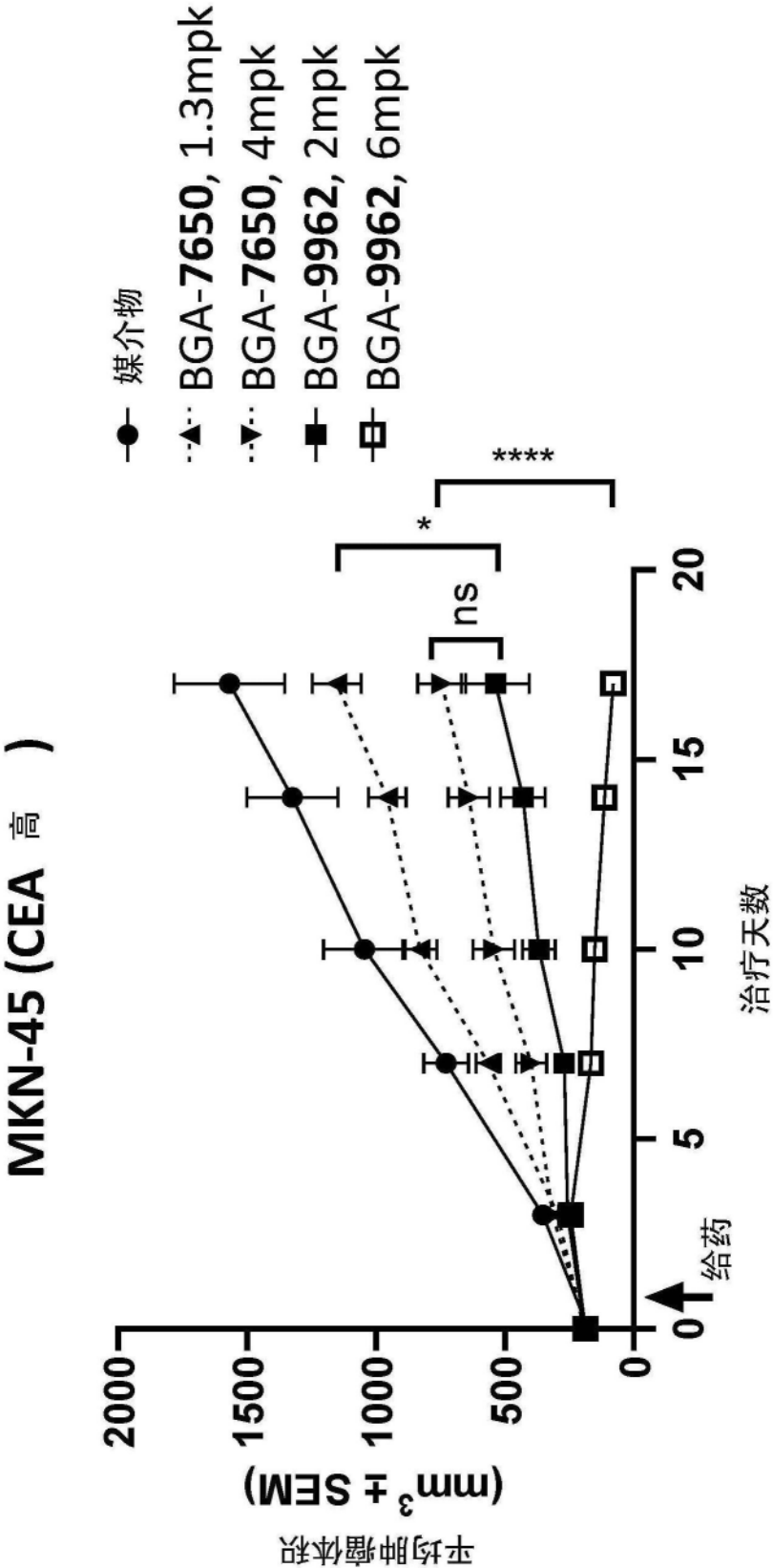


图21

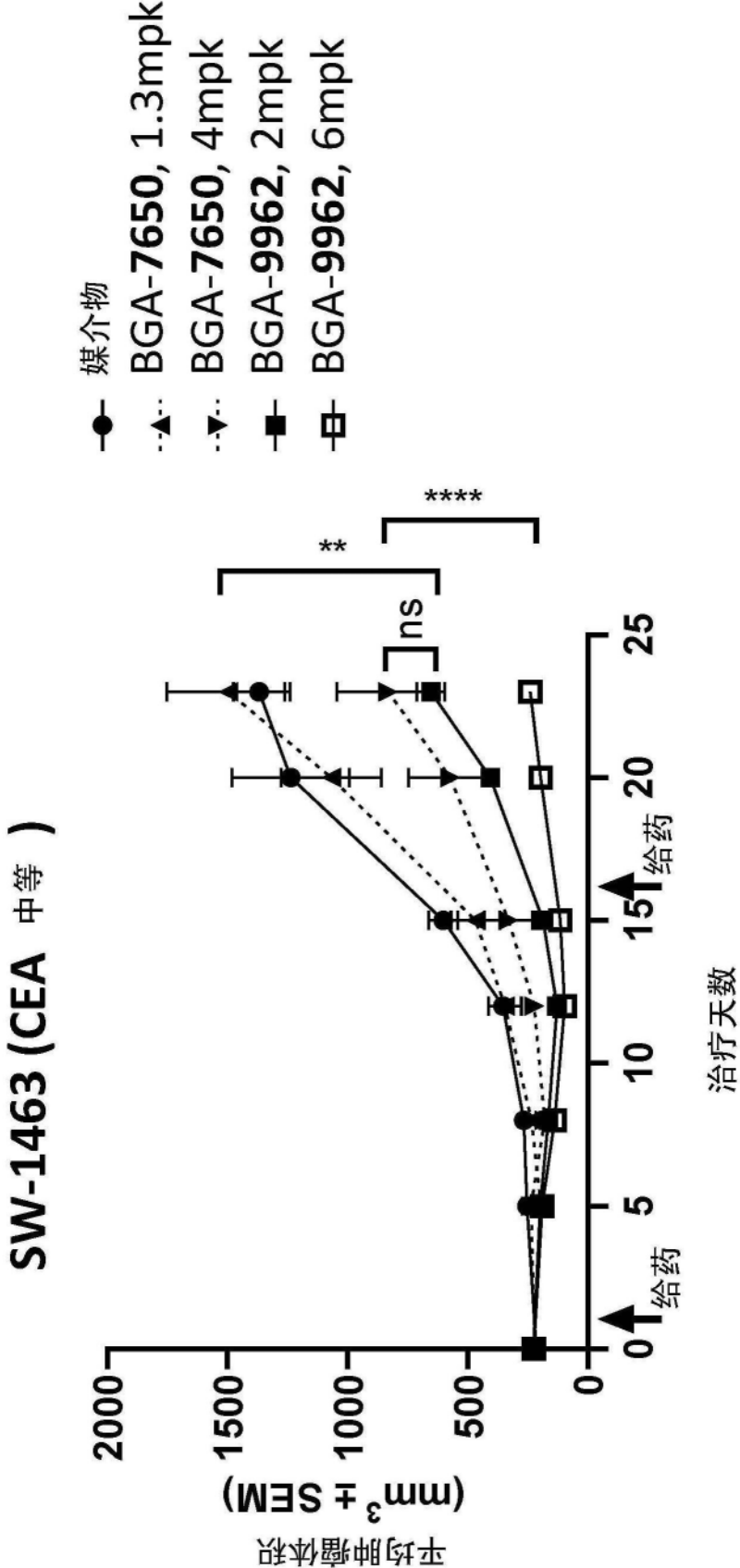


图22

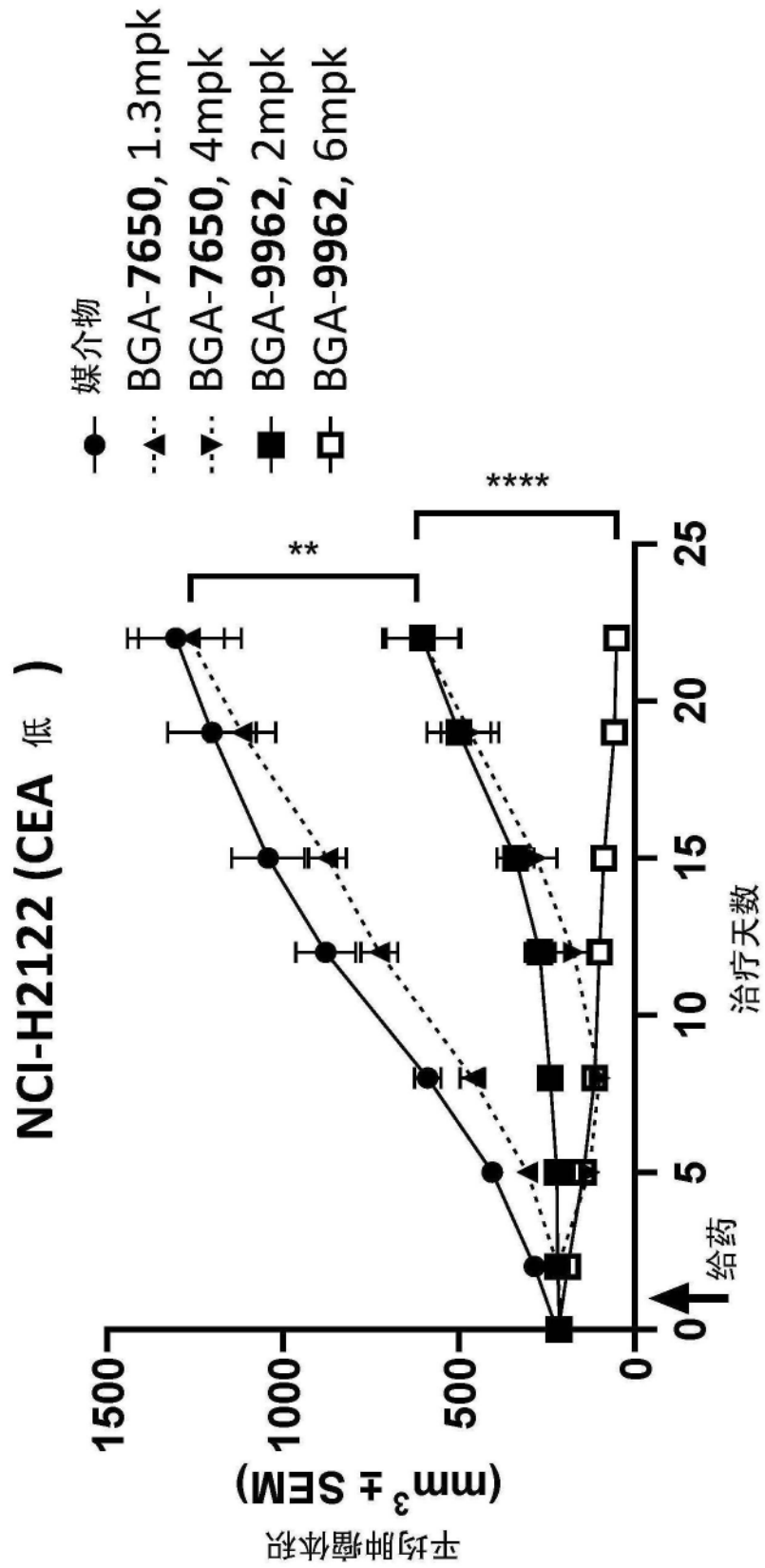


图23

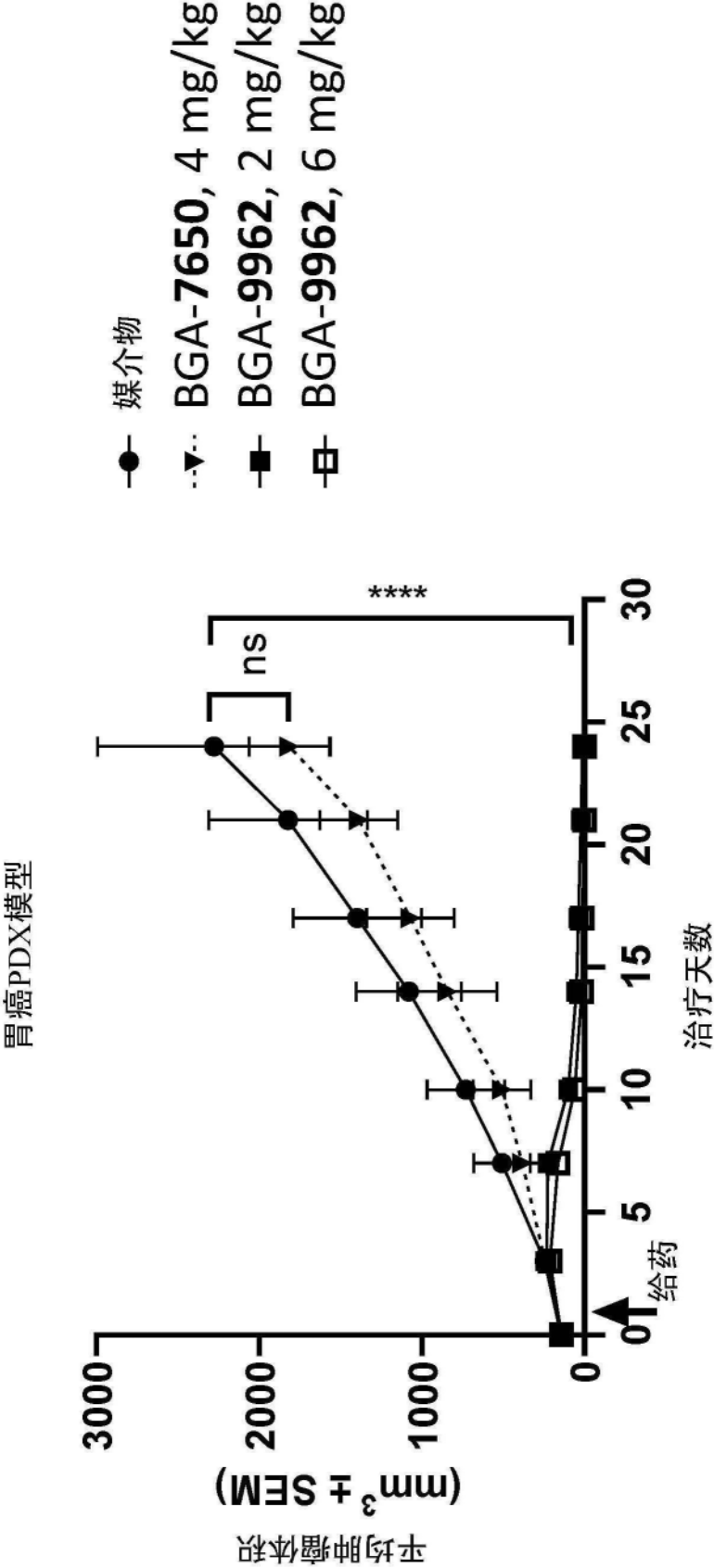


图24

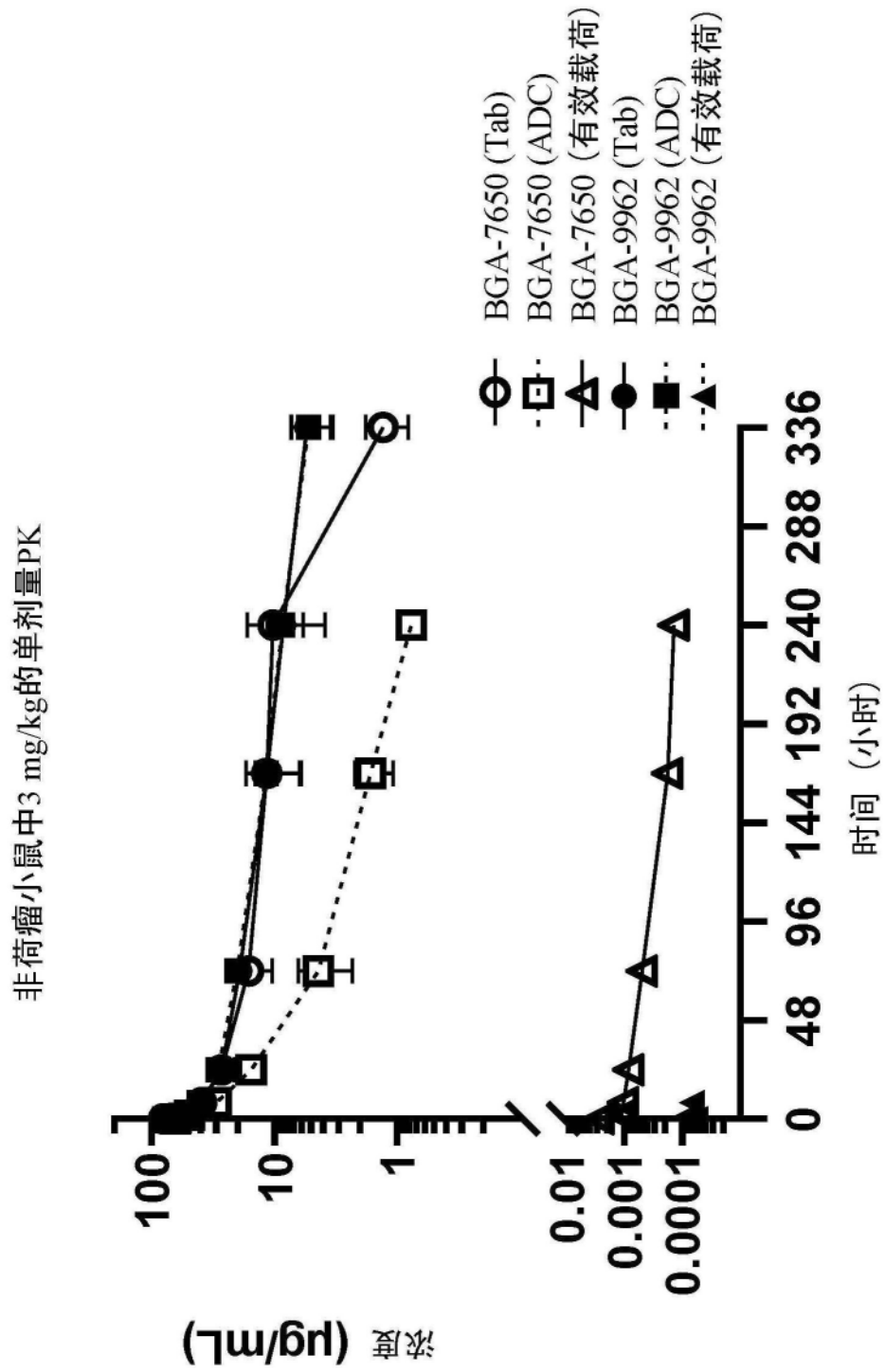


图25

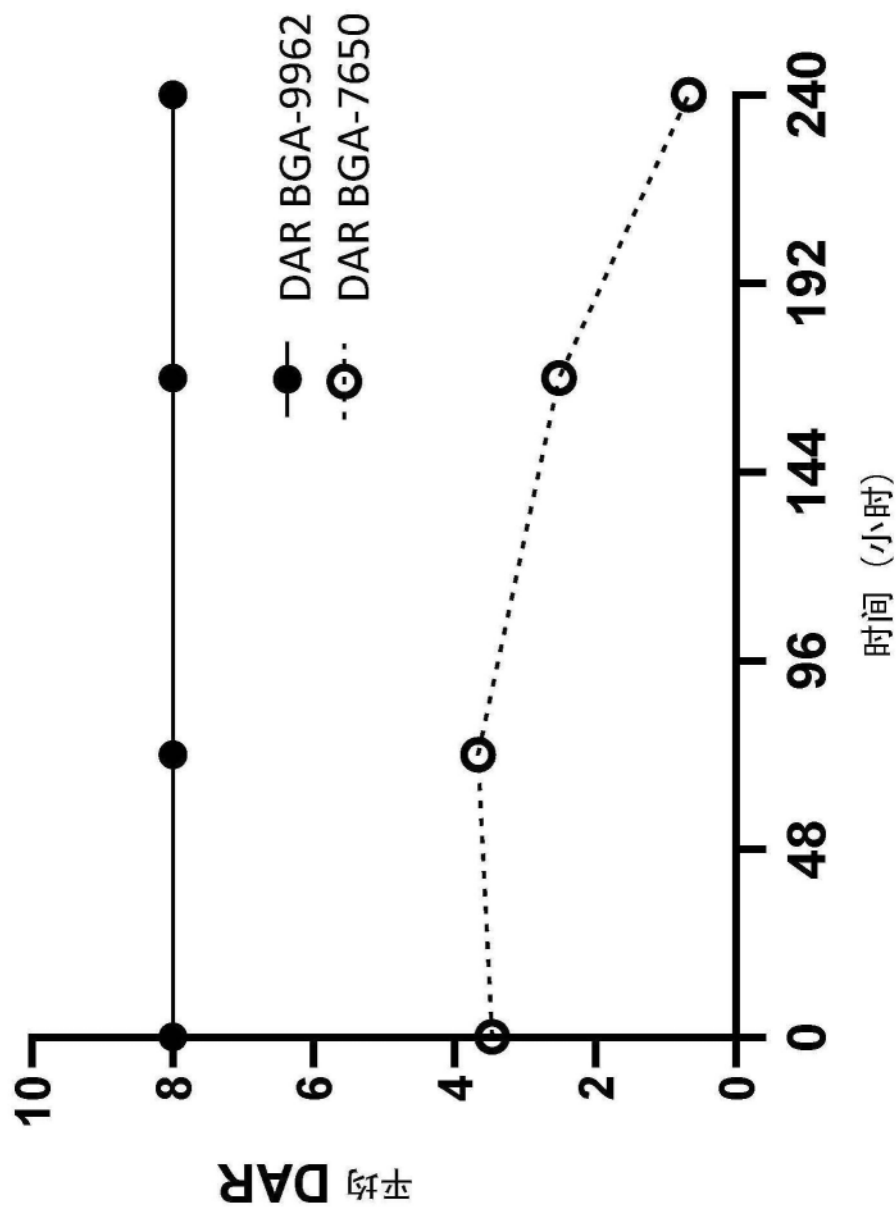


图26