(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120129533 A
(43)申请公布日 2025.06.10

(21)申请号 202380067219.0

(22)申请日 2023.09.20

(30)优先权数据
22196526.2 2022.09.20 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/075888 2023.09.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/061950 EN 2024.03.28

(71)申请人 瓦朗斯生物技术有限公司
地址 奥地利维也纳

(72)发明人 M·卢克施

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有限公司 44205
专利代理师 陈嘉蔚

(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

点击释放蛋白质和肽

(57)摘要

本发明涉及包含一个或多个生物正交官能团的修饰肽或蛋白质与经一个或多个与所述蛋白质或肽的生物正交官能团互补的生物正交官能团修饰的药物的组合。

CN 120129533 A

1.a和b的组合：

a、包含一个或多个生物正交官能团的修饰肽或蛋白质，和

b、经一个或多个与(a)的生物正交官能团反应的生物正交官能团修饰的药物；

其中当(b)的生物正交官能团与(a)的生物正交官能团接触时，(b)的生物正交官能团被消除，使得释放未修饰的药物。

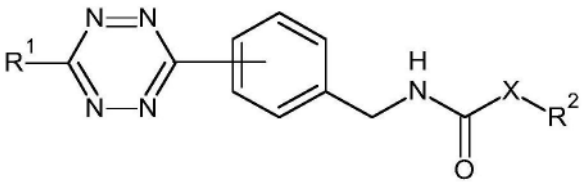
2.根据权利要求1所述的组合，其中生物正交官能团为亲二烯体或二烯。

3.根据权利要求2所述的组合，其中亲二烯体为反式环辛烯亲二烯体。

4.根据权利要求3所述的组合，其中二烯为四嗪部分。

5.根据权利要求1所述的组合，其中所述修饰肽或蛋白质选自抗体、抗体片段、双特异抗体、单链可变片段抗体、单结构域抗体、纳米抗体、蛋白质结合物、载体蛋白质、对人类疾病靶点具有亲和力的任何肽或蛋白质。

6.根据权利要求1所述的组合，其中所述修饰肽或蛋白质带有至少一个通式(I)的二烯部分，



(I)

其中，

X表示NH或O，

R^1选自卤素、$-OR^a$、$-C(O)R^a$、$-COOR^a$、NR^aR^a、$-SR^a$、$-C_{1-6}$烷基和苯基，其中$-C_{1-6}$烷基或苯基部分任选被卤素、$-OR^a$、$-C(O)R^a$、$-COOR^a$、$-NR^aR^a$、$-SR^a$取代；

R^2为与蛋白质或肽的N末端和C末端的下一个残基相连的氨基酸残基；

R^a为氢或C_{1-6}烷基。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的组合，其中药物与亲二烯体部分缀合。

8.根据权利要求7所述的组合，其中药物通过氨基甲酸酯部分与亲二烯体部分缀合。

9.根据权利要求7所述的组合，其中亲二烯体部分为反式环辛烯部分。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的组合，其中所述药物选自细胞毒素、抗增殖剂、抗肿瘤剂、抗病毒剂、抗生素、抗炎剂、化学增敏剂、放射增敏剂、免疫抑制剂、免疫刺激剂、免疫调节剂、抗血管生成因子、DNA损伤剂、DNA交联剂、DNA结合剂、DNA烷化剂、DNA嵌入剂、DNA切割剂、微管稳定剂和去稳定剂、以及拓扑异构酶抑制剂。

11.根据权利要求10所述的组合，其中所述药物选自秋水仙碱、长春花生物碱类、蒽环类、多柔比星、表柔比星、伊达比星、柔红霉素、喜树碱类、紫杉烷类、紫杉醇类、长春花碱、长春新碱、长春地辛、卡利霉素类、微管蛋白抑素类、微管蛋白抑素M、念珠藻素类、甲氨喋呤、甲喋呤、氨基蝶呤、二氯甲氨喋呤、伊立替康类、烯二炔类、鹅膏蕈碱类、更生霉素类、倍癌霉素类、美登素类、美登醇类、海兔毒素类、奥瑞他汀类、吡咯苯并二氮杂卓类及二聚体、吲哚苯并二氮杂卓类及二聚体、吡啶苯并二氮杂卓类及二聚体、丝裂霉素类、美法仑、环氧长春碱、异长春碱、放线菌素、他利霉素、偏端霉素类、博来霉素类、鬼臼毒素类、依托泊苷、依托泊苷磷酸盐、星形孢菌素、埃斯培拉霉素、喋啶类药物、铂类药物、以及细胞毒性核苷。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的组合用于治疗癌症、感染性疾病或自身免疫性疾病。

13.根据权利要求12所用的组合,其中所述癌症为黑素瘤、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、肺癌、软组织肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、胰腺癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、肛门/外阴癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、肝细胞癌、卡波济氏肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、膀胱癌、甲状腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤、前列腺腺癌、鼻咽癌或皮肤T细胞淋巴瘤。

14.根据权利要求12或13所用的组合,其中所述修饰肽或蛋白质和所述药物依次或伴随施用。

点击释放蛋白质和肽

技术领域

[0001] 本发明涉及修饰药物与包含一个或多个生物正交官能团的肽或蛋白质的组合,用于在有需要的受试者中生物正交递送药物。

背景技术

[0002] 点击化学(Click chemistry)已成为一种体内化学的多功能工具:“点击化学是指一组快速、简单易用、易于纯化、多用途、区域特异、并具有高产量的反应”[1];因此,这些反应是体内靶向和标记生物靶点的理想工具。二烯四嗪和亲二烯体之间的逆电子需求Diels-Alder(Inverse-electron demand Diels-Alder,IEDDA)反应显示出优异的动力学($1-10^6 M^{-1}s^{-1}$),并且由于其速度和一些开发的反应物的代谢稳定性,特别适合于这种体内应用。

[0003] 由于其速度和特异性,这种反应已应用于笼型(caged)前药的靶向释放。在这种方法中,生物活性分子被具有iEDDA化学活性的化学基团包围(修饰)。这种修饰改变(降低)了药物的生物活性,因此也改变(降低)了其全身副作用。然后用iEDDA反应对应物靶向药物在活生物体中应当具有活性的生物靶点。成功靶向后,施用笼型前药,与已经存在于生物体内的iEDDA活性对应物反应,并且只有在笼型基团消除的情况下反应时,才释放出其全部生物活性。

[0004] 目前文献描述了用iEDDA反应性部分标记生物靶点的各种方法,例如使用局部注射[2]。

[0005] 这种方法是将iEDDA反应性聚合物直接注射到肿瘤组织中。在聚合物与肿瘤结合后,施用iEDDA反应性前药,其在与肿瘤结合的聚合物接触后释放。这实现了活性药物的局部高浓度,同时降低了全身毒性(见图2)。这种方法的缺点是该过程具有侵入性,并且在施用聚合物之前需要对肿瘤精确定位。

[0006] 另一种方法使用内源性化学反应性标记物[3]。一些疾病通过氧化应激产生丙烯醛作为其代谢的副产物。丙烯醛是一种具有1,3-偶极环加成反应(1,3-dipolar cycloaddition)活性的化合物,该反应也可以消除化学基团,随后使药物从前体药物中释放出来。这意味着前药优先在发生氧化应激的疾病位点被激活(见图3)。尽管这种方法很巧妙,但其也因疾病多样性而存在缺点。为了适当地有效,这种潜在的治疗需要施用于局部丙烯醛浓度非常高的疾病类型,这需要预先分析确定。由于疾病类型的代谢多样性,不可避免地会有一些患者亚群没有反应。

[0007] 此外,可以使用蛋白质缀合物[4]。这种方法使用经iEDDA反应性部分修饰的蛋白质。该蛋白质对待用药物治疗的生物靶点的表面标记物具有亲和力。施用蛋白质缀合物并使其与靶点结合。经过适当的靶点标记时间后,通过追踪IEDDa笼型前药完成治疗。在与预先标记的靶点接触时,前药反应并释放活性药物(见图4)。

[0008] 该方法的缺点在于蛋白质缀合物的开发通常很繁琐,需要投入大量资源来开发合适的供应链和分析方法以验证药物产品质量。iEDDA反应性部分的结合需要具有位点特异性,以产生可再现的药物分子,而获得这种技术并非总是可能的。

[0009] WO2014081301A1公开了与触发部分连接的掩蔽部分的组合,该触发部分进一步与药物连接。触发部分包括亲二烯体,活化剂包括二烯。触发部分和活化剂发生快速的生物正交反应,使掩蔽部分释放并活化药物。WO2017044983A1描述了用于在受试者中递送药剂的生物正交组合物。生物正交组合物包括具有不同生物正交官能团的水凝胶载体组合物。WO2022032191A1公开了反式环辛烯生物正交剂及其在癌症和免疫治疗中的用途。

[0010] Fairhall J.M.等人公开了官能化反式环辛烯与西妥昔单抗的缀合,提供了用于生物正交试剂的预靶向和定位的试剂[5]。

[0011] 现有技术缀合物的缺点是蛋白质缀合物的开发通常很繁琐,需要投入大量资源来开发合适的供应链和分析方法以验证药物产品质量。iEDDA反应性部分的结合需要具有位点特异性,以产生可再现的药物分子,而获得这种技术并非总是可能的。

[0012] 因此,仍然需要基于带有生物正交官能团的修饰实体来治疗疾病的新方法。

发明内容

[0013] 本发明的目的在于提供一种基于带有生物正交官能团的修饰实体来治疗疾病的新方法。该目的由本发明的主题解决。该新方法基于包含一个或多个生物正交官能团的修饰肽或蛋白质与经一个或多个与所述蛋白质或肽的生物正交官能团互补的生物正交官能团修饰的药物的组合。

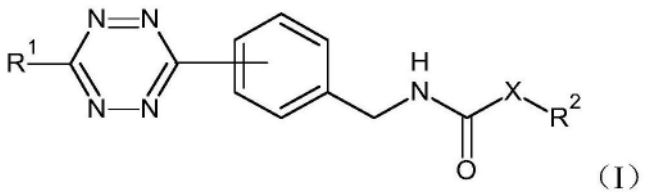
[0014] 本发明涉及(i)包含一个或多个生物正交官能团的修饰肽或蛋白质,和(ii)经一个或多个与(i)的生物正交官能团互补的生物正交官能团修饰的药物的组合。

[0015] 生物正交官能团可以是亲二烯体或二烯。亲二烯体例如是反式环辛烯。二烯例如是四嗪部分。

[0016] 根据本发明的一个实施方案,修饰肽或蛋白选自抗体、抗体片段、双特异抗体、单链可变片段抗体、单结构域抗体、纳米抗体、小蛋白结合物、载体蛋白、对人类疾病靶点具有亲和力的任何肽或蛋白。

[0017] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,包括完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段;线性抗体;单链抗体分子;多价单结构域抗体;由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0018] 根据本发明的一个实施方案,修饰肽或蛋白质带有至少一个通式(I)的二烯部分,

[0019] 

(I)

[0020] 其中,

[0021] X表示NH或O,

[0022] R选自卤素、-OR^a、-$C(O)R^a$、-$COOR^a$、NR^aR^a、-SR^a、-C_{1-6}烷基和苯基,其中-C_{1-6}烷基或苯基部分任选被卤素、-OR^a、-$C(O)R^a$、-$COOR^a$、-NR^aR^a、-SR^a取代,

[0023] R^2为氨基酸残基,与蛋白质或肽的N末端和C末端的下一个残基相连;

[0024] R^a为氢或C_{1-6}烷基。

[0025] 根据本发明的一个实施方案,药物可与亲二烯体部分缀合。药物可以通过氨基甲

酸酯部分与亲二烯体部分缀合。

[0026] 另一实施方案涉及如本文所述的组合,其中亲二烯体部分为反式环辛烯部分。

[0027] 另一实施方案涉及如本文所述的组合,其中所述药物选自细胞毒素、抗增殖剂、抗肿瘤剂、抗病毒剂、抗生素、抗炎剂、化学增敏剂、放射增敏剂、免疫抑制剂、免疫刺激剂、免疫调节剂、抗血管生成因子、DNA损伤剂、DNA交联剂、DNA结合剂、DNA烷化剂、DNA嵌入剂、DNA切割剂、微管稳定剂和去稳定剂、以及拓扑异构酶抑制剂。

[0028] 药物可选自秋水仙碱、长春花生物碱类、蒽环类、多柔比星、表柔比星、伊达比星、柔红霉素、喜树碱类、紫杉烷类、紫杉醇类、长春花碱、长春新碱、长春地辛、卡利霉素类、微管蛋白抑素类(tubulysins)、微管蛋白抑素M、念珠藻素类(cryptophycins)、甲氨喋呤、甲喋呤、氨基蝶呤、二氯甲氨喋呤、伊立替康类、烯二炔类、鹅膏蕈碱类、更生霉素类(dactinomycines)、倍癌霉素类(duocarmycins)、美登素类(maytansines)、美登醇类(maytansinoids)、海兔毒素类(dolastatins)、奥瑞他汀类(auristatins)、吡咯苯并二氮杂卓类(pyrrolobenzodiazepines)及二聚体、吲哚苯并二氮杂卓类(indolinobenzodiazepines)及二聚体、吡啶苯并二氮杂卓类(pyridinobenzodiazepines)及二聚体、丝裂霉素类、美法仑、环氧长春碱、异长春碱、放线菌素、他利霉素、偏端霉素类(lexitropsins)、博来霉素类、鬼臼毒素类、依托泊苷、依托泊苷磷酸盐、星形孢菌素、埃斯培拉霉素、喋啶类药物、铂类药物、以及细胞毒性核苷。

[0029] 本发明的一个实施方案涉及如本文所述的组合用于治疗癌症、感染性疾病或自身免疫性疾病。

[0030] 另一实施方案涉及如本文所述的组合,其中所述癌症为黑素瘤、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、肺癌、软组织肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、胰腺癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、肛门/外阴癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、肝细胞癌、卡波济氏肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、膀胱癌、甲状腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤、前列腺腺癌、鼻咽癌或皮肤T细胞淋巴瘤。

[0031] 另一实施方案涉及如本文所述的组合,其中所述修饰肽或蛋白质和所述药物依次或伴随施用。

附图说明

[0032] 图1:四嗪与亲二烯体的iEDDA反应。

[0033] 图2:通过用iEDDA反应性聚合物进行预靶向的药物释放。

[0034] 图3:使用丙烯醛作为体内药物释放的反应配偶体。

[0035] 图4:在肿瘤治疗中使用蛋白质缀合物进行高活性毒素的点击释放化学。

具体实施方式

[0036] 本发明涉及(i)包含一个或多个生物正交官能团的修饰肽或蛋白质,和(ii)经一个或多个与(i)的生物正交官能团互补的生物正交官能团修饰的药物的组合。

[0037] 在化学领域,狄尔斯-阿尔得(Diels-Alder)反应是一种重要的反应,其中共轭二烯与亲二烯体(取代烯烃)反应,产生取代的环己烯衍生物。这个反应有两个相互反应的配偶体:二烯和亲二烯体。

[0038] 二烯(diene)是包含两个碳原子间双键的不饱和烃。二烯也称为二烯烃(diolefin)或链二烯(alkadiene)。其是含有两个烯烃单元的共价化合物。二烯通常作为更复杂的有机分子的亚单元存在。此外,二烯存在于天然化合物中,也存在于合成化学品中。这些化学物质在有机合成反应中很有用。

[0039] 亲二烯体(dienophile)是易于与二烯反应的有机化合物。亲二烯体通常用于Diels-Alder反应,该反应涉及共轭二烯和取代烯烃之间的反应,其中取代烯烃充当亲二烯体。

[0040] 合适的亲二烯体通常带有以下官能团中的一个或两个:CHO、COR、COOR、CN、C=C、Ph或卤素。此外,二烯必须富含电子。

[0041] 烯烃通常被称为亲二烯体,因为其易于与二烯反应。通常,在Diels-Alder反应中不需要加热,但是加热可以提高反应的产率。

[0042] 术语“生物正交化学”(bioorthogonal chemistry)是指在不干扰天然生物化学过程的情况下,可在生命系统内部发生的任何化学反应。生物正交反应的概念使得能够在没有细胞毒性的情况下在生命系统中实时研究生物分子,例如聚糖、蛋白质和脂质。已经开发了许多满足生物正交性要求的化学连接策略,包括叠氮化物和环辛烯之间的1,3-偶极环加成(也称为无铜点击化学)和四嗪连接。

[0043] 反应必须满足许多要求以视为生物正交反应:

[0044] -选择性:反应必须在内源性官能团之间具有选择性,以避免与生物化合物发生副反应;

[0045] -生物惰性:反应性配偶体和由此产生的连接不应具有任何能够破坏所研究生物的天然化学功能的反应模式;

[0046] -化学惰性:共价键应该很强,并且对生物反应是惰性的;

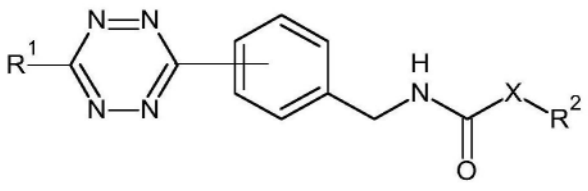
[0047] -动力学:反应必须快速,以便在探针代谢和清除之前实现共价连接。反应必须快速,以细胞过程的时间尺度计(分钟),以防止反应中可能减弱较少量物质的小信号的竞争。快速反应也提供了快速响应,这是准确跟踪动态过程所必需的;

[0048] -反应生物相容性:反应必须无毒,并且必须在考虑pH值、水性环境和温度的生物条件下发挥作用。随着生物正交化学扩展到活体动物模型,药代动力学越来越受到关注;

[0049] -可及工程化:化学报告分子必须能够通过某种形式的代谢或蛋白质工程整合到生物分子中。理想的情况是,其中一个官能团也非常小,因此不会干扰自然行为。

[0050] 根据本发明,肽或蛋白质可经一个或多个生物正交官能团修饰。肽或蛋白质可以带有二烯或亲二烯体。例如,可以通过掺入二烯部分,例如带有四嗪部分的氨基酸来修饰蛋白质。

[0051] 这种带有四嗪部分的氨基酸化合物具有通式(I),

[0052] 

(I)

[0053] 其中,

[0054] X表示N或O,

[0055] R选自卤素、-OR^a、-C(O)R^a、-$COOR^a$、NR^aR^a、-SR^a、-C_{1-6}烷基和苯基,其中-C_{1-6}烷基或苯基部分任选被卤素、-OR^a、-C(O)R^a、-$COOR^a$、-NR^aR^a、-SR^a取代,

[0056] R^2为氨基酸残基,与蛋白质或肽的N末端和C末端的下一个残基相连;

[0057] R^a为氢或C_{1-6}烷基。

[0058] 国际专利申请PCT/EP2022/064273中描述了生产这种修饰氨基酸的方法。

[0059] 优选地,四嗪部分结合在肽或蛋白质的预定位点。相应修饰的肽或蛋白质可包含单个或多个带有四嗪部分的氨基酸。在预定位点具有带有四嗪部分的氨基酸提供了产生精确定义的肽或蛋白质的能力。

[0060] 本发明的一些实施方案涉及生产包含单个或多个四嗪部分的肽或蛋白质的方法,所述方法包括将包含四嗪部分的合成氨基酸遗传结合至肽或蛋白质中。遗传上掺入四嗪部分允许精确构建确定的肽或蛋白质缀合物。可以精确控制四嗪部分的位置。这有利地避免了使用天然氨基酸中存在的化学官能团对整个肽或蛋白质进行复杂反应的需要。

[0061] 合适地,所述用于生产肽或蛋白质的方法包括:

[0062] (i)提供编码肽或蛋白质的核酸,所述核酸包含编码具有四嗪部分的氨基酸的正交密码子;

[0063] (ii)在能够识别所述正交密码子的正交tRNA合成酶/tRNA对的存在下翻译所述核酸,并将所述具有四嗪部分的氨基酸结合至肽或蛋白质链中。合适地,所述正交密码子包含琥珀密码子(TAG),所述tRNA包含tRNAcuA,所述tRNA合成酶包含来自生物马泽甲烷八叠球菌(Methanosarcina mazei)/贝克甲烷八叠球菌(Methanosarcina Bakeri)/嗜甲基甲烷拟球菌(Methanomethylophilus alvus)的PylRS。

[0064] 在其他实施例中,肽或蛋白质包含亲二烯体部分。亲二烯体部分可以选自螺己烯、乙烯基硼酸、降冰片烯、环丙烯衍生物、环辛烯和反式环辛烯(TCO)。优选地,反式环辛烯用作亲二烯体。

[0065] 相应修饰的蛋白质和肽可进化为对任何标记疾病的生物靶点具有亲和力。

[0066] 根据本发明的一个实施方案,药物经一种或多种官能团修饰。官能团是二烯或亲二烯体,并且与修饰肽或蛋白质中使用的官能团互补。因此,在肽或蛋白质经二烯修饰的情况下,药物经亲二烯体修饰。如果肽或蛋白质以亲二烯体修饰,那么药物以二烯修饰。

[0067] 术语“药物”是指能够治疗和/或改善受试者的病症或疾病或其一种或多种症状的药剂。本公开的药物还包括治疗剂的前药形式。

[0068] 药物可选自细胞毒素、抗增殖剂、抗肿瘤剂、抗病毒剂、抗生素、抗炎剂、化学增敏剂、放射增敏剂、免疫抑制剂、免疫刺激剂、免疫调节剂、抗血管生成因子、DNA损伤剂、DNA交联剂、DNA结合剂、DNA烷化剂、DNA嵌入剂、DNA切割剂、微管稳定剂和去稳定剂、以及拓扑异构酶抑制剂。

[0069] 例如,药物选自秋水仙碱、长春花生物碱类、蒽环类、多柔比星、表柔比星、伊达比星、柔红霉素、喜树碱类、紫杉烷类、紫杉醇类、长春花碱、长春新碱、长春地辛、卡利霉素类、微管蛋白抑素类(tubulysins)、微管蛋白抑素M、念珠藻素类(cryptophycins)、甲氨喋呤、甲喋呤、氨基蝶呤、二氯甲氨喋呤、伊立替康类、烯二炔类、鹅膏蕈碱类、更生霉素类(dactinomycines)、倍癌霉素类(duocarmycins)、美登素类(maytansines)、美登醇类(maytansinoids)、海兔毒素类(dolastatins)、奥瑞他汀类(auristatins)、吡咯苯并二氮

杂卓类(pyrrolobenzodiazepines)及二聚体、吲哚苯并二氮杂卓类(indolinobenzodiazepines)及二聚体、吡啶苯并二氮杂卓类(pyridinobenzodiazepines)及二聚体、丝裂霉素类、美法仑、环氧长春碱、异长春碱、放线菌素、他利霉素、偏端霉素类(lexitropsins)、博来霉素类、鬼臼毒素类、依托泊苷、依托泊苷磷酸盐、星形孢菌素、埃斯培拉霉素、喋啶类药物、铂类药物、以及细胞毒性核苷。

[0070] 经相应修饰的肽和蛋白质与药物的组合可用于治疗和/或诊断受试者的病症或疾病,所述病症或疾病可通过施用经修饰的药物来治疗或诊断。

[0071] 本文所述的组合可用于治疗癌症、感染性疾病或自身免疫性疾病。

[0072] 在某些实施方案中,本文所述的组合可用于治疗癌症。所述癌症可以是黑素瘤、肾癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、成胶质细胞瘤、肺癌、软组织肉瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、胰腺癌、胃癌、头颈部鳞状细胞癌、肛门/外阴癌、食道癌、胰腺癌、宫颈癌、肝细胞癌、卡波济氏肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、膀胱癌、甲状腺癌、胰腺神经内分泌肿瘤、前列腺腺癌、鼻咽癌或皮肤T细胞淋巴瘤。

[0073] 通过将一种或多种合成氨基酸掺入具有iEDDA反应活性的蛋白质和肽中,我们提供了一种方法,解决了上述治疗各种疾病的靶向药物释放的各种方法的缺点。这使我们能够发展针对各种适应症的治疗方法。通过避免缀合物的开发以及直接将蛋白质或肽用于点击释放反应,我们简化了这种疗法的开发,依赖于已建立的蛋白质纯化方案,而无需额外的蛋白质缀合物开发负担。靶向蛋白质或肽的功效和释放活性可以通过掺入多个合成氨基酸容易地进行调节,这又在靶向位点释放更多的药物。

[0074] 方法:

[0075] 将经四嗪修饰的合成氨基酸掺入蛋白质:

[0076] 获自野生型吡咯赖氨酰tRNA合成酶的突变型吡咯赖氨酰tRNA合成酶,其为甲烷八叠球菌(Methanosarcina)、甲烷球菌(Methanocaldococcus)、嗜甲基甲烷拟球菌(Methanomethylophilus)或其他衍生的吡咯赖氨酰tRNA合成酶,和/或突变型吡咯赖氨酰tRNA合成酶氨酰化吡咯赖氨酰tRNA,将本文所述的修饰氨基酸掺入蛋白质和肽中。

[0077] 将四嗪氨基酸掺入纳米抗体蛋白中并随后释放活性药物

[0078] 获自野生型吡咯赖氨酰tRNA合成酶的突变型吡咯赖氨酰tRNA合成酶,其为源自古细菌的吡咯赖氨酰tRNA合成酶(例如甲烷八叠球菌、或甲烷球菌、或嗜甲基甲烷拟球菌、或其他),和/或突变型吡咯赖氨酰tRNA合成酶氨酰化吡咯赖氨酰tRNA,将本文所述的氨基酸掺入。突变型吡咯赖氨酰tRNA合成酶通过现有蛋白质工程技术产生,例如结构导向的位点饱和诱变或定向进化或其组合。此外,也可以采用其他技术,例如基因改组(gene shuffling)。

[0079] 将突变型吡咯赖氨酸tRNA合成酶和相应的琥珀抑制型吡咯赖氨酸tRNA引入表达载体,该表达载体含有pBR322复制起点、在第65位氨基酸携带框内琥珀终止密码子的纳米抗体蛋白以及C末端六组氨酸标签和卡那霉素抗性基因。突变型吡咯赖氨酸tRNA合成酶由诱导型启动子表达,而抑制型吡咯赖氨酸tRNA由通常用于此目的的组成型启动子表达。

[0080] 在250mL烧瓶中培养含有上述表达载体的大肠杆菌细胞,每个烧瓶含有50mL含1-2%葡萄糖作为碳源的M9基本培养基或者含50g/mL卡那霉素(Roth)的标准2xYT培养基。培养物在37℃下以160-180rpm的速度在轨道摇床上培养。在D600为0.8-1.0时,通过添加

0.2％(w/v)的诱导物(Roth)来诱导PylRS的表达。此外,将0.1 -10mM的四嗪-赖氨酸溶解在0.1M的HCl或DMSO或H_2O或其混合物中。表达进行4-24小时(温度可以根据目标蛋白进行调节;纳米抗体为37℃)。通过离心(5000g,4℃下30分钟)收集细胞。按照制造商的说明,使用Ni-NTA琼脂糖通过Ni2+-亲和色谱纯化纳米抗体变体。

[0081] 携带四嗪-赖氨酸的纯化纳米抗体变体在溶液中与反式环辛烯-(TCO)-多柔比星(多柔比星的前药)接触。这导致TCO-多柔比星与纳米抗体中的四嗪-赖氨酸反应,随后因消除活性药物多柔比星而释放。

[0082] 通过使用适当标准的与质谱仪联用的高效液相色谱证实了多柔比星的存在和释放。这些测量证实了多柔比星直接释放在纳米抗体上。

[0083] 参考文献

[0084] [1]D.Hein,Christopher.Liu,Xin-Ming.Wang,D.Click Chemistry,a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences.Natl.Inst.Heal.J.25,1-7(2008).

[0085] [2]Oneto,J.M.M.,Khan,I.,Seebald,L.&Royzen,M.In vivo bioorthogonal chemistry enables local hydrogel and systemic pro-drug to treat soft tissue sarcoma.ACS Cent.Sci.2,476-482(2016).

[0086] [3]Pradipta,A.R.et al.Targeted 1,3-dipolar cycloaddition with acrolein for cancer prodrug activation.Chem.Sci.12,5438-5449(2021).

[0087] [4]Rossin,R.et al.Chemically triggered drug release from an antibody-drug conjugate leads to potent antitumour activity in mice.Nat.Commun.9,1-11(2018).

[0088] [5]Fairhal,J.M.et al.,EGFR-targeted prodrug activation using bioorthogonal alkene-azide click-and-release chemistry.Bioorg.Med.Chem.46,1-11(2021).

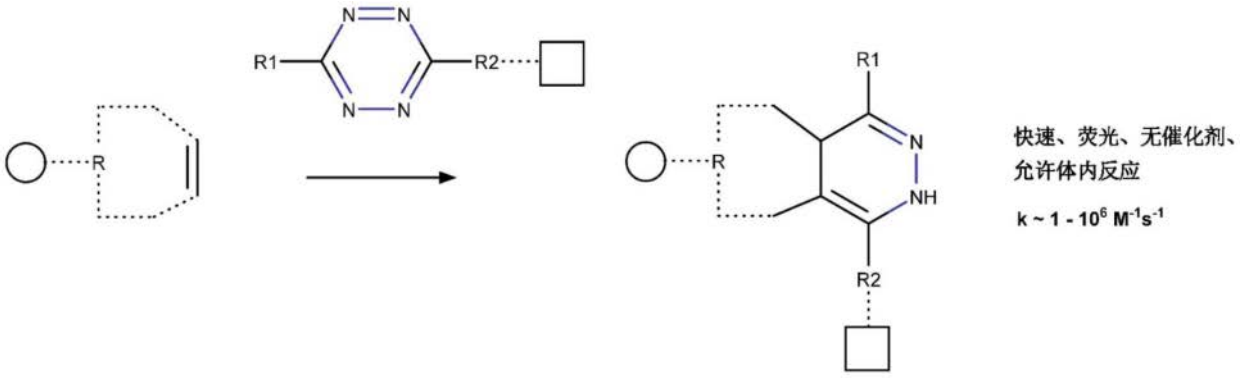

R1
R2
R
N
NH
快速、荧光、无催化剂、
允许体内反应
k ~ 1 - 10^6 M^-1s^-1

图1

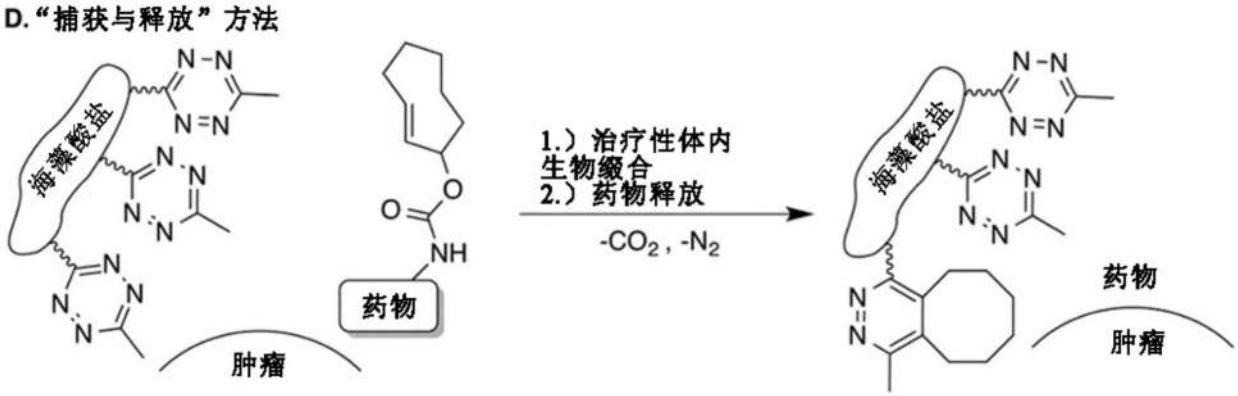

D.“捕获与释放”方法
海藻酸盐
药物
肿瘤
1.）治疗性体内
生物缀合
2.）药物释放
-CO2 , -N2
海藻酸盐
药物
肿瘤

图2

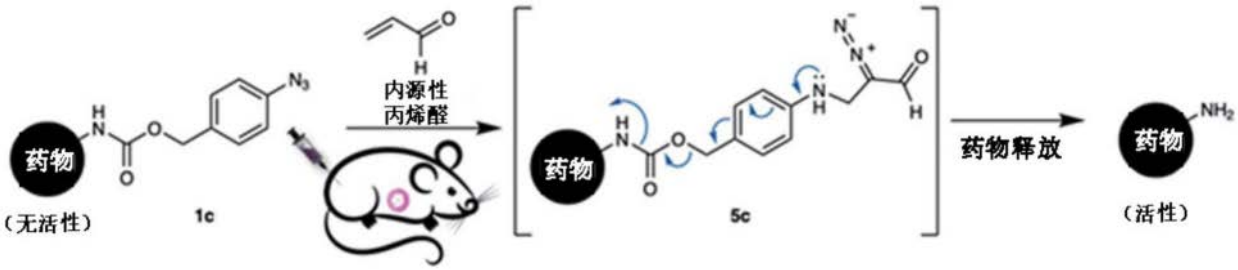

药物
（无活性）
1c
内源性
丙烯醛
药物
5c
药物释放
药物
（活性）

图3

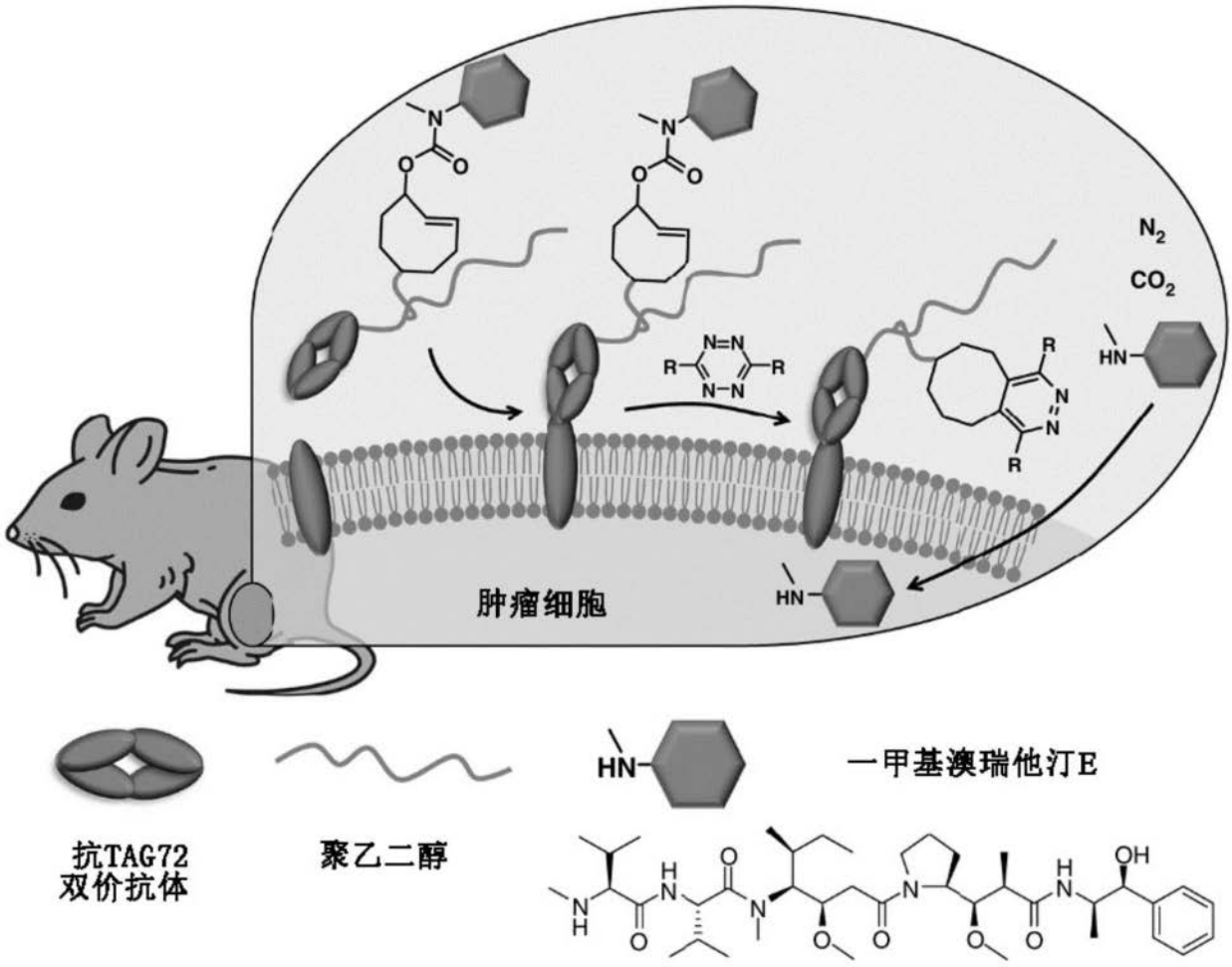


图4