



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117534764 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 09

(21) 申请号 202311507569.2

(22) 申请日 2017.06.06

(30) 优先权数据

1609866.7 2016.06.06 GB

1708105.0 2017.05.19 GB

(62) 分案原申请数据

201780035044.X 2017.06.06

(71) 申请人 阿布泽纳(英国)有限公司

地址 英国剑桥

(72) 发明人 T·D·琼斯 R·G·E·霍尔盖特

F·J·凯尔

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

专利代理师 张拥 张广育

(51) Int. Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书3页 说明书47页
序列表(电子公布) 附图26页

(54) 发明名称

抗体、其用途及其缀合物

(57) 摘要

抗体或其抗原结合部分,其与PSMA结合并包含含有SEQ ID NO:33中给出的序列的重链可变区,其中SEQ ID NO:33是EVQLVQSGX⁹EX¹¹KKPGASVKVSCX²⁴SGYTFEYTIHWVX³⁸QAX⁴¹GKLEWIGNINPNX⁵⁵GGTTYNOKFEDRX⁶⁸TX⁷⁰TVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGOGTTVTVSS,其中X⁹是A或P、X¹¹是V或L、X²⁴是A或T、X³⁸是R或K、X⁴¹是P或H、X⁵⁵是N或Q、X⁶⁸是V或A;并且X⁷⁰是I或L,其中,所述重链可变区在SEQ ID NO:33的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰。本发明还提供了包括抗体或其抗原结合部分的化合物,例如缀合物,以及它们在治疗或诊断疾病,特别是癌症,尤其是前列腺癌中的用途。

1. 一种抗体或其抗原结合部分,其与PSMA结合并包含重链可变区和轻链可变区,其中,所述重链可变区含有SEQ ID NO:33中给出的序列,其中

SEQ ID NO:33是:

EVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKV SCKX²⁴SGYTFT EYTIHWVX³⁸QAX⁴¹GKGLEWIGN INPNX⁵⁵GGTTY
NQKFEDRX⁶⁸TX⁷⁰TVDKSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCAAGW NFDYWGQGT T VTSS

其中,

X⁹是A或P

X¹¹是V或L

X²⁴是A或T

X³⁸是R或K

X⁴¹是P或H

X⁵⁵是N或Q

X⁶⁸是V或A;并且

X⁷⁰是I或L

其中,所述重链可变区在SEQ ID NO:33的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰;

以及其中所述轻链可变区含有SEQ ID NO:34中给出的序列,其中

SEQ ID NO:34是:

DIX³MTQSPSX¹⁰ LSASVGDRVT ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GQAPKLLIYWASTRHTGVPD
RFX⁶³GSGSGTD FTLTISRLQX⁸⁰EDFAX⁸⁵YX⁸⁷CQQ YNSYPLTFGQGT X¹⁰³VDIK

其中,

X³是Q或V

X¹⁰是T或F

X⁶³是S或T

X⁸⁰是P或S

X⁸⁵是V或D

X⁸⁷是Y或F;并且

X¹⁰³是K或M

其中所述轻链可变区在SEQ ID NO:34的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰。

2. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中所述重链可变区在SEQ ID NO:33的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间包含0、1或2个氨基酸序列修饰。

3. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中所述轻链可变区在SEQ ID NO:34的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含0、1或2个氨基酸序列修饰。

4. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中在SEQ ID NO:33中,X⁹为A、X¹¹为V、X²⁴为A或T、X³⁸为R或K、X⁴¹为P、X⁵⁵为N或Q、X⁶⁸为V或A,并且X⁷⁰为I。

5. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中在SEQ ID NO:33中,X⁹为A、X¹¹为V、X²⁴为A、X³⁸为R、X⁴¹为P、X⁵⁵为N、X⁶⁸为V,并且X⁷⁰为I。

6. 权利要求1的抗体或其抗原结合部分,其中在SEQ ID NO:34中,X³为Q或V、X¹⁰为T、X⁶³

为S或T、 X^{80} 为P或S、 X^{85} 为V或D、 X^{87} 为Y或F并且 X^{103} 为K。

7. 权利要求6的抗体或其抗原结合部分,其中在SEQ ID NO:34中, X^3 为Q、 X^{10} 为T、 X^{63} 为S、 X^{80} 为P、 X^{85} 为V、 X^{87} 为Y并且 X^{103} 为K。

8. 一种多核苷酸,其编码权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分。

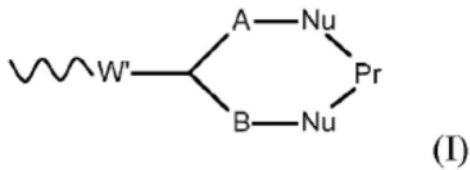
9. 一种载体,其包含权利要求8的多核苷酸。

10. 一种宿主细胞,其包含权利要求9的载体。

11. 一种抗体缀合物,其包含权利要求1的抗体或其抗原结合部分以及有效负载。

12. 权利要求11的抗体缀合物,其中所述有效负载为治疗剂、诊断剂或标记试剂,和/或聚合物。

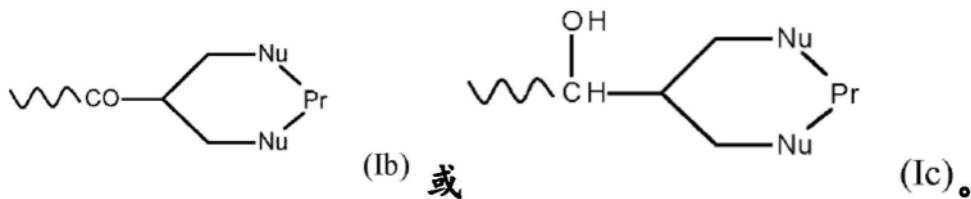
13. 权利要求11的抗体缀合物,其中所述有效负载与所述抗体或其抗原结合部分的键合是经由具有以下通式的键合部分进行的:



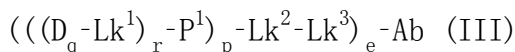
其中Pr代表所述抗体或其抗原结合部分,每个Nu代表存在于或连接至所述抗体或其抗原结合部分的亲核试剂,A和B各自独立地代表 C_{1-4} 亚烷基或亚烯基链,并且W'代表吸电子基团或通过还原吸电子基团得到的基团。

14. 权利要求13的缀合物,其中W'是酮基-CO-。

15. 权利要求13的缀合物,其中所述键合部分具有下式:



16. 权利要求13的缀合物,其具有以下通式:



其中D代表有效负载;

q代表1至10的整数;

Lk^1 代表接头;

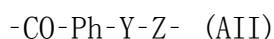
r代表1至10的整数;

P^1 代表键或c-价基团- P^2-NH- ,其中c为2至11,并且 P^2 为含有至少一个乙烯单元- CH_2-CH_2- 或乙二醇单元- $O-CH_2-CH_2-$ 的基团;

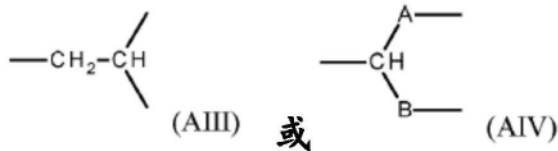
p代表1至10的整数;

Lk^2 代表键或d-价接头——其中d为2至11并且其由1至9个天冬氨酸和/或谷氨酸残基组成;

Lk^3 代表以下通式的接头:



其中,Ph是任选取代的苯基;Y代表CO基团或CH.OH基团;并且Z代表下式的基团:



其中,A和B各自代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基;

Ab代表权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,其经由来自所述抗体或其抗原结合部分中的二硫键的两个硫原子与Lk³键合;并且

e代表1至s的整数,其中s是在缀合至Lk³之前所述抗体或其抗原结合部分中存在的二硫键的数目。

17. 权利要求11至16中任一项的缀合物,其中所述有效负载是或包括奥瑞斯他汀或美登木素;或其中所述有效负载是或包括选自以下至少一种的可检测的标记物:放射性物质、染料、造影剂、荧光化合物、生物发光化合物、酶、增强剂或纳米颗粒。

18. 权利要求11至16中任一项的缀合物,其包括放射性同位素。

19. 权利要求18的缀合物,其中放射性同位素选自以下:碘-131、钷-90、镱-177、铜-67、碲-211、铅-212/铋-212、镭-225/铋-213和钷。

20. 权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物,其用于诊断或治疗。

21. 权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物,其用于诊断、治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症。

22. 用于权利要求21的用途的权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物,其中所述PSMA介导的疾病是癌症。

23. 用于权利要求22的用途的权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物,其中所述癌症为前列腺癌。

24. 用于权利要求22的用途的权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物,其中所述癌症为非前列腺癌。

25. 用于权利要求24的用途的权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物,其中所述非前列腺癌选自:膀胱癌,包括移行细胞癌;胰腺癌,包括胰管癌;肺癌,包括非小细胞肺癌;肾癌,包括常规肾细胞癌;肉瘤,包括软组织肉瘤;肝癌,包括转移性腺癌;乳腺癌,包括乳腺瘤;脑癌,包括多形性胶质母细胞瘤;神经内分泌癌;结肠癌,包括结肠瘤;睾丸癌,包括睾丸胚胎瘤;和黑色素瘤,包括恶性黑色素瘤。

26. 权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物用于制备用于治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的药物的用途。

27. 一种在体外检测样品中PSMA抗原的存在的方法,其使用权利要求1至7中任一项的抗体或其抗原结合部分,或权利要求11至16中任一项的抗体缀合物。

抗体、其用途及其缀合物

[0001] 本申请是2017年6月6日提交的申请号为PCT/GB2017/051638、发明名称为“抗体、其用途及其缀合物”的国际申请的分案申请,所述国际申请于2018年12月05日进入中国国家阶段,其申请号为201780035044.X。

[0002] 本发明涉及与PSMA结合的新的的人源化抗体,所述抗体和包括所述抗体的化合物(例如抗体的缀合物,例如抗体-药物缀合物)的用途。本发明的抗体和缀合物可用于治疗或诊断疾病,特别是癌症,尤其是前列腺癌。

背景技术

[0003] 抗体对靶细胞和分子表面上的特定抗原的特异性已经使得它们被广泛用作各种诊断和治疗试剂的载体。例如,与标记物和报告基团(如荧光团、放射性同位素和酶)缀合的抗体可用于标记和成像应用,而与细胞毒性试剂和化疗药物的缀合使得能够将这类试剂靶向递送到特定的组织或结构(例如,特定的细胞类型或生长因子),将对正常、健康组织的影响最小化并显著降低与化学疗法治疗相关的副作用。抗体-药物缀合物在一些疾病领域具有广泛的潜在的治疗应用。

[0004] 前列腺癌,也称为前列腺癌,是癌症在前列腺——男性生殖系统中的腺体——中的形成。在全球范围内,其是第二种最常见的癌症类型,并且是男性癌症相关死亡的第五大原因。晚期前列腺癌的一线治疗是雄激素剥夺。在进展之后,化疗提供了益处,但是反应是短暂的,并且没有已显示出在初始化疗之后提高存活率的疗法。转移性前列腺癌对常规化疗反应差。因此仍需要改进的疗法。

[0005] 前列腺特异性膜抗原(PSMA)表达与前列腺癌和其他实体瘤高度相关。PSMA存在于一些正常前列腺上皮细胞、正常肾近端小管细胞、近端小肠和一些星形胶质细胞(存在于脑中)的细胞表面上。PSMA在前列腺癌(PCa)细胞中高度上调/过表达。PSMA的表达水平随着前列腺癌进展而增加,并且早期前列腺癌中的高PSMA水平预示复发的可能性增加。相当大比例的实体瘤在其肿瘤新血管系统中表达PSMA,而正常血管内皮是PSMA阴性的。已观察到PSMA通过水解谷氨酸化的叶酸来增加可用的叶酸。据推测,PSMA通过增加癌细胞用于存活和生长的叶酸水平来刺激前列腺癌的形成。

[0006] 之前已产生了抗PSMA抗体(参见例如W098/03973),并且已制备了在人体中具有降低的免疫原性的经修饰的抗体(参见例如W02004/098535)。结合PSMA的去免疫的IgG单克隆抗体的实例是J591。小鼠J591抗体的重链可变区的氨基酸序列在本文以SEQ ID NO:23给出,相应的轻链在本文以SEQ ID NO:24给出。去免疫的抗体J591的重链可变区的氨基酸序列在本文以SEQ ID NO:25给出,相应的轻链在本文以SEQ ID NO:26给出。去免疫的J591已经以放射性标记的形式用于临床中,并且已被证明具有良好的耐受性和非免疫原性(参见Tagawa et al.,Cancer,2010,116(4),1075-1083)。

[0007] 在W003/034903及其家族成员(包括US 8,470,330B)中公开了结合PSMA的抗体的其他实例。例如,抗体“AB-PG1-XG1-006”在这些公开文本中具有重链和轻链序列SEQ ID NO 15和SEQ ID NO 17(在本文以SEQ ID NO 35和36给出),抗体“AB-PG1-XG1-026”在这些公开

文本中具有重链和轻链序列SEQ ID NO 19和SEQ ID NO 21(在本文以SEQ ID NO 37和38给出)。

[0008] 除了具有良好的靶标结合亲和力、低脱靶结合性和低免疫原性,作为药物候选物的抗体(无论是单独的还是与另一种活性成分缀合的)还应具有良好的稳定性。也就是说,其应该具有较低的变性或聚集、或解离成组分片段的倾向。鉴于这组苛刻的性质,仍需要开发其他有益的抗PSMA抗体。

发明内容

[0009] 本发明涉及与PSMA结合的新的人源化抗体。本发明提供了抗体或抗体的抗原结合部分,其与PSMA结合并包含含有SEQ ID NO:33中给出的序列的重链可变区,其中

[0010] SEQ ID NO:33是:

EVQLVQSGX⁹E X¹¹KKPGASVKV SCKX²⁴SGYTFT EYTIHWVX³⁸QA

[0011] X⁴¹GKGLEWIGN INPNX⁵⁵GGTTY NQKFEDRX⁶⁸TX⁷⁰ TVDKSTSTAY

MELSSLRSED TAVYYCAAGW NFDYWGQGTT VTVSS

[0012] 其中,

[0013] X⁹是A或P

[0014] X¹¹是V或L

[0015] X²⁴是A或T

[0016] X³⁸是R或K

[0017] X⁴¹是P或H

[0018] X⁵⁵是N或Q

[0019] X⁶⁸是V或A;并且

[0020] X⁷⁰是I或L

[0021] 其中,所述重链可变区在SEQ ID NO:33的第1-30、36-49、67-98和105-115位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰。

[0022] 在优选的实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合部分也包含含有SEQ ID NO:34中给出的序列的轻链可变区,其中

[0023] SEQ ID NO:34是:

DIX³MTQSPSX¹⁰ LSASVGDRTV ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GQAPKLLIYW

[0024] ASTRHTGVDP RFX⁶³GSGSGTD FTLTISRLQX⁸⁰ EDFAX⁸⁵YX⁸⁷CQQ YNSYPLTFGQ

GTX¹⁰³VDIK

[0025] 其中,

[0026] X³是Q或V

[0027] X¹⁰是T或F

[0028] X⁶³是S或T

[0029] X⁸⁰是P或S

[0030] X⁸⁵是V或D

[0031] X⁸⁷是Y或F;并且

[0032] X¹⁰³是K或M

[0033] 其中,所述轻链可变区在SEQ ID NO:34的第1-23、35-49、57-88和98-107位之间包含最多达3个氨基酸序列修饰。

[0034] 本发明的抗体和抗原结合部分具有与PSMA的强结合力、低的免疫原性和良好的稳定性。具有良好稳定性的抗体是有利的,因为其具有较小的变性或聚集、或解离成组分片段的倾向。因此,其可能更长时间地以天然构象存在于循环中。由于片段化抗体(或抗体-药物缀合物)失去其与靶抗原结合的能力,减少的片段化是有利的。细胞毒性药物往往是疏水性的,因此其在溶液中显示出聚集的趋势。降低的聚集趋势也是抗体-药物缀合物的优势。聚集体可促进免疫反应,也就是说,它们可具有免疫原性。包含本发明的抗体或抗原结合部分的抗体-药物缀合物具有良好的稳定性和降低的在溶液中聚集的趋势。

[0035] 本发明的抗体和抗原结合部分显示出良好的高选择性、效力和/或活性。显示出高选择性、效力和活性的抗体是特别优选的。

[0036] 本发明的抗体和抗原结合部分也显示出良好的表达效率。抗体的表达效率是抗体或抗体-药物缀合物生产中的重要因素。例如,获得抗体的稳定的、高产量的表达对于用于诊断或治疗用途的生产是重要的,其中甚至需要大量的抗体进行临床试验。因此,在整个表达和纯化过程中轻链或重链的表达水平及其易于操作可影响对选择用于生产的抗体的选择。优选具有高溶解度和低聚集倾向的表达良好的抗体。

附图说明

[0037] 图1示出了(a)重链和轻链抗体结构域和(b)人PSMA抗原的pANT表达载体的结构。

[0038] 图2示出了在经转染的细胞系中PSMA的表达。

[0039] 图3示出了通过FACS所分析的本发明抗体和现有技术抗体对PSMA抗原的竞争性结合。

[0040] 图4示出了使用本发明的抗体制备的抗体-药物缀合物的药物与抗体比例(DAR)的分布。

[0041] 图5示出了当用使用本发明的抗体制备的抗体-药物缀合物处理时LNCaP细胞的细胞活力应答。

[0042] 图6示出了当用使用本发明的抗体制备的不同的抗体-药物缀合物处理时LNCaP细胞的细胞活力应答。

[0043] 图7至14示出了在响应用使用本发明的抗体制备的抗体-药物缀合物给药时,体内异种移植物模型中的肿瘤体积随时间的变化。

[0044] 图15至21示出了本发明和现有技术重链和轻链抗体片段的核酸和氨基酸序列,以及PSMA抗原的核酸和氨基酸序列。

[0045] 图22示出了本发明的重链和轻链序列与现有技术序列的比对。

[0046] 图23示出了来自所获得的(A)AB-03、(B)AB-P1和(C)AB-P2抗体的原始熔点数据的一阶导数图。

具体实施方式

[0047] CDR区在上文的序列SEQ ID NO:33和34中以下划线示出。本发明包括在重链和轻

链可变区之一或两者中具有如上所定义的CDR区外的最多达3个氨基酸序列修饰的抗体及其抗原结合部分。例如,这种修饰可以改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。氨基酸序列修饰可通过将合适的核苷酸变化引入到抗体核酸中或通过肽合成来制备。这种修饰包括,例如,抗体的氨基酸序列内的残基的缺失、和/或插入和/或置换。可进行缺失、插入和置换的任意组合以获得最终构建体,只要所述最终构建体具有所需特征。置换可以是保守性置换或非保守性置换。氨基酸变化也可改变抗体的翻译后过程,例如改变糖基化位点的数量或位置。

[0048] 例如,当氨基酸序列修饰是置换时,优选是保守性置换,即,基本上不降低抗体或其抗原结合部分对抗原的特异性结合(例如,通过 K_D 测量的)的氨基酸置换(例如,增加结合、不显著改变结合或降低结合不超过约40%、通常不超过约30%、更通常不超过约20%、甚至更通常不超过约10%、或最通常不超过约5%的置换,如通过标准结合测定法(例如,ELISA)测定的)。

[0049] 例如,重链中CDR区外的0、1或2个残基,以及轻链中CDR区外的0、1或2个残基可被另一个氨基酸替换。例如,重链中CDR区外的0或1个残基可被另一个氨基酸替换。例如,轻链中CDR区外的0或1个残基可被另一个氨基酸替换。优选地,序列SEQ ID NO:33和34中没有残基被改变为除了具体列举的氨基酸之外的氨基酸。例如,SEQ ID NO:33可以是SEQ ID:10、SEQ ID:11、SEQ ID:12、SEQ ID:13或SEQ ID:14的序列。例如,SEQ ID NO:34可以是SEQ ID:15、SEQ ID:16、SEQ ID:17或SEQ ID:18的序列。

[0050] 在SEQ ID NO:33中,优选:

[0051] X^9 为A、 X^{11} 为V、 X^{24} 为A或T、 X^{38} 为R或K、 X^{41} 为P、 X^{55} 为N或Q、 X^{68} 为V或A,并且 X^{70} 为I。例如,SEQ ID NO:33可以是SEQ ID:11、SEQ ID:12、SEQ ID:13或SEQ ID:14的序列。

[0052] 在SEQ ID NO:33中,还优选:

[0053] X^9 为A、 X^{11} 为V、 X^{24} 为A、 X^{38} 为R、 X^{41} 为P、 X^{55} 为N或Q、 X^{68} 为V,并且 X^{70} 为I。例如,SEQ ID NO:33可以是SEQ ID:13或SEQ ID:14的序列。

[0054] 特别地,尤其优选的是:

[0055] X^9 为A、 X^{11} 为V、 X^{24} 为A、 X^{38} 为R、 X^{41} 为P、 X^{55} 为N、 X^{68} 为V,并且 X^{70} 为I。例如,SEQ ID NO:33可以是SEQ ID:13的序列。

[0056] 在SEQ ID NO:34中,优选:

[0057] X^3 为Q或V、 X^{10} 为T、 X^{63} 为S或T、 X^{80} 为P或S、 X^{85} 为V或D、 X^{87} 为Y或F,并且 X^{103} 为K。例如,SEQ ID NO:43可以是SEQ ID:16、SEQ ID:17或SEQ ID:18的序列。

[0058] 在SEQ ID NO:34中,还优选:

[0059] X^3 为Q或V、 X^{10} 为T、 X^{63} 为S、 X^{80} 为P、 X^{85} 为V或D、 X^{87} 为Y,并且 X^{103} 为K。例如,SEQ ID NO:34可以是SEQ ID:17或SEQ ID:18的序列。

[0060] 在SEQ ID NO:34中,特别优选:

[0061] X^3 为Q、 X^{10} 为T、 X^{63} 为S、 X^{80} 为P、 X^{85} 为V、 X^{87} 为Y,并且 X^{103} 为K。例如,SEQ ID NO:34可以是SEQ ID:18的序列。

[0062] 在优选的实施方案中,本发明的抗体包含SEQ ID NO:13的重链可变区和SEQ ID NO:17的轻链可变区(称为'VH4/VK3');或SEQ ID NO:14的重链可变区和SEQ ID NO:17的轻链可变区(称为'VH5/VK3');或SEQ ID NO:13的重链可变区和SEQ ID NO:18的轻链可变区

(称为'VH4/VK4');或SEQ ID NO:14的重链可变区和SEQ ID NO:18的轻链可变区(称为'VH5/VK4')。

[0063] 本发明的抗体是与PSMA(例如人PSMA)结合的人源化抗体,其平衡解离常数(Kd)为 10^{-8} M或更低,例如 10^{-9} M或更低,例如 750×10^{-12} M或更低,例如 500×10^{-12} M或更低。例如,本发明的抗体特异性地与人前列腺癌细胞结合。

[0064] 与某些现有技术人源化的(或去免疫的)抗PSMA抗体相比,本发明的抗体具有改善的稳定性。因此,本发明的抗体具有更小的变性或聚集、或解离成组分片段的倾向。因此,可假设其更长时间地以天然构象保持在循环中。对于抗体-药物缀合物和产生这些缀合物的试剂而言,降低的聚集倾向是特别有利的;细胞毒性药物往往是疏水性的,因此缀合试剂和具有细胞毒性药物的抗体-药物缀合物具有在溶液中聚集的趋势,这显著降低了它们的有效性。片段化的抗体(包括作为抗体-药物缀合物的一部分)失去其与靶抗原结合的能力。因此,对片段化敏感性降低的抗体也是有利的。

[0065] 本发明的抗体可具有同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD或IgE的重链。IgG1、IgG2、IgG3和IgG4是特别优选的。或者,其可具有改变的IgG恒定区,例如以增加或降低与Fc受体的结合或增加或降低与补体的结合,例如,IgG恒定区可以是IgG4k或IgG1k。本发明的抗体可具有为 κ 轻链的抗体轻链。

[0066] 本发明化合物可以是全长抗体(例如IgG4或IgG1抗体)。或者,其可仅包括抗原结合部分。例如,本发明的化合物可以是Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fd链、Fv片段或单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(sdFv)、仅包含V_H结构域的片段,包括来自骆驼、美洲驼等的纳米抗体或片段。本发明还提供了双特异性和多特异性抗体(被连接在一起以产生两种或更多种不同的特异性的两种或更多种不同的抗体分子),包括如上所述的至少一种抗体或其抗原结合部分。抗原结合部分可以是,例如,由scFv片段或双抗体和Fc片段或C_H结构域的不同排列组成的微抗体,例如scFv-Fc、scFv-Fc-scFv、(Fab' ScFv)₂、scDiabody-Fc、scDiabody-C_H3、scFv-C_H3、scFv-C_H2-C_H3融合蛋白等。抗体片段可通过酶促切割、合成或重组技术产生。

[0067] 本发明的抗体或其抗原结合部分可通过哺乳动物细胞系(尤其是CHO或NS0细胞)产生。例如,本发明的抗体可以是单克隆抗体。

[0068] 本发明的抗体或其抗原结合部分可用作体内和体外的诊断剂或治疗剂。

[0069] 另一方面,本发明提供了编码本发明的人源化抗体或其抗原结合部分的核酸分子。因此,本发明还涵盖包括本发明的编码抗体的核酸的重组表达载体和转染有这些载体的宿主细胞,以及通过培养这些宿主细胞制备本发明的抗体的方法。例如,本发明的抗体或其抗原结合部分可由具有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:5(重链)或SEQ ID NO:6至SEQ ID NO:9(轻链)所示的序列的人IgG重链核酸和人 κ 轻链核酸或其变体编码。

[0070] 例如,可确定变体核酸在本发明的范围内,其中包括含有SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:9或基本上与其相同的序列,例如通过其在严格条件下与本发明的核酸(例如SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:9的核酸)杂交的能力来确定的。术语“杂交”是指当特定核苷酸序列存在于复杂混合物(例如总细胞或文库DNA或RNA)中时,分子与该序列在严格杂交条件下的结合、双链体化或杂交,其中至少在约10倍的背景下检测所述特定核苷酸序列。选择严格杂交条件为,例如,比特定序列在确定的离子强度和pH下的热熔点(T_m)低5-10°C。例如,严格的杂交条件可以是:

- [0071] • 50% 去离子甲酰胺
- [0072] • 2x 盐水柠檬酸钠 (SSC)*
- [0073] • 50mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液; pH7.0
- [0074] • 1mM EDTA
- [0075] • 靶DNA/RNA (每种1mg/ml)
- [0076] • 探针 (约20-200ng/ml)
- [0077] 温度: 37至42°C; 杂交时间: 5分钟--16小时
- [0078] *SSC: 1x SSC=150mM NaCl, 15mM柠檬酸钠; pH7.0。
- [0079] 缀合物

[0080] 本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合部分, 例如, 经由接头与有效负载缀合的Fab, 所述有效负载可以是另一种功能性分子 (例如治疗剂、诊断剂或标记试剂) 和/或聚合物。可存在另一种功能性分子的单一分子, 或可存在两个或更多个分子。通常优选抗体药物缀合物应含有多拷贝的药物。所述功能性分子可以是例如另一种肽或蛋白质, 例如, Fab' 片段。优选包含一种或多种药物分子, 例如细胞毒性剂或毒素。奥瑞斯他汀类 (Auristatins) 和美登木素类 (maytansinoids) 是典型的细胞毒性药物。标记试剂 (其应被理解为包括成像试剂) 可例如包括放射性核素、荧光剂 (例如胺衍生的荧光探针, 例如5-二甲氨基萘基-1- (N- (2-氨基乙基)) 磺酰胺-丹磺酰基乙二胺、**OregonGreen®**488尸胺 (目录号O-10465, Molecular Probes)、丹磺酰尸胺、N- (2-氨基乙基) -4-氨基-3,6-二硫代-1,8-萘酰亚胺、二钾盐 (荧光黄乙二胺)、或罗丹明B乙二胺 (目录号L 2424, Molecular Probes)、或硫醇衍生的荧光探针, 例如**BODIPY®**FL L-胱氨酸 (目录号B-20340, Molecular Probes))。标记试剂也可以是染料、造影剂、生物发光剂、酶、增强剂或纳米颗粒。还可以使用生物素。

[0081] 在一些实施方案中, 将抗体或其抗原结合部分与治疗剂缀合。本文使用的“治疗剂”是可用于治疗由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的原子、分子或化合物。治疗剂的实例包括但不限于药物、化学治疗剂、治疗性抗体和抗体片段、毒素、放射性同位素、酶 (例如, 在抗原结合构建体结合位点将前药切割成细胞毒性剂的酶)、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、螯合剂、硼化合物、光活性剂和染料、以及纳米颗粒。

[0082] 在一些实施方案中, 治疗方法包括通过连接适当的放射性标记 (例如碘-131、 β -发射体、例如钷-90、镱-177、铜-67、砷-211、铅-212/铋-212、镅-225/铋-213和钷) 进行的放射免疫疗法, 其可以对靶组织造成细胞损伤和死亡。

[0083] 在一些实施方案中, 将纳米颗粒在治疗应用中用作药物载体, 当与抗体或其抗原结合部分缀合时, 其将化学治疗剂、激素治疗剂、放射治疗剂、毒素或任何本领域中已知的其他细胞毒性剂或抗癌剂递送至过表达PSMA的癌细胞中。本文所述的任何抗体或其抗原结合部分可进一步与一种或多种额外的治疗剂、可检测的标记物、纳米颗粒、载体或其组合缀合。例如, 抗体或其抗原结合部分可以用碘-131放射性标记并与脂质载体缀合, 以使得抗PSMA-脂质缀合物形成胶束。胶束可掺入一种或多种治疗的或可检测的标记物。或者, 除载体外, 抗原结合构建体还可以用碘-131I放射性标记 (例如, 在酪氨酸残基处) 并与药物缀合 (例如, 在赖氨酸残基的 ϵ 氨基处), 并且载体可以掺入额外的治疗的或可检测的标记物。

[0084] 在一些实施方案中, 本发明的抗原结合部分与治疗剂缀合。虽然与全长抗体相比,

这些抗原结合部分可具有更短的循环半衰期,但在一些实施方案中,这些形式可基于其较小的尺寸表现出改善的肿瘤穿透性,并且当适当地装备有细胞毒性药物或放射性同位素时是治疗有效的。在一些实施方案中,可使用抗体药物-缀合物方法。在一些实施方案中,用这些装备有细胞毒性药物或放射性核素的片段进行治疗导致较少的非特异性毒性,因为它们会更快地从体内清除。

[0085] 在一些实施方案中,将抗体或其抗原结合部分与可检测的标记物缀合。本文使用的“可检测的标记物”包括可用于诊断、检测或可视化细胞、组织、器官等中的PSMA抗原的位置和/或量的原子、分子或化合物。可根据本文的实施方案使用的可检测的标记物包括但不限于放射性物质(例如,放射性同位素、放射性核素、放射性标记或放射性示踪剂)、染料、造影剂、荧光化合物或分子、生物发光化合物或分子、酶和增强剂(例如,顺磁离子)。另外,本领域已知一些纳米颗粒,例如量子点和金属纳米颗粒,适合用作检测剂。在一些实施方案中,可检测的标记物是吲哚菁绿(ICG)、镧-89、IR800和/或另一种近红外染料。

[0086] 可根据本文的实施方案用作可检测的标记物的示例性的放射性物质包括但不限于¹⁸F、¹⁸F-FAC、³²P、³³P、⁴⁵Ti、⁴⁷Sc、⁵²Fe、⁵⁹Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷⁵Sc、⁷⁷As、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Sr、⁸⁹Zr、⁹⁴Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、⁹⁹Mo、¹⁰⁵Pd、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Er、¹⁷⁵Lu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²¹¹At、²¹¹Pb、²¹²Bi、²¹²Pb、²¹³Bi、²²³Ra和²²⁵Ac。可用作可检测的标记物的示例性的顺磁离子物质包括但不限于过渡金属离子和镧系金属离子(例如原子序数为6-9、21-29、42、43、44或57-71的金属)。这些金属包括Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb和Lu的离子。

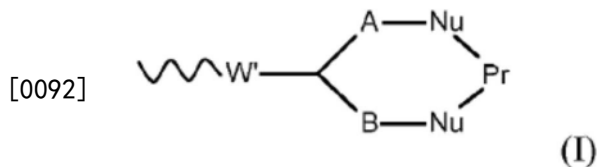
[0087] 可根据本公开内容的实施方案用作可检测的标记物的示例性的造影剂包括但不限于钡、泛影葡胺、乙氧基化油、柠檬酸镱、碘卡酸,碘酸胺酸,碘达胺、胆影酸、碘沙酸、iogulamamide、碘海醇、碘帕醇、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘硃葡胺、iosemetic acid、碘酞硫、碘替酸、碘他拉酸、碘曲西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影酸、丙碘酮、氯化亚锡或其组合。

[0088] 可根据本公开内容的实施方案用作可检测的标记物的生物发光和荧光化合物或分子和染料包括但不限于荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、OREGON GREEN™、罗丹明、德克萨斯红、四罗丹明异硫氰酸盐(TRITC)、Cy3、Cy5等、荧光标记物(例如,绿色荧光蛋白(GFP)、藻红蛋白等)、由肿瘤相关蛋白酶激活的自动猝灭的荧光化合物、酶(例如荧光素酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、纳米颗粒、生物素、洋地黄毒苷或其组合。

[0089] 可根据本公开内容的实施方案用作可检测的标记物的酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡糖醛酸酶或 β -内酰胺酶。这些酶可以与色原、荧光化合物或发光化合物组合使用以产生可检测的信号。

[0090] 用于将有效负载连接到抗体或其抗原结合部分的合适接头是下文关于缀合试剂的部分中描述的那些。所述接头是有利地可降解的,如下所述。在一些优选的实施方案中,所述接头包括聚合物,如下所述。

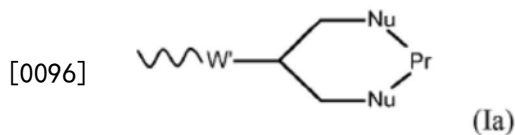
[0091] 本发明的优选缀合物是其中有效负载与抗体或其抗原结合部分的键合是经由具有以下通式的键合部分进行的那些:



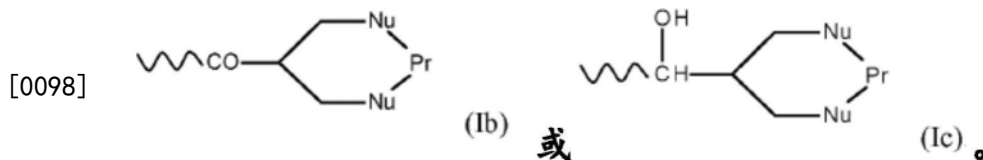
[0093] 其中Pr代表所述抗体或其抗原结合部分,每个Nu代表存在于或连接至所述抗体或其抗原结合部分的亲核试剂,A和B各自独立地代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基链,并且W'代表吸电子基团或通过还原吸电子基团得到的基团。

[0094] 吸电子基团W'可以是例如酮基-CO-、酯基-OCO-或砵基-SO₂-。优选地,W'代表这些基团之一或如下所述通过还原这些基团之一获得的基团。优选地,W'代表酮基或通过还原酮基获得的基团,特别是CH.OH基团。

[0095] 优选地,所述基团(grouping)具有下式:

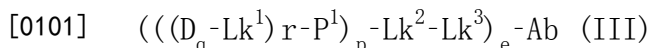


[0097] 尤其是



[0099] 抗体或其抗原结合部分中的亲核基团是例如由半胱氨酸、赖氨酸或组氨酸残基提供,并且Nu可以例如是硫原子或胺基。在本发明的一个优选实施方案中,每个Nu代表存在于抗体或其抗原结合部分中存在的半胱氨酸残基中的硫原子。根据本发明的抗体通常含有四个链间二硫键。可以还原这些中的每一个以提供充当亲核试剂的游离巯基。如果这些二硫键中的每一个如上式I所示桥接,则将产生药物-抗体比例(DAR)为4的缀合物。在另一个实施方案中,每个Nu代表存在于与所述抗体或其抗原结合部分连接的多聚组氨酸标签中存在的组氨酸残基中的咪唑基团。

[0100] 本发明的缀合物可以,例如,具有以下通式:



[0102] 其中D代表有效负载;

[0103] q代表1至10的整数;

[0104] Lk¹代表接头;

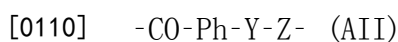
[0105] r代表1至10的整数;

[0106] P¹代表键或c-价基团-P²-NH-,其中c为2至11,并且P²为含有至少一个乙烯单元-CH₂-CH₂-或乙二醇单元-O-CH₂-CH₂-的基团;

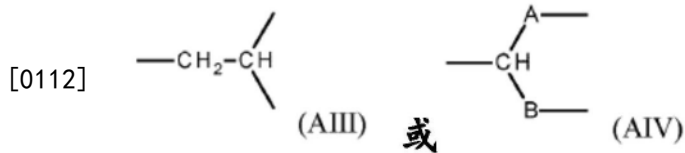
[0107] e代表1至10的整数;

[0108] Lk²代表键或d-价接头——其中d为2至11并且其由1至9个天冬氨酸和/或谷氨酸残基组成;

[0109] Lk³代表以下通式的接头:



[0111] 其中,Ph是任选取代的苯基;Y代表CO基团或CH.OH基团;并且Z代表下式的基团:



[0113] 其中,A和B各自代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基;

[0114] Ab代表本发明的抗体或其抗原结合部分,其经由来自所述抗体或其抗原结合部分中的二硫键的两个硫原子与Lk³键合;并且

[0115] e代表1至s的整数,其中s是在缀合至Lk³之前所述抗体或其抗原结合部分中存在的二硫键的数目。

[0116] q、r、e、c和d的含义决定了所存在的D基团的总数。该数目可例如最高达20,例如最高达15,例如最高达10,例如1、2、3或4。

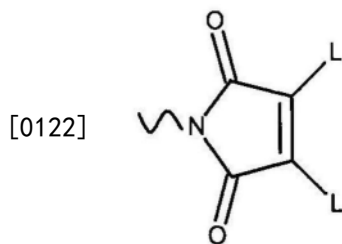
[0117] 缀合试剂

[0118] 根据本发明的缀合物可以通过使缀合试剂与本发明的抗体或其抗原结合部分反应来制备。缀合可以例如通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其他方式进行,但优选通过化学偶联进行。通常,缀合试剂将包含能够与至少一种亲电试剂或尤其是抗体或其抗原结合部分中存在的亲核试剂共价反应的官能团,该官能团经由接头与有效负载连接。可用于将有效负载与抗体或其抗原结合部分缀合的许多缀合试剂是已知的,并且这些中的任何一种都可用于制备本发明的缀合物。

[0119] 例如,所述试剂可含有马来酰亚胺基团,点击化学基团,例如叠氮基或炔基,胺基,羧基或活性酯基。其他可能的方法包括使用已经用特异性用于缀合的氨基酸(例如经改造的半胱氨酸或非天然氨基酸)进行重组改造的抗体,以及通过特定的酶促反应(例如使用转谷氨酰胺酶)进行酶促缀合。抗体或其抗原结合部分上的反应位点在性质上可以是亲核的或亲电子的。常见的蛋白质缀合位点为赖氨酸或半胱氨酸氨基酸残基或碳水化合物部分。或者,缀合可发生在多聚组氨酸标签上,所述标签已经连接至所述抗体或其抗原结合部分。

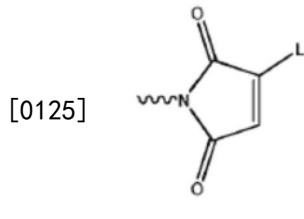
[0120] 有利地,缀合试剂能够与所述抗体或其抗原结合部分中的亲核试剂反应,从而与其化学键合。因此,缀合试剂通常包括至少一个离去基团,其在与亲核试剂反应时失去。缀合试剂可例如包括两个或更多个离去基团。优选地,缀合试剂能够与两个亲核试剂反应。有利地,缀合试剂包含至少两个离去基团。如果存在两个或更多个离去基团,它们可以是相同的或不同的。或者,缀合试剂可含有单个基团,其在化学上等价于两个离去基团,并且该单个基团能够与两个亲核试剂反应。

[0121] 一组试剂是基于如Smith et al., J. Am. Chem. Soc, 2010, 132, 1960-1965和Schumaker et al., Bioconj. Chem., 2011, 22, 132-136中所描述的双-卤代-或双-硫代-马来酰亚胺和其衍生物。这些试剂包含以下的官能团:



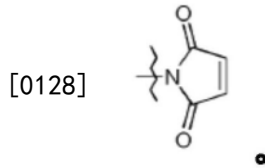
[0123] 其中每个L为离去基团。马来酰亚胺环的氮原子可直接或间接地携带有效负载。

[0124] 类似地,可使用含有单个离去基团L的马来酰亚胺:



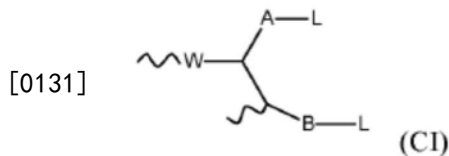
[0126] 同样地,马来酰亚胺环的氮原子直接或间接地携带有效负载。

[0127] 此外,可使用缺少离去基团的马来酰亚胺:

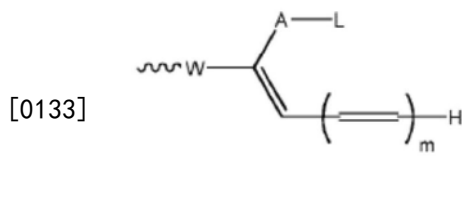


[0129] 同样地,马来酰亚胺环的氮原子直接或间接地携带有效负载。

[0130] 在优选的实施方案中,缀合试剂含有以下官能团:



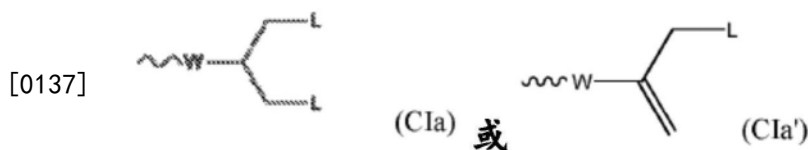
[0132] 其中W代表吸电子基团,例如酮基、酯基-O-CO-、砜基-SO₂-或氰基;A代表C₁₋₅亚烷基或亚烯基链;B代表键或C₁₋₄亚烷基或亚烯基链;并且每个L独立地代表离去基团,或两个L一起代表离去基团。这种类型的试剂记载于Bioconj.Chem 1990(1),36-50,Bioconj.Chem 1990(1),51-59和J.Am.Chem.Soc.110,5211-5212中。当含有这些基团的试剂与抗体或其抗原结合部分反应时,失去第一离去基团L以原位形成含有下式官能团的缀合试剂:



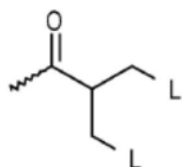
[0134] 其中m为0至4,其与第一亲核试剂反应。然后失去第二个离去基团L,并发生与第二亲核试剂的反应。作为使用含有官能团CI的试剂作为起始原料的替代方案,含有官能团CI'的试剂可用作起始原料。

[0135] 优选地,W代表酮基。优选地,A代表-CH₂-,B代表键。

[0136] 特别优选的式CI和CI'的官能团具有下式:

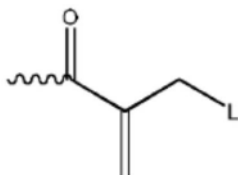


[0138] 例如,所述基团可具有下式:



[0139]

(C1b) 或



(C1b')

[0140] 另一组缀合试剂含有以下官能团:

[0141] $\sim W-CR^4R^{4'}-CR^4.L.L'$ (CII)

[0142] 其中W具有以上给出的含义和优选的含义,并且

[0143] 每个 R^4 代表氢原子或 C_{1-4} 烷基, $R^{4'}$ 代表氢原子,并且每个L独立地代表离去基团,或者两个L一起代表离去基团;或者[0144] 每个 R^4 代表氢原子或 C_{1-4} 烷基,L代表离去基团,并且 $R^{4'}$ 和L'一起代表键。

[0145] 另一组缀合试剂包括以下官能团:

[0146] $\sim W-(CH=CH)_p-(CH_2)_2-L$ (CIII) 或[0147] $\sim W-(CH=CH)_p-CH=CH_2$ (CIII')

[0148] 其中W具有以上给出的含义和优选的含义,并且p代表0或1至4的整数,优选0。特别优选的这类试剂包括以下官能团:

[0149] $\sim NH-CO-Ar-CO-CH=(CH_2)_2-L$ (CIIIa) 或[0150] $\sim NH-CO-Ar-CO-CH=CH_2$ (CIIIa')

[0151] 其中,Ar代表任选取代的芳基,尤其是苯基。

[0152] 例如,离去基团L可以是-SP、-OP、-SO₂P、-OSO₂P、-N⁺PR²R³、卤素、-O \bigcirc ,其中P代表氢原子、烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基)、或烷基-芳基(优选C₁₋₆烷基-苯基),或是包括部分-(CH₂CH₂O)_n-—其中n是2或更大、特别是6或更大的数——的基团,并且R²和R³各自独立地代表氢原子、C₁₋₄烷基或基团P,并且 \bigcirc 代表取代的芳基(尤其是苯基),其含有至少一个取代基,例如-CN、-CF₃、-NO₂、-CO₂R'、-COH、-CH₂OH、-COR'、-OR'、-OCOR'、-OCO₂R'、-SR'、-SOR'、-SO₂R'、-NHCOR'、-NR'COR'、-NHCO₂R'、-NR'CO₂R'、-NO、-NHOH、-NR'OH、-CH=N-NR'COR'、-N⁺R'₃、卤素(尤其是氯或尤其是氟)、-C=CR'和-CH=CR'₂,其中每个R'代表氢原子或烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基)或烷基-芳基(优选C₁₋₈烷基-苯基)。吸电子取代基的存在是优选的。

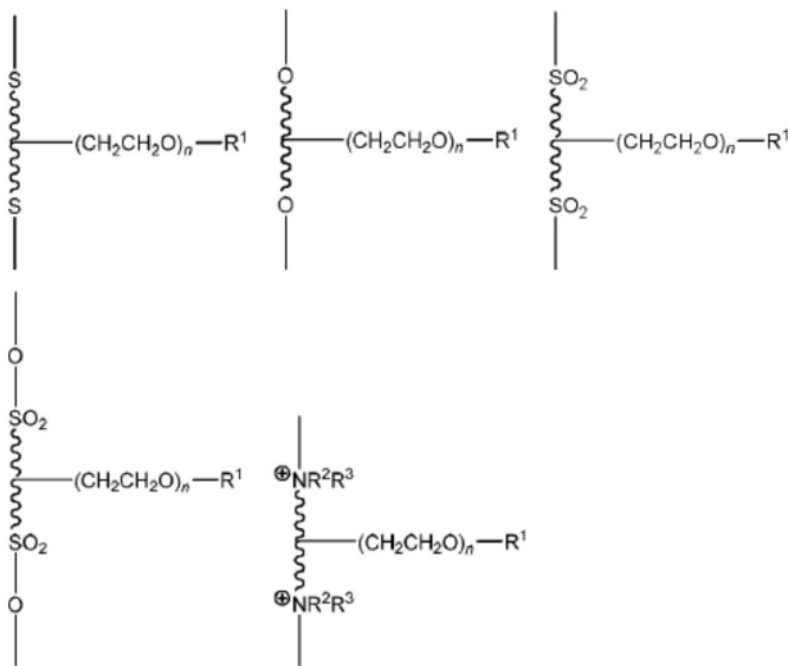
[0153] 其中P代表包括部分-(CH₂CH₂O)_n-—其中n是2或更大的数——的基团的缀合试剂是本发明人的共同悬而未决的申请GB 1418186.1——现公开为W02016/059377的PCT/GB2015/052952要求其优先权——的主题。该申请公开了以下内容:

[0154] “离去基团可以例如包括-(CH₂CH₂O)_n-R¹,其中R¹是封端基团。可以使用非常宽范围的封端基团。R¹可以例如是氢原子、烷基(尤其是C₁₋₄烷基,特别是甲基),或任选取代的芳基(例如任选取代的苯基,例如甲苯基)。或者,封端基团可包括官能团,例如羧基或胺基。这些封端基团可例如具有式-CH₂CH₂CO₂H或-CH₂CH₂NH₂,并且可以通过官能化-(CH₂CH₂O)_n-链的末

端单元来制备。或者,不同于由封端基团封端, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 基团可在缀合试剂内具有两个连接点,以使得在化学上存在两个离去基团的等价物,能够与两个亲核试剂结合。

[0155] 离去基团的 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 部分是基于PEG、聚乙二醇。PEG可以是直链或支链的,并且可以是衍生的或以任何方式官能化的。 n 是2或更大的数,例如2、3、4、5、6、7、8、9或10。例如, n 可以是5至9。或者, n 可以是10或更大的数。 n 没有具体的上限。 n 可以例如是150或更小,例如120或更小,例如100或更小。例如, n 可以是2至150,例如7至150,例如7至120。离去基团的PEG部分 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 可以例如具有1至5kDa的分子量;其可以是例如1kDa、2kDa、3kDa、4kDa或5kDa。如果需要,离去基团可以含有两个或更多个由一个或多个间隔物隔开的部分 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 。

[0156] 根据本发明的试剂中的离去基团适当地具有式 $-\text{SP}$ 、 $-\text{OP}$ 、 $-\text{SO}_2\text{P}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{P}$ 、 $-\text{N}^+\text{PR}^2\text{R}^3$, 其中P是包含部分 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 的基团,并且 R^2 和 R^3 各自独立地代表氢原子、 C_{1-4} 烷基或基团P。优选地, R^2 和 R^3 各自代表 C_{1-4} 烷基,尤其是甲基,或尤其是氢原子。或者,缀合试剂可包括下式的基团: $-\text{S}-\text{P}-\text{S}-$; $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-$; $-\text{SO}_2-\text{P}-\text{SO}_2-$; $-\text{OSO}_2-\text{P}-\text{OSO}_2-$; 和 $-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3-\text{P}-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3-$ 。这种类型的基团包括 $-\text{S}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{S}-$, $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O}-$; $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{SO}_2-$; $-\text{OSO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{OSO}_2-$; 或 $-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{N}^+\text{R}^2\text{R}^3-$ 。其还可以包括以下类型的基团:



[0157]

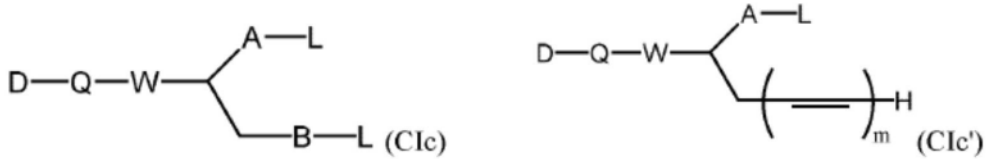
[0158] 其中 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 基团由任意合适的连接基团(例如烷基)携带。这些二价基团在化学上等价于能够与两个亲核试剂反应的两个离去基团。”

[0159] 存在于缀合试剂中的特别优选的离去基团L是 $-\text{SP}$ 或 $-\text{SO}_2\text{P}$, 尤其是 $-\text{SO}_2\text{P}$ 。在该基团中,一个优选的实施方式是其中P代表苯基或尤其是甲苯磺酰基。另一个优选的实施方式是其中P代表包括部分 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ 的基团,尤其是其中 n 具有上述值之一、特别是7的基团。特别优选的离去基团L是 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}/\text{Me}$, 特别是 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7-\text{H}/\text{Me}$ 。在整个说明书中,对离去基团L的任何提及都应理解为包括对这些优选基团,特别是 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}/\text{Me}$, 更特别是 $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_7-\text{H}/\text{Me}$ 的具体提及。

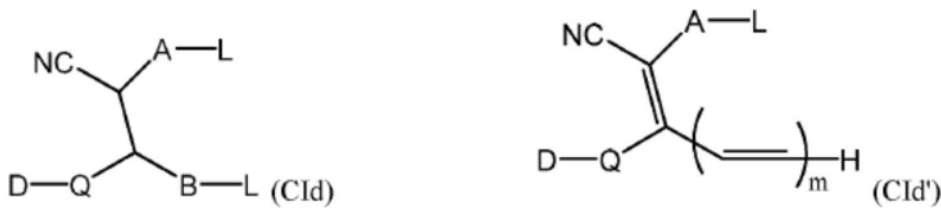
[0160] 缀合试剂可含有一个以上的官能团。例如,试剂可在分子的一端含有上述C型官能团,和一种或多种能够在分子的其他部分处与抗体或其抗原结合部分或任何其他分子缀合

的其他官能团。这种结构记载于例如Belcheva et al., J.Biomater. Sei Polymer Edn.9 (3), 207-226中,并且可用于合成含有多种蛋白的缀合物。

[0161] 含有式CI/CI'的单元的缀合试剂可具有式(CIc)或(CIc')或,其中W代表氰基,(CIId)或(CIId'):

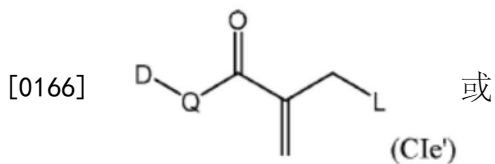
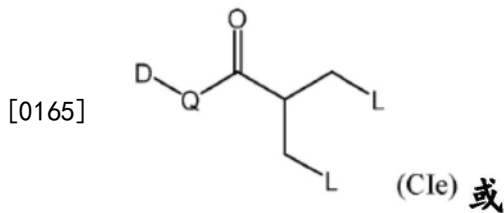


[0162]



[0163] 其中,D代表有效负载并且Q代表连接基团。

[0164] 优选的缀合试剂包括以下:



[0167] D-Q-NH-Ar-CO-(CH₂)₂-L (CIIIb) 或

[0168] D-Q-NH-CO-AR-CO-CH=CH₂ (cIIIb') .。

[0169] 其中D代表有效负载并且Q代表连接基团。

[0170] 缀合试剂可例如具有以下通式:

[0171] ((D_q-Lk¹)_r-P¹)_z-Lk²-Lk³-(L)₂ (III)

[0172] 其中D代表有效负载;

[0173] q代表1至10的整数;

[0174] Lk¹代表接头;

[0175] r代表1至10的整数;

[0176] P¹代表键或c-价基团-P²-NH-,其中c为2至11,并且P²为含有至少一个乙烯单元-CH₂-CH₂-或乙二醇单元-O-CH₂-CH₂-的基团;

[0177] z代表1至10的整数;

[0178] Lk²代表键或d-价接头——其中d为2至11并且其由1至9个天冬氨酸和/或谷氨酸残基组成;

[0179] Lk³代表以下通式的接头:

[0180] -CO-Ph-Y-Z- (E II)

[0181] 其中Ph是任选取代的苯基;Y代表CO基团或CH(OH)基团;并且Z代表下式的基团:



[0183] 其中A和B各自代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基;并且其中L是离去基团,例如下面描述的那些之一。

[0184] 可以使用任何合适的连接基团Q或Lk¹。在一个实施方案中,Q或Lk¹可为,例如直接键、亚烷基(优选C₁₋₁₀亚烷基)、或任选取代的芳基或杂芳基,其中任何一个可被一个或多个以下的原子或基团封端或中断:氧原子、硫原子、-NR¹基团(其中R¹代表氢原子或烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基),或烷基-芳基(优选C₁₋₆烷基-苯基)、酮基、-OCO-基团、-COO-基团、-O-CO-O-、-O-CO-NR¹、-NR¹-COO-、-CONR¹-和/或-NR¹CO-基团。这些芳基和杂芳基Q形成了本发明的一个优选实施方案。合适的芳基包括苯基和萘基,而合适的杂芳基包括吡啶、吡咯、咪唑、吡唑、噁唑、哒嗪、嘧啶和嘌呤。特别合适的连接基团Q或Lk¹是杂芳基,或尤其是芳基,尤其是苯基基团。这些可具有与治疗剂D的连接基团,例如,是或者包含-NR¹-CO-或-CO-NR¹-基团的基团,例如-NH-CO-或-CO-NH-基团。

[0185] 可存在于任选取代的芳基(特别是苯基)或杂芳基上的取代基包括,例如选自以下的一种或多种相同或不同的取代基:烷基(优选C₁₋₄烷基,特别是甲基,任选被OH或CO₂H取代)、CN、-NO₂、-CF₃、-NR²、-CO₂R²、-COH、-CH₂OH、-COR²、-OR²、-OCOR²、-OCO₂R²、-SR²、-SOR²、-SO₂R²、-NR²COR²、-NR².CO₂R²、-NO、-NHOH、-NR².OH、-CH=N-NR².COR²、-N¹R²₃、卤素(例如氟或氯)、-C≡CR²和-CH=CR²₂,其中每个R²独立地代表氢原子或烷基(优选C₁₋₆烷基)、芳基(优选苯基),或烷基-芳基(优选C₁₋₆烷基-苯基)基团。尤其优选存在吸电子取代基。优选的取代基包括,例如CN、-CF₃、-NO₂、-OR²、-OCOR²、-SR²、-NR²COR²、-NHOH和-NR²CO₂R²。

[0186] 在另一个实施方案中,根据本发明的缀合物中的接头Q或Lk¹或任何其他接头可含有可降解的基团,即,其可含有在生理条件下断裂的基团,将有效负载与其与之键合的抗体或其抗原结合部分分离。或者,其可以是在生理条件下不可切割的接头。

[0187] 合适的可降解的接头在下文更详细地讨论。

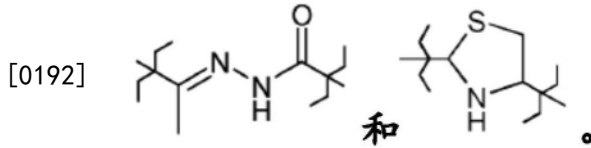
[0188] q、r、z、c和d的含义决定了所存在的D基团的总数。该数目可以例如最高达20、例如最高达15、例如最高达10、例如1、2、3或4。

[0189] 接头

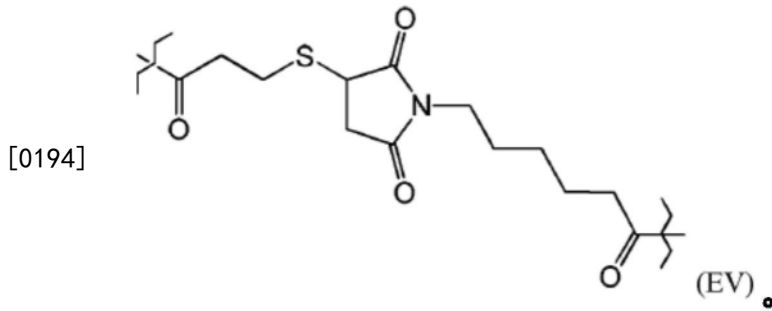
[0190] 本发明的缀合物和适于制备它们的缀合试剂含有将抗体或其抗原结合部分连接至有效负载的接头。该接头在生理条件下可以是不可降解的或可降解的。有利地,缀合物包含可降解的接头,其包含在生理条件下断裂的基团,将有效负载与其与之或最终将与之键合的抗体或其抗原结合部分分离。当接头在生理条件下断裂时,优选在细胞内条件下是可切割的。当靶标在细胞内时,优选地,接头对细胞外条件基本上不敏感(即,使得足够剂量的治疗剂向细胞内靶标的递送不被禁止)。合适的可降解的接头在下文更详细地讨论。

[0191] 当接头(例如Q或Lk¹)含有可降解的基团时,其通常对水解条件敏感,例如其可以

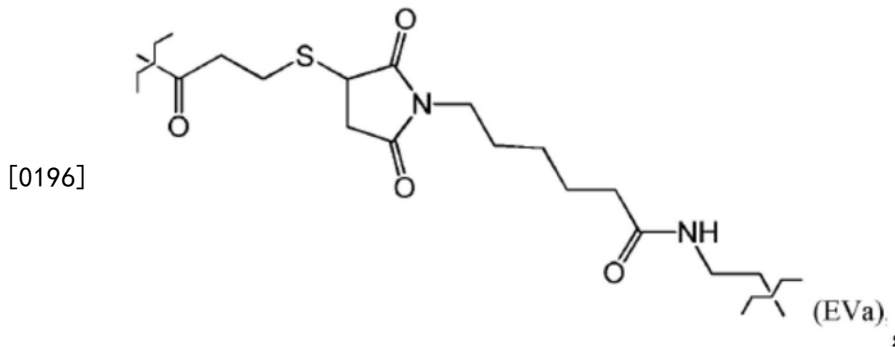
是在某些pH值(例如酸性条件)下降解的基团。水解/酸性条件可以例如在内体或溶酶体中存在。在酸性条件下易于水解的基团的实例包括脞、缩氨基脒、缩氨基硫脒、顺式乌头酰胺、原酸酯和缩酮。对水解条件敏感的基团的实例包括：



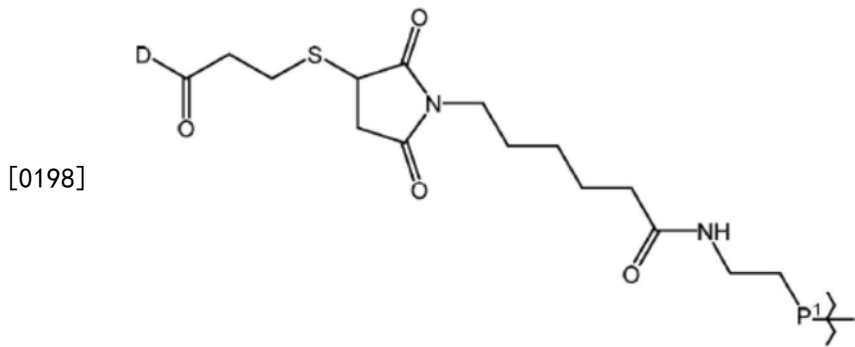
[0193] 在优选的实施方案中,接头(例如Q或Lk¹)是或包括:



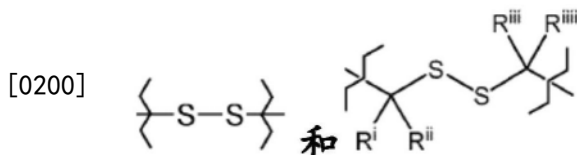
[0195] 例如,接头(例如Q或Lk¹)可以是:



[0197] 在这种情况下,其优选如下所示与D和P¹基团键合:

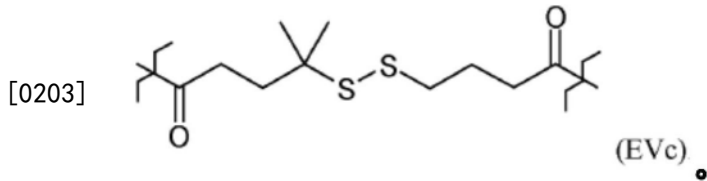
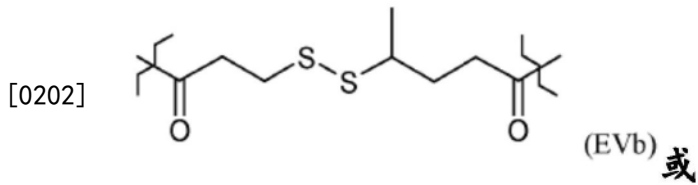


[0199] 接头在还原条件下也可易于降解。例如,其可含有二硫化物基团,其在暴露于生物还原剂(例如硫醇)时是可裂解的。二硫化物基团的实例包括:

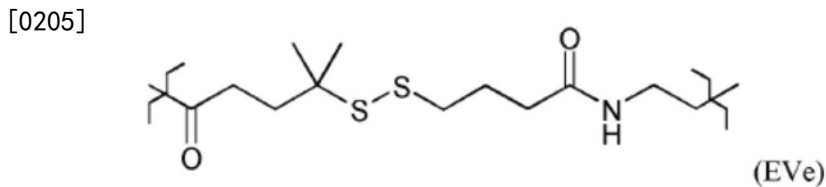
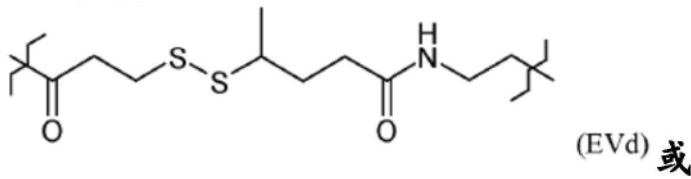


[0201] 其中,Rⁱ、Rⁱⁱ、Rⁱⁱⁱ和Rⁱⁱⁱⁱ各自独立地为氢或C₁₋₄烷基。在优选的实施方案中,接头

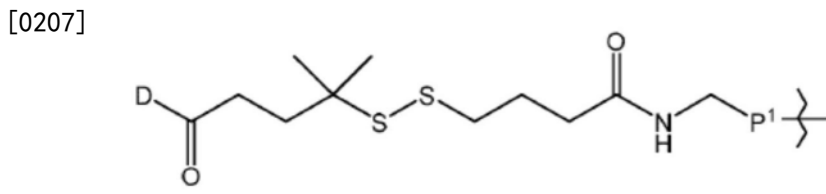
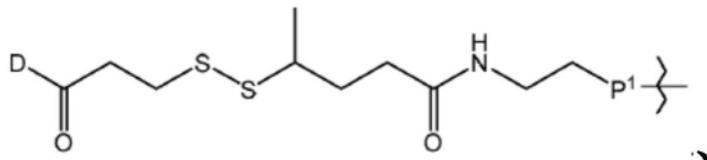
(例如Q或Lk¹),是或包括:



[0204] 例如,其可以是:

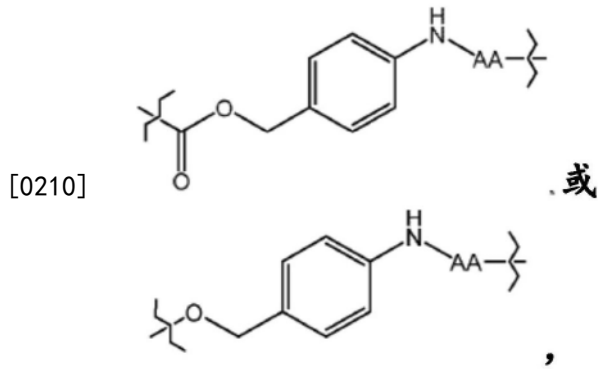


[0206] 在这种情况下,接头优选如下所示与D和P¹基团键合:



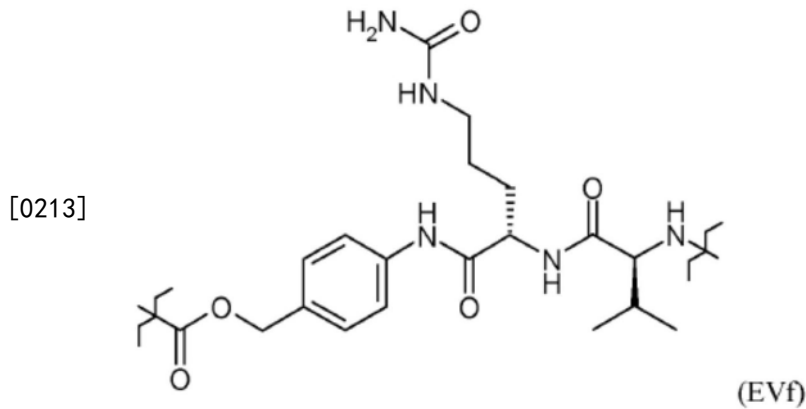
[0208] 接头,例如Q或Lk¹,也可含有易于酶促降解的基团,例如其可能易被蛋白酶(例如溶酶体或内体蛋白酶)或肽酶切割。例如,其可包含含有至少一个,例如至少两个,或至少三个氨基酸残基(例如Phe-Leu、Gly-Phe-Leu-Gly、Val-Ala、Val-Cit、Phe-Lys)的肽基。例如,其可以是具有1至5个,例如2至4个氨基酸的氨基酸链。

[0209] 易于酶促降解的基团的另一个实例是:

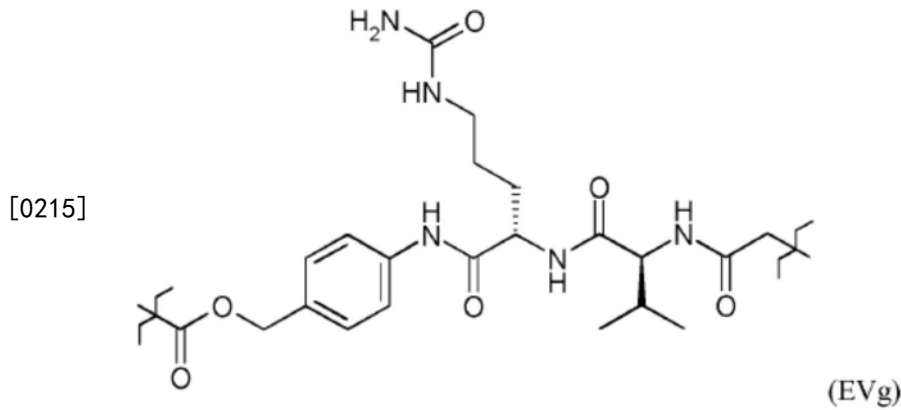


[0211] 其中AA代表氨基酸序列,尤其是含有1或2个氨基酸残基的氨基酸序列,尤其是两个残基的蛋白酶特异性氨基酸序列,例如Val-Cit。

[0212] 在优选的实施方案中,接头(例如Q或Lk¹)是或包括:

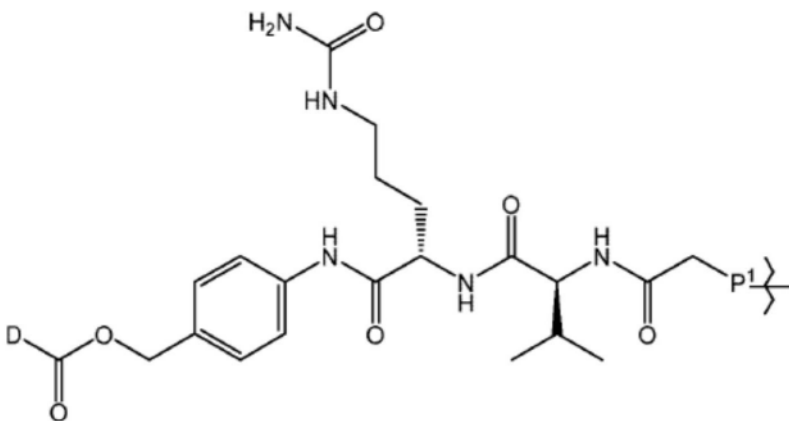


[0214] 例如,其可以是



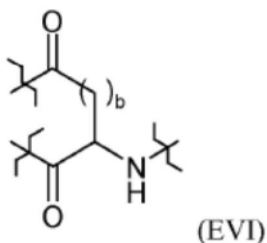
[0216] 在这种情况下,其优选如下所示与有效负载D和P¹基团键合:

[0217]



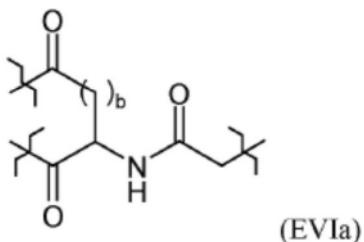
[0218] 在一个实施方案中,接头(例如Q或Lk¹)携带单个有效负载(即,在式(II)的缀合试剂中q=1)。以上所示的特定接头(EVa)、(EVd)和(EVe)是这种类型。在另一个实施方案中,接头携带多个有效负载(即在式(II)的缀合试剂中q>1,例如为2、3或4),并且接头被用作将一个以上拷贝的治疗剂纳入至本发明的缀合物中的工具。在一个实施方案中,这可通过使用支化接头Lk¹和/或Lk²来实现,其可以例如纳入天冬氨酸或谷氨酸或类似的残基。这引入了下式的支化元素:

[0219]

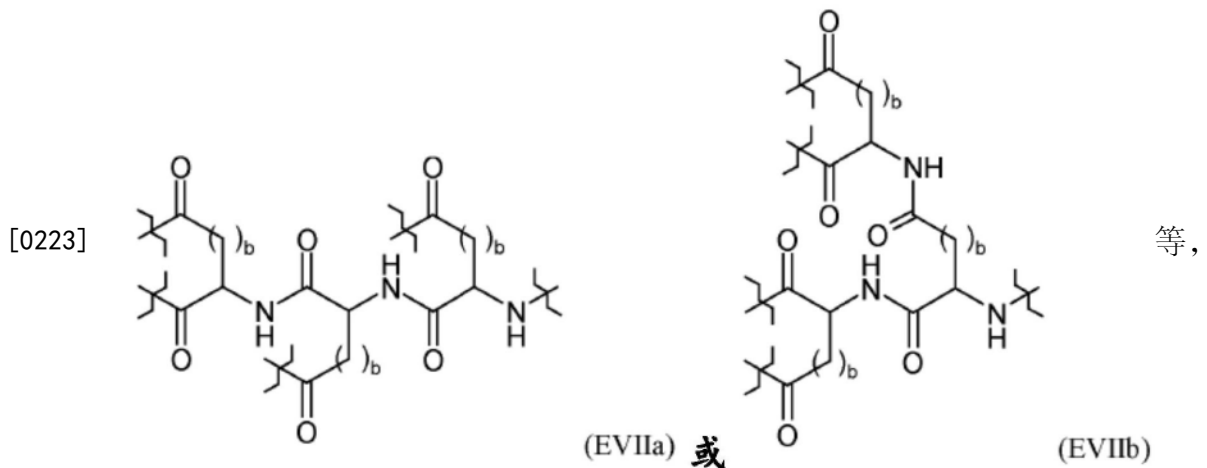


[0220] 其中b为1、2或3,b=1则为天冬氨酸,b=2则为谷氨酸,b=3则代表一个优选实施方案。式EVI中的每个酰基部分可经由合适的接头Lk^{1a}与有效负载偶联,其中Lk^{1a}是任何合适的接头,例如纳入上述连接体之一的可降解的接头。在具体的实施方案中,Lk^{1a}代表上文所示的基团(EVa)、(EVd)或(EVe)。天冬氨酸或谷氨酸或类似残基的氨基可以通过任何合适的方式与P¹键合,例如,连接可经由酰胺键,例如,上述支化基团可经由-CO-CH₂-基团与P¹连接,因此:

[0221]

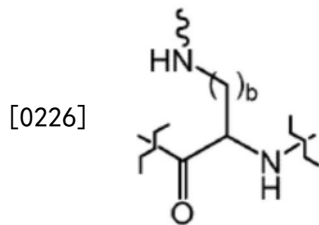


[0222] 如果需要,天冬氨酸或谷氨酸或类似的残基可与其他天冬氨酸和/或谷氨酸和/或类似残基偶联,例如:

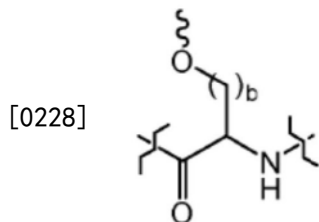


[0224] 使得有可能纳入很多单元的治疗剂。如上所述,每个有效负载单元可以经由任何合适的接头Lk^{1a}与天冬氨酸/谷氨酸或类似的残基连接。

[0225] 以类似的方式,可以引入氨基酸赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、精氨酸或酪氨酸或类似残基以形成支化基团,因此:



[0227] 其中,对于赖氨酸,b为4,并且



[0229] 其中,对于丝氨酸,b为1。

[0230] 聚合物

[0231] 本发明的缀合物可含有低聚物或聚合物(为方便起见,在本文统称为“聚合物”),以及本发明的抗体或其抗原结合部分。例如,所述抗体或其抗原结合部分可经由接头与聚合物缀合。或者,所述接头本身可包括聚合物,并且其可与抗体或其结合抗原部分缀合。聚合物尤其是水溶性的、合成的聚合物,特别是聚亚烷基二醇。聚合物可以是,例如聚亚烷基二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯(例如聚丙烯酰吗啉)、聚甲基丙烯酸酯、聚噁唑啉、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺或聚甲基丙烯酰胺(例如聚羧基甲基丙烯酰胺)、或HPMA共聚物。另外,所述聚合物可以是易于酶促降解或水解降解的聚合物。这种聚合物包括,例如聚酯、聚缩醛、聚(原酸酯)、聚碳酸酯、聚(亚氨基碳酸酯)和聚酰胺(如聚(氨基酸))。聚合物可以是同聚物、无规共聚物或结构确定的共聚物(如嵌段共聚物),例如其可以是衍生自两种或更多种环氧烷、或衍生自聚(环氧烷)和聚酯、聚缩醛、聚(原酸酯)或聚(氨基酸)的嵌段共聚物。使用的多官能聚合物包括二乙烯醚-马来酸酐和苯乙烯-马来酸酐的共聚物。

[0232] 还可使用天然存在的聚合物,例如多糖,如壳多糖、葡聚糖、糊精、壳聚糖、淀粉、纤维素、糖原、聚(唾液酸)、透明质酸及其衍生物。还可使用聚合物如聚谷氨酸,以及衍生自天然单体(如糖或氨基酸)和合成单体(如环氧乙烷或甲基丙烯酸)的杂化聚合物。

[0233] 如果所述聚合物是聚亚烷基二醇,其优选地为含有C₂和/或C₃单元的聚亚烷基二醇,尤其是聚乙二醇。聚合物,尤其是聚亚烷基二醇,可含有单个直链,或其可具有由许多小的或大的链组成的支链形态。所谓的泊洛沙姆(Pluronic)是一类重要的PEG嵌段共聚物。它们衍生自环氧乙烷和环氧丙烷嵌段。可使用置换的或加帽的聚亚烷基二醇,例如甲氧基聚乙二醇。

[0234] 所述聚合物可以是,例如通过WO 2004/113394(其内容以引用的方式纳入本文)中描述的方法产生的梳形聚合物。例如,所述聚合物可以是具有以下通式的梳形聚合物:

[0235] (F)_r - (G)_g - (H)_h

[0236] 其中:

[0237] F,在存在的情况下,可通过一种或多种烯键式不饱和单体的加成聚合反应获得,所述单体不是如G中所定义的;

[0238] G可通过多个单体的加成聚合反应获得,所述单体是直链的、支链的或星形的,取代的或未取代的,并且具有烯键式不饱和部分;

[0239] H,在存在的情况下,可通过一种或多种烯键式不饱和单体的加成聚合反应获得,所述单体不是如G中所定义的;

[0240] f和h是0和500之间的整数;

[0241] g是0至1000的整数;

[0242] 其中F和G中至少一种是存在的。

[0243] 所述聚合物可任选地是以任何所需的方式衍生化或官能化。可通过悬垂接头(pendent linkers)将反应基连接在聚合物终点或端基,或沿着聚合物链连接;在这种情况下,所述聚合物是,例如聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯或马来酸酐共聚物。如需要,可使用常规方法将所述聚合物偶联到固体载体上。

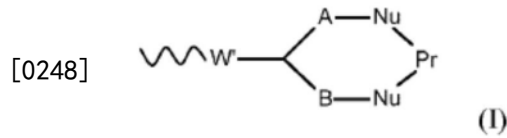
[0244] 当然,聚合物的最佳分子量取决于预期的应用。可使用长链聚合物,例如数均分子量可最高达约75,000g/mol,例如最高达50,000g/mol、40,000g/mol、30,000g/mol。例如,数均分子量可在500g/mol至约75,000g/mol的范围内。但是,由具有例如少至2个重复单元(例如2到50个重复单元)的离散的PEG链组成的非常小的低聚物可用于一些应用,并且存在于本发明的一个优选的实施方案中。例如,可使用可含有2至48、例如2至36、例如2至24个单元的聚合物。例如,可使用具有12、20、24、36、40或48个重复单元的直链或支链PEG。当所述缀合物旨在离开循环并渗入组织时(例如用于治疗由恶性肿瘤、感染或自身免疫疾病、或由外伤引起的炎症),使用在最高达30,000g/mol范围内的较低分子量聚合物可能是有利的。对于所述缀合物旨在保留在循环中的应用而言,使用更高分子量的聚合物(例如在20,000-75,000g/mol范围内)可能是有利的。

[0245] 优选地,所述聚合物是合成的聚合物,且优选地,其是水溶性聚合物。许多应用尤其优选使用水溶性聚乙二醇。

[0246] 公开为W02016/063006的、PCT/GB2015/052953要求其优先权的本发明人的共同悬而未决的申请GB 1418986.4涉及具有特定结构的含PEG的接头的用途,并且这些可用于本

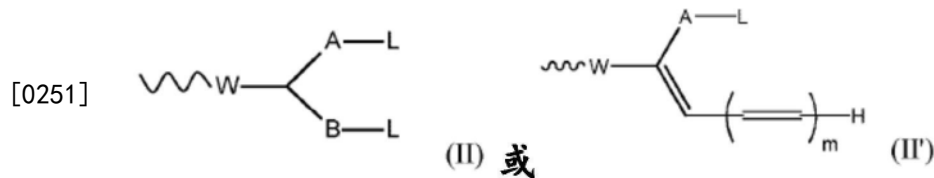
发明。该申请公开了以下内容：

[0247] “本发明提供了蛋白或肽与治疗剂、诊断剂或标记试剂的缀合物，所述缀合物含有蛋白或肽键合部分和聚乙二醇部分；其中所述蛋白或肽键合部分具有以下通式：



[0249] 其中Pr代表所述蛋白或肽，每个Nu代表存在于或连接至所述蛋白或肽的亲核试剂，A和B各自独立地代表C₁₋₄亚烷基或亚烯基链，并且W'代表吸电子基团或通过还原吸电子基团获得的基团；并且，其中所述聚乙二醇部分是或包括悬垂的聚乙二醇链，其具有式-CH₂CH₂OR的末端基团，其中R代表氢原子、烷基（例如C₁₋₄烷基、尤其是甲基）、或任选取代的芳基（尤其是苯基、尤其是未取代的苯基）。

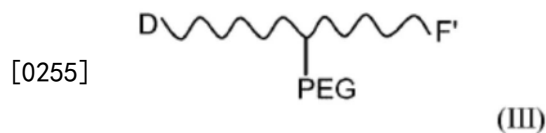
[0250] 本发明还提供了能够与蛋白或肽反应的缀合试剂，包括治疗剂、诊断剂或标记试剂和聚乙二醇部分；所述缀合试剂包括下式的基团：



[0252] 其中W代表吸电子基团，A和B具有上述含义，m为0至4，并且每个L独立地代表离去基团；并且，其中所述聚乙二醇部分是或包括悬垂的聚乙二醇链，其具有式-CH₂CH₂OR的末端基团，其中R代表氢原子、烷基（例如C₁₋₄烷基、尤其是甲基）、或任选取代的芳基（尤其是苯基、尤其是未取代的苯基）。

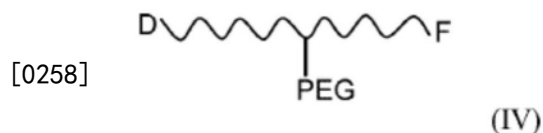
[0253] 本发明还提供了制备本发明的缀合物的方法，其包括使蛋白或肽与本发明的缀合试剂反应。

[0254] 本发明的缀合物可示意性地通过下式表示：



[0256] 其中D代表治疗剂、诊断剂或标记试剂，F'代表式I的基团，并且PEG代表具有式-CH₂CH₂O的末端基团的悬垂的聚乙二醇链。

[0257] 本发明的试剂可示意性地通过下式表示：



[0259] 其中D代表治疗剂、诊断剂或标记试剂，F'代表式II或II'的基团，并且PEG代表具有式-CH₂CH₂OR的末端基团的悬垂的聚乙二醇链。官能团F能够与蛋白或肽中存在的两个亲核试剂反应，如下所述。

[0260] 本发明的缀合物和试剂的聚乙二醇 (PEG) 部分是或包括悬垂的PEG链，其具有式-CH₂CH₂OR的末端基团，其中R代表氢原子、烷基（例如C₁₋₄烷基、尤其是甲基）、或任选取代的芳基（尤其是苯基、尤其是未取代的苯基）。优选地，R是甲基或氢原子。

[0261] 当然,PEG部分的总大小取决于预期的应用。对于一些应用,可使用高分子量的PEG,例如数均分子量可最高达约75,000,例如最高达50,000、40,000或30,000g/mol。例如,数均分子量可在500g/mol至约75,000的范围内。但是,对于一些应用,较小的PEG部分可能是优选的。

[0262] 在一个优选的实施方案中,PEG部分中的所有PEG都存在于悬垂的PEG链中。在另一个实施方案中,PEG也可存在于分子的骨架中,这将在下面更详细地讨论。

[0263] 与PEG部分一样,悬垂的PEG链的大小取决于预期的应用。对于一些应用,可以使用高分子量的悬垂的PEG链,例如数均分子量可最高达约75,000,例如最高达50,000、40,000或30,000g/mol。例如,数均分子量可以在500g/mol至约75,000的范围内。但是,对于许多应用,可使用较小的悬垂的PEG链。例如,所述PEG链可具有最高达3,000g/mol的分子量。但是,由具有例如至少2个重复单元(例如2到50个重复单元)的离散的PEG链组成的非常小的低聚物可用于一些应用,并且以所述PEG链存在于本发明的优选的实施方案中。悬垂的PEG侧链可以是直链或支链的。例如,可使用PEG链,例如具有12、20、24、36、40或48个重复单元的直链或支链。”

[0264] 缀合方法

[0265] 含有能够与本发明的抗体或其抗原结合部分反应的官能团的缀合试剂可与抗体或抗原结合部分反应以形成缀合物,并且这种反应形成了本发明的其他方面。在本发明的所述其他方面的优选实施方案中,具有上述结构CI、CI'、CII或CIII之一(包括所有优选的亚结构)的缀合试剂与抗体或其抗原结合部分反应以形成缀合物。使用这些试剂之一的缀合方法的直接产物是含有吸电子基团W的缀合物。但是,在合适的条件下,所述缀合方法是可逆的。这对于一些应用来说可能是期望的,例如需要快速释放有效负载时,但是对于其他应用而言,有效负载的快速释放可能是不期望的。因此,需要通过还原吸电子部分W以得到阻止有效负载释放的部分来稳定缀合物。因此,上述方法可包括额外的任选步骤:还原所述缀合物中的吸电子基团W。特别优选使用硼氢化物(例如硼氢化钠、氰基硼氢化钠、硼氢化钾或三乙酰氧基硼氢化钠)作为还原剂。可使用的其他还原剂包括,例如氯化亚锡(II)、醇盐(如烷醇铝)和氢化铝锂。

[0266] 因此,例如,可将含酮基的部分W还原成含CH(OH)基团的部分;可通过羟基与醚化剂的反应来获得醚基;可通过羟基与酰化剂的反应来获得酯基;可通过还原胺化由酮制备胺基;或者可通过胺的酰化来形成酰胺。可将砜还原成亚砜、硫化物或硫醚(thiol ether)。可将氰基还原成胺基。

[0267] 使用上述式CI或CII的缀合试剂的关键特征是 α -亚甲基离去基团和双键与充当迈克尔活化部分的吸电子官能团交叉共轭。如果所述离去基团易于在交叉官能的试剂中被消除而不是被直接置换,并且所述吸电子基团是适合用于迈克尔反应的活化部分,则可通过连续的迈克尔和逆迈克尔反应进行相继的分子内双-烷基化。所述离去基团用于掩护潜在的缀合双键,所述双键在第一次烷基化发生之后才暴露以得到式CI'的试剂,并且双-烷基化是相继的、交互的迈克尔和逆迈克尔反应的结果。交叉官能的烷基化试剂可包含与双键缀合的或位于离去基团和吸电子基团之间的多重键。

[0268] 当与抗体或其抗原结合部分的键合是经由来自所述抗体或抗原结合部分中的二硫键的两个硫原子时,该方法可通过如下进行:原位还原二硫键,然后使还原产物与具有上

述结构C之一的缀合试剂反应。优选地,在引入缀合试剂之前,还原二硫键并例如通过缓冲液交换除去任何过量的还原剂。可例如使用常规方法用二硫苏糖醇、巯基乙醇或三羧基乙基磷还原二硫键。

[0269] 缀合反应可在与已知缀合方法类似的条件下进行,包括现有技术中公开的条件。例如,当使用具有上述结构C之一的缀合试剂时,根据本发明的缀合反应可在与WO 2005/007197、WO 2009/047500、WO2010/100430、WO 2014/064423和WO 2014/064424中描述的反应条件类似的反应条件下进行。例如,所述方法可在所有反应物都可溶于其中的溶剂或溶剂混合物中进行。例如,可使蛋白在含水反应介质中与聚合物缀合试剂直接反应。该反应介质也可以是缓冲的,这取决于亲核试剂的pH要求。反应的最佳pH通常为至少4.5,一般在约5.0和约8.5之间,优选约6.0至7.5。当然,最佳反应条件取决于所使用的具体反应物。

[0270] 当使用含水反应介质时,3-40°C之间的反应温度通常是合适的。在有机介质(例如THF、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、DMF、DMSO)中进行的反应通常在最高达环境温度的温度下进行。在一个优选的实施方案中,反应在含水缓冲液中进行,所述含水缓冲液可含有一定比例的有机溶剂,例如最多达20体积%的有机溶剂,一般为5-20体积%的有机溶剂。

[0271] 可使用化学计量等量的或过量的缀合试剂将抗体或抗原结合部分有效地缀合。但是,也可以用过量的缀合试剂进行缀合反应,这对一些蛋白而言可能是合乎需要的。在随后的缀合物的纯化过程中,可通过常规方法(例如离子交换色谱或HPLC色谱)容易地将过量的试剂除去。

[0272] 当然,在抗体含有足够的合适的连接点时,可以将多于一种的缀合试剂与抗体或抗原结合部分缀合。例如,在含有两个不同的二硫键的抗体中,或在含有一个二硫键并且还带有多聚组氨酸标签的抗体中,每分子抗体可以缀合两个试剂分子。抗体通常含有4个合适的二硫键,并且可通过合适选择反应条件来将携带有效负载的接头横跨(across)每个二硫键进行缀合。如果每个接头携带单个有效负载,则得到药物抗体比例(DAR)为4的缀合物。可以通过使用如上所述的支链接头连接额外拷贝的有效负载。

[0273] 当将抗体或其抗原结合片段与放射性金属离子或顺磁离子缀合时,则在一些实施方案中,所述放射性金属离子或顺磁离子可与具有长尾部的试剂反应,其中一个或多个螯合基团连接至所述长尾部以结合这些离子。在一些实施方案中,所述试剂可携带被设计以共价连接抗体或其抗原结合部分的反应基团。所述长尾部可以是聚合物,例如聚赖氨酸、多糖、聚乙二醇(PEG)或具有可与螯合基团结合以结合离子的侧基的其他衍生的或可衍生的链。可根据本文的实施方案使用的螯合基团的实例包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、DOTA、NOTA、NODAGA、NETA、去铁胺(Df,其也可称为DFO)、卟啉、多胺、冠醚、双缩氨基硫脲、多胍等基团。当与非放射性金属(例如锰、铁和钆)络合时,在与本文所述的抗体或其抗原结合部分和载体一起使用时,相同的螯合物可用于MRI。大环螯合物(如NOTA、NODAGA、DOTA和TETA)可分别与多种金属和放射性金属一起使用,该放射性金属包括但不限于镱、钷和铜的放射性核素。可使用其他环型螯合物(如大环聚醚),其对于稳定结合放射性核素(如用于RAIT的镭-223)是有意义的。在某些实施方案中,螯合部分可用于将PET成像剂(如铝-¹⁸F或锆-89复合物)连接至靶向分子以用于PET分析。

[0274] 用途和组合物

[0275] 本发明的抗体及其抗原结合部分和本发明的缀合物可用于治疗、预防或诊断由

PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症。因此,本发明提供了本发明的抗体或其抗原结合部分或本发明的缀合物,其用于诊断或治疗,特别是用于诊断、治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症。本发明还提供了治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的方法,包括将本发明的抗体或其抗原结合部分或缀合物以可有效治疗或预防所述疾病或病症的量给予需要其的受试者。本发明还提供了根据本发明的抗体或其抗原结合部分或缀合物用于制备用于诊断、治疗或预防由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的药物的用途。

[0276] 在一些实施方案中,所述PSMA介导的疾病是癌症,例如前列腺癌或非前列腺癌(包括本文其他地方描述的非前列腺癌)。非前列腺癌优选选自膀胱癌,包括移行细胞癌;胰腺癌,包括胰管癌;肺癌,包括非小细胞肺癌;肾癌,包括常规肾细胞癌;肉瘤,包括软组织肉瘤;肝癌,包括转移性腺癌;乳腺癌,包括乳腺癌;脑癌,包括多形性胶质母细胞瘤;神经内分泌癌;结肠癌,包括结肠瘤;睾丸癌,包括睾丸胚胎瘤;和黑色素瘤,包括恶性黑色素瘤。最有效的癌症治疗通常需要几种药物共同给药。因此,优选本发明的活性剂与至少一种其他化疗剂联合给药。

[0277] 另一方面,本发明提供了使用本发明的抗体或其抗原结合部分或缀合物在体外或体内检测样品中PSMA抗原的存在(例如用于诊断PSMA相关疾病(例如人PSMA相关疾病))的方法。在一些方法中,这通过在允许在抗体和PSMA之间形成复合物的条件下,使待测样品以及对照样品与本发明的抗体或其抗原结合部分或本发明的缀合物(包括双特异性或多特异性分子)接触来实现。这种测定可在体外进行。然后在测试样品中检测复合物形成(例如,通过ELISA),并且在所述测试样品和对照样品之间复合物形成的任何统计学上显著的增加都指示测试样品中PSMA的存在。

[0278] 在其他实施方案中,本发明可用于诊断由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的方法中,包括将本发明的抗体或其抗原结合部分或缀合物给予具有或疑似具有由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症的受试者;将所述受试者暴露于成像方法以使经标记的抗体或其抗原结合部分或缀合物可视化,并确定所述受试者患有由PSMA介导的或以PSMA表达增加为表征的疾病或病症。

[0279] 对于体内诊断目的,本发明的抗体或其抗原结合部分优选为缀合物形式,其中所述抗体用可检测的标记物标记,如上所述。可检测的标记物包括放射性标记物或荧光标记物。可用于待给予的抗体或抗原-结合抗体片段的放射性标记物包括例如锶(^{225}Ac)、砹(^{211}At)、铋(^{213}Bi 或 ^{212}Bi)、碳(^{14}C)、钴(^{57}Co)、铜(^{67}Cu)、氟(^{18}F)、镓(^{68}Ga 或 ^{67}Ga)、钬(^{166}Ho)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 或 ^{111}In)、碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 或 ^{121}I)、铅(^{212}Pb)、镧(^{177}Lu)、钯(^{103}Pd)、磷(^{32}P)、铂(^{195}Pt)、铼(^{186}Re 或 ^{188}Re)、铑(^{105}Rh)、钌(^{97}Ru)、钐(^{153}Sm)、钪(^{47}Sc)、锝(^{99}Tc)、镱(^{169}Yb 或 ^{175}Yb)或钇(^{90}Y)。适用于抗体和抗体片段的荧光标记物也是本领域公知的。

[0280] 当用适当的放射性核素(例如用于PET成像的正电子发射体碘-124、铜-64、氟-18、镓-68和/或锆-89)或荧光团(用于荧光成像)标记时,抗体或其抗原结合部分可用于临床前成像和/或患者的临床成像。通过简单地将放射性标记改变为单光子发射放射性核素(如铟-111、碘-123和镧-177),抗体或其抗原结合部分也可用作潜在的SPECT成像剂。

[0281] 另一方面,本发明提供了药物组合物或诊断组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合部分,或本发明的缀合物,以及可药用的载体。如需要,所述组合物还可含有额外的

活性成分。

[0282] 实施例

[0283] 除非另有说明,根据制造商的说明使用实施例中提及的市售试剂。实施例和整个说明书中的细胞来源每次都由ECACC或ATCC登录号鉴定。ECACC是欧洲细胞培养物保藏中心(Salisbury, 英格兰), 而ATCC是美国典型培养物保藏中心(Manassas, 美国)。除非另有说明, 本文使用的所有技术术语和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。尽管与本文描述的方法和材料相似或等价的方法和材料可用于本发明的实施或测试, 但示例性的方法和材料如下所述。所述材料、方法和实施例仅是说明性的, 不意欲对范围进行限制。

[0284] 实施例1: 抗体的产生

[0285] 选择五条重链和四条轻链序列(分别命名为VH1至VH5, 和VK1至VK4)。它们的氨基酸序列分别是SEQ ID No 10至14和15至18, 它们的核酸序列分别是SEQ ID No 1至5和6至9。还选择了以下比较器现有技术抗体:mJ591的重链和轻链V区序列(分别为氨基酸序列SEQ ID No 23和24, 分别为核酸Seq ID 19和20), 以及去免疫的J591(分别为氨基酸序列SEQ ID No 25和26, 分别为核酸Seq ID 21和22)。

[0286] 合成编码变体V区的DNA并将其亚克隆到pANT抗体表达载体中(图1a), 其中重链和轻链V区分别被克隆到pANT17.2和pANT13.2中。将重链V区基因经由具有人 $\gamma 1$ 重链基因(G1m3(G1m(f))同种异型)的框架内的MluI和HindIII位点克隆到pANT17.2中, 并将轻链V区基因经由具有人 κ 轻链恒定区基因(Km3同种异型)的框架内的BssHII和BamHI位点克隆到pANT13.2中。重链和轻链基因的转录都在CMV I/E启动子(US5168062和US5385839, University of Iowa)的控制下, 并且pANT17质粒含有用于在真核细胞中进行选择的在SV40启动子和polyA序列控制下的突变dhfr小基因(Simonsen&Levinson 1983, PNAS 80: 2495-2499)。pANT17.2和pANT13.2都含有用于原核细胞选择的 β -内酰胺酶(Ap^R)基因和用于在原核细胞中繁殖的pMB1复制起点。所有质粒都在大肠杆菌(E. coli) XL1-blue (Stratagene Cat.No.200130)中繁殖。然后通过电穿孔将重链和轻链表达构建体稳定地共转染到NS0细胞中, 并通过在生长培养基中包含甲氨蝶呤来选择表达抗体的克隆。将嵌合的、去免疫的以及所有的人源化VH和VK链的组合(即, mJ591的人源化变体的共20个配对)都转染到NS0细胞中, 并如上所述通过蛋白A色谱法从培养物上清液中纯化分泌的抗体。

[0287] 制备的抗体如表1所示:

[0288] 表1:

[0289]

抗体名称	重链	轻链
AB-P1	SEQ ID No 35	SEQ ID No 36
AB-P2	SEQ ID No 37	SEQ ID No 38
AB-01 [VH4/VK3]	SEQ ID No 13	SEQ ID No 17
AB-02 [VH5/VK3]	SEQ ID No 14	SEQ ID No 17
AB-03 [VH4/VK4]	SEQ ID No 13	SEQ ID No 18
AB-04 [VH5/VK4]	SEQ ID No 14	SEQ ID No 18
AB-05 [VH1/VK1]	SEQ ID No 10	SEQ ID No 15
AB-06 [VH1/VK2]	SEQ ID No 10	SEQ ID No 16

AB-07[VH1/VK3]	SEQ ID No 10	SEQ ID No 17
AB-08[VH1/VK4]	SEQ ID No 10	SEQ ID No 18
AB-09[VH2/VK1]	SEQ ID No 11	SEQ ID No 15
AB-10[VH2/VK2]	SEQ ID No 11	SEQ ID No 16
AB-11[VH2/VK3]	SEQ ID No 11	SEQ ID No 17
AB-12[VH2/VK4]	SEQ ID No 11	SEQ ID No 18
AB-13[VH3/VK1]	SEQ ID No 12	SEQ ID No 15
AB-14[VH3/VK2]	SEQ ID No 12	SEQ ID No 16
AB-15[VH3/VK3]	SEQ ID No 12	SEQ ID No 17
AB-16[VH3/VK4]	SEQ ID No 12	SEQ ID No 18
AB-17[VH4/VK1]	SEQ ID No 13	SEQ ID No 15
AB-18[VH4/VK2]	SEQ ID No 13	SEQ ID No 16
AB-19[VH5/VK1]	SEQ ID No 14	SEQ ID No 15
AB-20[VH5/VK2]	SEQ ID No 14	SEQ ID No 16
AB-21[嵌合的]	SEQ ID No 23	SEQ ID No 24
AB-22[去免疫的]	SEQ ID No 25	SEQ ID No 26

[0290] 在纯化之前,使用0.4M NaOH将管子和Protein A柱都除去热原。用20倍柱体积的1x PBS pH7.4重新平衡柱子。收获细胞培养物上清液,使用10×PBS将其调节至1xPBS pH7.4并过滤灭菌。将过滤的上清液以0.5mL/min泵送通过柱。用1xPBS pH7.4洗涤柱,并使用无菌的0.1M柠檬酸钠(pH3)洗脱IgG,收集0.9mL级分并用0.1mL无菌的1M Tris-HCl pH9中和。在无菌条件下,将产物经缓冲交换至PBS pH7.4中以除去任何洗脱缓冲液。随后,使用改良的PBS(20mM磷酸盐、150mM NaCl、20mM EDTA、pH7.5)作为流动相在HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200pg制备型SEC柱(GE Healthcare)上运行经Protein A纯化的材料。在单级分中洗脱抗体,然后合并峰级分,浓缩并过滤灭菌。浓缩后,使用消光系数(基于每种抗体的预测氨基酸序列的 $E_{c}(0.1\%)$)通过OD280nm对抗体进行定量。

[0291] 实施例2:表达PSMA的NS0细胞系的产生

[0292] 对全长人PSMA抗原(FOLH1_HUMAN ECACC登录号Q04609)进行密码子优化(DNASEQ ID No.31,氨基酸Seq ID No.32)、合成并将其经BglIII和EagI位点(移除了IgG1重链表达盒)亚克隆到表达载体pANT17.2抗体中(图1b)。PSMA基因的转录在CMV I/E启动子(US5168062和US5385839,University of Iowa)的控制下,并且pANT17.2质粒含有用于在真核细胞中进行选择的在SV40启动子和polyA序列控制下的突变dhfr小基因(Simonsen& Levinson 1983,PNAS 80:2495-2499)。pANT17.2还含有用于原核细胞选择的 β -内酰胺酶(Ap^R)基因和用于在原核细胞中繁殖的pMB1复制起点。所有质粒都在大肠杆菌(E.coli)XL1-blue(Stratagene Cat.No.200130)中繁殖。然后通过电穿孔将PSMA表达构建体稳定地共转染到NS0细胞中,并通过在生长培养基中包含甲氨蝶呤来选择表达PSMA的克隆。通过基于F ACS的测定来分析表达PSMA的克隆。

[0293] 合成编码对照PSMA结合抗体(去免疫的J415—Seq ID 27-30)的DNA,并如前所述将其亚克隆到表达载体pANT17.2和pANT13.2中(参见US7,045,605)。然后通过电穿孔将重链和轻链表达构建体稳定地共转染到NS0细胞中,并通过在生长培养基中包含甲氨蝶呤来

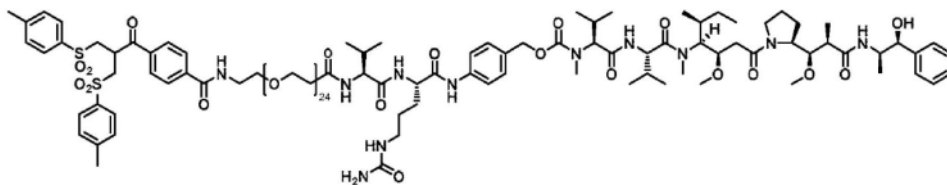
选择表达抗体的克隆。通过Protein A色谱法从细胞培养物上清液中纯化分泌的抗体。如下所述使用经纯化的抗体评估经转染的NS0细胞系的PSMA表达。

[0294] 使用去免疫的J415作为参照抗体,在FACS结合ELISA中评估PSMA抗原在NS0细胞上的表达。收获不表达或表达PSMA的NS0细胞(每次染色 5×10^5 个细胞),用Dulbecco's PBS (PAA Laboratories, Yeovil, UK) 洗涤一次,重悬于封闭缓冲液(含1% BSA/0.05% 叠氮化钠、2.5% 山羊血清的PBS)中,并在室温下孵育30分钟。然后将封闭的细胞重悬于50 μ L孔的去免疫的J591 (5 μ g/mL) 或稀释于FACS缓冲液(含1% BSA/0.05% 叠氮化钠的PBS)中的同型匹配阴性对照(5 μ g/mL)中,并在冰上孵育1h。孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,然后重悬于50 μ L/孔的以1:100稀释于FACS缓冲液中的抗人PE (Sigma)中,并在冰上孵育1h。孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,转移至FACS管中并在Becton Dickinson (Becton Dickinson, Oxford, UK) FACScalibur仪器上分析,每管收集15000个事件。如图2所示,鉴定出一个主细胞系(6/2F4),其与未经转染的空细胞系相比,显示出显著的PSMA表达。

[0295] 实施例3:对人源化抗体的分析

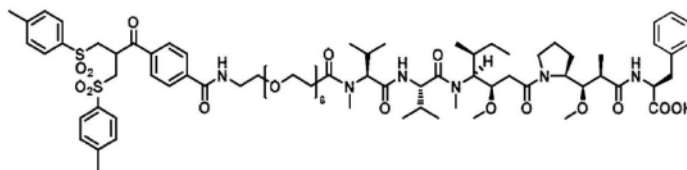
[0296] 在与亲本嵌合J591和去免疫的J591参照抗体的竞争性FACS ELISA中,评估NS0-衍生的J591变体与PSMA抗原的结合。使用AlexaFluor 488抗体标记试剂盒(Molecular Probes, Paisley, UK)对去免疫的J591抗体进行荧光标记。收获表达PSMA的NS0细胞(克隆6/2F4,每次染色 3×10^5 个细胞),用Dulbecco's PBS (PAA Laboratories, Yeovil, UK) 洗涤一次,重悬于封闭缓冲液(含1% BSA/0.05% 叠氮化钠、2.5% 山羊血清的PBS)并在室温下孵育30分钟。将各种浓度的测试人源化抗体与恒定浓度的Alexa-fluor 488标记的去免疫的J591抗体(终浓度为0.5 μ g/mL)预混合。然后将封闭的细胞重悬于150 μ L/孔的预稀释的抗体混合物中并在冰上孵育1h。孵育后,将细胞用含1% BSA/0.05%的叠氮化钠的PBS洗涤2次,转移至FACS管中并在Becton Dickinson (Becton Dickinson, Oxford, UK) FACScalibur仪器上分析,每管收集15000个事件。通过绘制相对于测试抗体浓度的几何平均荧光强度来分析数据。如图3所示,所有主要人源化PSMA变体均显示出与mJ591嵌合和去免疫抗体相似的竞争性结合谱。

[0297] 实施例4:包含奥瑞斯他汀细胞毒性有效负载的缀合试剂的合成。



1

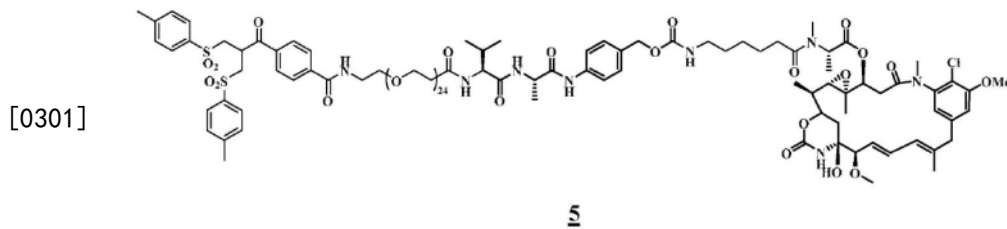
[0298]



2

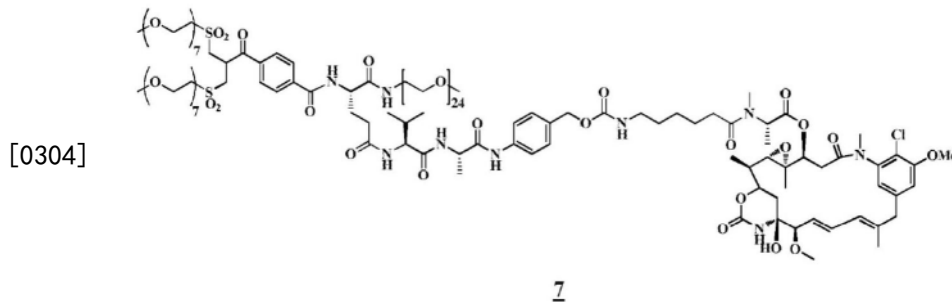
[0299] 如W02014064423中所述制备双砒试剂1和2。使用一旦连接MMAF即被氧化成双砒的双硫化物形式以与试剂1类似的方式制备试剂2。

[0300] 实施例5:包含美登木素细胞毒性有效负载的缀合试剂的合成。

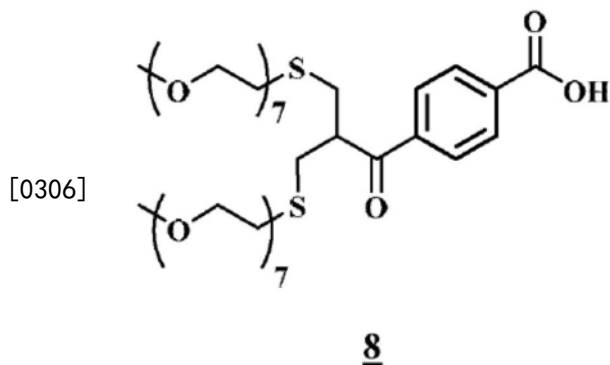


[0302] 如W02014064424中所述,经由双砜-PEG (24) -酸与val-alanine-PAB-AHX-DM1的偶联,以与实施例4的试剂1类似的方式制备双砜PEG (24) -val-alanine-PAB-AHX-DM1缀合试剂5。

[0303] 实施例6:包含美登木素细胞毒性有效负载的缀合试剂7的合成。

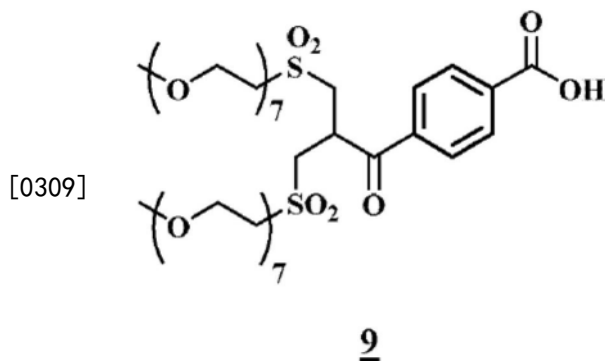


[0305] 步骤1:化合物8的合成



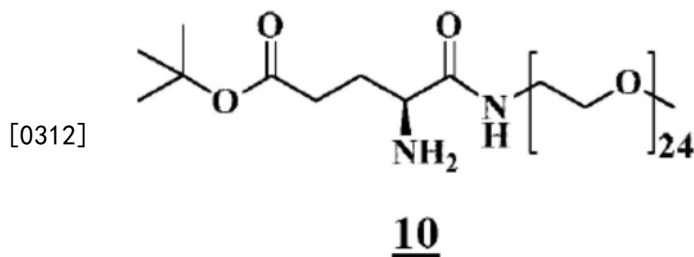
[0307] 向溶于二甲基甲酰胺 (DMF, 70mL) 的4-[2,2-双[(对甲苯磺酰基)-甲基]乙酰基]苯甲酸 (1.50g, Nature Protocols, 2006, 1 (54), 2241-2252) 的搅拌溶液中加入 α -甲氧基- ω -巯基七(乙二醇) (3.20g) 和三乙胺 (2.50mL)。在室温下在惰性氮气气氛下搅拌所得的反应混合物。19h后,真空除去挥发物。将所得的残余物溶于水 (2.4mL) 中,并通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A(v/v):水:5%乙腈:0.05%三氟乙酸和缓冲液B(v/v):乙腈:0.05%三氟乙酸 (100:0v/v至0:100v/v) 洗脱。真空除去有机溶剂,并通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到呈浓稠透明无色油状物的化合物8 (1.77g)。 m/z [M+H]⁺901。

[0308] 步骤2:试剂9的合成



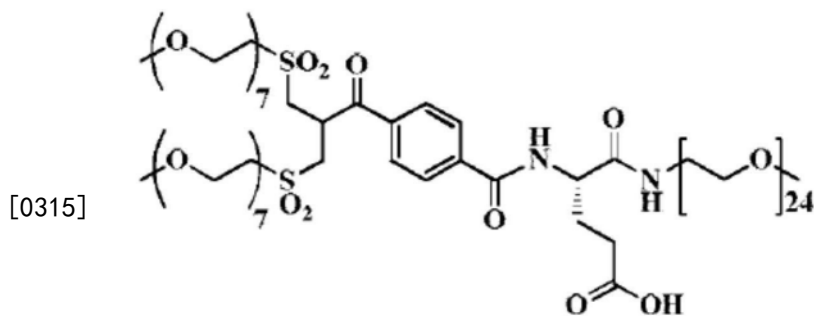
[0310] 在室温下向溶于甲醇:水(18mL,9:1v/v)的8(1.32g)的搅拌溶液中加入**Oxone®**(2.70g)。2.5h后,真空除去挥发物。将所得的残余物溶于二氯甲烷(3×10mL)中,通过硫酸镁柱过滤并用二氯甲烷(2×7mL)洗涤。合并洗脱液和洗涤液,真空除去挥发物,得到浓稠透明浅黄色油状物1.29g。将一部分残余物(700mg)溶于水:乙腈(1.50mL,3:1v/v)中,并通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A(v/v):水:5%乙腈:0.05%三氟乙酸和缓冲液B(v/v):乙腈:0.05%三氟乙酸(100:0v/v至0:100v/v)洗脱。真空除去有机溶剂,并通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到呈浓稠透明无色油状物的试剂9(524mg)。m/z [M+H]⁺965。

[0311] 步骤3:化合物10的合成。



[0313] 将溶于DMF(2mL)中的Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH(36mg)溶液在氩气气氛下冷却至0℃,并加入(苯并三唑-1-基氧基)三-(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐(BOP)(41mg),然后加入NH₂-PEG(24u)-OMe(100mg)和N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)(19μL)。将溶液温热至室温,22h后,真空除去挥发物,将所得的残余物溶于二氯甲烷(1mL)中,并用正相色谱法纯化,用二氯甲烷:甲醇(100:0v/v至80:20v/v)洗脱。将有机溶剂真空除去,得到呈无色油状物的Fmoc-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe](84mg)。在氩气气氛下,将哌啶(49μL)加入到溶于DMF(2mL)中的化合物Fmoc-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe](74mg)的溶液中,并将所得的溶液在室温下搅拌22h,然后真空除去挥发物。将所得的残余物用己烷(3×0.7mL)研磨。每次倾析出有机溶剂,并将所得的残余物真空干燥,得到为白色固体的化合物10(61mg),m/z [M+H]⁺(1274,70%),[M+2H]²⁺(638,100%)。

[0314] 步骤4:化合物11的合成。



11

[0316] 将溶于DMF (550 μ L)的化合物9 (26.6mg)的溶液在氩气气氛下冷却至0 $^{\circ}$ C,向其中加入HATU (10.5mg),并将溶液在0 $^{\circ}$ C下搅拌0.5h。加入溶于DMF (550 μ L)中的试剂10 (32mg)的溶液。将所得溶液在0 $^{\circ}$ C下搅拌5分钟,然后加入NMM (2.9 μ L)和HATU (10.5mg)。将反应溶液在0 $^{\circ}$ C下搅拌2h,然后温热至室温并再搅拌3.5h。此后,真空除去挥发物,将所得的残余物溶于水和乙腈 (v/v; 1/1, 1.2mL)中,并通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A (v/v):水:5%乙腈:0.1%甲酸和缓冲液B (v/v):乙腈:0.1%甲酸 (100:0v/v至0:100v/v)洗脱。真空除去有机溶剂,并通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到呈无色油状物的双-mPEG (7u) 砜-丙酰基-苯甲酰胺-Glu-[OtBu]-[PEG (24u)-OMe] (30.5mg, 55%)。 1 H NMR (400MHz, MeOH- d_4) 8.19 (2H, d), 8.04 (2H, d), 4.83-4.71 (1H, m), 4.58 (1H, dd), 3.92-3.83 (6H, m), 3.78-3.56 (140H, m), 3.57-3.51 (6H, m), 3.40 (4H, dd), 3.36 (3H, s), 3.35 (6H, s), 2.41 (2H, t), 2.24-2.13 (1H, m), 2.10-1.98 (1H, m), 1.45 (9H, s); m/z [M+Na] $^{+}$ (2243, 50%), [M+H] $^{+}$ (2221, 40%), [M+Na+2H] $^{3+}$ (747, 100%)

[0317] 在氩气气氛下,将溶于二氯甲烷 (2mL)中的双-mPEG (7u) 砜-丙酰基-苯甲酰胺-Glu-[OtBu]-[PEG (24u)-OMe] (30mg)的溶液冷却至0 $^{\circ}$ C,向其中加入三氟乙酸 (500 μ L),将所得溶液搅拌1.5h。使反应混合物温热至室温并再搅拌1h。此后,真空除去挥发物。将所得的残余物溶于水和乙腈 (v/v; 1/1; 0.6mL)中,并通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A (v/v):水:5%乙腈:0.05%三氟乙酸和缓冲液B (v/v):乙腈:0.05%三氟乙酸 (100:0v/v至0:100v/v)洗脱。真空除去有机溶剂,并通过冷冻干燥除去含水溶剂。得到呈无色油状物的化合物11 (20mg)。

[0318] 1 H NMR (400MHz, MeOH- d_4) 8.19 (2H, d), 8.04 (2H, d), 4.81-4.72 (1H, m), 4.59 (1H, dd), 3.92-3.84 (6H, m), 3.67-3.50 (146H, m), 3.40 (4H, dd), 3.36 (3H, s), 3.35 (6H, s), 2.48 (2H, t), 2.26-2.15 (1H, m), 2.15-2.03 (1H, m); m/z [M+H] $^{+}$ (2165, 55%), [M+2H] $^{2+}$ (1083, 60%), [M+2H+Na] $^{3+}$ (729, 100%)。

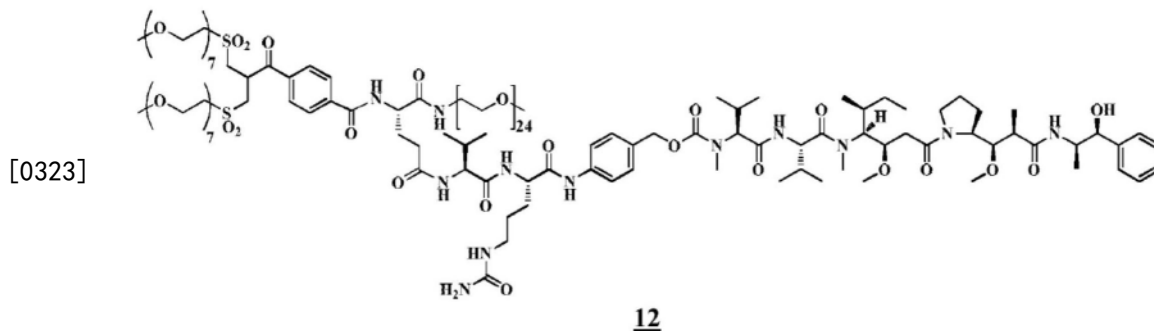
[0319] 步骤5:试剂7的合成

[0320] 将溶于DMF (600 μ L)中的化合物11 (15.0mg)的溶液在氩气气氛下冷却至0 $^{\circ}$ C。加入HATU (2.9mg),并在0 $^{\circ}$ C下搅拌0.5h。向其中加入已在室温下搅拌0.5h的溶于DMF (600 μ L)中的val-ala-PAB-AHX-DM1 (Concortis/Levena Biopharma, 9.2mg)和NMM (0.8 μ L)的溶液。5分钟后,加入额外量的HATU (2.9mg)和NMM (0.8 μ L),并将反应混合物在0 $^{\circ}$ C搅拌。3h后,加入额外量的HATU (0.7mg),并将反应混合物在0 $^{\circ}$ C搅拌。再过2h后,将反应物储存在-20 $^{\circ}$ C下,保持16h。将反应溶液真空浓缩,并通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A (v/v):水:5%乙腈:

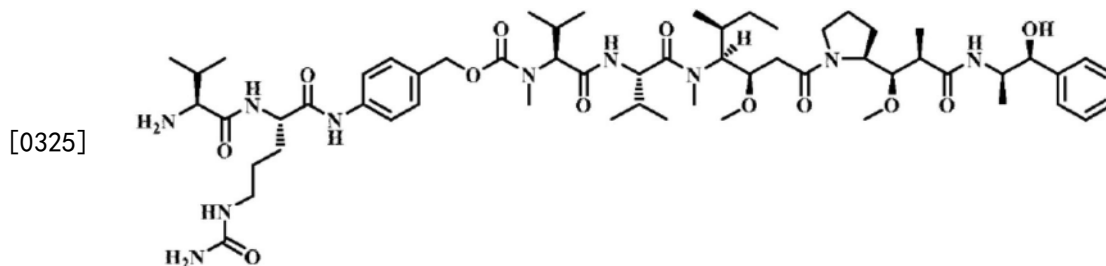
0.05% 三氟乙酸和缓冲液B(v/v):乙腈:0.05% 三氟乙酸(100:0v/v至0:100v/v)洗脱。真空除去有机溶剂,通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到呈浓稠透明无色油状物的试剂7(14.3mg)。

[0321] ^1H NMR (600MHz, MeOH- d_4) (所选的特征性信号) 5.69 (1H, dd,), 6.59 (1H, dd) , 6.68 (1H, s) , 6.69 (1H, d) , 7.10 (1H, s) , 7.28 (2H, d) , 7.57 (2H, d) , 8.01 (2H, d) , 8.16 (2H, d) 。

[0322] 实施例7:包含奥瑞斯他汀细胞毒性有效负载的缀合试剂12的合成。

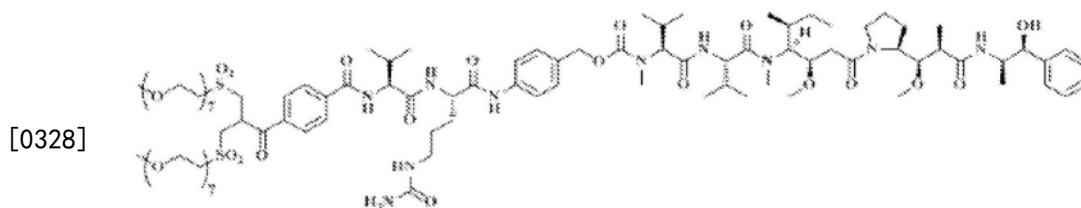


[0324] 以与实施例4的试剂1类似的方式从化合物11和具有以下结构的val-cit-PAB-MMAE TFA盐(Concortis/Levena Biopharma)合成试剂12:



[0326] 分离呈无色油状物的试剂12。 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ (3270, 12%) , $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (1636, 50%) , $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ (1091, 100%) 。

[0327] 实施例8:包含奥瑞斯他汀细胞毒性有效负载的缀合试剂13的合成。



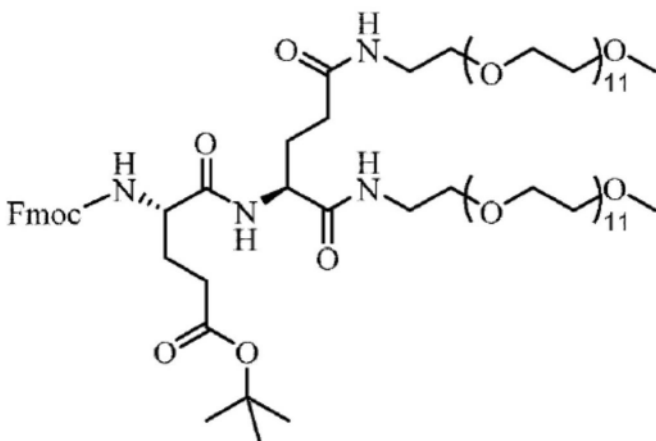
[0329] 向val-cit-PAB-MMAE盐(25.0mg)的TFA盐中加入溶于DMF(1.5mL)中的试剂9(15.6mg)的溶液,并在惰性氮气气氛下在室温下搅拌5分钟。将混合物冷却至0℃,每20分钟加入等份的HATU(6.1mg)和NMM(1.8μL),总共加入5次。1.5h后,将反应混合物温热至室温。2h后,真空除去挥发物。将所得的残余物溶于水和乙腈(v/v;1/1,0.6mL)中,并通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A(v/v):水:5%乙腈:0.05% 三氟乙酸和缓冲液B(v/v):乙腈:0.05% 三氟乙酸(100:0v/v至0:100v/v)洗脱。真空除去有机溶剂,通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到白色粉末状的试剂13(22.4mg) , m/z $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 1035。

[0330] 实施例9:包含奥瑞斯他汀细胞毒性有效负载的缀合试剂14的合成。

明无色固体的化合物16 (320mg), m/z $[M+Na]^+$ (1253, 10%) $[M+H]^{2+}$ (617, 100%)。

[0338] 步骤3: 化合物17的合成

[0339]

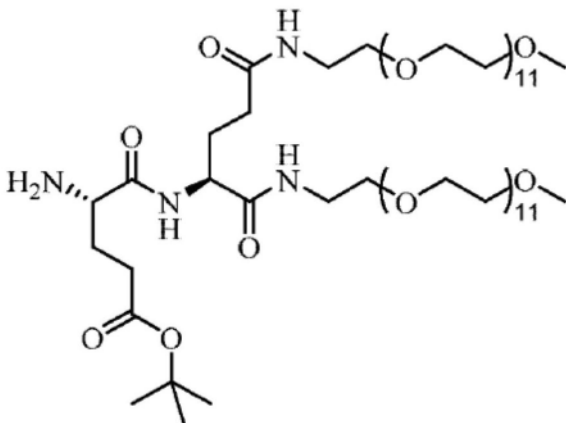


17

[0340] 向溶于无水DMF (2mL) 中的Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH (36.6mg) 的搅拌溶液中加入HATU (37.30mg)。将反应混合物在0°C和氮气气氛下搅拌1h, 然后加入到溶于DMF (1mL) 中的化合物16 (103.5mg) 和NMM (19.2 μ L) 的溶液中。加入额外的DMF (1mL)。使搅拌溶液在5h内温热至室温。真空除去挥发物。通过反相C18柱色谱法纯化所得的浅黄色油状物, 用缓冲液A (v/v): 水: 5% 乙腈: 0.1% 甲酸和缓冲液B (v/v): 乙腈: 0.1% 甲酸 (100:0v/v至50:50v/v) 洗脱。真空除去有机溶剂, 通过冷冻干燥除去含水溶剂, 得到为白色固体的化合物17 (173mg), m/z $[M+H]^+$ (1638, 100%), $[M+Na]^+$ (1661, 60%)。

[0341] 步骤4: 化合物18的合成

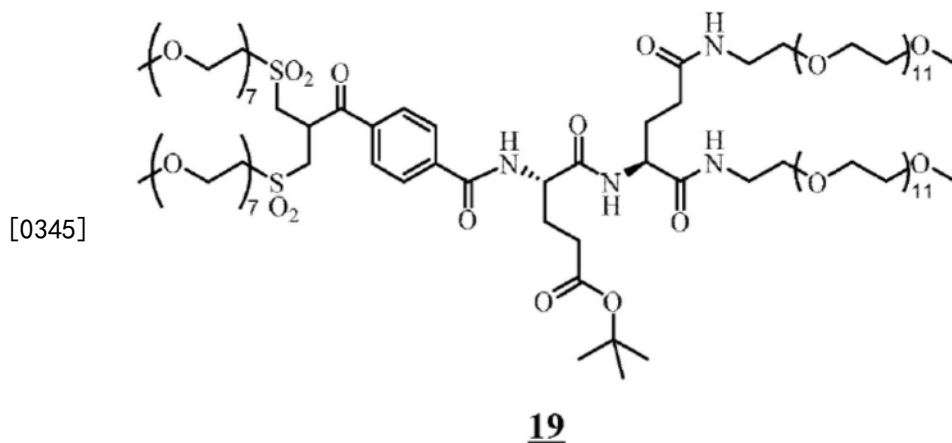
[0342]



18

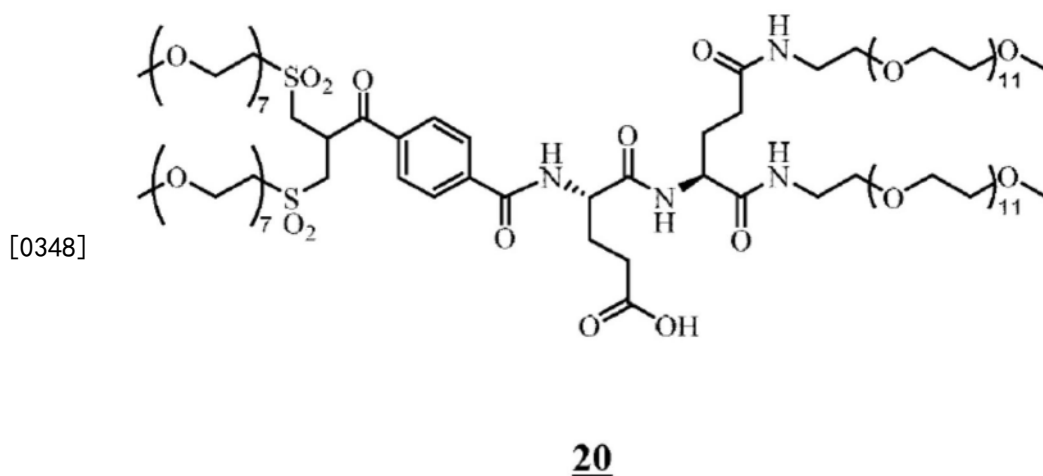
[0343] 向溶于无水DMF (3.2mL) 中的化合物17 (173mg) 的搅拌溶液中加入哌啶 (104.4 μ L)。将溶液在室温下在氩气下搅拌1.5h。真空除去挥发物, 将残余物用己烷 (5 \times 10mL) 重复研磨。将产物真空干燥, 得到呈透明无色油状物的化合物18 (152mg)。 m/z $[M+H]^+$ (1417, 85%), $[M+2H]^{2+}$ (709, 100%), $[M+Na]^+$ (1439, 30%)。

[0344] 步骤5: 化合物19的合成



[0346] 向溶于无水DMF (3mL) 中的化合物9 (114mg) 的搅拌溶液中加入HATU (51.4mg)。将反应混合物在0℃下搅拌0.5h, 然后加入到溶于DMF (3mL) 中的化合物18 (152.0mg) 的溶液中, 然后加入NMM (14.8μL)。将反应混合物在冰浴中搅拌3.5h, 然后真空除去挥发物。将所得的残余物通过反相C18柱色谱法纯化, 用缓冲液A (v/v): 水: 5% 乙腈: 0.1% 甲酸和缓冲液B (v/v): 乙腈: 0.1% 甲酸 (100:0v/v至55:45v/v) 洗脱。真空除去有机溶剂, 通过冷冻干燥除去含水溶剂, 得到呈透明无色油状物的化合物19 (160.6mg)。m/z [M+H]⁺ (2367, 95%), [M+2H]²⁺ (1184, 80%)。

[0347] 步骤6: 化合物20的合成

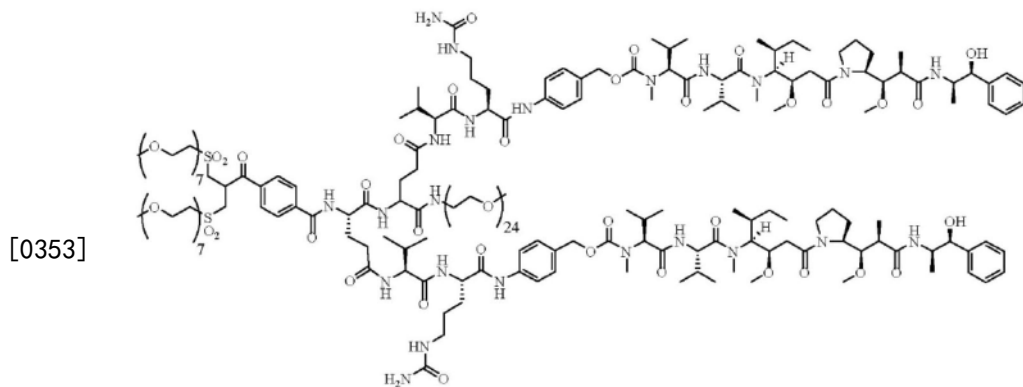


[0349] 向溶于无水二氯甲烷 (6mL) 中的化合物19 (156mg) 的搅拌溶液中加入三氟乙酸 (6mL)。将反应混合物在室温下搅拌2h, 然后真空除去挥发物, 将残余物溶于水 (25mL) 中, 并冷冻干燥, 得到呈透明无色油状物的化合物20 (156mg)。m/z [M+H]⁺ (2307, 90%), [M+2H]²⁺ (1153, 100%)。

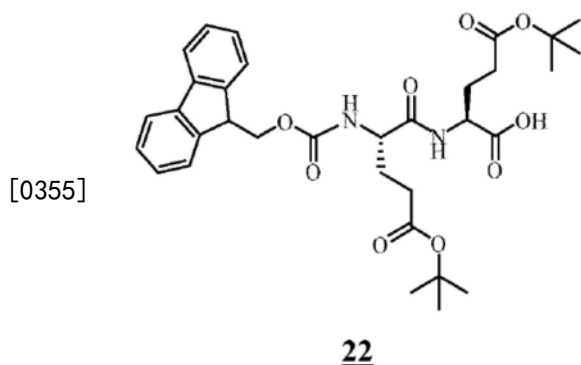
[0350] 步骤7: 试剂14的合成

[0351] 以与实施例4的试剂1类似的方式从化合物20和val-cit-PAB-MMAE TFA盐合成试剂14。分离呈无色油状物的试剂14。m/z [M+H]⁺ (3410, 40%), [M+2H]²⁺ (1706, 60%), [M+3H]³⁺ (1137, 85%), [M+4H]⁴⁺ (854, 70%)。

[0352] 实施例10: 包含奥瑞斯他汀细胞毒性有效负载的缀合试剂21的合成。

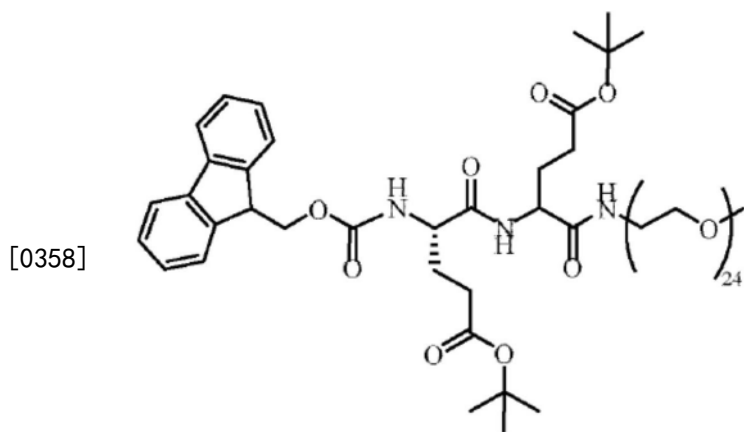


[0354] 步骤1: 化合物22的合成



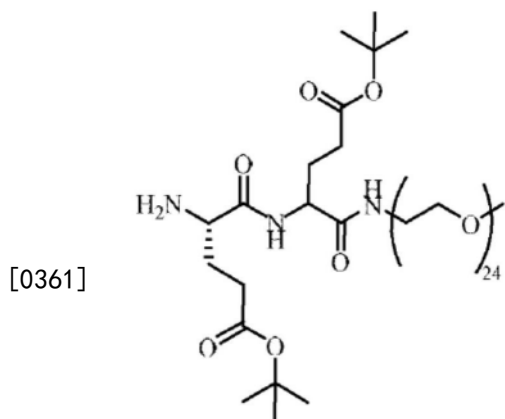
[0356] 向溶于无水DMF (18mL) 中的Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH (2g) 的搅拌溶液中加入HOBt (666mg) 和N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC) (768 μ L)。将反应混合物在0 $^{\circ}$ C下搅拌10分钟,然后在室温下搅拌2.5h。加入HL-Glu-(OtBu)-OH (1.19g) 和DIPEA (2.46mL), 并将反应混合物在室温下搅拌18h。将反应混合物用水(100mL)稀释,并通过加入稀盐酸酸化至pH2.0。将水层用乙酸乙酯(3 \times 100mL)萃取,合并有机相并用水(2 \times 50mL)和饱和盐水溶液(1 \times 50mL)洗涤。将乙酸乙酯层用硫酸钠干燥2h、过滤并将滤液真空浓缩。通过反相C18柱色谱法分离产物,用缓冲液A(v/v):水:5%乙腈:0.1%甲酸和缓冲液B(v/v):乙腈:0.1%甲酸(100:0)v/v至80:20v/v洗脱。真空除去有机溶剂,并通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到为白色固体的化合物22(875mg)。m/z [M+H]⁺ (611, 85%), [M+Na]⁺ (633, 55%), [2M+Na]⁺ (1243, 55%)。

[0357] 步骤2: 化合物23的合成。

**23**

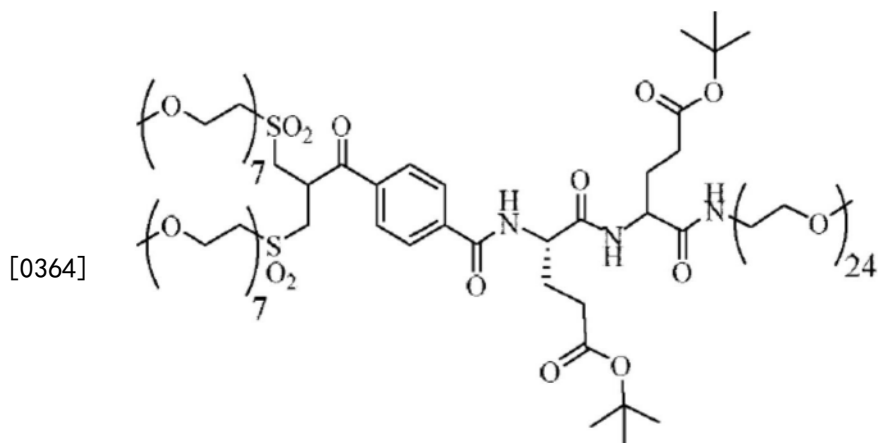
[0359] 向溶于无水DMF (5mL) 中的化合物22 (510mg) 和NH₂-PEG (24u) -OMe (1g) 的搅拌溶液中加入DIPEA (43.8μL) 和HATU (47.6mg)。将反应混合物在0℃下搅拌10分钟,然后在室温下搅拌16h。将溶液真空浓缩至2mL并通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A (v/v) :水:5%乙腈:0.1%甲酸和缓冲液B (v/v) :乙腈:0.1%甲酸 (100:0v/v至83:17v/v) 洗脱。真空除去有机溶剂,并通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到为白色固体的化合物23 (644mg)。 m/z [M+H]⁺ (1681, 40%), [M+Na]⁺ (1703, 30%) 和 [M+2H]²⁺ (841, 55%)。

[0360] 步骤3:化合物24的合成

**24**

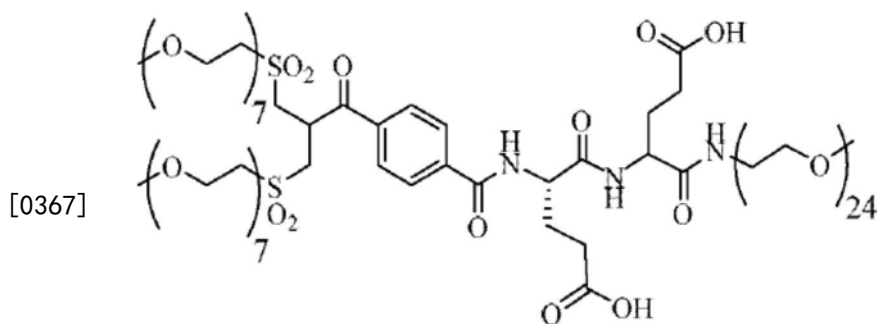
[0362] 向溶于无水DMF (900μL) 中的化合物23 (193mg) 的搅拌溶液中加入哌啶 (34μL), 将反应混合物在室温下搅拌1h。将溶液真空浓缩至干,并将残余物用乙醚 (2×2.5mL) 研磨。将产物真空干燥,得到为灰白色固体的化合物24 (166mg)。

[0363] 步骤4:化合物25的合成

**25**

[0365] 以与实施例9的试剂19类似的方式从化合物24和化合物9合成试剂25。分离呈无色油状物的试剂25。 m/z $[M+H]^+$ (2407, 25%), $[M+Na]^+$ (2429, 70%)。

[0366] 步骤5: 试剂26的合成

**26**

[0368] 以与实施例9的试剂20类似的方式从试剂25合成试剂26。分离呈无色油状物的试剂26。 m/z $[M+H]^+$ (2294, 20%), $[M+Na]^+$ (2317, 10%)。

[0369] 步骤6: 试剂21的合成

[0370] 向溶于无水DMF (1.5mL) 中的试剂26 (28.1mg)、val-cit-PAB-MMAE TFA盐 (30.6mg) 和HATU (13.9mg) 的搅拌溶液中加入NMM (6.7 μ L), 并将反应混合物在0 $^{\circ}$ C下搅拌5h。将溶液用水 (1mL) 稀释, 并通过反相C18柱色谱法纯化, 用缓冲液A (v/v): 水: 5% 乙腈: 0.1% TFA 和缓冲液B (v/v): 乙腈: 0.1% TFA (100:0v/v至60:40v/v) 洗脱。真空除去有机溶剂, 通过冷冻干燥除去含水溶剂, 得到为白色固体的试剂21 (36.1mg)。 m/z $[M+2H]^{2+}$ (2253, 40%), $[M+3H]^{3+}$ (1502, 60%) 和 $[M+4H]^{4+}$ (1127, 100%)。

[0371] 实施例11: 用于将试剂与抗PSMA抗体缀合以产生具有DAR 4的抗体药物缀合物 (ADC) 的一般方案。

[0372] 将溶于反应缓冲液 (20mM磷酸钠、150mM NaCl、20mM EDTA、pH7.5) 中的浓度为5.2mg/mL的抗PSMA抗体 (例如AB-03) 的溶液加热至40 $^{\circ}$ C, 持续15分钟。将TCEP (6当量/mAb) 加入到mAb溶液中, 轻轻混合并在40 $^{\circ}$ C下孵育1h, 然后冷却至22 $^{\circ}$ C。将缀合试剂1、2、5、7、12、13、14和21溶解于MeCN或DMF中, 得到1.6mM储备液。用反应缓冲液将经还原的mAb溶液稀释至4.2mg/mL。将缀合试剂 (6当量/mAb) 加入至mAb溶液中, 轻轻混合反应物并在22 $^{\circ}$ C下孵育6

至22h。孵育后,在22°C下将反应物用50mM N-乙酰基-L半胱氨酸(相对于试剂20当量)处理1h。

[0373] 可使用TOSOH TSK-凝胶Butyl-NPR柱通过疏水相互作用色谱(HIC)分析反应样品。将所分离的每种药物与抗体比例(DAR)变体(通过药物和抗体的UV吸光度最大值的比率以及峰洗脱的顺序确定)所获得的每个峰面积绘制为条形图。分别产生ADC 3和4的使用试剂1和2的缀合结果分别示于图4A和4B中。每个反应的主要产物是DAR 4缀合物。

[0374] 使用缓冲液A:50mM磷酸钠、2.0M NaCl、pH7.0,和缓冲液B:80%50mM磷酸钠、20%异丙醇、pH7.0平衡的ToyoPearl Phenyl 650S树脂,通过制备型HIC纯化反应混合物。将等体积的溶于50mM磷酸钠(pH7.0)中的4.0M NaCl加入到缀合混合物中,然后将其注射到柱上,随后使用0-100%缓冲液B梯度洗脱。收集洗脱峰的级分并通过分析型HIC分析。将含DAR4的级分合并,经缓冲交换到PBS pH7.4中并在VivaSpin 20(10kDa MWC0 PES膜)浓缩器中浓缩。在进一步评估之前,通过Bradford测定法定量最终样品。缀合试剂1、2、5、7、12、13、14和21分别产生ADC 3、4、6、27、28、29、30和31。

[0375] 实施例12:用于产生具有平均DAR 4的缀合物32的抗PSMA抗体与马来酰亚胺试剂mc-vc-PAB-MMAE的缀合

[0376] 将溶于反应缓冲液中的浓度为5.2mg/mL的抗PSMA抗体AB-03加热至40°C,保持15分钟。将TCEP(2当量)加入到mAb溶液中,轻轻混合,然后在40°C下孵育1h,并使其冷却至22°C。将马来酰亚胺试剂mc-val-cit-PAB-MMAE(Concortis/Levena Biopharma)溶解在MeCN中,得到2.1mM储备液。用反应缓冲液将经还原的mAb溶液稀释至4.2mg/mL。将mc-val-cit-PAB-MMAE(4当量/mAb)加入到mAb溶液中,将反应轻轻混合并在22°C下孵育1h。将反应用50mM N-乙酰基-L半胱氨酸(相对于试剂为20当量)处理,并使其在22°C下进行1h。通过疏水相互作用色谱法分析粗缀合混合物。将粗反应渗滤(Vivaspin 20,10kDa PES膜)以除去反应物并浓缩缀合物。将经浓缩的样品经缓冲交换到DPBS pH7.1-7.5中,然后无菌过滤(0.22 μm PVDF膜)。

[0377] 实施例13:用于产生平均DAR 4的缀合物33和34的抗体AB-P1和AB-P2与mc-vc-PAB-MMAE的缀合。

[0378] 以与实施例12的缀合物32的产生类似的方式进行缀合。

[0379] 实施例14:对由双砒-PEG(24u)-val-cit-PAB-MMAE缀合试剂1制备的抗PSMA ADC 3的体外细胞杀死分析。

[0380] 在体外用细胞毒性药物或ADC处理后肿瘤细胞活力的丧失可通过使细胞系在增加浓度的药物或ADC的存在下生长并使用**CellTiterGlo®**发光试剂(Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008;68:9280-9290)定量增殖或代谢活性的丧失来测量。所述方案描述了细胞接种、药物处理和基于ATP合成——其与孔中存在的细胞数目直接相关——测定相对于未经处理的细胞的细胞活力。

[0381] 用TrypLE分离PSMA阳性LNCaP(克隆FGC)细胞和C4-2细胞以及PSMA阴性PC-3细胞,并重悬于完全培养基中。使用一次性Neubauer计数室对细胞计数,并分别将LNCaP、C4-2和PC-3的细胞密度调整至 10×10^4 个细胞/mL、 2×10^4 个细胞/mL和 1×10^4 个细胞/mL。将细胞接种(100 μL/孔)到组织培养物处理的(C4-2)或聚-D-赖氨酸包被的(LNCaP和PC-3)白色、不透明壁的96孔板中,并在37°C和5% CO₂下孵育24h。从美国典型培养物保藏中心(ATCC)购买肿

瘤细胞系LNCaP (CRL-1740) 和PC-3 (CRL-1435)。使LNCaP和C4-2细胞在含2mM谷氨酰胺 (**LifeTechnologies®**)、10%胎牛血清、100U/mL青霉素和100µg/mL链霉素的RPMI-1640培养基中生长。使PC-3细胞在Ham's F-12K (**LifeTechnologies®**)、10%胎牛血清、100UI/mL青霉素和100µg/mL链霉素 (Invitrogen) 中生长。如产品信息表中所述并遵循关于组织培养的ATCC一般建议维持细胞。根据ATCC推荐和本文引用的参考文献 (例如, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney第3版, 由Alan R. Liss出版, N.Y. 1994, 或由Wiley-Liss出版的第5版, N.Y. 2005) 培养细胞。

[0382] 如制造商的说明书 (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008; 68: 9280-9290) 所述, 使用Cell-Titer **Glo®** 发光试剂进行细胞活力测定。使用酶标仪 (例如Molecular Devices Spectramax M3酶标仪) 记录发光值, 随后使用四参数非线性回归模型分析数据。

[0383] 如果绘制成图, 则将活力表示为%未经处理的细胞, 并使用以下公式计算:

$$[0384] \quad \% \text{活力} = 100 \times \frac{\text{发光值}_{\text{样品}} - \text{发光值}_{\text{非细胞对照}}}{\text{发光值}_{\text{未处理}} - \text{发光值}_{\text{非细胞对照}}}$$

[0385] 相对于以nM计的药物的对数 (X轴) 对%活力 (Y轴) 作图, 以外推所有缀合物以及游离药物的IC₅₀值。

[0386] 通过测量对过表达PSMA受体的癌细胞系LNCaP的细胞生长的抑制作用来测定ADC 3的体外活性。对照DAR 4非结合的mAb药物缀合物也包括在该研究中以证明抗原选择性细胞杀死。所述非结合的对照是通过用于制备3的方法由缀合试剂1制备的曲妥珠单抗ADC。曲妥珠单抗与LNCaP细胞上不存在或以非常低水平存在的靶HER-2结合。因此, 曲妥珠单抗ADC不是特异性靶向这些细胞, 并且应该仅具有非特异性的细胞毒性作用。

[0387] 通过穿过96孔板的第3-10列进行移液来一式三份制备ADC或游离药物 (MMAE) 的系列稀释物, 其中MMAE或MMAE DAR 4缀合物分别在作为稀释剂的细胞培养基中稀释2-2.5倍。用表2中所示的游离药物或药物缀合物浓度处理LNCaP细胞。随后将细胞用药物 (总体积为200µL/孔) 在37°C和5%CO₂下再孵育96h。

[0388] 表2:

细胞系	药物/药物-缀合物	浓度范围
LNCaP	MMAE	0.01-20nM
LNCaP	DAR 4 ADC <u>3</u>	0.01-5nM

[0390] 结果示于图5中, 并且IC₅₀值示于表3中, 说明了在LNCaP细胞内对用ADC 3或游离药物处理的细胞活力应答。ADC 3在PSMA阳性LNCaP细胞系内是有活性的, 而非结合的曲妥珠单抗对照ADC对这些细胞显示很少或无细胞毒性作用。曲妥珠单抗ADC数据无法确定IC₅₀值。

[0391] 表3:

样品	LNCaP IC ₅₀ (nM)
MMAE	0.81
ADC <u>3</u>	0.33

[0393] 实施例15: 对由二碘-PEG (24u) -val-ala-PAB-AHX-DM1缀合试剂5制备的抗PSMA ADC 6的体外细胞杀死分析。

[0394] 如对实施例14中的ADC 3所述测定DAR 4 ADC 6的体外活性。通过穿过96孔板的第3-10列进行移液来一式三份制备ADC的系列稀释物,其中使用细胞培养基作为稀释剂将ADC 6或曲妥珠单抗对照缀合物分别稀释2.5-3倍。如在实施例14中,将非结合的对照曲妥珠单抗ADC用于证明ADC6的抗原选择性细胞杀死。通过用于制备6的相同方法从缀合试剂5制备非结合的对照。曲妥珠单抗与LNCaP细胞上不存在或以非常低水平存在的靶HER-2结合。因此,曲妥珠单抗ADC不是特异性靶向这些细胞,并且应该仅具有非特异性的细胞毒性作用。

[0395] 如表4所示,用游离药物或缀合物浓度处理PSMA阳性细胞系LNCaP。

[0396] 表4:

细胞系	ADC	浓度范围
LNCaP	曲妥珠单抗对照ADC	0.005-10nM
LNCaP	ADC <u>6</u>	0.005-10nM

[0398] 结果示于图6中,其说明了在LNCaP细胞内对用ADC6或曲妥珠单抗对照ADC处理的细胞活力应答。将活力表示为%未经处理的细胞。相对于以nM计的药物浓度的对数(X轴)对%活力(Y轴)作图,以测定两种缀合物的IC₅₀值。IC₅₀值示于表5中。

[0399] 表5:

样品	LNCaPIC ₅₀ (nM)
曲妥珠单抗对照ADC	未测定
DAR <u>4</u> ADC <u>6</u>	0.44

[0401] 如图6和表5所示,ADC 6在PSMA阳性LNCaP细胞系中具有活性。

[0402] 实施例16:通过体外细胞活力测定对抗体药物缀合物和游离有效负载的分析。

[0403] 如实施例14所述,通过测量它们对过表达PSMA的癌细胞系的细胞生长的抑制作用来确定分别如实施例11中所述制备的ADC 27、28、29、30和31,以及如实施例12和13中所述制备的ADC 32、33和34的体外功效。

[0404] 在相关培养基中制备ADC或游离药物的8点连续稀释物。用50-0.00064nM浓度的ADC处理所有三种细胞系。将MMAE以500-0.0064nM用于C4-2细胞,以10,000-0.128nM用于LNCaP和PC-3细胞。将含有贴壁细胞的平板中的培养基除去并用100μL/孔的连续稀释的化合物替换。然后将细胞在37°C和5%CO₂下再孵育96h。

[0405] 如表6所示,在所测试的浓度范围内,所有ADC都能够特异性地抑制表达PSMA的LNCaP和C4-2细胞的增殖,显示出对PSMA阴性PC-3细胞的非常有限的作用。

[0406] 表6.显示出ADC和游离有效负载对LNCaP、C4-2和PC-3细胞(阴性对照)的抗增殖作用的IC₅₀值。

样品	LNCaP IC ₅₀ (nM)	C4-2 IC ₅₀ (nM)	PC-3 IC ₅₀ (nM)
<u>27</u>	0.61	0.02	> 50
<u>28</u>	0.38	0.06	> 50
<u>30</u>	0.47	0.11	> 50
<u>31</u>	0.17	0.03	> 50
[0407] <u>29</u>	0.59	0.08	> 50
<u>32</u>	0.84	0.11	> 10
<u>33</u>	0.18	0.06	> 50
<u>34</u>	0.27	0.07	> 50
MMAE		0.28	8.2
AHX-DM1	341	57	> 1000

[0408] 实施例17:在体内功效研究中对抗体药物缀合物(ADC)和游离有效负载的评估。

[0409] 使用健康的雌性严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠(C.B-17/1cr-Prkdcscid, Charles River Laboratories)。根据FELASA指南,在受控环境条件下在饲养屋中,使动物保持在SPF健康状态中。设计动物围栏以提供具有草垫材料、食物和水、环境和社会方面优渥的无菌和足够的空间。

[0410] 通过在SCID小鼠中皮下注射,用C4-2人前列腺癌细胞启动异种移植物。在肿瘤诱导的当天,每只测试小鼠在右侧肋腹接受溶于200 μ L的RPMI 1640中的10⁷个C4-2细胞。使用卡尺在两个维度上测量肿瘤,并使用以下公式计算体积:

$$[0411] \quad \text{肿瘤体积 (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

[0412] 其中w=肿瘤的宽度,l=肿瘤的长度,以mm计。

[0413] 在肿瘤植入后18天——将其指定为本研究的第1天,将动物分成每组由5只小鼠组成的小组,组平均肿瘤体积为100-200mm³。所有组均在第1天开始治疗。在第1天使用抗体-药物缀合物27、28、30、31、29、32以及抗体-药物缀合物33和34以6mg/kg对治疗组进行静脉注射(i.v.)。将PBS给予载体处理的对照组中的小鼠。

[0414] 单个监测小鼠,当其肿瘤达到2000mm³的终点体积时对每只动物实施安乐死。通过体重测量和频繁观察治疗相关副作用的临床现象来评估治疗耐受性。

[0415] 在第57天计算每只小鼠的肿瘤体积百分比变化,并将其表示为%平均值 \pm 标准误差。所有方案都具有良好的耐受性,并可评估其功效。结果示于图7至14中,其示出了针对抗体-药物缀合物27、28、30、31、29、32以及抗体-药物缀合物33和ADC 34的肿瘤体积的百分比变化。在每种情况下,图示出了响应于用抗体-药物缀合物给药时肿瘤体积随时间的变化。值表示为%平均值 \pm 标准误差。

[0416] 实施例18:通过热应激测试比较抗PSMA抗体的稳定性

[0417] 将抗体样品(溶于PBS中的0.5mg/mL)在75 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,随后在冰浴中孵育5分钟,然后分析其聚集程度。通过尺寸排阻色谱法(SEC)和浊度测量进行抗体溶液的分析。

[0418] SEC:

[0419] 使用TOSOH Bioscience TSK gel Super SW 3000柱进行SEC。在用0.2M磷酸钾缓

冲液 (pH 6.8) (0.2M氯化钾和15%异丙醇) 等度洗脱期间监测280nm处的UV吸光度。洗脱时间和峰数指示样品是否含有聚集的、降解的或天然的抗体。将%曲线下面积 (Abs280) 用于测定SEC分析中存在的每个种类的量。

[0420] 结果:

[0421] SEC测量的结果示于表7中。

[0422] 表7:

抗体分析——应激测试后	天然构象形式的Ab (%)	聚集形式的Ab (%)
AB-03	75	25
AB-P1	0	100
AB-P2	0	100
AB-22	0	100

[0424] 从该SEC分析中可以看出, 抗体AB-22、AB-P1和AB-P2不如AB-03稳定, 在加热和冷却时表现出更大的聚集倾向。

[0425] 实施例19: 通过热转变测定对抗PSMA抗体的稳定性的比较

[0426] 用DPBS pH7.1-7.5将抗体稀释至1.5mg/mL, 并使用Nanodrop仪器通过在280nm处测量OD来确定浓度。在热转变分析之前进行SEC分析以确认超过99%的各抗体以其天然形式存在。

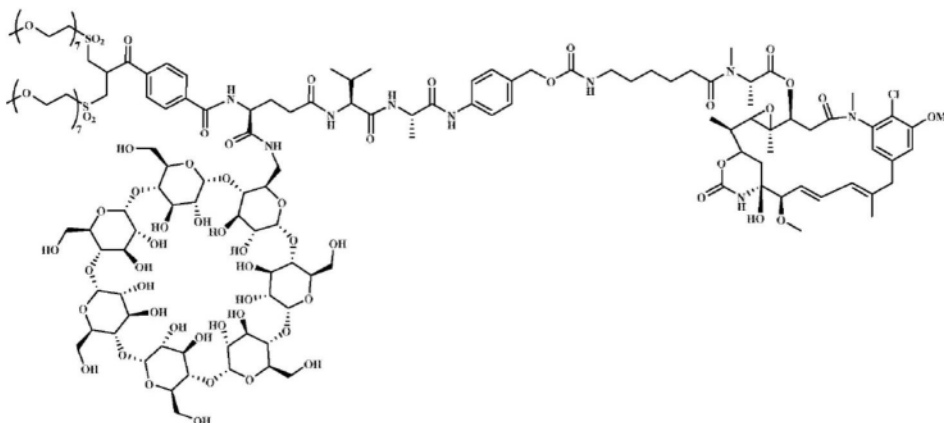
[0427] 使用Sypro Orange染料作为荧光报告分子, 设置RT-PCR仪器 (StepOnePlus, Applied Biosystems) 以用于基于荧光的热转变测定。该测定在PCR 96孔板中建立, 每个抗体样品重复5次, 并且最终反应体积为20 μ L/每孔。将13.5 μ L的DPBS用移液管移入至每孔中, 然后加入4 μ L抗体。最后, 将Sypro Orange试剂在DPBS中从5000x (储备液) 稀释到40x, 并将2.5 μ L的40x溶液加入到每孔中。平板中还包括五个重复的空白, 使用4 μ L DPBS替换4 μ L抗体样品。使用多通道移液管混合测定混合物。用光学透明膜密封板, 以1000rpm离心1分钟并置于RT-PCR仪器中。使用连续斜坡模式以1%的斜坡率将样品从25 $^{\circ}$ C加热至99 $^{\circ}$ C。使用470nm处的激发滤光片和610nm处的发射滤光片在整个温度斜坡中收集荧光数据。总测定时间约为45分钟。在抗体的热解折叠过程中由仪器软件生成的熔化曲线由荧光对温度的制图产生。溶解温度 (T_m) 是一半抗体分子解折叠时的温度 (由荧光强度增加50%来指示), 并且可以从溶解曲线的拐点确定。通常通过绘制导数图来计算 T_m 。其是荧光的变化除以相对于X轴上的温度在Y轴上绘制的时间变化 (变化率)。由获自该图的峰的最大值确定每种抗体的 T_m 值。使用GraphPad Prism软件 (v.5.04) 进行对所获得的溶解曲线的分析。

[0428] 确定对背景荧光 (由缓冲液组分和游离染料引起的) 校正的要求是非常低的, 并将原始数据直接用于绘制倒数图, 因为确定了荧光背景校正对 T_m 的拟合值几乎没有影响。如图23所示, 由于它们的多结构域结构, 对于所测定的三种抗体中的每一种都观察到两个峰。第一个转变峰 (T_{m1}) 代表CH2和Fab结构域的解折叠, 第二个转变峰 (T_{m2}) 代表CH3结构域的解折叠。表8中给出了抗体AB-03、AB-P1和AB-P2的 T_{m1} 和 T_{m2} 的值。这些 T_m 数据显示, 虽然这三种抗体的Fab和CH2结构域显示出相似的稳定性水平, 但AB-03的CH3结构域比AB-P1和AB-P2的稳定得多, 因为溶解温度约高12-15 $^{\circ}$ C。

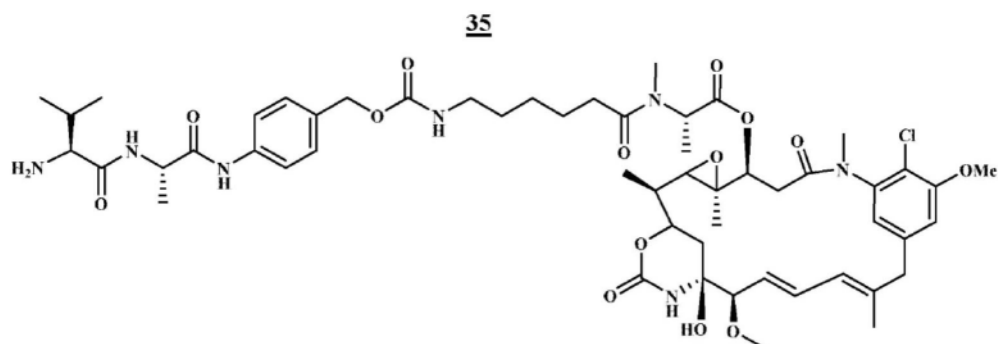
[0429] 表8:

	AB-03	AB-P1	AB-P2
[0430] T_{m1} ($^{\circ}\text{C}$)	68.9 ± 0.1	69.8 ± 0.1	68.9 ± 0.1
T_{m2} ($^{\circ}\text{C}$)	87.5 ± 0.1	72.6 ± 0.1	75.2 ± 0.1

[0431] 实施例20:包含酰氨基-6'- β -环糊精和美登木素生物碱细胞毒性有效负载的缀合试剂35的合成。



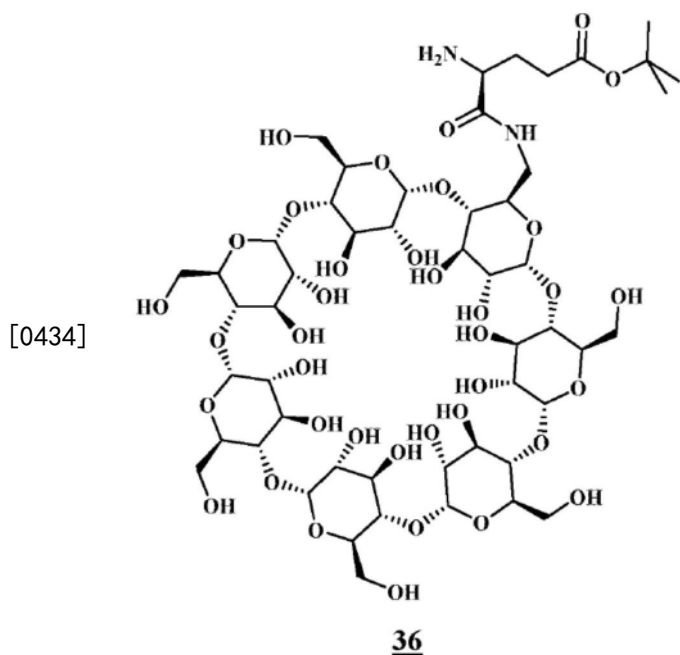
[0432]



Val-Ala-PAB-AHX-DM1

69

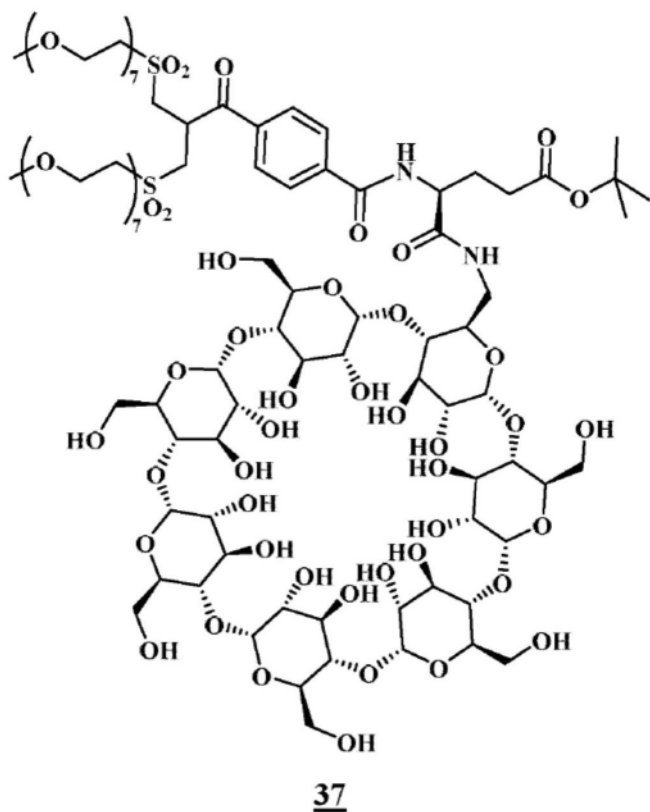
[0433] 步骤1:化合物36的合成



[0435] 向溶于DMF (1mL) 中的Fmoc-Glu- (OtBu) -OH (55mg) 的溶液中加入溶于DMF (1mL) 中的HATU (116mg) 的溶液、NMM (34 μ L) 和溶于DMF (2mL) 中的6-单脱氧-6-单氨基- β -环糊精盐酸盐 (150mg) 的溶液。在室温下将反应混合物搅拌16h后,加入NMM (13 μ L), 然后1h后,再加入溶于DMF (200 μ L) 中的6-单脱氧-6-单氨基- β -环糊精盐酸盐 (8mg)。3h后,真空除去挥发物。将残余物溶于DMF (5mL) 中,向溶液中加入哌啶 (151 μ L), 在室温下搅拌1h。然后真空浓缩反应溶液,在室温下将所得的油在二乙基乙基 (4 \times 200mL) 中沉淀并过滤,得到为白色固体的化合物36。 m/z [M+H]⁺ (1320, 50%)。

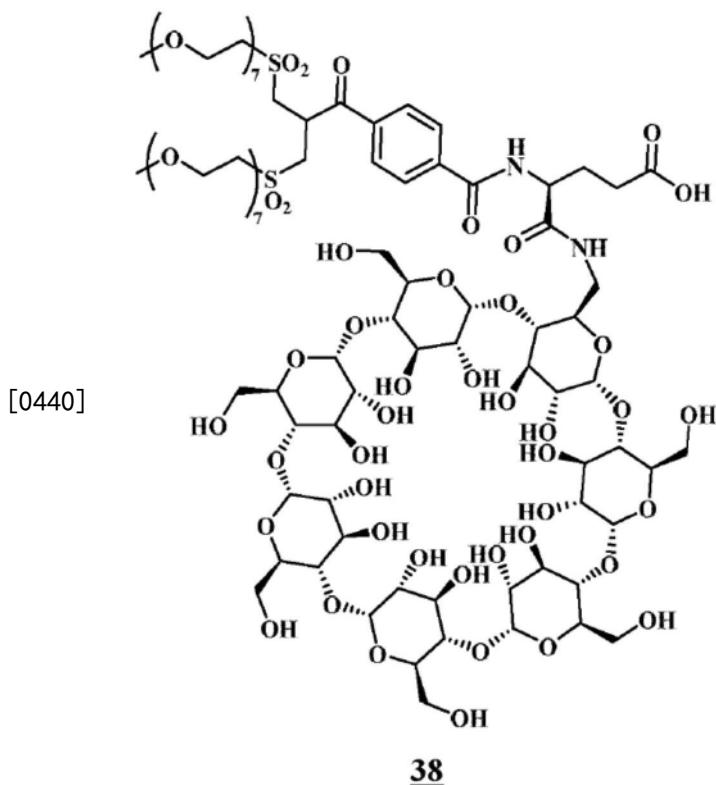
[0436] 步骤2:化合物37的合成

[0437]



[0438] 向溶于DMF (2mL) 中的试剂9 (156mg) 的溶液中加入溶于DMF (1mL) 中的HATU (141mg) 的溶液、NMM (41 μ L) 和溶于DMF (2.5mL) 中的化合物36 (196mg) 的溶液。在0 $^{\circ}$ C下搅拌2.5h后, 加入额外的溶于DMF (500 μ L) 中的试剂9 (19mg)。20分钟后, 将溶液真空浓缩, 并将残余物通过反相C18柱色谱法纯化, 用缓冲液A (v/v) : 水 : 5% 乙腈 : 0.05% 三氟乙酸和缓冲液B (v/v) : 乙腈 : 0.05% 三氟乙酸 (100:0v/v至0:100v/v) 洗脱。真空除去有机溶剂, 通过冷冻干燥除去含水溶剂, 得到呈无色油状物的化合物37 (76mg)。 m/z [M+H] $^{+}$ (2267, 20%), [M+2H] $^{2+}$ (1134, 100%)。

[0439] 步骤3: 化合物38的合成



[0441] 向溶于THF:氯仿(5mL, 1:4v/v)中的化合物37(33mg)的溶液加入对甲苯磺酸(14mg),在室温下搅拌所得的悬浮液。3.5h后,真空除去挥发物,将所得的残余物通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A(v/v):水:5%乙腈:0.05%三氟乙酸和缓冲液B(v/v):乙腈:0.05%三氟乙酸(100:0v/v至0:100v/v)洗脱。真空除去有机溶剂,通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到呈无色油状物的化合物38(26mg)。m/z [M+H]⁺(2212, 25%), [M+2H]²⁺(1106, 100%)。

[0442] 步骤4:试剂35的合成

[0443] 在室温下,在惰性氩气气氛下,向溶于DMF(250μL)中的化合物38(18mg)的搅拌溶液中加入HATU(6mg)。1h后,加入额外的HATU(6mg)和NMM(1.1μL),将溶液再搅拌0.5h。制备Val-Ala-PAB-AHX-DM1.TFA盐(Concortis/Levena Biopharma, 7.5mg)和NMM(1.7μL)溶于DMF(100μL)中的单独的溶液,并在室温下搅拌20分钟,然后合并两种溶液。加入额外的HATU(6mg)和NMM(1.7μL),并在室温下搅拌溶液。2h后,加入额外的HATU(6mg),将溶液在室温下再搅拌4h,然后加入额外的NMM(1.7μL)。3.5h后,真空除去挥发物,将所得的残余物通过反相C18柱色谱法纯化,用缓冲液A(v/v):水:5%乙腈:0.05%三氟乙酸和缓冲液B(v/v):乙腈:0.05%三氟乙酸(100:0v/v至0:100v/v)洗脱。真空除去有机溶剂,通过冷冻干燥除去含水溶剂,得到试剂35(2.7mg)。m/z [M+Na+2H]³⁺(1100, 65%)。[M+3H]³⁺(1094, 100%)。

[0444] 应理解,可以使用替代的环糊精环(例如3α-环糊精)制备类似的化合物。

[0445] 实施例21:用于产生具有平均DAR 4的抗体药物缀合物39的抗PSMA抗体与试剂35的缀合。

[0446] 将缀合试剂35与抗PSMA抗体缀合,产生ADC 39。将溶于20mM磷酸钠pH7.5(含有150mM NaCl和20mM EDTA)中的浓度为5.2mg/mL的抗PSMA抗体AB-03在加热模块中加热至40℃,持续15分钟。将TCEP(6当量/mAb)加入mAb溶液中,轻轻混合并在40℃下孵育1h,然后冷

却至22℃。将缀合试剂35溶解在DMF中,得到1.5mM溶液。用20mM磷酸钠pH7.5(含150mM NaCl和20mM EDTA)将经还原的mAb溶液稀释至4.4mg/mL。将缀合试剂(5.6当量/mAb)加入到mAb溶液中,将反应轻轻混合并在22℃下孵育6至22h。此后,将反应用50mM N-乙酰基-L-半胱氨酸(相对于试剂为20当量)在22℃下处理1h。通过疏水相互作用色谱分析粗缀合混合物。将粗反应与等体积的50mM磷酸钠pH7(4M NaCl)混合,并将所得溶液上样到用50mM磷酸钠pH7(2M NaCl)平衡的ToyoPearl Phenyl-650S HIC柱上。用50mM磷酸钠pH7(20%异丙醇)的梯度从柱上洗脱ADC。将含有DAR 4ADC的级分合并并浓缩(Vivaspin 20,10kDa PES膜)。将经浓缩的样品经缓冲交换到PBS pH7.1-7.5中并无菌过滤(0.22μm的PVDF膜)。DAR分配基于A248/A280吸收比。缀合物的平均DAR由在280nm处的HIC分析后各个DAR种类的相对峰面积计算。

[0447] 实施例22:通过体外细胞活力测定分析抗体药物缀合物39。

[0448] 通过测量缀合物对过表达靶标的癌细胞系的细胞生长的抑制作用来确定实施例21中制备的抗体药物缀合物39的体外功效。

[0449] 在体外用ADC或游离有效负载处理后的肿瘤细胞活力的丧失可通过使细胞系在增加浓度的化合物的存在下生长并使用CellTiterGlo®发光试剂定量增殖或代谢活性的丧失来测量。所述方案描述了细胞接种、药物处理和基于ATP合成——其与孔中存在的细胞数目直接相关——测定相对于未经处理的细胞的细胞活力。

[0450] 细胞系的特征以及用于测定的接种密度在下表中描述。

[0451] 使用一次性Neubauer计数室计数细胞,并如下表详述调整细胞密度。将LNCaP细胞以50μL/孔接种到组织培养物处理的不透明壁的96孔白色板中,并在37℃和5%CO₂下孵育24h。

细胞系	靶标	生长培养基	接种密度
[0452] LNCaP 克隆 FGC	PSMA	RPMI-1640 培养基(Life Technologies®), 10% 胎牛血清, 100 U/mL青霉素 和 100 μg/mL链霉素	1 x 10 ⁴ 个细胞/孔

[0453] 在相关培养基中制备化合物的八点连续稀释物。针对每种化合物/细胞系组合调整滴定范围。对于LNCaP细胞,除去生长培养基并用100μL/孔的1x ADC稀释液替换。然后将细胞在37℃和5%CO₂下再孵育96h。

[0454] 如制造商所述,使用Cell-Titer Glo®发光试剂(Promega)进行细胞活力测定。

[0455] 使用Molecular Devices SpectramaxMS酶标仪记录发光值,随后使用GraphPad Prism四参数非线性回归模型分析数据。将活力表示为%未经处理的细胞,并使用下式计算:

$$[0456] \quad \% \text{活力} = 100 \times \frac{\text{发光值}_{\text{样品}} - \text{发光值}_{\text{非细胞对照}}}{\text{发光值}_{\text{未处理}} - \text{发光值}_{\text{非细胞对照}}}$$

[0457] 相对于以nM计的药物浓度的对数对%活力作图,以外推缀合物的IC₅₀值。用于缀合物的浓度范围是50nM-3.1pM,并且所获得的IC₅₀值是1.3nM。

[0458] 所获得的缀合物39的IC₅₀值表明本发明的ADC具有有效的体外细胞杀死特性。

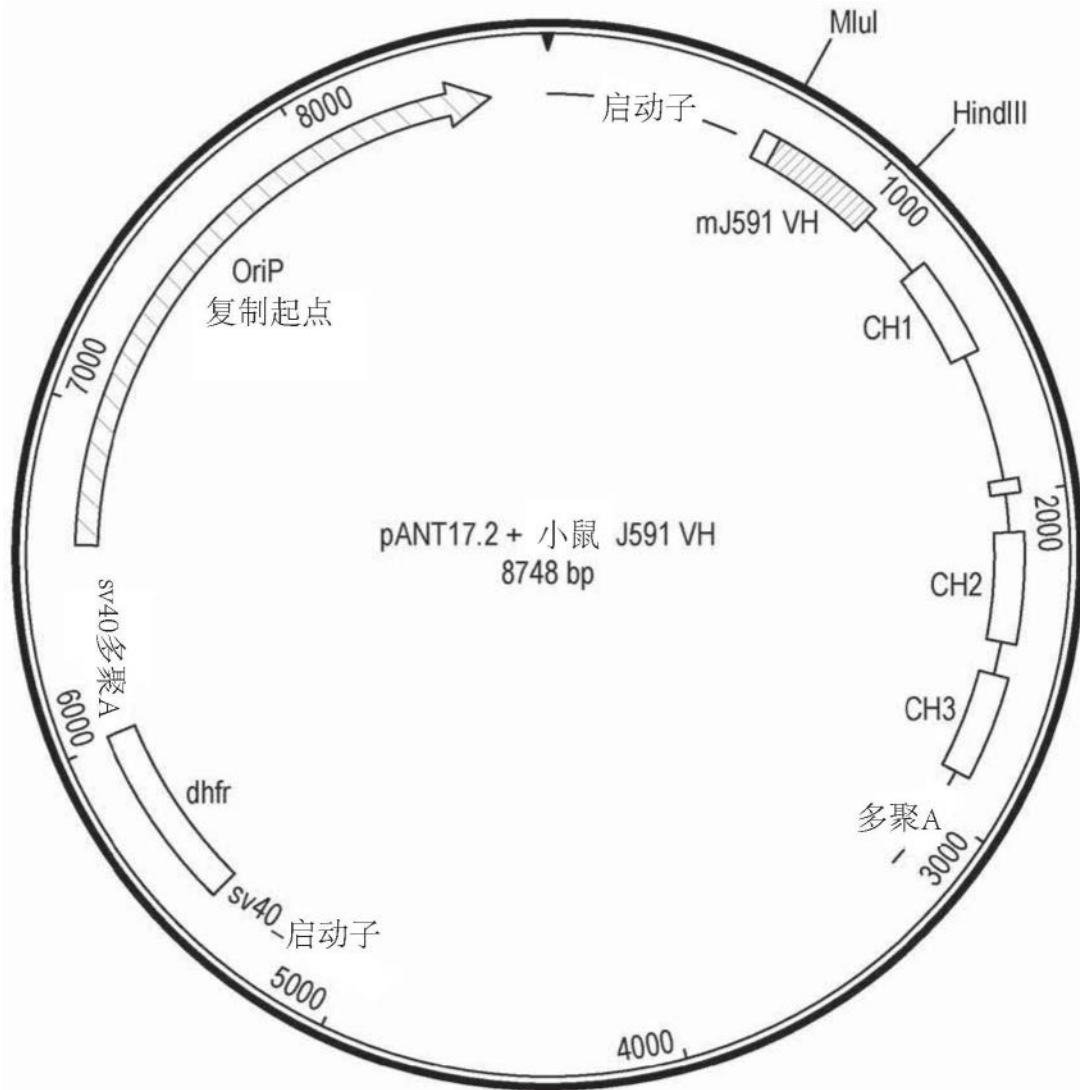


图1(a)

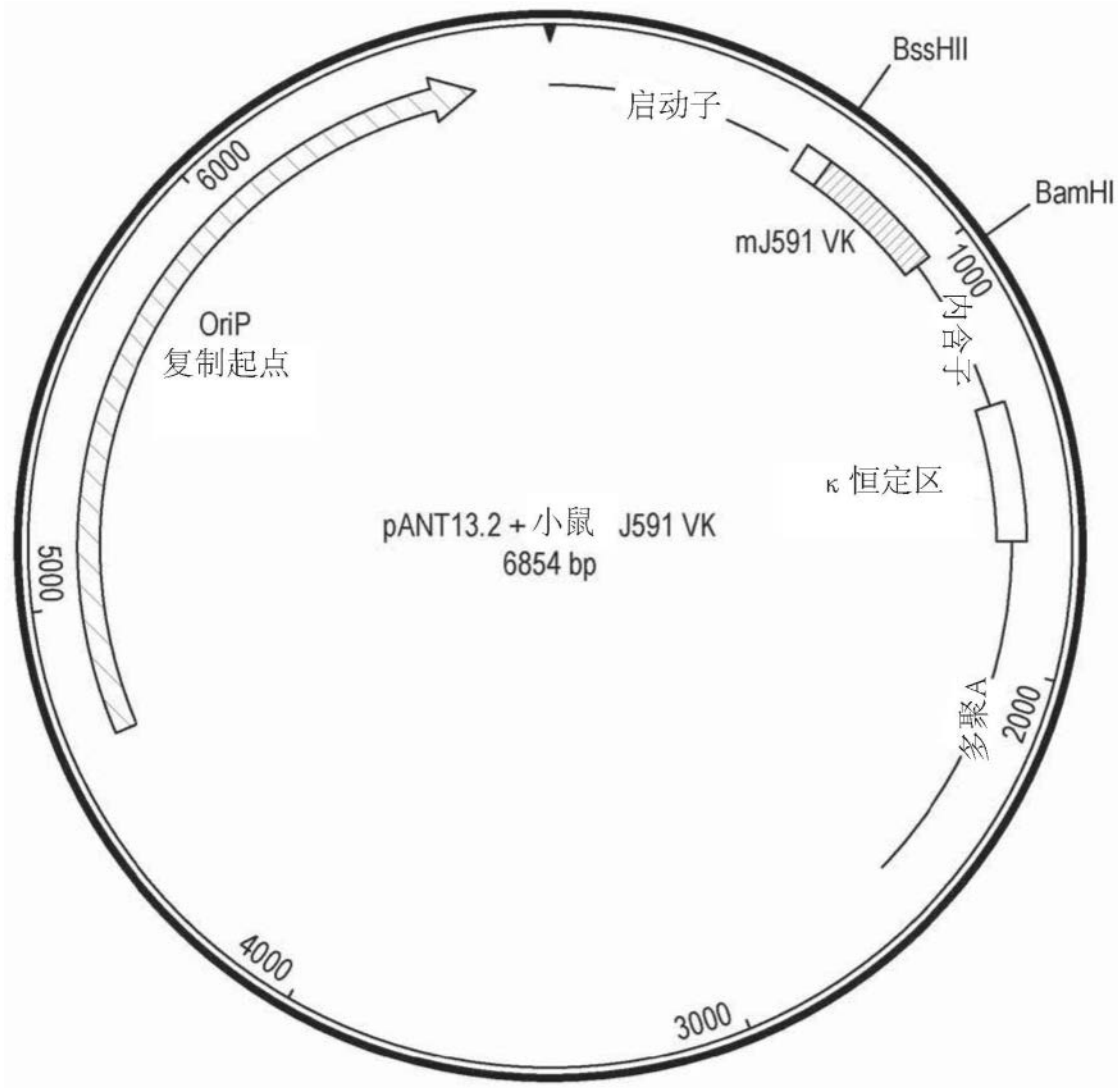


图1(a) 续

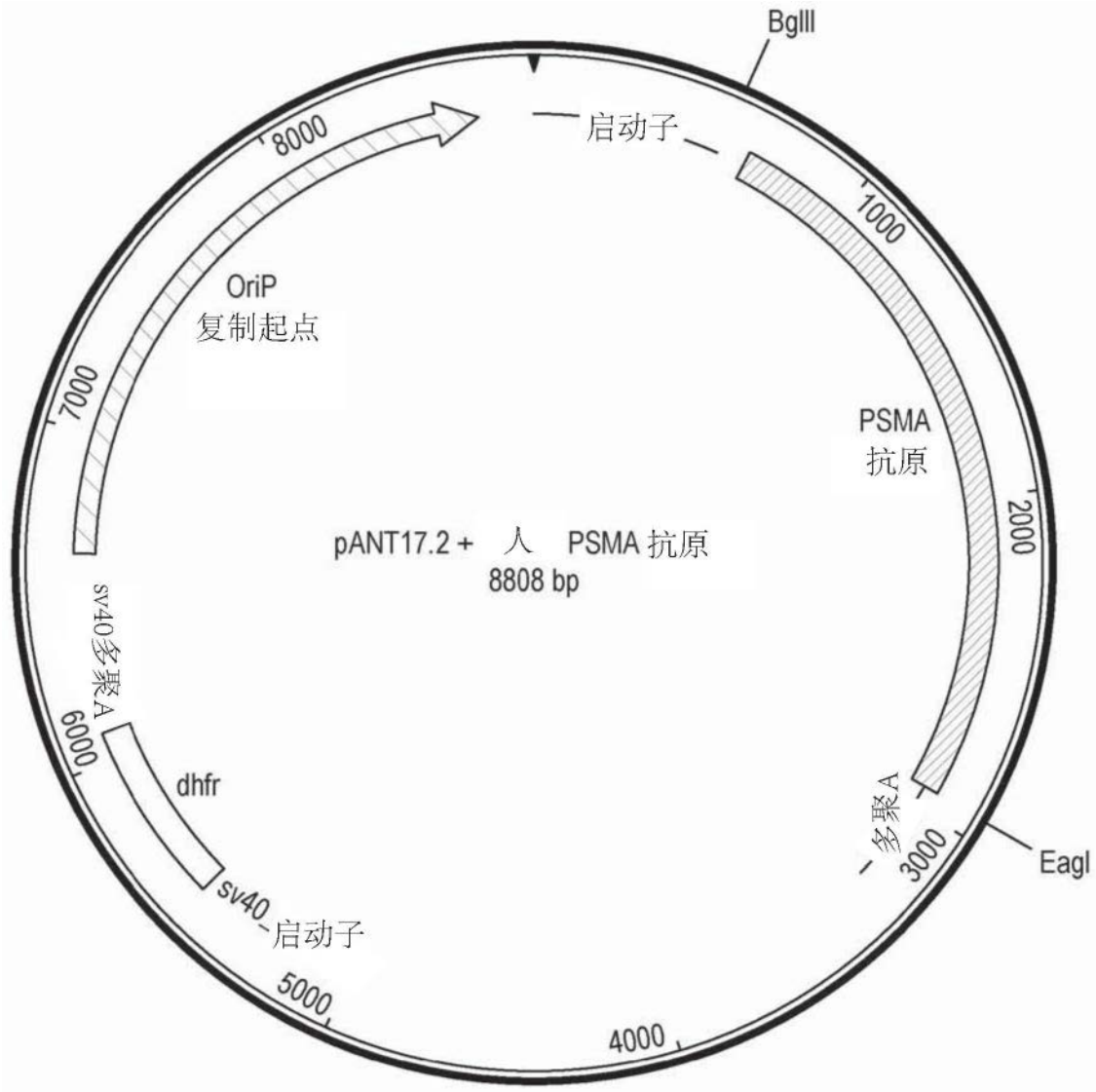


图1(b)

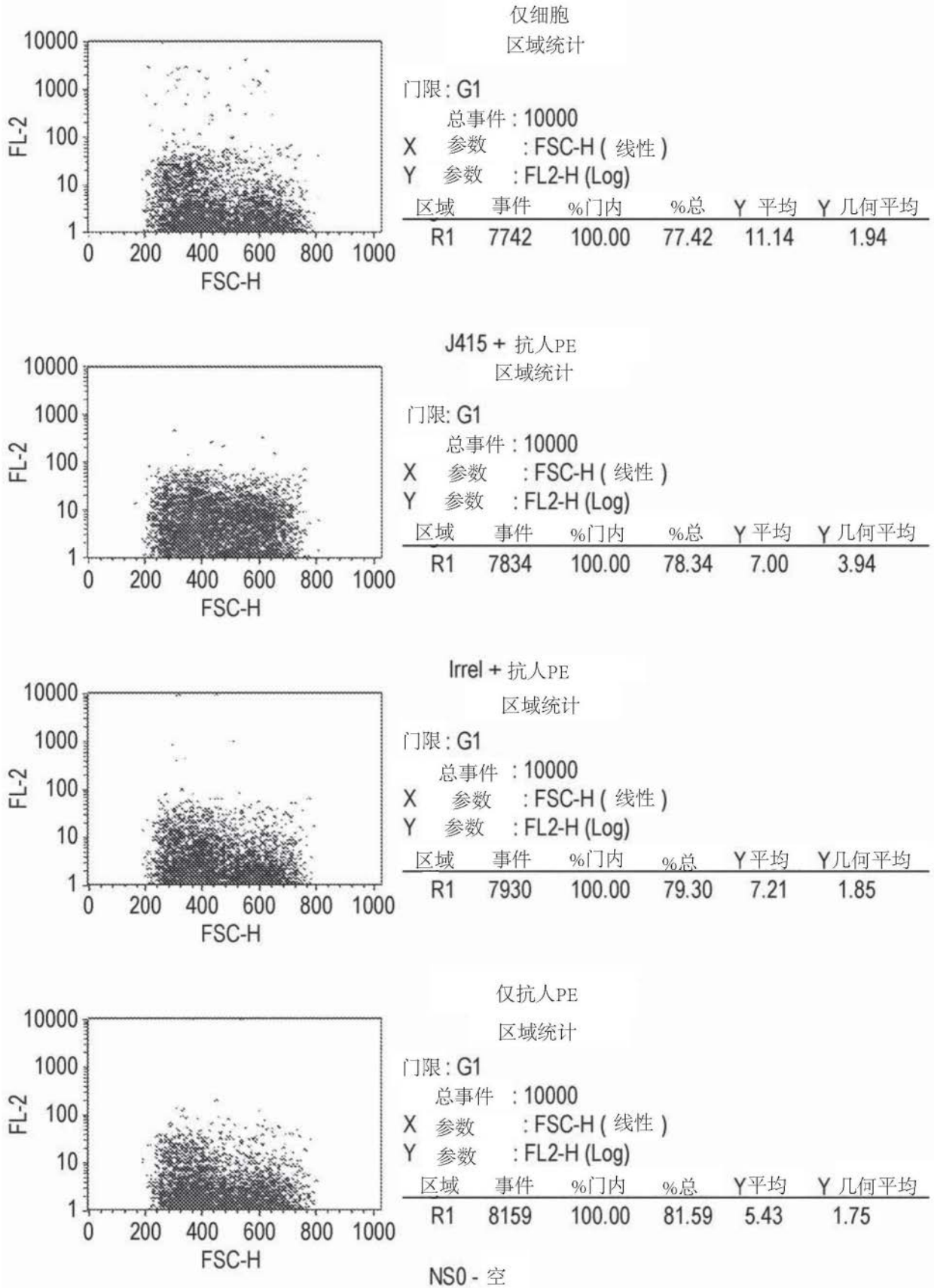


图2

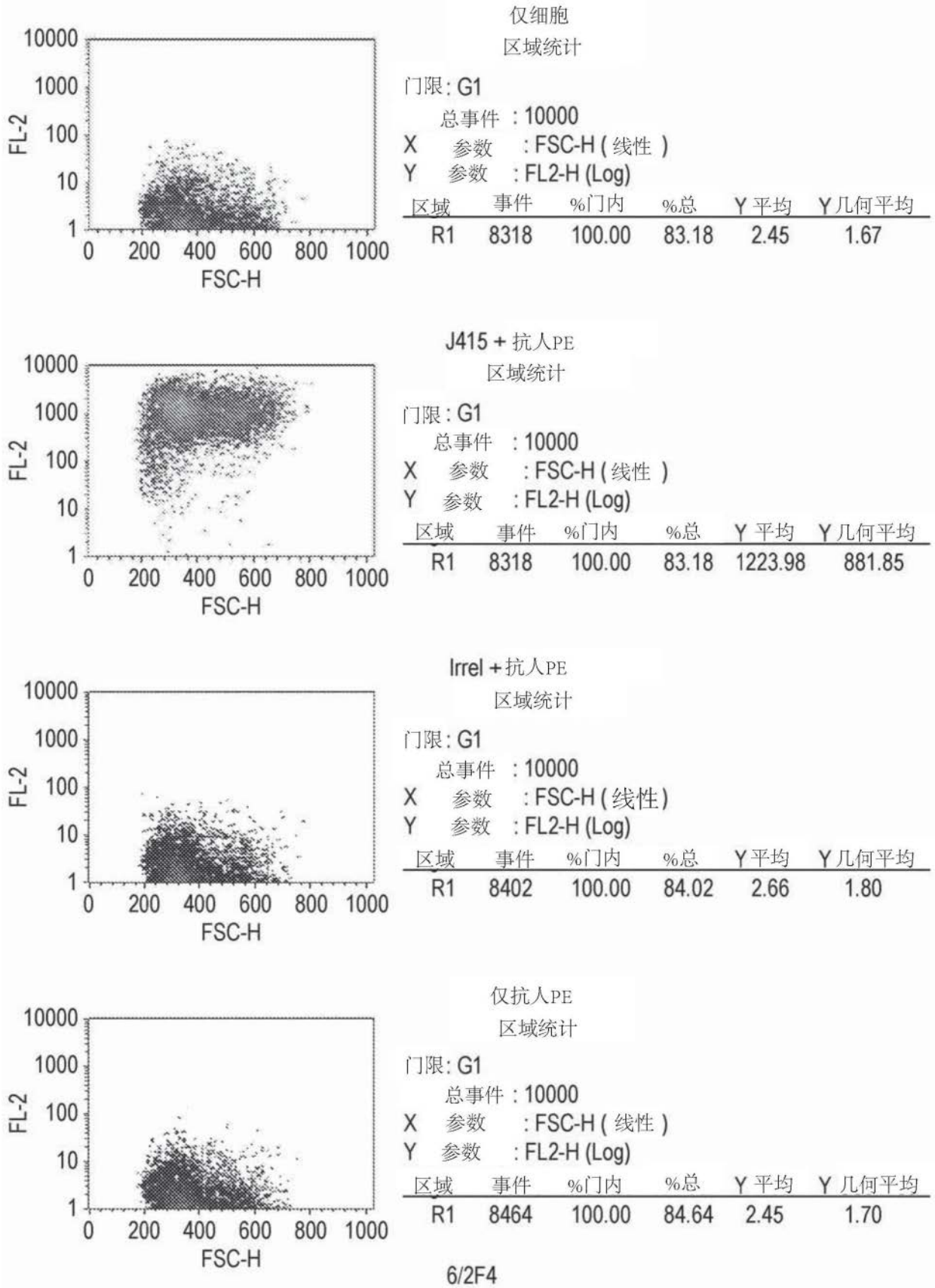


图2续

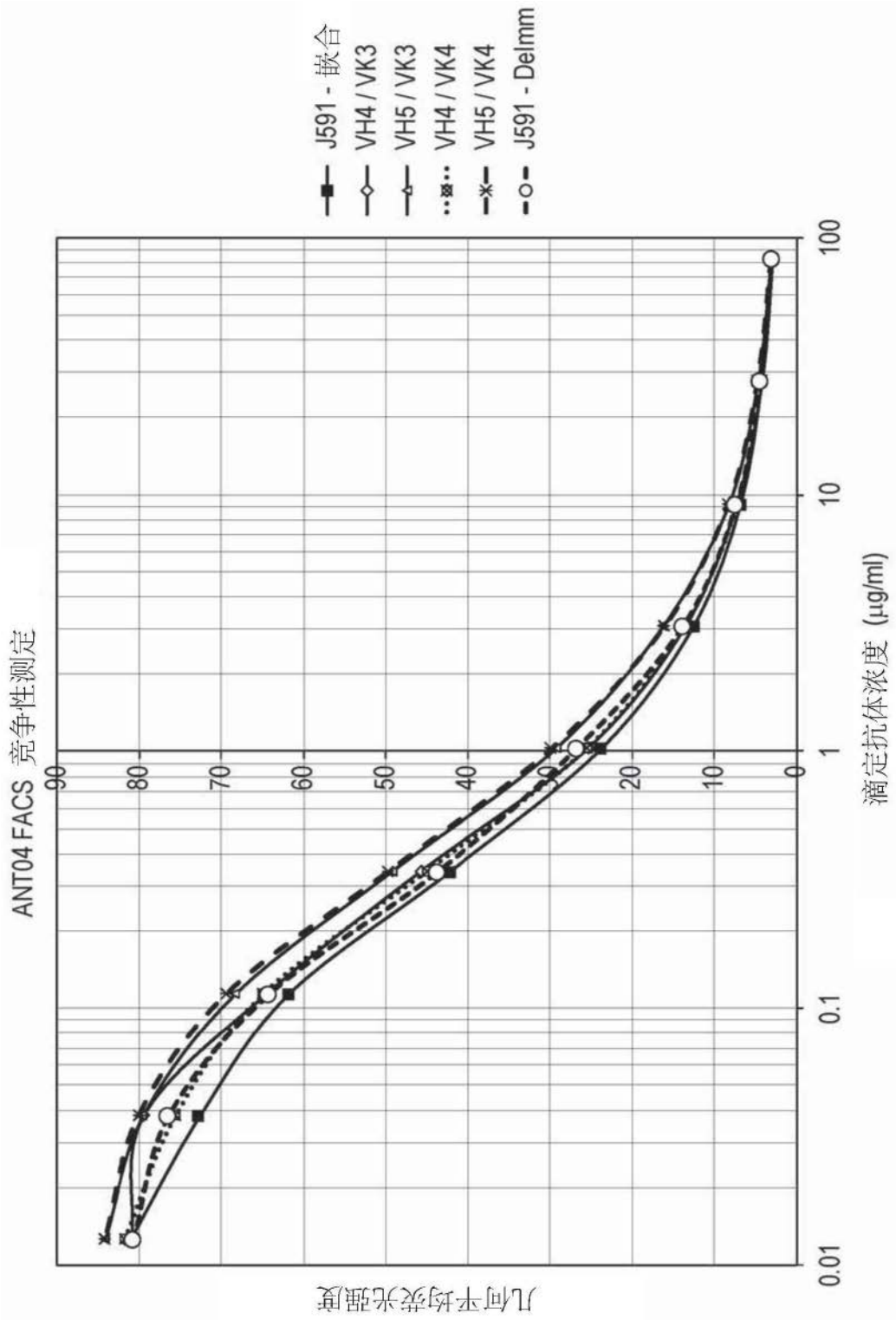


图3

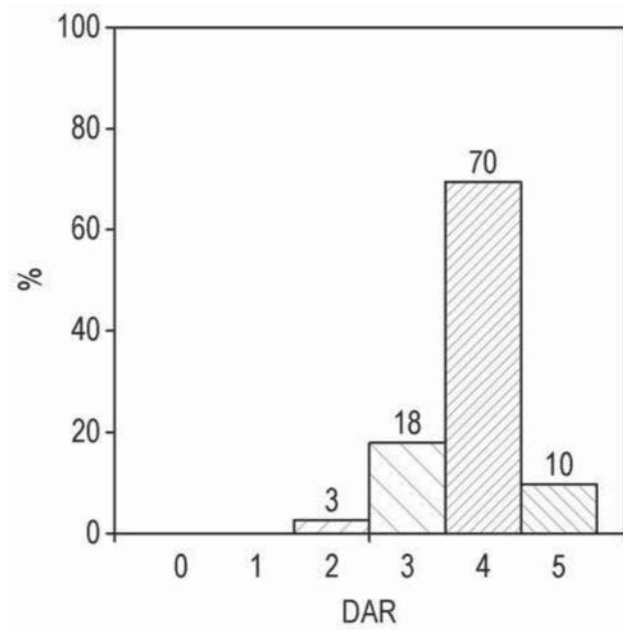


图4A

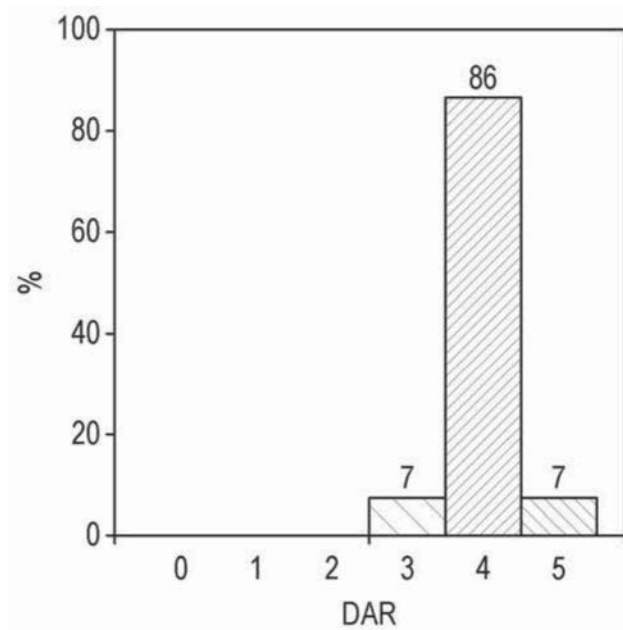


图4B

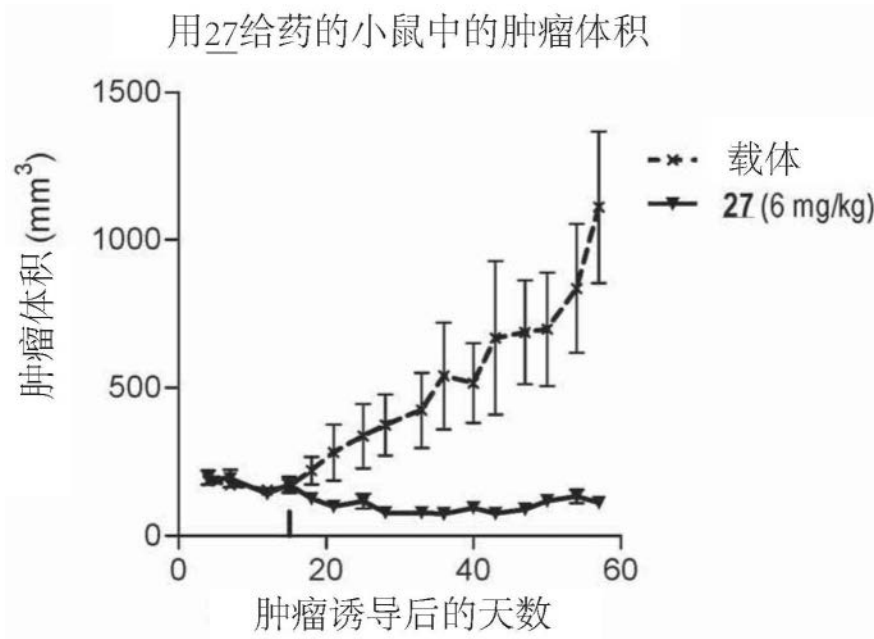


图7

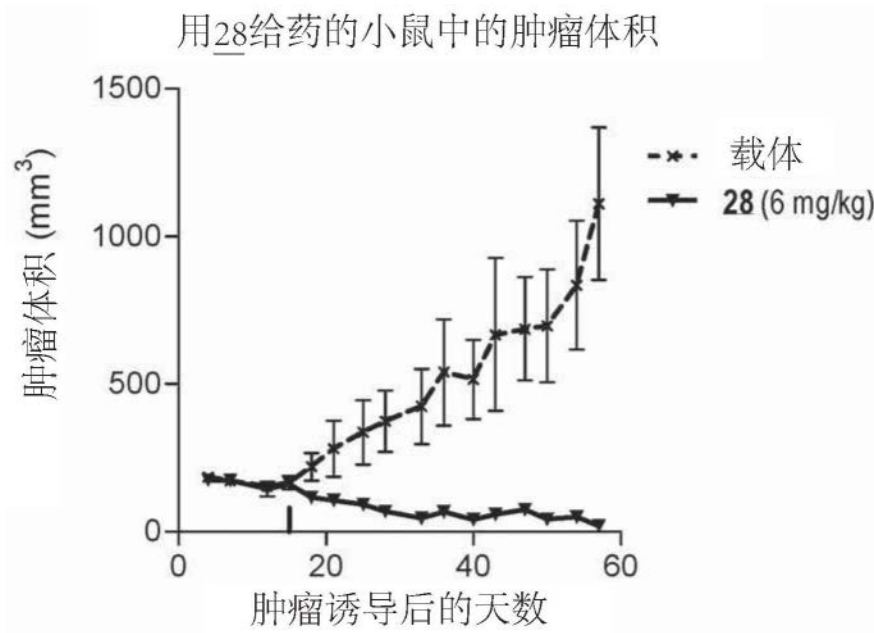


图8

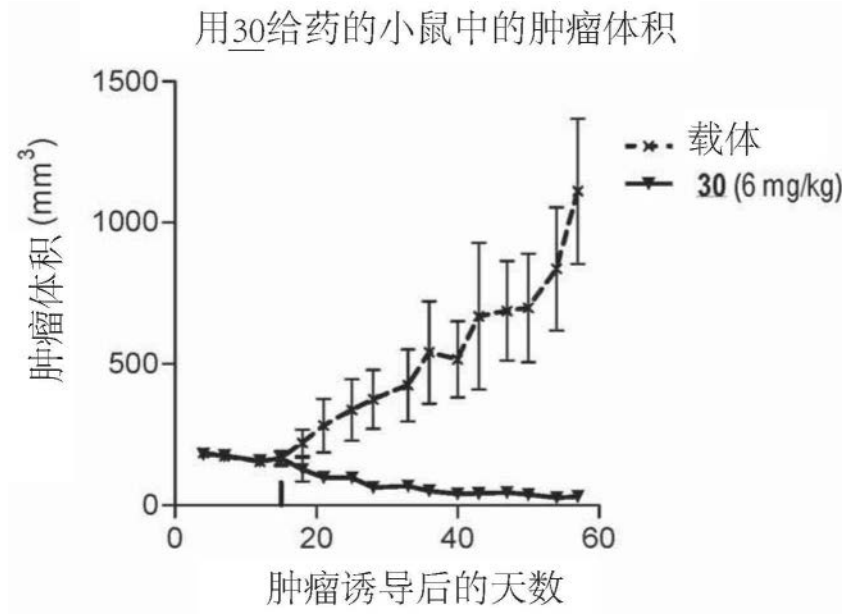


图9

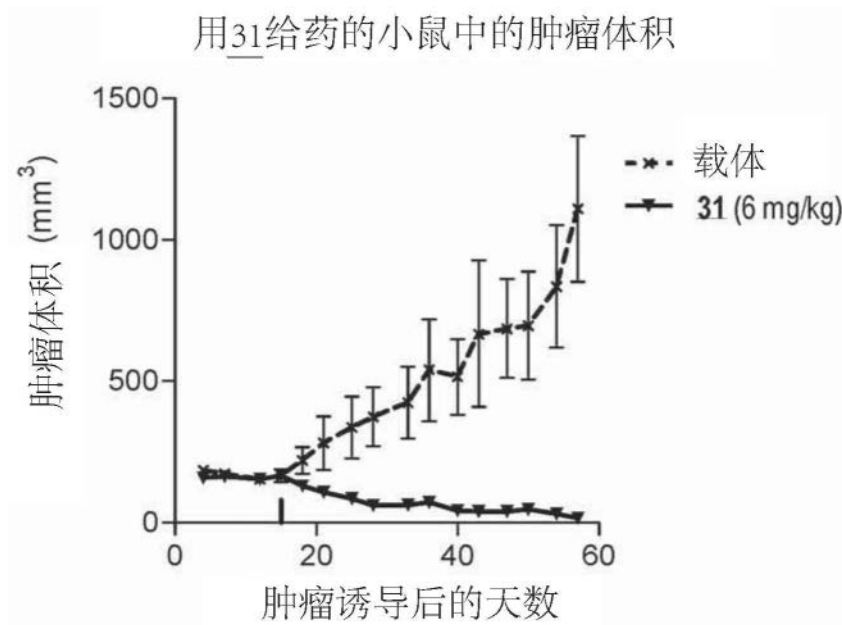


图10

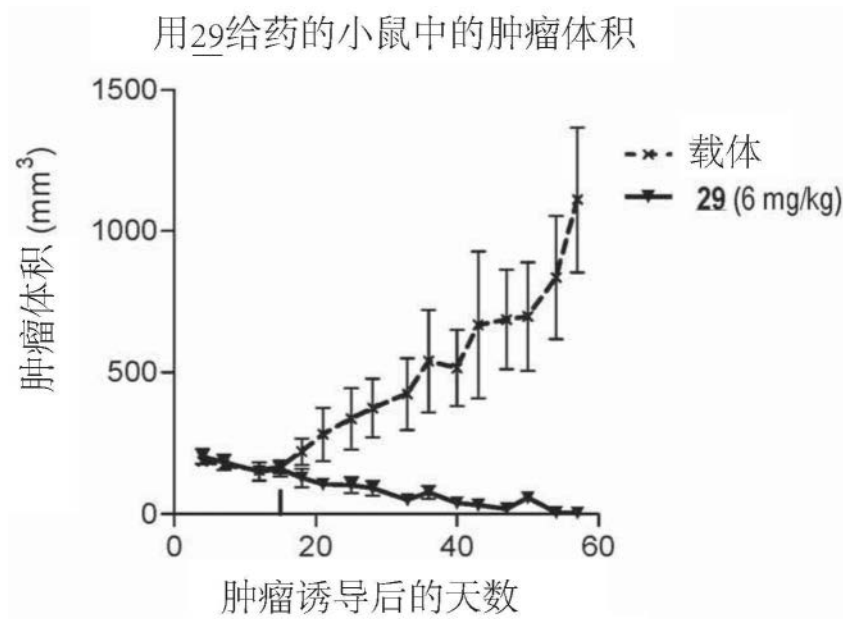


图11

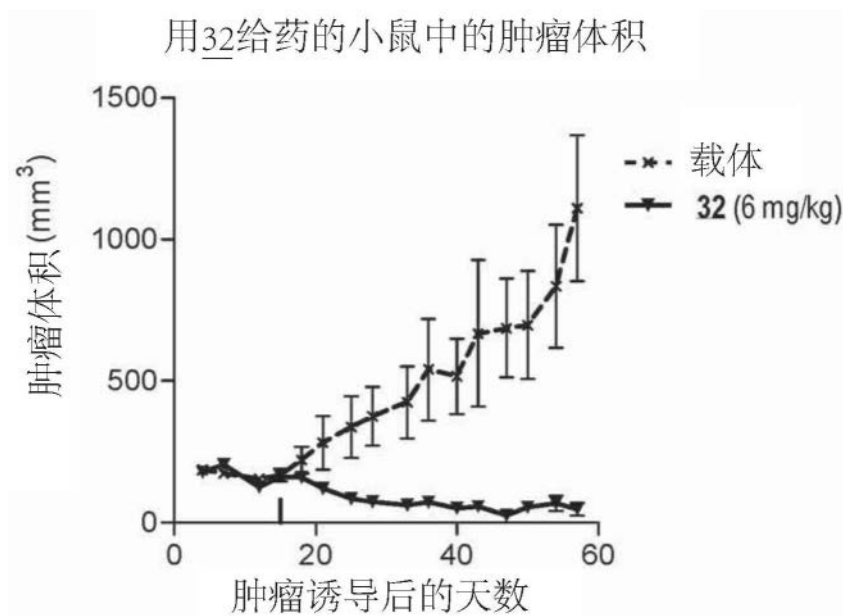


图12

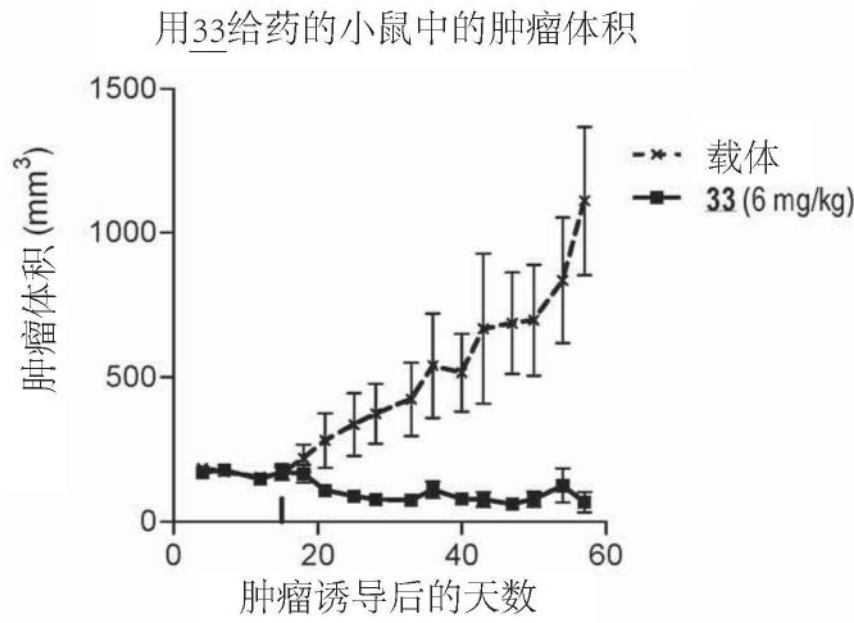


图13

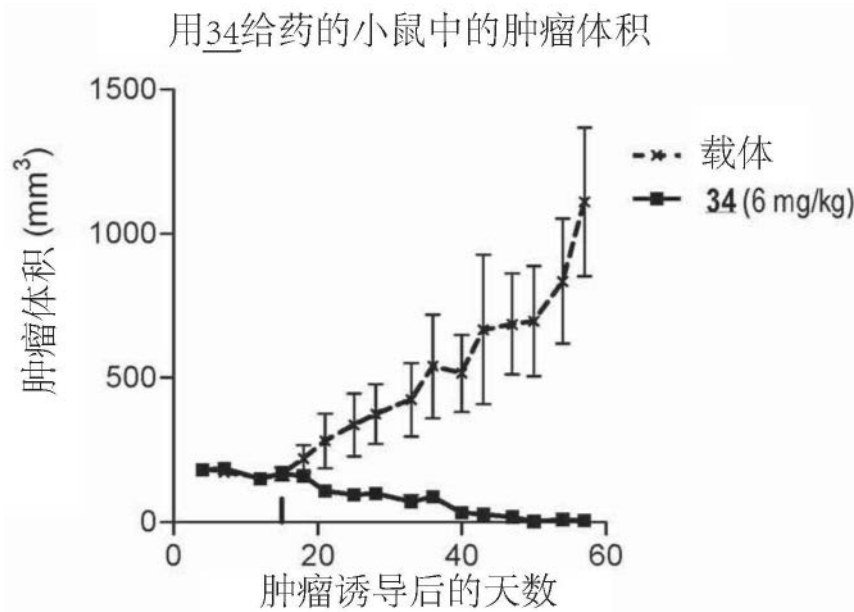


图14

J591 人源化的VH变体 1 DNA>Seq ID 1

```
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAGTGAATACACCATCCACTGGG
TGAAGCAGGCCCATGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGCCACATTGACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA
```

J591 人源化的VH变体 2 DNA>Seq ID 2

```
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAGTGAATACACCATCCACTGGG
TGAAGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGCCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA
```

图15

J591 人源化的VH变体 3 DNA>Seq ID 3

```
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGCCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA
```

J591 人源化的VH变体 4 DNA>Seq ID 4

```
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA
```

图15续

J591 人源化的 VH 变体 5 DNA>Seq ID 5

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTG
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTGAATACACCATCCACTGGG
TGAGGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACC
AGGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAG
ACAAGTCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC
CACGGTCACCGTCTCCTCA

J591 人源化的 VK 变体 1 DNA>Seq ID 6

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAGCTTCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGG
TCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCA
ACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCA
CACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC
ACCATCAGCAGACTGCAGTCTGAAGACTTTGCAGATTATTTCTGTCAGCAATATA
ACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCATGGTGGATATCAAA

J591 人源化的 VK 变体 2 DNA>Seq ID 7

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGTCTGAAGACTTTGCAGATTATTTCTGTCAGCAATAT
AACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA

J591 人源化的 VK 变体 3 DNA>Seq ID 8

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGATTATTACTGTCAGCAATAT
AACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA

图16

J591 人源化的 VK 变体 4 DNA>Seq ID 9

```
GACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCACCCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGG
GTCACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATAT
AACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA
```

J591 人源化的 VH 变体 1 氨基酸 >Seq ID 10

```
EVQLVQSGPELKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTIHWVKQAHGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS
```

J591 人源化的 VH 变体 2 氨基酸 >Seq ID 11

```
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS
```

J591 人源化的 VH 变体 3 氨基酸 >Seq ID 12

```
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS
```

图17

J591人源化的 VH 变体 4 氨基酸 >Seq ID 13

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNNG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

J591人源化的 VH 变体 5 氨基酸 >Seq ID 14

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIHWVRQAPGKGLEWIGNINPNQG
GTTYNQKFEDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCAAGWNFDYWGQGTTV
TVSS

J591人源化的 VK 变体 1 氨基酸 >Seq ID 15

DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISRLQSEDFADYFCQQYNSYPLTFGQGTMDIK

J591人源化的 VK 变体 2 氨基酸 >Seq ID 16

DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISRLQSEDFADYFCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK

图17续

J591人源化的 VK 变体 3 氨基酸 >Seq ID 17

DIVMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK

J591人源化的 VK 变体 4 氨基酸 >Seq ID 18

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHT
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISRLLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTFGQGTKVDIK

小鼠 J591 VH DNA>Seq ID 19

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGACTTCAGTG
AGGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCAGTGAATACACCATCCACTGGG
TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAACATTAATCCTAACA
ATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACATTGACTGTAG
ACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGATTC
TGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACC
ACGCTCACCGTCTCCTCA

小鼠 J591 VK DNA>Seq ID 20

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGG
GTCAGCATCATCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATC
AACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCGGC
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT
CACCATACCAATGTGCAGTCTGAAGACCTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAATAT
AACAGCTATCCTCTCACGTTTCGGCGCCGGGACCATGCTGGATCTCAA

图18

去免疫的 J591 VH DNA>Seq ID 21

```
GAGGTCCAACCTGGTACAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTG
AAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATATAACCATACTGGG
TGAAGCAGGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACATCAATCCTAACA
ATGGTGGTACCACCTACAATCAGAAGTTCGAGGACAAGGCCACACTAACTGTAG
ACAAGTCCACCGATACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTAAGATCTGAGGATA
CTGCAGTCTATTATTGTGCAGCTGGTTGGAACCTTGACTACTGGGGCCAAGGGAC
CCTGCTCACCGTCTCCTCA
```

去免疫的 J591VK DNA>Seq ID 22

```
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCCTCATCCCTGTCCACATCAGTAGGAGACAGGG
TCACCCTCACCTGTAAGGCCAGTCAAGATGTGGGTACTGCTGTAGACTGGTATCA
ACAGAAACCAGGACCATCTCCTAAACTACTGATTTATTGGGCATCCACTCGGCAC
ACTGGAATCCCTAGTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCA
CCATTTCTAGTCTTCAGCCTGAAGACTTTGCAGATTATTACTGTCAGCAATATAAC
AGCTATCCTCTCACGTTTCGGTCTGGGACCAAGGTGGACATCAAA
```

图18续

小鼠 J591 VH 氨基酸 >Seq ID 23

EVQLQQSGPELKKPGTSVRISCKTSGYTFTEYTIHWVKQSHGKSLEWIGNINPNNGGT
TYNQKFEDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLV
SS

小鼠 J591 VK 氨基酸 >Seq ID 24

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHT
GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTMLDLK

去免疫的 J591 VH 氨基酸 >Seq ID 25

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGG
TTYNQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDYAVYYCAAGWNFDYWGQGTTLLT
VSS

去免疫的 J591 VK 氨基酸 >Seq ID 26

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGPSPKLLIYWASTRHT
GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

去免疫的 J415 VH DNA>Seq ID 27

GAAGTGAAACTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGGTCCATG
AAAATCTCCTGTGTTGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAATTACTGGATGAACTGGGT
CCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATCGCAATCT
AATAATTTTGCAACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGGTCATCATCTCAA
GAGATGATTCCAAGAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACAGTTTGAGAGCTGAAG
ACACTGCCGTTTATTACTGTACCAGGCGATGGAATAATTTCTGGGGCCAAGGCAC
CACTGTCACAGTCTCCTCA

图19

去免疫的 J415 VK DNA>Seq ID 28

```
AACATTGTAATGACCCAATTTCCCAAATCCATGTCCGCCTCAGCAGGAGAGAGG
ATGACCTTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGGTACTTATGTGTCCTGGTATC
AACAGAAACCAACACAGTCTCCTAAGATGTTGATATACGGGGCATCCAACCGGT
TCACTGGGGTCCCAGATCGCTTCTCCGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTTATTCT
GACCATCAGCAGTGTGCAGGCAGAAGACCTTGTAGATTATTACTGTGGACAGAG
TTACACCTTTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATGAAG
```

去免疫的 J415 VH 氨基酸 >Seq ID 29

```
EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSQSN
NFATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTV
TVSS
```

去免疫的 J415 VK 氨基酸 >Seq ID 30

```
NIVMTQFPKSMSASAGERMTLTCKASENVGTYVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFT
GVPDRFSGSGSGTDFILTISSVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK
```

图19续

PSMA 抗原 DNA>Seq ID 31

ATGTGGAACCTGCTGCACGAGACAGACAGCGCCGTGGCCACCGCCAGACGGCCT
AGATGGCTGTGTGCCGGCGCTCTGGTGTGGCTGGCGGCTTCTTCTGCTGGGCT
TCCTGTTCGGCTGGTTCATCAAGAGCAGCAACGAGGCCACCAACATCACCCCCA
AGCACAACATGAAGGCCTTTCTGGACGAGCTGAAGGCCGAGAATATCAAGAAGT
TCCTGTACAACCTTACCCAGATCCCCACCTGGCCGGCACCGAGCAGAACTTCCA
GCTCGCCAAGCAGATCCAGAGCCAGTGGAAAGAGTTCGGCCTGGACAGCGTGGA
ACTGGCCCACTACGACGTGCTGCTGAGCTACCCCAACAAGACCCACCCCAACTA
CATCAGCATCATCAACGAGGACGGCAACGAGATTTTCAACACCAGCCTGTTCGA
GCCCCCTCCACCCGGCTACGAGAACGTGTCCGACATCGTGCCCCCATTAGCGCC
TTCAGTCCACAAGGCATGCCCCGAGGGCGACCTGGTGTACGTGAACTACGCCCGG
ACCGAGGACTTCTTCAAGCTGGAACGGGACATGAAGATCAACTGCTCCGGCAAG
ATCGTGATCGCCAGATACGGCAAGGTGTTCCGGGGCAACAAAGTGAAGAACGCC
CAGCTCGCTGGGGCCAAGGGCGTGATCCTGTACAGCGACCCCGCCGACTACTTC
GCCCCCTGGCGTGAAGTCCTACCCCGACGGCTGGAATCTGCCTGGCGGCGGAGTG
CAGCGGGGCAACATCCTGAACCTGAACGGCGCTGGCGACCCCTGACACCTGGC
TACCCCGCCAACGAGTACGCCTACAGACGGGGAATCGCCGAGGCCGTGGGCCTG
CCTAGCATCCCTGTGCACCCCATCGGCTACTACGACGCCCAGAACTGCTGGAAA
AGATGGGCGGCAGCGCCCCTCCCGACAGCTCTTGGAGAGGCAGCCTGAAGGTGC
CCTACAACGTGGGGCCCTGGCTTACCCGGCAACTTCAGCACCCAGAAAGTGAAGA
TGCACATCCACAGCACCAACGAAGTGACCCGGATCTACAACGTGATCGGCACCC
TGAGAGGGCGCCGTGGAACCCGACAGATACGTGATCCTGGGCGGCCACCGGGATA
GCTGGGTGTTTCGGCGGCATCGACCCTCAGTCTGGCGCCGCTGTGGTGCACGAGAT
CGTGCGGAGCTTTGGCACCCCTGAAGAAAGAGGGCTGGCGGCCCAGACGGACCAT
CCTGTTTCGCTCTTGGGACGCCGAGGAATTCGGCCTGCTGGGCAGCACCCGAGTGG
GCCGAGGAAAACAGCAGACTGCTCCAGGAACGGGGCGTCGCCTACATCAACGCC
GACAGCAGCATCGAGGGCAACTACACCCTGCGGGTGGACTGCACCCCCCTGATG
TACAGCCTGGTGCACAACCTGACCAAAGAGCTGAAGTCCCCCGACGAGGGCTTC
GAGGGCAAGAGCCTGTACGAGAGCTGGACCAAGAAGTCCCCAGCCCCGAGTTC
AGCGGCATGCCCAGAATCAGCAAGCTGGGCAGCGGCAACGACTTCGAGGTGTTTC
TTCCAGCGGCTGGGAATCGCCAGCGGCAGAGCCCGGTACACCAAGAACTGGGAG
ACAAACAAGTTCTCCGGCTACCCCTGTACCACAGCGTGTACGAGACATACGAG

图20

CTGGTGGAAAAGTTCTACGACCCCATGTTCAAGTACCACCTGACCGTGGCCCAAG
TGCGCGGAGGCATGGTGTTCGAGCTGGCCAACAGCATCGTGCTGCCCTTCGACTG
CCGGGACTACGCCGTGGTGTGCGGGAAGTACGCCGACAAAATCTACAGCATCAG
CATGAAGCACCCCCAGGAAATGAAGACCTACAGCGTGTCTTCGACAGCCTGTT
CAGCGCCGTGAAGAATTCACCGAGATCGCCAGCAAGTTCAGCGAGCGGCTCCA

PSMA 抗原 DNA>Seq ID 31 - 续

GGACTTCGACAAGAGCAACCCCATCGTGCTGAGAATGATGAACGACCAGCTCAT
GTTCTGGAACGGGCCTTCATCGACCCCTGGGCCTGCCCGACCGGCCCTTCTAC
AGACACGTGATCTATGCCCCAGCAGCCACAACAAATACGCCGGCGAGAGCTTC
CCCGGAATCTACGATGCCCTGTTCGACATCGAGAGCAAGGTGGACCCCAAG
GCCTGGGGCGAAGTGAAGCGGCAAATCTACGTGGCCGCCTTCACAGTGCAAGCC
GCTGCCGAGACACTGAGCGAAGTGGCCTAG

PSMA 抗原氨基酸 >Seq ID 32

MWNLLHETDSAVATARPRWLCAGALVLAGGFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKH
NMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHY
DVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPIPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGD
LVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYS
DPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAE
AVGLPSIPVHPIGYDAQKLLKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKV
KMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIV
RSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIE
GNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISK
LGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMF
KYHLTVAQVRGGMVFEANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYS
VSFDSLFSVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGLPDR
PFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQA
AAETLSEVA.

图20续

AB-P1 VH 氨基酸 >Seq ID 35

MELGLRWGFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFAFSR
YGMHWVRQAP GKGLEWVAVI WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTQYL
QMNSLRAEDT AVYYCARGGD FLYYYYYGMD VWGQGTTVTV SS

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 15所示的序列

AB-P1 VK 氨基酸 >Seq ID 36

MRVPAQLLGL LLLWLPDTRC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS
NYLAWYQQKT GKVPKFLIYE ASTLQSGVPS RFSGGGSGTD FTLTISSLQP
EDVATYYCQN YNSAPFTFGP GTKVDIK

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 17所示的序列

AB-P2 VH 氨基酸 >Seq ID 37

MELGLRWVLL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSN
YVMHWVRQAP GKGLEWVAII WYDGSNKYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AVYYCAGGYN WNYEYHYGMD DVWGQGTTVT VSS

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 19所示的序列

AB-P2 VK 氨基酸 >Seq ID 38

MRVPAQLLGL LLLCFPGARC DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIT
NYLAWFQQKP GKAPKSLIYA ASSLQSGVPS KFSGSGSGTD FSLTISSLQP
EDFATYYCQQ YNSYPITFGQ GTRLEIK

这是US 8,470,332 B中SEQ ID NO 21所示的序列

图21

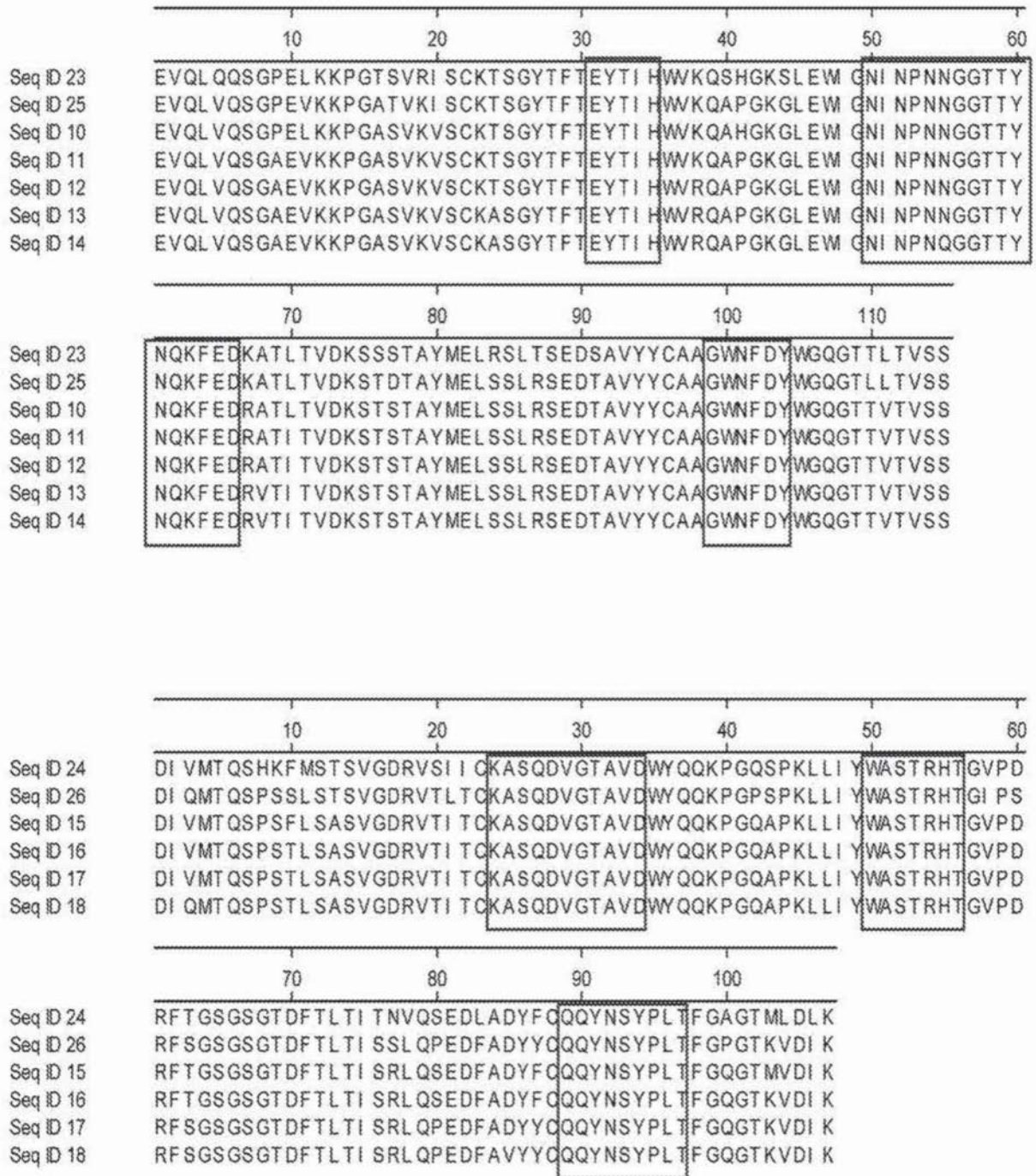


图22

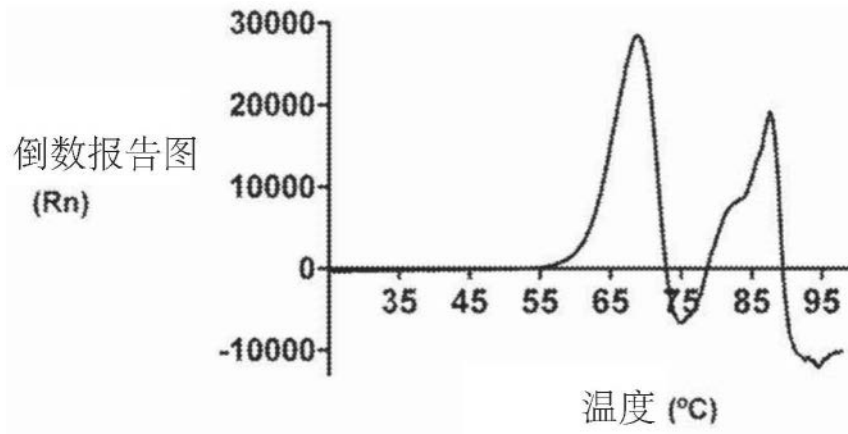


图23(a)

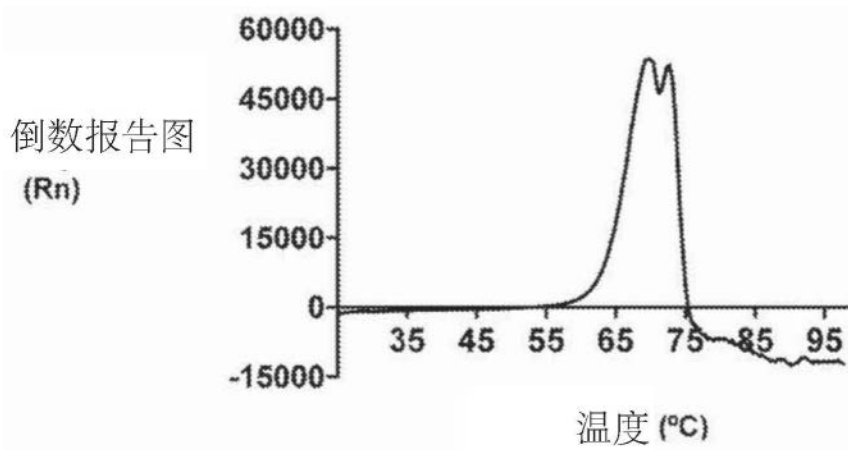


图23(b)

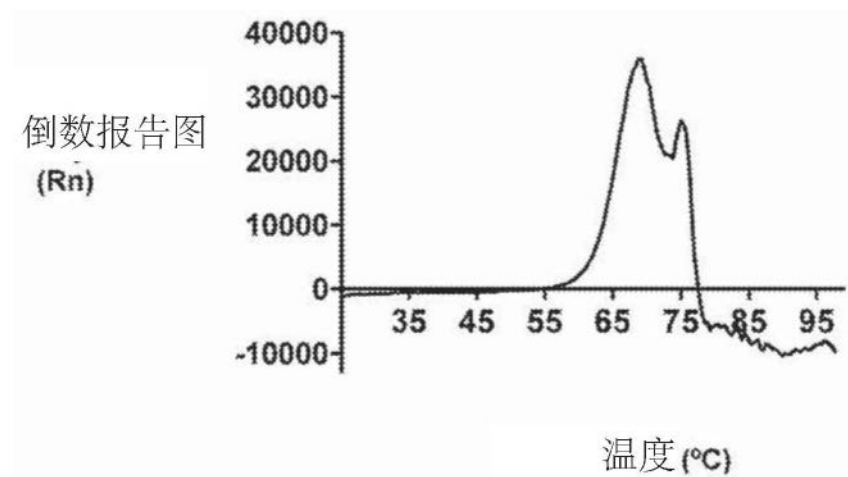


图23(c)