



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102665768 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201080042526. 6

(22) 申请日 2010. 09. 23

(30) 优先权数据

0916749. 5 2009. 09. 23 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2010/001796 2010. 09. 23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/036457 EN 2011. 03. 31

(73) 专利权人 莫洛迪克有限公司

地址 英国贝德福德郡

(72) 发明人 保罗·詹姆斯·戴维斯

詹姆斯·亚历山大·舒腾

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

(51) Int. Cl.

A61K 47/48 (2006. 01)

C07K 5/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 6172045 B1, 2001. 01. 09, 说明书摘要及  
权利要求 1-8.

US 2006140858 A1, 2006. 06. 29, 说明书摘要  
及说明书实施例 16.

WO 9720580 A1, 1997. 06. 12, 全文.

WO 9824478 A2, 1998. 06. 11, 说明书摘要及  
权利要求 1-7.

审查员 王斯婷

权利要求书2页 说明书20页

序列表1页 附图20页

(54) 发明名称

肽清除剂

(57) 摘要

本发明提供了一种肽清除剂,用于从对象中的非靶位置处清除酶与在靶位置处特异性结合的结合分子的偶联物。所述肽清除剂结合酶的活性位点。所述肽也与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合,以促进经肝脏的清除。所述肽可以被糖基化,通过与表达脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞结合来促进经肝脏的清除。典型地,所述肽在与酶结合后阻止或抑制酶活性,并且基本上不被酶活性所修饰。所述肽可以基于氨基萘甲酸(ANA)-谷氨酸(Glu)二肽,并且可以包含氨基酸序列丝氨酸(Ser)-丙氨酸(Ala)-氨基萘甲酸(ANA)-谷氨酸(Glu)。在这样的情况下,目标酶典型为CPG2。

1. 一种肽清除剂,其用于从对象的非靶位置处清除以下 a 和 b 的偶联物:
  - a. 酶,与
  - b. 在靶位置处特异性结合的结合分子,其中所述肽清除剂包含第一个结构域和第二个结构域,所述第一个结构域结合到酶的活性位点,所述第二个结构域结合肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体以促进由第一个结构域结合的偶联物经肝脏的清除,其中肽的长度不超过 30 个氨基酸,并且包含氨基萘甲酸 (ANA)-谷氨酸 (Glu) 二肽。
2. 权利要求 1 的肽清除剂,其中所述肽被糖基化,以通过与表达脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞结合来促进经肝脏的清除。
3. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述肽在与酶结合后阻止或抑制酶活性。
4. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述肽不被酶活性修饰。
5. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其包含氨基酸序列:丝氨酸 (Ser)-丙氨酸 (Ala)-氨基萘甲酸 (ANA)-谷氨酸 (Glu) (SEQ ID NO:1)。
6. 权利要求 5 的肽清除剂,其中丝氨酸残基被糖基化。
7. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中酶通过结合分子在靶位置处的特异性结合而集中在靶位置处。
8. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中结合分子是抗体或其抗原结合衍生物,其中所述抗原结合衍生物保留有与目标靶特异性结合的能力。
9. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中酶起到在靶位置处将前体药物转变成活性药物的作用。
10. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中肽对酶的亲和性足以允许从非靶位置处清除酶。
11. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述肽具有足够快的解离速率或足够高的解离常数,以不显著影响靶位置处的酶活性。
12. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述肽对酶的亲和性是结合分子对其靶位置的结合亲和性的十分之一。
13. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中靶位置是肿瘤细胞表达的抗原。
14. 权利要求 2 的肽清除剂,其中糖基化涉及结合一个或多个半乳糖基团。
15. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述肽的长度不超过 10 个氨基酸。
16. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述肽具有极低的免疫原性。
17. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述肽是化学合成的。
18. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述酶是非人类来源的。
19. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其中所述酶是羧肽酶 G2 (CPG2)。
20. 一种用于生产前述权利要求任一项中所述的肽清除剂的方法,所述方法包含:
  - a. 制备一组肽,任选以作为酶底物的结构类似物的起始肽为基础
  - b. 筛选该组肽对酶与在靶位置处特异性结合的结合分子的偶联物的结合亲和性,并选择具有结合亲和性的肽
  - c. 任选修饰在步骤 b 中具有结合亲和性的肽的氨基酸序列,并使用修饰肽重复步骤 b 以测试结合亲和性的提高
  - d. 任选对在步骤 c 中发现的具有提高的结合亲和性的修饰肽的每个残基处进行取代,并重复步骤 b 以确定是否任何取代的肽具有进一步提高的结合亲和性

- e. 任选确定从步骤 c 或 d 得到的肽是否具有阻止或抑制酶活性的能力
  - f. 任选通过使用来自于对象的一系列对照蛋白进行测试,以证实对酶的结合特异性
  - g. 测试肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合以促进经肝脏的清除的能力,其中步骤 e 和 f 如果进行的话,可以用任意次序执行。
21. 权利要求 20 的方法,其中步骤 g 可以在方法中的任何点处进行,包括在步骤 a 中提供能够与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合以促进经肝脏的清除的一组肽。
22. 权利要求 20 或 21 的方法,其中步骤 g 包含对肽进行糖基化。
23. 权利要求 20 或 21 的方法,其中步骤 a 包含提供一组糖基化肽。
24. 权利要求 20 或 21 的方法,其中步骤 a 使用肽文库来进行。
25. 权利要求 20 或 21 的方法,其中酶是 CPG2。
26. 权利要求 20 或 21 的方法,其中起始肽是三肽色氨酸 - 苯丙氨酸 - 谷氨酸。
27. 权利要求 20 或 21 的方法,其还包含将通过所述方法产生的肽的氨基酸序列与人类氨基酸序列数据库进行比较,以确认所述肽不可能具有不希望的生物活性。
28. 权利要求 1 或 2 的肽清除剂,其在抗体导向的酶前体药物治疗 (ADEPT) 中用作清除剂。
29. 权利要求 1-19 任一项的肽清除剂在制造用于抗体导向的酶前体药物治疗 (ADEPT) 中的清除剂中的应用。

## 肽清除剂

### 发明领域

[0001] 本发明涉及作用于从对象中的非靶位置清除酶的肽清除剂。本发明还涉及生产这些肽清除剂的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 抗体导向的酶前体药物治疗 (ADEPT) 旨在提高细胞毒性药物的选择性。利用的酶起到将前体药物转化成活性药物的作用。通过使用与肿瘤相关抗原结合的抗体, 将药物的作用局限于目标位点处。该抗体与作用于前体药物的酶接合或形成融合蛋白, 从而确保前体药物的转化主要发生在目标位点处。

[0004] 然而, 由于残留的酶 - 抗体偶联物以及偶联物从肿瘤的泄漏 (其可能是由于抗原而从肿瘤细胞上失落而进入循环), ADEPT 系统的治疗效能和特异性受到前体药物在正常组织中转化的限制。为了试图解决这个问题, 发展了酶清除阶段以除去残留酶活性, 从而最小化疗法的副作用。这依赖于与酶结合的另一种抗体。该抗体被糖基化以促进经肝脏的清除 (1)。

[0005] US 2003-0068322 (Hansen) 描述了一种基于抗体的清除剂, 用于进行循环中的靶向蛋白 - 酶偶联物的清除。在一个实施方案中, 清除剂与酶结合。然而, 清除剂在不干扰酶活性的位点处结合。WO 96/40245 和 US 5, 958, 408 提供了类似的公开内容。

[0006] Napier 等, *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 765-772, March 2000, 描述了一项临床试验, 其中 10 位患有结肠直肠癌并表达癌胚抗原的患者接受了抗体导向的酶前体药物治疗, 其中使用了与羧肽酶 G2 (CPG2) 接合的针对癌胚抗原的 A5B7F(ab')<sub>2</sub> 抗体。在该试验中, 给予针对 CPG2 的活性位点的半乳糖基化抗体 (SB43-gal) 来清除和失活循环中的酶。Napier 陈述在两周后, 在所有患者中发现了人类抗小鼠抗体应答 (HAMA), 从而阻止了进一步治疗 (参见第 768 页第二栏免疫应答标题下)。Napier 建议, 为了便于这种清除剂在 ADEPT 治疗的情形中的使用, 可以利用免疫抑制剂。

[0007] WO 91/17761 描述了一种与 ADEPT 技术不同的技术。在该技术中, 将拮抗剂靶向正常细胞, 从而能够治疗性使用细胞毒素以仅仅治疗患病细胞。因此, 该方法旨在保护正常细胞。

[0008] EP0308208 涉及抗体和抗体偶联物, 其通过接合到与人类肝脏脱唾液酸糖蛋白受体结合的糖苷残基上而进行修饰, 从而能够从循环中快速清除。

[0009] EP0733072 和 US 5, 876, 691 描述了特异性针对癌胚抗原 (CEA) 的抗体。

### 发明内容

[0010] 使用糖基化第二或其他抗体作为清除剂伴有几个问题, 其中最重要的如下所述:

[0011] 1) 第二 (清除) 抗体不可避免地具有免疫原性, 因此其使用限于几个重复使用循环。

[0012] 2) 它对酶具有难以调节的高亲和性。高亲和性意味着它可能也与定位于靶位置处的酶过强结合, 从而限制了有效的局部药物产生性。

- [0013] 3) 它的高分子量意味着为了结合并清除融合蛋白,不得不接种大质量的糖蛋白。
- [0014] 4) 第二抗体组分的成本、生产和管控问题相对困难。
- [0015] 为此,需要新型清除剂。因此,本发明提供了肽清除剂,其通过肽与偶联物的结合,从对象中的非靶位置处清除酶与在靶位置处特异性结合的结合分子的偶联物,其中所述肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合。这导致存在于非靶位置处的偶联物的内化。因此,肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体的结合促进了肽的清除。在特定实施方案中,肽被糖基化,以通过与表达脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞结合来促进经肝脏的清除。更具体来说,本发明提供了肽清除剂,其通过肽与酶的活性位点的结合,从对象中的非靶位置处清除酶与在靶位置处特异性结合的结合分子的偶联物,其中所述肽(也是清除剂)与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合。这导致存在于非靶位置处的偶联物的内化。因此,肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体的结合促进了肽的清除。在特定实施方案中,肽被糖基化,以通过与表达脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞结合来促进经肝脏的清除。
- [0016] 对象典型为人类或动物,并且优选为人类。因此,清除一般是经肝脏从循环中清除。本发明的肽清除剂与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合,导致存在于非靶位置处的偶联物的内化。
- [0017] 出于下列原因,本发明的清除剂解决了与抗体基清除剂相关的问题:
- [0018] 1) 它分子量低,因此它没有免疫原性
- [0019] 2) 它对酶结合位点的亲和性可以通过用替代氨基酸进行位置取代来转变,直到达到所需的结合亲和性。
- [0020] 3) 它的低分子量也意味着与融合蛋白相比,使用低得多的质量即可达到给定的清除效能。
- [0021] 4) 它可以作为合成化学物质通过已知的化学程序来生产,因此肽清除剂具有较少的成本、生产效能和管控障碍的问题。
- [0022] 正如上面提到的,ADEPT 系统依赖于通过在对象中的靶位置处、例如肿瘤相关抗原处结合的抗体或其他结合分子,对酶活性进行定位。ADEPT 系统由几种分子模块构成,其共同合作以向患病细胞(例如癌细胞)或引起疾病的细胞(例如寄生细胞)递送大剂量但高度局部化的药物,例如细胞毒性药剂。
- [0023] 本发明的肽清除剂与酶和结合分子的偶联物结合,更具体来说与酶、特别是酶的活性位点结合。结合分子可以是能够与靶位置结合从而将酶定位于该特定位置处的任何分子。在某些实施方案中,酶通过结合分子在靶位置处的特异性结合而集中在靶位置处。因此,结合分子可以与对象中由细胞表达、特别是稳定表达在细胞表面上的受体或抗原或其他分子相结合。优选地,尽管不是排他性的,结合分子包含抗体或其抗原结合衍生物、基本上由它们构成或由它们构成。可以利用任何适合的抗体,尽管最典型使用 IgG 免疫球蛋白。当然,重链抗体和非人类抗体的人源化形式包含在术语“抗体”的范围之内。抗体可以是多克隆的,尽管一般优选单克隆抗体。抗原结合衍生物覆盖了保留有与目标靶特异性结合的能力的所有抗体片段及其它衍生物。经常使用单价片段。实例包括 Fab 片段、scFv、单结构域抗体、纳米抗体、微抗体(minibody)、双抗体(diabody)、三抗体(triabody)等。
- [0024] 结合分子在靶位置处特异性结合,以避免与非靶位置、例如不表达特定抗原的细胞的不想要的结合。它还应该具有高亲和性,足以实现在靶位置处的快速摄取。然而,结合

亲和性应该使结合分子能够完全进入靶位置,例如与肿瘤相关抗原结合,但结合分子决不能结合过紧,以至于它只能结合到任何肿瘤体的外周。在实践中,任何选择性结合能力都足以提供所关注的治疗作用,并且所需的最低效能将随着不同应用而变。结合分子的结合亲和性优选伴有低解离常数(即慢的脱离速度),以最小化所述分子从其已结合的靶位置上的泄漏。因此,结合亲和性和动力学尽可能平衡,以确保在靶位置处定向和有效的作用。

[0025] 酶与结合分子接合的方式使得利用酶与结合分子的结合将酶递送至靶位置。典型地,酶与结合分子共价连接,使得结合剂分子结合的任何地方也结合有至少一个酶分子。因此,上面考虑的结合特性事实上适用于采取结合分子-酶化学偶联物或结合分子-酶融合蛋白形式的杂合分子,所述融合蛋白源自于将这两种分子表达为连续氨基酸序列并折叠成适合的功能结构域的单基因。酶起到在靶位置处将前体药物转化成活性药物的作用。酶优选为在对象中天然不存在的酶,以防止在对象中不期望的活性和副作用。酶的作用是修饰前体药物分子,所述前体药物分子是无毒性的,直到被酶作用后释放出活性药物、一般为寿命短的活性药物。因此,基于结合分子的酶活性定位确保了前体药物只在非常接近靶位置处才被切开。在某些实施方案中,前体药物是在被酶切开时形成高毒性但是短寿命分子的物质,该性质确保它是强有力的,但是只能杀死存在于前体药物被切开处附近的细胞。在特定实施方案中,使用烷基化剂例如苯甲酸氮芥衍生物。优选地,药物的作用是浓度依赖性的。烷基化剂上的末端谷氨酸使其无活性,因此使它们成为与起到切开该谷氨酸残基作用的 CPG2 一起使用的理想配偶体。在靶位置处产生的高浓度药物可能漏回到血液中并引起毒性,因此短半衰期是活性药物的重要属性。

[0026] 可以使用允许在靶位置处将无活性前体药物转化成活性药物的任何适合的酶。已经在 ADEPT 系统的环境中使用的适合的酶包括羧肽酶 G2、碱性磷酸酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶(beta-glucuronidase)、青霉素-V-酰胺酶、 $\beta$ -内酰胺酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶和硝基还原酶。可用于产生本发明的肽清除剂的潜在有用的酶/前体药物组合,列于表 1 中。

[0027] 表 1- 在本发明中可用于设计适合的肽清除剂的酶 (4)

[0028]

酶	前体药物	药物
羧肽酶 G2	苯甲酸氮芥谷氨酸	苯甲酸氮芥
胞嘧啶脱氨酶	5-氟胞嘧啶	5-氟尿嘧啶
羧肽酶 A	氮甲蝶呤-丙氨酸	氮甲蝶呤
$\alpha$ -半乳糖苷酶	N-[4-( $\alpha$ -D-吡喃半乳糖基)-苯甲氧基羰基]-柔红霉素	柔红霉素
B-葡糖苷酶	扁桃苷	氰化物
B-内酰胺酶	Vinca-头孢菌素 苯二胺氮芥-头孢菌素 氮芥-头孢菌素	4-去乙酰长春碱-3-羧基肼 苯二胺氮芥 氮芥
碱性磷酸酶	磷酸苯酚氮芥 磷酸阿霉素 磷酸丝裂霉素 磷酸依托泊苷	苯酚氮芥 阿霉素 丝裂霉素醇 依托泊苷
青霉素酰胺酶	沙海葵毒素-4-羟基苯基-乙酰胺 阿霉素-苯氧基乙酰胺 美法仑-苯氧基乙酰胺	水螅毒素 阿霉素 美法仑
硝基还原酶	CB1954	5-(氮丙啶-1-基)-4-羟基氨基-2-硝基苯甲酰胺

[0029] 在本发明的情形中,特别优选的酶是羧肽酶 G2(CPG2)。CPG2 是一种细菌肽酶(来自于假单胞菌(Pseudomonas))。它是叶酸水解酶,其从叶酸及其类似物例如氮甲蝶呤水解 C-端谷氨酸部分。同源的 CPG2 具有 83,000 的分子质量(凝胶过滤),但是在 SDS PAGE 后获得 41,400 的分子质量,显示出酶是二聚体。它在每个有功能的完整二聚体中具有两个活性位点,其结构和功能依赖于锌。

[0030] 结合分子与酶的偶联物一般通过遗传手段、或使用许多已知化学交联方法中的一种通过化学接合来生产。遗传手段一般包括将相应基因剪接在一起,使得酶和结合分子蛋白二者表达为具有两种功能的单一合并蛋白(“融合蛋白”)。对于融合蛋白来说,重要的是不糖基化,因为糖基化的融合蛋白一旦产生后就开始经肝脏清除其自身,因此与使用非糖基化形式相比递送至肿瘤的酶较少。

[0031] 在本发明的特定实施方案中,肽清除剂在与酶结合后阻止或抑制酶活性。因此,优

选地,肽不被酶活性修饰。“不被修饰”是指肽保持对酶的结合亲和性以允许清除;只要不失去亲和性,可以发生修饰。如果肽对酶活性有抗性,肽与活性位点结合是更有效的清除方式。本发明的肽可以对酶活性有抗性的一种方式是在掺入一个或多个 D- 型氨基酸。例如,在被设计与 CPG2 的活性位点结合的肽清除剂中包含 D- 氨基酸谷氨酸,可以起到防止该氨基酸处的肽键水解的作用。

[0032] 结合分子-酶偶联物结合于靶位置处。这典型为目标细胞类型,例如肿瘤细胞。在靶位置处的特异性结合可以是由于结合到目标细胞类型特有的抗原。在特定实施方案中,靶位置是肿瘤细胞表达的抗原。因此,例如在肿瘤学应用的情况下,抗原表达理想地应该是癌细胞特异性的,以避免攻击宿主非癌细胞的风险。抗原优选为肿瘤特异性的,尽管它可以是肿瘤相关的。此外,抗原应该稳定地表达在目标细胞的表面(膜)上。然而,在本发明的情形中,在释放或脱落之前瞬时表达也是可能的。表征靶位置的抗原优选不被快速内化,不论是自发的还是当它被结合分子结合时。其原因在于前体药物典型被全身性给药,细胞内的酶将不容易与循环中的前体药物相互作用。靶位置的一个具体实例是表达被称为癌胚抗原(CEA)的抗原的细胞。该抗原被显著比例的结肠直肠癌(CRC)表达,因此允许对CRC进行局域化治疗。能够结合CEA的抗体和衍生物在本技术领域是已知的,例如本文中讨论的ScFv抗CEA抗体,其可以作为或不作为与CPG2的融合蛋白来生产。

[0033] 本发明的肽清除剂与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合。这导致存在于非靶位置处的偶联物的内化。因此,肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体的结合促进了所述肽的清除。在特定实施方案中,肽被糖基化,通过与表达脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞结合来促进经肝脏的清除。因此,肽包含与酶结合的氨基酸序列,所述结合的亲和性允许在循环中、在肽清除剂与结合分子和酶的偶联物之间形成复合物,所述复合物具有足够的稳定性以达到肝细胞并通过脱唾液酸糖蛋白受体而被接受。然而,肽清除剂的脱离速率必须足够快,以允许在前体药物用药方案的时程内与结合在靶位置处的结合分子与酶的偶联物解离,否则将阻碍前体药物向活性药物的转化。因此,一方面是对肝细胞上表达的脱唾液酸糖蛋白受体的亲和性,另一方面是肽对结合分子与酶的偶联物的亲和性,在此两方面之间也需要平衡。在特定实施方案中,肽对结合分子与酶的偶联物、特别是酶(的活性位点)具有亲和性,所述亲和性足以允许将酶从非靶位置处清除。在某些实施方案中,肽(还)具有足够快的解离速率/足够高的解离常数,以便不显著影响靶位置处的酶活性。更具体来说,肽对结合分子与酶的偶联物、特别是酶(的活性位点)的亲和性,可以是结合分子对其靶位置的结合亲和性的大约十分之一(例如大约五分之一至大约十五分之一,包括其间的所有值)。因此,结合分子和酶的偶联物与靶位置的结合比清除占优势,但肽对结合分子与酶的偶联物、特别是酶(的活性位点)的亲和性,仍足以保证通过与脱唾液酸糖蛋白受体结合后的内化,有效地经肝脏清除未结合的偶联物。

[0034] 在本文中示例了表现出适合的动力学和亲和性性质的本发明的肽清除剂。这样的动力学和亲和性性质可以使用任何适合的手段来测量。可以使用表面等离子体共振(SPR)这种公知的技术(并且可商业获得,例如来自于GE Healthcare-Biacore系统),基于结合研究来得出动力学和亲和性参数。使用适合的仪器获得的数据,可以通过适合的软件来分析,以自动推导出相关参数。可以通过软件应用适合的结合模型,以确保尽可能接近地拟合于曲线。低于0.2的卡方值可以被当作可接受的拟合。

[0035] 在特定实施方案中,可以使用可商购的 Biaevaluation 软件,使用单态结合模型(1 : 1 朗缪尔 (Langmuir) 结合模型) 来获得数据。因此,在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $1 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  至  $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  之间的任何结合速率(结合速率常数,  $K_a$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_a$  值 ( $2.26 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  的  $K_a$ )。在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  至  $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  之间的任何脱离速率(解离速率常数,  $K_d$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_d$  值 ( $1.14 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  的  $K_d$ )。

[0036] 因此,在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $1 \times 10^6 \text{M}^{-1}$  至  $1 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$  至  $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^8 \text{M}^{-1}$  至  $5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$  之间的根据 1 : 1 朗缪尔模型推导出的平衡结合常数 ( $K_A$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_A$  值 (约  $1.98 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ )。在某些实施方案中,这可以使本发明的肽清除剂的解离常数在约  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  至  $1 \times 10^{-11} \text{M}$  之间、或约  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  至  $1 \times 10^{-10} \text{M}$  之间、或约  $4 \times 10^{-9} \text{M}$  至  $6 \times 10^{-9} \text{M}$  之间的任何范围内。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_D$  值 (约  $5.04 \times 10^{-9} \text{M}$ )。

[0037] 或者,在特定实施方案中,可以使用可商购的 Biaevaluation 软件,使用双态结合模型来获得数据。因此,在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $1 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  之间、或  $1 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  至  $5 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  之间的任何一级结合速率(结合速率常数,  $K_{a1}$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_{a1}$  值 ( $2.84 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  的  $K_{a1}$ )。因此,在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $0.001 \text{s}^{-1}$  至  $1 \text{s}^{-1}$  之间、或约  $0.01 \text{s}^{-1}$  至  $0.1 \text{s}^{-1}$  之间、或约  $0.01 \text{s}^{-1}$  至  $0.05 \text{s}^{-1}$  或  $0.02 \text{s}^{-1}$  之间的任何二级结合速率(结合速率常数,  $K_{a2}$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_{a2}$  值 ( $0.014 \text{s}^{-1}$  的  $K_{a2}$ )。

[0038] 在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $0.001 \text{s}^{-1}$  至  $1 \text{s}^{-1}$  之间、或约  $0.01 \text{s}^{-1}$  至  $0.1 \text{s}^{-1}$  之间、或约  $0.01 \text{s}^{-1}$  至  $0.05 \text{s}^{-1}$  或  $0.03 \text{s}^{-1}$  之间的任何一级脱离速率(解离速率常数,  $K_{d1}$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_{d1}$  值 ( $0.0258 \text{s}^{-1}$  的  $K_{d1}$ )。在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $1 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$  至  $1 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  至  $5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  之间的任何二级脱离速率(解离速率常数,  $K_{d2}$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K_{d2}$  值 ( $1.58 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  的  $K_{d2}$ )。

[0039] 在某些实施方案中,本发明的肽清除剂可以表现出约  $1 \times 10^5 \text{M}^{-1}$  至  $1 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$  至  $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$  之间、或约  $1 \times 10^8 \text{M}^{-1}$  至  $2 \times 10^8 \text{M}^{-1}$  之间的根据双状态结合模型拟合推导出的平衡结合常数 ( $K$ )。在本文中描述了本发明的某些肽的具体  $K$  值 (约  $1.09 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ )。在某些实施方案中,这可以使本发明的肽清除剂的解离常数在约  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  至  $1 \times 10^{-10} \text{M}$  之间、或约  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  至  $1 \times 10^{-9} \text{M}$  之间的任何范围内。在本文中描述了本发明的某些肽的基于双态反应拟合的具体平均  $K_D$  值 (约  $9 \text{nM}$ )。

[0040] 也已发现,本发明的肽清除剂具有适合的抑制酶活性的能力。因此,本发明的肽清除剂可以表现出微摩尔量级的半数最大抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。适合的肽可以表现出约  $10$  至约  $1000 \mu \text{M}$ 、更特别是约  $20$  至  $200 \mu \text{M}$  之间、例如约  $50$  至  $150 \mu \text{M}$  之间的  $IC_{50}$ 。

[0041] 正如上面讨论的,肽与结合分子和酶的偶联物结合,在特定实施方案中与酶、特别是酶的活性位点结合。因此,在某些实施方案中,肽以足够高的亲和性结合酶的活性位点,

以用作失活或阻断酶活性以及将其导向肝脏的手段。在优选实施方案中,尽管肽楔入活性位点中,但它对酶活性有抗性。在本文中详细描述了与酶结合但是不作为酶活性的底物的适合的肽。因此,本发明的肽清除剂的序列和结构典型地由目标酶的活性位点决定。在某些实施方案中,肽是结合活性位点但不被酶转化的底物类似物。因此,肽的起点可以是底物分子序列,然后可以对其进行相应修饰以产生肽清除剂。

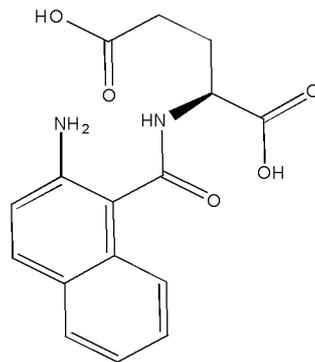
[0042] 例如,CPG2的天然底物是叶酸。叶酸是由蝶酸通过酰胺键与谷氨酸相连而构成的分子。CPG2水解谷氨酸-蝶酸酰胺键。因此,本发明的肽可以基于这种结构。在特定实施方案中,肽包含谷氨酸残基,但是采取D-型(与天然存在的L-型相反)。本发明的肽可以包含色氨酸-苯丙氨酸-谷氨酸(WFE)序列,任选谷氨酸作为D-氨基酸而不是L-氨基酸掺入。包含D-型氨基酸是为了防止谷氨酸-苯丙氨酸的肽键被CPG2裂解。该序列具有使用三肽所可能获得的与叶酸最接近的结构相似性,在氨基端具有双环氮取代的环结构,在中间具有6员芳香环,并在羧基端具有谷氨酸。本发明的肽可以在这种基本氨基酸序列上表现出变化。可以进行保守取代,例如将氨基酸用具有相同或相似电荷或疏水性或尺寸的其他氨基酸代替,这对本技术领域的专业人员来说是显而易见的。因此,例如,在某些实施方案中,各自具有脂族侧链的氨基酸例如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸可以相互取代。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸各自具有芳香族侧链,因此在某些实施方案中可以相互取代。半胱氨酸和甲硫氨酸都具有含硫侧链,因此在某些实施方案中可以相互取代。丝氨酸和苏氨酸具有脂族羟基侧链,因此在某些实施方案中可以相互取代。赖氨酸、精氨酸和组氨酸具有碱性侧链,因此在某些实施方案中可以相互取代。天冬氨酸和谷氨酸二者都是酸性的,因此在某些实施方案中可以相互取代。同样地,它们的酰胺衍生物天冬酰胺和谷氨酰胺,在某些实施方案中可以相互取代。可以引入非天然氨基酸,以便改进与酶(的活性位点)的结合。分子结构已被明确表征的许多非天然氨基酸在本技术领域是已知的,其可以容易地引入到合成肽中以便改进结合特性。其实例包括2-氨基己二酸(Aad)、2-氨基己二酸(bAad)、 $\beta$ -丙氨酸、 $\beta$ -氨基丙酸(bAla)、2-氨基丁酸(Abu)、4-氨基丁酸、哌啶酸(4Abu)、6-氨基己酸(Acp)、2-氨基庚酸(Ahe)、2-氨基异丁酸(Aib)、3-氨基异丁酸(bAib)、2-氨基庚二酸(Apm)、2,4-二氨基丁酸(Dbu)、锁链赖氨酸(Des)、2,2'-二氨基庚二酸(Dpm)、2,3-二氨基丙酸(Dpr)、N-乙基甘氨酸(EtGly)、N-乙基天冬酰胺(EtAsn)、羟赖氨酸(Hy1)、别羟赖氨酸(aHy1)、3-羟脯氨酸(3Hyp)、4-羟脯氨酸(4Hyp)、异锁链赖氨酸(Ide)、别异亮氨酸(alIle)、N-甲基甘氨酸、肌氨酸(MeGly)、N-甲基异亮氨酸(MeIle)、6-N-甲基赖氨酸(MeLys)、N-甲基缬氨酸(MeVal)、正缬氨酸(Nva)、正亮氨酸(NIle)和鸟氨酸(Orn)。

[0043] 本文中描述了与CPG2结合并有效抑制酶活性的本发明的特异性肽清除剂。这样的肽可以包含下列氨基酸序列、基本上由其构成或由其构成:

[0044] 氨基萘甲酸(ANA)-谷氨酸(Glu)

[0045] 本发明的肽可以包含式I的二肽、基本上由其构成或由其构成:

[0046]



(I)

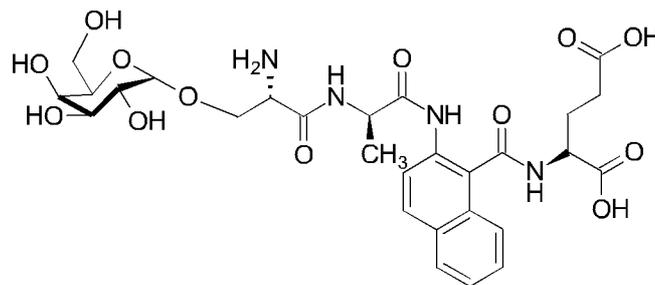
[0047] 本文中显示的这样的二肽表现出与本发明的清除剂相关的所需性质。肽对 CPG2 的活性位点具有纳摩尔级的亲和性, 并且不起到底物的作用。IC<sub>50</sub> 在微摩尔级上, 在 50 至 150 μM 之间, 更具体约为 88.5 μM。如上所述, 所述肽除了与酶的活性位点结合之外, 还必须与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合, 以促进经肝脏的清除。因此, 正如本文中讨论的, 可以延长这种基本的二肽以允许清除。这样的肽长度可以为 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个或以上氨基酸, 并可以被糖基化。

[0048] 在本发明的特定实施方案中, 肽包含下列氨基酸序列、基本上由其构成或由其构成:

[0049] 丝氨酸 (Ser) - 丙氨酸 (Ala) - 氨基萘甲酸 (ANA) - 谷氨酸 (Glu) (SEQ ID NO :1)。

[0050] 可以对所述肽进行修饰以促进清除。可以将所述肽在适合的残基处糖基化, 以允许其与表达脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞结合。在特定实施方案中, 丝氨酸残基被糖基化。如本文中讨论的, 所述肽可以包含其他氨基酸残基, 如果适合的话多达最多 10、20 或 30 个氨基酸, 例如总长度为 4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸。本发明的肽可以包含式 II 的肽、基本上由其构成或由其构成:

[0051]



(II)

[0052] 本文中显示的这样的肽表现出与本发明的清除剂相关的所需性质。所述肽对 CPG2 的活性位点具有纳摩尔级的亲和性, 并且不起到底物的作用。IC<sub>50</sub> 在微摩尔级上, 在 50 至 150 μM 之间, 更具体约为 110 μM。如上所讨论的, 本发明的肽可以含有与天然存在的 L-型相反的 D-型氨基酸 (不同的光学异构体)。具体来说, 谷氨酸残基可以被提供成 D-型的。也如本文中讨论的, 可以对肽中的任何氨基酸进行取代、特别是保守取代, 只要作为本发明的肽清除剂的功能得以保留即可。

[0053] 由于具有极低的免疫原性, 本发明的肽与基于抗体的清除剂相比提供了优势。这是由于它们相对短的长度。本发明的每种肽清除剂尽管典型尺寸小, 但包含两个不同结构

域。第一个结构域包含结合到靶酶的活性位点中、但是不被所述酶的作用共价改变的短的氨基酸序列（如上所讨论的）。该结构域可以包括非天然氨基酸例如 D- 型氨基酸，其防止酶在肽一旦结合到活性位点中之后作用于肽。因此，在某些实施方案中，本发明的肽的第一个结构域长度不超过 10、15 或 20 个氨基酸。在更具体的实施方案中，肽的第一个结构域长度在 3 至 10 个氨基酸之间，例如长度为 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸。在具体实施方案中，肽或其第一个结构域是七肽。

[0054] 第二个结构域与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合。这导致存在于非靶位置处的偶联物的内化。因此，肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体的结合促进了肽的清除。在特定实施方案中，肽包含连续的氨基酸序列或连有另外的化学结构。每个肽携带一个或多个糖基、优选为半乳糖基，其能够被带有脱唾液酸糖蛋白受体的肝细胞结合并摄取。因此，在特定实施方案中，本发明的肽清除剂的糖基化涉及一个或多个半乳糖基的接合。在特定实施方案中，第二个结构域包含一个或多个半乳糖基丝氨酸氨基酸（即半乳糖共价连接到丝氨酸羟基的 O 残基上），以产生 O- 连接的糖基肽。该物质可以从许多供应商处商购。如果需要，可以通过已知的肽化学技术添加任何数量的这些额外的半乳糖基丝氨酸基团，以加强糖基肽与肝细胞的脱唾液酸糖蛋白受体的结合。半乳糖基丝氨酸可以直接或通过接头氨基酸或氨基酸段添加到肽（的第一个结构域）。因此，接头可以包含一个或多个氨基酸、特别是甘氨酸残基。可以添加多个半乳糖部分，其每个由一个或多个间隔氨基酸隔开。因此，可以使用一个或多个其他氨基酸来构建其他半乳糖基丝氨酸残基之间的间隔，以便优化半乳糖基的取向和部署。当然，如果合适，可以使用另外的半乳糖基氨基酸代替半乳糖基丝氨酸。

[0055] 同样重要的是，肽的氨基酸序列不模拟（人类）对象的任何活性肽；否则它可能具有不希望的生物活性。此外，肽不应该与可能引起不希望活性的任何内源（人类）蛋白、特别是酶或受体（的活性位点）结合。候选物可以使用氨基酸序列数据库搜索来鉴定，然后使用例如适合的体外测试法来测试。

[0056] 典型地，本发明的肽是化学合成的。然而，如果需要，可以使用重组生产的肽。重组生产的肽可以在表达后进行后续糖基化，或者如果选择适合的细胞类型来指导表达的话，可以在细胞内糖基化。用于生产本发明的肽清除剂的适合的反应流程更详细地描述在本文中，参见实验例部分。

[0057] 本发明的肽可以通过任何适合的技术来产生。它们可以利用陈列在遗传工程化病毒或细胞表面上（噬菌体展示、双杂交系统等）、或合成并陈列在结构化表面上（例如 PEPSCAN 文库）的随机肽文库来产生。根据 PEPSCAN 方案，将靶酶在水性溶液中暴露于这种陈列有所述肽的表面，然后对表面进行处理以检测酶通过展示的肽与表面的结合。该程序的第一轮可能只产生弱的结合，但然后可以将阳性结合序列用作进一步修饰、包括延长的起点，以产生更长的肽。然后可以对这些更长的肽进行筛选，并对改进的结合物通过对序列每个位置中的氨基酸进行系统改变来进一步修饰，以产生优化肽。某些改变产生略微更高的结合效能，然后将这些略为改进的序列用作更多轮系统取代的进一步的起点，直到出现具有所需亲和性和特异性的结合序列。然后，可以添加带有糖的结构域以完成构建。这些物质的制造可以通过肽合成和糖基化的已知标准方法来实现。

[0058] 因此，本发明还提供了生产本发明的（优化的）肽清除剂的方法，所述方法包含：

- [0059] a. 制备一组肽, 任选以作为酶底物的结构类似物的起始肽为基础
- [0060] b. 筛选该组肽对酶与在靶位置处特异性结合的结合分子的偶联物的结合亲和性, 并选择具有结合亲和性的肽
- [0061] c. 任选修饰在步骤 b 中具有结合亲和性的肽的氨基酸序列, 并使用修饰肽重复步骤 b 以测试结合亲和性的提高
- [0062] d. 任选在步骤 c 中发现具有提高的结合亲和性的修饰肽的每个残基处进行取代, 并重复步骤 b 以确定是否任何取代的肽具有进一步提高的结合亲和性
- [0063] e. 任选确定从步骤 c 或 d 得到的 (具有提高的结合亲和性的) 肽是否具有阻止或抑制酶活性的能力
- [0064] f. 任选通过使用来自于对象的一系列对照蛋白进行测试, 以证实对酶的结合特异性
- [0065] g. 测试所述肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合以促进经肝脏清除的能力

[0066] 其中步骤 e 和 f 如果进行的话, 可以以任意次序进行, 并且步骤 g 可以在方法中的任何点进行, 包括在步骤 a 中提供能够与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合以促进经肝脏清除的一组肽。

[0067] 可以对步骤 g 中的肽进行修饰, 以确保它们能够与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合, 从而促进经肝脏的清除。因此, 在方法的具体实施方案中, 步骤 g 包含对肽进行糖基化。因此步骤 a 可以包含提供一组糖基化肽。

[0068] 因此, 在 PEPSCAN 类型的实施方案中, 该组肽典型被固定化在固相表面上, 例如多孔板的孔中。可以使用任何适合的固相表面。肽的合成可以发生在固相表面上, 或者肽可以被合成并随后固定化。或者, 在噬菌体展示类型的实施方案或相关技术中, 酶 (或结合分子与酶的偶联物) 是被固定化的实体, 并且针对固定化的酶来筛选噬菌体展示文库。

[0069] 该组肽可以包含肽文库。噬菌体展示或相关技术可以依赖于基本上随机的肽文库, 所述文库被展示并针对酶进行几轮筛选, 以鉴定最强的结合物。在某些实施方案中, 起始肽是被设计用于与结合分子和酶的偶联物结合、在特定实施方案中是与酶、特别是酶的活性位点结合的短肽。肽的起始序列和结构可以由目标酶的活性位点的形状决定。在某些实施方案中, 起始肽是预测的底物类似物, 其可能与活性位点结合但是不被酶转变。因此, 肽的起点可以是底物分子的序列或结构, 然后可以按照本发明的方法对其进行修饰, 以产生肽清除剂。在特定实施方案中, 它可以是三肽。例如, 正如在上文讨论的, CPG2 的天然底物是叶酸。因此, 方法的起点可以基于该结构。在特定实施方案中, 肽起点包含叶酸中存在的谷氨酸残基, 但是为 D-型 (与通常的 L-型相反)。起点肽可以包含色氨酸 - 苯丙氨酸 - 谷氨酸 (WFE) 序列, 任选掺入作为 D-氨基酸而不是 L-氨基酸的谷氨酸。或者, 起点可以是 ANA-Glu 二肽或 SEQ ID NO:1 的肽 (Ser-Ala-ANA-Glu)。然后, 本发明的方法可以系统地修饰该起始序列, 以产生具有所需性质的肽清除剂。因此, 肽阵列或文库可以包括三肽 WFE 与各种三肽衍生物。衍生物可以包含具有所有氨基酸的系统取代的肽, 或者可以例如只包括保守取代的氨基酸 (如本文中定义的)。

[0070] 步骤 b 包括筛选该组肽对酶与在靶位置处特异性结合的结合分子的偶联物的结合亲和性, 并选择具有结合亲和性的肽。正如指出的, 对结合的筛选典型为筛选与酶活性位

点的结合。可以使用任何适合的筛选。在噬菌体展示类型的实施方案中,筛选是基于结合。任何未结合的噬菌体在清洗步骤中被洗掉。在噬菌体洗脱并进一步感染以产生更多噬菌体后,可以将步骤 b 重复多次,以允许表达结合肽的噬菌体富集。然后可以根据噬菌体所表达的序列,容易地确定能够结合酶的肽的序列。如果需要,然后可以按照方法的其他步骤对回收的肽进行修饰。

[0071] 在 PEPSCAN 类型的实施方案中,可以将酶(或酶-结合分子偶联物)用标记物标记。如果肽与酶结合,它将变得固定化。在清洗步骤后,加入直接与酶结合、或者如果酶被标记的话与标记物结合的报告物。报告物自身可以是酶,例如碱性磷酸酶。报告物不是必需结合酶或标记物本身,它同样可以附着于与标记物或酶结合的结合分子。因此,在特定实施方案中,酶用生物素进行标记。报告物附着于亲和素分子,例如链亲和素。生物素与链亲和素之间的相互作用有效地将报告物活性定位于酶的位点,因此(在适当的清洗步骤后)揭示了与酶成功结合的肽的位置。方法的具体实例显示在实施例 1 中。

[0072] 任选的步骤 c 典型地包括延长肽的氨基酸序列以试图提高结合亲和性。然而,可以进行其他修饰,例如用非天然氨基酸取代以代替现有的氨基酸。在某些实施方案中,延长可以是每次 1、2、3、4 或 5 个氨基酸。然后按照步骤 b 对由此延长的肽进行重新测试,以确定那些修饰引起结合亲和性的提高。

[0073] 随后的步骤 d 是对来自于步骤 c 的表现出改进的结合性质的肽进行全位置扫描。“全位置扫描”意味着对每个单个氨基酸进行取代以产生一系列肽,从而确定是否可以进一步改进结合。这产生了对靶酶具有最适结合亲和性的肽。

[0074] 然后可以进行进一步测试。因此,可以对肽进行测试以确定对偶联物具有提高的结合亲和性的肽是否也具有阻止或抑制酶活性的能力。正如本文中讨论的,当肽被设计成结合活性位点时,该步骤可能不是必需的,因为筛选(其测试结合亲和性)可以防止受到酶的作用的那些肽产生阳性结果。

[0075] 正如上面讨论的,同样重要的是肽的氨基酸序列不模拟(人类)对象的任何活性肽;否则它可能具有不希望的生物活性。此外,肽不应该结合任何内源(人类)酶的活性位点。因此,本发明的方法可以任选地包含通过用来自于对象的一系列对照蛋白进行测试,以证实酶的结合特异性。适合的对照可以根据目标酶来确定。具有类似活性位点和/或一级氨基酸序列的蛋白,可以例如使用氨基酸序列或结构数据库搜索来鉴定,并相应地进行结合测试。附加或替代地,肽可以在适合的动物模型中进行测试,以确定是否存在任何副作用。在特定实施方案中,方法还包含将通过所述方法产生的肽的氨基酸序列与人类氨基酸序列数据库进行比较,以证实肽不可能具有不希望的生物活性。

[0076] 肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体结合。这导致存在于非靶位置处的偶联物的内化。因此,肽与肝细胞表达的脱唾液酸糖蛋白受体的结合促进肽的清除。在特定实施方案中,为了可以用作本发明的清除剂,对肽进行糖基化。这可以在方法中的任何点进行。典型地,这在按照本发明的方法产生了一个或多个适合的候选物后进行。它可以在肽的进一步测试之前进行。特别是在噬菌体展示类型的实施方案中,糖基化发生在候选结合肽的分离之后——所述由噬菌体表达的肽将没有被糖基化。在其他实施方案中,起始肽可以被糖基化,或者可以在步骤 b 或 d 之前对肽进行糖基化。糖基化可以通过任何适合的手段来实现,其实例在本文中讨论(所述讨论在必要的修改后适用)。

[0077] 本发明的肽清除剂特别可应用于治疗方法,例如 ADEPT,其中通过经结合分子与酶的偶联物将酶定位,使用酶将前体药物转化成活性药物。因此,本发明还提供了治疗方法,例如 ADEPT,其中通过经结合分子与酶的偶联物将酶定位,使用酶将前体药物转化成活性药物,在所述酶中利用了本发明的肽清除剂。同样地,本发明提供了本发明的肽作为清除剂在治疗方法、特别是抗体导向的酶前体药物治疗(ADEPT)中的应用,在所述治疗方法中通过经结合分子与酶的偶联物将酶定位,使用酶将前体药物转化成活性药物。这些方面也可以根据医学应用进行创造。因此,本发明提供了在治疗方法、特别是抗体导向的酶前体药物治疗(ADEPT)中用作清除剂的本发明的肽,在所述治疗方法中通过经结合分子与酶的偶联物将酶定位,使用酶将前体药物转化成活性药物。同样地,本发明提供了本发明的肽在制造用于治疗方法、特别是用于抗体导向的酶前体药物治疗(ADEPT)的清除剂中的应用,在所述治疗方法中通过经结合分子与酶的偶联物将酶定位,使用酶将前体药物转化成活性药物。

[0078] 附图简述

[0079] 图 1 :CP014 半乳糖部分乙酰化产物的 HPLC 谱图

[0080] 图 2 :CP014 半乳糖部分脱乙酰化产物的 HPLC 谱图

[0081] 图 3 :验证 CP014 结构的 ESI 数据(电喷雾质谱术)

[0082] 图 4 :CP014 对 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 的 CPG2 酶活性的抑制,显示出 CP014 是 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 的抑制剂。计算的 IC<sub>50</sub> 为 110 μM。

[0083] 图 5 :Amplex red 测定的结果,显示出 CP014 不被 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 转换。在 Amplex red 测定中底物叶酸和氨甲蝶呤被显示为阳性对照。使用 CP014 时不存在荧光信号证实了 CPG2 不使用它作为底物。

[0084] 图 6a :应用 1 : 1 朗缪尔结合模型的 Biacore 数据,显示出 CP014 与 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 融合蛋白的相互作用。

[0085] 图 6b :残差图显示了 Biacore 数据与 1 : 1 朗缪尔结合模型的拟合。

[0086] 图 6c :应用双态反应拟合的 Biacore 数据,显示出 CP014 与 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 融合蛋白的相互作用。

[0087] 图 6d :残差图显示了 Biacore 数据与双态结合模型的拟合。

[0088] 图 7 :CP006 的电喷雾质谱图,显示了主要的分子量峰。

[0089] 图 8 :抑制测定中 CP006 对 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 融合体的抑制。原始光谱数据

[0090] 图 9 :抑制测定中 CP006 对 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 融合体的抑制。抑制曲线显示 IC<sub>50</sub> 为 88.5 μM。

[0091] 图 10 :Amplex red 测定结果,显示出对 CP006 和 MFECF 的低底物活性。底物浓度为 12.5 μM。

[0092] 图 11a/b 显示了使用对照(CEA 表面抗原阴性)细胞系(CRL 1573)时,对照对于自身荧光的流式细胞术结果。

[0093] 图 11c/d 显示了使用对照(CEA 表面抗原阴性)细胞系(CRL 1573)时,对照对于 CPG2-PE 结合的流式细胞术结果。

[0094] 图 11e/f 显示了使用对照(CEA 表面抗原阴性)细胞系(CRL 1573)时,对照对于 ssFV 抗 CEA 抗体-CP-PE 结合的流式细胞术结果。

[0095] 图 11g/h 显示了使用对照(CEA 表面抗原阴性)细胞系(CRL 1573)时,对照对于

绵羊抗 CEA 抗体 -PE 结合的流式细胞术结果。

[0096] 图 11i/j 显示了使用对照 (CEA 表面抗原阴性) 细胞系 (CRL 1573) 时,对照对于 A5B5 抗 CEA 抗体 + 山羊抗小鼠抗体 -PE 结合的流式细胞术结果。

[0097] 图 12a/b 显示了使用 CEA 表面抗原阳性细胞系 (CC1-229) 时,对照对于自身荧光的流式细胞术结果。

[0098] 图 12c/d 显示了使用 CEA 表面抗原阳性细胞系 (CC1-229) 时,对照对于 CPG2-PE 结合的流式细胞术结果。

[0099] 图 12e/f 显示了使用 CEA 表面抗原阳性细胞系 (CC1-229) 时,对照对于 ssFV 抗 CEA 抗体 -CP-PE 结合的流式细胞术结果。

[0100] 图 12g/h 显示了使用 CEA 表面抗原阳性细胞系 (CC1-229) 时,对照对于绵羊抗 CEA 抗体 -PE 结合的流式细胞术结果。

[0101] 图 12i/j 显示了使用 CEA 表面抗原阳性细胞系 (CC1-229) 时,对照对于 A5B5 抗 CEA 抗体 + 山羊抗小鼠抗体 -PE 结合的流式细胞术结果。

[0102] 将参考下面的非限制性实施例对本发明进行描述:

[0103] 实施例 1- 产生针对酶 CPG2 的含糖基化结合肽的清除剂

[0104] 采取 PEPSCAN 技术的形式 (2&3),合成了三肽文库。通过机器人装置将肽附着于塑料孔的内表面进行合成。系列中的第一种肽基于 CPG2 的天然底物叶酸的结构。叶酸是由蝶酸经酰胺键与谷氨酸相连而构成的分子。CPG2 水解谷氨酸 - 蝶酸酰胺键。该第一种三肽具有下述序列:色氨酸 - 苯丙氨酸 - 谷氨酸 (WFE),但谷氨酸是 D-氨基酸而不是 L-氨基酸,这是因为打算使谷氨酸 - 苯丙氨酸肽键不受 CPG2 的裂解。选择该序列是因为它具有使用三肽所能获得的与叶酸最接近的相似性,在氨基端具有双环氮取代的环结构,在中间具有 6 员芳香环,并在羧基端具有谷氨酸。三肽文库的其余部分由从该起始结构出发,通过在三个位置的每个中用所有可能的氨基酸进行取代而系统改变的肽构成。

[0105] 将 CPG2-生物素偶联物 (0.1ug/ml) 在含有 Tween 20 (0.05% v/v) 和牛血清白蛋白 (0.1% w/v) 的磷酸缓冲盐水 (PBSTA) 中的水性溶液分配到每个孔中并使其温育 60 分钟,然后将孔倒空并漂洗。然后在所有孔中加入链亲和素 - 碱性磷酸酶偶联物在含有 0.5mM 氯化镁的 PBSTA 中的溶液 (1ug/ml) 并继续温育 60 分钟,然后再次将孔倒空并漂洗。在下一个测定步骤中,将碱性磷酸酶的底物 (对硝基酚磷酸酯) 在二乙醇胺 (105 在 600ml 纯水中) 中的溶液,以 1mg/ml 加入到孔中,并将其再次温育 60 分钟或直到形成一些颜色,最多为 48 小时。最后,在特制的读板器中根据 405nm 波长处的光密度读数评估孔的颜色产生。

[0106] 孔中出现颜色表明附着于孔表面的肽已结合生物素化的 CPG2 酶且自身不被水解,并且颜色的强度与已经结合的 CPG2 的量成正比,指示了结合的程度 (亲和性)。

[0107] 对已结合 CPG2 的序列进行标注和排序。然后将最高结合的序列用作起点,以与产生第一系列的肽相同的方式,制造其中所有可能的二肽变化形式与结合性三肽相连的一系列延长的肽。对这些孔再次使用检测 CPG2 结合的相同测定程序,并再次鉴定最强的结合物并排序。

[0108] 再次重复整个程序来添加另外两个氨基酸延伸,以鉴定最强的结合性七肽。然后对最强的结合物进行全位置扫描,以确定最佳结合序列的任何变体是否还能提供更强的结合。

[0109] 在该顺序测定步骤中的任何步骤处,有可能转向次强的结合物并产生该序列的肽变体,如果在源自于最强候选物的文库中没有检测到更强的结合物,则可以按照这种程序。

[0110] 应该认识到,为了发现结合肽,可以对这里描述的基本肽选择技术 (PEPSCAN) 进行许多不同方式的改变。这里描述的实施例方法仅仅是可以使用方法的可能方式之一。

[0111] 一旦发现满意的结合序列之后,可以合成足够量的游离肽样品,以进行进一步实验和开发。具体来说,可以通过在任一端延伸来制造变体,所述延伸由一个或多个半乳糖基丝氨酸氨基酸 (即半乳糖与丝氨酸羟基的 O 残基共价相连,其可以从许多供应商处商购) 构成,以产生 O- 连接的糖基肽。如果需要,可以通过已知的肽化学技术添加任何数量的这些额外的半乳糖基丝氨酸基团,以加强糖基肽与肝细胞的脱唾液酸糖蛋白受体的结合。这种结合可以通过使用分离的 C- 型凝集素或通过分离的大鼠肝细胞进行体外建立模型。

[0112] 半乳糖基丝氨酸可以直接或通过接头氨基酸或氨基酸段添加到七肽,所述接头氨基酸或氨基酸段优选 (但不是必需) 由一个或多个甘氨酸残基构成。可以使用一个或多个其他氨基酸来构建其他半乳糖基丝氨酸残基之间的间隔,以便优化半乳糖基的取向和部署。

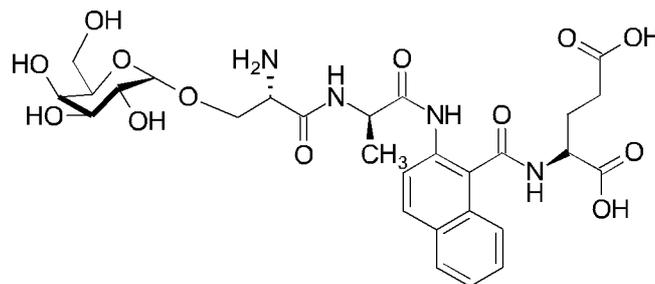
[0113] 可以使用其他半乳糖基氨基酸代替半乳糖基丝氨酸,如果它们容易获得并经得起肽合成化学的话。

[0114] 通过这种方式,可以开发许多 CPG2 结合肽以产生许多候选分子。然后可以根据与肝细胞的结合、与 CPG2 的结合、对蛋白酶的稳定性、储存稳定性、缺少毒性等,对每个候选分子进行更多轮的鉴定和选择。为了选择对 CPG2 的亲合性与靶向分子结合癌抗原的亲合性相匹配 (即亲合性是靶向抗体对癌抗原的亲合性的大约十分之一) 的肽,将产生许多的这些肽。

[0115] 实施例 2 :清除剂酶结合物 CP014

[0116] 被命名为 CP014 的化合物的化学描述和图形表示

[0117]



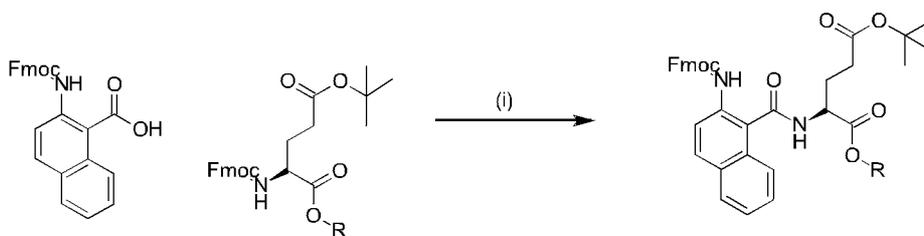
[0118] 式 II 的化合物 :CP014H-Ser (Gal)-Ala-ANA-Glu-OH

[0119] 合成和纯化方法

[0120] 通过固相肽合成 (SPPS) 方法,使用 CEM Liberty Microwave Synthesiser 并利用 Fmoc 化学来合成肽 CP014 (反应图式 1, 其中 R = 树脂)。树脂 Fmoc-Glu(OtBu)-NovaSynTGA (MerckBioscience) 以 0.1mmol 的量度使用。所有后续的 Fmoc 结构单元从 NeoMPS、Bachem 和 MerckBioscience 购买。Fmoc- 丝氨酸半乳糖 (乙酰基保护的) 从 DextraLabs 获得。

[0121] SPPS 步骤 1

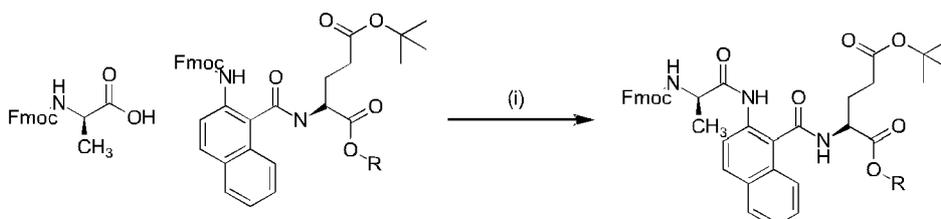
[0122]



[0123] 反应图式 1 : (i) 偶联条件 : HBTU, DMF, DIEA, NMP, 90 分钟。

[0124] SPPS 步骤 2

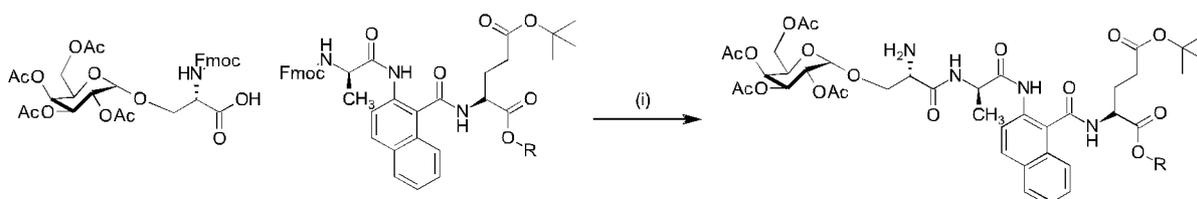
[0125]



[0126] 反应图式 2 : (i) 偶联条件 : BTC, 三甲吡啶, THF, MW, 50 °C。

[0127] SPPS 步骤 3

[0128]

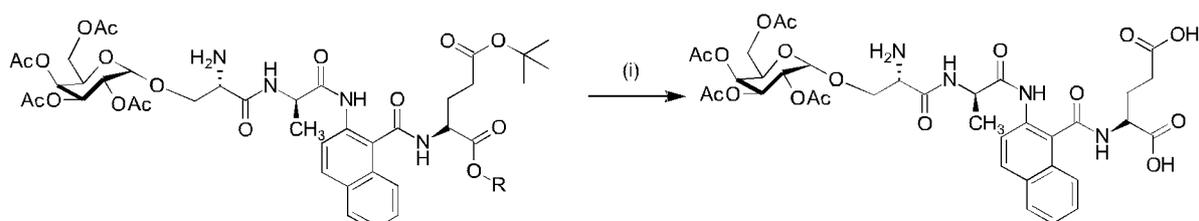


[0129] 反应图式 3 : 偶联条件 : PyBoP, HOBT, DIPEA, DMF, MW。

[0130] 从树脂上的切下肽并纯化

[0131] 合成完成后,将树脂用 DCM(10mL) 和 EtOH(10mL) 洗涤,并在干燥器中干燥 24 小时。24 小时后,将完成的肽从干燥器中取出,并用 10mL 95% TFA、2.5% d. H<sub>2</sub>O 和 2.5% TIPS 的溶液处理 3 小时。然后将反应在减压下蒸发,得到无色油。将油在冷 TBME 中沉淀,产生棕色粗品固体(反应图式 4)。将粗产物溶解在 500 μL 含 50% MeCN 的 d. H<sub>2</sub>O 中,然后用 600 μL 5% MeCN(0.1% TFA) 进一步稀释,然后在 Onyx C18 柱上使用反相程序,应用 5 至 100% MeCN(0.1% TFA) 的梯度洗脱 12 分钟,进行过滤和纯化。在 280nm 下,产物收集物的滞留时间为 5.6 分钟(图 2)。将收集到的级份合并并在减压下浓缩,得到棕色油,将其溶解在 d. H<sub>2</sub>O(4mL) 中,并在 0.2mBar 下进行 18 小时的冷冻干燥,得到棕色固体。

[0132]



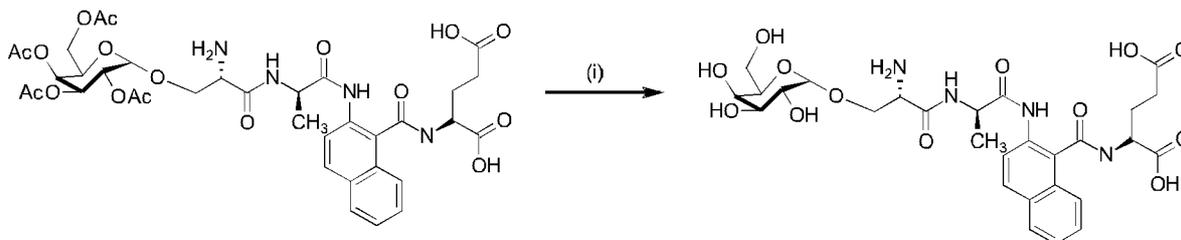
[0133] 反应图式 4 : (i) 切割条件 : TFA, TIPS, d. H<sub>2</sub>O, 室温 3 小时

[0134] 从半乳糖部分移除乙酰基保护并纯化

[0135] 通过将产物溶解在最小量无水 MeOH 中,然后逐滴加入 1M NaOMe 在无水 MeOH 中的

溶液至 pH 9-10 来实现从半乳糖部分移除乙酰基保护。然后将反应搅拌 1 小时。该时间后,逐滴加入乙酸至 pH 7,并在减压下除去挥发物,得到棕色固体(反应图式 5)。将产物溶解在 500  $\mu$ L 含 50% MeCN 的 d. H<sub>2</sub>O 中,然后用 600  $\mu$ L 5% MeCN(0.1% TFA) 进一步稀释,在 Onyx C18 柱上使用标准反相程序,应用 5 至 100% MeCN(0.1% TFA) 的梯度洗脱 12 分钟进行过滤和纯化。在 280nm 下,产物收集物的滞留时间为 4.7 分钟(图 3)。将收集到的级份合并并在减压下浓缩,得到棕色固体,将其溶解在 d. H<sub>2</sub>O(4mL) 中,并在 0.2mBar 下进行 18 小时的冷冻干燥,得到棕色固体。

[0136]



[0137] 反应图式 5 : (i) 乙酰基去保护条件 : 1M NaOMe, MeOH, 室温, 1h 使用的分析方法和数据 :

[0138] 对于肽 CP014 来说,获得了下列 HPLC 描记图(图 1 和 2)。利用了标准的反相条件,使用 Onyx C18 柱并应用 12 分钟的 5 至 100% MeCN(0.1% TFA) 的洗脱梯度。洗脱梯度:初始 5% MeCN(0.1% TFA),然后在 8 分钟时改为 100% MeCN(0.1% TFA) 1.5 分钟,然后返回到 5% MeCN(0.1% TFA) 直至结束。

[0139] CP014 的结构使用 LCMS 电喷雾 (ESI) 来验证,  $m/z$  (ESI) 为 637 (M+H<sup>+</sup>, 25%)。结果显示在图 3 中。

[0140] 酶抑制实验, 计算 IC<sub>50</sub>

[0141] 用于评估 CP014 作为 CPG2 活性抑制剂的酶抑制测定方法

[0142] 使用分光光度测定法测量 CP014 对 CPG2 活性的影响。将 CP014 溶解在测定缓冲液中 (0.1M Tris-HCl 缓冲液, pH 7.3, 含 0.2mM 氯化锌) 以提供 40mM 的浓度。向比色杯加入不同份量的该溶液, 并加入测定缓冲液以将每个比色杯中的溶液体积调整至 900  $\mu$ L。向每个比色杯加入在测定缓冲液中的 0.6mM 氨甲蝶呤溶液的 100  $\mu$ L 等份, 使氨甲蝶呤底物浓度为 0.06mM (60  $\mu$ M)。比色杯中 CP014 的浓度范围为 0-400  $\mu$ M。

[0143] 将比色杯中的底物溶液在烘箱中加热至 37°C。然后将比色杯依次置于使用 Peltier 维持在 37°C 下的分光光度计中。通过加入 10  $\mu$ L 等份的融合蛋白 (ScFV 抗 CEA 抗体 -CPG2) 溶液或 CPG2 溶液, 然后简短搅拌来启动测定。通过测量 320nm 处吸光度的降低来监测氨甲蝶呤底物的水解。

[0144] 一个 CPG2 活性单位 (1U) 被定义为在 37°C 下, 每分钟催化 1  $\mu$ mol 氨甲蝶呤水解的酶量。氨甲蝶呤的摩尔消光系数被取为 8300L mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>。对于每次测定来说, 制作吸光度对时间的图, 并将对 0 至 0.2 分钟之间的数据拟合直线。然后将直线的斜率乘以 -12 和 ScFV 抗 CEA 抗体 -CPG2/CPG2 溶液的稀释倍数, 得到以 U/mL 为单位的酶活性。

[0145] 测定法的变化形式是在 CPG2 测定之前, 将各种不同量的 CP014 与 ScFV 抗 CEA 抗体 -CPG2 或 CPG 在 4°C 下温育一段时间。在该温育步骤后, 在 37°C 下向比色杯加入 10  $\mu$ L 等份的每种混合物, 所述比色杯含有 1mL 等份的含 0.06mM 氨甲蝶呤的测定缓冲液。在对比

色杯的内含物进行搅拌后,如上所述进行吸光度降低的测量和随后酶活性的确定。

[0146] CP014 在抑制 CPG2 活性中的有效性,根据其  $IC_{50}$  值、即半数最大抑制浓度来表示。使用 GraphPad Prism 5 软件,通过对酶活性相对 CP014 浓度的对数的图应用非线性回归,来确定  $IC_{50}$  值。

[0147] 用于筛选潜在 CPG2 底物的非扩增 Amplex Red 测定法

[0148] 使用分光光度测定法确定了 CP014 是 CPG2 活性的潜在抑制剂。为了证实该物质是酶的抑制剂而不是底物,进行了由 Invitrogen Inc. 开发的测定法的改良版本。所谓的 Amplex Red 测定法可用于测量食品样品中的 L-谷氨酸并连续监测谷氨酸氧化酶活性。通过取消测定程序中的扩增步骤,可以筛选作为 CPG2 的底物的化合物。在改良的测定法中,从 CPG2 底物上切下的 L-谷氨酸被谷氨酸氧化酶氧化,产生  $\alpha$ -酮戊二酸、胺和过氧化氢。过氧化氢然后与 10-乙酰基-3,7-二羟基吩呢嗪 (Amplex Red 试剂) 以 1 : 1 的化学计量比在辣根过氧化物酶 (HRP) 催化的反应中反应,产生强荧光产物试卤灵。

[0149] 制备 CP014 在测定缓冲液 (0.1M Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5, 含 0.2mM 氯化锌) 中的 25  $\mu$ M 和 200  $\mu$ M 溶液,以及叶酸在测定缓冲液中的 25  $\mu$ M 溶液。通过将 2.5  $\mu$ L 10mM 的 Amplex Red 试剂在 DMSO 中的溶液、5  $\mu$ L 的 HRP 在测定缓冲液中的溶液 (100U/mL)、32  $\mu$ L 的 L-谷氨酸氧化酶在测定缓冲液中的溶液 (5U/mL) 以及 460.5  $\mu$ L 测定缓冲液合并,制备了 Amplex Red 试剂混合物。使用测定缓冲液将 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 融合蛋白适当稀释。

[0150] 向黑色微量滴定板的孔加入 50  $\mu$ L 等份的 CP014 溶液或 25  $\mu$ M 叶酸溶液和 50  $\mu$ L 等份的 Amplex Red 试剂混合物。将板盖上,然后在 37°C 温育 10 分钟。取下盖子,加入 1  $\mu$ L 等份的 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2。在简短搅拌后,将板置于 BMG Fluostar Omega 读板器中,并在 245 秒的时间段内以 5 秒的时间间隔监测荧光强度。激发滤光片的波长被设为 544nm,发射滤光片的波长被设为 590nm。如果材料是 CPG2 的底物例如叶酸的话,荧光强度对时间 (秒) 的图在初始的延迟期后显示出线性关系。已显示,图的直线部分的斜率与 CPG2 活性成正比。

[0151] 当 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 被稀释至约 2U/mL 的浓度时,对于 12.5  $\mu$ M 叶酸对照测定所计算的斜率值约为 4.0。在板孔中,在 12.5 和 100  $\mu$ M 两种浓度下,CP014 产生的斜率值不高于阴性对照样品 (即向孔加入测定缓冲液而不是 ScFV 抗 CEA 抗体-CPG2 溶液的情况) 的斜率值,表明材料不是 CPG2 的底物。

[0152] CP014 的  $IC_{50}$  和底物潜力的评估

[0153] 按照以前的描述测定  $IC_{50}$ ,使用 Graph pad prism 简化的数据如图 4 中所示。说明底物潜力的 Amplex red 测定数据显示在图 5 中。

[0154] 数据证实 CP014 抑制 CPG2 活性 (图 4),此外它不被改变或用作底物 (图 5)。

[0155] 使用表面等离子共振 (SPR) 的结合研究

[0156] 按照制造商 (GE healthcare) 的推荐,使用 EDC/NHS 化学将肽联接于 CM5 芯片。将分析物配制在 HBS-P 缓冲液 (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.005% v/v 表面活性剂 P20) 中,并以 5  $\mu$ l/min 在表面上注射 180 秒,随后的解离时间为 300 秒。使用再生缓冲液 (10mMCHAPS, 1mM 盐酸胍, 2M NaCl) 进行两次 10 秒的注射,来清除残留的结合。为了整个实验过程的一致性,检查响应信号和基线,并测试 15 和 75  $\mu$ l/min 的流速,以证实由质量传递造成的影响极小。

[0157] 图 6a 和 6c 各自显示了叠加的四个传感图。它们是来自于在固定化 CP014 肽的芯片表面上注射 12.5、25、50 和 100nM 的 ScFV 抗 CEA 抗体 -CPG2 后减去空白的实时响应。数据已使用在 BiaCore 软件 (“Biaevaluation”) 中提供的两种不同算法进行拟合。第一种算法显示在图 6a 中, 是 1 : 1 的结合模型 (朗缪尔), 第二种算法显示在图 6c 中, 是 2 态反应拟合。两种拟合近似与归一化的传感图对齐。这可以从残差图看出, 其显示出与预期值的极小偏差 (分别为图 6b 和 6d)。此外, 对于这些计算类型来说, 卡方值分别为 0.154 和 0.0882, 在可接受的范围 ( $< 0.2$ ) 之内。对于这两种拟合来说, 解离常数 (结合常数 KD) 接近一致, 分别为 5nM 和 9nM。

[0158] 推导出的动力学和亲和性参数分别归纳在表 1 和 2 中:

[0159] 表 1-1 : 1 朗缪尔拟合

[0160]

Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	卡方
2.26e5	1.14e-3	1.98e8	5.04e-9	0.154

[0161] 表 2-2 态反应拟合

[0162]

ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	ka2 (1/s)	kd2 (1/s)	K (1/M)	卡方
2.84e5	0.0258	0.014	1.58e-3	1.09e8	0.0882

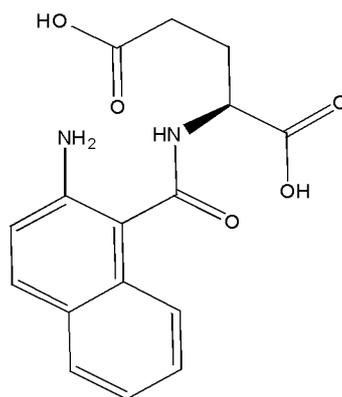
[0163] 注意, 正如由 Biaevaluation 软件所显示的, 2 态模型中 ka2 值的单位为每秒 ( $s^{-1}$ )。

[0164] 实施例 3 : 清除剂酶结合物 CP006

[0165] 被命名为 CP006 的化合物的化学描述和图形表示

[0166] CP006 是 CP014 的先导物, 其合成和结构如下所述。

[0167]



[0168] 式 I : CP006 : ANA-Glu-OH, 其中 ANA 是氨基萘甲酸 CP006 的合成

[0169] 对 IIDQ 树脂 (500mg, 1.91mmol/g) 进行漂洗并在 10ml 乙腈中溶胀 1 小时, 在真空下排出溶剂。然后将 Boc-氨基萘甲酸 (Polypeptide, 100mg, 0.35mmol) 和 H-Glu(OtBu)-OtBu (Bachem, 108mg, 0.37mmol) 溶解在 5ml 乙腈中, 并加入到预先溶胀的树脂中, 在室温下轻柔搅拌 72 小时。将反应排入到干净的烧瓶中, 并在真空下除去溶剂。向残

留物加入 50ml 50% TFA/DCM, 并剧烈搅拌 2 小时。在除去溶剂后, 将残留物在冰冷的叔丁基甲基醚中漂洗两次并倾析, 留下黄色固体。将干燥的粗材料重新溶解在 5% 乙腈 (0.1% TFA) 中, 并使用 5-100% 乙腈 0.1% TFA 的递增梯度通过 HPLC 进行纯化。将合并的级份在真空中浓缩, 在 50% 乙腈中稀释并进一步冷冻干燥, 得到白色粉末。ESMS-ve 预期质量为 316.11, 实测质量为 316.04。

[0170] 使用前面描述的方法测试用于评估酶抑制的方法和作为 CPG2 的底物的用途。

[0171] CP006 是 ScFv 抗 CEA 抗体 -CPG2 中 CPG2 活性的抑制剂, 并且是不良底物。

[0172] 按照前面的描述测定 IC<sub>50</sub>, 使用 Graph pad prism 简化的数据如图 9 中所示。说明底物潜力的 Amplex red 测定数据显示在图 10 中。

[0173] 实施例 4: 使用绵羊抗 CEA 抗体和 ScFv 抗 CEA 抗体 -CPG2 融合蛋白的细胞结合研究

[0174] 使用流式细胞术进行分析, 进行了考察在绵羊中产生的针对 CEA 的抗体和 ScFv 抗 CEA 抗体 -CPG2 融合蛋白的研究。

[0175] 使用 CEA 表达细胞, 通过流式细胞术测量 ScFv 抗 CEA 抗体 -CPG2 的结合能力

[0176] 材料:

[0177] 细胞系: CRL 1573- 对照细胞系, CCL 229 (LoVo)- 表达 CEA 的细胞系

[0178] 抗体 / 偶联物: CPG2-PE (藻红蛋白), CPG2100U/ml, 100U 偶联物的 1 : 100 稀释液

[0179] ScFv 抗 CEA 抗体 -CPG2-PE 的 1 : 100 稀释液 UCL, 40-50U/ml, 0.71mg/ml 蛋白, 在含有 BSA 的缓冲液中为 2.5 μg/ml

[0180] 绵羊抗 CEA 抗体 -PE, CF 1110-PE ;670 μg/ml 的储用液

[0181] 小鼠抗人 CEA 抗体, UCL, 3.9mg/ml, 在含有 BSA 的缓冲液中为 2.5 μg/ml

[0182] 山羊抗小鼠抗体 -PE, Southern Biotech, 1050-09L2806-XH69Z κ 链特异性, 0.25mg/ml, 以 1 μg/ml 使用

[0183] 4.5ml 聚苯乙烯管, 含叠氮化合物的 PBS, BSA, PBS+0.5% 甲醛 (Polysciences#18814), 碘化丙啶 (Orpegen, 100mg/ml)

[0184] Eppendorf 离心机 5810R, 设置为 250G, 5 分钟, 4°C

[0185] Coulter XL 流式细胞仪

[0186] 方法:

[0187] 培养的细胞二者都以每管  $2 \times 10^5$  个细胞使用, 将管中的细胞制备成含下列物质:

[0188] 1. 不添加任何物质, 自身荧光测试

[0189] 2. 终浓度为 10 μg/ml 的碘化丙啶

[0190] 3. CPG2-PE

[0191] 4. ScFv 抗 CEA 抗体 -CPG2-PE

[0192] 5. 绵羊抗 CEA 抗体 -PE

[0193] 6. 小鼠抗 CEA 抗体 / 抗小鼠抗体 -PE

[0194] 将细胞离心下来, 向相应的管加入 100 μl 抗体溶液。向 1 和 2 号管加入 100 μl 缓冲液, 在冰箱中留置, 直至晚些时候。

[0195] 将管在暗处, 在 4°C 下温育 1 小时, 加入 1ml PBS<sub>AB</sub>, 并如上所述离心。在该清洗中

包括 1 号管。移除上清液,并向 6 号管加入 100  $\mu$ l 偶联物,在暗处和 4 $^{\circ}$ C 下进一步温育 1 小时。

[0196] 向 1、3、4 和 5 号管加入 150  $\mu$ l 0.5% 甲醛,在冰箱中储存直至测量 (~ 2 小时)。如前所述清洗 6 号管,并向该管加入甲醛。测量前 30 分钟,向 2 号管加入 100  $\mu$ l 碘化丙啶,在测量前向所有样品加入 1ml PBS。

[0197] 对照细胞系没有显示出任何抗 CEA 抗体的特异性结合 (图 11a 至 j)。绵羊抗体存在轻微的非特异性结合抗体 (图 11h)。图 11a 至 11j 中每个的第一张图 (即图 11a、11c、11e、11g 和 11i) 是对照,其不应该在样品之间显示出任何差异。

[0198] CCL 229 细胞与阴性对照细胞系相比显示出略微更高的自身荧光 (图 12b)。CPG2 对照不与细胞系结合 (图 12d),然而在表达 CEA 的细胞系中存在两种细胞群体,一种呈递表面蛋白 CEA,另一种不呈递。使用所有三种抗 CEA 抗体组合时都显示出这种现象 (图 12f、12h 和 12j)。

#### [0199] 参考文献

[0200] 1) M. P. Napier, S. K. Sharma, C. J. Springer, K. D. Bagshawe, A. J. Green, J. Martin, S. M. Stribbling, N. Cushen, D. O' Malley 和 R. H. J. Begent, 抗体导向的酶前体药物疗法: 在结肠直肠癌中的效能和作用机制 (Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy: Efficacy and Mechanism of Action in Colorectal Carcinoma), *Clinical Cancer Research* 2000, 6:765-772. (作为现有技术的抗体清除剂的参考)

[0201] 2) Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ, 使用肽合成探测病毒抗原的表位至单个氨基酸的分辨率 (Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid), *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1984, 81:3998-4002.

[0202] 3) Meloen RH, Puijk WC, Schaaper WMM, 通过 PEPSCAN 进行表位作图 (Epitope mapping by PEPSCAN), 《免疫学方法手册》(Immunology Methods Manual), Iwan Lefkovits 主编, 1997, Academic Press, pp 982-988.

[0203] 4) Connors TA 和 Knox RJ, *Stem Cells* 1995; 13:501-511.

[0204] 本发明不限于本文描述的具体实施方案的范围。事实上,对于本技术领域的专业人员来说,除了本文所描述的之外,从上面的描述和附图可以明显看出本发明的各种修改方案。这样的修改方案打算涵盖在随附的权利要求书的范围之内。此外,本文描述的所有实施方案被认为是广泛适用的,并且如果适合,可以与任何和所有其他相容的实施方案组合。

[0205] 在本文中引用了各种出版物,其公开内容以其全文引为参考。

[0001]

## 序列表

<110> 莫洛迪克有限公司

<120> 肽清除剂

<130> P109133W000

<150> GB0916749.5

<151> 2009-09-23

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthesised peptide

<220>

<221> S

<222> (1).. (1)

<223> S may be glycosylated

<220>

<221> X

<222> (3).. (3)

<223> X = amino-naphthoic acid

<400> 1

Ser Ala Xaa Glu

1

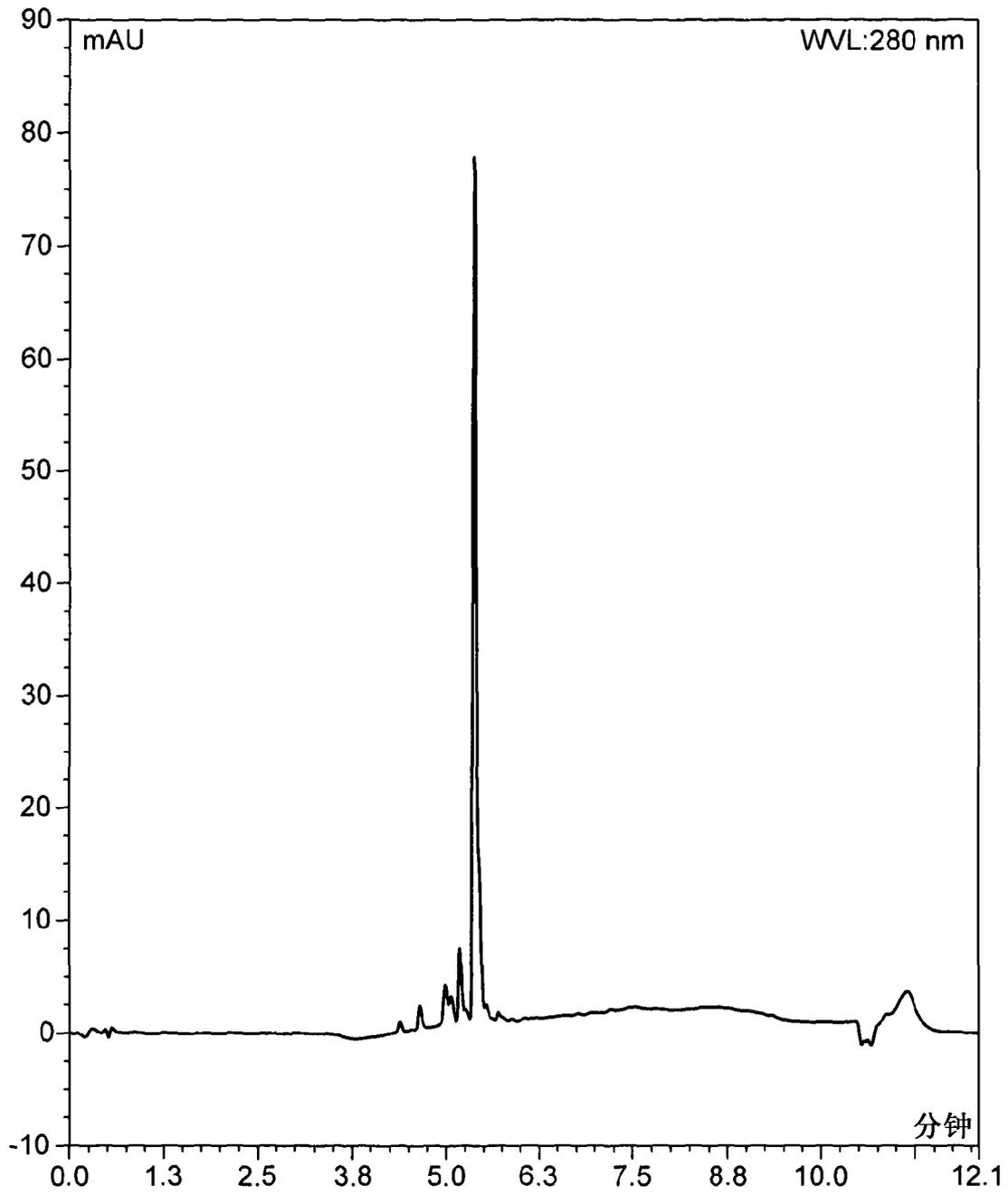


图 1

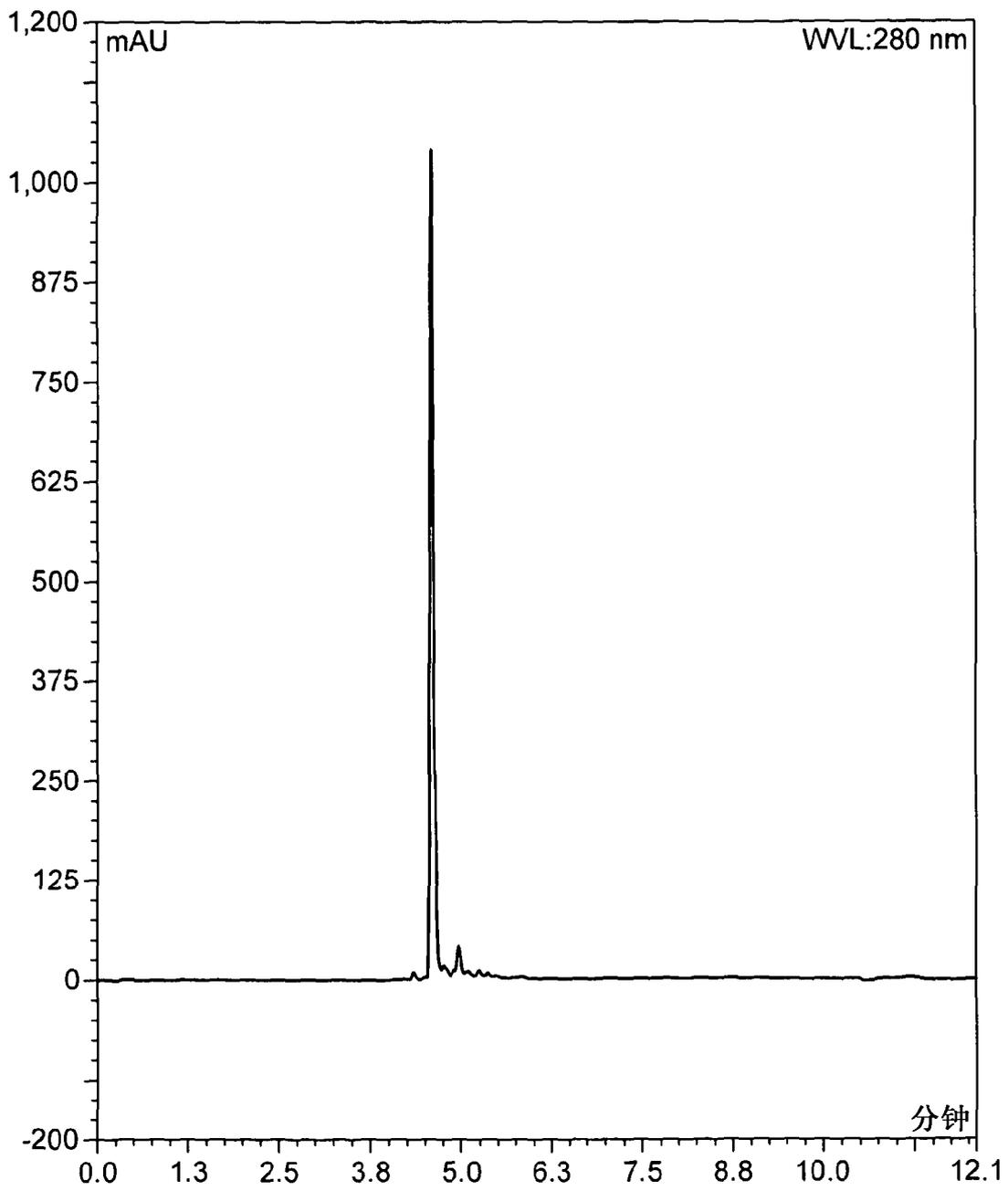


图 2

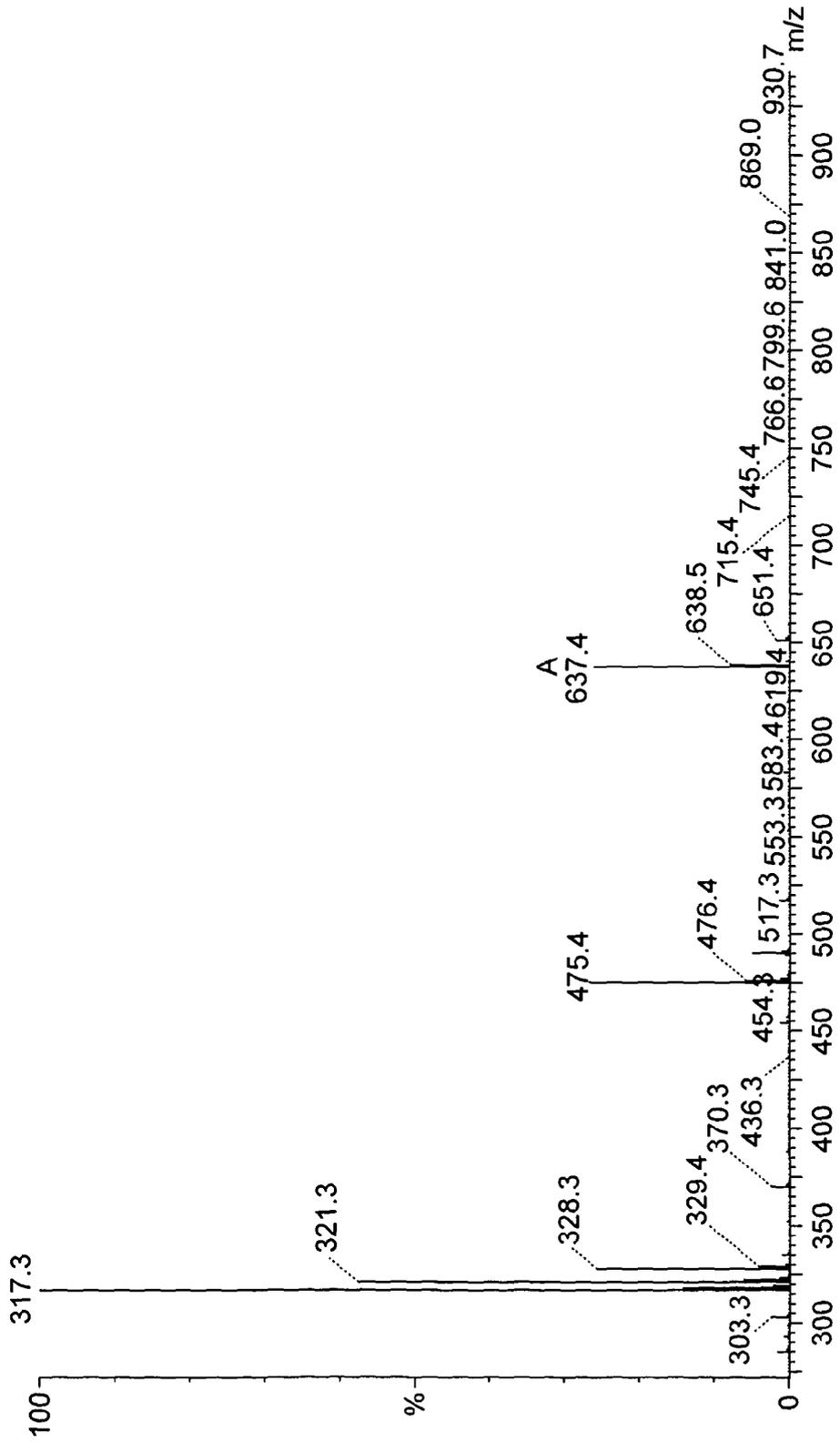


图 3

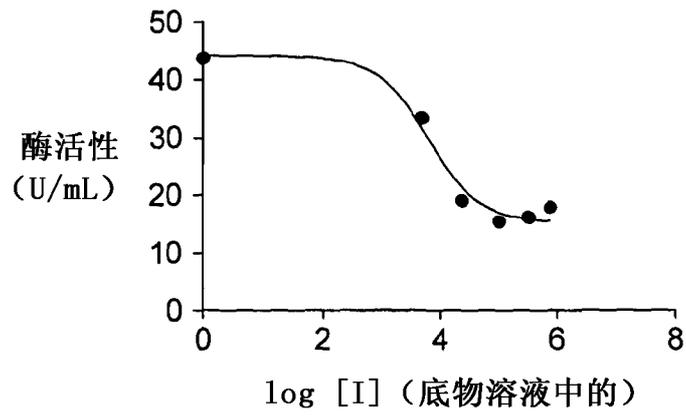


图 4

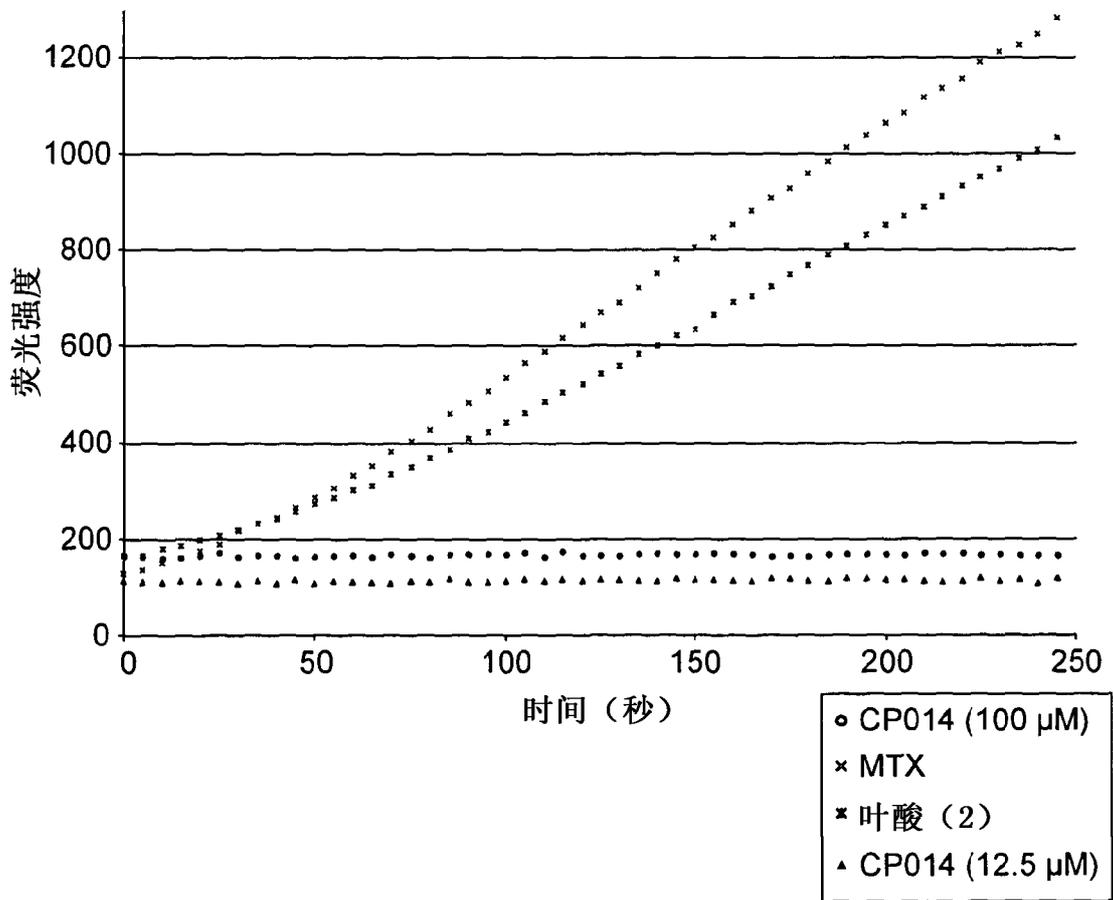


图 5

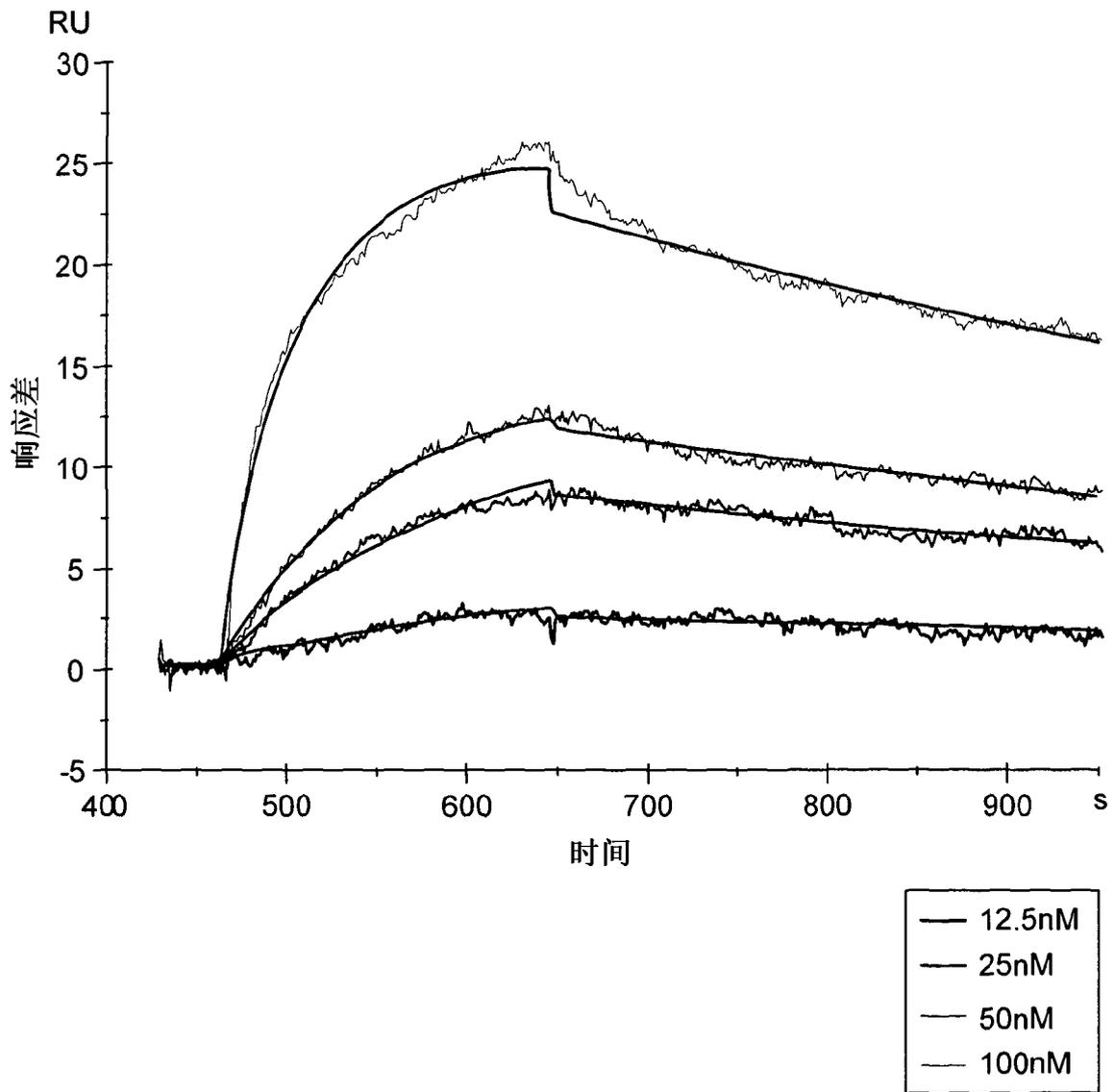


图 6a



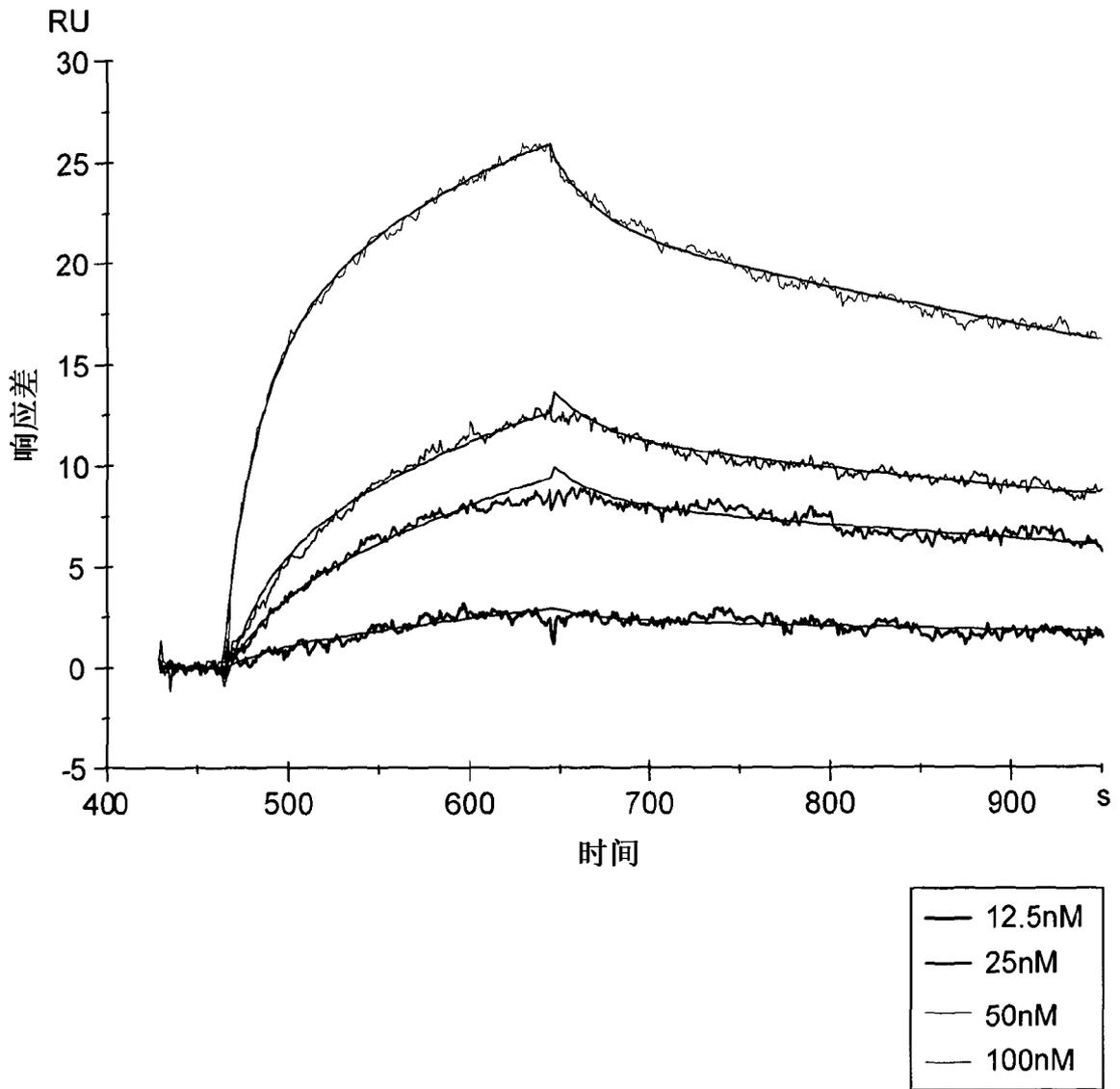


图 6c

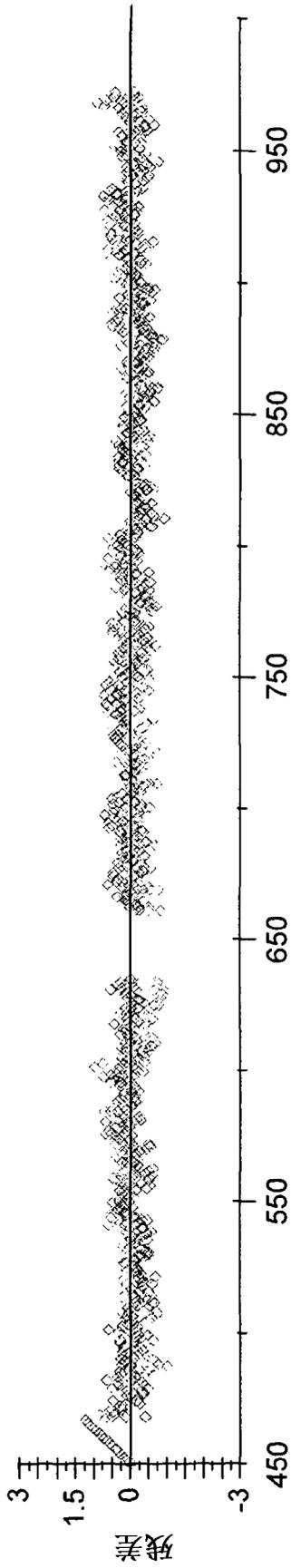


图 6d

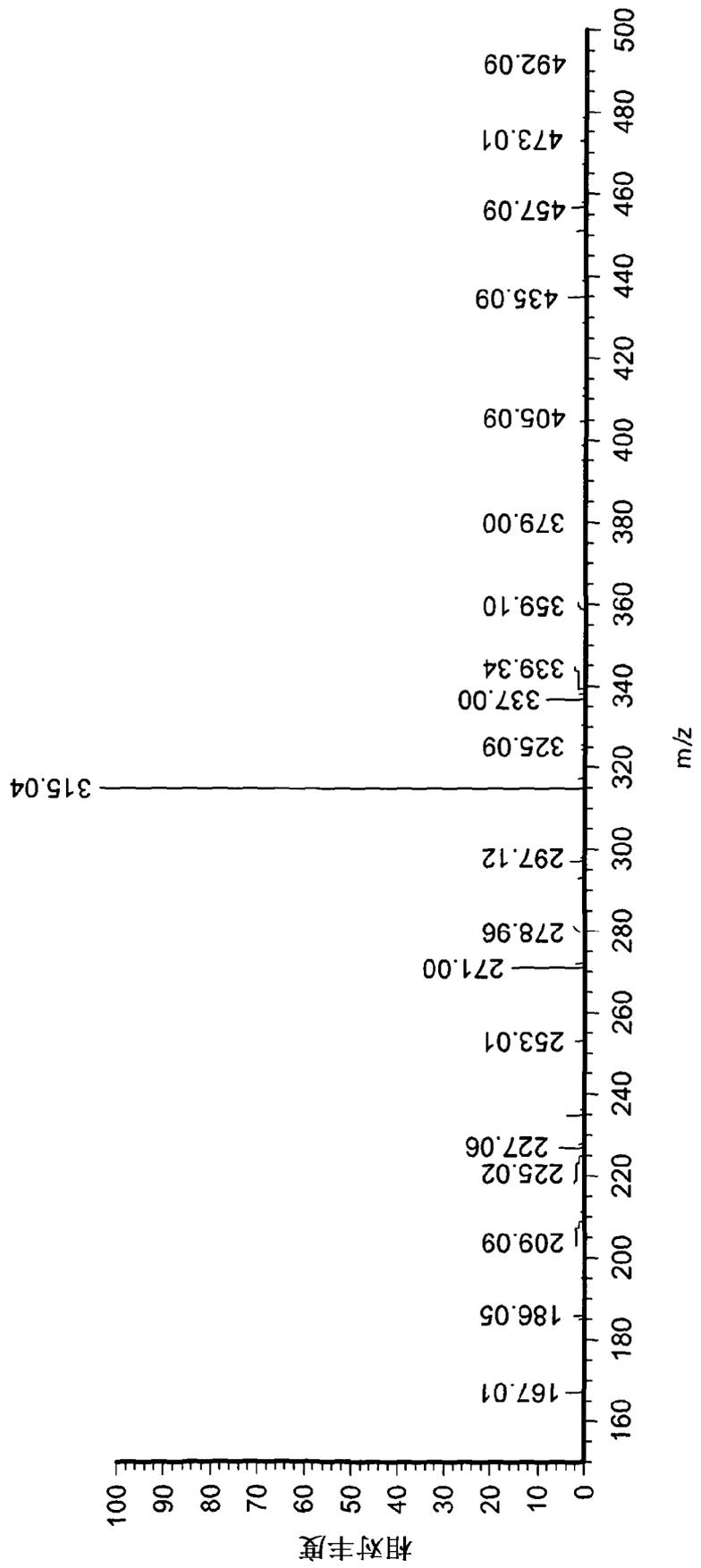


图 7

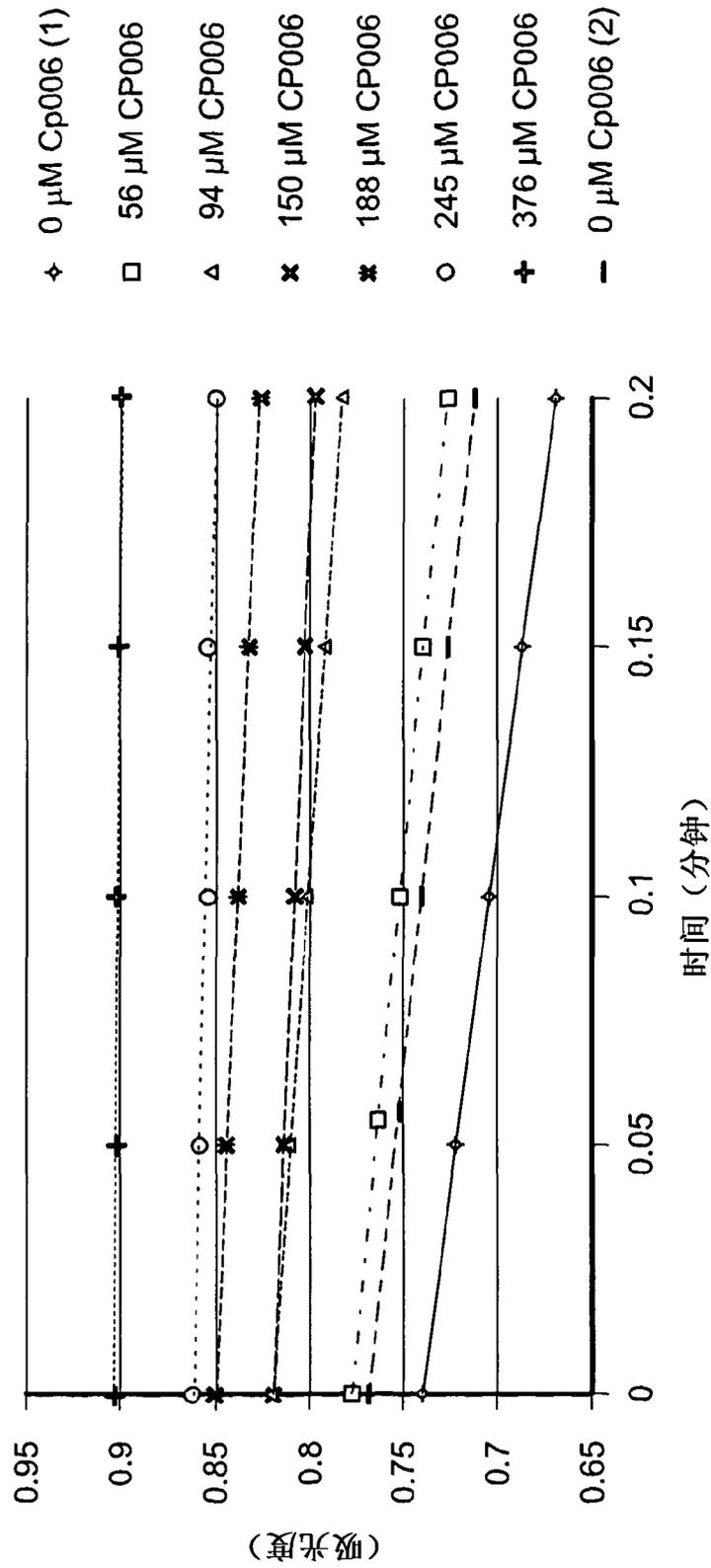


图 8

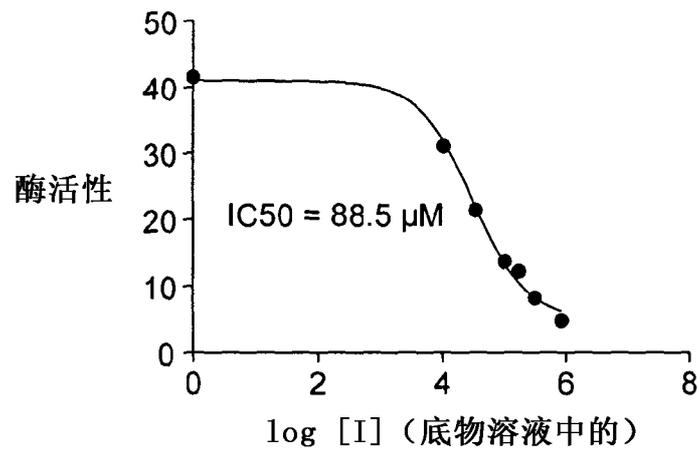


图 9

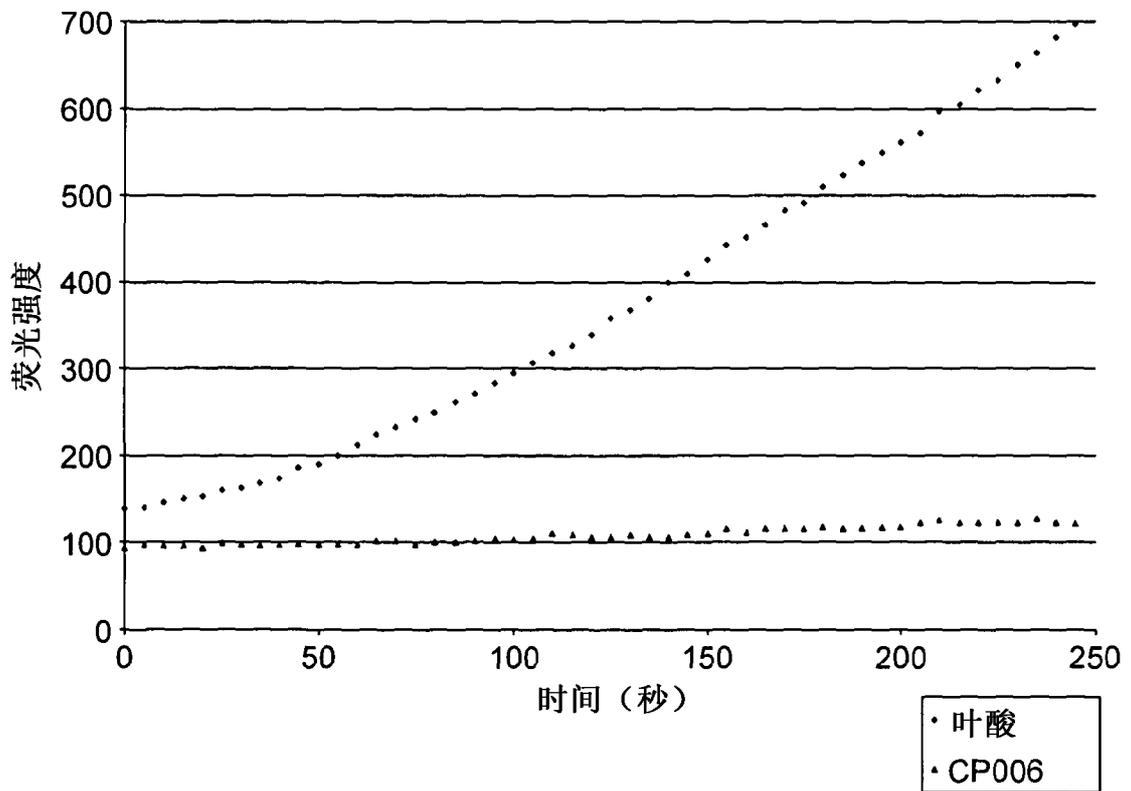


图 10

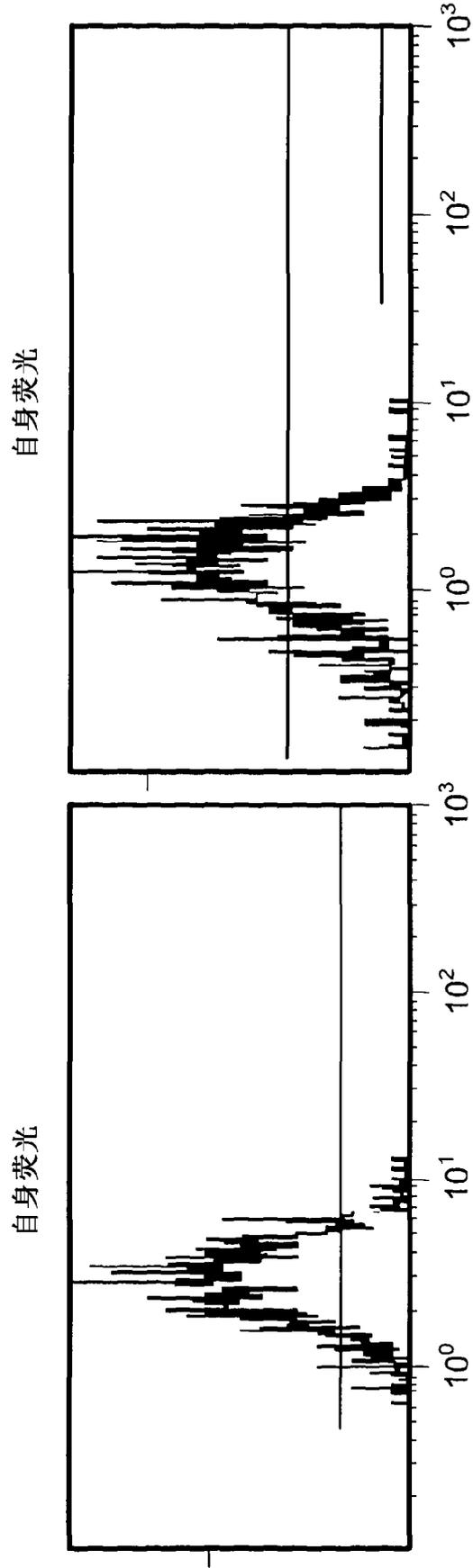


图11b

图11a

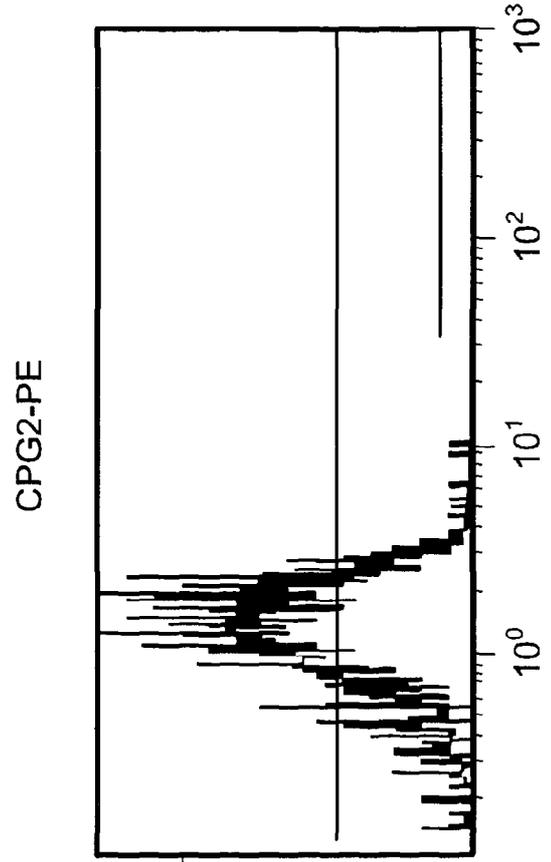


图11d

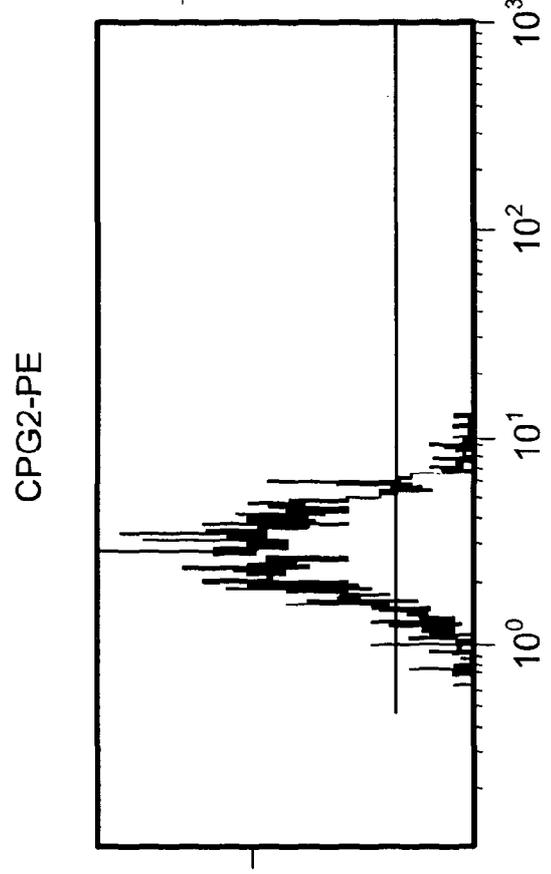


图11c

ssFV抗CEA抗体-CP-PE

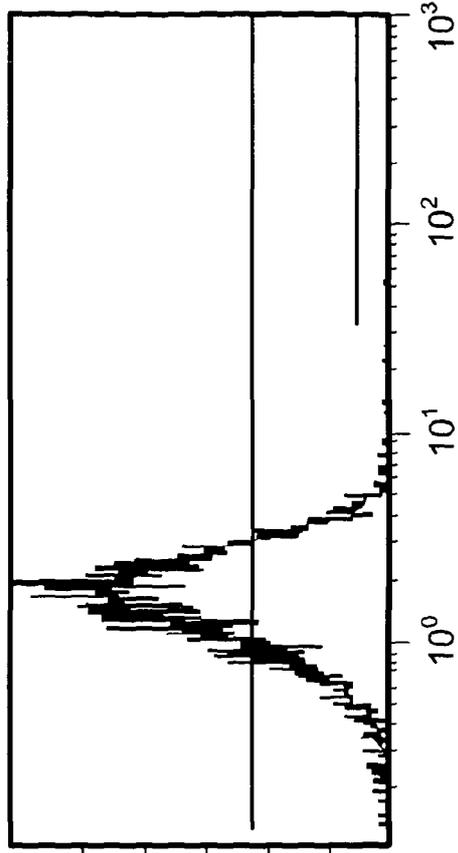


图11f

ssFV抗CEA抗体-CP-PE

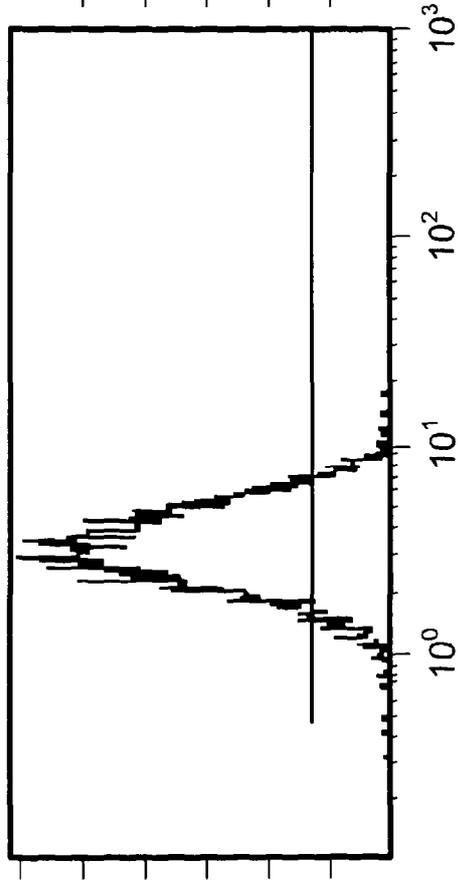


图11e

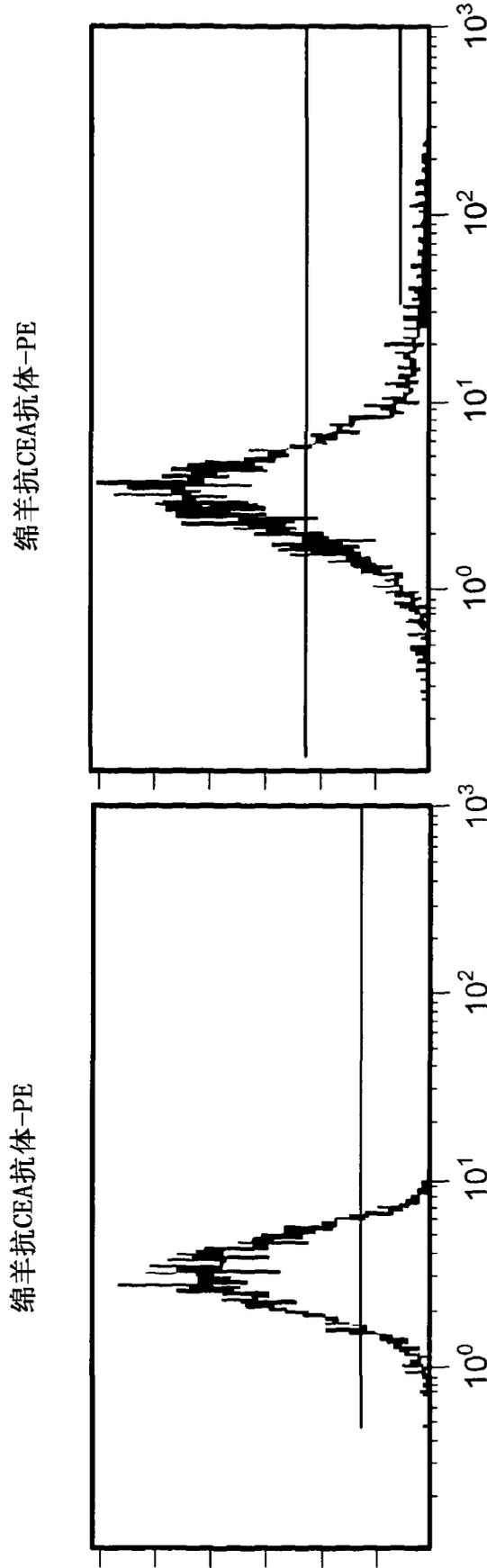
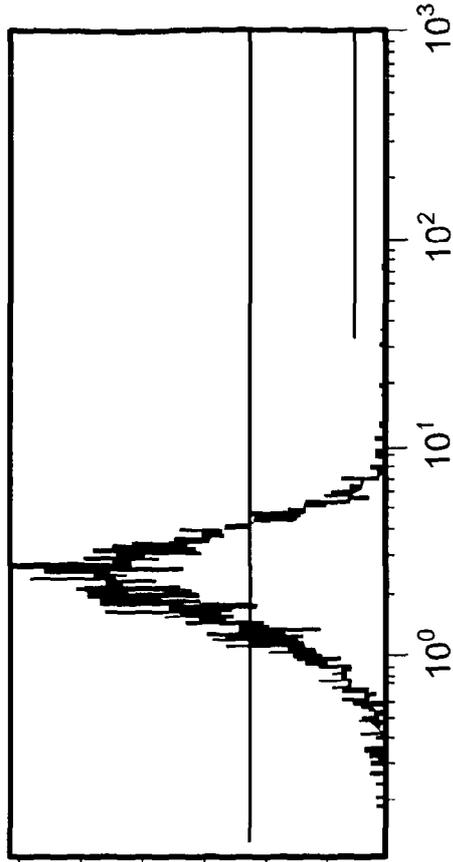


图11h

图11g

A5B5抗CEA抗体+山羊抗小鼠抗体-PE



A5B5抗CEA抗体+山羊抗小鼠抗体-PE

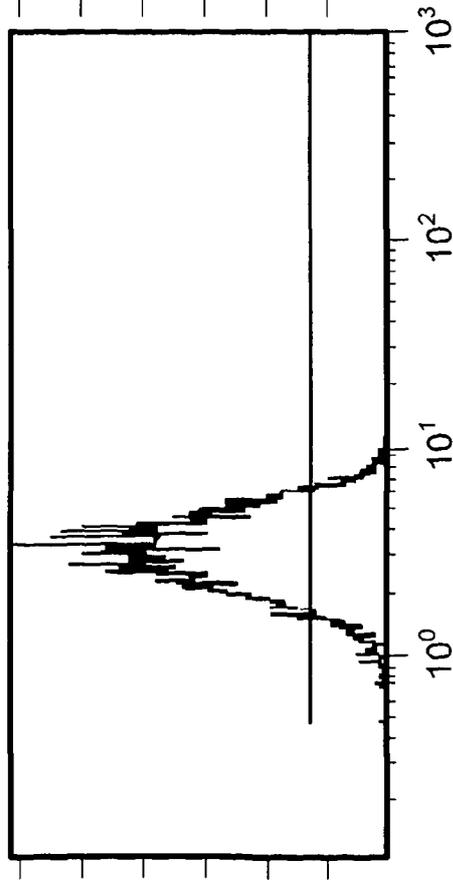


图11j

图11i

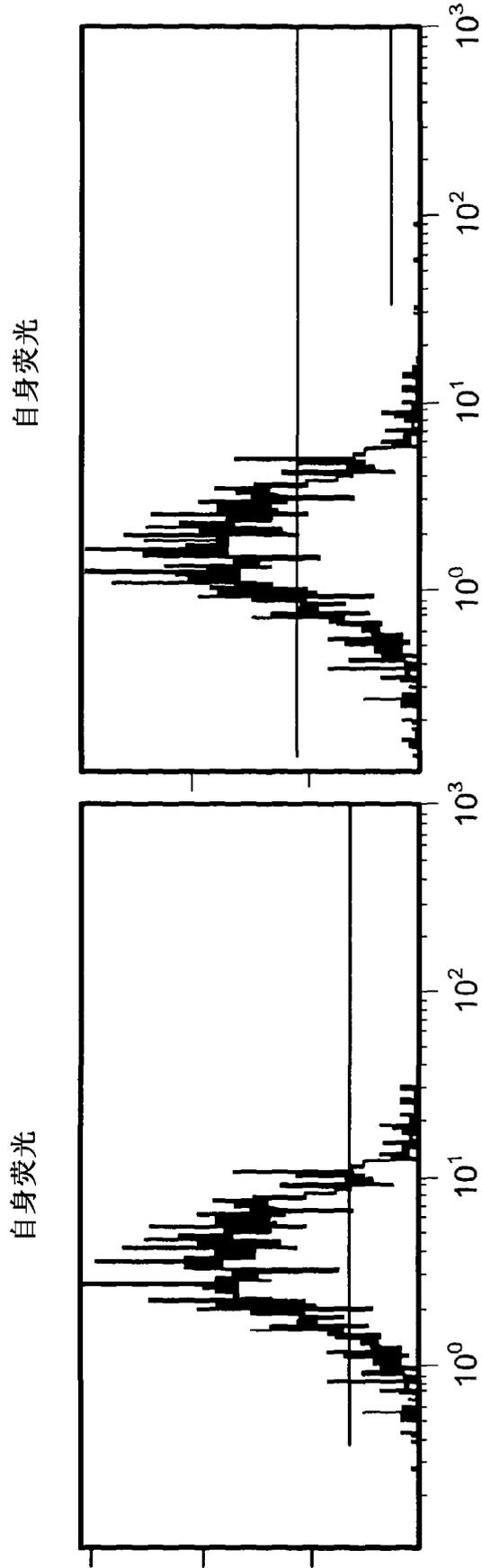


图12b

图12a

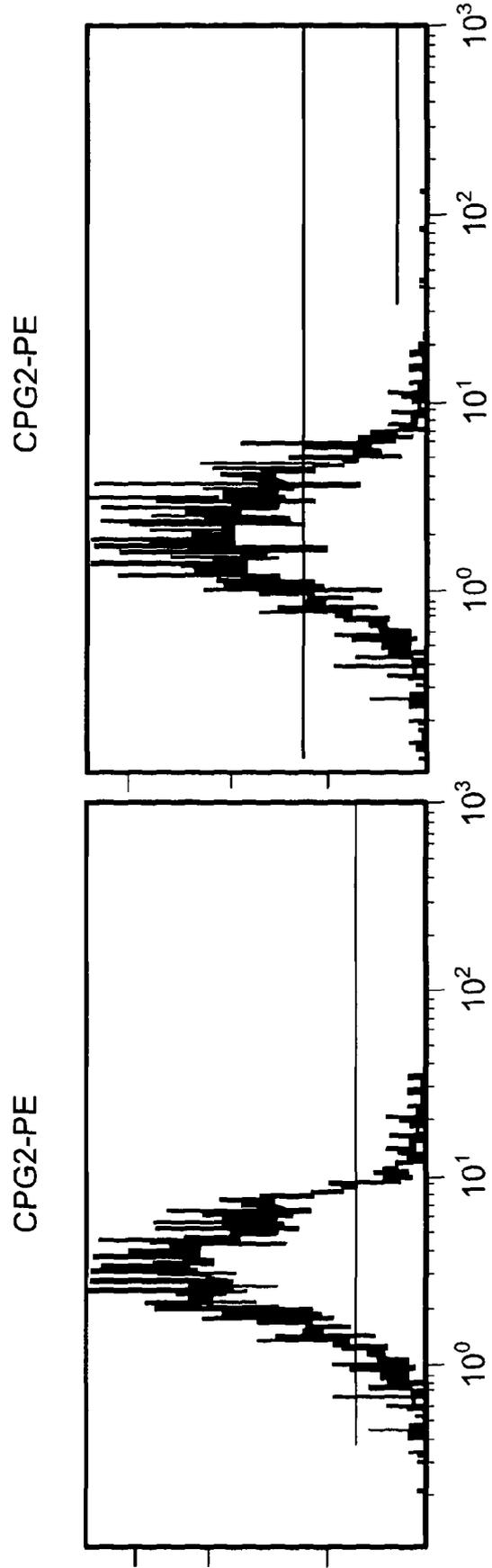


图12d

图12c

ssFV抗CEA抗体-CP-PE

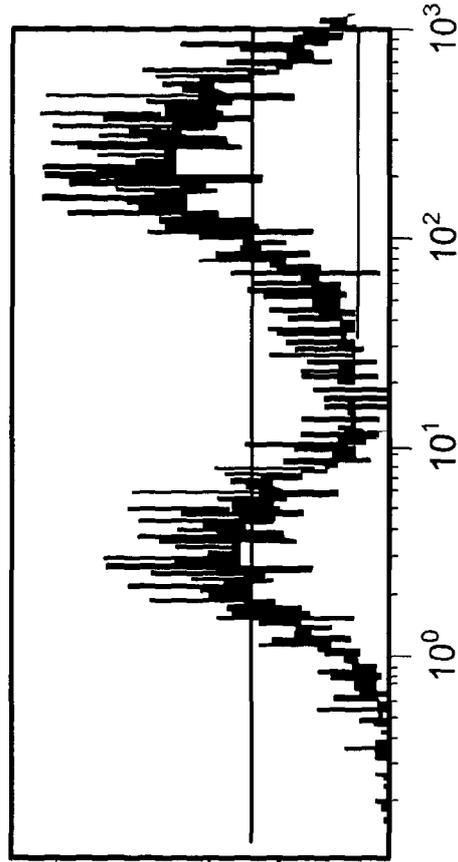


图12f

ssFV抗CEA抗体-CP-PE

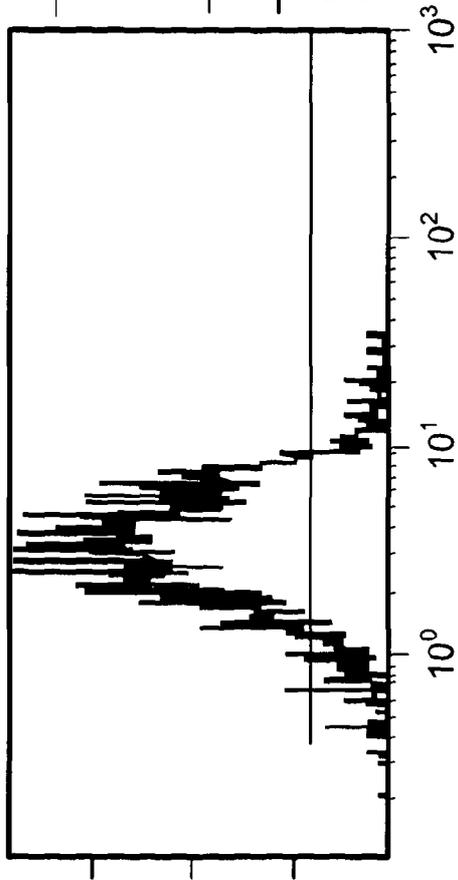
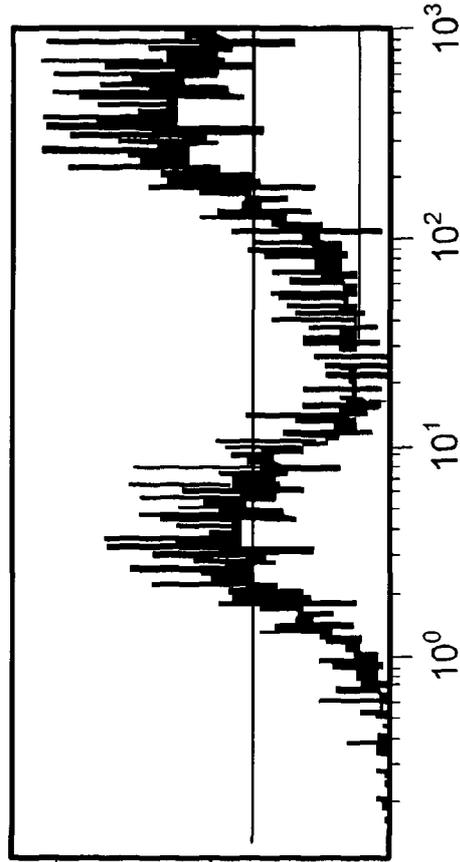


图12e

绵羊抗CEA抗体-PE



绵羊抗CEA抗体-PE

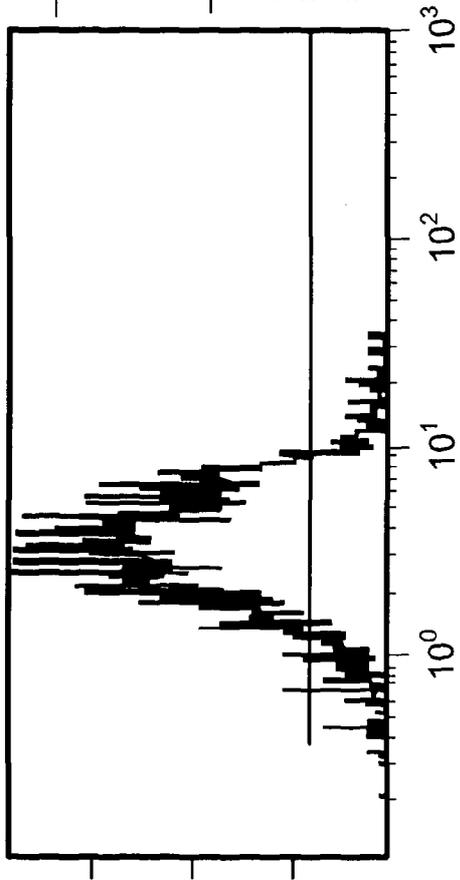
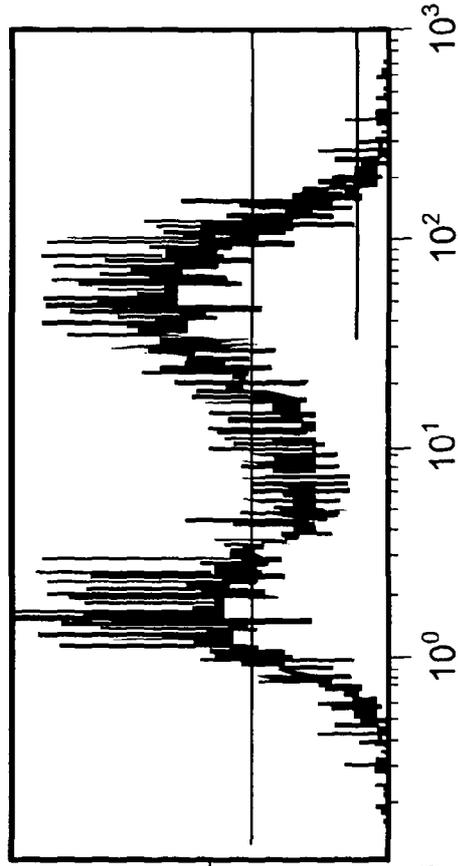


图12h

图12g

A5B5抗CEA抗体+山羊抗小鼠抗体-PE



A5B5抗CEA抗体+山羊抗小鼠抗体-PE

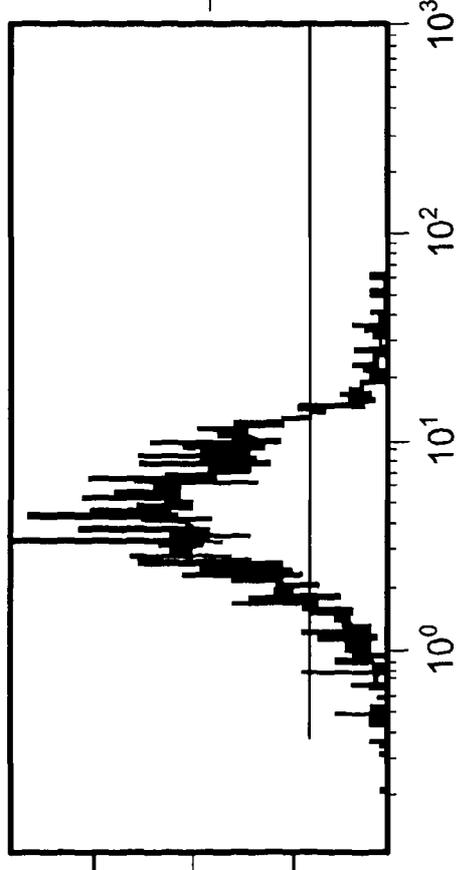


图12j

图12i