(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104334576 B
(45)授权公告日 2019.02.19

(21)申请号 201380029560.3

(22)申请日 2013.05.31

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104334576 A

(43)申请公布日 2015.02.04

(30)优先权数据
61/655,143 2012.06.04 US
61/777,430 2013.03.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.12.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/043684 2013.05.31

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/184514 EN 2013.12.12

(73)专利权人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 B·H·盖尔斯坦格尔
J·格鲁内瓦尔德 B·布尔苏拉亚

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 黄革生 刘金辉

(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
C07K 16/32(2006.01) (续)

(56)对比文件
WO 2007041689 A2,2007.04.12,
ZHOU ZHE et al.Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases.《ACS CHEMICAL BIOLOGY》.2007,第2卷(第5期),337-346.
YIN J et al.Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase.《PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES》.2005,第102卷(第44期),15815-15820.
YIN JUN et al..Site-specific protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase.《NATURE PROTOCOLS》.2006,第1卷(第1期),280-285.
ZHE ZHOU et al.An eight residue fragment of an Acyl carrier protein suffices for post-translational introduction of fluorescent pantetheinyl arms in protein modification in vitro and in vivo.《JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY》.2008,第130卷(第30期),9925-9930.

审查员 滕文静

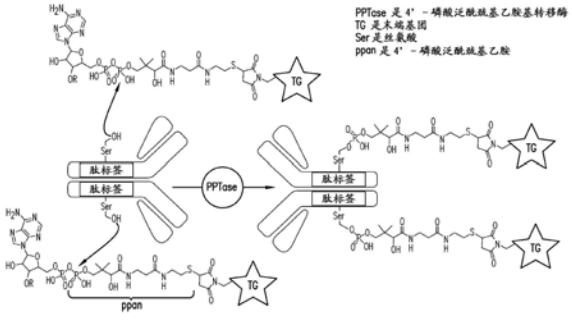
权利要求书15页 说明书235页 附图52页

(54)发明名称

位点特异性标记方法及由此产生的分子

(57)摘要

本发明公开内容提供了位点特异地标记抗体的方法,该方法使用具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的蛋白,所述蛋白催化并入目标抗体的一个或多个特异性位点的肽序列("肽标签")的翻译后修饰。酶促标记使得能够进行并入抗体的肽标签内特定丝氨酸残基的定量和不可逆的共价修饰,从而生产所需的抗体缀合物。



CN 104334576 B

[转续页]

[接上页]

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C07K 7/08(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

C12N 9/10(2006.01)

1.修饰的抗体或其片段,其包含至少一种肽标签,所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,且位于所述抗体或其片段的结构环内,其中所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp、AcpS、海栖热袍菌(T.maritime)PPTase、人PPTase或其保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的突变体或同源物形式;并且其中至少一种肽标签选自序列

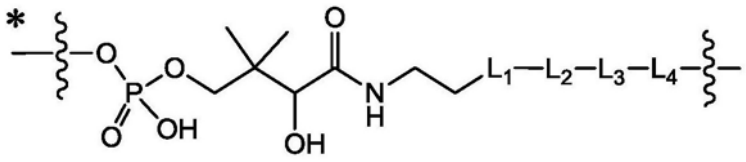
GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10),或

DSLDMLEWSL(SEQ ID NO:1132),其中肽标签插入亲本抗体或其片段的CH1结构域的氨基酸残基119和120之间,或氨基酸残基120和121之间,或氨基酸残基135和136之间,或氨基酸残基136和137之间,或氨基酸残基138和139之间,或氨基酸残基162和163之间,或氨基酸残基164和165之间,或氨基酸残基165和166之间,或氨基酸残基194和195之间,或氨基酸残基195和196之间;或肽标签插入亲本抗体或其片段的CH3结构域的氨基酸残基388和389之间,其中氨基酸根据EU编号系统进行编号。

2.权利要求1的修饰的抗体或其片段,其中所述抗体包含SEQ ID NO:126,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:130,SEQ ID NO:131,SEQ ID NO:132,SEQ ID NO:149,SEQ ID NO:151,SEQ ID NO:152,SEQ ID NO:157,SEQ ID NO:158,SEQ ID NO:160,SEQ ID NO:166,SEQ ID NO:168,SEQ ID NO:169,SEQ ID NO:178,SEQ ID NO:179,SEQ ID NO:250,SEQ ID NO:251,SEQ ID NO:256,SEQ ID NO:257,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:265,SEQ ID NO:267,SEQ ID NO:268,SEQ ID NO:277,SEQ ID NO:278,SEQ ID NO:356,SEQ ID NO:358,SEQ ID NO:359,SEQ ID NO:364,SEQ ID NO:365,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:371,SEQ ID NO:373,SEQ ID NO:374,SEQ ID NO:380,或SEQ ID NO:381。

3.权利要求1-2中任一项的修饰的抗体或其片段,其中抗体或其片段是人或人源化的抗体或其片段;或抗体或其片段是选自IgG,IgM,IgE和IgA的同种型;或其中抗体或其片段是选自IgG1,IgG2,IgG3和IgG4的IgG的亚型;或其中抗体或其片段是抗HER2抗体或抗HER2抗体片段。

4.免疫缀合物,其包含权利要求1-3中任一项的修饰的抗体或片段,以及末端基团;其中所述末端基团通过具有根据式(I-b)的结构的接头附着于修饰的抗体或抗体片段:



式(I-b)

其中:

L_1是键、非酶促可切割的接头、非可切割的接头;酶促可切割的接头、光稳定的接头或光可切割的接头;

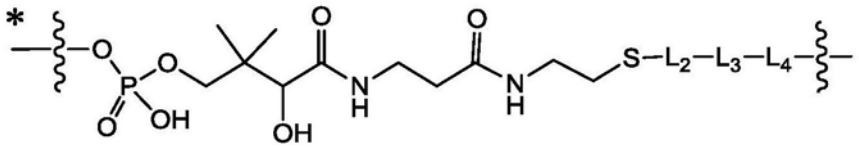
L_2是键、非酶促可切割的接头,非可切割的接头;酶促可切割的接头、光稳定的接头或光可切割的接头;

L_3是键、非酶促可切割的接头、非可切割的接头;酶促可切割的接头、光稳定的接头或光可切割的接头;

L_4是键、非酶促可切割的接头、非可切割的接头;酶促可切割的接头、光稳定的接头、光可切割的接头或自消间隔子,

*表示在此处4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签，

并且其中末端基团是药物部分，亲和探针，螯合剂，光谱探针，放射性探针，成像试剂，脂质分子，聚乙二醇，聚合物，纳米颗粒，量子点，脂质体，PLGA颗粒，多糖，乙酰基，或表面；或接头具有根据式(1-c)的结构：



式 (I-c)，

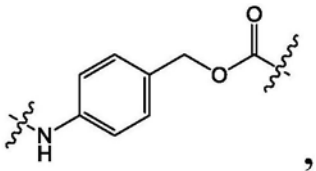
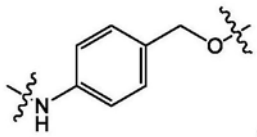
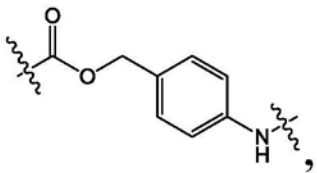
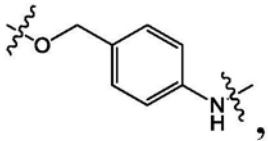
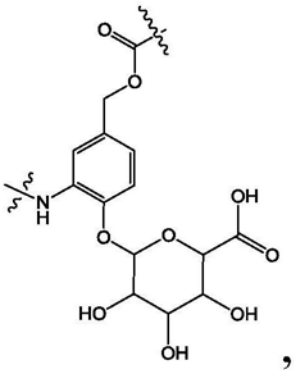
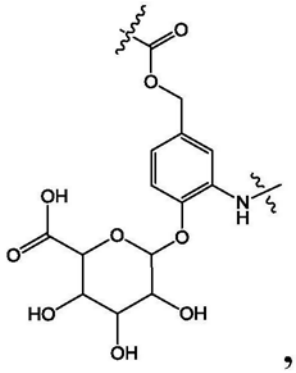
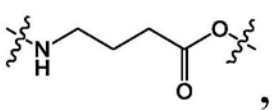
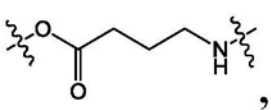
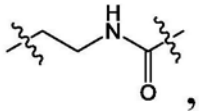
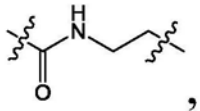
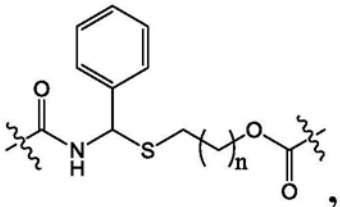
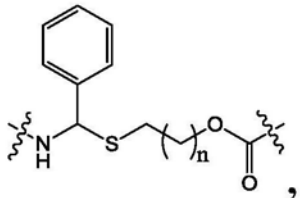
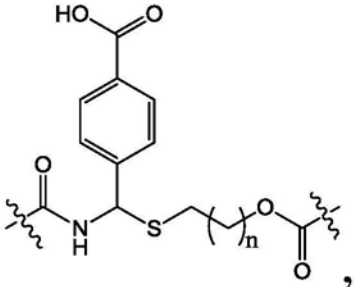
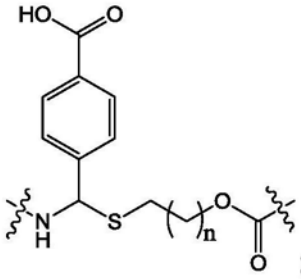
其中

L_1是$-A_1X^2-$或$-X^2-$；

L_2是键，$-A_2-$，或$-A_2X^2-$；

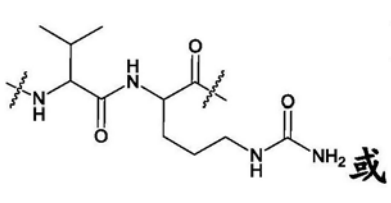
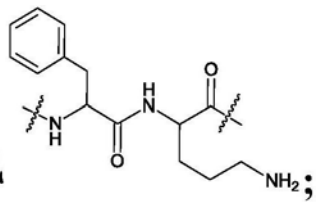
L_3是键，$-A_3-$，或$-A_3X^2-$；

L_4是键，$-A_4-$，$-A_4X^2-$，

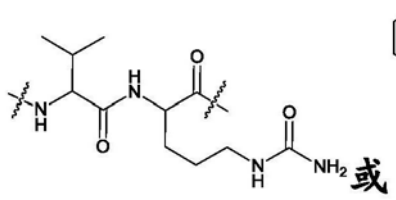
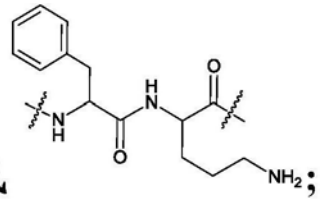

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，**或**

；

A_1是-C(=O)NH-,-NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_n$O)$_m$$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,或-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-;

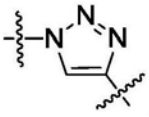
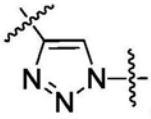
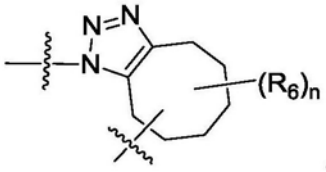
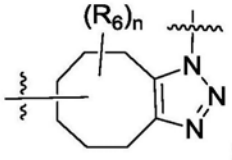
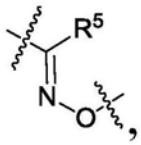
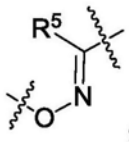
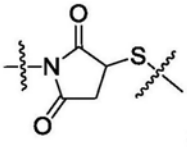
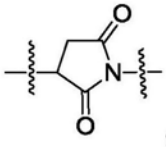
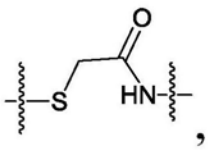
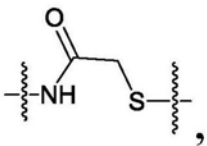
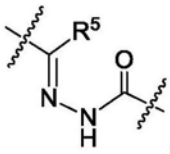
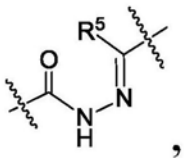
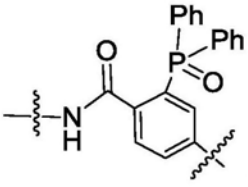
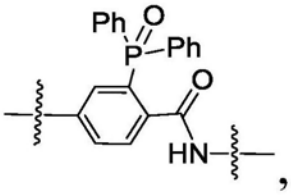
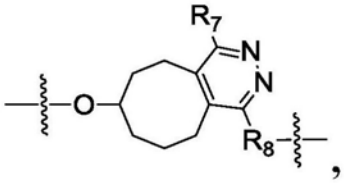
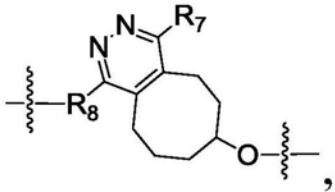
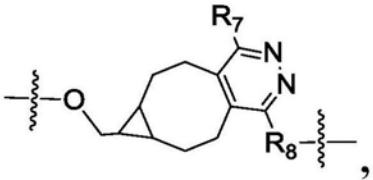
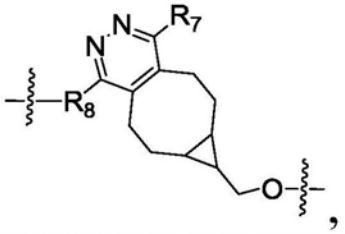
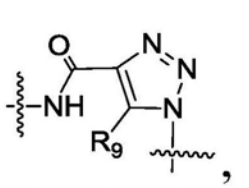
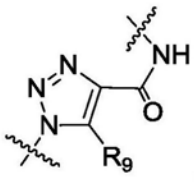
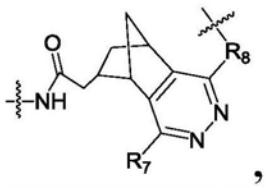
A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)$NR^4$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$S-,-$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH-,-$(C(R^4)_2)_n$NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$OC(=O)NH$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$OC(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_n$O)$_m$$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,

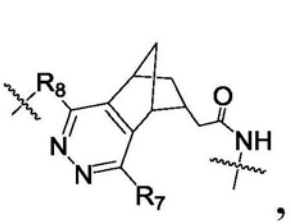
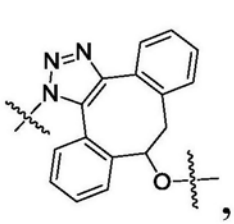
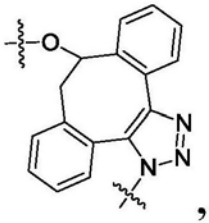
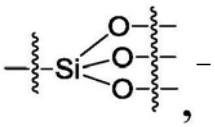

或

;

A_3是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$S-,-$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$OC(=O)NH$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$OC(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$OC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$OC(=O)-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$C(=O)-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,


或

；

A_4是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)-,-$(CH_2)_n$(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH(($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NH(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,或-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-；

每个X^2独立地选自键,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,




-S-,-Si(OH)$_2$O-,-,

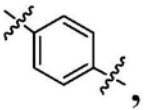
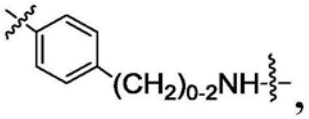
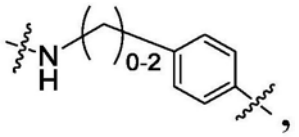
$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

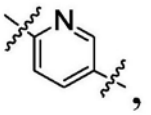
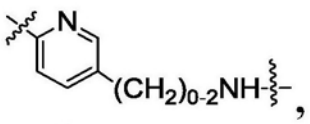
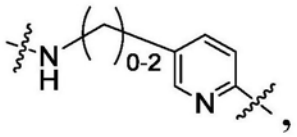
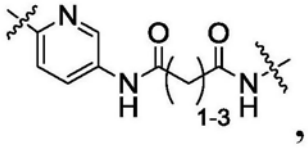
每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

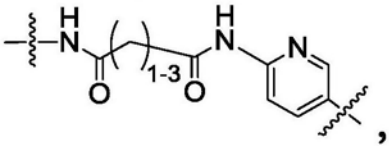
每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

R^8独立地选自,,,

,,,,

,

R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基;

每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,其中末端基团是选自抗炎剂,抗癌剂,抗真菌剂,抗细菌剂,抗寄生虫剂,抗病毒剂,麻醉剂,V-ATPase抑制剂,HSP90抑制剂,IAP抑制剂,mTor抑制剂,微管稳定剂,微管去稳定剂,阿里他汀,多拉司他汀,类美登素,MetAP(甲硫氨酸胺基肽酶),蛋白CRM1的核输出抑制剂,DPPIV抑制剂,在线粒体中磷酰基转移反应的抑制剂,蛋白合成抑制剂,CDK2抑制剂,CDK9抑制剂,Eg5抑制剂,HDAC抑制剂,DNA损伤剂,DNA烷基化剂,DNA嵌入剂,DNA小沟结合剂,蛋白酶体抑制剂,RNA聚合酶抑制剂,和DHFR抑制剂的部分;或其中末端基团选自荧光团,生色团,量子点,磁探针,放射性探针,成像试剂,对比试剂或亲和探针。

5.药物组合物,其包含有效量的权利要求4的免疫缀合物,或其可药用的盐,和可药用的稀释剂,运载体或赋形剂。

6.根据权利要求1-3中任一项的修饰的抗体或其片段,或根据权利要求4的免疫缀合物,其用作药物。

7.根据权利要求1-3中任一项的修饰的抗体或其片段,或根据权利要求4的免疫缀合物,其用于治疗癌症,炎性疾病或感染性疾病。

8.核酸,其编码权利要求1-3中任一项的修饰的抗体或其片段。

9.宿主细胞,其包含权利要求8的核酸。

10.生产权利要求4的免疫缀合物的方法,所述方法包括

(a)在合适的条件下孵育权利要求1-3中任一项的修饰的抗体或抗体片段、4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,和连接到CoA的末端基团或连接到CoA类似物的末端基团,从而促进形成包含抗体或抗体片段和末端基团的免疫缀合物,所述抗体或抗体片段与末端基团通过包含4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物的接头连接在一起;

b)i)在合适的条件下,用4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶和CoA或CoA类似物孵育权利要求1-7中任一项的抗体或抗体片段,从而将4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物附着至抗体或抗体片段,其中4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物包含官能团,

和

ii)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物与任选地连接末端基团的反应性基团反应,从而形成免疫缀合物,所述免疫缀合物包含通过接头连接在一起的抗体或抗体片段和末端基团,所述接头包含4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物;或

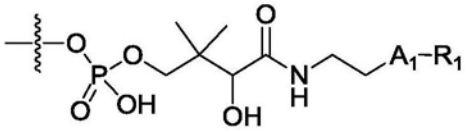
c)i)在合适的条件下,用4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶和CoA或CoA类似物孵育权利要求1-7中任一项的抗体或抗体片段,从而将4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物附着至抗体或抗体片段,其中4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物包含被保护的官能团;

ii)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物的被保护的官能团脱保护,

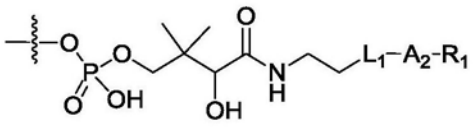
和

iii)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物的脱保护的官能团与任选地连接末端基团的反应性基团反应,从而形成免疫缀合物,所述免疫缀合物包含通过接头连接在一起的抗体或抗体片段和末端基团,所述接头包含4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物;其中所述合适的条件包括4℃至37℃之间的温度,以及pH 6.5至pH9.0。

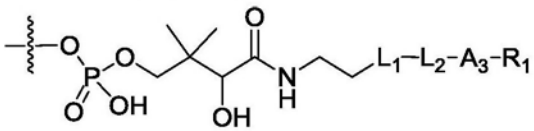
11.包含权利要求1-3中任一项的修饰的抗体或抗体片段的免疫缀合物,其中所述修饰的抗体或抗体片段中的肽标签的丝氨酸残基缀合到具有式(D-a)、式(E-a)、式(F-a)或式(G-a)的结构的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团:



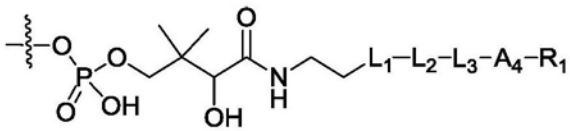
式 (D-a)



式 (E-a)



式(F-a)



式(G-a)

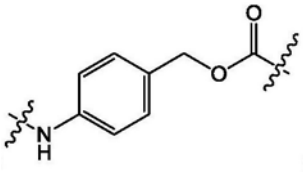
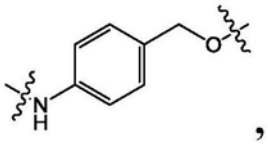
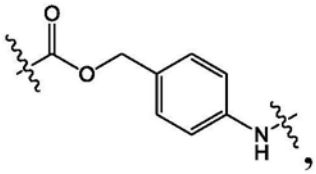
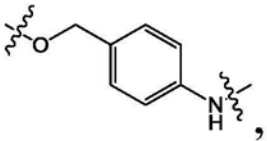
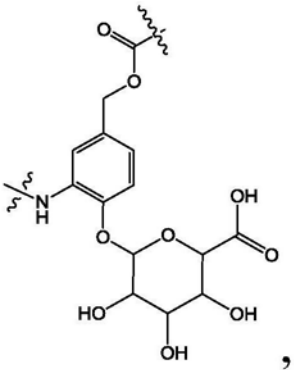
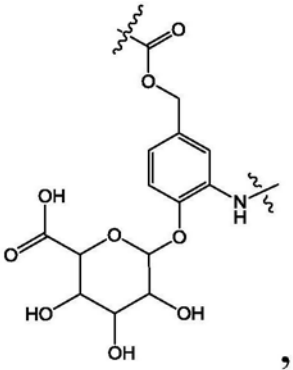
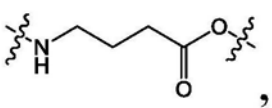
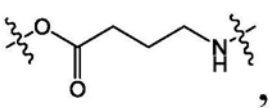
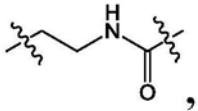
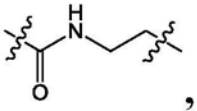
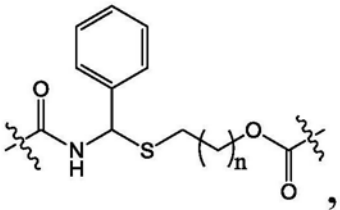
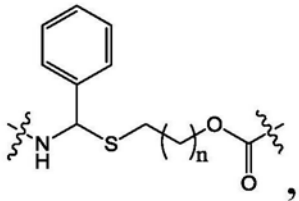
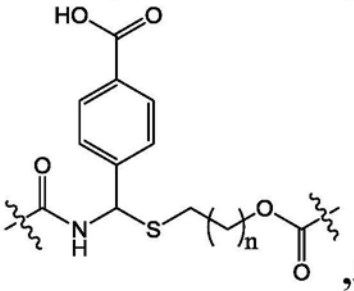
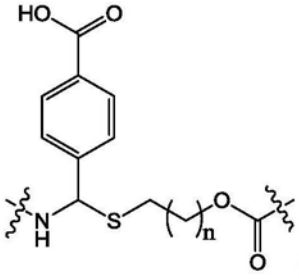
其中:

L_1是$-A_1X^2-$或$-X^2-$；

L_2是键，$-A_2-$，或$-A_2X^2-$；

L_3是键，$-A_3-$，或$-A_3X^2-$；

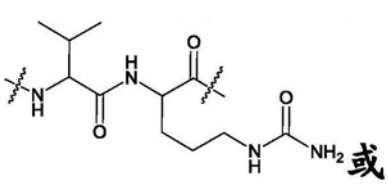
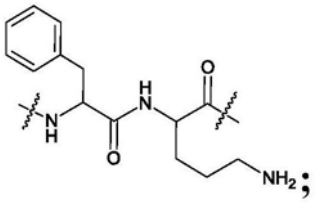
L_4是键，$-A_4-$，$-A_4X^2-$，


，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，

，或

；

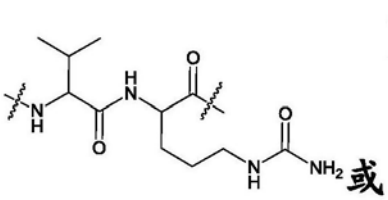
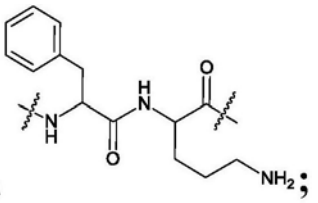
A_1是$-C(=O)NH-$，$-NHC(=O)-$，$-C(=O)NH(CH_2)_n-$，$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$，$-(O(CH_2)_n)_m-$，$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$，$-((CH_2)_nO)_m-$，$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$，$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$，$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$，$-(CH_2)_nC(=O)NH-$，$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$，$-(CH_2)_nNHC(=O)-$，$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$，$-NHC(=O)(CH_2)_n-$，$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$，$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$，$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$，$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$，$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$，$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$，$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$，$-C(=O)(CH_2)_n-$，$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$，$-(CH_2)_nC(=O)-$，$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$，$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$，$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$，$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$，$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$，$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$，$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$，$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$，或$-(O(C$

$(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-；

A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)$NR^4$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_n$S-,-$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH-,-$(C(R^4)_2)_n$NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$OC(=O)NH$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$OC(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,

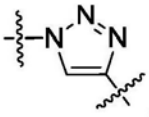
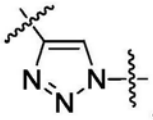
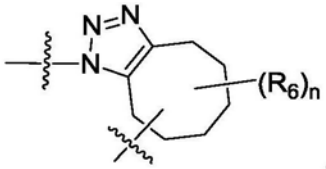
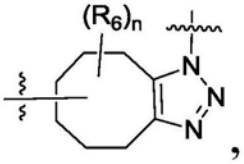
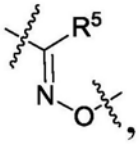
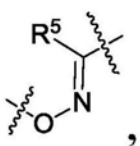
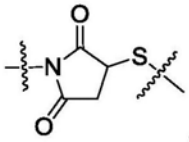
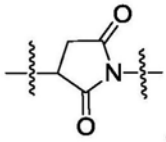
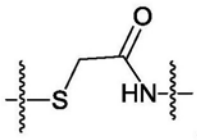
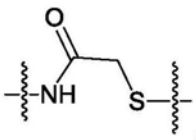
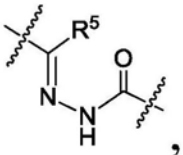
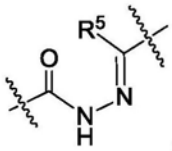
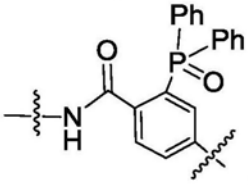
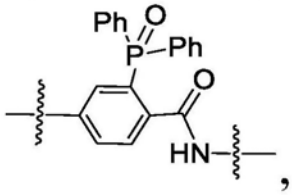
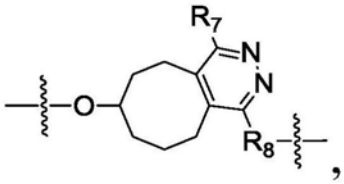
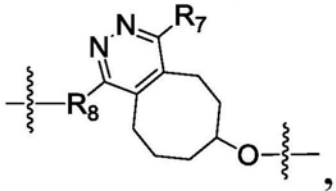
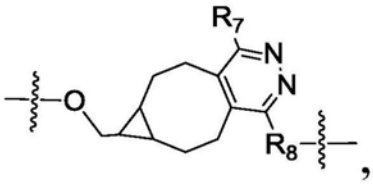
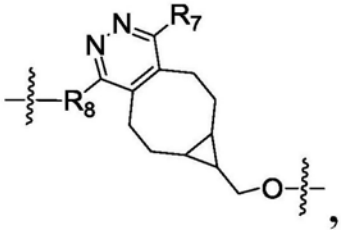
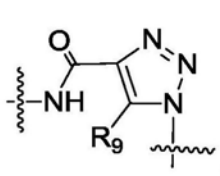
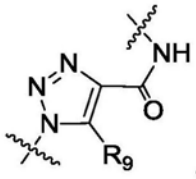
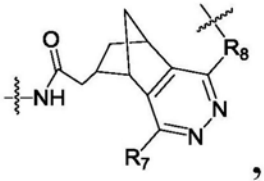
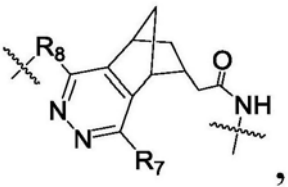
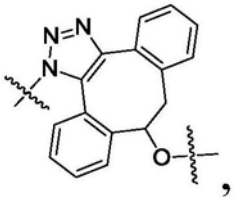
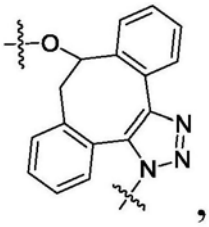
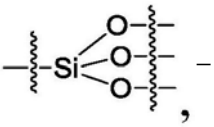

或

；

A_3是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_n$S-,-$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$OC(=O)NH$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$OC(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$OC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$OC(=O)-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$C(=O)-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC

(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,

或

；

A_4是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-

$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,或$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

每个X^2独立地选自键,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,-S-,$-Si(OH)_2O-$,,-

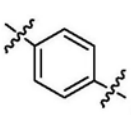
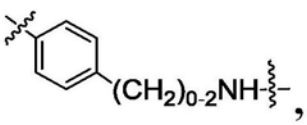
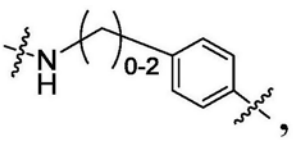
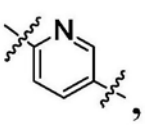
$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

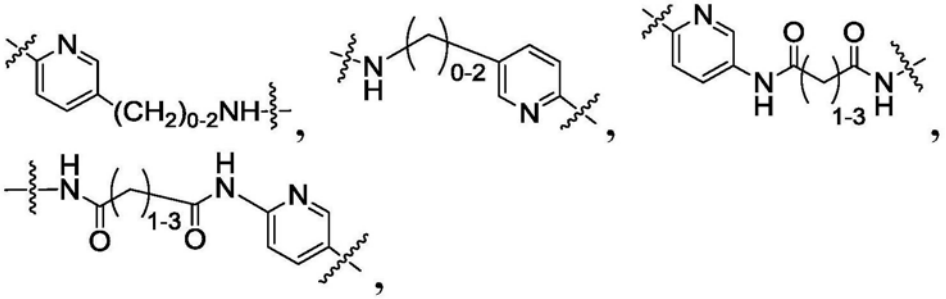
每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

R^8独立地选自,,,,



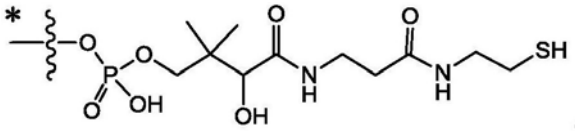
R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,

每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

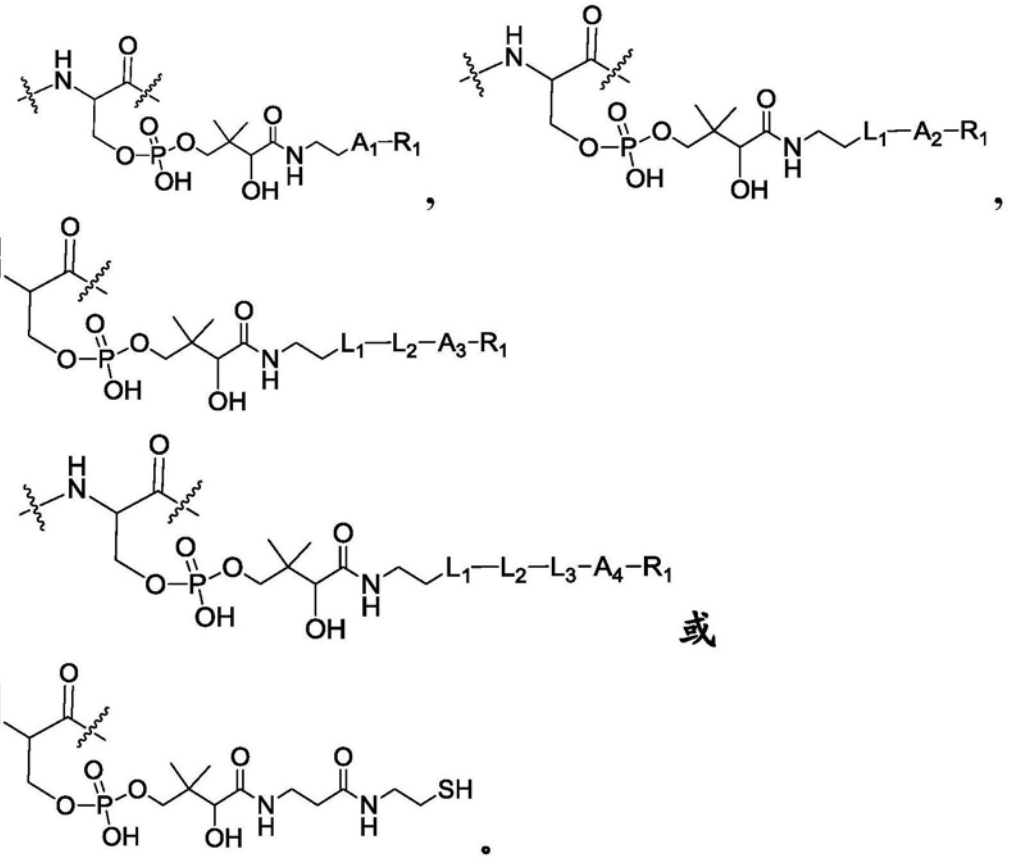
R^1是巯基,马来酰亚胺,卤代乙酰胺,炔烃,三芳基膦,环辛烯,氧杂降冰片二烯,叠氮化物,二芳基四嗪,降冰片烯,单芳基四嗪,羟胺,肼,NH_2-NH-C(=O)-,醛或酮。

12.权利要求11的免疫缀合物,其中4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团是



。

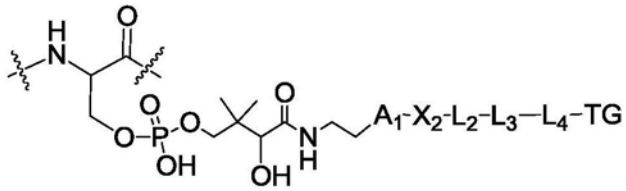
13.权利要求11的免疫缀合物,其中缀合的丝氨酸具有选自以下的结构:



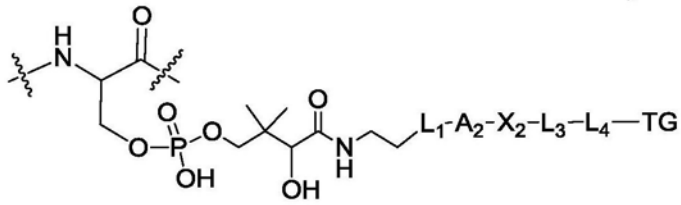
或

。

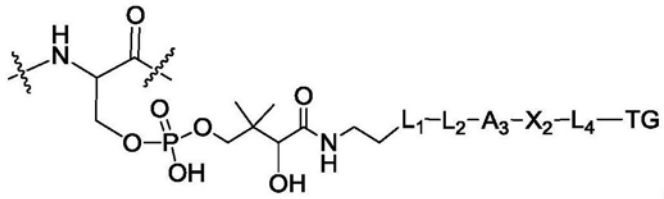
14.包含权利要求1-3中任一项的修饰的抗体或抗体片段的免疫缀合物,其中所述修饰的抗体或抗体片段中的肽标签的丝氨酸残基缀合到修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团,且具有选自以下的结构:



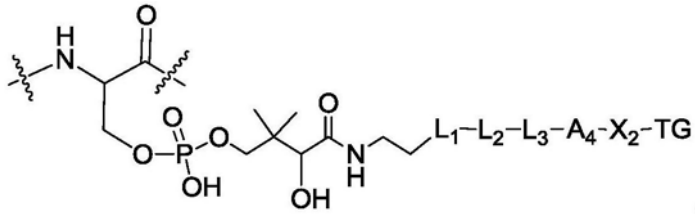
，



，



，和



其中

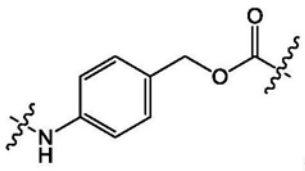
，

L_1是$-A_1X^2-$或$-X^2-$；

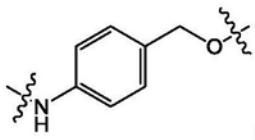
L_2是键，$-A_2-$，或$-A_2X^2-$；

L_3是键，$-A_3-$，或$-A_3X^2-$；

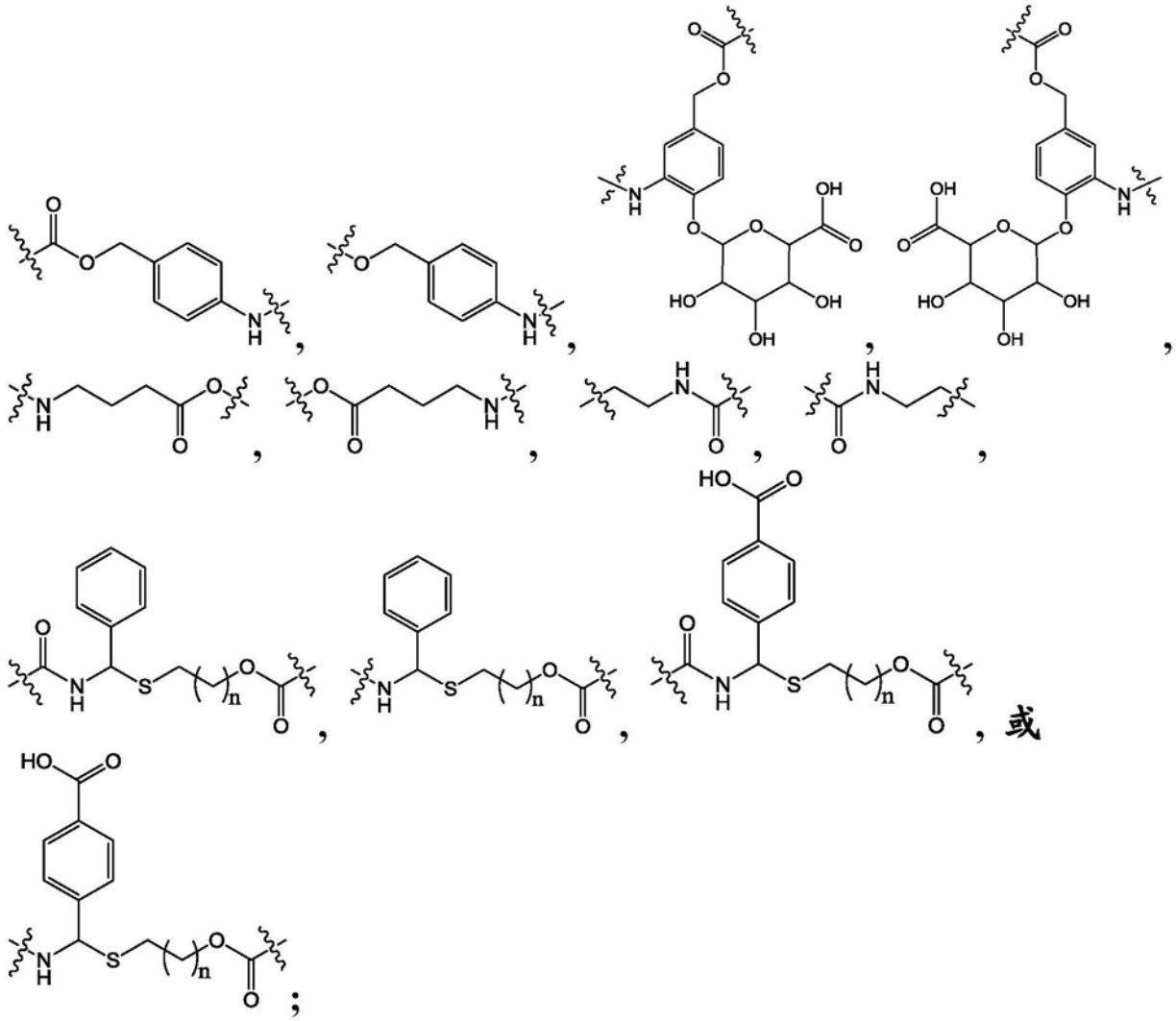
L_4是键，$-A_4-$，$-A_4X^2-$，



，



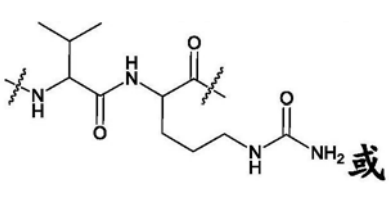
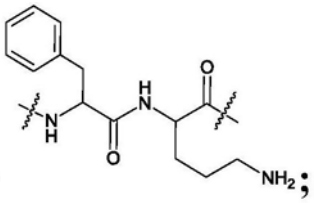
，



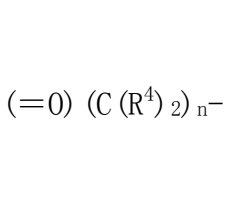
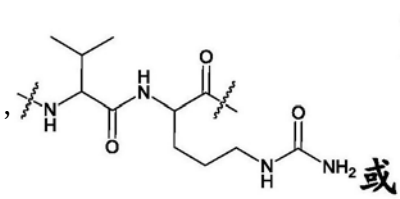
A_1是-C(=O)NH-,-NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_nNHC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nS$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_nNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_mNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,或-$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-;

A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)$NR^4$-,-$(CH_2)_nNHC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nS$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_nS$-,-$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH$-,-$(C(R^4)_2)_nNH$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)(C

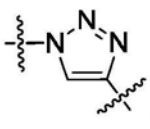
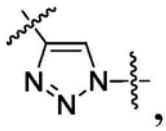
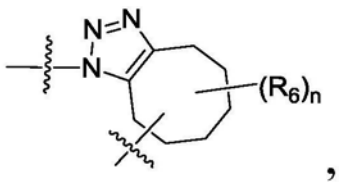
$(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,

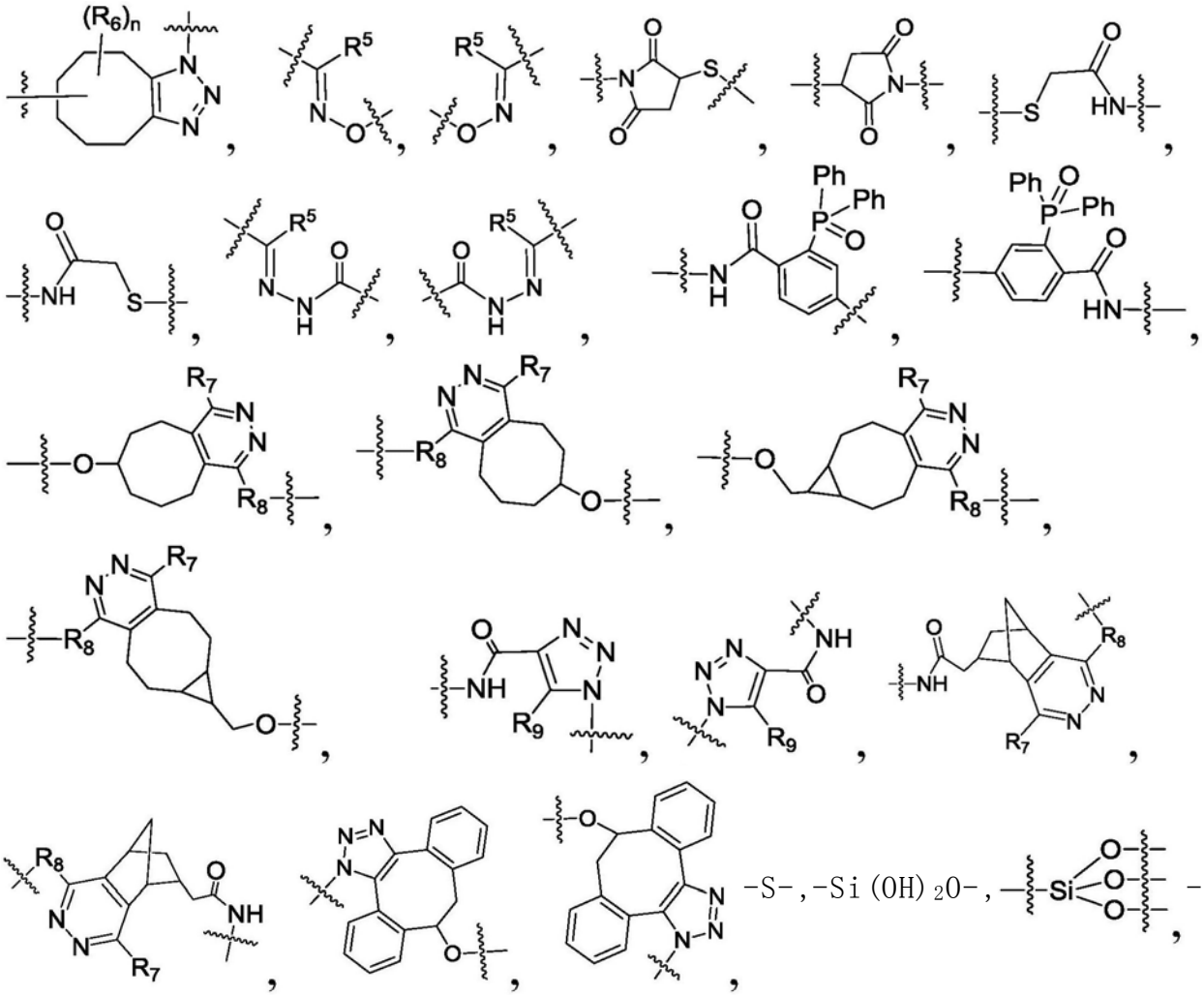

或

;

A_3是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nS-$,$-(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_n-$,$-S(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mC(=O)-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,


或

;

A_4是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,或$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

每个X^2独立地选自键，，，，



$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

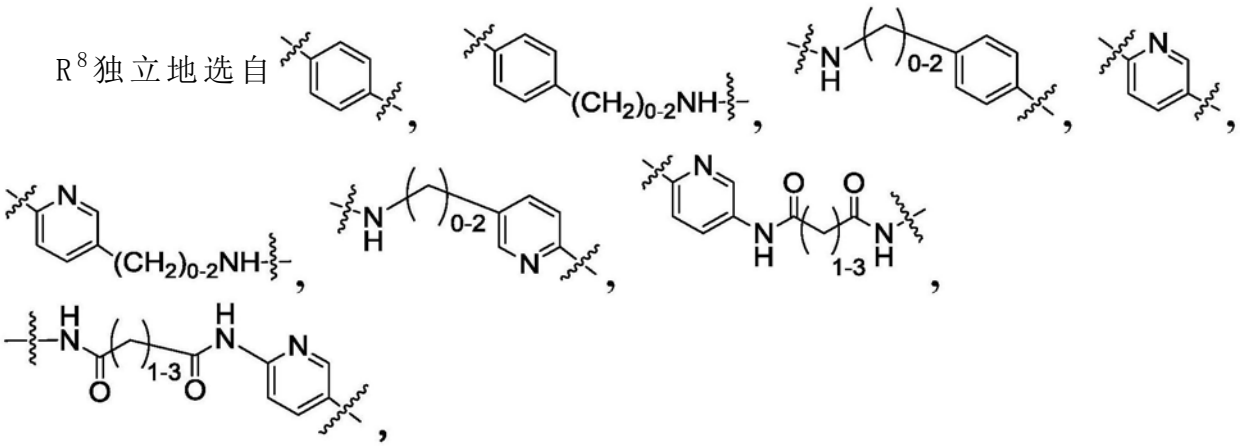
每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

R^8独立地选自



R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基;

每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,

每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

TG是药物部分,亲和探针,螯合剂,光谱探针,放射性探针,成像试剂,脂质分子,聚乙二醇,聚合物,纳米颗粒,量子点,脂质体,PLGA颗粒,多糖,乙酰基,或表面。

位点特异性标记方法及由此产生的分子

[0001] 序列表

[0002] 本申请包含已通过EFS-Web提交的ASCII格式的序列表，其在此通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2013年5月29日，命名为PAT055142_SL_2.txt，大小1,800,691字节。

技术领域

[0003] 本发明涉及位点特异性标记方法以及由此产生的分子。

背景技术

[0004] 缀合已被广泛用于优化生物活性蛋白的性质，如蛋白疗法、抗体药物缀合物(ADC)、疫苗、组织选择性靶向载体、分子诊断、蛋白核酸缀合物。传统的缀合方法是利用基于赖氨酸的共价连接，由于蛋白表面赖氨酸的丰度使其很难实现均质性。

[0005] 蛋白的位点特异性标记可以通过翻译后的酶促反应来实现，例如，使用人O^6-烷基鸟嘌呤-DNA烷基转移酶(AGT)，生物素连接酶，转谷氨酰胺酶，转肽酶，角质酶，或4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶将标签共价附着至蛋白。

[0006] 对于使用人O^6-烷基鸟嘌呤-DNA烷基转移酶的翻译后酶促反应，AGT融合到感兴趣的靶蛋白，随后加入标记的O^6-苄基鸟嘌呤(AGT的自杀底物)(Keppler等人，Nat.Biotechnol.21:86-89,2003)。这种方法是称为SNAP-tag™的技术的基础，它采用了180个氨基酸的标签(Tirat等人，International Journal of Biological Macromolecules,39:66-76,2006)。然而，使用这种方法的蛋白的标记只发生在C-或N-末端。

[0007] 对于生物素连接，酶生物素蛋白连接酶(BPL)连接生物素与某些羧化酶或脱羧酶的生物素运载体结构域。BPL在两个步骤中催化腺苷-5'-三磷酸(ATP)-依赖性反应，在生物素羧基和位于高保守的Ala-Met-Lys-Met(SEQ ID NO:1017)识别基序中的特定赖氨酸残基的ε-氨基之间翻译后形成酰胺键，所述高保守的Ala-Met-Lys-Met(SEQ ID NO:1017)识别基序位于生物素运载体结构域内(Tirat等人，International Journal of Biological Macromolecules,39:66-76,2006)。这种方法可被用来创建在C末端，N末端或甚至靶蛋白内的融合标签，且是称为BioEase™(72个氨基酸标签)和AviTag™(利用生物素连接酶，BirA和15个残基的受体肽标签(AP))的技术的基础。

[0008] 转谷氨酰胺酶催化谷氨酰胺(Gln)和赖氨酸(Lys)侧链之间稳定的异构肽键形成，伴随氨的丢失，并且已被用于在体外用荧光团标记蛋白中的谷氨酰胺侧链(Sato等人，Biochemistry 35:13072-13080,1996)。此外，细菌和人组织转谷氨酰胺酶(BTGase和TG2)也已被用于通过位于IgG重链中的Lys或Gln侧链催化不同的IgG的翻译后修饰(Mindt等人，Bioconjugate Chem.19:271-278,2008;Jeger等人，Angew.Chem.Int.49:9995-9997,2010)。

[0009] 转肽酶已用于蛋白的C末端和N末端位点特异性修饰，其中转肽酶A催化转肽反应(Antos等人，JACS,131:10800-10801,2009)。

[0010] 角质酶是22kDa的丝氨酸酯酶，其与抗水解的膦酸酯配体形成位点特异性共价加合物。角质酶已被用于抗体C末端和N末端的位点特异性修饰，随后固定到表面上(Kwon等人，Anal.Chem.76:5713-5720,2004;Hodnel和等人，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,99:5048-5052,2002)。

[0011] 酰基运载体蛋白(ACP)和肽基运载体蛋白(PCP)的4'-磷酸泛酰巯基乙胺化参与重要的翻译后修饰，该翻译后修饰是分别由聚酮合酶(PKS)和非核糖体肽合成酶(NRPS)激活代谢物合成所需要的(Fischbach等人，Chem.Rev.106(8):3468-3496,2006)。ACP和PCP的apo至holo的转换由4'-磷酸泛酰巯基乙胺(ppan)转移酶催化，其将辅酶A(CoA)的4'-磷酸-泛酰巯基乙胺基部分附着至蛋白质构域的不变的丝氨酸残基(Lambalot等人，Chem.Biol.3(11):923-936,1996)。由于运载体蛋白可比较的小尺寸以及4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接受功能化的CoA类似物作为底物的能力，研究人员利用运载体蛋白作为融合标签用多种小分子探针来标记靶蛋白(例如，参见La Clair等人，Chem.Biol.11(2):195-201,2004;Yin等人，J.Am.Chem.Soc.126(25):7754-7755,2004)。在尝试进一步减小运载体蛋白标签尺寸中，Walsh和同事使用噬菌体展示来鉴定8至12个残基的肽，其作为有效的底物被细菌4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶Sfp(先前鉴定为负责表面活性素生产的基因座)和ACPS(Yin等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102(44):15815-15820,2005;Zhou等人，ACS Chem.Biol.2(5):337-346,2007;Zhou等人，J.Am.Chem.Soc.130(30):9925-9930,2008)识别。

[0012] 抗体药物缀合物(ADC)已用于癌症治疗中细胞毒性剂的局部递送(例如参见，Lambert,Curr.Opinion In Pharmacology 5:543-549,2005)。ADC允许药物部分的靶向递送，其中可以实现具有最小毒性的最大功效。随着越来越多的ADC显示有希望的临床结果，对开发稳定的工程化抗体的需要增加了，该工程化抗体提供能够缀合，特别地位点特异性缀合至多种活性剂的反应基团，从而可以以限定的药物比抗体比产生均质化的免疫缀合物，用于癌症治疗中。

发明内容

[0013] 本发明提供了修饰的抗体或其片段，其包含至少一种肽标签，所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物，且位于所述抗体或抗体片段的结构环内。本发明进一步提供了包含这种修饰的抗体或抗体片段，以及末端基团的免疫缀合物。本发明还提供了制备这种修饰的抗体，抗体片段和免疫缀合物的方法，以及使用这类组合物的方法。

[0014] 在一些实施方案中，本发明提供了修饰的抗体或其片段，其包含至少一种肽标签，所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物，且位于所述抗体或抗体片段的结构环内，并且其中4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp，AcpS，海栖热袍菌(T.maritime)PPTase，人PPTase或保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的其突变体或同源物形式。在某些实施方案中，肽标签选自GDSLSWLLRLLN(SEQ ID NO:1)，GDSLSWL(SEQ ID NO:2)，GDSLSWLVRCLN(SEQ ID NO:3)，GDSLSWLLRCLN(SEQ ID NO:4)，GDSLSWLVRLLN(SEQ ID NO:5)，GDSLSWLLRSLN(SEQ ID NO:6)，GSQDVLDSLEFIASKLA(SEQ ID NO:7)，VLDSLEFIASKLA(SEQ ID NO:8)，DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9)，GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10)，GDSLDMLEWSL(SEQ ID NO:11)，GDSLDMLEWS(SEQ ID NO:12)，GDSLDMLEW(SEQ ID NO:13)，DSLDMLEW(SEQ ID

NO:14),GDSLDM(SEQ ID NO:15),LDSVRMMALAAR(SEQ ID NO:16),LDSLDMLEWSLR(SEQ ID NO:17),DSLEFIASKL(SEQ ID NO:18),DSLEFIASK(SEQ ID NO:19),DVLDSLEFI(SEQ ID NO:20),VLDSLEFIAS(SEQ ID NO:21)和DSLDMLEWSL(SEQ ID NO:1132)。本发明还提供了包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0015] 在某些实施方案,本发明提供了修饰的抗体或其片段,其包含至少一种肽标签,所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,且位于抗体或其片段的VH、VL、CH1、CH2、CH3或C_L区域的结构环内。在某些实施方案中,肽标签插入列于表1的任何两个氨基酸之间。在某些实施方案中,本发明提供了修饰的抗体或抗体片段,其包含至少一种肽标签,所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,且位于抗体或其片段的CH1区的结构环内。本发明进一步提供了包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0016] 在某些实施方案中,肽标签被插入亲本抗体或其片段的V_H或V_L结构域的氨基酸残基2和3之间,或V_H结构域的氨基酸残基63和64之间,或V_H结构域的氨基酸残基65和66之间,或CH1结构域的138和139之间,或CH1结构域的197和198之间,或CH3结构域的359和360之间,或CH3结构域的388和389之间,或CH3结构域的447之后。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0017] 在某些实施方案中,肽标签被插入亲本抗体或其片段的V_H或V_L结构域的氨基酸残基2和3中之间,或轻链的氨基酸残基110和111之间,或CH1结构域的119和120之间,或120和121之间,或135和136之间,或136和137之间,或138和139之间,或162和163之间,或164和165之间,或165和166之间,或194和195之间,或195和196之间,或CH3结构域的388和389之间,或445和446之间,或446和447之间。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0018] 在某些实施方案中,肽标签被插入亲本抗体或其片段的轻链的氨基酸残基110和111之间,或CH1结构域的119和120之间,或120和121之间,或135和136之间,或136和137之间,或138和139之间,或162和163之间,或164和165之间,或165和166之间,或194和195之间,或195和196之间,或CH3结构域的388和389之间。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0019] 在某些实施方案中,肽标签移植于V_H结构域的氨基酸残基62至64之间或62至65之间,或CH1结构域的氨基酸残基133和138之间,或CH1结构域的189和195之间,或CH1结构域的190和197之间。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0020] 在某些实施方案中,本发明提供了修饰的抗体或其片段,其包含SEQ ID NO:103,SEQ ID NO:109,SEQ ID NO:113,SEQ ID NO:121,SEQ ID NO:122,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:130,SEQ ID NO:131,和/或SEQ ID NO:141。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0021] 在某些实施方案中,本发明提供了修饰的抗体或其片段,其包含SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:94,SEQ ID NO:95,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:126,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:130,SEQ ID NO:131,SEQ ID NO:132,SEQ ID NO:139,SEQ ID NO:149,SEQ ID NO:151,SEQ ID NO:152,SEQ ID NO:157,SEQ ID NO:158,SEQ ID NO:160,SEQ ID NO:166,SEQ ID NO:168,SEQ ID NO:169,SEQ ID NO:178,SEQ ID NO:179,SEQ ID NO:248,SEQ ID NO:250,SEQ ID NO:251,SEQ ID NO:

256,SEQ ID NO:257,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:265,SEQ ID NO:267,SEQ ID NO:268,SEQ ID NO:277,SEQ ID NO:278,SEQ ID NO:348,SEQ ID NO:349,SEQ ID NO:356,SEQ ID NO:358,SEQ ID NO:359,SEQ ID NO:364,SEQ ID NO:365,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:371,SEQ ID NO:373,SEQ ID NO:374,SEQ ID NO:380,SEQ ID NO:381,SEQ ID NO:384,SEQ ID NO:386,SEQ ID NO:387,或SEQ ID NO:388。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0022] 在某些实施方案中,本发明提供了修饰的抗体或其片段,其包含SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:132,SEQ ID NO:151,SEQ ID NO:152,SEQ ID NO:157,SEQ ID NO:158,SEQ ID NO:160,SEQ ID NO:166,SEQ ID NO:168,SEQ ID NO:169,SEQ ID NO:178,SEQ ID NO:179,SEQ ID NO:250,SEQ ID NO:251,SEQ ID NO:256,SEQ ID NO:257,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:265,SEQ ID NO:267,SEQ ID NO:268,SEQ ID NO:277,SEQ ID NO:278,SEQ ID NO:358,SEQ ID NO:359,SEQ ID NO:364,SEQ ID NO:365,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:371,SEQ ID NO:373,SEQ ID NO:374,SEQ ID NO:380,SEQ ID NO:381,或SEQ ID NO:384。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0023] 在某些实施方案中,本发明提供了修饰的抗体或其片段,其包括至少一种肽标签,所述肽标签是Sfp的底物,且位于所述抗体或其片段的结构环内,并且其中肽标签是GDSLSWLLRLLN(SEQ ID NO:1),GDSLSWLVRCLN(SEQ ID NO:3),GDSLSWLLRCLN(SEQ ID NO:4),GDSLSWLVRLLN(SEQ ID NO:5),GDSLSWLLRSLN(SEQ ID NO:6),GSQDVLDSLEFIASKLA(SEQ ID NO:7),VLDSLEFIASKLA(SEQ ID NO:8),DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9),GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10),GDSLDMLEWSL(SEQ ID NO:11),GDSLDMLEWS(SEQ ID NO:12),GDSLDMLEW(SEQ ID NO:13),DSLDMLEW(SEQ ID NO:14),LDSLDMLEWSLR(SEQ ID NO:17),DSLEFIASKL(SEQ ID NO:18),DSLEFIASK(SEQ ID NO:19),或DSLEFIAS(SEQ ID NO:1116)。在另一个实施方案中,肽标签是GDSLSWLLRLLN(SEQ ID NO:1),GDSLSWL(SEQ ID NO:2),DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9),GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10),DSLEFIASKL(SEQ ID NO:18),DSLEFIASK(SEQ ID NO:19),或DSLDMLEWSL(SEQ ID NO:1132)。本发明进一步提供包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

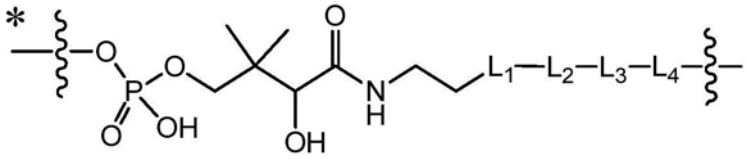
[0024] 在某些实施方案中,本发明的修饰抗体或抗体片段是选自IgG,IgM,IgE和IgA的同种型。在一些其他实施方案中,本发明的修饰的抗体或抗体片段是选自IgG1,IgG2,IgG3和IgG4的IgG亚型。在某些实施方案中,本发明的修饰抗体或抗体片段是人或人源化抗体或抗体片段。在具体的实施方案中,本发明的修饰的抗体或抗体片段是抗-HER2抗体或抗-HER2抗体片段。本发明进一步提供了包含这种修饰的抗体或其片段的免疫缀合物。

[0025] 本发明提供编码本文所描述的修饰的抗体或抗体片段的核酸,以及包含此类核酸的宿主细胞。

[0026] 本发明提供包含修饰的抗体或其片段,以及末端基团的免疫缀合物,其中修饰的抗体或抗体片段包含至少一个肽标签,所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,且位于抗体或抗体片段的结构环内。在某些实施方案中,修饰的抗体或抗体片段还包含一个或多个正交缀合位点。在具体的实施方案中,每个正交缀合位点独立地选自Sfp 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,AcpS 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,赖氨酸,半

胱氨酸，酪氨酸，组氨酸，甲酰基甘氨酸，非天然氨基酸，吡咯赖氨酸和吡咯啉-羧基赖氨酸。

[0027] 在另一方面，本发明提供包含修饰的抗体或抗体片段，以及末端基团(TG)的免疫缀合物，所述末端基团通过具有根据式(I-b)的结构的接头附着于修饰的抗体或抗体片段中的肽标签。

[0028] 

式（I-b）

[0029] 其中：

[0030] L_1是键、非酶促可切割的接头、非可切割的接头、酶促可切割的接头、光稳定的接头或光可切割的接头；

[0031] L_2是键、非酶促可切割的接头，非可切割的接头、酶促可切割的接头、光稳定的接头或光可切割的接头；

[0032] L_3是键、非酶促可切割的接头、非可切割的接头、酶促可切割的接头、光稳定的接头或光可切割的接头；

[0033] L_4是键、非酶促可切割的接头、非可切割的接头、酶促可切割的接头、光稳定的接头或光可切割的接头，或自消间隔子(self-immolative spacer)，

[0034] *表示在此处4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着于肽标签，

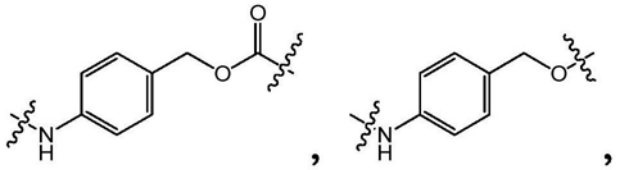
[0035] 并且其中末端基团是药物部分，亲和探针，螯合剂，光谱探针，放射性探针，成像试剂，脂质分子，聚乙二醇，聚合物，纳米颗粒，量子点，脂质体，PLGA颗粒，多糖，乙酰基，或表面。

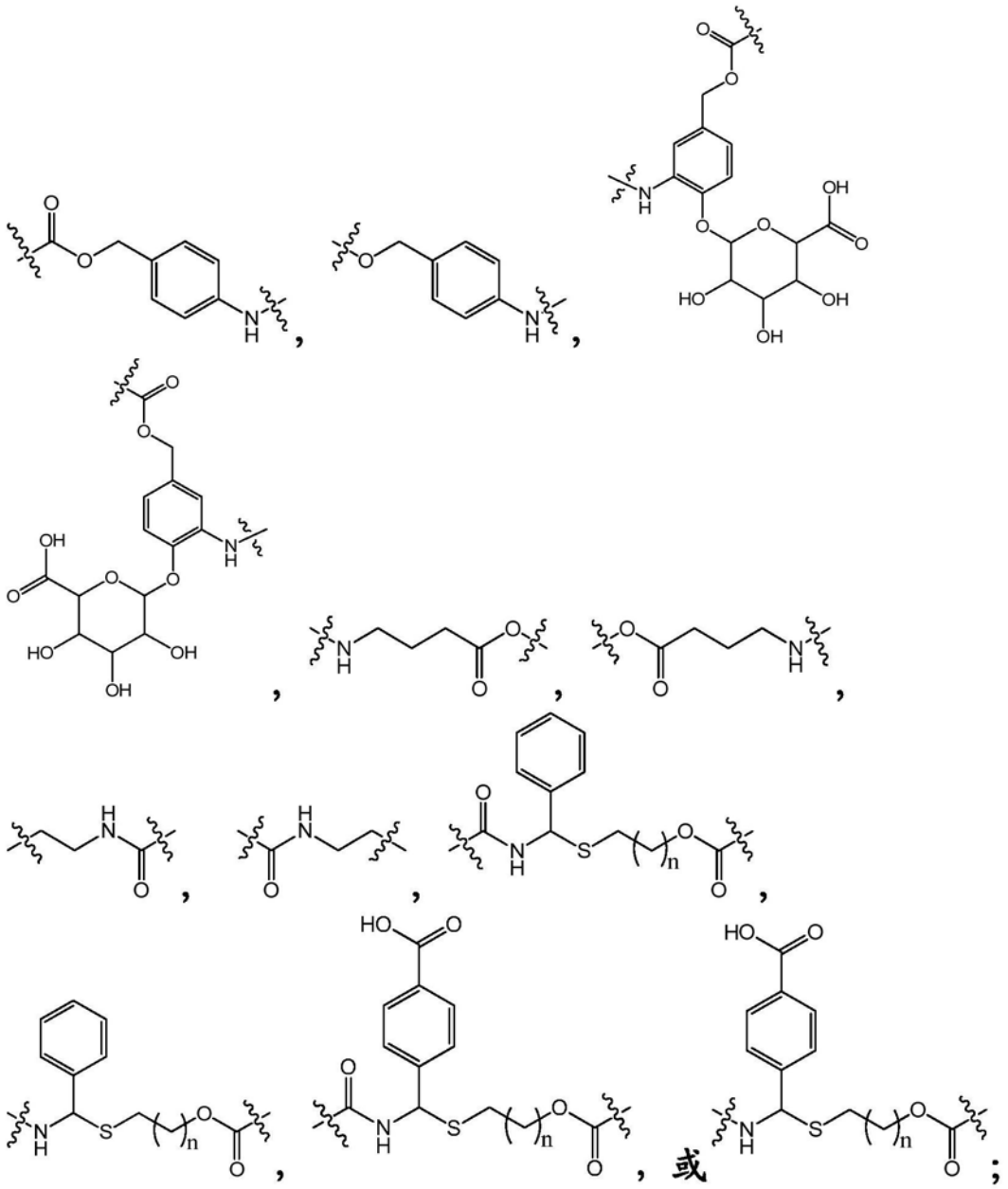
[0036] 在此类免疫缀合物的某些实施方案中：

[0037] L_1是-A_1X^2-或-X^2-；L_2是键，-A_2-或-A_2X^2-；

[0038] L_3是键，-A_3-或-A_3X^2-；

[0039] L_4是键-A_4-，-A_4X^2-，

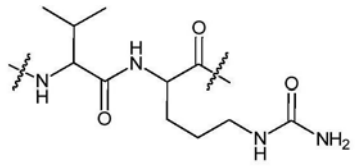
[0040] 

[0041] 

[0042] A_1是-C(=O)NH-,-NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC(=O)NH$-,-$(C(R^4)_2)_nC(=O)NH$-,-$(CH_2)_nNHC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nS$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_nC(=O)NH$-,-S$(C(R^4)_2)_nC(=O)NH$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_nC(=O)$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,或-$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-;

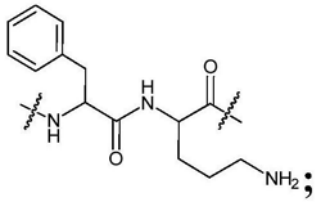
[0043] A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2$

)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NR^4-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$S-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$S-,-S(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-S(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(CH$_2$)$_n$S-,-(C(R^4)$_2$)$_n$S-,-S(CH$_2$)$_n$-,-S(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NH-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NH-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$C(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)-,-(CH$_2$)$_n$(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$(O(CH$_2$)$_n$)$_m$OC(=O)NH(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$OC(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NH((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NH((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,



或

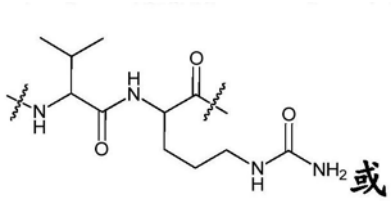
[0044]



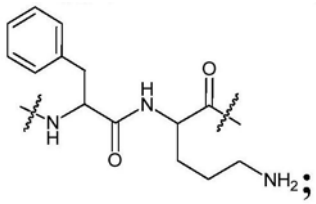
;

[0045] A$_3$是-C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$-,-(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$-,-(((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-(((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$S-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$S-,-S(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-S(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(CH$_2$)$_n$S-,-(C(R^4)$_2$)$_n$S-,-S(CH$_2$)$_n$-,-S(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$C(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)-,-(CH$_2$)$_n$(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$(O(CH$_2$)$_n$)$_m$OC(=O)NH(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$OC(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$(O(CH$_2$)$_n$)$_m$OC(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$(O(C(R^4)$_2$)n)mOC(=O)-,-(CH$_2$)$_n$(O(CH$_2$)$_n$)$_m$C(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$C(=O)-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,

[0046]



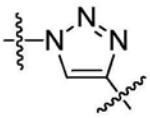
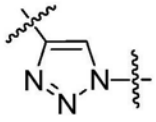
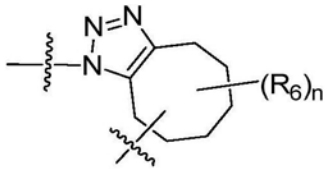
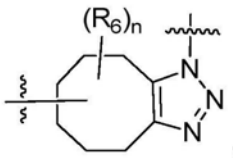
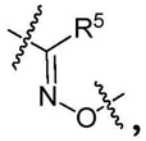
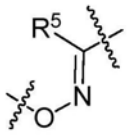
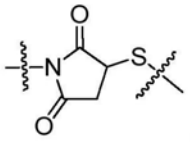
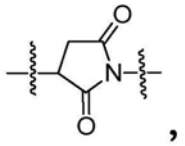
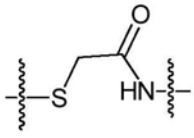
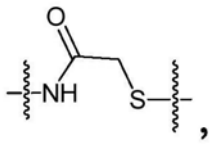
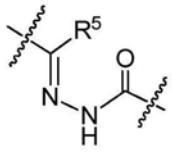
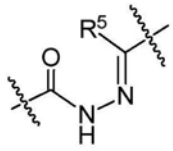
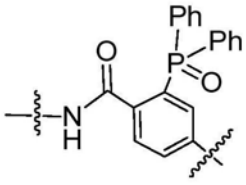
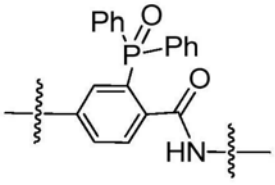
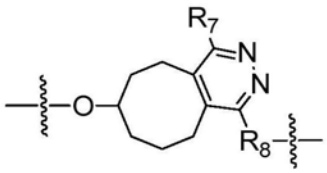
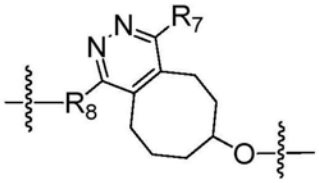
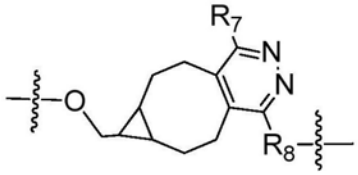
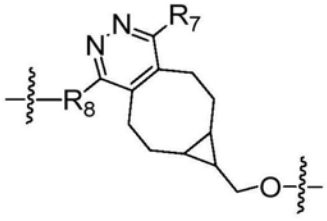
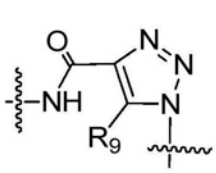
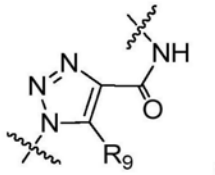
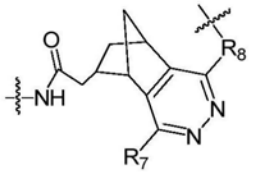
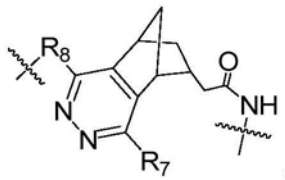
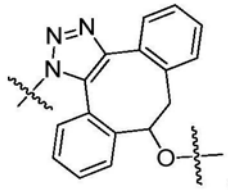
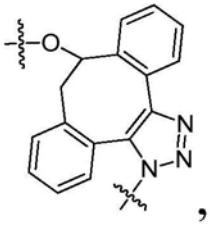
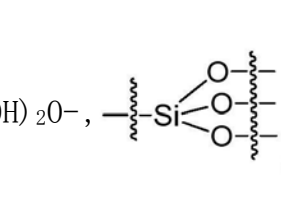
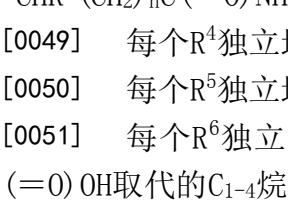
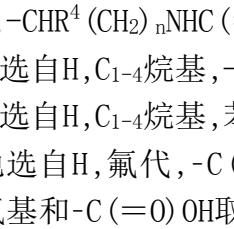
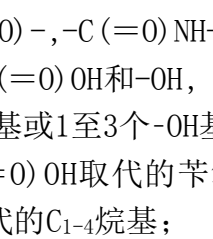
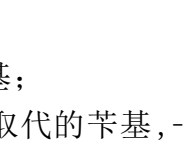
或



;

[0047] A$_4$是-C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$-,-(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$-,-(((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-(((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$S-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$S-,-S(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-S(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(C

$(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,或$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

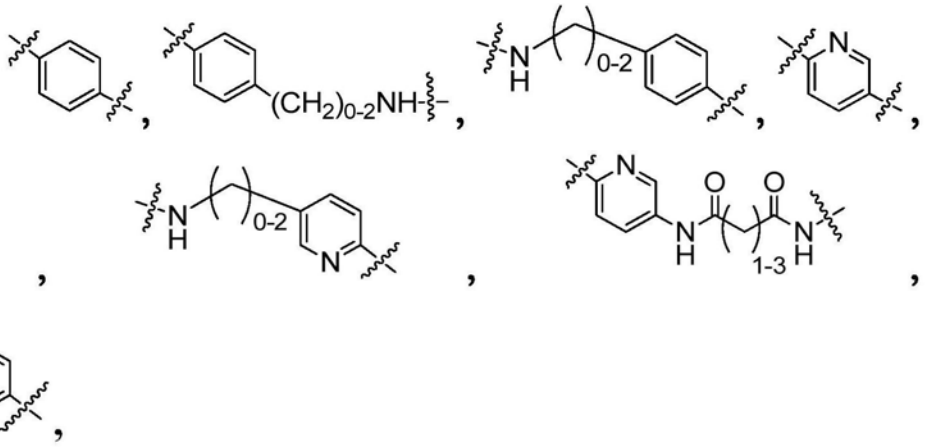
[0048] 每个X^2独立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，-S-,$-Si(OH)_2O-$，，$-CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

[0049] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

[0050] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

[0051] 每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

[0052] R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

[0053] R^8独立地选自

[0054] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

[0055] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

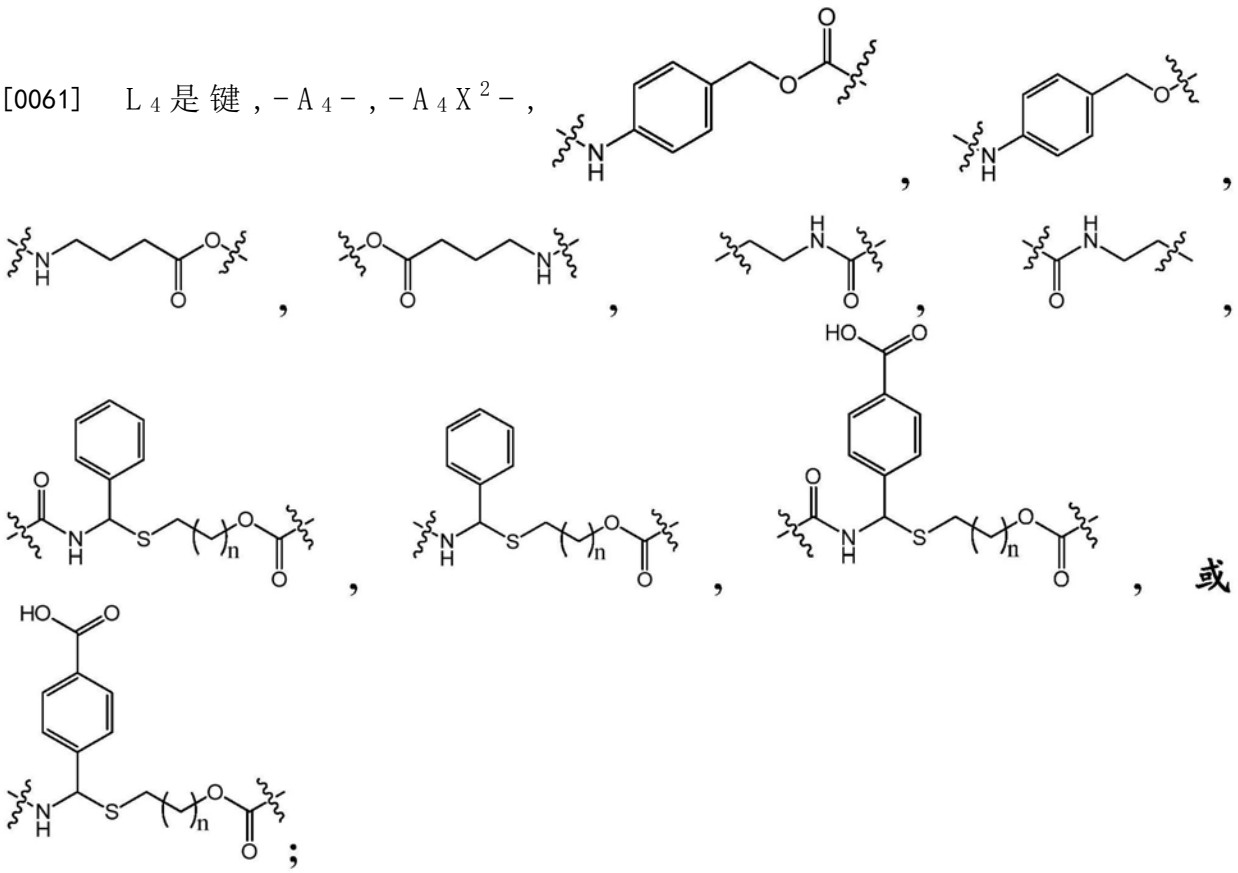
[0056] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9。

[0057] 在此类免疫缀合物的其它实施方案中:

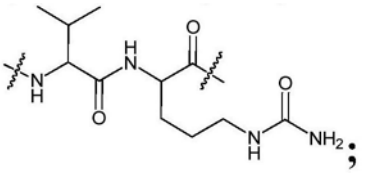
[0058] L_1是$-A_1X^2-$或$-X^2-$；

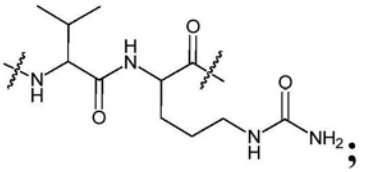
[0059] L_2是键,$-A_2-$,或$-A_2X^2-$；

[0060] L_3是键,$-A_3-$,或$-A_3X^2-$；

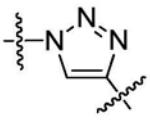
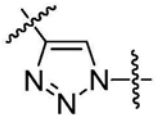
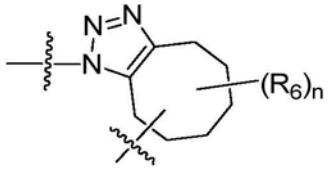
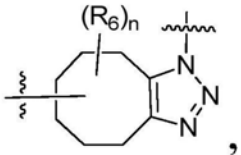
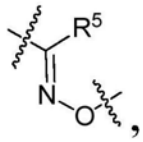
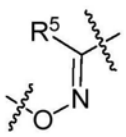
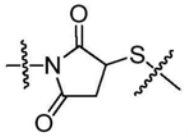
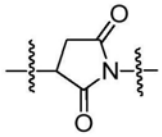
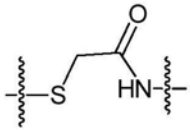
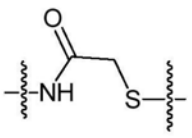
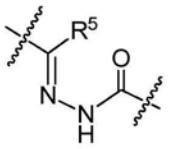
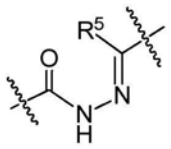
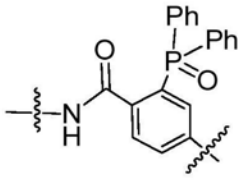
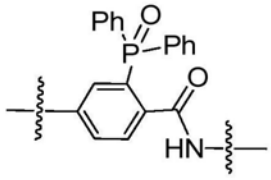
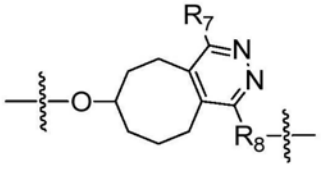
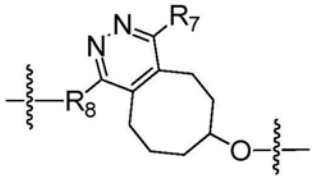
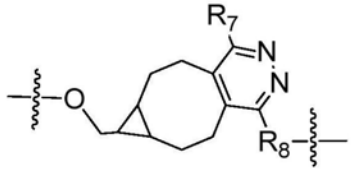
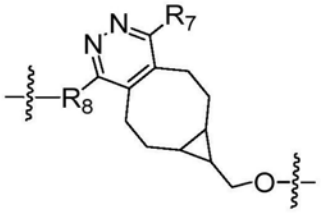
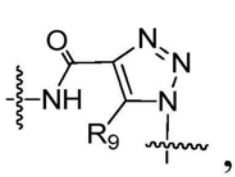
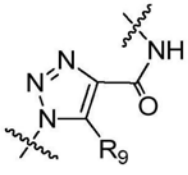
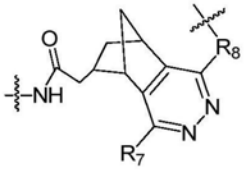
[0061] L_4是键，$-A_4-$，$-A_4X^2-$，

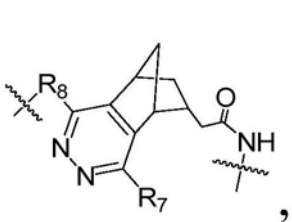
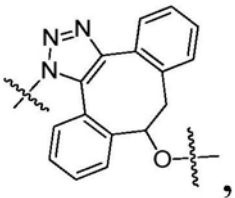
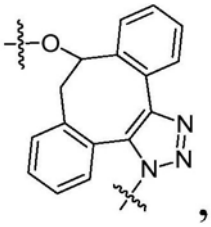
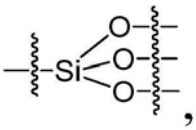
[0062] A_1是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$；

[0063] A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-或;

[0064] A_3是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-或;

[0065] A_4是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-或-(O$(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-;

[0066] 每个X^2独立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，




-S-,-Si(OH)$_2$O-,-,

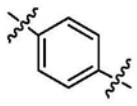
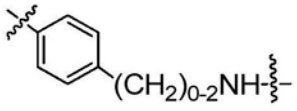
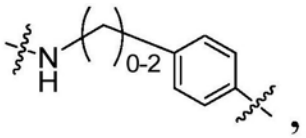
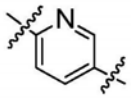
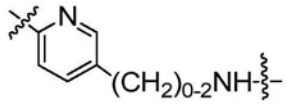
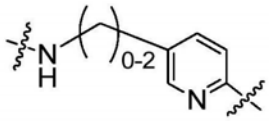
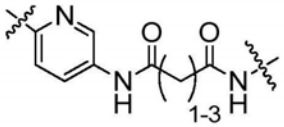
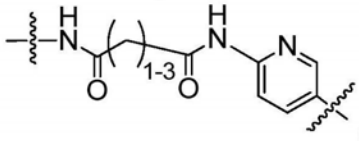
$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

[0067] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

[0068] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

[0069] 每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

[0070] R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

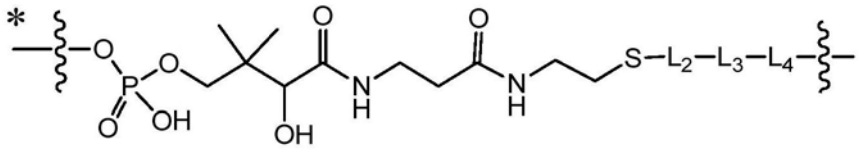
[0071] R^8独立地选自,,,,,,,,

[0072] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基;

[0073] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

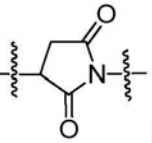
[0074] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9。

[0075] 在此类上述免疫缀合物的某些实施方案中,式(I-b)的接头是具有根据式(I-c)的结构的接头:

[0076] 

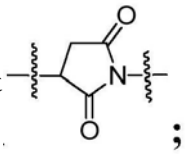
式 (I-c).

[0077] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

[0078] L_1是$-A_1X^2-$,其中A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$以及X^2是;

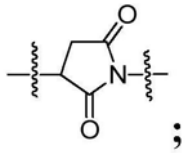
[0079] L_2是键;L_3是键,和L_4是$-A_4-$其中A_4是$-(CH_2)_nNHC(=O)-$。

[0080] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

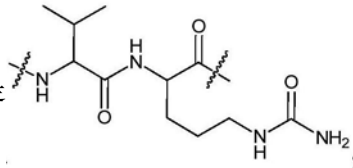
[0081] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-和X^2是;

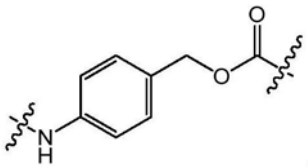
[0082] L_2是键;L_3是键;L_4是-A_4-,其中A_4是-$(CH_2)_n$C(=O)-。

[0083] 在此类免疫缀合物的其它实施方案中:

[0084] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-和X^2是;

[0085] L_2是-A_2-,其中A_2是-$(CH_2)_n$C(=O;

[0086] L_3是-A_3-,其中A_3是,和

[0087] L_4是。

[0088] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

[0089] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-和X^2是-$(CH_2)_n$C(=O)NH-;

[0090] L_2是键-;L_3是-A_3-,其中A_3是-$(CH_2)_n$C(=O)-,和L_4是键。

[0091] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

[0092] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,X^2是-$CHR^4(CH_2)_n$C(=O)NH-和R^4是-C(=O)OH;

[0093] L_2是键;L_3是-A_3-,其中A_3是-$(CH_2)_n$C(=O)-和L_4是键。

[0094] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

[0095] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-和X^2是-(CH_2)C(=O)NH-;

[0096] L_2是键;L_3是键,和L_4是-A_4-其中A_4是-$(CH_2)_n$NHC(=O)-。

[0097] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

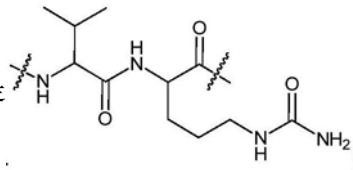
[0098] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-和X^2是-(CH_2)C(=O)NH-;

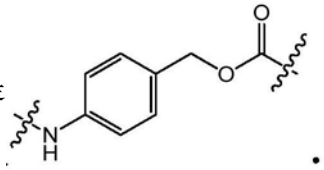
[0099] L_2是键;L_3是键;L_4是-A_4-,其中A_4是-$(CH_2)_n$C(=O)-。

[0100] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

[0101] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-和X^2是-(CH_2)C(=O)NH-;

[0102] L_2是-A_2-,其中A_2是-$(CH_2)_n$C(=O;

[0103] L_3是-A_3-,其中A_3是,和

[0104] L_4是。

[0105] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

[0106] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-和X^2是-(CH_2)C(=O)NH-;

[0107] L_2是键-;L_3是-A_3-,其中A_3是-$(CH_2)_n$C(=O)-,和L_4是键。

[0108] 在此类上述免疫缀合物的其它实施方案中:

[0109] L_1是-A_1X^2-,其中A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,X^2是-$CHR^4(CH_2)_n$C(=O)NH-和R^4是-C(=O)OH;

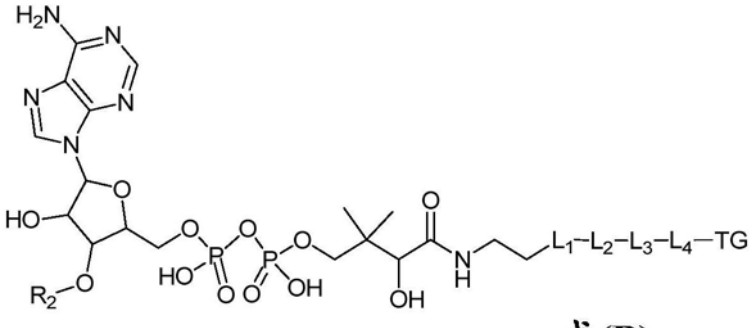
[0110] L_2是键;L_3是-A_3-,其中A_3是-$(CH_2)_n$C(=O)-和L_4是键。

[0111] 在上述免疫缀合物的实施方案中,末端基团是选自抗炎剂,抗癌剂,抗真菌剂,抗细菌剂,抗寄生虫剂,抗病毒剂和麻醉剂的药物部分。在此类免疫缀合物的某些实施方案,药物部分选自V-ATPase抑制剂,HSP90抑制剂,IAP抑制剂,mTOR抑制剂,微管稳定剂,微管去稳定剂,阿里他汀(auristatin),多拉司他汀(dolastatin),类美登素(maytansinoid),MetAP(甲硫氨酸胺基肽酶),蛋白CRM1的核输出抑制剂,DPPIV抑制剂,在线粒体中磷酰基转移反应的抑制剂,蛋白合成抑制剂,CDK2抑制剂,CDK9抑制剂,Eg5抑制剂,HDAC抑制剂,DNA损伤剂,DNA烷基化剂,DNA嵌入剂,DNA小沟结合剂,蛋白酶体抑制剂,RNA聚合酶抑制剂和DHFR抑制剂。在此类免疫缀合物的某些实施方案中,光谱探针选自荧光团,生色团,量子点,磁探针,放射性探针,成像试剂或对比试剂。在此类免疫缀合物的某些实施方案中,亲和探针是生物素。

[0112] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物,所述方法包括以下步骤:

[0113] (a)提供修饰的抗体或其片段,其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签,并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物,并且

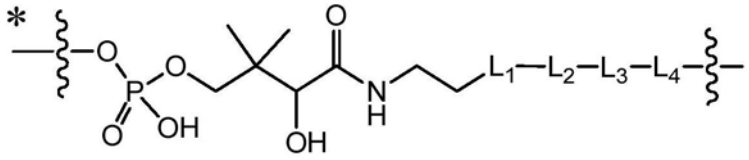
[0114] (b)在具有式B的结构的辅酶A类似物存在下,通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段,用末端基团标记修饰的抗体或抗体片段:

[0115] 

式(B)

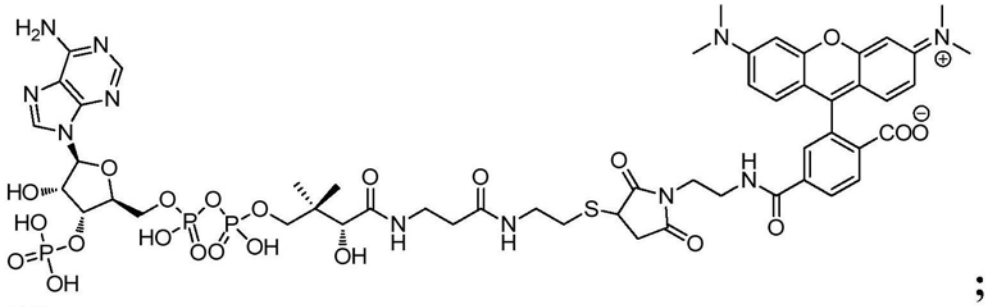
[0116] 其中L_1,L_2,L_3,L_4,R_2和TG如文中定义;

[0117] 从而末端基团通过具有根据式(I-b)的结构的接头附着至肽标签:

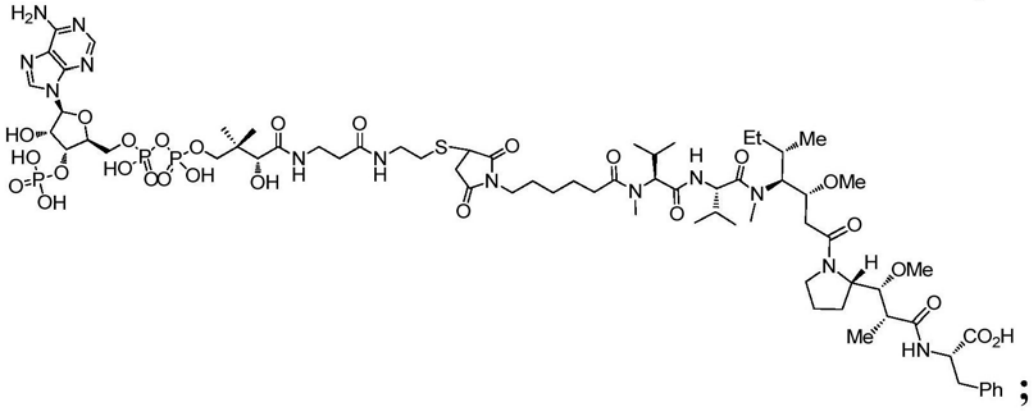
[0118] 

式（I-b）

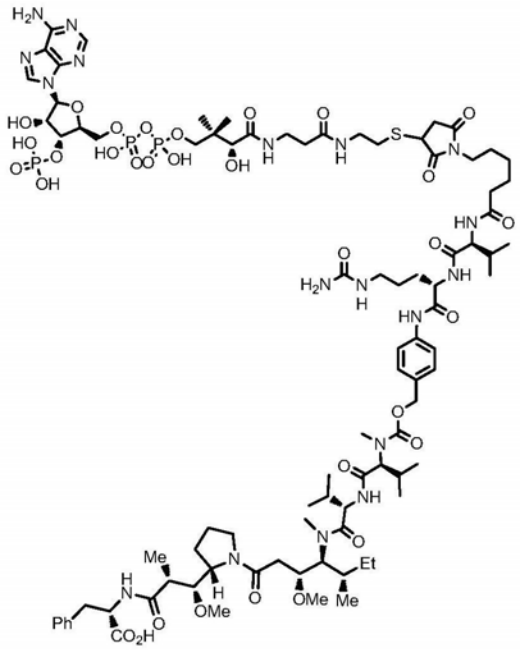
[0119] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签。在某些实施方案中，式(B)的化合物选自



；

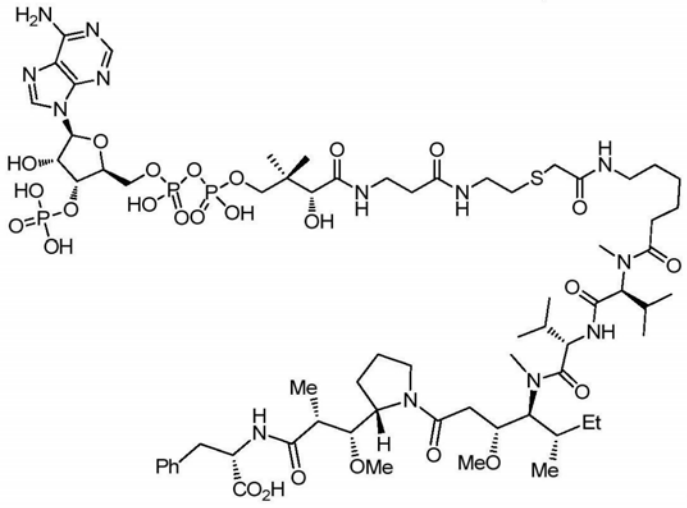
[0120] 

；

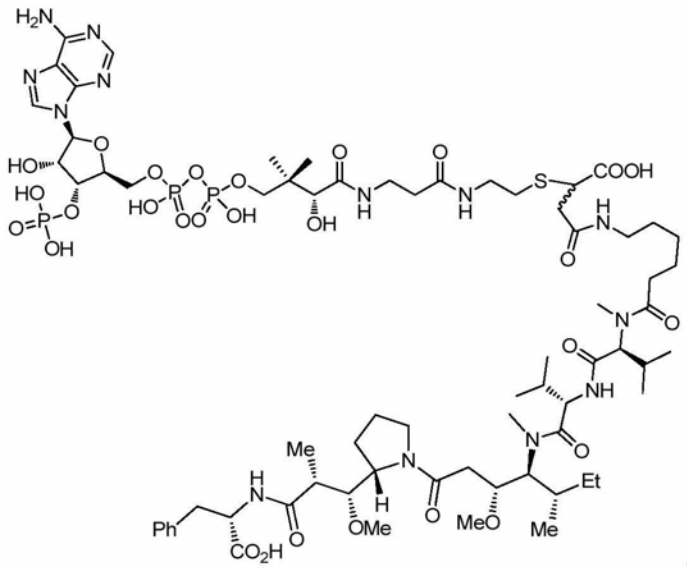


；

[0121]



，和



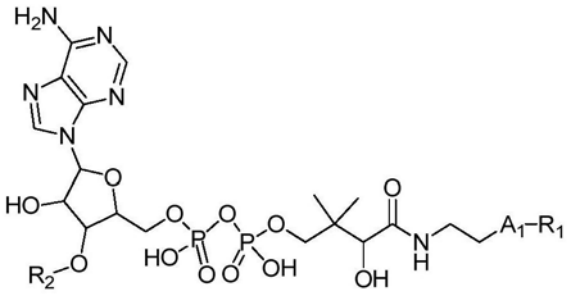
。

[0122] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物，所述方法包括以下步骤：

[0123] (a)提供修饰的抗体或其片段，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，

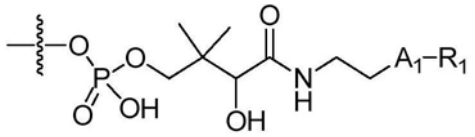
[0124] (b)通过如下用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段：

[0125] i)在式(D)的化合物存在下，用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段，

[0126] 

式（D）

[0127] 从而将式(D-a)的活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着于肽标签，

[0128] 

式（D-a）

[0129] 其中R_1是官能团；

[0130] 和

[0131] ii)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-a)的化合物反应，

[0132] $X-L_2-L_3-L_4-TG$

[0133] 式(II-a)

[0134] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0135] 其中：

[0136] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0137] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯(oxanobornadiene)；或者，

[0138] 当X是三芳基膦时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0139] 当X是氧杂降冰片二烯时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0140] 当X是炔烃时，则R_1为叠氮化物；或者，

[0141] 当X是烯烃时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0142] 当X为环辛烯时，则R_1为二芳基四嗪；或者，

[0143] 当X为二芳基四嗪时，则R_1是环辛烯；或者，

[0144] 当X为单芳基四嗪时，则R_1是降冰片烯；或者，

[0145] 当X为降冰片烯时，则R_1是单芳基四嗪；或者，

[0146] 当X是醛时，则R_1是羟胺或肼或$NH_2-NH-C(=O)-$；或者，

[0147] 当X为酮时，则R_1是羟胺或肼或$NH_2-NH-C(=O)-$；或者，

[0148] 当X是羟胺时，则R_1是醛或酮；或者，

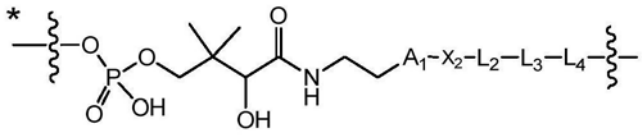
[0149] 当X是肼时，则R_1为醛或酮；或者，

[0150] 当X是NH_2-NH-C(=O)-时，则R_1为醛或酮；或者，

[0151] 当X是卤代乙酰胺时，则R_1是巯基；或者，

[0152] 当X是马来酰亚胺时，则R_1是巯基；

[0153] 从而末端基团通过具有根据式(II-b)的结构的接头附着至肽标签：

[0154] 

式（II-b）

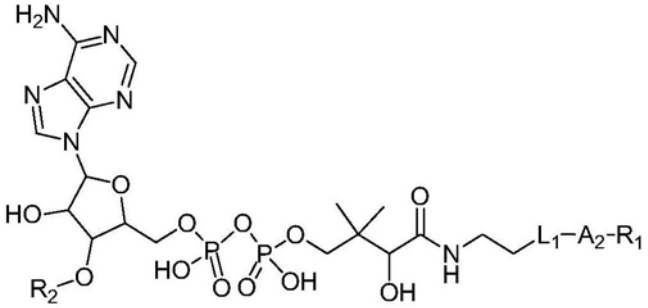
[0155] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签，且其中A_1,X_2,L_2,L_3,L_4,R_2和TG如文中定义。

[0156] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物，所述方法包括以下步骤：

[0157] (a)提供修饰的抗体或其片段，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，

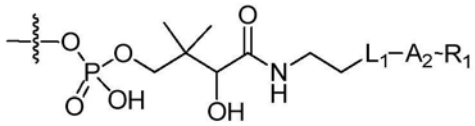
[0158] (b)用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段：

[0159] i)在式(E)的化合物存在下，通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段，

[0160] 

式（E）

[0161] 从而将式(E-a)的活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着至肽标签，

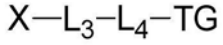
[0162] 

式（E-a）

[0163] 其中R_1是官能团；

[0164] 和

[0165] ii)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-c)的化合物反应，

[0166] 

式（II-c）

[0167] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0168] 其中：

[0169] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0170] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯(oxanobornadiene)；或者，

[0171] 当X是三芳基膦时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0172] 当X是氧杂降冰片二烯时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0173] 当X是炔烃时，则R_1为叠氮化物；或者，

[0174] 当X是烯烃时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0175] 当X为环辛烯时，则R_1为二芳基四嗪；或者，

[0176] 当X为二芳基四嗪时，则R_1是环辛烯；或者，

[0177] 当X为单芳基四嗪时，则R_1是降冰片烯；或者，

[0178] 当X为降冰片烯时，则R_1是单芳基四嗪；或者，

[0179] 当X是醛时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0180] 当X为酮时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0181] 当X是羟胺时，则R_1是醛或酮；或者，

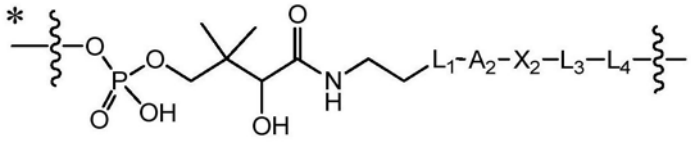
[0182] 当X是肼，则R_1为醛或酮；或者，

[0183] 当X是NH_2-NH-C(=O)-时，则R_1为醛或酮；或者，

[0184] 当X是卤代乙酰胺时，则R_1是巯基；或者，

[0185] 当X是马来酰亚胺时，则R_1是巯基；

[0186] 从而末端基团通过具有根据式(II-d)的结构的接头附着于肽标签：

[0187] 

式（II-d）

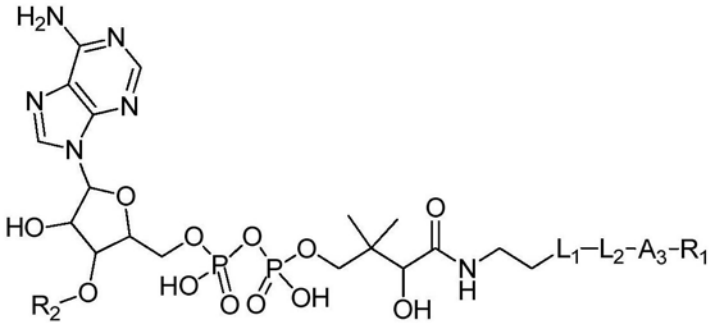
[0188] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签，且其中L_1,A_2,X_2,L_3,L_4,R_2和TG如文中定义。

[0189] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物，所述方法包括以下步骤：

[0190] (a)提供修饰的抗体或其片段，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，

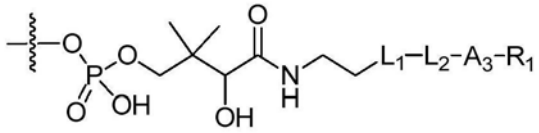
[0191] (b)用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段：

[0192] i)在式(F)的化合物存在下，通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段，

[0193] 

[0194] 式（F）

[0195] 从而将式(F-a)中活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着至肽标签，

[0196] 

式（F-a）

[0197] 其中R_1是官能团；

[0198] 和

[0199] ii)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-e)的化合物反应，

[0200] $X-L_3-L_4-TG$

[0201] 式(II-e)

[0202] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0203] 其中：

[0204] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0205] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯(oxanobornadiene)；或者，

[0206] 当X是三芳基膦时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0207] 当X是氧杂降冰片二烯时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0208] 当X是炔烃时，则R_1为叠氮化物；或者，

[0209] 当X是烯烃时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0210] 当X为环辛烯时，则R_1为二芳基四嗪；或者，

[0211] 当X为二芳基四嗪时，则R_1是环辛烯；或者，

[0212] 当X为单芳基四嗪时，则R_1是降冰片烯；或者，

[0213] 当X为降冰片烯时，则R_1是单芳基四嗪；或者，

[0214] 当X是醛时，则R_1是羟胺或肼或$NH_2-NH-C(=O)-$；或者，

[0215] 当X为酮时，则R_1是羟胺或肼或$NH_2-NH-C(=O)-$；或者，

[0216] 当X是羟胺时，则R_1是醛或酮；或者，

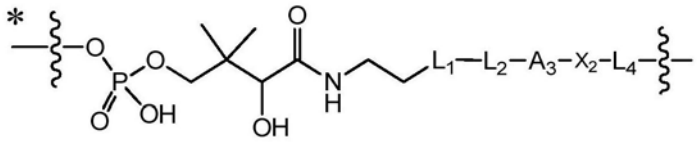
[0217] 当X是肼，则R_1为醛或酮；或者，

[0218] 当X是$NH_2-NH-C(=O)-$时，则R_1为醛或酮；或者，

[0219] 当X是卤代乙酰胺时，则R_1是巯基；或者，

[0220] 当X是马来酰亚胺时，则R_1是巯基；

[0221] 从而末端基团通过具有根据式(II-f)的结构的接头附着至肽标签：

[0222] 

式（II-f）

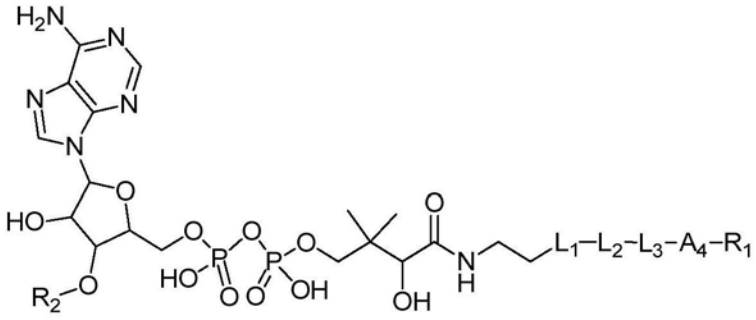
[0223] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签，且其中L_1,L_2,A_3,X_2,L_4和TG如文中定义。

[0224] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物，所述方法包括以下步骤：

[0225] (a)提供修饰的抗体或其片段，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，

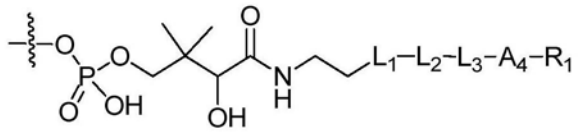
[0226] (b)用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段：

[0227] i)在式(G)的化合物存在下，通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段，

[0228] 

式（G）

[0229] 从而将式(G-a)中活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着至肽标签，

[0230] 

式（G-a）

[0231] 其中R_1是官能团；

[0232] 和

[0233] ii)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-g)的化合物反应，

[0234] X-TG

[0235] 式(II-g)

[0236] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0237] 其中：

[0238] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0239] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯

(oxanobornadiene);或者,

[0240] 当X是三芳基膦时,则R_1是叠氮化物;或者,

[0241] 当X是氧杂降冰片二烯时,则R_1是叠氮化物;或者,

[0242] 当X是炔烃时,则R_1为叠氮化物;或者,

[0243] 当X是烯烃时,则R_1是叠氮化物;或者,

[0244] 当X为环辛烯时,则R_1为二芳基四嗪;或者,

[0245] 当X为二芳基四嗪时,则R_1是环辛烯;或者,

[0246] 当X为单芳基四嗪时,则R_1是降冰片烯;或者,

[0247] 当X为降冰片烯时,则R_1是单芳基四嗪;或者,

[0248] 当X是醛时,则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-;或者,

[0249] 当X为酮时,则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-;或者,

[0250] 当X是羟胺时,则R_1是醛或酮;或者,

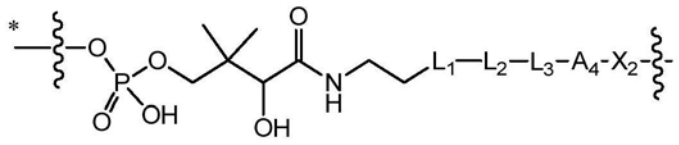
[0251] 当X是肼,则R_1为醛或酮;或者,

[0252] 当X是NH_2-NH-C(=O)-时,则R_1为醛或酮;或者,

[0253] 当X是卤代乙酰胺时,则R_1是巯基;或者,

[0254] 当X是马来酰亚胺时,则R_1是巯基;

[0255] 从而末端基团通过具有根据式(II-h)的结构的接头附着至肽标签:

[0256] 

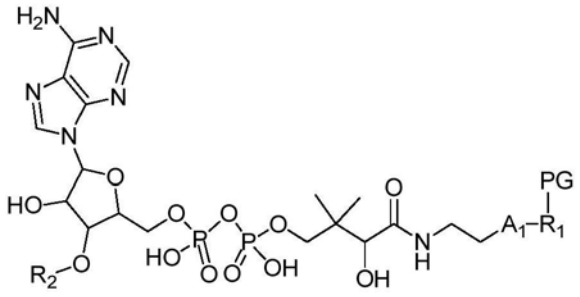
式(II-h)

[0257] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签,且其中L_1,L_2,L_3,A_4,X_2,R_2和TG如文中定义。

[0258] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物,所述方法包括以下步骤:

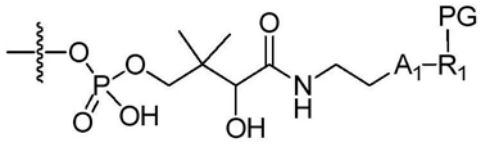
[0259] (a)提供修饰的抗体或其片段,其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签,并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物,

[0260] (b)在式(H)的化合物存在下,通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段,用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段:

[0261] 

式(H)

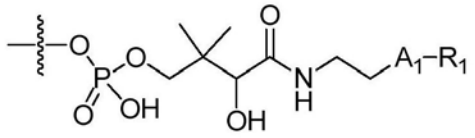
[0262] 从而将式(H-a)的被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着至肽标签,

[0263] 

式（H-a）

[0264] 其中R_1-PG是被保护的官能团R_1；

[0265] (c)使被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护，使式(D-a)的活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团与肽标签附着，

[0266] 

[0267] 式（D-a）

[0268] 其中R_1是官能团；

[0269] 和

[0270] (d)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-a)的化合物反应，

[0271] X-L_2-L_3-L_4-TG

[0272] 式(II-a)

[0273] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0274] 其中：

[0275] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0276] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯(oxanobornadiene)；或者，

[0277] 当X是三芳基膦时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0278] 当X是氧杂降冰片二烯时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0279] 当X是炔烃时，则R_1为叠氮化物；或者，

[0280] 当X是烯烃时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0281] 当X为环辛烯时，则R_1为二芳基四嗪；或者，

[0282] 当X为二芳基四嗪时，则R_1是环辛烯；或者，

[0283] 当X为单芳基四嗪时，则R_1是降冰片烯；或者，

[0284] 当X为降冰片烯时，则R_1是单芳基四嗪；或者，

[0285] 当X是醛时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0286] 当X为酮时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0287] 当X是羟胺时，则R_1是醛或酮；或者，

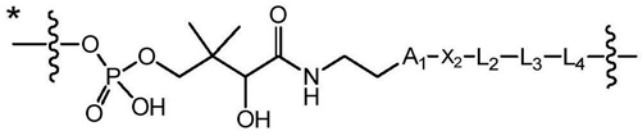
[0288] 当X是肼，则R_1为醛或酮；或者，

[0289] 当X是NH_2-NH-C(=O)-时，则R_1为醛或酮；或者，

[0290] 当X是卤代乙酰胺时，则R_1是巯基；或者，

[0291] 当X是马来酰亚胺时，则R_1是巯基；

[0292] 从而末端基团通过具有根据式(II-b)的结构的接头附着至肽标签：

[0293] 

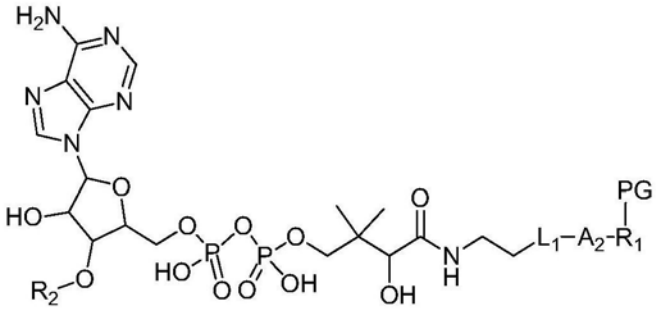
式（II-b）

[0294] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分连接至肽标签，且其中A_1,X_2,L_2,L_3,L_4,R_2,PG和TG如文中定义。

[0295] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物，所述方法包括以下步骤：

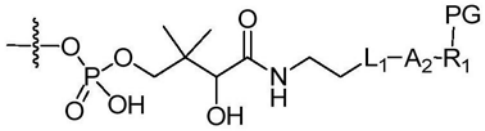
[0296] (a)提供修饰的抗体或其片段，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，

[0297] (b)在式(J)的化合物存在下，通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段，用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段：

[0298] 

式（J）

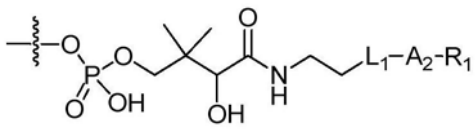
[0299] 从而将式(J-a)的被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着至肽标签，

[0300] 

式（J-a）

[0301] 其中R_1-PG是被保护的官能团R_1；

[0302] (c)使被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护，使式(E-a)的活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团与肽标签附着，

[0303] 

[0304] 式（E-a）

[0305] 其中R_1是官能团；

[0306] 和

[0307] (d)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-c)的物反应，

[0308] X-L_3-L_4-TG

[0309] 式(II-c)

[0310] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0311] 其中：

[0312] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0313] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯(oxanobornadiene)；或者，

[0314] 当X是三芳基膦时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0315] 当X是氧杂降冰片二烯时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0316] 当X是炔烃时，则R_1为叠氮化物；或者，

[0317] 当X是烯烃时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0318] 当X为环辛烯时，则R_1为二芳基四嗪；或者，

[0319] 当X为二芳基四嗪时，则R_1是环辛烯；或者，

[0320] 当X为单芳基四嗪时，则R_1是降冰片烯；或者，

[0321] 当X为降冰片烯时，则R_1是单芳基四嗪；或者，

[0322] 当X是醛时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0323] 当X为酮时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0324] 当X是羟胺时，则R_1是醛或酮；或者，

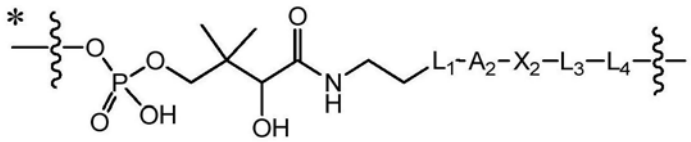
[0325] 当X是肼，则R_1为醛或酮；或者，

[0326] 当X是NH_2-NH-C(=O)-时，则R_1为醛或酮；或者，

[0327] 当X是卤代乙酰胺时，则R_1是巯基；或者，

[0328] 当X是马来酰亚胺时，则R_1是巯基；

[0329] 从而末端基团通过具有根据式(II-d)的结构的接头附着至肽标签：

[0330] 

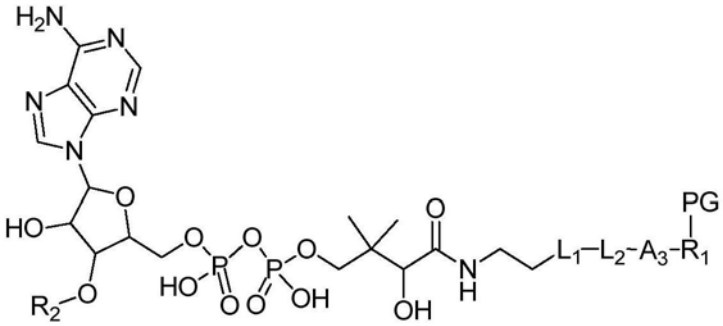
式（II-d）

[0331] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签，且其中L_1,A_2,X_2,L_3,L_4,R_2,PG和TG如文中定义。

[0332] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物，所述方法包括以下步骤：

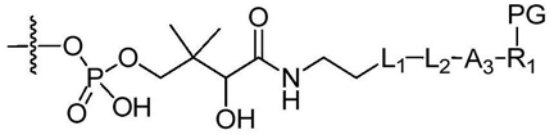
[0333] (a)提供修饰的抗体或其片段，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，

[0334] (b)在式(K)的化合物存在下，通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段，用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段：

[0335] 

式（K）

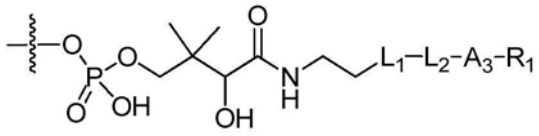
[0336] 从而将式(J-a)中被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着至肽标签，

[0337] 

式（K-a）

[0338] 其中R_1-PG是被保护的官能团R_1；

[0339] (c)使被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护，使式(F-a)的活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团与肽标签附着，

[0340] 

式（F-a）

[0341] 其中R_1是官能团；

[0342] 和

[0343] (d)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-e)的化合物反应，

[0344] X-L_4-TG

[0345] 式(II-e)

[0346] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0347] 其中：

[0348] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0349] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯(oxanobornadiene)；或者，

[0350] 当X是三芳基膦时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0351] 当X是氧杂降冰片二烯时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0352] 当X是炔烃时，则R_1为叠氮化物；或者，

[0353] 当X是烯烃时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0354] 当X为环辛烯时，则R_1为二芳基四嗪；或者，

[0355] 当X为二芳基四嗪时，则R_1是环辛烯；或者，

[0356] 当X为单芳基四嗪时，则R_1是降冰片烯；或者，

[0357] 当X为降冰片烯时，则R_1是单芳基四嗪；或者，

[0358] 当X是醛时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0359] 当X为酮时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0360] 当X是羟胺时，则R_1是醛或酮；或者，

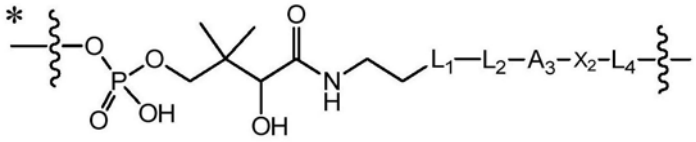
[0361] 当X是肼，则R_1为醛或酮；或者，

[0362] 当X是NH_2-NH-C(=O)-时，则R_1为醛或酮；或者，

[0363] 当X是卤代乙酰胺时，则R_1是巯基；或者，

[0364] 当X是马来酰亚胺时，则R_1是巯基；

[0365] 从而末端基团通过具有根据式(II-f)的结构的接头附着至肽标签：

[0366] 

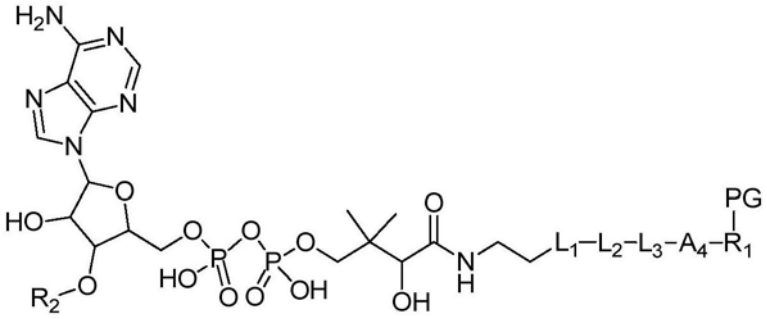
式（II-f）

[0367] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签，且其中L_1,L_2,A_3,X_2,L_4,R_2,PG和TG如文中定义。

[0368] 本文提供的另一个方面是通过如下方法制备免疫缀合物，所述方法包括以下步骤：

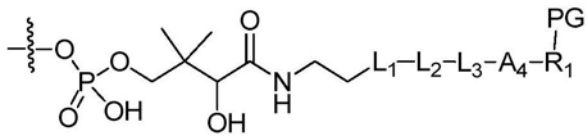
[0369] (a)提供修饰的抗体或其片段，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，并且其中所述肽标签是具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，

[0370] (b)在式(L)的化合物存在下，通过用具有磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶孵育修饰的抗体或其片段，用末端基团(TG)标记修饰的抗体或其片段：

[0371] 

式（L）

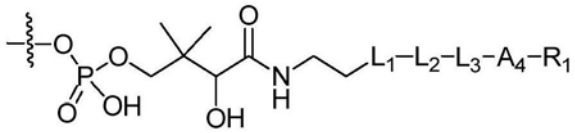
[0372] 从而将式(L-a)中被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团附着至肽标签，

[0373] 

式（L-a）

[0374] 其中R_1-PG是被保护的官能团R_1；

[0375] (c)使被保护的磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护，使式(G-a)的活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团与肽标签附着，

[0376] 

式（G-a）

[0377] 其中R_1是官能团；

[0378] 和

[0379] (d)使活化的磷酸泛酰巯基乙胺基团的R_1官能团与式(II-g)的化合物反应，

[0380] X-TG

[0381] 式(II-g)

[0382] 其中X是与官能团R_1反应的基团，

[0383] 其中：

[0384] 当X是巯基时，则R_1是巯基，马来酰亚胺或卤代乙酰胺；或者，

[0385] 当X是叠氮化物时，则R_1是炔烃，三芳基膦，环辛烯或氧杂降冰片二烯(oxanobornadiene)；或者，

[0386] 当X是三芳基膦时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0387] 当X是氧杂降冰片二烯时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0388] 当X是炔烃时，则R_1为叠氮化物；或者，

[0389] 当X是烯烃时，则R_1是叠氮化物；或者，

[0390] 当X为环辛烯时，则R_1为二芳基四嗪；或者，

[0391] 当X为二芳基四嗪时，则R_1是环辛烯；或者，

[0392] 当X为单芳基四嗪时，则R_1是降冰片烯；或者，

[0393] 当X为降冰片烯时，则R_1是单芳基四嗪；或者，

[0394] 当X是醛时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0395] 当X为酮时，则R_1是羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-；或者，

[0396] 当X是羟胺时，则R_1是醛或酮；或者，

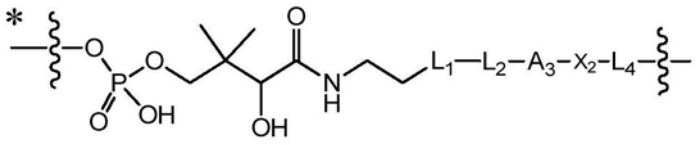
[0397] 当X是肼，则R_1为醛或酮；或者，

[0398] 当X是NH_2-NH-C(=O)-时，则R_1为醛或酮；或者，

[0399] 当X是卤代乙酰胺时，则R_1是巯基；或者，

[0400] 当X是马来酰亚胺时，则R_1是巯基；

[0401] 从而末端基团通过具有根据式(II-h)的结构的接头附着至肽标签：

[0402] 

式（II-h）

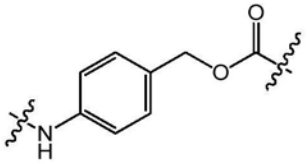
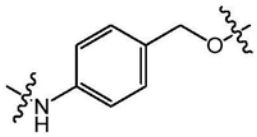
[0403] 其中*指示磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至肽标签，且其中L_1,L_2,L_3,A_4,X_2,R_2,PG和TG如文中定义。

[0404] 在上述制备方法的某些实施方案中，

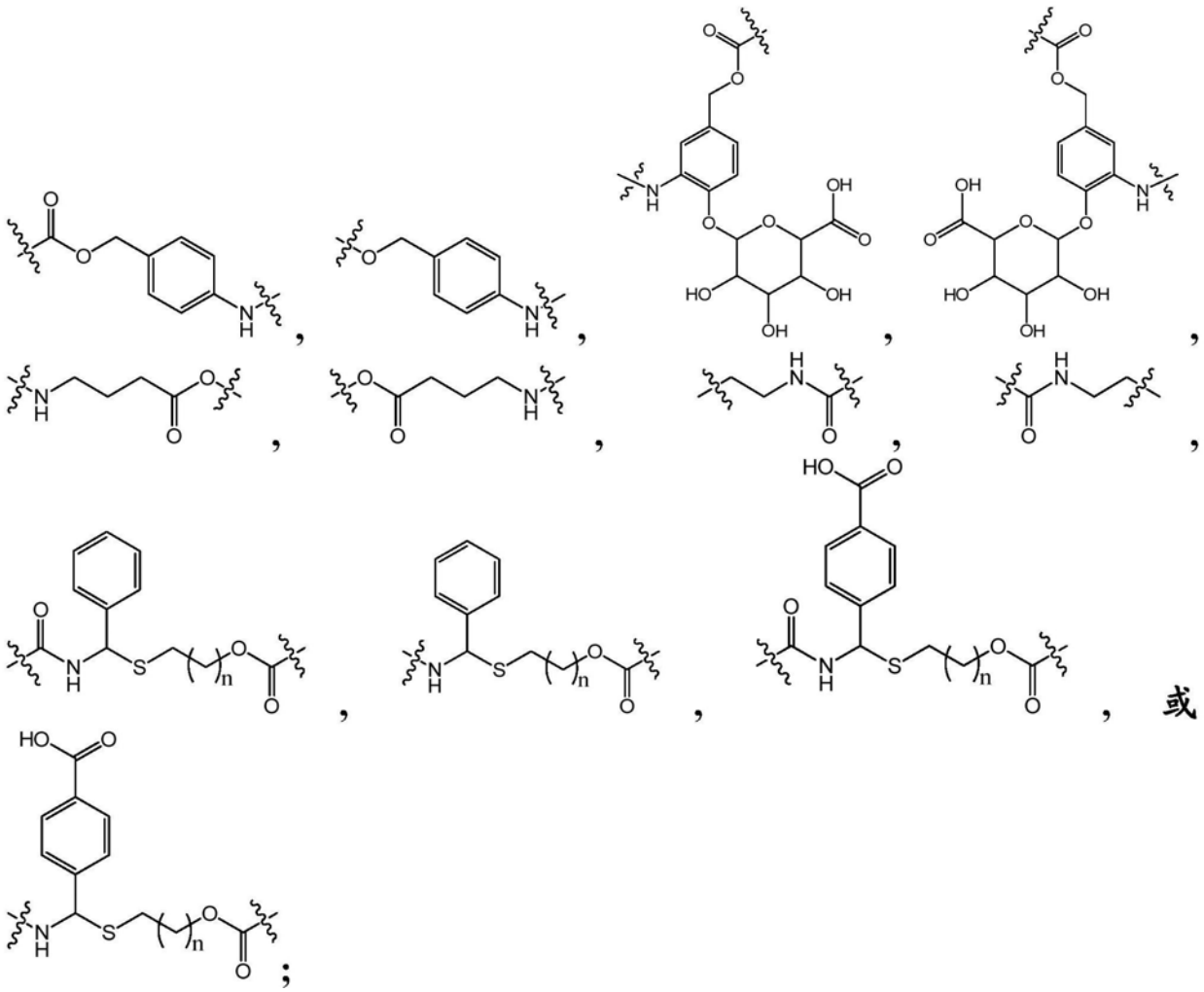
[0405] A_1是-C(=O)NH-,-NHC(=O)-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$-,-(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$-,-(((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-(((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NH-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$S-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$S-,-S(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-S(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-C(=O)(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$C(=O)-,-(C(R^4)$_2$)$_n$C(=O)-,-(CH$_2$)$_n$(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NH((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-(C(R^4)$_2$)$_n$NH((C(R^4)$_2$)$_n$O)$_m$(C(R^4)$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,或-(O(C(R^4)$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(C(R^4)$_2$)$_n$-；

[0406] L_2是键,-A_2-,或-A_2X^2-；

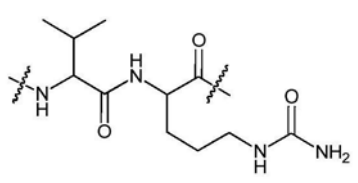
[0407] L_3是键,-A_3-,或-A_3X^2-；

[0408] L_4是键,-A_4-,-A_4X^2-，，，

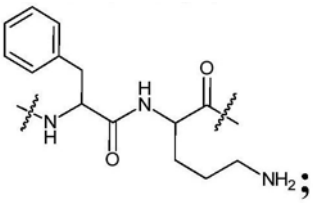
[0409]



[0410] A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$$C(R^4)_2$)$_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)$NR^4$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$S-,-$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH-,-$(C(R^4)_2)_n$NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)-,-$(CH_2)_n$(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$(O$(CH_2)_n$)$_m$OC(=O)NH$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$OC(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NH(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)(C$(R^4)_2)_n$-,



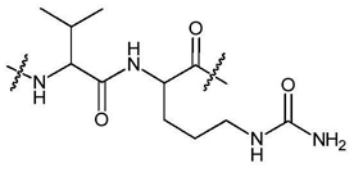
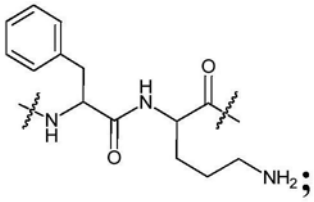
或



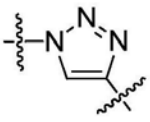
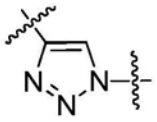
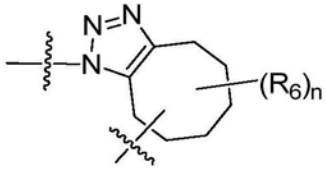
;

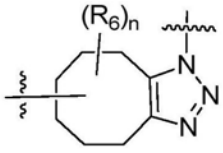
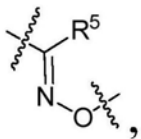
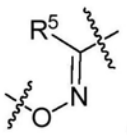
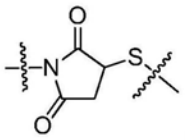
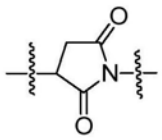
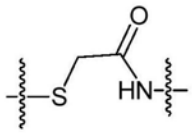
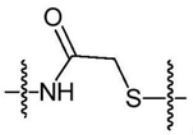
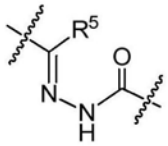
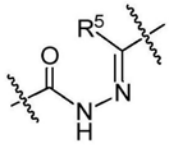
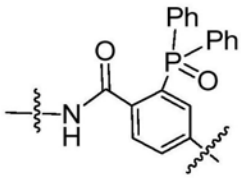
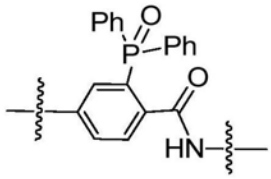
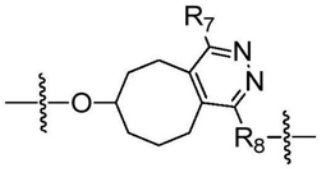
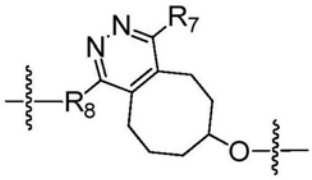
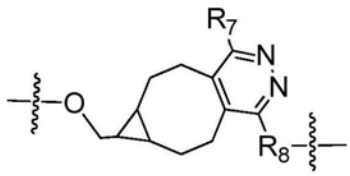
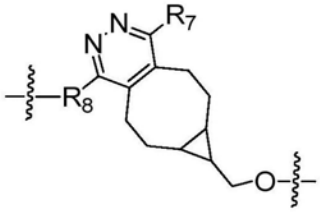
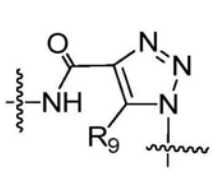
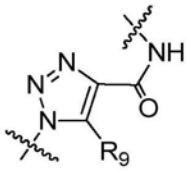
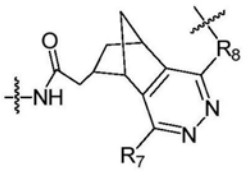
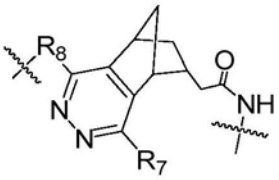
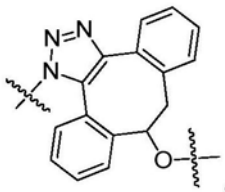
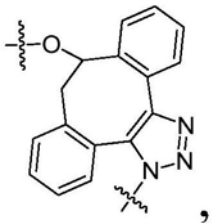
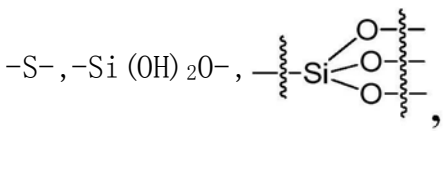
[0411] A_3是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O(C

$(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nS-$,$-(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_n-$,$-S(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mC(=O)-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,

[0412]  或 ;

[0413] A_4是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,或$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

[0414] 每个X^2独立地选自键，，，，

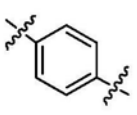
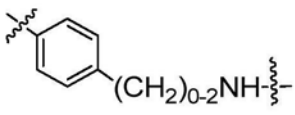
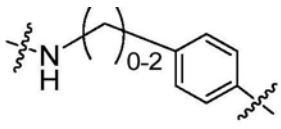
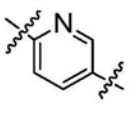
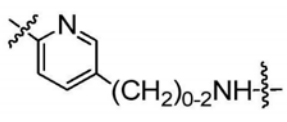
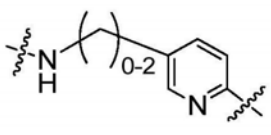
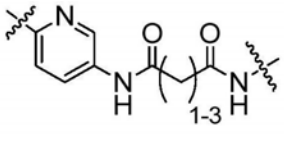
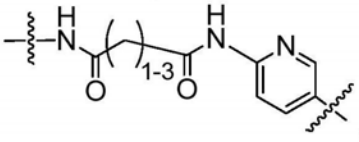
$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

[0415] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

[0416] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

[0417] 每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

[0418] R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

[0419] R^8独立地选自 








[0420] R独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基;

[0421] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9;

[0422] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

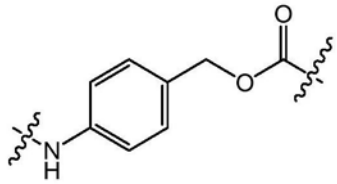
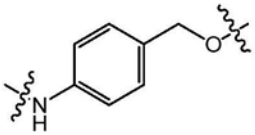
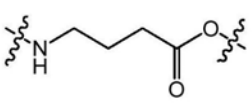
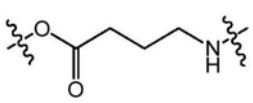
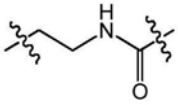
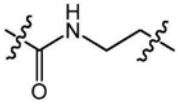
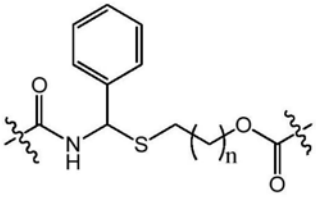
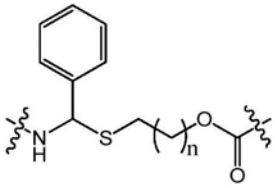
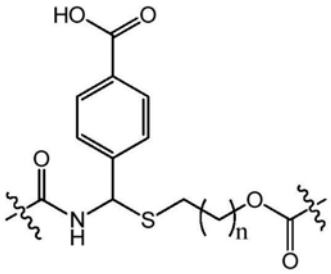
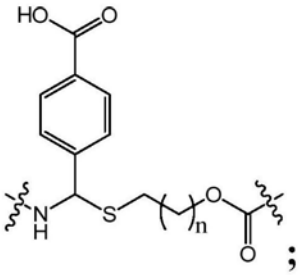
[0423] TG选自药物部分,亲和探针,螯合剂,光谱探针,放射性探针,成像试剂,脂质分子,聚乙二醇,聚合物,纳米颗粒,量子点,脂质体,PLGA颗粒和多糖。

[0424] 在上述制备方法的其它实施方案中,

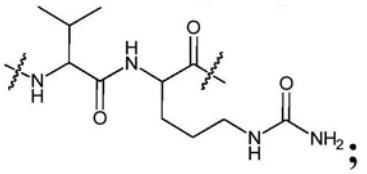
[0425] A_1是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m(CH_2)_n$-或-(O$(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-;

[0426] L_2是键,-A_2-,或-A_2X^2-;

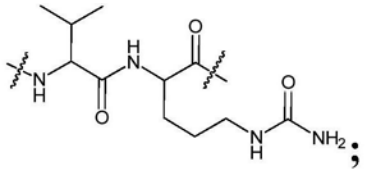
[0427] L_3是键,-A_3-,或-A_3X^2-;

[0428] L_4是键,-A_4-,-A_4X^2-,,,,,,,,,,或;

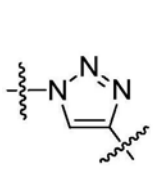
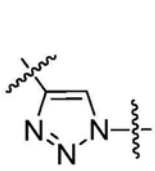
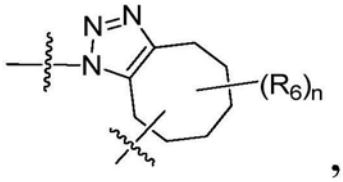
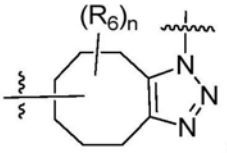
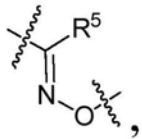
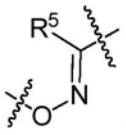
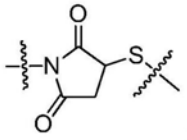
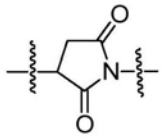
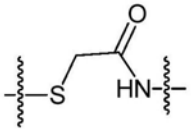
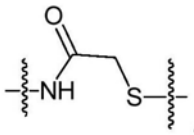
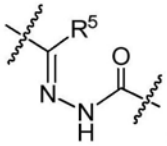
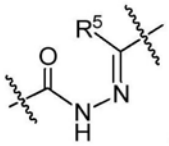
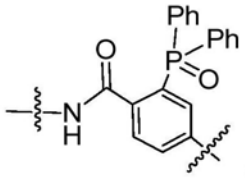
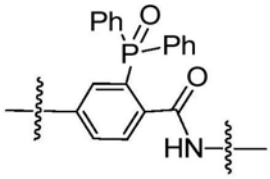
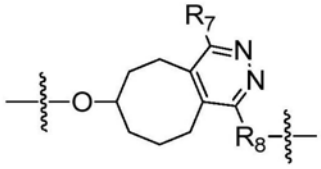
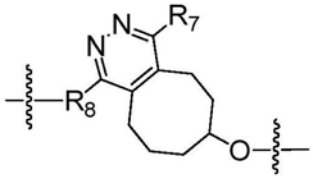
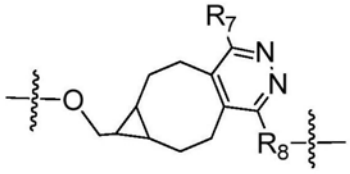
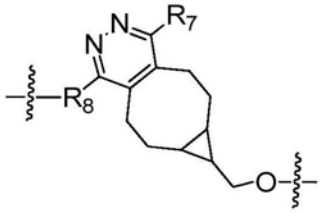
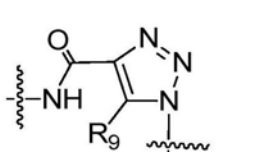
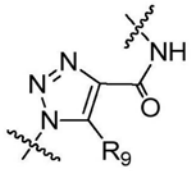
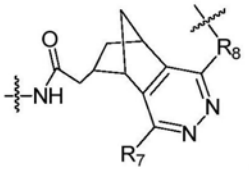
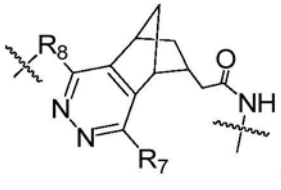
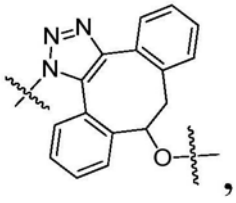
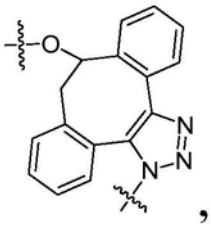
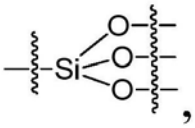
[0429] A_1是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m(CH_2)_n$-或-(O$(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-;

[0430] A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m(CH_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-或;

[0431] A_3是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-

$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$或 ;

[0432] A_4是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

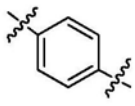
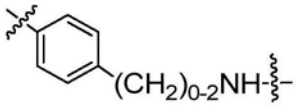
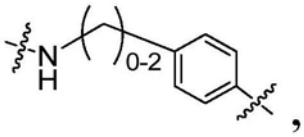
[0433] 每个X^2独立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，-S-,$-Si(OH)_2O-$，，$-CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

[0434] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

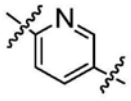
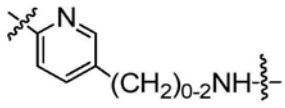
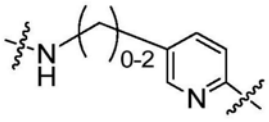
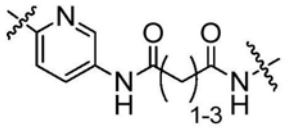
[0435] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

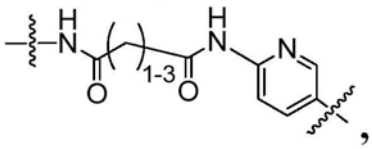
[0436] 每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

[0437] R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

[0438] R^8独立地选自 , , ,

[0439]

, , , ,

,

[0440] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

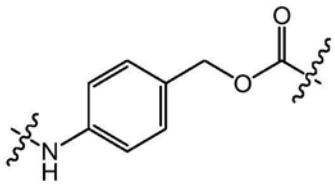
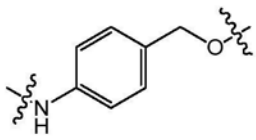
[0441] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

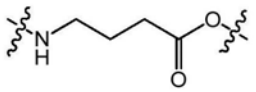
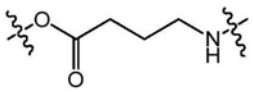
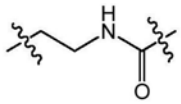
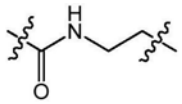
[0442] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9。

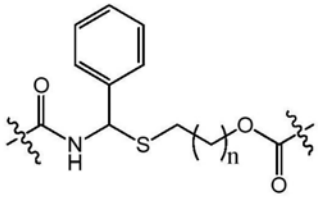
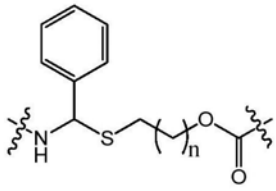
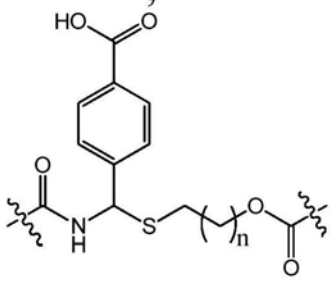
[0443] 在上述制备方法的其它实施方案中

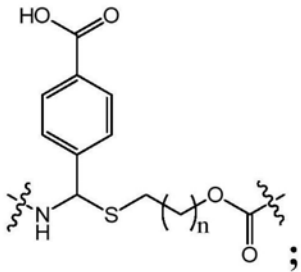
[0444] L_1是键,$-A_1-$,$-A_1X^2-$或$-X^2-$；

[0445] L_3是键,$-A_3-$,或$-A_3X^2-$；

[0446] L_4是键，$-A_4-$，$-A_4X^2-$，, ,

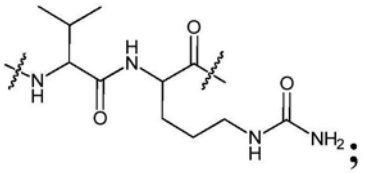
, , , ,

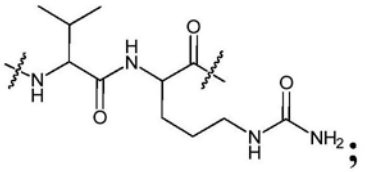
, , , 或

；

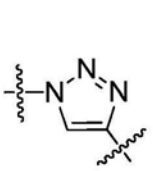
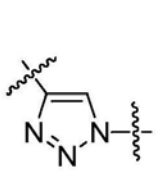
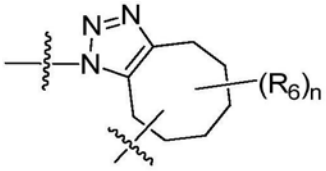
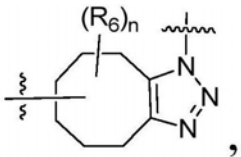
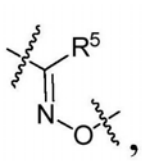
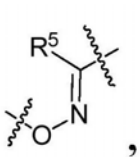
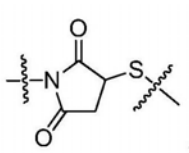
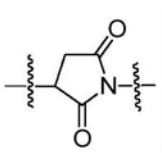
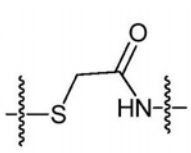
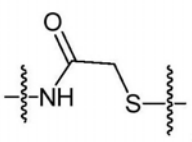
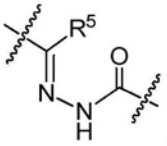
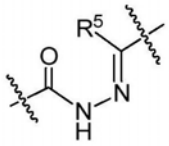
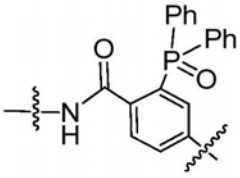
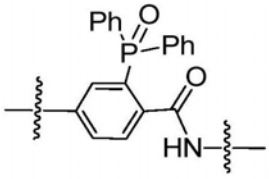
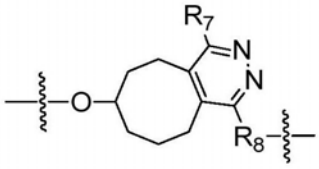
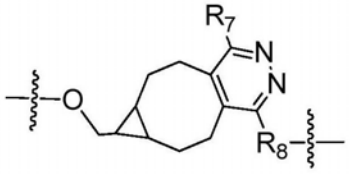
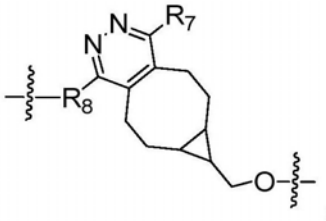
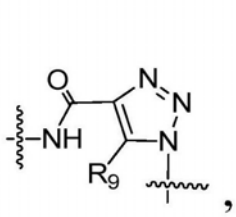
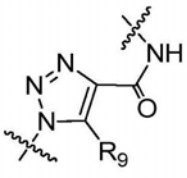
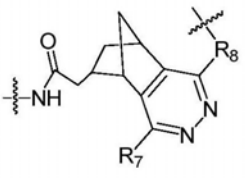
[0447] A_1是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$；

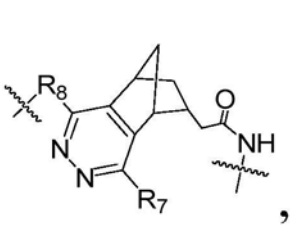
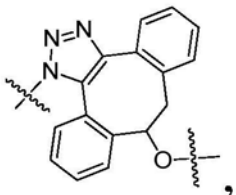
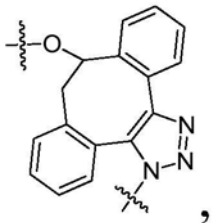
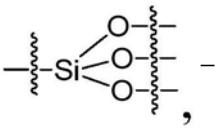
[0448] A_2是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)$

$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NH((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-或 ;

[0449] A$_3$是-C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$S-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NH((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-或 ;

[0450] A$_4$是-C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$S-,-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$-,-((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-,-NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH(CH$_2$)$_n$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-,-(CH$_2$)$_n$NH((CH$_2$)$_n$O)$_m$(CH$_2$)$_n$-或-(O(CH$_2$)$_n$)$_m$NHC(=O)(CH$_2$)$_n$-;

[0451] 每个X^{2}独立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，。




-S-,-Si(OH)$_2$O-,-,

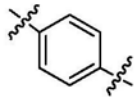
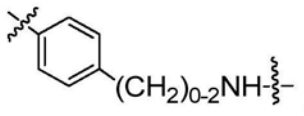
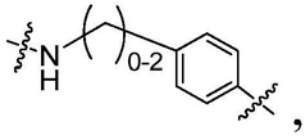
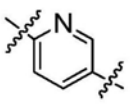
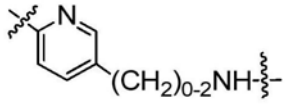
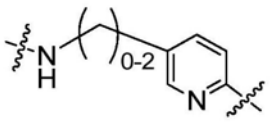
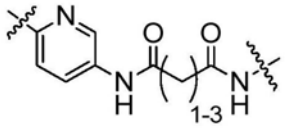
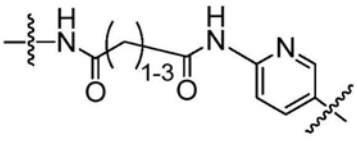
$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

[0452] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和-OH,

[0453] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C1-4烷基;

[0454] 每个R^6独立地选自H,氟代,$-C(=O)OH$取代的苄氧基,$-C(=O)OH$取代的苄基,$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和$-C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

[0455] R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

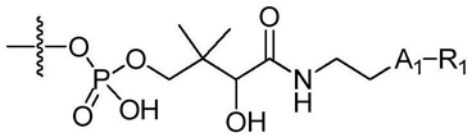
[0456] R^8独立地选自,,,,,,,,

[0457] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基;

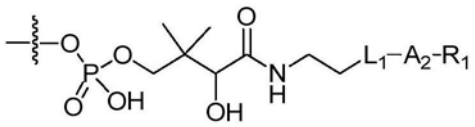
[0458] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0459] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9。

[0460] 本文提供的另一个方面是缀合的抗体或其抗体片段,其包含文中提供的修饰的抗体或抗体片段,其中所述修饰的抗体或其抗体片段中肽标签的丝氨酸残基缀合到具有式(D-a),式(E-a),式(F-a)或式(G-a)结构的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团:

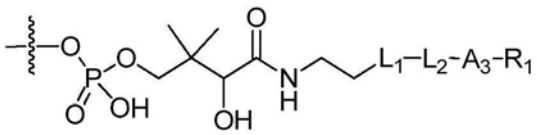
[0461] 

式 (D-a)

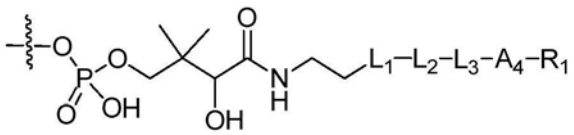


式 (E-a)

[0462]



式(F-a)



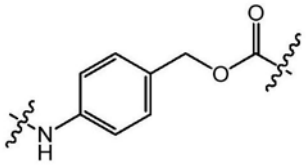
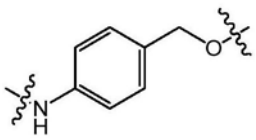
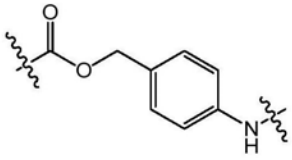
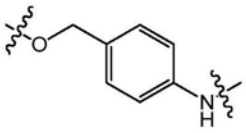
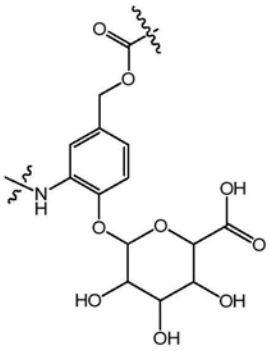
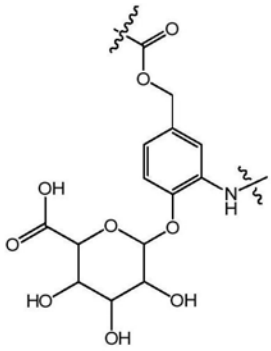
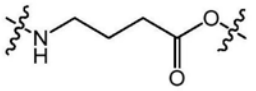
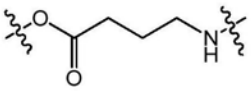
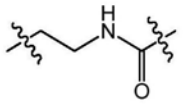
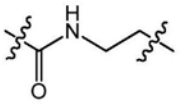
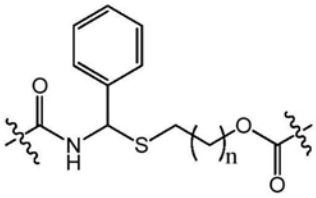
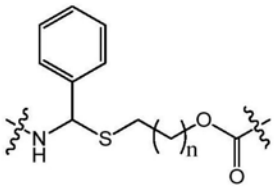
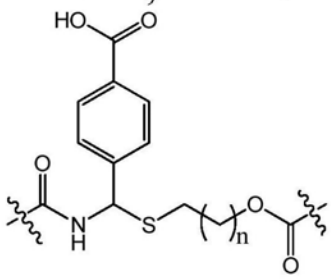
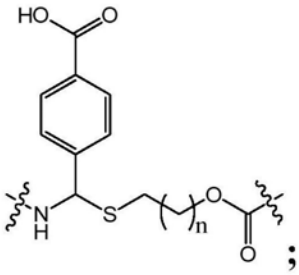
式(G-a)

[0463] 其中:

[0464] L_1是$-A_1X^2-$或$-X^2-$;

[0465] L_2是键,$-A_2-$,或$-A_2X^2-$;

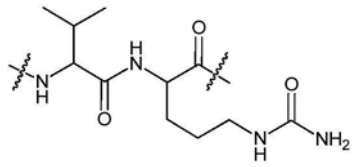
[0466] L_3是键,$-A_3-$,或$-A_3X^2-$;

[0467] L_4是键,$-A_4-$,$-A_4X^2-$,,,,,,,,,,,,,,或;

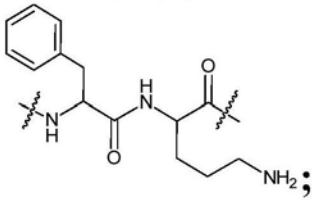
[0468] A_1是$-C(=O)NH-$,$-NHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,或$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

[0469] A_2是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-(O(C$

$(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NR^4-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nS-$,$-(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_n-$,$-S(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH-$,$-(C(R^4)_2)_nNH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,



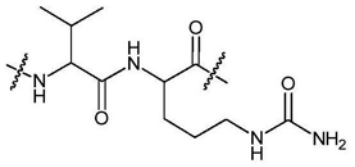
或



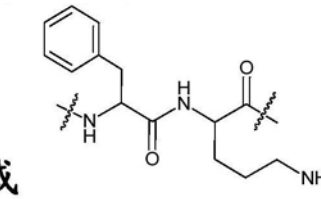
;

[0470] A_3是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nS-$,$-(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_n-$,$-S(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mC(=O)-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,

[0471]



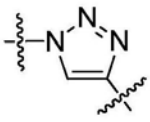
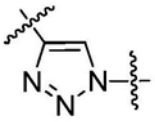
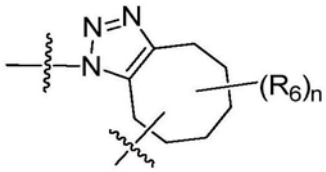
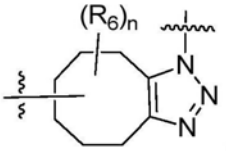
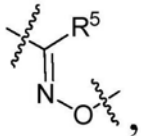
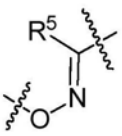
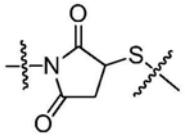
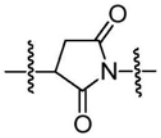
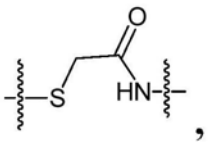
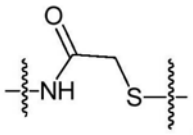
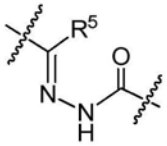
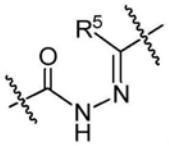
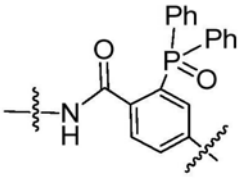
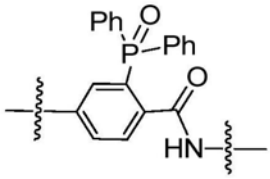
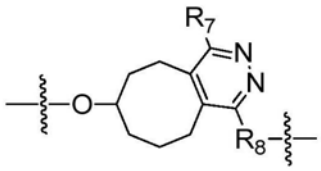
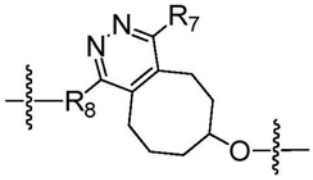
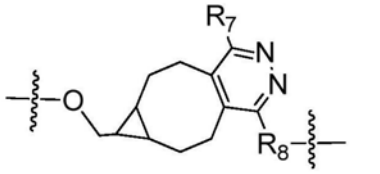
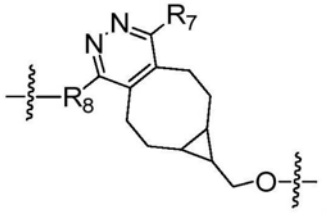
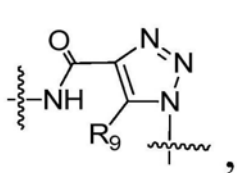
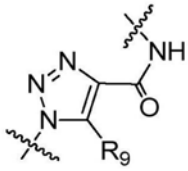
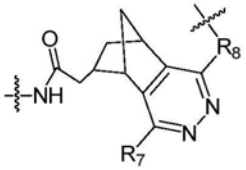
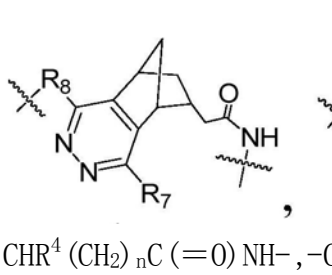
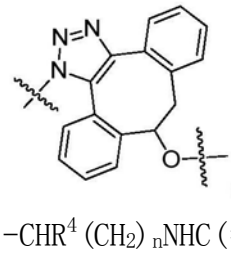
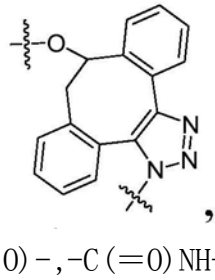
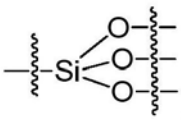
或



;

[0472] A_4是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)nC(=O)-$,$-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m$

$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,或-$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-;

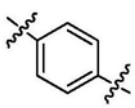
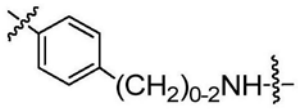
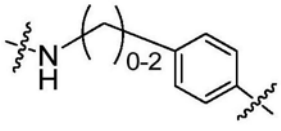
[0473] 每个X^2独立地选自键,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,-S-,-Si(OH)2O-,,-$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH$-,-$CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)$-,-$C(=O)NH$-和-$NHC(=O)$-;

[0474] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,-$C(=O)OH$和-OH,

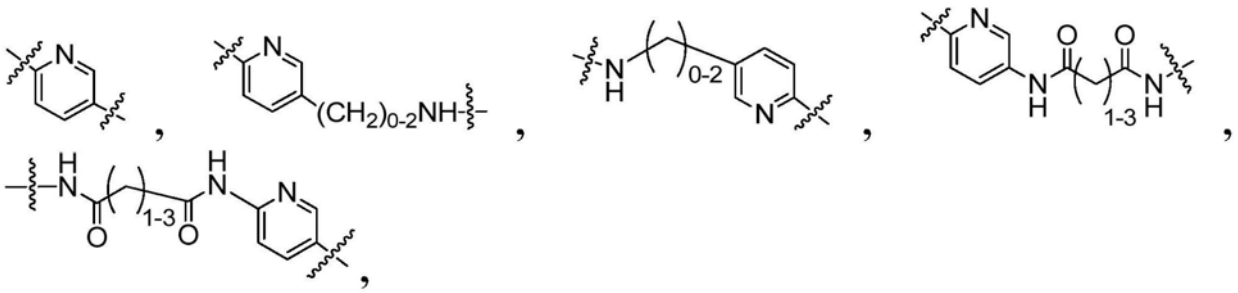
[0475] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

[0476] 每个R^6独立地选自H,氟代,-$C(=O)OH$取代的苄氧基,-$C(=O)OH$取代的苄基,-$C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷氧基和-$C(=O)OH$取代的C_{1-4}烷基;

[0477] R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

[0478] R^8独立地选自,,,

[0479]



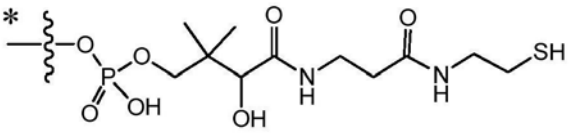
[0480] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

[0481] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,

[0482] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0483] R^1是巯基,马来酰亚胺,卤代乙酰胺,炔烃,三芳基膦,环辛烯,氧杂降冰片二烯,叠氮化物,二芳基四嗪,降冰片烯,单芳基四嗪,羟胺,肼,NH_2-NH-C(=O)-,醛或酮。

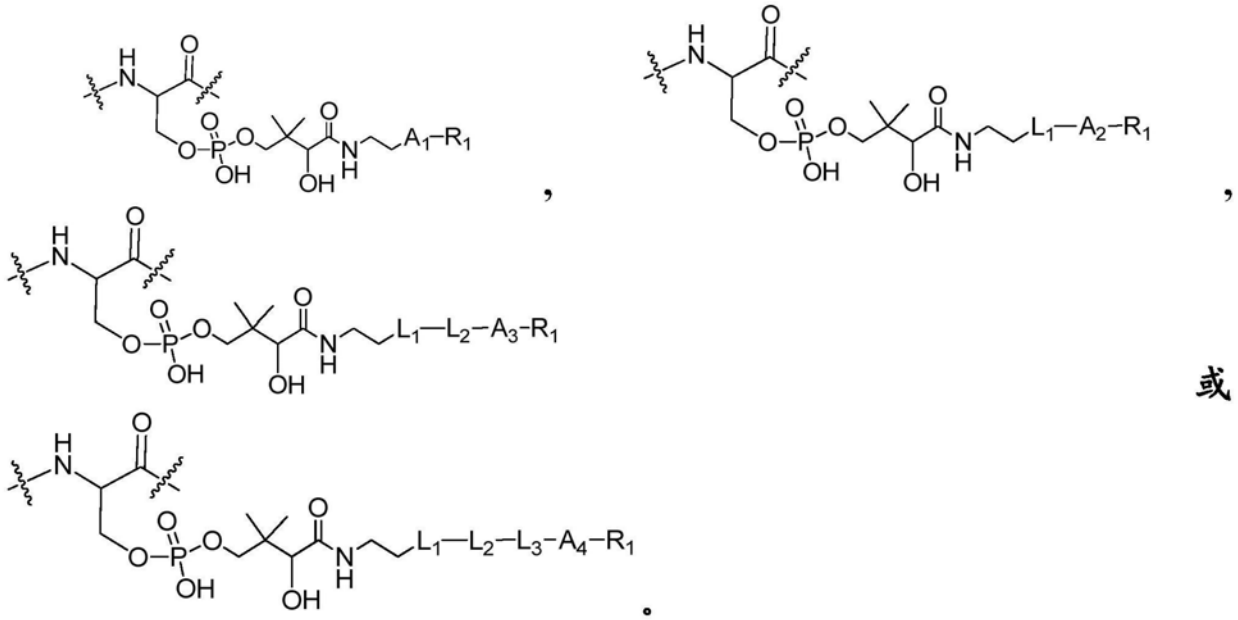
[0484] 在此类缀合的抗体或其抗体片段的某些实施方案中,4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团是



。

[0485] 在此类缀合的抗体或其抗体片段的某些实施方案中,缀合的丝氨酸具有选自以下的结构:

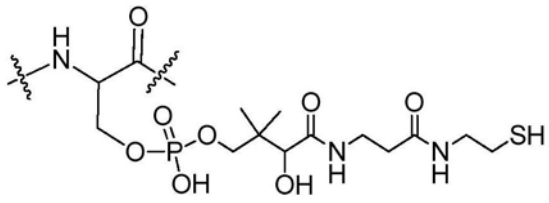
[0486]



。

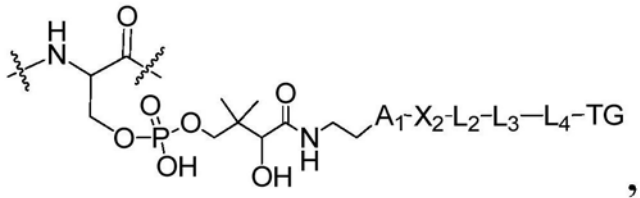
[0487] 在此类缀合的抗体或其抗体片段的其它实施方案中,缀合的丝氨酸是

[0488]

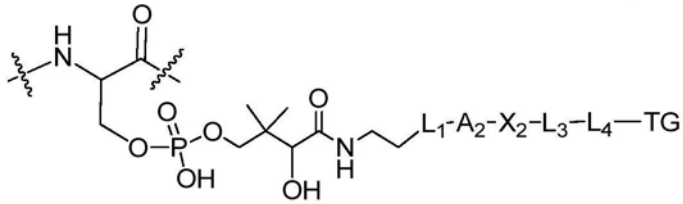


。

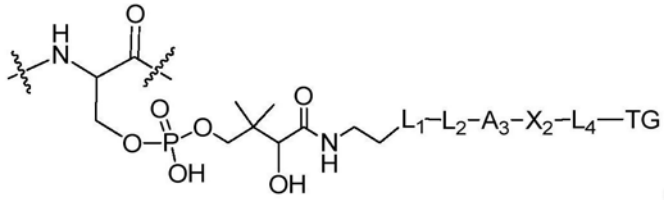
[0489] 本文提供的另一个方面是缀合的抗体或其抗体片段，其包含文中提供的修饰的抗体或其抗体片段，其中肽标签的丝氨酸残基缀合到修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团，且缀合的丝氨酸具有选自以下的结构：



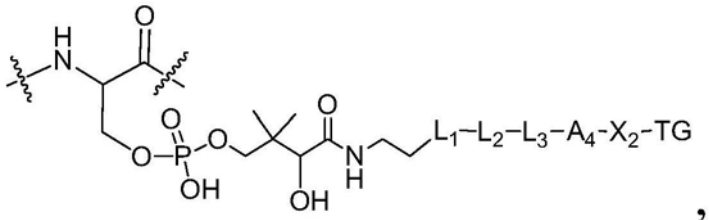
，

[0490] 

，



，和

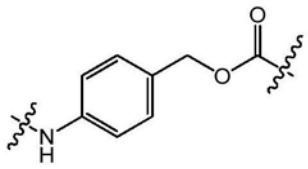
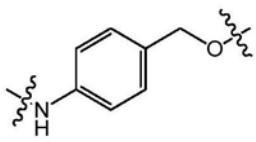
[0491] 

其中，

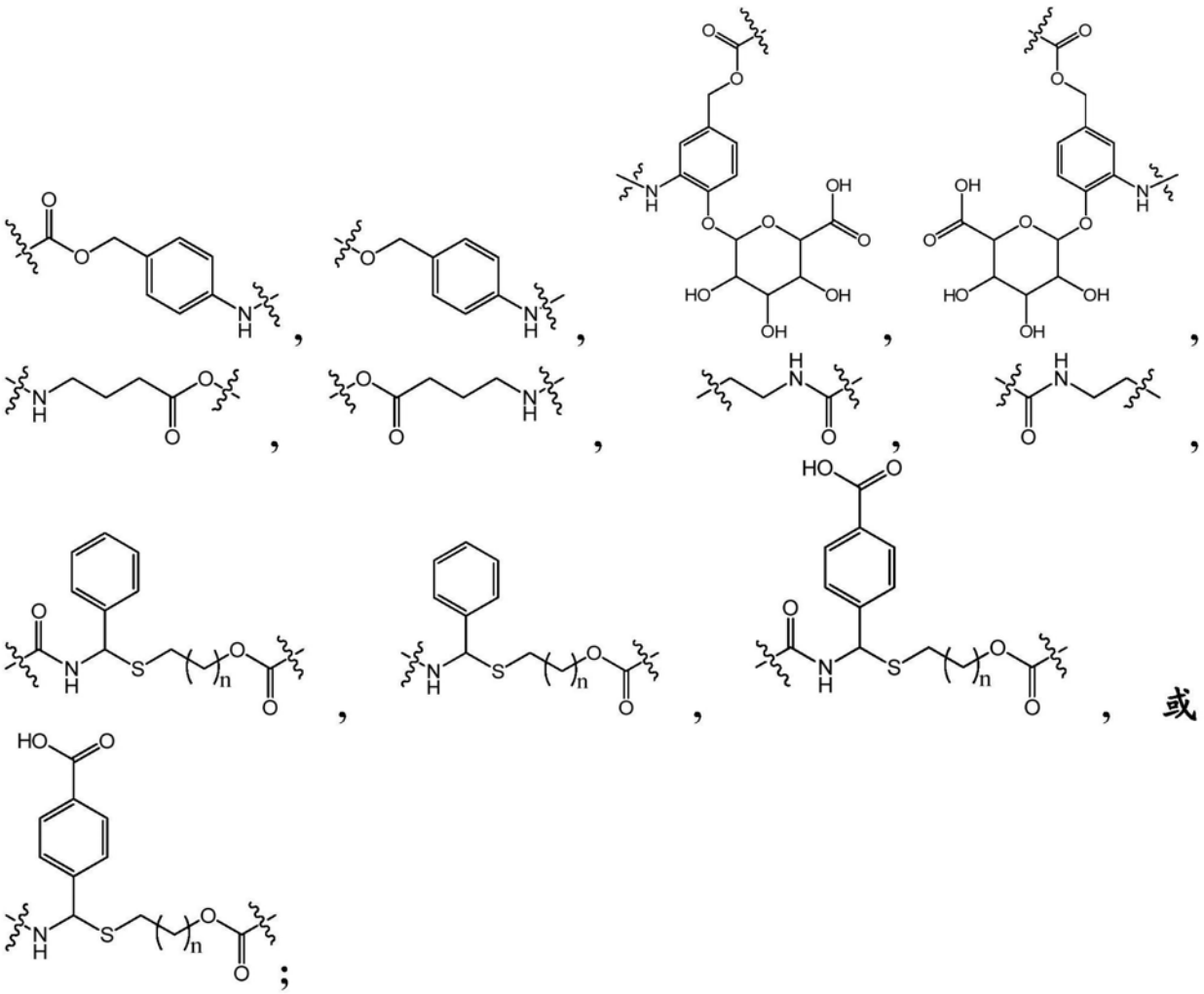
[0492] L_1是$-A_1X^2-$或$-X^2-$；

[0493] L_2是键，$-A_2-$，或$-A_2X^2-$；

[0494] L_3是键，$-A_3-$，或$-A_3X^2-$；

[0495] L_4是键，$-A_4-$，$-A_4X^2-$，，，

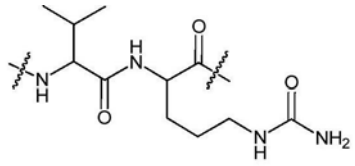
[0496]



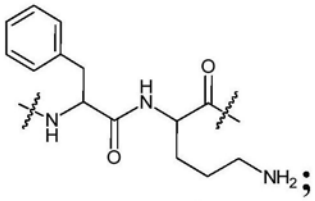
[0497] A_1是-C(=O)NH-,-NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n)_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_nNHC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nS$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_nNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_mNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,或-$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC$(=O)$(C(R^4)_2)_n$-;

[0498] A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_nC$(=O)$NR^4$-,-$(CH_2)_nNHC$(=O)-,-$(C(R^4)_2)_nNHC$(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nS$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_nC$(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_nC$(=O)NH-,-$(CH_2)_nS$-,-$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH$-,-$(C(R^4)_2)_nNH$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nNHC$(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nNHC$

(=O)(C(R4)2)n-,-C(=O)(CH2)n-,-C(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)nC(=O)-,-(C(R4)2)nC(=O)-,-(CH2)n(O(CH2)n)mNHC(=O)(CH2)n-,-(C(R4)2)n(O(C(R4)2)n)mNHC(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)n(O(CH2)n)mOC(=O)NH(CH2)n-,-(C(R4)2)n(O(C(R4)2)n)mOC(=O)NH(C(R4)2)n-,-(CH2)nNHC(=O)(CH2)n-,-(C(R4)2)nNHC(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)nNH((CH2)nO)m(CH2)n-,-(C(R4)2)nNH((C(R4)2)nO)m(C(R4)2)n-,-(O(CH2)n)mNHC(=O)(CH2)n-,-(O(C(R4)2)n)mNHC(=O)(C(R4)2)n-,



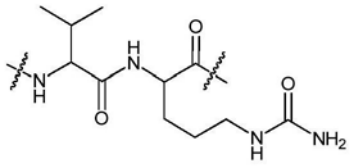
或



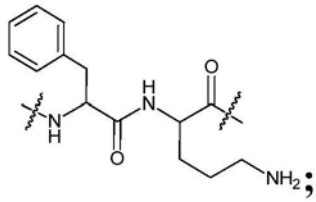
;

[0499] A3是-C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH2)n-,-C(=O)NH(C(R4)2)n-,-(O(CH2)n)m-,-(O(C(R4)2)n)m-,-((CH2)nO)m-,-(((C(R4)2)nO)m-,-((CH2)nO)m(CH2)n-,-(((C(R4)2)nO)mC(R4)2)n-,-(CH2)nC(=O)NH-,-(C(R4)2)nC(=O)NH-,-(CH2)nNHC(=O)-,-(C(R4)2)nNHC(=O)-,-NHC(=O)(CH2)n-,-NHC(=O)(C(R4)2)n-,-C(=O)NH(CH2)nS-,-C(=O)NH(C(R4)2)nS-,-S(CH2)nC(=O)NH-,-S(C(R4)2)nC(=O)NH-,-(CH2)nS-,-(C(R4)2)nS-,-S(CH2)n-,-S(C(R4)2)n-,-C(=O)NH(CH2)nNHC(=O)(CH2)n-,-C(=O)NH(C(R4)2)nNHC(=O)(C(R4)2)n-,-C(=O)(CH2)n-,-C(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)nC(=O)-,-(C(R4)2)nC(=O)-,-(CH2)n(O(CH2)n)mNHC(=O)(CH2)n-,-(C(R4)2)n(O(C(R4)2)n)mNHC(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)nOC(=O)NH(CH2)n-,-(C(R4)2)n(O(C(R4)2)n)mOC(=O)NH(C(R4)2)n-,-(CH2)n(O(CH2)n)mOC(=O)-,-(C(R4)2)n(O(C(R4)2)n)mOC(=O)-,-(CH2)n(O(CH2)n)mC(=O)-,-(C(R4)2)n(O(C(R4)2)n)mC(=O)-,-(CH2)nNHC(=O)(CH2)n-,-(C(R4)2)nNHC(=O)(C(R4)2)n-,-(O(CH2)n)mNHC(=O)(CH2)n-,-(O(C(R4)2)n)mNHC(=O)(C(R4)2)n-,

[0500]

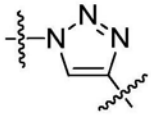
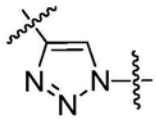
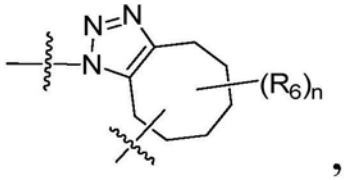
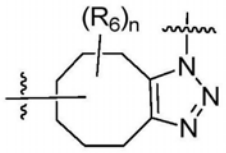
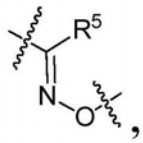
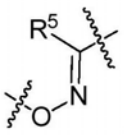
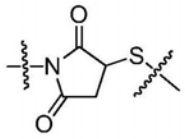
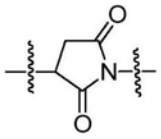
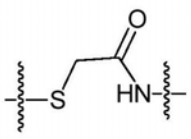
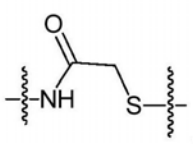
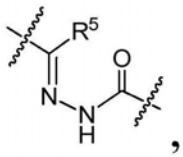
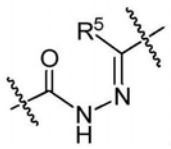
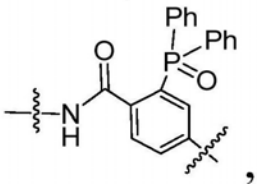
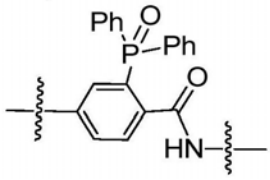
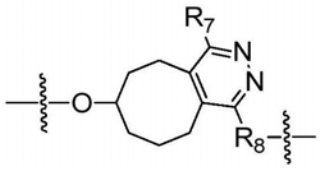
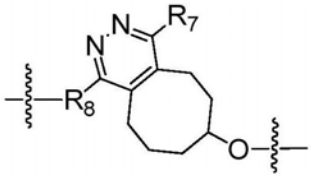
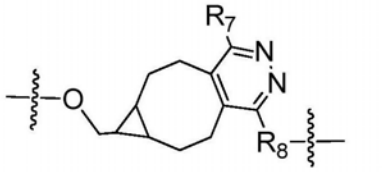
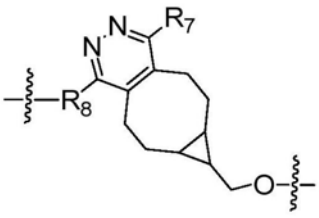
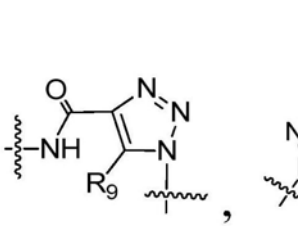
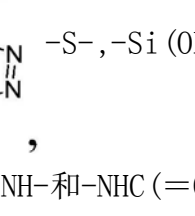
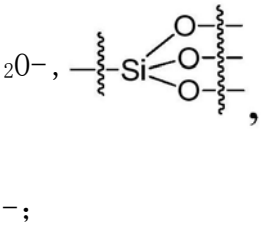
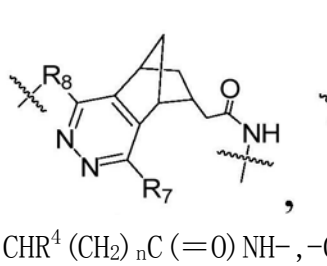
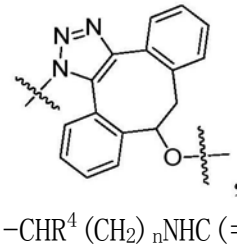
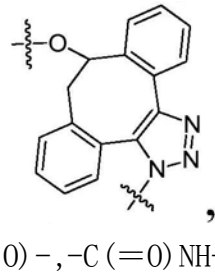


或



;

[0501] A4是-C(=O)NH-,-C(=O)NH(CH2)n-,-C(=O)NH(C(R4)2)n-,-(O(CH2)n)m-,-(O(C(R4)2)n)m-,-((CH2)nO)m-,-(((C(R4)2)nO)m-,-((CH2)nO)m(CH2)n-,-(((C(R4)2)nO)mC(R4)2)n-,-(CH2)nC(=O)NH-,-(C(R4)2)nC(=O)NH-,-(CH2)nNHC(=O)-,-(C(R4)2)nNHC(=O)-,-NHC(=O)(CH2)n-,-NHC(=O)(C(R4)2)n-,-C(=O)NH(CH2)nS-,-C(=O)NH(C(R4)2)nS-,-S(CH2)nC(=O)NH-,-S(C(R4)2)nC(=O)NH-,-C(=O)NH(CH2)nNHC(=O)(CH2)n-,-C(=O)NH(C(R4)2)nNHC(=O)(C(R4)2)n-,-C(=O)(CH2)n-,-C(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)nC(=O)-,-(C(R4)2)nC(=O)-,-(CH2)n(O(CH2)n)mNHC(=O)(CH2)n-,-(C(R4)2)n(O(C(R4)2)n)mNHC(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)nNHC(=O)(CH2)n-,-(C(R4)2)nNHC(=O)(C(R4)2)n-,-(CH2)nNH((CH2)nO)m(CH2)n-,-(C(R4)2)nNH((C(R4)2)nO)m(C(R4)2)n-,-(O(CH2)n)mNHC(=O)(CH2)n-,或-(O(C(R4)2)n)mNHC(=O)(C(R4)2)n-;

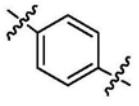
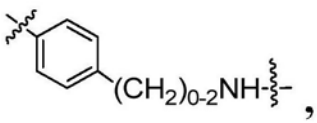
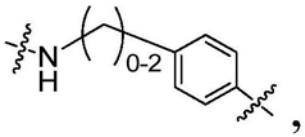
[0502] 每个X^2W立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，-S-，-Si(OH)$_2$O-，，-$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH$-，-$CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)$-，-C(=O)NH-和-NHC(=O)-；

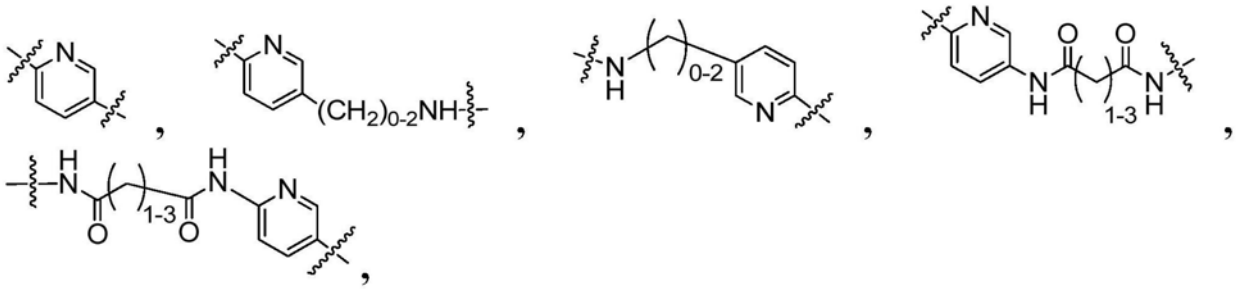
[0503] 每个R^4独立地选自H，C_{1-4}烷基，-C(=O)OH和-OH，

[0504] 每个R^5独立地选自H，C_{1-4}烷基，苯基或1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基；

[0505] 每个R^6独立地选自H，氟代，-C(=O)OH取代的苄氧基，-C(=O)OH取代的苄基，-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基；

[0506] R^7独立地选自H，苯基和吡啶；

[0507] R^8独立地选自，，，



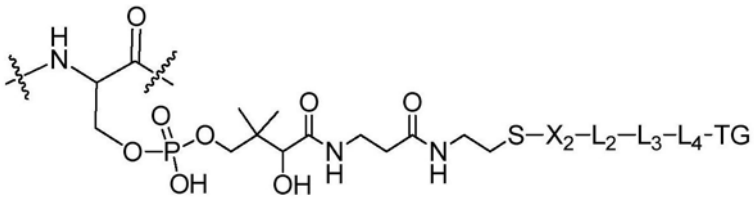
[0508] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

[0509] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,

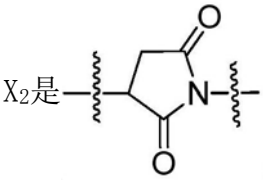
[0510] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0511] TG是药物部分,亲和探针,螯合剂,光谱探针,放射性探针,成像试剂,脂质分子,聚乙二醇,聚合物,纳米颗粒,量子点,脂质体,PLGA颗粒,多糖,乙酰基,或表面。

[0512] 此类缀合的抗体或其抗体片段的某些实施方案中,缀合的丝氨酸是



此类缀合抗体的或其抗体片段中,



X_2是—或-$(CH_2)C(=O)NH$-。

[0513] 本发明还提供了包含有效量的本发明的免疫缀合物,或其可药用的盐,以及可药用的稀释剂,运载体或赋形剂的药物组合物。

[0514] 本发明提供了治疗疾病,如癌症的方法,所述方法包括向有需要的哺乳动物施用有效量的本发明的免疫缀合物。在某些实施方案中,本发明提供免疫缀合物用作药物。在某些实施方案中,本发明提供了免疫缀合物在制备用于治疗癌症,自身免疫性疾病,炎性疾病,感染性疾病(如细菌,真菌,病毒),遗传性病症,心血管疾病,和/或代谢性疾病的药物中的用途。

[0515] 本发明提供生产本文中所描述的免疫缀合物的方法。在一个实施方案中,该方法包括在合适的条件下孵育本发明的修饰的抗体或抗体片段、4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶和连接到CoA的末端基团,以促进形成免疫缀合物,所述免疫缀合物包含由4'-磷酸泛酰巯基乙胺连接在一起的抗体或抗体片段和末端基团。在具体实施方案中,合适的条件包含4℃至37℃之间的温度,pH 6.5至pH9.0。

[0516] 在生产本文中所描述的免疫缀合物的此类方法的另一个实施方案中,该方法包括在合适的条件下孵育本发明的修饰的抗体或抗体片段,4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,和连接到CoA的末端基团或连接到CoA类似物的末端基团,从而促进免疫缀合物的形成,所述免疫缀合物包含通过接头连接在一起的抗体或抗体片段和末端基团,所述接头包含4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物。在具体实施方案中,合适的条件包含4℃至37℃之间的温度,和pH 6.5至pH9.0。

[0517] 在生产本文中所描述免疫缀合物的此类方法的另一个实施方案中，该方法包括以下步骤：

[0518] i)在合适的条件下，用4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶和CoA或CoA类似物孵育本发明的修饰的抗体或抗体片段，从而将4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物附着至抗体或抗体片段，其中所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物包含官能团，

[0519] 和

[0520] ii)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物与任选地连接末端基团的反应性基团反应，由此形成免疫缀合物，所述免疫缀合物包含通过接头连接在一起的抗体或抗体片段和末端基团，所述接头包含4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'磷酸泛酰巯基乙胺类似物。

[0521] 在具体实施方案中，合适的条件包含4℃至37℃之间的温度，和pH6.5至pH9.0。

[0522] 在生产本文中所描述免疫缀合物的此类方法的另一个实施方案中，该方法包括以下步骤：

[0523] i)在合适的条件下，用4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶和CoA或CoA类似物孵育本发明的修饰的抗体或抗体片段，从而将4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物附着至抗体或抗体片段，其中所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺和4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物包含被保护的官能团，

[0524] ii)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物的被保护的官能团脱保护，

[0525] 和

[0526] iii)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物的脱保护的官能团与任选地连接末端基团的反应性基团反应，由此形成免疫缀合物，所述免疫缀合物包含通过接头连接在一起的抗体或抗体片段和末端基团，所述接头包含4'-磷酸泛酰巯基乙胺或4'-磷酸泛酰巯基乙胺类似物。

[0527] 在具体实施方案中，合适的条件包含4℃至37℃之间的温度，和pH6.5至pH9.0。

[0528] 定义

[0529] 如本文使用的术语“烯基”或“烯烃”，是指具有至少一个碳-碳双键的支链或直链烃。相对双键定向的原子处于顺式(Z)或反式(E)构象。本文所用的术语“C_2-C_4烯基”，“C_2-C_5烯基”，“C_2-C_6烯基”，“C_2-C_7烯基”，“C_2-C_8烯基”，“C_2-C_4烯烃”，“C_2-C_5烯烃”，“C_2-C_6烯烃”，“C_2-C_7烯烃”和“C_2-C_8烯烃”指的是具有至少一个碳-碳双键，且分别含有至少2个和至多4，5，6，7或8个碳原子的支链或直链烃。非限制性的烯基团的例子，如本文所使用的，包括乙烯基，乙烯，丙烯基(epropenyl)，丙烯，烯丙基(2-丙烯基)，2-丙烯，丁烯基，戊烯基，戊烯，己烯基，庚烯基，庚烯，辛烯基，壬烯基，壬烯，癸烯基，癸烯等。如果没有特别的说明，烯基通常是C_2-C_6烯基。

[0530] 如本文使用的术语“炔基”或“炔烃”，是指具有至少一个碳-碳三键的支链或直链烃。如本文所用的术语“C_2-C_4炔基”，“C_2-C_5炔基”，“C_2-C_6炔基”，“C_2-C_7炔基”和“C_2-C_8炔基”是指具有至少1个碳-碳三键，且分别含有至少2个和至多4，5，6，7或8个碳原子的支链或直链烃基。如本文所使用的非限制性的炔基的例子，包括乙炔基，丙炔基，丁炔基，戊炔基，己

炔基，庚炔基，辛炔基，壬炔基，癸炔基等。如果没有特别的说明，炔基通常是C_2-C_6炔基。

[0531] 如本文所用的术语“烷基”，是指饱和的支链或直链烃。如本文所用的术语“C_1-C_3烷基”，“C_1-C_4烷基”，“C_1-C_5烷基”，“C_1-C_6烷基”，“C_1-C_7烷基”或“C_1-C_8烷基”指的是分别含至少1个，并且至多3，4，5，6，7或8个碳原子的饱和支链或直链烃。本文所用的非限制性烷基的例子包括甲基，乙基，正丙基，异丙基，正丁基，异丁基，仲丁基，叔丁基，正戊基，异戊基，己基，庚基，辛基，壬基，癸基等。如果没有另外指定，烷基通常是C_1-C_6烷基。

[0532] 如本文所用的术语“烷氧基”是指基团-OR_a，其中R_a是如本文所定义的烷基。如本文所用的术语“C_1-C_3烷氧基”，“C_1-C_4烷氧基”，“C_1-C_5烷氧基”，“C_1-C_6烷氧基”，“C_1-C_7烷氧基”和“C_1-C_8烷氧基”是指其中烷基部分含有至少1个和至多3，4，5，6，7或8个碳原子的烷氧基。如本文所用的非限制性烷氧基的例子，包括甲氧基，乙氧基，正丙氧基，异丙氧基，正丁氧基，叔丁氧基，戊氧基，己氧基，庚氧基，辛氧基，壬氧基，癸氧基等。

[0533] 如本文使用的术语“芳基”，是指具有总共6至14个环成员的单环，双环，和三环环系统，其中该系统中至少一个环是芳族的。芳基还包括稠合到一个或多个非芳族烃环的一个或多个芳环。如本文所使用的非限制性的芳基的例子，包括苯基(Ph)，萘基，芴基，茚基，蒽基，蒽基等。芳基可含有一个或多个取代基，因此可以被“任选地取代”。除非另有说明，芳基可以有多达4个取代基。

[0534] 如本文使用的术语“环烷基”，是指饱和的单环，稠合双环，稠合三环或桥连多环集合。本文所用的术语“C_3-C_5环烷基”，“C_3-C_6环烷基”，“C_3-C_7环烷基”，“C_3-C_8环烷基”，“C_3-C_9环烷基”和“C_3-C_{10}环烷基”指饱和的单环，稠合双环，稠合三环或桥连的多环集合，其含有至少3，和至多5，6，7，8，9或10个碳原子。如本文所使用的非限制性环烷基的例子，包括环丙基，环丁基，环戊基，环己基，环庚基，环辛基，环壬基，环癸基，十氢化萘等。如果不另外指明，环烷基通常是C_3-C_8环烷基。

[0535] 如本文使用的术语“环烯基”或“环烯”，是指具有至少一个碳-碳双键的单环，稠合双环，稠合三环或桥连多环集合。相对双键定向的原子处于顺式(Z)或反式(E)构象。单环环烯可以被稠合到一个或两个芳环上。如本文所使用的非限制性的环烯基的例子，包括环丙烯基，环丁烯基，环戊烯基，环己烯基，环庚烯基，环辛烯基，环壬烯基，环癸烯基等。如果不另外指明，环烯基通常是C_5-C_8环烯基。

[0536] 如本文使用的术语“环炔基”或“环炔”，是指具有至少一个碳-碳三键的单环，稠合双环，稠合三环或桥连多环集合。单环环炔可以被稠合到一个或两个芳环上。如本文所用的非限制性环炔基的例子，包括环丙炔基，环丁炔基，环戊炔基，环己炔基，环庚炔基，环辛炔基，环壬炔基，环癸炔基等。如果不另外指明，环炔基通常是C_6-C_8环炔基。

[0537] 这里使用的术语“杂芳基”，是指具有1至4个独立地选自氮，氧和硫的杂原子的5-6元杂芳族单环；具有1-4个独立地选自氮，氧和硫的杂原子作为环成员的8-10元稠合双环，且其中至少一个环是芳族；或具有1至4个独立地选自氮，氧和硫的杂原子的12-14元稠合三环，且其中至少一个环是芳族。这种稠合双环和三环系统还可稠合到一个或多个芳基，环烷基或杂环烷基环。如本文所使用的非限制性杂芳基的例子，包括2-或3-呋喃基；1-，2-，4-，或5-咪唑基；3-，4-，或5-异噻唑基；3-，4-，或5-异恶唑基；2-，4-，或5-恶唑基；4-或5-1，2，3-恶二唑基；2-或3-吡嗪基；1-，3-，4-，或5-吡唑基；3-，4-，5-或6-哒嗪基；2-，3-，或4-吡啶基；2-，4-，5-或6-嘧啶基；1-，2-或3-吡咯基；1-或5-四唑基；2-或5-1，3，4噻二唑基；2-，4-，

或5-噻唑基;2-或3-噻吩基;2-,4-或6-1,3,5-三嗪基;1-,3-或5-1,2,4-三唑基;1-,4-或5-1,2,3-三唑基;1-,2-,3-,4-,5-,6-,7-,8-,或9-吖啶基;1-,3-,4-,5-,6-,7-,8-,9-或10-苯并[g]异喹啉;2-,4-,5-,6-,或7-苯并恶唑基;1-,2-,4-,5-,6-,或7-苯并咪唑基;2-,4-,5-,6-,或7-苯并噻唑基;2-,3-,4-,5-,6-,7-苯并[b]噻吩基;2-,3-,4-,5-,6-,7-,8-,9-苯并[b]恶庚因;2-,4-,5-,6-,7-,或8-苯并恶嗪基;1-,2-,3-,4-,5-,6-,7-,8-或9-咔唑基;3-,4-,5-,6-,7-,或8-噌啉基;2-,4-,或5-4H咪唑并[4,5-d]噻唑基;2-,3-,5-,或6-咪唑并[2,1-b]噻唑基;2-,3-,6-,或7-咪唑并[1,2-b][1,2,4]三嗪基;1-,3-,4-,5-,6-或7-吲唑基;1-,2-,3-,5-,6-,7-,或8-吲嗪基;1-,2-,3-,4-,5-,6-,或7-吲哚基;1-,2-,3-,4-,5-,6-,或7-异吲哚基;1-,3-,4-,5-,6-,7-,或8异喹啉基;2-,3-,4-,5-,6-,或7-萘啶基;1-,2-,4-,5-,6-,7-,8-或9-呫啶基;1-,2-,3-,4-,6-,7-,8-,9-或1-0菲啶基;1-,2-,3-,4-,5-,6-,7-,8-,9-,或10-菲啰啉基(phenathrolinyl);1-,2-,3-,4-,6-,7-,8-,或9-吩噻基;1-,2-,3-,4-,6-,7-,8-,9-,或10-吩噻嗪基;1-,2-,3-,4-,6-,7-,8-,9-或10-吩恶嗪基;1-,4-,5-,6-,7-,或8-酞嗪基;2-,4-,6-,或7-蝶啶基;2-,6-,7-,或8-嘌呤基;2-,3-,5-,6-,7-,8-,9-,10-,或11-7H-吡嗪并[2,3-c]咔唑;2-,3-,5-,6-,或7-呋喃并[3,2-b]-吡喃基;1-,3-,或5-1H-吡唑并[4,3-d]-恶唑基;2-,3-,5-,或8-吡嗪并[2,3-d]哒嗪基;1-,2-,3-,4-,5-,或8-5H吡啶并[2,3-d]-o-恶嗪基;1-,2-,3-,4-,6-,7-,8-,或9-喹嗪基;2-,3-,4-,5-,6-,7-,或8-喹啉基;2-,3-,4-,5-,6-,7-或8-喹唑啉基;2-,3-,4-,或5-噻吩并[2,3-b]呋喃基,和1-,3-,6-,7-,8-,或9-呋喃并[3,4-C]噌啉基。

[0538] 如本文所用的术语“杂原子”,是指氮(N),氧(O)或硫(S)原子。

[0539] 如本文所用的术语“杂环烷基,”是指饱和的3-8元单环烃环结构,饱和的6-9元稠合双环烃环结构,或饱和的10-14元稠合三环烃环结构,其中烃环结构的1至4个环碳原子由1至4个独立地选自-O-,-NR-,-S-的基团所取代,其中R为氢,C_1-C_4烷基或氨基保护基团。如本文所使用的非限制性杂环烷基团的例子,包括氮丙啶基,氮丙啶-1-基,氮丙啶-2-基,氮丙啶-3-基,环氧乙烷基,环氧乙烷-2-基,环氧乙烷-3-基,环硫乙烷基,环硫乙烷-2-基,环硫乙烷-3-基,azetadinyl,azetadin-1-基,azetadin-2-基,azetadin-3-基,氧杂环丁烷基,氧杂环丁烷-2-基,氧杂环丁烷-3-基,氧杂环丁烷-4-基,硫杂环丁烷基,硫杂环丁烷-2-基,硫杂环丁烷-3-基,硫杂环丁烷-4-基,吡咯烷基,吡咯烷-1-基,吡咯烷-2-基,吡咯烷-3-基,吡咯烷-4-基,吡咯烷-5-基,四氢呋喃基,四氢呋喃-2-基,四氢呋喃-3-基,四氢呋喃-4-基,四氢呋喃-5-基,四氢噻吩基,四氢噻吩-2-基,四氢噻吩-3-基,四氢噻吩-4-基,四氢噻吩-5-基,哌啶基,哌啶-1-基,哌啶-2-基,哌啶-3-基,哌啶-4-基,哌啶-5-基,哌啶-6-基,四氢吡喃基,四氢吡喃-2-基,四氢吡喃-3-基,四氢吡喃-4-基,四氢吡喃-5-基,四氢吡喃-6-基,四氢噻喃基,四氢噻喃-2-基,四氢噻喃-3-基,四氢噻喃-4-基,四氢噻喃-5-基,四氢噻喃-6-基,哌嗪基,哌嗪-1-基,哌嗪-2-基,哌嗪-3-基,哌嗪-4-基,哌嗪-5-基,哌嗪-6-基,吗啉基,吗啉-2-基,吗啉-3-基,吗啉-4-基,吗啉-5-基,吗啉-6-基,硫代吗啉基,硫吗啉-2-基,硫吗啉-3-基,硫代吗啉-4-基,硫代吗啉基-5-基,硫代吗啉-6-基,氧硫杂环己烷基,氧硫杂环己烷-2-基,氧硫杂环己烷-3-基,氧硫杂环己烷-5-基,氧硫杂环己烷-6-基,二噻烷基,二噻烷-2-基,二噻烷-3-基,二噻烷-5-基,二噻烷-6-基,氮杂环庚烷基,氮杂环庚烷-1-基,氮杂环庚烷-2-基,氮杂环庚烷-3-基,氮杂环庚烷-4-基,氮杂环庚烷-5-基,氮杂环庚烷-6-基,氮杂环庚烷-7-基,环氧己烷基,环氧己烷-2-基,环氧己烷-3-基,环氧己烷-4-基,

环氧己烷-5-基，环氧己烷-6-基，环氧己烷-7-基，硫杂环庚烷基，硫杂环庚烷-2-基，硫杂环庚烷-3-基，硫杂环庚烷-4-基，硫杂环庚烷-5-基，硫杂环庚烷-6-基，硫杂环庚烷-7-基，二氧戊环基，二氧戊环-2-基，二氧戊环-4-基，二氧戊环-5-基，噻恶烷基，噻恶烷-2-基，噻恶烷-3-基，噻恶烷-4-基，噻恶烷-5-基，二硫戊环基，二硫戊环-2-基，二硫戊环-4-基，二硫戊环-5-基，吡咯啉基，吡咯啉-1-基，吡咯啉-2-基，吡咯啉-3-基，吡咯啉-4-基，吡咯啉-5-基，咪唑啉基，咪唑啉-1-基，咪唑啉-3-基，咪唑啉-4-基，咪唑啉-5-基，咪唑烷基，咪唑烷-1-基，咪唑烷-2-基，咪唑烷-3-基，咪唑-4-基，咪唑烷-4-基，吡唑啉基，吡唑啉-1-基，吡唑啉-3-基，吡唑啉-4-基，吡唑啉-5-基，吡唑烷基，吡唑烷-1-基，吡唑烷-2-基，吡唑烷-3-基，吡唑烷-4-基，吡唑烷-5-基，六氢-1,4-二吖庚因，二氢呋喃基二氢吡喃基，1,2,3,6-四氢吡啶基，2H-吡喃基，4H-吡喃基，二氢吡喃基，二氢噻吩基，二氢呋喃基，3-氮杂双环[3.1.0]己烷基，3-氮杂双环[4.1.0]庚基，吡咯烷基-2-酮，哌啶-3-酮哌啶-2-酮，哌啶-4-酮，和-2H-吡咯基。

[0540] 如本文所用的术语“任选地取代”，是指所引用的基团可以被或可以不被一个或多个额外的基团取代一个或多个未取代的基团中的氢原子。可以存在的这些基团的数目范围从1多至未取代的基团中的氢原子数目。除非另有说明，所述任选的取代基单独地和独立地选自烷基，烯基，炔基，环烷基，芳基，杂芳基，杂环烷基，羟基，烷氧基，巯基(mercaptyl)，氰基，卤素，羰基，硫代羰基，异氰酸基，氰硫基，异硫氰基，硝基，全卤代烷基，全氟烷基和氨基，包括单取代和双取代的氨基基团，以及其被保护的衍生物。任选的取代基的非限制性实例包括卤素(特别是F，Cl和Br)，-CN，-OR，-R，$-NO_2$，-C(=O)R，-OC(=O)R，-C(=O)OR，-OC(=O)NHR，-C(=O)N(R)$_2$，-SR-，-S(=O)R，$-S(=O)_2R$，-NHR，-N(R)$_2$，-NHC(=O)R，-NRC(=O)R，-NRC(S)R，NHC(=O)OR，$-NRCO_2R$，-NRC(=O)N(R)$_2$，-NRC(S)N(R)$_2$，-NRNRC(=O)R，-NRNRC(=O)N(R)$_2$，$-NRNRCO_2R$，-C(=O)NH-，$S(=O)_2NHR$，$-S(=O)_2N(R)_2$，$-NHS(=O)_2$，$-NHS(=O)_2R$，-C(=O)C(=O)R，$-C(=O)CH_2C(=O)R$，-C(S)R，-C(=O)N(R)$_2$，-C(S)N(R)$_2$，-OC(=O)N(R)$_2$，-C(O)N(OR)R，-C(NOR)R，$-S(=O)_3R$，$-NRSO_2N(R)_2$，$-NRSO_2R$，-N(OR)R，-C(=NH)-N(R)$_2$，$-P(=O)_2R$，$-PO(R)_2$，$-OPO(R)_2$，$-(CH_2)_{0-2}NHC(=O)R$，任选被R取代的苯基(Ph)，任选被R取代的-O(Ph)，任选被R取代的$-(CH_2)_{1-2}$(Ph)，任选被R取代的-CH=CH(Ph)，C_1-C_6烷基，C_1-C_6烷氧基，芳基，杂芳基，环烷基，杂环烷基，卤素取代的C_1-C_6烷基，卤素取代的C_1-C_6烷氧基，其中每个R独立地选自H，C_1-C_6烷基，C_2-C_6烯基，C_2-C_6炔基，C_1-C_6烷氧基，芳基，杂芳基，C_{3-8}环烷基，C_{3-8}杂环烷基，卤素取代的C_1-C_6烷基，卤素取代的C_1-C_6烷氧基；并且在相同或相邻连接的原子上的两个R基团可一起形成5-6元环，任选含有额外的N，O或S作为环成员的。对烷基，环烷基和杂环烷基合适的取代基可以进一步包括=CHR，=O(氧代)和=N-R。对芳基或杂芳基优选的取代基选自F，Cl，Br，CN，$-NR'_2$，羟基，C_1-C_4烷基，C_1-C_4卤代烷基，C_1-C_4烷氧基，C1-C4卤代烷氧基，C_1-C_4烷氧基-C_1-C_4烷基，-COOR'，$-CONR'_2$，-SR'和$-SO_2R'$，其中每个R'为H或C_1-C_4烷基。对烷基，环烷基或杂环烷基优选的取代基选自氧代(=O)，F，Cl，Br，CN，-NR'2，羟基，C_1-C_4烷基，C_1-C_4卤代烷基，C_1-C_4烷氧基，C_1-C_4卤代烷氧基，C_1-C_4烷氧基-C_1-C_4烷基，-COOR'，$-CONR'_2$，-SR'和$-SO_2R'$，其中每个R'为H或C_1-C_4烷基。

[0541] 术语“氨基酸”是指天然存在的，合成的，和非天然氨基酸，以及以与天然存在的氨基酸相似的方式发挥功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是那些由遗传密码编码的，以及后来被修饰的那些氨基酸，例如，羟脯氨酸，γ羧基谷氨酸，和O-磷酸丝

氨酸。氨基酸类似物是指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构的化合物，即，结合氢，羧基，氨基，和R基团的α-碳，例如，高丝氨酸，正亮氨酸，蛋氨酸亚砜，蛋氨酸甲基锍。此类类似物具有修饰的R基团(例如，正亮氨酸)或修饰的肽骨架，但保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构，但以与天然存在的氨基酸相似的方式发挥功能的化学化合物。

[0542] 如本文所用的术语“非天然氨基酸”，意在表示不能使用来自任何生物体(无论相同或不同)的未修饰或修饰的基因在任何生物体中通过生物合成产生的氨基酸结构。此外，应该理解，这样的“非天然氨基酸”需要修饰的tRNA和修饰的tRNA合成酶(RS)用于掺入蛋白。这些“所选的”正交tRNA/RS是非天然氨基酸特异性的，并由如Schultz等开发的选择方法(见，例如，Liu等人，Annu.Rev.Biochem.79:413-444,2010)或类似的过程产生。术语“非天然氨基酸”不包含天然存在的第22个蛋白氨基酸吡咯赖氨酸(Pyl)以及它的脱甲基类似物吡咯啉-羧基-赖氨酸(Pcl)，因为这两个残基向蛋白中的掺入由未修饰的，天然存在的吡咯赖氨酰-tRNA/tRNA合成酶对介导(见，例如，Ou等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA.108:10437-10442,2011)。

[0543] 如本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白家族的多肽，其能够非共价地，可逆地，并且以特异性方式结合相应的抗原。例如，天然存在的IgG抗体是四聚体，其包含由二硫键在之间连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链由重链可变区(本文缩写为V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域，CH1，CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文缩写为V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域C_L组成。V_H和V_L区可以进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，其中散布有更保守的称为构架区(FR)的区域。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成，从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3和FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子，包括免疫系统的多种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。

[0544] 术语“抗体”包括，但不限于，单克隆抗体，人抗体，人源化抗体，骆驼科抗体，嵌合抗体，和抗独特型(抗Id)抗体(包括，例如，对本发明抗体的抗Id抗体)。所述抗体可以是任何同种型/类(例如，IgG，IgE，IgM，IgD，IgA和IgY)，或亚类(例如，IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA1和IgA2)。

[0545] 轻链和重链均分为结构和功能同源的区域。术语“恒定”与“可变”在功能上使用。在这方面，可以理解，轻链(V_L)和重链(V_H)部分的可变结构域决定抗原的识别和特异性。相反地，轻链恒定区结构域(C_L)和重链恒定区结构域(CH1，CH2或CH3)赋予重要的生物特性，例如分泌，经胎盘的移动性，Fc受体结合，补体结合等。按照惯例，恒定区结构域的编号随其变得与抗体的抗原结合位点或氨基末端更远而增加。N末端是可变区和在C末端是恒定区；CH3和C_L结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基端结构域。

[0546] 如本文所用的术语“抗体片段”是指抗体的抗原结合片段或抗体的非抗原结合片段(例如，Fc)。如本文使用的术语“抗原结合片段”，是指保留与抗原的表位特异性相互作用能力的(例如，通过结合，空间位阻，稳定/去稳定，空间分布)抗体的一个或多个部分。结合片段的实例包括，但不限于，单链Fv(scFv)，二硫键连接的Fv(sdFv)，Fab片段，F(ab')片段，由V_L，V_H，C_L和CH1结构域组成的单价片段；$F(ab)_2$片段，包含在铰链区由二硫键连接的两个

Fab片段的二价片段;由V_H和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段;由V_H结构域组成的dAb片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989);和分离的互补决定区(CDR),或抗体的其它表位结合片段。

[0547] 此外,尽管Fv片段的两个结构域,V_L和V_H由分开的基因编码,但可以使用重组方法,通过合成的接头使其连接,从而使其能够制备为单个蛋白链,其中V_L和V_H区配对形成单价分子(称为单链Fv(“scFv”);参见,例如,Bird等人,Science 242:423-426,1988;和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883,1988)。此类单链抗体也旨在包括在术语“抗原结合片段”的范围内。这些抗原结合片段使用本领域技术人员公知的常规技术获得,并且对所述片段进行筛选以与完整抗体相同的方式应用。

[0548] 抗原结合片段也可以掺入到单结构域抗体,大抗体(maxibodies),微抗体,纳米抗体,内抗体,双抗体,三抗体,四抗体,V-NAR和bis-scFv中(参见,例如,Hollinger和Hudson,Nature Biotechnology 23:1126-1136,2005)。抗原结合片段可以被移植到基于多肽的支架中,如III型纤连蛋白(Fn3)(参见美国专利No 6703199,其描述了纤连蛋白多肽单抗体)。

[0549] 抗原结合片段可并入到包含一对串联的Fv片段(V_H-CH1-V_H-CH1)的单链分子中,其连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,Protein Eng.8:1057-1062,1995;and U.S.Pat.No.5,641,870;和美国专利No 5,641,870)。

[0550] 如本文使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指的是多肽,包括具有基本上相同的氨基酸序列或源自相同基因来源的抗体和抗体片段。这个术语还包括单分子组合物的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一结合特异性和亲和性。

[0551] 如本文所用的术语“人抗体”,包括具有其中构架区和CDR区均来自人来源的序列的可变区的抗体。此外,如果抗体含有恒定区,则所述恒定区也来自这样的人序列,例如人种系序列,或人种系序列的突变形式或含有从人的构架序列分析得到的共有框架区序列的抗体,例如,如Knappik等人,J.Mol.Biol.296:57-86,2000)所述。

[0552] 本发明的人抗体可包含不是由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内的体细胞突变,或保守取代引入的突变,以促进稳定性或生产)。

[0553] 如本文所使用的术语“人源化”抗体,指的是保留了非人抗体的反应性,同时在人类中免疫原性更低的抗体。这可以例如,通过保留非人CDR区并用其人类对应的部分替换抗体的其余部分来实现。参见,例如,Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984);Morrison和Oi,Adv.Immunol.,44:65-92(1988);Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536(1988);Padlan,Molec.Immun.,28:489-498(1991);Padlan,Molec.Immun.,31(3):169-217(1994)。

[0554] 本文所用的术语“识别”是指发现其表位并与其表位相互作用(例如,结合)的抗体或其抗原结合片段,无论该表位是线性的或构象的。术语“表位”指本发明的抗体或抗原结合片段特异性地结合的抗原上的位点。表位可由连续的氨基酸形成,或由蛋白的三级折叠而并列的非连续的氨基酸形成。从连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时也被保留,而由三级折叠形成的表位通常用变性溶剂处理时则消失了。表位常包括处于独特的空间构象中的至少3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14或15个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括在本领域中的技术,例如,x-射线晶体学和2维核磁共振(见,例如,Epitope Mapping

Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,编辑.(1996))。

[0555] 如本文所用的术语“亲和性”指在单个抗原位点的抗体和抗原之间相互作用的强度。在每个抗原性位点中,抗体“臂”的可变区通过弱的非共价力与抗原在多个位点相互作用,相互作用越多,亲和性越强。

[0556] 术语“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。但是,特异地结合一种抗原的分离的抗体可能对其他抗原具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0557] 术语“保守性修饰变体”适用于氨基酸和核酸序列。对于特定核酸序列,保守性修饰变体指的是那些编码相同或基本相同的氨基酸序列的核酸,或当核酸不编码氨基酸序列时,指基本相同的序列。由于遗传密码的简并,大量功能相同的核酸编码任意给定蛋白。例如,密码子GCA,GCC,GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在密码子指明丙氨酸的每个位置,该密码子都可变成任何所述的相应密码子,而不改变所编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰变异的一种。本文的编码多肽的每一核酸序列还描述了核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,其通常是蛋氨酸的唯一密码子,以及TGG,其通常是色氨酸的唯一密码子)可以被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含在每个所述序列中。

[0558] 对于多肽序列,“保守性修饰变体”包括对多肽序列的单个取代,缺失或添加,其导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能相似的氨基酸的保守取代列表是本领域公知的。此类保守性修饰变体是多态性变体,种间同源物,和本发明的等位基因之外的并且不排除上述。以下8组含有对于彼此是保守取代的氨基酸:1)丙氨酸(A),甘氨酸(G);2)天冬氨酸(D),谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R),赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I),亮氨酸(L),蛋氨酸(M),缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);7)丝氨酸(S),苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C),蛋氨酸(M)(见,例如,Creighton,Proteins(1984))。在某些实施方案中,术语“保守性序列修饰”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。

[0559] 这里使用的术语“优化”是指核苷酸序列已被改变以使用在生产细胞或生物体中优选的密码子编码氨基酸序列,所述生产细胞或生物体一般是真核细胞,例如酵母细胞,毕赤酵母细胞,真菌细胞,木霉细胞,中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞。优化的核苷酸序列被改造以完全地或尽可能多地保留由起始核苷酸序列原始编码的氨基酸序列,所述起始核苷酸序列也被称为“亲本”序列。

[0560] 在两个或多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“百分比相同”或“百分比同一性”是指两个或更多个序列或子序列是相同的。当使用以下序列比较算法之一或通过手工比对和目视检查比较和比对比较窗口上的最大对应时,或者指定区域上的最大对应时,如果两个序列具有指定的百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在一个指定的区域,或者,如果未指定,在整个序列中,60%同一性,任选65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,或99%同一性),则两个序列是“基本上相同”。任选地,所述同一性存在于至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)长的区域,或更优选地在100至500或1000或更多个核苷酸(或20个,50个,200个或更多个氨基酸)长的区域。

[0561] 对于序列比较,通常一个序列作为参考序列,测试序列与其进行比较。当使用序列

比较算法时，测试和参考序列输入到计算机中，子序列坐标被指定，如果需要的话，指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数，或可以指定替代参数。所述序列比较算法然后根据程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0562] 如本文所使用的“比较窗口”包括参考选自20到600，通常约50到约200，更通常约100到约150的连续位置数目中的任何一个的区段，其中两个序列进行最佳比对后，序列可与连续位置数目相同的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域公知的。用于比较的序列最佳比对可以通过以下进行，例如，Smith和Waterman，Adv.Appl.Math.2:482c(1970)的局部同源性算法，Needleman和Wunsch，J.Mol.Biol.48:443(1970)同源性比对算法，Pearson和Lipman，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性检索方法，这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package，Genetics Computer Group，575Science Dr.，Madison，WI中的GAP，BESTFIT，FASTA，和TFASTA)，或通过手工比对和视觉检查(参见，例如，Brent等人，Current Protocols in Molecular Biology，2003)。

[0563] 适合于测定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个例子是BLAST和BLAST2.0算法，其分别在Altschul等人，Nuc.Acids Res.25:3389-3402，1977；和Altschul等人，J.Mol.Biol.215:403-410，1990中进行了描述。用于进行BLAST分析的软件公众可通过国家生物技术信息中心获得。该算法包括首先通过识别查询序列中长度W的短词识别高分序列对(HSP)，当与数据库序列中具有相同长度的词比对时，其匹配或满足一些正值阈值分数T。T被称作邻近词评分阈值((Altschul等人，同上)。这些初始邻近词命中作为起始搜索的种子以发现包含它们的更长的HSP。词命中沿每个序列在两个方向上延伸，只要累积比对得分可以增加。对于核苷酸序列，累计得分采用参数M(对一对匹配残基的奖励得分；总是>0)和N(错配残基的罚分；总是<0)计算。对于氨基酸序列，使用评分矩阵来计算累积得分。在以下情况下在每个方向上的命中词的延伸停止：累积比对得分从其达到的最大值下降了数量X；由于一个或多个负得分残基比对的累积，累积得分达到0或者0以下时；或达到任一序列末端。BLAST算法参数W，T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用默认的词长(W)11，期望值(E)10，M＝5，N＝-4和两条链的比较。对于氨基酸序列，BLASTP程序使用默认的词长3，以及期望值(E)10，以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff，(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915)比对(B)50，期望值(E)10，M＝5，N＝-4和两条链的比较。

[0564] BLAST算法也进行两个序列之间的相似性的统计分析(见，例如，Karlin和Altschul，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787，1993)。一种由BLAST算法提供的相似性测量是最小总和概率(P(N))，其提供了将偶然发生的两个核苷酸或氨基酸序列之间匹配的概率的标志。例如，如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约0.2，更优选小于约0.01，最优选小于约0.001，核酸被认为与参考序列相似。

[0565] 两个氨基酸序列之间的百分比同一性还可以使用E.Meyers和W.Miller算法来确定，Comput.Appl.Biosci.4:11-17，1988，其已被合并到ALIGN程序(2.0版)，使用PAM120权重残基表，空位长度罚分12和空位罚分4。此外，两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以使用Needleman和Wunsch算法来确定，J.Mol.Biol.48:444-453，1970，该算法已被合并到GCG软件包的GAP程序(可在www.gcg.com获得)，使用Blossom62矩阵或PAM250矩阵，空位权重16，14，12，10，8，6，或4，长度权重1，2，3，4，5，或6。

[0566] 除了如上所述的序列百分比同一性，两个核酸序列或多肽基本相同的另一个标志是，由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽的抗体具有免疫交叉反应性，如下所述。因此，例如，当两个肽仅因保守取代而不同时，多肽通常与第二多肽基本相同。两个核酸序列基本相同的另一个标志是，这两个分子或其互补分子在严谨条件下相互杂交，如下面所述。两个核酸序列基本相同的另一个标志是，同样的引物可用于扩增序列。

[0567] 术语“核酸”用于本文中可与术语“多核苷酸”互换使用，指的是单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语包括含有已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键的核酸，其是合成的，天然存在的和非天然存在的核酸，具有与参考核酸类似的结合特性，并且与参考核苷酸以类似的方式代谢。这些类似物的实例包括，但不限于，硫代磷酸酯，氨基磷酸酯，甲基膦酸酯，手性甲基膦酸酯，2-O-甲基核糖核苷酸，肽核酸(PNA)。

[0568] 除非另有说明，特定核酸序列也隐含涵盖其保守性修饰变体(例如，简并密码子取代)和互补序列，以及明确指出的序列。具体地讲，如以下详述的，简并密码子取代可通过产生其中一个或多个选定(或所有)密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人，(1991)Nucleic Acid Res.19:5081;Ohtsuka等人，(1985)J.Biol.Chem.260:2605-2608;和Rossolini等人，(1994)Mol.Cell.Probes 8:91-98)。

[0569] 在核酸的上下文中，术语“有效连接”是指两个或多个多核苷酸(例如，DNA)片段之间的功能关系。通常，其是指转录调节序列与被转录序列的功能关系。例如，如果其刺激或调节编码序列在适当的宿主细胞或其它表达系统中的转录，则启动子或增强子序列有效连接于编码序列。一般地，有效连接到被转录序列的启动子转录调节序列在物理上与被转录的序列是连续的，即，它们是顺式作用。然而，一些转录调控序列，如增强子，并不需要物理上连续或位于靠近其增强转录的编码序列。

[0570] 术语“多肽”和“蛋白”在本文中可互换使用来指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于这样的氨基酸聚合物，其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。除非另有说明，特定的多肽序列也隐含地涵盖其保守性修饰的变体。

[0571] 如本文所用的术语“免疫缀合物”或“抗体缀合物”是指抗体或其抗体片段与其它活性剂的连接，诸如化疗剂，毒素，免疫治疗剂，成像探针，光谱探针，等等。所述连接可以是共价键，或例如通过静电力的非共价相互作用。可以使用本领域中已知的多种接头以形成免疫缀合物。此外，该免疫缀合物可以以融合蛋白的形式提供，所述融合蛋白可以从编码该免疫缀合物的多核苷酸表达。如本文所用的“融合蛋白”指的是通过连接两个或多个最初编码独立的蛋白(包括肽和多肽)的基因或基因片段产生的蛋白。融合基因的翻译产生具有来自各原始蛋白的功能特性的单一蛋白。

[0572] 术语“对象”包括人类和非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物，例如，哺乳动物和非哺乳动物，如非人灵长类动物，绵羊，狗，牛，鸡，两栖动物和爬行动物。除非指出，术语“患者”或“对象”在本文中可互换使用。

[0573] 如文中使用的术语“细胞毒素”或“细胞毒性剂”，指的是对细胞生长和增殖有害并且可以起到减少，抑制或破坏细胞或恶性肿瘤的作用的任何活性剂。

[0574] 如本文所用的术语“抗癌剂”是指可用于治疗细胞增殖性病症，如癌症的任何活性剂，包括但不限于，细胞毒性剂，化疗剂，放射疗法和放射治疗剂，靶向的抗癌剂和免疫治疗

剂。

[0575] 如本文所用的术语“末端基团(TG)”是指缀合至本发明抗体或抗体片段的化学部分或表面。例如,末端基团可以是选自抗肿瘤剂,抗炎剂,抗真菌剂,抗细菌剂,抗寄生虫剂,抗病毒剂,麻醉剂的药物部分。在某些实施方案中,药物部分选自V-ATP酶抑制剂,HSP90抑制剂,IAP抑制剂,mTor抑制剂,微管稳定剂,微管去稳定剂,阿里他汀,多拉司他汀,类美登素,MetAP(甲硫氨酸胺基肽酶),蛋白CRM1的核输出抑制剂,DPPIV抑制剂,线粒体中磷酰基转移反应的抑制剂,蛋白合成抑制剂,激酶抑制剂,CDK2抑制剂,CDK9抑制剂,蛋白酶体抑制剂,RNA聚合酶抑制剂,Eg5抑制剂,HDAC抑制剂,DNA损伤剂,DNA烷基化剂,DNA嵌入剂,DNA小沟结合剂和DHFR抑制剂。合适的例子包括阿里他汀类(auristatin)诸如MMAE和MMAF;刺孢霉素类(calicheamycins)如γ-刺孢霉素;和类美登素类化合物例如DM1和DM4。将这些中的每种附着到与本发明的抗体和方法相容的接头的方法是本领域已知的。见,例如,Singh等人,Therapeutic Antibodies:Methods and Protocols,vol.525,445-457(2009)。另外末端基团可以是生物物理探针,荧光团,自旋标记物,红外探针,亲和探针,螯合剂,光谱探针,放射性探针,脂质分子,聚乙二醇,聚合物,自旋标记物,DNA,RNA,蛋白,肽,表面,抗体,抗体片段,纳米颗粒,量子点,脂质体,PLGA颗粒,或多糖。在所述末端基团是表面的实施方案中,这样的固体支持物包括,但不限于,玻璃,纤维素,聚丙烯酰胺,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯或聚丙烯。

[0576] “肿瘤”是指赘生性细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌细胞和组织。

[0577] 术语“抗肿瘤活性”是指在肿瘤细胞的增殖速率,活力,或转移活性的降低。表示抗肿瘤活性的可能的方式是,显示在治疗期间发生的异常细胞生长速率的下降或肿瘤尺寸的稳定性或肿瘤尺寸的减小。这样的活性可以使用接受的体外或体内肿瘤模型评估,包括但不限于异种移植物模型,同种异体移植物模型,MMTV模型,以及其他本领域公知的研究抗肿瘤活性的模型。

[0578] 术语“恶性肿瘤”是指非良性肿瘤或癌症。如本文所用,术语“癌症”包括恶性肿瘤,其特征在于去调控的或不受控制的细胞生长。示例性的癌症包括:癌,肉瘤,白血病和淋巴瘤。

[0579] 术语“癌症”包括原发性恶性肿瘤(例如,其细胞还没有迁移到对象身体中原始肿瘤位点以外的位点的肿瘤)和继发恶性肿瘤(例如,来自肿瘤细胞转移,迁移到不同于原始肿瘤的位点的第二位点的肿瘤,)。

[0580] 在将肽标签插入到抗体的上下文中,术语“插入”是指在抗体的两个特异性残基之间并入肽标签。抗体残基总数目随插入的标签残基的数目而增加。

[0581] 在将肽标签并入到抗体的上下文中,术语“移植”是指通过诱变将肽标签并入抗体。例如,非CDR环内一小段氨基酸残基被肽序列取代。在这种情况下,抗体残基的总数保持不变。在某些实施方案中,术语“移植”还包括肽标签残基的取代和插入的组合。例如,肽标签的一部分通过取代结构环残基而并入,而肽标签的剩余部分被插入到非CDR环的特异性残基之间。IgG抗体残基总数目的增加小于标签残基的数目。

附图说明

[0582] 图1,4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)介导产生ADC的示意性描述。

[0583] 图2,包含肽标签的IgG1构建体的设计,所述肽标签用于通过翻译后4'-磷酸泛酰巯基乙胺化的位点特异性抗体标记。(A)IgG1构建体在V_H,CH1和CH3结构域中包含肽标签(有下划线的)。(B)IgG1构建体在CH3,V_L和C_L结构域中包含肽标签(有下划线的)。已成功克隆的设计的构建体在左边的列用加号(+)标记。未成功的克隆用负号(-)提示。成功克隆的构建体被分组为非表达组(-)和表达组(+)(中列)。在CoA-MC-MMAF底物存在时(乙酰CoA底物被用于SEQ ID NO:28,105,118,120,123和126),不显示任何可检测的Sfp催化的产物形成的表达组在右列用负号(-)标记。非常低,但可检测的各MC-MMAF ADC的形成用加号(+)符号提示。显著更有效率但非量化的MC-MMAF ADC形成用双加号(+)符号提示。定量地生成的具有两个末端基团(TG)的MC-MMAF ADC被归类为具有三重加号(+++)等级(根据HPLC分析)。图2(A)和图2(B)中公开的残基位置是每个序列根据Eu编号系统的对应SEQ ID NO的提示的"残基"。

[0584] 图2(A)公开了SEQ ID NO:1130的残基1-68,SEQ ID NO:94的残基1-80,SEQ ID NO:95的残基1-79,SEQ ID NO:96的残基1-80,SEQ ID NO:1130的残基1-72,SEQ ID NO:99的残基1-80,SEQ ID NO:97的残基1-79,SEQ ID NO:98的残基1-77,SEQ ID NO:1130的残基122-198,SEQ ID NO:100的残基1-77,SEQ ID NO:102的残基1-77,SEQ ID NO:101的残基1-77,SEQ ID NO:105的残基1-77,SEQ ID NO:107的残基1-77,SEQ ID NO:1130的残基122-190,SEQ ID NO:108的残基1-76,SEQ ID NO:103的残基1-75,SEQ ID NO:106的残基1-74,SEQ ID NO:1130的残基164-231,SEQ ID NO:118的残基43-115,SEQ ID NO:110的残基43-115,SEQ ID NO:113的残基43-114,SEQ ID NO:1130的残基164-240,SEQ ID NO:119的残基43-119,SEQ ID NO:109的残基43-119,SEQ ID NO:112的残基43-119,SEQ ID NO:111的残基43-119,SEQ ID NO:114的残基43-119,SEQ ID NO:115的残基43-119,SEQ ID NO:116的残基43-119,SEQ ID NO:117的残基43-119,SEQ ID NO:1130的残基324-400,SEQ ID NO:123的残基203-279,SEQ ID NO:120的残基203-279,所有序列号分别按出现顺序。

[0585] 图2(B)公开了SEQ ID NO:1130的残基324-388,SEQ ID NO:122的残基203-278,SEQ ID NO:121的残基203-279,SEQ ID NO:1130的残基373-449,SEQ ID NO:124的残基252-328,SEQ ID NO:125的残基252-328,SEQ ID NO:135的残基252-328,SEQ ID NO:137的残基252-328,SEQ ID NO:138的残基252-328,SEQ ID NO:1130的残基373-444,SEQ ID NO:134的残基252-328,SEQ ID NO:1130的残基390-449,SEQ ID NO:127的残基269-340,SEQ ID NO:126的残基269-335,SEQ ID NO:129的残基269-339,SEQ ID NO:131的残基269-337,SEQ ID NO:130的残基269-338,SEQ ID NO:132的残基269-340,SEQ ID NO:136的残基269-340,SEQ ID NO:1130的残基383-449,SEQ ID NO:140的残基262-341,SEQ ID NO:139的残基262-340,SEQ ID NO:141的残基262-340,SEQ ID NO:1131的残基1-68,SEQ ID NO:26的残基1-80,SEQ ID NO:27的残基1-79,SEQ ID NO:1131的残基76-152,SEQ ID NO:30的残基76-160,SEQ ID NO:1131的残基150-214,SEQ ID NO:29的残基42-117,SEQ ID NO:28的残基42-118,所有序列号分别按出现顺序。

[0586] 图3(A)Igγ1重链的CH1结构域,CH2结构域,CH3结构域和铰链区的序列(SEQ ID NO:93)。(B)Igκ轻链的C_L结构域的序列(SEQ ID NO:24)。下划线的氨基酸是结构环。根据如Edelman等人,Proc.Natl.Acad.USA 63:78-85(1969)所述的Eu编号系统编号氨基酸的位

置。X'$_1$,X'$_2$,X'$_3$,X'$_4$,X'$_5$和X'$_6$提示存在于IgG1亚类和κ同种型中的同种异型位置上的残基(根据Jefferis等人,MAbs.1:332-338(2009))。

[0587] 图4.(A)4种人Igγ亚类的CH1结构域,CH2结构域,CH3结构域,以及铰链区与曲妥珠单抗的序列比对(分别为SEQ ID NO 1109-1113,按照出现顺序)。(B)CL结构域与曲妥珠单抗的序列比对(分别为SEQ ID NO 1114-1115,按照出现顺序)。加下划线的残基属于结构环(还参见图3)。盒中残基表示根据Jefferis等人,MAbs.1:332-338(2009)的同种异型位置。为简单起见,只显示IgG1亚类和κ同种型中的同种异型位置。人Igγ亚类和人κ同种型的蛋白序列源自UniProt数据库(进入号P01857,P01859,P01860,P01861,和P01834)。

[0588] 图5.Sfp催化的ADC形成的HPLC特征。(A)确认免疫缀合物抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1117)的接近定量形成的HPLC踪迹线。(B)确认免疫缀合物抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1118)的接近定量形成的HPLC踪迹线。(C)确认免疫缀合物抗hHER2-HC-V2-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q3(SEQ ID NO:1119)的接近定量形成的HPLC踪迹线。(D)确认免疫缀合物抗hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3(SEQ ID NO:1120)的定量形成的HPLC踪迹线。(E)确认免疫缀合物抗hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389(SEQ ID NO:1121)的接近定量形成的HPLC踪迹线。(F)确认免疫缀合物抗hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:1122)的定量形成的HPLC踪迹线。(G)确认免疫缀合物mAb2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1123)的接近定量形成的HPLC踪迹线。(H)示例免疫缀合物抗hHER2-LC-I2-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q3(SEQ ID NO:1124)的部分形成的HPLC踪迹线。

[0589] 图6.通过分析型尺寸排阻层析(AnSEC)对三种曲妥珠单抗免疫缀合物的表征示例了单体,非聚集的ADC形成。(A)免疫缀合物抗hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3(SEQ ID NO:1120)的AnSEC分析。(B)免疫缀合物抗hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:1122)的AnSEC分析。(C)免疫缀合物抗hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389(SEQ ID NO:1121)的AnSEC分析。

[0590] 图7.用在特定位置并入肽标签不成功标记曲妥珠单抗的HPLC表征。提示抗hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L(SEQ ID NO:114)和CoA-MC-MMAF之间没有缀合的HPLC踪迹线。

[0591] 图8.用CoA-MC-MMAF标记混合移植/插入构建体的HPLC表征。(A)指示部分形成免疫缀合物抗hHER2-HC-S63-ppan-MC-MMAF-V64L-EFIASKLA-K65(SEQ ID NO:1125)的HPLC踪迹线。(B)指示没有形成免疫缀合物抗hHER2-LC-S76D-S77-ppan-MC-MMAF-L78-EFIASKLA-Q79(SEQ ID NO:1126)的HPLC踪迹线。

[0592] 图9.荧光团附着至IgG的HPLC表征。(A)确认抗体-荧光团缀合物抗hHER2-HC-P189G-S190D-S191-ppan-马来酰亚胺乙胺-TMR-S192L-L193S-G194W-T195L(SEQ ID NO:1127)的接近定量形成的HPLC踪迹线。在280和555nm监测的HPLC踪迹线之间的大量重叠表示接近定量的荧光团缀合。(B)确认抗体-荧光团缀合物抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-马来酰亚胺乙胺-TMR-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1128)的接近定量形成的HPLC踪迹线。在280和555nm监测的HPLC踪迹线之间的大量重叠表示接近定量的荧光团缀合。

[0593] 图10.用水解的马来酰亚胺或溴乙酰基硫醚连接的细胞毒素的抗体标记的HPLC表

征。(A)确认马来酰亚胺开环的CoA-MC-MMAF与抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)的接近定量的缀合的HPLC踪迹线。(B)确认CoA-AC-AHX-MMAF与抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)的接近定量的缀合的HPLC踪迹线。

[0594] 图11.用经可裂解的接头连接的细胞毒素的抗体标记的HPLC表征。(A)确认CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF与抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)的接近定量的缀合的HPLC踪迹线。(B)确认CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF与抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)的接近定量的缀合的HPLC踪迹线。

[0595] 图12.4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)催化的ADC形成作为pH函数的优化。条形图示显示产生的具有药物比抗体比(DAR)为2的ADC的量作为pH的函数。该数据是基于CoA-MC-MMAF与抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)或抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)反应的HPLC分析(280nm),pH范围5.0到10.0。

[0596] 图13.在含有2.5μM抗体、50μM CoA-MC-MMAF和10mM $MgCl_2$的50mM HEPES缓冲液(pH7.5)中(37℃,16小时)缀合反应作为Sfp酶浓度的函数的优化。(A)主要显示0.1μM Sfp浓度下未缀合的抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)的去卷积质谱。(B)显示0.25μM Sfp浓度下抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1118)的接近定量的ADC形成的去卷积质谱。(C)显示0.5μM Sfp浓度下抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1118)的接近定量的ADC形成的去卷积质谱。

[0597] 图14.pH 8.0时酶促缀合反应作为CoA-MC-MMAF底物浓度函数的优化。(A)HPLC踪迹线代表含有2.5μM(顶部踪迹线)、7.5μM(中间踪迹线)或者25μM(底部踪迹线)CoA-MC-MMAF的与2.5μM抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)的三种缀合反应。保留时间4.9分钟的峰对应于未标记的抗体(DAR=0),5.3分钟的峰对应于单标记的抗体(DAR=1),且5.7分钟的峰对应于双标记的抗体(DAR=2)。(B)条形图显示了产生的具有DAR为2的ADC量作为CoA-MC-MMAF底物浓度的函数。在Sfp酶浓度0.25μM(黑条)或1.0μM(白条)进行系列滴定。

[0598] 图15.通过使用SYPRO橙凝胶染色的差异扫描荧光测定法(DSF)测量的肽标记ADC的热稳定性。(A)测定免疫缀合物抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1117)的热稳定性。由DSF观察到68.5和81.5摄氏度的两个转变温度(两个测量的平均值)。(B)测定免疫缀合物抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1118)的热稳定性。由DSF观察到66.3和81.0摄氏度的两个转变温度(单次测量)。(C)测定未修饰的曲妥珠单抗IgG1(抗hHER2)的热稳定性,其被用作参考用于与肽标记的ADC比较。由DSF观察到69.7和81.1摄氏度的两个转变温度(两个测量的平均值)。

[0599] 图16.两种肽标记的曲妥珠单抗免疫缀合物的药代动力学(PK)研究。两种ADC的血浆效价通过如下测定:用板吸附的人HER2(细胞外结构域3-4)捕获各免疫缀合物,接着用抗人IgG和抗MMAF抗体检测。(A)通过ELISA比较抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1117)和未修饰的曲妥珠单抗(抗hHER2)抗体的血浆效价。免疫缀合物的血浆效价在4天之内表现出快速衰减。(B)通过ELISA比较抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1118)和未修饰的曲妥珠单抗(抗hHER2)抗体的血浆效价。免疫缀合物的血浆效价在14天的期间内与未修饰的抗hHER2抗体的对照

效价非常类似。

[0600] 图17.使用表达HER2的MDA-231细胞系在体外进行的肽标记的免疫缀合物的细胞杀伤实验。曲线基于使用细胞效价Glo发光法细胞活力测定法(Promega)的细胞活力测量。图中公开如SEQ ID No:1117,1118,1108,和1107分别所示的“抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360”、“抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389”、“抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360”和“抗hHER2-HC-E388-GDS-PPAN-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389”。

[0601] 图18.说明肽标签插入位点对IgG抗体热稳定性的影响的曲线。根据使用SYPRO橙凝胶染色的差异扫描荧光测定法(DSF),在Fc区的CH2结构域(氨基酸残基228-340)中含有肽标签插入的抗体的第一转变温度(Tm1)显著降低。相反地,在Fab区的CH1结构域中的肽标签插入使抗体支架不稳定的程度小得多,Tm1值比Tm1为69.7℃的未修饰的曲妥珠单抗IgG1低通常不多于3摄氏度。

[0602] 图19.具有DAR为4的ADC的酶促生成。(A)具有DAR为4的ADC可通过将多个肽标签并入抗体内产生,如ybbR-和S6-标签。(B)Sfp催化的CoA-MC-MMAF与曲妥珠单抗IgG的缀合的HPLC分析,所述曲妥珠单抗IgG含有VH结构域中的S6标签,以及CH3结构域中的ybbR标签(抗hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:142))。在1μM Sfp酶的存在下,室温孵育2.5μM抗体和50μMCoA底物导致接近定量生成具有DAR为4的ADC(t_R=6.1分钟,下部踪迹线)。顶部踪迹线表示相应的未偶联的抗体(DAR=0,t_R=5.2分钟)。

[0603] 图20.显示高和低的AUC IgG值的肽标记的曲妥珠单抗免疫缀合物的药代动力学谱。对应于SEQ ID NO:248(A)、SEQ ID NO:33(B)、SEQ ID NO:251(C)、SEQ ID NO:218(D)、SEQ ID NO:202(E)和SEQ ID NO:244(F)的六种肽标记的ADC的每种以1mg/kg的单剂量静脉施用到三只小鼠中。经过340小时期间后采集血浆样品,通过使用固定的人HER2细胞外结构域捕获曲妥珠单抗ADC分子。然后通过基于抗MMAF或抗hIgG抗体的两种ELISA形式测定血浆效价。第一种形式提供了“完整”ADC浓度的读出,而后一种形式产生与总IgG浓度成比例的信号,包括缀合和非缀合的曲妥珠单抗分子。A-C示例了显示高AUC IgG值的肽标记MMAFADC的PK曲线,而D-F显示表现出非常低的AUC IgG值的免疫缀合物的例子。在所有的情况下,抗MMAF和抗hIgG效价彼此非常接近,提示PK研究期间可以忽略不计的MMAF有效负载(payload)的脱缀合。

[0604] 图21.86种肽标记的ADC的抗MMAF和抗hIgG效价之间的关联。根据此图,总IgG和“完整”ADC的浓度读出彼此非常一致,从而表明MMAF的有效负载和肽标记的抗体之间高度稳定的ppan-MC连接。除了体内可以忽略不计的MMAF药物的脱缀合,这种高度的线性关联也表明,共价的有效负载附着不会负面地影响免疫缀合物的药代动力学谱。

[0605] 图22.涉及用随后用于通过肟连接的末端基团(TG)附着的羰基官能化的CoA类似物翻译后修饰A1-标记的抗体的两步法。在第一步骤中,用细胞培养基中的酮或醛官能化的CoA类似物位点特异性地标记A1-标记的抗体。在蛋白A亲和层析后,ppan部分的羰基基团与氨氧基衍生的T G反应。

[0606] 图23.ybbR-标记的曲妥珠单抗ADC抗hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:1122)在植有人肿瘤细胞系的免疫缺陷裸鼠中的体内效力的研究。用nu/nu小鼠进行异种移植物肿瘤模型,其中nu/nu小鼠皮下施用HER-2依赖的乳腺癌

细胞系MDA-MB231克隆16。在肿瘤成长为大小约200mm^{3}后，单剂量的3mg/kg(▲)、5mg/kg(●)的ybbR-标记的ADC或仅载体(■)静脉内注射到每个治疗组的9只小鼠中。垂直箭头表示ADC施用的时间点。每周监测肿瘤生长，显示这两种剂量水平导致了肿瘤消退，证实了肽标记的ADC的体内效力。

[0607] 具体描述

[0608] 本发明提供了抗体的位点特异性的标记方法，该方法使用具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶酶活性的蛋白("PPTase")，所述蛋白催化并入目的抗体的一个或多个特异性位点的肽序列("肽标签的")的翻译后修饰。环境反应条件下的酶促标记允许并入抗体的肽标签内特异性的丝氨酸残基的定量和不可逆的共价修饰，并从而产生理想的抗体缀合物。

[0609] 考虑到PPTase广泛的底物耐受性，可以用多种化学上可获得的标记试剂，如抗癌剂，荧光团，肽，糖，去污剂，聚乙二醇，免疫增效剂，放射成像探针，前药和其它的分子来实现根据本发明的位点特异性抗体标记的。此外，PPTase可用于将肽标记的抗体固定在固体支持物上，如聚苯乙烯纳米颗粒和金表面(参见，例如，Wong等人，Wong等人，Org.Biomol.Chem.8:782-787,2010;Wong等人,Nanoscale 4:659-666,2012,关于功能性酶的固定化的方法)。

[0610] 因此，本发明提供了制备具有限定的药物比抗体比的用于癌症疗法中的均质免疫缀合物的方法，和由此制备的免疫缀合物，以及含有这些免疫缀合物的药物组合物。本发明的方法可与本领域中已知的其他缀合方法组合使用。

[0611] 1.抗体改造

[0612] 位点特异性标记

[0613] 根据本发明的"结构环"或"非CDR环"按以下方式来理解:抗体是由具有免疫球蛋白折叠的结构域构成。在本质上，反平行β片层是由环连接，以形成压缩的反平行β桶。在可变区域中，一些结构域的环基本上对抗体的特异性，即抗体结合抗原有贡献。这些环被称为"CDR环"。抗体结构域的所有其它环则对分子结构和/或效应功能有贡献。这些环在本文中被定义为"结构环"或"非CDR环"。

[0614] 本发明的抗体(例如，亲本或天然抗体，任选含有一个或多个非天然存在的氨基酸)根据如Edelman等人,Proc.Natl.Acad.USA 63:78-85(1969)中示出的EU编号系统进行编号。人IgG1恒定区被用作整个申请的代表。然而，本发明不限于人IgG1;相应的氨基酸位置可以通过序列比对容易地推导出来。例如，图3(A)显示了IgG1重链恒定区，其中结构环标有下划线，这些有下划线的结构环可以容易地在IgG2,IgG3和IgG4中识别出来，如图4(A)的序列比对所示。图3(B)显示了轻链恒定区，其中结构环标有下划线。对于轻链恒定区，IgG1,IgG2,IgG3和IgG4是相同的。下面的表1分别列出了IgG1,IgG2,IgG3和IgG4的结构环中的氨基酸位置。

[0615] 表1.鉴定的结构环位置(根据Eu编号的IgG1)

[0616]

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
重链	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)	119(S)120(T)121(K)
	131(S)132(S)133(K) 134(S)135(T)136(S) 137(G)138(G)139(T) (SEQ ID NO: 1018)	131(C)132(S)133(R) 134(S)135(T)136(S) 137(E)138(S)139(T) (SEQ ID NO: 1019)	131(C)132(S)133(R) 134(S)135(T)136(S) 137(G)138(G)139(T) (SEQ ID NO: 1020)	131(C)132(S)133(R) 134(S)135(T)136(S) 137(E)138(S)139(T) (SEQ ID NO: 1019)
	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)	152(E)153(P)154(V)
	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)	159(N)160(S)161(G) 162(A)163(L)164(T) 165(S)166(G) (SEQ ID NO: 1021)
	171(P)172(A)	171(P)172(A)	171(P)172(A)	171(P)172(A)
	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)	176(S)177(S)178(G)
	189(P)190(S)191(S) 192(S)193(L)194(G) 195(T)196(Q)197(T) (SEQ ID NO: 1022)	189(P)190(S)191(S) 192(N)193(F)194(G) 195(T)196(Q)197(T) (SEQ ID NO: 1023)	189(P)190(S)191(S) 192(S)193(L)194(G) 195(T)196(Q)197(T) (SEQ ID NO: 1022)	189(P)190(S)191(S) 192(S)193(L)194(G) 195(T)196(K)197(T) (SEQ ID NO: 1024)
	205(K)206(P)207(S) 208(N) (SEQ ID NO: 1025)	205(K)206(P)207(S) 208(N) (SEQ ID NO: 1025)	205(K)206(P)207(S) 208(N) (SEQ ID NO: 1025)	205(K)206(P)207(S) 208(N) (SEQ ID NO: 1025)
	230(P)231(A)232(P) 233(E)234(L)235(L) 236(G)236(G) (SEQ ID NO: 1026)	227(P)228(A)229(P) 230(P)231(V)232(A) 233(G) (SEQ ID NO: 1027)	277(P)278(A)279(P) 280(E)281(L)282(L)2 83(G)284(G) (SEQ ID NO: 1026)	227(P)228(A)229(P) 230(E)231(F)232(L) 233(G)234(G) (SEQ ID NO: 1028)
	244(P)245(P)246(K)	240(P)241(P)242(K)	291(P)292(P)293(K)	241(P)242(P)243(K)
	253(I)254(S)255(R) 256(T)257(P)258(E) (SEQ ID NO: 1029)	249(I)250(S)251(R) 252(T)253(P)254(E) (SEQ ID NO: 1029)	300(I)301(S)302(R) 303(T)304(P)305(E) (SEQ ID NO: 1029)	250(I)251(S)252(R) 253(T)254(P)255(E) (SEQ ID NO: 1029)
	267(S)268(H)269(E) 270(D)271(P)272(E) (SEQ ID NO: 1030)	263(S)264(H)265(E) 266(D)267(P)268(E) (SEQ ID NO: 1030)	314(S)315(H)316(E) 317(D)318(P)319(E) (SEQ ID NO: 1030)	264(S)265(Q)266(E) 267(D)268(P)269(E) (SEQ ID NO: 1031)
	280(D)281(G)	276(D)277(G)	327(D)328(G)	277(D)278(G)

[0617]

	285(H)286(N)287(A)	281(H)282(N)283(A)	332(H)333(N)334(A)	282(H)283(N)284(A)
	291(P)292(R)	287(P)288(R)	338(P)339(R)	288(P)289(R)
	295(Q)296(Y)297(N)298(S)299(T) (SEQ ID NO: 1032)	291(Q)292(F)293(N)294(S)295(T) (SEQ ID NO: 1033)	342(Q)343(Y)344(N)345(S)346(T) (SEQ ID NO: 1032)	292(Q)293(F)294(N)295(S)296(T) (SEQ ID NO: 1033)
	307(T)308(V)309(L)310(H)311(Q) (SEQ ID NO: 1034)	303(T)304(V)305(V)306(H)307(Q) (SEQ ID NO: 1035)	354(T)355(V)356(L)357(H)358(Q) (SEQ ID NO: 1034)	304(T)305(V)306(L)307(H)308(Q) (SEQ ID NO: 1034)
	315(N)316(G)317(K)318(E) (SEQ ID NO: 1036)	311(N)312(G)313(K)314(E) (SEQ ID NO: 1036)	362(N)363(G)364(K)365(E) (SEQ ID NO: 1036)	312(N)313(G)314(K) 315(E) (SEQ ID NO: 1036)
	326(K)327(A)328(L)329(P)330(A)331(P) (SEQ ID NO: 1037)	322(K)323(G)324(L)325(P)326(A)327(P) (SEQ ID NO: 1038)	373(K)374(A)375(L)376(P)377(A)378(P) (SEQ ID NO: 1037)	323(K)324(G)325(L)326(P)327(S)328(S) (SEQ ID NO: 1039)
	339(A)340(K)341(G)342(Q)343(P)344(R)345(E) (SEQ ID NO: 1040)	335(T)336(K)337(G)338(Q)339(P)340(R)341(E) (SEQ ID NO: 1041)	386(T)387(K)388(G)389(Q)390(P)391(R)392(E) (SEQ ID NO: 1041)	336(A)337(K)338(G)339(Q)340(P)341(R) 342(E) (SEQ ID NO: 1040)
	355(R)356(D/E)357(E)358(L/M)359(T)360(K)361(N) (SEQ ID NO: 1042)	351(R)352(E)353(E)354(M)355(T)356(K)357(N) (SEQ ID NO: 1043)	402(R)403(E)404(E)405(M)406(T)407(K)408(N) (SEQ ID NO: 1043)	352(Q)353(E)354(E)355(M)356(T)357(K)358(N) (SEQ ID NO: 1044)
	384(N)385(G)	380(N)381(G)	431(S)432(G)	381(N)382(G)
	388(E)389(N)390(N)	384(E)385(N)386(N)	435(E)436(N)437(N)	385(E)386(N)387(N)
	394(T)395(P)396(P)	390(T)391(P)392(P)	441(T)442(P)443(P)	391(T)392(P)393(P)
	399(D)400(S)401(D)402(G) (SEQ ID NO: 1045)	395(D)396(S)397(D)398(G) (SEQ ID NO: 1045)	446(D)447(S)448(D)449(G) (SEQ ID NO: 1045)	396(D)397(S)398(D)399(G) (SEQ ID NO: 1045)
	415(S)416(R)417(W)418(Q)419(Q)420(G)421(N)422(V) (SEQ ID NO: 1046)	411(S)412(R)413(W) 414(Q)415(Q)416(G) 417(N)418(V) (SEQ ID NO: 1046)	462(S)463(R)464(W)465(Q)466(Q)467(G)468(N)469(I) (SEQ ID NO: 1047)	412(S)413(R)414(W) 415(Q)416(E)417(G) 418(N)419(V) (SEQ ID NO: 1048)
	433(H)434(N)435(H)	429(H)430(N)431(H)	480(H)481(N)482(R)	430(H)431(N)432(H)
	442(S)443(L)444(S)445(P)446(G) (SEQ ID NO: 1049)	438(S)439(L)440(S)441(P)442(G) (SEQ ID NO: 1049)	489(S)490(L)491(S)492(P)493(G) (SEQ ID NO: 1049)	439(S)440(L)441(S)442(L)443(G) (SEQ ID NO: 1050)
轻链	109(T)110(V)111(A)112(A) (SEQ ID NO: 1051)	109(T)110(V)111(A)112(A) (SEQ ID NO: 1051)	109(T)110(V)111(A)112(A) (SEQ ID NO: 1051)	109(T)110(V)111(A)112(A) (SEQ ID NO: 1051)

[0618]

	119(P)120(P)121(S) 122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)	119(P)120(P)121(S) 122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)	119(P)120(P)121(S) 122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)	119(P)120(P)121(S) 122(D)123(E) (SEQ ID NO: 1052)
	140(Y)141(P)142(R) 143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)	140(Y)141(P)142(R) 143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)	140(Y)141(P)142(R) 143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)	140(Y)141(P)142(R) 143(E)144(A) (SEQ ID NO: 1053)
	151(D)152(N)153(A) 154(L)155(Q)156(S) (SEQ ID NO: 1054)	151(D)152(N)153(A) 154(L)155(Q)156(S) (SEQ ID NO: 1054)	151(D)152(N)153(A) 154(L)155(Q)156(S) (SEQ ID NO: 1054)	151(D)152(N)153(A) 154(L)155(Q)156(S) (SEQ ID NO: 1054)
	161(E)162(S)163(V) 164(T)165(E)166(Q) 167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)	161(E)162(S)163(V) 164(T)165(E)166(Q) 167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)	161(E)162(S)163(V) 164(T)165(E)166(Q) 167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)	161(E)162(S)163(V) 164(T)165(E)166(Q) 167(D)168(S) (SEQ ID NO: 1055)
	197(T)198(H)199(Q) 200(G)201(L)202(S) 203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)	197(T)198(H)199(Q) 200(G)201(L)202(S) 203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)	197(T)198(H)199(Q) 200(G)201(L)202(S) 203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)	197(T)198(H)199(Q) 200(G)201(L)202(S) 203(S)204(P) (SEQ ID NO: 1056)
	207(K)208(S)	207(K)208(S)	207(K)208(S)	207(K)208(S)

[0619] 图3以及SEQ ID NO:24和93分别代表Igκ轻链恒定区和Igγ-1重链恒定区的序列。SEQ ID NO:24和93中的X'_1,X'_2,X'_3,X'_4,X'_5和X'_6表示存在于IgG1亚类和κ同种型中同种异型位置处的残基(根据Jefferis等人,MAbs.1:332-338(2009))。X'_1可以是Arg或Lys,X'_2可以是Asp或Glu,X'_3可以是Leu或Met,X'_4可以是Ala或Gly,X'_5可以是Val或Ala,X'_6可以是Leu或Val。

[0620] 因为IgG1,IgG2,IgG3和IgG4抗体恒定区的高序列同源性,本发明的结果不限于任何特定的抗体。此外,本发明的结果不限于使用PPTase。在本文中鉴定的抗体结构环中的位置也可用于并入其它肽标签,所述肽标签是其他酶促缀合方法的底物,如酶生物素蛋白连接酶(BPL),转谷氨酰胺酶和甲酰甘氨酸形成酶。

[0621] 在一个方面,本发明提供包含修饰的抗体或其片段,以及末端基团的免疫缀合物,其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签,所述肽标签本身是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,并且其中所述肽标签位于修饰的抗体或其片段的结构环,或C-或N-末端。本发明还提供了包含肽标签的修饰的抗体或其片段,其中所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,并且其中所述肽标签位于抗体或其片段的结构环,或C-或N-末端。在具体实施方案中,所述肽标签是选自表2所描述的一种或多种肽。在一个方面,肽标签被插入所述抗体或其片段的结构环的两个氨基酸之间。在另一个方面,所述肽标签被移植到所述抗体或其片段的结构环,C-或N-末端,其中所述肽标签替换亲本抗体或其片段的一个或多个氨基酸。在一个方面,结构环是指位于所述抗体或其片段的CH1,CH2,CH3或C_L区的结构环。修饰的抗体重链和/或轻链(或其片段)可以在其结构环中含有1,2,3,4,5,6,7,8,或更多个蛋白标签。在一个方面中,修饰的抗体或抗体片段在其结构环中含有2,4,6,8,或更多的蛋白标签。在另一个方面,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp,AcpS,海栖热袍菌(T.maritima)PPTase,人PPTase,或保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的其突变体形式。在一个方面中,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来源于人,枯草芽孢杆菌(Bacillus

subtilis)，大肠杆菌，海栖热袍菌(Thermotoga maritima)，热纤维梭菌(Clostridium thermocellum)，以及任何其它哺乳动物，细菌或真菌的基因组。在另一个方面，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp，AcpS，海栖热袍菌PPTase，人PPTase的同源蛋白，或其突变体。在一个实施方案中，4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来自嗜热生物。在某些实施方案中，亲本抗体(没有并入肽标签的抗体)是IgG，IgM，IgE或IgA抗体。在某些实施方案中，亲本抗体是IgG1抗体。在其他一些实施方案中，亲本抗体是IgG2，IgG3或IgG4抗体。

[0622] 文中使用的"4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物"表示当与4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶和带有与其连接的末端基团的CoA或CoA类似物接触时，所描述的结构可以作为4'-磷酸泛酰巯基乙胺(ppan)或修饰的ppan基团的受体，如文中的方案Ia所述。

[0623] 在一个方面，本发明提供包含修饰的抗体或其片段，和末端基团的免疫缀合物，其中所述修饰的抗体或其片段包含CH1，CH2，CH3和/或C_L区，并且其中所述CH1，CH2，CH3和/或C_L区还包含肽标签，所述肽标签本身是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物。本发明还提供了修饰的抗体或其片段，其包含CH1，CH2，CH3和/或C_L区，并且其中所述的CH1，CH2，CH3和/或C_L区还包含肽标签，所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物。在某些实施方案中，所述肽标签是选自表2中所描述的一种或多种肽。在某些实施方案中，所述肽标签被插入到所述抗体或其片段的结构环的两个氨基酸之间。在某些实施方案中，所述肽标签被移植到所述抗体或其片段的结构环中。修饰的抗体的重链和/或轻链(或其片段)在其结构环中可以含有1，2，3，4，5，6，7，8，或更多的蛋白标签。在某些实施方案中，修饰的抗体或片段在其结构环中含有2，4，6，8，或更多的蛋白标签。在某些实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp，AcpS，海栖热袍菌PPTase，人PPTase，或保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的其突变体形式。在某些实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来源于人，枯草芽孢杆菌，大肠杆菌，海栖热袍菌，热纤维梭菌，以及任何其它哺乳动物，细菌或真菌的基因组。在某些实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp，AcpS，海栖热袍菌PPTase的同源蛋白，或其突变体。在一个实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来自嗜热生物。在某些实施方案中，亲本抗体是IgG，IgM，IgE或IgA抗体。在具体的实施方案中，亲本抗体是IgG1抗体。在某些实施方案中，亲本抗体是IgG2，IgG3或IgG4抗体。

[0624] 如本文所用，"保留"活性是指所描述的酶保留参考物质活性的至少约10％，所述参考物质是枯草杆菌Sfp 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(例如，见Quadri等人，Biochemistry 37:1585-1595(1998))。例如，在相同反应条件下，即，使用相同的CoA底物、相同的肽标记的抗体、相同的缓冲液条件、相同的底物和酶浓度、相同的温度、相同的反应期间，与Sfp相比，不同的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶或酶的突变体形式保留了至少约10％的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性。

[0625] 在一个方面，本发明提供包含修饰的抗体或其片段，和末端基团的免疫缀合物，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，所述肽标签本身是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物，并且其中所述肽标签插入亲本抗体或其片段的V_H结构域的位置2和3之间，V_H结构域的位置63与64之间，V_H结构域的位置64和65之间，CH1结构域的位置138和139之间，CH1结构域的位置197和198之间，CH3结构域的位置359和360之间，CH3结构域的位置388和389之间，CH3结构域的C末端(Lys447之后)，和/或V_L结构域的位置2和3之间。在另一个方面，本发

明提供包含修饰的抗体或其片段，和末端基团的免疫缀合物，其中所述修饰的抗体或其片段包含肽标签，所述肽标签本身是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物，并且其中所述肽标签被插入亲本抗体或其片段的V_H或V_L结构域的氨基酸残基2和3之间，或轻链的氨基酸残基110和111之间，或CH1结构域的119和120之间，或120和121之间，或135和136之间，或136和137之间，或138和139之间，或164和165之间，或165和166之间，或194和195之间，或CH3结构域的388和389之间，或445和446之间，或446和447之间。在某些实施方案中，所述肽标签插入亲本抗体或其片段的轻链的氨基酸残基110和111之间，或CH1结构域的119和120之间，或120和121之间，或135和136之间，或136和137之间，或138和139之间，或165和166之间，或CH3结构域的388和389之间。

[0626] 在一个方面，本发明提供包含修饰的抗体或其片段，和末端基团的免疫缀合物，其中所述修饰的抗体或其片段包含SEQ ID NO:103,SEQ ID NO:109,SEQ ID NO:113,SEQ ID NO:121,SEQ ID NO:122,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:130,SEQ ID NO:131,和/或SEQ ID NO:141。在另一方面，本发明提供包含修饰的抗体或其片段，和末端基团的免疫缀合物，其中所述修饰的抗体或其片段包含SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:94,SEQ ID NO:95,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:126,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:130,SEQ ID NO:131,SEQ ID NO:132,SEQ ID NO:139,SEQ ID NO:149,SEQ ID NO:151,SEQ ID NO:152,SEQ ID NO:157,SEQ ID NO:158,SEQ ID NO:160,SEQ ID NO:168,SEQ ID NO:169,SEQ ID NO:178,SEQ ID NO:248,SEQ ID NO:250,SEQ ID NO:251,SEQ ID NO:256,SEQ ID NO:257,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:267,SEQ ID NO:268,SEQ ID NO:277,SEQ ID NO:348,SEQ ID NO:349,SEQ ID NO:356,SEQ ID NO:358,SEQ ID NO:359,SEQ ID NO:364,SEQ ID NO:365,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:373,SEQ ID NO:374,SEQ ID NO:380,SEQ ID NO:384,SEQ ID NO:386,SEQ ID NO:387,或SEQ ID NO:388。在某些实施方案中，所述修饰的抗体或其片段包含SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:132,SEQ ID NO:151,SEQ ID NO:152,SEQ ID NO:157,SEQ ID NO:158,SEQ ID NO:160,SEQ ID NO:169,SEQ ID NO:250,SEQ ID NO:251,SEQ ID NO:256,SEQ ID NO:257,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:268,SEQ ID NO:358,SEQ ID NO:359,SEQ ID NO:364,SEQ ID NO:365,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:374,或SEQ ID NO:384。

[0627] 关于本文所述的免疫缀合物，在一个方面，所述肽标签是选自表2所述的一种或多种肽。修饰的抗体的重链和/或轻链(或其片段)在其结构环中可含有1,2,3,4,5,6,7,8,或更多蛋白标签。在一个实施方案中，修饰的抗体或抗体片段在其结构环中含有2,4,6,8,或更多蛋白标签。在另一个实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp,AcpS,海栖热袍菌PPTase,人PPTase,或保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的其突变体形式。在一个实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来自人，枯草芽孢杆菌，大肠杆菌，海栖热袍菌，热纤维梭菌，以及任何其它哺乳动物，细菌或真菌的基因组。在具体实施方中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp，且所述肽标签选自GDSLSWLLRLLN(SEQ ID NO:1),GDSLSWL(SEQ ID NO:2),DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9),GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10),DSLEFIASKL(SEQ ID NO:18),和DSLEFIASK(SEQ ID NO:19)。在一个实施方案中，亲本抗体是IgG,IgM,IgE或IgA抗体。在具体实施方案中，亲本抗体是IgG1抗体。在另一具体实施方案中，亲本抗体是IgG2,IgG3或IgG4抗体。

[0628] 在另一个方面，本发明提供包含修饰的抗体或其片段，和末端基团的免疫缀合物，其中所述修饰的抗体或其片段包含的肽标签，所述肽标签本身是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物，并且其中所述肽标签被移植到抗体或其片段的结构环，或C-或N-末端。在具体实施方案中，所述肽标签被移植到亲本抗体或其片段的V_H结构域的氨基酸位置62-64(在氨基酸62和63处突变，氨基酸63和64之间插入肽标签的其余部分)，V_H结构域的氨基酸位置62到65(在氨基酸62-64处突变，氨基酸64和65之间插入肽标签的其余部分)；CH1结构域的氨基酸位置133到139(氨基酸133-138处突变，氨基酸138和139之间插入肽标签的其余部分)，CH1结构域的氨基酸位置189到195，和/或CH1结构域的氨基酸位置190至198(在氨基酸190-197处突变，在197和198之间插入肽标签的其余部分)。在一个实施方案中，所述肽标签是选自表2中所述的一种或多种肽。修饰的抗体的重链和/或轻链(或其片段)可以在其结构环中含有1,2,3,4,5,6,7,8，或更多的蛋白标签。在一个实施方案中，修饰的抗体或抗体片段在其结构环含有2,4,6,8，或更多的蛋白标签。在另一个实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp，AcpS，海栖热袍菌PPTase，人PPTase，或保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的其突变体形式。在一个实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来自人，枯草芽孢杆菌，大肠杆菌，海栖热袍菌，热纤维梭菌，以及任何其它哺乳动物，细菌或真菌的基因组。在具体实施方案中，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp，且所述肽标签选自GDSLSWLLRLLN(SEQ ID NO:1)，GDSLSWL(SEQ ID NO:2)，DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9)，GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10)，DSLEFIASKL(SEQ ID NO:18)，和DSLEFIASK(SEQ ID NO:19)。在一个实施方案中，亲本抗体是IgG，IgM，IgE或IgA抗体。在具体实施方案中，亲本抗体是IgG1抗体。在另一具体实施方案中，亲本抗体是IgG2，IgG3或IgG4抗体。

[0629] 在另一个方面，本发明提供了包含肽标签的修饰的抗体或其片段，所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物，并且其中所述肽标签被插入到亲本抗体或其片段的V_H结构域的位置2和3之间，V_H结构域的位置63和64之间，V_H结构域的位置64和65之间，CH1结构域的位置138和139之间，CH1结构域的位置197和198之间，CH3结构域的位置359和360之间，CH3结构域的位置388和389之间，CH3结构域的C末端(Lys447后)，和/或V_L结构域的位置2和3之间。在另一个方面，所述肽标签被插入亲本抗体或其片段的V_H或V_L结构域的氨基酸残基2和3之间，或轻链的氨基酸残基110和111之间，或CH1结构域的119和120之间，或120和121之间，或135和136之间，或136和137之间，或138和139之间，或164和165之间，或165和166之间，或194和195之间，或CH3结构域的388和389之间，或445和446之间，或446和447之间。在某些实施方案中，所述肽标签被插入亲本抗体或其片段的轻链氨基酸残基110和111之间，或CH1结构域的119和120之间，或120和121之间，或135和136之间，或136和137之间，或者138和139之间，或165和166之间，或CH3结构域的388和389之间。

[0630] 在另一方面，本发明提供修饰的抗体或其片段，所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:103,SEQ ID NO:109,SEQ ID NO:113,SEQ ID NO:121,SEQ ID NO:122,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:130,SEQ ID NO:131,和/或SEQ ID NO:141。在另一方面，本发明提供修饰的抗体或其片段，所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:27,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:94,SEQ ID NO:95,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:126,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:130,SEQ ID NO:131,SEQ ID NO:132,SEQ ID NO:139,SEQ ID NO:149,SEQ ID NO:151,SEQ ID NO:152,SEQ ID NO:157,SEQ ID NO:158,SEQ

ID NO:160,SEQ ID NO:168,SEQ ID NO:169,SEQ ID NO:178,SEQ ID NO:248,SEQ ID NO:250,SEQ ID NO:251,SEQ ID NO:256,SEQ ID NO:257,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:267,SEQ ID NO:268,SEQ ID NO:277,SEQ ID NO:348,SEQ ID NO:349,SEQ ID NO:356,SEQ ID NO:358,SEQ ID NO:359,SEQ ID NO:364,SEQ ID NO:365,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:373,SEQ ID NO:374,SEQ ID NO:380,SEQ ID NO:384,SEQ ID NO:386,SEQ ID NO:387,或SEQ ID NO:388。在某些实施方案中,本发明提供修饰的抗体或其片段,所述抗体或其片段包含SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:63,SEQ ID NO:127,SEQ ID NO:129,SEQ ID NO:132,SEQ ID NO:151,SEQ ID NO:152,SEQ ID NO:157,SEQ ID NO:158,SEQ ID NO:160,SEQ ID NO:169,SEQ ID NO:250,SEQ ID NO:251,SEQ ID NO:256,SEQ ID NO:257,SEQ ID NO:259,SEQ ID NO:268,SEQ ID NO:358,SEQ ID NO:359,SEQ ID NO:364,SEQ ID NO:365,SEQ ID NO:367,SEQ ID NO:374,或SEQ ID NO:384。

[0631] 在一个方面,所述肽标签是选自表2所述的一种或多种肽。抗体的重链和/或轻链(或其片段)在其结构环中可含有1,2,3,4,5,6,7,8,或更多蛋白标签。在某些实施方案中,抗体或抗体片段在其结构环中含有2,4,6,8,或更多蛋白标签。在某些实施方案中,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp,AcpS,海栖热袍菌PPTase,人PPTase,或保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的其突变体形式。在某些实施方案中,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来自人,枯草芽孢杆菌,大肠杆菌,海栖热袍菌,热纤维梭菌,以及任何其它哺乳动物,细菌或真菌的基因组。在具体实施方中,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp,且所述肽标签选自GDSLSWLLRLLN(SEQ ID NO:1),GDSLSWL(SEQ ID NO:2),DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9),GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10),DSLEFIASKL(SEQ ID NO:18),和DSLEFIASK(SEQ ID NO:19)。在某些实施方案中,亲本抗体是IgG,IgM,IgE或IgA抗体。在具体实施方案中,亲本抗体是IgG1抗体。在一些实施方案中,亲本抗体是IgG2,IgG3或IgG4抗体。

[0632] 在另一个方面,本发明提供包含肽标签的修饰的抗体或其片段,所述肽标签是4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,并且其中所述肽标签被移植到抗体或其片段的结构环,或C-或N-末端。在某些实施方案中,所述肽标签被移植到亲本抗体或其片段的V_H结构域的氨基酸位置62-64(在氨基酸62和63处突变,并且在氨基酸63和64之间插入肽标签的其余部分),V_H结构域的氨基酸位置62到65(在氨基酸62-64处突变,并且在氨基酸64和65之间插入肽标签的其余部分);CH1结构域的氨基酸位置133到139(在氨基酸133-138处突变,并且在氨基酸138和139之间插入肽标签的其余部分),CH1结构域的氨基酸位置189到195,和/或CH1结构域的氨基酸位置190至198(在氨基酸190-197处突变,并且在197和198之间插入肽标签的其余部分)。在一个实施方案中,所述肽标签是选自表2中所述的一种或多种肽。修饰的抗体的重链和/或轻链(或其片段)可以在其结构环中含有1,2,3,4,5,6,7,8,或更多的蛋白标签。在一个实施方案中,修饰的抗体或抗体片段在其结构环含中有2,4,6,8,或更多的蛋白标签。在另一个实施方案中,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp,AcpS,海栖热袍菌PPTase,人PPTase,或保留4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的其突变体形式。在一个实施方案中,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶来自人,枯草芽孢杆菌,大肠杆菌,海栖热袍菌,热纤维梭菌,以及任何其它哺乳动物,细菌或真菌的基因组。在一些实施方案中,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶是Sfp,且所述肽标签选自GDSLSWLLRLLN(SEQ ID NO:1),GDSLSWL(SEQ ID NO:2),DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9),GDSLDMLEWSLM(SEQ ID NO:10),

DSLEFIASKL(SEQ ID NO:18),和DSLEFIASK(SEQ ID NO:19)。在一个实施方案中,亲本抗体是IgG,IgM,IgE或IgA抗体。在具体实施方案中,亲本抗体是IgG1抗体。在一些实施方案中,亲本抗体是IgG2,IgG3或IgG4抗体。

[0633] 在某些方面,本文提供的修饰的抗体被改造以包含一个或多个正交缀合位点。此类正交缀合位点包括,但不限于,Sfp4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,AcpS 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,海栖热袍菌4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,人4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的底物,赖氨酸,半胱氨酸,酪氨酸,组氨酸,非天然氨基酸,吡咯赖氨酸和吡咯啉-羧基-赖氨酸。正交缀合位点也可以是可被酶促或化学修饰的肽序列,例如,四半胱氨酸标签,LPXTG-转肽酶肽(SEQ ID NO:1057)(X为任意氨基酸),生物素受体肽,CXPXR醛标签(SEQ ID NO:1058)(X为任意氨基酸),或His标签。在某些实施方案中,使用本发明的方法与本领域已知的其他缀合方法的组合标记此类改造的抗体,所述方法包括,但不限于,通过半胱氨酸,赖氨酸,组氨酸,酪氨酸,甲酰基-甘氨酸,吡咯赖氨酸,吡咯啉-羧基-赖氨酸和非天然氨基酸的化学选择性缀合。

[0634] 在某些方面中,酶Sfp和AcpS被用于将相同或者两个不同的标签正交位点特异性标记到被改造而含有S系列肽(例如,S1,S2,S3,S4,S5,S6和S7)和A系列肽(例如,A1,A-1,A-2,A-3,A-4和A-6)的抗体上,所述S系列肽和A系列肽位于抗体的VH,VL,CH1,CH2,CH3或C_L区(也见表2)。

[0635] 在其它方面中,酶Sfp和AcpS被用于将两个不同的标签正交位点特异性标记到被改造而含有ybbR系列肽(例如,ybbR11,ybbR12和ybbR13)和A系列肽(例如,A1,A-1,A-2,A-3,A-4和A-6)的抗体上,所述ybbR系列肽和A系列肽位于抗体的CH1,CH2,CH3或C_L区。

[0636] 在其它方面中,结合其它缀合方法,酶Sfp和AcpS被用于正交位点特异性标记到被改造而含有ybbR系列肽(例如,ybbR11,ybbR12和ybbR13)和A系列肽(例如,A1,A-1,A-2,A-3,A-4和A-6)的抗体上,所述ybbR系列肽和A系列肽位于抗体的VH,VL,CH1,CH2,CH3或C_L区。此类方法包括但不限于缀合至赖氨酸,半胱氨酸,酪氨酸,组氨酸,甲酰基甘氨酸,非天然氨基酸,吡咯赖氨酸和/或吡咯啉羧基-赖氨酸。相比于通过Sfp或AcpS的酶促缀合,这样的方法可以用来连接相同或不同的标签。

[0637] 具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的蛋白和肽底物

[0638] 如本文所用的术语"4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶"(PPTase)和"具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的蛋白"可以互换使用,是指能够将来自供体分子(如辅酶A(CoA)或其类似物)的ppan基团传递到底物,如肽标签或酰基运载体蛋白的任何蛋白或其片段。

[0639] PPTase是催化运载体蛋白翻译后修饰的酶,所述运载体蛋白与脂肪酸合酶(FAS)、聚酮合酶(PKS)和非核糖体肽合成酶(NRPS)相关。这些运载体蛋白通常被称为ACP,酰基运载体蛋白(FAS和PKS),或称为PCP,肽基运载体蛋白(NRPS)。ACP和PCP由约80个氨基酸组成,并通常整合为FAS、PKS或NRPS多酶复合体中的结构域。在一些情况下,ACP和PCP也发现作为独立的自主折叠的蛋白。ACP对脂肪酸和聚酮的生物合成是必不可少的,因为其通过共价附着于其柔性ppan辅基运载相应的代谢中间产物。通过在NRPS多酶复合体活性位点之间运输肽中间体,PCP在非核糖体肽合成中执行类似的功能。根据序列和结构相似性和底物特异性,PPTase已被分为三组。PPTase的第一组成员,例如大肠杆菌的AcpS,为约120个氨基酸残基长,作为同源三聚体发挥功能,并且具有相当窄的底物特异性,局限于例如,II型FAS和

PKS系统的酰基运载体蛋白(ACP)。第二组成员,例如枯草芽孢杆的Sfp或人PPTase,作为单体发挥功能,并且已报道具有广泛的底物特异性,包括与NRP、FAS和PKS相关的运载体蛋白(见,例如,Suo等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA398:99-104,2001;Quadri等人,Biochem.,37:1585-95,1998;Liu等人,Arch.Microbiol,183:37-44,2005;Joshi等人,J.Biol.Chem.,278:33142-33149,2003)。第三组包括被共价附着到I型FAS的PPTase,如与酵母细胞内FAS相关的那些(见,例如,Fichtlscherer等人,Eur.J.Biochem.,267:2666-71,2000)。

[0640] 根据本发明,PPTase包括天然存在的具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的蛋白,包括但不限于,来自大肠杆菌的AcpS(I型PPTase)和来自枯草芽孢杆菌的Sfp(II型PPTase)、整合的PPTase结构域(III型PPTase),其与以下相关:来自酿酒酵母(S.cerevisiae),粟酒裂殖酵母(S.pombe),C.albacans,构巢曲霉(E.nidulans),和展青霉(P.patulum)的脂肪酸合酶(FAS)、来自大肠杆菌,痢疾杆菌(S.flexneri),鼠伤寒沙门氏菌(S.typhimurium)和S.austin的EntD、来自短小芽孢杆菌(B.pumilus)的Psf-1、来自短芽孢杆菌(B.brevis)的Gsp、来自鱼腥藻属物种(Anabaena sp)的Hetl,来自酿酒酵母的Lys5,来自枯草芽孢杆菌的Lpa-14和来自大肠杆菌的0195、海栖热袍菌MSB8的PPTase(NP_228501)、人的PPTase(NP_056238)、以及其同源物及突变体。本发明的PPTases还包括具有来自除上述物种以外的物种的4'磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的蛋白,以及人工或重组生产的能够4'磷酸泛酰巯基乙胺基化本文描述的肽部分的蛋白。

[0641] Sfp和AcpS代表两个类型的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,其无论在其对运载体蛋白结构域的底物特异性中,还是在其结构中均具有差异(Flugal等人,J.Biol.Chem.,275:959-968,2000;Lambalot等人,Chem.Biol.,3:923-936,1996)。假二聚体PPTase的Sfp类别大小约为230个残基,且Sfp的晶体结构表明,其具有双重对称性,采用相似折叠的分子的N-和C-末端半部,以及界面处的酶活性位点(Hodneland等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:5048-5052,2002;Koglin等人,Science,312:273-276,2006)。与此相反,AcpS为约120个残基长,约SFP的一半大小,并且AcpS的晶体结构表明,酶组装成三聚体,并且ACP和CoA的结合位点在各单体之间的界面处形成(Reuter等人,Embo.J.,18:6823-6831,1999;Chirgadze等人,Embo.J.,19:5281-5287,2000)。据报道,Sfp显示出比AcpS广泛得多的底物特异性,在于Sfp可修饰来自非核糖体肽合成酶、聚酮合酶和脂肪酸合酶的PCP和ACP结构域,而AcpS仅修饰ACP(Flugel等人,J.Biol.Chem.,275:959-968,2000;Parris等人,Structure,8:883-895,2000;Mofid等人,J.Biol.Chem.,277:17023-17031,2002)。

[0642] 两种PPTase的ACP和PCP底物采用相似的折叠,折叠成四螺旋束蛋白,其中待被ppan辅基修饰的丝氨酸残基在第二α-螺旋顶部,已显示其对与Sfp和AcpS相互作用发挥重要的作用(Hodneland等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:5048-5052,2002;Chirgadze等人,Embo.J.,19:5281-5287,2000;Quadri等人,Biochem.,37:1585-1595,1998;Li等人,Biochem.,42:4648-4657,2003)。虽然PCP和ACP之间没有明显的共有序列的差异,二者之间最显著的差异是运载体蛋白的静电表面电势:FAS和PKS系统中的PCP具有中性蛋白表面,而ACP结构域带有负电酸性表面(Parris等人,Structure,8:883-895,2000)。

[0643] 几组短肽已经被鉴定为PPTase的有效率的底物。例如,ybbR13是11个氨基酸残基的肽,其是Sfp的底物(J.Yin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.US A,102:15815-15820,2005;Z.Zhou等人,ACS Chem Biol.,2:337-346,2007;Z.Zhou等人,J.Am.Chem.Soc.,130:9925-

9930,2008)。ybbR13肽(DSLEFIASKLA(SEQ ID NO:9))分离自枯草芽孢杆菌基因组的噬菌体展示文库(J.Yin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U S A,102:15815-15820,2005)。ybbR13肽序列的一部分源自枯草芽孢杆菌的开放阅读框,称为ybbR,并且其在N末端包括(H/D)S(L/I)三肽序列,该三肽序列在如ACP、PCP和芳基运载体蛋白(ArCP)的公知PPTase底物中是保守的。ybbR肽在其N末端不包括氨基酸序列DxFFxxLGG(SEQ ID NO:1059),该序列被发现在PCP中是保守的。已经描述了ybbR13肽的修饰和变体,其可以在4'-磷酸泛酰巯基乙胺化反应中用作用于位点特异性标记的底物(J.Yin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U S A,102:15815-15820,2005)。PPTase其他的肽底物是S系列肽和A系列肽,根据其与Sfp或AcpS的反应性分别命名为"S"或"A"(Z.Zhou等人ACS Chem Biol.,2:337-346,2007和Z.Zhou等人J.Am.Chem.Soc.,130:9925-9930,2008)。示例性S系列肽包括,但不限于Sfp的有效率的底物S6,而示例性A系列肽包括,但不限于AcpS的有效率的底物A1。S6肽和A 1肽的长度都是12个氨基酸残基。

[0644] 肽底物的实例列于下表2中。根据本发明,这些短肽标签可用于由PPTase催化的反应中的靶蛋白(包括抗体)的位点特异性标记。此外,本文中所描述的肽标签和各自PPTases的配对,例如,ybbR13/Sfp或S6/Sfp和A1/AcpS,也可用于,例如,在细胞裂解物或活细胞的表面上的一个(或多个)靶蛋白的正交位点特异性标记。

[0645] 表2:PPTase肽底物的实例。修饰的丝氨酸残基有下划线。

[0646]

序列	SEQ ID NO:	名称
GDSLSWLLRLLN	1	S6
GDSLSWL	2	S6截短
GDSLSWLVRCLN	3	S1
GDSLSWLLRCLN	4	S2
GDSLSWLVRLLN	5	S3
GDSLSWLLRSLN	6	S7
GSQDVLDSLEFIASKLA	7	Ybbr11
VLDSLEFIASKLA	8	Ybbr12
DSLEFIASKLA	9	Ybbr13
GDSLDMLEWSLM	10	A1
GDSLDMLEWSL	11	A-1
GDSLDMLEWS	12	A-2
GDSLDMLEW	13	A-3
DSLDMLEW	14	A-4
GDSLDM	15	A-6
LDSVRMMALAAR	16	E0
LDSLDMLEWSLR	17	E2
DSLEFIASKL	18	ybbR截短1
DSLEFIASK	19	ybbR截短2
DVLDSLEFI	20	ybbR8

VLDSLEFIAS	21	ybbR14
DSLDMLEWSL	1132	A1截短

[0647] 因此，本发明提供了一种含有一个或多个列于表2的肽标签的工程化抗体和标记这样的抗体的方法，例如，用细胞毒素缀合。以下以及实施例中说明标记化学。

[0648] 2.标记化学

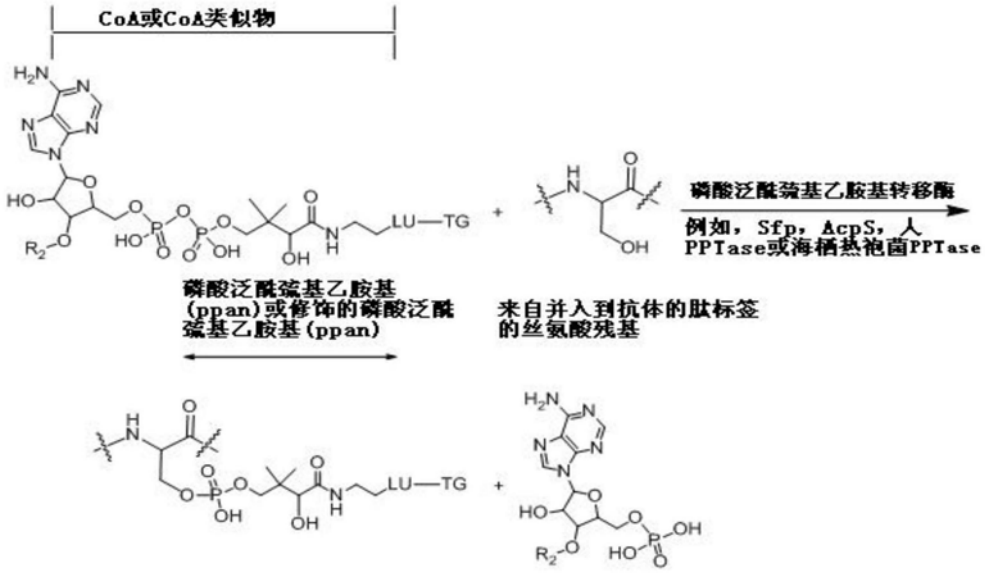
[0649] 使用PPTase或其突变体，通过短肽标签(插入或移植或其组合)的翻译后修饰对文中提供的修饰的抗体或其片段进行位点特异性标记，所述PPTase或其突变体包括但不限于，Sfp，AcpS，人PPTase或海栖热袍菌PPTase。这样的翻译后修饰包括PPTase催化的短肽标签中的保守丝氨酸残基和辅酶A(CoA)或辅酶A类似物的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基(ppan)基团之间的反应。在该反应中，CoA的ppan辅基，或CoA类似物的修饰ppan辅基的通过与短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基基团形成磷酸二酯键附着到短肽标签，所述短肽标签已并入(即插入或移植或其组合)抗体。ppan或修饰的ppan连接末端基团(TG)，从而形成的磷酸二酯键通过包括ppan或修饰的ppan部分的接头缀合末端基团(TG)与修饰的抗体或其片段。

[0650] 在某些实施方案中，本文所提供的修饰的抗体或其片段由一步法标记，其中翻译后修饰通过连接末端基团(TG)的CoA，或连接末端基团(TG)的CoA类似物与改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸反应而发生，如下面的方案(Ia)-(Ic)所示。备选地，在本文提供的修饰的抗体或其片段的翻译后修饰的其它实施方案中，修饰的抗体或其片段通过两步法标记，其中翻译后修饰包括，首先反应活化的CoA或活化的CoA类似物与改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸，然后使官能化的末端基团(TG)与活化的CoA或活化的CoA上的反应基团进行反应。这样的两步法示于以下的方案(IIa)-(IIf)。在本文提供的修饰的抗体或其片段的翻译后修饰的其他实施方案中，修饰的抗体或其片段通过三步法标记，其中翻译后修饰包括，首先反应具有保护的ppan辅基的CoA，或具有被保护的ppan辅基的CoA类似物与改造到抗体中的短肽标签的保守的丝氨酸，从而将CoA或CoA类似物附着至抗体。在第二步骤中，使被保护的ppan辅基脱保护，从而在被保护的ppan辅基上生成反应性官能团。在第三步骤中，将该反应性官能团连接到末端基团(TG)，从而将末端基团附着到修饰的抗体或其片段。这样的三步法在以下方案(IIIa)-(IIIf)中表示。

[0651] 一步法

[0652] 用于标记本文提供的修饰的抗体或其片段的一步法示于方案(Ia)中：

[0653] 方案(Ia)

[0654] 

[0655] 其中：

[0656] R_2是H或-P(=O)(OH)$_2$；

[0657] 接头单元(LU)是连接末端基团(TG)至CoA类似物的修饰的ppan辅基的化学部分，以及

[0658] 末端基团(TG)是药物部分，其选自抗癌剂，抗炎剂，抗真菌剂，抗细菌剂，抗寄生虫剂，抗病毒剂和麻醉剂，生物物理探针，荧光团，亲和探针，螯合剂，光谱探针，放射性探针，脂质分子，聚乙二醇，聚合物，自旋标记物，DNA，RNA，蛋白，肽，抗体，抗体片段，纳米颗粒，量子点，脂质体，PLGA颗粒，多糖或表面。

[0659] 在某些实施方案中，接头单元(LU)包含接头，所述接头选自非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头，光可切割的接头，或其任何组合，并且所述接头单元(LU)任选地含有自消间隔子。

[0660] 在某些实施方案，接头单元(LU)是-L_1-L_2-L_3-L_4-，其中

[0661] L_1是键，非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头或光可切割的接头；

[0662] L_2是键，非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头或光可切割的接头；

[0663] L_3是键，非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头或光可切割的接头，和

[0664] L_4是键，非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头，光可切割的接头或自消间隔子。

[0665] 在某些实施方案，接头单元(LU)是-L_1-L_2-L_3-L_4-，其中

[0666] L_1是非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头或光可切割的接头；

[0667] L_2是键，非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头或光可切割的接头；

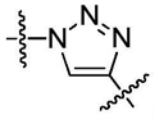
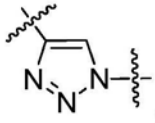
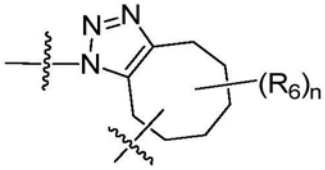
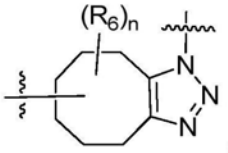
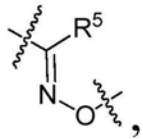
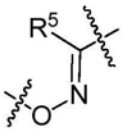
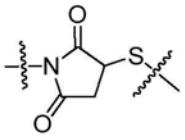
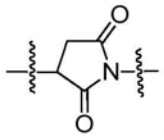
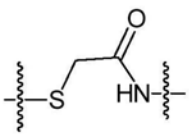
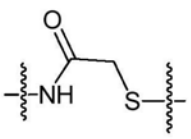
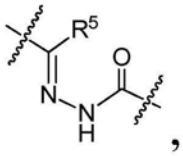
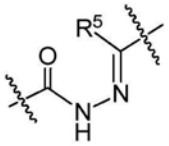
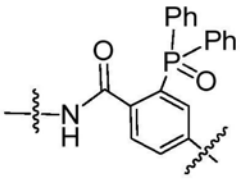
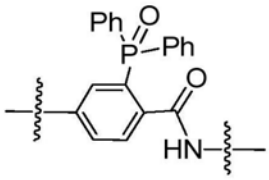
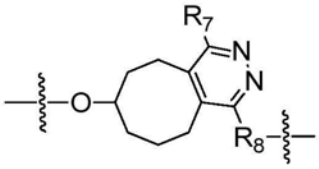
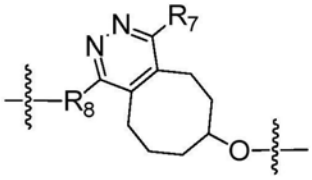
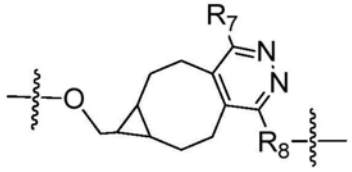
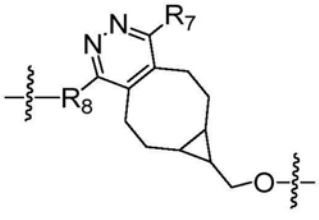
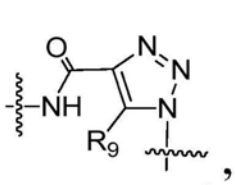
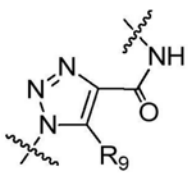
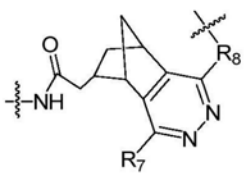
[0668] L_3是键，非酶促可切割的接头，非可切割的接头，酶促可切割的接头，光稳定的接头或光可切割的接头，和

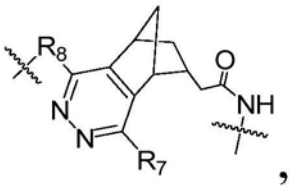
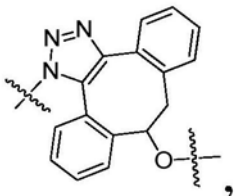
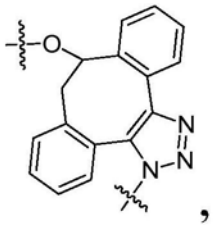
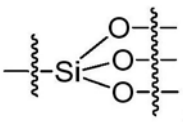
[0669] L_4是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头,光可切割的接头或自消间隔子。

[0670] 在某些实施方案,接头单元(LU)是-L_1-L_2-L_3-L_4-,其中

[0671] L_1是键,-A_1-,-A_1X^2-或-X^2-;其中:

[0672] A_1是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$$C(R^4)_2$)$_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)-,-$(CH_2)_n$(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NH($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,或-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-;

[0673] 每个X^2独立地选自键,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,




-S-,-Si(OH)2O-,-,

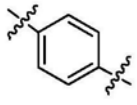
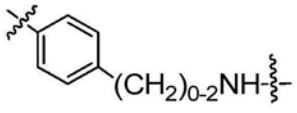
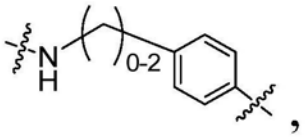
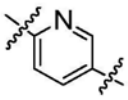
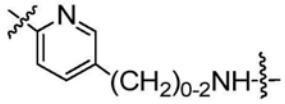
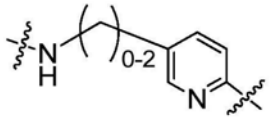
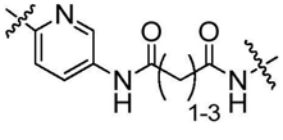
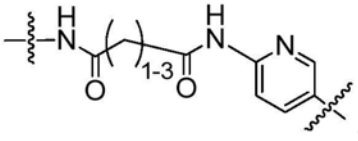
$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

[0674] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,-C(=O)OH和-OH,

[0675] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或由1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

[0676] 每个R^6独立地选自H,氟代,由-C(=O)OH取代的苄氧基,由-C(=O)OH取代的苄基,由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基;

[0677] R^7独立地选自H,苯基和吡啶;

[0678] R^8独立地选自,,,,,,,,

[0679] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基;

[0680] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0681] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9;

[0682] L_2是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头或光可切割的接头;

[0683] L_3是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头或光可切割的接头,和

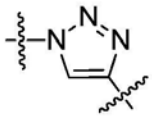
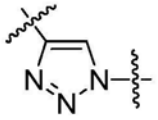
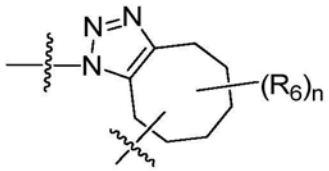
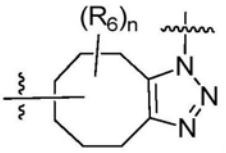
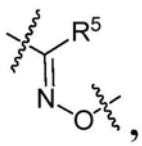
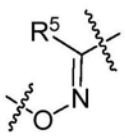
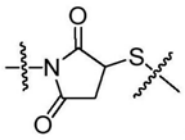
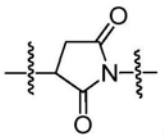
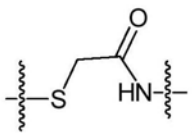
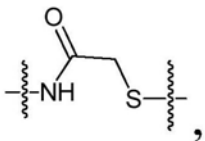
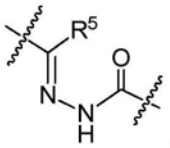
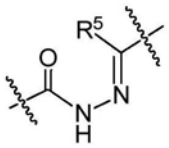
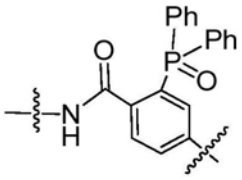
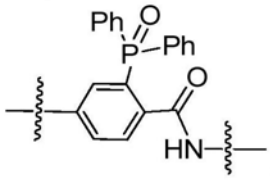
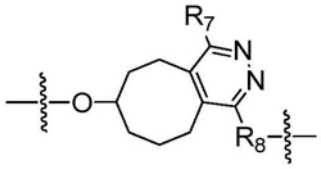
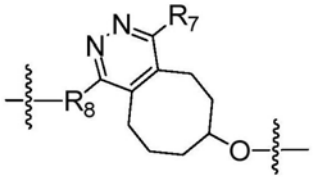
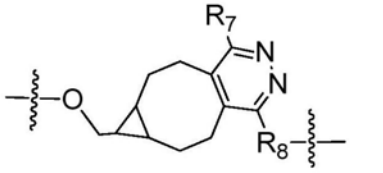
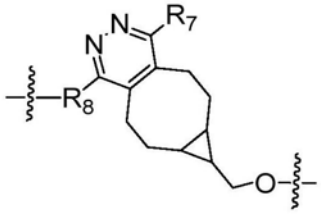
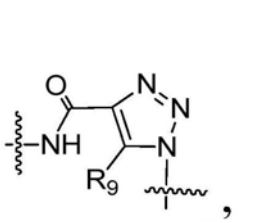
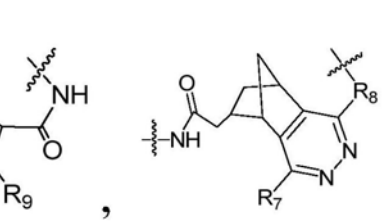
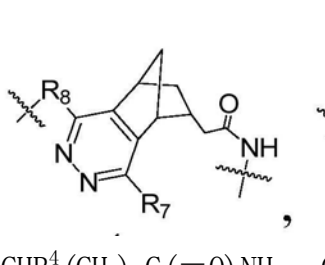
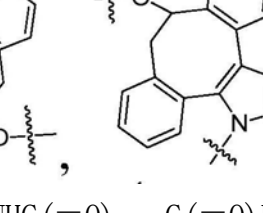
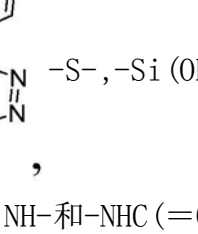
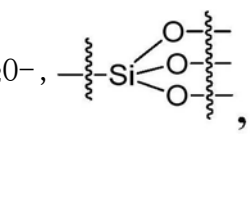
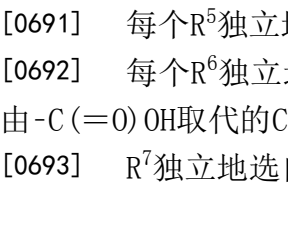
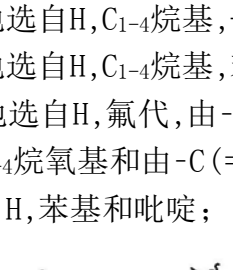
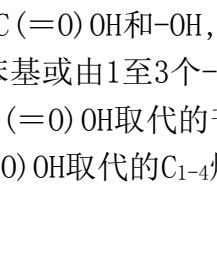
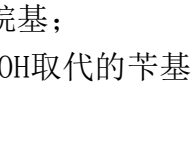
[0684] L_4是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头,光可切割的接头或自消间隔子。

[0685] 在某些实施方案,L_1是$C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-CH_2CH_2-S-$,因而LU是$-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-CH_2CH_2-S-L_2-L_3-L_4-$。

[0686] 在某些实施方案,接头单元(LU)是$-L_1-L_2-L_3-L_4-$,其中

[0687] L_1是键,$-A_1-$,$-A_1X^2-$或$-X^2-$;其中:

[0688] A_1是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

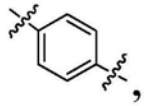
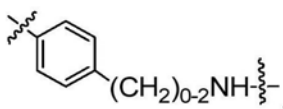
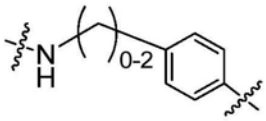
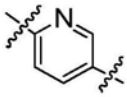
[0689] 每个X^2独立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，-S-，-Si(OH)$_2$O-，，-$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH$-，-$CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)$-，-C(=O)NH-和-NHC(=O)-；

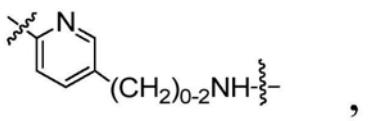
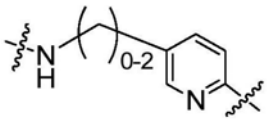
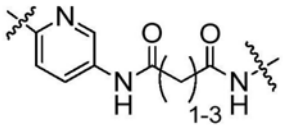
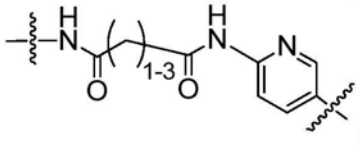
[0690] 每个R^4独立地选自H，C_{1-4}烷基，-C(=O)OH和-OH，

[0691] 每个R^5独立地选自H，C_{1-4}烷基，苯基或由1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基；

[0692] 每个R^6独立地选自H，氟代，由-C(=O)OH取代的苄氧基，由-C(=O)OH取代的苄基，由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基；

[0693] R^7独立地选自H，苯基和吡啶；

[0694] R^8独立地选自，，，，

[0695] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

[0696] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0697] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9；

[0698] L_2是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头或光可切割的接头；

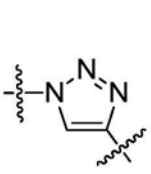
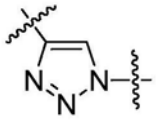
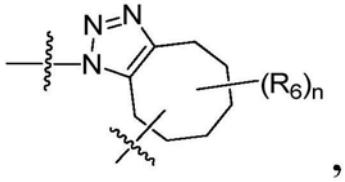
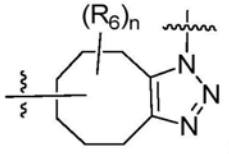
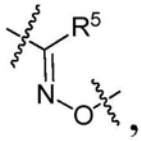
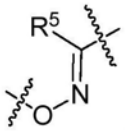
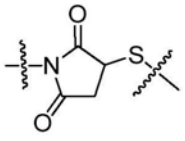
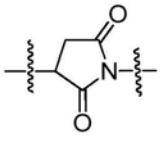
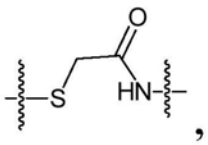
[0699] L_3是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头或光可切割的接头；

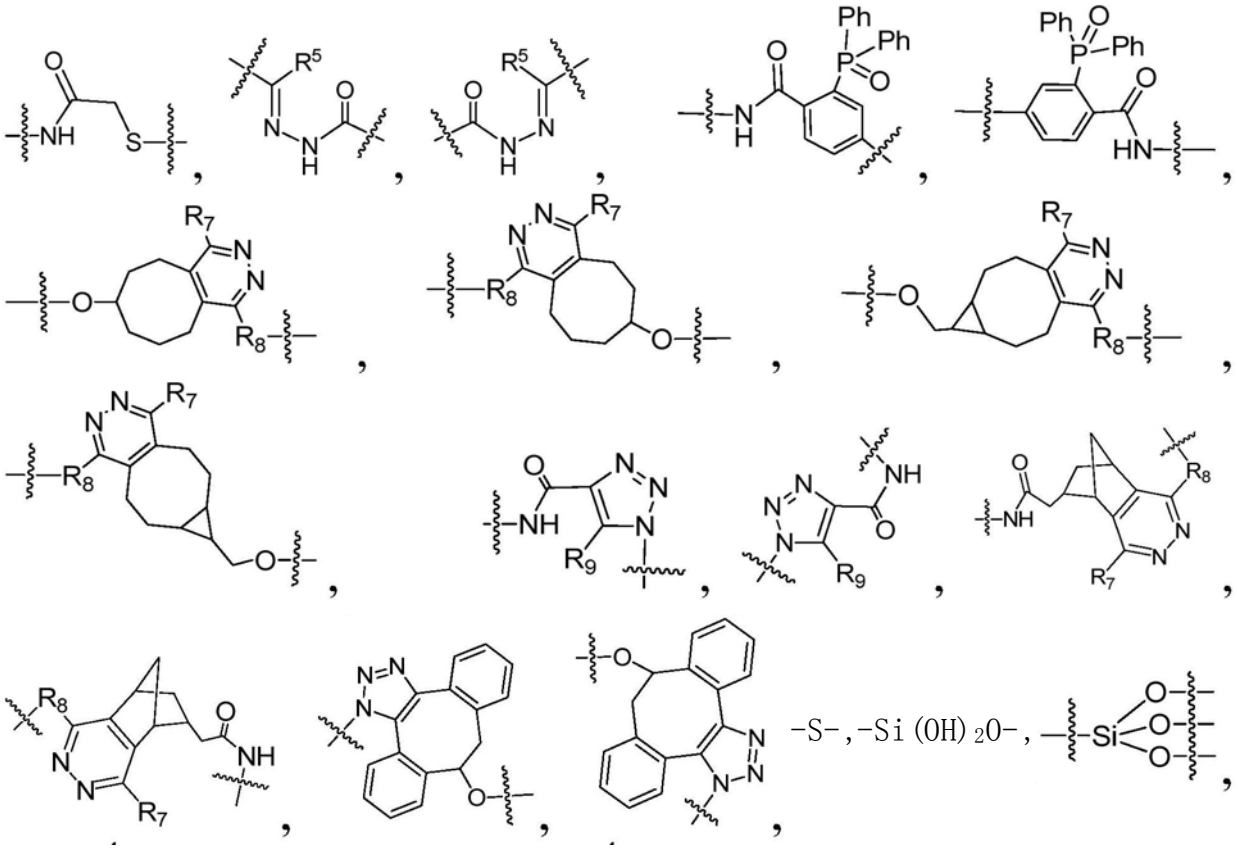
[0700] L_4是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头,光可切割的接头或自消间隔子。

[0701] 在某些实施方案,接头单元(LU)是-L_1-L_2-L_3-L_4-,其中

[0702] L_1是键,-A_1-,-A_1X^2-或-X^2-;其中:

[0703] A_1是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-或-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-；

[0704] 每个X^2独立地选自键，











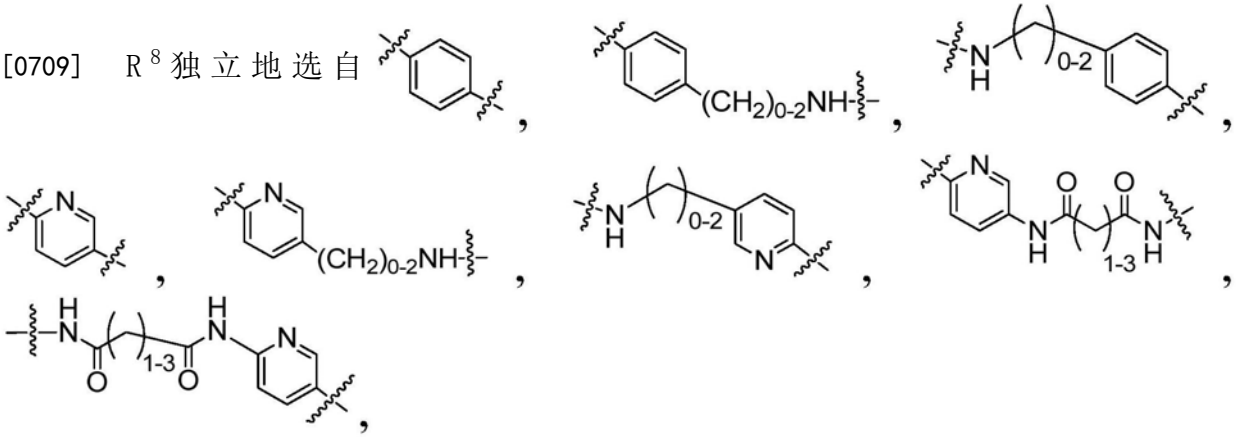
-CHR^4(CH$_2$)$_n$C(=O)NH-,-CHR^4(CH$_2$)$_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH-和-NHC(=O)-;

[0705] 每个R^{4}独立地选自H,C$_{1-4}$烷基,-C(=O)OH和-OH,

[0706] 每个R^{5}独立地选自H,C$_{1-4}$烷基,苯基或由1至3个-OH基团取代的C$_{1-4}$烷基;

[0707] 每个R^{6}独立地选自H,氟代,由-C(=O)OH取代的苄氧基,由-C(=O)OH取代的苄基,由-C(=O)OH取代的C$_{1-4}$烷氧基和由-C(=O)OH取代的C$_{1-4}$烷基;

[0708] R^{7}独立地选自H,苯基和吡啶;

[0709] R^{8}独立地选自 

[0710] R^{9}独立地选自H和C$_{1-6}$卤代烷基;

[0711] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0712] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9;

[0713] L$_2$是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头或光可切割的接头;

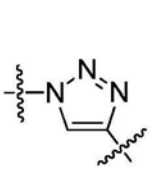
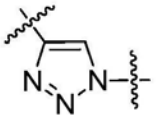
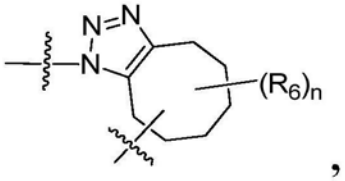
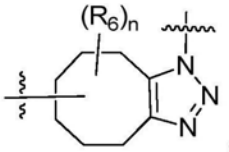
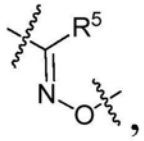
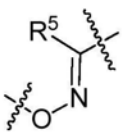
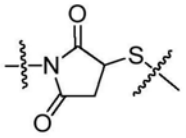
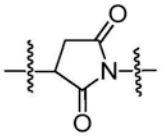
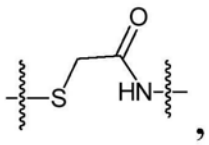
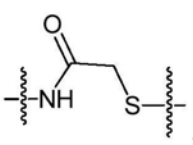
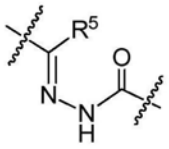
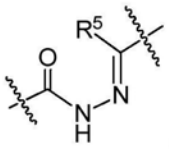
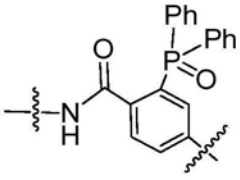
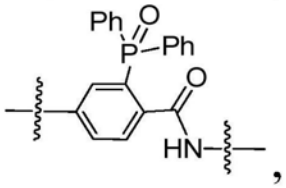
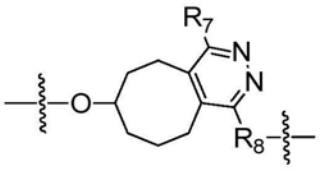
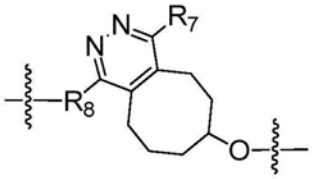
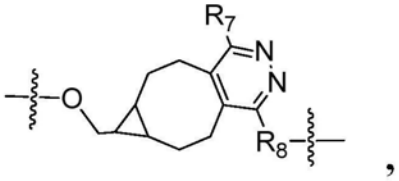
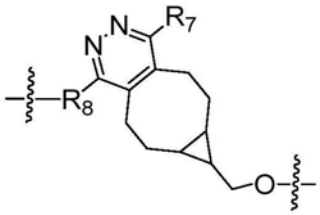
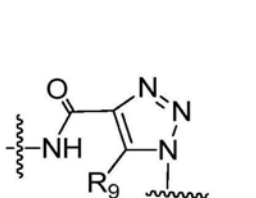
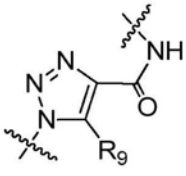
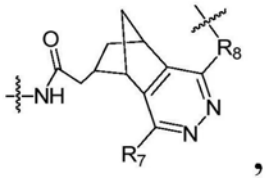
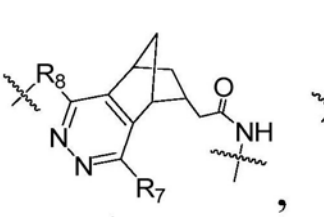
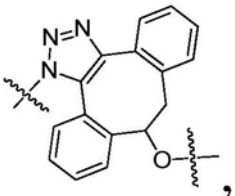
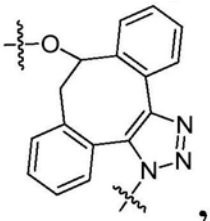
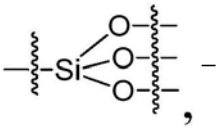
[0714] L_3是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头或光可切割的接头,和

[0715] L_4是键,非酶促可切割的接头,非可切割的接头,酶促可切割的接头,光稳定的接头,光可切割的接头或自消间隔子。

[0716] 在某些实施方案,接头单元(LU)是-L_1-L_2-L_3-L_4-,其中

[0717] L_1是键,-A_1-,-A_1X^2-或-X^2-;其中:

[0718] A_1是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-or-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-;

[0719] 每个X^2独立地选自键,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,-S-,-Si(OH)$_2$O-,,-$CHR^4(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$CHR^4(CH_2)_n$NHC(=O)-,-C(=O)NH-和-NHC(=O)-;

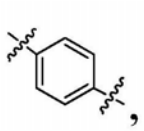
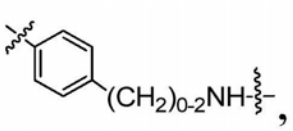
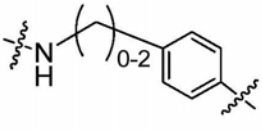
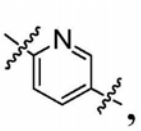
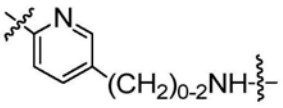
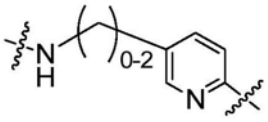
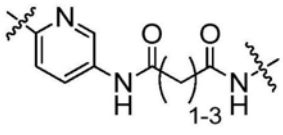
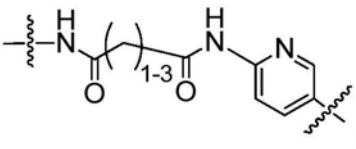
[0720] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,-C(=O)OH和-OH,

[0721] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或由1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基;

[0722] 每个R^6独立地选自H,氟代,由-C(=O)OH取代的苄氧基,由-C(=O)OH取代的苄基,

由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基；

[0723] R^7独立地选自H,苯基和吡啶；

[0724] R^8独立地选自，，，，，，，，

[0725] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

[0726] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0727] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9；

[0728] L_2是键,非酶促可切割的接头或非可切割的接头；

[0729] L_3是键,非酶促可切割的接头或非可切割的接头；

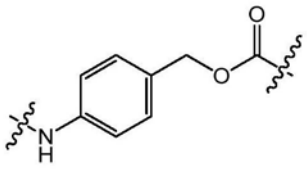
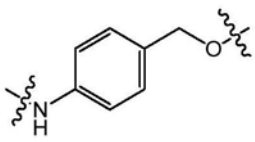
[0730] L_4是键,酶促可切割的接头或自消间隔子。

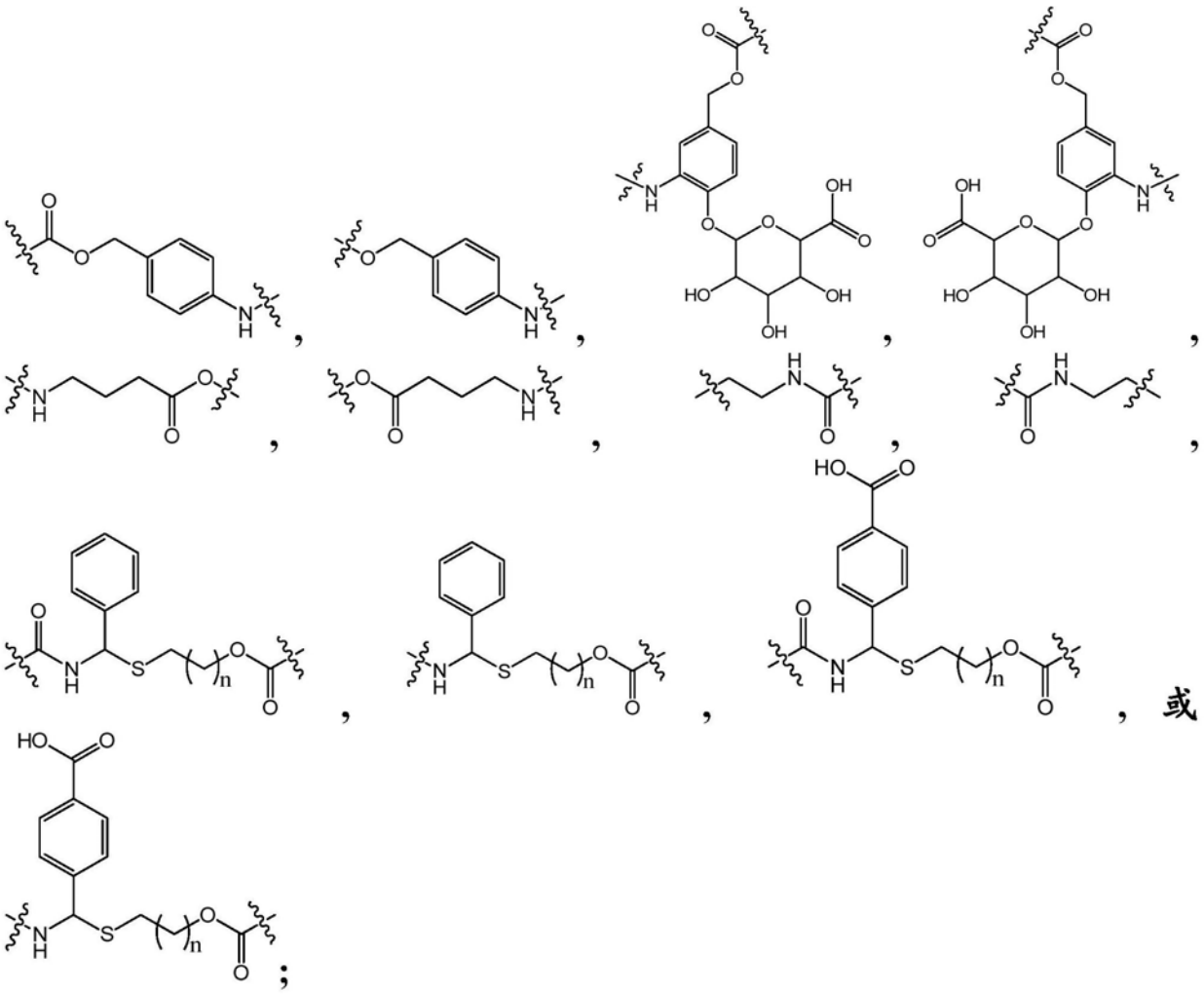
[0731] 在某些实施方案,接头单元(LU)是-L_1-L_2-L_3-L_4-,其中

[0732] L_1是键,-A_1-,-A_1X^2-或-X^2-；

[0733] L_2是键,-A_2-,或-A_2X^2-；

[0734] L_3是键,-A_3-,或-A_3X^2-；

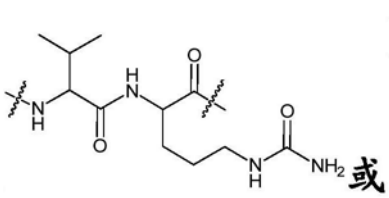
[0735] L_4是键,-A_4-,-A_4X^2-,，，



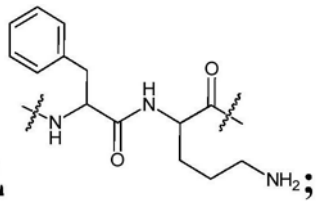
[0736] A_1是-C(=O)NH-,-NHC(=O)-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)-,-$(CH_2)_n$$(O(CH_2)_n)_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$$(O(C(R^4)_2)_n)_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_n$O)$_m$$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,或-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-;

[0737] A_2是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-(O$(CH_2)_n$)$_m$-,-(O$(C(R^4)_2)_n$)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_m$-,-($(CH_2)_n$O)$_m$$(CH_2)_n$-,-(($(C(R^4)_2)_n$O)$_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=O)$NR^4$-,-$(CH_2)_n$NHC(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$C(=O)NH-,-S$(C(R^4)_2)_n$C(=O)NH-,-$(CH_2)_n$S-,-$(C(R^4)_2)_n$S-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$NH-,-$(C(R^4)_2)_n$NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n$C(=O)-,-$(C(R^4)_2)_n$C(=

0)-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,



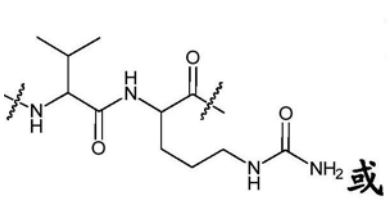
或



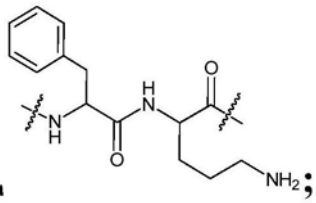
;

[0738] A_3是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC(=O)NH$-,-$(C(R^4)_2)_nC(=O)NH$-,-$(CH_2)_nNHC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nS$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_nC(=O)NH$-,-S$(C(R^4)_2)_nC(=O)NH$-,-$(CH_2)_nS$-,-$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_n$-,-S$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_nC(=O)$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)NH(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)NH(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mOC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mOC(=O)$-,-$(CH_2)_nC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_nC(=O)$-,-$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,

[0739] -$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,

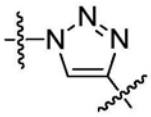
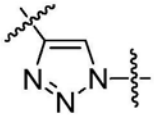
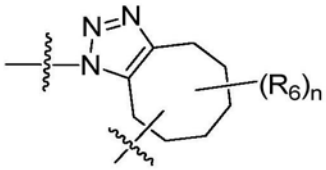
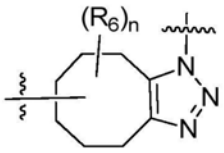
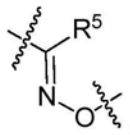
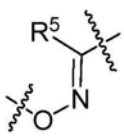
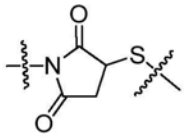
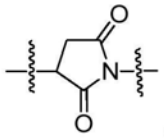
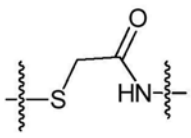
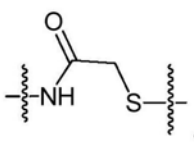
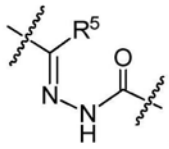
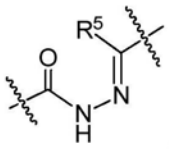
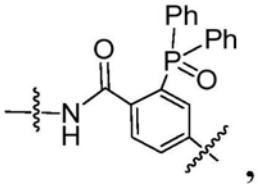
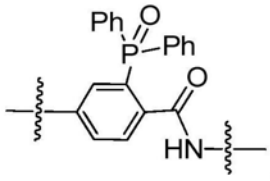
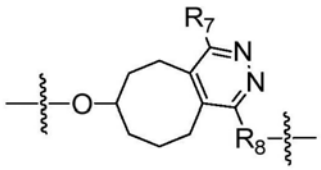
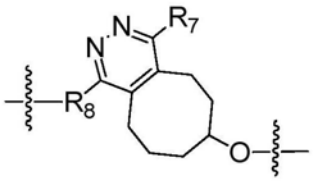
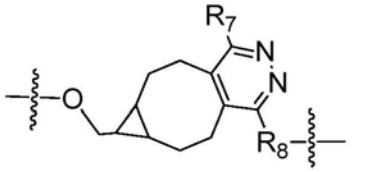
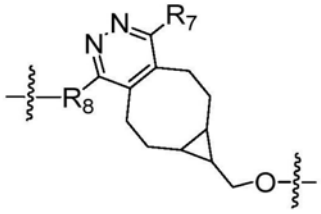
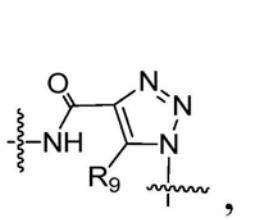
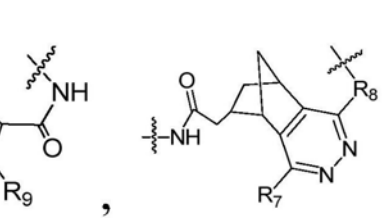
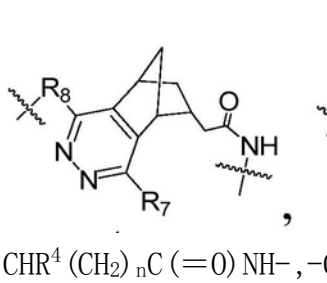
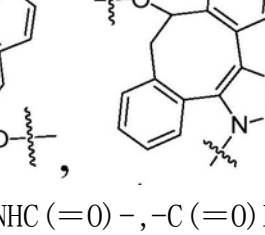
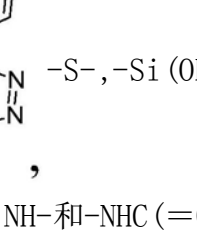
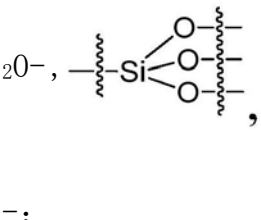
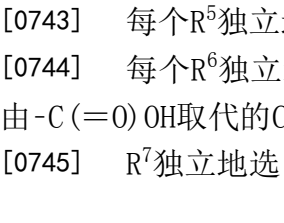
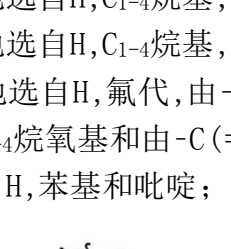
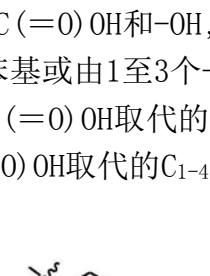
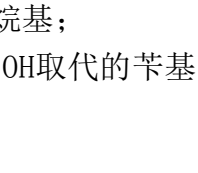


或



;

[0740] A_4是-C(=O)NH-,-C(=O)NH$(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_m$-,-$(O(C(R^4)_2)_n)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_m$-,-$((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC(=O)NH$-,-$(C(R^4)_2)_nC(=O)NH$-,-$(CH_2)_nNHC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)$-,-NHC(=O)$(CH_2)_n$-,-NHC(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nS$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nS$-,-S$(CH_2)_nC(=O)NH$-,-S$(C(R^4)_2)_nC(=O)NH$-,-C(=O)NH$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-,-C(=O)NH$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-C(=O)$(CH_2)_n$-,-C(=O)$(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nC(=O)$-,-$(C(R^4)_2)_nC(=O)$-,-$(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-,-$(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n$-,-$(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n$-,-$(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n$-,或-$(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n$-;

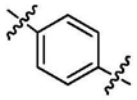
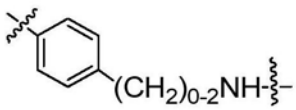
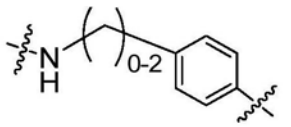
[0741] 每个X^2独立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，-S-，-Si(OH)$_2$O-，，-$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH$-，-$CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)$-，-C(=O)NH-和-NHC(=O)-；

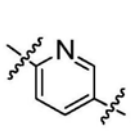
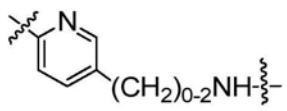
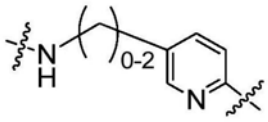
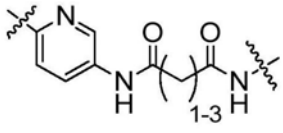
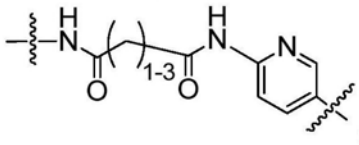
[0742] 每个R^4独立地选自H，C_{1-4}烷基，-C(=O)OH和-OH，

[0743] 每个R^5独立地选自H，C_{1-4}烷基，苯基或由1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基；

[0744] 每个R^6独立地选自H，氟代，由-C(=O)OH取代的苄氧基，由-C(=O)OH取代的苄基，由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基；

[0745] R^7独立地选自H，苯基和吡啶；

[0746] R^8独立地选自，，，


，
，
，
，
，

[0747] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

[0748] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

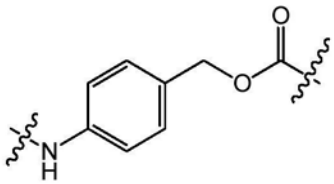
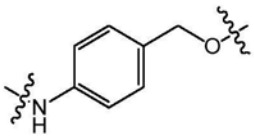
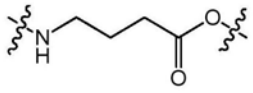
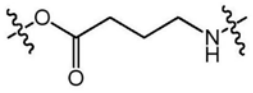
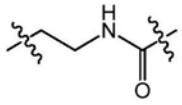
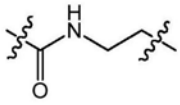
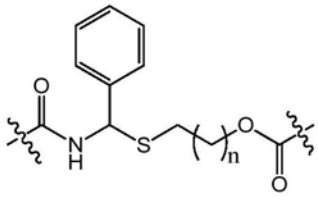
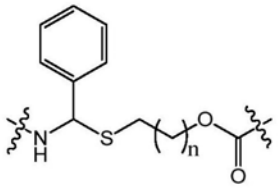
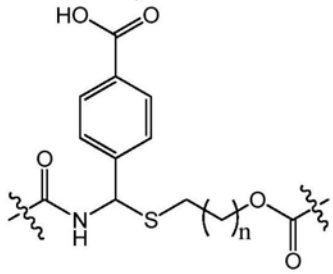
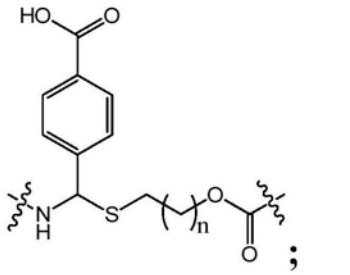
[0749] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9。

[0750] 在某些实施方案,接头单元(LU)是$-L_1-L_2-L_3-L_4-$,其中

[0751] L_1是键,$-A_1-$,$-A_1X^2-$或$-X^2-$；

[0752] L_2是键,$-A_2-$,或$-A_2X^2-$；

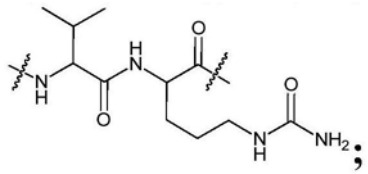
[0753] L_3是键,$-A_3-$,或$-A_3X^2-$；

[0754] L_4是键，$-A_4-$，$-A_4X^2-$，
，
，
，
，
，
，
，
，
，
；

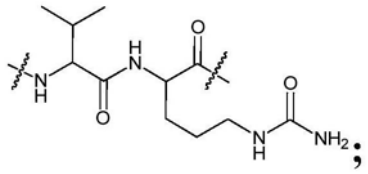
[0755] A_1是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$；

[0756] A_2是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-S$

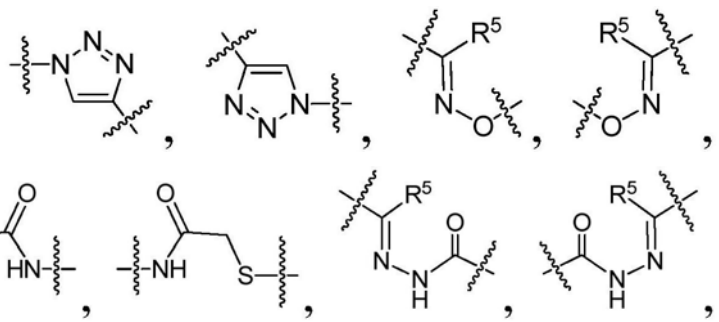
$(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$或

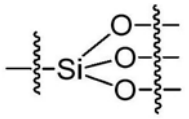
[0757] ;

[0758] A_3是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$或

[0759] ;

[0760] A_4-$C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)n-$,$-(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-S(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-C(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nC(=O)-$,$-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

[0761] 每个X^2独立地选自键，

$-S-$,$-Si(OH)_2O-$,,$-CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,$-CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH-$和$-NHC(=O)-$;

[0762] 每个R^4独立地选自H,C_{1-4}烷基,$-C(=O)OH$和$-OH$,

[0763] 每个R^5独立地选自H,C_{1-4}烷基,苯基或由1至3个$-OH$基团取代的C_{1-4}烷基;

[0764] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

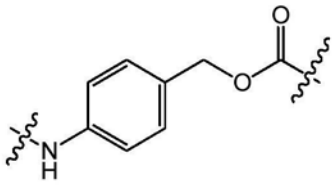
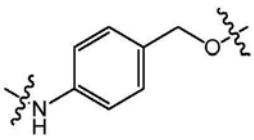
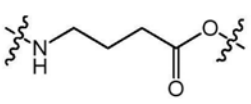
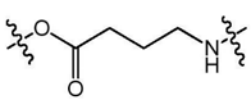
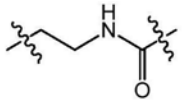
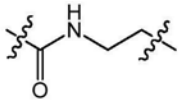
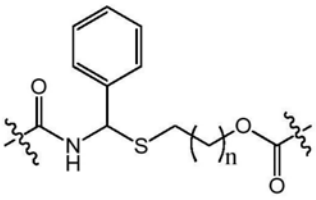
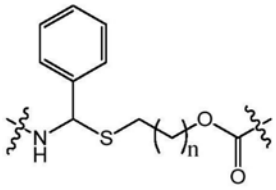
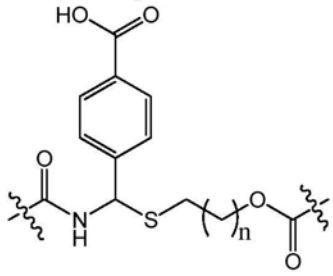
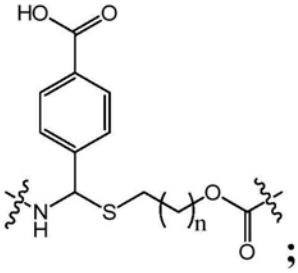
[0765] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9。

[0766] 在某些实施方案,接头单元(LU)是$-L_1-L_2-L_3-L_4-$,其中

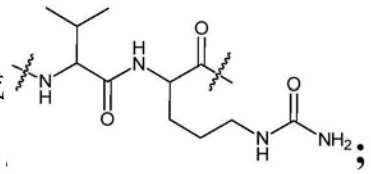
[0767] L_1是键,$-A_1-$,$-A_1X^2-$或$-X^2-$;

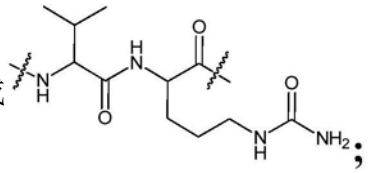
[0768] L_2是键,$-A_2-$,或$-A_2X^2-$;

[0769] L_3是键,$-A_3-$,或$-A_3X^2-$;

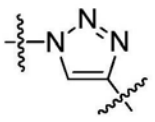
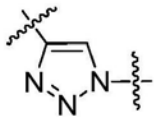
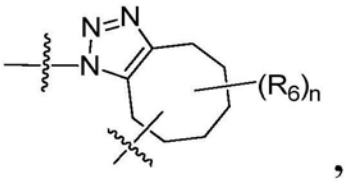
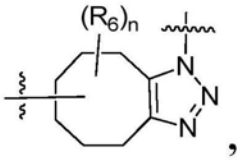
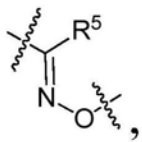
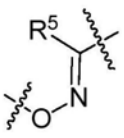
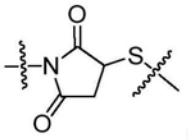
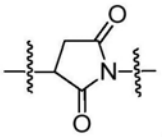
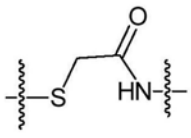
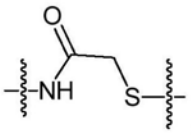
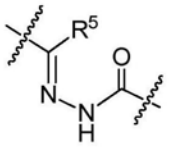
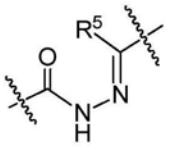
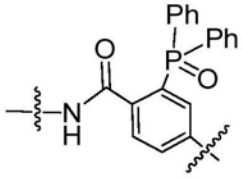
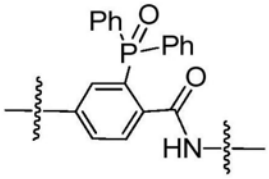
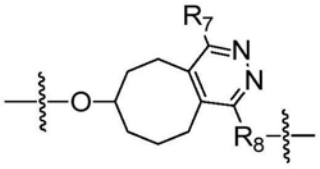
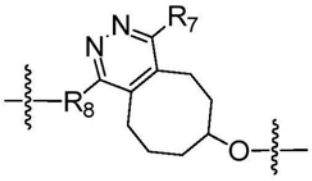
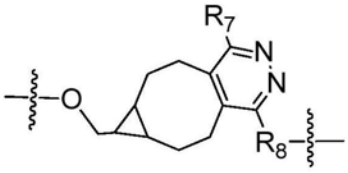
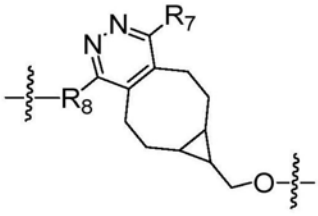
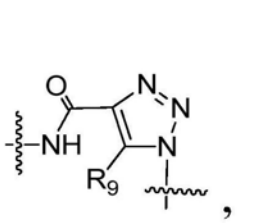
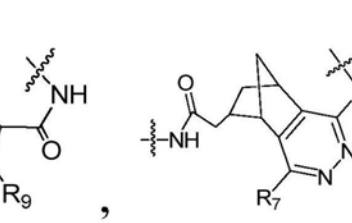
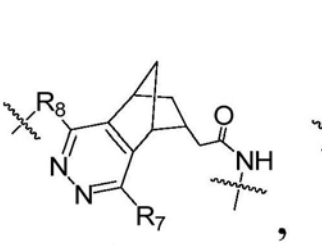
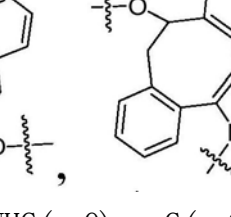
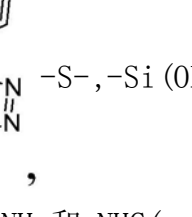
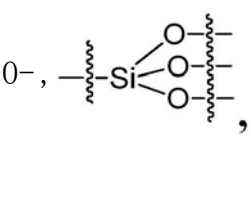
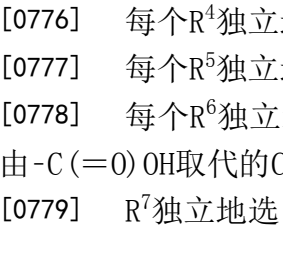
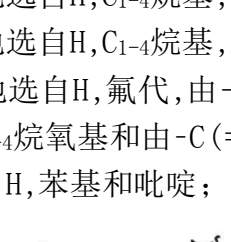
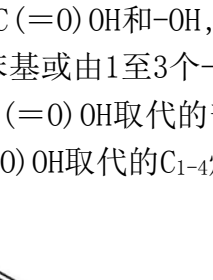
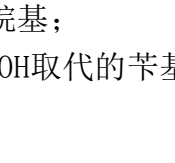
[0770] L_4是键,$-A_4-$,$-A_4X^2-$,,,,,,,,,,或;

[0771] A_1是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

[0772] A_2是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$或;

[0773] A_3是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$或;

[0774] A_4是$-C(=O)NH-$,$-C(=O)NH(CH_2)_n-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,$-(O(CH_2)_n)_m-$,$-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$,$-NHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,$-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,$-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$或$-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

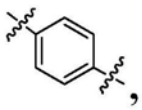
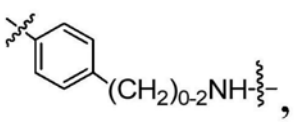
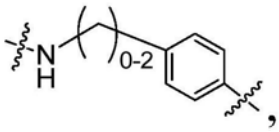
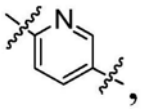
[0775] 每个独立地选自键，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，，-S-，-Si(OH)$_2$O-，，-$CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH$-，-$CHR^4(CH_2)_nNHC(=O)$-，-C(=O)NH-和-NHC(=O)-；

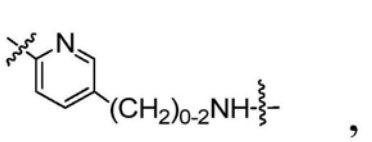
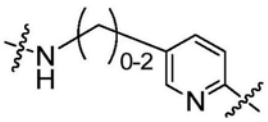
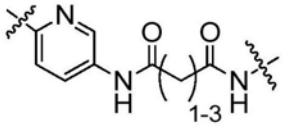
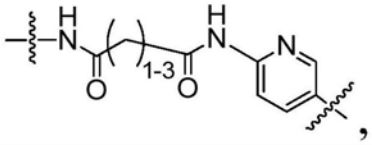
[0776] 每个R^4独立地选自H，C_{1-4}烷基，-C(=O)OH和-OH，

[0777] 每个R^5独立地选自H，C_{1-4}烷基，苯基或由1至3个-OH基团取代的C_{1-4}烷基；

[0778] 每个R^6独立地选自H，氟代，由-C(=O)OH取代的苄氧基，由-C(=O)OH取代的苄基，由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷氧基和由-C(=O)OH取代的C_{1-4}烷基；

[0779] R^7独立地选自H，苯基和吡啶；

[0780] R^8独立地选自，，，，

[0781] R^9独立地选自H和C_{1-6}卤代烷基；

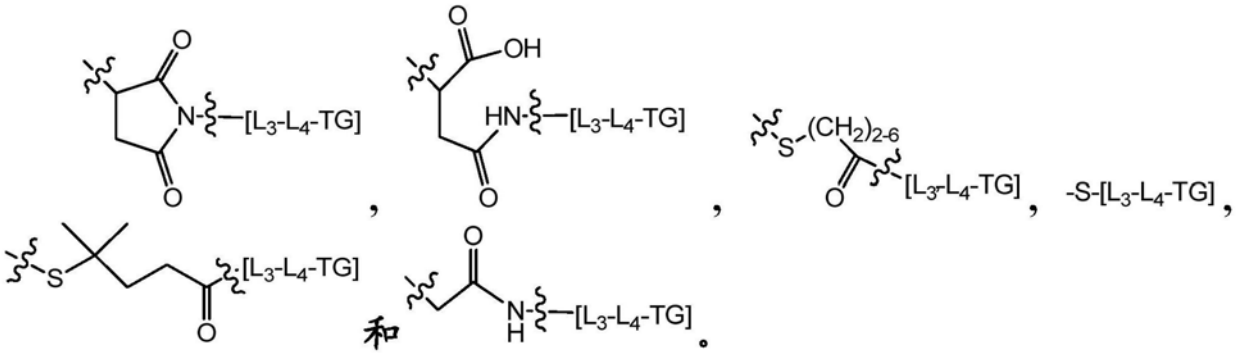
[0782] 每个n独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9,和

[0783] 每个m独立地选自1,2,3,4,5,6,7,8和9。

[0784] 在文中描述的任何化合物或方法的某些实施方案中,L_1是-C(=O)-NH-CH_2-CH_2-S-[L_2-L_3-L_4-TG]。(在括号中描述的这些结构式的部分,如[L_2-L_3-L_4-TG],被加到描述的式中以鉴别该式的哪个开放的价附着到其余结构的括号封闭的部分。)

[0785] 在文中描述的任何化合物或方法的某些实施方案中,L_2选自:

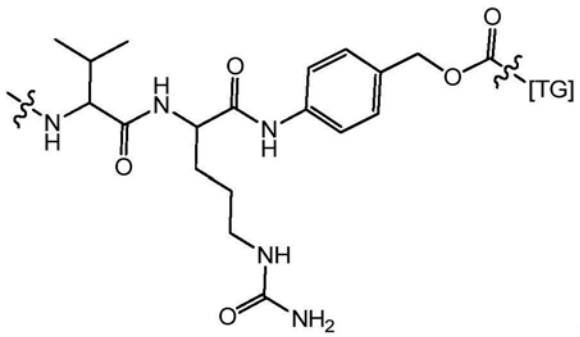
[0786]



[0787] 在文中描述的任何化合物或方法的某些实施方案,L_3选自-$(CH_2)_{2-6}$-C(=O)-[L_4-TG];-$(CH_2)_{2-6}$-NH-[L_4-TG];-$(CH_2)_{2-6}$-S-[L_4-TG];-$(CH_2)_{2-6}$-Z-[L_4-TG];和-$(CH_2)_{2-6}$-Z-C(=O)-[L_4-TG],其中Z是O,NH或S。

[0788] 在文中描述的任何化合物或方法的某些实施方案,L_4是此式的键或val-cit接头:

[0789]



[0790] 当L_4是val-cit接头时,L_3优选为-$(CH_2)_{2-6}$-C(=O)-。

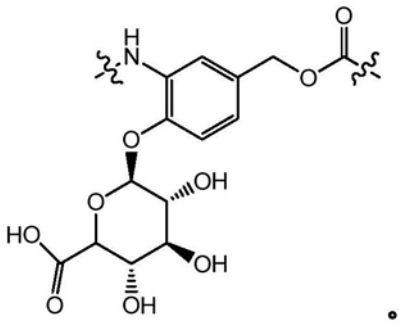
[0791] 在本文所述的任何化合物或方法的某些实施方案,TG是类美登素,如DM1或DM4,或多拉司他汀10化合物,例如阿里他汀类(auristatin)MMAF或MMAE,或刺孢霉素类,如N-乙酰基-γ-刺孢霉素,或,如罗丹明或四甲基罗丹明的标记物或染料。

[0792] 如本文中所使用的,“接头”是任何化学部分,其能够将抗体或其片段与末端基团

连接。接头可以是在化合物或抗体保持活性的条件下，易于裂解的，如，酸诱导的裂解，光诱导的裂解，肽酶诱导的裂解酶，酯酶诱导的裂解，和二硫键裂解。备选地，接头可以是基本上抵抗裂解的。接头可以包括或不包括自消间隔子。

[0793] 如本文使用的，缀合末端基团(TG)和本文提供的修饰的抗体或其片段的非酶促可切割的接头的非限制性实例包括对酸不稳定的接头，含二硫化物部分的接头，含三唑部分的接头，含肼部分的接头，含硫醚部分的接头，含重氮部分的接头，含肟部分的接头，含酰胺部分的接头和含乙酰胺部分的接头。

[0794] 如本文使用的，缀合末端基团(TG)和本文提供的修饰的抗体或其片段的酶促可切割的接头的非限制性实例包括，但不限于，由蛋白酶切割的接头，由酰胺酶切割的接头，和由β-葡萄糖醛酸酶切割的接头。

[0795] 在某些实施方案，这样的酶可切割的接头是由组织蛋白酶切割的接头，所述组织蛋白酶包括组织蛋白酶Z，组织蛋白酶B，组织蛋白酶H和组织蛋白酶C。在某些实施方案中，酶促可切割的接头是由组织蛋白酶切割的二肽，包括由组织蛋白酶Z，组织蛋白酶B，组织蛋白酶H或组织蛋白酶C切割的二肽。在某些实施方案中，酶促可切割的接头是组织蛋白酶B可切割的肽接头。在某些实施方案，酶促可切割的接头是组织蛋白酶B可切割的二肽接头。在某些实施方案中，酶促可切割的接头是组织蛋白酶B可切割的缬氨酸-瓜氨酸或苯丙氨酸-赖氨酸二肽接头。如本文使用的，缀合末端基团(TG)和本文提供的修饰的抗体或其片段的酶促可切割的接头的其他非限制性实例包括，但不限于，由β-葡萄糖醛酸酶切割的接头，例如：参见，Ducry等人，Bioconjugate Chem，vol.21(1)，5-13(2010)。

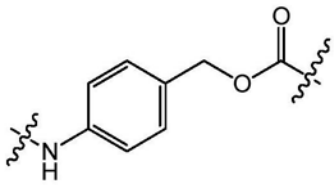
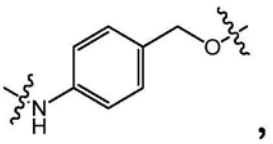
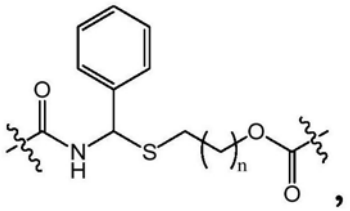
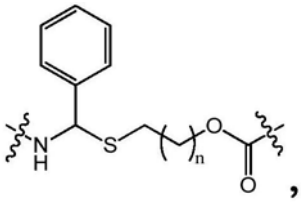
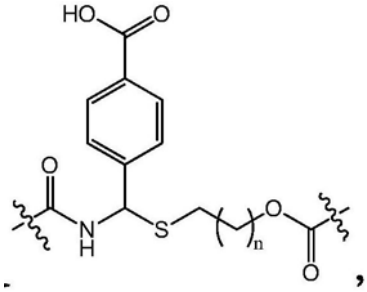
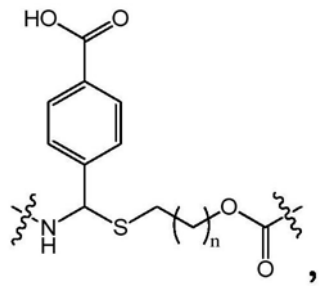
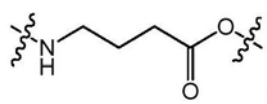
[0796] “自消间隔子”是在一末端共价连接第一化学部分，而在另一末端共价连接第二化学部分，从而形成稳定的三节分子的双官能化学部分。当自消间隔子和第一化学部分之间的键切割时，自消间隔子发生快速的和自发的分子内反应，并从而从第二化学部分分离。这些分子内反应通常包括电子重排，如1,4，或1,6或1,8-消去反应或环化反应以形成高度有利的五元或六元环。在本发明的某些实施方案中，第一部分是酶可切割的接头，并且此裂解起因于酶促反应，而在其它实施方案中，第一部分是酸不稳定的接头，并且此裂解由于pH变化而发生。如适用于本发明中的，第二部分是如本文所定义的“标记物”基团。在某些实施方案，第一部分从自消间隔子的切割起因于蛋白酶裂解酶的切割，而在其他实施方案中其是水解酶切割的结果。在某些实施方案，第一部分从自消间隔子的切割起因于组织蛋白酶的切割。

[0797] 在某些实施方案中，酶可切割的接头是肽接头，并且自消间隔子在其一端共价连接肽接头，并在其另一端共价连接药物部分。该三节分子在不存在酶时是稳定的，并且药理学上无活性，但共价连接间隔子部分与肽部分的键可被酶酶促切割。肽部分从三节分子切

割下来，启动间隔子部分的自发消除的特性，导致共价连接间隔子部分与药物部分的键的自发切割，从而实现释放药理学活性形式的药物。

[0798] 任选地用于缀合末端基团(TG)和文中提供的修饰的抗体或其片段的自消间隔子的非限制性例子包括但不限于包括苄基羰基部分，苄基醚部分，4-氨基丁酸部分，半硫代缩胺部分或N-酰基半硫代缩胺部分的部分。

[0799] 自消间隔子的其他例子包括但不限于，对-氨基苄氧基羰基基团，与对-氨基苄氧基羰基基团电子相似的芳族化合物，如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物和邻位或对位氨基苄基乙缩醛。在某些实施方案，如本文使用的在酰胺键水解时经历环化的自消间隔子包括取代的和未取代的4-氨基丁酸酰胺和2-氨基苯基丙酸酰胺。

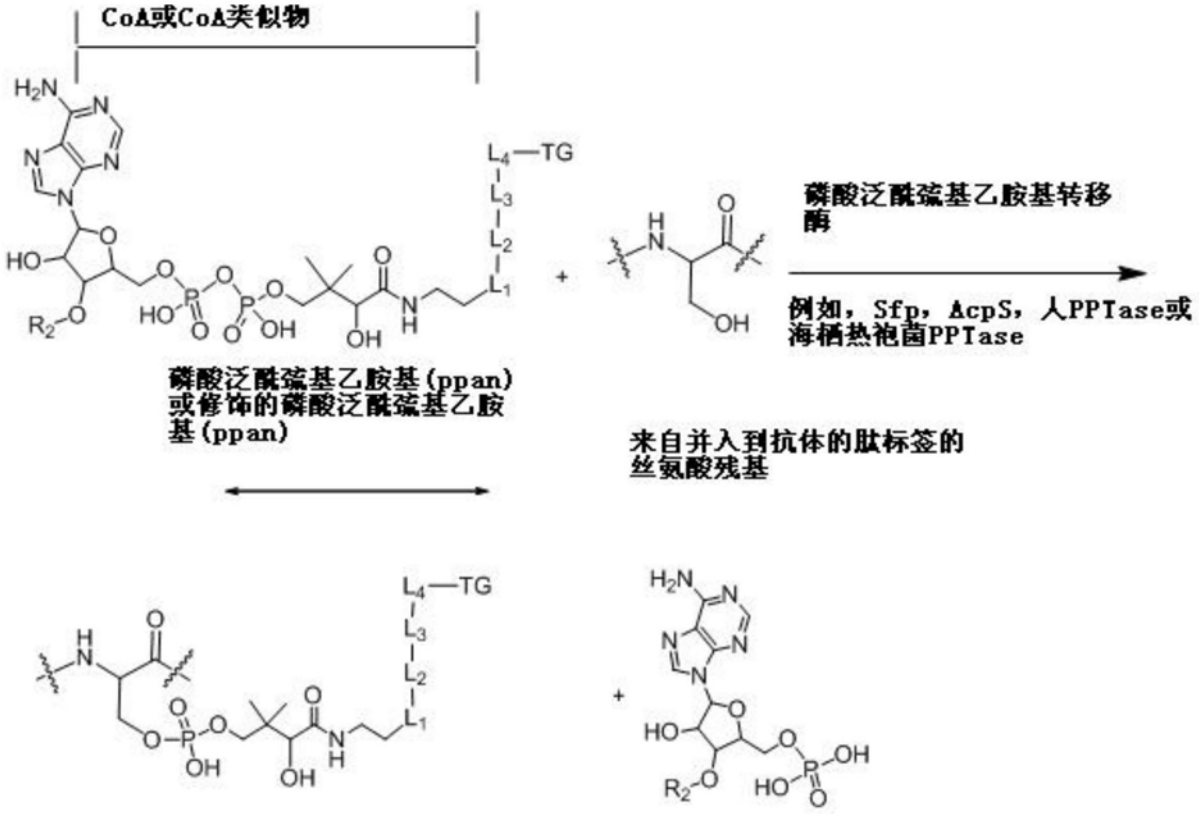
[0800] 在某些实施方案中，自消间隔子是或，在其它实施方案中，自消间隔子是其中n是1或2。在其它实施方案中，自消间隔子是，其中n是1或2。在其它实施方案中，自消间隔子是，其中n是1或2。在其它实施方案中，自消间隔子是，其中n是1或2。在其它实施方案中，自消间隔子是，其中n是1或2。

[0801] 方案(Ib)描述了文中提供的修饰的抗体或其片段的翻译后修饰，其中接头单元

(LU)是-L_1-L_2-L_3-L_4-。

[0802] 方案(Ib)

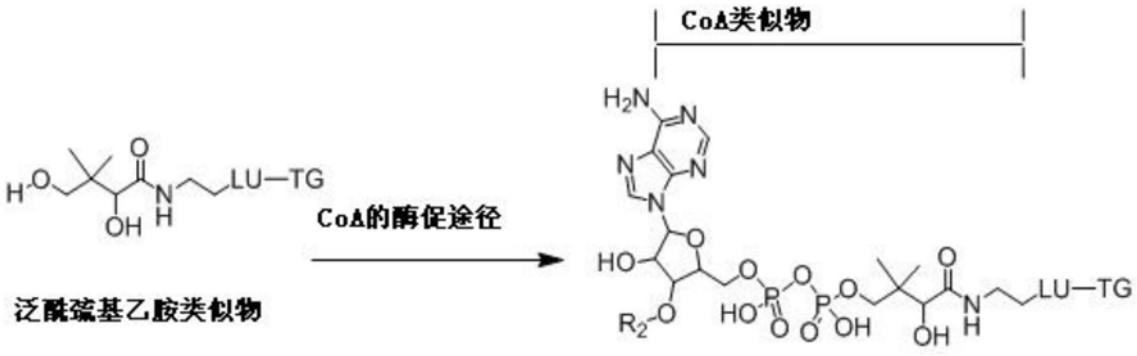
[0803]



[0804] 其中R_2,L_1,L_2,L_3,L_4和TG如文中定义。

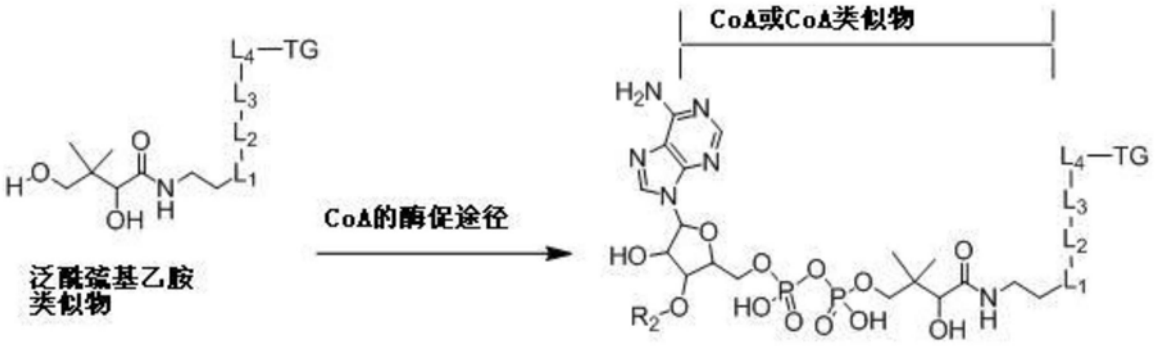
[0805] 方案(Ia)和方案(Ib)的CoA类似物可以通过全化学合成获得,然而,方案(Ia)和方案(Ib)中的CoA类似物优选通过化学酶促方法获得,其中化学合成泛酰巯基乙胺类似物,并然后生物合成转化成相应的CoA类似物(见Kristine M.Clarke等人,“In Vivo Reporter Labeling of Proteins via Metabolic Delivery of Coenzyme A Analogues”,J.Am.Chem.Soc.,2005,127,11234-11235页和Jordan L.Meier等人,“Synthesis和Evaluation of Bioorthogonal pantetheine Analogues for in Vivo Protein Modification”,J.Am.Chem.Soc.,2006,128,12174-12184页)。方案(Ia)的CoA类似物的生物合成转化如下所示:

[0806]



[0807] 而方案(Ib)的CoA类似物的生物合成转化如下所示:

[0808]



[0809] 其中LU,L_1,L_2,L_3,L_4和TG如文中定义。

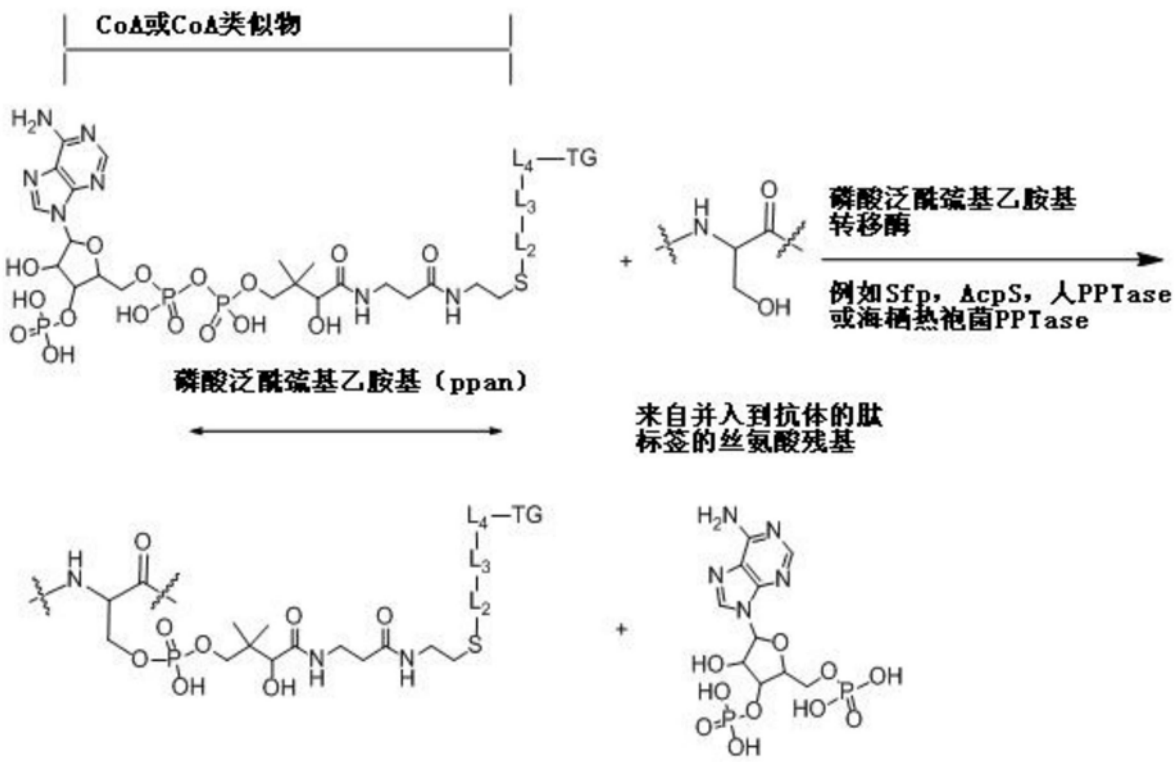
[0810] 在某些实施方案中,生物合成转化发生在“体内”,其中泛酰巯基乙胺类似物从周围介质进入细胞,由此一旦在细胞内,所述泛酰巯基乙胺类似物通过CoA酶促途径转化成相应的CoA类似物。在一个具体实施方案,大肠杆菌用于泛酰巯基乙胺类似物到相应的CoA类似物的生物合成转化,其中泛酰巯基乙胺类似物从周围介质进入大肠杆菌,并且一旦在细胞内,泛酰巯基乙胺类似物开始由泛酸激酶(PanK或CoaA)使用腺苷5’-三磷酸(ATP)磷酸化,然后通过磷酸泛酰巯基乙胺腺苷转移酶(PPAT或CoaD)腺苷酸化,得到脱磷酸-CoA类似物,然后通过脱磷酸辅酶(dephosphocoenzyme)A激酶(DPCK或CoaE)进一步磷酸化,得到CoA类似物。

[0811] 在其他实施方案,生物合成转化发生在“体外”,其中,酶促CoA途径由泛酰巯基乙胺类似物重建,由此其被重建的CoA酶促途径“体外”转换成相应的CoA类似物。在一个特定的“体外”转化的实施方案中,重建的CoA酶促途径是大肠杆菌CoA酶促途径,其中泛酰巯基乙胺类似物初始通过CoaA和ATP磷酸化,然后通过CoaD腺苷酸化,得到脱磷酸-CoA类似物,并进一步通过CoaE磷酸化,得到CoA类似物。

[0812] 在某些实施方案,接头单元(LU)是-C(=O)NH$(CH_2)_2$S-L_2-L_3-L_4-,R_2是-P(=O)$(OH)_2$,在这样的实施方案中,末端基团被连接到CoA。方案(Ic)显示本文所提供的用于具体实施方案的修饰的抗体或其片段的翻译后修饰,其中PPTase催化并入的短肽标签中的保守丝氨酸残基和连接到辅酶A(CoA)的末端基团(TG)之间的反应:

[0813] 方案(Ic)

[0814]



[0815] 其中，L_2，L_3，L_4和TG如文中所述。

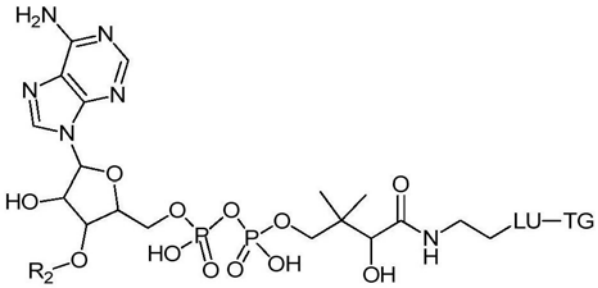
[0816] 在某些实施方案，通过显示在方案(Ia)，方案(Ib)和方案(Ic)中的一步法位点特异性地标记本文提供的修饰的抗体或其片段，其中连接至CoA或CoA类似物的末端基团与改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸反应。

[0817] 一步法包括以下步骤：

[0818] (a)提供修饰的抗体或其片段，其已被改造以包含小肽标签，且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，和

[0819] (b)在具有式(A)结构的化合物存在下，通过孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，用末端基团标记修饰的抗体或其片段：

[0820]



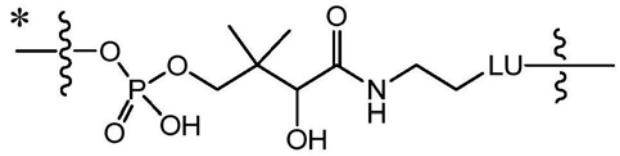
式（Ia）

[0821] 其中，

[0822] R_2，接头单元(LU)和TG如文中所述。

[0823] 在使用式(A)的化合物的此类一步法中，通过具有根据式(I-a)结构的接头，从而将末端基团(TG)缀合至修饰的抗体或其片段。式(I-a)的接头通过4'磷酸泛酰巯基乙胺基部分和改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基基团之间形成的磷酸二酯键附

着至小肽标签：

[0824] 

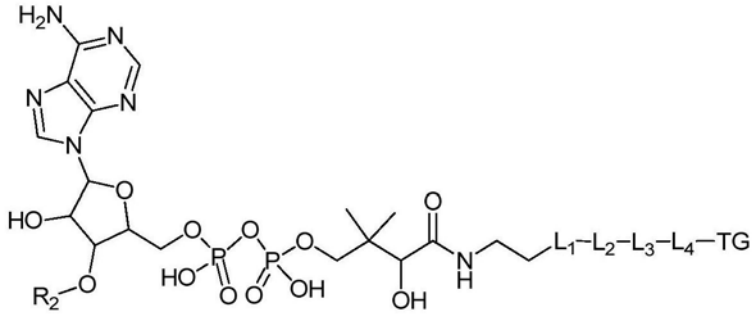
式（I-a）

[0825] 其中LU如文中定义，*指4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至小肽标签。

[0826] 在某些实施方案中，一步法包括以下步骤：

[0827] (a)提供修饰的抗体或其片段，其已被改造以包含小肽标签，且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，和

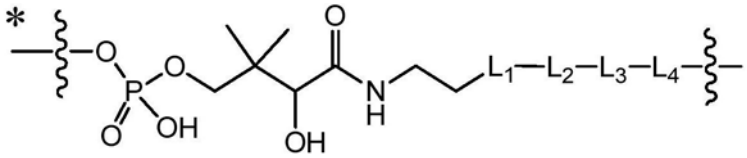
[0828] (b)在具有式(B)结构的化合物存在下，通过孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，用末端基团标记修饰的抗体或其片段：

[0829] 

式（B）

[0830] 其中R_2，L_1，L_2，L_3，L_4和TG如文中定义。

[0831] 在使用上述式(B)的化合物的此类一步法中，通过具有根据式(I-b)结构的接头，从而将末端基团附着至修饰的抗体或其片段。式(I-b)的接头通过4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分和改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基基团之间形成的磷酸二酯键附着至小肽标签：

[0832] 

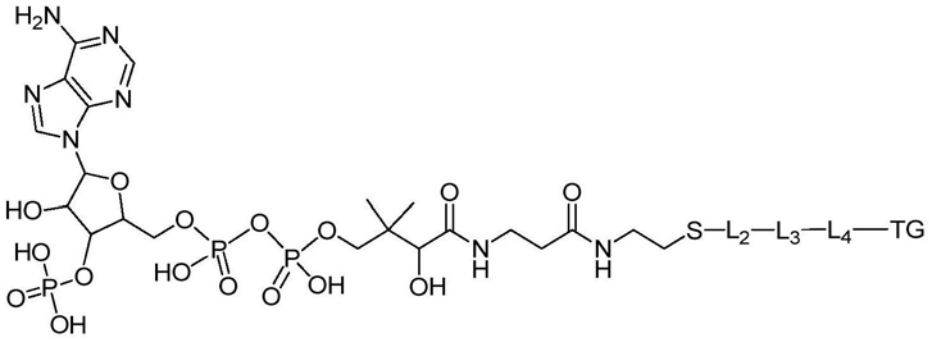
式（I-b）

[0833] 其中L_1，L_2，L_3和L_4如文中定义，*指4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着至小肽标签。

[0834] 在其它实施方案中，一步法包括以下步骤：

[0835] (a)提供修饰的抗体或其片段，其已被改造以包含小肽标签，且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物，和

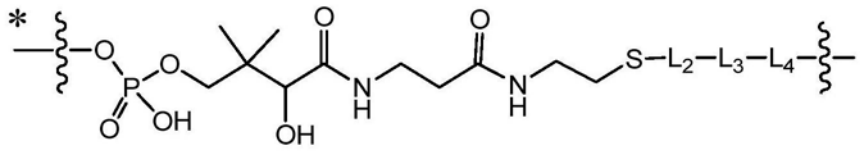
[0836] (b)在具有式(C)结构的化合物存在下，通过孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，用末端基团标记修饰的抗体或其片段：

[0837] 

式（C）

[0838] 其中L_2,L_3,L_4和TG如文中定义。

[0839] 在使用上述式(C)的化合物的此类一步法中,通过具有根据式(I-c)结构的接头,从而将末端基团附着至修饰的抗体或其片段。式(I-c)的接头通过4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分和改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基基团之间形成的磷酸二酯键附着至小肽标签:

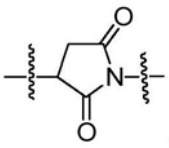
[0840] 

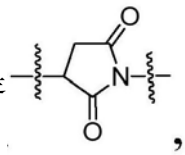
式（I-c）

[0841] 其中L_2,L_3和L_4如文中定义,*指4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

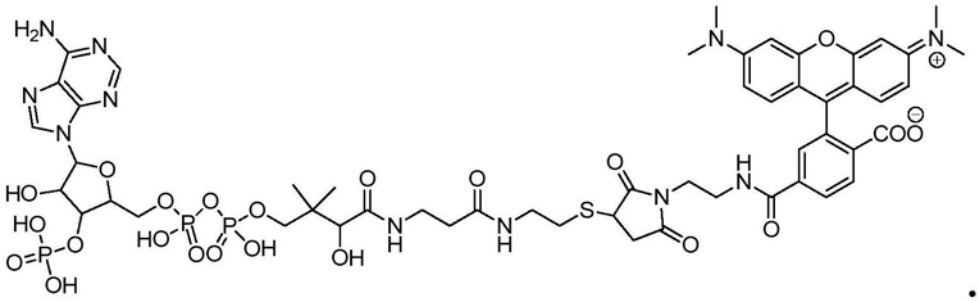
[0842] 在文中描述的一步法的某些实施方案中,修饰的抗体或其片段与具有式(A),式(B)或式(C)结构的化合物和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶与表达的修饰的抗体或其片段在相同的细胞中共同表达。在文中描述的一步法的某些实施方案中,修饰的抗体或其片段在细胞培养基中与具有式(A),式(B)或式(C)结构的化合物和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触,所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶在相同的细胞或另一个细胞中生成。在文中描述的一步法的某些实施方案中,4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶固定于固体支持物上。在某些实施方案中,固体支持物任选地由珠子或柱上的聚合物组成。

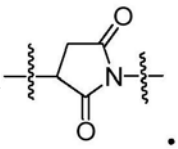
[0843] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,,L_2是键,L_3是键,L_4是$-A_4-$,A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,

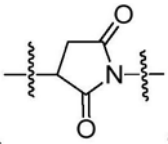
[0844] A_4是$-(CH_2)_nNHC(=O)-$,和X^2是 。

[0845] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,L_2是键,L_3是键,L_4是$-A_4-$,A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,,A_4是$-(CH_2)_nNHC(=O)-$;X^2是  和TG是荧光探针。

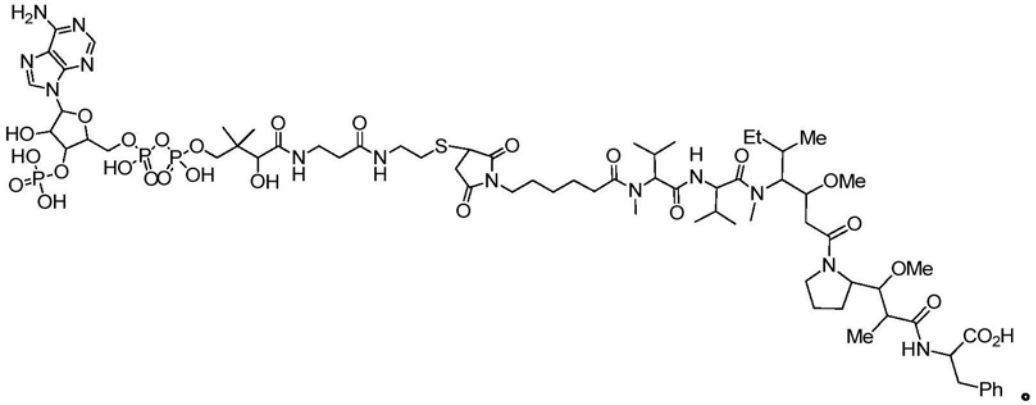
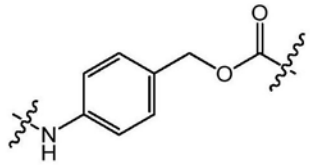
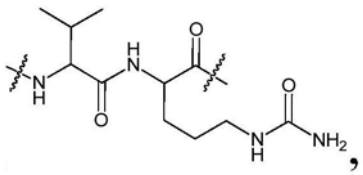
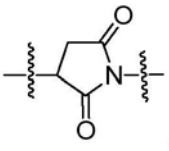
[0846] 在某些实施方案,式(B)的化合物是

[0847] .

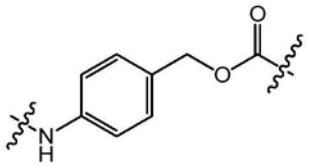
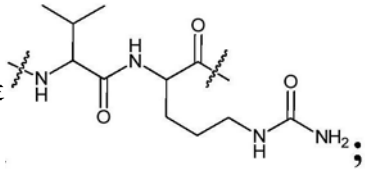
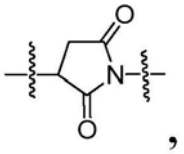
[0848] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,L_2是键,L_3是键,L_4是$-A_4-$,A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,A_4是$-(CH_2)_nC(=O)-$,和X^2是.

[0849] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,L_2是键,L_3是键,L_4是$-A_4-$,A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,A_4是$-(CH_2)_nC(=O)-$;X^2是 和TG是药物部分。

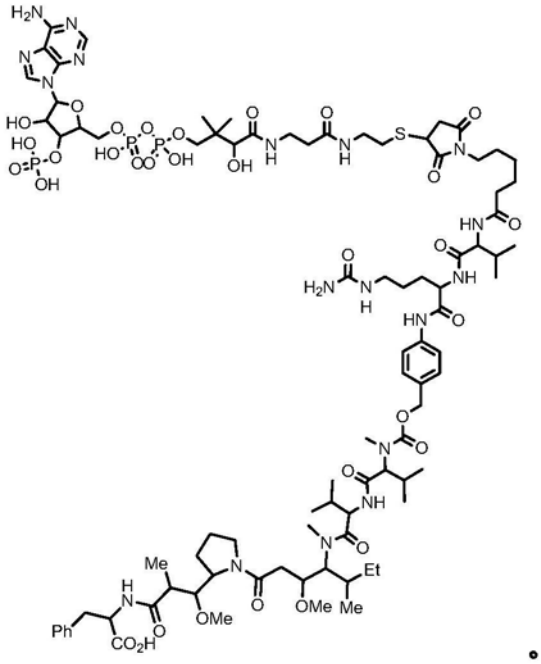
[0850] 在某些实施方案中,式(B)的化合物是

[0851]  在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,L_2是$-A_2-$,L_3是$-A_3-$,L_4是;A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$,A_2是$-(CH_2)_nC(=O$,A_3是,和X^2是.

[0852] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,L_2是-

A_2-,L_3是-A_3--,L_4是  ;A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,A_2是-$(CH_2)_n$C(=O,A_3是  ;X^2是  ,和TG是药物部分。

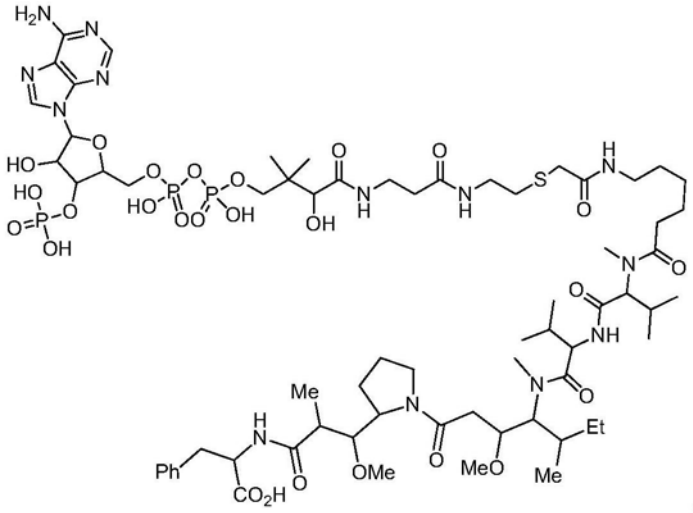
[0853] 在化合物的某些实施方案中,式(B)是

[0854]  。

[0855] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是-A_1X^2-,L_2是键,L_3是-A_3-,L_4是键,A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,A_3是-$(CH_2)_n$C(=O)-,和X^2是-$(CH_2)_n$C(=O)NH-。

[0856] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是-A_1X^2-,L_2是键-,L_3是-A_3-,L_4是键,A_1是-C(=O)NH$(CH_2)_n$S-,A_3是-$(CH_2)_n$C(=O)-,X^2是-$(CH_2)_n$C(=O)NH-,和TG是药物部分。

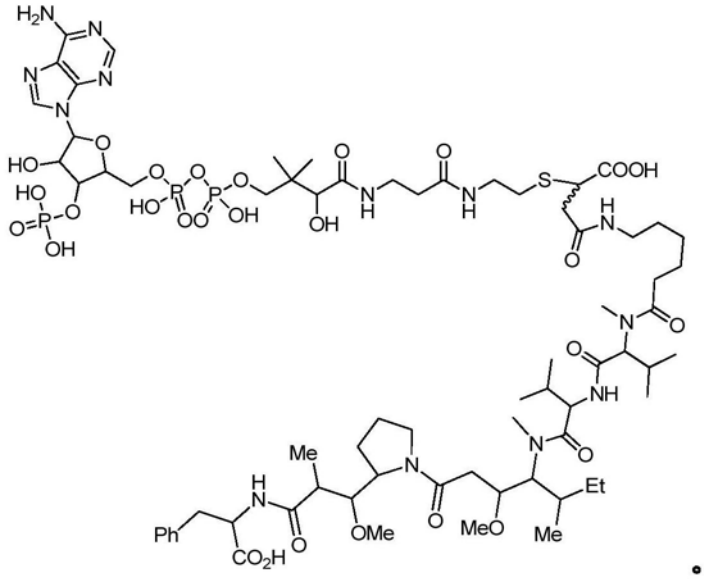
[0857] 在某些实施方案中,式(B)的化合物是

[0858] 

[0859] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,L_2是键,L_3是$-A_3-$,L_4是键,A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS$,A_3是$-(CH_2)_nC(=O)-$,X^2是$-CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,和R^4是$-C(=O)OH$。

[0860] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,L_2是键,L_3是$-A_3-$,L_4是键,A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS$,A_3是$-(CH_2)_nC(=O)-$,X^2是$-CHR^4(CH_2)_nC(=O)NH-$,R^4是$-C(=O)OH$,和TG是药物部分。

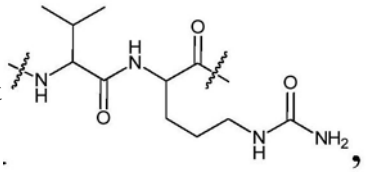
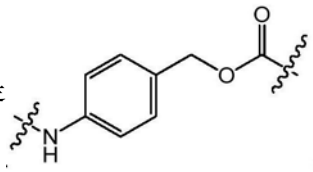
[0861] 在某些实施方案中,式(B)的化合物是

[0862] 

[0863] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,其中A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$和X^2是$-(CH_2)C(=O)NH-$;L_2是键;L_3是键,和L_4是$-A_4-$其中A_4是$-(CH_2)_nNHC(=O)-$。

[0864] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,其中A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$和X^2是$-(CH_2)C(=O)NH-$;L_2是键;L_3是键;L_4是$-A_4-$,其中A_4是$-(CH_2)_nC(=O)-$。

[0865] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,其中A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$和X^2是$-(CH_2)C(=O)NH-$;L_2是$-A_2-$,其中A_2是$-(CH_2)_nC(=O;L_3$是$-A_3-$,

其中A_3是，和L_4是。

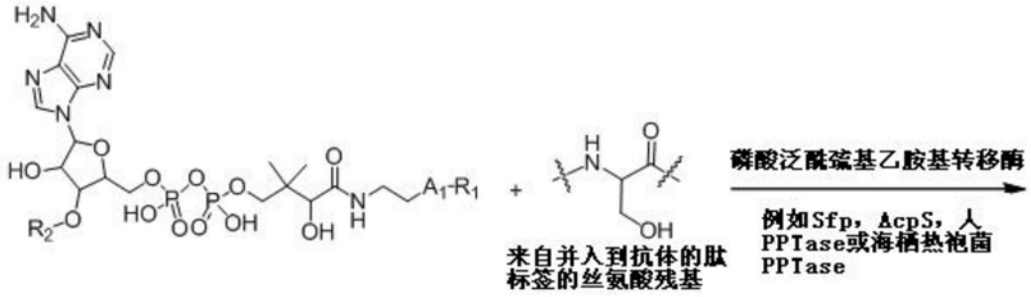
[0866] 在文中提供的方法、化合物和免疫缀合物的某些实施方案中:L_1是$-A_1X^2-$,其中A_1是$-C(=O)NH(CH_2)_nS-$和X^2是$-(CH_2)C(=O)NH-$;L_2是键;L_3是$-A_3-$,其中A_3是$-(CH_2)_nC(=O)-$,和L_4是键。

[0867] 两步法

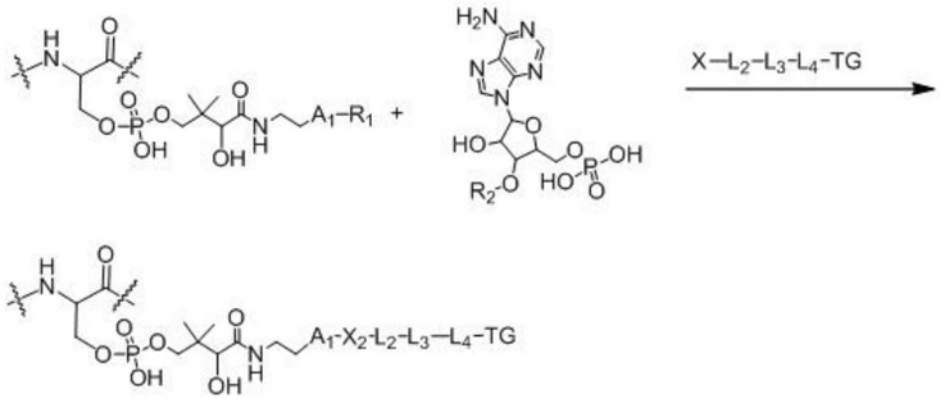
[0868] 备选地,通过两步法位点特异性地标记文中提供的修饰的抗体或其片段,其中,在第一步骤中,含有官能团(R_1)的CoA的ppan辅基,或含有官能团(R_1)的CoA类似物的修饰的ppan辅基,通过4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分和已并入到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基之间形成的磷酸二酯键附着至短肽标签。在第二步骤中,连接、或者直接附着至与官能团(R_1)反应的基团的末端基团(TG)与CoA的ppan辅基上的官能团(R_1)反应,或与CoA类似物的修饰的ppan辅基上的官能团(R_1)反应,从而直接将末端基团附着到修饰的抗体或其片段,或将末端基团通过接头单元(LU)附着到修饰的抗体或其片段。

[0869] 两步法的一个实施方案如方案(IIa)所示:

[0870] 方案(IIa)



[0871]



[0872] 其中X和对应的R_1在以下表3中给出,并且其中R_2,A_1,L_2,X_2,L_3,L_4和TG如文中所述。

[0873] 表3

[0874]

X	R_1
巯基	巯基,马来酰亚胺或卤代乙酰胺

[0875]

叠氮化物	炔烃,三芳基膦,环辛烯或氧杂降冰片二烯
三芳基膦	叠氮化物
氧杂降冰片二烯	叠氮化物
炔烃	叠氮化物
烯烃	叠氮化物
环辛烯	二芳基四嗪
二芳基四嗪	环辛烯
单芳基四嗪	降冰片烯
降冰片烯	单芳基四嗪
醛	羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-
酮	羟胺或肼或NH_2-NH-C(=O)-
羟胺	醛或酮
肼	醛或酮
NH_2-NH-C(=O)-	醛或酮
卤代乙酰胺	巯基
马来酰亚胺	巯基

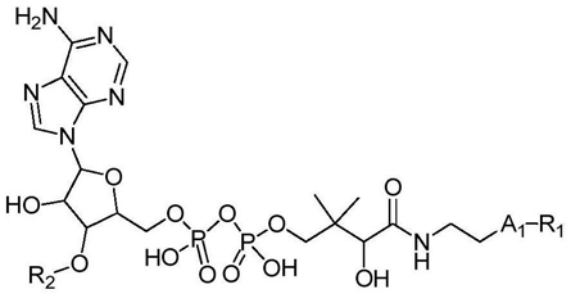
[0876] X和R_1的烯烃,炔烃,三芳基膦,环辛烯,氧杂降冰片二烯,二芳基四嗪,单芳基四嗪和降冰片烯是任选取代的。

[0877] 方案(IIa)的两步法包括以下步骤:

[0878] (a)提供修饰的抗体或其片段,其已被改造以含有肽标签,并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物;

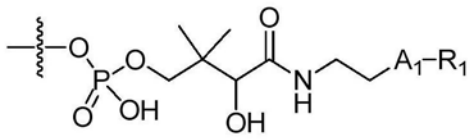
[0879] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段:

[0880] 在式(D)的化合物存在下,孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶,

[0881] 

式(D)

[0882] 从而将式(D-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到肽标签;

[0883] 

式(D-a)

[0884] 和

[0885] (c)使活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(IIa)的化合物反应：

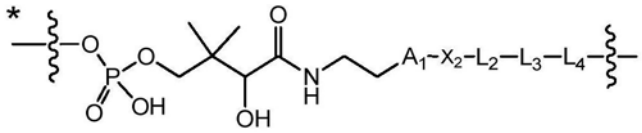
$$X—L_2—L_3-L_4-TG$$

[0886]

式（II-a）

[0887] 其中，X，R_1，R_2，A_1，L_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

[0888] 方案(IIa)的两步法的结果是，末端基团通过具有根据式(IIb)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段：

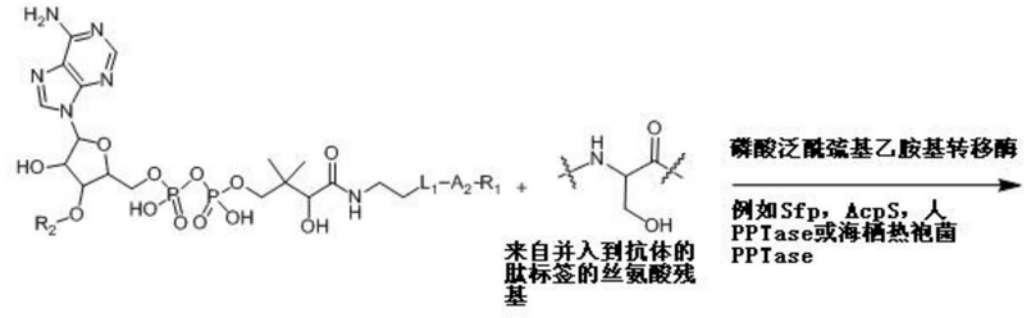
[0889] 

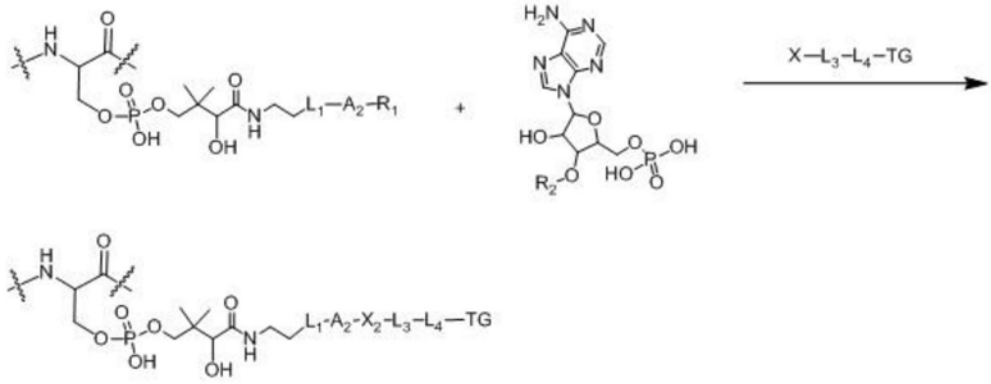
式（II-b）

[0890] 其中A_1，X_2，L_2，L_3和L_4如文中定义，*指修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

[0891] 两步法的另一个实施方案如方案(IIb)所示。

[0892] 方案(IIb)



[0893] 

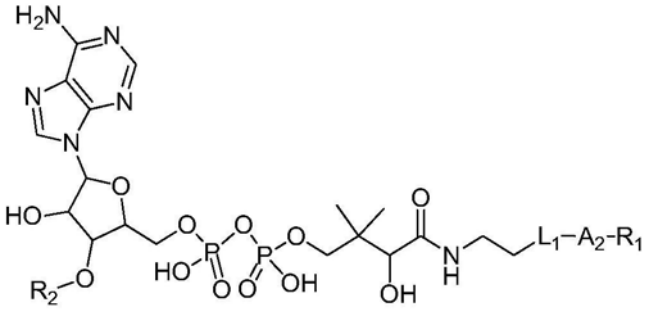
[0894] 其中X，R_1，R_2，L_1，A_2，X_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

[0895] 方案(IIb)的两步法包括以下步骤：

[0896] (a)提供修饰的抗体或其片段，其已被改造以含有短肽标签，并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物；

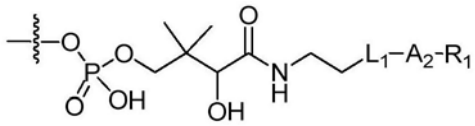
[0897] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段：

[0898] 在式(E)的化合物存在下，孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，

[0899] 

式（E）

[0900] 从而将式(E-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到短肽标签；

[0901] 

式（E-a）

[0902] 和

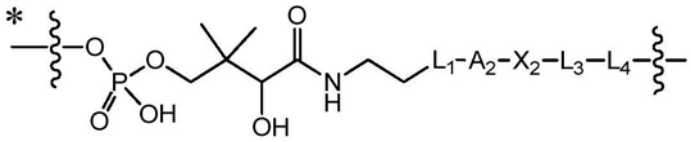
[0903] (c)使活化的4'磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(II-c)的化合物反应：

[0904] $X-L_3-L_4-TG$

[0905] 式(II-c)

[0906] 其中，X，R_1，R_2，L_1，A_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

[0907] 方案(IIb)的两步法的结果是，末端基团通过具有根据式(II-d)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段：

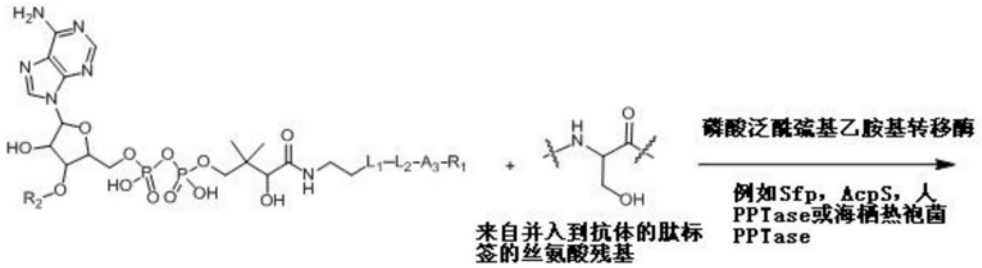
[0908] 

式（II-d）

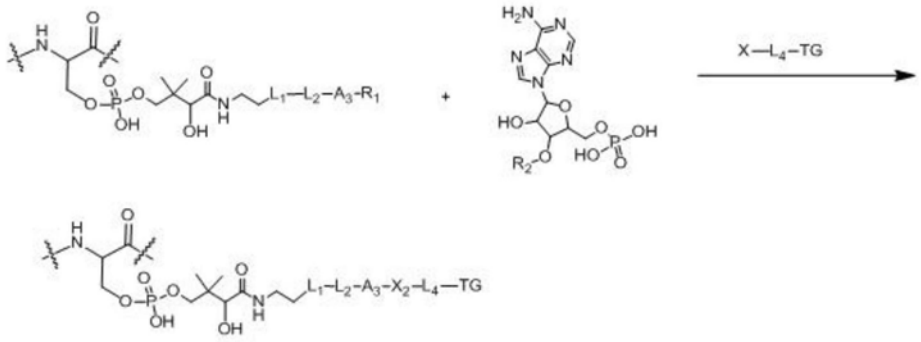
[0909] 其中L_1，A_2，X_2，L_3和L_4如文中定义，*指修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

[0910] 两步法的另一个实施方案如方案(II-c)所示。

[0911] 方案(IIc)



[0912]



[0913] 其中，X，R_1，R_2，L_1，X_2，A_3，L_4和TG如文中所定义。

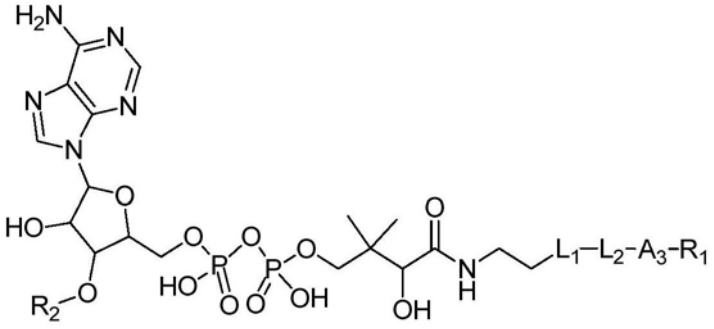
[0914] 方案(IIc)的两步法包括以下步骤：

[0915] (a)提供修饰的抗体或其片段，其已被改造以含有短肽标签，并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物；

[0916] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段：

[0917] 在式(F)的化合物存在下，孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，

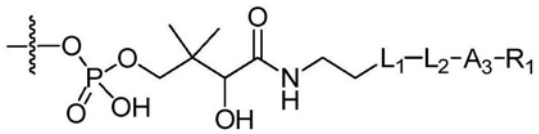
[0918]



式（F）

[0919] 从而将式(F-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到短肽标签；

[0920]



式（F-a）

[0921] 和

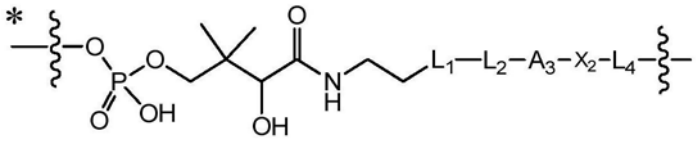
[0922] (c)使活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(IIe)的化合物反应：

[0923] X-L_4-TG

[0924] 式(II-e)

[0925] 其中,X,R_1,R_2,L_1,L_2,L_3,L_4和TG如文中所定义。

[0926] 方案(IIc)的两步法的结果是,末端基团通过具有根据式(II-f)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段:

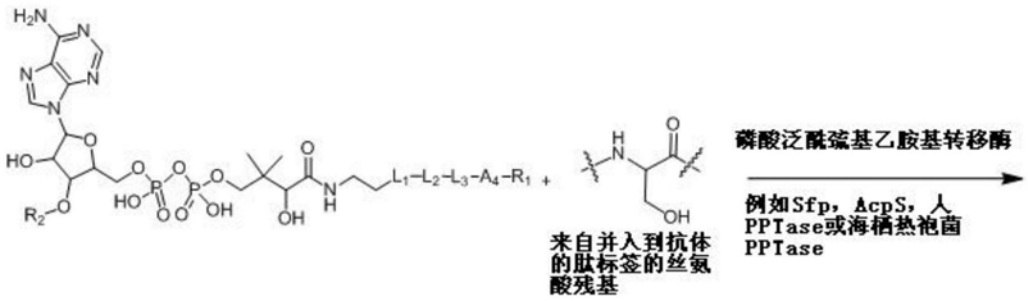
[0927] 

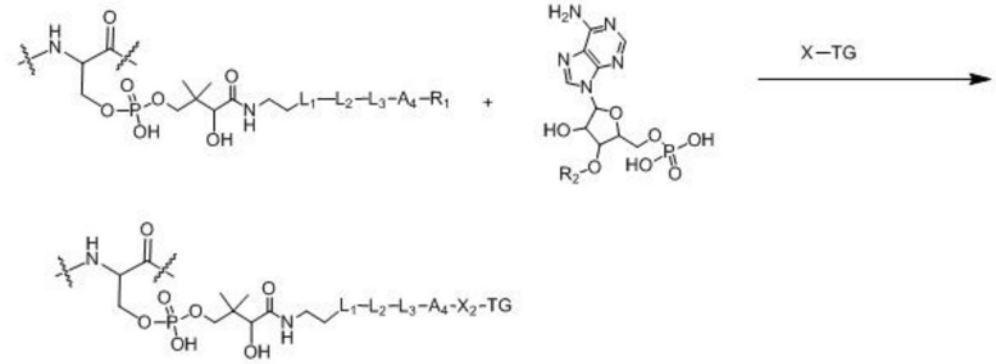
式(II-f)

[0928] 其中L_1,L_2,A_3,X_2和L_4如文中定义,*指修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

[0929] 两步法的另一个实施方案如方案(II-d)所示。

[0930] 方案(IId)



[0931] 

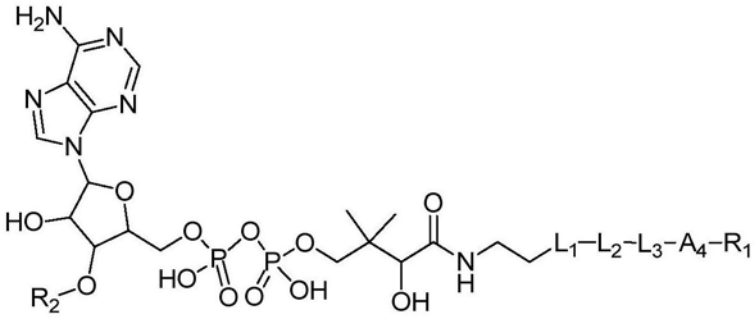
[0932] 其中,X,R_1,R_2,L_1,L_2,L_3,A_4,X_2和TG如文中所定义。

[0933] 方案(IId)的两步法包括以下步骤:

[0934] (a)提供修饰的抗体或其片段,其已被改造以含有短肽标签,并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物;

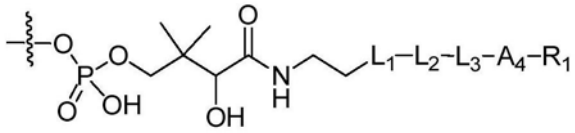
[0935] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段:

[0936] 在式(G)的化合物存在下,孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶,

[0937] 

式（G）

[0938] 从而将式(G-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到短肽标签；

[0939] 

式（G-a）

[0940] 和

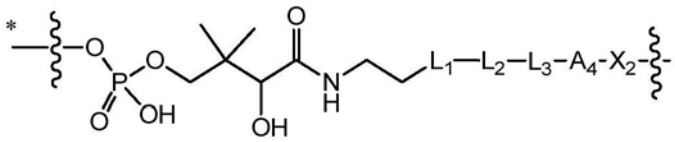
[0941] (c)使活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(II-g)的化合物反应：

[0942] X-TG

[0943] 式(II-g)

[0944] 其中，X，R_1，R_2，L_1，L_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

[0945] 方案(IId)的两步法的结果是，末端基团通过具有根据式(II-h)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段：

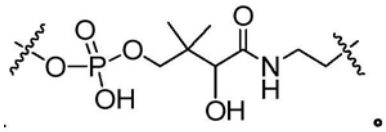
[0946] 

式（II-h）

[0947] 其中L_1，L_2，A_3，A_4和X_2如文中定义，*指修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

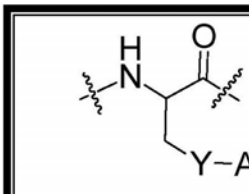
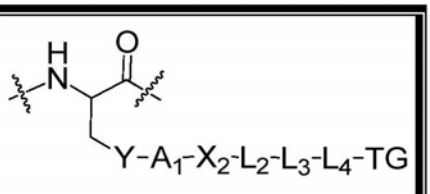
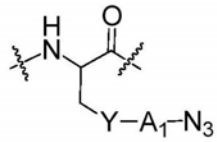
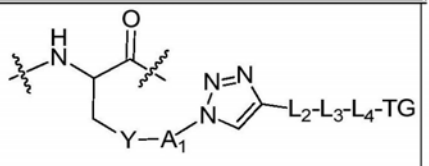
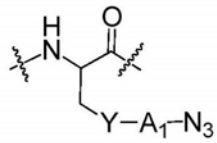
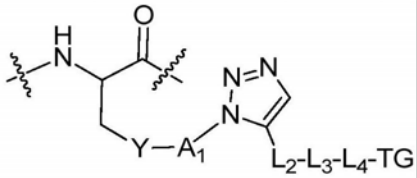
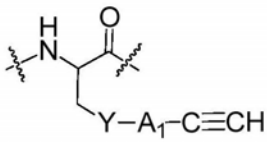
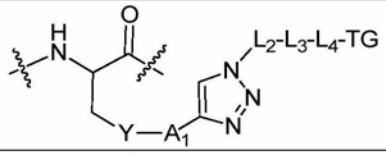
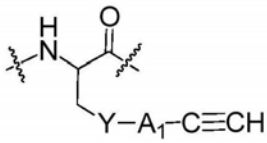
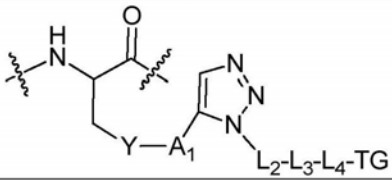
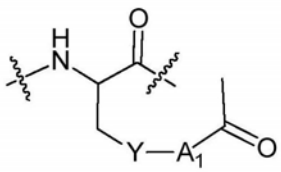
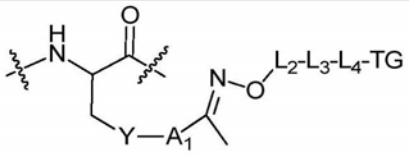
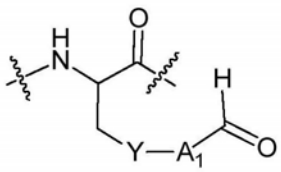
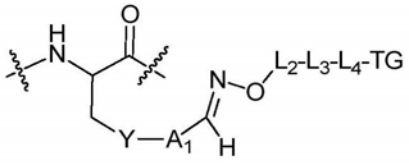
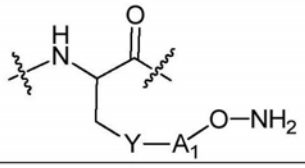
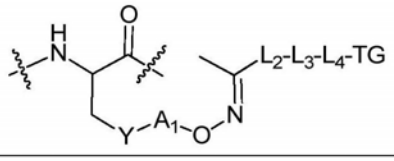
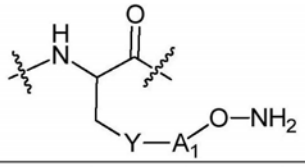
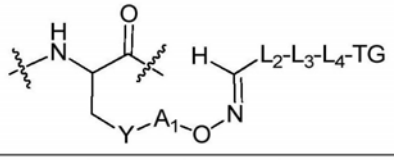
[0948] 在文中描述的两步法的某些实施方案中，修饰的抗体或其片段与具有式(D)，式(E)，式(F)或式(G)结构的化合物和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶与表达的修饰的抗体或其片段在相同的细胞中共同表达。在文中描述的两步法的某些实施方案中，修饰的抗体或其片段在细胞培养基中与具有式(D)，式(E)，式(F)或式(G)结构的化合物和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶在相同的细胞或另一个细胞中生成。在文中描述的两步法的某些实施方案中，4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶固定于固体支持物。在某些实施方案中，固体支持物任选地由珠子或柱上的聚合物构成。

[0949] 表4显示了用于文中描述的两步法和三步法中的式(D-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团和式(II-a)的化合物，以及得到的位于修饰的抗体或其片段中的修饰的丝氨酸的某些实施方案。注意A_1，L_2，L^3，L_4，R_5，R_6，R_7，R_8和TG如文中所定义，并且Y是

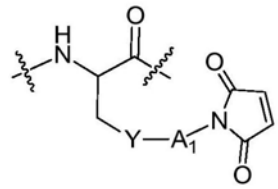
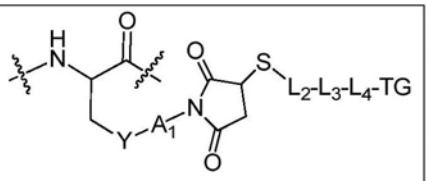
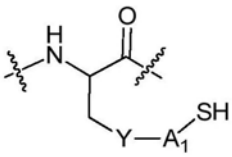
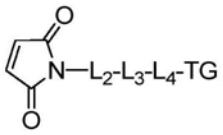
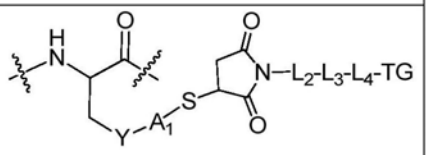
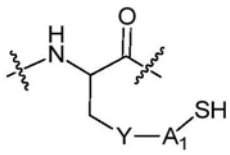
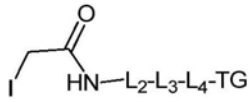
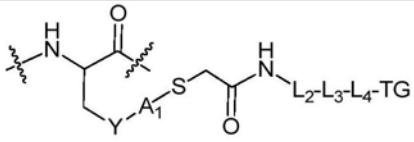
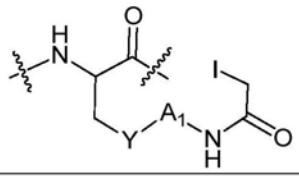
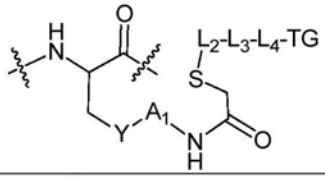
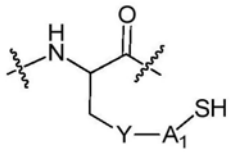
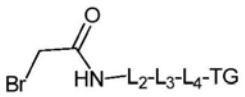
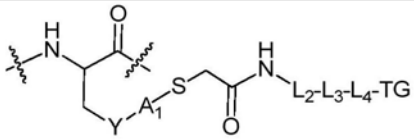
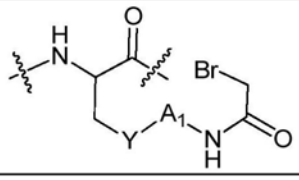
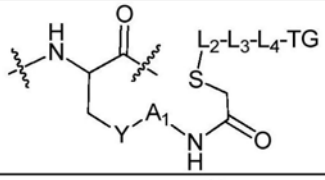
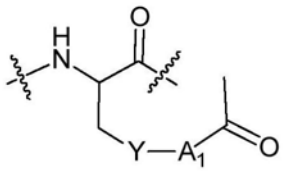
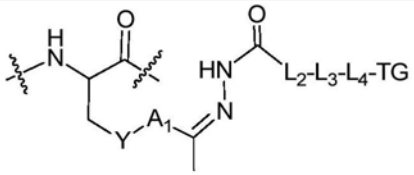
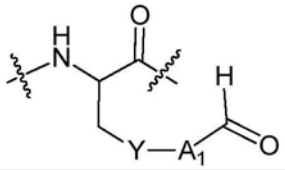
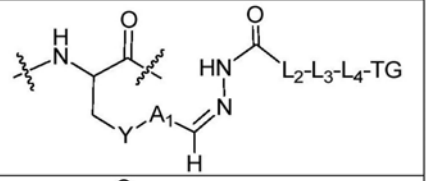
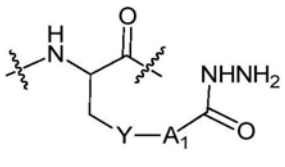
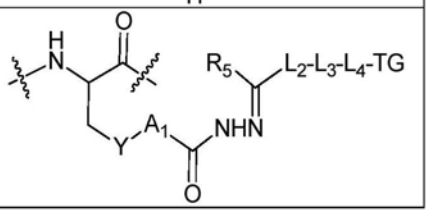


[0950] 表4

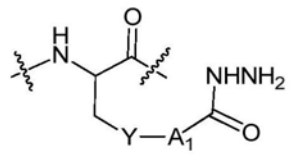
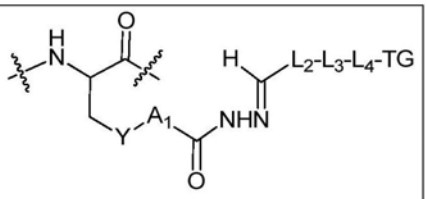
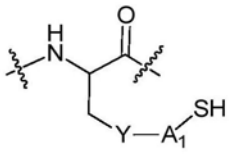
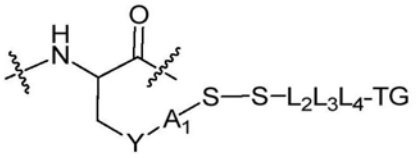
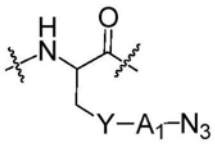
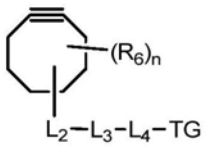
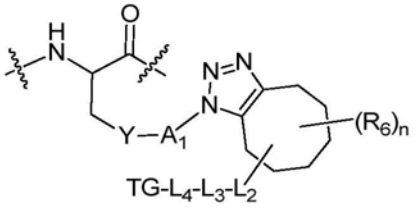
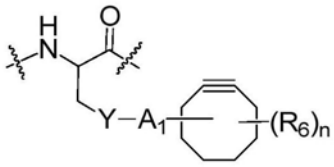
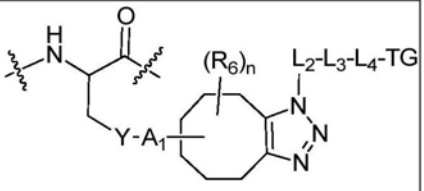
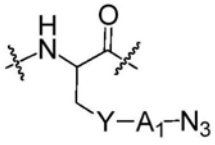
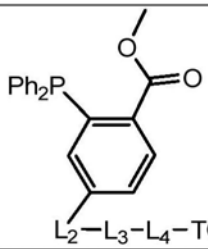
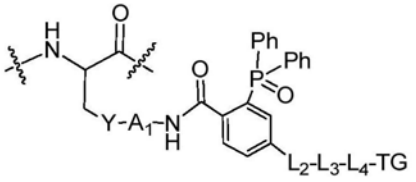
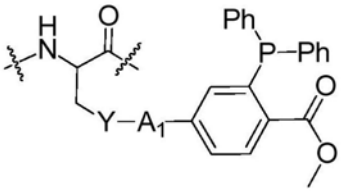
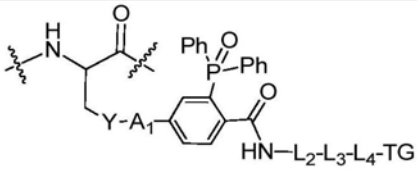
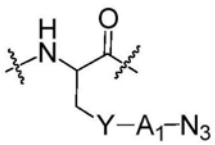
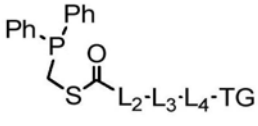
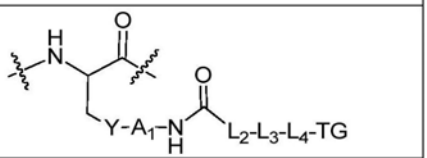
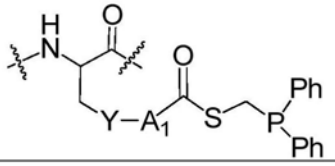
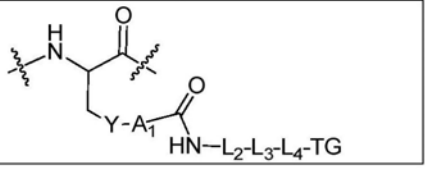
[0951]

	X-L_2-L_3-L_4-TG 式 (IIa)	
	HC≡C—L_2—L_3-L_4—TG	
	HC≡C—L_2—L_3-L_4—TG	
	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	
	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_2-L_3-L_4-TG	
	$CH_3C(=O)$-L_2-L_3-L_4-TG	
	HC(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	

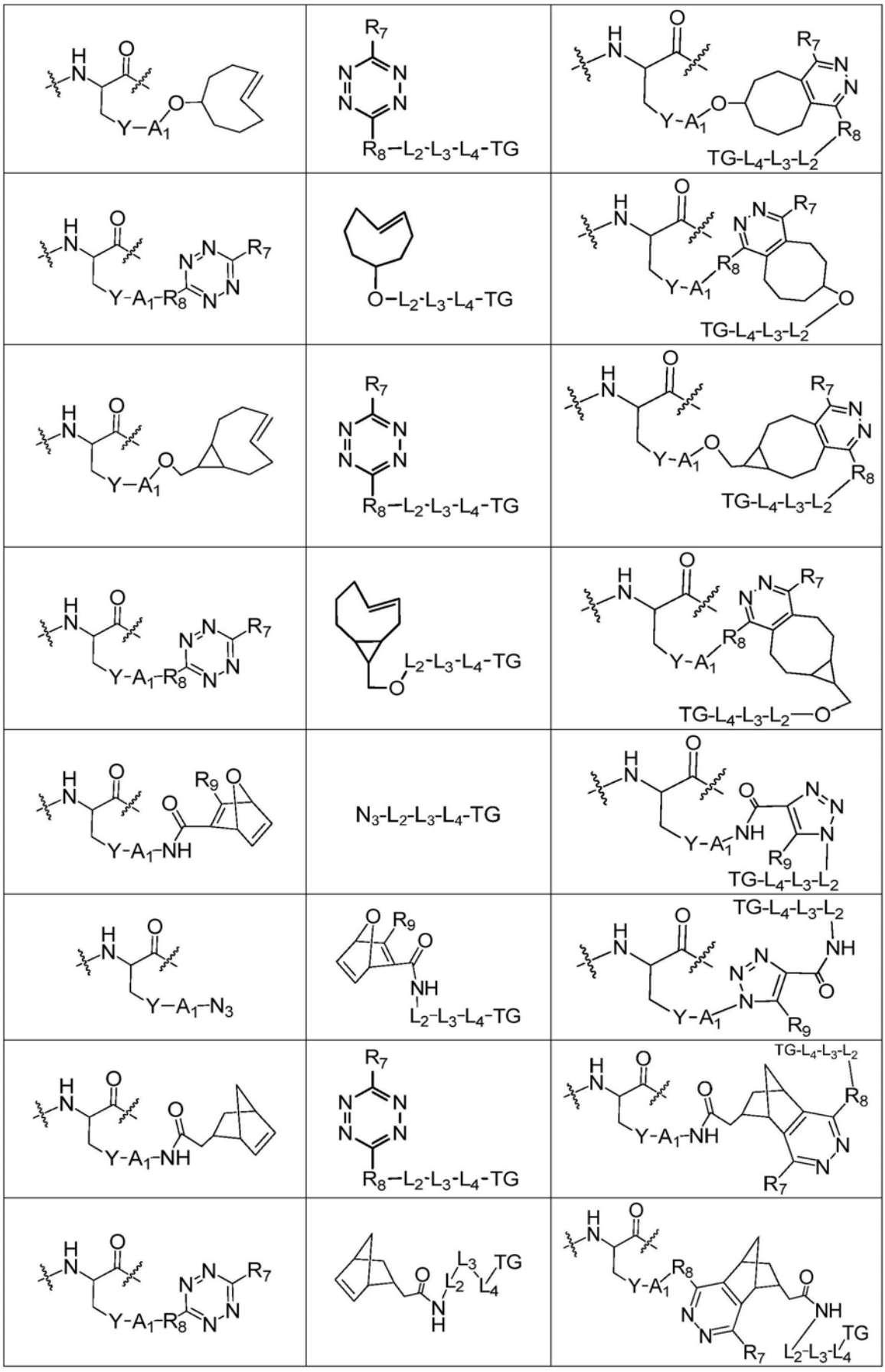
[0952]

	HS-L_2-L_3-L_4-TG	
		
		
	HS—L_2-L_3-L_4-TG	
		
	HS—L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	$R_5C(=O)$-L_2-L_3-L_4-TG	

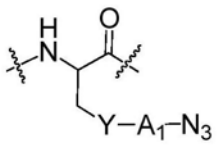
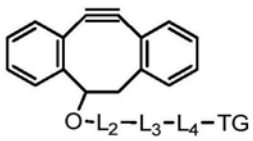
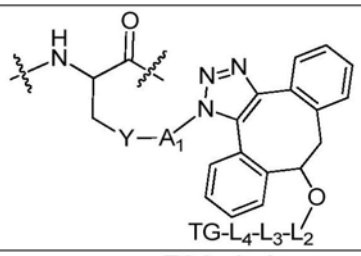
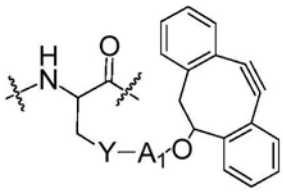
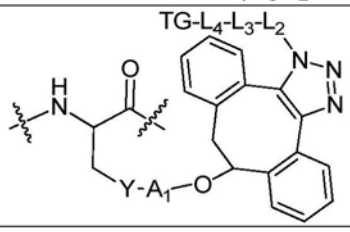
[0953]

	HC(=O)-L_2-L_3-L_4-TG	
	HS-L_2-L_3-L_4-TG	
		
	N$_3$-L_2-L_3-L_4-TG	
		
	N$_3$-L_2-L_3-L_4-TG	
		
	N$_3$-L_2-L_3-L_4-TG	

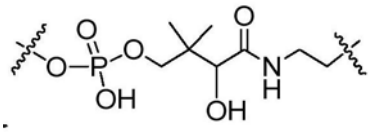
[0954]



[0955]

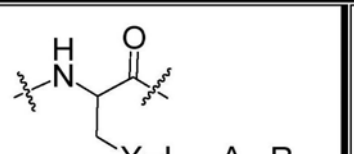
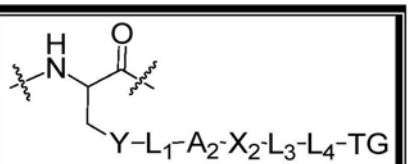
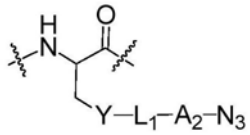
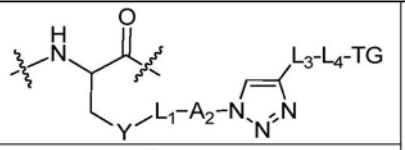
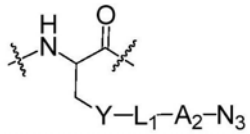
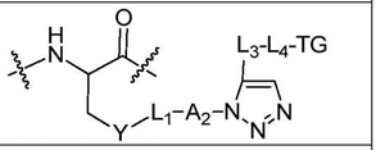
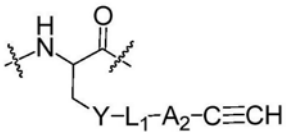
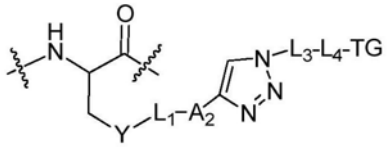
		
	N_3-L_2-L_3-L_4-TG	

[0956] 表5显示用于文中描述的两步法和三步法中的式(E-a)的活化4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团和式(II-c)的化合物,以及得到的位于修饰的抗体或其片段中的修饰的丝氨酸的某些实施方案。注意L_1,A_2,L_3,L_4,R_5,R_6,R_7,R_8和TG如文中所定义,并且Y是

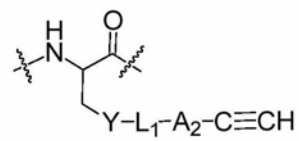
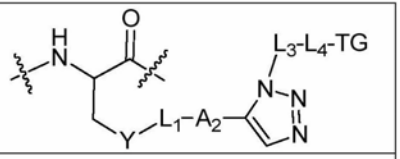
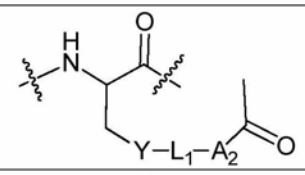
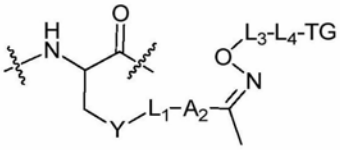
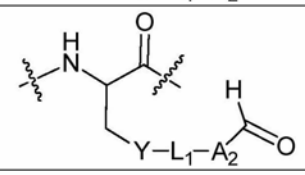
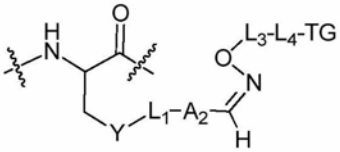
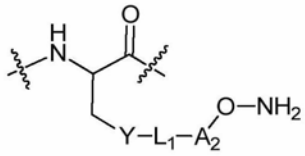
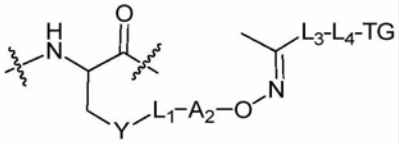
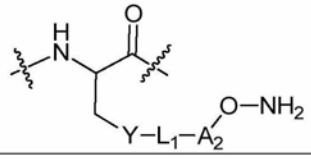
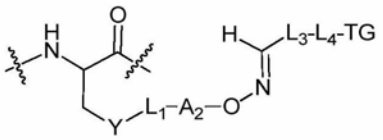
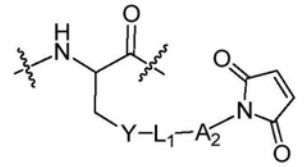
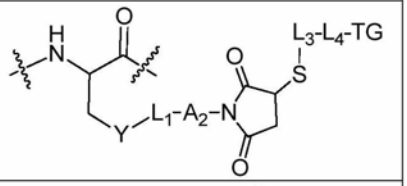
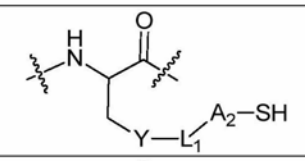
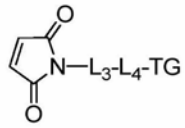
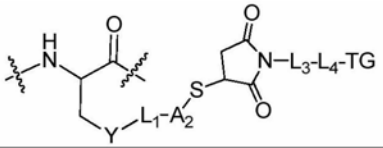
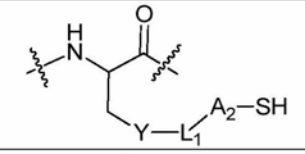
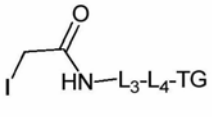
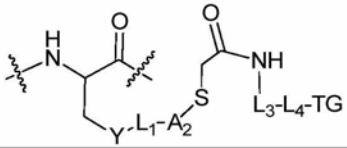
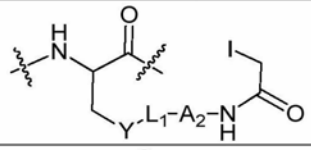
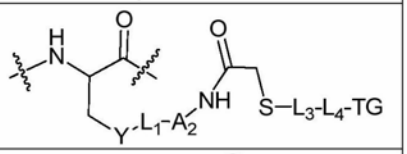
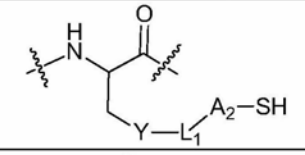
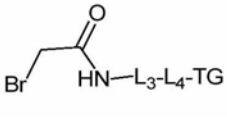
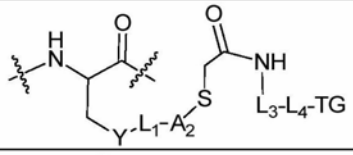
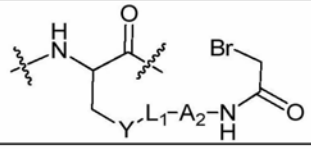
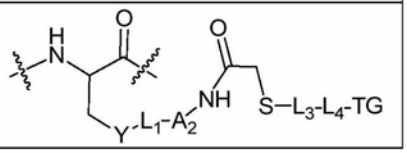


[0957] 表5

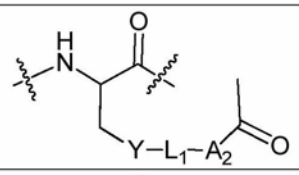
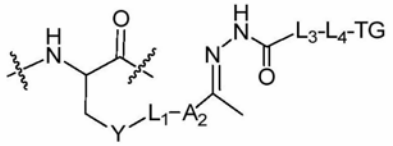
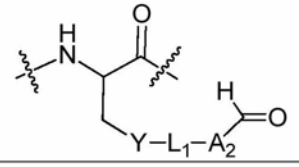
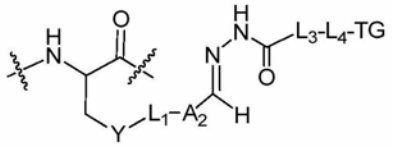
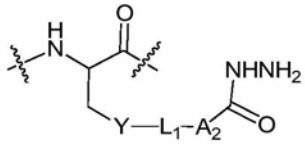
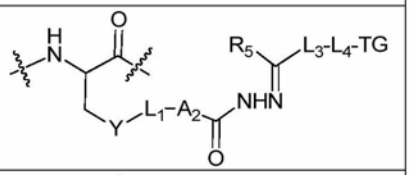
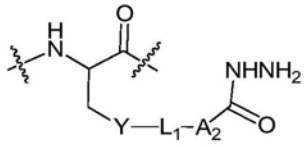
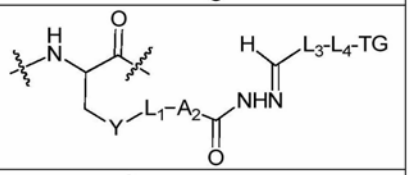
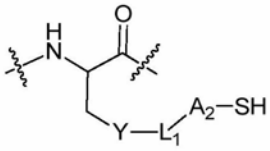
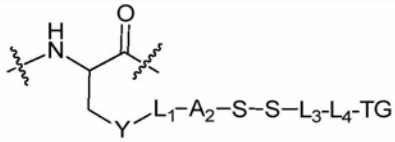
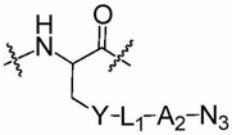
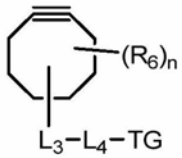
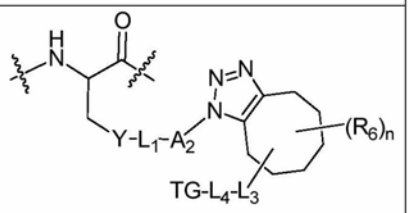
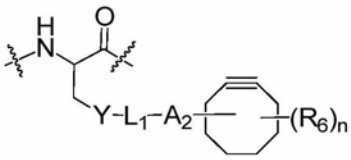
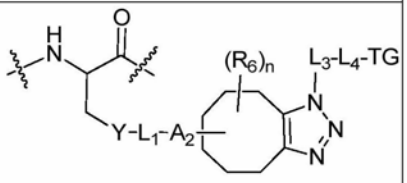
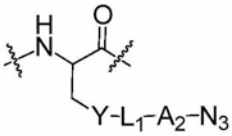
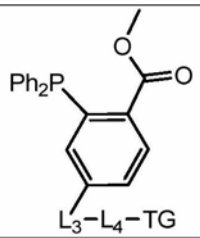
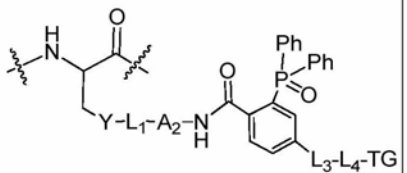
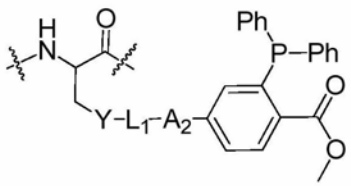
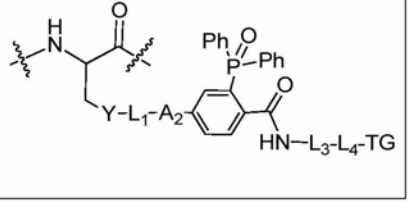
[0958]

	X-L_3-L_4-TG 式(II-c)	
	HC≡C-L_3-L_4-TG	
	HC≡C-L_3-L_4-TG	
	N_3-L_3-L_4-TG	

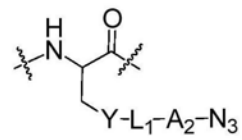
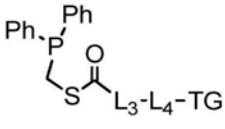
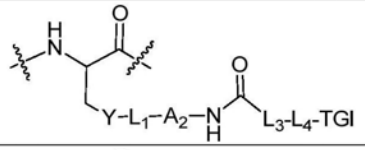
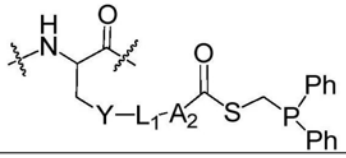
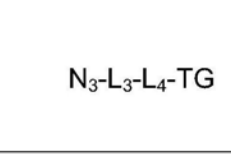
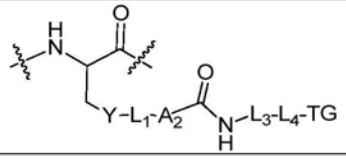
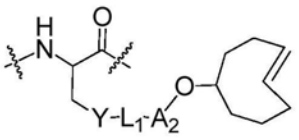
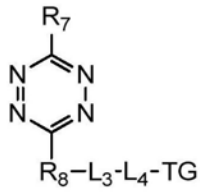
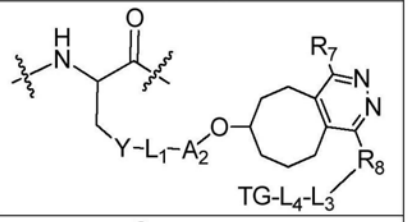
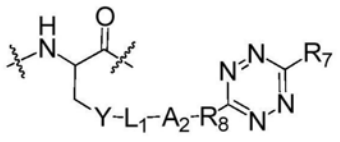
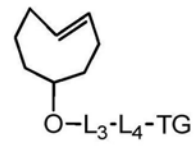
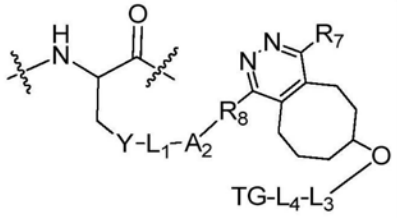
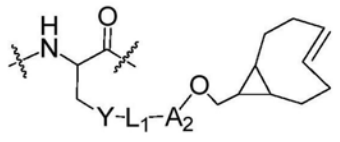
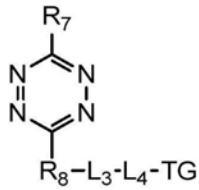
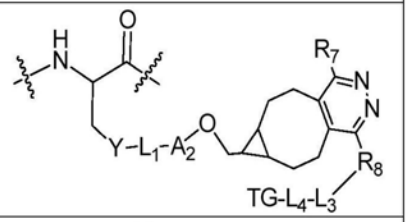
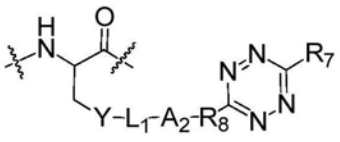
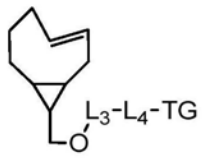
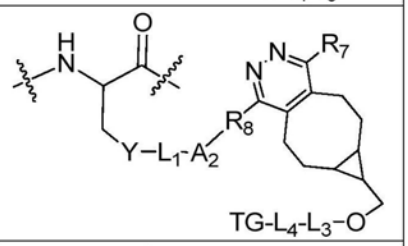
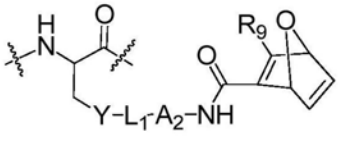
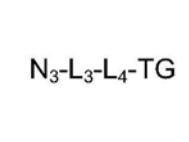
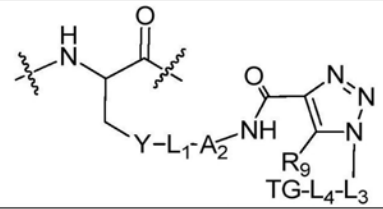
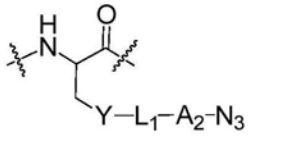
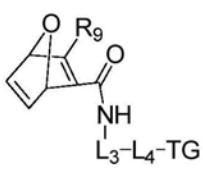
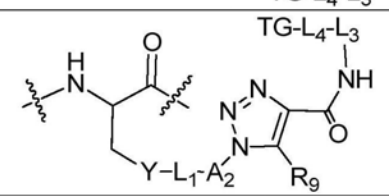
[0959]

	N_3-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_3-L_4-TG	
	$CH_3C(=O)$-L_3-L_4-TG	
	$HC(=O)$-L_3-L_4-TG	
	HS-L_3-L_4-TG	
		
		
	HS—L_3-L_4-TG	
		
	HS—L_3-L_4-TG	

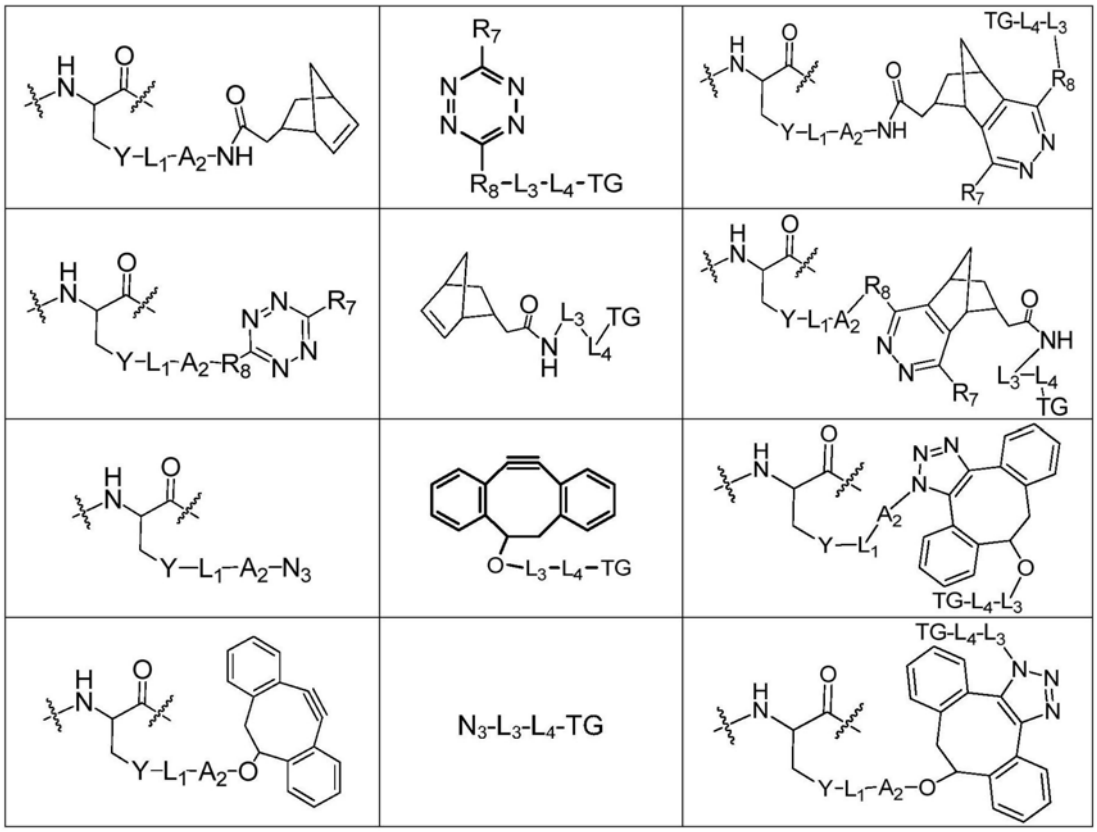
[0960]

	NH_2-NH-C(=O)-L_3-L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_3-L_4-TG	
	$R_5C(=O)$-L_3-L_4-TG	
	HC(=O)-L_3-L_4-TG	
	SH—L_3-L_4-TG	
		
	N_3-L_3-L_4-TG	
		
	N_3-L_3-L_4-TG	

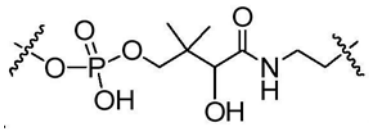
[0961]

[0962]



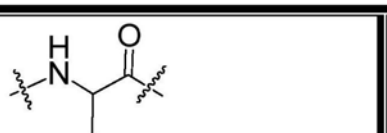
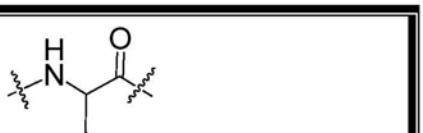
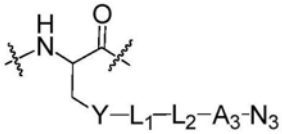
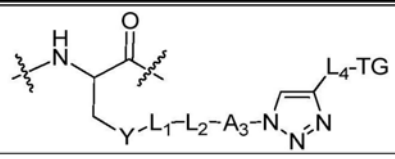
[0963] 表6显示用于文中描述的两步法和三步法中的式(F-a)的活化4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团和式(II-e)的化合物,以及得到的位于修饰的抗体或其片段中的修饰的丝氨酸的某些实施方案。注意L_1,L_2,A_3,L_4,R_5,R_6,R_7,R_8和TG如文中所定义,并且Y是



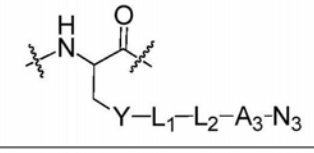
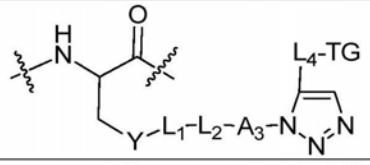
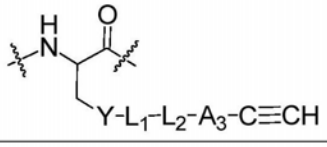
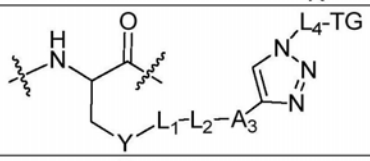
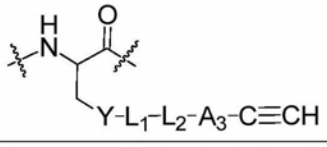
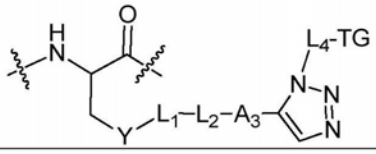
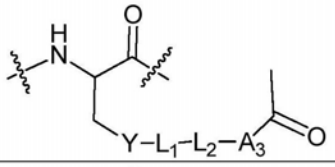
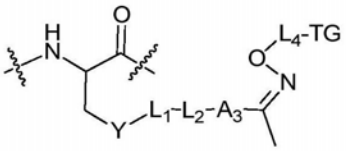
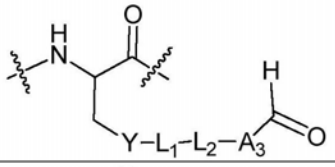
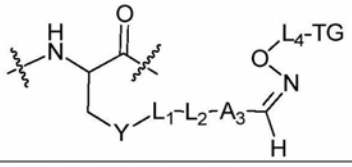
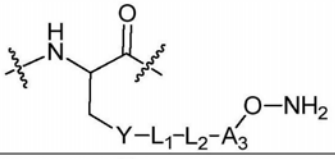
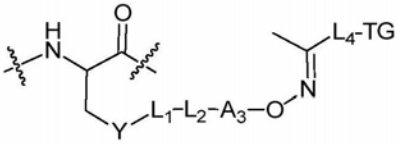
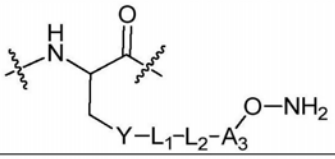
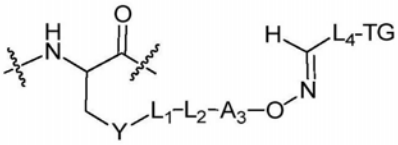
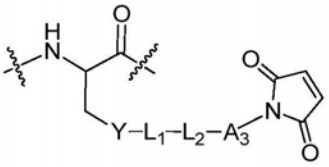
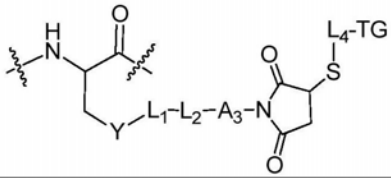
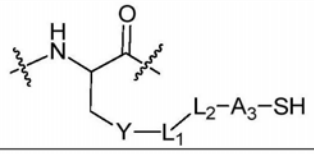
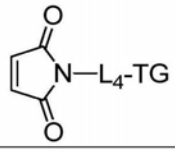
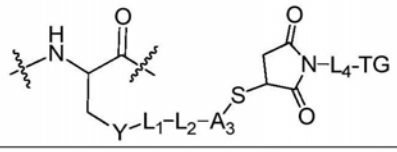
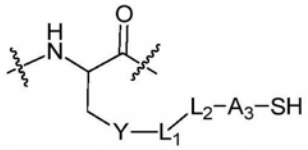
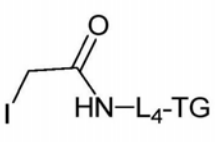
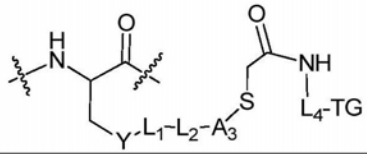
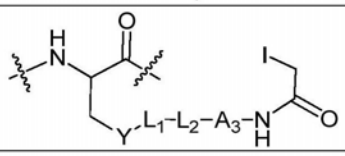
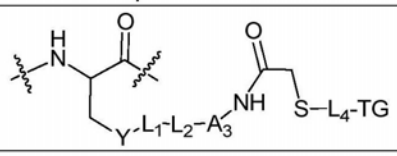
。

[0964] 表6

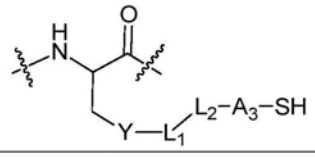
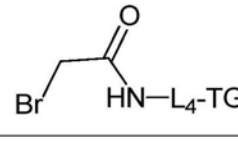
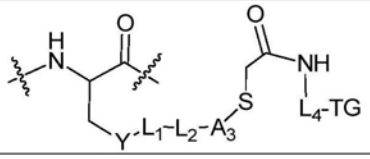
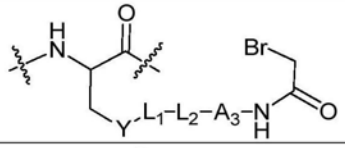
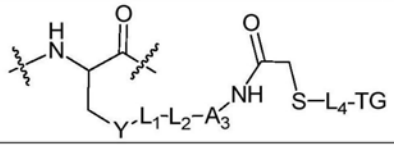
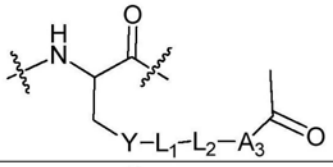
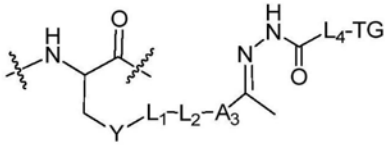
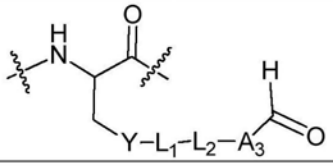
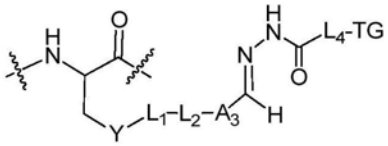
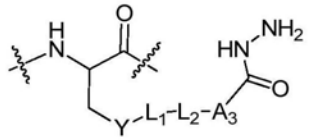
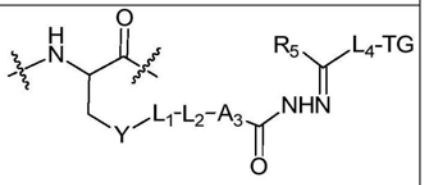
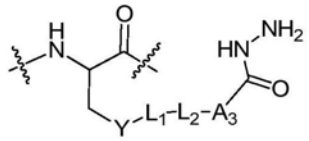
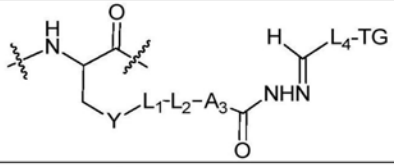
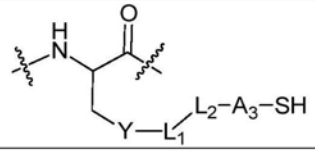
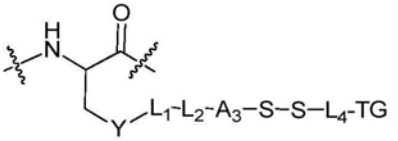
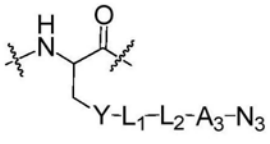
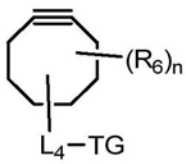
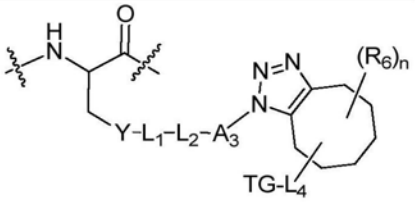
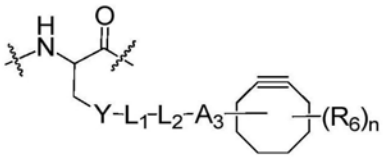
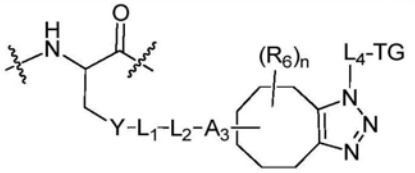
[0965]

	X-L4-TG 式(II-e)	
	HC≡C—L4-TG	

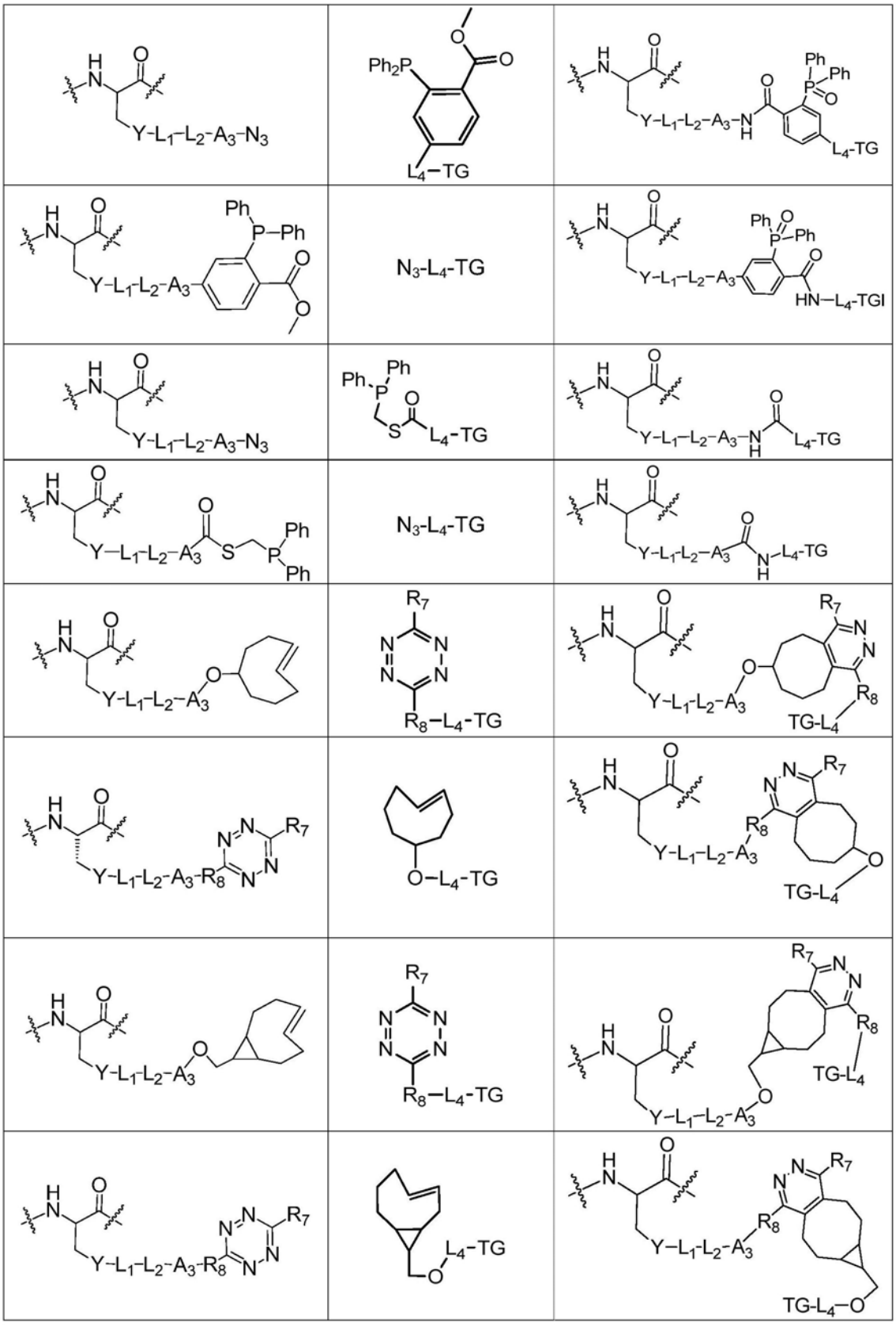
[0966]

	$HC\equiv C-L_4-TG$	
	N_3-L_4-TG	
	N_3-L_4-TG	
	NH_2-O-L_4-TG	
	NH_2-O-L_4-TG	
	$CH_3C(=O)-L_4-TG$	
	$HC(=O)-L_4-TG$	
	$HS-L_4-TG$	
		
		
	$HS-L_4-TG$	

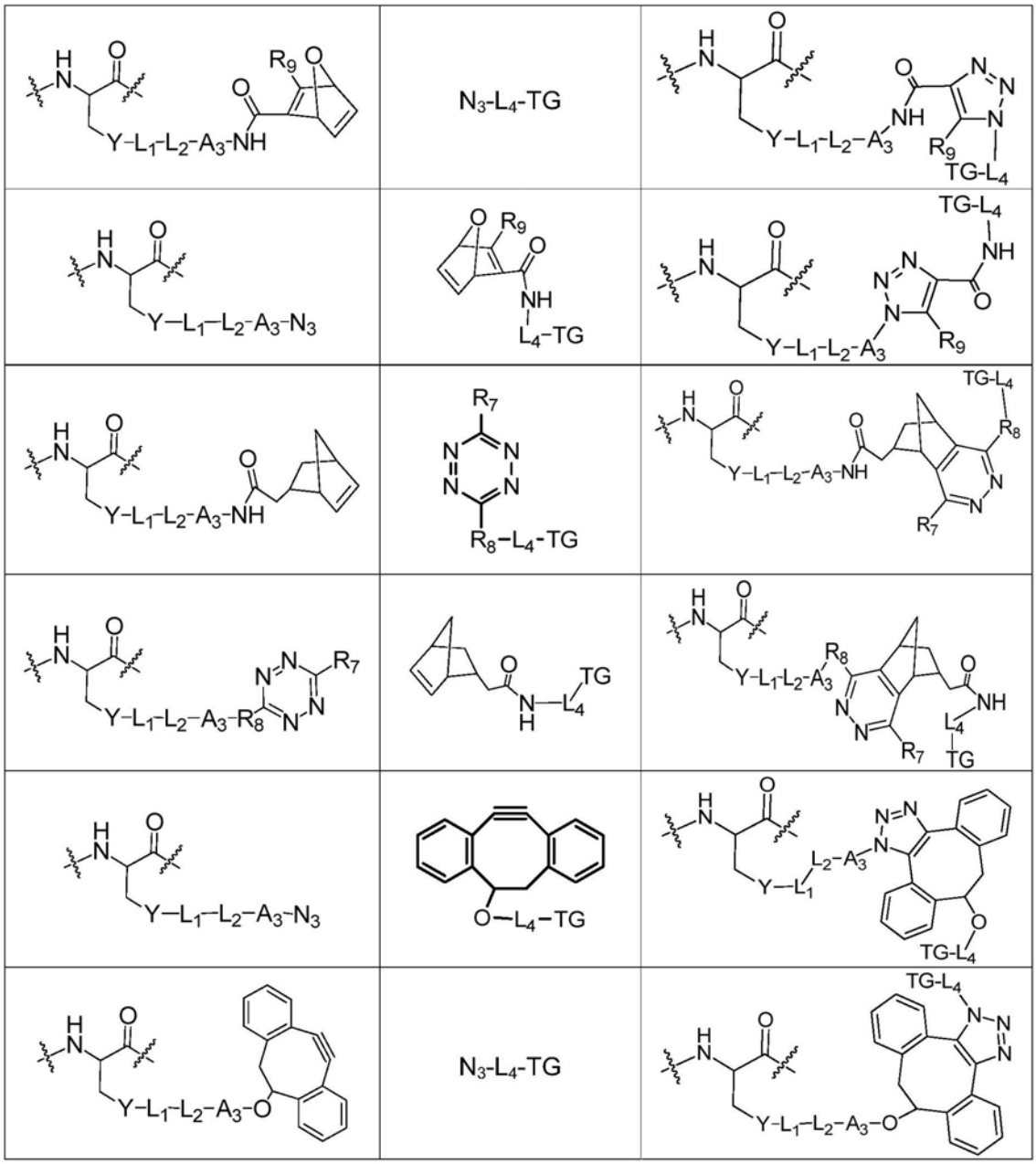
[0967]

		
	HS—L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_4-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-L_4-TGI	
	R_5C(=O)-L_4-TG	
	HC(=O)-L_4-TG	
	HS-L_4-TG	
		
	N_3-L_4-TG	

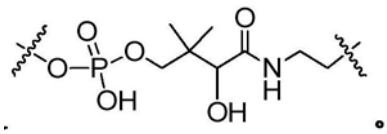
[0968]


Y-L1-L2-A3-N3
Ph2P
L4-TG
Ph
Ph
P
O
Y-L1-L2-A3-N
H
L4-TG
Y-L1-L2-A3
N3-L4-TG
HN-L4-TGI
S
R7
R8-L4-TG
TG-L4
O-L4-TG
TG-L4-O

[0969]

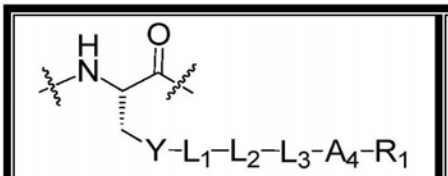
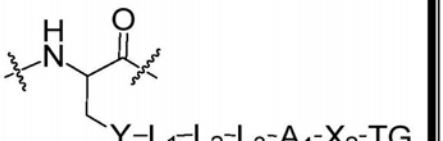
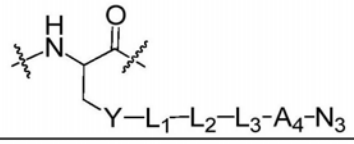
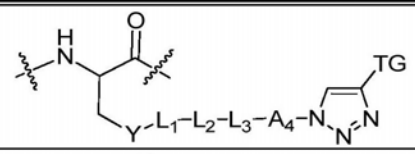
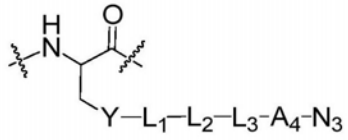
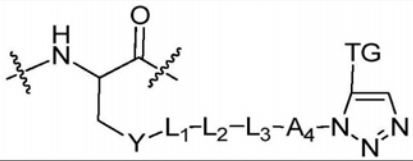
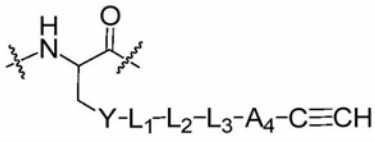
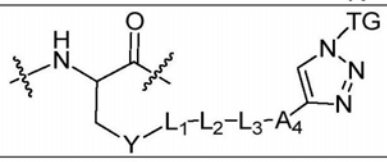
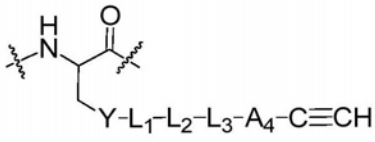
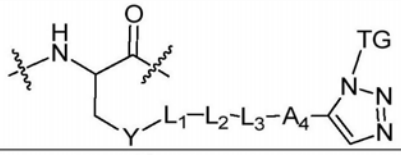
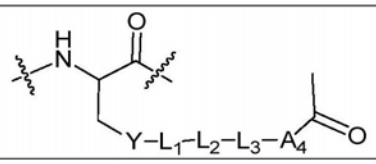
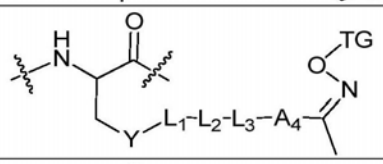
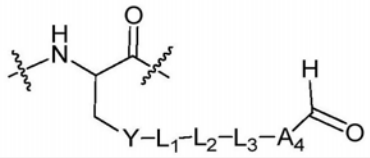
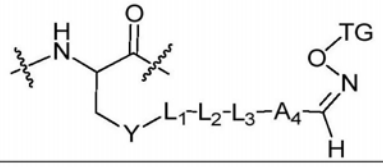
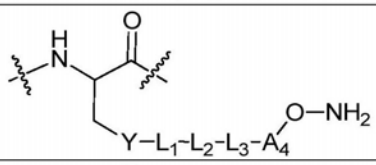
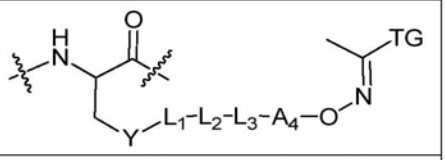
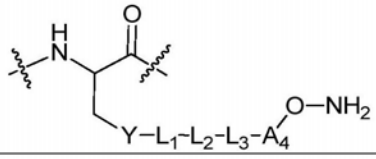
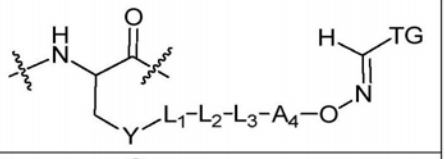
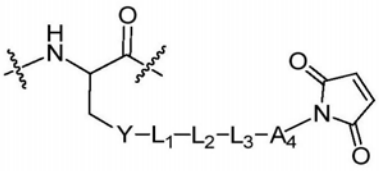
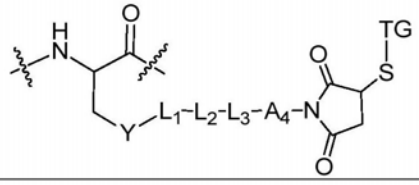
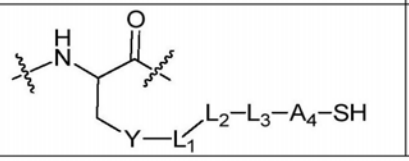
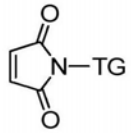
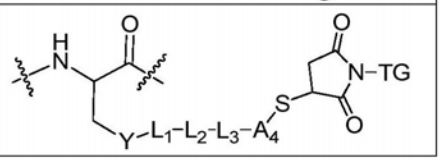


[0970] 表7表示用于文中描述的两步法和三步法中的式(G-a)的活化4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团和式(II-g)的化合物,以及得到的位于修饰的抗体或其片段中的修饰的丝氨酸的某些实施方案。注意L_1,L_2,L_3,A_4,R_5,R_6,R_7,R_8和TG如文中所定义,并且Y是

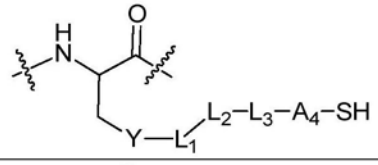
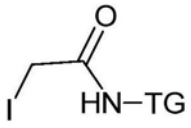
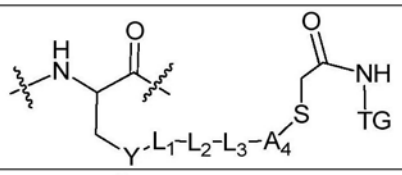
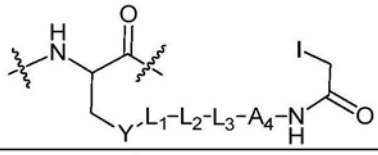
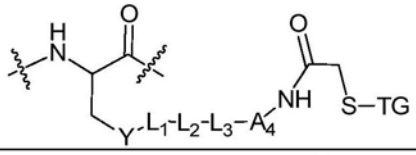
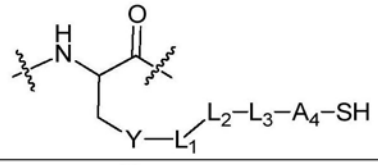
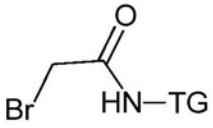
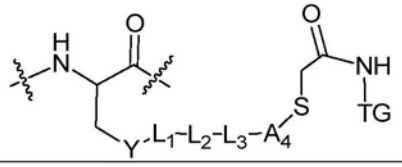
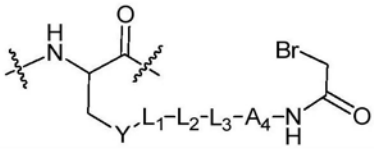
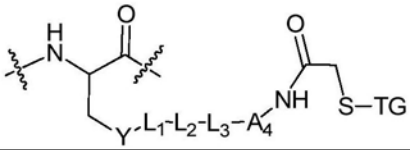
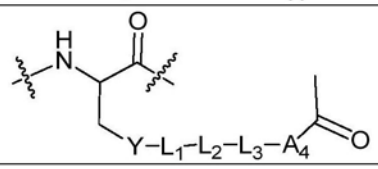
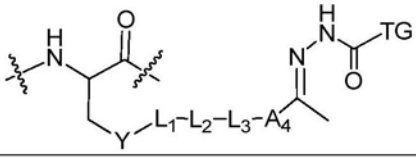
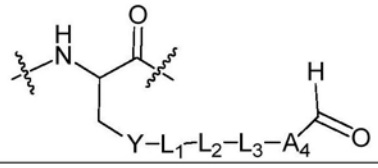
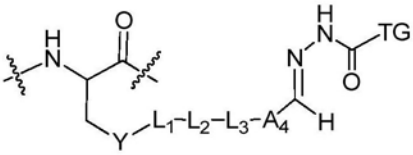
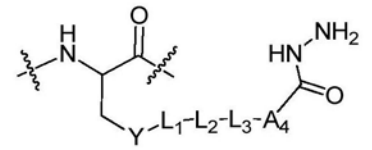
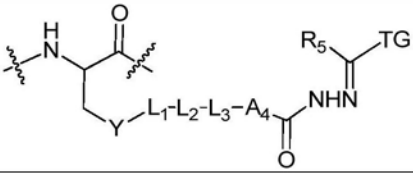
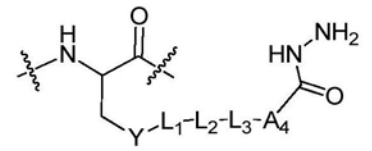
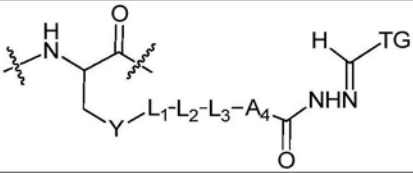
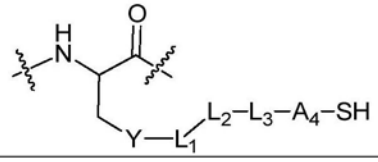
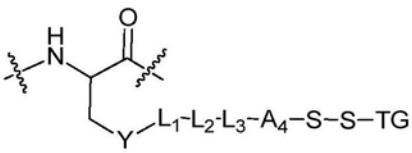
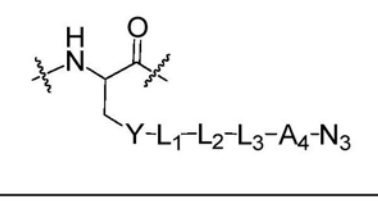
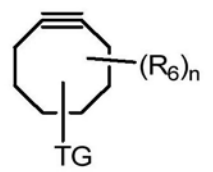
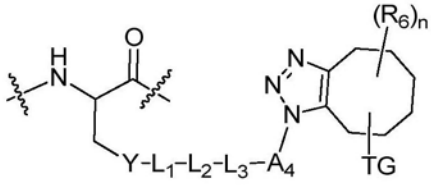


[0971] 表7

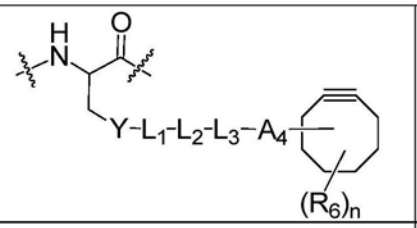
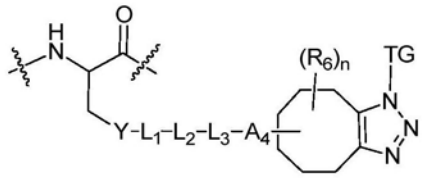
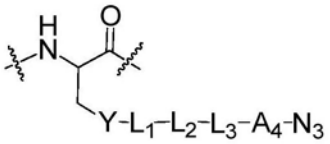
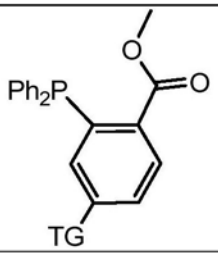
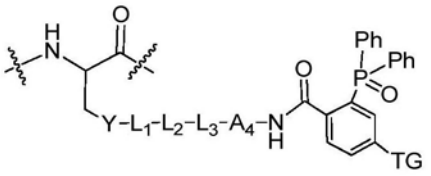
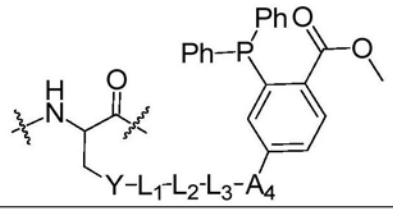
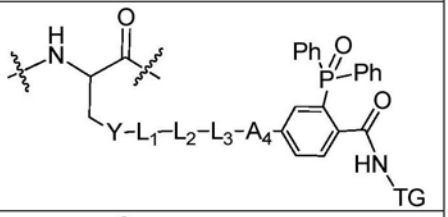
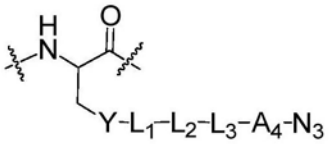
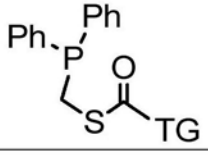
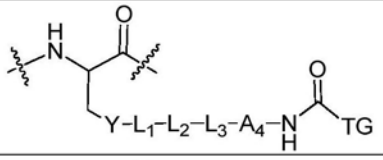
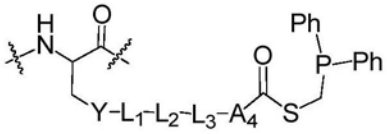
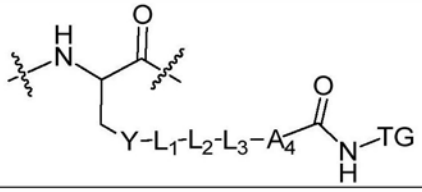
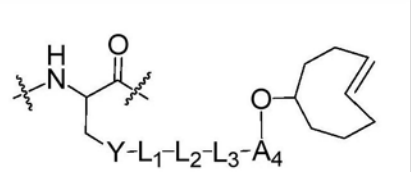
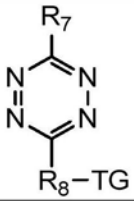
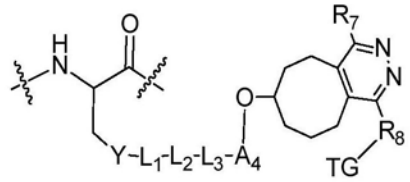
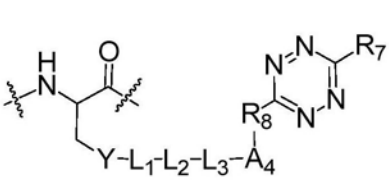
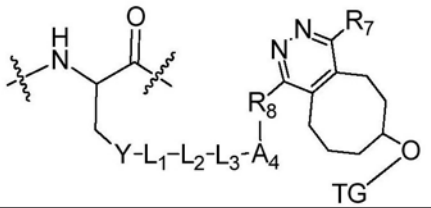
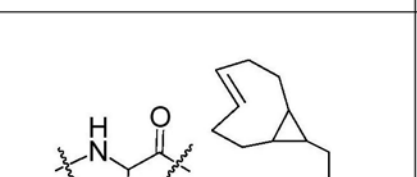
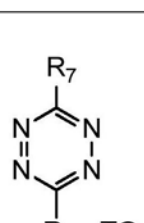
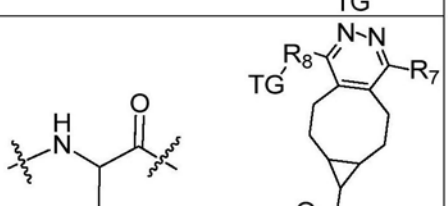
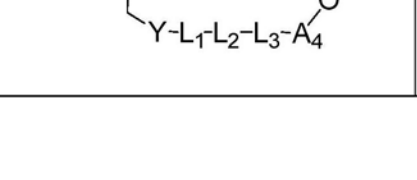
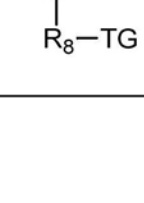
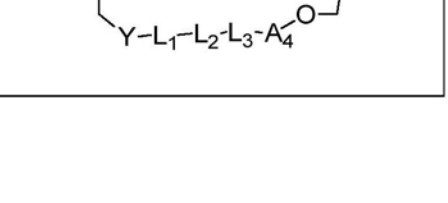
[0972]

	X-TG 式(II-g)	
	HC≡C−TG	
	HC≡C−TG	
	N_3-TG	
	N_3-TG	
	NH_2-O-TG	
	NH_2-O-TG	
	$CH_3C(=O)$-TG	
	HC(=O)-TG	
	HS-TG	
		

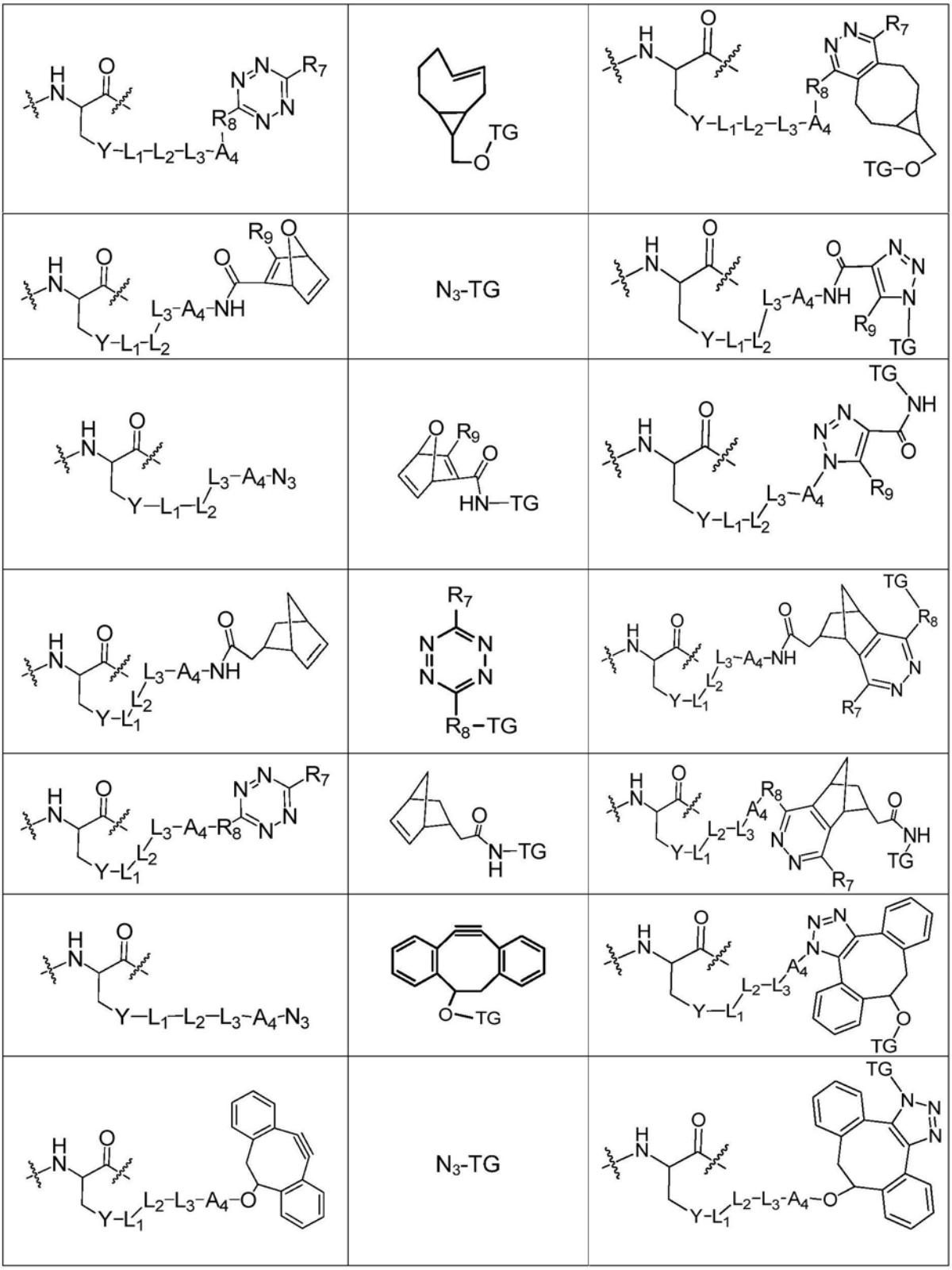
[0973]

		
	HS—TG	
		
	HS—TG	
	NH_2-NH-C(=O)-TG	
	NH_2-NH-C(=O)-TG	
	$R_5C(=O)$-TG	
	HC(=O)-TG	
	HS-TG	
		

[0974]

	N_3-TG	
		
	N_3-TG	
		
	N_3-TG	
		
		
		
		

[0975]



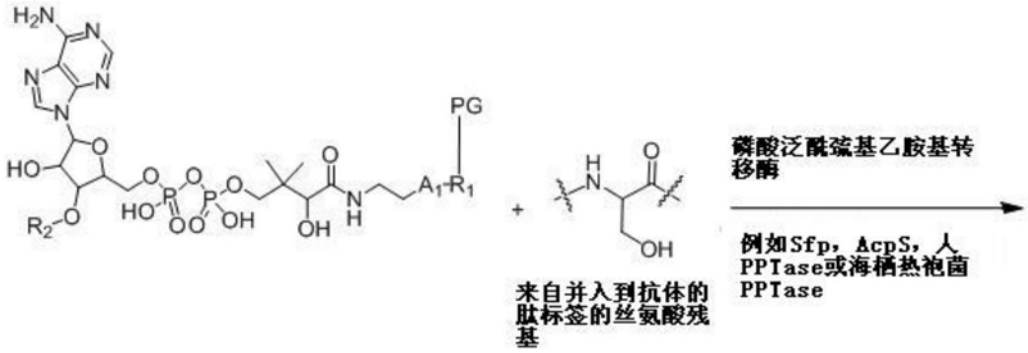
[0976] 三步法

[0977] 备选地，通过三步法位点特异性地标记文中提供的修饰的抗体或其片段，其中，在第一步骤中，CoA的被保护的ppan辅基，或CoA类似物的被保护的修饰的ppan辅基，通过4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分和已并入到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基之间形

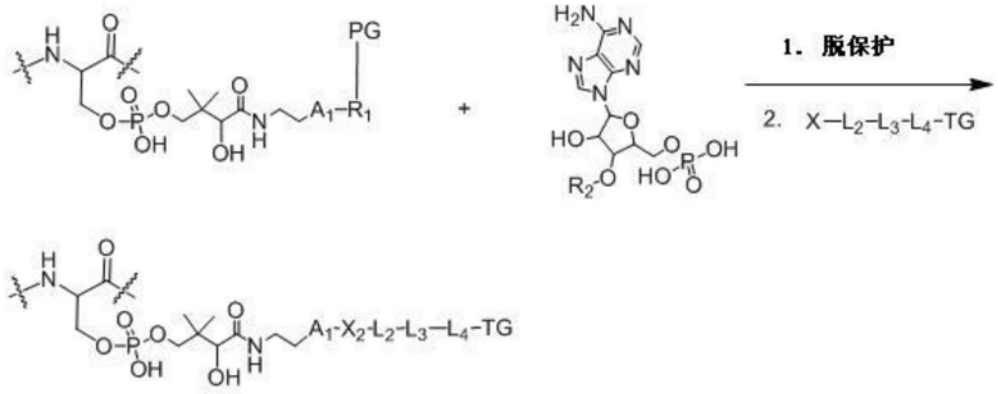
成的磷酸二酯键附着至短肽标签。在第二步骤中，CoA的被保护的ppan辅基，或CoA类似物的被保护的修饰的ppan辅基脱保护；从而产生反应性官能团(R_1)。在第三步骤中，连接、或者直接附着至与官能团(R_1)反应的基团的末端基团(TG)与CoA的ppan辅基上的官能团(R_1)反应，或与CoA类似物的修饰的ppan辅基上的官能团(R_1)反应，从而直接将所述末端基团附着到修饰的抗体或其片段，或将所述末端基团通过接头单元(LU)附着到修饰的抗体或其片段。

[0978] 三步法的一个实施方案如方案(IIIa)所示：

[0979] 方案(IIIa)



[0980]



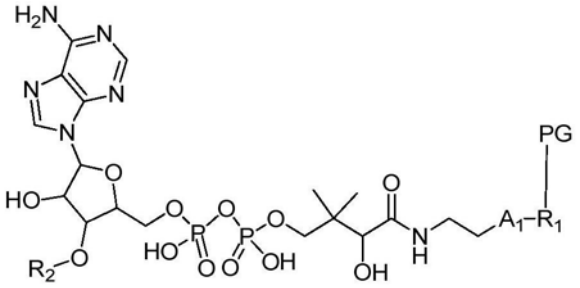
[0981] 其中X和对应的R_1如在表3中给出，其中PG是保护基团，和R_2，A_1，L_2，X_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

[0982] 方案(IIIa)的三步法包括步骤：

[0983] (a)提供修饰的抗体或其片段，其已被改造以含有短肽标签，并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物；

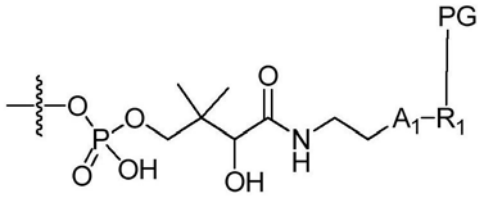
[0984] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段：

[0985] 在式H的化合物存在下，孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，

[0986] 

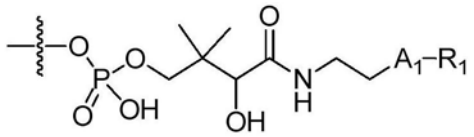
式（H）

[0987] 从而将式(H-a)的被保护的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到短肽标签；

[0988] 

式（H-a）

[0989] (c)使被保护的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护，以得到式(D-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团

[0990] 

式（D-a）

[0991] 和

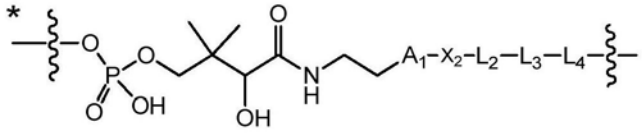
[0992] (d)使活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(IIa)的化合物反应：

[0993] $X-L_2-L_3-L_4-TG$

[0994] 式(II-a)

[0995] 其中，PG是保护基团，X，R_1，R_2，A_1，L_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

[0996] 方案(IIIa)的三步法的结果是，末端基团通过具有根据式(IIb)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段：

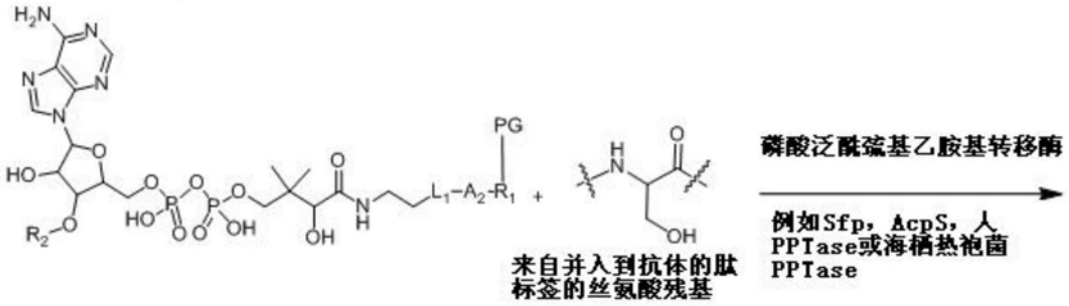
[0997] 

式（II-b）

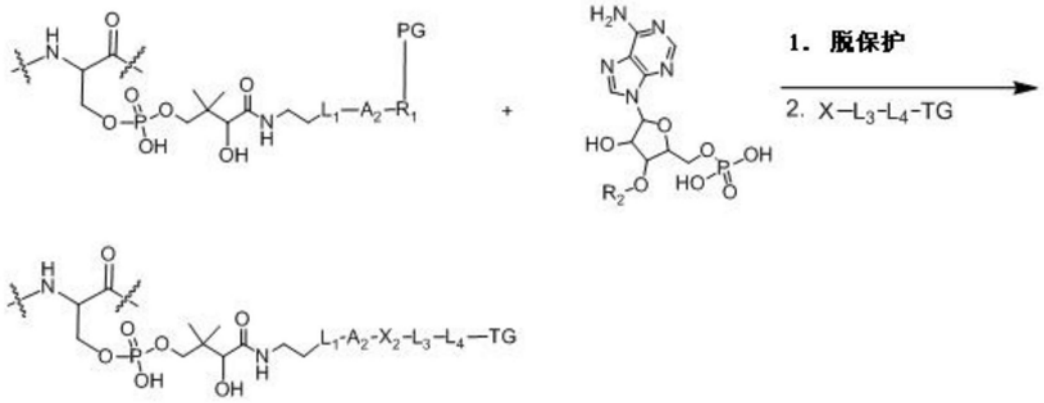
[0998] 其中A_1，X_2，L_3和L_4如文中定义，*指修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

[0999] 三步法的另一个实施方案如方案(IIIb)所示：

[1000] 方案(IIIb)



[1001]



[1002] 其中PG是保护基团，X，R_1，R_2，L_1，A_2，X_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

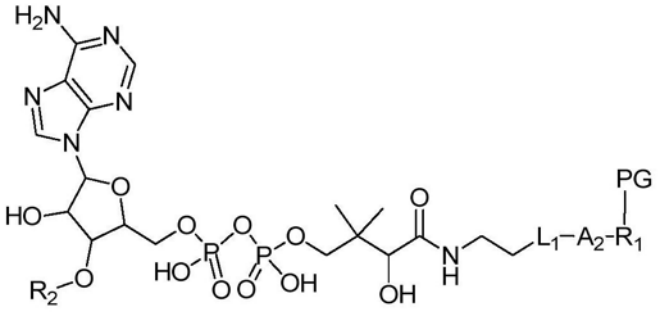
[1003] 方案(IIIb)的三步法包括步骤：

[1004] (a)提供修饰的抗体或其片段，其已被改造以含有短肽标签，并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物；

[1005] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段：

[1006] 在式(J)的化合物存在下，孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，

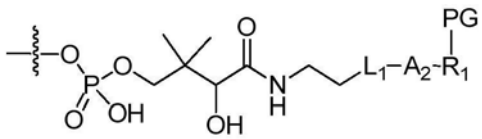
[1007]



式（J）

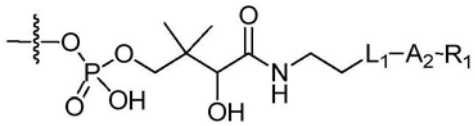
[1008] 从而将式(I-a)的被保护的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到短肽标签；

[1009]



式（J-a）

[1010] (c)使被保护的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护，以得到式(E-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团

[1011] 

式（E-a）

[1012] 和

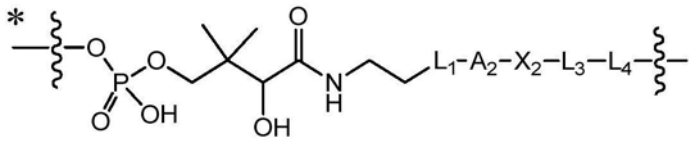
[1013] (d)使活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(II-c)的化合物反应：

[1014] X-L_3-L_4-TG

[1015] 式(II-c)

[1016] 其中,PG是保护基团,X,R_1,R_2,L_1,A_2,L_3,L_4和TG如文中所定义。

[1017] 方案(IIIb)的三步法的结果是,末端基团通过具有根据式(II-d)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段：

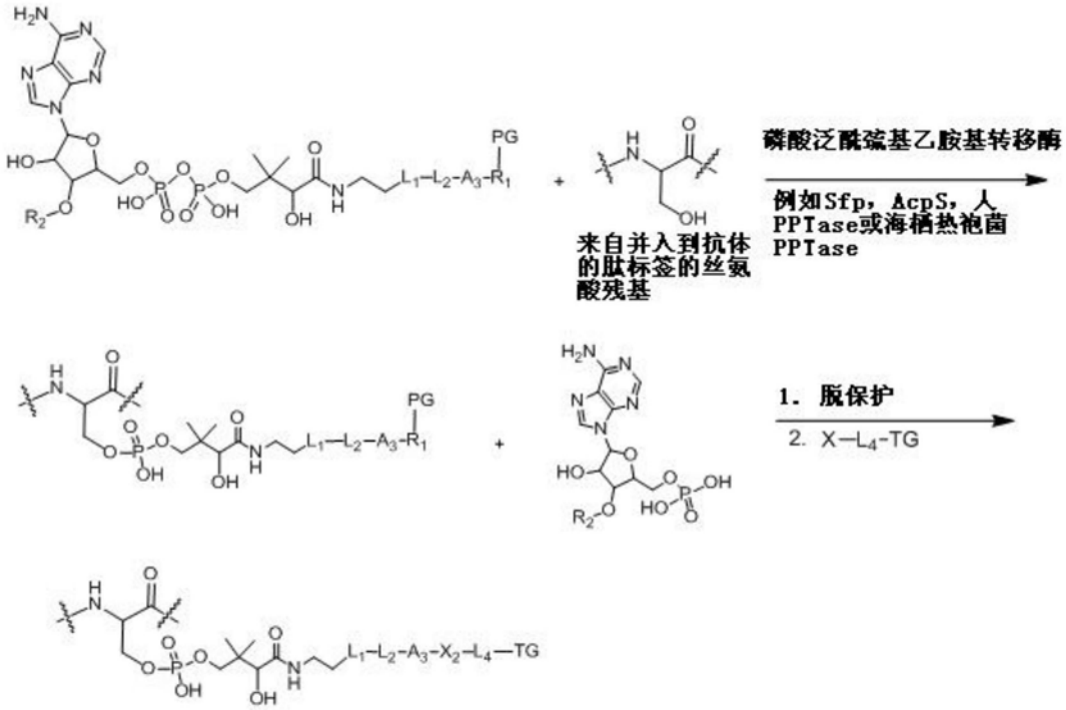
[1018] 

式（II-d）

[1019] 其中L_1,A_2,X_2,L_3和L_4如文中定义,*指修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

[1020] 三步法的另一个实施方案如方案(IIIc)所示：

[1021] 方案(IIIc)



[1022]

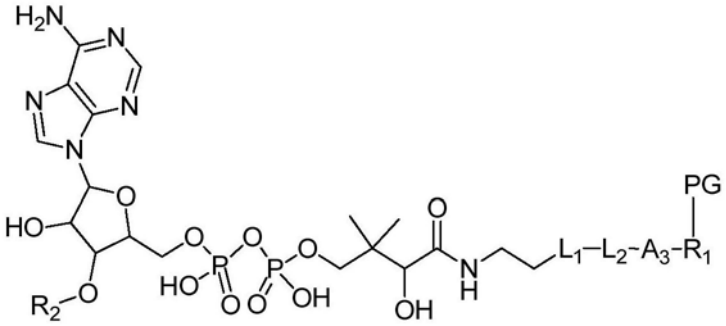
[1023] 其中PG是保护基团,X,R_1,R_2,L_1,L_2,X_2,A_3,L_4和TG如文中所定义。

[1024] 方案(IIIc)的三步法包括步骤：

[1025] (a)提供修饰的抗体或其片段,其已被改造以含有短肽标签,并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物；

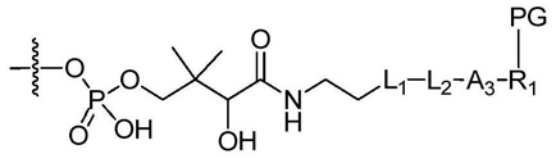
[1026] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段：

[1027] 在式(K)的化合物存在下，孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶，

[1028] 

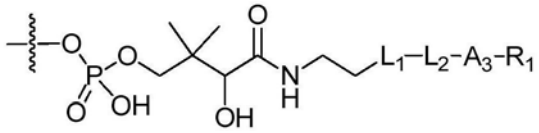
式（K）

[1029] 从而将式(K-a)的被保护的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到短肽标签；

[1030] 

式（K-a）

[1031] (c)使被保护的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护，以得到式(F-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团

[1032] 

式（F-a）

[1033] 和

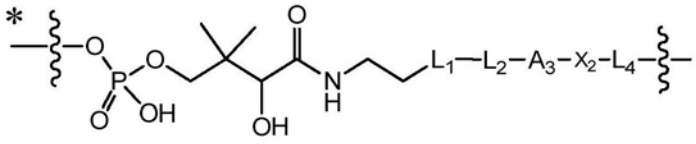
[1034] (d)使活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(IIe)的化合物反应：

[1035] $X-L_4-TG$

[1036] 式(II-e)

[1037] 其中，PG是保护基团，X，R_1，R_2，L_1，A_2，L_3，L_4和TG如文中所定义。

[1038] 方案(IIIc)的两步法的结果是，末端基团通过具有根据式(II-f)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段：

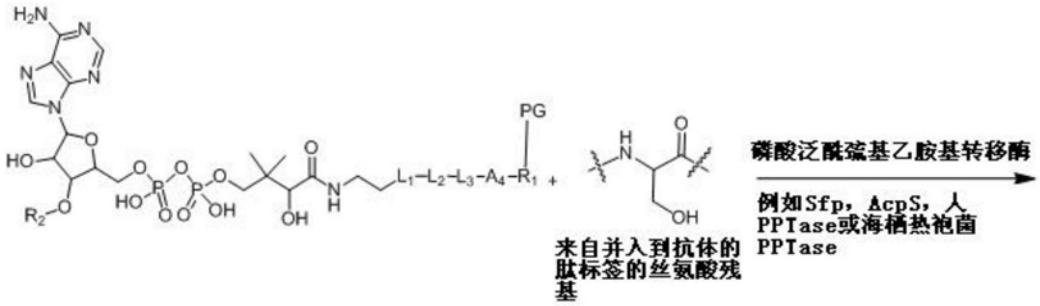
[1039] 

式（II-f）

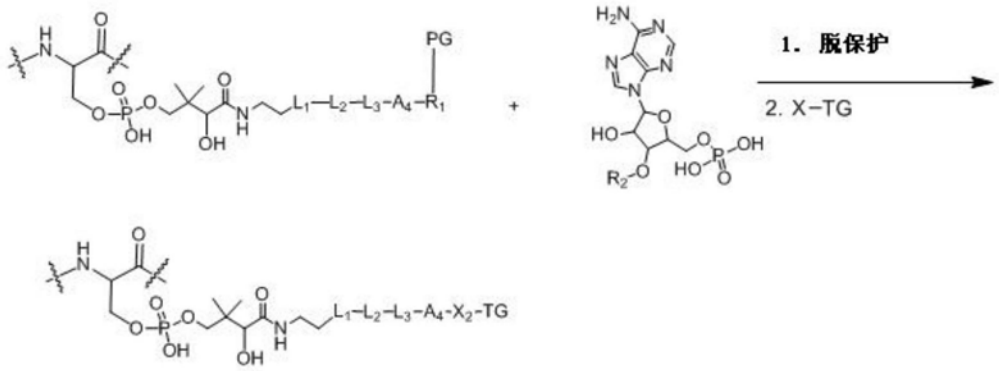
[1040] 其中L_1，L_2，A_2，X_2和L_4如文中定义，*指修饰的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

[1041] 三步法的另一个实施方案如方案(IIId)所示：

[1042] 方案(IIId)



[1043]



[1044] 其中PG是保护基团,X,R_1,R_2,L_1,L_2,L_3,A_4,X_2和TG如文中所定义。

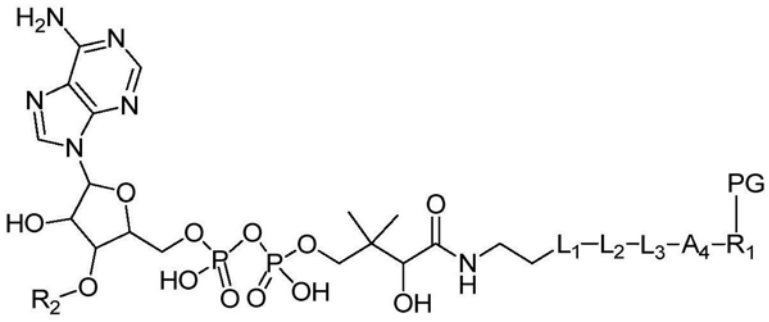
[1045] 方案(IIId)的三步法包括步骤：

[1046] (a)提供修饰的抗体或其片段,其已被改造以含有短肽标签,并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物；

[1047] (b)通过以下标记修饰的抗体或其片段：

[1048] 在式(L)的化合物存在下,孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶,

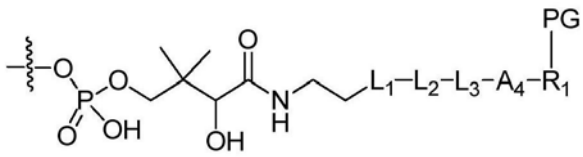
[1049]



式（L）

[1050] 从而将式(L-a)的活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团附着到短肽标签；

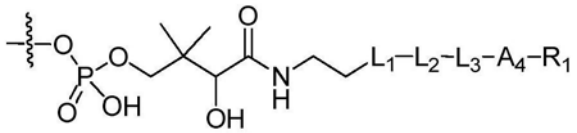
[1051]



[1052] 式（L-a）

[1053] (c)使被保护的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团脱保护,以得到式(G-a)的活化的4'-磷

酸泛酰巯基乙胺基团

[1054] 

式（G-a）

[1055] 和

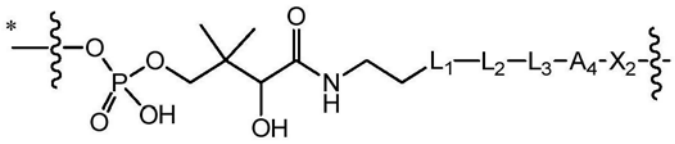
[1056] (d)使活化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团与式(II-g)的化合物反应：

[1057] X-TG

[1058] 式(II-g)

[1059] 其中,PG是保护基团,X,R_1,R_2,L_1,L_2,L_3,L_4和TG如文中所定义。

[1060] 方案(IIId)的三步法的结果是,末端基团通过具有根据式(II-h)结构的接头附着到修饰的抗体或其片段：

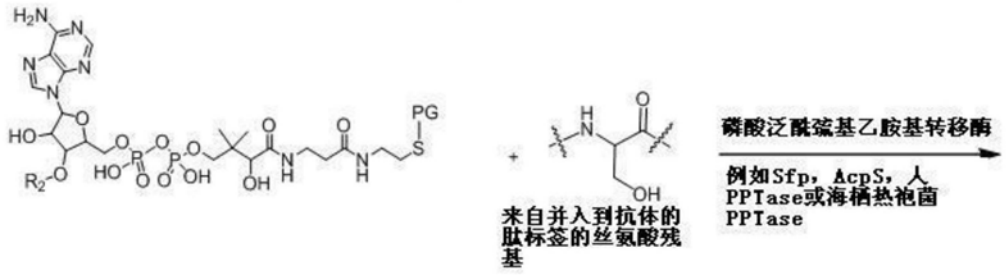
[1061] 

式（II-h）

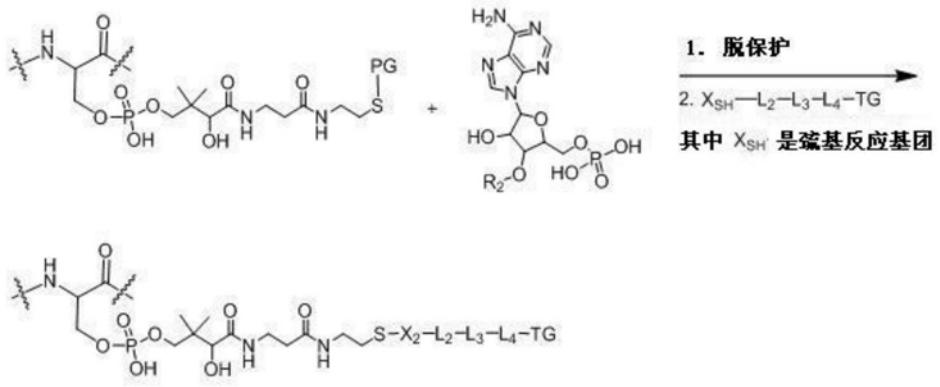
[1062] 其中L_1,L_2,L_3,A_4和X_2如文中定义,*指修饰的4'磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签。

[1063] 方案(IIIe)显示三步法的某实施方案,其中通过CoA类似物位点特异性地标记文中提供的修饰的抗体或其片段,其中所述CoA类似物的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基辅基的巯基被保护。在第一步骤中,被保护的CoA类似物与改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸残基反应,从而通过与短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基基团形成磷酸二酯键将含有被保护的巯基的辅基附着至短肽标签。在第二步骤中,移除巯基保护基团,将得到的具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团侧基的修饰的抗体或其片段与连接末端基团(TG)的巯基反应性基团反应。

[1064] 方案(IIIe)



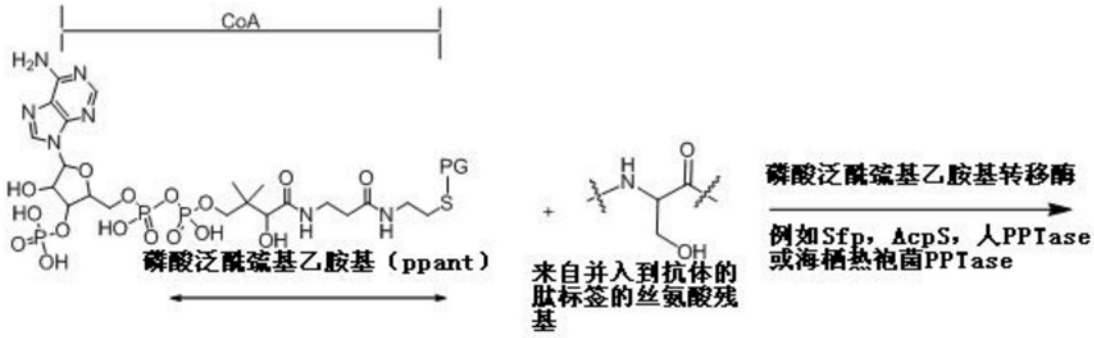
[1065]



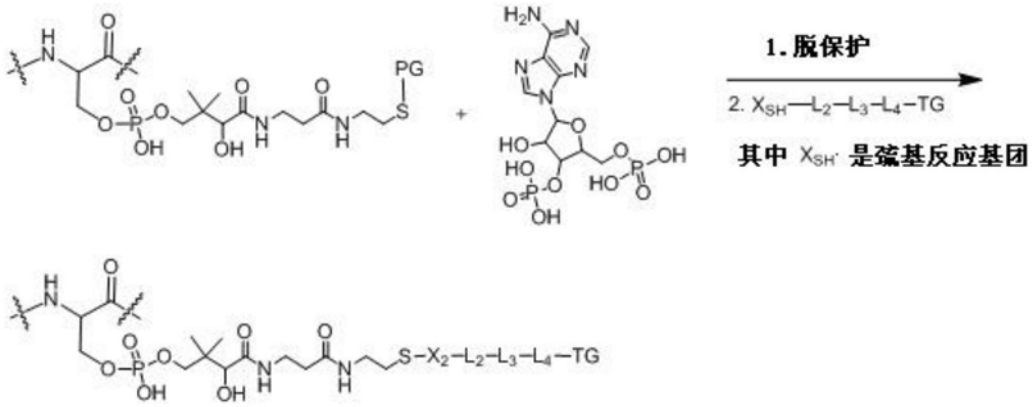
[1066] 其中X_{SH},保护基团(PG),R_2,A_2,L_3,L_4和TG如文中定义。

[1067] 方案(IIIf)显示三步法的某实施方案,其中使用CoA位点特异性地标记文中提供的修饰的抗体或其片段,其中CoA的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基辅基的巯基被保护。在第一步骤中,被保护的CoA与改造到抗体中的短肽标签的保守丝氨酸反应,从而通过与短肽标签的保守丝氨酸残基的羟基基团形成磷酸二酯键将含有被保护的巯基的辅基附着至短肽标签。在第二步骤中,移除巯基保护基团,将得到的具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团侧基的修饰的抗体或其片段与连接末端基团(TG)的巯基反应性基团反应。

[1068] 方案(IIIf)



[1069]



[1070] 其中X_{SH},保护基团(PG),R_2,A_2,L_3,L_4和TG如文中定义。

[1071] 在方案(IIIe)和方案(IIIf)的三步法中,巯基保护基团包括但不限于,乙酰基,乙酰氨基甲基,苄基,4-甲基苄基,4-甲氧基苄基,三苯甲基,甲氧基三苯甲基,叔丁基,叔丁基巯基和3-硝基-2-吡啶磺酰基(3-nitro-2-pyridinesulphenyl)。方案(IIIe)和方案(IIIf)的巯基反应性基团包括但不限于,马来酰亚胺,卤代乙酰,卤代乙酰胺,吡啶二硫化物和乙烯基砜。

[1072] 方案(IIIf)的三步法包括以下步骤:

[1073] (a)提供修饰的抗体或其片段,其已被改造以包含短肽标签,并且其中所述肽标签是具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶的底物;

[1074] (b)通过如下标记修饰的抗体或其片段:

[1075] (i)在巯基被保护的辅酶A存在下,孵育修饰的抗体或其片段和具有4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶活性的酶,从而将辅酶A巯基被保护的辅基附着到短肽标签;

[1076] (ii)使巯基脱保护,从而形成具有巯基侧基的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团,

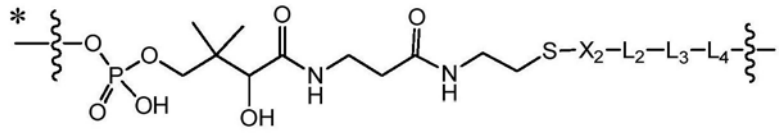
[1077] 和

[1078] (iii)使4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团的巯基侧基与式(IIIf)的化合物反应:

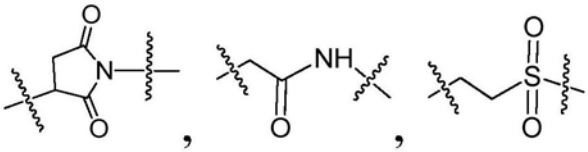
[1079] X_{SH}-L_2-L_3-L_4-TG

[1080] 式(IIIf)。

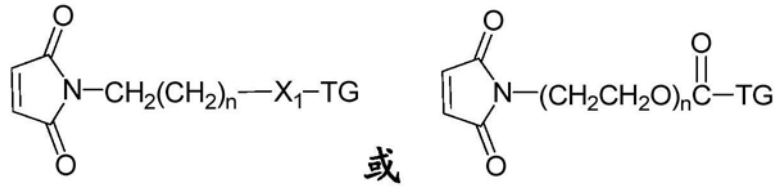
[1081] 其中X_{SH}是巯基反应性基团,包括但不限于,马来酰亚胺,卤代乙酰,卤代乙酰胺,吡啶二硫化物和乙烯基砜。A_2,L_3,L_4和TG如本文所定义。此外,在方案(IIf)的两步法中,末端基团通过具有根据式(III-a)结构的接头附着到修饰的抗体或片段:

[1082] 

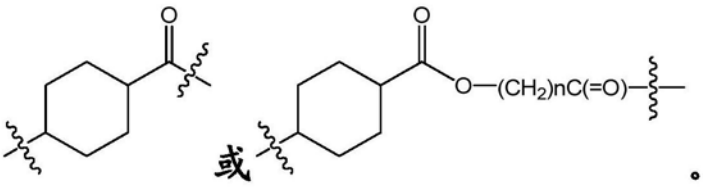
式（III-a）

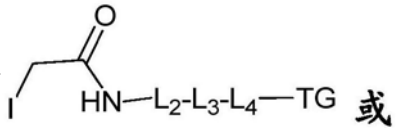
[1083] *指4'-磷酸泛酰巯基乙胺基部分附着到小肽标签，并且L_2，L_3，L_4和TG如文中定义。在该实施方案中，X_2是由X_{SH}和巯基侧基反应形成的基团，包括但不局限于，和-S-S-。

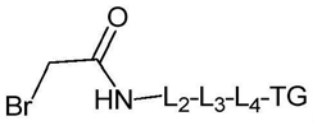
[1084] 在某些实施方案，X_{SH}-L_2-L_3-L_4-TG是

[1085] 

[1086] 其中：

[1087] X_1是键，-C（=O）-，-NH-，-NHC（=O）-，-（C（=O）NH（CH_2）$_n$）$_m$-，。

[1088] 在其它实施方案，X_{SH}-L_2-L_3-L_4-TG是或

[1089] 。

[1090] 在本文中所描述的三步法的某些实施方案中，修饰的抗体或其片段与具有式(H)，式(J)，式(K)或式(L)结构的化合物和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触，所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶与表达的修饰的抗体或其片段的在相同的细胞中共同表达。在本文所描述的两步法的某些实施方案中，修饰的抗体或其片段在细胞培养基中与具有式(H)，式(J)，式(K)或式(L)结构的化合物和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触，所述4'磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶在相同的或另一个细胞中共同表达。在文中所描述的两步法的某些实施方案中，4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶被固定在固体支持物上。在某些实施方案中，固体支持物任选地由珠子或柱上的聚合物构成。

[1091] 在三步法的某些实施方案，修饰的抗体或其片段将与在相同细胞中共表达的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触。在三步法的某些实施方案中，巯基被保护的辅酶A是乙酰辅酶A。在三步法的某些实施方案，修饰的抗体或其片段在细胞培养基中与在相同的或另一

个细胞中共表达的巯基被保护的辅酶A和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触。在三步法的某些实施方案,4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶固定在固体支持物上。所述固体支持物可任选由在珠子或柱上的聚合物构成。

[1092] 在本文所描述的一步法,二步法或三步法的某些实施方案,取决于所使用的方法,修饰的抗体或其片段与具有式(A),式(B),式(C),式(D),式(E),式(F),式(G),式(H),式(J),式(K)或式(L)的结构的化合物,和4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶接触,所述接触在温度为0至37摄氏度之间,在pH值调节到3至10之间,优选在7至9之间,最优选大约8的缓冲液或培养基中进行,反应时间为5分钟至48小时之间。

[1093] 在本文所描述的一步法,二步法或三步法的某些实施方案,取决于所使用的方法,修饰的抗体或其片段与具有式(A),式(B),式(C),式(D),式(E),式(F),式(G),式(H),式(J),式(K)或式(L)结构的化合物在4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶存在的情况下在溶液中接触。在本文所描述的一步法,二步法或三步法的其它实施方案,取决于所使用的方法,修饰的抗体或其片段与具有式(A),式(B),式(C),式(D),式(E),式(F),式(G),式(H),式(J),式(K)或式(L)结构的化合物在4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶存在的情况下在细胞培养基中接触。在本文所描述的一步法,二步法或三步法的某些实施方案,取决于所使用的方法,修饰的抗体或其片段与具有式(A),式(B),式(C),式(D),式(E),式(F),式(G),式(H),式(J),式(K)或式(L)结构的化合物在4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶存在的情况下在细胞内接触。

[1094] 在本文所描述的一步法,二步法或三步法的某些实施方案,取决于所使用的方法,修饰的抗体或其片段与具有式(A),式(B),式(C),式(D),式(E),式(F),式(G),式(H),式(J),式(K)或式(L)结构的化合物在4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶存在的情况下接触,其中所述4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶固定于表面。在某些实施方案中,所述表面是聚合物珠子。

[1095] 在本文所描述的一步法,二步法或三步法的某些实施方案,取决于所使用的方法,修饰的抗体或其片段与具有式(A),式(B),式(C),式(D),式(E),式(F),式(G),式(H),式(J),式(K)或式(L)结构的化合物在4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶存在的情况下接触,其中所述修饰的抗体或其片段固定于表面。在某些实施方案中,所述表面是聚合物珠子。

[1096] 在某些实施方案,本文提供的修饰的抗体或其片段以1,2,3,4,5,6,7或8的末端基团(“TG”)对抗体比进行标记,其中修饰的抗体或其片段包含位于抗体的结构环中的1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个或8个短肽标签,并且其中短肽标签为以下酶的底物:Sfp4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,AcpS 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,海栖热袍菌4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,热纤维梭菌(C.thermocellum)4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,人4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,或其突变体形式。例如,通过缀合末端基团与四个拷贝的插入的S6标签,或缀合末端基团与四个拷贝的插入的ybbR标签,或缀合末端基团与四个拷贝的插入的A1标签,或缀合末端基团与两个拷贝的插入的S6标签和两个拷贝的插入的ybbR标签的组合来实现TG对抗体比为4。在某些实施方案,使用两个不同的肽标签和两个不同的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,以两种不同的末端基团标记本文提供的修饰的抗体或其片段。作为例子,使用AcpS 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶将两个拷贝的A1标签缀合至第一末端基团。然后使用Sfp4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶将第二末端基团附着到两个拷贝的S6标

签(参见,例如,Zhou等人,ACS Chem.Biol.2:337-346,2007)。

[1097] 在某些实施方案,本文提供的修饰的抗体或其片段以1,2,3,4,5,6,7或8的末端基团(TG)对抗体比(如DAR)进行标记,其中修饰的抗体或其片段包含位于抗体的结构环中的1个,2个,3个,4个,5个,6个,7个或8个短肽标签,并且其中短肽标签为以下酶的底物:Sfp4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,AcpS 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,海栖热袍菌4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,热纤维梭菌4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,人4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,或其突变体形式。例如,通过缀合药物部分与四个拷贝的插入的S6标签,或缀合药物部分与四个拷贝的插入的ybbR标签,或缀合药物部分与四个拷贝的插入的A1标签,或缀合药物部分与两个拷贝的插入的S6标签和两个拷贝的插入的ybbR标签的组合来实现TG对抗体比为4。在某些实施方案,使用两个不同的肽标签和两个不同的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,以两种不同的药物部分标记本文提供的修饰的抗体或其片段。作为例子,使用AcpS 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶将两个拷贝的A1标签缀合至第一药物部分。然后使用Sfp 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶将第二药物部分附着到两个拷贝的S6标签(参见,例如,Zhou等人,ACS Chem.Biol.2:337-346,2007)。

[1098] 3.Fc区框架的其他改造

[1099] 本发明提供经位点特异性标记的免疫缀合物。本发明的免疫缀合物可以包含修饰的抗体或其片段,所述修饰的抗体或其片段例如在V_H和/或V_L内进一步包含对框架区残基的修饰,以改善抗体的性质。通常,这种框架区修饰是为了降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是使一个或多个框架区残基"返回突变"为相应的种系序列。更具体地,已经进行体细胞突变的抗体可能包含与该抗体所来源的种系序列不同的框架残基。此类残基可以通过比较抗体框架区序列与该抗体所来源的种系序列来鉴定。为了使框架区序列返回其种系构型,可以例如,通过位点定向诱变使体细胞突变"返回突变"至种系序列。这样的"返回突变"的抗体也意在被本发明所涵盖。

[1100] 另一种类型的框架修饰涉及突变框架区内,或者甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基,以除去T细胞表位,从而降低抗体的潜在免疫原性。这种方法也被称为"去免疫化",并由Carr等人在美国专利公开号20030153043中进一步详细地说明。

[1101] 除了框架区或CDR区内进行的修饰以外,或者框架区或CDR区内进行的修饰备选的,本发明的抗体可被改造以包括Fc区内的修饰,通常改变抗体的一种或多种功能性质,如血清半衰期,补体固定,F_c受体结合,和/或抗原依赖的细胞毒性。此外,本发明的抗体可以被化学修饰(例如,一个或多个化学部分可以附着到抗体上),或者被修饰以改变其糖基化,再次以改变该抗体的一种或多种功能性质。这些实施方案的每种将在下面进一步详细描述。

[1102] 在一个实施方案中,CH1的铰链区被修饰,使得铰链区中的半胱氨酸残基数目改变,例如增加或减少。该方法进一步由Bodmer等人在美国专利号5,677,425中描述。例如,CH1的铰链区中半胱氨酸残基数量被改变,以促进轻链和重链的装配,或提高或降低抗体的稳定性。

[1103] 在另一个实施方案中,对抗体的Fc铰链区进行突变,以降低该抗体的生物半寿期。更具体地,将一个或多个氨基酸突变引入Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区域,使得该抗体相对于天然Fc-铰链结构域SpA结合,具有受损的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合。这种方法

更详细地在Ward等人的美国专利号6165745中描述。

[1104] 在其他实施方案中，通过用不同的氨基酸残基替换至少一个氨基酸残基改变Fc区，以改变该抗体的效应功能。例如，可以用不同的氨基酸残基替换一个或多个氨基酸，使得该抗体具有改变的对效应子配体的亲和性，但保留亲本抗体的抗原结合能力。其亲和性被改变的效应子配体可以是，例如，Fc受体或补体的C1成分。这种方法例如，由Winter等人的美国专利号5,624,821和5,648,260描述。

[1105] 在另一个实施方案，选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基替换，使得该抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消失的补体依赖的细胞毒性(CDC)。这种方法被描述在，例如，Idusogie等人的美国专利号6,194,551中。

[1106] 在另一个实施方案中，改变一个或多个氨基酸残基，从而改变抗体固定补体的能力。这种方法，例如，在Bodmer等人的PCT公开WO94/29351中描述。在具体实施方案中，本发明的抗体或其片段的一个或多个氨基酸被一个或多个同种异型氨基酸残基替换，如在图4中所示的IgG1亚类和κ同种型的那些同种异型氨基酸残基。同种异型氨基酸残基还包括但不限于，Jefferis等人，MAbs.1:332-338(2009)所描述的IgG1，IgG2和IgG3亚类的重链恒定区以及κ同种型的轻链恒定区。

[1107] 在又一个实施方案中，通过修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区，以增加抗体介导抗体依赖的细胞毒性(ADCC)的能力和/或增加抗体对Fcγ受体的亲和性。这种方法在，例如，Presta的PCT公开WO00/42072中说明。此外，已经对人IgG1上FcγRl，FcγRII，FcγRIII和FcRn的结合位点进行作图，并且已描述了具有改善的结合的变体(参见Shields等人，J.Biol.Chem.276:6591-6604,2001)。

[1108] 在另一个实施方案中，修饰抗体的糖基化。例如，可制成aglycosylated抗体(即，抗体缺乏糖基化)。例如，可以改变糖基化，以增加抗体对“抗原”的亲和性。这样的碳水化合物修饰可以通过以下方式实现，例如，改变抗体序列内一个或多个糖基化位点。例如，可以进行一个或多个氨基酸取代，导致一个或多个可变区框架糖基化位点的消除，从而在该位点消除糖基化。这样的aglycosylation可以增加抗体对抗原的亲和性。这样的方法描述于，例如，Co等人的美国专利号5,714,350和6,350,861中。

[1109] 另外地或备选地，可以制备具有糖基化类型改变的抗体，例如具有岩藻糖基残基数量降低的低岩藻糖基化(hypofucosylated)抗体或具有增加的等分GlcNac结构的抗体。已显示这种改变的糖基化模式增加抗体的ADCC能力。这样的碳水化合物修饰可以通过，例如，在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体实现。具有改变的糖基化机制的细胞在本领域中已有描述，并且可以用作宿主细胞，在其中表达本发明的重组抗体，从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如，Hang等人的EP1,176,195描述了具有被功能破坏的FUT8基因的细胞系，该FUT8基因编码岩藻糖基转移酶，从而使得在这样的细胞系中表达的抗体表现出低岩藻糖基化。Presta的PCT公开WO 03/035835描述了变体CHO细胞系，Lecl3细胞，所述细胞系具有降低的将岩藻糖附着至Asn(297)-连接的碳水化合物的能力，也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(也参见Shields等人，(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开WO99/54342描述了被改造以表达糖蛋白修饰的糖基转移酶的细胞系(例如，β(1,4)-N-乙酰葡糖氨基转移酶III(GnTIII))，使得在该改造的细胞系中表达的抗体表现出增加的等分GlcNac结构，这导致抗体的ADCC活性增加(也见Umana等人，

Nat.Biotech.17:176-180,1999)。

[1110] 在另一个实施方案中,修饰抗体以增加其生物半寿期。多种方法都是可能的。例如,如在Ward的美国专利号6,277,375中描述的,可以引入一个或多个下列突变:T252L,T254S,T256F。备选地,为了增加生物半寿期,抗体可以在CH1或C_L区内改变以含有取自IgG Fc区的CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利号No.5,869,046和6,121,022所述。

[1111] 4.抗体缀合物

[1112] 本发明提供位点特异性标记方法,修饰的抗体和其片段,和由此制备的免疫缀合物。使用本发明的方法,修饰的抗体或其片段可缀合到标签,如药物部分,例如,抗肿瘤剂,自身免疫治疗剂,抗炎剂,抗真菌剂,抗细菌剂,抗寄生虫剂,抗病毒剂,或麻醉剂。还可以使用多个相同或不同的标记部分结合本发明的方法与其它缀合方法缀合抗体或其片段。

[1113] 在某些实施方案中,本发明免疫缀合物的末端基团选自V-ATPase抑制剂,HSP90抑制剂,IAP抑制剂,mTOR抑制剂,微管稳定剂,微管去稳定剂,阿里他汀,多拉司他汀,类美登素,MetAP(甲硫氨酸胺基肽酶),蛋白质CRM1核输出抑制剂,DPPIV抑制剂,蛋白酶抑制剂,线粒体中的磷酰基转移反应的抑制剂,蛋白合成抑制剂,激酶抑制剂,CDK2抑制剂,CDK9抑制剂,Eg5抑制剂,HDAC抑制剂,RNA聚合酶抑制剂,DNA损伤剂,DNA烷化剂,DNA嵌入剂,DNA小沟结合物和DHFR抑制剂。

[1114] 此外,本发明的修饰的抗体或抗体片段可缀合到修改给定生物学应答的治疗部分或药物部分。治疗部分或药物部分不被解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物学活性的蛋白质,肽或多肽。此类蛋白质可包括,例如,毒素如相思豆毒素,蓖麻毒素A,假单胞菌外毒素,霍乱毒素,或白喉毒素;蛋白如肿瘤坏死因子,α干扰素,β干扰素,神经生长因子,血小板衍生的生长因子,组织纤溶酶原激活物,细胞因子,细胞凋亡剂,抗血管生成剂,或生物学应答调节剂,如,例如,淋巴因子。

[1115] 在一个实施方案中,本发明的修饰的抗体或抗体片段缀合到治疗部分,如细胞毒素,药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素。细胞毒素的实例包括但不限于,紫杉烷类(见,例如,国际(PCT)专利申请号WO01/38318和PCT/US03/02675),DNA烷基化剂(例如,CC-1065类似物),蒽环霉素类(anthracyclines),tubulysin类似物,duocarmycin类似物,阿里他汀E,阿里他汀F,类美登素,和包括反应性聚乙二醇部分的细胞毒性剂(见,例如,Sasse等人,J.Antibiot.(Tokyo),53,879-85(2000),Suzawa等人,Bioorg.Med.Chem.,8,2175-84(2000),Ichimura等人,J.Antibiot.(Tokyo),44,1045-53(1991),Francisco等人,Blood(2003)(印刷物之前的电子出版物),U.S.专利号5,475,092,6,340,701,6,372,738,和6,436,931,U.S.专利申请公开号2001/0036923A1,待决的U.S.专利申请系列号10/024,290和10/116,053,和国际(PCT)专利申请号WO 01/49698),taxon,细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,吐根碱,丝裂霉素,依托泊苷,替尼泊苷,长春新碱,长春碱,秋水仙碱,阿霉素,柔红霉素,二羟基炭疽菌素二酮,米托蒽醌,光神霉素,放线菌素D,1-去氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗剂还包括,例如抗代谢物(如甲氨蝶呤,6-巯基嘌呤,6-硫鸟嘌呤,阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶达卡巴嗪),消融剂(如氮芥,三胺硫磷苯丁酸氮芥(thioepa chloraxnbucil),美法仑(meiphalan),卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU),环磷酰胺,白消安,二溴甘露醇,链脲霉素,丝裂霉素C和顺-二氯

二胺铂(II)(DDP)顺铂,蒽环霉素类(如柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星),抗生素(如更生霉素(以前称为放线菌素),博来霉素,光神霉素,和氨茴霉素(AMC)),以及抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春碱)(参见例如,Seattle Genetics US20090304721)。

[1116] 可缀合到本发明的修饰抗体或抗体片段的治疗性细胞毒素的其它实例包括倍癌霉素(duocarmycin),刺孢霉素,类美登素和阿里他汀和它们的衍生物。刺孢霉素抗体缀合物的实例是可商购的(Mylotarg™;Wyeth-Ayerst)。

[1117] 关于细胞毒素的类型,用于缀合治疗剂与抗体的接头和方法的进一步讨论,也参见Saito等人,(2003)Adv.Drug Deliv.Rev.55:199-215;Trail等人,(2003)Cancer Immunol.Immunother.52:328-337;Payne,(2003)Cancer Cell 3:207-212;Allen,(2002)Nat.Rev.Cancer 2:750-763;Pastan和Kreitman,(2002)Curr.Opin.Investig.Drugs 3:1089-1091;Senter和Springer,(2001)Adv.Drug Deliv.Rev.53:247-264。

[1118] 根据本发明,修饰的抗体或其片段还可以缀合到放射性同位素,以产生细胞毒性的放射性药物,称为放射性免疫缀合物。可缀合用于诊断或治疗的抗体的放射性同位素的例子包括但不限于,碘^{131},铟^{111},钇^{90}和镥^{177}。用于制备放射性免疫缀合物的方法是本领域确立的。放射性免疫缀合物的例子是市售的,包括Zevalin™(DEC Pharmaceuticals)和Bexxar™(Corixa Pharmaceuticals),并且使用本发明的抗体,相似的方法可以用于制备放射性免疫缀合物。在某些实施方案中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N″,N‴-四乙酸(DOTA),其可通过接头分子附着到抗体上。此类接头分子是本领域公知的,并且描述在Denardo等人,(1998)Clin Cancer Res.4(10):2483-90;Peterson等人,(1999)Bioconjug.Chem.10(4):553-7;和Zimmerman等人,(1999)Nucl.Med.Biol.26(8):943-50,各文献通过整体引用作为参考。

[1119] 本发明还提供了修饰的抗体或其片段,所述修饰的抗体或其片段特异性结合缀合异源蛋白质或多肽(或其片段,优选为至少10个,至少20个,至少30个,至少40个,在至少50,至少60,至少70,至少80,至少90或至少100个氨基酸的多肽)的抗原,以产生融合蛋白。特别地,本发明提供融合蛋白,其包含本文所述的抗体片段(例如,Fab片段,Fd片段,Fv片段,F(ab)2片段,V_H结构域,V_H CDR,V_L结构域或V_L CDR)和异源蛋白质,多肽或肽。

[1120] 额外的融合蛋白可通过基因改组,基序改组,外显子改组和/或密码子改组(统称为"DNA改组")的技术产生。DNA改组可用于改变本发明的抗体或其片段的活性(例如,抗体或其片段具有更高的亲和力和更低的解离速率)。大体参见美国专利号5605793,5811238,5830721,5834252和5837458。Patten等人,(1997)Curr.Opinion Biotechnol.8:724-33;Harayama,(1998)Trends Biotechnol.16(2):76-82;Hansson等人,(1999)J.Mol.Biol.287:265-76;和Lorenzo和Blasco,(1998)Biotechniques24(2):308-313(这些专利和出版物中的每个在此通过引用将其整体并入本文)。抗体或其片段,或编码的抗体或其片段,可以在重组前通过接受通过易错PCR,随机核苷酸插入或其它方法的随机诱变改变。编码特异性结合抗原的抗体或其片段的多核苷酸可以与一种或多种异源分子的一个或多个组分,基序,区段,部分,结构域,片段等重组。

[1121] 此外,本发明的修饰的抗体或其片段可缀合于标记物序列,如肽,以促进纯化。在优选的实施方案中,标记物氨基酸序列是六组氨酸肽(SEQ ID NO:1106),如pQE载体中提供的标签(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,CA,91311),特别地,其中许多是市售

的。如Gentz等人,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-824中描述的,例如,六组氨酸(SEQ ID NO:1106)提供了融合蛋白的方便纯化。其它对纯化有用的肽标签包括但不限于,血凝素("HA")标签,其对应于来自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,(1984)Cell 37:767),和"FLAG"标签(A.Einhauer等人,J.Biochem.Biophys.Methods 49:455-465,2001)。根据本发明,抗体或抗体片段也可缀合于肿瘤穿透肽,以增强它们的效力。

[1122] 在其它实施方案中,本发明的修饰的抗体或抗体片段缀合至诊断或检测剂。此类免疫缀合物可以用于监测或预后疾病或病症的发生,发展,进展和/或严重性,作为临床测试程序的一部分,例如确定特定治疗的效果。这样的诊断和检测可通过偶联抗体与可检测的物质完成,可检测的物质包括但不限于,多种酶,如但不限于辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,β半乳糖苷酶,或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如,但不限于链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光材料,如但不限于Alexa Fluor350,Alexa Fluor405,Alexa Fluor430,Alexa Fluor488,Alexa Fluor500,Alexa Fluor514,Alexa Fluor532,Alexa Fluor546,Alexa Fluor555,Alexa Fluor568,Alexa Fluor594,Alexa Fluor 610,Alexa Fluor633,Alexa Fluor647,Alexa Fluor660,Alexa Fluor680,Alexa Fluor700,Alexa Fluor750,伞形花内酯(umberlliferone),荧光素,异硫氰酸荧光素,罗丹明,二氯三嗪基胺荧光素,丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,例如,但不限于,鲁米诺;生物发光物质,例如但不限于,荧光素酶,萤光素和水母素;放射性物质,例如但不限于碘(^{131}I,^{125}I,^{123}I,和^{121}I),碳(^{14}C),硫(^{35}S),氚(^{3}H),铟(^{115}In,^{113}In,^{112}In,和^{111}In),锝(^{99}Tc),铊(^{201}Ti),镓(^{68}Ga,^{67}Ga),钯(^{103}Pd),钼(^{99}Mo),氙(^{133}Xe),氟(18F),^{153}Sm,^{177}Lu,^{159}Gd,^{149}Pm,^{140}La,^{175}Yb,^{166}Ho,^{90}Y,^{47}Sc,^{186}Re,^{188}Re,^{142}PR,^{105}Rh,^{97}Ru,^{68}Ge,^{57}Co,^{65}Zn及其,^{85}Sr,^{32}P,^{153}Gd,^{169}Yb,^{51}Cr,^{54}Mn,^{75}Se,^{64}Cu,^{113}Sn和^{117}Sn;以及使用多种正电子发射X线断层摄影术的正电子发射金属,和非放射性顺磁金属离子。

[1123] 本发明的修饰的抗体或抗体片段也可以附着到固体支持物,所述固体支持物对于免疫测定或靶抗原的纯化特别有用。此类固体支持物包括,但不限于,玻璃,纤维素,聚丙烯酰胺,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯或聚丙烯。

[1124] 5.药物组合物

[1125] 为了制备包括免疫缀合物的药物或无菌组合物,本发明的免疫缀合物与可药用的运载体或赋形剂混合。组合物可以另外含有一种或多种其它适用于治疗或预防癌症(乳腺癌,结肠直肠癌,肺癌,多发性骨髓瘤,卵巢癌,肝癌,胃癌,胰脏癌,急性髓性白血病,慢性髓性白血病,骨肉瘤,鳞状细胞癌,周围神经鞘瘤许旺氏细胞瘤,头和颈癌,膀胱癌,食道癌,巴雷特食管癌,胶质母细胞瘤,软组织的透明细胞肉瘤,恶性间皮瘤,神经纤维瘤,肾癌,黑色素瘤,前列腺癌,良性前列腺增生(BPH),gynacomastica,和子宫内膜异位症)的治疗剂。

[1126] 治疗剂和诊断剂的制剂可通过与生理上可接受的运载体,赋形剂或稳定剂混合制备成如冻干粉末,浆液,水性溶液,洗剂或悬浮液的形式(见,例如,Hardman等人,Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,McGraw-Hill,New York,N.Y.,2001;Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott,Williams,and Wilkins,New York,N.Y.,2000;Avis,等人(编辑),Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications,Marcel Dekker,NY,1993;Lieberman,等人(编辑),Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets,Marcel Dekker,NY,1990;Lieberman,等人(编

辑)Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems,Marcel Dekker,NY,1990;Weiner and Kotkoskie,Excipient Toxicity and Safety,Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,2000)。

[1127] 选择用于治疗的施用方案取决于几个因素,包括实体的血清或组织转化率,症状的水平,实体的免疫原性,和生物基质中靶细胞的可接近性。在某些实施方案中,施用方案最大化递送给患者的治疗量与可以接受的副作用水平一致。因此,生物制剂递送的量部分取决于特定实体和治疗的病症的严重程度。选择合适剂量的抗体,细胞因子,小分子的指南是可获得的(例如,见Wawrzynczak,Antibody Therapy,Bios Scientific Pub.Ltd,Oxfordshire,UK,1996;Kresina(编辑),Monoclonal Antibodies,Cytokines and Arthritis,Marcel Dekker,New York,N.Y.,1991;Bach(编辑),Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases,Marcel Dekker,New York,N.Y.,1993;Baert等人,New Engl.J.Med.348:601-608,2003;Milgrom等人,New Engl.J.Med.341:1966-1973,1999;Slamon等人,New Engl.J.Med.344:783-792,2001;Beniaminovitz等人,New Engl.J.Med.342:613-619,2000;Ghosh等人,New Engl.J.Med.348:24-32,2003;Lipsky等人,New Engl.J.Med.343:1594-1602,2000)。

[1128] 适当剂量的确定由临床医生进行,例如使用本领域已知的或怀疑的影响治疗或预测到会影响治疗的参数或因子。通常,剂量以稍微低于最佳剂量的量开始,其后通过小增量增加,直到相对于任何副作用获得了期望的或最优效果。重要的诊断测量包括,例如,炎症症状或产生的炎性细胞因子水平。

[1129] 在本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变,以获得有效实现对于特定患者,组合物和施用模式的期望的治疗应答,而对患者不具有毒性的活性成分的量。所选择的剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因子,包括本发明所采用的特定组合物的活性,或其酯,盐或酰胺的活性,所使用的特定化合物的施用途径,施用时间,排泄的速率,治疗的持续时间,与采用的特定组合物组合使用的其他药物,化合物和/或材料,被治疗的患者的年龄,性别,体重,状况,一般健康和之前的医疗史,和如在医学领域中已知的因素。

[1130] 包含本发明的抗体或其片段的组合物可以通过连续输注或通过间隔剂量来提供,所述间隔例如,一天,一周,或每周1-7次。可静脉内,皮下,局部,口腔,鼻,直肠,肌肉内,大脑内,或通过吸入提供剂量。具体的剂量方案是涉及最大剂量或剂量频率,避免显著不期望的副作用的方案。

[1131] 对于本发明的免疫缀合物,施用给患者的剂量可为0.0001mg/kg至100mg/kg患者体重。该剂量可为0.0001mg/kg至20mg/kg,0.0001mg/kg至10mg/kg,0.0001mg/kg至5mg/kg,0.0001至2mg/kg,0.0001至1mg/kg,0.0001mg/kg至0.75mg/kg,0.0001mg/kg至0.5mg/kg,0.0001mg/kg至0.25mg/kg,0.0001至0.15mg/kg,0.0001至0.10mg/kg,0.001至0.5mg/kg,0.01至0.25mg/kg或0.01至0.10mg/kg患者体重。本发明的抗体或其片段的剂量可以使用患者体重(千克(kg))乘以待施用剂量(mg/kg)来计算。

[1132] 本发明的免疫缀合物的剂量可重复,施用可以间隔至少1天,2天,3天,5天,10天,15天,30天,45天,2个月,75天,3个月,或至少6个月。在具体实施方案,本发明的免疫缀合物每3周重复。

[1133] 对于特定患者的有效剂量可以依据各种因素而不同,如治疗的病症,患者的总体

健康，施用方法的途径和剂量和副作用的严重性(参见，例如Maynard等人，A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice,Interpharm Press,Boca Raton,Fla.,1996;Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice,Urch Publ.,London,UK,2001)。

[1134] 施用途径可以通过，例如，局部或皮肤应用、静脉内、腹膜内、脑内、肌肉内、眼内、动脉内、脑脊髓内、病灶内注射或输注、或通过缓释系统或植入物施用(见，例如，Sidman等人,Biopolymers 22:547-556,1983;Langer等人,J.Biomed.Mater.Res.15:167-277,1981; Langer,Chem.Tech.12:98-105,1982;Epstein等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:3688-3692,1985;Hwang等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030-4034,1980;美国专利号6,350,466和6,316,024)。在必要时，组合物还可以包括溶解剂和局部麻醉剂如利多卡因，以减轻注射部位的疼痛。此外，也可以采用肺施用，例如，通过使用吸入器或喷雾器，和具有雾化剂的制剂。参见，例如，美国专利号6,019,968,5,985,320,5,985,309,5,934,272,5,874,064, 5,855,913,5,290,540和4,880,078;和PCT公开号WO 92/19244,WO 97/32572,WO 97/44013,WO 98/31346和WO 99/66903，各文献在此通过引用其全部内容并入本文。

[1135] 还可以使用本领域多种已知方法的一种或多种，通过一个或多个施用途径施用本发明的组合物。如本领域技术人员理解的，施用途径和/或模式将取决于期望的结果。选择的用于本发明的免疫缀合物的施用途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其它肠胃外施用途径，例如通过注射或输注。肠胃外施用可代表除肠和局部施用以外的施用模式，通常通过注射，并且包括但不限于，静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。备选地，本发明的组合物可通过非胃肠外途径施用，如局部、表皮或粘膜途径施用，例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部施用。在一个实施方案中，本发明的免疫缀合物经输注施用。在另一个实施方案，本发明的免疫缀合物是皮下施用。

[1136] 如果本发明的免疫缀合物在控释或持续释放系统中施用，可以使用泵以实现受控或持续释放(参见Langer，见上文;Sefton,CRC Crit.Ref Biomed.Eng.14:20,1987; Buchwald等人,Surgery 88:507,1980;Saudek等人,N.Engl.J.Med.321:574,1989)。可使用聚合物材料实现本发明疗法的受控或持续释放(见，例如Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编辑),CRC Pres.,Boca Raton,Fla.,1974; Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball(编辑)，Wiley，New York，1984；Ranger和Peppas，J.Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61,1983;还参见Levy等人,Science 228:190, 1985;During等人,Ann.Neurol.25:351,1989;Howard等人,J.Neurosurg.71:105,1989;美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公布号WO 99/15154;和PCT公布号WO 99/20253)。用于持续释放制剂中的聚合物的例子包括但不限于，聚(2-羟基乙基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酐、聚(N-乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交酯(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在一个实施方案，持续释放制剂中使用的聚合物是惰性的，不含可滤取的杂质，稳定储存，无菌和可生物降解。受控或持续释放系统可以放置在预防或治疗靶附近，从而仅仅需要全身剂量的一部分(参见，例如，Goodson,in Medical

Applications of Controlled Release,见上文,vol.2,第115-138页,1984)。

[1137] 在Langer,Science 249:1527-1533,1990的综述中讨论了控释系统。本领域技术人员已知的任何技术可以被用于产生包含本发明的一种或多种免疫缀合物的持续释放制剂。参见,例如,美国专利号4,526,938,PCT公布WO 91/05548,PCT公布WO 96/20698,Ning等人,Radiotherapy&Oncology 39:179-189,1996;Song等人,PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology 50:372-397,1995;Cleek等人,Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854,1997;和Lam等人,Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-760,1997,各文献整体引入本文作为参考。

[1138] 如果本发明的免疫缀合物局部施用,其可以以软膏、乳膏、经皮贴剂、洗剂、凝胶、洗发剂、喷雾剂、气雾剂、溶液、乳剂、或本领域技术人员公知的其它形式配制。见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms,第19版,Mack Pub.Co.,Easton,Pa.(1995)。对于非喷雾的局部剂型,通常采用粘性到半固体或固体形式,其包括运载体或一种或多种与局部应用相容的赋形剂且在一些情况下,具有大于水的动态粘度。合适的制剂包括但不限于,溶液、悬剂、乳剂、乳膏、软膏、粉剂、擦剂、药膏等,如果需要,它们是灭菌的或与用于影响多种性质,如,例如,渗透压的助剂(例如防腐剂、稳定剂、润湿剂、缓冲剂或盐)混合。其他合适的局部剂型包括可喷雾的气溶胶制剂,其中在某些情况下,活性成分与固体或液体惰性运载体组合,与加压挥发物(例如气体推进剂,如氟利昂)混合包装或包装在挤压瓶中。如果需要,保湿剂或湿润剂也可以加到药物组合物和剂型中。此种额外成分的例子是本领域公知的。

[1139] 如果鼻内施用包含免疫缀合物的组合物,其可以配制成气溶胶形式、喷雾剂、雾剂或滴剂形式。特别地,用于根据本发明的预防或治疗剂可以方便地从加压包装或喷雾器,通过使用合适的推进剂(如二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,二氯四氟乙烷,二氧化碳或其它合适的气体)以气溶胶喷雾的形式递送。在加压气溶胶的情况下,可通过提供阀门确定剂量单位,以递送计量的量。用于吸入器或吹入器中的胶囊和药筒(由,例如,明胶构成)可配制成含有化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物)。

[1140] 用于第二治疗剂(如细胞因子,类固醇,化疗剂,抗生素或辐射)的共同施用或治疗的方法在本领域是已知的(见,例如,Hardman等人,(编辑)(2001)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,10.sup.th ed.,McGraw-Hill,New York,N.Y.;Poole和Peterson(编辑)(2001)Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,Pa.;Chabner 和Longo(编辑)(2001)Cancer Chemotherapy and Biotherapy,Lippincott,Williams&Wilkins,Phila.,Pa.)。治疗的治疗有效量可以降低症状至少10%;至少20%;至少约30%;至少40%,或至少50%。

[1141] 可以与本发明的免疫缀合物组合施用的额外的疗法(例如,预防或治疗剂),可以与本发明的免疫缀合物以如下间隔施用:小于5分钟的间隔,小于30分钟的间隔,小于1小时的间隔,约1小时的间隔,约1至约2小时的间隔,约2小时至约3小时的间隔,约3小时至约4小时的间隔,约4小时至约5小时的间隔,约5小时至约6小时的间隔,约6小时至约7小时的间隔,约7小时至约8小时的间隔,约8小时至约9小时的间隔,约9小时至约10小时的间隔,约10小时至约11小时的间隔,约11小时至约12小时的间隔,约12小时至18小时的间隔,18小时至

24小时的相隔，24小时至36小时的间隔，36小时至48小时的间隔，48小时至52小时的间隔，52个小时至60小时的间隔，60小时至72小时的间隔，72小时至84小时的间隔，84小时至96小时的间隔，96小时至120小时的间隔。两个或更多的疗法可在同一次患者就诊内施用。

[1142] 在某些实施方案中，可配制本发明的免疫缀合物以确保在体内的恰当分布。例如，血-脑屏障(BBB)排除许多高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过BBB(如果希望)，例如，可以将它们配制在脂质体中。对于制造脂质体的方法，参见，例如，美国专利号4,522,811;5,374,548和5,399,331。脂质体可包含选择性运输到特定细胞或器官的一个或多个部分，从而增强靶向的药物递送(见，例如，Ranade，(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸和生物素(参见，例如，Low等人的美国专利号5,416,016)；甘露糖苷(Umezawa等人，(1988)Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038)；抗体(Bloeman等人，(1995)FEBS Lett.357:140;Owais等人，(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180)；表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等人，(1995)Am.J.Physiol.1233:134)；p120(Schreier等人，(1994)J.Biol.Chem.269:9090)；还参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)Immunomethods 4:273。

[1143] 本发明提供用于对有需要的对象施用药物组合物的方案，所述药物组合物单独包含本发明的免疫缀合物或与其它疗法的组合。本发明的组合疗法的疗法(如预防剂或治疗剂)可以同时或相继地施用给对象。本发明的组合疗法的疗法(例如，预防剂或治疗剂)也可以周期性施用。周期性疗法包括施用第一疗法(如第一预防剂或治疗剂)一段时间，然后施用第二疗法(例如，第二预防剂或治疗剂)一段时间，并重复该相继施用，即周期，以减少对疗法(例如，活性剂)之一的抗药性形成，从而避免或减少疗法(例如，活性剂)之一的副作用，和/或改善的疗法的功效。

[1144] 本发明的组合疗法的疗法(如预防剂或治疗剂)可以同时施用给对象。

[1145] 术语“同时”并不限于在完全相同的时间施用疗法(如预防剂或治疗剂)，而是意指包含本发明的抗体或其片段的药物组合物以顺序并且在时间间隔内施用给对象，使得本发明的抗体可以与其他疗法一起发挥作用，以提供比以其它方式施用它们增加的益处。例如，各个疗法可以在相同时间或可以在不同时间点以任何顺序相继地施用给对象；然而，如果不是同时施用，则应该在足够接近的时间上施用它们，从而提供所需的治疗或预防效果。每个疗法可以任何适当的形式和通过任何合适的途径单独施用给对象。在多种实施方案中，疗法(如预防剂或治疗剂)以少于15分钟，少于30分钟，少于1小时的间隔，约1小时的间隔，约1小时至约2小时的间隔，约2小时至约3小时的间隔，约3小时至约4小时的间隔，约4小时至约5小时的间隔，约5小时至约6小时的间隔，约6小时至约7小时的间隔，约7小时至约8小时的间隔，约8小时至约9小时的间隔，约9小时至约10小时的间隔，约10小时至约11小时的间隔，约11小时至约12小时的间隔，24小时的间隔，48小时的间隔，72小时的间隔，或1周的间隔施用给对象。在其它实施方案中，两个或更多的疗法(如预防剂或治疗剂)在同一次患者就诊内施用。

[1146] 组合疗法的预防剂或治疗剂可以在相同药物组合物中施用给对象。备选地，组合疗法的预防剂或治疗剂可以在单独的药物组合物中同时施用给对象。预防剂或治疗剂可以通过相同或不同的途径施用至对象。

[1147] 本发明已被充分描述，其由以下实施例和权利要求进一步说明，所述实施例和权

利要求是示例性的，并非意在进一步限制。

实施例

[1148] 实施例1.肽标记的IgG构建体的设计

[1149] 带有肽底物的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)Sfp(PDB ID:2GE1,Koglin等人,(2006)Science 312:273-276)模型的NMR结构的目测检测揭示了S6标签的反应性Ser残基深深插入到酶活性位点，并位于辅酶A的α磷酸酯附近。肽底物采取螺旋-扭结-环的构象，Ser残基在扭结处。基于这些观察，选择了IgG抗体表面的几个环。选择的程序包括以下步骤。首先，我们使用人IgG1B12抗体(PDB ID:1HZH,Saphire等人,(2001)Science 293:1155-1159)作为模板建立了曲妥珠单抗同源物模型。然后，选择具有显著的暴露于溶剂的残基的含量的环，并转化到S6标签环中。

[1150] 为此目的，采用了不同的策略：移植全长肽标签，移植截短的肽标签，和插入(截短的以及全长)。全长ybbR标签移植的一个实例由突变体抗-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A(SEQ ID NO:102)示例，而曲妥珠单抗抗hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L(SEQ ID NO:109)突变体构成截短的S6标签的移植。例如，在突变体抗-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198(SEQ ID NO:113)中使用移植策略的另一种变体，其中残基S190和S191分别突变为甘氨酸和天冬氨酸，G194突变为丝氨酸，T195突变为色氨酸，Q196和T197突变为亮氨酸，并且截短的S6标签RLLN(SEQ ID NO:1060)插入到L197和Y198之间。备选地，截短的和全长肽标签均插入到抗体残基之间的环中。

[1151] 在整个实施例部分，根据免疫球蛋白重链或轻链命名肽标记的抗体，其含有移植的或插入的肽标签。为简单起见，联接的未修饰的重链或轻链不明确提及。例如，抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQID NO:121)是指IgG1，其包含相应的肽标记的重链和联接的未修饰的κ轻链抗-hHER2-LC(SEQ ID NO:1131)，其中X'_5=Ala和X'_6=Val(参见图3)。相反，肽标记的mAb2重链构建体与未修饰的λ轻链mAb2-LC联接(SEQ ID NO:25)。作为另一个例子，抗hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79(SEQ ID NO:30)是指IgG1抗体，其含有与未修饰的Igγ1重链抗hHER2-HC(SEQ ID NO:1130)联接的肽标记的轻链，其中X'_1=Lys，X'_2=Glu,X'_3=Met,以及X'_4=Ala(参见图3)。在将(一个或多个)肽标签插入或移植到抗体的重链或轻链的恒定区中的情况下，仅仅给出恒定区的序列。

[1152] 在所有情况下，肽标签以使得反应性Ser残基在环上或者在环末端附近的方式被绘制于所选择的环上，以便允许更深地放入Sfp酶的活性位点。下一步构建IgG和Sfp酶间的复合物并检测冲突。放弃那些有显著冲突的复合物，并从选择中排除其相应的环。

[1153] 为了系统地将S6和ybbR标签序列插入曲妥珠单抗IgG1恒定区的结构环中，通过目视检查人类IgG1B12抗体(PDB ID:1HZH)的晶体结构，以及通过使用来自MolSoft LLC的程序ICM计算残基的溶剂可及表面面积，选择插入位点。

[1154] 实施例2.肽标记的IgG构建体的生产

[1155] 使用在CMV启动子的控制下的pOG表达载体，在哺乳动物细胞中瞬时表达曲妥珠单抗IgG1的重链和轻链。用标准的分子生物学方法，在多个位置处将用于用4'-磷酸泛酰巯基乙胺基基转移酶标记的肽标签并入曲妥珠单抗IgG1中。用于克隆的所有引物列于表8。

[1156] 使用如之前所描述的PEI方法进行HEK293F细胞的细胞培养和转染(参见,例如Erbacher等人,J Gene Med.,1:210-222(1999))。简而言之,用编码曲妥珠单抗的重链和轻链(人κ同种型)的质粒DNA共转染HEK293F细胞。在5%CO_2、在37℃下,在FreeStyle™293表达培养基中培养哺乳动物细胞,并在转染前一天将细胞分离为$0.7x10^6$个细胞/ml。转染后,在HEK293F细胞培养五天,而后通过在2000×g在4℃离心30分钟收获细胞。

[1157] 将所得的培养基上清液通过0.22μm孔隙尺寸的过滤器过滤。然后将滤液以约1mL/分钟的流速负载到蛋白A亲和性柱上,该柱事先用20倍柱体积的PBS平衡。用20倍柱体积的PBS洗涤该柱后,将用5倍柱体积的0.1M醋酸钠(pH 3.0)洗脱抗体。将洗脱液立即用10%(v/v)的1M Tris/盐酸(pH为10)中和。使用Slide-a-Lyzer透析盒进行透析到PBS中,截断值为3.5或7.0kDa分子量(Pierce)。

[1158] 最终产品的纯度通过SDS-PAGE评估。通过Bradford方法或使用ND-1000UV-Vis分光光度计通过在280nm的紫外光谱测定蛋白质产量。肽标记的妥珠单抗IgG的蛋白产量列于表9。

[1159] 表8.用于构建重组PPTase酶和其突变体、以及具有插入的/移植的肽标签的曲妥珠单抗IgG的引物DNA序列(HC,重链;LC,轻链)

[1160]

序列名称	SEQ ID NO	序列	SEQ ID NO
抗-hHER2-HC-A118-GDSLSWLLRLLN-S119	150	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCAAGGGCCCCAGCG	1061
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAGCCGAGGAGACGGTGACCAG	1062
抗-hHER2-HC-S119-GDSLSWLLRLLN-T120	151	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAAGGGCCCCAGCGTGTTC	1063
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTAGCCGAGGAGACGGTGAC	1064
抗-hHER2-HC-T120-GDSLSWLLRLLN-K121	152	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGGCCCCAGCGTGTTCCC	1065
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCTAGCCGAGGAGACGG	1066
抗-hHER2-HC-S131-GDSLSWLLRLLN-S132	153	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAAGAGCACCAGCGGCGG	1067
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGGAAC	1068
抗-hHER2-HC-S132-GDSLSWLLRLLN-K133	154	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAGCACCAGCGGCGGCAC	1069
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGGGCCAGGGG	1070
抗-hHER2-HC-K133-GDSLSWLLRLLN-S134	155	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCAGCGGCGGCACAG	1071
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	1072
抗-hHER2-HC-S134-GDSLSWLLRLLN-T135	156	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAGCGGCGGCACAGCC	1073
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	1074
抗-hHER2-HC-T135-GDSLSWLLRLLN-S136	157	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCGGCACAGCCGCC	1075
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCTCTTGCTGCTGGGGG	1076
抗-hHER2-HC-S136-GDSLSWLLRLLN-G137	158	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGGCACAGCCGCCCTG	1077
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGCTGGG	1078
抗-hHER2-HC-G137-GDSLSWLLRLLN-G138	159	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCACAGCCGCCCTGGGC	1079
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGC	1080
抗-hHER2-HC-G138-GDSLSWLLRLLN-T139	160	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACAGCCGCCCTGGGCTGC	1081
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGCTGGTGCTCTTG	1082
抗-hHER2-HC-E152-GDSLSWLLRLLN-P153	161	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGTGACCGTGTCCTGGAAC	1083
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGGAAGTAGTCCTTCACC	1084
抗-hHER2-HC-P153-GDSLSWLLRLLN-V154	162	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGACCGTGTCCTGGAACAGCG	1085
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTCGGGGAAGTAGTCCTTC	1086
抗-hHER2-HC-N159-GDSLSWLLRLLN-S160	163	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCG	1087
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCCAGGACACGGTCACGGG	1088
抗-hHER2-HC-S160-GDSLSWLLRLLN-G161	164	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC	1089
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGTTCCAGGACACGGTCACG	1090
抗-hHER2-HC-G161-GDSLSWLLRLLN-A162	165	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGACCTCCGGCGTG	1091
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTCCGCTGTTCCAGGACACGG	1092

[1161]

抗-hHER2-HC-A162-GDSLSWLLRLLN-L163	166	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGACCTCCGGCGTGCACAC	1093
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTCCGCTGTTCCAGGACAC	1094
抗-hHER2-HC-L163-GDSLSWLLRLLN-T164	167	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCTCCGGCGTGCACACCTTC	389
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCTCCGCTGTTCCAGG	390
抗-hHER2-HC-T164-GDSLSWLLRLLN-S165	168	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCGGCGTGCACACCTTCCC	391
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCAGGGCTCCGCTGTTCC	392
抗-hHER2-HC-S165-GDSLSWLLRLLN-G166	169	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGTGCACACCTTCCCCG	393
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGAGGTCAGGGCTCCGCTG	394
抗-hHER2-HC-P171-GDSLSWLLRLLN-A172	170	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGTGCTGCAGAGCAGCG	395
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAAGGTGTGCACGCCG	396
抗-hHER2-HC-S176-GDSLSWLLRLLN-S177	171	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCCTGTACAGCCTGTCC	397
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTGCAGCACGGCGGG	398
抗-hHER2-HC-S177-GDSLSWLLRLLN-G178	172	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCTGTACAGCCTGTCCAGC	399
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTCTGCAGCACGGCG	400
抗-hHER2-HC-P189-GDSLSWLLRLLN-S190	173	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGCAGCCTGGGCACCC	401
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCACTGTCACCACGCTGG	402
抗-hHER2-HC-S190-GDSLSWLLRLLN-S191	174	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGCCTGGGCACCCAGAC	403
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGCACTGTCACCACGC	404
抗-hHER2-HC-S191-GDSLSWLLRLLN-S192	175	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCCTGGGCACCCAGACCTAC	405
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGCACTGTCACCAC	406
抗-hHER2-HC-S192-GDSLSWLLRLLN-L193	176	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGGGCACCCAGACCTACATC	407
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTCAC	408
抗-hHER2-HC-L193-GDSLSWLLRLLN-G194	177	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCACCCAGACCTACATCTGC	409
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCTGCTGCTGGGCACTG	410
抗-hHER2-HC-G194-GDSLSWLLRLLN-T195	178	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCCAGACCTACATCTGCAACGTG	411
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCAGGCTGCTGCTGGG	412
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	110	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	413
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGCCCAGGCTGCTGCTG	414
抗-hHER2-HC-Q196-GDSLSWLLRLLN-T197	180	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCTACATCTGCAACGTGAACCAC	415
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGGTGCCCAGGCTGCTG	416
抗-hHER2-HC-K205-GDSLSWLLRLLN-P206	181	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAGCAACACCAAGGTGGAC	417
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGTGGTTCACGTTGCAGATGTAG G	418
抗-hHER2-HC-P206-GDSLSWLLRLLN-S207	182	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA G	419
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTTGTGGTTCACGTTGCAG	420
抗-hHER2-HC-S207-GDSLSWLLRLLN-N208	183	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTG G	421
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGCTTGTGGTTCACGTTG	422
抗-hHER2-HC-P230-GDSLSWLLRLLN-A231	184	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCCAGAGCTGCTGGGC	423
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGCAGGGGGGGCAGGTG	424
抗-hHER2-HC-A231-GDSLSWLLRLLN-P232	185	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGAGCTGCTGGGCGGAC	425
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTGGGCAGGGGGGGC	426

[1162]

抗-hHER2-HC-P232-GDSLSWLLRLLN-E233	186	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCTGCTGGGCGGACCC	427
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGGCTGGGCAGGGGGG	428
抗-hHER2-HC-E233-GDSLSWLLRLLN-L234	187	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCTGGGCGGACCCTCC	429
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCTGGGGCTGGGCAGGG	430
抗-hHER2-HC-L234-GDSLSWLLRLLN-L235	188	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGGGCGGACCCTCCGTG	431
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCTCTGGGGCTGGGCAG	432
抗-hHER2-HC-L235-GDSLSWLLRLLN-G236	189	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGGACCCTCCGTGTTCC	433
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCAGCTCTGGGGCTGGG	434
抗-hHER2-HC-G236-GDSLSWLLRLLN-G237	190	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCC	435
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCAGCAGCTCTGGGGC	436
抗-hHER2-HC-P244-GDSLSWLLRLLN-P245	191	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAAGCCCAAGGACACCCTG	437
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAACAGGAACACGGAGGG	438
抗-hHER2-HC-P245-GDSLSWLLRLLN-K246	192	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC	439
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGGGAACAGGAACACGG	440
抗-hHER2-HC-I253-GDSLSWLLRLLN-S254	193	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAGGACCCCCGAGGTGAC	441
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGATCATCAGGGTGTCCTTGGGC	442
抗-hHER2-HC-S254-GDSLSWLLRLLN-R255	194	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGGACCCCCGAGGTGACCTG	443
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGATCATCAGGGTGTCCTTGG	444
抗-hHER2-HC-R255-GDSLSWLLRLLN-T256	195	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCCCCGAGGTGACCTGCG	445
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCTGCTGATCATCAGGGTGTCC	446
抗-hHER2-HC-T256-GDSLSWLLRLLN-P257	196	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGAGGTGACCTGCGTGG	447
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCCTGCTGATCATCAGGGTG	448
抗-hHER2-HC-P257-GDSLSWLLRLLN-E258	197	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG	449
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGTCCTGCTGATCATCAG	450
抗-hHER2-HC-S267-GDSLSWLLRLLN-H268	198	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC	451
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCACGTCCACCACCACGC	452
抗-hHER2-HC-H268-GDSLSWLLRLLN-E269	199	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC	453
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGGCTCACGTCCACCACCAC	454
抗-hHER2-HC-E269-GDSLSWLLRLLN-D270	200	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG	455
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGTGGCTCACGTCCACCAC	456
抗-hHER2-HC-D270-GDSLSWLLRLLN-P271	201	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC	457
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCTCGTGGCTCACGTCCAC	458
抗-hHER2-HC-P271-GDSLSWLLRLLN-E272	202	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG	459
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGGTCCTCGTGGCTCACGTC	460
抗-hHER2-HC-D280-GDSLSWLLRLLN-G281	203	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCGTGGAGGTGCACAACGC	461
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCACGTACCAGTTGAACTTCACC	462
抗-hHER2-HC-H285-GDSLSWLLRLLN-N286	204	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG	463
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCACCTCCACGCCGTCC	464
抗-hHER2-HC-N286-GDSLSWLLRLLN-A287	205	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG	465
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTGCACCTCCACGCCGTC	466
抗-hHER2-HC-P291-GDSLSWLLRLLN-R292	206	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC	467
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCTTGGTCTTGGCGTTGTG	468

[1163]

抗-hHER2-HC-T307-GDSLSWLLRLLN-V308	207	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGCTGCACCAGGACTGGCTG	469
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCAGCACGGACACCACCC	470
抗-hHER2-HC-V308-GDSLSWLLRLLN-L309	208	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCACCAGGACTGGCTGAAC	471
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACGGTCAGCACGGACACCAC	472
抗-hHER2-HC-L309-GDSLSWLLRLLN-H310	209	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACCAGGACTGGCTGAACGGC	473
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGCACGGTCAGCACGGACAC	474
抗-hHER2-HC-H310-GDSLSWLLRLLN-Q311	210	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG	475
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCAGCACGGTCAGCACGG	476
抗-hHER2-HC-N315-GDSLSWLLRLLN-G316	211	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC	477
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCAGCCAGTCCTGGTGCAG	478
抗-hHER2-HC-G316-GDSLSWLLRLLN-K317	212	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC	479
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGTTCAGCCAGTCCTGGTG	480
抗-hHER2-HC-K317-GDSLSWLLRLLN-E318	213	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG	481
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCCGTTCAGCCAGTCCTG	482
抗-hHER2-HC-K326-GDSLSWLLRLLN-A327	214	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGCCAGCCCCCATC	483
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGTTGGAGACCTTGCACTTGTATTC	484
抗-hHER2-HC-A327-GDSLSWLLRLLN-L328	215	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCCAGCCCCCATCGAAAAG	485
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCTTGTTGGAGACCTTGCAC	486
抗-hHER2-HC-L328-GDSLSWLLRLLN-P329	216	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGCCCCCATCGAAAAGACC	487
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCCTTGTTGGAGACCTTG	488
抗-hHER2-HC-P329-GDSLSWLLRLLN-A330	217	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCCCATCGAAAAGACCATCAG	489
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGCAGGGCCTTGTTGGAGAC	490
抗-hHER2-HC-A330-GDSLSWLLRLLN-P331	218	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAG	491
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCTGGCAGGGCCTTGTTGG	492
抗-hHER2-HC-A339-GDSLSWLLRLLN-K340	219	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGGGCCAGCCACGGGAGC	493
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCTTGCTGATGGTCTTTTCGATG	494
抗-hHER2-HC-K340-GDSLSWLLRLLN-G341	220	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCAGCCACGGGAGCCC	495
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGCCTTGCTGATGGTCTTTTC	496
抗-hHER2-HC-G341-GDSLSWLLRLLN-Q342	221	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCCACGGGAGCCCCAG	497
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTTGGCCTTGCTGATGGTC	498
抗-hHER2-HC-Q342-GDSLSWLLRLLN-P343	222	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCACGGGAGCCCCAGGTG	499
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGCCCTTGGCCTTGCTGATG	500
抗-hHER2-HC-P343-GDSLSWLLRLLN-R344	223	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCGGGAGCCCCAGGTGTACAC	501
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGGCTGGCCCTTGGCCTTGC	502
抗-hHER2-HC-R344-GDSLSWLLRLLN-E345	224	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCCCCAGGTGTACACCCTG	503
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGTGGCTGGCCCTTGGC	504
抗-hHER2-HC-R355-GDSLSWLLRLLN-E356	225	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG	505
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGGGAGGGGGGCAGGG	506
抗-hHER2-HC-E356-GDSLSWLLRLLN-E357	226	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC	507
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGAGGGGGGCAG	508
抗-hHER2-HC-E357-	227	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG	509

[1164]

GDSLSWLLRLLN-M358		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCTCCCGGGAGGGGGG	510
抗-hHER2-HC-M358-GDSLSWLLRLLN-T359	228	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC	511
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	512
抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	121	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG	513
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCATCTCCTCCCGGGAGG	514
抗-hHER2-HC-K360-GDSLSWLLRLLN-N361	229	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC	515
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGTCATCTCCTCCCGGGAG	516
抗-hHER2-HC-N384-GDSLSWLLRLLN-G385	230	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCAGCCCGAGAACAACTAC	517
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGCTCTCCCACTCCACGGC	518
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	127	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	519
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	520
抗-hHER2-HC-N389-GDSLSWLLRLLN-N390	231	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAGTGC	521
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTCTCGGGCTGGCCGTTGC	522
抗-hHER2-HC-T394-GDSLSWLLRLLN-P395	232	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCTCCAGTGCTGGACAGCGAC	523
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCGGGC	524
抗-hHER2-HC-P395-GDSLSWLLRLLN-P396	233	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCAGTGCTGGACAGCGACGG	525
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAGGTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCG	526
抗-hHER2-HC-D399-GDSLSWLLRLLN-S400	234	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG	527
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCAGCACTGGAGGTGTGGTC	528
抗-hHER2-HC-S400-GDSLSWLLRLLN-D401	136	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG	529
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGTCCAGCACTGGAGGTGTG	530
抗-hHER2-HC-D401-GDSLSWLLRLLN-G402	235	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG	531
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCGCTGTCCAGCACTGGAGG	532
抗-hHER2-HC-S415-GDSLSWLLRLLN-R416	236	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGGTGGCAGCAGGGCAACGTG	533
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACTTGTCCACGGTCAGCTTG	534
抗-hHER2-HC-R416-GDSLSWLLRLLN-W417	237	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC	535
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCTGGACTTGTCCACGGTCAG	536
抗-hHER2-HC-W417-GDSLSWLLRLLN-Q418	238	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC	537
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCACCTGGACTTGTCCACGGTC	538
抗-hHER2-HC-Q418-GDSLSWLLRLLN-Q419	239	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGGCAACGTGTTCAGCTGC	539
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCCACCTGGACTTGTCCAC	540
抗-hHER2-HC-Q419-GDSLSWLLRLLN-G420	240	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC	541
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCTGCCACCTGGACTTGTC	542
抗-hHER2-HC-G420-GDSLSWLLRLLN-N421	241	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG	543
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTGCTGCCACCTGGAC	544
抗-hHER2-HC-N421-GDSLSWLLRLLN-V422	242	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC	545
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGCCCTGCTGCCACCTGG	546
抗-hHER2-HC-H433-GDSLSWLLRLLN-N434	243	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTG	547
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGCAGGGCCTCGTGCATCAC	548
抗-hHER2-HC-N434-GDSLSWLLRLLN-H435	244	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAG	549
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTGCAGGGCCTCGTGCATC	550
抗-hHER2-HC-S442-GDSLSWLLRLLN-L443	245	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGTCCCCCGGCAAGTAATCTAG	551
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCAGGCTCTTCTGGGTGTAG	552

[1165]

抗-hHER2-HC-L443-GDSLSWLLRLLN-S444	246	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCCCCGGCAAGTAATCTAGACAC	553
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCTCAGGCTCTTCTGGGTG	554
抗-hHER2-HC-S444-GDSLSWLLRLLN-P445	247	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGGCAAGTAATCTAGACACCTC	555
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACAGGCTCAGGCTCTTCTG	556
抗-hHER2-HC-P445-GDSLSWLLRLLN-G446	248	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCAAGTAATCTAGACACCTCAGAC	557
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGACAGGCTCAGGCTC	558
抗-hHER2-HC-G446-GDSLSWLLRLLN-K447	139	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGTAATCTAGACACCTCAGACAATCAAC	559
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCGGGGGACAGGCTCAG	560
抗-hHER2-HC-A118-DSLEFIASKLA-S119	249	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCG	561
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAGCCGAGGAGACGGTGACCAG	562
抗-hHER2-HC-S119-DSLEFIASKLA-T120	250	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTC	563
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTAGCCGAGGAGACGGTGAC	564
抗-hHER2-HC-T120-DSLEFIASKLA-K121	251	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCC	565
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCTAGCCGAGGAGACGG	566
抗-hHER2-HC-S131-DSLEFIASKLA-S132	252	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG	567
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGCCAGGGGGAAC	568
抗-hHER2-HC-S132-DSLEFIASKLA-K133	253	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC	569
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGGGGGCCAGGGG	570
抗-hHER2-HC-K133-DSLEFIASKLA-S134	254	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCAGCGGCGGCACAG	571
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	572
抗-hHER2-HC-S134-DSLEFIASKLA-T135	255	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAGCGGCGGCACAGCC	573
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	574
抗-hHER2-HC-T135-DSLEFIASKLA-S136	256	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCGGCACAGCCGCC	575
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCTCTTGCTGCTGGGGG	576
抗-hHER2-HC-S136-DSLEFIASKLA-137	257	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGGCACAGCCGCCCTG	577
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGTGCTCTTGCTGCTGGG	578
抗-hHER2-HC-G137-DSLEFIASKLA-G138	258	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCACAGCCGCCCTGGGC	579
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGCTGGTGCTCTTGCTGC	580
抗-hHER2-HC-G138-DSLEFIASKLA-T139	259	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACAGCCGCCCTGGGCTGC	581
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGCCGCTGGTGCTCTTG	582
抗-hHER2-HC-E152-DSLEFIASKLA-P153	260	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGTGACCGTGTCCTGGAAC	583
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGGAAGTAGTCCTTCACC	584
抗-hHER2-HC-P153-DSLEFIASKLA-V154	261	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCG	585
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTCGGGGAAGTAGTCCTTC	586
抗-hHER2-HC-N159-DSLEFIASKLA-S160	262	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGAGCCCTGACCTCCG	587
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCCAGGACACGGTCACGGG	588
抗-hHER2-HC-S160-DSLEFIASKLA-G161	263	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCAC	589
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGTTCCAGGACACGGTCACG	590
抗-hHER2-HC-G161-DSLEFIASKLA-A162	264	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGACCTCCGGCGTG	591
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTCCGCTGTTCCAGGACACGG	592
抗-hHER2-HC-A162-DSLEFIASKLA-L163	265	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGACCTCCGGCGTGCACAC	593
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCTCCGCTGTTCCAGGACAC	594

[1166]

抗-hHER2-HC-L163-DSLEFIASKLA-T164	266	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCTCCGGCGTGCACACCTTC	595
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCTCCGCTGTTCCAGG	596
抗-hHER2-HC-T164-DSLEFIASKLA-S165	267	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCACACCTTCCC	597
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCAGGGCTCCGCTGTTCC	598
抗-hHER2-HC-S165-DSLEFIASKLA-G166	268	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGTGCACACCTTCCCCG	599
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGAGGTCAGGGCTCCGCTG	600
抗-hHER2-HC-P171-DSLEFIASKLA-A172	269	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCG	601
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGAAGGTGTGCACGCCG	602
抗-hHER2-HC-S176-DSLEFIASKLA-S177	270	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCC	603
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTGCAGCACGGCGGG	604
抗-hHER2-HC-S177-DSLEFIASKLA-G178	271	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGC	605
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTCTGCAGCACGGCG	606
抗-hHER2-HC-P189-DSLEFIASKLA-S190	272	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCC	607
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCACTGTCACCACGCTGG	608
抗-hHER2-HC-S190-DSLEFIASKLA-S191	273	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGCCTGGGCACCCAGAC	609
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCACTGTCACCACGC	610
抗-hHER2-HC-S191-DSLEFIASKLA-S192	274	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCCTGGGCACCCAGACCTAC	611
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGGGCACTGTCACCAC	612
抗-hHER2-HC-S192-DSLEFIASKLA-L193	275	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGGGCACCCAGACCTACATC	613
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGCTGCTGGGCACTGTCAC	614
抗-hHER2-HC-L193-DSLEFIASKLA-G194	276	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCACCCAGACCTACATCTGC	615
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCTGCTGCTGGGCACTG	616
抗-hHER2-HC-G194-DSLEFIASKLA-T195	277	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG	617
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCAGGCTGCTGCTGGG	618
抗-hHER2-HC-T195-DSLEFIASKLA-Q196	278	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	619
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGCCCAGGCTGCTGCTG	620
抗-hHER2-HC-Q196-DSLEFIASKLA-T197	279	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCTACATCTGCAACGTGAACCAC	621
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGGTGCCCAGGCTGCTG	622
抗-hHER2-HC-K205-DSLEFIASKLA-P206	280	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCAGCAACACCAAGGTGGAC	623
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGTGGTTCACGTTGCAGATGTAGG	624
抗-hHER2-HC-P206-DSLEFIASKLA-S207	281	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG	625
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTTGTGGTTCACGTTGCAG	626
抗-hHER2-HC-S207-DSLEFIASKLA-N208	282	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGG	627
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCTTGTGGTTCACGTTG	628
抗-hHER2-HC-P230-DSLEFIASKLA-A231	283	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCCAGAGCTGCTGGGC	629
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGCAGGGGGGGCAGGTG	630
抗-hHER2-HC-A231-DSLEFIASKLA-P232	284	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGAC	631
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCTGGGCAGGGGGGGC	632
抗-hHER2-HC-P232-DSLEFIASKLA-E233	285	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCTGCTGGGCGGACCC	633
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGGCTGGGCAGGGGGG	634
抗-hHER2-HC-E233-	286	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCTGGGCGGACCCTCC	635

[1167]

DSLEFIASKLA-L234		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCTGGGGCTGGGCAGGG	636
抗-hHER2-HC-L234-DSLEFIASKLA-L235	287	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGGGCGGACCCTCCGTG	637
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCTCTGGGGCTGGGCAG	638
抗-hHER2-HC-L235-DSLEFIASKLA-G236	288	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGGACCCTCCGTGTTCC	639
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCAGCTCTGGGGCTGGG	640
抗-hHER2-HC-G236-DSLEFIASKLA-G237	289	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCC	641
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCAGCAGCTCTGGGGC	642
抗-hHER2-HC-P244-DSLEFIASKLA-P245	290	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG	643
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGAACAGGAACACGGAGGG	644
抗-hHER2-HC-P245-DSLEFIASKLA-K246	291	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC	645
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGGGAACAGGAACACGG	646
抗-hHER2-HC-I253-DSLEFIASKLA-S254	292	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAGGACCCCCGAGGTGAC	647
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGATCATCAGGGTGTCCTTGGGC	648
抗-hHER2-HC-S254-DSLEFIASKLA-R255	293	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGGACCCCCGAGGTGACCTG	649
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGATCATCAGGGTGTCCTTGG	650
抗-hHER2-HC-R255-DSLEFIASKLA-T256	294	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCCCCGAGGTGACCTGCG	651
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCTGCTGATCATCAGGGTGTCC	652
抗-hHER2-HC-T256-DSLEFIASKLA-P257	295	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGAGGTGACCTGCGTGG	653
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCCTGCTGATCATCAGGGTG	654
抗-hHER2-HC-P257-DSLEFIASKLA-E258	296	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG	655
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGTCCTGCTGATCATCAG	656
抗-hHER2-HC-S267-DSLEFIASKLA-H268	297	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTC	657
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCACGTCCACCACCACGC	658
抗-hHER2-HC-H268-DSLEFIASKLA-E269	298	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAAC	659
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGGCTCACGTCCACCACCAC	660
抗-hHER2-HC-E269-DSLEFIASKLA-D270	299	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGG	661
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGTGGCTCACGTCCACCAC	662
抗-hHER2-HC-D270-DSLEFIASKLA-P271	300	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC	663
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCTCGTGGCTCACGTCCAC	664
抗-hHER2-HC-P271-DSLEFIASKLA-E272	301	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG	665
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGGTCCTCGTGGCTCACGTC	666
抗-hHER2-HC-D280-DSLEFIASKLA-G281	302	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCGTGGAGGTGCACAACGC	667
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCACGTACCAGTTGAACTTCACC	668
抗-hHER2-HC-H285-DSLEFIASKLA-N286	303	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG	669
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCACCTCCACGCCGTCC	670
抗-hHER2-HC-N286-DSLEFIASKLA-A287	304	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG	671
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTGCACCTCCACGCCGTC	672
抗-hHER2-HC-P291-DSLEFIASKLA-R292	305	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACC	673
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCTTGGTCTTGGCGTTGTG	674
抗-hHER2-HC-T307-DSLEFIASKLA-V308	306	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGCTGCACCAGGACTGGCTG	675
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCAGCACGGACACCACCC	676
抗-hHER2-HC-V308-DSLEFIASKLA-L309	307	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCACCAGGACTGGCTGAAC	677
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACGGTCAGCACGGACACCAC	678

[1168]

抗-hHER2-HC-L309-DSLEFIASKLA-H310	308	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACCAGGACTGGCTGAACGGC	679
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGCACGGTCAGCACGGACAC	680
抗-hHER2-HC-H310-DSLEFIASKLA-Q311	309	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGACTGGCTGAACGGCAAG	681
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCAGCACGGTCAGCACGG	682
抗-hHER2-HC-N315-DSLEFIASKLA-G316	310	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC	683
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCAGCCAGTCCTGGTGCAG	684
抗-hHER2-HC-G316-DSLEFIASKLA-K317	311	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAAC	685
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGTTCAGCCAGTCCTGGTG	686
抗-hHER2-HC-K317-DSLEFIASKLA-E318	312	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAG	687
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCCGTTCAGCCAGTCCTG	688
抗-hHER2-HC-K326-DSLEFIASKLA-A327	313	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGCCAGCCCCCATC	689
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGTTGGAGACCTTGCACTTGTATTC	690
抗-hHER2-HC-A327-DSLEFIASKLA-L328	314	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAG	691
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCCTTGTTGGAGACCTTGCAC	692
抗-hHER2-HC-L328-DSLEFIASKLA-P329	315	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGCCCCCATCGAAAAGACC	693
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCCTTGTTGGAGACCTTG	694
抗-hHER2-HC-P329-DSLEFIASKLA-A330	316	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCCCATCGAAAAGACCATCAG	695
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCAGGGCCTTGTTGGAGAC	696
抗-hHER2-HC-A330-DSLEFIASKLA-P331	317	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAG	697
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCTGGCAGGGCCTTGTTGG	698
抗-hHER2-HC-A339-DSLEFIASKLA-K340	318	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC	699
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCCTTGCTGATGGTCTTTTCGATG	700
抗-hHER2-HC-K340-DSLEFIASKLA-G341	319	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCAGCCACGGGAGCCC	701
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGCCTTGCTGATGGTCTTTTC	702
抗-hHER2-HC-G341-DSLEFIASKLA-Q342	320	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCCACGGGAGCCCCAG	703
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTTGGCCTTGCTGATGGTC	704
抗-hHER2-HC-Q342-DSLEFIASKLA-P343	321	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCACGGGAGCCCCAGGTG	705
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGCCCTTGGCCTTGCTGATG	706
抗-hHER2-HC-P343-DSLEFIASKLA-R344	322	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCGGGAGCCCCAGGTGTACAC	707
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGGCTGGCCCTTGGCCTTGC	708
抗-hHER2-HC-R344-DSLEFIASKLA-E345	323	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCCCCAGGTGTACACCCTG	709
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGTGGCTGGCCCTTGGC	710
抗-hHER2-HC-R355-DSLEFIASKLA-E356	324	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG	711
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGGGAGGGGGGCAGGG	712
抗-hHER2-HC-E356-DSLEFIASKLA-E357	325	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC	713
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCCGGGAGGGGGGCAG	714
抗-hHER2-HC-E357-DSLEFIASKLA-M358	326	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG	715
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCTCCCGGGAGGGGGG	716
抗-hHER2-HC-M358-DSLEFIASKLA-T359	327	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC	717
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	718
抗-hHER2-HC-T359-	122	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG	719

[1169]

DSLEFIASKLA-K360		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCATCTCCTCCCGGGAGG	720
抗-hHER2-HC-K360-DSLEFIASKLA-N361	328	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC	721
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGTCATCTCCTCCCGGGAG	722
抗-hHER2-HC-N384-DSLEFIASKLA-G385	329	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCAGCCCGAGAACAACTAC	723
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGCTCTCCCACTCCACGGC	724
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	129	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	725
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	726
抗-hHER2-HC-N389-DSLEFIASKLA-N390	330	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACTACAAGACCACACCTCCAGTGC	727
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTCTCGGGCTGGCCGTTGC	728
抗-hHER2-HC-T394-DSLEFIASKLA-P395	331	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCTCCAGTGCTGGACAGCGAC	729
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCGGGC	730
抗-hHER2-HC-P395-DSLEFIASKLA-P396	332	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCAGTGCTGGACAGCGACGG	731
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAGGTGTGGTCTTGTAGTTGTTCTCG	732
抗-hHER2-HC-D399-DSLEFIASKLA-S400	333	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGACGGCAGCTTCTTCCTG	733
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCAGCACTGGAGGTGTGGTC	734
抗-hHER2-HC-S400-DSLEFIASKLA-D401	334	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAG	735
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGTCCAGCACTGGAGGTGTG	736
抗-hHER2-HC-D401-DSLEFIASKLA-G402	335	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG	737
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCGCTGTCCAGCACTGGAGG	738
抗-hHER2-HC-S415-DSLEFIASKLA-R416	336	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTG	739
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACTTGTCCACGGTCAGCTTG	740
抗-hHER2-HC-R416-DSLEFIASKLA-W417	337	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC	741
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCTGGACTTGTCCACGGTCAG	742
抗-hHER2-HC-W417-DSLEFIASKLA-Q418	338	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC	743
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCACCTGGACTTGTCCACGGTC	744
抗-hHER2-HC-Q418-DSLEFIASKLA-Q419	339	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGGCAACGTGTTCAGCTGC	745
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCCACCTGGACTTGTCCAC	746
抗-hHER2-HC-Q419-DSLEFIASKLA-G420	340	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAACGTGTTCAGCTGCAGC	747
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCTGCCACCTGGACTTGTC	748
抗-hHER2-HC-G420-DSLEFIASKLA-N421	341	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG	749
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTGCTGCCACCTGGAC	750
抗-hHER2-HC-N421-DSLEFIASKLA-V422	342	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGC	751
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGCCCTGCTGCCACCTGG	752
抗-hHER2-HC-H433-DSLEFIASKLA-N434	343	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACCACTACACCCAGAAGAGCCTG	753
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGCAGGGCCTCGTGCATCAC	754
抗-hHER2-HC-N434-DSLEFIASKLA-H435	344	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACTACACCCAGAAGAGCCTGAG	755
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTGCAGGGCCTCGTGCATC	756
抗-hHER2-HC-S442-DSLEFIASKLA-L443	345	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGTCCCCCGGCAAGTAATCTAG	757
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCAGGCTCTTCTGGGTGTAG	758
抗-hHER2-HC-L443-DSLEFIASKLA-S444	346	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCCCCGGCAAGTAATCTAGACAC	759
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCTCAGGCTCTTCTGGGTG	760
抗-hHER2-HC-S444-DSLEFIASKLA-P445	347	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGGCAAGTAATCTAGACACCTC	761
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACAGGCTCAGGCTCTTCTG	762

[1170]

抗-hHER2-HC-P445-DSLEFIASKLA-G446	348	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCAAGTAATCTAGACACCTCAGAC	763
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGACAGGCTCAGGCTC	764
抗-hHER2-HC-G446-DSLEFIASKLA-K447	349	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGTAATCTAGACACCTCAGACAATCAAC	765
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCGGGGGACAGGCTCAG	766
抗-hHER2-LC-T109-GDSLSWLLRLLN-V110	31	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGGCCGCTCCCAGCGTG	767
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCGTTCGTTTGATCTCCACCTTGGT	768
抗-hHER2-LC-V110-GDSLSWLLRLLN-A111	32	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGCTCCCAGCGTGTTCATC	769
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACCGTTCGTTTGATCTCCACCTTG	770
抗-hHER2-LC-A111-GDSLSWLLRLLN-A112	33	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCC	771
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCCACCGTTCGTTTGATCTCC	772
抗-hHER2-LC-P119-GDSLSWLLRLLN-P120	34	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG	773
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGAAGATGAACACGCTGGG	774
抗-hHER2-LC-P120-GDSLSWLLRLLN-S121	35	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC	775
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGGGGAAGATGAACACGCTG	776
抗-hHER2-LC-S121-GDSLSWLLRLLN-D122	36	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC	777
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGGGAAGATGAACAC	778
抗-hHER2-LC-D122-GDSLSWLLRLLN-E123	37	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC	779
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCGCTGGGGGGGAAGATGAAC	780
抗-hHER2-LC-Y140-GDSLSWLLRLLN-P141	38	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCCGGGAGGCCAAGGTG	781
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTAGAAGTTGTTCAGCAGGCACAC	782
抗-hHER2-LC-P141-GDSLSWLLRLLN-R142	39	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG	783
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGGTAGAAGTTGTTCAGCAGGC	784
抗-hHER2-LC-R142-GDSLSWLLRLLN-E143	40	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG	785
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCCGGGGGTAGAAGTTGTTCAGC	786
抗-hHER2-LC-E143-GDSLSWLLRLLN-A144	41	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG	787
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGGGTAGAAGTTGTTC	788
抗-hHER2-LC-D151-GDSLSWLLRLLN-N152	42	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC	789
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCACCTTCCACTGCACCTTG	790
抗-hHER2-LC-N152-GDSLSWLLRLLN-A153	43	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG	791
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTCCACCTTCCACTGCACC	792
抗-hHER2-LC-A153-GDSLSWLLRLLN-L154	44	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG	793
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGCGTTGTCCACCTTCCACTG	794
抗-hHER2-LC-L154-GDSLSWLLRLLN-Q155	45	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGAGCGGCAACAGCCAGGAG	795
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGGCGTTGTCCACCTTCCAC	796
抗-hHER2-LC-Q155-GDSLSWLLRLLN-S156	46	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC	797
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCAGGGCGTTGTCCACCTTC	798
抗-hHER2-LC-E161-GDSLSWLLRLLN-S162	47	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCGTCACCGAGCAGGACAGC	799
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCTGGCTGTTGCCGCTCTG	800
抗-hHER2-LC-S162-GDSLSWLLRLLN-V163	48	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTCACCGAGCAGGACAGCAAG	801
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTCCTGGCTGTTGCCGC	802
抗-hHER2-LC-V163-GDSLSWLLRLLN-T164	49	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACCGAGCAGGACAGCAAGGAC	803
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGACGCTCTCCTGGCTGTTGCC	804

[1171]

抗-hHER2-LC-T164-GDSLSWLLRLLN-E165	50	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGAGCAGGACAGCAAGGACTCC	805
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTGACGCTCTCCTGGCTGTTG	806
抗-hHER2-LC-E165-GDSLSWLLRLLN-Q166	51	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGACAGCAAGGACTCCACC	807
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGTGACGCTCTCCTGGC	808
抗-hHER2-LC-Q166-GDSLSWLLRLLN-D167	52	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGACAGCAAGGACTCCACCTACAG	809
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGCTCGGTGACGCTCTCCTG	810
抗-hHER2-LC-D167-GDSLSWLLRLLN-S168	53	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC	811
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTCCTGCTCGGTGACGCTCTC	812
抗-hHER2-LC-T197-GDSLSWLLRLLN-H198	54	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCACCAGGGCCTGTCCAGCC	813
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCACCTCGCAGGCGTACAC	814
抗-hHER2-LC-H198-GDSLSWLLRLLN-Q199	55	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGGGCCTGTCCAGCCCC	815
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTGGGTCACCTCGCAGGCG	816
抗-hHER2-LC-Q199-GDSLSWLLRLLN-G200	56	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGGCCTGTCCAGCCCCGTG	817
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTGGTGGGTCACCTCGCAGG	818
抗-hHER2-LC-G200-GDSLSWLLRLLN-L201	57	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG	819
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCCCTGGTGGGTCACCTCG	820
抗-hHER2-LC-L201-GDSLSWLLRLLN-S202	58	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC	821
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCAGGCCCTGGTGGGTCACC	822
抗-hHER2-LC-S202-GDSLSWLLRLLN-S203	59	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC	823
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGACAGGCCCTGGTGGGTC	824
抗-hHER2-LC-S203-GDSLSWLLRLLN-P204	60	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAG	825
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGACAGGCCCTGGTGG	826
抗-hHER2-LC-K207-GDSLSWLLRLLN-S208	61	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC	827
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGGTCACGGGGCTGGACAG	828
抗-hHER2-LC-T109-DSLEFIASKLA-V110	62	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTGGCCGCTCCCAGCGTG	829
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCGTTCGTTTGATCTCCACCTTGGT	830
抗-hHER2-LC-V110-DSLEFIASKLA-A111	63	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCGCTCCCAGCGTGTTCATC	831
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACCGTTCGTTTGATCTCCACCTTG	832
抗-hHER2-LC-A111-DSLEFIASKLA-A112	64	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCC	833
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCCACCGTTCGTTTGATCTCC	834
抗-hHER2-LC-P119-DSLEFIASKLA-P120	65	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG	835
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGAAGATGAACACGCTGGG	836
抗-hHER2-LC-P120-DSLEFIASKLA-S121	66	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGC	837
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGGGGAAGATGAACACGCTG	838
抗-hHER2-LC-S121-DSLEFIASKLA-D122	67	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGC	839
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGGGAAGATGAACAC	840
抗-hHER2-LC-D122-DSLEFIASKLA-E123	68	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC	841
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCGCTGGGGGGGAAGATGAAC	842
抗-hHER2-LC-Y140-DSLEFIASKLA-P141	69	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCCGGGAGGCCAAGGTG	843
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTAGAAGTTGTTCAGCAGGCACAC	844
抗-hHER2-LC-P141-DSLEFIASKLA-R142	70	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG	845
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGGTAGAAGTTGTTCAGCAGGC	846
抗-hHER2-LC-R142-	71	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAG	847

[1172]

DSLEFIASKLA-E143		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCGGGGGGTAGAAGTTGTTCAGC	848
抗-hHER2-LC-E143-DSLEFIASKLA-A144	72	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG	849
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCCGGGGGTAGAAGTTGTTC	850
抗-hHER2-LC-D151-DSLEFIASKLA-N152	73	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGCCCTGCAGAGCGGCAAC	851
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCACCTTCCACTGCACCTTG	852
抗-hHER2-LC-N152-DSLEFIASKLA-A153	74	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGCCCTGCAGAGCGGCAACAG	853
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTCCACCTTCCACTGCACC	854
抗-hHER2-LC-A153-DSLEFIASKLA-L154	75	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG	855
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCGTTGTCCACCTTCCACTG	856
抗-hHER2-LC-L154-DSLEFIASKLA-Q155	76	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGAGCGGCAACAGCCAGGAG	857
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGGCGTTGTCCACCTTCCAC	858
抗-hHER2-LC-Q155-DSLEFIASKLA-S156	77	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC	859
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCAGGGCGTTGTCCACCTTC	860
抗-hHER2-LC-E161-DSLEFIASKLA-S162	78	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCGTCACCGAGCAGGACAGC	861
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCCTGGCTGTTGCCGCTCTG	862
抗-hHER2-LC-S162-DSLEFIASKLA-V163	79	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGTCACCGAGCAGGACAGCAAG	863
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTCTCCTGGCTGTTGCCGC	864
抗-hHER2-LC-V163-DSLEFIASKLA-T164	80	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCACCGAGCAGGACAGCAAGGAC	865
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGACGCTCTCCTGGCTGTTGCC	866
抗-hHER2-LC-T164-DSLEFIASKLA-E165	81	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC	867
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTGACGCTCTCCTGGCTGTTG	868
抗-hHER2-LC-E165-DSLEFIASKLA-Q166	82	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGACAGCAAGGACTCCACC	869
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGTGACGCTCTCCTGGC	870
抗-hHER2-LC-Q166-DSLEFIASKLA-D167	83	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGACAGCAAGGACTCCACCTACAG	871
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGCTCGGTGACGCTCTCCTG	872
抗-hHER2-LC-D167-DSLEFIASKLA-S168	84	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCAAGGACTCCACCTACAGCC	873
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTCCTGCTCGGTGACGCTCTC	874
抗-hHER2-LC-T197-DSLEFIASKLA-H198	85	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCACCAGGGCCTGTCCAGCC	875
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGTCACCTCGCAGGCGTACAC	876
抗-hHER2-LC-H198-DSLEFIASKLA-Q199	86	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGGGCCTGTCCAGCCCC	877
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTGGGTCACCTCGCAGGCG	878
抗-hHER2-LC-Q199-DSLEFIASKLA-G200	87	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCCTGTCCAGCCCCGTG	879
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTGGTGGGTCACCTCGCAGG	880
抗-hHER2-LC-G200-DSLEFIASKLA-L201	88	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG	881
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCCCTGGTGGGTCACCTCG	882
抗-hHER2-LC-L201-DSLEFIASKLA-S202	89	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTCCAGCCCCGTGACCAAGAGC	883
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCAGGCCCTGGTGGGTCACC	884
抗-hHER2-LC-S202-DSLEFIASKLA-S203	90	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC	885
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGACAGGCCCTGGTGGGTC	886
抗-hHER2-LC-S203-DSLEFIASKLA-P204	91	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAG	887
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGACAGGCCCTGGTGG	888
抗-hHER2-LC-K207-DSLEFIASKLA-S208	92	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC	889
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGGTCACGGGGCTGGACAG	890

[1173]

枯草芽孢杆菌 Sfp pET22b		GAAGGAGATATACATATGAAAATTTATGGGATTTACATGGATCGC	891
		GTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGCAATTCTTCATAGGAGACCATCG	892
pET22b		CACCACCACCACCACCACTGAG	893
		CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC	894
TEV 进入枯草芽孢杆菌 Sfp pET22b 中		GAGAACCTGTACTTCCAAGGCCACCACCACCACCACCACTGAG	895
		GCCTTGGAAGTACAGGTTCTCCAGCAATTCTTCATAGGAGACCATCG	896
枯草芽孢杆菌 Sfp K28E		GTCTTTCATTTCACCAGAGGAGCGCGAAAAATGCCGTCGCT	897
		AGCGACGGCATTTTTCGCGCTCCTCTGGTGAAATGAAAGAC	898
枯草芽孢杆菌 Sfp T44E		AAAGAAGATGCTCACCGCGAGCTGCTGGGAGATGTGCTG	899
		CAGCACATCTCCCAGCAGCTCGCGGTGAGCATCTTCTTT	900
枯草芽孢杆菌 Sfp C77Y		GCAGGAATATGGCAAACCGTATATTCCAGATCTTCCAGATGC	901
		GCATCTGGAAGATCTGGAATATACGGTTTGCCATATTCCTGC	902
大肠杆菌 AcpS pET22b		AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAATATTAGGTTTAGGCACG	903
		CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGACTTTCAATAATTACCGTGGCACAAGC	904
pET22b		CACCACCACCACCACCACTG	905
		ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATT	906
抗-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	99	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGC	907
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTATCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAGG	908
抗-hHER2-HC-S63-LEFIASK-V64	97	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGC	909
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAGG	910
抗-hHER2-HC-V64L-EFIAS-K65	98	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGAC	911
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGCATATCTAGTATAACCATTCGTAGG	912
抗-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	30	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTATTAC	913
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGATGGTCAGAGTGAAATCCGTCC	914
抗-hHER2-HC-S132G-K133D-S134-T135L-S136-G137W-G138L-T139L-A140R-A141L-L142-G143N	101	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC	915
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGG	916
抗-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	103	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACACAGCCGCCCTGGGCTGC	917
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGGGGGCCAGGG	918
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L	105	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGGCCCTGGGCTGCCTGGTG	919
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	920
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-LRLLN-A141	106	CTGAGACTGCTGAACGCCCTGGGCTGCCTGGTG	921
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGC	922
抗-hHER2-HC-T135G-S136D-G137S-G138L-T139S-WLLRLLN-A140	108	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGCCGCCCTGGGCTGCCTG	923
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTCTTGCTGCTGGGGGCC	924

[1174]

抗-hHER2-HC-T359G-K360D-N361S-Q362L-V363S-S364W	123	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTC	925
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCATCTCCTCCCGGGAGGGG	926
抗-hHER2-HC-S132G-K133D-S134-T135L-S136-G137W-G138L	100	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGACAGCCGCCCTGGGCTGC	927
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGGGGGCCAGGGGG	928
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-A141L-L142R-G143L-C144L-L145N	107	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACGTGAAGGACTACTTCCCCGAGC	929
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCTGCTGGGGGCCAGG	930
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L	117	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	931
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTC	932
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L-LRLLN-C200	118	CTGAGACTGCTGAACTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	933
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGC	934
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L-C200L-N201R-V202L-N203L-H204N	119	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG	935
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCTGCTGCTGGGCACTGTC	936
抗-hHER2-HC-E357G-M358D-T359S-K360L-N361S-Q362W-V363L	120	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGG	937
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCCGGGAGGGGGGC	938
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWL-N389	126	GGCGACAGCCTGAGCTGGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	939
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	940
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	109	GCGACAGCCTGAGCTGGCTGCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	941
		CAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACTGTCACCACGCTGGACAG	942
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-Q196L-T197R-Y198L-I199L-C200N	111	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC	943
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACTGTCACCACGCTGGACAG	944
抗-hHER2- HC-L398G-D399-S400-D401L-G402S-S403W-F404L-LRLLN-F405	134	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG	945
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCACTGGAGGTGTGGTCTTGTAG	946
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	110	CTGAGACTGCTGAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAAC	947
		GTTCAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGC	948
抗-hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	112	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	949
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACTGTCACCACGCTGGACAG	950
抗-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	113	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC	951
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGGCACTGTCACCACGCTGG	952

[1175]

抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	115	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC	953
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCACTGTCACCACGCTGG	954
抗-hHER2-HC-D413-K414S-S415L-R416S-W417-Q418L-Q419L-G420R-N421L-V422L	137	AGCCTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG	955
		CAGCAGTCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCCACGGTCAGCTTGCTGTAC	956
抗-hHER2-HC-D413-K414S-S415L-R416E-W417F-Q418I-Q419A-G420S-N421K-V422L	138	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG	957
		CAGCTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACGGTCAGCTTGCTGTAC	958
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385E-Q386F-P387I-E388A	125	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	959
		GGCGATGAACTCCAGGCTGTCCCACTCCACGGCGATGTCGC	960
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385S-Q386W-P387L-E388L	124	GACAGCCTGAGCTGGCTGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	961
		CAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCCCACTCCACGGCGATGTCGC	962
抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	94	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGCTGGTGGAGTCTGGCGG	963
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCAACCTCAGCAGTGGCACCGGG	964
抗-hHER2-LC-I2-GDSLSWLLRLLN-Q3	26	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACCAGATGACCCAGTCCCCGAGC TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGATATCAGCAGTGGCACCGGG	965 1095
抗-hHER2-LC-C214-GDSLSWLLRLLN	28	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	966
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGCACTCGCCCCTGTTGAAGC	967
抗-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	27	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGATGACCCAGTCCCCGAG	968
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGATATCAGCAGTGGCACCGGG	969
抗-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	29	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	970
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCACTCGCCCCTGTTGAAGC	971
抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	95	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCCAGCTGGTGGAGTCTGGCGG	972
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCAACCTCAGCAGTGGCACCGG	973
抗-hHER2-HC-K447-GDSLSWLLRLLN	140	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	974
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTTGCCGGGGGACAGGCTC	975
抗-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	141	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCTAATCTAGACACCTCAGACAATCAACC	976
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTTGCCGGGGGACAGGCTC	977
抗-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	102	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC	978
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGGGGCCAGGGGG	979
抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L	114	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	980
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGGGCACTGTCACCACGCTGG	981
抗-hHER2-HC-S191D-	116	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGTGCAACGTGAACCACAAGCCCAG	982

[1176]

S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGCTGGGCACTGTCACCACGC	983
抗-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	135	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAG	984
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCACTGGAGGTGTGGTCTTGTAG	985
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	131	GACAGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	986
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	987
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	130	AGCCTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	988
		CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	989
pET22b/TEV		GAGAACCTGTACTTCCAAGGCCAC	990
		ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC	991
		CACCACCACCACCACCACTGAG	992
PPTase_热纤维梭菌_pET22b/TEV		TTGGAAGTACAGGTTCTCACGTTCGCAGAGGAATTTACACACTTC	993
		TAAGAAGGAGATATACATATGGGTTTTCTGCCGAAAGAGAAAAAG	994
ACP_热纤维梭菌_pET22b		GTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTATTATTTTTAATATATTCAACGACGTCGC	995
		TAAGAAGGAGATATACATATGTTCGAGAAAGTCCGTAAAATCATTGC	996
ACP_大肠杆菌_pET22b		GTGGTGGTGGTGGTGGTGCGCCTGGTGGCCGTTGATGTAATC	997
		TAAGAAGGAGATATACATATGAGCACTATCGAAGAACGCGTTAAG	998
抗-hHER2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389	132	CTGGACATGCTGGAGTGGAGCCTGATGAACAACTACAAGACCACACCTCCAG	999
		CCACTCCAGCATGTCCAGGCTGTCGCCCTCGGGCTGGCCGTTGCTC	1000
抗-hHER2-HC-V2-GDSLDMLEWSLM-Q3	96	CTGGACATGCTGGAGTGGAGCCTGATGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGG	1001
		CCACTCCAGCATGTCCAGGCTGTCGCCAACCTCAGCAGTGGCACCGG	1002
mAb2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	148	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG	1003
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGGTCATCTCCTCCCGGGATG	1004
mAb2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	149	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAACTACAAGACCACGCCTCCC	1005
		TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCCTCCGGCTGCCCATTGCTCTC	1006
抗-hHER2-HC-Y296-GDSLSWLLRLLN-N297	143	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTACTGCTCCTCTCTGGGCTTG	1007 1096
抗-hHER2-HC-N297-GDSLSWLLRLLN-S298	145	CTGAGCTGGCTGCTGAGACTGCTGAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCC TCTCAGCAGCCAGCTCAGGCTGTCGCCGTTGTACTGCTCCTCTCTGGGC	1008 1097
抗-hHER2-HC-Y296-DSLEFIASKLA-N297	144	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAACAGCACCTACAGGGTGGTGTC CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTACTGCTCCTCTCTGGGCTTG	1009 1098
抗-hHER2-HC-N297-DSLEFIASKLA-S298	146	CTGGAGTTCATCGCCAGCAAGCTGGCCAGCACCTACAGGGTGGTGTCC CTTGCTGGCGATGAACTCCAGGCTGTCGTTGTACTGCTCCTCTCTGGGC	1010 1099
Tras_HC_S6_i415_S418A		GCCCGAGGGCGACGCCCTGAGCTGGCTG CAGCCAGCTCAGGGCGTCGCCCTCGGGC	1011 1100
人 PPTase_N-His6 (PIPE 克隆) ('His6' 公开为 SEQ ID NO: 1106)		CATCACCATCACCATCACGTTTTCCCTGCCAAACGGTTCTGC ACGGGCCCTCTAGACTTATGACTTTGTACCATTTCGTATTGGAATTTC	1012 1101
pRS_N-His6 (PIPE 克隆) ('His6' 公开为 SEQ ID NO: 1106)		TAAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACC GTGATGGTGATGGTGATGAGGCTGAGCAGTGGCACCGG	1013 1102

[1177]

人 PPTase_C-His6 (PIPE 克隆)('His6' 公开为 SEQ ID NO: 1106)		GGTGCCACTGCTCAGCCTGTTTTCCCTGCCAAACGGTTCTGC GTGATGGTGATGGTGATGTGACTTTGTACCATTTCGTATTGGAATTTC	1014 1103
pRS_C-His6 (PIPE 克隆) ('His6' 公开为 SEQ ID NO: 1106)		CATCACCATCACCATCACTAAGTCTAG AGGCTGAGCAGTGGCACCGG	1015 1104
海栖热袍菌PPTase		ATGATAGTCGGTGTGGGTATTGATG TTACTCTCCGATGAGGATGTTACC	1016 1105

[1178] 顶部＝正向引物

[1179] 底部＝反向引物

[1180] 表9:带有插入的/移植的肽标签的曲妥珠单抗IgG的表达产量(HC,重链;LC,轻链)。括号()[ ]中的值对应按比例放大后的抗体产量。

[1181]

构建体（测试的整个抗体，名称代表含有肽标签的 HC 或 LC 部分，配对的野生型链未列出）	每升培养基产量 / mg	表达规模 / L	SEQ ID NO
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L	26	0.02	105
抗-hHER2-HC-L193G-G194D-T195S-Q196L-T197S-Y198W-I199L	73	0.02	117
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	61 (36)	0.02 (1)	109
抗-hHER2-HC-T359G-K360D-N361S-Q362L-V363S-S364W	43	0.02	123
抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	45 (29)	0.02 (1)	121
mAb2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	78	0.05	148
mAb2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	26	0.05	149
抗-hHER2-HC-E357G-M358D-T359S-K360L-N361S-Q362W-V363L	59	0.02	120
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	39 (13) [16]	0.02 (1) [0.5]	127
抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWL-N389	39	0.02	126
抗-hHER2-LC-C214-GDSLSWLLRLLN	42	0.02	28
抗-hHER2-HC-S134G-T135D-S136-G137L-G138S-T139W-A140L-LRLLN-A141	2	0.05	106
抗-hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	19	0.05	103
抗-hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	48	0.3	110
抗-hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	33	0.05	113
抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	20 (11)	0.05 (0.5)	94

[1182]

抗-hHER2-LC-I2-GDSLSWLLRLLN-Q3	3	0.05	26
抗-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	43 (29)	0.05 (0.4)	27
抗-hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	55	0.05	29
抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	34 (20)	0.05 (0.4)	95
抗-hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	32	0.05	141
抗-hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	32	0.05	102
抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L	41	0.05	114
抗-hHER2-HC-S191D-S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K	30	0.05	116
抗-hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	13	0.05	135
抗-hHER2-HC-Y296-GDSLSWLLRLLN-N297	23	0.05	143
抗-hHER2-HC-N297-GDSLSWLLRLLN-S298	23	0.05	145
抗-hHER2-HC-Y296-DSLEFIASKLA-N297	21	0.05	144
抗-hHER2-HC-N297-DSLEFIASKLA-S298	23	0.05	146
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	36 (15)	0.05 (0.5)	129
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	35 (20)	0.05 (0.5)	130
抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	56	0.05	131
抗-hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	43 (18)	0.05 (0.5)	122
抗-hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	19	0.05	115
抗-hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	40	0.05	112
抗-hHER2-HC-D413-K414S-S415L-R416E-W417F-Q418I-Q419A-G420S-N421K-V422L	29	0.05	138
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385E-Q386F-P387I-E388A	39	0.05	125
抗-hHER2-HC-E382D-S383-N384L-G385S-Q386W-P387L-E388L	33	0.05	124
抗-hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	13	0.05	30
抗-hHER2-HC-S63-LEFIASK-V64	12	0.05	97
抗-hHER2-HC-V64L-EFIAS-K65	23	0.05	98
抗-hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	11	0.05	99
抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389	8 (19)	0.05 (0.4)	142
抗-hHER2-HC-V2-GDSLDMLEWSLM-Q3	56	0.05	96
抗-hHER2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389	32	0.05	132

[1183] 实施例3.Sfp 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)的生产

[1184] 通过使用PIPE方法将枯草芽孢杆菌的Sfp PPTase克隆到pET22b表达载体(参见Klock等人,Proteins 71:982-994(2008))。为了允许C-末端His_6标签(SEQ ID NO:1106)的切割,TEV(烟草蚀纹病毒(tobacco etch virus))蛋白酶识别位点被插入到Sfp编码序列的下游。用于克隆的所有引物列于表8。

[1185] 蛋白的表达和纯化根据Yin等人(参见Nat.Protoc.1:280-285(2006))进行,稍有一些小的修改。首先,从携带pET22b/Sfp表达质粒的大肠杆菌BL21(DE3)细胞的甘油储液接种5mL LB初始培养物。通过在37℃下,以300rpm过夜孵育将培养物生长至饱和。第二天,使用起始培养物接种1L TB培养基(Sigma),在300rpm下搅拌,并保持在37℃。在600nm处达到0.5的光密度后,通过添加IPTG至终浓度1mM,并将温度降低至30℃诱导培养物。将培养物再振荡12-16小时,通过离心收获细菌细胞。在使用前,将细胞沉淀物储存于-20℃。

[1186] 为起始蛋白质纯化,在冰上融化冷冻沉淀物15分钟,并重悬于包含20mM Tris/HCl(pH 7.9)、0.5M NaCl、5mM咪唑、和2U/ml DNA酶I的缓冲液(3mL缓冲液每克细胞湿重)中。通过超声裂解处理4分钟诱导细胞裂解,其间隔为0.5秒开和0.5秒关。为了除去不溶的细胞碎片,在4℃下,以40000×g 20分钟离心所得裂解液。然后通过向澄清的裂解液中加入4mL 50%Ni-NTA浆液(Qiagen公司),捕获His_6-标记的Sfp酶('His6'公开为SEQ ID NO:1106)。在4℃振荡1小时后,将树脂裂解液混合物倒入一次性柱(Bio-Rad)上。用25倍柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑(pH 8.0)洗涤固定的树脂,并用5倍柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、250mM咪唑(pH 8.0)洗脱。然后用10mM Tris/HCl,1mM EDTA,10%甘油(pH值7.5),使用具有3.5kDa截断值的Slide-A-Lyzer透析盒(Pierce)两次透析纯化的Sfp酶,随后使用具有10kDa截断值的Amicon Ultra-15离心过滤器单元(Millipore)浓缩至至少100μM的最终浓度。最后,将浓缩的酶分成等分液,快速在液氮中冷冻,并储存于-80℃。

[1187] 为了提高Sfp的纯度,使用反向Ni-NTA色谱,将TEV切割位点引入C末端的His_6标签(SEQ ID NO:1106)之前。如上述进行该构建体的Ni-NTA纯化。然而,洗脱后,将Sfp酶交换到含有50mM Tris/HCl,50mM NaCl(pH 8.0)的TEV切割缓冲液中。通过用7%(w/w)TEV蛋白酶在23℃下进行1小时消化然后在4℃下16小时去除His_6标签(SEQ ID NO:1106)。然后将TEV消化的酶Sfp重新加载到Ni-NTA柱上,所述柱用1×PBS(pH7.2)平衡。从柱流通液以及从洗涤步骤收集切割的酶,所述洗涤步骤包括5倍柱体积的50mM NaH_2PO_4、300mM NaCl、20mM咪唑(pH8.0)。然后,使用具有3.5kDa截断值的Slide-A-Lyzer透析盒(Pierce),用10mM Tris/HCl、1mM EDTA、10%甘油(pH 7.5)两次透析纯化的Sfp酶。透析后,使用具有10kDa截断值的Amicon Ultra-15离心过滤器单元(Millipore)浓缩Sfp至至少100μM的最终浓度。最后,将浓缩的酶分成等分液,快速在液氮中冷冻,并储存于-80℃。

[1188] 通过SDS-PAGE评估Sfp的纯度。通过LC-MS验证His_6标签(SEQ ID NO:1106)的去除,通过280nm处的紫外光谱(ND-1000UV-Vis分光光度计,NanoDrop Technologies,Wilmington,DE),使用28620$M^{-1}cm^{-1}$的摩尔消光系数,定量SFP产量。每升培养物中获得48mg TEV切割的Sfp酶。

[1189] 实施例4.PPTase同源物和突变体的鉴定和生产

[1190] Sfp突变体R4-4

[1191] 使用标准分子生物学方法,我们将下列突变插入枯草芽孢杆菌SfpPPTase中:Lys28Glu,Thr44Glu和Cys77Tyr。用于诱变反应的寡核苷酸的序列列于表8中。

[1192] 为了蛋白质表达,0.5L TB培养基中接种5mL初始培养物。在300rpm搅拌培养物,并维持在37℃。在达到600nm处0.5的光密度后,通过添加IPTG至终浓度1mM并且将温度降低至30℃诱导培养物。在300rpm将培养物再振荡16小时,通过离心(3400rpm,15分钟)收获细菌细胞。在使用前,将细胞沉淀物储存于-20℃。

[1193] 将冷冻沉淀物在冰上融化10分钟,并重悬于含有50mM Tris/HCl(pH8)、300mM NaCl,10mM咪唑、1U/mL DNase I和complete™无EDTA蛋白酶抑制剂混合物片剂(Roche)的缓冲液中(3mL缓冲液每g细胞湿重)。通过在冰上超声破碎3分钟诱导细胞裂解,超声破碎的间隔为0.5秒开和0.5秒关。在冰上再孵育10min后,在40,000×g在4℃下离心裂解液30分钟。然后通过向澄清的裂解液中加入2mL 50%Ni-NTA浆液(Qiagen公司),捕获His_6-标记的Sfp突变体R4-4('His_6'公开为SEQ ID NO:1106)。在4℃振荡1小时后,将树脂裂解液混合物倒入一次性柱(Bio-Rad)上。收集流通液,用50倍柱体积的50mM Tris、300mM NaCl、20mM咪唑(pH 8.0)洗涤固定的树脂,并用5倍柱体积的50mM Tris、300mM NaCl、250mM咪唑(pH 8.0)洗脱。缓冲液交换后,洗脱液进入含有50mM Tris/HCl、50mM NaCl(pH 8.0)的TEV蛋白酶裂解缓冲液中。使用PD-10柱,通过用7%(w/w)TEV蛋白酶在23℃下消化1小时然后在4℃ 16小时除去His_6标签(SEQ ID NO:1106)。

[1194] 然后,将TEV消化的Sfp突变体R4-4重新加载到Ni-NTA柱上(1mL床体积),所述柱用1×PBS(pH7.2)平衡。从柱流通液以及从洗涤步骤收集切割的酶,所述洗涤步骤包括5倍柱体积的50mM Tris、300mM NaCl、20mM咪唑(pH 8.0)。然后,使用PD-10柱,以10mM Tris/HCl、1mM EDTA、10%甘油(pH 7.5)对纯化的Sfp突变体R4-4进行缓冲液交换。根据使用BSA作为标准物的Bradford分析,酶在17mL终体积中的终浓度是3.1mg/mL,对应于每升培养物中105mg TEV切割的R4-4突变体。最后,将酶等分为100-1000μL部分,快速在液氮中冷冻,并储存于-80℃。通过SDS-PAGE分析评估酶纯度,并通过ESI-MS证实His_6标签(SEQ ID NO:1106)的除去。

[1195] AcpS

[1196] 使用标准分子生物学方法,我们将大肠杆菌K-12的acpS基因克隆至pET22b载体中,所述载体允许具有C-末端His6标签(SEQ ID NO:1106)的重组酶的表达。用于克隆的寡聚核苷酸的序列列于表8中。

[1197] 在从饱和的5mL初始培养物进行接种后,AcpS酶在1L TB培养基中表达。在37℃以300rpm振荡培养物后,通过在0.5的光密度(600nm)时加入1mM IPTG诱导蛋白质生产。在30℃和300rpm下过夜进行蛋白的表达。第二天,通过在3400rpm下离心15分钟收集细胞。蛋白纯化前将细胞沉淀物储存于-20℃。

[1198] 为起始蛋白质纯化,将冷冻沉淀物在冰上融化10分钟,并重悬于含有50mM Tris/HCl(pH 8)、300mM NaCl,10mM咪唑、1U/mL DNase I和complete™无EDTA的蛋白酶抑制剂混合片剂(Roche)的缓冲液中(3mL缓冲液每g细胞湿重)。通过在冰上超声破碎3分钟实现细胞裂解,超声破碎的间隔为0.5秒开和0.5秒关。在冰上再孵育10min后,在40,000×g在4℃下离心裂解液30分钟。然后向澄清的裂解液中加入2mL 50%Ni-NTA浆液,并且裂解液/树脂混合物在4℃振荡1小时。将裂解液/树脂混合物倒入一次性柱上。在收集流通液后,用50倍柱体积的含有50mM Tris(pH 8.0)、300mM NaCl和20mM咪唑的缓冲液洗涤Ni-NTA柱。用5倍柱体积的含有50mM Tris(pH 8.0)、300mM NaCl和250mM咪唑的缓冲液进行洗脱。使用3.5kDa

截断值的透析盒(Slide-A-Lyzer,Thermo Scientific),将洗脱液过夜透析至含有50mM Tris(pH 8)和300mM NaCl的缓冲液中。通过使用0.45μm的滤器(Millipore)除去沉淀的蛋白质。在加入甘油至10%终浓度(v/v)后,Ni-NTA纯化的蛋白在液氮中快速冷冻并保存于-80℃(100和200μL等分)。AcpS的纯度是通过SDS-PAGE评估,并使用BSA作为标准,通过Bradford测定法对产量进行定量。每升培养物中获得约13mg AcpS酶。

[1199] 海栖热袍菌PPTase

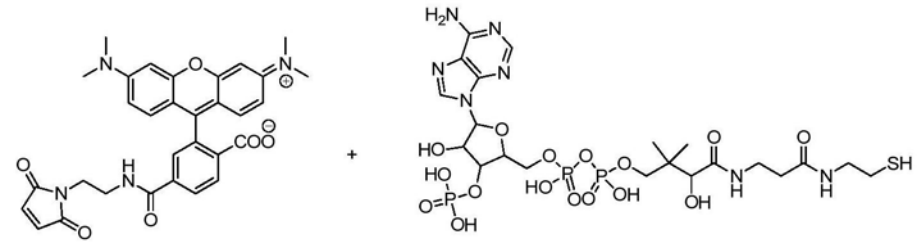
[1200] 通过接种10mL饱和的初始培养物在天然的FM培养基中以1L规模进行海栖热袍菌PPTase的表达。在300rpm下,在37℃下振荡1L培养物。2.5小时后,培养达到600nm处光密度0.5。通过加入阿拉伯糖至终浓度0.1%(w/v)诱导蛋白生产,并将培养物再振荡4小时。通过在4000rpm下离心15分钟收集细胞,细胞沉淀物贮存于-20℃。

[1201] 使用Ni-NTA琼脂糖树脂(Qiagen),通过IMAC(固定化金属亲和层析)进行初步的海栖热袍菌PPTase纯化。细胞沉淀物融化并重悬于60mL裂解缓冲液中(40mM Tris缓冲液(pH 8.0),300mM NaCl,10mM咪唑,1mM TCEP)。将细胞悬浮液在冰上超声破碎1.5分钟(使用1秒的脉冲),并在5℃下在15000rpm离心30分钟。将澄清的裂解液加载至1.5mL Ni-NTA柱。收集流通液后,用5倍柱体积的洗涤缓冲液(40mM Tris缓冲液(pH8.0),300mM NaCl,40mM咪唑,10%甘油,1mM TCEP)洗柱。用2倍柱体积的洗脱缓冲液(20mM Tris缓冲液(pH8.0),150mM NaCl,300mM咪唑,1mM TCEP)进行蛋白洗脱。

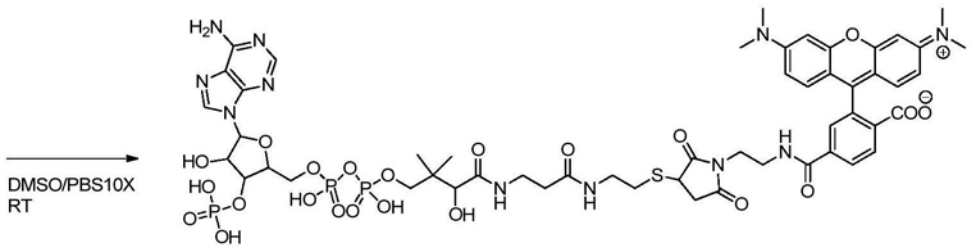
[1202] 使用连接到Äkta FPLC系统的Superdex75柱(GE Healthcare)进一步纯化Ni-NTA洗脱液。在补充有1mM EDTA和10%(v/v)甘油的10mM Tris缓冲液(pH7.4)中,以1mL/min的流速进行尺寸排阻层析(SEC)。通过SDS-PAGE分析含有蛋白的级分后,将含有海栖热袍菌PPTase的级分合并,并用先前用于SEC的缓冲液再次渗析。然后用具有10kDa截断值的Amicon Ultra-15离心过滤器单元(Millipore)浓缩纯化的酶。使用台式离心机在13000rpm离心2分钟除去沉淀物。将浓缩的蛋白质(1.0mg/ml,48μM)等分为100μL级分,快速冷冻在液氮中,并储存在零下80℃。海栖热袍菌PPTase物的纯度通过SDS-PAGE评估,用BSA作为标准物通过Bradford测定法定量产量。所有纯化步骤之后,每升培养物获得1.4mg AcpS酶。

[1203] 实施例5.辅酶A(CoA)类似物的合成

[1204] CoA-马来酰亚胺乙胺-四甲基罗丹明



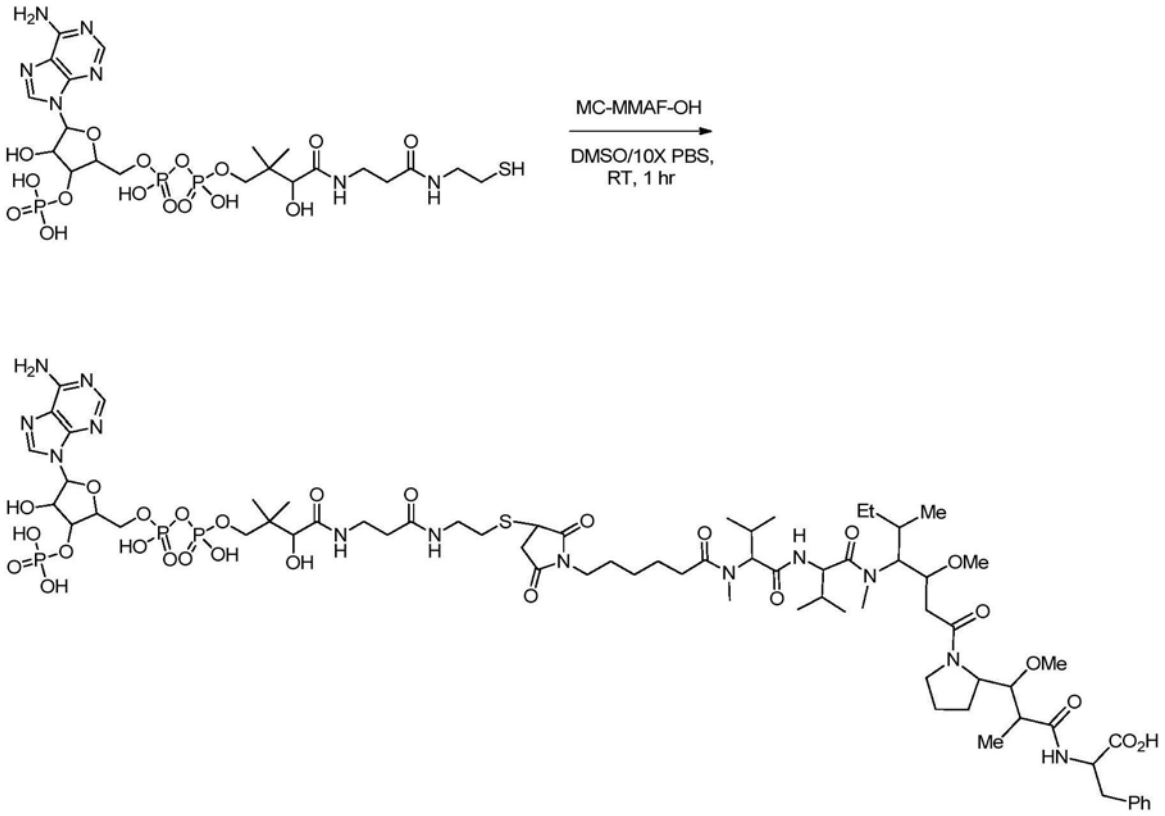
[1205]



[1206] 将溶于300μL DMSO中的四甲基罗丹明-C2-马来酰亚胺(5.5mg,10.4μmol)添加至750μL 10×PBS缓冲液中的辅酶A(150μL水中10.4μmol),并在23℃下搅拌1小时。反应后,将反应混合物冷冻干燥,得到粗产物,将其通过RP-C18快速层析纯化。合并想要的产物的级分并冷冻干燥,得到CoA-马来酰亚胺乙胺-四甲基罗丹明(9.8mg,纯度94.4%),为暗紫色粉末。$C_{52}H_{64}N_{11}O_{22}P_3S[MH]^+$计算的ESI-MS:1320.3;观察的:1320.3。

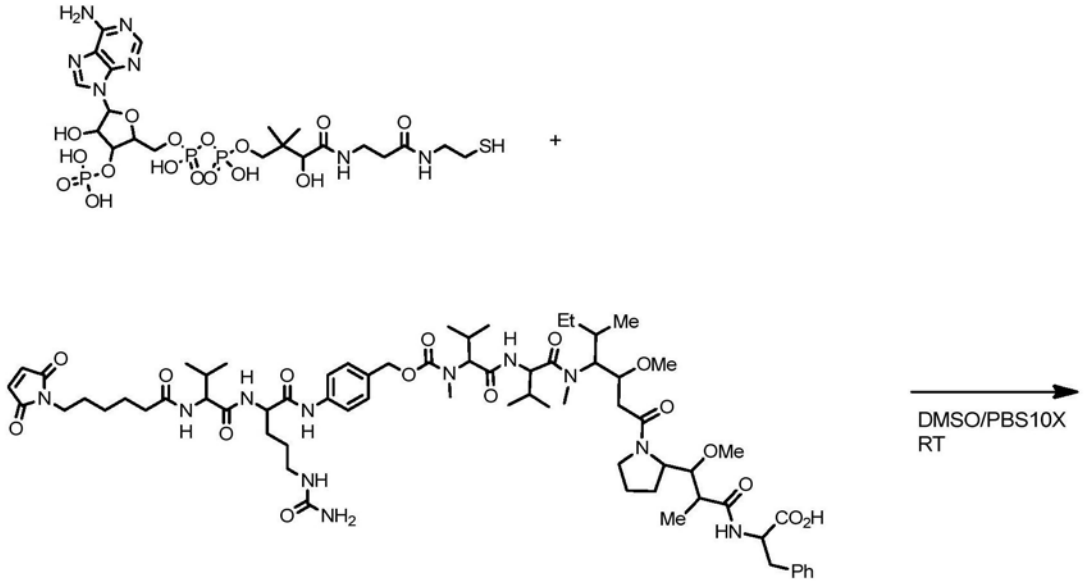
[1207] CoA-马来酰亚胺己酰基(MC)-MMAF

[1208]

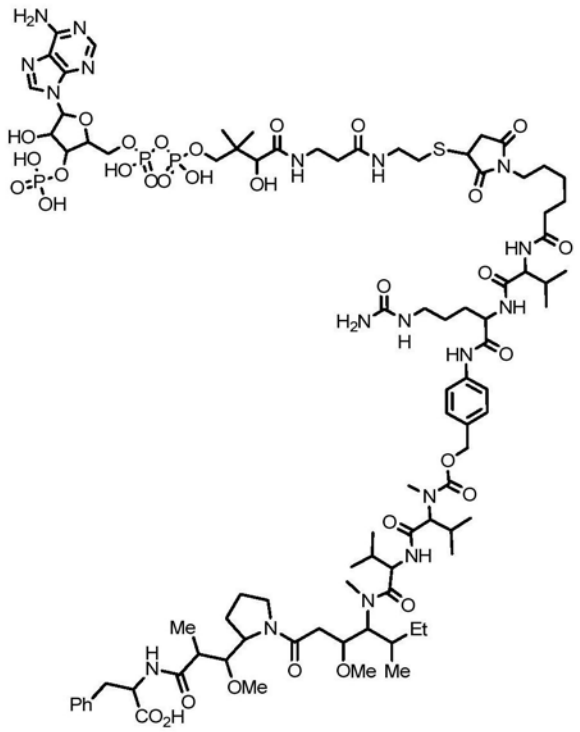


[1209] 将溶解在1.8mL DMSO中的MC-MMAF(见Doronina等人,Bioconj.Chem.17:114-124(2006))(36.0mg,38.9μmol)添加至2.9mL 10×PBS缓冲液中的CoA(312μL水中39.0μmol),并在23℃下搅拌1小时。反应后,将反应混合物冷冻干燥,得到粗产品,将其通过RP-C18快速层析纯化。合并想要的产物的级分并冷冻干燥,得到CoA-MC-MMAF(35.5mg,纯度97.5%),为白色粉末。$C_{70}H_{112}N_{13}O_{27}P_3S[MH]^+$计算的ESI-MS:1691.7;观察的:1691.2。

[1210] CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF

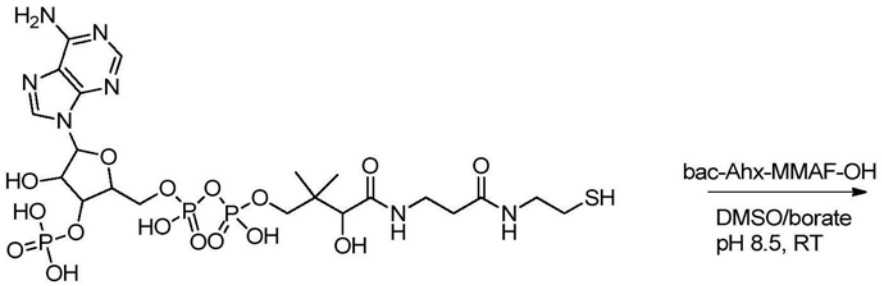


[1211]

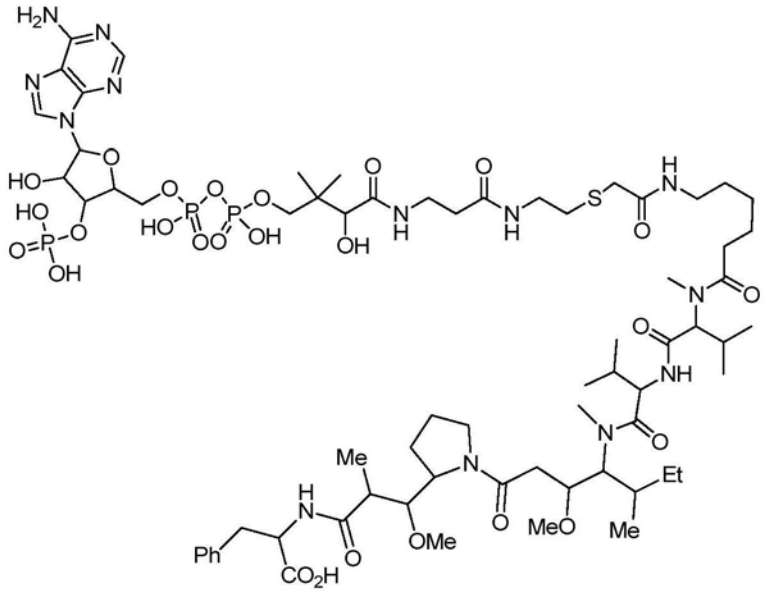


[1212] 将溶于300μL DMSO中的MC-Val-Cit-PABC-MMAF(见Doronina等人,Bioconj.Chem.17:114-124(2006))(5.7mg,4.3mol)添加至2666μL10×PBS缓冲液中的CoA(34μL水中4.3μmol),并在23℃搅拌1小时。反应后,将反应混合物冷冻干燥,得到粗产品,将其通过RP-C18快速层析纯化。合并想要的产物的级分并冷冻干燥,得到CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF(6.1mg,纯度98.0%),为白色粉末。$C_{89}H_{139}N_{18}O_{32}P_3S[MH2]^{2+}/2$计算的ESI-MS:1049.4;观察的:1049.4。

[1213] CoA-Ac-Ahx-MMAF



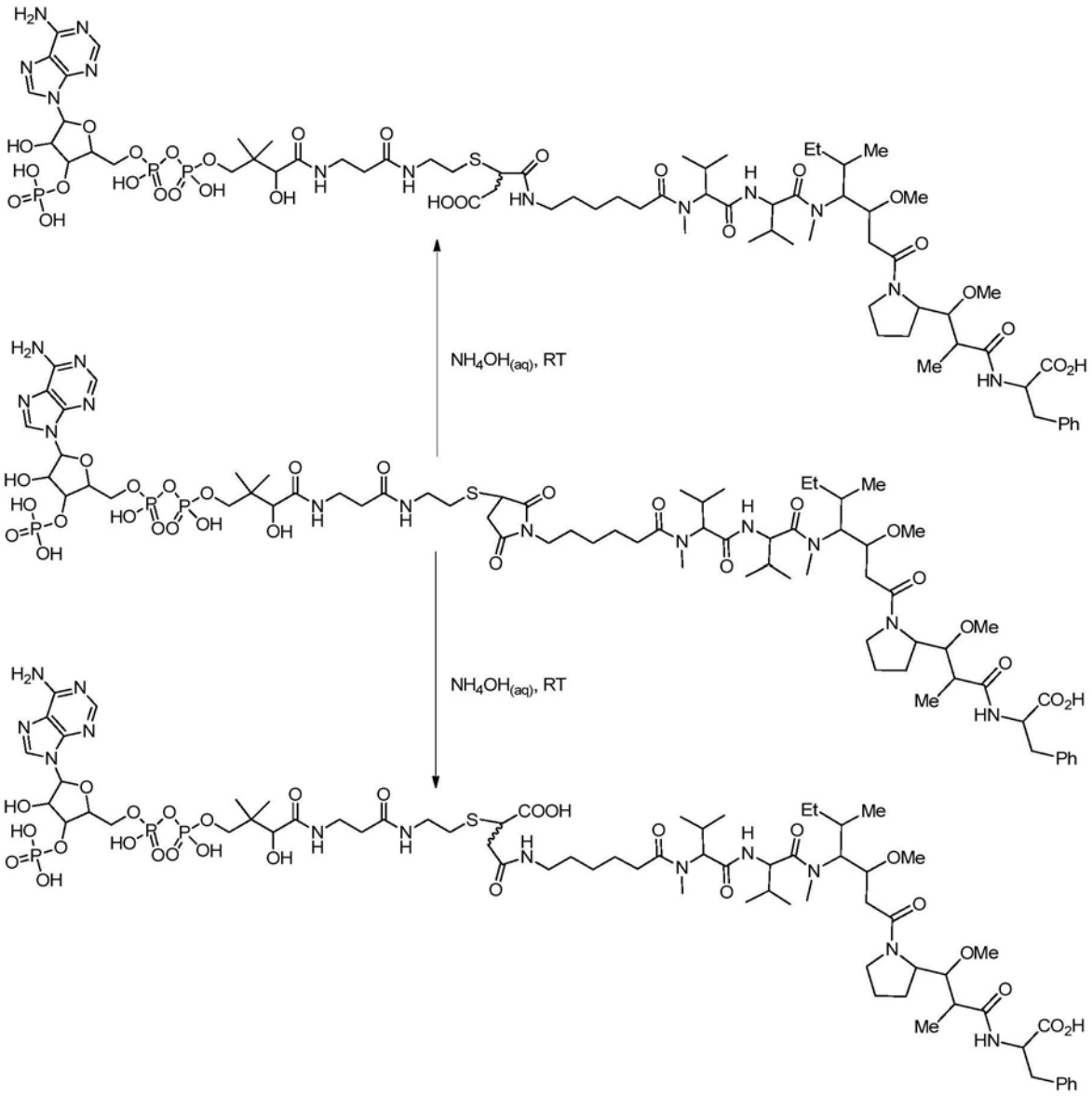
[1214]



[1215] 将溶解在400μL DMSO中的溴乙酰基-Ahx-MMAF(参见,Alley等人,Bioconj.Chem.19:759-765(2008))(1.3mg,1.4μmol)添加至3.6mL硼酸盐缓冲液(6.7mM,pH8.5)中的CoA(43μL水中5.4μmol),并在23℃搅拌24小时。反应后,将反应混合物冷冻干燥,得到粗材料,将其通过RP-C18快速层析纯化。合并想要的产物的级分并冷冻干燥,得到CoA-Ac-Ahx-MMAF(1.1mg,纯度96.9%),为白色粉末。$C_{68}H_{112}N_{13}O_{26}P_3S[MH]^+$计算的ESI-MS:1651.7;观察的:1651.3。

[1216] CoA-开环-MC-MMAF

[1217]



[1218] CoA-MC-MMAF(1mL水中5μmol)添加至9mL 1M NH 4OH(aq)中并在23℃下搅拌30分钟。反应后,将反应混合物冷冻干燥,得到粗材料,将其通过RP-C18快速层析纯化。合并想要的产物的级分并冷冻干燥,得到作为四个位置和非对映异构体的混合物的3.9mg马来酰亚胺环开的CoA-MC-MMAF,如以上方案所示(白色粉末,纯度96.6%)。$C_{70}H_{114}N_{13}O_{28}P_3S[MH]^+$计算的ESI-MS:1709.7;观察的:1709.2。

[1219] 实施例6.在体外用CoA类似物标记肽标记的IgG

[1220] 为了举例说明在体外单步缀合CoA类似物与肽标记的IgG,使多种肽标记的曲妥珠单抗构建体在Sfp酶存在下与CoA-MC-MMAF反应。一般地,缀合反应在补充有10.0或12.5mM $MgCl_2$的50或75mM HEPES或Tris缓冲液(pH为7.5或8.0)中进行。肽标记的曲妥珠单抗的终浓度保持恒定在2.5μM,对应于每个肽标签5.0μM,而CoA底物的终浓度通常在40μM至100μM之间变化。为了发起缀合反应,加入Sfp酶得到通常为1μM的终浓度。允许酶促反应在23℃或37℃进行16小时。此期间之后,通过ESI-MS和HPLC分析反应进程。

[1221] 例7.插入物的标记

[1222] 如实施例6所述，通过孵育反应混合物与Sfp实现了几乎定量地缀合CoA-MC-MMAF与六种曲妥珠单抗抗体和针对带有插入的S6-或ybbR-标签的不同靶的一种第二抗体(“mAb2”)。抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121,图5A)，抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127,图5B)，抗-hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3(SEQ ID NO:95,图5C)，抗-hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3(SEQ ID NO:94,图5D)，抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389(SEQ ID NO:130,图5E)，抗-hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:129,图5F)和mAb2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:148,图5G)的单步缀合反应混合物的HPLC(表10)表明标记的抗体几乎完全转化至免疫缀合物，药物比抗体比(DAR)接近2。降低的缀合样品的ESI-MS表明如所设计的，只有重链的位点特异性修饰。对于抗-hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3(SEQ ID NO:27中，图5H)，HPLC表明仅部分地形成免疫缀合物，因为保留了显著量的未修饰的抗体(39％，保留时间4.8分钟)，且观察到DAR＝1(46％，保留时间5.4分钟)，和DAR＝2(16％，保留时间5.9分钟)的物种的混合物。

[1223] 表10.与插入标签的缀合反应的MS和HPLC分析：

[1224]

SEQ ID NO	抗体构建体(检测了全抗体，名称代表包含肽标签的 HC 或 LC 的部分，配对的野生型链未列出)	观察的质量(Da)	预期的质量免疫缀合物(Da)	预期的质量未修饰的抗体(Da)	根据 HPLC，DAR = 2
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	51785.20	51791	50525	92%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	51786.40	51791	50525	97%
95	抗 hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	51588.00	51598	50332	96%
94	抗 hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	51780.40	51791	50525	100%
130	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	51517.20	51527	50261	94%
129	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	51588.00	51598	50332	100%
27	抗 hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	25878.40	25884	24618	16%
148	mAb2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	52848.80(主要);51600.40(次要)	52849	51597	95%

[1225] 如图6所示，通过在Shodex PROTEIN KW-803柱上的分析型尺寸排阻层析(AnSEC)分析了曲妥珠单抗免疫缀合物(A)抗hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3(SEQ ID NO:1120)，(B)抗hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:1122)，和(C)抗hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389(SEQ ID NO:1121)。在所有三种情况中，ADC是单体(没有可检测量的聚集物质)。

[1226] 实施例8.具有移植的肽标签的构建体的标记

[1227] 也尝试了在体外单步Sfp催化的CoA-MC-MMAF与具有移植的ybbR标签的曲妥珠单抗抗体的缀合。IgG1构建抗hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L(SEQ ID NO:114)的Sfp催化的反应如实施例6所描述的进行。反应混合物的HPLC(图7)和ESI-MS分析表明没有形成具有MMAF的免疫缀合物(预期缀合物质量：50489Da，预期未修饰的抗体质量：49223Da，观察到的：49216.8Da)。其他移植的构建体也没有反应，没能形成免疫缀合物。

[1228] 实施例9.混合的移植/插入构建体的标记

[1229] 也尝试了在体外单步Sfp催化的CoA-MC-MMAF与带有移植/插入的S6-或ybbR-标签的曲妥珠单抗抗体的缀合。如实施例6所述，两种曲妥珠单抗突变体抗hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65(SEQ ID NO:99)和抗hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79(SEQ ID NO:30)与CoA-MC-MMAF和Sfp反应。如反应混合物的HPLC所示，抗hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65(SEQ ID NO:99)被部分修饰(图8A)，然而，抗hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79(SEQ ID NO:30)在相同条件下没有反应(表11)(图8B)。

[1230] 表11.与混合的移植/插入的标签的缀合反应的ESI-MS结果：

[1231]

SEQ ID NO	抗体构建体(检测了全抗体，名称代表包含肽标签的HC或LC的部分，配对的野生型链未列出)	观察的质量(Da)	预期的质量免疫缀合物(Da)	预期的质量未修饰的抗体(Da)	根据HPLC，DAR = 2
99	抗hHER2-HC-V64L-EFIASKLA-K65	51287.20	51297	50031	32%
30	抗hHER2-LC-S76D-S77-L78-EFIASKLA-Q79	24324.80	25597	24331	0%

[1232] 实施例10.用荧光染料标记

[1233] 为了使酶促抗体标记从细胞毒素的位点特异性附着延伸，我们证明了Sfp-催化生成抗体-荧光团缀合物的可行性。这个例子代表了两种Sfp催化的CoA-四甲基罗丹明(CoA-TMR)与具有移植或插入的S6标签的曲妥珠单抗抗体的缀合，如实施例6所述进行。在280nm和555nm两处监控了反应混合物的HPLC踪迹线(图9)。后者波长接近TMR染料的最大吸收(~550nm)。此外，抗体-荧光团缀合物的去卷积质谱数据总结于表12中。

[1234] 对于包含截短的移植的S6标签的抗hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L(SEQ ID NO:109)，缀合主要导致形成每个抗体缀合物两种染料(图9A)。同样地，在残基T359和K360之间插入全长S6标签的抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)主要表现出两种染料分子与每个抗体的缀合(图9B)。该结果表明S6标签可用于修饰的抗体的荧光标记的缀合。

[1235] 表12:与荧光染料的缀合反应的ESI-MS结果：

[1236]

SEQ ID NO	抗体构建体(检测了全抗体，名称代表包含肽标签的 HC 或 LC 的部分，配对的野生型链未列出)	观察的质量 (Da)	预期的质量 荧光团缀合物 (Da)	预期的质量 未修饰的抗体 (Da)
109	抗 -hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	50177.20	50180	49286
121	抗 -hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	51422.00	51419	50525

[1237] 实施例11.使用通过硫醚或水解的马来酰亚胺键连接的细胞毒素的接近定量的标记

[1238] 虽然对于本发明的缀合物没有观察到，马来酰亚胺连接的有效负载可以通过与白蛋白、谷胱甘肽和半胱氨酸的反应性硫醇的马来酰亚胺交换而在血浆中进行去缀合(Alley等人，Bioconjugate Chem.2008,19,759-765)。基于马来酰亚胺的缀合物可通过马来酰亚胺己酰基键的化学开环被稳定化(参见Shen等人，Nature Biotech.30:184-189(2012))。为了检验这一水解过程，使用CoA-开环-MC-MMAF制备了抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)的各自的ADC。此外，为了测试备选的硫醇反应性化学反应，我们将MMAF细胞毒素通过基于乙酰胺的硫醚键附着至CoA的末端巯基，导致CoA-AC-AHX-MMAF(参见，Alley等人，Bioconj.Chem.19:759-765(2008))。这些酶促缀合反应(根据实施例6中所述的方案)的ESI-MS和HPLC结果总结于表13中。对于与CoA开环-MC-MMAF反应的抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)(图10A)，以及与CoA-AC-Ahx-MC-MMAF反应的抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)(图10B)，观察到接近定量的标记，DAR＝2。

[1239] 表13.与备选接头缀合反应的ESI-MS结果：

[1240]

抗体的 SEQ ID NO (检测了全抗体，名称代表包含肽标签的 HC 或 LC 的部分，配对的野生型链未列出)	CoA 底物	观察到的质量 (Da)	预期的质量 免疫缀合物 (Da)	预期的质量 未修饰的抗体(Da)	根据 HPLC 的 DAR = 2
121	马来酰亚胺-环开的 CoA-MC-MMAF	51802.00	51809	50525	85%
121	CoA-Ac-Ahx-MMAF	51742.40	51750	50525	80%

[1241] 实施例12.使用具有可切割的接头的细胞毒素的接近定量的标记

[1242] 为了证明通过可切割的接头附着的细胞毒素对肽标签标记的IgG的标记，在Sfp存

在下我们将含有组织蛋白酶B-敏感的缬氨酸-瓜氨酸接头的CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF与抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)(图11A)或抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)(图11B)缀合。这个单步酶促缀合的HPLC和ESI-MS结果总结在表14中,表明两个标签位置的接近定量的标记,DAR=2。

[1243] 表14.使用CoA-MC-Val-Cit-PABC-MMAF的缀合反应的ESI-MS结果:

[1244]

SEQ ID NO	抗体构建体	观察到的质量 (Da)	预期的质量免疫缀合物 (Da)	预期的质量未修饰的抗体 (Da)	DAR = 2 根据 HPLC
121	抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	52189.60	52196	50525	91%
127	抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	52188.40, 51412.40	52196	50525	95%

[1245] 实施例13.标记反应作为pH的函数的优化

[1246] 该实验的目的是为了确定Sfp催化的CoA底物与肽标签标记的抗体的缀合的最佳pH值范围。在三个实验中,2.5μM抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)或2.5μM抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)在0.25μM Sfp存在下(对于抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127))、或在1.0μM Sfp存在下(对于抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)),与10μM CoA-MC-MMAF反应,并将pH从pH 5.0滴定为10.0。为了覆盖该pH范围,使用5种缓冲液:75mM乙酸钠缓冲液用于pH 5.0;75mM MES缓冲液用于pH 5.5,6.0和6.5;75mM HEPES缓冲液用于pH 7.0,7.5和8.0;75mM硼酸钠缓冲液用于pH 9.0;75mM碳酸钠缓冲液用于pH 10.0。所有缓冲液补充有12.5mM氯化镁,以确保酶的活性。对于每个反应,pH滴定系列在100μL体积中在23℃进行25至35分钟。通过加入30μL 4%(v/v)三氟乙酸(TFA)淬火酶促反应后,在280nm处通过HPLC分析反应混合物,总结于表15。

[1247] 表15:标记反应的HPLC结果作为pH的函数:

[1248]

SEQ ID NO	抗体构建体(检测了全抗体，名称代表包含肽标签的 HC 或 LC 的部分，配对的野生型链未列出)	pH 值	DAR = 0	DAR = 1	DAR = 2
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	5.0	100%; 100%	0%; 0%	0%; 0%
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		100%	0%	0%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	5.5	100%	0%	0%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	6.0	88%; 90%	12%; 10%	0%; 0%
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		100%	0%	0%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	6.5	68%	23%	9.2%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	7.0	25%; 26%	48%; 44%	28%; 31%
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		77%	23%	0%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	7.5	12%	41%	47%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	8.0	7.7%; 11%	36%; 36%	56%; 52%
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		52%	37%	11%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	9.0	12%	31 %	57%
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		32%	46%	23%
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	10.0	100%	0%	0%
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360		53%	36%	11%

[1249] HPLC的结果表明，pH值范围8至9对于CoA-MC-MMAF与肽标记的曲妥珠单抗的缀合是最佳的。在此pH范围内，可以通过HPLC检测到未偶联抗体(DAR＝0)的最低量和双缀合的ADC(DAR＝2)的最高量。另外，绘图DAR为2的ADC的百分比与pH值(图12)表明对于进行测试的两个位点，最佳pH不依赖S6标签的插入位点。

[1250] 实施例14.标记反应作为酶浓度的函数的优化

[1251] 为了测试有效率的酶促缀合所需的Sfp的量，2.5μM抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)在不存在Sfp酶或在0.1、0.25、0.5、1、2.5、5或10μM Sfp酶存在下，在37℃与补充有10mM $MgCl_2$的50mM HEPES缓冲液(pH7.5)中的50μMCoA-MC-MMAF反应16小时。16小时后，通过ESI-MS分析反应的等分试样。对于0.1μM的Sfp浓度，通过ESI-MS可检测到的主要是非缀合的修饰的抗体(图13A)。对于等于(图13B)或大于0.25μM的所有Sfp浓度，得到定量的缀合，例如0.5μM Sfp(图13C)。

[1252] 实施例15.标记反应作为CoA类似物的函数的优化

[1253] 为了确定肽标记的IgG1抗体的定量标记所需的CoA底物的最小浓度，在含有12.5mM $MgCl_2$和补充有浓度为2.5,5,7.5,10,15,25,和50μM的CoA-MC-MMAF的75mM Tris缓冲液(pH 8.0)中孵育2.5μM抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)与0.25

μM或1.0μM Sfp。使反应在23℃持续进行13小时，然后用30μL 4％(v/v)三氟乙酸(TFA)淬灭。根据HPLC分析(图14A和图14B，表16)，对于所有等于或大于7.5μM的CoA-MC-MMAF浓度实现了接近定量的抗体缀合。标记的程度几乎不取决于Sfp浓度，在0.25μM Sfp观察到86％DAR2物种，并且在1.0μM Sfp观察到92％DAR2物种。

[1254] 表16.标记反应的HPLC结果作为CoA浓度的函数：

[1255]

		保留时间		
		4.9 min	5.3 min	5.7 min
CoA-MC-MMAF (μM)	Sfp (μM)	DAR = 0	DAR = 1	DAR = 2
50	0.25	3.8 %	7.1 %	89 %
25	0.25	3.7 %	7.0 %	89 %
15	0.25	3.2 %	6.9 %	90 %
10	0.25	3.9 %	7.2 %	89 %
7.5	0.25	5.0 %	8.6 %	86 %
5	0.25	5.7 %	20.5 %	74 %

[1256]

2.5	0.25	28 %	48.3 %	24 %
50	1.0	---	7.1 %	93 %
25	1.0	---	6.3 %	94 %
15	1.0	---	5.7 %	94 %
10	1.0	---	5.7 %	94 %
7.5	1.0	1.0 %	6.7 %	92 %
5	1.0	2.8 %	24 %	73 %
2.5	1.0	31 %	48 %	21 %

[1257] 为了确定抗hHER2-HC-E388-GDS-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1129)免疫缀合物的聚集状态，在1μM Sfp存在下，5.6mg抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)(2.5μM)与40μM CoA-MC-MMAF在补充有10mM $MgCl_2$的50mM HEPES缓冲液(pH7.5)中反应。在23℃孵育3天后，将反应混合物在Sephacryl100-HR尺寸排阻柱(Sigma)上进行纯化。通过ESI-MS确认定量缀合后(观察到的质量，51786.40Da；预期的质量免疫缀合物，51791Da；预期的质量未修饰抗体，50525Da)，在Tricorn S200柱(Agilent)上分析各自的ADC的四级结构。ADC主要是单体(98％)，含有痕量的寡聚的物种(2％)。

[1258] 实施例16.S6抗体和ADC的热稳定性

[1259] 为了检查肽标记的免疫缀合物的热稳定性，通过差示扫描荧光测定法(DSF)(表17)或差示扫描量热法(DSC)(表18)测量纯化的ADC样品。在pH 7.4的PBS中将样品稀释至终浓度0.25mg/mL(1.67μm)。对于DSF，加入SYPRO橙凝胶染料(Sigma)至5×最终浓度，作为示踪剂以指示ADC的热解折叠。在LightCycler(Roche)仪器中使用20荧光扫描/度加热样品。对于DSC，通过测量热容量监测热解折叠，因为在MicroCal VP-DSC仪器中，温度以每分钟1摄氏度的速率增加。在各个控制器中使用采取三态模型的软件包计算解链温度。

[1260] 如先前所述(Wakankar等人Bioconjugate Chem.2010,21,1588-1595)，未修饰的曲妥珠单抗表现出两种转换。通过DSF在69.7和81.1摄氏度观察到转换，而通过DSC在72.3和81.0摄氏度观察到转换。与未修饰的抗体相似，大多数CoA-MC-MMAF免疫缀合物表现出两

种转换，虽然幅度不同(图15)。DSF和DSC测量的热熔点非常一致，尽管DSF报道了大约低2度的第一次转换。通常，大多数改造的、非缀合的抗体和各自的肽标记的ADC与野生型抗-hHER2相比显示很小的不稳定。

[1261] 表17.如通过DSF测量的热稳定性。ΔTm值是相对于未修饰的抗hHER2抗体。

[1262]

SEQ ID NO	样本(检测了全抗体，名称代表包含肽标签的 HC 或 LC 的部分，配对的野生型链未列出)	Tm_1 / °C	Tm_2 / °C	ΔTm_1 / °C	ΔTm_2 / °C
93/25	抗 hHER2	69.7	81.2		
94	抗 hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3	70.8	---	1.1	---
95	抗 hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	70.0	78.0	0.3	-3.1
102	抗 hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	69.3	---	-0.4	---
103	抗 hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	68.4	81.0	-1.3	-0.1
109	抗 hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	69.6; 69.3	81.0; 80.6	-0.1; -0.4	-0.1; -0.5
110	抗 hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	69.4	80.7	-0.3	-0.4
112	抗 hHER2-HC-P189D-S190-S191L-S192E-L193F-G194I-T195A-Q196S-T197K-Y198L-I199A	69.4	78.6	-0.3	-2.5
113	抗 hHER2-HC-S190G-S191D-S192-L193-G194S-T195W-Q196L-T197L-RLLN-Y198	68.1	78.1	-1.7	-3.1
114	抗	67.8	---	-1.9	---

[1263]

	hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L				
115	抗 hHER2-HC-S190D-S191-S192L-L193E-G194F-T195I-Q196A-T197S-Y198K-I199L-C200A	67.1	---	-2.6	---
116	抗 hHER2-HC-S191D-S192-L193-G194E-T195F-Q196I-T197A-Y198S-I199K	69.3	---	-0.4	---
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	70.1; 70.3	81.7; 81.7	0.3; 0.5	0.6; 0.6
1117	抗 hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.4; 68.6	81.5; 81.4	-1.3; -1.2	0.4; 0.3
122	抗 hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	70.1	81.7	0.3	0.6
127	抗 hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389	66.6	81.5	-3.1	0.4
1118	抗 hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.3	81.0	-3.4	-0.1
1107	抗 hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	66.7	80.9	-3.0	-0.2
131	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	69.4	81.6	-0.3	0.5
130	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	68.9	81.5	-0.9	0.4
129	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	69.3	81.6	-0.4	0.5
135	抗 hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	49.2	81.2	-20.6	0.1
141	抗 hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	70.1	81.0	0.4	-0.1
27	抗 hHER2-LC-I2-DSLEFIASKLA-Q3	70.0	78.8	0.2	-2.3

[1264]

29	抗 hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	69.7	80.9	0.0	-0.2

[1265] 表18.如通过DSC测得的热稳定性。ΔTm值相对于未修饰的抗hHER2抗体。

[1266]

SEQ ID No (抗体)	样本	Tm1 / °C	Tm2 / °C	Tm3 / °C	ΔTm1 / °C	ΔTm2 / °C
93/25	抗 hHER2	72.3; 72.3	80.9; 81.0	---		
95	抗 hHER2-HC-V2-DSLEFIASKLA-Q3	72.3	77.9	83.3	0.1	-3.1
1120	抗 hHER2-HC-V2-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q3	70.4	82.6	---	-1.9	1.7
102	抗 hHER2-HC-S132D-K133S-S134L-T135E-S136F-G137I-G138A-T139S-A140K-A141L-L142A	70.3	76.2	83.3	-2.0	-4.8
103	抗 hHER2-HC-K133G-S134D-T135S-S136L-G137S-G138W-LLRLLN-T139	69.7	80.5	---	-2.6	-0.5
109	抗 hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L	72.8; 70.7	80.1; 79.9	---	0.5; -1.6	-0.9; -1.1
110	抗 hHER2-HC-P189G-S190D-S191-S192L-L193S-G194W-T195L-LRLLN-Q196	71.2	80.0	---	-1.1	-1.0
121	抗 hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360	70.4; 70.6	80.9; 80.6	---	-1.9; -1.6	-0.1; -0.4
1117	抗 hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.7	80.6	---	-3.6	-0.4
1117	抗 hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	68.8	80.4	---	-3.5	-0.6
122	抗 hHER2-HC-T359-DSLEFIASKLA-K360	71.8	80.9	---	-0.5	-0.1
1118	抗 hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	67.0	80.2	---	-5.3	-0.8
1107	抗	66.0	80.1	---	-6.3	-0.9

[1267]

	hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-VaICit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389					
131	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASK-N389	71.2	80.8	---	-1.0	-0.2
130	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASKL-N389	70.7	80.8	---	-1.6	-0.2
1121	抗 hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKL-N389	69.9	80.2	---	-2.3	-0.8
129	抗 hHER2-HC-E388-DSLEFIASKLA-N389	71.1	80.8	---	-1.2	-0.2
1122	抗 hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	70.2	80.3	---	-2.1	-0.7
135	抗 hHER2-HC-L398D-D399S-S400L-D401E-G402F-S403I-F404A-F405S-L406K-Y407L-S408A	---	81.0	---	---	0.1
141	抗 hHER2-HC-K447-DSLEFIASKLA	72.7	81.0	---	0.4	0.1
29	抗 hHER2-LC-C214-DSLEFIASKLA	71.6	81.1	---	-0.7	0.1

[1268] 实施例17.肽标记的ADC的药代动力学特性

[1269] 为了检查带有MMAF有效负载的2种肽标记的曲妥珠单抗ADC(DAR为2)的体内稳定性,我们在小鼠中进行了药代动力学(PK)的研究。向3只小鼠静脉内注射抗hHER2-HC-T359-GDS-PPAN-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1117)和抗hHER2-HC-E388-GDS-PPAN-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO::1118),使用的ADC浓度是1.0mg/kg。在0.2,1,3,7,24,48,96,168,240和336小时收集了10个样品。使用ELISA测定法监测两种ADC的血浆效价多至两周,在所述ELISA测定法中,使用抗人IgG和抗MMAF抗体,且ELISA板包被截短的人HER2(胞外结构域3-4)。然后将ELISA结果与未修饰的曲妥珠单抗IgG1的PK研究比较。尽管相比于未修饰的曲妥珠单抗,抗hHER2-HC-T359-GDS-PPAN-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1117)在小鼠中显示出快速衰减,抗hHER2-HC-E388-GDS-PPAN-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1118)在两周期间显示出与未修饰的曲妥珠单抗相似的血清清除(图16)。对于两种ADC,抗hIgG和抗MMAF效价彼此追踪(track),这表明在小鼠体内暴露期间,如果有任何药物丢失也非常少。

[1270] 实施例18.肽标记的ADC的体外效力

[1271] 使用表达HER-2的MDA-231细胞系进行了肽标记的ADC的体外细胞杀伤测定法。如实施例6所述,通过使抗hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:121)和抗hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:127)与非可切割的MC-MMAF和可切割的MC-

ValCit-PABC-MMAF反应制备DAR＝2的ADC(实施例12)。在PC3-31(高拷贝数的HER2)和PC3(低拷贝数的HER2)ErbB2改造的细胞中测试相应的ADC,抗hHER2-HC-T359-GDS-PPAN-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1117),抗hHER2-HC-E388-GDS-PPAN-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1118),抗hHER2-HC-T359-GDS-PPAN-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360(SEQ ID NO:1108),和抗hHER2-HC-E388-GDS-PPAN-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389(SEQ ID NO:1107)的体外效力。对于PC3-31细胞系,所有肽标记的ADC显示有效的细胞毒性活性,半数最大有效浓度(EC_{50})在皮摩尔范围内。与此相反,对于PC3细胞相应的EC_{50}值大于60nM。结果总结于表19和图17,表明所有4种缀合物是高度有效的ADC,并且以抗原依赖的方式杀死HER2/neu阳性细胞。

[1272] 表19.S6-标签缀合的MMAF免疫缀合物的体外效力。

[1273]

SEQ ID NO	ADC	EC_{50}值	
		PC3-31细胞系	PC3细胞系
1117	抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	7.9 ng/mL; 53 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM
1118	抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	8.5 ng/mL; 57 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM
1108	抗hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360	7.7 ng/mL; 51 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM
1107	抗hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	1.6 ng/mL; 11 pM	>9,000 ng/mL; >60 nM

[1274] 实施例19.在细胞培养基中用细胞毒性CoA类似物标记肽标记的IgG

[1275] PPTase催化的4'-磷酸泛酰巯基乙胺化的生物正交(bioorthogonality)使得能够在复合混合物(如条件培养基)中位点特异性标记肽标记的IgG。在肽标记的抗体分泌后,外源添加的PPTase(如Sfp)和药物-CoA底物(如CoA-MC-MMAF)导致形成均质的ADC,其可以在单个步骤中使用蛋白A亲和层析进行纯化。

[1276] 例如,用编码在CH3结构域中具有S6标签插入的IgG1重链的质粒DNA和编码未修饰的κ轻链的质粒DNA转染HEK293F细胞。在37℃将40mL HEK293悬浮培养物培养五天。在通过2000rpm离心10分钟收获后,将培养基上清液补充到最终浓度40μM的CoA-MC-MMAF,10mM氯化镁和50mM HEPES(pH7.5)。然后将培养基上清液分成两个20mL的等分试样。重组产生的Sfp酶(5μM)加入到等分试样之一(见表20,实验#2),并在室温下允许酶促反应进行24小时。

[1277] 表20.在培养基中的标记方案。

[1278]

实验#	1	2
将CoA-MC-MMAF(40μM)加入培养基上清	X	X
将Sfp(5μM)加入培养基上清		X

[1279] 使用具有0.25mL床体积的蛋白A琼脂糖快速流动柱对每个实验进行抗体的纯化。用PBS平衡后，将培养基上清液以约1mL/min的流速施加到柱上，并收集流通液。用20倍柱体积的PBS洗涤后，用6倍柱体积的0.1M乙酸钠(pH3.0)洗脱结合的抗体，接着用1M Tris/HCl(pH 10)立即中和以达到最终pH约8。通过SDS-PAGE分析评估洗出液的纯度，并通过Bradford方法测定抗体产量。最后，通过蛋白A洗出液的ESI-MS和HPLC分析证实Sfp-依赖的培养基中ADC的形成。

[1280] 实施例20.使用乙酰CoA体外标记肽标记的IgG以及随后与细胞毒素缀合

[1281] 通过乙酰CoA制备免疫缀合物的原理是一种三步化学酶促缀合方法，其中乙酰基部分作为CoA的反应性硫醇基团的保护基。此外，尽管PPTase如Sfp耐受对大的CoA类似物(例如，肽基-CoA)的催化，催化效率(k_{cat}/K_M)相比对CoA本身显著降低(参见，Sieber等人，J.Am.Chem.Soc.125:10862-10866(2003))。因此，预期小的乙酰基团保证了与天然CoA底物中所见的相似的酶动力学。

[1282] 例如，如实施例6所述，使用乙酰CoA代替CoA-MC-MMAF进行乙酰化的ppan部分与肽标记的IgG抗体的共价缀合。在通过ESI-MS确认定量缀合后，将缀合物透析到反应缓冲液(0.1M磷酸钠(pH7.2)，0.15M NaCl)中。将透析的缀合物浓缩至约5mg/mL，并补充10％(v/v)含有0.5M羟胺和25mM EDTA的反应缓冲液(pH7.2)的脱乙酰溶液。允许该化学硫酯裂解反应在室温下进行3小时，之后对反应混合物缓冲液交换为补充有10mM EDTA的反应缓冲液(pH为7.2)中。在通过ESI-MS确认定量脱乙酰后，然后将脱保护的ppan部分在室温下与15当量的巯基反应性马来酰亚胺-MC-MMAF(0.5mM)缀合1小时。通过缓冲液交换至PBS淬灭该反应。最后，通过ESI-MS和HPLC分析确认定量的ADC形成。

[1283] 实施例21.使用乙酰CoA在细胞培养基中标记肽标记的IgG以及随后与细胞毒素缀合

[1284] PPTase催化生成的均质ADC的生物正交允许在细胞培养基中进行IgG的位点特异性标记(参见实施例19)。代替了直接将细胞毒性药物分子附着至抗体，也能够通过三步化学酶促缀合方法在培养基中进行用乙酰CoA标记用于生成ADC。与大的细胞毒性CoA类似物相比，小的乙酰CoA类似物允许具有改进的催化效率(K_{cat}/K_M)的缀合反应，从而显著降低定量缀合所需的酶量。另外，对于方法开发，在大培养物体积中用非毒性化合物进行标记反应是有利的。可使用蛋白A亲和层析一步纯化与乙酰ppan部分缀合的肽标记的IgG。为了从纯化的乙酰-ppan-缀合的抗体起始制备免疫偶联物，如实施例20所述进行两个随后的化学反应。

[1285] 实施例22.使用乙酰CoA或生物正交的CoA类似物在细胞培养基中标记肽标记的IgG以及随后与细胞毒素缀合

[1286] PPTase催化生成的均质ADC的生物正交还允许在细胞培养基中进行IgG的位点特异性标记(参见实施例19)。代替了直接将细胞毒性药物分子附着至抗体，也能够通过三步化学酶促缀合方法在培养基中进行用乙酰CoA标记用于生成ADC。与大的细胞毒性CoA类似物相比，小的乙酰CoA类似物允许具有改进的催化效率(K_{cat}/K_M)的缀合反应，从而显著降低定量缀合所需的酶量。另外，对于方法开发，在大培养物体积中用非毒化合物进行标记反应是有利的。可使用蛋白A亲和层析一步纯化与乙酰ppan部分缀合的肽标记的IgG。为了从纯化的乙酰-ppan-缀合的抗体起始制备免疫偶联物，如实施例20所述进行两个随后的化学反

应。

[1287] 备选地，在培养基中的标记不使用乙酰CoA，而是也可以使用共价连接至生物正交基团(如叠氮基，烯烃，炔烃，酮或醛部分)的CoA类似物进行在培养基中标记。在培养基中的PPTase催化后，使用蛋白A亲和层析将具有ppan结合的生物正交基团的肽标记的抗体纯化为均质。作为用于ADC制备的此两步化学酶促标记策略的最后一步，与互补的生物正交基团的反应导致药物部分与抗体的位点特异性附着。图22示例了羰基官能化的CoA类似物与A1-标记的抗体的位点特异性附着，以及随后的末端基团(TG)的肟连接的两步法。在细胞培养基中进行第一个步骤后，通过蛋白A亲和纯化来纯化所得的羰基官能化的抗体。然后，第二步骤涉及ppan连接的羰基与氨氧基衍生的TG的反应。反应后，通过透析或缓冲液交换除去过量的TG。羰基官能化的CoA类似物(酮CoA)的合成在实施例23中描述。

[1288] 实施例23.酮CoA的合成

[1289] 将784μL 25mM的CoA-SH(20μmol，Sigma-Aldrich)水溶液加入到9.0mL 100mM的磷酸钠缓冲液(pH7.1)。在H_2O中10倍稀释甲基乙烯基酮(30μmol，Sigma-Aldrich)后，将25μL得到的水溶液加入到2mMCoA-SH溶液中。将反应混合物在室温下振荡1小时。在液氮中对反应淬火，并储存在-80℃。

[1290] 在5μm粒径和10×100mm尺寸的SunFire Prep C_{18}柱(Waters)上纯化反应混合物。在注射4-6mL反应混合物后，以5mL/min的流速施用在0.1％(v/v)TFA/水(A)至0.1％(v/v)TFA/乙腈(B)之间的下列梯度。

[1291]

时间(min)	％B
0	5
5	5
30	100

[1292] 通过LC-MS确认HPLC纯化的酮CoA。$C_{25}H_{43}N_7O_{17}P_3S$[MH]+计算的ESI-MS：838.2；观察到的：838.1。冷冻干燥想要的产物，并以18％收率得到2.93mg(3.5μmol)酮CoA。

[1293] 实施例24.DAR为4的ADC的制备和性能

[1294] 可以通过向抗体中插入/移植多个肽标签产生具有DAR为4的ADC，其中所述肽标签是相同酶的底物(图19A)。例如，ybbR-和S6-标签都被PPTase Sfp识别为底物。相反，通过向抗体中插入/移植肽标签来实现使用多种不同配体的抗体标记，其中所述肽标签是两个不同PPTase的底物。例如，A1标签专门被AcpS PPTase识别，而S6标签优先被Sfp PPTase修饰。此外，具有更高DAR(例如，6，8，10，12等的DAR)的免疫缀合物可以通过添加额外的标签生成。酶促缀合也可与其它标记策略组合，如通过半胱氨酸，吡咯赖氨酸，吡咯啉-羧基赖氨酸，和非天然氨基酸的位点特异性缀合，以及化学选择性的方法，如Lys，Cys或Tyr选择性化学。

[1295] 为了制备具有DAR为4的均质ADC，将二个肽标签并入曲妥珠单抗IgG1的重链，即S6标签并入VH结构域，ybbR标签并入CH3结构域(抗hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:142))。这种双标记的抗体以50毫升规模在HEK293F细胞中表达。转染后，培养HEK293F细胞五天，而后通过在3400rpm离心15分钟收获细胞。将所得的培养基上清液通过0.22μm孔隙尺寸的过滤器过滤。使用床体积0.6mL的蛋白A Sepharose

Fast Flow柱(GE Healthcare)完成纯化,该柱用20倍柱体积的PBS平衡。将过滤的培养基上清液以约1mL/min的流速加载。用20倍柱体积的PBS洗涤柱后,用5倍柱体积的0.1M乙酸钠(pH3.0)洗脱肽标记的抗体,接着立即用1M Tris/HCl(pH10)中和至最终pH值约8。根据Bradford方法,总产量为每升培养物8mg纯化的抗体。通过SDS-凝胶电泳评估抗体构建体的纯度。使用30kDa截断值的Amicon Ultra离心过滤器单元浓缩后,在23℃,在75mM HEPES缓冲液,pH 7.5中孵育2.5μM抗hHER2-HC-V2-GDSLSWLLRLLN-Q3-E388-DSLEFIASKLA-N389(142SEQ ID NO)与50μM CoA-MC-MMAF,1μM Sfp,12.5mM $MgCl_2$16小时以用四个药物分子酶促标记双标记的抗体。

[1296] 还原的和去糖基化抗体构建体的去卷积质谱确认了两个ppan-MC-MMAF单元共价附着到曲妥珠单抗的每个重链(观察的质量,54223.20Da;预期质量,54231Da)。ESI-MS既没观察到未偶联(预期质量,51700Da),也没有观察到单-标记的物种(预期质量,52966Da)。通过HPLC分析进一步确认了接近定量地转化成DAR为4的ADC(95%,根据峰面积积分)(图19B)。

[1297] 实施例25:使用蛋白质表达与纯化平台(PEPP)生成肽标记的ADC的综合文库

[1298] 基于人IgG1B12抗体的晶体结构的检查以及表面可及性计算(实施例1),提出了268个肽标记的曲妥珠单抗IgG1构建体的文库。通过标准分子生物学方法,使用表8中所列的寡核苷酸实现S6和ybbR标签序列向恒定区的系统插入。序列证实的携带曲妥珠单抗的重链或轻链基因的质粒用于根据PEI方法的293Freestyle™细胞的瞬时共转染(Meissner等人,2001)。在PEPP系统上进行每个文库成员的培养,所述培养在37℃,5%CO_2下,在体积为35mL的Freestyle™表达培养基(Invitrogen)中进行五天(Gonzalez R,Jennings LL,Knuth M,Orth AP,Klock HE,Ou W,Feuerhelm J,Hull MV,Koesema E,Wang Y,Zhang J,Wu C,Cho CY,Su AI,Batalov S,Chen H,Johnson K,Laffitte B,Nguyen DG,Snyder EY,Schultz PG,Harris JL,Lesley SA.Proc Natl Acad Sci U S A.2010,107(8):3552-7)。自动收获细胞后,使用相同的系统通过蛋白A亲和层析纯化肽标记的抗体的文库。简言之,在0.22μm过滤培养基上清液后,每个滤液以约为1mL/min的流速加载至含有0.2mL固定的树脂的蛋白A亲和柱上。然后用20倍柱体积的PBS洗涤柱,接着用5倍柱体积的0.1M乙酸钠,pH 3.0洗脱。洗出液立即用25%(v/v)的1M Tris-HCl(pH 8.0)中和。

[1299] 为了确定蛋白A纯化的抗体的产量(表21),一式两份在ND-1000UV-Vis分光光度计(NanoDrop Technologies)上、在280nm处、使用预置的IgG分子的摩尔消光系数测定洗出液的蛋白浓度。在使用30kDa截断值的Amicon Ultra-0.5离心过滤装置(EMD Millipore)浓缩肽标记的抗体后,在补充有12.5mM $MgCl_2$和20mM NaCl的Tris-HCl缓冲液(75mM,pH8.0)中用2.5μM肽标记的抗体、20μM CoA-MC-MMAF底物和1μM Sfp酶在20℃进行酶催化的缀合反应约16小时。肽标记的抗体的标记程度通过分析性HPLC在PLRP-S柱上进行定量(4000Å,5μM,50×4.6mm,Agilent Technologies),使用在含有0.1%三氟乙酸的水中的25-50%乙腈的6-min线性梯度。对应的未偶联的抗体被用作阴性对照(表21)。在使用Amicon Ultra-4离心过滤装置(EMD Millipore)浓缩抗体缀合物后,通过在Agilent 6520Q-TOF仪器(Agilent Technologies)上的质谱法进一步分析酶促反应。通过使用10μL浓缩的反应混合物得到还原的和去糖基化的抗体缀合物的去卷积ESI-MS谱(表21)。

[1300] 用Ni-NTA(镍-次氮基三乙酸)层析进一步纯化肽标记的ADC构建体以除去Sfp酶和

过量的CoA-MC-MMAF底物。用PBS平衡所述Ni-NTA柱(各0.2mL床体积)后,将浓缩的缀合样品以约1mL/min的流速加载到柱。接着,用20倍柱体积的PBS洗涤柱,然后用5倍柱体积的补充有250mM咪唑和300mM NaCl的Tris-HCl缓冲液(50mM,pH8.0)洗脱。根据Bradford测定法,肽标记的ADC的回收率平均为蛋白A纯化的起始材料的39％。然后使用NAP-10柱(GE Healthcare),用PEPP系统缓冲液交换各样品为PBS。缓冲液交换后,使用Amicon Ultra-4离心过滤装置(EMD Millipore)浓缩肽标记的ADC,并且通过用PBS稀释调整缀合物的浓度。调节至适当的浓度后,进一步通过DSF(差示扫描荧光测定法),LC90(LabChip 90),AnSEC(分析性尺寸排阻层析),和体外效能测定法表征ADC样本(数据未示出)。

[1301] 在最初设计的268个肽标记的曲妥珠单抗抗体中,对183个构建体测试了表达(68％)。表达水平显示出很大的变异性,范围从0到每升培养物超过30mg抗体(表21),平均为每升培养物16mg(±8mg标准差)抗体。此外,表达水平与肽标签插入的位置有关,其中46个轻链构建体(每升培养物13±8mg)表现出低于137个重链构建体(每升培养物17±8mg)的平均表达水平。表达水平还取决于肽标签的类型:95个带有ybbR标签插入的抗体构建体平均显示比相应的88个带有S6标签插入的构建体(每升培养物13±8mg)更高的表达水平(每升培养物19±7mg)。基于反相HPLC分析观察到缀合效率的相反趋势:44个(72％)具有接近定量的ADC形成(药物比抗体比值≥1.9)的肽标记的构建体是基于S6肽序列的插入,而只有17个(28％)ybbR-标记的抗体显示接近定量转化成相应的ADC。

[1302] 平均而言,重链构建体比在轻链中插入肽的缀合效率高:19％(43个中的8个)在轻链中具有肽标签插入的构建体显示DAR至少为1.9,而40％(131个中的53个)在重链中具有肽标签插入的构建体可以同样的效率缀合。最佳的整体缀合效率由在CH1结构域的几个环区域中的肽标签插入显示。总体上,在183个表达的肽标记的抗体中,确定了174个构建体的缀合效率,其中61(35％)个构建体产生药物比抗体比率(DAR)为1.9或更高。

[1303] 得到的ADC的热稳定性取决于肽标签插入的位点。例如,根据DSF(差示扫描荧光测定法)测量,在CH2结构域中的大多数肽标签插入导致最低观察到的热转换(TM1)的显著降低,如将在实施例26中更详细地说明。通过分析性尺寸排阻层析检测的156个肽标记的ADC中的135个(87％)观察到很少聚集或抗体寡聚物(≥90％的单体类型)。如所预期的,肽标记的ADC的体外效力与其标记程度相关。虽然可以产生大量的具有优选性质的肽标记的ADC,该数据也表明,表达产量,热稳定性,缀合效率和其它性质大大受标签插入位点的选择的影响。

[1304] 表21.在PEPP系统上制备的材料的ADC制备和表征。

[1305]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	DAR[c]	预期质量抗体[d] (Da)	预期质量 ADC[e] (Da)	观察的质量[f] (Da)
SEQ ID NO:150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	10	2.0	50525.0	51790.5	51792.7 51814.6
SEQ ID NO:151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	12	2.0	50525.0	51790.5	51792.4
SEQ ID NO:152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	11	2.0	50525.0	51790.5	51797.2
SEQ ID NO:157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	24	2.0	50525.0	51790.5	51792.8
SEQ ID NO:158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	20	2.0	50525.0	51790.5	51792.0
SEQ ID NO:160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	14	2.0	50525.0	51790.5	51792.3 51814.6
SEQ ID NO:161	抗-hHER2-HC-E152-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P153	SEQ ID NO: 1142	3	0.2	50525.0	51790.5	50528.4 51794.8
SEQ ID NO:162	抗-hHER2-HC-P153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V154	SEQ ID NO: 1143	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:163	抗-hHER2-HC-N159-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S160	SEQ ID NO: 1144	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:164	抗-hHER2-HC-S160-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G161	SEQ ID NO: 1145	10	1.4	50525.0	51790.5	51792.0
SEQ ID NO:165	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A162	SEQ ID NO: 1146	9	1.3	50525.0	51790.5	51798.0 50529.2

[1306]

SEQ ID NO:166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	15	2.0	50525.0	51790.5	51798.4
SEQ ID NO:168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	22	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
SEQ ID NO:169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	15	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
SEQ ID NO:170	抗-hHER2-HC-P171-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A172	SEQ ID NO: 1150	3	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:171	抗-hHER2-HC-S176-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S177	SEQ ID NO: 1151	8	1.9	50525.0	51790.5	51791.7 51812.9
SEQ ID NO:173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	24	1.5	50525.0	51790.5	51792.4
SEQ ID NO:175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	21	2.0	50525.0	51790.5	51792.0 51814.0
SEQ ID NO:176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	32	2.0	50525.0	51790.5	51792.0 51813.7
SEQ ID NO:177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	18	2.0	50525.0	51790.5	51791.0
SEQ ID NO:178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	19	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
SEQ ID NO:179	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	17	2.0	50525.0	51790.5	51800.0 53918.8
SEQ ID NO:180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	23	1.9	50525.0	51790.5	51791.9 51813.5
SEQ ID NO:181	抗-hHER2-HC-K205-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P206	SEQ ID NO: 1159	22	0.2	50525.0	51790.5	50526.7 51792.6 50548.6
SEQ ID NO:182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	25	1.9	50525.0	51790.5	51792.1 51813.9
SEQ ID NO:185	抗-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	35	2.0	50525.0	51790.5	51789.5 51810.4
SEQ ID NO:187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	13	1.9	50525.0	51790.5	51789.5 51770.4 51809.6
SEQ ID NO:189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	16	1.9	50525.0	51790.5	51790.1 51811.8

[1307]

SEQ ID NO:191	抗-hHER2-HC-P244-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P245	SEQ ID NO: 1164	12	0.8	50525.0	51790.5	50522.7 51790.6 50545.4
SEQ ID NO:193	抗 -hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	23	1.9	50525.0	51790.5	51789.0 51809.6
SEQ ID NO:194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	20	2.0	50525.0	51790.5	51789.5 51810.5
SEQ ID NO:195	抗 -hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	25	2.0	50525.0	51790.5	51792.2 51814.5
SEQ ID NO:198	抗 -hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	20	2.0	50525.0	51790.5	51789.2 51810.1
SEQ ID NO:199	抗 -hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	10	2.0	50525.0	51790.5	51789.6 51810.0
SEQ ID NO:200	抗 -hHER2-HC-E269-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-D270	SEQ ID NO: 1170	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:201	抗 -hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	18	2.0	50525.0	51790.5	51789.8 51771.0 51811.2
SEQ ID NO:202	抗 -hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	8	2.0	50525.0	51790.5	51796.4
SEQ ID NO:206	抗 -hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	23	1.8	50525.0	51790.5	51789.8 51811.3
SEQ ID NO:207	抗 -hHER2-HC-T307-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V308	SEQ ID NO: 1174	4	n.d.	50525.0	51790.5	51793.6 50526.4
SEQ ID NO:209	抗 -hHER2-HC-L309-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H310	SEQ ID NO: 1175	10	n.d.	50525.0	51790.5	51795.6 50530.8
SEQ ID NO:211	抗 -hHER2-HC-N315-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G316	SEQ ID NO: 1176	13	0.9	50525.0	51790.5	51788.9 50523.3 51810.4
SEQ ID NO:212	抗 -hHER2-HC-G316-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K317	SEQ ID NO: 1177	7	0.8	50525.0	51790.5	50524.1 51789.7 50545.9
SEQ ID NO:215	抗 -hHER2-HC-A327-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L328	SEQ ID NO: 1178	14	0.5	50525.0	51790.5	51789.9 50522.7
SEQ ID NO:216	抗 -hHER2-HC-L328-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P329	SEQ ID NO: 1179	16	1.0	50525.0	51790.5	51789.8 50523.2 51810.9
SEQ ID NO:217	抗 -hHER2-HC-P329-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A330	SEQ ID NO: 1180	18	1.5	50525.0	51790.5	51790.1 51811.9

[1308]

SEQ ID NO:218	抗-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	9	1.7	50525.0	51790.5	51792.4 50527.6
SEQ ID NO:220	抗-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	6	1.8	50525.0	51790.5	51792.4 51604.8
SEQ ID NO:221	抗-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	26	1.9	50525.0	51790.5	51790.0
SEQ ID NO:222	抗-hHER2-HC-Q342-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P343	SEQ ID NO: 1184	0	N/A	50525.0	51790.5	N/A
SEQ ID NO:223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	14	2.0	50525.0	51790.5	51792.2 51809.3
SEQ ID NO:224	抗-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	16	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
SEQ ID NO:229	抗-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	26	2.0	50525.0	51790.5	51796.8
SEQ ID NO:230	抗-hHER2-HC-N384-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G385	SEQ ID NO: 1188	2	2.0	50525.0	51790.5	51792.8
SEQ ID NO:127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	23	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
SEQ ID NO:232	抗-hHER2-HC-T394-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P395	SEQ ID NO: 1189	3	0.7	50525.0	51790.5	51793.2 50525.2
SEQ ID NO:233	抗-hHER2-HC-P395-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P396	SEQ ID NO: 1190	4	n.d.	50525.0	51790.5	51794.6 51773.9 51820.4
SEQ ID NO:235	抗-hHER2-HC-D401-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G402	SEQ ID NO: 1191	10	0.2	50525.0	51790.5	51793.7 51818.2
SEQ ID NO:236	抗-hHER2-HC-S415-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R416	SEQ ID NO: 1192	5	1.1	50525.0	51790.5	51792.8 50526.8
SEQ ID NO:237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	5	1.7	50525.0	51790.5	51794.1
SEQ ID NO:238	抗-hHER2-HC-W417-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q418	SEQ ID NO: 1194	15	1.4	50525.0	51790.5	51798.8 51921.6[g]
SEQ ID NO:239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	9	2.0	50525.0	51790.5	51794.4
SEQ ID NO:243	抗-hHER2-HC-H433-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N434	SEQ ID NO: 1196	5	2.0	50525.0	51790.5	51793.6 51922.4[g] 51735.6

[1309]

SEQ ID NO:244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	20	2.0	50525.0	51790.5	51797.6 51923.6[g]
SEQ ID NO:246	抗-hHER2-HC-L443-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S444	SEQ ID NO: 1198	24	0.0	50525.0	51790.5	50527.2 50547.1
SEQ ID NO:248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	10	2.0	50525.0	51790.5	51786.8 51915.6[g] 51729.6
SEQ ID NO:249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	18	1.5	50331.8	51597.3	51598.4 51618.3
SEQ ID NO:250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	15	1.6	50331.8	51597.3	51602.4
SEQ ID NO:251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	27	2.0	50331.8	51597.3	51600.8
SEQ ID NO:257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	19	2.0	50331.8	51597.3	51603.2
SEQ ID NO:259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	21	2.0	50331.8	51597.3	51601.6
SEQ ID NO:261	抗-hHER2-HC-P153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V154	SEQ ID NO: 1205	15	0.1	50331.8	51597.3	50339.6
SEQ ID NO:262	抗-hHER2-HC-N159-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S160	SEQ ID NO: 1206	13	n.d.[-]	50331.8	51597.3	50334.4 51600.4
SEQ ID NO:265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	16	1.7	50331.8	51597.3	51598.3 51618.5
SEQ ID NO:267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	18	1.2	50331.8	51597.3	51597.7 51616.8
SEQ ID NO:268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	23	1.9	50331.8	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:269	抗-hHER2-HC-P171-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A172	SEQ ID NO: 1210	15	1.0	50331.8	51597.3	50332.9 50353.8
SEQ ID NO:270	抗-hHER2-HC-S176-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S177	SEQ ID NO: 1211	13	0.1	50331.8	51597.3	50333.0 50354.0
SEQ ID NO:273	抗-hHER2-HC-S190-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S191	SEQ ID NO: 1212	23	0.2	50331.8	51597.3	50333.6 51600.8
SEQ ID NO:274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	24	1.6	50331.8	51597.3	51598.9 51620.3

[1310]

SEQ ID NO:275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	21	2.0	50331.8	51597.3	51598.4 51618.8
SEQ ID NO:277	抗-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	SEQ ID NO: 1215	14	1.6	50331.8	51597.3	51599.2
SEQ ID NO:278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	14	1.9	50331.8	51597.3	51599.0 51617.2
SEQ ID NO:279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	SEQ ID NO: 1217	21	2.0	50331.8	51597.3	51598.1 51618.7
SEQ ID NO:280	抗-hHER2-HC-K205-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P206	SEQ ID NO: 1218	24	0.0	50331.8	51597.3	50327.6
SEQ ID NO:281	抗-hHER2-HC-P206-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S207	SEQ ID NO: 1219	23	0.0	50331.8	51597.3	50333.3 50354.7
SEQ ID NO:286	抗-hHER2-HC-E233-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L234	SEQ ID NO: 1220	28	0.6	50331.8	51597.3	50330.8 51596.6 51615.6
SEQ ID NO:288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	24	2.0	50331.8	51597.3	51596.7 51617.5
SEQ ID NO:289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	SEQ ID NO: 1222	22	1.3	50331.8	51597.3	51598.8 51620.7
SEQ ID NO:290	抗-hHER2-HC-P244-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P245	SEQ ID NO: 1223	8	1.4	50331.8	51597.3	51596.8 51614.6
SEQ ID NO:291	抗-hHER2-HC-P245-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K246	SEQ ID NO: 1224	22	1.0	50331.8	51597.3	50330.6 51595.9 50351.5
SEQ ID NO:292	抗-hHER2-HC-I253-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S254	SEQ ID NO: 1225	0	N/A	50331.8	51597.3	N/A
SEQ ID NO:293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	24	1.9	50331.8	51597.3	51596.6 51616.8
SEQ ID NO:294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	21	2.0	50331.8	51597.3	51596.3 51616.5
SEQ ID NO:296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	SEQ ID NO: 1228	22	1.9	50331.8	51597.3	51596.3 51616.1
SEQ ID NO:297	抗-hHER2-HC-S267-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H268	SEQ ID NO: 1229	23	0.2	50331.8	51597.3	51596.0 50330.9 51615.6
SEQ ID NO:298	抗-hHER2-HC-H268-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E269	SEQ ID NO: 1230	22	0.7	50331.8	51597.3	51596.2 50331.0 51616.8

[1311]

SEQ ID NO:299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	17	1.8	50331.8	51597.3	51598.7 51620.0
SEQ ID NO:300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	26	1.3	50331.8	51597.3	51596.4 51616.5
SEQ ID NO:301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	22	1.7	50331.8	51597.3	51595.9 51615.4
SEQ ID NO:302	抗-hHER2-HC-D280-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G281	SEQ ID NO: 1234	4	0.7	50331.8	51597.3	50330.8 51596.3 50351.7
SEQ ID NO:303	抗-hHER2-HC-H285-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N286	SEQ ID NO: 1235	25	0.0	50331.8	51597.3	50331.0 50352.7
SEQ ID NO:304	抗-hHER2-HC-N286-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A287	SEQ ID NO: 1236	20	0.0	50331.8	51597.3	50332.0 50354.1
SEQ ID NO:305	抗-hHER2-HC-P291-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R292	SEQ ID NO: 1237	21	0.5	50331.8	51597.3	50333.5 51598.8 51620.0
SEQ ID NO:310	抗-hHER2-HC-N315-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G316	SEQ ID NO: 1238	15	n.d.	50331.8	51597.3	50331.5 51596.8 50353.1
SEQ ID NO:311	抗-hHER2-HC-G316-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K317	SEQ ID NO: 1239	9	1.1	50331.8	51597.3	51596.6 50331.0 51614.0
SEQ ID NO:312	抗-hHER2-HC-K317-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E318	SEQ ID NO: 1240	10	0.8	50331.8	51597.3	50330.9 51596.3 50352.1
SEQ ID NO:313	抗-hHER2-HC-K326-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A327	SEQ ID NO: 1241	15	0.0	50331.8	51597.3	50330.8 51597.2
SEQ ID NO:314	抗-hHER2-HC-A327-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L328	SEQ ID NO: 1242	25	0.1	50331.8	51597.3	50333.6 50355.1
SEQ ID NO:315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	13	1.9	50331.8	51597.3	51598.8
SEQ ID NO:316	抗-hHER2-HC-P329-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A330	SEQ ID NO: 1244	7	0.9	50331.8	51597.3	51601.6 50334.8
SEQ ID NO:317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	25	1.8	50331.8	51597.3	51602.4
SEQ ID NO:318	抗-hHER2-HC-A339-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K340	SEQ ID NO: 1246	25	0.0	50331.8	51597.3	50333.6
SEQ ID NO:319	抗-hHER2-HC-K340-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G341	SEQ ID NO: 1247	27	0.4	50331.8	51597.3	51600.4 50333.2

[1312]

SEQ ID NO:320	抗-hHER2-HC-G341-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q342	SEQ ID NO: 1248	25	0.2	50331.8	51597.3	51599.9 50334.7
SEQ ID NO:321	抗-hHER2-HC-Q342-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P343	SEQ ID NO: 1249	28	0.8	50331.8	51597.3	51599.8 50334.5
SEQ ID NO:322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	24	1.9	50331.8	51597.3	51599.1 51615.8
SEQ ID NO:323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	29	1.9	50331.8	51597.3	51600.1 51616.6
SEQ ID NO:325	抗-hHER2-HC-E356-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E357	SEQ ID NO: 1252	20	0.8	50331.8	51597.3	51600.8 50335.1 51616.8
SEQ ID NO:327	抗-hHER2-HC-M358-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T359	SEQ ID NO: 1253	26	0.2	50331.8	51597.3	50333.9 51599.4
SEQ ID NO:328	抗-hHER2-HC-K360-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N361	SEQ ID NO: 1254	24	0.6	50331.8	51597.3	51599.9 51615.1
SEQ ID NO:329	抗-hHER2-HC-N384-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G385	SEQ ID NO: 1255	24	0.0	50331.8	51597.3	50334.3 50354.2
SEQ ID NO:129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	21	1.9	50331.8	51597.3	51601.2
SEQ ID NO:330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	25	1.6	50331.8	51597.3	51600.1 51620.9
SEQ ID NO:332	抗-hHER2-HC-P395-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P396	SEQ ID NO: 1257	25	0.0	50331.8	51597.3	50334.4 50352.8
SEQ ID NO:333	抗-hHER2-HC-D399-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S400	SEQ ID NO: 1258	11	0.0	50331.8	51597.3	50335.1 50353.6
SEQ ID NO:335	抗-hHER2-HC-D401-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G402	SEQ ID NO: 1259	23	0.0	50331.8	51597.3	50334.9 50353.0
SEQ ID NO:336	抗-hHER2-HC-S415-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R416	SEQ ID NO: 1260	21	0.2	50331.8	51597.3	50335.0 51600.5
SEQ ID NO:337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	15	1.9	50331.8	51597.3	51599.9 51615.8
SEQ ID NO:338	抗-hHER2-HC-W417-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q418	SEQ ID NO: 1262	9	0.2	50331.8	51597.3	50334.8 51599.9 50353.4
SEQ ID NO:339	抗-hHER2-HC-Q418-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q419	SEQ ID NO: 1263	22	0.5	50331.8	51597.3	51600.5 50335.2 51616.7

[1313]

SEQ ID NO:340	抗-hHER2-HC-Q419-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G420	SEQ ID NO: 1264	21	0.8	50331.8	51597.3	51600.0 51616.5
SEQ ID NO:341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	SEQ ID NO: 1265	22	1.1	50331.8	51597.3	51599.5 51616.0
SEQ ID NO:342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	24	1.4	50331.8	51597.3	51600.6 51614.9
SEQ ID NO:343	抗-hHER2-HC-H433-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N434	SEQ ID NO: 1267	26	0.0	50331.8	51597.3	50334.7 50276.2
SEQ ID NO:344	抗-hHER2-HC-N434-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H435	SEQ ID NO: 1268	25	0.6	50331.8	51597.3	51592.4 50326.8 50268.8
SEQ ID NO:346	抗-hHER2-HC-L443-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S444	SEQ ID NO: 1269	26	0.0	50331.8	51597.3	50334.5 50275.8 50353.4
SEQ ID NO:349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	29	1.8	50331.8	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:31	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V110	SEQ ID NO: 1271	34	1.4	24811.6	26077.1	26077.8 26058.3 26096.4
SEQ ID NO:32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	5	1.9	24811.6	26077.1	26076.4
SEQ ID NO:33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	13	2.0	24811.6	26077.1	26075.6
SEQ ID NO:34	抗-hHER2-LC-P119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P120	SEQ ID NO: 1274	1	N/A	24811.6	26077.1	N/A
SEQ ID NO:37	抗-hHER2-LC-D122-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E123	SEQ ID NO: 1275	1	N/A	24811.6	26077.1	N/A
SEQ ID NO:38	抗-hHER2-LC-Y140-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P141	SEQ ID NO: 1276	3	0.8	24811.6	26077.1	26077.2
SEQ ID NO:39	抗-hHER2-LC-P141-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R142	SEQ ID NO: 1277	3	0.3	24811.6	26077.1	26076.8
SEQ ID NO:40	抗-hHER2-LC-R142-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E143	SEQ ID NO: 1278	5	0.3	24811.6	26077.1	26077.7 24811.8 26097.2
SEQ ID NO:41	抗-hHER2-LC-E143-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A144	SEQ ID NO: 1279	6	0.4	24811.6	26077.1	26075.6 26097.6
SEQ ID NO:42	抗-hHER2-LC-D151-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N152	SEQ ID NO: 1280	16	0.3	24811.6	26077.1	24811.7 26077.3 24829.7

[1314]

SEQ ID NO:43	抗-hHER2-LC-N152-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A153	SEQ ID NO: 1281	5	1.0	24811.6	26077.1	26077.2
SEQ ID NO:44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282	13	1.9	24811.6	26077.1	26077.7 26096.6
SEQ ID NO:45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	21	1.2	24811.6	26077.1	26078.2 26096.9
SEQ ID NO:46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	14	2.0	24811.6	26077.1	26075.2
SEQ ID NO:47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	19	1.9	24811.6	26077.1	26077.6 26097.6
SEQ ID NO:48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1286	17	0.7	24811.6	26077.1	26077.2
SEQ ID NO:50	抗-hHER2-LC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E165	SEQ ID NO: 1287	14	0.0	24811.6	26077.1	24810.0
SEQ ID NO:51	抗-hHER2-LC-E165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q166	SEQ ID NO: 1288	0	N/A	24811.6	26077.1	N/A
SEQ ID NO:52	抗-hHER2-LC-Q166-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-D167	SEQ ID NO: 1289	17	0.0	24811.6	26077.1	24810.4 24832.4
SEQ ID NO:53	抗-hHER2-LC-D167-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S168	SEQ ID NO: 1290	24	0.7	24811.6	26077.1	26077.4 24812.3 26096.5
SEQ ID NO:54	抗-hHER2-LC-T197-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H198	SEQ ID NO: 1291	8	1.2	24811.6	26077.1	24812.0 26077.9 24831.4
SEQ ID NO:56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	5	1.9	24811.6	26077.1	26076.0
SEQ ID NO:59	抗-hHER2-LC-S202-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S203	SEQ ID NO: 1293	8	2.0	24811.6	26077.1	26077.4 26095.9
SEQ ID NO:63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	15	2.0	24618.4	25883.9	25883.2
SEQ ID NO:64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	17	1.6	24618.4	25883.9	25881.2
SEQ ID NO:65	抗-hHER2-LC-P119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P120	SEQ ID NO: 1296	13	0.0	24618.4	25883.9	24618.1 24637.6
SEQ ID NO:66	抗-hHER2-LC-P120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S121	SEQ ID NO: 1297	9	0.0	24618.4	25883.9	24617.2

[1315]

SEQ ID NO:67	抗-hHER2-LC-S121-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D122	SEQ ID NO: 1298	4	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
SEQ ID NO:68	抗-hHER2-LC-D122-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E123	SEQ ID NO: 1299	2	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
SEQ ID NO:69	抗-hHER2-LC-Y140-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P141	SEQ ID NO: 1300	5	0.1	24618.4	25883.9	24616.4
SEQ ID NO:71	抗-hHER2-LC-R142-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E143	SEQ ID NO: 1301	13	0.1	24618.4	25883.9	24618.8 25884.0 24639.3
SEQ ID NO:72	抗-hHER2-LC-E143-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A144	SEQ ID NO: 1302	10	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
SEQ ID NO:73	抗-hHER2-LC-D151-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N152	SEQ ID NO: 1303	17	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
SEQ ID NO:74	抗-hHER2-LC-N152-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A153	SEQ ID NO: 1304	17	0.0	24618.4	25883.9	24616.8
SEQ ID NO:75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	20	1.8	24618.4	25883.9	25882.8
SEQ ID NO:76	抗-hHER2-LC-L154-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q155	SEQ ID NO: 1306	25	0.6	24618.4	25883.9	25884.6 24618.9 25904.2
SEQ ID NO:77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	27	1.1	24618.4	25883.9	25883.9 24619.0 25903.2
SEQ ID NO:79	抗-hHER2-LC-S162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V163	SEQ ID NO: 1308	7	0.0	24618.4	25883.9	24616.4
SEQ ID NO:81	抗-hHER2-LC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E165	SEQ ID NO: 1309	10	0.0	24618.4	25883.9	24616.4
SEQ ID NO:82	抗-hHER2-LC-E165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q166	SEQ ID NO: 1310	29	0.0	24618.4	25883.9	24618.9 24639.4
SEQ ID NO:83	抗-hHER2-LC-Q166-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D167	SEQ ID NO: 1311	20	0.0	24618.4	25883.9	24617.2
SEQ ID NO:84	抗-hHER2-LC-D167-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S168	SEQ ID NO: 1312	28	0.0	24618.4	25883.9	24618.8 24639.0
SEQ ID NO:85	抗-hHER2-LC-T197-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-H198	SEQ ID NO: 1313	5	0.0	24618.4	25883.9	24615.2
SEQ ID NO:87	抗-hHER2-LC-Q199-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G200	SEQ ID NO: 1314	7	0.0	24618.4	25883.9	24617.2

[1316]

SEQ ID NO:88	抗-hHER2-LC-G200-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L201	SEQ ID NO: 1315	18	0.2	24618.4	25883.9	24618.8 25884.4 24638.9
SEQ ID NO:89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	15	0.8	24618.4	25883.9	25884.0

[1317] [a]名称代表含有具有附着的化合物的肽标签的HC或LC部分，配对的野生型链未列出。

[1318] [b]蛋白A纯化后测量的每升培养物的抗体产量(基于35mL培养物)。

[1319] [c]根据HPLC的药物比抗体比率。

[1320] [d]预测的抗体质量，道尔顿。

[1321] [e]预测的ADC质量，道尔顿。

[1322] [f]Agilent 6520Q-TOF仪器(Agilent Technologies)上检测的质量，道尔顿。首先列表了最显著的观察。

[1323] [g]观察到的质量对应于重链的未剪切的C末端赖氨酸残基。

[1324] nd，未测定。由于峰重叠，药物比抗体比率不能通过HPLC准确地测定。

[1325] N/A，不可用。由于低产量没有尝试缀合或者不能获得数据。实施例26.选择的肽标记的ADC的比例放大用于药代动力学(PK)研究和进一步表征

[1326] PEPP系统不提供足够量的肽标记的ADC用于PK研究。随后，选自实施例25中测试的183个抗体(表21)中的97个构建体(表22)的表达被放大到200-1000mL培养物体积。对于按比例放大的选择标准是高缀合效率，合理的表达产率，证实的在体外效力，以及对实施例25中制备的ADC所观察到的低聚集水平。

[1327] 在所选的S6/ybbR-标记的抗体在Freestyle™表达培养基(Invitrogen)中在37℃下在5％CO_2中表达五天后，通过离心收集培养物，将得到的培养基上清液通过0.22μm过滤器(EMD Millipore)。通过SDS-PAGE分析证实抗体的表达。接着，通过使用MINIPULS Evolution蠕动泵(Gilson Inc)将滤液以0.5-1mL/min的流速加载到含0.5mL蛋白A树脂的PBS平衡的柱上。用100-200倍柱体积的PBS洗涤该后，用0.1M乙酸钠(pH3.0)将抗体构建体洗脱至两个2.5mL级分中。立即用25-38％(v/v)的Tris-HCl缓冲液(1M，pH 8.0)中和两个级分。为了确定蛋白A纯化的抗体的产量(表22)，根据预先设定的IgG分子摩尔消光系数，在ND-1000UV-Vis分光光度计(NanoDrop Technologies)上在280nm处一式两份测定所述洗出液的蛋白浓度。使用Slide-A-Lyzer透析盒(3.5-7.0kDa截断值，Pierce)，将各构建体的第二洗脱级分透析到PBS中，用于后续的通过DSF测量非缀合抗体的热稳定性(表23)。各肽标记的抗体的第一洗脱级分透析至缀合缓冲液中(补充有20mM NaCl和12.5mM $MgCl_2$的75mM Tris-HCl缓冲液，pH8.0)。在调节抗体浓度至2.5μM后，通过加入CoA-MC-MMAF和Sfp酶至终浓度分别为30-60μM和1-4μM，启动缀合反应。允许酶促反应在室温下进行约16-20小时，而后使用各自的未偶联抗体作为对照，通过分析性反相HPLC验证标记的程度(表22)。所有缀合反应在Agilent6520Q-TOF仪器上通过质谱法进行分析(表22)。在确认接近定量的缀合后，用30kDa截断值的Amicon Ultra离心过滤装置(EMD Millipore)将反应混合物浓缩至最终体积1mL。通过离心除去沉淀后，通过SEC(尺寸排阻色谱)，在PBS中的HiLoad 26/

60Superdex200制备级柱(GE Healthcare)上,以1mL/min的流速,除去Sfp酶和过量的CoA-MC-MMAF底物。SEC后通过反相HPLC评估肽标记的ADC的纯度。0.22μm过滤后,如上所述在ND-1000UV-Vis分光光度计(NanoDrop Technologies)上使用一式三份测量ADC的最终产量(表22)。

[1328] 表22.来自200-1000mL比例放大的培养物的ADC生产和表征

[1329]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	ADC产量[c] (mg/L)	DAR[d]	单体[e] (%)	预期质量[f] (Da)	观察的质量[g] (Da)
SEQ ID NO:151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	57	31	2.0	97	51790.5	51786.4
SEQ ID NO:152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	40	23	2.0	100	51790.5	51796.4
SEQ ID NO:157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	41	20	2.0	100	51790.5	51785.2
SEQ ID NO:158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	40	20	2.0	100	51790.5	51785.6

[1330]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	ADC 产量[c] (mg/L)	DAR[d]	单体[e] (%)	预期质量[f] (Da)	观察的质量[g] (Da)
SEQ ID NO:166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	25	16	2.0	100	51790.5	51791.6
SEQ ID NO:168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	32	15	2.0	100	51790.5	51787.6
SEQ ID NO:169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	39	21	2.0	100	51790.5	51786.4
SEQ ID NO:173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	36	25	2.0	100	51790.5	51792.0
SEQ ID NO:178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	35	21	2.0	100	51790.5	51794.8
SEQ ID NO:179	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	39	21	1.9	100	51790.5	51790.4
SEQ ID NO:202	抗-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	9	4	1.9	100	51790.5	51782.0
SEQ ID NO:218	抗-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	30	14	1.8	100	51790.5	51796.4 50526.8[h]
SEQ ID NO:220	抗-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	20	9	2.0	100	51790.5	51794.4 51918.4[i]
SEQ ID NO:221	抗-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	47	26	1.9	100	51790.5	51794.8
SEQ ID NO:224	抗-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	37	21	2.0	100	51790.5	51795.6
SEQ ID NO:229	抗-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	46	21	1.9	100	51790.5	51785.2
SEQ ID NO:127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	40	25	2.0	100	51790.5	51792.4
SEQ ID NO:239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	55	26	2.0	100	51790.5	51786.8 51914.4[i]
SEQ ID NO:244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	41	10	1.9	n.d.	51790.5	51785.2 51912.8[i]
SEQ ID NO:248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	9	3	1.9	100	51790.5	51783.2 51910.8[i]

[1331]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	ADC 产量[c] (mg/L)	DAR[d]	单体[e] (%)	预期质量[f] (Da)	观察的质量[g] (Da)
SEQ ID NO:250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	35	25	1.9	100	51597.3	51591.2
SEQ ID NO:251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	42	24	1.9	100	51597.3	51592.4
SEQ ID NO:257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	33	20	1.9	100	51597.3	51602.0
SEQ ID NO:259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	26	14	1.9	100	51597.3	51592.0
SEQ ID NO:268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	33	21	1.9	100	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:277	抗-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	SEQ ID NO: 1215	24	14	1.9	100	51597.3	51592.4
SEQ ID NO:315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	35	22	1.9	100	51597.3	51600.4
SEQ ID NO:317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	20	12	1.8	100	51597.3	51589.2 50323.6[h]
SEQ ID NO:129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	51	28	1.9	100	51597.3	51592.0
SEQ ID NO:349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	37	23	1.9	100	51597.3	51590.4
SEQ ID NO:32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	8	3	2.0	93	26077.1	26074.8
SEQ ID NO:33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	20	13	2.0	100	26077.1	26073.6
SEQ ID NO:46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	29	19	1.9	100	26077.1	26070.8
SEQ ID NO:48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	9	5	1.9	100	26077.1	26076.0
SEQ ID NO:56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	10	3	1.9	100	26077.1	26074.4
SEQ ID NO:63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	53	30	1.9	100	25883.9	25880.8

[1332]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	ADC 产量[c] (mg/L)	DAR[d]	单体[e] (%)	预期质量[f] (Da)	观察的质量[g] (Da)
SEQ ID NO:64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	12	8	1.9	100	25883.9	25880.4 25901.2[j]
SEQ ID NO:75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	14	7	1.9	100	25883.9	25878.0
SEQ ID NO:89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	26	15	1.8	100	25883.9	25881.2
SEQ ID NO:330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	23	14	1.9	100	51597.3	51592.7
SEQ ID NO:195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	20	7	2.0	100	51790.5	51786.1 51727.9[k]
SEQ ID NO:206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	28	16	1.9	100	51790.5	51786.8
SEQ ID NO:288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	28	18	2.0	100	51597.3	51593.9 50407.9[l]
SEQ ID NO:249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	24	15	1.9	100	51597.3	51595.9
SEQ ID NO:323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	23	13	1.9	100	51597.3	51594.6
SEQ ID NO:322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	24	15	1.9	100	51597.3	51594.6
SEQ ID NO:301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	21	13	1.9	100	51597.3	51594.1
SEQ ID NO:279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	SEQ ID NO: 1217	12	7	1.9	100	51597.3	51595.9
SEQ ID NO:293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	19	11	2.0	100	51597.3	51595.3
SEQ ID NO:194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	23	3	2.0	n.d.	51790.5	51788.3 51597.3[j] 51729.3[k]
SEQ ID NO:337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	22	10	2.0	100	51597.3	51595.0 51537.0[k]
SEQ ID NO:201	抗-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	17	9	2.0	100	51790.5	51788.7

[1333]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	ADC 产量[c] (mg/L)	DAR[d]	单体[e] (%)	预期质量[f] (Da)	观察的质量[g] (Da)
SEQ ID NO:265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	20	14	1.9	100	51597.3	51596.6
SEQ ID NO:274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	22	12	2.0	100	51597.3	51596.9
SEQ ID NO:275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	22	14	2.0	100	51597.3	51597.0
SEQ ID NO:177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	18	10	2.0	100	51790.5	51790.8
SEQ ID NO:294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	12	7	2.0	100	51597.3	51595.0 51536.9[k]
SEQ ID NO:199	抗-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	13	6	2.0	100	51790.5	51789.1
SEQ ID NO:198	抗-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	9	5	2.0	100	51790.5	51788.7
SEQ ID NO:189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	9	4	2.0	100	51790.5	51789.6
SEQ ID NO:223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	15	6	2.0	100	51790.5	51789.2
SEQ ID NO:193	抗-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	7	3	1.9	100	51790.5	51788.9 51729.9[k]
SEQ ID NO:182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	30	15	1.9	100	51790.5	51790.1
SEQ ID NO:296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	SEQ ID NO: 1228	10	5	2.0	100	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	12	6	2.0	100	51597.3	51597.3
SEQ ID NO:299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	9	5	1.9	100	51597.3	51595.7
SEQ ID NO:150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	10	4	2.0	100	51790.5	51792.2
SEQ ID NO:185	抗-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	27	12	2.0	100	51790.5	51789.6

[1334]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	ADC 产量[c] (mg/L)	DAR[d]	单体[e] (%)	预期质量[f] (Da)	观察的质量[g] (Da)
SEQ ID NO:47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	23	15	2.0	100	26077.1	26076.5 25457.3[l]
SEQ ID NO:91	抗-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	SEQ ID NO: 1317	15	8	1.9	100	25883.9	25883.5 28925.4[l]
SEQ ID NO:60	抗-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	15	6	2.0	100	26077.1	26076.7
SEQ ID NO:61	抗-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	9	4	1.9	100	26077.1	26076.7
SEQ ID NO:90	抗-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	SEQ ID NO: 1320	22	13	1.9	100	25883.9	25883.6
SEQ ID NO:44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282	30	22	2.0	100	26077.1	26075.7 25456.0[l]
SEQ ID NO:267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	25	19	2.0	100	51597.3	51597.0
SEQ ID NO:176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	15	8	2.0	100	51790.5	51791.2
SEQ ID NO:300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	33	26	1.9	100	51597.3	51595.2
SEQ ID NO:180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	27	17	2.0	100	51790.5	51787.2
SEQ ID NO:175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	43	23	2.0	100	51790.5	51791.5
SEQ ID NO:341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	SEQ ID NO: 1265	42	33	2.0	100	51597.3	51595.0
SEQ ID NO:289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	SEQ ID NO: 1222	49	38	1.9	100	51597.3	51595.2 50408.8[l]
SEQ ID NO:342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	39	31	2.0	100	51597.3	51596.7 51725.6[i]
SEQ ID NO:77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	45	35	1.9	100	25883.9	25883.0 28925.2[l]
SEQ ID NO:45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	35	27	2.0	100	26077.1	26076.8 28925.2[l]

[1335]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	抗体产量[b] (mg/L)	ADC 产量[c] (mg/L)	DAR[d]	单体[e] (%)	预期质量[f] (Da)	观察的质量[g] (Da)
SEQ ID NO:237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	8	4	2.0	81	51790.5	51790.9 51917.9[i]
SEQ ID NO:187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	4	1	2.0	100	51790.5	51790.0
SEQ ID NO:160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	17	12	2.0	100	51790.5	51790.1
SEQ ID NO:370	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	SEQ ID NO: 1321	18	9	1.9	100	51800.5	51798.3 50533.6[h]
SEQ ID NO:372	抗-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	SEQ ID NO: 1322	22	10	1.5	100	51800.5	51799.0 50533.8[h]
SEQ ID NO:374	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	SEQ ID NO: 1323	23	10	1.9	100	51800.5	51799.2
SEQ ID NO:376	抗-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	SEQ ID NO: 1324	8	4	1.8	100	51800.5	51799.3 50534.1[h]
SEQ ID NO:377	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	SEQ ID NO: 1325	14	7	1.9	100	51800.5	51799.2
SEQ ID NO:378	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	SEQ ID NO: 1326	11	5	1.9	100	51800.5	51799.2
SEQ ID NO:380	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	SEQ ID NO: 1327	16	9	1.9	100	51800.5	51799.0
SEQ ID NO:381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	SEQ ID NO: 1328	25	10	1.9	100	51800.5	51799.2
SEQ ID NO:383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	SEQ ID NO: 1329	27	10	1.9	100	26087.1	26085.8 28924.5[l]
SEQ ID NO:384	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	SEQ ID NO: 1330	27	10	1.9	100	26087.1	26086.0 28924.7[l]

[1336] [a]名称代表含有具有附着的化合物的肽标签的HC或LC部分，配对的野生型链未列出。

[1337] [b]蛋白A纯化后测量的每升培养物的抗体产量(基于200-1000mL培养物)。

[1338] [c]尺寸排阻层析后测量的每升培养物中ADC的产量。

[1339] [d]根据HPLC的药物比抗体的比率。

[1340] [e]ADC的分析性尺寸排阻层析的结果(单体的百分比)。

[1341] [f]ADC的预期质量，道尔顿。

[1342] [g]Agilent 6520Q-TOF仪器(Agilent Technologies)检测的质量，道尔顿。首先列

表了最显著的观察。

[1343] [h]观察到的质量对应于未缀合的抗体。

[1344] [i]观察到的质量对应于重链的未剪切的C末端赖氨酸残基。

[1345] [j]观察到的质量推测对应于钠加合物。

[1346] [k]观察到的质量对应于重链的剪切的Gly446残基。

[1347] [l]观察到的质量对应于低丰度的未知物种。

[1348] [j]遗留峰。

[1349] n.d.,未测定。

[1350] 所选肽标记的抗体的表达水平平均为每升细胞培养物25mg(范围从4到57mg/L)(表22),纯化的ADC最终产量平均每升细胞培养物14mg(范围从1到38mg/L)(表22)。所有ADC位点特异性地与两个CoA-MC-MMAF分子缀合,平均DAR为1.9(DAR范围从1.5至2.0)如HPLC和MS所验证的(表22)。制备的97个ADC中的92个没有检测到聚集或寡聚物种(表22)。如通过分析型尺寸排阻层析所测定的,所有其他ADC是至少81%的单体(两个ADC的数据未显示)。非缀合抗体和ADC的热稳定性由DSF表征(表23)。对于野生型曲妥珠单抗,在69.7和81.2℃观察到两个DSF的热融解转换(Tm1和Tm2)。对于97个肽标记的抗体中的28个,两个转换均在比野生型曲妥珠单抗所观察到的转换温度少3℃以内。相对于未缀合的抗体,CoA-MC-MMAF的缀合使ADC的Tm1平均降低1.2℃,使ADC的Tm2平均降低0.6℃(表23)。对于37个抗体(和ADC),相对于野生型曲妥珠单抗热稳定性显著降低(>3℃),如Tm1的差异所表明的。这个过渡是归因于IgG的CH2结构域(氨基酸残基228-340)的解折叠,实际上大多数去稳定的抗体在CH2结构域中的位置处具有肽标签插入。具体而言,图18的曲线示出了CH2结构域中的肽标签插入通常导致比相邻重链CH1和CH3结构域中的各自的肽标签插入更低的Tm1值。如上所述,该肽标签的位置可以显著影响所得到的抗体和ADC的性能。

[1351] 表23.如通过差示扫描荧光测定法(DSF)测定的修饰的抗体和ADC的热稳定性。

[1352]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
SEQ ID NO:151	抗 -hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	69.8	t.b.	69.2	t.b.	-0.6	t.b.	0.1
SEQ ID NO:152	抗 -hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	69.1	t.b.	68.8	t.b.	-0.3	t.b.	-0.6
SEQ ID NO:157	抗 -hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	67.6	81.3	67.1	81.2	-0.5	-0.1	-2.1
SEQ ID NO:158	抗 -hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	67.9	81.3	67.3	81.3	-0.6	0	-1.8
SEQ ID NO:166	抗 -hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	69.3	80.0	68.9	79.8	-0.3	-0.2	-0.4
SEQ ID NO:168	抗 -hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	68.9	80.4	68.8	80.5	-0.2	0.1	-0.8
SEQ ID NO:169	抗 -hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	69.2	80.4	68.8	80.2	-0.4	-0.2	-0.5
SEQ ID NO:173	抗 -hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	69.0	80.5	68.3	80.4	-0.7	-0.2	-0.7
SEQ ID NO:178	抗 -hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	68.7	80.8	67.6	80.9	-1.1	0.1	-1.0
SEQ ID NO:179	抗 -hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	69.3	81.1	68.8	80.9	-0.5	-0.1	-0.4
SEQ ID NO:202	抗 -hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	53.4	81.6	51.2	81.2	-2.2	-0.4	-16.3
SEQ ID NO:218	抗 -hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	52.5	81.5	49.0	81.1	-3.5	-0.3	-17.2
SEQ ID NO:220	抗 -hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	65.2	77.3	58.7	81.0	-6.5	3.7	-4.5
SEQ ID NO:221	抗 -hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	65.0	76.9	56.0	81.0	-9	4.2	-4.7
SEQ ID NO:224	抗 -hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	58.6	81.4	57.7	81.2	-0.9	-0.2	-11.1
SEQ ID NO:229	抗 -hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	70.1	81.7	68.8	81.4	-1.3	-0.3	0.4

[1353]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
SEQ ID NO:127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	66.4	81.3	66.2	80.9	-0.2	-0.4	-3.3
SEQ ID NO:239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	69.0	81.0	68.3	81.1	-0.7	0.1	-0.7
SEQ ID NO:244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	60.5	81.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-9.2
SEQ ID NO:248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	71.8	81.0	69.9	80.5	-1.8	-0.5	2.1
SEQ ID NO:250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	70.1	t.b.	71.2	t.b.	1	t.b.	0.4
SEQ ID NO:251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	70.4	t.b.	70.4	t.b.	0	t.b.	0.7
SEQ ID NO:257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	69.3	80.8	68.3	81.0	-1.1	0.2	-0.4
SEQ ID NO:259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	69.3	80.9	68.5	81.2	-0.7	0.2	-0.4
SEQ ID NO:268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	69.6	80.3	69.2	80.5	-0.4	0.1	-0.1
SEQ ID NO:277	抗-hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	SEQ ID NO: 1215	69.3	81.1	68.5	80.9	-0.9	-0.1	-0.4
SEQ ID NO:315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	56.9	78.8	50.4	81.0	-6.5	2.1	-12.8
SEQ ID NO:317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	54.2	81.1	51.3	81.2	-2.9	0.1	-15.5
SEQ ID NO:129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	69.3	81.5	68.8	81.0	-0.6	-0.5	-0.4
SEQ ID NO:349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	69.9	81.2	69.9	80.9	0	-0.4	0.2
SEQ ID NO:32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	66.9	t.b.	66.3	t.b.	-0.6	t.b.	-2.8
SEQ ID NO:33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO:	67.3	t.b.	66.0	t.b.	-1.3	t.b.	-2.4

[1354]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LSWLLRLLN-A112	1273							
SEQ ID NO:46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	69.4	80.0	68.7	79.4	-0.7	-0.6	-0.3
SEQ ID NO:48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	68.5	t.b.	67.3	t.b.	-1.2	t.b.	-1.2
SEQ ID NO:56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	67.5	t.b.	67.4	t.b.	-0.1	t.b.	-2.2
SEQ ID NO:63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	69.0	t.b.	67.6	t.b.	-1.4	t.b.	-0.7
SEQ ID NO:64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	69.6	t.b.	68.5	t.b.	-1.1	t.b.	-0.1
SEQ ID NO:75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	69.6	79.7	69.0	79.2	-0.5	-0.5	-0.1
SEQ ID NO:89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	69.5	75.1	68.7	74.8	-0.8	-0.4	-0.2
SEQ ID NO:330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	67.8	79.1	67.3	78.7	-0.5	-0.5	-1.9
SEQ ID NO:195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	52.0	76.9	49.7	78.6	-2.3	1.7	-17.7
SEQ ID NO:206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	56.0	77.3	65.4	77.9	9.4	0.6	-13.7
SEQ ID NO:288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	64.1	79.4	63.5	78.9	-0.6	-0.5	-5.6
SEQ ID NO:249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	68.1	t.b.	67.8	t.b.	-0.3	t.b.	-1.6
SEQ ID NO:323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	60.5	79.2	58.4	78.6	-2.1	-0.5	-9.2
SEQ ID NO:322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	59.5	79.2	57.6	78.7	-1.8	-0.5	-10.2
SEQ ID NO:301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	53.0	79.8	49.8	78.0	-3.1	-1.8	-16.7
SEQ ID NO:279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO:	68.2	77.3	68.2	77.3	0.0	0.0	-1.5

[1355]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LEFIASKLA-T197	1217							
SEQ ID NO:293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	57.9	79.2	53.3	78.5	-4.5	-0.7	-11.8
SEQ ID NO:194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	67.5	78.8	66.8	78.5	-0.8	-0.3	-2.2
SEQ ID NO:201	抗-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	67.7	75.9	43.9	77.7	-23.8	1.8	-2.0
SEQ ID NO:265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	69.0	78.2	68.1	76.4	-0.9	-1.7	-0.7
SEQ ID NO:274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	68.3	77.8	66.8	74.9	-1.5	-2.9	-1.4
SEQ ID NO:275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	68.4	78.1	66.9	76.1	-1.4	-1.9	-1.3
SEQ ID NO:177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	68.0	77.1	66.7	75.9	-1.3	-1.2	-1.7
SEQ ID NO:294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	58.4	79.3	54.4	78.7	-4.1	-0.5	-11.3
SEQ ID NO:199	抗-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	49.8	78.9	48.1	77.6	-1.6	-1.3	-19.9
SEQ ID NO:198	抗-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	49.1	78.9	47.4	78.0	-1.7	-0.9	-20.6
SEQ ID NO:189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	61.1	79.3	62.3	79.1	1.2	-0.2	-8.6
SEQ ID NO:223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	56.9	79.0	55.3	78.4	-1.5	-0.6	-12.9
SEQ ID NO:193	抗-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	50.3	79.0	46.2	78.7	-4.1	-0.3	-19.4
SEQ ID NO:182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	58.8	63.4	56.1	61.9	-2.7	-1.6	-10.9
SEQ ID NO:296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO:	59.9	75.9	66.8	74.8	6.9	-1.2	-9.8

[1356]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LEFIASKLA-E258	1228							
SEQ ID NO:278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	68.4	77.7	66.8	75.5	-1.6	-2.2	-1.3
SEQ ID NO:299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	53.9	79.4	69.4	t.b.	15.5	t.b.	-15.8
SEQ ID NO:150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	70.0	t.b.	64.6	79.0	-5.3	t.b.	0.3
SEQ ID NO:185	抗-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	60.4	79.2	69.0	75.1	8.6	-4.1	-9.3
SEQ ID NO:47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	70.1	75.8	67.4	t.b.	-2.7	t.b.	0.4
SEQ ID NO:91	抗-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	SEQ ID NO: 1317	68.9	74.0	66.4	t.b.	-2.5	t.b.	-0.8
SEQ ID NO:60	抗-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	66.6	t.b.	65.4	t.b.	-1.3	t.b.	-3.1
SEQ ID NO:61	抗-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	65.4	t.b.	62.8	t.b.	-2.6	t.b.	-4.3
SEQ ID NO:90	抗-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	SEQ ID NO: 1320	68.6	t.b.	66.9	t.b.	-1.8	t.b.	-1.1
SEQ ID NO:44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282		77.8	66.7	76.1		-1.6	
SEQ ID NO:267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	69.0	78.3	68.1	77.4	-0.9	-1.0	-0.7
SEQ ID NO:176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	66.4	77.9	65.5	74.6	-0.9	-3.3	-3.3
SEQ ID NO:300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	53.7	79.6	51.3	77.9	-2.4	-1.7	-16.0
SEQ ID NO:180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	66.5	75.9	65.5	73.9	-0.9	-2.0	-3.3
SEQ ID NO:175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	66.3	77.2	65.7	77.1	-0.6	-0.1	-3.4
SEQ ID NO:341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO:	67.9	78.9	67.3	78.4	-0.6	-0.6	-1.8

[1357]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LSWLLRLLN-A112	1273							
SEQ ID NO:46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	69.4	80.0	68.7	79.4	-0.7	-0.6	-0.3
SEQ ID NO:48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	68.5	t.b.	67.3	t.b.	-1.2	t.b.	-1.2
SEQ ID NO:56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	67.5	t.b.	67.4	t.b.	-0.1	t.b.	-2.2
SEQ ID NO:63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	69.0	t.b.	67.6	t.b.	-1.4	t.b.	-0.7
SEQ ID NO:64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	69.6	t.b.	68.5	t.b.	-1.1	t.b.	-0.1
SEQ ID NO:75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	69.6	79.7	69.0	79.2	-0.5	-0.5	-0.1
SEQ ID NO:89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	69.5	75.1	68.7	74.8	-0.8	-0.4	-0.2
SEQ ID NO:330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	67.8	79.1	67.3	78.7	-0.5	-0.5	-1.9
SEQ ID NO:195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	52.0	76.9	49.7	78.6	-2.3	1.7	-17.7
SEQ ID NO:206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	56.0	77.3	65.4	77.9	9.4	0.6	-13.7
SEQ ID NO:288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	64.1	79.4	63.5	78.9	-0.6	-0.5	-5.6
SEQ ID NO:249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	68.1	t.b.	67.8	t.b.	-0.3	t.b.	-1.6
SEQ ID NO:323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	60.5	79.2	58.4	78.6	-2.1	-0.5	-9.2
SEQ ID NO:322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	59.5	79.2	57.6	78.7	-1.8	-0.5	-10.2
SEQ ID NO:301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	53.0	79.8	49.8	78.0	-3.1	-1.8	-16.7
SEQ ID NO:279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO:	68.2	77.3	68.2	77.3	0.0	0.0	-1.5

[1358]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LEFIASKLA-E258	1228							
SEQ ID NO:278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	68.4	77.7	66.8	75.5	-1.6	-2.2	-1.3
SEQ ID NO:299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	53.9	79.4	69.4	t.b.	15.5	t.b.	-15.8
SEQ ID NO:150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	70.0	t.b.	64.6	79.0	-5.3	t.b.	0.3
SEQ ID NO:185	抗-hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	60.4	79.2	69.0	75.1	8.6	-4.1	-9.3
SEQ ID NO:47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	70.1	75.8	67.4	t.b.	-2.7	t.b.	0.4
SEQ ID NO:91	抗-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	SEQ ID NO: 1317	68.9	74.0	66.4	t.b.	-2.5	t.b.	-0.8
SEQ ID NO:60	抗-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	66.6	t.b.	65.4	t.b.	-1.3	t.b.	-3.1
SEQ ID NO:61	抗-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	65.4	t.b.	62.8	t.b.	-2.6	t.b.	-4.3
SEQ ID NO:90	抗-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	SEQ ID NO: 1320	68.6	t.b.	66.9	t.b.	-1.8	t.b.	-1.1
SEQ ID NO:44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282		77.8	66.7	76.1		-1.6	
SEQ ID NO:267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	69.0	78.3	68.1	77.4	-0.9	-1.0	-0.7
SEQ ID NO:176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	66.4	77.9	65.5	74.6	-0.9	-3.3	-3.3
SEQ ID NO:300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	53.7	79.6	51.3	77.9	-2.4	-1.7	-16.0
SEQ ID NO:180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	66.5	75.9	65.5	73.9	-0.9	-2.0	-3.3
SEQ ID NO:175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	66.3	77.2	65.7	77.1	-0.6	-0.1	-3.4
SEQ ID NO:341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO:	67.9	78.9	67.3	78.4	-0.6	-0.6	-1.8

[1359]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LEFIASKLA-N421	1265							
SEQ ID NO:289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	SEQ ID NO: 1222	66.2	79.3	63.1	78.8	-3.1	-0.5	-3.5
SEQ ID NO:342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	68.9	t.b.	68.1	77.4	-0.7	t.b.	-0.9
SEQ ID NO:77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	69.3	77.1	68.3	76.0	-1.0	-1.2	-0.4
SEQ ID NO:45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	68.9	77.2	67.6	75.9	-1.2	-1.3	-0.9
SEQ ID NO:237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	63.4	78.9	66.7	78.4	3.3	-0.6	-6.3
SEQ ID NO:187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	44.9	78.5	44.0	77.7	-0.9	-0.8	-24.8
SEQ ID NO:160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	67.1	78.8	66.6	78.1	-0.5	-0.7	-2.6
SEQ ID NO:370	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	SEQ ID NO: 1321	68.9	78.2	67.7	75.9	-1.1	-2.3	-0.8
SEQ ID NO:372	抗-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	SEQ ID NO: 1322	69.0	78.4	68.3	77.5	-0.8	-0.9	-0.7
SEQ ID NO:374	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	SEQ ID NO: 1323	69.1	78.7	68.1	77.5	-1.0	-1.3	-0.6
SEQ ID NO:376	抗-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	SEQ ID NO: 1324	68.0	78.0	66.6	76.6	-1.4	-1.5	-1.7
SEQ ID NO:377	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	SEQ ID NO: 1325	68.0	78.1	66.5	76.2	-1.5	-2.0	-1.7
SEQ ID NO:378	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	SEQ ID NO: 1326	68.1	78.4	66.7	76.4	-1.4	-1.9	-1.6
SEQ ID NO:380	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	SEQ ID NO: 1327	68.3	78.4	66.9	76.7	-1.4	-1.7	-1.4
SEQ ID NO:381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	SEQ ID NO: 1328	68.3	77.9	66.9	75.8	-1.4	-2.1	-1.4
SEQ ID NO:383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO:	66.5	t.b.	64.3	t.b.	-2.2	t.b.	-3.2

[1360]

抗体 SEQ ID:	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	抗体 Tm1 (°C)	抗体 Tm2 (°C)	ADC Tm1 (°C)	ADC Tm2 (°C)	ΔTm1[b] (°C)	ΔTm2[b] (°C)	Ab-WT ΔTm1[c] (°C)
	LDMLEWSLM-V110	1329							
SEQ ID NO:384	抗 -hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	SEQ ID NO: 1330	66.1	t.b.	63.8	t.b.	-2.3	t.b.	-3.6

[1361] [a]名称代表含有具有附着的化合物的肽标签的HC或LC部分,配对的野生型链未列出。

[1362] [b]ADC的Tm减去抗体的Tm。

[1363] [c]抗体的Tm1减去野生型曲妥珠单抗的Tm1(69.7℃)。

[1364] n.d.,未测定。由于样品量不足,未进行测量。

[1365] t.b.,转换太宽不能准确测量Tm2。

[1366] 进一步表征纯化的ADC针对选定细胞系的体外效力(表24),所述细胞系包括两个改造的细胞系MDA-MB231克隆16和克隆40,和两个内源性在细胞表面上表达靶向的抗原,人HER2的细胞系(JimT1和HCC1954)。MDA-MB231克隆16细胞稳定表达～500,000个HER2拷贝每个细胞,而克隆40只表达～5000个拷贝/细胞。HCC1954细胞在其表面内源性表达高水平(～500,000个拷贝/细胞)的人HER2(Clinchy B,Gazdar A,Rabinovsky R,Yefenof E,Gordon B,Vitetta ES.Breast Cancer Res Treat.(2000)61:217-228)。JimT1细胞系表达约80,000个HER2拷贝每个细胞(Mocanu M-M,Fazekas Z,Petrás M,Nagy P,Sebestyén Z,Isola J,Tímár J,Park JW,Vereb G,**Szöllősi** J.Cancer Letters(2005)227:201-212)。使用自动系统((Melnick等人,(2006)Proc Natl Acad Sci U S A.103:3153-3158)用多同浓度的ADC孵育细胞5天后,用Cell-Titer-Glo™(Promega)进行细胞增殖测定法(Riss等人,(2004)Assay Drug Dev Technol.2:51-62)。曲妥珠单抗肽标记的MMAF ADC特异地杀伤MDA-MB231克隆16,HCC1954和JimT1细胞(表24):曲妥珠单抗肽标签标记的MMAF的ADC对MDA-MB231克隆16,HCC1954和JimT1细胞的IC_{50}值分别平均约为0.45nM,0.24nM和2.0nM(表24),与不同的HER2表达水平相一致。对于97个ADC中的92个,在最高测试浓度(33nM)没有观察到抗原阴性(Her2低)对照细胞系MDA-MB231克隆40的杀伤。

[1367] 表24.抗-HER2ADC的体外效力。报告了对HER2阳性和阴性细胞系的IC_{50}细胞杀伤浓度。

[1368]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
SEQ ID NO:151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	1.94E-04	5.10E-04	6.82E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	1.69E-04	7.53E-04	7.02E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	1.36E-04	2.57E-04	3.10E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	1.64E-04	2.43E-04	3.05E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	1.55E-04	8.66E-04	3.31E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	1.89E-04	5.36E-04	4.69E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	1.69E-04	6.19E-04	4.00E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	1.47E-04	2.69E-04	2.86E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	1.03E-04	1.33E-03	3.56E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:179	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	1.42E-04	3.00E-04	2.79E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:202	抗-hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	1.33E-04	4.50E-04	6.75E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:218	抗-hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	9.68E-05	3.18E-04	4.66E-04	> 3.33E-02

[1369]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
SEQ ID NO:220	抗-hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	3.76E-04	5.55E-04	3.08E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:221	抗-hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	7.21E-05	3.58E-04	7.82E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:224	抗-hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	2.13E-03	4.47E-04	3.21E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:229	抗-hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	1.80E-04	1.31E-03	7.57E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:127	抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	1.57E-04	4.21E-04	5.42E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:239	抗-hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	2.48E-04	1.24E-03	7.31E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:244	抗-hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:248	抗-hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	7.42E-05	3.84E-03	7.44E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:250	抗-hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	1.80E-04	3.46E-04	3.21E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:251	抗-hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	1.98E-04	4.59E-04	3.94E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:257	抗-hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	6.48E-05	3.95E-04	2.62E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:259	抗-hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	1.58E-04	> 3.33E-02	3.21E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:268	抗-hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	1.65E-04	4.07E-04	3.79E-04	> 3.33E-02
SEQ ID	抗-hHER2-HC-G194-	SEQ ID	1.22E-04	6.48E-04	1.83E-04	> 3.33E-02

[1370]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
NO:277	DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	NO: 1215				
SEQ ID NO:315	抗-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	1.37E-04	2.79E-04	1.15E-03	> 3.33E-02
SEQ ID NO:317	抗-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	4.09E-04	2.24E-02	2.85E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:129	抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	2.26E-04	1.83E-03	3.12E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:349	抗-hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	2.12E-04	6.82E-04	7.77E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:32	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	2.31E-04	4.14E-04	5.18E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:33	抗-hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	1.95E-04	1.15E-02	5.05E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:46	抗-hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	1.43E-04	5.47E-04	3.70E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:48	抗-hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	2.67E-04	8.13E-04	7.14E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:56	抗-hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	1.92E-04	9.21E-04	4.77E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:63	抗-hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	3.97E-04	4.62E-04	2.77E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:64	抗-hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	1.59E-04	6.32E-04	1.68E-02	> 3.33E-02
SEQ ID NO:75	抗-hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	1.80E-04	2.03E-02	2.60E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:89	抗-hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	4.25E-04	3.86E-04	4.74E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:330	抗-hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO: 1256	2.32E-04	4.93E-04	2.26E-04	> 3.33E-02

[1371]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
	LEFIASKLA-N390					
SEQ ID NO:195	抗-hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	2.06E-04	3.67E-04	1.16E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:206	抗-hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	1.99E-04	3.04E-04	9.74E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:288	抗-hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	1.90E-04	2.97E-04	6.48E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:249	抗-hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	2.41E-04	3.39E-04	1.97E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:323	抗-hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	2.31E-04	3.39E-04	6.45E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:322	抗-hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	2.40E-04	3.75E-04	7.55E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:301	抗-hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	2.21E-04	3.78E-04	7.46E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:279	抗-hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	SEQ ID NO: 1217	2.44E-04	4.28E-04	1.13E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:293	抗-hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	1.92E-04	5.49E-04	6.43E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:194	抗-hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:337	抗-hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	2.69E-04	7.57E-04	8.06E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:201	抗-hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	2.28E-04	3.41E-04	8.89E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:265	抗-hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	2.27E-04	3.42E-04	1.24E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:274	抗-hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	2.39E-04	3.21E-04	1.49E-04	> 3.33E-02

[1372]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
SEQ ID NO:275	抗-hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	2.30E-04	3.37E-04	1.47E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:177	抗-hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	2.10E-04	3.03E-04	7.99E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:294	抗-hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	2.06E-04	4.33E-04	4.40E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:199	抗-hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	2.26E-04	3.79E-04	8.97E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:198	抗-hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	2.30E-04	3.68E-04	8.13E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:189	抗-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	2.43E-04	3.09E-04	1.44E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:223	抗-hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	2.27E-04	3.88E-04	6.27E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:193	抗-hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:182	抗-hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	2.68E-04	9.11E-04	1.79E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:296	抗-hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	SEQ ID NO: 1228	2.20E-04	5.53E-04	7.67E-05	> 3.33E-02
SEQ ID NO:278	抗-hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	1.91E-04	3.14E-04	1.31E-04	2.90E-02
SEQ ID NO:299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	2.33E-04	3.97E-04	1.13E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:150	抗-hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	2.57E-04	6.74E-04	1.95E-04	> 3.33E-02
SEQ ID	抗-hHER2-HC-A231-	SEQ ID	2.32E-04	2.70E-04	1.72E-04	> 3.33E-02

[1373]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
NO:185	GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	NO: 1161				
SEQ ID NO:47	抗-hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	1.63E-04	2.74E-04	1.39E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:91	抗-hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	SEQ ID NO: 1317	2.20E-04	3.33E-04	1.84E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:60	抗-hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	2.32E-04	4.29E-04	1.28E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:61	抗-hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	2.23E-04	4.54E-04	1.78E-04	1.49E-02
SEQ ID NO:90	抗-hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	SEQ ID NO: 1320	2.41E-04	4.33E-04	1.82E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:44	抗-hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282	2.44E-04	3.95E-04	1.42E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:267	抗-hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	1.64E-04	3.00E-04	1.22E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:176	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	2.53E-04	3.41E-04	1.81E-04	3.25E-02
SEQ ID NO:300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	2.47E-04	4.49E-04	1.87E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:180	抗-hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	2.49E-04	2.69E-04	1.81E-04	2.26E-02
SEQ ID NO:175	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	2.35E-04	3.10E-04	1.81E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:341	抗-hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	SEQ ID NO: 1265	2.47E-04	7.03E-04	1.56E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:289	抗-hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-	SEQ ID NO: 1222	2.37E-04	1.75E-03	1.30E-04	> 3.33E-02

[1374]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
	LEFIASKLA-G237					
SEQ ID NO:342	抗-hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	2.47E-04	2.27E-02	1.59E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	2.21E-04	4.48E-04	1.70E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:45	抗-hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	2.48E-04	4.57E-04	1.26E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:237	抗-hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	6.68E-04	8.65E-04	2.69E-04	3.03E-02
SEQ ID NO:187	抗-hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	2.43E-04	4.47E-04	1.01E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:160	抗-hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	2.44E-04	3.16E-04	1.78E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:370	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	SEQ ID NO: 1321	2.28E-04	3.48E-04	1.63E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:372	抗-hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	SEQ ID NO: 1322	2.72E-04	> 3.33E-02	2.21E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:374	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	SEQ ID NO: 1323	2.54E-04	4.88E-04	1.95E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:376	抗-hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	SEQ ID NO: 1324	2.58E-04	7.20E-04	1.69E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:377	抗-hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	SEQ ID NO: 1325	2.45E-04	3.68E-04	1.84E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:378	抗-hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	SEQ ID NO: 1326	2.58E-04	4.76E-04	1.57E-04	> 3.33E-02
SEQ ID	抗-hHER2-HC-G194-	SEQ ID	2.51E-04	4.93E-04	1.67E-04	> 3.33E-02

[1375]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	HCC1954 IC_{50} (μM)[b]	JimT1 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 16 IC_{50} (μM)[b]	MDA-MB-231 克隆 40 IC_{50} (μM)[b]
NO:380	GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	NO: 1327				
SEQ ID NO:381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	SEQ ID NO: 1328	2.44E-04	4.39E-04	1.36E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	SEQ ID NO: 1329	2.12E-04	3.19E-04	1.26E-04	> 3.33E-02
SEQ ID NO:384	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	SEQ ID NO: 1330	2.24E-04	3.54E-04	1.60E-04	> 3.33E-02

[1376] [a]名称代表含有具有附着的化合物的肽标签的HC或LC部分，配对的野生型链未列出。

[1377] [b]33nM是IC_{50}细胞杀伤测定法中使用的最高浓度。

[1378] n.d.，未测量。

[1379] 良好的药代动力学性质对于ADC的体内效力是至关重要的(Hamblett,等人,Clin Cancer Res.,10:7063-7070(2004);Alley等人,Bioconjug.Chem.19:759-765(2008))。CoA-MC-MMAF分子缀合到抗体可负面地影响其生物物理性质，造成其快速清除和相应的ADC体内功效急剧降低(Hamblett等人,2004)。为了评价缀合位点对体内清除和ADC体内稳定性的影响，使用86个肽标记的曲妥珠单抗ADC在不具有肿瘤的小鼠中进行药代动力学(PK)研究(表25)。

[1380] 每个肽标记的MMAF ADC以1mg/kg的单剂量静脉内注射到三只小鼠中。然后在340小时时程中收集九个血浆样品，而后用ELISA测定ADC的血浆效价。ELISA测定法使用固定化的人HER2的细胞外结构域，用于从血浆样品捕获曲妥珠单抗ADC分子。该测定法的捕获步骤之后，使用抗-MMAF抗体专门测量“完整”曲妥珠单抗MMAF缀合物的血浆浓度。在第二个ELISA实验中，抗hIgG抗体生成信号，提示缀合的和非缀合的曲妥珠单抗分子的血浆浓度。如果在体内没有发生ADC的有效负载的脱缀合，预期抗-MMAF和抗-hIgG ELISA二者提供对ADC血浆浓度的相同读出。然而，在体内有效负载失去的情况下，预期抗-MMAF ELISA产生比抗-hIgG ELISA更低的信号。因此，这两种ELISA信号的对比允许定量在各自的ADC的体内暴露期间有效负载脱缀合。PK数据的解释基于标准曲线，该标准曲线使用与静脉内注射到小鼠中所使用的相同的ADC生成。

[1381] 血浆浓度与时间曲线下的面积(AUC)是重要的药代动力学参数，其可被用于确定所施用的生物治疗剂的总清除和生物利用度。对于每个肽标记的MMAF ADC，两个特征的AUC值，AUC hIgG和AUC MMAF，分别由抗-hIgG和抗-MMAF ELISA实验得到。表25总结了86个测试的肽标记的ADC的AUC hIgG值和AUC MMAF值以及各自的比率。得到的AUC hIgG值跨越宽的范围，其中最高值是32553nM*hr，为最低值1362nM*hr的约30倍，平均为16935nM*hr。图20A-C例举了显示高AUC hIgG值的三个肽标记的MMAF ADC的PK曲线(SEQ ID NO:248的ADC,28334nM*hr;SEQ ID NO:33的ADC,21011nM*hr;SEQ ID NO:251的ADC,21689nM*hr)。相反，

显示低的AUC hIgG值的三个构建体的PK曲线描绘在图20D-F(SEQ ID NO:218的ADC,1362nM*hr;SEQ ID NO:202的ADC,1757nM*hr;SEQ ID NO:244的ADC,2378nM*hr)。尽管AUC hIgG值的巨大变化,抗-hIgG和抗-MMAF效价彼此追踪,表明如果在体内发生任何有效负载脱缀合,也是很少的。此外,所有测试的86个肽标记的ADC的AUC MMAF和AUC hIgG值之间的比率平均为1.0±0.1(AUC(MMAF)/AUC(hIgG)±标准偏差,见表25和图21)表明MC-MMAF和4'-磷酸泛酰巯基乙胺(ppan)部分的末端巯基之间的基于马来酰亚胺的键在PK实验时间过程中在循环中保持稳定。同样地,这些结果还表明ppan辅基和插入的S6/ybbR/A1肽标签的丝氨酸残基之间的基于磷酸二酯键的高的体内稳定性。

[1382] 观察到的某些肽标记的ADC的快速清除可能是S6,A1或ybbR肽序列插入到IgG1分子特定区域而不是药物附着的结果。标签插入位点和药代动力学谱之间的推定的关系由SEQ ID NO:218和SEQ ID NO:202的两个肽标记的MMAF ADC示例,二者分别显示最低和第三低的测得的AUChIgG值,1362nM*hr和1757nM*hr。两个ADC均含有重链CH2结构域中的S6标签插入。除了在鼠类循环中的不稳定性,这些ADC还表现出在PK研究的86个测试的样本中第五低和第九低的热稳定性。根据DSF测量,相应的ADC显示49.0℃的Tm1(SEQ ID NO:218的ADC)和51.2℃的Tm1(SEQ ID NO:202的ADC),导致较之具有69.7℃的TM1的野生型曲妥珠单抗分别降低20.7℃和18.5℃。与此相反,具有最高的AUC hIgG值(19695-32553nM*hr)的40个ADC显示平均TM1值为67.4℃,这比野生型曲妥珠单抗的TM1仅仅低2.3℃,提示药代动力学和ADC的热稳定性之间可能的关联。此外,该40个ADC中的26个在重链CH1结构域的环区域中包含S6,ybbR或A1标签。如上所述,在这些有利位点处的肽标签插入也显示最佳整体缀合效率,使得它们成为优选的生产ADC的候选者。这些包括在S119-T120,T120-K121,T135-S136,S136-G137,G138-T139,A162-L163,T164-S165,S165-G166,G194-T195,T195-Q196,以及E388-N389(CH3结构域)之间具有重链插入的抗体,对应于SEQ ID No:126,127,129,130,131,132,149,151,152,157,158,160,166,168,169,178,179,250,251,256,257,259,265,267,268,277,278,356,358,359,364,365,367,371,373,374,380和381。

[1383] 表25.药代动力学数据。

[1384]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
SEQ ID NO:151	抗-hHER2-HC-S119-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T120	SEQ ID NO: 1137	22485	21693	1.0
SEQ ID NO:152	抗-hHER2-HC-T120-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K121	SEQ ID NO: 1138	13880	12542	0.9
SEQ ID NO:157	抗-hHER2-HC-T135-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S136	SEQ ID NO: 1139	21494	16931	0.8
SEQ ID NO:158	抗-hHER2-HC-S136-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G137	SEQ ID NO: 1140	22833	23533	1.0
SEQ ID NO:166	抗-hHER2-HC-A162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L163	SEQ ID NO: 1147	11178	10981	1.0
SEQ ID NO:168	抗-hHER2-HC-T164-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S165	SEQ ID NO: 1148	20916	22125	1.1
SEQ ID NO:169	抗-hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G166	SEQ ID NO: 1149	23242	21304	0.9
SEQ ID NO:173	抗-hHER2-HC-P189-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S190	SEQ ID NO: 1152	8922	8840	1.0
SEQ ID NO:178	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T195	SEQ ID NO: 1156	20702	18593	0.9

[1385]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
SEQ ID NO:179	抗 -hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q196	SEQ ID NO: 1157	16083	17465	1.1
SEQ ID NO:202	抗 -hHER2-HC-P271-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E272	SEQ ID NO: 1172	1757	1550	0.9
SEQ ID NO:218	抗 -hHER2-HC-A330-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P331	SEQ ID NO: 1181	1362	1768	1.3
SEQ ID NO:220	抗 -hHER2-HC-K340-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G341	SEQ ID NO: 1182	17396	16060	0.9
SEQ ID NO:221	抗 -hHER2-HC-G341-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q342	SEQ ID NO: 1183	9214	10336	1.1
SEQ ID NO:224	抗 -hHER2-HC-R344-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E345	SEQ ID NO: 1186	15196	16061	1.1
SEQ ID NO:229	抗 -hHER2-HC-K360-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N361	SEQ ID NO: 1187	7867	8209	1.0
SEQ ID NO:127	抗 -hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389	SEQ ID NO: 1118	14224	14887	1.0
SEQ ID NO:239	抗 -hHER2-HC-Q418-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q419	SEQ ID NO: 1195	8561	6136	0.7
SEQ ID NO:244	抗 -hHER2-HC-N434-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H435	SEQ ID NO: 1197	2378	2249	0.9
SEQ ID NO:248	抗 -hHER2-HC-P445-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G446	SEQ ID NO: 1199	28334	24130	0.9
SEQ ID NO:250	抗 -hHER2-HC-S119-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T120	SEQ ID NO: 1201	22854	24551	1.1
SEQ ID NO:251	抗 -hHER2-HC-T120-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K121	SEQ ID NO: 1202	21689	19734	0.9
SEQ ID NO:257	抗 -hHER2-HC-S136-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-137	SEQ ID NO: 1203	27232	24064	0.9
SEQ ID NO:259	抗 -hHER2-HC-G138-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T139	SEQ ID NO: 1204	17184	15404	0.9
SEQ ID NO:268	抗 -hHER2-HC-S165-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G166	SEQ ID NO: 1209	12794	13854	1.1

[1386]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
SEQ ID NO:277	抗 -hHER2-HC-G194-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T195	SEQ ID NO: 1215	20659	21603	1.0
SEQ ID NO:315	抗 i-hHER2-HC-L328-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P329	SEQ ID NO: 1243	7590	8039	1.1
SEQ ID NO:317	抗 i-hHER2-HC-A330-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P331	SEQ ID NO: 1245	12960	14302	1.1
SEQ ID NO:129	抗 -hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389	SEQ ID NO: 1122	21023	21257	1.0
SEQ ID NO:349	抗 -hHER2-HC-G446-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-K447	SEQ ID NO: 1270	20329	16452	0.8
SEQ ID NO:32	抗 -hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A111	SEQ ID NO: 1272	17358	18734	1.1
SEQ ID NO:33	抗 -hHER2-LC-A111-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-A112	SEQ ID NO: 1273	21011	20711	1.0
SEQ ID NO:46	抗 -hHER2-LC-Q155-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S156	SEQ ID NO: 1284	15444	17657	1.1
SEQ ID NO:48	抗 -hHER2-LC-S162-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-V163	SEQ ID NO: 1251	11348	11645	1.0
SEQ ID NO:56	抗 -hHER2-LC-Q199-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G200	SEQ ID NO: 1292	16832	17973	1.1
SEQ ID NO:63	抗 -hHER2-LC-V110-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A111	SEQ ID NO: 1294	20373	24757	1.2
SEQ ID NO:64	抗 -hHER2-LC-A111-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-A112	SEQ ID NO: 1295	16092	16196	1.0
SEQ ID NO:75	抗 -hHER2-LC-A153-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L154	SEQ ID NO: 1305	18406	19496	1.1
SEQ ID NO:89	抗 -hHER2-LC-L201-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S202	SEQ ID NO: 1316	17223	15036	0.9
SEQ ID NO:330	抗 -hHER2-HC-N389-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N390	SEQ ID NO: 1256	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:195	抗 -hHER2-HC-R255-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T256	SEQ ID NO: 1167	5657	6480	1.1

[1387]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
SEQ ID NO:206	抗 -hHER2-HC-P291-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R292	SEQ ID NO: 1173	23692	29456	1.2
SEQ ID NO:288	抗 -hHER2-HC-L235-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G236	SEQ ID NO: 1221	24430	27937	1.1
SEQ ID NO:249	抗 -hHER2-HC-A118-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S119	SEQ ID NO: 1200	22713	19408	0.9
SEQ ID NO:323	抗 -hHER2-HC-R344-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E345	SEQ ID NO: 1251	16731	19050	1.1
SEQ ID NO:322	抗 -hHER2-HC-P343-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R344	SEQ ID NO: 1250	18942	22948	1.2
SEQ ID NO:301	抗 -hHER2-HC-P271-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E272	SEQ ID NO: 1233	6651	7233	1.1
SEQ ID NO:279	抗 -hHER2-HC-Q196-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T197	SEQ ID NO: 1217	20702	24082	1.2
SEQ ID NO:293	抗 -hHER2-HC-S254-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-R255	SEQ ID NO: 1226	2447	2783	1.1
SEQ ID NO:194	抗 -hHER2-HC-S254-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R255	SEQ ID NO: 1166	1609	1872	1.2
SEQ ID NO:337	抗 -hHER2-HC-R416-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-W417	SEQ ID NO: 1261	20158	21424	1.1
SEQ ID NO:201	抗 -hHER2-HC-D270-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P271	SEQ ID NO: 1171	2566	2414	0.9
SEQ ID NO:265	抗 -hHER2-HC-A162-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L163	SEQ ID NO: 1207	26501	27992	1.1
SEQ ID NO:274	抗 -hHER2-HC-S191-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S192	SEQ ID NO: 1213	21971	25264	1.1
SEQ ID NO:275	抗 -hHER2-HC-S192-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-L193	SEQ ID NO: 1214	25220	27786	1.1
SEQ ID NO:177	抗 -hHER2-HC-L193-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G194	SEQ ID NO: 1155	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:294	抗 -hHER2-HC-R255-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-T256	SEQ ID NO: 1227	2435	2514	1.0

[1388]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
SEQ ID NO:199	抗 -hHER2-HC-H268-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-E269	SEQ ID NO: 1169	1916	1927	1.0
SEQ ID NO:198	抗 -hHER2-HC-S267-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-H268	SEQ ID NO: 1168	2481	2631	1.1
SEQ ID NO:189	抗 i-hHER2-HC-L235-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-G236	SEQ ID NO: 1163	15932	15515	1.0
SEQ ID NO:223	抗 -hHER2-HC-P343-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-R344	SEQ ID NO: 1185	16217	17009	1.0
SEQ ID NO:193	抗 -hHER2-HC-I253-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S254	SEQ ID NO: 1165	3203	2996	0.9
SEQ ID NO:182	抗 -hHER2-HC-P206-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S207	SEQ ID NO: 1160	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:296	抗 -hHER2-HC-P257-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-E258	SEQ ID NO: 1228	3036	2834	0.9
SEQ ID NO:278	抗 -hHER2-HC-T195-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-Q196	SEQ ID NO: 1216	23422	25475	1.1
SEQ ID NO:150	抗 -hHER2-HC-A118-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S119	SEQ ID NO: 1136	14235	12465	0.9
SEQ ID NO:185	抗 -hHER2-HC-A231-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P232	SEQ ID NO: 1161	18890	18982	1.0
SEQ ID NO:47	抗 -hHER2-LC-E161-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S162	SEQ ID NO: 1285	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:91	抗 -hHER2-LC-S203-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P204	SEQ ID NO: 1317	18663	19769	1.1
SEQ ID NO:60	抗 -hHER2-LC-S203-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-P204	SEQ ID NO: 1318	26363	31434	1.2
SEQ ID NO:61	抗 -hHER2-LC-K207-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S208	SEQ ID NO: 1319	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:90	抗 -hHER2-LC-S202-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S203	SEQ ID NO: 1320	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:44	抗 -hHER2-LC-A153-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L154	SEQ ID NO: 1282	22890	25331	1.1

[1389]

抗体 SEQ ID	ADC 名称 [a]	ADC SEQ ID NO	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
SEQ ID NO:267	抗 -hHER2-HC-T164-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S165	SEQ ID NO: 1208	23675	24973	1.1
SEQ ID NO:176	抗 -hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L193	SEQ ID NO: 1154	21492	20712	1.0
SEQ ID NO:180	抗 -hHER2-HC-Q196-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T197	SEQ ID NO: 1158	19695	19974	1.0
SEQ ID NO:175	抗 -hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-S192	SEQ ID NO: 1153	18430	16233	0.9
SEQ ID NO:341	抗 -hHER2-HC-G420-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N421	SEQ ID NO: 1265	32553	34202	1.1
SEQ ID NO:289	抗 -hHER2-HC-G236-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-G237	SEQ ID NO: 1222	14771	16398	1.1
SEQ ID NO:342	抗 -hHER2-HC-N421-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-V422	SEQ ID NO: 1266	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:45	抗 -hHER2-LC-L154-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-Q155	SEQ ID NO: 1283	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:237	抗 -hHER2-HC-R416-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-W417	SEQ ID NO: 1193	15181	18255	1.2
SEQ ID NO:187	抗 -hHER2-HC-E233-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-L234	SEQ ID NO: 1162	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:160	抗 -hHER2-HC-G138-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-T139	SEQ ID NO: 1141	21276	24046	1.1
SEQ ID NO:372	抗 -hHER2-HC-L163-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T164	SEQ ID NO: 1322	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:374	抗 -hHER2-HC-S165-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-G166	SEQ ID NO: 1323	21008	23328	1.1
SEQ ID NO:376	抗 -hHER2-HC-S190-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S191	SEQ ID NO: 1324	n.d.	n.d.	n.d.
SEQ ID NO:377	抗 -hHER2-HC-S191-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-S192	SEQ ID NO: 1325	27588	28786	1.0
SEQ ID NO:378	抗 -hHER2-HC-S192-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-L193	SEQ ID NO: 1326	27124	24221	0.9

[1390]

抗体 SEQ ID	ADC 名称[a]	ADC SEQ ID NO	AUC[b] hIgG (nM*hr)	AUC[c] MMAF (nM*hr)	AUC(MMAF) /AUC(hIgG)
SEQ ID NO:380	抗-hHER2-HC-G194-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-T195	SEQ ID NO: 1327	23858	27185	1.1
SEQ ID NO:383	抗-hHER2-LC-T109-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-V110	SEQ ID NO: 1329	21940	19449	0.9
SEQ ID NO:299	抗-hHER2-HC-E269-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-D270	SEQ ID NO: 1231	12525	14829	1.2
SEQ ID NO:300	抗-hHER2-HC-D270-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-P271	SEQ ID NO: 1232	12981	14803	1.1
SEQ ID NO:77	抗-hHER2-LC-Q155-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-S156	SEQ ID NO: 1307	30628	33193	1.1
SEQ ID NO:370	抗-hHER2-HC-G161-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A162	SEQ ID NO: 1321	23116	25913	1.1
SEQ ID NO:381	抗-hHER2-HC-T195-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-Q196	SEQ ID NO: 1328	25023	26308	1.1
SEQ ID NO:384	抗-hHER2-LC-V110-GDS-ppan-MC-MMAF-LDMLEWSLM-A111	SEQ ID NO: 1330	27475	31910	1.2

[1391] [a]名称代表含有具有附着的化合物的肽标签的HC或LC部分，配对的野生型链未列出。

[1392] [b]由抗人IgG ELISA测量的曲线下面积。

[1393] [c]由抗MMAF ELISA测量的曲线下面积。

[1394] n.d.，未测量。

[1395] 实施例27.在细胞培养基中用共表达的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶标记肽标记的IgG

[1396] 为了流线化制备ADC的方法，在Freestyle™表达培养基(Invitrogen)中用共同表达的4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTase)进行肽标记的抗体的酶促标记。除了减少纯化步骤的数量外，在抗体生产期间PPTase的共表达可以规避与添加和去除此类酶的重组产生形式相关联的问题。作为该观点的验证，来自大肠杆菌的AcpS PPTase用于在细胞培养基中位点特异性缀合A1-标记的抗体和乙酰辅酶A(乙酰CoA)。

[1397] 为促进共表达，将编码AcpS PPTase的基因克隆到哺乳动物表达载体pRS中，该载体附加N-末端信号序列MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA(SEQ ID NO:355)。构建体pRS-AcpS还向重组酶增加了C末端His_6标签(SEQ ID NO:1106)。为了共表达A1-标记的抗体mAb2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389(SEQ ID NO:356)，将编码12个氨基酸的A1肽序列的寡核苷酸片段插入哺乳动物表达载体pM4中的抗体mAb2-HC(SEQ ID NO:147)的重链基因中，得到构建体pM4-A1。该质粒还共表达CMV启动子下的相应轻链。使用PEI方法(Meissner等人，2001)，用重组表达质粒pM4-A1和pRS-AcpS的1:1混合物瞬时转染293Freestyle™细胞，并在五等份

的200mL Freestyle™表达培养基(Invitrogen)中在5%CO2下在37℃培养五天。接着,通过在2000rpm离心10分钟收获细胞培养物,经过0.22μm的过滤器,并汇集。为了确定在细胞培养基中形成有效缀合所需的最小抗体和酶浓度,滤液的等分试样分别未浓缩或使用30kDa截断值的AmiconUltra离心过滤单元(EMD Millipore)浓缩2倍,5倍,10倍和20倍。将浓缩的样品在3724×g离心2分钟以除去沉淀物。为了优化用于AcpS催化的细胞培养基条件,所有样品补充10倍反应缓冲液(pH 8.8)至终浓度为75mM Tris-HCl和10mM $MgCl_2$。然后通过添加乙酰CoA底物(Sigma-Aldrich)至最终浓度1mM起始标记反应。将1.5mL到15mL体积的所得反应混合物在37℃下孵育约16小时。

[1398] 为了确定A1-标记的抗体的标记程度以及定量酶和抗体的表达水平,所有反应混合物分别通过Ni-NTA和蛋白A亲和层析纯化。除了未浓缩的样品,在以大约1mL/min的流速加载至PBS平衡的蛋白A-琼脂糖柱(0.5mL床体积,GE Healthcare)上之前,所有反应混合物用PBS稀释2倍。柱流通液直接施用于填充有0.5mL Ni-NTA琼脂糖的PBS平衡的IMAC柱(Qiagen)上。所有蛋白A和Ni-NTA亲和柱用40倍柱体积的补充有300mM NaCl和20mM咪唑的50mM Tris-HCl缓冲液(pH 8)洗涤。用6倍柱体积的含有300mM NaCl和250mM咪唑的50mM Tris-HCl缓冲液(pH8)从Ni-NTA亲和柱洗脱His_6-标记的(SEQ ID NO:1106)AcpS酶。类似地,使用6倍柱体积的0.1M乙酸钠缓冲液(pH3.0)从蛋白A亲和柱洗脱A1-标记的抗体,随后立即用12%(v/v)1M的Tris-HCl缓冲液(pH10)中和。

[1399] SDS-PAGE和ESI-MS分别确认了AcpS酶和A1-标记的抗体的洗脱。UV-vis和Bradford测量表明,0.17mg至0.34mg之间的A1-标记的抗体和0.12mg至0.15mg之间的AcpS酶被回收(见表26)。这表明在使用乙酰CoA的标记反应期间范围从未浓缩的细胞培养基中的0.08μM(13mg/L)至20倍浓缩的细胞培养基中的1.5μM(230mg/L)的抗体浓度。因此,A1标记的抗体的浓度大致与细胞培养基的浓度因子成比例。相似地,AcpSPPTase的浓度从未浓缩的细胞培养基中的0.6μM(9mg/L)增加至20倍浓缩的细胞培养基中的6.8μM(100mg/L)。

[1400] 表26.mAb2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389(SEQ ID NO:356)和AcpS PPTase的表达产量以及细胞培养基中酶促标记的质谱评估。

[1401]

细胞培养基的浓度因子	AcpS PPTase的产量(mg)[a]	在培养基中标记期间的AcpS 浓度.(μM)	mAb2-HC-E388-GDSLDMLEWSLM-N389(SEQ ID NO:356)的产量(mg)[b]	在培养基中标记期间的抗体浓度(μM)	观察到的质量 (Da)	预期质量(Da)[c]
1 x	0.14	0.6	0.19	0.08	51927.89 51587.6	未偶联, 51589.2 偶联, 51971.6 偶联和脱乙酰化的, 51929.6
2 x	0.12	1.1	0.17	0.16	51927.56	
5 x	0.14	1.9	0.31	0.41	51927.94	
10 x	0.14	3.8	0.32	0.85	51927.94	
20 x	0.15	6.8	0.34	1.5	51928.1	

[1402] [a]根据Bradford分析来自13mL(浓度因子1×),12mL(浓度因子2×),22mL(浓度因子5-10×)和26mL(浓度因子20×)的培养物的产量(两次测量的平均值)。

[1403] [b]根据NanoDrop ND-1000分光光度计上的UV-Vis测量的产量(两次测量的平均

值)。

[1404] [c]显示的对于信号肽切割后重链的N末端谷氨酰胺残基的焦谷氨酸形成的预期质量。

[1405] 用30kDa截断值的Amicon Ultra离心过滤器单元浓缩纯化的抗体构建体,还原,去糖基化,随后在Agilent 6520Q-TOF仪器(Agilent Technologies)上进行质谱分析。如表26所示,在存在1mM乙酰CoA底物,0.16μM(24mg/L)A1-标记的抗体和1.1μM(17mg/L)AcpS酶时,条件细胞培养基的2倍浓度因子足以定量缀合。值得注意的是,乙酰CoA底物的乙酰基团在培养基中标记期间被完全切下,由此表明在条件细胞培养基中硫酯键的水解。在使用30倍浓缩的细胞培养基的独立实验中,发现在没有外源性加入的乙酰CoA时,没有质谱可检测的缀合形成。因此该阴性对照排除了在细胞培养基中存在显著量的CoA或其类似物之一。

[1406] 总之,本实验证明肽标记的抗体可被2倍浓缩的细胞培养基中补充的CoA类似物通过PPTase催化定量标记。由于在生产细胞系的发酵过程中抗体浓度比在当前的观点验证实验中显著更高,可以预期补充的辅酶A类似物与肽标记的抗体的酶促缀合将可扩展至生产水平。补充的CoA类似物将有巯基,受保护的巯基或生物正交反应性基团,如醛,酮基,叠氮基或炔基。蛋白A纯化后,用反应性基团酶促激活的抗体可与互补的毒素类似物反应,以在第二步中得到相应的ADC。

[1407] 实施例28.使用酮CoA在细胞培养基中位点特异性修饰肽标记的抗体

[1408] 本实验的目的是证明在条件细胞培养基中将生物正交基团位点特异地附着到肽标记的抗体的可行性。使用酮CoA类似物进行两步法的第一步,所述酮CoA类似物的合成在实施例23中描述。用此羰基官能化的CoA类似物在培养基中成功标记肽标记的抗体将允许随后在两步法的第二步中通过肟连接附着氨氧基官能化的有效负载(也参见图22)。

[1409] 使用PEI方法(Meissner等人,2001),用重组表达质粒pM4-A1和pRS-AcpS的1:1混合物瞬时转染293Freestyle™细胞,这已在实施例27中描述了。在5%CO_2、在37℃下、在400mL Freestyle™表达培养基(Invitrogen)中培养共转染的哺乳动物细胞五天后,通过在2,000rpm离心10分钟收集细胞培养物,并通过0.22μm过滤器。接着,使用30kDa截断值的Amicon Ultra离心过滤单元(EMD Millipore)将60mL澄清细胞培养基的等分试样浓缩20倍。在通过在3724×g离心5分钟去除沉淀后,通过补充具有最终浓度1mM的酮CoA的1.31mL浓缩物和最终浓度75mM Tris-HCl和10mM $MgCl_2$的10倍反应缓冲液(pH8.8),起始标记反应。在1.5mL总体积中的酶促反应在37℃下孵育约16小时。

[1410] 通过质谱法分析使用羰基官能化CoA类似物标记的程度之前,通过蛋白A亲和层析纯化反应混合物。用PBS 2倍稀释后,将稀释的反应混合物以约1mL/min的流速加载到PBS-平衡的蛋白A琼脂糖柱(0.6mL床体积,GE Healthcare)上。用约40倍床体积的PBS洗涤柱基质,然后用6倍柱体积的0.1M乙酸钠缓冲液(pH3)洗脱保留的物质。最后,通过加入12%(v/v)1M Tris-HCl缓冲液(pH为10)中和洗出液。

[1411] 通过还原SDS-PAGE评估抗体的纯度。根据NanoDrop ND-1000分光光度计上的UV-Vis测量,回收0.34mg抗体,对应于20倍浓缩的细胞培养基中抗体浓度为1.5μM(230mg/L)。这准确地再现在20倍浓缩的细胞培养基中使用乙酰CoA的标记反应过程中所测得的抗体浓度(实施例27)。为了通过质谱法评估使用酮CoA的抗体标记程度,用30kDa截断值的Amicon Ultra离心过滤器单元浓缩经中和的洗出液,去糖基化,并还原。在Agilent 6520Q-TOF仪器

上的质谱分析表明想要的羰基官能化的抗体缀合物的形成(观察的,51995.32;预期的,51999.6),其中形成约24％4'-磷酸泛酰巯基乙胺修饰的抗体作为副产物(观察的,51925.42;预期的,51929.6)。在去卷积质谱中没有检测到未缀合的抗体(预期的,51589.2)。4'-磷酸泛酰巯基乙胺修饰的抗体作为副产物的存在可能解释为由于在CoA-SH与甲基乙烯基酮的反应期间酮CoA的不完全形成(实施例23)。

[1412] 实验结果表明在条件细胞培养基中位点特异性缀合羰基团与抗体的可行性。这种方法可以扩展到其他生物正交基团,如叠氮基和炔基部分。这类生物正交基团在细胞培养基中是完全惰性的,并且只与包含互补官能团的有效负载发生反应,从而确保在两步法的第二步骤中形成均质的ADC。

[1413] 例29.ybbR-标记的曲妥珠单抗MMAF ADC的体内效力评价

[1414] 通过使用异种移植物肿瘤模型评估ybbR-标记的曲妥珠单抗ADC抗-hHER2-HC-E388-DS-ppan-MC-MMAF-LEFIASKLA-N389(SEQ ID NO:1122)的体内效力,该模型基于人肿瘤细胞系移植到免疫缺陷的裸鼠中。如前文所述(Sausville和Burger,2006),使用这种肿瘤异种移植物小鼠的研究提供了抗癌试剂在体内效力的有价值的见解。具体而言,使用nu/nu小鼠进行体内效力的研究,所述nu/nu小鼠皮下注射MDA-MB231克隆16细胞(Morton和Houghton,2007)。基于先前的体外效能测定法选择细胞系,所述测定法揭示其以抗原依赖的方式对前述ybbR-标记的MMAF ADC细胞系高度敏感(见表24)。在肿瘤达到大小约200mm^3后,静脉注射单剂量5mg/kg或3mg/kg的ybbR-标记的MMAF ADC,每个治疗组包括9只小鼠。在施用抗体药物缀合物后,每周监测肿瘤生长。如图23所示,ybbR-标记的MMAF ADC在两个剂量水平的静脉施用均引起肿瘤消退。此外,小鼠ADC治疗的耐受性良好,在任何治疗组中没有观察到的重量损失。在低至3mg/kg的单次剂量时MDA-MB231克隆16肿瘤的有效消退证明了ybbR-标记的ADC在HER-2依赖的肿瘤小鼠模型中是有效的。所有动物研究均按照实验动物护理和使用的指南进行(NIH公布;National Academy Press,第8版,2001)。

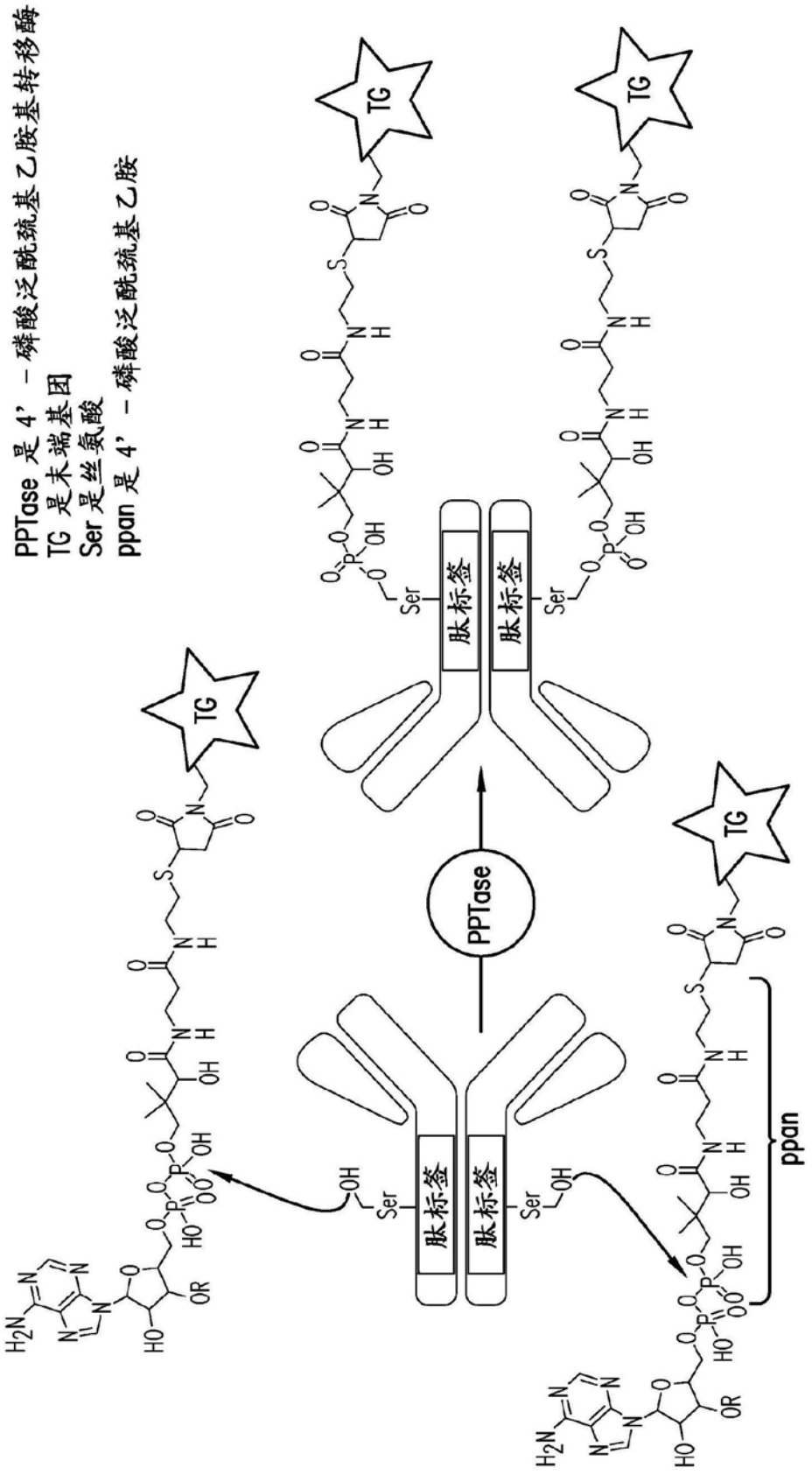

PPTase 是 4' – 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶
TG 是末端基团
Ser 是丝氨酸
ppan 是 4' – 磷酸泛酰巯基乙胺
TG
肽标签
Ser
PPTase
ppan

图1

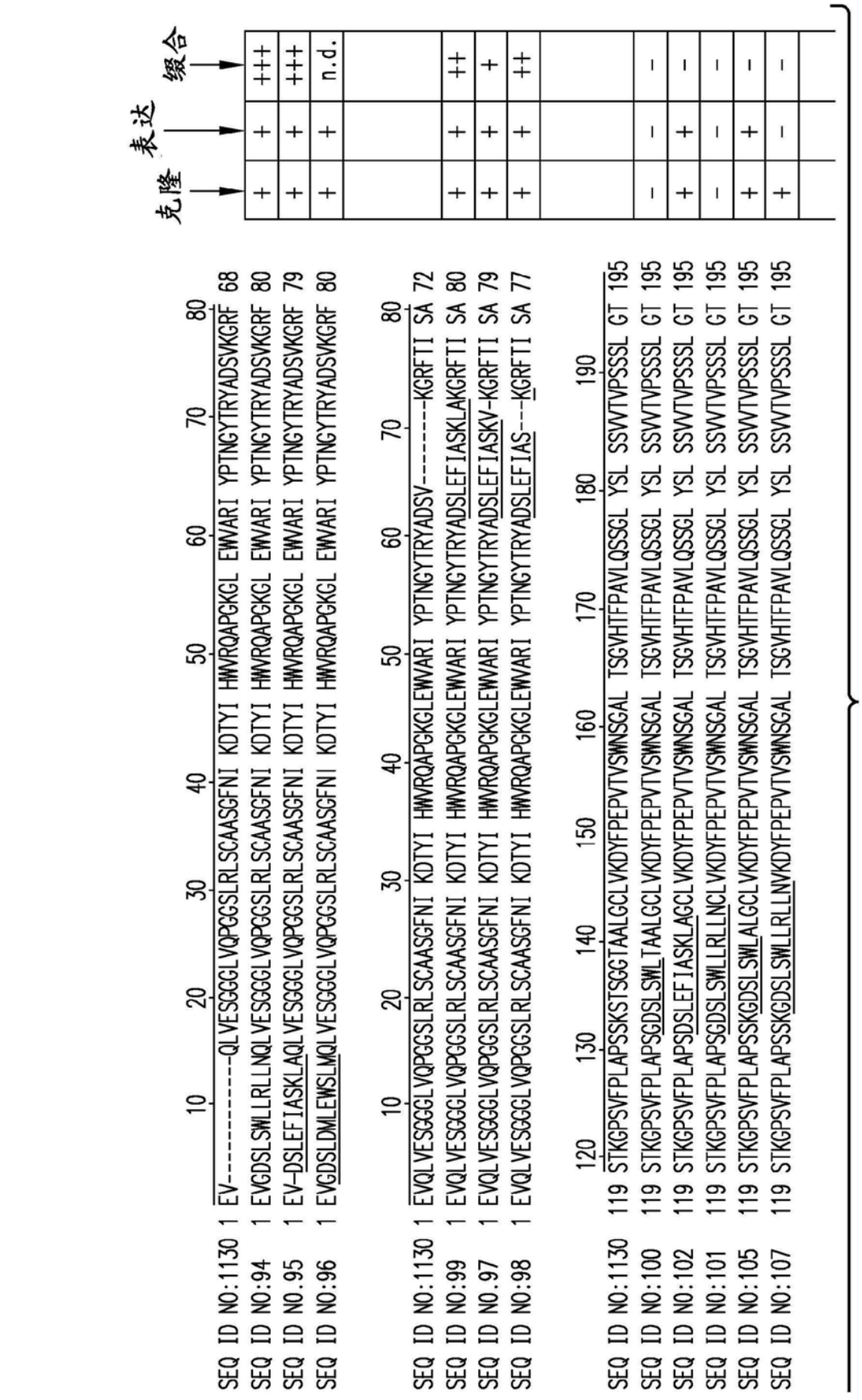

克隆
表达
缀合
SEQ ID NO:1130 1 EV----------QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGL EWVARI YPTNGYTRYADSVKGRF 68
SEQ ID NO:94 1 EVGDSLSWLLRLLNQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGL EWVARI YPTNGYTRYADSVKGRF 80
SEQ ID NO.95 1 EV-DSLEFIASKLAQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGL EWVARI YPTNGYTRYADSVKGRF 79
SEQ ID NO:96 1 EVGDSLDMLEWSLMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGL EWVARI YPTNGYTRYADSVKGRF 80
SEQ ID NO:1130 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGLEWVARI YPTNGYTRYADSV--------KGRFTI SA 72
SEQ ID NO:99 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGLEWVARI YPTNGYTRYADSLEFIASKLAKGRFTI SA 80
SEQ ID NO.97 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGLEWVARI YPTNGYTRYADSLEFIASKV-KGRFTI SA 79
SEQ ID NO:98 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYI HWVRQAPGKGLEWVARI YPTNGYTRYADSLEFIAS---KGRFTI SA 77
SEQ ID NO:1130 119 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSL GT 195
SEQ ID NO:100 119 STKGPSVFPLAPSGDSLSWLTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSL GT 195
SEQ ID NO:102 119 STKGPSVFPLAPSDSLEFIASKLAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSL GT 195
SEQ ID NO:101 119 STKGPSVFPLAPSGDSLSWLLRLLNCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSL GT 195
SEQ ID NO:105 119 STKGPSVFPLAPSSKGDSLSWLALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSL GT 195
SEQ ID NO:107 119 STKGPSVFPLAPSSKGDSLSWLLRLLNVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSL GT 195
下接图 2A-1

图2A

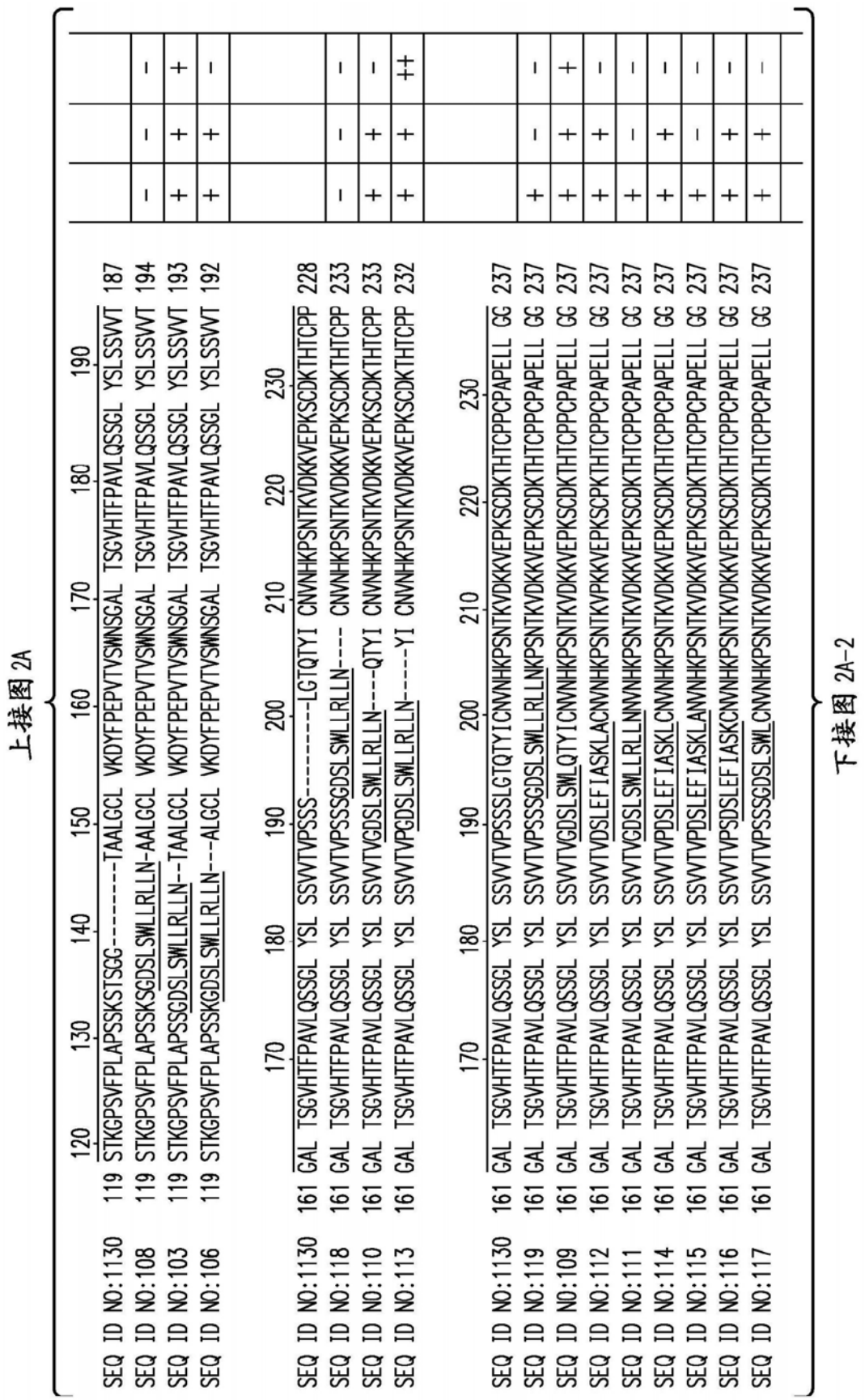

上接图 2A
120 130 140 150 160 170 180 190
SEQ ID NO:1130 119 STKGPSVFPLAPSSKSTSGG--------TAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVT 187
SEQ ID NO:108 119 STKGPSVFPLAPSSKSGDSLSWLLRLLN-AALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVT 194
SEQ ID NO:103 119 STKGPSVFPLAPSSGDSLSWLLRLLN--TAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVT 193
SEQ ID NO:106 119 STKGPSVFPLAPSSKGDSLSWLLRLLN---ALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVT 192
170 180 190 200 210 220 230
SEQ ID NO:1130 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSS----------LGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP 228
SEQ ID NO:118 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSGDSLSWLLRLLN---- CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP 233
SEQ ID NO:110 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVGDSLSWLLRLLN----QTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP 233
SEQ ID NO:113 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPGDSLSWLLRLLN-----YI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP 232
170 180 190 200 210 220 230
SEQ ID NO:1130 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:119 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSGDSLSWLLRLLNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:109 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVGDSLSWLQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:112 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVDSLEFIASKLACNVNHKPSNTKVPKKVEPKSCPKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:111 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVGDSLSWLLRLLNNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:114 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPDSLEFIASKLCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:115 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPDSLEFIASKLANVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:116 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSDSLEFIASKCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
SEQ ID NO:117 161 GAL TSGVHTFPAVLQSSGL YSL SSVVTVPSSSGDSLSWLCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GG 237
下接图 2A-2

图2A-1

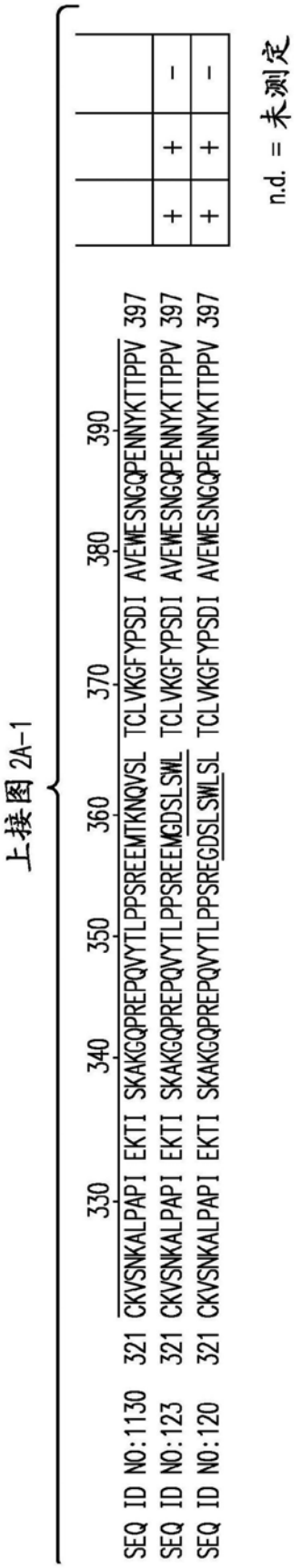

上接图 2A-1
330 340 350 360 370 380 390
SEQ ID NO:1130 321 CKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV 397
SEQ ID NO:123 321 CKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMGDSLSWL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV 397
SEQ ID NO:120 321 CKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREGDSLSWLSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV 397
+ + -
+ + -
n.d. = 未测定

图2A-2

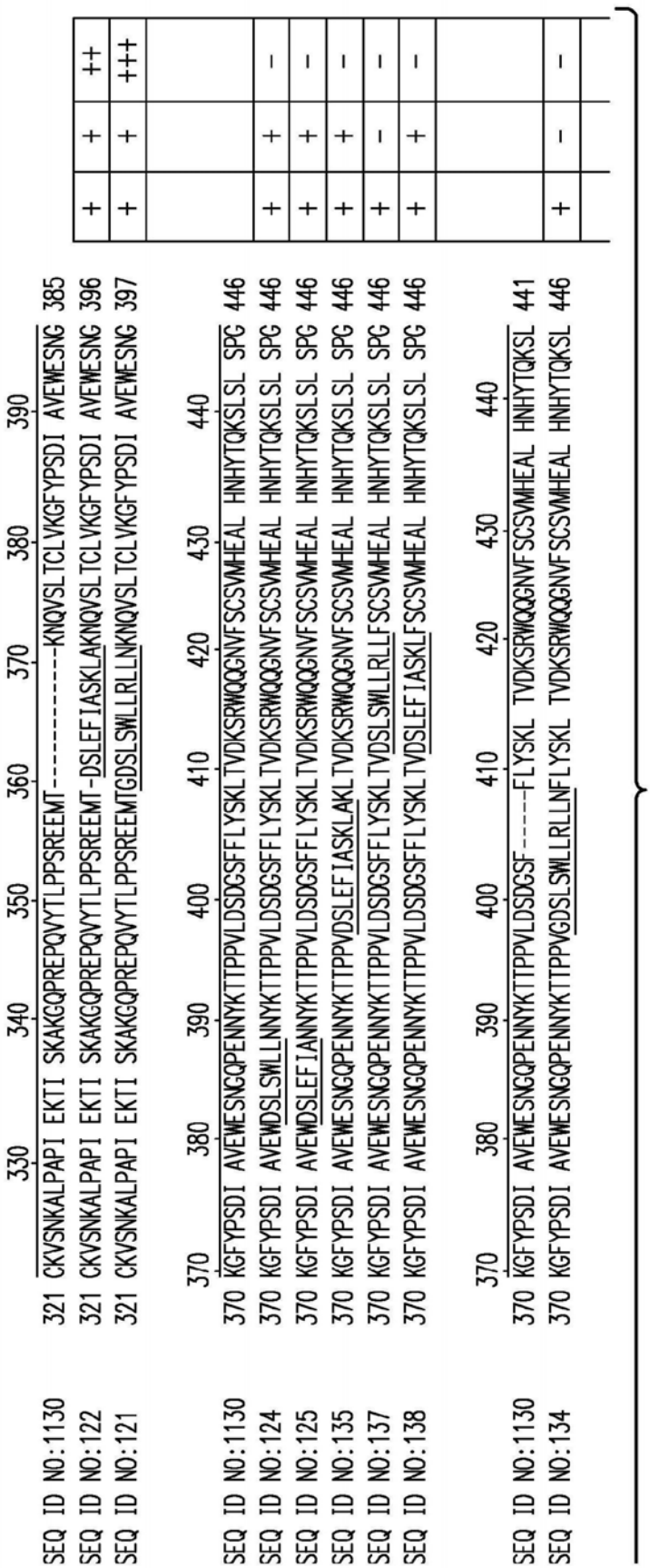

330 340 350 360 370 380 390
SEQ ID NO:1130 321 CKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT----------KNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNG 385
SEQ ID NO:122 321 CKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT-DSLEFIASKLAKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNG 396
SEQ ID NO:121 321 CKVSNKALPAPI EKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTGDSLSWLLRLLNKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNG 397
370 380 390 400 410 420 430 440
SEQ ID NO:1130 370 KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SPG 446
SEQ ID NO:124 370 KGFYPSDI AVEWDSLSWLLNNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SPG 446
SEQ ID NO:125 370 KGFYPSDI AVEWDSLEFIANNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SPG 446
SEQ ID NO:135 370 KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVDSLEFIASKLAKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SPG 446
SEQ ID NO:137 370 KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDSLSWLLRLLFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SPG 446
SEQ ID NO:138 370 KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDSLEFIASKLFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSL SPG 446
370 380 390 400 410 420 430 440
SEQ ID NO:1130 370 KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF-----FLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSL 441
SEQ ID NO:134 370 KGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVGDSLSWLLRLLNFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSL 446
+ + ++
+ + +++
下接图 2B-1

图2B

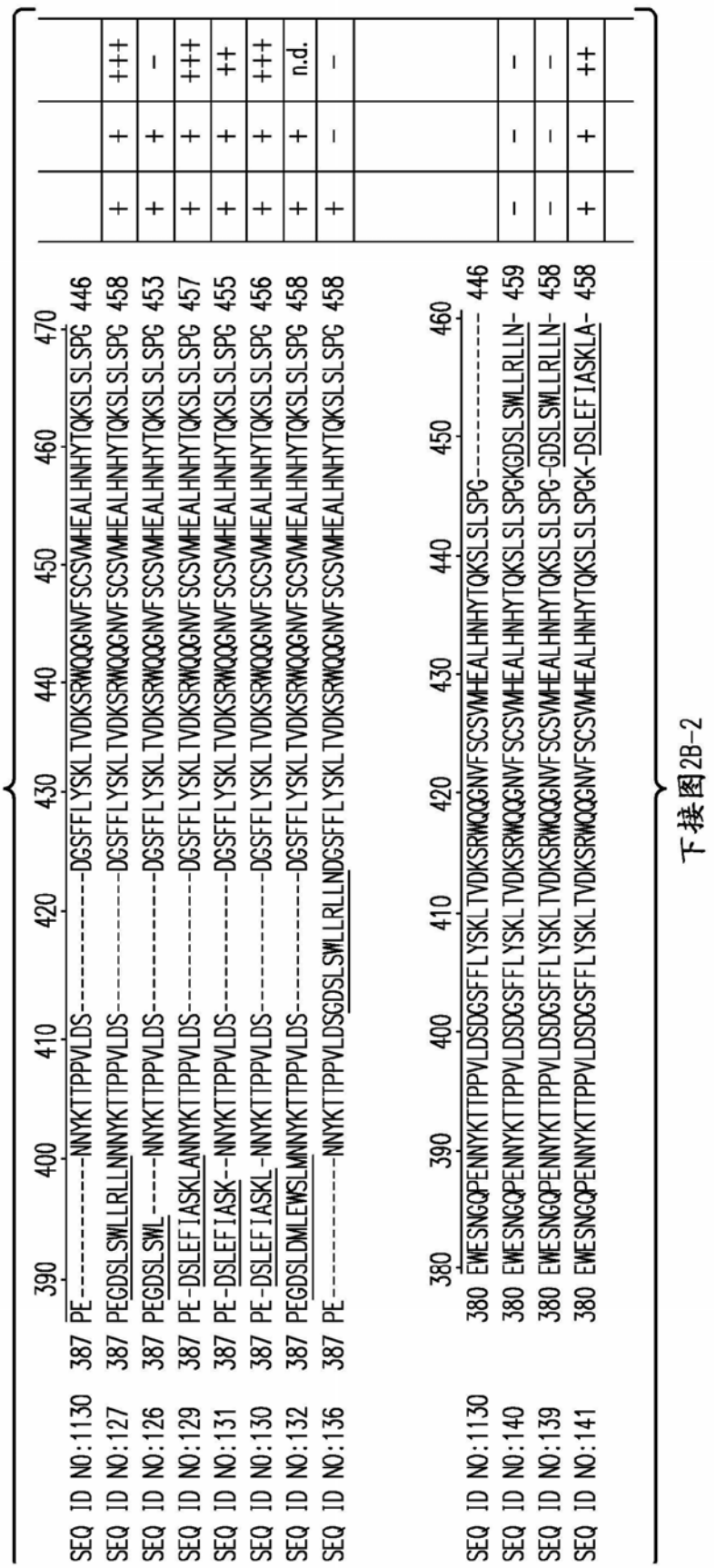

上接图2B
390 400 410 420 430 440 450 460 470
SEQ ID NO:1130 387 PE----------NNYKTTPPVLDS----------DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446
SEQ ID NO:127 387 PEGDSLSWLLRLLNNNYKTTPPVLDS----------DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 458
SEQ ID NO:126 387 PEGDSLSWL-----NNYKTTPPVLDS----------DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 453
SEQ ID NO:129 387 PE-DSLEFIASKLANNYKTTPPVLDS----------DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 457
SEQ ID NO:131 387 PE-DSLEFIASK--NNYKTTPPVLDS----------DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 455
SEQ ID NO:130 387 PE-DSLEFIASKL-NNYKTTPPVLDS----------DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 456
SEQ ID NO:132 387 PEGDSLDMLEWSLMNNYKTTPPVLDS----------DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 458
SEQ ID NO:136 387 PE----------NNYKTTPPVLDSGDSLSWLLRLLNDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 458
+ + +++
+ + -
+ + +++
+ + ++
+ + +++
+ + n.d.
+ - -
SEQ ID NO:1130 380 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG---------- 446
SEQ ID NO:140 380 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGDSLSWLLRLLN- 459
SEQ ID NO:139 380 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG-GDSLSWLLRLLN- 458
SEQ ID NO:141 380 EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-DSLEFIASKLA- 458
- - -
- - -
+ + ++
下接图2B-2

图2B-1

上接图 2B-1
10 20 30 40 50 60 70 80
SEQ ID NO:1131 1 DI----------QMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSG 68
SEQ ID NO:26 1 DIGDSLSWLLRLLNQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSG 80
SEQ ID NO:27 1 DI-DSLEFIASKLAQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSG 79
80 90 100 110 120 130 140 150 160
SEQ ID NO:1131 76 SSL--------QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN 152
SEQ ID NO:30 76 DSLEFIASKLAQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN 160
150 160 170 180 190 200 210 220
SEQ ID NO:1131 150 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC---------- 214
SEQ ID NO:29 150 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-DSLEFIASKLA 225
SEQ ID NO:28 150 VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGDSLSWLLRLLN 226

图2B-2

```
119  STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  177
178  GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKX'1VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  237
238  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  297
298  STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRX'2E  357
358  X'3TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  417
418  QQGNVFSCSVMHEX'4LHNHYTQKSLSLSPG  446
```

图3A


168
214
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNX'5LQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKX'6YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
109
169

图3B

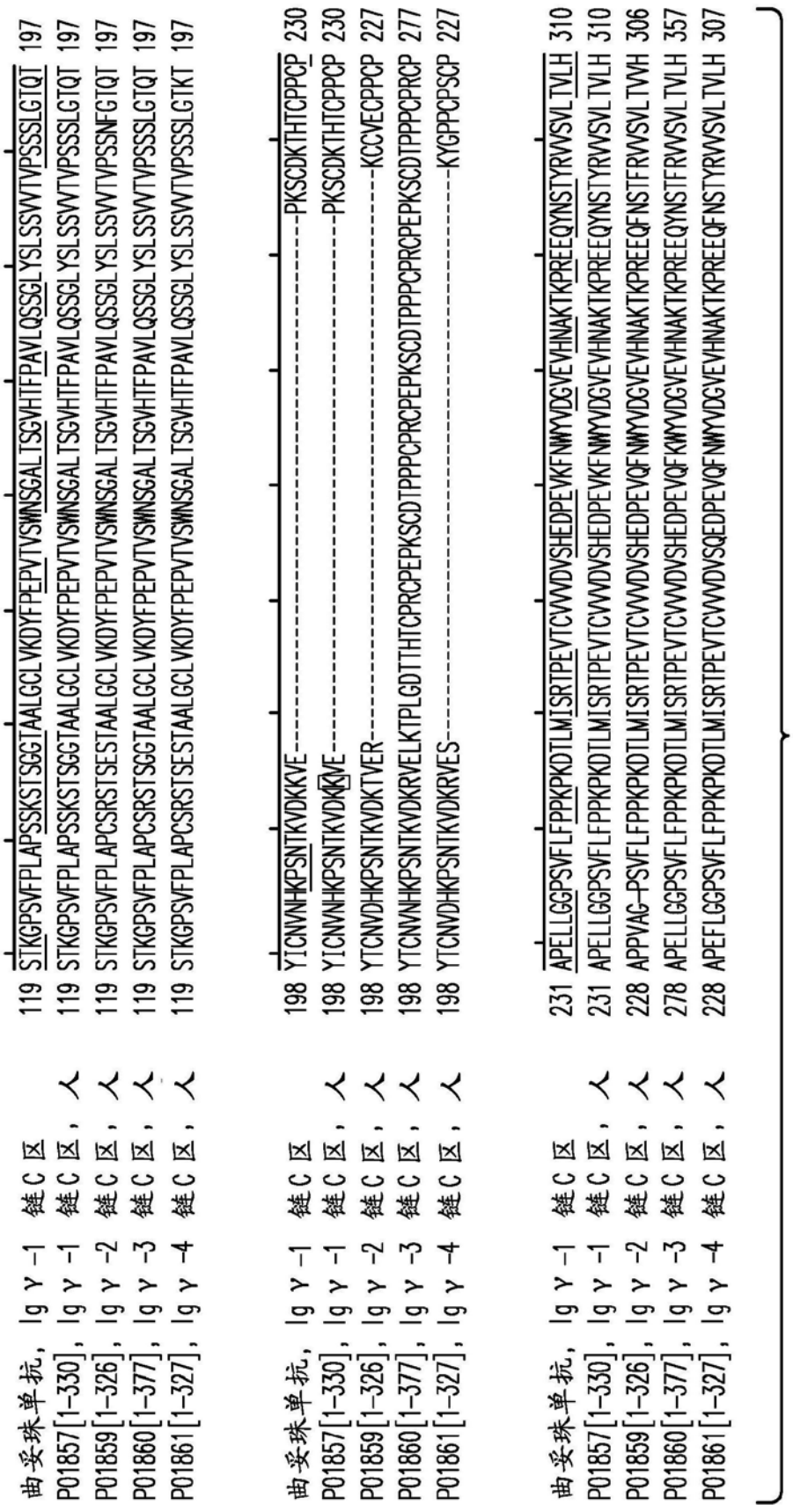

曲妥珠单抗, Ig γ -1 链 C 区 119 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT 197
P01857[1-330], Ig γ -1 链 C 区, 人 119 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT 197
P01859[1-326], Ig γ -2 链 C 区, 人 119 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT 197
P01860[1-377], Ig γ -3 链 C 区, 人 119 STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT 197
P01861[1-327], Ig γ -4 链 C 区, 人 119 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT 197
曲妥珠单抗, Ig γ -1 链 C 区 198 YTCNVNHKPSNTKVDKKVE----------PKSCDKTHTCPPCP 230
P01857[1-330], Ig γ -1 链 C 区, 人 198 YTCNVNHKPSNTKVDKRVE----------PKSCDKTHTCPPCP 230
P01859[1-326], Ig γ -2 链 C 区, 人 198 YTCNVDHKPSNTKVDKTVER----------KCCVECPPCP 227
P01860[1-377], Ig γ -3 链 C 区, 人 198 YTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP 277
P01861[1-327], Ig γ -4 链 C 区, 人 198 YTCNVDHKPSNTKVDKRVES----------KYGPPCPSCP 227
曲妥珠单抗, Ig γ -1 链 C 区 231 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH 310
P01857[1-330], Ig γ -1 链 C 区, 人 231 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH 310
P01859[1-326], Ig γ -2 链 C 区, 人 228 APPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH 306
P01860[1-377], Ig γ -3 链 C 区, 人 278 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH 357
P01861[1-327], Ig γ -4 链 C 区, 人 228 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH 307
下接图 4A-1

图4A

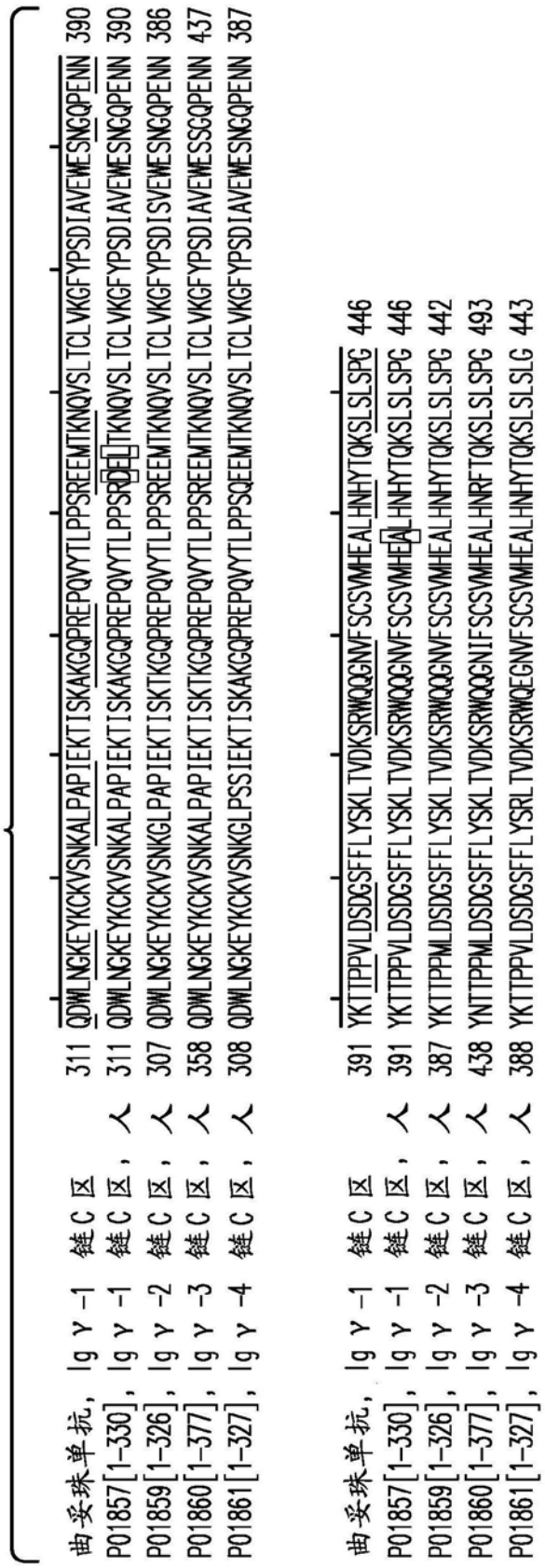

上接图 4A
曲妥珠单抗, Ig γ -1 链 C 区 311 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN 390
P01857[1-330], Ig γ -1 链 C 区, 人 311 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN 390
P01859[1-326], Ig γ -2 链 C 区, 人 307 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENN 386
P01860[1-377], Ig γ -3 链 C 区, 人 358 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENN 437
P01861[1-327], Ig γ -4 链 C 区, 人 308 QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN 387
曲妥珠单抗, Ig γ -1 链 C 区 391 YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446
P01857[1-330], Ig γ -1 链 C 区, 人 391 YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 446
P01859[1-326], Ig γ -2 链 C 区, 人 387 YKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 442
P01860[1-377], Ig γ -3 链 C 区, 人 438 YNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG 493
P01861[1-327], Ig γ -4 链 C 区, 人 388 YKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG 443

图4A-1

曲妥珠单抗 Ig κ 链 C 区 109 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK 188
P01834[1-106], Ig κ 链 C 区，人 109 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK 188
曲妥珠单抗 Ig κ 链 C 区 189 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214
P01834[1-106], Ig κ 链 C 区，人 189 HKDYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 214

图4B

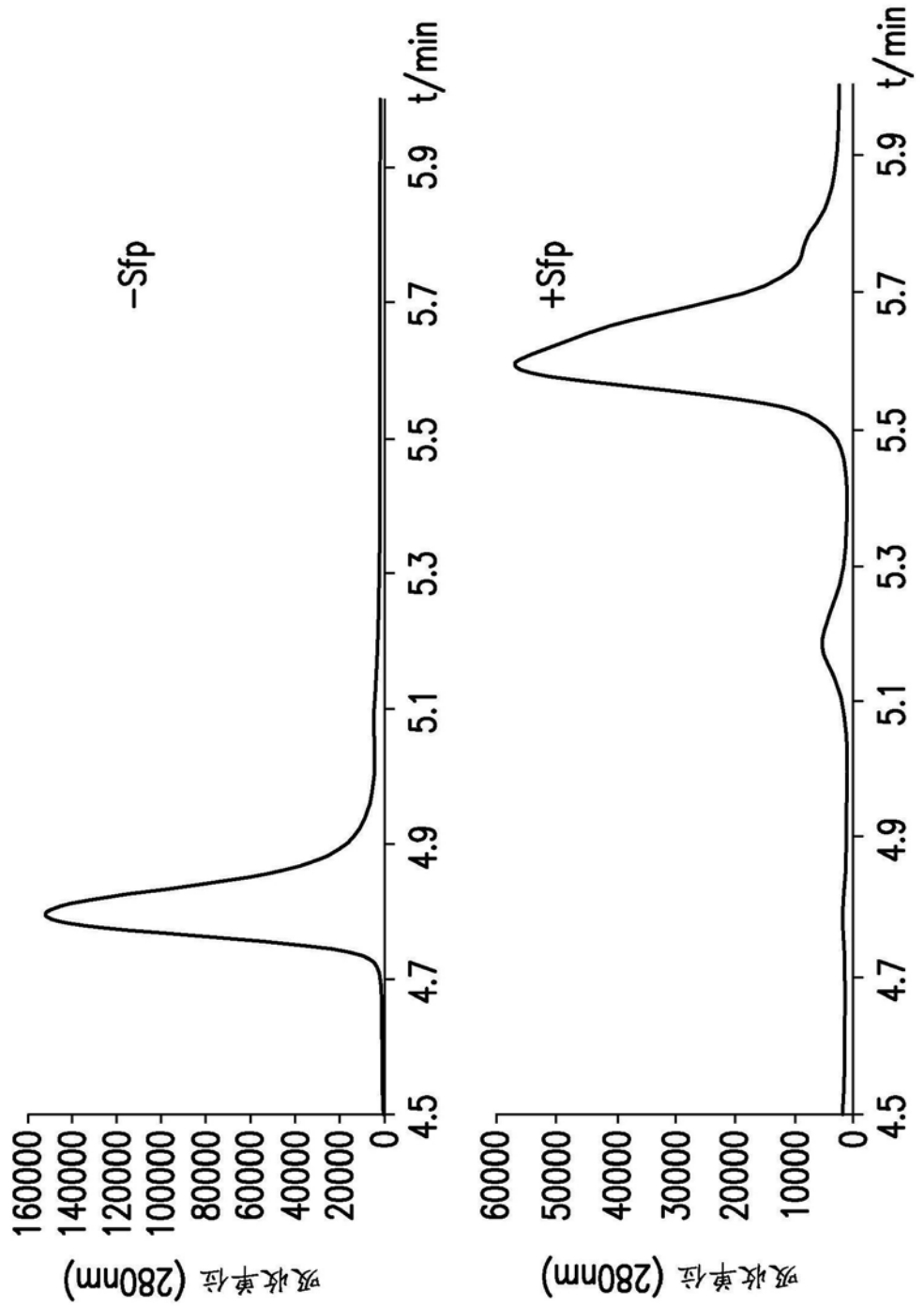

-Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
60000
50000
40000
30000
20000
10000
4.5
4.7
4.9
5.1
5.3
5.5
5.7
5.9

图5A

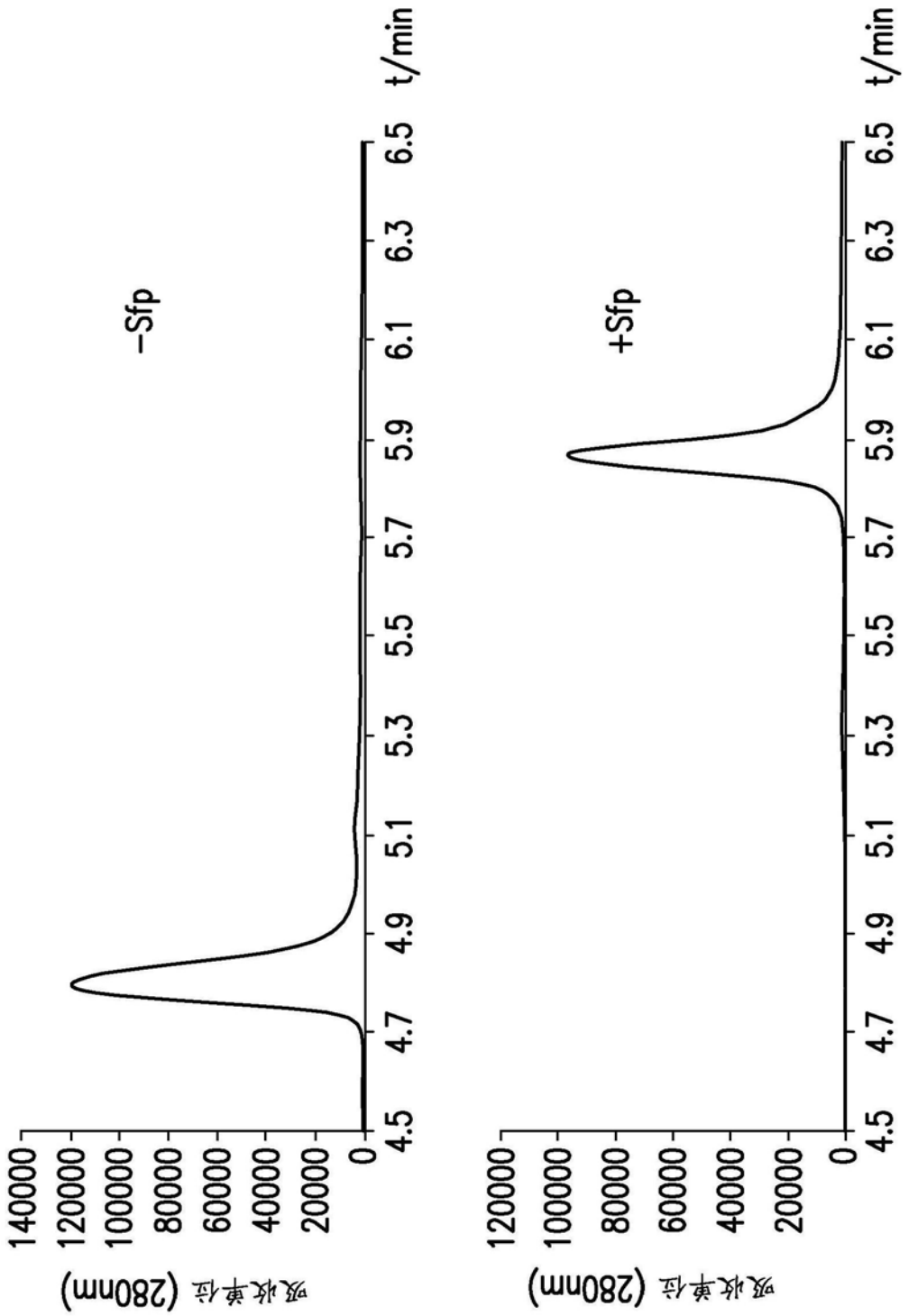

−Sfp
+Sfp
吸收单位 (280nm)
t/min
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
140000
4.5
4.7
4.9
5.1
5.3
5.5
5.7
5.9
6.1
6.3
6.5

图5B

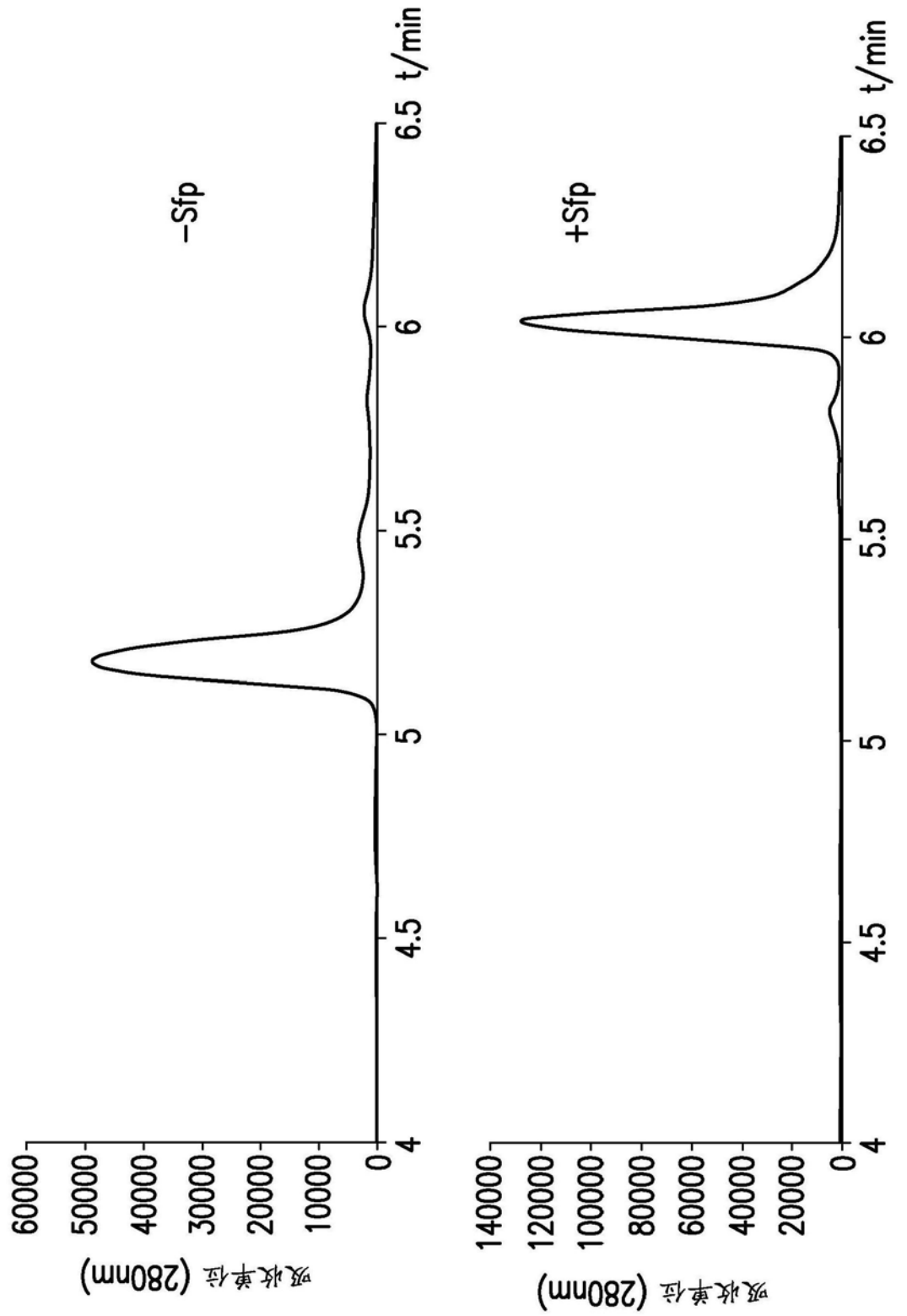

-Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
140000
4
4.5
5
5.5
6
6.5

图5C

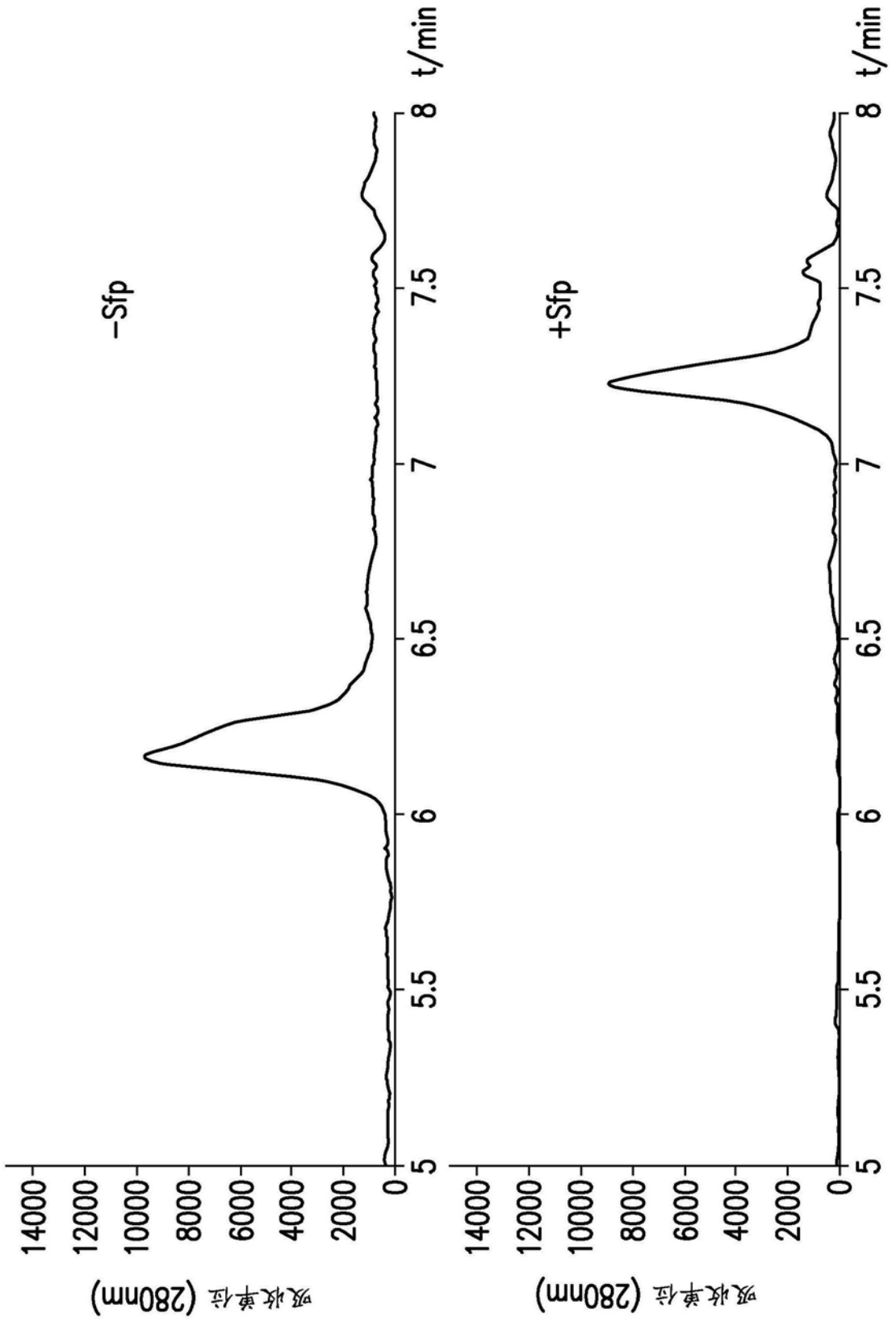

-Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8

图5D

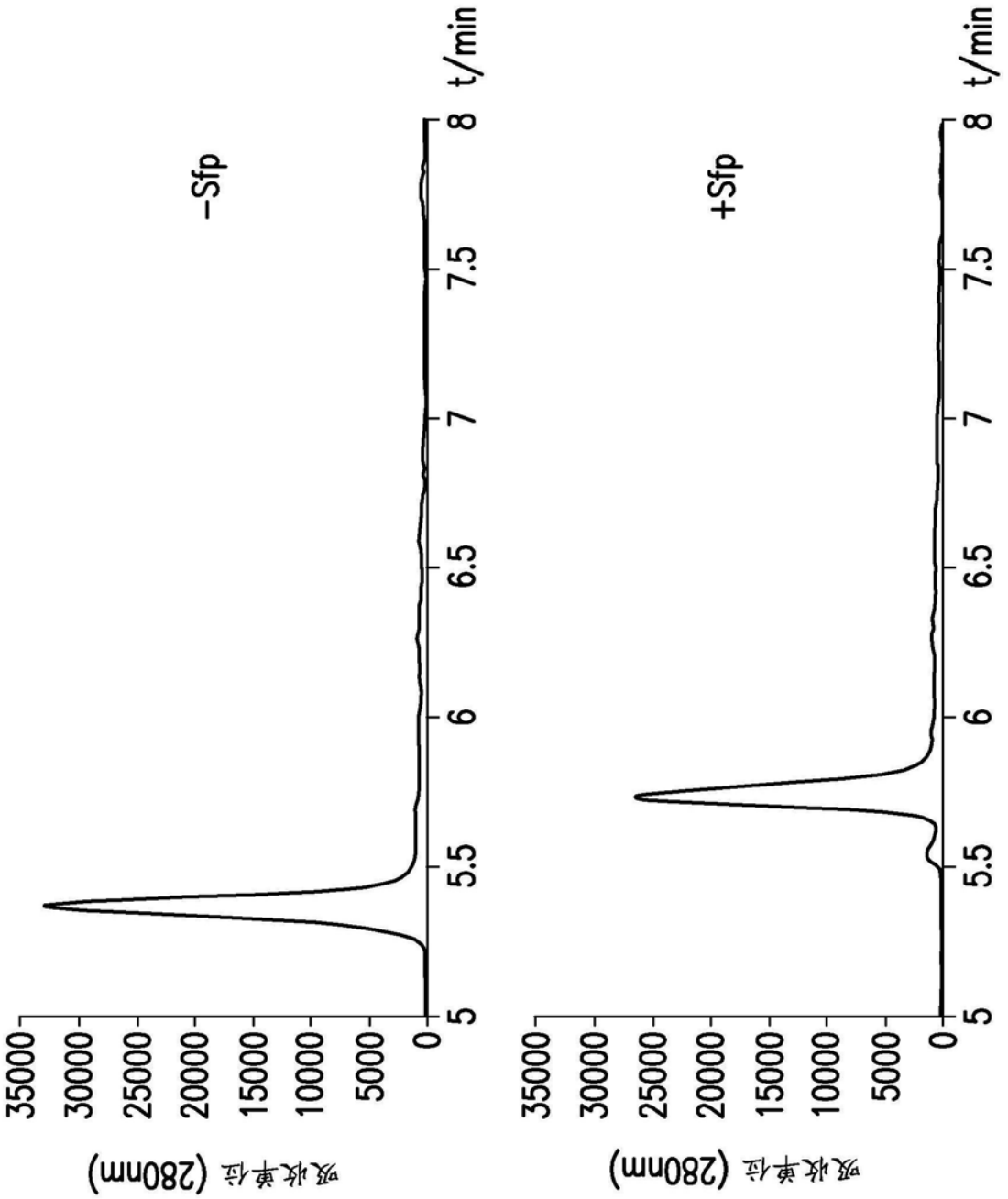

-Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8

图5E

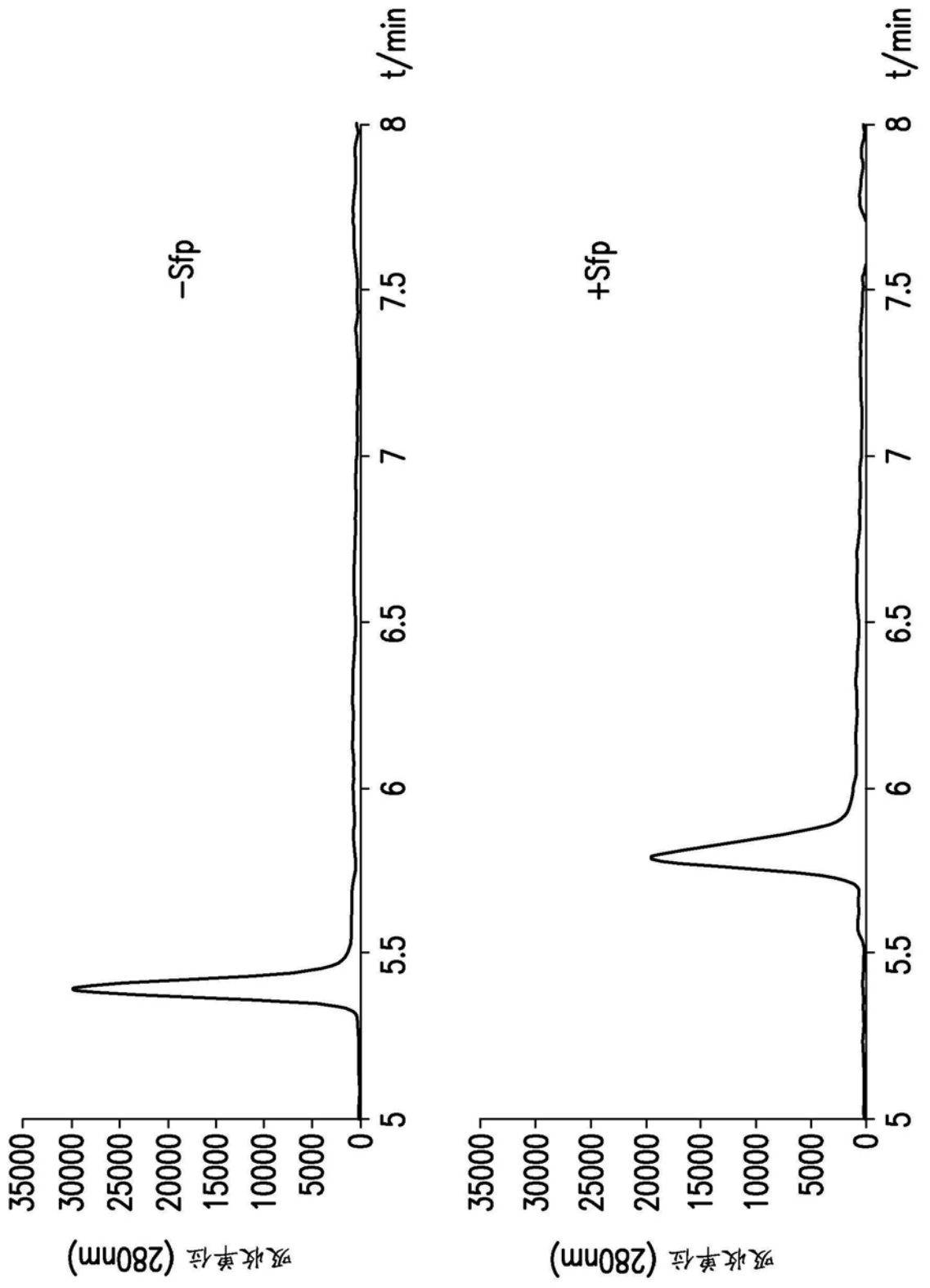

−Sfp
+Sfp
吸收单位 (280nm)
t/min
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
5
5.5
6
6.5
7
7.5
8

图5F

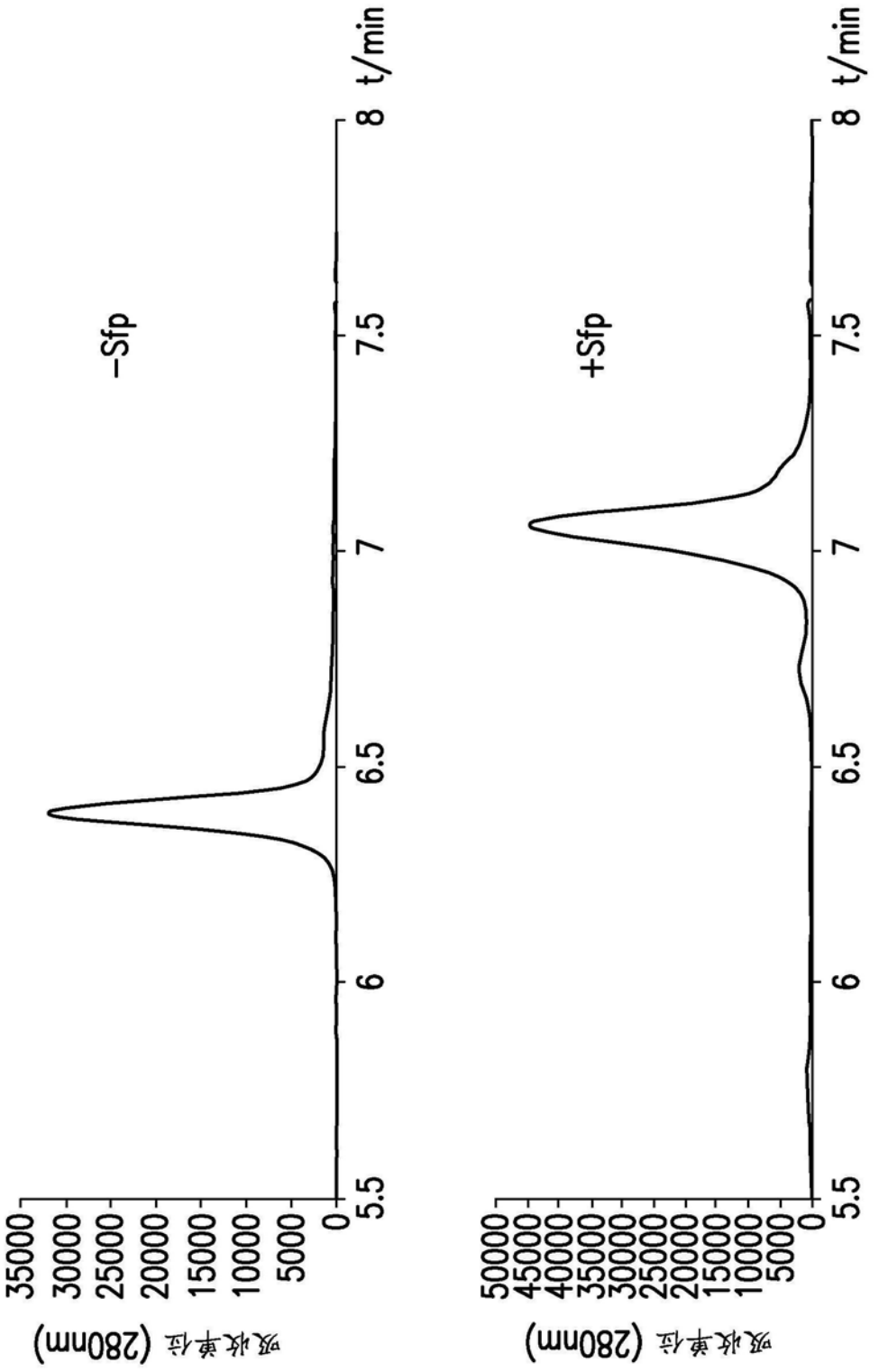

-Sfp
+Sfp
吸收单位 (280nm)
t/min
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
50000
5.5
6
6.5
7
7.5
8

图5G

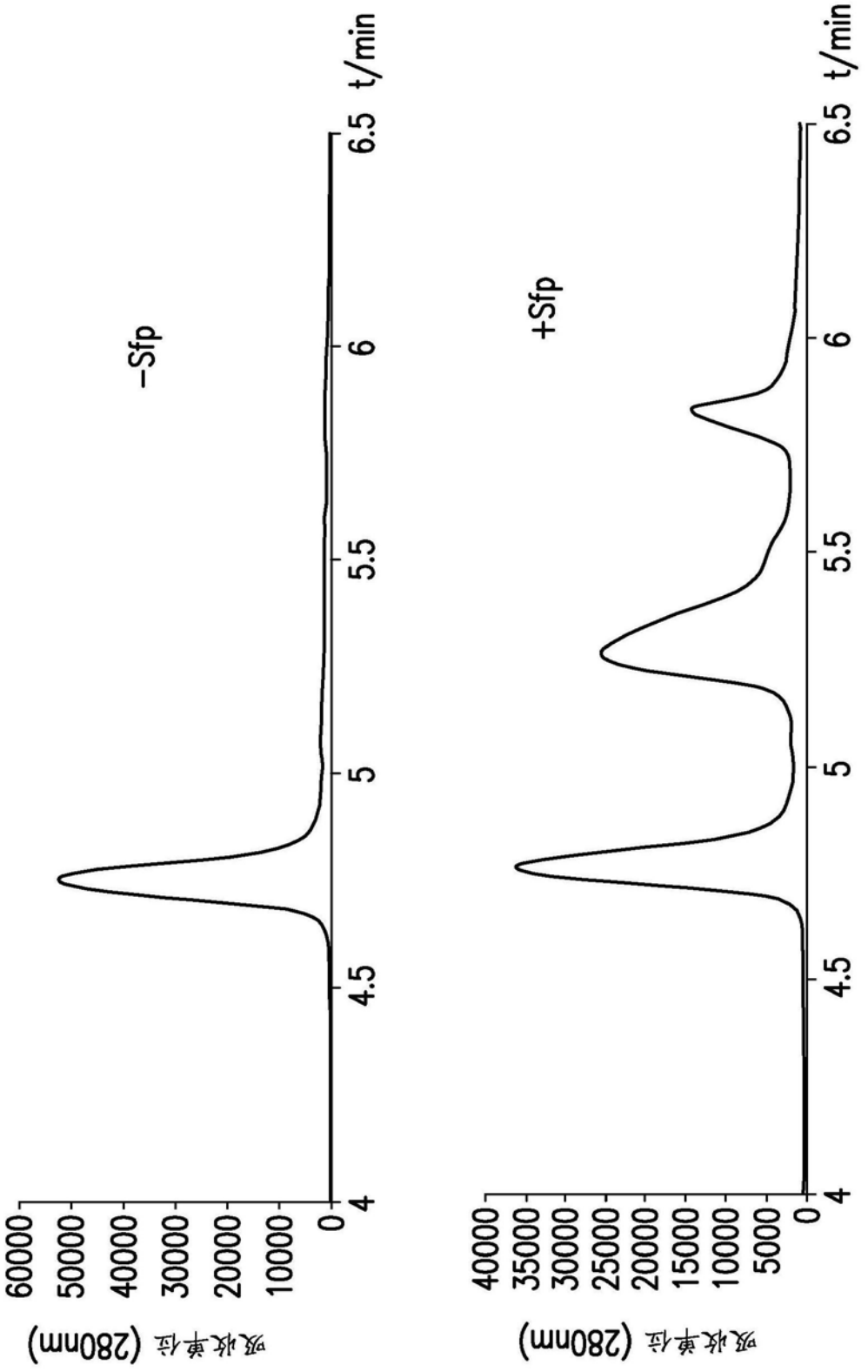

-Sfp
+Sfp
吸收单位 (280nm)
t/min
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
5000
15000
25000
35000
4
4.5
5
5.5
6
6.5

图5H

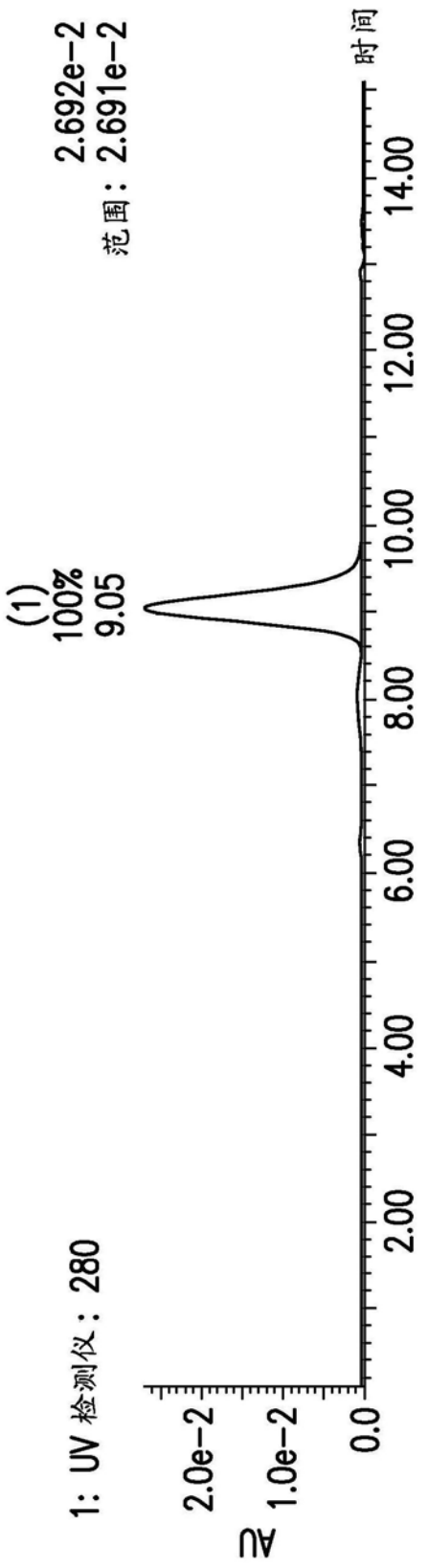

2.692e-2
范围：2.691e-2
(1)
100%
9.05
时间
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.0
2.0e-2
1.0e-2
AU
1: UV 检测仪：280

图6A

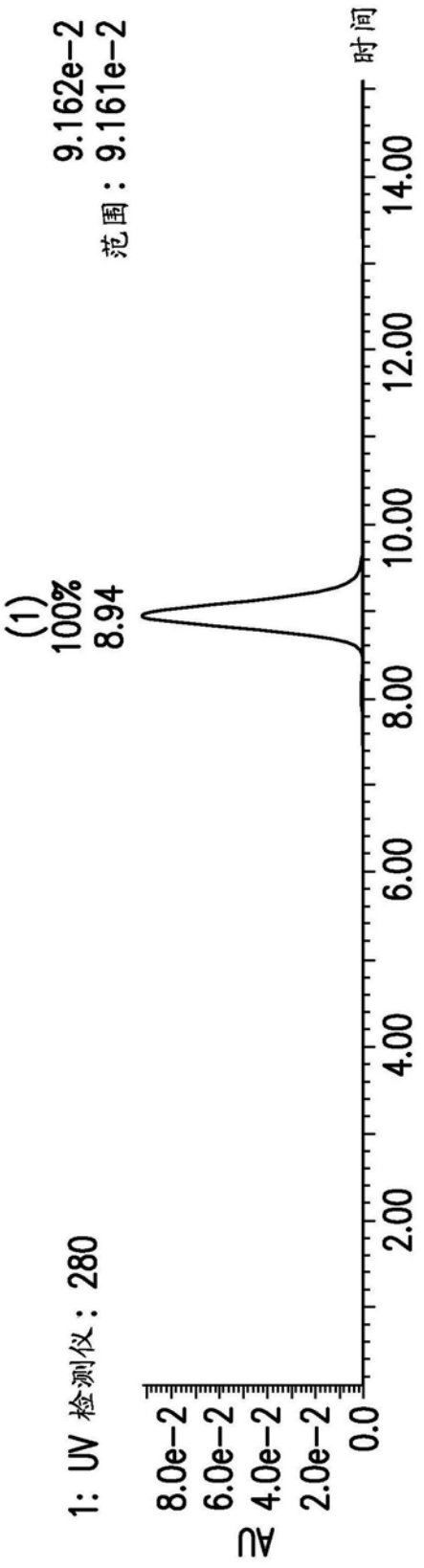

9.162e-2
范围：9.161e-2
(1)
100%
8.94
1: UV 检测仪：280
AU
8.0e-2
6.0e-2
4.0e-2
2.0e-2
0.0
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
时间

图6B

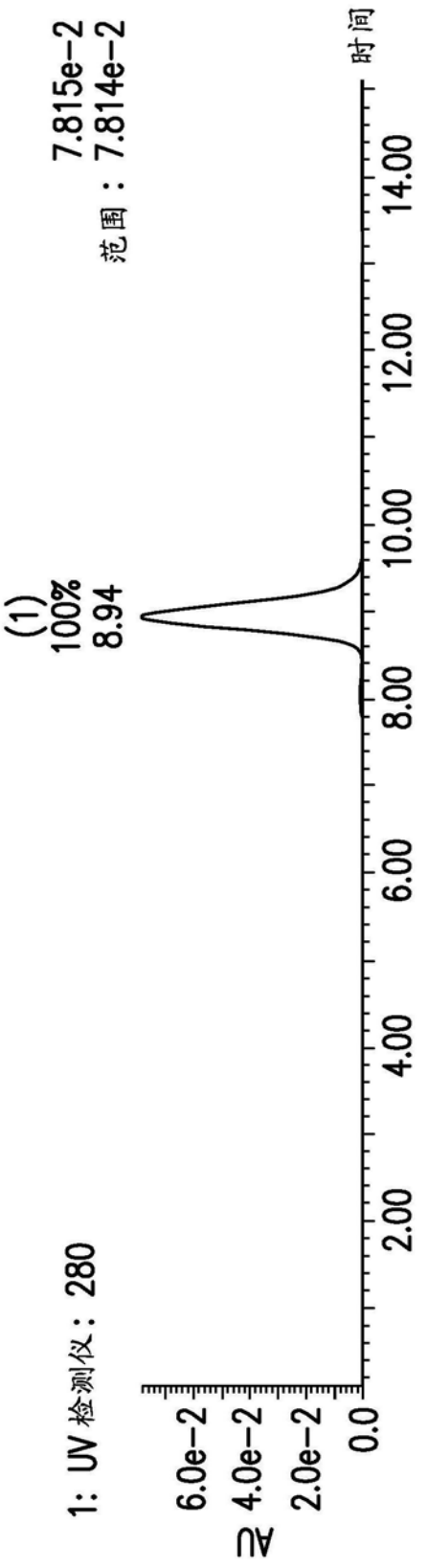

7.815e-2
范围：7.814e-2
(1)
100%
8.94
1: UV 检测仪：280
AU
6.0e-2
4.0e-2
2.0e-2
0.0
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
时间

图6C

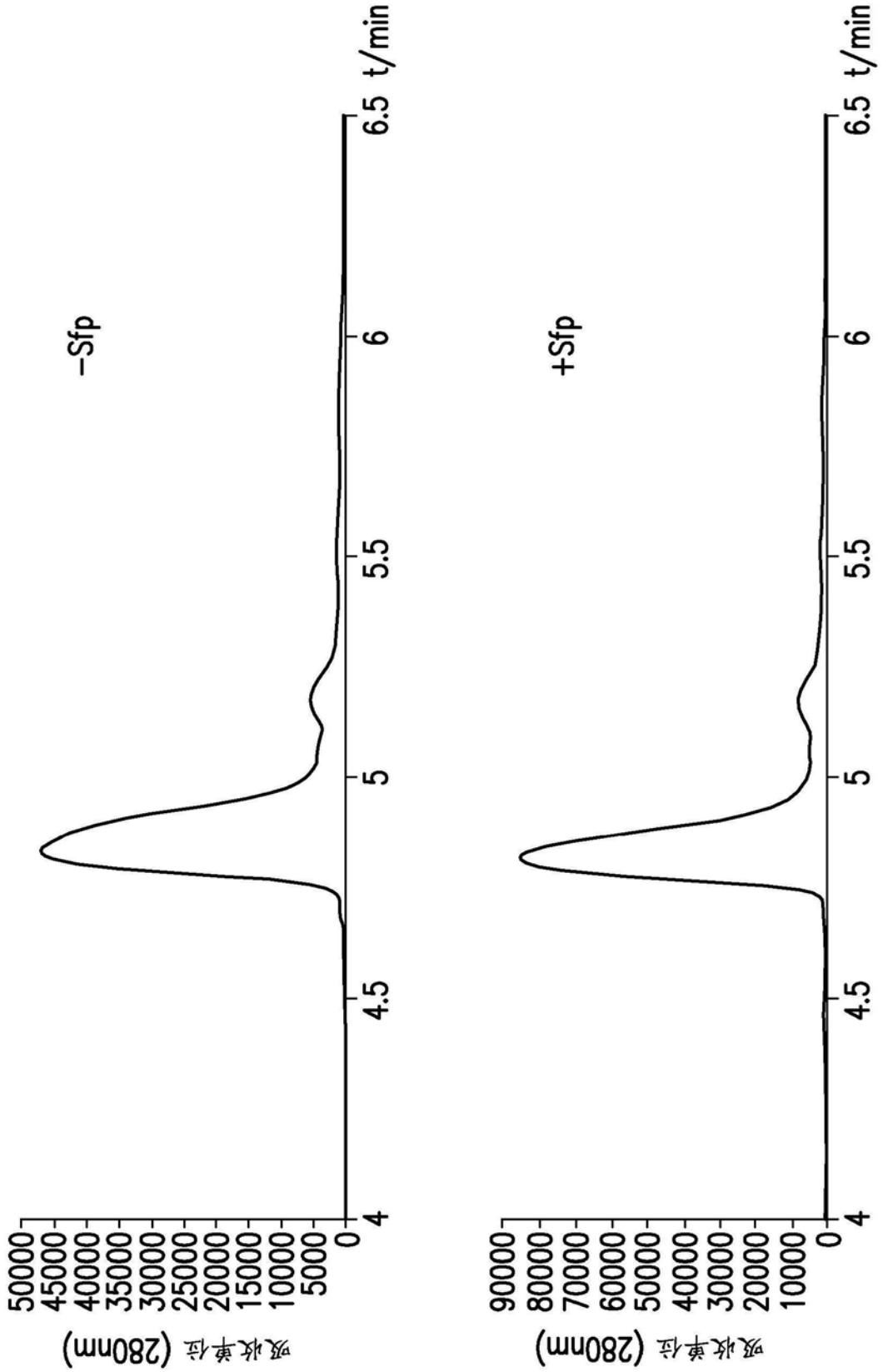

−Sfp
+Sfp
吸收单位 (280nm)
t/min
0
4
4.5
5
5.5
6
6.5
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
50000
60000
70000
80000
90000

图7

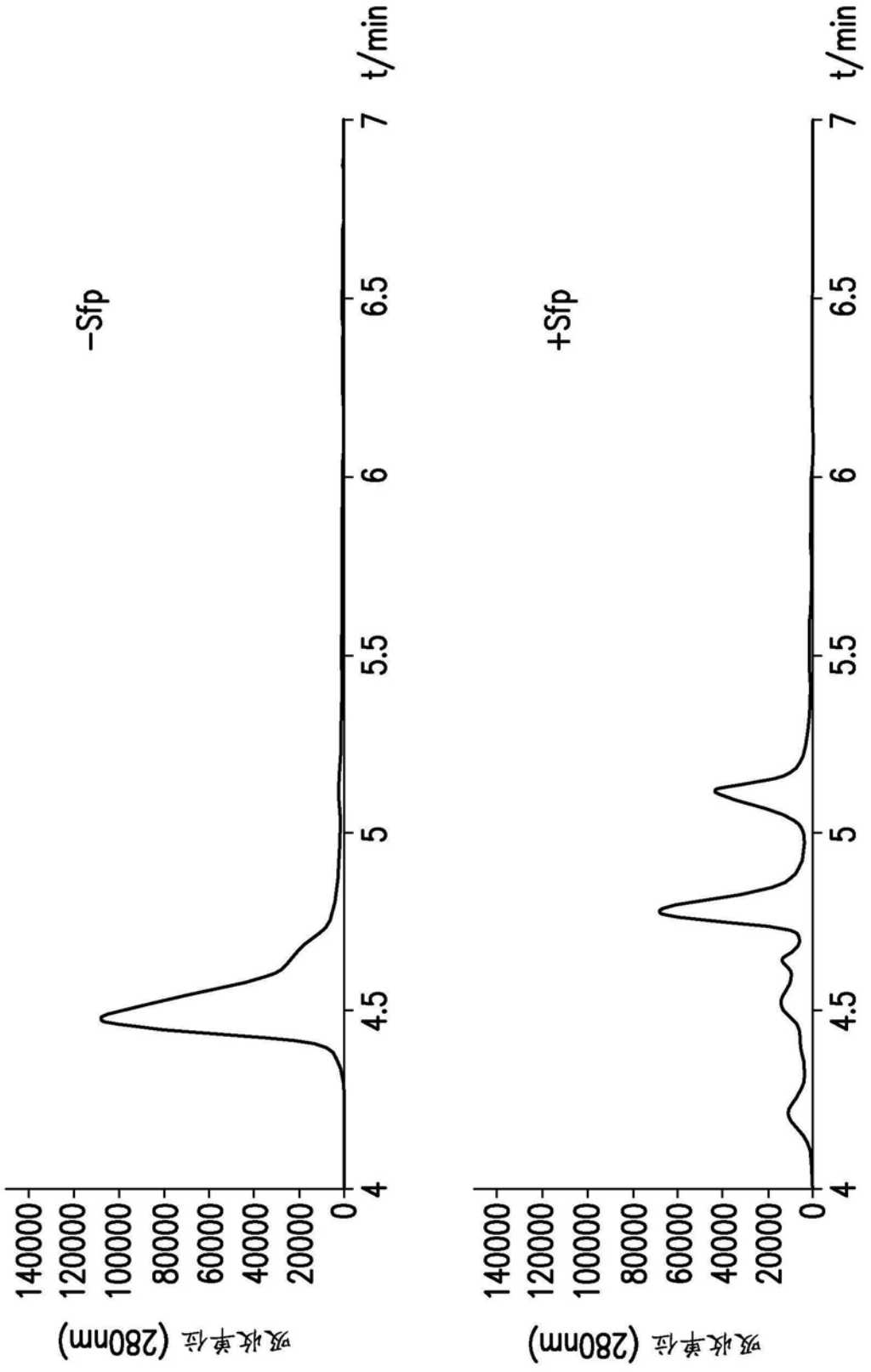

-Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
140000
4
4.5
5
5.5
6
6.5
7

图8A

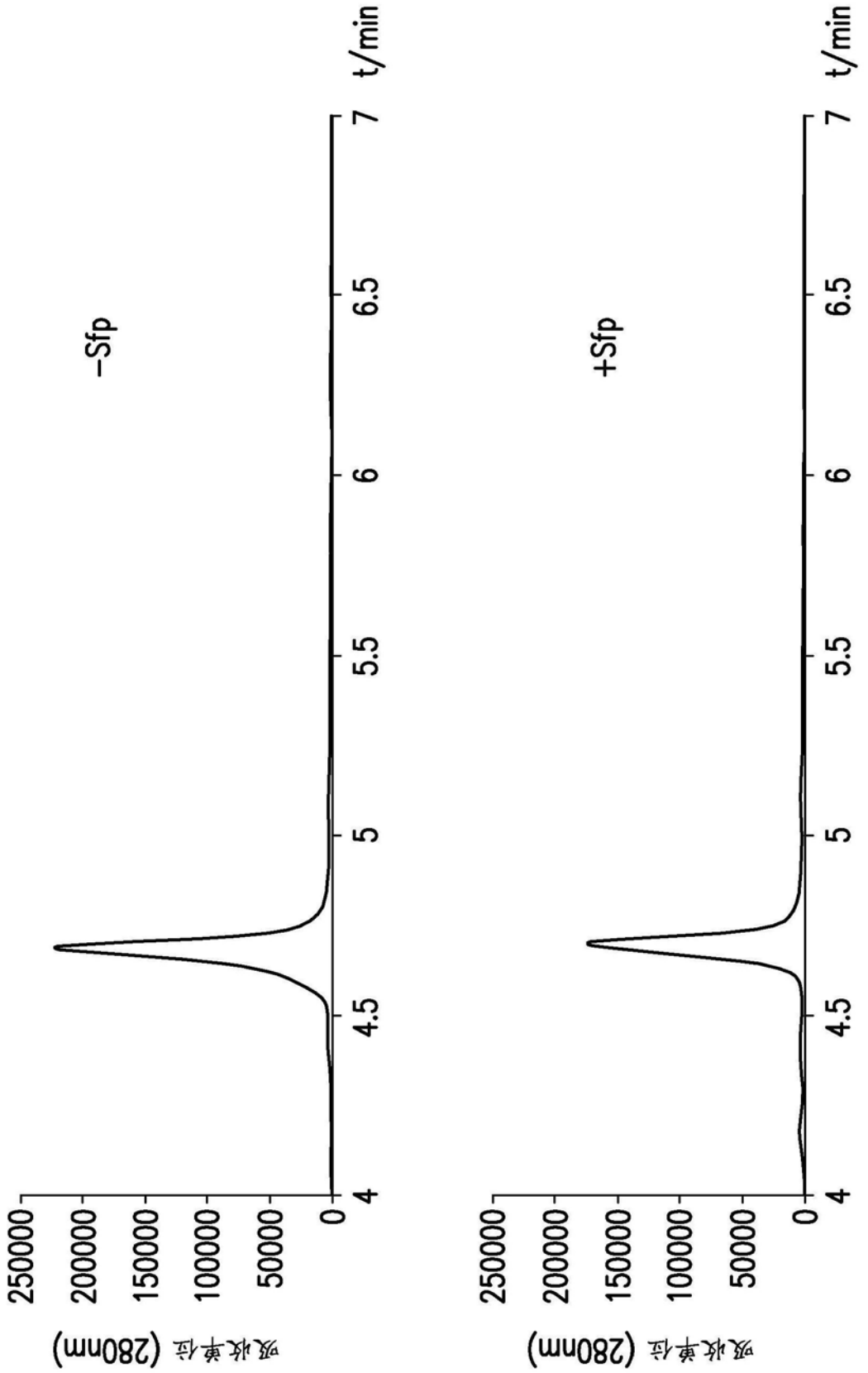

-Sfp
+Sfp
吸收单位 (280nm)
250000
200000
150000
100000
50000
0
4
4.5
5
5.5
6
6.5
7
t/min

图8B

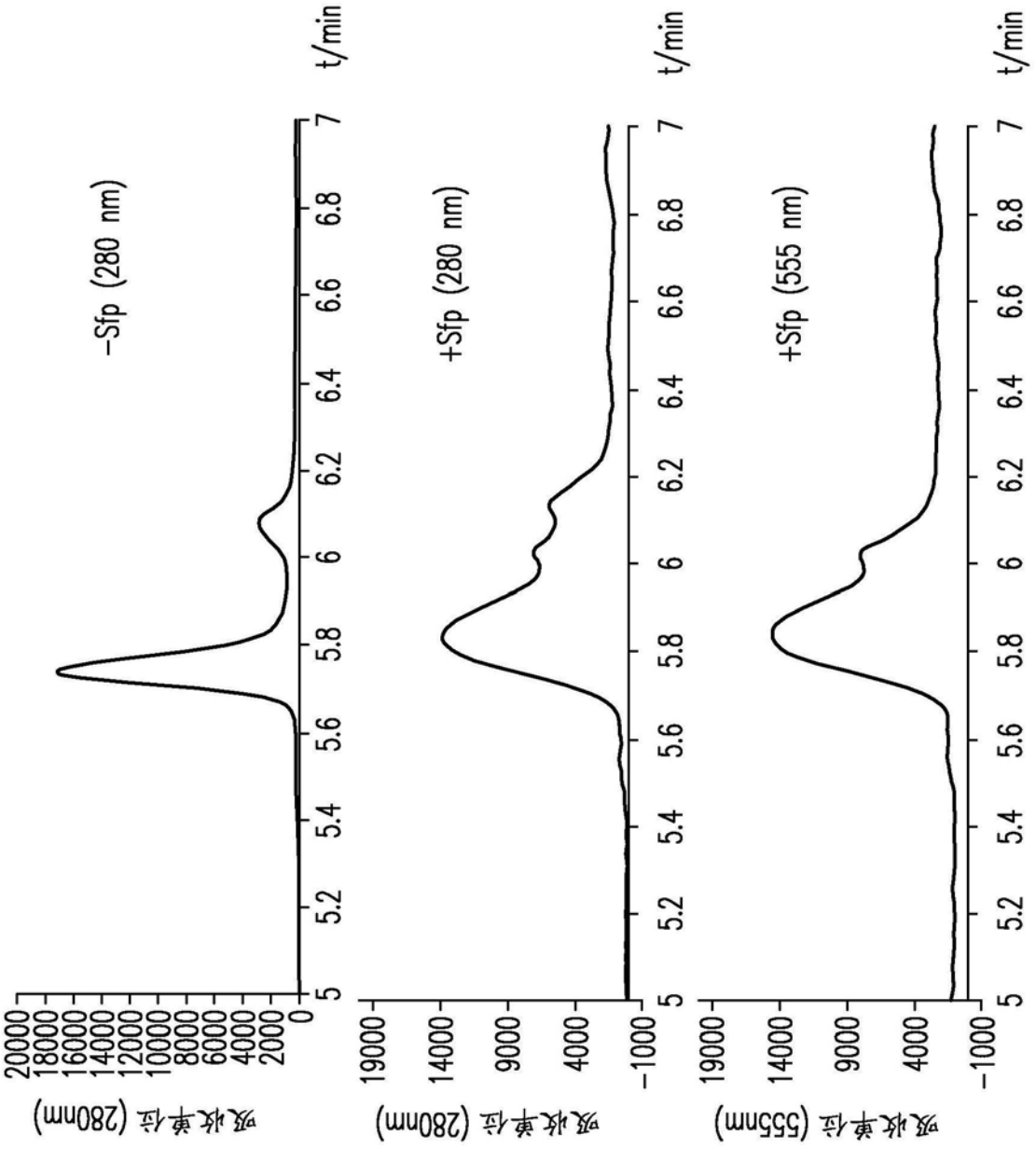

-Sfp (280 nm)
+Sfp (280 nm)
+Sfp (555 nm)
t/min
吸收单位 (280nm)
吸收单位 (280nm)
吸收单位 (555nm)

图9A

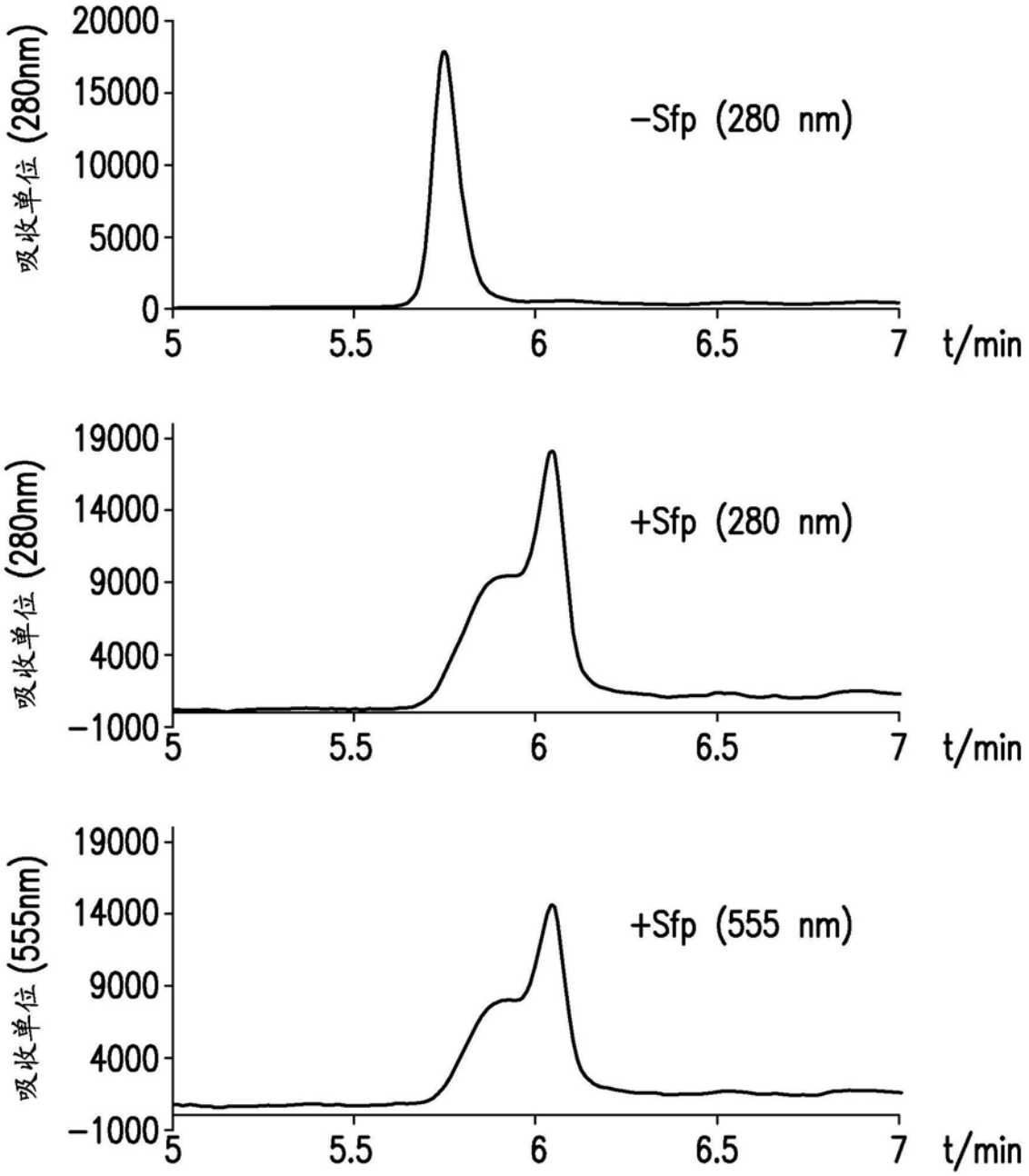

吸收单位 (280nm)
20000
15000
10000
5000
0
−Sfp (280 nm)
5
5.5
6
6.5
7
t/min
吸收单位 (280nm)
19000
14000
9000
4000
−1000
+Sfp (280 nm)
5
5.5
6
6.5
7
t/min
吸收单位 (555nm)
19000
14000
9000
4000
−1000
+Sfp (555 nm)
5
5.5
6
6.5
7
t/min

图9B

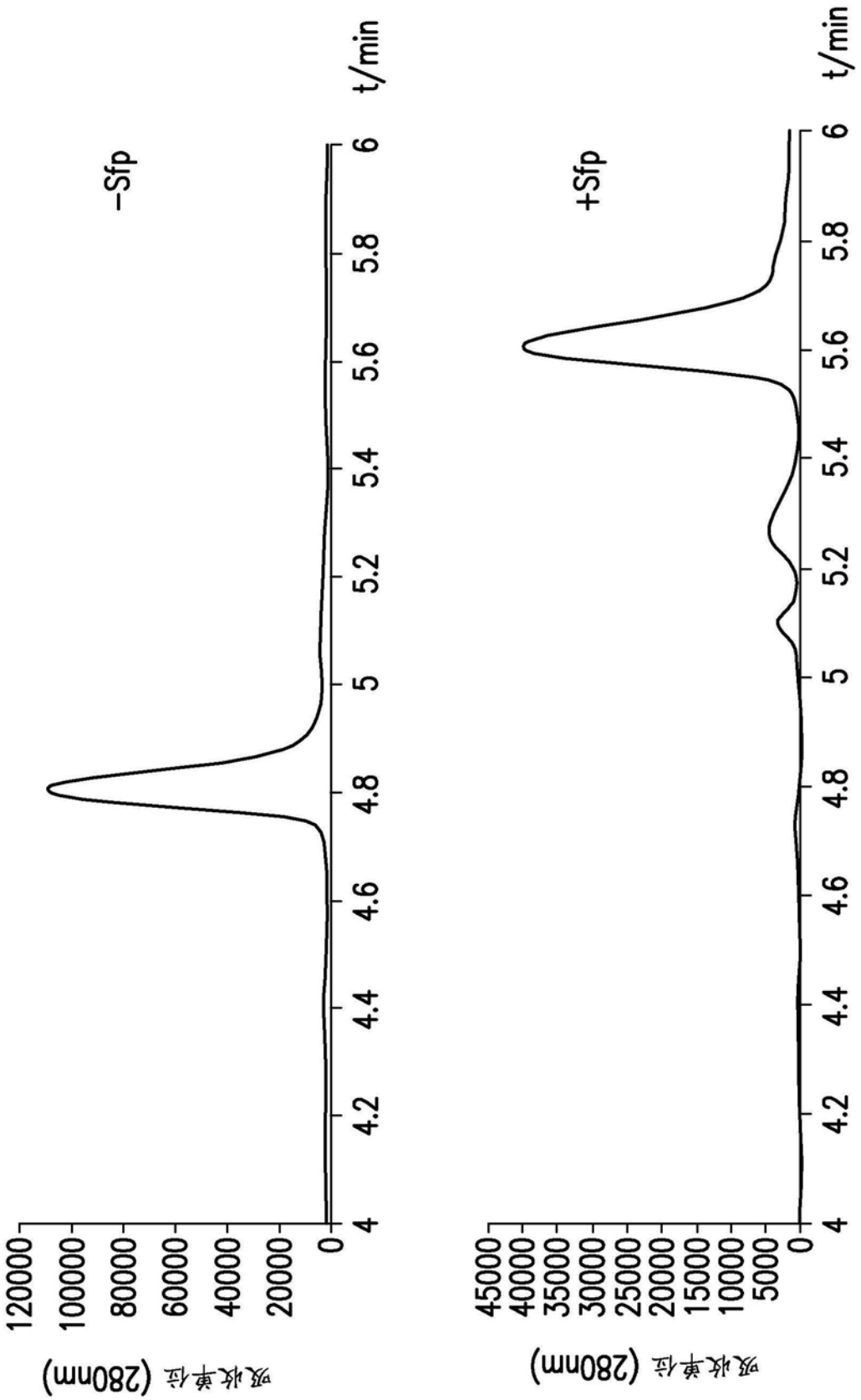

-Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
4
4.2
4.4
4.6
4.8
5
5.2
5.4
5.6
5.8
6

图10A

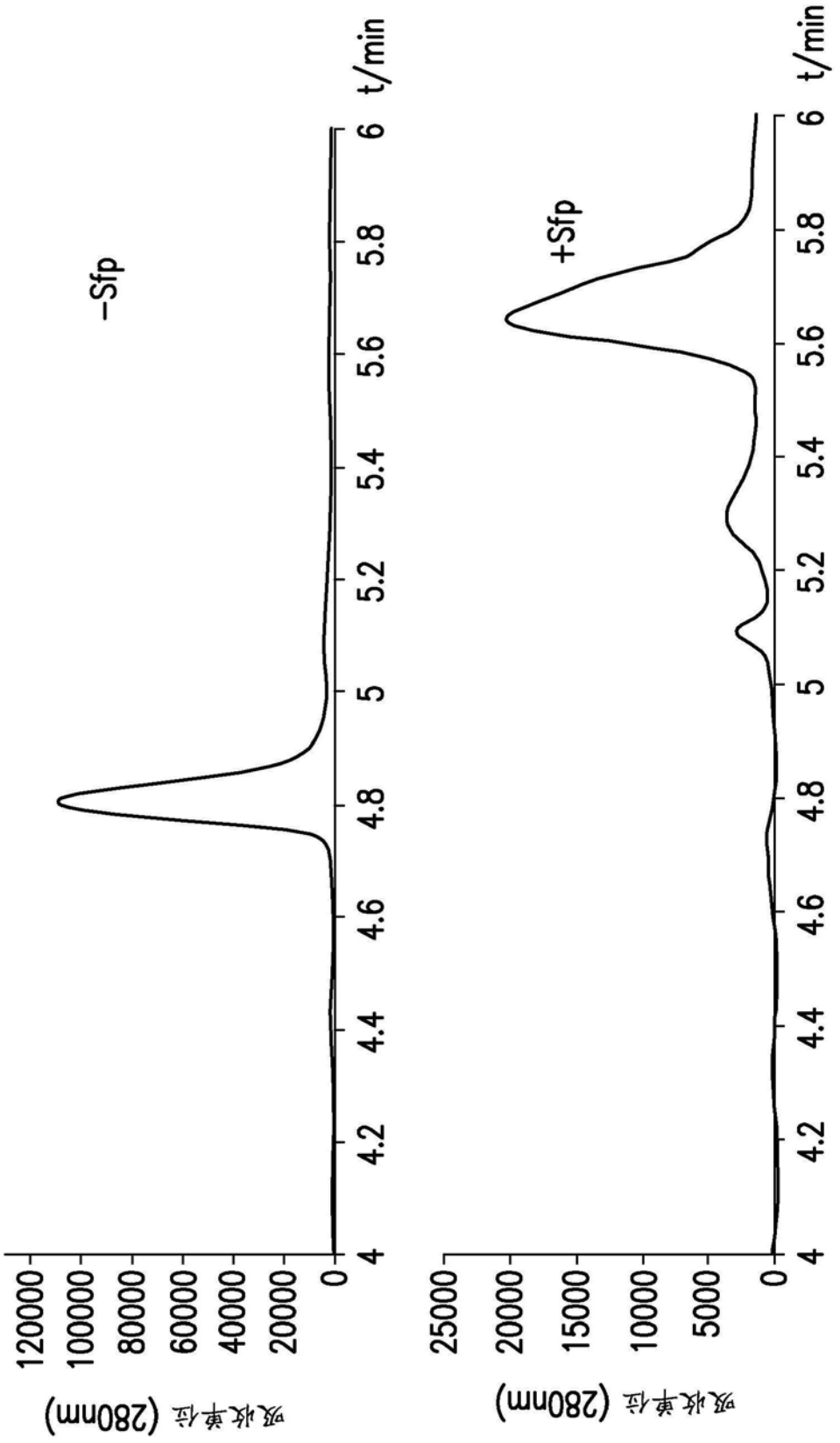

-Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
5000
10000
15000
20000
25000
4
4.2
4.4
4.6
4.8
5
5.2
5.4
5.6
5.8
6

图10B

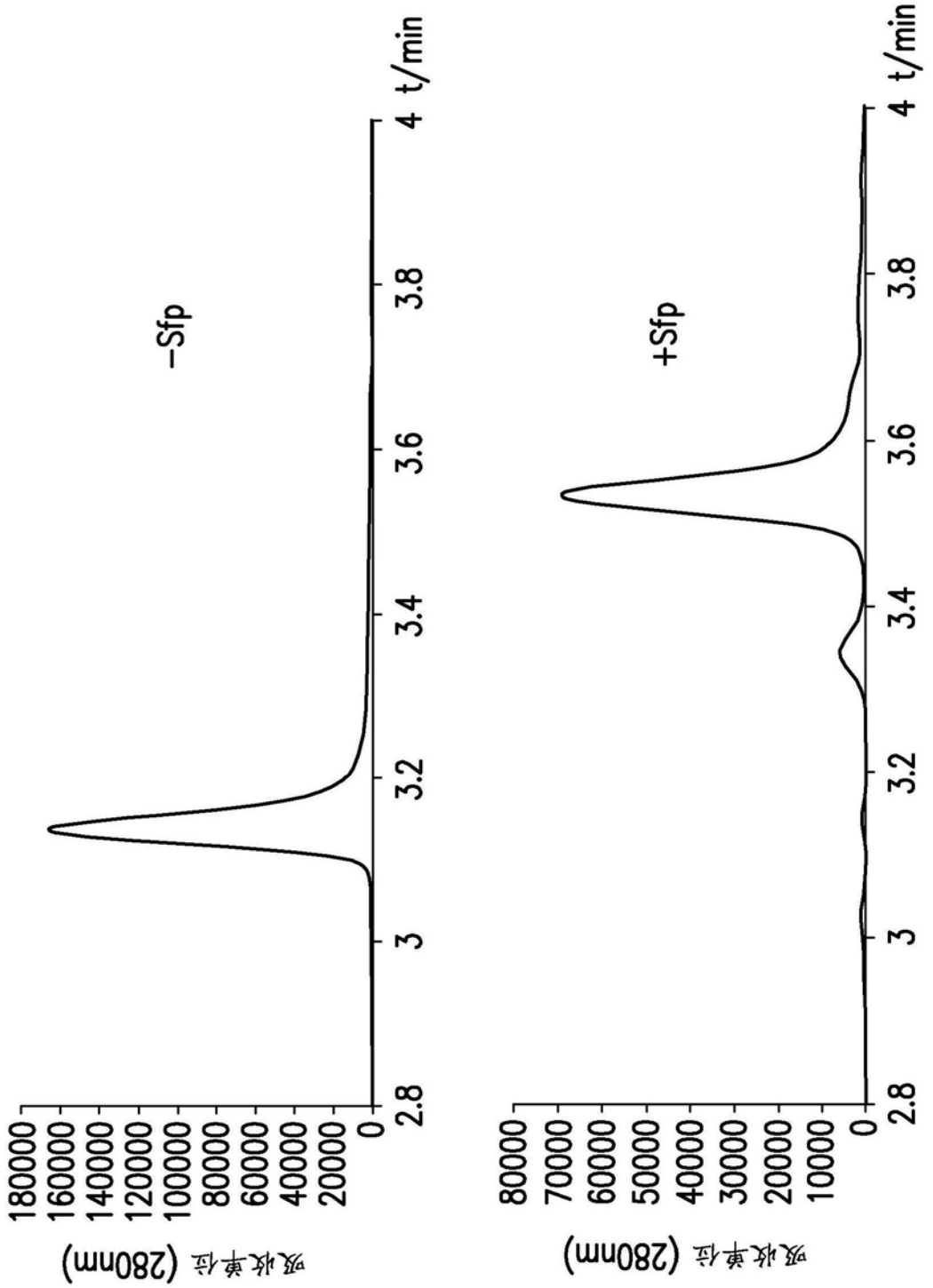

-Sfp
+Sfp
吸收单位 (280nm)
t/min
2.8
3
3.2
3.4
3.6
3.8
4
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
140000
160000
180000
10000
30000
50000
70000

图11A

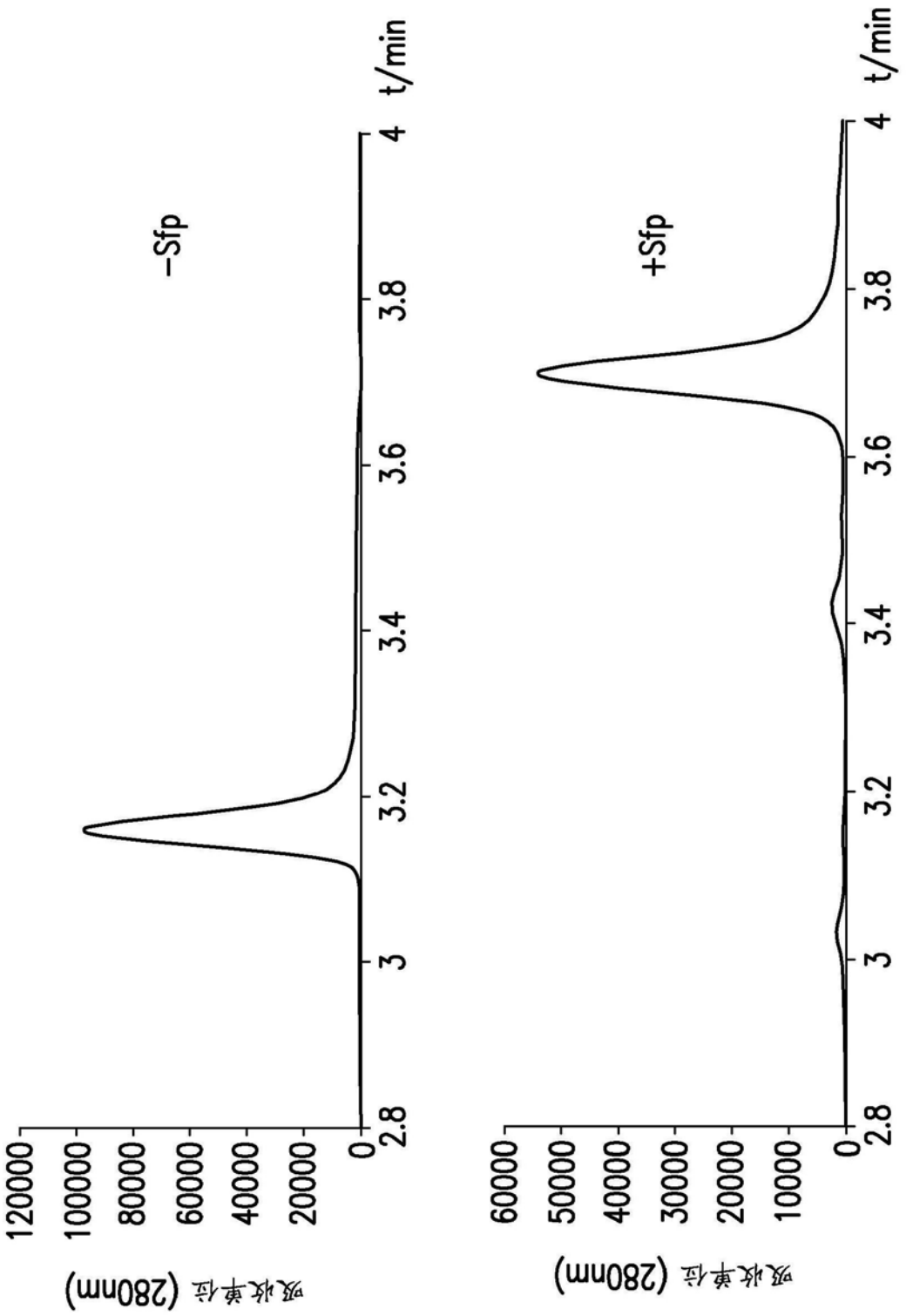

−Sfp
+Sfp
t/min
吸收单位 (280nm)
0
20000
40000
60000
80000
100000
120000
10000
30000
50000
2.8
3
3.2
3.4
3.6
3.8
4

图11B

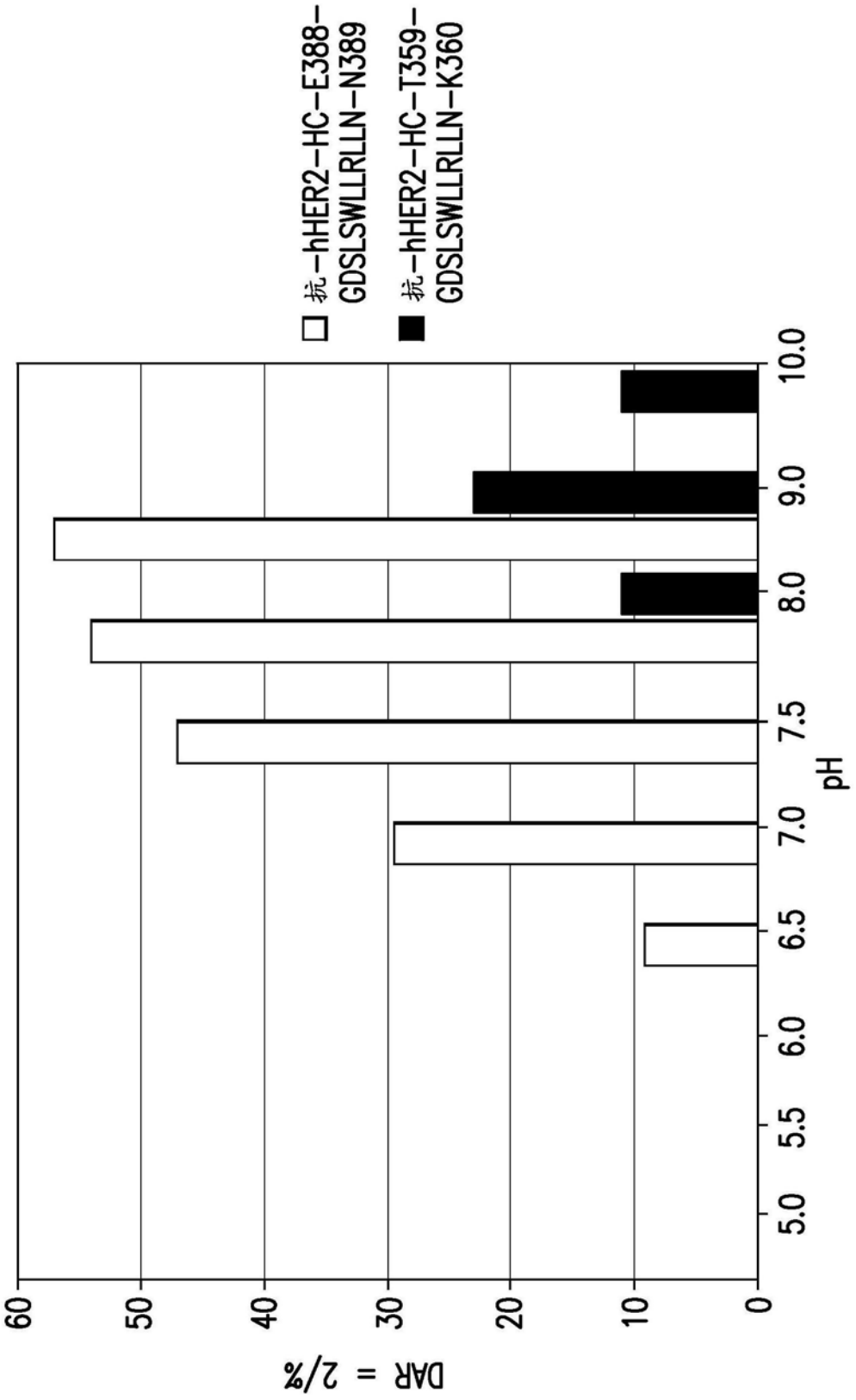

□ 抗-hHER2-HC-E388-GDSLSWLLRLLN-N389
■ 抗-hHER2-HC-T359-GDSLSWLLRLLN-K360
DAR = 2/%
0
10
20
30
40
50
60
pH
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
9.0
10.0

图12

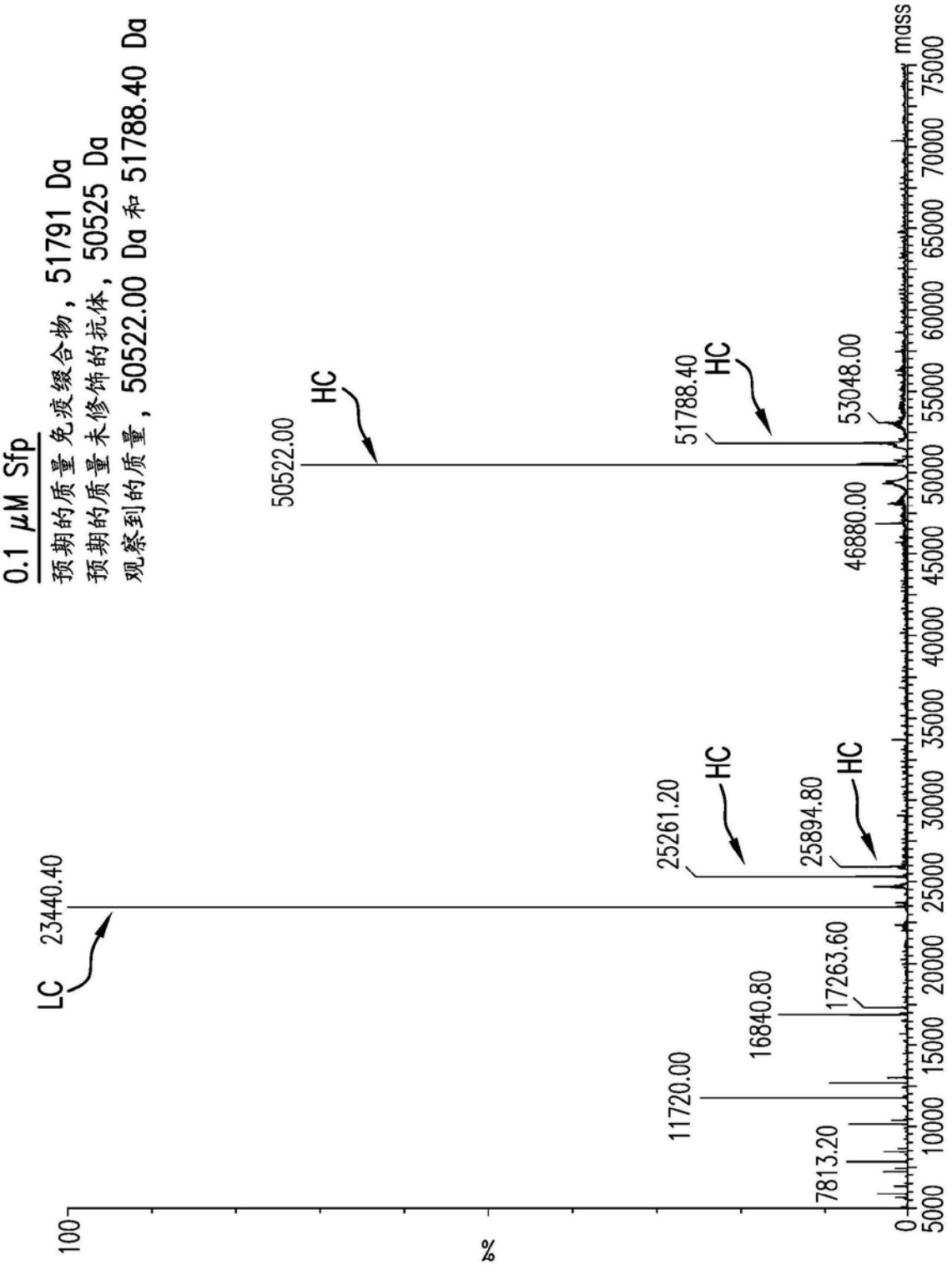

0.1 μM Sfp
预期的质量免疫缀合物，51791 Da
预期的质量未修饰的抗体，50525 Da
观察到的质量，50522.00 Da 和 51788.40 Da
LC
23440.40
HC
50522.00
HC
51788.40
HC
25261.20
HC
25894.80
HC
53048.00
46880.00
11720.00
16840.80
17263.60
7813.20
100
%
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
50000
55000
60000
65000
70000
75000
mass

图13A

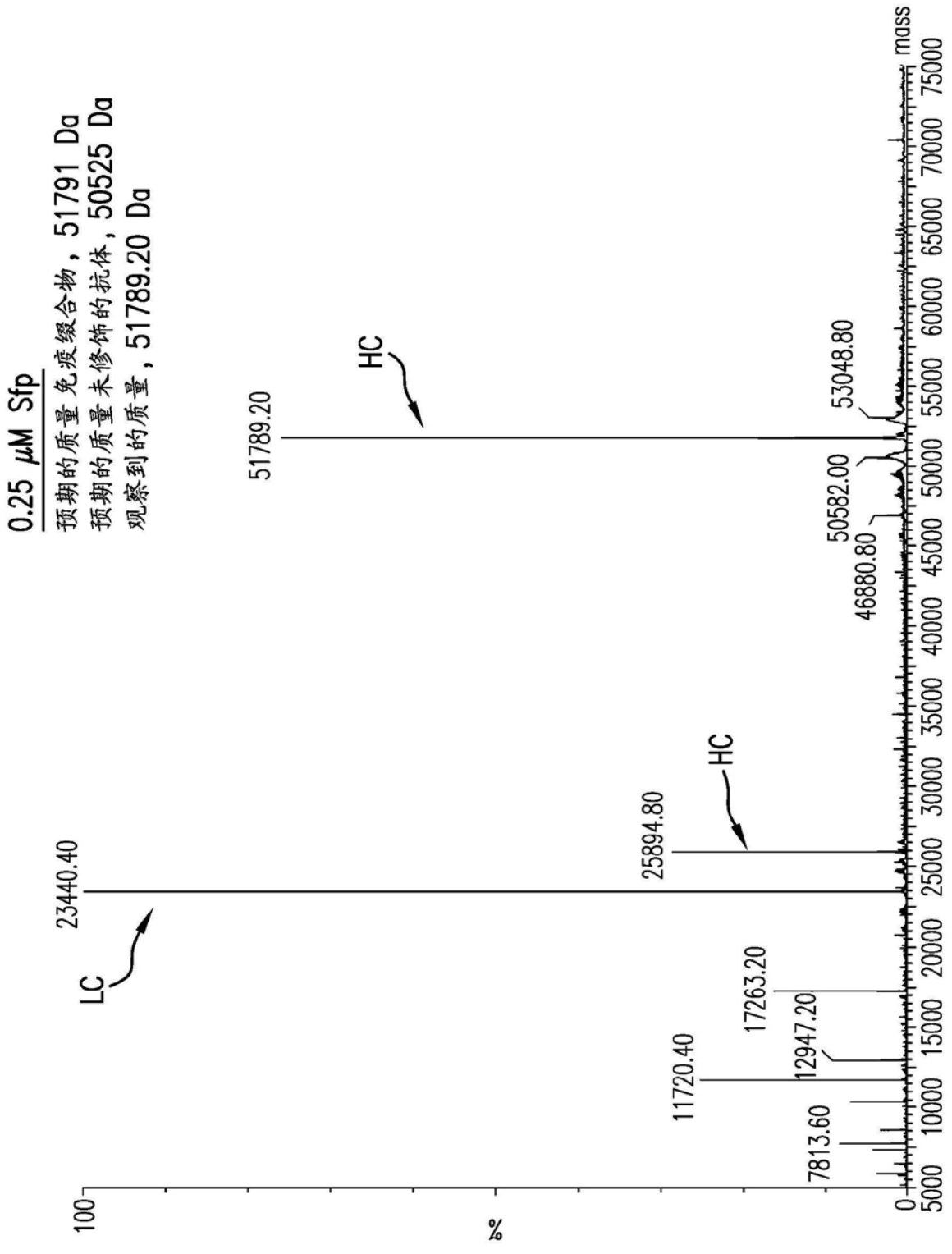

0.25 μM Sfp
预期的质量免疫缀合物，51791 Da
预期的质量未修饰的抗体，50525 Da
观察到的质量，51789.20 Da
LC
HC
HC
23440.40
25894.80
51789.20
53048.80
50582.00
46880.80
17263.20
12947.20
11720.40
7813.60
100
%
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
50000
55000
60000
65000
70000
75000
mass

图13B

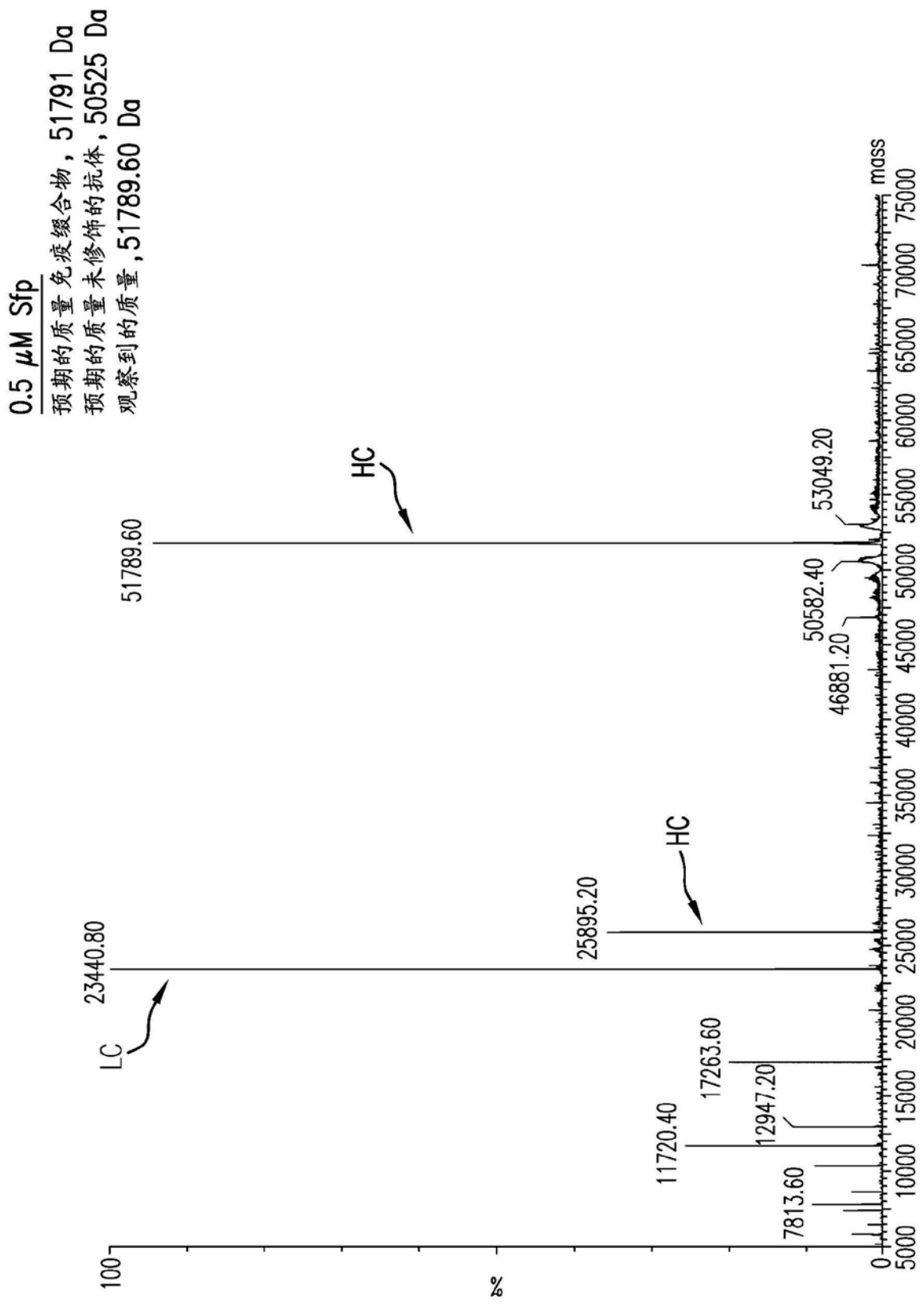

0.5 μM Sfp
预期的质量免疫缀合物，51791 Da
预期的质量未修饰的抗体，50525 Da
观察到的质量，51789.60 Da
LC
HC
HC
23440.80
25895.20
51789.60
53049.20
50582.40
46881.20
17263.60
12947.20
11720.40
7813.60
100
%
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
50000
55000
60000
65000
70000
75000
mass

图13C

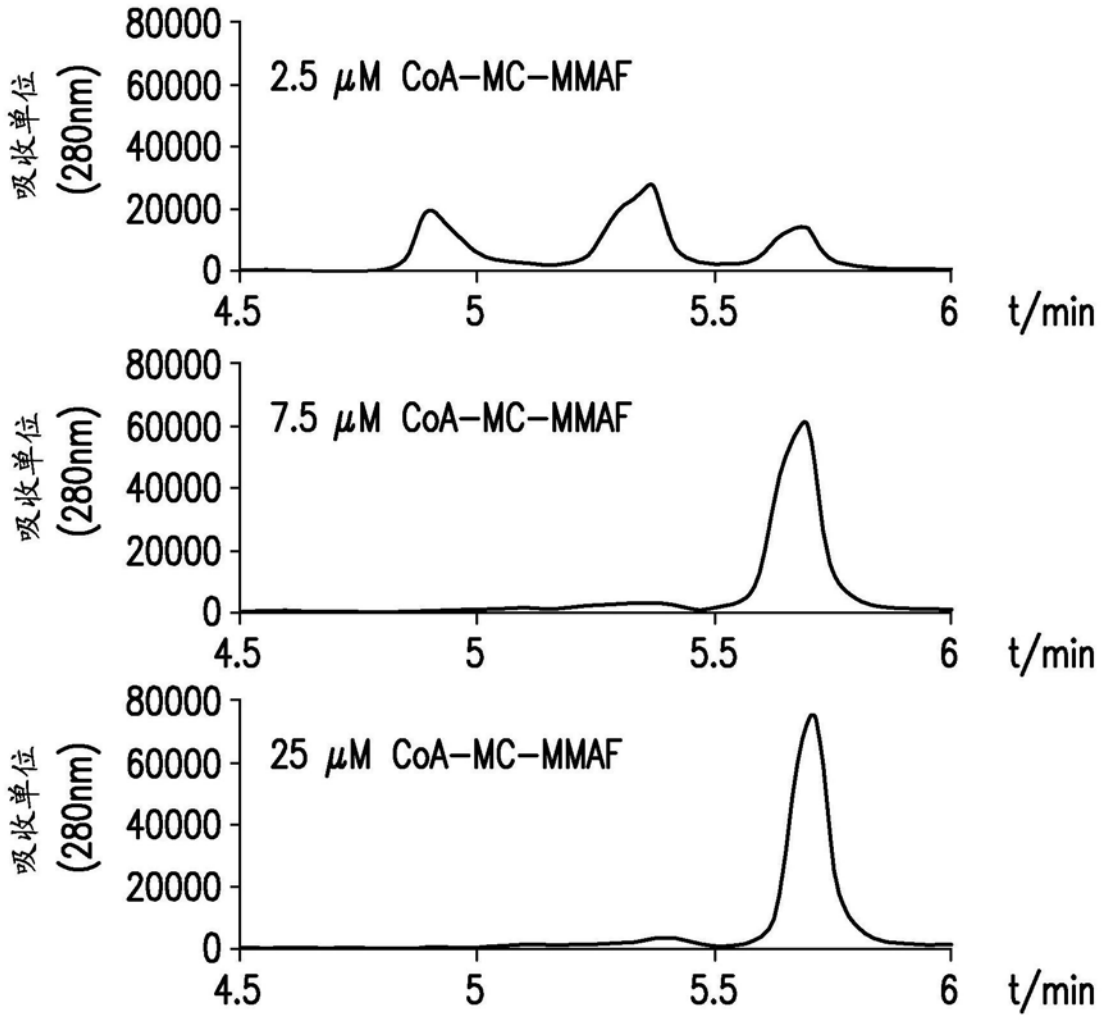

80000
60000
40000
20000
0
吸收单位
(280nm)
2.5 μM CoA-MC-MMAF
4.5
5
5.5
6
t/min
7.5 μM CoA-MC-MMAF
25 μM CoA-MC-MMAF

图14A

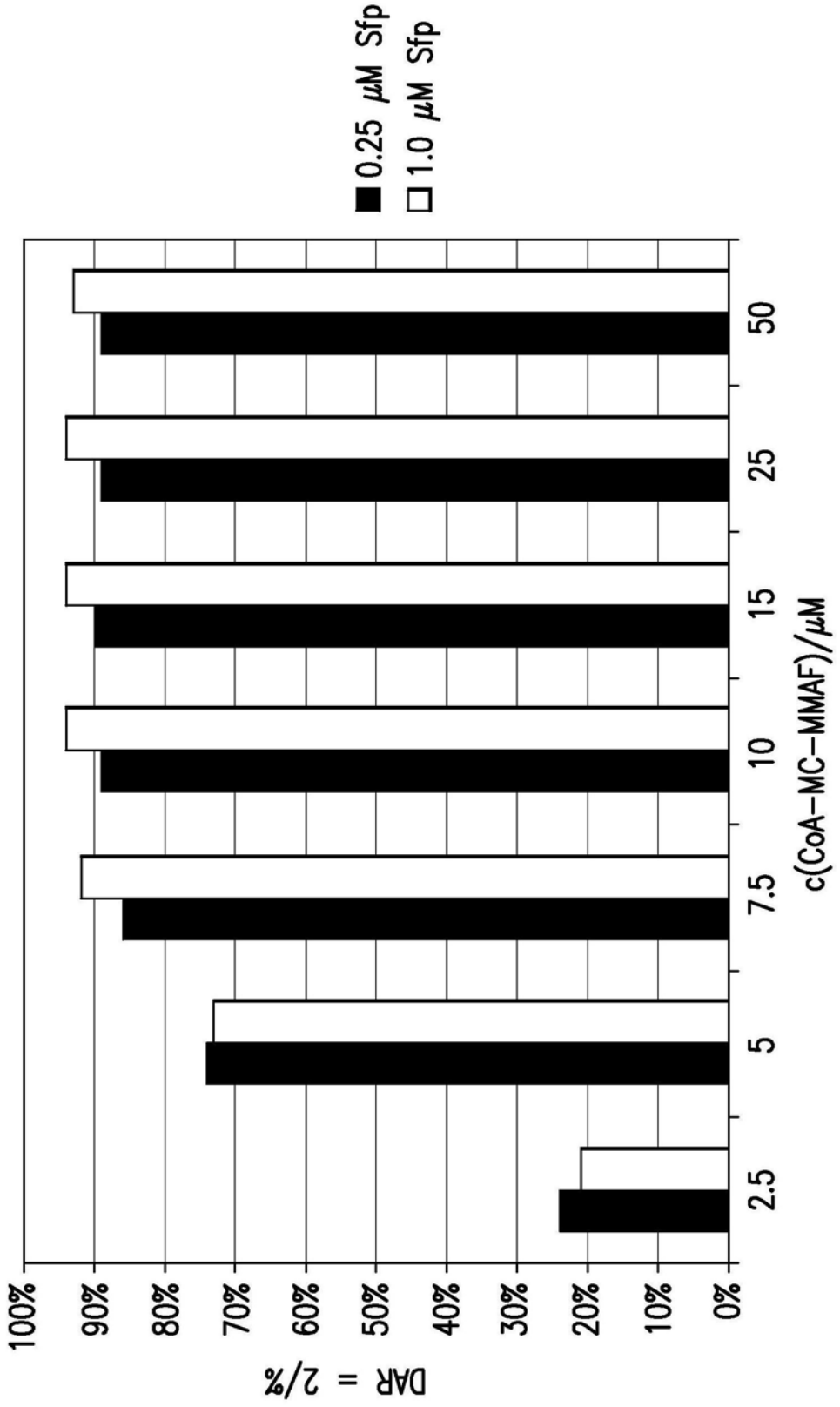

■0.25 μM Sfp
□1.0 μM Sfp
DAR = 2/%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
2.5
5
7.5
10
15
25
50
c(CoA-MC-MMAF)/μM

图14B

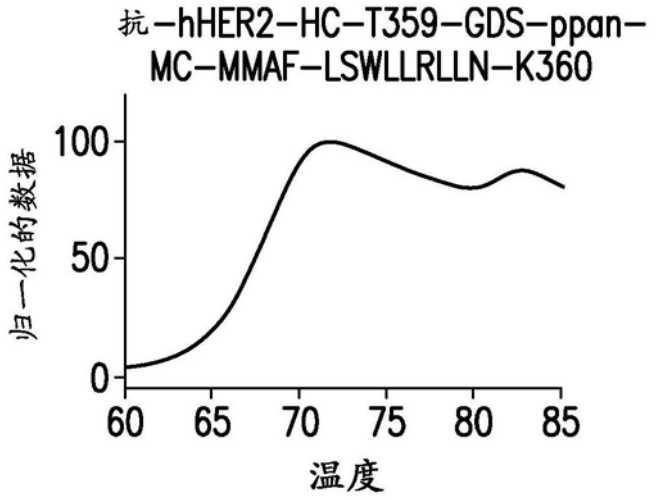

抗-hHER2-HC-T359-GDS-ppan-
MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360
归一化的数据
100
50
0
60
65
70
75
80
85
温度

图15A

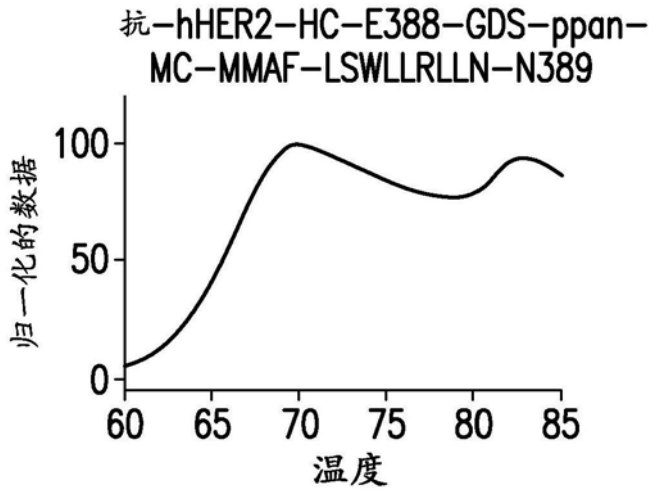

抗-hHER2-HC-E388-GDS-ppan-
MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389
归一化的数据
100
50
0
60
65
70
75
80
85
温度

图15B

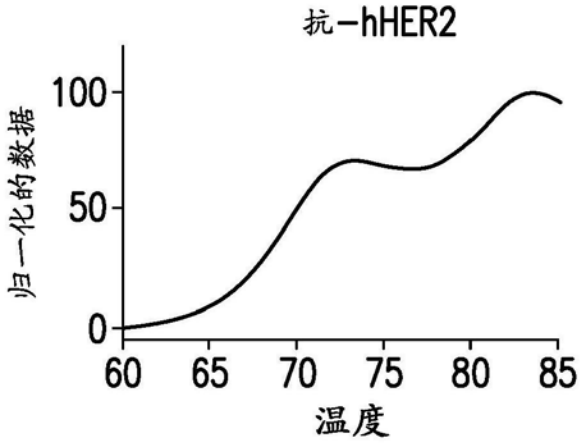


图15C

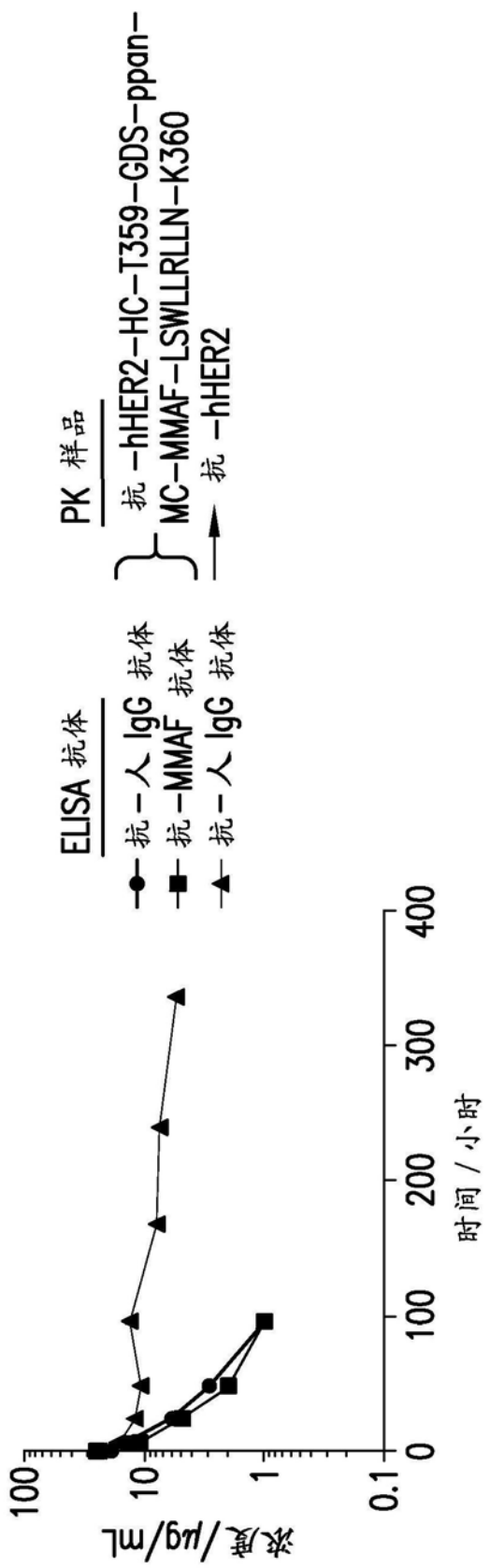

PK 样品
抗 -hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360
抗 -hHER2
ELISA 抗体
抗-人 IgG 抗体
抗-MMAF 抗体
抗-人 IgG 抗体
浓度 /μg/mL
100
10
1
0.1
0
100
200
300
400
时间 / 小时

图16A

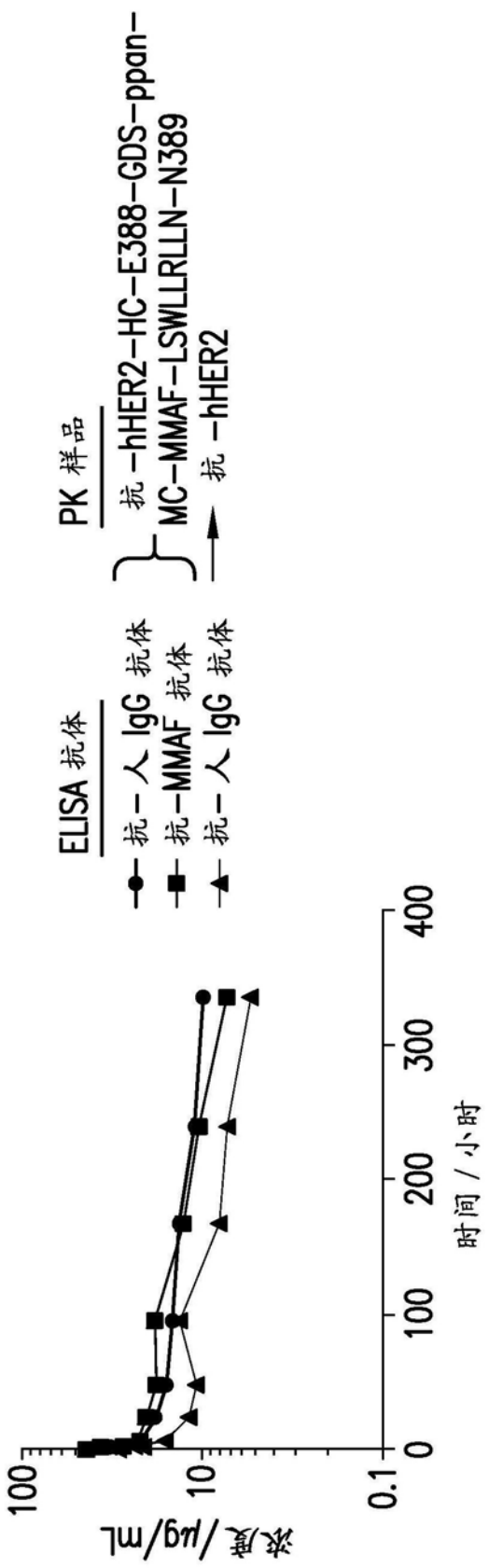

PK 样品
抗 -hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389
抗 -hHER2
ELISA 抗体
抗-人 IgG 抗体
抗-MMAF 抗体
抗-人 IgG 抗体
浓度 /μg/mL
100
10
0.1
0
100
200
300
400
时间 / 小时

图16B

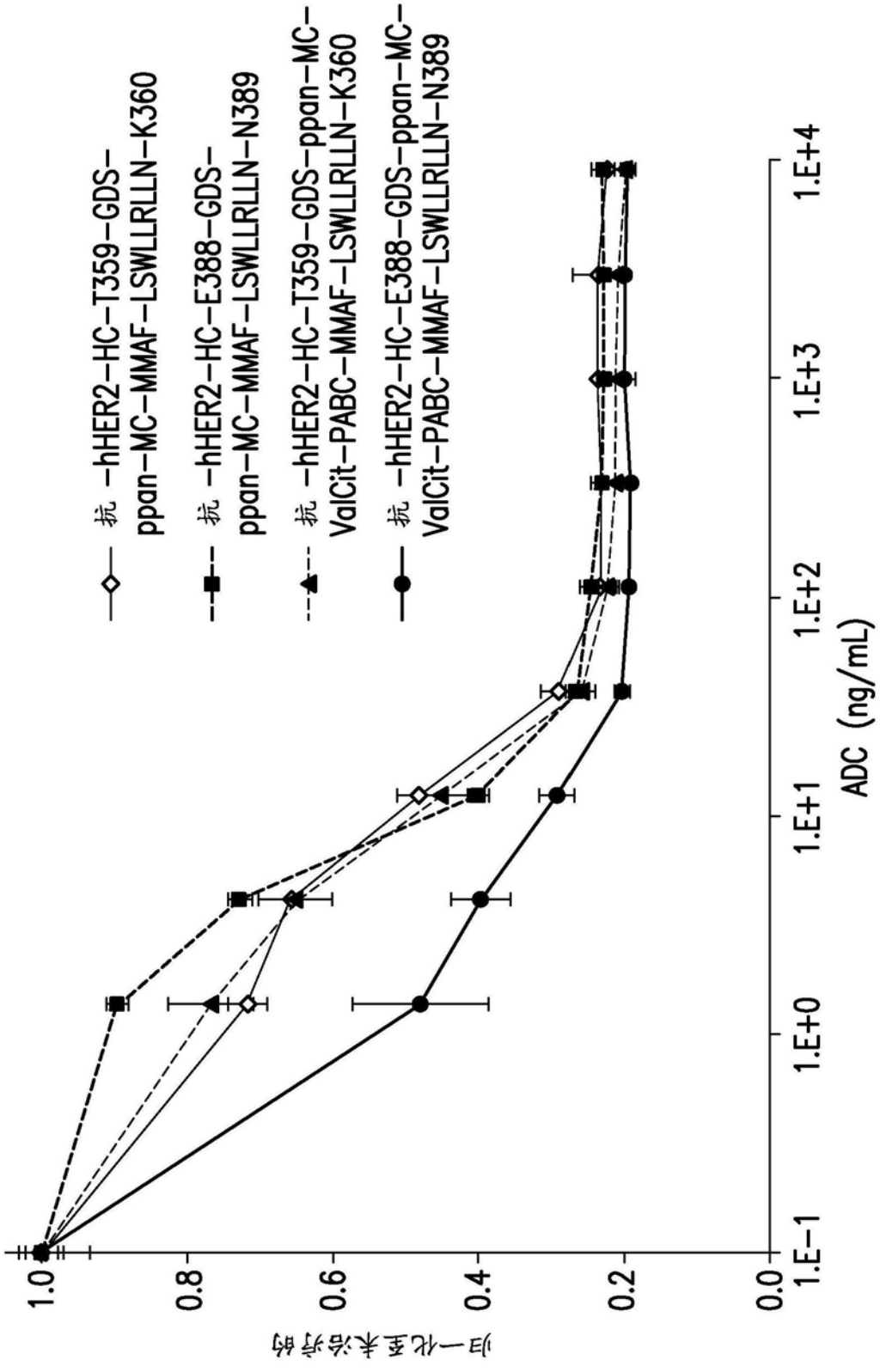

抗 -hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-K360
抗 -hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-MMAF-LSWLLRLLN-N389
抗 -hHER2-HC-T359-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-K360
抗 -hHER2-HC-E388-GDS-ppan-MC-ValCit-PABC-MMAF-LSWLLRLLN-N389
归一化至未治疗的
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1.E-1
1.E+0
1.E+1
1.E+2
1.E+3
1.E+4
ADC (ng/mL)

图17

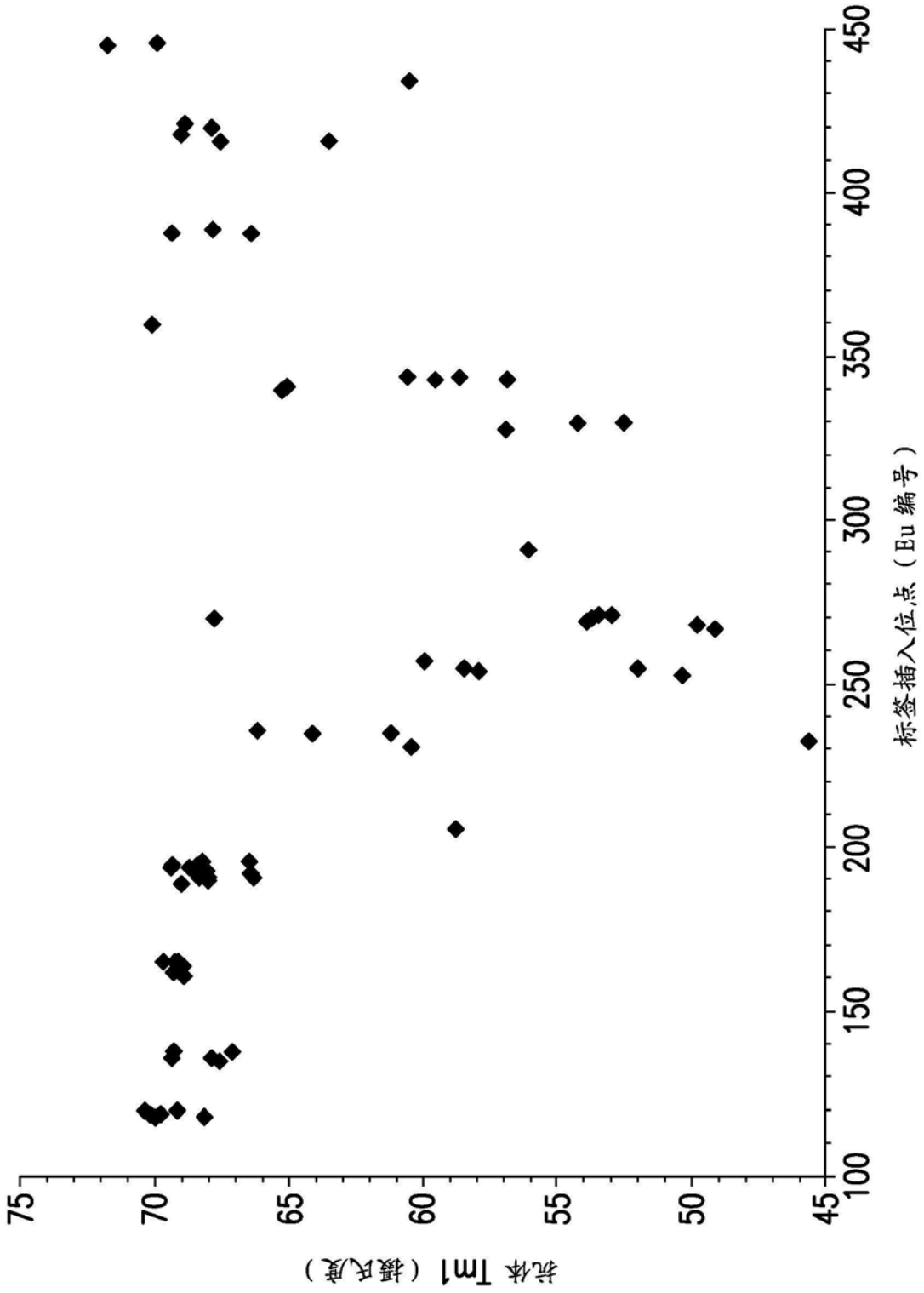

抗体 Tm1（摄氏度）
75
70
65
60
55
50
45
100
150
200
250
300
350
400
450
标签插入位点（Eu 编号）

图18

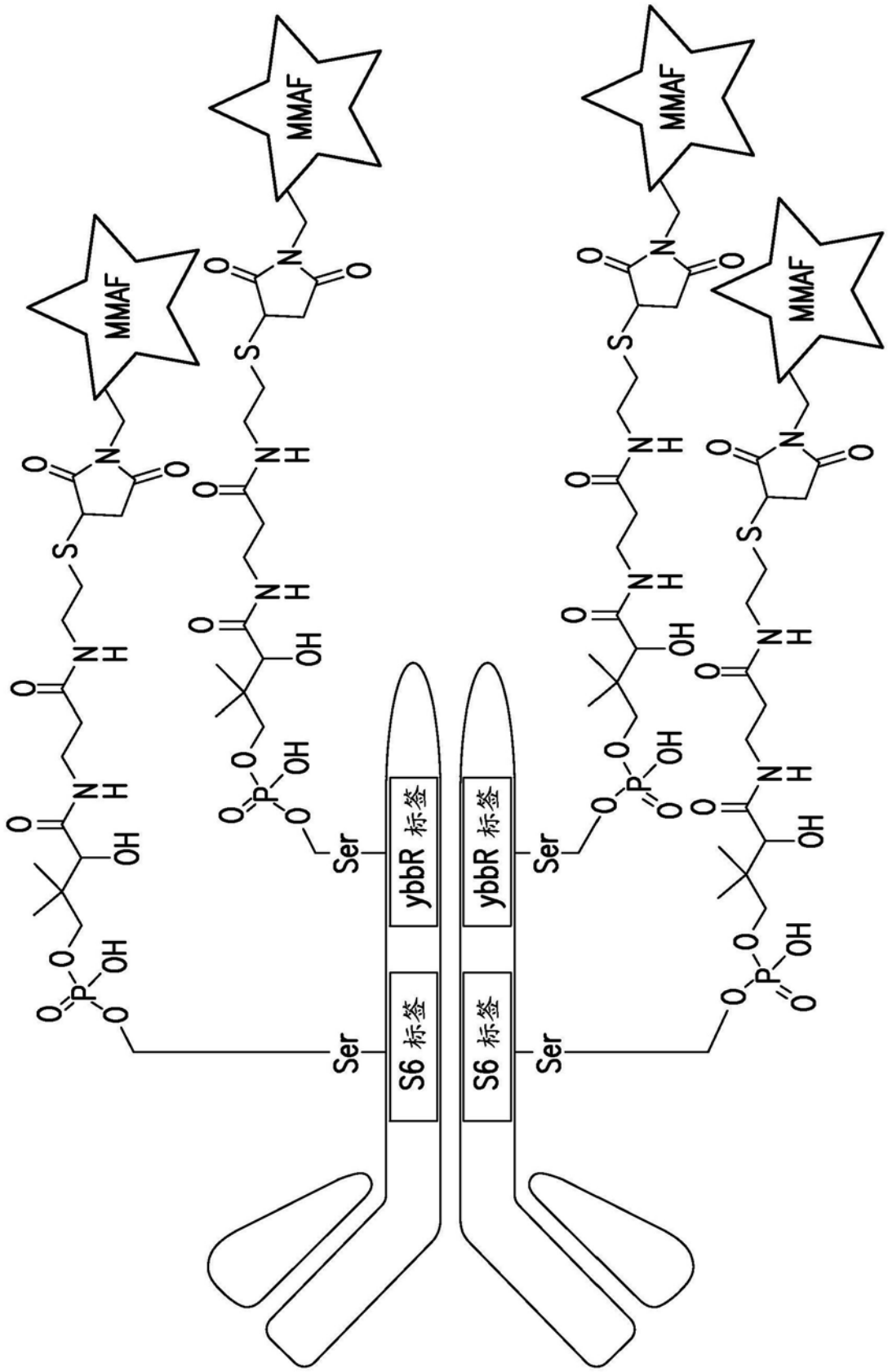


图19A

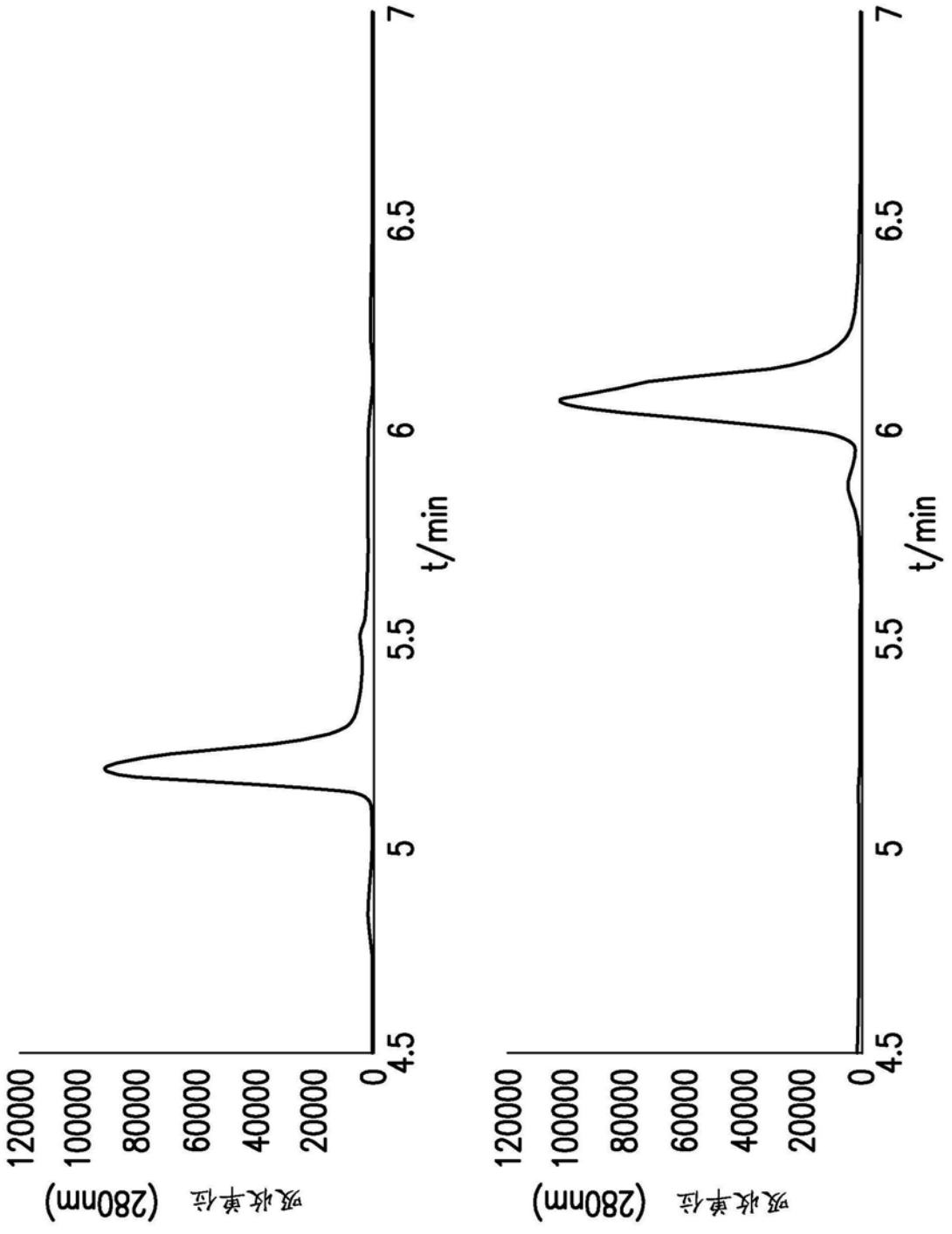

120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
4.5
5
5.5
6
6.5
7
t/min
吸收单位 (280nm)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
4.5
5
5.5
6
6.5
7
t/min
吸收单位 (280nm)

图19B

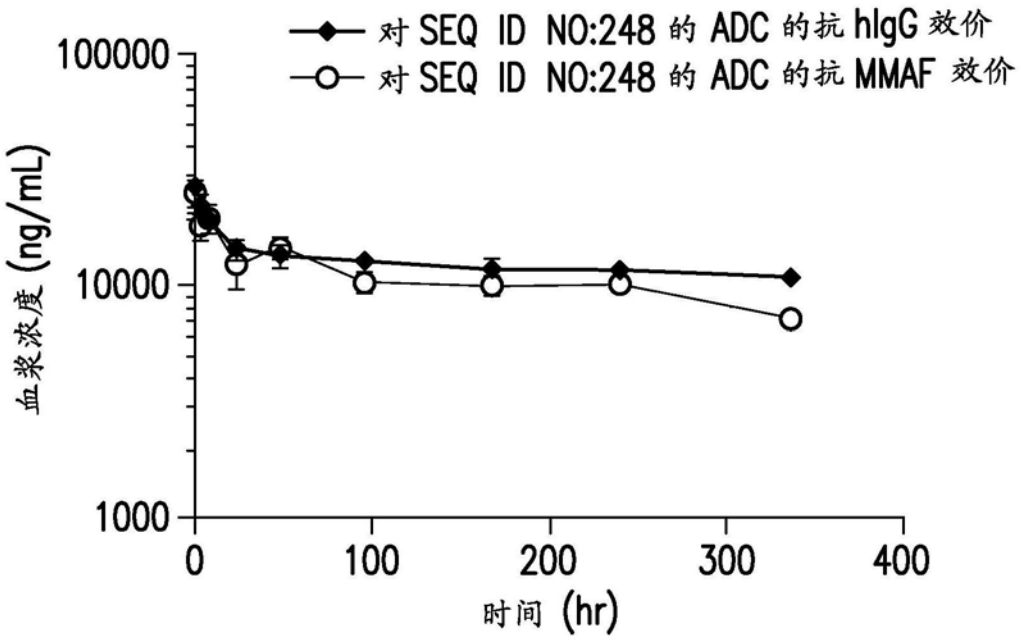

对 SEQ ID NO:248 的 ADC 的抗 hIgG 效价
对 SEQ ID NO:248 的 ADC 的抗 MMAF 效价
血浆浓度 (ng/mL)
100000
10000
1000
0
100
200
300
400
时间 (hr)

图20A

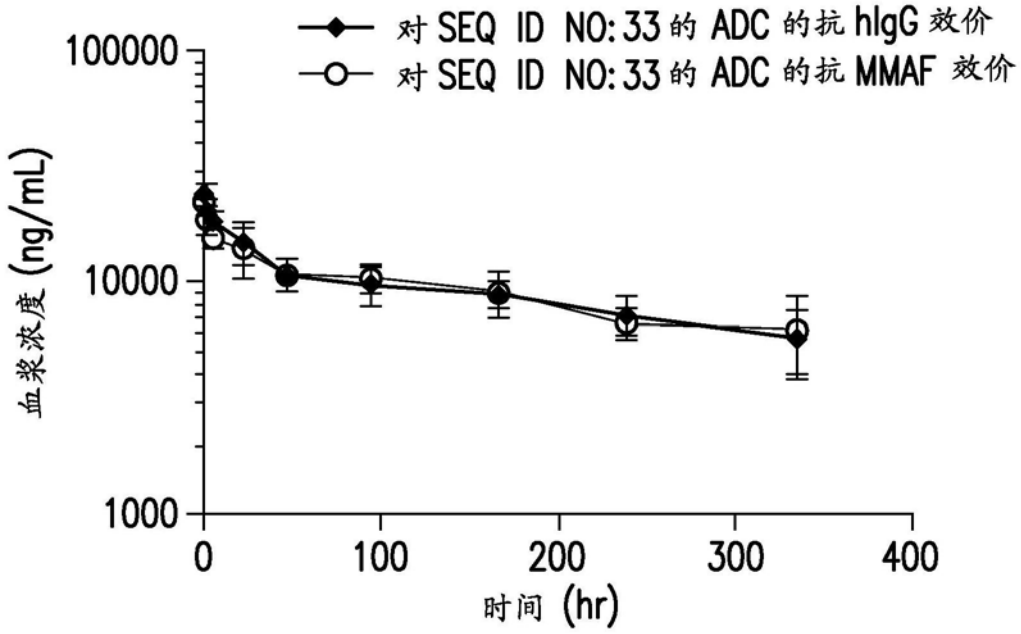

对 SEQ ID NO:33 的 ADC 的抗 hIgG 效价
对 SEQ ID NO:33 的 ADC 的抗 MMAF 效价
血浆浓度 (ng/mL)
100000
10000
1000
0
100
200
300
400
时间 (hr)

图20B

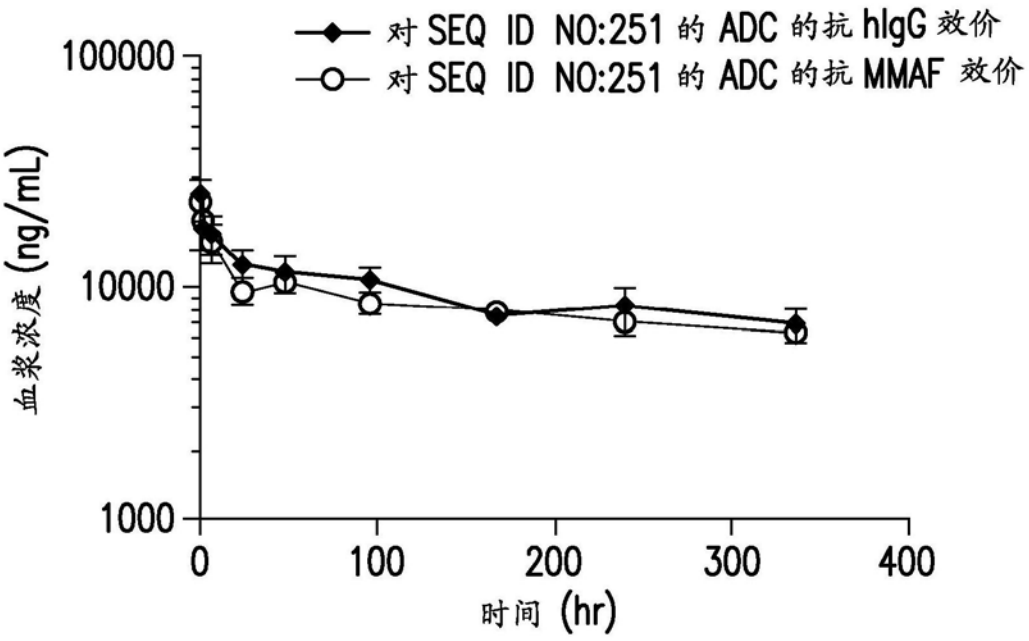

对 SEQ ID NO:251 的 ADC 的抗 hIgG 效价
对 SEQ ID NO:251 的 ADC 的抗 MMAF 效价
血浆浓度 (ng/mL)
100000
10000
1000
0
100
200
300
400
时间 (hr)

图20C

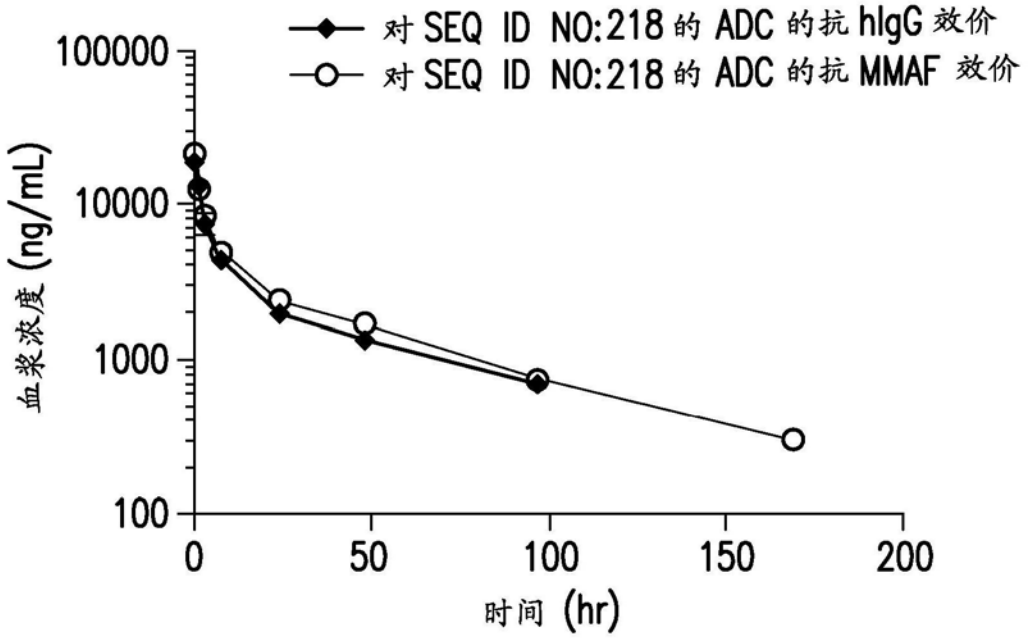

对 SEQ ID NO:218 的 ADC 的抗 hIgG 效价
对 SEQ ID NO:218 的 ADC 的抗 MMAF 效价
血浆浓度 (ng/mL)
100000
10000
1000
100
0
50
100
150
200
时间 (hr)

图20D

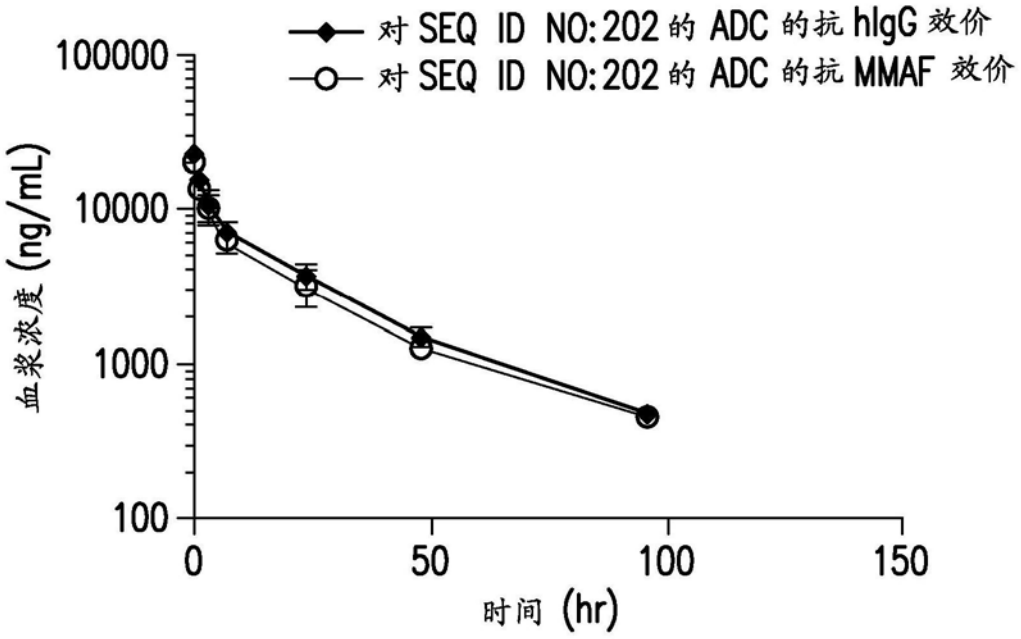

对 SEQ ID NO:202 的 ADC 的抗 hIgG 效价
对 SEQ ID NO:202 的 ADC 的抗 MMAF 效价
血浆浓度 (ng/mL)
100000
10000
1000
100
0
50
100
150
时间 (hr)

图20E

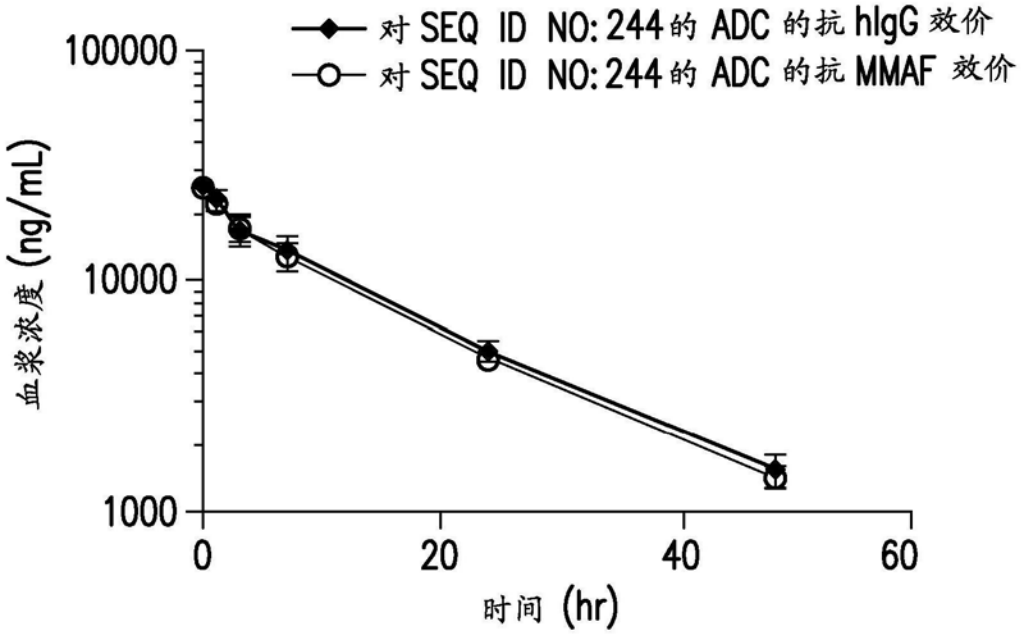

对 SEQ ID NO:244 的 ADC 的抗 hIgG 效价
对 SEQ ID NO:244 的 ADC 的抗 MMAF 效价
血浆浓度 (ng/mL)
100000
10000
1000
0
20
40
60
时间 (hr)

图20F

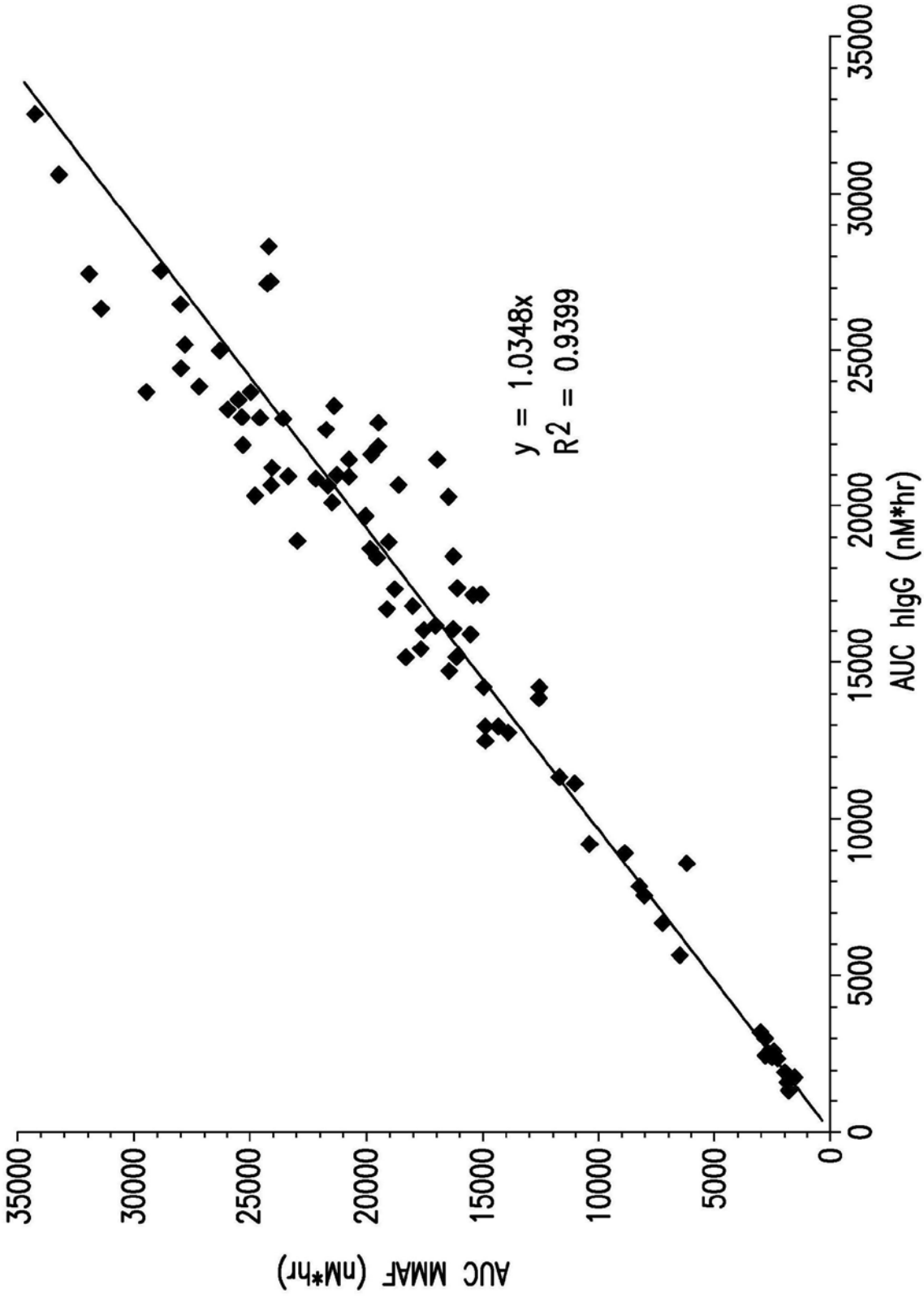

y = 1.0348x
R2 = 0.9399
AUC hIgG (nM*hr)
AUC MMAF (nM*hr)
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000

图21

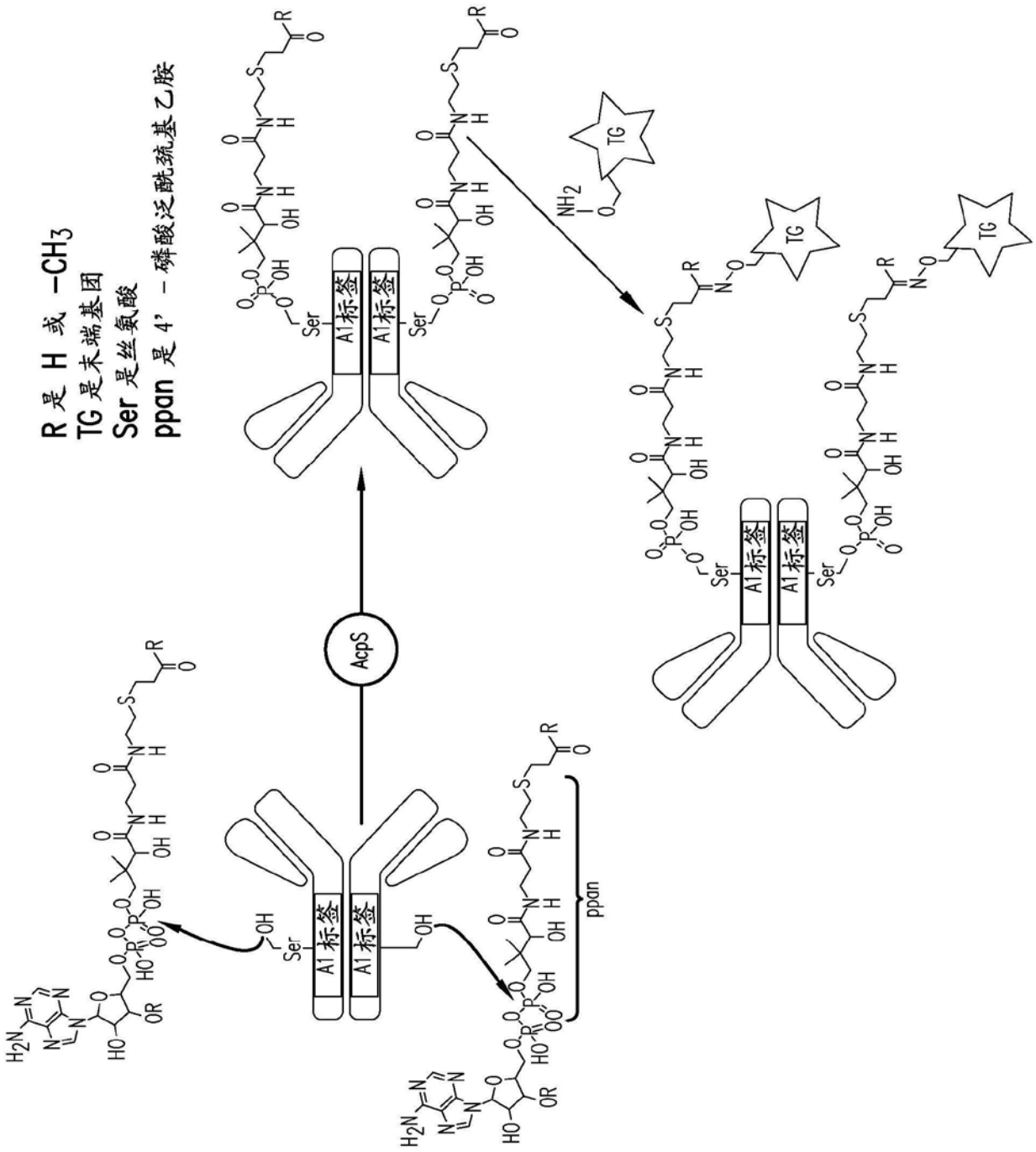

R 是 H 或 -CH3
TG 是末端基团
Ser 是丝氨酸
ppan 是 4' - 磷酸泛酰巯基乙胺
A1标签
A1标签
Ser
AcpS
TG
NH2
ppan

图22

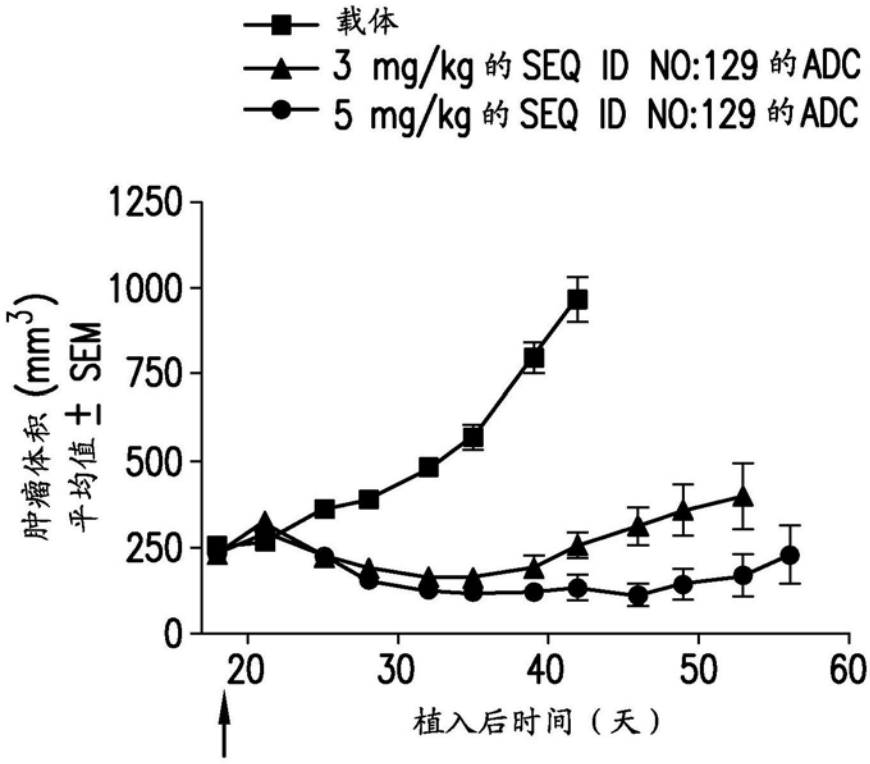

载体
3 mg/kg 的 SEQ ID NO:129 的 ADC
5 mg/kg 的 SEQ ID NO:129 的 ADC
肿瘤体积 (mm3)
平均值 ± SEM
1250
1000
750
500
250
0
20
30
40
50
60
植入后时间（天）

图23