



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110420333 A

(43)申请公布日 2019. 11. 08

(21)申请号 201910610825.8

(22)申请日 2014.03.14

(30)优先权数据

61/783,426 2013.03.14 US

61/839,330 2013.06.25 US

(62)分案原申请数据

201480028567.8 2014.03.14

(71)申请人 斯克利普斯研究所

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 赞赫·金 俊·Y·阿库普

花英·尹 彼得·G·舒尔茨

詹尼弗·马 佳寅·沈 彭宇·杨

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 贺淑东

(51)Int.Cl.

A61K 47/54(2017.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书2页 说明书81页

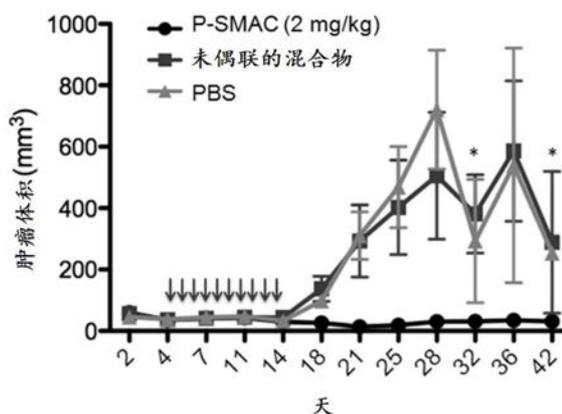
序列表28页 附图24页

(54)发明名称

靶向剂抗体偶联物及其用途

(57)摘要

本文提供了用于包含一个或多个非天然氨基酸的双特异性抗体的方法、组合物和用途。该双特异性抗体可与一种或多种细胞上的两种或更多种不同的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合。该双特异性抗体可用于治疗疾病或病况(例如,癌症、自身免疫病、病原体感染、炎性疾病)。该双特异性抗体可用于调节(例如,刺激或抑制)免疫应答。



1. 一种靶向剂抗体偶联物,其包含:

- a. 与靶细胞结合的靶向剂,其中该靶向剂不是抗体或抗体片段;以及
- b. 不与靶细胞结合的抗体或抗体片段;以及
- c. 一个或多个连接体,

其中,该抗体或抗体片段通过所述一个或多个连接体与该靶向剂连接并且其中该抗体或抗体片段结合细胞毒性效应细胞上的抗原。

2. 根据权利要求1所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗体或抗体片段包含一个或多个非天然氨基酸。

3. 根据权利要求2所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶向剂通过所述一个或多个连接体与所述抗体或抗体片段的所述一个或多个非天然氨基酸经位点特异性地连接。

4. 根据权利要求1所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶向剂抗体偶联物是式I:X-L1-Y或式IA:Y-L1-X,其中:

- a. X包含所述抗体或抗体片段;
- b. L1包含所述一个或多个连接体;且
- c. Y包含所述靶向剂。

5. 根据权利要求1或4所述的抗体,其中该抗体的至少一部分基于或衍生自人抗体、人源化抗体、人工程化抗体或完全人抗体。

6. 根据权利要求1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗体是嵌合抗体。

7. 根据权利要求1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶向剂结合靶细胞上的细胞表面蛋白质或细胞表面标志物。

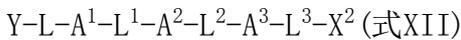
8. 根据权利要求7所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述细胞毒性效应细胞能够增强免疫应答。

9. 一种靶向剂抗体偶联物,其包含:

- a. 抗-CD3 Fab;
- b. 一个或多个DUPA分子;以及
- c. 一个或多个连接体,

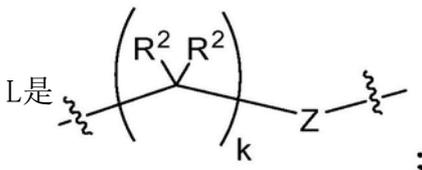
其中该抗体或抗体片段通过所述一个或多个连接体与所述一个或多个靶向剂连接。

10. 式XII的化合物,或其立体异构体:



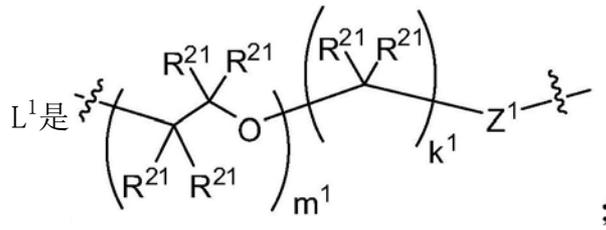
其中:

Y是前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的配体;

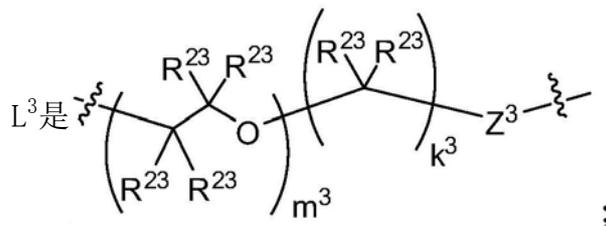
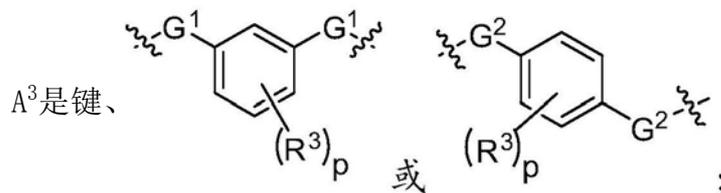
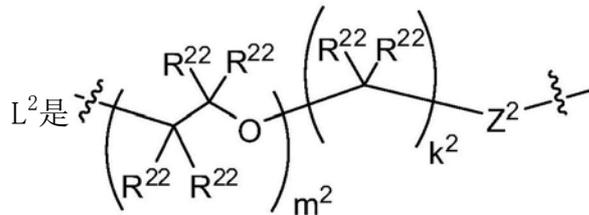


A¹选自芳基、5至6元杂芳

基、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;



A^2 选自键、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^1)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_{1,2}\text{N}(\text{R}^1)-$ 和 $-\text{N}(\text{R}^1)\text{S}(\text{O})_{1,2}-$;



X^2 是与和非天然氨基酸反应的官能团结合的连接体或与修饰的非天然氨基酸结合的连接体,其中该修饰的非天然氨基酸是X的一部分,其中X是修饰的治疗性肽、蛋白质或抗体;

每个 R^1 独立地选自H、烷基或卤代烷基;

每个 R^2 、 R^{21} 、 R^{22} 和 R^{23} 独立地选自H、卤代、 $-\text{OR}^1$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SR}^1$ 、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

每个 R^3 独立地选自卤代、 $-\text{OR}^1$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{SR}^1$ 、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基、 $-\text{NO}_2$ 和 NR^1R^1 ;

每个 G^1 和 G^2 独立地选自

键、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^1)-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^1)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}^1)\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_{1,2}\text{N}(\text{R}^1)-$ 和 $-\text{N}(\text{R}^1)\text{S}(\text{O})_{1,2}-$;

每个 Z 、 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 独立地选自键、 $-\text{O}-$ 和 $-\text{N}(\text{R}^1)-$;

k 、 k^1 、 k^2 和 k^3 各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9

和10;

m^1 、 m^2 和 m^3 各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;且

p 为0、1、2、3或4。

靶向剂抗体偶联物及其用途

本申请是2014年03月14日提交的发明名称为“靶向剂抗体 偶联物及其用途”的第201480028567.8号(国际申请号 PCT/US2014/029379)中国专利申请的分案申请。

交叉引用

[0001] 该申请要求2013年3月14号提交的美国临时申请序列号 61/783,426和2013年6月25号提交的美国临时申请序列号61/839,330 的权益;所述临时申请通过引用而全文并入。

关于联邦政府资助的研究的声明

[0002] 本发明是根据国立卫生研究院(NIH)的第GM062159号合同 在美国政府支持下作出的。政府对本发明具有一定的权利。

技术领域

[0003] 本文描述了包含一个或多个非天然氨基酸的靶向剂抗体偶联物、制备这样的构建体的方法、包含这样的构建体的药物组合物和药物以及使用这样的构建体和组合物来预防、抑制和/或治疗受试者的疾病或 病况的方法。

背景技术

[0004] 抗体是脊椎动物免疫系统响应于外来物质(抗原)而形成的天然蛋白质,主要用于防御感染。超过一个世纪以来,抗体已经在人工 条件下在动物中诱导,并采集用于疾病病症的治疗或诊断,或用于生物学研究。各个单独的抗体产生细胞产生单一类型的具有在化学上确定的组成的抗体,但是,响应于抗原接种而从动物血清直接获得的抗体实际上包含由单独的抗体产生细胞的总体制成的不同分子的总体(例如,多克隆抗体)。

[0005] 一些抗体偶联物,诸如双特异性抗体,可与两种或更多种不同 抗原结合。已开发了许多重组体策略来合成双特异性抗体,包括单链 可变片段(scFv)衍生的形式,诸如双抗体、串联双抗体、BiTes(双 特异性T细胞衔接体)和DART(双亲和力再靶向)以及基于免疫球蛋白G(IgG)的形式如Triomab、DVD-Ig(双可变域抗体)和二合一抗体。然而,双特异性抗体可能具有较差的药代动力学和物理性质,诸如免疫原性和制造中的困难。因此,需要对这样的现有技术的改善 或替代技术。此外,希望精确控制这样的靶向部分中的几何结构,因为几何结构能改变结合亲和力和特异性。本文公开了靶向剂抗体偶联 物以及产生这样的偶联物的方法,通过位点特异性地偶联抗体或抗体 片段与靶向剂,其具有针对最佳治疗效果和靶标特异性的特定几何结 构。

发明内容

[0006] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含:与靶细胞结合的靶向剂,其中该靶向剂不是抗体或抗体片段;和与靶细胞结合的抗体或抗体片 段;以及一个或多个连接体,其中该抗体或抗体片段通过该一个或多个 连接体与该靶向剂连接,并且其中该抗体或抗体片段结合细胞毒性效应 细胞上的抗原。该抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。该 靶向剂抗体偶联物可以位点特异性地通过所述一个或多个连接体与所述 抗体或抗

体片段的所述一个或多个非天然氨基酸连接。

[0007] 靶向剂抗体偶联物可以是式I:X-L1-Y或式IA:Y-L1-X,其中:X包含抗体或抗体片段;L1包含一个或多个连接体;且Y包含靶向剂。

[0008] 抗体的至少一部分可基于或衍生自人抗体、人源化抗体、人工程 化抗体或完全人抗体。该抗体可以是嵌合抗体。该抗体或抗体片段可结 合细胞毒性效应细胞上的抗原,并且该靶向剂结合靶细胞上的细胞表面 蛋白质或细胞表面标志物。该细胞毒性效应细胞可以能够增强(mounting) 免疫应答。该抗体或抗体片段的至少一部分可结合该细胞毒性效 应细胞 上的受体的至少一部分。该抗体或抗体片段的至少一部分可结合该细胞 毒性效应 细胞上的共受体的至少一部分。该受体可以是T细胞受体 (TCR)。该共受体可以是T细胞共 受体。该共受体可以是CD3T细胞 共受体。该细胞毒性效应细胞可以是造血细胞。该造血细胞 可选自巨噬 细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞、B细胞或T细胞。该细胞 毒性效应细胞可以是细胞毒性T细胞。该抗体片段可以包括Fab 片段。该抗体片段可以包括 抗-CD3Fab片段。该抗-CD3Fab片段可以是 UCHT1。该抗体片段可由选自SEQ ID NO:1和2的 序列编码。

[0009] 所述靶向剂可选自小分子、细胞靶向分子、配体、蛋白质、肽、类肽、DNA适体、肽核 酸、维生素、底物或底物类似物。该靶向剂可以 不包含抗体或抗体片段。所述细胞表面蛋白 质或细胞表面标志物可选自 靶细胞上的抗原、受体、共受体、跨膜蛋白质或细胞标志物。该 细胞表 面蛋白质可其选自胆囊收缩素B受体、促性腺激素释放激素受体、促生 长素抑制素 受体2、avb3整联蛋白、胃泌素释放肽受体、神经激肽1受 体、黑皮质素1受体、神经降压肽受 体、神经肽Y受体和C型凝集素样 分子1。该抗原可包括前列腺特异性膜抗原。该靶向剂可包 括奥曲肽。该靶向剂可包括octreotate。该靶向剂可包括促生长素抑制素类似物。该 靶向 剂可包括CD38NAD+糖基水解酶抑制剂。该靶向剂可包括五肽胃 泌素。该靶向剂可包括促性 腺激素释放激素。该靶向剂可包括CCKB拮 抗剂。该靶向剂可包括cRGD。该靶向剂可包括铃 蟾肽。该靶向剂可包 括2-[3-(1,3-二羧基丙基)脲基]戊二酸(DUPA)。该靶向剂可小到足以 穿透肿瘤。该靶向剂可由选自SEQ ID NO:3-40的序列编码。该靶向剂 抗体偶联物可进一步 包含第二靶向剂。该靶向剂抗体偶联物可进一步包 含1、2、3、4个或更多个靶向剂。

[0010] 所述抗体或抗体片段可结合细胞毒性效应细胞上的抗原,并且所 述靶向剂可结 合靶细胞上的细胞表面蛋白质或细胞表面标志物。该靶细 胞可以是癌细胞。该癌细胞可来 源于前列腺癌。该癌细胞可来源于上皮 癌。该癌细胞可来源于乳腺癌。该癌细胞可来源于 肾癌。该癌细胞可来 源于肺癌。该癌细胞可来源于结肠癌。该癌细胞可来源于结直肠癌。该 癌细胞可来源于胃癌。该癌细胞可来源于脑癌。该癌细胞可来源于胶质 母细胞瘤。该癌细胞 可来源于胰腺癌。该癌细胞可来源于髓样白血病。 该癌细胞可来源于宫颈癌。该癌细胞 可来源于甲状腺髓样癌。该癌细胞 可来源于基质卵巢癌。该癌细胞可来源于星形细胞瘤。 该癌细胞可来源 于上皮癌。该癌细胞可来源于神经内分泌癌。该癌细胞可来源于胃肠胰 肿瘤。该癌细胞可来源于成非霍奇金淋巴瘤。该癌细胞可来源于外分泌 胰腺癌。该癌细胞 可来源于尤因肉瘤。该癌细胞可来源于皮肤癌。该皮 肤癌可以是黑色素瘤。该皮肤癌可以 是新生成血管的皮肤癌。该肺癌可 以是小细胞肺癌。

X可与L1偶联。Y可与L1偶联。X可通过脰与L1偶联。Y可通 过脰与L1偶联。X可通过共价 键、离子键或非共价键与L1偶联。Y可 通过共价键、离子键或非共价键与L1偶联。L1可提供X

与Y之间约 10至100埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或小于约50埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或小于约45埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或小于约40埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或小于约30埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或大于约5埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或大于约10埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或大于约15埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间等于或大于约20埃(\AA)的距离。L1可提供X与Y之间包括并且为约10至约100埃(\AA)的距离。

[0011] 所述抗体或抗体片段的一个或多个非天然氨基酸包括对乙酰苯丙氨酸(pAcF)。所述抗体或抗体片段的一个或多个非天然氨基酸包括硒代胱氨酸。所述一个或多个非天然氨基酸可包括(a)各种取代的酪氨酸和苯丙氨酸类似物如邻甲基-L-酪氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、3-硝基-L-酪氨酸、对硝基-L-苯丙氨酸、间甲氧基-L-苯丙氨酸和对异丙基-L-苯丙氨酸；(b)可光交联的具有芳基叠氮和二苯甲酮基团的氨基酸；(c)具有独特化学反应性的氨基酸,包括乙酰基-L-苯丙氨酸和间乙酰基-L-苯丙氨酸、邻烯丙基-L-酪氨酸、邻-(2-丙炔基)-L-酪氨酸、对乙基硫代羰基-L-苯丙氨酸和对-(3-氧代丁酰基)-L-苯丙氨酸；(d)用于在X射线晶体学中定相的含重原子的氨基酸,包括对碘和对溴-L-苯丙氨酸；(e)氧化还原活性的氨基酸二羟基-L-苯丙氨酸；(f)糖基化的氨基酸,包括b-N-乙酰葡萄糖胺-邻-丝氨酸和a-N-乙酰半乳糖胺-邻-苏氨酸；(g)具有萘基、丹酰和7-氨基香豆素侧链的荧光氨基酸；(h)具有偶氮苯和硝基苄基Cys、Ser和Tyr侧链的可光裂解和可光异构化的氨基酸；(i)磷酸酪氨酸模拟物对羧甲基-L-苯丙氨酸；(j)谷氨酰胺同系物高谷氨酰胺(homoglutamine)；(k)2-氨基辛酸；(l)或(a)-(k)的组合。所述一个或多个非天然氨基酸可包含至少一个脞基、羰基、二羰基、羟胺、环辛炔、芳基/烷基叠氮、降冰片烯、环丙烯、反式环辛烯以及四嗪基团。所述一个或多个非天然氨基酸可进行遗传编码。所述一个或多个非天然氨基酸可并入所述抗体或抗体片段中。所述一个或多个非天然氨基酸可位点特异性地并入所述抗体或抗体片段中。所述靶向剂抗体偶联物可包含两个或更多个非天然氨基酸。所述靶向剂抗体偶联物可包含三个或更多个非天然氨基酸。所述靶向剂抗体偶联物可包含四个或更多个非天然氨基酸。所述一个或多个非天然氨基酸可代替所述抗体或抗体片段中的一个或多个氨基酸残基。所述一个或多个非天然氨基酸可代替所述抗体或抗体片段的重链中的氨基酸残基。所述抗体或抗体片段的所述一个或多个非天然氨基酸可代替所述抗体或抗体片段的轻链中的氨基酸残基。所述抗体或抗体片段的所述一个或多个非天然氨基酸可代替所述抗体或抗体片段的可变区中的氨基酸残基。

[0012] 本文进一步公开了包含靶向剂抗体偶联物的药物组合物,该靶向剂抗体偶联物包含:抗体或抗体片段;靶向剂,其中该靶向剂不是抗体或抗体片段;以及一个或多个连接体,其中该抗体或抗体片段通过该一个或多个连接体与该靶向剂连接。该抗体或抗体片段和该靶向剂可以位点特异性地连接。该抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。该药物组合物可进一步包含药学上可接受的稀释剂。该药物组合物可进一步包含药学上可接受的赋形剂。该药物组合物可进一步包含药学上可接受的载体。

[0013] 本文公开了用于治疗有其需要的受试者中的疾病或病况的方法,包括施用靶向剂抗体偶联物,其包含抗体或抗体片段;靶向剂,其中该靶向剂不是抗体或抗体片段;以及

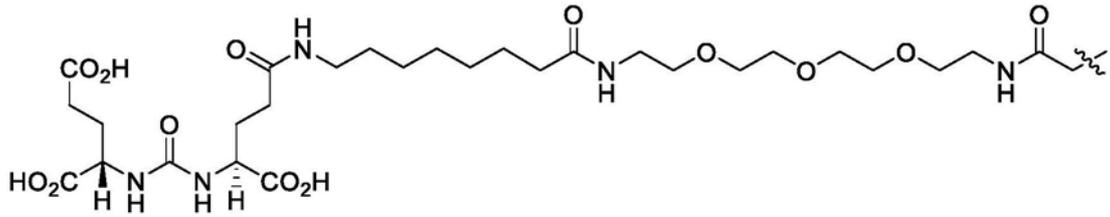
一个或多个连接体,其中该抗体或抗体片段通过该一个或多个连接体与该靶向剂连接。该抗体或抗体片段和靶向剂可位点特异性地连接。该抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。该疾病或病况可以是病原体感染。该病原体感染可以是细菌感染。该病原体感染可以是病毒感染。该疾病或病况可以是炎性疾病。该疾病或病况可以是自身免疫病。该自身免疫病可以是糖尿病。该疾病或病况可以是癌症。该疾病或病况可以是前列腺癌。该疾病或病况可以是上皮癌。该疾病或病况可以是肾癌。该疾病或病况可以是肺癌。该疾病或病况可以是结肠癌。该疾病或病况可以是结直肠癌。该疾病或病况可以是胃癌。该疾病或病况可以是脑癌。该疾病或病况可以是胶质母细胞瘤。该疾病或病况可以是胰腺癌。该疾病或病况可以是髓样白血病。该疾病或病况可以是宫颈癌。该疾病或病况可以是甲状腺髓样癌。该疾病或病况可以是乳腺癌。该疾病或病况可以是卵巢癌。该疾病或病况可以是星形细胞瘤。该疾病或病况可以是子宫内膜癌。该疾病或病况可以是神经内分泌癌。该疾病或病况可以是胃肠胰肿瘤。该疾病或病况可以是非霍奇金淋巴瘤。该疾病或病况可以是外分泌胰腺癌。该疾病或病况可以是尤因肉瘤。该疾病或病况可以是皮肤癌。该皮肤癌可以是黑色素瘤。该皮肤癌可以是新生成血管的皮肤癌。该肺癌可以是小细胞肺癌。

施用所述靶向剂抗体偶联物或药物组合物可包括静脉内给药、皮下给药、腹膜内给药、肌内给药、血管内给药、鞘内给药、玻璃体内给药、局部给药或输注。施用可包括口服给药。施用可包括鼻内给药。施用可包括显微针装置的使用。

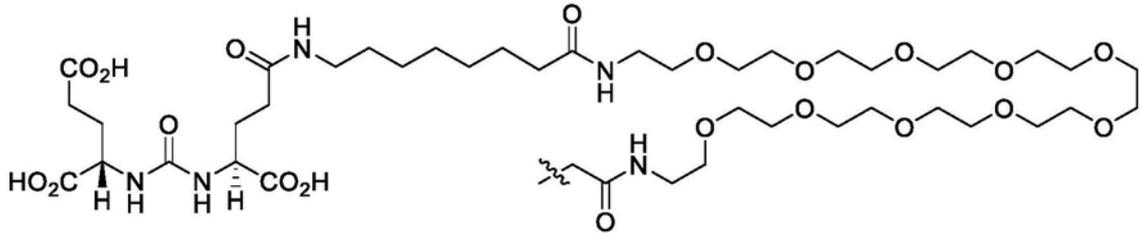
[0014] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含:抗体或抗体片段;一个或多个DUPA分子;以及一个或多个连接体,其中该抗体或抗体片段通过一个或多个连接体与一个或多个DUPA分子连接。该抗体或抗体片段可通过所述一个或多个连接体与所述一个或多个DUPA分子经位点特异性地连接。该抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。该抗体或抗体片段可通过针对所述一个或多个非天然氨基酸的所述一个或多个连接体与所述一个或多个DUPA分子连接。该抗体或抗体片段可以可替代地通过针对天然氨基酸的所述一个或多个连接体与所述一个或多个DUPA分子连接。该抗体或抗体片段可以是抗-CD3Fab。

[0015] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含:抗-CD3Fab;一个或多个DUPA分子;以及一个或多个连接体,其中该抗-CD3Fab通过所述一个或多个连接体与所述一个或多个DUPA分子连接。该抗-CD3Fab可包含一个或多个非天然氨基酸。所述一个或多个非天然氨基酸可代替该抗-CD3Fab的天然氨基酸。所述一个或多个非天然氨基酸可代替该抗-CD3Fab的天然氨基酸,其中该天然氨基酸选自该抗-CD3Fab的重链的赖氨酸138(Lys 138)、该抗-CD3Fab的重链的丙氨酸123(Ala 123)、该抗-CD3Fab的重链的苏氨酸109(Thr 109)、该抗-CD3Fab的重链的丝氨酸202(Ser 202)。第一DUPA分子和第二DUPA分子可以通过第一连接体和第二连接体与该抗-CD3Fab的第一非天然氨基酸和第二非天然氨基酸经位点特异性地连接。该靶向剂抗体偶联物可以是式I:X-L-Y或式IA:Y-L-X,其中:X包含抗-CD3Fab;L包含一个或多个连接体;且Y包含一个或多个DUPA分子。

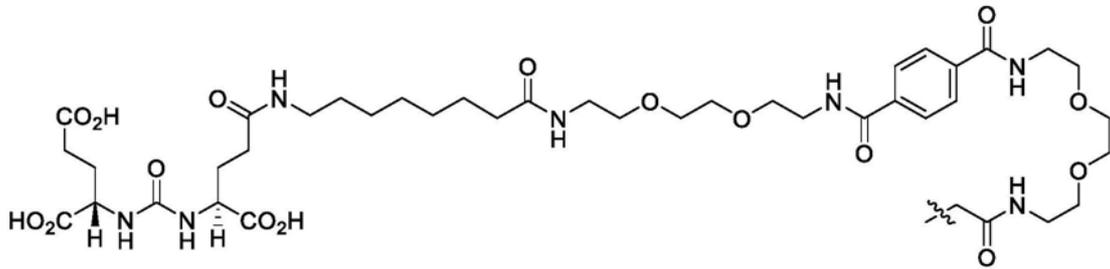
[0016] 所述靶向剂抗体偶联物可包含选自式V、式VI、式VII或式VIII的化合物:



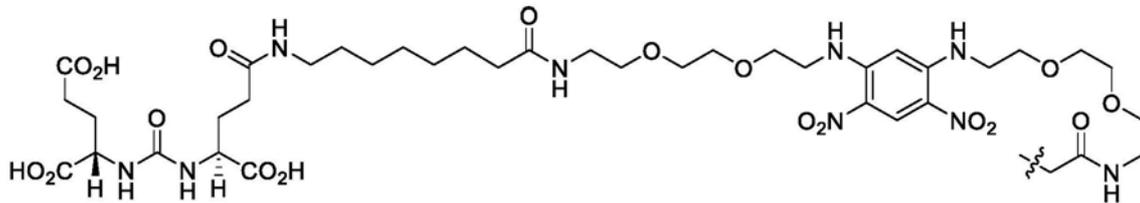
(式 V),



(式 VI),

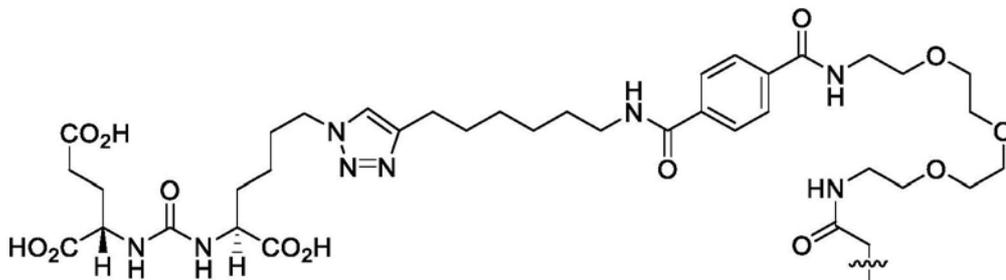


(式 VII), 和



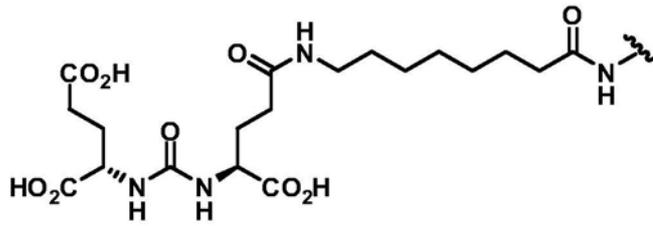
(式 VIII)。

[0017] 所述靶向剂抗体偶联物可包含式IX的化合物:



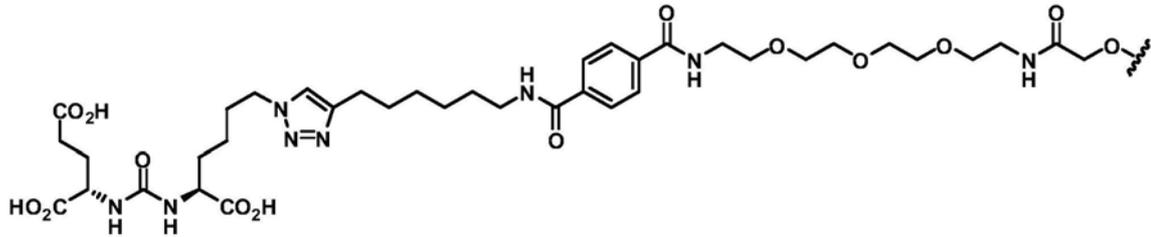
(式 IX)。

[0018] 所述靶向剂抗体偶联物可包含式IX的化合物:



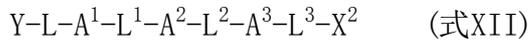
(式 X)。

[0019] 所述靶向剂抗体偶联物可包含式XI的化合物：



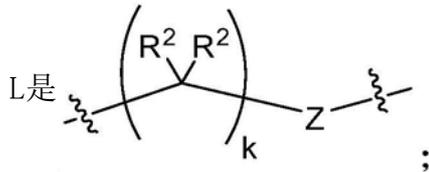
(式 XI)。

[0020] 在另一方面,本文提供了式XII的化合物,或其立体异构体：



其中：

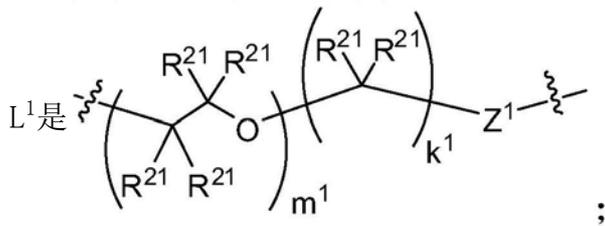
Y是前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的配体；



A¹选自芳基、5至6元杂芳

基、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S

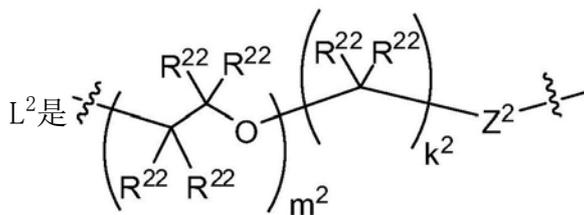
(O)_{1,2}-；

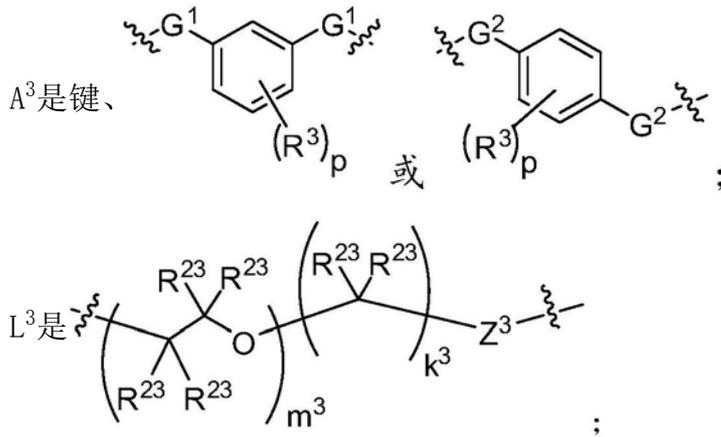


A²选自

键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S

(O)_{1,2}-；





X²是与和氨基酸反应的官能团结合的连接体或与修饰的氨基酸结合的连接体,其中该修饰的氨基酸是X的一部分,其中X是修饰的治疗性肽、蛋白质或抗体;

每个R¹独立地选自H、烷基或卤代烷基;

每个R²、R²¹、R²²和R²³独立地选自H、卤代、-OR¹、-CN、SR¹、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

每个R³独立地选自卤代、-OR¹、-CN、-SR¹、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基、-NO₂和NR¹R¹;

每个G¹和G²独立地选自键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;

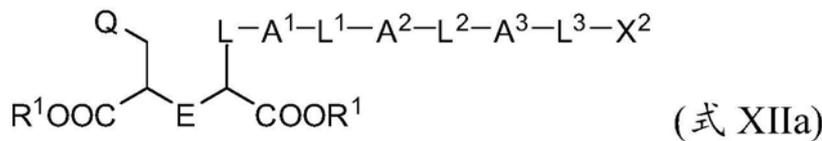
每个Z、Z¹、Z²和Z³独立地选自键、O和N(R¹)-;

k、k¹、k²和k³各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

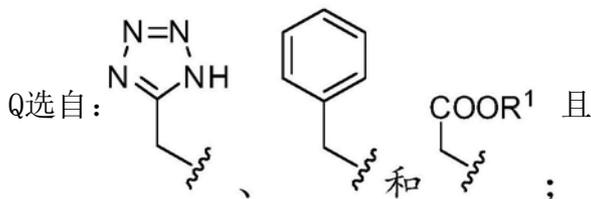
m¹、m²和m³各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;且

p为0、1、2、3、或4。

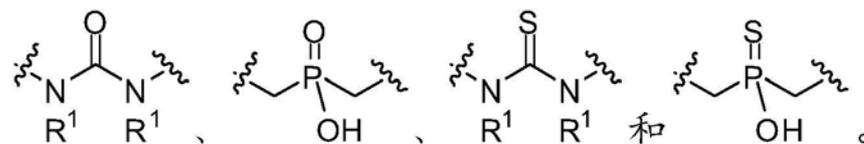
[0021] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,该化合物是 式XIIa:



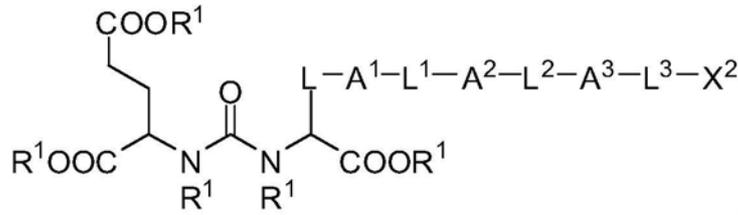
其中:



E选自:

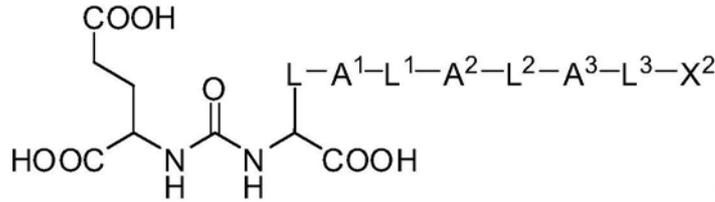


[0022] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,该化合物是 式XIIb:



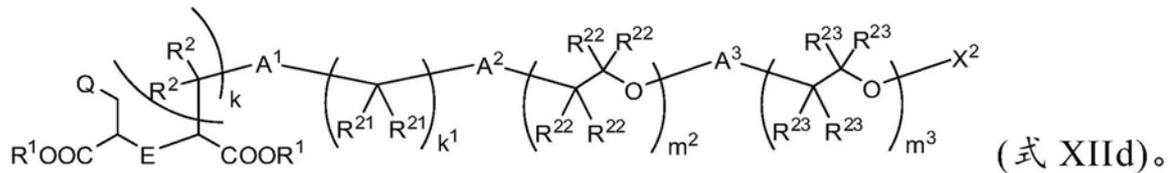
(式 XIIb)。

在式XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中,该化合物是 式XIIc:



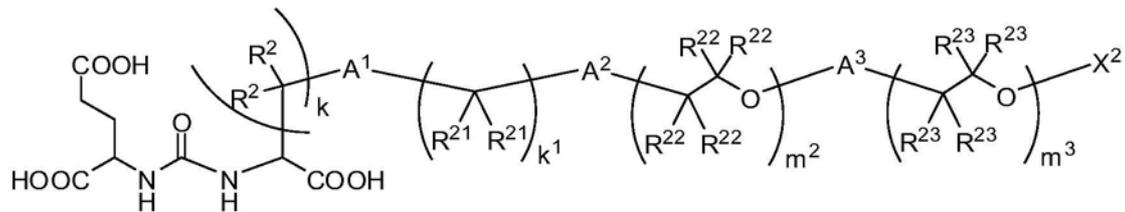
(式 XIIc)。

[0023] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,该化合物是 式XIIId:



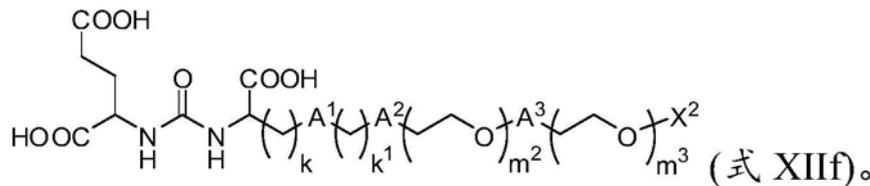
(式 XIIId)。

在式XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中,该化合物是 式XIIe:



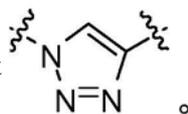
(式 XIIe)。

在式XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中,该化合物是 式XIIIf:

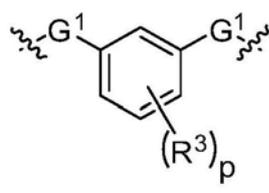
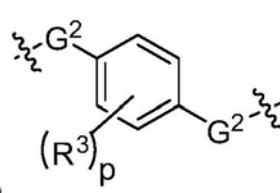


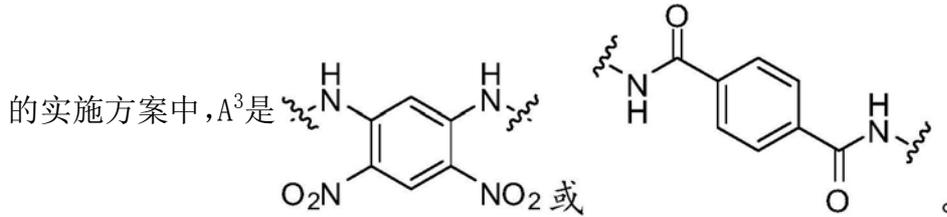
(式 XIIIf)。

[0024] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,A¹是-C(O)N(H)-。在式XII

化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,A¹是 。

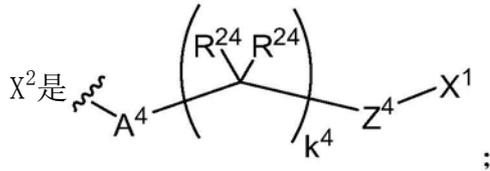
[0025] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,A³是

 或 。在式XII化合物的以上或以下描述 的进一步



[0026] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, 每个 R^2 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 和 R^{24} 独立地选自H、F、 $-CH_3$ 或 $-CF_3$ 。在式XII化合物的 以上或以下描述的一些实施方案中, 每个 R^2 、 R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 和 R^{24} 是H。

[0027] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,



其中:

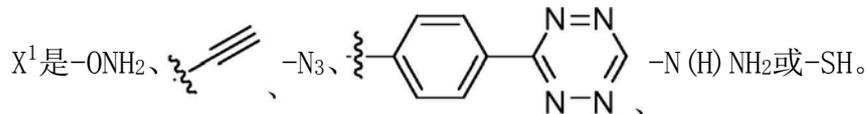
A^4 选自

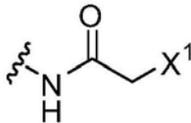
键、 $-C(O)-$ 、 $-N(R^1)-$ 、 $-O-$ 、 $-C(O)N(R^1)-$ 、 $-N(R^1)C(O)-$ 、 $-S(O)_{1,2}N(R^1)-$ 和 $-N(R^1)S(O)_{1,2}-$;

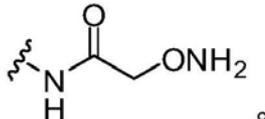
每个 R^{24} 独立地选自H、卤代、 $-OR^1$ 、 $-CN$ 、 $-SR^1$ 、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

k^4 选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

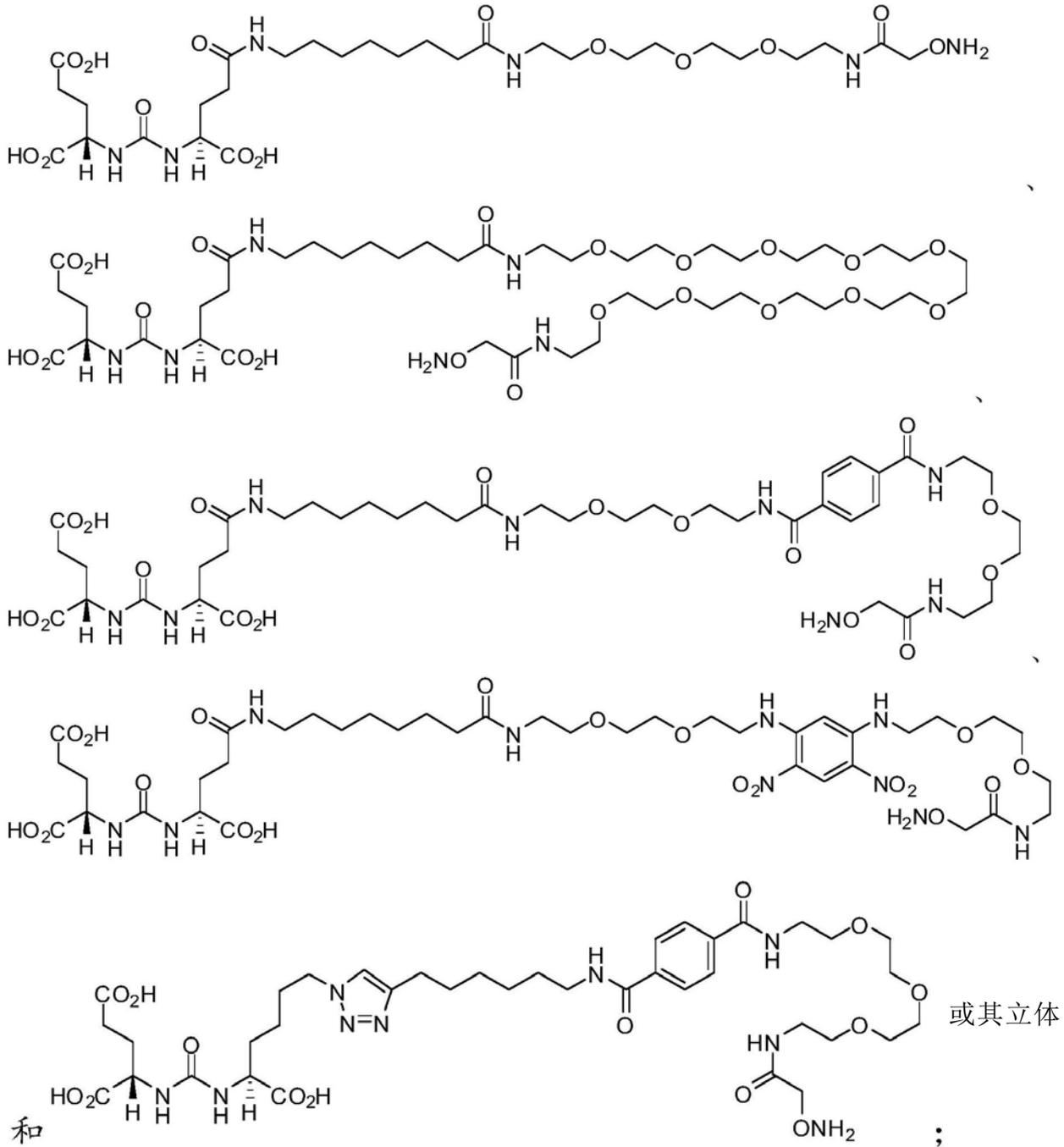
Z^4 选自键、芳基和5至6元杂芳基; 且



[0028] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, X^2 是  在式

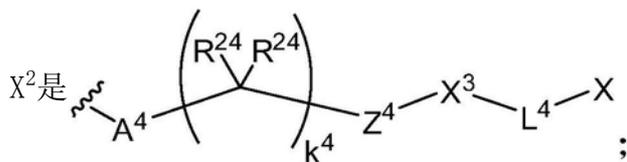
XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中, X^2 是 .

[0029] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, 该化合物选自:



异构体。

[0030] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中，



其中：

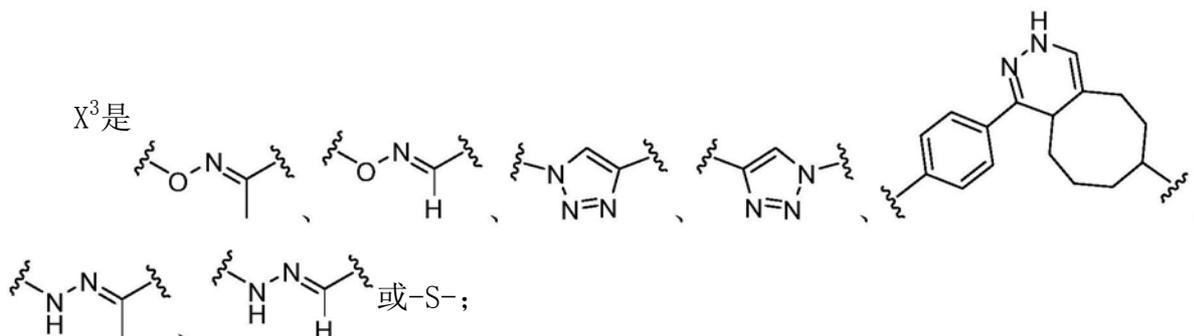
A⁴选自

键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-；

每个 R^{24} 独立地选自H、卤代、 $-OR^1$ 、 $-CN$ 、 $-SR^1$ 、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基；

k^4 选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10；

Z^4 选自键、芳基和5至6元杂芳基；且



X是修饰的治疗性肽、蛋白质或抗体；

L^4 是直接衔接至修饰的氨基酸的键或与修饰的氨基酸结合的连接体，其中该修饰的氨基酸是X的一部分。

在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中，该氨基酸是非天然氨基酸。

[0031] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， k 为1、2或3；且 Z 是键。

[0032] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^1 是 $-C(O)N(R^1)-$ 、6元芳基或5元杂芳基。

[0033] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， m^1 为0； k^1 为6或7；且 Z^1 是键。

[0034] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是键； m^2 和 k^2 为0；且 Z^2 是键。

[0035] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是 $-C(O)N(H)-$ ； m^2 为2； k^2 为2；且 Z^2 是键。在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是 $-C(O)N(H)-$ ； m^2 为3； k^2 为2；且 Z^2 是键。在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是 $-C(O)N(H)-$ ； m^2 为10； k^2 为2；且 Z^2 是键。

[0036] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， R^3 是 $-NO_2$ ；且 p 为2。

[0037] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中，每个 GX^1 和 GX^2 独立地选自 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 和 $-N(H)C(O)-$ 。

[0038] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， m^3 为3； k^3 为2；且 Z^3 是键。在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， m^3 为2； k^3 为2；且 Z^3 是键。

[0039] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^3 是键； m^3 和 k^3 为0；且 Z^3 是键。

[0040] 本文进一步公开了包含靶向剂抗体偶联物的组合物，该靶向剂抗体偶联物包含抗体或抗体片段；一个或多个连接体；以及靶向剂，其中该靶向剂抗体偶联物或化合物的纯度为至少90%。该靶向剂抗体构建体可包含非天然氨基酸。该抗体或抗体片段和靶向剂可以位点特异性地连接。

[0041] 本文进一步公开了化合物，其包含选自式XII或XIIIa-f的通式，其中该化合物的

纯度为至少90%。

[0042] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含:抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及靶向剂,其中该抗体或抗体片段与第一细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用;并且该靶向剂与第二细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用。

[0043] 本文进一步公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及靶向剂,其中该抗体或抗体片段与第一细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用;该靶向剂与第二细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用;并且所述一个或多个连接体将该抗体或抗体片段与该靶向剂位点特异性地连接。

附图说明

[0044] 上述发明内容以及下述发明详述当与所附附图一起阅读时可以被更好地理解。为图示本公开内容的目的,在附图中显示了目前优选的实施方案。但是,应该理解,本公开内容并不限于所示的确切的布置、实例和手段。

[0045] 当详述连同附图一起阅读时可最好地理解本发明。要强调的是,根据通常的做法,附图的各种特征不是按比例。相反,为了清楚起见各种特征的尺寸被任意放大或缩小。附图中包含以下图。

[0046] 图1描绘了合成PSMA结合靶向剂连接体化合物的线路图。

[0047] 图2描绘了UCHT1-Fab片段的Ribbon图。

[0048] 图3A描绘了连接PSMA结合靶向剂连接体化合物与连接体偶联的Fab片段的线路图。

[0049] 图3B-3E显示了连接体的实例。

[0050] 图4A和4C描绘了连接体结合之前和之后的Fab片段的ESI-MS分析。

[0051] 图4B和4D描绘了连接体结合之前和之后的Fab片段的去卷积质谱。

[0052] 图5A-5B描绘了与靶向剂抗体偶联物一起温育的Jurkat细胞(图5A)和C4-2细胞(图5B)的流式细胞分析。

[0053] 图5C描绘了不同Fab与C4-2细胞的基于FACS的结合分析。

[0054] 图6A描绘了用C4-2细胞中不同浓度的偶联的和未偶联的Fab处理的C4-2细胞的相对荧光。

[0055] 图6B描绘了与双-Phthal或混合物一起温育的C4-2或DU145细胞的百分比细胞毒性。

[0056] 图6C描绘了来自细胞毒性测定的上清液中促炎性细胞因子TNF- α 水平。剂量依赖性TNF- α 信号仅在PSMA-阳性C4-2细胞的存在下通过ELISA测定(R&D系统)检测出。

[0057] 图7A描绘了体内异种移植模型实验的原理图。

[0058] 图7B描绘了用PBS、偶联的Fab和PBMC或偶联的Fab(无PBMC)处理的小鼠中植入的C4-2细胞的肿瘤体积。

[0059] 图8描绘了对乙酰苯丙氨酸的结构。

[0060] 图9描绘了不同的P-抗-CD3偶联物与PSMA-阳性C4-2细胞在各种浓度下的结合的高通量FACS分析。与相应的单一偶联物相比,P-Phthal-双偶联物显示明显提高的亲和力。

[0061] 图10描绘了在新纯化的未激活的hPBMC的存在下(T:E=1:10)靶细胞的体外细胞毒性。偶联物对具有不同EC50值的PSMA- 阳性C4-2细胞显示了剂量依赖性的活性,而未偶联的混合物不显示活性。

[0062] 图11描绘了100pM孔的显微图像,其中在P-靶向剂抗体偶联物偶联物的存在下细胞群集可仅在C4-2细胞上观察到。未偶联的抗-CD3和P-Phthal混合物对细胞群集没有影响。

[0063] 图12描绘了P-靶向剂抗体偶联物的体内效能研究。在预防用药模型中,1x10⁶C4-2细胞与2x10⁶PBMC(1:2比例)在基质胶中混合并注射SC进入雄性NOD-SCID小鼠的右肩。每天施用2mg/kg P-靶向剂抗体偶联物、未偶联的Fab或PBS(n=6)持续10天,在开始第4天通过静脉内施用。通过外部测径器测量定期监测肿瘤持续6周。P-靶向剂抗体偶联物抑制肿瘤生长(p<0.0001)而对对照组产生了快速的肿瘤。*表示具有大肿瘤(>1000mm³)的小鼠在这些天之前死亡。

[0064] 图13描绘了第二代PSNA靶向化合物P-TriA的设计。P-Phthal中C-9位置处的酰胺基团改变为三唑基团以增加PSMA酶活性位点附近的疏水袋的亲和力。基于晶体结构中第一和第二疏水结合袋(~11 Å)之间的距离,较短的碳氢化合物连接体在邻苯二甲酰亚胺基团之前被引入。

[0065] 图14描绘了P-Tet、P-Und和P-DNP的化学结构。

[0066] 图15A-J描绘了(S)-2-(3-((S)-5-(4-(6-(4-(1-(氨基氧)-2-氧-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基氨基甲酰基)苯甲酰氨基)己基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-羧基戊基)脲基)戊二酸(P-TriA)的合成。

[0067] 图15K描绘了与抗-CD3Fab偶联的P-TriA的ESI-MS分析。

[0068] 图15L描绘了与抗-CD3Fab偶联的P-TriA的去卷积质谱。

[0069] 图16A-B描绘了PSMA抑制测定的结果。(A)描绘了不同抑制剂的代表性的PSMA抑制曲线。(B)描绘了从PSMA抑制测定中获得的Km曲线。

[0070] 图17A-B描绘了在24小时和48小时处C4-2细胞中体外细胞毒性测定的结果。

[0071] 图18描绘了示例性的靶向剂的结构。

发明详述

[0072] 本发明在描述本发明方法和组合物之前,应当理解,本发明并不局限于所述的特定方法或组合物,因此当然可能会有所不同。还应当理解的是,本文所使用的术语仅用于描述特定的实施方案的目的,并且不是旨在限制性的。描述了实施例以便为本领域的普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完整的公开内容和描述,并且并不旨在限制发明人视为其发明的范围,也并非旨在表示下面的实验是进行的全部或仅有的实验。已作出努力以确保关于所用数字(例如量,温度等)的准确度,但一些实验误差和偏差应该予以考虑。除非另外指出,分数是重量分数,分子量是重量平均分子量,温度是摄氏度以及压力为大气压或接近大气压。

[0073] 当提供一个数值的范围时,应当理解,到下限的单位的十分之一,该范围的上限和下限之间的每个中间值,除非上下文另有明确说明,也被具体地公开。在所述范围中的任何所述值或中间值之间的各个较小的范围以及和在所述范围中的其他所述的或中间值包含在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可独立地包含在该范围内或排除在该范

围之外，并且每个范围也包含在本发明内，服从于所述范围中任何特定地排除在外的界限，其中任一、无一或两个界限均包含在较小范围内。当所述范围包含一个或两个界限，除去任一或两个那些包含在内的界限的范围也包含在本发明中。

[0074] 除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语具有如由本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然类似或等同于本文描述的任何方法和材料可以在本发明的实行或测试中使用，现在描述一些潜在的和优选的方法和材料。本文提及的所有出版物在此通过引用并入，以公开和描述与所引用的出版物有关的方法和/或材料。可以理解的是，存在矛盾的情况下，本公开内容取代所并入的出版物的任何公开内容。

[0075] 如在阅读本公开内容时对本领域技术人员将是显而易见的，每个本文所述并说明的单独的实施方案具有分立的组件和特征，其可从其他若干实施方案中容易地分离或结合，而不脱离本发明的范围或实质。可以按所列举事件的顺序或任何其他逻辑上可能的顺序实施任何列举的方法。

[0076] 必须指出，如本文和所附权利要求中所用，单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数项，除非上下文另有明确说明。因此，例如，提及“一个细胞”包括多个这样的细胞，并且提及“该肽”包括提及一种或多种肽及其等价物，例如本领域的技术人员已知的多肽，等等。

[0077] 本文所讨论的出版物仅提供用于先于本申请的申请日的公开内容。此处没有什么可以被解释为承认本发明没有资格由于在先发明而早于这样的出版物。此外，提供的出版物的日期可能不同于实际的公开日期，这可能需要单独证实。

[0078] 本文公开了靶向剂抗体偶联物，其包含：与靶细胞结合的靶向剂，其中该靶向剂不是抗体或抗体片段；以及不与靶细胞结合的抗体或抗体片段；以及一个或多个连接体，其中该抗体或抗体片段与靶向剂通过一个或多个连接体连接，并且其中抗体或抗体片段与细胞毒性效应细胞上的抗原结合。抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。靶向剂抗体偶联物可以是与所述抗体或抗体片段的一个或多个非天然氨基酸通过一个或多个连接体经位点特异性地连接。

[0079] 本文进一步公开了靶向剂抗体偶联物。靶向剂抗体偶联物可包括式 I：X-L1-Y 或式 IA：Y-L1-X，其中 (a) X 包含抗体或抗体片段的至少一部分；(b) L1 包含一个或多个连接体；以及 (c) Y 包含靶向剂，其中抗体或抗体片段与靶向剂通过一个或多个连接体连接。抗体或抗体片段和靶向剂可以位点特异性地连接。通常 X 结合细胞毒性效应细胞而 Y 结合靶细胞。例如，X 可结合细胞毒性 T 细胞上的抗原而 Y 可结合受体或癌细胞上的细胞表面标志物。另一个实例是细胞毒性效应细胞可以是巨噬细胞而靶细胞可以是病原体。

[0080] 本文公开了靶向剂抗体偶联物。靶向剂抗体偶联物可包括式 I：X-L1-Y 或式 IA：Y-L1-X，其中 (a) X 包含抗体或抗体片段的至少一部分；(b) L¹ 包含一个或多个连接体；以及 (c) Y 包含靶向剂，其中抗体或抗体片段与靶向剂通过一个或多个连接体连接以及其中抗体或抗体片段和靶向剂被位点特异性地连接。通常，靶向剂抗体偶联物包含一个或多个非天然氨基酸。通常，抗体或抗体片段包含一个或多个非天然氨基酸。

[0081] 本文进一步地公开了式 I 的靶向剂抗体偶联物：X-L1-Y 或式 IA：Y-L1-X，其中 X 包含多于一个抗体或抗体片段。X 可包括 1、2、3、4 或更多个抗体或抗体片段。X 包含两个抗体或抗体片段；两个或更多个抗体或抗体片段可通过肽连接。肽可以是约 2、3、4、5、6、7、8、9 或

10个氨基酸长度。肽可以是约五个氨基酸长度。X可包括一个或多个单链可变区片段(scFv)。X可包括一个或多个Fab。X可包括1、2、3、4或更多个scFv。X可包括1、2、3、4或更多个Fab。X可包括单价Fab。X可包括二价Fab。X可包括三价Fab。X可包括四价Fab。X可包括单价scFv。X可包括二价scFv。X可包括三价scFv。X可包括四价scFv。一个或多个Fab可以是相同的。一个或多个Fab可以是不同的。一个或多个scFv可以是相同的。一个或多个scFv可以是不同的。

[0082] 本文进一步地公开了式I的靶向抗体偶联物： $X-L1-Y$ 或式IA： $Y-L1-X$ ，其中X包含多于一个抗体或抗体片段而Y包含一个或多个靶向剂。Y可包括1、2、3、4或更多个靶向剂。一个或多个靶向剂可以是相同的。一个或多个靶向剂可以是不同的。靶向抗体偶联物可包含第二连接体，其中第一连接体将一个靶向剂与第一抗体或抗体片段连接而第二连接体将第二靶向剂与第二抗体或抗体片段连接。靶向剂可包括2、3、4或更多个连接体，其中每个连接体将各个靶向剂与靶向抗体偶联物的抗体或抗体片段连接。

[0083] 本文进一步地公开了式I的靶向抗体偶联物： $X-L^1-Y$ 或式IA： $Y-L1-X$ ，其中X包含一个抗体或抗体片段并且其中Y包含一个或多个靶向剂。Y可包括1、2、3、4、5、6或更多个靶向剂。一个或多个靶向剂可以是相同的。一个或多个靶向剂可以是不同的。靶向抗体偶联物可包含1、2、3、4、5、6或更多个连接体，其中每个连接体将靶向剂与抗体或抗体片段连接。

[0084] 靶向抗体偶联物的效能可通过修饰连接体结构、连接体长度、靶向剂的相对结合方向和化学计量进行优化。使用赖氨酸或半胱氨酸的化学反应以连接抗原结合部分的传统化学方法易于产生不均一产物，其很可能在调节形成免疫突触的生产的几何结构方面不同和/或具有体内降低的稳定性和半衰期。规避这些挑战，本文公开了将非天然氨基酸并入的靶向抗原抗体偶联物，非天然氨基酸允许精确控制连接体部分的放置并且从而对靶向剂抗体偶联物几何结构以及靶向剂抗体偶联物的同质池(homogenous pools)的生成精确控制。

[0085] 本文公开了靶向剂抗体偶联物，其包含抗-CD3抗体或抗体片段；一个或多个连接体；以及结合前列腺特异性膜抗原(PSMA)的靶向剂。靶向剂可以是DUPA。抗体片段可以是抗-CD3Fab。抗-CD3Fab可以是UCHT1。连接体可以是P-TriA连接体。连接体可以是P-Und连接体。连接体可以是P-Tet连接体。连接体可以是P-Phthal连接体。连接体可以是P-DNP连接体。靶向剂抗体偶联物可进一步包含第二抗-CD3Fab。靶向剂抗体偶联物可进一步包含与前列腺特异性膜抗原结合的第二、第三或第四靶向剂。与前列腺特异性膜抗原结合的第二、第三或第四靶向剂可以包括DUPA。靶向剂抗体偶联物可包含二价抗-CD3Fab和四个DUPA，其中第一和第二DUPA与抗-CD3Fab的第一Fab通过第一连接体和第二连接体连接，而第三和第四DUPA与抗-CD3Fab的第二Fab通过第三连接体和第四连接体连接。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸，其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与DUPA经位点特异性地连接。DUPA可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0086] 本文公开了靶向剂抗体偶联物，其包含抗-CD3抗体或抗体片段；一个或多个连接体；以及结合c型凝集素样分子的靶向剂。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天

然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与结合c型凝集素样分子的靶向剂经位点特异性地连接。结合c型凝集素样分子的靶向剂可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0087] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合胆囊收缩素B受体(CCKBR)的靶向剂。结合胆囊收缩素B受体的靶向剂可包括五肽胃泌素。结合胆囊收缩素B受体的靶向剂可包括CCKBR拮抗剂。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与五肽胃泌素经位点特异性地连接。抗-CD3抗体或抗体片段可与CCKBR拮抗剂经位点特异性地连接。CCKBR拮抗剂可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。五肽胃泌素可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0088] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合促性腺激素释放激素受体(GnRHR)的靶向剂。结合GnRHR受体的靶向剂可包括促性腺激素释放激素(GnRH)。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与GnRH经位点特异性地连接。GnRH可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0089] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合促生长素抑制素受体2(SST2)的靶向剂。结合促生长素抑制素受体2的靶向剂可包括奥曲肽。结合促生长素抑制素受体2的靶向剂可包括octreotate。结合促生长素抑制素受体2的靶向剂可包括促生长素抑制素类似物。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与奥曲肽、octreotate或促生长素抑制素类似物经位点特异性地连接。奥曲肽、octreotate或促生长素抑制素类似物可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0090] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体连接体;以及结合avb3整联蛋白的靶向剂。结合avb3整联蛋白的靶向剂可包括环状的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽(cRGD)。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与cRGD经位点特异性地连接。cRGD可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0091] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合胃泌素释放肽受体的靶向剂。结合胃泌素释放肽受体的靶向剂可包括铃蟾肽。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与铃蟾肽经位点特异性地连接。铃蟾肽可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0092] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合神经激肽1受体的靶向剂。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与结合神经激肽1受体的靶向剂经位点特异性地连接。结合神经激肽1受体的靶向剂可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0093] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合黑皮质素1受体的靶向剂。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与结合黑皮质素1受体的靶向剂经位点特异性地连接。结合黑皮质素1受体的靶向剂可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0094] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合神经降压肽受体的靶向剂。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与结合神经降压肽受体的靶向剂经位点特异性地连接。结合神经降压肽受体的靶向剂可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0095] 本文公开了靶向剂抗体偶联物,其包含抗-CD3抗体或抗体片段;一个或多个连接体;以及结合神经肽Y受体的靶向剂。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。抗-CD3抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸,其中非天然氨基酸被位点特异性地并入。抗-CD3抗体或抗体片段可与结合神经肽Y受体的靶向剂经位点特异性地连接。结合神经肽Y受体的靶向剂可与抗-CD3抗体或抗体片段在抗-CD3抗体或抗体片段的非天然氨基酸处位点特异性地连接。

[0096] 相对于具有类似结合靶的双特异性抗体,本文公开的靶向剂抗体偶联物可显示提高的血清半衰期、选择性和效能。

[0097] 本文进一步公开了产生靶向剂抗体偶联物的方法,这些方法允许易于生成具有不同相关的几何结构的各种靶向剂抗体偶联物。

I. 抗体、抗体片段和靶向剂

[0098] 靶向剂抗体偶联物可包含Ig-靶向剂构建体,其中X包含免疫球蛋白而Y包含靶向剂。靶向剂抗体偶联物可包含Fab-靶向剂构建体,其中X包含Fab片段而Y包含靶向剂。X和Y可通过一个或多个连接体(例如, L^1 、 L^2)连接。如本文所用,术语“抗体片段”指的是任何形式的抗体而非全长形式。本文的抗体片段包括存在于全长抗体和已经工程化的抗体中的较小组分的抗体。抗体片段包括但不限于Fv、Fc、Fab以及(Fab')₂、单链Fv(scFv)、双抗体、三抗体、四抗体、双官能团杂交抗体、CDR1、CDR2、CDR3、CDR的组合、可变区、框架区、恒定区、重链、轻链、可替代的支架非抗体分子以及双特异性抗体。除非特别指出,使用术语“抗体”或“抗体(多个)”的声明和权利要求可特别地包括“抗体片段”和“抗体片段(多个)”。

[0099] 本文公开的抗体可以是人抗体、完全人抗体、人源化抗体、人工程化抗体、非人抗

体和/或嵌合抗体。例如,式I的抗体可以是人源化抗体。在另一个实例中,式I的抗体是嵌合抗体。本文公开的抗体可以基于或衍生自人抗体、完全人抗体、人源化抗体、人工程化抗体、非人抗体和/或嵌合抗体。例如,式IA的X可基于或衍生自人工程化抗体。可替代地,式IA的X可基于或衍生自非人的抗体。非人的抗体可人源化为减少对人的免疫原性,而保留亲代非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中CDR(或其部分)衍生自非人抗体,FR(或其部分)衍生自人抗体序列。人源化抗体任选地还会包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,在人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生出CDR残基的抗体)的相应残基置换,例如,以便恢复或改善抗体特异性或亲和性。

[0100] 人源化抗体及其制备方法例如在Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中综述,并且在以下文献中进一步描述,例如:Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri等, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述SDR (a-CDR) 嫁接); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述“表面重修”); Dall'Acqua等, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述“FR改组”); 和 Osbourn等, *Methods* 36:61-68 (2005); Klimka等, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述通向FR改组的“指导选择”方法); 和 Studnicka等, 美国专利5,766,886。

[0101] 嵌合抗体可指通过接合两个或更多个原始编码各自抗体的抗体基因而产生的抗体。嵌合抗体可包括来自第一抗体的至少一个氨基酸和来自第二抗体的至少一个氨基酸,其中该第一和第二抗体是不同的。X(例如,式I、IA、II的抗体)可以是嵌合抗体。抗体或抗体片段的至少一部分可以来自牛科动物的种、人的种或鼠的种。抗体或抗体片段的至少一部分可以来自母牛。抗体或抗体片段的至少一部分可以来自大鼠、山羊、豚鼠或兔。抗体或抗体片段的至少一部分可以来自人。抗体或抗体片段的至少一部分可以来自食蟹猴。

[0102] 本文公开的抗体可基于或衍生自来自哺乳动物、鸟、鱼、两栖动物、爬行动物的抗体或抗体片段。哺乳动物包括但不限于食肉动物、啮齿动物、象、有袋目的哺乳动物、兔、蝙蝠、灵长类、海豹、食蚁动物、鲸目哺乳动物、奇数趾有蹄类动物和偶数趾有蹄类动物。该哺乳动物可以是人、非人灵长类、小鼠、绵羊、猫、狗、母牛、马、山羊或猪。

[0103] 鸟类包括但不限于,信天翁、蜂鸟、鹰、鸵鸟、主红雀、鹈鹕和企鵝。鱼类可能是软骨鱼、鳍鱼或肉鳍鱼。两栖动物可能包括但不限于,北螈属蝾螈、蝾螈目动物、蛙和蟾蜍。爬行动物的实例包括但不限于龟、有鳞类、鳄类动物和斑点楔齿蜥。有鳞类可包括蜥蜴属、蜥蜴和蛇。

[0104] 本文公开的抗体可以是跨物种反应性的。例如,抗体可以识别人抗原和食蟹猴抗原(例如人/cyo抗体)。

[0105] 抗体或抗体片段可包含选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少一部分。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少50%相同的序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少60%相同的序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少70%相同的序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少80%相同的序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少50%相同的序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少85%相同的

序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少90%相同的序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少95%相同的序列。抗体或抗体片段可包含与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少97%相同的序列。

[0106] 抗体或抗体片段可包含包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的五个或更多个氨基酸的序列。抗体或抗体片段可包含包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的6、7、8、9、10个或更多个氨基酸的序列。抗体或抗体片段可包含包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的15、16、17、18、19、20个或更多个氨基酸的序列。抗体或抗体片段可包含包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸的序列。抗体或抗体片段可包含包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多个氨基酸的序列。氨基酸可以是连续的。氨基酸可以是非连续的。

IA.X的抗体或抗体片段

[0107] 本文公开的抗体可包括X,其中X包含抗体或抗体片段的至少一部分。抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。X可包含整个抗体。X可包含至少一部分抗体。X可包含至少一部分单克隆抗体。X可包含至少一部分多克隆抗体。X可包含至少一部分多价抗体。

[0108] X可包含抗体的至少一部分。该抗体的一部分可包括抗体片段。该抗体的一部分可以是免疫球蛋白(Ig)。免疫球蛋白可选自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、其片段或其修饰。免疫球蛋白可以是IgG。IgG可以是IgG1。IgG可以是IgG2。IgG可具有针对降低的FcR结合的Fc突变。IgG1中的Fc突变可以是L234A和L235A。IgG1中的Fc突变可以是L234A和L235E。IgG1中的Fc突变可以是N297A。IgG2中的Fc突变可以是V234A和V237A。抗体片段包括但不限于Fv、Fc、Fab以及(Fab')₂、单链Fv(scFv)、双抗体、三抗体、四抗体、双官能团杂交抗体、CDR1、CDR2、CDR3、CDR的组合、可变区、框架区、恒定区、重链、轻链、可替代的支架非抗体分子以及双特异性抗体。X可包括Fab抗体。X可包括抗体的重链(HC)的至少一部分。X可包括抗体的轻链(LC)的至少一部分。X可包括抗体的可变区的至少一部分。X可包括抗体的恒定区的至少一部分。

[0109] X可包括选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少一部分。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少50%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少60%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少70%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少80%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少50%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少85%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少90%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少95%相同的序列。X可包括与选自SEQ ID NO:1-2的序列的至少97%相同的序列。

[0110] X可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的五个或更多个氨基酸的序列。X可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的6、7、8、9、10个或更多个氨基酸的序列。X可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的15、16、17、18、19、20个或更多个氨基酸的序列。X可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸的序列。X可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:1-2的序列的55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多个氨基酸的序列。氨基酸可以是连

续的。氨基酸可以是非连续的。

[0111] X可包括与细胞上受体的至少一部分结合的抗体或抗体片段。X可包括与细胞上共受体的至少一部分结合的抗体或抗体片段。X可包括与抗原或细胞上细胞表面标志物的至少一部分结合的抗体或抗体片段。细胞可以是造血细胞。造血细胞可以是骨髓细胞。骨髓细胞可以是红细胞、凝血细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或肥大细胞。造血细胞可以是淋巴样细胞。造血细胞可以是巨噬细胞。造血细胞可以是嗜中性粒细胞。淋巴样细胞可以是B细胞、T细胞或NK细胞。造血细胞可以是白细胞。造血细胞可以是淋巴细胞。T细胞可以是细胞毒性T细胞、辅助T细胞、调节T细胞、记忆T细胞或自然杀伤T细胞。T细胞可以是细胞毒性T细胞。T细胞可以是杀伤T细胞。

X可包含抗-T细胞受体抗体的至少一部分。X可包含抗-T细胞受体共抗体的至少一部分。X可包含与T细胞上的抗原结合的抗体的至少一部分。X可包含与T细胞上的细胞表面蛋白质结合的抗体的至少一部分。X可包含与T细胞上的细胞表面标志物结合的抗体的至少一部分。X可包含与T细胞上的分化蛋白群集结合的抗体的至少一部分。X可包含抗-CD3抗体的至少一部分。X可包含抗-CD3抗体。抗-CD3抗体可以是UCHT1。X可包含抗-CD3抗体的Fab片段至少一部分。X可包含抗-CD3抗体的抗体片段。X可包含人/食蟹猴(cynomolgus)交叉反应的抗-CD3Fab(例如SP34)。

[0112] X可包括与细胞上受体的至少一部分结合的抗体或抗体片段。X可包括与细胞上共受体的至少一部分结合的抗体或抗体片段。X可包括与抗原或细胞上细胞表面标志物的至少一部分结合的抗体或抗体片段。细胞可以是免疫细胞。细胞可以是造血细胞。造血细胞可以是骨髓细胞。骨髓细胞可以是红细胞、凝血细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或肥大细胞。造血细胞可以是淋巴样细胞。淋巴样细胞可以是B细胞、T细胞或NK细胞。造血细胞可以是白细胞。造血细胞可以是淋巴细胞。细胞可以是遗传修饰细胞。细胞可以进行遗传修饰以具有细胞毒素活性。细胞可以进行遗传修饰以具有强化的细胞毒素活性。细胞可以进行修饰以具有降低的细胞毒素活性。

[0113] X可包括与T细胞上受体的至少一部分结合的抗体或抗体片段。受体可以是T细胞受体(TCR)。TCR可包括TCR α 、TCR β 、TCR γ 和/或TCR Δ 。受体可以是T细胞受体 ζ 。

[0114] X可包括与淋巴细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞和/或NK细胞上受体的至少一部分结合的抗体或抗体片段。受体可以是Fc受体。Fc受体可以是Fc- γ 受体、Fc- α 受体和/或Fc- ϵ 受体。Fc- γ 受体包括但不限于,Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIA(CD32)、Fc γ RIIB(CD32)、Fc γ RIIIA(CD16a)和Fc γ RIIIB(CD16b)。Fc- α 受体包括但不限于,Fc α RI。Fc- ϵ 受体包括但不限于,Fc ϵ RI和Fc ϵ RII。受体可以是CD89(IgA受体的Fc片段或FCAR)。当靶向剂抗体偶联物包括Fc受体结合抗体时,靶向剂抗体偶联物可与病原细菌或真菌特异性结合。

[0115] X可包含结合T细胞上共受体的至少一部分的抗体或抗体片段。共受体可以是CD3、CD4和/或CD8。X可包含与CD3共受体结合的抗体片段。CD3共受体可包括CD3- γ 、CD3- Δ 和/或CD3- ϵ 。CD8可包括CD8 α 和/或CD8- β 链。

[0116] X可包含抗体或抗体的至少一部分,该抗体是人抗体、完全人抗体、人源化抗体、人工程化抗体、非人抗体或嵌合抗体。X可包含抗体或抗体的至少一部分,该抗体是哺乳动物抗体。X可包含抗体或抗体的至少一部分,该抗体是非哺乳动物抗体。

[0117] X可包含基于或衍生自一种或多种抗体和/或抗体片段序列的序列。X可包含至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99%或更多与基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的序列同源的序列。X可包含至少约70%与基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的序列同源的序列。X可包含至少约80%与基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的序列同源的序列。X可包含至少约90%与基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的序列同源的序列。X可包含至少约95%与基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的序列同源的序列。序列可以是肽序列。可替代地,序列是核苷酸序列。

[0118] X可以包含以少于或等于约20、17、15、12、10、8、6、5、4个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列。X可以包含以少于或等于约4个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列。X可以包含以少于或等于约3个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列。X可以包含以少于或等于约2个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列。X可以包含以少于或等于约1个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列。氨基酸可以是连续的、非连续的或其组合。例如,X可以包含以少于约3个连续的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列。可替代地,或此外,X可以包含以少于约2个非连续的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列。在另一个实例中,X可以包含以少于约5个氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的肽序列的肽序列,其中氨基酸中的2个是连续的而氨基酸中的2个是非连续的。

[0119] X可以包含以少于或等于约30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约15个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约12个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约9个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约6个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约4个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约3个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约2个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。X可以包含以少于或等于约1个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。核苷酸或碱基对可以是连续的、非连续的或其组合。例如,X可以包含以少于约3个连续的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。可替代地,或此外,X可以包含以少于约2个非连续的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一

个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列。在另一个实例中，X可以包含以少于约5个核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个抗体和/或抗体片段的核苷酸序列的核苷酸序列，其中核苷酸或碱基对中的2个是连续的而核苷酸或碱基对中的2个是非连续的。

[0120] X的肽序列可以以一个或多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的肽序列。X的肽序列可以以两个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的肽序列。X的肽序列可以以三个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的肽序列。X的肽序列可以以四个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的肽序列。X的肽序列可以以五个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的肽序列。X的肽序列可以以六个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的肽序列。X的肽序列可以以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、17、20、25个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的肽序列。

[0121] X的核苷酸序列可以以一个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以两个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以三个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以四个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以五个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以六个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以九个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以十二个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以十五个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以十八个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。X的核苷酸序列可以以20、22、24、25、27、30个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的抗体或抗体片段的核苷酸序列。

[0122] X可包含一个或多个非天然氨基酸。X可包含两个或更多个非天然氨基酸。X可包含三个或更多个非天然氨基酸。X可包含四个或更多个非天然氨基酸。X可包含5、6、7、8、9、10个或更多个非天然氨基酸。X可包含一个或多个抗体或抗体片段，其中抗体或抗体片段中的一个或多个包括一个或多个非天然氨基酸。X可包含一个或多个非天然氨基酸，其中一个氨基酸代替抗体或抗体片段的重链中的赖氨酸138。X可包含抗体或抗体片段的抗原结合位点的远端的一个或多个非天然氨基酸。X可包含抗体或抗体片段的抗原结合位点附近的一个或多个非天然氨基酸。X可包含抗体或抗体片段的抗原结合位点中的一个或多个非天然氨基酸。

[0123] X可与一个或多个连接体偶联。X可通过一个或多个连接体与Y偶联。X可通过两个或更多个连接体与Y偶联。X可通过三个或更多个连接体与Y偶联。

IB.Y的靶向剂

[0124] Y可包括靶向剂。Y可以不是抗体或抗体片段。Y可选自小分子、细胞靶向分子、配体、蛋白质、肽、类肽、DNA适体、肽核酸(PNA)、维生素、底物或底物类似物。肽可以包括环状肽或线形肽。Y可包括配体。Y可包含配体的至少一部分。配体可以是化学配体。配体可以是激素配体。配体可以是肽配体。配体可以是蛋白质配体。Y可进行化学修饰。Y可被衍生(例如用天然存在的蛋白质或肽)。Y可以是小分子。Y可以小到足以穿透组织。Y可以小到足以穿透肿瘤。Y可包含小分子,从而当与X偶联时产生小分子抗体偶联物(SMAC)。SMAC可小到足以穿透组织。SMAC可小到足以穿透肿瘤。小分子可适合于广泛的化学修饰。小分子可用包括蛋白质的其他分子进行衍生。

[0125] 靶向剂可结合靶细胞。靶向剂可结合细胞上的细胞表面蛋白质或细胞表面标志物。靶向剂可结合蛋白质、肽或生物分子,其中蛋白质、肽或生物分子不与细胞结合。蛋白质、肽或生物分子可在血流中循环。蛋白质、肽或生物分子可以是细胞外基质的组分。该蛋白质可以是酶。酶可以具有酶活性。举非限制性的实例,生物分子可选自纤维、生物聚合物(例如胶原)、聚糖、蛋白聚糖、脂质、固醇、碳水化合物、核酸和细胞碎片。

[0126] 靶向剂抗体偶联物的靶向剂可以具有治疗效果,因为它将细胞毒性效应细胞带入邻近的靶细胞。关于靶向剂抗体构建体的预期指征的治疗效果可能是由于靶向剂抗体偶联物将细胞毒性效应细胞补充至靶细胞。关于靶向剂抗体构建体的预期指征的治疗效果可能完全是由于靶向剂抗体偶联物将细胞毒性效应细胞补充至靶细胞。关于靶向剂抗体构建体的预期指征的治疗效果可能主要是由于靶向剂抗体偶联物将细胞毒性效应细胞补充至靶细胞。

[0127] 靶向剂抗体构建体的预期指征的治疗效果可能是由于靶向剂抗体偶联物将蛋白质、肽或生物分子补充至靶细胞。靶向剂抗体构建体的预期指征的治疗效果可能完全是由于靶向剂抗体偶联物将蛋白质、肽或生物分子补充至靶细胞。关于靶向剂抗体构建体的预期指征的治疗效果可能至少部分是由于靶向剂抗体偶联物将蛋白质、肽或生物分子补充至靶细胞。

[0128] 单独靶向剂可能不具有任何治疗效果。单独靶向剂对靶向剂抗体偶联物的预期指征可能不具有任何治疗效果。在不偶联抗-CD3抗体或抗体片段的情况下,靶向剂对靶向剂抗体偶联物的预期指征可能不具有治疗效果。作为靶向剂抗体偶联物的一部分施用以提供治疗效果时的治疗剂的剂量可能不具有治疗效果,当治疗剂在此剂量下单独施用时。靶向剂抗体偶联物的靶向剂可能预计不具有任何治疗效果,除非将细胞毒性效应细胞补充至靶细胞。靶向剂抗体偶联物的靶向剂对靶细胞可能具有治疗效果,其中该治疗效果相对于将细胞毒性效应细胞、蛋白质、肽或生物分子补充至靶细胞而言是可忽略的。靶向剂抗体偶联物的靶向剂对靶细胞可能具有治疗效果,其中该治疗效果小于将细胞毒性效应细胞、蛋白质、肽或生物分子补充至靶细胞。靶向剂与靶细胞的结合可引起来自靶细胞的不期望的响应。靶向剂与靶细胞的结合可引起除了将细胞毒性效应细胞、蛋白质、肽或生物分子补充至靶细胞的治疗效果之外不期望的治疗效果。

[0129] 靶向剂可具有约0.1kDa至约60kDa的质量。靶向剂可具有约0.1 kDa至约55kDa的质量。靶向剂可具有约0.1kDa至约50kDa的质量。靶向剂可具有约0.3kDa至约50kDa的质量。靶向剂可具有约0.1kDa、约0.2kDa、约0.3kDa、约0.4kDa、约0.5kDa、约0.6kDa、约

0.7kDa、约0.8kDa、约0.9kDa或约1kDa。靶向剂可具有约20kDa、约25kDa、约30kDa、约35kDa、约40kDa、约45kDa、约0.7kDa、约0.8kDa、约50kDa或约55kDa的质量。

[0130] 小分子靶向剂可包括前列腺特异性膜抗原(PSMA)抑制剂。PSMA 也称作谷氨酸羧肽酶II和N-乙酰基-L-天冬氨酰基-L-谷氨酸肽酶I。PSMA抑制剂可以是2-[3-(1,3-二羧基丙基)脲基]戊二酸(DUPA)或其衍生物。靶向剂抗体偶联物可以包含一个抗-CD3Fab和两个DUPA,其中两个DUPA中的第一个通过第一连接体与抗-CD3Fab连接而两个DUPA中的第二个通过第二连接体与抗-CD3Fab连接。

[0131] Y可包含与细胞上受体的至少一部分结合的配体。Y可包含与细胞上共受体的至少一部分结合的配体。Y可包含与抗原或细胞上细胞表面标志物的至少一部分结合的配体。细胞可以是造血细胞。造血细胞可以是骨髓细胞。骨髓细胞可以是红细胞、凝血细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或肥大细胞。造血细胞可以是淋巴样细胞。淋巴样细胞可以是B细胞、T细胞或NK细胞。造血细胞可以是白细胞。造血细胞可以是淋巴细胞。细胞可以是前列腺细胞。细胞可以是乳房细胞。细胞可以是肝细胞、肾细胞、肺细胞、心肌细胞、肌肉细胞、神经细胞、神经元、脑细胞、上皮细胞、食管细胞。细胞可以是肿瘤细胞。细胞可以是非肿瘤细胞。细胞可以是炎症细胞。炎症细胞可以是巨噬细胞。巨噬细胞可以是促炎性的。巨噬细胞可以是抗炎性的。细胞可产生细胞因子。细胞可产生趋化因子。

[0132] 细胞可以是癌细胞。癌细胞可来源于前列腺、乳房、卵巢、子宫颈、肺、肾、结肠、直肠、脑、甲状腺、胰腺、胃肠道或胃。癌细胞可来源于上皮组织、基质组织或子宫内膜组织。

[0133] Y可包含与细胞上受体结合的配体。受体可以是G-蛋白偶联的受体(GPCR)、酪氨酸激酶受体、细胞因子受体或整联蛋白。受体可以是生长因子受体。生长因子受体可以是表皮生长因子受体(EGFR)、血小板源性生长因子受体(PDGFR)或成纤维细胞生长因子受体(FGFR)。EGFR可以是EGFR1。EGFR可以是Her2。受体可以是胆囊收缩素B受体。受体可以是促性腺激素释放激素受体。受体可以是促生长素抑制素受体。受体可以是促生长素抑制素受体2。受体可以是胃泌素释放肽受体。受体可以是神经激肽受体。受体可以是神经激肽1受体,也称作速激肽1受体。受体可以是黑皮质素受体。受体可以是黑皮质素1受体。受体可以是神经降压肽受体。受体可以是神经肽Y受体。神经肽Y受体(NPYP)可选自NPY1R、NPY2R、PPYR1和NPY5R。

[0134] Y可结合细胞上的抗原或细胞表面标志物。抗原或细胞表面标志物可包括分化蛋白群集。分化蛋白可包括CD38。

[0135] Y可以是粘附分子。粘附分子可以是CLL-1。

[0136] Y可以结合整联蛋白。整联蛋白可以是 α v整联蛋白。整联蛋白可以是 α vB3整联蛋白。

[0137] Y可以结合前列腺特异性膜抗原(PSMA)。Y可包括DUPA。Y可基本上由DUPA组成。

[0138] Y可以是G蛋白偶联的受体激动剂。Y可以是G蛋白偶联的受体拮抗剂。Y可以是胆囊收缩素(CCK)受体激动剂。Y可以是胆囊收缩素(CCK)受体拮抗剂。Y可以是胆囊收缩素A受体激动剂。Y可以是胆囊收缩素A受体拮抗剂。Y可以是胆囊收缩素B受体激动剂。Y可以是胆囊收缩素B受体拮抗剂。胆囊收缩素B受体拮抗剂可以是五肽胃泌素。

[0139] Y可包括激素。Y可包括激素配体。Y可包括激素受体受体激动剂。Y可包括激素受

体受体拮抗剂。Y可包括促性腺激素释放激素。Y可以是黑皮质素受体配体。Y可以包括 α -促黑素细胞激素、阿法诺肽、BMS-470,539、布美诺肽、美拉诺坦II或刺豚鼠信号肽。

[0140] Y包含神经肽。Y可包括速激肽。Y可包括神经激肽受体配体。Y可包括物质P。Y可包括神经激肽。神经激肽可以是神经激肽A。神经肽可包括神经肽Y。Y可包括神经肽Y受体激动剂或神经肽Y受体拮抗剂。神经肽Y受体激动剂可选自YY和胰多肽。神经肽Y受体拮抗剂可选自BIBP-3226、Lu AA-33810、BIIE-0246和UR-AK49。神经肽可包括神经降压肽受体配体。神经降压肽受体配体可以是神经降压肽受体激动剂。神经降压肽受体激动剂可选自 β -乳紧张素(lactotensin)、JMV-449、神经降压肽、神经调节肽N、PD-149,163和衍生自SR-48692的非肽部分激动剂。神经降压肽受体配体可包括神经降压肽受体拮抗剂。神经降压肽受体拮抗剂可选自左卡巴斯汀(NTS2选择性的,也是H1组胺拮抗剂)、SR-48692(NTS1选择性的)或SR-142,948。

[0141] Y可包括肽类激素。肽类激素可以是促生长素抑制素或促生长素抑制激素或促生长素释放抑制因子或促生长素释放抑制激素。Y可包括促生长素抑制素类似物。Y可包括奥曲肽。Y可包括octreotate。octreotate可以进行DOTA标记用于 ^{68}Ga PET成像和 ^{177}Lu 放射治疗。

[0142] Y可包括肽。Y可包括小的肽。Y可包括小的肽配体。Y可包括环状肽。Y可包括精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列。Y可包括用于整联蛋白的含RGD的配体。Y可包括cRGD。Y可包括西仑吉肽。小的肽可包括用于胃泌素释放肽受体的配体。小的肽可包括用于选自BBR1、BBR2和BBR3的铃蟾肽受体的配体。用于胃泌素释放肽受体的配体可包括铃蟾肽、神经调节肽B、胃泌素释放肽。用于胃泌素释放肽受体的配体可包括铃蟾肽。

[0143] 靶向剂抗体偶联物可包含放射性标记的同位素。靶向剂抗体偶联物可包含用于放射性标记的同位素的螯合剂。靶向剂可包括放射性标记的同位素。靶向剂可包括用于放射性标记的同位素的螯合剂。Y可包括用于放射性标记的同位素的螯合剂。Y可包括(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸)DOTA。放射性标记的同位素可包括钇。放射性标记的同位素可以是 ^{90}Y 。DOTA可包括DOTATOC。DOTA可包括DOTA-TATE。

[0144] Y可包括选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少一部分。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少50%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少60%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少70%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少80%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少50%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少85%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少90%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少95%相同的序列。Y可包括与选自SEQ ID NO:3-40的序列的至少97%相同的序列。

[0145] Y可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:3-40的序列的五个或更多个氨基酸的序列。Y可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:3-40的序列的6、7、8、9、10个或更多个氨基酸的序列。Y可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:3-40的序列的15、16、17、18、19、20个或更多个氨基酸的序列。Y可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:3-40的序列的25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸的序列。Y可包括包含基于或衍生自选自SEQ ID NO:3-40的序列的55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多个氨基酸的序列。氨基酸可

以是连续的。氨基酸可以是非连续的。

[0146] Y可以包含以少于或等于约20、17、15、12、10、8、6、5、4个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列。Y可以包含以少于或等于约4个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列。Y可以包含以少于或等于约3个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列。Y可以包含以少于或等于约2个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列。Y可以包含以少于或等于约1个或更少的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列。氨基酸可以是连续的、非连续的或其组合。例如，Y可以包含以少于约3个连续的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列。可替代地，或此外，Y可以包含以少于约2个非连续的氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列。在另一个实例中，Y可以包含以少于约5个氨基酸不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的肽序列的肽序列，其中氨基酸中的2个是连续的而氨基酸中的2个是非连续的。

[0147] Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约15个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约12个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约9个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约6个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约4个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约3个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约2个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于或等于约1个或更少的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。核苷酸或碱基对可以是连续的、非连续的或其组合。例如，Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于约3个连续的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。可替代地，或此外，Y可以包含蛋白质或肽，其基于以少于约2个非连续的核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列。在另一个实例中，X可以包含蛋白质或肽，其基于以少于约5个核苷酸或碱基对不同于基于或衍生自一个或多个靶向剂的核苷酸序列的核苷酸序列，其中核苷酸或碱基对中的2个是连续的而核苷酸或碱基对中的2个是非连续的。

[0148] Y的肽序列可以以一个或多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的肽序列。Y的肽序列可以以两个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的肽序列。Y的肽序列可以以三个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自

的靶向剂的肽序列。Y 的肽序列可以以四个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的肽序列。Y的肽序列可以以五个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的肽序列。Y的肽序列可以以六个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的肽序列。Y的肽序列可以以1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、17、20、25个或更多个氨基酸取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的肽序列。

[0149] Y的核苷酸序列可以以一个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以两个或更多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以三个或更多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以四个或更多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以五个或更多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以六个或更多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以九个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以十二个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以十五个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以十八个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。Y的核苷酸序列可以以20、22、24、25、27、30个或多个核苷酸和/或碱基对取代不同于它基于的和/或衍生自的靶向剂的核苷酸序列。

[0150] Y可包含一个或多个非天然氨基酸。Y可包含两个或更多个非天然氨基酸。Y可包含三个或更多个非天然氨基酸。Y可包含四个或更多个非天然氨基酸。Y可包含5、6、7、8、9、10个或多个非天然氨基酸。

[0151] Y可与一个或多个连接体偶联。Y可通过一个或多个连接体与X偶联。Y可通过两个或更多个连接体与X偶联。Y可通过三个或更多个连接体与X偶联。

[0152] X与Y之间的距离可为约1埃(Å)至约120埃(Å)。X与Y之间的距离可为约5埃(Å)至约105埃(Å)。X与Y之间的距离可为约10埃(Å)至约100埃(Å)。X与Y之间的距离可为约10埃(Å)至约90埃(Å)。X与Y之间的距离可为约10埃(Å)至约80埃(Å)。X与Y之间的距离可为约10埃(Å)至约70埃(Å)。X与Y之间的距离可为约15埃(Å)至约45埃(Å)。X与Y之间的距离可等于或大于约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27、30或更多埃。X与Y之间的距离可等于或大于约10埃。X与Y之间的距离可等于或大于约15埃。X与Y之间的距离可等于或大于约20埃。X与Y之间的距离可等于或小于约110、100、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30或更小的埃。X与Y之间的距离可等于或小于约100埃。X与Y之间的距离可等于或小于约80埃。X与Y之间的距离可等于或小于约60埃。X与Y之间的距离可等于或小于约40埃。

II. 连接体

[0153] 本文公开的靶向剂抗体偶联物可包含一个或多个连接体(例如, L1、L2)。本文公

开的靶向剂抗体偶联物可包含两个或更多个连接体。本文公开的靶向剂抗体偶联物可包含三个或更多个连接体。本文公开的 靶向剂抗体偶联物可包含4、5、6、7个或更多个连接体。

[0154] 连接体可包含化学键。连接体可包含官能团。连接体可包含氨基酸。连接体可包括肽。连接体可包括聚合物。聚合物可以是聚乙二醇。

[0155] 一个或多个连接体可包含能与偶联配偶子上的互补反应性官能团 反应的一个或多个反应性官能团。连接体可以是双官能团的。双官能团 的连接体可以是杂双官能团的。连接体可包括乙二醇。连接体可以是双 官能团的乙二醇连接体。

[0156] 一个或多个连接体可通过X上的氨基酸与已经附接至Y的连接体 的反应而形成。一个或多个连接体可通过氨基酸或Y上的另一个反应性 官能团与已经附接至X的连接体的反应而形成。一个或多个连接体可通 过已经附接至X的连接体与已经附接至Y的另一个连接体的反应而形成。为了形成已经附接至X或Y的连接体,具有两个正交反应性官能团的双官能团连接体可与X或Y偶联,使得一个保持反应性官能团可用于随后的偶联。

[0157] 连接体可以是生物正交反应的产物,其非限制性的实例综述在 Kim等人,Curr Opin Chem Bio 17:412-419 (2013)。连接体可包括肟、四 嗪、Diels Alder加合物、杂Diels Alder加合物、芳族取代反应产物、亲 核取代反应产物、酯、酰胺、氨基甲酸酯、乙醚、硫醚或 Michael反应 产物。连接体可以是环加成产物、复分解反应产物、金属介导的交叉偶 联反应产物、游离基聚合产物、氧化偶联产物、酰基转移反应产物或光 点击反应产物。环加成可以是Huisgen-环加成。环加成可以是无铜 [3+2]Huisgen-环加成。环加成可以是Diels-Alder反应。环加成可以是杂 Diels-Alder反应。连接体可以是酶介导的反应的产物。连接体可以是谷 氨酰胺转移酶介导的反应的产物,其非限制性的实例描述在Lin等人,J. Am.Chem.Soc.128:4542-4543 (2006) 和WO 2013/093809。连接体可包含 二硫键,它连接两个半胱氨酸残基,诸如根据PolyTherics的ThioBridge™技术。连接体可包含马来酰亚胺桥,它连接两个氨基酸残基。

[0158] 一个或多个连接体中的每一个可包括一个或多个乙二醇。一个或 多个连接体中的每一个可包含至少一个选自以下的反应性官能团:烷氧 基胺、肼、芳基/烷基叠氮、炔烃、烯烃、四嗪、二氯三嗪、三氟乙基磺 酸酯、琥珀酰亚胺碳酸酯、苯并噻唑碳酸酯、硝基苯基碳酸酯、三氯苯 基碳酸酯、羰基咪唑、琥珀酰亚胺琥珀酸酯、马来酰亚胺、乙烯基磺、卤代乙 酰胺和二硫化物。炔烃可选自降冰片烯、反式环辛烯和环丙烯。一个或多个连接体中的每一个可包括至少一个烷氧基胺。一个或多个连 接体中的每一个可包括至少一个叠氮。一个或多个连接体中的每一个可 包括至少一个环辛炔。一个或多个连接体中的每一个可包括至少一个四 嗪。

[0159] 连接体可与X或Y上的一个或多个天然氨基酸偶联。连接体可与 X或Y上的一个或多个非天然氨基酸偶联。连接体可与氨基酸偶联,该 氨基酸是位点特异性诱变的产物。连接体可与半胱氨酸偶联,该半胱氨 酸是位点特异性诱变的产物。连接体(例如,取代的马来酰亚胺)可与 半胱氨酸以及天然半胱氨酸残基偶联,该半胱氨酸是位点特异性诱变的 产物。各自具有互补的反应性官能团的两个连接体可彼此偶联。

[0160] 一个或多个连接体可包括可裂解的连接体。一个或多个连接体可 包括不可裂解的连接体。一个或多个连接体可包括可弯曲的连接体。一 个或多个连接体可包括不可弯曲

的连接体。

[0161] 乙二醇连接体可包含约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19或约20个乙二醇亚基。一个或多个连接体可包含1,4-二羧基的部分。一个或多个连接体可包含1,3-二硝基取代的苯基的部分。一个或多个连接体可包含

[0162] 一个或多个连接体可在一个或多个末端包含烷氧基胺(或氨基氧)基团、叠氮基团和/或环辛炔基团。一个或多个连接体可在一个末端包含烷氧基胺而在另一末端包含叠氮基团。一个或多个连接体可在一个末端包含烷氧基胺而在另一末端包含环辛炔基团。烷氧基胺可与氨基酸上的含酮基团形成稳定的脎。烷氧基胺可与非天然氨基酸上的含酮基团形成稳定的脎。含酮基团可以在对乙酰基苯丙氨酸(pAcF)上。

[0163] 一个或多个连接体可与X、Y或其组合偶联。一个或多个连接体可与X和/或Y偶联以形成式III:L1-X、式IIIA:X-L1、式IV:L1-Y或式IVA:Y-L1中的一个或多个中间体。一个或多个连接体可通过脎与X和/或Y偶联。一个或多个连接体可通过环辛炔、环丙烯、芳基/烷基叠氮、反式环辛烯、降冰片烯、四嗪或其组合与X和/或Y偶联。一个或多个连接体可通过共价键、非共价键、离子键或其组合与X和/或Y偶联。

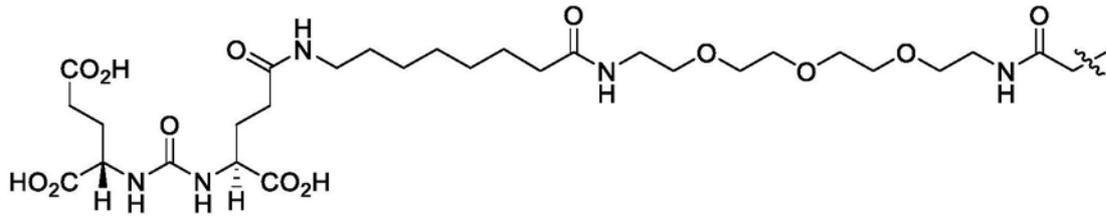
[0164] 两个或更多个连接体可进行连接。两个或更多个连接体可通过一个或多个无铜反应进行连接。两个或更多个连接体可通过一个或多个环加成进行连接。两个或更多个连接体可通过一个或多个Huisgen-环加成进行连接。两个或更多个连接体可通过一个或多个无铜[3+2]Huisgen-环加成进行连接。两个或更多个连接体可通过一个或多个含铜反应进行连接。两个或更多个连接体可通过一个或多个Diels Alder反应进行连接。两个或更多个连接体可通过一个或多个杂Diels Alder反应进行连接。

[0165] 靶向剂抗体偶联物可通过调节连接体长度进行优化。连接体可以是相对短的。连接体可以是相对长的。一个或多个连接体可以是约1埃(Å)至约120埃(Å)的长度。一个或多个连接体可以是约5埃(Å)至约105埃(Å)的长度。一个或多个连接体可以是约10埃(Å)至约100埃(Å)的长度。一个或多个连接体可以是约10埃(Å)至约90埃(Å)的长度。一个或多个连接体可以是约10埃(Å)至约80埃(Å)的长度。一个或多个连接体可以是约10埃(Å)至约70埃(Å)的长度。一个或多个连接体可以是约15埃(Å)至约45埃(Å)的长度。一个或多个连接体可等于或大于约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27、30或更多埃的长度。一个或多个连接体可等于或大于约10埃(Å)的长度。一个或多个连接体可等于或大于约15埃(Å)的长度。一个或多个连接体可等于或大于约20埃(Å)的长度。一个或多个连接体可等于或小于约110、100、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30或更小埃的长度。一个或多个连接体可等于或小于约100埃(Å)的长度。一个或多个连接体可等于或小于约80埃(Å)的长度。一个或多个连接体可等于或小于约60埃(Å)的长度。一个或多个连接体可等于或小于约40埃(Å)的长度。

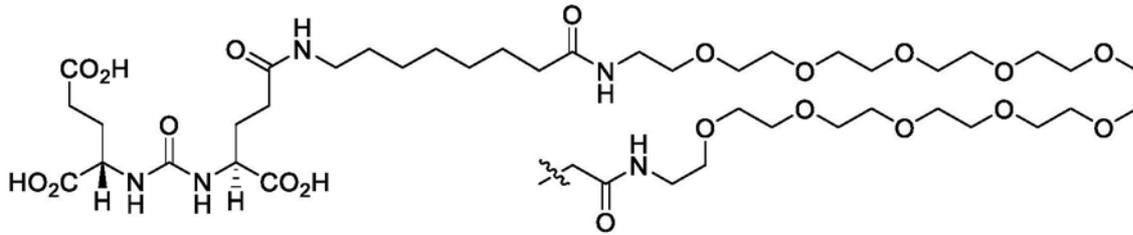
[0166] X连接体的总长度可为约1埃(Å)至约120埃(Å)。X连接体的总长度可为约5埃(Å)至约105埃(Å)。X连接体的总长度可为约10埃(Å)至约100埃(Å)。X连接体的总长度可为约10埃(Å)至约90埃(Å)。X连接体的总长度可为约10埃(Å)至约80埃(Å)。X连接体的总长度可为约10埃(Å)至约70埃(Å)。X连接体的总长度可为约15埃(Å)至约45埃(Å)。连接体的总长度可等于或大于约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、27、30或更多埃。连接体的总长度可等于或大于约10埃。连接体的总长度可等于或大于约15埃。连接体的总长度可等于或大于约20埃。连接体的总长度可等于或小于约110、100、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30或更小的埃。连接体的总长度可等于或小于约100埃。连接体的总长度可等于或小于约80埃。连接体的总长度可等于或小于约60埃。连接体的总长度可等于或小于约40埃。

前列腺特异性膜抗原结合小分子抗体偶联物 (PSMAC)

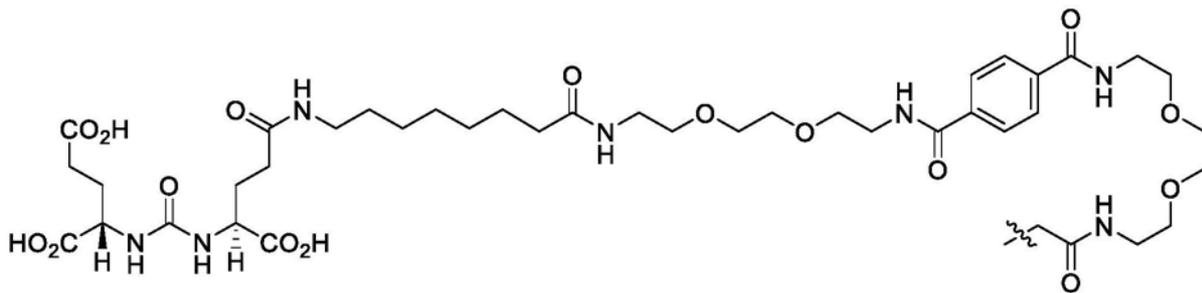
[0167] 靶向剂抗体偶联物可包含抗-CD3Fab；一个或多个DUPA分子；以及一个或多个连接体，其中抗体或抗体片段与一个或多个靶向剂通过一个或多个连接体连接。抗-CD3Fab可包含一个或多个非天然氨基酸。第一非天然氨基酸和第二非天然氨基酸可代替抗-CD3Fab的天然氨基酸。第一DUPA分子和第二DUPA分子可以与抗-CD3Fab的第一非天然氨基酸和第二非天然氨基酸经位点特异性地连接。天然氨基酸可选自X和/或Y的丙氨酸(Ala)、赖氨酸(Lys)、丝氨酸(Ser)和/或苏氨酸(Thr)残基。被代替的天然氨基酸可选自抗-CD3Fab的重链的赖氨酸138(Lys 138)、抗-CD3Fab的重链的丙氨酸123(Ala 123)、抗-CD3Fab的重链的苏氨酸109(Thr 109)、抗-CD3Fab的重链的丝氨酸202(Ser 202)。靶向剂抗体偶联物可以是式I: X-L1-Y或式IA: Y-L1-X，其中: X包含抗-CD3Fab; L包括一个或多个连接体; 且Y包含一个或多个DUPA分子。靶向剂抗体偶联物可包括选自式V、式VI、式VII、式VIII的化合物中的化合物:



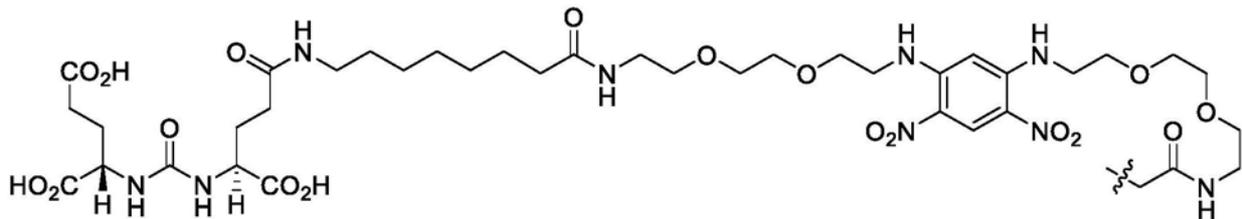
(式 V)、



(式 VI)、

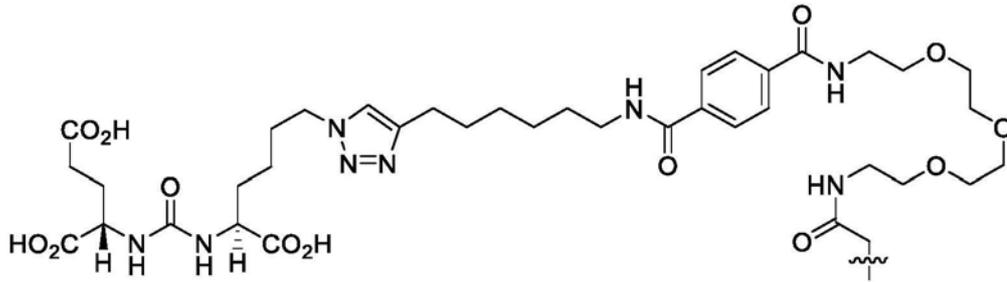


(式 VII)和



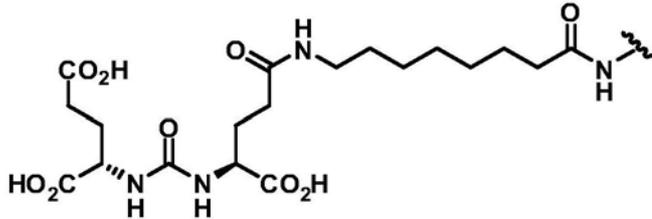
(式 VIII)。

[0168] 靶向剂抗体偶联物可包括式IX的化合物：



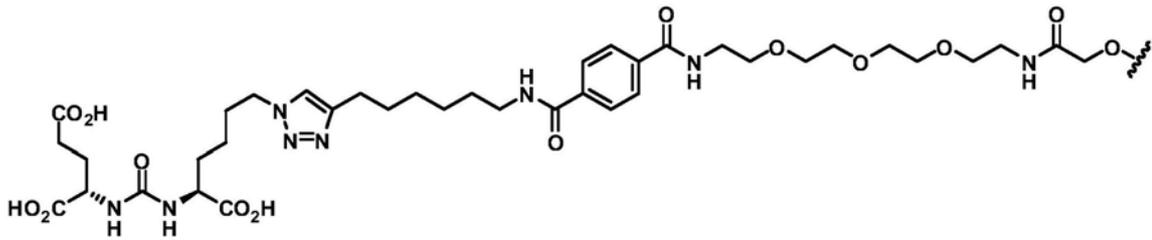
(式 IX)。

[0169] 靶向剂抗体偶联物可包括式IX的化合物：



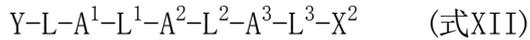
(式 X)。

[0170] 靶向剂抗体偶联物可包括式XI的化合物：



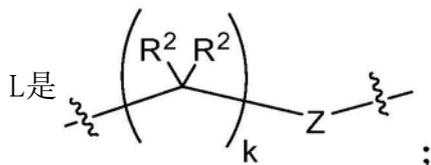
(式 XI)。

[0171] 在另一方面，本文提供了式XII的化合物，或其立体异构体：



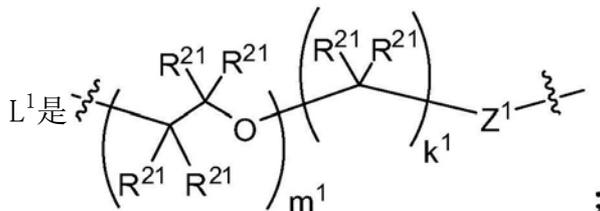
其中：

Y是前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的配体；



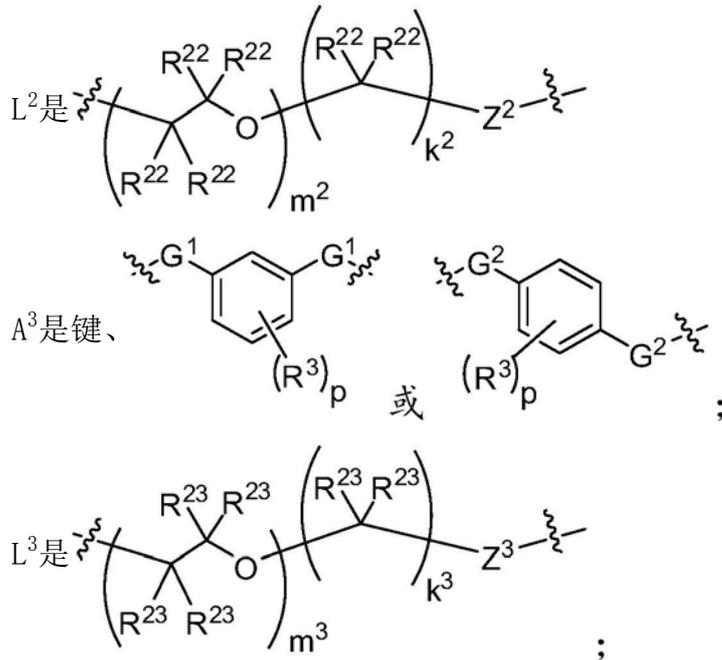
A¹选自芳基、5-至6-元杂芳

基、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-；



A²选自

键、 $-C(O)-$ 、 $-N(R^1)-$ 、 $-O-$ 、 $-C(O)N(R^1)-$ 、 $-N(R^1)C(O)-$ 、 $-S(O)_{1,2}N(R^1)-$ 和 $-N(R^1)S(O)_{1,2}-$;



X^2 是与和氨基酸反应的官能团结合的连接体或与修饰的氨基酸结合的连接体,其中修饰的氨基酸是X的一部分,其中X是修饰的治疗性肽、蛋白质或抗体;

每个 R^1 独立地选自H、烷基或卤代烷基;

每个 R^2 、 R^{21} 、 R^{22} 和 R^{23} 独立地选自H、卤代、 $-OR^1$ 、 $-CN$ 、 $-SR^1$ 、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

每个 R^3 独立地选自卤代、 $-OR^1$ 、 $-CN$ 、 $-SR^1$ 、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基、 $-NO_2$ 和 NR^1R^1 ;

每个 G^1 和 G^2 独立地选自

键、 $-C(O)-$ 、 $-N(R^1)-$ 、 $-O-$ 、 $-C(O)N(R^1)-$ 、 $-N(R^1)C(O)-$ 、 $-S(O)_{1,2}N(R^1)-$ 和 $-N(R^1)S(O)_{1,2}-$;

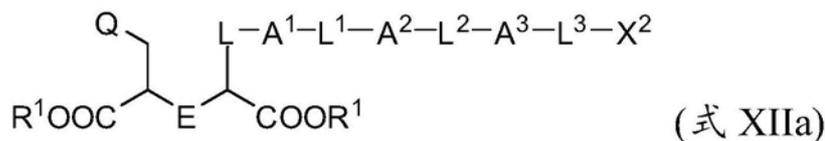
每个 Z 、 Z^1 、 Z^2 和 Z^3 独立地选自键、 $-O-$ 和 $-N(R^1)-$;

k 、 k^1 、 k^2 和 k^3 各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

m^1 、 m^2 和 m^3 各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;且

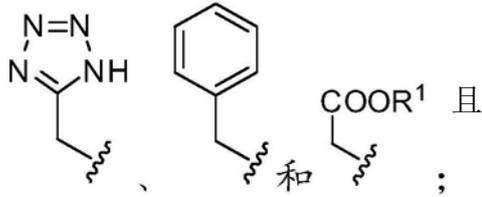
p 为0、1、2、3、或4。

[0172] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,该化合物是式XIIa:

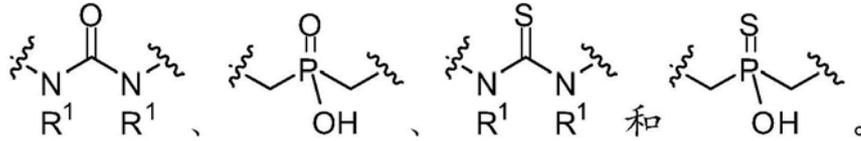


其中:

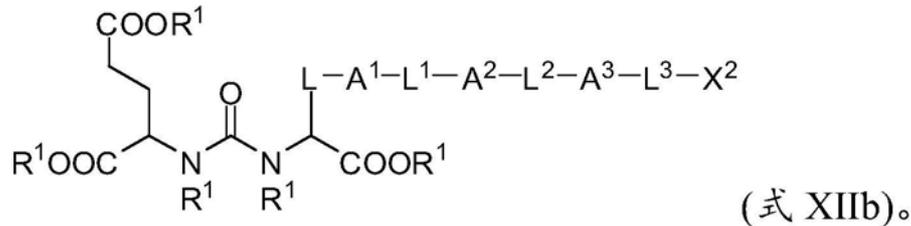
Q选自:



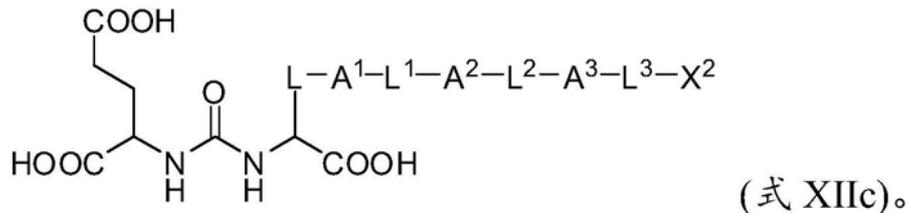
E选自:



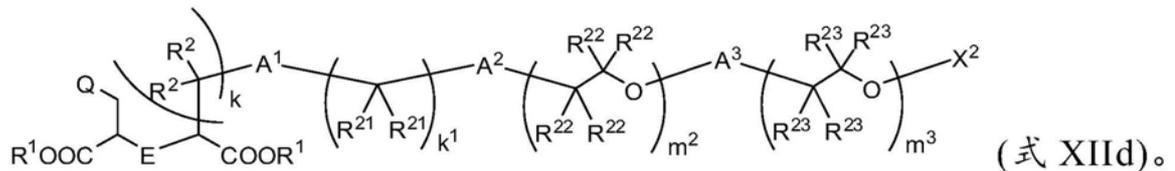
[0173] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,该化合物是式XIIb:



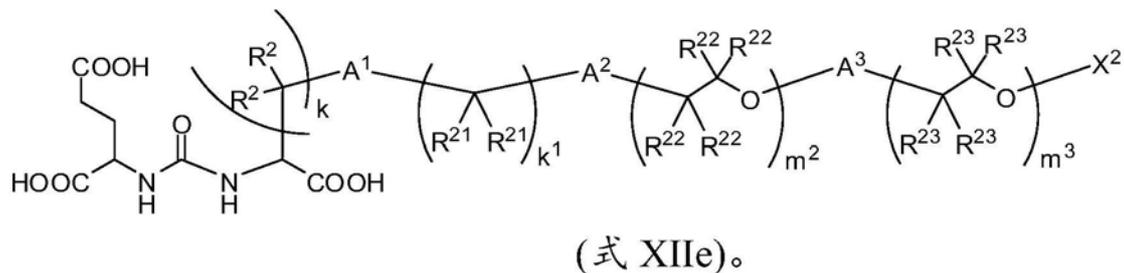
在式XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中,该化合物是式XIIc:



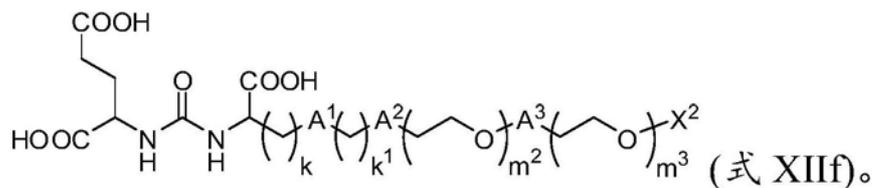
[0174] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,该化合物是式XIIId:



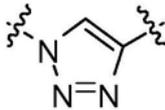
在式XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中,该化合物是式XIIe:



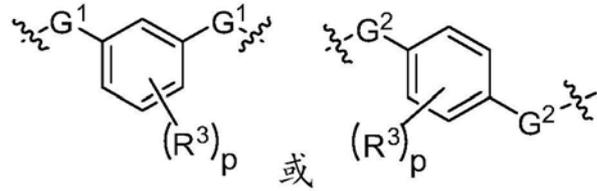
在式XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中,该化合物是式XIIIf:

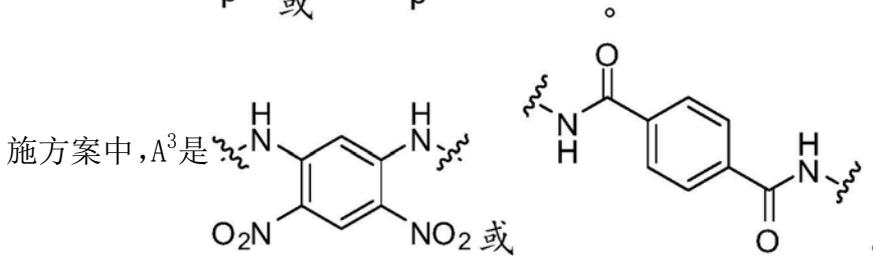


[0175] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, A¹是-C(O)N(H)-。在式XII

化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, A¹是 。

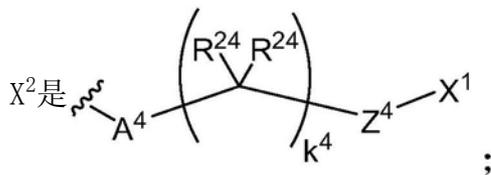
[0176] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, A³是

 在式XII化合物的以上或以下描述 的一些实

施方案中, A³是 。

[0177] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, 每个R²、R²¹、R²²、R²³和R²⁴独立地选自H、F、-CH₃或-CF₃。在式XII化合物的 以上或以下描述的一些实施方案中, 每个R²、R²¹、R²²、R²³和R²⁴是H。

[0178] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中,



其中:

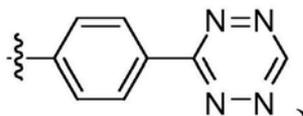
A⁴选自

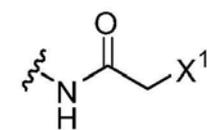
键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;

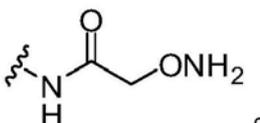
每个R²⁴独立地选自H、卤代、-OR¹、-CN、-SR¹、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

k⁴选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

Z⁴选自键、芳基和5至6元杂芳基;且

X¹是 -ONH₂、、-N₃、、-N(H)NH₂或-SH。

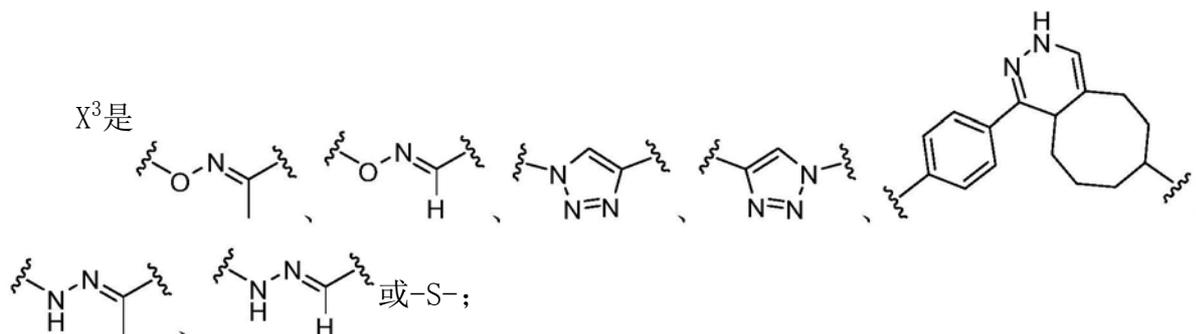
[0179] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中, X²是  在式

XII化合物的以上或以下描述的进一步的实施方案中, X²是 。

基烷基；

k^4 选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10；

Z^4 选自键、芳基和5至6元杂芳基；且



X是修饰的治疗性肽、蛋白质或抗体；

L^4 是直接衔接至修饰的氨基酸的键或与修饰的氨基酸结合的连接体，其中该修饰的氨基酸是X的一部分。

在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中，该氨基酸是非天然氨基酸。

[0182] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， k 为1、2或3；且 Z 是键。

[0183] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^1 是 $-C(O)N(R^1)-$ 、6元芳基或5元杂芳基。

[0184] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， m^1 为0； k^1 为6或7；且 Z^1 是键。

[0185] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是键； m^2 和 k^2 为0；且 Z^2 是键。

[0186] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是 $-C(O)N(H)-$ ； m^2 为2； k^2 为2；且 Z^2 是键。在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是 $-C(O)N(H)-$ ； m^2 为3； k^2 为2；且 Z^2 是键。在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^2 是 $-C(O)N(H)-$ ； m^2 为10； k^2 为2；且 Z^2 是键。

[0187] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， R^3 是 $-NO_2$ ；且 p 为2。

[0188] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中，每个 GX^1 和 GX^2 独立地选自 $-N(H)-$ 、 $-C(O)N(H)-$ 和 $-N(H)C(O)-$ 。

[0189] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， m^3 为3； k^3 为2；且 Z^3 是键。在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， m^3 为2； k^3 为2；且 Z^3 是键。

[0190] 在式XII化合物的以上或以下描述的一些实施方案中， A^3 是键； m^3 和 k^3 为0；且 Z^3 是键。

III. 非天然氨基酸

[0191] 本文公开的靶向剂抗体偶联物可包含一个或多个非天然氨基酸。如本文所用，术语“非天然氨基酸”和“非天然的氨基酸”指的是天然存在或化学合成的非蛋白原氨基酸。本文公开的靶向剂抗体偶联物可包含X，其中X包含一个或多个非天然氨基酸。本文公开的靶向剂抗体偶联物可包含Y，其中Y包含一个或多个非天然氨基酸。本文公开的抗体可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个非天然氨基酸。非天然氨基酸可与连接体反应以产生化学键。

[0192] 一个或多个非天然氨基酸可并入抗体(例如,式I、IA、II和IIA的抗体);中间体(例如,式III、IIIA、IV、IVA的中间体);X抗体或抗体片段;Y(例如肽);或其组合。一个或多个非天然氨基酸可位点特异性地并入抗体(例如,式I、IA、II和IIA的抗体);中间体(例如,式III、IIIA、IV、IVA的中间体);X抗体或抗体片段;Y肽;或其组合。一个或多个非天然氨基酸可并入抗体(例如,式I、IA、II和IIA的抗体)的抗体片段;中间体(例如,式III、IIIA、IV、IVA的中间体);X抗体或抗体片段;Y肽;或其组合。

[0193] 一个或多个非天然氨基酸可并入抗体(例如,式I、IA、II和IIA的抗体)重链、轻链、可变区、恒定区、Fab片段;中间体(例如,式III、IIIA、IV、IVA的中间体);X抗体或抗体片段;Y肽;或其组合。

[0194] 一个或多个非天然氨基酸可插入抗体或抗体片段中的两个天然存在的氨基酸之间。一个或多个非天然氨基酸可代替抗体或抗体片段中的一个或多个天然存在的氨基酸。一个或多个非天然氨基酸可在抗体或抗体片段的N末端并入。一个或多个非天然氨基酸可在抗体或抗体片段的C末端并入。非天然氨基酸可在抗体或抗体片段的结合区的远端并入。非天然氨基酸可在抗体或抗体片段的结合区的附近并入。非天然氨基酸可在抗体或抗体片段的结合区并入。

[0195] 一个或多个非天然氨基酸可插入靶向剂中两个天然存在的氨基酸之间。一个或多个非天然氨基酸可代替靶向剂中的一个或多个天然存在的氨基酸。一个或多个非天然氨基酸可在靶向剂的N末端并入。一个或多个非天然氨基酸可在靶向剂的C末端并入。非天然氨基酸可在靶向剂的结合区的远端并入。非天然氨基酸可在靶向剂的结合区的附近并入。非天然氨基酸可在靶向剂的结合区并入。

[0196] 一个或多个非天然氨基酸可由密码子编码,该密码子不编码十二个天然氨基酸中的一个。一个或多个非天然氨基酸可由无义密码子(终止密码子)编码。终止密码子可以是琥珀密码子。琥珀密码子可以包含UAG序列。终止密码子可以是赭石密码子。赭石密码子可以包含UAA序列。终止密码子可以是乳白密码子或棕土密码子。乳白密码子或棕土密码子可以包含UGA序列。一个或多个非天然氨基酸可由四碱基密码子编码。

[0197] 一个或多个非天然氨基酸可以是对乙酰苯丙氨酸(pAcF或pAcPhe)。一个或多个非天然氨基酸可以是硒代胱氨酸。一个或多个非天然氨基酸可以是对氟苯丙氨酸(pFPhe)。一个或多个非天然氨基酸可选自以下基团,包括对叠氮基苯丙氨酸(pAzF)、对苯甲酰苯丙氨酸(pBpF)、对炔丙基氧苯丙氨酸(pPrF)、对碘苯丙氨酸(pIF)、对氰基苯丙氨酸(pCNF)中、对羧基甲基苯丙氨酸(pCmF)、3-(2-萘基)丙氨酸(NapA)、对二羟硼基苯丙氨酸(pBoF)、邻硝基苯丙氨酸(oNiF)、(8-羟基喹啉-3-基)丙氨酸(HQA)、硒代半胱氨酸和(2,2'-二吡啶-5-基)丙氨酸(BipyA)。

[0198] 一个或多个非天然氨基酸可以是 β -氨基酸(β 3和 β 2)、高氨基酸、脯氨酸和丙酮酸衍生物、3-取代丙氨酸衍生物、甘氨酸衍生物、环取代苯丙氨酸和酪氨酸衍生物、线形核心氨基酸、二氨酸、D-氨基酸、N-甲基氨基酸或其组合。

[0199] 非天然氨基酸的附加实例包括但不限于,1)各种取代的酪氨酸和苯丙氨酸类似物诸如邻甲基-L-酪氨酸、对氨基-L-苯丙氨酸、3-硝基-L-酪氨酸、对硝基-L-苯丙氨酸、间甲氧基-L-苯丙氨酸和对异丙基-L-苯丙氨酸;2)具有可光交联的芳基叠氮和二苯甲酮基团的氨基酸;3)具有独特化学反应性的氨基酸,包括乙酰基-L-苯丙氨酸和间乙酰基-L-苯

丙氨酸、邻烯丙基-L-酪氨酸、邻-(2-丙炔基)-L-酪氨酸、对-乙基硫代羰基-L-苯丙氨酸和对-(3-氧代丁酰基)-L-苯丙氨酸;4)用于在X射线晶体学中定相的含重原子的氨基酸,包括对碘和对溴-L-苯丙氨酸;5)氧化还原活性的氨基酸二羟基-L-苯丙氨酸;6)糖基化的氨基酸,包括 β -N-乙酰葡萄糖胺-邻-丝氨酸和 α -N-乙酰半乳糖胺-邻-苏氨酸;7)具有萘基、丹酰和7-氨基香豆素侧链的荧光氨基酸;8)具有偶氮苯和硝基苄基Cys、Ser和Tyr侧链的可光裂解和可光异构化的氨基酸;9)磷酸酪氨酸模拟物对羧甲基-L-苯丙氨酸;10)谷氨酰胺同系物高谷氨酰胺;以及11)2-氨基辛酸。非天然氨基酸可进行修饰以将化学基团并入。非天然氨基酸可进行修饰以将含酮基团并入。

[0200] 一个或多个非天然氨基酸可包含至少一个脞基、羰基、二羰基、羟胺基团或其组合。一个或多个非天然氨基酸可包含至少一个羰基、二羰基、烷氧基胺、肼、无环烯烃、五环炔烃、环辛炔、芳基/烷基叠氮、降冰片烯、环丙烯、反式环辛烯或四嗪官能团或其组合。

[0201] 一个或多个非天然氨基酸可通过本领域已知的方法并入X和/或Y。基于细胞的或无细胞的系统可用来改变X和/或Y的基因序列,从而产生具有一个或多个非天然氨基酸的X和/或Y。营养缺陷型菌株可代替工程化的tRNA和合成酶而使用。一个或多个非天然氨基酸可通过一个或多个天然氨基酸的选择性反应而产生。选择性反应可通过一种或多种酶来介导。在一个非限制性的实例中,具有甲酰甘氨酸生成酶(FGE)的一个或多个半胱氨酸的选择性反应可产生一个或多个甲酰甘氨酸,如描述在Rabuka等人,Nature Protocols 7:1052-1067(2012)。

[0202] 一个或多个非天然氨基酸可参与化学反应以形成连接体。形成连接体的化学反应可以是生物正交反应。形成连接体的化学反应可以是点击化学。

[0203] 附加的非天然氨基酸公开在Liu等人(Annu Rev Biochem, 79:413-44,2010)、Wang等人(Angew Chem Int Ed,44:34-66,2005)和PCT申请号PCT/US2012/039472、PCT/US2012/039468、PCT/US2007/088009、PCT/US2009/058668、PCT/US2007/089142、PCT/US2007/088011、PCT/US2007/001485、PCT/US2006/049397、PCT/US2006/047822和PCT/US2006/044682,这些均通过引用它们的全文而并入本文。

IV. 靶向剂抗体偶联物组合物

[0204] 本文公开了组合物,其包含一个或多个本文公开的靶向剂抗体偶联物。该组合物可包含靶向剂抗体偶联物,其包含(a)包含一个或多个非天然氨基酸的抗体或抗体片段;(b)一个或多个连接体;以及(c)靶向剂,其中一个或多个连接体将抗体或抗体片段与靶向剂连接。一个或多个连接体将抗体或抗体片段与靶向剂经位点特异性地连接。抗体或抗体片段可包含一个或多个非天然氨基酸。靶向剂抗体偶联物可包含四个或更多个非天然氨基酸。该组合物可进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。该组合物可进一步包含一种或多种溶剂或稀释剂。该组合物可进一步包含一种或多种药物载体。

[0205] 该组合物可包含式I的靶向剂抗体偶联物:X-L1-Y,其中(i)X包含抗体或抗体片段;(ii)L1包含一个或多个连接体;以及(iii)Y包含靶向剂。抗体或抗体片段和靶向剂可通过一个或多个连接体经位点特异性地连接。抗体、抗体片段和/或靶向剂可包括一个或多个非天然氨基酸。抗体或抗体片段和靶向剂可在一个或多个非天然氨基酸的位点进行连接。该组合物可进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。该组合物可进一步包含一种或多种溶剂或稀释剂。该组合物可进一步包含一种或多种药物载体。

[0206] 该组合物可包含式IA的靶向剂抗体偶联物:Y-L¹-X,其中(i) X包含抗体或抗体片段;(ii) L¹包含一个或多个连接体;以及(iii) Y 包含靶向剂。抗体或抗体片段和靶向剂可通过一个或多个连接体经位点 特异性地连接。抗体、抗体片段和/或靶向剂可包括一个或多个非天然氨基酸。抗体或抗体片段和靶向剂可在一个或多个非天然氨基酸的位点进行连接。该组合物可进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。该组合物可进一步包含一种或多种溶剂或稀释剂。该组合物可进一步包含 一种或多种药物载体。

[0207] 该组合物可包含式II的靶向剂抗体偶联物:X-L¹-L²-Y,其中(i) X包含抗体或抗体片段;(ii) L¹和L²包括一个或多个连接体;以及(iii) Y包含靶向剂。抗体或抗体片段和靶向剂可通过一个或多个连接体经位点 特异性地连接。抗体、抗体片段和/或靶向剂可包括一个或多个非天然氨基酸。抗体或抗体片段和靶向剂可在一个或多个非天然氨基酸的位点进行连接。该组合物可进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。该组合物可进一步包含一种或多种溶剂或稀释剂。该组合物可进一步包含 一种或多种药物载体。

[0208] 该组合物可包含式IIA的靶向剂抗体偶联物:Y-L²-L¹-X,其中(i) X包含抗体或抗体片段;(ii) L¹和L²包括一个或多个连接体;以及(iii) Y包含靶向剂。抗体或抗体片段和靶向剂可通过一个或多个连接体经位点 特异性地连接。抗体、抗体片段和/或靶向剂可包括一个或多个非天然氨基酸。抗体或抗体片段和靶向剂可在一个或多个非天然氨基酸的位点进行连接。该组合物可进一步包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。该组合物可进一步包含一种或多种溶剂或稀释剂。该组合物可进一步包含 一种或多种药物载体。

[0209] 如本文所用的术语“药学上可接受的”指的是不废除本文所述试剂的生物活性或特性的材料,并且是相对无毒的(即,材料的毒性明显超过材料的益处)。在一些情况下,可向个体施用药学上可接受的材料而不引起明显的不期望的生物效应或以有害的方式明显干扰该组合物中含有 的任何组分。

[0210] 本文的药物组合物可使用一种或多种生理上可接受的载体进行配制,该载体包含促进活性剂进入药学上使用的制剂的过程的赋形剂和助剂。适当的配制依赖于所选的施用途径。例如,药物组合物的概要发现于Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Nineteenth Ed(Easton, Pa.:Mack Publishing Company,1995);Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton, Pennsylvania 1975; Liberman,H.A.and Lachman,L.,Eds.,Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;和Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,Seventh Ed.(Lippincott Williams&Wilkins,1999)。

[0211] 本文公开的药物组合物可进一步包含药学上可接受的稀释剂(多个)、赋形剂(多个)或载体(多个)。该药物组合物可包含医药或药物剂、载体、佐剂诸如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶解促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。此外,该药物组合物还含有其他在治疗上有价值的物质。

[0212] 可通过任何适合的给药途径向受试者施用本文公开的药物组合物,给药途径包括但不限于,肠胃外(静脉内、皮下、腹膜内、肌内、血管内、鞘内、玻璃体内、输注或局部)、局部、口服或鼻腔粘膜给药。合适的给药途径可包括显微针装置。

[0213] 适合于肌内、皮下、瘤周或静脉内注射的制剂可包括生理上可接受的无菌水性或非水性溶液、胶体溶液、悬浮液或乳液以及用于重建无菌可注射的溶液或胶体溶液的无菌

粉末。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介物的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、克列莫佛等),它们合适的混合物、植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。例如,通过使用涂料诸如卵磷脂、通过在胶体溶液的情况下保持所需颗粒大小和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。适合于皮下注射的制剂还含有任选的添加剂诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0214] 对于静脉内注射,活性剂可任选地在水性溶液中配制,优选地在生理上相容的缓冲剂中,诸如Hank溶液(Hank's solution)、Ringer溶液(Ringer's solution)或生理盐水缓冲剂。

[0215] 肠胃外注射任选包括推注注射或连续的输注。用于注射的制剂任选地以单位剂型例如在安瓿中或在具有添加的防腐剂的多剂量容器中存在。本文公开的药物组合物可以是作为油性或水性媒介物中的无菌悬浮液、溶液或乳液适合于肠胃外注射的形式,并且含有配制剂诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于肠胃外给药的药物制剂包括水溶性形式的活性剂的水性溶液。此外,悬浮液作为合适的油性注射悬浮液任选地制备。

[0216] 本文所述的药物组合物可以是适合于精确剂量的单次给药的单位剂型。在单位剂型中,该制剂可被分成含有适当量的本文公开的活性剂的单位剂量。单位剂型可以是含有独立量的制剂的包装形式。非限制性实例是包装的片剂或胶囊以及小瓶或安瓿中的粉末。水性悬浮液组合物可包装在单次剂量的不可再封闭的容器中。或者,可使用多剂量可再封闭的容器,在这种情况下通常在组合物中包括防腐剂。仅举例而言,用于肠胃外注射的制剂以单位剂型存在,单位剂型包括但不限于安瓿,或在具有添加的防腐剂的多剂量容器中。

[0217] 药物组合物可以以约0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、约1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4 mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg或约3.0 mg/kg的剂量施用。药物组合物可以以约3.5mg/kg、4.0mg/kg、4.5mg/kg、5.0mg/kg、6.0mg/kg、7.0mg/kg、8.0mg/kg、9.0mg/kg或约10mg/kg的剂量施用。

[0218] 药物组合物可以每日一次、每日两次、每日三次或更多次地施用。药物组合物可以每周一次、每周两次、每周三次或更多次地施用。药物组合物可以两周施用一次。药物组合物可以每月施用一次。药物组合物可以按需要施用。

[0219] 药物组合物可以与治疗处理一起共同施用。治疗处理可包括抗炎治疗。抗炎治疗可包括类固醇。抗炎治疗可包括非类固醇。治疗处理可包括抗生素。治疗处理可包括抗病毒药物。治疗处理可包括化学疗法。治疗处理可包括放射。治疗处理可包括双特异性抗体。治疗处理可包括附加的靶向剂抗体偶联物。

V. 靶向剂抗体偶联物的产生方法

本文公开了产生式I的靶向剂抗体偶联物的方法: $X-L1-Y$ 或式IA: $Y-L1-X$ 。该方法可包括将一个或多个连接体与Y偶联,其中Y包含靶向剂,以产生中间体Y-L1或L1-Y;并将中间体与X结合,其中X包含抗体或抗体片段的至少一部分,从而产生靶向剂抗体偶联物。该方法可进一步包括将中间体与X和/或Y经位点特异性地结合。该方法可进一步包括将一个或多个非天然氨基酸并入X和/或Y。

或者,该方法可包括将一个或多个连接体与抗体或抗体片段偶联以产生中间体X-L1或L1X;并将中间体与Y偶联,其中Y包含靶向剂,从而产生靶向剂抗体偶联物。将中间体X-L1或L1X与靶向剂偶联可包括形成肽。形成肽可能需要酸性条件。该方法可进一步包括将中间体与X和/或Y经位点特异性地偶联。该方法可进一步包括将一个或多个非天然氨基酸并入X和/或Y。

[0220] 本文进一步公开了产生式II:X-L1-L2-Y的靶向剂抗体偶联物的方法,包括(a)将一个或多个非天然氨基酸并入X和/或Y,其中(i) X包含抗体或抗体片段的至少一部分;以及(ii) Y包含肽或蛋白质的至少一部分;(b)将L1与X偶联以产生式III:X-L1并将L2与Y偶联以产生式IV:L2-Y的第二中间体;以及(c)将式III的第一中间体与式IV的第二中间体连接,从而产生式II的靶向剂抗体偶联物。

[0221] 产生靶向剂抗体偶联物的方法可进一步包括将编码抗体或抗体片段的核酸工程化。该方法可进一步包括将无义密码子并入核酸。无义密码子可以是琥珀密码子。该方法可进一步包括将非天然氨基酸经位点特异性地并入核酸。该方法可进一步包括在无义密码子处将非天然氨基酸并入核酸。该方法可进一步包括表达细胞中的核酸。该方法可进一步包括共表达正交tRNA/酪氨酰-tRNA合成酶对。正交tRNA/酪氨酰-tRNA合成酶对可选择性地响应于无义密码子而将非天然氨基酸并入。

VA. 非天然氨基酸的并入

[0222] 将一个或多个非天然氨基酸并入抗体或抗体片段可以包括修饰抗体或抗体片段中的一个或多个氨基酸残基。修饰抗体或抗体片段中的一个或多个氨基酸残基可包括使编码靶向剂的核苷酸序列中的一个或多个核苷酸突变。使编码靶向剂的核苷酸序列中的一个或多个核苷酸突变可包括使编码氨基酸的密码子改变为无义密码子。

[0223] 将一个或多个非天然氨基酸并入抗体或抗体片段可以包括修饰抗体或抗体片段中的一个或多个氨基酸残基以产生抗体或抗体片段中的一个或多个琥珀密码子。

[0224] 一个或多个非天然氨基酸可响应于琥珀密码子而并入抗体或抗体片段。一个或多个非天然氨基酸可位点特异性地并入抗体或抗体片段。

[0225] 将一个或多个非天然氨基酸并入抗体或抗体片段可以包括使用相对于典型二十个氨基酸具有正交化学反应性的一个或多个遗传编码的非天然氨基酸,以位点特异性地修饰靶向剂。将一个或多个非天然氨基酸并入可包括使用进化的tRNA/氨酰基-tRNA合成酶对,以响应于一个或多个琥珀无义密码子而位点特异性地在靶向剂中的限定位点处将一个或多个非天然氨基酸并入。

[0226] 将一个或多个非天然氨基酸并入靶向剂可包括修饰靶向剂中的一个或多个氨基酸残基。修饰靶向剂中的一个或多个氨基酸残基可包括使编码靶向剂的核苷酸序列中的一个或多个核苷酸突变。使编码靶向剂的核苷酸序列中的一个或多个核苷酸突变可包括使编码氨基酸的密码子改变为无义密码子。

[0227] 将一个或多个非天然氨基酸并入靶向剂可包括修饰靶向剂中的一个或多个氨基酸残基以产生靶向剂中的一个或多个琥珀密码子。

[0228] 一个或多个非天然氨基酸可响应于琥珀密码子而并入靶向剂。一个或多个非天然氨基酸可位点特异性地并入靶向剂。

[0229] 将一个或多个非天然氨基酸并入靶向剂可包括使用相对于典型二十个氨基酸具

有正交化学反应性的一个或多个遗传编码的非天然氨基酸，以位点特异性地修饰靶向剂。将一个或多个非天然氨基酸并入可包括使用进化的tRNA/氨酰基-tRNA合成酶对，以响应于一个或多个琥珀无义密码子而位点特异性地在靶向剂中的限定位点处将一个或多个非天然氨基酸并入。

[0230] 用于将非天然氨基酸并入的附加方法包括但不限于公开在 Chatterjee等人 (A Versatile Platform for Single-and Multiple-Unnatural Amino Acid Mutagenesis in Escherichia coli, *Biochemistry*, 2013), Kazane 等人 (*J Am Chem Soc*, 135(1):340-6, 2013), Kim等人 (*J Am Chem Soc*, 134(24):9918-21, 2012), Johnson等人 (*Nat Chem Biol*, 7(11):779-86, 2011) and Hutchins等人 (*J Mol Biol*, 406(4):595-603, 2011) 中的方法。

VB. 连接体的偶联

[0231] 本文公开的方法可包括将一个或多个连接体与一个或多个抗体、抗体片段、靶向剂或其组合偶联，以产生一个或多个中间体诸如抗体-连接体中间体、抗体片段-连接体中间体和/或靶向剂抗体偶联物-连接体中间体。该方法可包括将第一连接体与抗体或抗体片段偶联，以产生抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体。该方法可包括将连接体与靶向剂偶联，以产生靶向剂-连接体中间体。

[0232] 一个或多个连接体与抗体、抗体片段或靶向剂的偶联可同时发生。一个或多个连接体与抗体、抗体片段或靶向剂的偶联可顺序发生。一个或多个连接体与抗体、抗体片段或靶向剂的偶联可发生在单一反应体积中。一个或多个连接体与抗体、抗体片段或靶向剂的偶联可发生在两个或更多个反应体积中。

[0233] 将一个或多个连接体与抗体、抗体片段和/或靶向分子偶联可包括在连接体与抗体、抗体片段或靶向分子之间形成一个或多个脰。将一个或多个连接体与抗体、抗体片段和/或靶向剂偶联可包括在连接体与抗体、抗体片段或靶向剂之间形成一个或多个稳定的键。将一个或多个连接体与抗体、抗体片段和/或靶向剂偶联可包括在连接体与抗体、抗体片段或靶向剂之间形成一个或多个共价键。将一个或多个连接体与抗体、抗体片段和/或靶向剂偶联可包括在连接体与抗体、抗体片段或靶向剂之间形成一个或多个非共价键。将一个或多个连接体与抗体、抗体片段和/或配体偶联可包括在连接体与抗体、抗体片段或靶向剂之间形成一个或多个离子键。

[0234] 将一个或多个连接体与抗体或抗体片段偶联可包括将一个或多个连接体与抗体或抗体片段经位点特异性地偶联。位点特异性的偶联可包括将一个或多个连接体与抗体或抗体片段的非天然氨基酸连接。将一个或多个连接体与抗体或抗体片段的非天然氨基酸连接可包括脰的形成。将一个或多个连接体与抗体或抗体片段的非天然氨基酸连接可包括，举非限制性的实例来说，使一个或多个连接体的羟胺与氨基酸的醛或酮反应。<http://en.wikipedia.org/wiki/Ketone>该氨基酸可以是非天然氨基酸。

VC. 连接抗体、抗体片段和/或靶向剂

[0235] 该方法可包括连接抗体、抗体片段、靶向剂或其中间体以产生靶向剂抗体偶联物，其包含 (a) 包含抗体或抗体片段；(b) 一个或多个连接体；以及 (c) 靶向剂，其中一个或多个连接体将第一抗体或抗体片段与靶向剂连接。该方法可进一步包括将一个或多个连接体与靶向剂结合以产生靶向剂-连接体中间体 (Y-L1或L1-Y) 并将靶向剂-连接体中间体

与抗体或抗体片段偶联。该方法可进一步包括将一个或多个连接体与抗体或抗体片段结合以产生抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L1或L1-X) 并将抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体与靶向剂偶联。将中间体与抗体、抗体片段或靶向剂偶联可包括胍的形成。将中间体与抗体、抗体片段或靶向剂偶联可包括在酸性溶液中胍的形成。将中间体与抗体、抗体片段或靶向剂偶联可包括在微酸性溶液中胍的形成。将中间体与抗体、抗体片段或靶向剂偶联可包括在微中性溶液中胍的形成。抗体或抗体片段可包含非天然氨基酸。将抗体或抗体片段与靶向剂-连接体中间体连接可包括在非天然氨基酸与靶向剂-连接体中间体之间形成胍。靶向剂可包含非天然氨基酸。将靶向剂和抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体连接可包括在非天然氨基酸与抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体之间形成胍。

产生靶向剂抗体偶联物的方法可包括 (a) 将第一连接体 (L1) 与抗体或抗体片段结合以产生抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L1或L1-X); (b) 将第二连接体 (L2) 与靶向剂偶联以产生靶向剂-连接体中间体 (Y-L2或L2-Y); 以及 (c) 将两个中间体连接在一起以产生靶向剂抗体偶联物, X-L1-L2-Y或Y-L2-L-X。将连接体与抗体、抗体片段或靶向剂偶联可包括在连接体与抗体、抗体片段或靶向剂之间产生离子键、共价键、非共价键或其组合。将连接体与抗体、抗体片段或靶向剂偶联可如Roberts等人, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476 (2002) 中所述进行。L1和/或L2可包括选自以下的连接体: 双官能团连接体、可裂解连接体、不可裂解连接体、乙二醇连接体、双官能团乙二醇连接体、可弯曲连接体或不可弯曲连接体。L1和/或L2可包括选自以下的连接体: 环辛炔、环丙烯、芳基/烷基叠氮、反式环辛烯、降冰片烯和四嗪。L1的末端和/或L2的末端可包括烷氧基胺。L1的末端和/或L2的末端可包括叠氮或环辛炔基团。X可通过选自环辛炔、环丙烯、芳基/烷基叠氮、反式环辛烯、降冰片烯和四嗪的化学基团与L1偶联。将抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L¹或L¹-X) 与靶向剂-连接体中间体 (Y-L2或L2-Y) 连接可包括进行一个或多个无铜的反应。将抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L1或L1-X) 与靶向剂-连接体中间体 (Y-L2或L2-Y) 连接可包括进行一个或多个含铜的反应。将抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L1或L1-X) 与靶向剂-连接体中间体 (Y-L2或L2-Y) 连接可包括一个或多个环加成。将抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L1或L1-X) 与靶向剂-连接体中间体 (Y-L2或L2-Y) 连接可包括一个或多个Huisgen-环加成。将抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L1或L1-X) 与靶向剂-连接体中间体 (Y-L2或L2-Y) 连接可包括一个或多个Diels Alder反应。将抗体-连接体中间体或抗体片段-连接体中间体 (X-L1或L1-X) 与靶向剂-连接体中间体 (Y-L2或L2-Y) 连接可包括一个或多个Hetero Diels Alder反应。

VD. 抗体的纯化

[0236] 该方法可进一步包括纯化靶向剂抗体偶联物, 其包含 (a) 包含一个或多个非天然氨基酸的抗体或抗体片段; (b) 靶向剂; 以及 (c) 一个或多个连接体, 其中一个或多个连接体将抗体或抗体片段与靶向剂连接。该方法可进一步包括纯化抗体、抗体片段或靶向剂的一个或多个中间体 (例如, 抗体-连接体、抗体片段-连接体或配体-连接体分子)。纯化抗体或中间体可包括去除过量的连接体、非连接的抗体、非连接的抗体片段或非连接的配体。纯化抗体或中间体可包括使用一个或多个浓缩柱、电泳、过滤、离心、色谱法或其组合。色

谱法可包括尺寸排阻色谱法。附加的色谱法包括但不限于,疏水作用色谱法、离子交换色谱法、亲和色谱法、金属结合、免疫亲和色谱法以及高效液相色谱法或高压液相色谱法。电泳可包括变性电泳或非变性电泳。

[0237] 抗体、抗体片段、靶向剂或中间体可包含一个或多个标签。连接体可包含一个或多个标签。标记可用来纯化抗体、抗体片段、靶向剂或中间体。一个或多个标记可被一种或多种蛋白酶切割。标记的实例包括但不限于,聚组氨酸、FLAG、HA、c-myc、V5、壳多糖结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。

[0238] 方法可进一步包括抗体、抗体片段、靶向剂或中间体的冻干或超速离心。

[0239] 抗体或抗体片段的纯度可等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。抗体的纯度可等于或大于85%。抗体或抗体片段的纯度可等于或大于90%。抗体或抗体片段的纯度可等于或大于95%。抗体或抗体片段的纯度可等于或大于97%。

[0240] 中间体(例如,抗体-连接体、抗体片段-连接体、靶向剂-连接体)的纯度可等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。中间体的纯度可等于或大于85%。中间体的纯度可等于或大于90%。中间体的纯度可等于或大于95%。中间体的纯度可等于或大于97%。

[0241] 靶向剂的纯度可等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。靶向剂的纯度可等于或大于85%。靶向剂的纯度可等于或大于90%。靶向剂的纯度可等于或大于95%。靶向剂的纯度可等于或大于97%。

[0242] 抗体或抗体片段的均一性可等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。抗体或抗体片段的均一性可等于或大于85%。抗体或抗体片段的均一性可等于或大于90%。抗体或抗体片段的均一性可等于或大于95%。抗体或抗体片段的均一性可等于或大于97%。

[0243] 中间体(例如,抗体-连接体、抗体片段-连接体、靶向剂-连接体)的均一性可等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。抗体的均一性可等于或大于85%。抗体的均一性可等于或大于90%。抗体的均一性可等于或大于95%。抗体的均一性可等于或大于97%。

[0244] 靶向剂的均一性可等于或大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。靶向剂的均一性可等于或大于85%。靶向剂的均一性可等于或大于90%。靶向剂的均一性可等于或大于95%。靶向剂的均一性可等于或大于97%。

VI. 细胞

[0245] 本文公开的靶向剂抗体偶联物可与一种或多种细胞上的一种或多种受体、共受体、抗原或细胞标志物结合。本文公开的靶向剂抗体偶联物可包含(a)抗体或抗体片段和(b)靶向剂,其中(i)抗体或抗体片段与第一细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用;(ii)靶向剂与第二细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用;或(iii)(i)和(ii)的组合,且其中(iv)抗体或抗体片段包含一个或多个非天然氨基酸;(v)靶向剂包含一个或多个非天然氨基酸;或(vi)(iv)和(v)的组合。第一细胞可以是

细胞毒性效应细胞。第二细胞可以是靶细胞。通常,细胞毒性效应细胞和靶细胞与靶向剂抗体偶联物构建体的结合使靶细胞与足够靠近的细胞毒性效应细胞接近对于细胞毒性效应细胞的活性,以对靶细胞起作用。例如,当细胞毒性效应细胞和靶细胞与靶向剂抗体偶联物结合时,细胞毒性效应细胞可释放与靶细胞上的细胞因子受体结合的细胞因子。

[0246] 细胞毒性效应细胞可以是细胞毒性细胞。细胞毒性细胞可以是造血细胞。造血细胞可以是巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、NK 细胞、B细胞或T细胞。造血细胞可以是T细胞。T细胞可以是细胞毒性T细胞。T细胞可以是自然杀伤T细胞。

[0247] 靶细胞可以是癌细胞。靶细胞可以是肿瘤细胞。靶细胞可以是白血病细胞。靶细胞可以是淋巴(lymphomic)细胞。靶细胞可以是转移细胞。靶细胞可进行遗传修饰。靶细胞可包含基因突变。基因突变可包含癌基因突变。基因突变可以是肿瘤抑制基因的突变。基因突变可以是原癌基因的突变。靶细胞可以是炎症细胞。靶细胞可以是感染细胞。靶细胞可以是病原细胞。

[0248] 第一细胞和第二细胞可以是同一类型的细胞。第一细胞和第二细胞可以是不同类型的细胞。或者,第一细胞和第二细胞可以是相同的细胞。靶向剂抗体偶联物可与多于两种不同的细胞类型上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用。抗体或抗体片段可与两种或更多种不同的细胞类型上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用。靶向剂可与两种或更多种不同的细胞类型上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用。不同的细胞类型可根据细胞谱系有所不同。不同的细胞类型可根据它们的功能有所不同。不同的细胞类型可根据一种或多种蛋白质的表达而有所不同。不同的细胞类型可根据它们的形态有所不同。不同的细胞类型可根据它们的位置有所不同。不同的细胞类型可根据它们的基因型有所不同。不同的细胞类型可根据单一的基因突变有所不同。不同的细胞类型可根据多于一种基因突变有所不同。

[0249] 一种或多种细胞可包括造血细胞。造血细胞包括但不限于,嗜碱性髓细胞,嗜碱性粒细胞,B细胞,爆式生成单位红细胞(BFU-E)、爆式生成单位巨核细胞(BFU-Mk)、集落形成单位嗜碱性粒细胞(CFU-Bas)、集落形成单位红细胞(CFU-E)、集落形成单位嗜酸性粒细胞(CFU-Eo)、集落形成单位粒细胞(CFU-G),集落形成单位粒细胞红细胞单核细胞巨噬细胞(CFU-GEMM)、集落形成单位粒细胞巨噬细胞(CFU-GM)、集落形成单位巨核细胞(CFU-Mk、CFU-MEG)、共同树突祖、共同淋巴祖细胞、共同myeloerythroid祖、共同髓系祖细胞、共同myelolymphoid 祖、双阴性1(DN1)细胞、DN2细胞、DN3细胞、DN4细胞、双阳性细胞(DP细胞)、嗜伊红髓细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、淋巴干细胞、淋巴相关树突细胞、巨噬细胞、肥大细胞、巨核细胞、记忆B细胞、记忆细胞、记忆T细胞、成单核细胞、单核细胞、成髓细胞、骨髓干细胞、骨髓相关树突细胞、嗜中性髓细胞、嗜中性粒细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)、自然杀伤T细胞(NKT细胞)、血小板、pro-B1-细胞、pro-B-2-细胞、pro-B-细胞、前成红细胞、前单核细胞、调节性T细胞(Tregs)、T细胞、T辅助(Th)细胞、Th0细胞、Th1细胞、Th2细胞、Th3细胞、Th17细胞。BFU-E或CFU-E可指可分化为红细胞的红细胞先体细胞。CFU-E细胞可能比BFU-E细胞更发达。CFU-Eo可指可发育为嗜酸性粒细胞的造血细胞的发育类型。CFU-G可指可能是粒细胞的前体的造血细胞的发育类型。CFU-GEMM可指造血细胞的谱系中多能类型的前体细胞,该前体细胞可分化为粒细胞、红细胞、单核细胞和/或巨噬细胞。CFU-GM可指造血细胞的谱系中多能类型的前体细胞,该前体细胞可分化为粒细胞和/或巨噬细

胞。BFU-Mk、CFU-Mk或CFU-MEG可指可分化为巨核细胞的前体细胞。CFU-Mk或CFU-MEG细胞可能比BFU-Mk 细胞更发达。

[0250] 一种或多种细胞可来自器官或组织。器官可以是腺器官。器官可以是消化或内分泌系统的器官。器官可以是内分泌腺和消化器官。器官可衍生自内胚层、外胚层、原始内胚层或中胚层。器官可以是肾上腺。在一些情况下,肾上腺包含嗜铬细胞或神经节细胞。或者,该器官是阑尾、膀胱或脑。在一些情况下,脑包含神经元(例如,神经细胞)或胶质细胞。胶质细胞包括但不限于,星形胶质细胞、少突胶质细胞和室管膜细胞。在一些情况下,该器官是耳、食管、眼或胆囊。胆囊包含胆囊收缩素。器官可以是肾。肾脏可包含肾小球壁细胞,肾小球足细胞,肾近端小管刷状缘细胞,亨利氏环(Loop of Henle)细段细胞,升支粗段细胞,肾远端小管细胞,肾集合导管细胞或间质肾细胞。在一些情况下,该器官是大肠并且该大肠可包含肠细胞、杯形细胞、凹陷丛细胞、肠内分泌细胞或神经节神经元。器官可以是肝。肝可包含实质细胞和非实质细胞。实质细胞的实例包括肝细胞。非实质细胞包括但不限于,窦状隙内皮细胞、库普弗细胞和肝星形细胞。在一些情况下,该器官是肺、口、鼻、甲状旁腺、松果腺、垂体腺、皮肤、小肠、胃、脾、胸腺、甲状腺、气管、子宫或阑尾。在一些情况下,该器官可以是心脏。在一些情况下,心脏包含心肌细胞。在一些情况下,该器官是肌肉(例如,心肌、骨骼肌、平滑肌等)。肌肉可包含肌细胞。

[0251] 在一些情况下,该细胞来自组织。该组织可以是结缔组织、上皮组织、肌组织或神经组织。或者,该组织是骨、腱(统称为肌骨骼连接)、角膜、皮肤、心瓣膜或静脉。

[0252] 结缔组织可以是纤维组织并常发现于整个身体。结缔组织的实例包括但不限于,结缔组织、脂肪组织、致密纤维组织、软骨、骨、血液和淋巴。通常,结缔组织具有三种主要组分:细胞、纤维和细胞外基质,它们可嵌入体液中。成纤维细胞常常是负责产生结缔组织的细胞。纤维、细胞外基质和水一起相互作用可形成整体上柔韧的结缔组织。结缔组织可组成各种身体结构,包括关节、软骨、骨、脂肪组织、血液和淋巴组织周围的肌肉、囊和韧带中的腱和纤维的连接框架。结缔组织(CT)可分为三种亚型:胚胎CT、固有CT和特殊CT。固有CT亚型可包括规则致密CT、不规则致密CT和疏松CT。特殊CT亚型可包括软骨、骨、脂肪组织、血液、造血组织和淋巴组织。

[0253] 结缔组织通常具有不同的功能、特征和组成。结缔组织的功能可包括储存能量、保护器官、为身体提供结构框架以及连接身体组织。结缔组织的特征可在于散步整个细胞外液的细胞。在一些情况下,结缔组织可包括基质,它通常是含有糖胺聚糖和蛋白聚糖的透明、无色和粘性流体。基质可将身体水分和胶原纤维固定在细胞间隙。基质还可减慢病原体的传播。

[0254] 结缔组织可以是纤维状的并且该纤维组织可包含不同的组合物并定位于身体的特定区域。例如,胶原纤维常含有 α 多肽链并可主要定位于腱、韧带、皮肤、角膜、软骨、骨、血管、肠和椎间盘。网状纤维是纤维组织的另一实例并可定位于肝、骨髓或淋巴器官。

[0255] 然而,不是所有类型的结缔组织都是纤维状的。非纤维状结缔组织的实例是脂肪组织和血液。脂肪组织可为我们的身体提供“机械缓冲”。虽然通常在脂肪组织中没有致密胶原网络,脂肪细胞群可通过胶原纤维和胶原片保持在一起,以便保持脂肪组织压缩在适当的位置。

[0256] 上皮是可由紧密并列的细胞构成而不介入细胞间质的组织。上皮通常是无血管

的,但上皮可在血管的结缔组织的下层“生长”。结缔组织和上皮可通过基膜分离。上皮可覆盖身体的所有自由表面。上皮还可勾勒出大的内部体腔的轮廓,其中它被称为间皮。此外,血液的内表面和淋巴管可被上皮勾勒出轮廓,此处称为内皮。通常在细胞层的数量和表面层中的细胞形状的基础上对上皮进行分类。如果在上皮中仅有一层细胞,它被指定为简单的。如果有两层或更多层的细胞,它被称为复层的。表面层的细胞可按照它们的高度被描述为鳞状的(鳞样或板样)、立方形的或圆柱状的。

[0257] 不同类型的上皮组织可在体内具有专门的功能和位置。例如,假复层的圆柱状可用来从气道移除粉尘和颗粒并可具有纤毛。假复层的圆柱状可勾勒出呼吸通道的轮廓。简单的圆柱状可涉及吸收并且通常勾勒出子宫和消化管的大多数器官的轮廓。简单的立方形可涉及分泌和吸收并可定位于腺、肾小管和卵巢。简单的鳞状可起到扩散和过滤作用,并可定位于肺、毛细血管和血管的壁。复层鳞状可保护下面的细胞,并常定位于皮肤、咽喉、阴道和嘴。复层立方形可涉及保护并可排列乳腺、汗腺和胰腺的导管。分层柱状可涉及保护和分泌,并且可定位于男性尿道和输精管和咽的部分。

[0258] 肌肉组织通常是收缩组织,并且可衍生自胚胎生殖细胞的中胚层的层。肌肉细胞可含有移动经过彼此并改变细胞大小的收缩丝。它们被归类为骨骼肌、心肌或平滑肌。骨骼肌或“随意肌”可被腱(或被几处地方的腱膜)固定到骨,并用来实现骨骼运动诸如运动和维持姿势。平滑肌或“不随意肌”通常发现于器官和结构的壁,诸如食管、胃、肠、支气管、子宫、尿道、膀胱、血管和皮肤的立毛肌(其中它控制体毛的竖立)。心肌也是“不随意肌”,但结构上可更类似于骨骼肌,并且通常发现于心脏中。

[0259] 心肌和骨骼肌通常是“横纹肌的”,因为它们含有肌节并被包装为成束的高度规则的排列。虽然骨骼肌可以布置为规则的平行束,心肌通常以分枝的不规则的角度(称为闰盘)连接。横纹肌可以以短的、剧烈的爆发方式收缩或放松,而平滑肌可支持较长的,甚至近乎永久性的收缩。

[0260] 骨骼肌可分为若干亚型。I型,缓慢氧化的、慢抽搐的或“红色的”肌肉通常具有致密的毛细血管,并可富含线粒体和肌红蛋白,这给予肌肉组织其特有的红色。它可携带氧并支持有氧代谢活动。II型,快缩肌,具有三大类,IIa型、IIx型和IIb型。IIa型通常是有氧代谢的,并可富含线粒体和毛细血管和可能呈现红色。IIx型(也称为IId型),通常其中线粒体和肌红蛋白的密度较小。IIb型,其可以是厌氧的、糖酵解的、“白色的”肌肉,通常其中线粒体和肌红蛋白的密度更小。

[0261] 神经组织是组织的四大类之一。神经组织通常是神经系统、脑、脊髓、神经的主要组分,它可以调节和控制身体功能。神经组织通常由神经元和神经胶质细胞组成。神经元可以传递冲动。神经胶质细胞可有助于神经冲动的传播以及为神经元提供养分。神经组织通常由可能有多种类的神经细胞构成,所有这些神经细胞的明显特征在于,轴突或长茎类似发送动作电位信号到下一个细胞的细胞的一部分。

[0262] 神经系统的功能可包括感觉输入、整合、肌肉和腺的控制、体内平衡以及心理活动。神经组织可对刺激起反应,并且可将冲动传导至通常引起对刺激的响应的体内各个器官。神经组织(如在脑、脊髓和在整个身体有分支的外周神经)通常由称为神经元的专门的神经细胞构成。神经元容易受到刺激并且非常快速地传递冲动。神经通常包括由结缔组织结合在一起的许多神经细胞纤维(神经元)。致密结缔组织的一种鞘,神经外膜可环绕神

经。该鞘穿透神经以形成环绕神经纤维束的神经束膜。各种大小的血管中可出现在神经外膜中。包含薄层的疏松结缔组织的神经内膜环绕个体的神经纤维。

[0263] 细胞体可被细胞(血浆)膜包围,并且可具有中心的细胞核。称为尼氏体(Nissl bodies)的颗粒通常发现于细胞体内的细胞质中。在细胞体内,极细的神经原纤维可以从树突延伸到轴突。轴突通常被髓鞘包围,它形成了一个围绕轴突的发白的、非细胞的脂肪层。髓鞘的外部可以是被称为神经鞘或许旺(Schwann)细胞的鞘的细胞层。髓鞘连同神经鞘也被称为髓鞘(medullary sheath)。该髓鞘(medullary sheath)可每隔一段距离被郎飞节(nodes of Ranvier)中断。

[0264] 可以对神经元进行结构和功能上的分类。结构分类可按照从它们的细胞体延伸的突数目把神经元分组。三大神经元组通常构成了这种分类:多极(极性=端、极)、双极和单极的神经元。多极的神经元通常具有三个或更多个突。这些是在人类中最常见的神经元类型(超过99%的神经元属于这一类)并且是中枢神经系统(CNS)中主要的神经元类型。双极神经元通常是纺锤形的,在一端具有树突而在另一端具有轴突。实例可发现于眼的感光视网膜中。单极神经元通常包括感觉神经元。感觉神经元通常仅具有单一的突或纤维,它靠近细胞体分为两个主要的分支(轴突和树突)。

[0265] 细胞还可包括毛囊、毛细胞、耳毛细胞、耳毛干细胞或耳蜗细胞。毛细胞通常是听觉系统和前庭系统的感觉受体。听觉毛细胞可位于内耳的耳蜗中薄基底膜上的柯尔蒂器(organ of Corti)内。耳蜗毛细胞可有两种解剖上和功能上不同的类型:外和内毛细胞。

[0266] 一种或多种细胞可以是病原细胞。病原细胞包括但不限于,细菌、病毒、真菌和原生动物。病原体的实例可包括但不限于,本文公开的细菌、病毒、真菌和原生动物。

VII. 受体、共受体、抗原和细胞标志物

[0267] 本文公开的靶向剂抗体偶联物可与一种或多种细胞上的一种或多种受体、共受体、抗原或细胞标志物结合。本文公开的靶向剂抗体偶联物可包含(a)抗体或抗体片段和(b)靶向剂,其中(i)抗体或抗体片段与第一细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用;(ii)靶向剂与第二细胞上的受体、共受体、抗原或细胞标志物结合或相互作用;或(iii)(i)和(ii)的组合,且其中(iv)抗体或抗体片段包含一个或多个非天然氨基酸;(v)靶向剂包含一个或多个非天然氨基酸;或(vi)(iv)和(v)的组合。第一细胞和第二细胞可以是同一类型的细胞。第一细胞和第二细胞可以是不同类型的细胞。或者,第一细胞和第二细胞可以是相同的细胞。

[0268] 例如,对于式I、IA、II和/或IIA的靶向剂抗体偶联物,X包含可与受体、共受体、抗原、跨膜蛋白质或细胞标志物结合的抗体或抗体片段。或者,或此外,对于式I、IA、II和/或IIA的靶向剂抗体偶联物,Y包含可与受体结合、共受体、抗原或细胞标志物结合的靶向剂。

[0269] 受体、共受体、抗原或细胞标志物的实例可包括但不限于造血细胞、组织细胞、上皮细胞、间皮细胞、真皮细胞、内皮细胞、树突细胞、血管细胞、基质细胞、神经元、癌细胞、细菌、真菌或病毒上的受体、共受体、抗原或细胞标志物。受体、受体、抗原或细胞标志物可选自MUC16、GPNMB、Cripto、ED-8、TMEFF2、EphB2的、EphA2的、FAP、间皮素、、TAG-72、GD2、CAIX和5T4。

[0270] 受体、共受体、抗原或细胞标志物可在前列腺癌细胞上超表达。受体、共受体、抗原或细胞标志物可包括内皮素。受体、共受体、抗原或细胞标志物可以是PSMA。

[0271] 受体可以是G蛋白偶联的受体(GPCR)。受体可以是酪氨酸激酶受体。受体可以是细胞因子受体。受体可以是趋化因子受体。受体可以是生长因子受体。生长因子受体可以是表皮生长因子受体(EGFR)、血小板源性生长因子受体(PDGFR)或成纤维细胞生长因子受体(FGFR)。EGFR可以是EGFR1。EGFR可以是Her2。受体可以是胆囊收缩素B受体。受体可以是促性腺激素释放激素受体。受体可以是促生长素抑制素受体。受体可以是促生长素抑制素受体2。受体可以是胃泌素释放肽受体。受体可以是神经激肽受体。受体可以是神经激肽1受体,也称作速激肽1受体。受体可以是黑皮质素受体。受体可以是黑皮质素1受体。受体可以是神经降压肽受体。受体可以是神经肽Y受体。受体可以是整联蛋白。整联蛋白可以是av整联蛋白。整联蛋白可以是avB3整联蛋白。

[0272] 受体、共受体、抗原或细胞表面标志物可包括分化蛋白群集。该分化蛋白集群可选自CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD40、CD56、CD64、CD70、CD74、CD79、CD105、CD138、CD174、CD205、CD227、CD326、CD340,该分化蛋白包括CD38。

[0273] 跨膜蛋白质可包括糖蛋白。糖蛋白可以是C型凝集素样分子1 (CLL-1)。

[0274] 受体、共受体、抗原、跨膜蛋白质或细胞标志物可以是细胞粘附分子。细胞粘附分子可以结合细胞。细胞粘附分子可以结合细胞外基质。受体、共受体、抗原或细胞表面标志物可包括间隙连接蛋白。

[0275] 抗原可引起一个或多个抗体的产生。抗原可指可通过主要组织相容性复合体(MHC)进行结合并提交给T细胞受体的分子或分子片段。术语“抗原”还可指免疫原性。如果靠自身注入受试者,免疫原可引发适应性免疫应答。免疫原可诱导其本身的免疫应答。抗原还可指半抗原。半抗原可以是靶向剂。通常,当附接至较大的载体分子诸如蛋白质时,半抗原可引起免疫应答。抗原可以是蛋白质或多糖。抗原可包括细菌、病毒和其他微生物的一部分(例如,衣、囊、细胞壁、鞭毛、菌毛和毒素)。当与蛋白质和多糖结合时,脂质和核酸可以是抗原的。抗原可包括超抗原、T依赖性抗原和T非依赖性抗原。

[0276] 抗原可以是外源性抗原或内源性抗原。外源性抗原典型地是从外部进入身体的抗原,例如通过吸入、摄取或注射。一些抗原可以开始作为外源性抗原,而后来变为内源性的(例如,细胞内的病毒)。细胞内的抗原可在感染的细胞破坏时被再次释放回循环。内源性抗原可以在先前正常的细胞内作为正常细胞代谢或由于病毒或细胞内细菌感染的结果已经生成的抗原。

[0277] 抗原还可包括自身抗原。自身抗原可以是正常的蛋白质或蛋白质复合物(有时是DNA或RNA),其通过患有特定的自身免疫病的患者的免疫系统来识别。这些抗原在正常情况下不应该是免疫系统的靶,但是主要由于基因和环境因素,在这些患者中失去了对于这种抗原的正常免疫耐受。

[0278] 抗原可包括肿瘤抗原。肿瘤抗原或新生抗原可以由肿瘤细胞表面上的MHC I或MHC II分子显示的抗原。这些抗原有时可以由肿瘤细胞显示,而从不由正常的细胞显示。在这种情况下,它们被称为肿瘤特异性抗原(TSA),并且一般由肿瘤特异性突变产生。更常见的是由肿瘤细胞和正常细胞显示的抗原,并且它们被称为肿瘤关联抗原(TAA)。识别这些抗原的细胞毒性T淋巴细胞可以能够在肿瘤细胞增殖或转移之前摧毁它们。肿瘤抗原还可以以例如突变的受体的形式在肿瘤的表面,在这种情况下它们可被B细胞识别。

VIII. 指征

[0279] 本文公开的靶向剂抗体偶联物和组合物可用来治疗有其需要的受试者中的一种或多种疾病或病况。该方法可包括向有其需要的受试者施用靶向剂抗体偶联物。靶向剂抗体偶联物可包含 (a) 包含与第一细胞上的表面标志物相互作用的抗体或抗体片段的第一区域；和 (b) 包含与第二细胞上的表面标志物相互作用的非抗体区域的第二区域。抗体或抗体片段可包含抗-CD3抗体。非抗体区域可与第二细胞上的PSMA相互作用。非抗体区域可包括DUPA。靶向剂抗体偶联物可进一步包含一个或多个连接体。一个或多个连接体可连接第一区域和第二区域。一种或多种疾病或病况可以是癌症、病原体感染、自身免疫病、炎症性疾病或遗传病。

[0280] 在一些情况下，一种或多种疾病包括癌症。癌症可包括复发癌和/或难治性癌症。癌症的实例包括但不限于，肉瘤、癌、淋巴瘤或白血病。

[0281] 癌症可包括神经内分泌癌。癌症可包括胰腺癌。癌症可包括外分泌胰腺癌。癌症可包括甲状腺癌。甲状腺癌可包括甲状腺髓样癌。

[0282] 癌症可包括前列腺癌。前列腺癌可以是PSMA阳性前列腺癌。PSMA可高度上调并限于前列腺癌的某个阶段或全部阶段的癌细胞。癌症可包括激素难治性前列腺癌。

[0283] 癌症可包括上皮癌。癌症可以是乳腺癌。癌症可以是子宫内膜癌。癌症可以是卵巢癌。卵巢癌可包括基质卵巢癌。癌症可包括宫颈癌。

[0284] 癌症可包括皮肤癌。皮肤癌可包括新生成血管的皮肤癌。皮肤癌可包括黑色素瘤。

[0285] 癌症可包括肾癌。

[0286] 癌症可包括肺癌。肺癌可包括小细胞肺癌。肺癌可包括非小细胞肺癌。

[0287] 癌症可包括结直肠癌。癌症可包括胃癌。癌症可包括结肠癌。

[0288] 癌症可包括脑癌。癌症可包括脑瘤。癌症可包括胶质母细胞瘤。癌症可包括星形细胞瘤。

[0289] 癌症可包括血癌。血癌可包括白血病。白血病可包括髓样白血病。癌症可包括淋巴瘤。淋巴瘤可包括非霍奇金淋巴瘤。

[0290] 癌症可包括肉瘤。肉瘤可包括尤因肉瘤。

[0291] 肉瘤是骨、软骨、脂肪、肌肉、血管或其他结缔组织或支持性组织的癌症。肉瘤包括但不限于，骨癌、纤维肉瘤、软骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性血管内皮细胞瘤、恶性神经鞘瘤、双侧前庭神经鞘瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤（例如，软组织腺泡状肉瘤、血管肉瘤、叶状囊性肉瘤、皮肤纤维肉瘤、硬纤维瘤、上皮样肉瘤、骨外骨肉瘤、纤维肉瘤、血管外皮细胞瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤 (Kaposi's sarcoma)、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、神经纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤）。

[0292] 癌是在上皮细胞中开始的癌症，上皮细胞是覆盖身体表面、产生激素并构成腺的细胞。非限制性的实例而言，癌包括乳腺癌、胰腺癌、肺癌、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、肾癌、膀胱癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、卵巢癌、脑癌、阴道癌、外阴癌、子宫癌、口癌、阴茎癌、睾丸癌、食管癌、皮肤癌、输卵管癌、头颈癌、胃肠间质癌、腺癌、皮肤或眼内黑色素瘤、肛区癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、尿道癌、肾盂癌、输尿管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、垂体腺癌、中枢神经系统 (CNS) 肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脑干神经胶质瘤和脊髓轴肿瘤。在一些情况下，癌症是皮肤癌，诸如基底细胞癌、鳞状的、黑色素瘤、

非黑色素瘤或光化性(日光性)角化病。

[0293] 在一些情况下,癌症是肺癌。肺癌可开始于从气管分支以供给肺(支气管)或肺的小气囊(肺泡)的气道。肺癌包括非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌和间皮瘤。NSCLC的实例包括鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌。间皮瘤可以是肺腔和胸腔的内层(胸膜)或腹部内层(腹膜)的癌肿瘤。间皮瘤可能是由于接触石棉。癌症可以是脑癌,诸如胶质母细胞瘤。

[0294] 或者,癌症可以是中枢神经系统(CNS)肿瘤。CNS肿瘤可归类为神经胶质瘤或非神经胶质瘤。神经胶质瘤可以是恶性神经胶质瘤、高度神经胶质瘤、弥漫性内部脑桥神经胶质瘤。神经胶质瘤的实例包括星形细胞瘤、少突神经胶质瘤(或少突神经胶质瘤和星形细胞瘤元素的混合)和室管膜瘤。星形细胞瘤包括但不限于,低度星形细胞瘤、未分化的星形细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、纤维性星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤和室管膜下巨细胞星形细胞瘤。少突神经胶质瘤包括低度少突神经胶质瘤(或少星形细胞瘤)和未分化的少突神经胶质瘤。非神经胶质瘤包括脑膜瘤、垂体腺瘤、原发性CNS淋巴瘤和成髓细胞瘤。在一些情况下,癌症是脑膜瘤。

[0295] 白血病可以是急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病或慢性髓细胞白血病。附加类型的白血病包括多毛细胞白血病、慢性髓细胞单核细胞白血病和幼年性髓细胞单核细胞白血病。

[0296] 淋巴瘤是淋巴细胞癌并可从B或T淋巴细胞发展而来。淋巴瘤的两大类是先前被称为霍奇金(Hodgkin's)病的霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤的标志是Reed-Sternberg细胞的存在。非霍奇金淋巴瘤是那些不是霍奇金(Hodgkin's)淋巴瘤的所有淋巴瘤。非霍奇金淋巴瘤可以是生长缓慢性淋巴瘤和侵袭性淋巴瘤。非霍奇金淋巴瘤包括但不限于,弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜关联淋巴组织淋巴瘤(MALT)、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、纵隔大B细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦(Waldenström)巨球蛋白血症、结节边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤和淋巴瘤样肉芽肿病。

[0297] 一种或多种疾病或病况可以是病原体感染。病原体感染可由一种或多种病原体引起。在一些情况下,病原体是细菌、真菌、病毒或原生动物。

[0298] 示例性的病原体包括但不限于:博德特氏菌属(Bordetella)、疏螺旋体属(Borrelia)、布鲁氏菌属(Brucella)、弯曲杆菌属(Campylobacter)、衣原体属(Chlamydia)、嗜衣原体属(Chlamydophila)、梭菌属(Clostridium)、棒杆菌属(Corynebacterium)、肠球菌属(Enterococcus)、埃希氏菌属(Escherichia)、弗朗西斯氏菌属(Francisella)、嗜血菌属(Haemophilus)、螺杆菌属(Helicobacter)、军团菌属(Legionella)、钩端螺旋体属(Leptospira)、利斯特氏菌属(Listeria)、分支杆菌属(Mycobacterium)、枝原体属(Mycoplasma)、奈瑟氏球菌属(Neisseria)、假单胞菌属(Pseudomonas)、立克次氏体属(Rickettsia)、沙门氏菌属(Salmonella)、志贺氏菌属(Shigella)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、密螺旋体属(Treponema)、弧菌属(Vibrio)或耶尔森氏菌属(Yersinia)。在一些情况下,由病原体引起的疾病或病况是结核病,并且不均一样品包括衍生自细菌分支杆菌属结核病的外来分子和衍生自受试者的分子。在一些情况下,由细菌引起的疾病或病况是结核病、可由细菌诸

如链球菌属和假单胞菌属引起的肺炎、可由细菌 诸如志贺氏菌属、弯曲杆菌属和沙门氏菌属引起的食物传染疾病以及感 染诸如破伤风、伤寒、白喉、梅毒和麻风。疾病或病况可以是细菌性阴 道病,一种由天然存在的细菌菌群的不均衡引起的阴道疾病。或者,疾 病或病况是细菌性脑膜瘤,一种脑脊膜(例如,覆盖脑和脊髓的保护膜) 的细菌性炎症。由细菌引起的其他疾病或病况包括但不限于,细菌性肺 炎、尿路感染、细菌性胃肠炎和细菌性皮肤感染。细菌性皮肤感染的实 例包括但不限于,可由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或酿脓 链球菌(*Streptococcus pyogenes*)引起的脓疱病;由具有淋巴扩散的深 层表皮的链球菌属细菌性感染引起的丹毒;以及由正常皮肤菌群或由外 源性细菌引起的蜂窝织炎。

[0299] 病原体可以是真菌,诸如假丝酵母属(*Candida*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、隐球酵 母属(*Cryptococcus*)、组织孢浆菌属(*Histoplasma*)、肺囊虫属(*Pneumocystis*)和葡萄穗 霉属(*Stachybotrys*)。由真菌引起的 疾病或病况的实例包括但不限于,股癣、酵母菌感染、 癣菌病和足癣。

[0300] 病原体可以是病毒。病毒的实例包括但不限于,腺病毒 (*adenovirus*)、柯赛基病 毒群(*coxsackievirus*)、EB病毒(*Epstein-Barr virus*)、肝炎(例如,甲型、乙型和丙型肝炎) 病毒(*Hepatitis virus*)、单纯疱疹病毒(1和2型)、巨细胞病毒(*cytomegalovirus*)、疱 疹病毒属 (*herpes virus*)、HIV、流感病毒属(*influenza virus*)、麻疹病毒(*measles virus*)、腮腺炎病毒(*mumps virus*)、乳头瘤病毒属(*papillomavirus*)、副流感病毒 (*parainfluenza virus*)、脊髓灰质炎病毒(*poliovirus*)、人呼 吸道合胞病毒 (*respiratory syncytial virus*)、风疹病毒(*rubella virus*)和 水痘-带状疱疹病毒 (*rubella virus*)。由病毒引起的疾病或病况的实例包 括但不限于,感冒、流感、肝炎、 AIDS、水痘、风疹、流行性腮腺炎、麻疹、疣和脊髓灰质炎。

[0301] 病原体可以是原生动物,诸如棘变形虫属(*Acanthamoeba*) (例如, 星棘变形虫 (*A. astronyxis*)、卡氏棘变形虫(*A. castellanii*)、*A. culbertsoni*、*A. hatchetti*、 *A. polyphaga*、*A. rhyodes*、*A. healyi*、*A. divionensis*)、*Brachiola*(例如,*B. connori*、 *B. vesicularum*)、隐孢子虫属(*Cryptosporidium*) (例如,小隐孢子虫(*C. parvum*))、环孢子 虫属(*Cyclospora*) (例如, *C. cayetanensis*)、脑胞内原虫属(*Encephalitozoon*) (例如,家 兔脑胞内 原虫(*E. cuniculi*)、脑炎微孢子虫(*E. hellem*)、肠脑炎微孢子虫(*E. intestinalis*))、内变形虫属(*Entamoeba*) (例如,痢疾内变形虫(*E. histolytica*))、肠孢 虫属(例如,*E. bieneusi*)、贾第虫属(*Giardia*) (例 如,表吮贾第虫(*G. lamblia*))、等孢球虫 属(*Isospora*) (例如,贝氏等 孢球虫(*I. belli*))、微孢子虫属(*Microsporidium*) (例如, *M. africanum*、*M. ceylonensis*)、纳归虫属(*Naegleria*) (例如,福氏纳归虫(*N. fowleri*))、 微粒子虫属(*Nosema*) (例如,海藻小孢子虫(*N. algerae*)、*N. ocularum*)、具褶孢虫属 (*Pleistophora*)、*Trachipleistophora*(例如,*T. anthropophthera*、*T. hominis*)和角膜微 孢子(*Vittaforma*) (例如,*V. corneae*)。

[0302] 疾病或病况可以是自身免疫病或自身免疫相关疾病。自身免疫性 疾病可能是身 体免疫系统的功能障碍,它引起身体攻击自身的组织。自 身免疫病和自身免疫相关的疾病的 实例包括但不限于,艾迪生病 (*Addison's disease*)、斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合 征(APS)、自 身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免

疫性心肌炎、贝赫切特病 (Behcet's disease)、口炎性腹泻、克罗恩病 (Crohn's disease)、皮炎、嗜酸性筋膜炎、结节性红斑、巨细胞动脉炎 (颞动脉炎)、古德帕斯丘综合征 (Goodpasture's syndrome)、格雷夫斯病 (Graves' disease)、桥本病 (Hashimoto's disease)、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA肾病、幼年性关节炎、糖尿病、幼年型糖尿病、川崎综合征、兰伯特-伊顿综合征、狼疮 (SLE)、混合性结缔组织病 (MCTD)、多发性硬化、重症肌无力、天疱疮、结节性多动脉炎、I、II和III型自身免疫多腺性综合征、风湿性多肌痛、多肌炎、银屑病、银屑病关节炎、赖特尔综合征 (Reiter's syndrome)、复发性多关节炎、类风湿关节炎、结节病、硬皮病、舍格伦综合征、精子和睾丸自身免疫、僵人综合征、高安动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。

[0303] 疾病或病况可以是炎性疾病。炎性疾病的实例包括、但不限于、肺泡炎、淀粉样变、血管炎、强直性脊柱炎、缺血性坏死、巴泽多病 (Basedow's disease)、贝尔麻痹 (Bell's palsy)、滑囊炎、腕管综合征、乳糜泻、胆管炎、髌骨软骨软化、慢性活动性肝炎、慢性疲劳综合征、科根综合征 (Cogan's syndrome)、先天性髋关节发育不良、肋软骨炎、克罗恩病、囊性纤维化病、德·奎尔万腱炎、糖尿病相关的关节炎、弥漫性特发性骨质增生、盘状狼疮、埃-当综合征 (Ehlers-Danlos syndrome)、家族性地中海热、筋膜炎、纤维织炎/纤维肌痛、冷冻肩、腱鞘囊肿、巨细胞动脉炎、痛风、格雷夫斯病、HIV相关的风湿性疾病综合征、甲状旁腺功能亢进相关的关节炎、感染性关节炎、炎性肠综合征/肠易激综合征、幼年型类风湿关节炎、莱姆病、马方综合征 (Marfan's Syndrome)、米库利奇病、混合性结缔组织病、多发性硬化、肌筋膜疼痛综合征、骨关节炎、骨软化症、骨质疏松症和皮质类固醇引起的骨质疏松症、佩吉特病 (Paget's Disease)、复发性风湿病、帕金森病、普卢默病 (Plummer's Disease)、风湿性多肌痛、多肌炎、假痛风、银屑病关节炎、雷诺现象/综合征、赖特尔综合征 (Reiter's Syndrome)、风湿热、类风湿关节炎、结节病、坐骨神经痛 (腰椎间盘突出)、硬皮病、坏血病、镰状细胞性关节炎、舍格伦综合征 (Sjogren's Syndrome)、椎管狭窄、脊椎前移、斯蒂尔病 (Still's Disease)、系统性红斑狼疮、高安(无脉)病、腱炎、网球肘/高尔夫球肘、甲状腺相关的关节炎、扳机指、溃疡性结肠炎、韦格纳肉芽肿病 (Wegener's Granulomatosis) 和惠普尔病。

[0304] 本文进一步公开了使用本文公开的靶向剂抗体偶联物来治疗疾病或病况。本文公开了使用靶向剂抗体偶联物来治疗有其需要的受试者的癌症，其中该靶向剂抗体偶联物包含 (a) 包含与免疫细胞相互作用的抗体或抗体片段的第一区域；和 (b) 包含与靶细胞相互作用的非抗体部分的第二区域。靶向剂抗体偶联物可进一步包含一个或多个连接体。一个或多个连接体可连接靶向剂抗体偶联物的第一区域和第二区域。非抗体部分可与靶细胞上的PSMA相互作用。非抗体部分可包括DUPA。抗体或抗体片段可包括抗-CD3抗体。癌症可以是前列腺癌。

IX. 免疫调节

[0305] 本文公开的靶向剂抗体偶联物可用来调节免疫应答。免疫应答的调节可包括刺激、激活、提高、强化或上调免疫应答。免疫应答的调节可包括抑制、抑制、阻止、减少或下调免疫应答。例如，抗体可包括可与第一细胞结合的抗体或抗体片段和可与第二细胞结合的靶向剂。抗体与第一或第二细胞的结合可导致免疫应答的调节。第一细胞可以是免疫

细胞。免疫细胞可以是造血细胞。第二细胞可以是免疫细胞、健康的细胞、癌细胞、细菌或病毒感染的。

[0306] 调节免疫应答的方法可包括 (a) 使免疫细胞与靶向剂抗体偶联物接触以产生免疫细胞-靶向剂抗体偶联物复合物; 和 (b) 使靶细胞与免疫细胞-靶向剂抗体偶联物复合物接触, 从而调节来自免疫细胞的免疫应答。

[0307] 或者, 该方法可包括 (a) 使靶细胞与靶向剂抗体偶联物接触以产生靶细胞-靶向剂抗体偶联物复合物; 和 (b) 使免疫细胞与靶细胞-靶向剂抗体偶联物复合物接触, 从而调节来自免疫细胞的免疫应答。靶向剂抗体偶联物可包含与免疫细胞上的细胞表面标志物相互作用的抗体或其片段。免疫细胞上的细胞表面标志物可以是受体或共受体。细胞表面标志物可以是CD3T细胞共受体。免疫细胞上的细胞表面标志物可以是蛋白质、糖蛋白或类固醇。免疫细胞可以是T细胞。靶向剂抗体偶联物可包含与靶细胞上的细胞表面标志物相互作用的非抗体部分。靶向剂抗体偶联物可以将免疫细胞连接到靶细胞。靶细胞可以是癌细胞。靶细胞可以是病毒感染的细胞。靶细胞可以是免疫细胞。免疫细胞可以是T细胞。免疫细胞可以是巨噬细胞。免疫细胞可以是B细胞。靶细胞上的细胞表面标志物可以是受体、共受体、表面蛋白质、糖蛋白或类固醇。靶向抗体偶联物的非抗体部分可包含配体、细胞因子、毒素或小分子。调节免疫应答的方法可进一步包括向受试者施用一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物。一个或多个靶向剂抗体偶联物可与一个或多个附加的免疫细胞相互作用。一个或多个附加的免疫细胞可以是与先前的免疫细胞类型相同的免疫细胞。例如, 第一靶向剂抗体偶联物可与T细胞相互作用而第二靶向剂抗体偶联物也可以与T细胞相互作用。或者, 或此外, 一个或多个附加的免疫细胞可以是不同于先前的免疫细胞类型的免疫细胞。例如, 第一靶向剂抗体偶联物可与抗原呈递细胞相互作用而第二靶向剂抗体偶联物可与T细胞相互作用。一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物可与一个或多个附加的细胞相互作用。一个或多个附加的细胞可以是与免疫细胞或靶细胞相同的细胞类型。例如, 第一靶向剂抗体偶联物可与病毒感染细胞相互作用并且第二靶向剂抗体偶联物可与病毒感染细胞相互作用。或者, 或此外, 一个或多个附加的免疫细胞可以不同于免疫细胞或靶细胞。例如, 第一靶向剂抗体偶联物可与细菌细胞相互作用并且第二靶向剂抗体偶联物可与病毒感染的细胞相互作用。

[0308] 在另一方面, 该方法可包括 (a) 使包含靶细胞和免疫细胞的样品与靶向剂抗体偶联物接触; 和 (b) 使靶细胞与免疫细胞经由靶向剂抗体偶联物连接, 从而调节来自免疫细胞的免疫应答。靶向剂抗体偶联物可包含与免疫细胞上的细胞表面标志物相互作用的抗体或其片段。免疫细胞上的细胞表面标志物可以是受体或共受体。细胞表面标志物可以是CD3T细胞共受体。免疫细胞上的细胞表面标志物可以是蛋白质、糖蛋白或类固醇。免疫细胞可以是T细胞。靶向剂抗体偶联物可包含与靶细胞上的细胞表面标志物相互作用的非抗体部分。靶向剂抗体偶联物可使免疫细胞与靶细胞连接。靶细胞可以是癌细胞。靶细胞可以是病毒感染的细胞。靶细胞可以是免疫细胞。免疫细胞可以是T细胞。免疫细胞可以是巨噬细胞。免疫细胞可以是B细胞。靶细胞上的细胞表面标志物可以是受体、共受体、表面蛋白质、糖蛋白或类固醇。靶向抗体偶联物的非抗体部分可包含配体、细胞因子、毒素或小分子。调节免疫应答的方法可进一步包括向受试者施用一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物。一个或多个靶向剂抗体偶联物可与一个或多个附加的免疫细胞相互作用。一个或

多个附加的免疫细胞可以是与先前的免疫细胞类型相同的免疫细胞。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与T细胞相互作用而第二靶向剂抗体偶联物也可以与T细胞相互作用。或者，或此外，一个或多个附加的免疫细胞可以是不同于先前的免疫细胞类型的免疫细胞。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与抗原呈递细胞相互作用而第二靶向剂抗体偶联物可与T细胞相互作用。一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物可与一个或多个附加的细胞相互作用。一个或多个附加的细胞可以是与免疫细胞或靶细胞相同的细胞类型。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与病毒感染细胞相互作用并且第二靶向剂抗体偶联物可与病毒感染细胞相互作用。或者，或此外，一个或多个附加的免疫细胞可以不同于免疫细胞或靶细胞。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与细菌细胞相互作用并且第二靶向剂抗体偶联物可与病毒感染的细胞相互作用。

[0309] 调节免疫应答的方法可包括向有其需要的受试者施用包含靶向剂抗体偶联物的组合物，其中靶向剂抗体偶联物包含与免疫细胞上的细胞表面标志物相互作用的抗体或抗体片段。免疫细胞上的细胞表面标志物可以是受体或共受体。细胞表面标志物可以是CD3T细胞共受体。免疫细胞上的细胞表面标志物可以是蛋白质、糖蛋白或类固醇。免疫细胞可以是T细胞。靶向剂抗体偶联物可包含与第二细胞上的细胞表面标志物相互作用的非抗体部分。靶向剂抗体偶联物可使免疫细胞连接至第二细胞。第二细胞可以是癌细胞。第二细胞可以是病毒感染细胞。第二细胞可以是免疫细胞。免疫细胞可以是T细胞。免疫细胞可以是巨噬细胞。免疫细胞可以是B细胞。第二细胞上的细胞表面标志物可以是受体、共受体、表面蛋白质、糖蛋白或类固醇。靶向剂抗体偶联物的非抗体部分可包含配体、细胞因子、毒素或小分子。调节免疫应答的方法可进一步包括向受试者施用一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物。一个或多个靶向剂抗体偶联物可与一个或多个附加的免疫细胞相互作用。一个或多个附加的免疫细胞可以是与先前的免疫细胞类型相同的免疫细胞。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与T细胞相互作用而第二靶向剂抗体偶联物也可以与T细胞相互作用。或者，或此外，一个或多个附加的免疫细胞可以是不同于先前的免疫细胞类型的免疫细胞。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与抗原呈递细胞相互作用而第二靶向剂抗体偶联物可与T细胞相互作用。一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物可与一个或多个附加的细胞相互作用。一个或多个附加的细胞可以是与免疫细胞或第二细胞相同的细胞类型。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与病毒感染的细胞相互作用并且第二靶向剂抗体偶联物可与病毒感染的细胞相互作用。或者，或此外，一个或多个附加的免疫细胞可以不同于免疫细胞或第二细胞。例如，第一靶向剂抗体偶联物可与细菌细胞相互作用并且第二靶向剂抗体偶联物可与病毒感染的细胞相互作用。

X. 附加的应用

[0310] 本文进一步公开了连接两种或更多种细胞的方法。该方法可包括使包含两种或更多种细胞的样品与靶向剂抗体偶联物接触。靶向剂抗体偶联物可包含 (a) 包含抗体或抗体片段的第一区域；和 (b) 包含非抗体部分的第二区域。抗体或抗体片段可与第一细胞上的表面标志物相互作用。非抗体部分可与第二细胞上的表面标志物相互作用。第一和第二细胞可以是同一类型的细胞。第一和第二细胞可以是不同类型的细胞。表面标志物可以是受体、共受体、蛋白质、糖蛋白、抗原、多糖或类固醇。该方法可进一步包括使样品与一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物接触。一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物可包含 (a) 包含

抗体或抗体片段的第一区域;和(b)包含非抗体部分的第二区域。一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物的抗体或抗体片段可与第一细胞、第二细胞或第三细胞上的表面标志物相互作用。一个或多个附加的靶向剂抗体偶联物的非抗体部分可与第一细胞、第二细胞或第四细胞上的表面标志物相互作用。第一、第二、第三和/或第四细胞可以是同一细胞类型。第一、第二、第三和/或第四细胞可以是不同的细胞类型。

[0311] 靶向剂抗体偶联物可用来连接多种细胞。同样地,多细胞复合物可通过靶向剂抗体偶联物附接至细胞而形成。细胞支架和/或细胞基质可通过靶向剂抗体偶联物附接至细胞而形成。

[0312] 靶向剂抗体偶联物的第一区域和第二区域可通过一个或多个连接体来连接。连接体可以是生物可降解的。连接体可以是可裂解。同样地,暂时的细胞-细胞复合物、支架或基质可通过使用包含生物可降解、可裂解或以其他方式可降解的连接体的靶向剂抗体偶联物而形成,以连接两种或更多种细胞。或者,或此外,连接体可抵抗裂解或降解。同样地,永久性或半永久性细胞-细胞复合物、支架或基质可通过使用包含裂解或降解抵抗性连接体的靶向剂抗体偶联物而形成,以连接两种或更多种细胞。靶向剂抗体偶联物可包含可降解的和不可降解的连接体的混合物以生成可弯曲的细胞-细胞复合物。

[0313] 靶向剂抗体偶联物的使用可使得能够分析细胞-细胞相互作用和信号转导途径。可进一步分离细胞,并且可进行细胞的表达谱分析。这些类型的分析可在诊断、预后和/或治疗有其需要的受试者的疾病或病况中使用。

本发明提供了包括但不限于以下实施方案:

1. 一种靶向剂抗体偶联物,其包含:

- a. 与靶细胞结合的靶向剂,其中该靶向剂不是抗体或抗体片段;以及
- b. 不与靶细胞结合的抗体或抗体片段;以及
- c. 一个或多个连接体,

其中,该抗体或抗体片段通过所述一个或多个连接体与该靶向剂连接并且其中该抗体或抗体片段结合细胞毒性效应细胞上的抗原。

2. 根据实施方案1所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗体或抗体片段包含一个或多个非天然氨基酸。

3. 根据实施方案2所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶向剂通过所述一个或多个连接体与所述抗体或抗体片段的所述一个或多个非天然氨基酸经位点特异性地连接。

4. 根据实施方案1所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶向剂抗体偶联物是式I:X-L1-Y或式IA:Y-L1-X,其中:

- a. X包含所述抗体或抗体片段;
- b. L1包含所述一个或多个连接体;且
- c. Y包含所述靶向剂。

5. 根据实施方案1或4所述的抗体,其中该抗体的至少一部分基于或衍生自人抗体、人源化抗体、人工程化抗体或完全人抗体。

6. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗体是嵌合抗体。

7. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶向剂结合靶细胞上的细胞表面蛋白质或细胞表面标志物。

8. 根据实施方案7所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述细胞毒性效应细胞能够增强免疫应答。

9. 根据实施方案7所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗原是T 细胞受体 (TCR)。

10. 根据实施方案7所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗原包 含T细胞共受体。

11. 根据实施方案10所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述共受 体是CD3T细胞共受体。

12. 根据实施方案7所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述细胞毒 性效应细胞是造血细胞。

13. 根据实施方案12所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述造血 细胞选自巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、自然杀伤细胞、B细胞或T细胞。

14. 根据实施方案7所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述细胞毒 性效应细胞是细胞毒性T细胞。

15. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗 体或抗体片段包含抗-CD3Fab片段。

16. 根据实施方案15所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗-CD3 Fab片段是UCHT1。

17. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗 体片段由选自SEQ ID NO:1和2的序列编码。

18. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂选自细胞靶向分子、激素配体、蛋白质、肽、类肽、DNA适体 和肽核酸。

19. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂不包含抗体或抗体片段。

20. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂结合选自胆囊收缩素B受体、促性腺激素释放激素受体、促生长 素抑制素受体2、avb3整联蛋白、胃泌素释放肽受体、神经激肽1受 体、黑皮质素1受体、神经降压肽受体、神经肽Y受体和C型凝集 素样分子1的细胞表面蛋白质。

21. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂结合前列腺特异性膜抗原。

22. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂选自奥曲肽、octreotate、促生长素抑制素类似物、CD38NAD⁺ 糖基水解酶抑制剂、五肽胃泌素、促性腺激素释放激素、CCKB拮抗 剂、RGD和铃蟾肽。

23. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂包含2-[3-(1,3-二羧基丙基)脲基]戊二酸 (DUPA)。

24. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂抗体偶联物小到足以穿透肿瘤。

25. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶 向剂由选自SEQ ID NO: 3-40的序列编码。

26. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其进一步包 含第二靶向剂。

27. 根据实施方案7所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶细胞 是癌细胞。

28. 根据实施方案27所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述癌细 胞来源于前列腺癌。

29. 根据实施方案27所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述癌细 胞来源于选自上皮癌、

乳腺癌、肾癌、肺癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、脑癌、胶质母细胞瘤、胰腺癌、髓样白血病、宫颈癌、甲状腺髓样癌、基质卵巢癌、星形细胞瘤、子宫内膜癌、神经内分泌癌、胃肠胰肿瘤、非霍奇金淋巴瘤、外分泌胰腺癌、尤因肉瘤和皮肤癌的癌症。

30. 根据实施方案4所述的靶向剂抗体偶联物,其中X和/或Y通过脒与L1偶联。

31. 根据实施方案4所述的靶向剂抗体偶联物,其中L1提供了X与Y之间约10至约100埃(Å)的距离。

32. 根据实施方案2或3所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗体或抗体片段的所述一个或多个非天然氨基酸包括对乙酰苯丙氨酸(pAcF)。

33. 根据实施方案2或3所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗体或抗体片段的所述一个或多个非天然氨基酸包括硒代胱氨酸。

34. 一种药物组合物,其包含根据实施方案1-33所述的靶向剂抗体偶联物。

35. 一种治疗有需要的受试者中的疾病或病况的方法,其包括施用根据实施方案1-33所述的靶向剂抗体偶联物或根据实施方案34所述的组合物。

36. 根据实施方案35所述的方法,其中所述疾病或病况是癌症。

37. 根据实施方案36所述的方法,其中所述癌症是前列腺癌。

38. 根据实施方案36所述的方法,其中所述癌症选自上皮癌、肾癌、肺癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌、脑癌、胶质母细胞瘤、胰腺癌、髓样白血病、宫颈癌、甲状腺髓样癌、乳腺癌、卵巢癌、星形细胞瘤、子宫内膜癌、神经内分泌癌、胃肠胰肿瘤、非霍奇金淋巴瘤、外分泌胰腺癌、尤因肉瘤和皮肤癌。

39. 根据实施方案35所述的方法,其中施用包括显微针装置的使用。

40. 一种靶向剂抗体偶联物,其包含:

a. 抗-CD3Fab;

b. 一个或多个DUPA分子;以及

c. 一个或多个连接体,

其中该抗体或抗体片段通过所述一个或多个连接体与所述一个或多个靶向剂连接。

41. 根据实施方案41所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述抗-CD3 Fab包含一个或多个非天然氨基酸。

42. 根据实施方案42所述的靶向剂抗体偶联物,其中第一非天然氨基酸和第二非天然氨基酸代替所述抗-CD3Fab的天然氨基酸,其中该天然氨基酸选自所述抗-CD3Fab的重链的赖氨酸138(Lys 138)、所述抗-CD3Fab的重链的丙氨酸123(Ala 123)、所述抗-CD3Fab的重链的苏氨酸109(Thr 109)和所述抗-CD3Fab的重链的丝氨酸202(Ser 202)。

43. 根据实施方案42所述的靶向剂抗体偶联物,其中第一DUPA分子和第二DUPA分子与所述抗-CD3Fab的第一非天然氨基酸和第二非天然氨基酸经位点特异性地连接。

44. 根据实施方案40所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述靶向剂抗体偶联物是式I:X-L1-Y或式IA:Y-L1-X,其中:

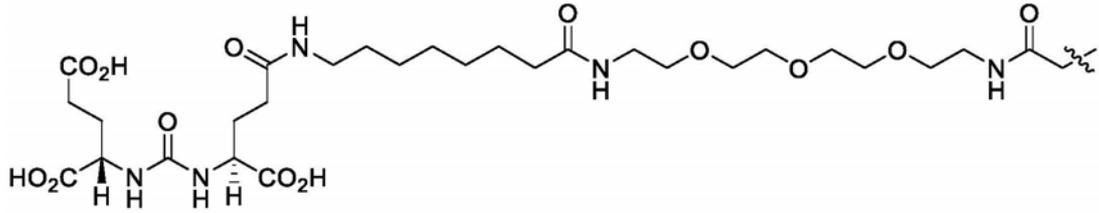
a. X包含所述抗-CD3Fab;

b. L1包含所述一个或多个连接体;且

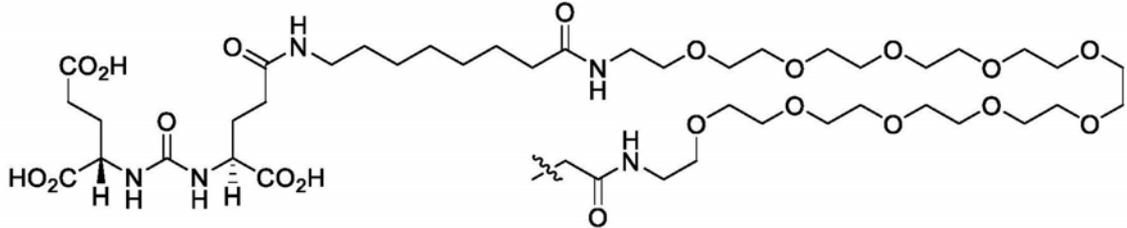
c. Y包含一个或多个DUPA分子。

45. 根据实施方案44所述的靶向剂抗体偶联物,其包含选自式V、式VI、式VII和式VIII

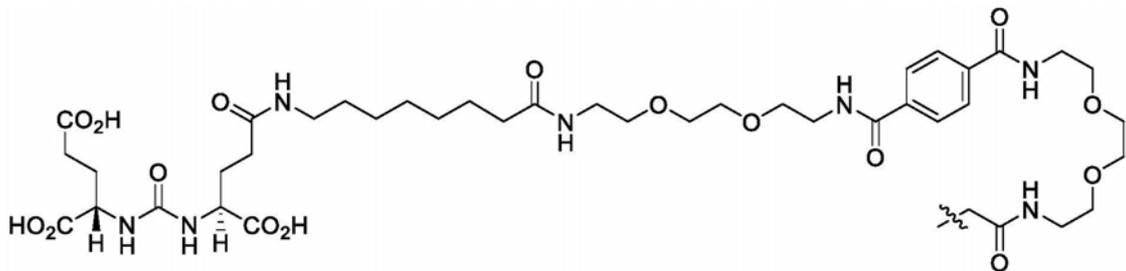
的化合物中的化合物：



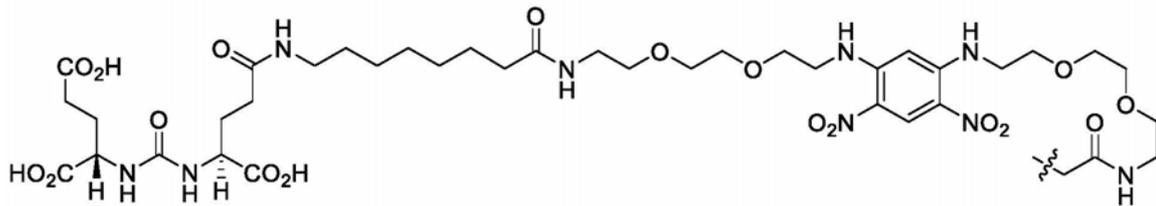
(式 V)、



(式 VI)、

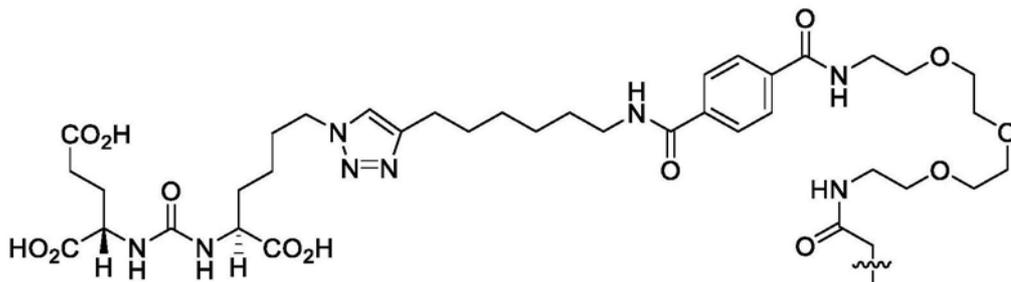


(式 VII), 和



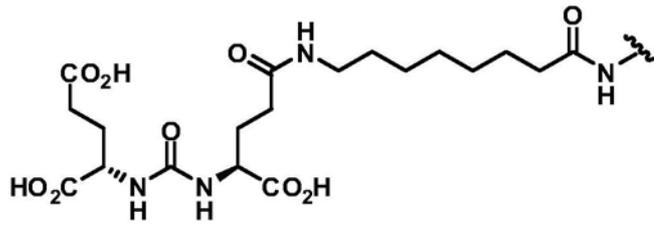
(式 VIII)。

46. 根据实施方案44所述的靶向剂抗体偶联物,其包含式IX的 化合物:

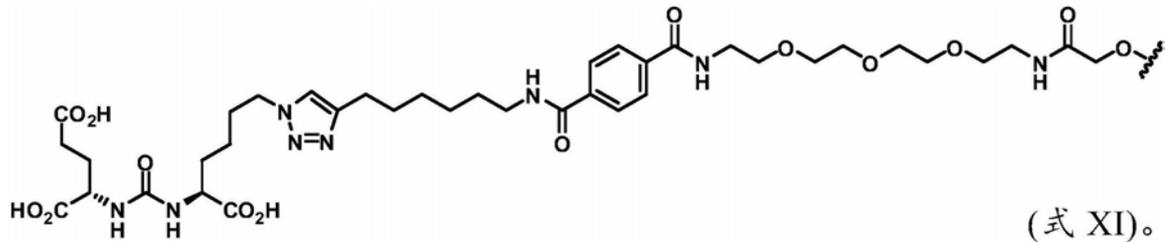


(式 IX)。

47. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其包含式X 的化合物:

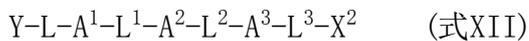


48. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其包含式XI 的化合物:



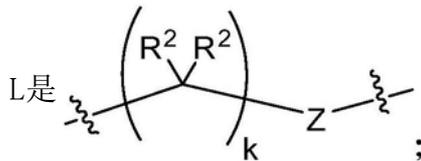
49. 根据实施方案1或4所述的靶向剂抗体偶联物,其中所述一个或多个连接体包括P-TriA衍生的连接体。

50. 式XII的化合物,或其立体异构体:



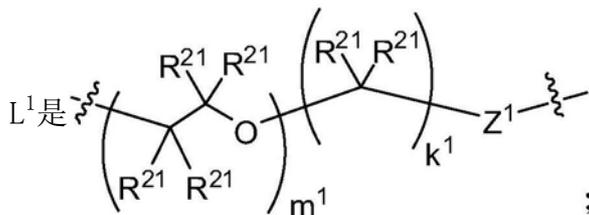
其中:

Y是前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的配体;



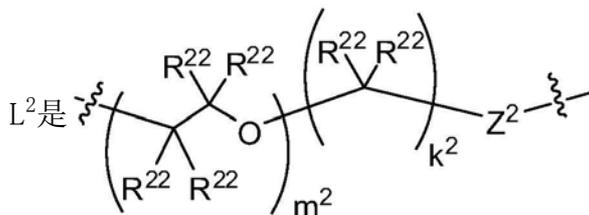
A¹选自芳基、5至6元杂芳

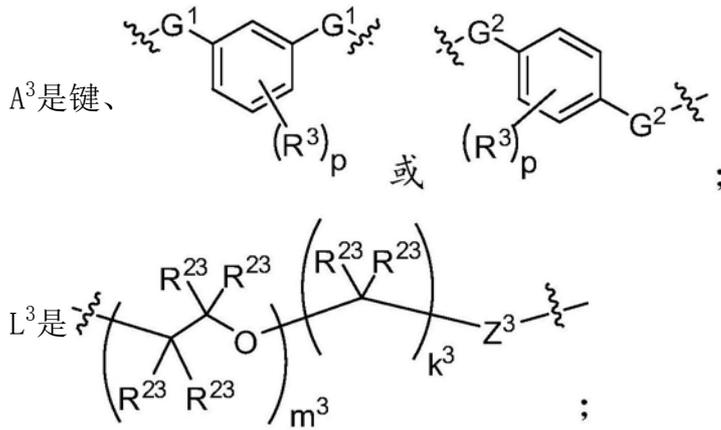
基、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;



A²选自

键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;





X²是与和非天然氨基酸反应的官能团结合的连接体或与修饰的非天然氨基酸结合的连接体,其中该修饰的非天然氨基酸是X的一部分,其中X是修饰的治疗性肽、蛋白质或抗体;

每个R¹独立地选自H、烷基或卤代烷基;

每个R²、R²¹、R²²和R²³独立地选自H、卤代、-OR¹、-CN、-SR¹、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

每个R³独立地选自卤代、-OR¹、-CN、-SR¹、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基、-NO₂和NR¹R¹;

每个G¹和G²独立地选自

键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;

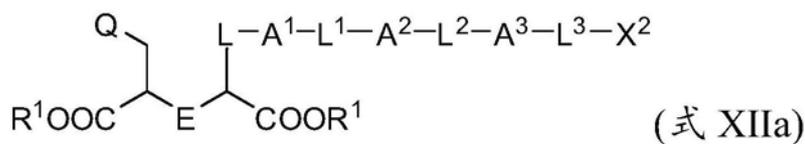
每个Z、Z¹、Z²和Z³独立地选自键、-O-和-N(R¹)-;

k、k¹、k²和k³各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

m¹、m²和m³各自独立地选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;且

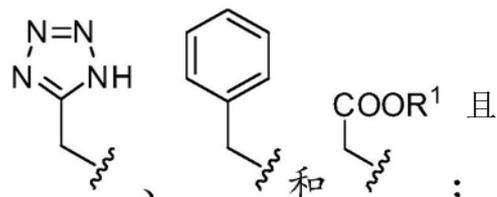
p为0、1、2、3或4。

51. 根据实施方案50所述的化合物,其中所述化合物是式XIIa的化合物:

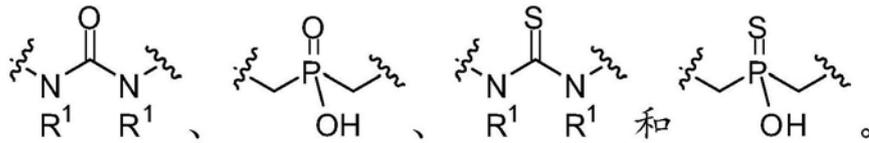


其中:

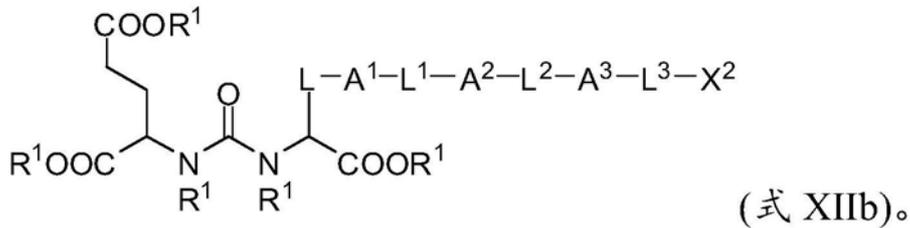
Q选自:



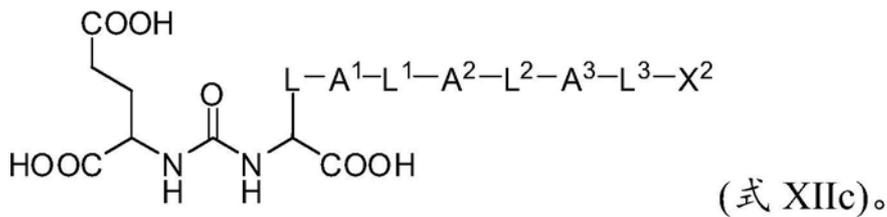
E选自:



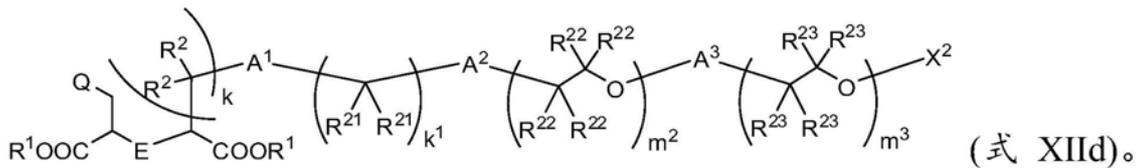
52. 根据实施方案51所述的化合物,其中所述化合物是式XI Ib的化合物:



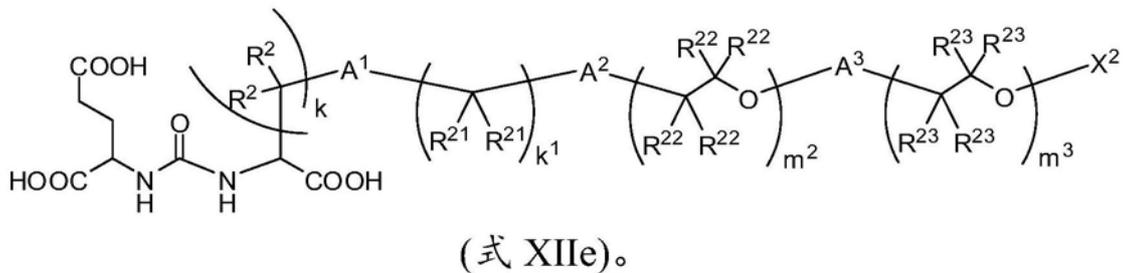
53. 根据实施方案52所述的化合物,其中所述化合物是式XI Ic的化合物:



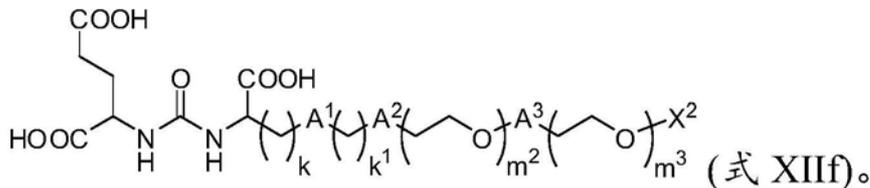
54. 根据实施方案51所述的化合物,其中所述化合物是式XI Id的化合物:



55. 根据实施方案54所述的化合物,其中所述化合物是式XI e的化合物:



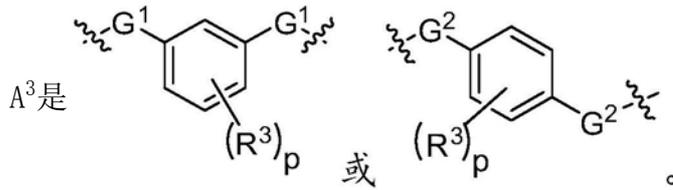
56. 根据实施方案55所述的化合物,其中所述化合物是式XI f的化合物:



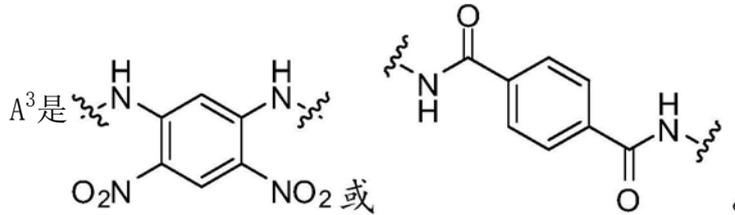
57. 根据实施方案50-56中任意一项所述的化合物,其中: A¹是-C(O)N(H)-。

58. 根据实施方案50-56中任意一项所述的化合物,其中: A¹是 。

59. 根据实施方案50-58中任意一项所述的化合物,其中:



60. 根据实施方案59所述的化合物,其中:



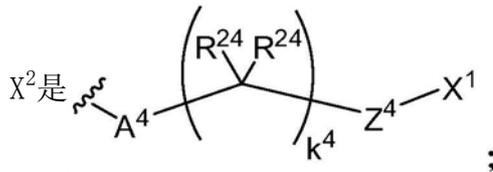
61. 根据实施方案50所述的化合物,其中:

每个R²、R²¹、R²²、R²³和R²⁴独立地选自H、F、-CH₃或-CF₃。

62. 根据实施方案50所述的化合物,其中:

每个R²、R²¹、R²²、R²³和R²⁴是H。

63. 根据实施方案50-62中任意一项所述的化合物,其中:



其中:

A⁴选自

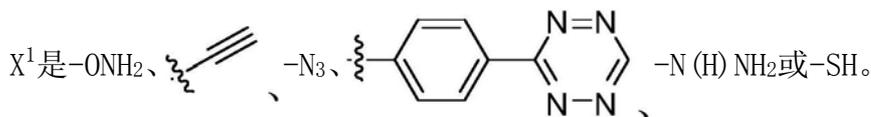
键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}

N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;

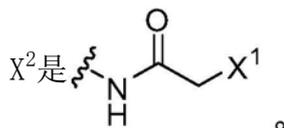
每个R²⁴独立地选自H、卤代、-OR¹、-CN、SR¹、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

k⁴选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

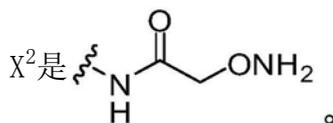
Z⁴选自键、芳基和5至6元杂芳基;且



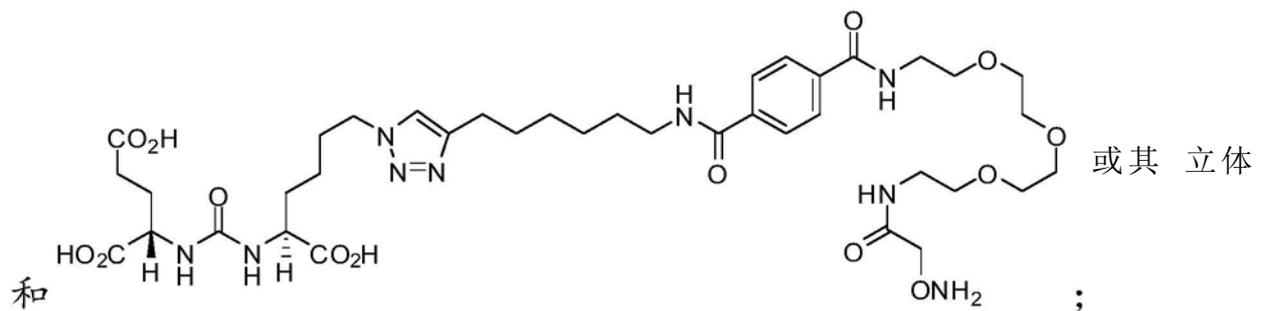
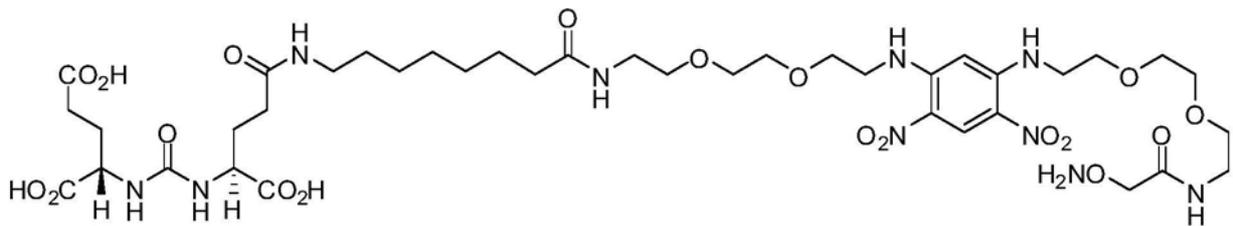
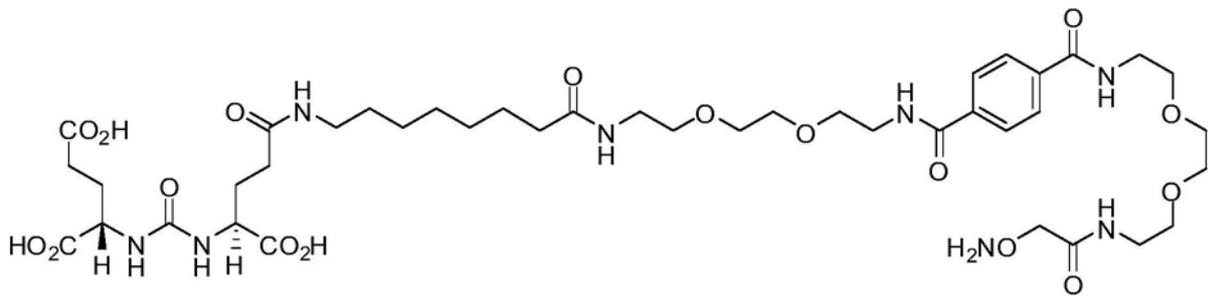
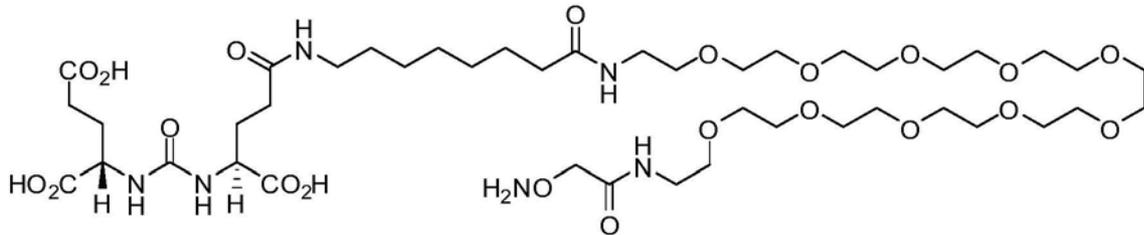
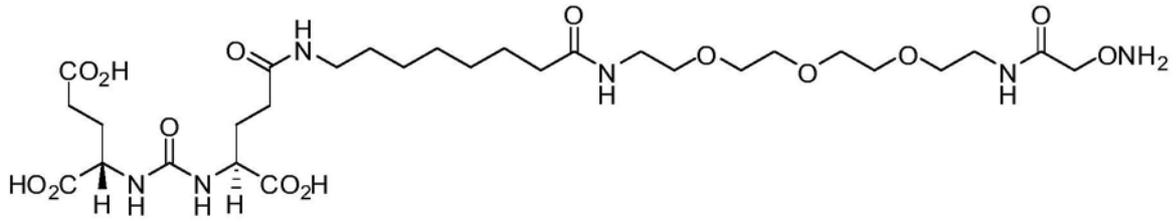
64. 根据实施方案63所述的化合物,其中:



65. 根据实施方案64所述的化合物,其中:

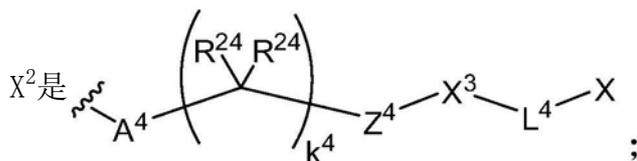


66. 根据实施方案50所述的化合物,其中所述化合物选自:



异构体。

67. 根据实施方案50-62中任意一项所述的化合物, 其中:



其中:

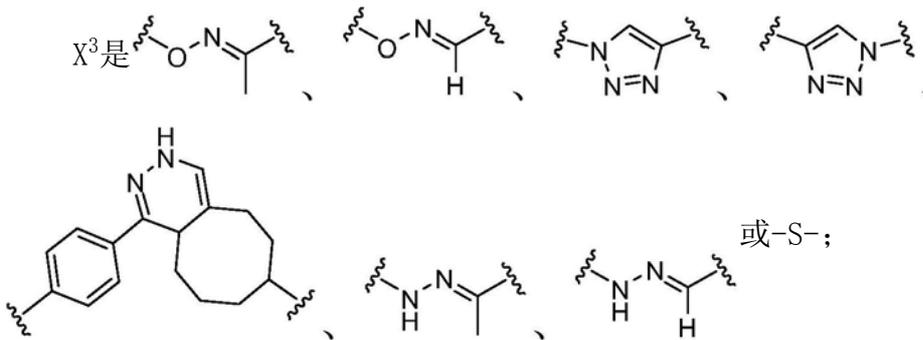
A⁴选自

键、-C(O)-、-N(R¹)-、-O-、-C(O)N(R¹)-、-N(R¹)C(O)-、-S(O)_{1,2}N(R¹)-和-N(R¹)S(O)_{1,2}-;

每个R²⁴独立地选自H、卤代、-OR¹、-CN、-SR¹、烷基、环烷基、卤代烷基、芳基烷基或杂芳基烷基;

k⁴选自0、1、2、3、4、5、6、7、8、9和10;

Z⁴选自键、芳基和5至6元杂芳基;且



X是修饰的治疗性肽、蛋白质或抗体;

L⁴是直接衔接至修饰的氨基酸的键或与修饰的氨基酸结合的连接体,其中该修饰的氨基酸是X的一部分。

68. 根据实施方案50-67中任意一项所述的化合物,其中所述氨基酸是非天然氨基酸。

69. 一种组合物,其包含根据实施方案1-33所述的靶向剂抗体偶联物或根据实施方案50-68所述的化合物。

70. 根据实施方案69所述的组合物,其中所述靶向剂抗体偶联物或所述化合物的纯度为至少90%。

71. 一种治疗有需要的受试者中的前列腺癌的方法,其包括施用根据实施方案1-33所述的靶向剂抗体构建体或根据实施方案50-70所述的化合物。

实施例

实施例1:流式细胞分析DUPA-Phthal-双- α CD3与C4-2细胞的结合

[0314] 在本实例中,我们将两个DUPA配体与抗-CD3Fab偶联,使得二价配体可同时结合具有高亲合力的PSMA同源二聚体的每个亚基。为了合成二价Fab,我们在两个不同的位置(轻链S202和重链K138)引入TAG密码子,并且如以上所述表达并纯化双突变体。值得注意的是,表达水平与先前表达的其他单一突变体和野生型抗体相比。双突变体抗体如上所述与P-Phthal(3)或P-DNP(4)偶联;LC-MS分析显示反应在48小时内完成(>95%效率),产生了二价偶联物,P-Phthal-双- α CD3(12)和P-DNP-双- α CD3(13)。纯化之后,通过SDS-PAGE和LC-MS证实结构(纯化之后反应产率>90%)。然后使用流式细胞术(图9,表1)评估(与单价偶联物一起)二价偶联物与C4-2细胞的结合。观察到二价P-Phthal-双- α CD3(12)与单价P-Phthal-HK138- α CD3(7)相比明显提高的结合亲和力(>60倍)。有趣的是,P-DNP-双- α CD3(13)不显示比它的单价等价物P-DNP-HK138- α CD3(8)明显提高,后者已具有高的亲和力。P-Phthal-双- α CD3(12)的明显提高的结合亲和力尤其令人鼓舞,因为尽管DNP基团的高亲和

力,它的已知高免疫原性可能限制它在体内的使用。

[0315] 表1不同的P-抗-CD3偶联物与各种浓度下PSMA-阳性C4-2细胞 的结合的FACS分析。

[M]	阳性百分比						
	P-Phthal-LC-109	P-Phthal-LC-202	P-Phthal-HC-123	P-Phthal-HC-138	P-DNP-HC	P-Phthal-双	P-DNP-双
0.000001	100	99.9	93.2	99	99.9	99.8	99.6
2E-07	99.4	99.8	92.8	97.5	100	98	98.7
4E-08	95.2	95.6	69.7	89.5	99.5	96.2	97.7
8E-09	56.7	42.5	7.6	32.4	99	95.1	97.5
1.6E-09	1.94	1.37	0.42	0.82	93.7	91	96.9
3.2E-10	0.49	0.47	0.76	0.079	38.2	60	86.3
6.4E-11	0.88	0.38	0.29	0.08	1.44	5.46	27.1
1.28E-11	0	0.66	0.52	0.43	0.13	0.4	0.81

实施例2:DUPA/抗-CD3偶联物的体外细胞毒性

[0316] 我们接下来比较了各种DUPA/ α CD3偶联物的体外细胞毒性。新鲜纯化的人外周血液单核细胞(hPBMCs)与C4-2(PSMA+)细胞以10:1的比例(分别100,000和10,000个细胞)混合,并与每个偶联物温育24小时。野生型UCHT1Fab与DUPA-连接体偶联物(P-DNP,4)的1:1混合物被用作阴性对照。通过测量由裂解的靶细胞释放的乳糖脱氢酶(LDH)来确定细胞毒性。如图10和表2所示,除了在先前测定中较差地结合C4-2细胞的P-Phthal-HC-123- α CD3(11)外,每个偶联物显示剂量依赖性细胞毒性。P-Phthal-LC-109- α CD3(9)显示与P-Phthal-LC-202- α CD3(10, $EC_{50} \sim 0.4nM$)和P-Phthal-HC-138- α CD3(7, $EC_{50} \sim 0.5nM$)相比减少的细胞毒性($EC_{50} \sim 4.1nM$),尽管在结合研究中全部具有相似的亲和力。最后,P-Phthal-双 α -CD3(12)显示与单价构建体相比最高的细胞毒性($EC_{50} \sim 0.1nM$)。即使在使用未偶联的DUPA-连接体和UCHT1Fab混合物测得的最高浓度下,也没有观察到细胞毒性。总之,这些结果表明不仅亲和力而且双特异性的几何结构明显影响细胞毒性。基于结合和体外细胞毒性测定,我们选择P-Phthal-双- α CD3(12)(也称作PSMA-靶向小分子抗体偶联物、P-靶向剂抗体偶联物)偶联物用于进一步表征。

[0317] 表2靶细胞的体外细胞毒性

[pM]	细胞毒性百分比								
	T109			S202			A123		
0	-6.31405	-1.15703	8.561983	-3.33884	0.628099	1.619835	-1.91715	4.861349	3.218076
1.28	-5.52066	2.016529	3.801653	-2.34711	2.809917	-1.95041	-2.12256	3.834303	4.450531
6.4	-6.5124	7.570248	7.966942	-2.94215	3.206612	4.198347	-0.27388	0.342349	2.191031
32	-4.92562	6.578512	6.380165	-2.94215	4.198347	3.404959	0.342349	3.012667	6.710031
160	2.214876	9.752066	11.73554	10.54545	25.61983	17.8843	-3.97124	-5.40911	5.272167
800	16.29752	35.33884	30.97521	52	63.70248	56.95868	-3.97124	-0.06847	6.710031
4000	35.73554	47.83471	48.6281	64.29752	75.80165	76.3967	5.272167	4.450531	11.84526
20000	51.20661	65.09091	75.20661	72.42975	83.1405	77.58678	8.764122	5.477576	15.54262
100000	66.47934	76.19835	83.33884	83.1405	83.73553	82.54546	9.996576	5.272167	16.15885

[pM]	细胞毒性百分比								
	K138			phthal 双			未偶联		
0	-3.14961	-2.9442	-0.06847	-5.89878	7.504363	3.73473	0	0	0
1.28	-1.71174	-0.06847	1.163985	2.268761	5.410122	3.73473	0	0.230681	0.230947
6.4	-2.53338	1.369394	12.05067	-1.08202	3.525306	4.991274	-0.92593	-0.46136	-0.57737
32	-2.12256	1.780212	4.245121	6.876091	11.90227	10.85515	-0.61728	-0.69204	-1.61663
160	16.15885	12.05067	14.31017	42.26876	49.5986	54.83421	-1.64609	-0.92272	-1.15473
800	51.0784	56.82985	62.58131	59.86038	70.12216	85.41013	0.514403	1.845444	0.577367
4000	78.1924	77.16535	74.70045	69.49389	78.49913	77.452	4.526749	3.921569	3.117783
20000	70.59226	82.30058	76.13831	66.56196	75.56719	78.70855	2.777778	3.921569	4.157044
100000	84.9709	85.99795	101.1982	74.52007	82.68761	71.37871	2.469136	5.536332	3.00231

[0318] 最后,对于C4-2细胞仅在P-靶向剂抗体偶联物的存在下清楚地观察到在突触形成时明显的莲座形态(图11)。

实施例3:体内PK和抗肿瘤活性

[0319] 我们首先评估了P-靶向剂抗体偶联物的药物代谢动力学。雄性 Sprague Dawley 大鼠(Charles River)在零点时间静脉内注射1和5mg/kg的P-靶向剂抗体偶联物或0.5mg/kg的未偶联的UCHT1Fab。定期采集血液至32小时,并进行处理以使用夹心-ELISA测量药物浓度。有趣的是,P-靶向剂抗体偶联物显示与未偶联的Fab(~1小时)相比明显提高的循环半衰期(~5-6小时),这可能是由于在偶联后DUPA-连接体部分的整体疏水性提高。值得注意的是,相对于小的双特异性scFv诸如BiTEs(双特异性T细胞衔接体,在人中~2小时的半衰期),P-靶向剂抗体偶联物具有提高的血清半衰期,尽管它们有相似的分子量(~50,000Da)。P-靶向剂抗体偶联物的提高的血清半衰期转换成 $\geq 1x$ /天给药的人半衰期。而且,小尺寸的P-靶向剂抗体偶联物可能有利于穿透实体肿瘤。

[0320] 我们接下来建立了小鼠异种移植模型以评估P-靶向剂抗体偶联物的体内效能。免疫缺陷的NOD/SCID小鼠被皮下注射 1×10^6 个C4-2细胞和 2×10^6 个hPBMCs在基质胶(BD Bioscience)中的混合物。4天后,通过经由尾静脉注射2mg/kg的药物开始治疗,并持续10天(n=6)。在对照组中,小鼠被注射P-Phthal(3)和UCHT1野生型Fab的未偶联的混合物,而另一组小鼠被注射单独的媒介物(n=6)。通过外部测径器测量来监测肿瘤生长。该混合物和媒介物组显示在植入约两周后长出肿瘤。然而,治疗组长达6周没有发育任何明显的肿瘤(此时其他两组中的所有小鼠由于大尺寸的肿瘤而处死)(图12,表3)。组织学也证实了来自对照组(PBS和混合物组)的小鼠中实体肿瘤的形成,而在治疗组中没有检测到实体肿瘤。证实P-靶向剂抗体偶联物的预防效果后,我们进行异种移植模型,该模型中我们拖延了治疗,直到我们观察到明显的肿瘤形成。在该治疗研究中,我们使用NOD/scid γ (NSG, Jackson实验室)小鼠,它已知更适用于具有人源细胞的免疫重建。第0天,基质胶中 1×10^6 个C4-2细胞进行皮下注射,并在三天后,将 20×10^6 个hPBMC单独地注射入腹腔。单独注射hPBMC进一步允许评估P-靶向剂抗体偶联物重定向T细胞形成肿瘤部位的周边的能力。植入肿瘤约两周后,在小鼠中形成了明显的实体肿瘤(~150mm³),此时我们经由尾静脉注射1 mg/kg P-靶向剂抗体偶联物开始治疗,持续10天(n=7)。在治疗的第一和第四天,我们经由尾静脉向所有组共同注射 10×10^6 个来自同一供体的离体扩大的T细胞,以补充更多的细胞毒性效应细胞。治疗开始后,在治疗组中观察到立即的肿瘤缩小,而在媒介

物组 (n=7) 再次显示快速 长出肿瘤。

[0321] 表3P-靶向剂抗体偶联物的体内效能研究。

		肿瘤体积[mm ³]				
天	P-靶向剂抗体偶联物					
2	37.888	113.4	61.32	48.618	46.08	52.022
		肿瘤体积[mm ³]				
4	35.77	37.23	35.52	37.765	31.098	36.72
7	31.968	21.78	44.376	60.04	43.2	43.8
11	29.127	42.282	43.092	74.646	29.07	37.422
14	27.269	27.72	25.2405	38.766	29.106	29.106
18	13.8355	36.686	20.8035	27.255	28.44	28.116
21	18.63	22.62	0	19.7945	0	20.475
25	18.009	26.18	23.79	22.32	11.088	10.962
28	14.413	40.95	21.168	37.026	28.49	39.368
32	45.2965	74.493	0	24.36	28.86	14.64
36	36.6825	96.148	34.02	22.01	0	16.896
42	23.94	74.8	30.016	41.616	0	16.775
天	未偶联的混合物					
2	46.512	52.65	65.934	51.714	51.205	67.068
4	37.185	26.88	36.96	39.347	38.08	37.488
7	35.644	44.968	40.32	39.9	45.54	43.2
11	54.32	37.422	54	43.12	44.968	34.125
14	41.208	30.66	51.264	49.217	55.48	34.684
18	36.92	44.156	227.476	203.463	250.908	58.32
21	44.625	25.3125	601.965	563.64	494.125	26.04
25	169.32	38.25	686.28	944.58	532.35	44.064
28	180.5	63.882	757.68	1387.2	513.188	131.648
32	360.47	73.44			697.6375	393.12
36	356.16	91.047			1130.96	766.233
42	519.294	57.646				
天	PBS					
2	40.052	49.928	36.4	45.369	58.8	44.384
4	37.8	25.62	39.69	34.6385	62.123	25.56
7	32.319	36.652	33.744	43.911	67.716	51.128
11	27.702	39.36	40.664	63.121	54.614	57.4275
14	35.6655	35.438	18.4	41.7075	37.296	30.03
18	143.64	156.8	54.648	92.4	104.4	37.31
21	379.008	157.32	375.417	597.1875	297.54	54.1875
25	427.68	121.968	701.22	702.1	810.16	48.048
28	842.996	209.088	1163.986	1098.2	963.746	48.96
32		493.476				92.4
36		921.6				157.32
42						253.376

实施例4:第二代P-连接体化合物的合成

[0322] 在该实例中,我们已经设计并合成了第二代P-连接体化合物,它在PSMA酶抑制测定中显示了相比于第一代P-连接体显著提高的活性。如上所述评估了第二代P-连接体化合物的体外和体内效能以及PK。

[0323] 在免疫缺陷小鼠(NOD/SCID γ)中的原位前列腺癌异种移植模型允许我们监测继发性转移的人T细胞移动并穿透进入前列腺。免疫活性小鼠中同系移植前列腺癌模型也被用来进一步检查靶向剂抗体偶联物的体内活性和安全性。为了这个目的,使用了小鼠前列腺癌细胞系RM-1-hPSMA,它在B6中是同基因的。为了补充小鼠T细胞,小鼠特异性 α CD3Fab(2C11)如上所述与P-连接体偶联。重要的是,mPSMA强烈地结合DUPA(P-连接体的亲本酶抑制剂),DUPA使得能够评估小鼠中的效能和安全性。P-靶向剂抗体偶联物的药物代谢动力学和安全性在非人灵长类、短尾猴猕猴(cyno)模型中进行评估。在先前的报告中,cynoPSMA的谷氨酸羧基肽酶活性被底物类似物抑制剂(诸如DUPA)有效地抑制,并因此应对我们的DUPA-连接体具有高亲和力。食蟹猴/人交叉反应性靶向剂抗体偶联物通过DUPA-连接体与高亲和力的人/短尾猴交叉反应性的 α CD3Fab(SP34)的结合来制备。这些研究的目标是提供必要的信息,以指导在人类中进行I期剂量递增的研究。

实施例5:完全的结构-活性关系研究以确定最佳的靶向剂抗体偶联物候选

[0324] 我们已发现,P-连接体化合物的亲和力显著影响了靶细胞与产生的P-靶向剂抗体偶联物的结合,这反过来又影响它们在基于细胞的测定中的细胞毒素活性。为了提高P-连接体的亲和力,我们重新检查先前的结构-活性关系(SAR)数据和PSMA-抑制剂复合物的共晶体结构。基于该分析,我们设计了第二代P-连接体候选,P-TriA(图15J化合物14),其中P-Phthal中的C-9酰胺基团被三唑键取代,并且较短的直链烃连接体用来连接两个疏水芳族基团、三唑和邻苯二甲酰亚胺基团(图13)。

[0325] PSMA抑制测定

[0326] 40mM的NaOH中N-乙酰基-天冬氨酰基-谷氨酸(NAAG)的10 mM溶液被稀释到40 μ M的反应缓冲液(0.1M Tris-HCl,pH=7.5),并将该溶液加入到384孔板(每孔10 μ L)。对于 K_M 测量和 K_M 阴性对照(不存在PSMA),NAAG溶液连续稀释2倍,以得到最终的NAAG浓度范围40 μ L-312.5 μ L。对于 IC_{50} 测定,含有40 μ M NAAG溶液的反应缓冲液中的靶向剂PSMA抑制剂连续稀释5倍,以得到最终的抑制剂浓度范围100 μ L-51.2PM。为了启动反应,10 μ L的rhPSMA(在反应缓冲液为20 μ M,R&D研究)加入到每个孔中。反应缓冲液(10 μ L)加入到 K_M 对照系列中。板在37 $^{\circ}$ C下温育30min,然后加热至95 $^{\circ}$ C,持续3min。谷氨酸水平使用Amplex[®]红谷氨酸/谷氨酸盐氧化酶测定试剂盒(Invitrogen)进行定量。使用具有545和590nm的激发和发射滤光器的SpectraMax Gemini EM微板阅读器(GMI)分别测量荧光强度。使用Cheng-Prusoff方程从 IC_{50} 和 K_M 值计算 K_i 值,并使用GraphPad Prism软件计算这些值。 K_M 值(0.288 μ M)与文献(Humblet,V.;Misra,P.;Bhushan,K.R.;Nasr,K.;Ko,Y.-S.;Tsukamoto,T.;Pannier,N.;Frangioni,J.V.;Maison,W.J.Med.Chem.2009,52,544-550)中报道的一致。所有报道的数据表示一式三份实验的均值。

[0327] 图16A和表4描绘了根据不同的抑制剂(P-Pthal、P-DNP和P-TriA)的代表性PSMA抑制曲线。已知的PSMA抑制剂PMPA用作实验的对照。

[0328] 表4PSMA抑制测定

[μM]	相对荧光单位			
	Phthal	DNP	TriA	PMPA
50	581.035	525.6755	559.8246667	549.6583333
10	688.1815	581.8336667	599.969	567.78
2	798.8586667	586.843	562.8576667	599.2116667
0.4	1021.402333	622.7463333	586.721	651.3216667
0.08	1273.804667	704.2426667	664.949	787.839
0.016	1387.603	896.7893333	817.1303333	1118.747667
0.0032	1542.606	1123.0625	950.487	1386.251333
0.00064	1633.913	1413.9875	1259.409667	1575.243667
0.000128	1592.5445	1558.430667	1499.6145	1633.926333
0.0000256	1608.653333	1650.519	1618.877333	1622.5365

[0329] 图16B和表5描绘了从图16A和表4所述的同一实验获得的 K_m 曲线。

[0330] 表5 K_m 测量

NAAG [μM]	RFU
20	653.474
10	549.5883333
5	480.622
2.5	446.9936667
1.25	434.8145
0.625	422.2223333
0.3125	400.6455
0.15625	403.0393333

[0331] 如表6所示,基于酶的抑制测定显示相比于P-Phthal (平均 $K_i = 2 \text{ nM}$) 超过400倍强化的对P-TriA的亲合力(平均 $K_i = 4.8 \mu\text{M}$)。

[0332] 表6

试验	Phthal IC_{50} (Ki)	DNP IC_{50} (Ki)	TriA IC_{50} (Ki)	PMPA IC_{50} (Ki)	K_m
1	$2.08 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($2.95 \times 10^{-9} \text{ M}$)	$7.28 \times 10^{-9} \text{ M}$ ($2.95 \times 10^{-10} \text{ M}$)	$1.62 \times 10^{-10} \text{ M}$ ($2.30 \times 10^{-12} \text{ M}$)	$1.11 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($1.58 \times 10^{-10} \text{ M}$)	$2.88 \times 10^{-7} \text{ M}$
2	$3.97 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($2.15 \times 10^{-9} \text{ M}$)	$4.46 \times 10^{-9} \text{ M}$ ($2.42 \times 10^{-11} \text{ M}$)	$1.09 \times 10^{-9} \text{ M}$ ($5.91 \times 10^{-12} \text{ M}$)	$2.48 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($1.34 \times 10^{-10} \text{ M}$)	$1.09 \times 10^{-7} \text{ M}$
3	$2.23 \times 10^{-7} \text{ M}$ ($8.39 \times 10^{-10} \text{ M}$)	$4.58 \times 10^{-9} \text{ M}$ ($1.72 \times 10^{-11} \text{ M}$)	$1.63 \times 10^{-9} \text{ M}$ ($6.13 \times 10^{-12} \text{ M}$)	$1.66 \times 10^{-8} \text{ M}$ ($6.24 \times 10^{-11} \text{ M}$)	$7.55 \times 10^{-7} \text{ M}$
平均 Ki	$1.98 \times 10^{-9} \text{ M}$	$4.82 \times 10^{-11} \text{ M}$	$4.78 \times 10^{-12} \text{ M}$	$1.18 \times 10^{-10} \text{ M}$	

[0333] 体外细胞毒性测定

[0334] 外周血液单核细胞 (PBMC) 通过常规的聚蔗糖-泛影葡胺梯度离心从新鲜健康的人供体血液中纯化。洗涤纯化的PBMC并在烧瓶中具有 10%FBS的RPMI培养基中温育1小时,以除去任何粘连细胞。C4-2 (PSMA+) 细胞(靶细胞)用0.05%胰蛋白酶/EDTA溶液(HyClone)

进行离解,并用10%FBS的RPMI洗涤。 1×10^4 靶细胞与PBMC以1:10 的比例混合在100ml中,并与不同浓度的偶联和未偶联的Fab(在PBS 中为10mL)在37℃下温育24和48小时。使用Cytotox-96非放射性细胞毒性测定试剂盒(Promega)测量每个孔的细胞毒性,用于上清液中 LDH(乳酸脱氢酶)水平。细胞溶解溶液(10mL,在相同的试剂盒中 提供)加入到仅有靶细胞的孔中,以得到最大杀伤,并从具有用媒介物(10mL PBS)处理过的效应细胞和靶细胞的孔中测量自发性杀伤。使用SpectraMax250板阅读器(Molecular Devices Corp.)记录490nm处的吸光度。百分比细胞毒性如下进行计算:

$$\% \text{细胞毒性} = (\text{吸光度}_{\text{实验}} - \text{吸光度}_{\text{自发性平均}}) / (\text{吸光度}_{\text{最大杀伤平均}} - \text{吸光度}_{\text{自发性平均}}) \times 100$$

[0335] 图17A-B显示分别在24小时和48小时处有细胞毒性。表7显示 图17A-B描绘的图的数值。

[0336] 表7体外细胞毒性测定

%细胞毒性			
24h			
[pM]	双-Phthal 偶联物	双-TriA 偶联物	wt-UCHT1
0	0	0	0
0.0512	-0.892388451	-1.319308255	-0.175284838
0.256	-0.699912511	-1.604564093	-0.876424189
1.28	-0.699912511	-1.497593154	-0.911481157
6.4	-0.31496063	2.31770369	-0.473269062
32	-0.472440945	13.06828312	-0.753724803
160	11.65354331	33.17881975	-0.403155127
800	31.14610674	36.14726333	1.191936897
4000	33.14085739	37.93902656	1.858019281
48h			
[pM]	双-Phthal 偶联物	双-TriA 偶联物	wt-UCHT1
0	0	0	0
0.01024	-1.277711965	-1.636828645	-0.608963949
0.0512	-0.913860213	-1.227621483	-1.023059435
0.256	-1.827720426	-1.585677749	-0.519649237
1.28	-1.523100355	4.228473998	-0.081195193
6.4	1.455407006	13.04347826	-0.487171159
32	16.68641056	37.92838875	-1.104254628
160	38.26366559	42.01193521	-0.941864242
800	38.09443222	38.72122762	4.871711595

[0337] 在另一实验中,P-TriA与 α CD Fab结合以生成第二代P-靶向剂抗体偶联物。第二代P-靶向剂抗体偶联物的体外活性和体内PK以及效能 与第一代P-靶向剂抗体偶联物相比较。使用其他的人PSMA-阳性前列腺 癌细胞系(包括22Rv1和PC-3-huPSMA)的靶向剂抗体偶联物的体外 效能也进行了评价。此外,靶向剂抗体偶联物的活性也在来自患者的前 列腺 癌组织中进行测试。使用相应的异硫氰酸荧光素(FITC)偶联物和 冰冻组织微阵列(Asterand)公开的P-连接体部分的组织特异性也可以 进行证实。除了上述的皮下异种移植模型之外,还可以确定在原位前列 腺癌模型中最佳的P-靶向剂抗体偶联物构建体,它更接近地模仿了前列 腺的特定肿瘤微环境。为了确定最佳的P-靶向剂抗体偶联物构建体,荧

光化的 (luciferized) 前列腺癌细胞系 (LNCaP-Luc) 通过生物发光成像 用来监测肿瘤的生长和消退。第0天, 癌细胞 (1.0×10^6 细胞) 被注入6 周大的NSG小鼠的后部的前列腺叶。两周后, 腹膜内注射新鲜纯化的 hPBMC。每周两次监测肿瘤的生长, 并且预计在肿瘤植入后大约4周观察到肿瘤生物发光的增加。在开始治疗之前, 小鼠流血并且通过使用 FACS检测周边的人T细胞评估正确的免疫重建。在治疗期间, 每日静脉内给药0.2~1mg/kg的P-靶向剂抗体偶联物长达10天。肿瘤生长被监测长达8周。进行IHC研究以检测前列腺中浸润的T细胞。

实施例6: 免疫活性小鼠中安全性和效能研究

[0338] 为了准确地评估药物和优化治疗方案, 生成了可能识别小鼠T细胞的小鼠替代物P-靶向剂抗体偶联物。与小鼠CD3 (该抗体还与 ϵ 亚基 结合作为UCHT1剂量) 结合的仓鼠单克隆145-2C11在生成小鼠替代物 P-靶向剂抗体偶联物中使用。145-2C11的可变区序列从文献中获得, 并且合成的基因被克隆入pBAD表达载体, 以表达大肠杆菌 (*E. coli*) 中含 pAcF的Fab。我们使用FACS证实m-P-靶向剂抗体偶联物的结合, 并且 它的体外活性使用纯化的mPBMC进行测量。我们的P-连接体部分基于 hPSMA酶抑制剂, 这已经显示针对来自不同来源包括小鼠、大鼠、狗和 猴的各种PAMS的相似活性。因此我们在先前的研究中开发的优化的DUPA-连接体化合物可直接与抗-m-CD3抗体偶联, 以快速地生成小鼠 替代物形式的P-靶向剂抗体偶联物 (mP-靶向剂抗体偶联物)。然而, 不同于人, 在正常小鼠前列腺组织中mPSMA的表达水平非常低, 并且在 已知的小鼠前列腺癌细胞中的超表达是有争议的。为了模仿人PSMA表达水平, 因此, 我们使用与人PSMA (RM-1-hPSMA) 稳定转导的小鼠 前列腺癌细胞系RM-1。亲本RM-1细胞系是在C57BL/6 (B6) 中MHC 1- 不足的和同基因的, 并且已知RM-1-hPSMA在免疫活性B6小鼠中生长 良好。我们可以首先证实在mPBMC的存在下P-靶向剂抗体偶联物的体 外活性。我们可随后测量药物代谢动力学参数, 它与体外活性实验仪器 确定了用于效能研究的给药规范。对于体内研究, 我们正交注射 0.5×10^6 RM-1-hPSMA细胞进入B6小鼠。在~10天, 当肿瘤达到~200mm³, 通 过静脉内注射mP-靶向剂抗体偶联物治疗小鼠。我们确定了最小有效剂 量、最佳给药频率和最大耐受剂量。我们还评估了在各种器官 (例如, 脑、肝、心脏、肾、脾、肺等) 中B6小鼠中的mP-靶向剂抗体偶联物 的免疫毒性。值得注意的是, 虽然没有直接比较, 但是一些报告表明 与人相比在小鼠的肾中具有大量的mPSMA表达, 这应在评估肾的毒性 的过程中进行考虑。在治疗的过程中测量体重、提高的细胞因子水平 (TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-2等) 和T细胞的活化状态 (CD69和CD25- 阳性), 以监测剂量相关的副作用诸如小鼠中的细胞因子释放综合征。我 们相信剂量依赖性效能数据与最大耐受剂量以及本研究中确定的药物代 谢动力学参数一起提供了对于在非人灵长类研究中安全起始剂量的指导 以及在人中有效剂量的更好评价。

实施例7: 人/食蟹猴交叉反应性P-靶向剂抗体偶联物的生成和非人灵长 类中的安全性研究

[0339] 我们评价了在非人灵长类、短尾猴猕猴 (cyno) 模型中P-靶向剂 抗体偶联物的药物代谢动力学和安全性。不幸的是, 我们已经确定 UCHT1的cyno交叉反应性不足以允许NHP 中的安全性评估。因此人/ 食蟹猴交叉反应性P-靶向剂抗体偶联物 (cyP-靶向剂抗体偶联物) 通过 P-连接体与人/短尾猴交叉反应性 α CD3Fab (SP34) 的结合来制备, 该 偶联物还以高亲和力 ($K_d = 4nM$) 结合CD3 ϵ 链。因为SP34最初衍生自 小鼠, 我们制造了嵌合的或人源化形式的SP34。如以上所讨论, 我们的 P-连接体化合物应该具有与cyno-PSMA类似的亲和力。

我们证实了与用 cynoPSMA转染的CHO细胞的结合。对C4-2细胞的体外细胞毒性在 cyPBMC的存在下进行测量。我们还使用纯化的人和cyno T细胞进行了相似的体外细胞毒性测定，并比较了它们的应答(靶细胞细胞溶解的量级、效能、T细胞活化状态和细胞因子释放)。我们还评估了在啮齿动物 C402异种移植模型中双特异性的效能并如上所述进行了PK、剂量增加和剂量频率研究。

[0340] 对于体内NHP PK研究,雄性食蟹猴静脉内接纳媒介物对照或 cyP-靶向剂抗体偶联物。在规定的时点采集血液样品以确定PK参数。我们使用cyno PK与啮齿动物PK、安全性和效能研究数据一起来设计上升剂量cyno安全性研究,其中三雄性食蟹猴组静脉内接纳不同量的cyP-靶向剂抗体偶联物长达三周(采用Charles River、SNBL或Covance)。在安全性研究的过程中,观察动物的死亡率或濒死以及临床体征或对治疗的反应。进行其他的研究,包括体温、眼科学、体重、摄食量、心血管功能、血液学、凝结、血清化学、尿分析、淋巴细胞亚型(FACS)、细胞因子释放和毒物代谢动力学。制备血清用于测量cyP-靶向剂抗体偶联物的血清浓度水平和用于免疫原性评价。治疗后,来自动物的组织和器官受到完全的宏观评估以及组织病理学检查。这些研究和啮齿动物的研究目标是提供必要的的数据,以用于人中阶段I剂量逐步上升的研究。

实施例8:靶向剂抗体偶联物产量优化、稳定性测试和生物分析方法的开发

[0341] 在本实例中,我们开发了产生P-靶向剂抗体偶联物的最佳方案,以提供足够的材料用于本文公开的研究。人源化SP34序列被亚克隆入不同类型的发酵载体,以筛选最佳的诱导系统。我们还优化了大肠杆菌(E.coli)细胞菌株以及其他的发酵参数,并确定了表达系统的稳定性。来自发酵批的抗体与来自先前的小批表达相比,以确保它们的纯度和活性。靶向剂结合条件(温度、pH、浓度和配体与抗体之比)进行优化以用于大规模反应。对可替代的纯化方法进行测试,以在大规模结合后快速地去除了过量的靶向剂。通过在合并的人血清中37°C无菌条件下温育,我们测试了P-靶向剂抗体偶联物的血清稳定性。针对完整的P-靶向剂抗体偶联物和降解产物(例如,游离的DUPA-连接体),以规定的时间间隔通过LS-MS分析整分试样。还分析体外细胞毒性以确定血清中功能活性P-靶向剂抗体偶联物的浓度。通过差示扫描量热法(DSC)评估热稳定性谱,以确定与亲本SP34相比P-靶向剂抗体偶联物的 T_m 。长期的稳定性在4°C下在各种预配制缓冲液中的不同浓度(1-50mg/ml)下经过至少2个月进行测试。我们还开发了生物分析方法以更准确地确定P-靶向剂抗体偶联物的药物代谢动力学参数。在药物代谢动力学研究中,为了仅检测功能完整的P-靶向剂抗体偶联物,huPSMA包被的ELISA板被用来捕获血清中的P-靶向剂抗体偶联物,随后与具有六组氨酸标签(His-tag)(SEQ ID NO:41)的纯化的CD3 ϵ 链一起温育。在与二次 α His-Tag抗体(与辣根过氧化物酶偶联)一起温育后,使用化学发光试剂盒使信号可视化。对于免疫原性研究,P-靶向剂抗体偶联物被共价键固定至传感器芯片,针对P-靶向剂抗体偶联物的血清抗体应答通过表面等离子共振(SPR)检测。在血清样品中观察到的与P-靶向剂抗体偶联物的特异性结合通过使用游离P-靶向剂抗体偶联物的竞争实验得到证实。

[0342] 实施例9:(S)-2-(3-((S)-5-(4-(6-(4-(1-(氨基氧)-2-氧-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基氨基甲酰基)苯甲酰氨基)己基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-羧基戊基)脲基)戊二酸(P-TriA)的合成。

[0343] (10S,14S)-2,2-二甲基-4,12-二氧-3-氧杂-5,11,13-三氮杂十六烷-10,14,16-

三羧酸三叔丁酯的合成

[0344] 如图15A中所述的反应图解所示,向1 (5.83g, 19.7mmol) 的 CH_2Cl_2 溶液 (150mL) 中加入三光气 (2.92g, 9.85mmol)。反应混合物冷却至 -78°C 并缓慢地添加 Et_3N (27.5mL, 0.197mol)。在环境温度下 搅拌反应混合物1h后,添加 CH_2Cl_2 (10mL) 的2溶液 (Maindron, N.; Poupert, S.; Hamon, M.; Langlois, J.-B.; Plé, N.; Jean, L.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 2357-2370)。在环境温度下 搅拌14h后,反应混合物用饱和的 $\text{aq. NH}_4\text{Cl}$ 猝灭。水层用 CH_2Cl_2 萃取, 并且合并的有机层经 MgSO_4 干燥和真空浓缩。残余物通过在硅胶 (乙酸 乙酯:正己烷=1:3) 上的快速柱色谱法进行纯化以提供11.2g (97%) 的3作为一种淡黄色的油: R_f 0.5 (乙酸乙酯:正己烷=1:2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.50 (d, 1H, $J=8.3\text{Hz}$)、5.46 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$)、5.01 (s, 1H)、4.31 (m, 2H)、3.04 (m, 2H)、2.26 (m, 2H)、2.03 (m, 1H)、1.83 (m, 1H)、1.70 (m, 1H)、1.58 (m, 1H)、1.41 (s, 9H)、1.40 (s, 9H)、1.39 (s, 9H)、1.38 (s, 9H)、1.32 (m, 4H); LR-MS (ESI+) m/z 588 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

(S)-2-(3-((S)-6-氨基-1-叔丁氧基-1-氧代己烷-2-基) 脲基) 戊二酸二叔丁酯的合成

[0346] 如图15B所述的反应图解所示,在 0°C 下向3 (10.8g, 18.4mmol) 的 CH_2Cl_2 溶液 (100mL) 中加入2,6-二甲基吡啶 (4.29mL, 36.8mmol) 和 TMSOTf (5.00mL, 27.6mmol)。在环境温度下搅拌30min后,反应 混合物用甲醇猝灭并真空浓缩。残余物通过快速柱色谱法在硅胶上进行 纯化 (乙酸乙酯:正己烷=3:1至甲醇:乙酸乙酯=1:10), 以提供8.09 g (90%) 的4作为黄色油: R_f 0.4 (甲醇:乙酸乙酯=1:10); LR-MS (ESI+) m/z 488 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

(S)-2-(3-((S)-6-叠氮基-1-叔丁氧基-1-氧代己烷-2-基) 脲基) 戊二酸二叔丁酯的合成

[0348] 如图15C中所述的反应图解所示,在 0°C 下向叠氮化钠 (1.55g, 23.8mmol) 的 CH_3CN 溶液 (30mL) 中逐滴加入 Tf_2O (3.20g, 19.0mmol)。1h后,在 0°C 下向4 (5.80g, 11.9mmol)、 Et_3N (4.98mL, 35.7mL) 和 CuSO_4 (38.0mL, 0.238mmol) 的 CH_3CN 溶液 (mL) 中逐滴加入叠 氮化三氟甲磺酸溶液。在环境温度下搅拌14h后,反应混合物用饱和的 $\text{aq. NH}_4\text{Cl}$ 猝灭。水层用乙酸乙酯萃取,并且合并的有机层经 MgSO_4 干燥和真空浓缩。残余物通过在硅胶 (乙酸乙酯:正己烷=1:3) 上的快 速柱色谱法进行纯化以提供3.20g (52%) 的5作为白色固体: R_f 0.3 (乙 酸乙酯:正己烷=1:2); $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 6.33 (s, 2H)、5.22 (m, 2H)、4.28 (m, 2H)、3.26 (t, 2H, $J=6.8\text{Hz}$)、2.28 (m, 2H)、2.02 (m, 1H)、1.86 (m, 1H)、1.77 (m, 1H)、1.61 (m, 3H)、1.46 (s, 18H)、1.43 (s, 9H); LR-MS (ESI+) m/z 514 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

辛-7-炔基氨基甲酸叔丁酯的合成

[0350] 如图15D所述的反应图解所示,向6 (Coutrot, F.; Romuald, C.; Busseron, E. *Org. Lett.*, 2008, 10, 3741-3744) (101mg, 0.807mmol) 的 $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ 溶液 (4/4mL) 中加入 NaHCO_3 (102mg, 1.21mmol) 和 Boc_2O (0.210mL, 0.968mmol)。在环境温度下搅拌14h后,反应混 合物用饱 和的 $\text{aq. NH}_4\text{Cl}$ 猝灭。水层用乙酸乙酯萃取,并且合并的有机层经 MgSO_4 干燥和真空 浓缩。残余物通过快速柱色谱法在硅胶上进行纯化 (乙酸乙 酯:正己烷=1:7), 以提供 144mg (79%) 的7作为淡黄色油: R_f 0.5 (乙酸乙酯:正己烷=1:7); LR-MS (ESI+) m/z 226 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

(S)-2-(3-((S)-1-叔丁氧基-6-(4-(6-(叔丁氧基羰基氨基) 己基) -1H-1,2,3-三

唑-1-基)-1-氧代己烷-2-基)脲基)戊二酸二叔丁酯的合成

[0352] 如图15E所述的反应图解所示,向5(770mg,1.25mmol)、7(309 mg,1.37mmol)和抗坏血酸钠(99.1mg,0.500mmol)的THF溶液(20 mL)中加入CuSO₄·H₂O(62.4mg,0.250mmol)的水溶液(3.2mL)。在环境温度下搅拌30min后,水层用乙酸乙酯萃取,并且合并的有机层经MgSO₄干燥和真空浓缩。残余物通过在硅胶(乙酸乙酯:正己烷=2:1)上的快速柱色谱法进行纯化以提供644mg(70%)的8作为白色固体:R_f0.3(乙酸乙酯:正己烷=2:1);¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ5.28(m,2H)、4.57(s,1H)、4.30(m,4H)、3.08(m,2H)、2.67(t,2H,J=7.7Hz)、2.04(m,2H)、1.89(m,2H)、1.78(m,2H)、1.64(m,3H)、1.44(s,9H)、1.41(s,27H)、1.37(s,8H);LR-MS(ESI+)m/z 739(M+H⁺)。

(S)-2-(3-((S)-6-(4-(6-氨基己基))-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-叔丁氧基-1-氧代己烷-2-基)脲基)戊二酸二叔丁酯的合成

[0354] 如图15F所述的反应图解所示,在0℃下向8(644mg,0.872mmol)的CH₂Cl₂溶液(10mL)中加入2,6-二甲基吡啶(0.200mL,1.74mmol)和TMSOTf(0.240mL,1.31mmol)。在环境温度下搅拌30min后,反应混合物用甲醇猝灭并真空浓缩。残余物通过快速柱色谱法在硅胶上进行纯化(乙酸乙酯:正己烷=3:1至甲醇:乙酸乙酯=1:10),以提供351mg(63%)的9作为黄色油:R_f0.2(甲醇:乙酸乙酯=1:10);LR-MS(ESI+)m/z 639(M+H⁺)。

4-(2,2-二甲基-4,8-二氧化-3,6,12,15,18-五氧杂-5,9-二氮杂二十碳烷-20-基氨基甲酰基)苯甲酸甲酯的合成

[0356] 如图15G所述的反应图解所示,在0℃下向10(Hagemeyer,C;Peter,K.;Johnston,A.P.R.;Owen,D.PCT Int.Appl.WO 2012142659A1,2012)(74.5mg,0.209mmol)的CH₂Cl₂溶液(5mL)中加入*i*-PrNEt(54.7μL,0.314mmol)和4-(氯羰基)苯甲酸甲酯(125mg,0.627mmol)。在环境温度下搅拌12h后,反应混合物用饱和aq.NH₄Cl猝灭。水层用CH₂Cl₂萃取,并且合并的有机层经MgSO₄干燥和真空浓缩。残余物通过快速柱色谱法在硅胶上进行纯化(甲醇:乙酸乙酯=1:20),以提供98.1mg(89%)的11作为淡黄色油:R_f0.4(甲醇:乙酸乙酯=1:10);LR-MS(ESI+)m/z 550(M+Na⁺)。

4-(2,2-二甲基-4,8-二氧化-3,6,12,15,18-五氧杂-5,9-二氮杂二十碳烷-20-基氨基甲酰基)苯甲酸的合成

[0358] 如图15H中所述的反应图解所示,向11(200mg,0.379mmol)的THF/H₂O溶液(5/5mL)中加入LiOH·H₂O(23.9mg,0.569mmol)。在环境温度下搅拌4h后,反应混合物用2N NH₄Cl酸化。水层用乙酸乙酯萃取,并且合并的有机层经MgSO₄干燥和真空浓缩。残余物通过快速柱色谱法在硅胶上进行纯化(甲醇:乙酸乙酯=1:7),以提供118mg(74%)的12作为淡黄色油:R_f0.2(甲醇:乙酸乙酯=1:7);LR-MS(ESI+)m/z 536(M+Na⁺)。

(S)-2-(3-((S)-1-叔丁氧基-6-(4-(6-(4-(2,2-二甲基-4,8-二氧化-3,6,12,15,18-五氧杂-5,9-二氮杂二十碳烷-20-基氨基甲酰基)苯甲酰氨基)己基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-氧代己烷-2-基)脲基)戊二酸二叔丁酯的合成

[0360] 如图15I所述的反应图解所示,在0℃下向9(45.8mg,71.7μmol)和12(43.8mg,71.7μmol)的DMF溶液(5mL)中加入EDCI(41.2mg,0.215mmol)、HOBt(29.1mg,0.215mmol)和Et₃N(30.0μL,0.215mmol)。在环境温度下搅拌14h后,反应混合物用饱和aq.NH₄Cl猝灭。水层用乙酸乙酯萃取,并且合并的有机层经MgSO₄干燥和真空浓缩。残余物通过快速柱色谱

法在硅胶上进行纯化(甲醇:乙酸乙酯=1:15),以提供 22.0mg (27%)的13作为淡黄色油:LR-MS (ESI+) m/z 1134 (M+H⁺)。

[0361] (S)-2-(3-((S)-5-(4-(6-(4-(1-(氨基氧)-2-氧-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基氨基甲酰基)苯甲酰氨基)己基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-1-羧基戊基)脲基)戊二酸(P-TriA)的合成。

[0362] 如图15J中所述的反应图解所示,向13 (26.6mg, 23.4 μ mol) 的CH₂Cl₂溶液(1.5mL)中加入TFA (1.5mL)。在环境温度下搅拌14h 后,反应混合物进行真空浓缩。残余物通过快速柱色谱法在硅胶上进行 纯化(甲醇:乙酸乙酯=1:15),以提供20.1mg (99%)的14作为淡黄色油:LR-MS (ESI+) m/z 866 (M+H⁺)。与抗-CD3Fab (UCHT1) pAcF 突变体 (LC-202X/HC-138X) 偶联的P-TriaA (化合物14)的ESI-MS 分析和去卷积质谱分别描绘在图15K和15L中。

[0363] 表8抗体、抗体片段或靶向剂的序列(在用于UCHT1非天然氨基酸并入的位点下加下划线)。

	描述	序列
1	UCHT1 的抗-CD3 的轻链克隆	ATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTTGCTAGC ATGTTCTGTTTTTCTATTGCTACAAACGCATAC GCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCC CTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT CACTTGCCGGGCAAGTCAGGACATCCGTAATT ATCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATTATACCTCCCGC CTGGAGTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGG CTCTGGATCTGGGACAGATTACACTCTGACCAT CAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTT ACTACTGTCAACAGGGTAATACTCTGCCGTGG ACGTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAGATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGA GAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGTCCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T

	描述	序列
2	UCHT1 的抗-CD3 的重链克隆	ATGAAAAAGAATATCGCATTCTTCTTGCATCT ATGTTTCGTTTTTCTATTGCTACAAACGCGTAC GCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGG CTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC CTGTGCAGCCTCTGGGTACTCCTTTACCGGCTA CACTATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTTCGCACTGATTAATCCT TATAAAGGTGTTTCCACCTATAACCAGAAATTC AAGGATCGATTACCATCTCCGTAGATAAATC CAAAAACACGGCGTATCTTCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCTAGAAGCGGATACTACGGCGATAGTACTG GTATTTTGACGTCTGGGGCCAAGGAACCCTGG TCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA TCGGTCTTCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGT GCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAA ACTCACACA
3	SS-14 (促生长素抑制素类似物)	Ala-Gly-环 (Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)
4	OC (促生长素抑制素类似物)	D-Phe1-环 (Cys2-Phe3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
5	TOC (促生长素抑制素类似物)	D-Phe1-环 (Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
6	TATE (促生长素抑制素类似物)	D-Phe1-环(Cys2-Tyr3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8

	描述	序列
7	NOC (促生长素抑制素类似物)	D-Phe1-环 (Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
8	NOC-ATE (促生长素抑制素类似物)	D-Phe1-环 (Cys2-1-Nal3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
9	BOC (促生长素抑制素类似物)	D-Phe1-环 (Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr(ol)8
10	BOC-ATE (促生长素抑制素类似物)	D-Phe1-环 (Cys2-BzThi3-D-Trp4-Lys5-Thr6-Cys7)Thr8
11	KE108 (促生长素抑制素类似物)	Tyr-环(DAB-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe)
12	LM3 (促生长素抑制素类似物)	p-Cl-Phe-环 (D-Cys-Tyr-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys)D-Tyr-NH ₂
13	BN (铃蟾肽类似物)	pGlu1-Gln2-Arg3-Leu4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH ₂
14	RP527(铃蟾肽类似物)	N3S-Gly-5-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Met14-NH ₂]
15	Demobesin 1 (铃蟾肽类似物)	N40-1-bzlg0 [D-Phe6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu-NH ₂ Et13]
16	Demobesin 4 (铃蟾肽类似物)	N4-[Pro1-Gln2-Arg3-Tyr4-Gly5-Asn6-Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Leu13-Nle14- NH ₂]
17	BBS-38 (铃蟾肽类似物)	(NαHis)Ac-β-Ala-β-Ala-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-Gly11-His12-Cha13-Nle14- NH ₂]
18	BAY 86-4367 (铃蟾肽类似物)	3-氟基-4-三甲基铵-苯甲酰基 -Ala(SO ₃ H)-Ala(SO ₃ H)-Ava-[Gln7-Trp8-Ala9-Val10-NMeGly11-His12-Sta13-Leu14-NH ₂]
19	MG (小促胃液素类似物)	Leu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH ₂
20	MG0 (小促胃液素类似物)	D-Glu1-Glu2-Glu3-Glu4-Glu5-Glu6-Ala7-Tyr8-Gly9-Trp10-Met11-Asp12-Phe13-NH ₂

	描述	序列
21	MG11 (小促胃液素类似物)	D-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
22	H2-Met (小促胃液素类似物)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
23	H2-Nle (小促胃液素类似物)	His-His-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
24	Demogastrin (小促胃液素类似物)	N ⁴ -D-Glu-(Glu) ⁵ -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
25	环-MG1 (小促胃液素类似物)	c(γ-D-Glu-Ala-Tyr-D-Lys)-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
26	MGD5 (小促胃液素类似物)	Gly-Ser-Cys(琥珀酰亚胺丙酰基-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂)-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH ₂
27	布舍瑞林 (GnRH 类似物)	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Ser(tBu) 6-Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -NHC ₂ H ₅
28	戈舍瑞林 (GnRH 类似物)	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Ser(tBu) 6-Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -AzGly ¹⁰ -NH ₂
29	亮丙瑞林 (GnRH 类似物)	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Leu ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -NHC ₂ H ₅
30	那法瑞林 (GnRH 类似物)	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Nal (2) 6-Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -NHC ₂ H ₅
31	曲普瑞林 (GnRH 类似物)	pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Trp ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂
32	阿巴瑞克 (GnRH 类似物)	Ac-D-Ala ¹ -D-Cpa ² -D-Ala ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -D-Asp ⁶ -Leu ⁷ -Ilys ⁸ -Pro ⁹ -D-Ala ¹⁰ -NH ₂

	描述	序列
33	Acylone (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(Ac)5-D-Aph(Ac)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
34	安雷利克斯 (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Hci6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
35	抗排卵肽 (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Lys(Nic)5-D-Lys(Nic)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
36	Azaline B (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph (Atz)5-D-Aph(Atz)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
37	西曲瑞克 (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-Cit6-Leu7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2
38	地加瑞克 (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Aph(L-hydroorotylyl)5-D-Aph(氨基甲酰基)6-Leu7-Ilys8-Pro9-D-Ala10-NH2
39	加尼瑞克 (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-Tyr5-D-hArg(Et2)6-Leu7-hArg(Et2)8-Pro9-D-Ala10-NH2
40	奥扎瑞克 (GnRH 类似物)	Ac-D-Nal1-D-Cpa2-D-Pal3-Ser4-N-MeTyr5-D-hCit6-Nle7-Arg8-Pro9-D-Ala10-NH2

[0364] 前面仅说明了本发明的原理。应理解，本领域技术人员将能够设计多种布置，这些布置尽管没有在本文中明确地描述或显示，但其体现了本发明的原理并包括在其精神和范围内。此外，本文描述的实例和条件性语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和由发明人贡献的概念以促进本领域发展，并应解释为不限于这些具体描述的实例和条件。而且，本文描述本发明的原理、方面和实施方案的所有声明以及其具体实例，旨在涵盖其结构和功能上的等同物。另外，这样的等同物旨在包括目前已知的等同物和将来研发的等同物，即，无论结构如何，研发的执行相同功能的任何元件。因此，发明的范围并非旨在限于本文所示和描述的示例性实施方案。相反，本发明的范围和精神通过所附权利要求来体现。

[0365] 尽管本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案，但是本领域技术人员将会明白，这些实施方案仅通过举例提供。在不偏离本发明的情况下，本领域技术人员现在将会想到许多变换、改变和替代。应理解，本文描述的本发明实施方案的多种替代方案可以用于实施本发明。下面的权利要求旨在限定本发明的范围，由此涵盖在这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

序列表

- <110> 斯克利普斯研究所
<120> 靶向剂抗体偶联物及其用途
<130> 41135-720.601
<140> PCT/US2014/029379
<141> 2014-03-14
<150> 61/839,330
<151> 2013-06-25
<150> 61/783,426
<151> 2013-03-14
<160> 41
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 711
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多核苷酸

<400> 1

```
atgaaaaaga atatcgatt tcttcttgct agcatgttcg tttttctat tgctacaaac 60
gcatacgctg acatccagat gaccagctc ccatcctccc tgtctgcatc tgtaggagac 120
agagtcacca tcaactgccc ggcaagtcag gacatccgta attatctgaa ctggtatcag 180
cagaaaccag ggaaagcccc taagctcctg atctattata cctcccgcct ggagtctggg 240
gtcccatcaa ggttcagtgg ctctggatct gggacagatt aactctgac catcagcagt 300
ctgcaacctg aagatcttgc aacttactac tgtcaacagg gtaatactct gccgtggacg 360
ttcggccaag gtaccaaggt ggagatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 420
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgtcgtgtg cctgctgaat 480
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 540
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 600
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 660
catcagggcc tgtcctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg t 711
```

<210> 2

<211> 759

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多核苷酸

<400> 2

atgaaaaaga atatcgatt tcttcttgca tctatgttcg ttttttctat tgctacaaac 60
 gcgtacgctg aggtgcagct ggtggagtct ggaggaggct tggccagcc tgggggtcc 120
 ctgagactct cctgtgcagc ctctgggtac tcctttaccg gctacactat gaactgggtc 180
 cgccaggctc caggaagg gctggagtgg gtgcactga ttaatcctta taaagtggt 240
 tccacctata accagaaatt caaggatcga ttaccatct ccgtagataa atccaaaaac 300
 acggcgtatc ttcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cggccgtgta ttactgtgct 360
 agaagcggat actacggcga tagtgaactg tattttgacg tctggggcca aggaaccctg 420
 gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccateggtct tccccctggc accctcctcc 480
 aagagcacct ctgggggac agcggcctg ggctgctgg tcaaggacta ctccccgaa 540
 ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcagcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccgct 600
 gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgactgtgcc ctctagcagc 660
 ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 720
 aagaaagttg agcccaaatt ttgtgacaaa actcacaca 759

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (3) .. (14)

<223> 环状

<400> 3

Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys

1

5

10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> D-氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (7)

<223> 环状

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) .. (3)

<223> BzThi

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> D-氨基酸

<400> 10

Phe Cys Xaa Trp Lys Thr Cys Thr

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2) .. (2)

<223> DAB

<220>

<221> misc_feature

<222> (2) .. (9)

<223> 环状

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6) .. (6)

<223> D-氨基酸

<400> 11
Tyr Xaa Arg Phe Phe Trp Lys Thr Phe
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述:合成
肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
<223> p-Cl-Phe

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> D-氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (2) .. (7)
<223> 环状

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
<223> D-Aph (Cbm)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> D-氨基酸

<220>
<223> C-末端NH2

<400> 12
Phe Cys Tyr Xaa Lys Thr Cys Tyr
1 5

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成
肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> pGlu

<220>

<223> C-末端NH2

<400> 13

Glu Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met

1

5

10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成
肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> N,N-dimethyl-Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) .. (3)

<223> Cys (acm)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (3)

<223> N3S

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (5)

<223> Ava

<220>

<223> C-末端NH2

<400> 14

Gly Ser Cys Gly Xaa Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met

1	5	10
<210>	15	
<211>	8	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述:合成肽	
<220>		
<223>	N-末端N40-1-bzlg0	
<220>		
<221>	MOD_RES	
<222>	(1) .. (1)	
<223>	D-氨基酸	
<220>		
<223>	C-末端NHEt13	
<400>	15	
	Phe Gln Trp Ala Val Gly His Leu	
1	5	
<210>	16	
<211>	14	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列的描述:合成肽	
<220>		
<223>	N-末端N4	
<220>		
<221>	MOD_RES	
<222>	(14) .. (14)	
<223>	Nle	
<220>		
<223>	C-末端NH2	
<400>	16	
	Pro Gln Arg Tyr Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Leu	
1	5	10
<210>	17	
<211>	11	

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Ava
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> NMeGly
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 <223> Sta
 <220>
 <223> C-末端NH2
 <400> 18
 Ala Ala Xaa Gln Trp Ala Val Gly His Xaa Leu
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成
 肽
 <220>
 <223> C-末端NH2
 <400> 19
 Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的描述:合成
 肽
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)

<223> 人工序列的描述:合成
肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8) .. (8)

<223> Nle

<220>

<223> C-末端NH2

<400> 23

His His Glu Ala Tyr Gly Trp Leu Asp Phe

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成
肽

<220>

<223> N-末端N4

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> D-氨基酸

<220>

<223> C-末端NH2

<400> 24

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met Asp Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成
肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

1

5

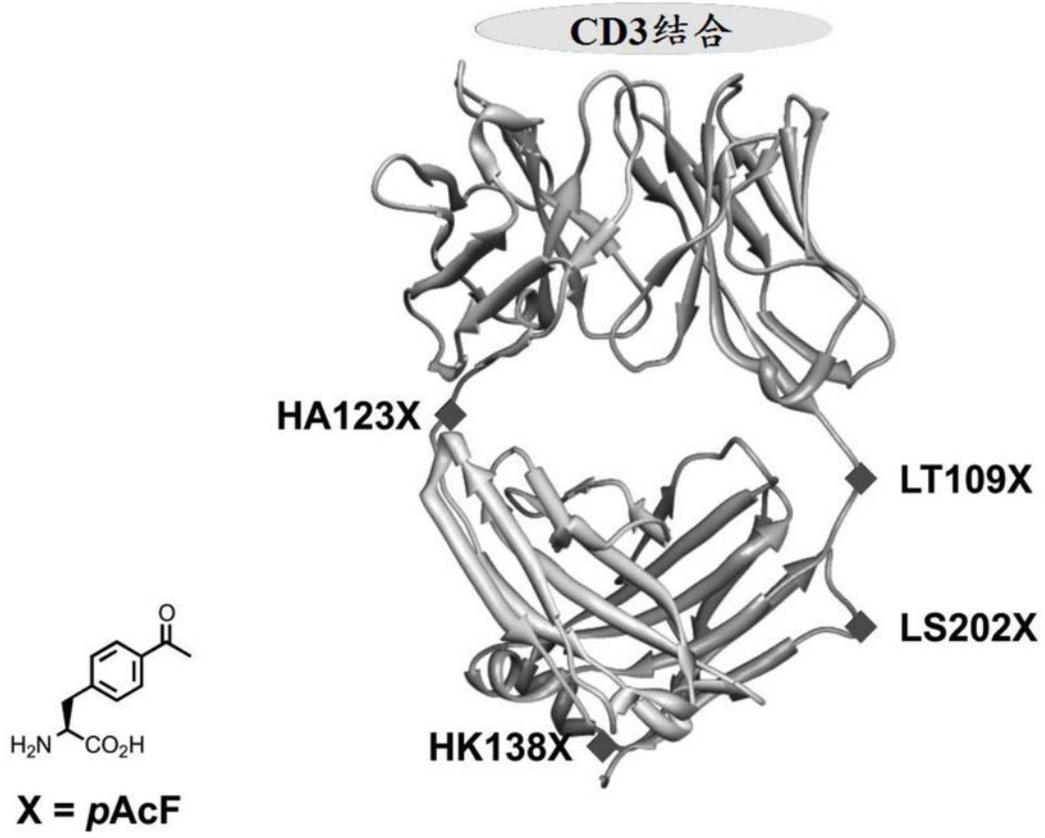


图2

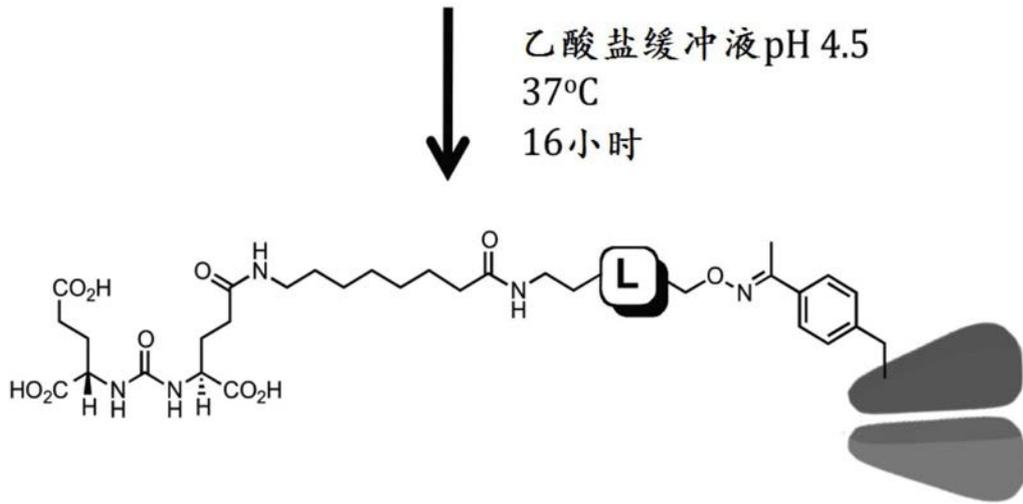
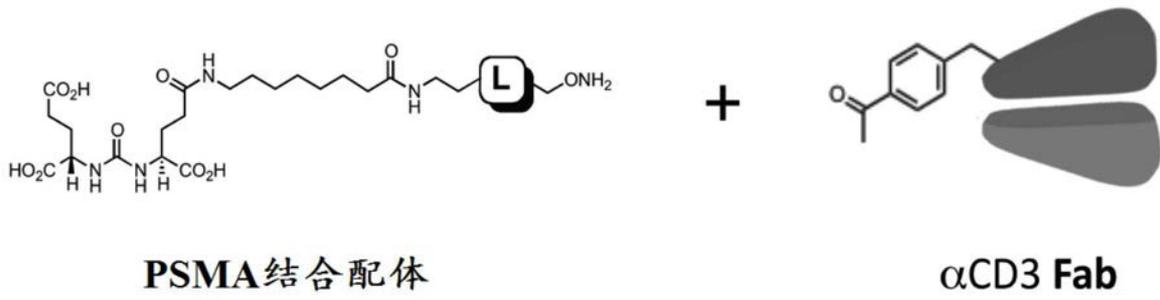


图3A

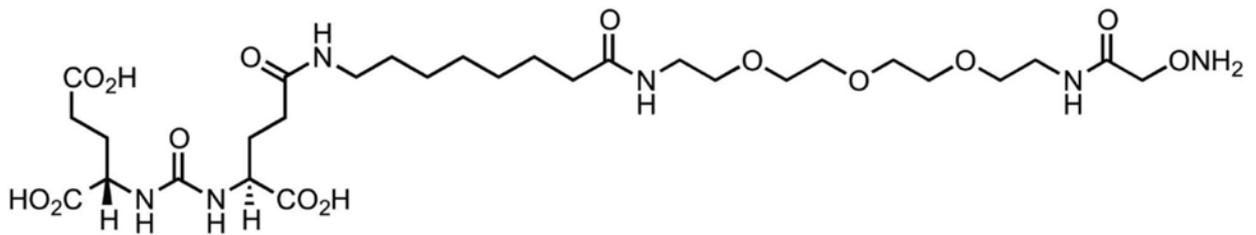


图3B

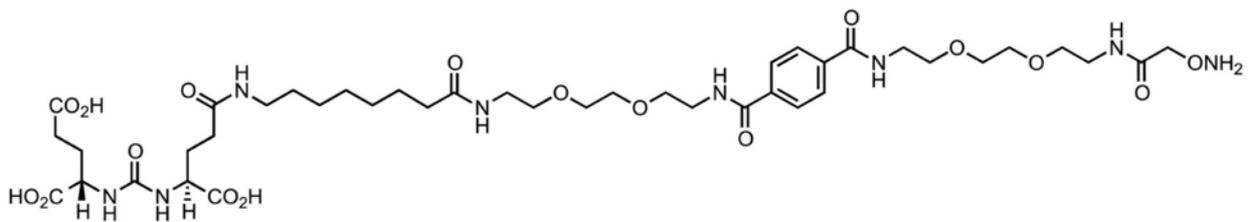


图3C

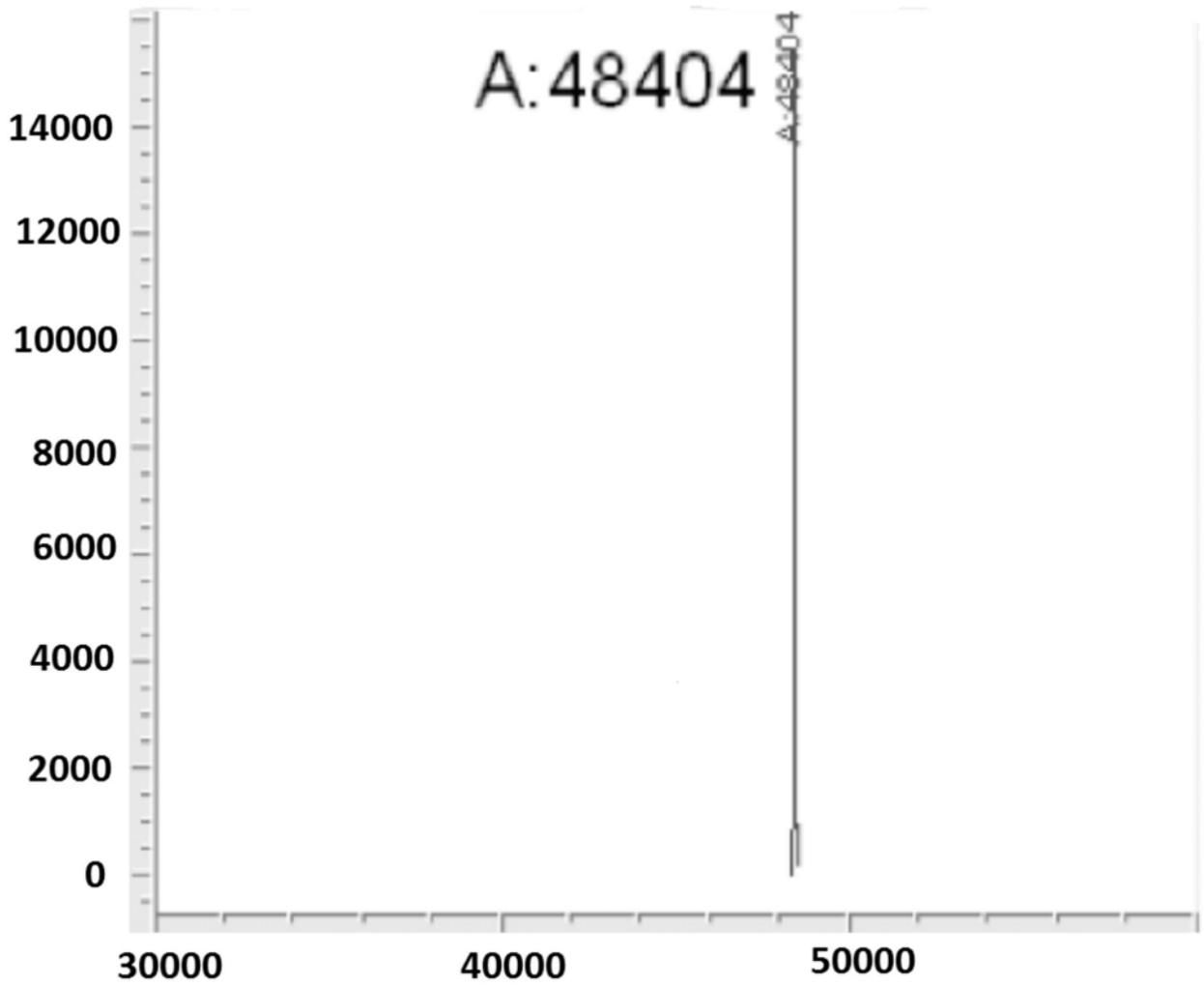


图4B

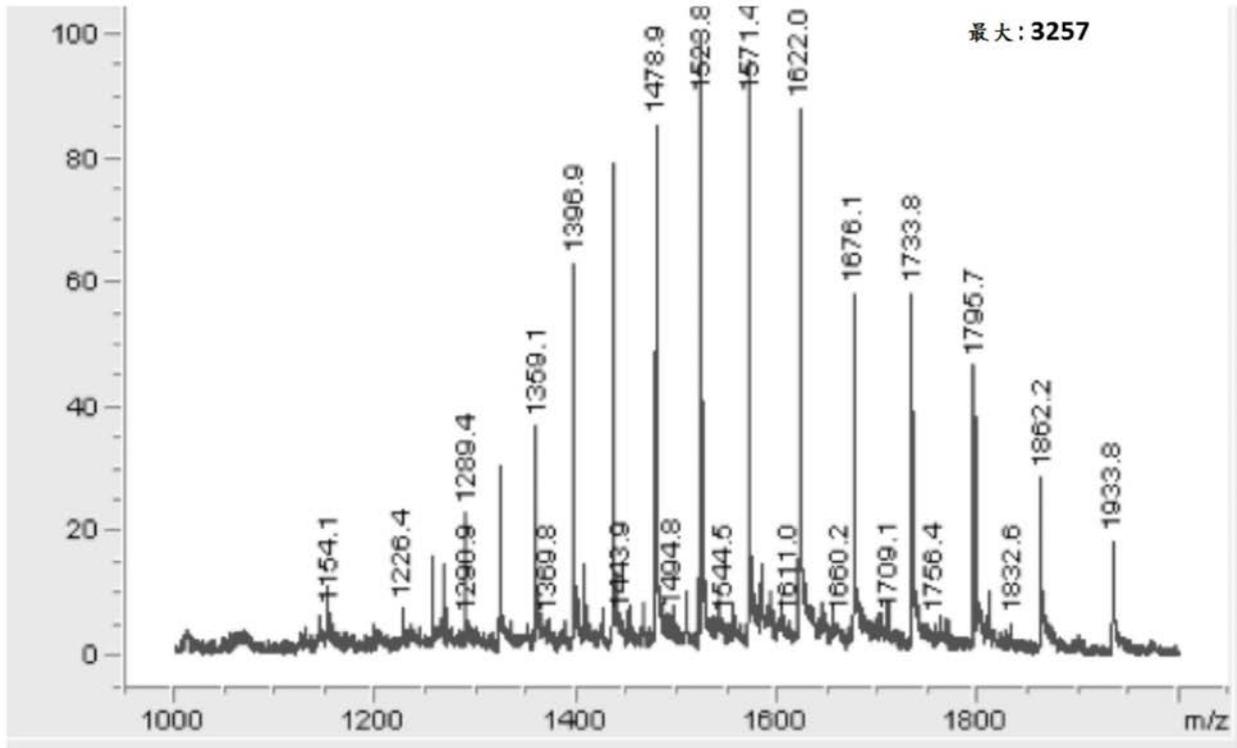


图4C

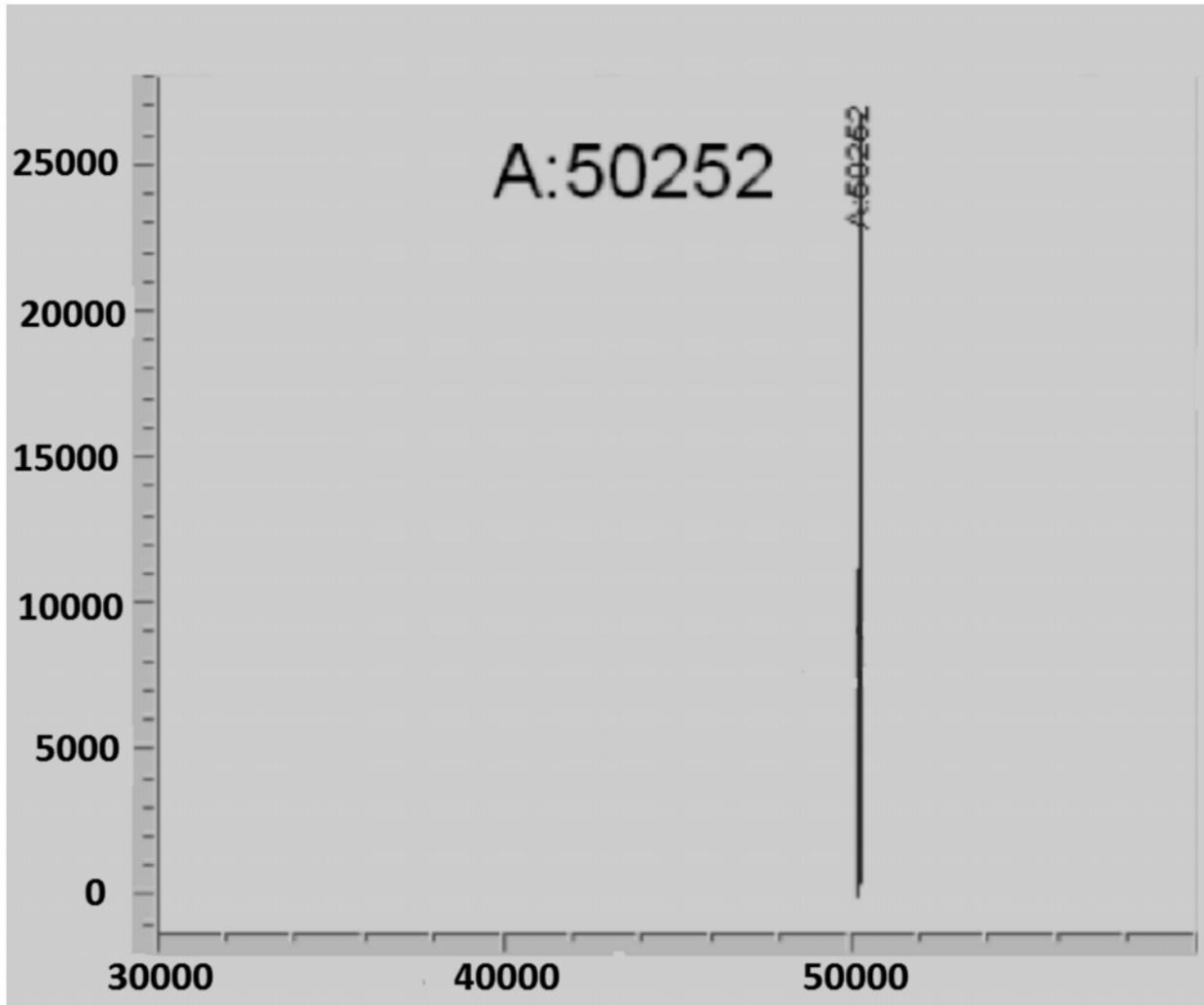


图4D

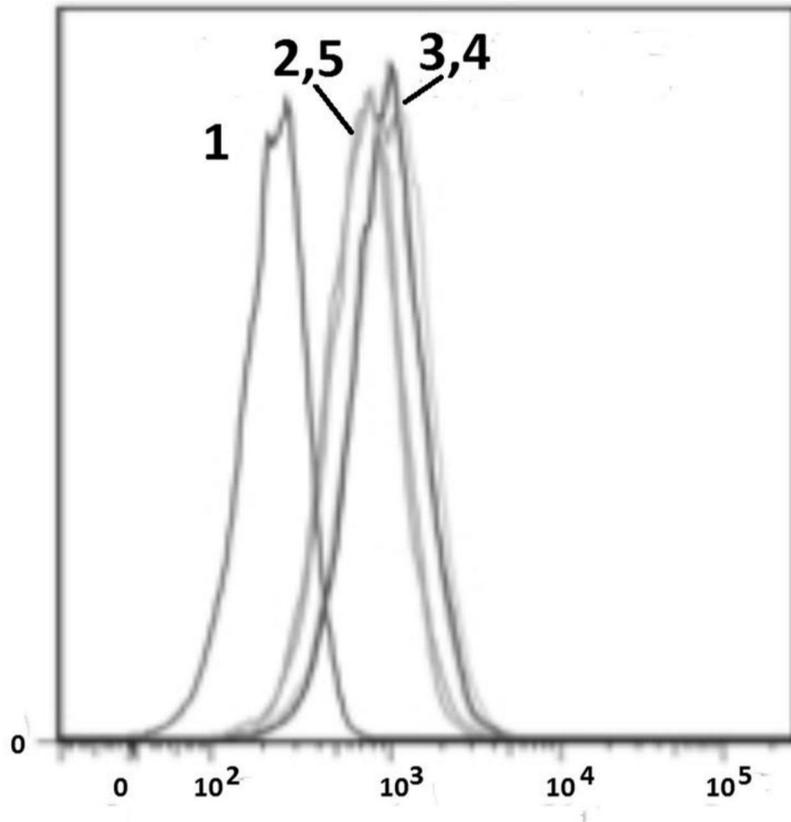


图5A

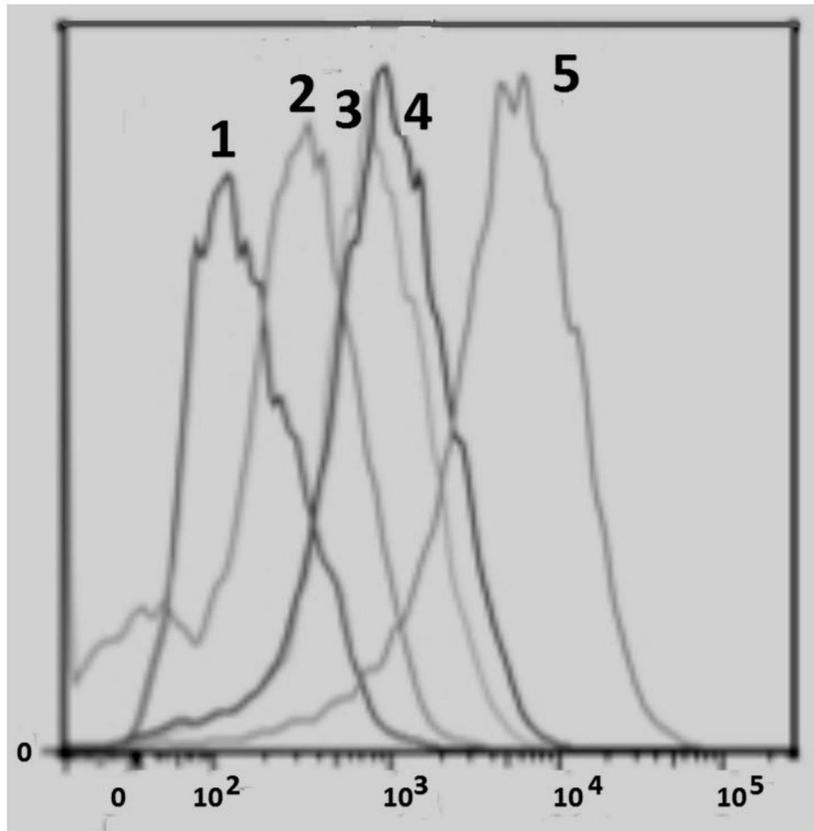


图5B

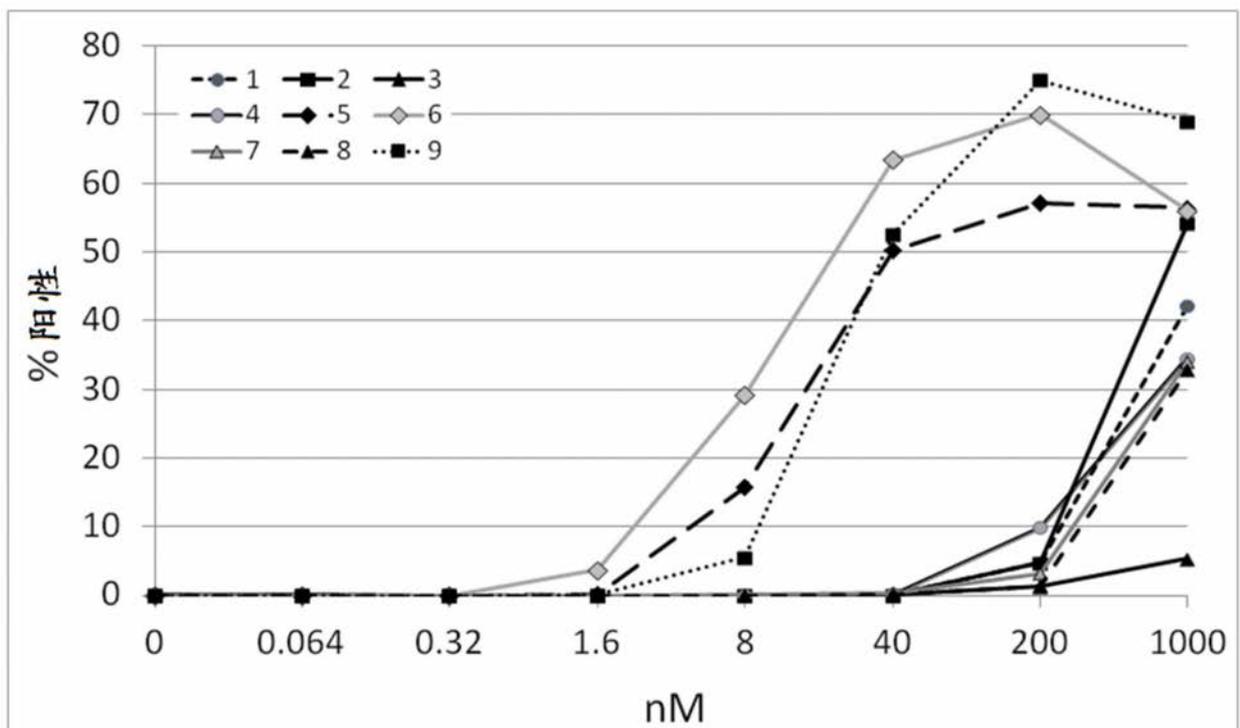


图5C

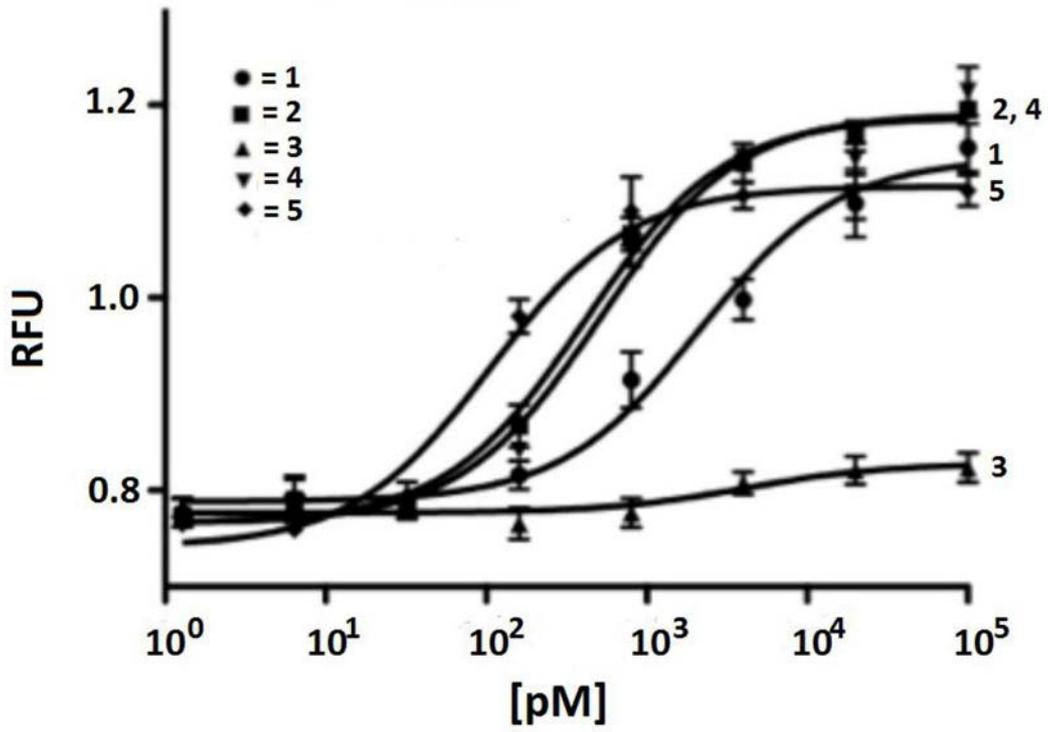


图6A

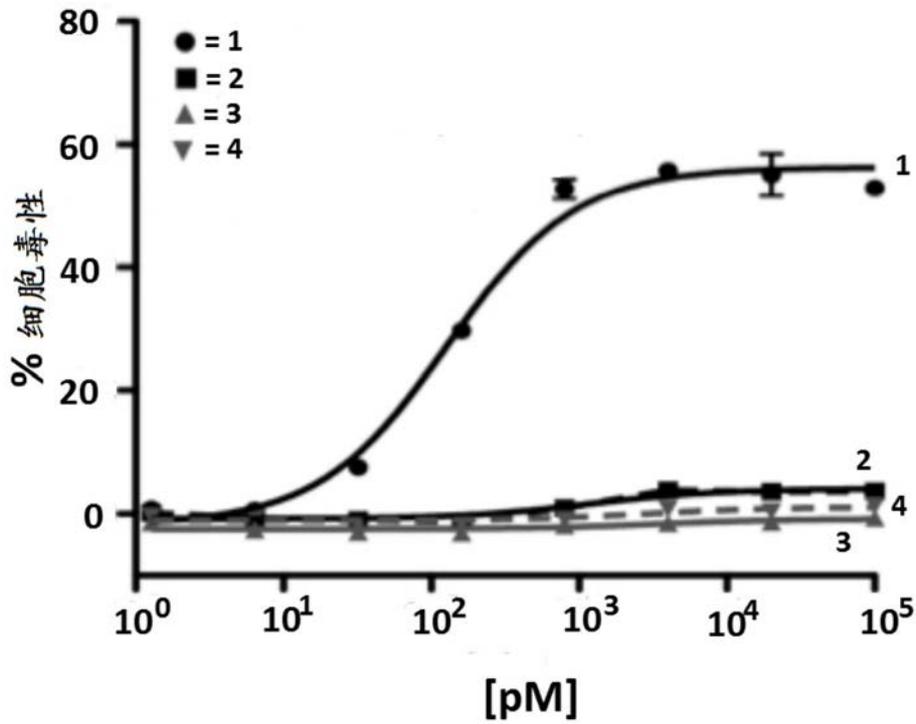


图6B

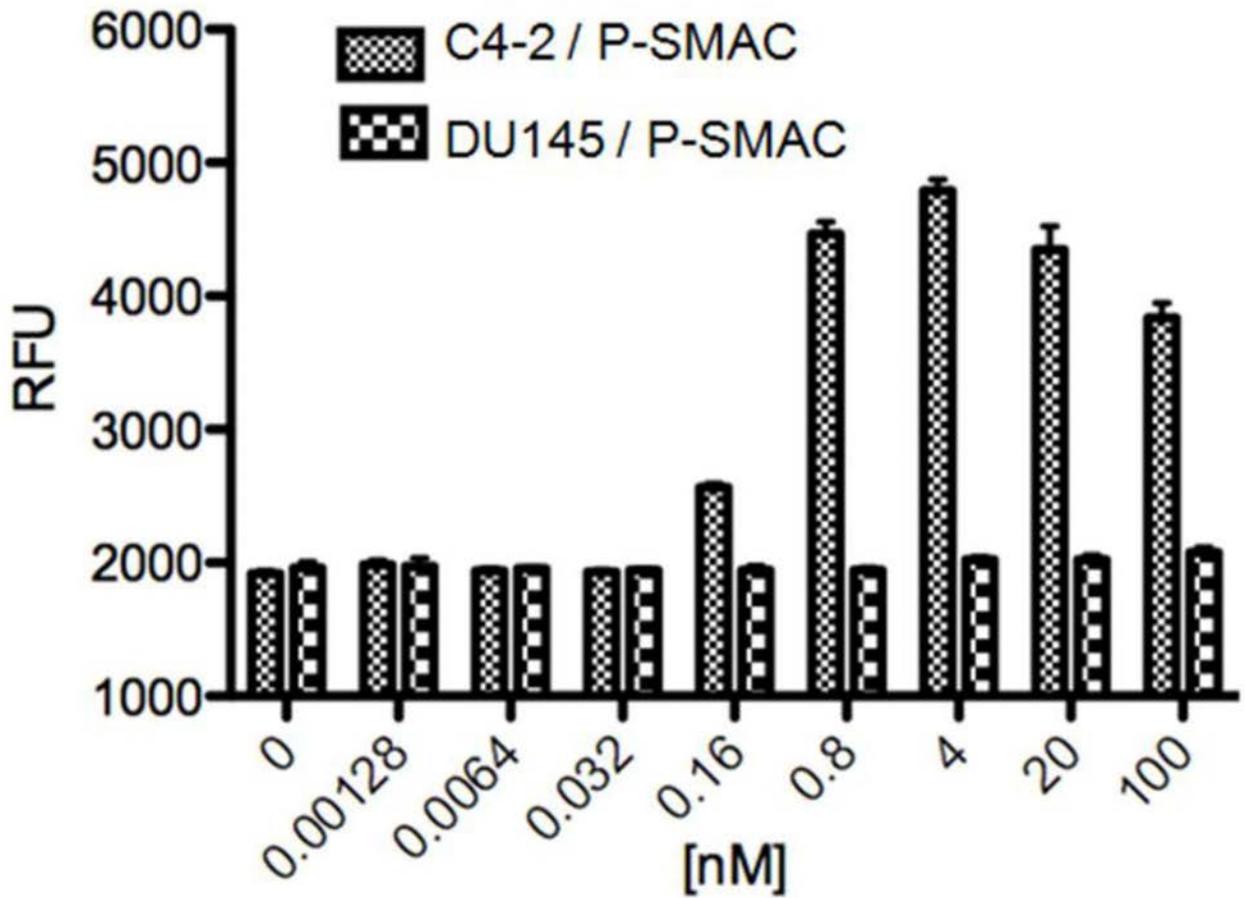


图6C

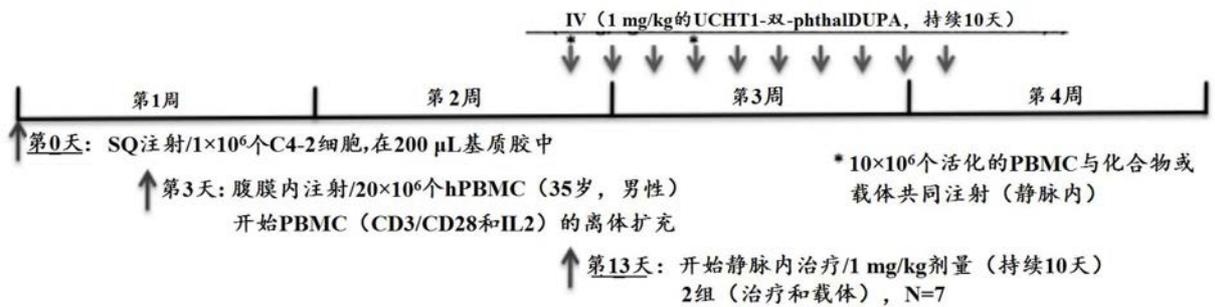


图7A

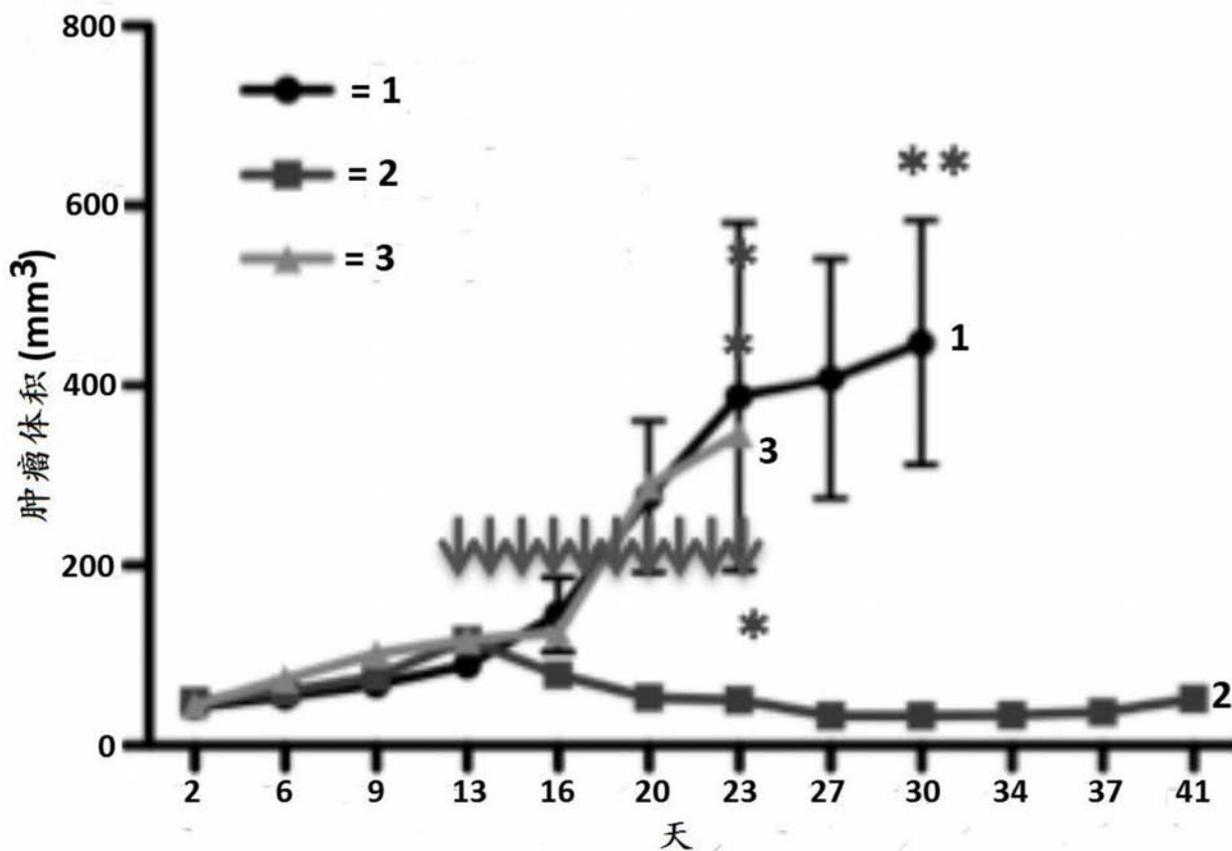


图7B

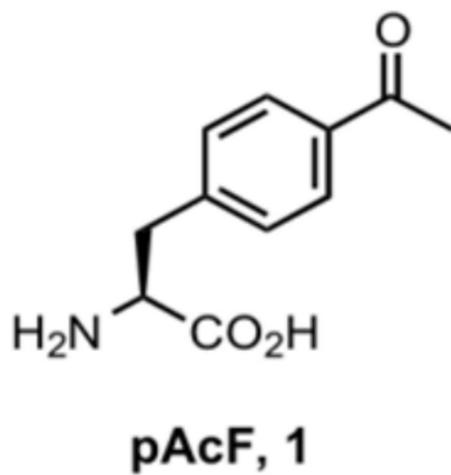


图8

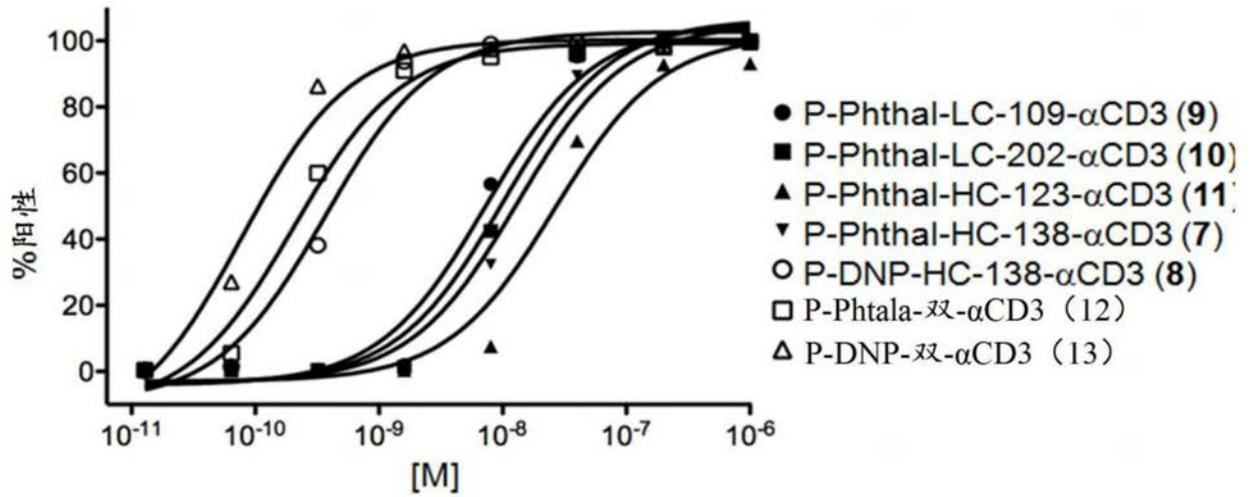


图9

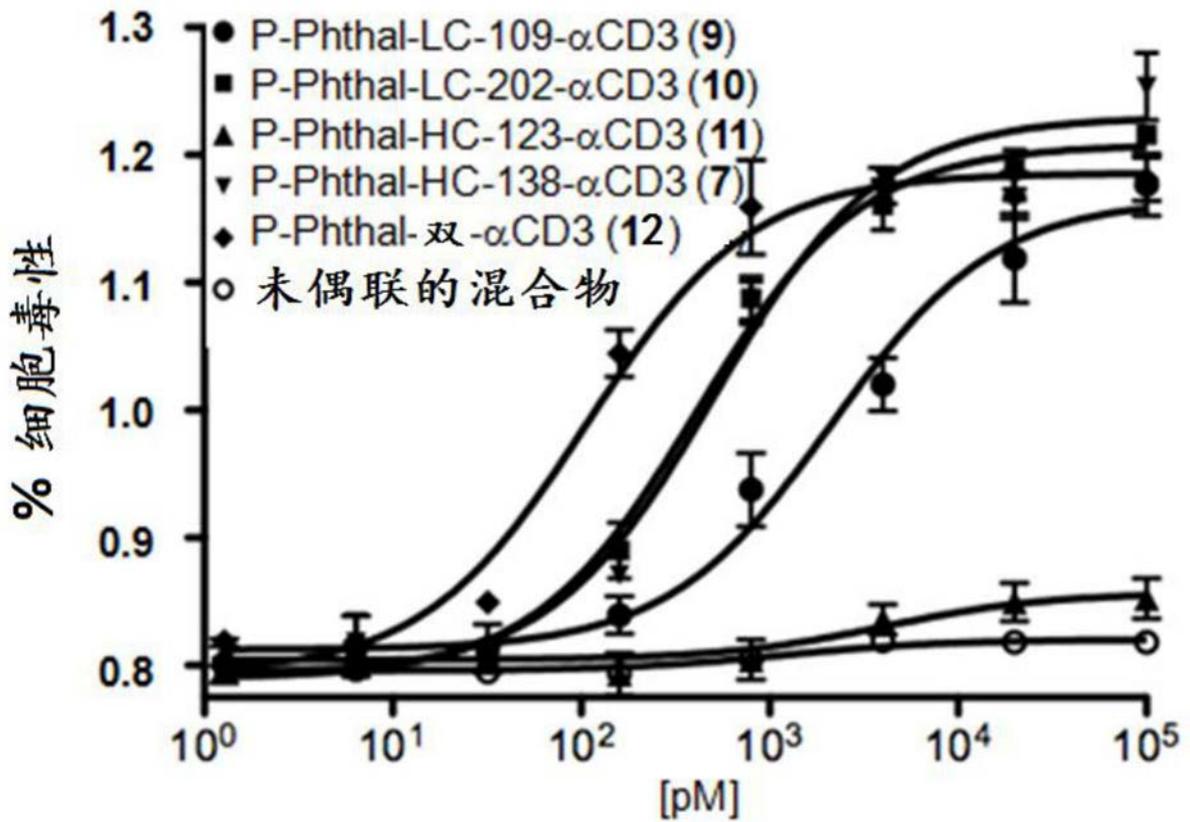


图10

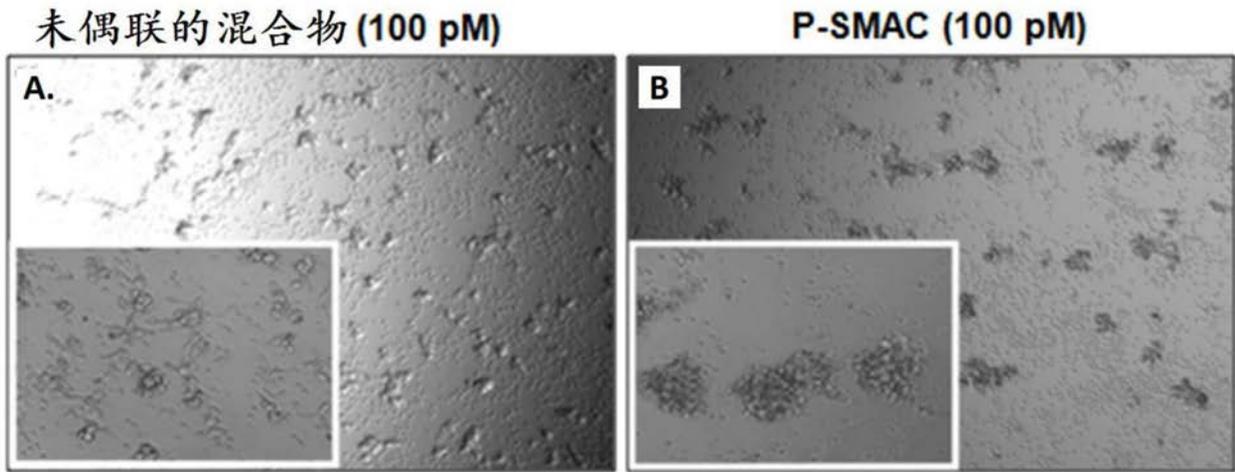


图11

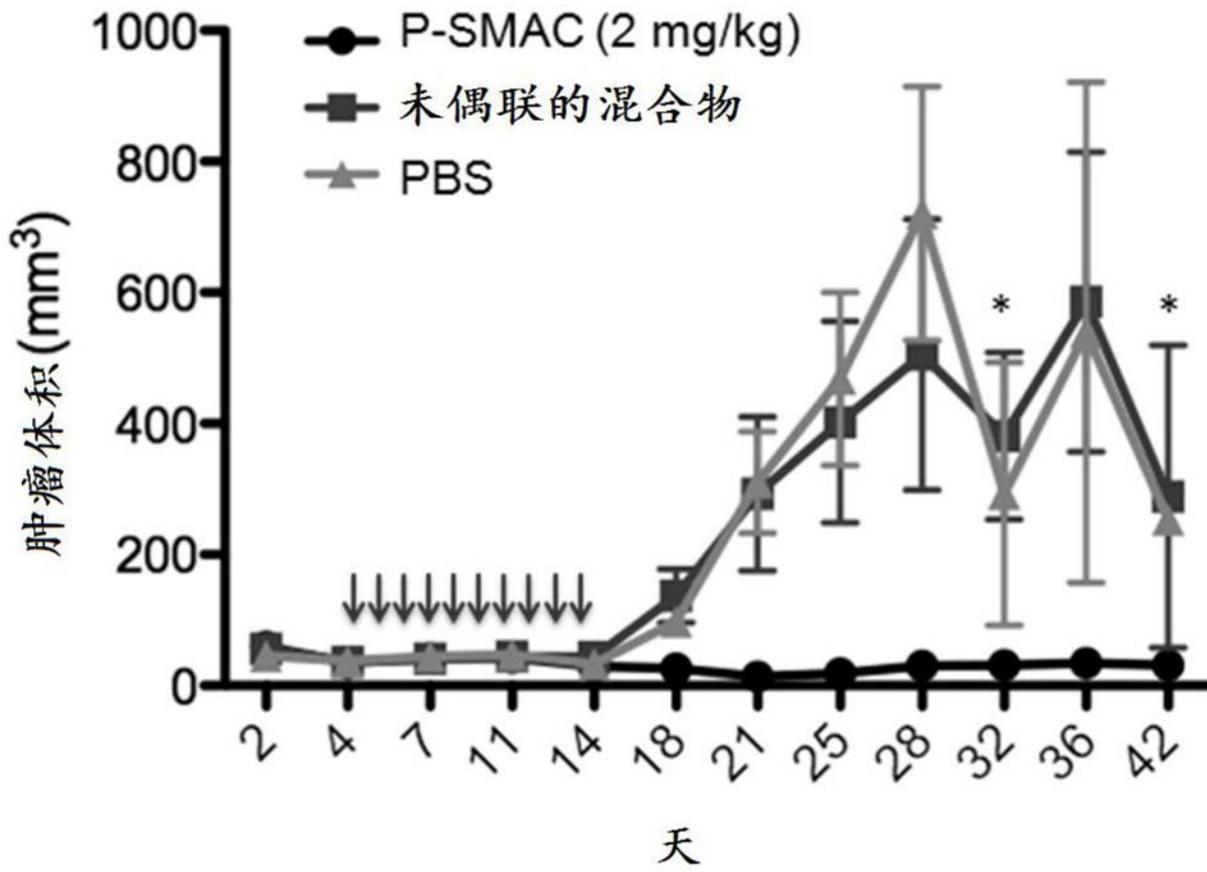


图12

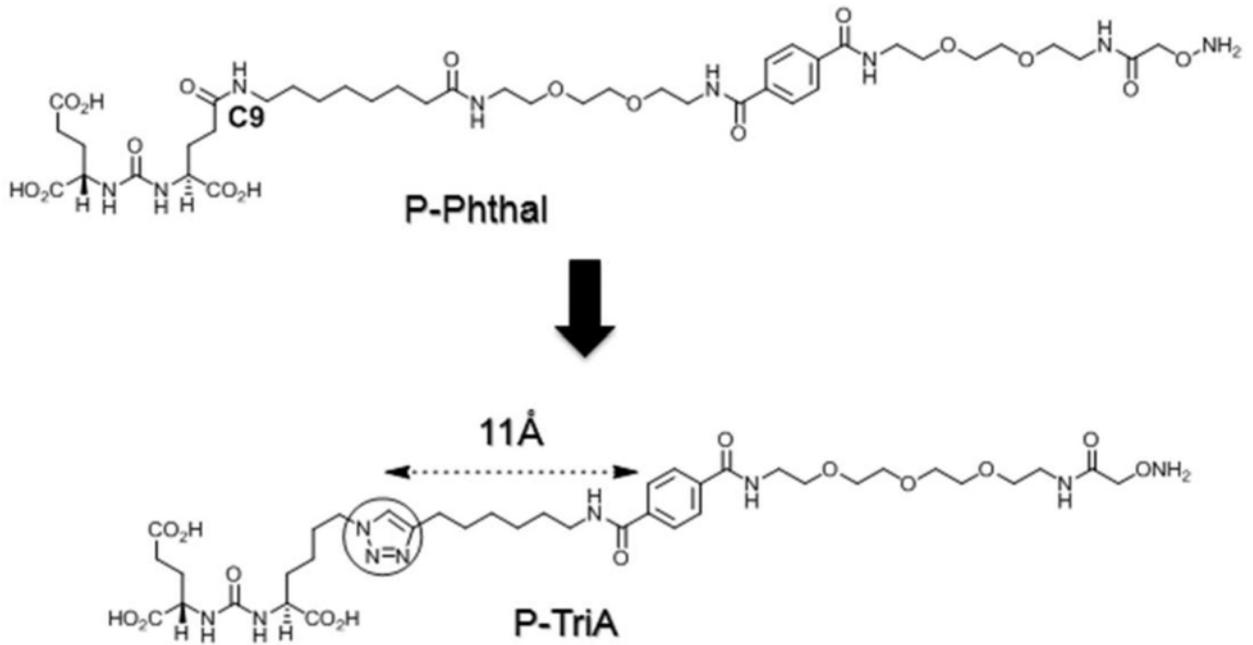


图13

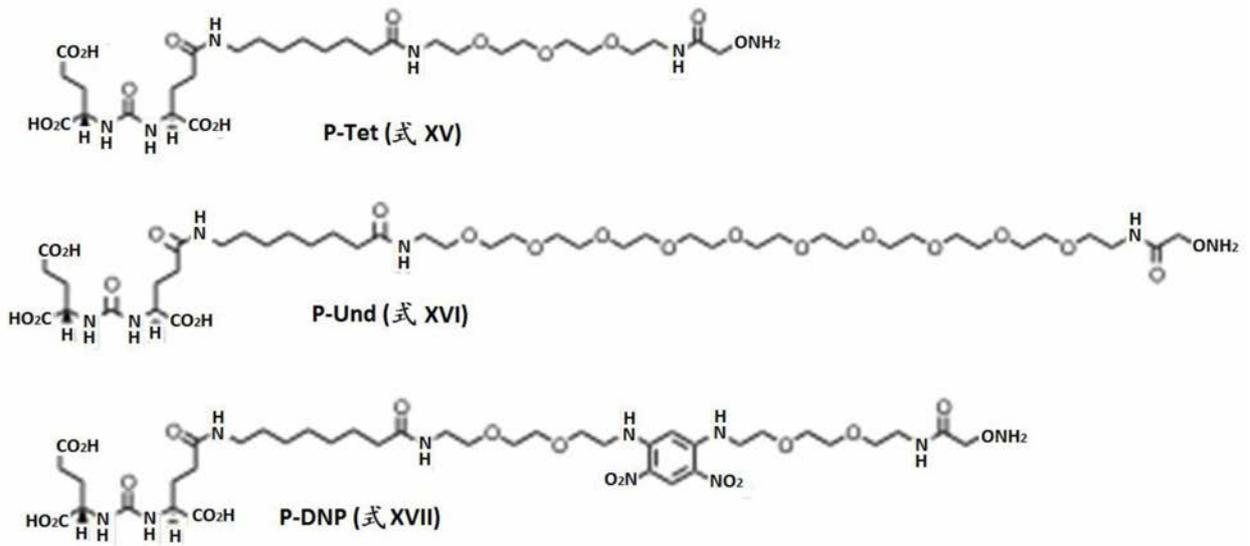


图14

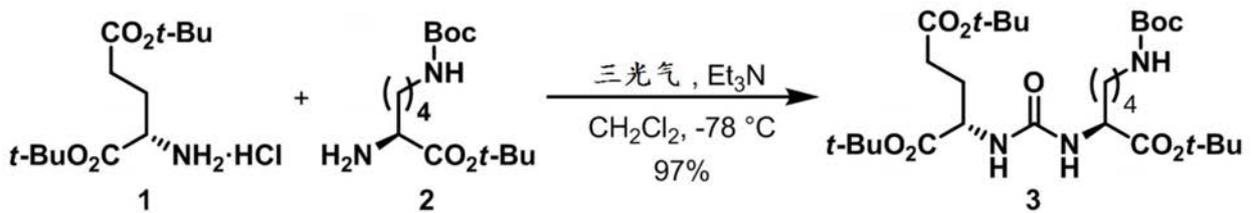


图15A

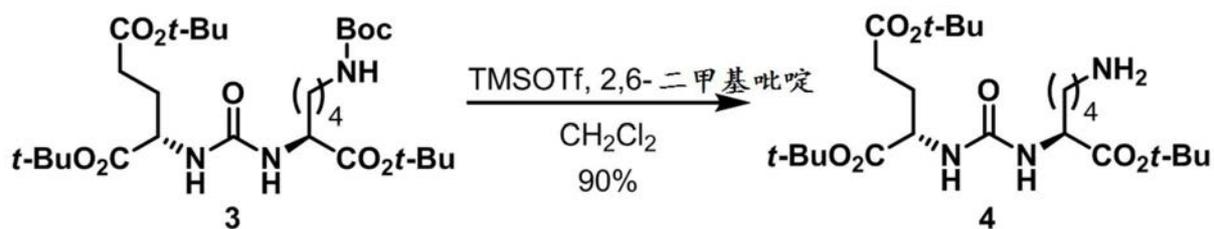


图15B

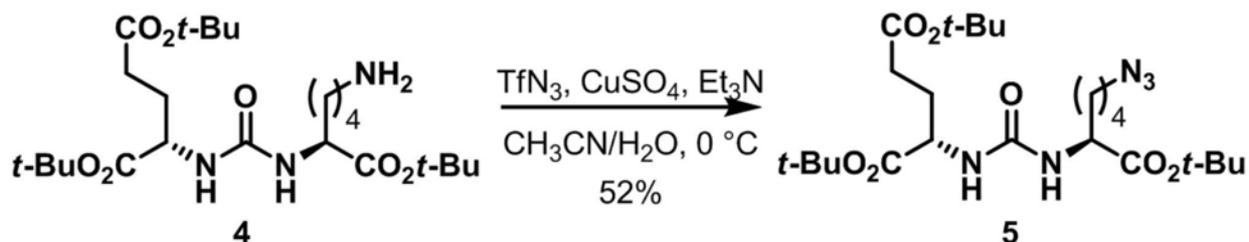


图15C

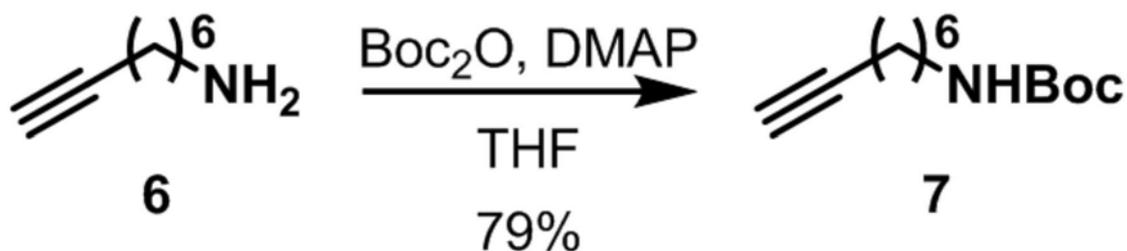


图15D

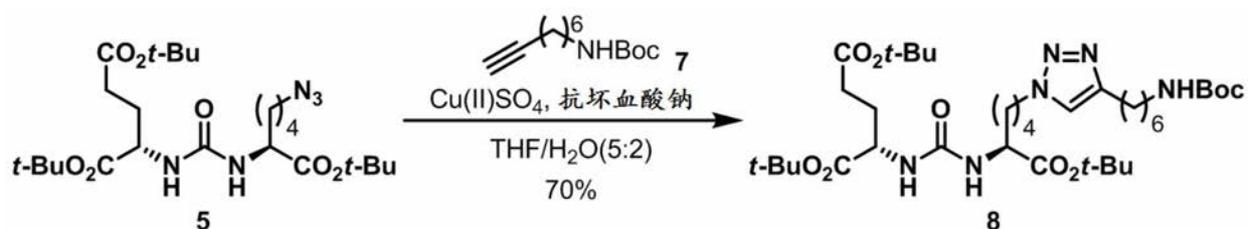


图15E

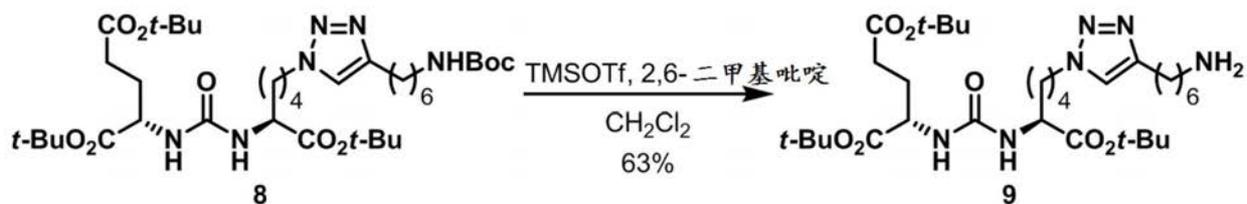


图15F

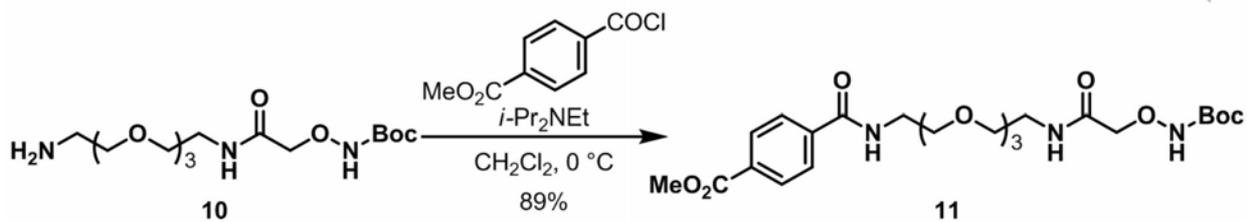


图15G

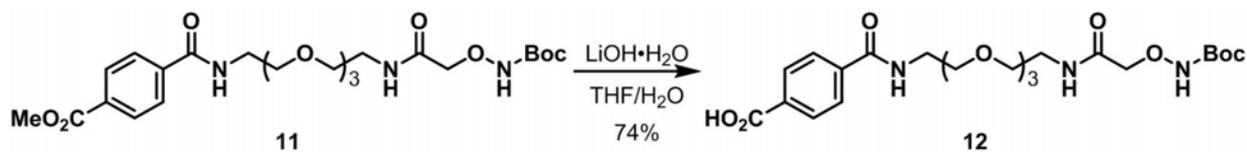


图15H

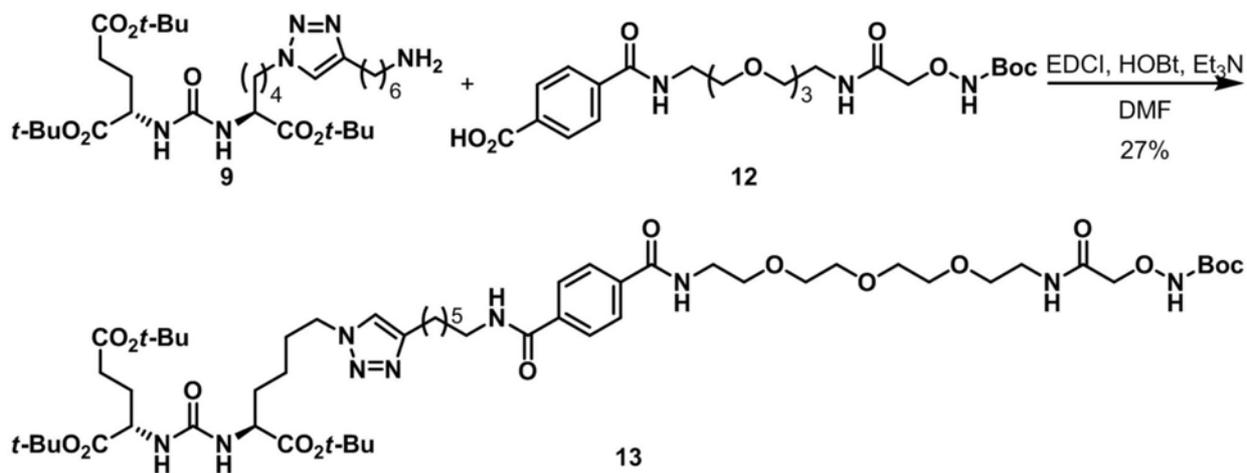


图15I

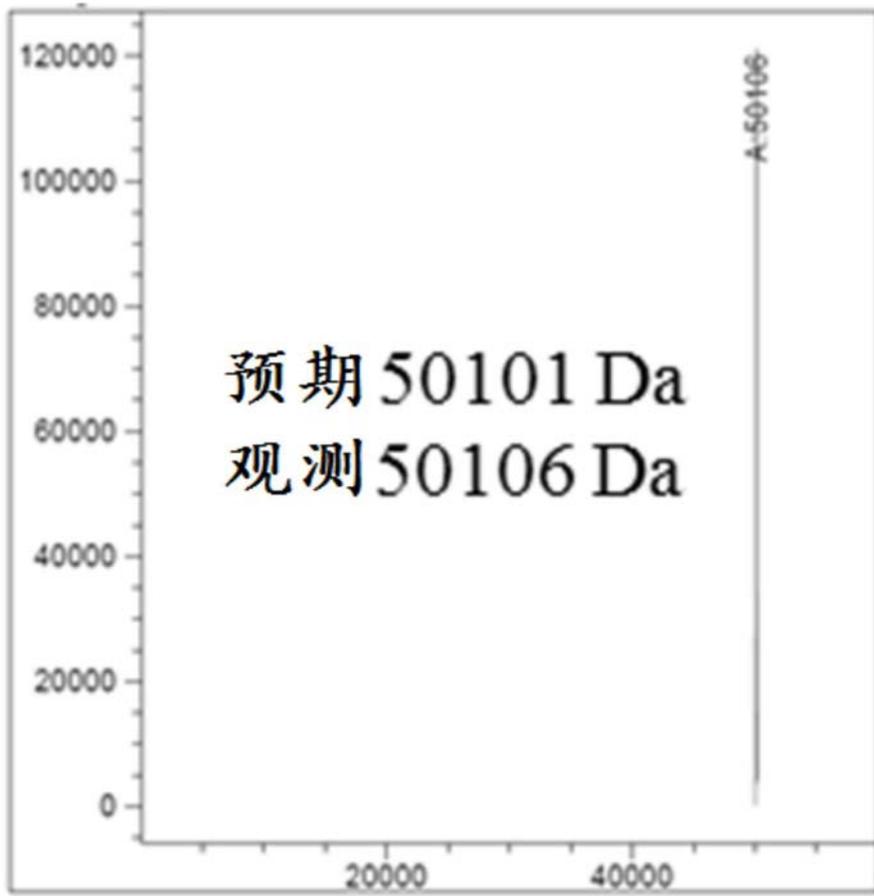


图15L

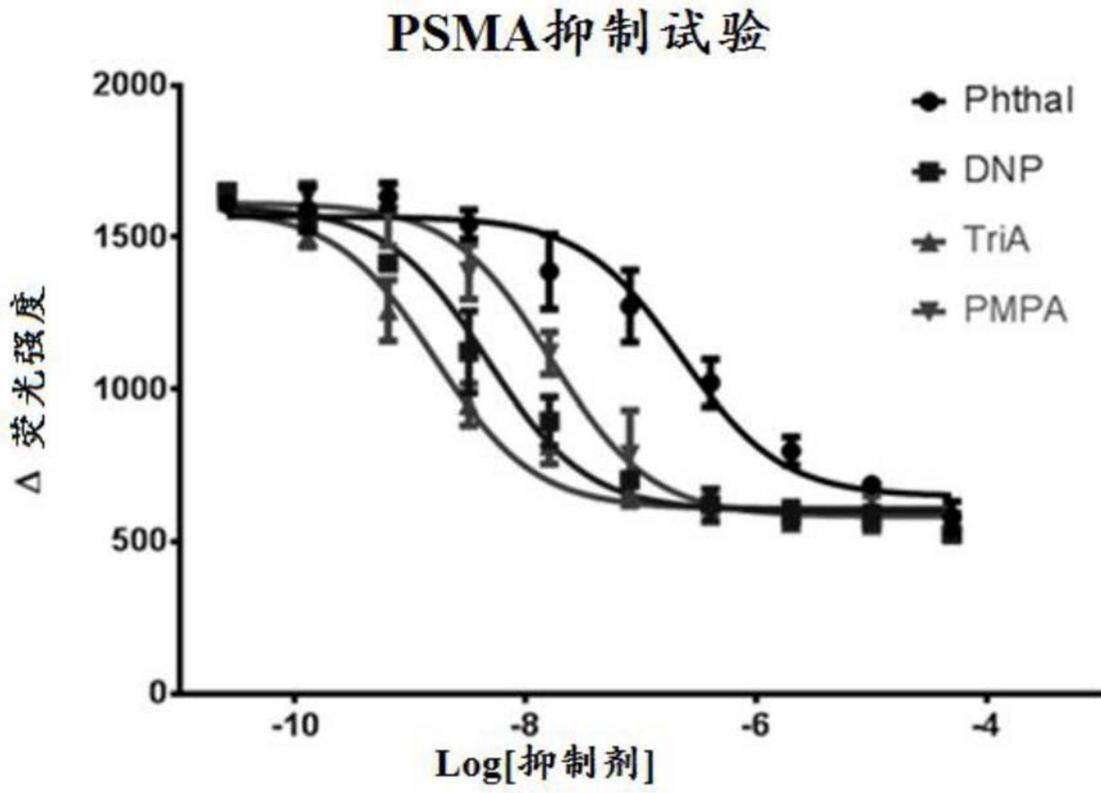


图16A

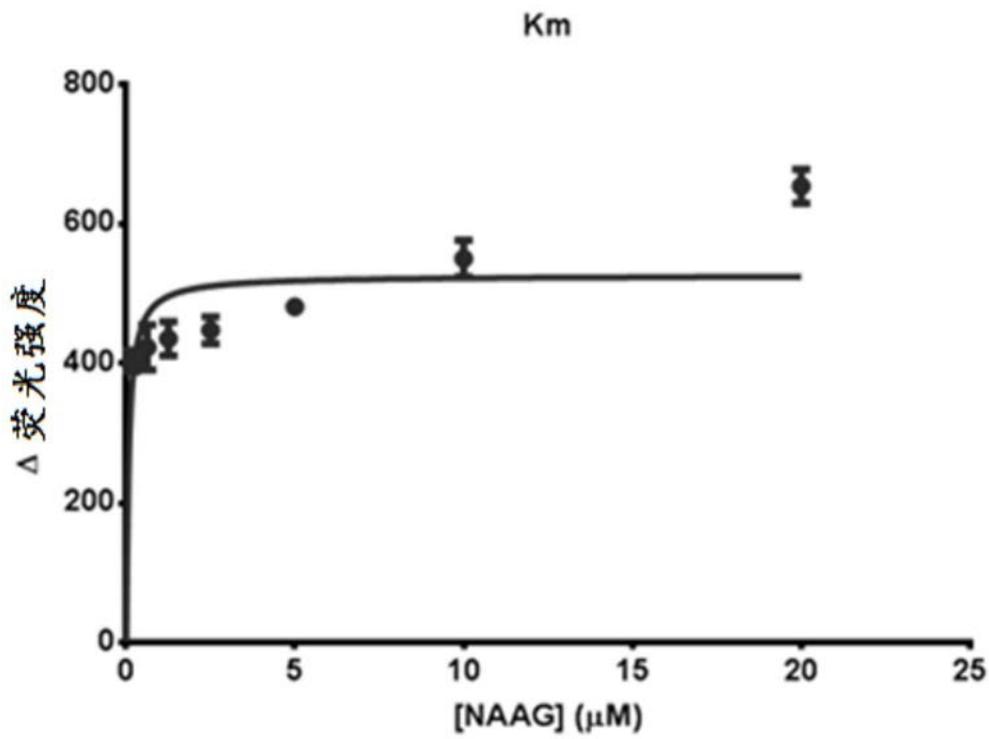


图16B

C4-2细胞 (PSMA+), 24h

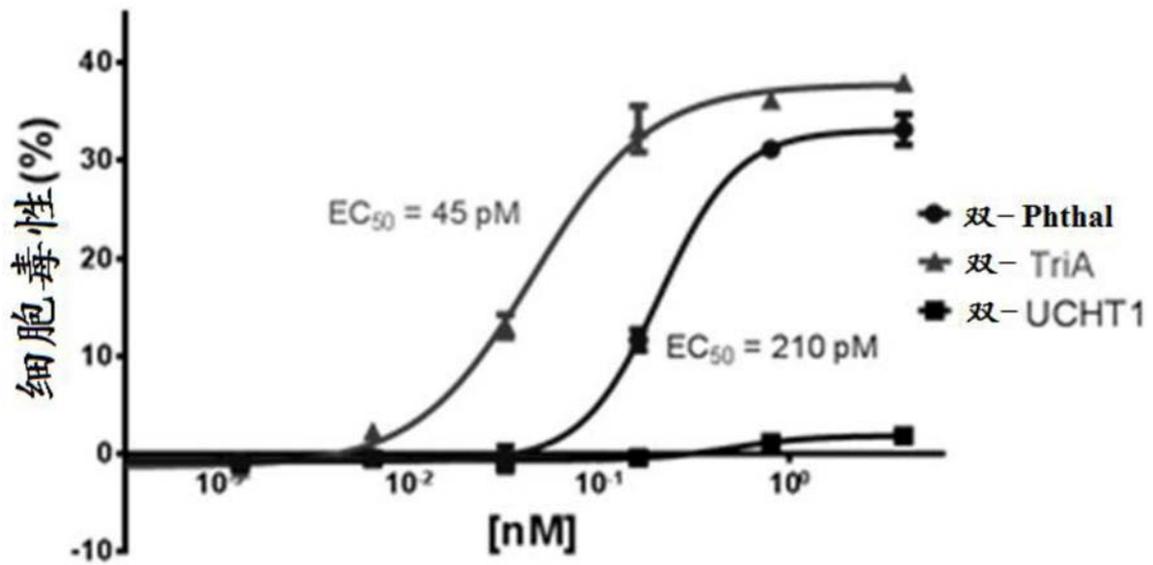


图17A

C4-2细胞 (PSMA+), 48h

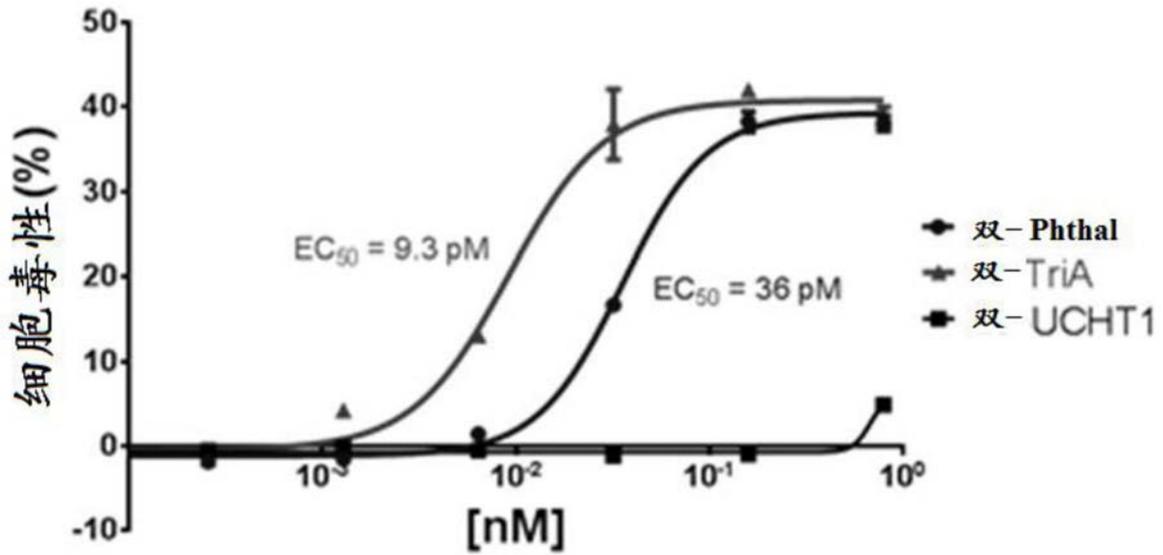
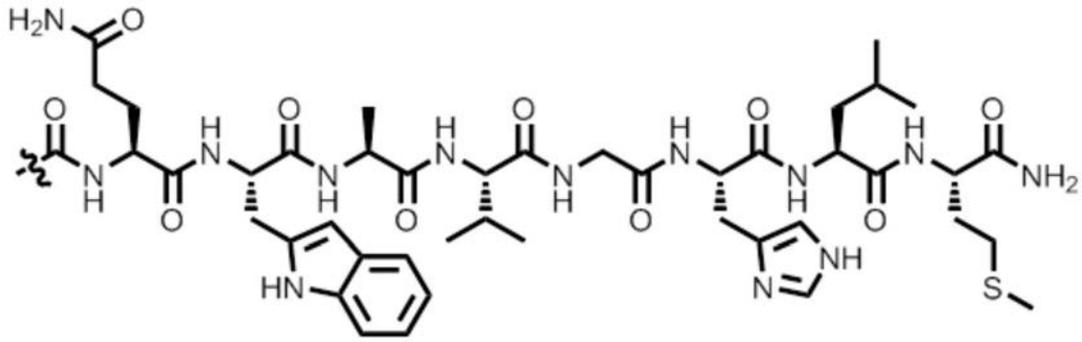
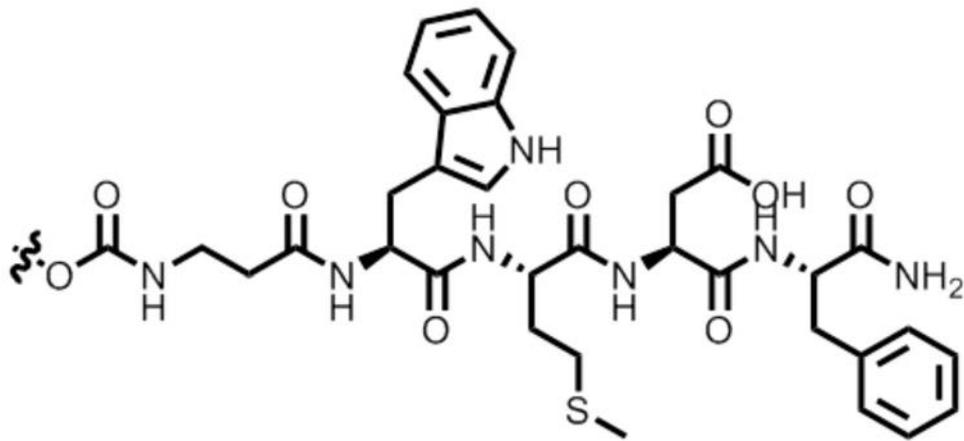


图17B



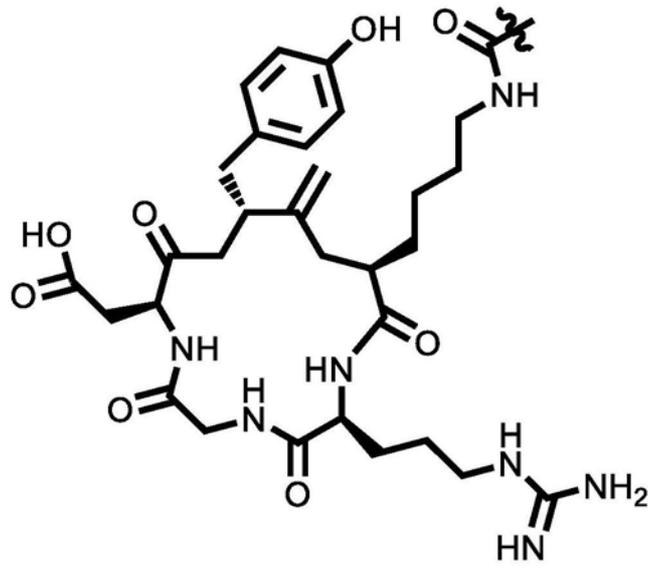
铃蟾肽

图18C



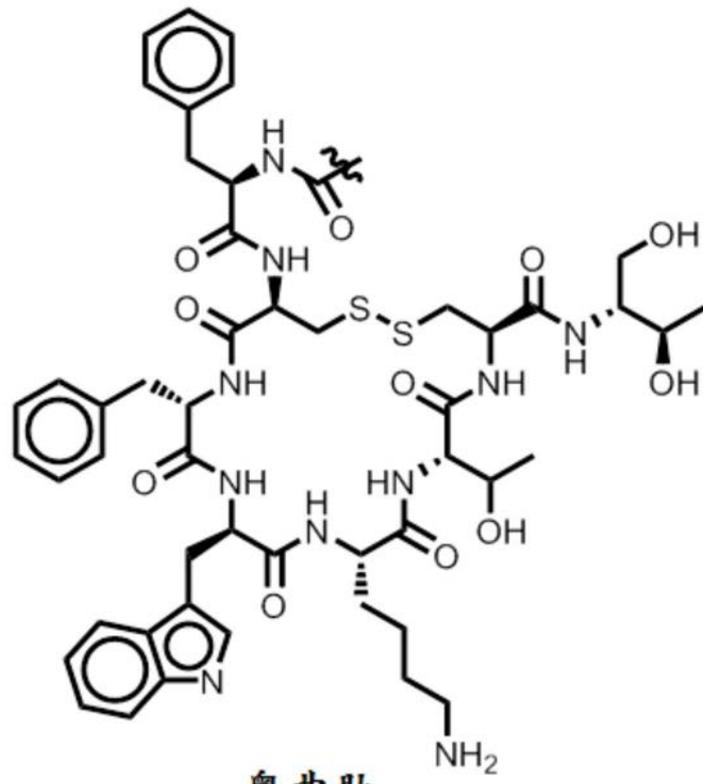
五肽胃泌素

图18D



cRGD

图18E



奥曲肽

图18F