



(10) 申请公布号 CN 116322782 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202080103341.5

(22) 申请日 2020.07.09

(30) 优先权数据

2025900 2020.06.24 NL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/069340 2020.07.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/259507 EN 2021.12.30

(71) 申请人 萨普雷米科技有限公司

地址 荷兰比尔特霍芬

(72) 发明人 鲁本·波斯特尔 盖伊·赫尔曼斯

亨德里克·福斯

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 47/59 (2006.01)

权利要求书12页 说明书101页 附图57页

(54) 发明名称

单结构域抗体、皂苷和效应分子的缀合物，包含其的药物组合物，所述药物组合物的治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及一种用于将效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内的缀合物，该缀合物包含至少一个待转移到该细胞内的效应分子、至少一个单糖链三萜糖苷类型皂苷或双糖链三萜糖苷类型的皂苷，和至少一个单结构域抗体(sdAb)，它们彼此共价结合，其中该sdAb能够结合所述细胞的细胞表面分子。本发明还涉及包含本发明的缀合物的药物组合物。此外，本发明涉及本发明的药物组合物，用作药物。此外，本发明涉及本发明的药物组合物，用于治疗或预防以下中的任何一种或多种：癌症、自身免疫疾病如类风湿性关节炎、酶缺乏、与酶缺乏相关的疾病、基因缺陷、与基因缺陷相关的疾病、感染如病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、 α -1抗胰蛋白酶相关的肝病、急性肝卟啉病、淀粉样变性和甲状腺素转运蛋白介导的淀粉样

变性。本发明还涉及体外或离体方法，用于将该缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内，或用于将本发明的缀合物包含的效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内，优选转移到所述细胞的胞质溶胶。

1. 一种用于将效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内的缀合物,该缀合物包含直接或通过至少一个接头彼此共价结合的至少一个待转移到该细胞内的效应分子、至少一个单结构域抗体(sdAb)和至少一个皂苷,其中该至少一个皂苷是单糖链三萜糖苷或者是双糖链三萜糖苷,并且其中该sdAb能够结合所述细胞的细胞表面分子。

2. 如权利要求1所述的缀合物,其包含至少一个sdAb,该sdAb是以下中任何一个或多个:衍生自抗体重链的 V_H 结构域,该抗体优选免疫球蛋白G来源,优选人来源;衍生自抗体轻链的 V_L 结构域,该抗体优选免疫球蛋白G来源,优选人来源; V_{HH} 结构域,其例如衍生自仅重链抗体(HCAb),该仅重链抗体例如来自骆驼科来源或Ig-NAR来源,例如可变重链链新抗原受体(V_{NAR})结构域,优选该HCAb来自骆驼科来源;并且优选地,该至少一个sdAb是衍生自来自骆驼科来源的HCAb(骆驼 V_H)的 V_{HH} 结构域,例如衍生自来自骆驼、美洲驼、羊驼、单峰驼、骆马、原驼和双峰驼的HCAb。

3. 如权利要求1或2所述的缀合物,其包含至少两个sdAb,其中单个第一sdAb共价结合至该至少一个效应分子之一和/或该至少一个皂苷之一,或其中两个或更多个sdAb中的至少一个sdAb与该至少一个效应分子结合和/或两个或更多个sdAb中的至少一个sdAb与至少一个皂苷结合,或其中该至少两个sdAb中的全部各自分别与该至少一个效应分子中的效应分子或该至少一个皂苷中的皂苷或两者结合。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的缀合物,其中该至少一个sdAb包含至少两个sdAb,该至少两个sdAb是相同的sdAb,优选地包含二至八个sdAb,更优选地二至四个sdAb。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的缀合物,其包含能够结合细胞表面分子上的相同结合位点的一至八个sdAb,其中该至少一个效应分子和/或该至少一个皂苷与该一至八个sdAb中的单个第一sdAb结合,或者其中该至少一个效应分子和/或该至少一个皂苷与这些sdAb中的两个或更多个(如果存在的话)结合,其中该至少一个效应分子和该至少一个皂苷与相同的sdAb结合或与不同的sdAb结合,其中优选该至少一个效应分子中的每一个与单独的sdAb结合和/或该至少一个皂苷中的每一个与单独的sdAb结合,其中效应分子和皂苷与相同的sdAb结合或与单独的sdAb结合。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的缀合物,其中该至少一个sdAb是单个sdAb或者是至少两个,优选两个sdAb,其中该一个或多个sdAb能够结合该细胞的细胞表面分子,例如HIVgp41,或其中该一个或多个sdAb能够结合该细胞的细胞表面受体,例如该细胞的肿瘤细胞表面受体,优选肿瘤细胞特异性受体,更优选结合选自以下中任何一种或多种的受体:CD71、CA125、EpCAM(17-1A)、CD52、CEA、CD44v6、FAP、EGF-IR、整合素、黏结蛋白聚糖-1、血管整合素 α -V β -3、HER2、EGFR、CD20、CD22、叶酸受体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L受体、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、CanAg、整合素- α V、CA6、CD33、间皮素、Cripto、CD3、CD30、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、肝配蛋白A4、MUC-1、Trop2、CEACAM5、CEACAM6、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD38、FGFR3、CD7、PD-L1、CTLA-4、CD52、PDGFRA、VEGFR1、VEGFR2、c-Met(HGFR)、EGFR1、RANKL、ADAMTS5、CD16、CXCR7(ACKR3)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR),最优选选自:HER2、c-Met、VEGFR2、CXCR7、CD71和EGFR1。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的缀合物,其中该至少一个sdAb是单个sdAb或是至少两个,优选两个,其中该一个或多个sdAb选自:抗CD71 sdAb、抗HER2 sdAb、抗CD20 sdAb、抗CA125 sdAb、抗EpCAM(17-1A) sdAb、抗EGFR sdAb、抗CD30sdAb、抗CD33 sdAb、抗血管整合素

α -v β -3sdAb、抗CD52 sdAb、抗CD22 sdAb、抗CEA sdAb、抗CD44v6 sdAb、抗FAP sdAb、抗CD19 sdAb、抗CanAg sdAb、抗CD56 sdAb、抗CD38 sdAb、抗CA6 sdAb、抗IGF-1R sdAb、抗整合素sdAb、抗黏结蛋白聚糖-1sdAb、抗CD79b、抗c-Met sdAb、抗EGFR1 sdAb、抗VEGFR2 sdAb、抗CXCR7 sdAb、抗HIVgp41,其中该一个或多个sdAb优选是一个或多个V_H,更优选是一个或多个骆驼V_H。

8.如权利要求1-7中任一项所述的缀合物,其中该至少一个sdAb包含能够结合HER2、CD71、HIVgp41和/或EGFR的sdAb,其中所述sdAb优选是V_H,更优选是骆驼V_H。

9.如权利要求1-8中任一项所述的缀合物,其中该至少一个sdAb包含选自以下的用于结合HER2的sdAb:由克隆11A4、克隆18C3、克隆22G12、克隆Q17或克隆Q17-C-标签产生的sdAb;或包含用于结合EGFR并由克隆抗EGFR Q86-C-标签产生的sdAb;或包含用于结合CD71并由克隆抗CD71 Q52-C-标签产生的sdAb;或包含用于结合HIVgp41并由克隆抗HIVgp41 Q8-C-标签产生的sdAb;或包含由SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29和31中任一项的cDNA编码的sdAb;或包含具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、36-72的氨基酸序列的sdAb中的任一个,其中任选地,该缀合物进一步包含不同于该至少一个sdAb的另外sdAb、用于结合白蛋白的另外sdAb,例如具有SEQ ID NO:33、34和35的氨基酸序列的另外sdAb中的任何一个或多个,优选地该另外sdAb是V_H,更优选是骆驼V_H。

10.如权利要求1-9中任一项所述的缀合物,其中该效应分子包含以下或由以下组成:小分子如药物分子、毒素如蛋白毒素、寡核苷酸如BNA、异种核酸或siRNA、酶、肽、蛋白质中的至少一个或其任何组合。

11.如权利要求1-10中任一项所述的缀合物,其中该至少一个效应分子选自以下中的任何一个或多个:载体、基因、诱导细胞自杀的转基因、脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、抗有义寡核苷酸(ASO,AON)、短干扰RNA(siRNA)、抗微小RNA(抗miRNA)、DNA适体、RNA适体、mRNA、小环DNA、肽核酸(PNA)、氨基磷酸酯吗啉寡聚物(PMO)、锁核酸(LNA)、桥接核酸(BNA)、2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、3'-氟己糖醇核酸(FHNA)、质粒、乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)或其衍生物,更优选BNA,例如用于沉默HSP27蛋白表达的BNA或用于沉默载脂蛋白B表达的BNA。

12.如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中该至少一个效应分子是选自以下中的任何一个或多个的寡核苷酸:短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、抗发夹状微小RNA(miRNA)、单链RNA、适体RNA、双链RNA(dsRNA)、抗微小RNA(抗miRNA、抗miR)、反义寡核苷酸(ASO)、mRNA、DNA、反义DNA、锁核酸(LNA)、桥接核酸(BNA)、2'-O,4'-氨基乙烯桥接核酸(BNA^{NC})、基于BNA的siRNA和基于BNA的反义寡核苷酸(BNA-AON)。

13.如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中该至少一个效应分子是选自抗miRNA、BNA-AON或siRNA例如基于BNA的siRNA中的任一个的寡核苷酸,优选选自化学修饰的siRNA、代谢稳定的siRNA和化学修饰的代谢稳定的siRNA。

14.如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中该至少一个效应分子是寡核苷酸,该寡核苷酸当存在于包含基因的细胞中时能够沉默这样的基因,其中该基因是以下基因中的任何一个:载脂蛋白B(apoB)、甲状腺素转运蛋白(TTR)、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/科信9型(PCSK9)、 δ -氨基乙酰丙酸合酶1(ALAS1)、抗凝血酶3(AT3)、乙醇酸氧化酶(GO)、补体

组分C5 (CC5)、乙型肝炎病毒 (HBV) 的X基因、HBV的S基因、 α -1抗胰蛋白酶 (AAT) 和乳酸脱氢酶 (LDH), 和/或当存在于包含异常miRNA的细胞中时能够靶向这样的异常miRNA。

15. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物, 其中该效应分子是寡核苷酸, 该寡核苷酸当存在于包含mRNA的细胞中时能够靶向这样的mRNA, 其中该mRNA参与以下任何一种蛋白质的表达: apoB、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、G0、CC5、HBV的X基因的表达产物、HBV的S基因的表达产物、AAT和LDH, 或当存在于包含miRNA的细胞中时能够拮抗或恢复这样的miRNA的功能, 如抑制致癌miRNA (onco-miR) 或阻遏onco-miR的表达。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个效应分子包含至少一个肽分子, 或当从属于权利要求1-9中任一项时, 由至少一个肽分子组成, 优选选自肽、蛋白、酶和蛋白毒素中的任何一个或多个。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个效应分子包含以下中的至少一个, 或当从属于权利要求1-9中任一项时, 由以下中的至少一个组成: 脲酶和Cre-重组酶、肽毒素、核糖体失活蛋白、蛋白毒素、细菌毒素、植物毒素, 更优选选自以下中的任何一个或多个: 病毒毒素, 例如凋亡素; 细菌毒素, 例如志贺毒素、志贺样毒素、铜绿假单胞菌外毒素 (PE) 或PE的外毒素A、全长或截短的白喉毒素 (DT)、霍乱毒素; 真菌毒素, 例如 α -八叠球菌素; 植物毒素, 其包括核糖体失活蛋白和2型核糖体失活蛋白的A链, 该2型核糖体失活蛋白是例如香石竹毒蛋白如香石竹毒蛋白-30或香石竹毒蛋白-32、皂草毒蛋白如皂草毒蛋白-S3或皂草毒蛋白-S6; bouganin或bouganin的去免疫衍生物debouganin、志贺样毒素A、商陆抗病毒蛋白、蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、莫迪素 (modeccin)、莫迪素A链、相思豆毒素、相思豆毒素A链、沃氏藤黄辛 (volkensin)、沃氏藤黄辛A链、槲寄生凝集素、槲寄生凝集素A链; 或动物或人毒素, 例如青蛙RNA酶, 或颗粒酶B或人血管生成素, 或其任何有毒片段或有毒衍生物; 优选地, 该蛋白毒素是香石竹毒蛋白和/或皂草毒蛋白。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个效应分子包含至少一个载荷, 或当从属于权利要求1-9中任一项时, 由至少一个载荷组成。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个效应分子包含以下中的至少一个, 或当从属于权利要求1-9中任一项时, 由以下中的至少一个组成: 靶向核糖体的毒素、靶向延伸因子的毒素、靶向微管蛋白的毒素、靶向DNA的毒素和靶向RNA的毒素、更优选以下中的任何一种或多种: 厄塔毒素、帕舒托、美登素类衍生物DM1、美登素类衍生物DM4、单甲基奥瑞西汀E (MMAE、维多汀)、单甲基瑞奥西汀F (MMAF、马福多汀)、加利车霉素、N-乙酰基- γ -加利车霉素、吡咯并苯并二氮杂萘 (PBD) 二聚体、苯并二氮杂萘、CC-1065类似物、倍癌霉素、多柔比星、紫杉醇、多西他赛、顺铂、环磷酰胺、依托泊苷、多西他赛、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、米托蒽醌、tubulysin、吲哚啉苯并二氮杂萘、AZ13599185、念珠藻素、根霉素、甲氨蝶呤、蒽环素、喜树碱类似物、SN-38、DX-8951f、甲磺酸依喜替康、截短形式的绿脓杆菌外毒素 (PE38)、倍癌霉素衍生物、鹅膏蕈碱、 α -鹅膏蕈碱、斯普利他汀、泰兰斯他汀、奥加米星、泰斯林、Amberstatin269和索星、或其衍生物。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的缀合物, 其中该缀合物包含抗体-药物缀合物 (ADC), 例如ADC, 其包含至少一个衍生自以下的sdAb: 吉妥珠单抗-奥加米星、布伦妥昔单抗-维多汀、曲妥珠单抗-厄塔毒素、艾诺妥珠单抗-奥加米星、莫塞妥莫单抗-帕舒托和珀拉妥珠单抗-维多汀, 和/或包含至少一个效应分子, 该效应分子是存在于以下任何一种或多

种中的毒素：吉妥珠单抗-奥加米星、布伦妥昔单抗-维多汀、曲妥珠单抗-厄塔毒素、艾诺妥珠单抗-奥加米星、莫塞妥莫单抗-帕舒托和珀拉妥珠单抗-维多汀，和/或选自香石竹毒蛋白和皂草毒蛋白。

21. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中该至少一个皂苷包含选自以下的苷元核心结构：

2 α -羟基齐墩果酸；
 16 α -羟基齐墩果酸；
 常春藤皂苷元 (23-羟基齐墩果酸)；
 16 α , 23-二羟基齐墩果酸；
 丝石竹皂苷元；
 皂皮酸；
 原七叶皂苷元-21 (2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯；
 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21, 22-双 (2-甲基丁-2-烯酸酯)；
 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21 (2-甲基丁-2-烯酸酯)-16, 22-二乙酸酯；
 洋地黄皂苷配基；
 3, 16, 28-三羟基齐墩果-12-烯；
 丝石竹酸；或
 其衍生物，

优选地，该至少一个皂苷包含选自皂皮酸和丝石竹皂苷元的苷元核心结构，更优选地该至少一个皂苷包含苷元核心结构皂皮酸。

22. 如前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中该至少一个皂苷包含以下中的一者或两者：与该至少一个皂苷的苷元核心结构的C₃原子或C₂₈原子结合、优选与C₃原子结合的第一糖链，和与该至少一个皂苷的苷元核心结构的C₂₈原子结合的第二糖链，并且优选该至少一个皂苷包含该第一糖链和该第二糖链。

23. 如权利要求22所述的缀合物，其中

• 该至少一个皂苷包含该第一糖链，该第一糖链选自：

GlcA-，
 Glc-，
 Gal-，
 Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -Ara-，
 Gal- (1 $\rightarrow$ 2) -[Xyl- (1 $\rightarrow$ 3)] -GlcA-，
 Glc- (1 $\rightarrow$ 2) -[Glc- (1 $\rightarrow$ 4)] -GlcA-，
 Glc- (1 $\rightarrow$ 2) -Ara- (1 $\rightarrow$ 3) -[Gal- (1 $\rightarrow$ 2)] -GlcA-，
 Xyl- (1 $\rightarrow$ 2) -Ara- (1 $\rightarrow$ 3) -[Gal- (1 $\rightarrow$ 2)] -GlcA-，
 Glc- (1 $\rightarrow$ 3) -Gal- (1 $\rightarrow$ 2) -[Xyl- (1 $\rightarrow$ 3)] -Glc- (1 $\rightarrow$ 4) -Gal-，
 Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -Gal- (1 $\rightarrow$ 3) -[Glc- (1 $\rightarrow$ 2)] -GlcA-，
 Ara- (1 $\rightarrow$ 4) -Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -Glc- (1 $\rightarrow$ 2) -Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -GlcA-，
 Ara- (1 $\rightarrow$ 4) -Fuc- (1 $\rightarrow$ 2) -Glc- (1 $\rightarrow$ 2) -Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -GlcA-，
 Ara- (1 $\rightarrow$ 4) -Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -Gal- (1 $\rightarrow$ 2) -Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -GlcA-，

Ara- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
 Ara- (1→4) -Rha- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
 Ara- (1→4) -Fuc- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
 Ara- (1→4) -Rha- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
 Ara- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Glc- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Glc- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Gal- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
 Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,和
 其任何衍生物,

和/或

• 该至少一个皂苷包含该第二糖链,该第二糖链选自:

Glc- ,
 Gal- ,
 Rha- (1→2) -[Xyl- (1→4)] -Rha- ,
 Rha- (1→2) -[Ara- (1→3) -Xyl- (1→4)] -Rha- ,
 Ara- ,
 Xyl- ,
 Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -[R1- (→4)] -Fuc- 其中R1是4E-甲氧基肉桂酸,
 Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -[R2- (→4)] -Fuc- 其中R2是4Z-甲氧基肉桂酸,
 Xyl- (1→4) -[Gal- (1→3)] -Rha- (1→2) -4-OAc-Fuc- ,
 Xyl- (1→4) -[Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -3,4-二-OAc-Fuc- ,
 Xyl- (1→4) -[Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -[R3- (→4)] -3-OAc-Fuc- 其中R3是4E-甲氧基
 肉桂酸,
 Glc- (1→3) -Xyl- (1→4) -[Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -4-OAc-Fuc- ,
 Glc- (1→3) -Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -4-OAc-Fuc- ,
 (Ara-或Xyl-) (1→3) - (Ara-或Xyl-) (1→4) - (Rha-或Fuc-) (1→2) -[4-OAc- (Rha-或
 Fuc-) (1→4)] - (Rha-或Fuc-) ,
 Xyl- (1→3) -Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -[Qui- (1→4)] -Fuc- ,
 Api- (1→3) -Xyl- (1→4) -[Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -Fuc- ,
 Xyl- (1→4) -[Gal- (1→3)] -Rha- (1→2) -Fuc- ,
 Xyl- (1→4) -[Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -Fuc- ,
 Ara/Xyl- (1→4) -Rha/Fuc- (1→4) -[Glc/Gal- (1→2)] -Fuc- ,
 Api- (1→3) -Xyl- (1→4) -[Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -[R4- (→4)] -Fuc- 其中R4是5-O-
 [5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R5-(→4)]-Fuc-其中R5是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,

6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,

Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,

Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,

Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,

6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,

Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc-其中R6是5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc-其中R7是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc-其中R8是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc-其中R9是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc-其中R10是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc-其中R11是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),

Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc-其中R12是5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)

Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-,和

其任何衍生物。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的缀合物,其中该至少一个皂苷包含如权利要求22或23所述的第一糖链和第二糖链,其中该第一糖链包含多于一个糖部分并且该第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中该苷元核心结构优选是皂皮酸或丝石竹皂苷元,更优选皂皮酸,其中以下中的一项、两项或三项,优选一项或两项:

i. 该苷元核心结构中的醛基团已被衍生化,

ii. 该第一糖链中的葡糖醛酸部分的羧基基团已被衍生化,以及

iii. 该第二糖链中的至少一个乙酰氧基 (Me (CO) O-) 基团已被衍生化。

25. 如权利要求1-24中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个皂苷包含:

i. 包含醛基团的苷元核心结构, 该醛基团已通过以下进行衍生化:

- 还原成醇;

- 通过与N- ϵ -马来酰亚胺基己酸酰肼 (EMCH) 反应转化为腙键, 其中该EMCH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;

- 通过与N-[β -马来酰亚胺基丙酸]酰肼 (BMPH) 反应转化为腙键, 其中该BMPH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化; 或

- 通过与N-[κ -马来酰亚胺基十一烷酸]酰肼 (KMUH) 反应转化为腙键, 其中该KMUH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;

ii. 第一糖链, 其包含羧基基团, 优选葡萄糖醛酸部分的羧基基团, 该羧基基团已经通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇 (AMPD) 或N-(2-氨基乙基) 马来酰亚胺 (AEM) 反应转化为酰胺键而衍生化;

iii. 第二糖链, 其包含乙酰氧基基团 (Me (CO) O-), 该乙酰氧基基团已经通过脱乙酰转化为羟基基团 (HO-) 而衍生化; 或

iv. i.、ii. 和/或iii. 的两个或三个衍生化的任何组合, 优选是i.、ii. 和/或iii. 的两个衍生化的任何组合。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个皂苷是以下中的任何一个或多个: 皂树树皮皂苷、川续断皂苷B、柴胡皂苷A、柴胡皂苷D、灰毡毛忍冬皂苷A、商陆皂苷A、商陆皂苷元、七叶皂苷盐、AS6.2、NP-005236、AMA-1、AMR、 α -常春藤皂苷、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、AE X55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、S01861、GE1741、S01542、S01584、S01658、S01674、S01832、S01904、S01862、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、QS-21B-xylo、 β -七叶皂苷、七叶皂苷Ia、油茶籽皂苷I、油茶籽皂苷J、阿萨姆皂苷F、洋地黄皂苷、报春花酸1和AS64R、或其衍生物、或其立体异构体、和/或其任何组合, 优选以下中的任何一个或多个: QS-21或QS-21衍生物、S01861或S01861衍生物、SA1641或SA1641衍生物和GE1741或GE1741衍生物, 更优选QS-21衍生物或S01861衍生物, 最优选S01861衍生物, 例如如权利要求24或25所述的皂苷衍生物。

27. 如权利要求1-26中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个皂苷是以下中的任何一个或多个: S01861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xyl、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、皂树皂苷、Saponinum album、QS-18、Quil-A、Gyp1、丝石竹皂苷A、AG1、AG2、S01542、S01584、S01658、S01674、S01832、S01862、S01904、或其衍生物、或其立体异构体、和/或其任何组合, 优选地, 该皂苷衍生物是S01861衍生物和/或GE1741衍生物和/或SA1641衍生物和/或QS-21衍生物, 更优选地, 该皂苷衍生物是S01861衍生物或QS21衍生物, 最优选地, 该皂苷衍生物是根据权利要求24或25所述的S01861衍生物。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的缀合物, 其中该至少一个sdAb包含用于结合该细

胞的细胞表面分子的sdAb,其中该细胞是异常细胞,例如肿瘤细胞、自身免疫细胞、受感染的细胞例如病毒感染的细胞、或包含基因缺陷或酶缺陷的细胞。

29.如权利要求1-28中任一项所述的缀合物,其中该至少一个sdAb包含用于结合该细胞的细胞表面分子的sdAb,该sdAb衍生自或基于以下免疫球蛋白中的任何一种或多种:抗CD71抗体如IgG型OKT-9、抗HER2抗体如曲妥珠单抗(赫赛汀)、珀妥珠单抗、抗CD20抗体如利妥昔单抗、奥法妥木单抗、托司妥莫单抗、奥比妥珠单抗艾瑞妥莫单抗、抗CA125抗体如奥戈伏单抗、抗EpCAM(17-1A)抗体如依决洛单抗、抗EGFR抗体如西妥昔单抗、马妥珠单抗、帕尼妥木单抗、尼妥珠单抗、抗CD30抗体如布仑妥昔单抗、抗CD33抗体如吉妥珠单抗、huMy9-6、抗血管整合素 α -v β -3抗体如伊瑞西珠单抗、抗CD52抗体如阿仑单抗、抗CD22抗体如依帕珠单抗、匹那妥珠单抗、抗CD22抗体莫塞妥莫单抗的结合片段(Fv)、人源化单克隆抗体艾诺妥珠单抗、抗CEA抗体如拉贝妥珠单抗、抗CD44v6抗体如比伐珠单抗、抗FAP抗体如西罗珠单抗、抗CD19抗体如huB4、抗CanAg抗体如huC242、抗CD56抗体如huN901、抗CD38抗体如达雷木单抗、OKT-10抗CD38单克隆抗体、抗CA6抗体如DS6、抗IGF-1R抗体如西妥木单抗、3B7、抗整合素抗体如CNT0 95、抗黏结蛋白聚糖-1抗体如B-B4、抗CD79b如珀拉妥珠单抗、抗HIVgp41抗体,优选以下中的任何一种:抗HIVgp41抗体、抗CD71抗体、抗HER2抗体和抗EGFR抗体,更优选以下中的任何一种:曲妥珠单抗、珀妥珠单抗、西妥昔单抗、马妥珠单抗、抗CD71抗体、OKT-9,最优选曲妥珠单抗、西妥昔单抗、抗CD71抗体OKT-9。

30.如权利要求1-29中任一项所述的缀合物,其中该至少一个效应分子通过接头共价结合到该至少一个sdAb中的至少一个sdAb,优选一个和/或该至少一个皂苷中的至少一个,优选一个,或直接结合到该sdAb和/或该皂苷,和/或其中该至少一个皂苷通过接头共价结合到该至少一个sdAb的至少一个sdAb,优选一个和/或该至少一个效应分子的至少一个效应分子,优选一个,或直接结合到该sdAb和/或该效应分子。

31.如权利要求1-30中任一项所述的缀合物,其中该缀合物包含三官能接头,其中该至少一个sdAb、该至少一个皂苷和该至少一个效应分子中的每一个与该三官能接头直接地或通过接头共价结合,优选单独地结合,并且优选地,该缀合物包含三官能接头,其中一个sdAb、该至少一个皂苷和至少一个、优选一个效应分子直接地或通过接头单独地与该三官能接头共价结合。

32.如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中该至少一个皂苷通过硫醚键共价结合到该至少一个sdAb之一中和/或该至少一个效应分子之一中的巯基基团上,该共价键合优选通过接头N- ϵ -马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH),该接头与该皂苷的苷元核心结构的位置C₂₃中的醛基团共价结合并且与该sdAb和/或该效应分子中的巯基基团如半胱氨酸的巯基基团共价结合。

33.如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中该至少一个皂苷是双糖链三萜皂苷或其衍生物,该双糖链三萜皂苷或其衍生物属于在位置C₂₃处任选具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且在结合于该皂苷的苷元核心结构的C₃ β -OH处的第一糖链中包含葡萄糖醛酸单元,其中该皂苷通过该第一糖链中的葡萄糖醛酸单元的羧基基团,优选通过接头,共价结合到该至少一个sdAb和/或该至少一个效应分子的氨基酸残基上,其中该氨基酸残基优选选自半胱氨酸和赖氨酸。

34.如权利要求33所述的缀合物,其中该至少一个皂苷在该皂苷的苷元核心结构的C₃ β -

OH基团处的第一糖链中包含葡萄糖醛酸单元,该葡萄糖醛酸单元与接头共价结合,该接头优选通过酰胺键与该至少一个sdAb和/或该至少一个效应分子中的胺基团共价结合,例如该sdAb和/或该效应分子的赖氨酸或N-末端的胺基团,优选地所述接头是1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)。

35.如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其包含该至少一个皂苷的多于一个共价结合的皂苷部分,优选地2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128或1-100个这样的部分或其间的任何数量的这样的部分,例如7、9、12个皂苷部分。

36.如权利要求35所述的缀合物,其中该多于一个共价结合的皂苷部分直接共价结合至该至少一个sdAb和/或该至少一个效应分子的氨基酸残基,优选结合至半胱氨酸和/或赖氨酸,和/或通过接头和/或通过可切割接头共价结合。

37.如权利要求35所述的缀合物,其中该多于一个共价结合的皂苷部分是共价皂苷缀合物的一部分,该共价皂苷缀合物包含至少一个寡聚分子或聚合分子以及与其共价结合的多于一个皂苷,其中该共价皂苷缀合物与该至少一个sdAb中的至少一个和/或该至少一个效应分子中的至少一个共价结合,优选地,1-8个这样的共价皂苷缀合物与该sdAb和/或该效应分子结合,更优选2-4个这样的共价皂苷缀合物,其中该至少一个共价皂苷缀合物任选地基于树状突,其中任选地1-32个皂苷部分,优选2、3、4、5、6、8、10、16、32个这样的部分,或其间任何数目的这样的部分,例如7、9、12个皂苷部分,直接或通过接头共价结合到该至少一个共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子上。

38.如前述权利要求中任一项所述的缀合物,其中该至少一个皂苷通过可切割接头与该至少一个sdAb中的至少一个和/或该至少一个效应分子中的至少一个共价结合。

39.如权利要求38所述的缀合物,其中该可切割接头在酸性条件、还原条件、酶促条件和/或光诱导条件下经受切割,并且优选地,该可切割接头包含选自以下的可切割键:在酸性条件下经受切割的胺键和酰胺键,和/或易进行蛋白水解的键,例如被组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,和/或在还原条件下易被切割的键,例如二硫键。

40.如权利要求38或39所述的缀合物,其中该可切割接头在体内在酸性条件下经受切割,例如在哺乳动物细胞,优选人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选在pH 4.0-6.5,更优选在pH≤5.5。

41.如权利要求37或当从属于权利要求37时的权利要求38-40中任一项所述的缀合物,其中该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子与该至少一个sdAb中的至少一个和/或该至少一个效应分子中的至少一个共价结合,优选与该sdAb和/或该效应分子的氨基酸残基共价结合。

42.如权利要求41所述的缀合物,其中该至少一个皂苷通过如权利要求38-40中任一项所述的可切割接头与该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子共价结合。

43.如权利要求41或42所述的缀合物,其中该至少一个皂苷通过亚胺键、胺键、酰胺键、脲键、1,3-二氧戊环键、二硫键、硫醚键、酰胺键、肽键或酯键中的任何一个或多个,优选通过接头与该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子共价结合。

44.如权利要求41-43中任一项所述的缀合物,其中该至少一个皂苷包含在位置C₂₃含有醛官能团的苷元核心结构,并且该至少一个皂苷任选地在该皂苷的苷元核心结构的C₃-OH基团处的第一糖链中包含葡萄糖醛酸官能团,该醛官能团参与与该共价皂苷缀合物的寡聚分

子或聚合分子的共价键合,和/或,如果存在的话,该葡萄糖醛酸官能团参与与该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子的共价键合,该皂苷的键合通过直接共价键或通过接头。

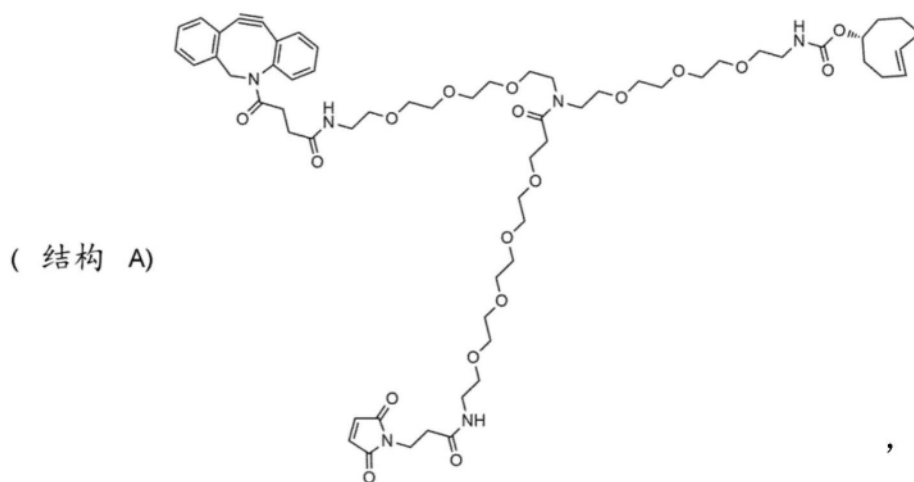
45. 如权利要求44所述的缀合物,其中该至少一个皂苷的苷元核心结构的位置C₂₃的醛官能团与接头EMCH共价结合,该EMCH通过硫醚键共价结合到该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子中的巯基基团,例如半胱氨酸的巯基基团。

46. 如权利要求44或45所述的缀合物,其中在该皂苷的苷元核心结构的C₃β-OH基团处的第一糖链中的葡萄糖醛酸官能团与接头HATU共价结合,该HATU通过酰胺键共价结合到该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子中的胺基团,例如蛋白质的赖氨酸或N-末端的胺基团。

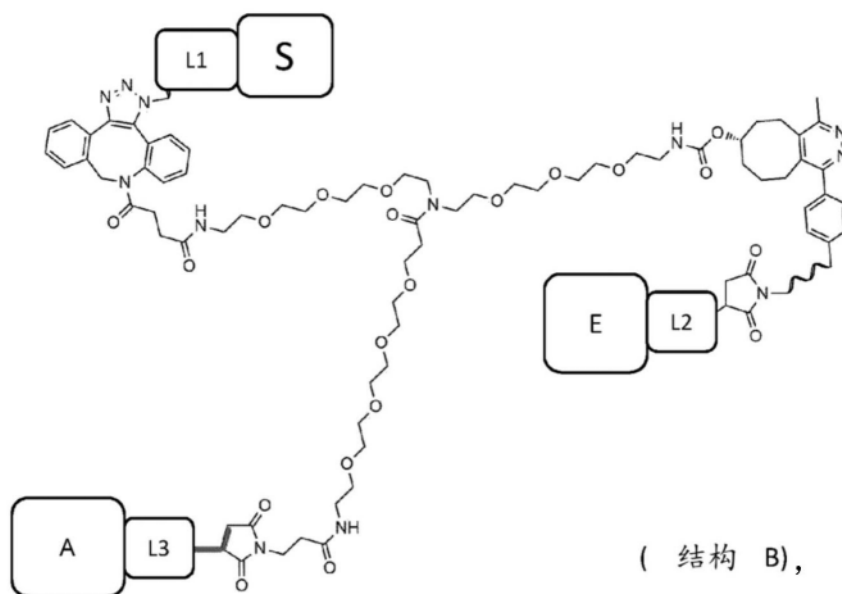
47. 如权利要求41-46中任一项所述的缀合物,其中该共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子结合到该至少一个sdAb中的至少一个,优选一个,和/或该至少一个效应分子中的至少一个,优选一个,优选结合到该sdAb的氨基酸残基和/或该效应分子的氨基酸残基,涉及该共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子上的点击化学基团,该点击化学基团优选选自四嗪、叠氮化物、烯炔或炔炔或这些基团的环状衍生物,更优选该点击化学基团是叠氮化物。

48. 如权利要求41-47中任一项所述的缀合物,其中该共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子包含选自以下的聚合结构和/或寡聚结构:线性聚合物、支化聚合物和/或环状聚合物、寡聚物、树枝状聚合物、树状突、树状突化聚合物、树状突化寡聚物、DNA、多肽、聚赖氨酸、聚乙二醇、寡聚乙二醇(OEG),例如OEG₃、OEG₄和OEG₅,或这些聚合结构和/或寡聚结构的组装,该组装优选通过共价交联构建,优选该共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子是树状突,例如聚酰胺基胺(PAMAM)树枝状聚合物。

49. 如权利要求1-48中任一项所述的缀合物,其中该至少一个皂苷通过三官能接头与该至少一个sdAb中的至少一个,优选一个共价结合并与该至少一个效应分子中的至少一个,优选一个共价结合,该三官能接头优选是由结构A表示的三官能接头:



该缀合物优选包含结构A的三官能接头并具有由结构B表示的分子结构:



其中S是如权利要求37和41-48中任一项所述的至少一个皂苷或共价皂苷缀合物,E是至少一个,优选一个效应分子,A是至少一个sdAb如单个sdAb,L1、L2和L3各自分别独立地是该三官能接头和该皂苷或该共价皂苷缀合物之间的键、该效应分子与该sdAb,或L1、L2和L3是接头,其中L1、L2和L3相同或不同。

50. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-49中任一项所述的缀合物,以及任选的药学上可接受的赋形剂和/或药学上可接受的稀释剂。

51. 如权利要求50所述的药物组合物,用作药物。

52. 如权利要求50所述的药物组合物,用于治疗或预防以下中的任何一种或多种:癌症、自身免疫疾病如类风湿性关节炎、酶缺乏、与酶缺乏相关的疾病、基因缺陷、与基因缺陷相关的疾病、感染如病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、 α -1抗胰蛋白酶相关的肝病、急性肝卟啉病、淀粉样变性和甲状腺素转运蛋白介导的淀粉样变性。

53. 如权利要求51或52所述的药物组合物,其中该皂苷是S01861、S01861衍生物、QS-21或QS-21衍生物,优选S01861衍生物或QS-21衍生物,更优选如权利要求24-27中任一项所述的S01861衍生物。

54. 用于如权利要求52或53所述使用的药物组合物,其中:

- 所述用途用于治疗或预防人受试者的癌症;和/或
- 所述用途用于治疗或预防有需要的患者的癌症,其中该至少一个sdAb结合细胞的细胞表面分子,优选结合细胞的肿瘤细胞表面分子,更优选结合细胞的肿瘤细胞特异性表面分子;和/或
- 将该药物组合物,优选治疗有效量的该药物组合物,施用给有需要的患者,优选人患者。

55. 一种用于将如权利要求1-49中任一项所述的效应分子从细胞的外部转移至所述细胞内,优选转移至所述细胞的胞质溶胶的体外或离体方法,该方法包括以下步骤:

a) 提供细胞,该在其细胞表面上表达如权利要求1-49中任一项所述的缀合物所包含的至少一个sdAb的结合位点,所述结合位点优选存在于如权利要求4-9、20、28或29中任一项所述的细胞的细胞表面分子上,所述细胞优选选自肝细胞、异常细胞如病毒感染的细胞、自

身免疫细胞、包含基因缺陷的细胞、包含酶缺乏的细胞和肿瘤细胞；

b) 提供如权利要求1-49中任一项所述的缀合物，所述缀合物包含待转移到步骤a) 中提供的细胞内的效应分子；以及

c) 使步骤a) 的细胞体外或离体与步骤b) 的缀合物接触，

从而实现包含该效应分子的所述缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内，并且通过实现所述缀合物的转移实现该效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内，优选转移到所述细胞的胞质溶胶内。

56. 一种用于将如权利要求1-49中任一项所述的缀合物从细胞的外部转移至所述细胞内的体外或离体方法，该方法包括以下步骤：

a) 提供细胞，该在其细胞表面上表达如权利要求1-49中任一项所述的缀合物所包含的至少一个sdAb的结合位点，所述结合位点优选存在于如权利要求4-9、20、28或29中任一项所述的细胞的细胞表面分子上，所述细胞优选选自肝细胞、异常细胞如病毒感染的细胞、自身免疫细胞、包含基因缺陷的细胞、包含酶缺乏的细胞和肿瘤细胞；

b) 提供如权利要求1-49中任一项所述的缀合物；以及

c) 使步骤a) 的细胞体外或离体与步骤b) 的缀合物接触，从而实现该缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内。

单结构域抗体、皂苷和效应分子的缀合物,包含其的药物组合物,所述药物组合物的治疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于将效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内的缀合物,该缀合物包含至少一个待转移到该细胞内的效应分子、至少一个单糖链三萜糖苷类型皂苷或双糖链三萜糖苷类型的皂苷,和至少一个单结构域抗体(sdAb),它们彼此共价结合,其中该sdAb能够结合所述细胞的细胞表面分子。本发明还涉及包含本发明的缀合物的药物组合物。此外,本发明涉及本发明的药物组合物,用作药物。此外,本发明涉及本发明的药物组合物,用于治疗或预防以下中的任何一种或多种:癌症、自身免疫疾病如类风湿性关节炎、酶缺乏、与酶缺乏相关的疾病、基因缺陷、与基因缺陷相关的疾病、感染如病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、 α -1抗胰蛋白酶相关的肝病、急性肝卟啉病、淀粉样变性和甲状腺素转运蛋白介导的淀粉样变性。本发明还涉及体外或离体方法,用于将缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内,或用于将本发明的缀合物包含的效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内,优选转移到所述细胞的胞质溶胶。

背景技术

[0002] 具有治疗生物活性的分子在理论上在许多情况下适合作为有效的治疗药物应用,用于治疗有需要的人类患者的疾病例如癌症。典型的实例是小分子生物活性部分。然而,即使不是全部,也有许多目前在临床中使用的潜在药物样分子和疗法至少存在众多缺点和缺陷中的一个。当施用于人体时,除了针对治疗疾病或健康问题的所期望生物活性之外,治疗活性分子还可以发挥脱靶效应。这种脱靶效应是不希望出现的,并且存在诱发所施用分子的危及健康副作用甚至危及生命的副作用的风险。正是此类不良事件的发生导致许多药物样化合物和治疗性部分未能通过III期临床试验甚至IV期临床试验(授权后监督)。因此,强烈希望提供药物分子,例如小分子治疗剂,其中药物分子的治疗效果应该例如(1)对引起疾病的生物因子或生物过程高度特异,(2)足够安全,(3)足够有效,(4)充分针对患病细胞,对非患病细胞几乎没有或没有脱靶活性,(5)具有足够及时的作用模式(例如,所施用的药物分子应当在一定的时间范围内到达人患者中的靶向位点,并且应当在靶向位点保持一定的时间范围),和/或(6)在患者体内具有足够长的持续治疗活性,等等。不幸的是,迄今为止,尽管已经进行了长期深入的研究,并且尽管在个别解决遇到的困难和缺点的几个领域中取得了令人印象深刻的进展,但是对于患者来说,仍然不能获得具有上述许多甚至所有有益特征的“理想”疗法。

[0003] 化疗是癌症治疗最重要的治疗选择之一。然而,它通常与小的治疗窗有关,因为它相比于健康组织中的分裂细胞对癌细胞没有特异性。单克隆抗体的发明提供了利用其特异性结合特性作为将细胞毒剂靶向递送至癌细胞的机制同时不伤害正常细胞的可能性。这可以通过细胞毒性效应子(也称为载荷或弹头)与抗体的化学缀合来实现,以产生抗体-药物缀合物(ADC)。通常,使用非常有效的载荷,例如厄塔毒素(emtansine)(DM1),其未缀合形式的治疗指数(毒性剂量与有效剂量的比率)有限。DM1与曲妥珠单抗(曲妥珠单抗-厄塔毒素

(ado-trastuzumab emtansine)) (也称为Kadcycla)的缀合可将猴中DM1的耐受剂量提高至少两倍。在过去的几十年里,人们为开发治疗性ADC付出了巨大的努力和投资。然而,尽管临床前数据很有希望,但将ADC带入临床仍然具有挑战性。第一个获批用于临床的ADC是2000年用于复发性急性髓性白血病(AML)的吉妥珠单抗-奥加米星(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg,靶向CD33,辉瑞公司(Pfizer)/惠氏公司(Wyeth))。然而,Mylotarg应联邦药物管理局(FDA)的要求退出市场,原因是存在诸多问题,包括其安全性。接受Mylotarg治疗的患者比接受常规化疗的患者更容易死亡。Mylotarg于2017年在较低的推荐剂量、与化疗组合或单独使用的不同时间表以及新的患者群体情况下再次进入市场。迄今为止,只有五种ADC被批准用于临床,同时大约有五十五种ADC的临床开发已经停止。然而,人们的兴趣仍然很高,目前大约有八十种ADC仍在近六百项临床试验中进行临床开发。

[0004] 尽管有可能使用患者通常不能耐受的毒性载荷,但低治疗指数是许多ADC在临床开发中中止的主要问题,这可能由几种机制引起,如对正常细胞的脱靶毒性、对细胞毒性剂的抗性发展和循环中药物的过早释放。FDA对ADC进行的系统审查发现,大多数ADC的毒性特征可以根据使用的载荷进行分类,而不是根据使用的抗体进行分类,这表明毒性主要是由载荷的过早释放决定的。在大约五十五种中止的ADC中,估计至少有二十三种是由于治疗指数不佳。例如,特斯瑞曲妥珠单抗(trastuzumab tesirine)缀合物(ADCT-502,HER-2靶向,ADC疗法)的开发最近由于治疗指数低而中止,这可能是由于表达相当高水平HER2的肺组织中的中靶、脱组织效应。此外,由于缺少主要终点,3期试验中的几个ADC已经中止。例如,在新诊断的胶质母细胞瘤患者中测试的迪妥昔单抗-玛汀(depatuxizumab mafodotin)缀合物(ABT-414,EGFR靶向,艾伯维公司(AbbVie))和在铂耐药卵巢癌患者中测试的米妥昔单抗-索星(mirvetuximab soravtansine)缀合物(IMGN853,叶酸受体 α (FR α)靶向,免疫原公司(ImmunoGen))的3期试验最近被停止,显示无存活益处。需要注意的是,一些ADC的临床可用剂量可能不足以发挥其全部抗癌活性。例如,曲妥珠单抗-厄塔毒素在人中的MTD为3.6mg/kg。在乳腺癌的临床前模型中,曲妥珠单抗-厄塔毒素在3mg/kg或更高的剂量水平下诱导肿瘤消退,但在15mg/kg时观察到更有效的功效。这表明在临床施用剂量下,曲妥珠单抗-厄塔毒素可能无法发挥其最大的潜在抗肿瘤作用。

[0005] ADC主要由抗体、细胞毒性部分(如载荷)和接头构成。针对ADC的每个组分,在新ADC的设计和开发中已经提出并实施了几种新策略以克服现有问题。例如,通过鉴定和验证抗体组分的足够抗原靶标,通过选择在肿瘤中具有高表达水平而在正常组织中表达很少或没有表达的抗原,存在于细胞表面上可被循环的ADC接近的抗原,以及允许ADC在结合后内化进入细胞的抗原;和替代活动机制;设计和优化接头,以提高ADC的溶解度和药物-比-抗体比率(DAR),并克服由可将化疗药物转运出细胞的蛋白质引起的抗性;通过包含更多载荷来提高DAR比率,选择和优化抗体以提高抗体同质性和可开发性。除了ADC的技术发展,新的临床和转化策略也正在部署以最大化治疗指数,例如,通过分次给药改变给药方案;进行生物分布研究;包括生物标志物以优化患者选择,及早捕获反应信号并监测反应的持续时间和深度,并为联合研究提供信息。

[0006] 具有临床潜力的ADC的实例是那些ADC,例如布伦妥昔单抗-维多汀(brentuximab vedotin)、艾诺妥珠单抗-奥加米星(inotuzumab ozogamicin)、莫塞妥莫单抗-帕舒托(moxetumomab pasudotox)、和珀拉妥珠单抗-维多汀(polatuzumab vedotin),它们被评估

为淋巴恶性肿瘤和多发性骨髓瘤的治疗选择。结合(恶性)B细胞上的CD79b的珀拉妥珠单抗-维多汀和结合CD22的匹那妥珠单抗-维多汀(pinatuzumab vedotin)在临床试验中进行了测试,其中每种ADC均与共同施用的利妥昔单抗(一种结合CD20且不具有载荷的单克隆抗体)组合[B.Yu和D.Liu, Antibody-drug conjugates in clinical trials for lymphoid malignancies and multiple myeloma [淋巴恶性肿瘤和多发性骨髓瘤临床试验中的抗体-药物缀合物]; Journal of Hematology&Oncology [血液学与肿瘤学杂志] (2019) 12:94]。诸如这些实例的单克隆抗体的组合是进一步的方法,并试图达到组合许多甚至所有上述ADC所期望特性的“灵丹妙药”。

[0007] 同时,在过去的几十年中,基于核酸的疗法正在开发中。治疗性核酸可基于脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、反义寡核苷酸(ASO、AON)和短干扰RNA(siRNA)、微小RNA以及DNA和RNA适体,用于方法例如基因疗法, RNA干扰(RNAi)。它们中的许多通过抑制DNA或RNA表达来共享相同的基本作用基础,从而防止与疾病相关的异常蛋白质的表达。基因疗法领域正在进行的临床试验数量最多,全球有近2600项正在进行或已完成的临床试验,但只有约4%进入3期。随后是ASO的临床试验。与ADC类似,尽管正在探索大量技术,但治疗性核酸在临床开发过程中存在两个主要问题:递送至细胞和脱靶效应。例如,ASO,例如肽核酸(PNA)、氨基磷酸酯吗啉寡聚物(PMO)、锁核酸(LNA)和桥接核酸(BNA),正在被研究作为一种有吸引力的策略来抑制特异性靶基因,尤其是那些难以用小分子抑制剂或中和抗体靶向的基因。目前,正在研究不同ASO在许多神经退行性疾病(例如亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病和肌萎缩侧索硬化症)以及几个癌症阶段中的功效。ASO作为潜在治疗剂的应用需要安全有效的方法将其递送至靶细胞和组织的细胞质和/或细胞核。尽管ASO的临床相关性已得到证实,但体外和体内低效的细胞摄取限制了ASO的功效,并成为治疗发展的障碍。细胞摄取可能小于剂量的2%,导致活性部位的ASO浓度过低,无法获得有效和持续的结局。因此,这需要增加施用剂量,从而诱导脱靶效应。最常见的副作用是补体级联的激活、凝血级联的抑制和Toll样受体介导的免疫系统刺激。

[0008] 化疗药物最常见的是小分子,然而,它们的功效受到严重的脱靶副作用毒性、以及它们溶解性差、清除速度快和肿瘤暴露有限等因素的阻碍。支架-小分子药物缀合物,如聚合物-药物缀合物(PDC)是具有药理活性的大分子结构,其包含与载剂支架(例如聚乙二醇(PEG))结合的小分子药物的一个或多个分子。

[0009] 这种缀合原理引起了很多关注,并且已经研究了几十年。大多数处于临床前或临床开发阶段的小分子药物缀合物用于肿瘤适应症。然而,截至目前只有一种与癌症无关的药物(Movantik,阿片类拮抗剂纳洛酮的PEG低聚物缀合物,阿斯利康公司)于2014年获批用于慢性疼痛患者中阿片类引起的便秘,这是一种非肿瘤药物适应症。迄今为止,将药物-支架缀合物的应用转化为人类受试者的治疗几乎没有取得临床成功。例如,PK1(N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)共聚物多柔比星;由法玛西亚公司(Pharmacia)、辉瑞公司开发)在鼠模型中显示出对实体瘤和白血病的强大抗癌活性,并且正在针对肿瘤适应症进行临床研究。尽管它在人中证明了非特异性毒性的显著降低和药代动力学的改善,但在患者中抗癌功效的改善却微乎其微,因此PK1的进一步开发停止了。

[0010] 支架-小分子药物缀合物的失败至少部分归因于其在肿瘤部位的积聚不良。例如,虽然在鼠模型中,PK1在肿瘤中的积累比在健康组织(肝、肾、肺、脾和心脏)中高45-250倍,

但在临床试验中,仅在一小部分患者中观察到肿瘤中的积累。

[0011] 上述问题的潜在解决方案是应用纳米颗粒系统进行药物递送,例如脂质体。脂质体是由一个或多个磷脂双层组成的球形囊泡,当磷脂分散在水中时会自发形成球形囊泡。磷脂的两亲特性使其具有自组装、乳化和润湿特性,并且这些特性可用于新药和新药递送系统的设计。与直接施用药物相比,脂质体递送系统中的药物封装可能具有多种优势,例如改善和控制药代动力学和药效学、组织靶向特性、降低毒性和增强药物活性。这种成功的实例是小分子化疗药物多柔比星的脂质体包封形式(Doxil:多柔比星的聚乙二醇化脂质体包封形式;Myocet:非聚乙二醇化脂质体多柔比星),其已被批准用于临床。

[0012] 因此,仍然需要找到一种解决方案,以允许药物治疗(例如抗肿瘤疗法)在期望时适用于非全身性使用,其中药物具有例如可接受的安全性谱、很少的脱靶活性、足够的功效,从患者体内清除率足够低,治疗窗足够宽等。

[0013] 在欧洲专利EP 1623715 B1中,描述了一种组合物,该组合物包含与靶细胞特异性结合分子偶联的药理活性剂与皂苷组合。该药理活性剂例如是毒素。

发明内容

[0014] 对于本发明的实施例,第一个目标是提供改善的生物活性化合物或包含这种改善的生物活性化合物的组合物。

[0015] 本发明实施例的几个目标之一是提供对非特异性问题的解决方案,该问题是在将(小分子)治疗活性化合物施用给有需要的人类患者时遇到的。本发明实施例的几个目标之一是为药物对导致疾病的生物因子或生物过程具有非最佳特异性的问题提供解决方案。本发明实施例的几个目标之一是为当前药物在对有需要的人类患者施用安全性不足的问题提供解决方案。本发明实施例的几个目标之一是为当前药物在对有需要的人类患者施用时效果低于预期的问题提供解决方案。本发明实施例的几个目标之一是为当前药物在对有需要的人类患者施用在对非患病细胞几乎没有脱靶活性情况下没有充分定向至患病细胞的问题提供解决方案。本发明实施例的几个目标之一是为以下问题提供解决方案:当前药物在对有需要的人类患者施用不具有足够及时的作用模式(例如,所施用的药物分子应该在一定的时间范围内到达人类患者的靶向位点,并且应该在靶向位点保持一定的时间范围)。本发明实施例的几个目标之一是为以下问题提供解决方案:当前药物在对有需要的人类患者施用时在患者体内没有足够长的持续治疗活性。

[0016] 通过提供本发明的抗体-药物缀合物(ADC)或抗体-寡核苷酸(AOC)如抗体-BNA共价复合物来实现本发明实施例的至少一个上述目的,所述抗体-药物缀合物或抗体-寡核苷酸包含细胞靶向部分(其是单结构域抗体(sdAb),例如V_{HH})和至少一个皂苷和至少一个效应子部分如朐毒素和/或寡核苷酸如BNA,根据本发明,提供有共价连接的皂苷的ADC和/或提供有共价连接的皂苷的AOC也适合用作药物。

[0017] 本发明将相对于具体实施例来说明,但本发明并不受限于此而只受权利要求限制。除非另有说明,在此描述的本发明的实施例可以组合和协作操作。

[0018] 本发明的第一方面涉及一种用于将效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内的缀合物,该缀合物包含至少一个待转移到细胞中的效应分子、至少一个单结构域抗体(sdAb)和至少一个皂苷,它们直接或通过至少一个接头彼此共价结合,其中该至少一个皂

昔是单糖链三萜糖苷或者是双糖链三萜糖苷,并且其中该sdAb能够结合所述细胞的细胞表面分子。

[0019] 本发明的第二个方面涉及药物组合物,其包含本发明的缀合物,以及任选的药学上可接受的赋形剂和/或药学上可接受的稀释剂。

[0020] 本发明的第三个方面涉及本发明的药物组合物,用作药物。

[0021] 本发明的第四个方面涉及本发明的药物组合物,用于治疗或预防以下中的任何一种或多种:癌症、自身免疫疾病如类风湿性关节炎、酶缺乏、与酶缺乏相关的疾病、基因缺陷、与基因缺陷相关的疾病、感染如病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、 α -1抗胰蛋白酶相关的肝病、急性肝卟啉病、淀粉样变性和甲状腺素转运蛋白介导的淀粉样变性。

[0022] 本发明的第五个方面涉及一种体外或离体方法,用于将本发明的效应分子(本发明的缀合物所包含的效应分子)从细胞的外部转移到所述细胞内,优选转移到所述细胞的胞质溶胶,该方法包括以下步骤:

[0023] a) 提供一种细胞,该细胞在其细胞表面表达本发明的缀合物所包含的至少一个sdAb的结合位点,所述结合位点优选存在于如本文所述的细胞的细胞表面分子上,所述细胞优选选自肝细胞、异常细胞如病毒感染的细胞、自身免疫细胞、包含基因缺陷的细胞、包含酶缺乏的细胞和肿瘤细胞;

[0024] b) 提供本发明的缀合物,所述缀合物包含待转移到步骤a)中提供的细胞内的效应分子;以及

[0025] c) 使步骤a)的细胞体外或离体与步骤b)的缀合物接触,

[0026] 从而实现包含该效应分子的所述缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内,并且通过实现所述缀合物的转移实现该效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内,优选转移到所述细胞的胞质溶胶内。

[0027] 本发明的第六方面涉及一种用于将本发明的缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内的体外或离体方法,该方法包括以下步骤:

[0028] a) 提供一种细胞,该细胞在其细胞表面表达本发明的缀合物所包含的至少一个sdAb的结合位点,所述结合位点优选存在于如本文所述的细胞的细胞表面分子上,所述细胞优选选自肝细胞、异常细胞如病毒感染的细胞、自身免疫细胞、包含基因缺陷的细胞、包含酶缺乏的细胞和肿瘤细胞;

[0029] b) 提供本发明中任一项的缀合物;以及

[0030] c) 使步骤a)的细胞体外或离体与步骤b)的缀合物接触,从而实现该缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内。

[0031] 本发明的一个方面涉及试剂盒,其包含本发明的缀合物或本发明的药物组合物,以及所述缀合物或所述药物组合物在治疗或预防以下任何一种或多种疾病中的使用说明:癌症、自身免疫疾病如类风湿性关节炎、酶缺乏、与酶缺乏相关的疾病、基因缺陷、与基因缺陷相关的疾病、感染如病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、 α -1抗胰蛋白酶相关的肝病、急性肝卟啉病、淀粉样变性和甲状腺素转运蛋白介导的淀粉样变性,或应用本发明的体外或离体方法的说明书。

[0032] 本发明的一个方面涉及缀合物如ADC或AOC,或半成品ADC缀合物或半成品AOC缀合

物,其包含细胞表面分子靶向分子如本发明的sdAb并且包含至少一个本发明的效应子部分和/或包含至少一个本发明的皂苷,该缀合物具有结构C:

[0033] $A(-S)_b(-E)_c$

[0034] (结构C)

[0035] 其中A是细胞表面分子靶向分子,例如sdAb;

[0036] S是皂苷;

[0037] E是效应子部分;

[0038] $b=0-64$,优选是0、1、2、3、4、8、16、32、64或其间的任何整数(或分数);

[0039] $c=0-8$,优选是0、1、2、3、4、6、8或其中的任何整数(或分数),

[0040] 其中S偶联到A和/或E,E偶联到A和/或S,优选S偶联到A并且E偶联到A。

[0041] 定义

[0042] 术语“肽”具有其常规的科学含义并且在此指的是蛋白样分子,意思是该分子在某种程度上具有蛋白的物理化学性质特征,具有蛋白,与蛋白相关,包含蛋白,属于蛋白,由蛋白组成,类似蛋白,或者是蛋白。在例如“肽分子”中使用的术语“肽”是指存在至少一部分类似于或者是蛋白的分子,其中“蛋白”应理解为包括至少两个残基长的氨基酸残基链,因此包括肽、多肽和蛋白以及蛋白或蛋白结构域的组合。在肽分子中,至少两个氨基酸残基例如通过(一个或多个)酰胺键,例如(一个或多个)肽键结合。在肽分子中,氨基酸残基是天然氨基酸残基和/或人工氨基酸残基,例如经修饰的天然氨基酸残基。在优选的实施例中,肽分子是包含至少两个氨基酸残基,优选地介于两个和约2,000个之间的氨基酸残基的分子。在一个实施例中,肽分子是包含2至20个(通常对于肽而言)氨基酸的分子。在一个实施例中,肽分子是包含21至1,000个氨基酸的分子(对于多肽、蛋白、蛋白结构域,例如抗体、Fab、scFv、受体例如EGF的配体而言是典型的)。优选地,氨基酸残基(通常)通过(一个或多个)肽键结合。根据本发明,所述氨基酸残基是或包含(经修饰的)(非)天然氨基酸残基。

[0043] 术语“效应分子”或“效应子部分”当指作为例如共价缀合物的一部分的效应分子时,具有其常规的科学含义,在此指分子,该分子可选择性结合例如以下任何一个或多个靶分子:蛋白质,肽,碳水化合物,糖类如聚糖,(磷)脂,核酸如DNA、RNA,酶,并调节这样一个或多个靶分子的生物活性。效应分子是例如选自小分子如药物分子、毒素如蛋白毒素、寡核苷酸如BNA、异种核酸或siRNA、酶、肽、蛋白质中的任何一个或多个或其任何组合的小分子。因此,例如,效应分子或效应子部分是例如选自小分子如药物分子、毒素如蛋白毒素、寡核苷酸如BNA、异种核酸或siRNA、酶、肽、蛋白质中的任何一个或多个或其任何组合的效应分子或部分,其可以选择性地结合以下靶分子中的任何一个或多个:蛋白质,肽,碳水化合物,糖类如聚糖,(磷)脂,核酸如DNA、RNA,酶,并且其在与靶分子结合后调节这样一个或多个靶分子的生物活性。通常,效应分子可以在细胞内发挥生物学效应,例如哺乳动物细胞,例如人细胞,例如在所述细胞的胞质溶胶中。因此,本发明的效应分子或部分是通过与细胞内效应分子靶标相互作用影响细胞代谢的任何物质,其中该效应分子靶标是细胞内的任何分子或结构,不包括内吞和再循环途径的隔室和囊泡的内腔,但包括这些隔室和囊泡的膜。因此,细胞内的所述结构包括细胞核、线粒体、叶绿体、内质网、高尔基体、其他运输小泡、质膜的内部和胞质溶胶。因此,典型的效应分子是药物分子、酶、质粒DNA、毒素如抗体-药物缀合物(ADC)包含的毒素、寡核苷酸如siRNA、BNA、抗体-寡核苷酸缀合物(AOC)包含的核酸。例如,

效应分子是可以充当配体的分子,该配体可以增加或减少(细胞内)酶活性、基因表达或细胞信号传导。

[0044] 术语“皂苷”具有其常规的科学含义并且此处指的是一组两亲性糖苷,其包含一个或多个亲水性糖基部分与亲脂性苷元核心(其是皂苷配基)组合。皂苷可以是天然存在的或合成的(即非天然存在的)。术语“皂苷”包括天然存在的皂苷、天然存在的皂苷的衍生物以及通过化学和/或生物技术合成途径从头合成的皂苷。

[0045] 术语“皂苷衍生物”(也称为“经修饰的皂苷”)具有其常规的科学含义并且在此是指对应于天然存在的皂苷的化合物,其通过一个或多个化学修饰而衍生,例如官能团的氧化、官能团的还原和/或与另一分子形成共价键(也称为“缀合”或“共价缀合”)。优选的修饰包括以下的衍生化:苷元核心的醛基团;糖链的羧基基团或糖链的乙酰氧基基团。通常,皂苷衍生物没有天然对应物,即皂苷衍生物不是由例如植物或树木天然产生的。术语“皂苷衍生物”包括通过天然存在的皂苷衍生化获得的衍生物以及通过化学和/或生物技术合成途径从头合成的衍生物,这些途径产生对应于天然存在的皂苷的化合物,其已经通过一个或多个化学修饰进行了衍生化。

[0046] 术语“苷元核心结构”具有其常规的科学含义并且此处指的是皂苷的苷元核心,没有与其结合的一个或两个碳水化合物触角或糖链(聚糖)。例如,皂皮酸是S01861、QS-7和QS21的苷元核心结构。通常,皂苷的聚糖是单糖或寡糖,例如直链或支链聚糖。

[0047] 术语“糖链”具有其常规的科学含义并且此处指的是聚糖、碳水化合物触角、单个糖部分(单糖)或包含多个糖部分(寡糖、多糖)的链中的任何。糖链可仅由糖部分组成,或还可包含其他部分,例如4E-甲氧基肉桂酸、4Z-甲氧基肉桂酸和5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸中的任一种,例如存在于QS-21中。

[0048] 糖链名称上下文中的术语“Api/Xyl-”或“Api-或Xyl-”具有其常规的科学含义并且此处是指包含芹菜糖(Api)部分或包含木糖(Xyl)部分的糖链。

[0049] 术语“经修饰的皂苷所基于的皂苷”具有其常规的科学含义并且此处指的是经过修饰以提供经修饰的皂苷的皂苷。通常,经修饰的皂苷所基于的皂苷是天然存在的皂苷,对其进行化学修饰以提供经修饰的皂苷。

[0050] 术语“基于皂苷的经修饰的皂苷”具有其常规的科学含义并且此处指的是经过化学修饰步骤以提供经修饰的皂苷的皂苷,其中从其制备经修饰的皂苷的皂苷通常是天然存在的皂苷。

[0051] 术语“寡核苷酸”具有其常规的科学含义并且此处指任何天然或合成的核酸链,包括DNA、经修饰的DNA、RNA、mRNA、经修饰的RNA、合成的核酸,以单链分子或双链分子呈现,例如BNA、反义寡核苷酸(ASO)、短或小干扰RNA(siRNA;沉默RNA)、反义DNA、反义RNA等。

[0052] 术语“抗体-药物缀合物”或“ADC”具有其常规的科学含义并且在此指抗体(例如IgG、Fab、scFv、免疫球蛋白、免疫球蛋白片段、一个或多个V_H结构域、单结构域抗体、V_H、骆驼V_H等)以及当与受试者如人患者的细胞接触时能够发挥治疗效果的任何分子(如活性药物成分、毒素、寡核苷酸、酶、小分子药物化合物等)的任何缀合物。

[0053] 术语“抗体-寡核苷酸缀合物”或“AOC”具有其常规的科学含义并且在此指抗体(例如IgG、Fab、scFv、免疫球蛋白、免疫球蛋白片段、一个或多个V_H结构域、单结构域抗体、V_H、骆驼V_H等)和当与受试者如人患者的细胞接触时能发挥治疗作用的任何寡核苷酸分子(如

选自天然或合成的核酸串的寡核苷酸,包括DNA、经修饰的DNA、RNA、mRNA、经修饰的RNA、合成的核酸,呈现为单链分子或双链分子,如BNA、反义寡核苷酸(ASO)、短或小干扰RNA(siRNA;沉默RNA)、反义DNA、反义RNA等)的任何缀合物。

[0054] 术语“桥接核酸”,或简称“BNA”,或简称“锁核酸”或“LNA”,具有其常规的科学含义并且此处指经修饰的RNA核苷酸。BNA也称为“受限RNA分子”或“不可接近的RNA分子”。BNA单体可以包含五元、六元或甚至七元桥接结构,其具有“固定”C₃'-内糖折叠。该桥在核糖的2',4'-位置合成地并入,以提供2',4'-BNA单体。可以使用本领域已知的标准亚磷酰胺化学将BNA单体并入寡核苷酸聚合结构中。BNA是结构刚性的寡核苷酸,具有增加的结合亲和力和稳定性。

[0055] 如在包含接头的抗体-皂苷缀合物中使用的术语“S”代表“稳定接头”,其在哺乳动物细胞如人细胞如人肿瘤细胞的内体和溶酶体中,因此在弱酸性条件下(pH<6.6,例如pH 4.0-5.5)保持完整。

[0056] 如在包含接头的抗体-皂苷缀合物中使用的术语“L”表示在哺乳动物细胞如人细胞如人肿瘤细胞的内体和溶酶体中的弱酸性条件下(pH<6.6,例如pH 4.0-5.5)被切割的“不稳定接头”。

[0057] 说明书和权利要求中的术语第一、第二、第三等用于区分例如相似的要素、组合物、组合物中的成分或单独的方法步骤,而不一定用于描述先后顺序或时间顺序。这些术语在适当的情况下是可互换的,并且本发明的实施例可以以本文描述或说明的顺序以外的顺序操作,除非另有说明。

[0058] 除非另有说明,在此描述的本发明的实施例可以组合和协作操作。

[0059] 此外,尽管各种实施例被称为“优选的”或“例如”或“举例”或“特别地”等,但是这些实施例应被解释为可以实施本发明的示例性方式,而不是限制本发明的范围。

[0060] 权利要求中使用的术语“包含”不应被解释为限于例如要素或方法步骤或其后列出的组合物的成分;它不排除某一组合物中的其他要素或方法步骤或成分。它需要被解释为指定所提及的所陈述特征、整数、(方法)步骤或组分的存在,但不排除一个或多个其他特征、整体、步骤或组分或其组合的存在或添加。因此,表述“包括步骤A和B的方法”的范围不应限于仅由步骤A和B组成的方法,而是对于本发明而言,该方法的唯一列举的步骤是A和B,并且权利要求应进一步解释为包括那些方法步骤的等同物。因此,表述“包含组分A和B的组合物”的范围不应限于仅由组分A和B组成的组合物,而是对于本发明而言,该组合物的唯一列举的组分是A和B,并且权利要求应进一步解释为包括那些组分的等同物。

[0061] 另外,通过不定冠词“一个/一种”(“a”或“an”)指代要素或组分并不排除存在多于一个/一种要素或组分的可能性,除非上下文明确要求存在一个/一种并且仅一个/一种要素或组分。因此,不定冠词“一个/一种”(“a”或“an”)通常意指“至少一个/一种”。

[0062] 术语“Saponinum album”具有其正常含义并且此处指的是Merck KGaA(达姆施塔特,德国)生产的皂苷混合物,其中含有来自满天星(*Gypsophila paniculata*)和*Gypsophila arrostii*的皂苷,其含有SA1657,主要是SA1641。

[0063] 术语“皂树皂苷”具有其正常含义并且此处指的是皂树皂苷的皂苷级分,因此是所有其他QS皂苷的来源,主要含有QS-18和QS-21。

[0064] “QS-21”或“QS21”具有其常规的科学含义并且此处指的是QS-21A-apio(约63%)、

QS-21A-xylo (约32%)、QS-21B-apio (约3.3%) 和QS-21B-xylo (约1.7%) 的混合物。

[0065] 同样,“QS-21A”具有其常规的科学含义并且此处指的是QS-21A-apio (约65%) 和QS-21A-xylo (约35%) 的混合物。

[0066] 同样,“QS-21B”具有其常规的科学含义并且此处指的是QS-21B-apio (约65%) 和QS-21B-xylo (约35%) 的混合物。

[0067] 术语“Quil-A”是指一种市售的皂树皂苷半纯化提取物并且含有数量不定的50多种不同的皂苷,其中许多在QS-7、QS-17、QS18和QS-21的C-3 β -OH基团处掺入了三萜-三糖亚结构Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-。Quil-A中发现的皂苷列于van Setten (1995),表2 [Dirk C.van Setten,Gerrit van de Werken,Gijsbert Zomer和Gideon F.A.Kersten, Glycosyl Compositions and Structural Characteristics of the Potential Immuno-adjutant Active Saponins in the Quillaja saponaria Molina Extract Quil A[皂树提取物Quil A中潜在免疫佐剂活性皂苷的糖基组成和结构特征],RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY[质谱分析快讯],第9卷,660-666 (1995)]。Quil-A和皂树皂苷是来自皂树的皂苷的级分,两者都含有大量不同的皂苷,且含量大体上是重叠的。这两个级分的具体组成不同,因为这两个级分是通过不同的纯化程序获得的。

[0068] 术语“QS1861”和术语“QS1862”指的是QS-7和QS-7api。QS1861的分子量为1861道尔顿, QS1862的分子量为1862道尔顿。QS1862在以下中有描述:Fleck等人 (2019) 表1中,第28行 [Juliane Deise Fleck,Andresa Heemann Betti,Francini Pereira da Silva, Eduardo Artur Troian,Cristina Olivaro,Fernando Ferreira and Simone Gasparin Verza,Saponins from Quillaja saponaria和Quillaja brasiliensis:Particular Chemical Characteristics and Biological Activities[特定的化学特征和生物活性],Molecules[分子]2019,24,171;doi:10.3390/molecules24010171]。所描述的结构是QS-7的api-变体QS1862。分子量为1862道尔顿,因为该质量是包括葡糖醛酸处的质子在内的形式质量。在中性pH下,分子去质子化。在负离子模式下进行质谱测量时,测量质量为1861道尔顿。

附图说明

[0069] 图1A (Fig.1A):靶向的2组分方法 (1靶标)。S01861和毒素 (例如核糖体失活蛋白) 分别各自与V_{HH}或抗体 (mAb) 结合,用于递送和内化到靶细胞内。1) mAb-毒素和V_{HH}-S01861与细胞表面受体结合,2) 两种缀合物的受体介导的胞吞作用发生 (缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3) 在低溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内溶酶体逃逸,4) 毒素向细胞质的释放发生,5) 毒素诱导细胞死亡。

[0070] 图1B (Fig.1B):靶向的2组分方法 (2靶标)。S01861和毒素 (核糖体失活蛋白) 分别各自与V_{HH}或抗体 (mAb) 结合,用于递送和内化到靶细胞内。1) mAb-毒素和V_{HH}-S01861与其相应的细胞表面受体结合,2) 两种缀合物的受体介导的胞吞作用发生 (缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3) 在低溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内溶酶体逃逸,4) 毒素向细胞质的释放发生,5) 毒素诱导细胞死亡。

[0071] 图1C (Fig.1C):靶向的2组分方法 (2靶标)。S01861和毒素 (核糖体失活蛋白) 分别各自与V_{HH}结合,用于递送和内化到靶细胞内。1) V_{HH}-毒素和V_{HH}-S01861与其相应的细胞表面

受体结合,2)两种缀合物的受体介导的胞吞作用发生(缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3)在低溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内溶酶体逃逸,4)毒素向细胞质的释放发生,5)毒素诱导细胞死亡。

[0072] 图1D (Fig.1D):靶向的2组分方法(2靶标)。S01861和毒素(核糖体失活蛋白)分别各自与 V_{HH} 或mAb结合,用于递送和内化到靶细胞内。1) V_{HH} -毒素和mAb-S01861与其相应的细胞表面受体结合,2)两种缀合物的受体介导的胞吞作用发生(缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3)在低溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内溶酶体逃逸,4)毒素向细胞质的释放发生,5)毒素诱导细胞死亡。

[0073] 图1E (Fig.1E):靶向的2组分方法(1靶标)。S01861和毒素(核糖体失活蛋白)分别各自与 V_{HH} 或抗体(mAb)结合,用于递送和内化到靶细胞内。1) V_{HH} -毒素和mAb-S01861与细胞表面受体结合,2)两种缀合物的受体介导的胞吞作用发生(缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3)在低溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内溶酶体逃逸,4)毒素向细胞质的释放发生,5)毒素诱导细胞死亡。

[0074] 图1F (FIG.1F):卡通展示了本发明的示例性分子和缀合物。显示了与结合到抗体轻链上的四个皂苷分子‘S’和与共价结合到抗体重链恒定结构域的效应分子‘E’共价缀合的IgG抗体。

[0075] 图1G (FIG.1G):卡通展示了本发明的示例性分子和缀合物。显示了与四个三价接头共价缀合的IgG抗体,其中每个接头与皂苷共价结合,并与效应分子共价结合。三价接头与抗体轻链共价结合。

[0076] 图1H (FIG.1H):卡通展示了本发明的示例性分子和缀合物。显示了与两个三价接头共价缀合的单结构域抗体,其中每个接头与皂苷共价结合,并与效应分子共价结合。

[0077] 图1I (FIG.1I):卡通展示了本发明的示例性分子和缀合物。显示了与三价接头共价缀合的单结构域抗体,其中三价接头与皂苷共价结合,并与效应分子共价结合。

[0078] 图1J (FIG.1J): (S)_n-(L)(E)概念:mAb-(S01861)ⁿ(蛋白毒素)^m。在半胱氨酸残基(Cys)处共价连接的S01861和在赖氨酸残基处共价连接的蛋白毒素(核糖体失活蛋白)都与相同的抗体(mAb)缀合,用于递送和内化到靶细胞内。1) mAb-(Cys-L-S01861)⁴(Lys-蛋白毒素)²与其相应的细胞表面受体结合,2)缀合物的受体介导的胞吞作用发生(缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3)在低溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内溶酶体逃逸,4)毒素向细胞质的释放发生,5)毒素诱导细胞死亡。

[0079] 图1K (FIG.1K): (S)_n-(L)(E)概念:mAb-(S01861)ⁿ(反义BNA寡聚物)^m。与半胱氨酸残基(Cys)结合的S01861和与赖氨酸残基结合的反义BNA寡核苷酸都与相同的抗体(mAb)缀合,用于递送和内化到靶细胞内。1) mAb-(Cys-S01861)⁴(Lys-BNA寡聚物)²与其相应的细胞表面受体结合,2)两种缀合物的受体介导的内吞作用发生(缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3)在低内体、溶酶体和内溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内体、溶酶体和内溶酶体逃逸,4)BNA寡聚物向细胞质中的释放发生以及5)诱导靶基因沉默。

[0080] 图1L (FIG.1L): (S)_n-(L)(E)概念:mAb-(S01861-支架-反义BNA寡聚物)ⁿ。[S01861-三官能接头-BNA寡聚物]ⁿ与抗体(mAb)缀合,用于递送和内化到靶细胞内。抗体例如是IgG,或sdAb,例如 V_{HH} 。1) mAb-(S01861-三官能接头-BNA寡聚物)⁴与其相应的细胞表面

受体结合,2)两种缀合物的受体介导的内吞作用发生(缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物内化),3)在低内溶酶体pH和适当浓度下,S01861变得有活性,实现内溶酶体逃逸,4)BNA寡聚物向细胞质中的释放发生以及5)诱导靶基因沉默。在本发明缀合物的上下文中,术语“支架”应理解为寡聚分子或聚合分子,该寡聚分子或聚合分子带有一个或多个化学基团用于共价结合一个或多个其他分子,例如皂苷分子和/或效应分子,例如蛋白毒素或寡核苷酸,并且带有至少一个化学基团用于共价偶联蛋白质,例如抗体,例如IgG或sdAb。

[0081] 图2(Fig.2):在SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺/CD71⁺)(A)和MD-MB-468细胞(HER2⁻/CD71⁺)(B)上用根据本发明的V_{HH}(HER2)-S01861(DAR1)+50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(DAR4)或10pM CD71mab-皂草毒蛋白(DAR4)的联合处理的细胞杀伤(MTS)测定。

[0082] 图3(Fig.3):在SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺/CD71⁺)(A)和MD-MB-468细胞(HER2⁻/CD71⁺)(B)上用根据本发明的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(DAR4)或CD71-皂草毒蛋白(DAR4)+900nM HER2V_{HH}-S01861(DAR1)的联合处理的细胞杀伤(MTS)测定。

[0083] 图4(Fig.4):在SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺/CD71⁺)(A)和MD-MB-468细胞(HER2⁻/CD71⁺)(B)上用根据本发明的V_{HH}(HER2)-S01861(DAR1)+50pM CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)的联合处理的细胞杀伤(MTS)测定。

[0084] 图5(Fig.5):在SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺/CD71⁺)(A)和MD-MB-468细胞(HER2⁻/CD71⁺)(B)上用根据本发明的CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)+900nM HER2V_{HH}-S01861(DAR1)的联合处理的细胞杀伤(MTS)测定。

[0085] 图6(Fig.6):在A431细胞(EGFR⁺⁺/HER^{+/+}/CD71⁺)(A)和A2058细胞(EGFR⁻/HER^{+/+}/CD71⁺)(B)上用根据本发明的CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)+西妥昔单抗-S01861(DAR4)或HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)+西妥昔单抗-S01861(DAR4)或EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)+西妥昔单抗-S01861(DAR4)的联合处理的细胞杀伤(MTS)测定。

[0086] 图7(Fig.7):在SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺/EGFR⁺/CD71⁺)(A)和MDA-MB-468细胞(HER2⁻/EGFR⁺⁺/CD71⁺)(B)上用根据本发明的CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)+77nM西妥昔单抗-S01861(DAR4)或HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)+77nM西妥昔单抗-S01861(DAR4)或EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)+77nM西妥昔单抗-S01861(DAR4)的联合处理的细胞杀伤(MTS)测定。

[0087] 图8.(FIG.8):肿瘤靶向蛋白毒素递送导致荷瘤小鼠体内肿瘤体积减小和肿瘤生长抑制。A)与对照相比,A431荷瘤小鼠中的西妥昔单抗(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)²的剂量递增(腹膜内,i.p.)显示在第26天肿瘤体积减小。B,C)与对照相比,A431荷瘤小鼠中西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)²的剂量递增(腹膜内,i.p.(B)或静脉内i.v.(C))显示肿瘤生长减少。在本发明共价缀合物的上下文中,术语“Cys-L-”应理解为与半胱氨酸侧链的共价键,其中该键在如存在于哺乳动物细胞如人细胞如人肿瘤细胞的内体和溶酶体中酸性条件下是不稳定的和可切割的。在本发明共价缀合物的上下文中,术语“Lys-S-”应理解为与赖氨酸侧链的共价键,其中该键在如存在于哺乳动物细胞如人细胞如人肿瘤细胞的内体和溶酶体中酸性条件下是稳定的和不可切割的。

[0088] 图9.(FIG.9):荷瘤小鼠中的肿瘤靶向反义BNA寡核苷酸递送和基因沉默。与对照相比,30mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-HSP27BNA)^{1,8}在A431荷瘤小鼠中显示了诱导的有效肿瘤靶向基因沉默。

[0089] 图10.(FIG.10):荷瘤小鼠中的肿瘤靶向反义BNA寡核苷酸递送和基因沉默。与对

照相比,30mg/kg西妥昔单抗-Cys-(S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}在A431荷瘤小鼠中显示了诱导的有效肿瘤靶向基因沉默。

[0090] 图11 (FIG. 11): 癌细胞(肿瘤细胞)中的HER2或EGFR靶向蛋白毒素递送和细胞杀伤。A,B) SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺)和MDA-MB-468细胞(HER2⁻)上的曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}(Lys-L-香石竹毒蛋白)^{1,7}或曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{1,7}处理和对照。备注:图11B的图例也与图11A中的图表有关。C,D) A431细胞(EGFR⁺⁺)和A2058细胞(EGFR⁻)上的曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)^{2,0}或曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{2,0}处理和对照。备注:图11D的图例也与图11C中的图表有关。备注:对于每种细胞系的靶受体表达数据(通过FACS分析确定),参见表A2。

[0091] 图12 (FIG. 12): 根据本发明,癌细胞中的EGFR靶向反义BNA寡聚物递送和基因沉默。A,B) A431细胞(EGFR⁺⁺)和A2058细胞(EGFR⁻)上的西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}(Lys-L-HSP27BNA)^{3,8}处理和对照。备注:图12B的图例也与图12A中的图表有关。备注:对于每种细胞系的靶受体表达数据(通过FACS分析确定),参见表A2。

[0092] 图13 (FIG. 13): 癌细胞中的HER2靶向反义BNA寡聚物递送和基因沉默。SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺)上的曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}(Lys-L-HSP27BNA)^{3,5}处理和对照。备注:对于每种细胞系的靶受体表达数据(通过FACS分析确定),参见表A2。

[0093] 图14 (FIG. 14): 癌细胞中的EGFR靶向反义BNA寡聚物递送和基因沉默。A,B) A431细胞(EGFR⁺⁺)和A2058细胞(EGFR⁻)上的西妥昔单抗-Cys-(S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}处理和对照。备注:对于每种细胞系的靶受体表达数据(通过FACS分析确定),参见表A2。

[0094] 图15. (FIG. 15): 1靶标2组分(EGFR高表达)。通过治疗性组合,A431(EGFR⁺⁺⁺)和CaSKI(EGFR⁺⁺)中的EGFR靶向细胞杀伤。A,B) 与10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白的固定浓度组合的西妥昔单抗-S01861滴定表明,与未缀合的S01861相比,需要降低100-400倍的缀合的S01861浓度,以诱导西妥昔单抗-皂草毒蛋白杀伤细胞。C,D), 与300nM未缀合的S01861+西妥昔单抗-皂草毒蛋白相比,与278nM西妥昔单抗-S01861组合的西妥昔单抗-皂草毒蛋白滴定杀伤细胞。与治疗性组合相比,1500nM未缀合的S01861+西妥昔单抗-皂草毒蛋白更有效,因为两种西妥昔单抗缀合物竞争相同的EGFR受体。只有两种西妥昔单抗缀合物的同时靶向递送才导致有效的细胞杀伤,这与单独使用任一缀合物的单一疗法不同。备注:图15B中显示的图例也与图15A中的图表有关。备注:图15D中显示的图例也与图15C中的图表有关。

[0095] 图16 (FIG. 16): 1靶标2组分(EGFR无/低表达)。通过治疗性组合,HeLa(EGFR⁺)和A2058(EGFR⁻)中的EGFR靶向细胞杀伤。A,B) 与10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白的固定浓度组合的西妥昔单抗-S01861滴定不诱导西妥昔单抗-皂草毒蛋白杀伤细胞。C,D), 与278nM西妥昔单抗-S01861组合的西妥昔单抗-皂草毒蛋白滴定不能诱导细胞杀伤。低EGFR受体表达禁止了足够的S01861通过抗体介导的递送进行递送,而1500nM的非缀合S01861诱导细胞杀伤。备注:图16B中显示的图例也与图16A中的图表有关。备注:图16D中显示的图例也与图16C中的图表有关。

[0096] 图17 (FIG. 17): 1靶标2组分(HER2高表达)。通过治疗性组合,SKBR3(HER2⁺⁺⁺)细胞中的HER2靶向细胞杀伤。A) 与673pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度组合的曲妥珠单抗-S01861滴定表明,与未缀合的S01861相比,需要降低1000倍的缀合的S01861浓度,以诱

导曲妥珠单抗-皂草毒蛋白杀伤细胞。C,D),与10nM未缀合的S01861+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白相比,与9,4nM曲妥珠单抗-S01861组合的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白滴定杀伤细胞。与治疗性组合相比,1075nM未缀合的S01861+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白更有效,因为两种曲妥珠单抗缀合物竞争相同的HER2受体。只有两种曲妥珠单抗缀合物的同时靶向递送才导致有效的细胞杀伤,这与单独使用任一缀合物的单一疗法不同。SPT001是S01861。

[0097] 图18 (FIG. 18): 1靶标2组分 (HER2无/低表达)。通过治疗性组合, JIMT1 (HER2⁺) 和 A431 (HER2^{+/}) 中的HER2靶向细胞杀伤。A,B) 与50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度组合的曲妥珠单抗-S01861滴定不诱导曲妥珠单抗-皂草毒蛋白杀伤细胞。C,D), 与10nM曲妥珠单抗-S01861组合的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白滴定不能诱导细胞杀伤。低HER2受体表达禁止了足够的S01861通过抗体介导的递送进行递送, 而1500nM的非缀合S01861诱导有效细胞杀伤。备注: 图18B中显示的图例也与图18A中的图表有关。备注: 图18D中显示的图例也与图18C中的图表有关。SPT001是S01861。

[0098] 图19 (FIG. 19): 2靶标2组分 (EGFR高表达和HER2低表达)。通过治疗性组合, A431 (EGFR⁺⁺⁺/HER2^{+/}) 和 Caski (EGFR⁺⁺/HER2^{+/}) 细胞中的EGFR/HER2靶向细胞杀伤。A,B) 与50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度组合的西妥昔单抗-S01861滴定表明, 与未缀合的S01861相比, 需要降低100倍的缀合的S01861浓度, 以诱导曲妥珠单抗-皂草毒蛋白杀伤细胞。C,D), 与300nM未缀合的S01861+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白相比, 与278nM曲妥珠单抗-S01861组合的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白滴定杀伤细胞。与治疗性组合278nM西妥昔单抗-S01861+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白相比, 1500nM未缀合的S01861+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白具有相当的细胞杀伤效率, 因为两种之和物不竞争相同的受体。只有两种缀合物的同时靶向递送才导致有效的细胞杀伤, 这与单独使用任一缀合物的单一疗法不同。备注: 图19B中显示的图例也与图19A中的图表有关。备注: 图19D中显示的图例也与图19C中的图表有关。SPT001是S01861。

[0099] 图20. (FIG. 20): 2靶标2组分 (EGFR低表达和HER2无/低表达)。通过治疗性组合, HeLa (EGFR⁺/HER2^{+/}) 和 A2058 (EGFR⁻/HER2^{+/}) 细胞中的EGFR/HER2靶向细胞杀伤。A,B) 与50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度组合的西妥昔单抗-S01861滴定不诱导曲妥珠单抗-皂草毒蛋白杀伤细胞。C,D), 与278nM西妥昔单抗-S01861组合的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白滴定不增强细胞杀伤, 而1500nM的非缀合S01861诱导有效的细胞杀伤。低EGFR受体表达禁止了足够的S01861通过抗体介导的递送进行递送。备注: 图20B中显示的图例也与图20A中的图表有关。备注: 图20D中显示的图例也与图20C中的图表有关。SPT001是S01861。

[0100] 图21. (FIG. 21): 2靶标2组分 (HER2高表达和EGFR低表达)。通过治疗性组合, SKBR3 (HER2⁺⁺⁺/EGFR^{+/}) 细胞中的HER2靶向细胞杀伤。A) 与1.5pM EGF香石竹毒蛋白的固定浓度组合的曲妥珠单抗-S01861滴定表明, 与未缀合的S01861相比, 需要降低400倍的缀合的S01861浓度, 以诱导EGF香石竹毒蛋白杀伤细胞。B), 与10nM未缀合的S01861+EGF香石竹毒蛋白相比, 与9,4nM曲妥珠单抗-S01861组合的EGF香石竹毒蛋白滴定可以杀伤细胞。与治疗性组合9,4nM曲妥珠单抗-S01861+EGF香石竹毒蛋白相比, 1075nM未缀合的S01861+EGF香石竹毒蛋白具有相当的细胞杀伤效率, 因为两种之和物不竞争相同的受体。只有两种缀合物的同时靶向递送才导致有效的细胞杀伤, 这与单独使用任一缀合物的单一疗法不同。SPT001是S01861。

[0101] 图22. (FIG. 22): 2靶标2组分 (HER2低表达和EGFR低或高表达)。通过根据本发明的治疗性组合, JIMT1 (HER2⁺) 和A431 (HER2^{+/+}) 中的HER2靶向细胞杀伤。A, B) 与5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白的固定浓度组合的曲妥珠单抗-S01861滴定不诱导西妥昔单抗-皂草毒蛋白杀伤细胞。C, D), 与10nM曲妥珠单抗-S01861组合的西妥昔单抗-皂草毒蛋白滴定不能诱导细胞杀伤。低HER2受体表达禁止了足够的S01861通过抗体介导的递送进行递送, 而1500nM的非缀合S01861诱导有效细胞杀伤。在曲妥珠单抗-S01861存在下, 即使高EGFR受体表达水平 (D) 用于递送西妥昔单抗-皂草毒蛋白也不会改变其效力, 这表明细胞杀伤活性的瓶颈是太低的HER2表达水平, 导致靶细胞内S01861不足以启动内体逃逸。备注: 图22B中显示的图例也与图22A中的图表有关。备注: 图22D中显示的图例也与图22C中的图表有关。SPT001是S01861。

[0102] 图23. (FIG. 23): 2靶标2组分相比于T-DM1。具有高EGFR表达和低HER2表达的细胞 (A431) 被治疗性组合有效杀伤, 但是T-DM1在如此低的毒素浓度下无效。T-DM1是曲妥珠单抗-厄塔毒素 (Kadcyla®), 每个抗体携带约3.5个DM1毒素分子。

[0103] 图24A-E. (FIG. 24A-E): 显示了当曲妥珠单抗 (图24A)、西妥昔单抗 (图24B) 或T-DM1 (图24C)、游离毒素皂草毒蛋白 (图24D) 和香石竹毒蛋白 (图24D)、与非细胞结合IgG偶联的皂草毒蛋白 (图24D) 以及与非细胞结合IgG偶联的皂草毒蛋白跟游离皂苷S01861组合 (图24E) 与所示细胞系SK-BR-3、JIMT-1、MDA-MB-468、A431、CaSki、HeLa、A2058、BT-474接触时的相对细胞活力。备注: 图24C中显示的图例也与图24A和24B中的曲线相关。

[0104] 图25. (FIG. 25): 1T2C体内活性。与对照相比, 50mg/kg西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)⁴+25mg/kg西妥昔单抗- (-L-HSP27BNA)⁴的1T2C组合在A431荷瘤小鼠中显示了强肿瘤靶向基因沉默。

[0105] 图26. (FIG. 26): 1T2C体内活性。在PDX肿瘤小鼠模型 (高HER2表达) 中, 40mg/kg曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴+0.02/0.03mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的1T2C组合显示出有效的肿瘤生长抑制。

[0106] 图27. (FIG. 27): 在A431荷瘤小鼠模型中测试的2T2组分系统显示肿瘤消退。

[0107] 图28. (FIG. 28): 在A431荷瘤小鼠模型中测试的2T2组分系统显示肿瘤消退和根除。

[0108] 图29 (FIG. 29): 2靶标2组分。通过根据本发明的治疗性组合, A431细胞 (EGFR⁺⁺/HER2^{+/+}) (A, C) 和CaSki细胞 (EGFR⁺⁺/HER2^{+/+}) (B, D) 中的EGFR/HER2靶向细胞杀伤。A, B) 西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,7}滴定+固定浓度50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白和对照, 用A431细胞。C, D) 曲妥珠单抗-皂草毒蛋白滴定+75nM西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,7}的固定浓度和对照, 用CaSki细胞。图例和/或轴对于A、B是相同的, 图例对于图C和D是相同的。

[0109] 图30. (FIG. 30): 2靶标2组分。通过根据本发明的治疗性组合, HeLa细胞 (EGFR^{+/+}/HER2^{+/+}) (A, C) 和A2058细胞 (EGFR⁻/HER2^{+/+}) (B, D) 中的EGFR/HER2靶向细胞杀伤。A, B) 西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,7}滴定+固定浓度50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白和对照, 用HeLa细胞。C, D) 曲妥珠单抗-皂草毒蛋白滴定+75nM西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,7}的固定浓度和对照, 用A2058细胞。图例和/或轴对于C和D是相同的。

[0110] 图31. (FIG. 31): 2靶标2组分。通过根据本发明的治疗性组合, 在SKBR3细胞 (HER2⁺⁺/EGFR^{+/+}) 中HER2/EGFR靶向细胞杀伤 (A, B)。曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴滴定+固定浓度

1.5pM EGF香石竹毒蛋白和对照,用SKBR3细胞。B) EGF香石竹毒蛋白滴定+2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴的固定浓度和对照,用SKBR3细胞。

[0111] 图32. (FIG. 32): 2靶标2组分。通过根据本发明的治疗性组合, JIMT-1细胞 (HER2^{+/+}/EGFR^{+/+}) (A,C) 和MDA-MB-468细胞 (HER2⁻/EGFR^{+/+}) (B,D) 中的HER2/EGFR靶向细胞杀伤。A,B) 曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴滴定+固定浓度1.5pM EGF香石竹毒蛋白和对照,用JIMT-1细胞。C,D) EGF香石竹毒蛋白滴定+2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴的固定浓度和对照,用MDA-MB-468细胞。图例和/或轴对于C和D是相同的。

[0112] 图33. (FIG. 33): 2靶标2组分。通过根据本发明的治疗性组合, 在SKBR3细胞 (HER2^{+/+}/EGFR^{+/+}) 中HER2/EGFR靶向细胞杀伤 (A,B)。A) 曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴滴定+固定浓度10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白和对照,用SKBR3细胞。B) 西妥昔单抗-皂草毒蛋白滴定+2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴的固定浓度和对照,用SKBR3细胞。

[0113] 图34. (FIG. 34): 2靶标2组分。通过根据本发明的治疗性组合, JIMT-1细胞 (HER2^{+/+}/EGFR^{+/+}) (A,C) 和MDA-MB-468细胞 (HER2⁻/EGFR^{+/+}) (B,D) 中的HER2/EGFR靶向细胞杀伤。A,B) 曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴滴定+固定浓度10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白和对照,用JIMT-1细胞。C,D) 西妥昔单抗-皂草毒蛋白滴定+2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴的固定浓度和对照,用MDA-MB-468细胞。图例和/或轴对于A和B是相同的,图例对于C和D是相同的。

具体实施方式

[0114] 为了使生物活性分子(例如效应分子)起作用,该分子必须能够与其靶标接合,例如在血清中、细胞表面外部或细胞或细胞器内部。几乎所有基于蛋白质的靶向毒素的活性部分,例如,必须进入靶细胞的胞质溶胶以介导其靶标调节作用。在许多情况下,毒素仍然无效,因为(1)靶向部分内化不良,仍与细胞的外部结合,(2)内化后被循环回细胞表面,或(3)运输到溶酶体内,在那里被降解。尽管这些基本问题几十年前就为人所知,并且在过去几十年中研究了500多种靶向毒素,但这些问题尚未得到解决,并且只有少数靶向抗体的蛋白毒素被允许进入市场,尽管带有严重毒性的警告标签。莫塞妥单抗-帕舒托(moxetumomab pasudotox)-tdfk (LUMOXITI[®],阿斯利康制药公司(AstraZeneca Pharmaceuticals LP))迄今已被FDA批准用于复发或难治性毛细胞白血病。其他此类批准的ADC是Elzonris、Ontak。

[0115] 为了克服这些问题,已经描述了许多策略,包括将毒素重定向到内质网生物合成途径的内源性细胞膜转运复合物的方法,以及破坏或削弱内体(即细胞中内吞途径的隔室)膜完整性的技术,从而促进内体逃逸。这包括使用亲溶酶体胺、羧基离子载体,钙通道拮抗剂,病毒、细菌、植物、动物、人和合成来源的各种细胞穿透肽,其他有机分子和光诱导技术。尽管靶向毒素的功效通常在细胞培养中增加了一百倍或一千倍,在特殊情况下增加了超过一百万倍,但将内体逃逸增强剂与其他物质共同施用的需要带来了新的问题,包括额外的副作用、靶特异性的丧失、难以确定治疗窗和细胞类型依赖性变异。

[0116] 所有策略,包括物理化学技术,都需要或多或少直接与膜相互作用的增强子分子,并且基本上包括小化学分子、次级代谢物、肽和蛋白质。所有这些物质的共同特征是它们本身不是靶细胞特异性的,并且以不同于靶向的毒素的其他动力学分布。这是当前方法的一

个主要缺点。

[0117] 本发明的第一个目的是提供具有增加的治疗窗的改善的ADC和AOC,并且提供用于递送有效量或剂量的效应分子的改善的ADC和AOC,例如当考虑从靶细胞的外部递送到所述细胞内时,或者更具体地当考虑在所述靶细胞的胞质溶胶中递送效应分子时。本发明的第二个目的是提供一种治疗患有疾病的(人)患者的改善方法,所述疾病要用包含效应分子和例如针对靶肿瘤细胞的配体的缀合物来治疗,即以改善ADC或AOC(其包含要在例如靶肿瘤细胞的胞质溶胶中递送的效应分子)的治疗窗。

[0118] 本发明的一个目的是提供一种缀合物,其是效应分子活性增强分子与ADC或AOC的组合,用于疗法中,如抗癌疗法。通过提供本发明的此类缀合物,作为缀合物例如ADC或AOC的一部分的效应分子的治疗窗被有效地加宽。

[0119] 上述目标中的至少一个是通过提供改善的ADC和改善的AOC来实现的,它们是进一步包含效应分子活性增强分子的缀合物。

[0120] 本发明将相对于具体实施例来说明,但本发明并不受限于此而只受权利要求限制。虽然本发明已根据几个实施例进行了描述,但可以预期的是,在阅读说明书和研究附图后,其替换、修改、置换和等同物对于本领域普通技术人员来说将变得显而易见。本发明不得以任何方式限制于所示实施例。在不脱离所附权利要求限定的范围的情况下可以进行改变。

[0121] 本发明人确定,当将缀合物如抗体药物缀合物或抗体-寡核苷酸缀合物施用于接受该缀合物的荷瘤哺乳动物(小鼠)时,当所述缀合物包含至少一个共价结合的皂苷时,该缀合物的治疗窗增加(参见例如实例部分的图8-14,与效应分子和抗体共价结合的皂苷的作用的一系列体外肿瘤细胞和体内肿瘤模型实例)。皂苷与抗体和效应分子(如蛋白毒素)和寡核苷酸(如BNA)缀合。发明人首先建立并确定了本发明的皂苷与用于结合细胞表面分子的配体如抗体如全长完整IgG,或如sdAb如V_H的缀合提供了一种缀合物,用于在其细胞表面暴露细胞表面分子的靶细胞的细胞表面特异性递送皂苷,随后将皂苷递送到细胞内,如细胞内体、内溶酶体、溶酶体,并最终递送到细胞胞质溶胶中。此类细胞靶向皂苷缀合物的实例例如在图2-5(对于皂苷-V_H缀合物)和图5-7、15-23和25-34中提供,如下面的实例部分中所述。皂苷与配体例如EGF、靶向V_H的Her2或IgG、靶向IgG的EGFR结合。

[0122] 本发明的缀合物(其包含sdAb或全长抗体或不同的免疫球蛋白(Ig)形式,作为本发明缀合物中的细胞表面分子结合分子)具有至少一个糖苷,例如与其结合的本发明的皂苷,优选地,并且在所有的示例性实例中,共价地,更优选地通过(可切割的)接头与其结合。皂苷增强了与细胞表面分子靶向分子(抗体,sdAb)结合的效应子部分的治疗功效,不希望受任何理论的束缚,这可能是通过增强效应子部分的内体逃逸到需要效应子部分活性的胞质溶胶中。这样,已经在比ADC或AOC的常规剂量更低的效应分子剂量下,即本发明的缀合物的更低剂量下,在包含一个或多个皂苷的缀合物存在的影响下建立治疗效果,从而将一个或多个皂苷带到靶向的细胞附近、靶向的细胞处和/或靶向的细胞内。靶向的细胞例如是患病细胞,如肿瘤细胞或自身免疫细胞或B细胞疾病相关的B细胞等。根据本发明,效应子部分例如是作为ADC一部分的毒素或作为AOC一部分的寡核苷酸,如反义BNA。

[0123] 本发明的第一方面涉及一种用于将效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内的缀合物,该缀合物包含至少一个待转移到细胞中的效应分子、至少一个单结构域抗体

(sdAb) 和至少一个皂苷, 它们直接或通过至少一个接头彼此共价结合, 其中该至少一个皂苷是单糖链三萜糖苷或者是双糖链三萜糖苷, 并且其中该sdAb能够结合所述细胞的细胞表面分子。

[0124] 发明人在此披露了将皂苷如皂树QS-21、SA1641、S01861的水溶性级分中的皂苷共价偶联至细胞表面分子靶向性分子, 如抗体、sdAb, 如通过三官能接头, 如结构A的三官能接头(如下所示), 或通过包含共价结合的皂苷的支架的寡聚或多聚结构, 导致在缀合物中共价偶联的皂苷的影响下, 由本发明缀合物包含的效应子部分如毒素产生的细胞毒性改善。

[0125] 因此, 本发明的一个方面涉及一种缀合物, 其包含内体逃逸增强分子即皂苷、效应子部分和结合分子如sdAb, 因此涉及一种缀合物, 其中糖苷分子和效应分子例如与内体逃逸增强缀合物中的同一个结合分子结合, 并且其中内体逃逸增强缀合物能够特异性结合靶细胞特异性表面分子或结构, 从而诱导缀合物和靶细胞特异性表面分子的复合物的受体介导的内吞作用(缀合物与受体结合后, 缀合物/受体复合物内化)。优选地, 内体逃逸增强缀合物中的皂苷和效应子部分的组合能够通过所述皂苷增强所述效应子部分的内体逃逸。通过这样做, 与包含结合分子和效应子部分但不含皂苷的ADC相比, 缀合物优选改善效应分子的作用。

[0126] 为了更详细地解释本发明, 首先描述细胞摄取物质的过程和本发明中使用的术语。通过囊泡出芽将细胞外物质摄取到细胞内称为内吞作用。所述囊泡出芽的特征在于(1) 细胞溶质蛋白网格蛋白介导的受体依赖性配体摄取, (2) 胆固醇结合蛋白小窝蛋白介导的脂筏摄取, (3) 非特异性流体摄取(胞饮作用), 或(4) 非特异性颗粒摄取(吞噬作用)。所有类型的内吞作用都会遇到以下称为内吞途径的囊泡运输和物质分选的细胞过程。内吞途径很复杂, 尚未完全了解。早些时候, 人们认为细胞器是从头形成并沿着内吞途径成熟为下一个细胞器。如今, 据推测, 内吞途径包括由囊泡交通连接的稳定的隔室。隔室是一种复杂的多功能膜细胞器, 专门负责细胞的一组特定基本功能。囊泡被认为是短暂的细胞器, 组成更简单, 并且被定义为通过从预先存在的隔室出芽从头形成的膜封闭容器。与隔室不同, 囊泡可以经历成熟, 这是生理上不可逆的一系列生化变化。早期内体和晚期内体代表内吞途径中的稳定隔室, 而初级内吞囊泡、吞噬体、多囊泡体(也称为内体载体囊泡)、分泌颗粒, 甚至溶酶体代表囊泡。内吞囊泡出现在质膜上, 最突出的是来自网格蛋白包被的凹坑, 首先与早期内体融合, 早期内体是大约pH 6.5的主要分选隔室。大部分内化的货物和膜通过回收囊泡(回收途径)回收回质膜。应降解的组分通过多囊泡体被运输到酸性晚期内体(pH低于6)。溶酶体是囊泡, 可以储存成熟的溶酶体酶, 并在需要时将它们递送到晚期内体隔室。由此产生的细胞器称为混合细胞器或内溶酶体。溶酶体在称为溶酶体重构的过程中从混合细胞器中出芽。晚期内体、溶酶体和混合细胞器是极动态的细胞器, 通常很难区分它们。内吞分子的降解发生在内溶酶体内。核内体逃逸是物质从任何类型的隔室或囊泡的内腔中主动或被动地从内吞途径, 优选从网格蛋白介导的内吞或再循环途径释放到胞质溶胶中。因此, 内体逃逸包括但不限于从内体、内溶酶体或溶酶体释放, 包括它们的中间和混合细胞器。进入胞质溶胶后, 所述物质可能会移动到其他细胞单位, 例如细胞核。本发明上下文中的糖苷分子(皂苷)是能够增强效应分子作用的化合物, 特别是通过促进内体逃逸。糖苷分子与内吞和再循环途径的隔室和囊泡的膜相互作用, 并使它们对所述效应分子发生渗漏, 从而导致内体逃逸增加。

[0127] 术语“改善效应分子的作用”是指皂苷增加效应分子的功能功效(例如毒素或药物的治疗指数;生物技术过程中调节剂的代谢功效;基因在细胞培养研究实验中的转染功效),优选是通过实现或改善其靶标接合。优选不包括抗原特异性免疫反应的加速、延长或增强。治疗功效包括但不限于更强的治疗效果且更低的剂量和/或更少的副作用。“改善效应分子的作用”还可以指由于缺乏作用而不能使用的效应分子(例如,不被称为效应分子)在与本发明组合使用时变得有效。如本发明所提供的,任何其他有益的或期望的且可归因于效应子部分和皂苷在一个缀合物中的组合的作用,都被认为是“改善的作用”。在本发明的上下文中,本发明的皂苷是本发明缀合物中效应分子的功能功效的“增强剂”。

[0128] 到本发明为止,通过糖苷(例如皂苷)增强靶向毒素的一个主要缺点是靶向毒素通过受体介导的内吞作用被内化(缀合物与受体结合后,缀合物/受体复合物被内化),而糖苷被动扩散通过质膜并可能通过与胆固醇的相互作用到达内体膜。原则上,糖苷可以进入任何细胞,也可以进入非靶细胞(脱靶细胞),导致靶细胞中用于有效释放靶向毒素的增强剂利用率低,并可能在非靶细胞中产生副作用。一个主要问题是靶向毒素和糖苷的进入以不同的动力学进行,并且这些动力学在细胞(系)与细胞(系)之间以及组织与组织之间不同,从而两种物质(ADC,游离皂苷)的正确施用时间差可以在肿瘤(细胞(系))与肿瘤(细胞(系))之间变化很大。而且,在生物体内,这些物质的释放、吸收、分布、代谢和排泄也是不同的。此外,非靶向细胞对糖苷的特异性摄取可能会在这些细胞中引起不良影响。这可以是,例如,本应被递送至溶酶体的化合物的胞质递送、被扰乱的抗原呈递等。糖苷和靶向药物的非靶向施用在药物开发中也可能成为问题,并可能会阻碍或至少推迟相关机构(例如FDA或EMA)的上市许可。在本发明的上下文中,靶向毒素或靶向药物是指毒素或药物特异性靶向靶细胞上的膜结合分子,例如结合至膜受体配体或结合至特异性识别靶细胞细胞膜上结构的抗体的毒素或药物。

[0129] 因此,通过与效应分子相同的途径(例如,通过靶向配体)将糖苷定向至靶细胞是非常有用的,以使增强剂在靶细胞的内吞途径的酸性区室中以有效浓度可用,并显示出与毒素的协同作用。因此,本发明提供了通过靶向配体(结合分子)将效应分子和内体逃逸增强剂(即本发明的皂苷)重定向至靶细胞内吞途径的酸性隔室的新方法。

[0130] 当考虑效应分子在细胞内的作用时,本发明人确定,作为包含sdAb的缀合物的一部分的效应分子在也包含在缀合物中的皂苷的影响下被高效递送到细胞内。出人意料的是,尽管sdAb,例如 V_{HH} 的尺寸相对较小,但当包含sdAb如 V_{HH} 的缀合物包含效应分子和皂苷时,包含这种sdAb的缀合物与细胞表面受体的结合仍然发生。皂苷和效应分子一起结合到sdAb,例如 V_{HH} ,不会导致例如当考虑 V_{HH} 与细胞表面分子结合的能力时的空间位阻。也就是说,在不存在共价偶联至所述ADC的皂苷的情况下,将例如肿瘤细胞与亚最佳剂量的例如ADC接触不会导致细胞内效应分子活性(效应分子的生物活性不会有效杀伤靶细胞)。然而,当靶肿瘤细胞与本发明的包含效应分子和皂苷并进一步包含结合靶细胞的sdAb的缀合物接触时,实现了有效的肿瘤细胞杀伤。

[0131] 通过用本发明的缀合物靶向单个细胞表面分子,与例如将细胞仅与缺乏本发明的皂苷的常规ADC接触,因此不存在细胞靶向的皂苷(本发明的缀合物)相比,本发明的缀合物中皂苷和结合到细胞表面分子靶向性抗体(例如sdAb)的效应子部分在靶向细胞(其将细胞表面分子暴露在细胞表面上)的胞质溶胶处和胞质溶胶内的递送得到改善且更具特异性。

选择用于被缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb靶向的异常细胞理想地在细胞表面分子上带有表位,细胞表面分子靶向性分子可以与该表位高程度地结合(即,靶向的细胞表面分子在靶向的细胞(例如肿瘤细胞或自身免疫细胞)上的表达相对高于在非靶向的细胞(例如健康细胞)上的表达)和/或暴露靶向的细胞表面分子中的表位,用于结合缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb,特别是当考虑患者中的(相邻)健康细胞时。优选地,与健康细胞相比,本发明缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb所靶向的细胞表面分子在靶向(患病、肿瘤)的细胞上相对高和/或特异地表达。实施例是本发明的缀合物,其中缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb的靶细胞表面分子,例如肿瘤细胞受体,当与健康(邻近)细胞表面上的细胞表面分子的表达相比时,特异性地或以相对较高的程度表达。因此,靶向的细胞表面分子上的表位理想地对靶向的患病细胞是独特的,并且至少特异性地存在并暴露于靶向的细胞的表面。本发明的缀合物与靶向的细胞上细胞表面分子上的表位结合后是缀合物与靶细胞表面分子的复合物的内吞作用(缀合物与受体结合后是缀合物/受体复合物的内化)。由于与不应被靶向的健康细胞相比,缀合物只能通过与在靶细胞上以足够的程度特异性表达或独特表达的细胞表面分子的结合相互作用进入靶细胞,因此缀合物中包含的治疗活性量的效应子部分和皂苷在靶细胞内的积累只有在靶细胞表面分子的表达水平高于某个最小表达阈值时才可能发生。同时,结合到缀合物的细胞表面分子性sdAb上的效应子部分仅能够在具有共价结合的皂苷的同一个缀合物存在下发挥其细胞内(例如细胞毒性或基因沉默)活性,当与细胞暴露于没有共价结合的一个或多个皂苷情况下的ADC相比时,这一事实也提供了防止效应子部分对例如健康细胞和健康组织(其不是效应子部分的靶向和影响对象)的负面和不希望的副作用的保护。也就是说,缀合物可以结合的暴露的细胞表面分子的足够低表达或甚至不存在理想情况下不允许缀合物进入(非靶向)健康细胞的量导致效应子部分在缀合物所含皂苷的影响下发生内体逃逸。因为与没有偶联的皂苷的ADC或AOC应用于治疗方案相比,根据本发明的具有偶联的皂苷的ADC或具有共价偶联的皂苷的AOC可以以更低的剂量使用,当例如考虑靶向和杀伤靶患病细胞如肿瘤细胞和自身免疫细胞时,在健康细胞中以低程度进入具有偶联的皂苷的ADC或具有偶联的皂苷的AOC已经具有发生不希望副作用的较低风险。

[0132] 因此,与包含抗体如IgG或其结合片段或结合结构域相比,将sdAb包含在缀合物中具有多种优势。重要的是,由于sdAb不包含IgG中存在的Fc尾,因此不存在由于缀合物与细胞(例如施用缀合物的宿主的内皮细胞)上的Fc受体结合而导致的脱靶副作用的风险。因此,与基于IgG的ADC和AOC相比,或者与包含Fc尾的ADC或AOC相比,本发明的缀合物的风险谱得到改善。此外,由于本发明的缀合物不能与Fc受体结合,因此缀合物在低于用基于全长抗体的ADC和AOC达到相同效应分子活性所需剂量的剂量下就已经有效,这是因为不同于靶向靶细胞表面分子的细胞表面受体对缀合物的捕获更少或没有不期望的捕获。此外,由于与例如Fab、scFv、IgG相比,sdAbs的尺寸相对较小,因此提高了组织穿透性,一旦将缀合物施用需要治疗的患者,这有利于到达靶细胞。当与在类似的ADC或AOC中应用更大的抗体或其片段(例如包含Fc尾的IgG)相比时,在本发明的缀合物中应用sdAb的所有这些优点导致当被本发明的缀合物包含时,效应分子的治疗窗得到改善。例如,当效应分子例如是毒素时,基于sdAb的ADC可以在靶向肿瘤细胞的情况下以与基于IgG并包含相同效应分子的ADC相同的剂量(其无效或只是次优有效)实现改善的靶细胞杀伤。由于本发明的方面,现在可

以用较低剂量的效应分子作为包含sdAb的缀合物(即本发明的缀合物)的一部分来治疗患者,从而与使用包含相同效应分子的基于抗体的ADC或AOC时所需的更高剂量相比,在靶细胞中达到相同或改善的效应分子介导的作用。以较低剂量施用本发明的此类缀合物降低了患者例如通过非靶向的健康细胞的非特异性进入发生副作用的风险。例如,当由缀合物包含的sdAb靶向的细胞表面分子在靶(肿瘤)细胞上以更高程度表达,但不是在此类靶细胞上独特表达时,这例如是重要的。较低剂量的缀合物降低了缀合物与此类低表达者如非肿瘤健康细胞结合的风险。

[0133] 发明人还发现,由于在本发明的缀合物中掺入了共价结合的皂苷,本发明的缀合物的治疗窗被加宽了。也就是说,当提供有皂苷的ADC或AOC(即本发明的缀合物)与靶细胞接触时,在sdAb与其在靶细胞表面的结合配偶体结合后,本发明缀合物所包含的皂苷也与缀合物的效应分子紧密接近,即在靶细胞的表面。当带有细胞表面分子(即缀合物包含的sdAb的靶)的靶细胞与本发明的缀合物接触时,效应分子的有效剂量和皂苷的有效剂量都低于靶细胞在不存在皂苷或存在游离(非靶向的)皂苷的情况下与ADC或AOC接触时的剂量。作为本发明缀合物的一部分的靶向皂苷的存在增强了靶细胞中效应分子的活性,使得缀合物的治疗窗以及效应分子的治疗窗随之加宽。当靶细胞与本发明的缀合物接触时,以较低剂量实现足够的效应分子效率。在以下情况下发明人发现了类似的效果:当ADC或AOC与靶细胞在皂苷或其功能衍生物的存在下接触时并且当考虑到皂苷的效应分子增强活性(然而与施用本发明的缀合物时建立的有效剂量相比,游离皂苷(衍生物)的浓度高100-1000倍)时,缀合物现在包含效应分子和效应分子活性增强皂苷,以及用于缀合物与靶(肿瘤)细胞靶向结合的sdAb。因此,当本发明的缀合物与在其表面表达细胞表面分子(即sdAb的结合靶标)的靶细胞接触时,向皂苷或其衍生物提供结合分子(即本发明的缀合物所包含的sdAb)并向同一缀合物提供效应分子(即本发明的缀合物所包含的效应分子)会导致效应分子活性增强性作用的改善。在靶细胞内递送效应分子以及从所述细胞的内体或溶酶体递送到胞质溶胶方面,靶向皂苷在比游离皂苷更低的剂量下就已经是有效的,其中效应分子应结合其靶结合配偶体并应发挥其生物活性(例如在靶细胞是肿瘤细胞且效应分子是例如毒素的情况下的细胞杀伤),然而,发明人发现在单个分子中组合皂苷、靶向部分(sdAb)和效应分子(例如毒素、AON)甚至更有效。

[0134] 因此,本发明人提供了一种药物组合物,其包含含有皂苷(衍生物)、效应分子和用于将缀合物靶向递送至靶细胞的sdAb的缀合物,当与基于全长抗体或包含其构建体的Fc的当前ADC(其不具有共价连接的皂苷)相比时,该药物组合物具有改善的治疗窗,诱导副作用的风险降低(当将包含在缀合物中的有效剂量的效应分子施用给需要基于效应分子的治疗的患者时),以及改善的效应分子活性(这是因为在作为本发明缀合物一部分的靶向皂苷的影响下,缀合物在靶细胞内的递送得到改善,更具体地说,在这种靶细胞的胞质溶胶内)。本发明的这些缀合物与一定剂量的游离皂苷(衍生物)一起施用于需要基于效应分子的治疗的患者,这是本发明的一部分,尽管优选单独应用缀合物。

[0135] 实施例是本发明的缀合物,其包含至少一个sdAb,其是以下中的任何一种或多种:衍生自抗体重链的 V_H 结构域,该抗体优选免疫球蛋白G来源,优选人来源;衍生自抗体轻链的 V_L 结构域,该抗体优选免疫球蛋白G来源,优选人来源; V_{HH} 结构域,其例如衍生自仅重链抗体(HCAb),该仅重链抗体例如来自骆驼科来源或Ig-NAR来源,例如可变重链链新抗原受体

(V_{NAR}) 结构域, 优选该HCAb来自骆驼科来源; 并且优选地, 该至少一个sdAb是衍生自来自骆驼科来源的HCAb (骆驼V_H) 的V_{HH}结构域, 例如衍生自来自骆驼、美洲驼、羊驼、单峰驼、骆马、原驼和双峰驼的HCAb。

[0136] 特别地, V_{HH}结构域适用于本发明的缀合物。这样的V_{HH}结构域通常因以下而闻名: 其高稳定性 (即抗展开性), 其与结合配偶体结合的能力 (不需要存在第二个V结构域, 例如存在于例如IgG中, 并且是IgG通过两个V结构域与其结合配偶体结合所必需的), 其通过本领域已知的技术 (骆驼免疫、噬菌体展示技术等) 易于生产, 其穿透组织的能力比全长IgG更高 (当靶 (肿瘤) 细胞位于这种 (器官) 组织内部或作为这种组织的一部分时, 这是有益的)。

[0137] 实施例是本发明的缀合物, 其包含至少两个sdAb, 其中单个第一sdAb共价结合至该至少一个效应分子之一和/或该至少一个皂苷之一, 或其中两个或更多个sdAb中的至少一个sdAb与该至少一个效应分子结合和/或两个或更多个sdAb中的至少一个sdAb与至少一个皂苷结合, 或其中该至少两个sdAb中的全部各自分别与该至少一个效应分子中的效应分子或该至少一个皂苷中的皂苷或两者结合。

[0138] 实施例是本发明的缀合物, 其中至少一个sdAb包含至少两个sdAb, 它们是相同的sdAb, 优选地包含二至八个sdAb, 更优选地二至四个sdAb。

[0139] 实施例是本发明的缀合物, 其包含能够结合细胞表面分子上的相同结合位点的一至八个sdAb, 其中该至少一个效应分子和/或该至少一个皂苷与该一至八个sdAb中的单个第一sdAb结合, 或者其中该至少一个效应分子和/或该至少一个皂苷与这些sdAb中的两个或更多个 (如果存在的话) 结合, 其中该至少一个效应分子和该至少一个皂苷与相同的sdAb结合或与不同的sdAb结合, 其中优选该至少一个效应分子中的每一个与单独的sdAb结合和/或该至少一个皂苷中的每一个与单独的sdAb结合, 其中效应分子和皂苷与相同的sdAb结合或与单独的sdAb结合。

[0140] 提供包含相互共价连接的多个sdAb的 (线性) 串的本发明的缀合物, 可以提供缀合物以更高亲和力结合靶细胞的能力的益处, 这可以导致靶细胞对缀合物的摄取 (胞吞作用) 得到改善 (缀合物与受体结合之后是缀合物/受体复合物的内化)。

[0141] 当考虑皂苷对效应分子的内体逃逸增强作用的应用时, 同步化是小鼠成功递送策略与其在人类中的应用之间缺失的环节。事实上, 发明人建立了一系列体内小鼠肿瘤模型, 即, 与没有在游离皂苷存在下用ADC治疗的对照动物相比, 分别给小鼠施用一定剂量的游离皂苷和一定剂量的例如不含偶联皂苷的ADC没有产生任何期望的抗肿瘤活性, 例如肿瘤生长延迟、肿瘤消退、肿瘤生长减少和减慢。另见下面的实例4-18。使用各种施用途径施用游离皂苷并使用与施用ADC的时刻相比施用游离皂苷的不同时间点 (在施用ADC之前、期间和之后施用游离皂苷)。在体内肿瘤模型中测试的ADC是西妥昔单抗-香石竹毒蛋白 (含游离S01861) 或曲妥珠单抗-皂草毒蛋白 (含游离S01861)。改变游离皂苷的剂量并不能提供有效的抗肿瘤活性。所提及的ADC的施用剂量本身不会对荷瘤动物造成任何有益的抗肿瘤作用。出人意料的是, 发明人现在确定, 在使用人肿瘤细胞的各种基于哺乳动物细胞的体外生物测定中和/或在各种体内动物肿瘤模型中, 可以通过用根据本发明的缀合物处理细胞或动物来实现有益的抗肿瘤活性。缀合物任选地包含根据本发明的支架 (见下文; 共价皂苷缀合物, 其包含具有一个或多个与其共价结合的皂苷部分的寡聚或聚合结构)。支架例如是三官能接头, 其通过可切割或不可切割的连接与共价结合的皂苷 (例如S01861、QS-21) 连接, 和/

或通过不可切割的键或可切割的键与共价结合的效应子部分(例如香石竹毒蛋白、基因沉默反义BNA(HSP27))连接,支架通过共价键连接到缀合物的细胞表面分子靶向性分子,例如单克隆抗体如西妥昔单抗、曲妥珠单抗、OKT-9,或者支架是树状突,例如树状突,例如G4-树状突,例如四个部分可以结合到其上,例如四个皂苷分子,或者用于结合例如两个皂苷和两个效应分子的树状突,树状突包含用于(共价)偶联到缀合物的细胞表面分子靶向性抗体如sdAb的化学基团。参考进一步的实施例和实例部分,举例说明根据本发明的这些支架中的几个,当考虑由例如朊病毒产生的细胞毒性或当考虑肿瘤细胞中的基因沉默时,其显示体内和/或体外抗肿瘤细胞活性。

[0142] 不希望受任何理论的束缚,鉴于考虑用ADC和游离皂苷一起治疗荷瘤动物时观察到的失败,优选在靶细胞(例如肿瘤细胞或自身免疫细胞)的内吞途径的隔室或小泡中同步存在至少一个皂苷和效应子部分(优选毒素或寡核苷酸)两者。根据本发明人的尝试,对于ADC和游离皂苷,为了在体内获得协同效应,使晚期内体中分子的存在同步化是不有利的。一方面,本发明优选解决至少以下关于将效应子部分和一个或多个皂苷组合在单个缀合物分子中的问题:不希望受任何理论的束缚,内体逃逸活性需要在例如皂苷中唯一合理的化学基团,其可用于(共价),特别是单一的和可切割的、可保留的偶联。已知的限制很可能是为什么除了将皂苷应用于疫苗接种方案(其中暗示了免疫增强佐剂物质的使用)中以外,在临床研究中没有将皂苷与药物活性物质联合使用的原因,尽管例如本发明和本文举例说明的皂苷的显著的内体逃逸增强剂作用已为人所知超过10年。例如,提供具有共价结合的皂苷的本发明的缀合物,例如在携带若干皂苷的支架的情况下,至少部分地解决了这些困难。出人意料的是,以前在涉及皂苷作为佐剂组分的疫苗接种环境中应用其免疫增强活性的皂苷现在也适用于(共价)偶联至细胞表面分子靶向性抗体,例如由本发明的缀合物包含的sdAb,用于体外和体内的抗肿瘤活性。

[0143] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个sdAb是单个sdAb或至少两个,优选两个sdAb,其中一个或多个sdAb能够结合细胞的细胞表面分子例如HIVgp41或其中一个或多个sdAb能够结合细胞的细胞表面受体,例如细胞的肿瘤细胞表面受体,优选肿瘤细胞特异性受体,更优选结合选自以下任何一种或多种的受体:CD71、CA125、EpCAM(17-1A)、CD52、CEA、CD44v6、FAP、EGF-IR、整合素、黏结蛋白聚糖-1、血管整合素 α -V β -3、HER2、EGFR、CD20、CD22、叶酸受体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L受体、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、CanAg、整合素- α V、CA6、CD33、间皮素、Cripto、CD3、CD30、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、肝配蛋白A4、MUC-1、Trop2、CEACAM5、CEACAM6、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD38、FGFR3、CD7、PD-L1、CTLA-4、CD52、PDGFRA、VEGFR1、VEGFR2、c-Met(HGFR)、EGFR1、RANKL、ADAMTS5、CD16、CXCR7(ACKR3)、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR),最优选选自:HER2、c-Met、VEGFR2、CXCR7、CD71和EGFR1。

[0144] 本发明的一部分是本发明的缀合物包含的sdAb对在靶细胞上特异性表达的细胞表面分子具有结合特异性。“特异性表达”在此应理解为细胞表面分子仅在靶细胞上的独特表达,其中例如不应该结合缀合物的健康细胞由于没有靶向分子的细胞表面暴露而没有被靶向,或在此应理解为与例如健康细胞上的细胞表面分子的较低表达相比,靶细胞上靶细胞表面分子的上调或相对高的表达,所述健康细胞不应或至少在低得多的程度上结合缀合物。这些列出的细胞受体是这样的细胞表面分子,其对作为缀合物的靶标的细胞具有足够

的特异性,因此是被缀合物结合的优选候选物。应当理解,当靶细胞上细胞表面分子的表达与本发明的缀合物不打算靶向的其他细胞上的表达相比较时,某种细胞表面分子的特异性越高,当考虑细胞内效应分子的活性时,治疗窗更好。例如,缀合物靶向的合适靶标包括其他肿瘤细胞特异性受体、HER2、EGFR,例如EGFR1和CD71。

[0145] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个sdAb是单个sdAb或至少两个,优选两个,其中一个或多个sdAb选自:抗CD71 sdAb、抗HER2 sdAb、抗CD20 sdAb、抗CA125 sdAb、抗EpCAM (17-1A) sdAb、抗EGFR sdAb、抗CD30 sdAb、抗CD33 sdAb、抗血管整合素 α -v β -3sdAb、抗CD52 sdAb、抗CD22 sdAb、抗CEAsdAb、抗CD44v6sdAb、抗FAP sdAb、抗CD19 sdAb、抗CanAg sdAb、抗CD56 sdAb、抗CD38 sdAb、抗CA6 sdAb、抗IGF-1R sdAb、抗整合素sdAb、抗黏结蛋白聚糖-1sdAb、抗CD79b、抗c-Met sdAb、抗EGFR1 sdAb、抗VEGFR2 sdAb、抗CXCR7 sdAb、抗HIVgp41,其中该一个或多个sdAb优选是一个或多个 V_{HH} ,更优选是一个或多个骆驼 V_H 。

[0146] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个sdAb包含能够结合HER2、CD71、HIVgp41和/或EGFR的sdAb,其中所述sdAb优选是 V_{HH} ,更优选是骆驼 V_H 。

[0147] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个sdAb包含选自以下的用于结合HER2的sdAb:由克隆11A4、克隆18C3、克隆22G12、克隆Q17或克隆Q17-C-标签产生的sdAb;或包含用于结合EGFR并由克隆抗EGFR Q86-C-标签产生的sdAb;或包含用于结合CD71并由克隆抗CD71 Q52-C-标签产生的sdAb;或包含用于结合HIVgp41并由克隆抗HIVgp41 Q8-C-标签产生的sdAb;或包含由SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29和31中任一项的cDNA编码的sdAb;或包含具有SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、36-72的氨基酸序列的sdAb中的任一个,其中任选地,该缀合物进一步包含不同于该至少一个sdAb的另外sdAb、用于结合白蛋白的另外sdAb,例如具有SEQ ID NO:33、34和35的氨基酸序列的另外sdAb中的任何一个或多个,优选地该另外sdAb是 V_{HH} ,更优选是骆驼 V_H 。

[0148] 适用于掺入本发明缀合物的 V_{HH} 例如在以下中找到:单结构域抗体数据库(Wilton, E.E.等人(2018))、专利申请US20160251440(抗CD123、抗CEACAM)、US9683045(抗c-Met)、US20090252681(抗EGFR、抗IGF-1R)、US9969805(抗HER2)、US20190023796A1(抗HER3)和Kijanka等人(2013)(对于抗HER2)和Mercier等人(2019)(对于抗HER2)。下文还鉴于它们与肿瘤细胞特异性受体结合的能力提供了抗HER2、抗HER3、抗CD123、抗CEACAM、抗c-Met、抗-EGFR、抗-IGF-1R、抗-PD-L1、抗-CTLA-4、抗-CD19、抗-HER1和抗-VEGFR2的一系列合适的 V_{HH} 的氨基酸序列和/或cDNA序列,如SEQ ID NO 1-32和36-72。特别地,能够结合到任何肿瘤细胞特异性受体HER2、VEGFR和CD71上的结合位点的 V_{HH} 适合并入本发明的缀合物中。发明人揭示了包含靶向任何一种此类受体的 V_{HH} 的ADC可有效递送与sdAb结合的效应分子。例如,参见实例部分和图4-7。

[0149] 实施例是本发明的缀合物,其中效应分子包含以下或由以下组成:小分子如药物分子、毒素如蛋白毒素、寡核苷酸如BNA、异种核酸或siRNA、酶、肽、蛋白质中的至少一个或其任何组合。

[0150] 实施例是根据本发明的缀合物,其中效应分子是药物活性物质,例如毒素如肽毒素、药物、多肽或多核苷酸。本发明中的药物活性物质是用于在生物体,优选脊椎动物,更优选人中实现有益结局的效应分子。益处包括疾病和/或症状的诊断、预后、治疗、治愈和预防。药物活性物质还可能导致不希望的有害副作用。在这种情况下,必须权衡利弊,以决定

药物活性物质是否适用于特定情况。如果细胞内的药物活性物质的作用主要对整个生物体有益,例如对于人患者,该细胞称为靶细胞。如果细胞内的作用主要对整个生物体有害,则该细胞称为脱靶细胞。在细胞培养物和生物反应器等人工系统中,靶细胞和脱靶细胞取决于目的并由使用者定义。效应分子的实例是药物、毒素、多肽(例如酶)和多核苷酸,包括包含非天然氨基酸或核酸的多肽和多核苷酸。效应分子除其他还包括:DNA:单链DNA(例如腺嘌呤磷酸核糖转移酶的DNA);线性双链DNA;环状双链DNA(例如质粒);RNA:-mRNA(例如TAL效应分子核酸酶)、tRNA、rRNA、siRNA、miRNA、asRNA、LNA和BNA;蛋白质和多肽:Cas9;毒素(例如皂草毒蛋白、香石竹毒蛋白、白树毒素、(de) bouganin、agrostin、蓖麻毒素(毒素A链));商陆抗病毒蛋白、凋亡素、白喉毒素、假单胞菌外毒素)代谢酶(精氨基琥珀酸裂解酶、精氨基琥珀酸合成酶)、凝血级联酶、修复酶;用于细胞信号传导的酶;细胞周期调节因子;基因调节因子(转录因子,如NF- κ B或基因阻遏物,如甲硫氨酸阻遏物)。本发明中使用的毒素被定义为能够杀伤细胞或使细胞失活的药物活性物质。优选地,靶向毒素是仅或至少主要对靶细胞有毒但对脱靶细胞无毒的毒素。靶向毒素的净作用优选对整个生物体有益。

[0151] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子选自以下中的任何一个或多个:载体、基因、诱导细胞自杀的转基因、脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、抗有义寡核苷酸(ASO,AON)、短干扰RNA(siRNA)、抗微小RNA(抗miRNA)、DNA适体、RNA适体、mRNA、小环DNA、肽核酸(PNA)、氨基磷酸酯吗啉寡聚物(PMO)、锁核酸(LNA)、桥接核酸(BNA)、2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、3'-氟己糖醇核酸(FHNA)、质粒、乙二醇核酸(GNA)和苏糖核酸(TNA)或其衍生物,更优选BNA,例如用于沉默HSP27蛋白表达的BNA或用于沉默载脂蛋白B表达的BNA。

[0152] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子是选自以下中的任何一个或多个的寡核苷酸:短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、抗发夹状微小RNA(miRNA)、单链RNA、适体RNA、双链RNA(dsRNA)、抗微小RNA(抗miRNA、抗miR)、反义寡核苷酸(ASO)、mRNA、DNA、反义DNA、锁核酸(LNA)、桥接核酸(BNA)、2'-O,4'-氨基乙烯桥接核酸(BNA^{NC})、基于BNA的siRNA和基于BNA的反义寡核苷酸(BNA-AON)。

[0153] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子是选自抗miRNA、BNA-AON或siRNA(例如基于BNA的siRNA)中的任一个的寡核苷酸,优选选自化学修饰的siRNA、代谢稳定的siRNA和化学修饰的代谢稳定的siRNA。

[0154] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子是寡核苷酸,当该寡核苷酸存在于包含基因的细胞中时能够沉默这样的基因,其中该基因是以下基因中的任何一个:载脂蛋白B(apoB)、甲状腺素转运蛋白(TTR)、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/科信9型(PCSK9)、 δ -氨基乙酰丙酸合酶1(ALAS1)、抗凝血酶3(AT3)、乙醇酸氧化酶(GO)、补体组分C5(CC5)、乙型肝炎病毒(HBV)的X基因、HBV的S基因、 α -1抗胰蛋白酶(AAT)和乳酸脱氢酶(LDH),和/或当存在于包含异常miRNA的细胞中时能够靶向这样的异常miRNA。

[0155] 实施例是本发明的缀合物,其中效应分子是寡核苷酸,该寡核苷酸当存在于包含mRNA的细胞中时能够靶向这样的mRNA,其中该mRNA参与以下任何一种蛋白质的表达:apoB、TTR、PCSK9、ALAS1、AT3、GO、CC5、HBV的X基因的表达产物、HBV的S基因的表达产物、AAT和LDH,或当存在于包含miRNA的细胞中时能够拮抗或恢复这样的miRNA的功能,如抑制致癌miRNA(onco-miR)或阻遏onco-miR的表达。

[0156] 发明人表明,与对照和仅含BNA而不含皂苷的AOC(S01861,Quil-A)相比,与肿瘤细胞接触的肿瘤细胞靶向性单克隆抗体(具有共价偶联的反义BNA(如BNA(HSP27)并且具有本发明的共价偶联的皂苷,BNA和皂苷两者都通过可切割的键与抗体(例如西妥昔单抗)偶联)能够在体内肿瘤中沉默HSP27。施用本发明的ADC-皂苷缀合物或本发明的抗体-寡核苷酸缀合物-皂苷缀合物(AOC-皂苷),例如抗体-BNA-皂苷缀合物,从而赋予ADC-皂苷或AOC-皂苷抗肿瘤细胞活性,该抗肿瘤细胞活性在相同剂量下仅用ADC或仅用AOC(其不具有与单克隆抗体共价结合的皂苷)观察不到。值得注意的是,与对照组(仅媒剂施用)相比,AOC和单独的单克隆抗体与共价偶联的皂苷作为两种单独的缀合物的组合,当分别施用于不同小鼠组的荷瘤小鼠时,会增加肿瘤细胞中的HSP27表达。当与对照相比时,仅施用包含本发明的效应子部分的本发明的AOC-皂苷缀合物显示降低的HSP27表达。根据Zhang等人(2011),反义BNA(HSP27)是一种具有寡核苷酸序列的BNA[Y Zhang,Z Qu,S Kim,V Shi,B Liao1,P Kraft,R Bandaru,Y Wu,LM Greenberger和ID Horak,Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid(LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection[使用基于锁核酸(LNA)的反义寡核苷酸在不转染的情况下下调癌症靶标],Gene Therapy[基因疗法](2011) 18,326-333]。值得注意的是,就发明人所知,BNA设计用于作为游离核酸应用。发明人现在首先证明反义BNA可以通过(不)可切割的接头以如下方式与配体或抗体共价偶联:在体外,更重要的是在体内,在荷瘤动物的肿瘤细胞中保留基因沉默活性。这种提供基于BNA的AOC的方法开辟了向有需要的人(癌症)患者施用靶向BNA的新途径。

[0157] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子包含至少一个肽分子或由其组成,优选选自肽、蛋白、酶和蛋白毒素中的任何一个或多个。本发明人发现,当选择结合HER2、VEGFR、CD71中任一种的sdAb时,可实现非常有效的肿瘤细胞杀伤,该sdAb在缀合物中与毒素如蛋白毒素如香石竹毒蛋白或皂草毒蛋白组合,并且该sdAb与皂苷组合。实例部分提供了证明包含sdAb和效应分子的某些缀合物的高效能的实例,并显示在图4-7中。

[0158] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子包含以下至少一种或由以下至少一种组成:脲酶和Cre-重组酶、肽毒素、核糖体失活蛋白、蛋白毒素、细菌毒素、植物毒素,更优选选自以下中的任何一个或多个:病毒毒素,例如凋亡素;细菌毒素,例如志贺毒素、志贺样毒素、铜绿假单胞菌外毒素(PE)或PE的外毒素A、全长或截短的白喉毒素(DT)、霍乱毒素;真菌毒素,例如 α -八叠球菌素;植物毒素,其包括核糖体失活蛋白和2型核糖体失活蛋白的A链,该2型核糖体失活蛋白是例如香石竹毒蛋白如香石竹毒蛋白-30或香石竹毒蛋白-32、皂草毒蛋白如皂草毒蛋白-S3或皂草毒蛋白-S6;bouganin或bouganin的去免疫衍生物debouganin、志贺样毒素A、商陆抗病毒蛋白、蓖麻毒素、蓖麻毒素A链、莫迪素(modeccin)、莫迪素A链、相思豆毒素、相思豆毒素A链、沃氏藤黄辛(volkensin)、沃氏藤黄辛A链、槲寄生凝集素、槲寄生凝集素A链;或动物或人毒素,例如青蛙RNA酶,或颗粒酶B或人血管生成素,或其任何有毒片段或有毒衍生物;优选地,蛋白毒素是香石竹毒蛋白和/或皂草毒蛋白。

[0159] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子包含至少一个载荷或由至少一个载荷组成。

[0160] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个效应分子包含以下至少一种或由以下至少一种组成:靶向核糖体的毒素、靶向延伸因子的毒素、靶向微管蛋白的毒素、靶向DNA的毒

素和靶向RNA的毒素、更优选以下中的任何一种或多种：厄塔毒素、帕舒托 (pasudotox)、美登素类衍生物DM1、美登素类衍生物DM4、单甲基奥瑞西汀E (MMAE、维多汀 (vedotin))、单甲基奥瑞西汀F (MMAF、马福多汀 (mafodotin))、加利车霉素、N-乙酰基- γ -加利车霉素、吡咯并苯并二氮杂萘 (PBD) 二聚体、苯并二氮杂萘、CC-1065类似物、倍癌霉素、多柔比星、紫杉醇、多西他赛、顺铂、环磷酰胺、依托泊苷、多西他赛、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、米托蒽醌、tubulysin、吲哚啉苯并二氮杂萘、AZ13599185、念珠藻素、根霉素、甲氨蝶呤、蒽环素、喜树碱类似物、SN-38、DX-8951f、甲磺酸依喜替康、截短形式的绿脓杆菌外毒素 (PE38)、倍癌霉素衍生物、鹅膏蕈碱、 α -鹅膏蕈碱、斯普利他汀 (spliceostatin)、泰兰斯他汀 (thailanstatin)、奥加米星 (ozogamicin)、泰斯林 (tesirine)、Amberstatin269和索星 (soravtansine)、或其衍生物。

[0161] 可用于本发明的效应子部分优选依赖于晚期内体逃逸来发挥其作用。一些效应分子，例如假单胞菌外毒素，在“晚期内体阶段”之前被重新引导到其他细胞器，因此通常不会受益于掺入根据本发明的缀合物中。然而，此类毒素可适用于本发明，例如，通过缺失负责重新引导的信号肽。特别是剧毒的毒素，只需要一个分子就可以逃脱内体来杀伤细胞，这些毒素可能会被修饰为效力较低的毒素。如果至少2个、更优选至少5个、更优选至少10个、更优选至少20个、更优选至少50个、最优选至少100个毒素分子逃出内体 (并进入胞质溶胶)，则优选使用杀伤细胞的毒素。进一步优选地，本发明的缀合物包含共价缀合的官能化支架，即支架，例如寡聚或多聚支架或三官能接头，其包含一个或多个共价结合的效应子部分，用于将包含一个或多个结合的效应子部分的支架靶向靶细胞，例如肿瘤细胞或自身免疫细胞。此外，为了减少脱靶毒性，细胞膜不可渗透的小分子毒素是优于细胞膜可渗透毒素的优选效应分子。

[0162] 优选地，本发明的缀合物所包含的效应子部分 (其作用被缀合物所包含的皂苷增强) 从缀合物上分离，例如当被胞吞时从作为缀合物的细胞表面分子靶向性部分存在于缀合物中的抗体如sdAb分离。这可以通过例如在酸性、还原性、酶或光诱导条件下断裂的可切割键来实现。

[0163] 实施例是本发明的缀合物，其中缀合物包含抗体-药物缀合物 (ADC)，例如包含至少一个衍生自以下的sdAb的ADC：吉妥珠单抗-奥加米星 (gemtuzumab ozogamicin)、布伦妥昔单抗-维多汀 (brentuximab vedotin)、曲妥珠单抗-厄塔毒素 (trastuzumab emtansine)、艾诺妥珠单抗-奥加米星 (inotuzumab ozogamicin)、莫塞妥莫单抗-帕舒托 (moxetumomab pasudotox) 和珀拉妥珠单抗-维多汀 (polatuzumab vedotin)，和/或包含至少一个效应分子，该效应分子是存在于以下任何一种或多种中的毒素：吉妥珠单抗-奥加米星、布伦妥昔单抗-维多汀、曲妥珠单抗-厄塔毒素、艾诺妥珠单抗-奥加米星、莫塞妥莫单抗-帕舒托 (moxetumomab pasudotox) 和珀拉妥珠单抗-维多汀 (polatuzumab vedotin)，和/或选自香石竹毒蛋白和皂草毒蛋白。应当理解，当sdAb衍生自此类人抗体时，此类人抗体的 V_H 结构域可能需要在结构域稳定性方面进行一些在本领域中是已知的改善 (人 V_H 结构域的“骆驼化”)。

[0164] 实施例是本发明的缀合物，其中至少一个皂苷包含选自以下的苷元核心结构 (组C)：

- [0165] 2 α -羟基齐墩果酸；
- [0166] 16 α -羟基齐墩果酸；
- [0167] 常春藤皂苷元 (23-羟基齐墩果酸)；
- [0168] 16 α ,23-二羟基齐墩果酸；
- [0169] 丝石竹皂苷元；
- [0170] 皂皮酸；
- [0171] 原七叶皂苷元-21 (2-甲基丁-2-烯酸酯)-22-乙酸酯；
- [0172] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21,22-双 (2-甲基丁-2-烯酸酯)；
- [0173] 23-氧代-玉蕊皂苷元C-21 (2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯；
- [0174] 洋地黄皂苷配基；
- [0175] 3,16,28-三羟基齐墩果-12-烯；
- [0176] 丝石竹酸；或
- [0177] 其衍生物，
- [0178] 优选地，至少一个皂苷包含选自皂皮酸和丝石竹皂苷元的苷元核心结构，更优选地至少一个皂苷包含苷元核心结构皂皮酸。
- [0179] 不希望受任何理论的束缚，皂苷的苷元核心结构 (此处也称为“苷元”) 中醛基团 (或其衍生物) 的存在有益于皂苷刺激和/或增强本发明缀合物所包含的效应分子的体内逃逸的能力，这是当这样的皂苷与作为本发明缀合物的一部分的这些效应分子共定位在细胞中在所述细胞的体内中时或者当在体内中为游离形式时 (例如，一旦缀合物被递送到靶细胞内体或溶酶体中，就从缀合物中分离)。因此，包含具有带醛基团的苷元的皂苷的本发明的缀合物是优选的。在皂皮酸和丝石竹皂苷元中，醛基团位于苷元的C₂₃原子处。
- [0180] 实施例是本发明的缀合物，其中至少一个皂苷包含以下之一或两者：与该至少一个皂苷的苷元核心结构的C₃原子或C₂₈原子结合、优选与C₃原子结合的第一糖链，和与该至少一个皂苷的苷元核心结构的C₂₈原子结合的第二糖链，并且优选该至少一个皂苷包含该第一糖链和该第二糖链。因此，当本发明的缀合物包含的皂苷带有两个聚糖 (糖链) 时，第一糖链结合在苷元核心结构的位置C₃处并且第二糖链结合在皂苷的苷元核心结构的位置C₂₈处。
- [0181] 实施例是本发明的缀合物，其中
- [0182] • 至少一个皂苷包含第一糖链，该第一糖链选自 (组A)：
- [0183] GlcA-，
- [0184] Glc-，
- [0185] Gal-，
- [0186] Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -Ara-，
- [0187] Gal- (1 $\rightarrow$ 2) -[Xyl- (1 $\rightarrow$ 3)] -GlcA-，
- [0188] Glc- (1 $\rightarrow$ 2) -[Glc- (1 $\rightarrow$ 4)] -GlcA-，
- [0189] Glc- (1 $\rightarrow$ 2) -Ara- (1 $\rightarrow$ 3) -[Gal- (1 $\rightarrow$ 2)] -GlcA-，
- [0190] Xyl- (1 $\rightarrow$ 2) -Ara- (1 $\rightarrow$ 3) -[Gal- (1 $\rightarrow$ 2)] -GlcA-，
- [0191] Glc- (1 $\rightarrow$ 3) -Gal- (1 $\rightarrow$ 2) -[Xyl- (1 $\rightarrow$ 3)] -Glc- (1 $\rightarrow$ 4) -Gal-，
- [0192] Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -Gal- (1 $\rightarrow$ 3) -[Glc- (1 $\rightarrow$ 2)] -GlcA-，
- [0193] Ara- (1 $\rightarrow$ 4) -Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -Glc- (1 $\rightarrow$ 2) -Rha- (1 $\rightarrow$ 2) -GlcA-，

- [0194] Ara- (1→4) -Fuc- (1→2) -Glc- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
- [0195] Ara- (1→4) -Rha- (1→2) -Gal- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
- [0196] Ara- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
- [0197] Ara- (1→4) -Rha- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
- [0198] Ara- (1→4) -Fuc- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
- [0199] Ara- (1→4) -Rha- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
- [0200] Ara- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
- [0201] Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Glc- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
- [0202] Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Glc- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
- [0203] Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Gal- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
- [0204] Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Rha- (1→2) -GlcA- ,
- [0205] Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
- [0206] Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Glc- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
- [0207] Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,
- [0208] Xyl- (1→4) -Fuc- (1→2) -Gal- (1→2) -Fuc- (1→2) -GlcA- ,和
- [0209] 其任何衍生物,
- [0210] 和/或
- [0211] • 至少一个皂苷包含第二糖链,该第二糖链选自(组B):
- [0212] Glc- ,
- [0213] Gal- ,
- [0214] Rha- (1→2) - [Xyl- (1→4)] -Rha- ,
- [0215] Rha- (1→2) - [Ara- (1→3) -Xyl- (1→4)] -Rha- ,
- [0216] Ara- ,
- [0217] Xyl- ,
- [0218] Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) - [R1- (→4)] -Fuc- 其中R1是4E-甲氧基肉桂酸,
- [0219] Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) - [R2- (→4)] -Fuc- 其中R2是4Z-甲氧基肉桂酸,
- [0220] Xyl- (1→4) - [Gal- (1→3)] -Rha- (1→2) -4-OAc-Fuc- ,
- [0221] Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -3,4-二-OAc-Fuc- ,
- [0222] Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) - [R3- (→4)] -3-OAc-Fuc- 其中R3是4E-甲氧基肉桂酸,
- [0223] Glc- (1→3) -Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -4-OAc-Fuc- ,
- [0224] Glc- (1→3) -Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) -4-OAc-Fuc- ,
- [0225] (Ara-或Xyl-) (1→3) - (Ara-或Xyl-) (1→4) - (Rha-或Fuc-) (1→2) - [4-OAc- (Rha-或Fuc-) (1→4)] - (Rha-或Fuc-) ,
- [0226] Xyl- (1→3) -Xyl- (1→4) -Rha- (1→2) - [Qui- (1→4)] -Fuc- ,
- [0227] Api- (1→3) -Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -Fuc- ,
- [0228] Xyl- (1→4) - [Gal- (1→3)] -Rha- (1→2) -Fuc- ,
- [0229] Xyl- (1→4) - [Glc- (1→3)] -Rha- (1→2) -Fuc- ,
- [0230] Ara/Xyl- (1→4) -Rha/Fuc- (1→4) - [Glc/Gal- (1→2)] -Fuc- ,

- [0231] Api - (1→3) - Xyl - (1→4) - [Glc - (1→3)] - Rha - (1→2) - [R4 - (→4)] - Fuc - 其中R4是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0232] Api - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [R5 - (→4)] - Fuc - 其中R5是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0233] Api - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [Rha - (1→3)] - 4-OAc - Fuc - ,
- [0234] Api - (1→3) - Xyl - (1→4) - [Glc - (1→3)] - Rha - (1→2) - [Rha - (1→3)] - 4-OAc - Fuc - ,
- [0235] 6-OAc-Glc - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [3-OAc-Rha - (1→3)] - Fuc - ,
- [0236] Glc - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [3-OAc - Rha - (1→3)] - Fuc - ,
- [0237] Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [Qui - (1→4)] - Fuc - ,
- [0238] Glc - (1→3) - [Xyl - (1→4)] - Rha - (1→2) - [Qui - (1→4)] - Fuc - ,
- [0239] Glc - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [Xyl - (1→3) - 4-OAc-Qui - (1→4)] - Fuc - ,
- [0240] Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [3,4-二-OAc-Qui - (1→4)] - Fuc - ,
- [0241] Glc - (1→3) - [Xyl - (1→4)] - Rha - (1→2) - Fuc - ,
- [0242] 6-OAc-Glc - (1→3) - [Xyl - (1→4)] - Rha - (1→2) - Fuc - ,
- [0243] Glc - (1→3) - [Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4)] - Rha - (1→2) - Fuc - ,
- [0244] Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [Xyl - (1→3) - 4-OAc-Qui - (1→4)] - Fuc - ,
- [0245] Api/Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - [Glc - (1→3)] - Rha - (1→2) - [Rha - (1→3)] - 4-OAc - Fuc - ,
- [0246] Api - (1→3) - Xyl - (1→4) - [Glc - (1→3)] - Rha - (1→2) - [Rha - (1→3)] - 4-OAc - Fuc - ,
- [0247] Api/Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - [Glc - (1→3)] - Rha - (1→2) - [R6 - (→4)] - Fuc - 其中R6是5-0-[5-0-Rha - (1→2) - Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0248] Api/Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - [Glc - (1→3)] - Rha - (1→2) - [R7 - (→4)] - Fuc - 其中R7是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0249] Api/Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - [Glc - (1→3)] - Rha - (1→2) - [R8 - (→4)] - Fuc - 其中R8是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0250] Api - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [R9 - (→4)] - Fuc - 其中R9是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0251] Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [R10 - (→4)] - Fuc - 其中R10是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0252] Api - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [R11 - (→3)] - Fuc - 其中R11是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸),
- [0253] Xyl - (1→3) - Xyl - (1→4) - Rha - (1→2) - [R12 - (→3)] - Fuc - 其中R12是5-0-[5-0-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
- [0254] Glc - (1→3) - [Glc - (1→6)] - Gal - ,和
- [0255] 其任何衍生物。
- [0256] 因此,当本发明的缀合物包含的皂苷带有两个聚糖(糖链)时,第一糖链结合在皂苷的苷元核心结构的位置C₃处并且第二糖链结合在皂苷的苷元核心结构的位置C₂₈处。优选

地,皂苷在苷元中具有醛基团。

[0257] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个皂苷分别根据组A和组B包含第一糖链和包含第二糖链,优选一种或两种:其中第一糖链包含多于一个糖部分并且第二糖链包含多于一个糖部分,并且其中苷元核心结构优选是皂皮酸或丝石竹皂苷元,更优选皂皮酸,其中以下中的一项、两项或三项,优选一项或两项:

[0258] i. 苷元核心结构中的醛基团已被衍生化,

[0259] ii. 第一糖链中的葡萄糖醛酸部分的羧基基团已被衍生化,以及

[0260] iii. 第二糖链中的至少一个乙酰氧基(Me (CO) O-) 基团已被衍生化。

[0261] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个皂苷包含:

[0262] i. 包含醛基团的苷元核心结构,该醛基团已通过以下进行衍生化:

[0263] -还原成醇;

[0264] -通过与N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)反应转化为腙键,其中EMCH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;

[0265] -通过与N-[β-马来酰亚胺基丙酸]酰肼(BMPH)反应转化为腙键,其中BMPH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;或

[0266] -通过与N-[κ-马来酰亚胺基十一烷酸]酰肼(KMUH)反应转化为腙键,其中KMUH的马来酰亚胺基团任选通过与巯基乙醇形成硫醚键而衍生化;

[0267] ii. 第一糖链,其包含羧基基团,优选葡萄糖醛酸部分的羧基基团,该羧基基团已经通过与2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)或N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺(AEM)反应转化为酰胺键而衍生化;

[0268] iii. 第二糖链,其包含乙酰氧基基团(Me (CO) O-),该乙酰氧基基团已经通过脱乙酰转化为羟基基团(HO-)而衍生化;或

[0269] iv. i.、ii. 和/或iii. 的两个或三个衍生化的任何组合,优选是i.、ii. 和/或iii. 的两个衍生化的任何组合。

[0270] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个皂苷是以下中的任何一种或多种:皂树皮皂苷、川续断皂苷B、柴胡皂苷A、柴胡皂苷D、灰毡毛忍冬皂苷A、商陆皂苷A、商陆皂苷元、七叶皂苷盐、AS6.2、NP-005236、AMA-1、AMR、α-常春藤皂苷、NP-012672、NP-017777、NP-017778、NP-017774、NP-018110、NP-017772、NP-018109、NP-017888、NP-017889、NP-018108、SA1641、AE X55、NP-017674、NP-017810、AG1、NP-003881、NP-017676、NP-017677、NP-017706、NP-017705、NP-017773、NP-017775、SA1657、AG2、S01861、GE1741、S01542、S01584、S01658、S01674、S01832、S01904、S01862、QS-7、QS1861、QS-7api、QS1862、QS-17、QS-18、QS-21A-apio、QS-21A-xylo、QS-21B-apio、QS-21B-xylo、β-七叶皂苷、七叶皂苷Ia、油茶籽皂苷I、油茶籽皂苷J、阿萨姆皂苷F、洋地黄皂苷、报春花酸1和AS64R、或其衍生物、或其立体异构体、和/或其任何组合,优选以下中的任何一个或多个:QS-21或QS-21衍生物、S01861或S01861衍生物、SA1641或SA1641衍生物和GE1741或GE1741衍生物,更优选QS-21衍生物或S01861衍生物,最优选S01861衍生物,例根据本发明的皂苷衍生物。

[0271] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个皂苷是以下中的任何一种或多种:S01861、SA1657、GE1741、SA1641、QS-21、QS-21A、QS-21A-api、QS-21A-xyl、QS-21B、QS-21B-api、QS-21B-xyl、QS-7-xyl、QS-7-api、QS-17-api、QS-17-xyl、QS1861、QS1862、皂树皂苷、

Saponinum album、QS-18、Quil-A、Gyp1、丝石竹皂苷A、AG1、AG2、S01542、S01584、S01658、S01674、S01832、S01862、S01904、或其衍生物、或其立体异构体、和/或其任何组合,优选地,该皂苷衍生物是S01861衍生物和/或GE1741衍生物和/或SA1641衍生物和/或QS-21衍生物,更优选地,该皂苷衍生物是S01861衍生物或QS21衍生物,最优选的是,该皂苷衍生物是根据本发明的S01861衍生物。

[0272] 当皂苷作为缀合物的一部分或以游离形式与细胞内的效应分子共定位时,这种三萜糖苷类型的皂苷能够增强缀合物所包含的并且存在于细胞的内体(或溶酶体)中的效应分子的内体逃逸。发明人确定,当皂苷作为本发明缀合物的一部分与细胞接触时,这些皂苷的内体逃逸增强活性约为100至1000倍更有效。当这样的细胞与作为某种细胞靶向缀合物如ADC或AOC的一部分的效应分子接触时,游离皂苷能够刺激效应分子在细胞胞质溶胶中的递送,并且与本发明缀合物所包含的相同皂苷的浓度相比,皂苷的浓度高100-1000倍,这是实现效应分子从靶细胞的外部递送到内体内并最终递送到所述细胞的胞质溶胶中的相同程度递送所需要的。表A1列出了显示这种内体逃逸增强活性的皂苷,以及与已经确定增强缀合物所包含的效应分子的胞质递送的能力的皂苷具有高度结构相似性的皂苷。当皂苷是本发明缀合物的一部分时,当缀合物的sdAb与靶细胞上、所述细胞上的靶细胞表面结合位点结合时,并且在内吞后,皂苷靶向所述细胞的内体中的递送与使相同细胞与游离的、未靶向的皂苷(衍生物)(其不具有用于结合靶细胞的细胞表面分子的结合分子,例如抗体或sdAb)接触相比是约100至1000倍更有效。

[0273] 与例如IgG型抗体或其片段如Fab、scFv相比,本发明缀合物的sdAb的小尺寸有助于靶细胞的有效摄取(例如通过内吞作用摄取),所述靶细胞暴露用于结合缀合物所包含的sdAb的结合位点。通常,本发明缀合物中的sdAb能够结合靶细胞的细胞表面受体,例如肿瘤细胞特异性细胞表面受体。这样,本发明的缀合物特别适合于胞吞作用进入例如表达细胞表面受体的肿瘤细胞。

[0274] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个sdAb包含用于结合细胞的细胞表面分子的sdAb,其中细胞是异常细胞,例如肿瘤细胞、自身免疫细胞、受感染的细胞例如病毒感染的细胞,或包含基因缺陷或酶缺陷的细胞。

[0275] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个sdAb包含用于结合细胞的细胞表面分子的sdAb,该sdAb衍生自或基于以下免疫球蛋白中的任何一种或多种:抗CD71抗体如IgG型OKT-9、抗HER2抗体如曲妥珠单抗(赫赛汀)、珀妥珠单抗、抗CD20抗体如利妥昔单抗、奥法妥木单抗、托司妥莫单抗、奥比妥珠单抗(obinutuzumab)艾瑞妥莫单抗(ibritumomab)、抗CA125抗体如奥戈伏单抗、抗EpCAM(17-1A)抗体如依决洛单抗、抗EGFR抗体如西妥昔单抗、马妥珠单抗、帕尼妥木单抗、尼妥珠单抗、抗CD30抗体如布仑妥昔单抗、抗CD33抗体如吉妥珠单抗、huMy9-6、抗血管整合素 α -v β -3抗体如伊瑞西珠单抗(etaracizumab)、抗CD52抗体如阿仑单抗、抗CD22抗体如依帕珠单抗、匹那妥珠单抗、抗CD22抗体莫塞妥莫单抗(moxetumomab)的结合片段(Fv)、人源化单克隆抗体艾诺妥珠单抗、抗CEA抗体如拉贝妥珠单抗、抗CD44v6抗体如比伐珠单抗(bivatuzumab)、抗FAP抗体如西罗珠单抗、抗CD19抗体如huB4、抗CanAg抗体如huC242、抗CD56抗体如huN901、抗CD38抗体如达雷木单抗(daratumumab)、OKT-10抗CD38单克隆抗体、抗CA6抗体如DS6、抗IGF-1R抗体如西妥木单抗、3B7、抗整合素抗体如CNT0 95、抗黏结蛋白聚糖-1抗体如B-B4、抗CD79b如珀拉妥珠单抗、抗

HIVgp41抗体,优选以下中的任何一种:抗HIVgp41抗体、抗CD71抗体、抗HER2抗体和抗EGFR抗体,更优选以下中的任何一种:曲妥珠单抗、珀妥珠单抗、西妥昔单抗、马妥珠单抗、抗CD71抗体、OKT-9,最优选曲妥珠单抗、西妥昔单抗、抗CD71抗体OKT-9。

[0276] 这些细胞表面分子通常至少在一定程度上以肿瘤细胞特异性存在于肿瘤细胞上。肿瘤细胞特异性使这些受体成为本发明缀合物的合适靶标,因此缀合物中的sdAb能够结合此类细胞表面受体。由于本发明的缀合物所包含的皂苷能够刺激本发明的缀合物所包含的效应分子在细胞的胞质溶胶中,例如在由本发明的缀合物所包含的sdAb靶向的(肿瘤)细胞中的释放和递送,特别适合选择已知其适合作为例如ADC和AOC的靶的细胞表面受体作为sdAb的靶(肿瘤)细胞表面分子。因此,本发明的缀合物适合于共同递送作为缀合物一部分的效应分子以及由本发明的完全相同的缀合物包含的皂苷,该缀合物是改善的ADC或改善的AOC,其包含sdAb并包含皂苷。用本发明的缀合物靶向肿瘤细胞特异性受体促进了作为缀合物一部分的皂苷内吞和递送到靶细胞内体和/或溶酶体中。当肿瘤细胞与本发明的缀合物接触时,本发明的缀合物所包含的效应分子被共同递送到内体或溶酶体中,并且在共定位的皂苷的影响下,效应分子随后被转移到靶细胞的胞质溶胶中。如本文前面所解释的,当考虑本发明缀合物所包含的效应分子的生物活性时,与缺乏细胞靶向结合分子如受体配体、抗体或sdAb的游离皂苷的应用相比,作为本发明缀合物的一部分的靶向皂苷的应用导致皂苷的增强效果的约100至1000倍的改善。

[0277] 与通常观察到的基于抗体的ADC的清除率相比,在本发明的缀合物中应用小的sdAb(例如骆驼 V_H)可防止或减缓本发明的缀合物从施用缀合物的人受试者的循环和身体中的清除。此外,由于sdAb的相对小的尺寸,与例如抗体的较大尺寸相比,当这种抗体将与皂苷结合时,由于连接的蛋白结构域的存在而限制或阻碍靶细胞内皂苷活性的风险是有限的。一般而言,与皂苷连接的分子尺寸越小,由于结合分子(例如sdAb,如VHH)的存在,干扰细胞内皂苷活性的风险越小。此外,与通常应用于例如ADC、OAC中的相对大尺寸的IgG相比,sdAb的相对小尺寸导致它们在组织(例如肿瘤组织)中的快速分布,从而允许本发明的缀合物更好地到达靶细胞,并由此改善与靶细胞的结合(程度)。在本发明的缀合物中应用sdAb的许多益处之一是没有例如IgG型常规抗体共有的Fc尾。当将本发明的缀合物施用于有需要的患者时,本发明的缀合物中sdAb中没有Fc尾可防止发生Fc γ -受体介导的靶外效应,例如与Fc γ -受体活化相关的不希望的副作用。没有Fc尾消除了Fc与患者(例如施用基于抗体的ADC的患者)的细胞结合产生副作用的风险。包含本发明缀合物的sdAb不具有Fc介导的不良副作用的这种风险。

[0278] 实施例是本发明的缀合物,其中该至少一个效应分子通过接头共价结合到该至少一个sdAb中的至少一个sdAb,优选一个和/或该至少一个皂苷中的至少一个,优选一个,或直接结合到该sdAb和/或该皂苷,和/或其中该至少一个皂苷通过接头共价结合到该至少一个sdAb的至少一个sdAb,优选一个和/或该至少一个效应分子的至少一个效应分子,优选一个,或直接结合到该sdAb和/或该效应分子。

[0279] 实施例是本发明的缀合物,其中该缀合物包含三官能接头,其中该至少一个sdAb、该至少一个皂苷和该至少一个效应分子中的每一个与该三官能接头直接地或通过接头共价结合,优选单独地结合,并且优选地,该缀合物包含三官能接头,其中一个sdAb、该至少一个皂苷和至少一个、优选一个效应分子直接地或通过接头单独地与该三官能接头共价结

合。

[0280] 当考虑皂苷与sdAb和/或效应分子偶联的结合位点时,皂苷通过接头与sdAb和/或效应分子偶联提供了灵活性。此外,这样的接头可以充当sdAb和皂苷与效应分子之间的间隔物,使得sdAb保持其结合细胞表面分子上的结合位点的能力,并且皂苷保持其增强缀合物所包含的效应分子的内体逃逸的能力,并且效应分子保持其对其细胞内结合配偶体的生物活性。

[0281] 实施例是本发明的缀合物,其中该至少一个皂苷通过硫醚键共价结合到该至少一个sdAb之一中和/或该至少一个效应分子之一中的巯基基团上,共价键合优选通过接头N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH),该接头与该皂苷的苷元核心结构的位置C₂₃中的醛基团共价结合并且与该sdAb和/或该效应分子中的巯基基团如半胱氨酸的巯基基团共价结合。

[0282] 实施例是本发明的缀合物,其中该至少一个皂苷是双糖链三萜皂苷或其衍生物,该双糖链三萜皂苷或其衍生物属于在位置C₂₃处任选具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且在结合于该皂苷的苷元核心结构的C₃β-OH处的第一糖链中包含葡糖醛酸单元,其中该皂苷通过该第一糖链中的葡糖醛酸单元的羧基基团,优选通过接头,共价结合到该至少一个sdAb和/或该至少一个效应分子的氨基酸残基上,其中该氨基酸残基优选选自半胱氨酸和赖氨酸。

[0283] 实施例是本发明的缀合物,其中该至少一个皂苷包含在该皂苷的苷元核心结构的C₃β-OH基团处的第一糖链中葡糖醛酸单元,该葡糖醛酸单元与接头共价结合,该接头优选通过酰胺键与该至少一个sdAb和/或该至少一个效应分子中的胺基团共价结合,例如该sdAb和/或该效应分子的赖氨酸或N-末端的胺基团,优选地所述接头是1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)。

[0284] 实施例是本发明的缀合物,其包含该至少一个皂苷的多于一个共价结合的皂苷部分,优选地2、3、4、5、6、8、10、16、32、64、128或1-100个这样的部分或其间的任何数量的这样的部分,例如7、9、12个皂苷部分。

[0285] 实施例是本发明的缀合物,其中多于一个共价结合的皂苷部分直接共价结合至至少一个sdAb和/或至少一个效应分子的氨基酸残基,优选结合至半胱氨酸和/或赖氨酸,和/或通过接头和/或通过可切割接头共价结合。

[0286] 实施例是根据本发明的内体和/或溶酶体逃逸增强缀合物,其基本上具有分子结构(II)的分子形式:

[0287] (皂苷-接头)_a-免疫球蛋白-效应子部分

[0288] (结构(II)),

[0289] 其中a=1-4,优选1、2、4,并且其中免疫球蛋白优选是sdAb,

[0290] 或基本上具有分子结构(III)的分子形式:

[0291] (皂苷-树状突(-皂苷))_x_b-免疫球蛋白-效应子部分

[0292] (结构(III)),

[0293] 其中x=1至100,优选1-63、1-31、1-15、1-7或3;b=1-4,优选1、2、4,并且其中免疫球蛋白优选是sdAb,

[0294] 或基本上具有分子结构(IV)的分子形式:

[0295] (皂苷-三官能接头(-效应子部分))_c-免疫球蛋白

[0296] (结构(IV)),

[0297] 其中 $c=1-4$,优选1、2、4,并且其中免疫球蛋白优选是sdAb,

[0298] 或基本上具有分子结构(V)的分子形式:

[0299] $((\text{皂苷}-\text{树状突}(-\text{皂苷})_y)-\text{三官能接头}(-\text{效应子部分}))_d-\text{Ig}$

[0300] (结构(V)),

[0301] 其中 $y=1$ 至100,优选1-63、1-31、1-15、1-7或3; $d=1-4$,优选1、2、4,并且其中免疫球蛋白('Ig')优选是sdAb。

[0302] 优选地, x 或 y 是3、7或15。优选地, b 或 d 是1、2或4,尽管在一些实施例中, b 或 d 是3,并且当免疫球蛋白是sdAb例如 V_{HH} 时, a 优选是1, b 优选是1, c 优选是1, d 优选是1。树状突是例如G4树状突或G5树状突。优选地,皂苷通过可切割的键结合至接头,例如在 <6.5 的pH条件(即内体、内容酶体、溶酶体中的pH)下胞内切割的酰胺键。优选地,接头是EMCH。优选地,三官能接头是具有如下所示结构A的接头。对于结构II和III,优选地,效应子部分通过接头例如可切割接头与Ig结合。

[0303] 实施例是本发明的缀合物,其中多于一个共价结合的皂苷部分是共价皂苷缀合物的一部分,所述共价皂苷缀合物包含至少一个寡聚分子或聚合分子以及与其共价结合的多于一个皂苷,其中所述共价皂苷缀合物与至少一个sdAb中的至少一个和/或至少一个效应分子中的至少一个共价结合。

[0304] 这种共价皂苷缀合物用作多个皂苷部分的载体,该多个皂苷部分可以通过单键,优选通过(可切割的)接头结合到缀合物包含的sdAb。由于共价皂苷缀合物可带有任何选定数目的共价结合的皂苷部分,例如1-200个皂苷部分(这与包括用于共价连接这些皂苷的结合位点的选定寡聚或聚合结构的类型有关),当考虑本发明缀合物中皂苷部分的数目时,这种共价皂苷缀合物的应用提供了自由度。例如,对于本发明缀合物所包含的效应分子的胞质递送,当共价皂苷缀合物是本发明缀合物的一部分时,并且当效应分子与皂苷作为同一个缀合物的组成部分共定位在效应分子应发挥其生物活性的靶细胞的内体或溶酶体中时,本发明的缀合物中存在的皂苷的数量可以通过提供共价皂苷缀合物来适应,所述共价皂苷缀合物具有足以和足够刺激效应分子的胞质递送的数量的皂苷部分。

[0305] 优选地,1-8个共价皂苷缀合物与sdAb和/或效应分子结合,更优选2-4个这样的共价皂苷缀合物,其中至少一个共价皂苷缀合物任选地基于树状突,其中任选地1-32个皂苷部分,优选2、3、4、5、6、8、10、16、32个这样的部分,或其中任何数目的这样的部分,例如7、9、12个皂苷部分,直接或通过接头共价结合到至少一个共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子上。

[0306] 优选地,一个或两个共价皂苷缀合物与本发明缀合物中的单个sdAb结合。对于许多目的,单个皂苷或单个共价皂苷缀合物与缀合物所包含的单个sdAb的偶联足以有效刺激效应分子递送到靶细胞中和所述细胞的胞质溶胶中,其中效应分子由本发明的缀合物所包含。通常,本发明的缀合物包含4、8或16个皂苷,例如由与本发明缀合物中的sdAb偶联的单个共价皂苷缀合物所包含的4或8个皂苷。通常,本发明的这类缀合物包含单个sdAb,一个或多个皂苷或一个或多个共价皂苷缀合物与其结合,优选单个皂苷或单个共价皂苷缀合物是缀合物的一部分。

[0307] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个皂苷通过可切割接头与至少一个sdAb中

的至少一个和/或至少一个效应分子中的至少一个共价结合。

[0308] 实施例是本发明的缀合物,其中该可切割接头在酸性条件、还原条件、酶促条件和/或光诱导条件下经受切割,并且优选地,该可切割接头包含选自以下的可切割键:在酸性条件下经受切割的腙键和酰肼键,和/或易进行蛋白水解的键,例如被组织蛋白酶B进行蛋白水解的键,和/或在还原条件下易被切割的键,例如二硫键。

[0309] 实施例是本发明的缀合物,其中可切割接头在体内在酸性条件下进行切割,例如在哺乳动物细胞,优选人细胞的内体和/或溶酶体中存在的酸性条件下,优选在pH4.0-6.5,更优选在pH $\leq$ 5.5。

[0310] 这种在内体和溶酶体中明显的条件下可切割的可切割接头有助于游离皂苷在内体或溶酶体中在皂苷从本发明缀合物的剩余部分切割(分开)后的递送。这样,本发明的缀合物组合了以下的益处:在sdAb与靶细胞上的细胞表面分子特异性结合后皂苷的细胞靶向递送,以及游离皂苷在细胞内,即在内体(或溶酶体)内的存在,这有助于游离皂苷刺激和/或促进本发明缀合物所包含的效应分子递送出内体(或溶酶体)并进入靶细胞胞质溶胶的能力。

[0311] 实施例是本发明的缀合物,其中共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子与至少一个sdAb中的至少一个和/或至少一个效应分子中的至少一个共价结合,优选与sdAb和/或效应分子的氨基酸残基共价结合。

[0312] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个皂苷通过本发明的可切割接头共价结合到共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子上。

[0313] 实施例是本发明的缀合物,其中该至少一个皂苷通过亚胺键、腙键、酰肼键、肟键、1,3-二氧戊环键、二硫键、硫醚键、酰胺键、肽键或酯键中的任何一个或多个,优选通过接头与该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子共价结合。

[0314] 实施例是本发明的缀合物,其中该至少一个皂苷包含在位置C₂₃含有醛官能团的苷元核心结构,并且该至少一个皂苷任选地在该皂苷的苷元核心结构的C₃ β -OH基团处的第一糖链中包含葡萄糖醛酸官能团,该醛官能团参与与该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子的共价键合,和/或,如果存在的话,该葡萄糖醛酸官能团参与与该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子的共价键合,该皂苷的键合通过直接共价键或通过接头,其中该接头是可切割接头或稳定接头。这里,稳定是指皂苷与sdAb或效应分子之间的键,或皂苷与寡聚或聚合结构之间的键,该键在细胞内的酸性条件下,特别是在此类细胞的内体或溶酶体的酸性条件下,保持完整(未切割)。此外,这种稳定的键在例如施用了包含共价皂苷缀合物的本发明缀合物的人受试者的循环和器官中保持完整(即未切割)。相比之下,在皂苷与由缀合物所包含的sdAb或效应分子或与寡聚结构或聚合结构结合的上下文中,可切割接头是指在哺乳动物细胞如人细胞如肿瘤细胞的内体和溶酶体内显而易见的酸性条件下被切割的键,而当包含这种可切割键的缀合物存在于例如施用本发明缀合物的人受试者的循环或器官中,即细胞外时,这种可切割接头保持完整(未被切割)。

[0315] 实施例是本发明的缀合物,其中至少一个皂苷的苷元核心结构的位置C₂₃的醛官能团与接头EMCH共价结合,该EMCH通过硫醚键共价结合到共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子中的巯基基团,例如半胱氨酸的巯基基团。EMCH接头与皂苷苷元的醛基团的结合导致腙键的形成。这样的腙键是内体和溶酶体内酸性条件下可切割键的典型实例。与本发明的

缀合物所包含的sdAb或与本发明的缀合物所包含的效应分子偶联或与共价皂苷缀合物的寡聚结构或聚合结构偶联的皂苷(其中这种共价皂苷缀合物与sdAb或缀合物的效应分子偶联)一旦在靶细胞的内体或溶酶体中递送就可从本发明的缀合物中释放,所述靶细胞暴露缀合物的sdAb可与之结合的细胞表面分子。这样,与本发明缀合物中的sdAb或效应分子偶联的皂苷从细胞外转移到内体(或溶酶体)中,在内体(或溶酶体)中,皂苷在pH驱动的腈键切割后从缀合物的剩余部分释放。在内体(或溶酶体)中,当考虑将本发明的缀合物包含的效应分子递送到胞质溶胶中时,游离皂苷可以发挥其刺激活性。出人意料的是,发明人确定对于皂苷而言,皂苷以游离形式存在于内体或溶酶体中并不是皂苷内体逃逸增强活性的先决条件。此外,例如某些缀合物所包含的皂苷,一旦作为某些缀合物一部分的效应分子和皂苷都与相同的靶细胞接触,则增强效应分子从内体/溶酶体进入靶细胞胞质溶胶的递送。

[0316] 实施例是本发明的缀合物,其中在该皂苷的苷元核心结构的C₃β-OH基团处的第一糖链中的葡糖醛酸官能团与接头HATU共价结合,该HATU通过酰胺键共价结合到该共价皂苷缀合物的寡聚分子或聚合分子中的胺基团,例如蛋白质的赖氨酸或N-末端的胺基团。当HATU接头与本发明缀合物的皂苷和sdAb或效应分子偶联时,例如,皂苷与sdAb或效应分子(如果这种效应分子是靶效应分子,如蛋白毒素)的N-末端结合,或与存在于sdAb中或存在于效应分子中的赖氨酸的胺基结合。

[0317] 实施例是本发明的缀合物,其中该共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子结合到该至少一个sdAb中的至少一个,优选一个,和/或该至少一个效应分子中的至少一个,优选一个,优选结合到该sdAb的氨基酸残基和/或该效应分子的氨基酸残基,涉及该共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子上的点击化学基团,该点击化学基团优选选自四嗪、叠氮化物、烯炔或炔炔或这些基团的环状衍生物,更优选该点击化学基团是叠氮化物。

[0318] 实施例是本发明的缀合物,其中共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子包含选自以下的聚合结构和/或寡聚结构:线性聚合物、支化聚合物和/或环状聚合物、寡聚物、树枝状聚合物、树状突、树状突化聚合物、树状突化寡聚物、DNA、多肽、聚赖氨酸、聚乙二醇、寡聚乙二醇(OEG),例如OEG₃、OEG₄和OEG₅,或这些聚合结构和/或寡聚结构的组装,该组装优选通过共价交联构建,优选该共价皂苷缀合物的聚合分子或寡聚分子是树状突,例如聚酰胺基胺(PAMAM)树枝状聚合物。由待掺入本发明的缀合物中的所选皂苷的数目驱动,选择寡聚结构或聚合结构的类型和大小或长度。也就是说,为了形成本发明的缀合物,与缀合物所包含的sdAb或效应分子偶联的皂苷的数目可以决定合适的寡聚或聚合结构的选择,其具有足够量的用于偶联所期望数目的皂苷的结合位点,由此提供共价皂苷缀合物,其带有待偶联至sdAb或效应分子的选定数目的皂苷部分,用于提供本发明的缀合物。例如,OEG的长度或树状突分子或聚赖氨酸分子的大小决定了可以共价连接到此类寡聚或聚合结构的皂苷的最大数量。

[0319] 因此,根据本发明的缀合物包含至少一个皂苷。本文中的“至少一个”是指缀合物包含一个皂苷分子,但也可以包含一些(例如两个、三个或四个)皂苷或多个(例如10、20或100个)皂苷。取决于应用,所述缀合物可以包含具有共价结合的皂苷的共价结合支架(共价皂苷缀合物),其中所述支架可以被设计成包含限定数量的皂苷。优选地,根据本发明的缀合物包含限定数目或范围的皂苷,而不是随机数目。这对于与上市许可相关的药物开发尤其有利。在这方面定义的数量意味着缀合物优选包含先前定义数量的皂苷。例如,这是通过

设计包含聚合结构的支架来实现的,该聚合结构具有一定数量的可能用于一个或多个皂苷附着的部分。在理想情况下,所有这些部分都与皂苷偶联,并且支架包含预先定义数量的皂苷。设想提供一套标准支架,包括例如二、四、八、十六、三十二、六十四等皂苷,以便用户可以根据他的需要容易地测试最佳数量。实施例是本发明的缀合物,其包含本发明的支架(本发明的共价皂苷缀合物),其中皂苷以限定的范围存在,例如,在非理想情况下,并非聚合结构中存在的所有部分都结合皂苷。例如,这样的范围可以是每个支架2-4个皂苷分子、每个支架3-6个皂苷分子、每个支架4-8个皂苷分子、每个支架6-8个皂苷分子、每个支架6-12个皂苷分子等等。在这种情况下,如果范围被定义为2-4,则包含根据本发明的支架的缀合物因此包含2、3或4个皂苷。

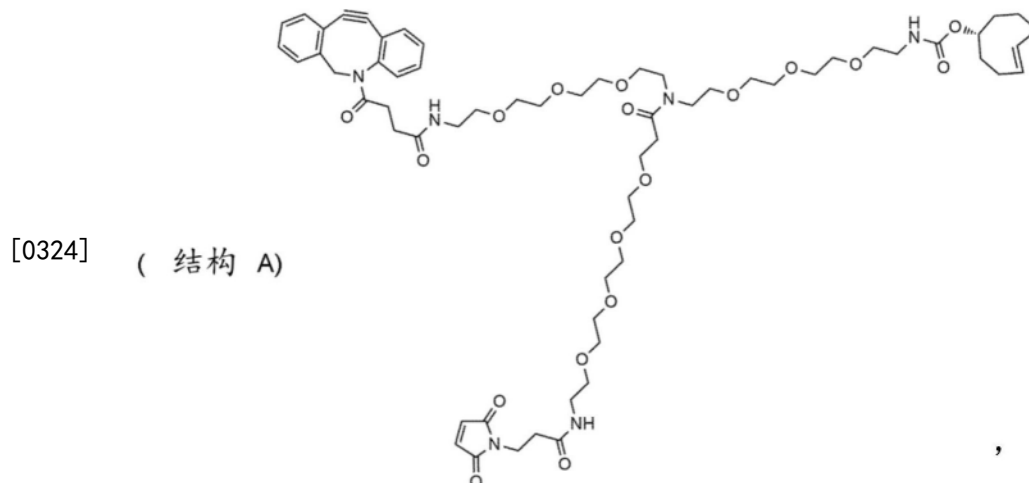
[0320] 支架基本上独立于共价结合到支架的皂苷的类型,支架随后(按顺序)共价偶联到缀合物。因此,包含支架的本发明的缀合物(本发明的共价皂苷缀合物)是平台技术的基础产品。由于至少一个共价结合皂苷介导与本发明缀合物所包含的细胞表面分子靶向性sdAb的结合的效应子部分的细胞内递送,根据本发明的支架技术是通过皂苷介导受控的细胞内效应子部分递送的系统。该支架提供了一个优化的功能活性单元,可以在sdAb中的单个确定位置连接到由缀合物包含的一个或多个皂苷和细胞表面分子靶向性sdAb。

[0321] 实施例是包含根据本发明的支架的本发明的缀合物(本发明的共价皂苷缀合物),其中聚合结构或寡聚结构的单体数量是精确定义的数量或范围。优选地,聚合或寡聚结构包括结构例如聚(胺),例如聚乙烯亚胺和聚(酰胺基胺),或结构例如聚乙二醇、聚(酯),例如聚(丙交酯)、聚(内酰胺)、聚丙交酯-共-乙交酯共聚物、聚(糊精),或肽或蛋白质,或结构例如天然和/或人工聚氨基酸,例如聚赖氨酸、DNA聚合物、稳定的RNA聚合物或PNA(肽核酸)聚合物,其表现为线性、支化或环状聚合物、寡聚物、树枝状聚合物、树状突、树状突化聚合物、树状突化寡聚物或这些结构的纯的或者是混合的组装体。优选地,聚合结构或寡聚结构是生物相容的,其中生物相容性是指所述聚合结构或寡聚结构在生物体中不表现出显著的急性或慢性毒性,并且可以按原样排泄或通过机体代谢完全降解为可排泄的和/或生理性的化合物。可以通过共价交联或非共价键和/或吸引来构建组件。因此,它们也可以形成纳米凝胶、微凝胶或水凝胶,或者它们可以附着在载体上,例如无机纳米颗粒、胶体、脂质体、胶束或包含胆固醇和/或磷脂的颗粒状结构。所述聚合结构或寡聚结构优选带有精确限定数目或范围的偶联部分(化学基团),用于糖苷分子(和/或效应分子和/或载体分子,例如配体、单克隆抗体或其片段,例如sdAb)的偶联。聚合结构或寡聚结构中精确定义数量或范围的偶联部分(化学基团)中优选至少50%,更优选至少75%,更优选至少85%,更优选至少90%,更优选至少95%,更优选至少98%,更优选至少99%,最优选(约)100%被根据本发明的支架(本发明的共价皂苷缀合物)中的苷分子(本发明皂苷)占据。

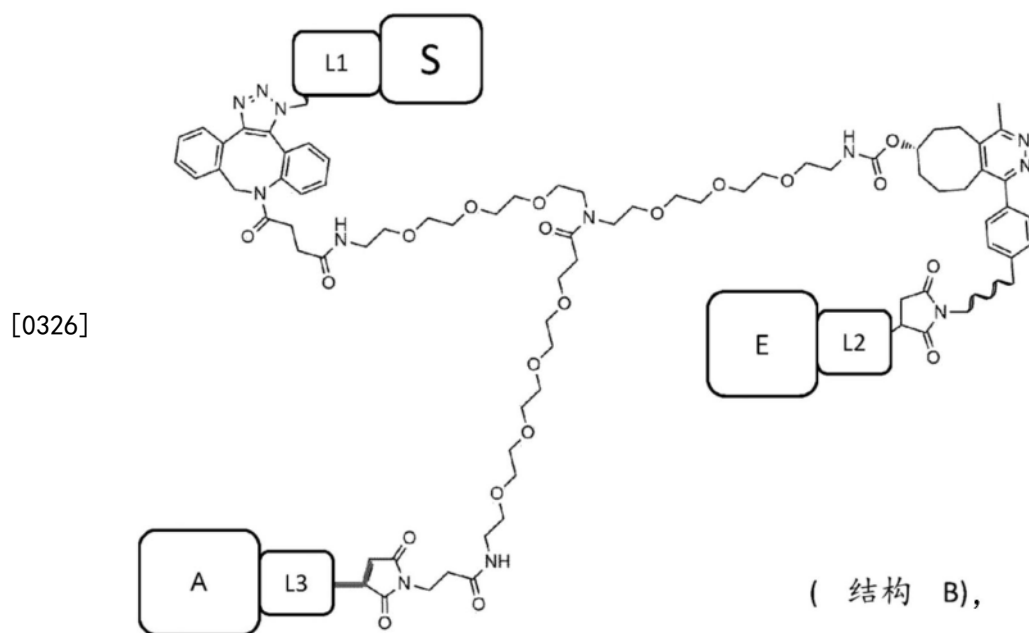
[0322] 优选地,树状突是一种分支的、明确定义的树状聚合物,在树的起点有单一的化学可寻址基团,称为焦点。树枝状聚合物是两个或多个树状突在其焦点处的连接。树状突化聚合物是一个或多个树状突的焦点与聚合物的连接。在优选的实施例中,提供了根据本发明的支架,其中聚合或寡聚结构包括线性、支化或环状聚合物、寡聚物、树枝状聚合物、树状突、树状突化聚合物、树状突化寡聚物或这些结构的纯的或者是混合的组装体,其中组装体可以通过共价交联或非共价吸引来构建,并且可以形成纳米凝胶、微凝胶或水凝胶,并且其中优选地,聚合物是聚(胺)的衍生物,例如聚乙烯亚胺和聚(酰胺基胺),以及结构例如聚乙

二醇、聚(酯),例如聚(乳酸)、聚(内酰胺)、聚丙交酯-共-乙交酯共聚物和聚(糊精),以及结构例如天然和/或人工聚氨基酸,例如聚赖氨酸,或肽或蛋白质或DNA聚合物,稳定的RNA聚合物或PNA(肽核酸)聚合物。优选地,聚合结构或寡聚结构是生物相容的。

[0323] 实施例是本发明的缀合物,其中该至少一个皂苷通过三官能接头与该至少一个sdAb中的至少一个,优选一个共价结合并与该至少一个效应分子中的至少一个,优选一个共价结合,该三官能接头优选是由结构A表示的三官能接头:



[0325] 缀合物优选包含结构A的三官能接头并具有由结构B表示的分子结构:



[0327] 其中S是根据本发明的至少一个皂苷或共价皂苷缀合物,E是至少一个,优选一个效应分子,A是至少一个sdAb如单个sdAb,L1、L2和L3各自分别独立地是三官能接头和皂苷或共价皂苷缀合物之间的键、效应分子与sdAb,或L1、L2和L3是接头,其中L1、L2和L3相同或不同。

[0328] 除非另有特别说明,特别是当涉及本发明皂苷的内体逃逸机制时,每当本文使用术语“内体”或“内体逃逸”时,其还包括内溶酶体和溶酶体,以及分别从内溶酶体和溶酶体逃逸。进入胞质溶胶后,所述物质可能会移动到其他细胞单位,例如细胞核。

[0329] 在形式上,糖苷是任何分子,其中糖基团通过其异头碳通过糖苷键与另一个基团

结合。糖苷分子,例如皂苷,在本发明的上下文中是这样的分子,其能够进一步增强效应子部分的作用,不希望受任何理论的束缚,特别是通过促进效应子部分的内体逃逸。不希望受任何理论的束缚,糖苷分子(本发明的皂苷,例如本文和权利要求中举例说明的那些)与内吞和再循环途径的隔室和囊泡的膜相互作用并使得它们对于所述效应子部分是渗漏的,从而导致增强的内体逃逸。术语“支架能够增加效应子部分的内体逃逸”是指至少一个皂苷(糖苷分子)(其通过接头或直接与细胞表面分子靶向性抗体如sdAb偶联,或通过支架的聚合或寡聚结构(本发明的共价皂苷缀合物)偶联),当两种分子都在内体如晚期内体中时能够增加效应子部分的内体逃逸,任选地且优选地,这是在至少一个皂苷从缀合物中释放之后,例如从所述缀合物包含的接头或聚合或寡聚结构中释放,例如通过至少一个糖苷(皂苷)和缀合物之间(例如通过支架的聚合或寡聚结构和/或通过接头)的可切割键的切割。即使根据本发明的至少一个皂苷与本发明缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb之间的键,任选地通过接头或支架,可以是“稳定键”,但这并不意味着这种键不能在内体中被例如酶切割。例如,皂苷任选地与接头或支架的寡聚结构或聚合结构的一部分一起,可以从剩余的接头片段或寡聚结构或聚合结构中切下。例如,蛋白酶可以切割(肽)接头或肽聚合结构,例如白蛋白,从而释放至少一个皂苷。然而,优选糖苷分子(优选皂苷)以活性形式释放,优选以其在任选地通过接头和/或寡聚或聚合支架(本发明的共价皂苷缀合物)与本发明缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb偶联(被制备成偶联)之前所具有的原始形式释放;因此,糖苷(皂苷)在这种切割后具有其天然结构,或者糖苷(皂苷)在这种切割后具有与其结合的化学基团(的部分)或接头,而糖苷生物活性(皂苷生物活性),例如对存在于同一内体或溶酶体中的效应子部分的内体/溶酶体逃逸增强活性,在糖苷(皂苷)和细胞表面分子靶向性抗体如sdAb(任选地包含本发明的接头和/或支架)之间的键的切割后被维持或恢复。关于本发明,关于例如皂苷和缀合物中的细胞表面分子靶向性sdAb的氨基酸残基、接头、聚合结构或寡聚结构(支架的,也称为本发明的共价皂苷缀合物)、配体、(单克隆)免疫球蛋白或其结合结构域或片段和/或效应子(效应子部分、效应分子)之间的键,术语“稳定”是指该键不容易断裂或至少不设计成容易被例如pH差异、盐浓度或UV光、还原条件断裂。关于本发明,关于例如皂苷和共价皂苷缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb、接头、氨基酸残基、聚合或寡聚结构、配体、抗体和/或效应子之间的键的术语“可切割的”是指该键被设计成在还原条件下容易被例如pH差异、盐浓度等断裂。本领域技术人员熟知此类可切割键以及如何制备它们。

[0330] 在本发明之前,将ADC和AOC引入市场的主要障碍之一是治疗窗小:治疗有效剂量的ADC或AOC伴随着(不可接受的)副作用,阻碍了ADC患者治疗的发展和作用。通过应用本发明的缀合物,例如ADC-皂苷缀合物和AOC-皂苷缀合物,现在已经可以将一个或多个糖苷分子(一个或多个皂苷)引导至(靶)细胞,连同携带载荷的ADC或连同与寡核苷酸例如根据本发明的BNA缀合的(单克隆)抗体(sdAb)。特别是,以前不可能将ADC或AOC的效应子部分或载荷与(肽的)细胞表面分子靶向性分子的任何其他缀合物,以及每个效应子部分的(预定的、可控的)特定数目或范围的糖苷分子(皂苷)同时特异性地引导到细胞的胞质溶胶,例如通过细胞的内吞途径。

[0331] 本发明提供的溶液包含至少一个皂苷与本发明缀合物的细胞表面分子靶向性分子即sdAb的共价结合。本发明提供的另一种解决方案包括(首先)使用寡聚或聚合支架聚合糖苷分子(皂苷),并为本发明的缀合物包含的细胞表面分子靶向性分子提供共价结合的皂

苷簇,使一个或多个皂苷能够在需要皂苷作用方式的细胞内位点重新单体化,例如胞吞作用后。本文中的“聚合”是指皂苷分子通过接头或直接或通过聚合或寡聚结构与sdAb可逆和/或不可逆的多重缀合以形成支架(本发明的共价皂苷缀合物),或(经修饰的)皂苷的可逆和/或不可逆的多重缀合以形成聚合或寡聚结构以形成支架(本发明的共价皂苷缀合物)。本文中的“再单聚化”是指例如在内吞后,从缀合物、从将一个或多个皂苷连接到缀合物的细胞表面分子靶向性sdAb的接头或从支架切割皂苷,并恢复未结合皂苷的(天然)化学状态,该未结合的皂苷可以包含或不包含另外的化学基团,例如用于将皂苷连接到接头、缀合物的氨基酸残基或支架上的化学基团,和/或连接到皂苷的化学基团如醛基团或羧酸基团上的(化学)接头。由于皂苷的复杂化学性质,例如皂苷在支架或其他连接接头处的聚合及其在所期望位置(如细胞内,如内吞后)的再单聚化是一项具有挑战性的任务。特别地,用于提供接头和包含共价连接的糖苷以与缀合物共价结合的支架(例如三萜皂苷(糖苷的聚合))的化学反应通常发生在不含水的有机溶剂中,但是皂苷和例如用作用于承载结合的皂苷的支架的生物相容性聚合物是水溶性分子。未经修饰的皂苷的化学性质进一步阻止了其自身的聚合,并且,另一种可能的解决方案是将多个皂苷(直接)结合到效应分子上,这被估计为不是非常有前景,因为效应分子(药物、毒素、多肽或多核苷酸)通常不提供足够的结合位点并且因为偶联产物将变得非常不均匀和/或将生物活性分子如皂苷和例如肽、毒素、核酸偶联在一起具有影响和阻碍在这种含皂苷缀合物中结合在一起的一个或甚至两个分子的活性的风险。此外,当皂苷与例如ADC或抗体-寡核苷酸缀合物(AOC)偶联时,存在本发明缀合物所包含的效应子部分丧失其功能的相当大的风险。本发明的实施例解决了这些缺点中的至少一个。

[0332] 本发明的第二个方面涉及药物组合物,其包含本发明的缀合物,以及任选的药学上可接受的赋形剂和/或药学上可接受的稀释剂。

[0333] 包含皂苷的本发明缀合物,无论是否进一步包含一个或多个(可切割的)接头和/或任选的支架(本发明的共价皂苷缀合物),是否能够扰乱酸性环境并抑制至少一个糖苷(皂苷)的内体逃逸功能,可以用如实例部分所述的和本领域已知的测定法容易地确定。这种抑制被描述为“诱导50%细胞杀伤所必需的糖苷(本发明的皂苷)的倍数量增加”。优选支架不会导致增加,至少是当使用氯喹作为阳性对照时观察到的获得50%细胞杀伤所必需的糖苷分子(皂苷)的增加。可替代地,并且优选地,包含皂苷的缀合物,无论是否进一步包含一个或多个(可切割的)接头和/或任选的支架,都不会导致糖苷分子增加至少4倍以诱导50%的细胞杀伤,更优选不会导致增加至少2倍。倍数增加将在测定中测量,其中氯喹作为阳性对照,诱导糖苷量,优选皂苷量增加2倍,其中皂苷是本发明的任何一个或多个皂苷(前面的实施例),以观察50%的细胞杀伤。

[0334] 如前所述,本发明的缀合物所包含的至少一个皂苷增加了本发明中定义的至少当前和新的效应子部分的功效。由于缀合物所含效应子部分的给药剂量降低,潜在副作用将减少,而功效不降低。因此,本发明提供了根据本发明的缀合物,用于药物中或用作药物。本发明的第三个方面涉及本发明的药物组合物,用作药物。

[0335] 可以为本发明的缀合物所包含的内体逃逸增强剂,即本发明的皂苷配制许多优选的特征:(1)它们优选无毒且不引起免疫反应,(2)它们优选不介导效应子部分被细胞质摄取到非靶细胞中,(3)它们在作用位点的存在优选与效应子部分的存在同步,(4)它们优选

是可生物降解的或可排泄的,和(5)它们优选基本上不干扰与效应子、分子的生物活性无关的生物体的生物过程,所述效应分子与内体逃逸增强剂组合,例如与激素相互作用。至少在某种程度上满足上述标准的本发明皂苷的实例是双糖链三萜,优选双糖链三萜皂苷,例如S01861、SA1641、QS-21、GE1741,以及在整个说明书中列出的其他皂苷。

[0336] 还提供了根据本发明的缀合物用于制造药物的用途。尤其是抗癌药物,尤其是经典的化疗药物,因其副作用而坏名声。由于缀合物所包含的药物活性物质和同一缀合物分子所包含的皂苷在时间和位置上的靶向性和同步性,根据本发明的治疗性缀合物特别有价值地用作药物,特别是用于治疗癌症的方法中。因此,本发明提供了根据本发明的治疗性缀合物用于治疗癌症的方法。本发明还提供根据本发明的治疗性缀合物用于治疗获得性或遗传性障碍,特别是单基因缺陷障碍的方法。因此,治疗性缀合物包含至少一个皂苷和至少一个效应子部分,以及用于将缀合物靶向异常靶细胞如肿瘤细胞或自身免疫细胞的sdAb。因此,本发明的一个方面涉及根据本发明的治疗性缀合物,其中该缀合物包含共价结合的效应子部分并包含共价结合的皂苷和细胞表面分子结合性抗体如sdAb,用于治疗癌症或自身免疫疾病的方法中。

[0337] 本发明的缀合物在医学中的进一步应用是替代靶细胞中的胞内酶,该靶细胞产生的这些酶的量不足或功能不足。由此产生的疾病可能是遗传性的或获得性的。在大多数情况下,只能对症治疗,而对于一些罕见疾病,治疗选择不足会导致相关患者的寿命缩短。这种疾病的实例是苯丙酮尿症,它是一种先天性代谢错误,会导致氨基酸苯丙氨酸的代谢减少。该疾病的特征是肝酶苯丙氨酸羟化酶基因发生突变。迄今为止,苯丙酮尿症无法治愈。发病率约为1:10,000,土耳其的已知发病率最高,为1:2,600。由本发明的缀合物包含的细胞表面分子靶向性抗体,优选sdAb例如V_{III},具有结合的苯丙氨酸羟化酶或具有结合的编码苯丙氨酸羟化酶的多核苷酸,可用于通过使用合适的特异性抗体或sdAb靶向肝细胞,并替代肝细胞中的缺陷酶。这是使用本发明的治疗性缀合物的实例,其包含与其结合的皂苷和根据本发明的与其结合的酶或寡核苷酸,用于替代或基因疗法。在优选的实施例中,提供了用于基因疗法或替代疗法的方法中的根据本发明的治疗性缀合物。

[0338] 使用本发明的缀合物,现在已经可以设计和制造一种单组分、非病毒临床适用的基因递送技术。例如,本发明的缀合物允许开发基于非病毒的基因递送技术,其以较低的治疗剂量增强治疗功效,从而改善患者的健康。本发明的缀合物,特别是当包含共价结合的细胞表面分子靶向性抗体如单克隆抗体或sdAb以结合(肿瘤,自身免疫)细胞表面特异性分子时,以及当结合效应子部分如寡核苷酸如BNA时,允许克服基因递送领域中的长期和主要的瓶颈,即基因治疗产品穿过内体膜有效、安全和成本有效地转移到胞质溶胶/核溶胶中。事实上,基因疗法是未来广泛疾病高级疗法中最有希望的治疗选择之一。成功的基因递送需要识别靶细胞以及基因的细胞溶质和核溶质摄取。非病毒基因疗法领域的主要问题之一是用于患者治疗用途的遗传物质递送效率低下且不够安全。

[0339] 因此,当应用本发明的缀合物时,其包含细胞靶向性细胞表面分子靶向性分子如配体或优选抗体(其片段、结构域,优选sdAb)并包含寡核苷酸如反义BNA,发明人现在使得克服基因递送领域中的长期和主要瓶颈成为可能:基因治疗产品通过内体膜安全转移到胞质溶胶/核溶胶中。本发明的缀合物代表设计用于允许用所有已知的遗传试剂靶向任何可寻址细胞类型的技术,从而确保不局限于遗传性障碍的更好的患者疗法,而且对于癌症疗

法也是如此,因此对于大的患者群体是重要的。基于本发明的缀合物的技术可以包括聚合支架或寡聚支架(本发明的共价皂苷缀合物),其用作内体逃逸增强剂(EEE)(例如本文示例的皂苷以及根据本发明的实施例的皂苷)的载体,用于细胞表面分子靶向性分子例如靶向配体或(单克隆)(肿瘤细胞特异性)抗体或其片段,或优选sdAb例如V_{HH},以及用于效应子部分,这里是效应子基因,例如LNA或BNA。本发明缀合物(例如包含细胞靶向性抗体(片段)或sdAb和寡核苷酸(如BNA))的用途具有将任何种类的生物大分子带入细胞质和细胞核的潜力。全球众多研究小组和公司正在不断研究开发新的靶向配体、sdAb和单克隆(人、人源化)抗体。对于旨在递送到疾病细胞(例如癌细胞)的胞质溶胶中的寡核苷酸也是如此。因此,本发明的缀合物还呈现为分子界面,其中当前和未来的靶向性sdAb和抗体以及当前和未来的治疗性寡核苷酸(以及载荷,例如蛋白毒素)通过点击化学连接或可以连接到例如本发明的寡聚或聚合支架模块(本发明的共价皂苷缀合物),允许定制的药物应用和组织/细胞靶向技术领域的未来开发。本发明的缀合物可包含抗体和配体作为细胞表面分子靶向性分子,但优选sdAb。全球基因治疗剂市场正在迅速增长,涵盖了癌症、心血管疾病、帕金森病、阿尔茨海默病、HIV和许多罕见(单基因)疾病等广泛疾病领域的潜在治疗。目前基于病毒载体的基因治疗技术面临着重大挑战,例如安全性、生产物流和相关高成本。本发明的缀合物允许在代表当前病毒基因递送技术的替代方案的技术平台中使用。因此,本发明的缀合物适用于在开发用于疾病如癌症、心血管疾病、帕金森病、阿尔茨海默病、HIV感染和许多罕见(单基因)疾病的非病毒基因治疗的方法中实施。本发明的缀合物适于开发用于通过制备基于非病毒载体的基因治疗剂(例如基于靶向反义BNA的基因治疗剂)来转化抗体-药物缀合物(ADC)和基于寡核苷酸的治疗剂领域的新治疗。本发明的缀合物的应用,特别是在与抗体如sdAb和寡核苷酸如BNA和至少一个皂苷的共价缀合物中的应用,是由于本发明而成为可能的许多有益方法之一。例如,使用本发明的缀合物现在允许开发哺乳动物细胞的内吞途径。利用胞吞作用来递送治疗剂,其中本发明的缀合物有助于改善缀合物所包含的例如siRNA的摄取和内体逃逸。本发明的缀合物适合与小分子一起使用,所述小分子充当例如载荷、寡核苷酸的递送增强剂。因此,本发明的缀合物(其带有共价偶联的寡核苷酸如BNA,带有共价偶联的细胞靶向部分如配体,优选抗体(结构域或片段,优选V_{HH})并带有本发明的皂苷)为目前的核内体逃逸增强剂和基因治疗产品所面临的问题提供了解决方案,这些问题涉及它们作为两种组分的应用,从而使治疗批准和临床应用复杂化,因为本发明的这种缀合物是包含皂苷、基因产物如BNA和(肿瘤)细胞靶向部分如(单克隆)抗体或sdAb的单缀合物治疗性分子。因此,本发明提供了一种非病毒基因递送技术,其中内体逃逸增强剂(例如本发明实施例和所提供的实例的糖苷)、基因治疗产物(根据本发明的寡核苷酸,例如BNA)和靶向配体或抗体(例如根据本发明的实施例和下面在实例部分中举例说明的sdAb)都由本发明的缀合物包含。因此,本发明的这种缀合物为当前和未来的大分子药物提供了用于广泛疾病和大患者群体的治疗机会。通过应用包含至少一个皂苷、至少一个寡核苷酸和至少一个特异性细胞靶向部分如免疫球蛋白或sdAb的本发明的这种缀合物,解决了对于分别应用内体逃逸增强剂和基因治疗产物的当前方法显而易见的问题,所述当前方法不能确保两种化合物同时位于相互作用位点。这个问题现在通过使用本发明的缀合物得以克服。也就是说,本发明的这种缀合物提供了两种化合物(即皂苷和基因产物如BNA)同步性(在时间和位置上)增强的非病毒基因递送技术。

[0340] 基因疗法可以帮助治疗以前无法治愈的遗传性疾病,例如囊性纤维化、舞蹈病、亨廷顿舞蹈病或血友病。但是,目前还有一些问题没有解决:例如,治疗性基因必须精确到达体内的特定靶细胞。另一方面,治疗性基因应该被靶细胞吸收,但治疗性基因不应该被破坏。目前的基因治疗方法使用病毒作为基因的载剂。然而,这些程序涉及相当大的风险,并且不能转移到其他生物分子的引入。实施例是本发明的包含(植物衍生的)糖苷(例如本发明的任何一种皂苷)的缀合物,其使用平台技术,该技术不仅允许当作为载剂分子的缀合物包含基因时递送基因,还允许递送待引入靶细胞的不同治疗性生物分子。因此,本发明的缀合物用于开发基于核酸的针对囊性纤维化、舞蹈病、亨廷顿舞蹈病或血友病的治疗。因此,利用本发明的缀合物,新的基因疗法策略可用于改善患有遗传疾病的患者的健康,包括患有囊性纤维化、亨廷顿舞蹈病和血友病的那些患者。作为本发明的一部分,开发了一种非病毒基因递送技术,其组合了植物衍生的核内体逃逸增强剂(糖苷;即本发明的皂苷)、基因治疗产品和靶向配体(即sdAb),它们都包含在单一缀合物中。所得的基于本发明缀合物的非病毒基因疗法在较低剂量下显示出比目前可获得的策略高约40倍的递送效率。因此,本发明的缀合物用于临床应用,例如用于修复或替换有缺陷的基因,如在囊性纤维化患者中,以及用于靶向递送特定基因,例如用于破坏癌细胞。事实上,本发明的缀合物适用于由遗传缺陷引起的任何疾病的治疗方案,例如囊性纤维化、亨廷顿舞蹈病和血友病,这些疾病目前是不可治愈的。利用本发明缀合物的基因疗法有助于克服两个当前的问题:首先,使用本发明的缀合物可以将治疗性基因递送至体内特定的靶细胞;第二,治疗性基因进入这些细胞的内部,但不被破坏,这是由于存在一个或多个皂苷、寡核苷酸产物和用于结合靶细胞的靶向部分,如抗体或sdAb,所有这些在本发明的缀合物中共价连接在一起,例如通过使用本发明的寡聚或多聚支架(本发明的共价皂苷缀合物)。

[0341] 本发明还提供了一种治疗癌症的方法,该方法包括将包含根据本发明的治疗缀合物的药物施用给有需要的患者,优选将有效剂量的所述药物施用给有需要的患者,优选人癌症患者。

[0342] 关于适合施用形式的考虑是本领域已知的,并且包括毒性作用、溶解度、施用途径和维持活性。例如,注射到血流中的药物组合物应该是可溶的。

[0343] 合适的剂型部分取决于用途或进入途径,例如透皮或通过注射。无论靶细胞是否存在于多细胞宿主中,这种剂型都应允许化合物到达靶细胞。其他因素在本领域是已知的,包括诸如毒性和剂型之类的因素,这些因素阻碍了化合物或组合物发挥其作用。

[0344] 本发明的第四个方面涉及本发明的药物组合物,用于治疗或预防以下中的任何一种或多种:癌症、自身免疫疾病如类风湿性关节炎、酶缺乏、与酶缺乏相关的疾病、基因缺陷、与基因缺陷相关的疾病、感染如病毒感染、高胆固醇血症、原发性高草酸尿症、血友病A、血友病B、 α -1抗胰蛋白酶相关的肝病、急性肝卟啉病、淀粉样变性和甲状腺素转运蛋白介导的淀粉样变性。

[0345] 出人意料的是,发明人发现,当ADC在与肿瘤细胞靶向性抗体或 V_{HH} 偶联的皂苷存在下与肿瘤细胞接触时,不导致任何肿瘤细胞杀伤的ADC剂量足以有效杀伤肿瘤细胞。图2-7中提供了实例。例如,当与肿瘤细胞接触时,一定剂量的ADC如ADC抗CD71 V_{HH} -毒素、抗HER2 V_{HH} -毒素或抗EGFR V_{HH} -毒素不会对肿瘤细胞产生毒性作用。典型的毒素是蛋白毒素,例如香石竹毒蛋白和/或皂草毒蛋白。然而,当这种ADC与包含皂苷的缀合物一起共同施用,可

实现有效的肿瘤细胞杀伤。包含皂苷的缀合物例如是抗HER2 V_{HH} -S01861、抗CD71 V_{HH} -S01861、抗EGFR V_{HH} -S01861、西妥昔单抗-S01861、曲妥珠单抗-S01861。ADC例如是包含能够与HER2、CD71或EGFR结合的 V_{HH} 的ADC,并且例如,ADC包含蛋白毒素,例如香石竹毒蛋白或皂草毒蛋白。通过施用包含皂苷和肿瘤细胞靶向性抗体或 V_{HH} 的缀合物,当包含皂苷的缀合物与ADC(即ADC或AOC)共同施用至靶细胞时,与ADC和游离皂苷一起共同施用至靶细胞时所需的游离皂苷剂量相比,在靶细胞内实现ADC(即ADC或AOC)所包含的效应分子的有效生物活性所需的皂苷剂量低约100至1000倍。因此,包含皂苷的缀合物在ADC或AOC的剂量下增强ADC,即包含sdAb的ADC或AOC,否则当在没有靶向皂苷的情况下将所述缀合物施用给有需要的患者时,该剂量在肿瘤细胞中不会有效,此外,当考虑ADC或AOC的效应分子的增强时,包含皂苷的缀合物在相对低的剂量下(即在未提供肿瘤细胞靶向结合性分子如sdAb的游离皂苷不足以有效增强效应分子的剂量下)已经足够有效。组合起来,发明人提供了一种用于治疗需要用治疗有效量的包含肿瘤细胞靶向性sdAb的ADC或AOC进行治疗的人患者的改善方法,因为当在包含肿瘤细胞靶向性抗体或 V_{HH} 并包含皂苷的缀合物存在下共同施用给患者时,ADC或AOC在较低剂量下就已经有效。这种组合的许多益处之一在于ADC的sdAb部分中没有Fc尾,优选地在包含皂苷的缀合物中也没有Fc尾。Fc尾的不存在防止了缀合物与带有Fc受体的非靶患者细胞的不需要的结合,否则如果存在这种Fc尾,这种结合会导致副作用,如在许多常规ADC、AOC中所见。基于抗体的包含Fc尾的ADC和AOC由于这种基于IgG的ADC、AOC与Fc受体的不期望的结合而遭受功效降低。作为Fc受体结合的结果,这种基于IgG的ADC和AOC的有效剂量降低。因此,Fc尾的不存在在这方面提供了几个益处。本发明的ADC、AOC和改善的ADC和改善的AOC(即本发明的缀合物)与Fc受体的脱靶和不期望的结合不会发生。因此,当考虑靶受体介导的ADC、AOC和本发明的缀合物在内体中的胞吞和递送时,本发明的ADC、AOC和缀合物具有较低的有效剂量,因为没有缀合物由于Fc受体结合而“丢失”,这种丢失是基于IgG的缀合物情况下所见的缺点。结果,ADC、AOC和本发明的缀合物(其全部包含细胞靶向性sdAb而不是包含Fc的抗体)的治疗窗比当sdAb被包含Fc尾的常规IgG替代时所达到的治疗窗更宽。类似地,作为结果,包含皂苷的缀合物的治疗窗宽于当肿瘤细胞靶向性sdAb和皂苷的这种缀合物中的sdAb被用于结合靶细胞上的细胞表面分子的结合分子(例如包含Fc尾的常规IgG)替代时所达到的治疗窗。

[0346] 实施例是用于本发明的药物组合物,其中根据本发明,皂苷是S01861、S01861衍生物、QS-21或QS-21衍生物,优选S01861衍生物或QS-21衍生物,更优选S01861衍生物。

[0347] 实施例是用于本发明的药物组合物,其中:

[0348] -所述用途用于治疗或预防人受试者的癌症;和/或

[0349] -所述用途用于治疗或预防有需要的患者的癌症,其中至少一个sdAb结合细胞的细胞表面分子,优选结合细胞的肿瘤细胞表面分子,更优选结合细胞的肿瘤细胞特异性表面分子;和/或

[0350] -将药物组合物,优选治疗有效量的药物组合物,施用给有需要的患者,优选人患者。

[0351] 本发明的第五个方面涉及一种体外或离体方法,用于将本发明的效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内,优选转移到所述细胞的胞质溶胶,该方法包括以下步骤:

[0352] a) 提供一种细胞,该细胞在其细胞表面表达本发明的缀合物所包含的至少一个

sdAb的结合位点,所述结合位点优选存在于细胞的细胞表面分子上,所述细胞优选选自肝细胞、异常细胞如病毒感染的细胞、自身免疫细胞、包含基因缺陷的细胞、包含酶缺乏的细胞和肿瘤细胞;

[0353] b) 提供本发明的缀合物,所述缀合物包含待转移到步骤a) 中提供的细胞内的效应分子;以及

[0354] c) 使步骤a) 的细胞体外或离体与步骤b) 的缀合物接触,

[0355] 从而实现包含该效应分子的所述缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内,并且通过实现所述缀合物的转移实现该效应分子从细胞的外部转移到所述细胞内,优选转移到所述细胞的胞质溶胶内。

[0356] 本发明的第六方面涉及一种用于将本发明的缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内的体外或离体方法,该方法包括以下步骤:

[0357] a) 提供一种细胞,该细胞在其细胞表面表达本发明的缀合物所包含的至少一个sdAb的结合位点,所述结合位点优选存在于细胞的细胞表面分子上,所述细胞优选选自肝细胞、异常细胞如病毒感染的细胞、自身免疫细胞、包含基因缺陷的细胞、包含酶缺乏的细胞和肿瘤细胞;

[0358] b) 提供本发明的缀合物;以及

[0359] c) 使步骤a) 的细胞体外或离体与步骤b) 的缀合物接触,从而实现该缀合物从细胞的外部转移到所述细胞内。

[0360]

表 A1. 显示（晚期）内体/溶酶体逃逸增强活性的皂苷，以及包含与显示（晚期）内体/溶酶体逃逸增强活性的此类皂苷相似的结构皂苷			
皂苷名称	苷元核心	C-3 β -OH 基团上的碳水化合物取代基	C-28-OH 基团上的碳水化合物取代基
NP-00523 6	2 α -羟基 齐墩果 酸	GlcA-	Glc/Gal-
AMA-1	16 α -羟基 齐墩果 酸	Glc-	Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-Rha-
AMR	16 α -羟基 齐墩果 酸	Glc-	Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[Ara-(1 $\rightarrow$ 3)-Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)]-Rha-
α -常春藤 皂苷	常春藤 皂苷元 (23-羟基 齐墩果 酸)	Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-Ara-	-
NP-01267 2	16 α ,23- 二羟基 齐墩果 酸	Ara/Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha/Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)-Glc /Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-Rha/Fuc-(1 $\rightarrow$ 2)-GlcA-	Ara/Xyl-
NP-01777 7	丝石竹 皂苷元	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-($\rightarrow$ 4)]-Fuc- (R = 4E-甲氧基肉桂酸)
NP-01777 8	丝石竹 皂苷元	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-[R-($\rightarrow$ 4)]-Fuc- (R = 4Z-甲氧基肉桂酸)
NP-01777 4	丝石竹 皂苷元	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Gal-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-4-O Ac-Fuc-
NP-01811	丝石竹	Gal-(1 $\rightarrow$ 2)-[Xyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-GlcA-	Xyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[Glc-(1 $\rightarrow$ 3)]-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4-

[0361]

0 ^c , NP-01777 2 ^d	皂苷元		二-OAc-Fuc-
NP-01810 9	丝石竹 皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-3-OAc-Fuc- (R = 4E- 甲氧基肉桂 酸)
NP-01788 8	丝石竹 皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-
NP-01788 9	丝石竹 皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc -Fuc-
NP-01810 8	丝石竹 皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[4-OAc-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-
SA1641 ^a , AE X55 ^b	丝石竹 皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
NP-01767 4	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-01781 0	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
AG1	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-
NP-00388 1	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal- (1→2)]-Fuc-
NP-01767 6	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲 基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
NP-01767 7	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→ 4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲 基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
NP-01770 6	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-01770 5	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-
NP-01777 3	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2) -[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-

[0362]

NP-01777 5	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc--Rha-(1→3)]-Fuc-
SA1657	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
AG2	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1861	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
GE1741	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-二-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
SO1542	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1584	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1658	丝石竹 皂苷元	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1674	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-
SO1832	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-
QS-7 (也称为 QS1861)	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
QS-7 api (也称为 QS1862)	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-
QS-17	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
QS-18	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
QS-21	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→

[0363]

A-apio			4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
QS-21 A-xylo	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
QS-21 B-apio	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
QS-21 B-xylo	皂皮酸	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→3)]-Fuc- (R = 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-二羟基-6-甲基-辛酰基]-3,5-二羟基-6-甲基-辛酸)
β-七叶皂 苷(描述: 七叶皂苷 Ia)	原七叶 皂苷元 -21(2-甲 基丁-2- 烯酸 酯)-22- 乙酸酯	Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-	-
油茶籽皂 苷 I	23-氧代- 玉蕊皂 苷元 C -21,22- 双(2-甲 基丁-2- 烯酸酯)	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)] -GlcA-	-
油茶籽皂 苷 J	23-氧代- 玉蕊皂 苷元 C -21,22- 双(2-甲	Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)] -GlcA-	-

[0364]

	基丁-2-烯酸酯)		
阿萨姆皂苷 (Assamsonin) F	23-氧代-玉蕊皂苷元 C-21(2-甲基丁-2-烯酸酯)-16,22-二乙酸酯	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-
洋地黄皂苷	洋地黄皂苷配基	Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-	-
报春花酸 (Primulic acid) 1	3,16,28-三羟基齐墩果-12-烯	Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-	-
AS64R	丝石竹酸	-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
		C-23-OH 基团上的碳水化合物取代基	
AS6.2	丝石竹酸	Gal-	Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal-
a, b: 不同的名称指的是相同结构的不同分离物 c, d: 不同的名称指的是相同结构的不同分离物			

[0365] 本发明的一个方面涉及一种试剂盒,其包括含有根据本发明的内体逃逸增强缀合物的容器,该试剂盒还包括该缀合物的使用说明。

[0366] 本发明的一个方面涉及以下中的任何:具有至少一个共价连接的皂苷的ADC和具有至少一个共价连接的皂苷的AOC,以及它们的半成品缀合物,包含本发明的细胞表面分子靶向性分子(即sdAb),并且包含至少一个本发明的效应子部分,从而提供ADC或AOC,或者包含至少一个本发明的皂苷,其中下列抗体是sdAb:

[0367] 抗EGFR抗体-皂苷;

[0368] 抗EGFR抗体-三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷,该三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3β-OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团;

[0369] 抗EGFR抗体-S01861;

- [0370] 抗EGFR抗体-GE1741;
- [0371] 抗EGFR抗体-SA1641;
- [0372] 抗EGFR抗体-Quil-A;
- [0373] 抗EGFR抗体-QS-21;
- [0374] 抗EGFR抗体-皂树水溶性皂苷级分中的皂苷;
- [0375] 衍生自西妥昔单抗的sdAb-皂苷;
- [0376] 衍生自西妥昔单抗的sdAb-三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷,该三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团;
- [0377] 衍生自西妥昔单抗的V_H或V_L的sdAb-S01861;
- [0378] 衍生自西妥昔单抗的V_H或V_L的sdAb-GE1741;
- [0379] 衍生自西妥昔单抗的V_H或V_L的sdAb-SA1641;
- [0380] 衍生自西妥昔单抗的V_H或V_L的sdAb-Quil-A;
- [0381] 衍生自西妥昔单抗的V_H或V_L的sdAb-QS-21;
- [0382] 衍生自西妥昔单抗的V_H或V_L的sdAb-皂树水溶性皂苷级分中的皂苷;
- [0383] 抗HER2抗体-皂苷;
- [0384] 抗HER2抗体-三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷,该三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团;
- [0385] 抗HER2抗体-S01861;
- [0386] 抗HER2抗体-GE1741;
- [0387] 抗HER2抗体-SA1641;
- [0388] 抗HER2抗体-Quil-A;
- [0389] 抗HER2抗体-QS-21;
- [0390] 抗HER2抗体-皂树水溶性皂苷级分中的皂苷;
- [0391] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-皂苷;
- [0392] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷,该三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团;
- [0393] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-S01861;
- [0394] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-GE1741;
- [0395] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-SA1641;
- [0396] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-Quil-A;
- [0397] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-QS-21;
- [0398] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-皂树水溶性皂苷级分中的皂苷;
- [0399] 抗CD71抗体-皂苷;
- [0400] 抗CD71抗体-三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷,该三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团;

- [0401] 抗CD71抗体-S01861;
- [0402] 抗CD71抗体-GE1741;
- [0403] 抗CD71抗体-SA1641;
- [0404] 抗CD71抗体-Quil-A;
- [0405] 抗CD71抗体-QS-21;
- [0406] 抗CD71抗体-皂树水溶性皂苷级分中的皂苷;
- [0407] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-皂苷;
- [0408] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷,该三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团;
- [0409] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-S01861;
- [0410] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-GE1741;
- [0411] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-SA1641;
- [0412] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-Quil-A;
- [0413] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-QS-21;
- [0414] 衍生自OKT-9的 V_H 或 V_L 的sdAb-皂树水溶性皂苷级分中的皂苷;
- [0415] 抗EGFR抗体-寡核苷酸;
- [0416] 抗EGFR抗体-反义寡核苷酸;
- [0417] 抗EGFR抗体-siRNA;
- [0418] 抗EGFR抗体-反义BNA;
- [0419] 抗EGFR抗体-反义BNA (HSP27) ;
- [0420] 抗EGFR抗体-朐毒素;
- [0421] 抗EGFR抗体-核糖体失活蛋白;
- [0422] 抗EGFR抗体-香石竹毒蛋白;
- [0423] 抗EGFR抗体-皂草毒蛋白;
- [0424] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-寡核苷酸;
- [0425] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-反义寡核苷酸;
- [0426] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-siRNA;
- [0427] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-反义BNA;
- [0428] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-反义BNA (HSP27) ;
- [0429] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-朐毒素;
- [0430] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-核糖体失活蛋白;
- [0431] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-香石竹毒蛋白;
- [0432] 衍生自西妥昔单抗的 V_H 或 V_L 的sdAb-皂草毒蛋白;
- [0433] 抗HER2抗体-寡核苷酸;
- [0434] 抗HER2抗体-反义寡核苷酸;
- [0435] 抗HER2抗体-siRNA;
- [0436] 抗HER2抗体-反义BNA;
- [0437] 抗HER2抗体-反义BNA (HSP27) ;

- [0438] 抗HER2抗体-朊毒素；
- [0439] 抗HER2抗体-核糖体失活蛋白；
- [0440] 抗HER2抗体-香石竹毒蛋白；
- [0441] 抗HER2抗体-皂草毒蛋白；
- [0442] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-寡核苷酸；
- [0443] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-反义寡核苷酸；
- [0444] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-siRNA；
- [0445] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-反义BNA；
- [0446] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-反义BNA (HSP27)；
- [0447] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-朊毒素；
- [0448] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-核糖体失活蛋白；
- [0449] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-香石竹毒蛋白；
- [0450] 衍生自曲妥珠单抗的V_H或V_L的sdAb-皂草毒蛋白；
- [0451] 抗CD71抗体-寡核苷酸；
- [0452] 抗CD71抗体-反义寡核苷酸；
- [0453] 抗CD71抗体-siRNA；
- [0454] 抗CD71抗体-反义BNA；
- [0455] 抗CD71抗体-反义BNA (HSP27)；
- [0456] 抗CD71抗体-朊毒素；
- [0457] 抗CD71抗体-核糖体失活蛋白；
- [0458] 抗CD71抗体-香石竹毒蛋白；
- [0459] 抗CD71抗体-皂草毒蛋白；
- [0460] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-寡核苷酸；
- [0461] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-反义寡核苷酸；
- [0462] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-siRNA；
- [0463] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-反义BNA；
- [0464] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-反义BNA (HSP27)；
- [0465] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-朊毒素；
- [0466] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-核糖体失活蛋白；
- [0467] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-香石竹毒蛋白；
- [0468] 衍生自OKT-9的V_H或V_L的sdAb-皂草毒蛋白；
- [0469] 抗EGFR抗体(-寡核苷酸)(-皂苷)，其中寡核苷酸是反义寡核苷酸、siRNA、反义BNA和反义BNA (HSP27)中的任何一种或多种，并且其中皂苷是三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷(其属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3β-OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团)、S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷中的任何一种或多种，其中抗EGFR抗体优选为西妥昔单抗；
- [0470] 抗EGFR抗体(-朊毒素)(-皂苷)，其中朊毒素是核糖体失活蛋白、香石竹毒蛋白和皂草毒蛋白中的任何一种或多种，并且其中皂苷是三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷(其属于

在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团)、S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷中的任何一种或多种,其中抗EGFR抗体优选为西妥昔单抗;

[0471] 抗HER2抗体(-寡核苷酸)(-皂苷),其中寡核苷酸是反义寡核苷酸、siRNA、反义BNA和反义BNA(HSP27)中的任何一种或多种,并且其中皂苷是三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷(其属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团)、S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷中的任何一种或多种,其中抗HER2抗体优选为曲妥珠单抗;

[0472] 抗HER2抗体(-朐毒素)(-皂苷),其中朐毒素是核糖体失活蛋白、香石竹毒蛋白和皂草毒蛋白中的任何一种或多种,并且其中皂苷是三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷(其属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团)、S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷中的任何一种或多种,其中抗HER2抗体优选为曲妥珠单抗;

[0473] 抗CD71抗体(-寡核苷酸)(-皂苷),其中寡核苷酸是反义寡核苷酸、siRNA、反义BNA和反义BNA(HSP27)中的任何一种或多种,并且其中皂苷是三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷(其属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地包含在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中的葡糖醛酸官能团)、S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷中的任何一种或多种,其中抗CD71抗体优选为OKT-9;以及

[0474] 抗CD71抗体(-朐毒素)(-皂苷),其中朐毒素是核糖体失活蛋白、香石竹毒蛋白和皂草毒蛋白中的任何一种或多种,并且其中皂苷是三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷(其属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团)、S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷中的任何一种或多种,其中抗CD71抗体优选为OKT-9。

[0475] 实施例是本发明的半成品缀合物(sdAb-皂苷或sdAb-效应子部分)或本发明的缀合物,其中细胞表面分子靶向性分子选自衍生自西妥昔单抗、曲妥珠单抗、OKT-9的V_H或V_L的sdAb(即sdAb基于这类单克隆抗体的V_H或V_L并且能够特异性结合靶细胞的细胞表面上的靶受体),和/或其中效应子部分选自香石竹毒蛋白、皂草毒蛋白和反义BNA(HSP27),和/或其中皂苷选自S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷,或其衍生物。

[0476] 实施例是根据本发明的缀合物,其中细胞表面分子靶向性分子选自衍生自西妥昔单抗、曲妥珠单抗、OKT-9的V_H或V_L的sdAb(即sdAb基于这类单克隆抗体的V_H或V_L并且能够特异性结合靶细胞的细胞表面上的靶受体),和/或其中效应子部分选自香石竹毒蛋白、皂草毒蛋白和反义BNA(HSP27),和/或其中皂苷选自S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷,或其衍生物。

[0477] 本发明的一个方面涉及ADC或AOC或半成品ADC缀合物或半成品AOC缀合物,其包含本发明的细胞表面分子靶向性sdAb并且包含至少一个本发明的效应子部分和/或包含至少一个本发明的皂苷,具有结构C:

[0478] $A(-S)_b(-E)_c$

[0479] (结构C)

[0480] 其中A是细胞表面分子靶向性sdAb;

[0481] S是皂苷;

[0482] E是效应子部分;

[0483] $b=0-64$, 优选0、1、2、3、4、8、16、32、64或其间的任何整数或分数;

[0484] $c=0-8$, 优选0、1、2、3、4、6、8或其间的任何整数或分数,

[0485] 其中S偶联到A和/或E, E偶联到A和/或S, 优选S偶联到A并且E偶联到A。

[0486] 实施例是本发明的结构C, 其中A是衍生自抗EGFR抗体如西妥昔单抗、抗HER2抗体如曲妥珠单抗、抗CD71抗体如OKT-9的sdAb, 和/或其中S是皂苷、三萜皂苷和/或双糖链三萜皂苷(其属于在位置C-23具有醛官能团的12,13-脱氢齐墩果烷类型并且任选地在皂苷的C-3 β -OH基团处的碳水化合物取代基中包含葡糖醛酸官能团)、S01861、GE1741、SA1641、Quil-A、QS-21和皂树水溶性皂苷级分中的皂苷中的任何一种或多种, 和/或其中E是寡核苷酸、反义寡核苷酸、siRNA、反义BNA和反义BNA (HSP27) 中的任何一种或多种, 和/或朊毒素、核糖体失活蛋白、香石竹毒蛋白和皂草毒蛋白中的任何一种或多种。

[0487] 实施例是本发明的结构C、本发明的缀合物或本发明的半成品缀合物, 其中皂苷(如果存在的话)和/或效应子部分(如果存在的话)通过至少一个接头, 例如可切割接头, 和/或通过共价皂苷缀合物(即至少一个寡聚或多聚支架), 例如基于N- ϵ -马来酰亚胺基己酸酰肼(EMCH)、琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯或3-(2-吡啶基二硫代)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)和1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐(HATU)的接头, 和例如基于树状突如G4-树状突的共价皂苷缀合物(支架)或三官能接头如结构A的三官能接头共价偶联, 和/或其中根据本发明的细胞表面分子靶向性抗体优选sdAb如V_{HH}的至少赖氨酸侧链和/或半胱氨酸侧链参与与皂苷和/或效应子部分和/或接头和/或可切割接头和/或共价皂苷缀合物的共价键, 其中优选皂苷和/或效应子部分共价连接到细胞表面分子靶向性分子, 优选抗体如sdAb, 其中共价连接包含酰胺键、腙键、二硫键或由其组成。

[0488] 本发明的一个方面涉及任何前述缀合物、包含共价连接的皂苷的ADC、包含共价连接的皂苷的AOC、半成品ADC、半成品AOC作为药物的用途。

[0489] 本发明的一个方面涉及任何前述缀合物、包含共价连接的皂苷的ADC、包含共价连接的皂苷的AOC、半成品ADC、半成品AOC用于治疗或预防癌症或自身免疫疾病的用途。

[0490] 实例和示例性实施例

[0491] 实例1. V_{HH}-S01861+mAb-皂草毒蛋白(1T2C和2T2C)

[0492] 1靶2组分系统(1T2C)是V_{HH}-S01861和mAb-蛋白毒素的联合处理, 其中V_{HH}和mAb识别并结合相同的细胞表面受体(图1A)。2靶2组分系统(2T2C)是V_{HH}-S01861和mAb蛋白毒素的联合处理, 其中V_{HH}和mAb识别并结合不同的细胞表面受体(图1B)。S01861-EMCH通过末端半胱氨酸残基(Cys)与抗HER2V_{HH}缀合, 具有DAR 1 (HER2V_{HH}-S01861) (不稳定)。HER2V_{HH}-S01861在10pM CD71mab-皂草毒蛋白(CD71单克隆抗体与蛋白毒素皂草毒蛋白偶联, 具有DAR4)或50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(曲妥珠单抗与蛋白毒素皂草毒蛋白偶联, 具有DAR4)的固定浓度滴定。确定了靶向蛋白毒素介导的对SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺)和MDA-MB-468 (HER2⁻/

CD71⁺)的细胞杀伤。这揭示了对于与10pM CD71mab-皂草毒蛋白或50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的两种组合,在SK-BR-3中低浓度的HER2V_{HH}-S01861下增强的细胞杀伤(IC₅₀=300nM;图2A)。同等浓度的HER2V_{HH}-S01861单独在高浓度下诱导细胞杀伤(IC₅₀=4.000nM),而同等浓度的HER2V_{HH}、HER2V_{HH}+CD71mab-皂草毒蛋白或HER2V_{HH}+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白不能诱导细胞杀伤活性(IC₅₀>5000nM;图2A)。在MDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺)中,HER2V_{HH}-S01861+10pM CD71mab-皂草毒蛋白的组合在高浓度下显示细胞杀伤活性(IC₅₀=2.000nM;图2B),而HER2V_{HH}-S01861+50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合在高得多的浓度下显示细胞杀伤活性(IC₅₀>5.000nM;图2B)。同等浓度的HER2V_{HH}、HER2V_{HH}+CD71mab-皂草毒蛋白或HER2V_{HH}+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白不能在MDA-MB-468细胞中诱导细胞杀伤活性(IC₅₀>5.000nM;图2B)。

[0493] 所有这些表明S01861-EMCH与HER2靶向性V_{HH}的缀合增强了靶向蛋白毒素(靶向相同或不同的细胞表面受体)的内体逃逸和细胞质递送,导致HER2表达细胞的细胞杀伤。

[0494] 接下来,在900nM HER2V_{HH}-S01861的固定浓度下滴定曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或CD71mab-皂草毒蛋白,并确定了靶向蛋白毒素介导的对SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺)和MDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺)的细胞杀伤。这揭示了900nM HER2V_{HH}-S01861与低浓度曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或CD71mab-皂草毒蛋白的组合已经诱导了SK-BR-3的有效细胞杀伤(IC₅₀=0.0001pM;图3A),而CD71mab-皂草毒蛋白+900nM HER2V_{HH}或曲妥珠单抗-皂草毒蛋白+900nM HER2V_{HH}只能在高浓度诱导细胞杀伤(分别是IC₅₀=50pM; IC₅₀=400pM;图3)。在MDA-MB-468细胞(HER2⁻/CD71⁺)中,CD71mab-皂草毒蛋白+900nM HER2V_{HH}-S01861在IC₅₀=0.01pM显示细胞杀伤,而曲妥珠单抗-皂草毒蛋白+900nM HER2V_{HH}-S01861在IC₅₀=2.000pM显示活性。曲妥珠单抗-皂草毒蛋白+900nM HER2V_{HH}或CD71mab-皂草毒蛋白+900nM HER2V_{HH}分别仅在(IC₅₀>10.000pM和IC₅₀=20pM,图3B)显示细胞杀伤。所有这些表明,在HER2⁺⁺/CD71⁺表达细胞中,相对低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或CD71单抗-皂草毒蛋白与相对低浓度的HER2V_{HH}-S01861 (DAR1)组合可以有效并诱导细胞杀伤。

[0495] 实例2.V_{HH}-S01861+V_{HH}-香石竹毒蛋白(2T2C)

[0496] 2target 2-components系统(2T2C)是V_{HH}1-S01861和V_{HH}2-蛋白毒素的联合处理,其中每个V_{HH}识别另一个细胞表面受体(图1C)。S01861-EMCH与靶向HER2的V_{HH}的末端半胱氨酸残基缀合,产生HER2V_{HH}-S01861 (DAR1)。在50pM CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白的固定浓度下滴定HER2V_{HH}-S01861,并确定了靶向蛋白毒素介导的对SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺)和MDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺)的细胞杀伤。这揭示了在相对低浓度的V_{HH}HER2-L-S01861 (SK-BR-3: IC₅₀=300nM;图4A)时的增强的细胞杀伤。同等浓度的HER2V_{HH}-S01861单独在高浓度下诱导细胞杀伤(IC₅₀=4.000nM),而同等浓度的HER2V_{HH}、HER2V_{HH}+50pM CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白不能诱导细胞杀伤(IC₅₀>5.000nM;图4A)。在MDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺)中,HER2V_{HH}-S01861+50pM CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白的组合在较高浓度下显示细胞杀伤活性(IC₅₀=600nM;图4B),而同等浓度的HER2V_{HH}、HER2V_{HH}-S01861或HER2V_{HH}+50pM CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白不能诱导细胞杀伤活性(IC₅₀>5.000nM;图4B)。

[0497] 接下来,在900nM HER2V_{HH}-S01861的固定浓度下滴定CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白,并确定了靶向蛋白毒素介导的对SK-BR-3 (HER2⁺⁺/CD71⁺)和MDA-MB-468 (HER2⁻/CD71⁺)的细胞杀伤。这揭示了900nM HER2V_{HH}-S01861与低浓度CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白的组合诱导了SK-BR-3细胞的有效细胞杀伤(IC₅₀=0.05pM;图5A),而CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白或CD71V_{HH}-香石竹毒

蛋白+900nM HER2V_{HH}只能在高浓度下诱导细胞杀伤(IC₅₀>10.000pM);图5A)。此外,CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白也在77nM曲妥珠单抗-S01861(DAR4)的固定浓度下滴定,这也揭示了在SK-BR-3(HER2⁺/CD71⁺)细胞中细胞杀伤活性的强烈增强(IC₅₀<0,0001pM)。在MDA-MB-468细胞(HER2⁻/CD71⁺)中,CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白+900nM HER2V_{HH}-S01861仅在高得多的浓度下显示细胞杀伤(IC₅₀=10pM,图5B),而CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白、CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白+900nM HER2V_{HH}或CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白+曲妥珠单抗-S01861(DAR4)仅在IC₅₀=2.000pM时显示细胞杀伤;图5B)。

[0498] 所有这些表明,在高HER2/CD71表达细胞中,相对低浓度的V_{HH}CD71-香石竹毒蛋白与低浓度的V_{HH}HER2-S01861缀合物组合可有效诱导细胞杀伤。

[0499] 根据本发明的组合在MDA-MB-468细胞中(HER2⁻/CD71⁺)没有显示任何细胞杀伤活性。这表明在缺乏足够的受体表达的情况下,没有达到有效的胞内递送的S01861浓度(阈值)来诱导蛋白毒素的内体逃逸和胞质递送。

[0500] 实例3.V_{HH}-香石竹毒蛋白+mAb-S01861(1T2C和2T2C)

[0501] 1靶2组分系统(1T2C)是mAb-S01861和V_{HH}-蛋白毒素的联合处理,其中mAb和V_{HH}识别并结合相同的细胞表面受体(图1E)。2靶2组分系统(2T2C)也是mAb-S01861和V_{HH}-蛋白毒素的联合处理,其中mAb和V_{HH}识别另一种细胞表面受体(图1D)。

[0502] 香石竹毒蛋白-C(具有末端半胱氨酸的香石竹毒蛋白)与靶向HER2的V_{HH}-靶向CD71的V_{HH}或靶向EGFR的V_{HH}的末端半胱氨酸残基缀合,产生HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)、CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)和EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白(DAR1)。

[0503] CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白、HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白或EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白在固定浓度的西妥昔单抗-S01861(DAR4)滴定,并且确定了靶向蛋白毒素介导的对A431(EGFR⁺/HER2⁺/CD71⁺)和A2058(EGFR⁻/HER2⁺/CD71⁺)的细胞杀伤。这揭示了非常低浓度的CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白与77nM西妥昔单抗-S01861的组合诱导了A431细胞的有效细胞杀伤(IC₅₀<0,0001pM;图6A),而单独CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白在IC₅₀=2000pM显示活性。其他两种组合EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白+77nM西妥昔单抗-S01861和HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白+77nM西妥昔单抗-S01861分别在IC₅₀=20pM和IC₅₀=50pM时显示出有效的细胞杀伤,而EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白或HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白单独不能在A431细胞中诱导有效的细胞杀伤(IC₅₀>10.000pM;图6A)。在A2058细胞中(EGFR⁻/HER2⁺/CD71⁺),CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白和CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白+77nM西妥昔单抗-S01861分别在IC₅₀=3.000pM和IC₅₀=1.000pM显示细胞杀伤活性,而所有其他处理或组合在A2058细胞中在高达IC₅₀=10.000pM V_{HH}毒素没有显示出细胞杀伤(图6B)。

[0504] 这表明西妥昔单抗-S01861(DAR4)可以有效地诱导三种不同的V_{HH}-香石竹毒蛋白缀合物的内体逃逸,从而诱导A431细胞中增强的细胞杀伤。

[0505] 接下来,在固定浓度的曲妥珠单抗-S01861(DAR4)滴定CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白、HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白或EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白,并且确定了靶向蛋白毒素介导的对SK-BR-3(HER2⁺/EGFR⁻/CD71⁺)和MDA-MB-468细胞(HER2⁻/EGFR⁺/CD71⁺)的细胞杀伤。这揭示了非常低浓度的CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白与77nM曲妥珠单抗-S01861的组合诱导了SK-BR-3细胞的有效细胞杀伤(IC₅₀<0,0001pM;图7A),而单独CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白在IC₅₀=10.000pM显示活性。其他两种组合EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白+77nM曲妥珠单抗-S01861和HER2V_{HH}-香石

竹毒蛋白+77nM曲妥珠单抗-S01861分别在 $IC_{50}=400pM$ 和 $IC_{50}=6pM$ 时显示出有效的细胞杀伤,而EGFRV_{HH}-香石竹毒蛋白或HER2V_{HH}-香石竹毒蛋白单独不能在SK-BR-3细胞中诱导有效的细胞杀伤($IC_{50}>10.000pM$;图7A)。在MDA-MB-468细胞(HER2⁻/EGFR⁺⁺/CD71⁺)中,CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白和CD71V_{HH}-香石竹毒蛋白+77nM西妥昔单抗-S01861分别在 $IC_{50}=3000pM$ 和 $IC_{50}=2000pM$ 显示细胞杀伤活性,而所有其他处理或组合在MDA-MB-468细胞中在高达 $IC_{50}=10.000pM$ V_{HH}香石竹毒蛋白没有显示出细胞杀伤(图7B)。这表明曲妥珠单抗-S01861(DAR4)可以有效地诱导三种不同的V_{HH}-香石竹毒蛋白缀合物的内体逃逸,从而诱导SK-BR-3细胞中增强的细胞杀伤。

[0506] 材料与方法

[0507] 材料

[0508] S01861由分析发现有限公司(Aanalyticon Discovery GmbH)从肥皂草获得的原植物提取物中分离和纯化。V_{HH}购自荷兰乌特勒支的QVQ公司(HER2V_{HH}:克隆名称:Q17c;CD71V_{HH}:克隆名称:Q52c EGFRV_{HH}:克隆名称:Q86c)。曲妥珠单抗(Tras, **Herceptin®**, 罗氏公司(Roche))、西妥昔单抗(Cet, **Erbix®**, 默克公司(Merck KGaA))购自药房(夏里特, 柏林)。CD71单克隆抗体购自生物细胞公司(BioCell) (Okt9, #BE0023)。定制曲妥珠单抗-皂草毒蛋白和抗CD71mab-皂草毒蛋白缀合物从先进靶向系统公司(Advanced Targeting Systems) (圣地亚哥, 加利福尼亚州)生产和购买。香石竹毒蛋白-Cys(Dia-Cys, 具有单个C-末端半胱氨酸的香石竹毒蛋白突变体, 由法国Proteogenix公司生产。

[0509] 三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP, 98%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, 埃尔曼试剂, 99%, 西格玛-奥尔德里奇公司), Zeba™旋转脱盐柱(2mL, 赛默飞世尔公司), NuPAGE™4-12% Bis-Tris蛋白质凝胶(赛默飞世尔公司), NuPAGE™MES SDS运行缓冲液(赛默飞世尔公司), Novex™Sharp预染色蛋白标准品(赛默飞世尔公司), PageBlue™蛋白质染色溶液(赛默飞世尔公司), Pierce™BCA蛋白检测试剂盒(赛默飞世尔公司), N-乙基马来酰亚胺(NEM, 98%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 1,4-二硫苏糖醇(DTT, 98%, 西格玛-奥尔德里奇公司), Sephadex G25(通用电气医疗保健公司), Sephadex G50 M(通用电气医疗保健公司), Superdex 200P(通用电气医疗保健公司), 异丙醇(IPA, 99.6%, VWR), 三(羟基甲基)氨基甲烷(Tris, 99%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 三(羟基甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris.HCL, 西格玛-奥尔德里奇公司), L-组氨酸(99%, 西格玛-奥尔德里奇公司), D-(+)-海藻糖脱水物(99%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 聚乙二醇脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温20, 西格玛-奥尔德里奇公司), 杜尔贝克氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS, 赛默飞世尔公司), 盐酸胍(99%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 乙二胺四乙酸二钠盐二水合物(EDTA-Na₂, 99%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 0.2微米和0.45微米无菌过滤器(赛多利斯公司(Sartorius)), 琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC, 赛默飞世尔公司), Vivaspin T4和T15浓缩器(赛多利斯公司), Superdex200PG(通用电气医疗保健公司), 四(乙二醇)琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(PEG₄-SPDP, 赛默飞世尔公司), HSP27 BNA二硫化物寡核苷酸(生物合成), [0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脒鎓-六氟磷酸盐](HATU, 97%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 二甲基亚砜(DMSO, 99%, 西格玛-奥尔德里奇公司), N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺三氟乙酸盐(AEM, 98%, 西格玛-奥尔德里奇公司), L-半胱氨酸(98.5%, 西格玛-奥尔德里奇公司), 去离子水(DI)是从超纯实验

室水系统中新鲜取出的(密理博公司(Milliq),默克公司(Merck)),镍-氨三乙酸琼脂糖(Ni-NTA琼脂糖,Protino公司),甘氨酸(99.5%,VWR),5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸(埃尔曼试剂,DTNB,98%,西格玛-奥尔德里奇公司),S-乙酰基巯基琥珀酸酐荧光素(SAMSA试剂,英杰公司)碳酸氢钠(99.7%,西格玛-奥尔德里奇公司),碳酸钠(99.9%,西格玛-奥尔德里奇公司),具有Sephadex G-25树脂的PD MiniTrap脱盐柱(通用电气医疗保健公司),PD10 G25脱盐柱(通用电气医疗保健公司)、Zeba旋转脱盐柱(0.5、2、5、和10mL(赛默飞世尔公司),Vivaspin离心过滤器T4 10kDa MWC0,T4 100kDa MWC0,和T15(赛多利斯公司),Biosep s3000 aSEC柱(菲罗门公司(Phenomenex)),Vivacell超滤装置10和30kDa MWC0(赛多利斯公司),Nalgene快速流动过滤器(赛默飞世尔公司),

[0510] 方法

[0511] S01861-EMCH合成

[0512] 向S01861(121mg,0.065mmol)和EMCH.TFA(110mg,0.325mmol)中添加甲醇(特干,3.00mL)和TFA(0.020mL,0.260mmol)。在室温下搅拌反应混合物。1.5小时后,将反应混合物进行制备型MP-LC。¹将对应于产物的级分立即汇集在一起,冷冻并冻干过夜,得到呈白色蓬松固体的标题化合物(120mg,90%)。基于LC-MS的纯度为96%。

[0513] LRMS (m/z):2069[M-1]¹⁻

[0514] LC-MSr.t. (min):1.08⁴

[0515] 细胞活力测定

[0516] 处理后,将细胞在37℃下孵育72小时,然后根据制造商的说明(CellTiter 96® 水性单溶液细胞增殖测定,普洛麦格公司(Promega))通过MTS测定确定细胞活力。简而言之,在不含酚红(泛生物技术公司(PAN-Biotech GmbH))的补充有10% FBS的DMEM中将MTS溶液稀释20倍。用200μL/PBS孔洗涤细胞一次,之后每孔加入100μL稀释的MTS溶液。将板在37℃下孵育约20-30分钟。随后,在赛默飞世尔科技公司Multiskan FC平板读数器(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))上测量492nm处的OD。为了定量,在计算处理/未处理细胞的细胞活力百分比之前,通过将处理孔的背景校正信号除以未处理孔的背景校正信号,从所有其他孔中减去“仅培养基”孔的背景信号(x 100)。

[0517] FACS分析

[0518] 将细胞以500,000个细胞/板接种于10cm培养皿中的补充有10%胎牛血清(泛生物技术公司)和1%青霉素/链霉素(泛生物技术公司)的DMEM(泛生物技术公司)中,并孵育48小时(5% CO₂,37℃),直到达到90%的汇合。接下来,将细胞进行胰蛋白酶化(Tryp1E Express,吉布科赛默飞世尔科技公司)成单细胞。将0.75x 10⁶个细胞转移到15mL离心管中并离心(1,400rpm,3分钟)。弃去上清液,同时让细胞沉淀浸没。通过在涡旋振荡器上轻轻振荡离心管来解离沉淀,并用4mL冷PBS(不含Mg²⁺和Ca²⁺,2% FBS)洗涤细胞。洗涤后,将细胞重悬浮于3mL冷PBS(不含Mg²⁺和Ca²⁺,2% FBS)中,并等分于3个圆底FACS管中(1mL/管)。将细胞再次离心并重悬浮在200μL冷PBS(不含Mg²⁺和Ca²⁺,2% FBS)或200μL抗体溶液中;在195μL冷PBS(不含Mg²⁺和Ca²⁺,2% FBS)中含有5μL抗体。APC小鼠IgG1,κAPC抗人EGFR(#352906,百进公司(Biolegend))用于染色EGFR受体。PE抗人HER2 APC抗人CD340(erbB2/HER-2)(#324408百进公司)用于染色HER2受体,PE小鼠IgG2a,κ同种型Ctrl FC(#400212,百进公司)用作其匹配的同种型对照。PE抗人CD71(#334106,百进公司)用于染色CD71受体,PE

小鼠IgG2a, κ 同种型Ctrl FC(#400212,百进公司)用作其匹配的同种型对照。样品在4℃下在管辊混合器上孵育30分钟。之后,用冷PBS(不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} ,2% FBS)将细胞洗涤3x,并使用PBS中的2% PFA溶液在室温下固定20分钟。用冷PBS洗涤细胞2x,并重悬浮在250-350 μ L冷PBS中用于FACS分析。用BD FACSCanto II流式细胞仪系统(BD生物科学公司(BD Biosciences))和FlowJo软件分析样品。各种细胞上EGFR、HER2和CD71的细胞表面表达的分析结果总结在表A2中。

[0519] 表A2. 各种细胞的EGFR、HER2和CD71的细胞表面表达水平

细胞系	EGFR表	HER2表	CD71表
	达水平 (MFI)	达水平 (MFI)	达水平 (MFI)
[0520] MDA-MB-468	1656	1	186
A431	1593	10	322
SK-BR-3	28	1162	331
A2058	1	5	59

[0521] V_{HH} -S01861缀合的程序

[0522] 向 V_{HH} 的等份中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(10.0mg/ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃孵育30分钟。孵育后,使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤将所得 V_{HH} -SH纯化至TBS pH 7.5。向所得的 V_{HH} -SH中添加新鲜制备的SPT-EMCH溶液,将混合物短暂涡旋,然后在20℃孵育过夜。

[0523] 孵育后,取出 V_{HH} -S01861混合物的等份,并通过Ellman测定进行表征,以确定S01861掺入。将缀合物通过1.6 $\times$ 35cm Superdex 200PG柱纯化,用DPBS pH 7.5洗脱,得到纯化的 V_{HH} -S01861。将等份过滤至0.2 μ m,浓缩并归一化至1.0mg/ml,得到 V_{HH} -S01861。

[0524] V_{HH} -香石竹毒蛋白缀合的程序

[0525] 使用vivaspin T15 10KDa MWC0离心过滤器通过超滤浓缩香石竹毒蛋白-Cys,并进行缓冲液交换成TBS pH 7.5。向浓缩的香石竹毒蛋白-Cys中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(10.0mg/ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃孵育60分钟。孵育后,使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化所得的香石竹毒蛋白-SH,然后使用vivaspin T15 10KDa MWC0离心过滤器重复离心洗涤循环至TBS pH 7.5中。将所得的香石竹毒蛋白-SH与在DMSO中新制备的DTME溶液(10mg/ml)反应,将混合物短暂涡旋,然后在20℃下孵育60分钟。之后,使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤到TBS pH 7.5中进行纯化,获得香石竹毒蛋白-DTME。将香石竹毒蛋白-DTME储存在20℃直到缀合。同时,使用vivaspin T15 10KDa MWC0离心过滤器通过超滤浓缩 V_{HH} 的等份,并进行缓冲液交换成TBS pH 7.5。向浓缩的 V_{HH} 中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(10.0mg/ml),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在37℃孵育60分钟。孵育后,使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化所得的 V_{HH} ,然后使用vivaspin T4 5KDa MWC0离心过滤器重复离心洗涤循环至TBS pH 7.5中。将所得 V_{HH} -SH的等份与香石竹毒蛋白-DTME反应,将混合物短暂涡旋,然后在20℃下孵育过夜。之后,使用vivaspin T4 10KDa MWC0离心管浓缩反应混合物,并使用1.6 $\times$ 35cm Superdex 200PG柱通过凝胶过滤纯化,洗脱至DPBS pH 7.5中。

[0526] 抗体-(L-SO1861)₄

[0527] 曲妥珠单抗、西妥昔单抗在下文中称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯缀合反应以DAR为1、2、3、4、5和6与皂苷SO18161-EMCH缀合。SO1861-EMCH分子在其结构和其马来酰亚胺官能团之间获得不稳定的(L) 胺键,在皂苷和Ab之间产生不稳定的键。针对曲妥珠单抗-(L-SO1861)₄,示例性地描述了该程序:

[0528] 向西妥昔单抗(40mg, 8.0ml)溶液中加入10μl/ml的Tris浓缩物(127mg/ml, 1.05M), Tris.HCl浓缩物(623mg/ml, 3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml, 0.26M)中的每者, 得到50mM TBS, 2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0529] 向分成四份的西妥昔单抗(每份9.73mg、4.864mg/ml、65nmol)中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(0.5-2.0g/ml, 1.15-7.02摩尔当量, 75-455nmol), 将混合物短暂涡旋, 然后在20℃下用辊混合孵育300分钟。孵育后(在添加SO1861-EMCH之前), 从每种混合物中取出约1mg (0.210ml) 等份的Ab-SH, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比Ab比率=分别为2.0、4.2、5.9和6.8)。向每个主体Ab-SH中加入等份的新鲜制备的SO1861-EMCH溶液(2mg/ml, 1.3摩尔当量/“硫醇”, 0.15-0.61μmol, 0.16-0.63ml), 短暂涡旋混合物, 然后在20℃下孵育120分钟。除了每个缀合反应之外, 两个等份的脱盐Ab-SH(0.25mg, 1.67nmol) 分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”, 4.3-17.4nmol, 2.2-8.7μl的0.25mg/ml溶液)或TBS pH 7.5缓冲液(2.2-8.7μl)在20℃反应120分钟, 作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前), 取出0.200ml等份的Ab-SO1861-EMCH混合物, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份, 并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照, 以获得SO1861-EMCH掺入。向主体Ab-SO1861-EMCH混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(2.5mg/ml, 2.5-10摩尔当量, 0.15-0.58μmol), 并且将混合物通过zeba旋转脱盐柱纯化, 用DPBS pH 7.5洗脱, 得到纯化的西妥昔单抗-(L-SO1861)缀合物。在分配用于生物评估之前, 将产物标准化至2.5mg/ml并过滤至0.2μm。曲妥珠单抗-L-SO1861缀合物的反应条件和结果以及西妥昔单抗-L-SO1861缀合物的反应条件和结果总结在表A3和表A4中。

[0530] 表A3. 曲妥珠单抗-L-SO1861缀合物的总结反应条件和结果

批次	Ab 进料	TCEP 进料 摩尔当量	SO1861-E MCH 进料	获得的 DAR	通过分析型 SEC 的纯度 (%)	产率 (%)
Tras-(L-SO1861) ₄	9.91 mg 66 nmol	3.83	0.46 μmol	4.0	98.4	81

[0532] 表A4. 西妥昔单抗-L-SO1861缀合物的总结反应条件和结果

批次	Ab 进料	TCEP 进料 摩尔当量	SO1861-E MCH 进料	获得的 DAR	通过分析型 SEC 的纯度 (%)	产率 (%)
Cet-(L-SO1861) ₄	9.73 mg 65 nmol	4.19	0.46 μmol	4.1	99.0	77

[0534] 材料

[0535] 在整个说明书、权利要求书和附图中,“VHH”、“Vhh”、“V_{hh}”和“V_{HH}”应理解为指相同类型的单结构域抗体。对于称为“VH”、“Vh”、“V_h”和“V_H”中任一种的类型的单结构域抗体的情况类似。

[0536] HER2-V_{HH},EGFR-V_{HH},CD71-V_{HH}(购买),三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP,98%,西格玛-奥尔德里奇公司),5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB,埃尔曼试剂,99%,西格玛-奥尔德里奇公司),Zeba™旋转脱盐柱(2mL,赛默飞世尔公司),NuPAGE™4-12% Bis-Tris蛋白质凝胶(赛默飞世尔公司),NuPAGE™MES SDS运行缓冲液(赛默飞世尔公司),Novex™Sharp预染色蛋白标准品(赛默飞世尔公司),PageBlue™蛋白质染色溶液(赛默飞世尔公司),Pierce™BCA蛋白检测试剂盒(赛默飞世尔公司),N-乙基马来酰亚胺(NEM,98%,西格玛-奥尔德里奇公司),1,4-二硫苏糖醇(DTT,98%,西格玛-奥尔德里奇公司),Sephadex G25(通用电气医疗保健公司),Sephadex G50 M(通用电气医疗保健公司)、Superdex 200P(通用电气医疗保健公司),异丙醇(IPA,99.6%,VWR),三(羟基甲基)氨基甲烷(Tris,99%,西格玛-奥尔德里奇公司),三(羟基甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris.HCL,西格玛-奥尔德里奇公司),L-组氨酸(99%,西格玛-奥尔德里奇公司),D-(+)-海藻糖脱水物(99%,西格玛-奥尔德里奇公司),聚乙二醇脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温20,西格玛-奥尔德里奇公司),杜尔贝克氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS,赛默飞世尔公司),盐酸胍(99%,西格玛-奥尔德里奇公司),乙二胺四乙酸二钠盐二水合物(EDTA-Na₂,99%,西格玛-奥尔德里奇公司),0.2微米和0.45微米无菌过滤器(赛多利斯公司(Sartorius)),Vivaspin T4和T15浓缩器(赛多利斯公司),Superdex 200PG(通用电气医疗保健公司),HSP27 BNA二硫化物寡核苷酸(生物合成),[O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脲鎓-六氟磷酸盐](HATU,97%,西格玛-奥尔德里奇公司),二甲基亚砜(DMSO,99%,西格玛-奥尔德里奇公司),N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺三氟乙酸盐(AEM,98%,西格玛-奥尔德里奇公司),L-半胱氨酸(98.5%,西格玛-奥尔德里奇公司),去离子水(DI)是从超纯实验室水系统中新鲜取出的(密理博公司(Milliq),默克公司(Merck)),镍-氨三乙酸琼脂糖(Ni-NTA琼脂糖,Protino公司),甘氨酸(99.5%,VWR),5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(埃尔曼试剂,DTNB,98%,西格玛-奥尔德里奇公司),碳酸氢钠(99.7%,西格玛-奥尔德里奇公司),碳酸钠(99.9%,西格玛-奥尔德里奇公司),具有Sephadex G-25树脂的PD MiniTrap脱盐柱(通用电气医疗保健公司),PD10G25脱盐柱(通用电气医疗保健公司)、Zeba旋转脱盐柱(0.5、2、5、和10mL(赛默飞世尔公司),Vivaspin离心过滤器T4 10kDa MWC0,T4 100kDa MWC0,和T15(赛多利斯公司),Biosep s3000 aSEC柱(菲罗门公司(Phenomenex)),Vivacell超滤装置10和30kDa MWC0(赛多利斯公司),Nalgene快速流动过滤器(赛默飞世尔公司),丙烯酰胺(99.9%,西格玛-奥尔德里奇公司),十二烷基硫酸钠(98%,西格玛-奥尔德里奇公司),过硫酸铵(APS,98%,西格玛-奥尔德里奇公司),甘油(99%,西格玛-奥尔德里奇公司),溴酚蓝(西格玛-奥尔德里奇公司)、聚乙二醇十二烷基醚(Brij-35,西格玛-奥尔德里奇公司)。所有S01861衍生物(S01861-EMCH、S01861-AEM、树状突-[L-S01861]_n)、所有QS21衍生物(QS21-EMCH、QS21-AEM、树状突-[L-QS21]_n)和三官能接头衍生物均在内部生产。

[0537] 合成

[0538] 1.V_{HH}-[S-三官能接头-(L-S01861)-(L-HSP27 BNA)]₄

[0539] HER2-V_{HH}-[S-Tri-(L-S01861)-(L-HSP27)]₄,HER2-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-

HSP27)]₄,

[0540] EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(L-S01861)-(L-HSP27)]₄,EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]₄,

[0541] CD71-V_{HH}-[S-Tri-(L-S01861)-(L-HSP27)]₄,CD71-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]₄,

[0542] HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}和CD71-V_{HH}在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有HSP27 BNA衍生物的马来酰亚胺(Mal)缀合,下文称之为“HSP27-Mal”。这些HSP27-Mal衍生物是:1)Mal-三官能接头-(L-S01861)-(L-HSP27 BNA),2)Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-HSP27 BNA)。针对HER2-V_{HH}-[S-三官能接头-(L-S01861)-(L-HSP27 BNA)]₄,示例性地描述了该程序:

[0543] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml,然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg(4.0ml)等份中加入10μl/ml的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml,3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml,0.26M),得到50mM TBS,2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0544] 向Ab(2.1mg,0.5mg/ml,0.14μmol)中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml,2.35摩尔当量,0.32μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前),从每种混合物中取出约0.2mg(0.044ml)等份的Ab-SH,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg,7.6nmol和0.12mg,8.3nmol),向每等份中加入等份的每一HSP27 BNA-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备,2mg/ml,1.3摩尔当量/“硫醇”,40nmol和43nmol),将混合物短暂涡旋,然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-HSP27 BNA衍生物2缀合反应外,两等份的脱盐的Ab-SH(50μg,3.3nmol)分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”,17.3nmol,6.7μl的0.25mg/ml溶液)或TBS pH7.5缓冲液(6.7μl)在20℃反应120分钟,作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前),取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份,并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照,以获得HSP27 BNA衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml,2.5摩尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用1.6×30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至0.2μm。

[0545] 2.V_{HH}-[S-三官能接头-(S-S01861)-(L-HSP27 BNA)]₄

[0546] HER2-V_{HH}-[S-Tri-(S-S01861)-(L-HSP27)]₄,HER2-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]₄,

[0547] EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(S-S01861)-(L-HSP27)]₄,EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]₄,

[0548] CD71-V_{HH}-[S-Tri-(S-S01861)-(L-HSP27)]₄,CD71-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]₄,

[0549] HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}和CD71-V_{HH}在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有HSP27 BNA衍生物的马来酰亚胺(Mal)缀合,下文称之为“HSP27-Mal”。这

些HSP27-Ma1衍生物是:1)Ma1-三官能接头-(S-S01861)-(L-HSP27 BNA),2)Ma1-三官能接头-(封闭的)-(L-HSP27 BNA)。针对 $HER2-V_{HH}-[S-三官能接头-(S-S01861)-(L-HSP27 BNA)]_4$,示例性地描述了该程序:

[0550] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml,然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg(4.0ml)等份中加入10 μ l/ml的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml,3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml,0.26M),得到50mM TBS,2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0551] 向Ab(2.1mg,0.5mg/ml,0.14 μ mol)中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml,2.35摩尔当量,0.32 μ mol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前),从每种混合物中取出约0.2mg(0.044ml)等份的Ab-SH,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg,7.6nmol和0.12mg,8.3nmol),向每等份中加入等份的每一HSP27 BNA-Ma1衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备,2mg/ml,1.3摩尔当量/“硫醇”,40nmol和43nmol),将混合物短暂涡旋,然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-HSP27 BNA衍生物2缀合反应外,两等份的脱盐的Ab-SH(50 μ g,3.3nmol)分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”,17.3nmol,6.7 μ l的0.25mg/ml溶液)或TBS pH7.5缓冲液(6.7 μ l)在20℃反应120分钟,作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前),取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份,并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照,以获得HSP27 BNA衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml,2.5摩尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用1.6 $\times$ 30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至0.2 μ m。

[0552] $3.V_{HH}-[S-三官能接头-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-HSP27 BNA)]_4$

[0553] $HER2-V_{HH}-[S-Tri-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-HSP27)]_4$, $HER2-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]_4$,

[0554] $EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-HSP27)]_4$, $EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]_4$,

[0555] $CD71-V_{HH}-[S-Tri-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-HSP27)]_4$, $CD71-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-HSP27)]_4$,

[0556] $HER2-V_{HH}$ 、 $EGFR-V_{HH}$ 和 $CD71-V_{HH}$ 在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有HSP27 BNA衍生物马来酰亚胺(Ma1)缀合,下文称之为“HSP27-Ma1”。这些HSP27-Ma1衍生物是:1)Ma1-三官能接头-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-HSP27 BNA),2)Ma1-三官能接头-(封闭的)-(L-HSP27 BNA)。“n”是指4、8或大于8的S01861分子数目。针对 $HER2-V_{HH}-[S-三官能接头-(S-树状突-(L-S01861)_4)-(L-HSP27 BNA)]_4$,示例性地描述了该程序:

[0557] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml,然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg(4.0ml)等份中加入10 μ l/ml的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml,3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml,0.26M),得到50mM TBS,2.5mM EDTA缓冲液

pH 7.5。

[0558] 向Ab (2.1mg, 0.5mg/ml, 0.14 μ mol) 中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液 (1.00mg/ml, 2.35摩尔当量, 0.32 μ mol), 将混合物短暂涡旋, 然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后 (在添加构建体之前), 从每种混合物中取出约0.2mg (0.044ml) 等份的Ab-SH, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征 (硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份 (0.11mg, 7.6nmol和0.12mg, 8.3nmol), 向每等份中加入等份的每一HSP27 BNA-Mal衍生物1-2 (在TBS pH 7.5中新鲜制备, 2mg/ml, 1.3摩尔当量/“硫醇”, 40nmol和43nmol), 将混合物短暂涡旋, 然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-HSP27 BNA衍生物2缀合反应外, 两等份的脱盐的Ab-SH (50 μ g, 3.3nmol) 分别与NEM (1.3摩尔当量/“硫醇”, 17.3nmol, 6.7 μ l的0.25mg/ml溶液) 或TBS pH7.5缓冲液 (6.7 μ l) 在20℃反应120分钟, 作为阳性和阴性对照。孵育后 (在添加NEM之前), 取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份, 并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照, 以获得HSP27 BNA衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液 (0.25mg/ml, 2.5摩尔当量, 19和21nmol), 并且将混合物使用1.6 $\times$ 30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化, 随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤, 得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前, 将产物过滤至0.2 μ m。

[0559] $4 \cdot V_{HH} - [S - \text{三官能接头} - (L - QS21) - (L - HSP27 \text{ BNA})]_4$

[0560] $HER2 - V_{HH} - [S - Tri - (L - QS21) - (L - HSP27)]_4$, $HER2 - V_{HH} - [S - Tri - (\text{封闭的}) - (L - HSP27)]_4$,

[0561] $EGFR - V_{HH} - [S - Tri - (L - QS21) - (L - HSP27)]_4$, $EGFR - V_{HH} - [S - Tri - (\text{封闭的}) - (L - HSP27)]_4$,

[0562] $CD71 - V_{HH} - [S - Tri - (L - QS21) - (L - HSP27)]_4$, $CD71 - V_{HH} - [S - Tri - (\text{封闭的}) - (L - HSP27)]_4$,

[0563] $HER2 - V_{HH}$, $EGFR - V_{HH}$ 和 $CD71 - V_{HH}$ 在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有HSP27 BNA衍生物的马来酰亚胺 (Mal) 缀合, 下文称之为“HSP27-Mal”。这些HSP27-Mal衍生物是: 1) Mal-三官能接头- (L-QS21) - (L-HSP27BNA), 2) Mal-三官能接头- (封闭的) - (L-HSP27 BNA)。针对 $HER2 - V_{HH} - [S - \text{三官能接头} - (L - QS21) - (L - HSP27 \text{ BNA})]_4$, 示例性地描述了该程序:

[0564] 用去离子水 (DI) 将Ab重构至21mg/ml, 然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg (4.0ml) 等份中加入10 μ l/ml的Tris浓缩物 (127mg/ml, 1.05M)、Tris.HCl浓缩物 (623mg/ml, 3.95M) 和EDTA-Na₂浓缩物 (95mg/ml, 0.26M), 得到50mM TBS, 2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0565] 向Ab (2.1mg, 0.5mg/ml, 0.14 μ mol) 中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液 (1.00mg/ml, 2.35摩尔当量, 0.32 μ mol), 将混合物短暂涡旋, 然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后 (在添加构建体之前), 从每种混合物中取出约0.2mg (0.044ml) 等份的Ab-SH, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征 (硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份 (0.11mg, 7.6nmol和0.12mg, 8.3nmol), 向每等份中加入等份的每一HSP27 BNA-Mal衍生物1-2 (在TBS pH 7.5中新鲜制

备, 2mg/ml, 1.3摩尔当量/“硫醇”, 40nmol和43nmol), 将混合物短暂涡旋, 然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-HSP27 BNA衍生物2缀合反应外, 两等份的脱盐的Ab-SH (50μg, 3.3nmol) 分别与NEM (1.3摩尔当量/“硫醇”, 17.3nmol, 6.7μl的0.25mg/ml溶液) 或TBS pH7.5缓冲液 (6.7μl) 在20℃反应120分钟, 作为阳性和阴性对照。孵育后 (在添加NEM之前), 取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份, 并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照, 以获得HSP27 BNA衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液 (0.25mg/ml, 2.5摩尔当量, 19和21nmol), 并且将混合物使用1.6×30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化, 随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤, 得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前, 将产物过滤至0.2μm。

[0566] $5.V_{HH} - [S - \text{三官能接头} - (S - QS21) - (L - HSP27 \text{ BNA})]_4$

[0567] $HER2 - V_{HH} - [S - \text{Tri} - (S - QS21) - (L - HSP27)]_4, HER2 - V_{HH} - [S - \text{Tri} - (\text{封闭的}) - (L - HSP27)]_4,$

[0568] $EGFR - V_{HH} - [S - \text{Tri} - (S - QS21) - (L - HSP27)]_4, EGFR - V_{HH} - [S - \text{Tri} - (\text{封闭的}) - (L - HSP27)]_4,$

[0569] $CD71 - V_{HH} - [S - \text{Tri} - (S - QS21) - (L - HSP27)]_4, CD71 - V_{HH} - [S - \text{Tri} - (\text{封闭的}) - (L - HSP27)]_4,$

[0570] $HER2 - V_{HH}, EGFR - V_{HH}$ 和 $CD71 - V_{HH}$ 在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有HSP27 BNA衍生物的马来酰亚胺 (Mal) 缀合, 下文称之为“HSP27-Mal”。这些HSP27-Mal衍生物是: 1) Mal-三官能接头- (S-QS21) - (L-HSP27BNA), 2) Mal-三官能接头- (封闭的) - (L-HSP27 BNA)。针对 $HER2 - V_{HH} - [S - \text{三官能接头} - (S - QS21) - (L - HSP27 \text{ BNA})]_4$, 示例性地描述了该程序:

[0571] 用去离子水 (DI) 将Ab重构至21mg/ml, 然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg (4.0ml) 等份中加入10μl/ml的Tris浓缩物 (127mg/ml, 1.05M)、Tris.HCl浓缩物 (623mg/ml, 3.95M) 和EDTA- Na_2 浓缩物 (95mg/ml, 0.26M), 得到50mM TBS, 2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0572] 向Ab (2.1mg, 0.5mg/ml, 0.14μmol) 中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液 (1.00mg/ml, 2.35摩尔当量, 0.32μmol), 将混合物短暂涡旋, 然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后 (在添加构建体之前), 从每种混合物中取出约0.2mg (0.044ml) 等份的Ab-SH, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征 (硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份 (0.11mg, 7.6nmol和0.12mg, 8.3nmol), 向每等份中加入等份的每一HSP27 BNA-Mal衍生物1-2 (在TBS pH 7.5中新鲜制备, 2mg/ml, 1.3摩尔当量/“硫醇”, 40nmol和43nmol), 将混合物短暂涡旋, 然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-HSP27 BNA衍生物2缀合反应外, 两等份的脱盐的Ab-SH (50μg, 3.3nmol) 分别与NEM (1.3摩尔当量/“硫醇”, 17.3nmol, 6.7μl的0.25mg/ml溶液) 或TBS pH7.5缓冲液 (6.7μl) 在20℃反应120分钟, 作为阳性和阴性对照。孵育后 (在添加NEM之前), 取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份, 并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照, 以获得HSP27 BNA衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液 (0.25mg/ml, 2.5摩

尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用 $1.6 \times 30\text{cm}$ Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至 $0.2\mu\text{m}$ 。

[0573] $6.V_{\text{HH}}-[S\text{-三官能接头}-(S\text{-树状突}-(L\text{-QS21})_n)-(L\text{-HSP27 BNA})]_4$

[0574] $\text{HER2-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(S\text{-树状突}-(L\text{-QS21})_n)-(L\text{-HSP27})]_4, \text{HER2-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(\text{封闭的})-(L\text{-HSP27})]_4,$

[0575] $\text{EGFR-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(S\text{-树状突}-(L\text{-QS21})_n)-(L\text{-HSP27})]_4, \text{EGFR-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(\text{封闭的})-(L\text{-HSP27})]_4,$

[0576] $\text{CD71-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(S\text{-树状突}-(L\text{-QS21})_n)-(L\text{-HSP27})]_4, \text{CD71-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(\text{封闭的})-(L\text{-HSP27})]_4,$

[0577] $\text{HER2-}V_{\text{HH}}, \text{EGFR-}V_{\text{HH}}$ 和 $\text{CD71-}V_{\text{HH}}$ 在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有HSP27 BNA衍生物的马来酰亚胺(Mal)缀合,下文称之为“HSP27-Mal”。这些HSP27-Mal衍生物是:1)Mal-三官能接头-(S-树状突-(L-QS21)_n)-(L-HSP27 BNA),2)Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-HSP27 BNA)。“n”是指4、8或大于8的QS21分子数目。针对 $\text{HER2-}V_{\text{HH}}-[S\text{-三官能接头}-(S\text{-树状突}-(L\text{-QS21})_4)-(L\text{-HSP27 BNA})]_4$,示例性地描述了该程序:

[0578] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml,然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg(4.0ml)等份中加入10 μl /ml的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml,3.95M)和EDTA- Na_2 浓缩物(95mg/ml,0.26M),得到50mM TBS,2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0579] 向Ab(2.1mg,0.5mg/ml,0.14 μmol)中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml,2.35摩尔当量,0.32 μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前),从每种混合物中取出约0.2mg(0.044ml)等份的Ab-SH,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg,7.6nmol和0.12mg,8.3nmol),向每等份中加入等份的每一HSP27 BNA-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备,2mg/ml,1.3摩尔当量/“硫醇”,40nmol和43nmol),将混合物短暂涡旋,然后在20 $^{\circ}\text{C}$ 孵育120分钟。除了Ab-HSP27 BNA衍生物2缀合反应外,两等份的脱盐的Ab-SH(50 μg ,3.3nmol)分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”,17.3nmol,6.7 μl 的0.25mg/ml溶液)或TBS pH7.5缓冲液(6.7 μl) 在20 $^{\circ}\text{C}$ 反应120分钟,作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前),取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份,并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照,以获得HSP27 BNA衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml,2.5摩尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用 $1.6 \times 30\text{cm}$ Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至 $0.2\mu\text{m}$ 。

[0580] $7.V_{\text{HH}}-[S\text{-三官能接头}-(L\text{-S01861})-(L\text{-香石竹毒蛋白})]_4$

[0581] $\text{HER2-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(L\text{-S01861})-(L\text{-香石竹毒蛋白})]_4, \text{HER2-}V_{\text{HH}}-[S\text{-Tri}-(\text{封闭的})-(L\text{-香石竹毒蛋白})]_4,$

[0582] EGFR- V_{HH} -[S-Tri-(L-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, EGFR- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0583] CD71- V_{HH} -[S-Tri-(L-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, CD71- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0584] HER2- V_{HH} 、EGFR- V_{HH} 和CD71- V_{HH} 在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有香石竹毒蛋白衍生物马来酰亚胺(Mal)缀合,下文称之为“香石竹毒蛋白-Mal”。这些香石竹毒蛋白-Mal衍生物是:1)Mal-三官能接头-(L-S01861)-(L-香石竹毒蛋白),2)Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)。针对HER2- V_{HH} -[S-三官能接头-(L-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,示例性地描述了该程序:

[0585] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml,然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg(4.0ml)等份中加入10μl/ml的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml,3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml,0.26M),得到50mM TBS,2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0586] 向Ab(2.1mg,0.5mg/ml,0.14μmol)中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml,2.35摩尔当量,0.32μmol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前),从每种混合物中取出约0.2mg(0.044ml)等份的Ab-SH,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg,7.6nmol和0.12mg,8.3nmol),向每等份中加入等份的每一香石竹毒蛋白-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备,2mg/ml,1.3摩尔当量/“硫醇”,40nmol和43nmol),将混合物短暂涡旋,然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-香石竹毒蛋白衍生物2缀合反应外,两等份的脱盐的Ab-SH(50μg,3.3nmol)分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”,17.3nmol,6.7μl的0.25mg/ml溶液)或TBS pH7.5缓冲液(6.7μl)在20℃反应120分钟,作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前),取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份,并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照,以获得香石竹毒蛋白衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml,2.5摩尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用1.6×30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至0.2μm。

[0587] 8. V_{HH} -[S-三官能接头-(S-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄

[0588] HER2- V_{HH} -[S-Tri-(S-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, HER2- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0589] EGFR- V_{HH} -[S-Tri-(S-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, EGFR- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0590] CD71- V_{HH} -[S-Tri-(S-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, CD71- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0591] HER2- V_{HH} 、EGFR- V_{HH} 和CD71- V_{HH} 在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有香石竹毒蛋白衍生物马来酰亚胺(Mal)缀合,下文称之为“香石竹毒蛋白-Mal”。这些香石竹毒蛋白-Mal衍生物是:1)Mal-三官能接头-(S-S01861)-(L-香石竹毒

蛋白), 2) Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)。针对HER2- V_{HH} -[S-三官能接头-(S-S01861)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, 示例性地描述了该程序:

[0592] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml, 然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg (4.0ml) 等份中加入10μl/ml的Tris浓缩物(127mg/ml, 1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml, 3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml, 0.26M), 得到50mM TBS, 2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0593] 向Ab (2.1mg, 0.5mg/ml, 0.14μmol) 中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml, 2.35摩尔当量, 0.32μmol), 将混合物短暂涡旋, 然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前), 从每种混合物中取出约0.2mg (0.044ml) 等份的Ab-SH, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg, 7.6nmol和0.12mg, 8.3nmol), 向每等份中加入等份的每一香石竹毒蛋白-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备, 2mg/ml, 1.3摩尔当量/“硫醇”, 40nmol和43nmol), 将混合物短暂涡旋, 然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-香石竹毒蛋白衍生物2缀合反应外, 两等份的脱盐的Ab-SH (50μg, 3.3nmol) 分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”, 17.3nmol, 6.7μl的0.25mg/ml溶液) 或TBS pH7.5缓冲液(6.7μl) 在20℃反应120分钟, 作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前), 取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份, 并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照, 以获得香石竹毒蛋白衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml, 2.5摩尔当量, 19和21nmol), 并且将混合物使用1.6×30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化, 随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤, 得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前, 将产物过滤至0.2μm。

[0594] 9. V_{HH} -[S-三官能接头-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄

[0595] HER2- V_{HH} -[S-Tri-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, HER2- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0596] EGFR- V_{HH} -[S-Tri-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, EGFR- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0597] CD71- V_{HH} -[S-Tri-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, CD71- V_{HH} -[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0598] HER2- V_{HH} 、EGFR- V_{HH} 和CD71- V_{HH} 在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有香石竹毒蛋白衍生物的马来酰亚胺(Mal)缀合, 下文称之为“香石竹毒蛋白-Mal”。这些香石竹毒蛋白-Mal衍生物是: 1) Mal-三官能接头-(S-树状突-(L-S01861)_n)-(L-香石竹毒蛋白), 2) Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)。“n”是指4、8或大于8的S01861分子数目。针对HER2- V_{HH} -[S-三官能接头-(S-树状突-(L-S01861)₄)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, 示例性地描述了该程序:

[0599] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml, 然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg (4.0ml) 等份中加入10μl/ml的Tris浓缩物(127mg/ml, 1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml, 3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml, 0.26M), 得到50mM TBS, 2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0600] 向Ab (2.1mg, 0.5mg/ml, 0.14 μ mol) 中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液 (1.00mg/ml, 2.35摩尔当量, 0.32 μ mol), 将混合物短暂涡旋, 然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前), 从每种混合物中取出约0.2mg (0.044ml) 等份的Ab-SH, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg, 7.6nmol和0.12mg, 8.3nmol), 向每等份中加入等份的每一香石竹毒蛋白-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备, 2mg/ml, 1.3摩尔当量/“硫醇”, 40nmol和43nmol), 将混合物短暂涡旋, 然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-香石竹毒蛋白衍生物2缀合反应外, 两等份的脱盐的Ab-SH (50 μ g, 3.3nmol) 分别与NEM (1.3摩尔当量/“硫醇”, 17.3nmol, 6.7 μ l的0.25mg/ml溶液) 或TBS pH7.5缓冲液 (6.7 μ l) 在20℃反应120分钟, 作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前), 取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份, 并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照, 以获得香石竹毒蛋白衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液 (0.25mg/ml, 2.5摩尔当量, 19和21nmol), 并且将混合物使用1.6 $\times$ 30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化, 随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤, 得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前, 将产物过滤至0.2 μ m。

[0601] 10.V_{HH}-[S-三官能接头-(L-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄

[0602] HER2-V_{HH}-[S-Tri-(L-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, HER2-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0603] EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(L-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0604] CD71-V_{HH}-[S-Tri-(L-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, CD71-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0605] HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}和CD71-V_{HH}在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有香石竹毒蛋白衍生物马来酰亚胺(Mal)缀合, 下文称之为“香石竹毒蛋白Mal”。这些香石竹毒蛋白-Mal衍生物是: 1) Mal-三官能接头-(L-QS21)-(L-香石竹毒蛋白), 2) Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)。针对HER2-V_{HH}-[S-三官能接头-(L-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄, 示例性地描述了该程序:

[0606] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml, 然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg (4.0ml) 等份中加入10 μ l/ml的Tris浓缩物 (127mg/ml, 1.05M)、Tris.HCl浓缩物 (623mg/ml, 3.95M) 和EDTA-Na₂浓缩物 (95mg/ml, 0.26M), 得到50mM TBS, 2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0607] 向Ab (2.1mg, 0.5mg/ml, 0.14 μ mol) 中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液 (1.00mg/ml, 2.35摩尔当量, 0.32 μ mol), 将混合物短暂涡旋, 然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前), 从每种混合物中取出约0.2mg (0.044ml) 等份的Ab-SH, 并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg, 7.6nmol和0.12mg, 8.3nmol), 向每等份中加入等份的每一香石竹毒蛋白-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备, 2mg/ml, 1.3摩尔当量/“硫醇”, 40nmol和43nmol), 将混合物短暂涡旋, 然后在20℃孵

育120分钟。除了Ab-香石竹毒蛋白衍生物2缀合反应外,两等份的脱盐的Ab-SH(50 μ g, 3.3nmol)分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”,17.3nmol,6.7 μ l的0.25mg/ml溶液)或TBS pH7.5缓冲液(6.7 μ l)在20 $^{\circ}$ C反应120分钟,作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前),取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份,并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照,以获得香石竹毒蛋白衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml,2.5摩尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用1.6 $\times$ 30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至0.2 μ m。

[0608] 11.V_{HH}-[S-三官能接头-(S-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄

[0609] HER2-V_{HH}-[S-Tri-(S-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,HER2-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0610] EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(S-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0611] CD71-V_{HH}-[S-Tri-(S-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,CD71-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0612] HER2-V_{HH}、EGFR-V_{HH}和CD71-V_{HH}在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有香石竹毒蛋白衍生物马来酰亚胺(Mal)缀合,下文称之为“香石竹毒蛋白-Mal”。这些香石竹毒蛋白-Mal衍生物是:1)Mal-三官能接头-(S-QS21)-(L-香石竹毒蛋白),2)Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)。针对HER2-V_{HH}-[S-三官能接头-(S-QS21)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,示例性地描述了该程序:

[0613] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml,然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg(4.0ml)等份中加入10 μ l/ml的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml,3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml,0.26M),得到50mM TBS,2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0614] 向Ab(2.1mg,0.5mg/ml,0.14 μ mol)中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml,2.35摩尔当量,0.32 μ mol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20 $^{\circ}$ C孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前),从每种混合物中取出约0.2mg(0.044ml)等份的Ab-SH,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg,7.6nmol和0.12mg,8.3nmol),向每等份中加入等份的每一香石竹毒蛋白-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备,2mg/ml,1.3摩尔当量/“硫醇”,40nmol和43nmol),将混合物短暂涡旋,然后在20 $^{\circ}$ C孵育120分钟。除了Ab-香石竹毒蛋白衍生物2缀合反应外,两等份的脱盐的Ab-SH(50 μ g, 3.3nmol)分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”,17.3nmol,6.7 μ l的0.25mg/ml溶液)或TBS pH7.5缓冲液(6.7 μ l)在20 $^{\circ}$ C反应120分钟,作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前),取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份,并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照,以获得香石竹毒蛋白衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml,2.5摩尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用1.6 $\times$ 30cm Sephadex G50M用

DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至0.2 μ m。

[0615] 12.V_{HH}-[S-三官能接头-(S-树状突-(L-QS21)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄

[0616] HER2-V_{HH}-[S-Tri-(S-树状突-(L-QS21)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,HER2-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0617] EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(S-树状突-(L-QS21)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,EGFR-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0618] CD71-V_{HH}-[S-Tri-(S-树状突-(L-QS21)_n)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,CD71-V_{HH}-[S-Tri-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白)]₄,

[0619] HER2-V_{HH},EGFR-V_{HH}和CD71-V_{HH}在下文中被称为“Ab”。Ab通过迈克尔型硫醇-烯反应与两种不同的带有香石竹毒蛋白衍生物的马来酰亚胺(Mal)缀合,下文称之为“香石竹毒蛋白-Mal”。这些香石竹毒蛋白-Mal衍生物是:1)Mal-三官能接头-(S-树状突-(L-QS21)_n)-(L-香石竹毒蛋白-Mal),2)Mal-三官能接头-(封闭的)-(L-香石竹毒蛋白-Mal)。“n”是指4、8或大于8的QS21分子数目。针对HER2-V_{HH}-[S-三官能接头-(S-树状突-(L-QS21)₄)-(L-香石竹毒蛋白-Mal)]₄,示例性地描述了该程序:

[0620] 用去离子水(DI)将Ab重构至21mg/ml,然后用组氨酸缓冲液pH 6稀释至5mg/ml。向20mg(4.0ml)等份中加入10 μ l/ml的Tris浓缩物(127mg/ml,1.05M)、Tris.HCl浓缩物(623mg/ml,3.95M)和EDTA-Na₂浓缩物(95mg/ml,0.26M),得到50mM TBS,2.5mM EDTA缓冲液pH 7.5。

[0621] 向Ab(2.1mg,0.5mg/ml,0.14 μ mol)中加入等份的新鲜制备的TCEP溶液(1.00mg/ml,2.35摩尔当量,0.32 μ mol),将混合物短暂涡旋,然后用辊混合在20℃孵育90分钟。孵育后(在添加构建体之前),从每种混合物中取出约0.2mg(0.044ml)等份的Ab-SH,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。这些等份通过UV-vis分析和Ellman测定进行表征(硫醇比ab的比率=4.0)。将主体Ab-SH分成两等份(0.11mg,7.6nmol和0.12mg,8.3nmol),向每等份中加入等份的每一香石竹毒蛋白-Mal衍生物1-2(在TBS pH 7.5中新鲜制备,2mg/ml,1.3摩尔当量/“硫醇”,40nmol和43nmol),将混合物短暂涡旋,然后在20℃孵育120分钟。除了Ab-香石竹毒蛋白衍生物2缀合反应外,两等份的脱盐的Ab-SH(50 μ g,3.3nmol)分别与NEM(1.3摩尔当量/“硫醇”,17.3nmol,6.7 μ l的0.25mg/ml溶液)或TBS pH7.5缓冲液(6.7 μ l)在20℃反应120分钟,作为阳性和阴性对照。孵育后(在添加NEM之前),取出0.100ml等份的Ab-构建体2混合物,并使用zeba旋转脱盐柱通过凝胶过滤纯化至TBS pH 7.5中。通过UV-vis表征该等份,并且通过Ellman测定表征阳性和阴性对照,以获得香石竹毒蛋白衍生物2掺入。向每个主体Ab-构建体混合物中加入等份的新鲜制备的NEM溶液(0.25mg/ml,2.5摩尔当量,19和21nmol),并且将混合物使用1.6 $\times$ 30cm Sephadex G50M用DPBS pH 7.5洗脱通过凝胶过滤纯化,随后重复离心过滤并使用100KDa MWC0浓缩器洗涤,得到纯化的Ab-构建体1-2缀合物。在分配用于生物评估之前,将产物过滤至0.2 μ m。

[0622] 实例4

[0623] 本发明的缀合物。图1F-I显示了本发明的四种典型的分子组装体或缀合物(共价复合物)。制造和纯化这些缀合物,用于在基于细胞的生物测定、体内动物模型等中进行测试。

[0624] 图1F是表示根据本发明的内体/溶酶体逃逸增强缀合物的卡通图,其包含至少一个与靶向配体如IgG(或在一些实施例中为sdAb)复合(共价结合)的皂苷部分“S”,其中皂苷直接与抗体连接,或通过(可切割的)接头与抗体结合,抗体进一步通过一个或多个(可切割的)键与至少一个效应子部分“E”复合(共价结合)。皂苷通常与配体(此处为抗体)中半胱氨酸的-SH基团连接。效应子部分通常与配体(此处为抗体)中半胱氨酸的-SH基团连接。典型地,所述至少一个皂苷选自SA1641、S01861、GE1741、QS-21、QS-7或其衍生物以及其组合,并且优选皂苷S01861(衍生物)。选择掺入本发明缀合物的典型细胞表面分子靶向配体是对(肿瘤)细胞表面受体特异的免疫球蛋白,例如曲妥珠单抗、西妥昔单抗、抗CD71单克隆抗体或用于结合EGFR的EGF。在图1F中,细胞靶向配体是对细胞表面受体特异的抗体。典型的靶向细胞表面分子是HER2、EGFR、CD20、CD22、叶酸受体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L、PSMA、CanAg、整合素- α_v 、CA6、CD33、间皮素、Cripto、CD3、CD30、CD33、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、肝配蛋白A4、MUC1、Trop2、CD38、FGFR3、CD123、DLL3、CEACAM5、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD71。已知的肿瘤靶向抗体也优选用于制造根据图1F的本发明的缀合物。典型地,一个或多个效应子部分选自(蛋白质)毒素,例如香石竹毒蛋白、皂草毒蛋白、核糖体失活蛋白,或者是寡核苷酸,例如RNA、siRNA、mRNA、BNA或酶。皂苷和载荷(效应子部分)直接共价偶联到抗体上,或者通过接头如可切割接头连接到抗体上,可切割接头在酸性条件下可切割,如pH 4.5-5.5。

[0625] 由本发明人制造并测试活性的图1F的内体/溶酶体逃逸增强缀合物的实例至少是西妥昔单抗、抗CD71单克隆抗体和曲妥珠单抗与(末端)S01861偶联并与载荷如HSP27沉默性ASO(BNA)、香石竹毒蛋白、Cre重组酶偶联。在本发明的上下文中,术语“末端”应理解为在本发明的缀合物中与单个另外的分子共价连接的分子。例如,在缀合物皂苷-sdAb-效应子部分中,应当理解,皂苷和效应子部分都是缀合物中的末端部分,而sdAb是带有两个末端部分的中心部分。

[0626] 图1G是表示根据本发明的内体/溶酶体逃逸增强缀合物的卡通图,其包含至少一个通过支架部分如树状突或PAMAM与靶向配体如IgG复合的皂苷部分“S”,其中皂苷与树状突直接连接,或通过(可切割的)接头连接。树状突部分通常与配体(抗体)中半胱氨酸的-SH基团连接。通常,皂苷选自SA1641、S01861、GE1741、QS-21、QS-7及其组合和其衍生物,并且皂苷S01861(衍生物)是优选的。选择掺入本发明缀合物的典型细胞表面分子靶向配体是对(肿瘤)细胞表面受体特异的免疫球蛋白,例如曲妥珠单抗、抗CD71单克隆抗体、西妥昔单抗。本领域已知的抗肿瘤单克隆抗体也优选用于制造根据图1G的本发明的缀合物。缀合物包含进一步与至少一个效应子部分“E”复合的抗体,其中一个或多个效应子部分连接到相同的支架上,例如与至少一各皂苷部分偶联的树状突,效应子部分通过一个或多个(可切割的)键,例如通过接头,与树状突偶联。通常,抗体结合任何细胞表面分子HER2、EGFR、CD20、CD22、叶酸受体1、CD146、CD56、CD19、CD138、CD27L、PSMA、CanAg、整合素- α_v 、CA6、CD33、间皮素、Cripto、CD3、CD30、CD33、CD239、CD70、CD123、CD352、DLL3、CD25、肝配蛋白A4、MUC1、Trop2、CD38、FGFR3、CD123、DLL3、CEACAM5、HER3、CD74、PTK7、Notch3、FGF2、C4.4A、FLT3、CD71。

[0627] 由发明人制造并测试活性的图1G的内体/溶酶体逃逸增强缀合物的实例至少是具有至少一个树状突的曲妥珠单抗,该至少一个树状突结合到一个或多个(末端)皂苷部分和

一个或多个(末端)载荷部分(一个或多个效应子部分)。皂苷通常是S01861,载荷通常是能够沉默HSP27的BNA(ASO(BNA)),或(蛋白质)毒素或siRNA。S01861(衍生物)通过可切割的脲键(共价键)与树状突偶联。

[0628] 实例5

[0629] S01861通过半胱氨酸残基(Cys)缀合(不稳定)并且香石竹毒蛋白(蛋白毒素)通过赖氨酸残基(Lys)缀合(稳定)西妥昔单抗(识别和结合人EGFR的单克隆抗体),导致产生:西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)²。如图1J所示,在A431(EGFR⁺)异种小鼠肿瘤模型中测试缀合物对EGFR肿瘤靶向细胞的杀伤作用。在第12天肿瘤达到约150mm³大小时开始给药,每次给药后测定肿瘤体积。使用西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)²或西妥昔单抗-(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{1,6}对小鼠(n=3)进行处理(腹膜内;i.p.;剂量递增),第12天:0.5mg/kg;第15天:1mg/kg,第24天:1.5mg/kg。在第26天,与对照组相比,在用西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)²治疗的荷瘤小鼠中观察到肿瘤体积减小(图8A)。这表明S01861与抗体-蛋白毒素(稳定的)缀合物的不稳定缀合增强了肿瘤靶向抗体-蛋白毒素的靶向治疗功效,从而诱导了更有效的肿瘤靶向治疗。

[0630] 接下来,S01861通过半胱氨酸残基(Cys)缀合(不稳定)并且香石竹毒蛋白(蛋白毒素)通过赖氨酸残基(Lys)缀合(不稳定)西妥昔单抗(识别和结合人EGFR的单克隆抗体),导致产生:西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)²。如图1J所示,在A431(EGFR⁺)异种小鼠肿瘤模型中测试缀合物对EGFR肿瘤靶向细胞的杀伤作用。在第12天肿瘤达到约150mm³大小时开始给药,每次给药后测定肿瘤体积。使用西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)²或西妥昔单抗-(Lys-L-香石竹毒蛋白)^{1,6}对小鼠(n=3)进行处理(腹膜内;i.p.;剂量递增),第12天:0.5mg/kg;第15天:1mg/kg,第24天:1.5mg/kg。这表明,与对照组相比,在35天后,用西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)²治疗的荷瘤小鼠显示出肿瘤生长抑制(图8B)。当用根据本发明的西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)²对小鼠(n=3;静脉内.i.v.;剂量递增,第12天:0.5mg/kg;第15天:1mg/kg,第18天:2mg/kg,第24天:2.5mg/kg)进行治疗时,与对照相比也观察到肿瘤生长抑制(数据代表1只小鼠,因为2只小鼠在治疗期间死亡)。这表明S01861与抗体-蛋白毒素(不稳定的)缀合物的不稳定缀合增强了肿瘤靶向抗体-蛋白毒素的靶向治疗功效,从而与不含皂苷的抗体-寡核苷酸缀合物相比,诱导了更有效的肿瘤靶向治疗。

[0631] 接下来,S01861-EMCH通过半胱氨酸残基(Cys)与西妥昔单抗(识别和结合人EGFR的单克隆抗体)缀合(DAR 3,9)并且反义HSP27BNA寡核苷酸(靶向并诱导癌细胞中肿瘤靶hsp27 mRNA的降解(基因沉默))通过抗体赖氨酸残基(Lys)的不稳定(L)接头缀合(DAR 1,8),导致产生西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-HSP27BNA)^{1,8}。根据图1K所示的本发明,在A431异种“裸”小鼠肿瘤模型中测试西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-HSP27BNA)^{1,8}的EGFR介导的肿瘤靶向HSP27基因沉默。在第12天肿瘤达到约150mm³大小时开始给药,并测定HSP27 mRNA表达。为此,在第一次给药后72小时收集肿瘤样品,并与细胞对照mRNA表达水平(参照基因)相比分析HSP27基因表达水平。接受30mg/kg的西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-HSP27BNA)^{1,8}治疗的荷瘤小鼠(n=3)(腹膜内;i.p.)为在1次给药后显示,与单一给药西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}或西妥昔单抗-(Lys-L-HSP27BNA)^{1,5}相比,肿瘤中HSP27 mRNA表达减少40%(图9)。与媒介剂对照的肿瘤相比,观察到HSP27基因表

达减少25%。这表明并使得根据本发明,S01861和HSP27BNA与同一靶向抗体的缀合能够有效诱导治疗性反义寡核苷酸在荷瘤小鼠的实体瘤中的由S01861介导的增强的细胞质递送,诱导肿瘤靶向基因沉默。

[0632] 在另一个实例中,设计并制备了三官能接头支架,其具有三个特定的化学端基,用于在一个臂上与S01861缀合,在另一个臂上与HSP27BNA缀合,以产生S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA。接下来,S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA用其第三臂与抗EGFR抗体西妥昔单抗的半胱氨酸残基(Cys)缀合(西妥昔单抗-Cys-(S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}),并在A431异种“裸”小鼠肿瘤模型中测试EGFR介导的肿瘤靶向基因沉默活性,根据本发明如图1L所示。在第12天肿瘤达到约150mm³大小时开始给药,并测定HSP27 mRNA表达。为此,在第一次给药后72小时收集肿瘤样品,并与细胞对照mRNA表达水平(参照基因)相比分析HSP27基因表达水平。这表明,与单一给予25mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}或25mg/kg西妥昔单抗-(Lys-L-HSP27BNA)⁴相比,1次给予30mg/kg西妥昔单抗-Cys-(S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}导致肿瘤中HSP27基因表达降低40%(图10)。与媒剂对照肿瘤相比,在用1次给予西妥昔单抗-Cys-(S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}治疗的荷瘤小鼠中观察到25%的HSP27基因表达降低。这表明并使得西妥昔单抗-Cys-(S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}有效诱导治疗性反义寡核苷酸在荷瘤小鼠的实体瘤中由S01861介导的增强的胞质递送,诱导体内靶向基因沉默。

[0633] 实例6

[0634] 在根据本发明的另一个实例中,S01861(不稳定)和蛋白毒素香石竹毒蛋白(不稳定或稳定)与HER2靶向抗体曲妥珠单抗缀合。产生曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}(Lys-L-香石竹毒蛋白)^{1,7}或曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{2,0},并检测其在SK-BR-3(HER2⁺⁺)和MDA-MB-468(HER2⁻)细胞中的增强的细胞杀伤作用,如图1J所示。曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}(Lys-L-香石竹毒蛋白)^{1,7}(IC₅₀=0,8nM)和曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{2,0}(IC₅₀=0,8nM)两者都有效地诱导SK-BR-3细胞(HER2⁺⁺)的细胞杀伤(图11A)。这在单独用曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-(Lys-L-香石竹毒蛋白)^{1,7}、曲妥珠单抗-(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{1,7}或曲妥珠单抗-(L-S01861)^{3,8}处理的SK-BR-3细胞中没有观察到(图11A)。根据本发明,在MDA-MB-468细胞(HER2⁻)中,没有观察到任何缀合物的细胞杀伤活性(图11B)。这表明S01861与HER2靶向抗体-蛋白毒素缀合物的缀合有效地诱导了蛋白毒素在靶细胞中由S01861介导的增强的胞质递送,导致靶细胞死亡。

[0635] 在根据本发明的另一个实例中,S01861(不稳定)和蛋白毒素香石竹毒蛋白(不稳定或稳定)与EGFR靶向抗体西妥昔单抗缀合。测试了西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)²或西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-S-香石竹毒蛋白)²在A431细胞(EGFR⁺⁺)和A2058细胞(EGFR⁻)中增强的细胞杀伤作用(图1J)。与单独使用西妥昔单抗-(Lys-L-香石竹毒蛋白)^{1,6}(IC₅₀=2pM)、西妥昔单抗-(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{1,6}(IC₅₀=2pM)相比,西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,9}(Lys-L-香石竹毒蛋白)²(IC₅₀=0,3nM)和西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,8}(Lys-S-香石竹毒蛋白)^{1,7}(IC₅₀=0,3nM)两者在A431细胞(EGFR⁺⁺)中显示增强的细胞杀伤(图11C)。在A2058细胞(EGFR⁻)中,根据本发明的组合没有显示任何细胞杀伤活性(IC₅₀>200nM;图11D)。这表明S01861与EGFR靶向抗体-蛋白毒素缀合物的缀合有效地增强了蛋白毒素在靶细胞中由S01861介导的胞质递送,导致增强的靶细胞死

亡。

[0636] 实例7

[0637] 在根据本发明的另一个实例中, S01861 (不稳定) 和HSP27BNA寡核苷酸 (不稳定, L) 与EGFR靶向抗体西妥昔单抗缀合。根据图1K所示的本发明, 测试了西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3,8}在A431细胞 (EGFR⁺⁺) 和A2058细胞 (EGFR⁻) 中增强的HSP27基因沉默。与单独的西妥昔单抗、西妥昔单抗- (Lys-L-HSP27BNA)^{3,9}或西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,8}相比, 西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3,8}在A431细胞中有效诱导HSP27基因沉默 (IC₅₀=3nM) (图12A)。在A2058细胞中 (EGFR⁻), 用西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3,8}没有观察到基因沉默活性 (IC₅₀>100nM; 图12B)。这表明并使得根据本发明, S01861和HSP27BNA与同一靶向抗体的缀合能够有效诱导治疗性反义寡核苷酸在靶细胞中由S01861介导的增强的胞质递送, 诱导靶向基因沉默。

[0638] 在根据本发明的另一个实例中, S01861 (不稳定) 和HSP27BNA寡核苷酸 (不稳定) 与HER2靶向抗体曲妥珠单抗缀合。根据图1K所示的本发明, 测试了曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)^{3,8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3,5}在SK-BR-3细胞 (HER2⁺⁺) 细胞中增强的HSP27基因沉默。与单独的曲妥珠单抗- (Lys-L-HSP27BNA)^{4,4}相比, 曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)^{3,8} (Lys-L-HSP27BNA)^{3,5}在SK-BR-3细胞中有效诱导HSP27基因沉默 (IC₅₀=9nM) (图13)。这表明并使得根据本发明, S01861和HSP27BNA与HER2靶向抗体的缀合能够有效诱导治疗性反义寡核苷酸在靶细胞中由S01861介导的增强的胞质递送, 诱导靶向基因沉默。

[0639] 在另一个实例中, 如图1L所示根据本发明, 测试了西妥昔单抗-Cys- (S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}在A431细胞 (EGFR⁺⁺) 和A2058细胞 (EGFR⁻) 中增强的HSP27基因沉默。与单独的西妥昔单抗- (Lys-L-HSP27BNA)⁴或西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,7}相比, 西妥昔单抗-Cys- (S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}在A431细胞中有效诱导HSP27基因沉默 (IC₅₀=2nM) (图14A)。在A2058细胞中 (EGFR⁻), 仅在高 (>80nM) 浓度的西妥昔单抗-Cys- (S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}观察到基因沉默 (IC₅₀=100nM; 图14B)。这表明并使得在高EGFR表达细胞中, 西妥昔单抗-Cys- (S01861-L-三官能接头-L-HSP27BNA)^{3,7}有效诱导治疗性反义寡核苷酸在靶细胞中由S01861介导的增强的胞质递送, 诱导靶向基因沉默。

[0640] 有关共价结合到蛋白毒素或皂苷的抗体和受体配体的许多实施例的总结

[0641] mAb: 曲妥珠单抗 (HER2) 或西妥昔单抗 (EGFR)

[0642] 配体: EGF

[0643] 蛋白毒素: 核糖体失活蛋白, 皂草毒蛋白或香石竹毒蛋白

[0644] 皂苷与配体的内体逃逸增强缀合物:

[0645] mAb-S01861内体逃逸增强缀合物

[0646] • 含有可切割的腺接头

[0647] • 曲妥珠单抗-S01861 DAR 4.0

[0648] • 西妥昔单抗-S01861 DAR 3.7

[0649] 皂苷与配体的内体逃逸增强缀合物在体外或体内试验模型中与以下组合:

[0650] mAb/配体-蛋白毒素缀合物

[0651] • 包含不可切割的化学接头或者是重组融合蛋白

- [0652] • 曲妥珠单抗-皂草毒蛋白 DAR 3.0
- [0653] • 西妥昔单抗-皂草毒蛋白 DAR 2.6
- [0654] • 曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白 DAR 1.0
- [0655] • EGF-香石竹毒蛋白(融合蛋白) DAR 1.0
- [0656] • IgG-皂草毒蛋白 DAR 2.2
- [0657] 对于实例8-13:
- [0658] 材料:
- [0659] 曲妥珠单抗和西妥昔单抗购自药房(夏里特,柏林)。S01861由分析发现有限公司 (Analyticon Discovery GmbH) 从肥皂草获得的原植物提取物中分离和纯化。
- [0660] 方法
- [0661] S01861-EMCH合成
- [0662] S01861来自肥皂草(分析发现有限公司),并根据本领域已知的常规步骤与EMCH偶联。
- [0663] S01861与抗体的缀合
- [0664] 曲妥珠单抗-S01861和西妥昔单抗-S01861的定制生产由菲利特生物加工公司 (FleetBioprocessing) (英国) 完成。S01861-EMCH与抗体的半胱氨酸缀合。
- [0665] 皂草毒蛋白与曲妥珠单抗和西妥昔单抗的缀合
- [0666] 定制的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白和西妥昔单抗-皂草毒蛋白缀合物从先进靶向系统公司 (Advanced Targeting Systems) (圣地亚哥,加利福尼亚州) 生产和购买。IgG-皂草毒蛋白和皂草毒蛋白购自先进靶向系统公司
- [0667] FACS分析
- [0668] 在BD FACSCanto II上进行FACS分析,用FlowJo V10软件进行数据分析,FACS抗体为:1) 同种型:APC小鼠IgG1, κ 同种型Ctrl (FC) (400122,百进公司)。EGFR:APC抗人EGFR (352906,百进公司) HER2:APC抗人CD340 (erbB2/HER-2) (324408,百进公司)。
- [0669] 香石竹毒蛋白产生
- [0670] 在细菌培养物中表达香石竹毒蛋白,并按照本领域已知的常规细胞培养和蛋白质纯化步骤纯化蛋白质。
- [0671] 抗体与香石竹毒蛋白的缀合
- [0672] 抗体和香石竹毒蛋白的缀合是根据本领域已知的普通程序进行的。
- [0673] 细胞培养
- [0674] 在37°C和5% CO₂下,在补充有10%胎牛血清 (FBS) 的DMEM (泛生物技术公司) 中培养细胞。
- [0675] 细胞活力测定
- [0676] 将细胞以5.000-10.000c/w接种在96孔板中,每孔100 μ L,并在37°C下孵育过夜。第二天,在PBS中制备10x浓缩的处理混合物样品,其含有都是10x终浓度的抗体缀合的S01861 (即本发明的“结合分子”或“内体逃逸增强缀合物”) 和靶向毒素 (即“结合分子”)。从细胞培养板中取出培养基,用180 μ L培养基代替,随后添加20 μ L处理混合物/孔。作为对照,制备10x处理混合物样品,其含有相应浓度的仅缀合抗体的S01861、仅抗体、仅S01861、仅靶向毒素或不含化合物的PBS作为媒介对照。在使用内体酸化抑制剂(氯喹(西格玛奥德里奇公司)或

巴弗洛霉素A1(恩佐生命科学公司))的情况下,处理的步骤1中的细胞培养基被180 μ L含有1 μ M氯喹或0.2 μ M巴弗洛霉素A1的培养基所替代。在添加10x处理混合物样品之前,将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。根据本领域已知的标准程序进行剩余的孵育和处理步骤。

[0677] 处理后,将细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育72小时,然后根据制造商的说明(CellTiter 96®水性单溶液细胞增殖测定,普洛麦格公司(Promega))通过MTS测定确定细胞活力。简而言之,在不含酚红(泛生物技术公司)的补充有10% FBS(泛生物技术公司)的DMEM中将MTS溶液稀释20x。用每孔200 μ L PBS洗涤细胞一次,之后每孔添加100 μ L稀释的MTS溶液。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育约20-30分钟。随后,在赛默飞世尔科技公司Multiskan FC平板读数器(赛默飞世尔科技公司)上测量492nm处的光密度。为了定量,在计算未处理/处理细胞的比率之前,通过将未处理孔的背景校正信号除以处理孔的背景校正信号,从所有其他孔中减去“仅培养基”孔的背景信号。

[0678] 结果

[0679] 实例8.1靶标2组分系统

[0680] 1靶标2组分系统是mAb1-蛋白毒素和mAb1-S01861的联合处理(见图1A,E),而2靶标2组分系统是mAb1-蛋白毒素和mAb2-S01861或mAb2-蛋白毒素+mAb1-S01861的组合(图1B-D)。本发明的1靶标1组分系统(将相同的配体如抗体如IgG或sdAb如V_{HH}用于将皂苷共价缀合到所述配体的第一部分,并将效应分子共价缀合到所述配体的第二独立部分)包含例如mAb1-S01861和mAb1-效应子部分(见图1F-L)。

[0681] 西妥昔单抗-S01861(识别并结合EGFR的单克隆抗体,与皂苷分子S01861缀合;内体逃逸增强结合物)在10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白(识别并结合EGFR的单克隆抗体,与蛋白毒素皂草毒蛋白结合)的固定浓度下滴定(基于浓度S01861计算),并测定对高EGFR表达细胞的细胞杀伤。当10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白与高浓度的非靶向非缀合S01861组合时,高EGFR表达细胞(A431或CaSKi)显示出有效的细胞杀伤(A431:[S01861] IC₅₀=600nM和CaSKi:[S01861] IC₅₀=700nM;图15A,15B表A6)。然而,当西妥昔单抗-皂草毒蛋白与西妥昔单抗-S01861组合时,在低浓度的S01861下已经诱导了强烈的细胞杀伤(A431:[S01861] IC₅₀=5nM和Caski [S01861] IC₅₀=8nM;图15A,15B;表A6)。这表明,与非靶向非缀合S01861相比,靶向缀合S01861在诱导内体逃逸方面更有效。接下来,在300nM的西妥昔单抗-S01861的固定浓度下滴定西妥昔单抗-皂草毒蛋白,并测定对EGFR表达细胞的靶向蛋白毒素介导的细胞杀伤。高EGFR表达细胞(A431或CaSKi)仅在高西妥昔单抗-皂草毒蛋白浓度与非靶向非缀合的300nM S01861组合时显示细胞杀伤(A431:[毒素] IC₅₀=40pM;CaSKi:[毒素] IC₅₀=40pM;图15C,15D;表A7)而300nM西妥昔单抗-S01861与低浓度西妥昔单抗-皂草毒蛋白组合已经诱导了有效的细胞杀伤(A431:[毒素] IC₅₀=0.4pM;CaSKi:[毒素] IC₅₀=2pM;图15C和15D;表A7)。当高浓度的非靶向非缀合S01861(1500nM)与低浓度的西妥昔单抗-皂草毒蛋白组合时实现最高的细胞杀伤效率(A431:[毒素] IC₅₀=0.03pM;CaSKi:[毒素] IC₅₀=0.02pM;图15C,15D;表A7)。所有这些表明,当与西妥昔单抗缀合时,相对低浓度的S01861与相对低浓度的西妥昔单抗-皂草毒蛋白组合可有效杀伤高EGFR表达细胞。高浓度(1500nM)的非靶向非缀合S01861与低浓度的西妥昔单抗-皂草毒蛋白的组合仍然是最有效的,因为受体竞争对S01861进入细胞不起作用,因为在1靶标2组分系统中,两种缀合物竞争相同的EGFR受体。受体竞争原理也清楚地显示在没有(A431:[毒素] IC₅₀=40pM;Caski:[毒素]

IC₅₀=40pM)或有75nM西妥昔单抗(A431:[毒素]IC₅₀=1000pM;Caski:从IC₅₀=1000pM;图15C、15D)的西妥昔单抗-毒素滴定处理中。

[0682] 接下来,在10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白的固定浓度滴定西妥昔单抗-S01861(基于浓度S01861计算),并测定对低/无EGFR表达细胞的细胞杀伤。当10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白与高浓度的非靶向非缀合S01861组合时,仅低EGFR表达细胞(HeLa)显示细胞杀伤,而不表达EGFR(A2058)的A2058细胞根本不敏感(HeLa:[S01861]IC₅₀=1000nM;A2058:[S01861]IC₅₀>1000nM;图16A,16B;表A6)。10pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白与增加浓度的西妥昔单抗-S01861的组合在两种细胞系中都没有诱导任何显著的细胞杀伤(HeLa:[S01861]IC₅₀=1000nM;A2058:[S01861]IC₅₀>1000nM;图16A,16B;表A6)。这表明在缺乏足够的受体表达的情况下,没有达到有效的细胞内S01861浓度(阈值)来诱导内体蛋白毒素逃逸和毒素介导的细胞杀伤。接下来,在300nM的西妥昔单抗-S01861的固定浓度下滴定西妥昔单抗-皂草毒蛋白,并测定对低/无EGFR表达细胞的靶向蛋白毒素介导的细胞杀伤。低EGFR表达细胞(HeLa)仅在非常高的西妥昔单抗-皂草毒蛋白浓度与278nM西妥昔单抗-S01861或300nM非缀合S01861组合时显示细胞杀伤,而A2058细胞(EGFR)在任何测试浓度下都不敏感(HeLa:[毒素]IC₅₀=60pM;A2058:[毒素]IC₅₀>10.000pM;图16C,16D;表A7)。在低EGFR表达细胞(HeLa)中,高浓度的非缀合S01861(1500nM)与低浓度的西妥昔单抗-皂草毒蛋白组合显示出有效的细胞杀伤,而在A2058细胞中,只有在非常高的西妥昔单抗-皂草毒蛋白浓度与1500nM S01861组合时,才诱导非靶向非特异性细胞杀伤(HeLa:[毒素]IC₅₀=0.03pM;A2058:[毒素]IC₅₀=20pM;图16C,16D;表A5)。所有这些表明,具有低或无EGFR受体表达的细胞对西妥昔单抗-S01861+西妥昔单抗-皂草毒蛋白的组合不敏感,因为缺乏足够的EGFR受体来促进足够的S01861和毒素进入细胞内。

[0683] 曲妥珠单抗-S01861(识别并结合HER2的单克隆抗体,与皂苷分子S01861缀合;根据本发明的内体逃逸增强缀合物)在50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(识别并结合HER2的单克隆抗体,与蛋白毒素皂草毒蛋白结合)的固定浓度下滴定(基于浓度S01861计算),并测定对高HER2表达细胞的细胞杀伤。当50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与高浓度的非靶向非缀合S01861组合时,高HER2表达细胞(SKBR3)显示出有效的细胞杀伤(SKBR3;图17A,17B;表A6)。然而,当曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与曲妥珠单抗-S01861组合时,在低浓度的S01861下已经诱导了强烈的细胞杀伤(SKBR3;图17A,17B;表A6)。这表明,与非靶向非缀合S01861相比,靶向缀合S01861在诱导内体逃逸方面更有效。接下来,在50nM的曲妥珠单抗-S01861的固定浓度下滴定曲妥珠单抗-皂草毒蛋白,并测定对HER2表达细胞的靶向蛋白毒素介导的细胞杀伤。高HER2表达细胞(SKBR3或BT474)仅在高曲妥珠单抗-皂草毒蛋白浓度与非靶向非缀合的10nM S01861组合时显示细胞杀伤(表A7),而10nM曲妥珠单抗-S01861与低曲妥珠单抗-皂草毒蛋白浓度组合已经诱导了有效的细胞杀伤(表A7)。当高浓度的非靶向非缀合S01861(1500nM)与低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白组合时实现最高的细胞杀伤效率(表A7)。所有这些都表明,当与曲妥珠单抗缀合时,低浓度的S01861与相对低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白组合可以有效地杀伤高HER2表达细胞。高浓度(1500nM)的非靶向非缀合S01861与低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合仍然是最有效的,因为受体竞争对S01861进入细胞不起作用,因为在1靶标2组分系统中,两种缀合物竞争相同的EGFR受体。在没有或有2.5nM曲妥珠单抗时的曲妥珠单抗-毒素滴定处理中也清楚地显示了受体竞争原理(SKBR3:[毒

素]IC₅₀=1000nM)。

[0684] 接下来,在50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度下滴定曲妥珠单抗-S01861(基于浓度S01861计算),并测定对低/无EGFR表达细胞的细胞杀伤。低EGFR表达细胞(JIMT1;A431)仅当50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与高浓度的非靶向非缀合S01861组合时显示细胞杀伤(JIMT1:[S01861]IC₅₀>1000nM;A431:[S01861]IC₅₀>1000nM;图18A,18B;表A6)。50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与增加浓度的曲妥珠单抗-S01861的组合在两种细胞系中都没有诱导任何显著的细胞杀伤(JIMT1:[S01861]IC₅₀>1000nM;A431:[S01861]IC₅₀>1000nM;图18A,18B;表A6)。这表明在缺乏足够的受体表达的情况下,没有达到有效的细胞内S01861浓度(阈值)来诱导内体蛋白毒素逃逸和毒素介导的细胞杀伤。接下来,在10nM的曲妥珠单抗-S01861的固定浓度下滴定曲妥珠单抗-皂草毒蛋白,并测定靶向蛋白毒素介导的对低/无HER2表达细胞的细胞杀伤。低HER2表达细胞(JIMT1;A431)显示在高曲妥珠单抗-皂草毒蛋白浓度与10nM曲妥珠单抗-S01861组合时没有显著的细胞杀伤(JIMT-1:[毒素]IC₅₀>10.000pM;A431:[毒素]IC₅₀>10.000pM;图18C,18D;表A7)。在低HER2表达细胞中,高浓度的非缀合S01861(1500nM)与低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白组合显示有效的细胞杀伤(JIMT-1:[毒素]IC₅₀=0.1pM;A431:[毒素]IC₅₀=0.8pM;图18C,18D;表A5)。所有这些表明,具有低或无HER2受体表达的细胞对曲妥珠单抗-S01861+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合不敏感,因为缺乏足够的HER2受体来促进足够的S01861和毒素进入细胞内。

[0685] 实例9.2靶标2组分系统

[0686] 接下来,在50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度滴定西妥昔单抗-S01861(基于浓度S01861计算),并测定对高EGFR/低HER2表达细胞的细胞杀伤。当50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与高浓度的非靶向非缀合S01861组合时A431和CaSki细胞显示出有效的细胞杀伤(A431和Caski:[S01861]IC₅₀=1000nM;图19A,19B;表A6)。然而,当曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与西妥昔单抗-S01861组合时,在低浓度的S01861下已经诱导了强烈的细胞杀伤(A431:[S01861]IC₅₀=12nM和Caski[S01861]IC₅₀=40nM;图19A,19B;表A6)。这表明,与非靶向非缀合S01861相比,靶向缀合S01861在诱导内体逃逸方面更有效。接下来,在300nM西妥昔单抗-S01861的固定浓度滴定曲妥珠单抗-皂草毒蛋白,并测定对高EGFR/低HER2表达细胞(A431和CaSki)的靶向蛋白毒素介导的细胞杀伤。在高曲妥珠单抗-皂草毒蛋白浓度与非靶向非缀合的300nM S01861组合时没有观察到有效的细胞杀伤(A431和Caski:[毒素]IC₅₀>10.000pM;图19C,19D;表A7)而300nM西妥昔单抗-S01861与低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白组合已经诱导了有效的细胞杀伤(A431:[毒素]IC₅₀=3pM;Caski:[毒素]IC₅₀=1pM;图19C和19D;表A7)。在A431细胞中,当高浓度(1500nM)的非靶向非缀合S01861与低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白组合时实现相当的细胞杀伤效率(A431:[毒素]IC₅₀=1pM;参见图19C;表A7)。在Caski细胞中,与西妥昔单抗-S01861和曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合相比,反应稍微更强,这是由于这些细胞中的EGFR表达与A431相比显著较低,因此S01861向Caski细胞的靶向递送不够充分(Caski:[毒素]IC₅₀=0.2pM,参见图19D;表A7)。所有这些表明,当与西妥昔单抗缀合时,低浓度的S01861与相对低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白组合可有效杀伤高EGFR表达细胞。高浓度(1500nM)的非靶向非缀合S01861与低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合具有相当的活性,因为受体竞争对S01861进入细胞不起作用,因为在2靶标2组分系统中,两种缀合物通过不同的受体递送,S01861通过EGFR递送,毒素通过HER2

受体递送。

[0687] 接下来,在50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度滴定曲妥珠单抗-S01861(基于浓度S01861计算),并测定对低/无EGFR/HER2表达细胞的细胞杀伤。低EGFR/HER2表达细胞仅当50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与高浓度的非靶向非缀合S01861组合时显示细胞杀伤(HeLa:[S01861]IC₅₀>1000nM;A2058:[S01861]IC₅₀>1000nM;图20A,20B;表A6)。50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与增加浓度的西妥昔单抗-S01861的组合仅在两种细胞系中高浓度的西妥昔单抗-S01861下显示显著的细胞杀伤(HeLa:[S01861]IC₅₀>1000nM;A2058:[S01861]IC₅₀>1000nM;图20A,20B;表A6)。这表明在缺乏足够的受体表达的情况下,没有达到有效的细胞内S01861浓度(阈值)来诱导内体蛋白毒素逃逸和毒素介导的细胞杀伤。接下来,在西妥昔单抗-S01861的固定浓度滴定曲妥珠单抗-皂草毒蛋白,并测定靶向蛋白毒素介导的对低/无EGFR/HER2表达细胞的细胞杀伤。低/无EGFR/HER2表达细胞(HeLa和A2058)显示在高曲妥珠单抗-皂草毒蛋白浓度与278nM西妥昔单抗-S01861组合时没有显著的细胞杀伤(HeLa:[毒素]IC₅₀>10.000pM;A2058:[毒素]IC₅₀>10.000pM;图20C,20D;表A7)。高浓度的非缀合S01861(1500nM)与低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白组合显示有效的细胞杀伤(HeLa:[毒素]IC₅₀=0.4pM;A2058:[毒素]IC₅₀=0.5pM;图20C,20D;表A5)。所有这些表明,具有低/无EGFR/低HER2表达的细胞对西妥昔单抗-S01861+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合不敏感,因为缺乏足够的EGFR受体来促进足够的S01861进入以确保毒素在细胞内的有效胞质递送。

[0688] 接下来,在1.5pM EGF-香石竹毒蛋白的固定浓度滴定曲妥珠单抗-S01861(基于浓度S01861计算),并测定对高HER2/低EGFR表达细胞的细胞杀伤。当1.5pM EGF-香石竹毒蛋白与高浓度的非靶向非缀合S01861组合时,SKBR3显示出有效的细胞杀伤(SKBR3:[S01861]IC₅₀=800nM;图21A;表A6)。然而,当EGF-香石竹毒蛋白与曲妥珠单抗-S01861组合时,在低浓度的缀合S01861下已经诱导了强烈的细胞杀伤(SKBR3:[S01861]IC₅₀=2nM;图21A;表A6)。这表明,与非靶向非缀合S01861相比,靶向缀合S01861在诱导内体逃逸方面更有效。接下来,在曲妥珠单抗-S01861的固定浓度滴定EGF-香石竹毒蛋白,并对测定靶向蛋白毒素介导的对SKBR3的细胞杀伤。用高EGF-香石竹毒蛋白浓度与非靶向非偶联的10nM S01861组合没有观察到有效的细胞杀伤(SKBR3(显示)和BT474(未显示):[毒素]IC₅₀>10.000pM;图21B;表A7)而9.4nM曲妥珠单抗-S01861与低EGF-香石竹毒蛋白浓度的组合已经诱导了有效的细胞杀伤(SKBR3:[毒素]IC₅₀=3pM(显示);BT474:[毒素]IC₅₀=1pM(未显示);图21B;表A7)。当高浓度(1075nM)的非靶向非缀合S01861与低浓度的EGF-香石竹毒蛋白组合时,获得了相当的细胞杀伤效率;图21B;表A7)。所有这些都表明,当与曲妥珠单抗缀合时,低浓度的S01861与相对低浓度的EGF-香石竹毒蛋白组合可以有效地杀伤高HER2表达细胞。高浓度(1500nM)的非靶向非缀合S01861与低浓度的EGF-香石竹毒蛋白的组合具有相当的活性,因为受体竞争对S01861进入细胞不起作用,因为在2靶标2组分系统中,两种缀合物通过不同的受体递送,S01861通过HER2递送,毒素通过EGFR受体递送。

[0689] 接下来,在5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白的固定浓度滴定曲妥珠单抗-S01861(基于浓度S01861计算),并测定对低HER2、低/高EGFR表达细胞的细胞杀伤,显示当5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白与高浓度非靶向未缀合S01861组合时的细胞杀伤(JIMT-1:[S01861]IC₅₀>1000nM;A431:[S01861]IC₅₀>1000nM;图22A,22B;表A6)。5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白与增

加浓度的曲妥珠单抗-S01861的组合在两种细胞系中仅在高浓度西妥昔单抗-S01861下显示细胞杀伤(JIMT-1:[S01861]IC₅₀>1000nM;A431:[S01861]IC₅₀>1000nM;图22A,22B;表A6)。这表明在缺乏足够的受体表达的情况下,没有达到有效的细胞内S01861浓度(阈值)来诱导内体蛋白毒素逃逸和毒素介导的细胞杀伤。接下来,在曲妥珠单抗-S01861的固定浓度滴定西妥昔单抗-皂草毒蛋白,并测定靶向蛋白毒素介导的对JIMT-1和A431的细胞杀伤。仅在高西妥昔单抗-皂草毒蛋白浓度与10nM曲妥珠单抗-S01861组合时观察到细胞杀伤(JIMT-1:[毒素]IC₅₀>90pM;A431:[毒素]IC₅₀>20pM;图22C,22D;表A7)。高浓度的非缀合S01861(1500nM)与低浓度的西妥昔单抗-皂草毒蛋白组合显示有效的细胞杀伤(JIMT-1:[毒素]IC₅₀=0,02pM;A431:[毒素]IC₅₀=0,03pM;图22C,22D;表A5)。所有这些表明,具有低HER2、低/高EGFR表达的细胞对曲妥珠单抗-S01861+西妥昔单抗-皂草毒蛋白的组合不敏感,因为缺乏足够的HER2受体来促进足够的S01861进入以确保毒素在细胞内的有效胞质递送。即使A431细胞中非常高的EGFR表达也没有导致西妥昔单抗-皂草毒蛋白的有效细胞杀伤,因为由于缺乏HER2受体而没有达到S01861的阈值,HER2受体可以促进通过曲妥珠单抗-S01861摄取S01861。

[0690] 实例10.

[0691] 2靶向2组分系统导致表达非常低的靶的细胞的细胞杀伤。在A431细胞中,T-DM1在纳摩尔浓度杀伤细胞,而靶向的2组分系统可以在皮摩尔浓度有效杀伤细胞(毒素浓度降低约7000倍)(图23)

[0692] 实例11.作用机制

[0693] 当内体酸化被阻断时,靶向的2组分系统没有活性,因为SPT001(一种植物衍生的皂苷,S01861)仅在低内体pH下有活性。

[0694] 实例12

[0695] 内体酸化抑制剂阻断靶向的2组分系统活性,表明当内体酸化被阻断时,S01861功能降低。

[0696] 实例13

[0697] 图24A-E显示了当曲妥珠单抗(图24A)、西妥昔单抗(图24B)或T-DM1(图24C)、游离毒素皂草毒蛋白(图24D)和香石竹毒蛋白(图24D)、与非细胞结合IgG偶联的皂草毒蛋白(图24D)以及与非细胞结合IgG偶联的皂草毒蛋白跟游离皂苷S01861组合(图24E)与所示细胞系SK-BR-3、JIMT-1、MDA-MB-468、A431、CaSki、HeLa、A2058、BT-474接触时的相对细胞活力。

[0698] 当暴露于大多数细胞系时,曲妥珠单抗和西妥昔单抗不影响或几乎不影响细胞活力,当曲妥珠单抗以相对高剂量暴露于SK-BR-3细胞时,对细胞活力有一些影响,当西妥昔单抗以相对高剂量暴露于MDA-MB-468细胞时,对细胞活力有一些影响。

[0699] TDM-1或曲妥珠单抗-厄塔毒素是美国食品药品监督管理局批准的靶向疗法,用于治疗:HER2阳性的转移性乳腺癌,以前曾用赫赛汀(Herceptin)(化学名:曲妥珠单抗)和紫杉烷化疗;手术后早期HER2阳性乳腺癌,如果在使用赫赛汀和紫杉烷化疗的新辅助(手术前)治疗后发现残留疾病。TDM-1是赫赛汀和化疗药物厄塔毒素(emtansine)的组合。图24C显示TDM-1导致所有测试的细胞系的细胞活力降低。

[0700] 游离毒素皂草毒蛋白和香石竹毒蛋白以及对照IgG(对受试细胞系上的任何细胞表面分子都没有亲和力)偶联的毒素皂草毒蛋白在受试毒素浓度的大范围内,直至

10000pM,对细胞活力没有或几乎没有任何影响。

[0701] 当毒素皂草毒蛋白与非细胞结合IgG偶联时,缀合物与游离皂苷S01861的组合导致相对细胞活力的IgG-皂草毒蛋白剂量依赖性降低(图24E)。

[0702] 表A5.mAb、毒素、配体毒素或mAb-毒素单一疗法+/-S01861的IC50值总结。

[0703]

细胞系	EGFR 表达 水平 (MFI)	HER2 表达 水平 (MFI)	曲安珠 单抗 (nM)	西安普 单抗 (nM)	T-DM1 (nM)	皂草素 (pM)					曲安珠单抗- 皂草素 (pM)		曲安珠单抗- 香石竹毒蛋白 (pM)		西安普单抗- 皂草素 (pM)		EGF-香石竹毒 蛋白 (pM)	
						无 S01861	1500 nM S01861	1500 nM S01861	1500 nM S01861	1500 nM S01861	无 S01861	1500 nM S01861	无 S01861	1500 nM S01861	无 S01861	1500 nM S01861	无 S01861	1500 nM S01861
MDA- MB-468	1656	1	> 3,000	> 3,000	60	> 10,000	20	> 10,000	30	1500 nM S01861	> 10,000	25	> 10,000	200	180	0.06	240	0.09
A431	1593	10	> 3,000	> 3,000	80	> 10,000	n.d.	> 10,000	90	1500 nM S01861	> 10,000	0.8	> 10,000	60	40	0.03	700	0.03
CaSki	481	12	> 3,000	> 3,000	40	> 10,000	15	> 10,000	60	1500 nM S01861	> 10,000	0.2	> 10,000	5	40	0.02	2000	0.03
SK-BR- 3	28	1162	> 3,000	> 3,000	1	> 10,000	n.d.	> 10,000	100	1500 nM S01861	> 10,000	0.05	> 10,000	1	n.d.	n.d.	> 10,000	0.5
JIMT-1	58	74	> 3,000	> 3,000	10	> 10,000	30	> 10,000	90	1500 nM S01861	> 10,000	0.1	> 10,000	40	300	0.02	> 10,000	0.07
HeLa	91	7	> 3,000	> 3,000	40	> 10,000	30	> 10,000	200	1500 nM S01861	> 10,000	0.4	> 10,000	18	60	0.03	3800	0.04
A205	1	5	> 3,000	> 3,000	20	> 10,000	25	> 10,000	200	1500 nM S01861	> 10,000	0.5	> 10,000	5	> 10,000	20	> 10,000	30

[0704] 表A5的图例：

[0705] *在5nM以上的所有西妥昔单抗[]下MDA-MB-468细胞显示细胞活力降低20-25%

[0706] **SK-BR-3细胞在1nM的曲妥珠单抗下显示20%的细胞活力降低，在1nM以上的所有曲妥珠单抗[]下显示30-35%的细胞活力降低

[0707] 表A6.用固定[mAb-毒素]情况下非靶向SO1861靶向2组分系统mAb-SO1861滴定的IC50值的数据摘要。

[0708]

非靶向 SO1861							1 靶标 2 组分				2 靶标 2 组分		
							SO1861 和毒素都针对 EGFR	SO1861 和毒素都针对 HER2			SO1861 针对 EGFR ; 毒素针对 HER2	SO1861 针对 HER2 毒素针对 EGFR	
细胞系	EGFR 表达水平 (MFI)	HER2 表达水平 (MFI)	SO1861 + 50 pM 曲妥珠单抗-皂草毒蛋白 (IC50, nM)	SO1861 + 50 pM 曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白 (IC50, nM)	SO1861 + 10 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白 (IC50, nM)	SO1861 + 10 pM 西妥昔单抗-香石竹毒蛋白 (IC50, nM)	10 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白 + 西妥昔单抗-SO1861 (IC50, nM)	10 pM 香石竹毒蛋白:EGF + 西妥昔单抗-SO1861 (IC50, nM)	50 pM 曲妥珠单抗-皂草毒蛋白 + 曲妥珠单抗-SO1861 (IC50, nM)	50 pM 曲妥珠单抗-香石竹毒蛋白 + 曲妥珠单抗-SO1861 (IC50, nM)	50 pM 曲妥珠单抗-皂草毒蛋白 + 西妥昔单抗-SO1861 (IC50, nM)	5 pM 西妥昔单抗-皂草毒蛋白 + 曲妥珠单抗-SO1861 (IC50, nM)	1.5 pM 香石竹毒蛋白:EGF + 曲妥珠单抗-SO1861 (IC50, nM)
MDA-MB-468	1656	1	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000	3	6	> 1.000	> 1.000	18	> 1.000	> 1.000

[0709]

8															
A4 31	159 3	10		> 1.000	> 1.000	600	> 1.00 0	5	8	> 1.000	> 1.000		12	> 1.000	> 1.000
Ca Ski	481	12		> 1.000	> 1.000	700	> 1.00 0	5-10	10	> 1.000	> 1.000		40	> 1.000	> 1.000
SK -B R- 3	28	116 2		700	n.d.	800	650	> 1.000	> 1.000	2*	3*		> 1.000	n.d.	3
JI M T-1	58	74		> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.00 0	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000		> 1.000	> 1.000	> 1.000
He La	91	7		> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.00 0	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000		> 1.000	> 1.000	> 1.000
A2 05 8	1	5		> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.00 0	> 1.000	> 1.000	> 1.000	> 1.000		> 1.000	> 1.000	> 1.000

[0710] 表A7. 靶向2组分系统的IC50值的数据总结, 用固定的[mAb-SO1861]进行mAb-毒素滴定。每个值的IC50计算为相对于该处理的恒定浓度的一个或多个组分 (100%) 的百分比

[0711]

1 靶标 2 组分								2 靶标 2 组分			
			SO1861 和毒素都 针对 EGFR		SO1861 和毒素都 针对 HER2		SO1861 针对 EGFR; 毒素针对 HER2		SO1861 针对 HER2 毒素针对 EGFR		
细胞系	EGFR 表达水 平 (MFI)	HER2 表达水 平 (MFI)	278 nM	278 nM	300 nM	300 nM	278 nM	1388	300 nM	300 nM	
			西安昔	西安昔	曲妥珠	曲妥珠	西安昔	nM 西	曲妥珠	曲妥珠	
			单抗	单抗	单抗	单抗	单抗	妥昔单	单抗	单抗	
			-SO186	-SO186	-SO186	-SO186	-SO186	抗	-SO186	-SO186	
			1 +	1 +	1 + 曲	1 + 曲	1 + 曲	-SO186	1 +	1 +	
			西安昔	EGF-香	妥珠单	妥珠单	妥珠单	1 + 曲	西安昔	EGF-香	
			单抗-皂	石竹毒	抗-皂草	抗-香石	抗-皂草	妥珠单	单抗-皂	石竹毒	

[0712]

			草毒蛋白 (IC50, pM)	蛋白 (IC50, pM)	毒蛋白 (IC50, pM)	竹毒蛋白 (IC50, pM)	毒蛋白 (IC50, pM)	抗-香石竹毒蛋白 (IC50, pM)	草毒蛋白 (IC50, pM)	蛋白 (IC50, pM)
MDA-MB-468	1656	1	0.5	1	> 10.000	> 10.000	55	500	100	750
A431	1593	10	0.4	0.4	> 10.000	> 10.000	3	30	20	2.300
CaSki	481	12	2	1	> 10.000	> 10.000	1	25	14	1.600
SK-BR-3	28	1162	n.d.	n.d.	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
JIMT-1	58	74	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	3.000	> 10.000	90	4.000
HeLa	91	7	6.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	10.000	50	4.000
A2058	1	5	> 10.000	> 10.000	> 1.0000	> 10.000	> 10.000	> 10.000	> 10000	> 10.000

[0713] 实例14-用本发明的缀合物与ADC组合治疗荷瘤哺乳动物导致存活和肿瘤消退

[0714] 给雌性Balb/c裸鼠皮下注射人A431肿瘤细胞的悬浮液。在小鼠的皮肤下，在异种移植动物肿瘤模型中发展人表皮癌。注射肿瘤细胞后，允许异种移植肿瘤发展到大约170-180mm³的大小。A431肿瘤细胞具有以下特征：高EGFR表达，中CD71表达，低HER2表达。

[0715] 在表8A中，显示了对照小鼠和荷瘤小鼠的治疗结果。用针对人Her2/neu、人EGFR或人CD71（异种移植肿瘤上的细胞表面受体）的指定抗体治疗荷瘤小鼠。西妥昔单抗与皂苷S01861共价缀合。首先向S01861提供接头EMCH（N-ε-马来酰亚胺基己酸酰肼），该EMCH是用于将巯基（抗体的还原半胱氨酸）共价缀合到羰基（醛或酮；这里是在皂苷的位置C-23处的醛的羰基）上的马来酰亚胺和酰肼交联剂。皂苷-EMCH与西妥昔单抗的还原半胱氨酸共价偶联，在EMCH和半胱氨酸侧链之间形成共价硫醚键。对ADC曲妥珠单抗-皂草毒蛋白（共价缀合物）和抗CD71 mAb（OKT-9, IgG）-皂草毒蛋白（共价缀合物）在小鼠中的肿瘤攻击功效进行了测试，测量为在开始用ADC治疗后的时间内的肿瘤体积。在肿瘤模型中，ADC的剂量是次优的。也就是说，从以前的实验中可以确定，在ADC的次优剂量下，不会观察到肿瘤消退或肿瘤生长抑制。

表 8A：用本发明的缀合物与 ADC 组合治疗荷瘤哺乳动物导致存活和肿瘤消退的结果

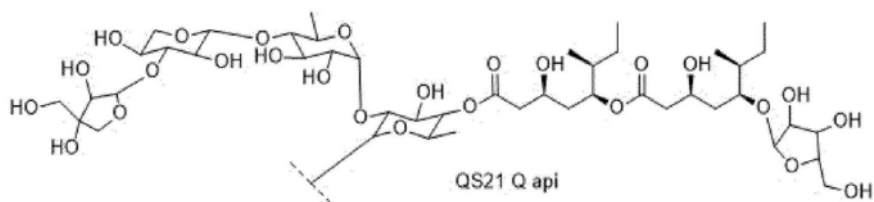
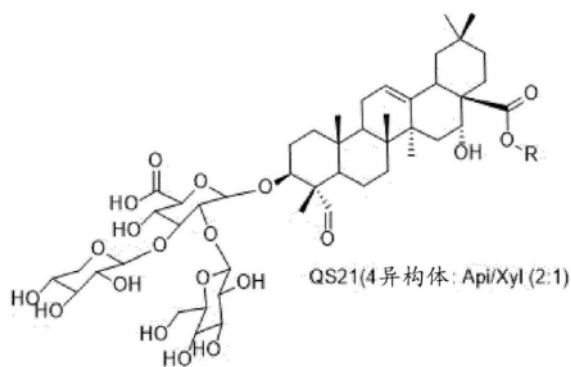
处理组	患者/健康动物	处理	肿瘤大小（以 mm ³ 体积或 “+” 表示生长，“-” 表示消退，以及 “稳定” 表示无生长也无消退）
1	异种移植物	媒剂	2000 mm ³ （死亡/安乐死）
2	异种移植物	曲妥珠单抗-皂草毒蛋白	2000 mm ³ （死亡/安乐死）
3	异种移植物	抗 CD71 mAb OKT-9-皂草毒蛋白（共价缀合物）	2000 mm ³ （死亡/安乐死）
4	异种移植物	西妥昔单抗-SO1861（共价缀合物）	2000 mm ³ （死亡/安乐死）
5	异种移植物	西妥昔单抗	> 170 mm ³ ，但 < 2000 mm ³ （死亡/安乐死）
6	异种移植物	曲妥珠单抗-皂草毒蛋白（共价缀合物）+ 西妥昔单抗-SO1861（共价缀合物）	肿瘤从治疗开始时的 180 mm ³ 消退至 80 mm ³ （存活）
7	异种移植物	抗 CD71 mAb OKT-9-皂草毒蛋白（共价缀合物）+ 西妥昔单抗-SO1861（共价缀合物）	肿瘤从治疗开始时的 180 mm ³ 消退至 40 mm ³ （存活）

[0717] 这些结果表明，当考虑用ADC单独治疗荷瘤小鼠时无效（肿瘤生长，不能防止小鼠死亡（安乐死）的剂量的ADC与本发明的缀合物（其由与皂苷即SO1861共价结合的肿瘤细胞特异性受体靶向性抗体组成，所述共价缀合物以单独施用时无效剂量（肿瘤生长，不能防止小鼠的死亡（安乐死）施用给患有癌症的小鼠）的组合疗法提供了有效且高效的治疗方案，表达为治疗动物的肿瘤消退和延长的存活（超过实验持续时间）。次优剂量的ADC与本发明的包含共价结合的皂苷的缀合物（其在单独施用时无抗肿瘤活性）组合，因此为癌症患者提供了有效的治疗选择，其中相对低剂量的ADC是有效的。较低剂量的ADC有望降低不良事件的风险，甚至完全没有副作用。此外，当考虑ADC的功效时，含有皂苷的缀合物的刺激作用表明，以前被证明在涉及肿瘤患者治疗时缺乏功效的ADC可能获得新的关注和价值，因为ADC功效在组合疗法环境中得到改善，如当前的实例所示。参考先前在人临床环境中研究过的本领域中已知的ADC，但是对于一些ADC，从进一步的临床研究中撤回。特别是由于观察到缺乏功效和/或由于出现不可接受的不良事件而终止临床开发的ADC是这样的ADC，当与包含共价结合的皂苷的缀合物（例如所测试的西妥昔单抗-皂苷）组合时，其可为癌症患者获得新的价值。

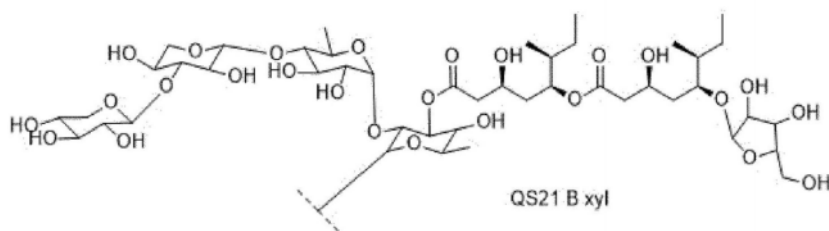
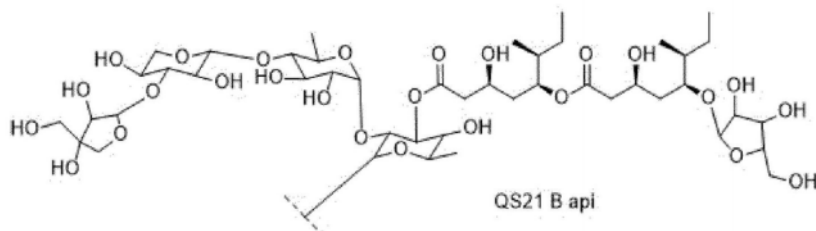
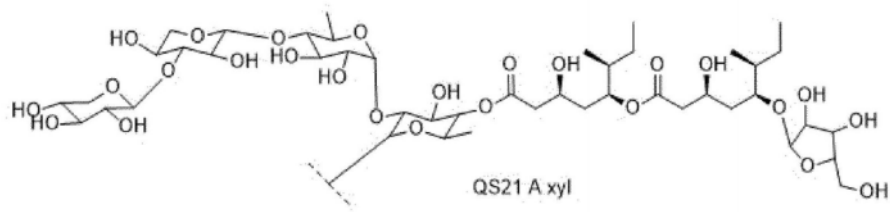
[0718] 实例15-含有具有内体/溶酶体逃逸增强活性的QS-21的皂树皂苷混合物

[0719] 方案Q显示了一系列QS-21皂苷的共同分子结构(部分改编自:Conrado Pedebos, Laércio Pol-Fachin, Ramon Pons, Cilaine V. Teixeira Hugo Verli, Atomic Model和 Micelle Dynamics of QS-21 Saponin[QS-21皂苷的胶束动力学], Molecules[分子]2014, 19, 3744-3760; 四种同工型, 其中每种描述的聚糖可以作为R基团结合)。从皂树中获得的水溶性皂苷混合物(西格玛-奥尔德里奇公司, 产品号S4521; 罗斯(Roth), 项目编号6857; 英杰公司(InvivoGen), 产品“Quil-A”)基于混合物中存在的至少一种单独皂苷(例如QS-21)的内体/溶酶体逃逸增强特性或者基于混合物中包含的两种或更多种皂苷(例如QS-21和QS-7)的组合可以应用于本发明的内体/溶酶体逃逸增强缀合物、组合物和组合中。

[0720] 发明人证明了来自皂树的皂苷的混合物在2.5微克/毫升的剂量下能够增强香石竹毒蛋白的内体逃逸, 如在基于细胞的生物测定中用哺乳动物肿瘤细胞测试的。暴露于细胞的效应分子与配体EGF共价偶联: EGF-香石竹毒蛋白。测试的细胞是肿瘤细胞系HeLa(用于测试游离皂苷), A431、MDA-MB-468、CaSki和A2058(用于测试与西妥昔单抗共价偶联时的皂苷)。



[0721]



[0722] (方案Q)

[0723] 实例16

[0724] 1靶标2组分系统(1T2C)是mAb1-蛋白毒素和mAb1-S01861的联合治疗,如图1A,E所示。S01861-EMCH通过半胱氨酸残基(Cys)缀合,HSP27BNA寡核苷酸通过赖氨酸残基缀合至西妥昔单抗(识别和结合人EGFR的单克隆抗体),两者均以DAR 4,从而产生2种缀合物:西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴和西妥昔单抗-(Lys-L-HSP27BNA)⁴。在A431异种移植小鼠肿瘤模

型中测试西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴(腹膜内施用,(i.p.))和西妥昔单抗-(Lys-L-HSP27BNA)⁴(静脉内施用,(i.v.))的組合的EGFR肿瘤靶向基因沉默活性。在第12天肿瘤达到约150mm³大小时开始给药,在第一次给药后72小时收集肿瘤样品,并与对照基因mRNA表达水平(参照基因)相比分析HSP27基因表达。这表明,与单一给予西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴或西妥昔单抗-(Lys-L-HSP27BNA)⁴单一疗法相比,1次给予50mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴+25mg/kg西妥昔单抗-(Lys-L-HSP27BNA)⁴导致A431肿瘤中HSP27基因表达降低50%(图25)。与媒剂对照肿瘤相比,观察到40%的HSP27基因沉默减少。这表明并使得根据1T2C发明的西妥昔单抗缀合的S01861+西妥昔单抗缀合的HSP27BNA寡核苷酸的組合能够诱导治疗性反义寡核苷酸在实体瘤细胞的细胞质中的有效靶向递送,从而在体内诱导肿瘤靶向基因沉默。

[0725] 接下来,S01861-EMCH通过半胱氨酸残基(Cys)与曲妥珠单抗(识别和结合人HER2的单克隆抗体)缀合,具有DAR 4,导致曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴的产生。曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴和曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(曲妥珠单抗蛋白毒素缀合物)的組合在具有高HER2表达水平和对曲妥珠单抗单一疗法有抗性的小鼠肿瘤模型(患者衍生异种肿瘤模型,PDX)中进行了测试。根据1T2C发明的40mg/kg曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴(腹膜内施用)+0.03(第1、8天)/0.02(第15、22、30、36、43天)mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(静脉内施用,(i.v.))的組合与媒剂对照和40mg/kg曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴或0.03/0.02mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白单一疗法相比显示出强烈的肿瘤生长抑制作用(图26)。此外,在用较低剂量組合(40mg/kg曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴+0.01mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白)治疗的荷瘤小鼠中,没有观察到肿瘤生长抑制活性(图26)。这表明并使得曲妥珠单抗缀合的S01861+曲妥珠单抗缀合的蛋白毒素的1T2C組合能够诱导治疗性蛋白毒素在实体肿瘤细胞的细胞质中的有效靶向递送,从而诱导体内肿瘤细胞死亡和肿瘤生长抑制。

[0726] 实例17.2靶标2组分系统(体内)

[0727] 2靶标2组分系统(2T2C)是mAb1-S01861和mAb2-蛋白毒素的联合治疗(图1B-D)。S01861-EMCH通过半胱氨酸残基(Cys)与西妥昔单抗(识别和结合人EGFR的单克隆抗体)缀合,具有DAR 4,导致西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴的产生。在A431(EGFR⁺⁺/HER2^{+/-}/CD71⁺)异种移植“裸”小鼠肿瘤模型中测试了西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴和曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或CD71mab-皂草毒蛋白的組合对EGFR肿瘤的靶向细胞杀伤,如图1B-D所示。进行剂量递增以确定治疗功效(第9天:0.3mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或0.1mg/kg CD71mab-皂草毒蛋白+5mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴;第14、18天:0.1mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或0.05mg/kg CD71mab-皂草毒蛋白+5mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴;第21天:0.05mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或0.05mg/kg CD71mab-皂草毒蛋白+15mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴;第28天:0.02mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或0.02mg/kg CD71mab-皂草毒蛋白+15mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴曲妥珠单抗-皂草毒蛋白/西妥昔单抗-S01861。对照分别采用相同的给药方案,仅在每个治疗日给予25mg/kg的西妥昔单抗(i.v.)。在第32天(垂直虚线)、第35天和第39天,发明人根据2T2C发明开始了25mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴(腹膜内注射(i.p.))+0.02mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或0.02mg/kg CD71mab-皂草毒蛋白(静脉内施用,(i.v.))的組合并且这表明,与媒剂对照、25mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴或0.02mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白/CD71mab-皂

草毒蛋白单一疗法相比, 2T2C组合组均出现了强烈的肿瘤消退(图27)。2T2C系统甚至胜过临床上使用的抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗。接下来, 发明人进行了相同的实验, 但是随后用25mg/kg西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)⁴(腹膜内注射(i.p.))+0.03mg/kg曲妥珠单抗-皂草毒蛋白或0.03CD71mab-皂草毒蛋白(静脉内施用)治疗开始试验, 在第9天和第14天给药, 此后每周给药1次。根据本发明的2T2C系统在所有小鼠中显示肿瘤消退, 甚至在两个2T2C组中的1只小鼠中显示肿瘤完全根除(肿瘤体积=0mm³) (图28)。此外, 此处对照显示肿瘤体积显著增加, 而A431小鼠模型的阳性对照西妥昔单抗仅显示肿瘤生长抑制, 但无消退(图28)。这表明并实现了西妥昔单抗缀合的S01861+曲妥珠单抗缀合的蛋白毒素或CD71mab缀合的蛋白毒素的2T2C系统方法, 在体内在荷瘤小鼠的实体瘤的细胞质中诱导治疗性蛋白毒素的高效靶向递送, 从而甚至在大尺寸肿瘤(2000mm³)时在一些小鼠中诱导甚至完全的肿瘤根除以及在其他小鼠中诱导强烈的肿瘤消退。

[0728] 实例18.2靶标2组分系统(体外)

[0729] 结果

[0730] 2靶标2组分系统(2T2C)是mAb1-S01861和mAb2-蛋白毒素的联合治疗(图1B-D)。S01861-EMCH通过半胱氨酸残基(Cys)与西妥昔单抗(识别和结合人EGFR的单克隆抗体)缀合, 具有DAR 3,7(西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7})。在50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白(曲妥珠单抗, 与蛋白毒素皂草毒蛋白缀合)的固定浓度滴定西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}, 并且测定靶向蛋白毒素介导的对EGFR/HER2表达细胞(A431, EGFR⁺⁺/HER2^{+/-}; CaSKi, EGFR⁺/HER2^{+/-})的细胞杀伤, 如图1B-D所示。这揭示了在低浓度的西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}的强烈细胞杀伤(A431: IC50=3nM, CaSKi IC50=10nM; 图29A, 29B), 而同等浓度的西妥昔单抗、西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}或西妥昔单抗+50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白不能在EGFR/HER2表达细胞中诱导任何细胞杀伤活性。这表明相对低浓度的西妥昔单抗-S01861缀合物有效地增强了曲妥珠单抗缀合蛋白毒素的内体逃逸(在非有效浓度下), 从而诱导了对高EGFR/低HER2表达细胞的有效细胞杀伤。

[0731] 接下来, 在75nM西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}的固定浓度滴定曲妥珠单抗-皂草毒蛋白, 并测定靶向蛋白毒素介导的对EGFR/HER2表达细胞的细胞杀伤。这揭示了75nM西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}与低浓度曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合在EGFR/HER2表达细胞中已经诱导了有效的细胞杀伤(A431: IC50=5pM; CaSKi: IC50=1pM; 图29C和29D), 而曲妥珠单抗-皂草毒蛋白单独或曲妥珠单抗-皂草毒蛋白+75nM西妥昔单抗在两种细胞系中都没有显示出显著的细胞杀伤活性(IC50>10.000pM) (图29C, 29D)。所有这些表明, 在高EGFR/低HER2表达细胞中, 相对低浓度的曲妥珠单抗-皂草毒蛋白与低西妥昔单抗-S01861缀合物浓度组合可以有效并诱导细胞杀伤。

[0732] 接下来, 在50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的固定浓度滴定西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}, 并测定靶向蛋白毒素介导的对HeLa (EGFR^{+/-}/HER2^{+/-})或A2058 (EGFR⁻/HER2^{+/-})的细胞杀伤, 如图1B-D所示。HeLa (EGFR^{+/-}/HER2^{+/-})和A2058 (EGFR⁻/HER2^{+/-})细胞在低浓度的西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}+50pM曲妥珠单抗-皂草毒蛋白时不显示细胞杀伤(HeLa: IC50=400nM; A2058: IC50>400nM; 图30A, 30B)。这表明在缺乏足够的受体表达的情况下, 没有达到有效的胞内递送的S01861浓度(阈值)来诱导蛋白毒素的内体逃逸和胞质递送。接下来, 在75nM西妥昔单抗-(Cys-L-S01861)^{3,7}的固定浓度滴定曲妥珠单抗-皂草毒蛋白, 并测

定靶向蛋白毒素介导的对HeLa (EGFR^{+/+}/HER2^{+/+}) 或A2058 (EGFR⁻/HER2^{+/+}) 的细胞杀伤。HeLa (EGFR^{+/+}/HER2^{+/+}) 和A2058 (EGFR⁻/HER2^{+/+}) 细胞都没有显示细胞杀伤活性 (HeLa: IC50>10.000pM; A2058: IC50>10.000pM; 图30C, 30D)。所有这些表明, EGFR受体低表达或无表达的细胞对西妥昔单抗- (Cys-L-S01861)^{3,7}+曲妥珠单抗-皂草毒蛋白的组合不敏感, 因为缺乏足够的EGFR受体来促进抗体介导的足够S01861 (阈值) 的递送以确保毒素在细胞胞质内的内体逃逸。

[0733] 接下来, S01861-EMCH通过半胱氨酸残基 (Cys) 与曲妥珠单抗 (识别和结合人HER2的单克隆抗体) 缀合, 具有DAR 4 (曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴)。在1.5pM EGF香石竹毒蛋白 (EGFR靶向配体毒素融合蛋白) 的固定浓度滴定曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴, 并且测定靶向蛋白毒素介导对HER2/EGFR表达细胞 (SK-BR-3: HER2⁺⁺/EGFR^{+/+}) 的细胞杀伤。这揭示了在低浓度的曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴+1.5pM EGF香石竹毒蛋白 (SK-BR-3: IC50=1nM; 图31A) 时的强烈细胞杀伤, 而同等浓度的曲妥珠单抗、曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴或曲妥珠单抗+1.5pM EGF香石竹毒蛋白不能在HER2⁺⁺/EGFR^{+/+}表达细胞中诱导任何细胞杀伤活性。这表明曲妥珠单抗缀合S01861有效地增强EGF融合蛋白毒素的内体逃逸 (在非有效浓度下), 从而诱导高HER2/低EGFR表达细胞的细胞杀伤。

[0734] 接下来, 在2.5nM曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴的固定浓度滴定EGF香石竹毒蛋白, 并测定靶向蛋白毒素介导的对SK-BR-3 (HER2⁺⁺/EGFR^{+/+}) 表达细胞的细胞杀伤。这揭示了2.5nM曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴与低浓度EGF香石竹毒蛋白组合在HER2/EGFR表达细胞中已经诱导了有效的细胞杀伤 (SK-BR-3: IC50=1pM) (图31B), 而EGF香石竹毒蛋白单独或EGF香石竹毒蛋白+2.5nM曲妥珠单抗没有显示细胞杀伤活性 (IC50>10.000pM) (图31B)。所有这些表明, 在高HER2/低EGFR表达细胞中相对低浓度的EGF香石竹毒蛋白与低曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴浓度组合才能有效并诱导细胞杀伤。

[0735] 接下来, 在1.5pM EGF香石竹毒蛋白的固定浓度滴定曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴, 并测定靶向蛋白毒素介导的对JIMT-1 (HER2^{+/+}/EGFR^{+/+}) 或MDA-MB-468: HER2⁻/EGFR⁺⁺) 的细胞杀伤。两种细胞系对曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴+1.5pM EGF香石竹毒蛋白的任何组合均不敏感 (JIMT-1: IC50>1000nM; MDA-MB-468: IC50>1000nM; 图32A, 32B)。这表明在缺乏足够的HER2受体表达的情况下, 没有达到有效的胞内递送的S01861浓度 (阈值) 来诱导蛋白毒素的内体逃逸和胞质递送。

[0736] 接下来, 在2.5nM曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴的固定浓度滴定EGF香石竹毒蛋白, 并测定靶向蛋白毒素介导的对JIMT-1 (HER2^{+/+}/EGFR^{+/+}) 或MDA-MB-468 (HER2⁻/EGFR⁺⁺) 的细胞杀伤。两种细胞系在有或没有2.5nM曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴情况下在高EGF香石竹毒蛋白浓度下均显示细胞杀伤 (JIMT-1: IC50=10.000pM; MDA-MB-468: IC50=200pM图32C, 32D)。

[0737] 所有这些表明, HER2受体低表达或无表达的细胞对曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)^{3,7}+1.5pM EGF香石竹毒蛋白的组合不敏感, 因为缺乏足够的HER2受体来促进抗体介导的足够S01861 (阈值) 的递送以确保毒素在细胞胞质内的内体逃逸。

[0738] 接下来, S01861-EMCH通过半胱氨酸残基 (Cys) 与曲妥珠单抗 (识别和结合人HER2的单克隆抗体) 缀合, 具有DAR 4 (曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴)。在5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白 (EGFR靶向抗体-蛋白毒素缀合物) 的固定浓度滴定曲妥珠单抗- (Cys-L-S01861)⁴,

并测定靶向蛋白毒素介导的对HER2/EGFR表达细胞(SK-BR-3:HER2⁺⁺/EGFR^{+/-})的细胞杀伤,如图1B-D所示。这揭示了在低浓度的曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴+5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白(SK-BR-3:IC50=1nM;图33A)时的强烈细胞杀伤,而同等浓度的曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴或曲妥珠单抗+5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白不能在HER2⁺⁺/EGFR^{+/-}表达细胞中诱导任何细胞杀伤活性。这表明曲妥珠单抗缀合S01861有效地增强西妥昔单抗缀合蛋白毒素的内体逃逸(在非有效浓度下),从而诱导HER2⁺⁺/EGFR^{+/-}表达细胞的细胞杀伤。

[0739] 接下来,在2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴和75nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴的固定浓度滴定西妥昔单抗-皂草毒蛋白,并测定靶向蛋白毒素介导的对HER2/EGFR表达细胞(SK-BR-3:HER2⁺⁺/EGFR^{+/-})的细胞杀伤。这揭示了2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴与低浓度西妥昔单抗-皂草毒蛋白组合在SK-BR-3细胞中已经诱导了有效的细胞杀伤(SK-BR-3:IC50=1pM;图33B),而单独的西妥昔单抗-皂草毒蛋白或西妥昔单抗-皂草毒蛋白+2.5nM曲妥珠单抗仅在高浓度曲妥珠单抗-皂草毒蛋白下显示细胞杀伤(SK-BR-3:IC50>4000pM;图33B)。所有这些表明,在HER2⁺⁺/EGFR^{+/-}表达细胞中相对低浓度的西妥昔单抗-皂草毒蛋白只有与低曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴浓度组合才能有效并诱导细胞杀伤。

[0740] 接下来,在5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白的固定浓度滴定曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴,并测定靶向蛋白毒素介导的对JIMT-1(HER2^{+/-}/EGFR^{+/-})和MDA-MB-468(HER2⁻/EGFR⁺⁺)细胞的细胞杀伤。两种细胞系对曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴+5pM西妥昔单抗-皂草毒蛋白的组合均不敏感(JIMT-1:IC50>1000nM;MDA-MB-468:IC50>1000nM;图34A,34B)。这表明在缺乏足够的HER2受体表达的情况下,没有达到有效的胞内递送的S01861浓度(阈值)来诱导蛋白毒素的内体逃逸和胞质递送。

[0741] 接下来,在2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴的固定浓度滴定西妥昔单抗-皂草毒蛋白,并测定靶向蛋白毒素介导的对JIMT-1(HER2^{+/-}/EGFR^{+/-})和MDA-MB-468(HER2⁻/EGFR⁺⁺)细胞的细胞杀伤。两种细胞系在有或没有2.5nM曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴情况下在相似的西妥昔单抗-皂草毒蛋白浓度下均显示细胞杀伤(JIMT-1:IC50=80pM;MDA-MB-468:IC50=100pM;图34C,34D)。

[0742] 所有这些表明,HER2受体低表达或无表达的细胞对曲妥珠单抗-(Cys-L-S01861)⁴+西妥昔单抗-皂草毒蛋白的组合不敏感,因为缺乏足够的HER2受体来促进抗体介导的足够S01861(阈值)的递送以确保毒素在细胞胞质内的内体逃逸。

[0743] 参考文献

[0744] • Wilton, E. E. et al. (2018) "sdAb-DB: The Single Domain Antibody Database", ACS Synthetic Biology 7 (11): 2480-2484. DOI: 10.1021/acssynbio.8b00407

[0745] • Marta Kijanka & Frank-Jan Warnders & Mohamed El Khattabi & Marjolijn Lub-de Hooge & Gooitzen M. van Dam & Vasilis Ntziachristos & Liesbeth de Vries & Sabrina Oliveira & Paul M. P. van Bergen en Henegouwen, "Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 V_{HH}s site-directly conjugated to IRDye800CW for image-guided surgery", Eur J Nucl Med Mol Imaging (2013) 40:1718-1729 DOI 10.1007/s00259-013-2471-2

[0746] • Karen Mercier, Raimond Heukers and Chiraz Frydman, "Surface Plasmon

Resonance imaging (SPRi) -Production of a single domain antibody Q17c directed against recombinant HER2 protein and its binding study by Surface Plasmon Resonance imaging technology”, Horiba Application Note Pharmaceuticals SPRi 42, 2019

[0747] SEQ ID NO

[0748] SEQ ID NO:1:来自骆驼的抗HER2 sdAb 2Rb17c的氨基酸编码DNA序列

[0749] gaagttcagctgcaggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgtctgtcttgcgcg
ggcgtctggtttcatcttcttaacgacgcgatgacctgggttcgtcaggcgccgggtaaaggtctggaatgggtt
tcttctatcaactggtctggtacccacaccaactacgcggactctgttaaaggtcgtttcaccatctctcgtgaca
acgcgaaacgtaccctgtacctgcagatgaactctctgaaagacgaagacaccgcgctgtactactgcgttaccgg
ttacgggtgttaccaaaaccccgaccgggtcagggtaccaggttaccgtttcttctcaccaccaccaccactct
ccgtctaccccgccgaccccgctctccgtctaccccgccgtgc

[0750] SEQ ID NO:2:来自骆驼的抗HER2 sdAb 2Rb17c的氨基酸序列

[0751] EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIFISNDAMTWVRQAPGKGLEWVSSINWSGHTNYADSVKGRFT
ISRDNARTLYLQMNSLKDEDTALYYCVTGYGVTKTPTGQGTQVTVSSHHHHHHSPSTPPTPSPSTPPC

[0752] SEQ ID NO:3:来自单峰驼的抗HER2 sdAb NB2的氨基酸编码DNA序列

[0753] atggaagttcagctggttgaatctggtggtggtctggttcaggcggggtggttctctgcgtctgtcttg
cgcgcgctctggtatcaccttctctatcaacaccatgggttggtaccgtcaggcgccgggtaaacagcgtgaactg
gttgcgctgatctcttctatcggtgacacctactacgcggactctgttaaaggtcgtttcaccatctctcgtgaca
acgcgaaaaacaccgtttacctgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcggtttactactgcaaacgttt
ccgtaccgcggcgagggtaccgactactgggggtcagggtaccaggttaccgtttcttctcaccaccaccaccac
cac

[0754] SEQ ID NO:4:来自单峰驼的抗HER2 sdAb NB2的氨基酸序列

[0755] MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFT
ISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCKRFRATAAQGTDYWGQGTQVTVSSHHHHHH

[0756] SEQ ID NO:5:抗HER2 sdAb pcNB2 (一种合成构建体) 的氨基酸编码DNA序列

[0757] atggaagttcagctggttgaaaaaggtggtggtcgtgttcaggcggggtggttctctgcgtctgcgttg
cgcgcgctctggtatcaccttctctatcaacaccatgggttggtaccgtcaggcgccgggtaaacagcgtgaactg
gttgcgctgatctcttctatcggtgacacctactacgcggactctgttaaaggtcgtttcggtatccgtcgtgaca
acgcgaaaaacaccgtttacctgcgtatgcgtcgtctgaaaccggaagacaccgcggtttactactgcaaacgttt
ccgtaccgcggcgagggtaccgactactgggggtcagggtaccggttaccgtttctaaacaccaccaccaccac
cac

[0758] SEQ ID NO:6:抗HER2 sdAb pcNB2 (一种合成构建体) 的氨基酸序列

[0759] MEVQLVEKGGGRVQAGGSLRLRCAASGITFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDTYYADSVKGRFR
IRRDNANTVYLRMRRLKPEDTAVYYCKRFRATAAQGTDYWGQGTQVTVSKHHHHHH

[0760] SEQ ID NO:7:来自骆驼的抗HER1 sdAb 7D12的氨基酸编码DNA序列

[0761] gcggcgcagggttaaactggaagaatctggtggtggttctgttcagaccggtggttctctgcgtctgac
ctgcgcggcgtctggtcgtacctctcgttcttacggtatgggttggttccgtcaggcgccgggtaaagaacgtgaa
ttcgtttctggtatctcttggtggtgactctaccggttacgcggactctgttaaaggtcgtttcaccatctctc

gtgacaacgcgaaaaacaccgttgacctgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcgatctactactgcgc
ggcgcgcgcggttctgcgtggtacgggtaccctgtacgaatacgaactactggggtcagggtaccaggttacggtt
tcttct

[0762] SEQ ID NO:8:来自骆驼的抗HER1 sdAb 7D12的氨基酸序列

[0763] AAQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGR
FTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS

[0764] SEQ ID NO:9:来自骆驼的抗HER1 sdAb 9G8的氨基酸编码DNA序列

[0765] gaagttcagctggttgaatctggtggtggtctggttcaggcggtggttctctgcgtctgtcttgccg
ggcgtctggtcgctaccttctcttcttacgcgatgggttggttccgctcaggcgccgggtaaagaacgtgaattcggt
gttgcgatcaactggtcttctggttctacactacgcggactctgttaaaggctggttcaccatctctcgtgaca
acgcgaaaaacaccatgtacctgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcggtttactactgcgcggcggt
ttaccagatcaactctggttaactacaacttcaaagactacgaatacgaactactggggtcagggtaccaggttacc
gttttcttct

[0766] SEQ ID NO:10:来自骆驼的抗HER1 sdAb 9G8的氨基酸序列

[0767] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSS

[0768] SEQ ID NO:11:抗VGFR2 sdAb NTV1(一种合成构建体)的氨基酸编码DNA序列

[0769] atggcgcaggttcagctgctggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgtctgtc
ttgcgcggcgtctggttactctgttatcaacgacttcatgacctgggttcgctcaggcgccgggtaaaggtctggaa
tgggtttcttctatctctgttgcgacggttctacactacgcggactctgttaaaggctggttcaccatctctc
gtgacaactctaaaaacacctgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacaccgcggtttactactgcgc
ggcgcgtgttggtggtcgtgacctgggttgccgtacgaactggactactggggtcagggtaccctggttacggtt
tcttct

[0770] SEQ ID NO:12:抗VGFR2 sdAb NTV1(一种合成构建体)的氨基酸序列

[0771] MAQVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSYVINDFMTWVRQAPGKGLEWVSSISVADGSTYYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARVGGRLGWPELDYWGQGTLLVTVSS

[0772] SEQ ID NO:13:抗VGFR2 sdAb NTV2(一种合成构建体)的氨基酸编码DNA序列

[0773] atggcgcaggttcagctgctggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgtctgtc
ttgcgcggcgtctggtttcaaaatcaccaacaaaacatggcgtgggttcgctcaggcgccgggtaaaggtctggaa
tgggtttcttctatcggttcttcttctggttctacactacgcggactctgttaaaggctggttcaccatctctc
gtgacaactctaaaaacacctgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacaccgcggtttactactgcgc
gcgtcgtaaaggtaacgctctgggtccggcgcgctgcgttcttggggtcagggtaccctggttacggtttcttct

[0774] SEQ ID NO:14:抗VGFR2 sdAb NTV2(一种合成构建体)的氨基酸序列

[0775] MAQVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFKITNKTMAWVRQAPGKGLEWVSSIGSSSGSTYYADSVKGR
FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRKGNRLGPAALRSWGQGTLLVTVSS

[0776] SEQ ID NO:15:抗VGFR2 sdAb NTV3(一种合成构建体)的氨基酸编码DNA序列

[0777] atggcgcaggttcagctgctggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgtctgtc
ttgcgcggcgtctggtgttcgtgttaactacaaatctatgtcttgggttcgctcaggcgccgggtaaaggtctggaa
tgggtttctaccatcacctctcgtaacggttctacactacgcggactctgttaaaggctggttcaccatctctc

gtgacaactctaaaaacaccctgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacaccgcggtttactactgcgc
gaccggtcgtgcgcaccacgcgcggttcgttactggggtcagggtaccctggttaccgtttcttct

[0778] SEQ ID NO:16:抗VGFR2 sdAb NTV3(一种合成构建体)的氨基酸序列

[0779] MAQVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGVRVNYKSMSWVRQAPGKGLEWVSTITSRNGSTYYADSVKGR
FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATGRAHHAPVRYWGQGLTVTVSS

[0780] SEQ ID NO:17:抗VGFR2 sdAb NTV4(一种合成构建体)的氨基酸编码DNA序列

[0781] atggcgcaggttcagctgctggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgtctgtc
ttgcgcggcgtctggtgttaccatcaccgacgaagacatgaccctggttcgtcagcgccgggtaaaggtctggaa
tggttttcttctatcctgaacaccggtggttctacctactacgcggactctgttaaaggtcggttaccatctctc
gtgacaactctaaaaacaccctgtacctgcagatgaactctctgcgtgcggaagacaccgcggtttactactgcgc
ggcggttcacgaaaaagcggcgacatgaacttctggggtcagggtaccctggttaccgtttcttct

[0782] SEQ ID NO:18:抗VGFR2 sdAb NTV4(一种合成构建体)的氨基酸序列

[0783] AQVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGVTITDEDMTRVRQAPGKGLEWVSSILNTGGSTYYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAVHEKAADMNFWGQGLTVTVSS

[0784] SEQ ID NO:19:来自双峰驼抗人CD19 sdAb SRB-85的氨基酸编码DNA序列

[0785] gaagttcagctgctggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgttcttgcgaagc
gtctggtttcaacgcgatgacctctatcgactcttgaccgacgcggttaaaggttggttcgtcagccgccgggt
aaaggtctggaatgggtttctcggttcgcgatctctcaggacaacgcgaaaaacaccgtttacctgcagatgaact
ctctgaaaccggaagacaccgcgatgtactactgcgcgctgtctaaatgctacaccgtgtttacgactactgggg
tcagggtaccaggttaccgtttcttctggt

[0786] SEQ ID NO:20:来自双峰驼抗人CD19 sdAb SRB-85的氨基酸序列

[0787] EVQLLESGLLVQPGSLRSCEASGFNAMTSIDSWTDAVKGWVRQPPGKGLEWVSRFAISQDNAKNTVY
LQMNSLKPEDTAMYYCALSKCYTRVYDYWGQGTQVTVSSG

[0788] SEQ ID NO:21:来自双峰驼抗人CD19 sdAb SRB-37的氨基酸编码DNA序列

[0789] gaagttcagctgcaggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgtctgtcttgcgc
ggcgtctggtttcatctacatggttggtatcaaaaccgaacgtgacggtgttaaaggttggttcgtcagcgccg
ggtaaaggtctggaatggctgtctcggttaccatcccgcgtgacaacgcgaaaaacaccctgtacctgcagatga
acaacctgaaatctgaagacaccgcgctgtactactgcgcgaccgaagaaaacgactggggtcagggtaccaggt
taccgtttcttctggt

[0790] SEQ ID NO:22:来自双峰驼抗人CD19 sdAb SRB-37的氨基酸序列

[0791] EVQLQESGGLLVQPGSLRLSCAASGFIYMGVIKTERDGVKGWVRQAPGKGLEWLSRFTIPRDNKNTL
YLQMNNLKSEDTALYYCATEENDWGQGTQVTVSSG

[0792] SEQ ID NO:23:来自单峰驼的抗CTLA-4sdAb NB16的氨基酸编码DNA序列

[0793] caggttcagctgcaggaatctggtggtggttctggttcagcggggtggttctctgcgtctgtcttgcac
cgcgtctggtttcgggtgttgacggtaccgacatgggttggtaccgtcagcgccgggtaacgaatgcgaactggtt
tcttctatctcttctatcggtatcggttactactctgaatctgttaaaggtcggttaccatctctcgtgacaacg
cgaaaaacaccgtttacctgcagatgaactctctgcgtccggacgacaccgcggtttactactgcggtcgtcgttg
gatcggttaccgttgcggttaactggggtcgtggtaccaggttaccgtttcttct

[0794] SEQ ID NO:24:来自单峰驼的抗CTLA-4sdAb NB16的氨基酸序列QVQLQESGGGSVQA

GGSLRLSCTASGFGVDGTDMDGWYRQAPGNECELVSSISSIGIGYYSESVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPDDTA
VYYCGRRWIGYRCGNWGRGTQVTVSS

[0795] SEQ ID NO:25:来自单峰驼的抗CTLA-4sAb NB36的氨基酸编码DNA序列

[0796] caggttcagctgcaggaatctggtggtggttctgttcaggcgccgggtaaagaacgtgaaggtgttggtgcgac
cggttctcgttacacctacacatgggttggttccgtcaggcgccgggtaaagaacgtgaaggtgttggtgcgac
accggttcggttctccgttctacgcgactctgttaaaggtcgtttcaccatctctcgtgacaacgcgaacaaca
ccatcttctcgcagatgaactctctgaaaccggaagactctgcgatgtactactgcgcggcgcggtggttcttctg
tacctcttacaatggaacgaatacggttcttacaactactggggtcagggtacccaggttaccgtttcttct

[0797] SEQ ID NO:26:来自单峰驼的抗CTLA-4sAb NB36的氨基酸序列

[0798] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGSRYTYTMGWFRQAPGKEREGVVAITAFGSPFYADSVKGRFTISR
NANNTIFLQMNSLKPEDSAMYYCAARGSSGTSYKWEYGSYNYWGQGTQVTVSS

[0799] SEQ ID NO:27:来自单峰驼的抗CTLA-4sAb NB91的氨基酸编码DNA序列

[0800] caggttcagctgcaggaatctggtggtggttctgttcaggcgccgggtaaagaacgtgaagttgttgccacatc
ggcgtctaaatacacctcttgcattgggttggttccgtcaggcgccgggtaaagaacgtgaagttgttgccacatc
gactctgggtccggtaccctgtacgcgactctgttaaaggtcgtttcaccatctctaaagacaacgcgaaaaaca
ccctgtacctggaaatgtctaccctgaaaccggacgacaccgcgatgtactactgcgcggcggggtccgatgtactc
tggttcttgcactacaactactggggtcagggtacccaggttaccgtttcttct

[0801] SEQ ID NO:28:来自单峰驼的抗CTLA-4sAb NB91的氨基酸序列

[0802] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAASKYTSCMGWFRQAPGKEREVVAHIDSGPRTLYADSVKGRFTISK
NAKNTLYLEMSTLKPDDTAMYYCAAGPMYSGSCNYNYWGQGTQVTVSS

[0803] SEQ ID NO:29:来自单峰驼的抗人PD-L1 sAb A1的氨基酸编码DNA序列

[0804] Caggttcagctgcaggaatctggtggtggtctggttcagccgggtggttctctgcgtctgtcttgcgc
ggcgtctggtttcaccctggactactacgcgatcggttggttccgtcaggcgccgggtaaagaacgtgaaggtgtt
tcttgcattcttcttcttgacggttctacctactacgcgactctgttaaaggtcgtttcaccatctctcgtgaca
acgcgaaaaacaccgtttacctgcagatgtcttctctgaaaccggaagacaccgcggtttactactgcggtatctc
tggttcttgcctgctggaagactacggtatggactactggggtaaaggtacccaggttaccgtttcttct

[0805] SEQ ID NO:30:来自单峰驼的抗人PD-L1 sAb A1的氨基酸序列

[0806] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLMSSSLKPEDTAVYYCGISGSCLEDYGM DYWGKGQGTQVTVSS

[0807] SEQ ID NO:31:来自单峰驼的抗人PD-L1 sAb B1的氨基酸编码DNA序列

[0808] caggttcagctgcaggaatctggtggtggtctggttcacccgggtggttctctgcgtctgtcttgcgc
ggcgtctggtttctctctggacaactacgcgatcggttggttccgtcaggcgccgggtaaagaacgtgaaggtgtt
tcttgcattcttcttctggttctgaaggtcgctcgttactacgcgacttcgttaaaggtcgtttcaccatctctcgtg
acaacgcgaaaaacaccgcgttctcgcagatgaactctctgaaaccggaagacaccgcgactactactgcgcgac
cgttggtttctgctcttctcagtaggtatggaattcggttggtgactactggggtcagggtacccaggttaccgtt
tcttct

[0809] SEQ ID NO:32:来自单峰驼的抗人PD-L1 sAb B1的氨基酸序列

[0810] QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGFTLDNYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSGSEGRYYADFVKGRF
TISRDNKNTAFLQMNSLKPEDTADYYCATVGFCSQYGMFVGDYWGQGTQVTVSS

- [0811] SEQ ID NO:33:抗小鼠血清白蛋白sdAb MSA21的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0812] QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISSLDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSS
- [0813] SEQ ID NO:34:抗人血清白蛋白sdAb A1b-1的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0814] AVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKEPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTQVTVSS
- [0815] SEQ ID NO:35:抗人血清白蛋白sdAb A1b23的氨基酸序列(人源化、优化的A1b1)(生物体:人工序列)
- [0816] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN SKTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSS
- [0817] SEQ ID NO:36:抗EGFR V_{HH} 7A5的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0818] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASDRTFSSNMGWFRQAPGKEREFVAAIGWGGLETHYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTARYYCAVSSSTRTVIYTLPRMYNYWGQGTQVTVSS
- [0819] SEQ ID NO:37:抗EGFR V_{HH} 7D12的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0820] QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS
- [0821] SEQ ID NO:38:抗EGFR V_{HH} 7C12的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0822] AVQLVESGGGSVQAGGSLRLTCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTAIYYCAAAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTQVTVSS
- [0823] SEQ ID NO:39:抗胰岛素样生长因子1受体V_{HH} 4B11的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0824] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFTFNAMGWYRQAPGKQRELVAVIISGGSTHYVDSVKGRFTISRDN AKKMVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVKKFGDYWGQGTQVTVSS
- [0825] SEQ ID NO:40:抗胰岛素样生长因子1受体V_{HH} 3G7的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0826] DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASESISTINVMWYRQAPGKQRELVAEITRSGRTNYVDSVKGRFTISRDN AKNTMYLQMNSLNLED TAVYYCRTIDG SWREYWGQGTQVTVSS
- [0827] SEQ ID NO:41:抗胰岛素样生长因子1受体V_{HH} 2C7的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0828] QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCVASGRFTFSNYAIVIGWFRQAPGQEREFVAAINWNSRSTYYADSVKGRFTISR LNARNTVYLQMNLKPEDTAVYDCAASHDSYGGTNANLYDYWGQGTQVTVSS
- [0829] SEQ ID NO:42:抗胰岛素样生长因子1受体V_{HH} 1C7的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0830] QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRFTFSRTANAWFRQAPGKEREFVATITWNSGTTRYADSVKGRFFISKDS AKNTIYLEMNSLEPEDTAVYYCAATAAAVITPTRGYNYWGQGTQVTVSS
- [0831] SEQ ID NO:43:抗CEACAM V_{HH} NbCEA5的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0832] EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDYGSYWMGWFRQAPGKEREGVAAINRGGGYTVYADSVKGRFTISRDT AKNTVYLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGT LVT VSS
- [0833] SEQ ID NO:44:抗CEACAM V_{HH} CEA5的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)

- [0834] EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGDTYGSYWMGFRQAPGQEREAVAAINRGGGYTVYADSVKGRFT
ISRDNAKNTLYLQMNSLRPDDTADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGLTLTVSS
- [0835] SEQ ID NO:45:抗CD123 V_{HH} 57A07的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0836] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSGNMGWYRRQAPGKEREWAAIASGGSIYYRDSVKGRFT
ISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNSHPPTLPYWGLGTQVTVSS
- [0837] SEQ ID NO:46:抗CD123 V_{HH} 57B04的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0838] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGINFRFNSMGWRRRAPGKEREWAAITSGDITNYRDSVRGRFT
ISRDNVKNVTYVLQMNTLKLEDTAVYYCNTFPPIADYWGLGTQVTVSS
- [0839] SEQ ID NO:47:抗CD123 V_{HH} 51D09的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0840] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSGNTMGWYRQAPGKQRELVAAISSGGSTDYADSVKGRFTI
SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNAAILLYRLGYEEGDYWGGLTLTVSS
- [0841] SEQ ID NO:48:抗CD123 V_{HH} 55C05的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0842] EVQLVESGGGLVPAGDSLRLSCVASGRSLNTYTMGWFRQAPGKECEEVAAINWNGVYRDYADSAKGRET
ASRDNAMNTVFLQMNSLKPEDTAVYFCATATQGWRHTEPSDFGSWGLGTQVTVSS
- [0843] SEQ ID NO:49:抗CD123 V_{HH} 50F07的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0844] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTGSGSTFSINAMGWYRQAPGKQRELVAAITSGGRTNYADSVKGRFTI
SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNARISAGTAFWLWSDYEWGLGTTLTVSS
- [0845] SEQ ID NO:50:抗CD123 V_{HH} 55F03的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0846] EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIYWSNGKTQYTDSVKGRFT
ISGDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCVADKDETFRTLPYDYWGGLGTQVTVSS
- [0847] SEQ ID NO:51:抗CD123 V_{HH} 55A01的氨基酸序列(生物体:人工;重组肽)
- [0848] EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCTTSGRALNMYVMGWFRQAPGNEREFVAATSSSGGSTSYPD SVKGRFT
ISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAAYRCAASPYVSTPTMNILEEYRYWGLGTQVTVSS
- [0849] SEQ ID NO:52:抗c-MET V_{HH} 04E09的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0850] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFILDYYAIGWFRQAPGKEREGVLCIDASDDITYYADSVKGRFT
ISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGYYCATPIGLSSCLLEYDYDYWGQGLTLTVSS
- [0851] SEQ ID NO:53:抗c-MET V_{HH} 06B08的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0852] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISRYTMGWFRQAPGKEREFVAAISWGDNTNYADSVKGRFT
ISRPNTKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADYRSGSYQASEWTRPSGYDYWGQGLTLTVSS
- [0853] SEQ ID NO:54:抗c-MET V_{HH} 06C12的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0854] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLDYFAIGWFRQAPGKEREEISCISNSDGSTYYANSVKGRFT
ISIDNAKNTVYLQMTSLKPEDTAVYYCATPVGLGPFCKTTNDYDYSQGGLTLTVSS
- [0855] SEQ ID NO:55:抗c-MET V_{HH} 06F10的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0856] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAINWFRQAPGKEREGVSCISGGDGSTYYADSVKGRFT
ISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATALGLSSSCHGDGYDYWGQGLTLTVSS
- [0857] SEQ ID NO:56:抗-Her3 V_{HH} 21F6的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0858] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTYYLNAMGWFRQGPGRKREFVAAIDWSDGNKDYADSVKGRFT
ISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADTPPWGPMIYIESYDSWGQGLTLTVSS
- [0859] SEQ ID NO:57:抗-Her3 V_{HH} 4C7的氨基酸序列(生物体:人工序列)

- [0860] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSSYPMSWVRQAPGKGPAAVSTVSPGGITTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCLRDNLNRGQGTQVTVSS
- [0861] SEQ ID NO:58:抗-Her3 V_{HH} 17B5的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0862] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIGGLNAMAWYRQAPGKERELVAGIFGVGSTRYADSVKGRFTISRDIKNTVFLQMNSLNSED TAVYYCRMSSVTRGSSDYWGQGTQVTVSS
- [0863] SEQ ID NO:59:抗-Her3 V_{HH} 18G11的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0864] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTLFKINAMGWYRQAPGKRRELVALITSSDITDYAESVEGRFTISRDNNTWNAVYLMNSLKPEDTAVYYCHSDHYSMGVPEKRVIMYGQGTQVTVSS
- [0865] SEQ ID NO:60:抗-Her3 V_{HH} 34C7的氨基酸序列(生物体:人工序列)
- [0866] EVQLVESGGGLVQPGGSLGLSCVASGSIFRINAMAWYRQAPGKQRELVAEITAGGSTNYADSVKGRFTISRVDNAWNTLYLQMNSLKVEDTAVYYCNLDHYTTWDRRSAYWGQGTQVTVSS
- [0867] SEQ ID NO:61:抗-Her2 V_{HH} 47D5的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0868] KVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFGFNDMAWYRQAPGKQRELVALISRVTGVTSSADSVKGRFTISR VNAKDTVYLMNSLKPEDTAVYYCYMDQRLDGSTLAYWGQGTQVTVSS
- [0869] SEQ ID NO:62:抗-Her2 V_{HH} 2D3的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0870] EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMSWVRQVPKGLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRNNANNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNWRDAGTTWFEKSGSAGQGTQVTVSS
- [0871] SEQ ID NO:63:抗-Her2 V_{HH} 5F7的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0872] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSINTMGWYRQAPGKQRELVALISSIGDYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCKRFRTAAQGTQVTVSS
- [0873] SEQ ID NO:64:抗-Her2 V_{HH} 13D11的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0874] EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCVGSGLDDYGMTWVRRAPGKLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLFLQMNSLNPEDTAVYYCGQGWKIVPTNPRGHGTQVTVSS
- [0875] SEQ ID NO:65:抗-Her2 V_{HH} 2B4的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0876] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVGSGLDDYAMTWVRQAPGKLEWVSSINWSGTHTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLFLQMNSLSPEDTAVYYCNQGWKIRPTIPMGHGTQVTVSS
- [0877] SEQ ID NO:66:抗-Her2 V_{HH} 2G2的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0878] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSLDDYGMTWVRQAPGKLEWVSSINWSGTHTDYTDVPKGRFTISRDNAKNTLFLQMNNLTPEDTAVYYCNRGWKIVPTDLGGHGTQVTVSS
- [0879] SEQ ID NO:67:抗-Her2 V_{HH} 13G11的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0880] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFISNYAMGWFRQAPGKEREFVATINWSGSHSDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNNLKSEDTAVYYCAPGWGTAPLSTSVYWGQGTQVTVSS
- [0881] SEQ ID NO:68:抗-Her2 V_{HH} 12E33的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0882] EVQLVESGGGMVQAGGSLRLSCAASGLTSLNYMGWFRQAPGKEREFVSSINWSGTHTYDADFVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAGGWGTGRYNYWGQGTQVTVSS
- [0883] SEQ ID NO:69:抗-Her2 V_{HH} 13F21的氨基酸序列(生物体:美洲驼)
- [0884] EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCVASGTIVSINATSWYRQAPGNQRELVAITIGDGRTHYADSVKDRFTISRDAANLVYLMNSLKPSTAIYSCNANGIESYGWGNRHFNYWTVGTQVTVSS
- [0885] SEQ ID NO:70:抗-Her2 V_{HH} 11A101的氨基酸序列(生物体:美洲驼)

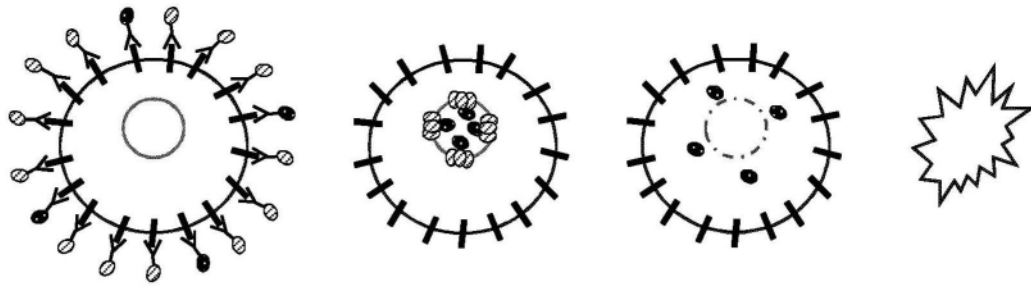
[0886] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNAMGWFRQAPGKEREFVAAISRSPGVITYYADSVKGRFTTS
RDNAKNTVYLMNDLKPEDTAVYYCAADFYLATLAHEYDYWGQGTQVTVSS

[0887] SEQ ID NO:71:抗-Her2 V_{HH} 11A22的氨基酸序列(生物体:美洲驼)

[0888] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGTEREFIAGIRWSDGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAADFVSTLAHEYDYWGQGTQVTVSS

[0889] SEQ ID NO:72:抗-Her2 V_{HH} 12D44的氨基酸序列(生物体:美洲驼)

[0890] KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMAWFRQAPGTEREFIAGIRWSDGSTYYADSVKGRFT
ISRANAKNTVYLMNGLKPEDTAVYYCAADFVSTLAHEYDYWGQGTQVTVSS



1T2C



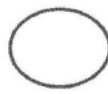
细胞表面受体



VHH-SO1861

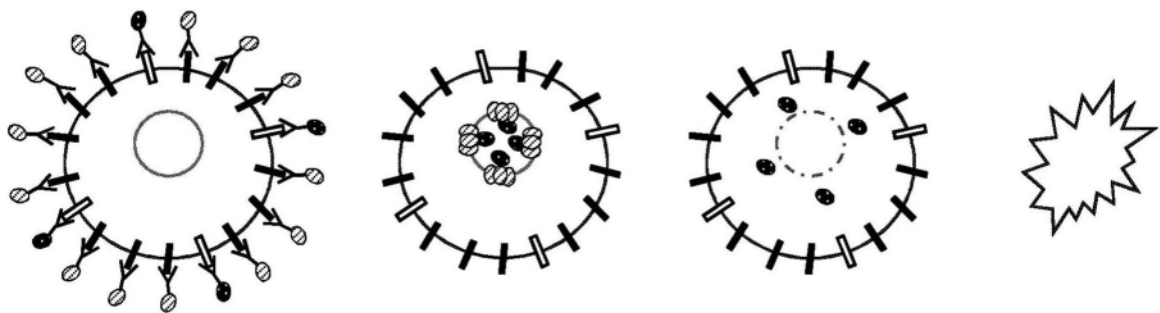


mAb-毒素



内体 pH<5

图1A



2T2C



细胞表面受体1



细胞表面受体2



mAb-毒素



VHH-SO1861



内体 pH<5

图1B

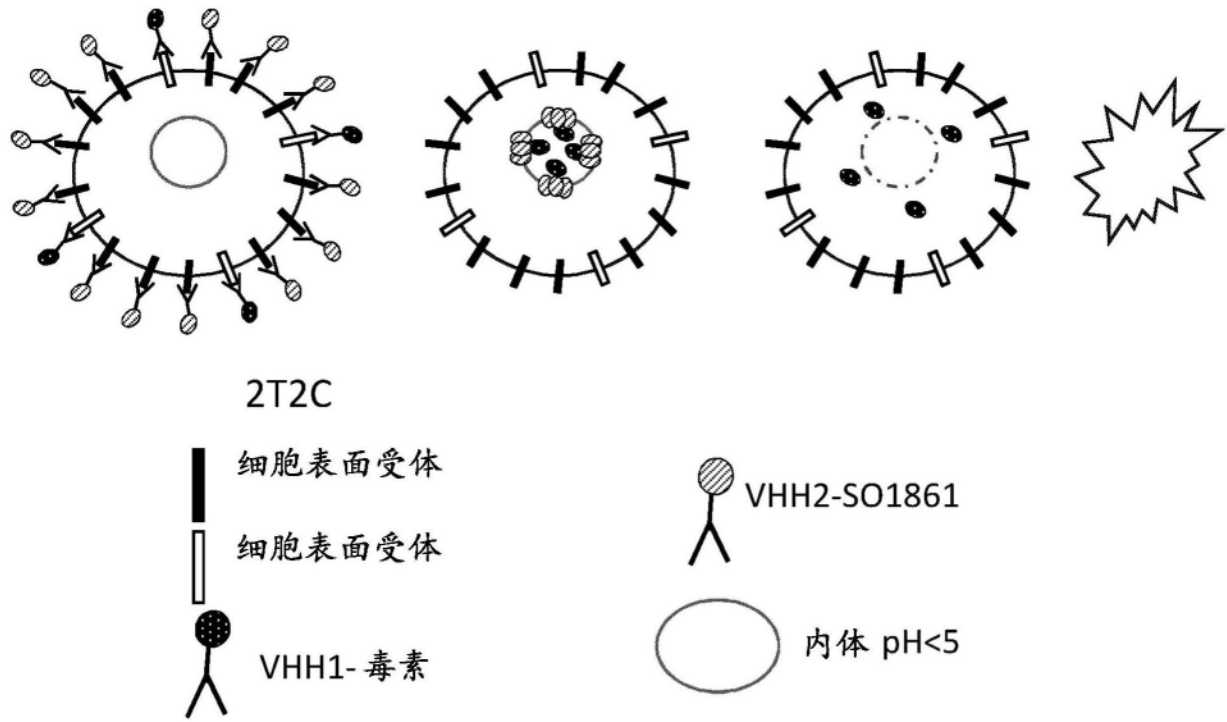


图1C

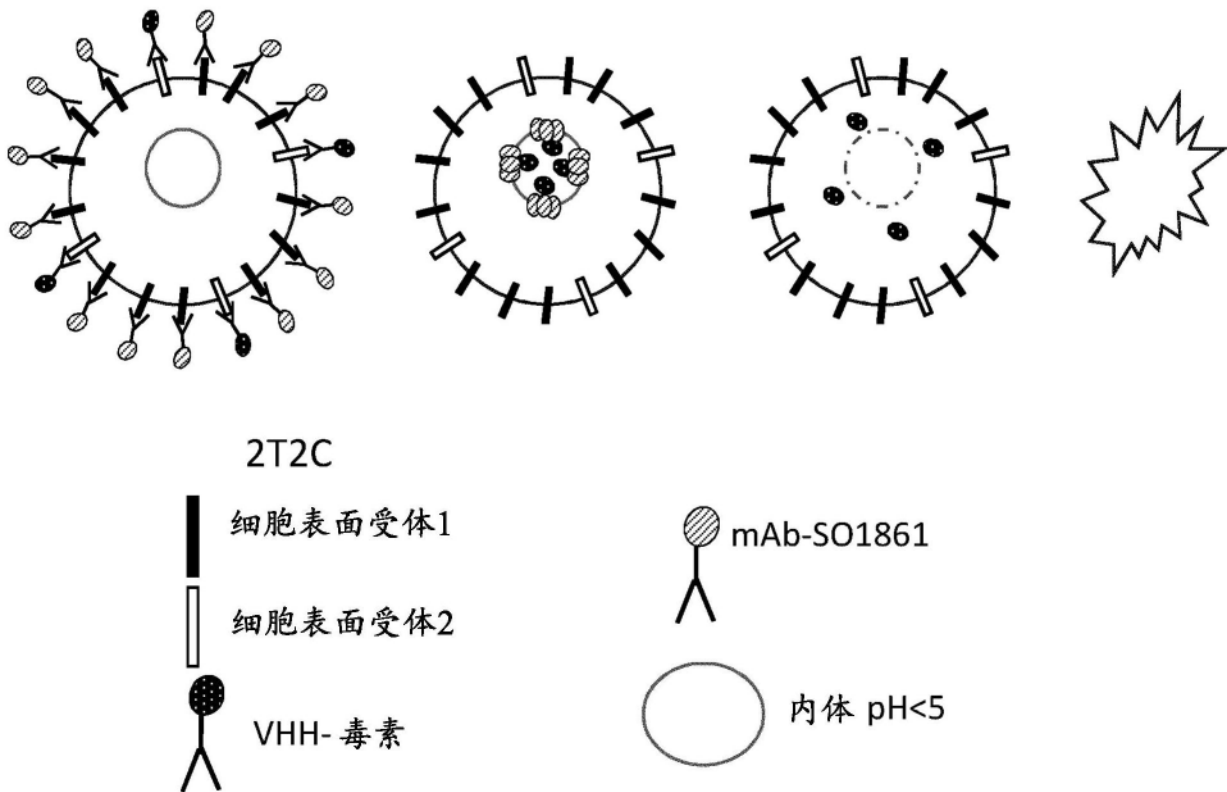


图1D

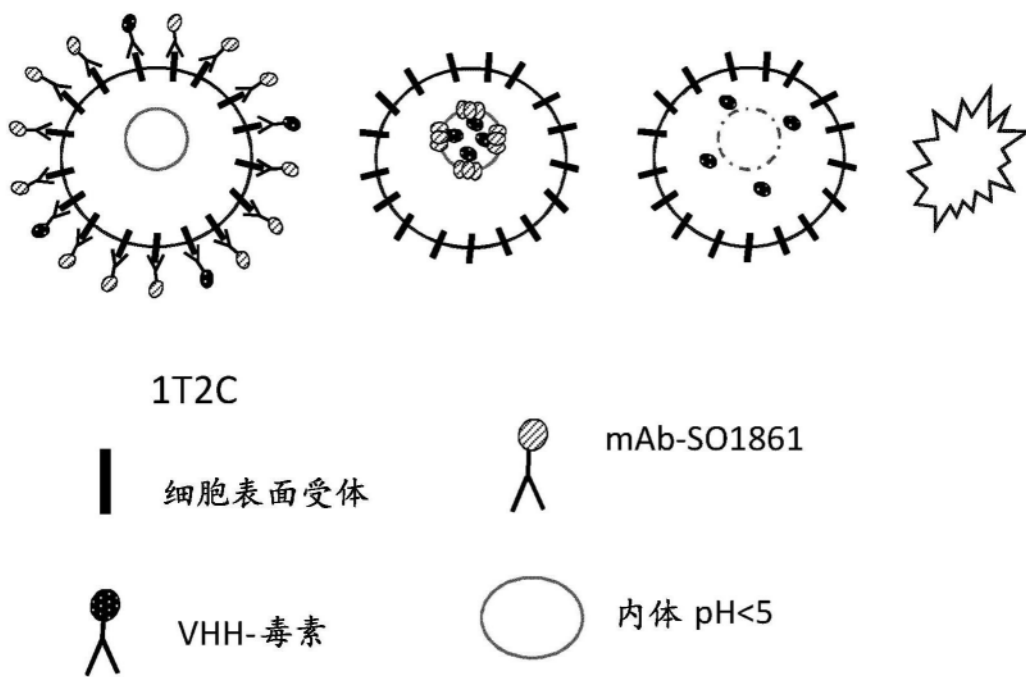


图1E

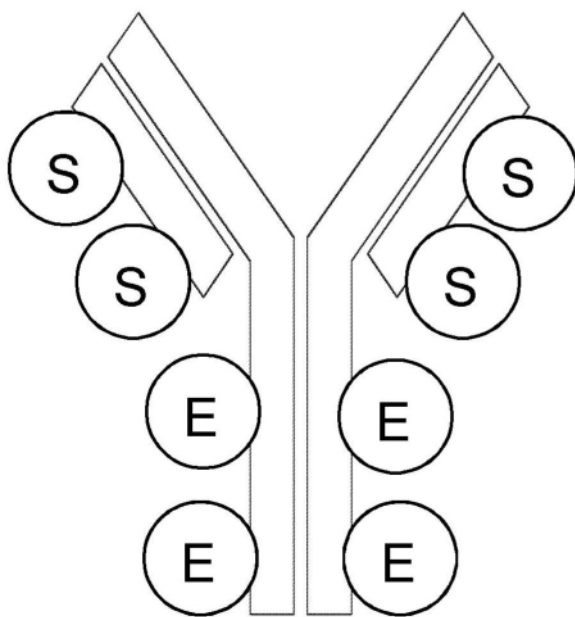


图1F

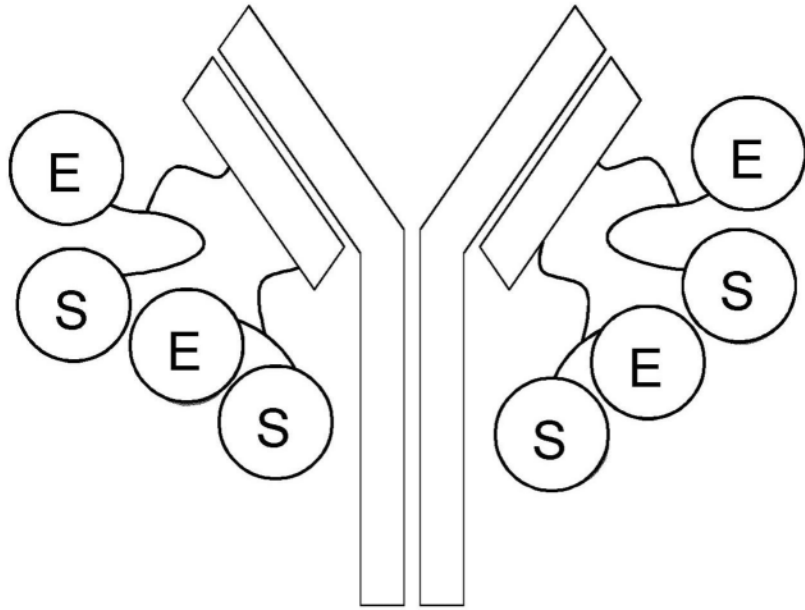


图1G

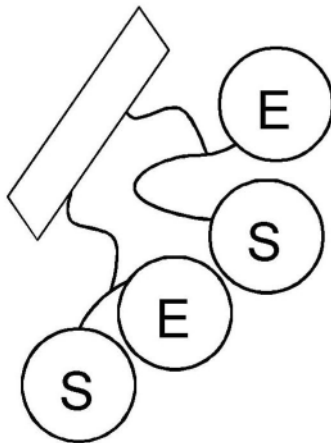


图1H

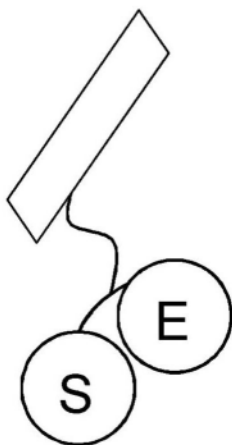


图1I

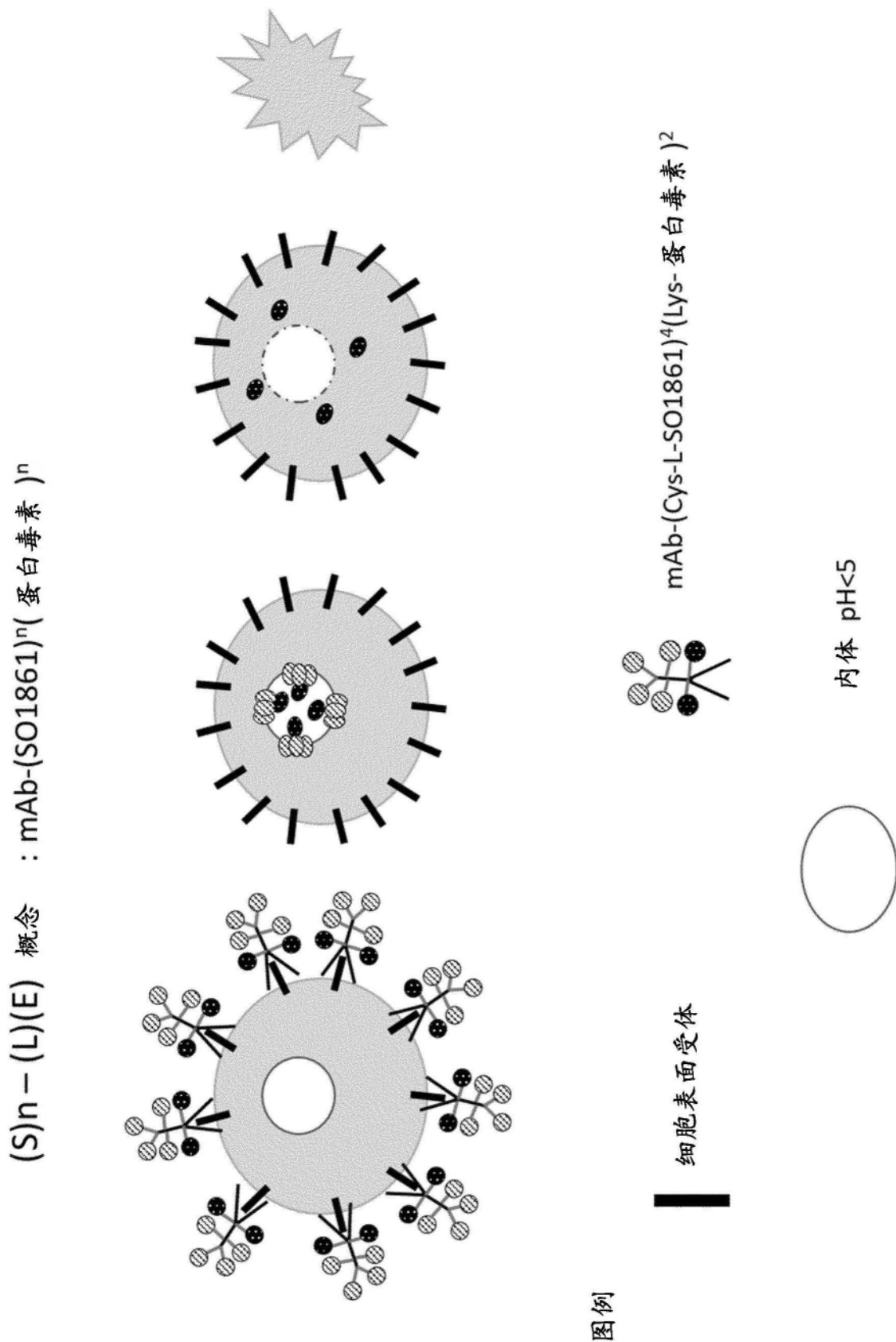
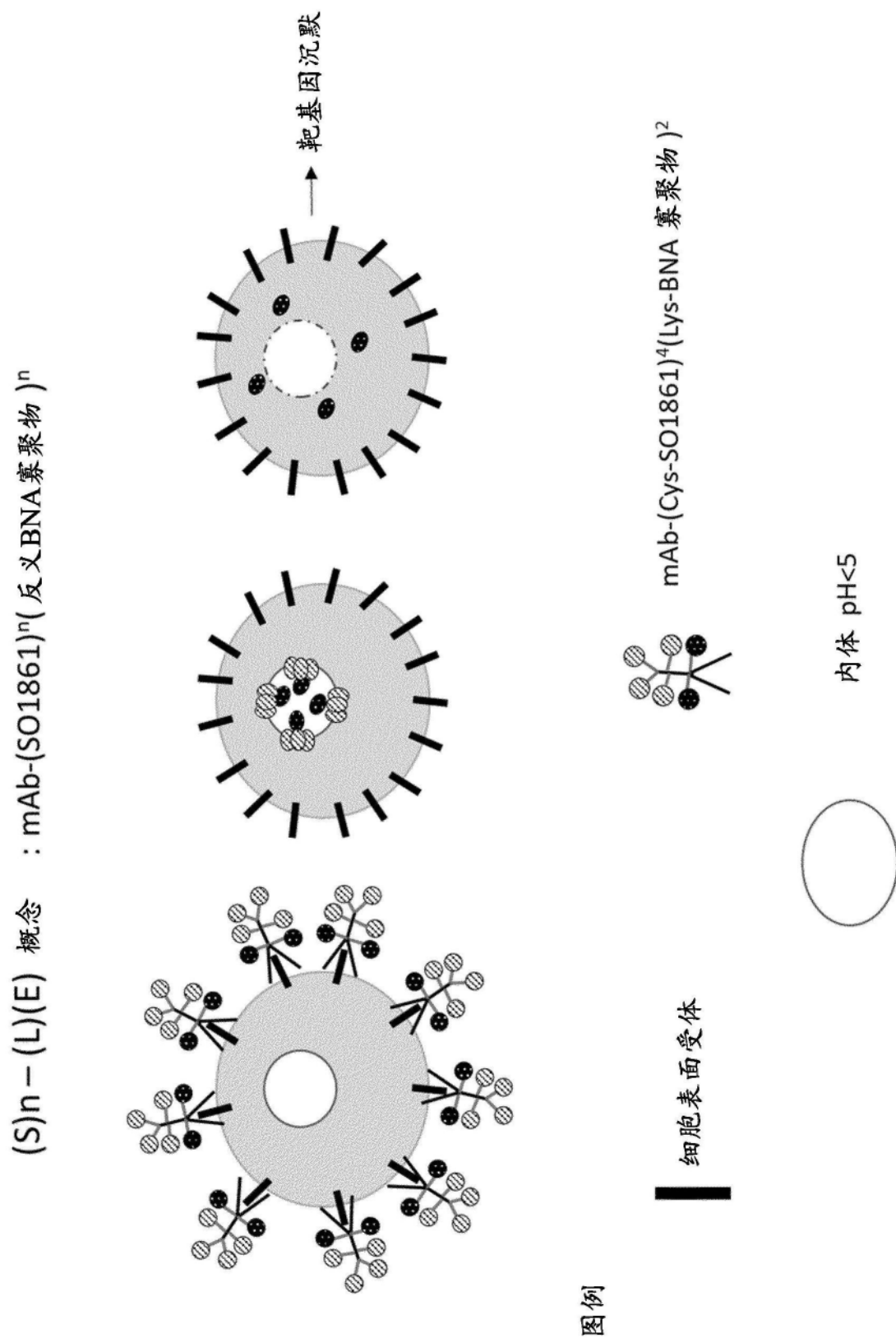
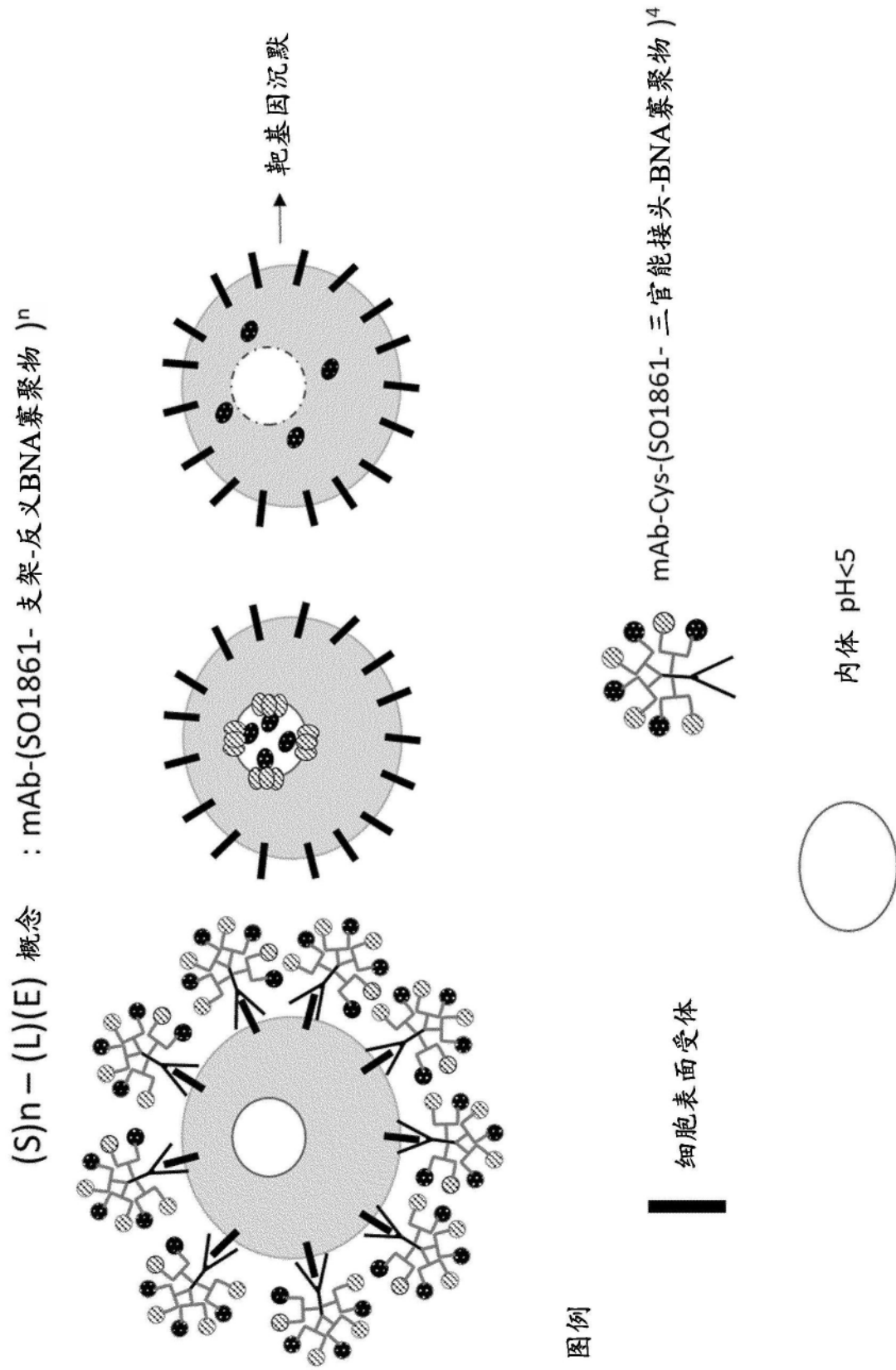


图1J



图例

图1K



图例

图1L

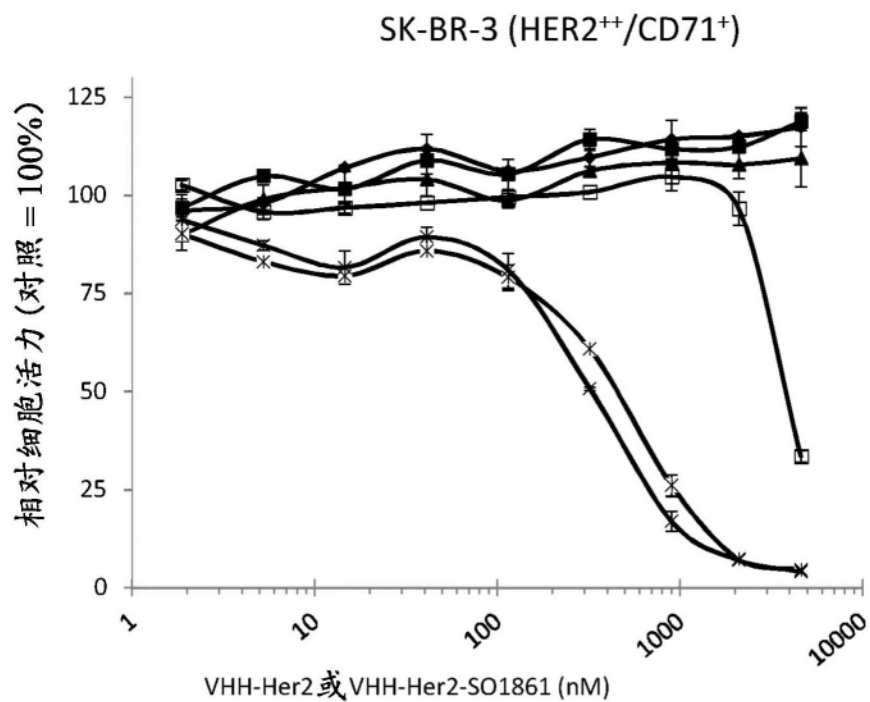


图2A

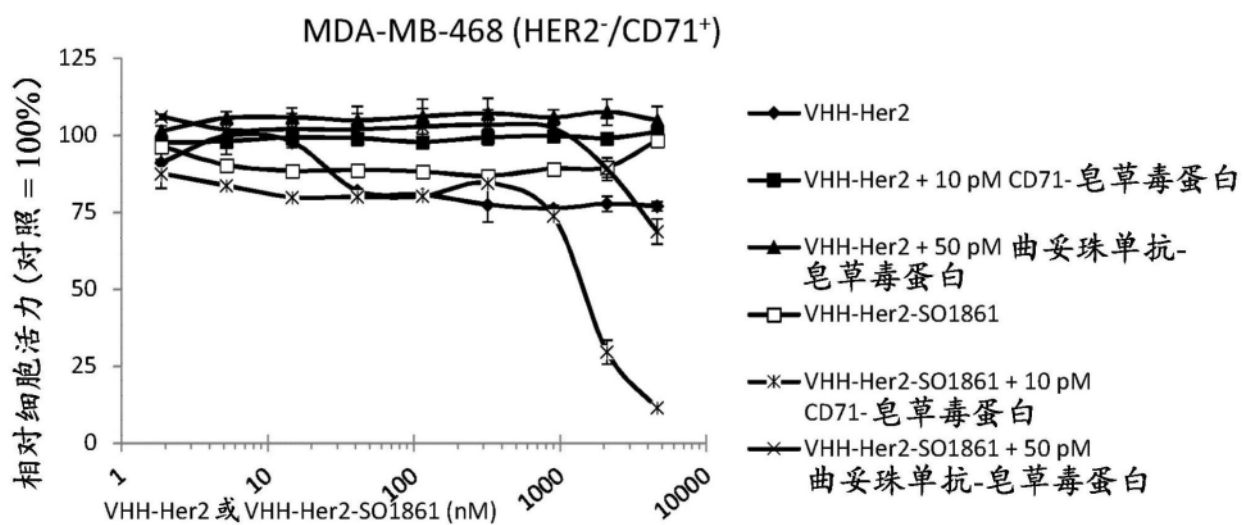


图2B

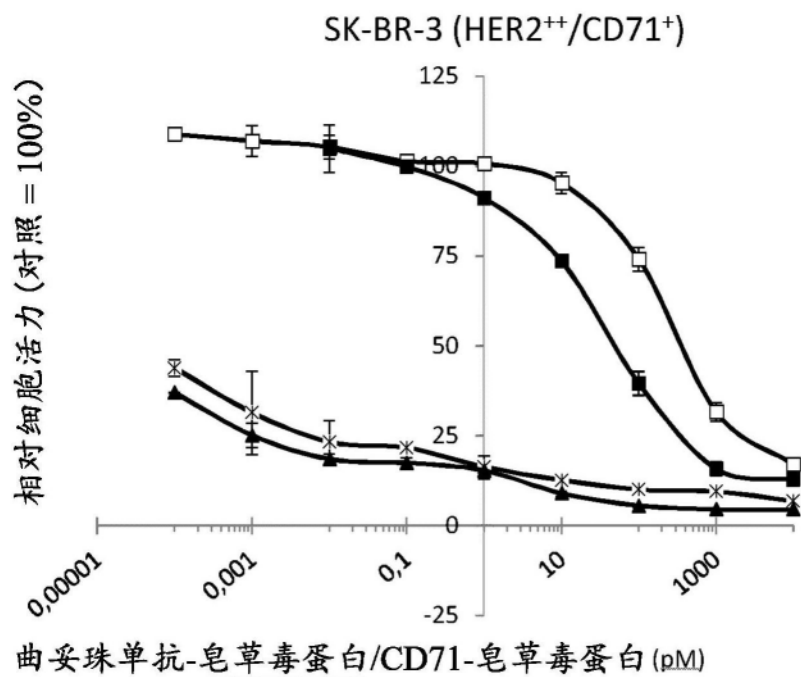


图3A

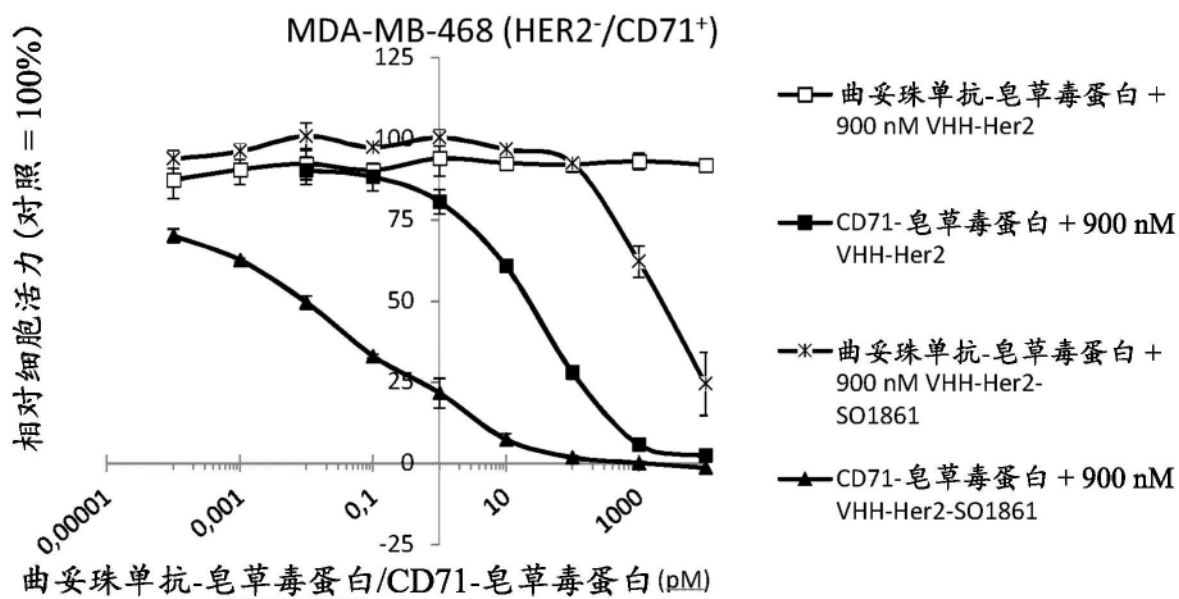


图3B

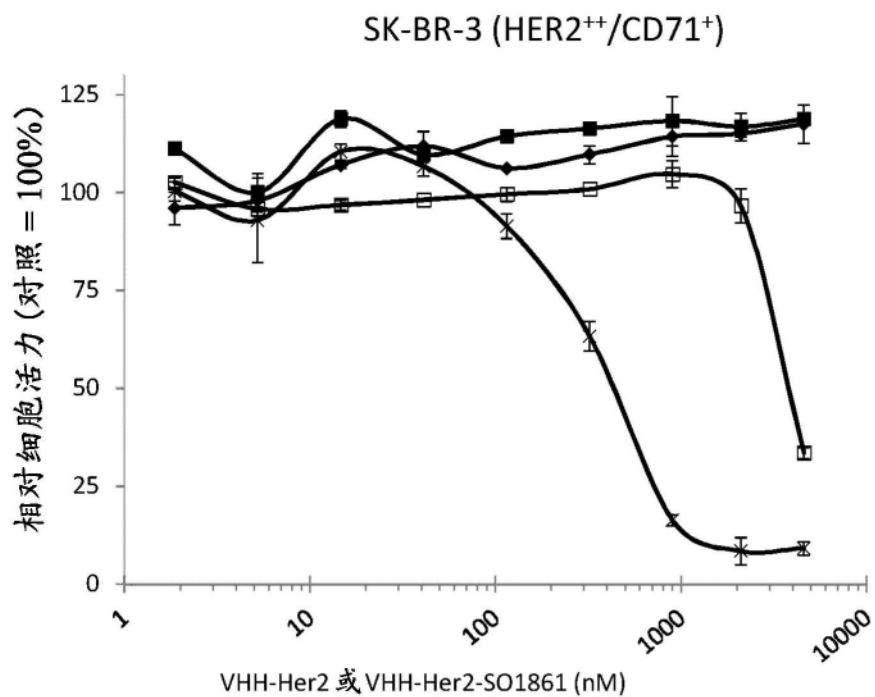


图4A

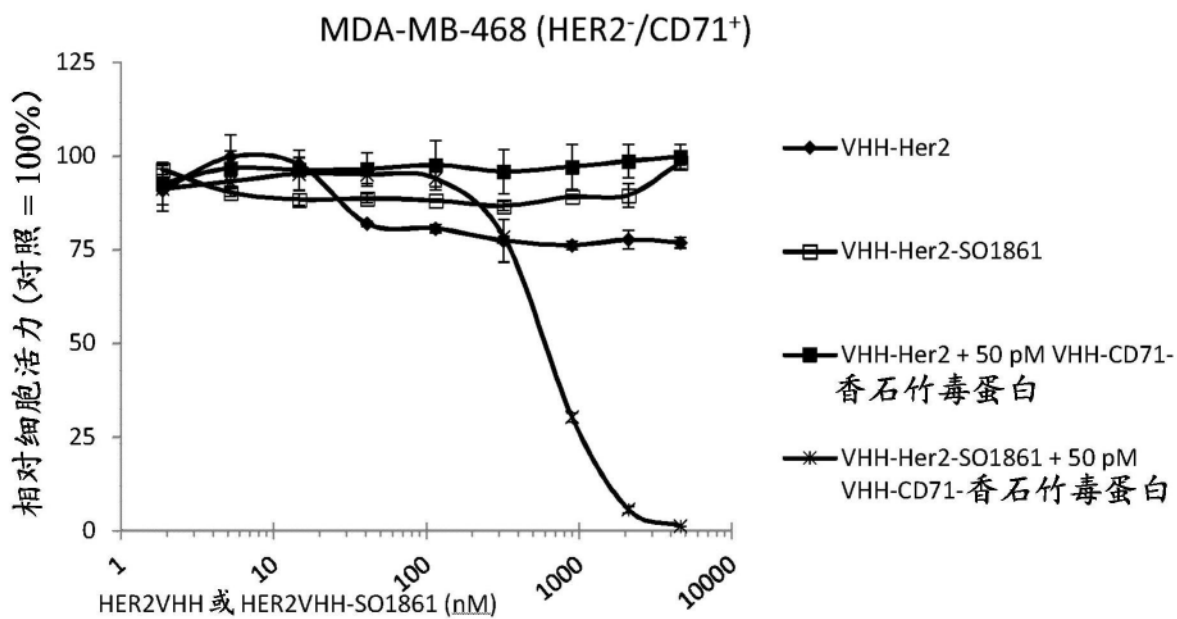


图4B

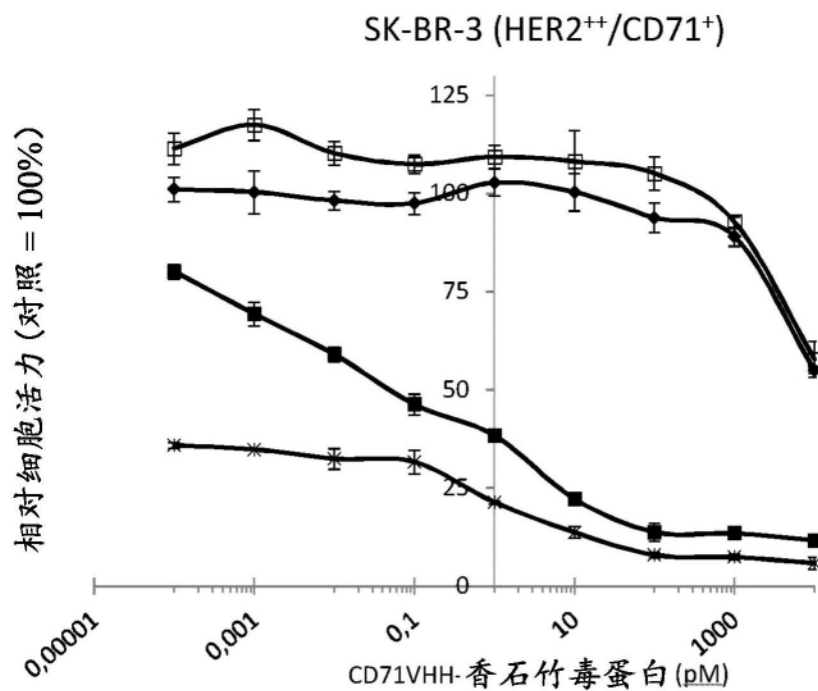


图5A

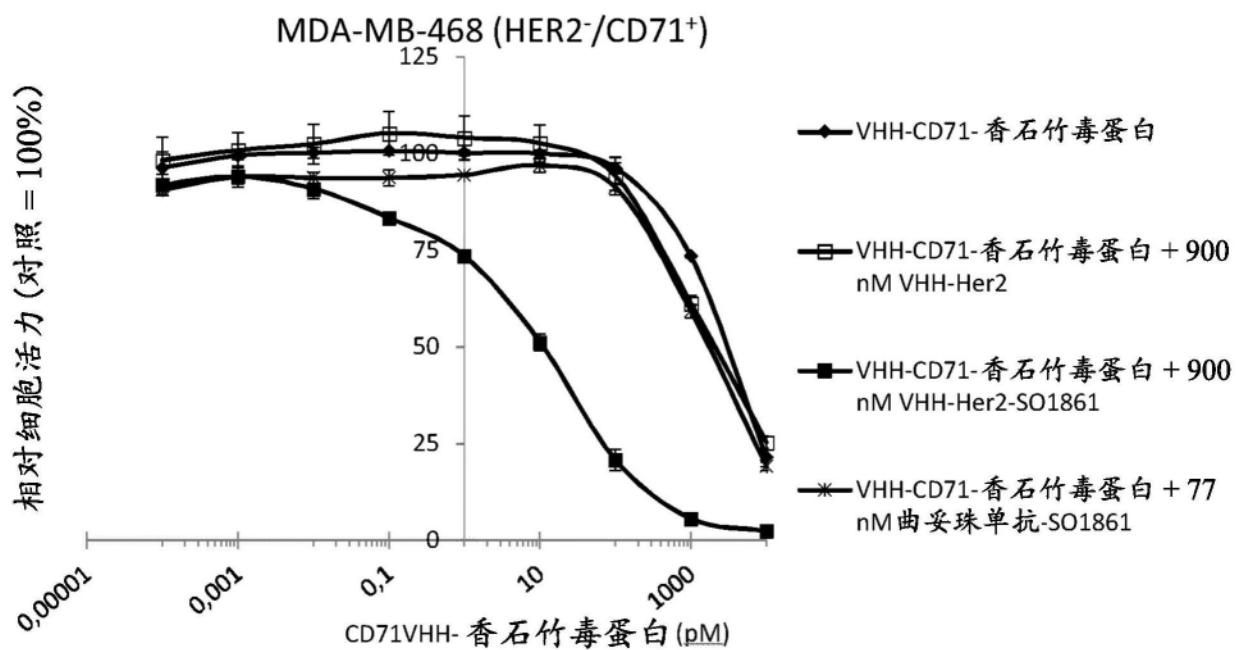


图5B

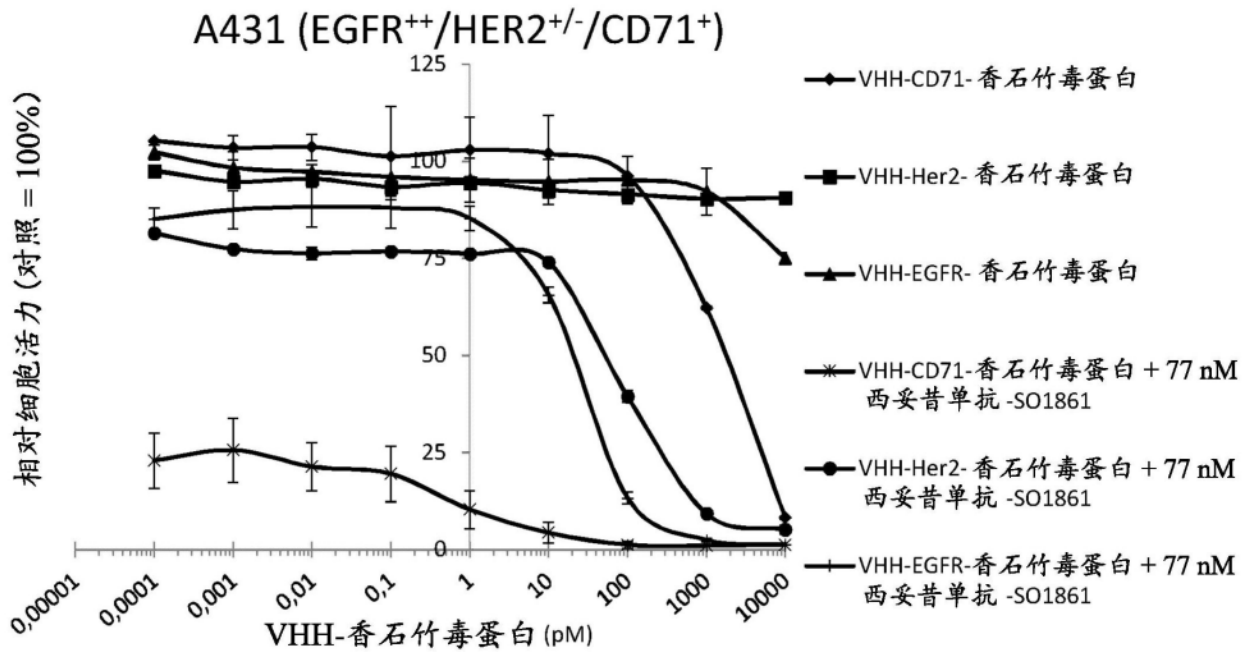


图6A

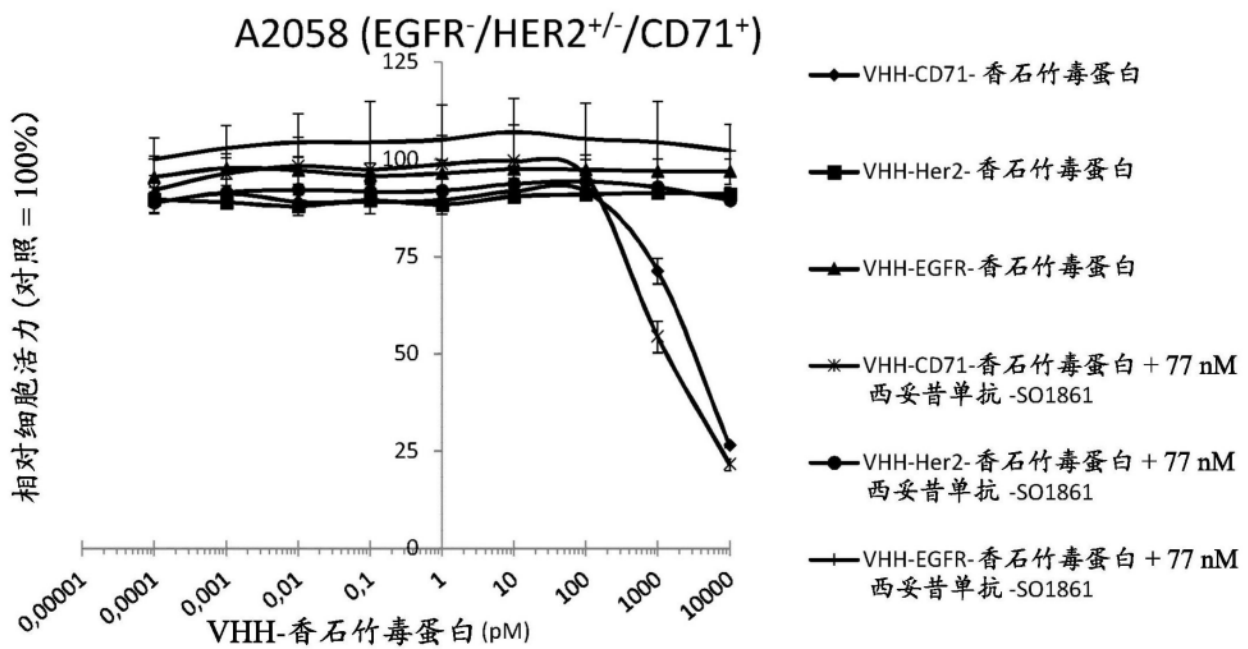


图6B

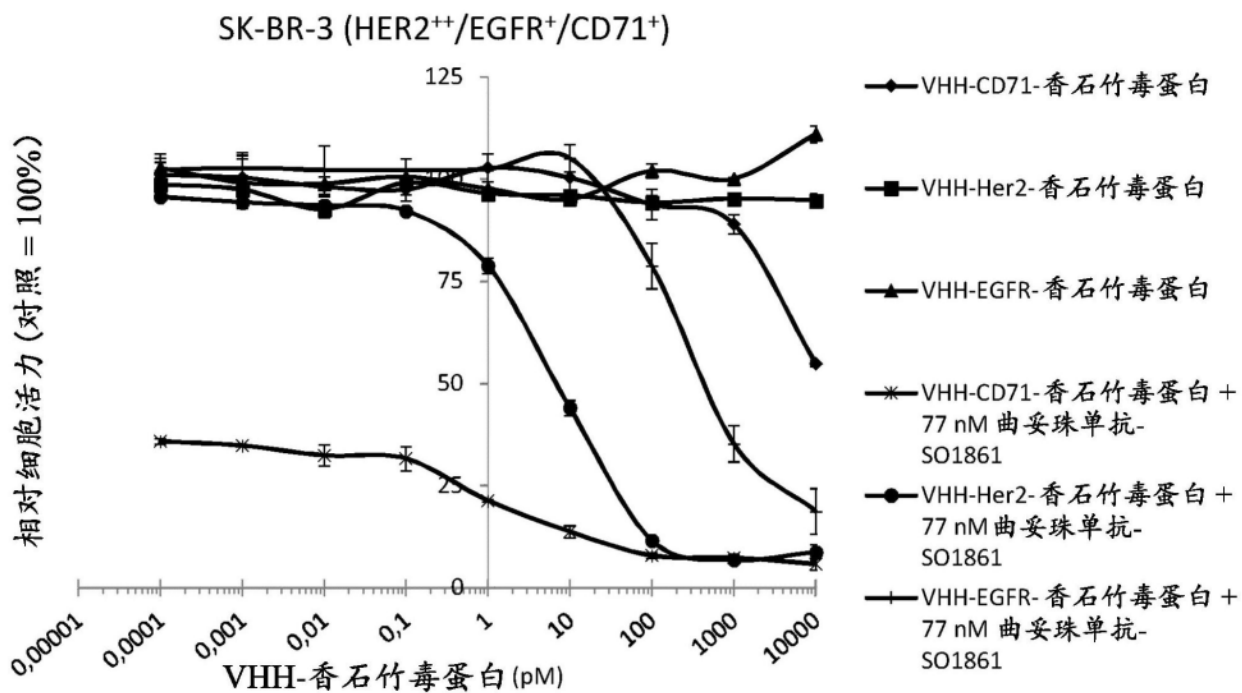


图7A

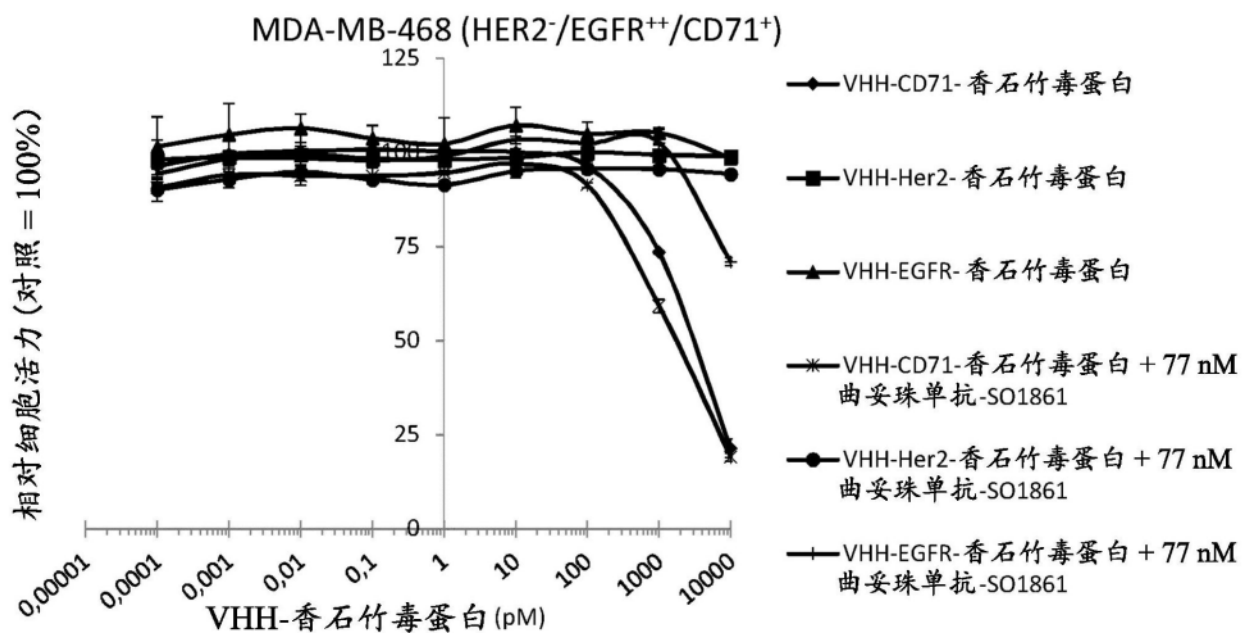


图7B

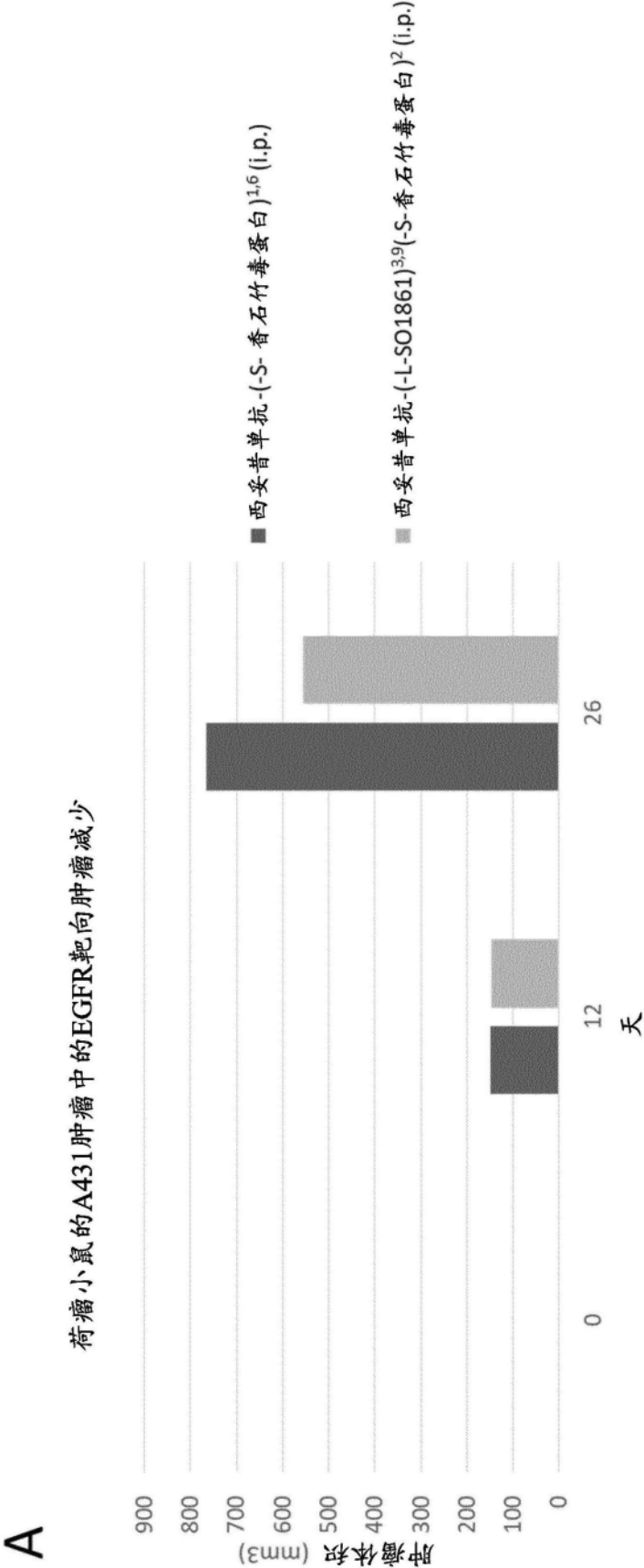


图8

B

荷瘤小鼠的A431肿瘤中的EGFR靶向肿瘤减少

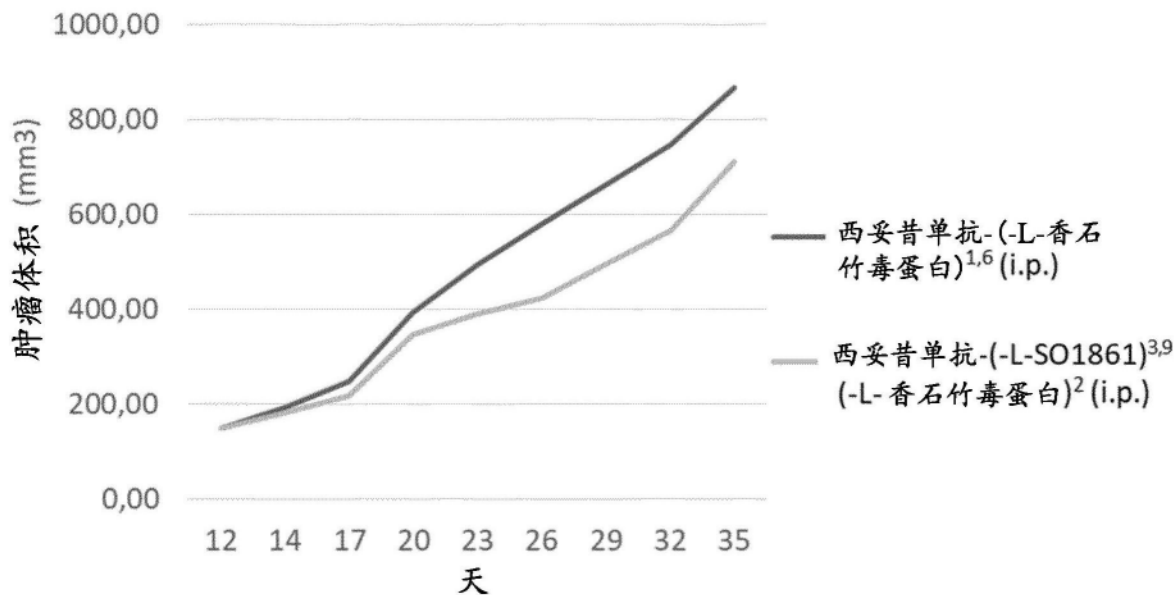


图8

C

荷瘤小鼠的A431肿瘤中的EGFR靶向肿瘤减少

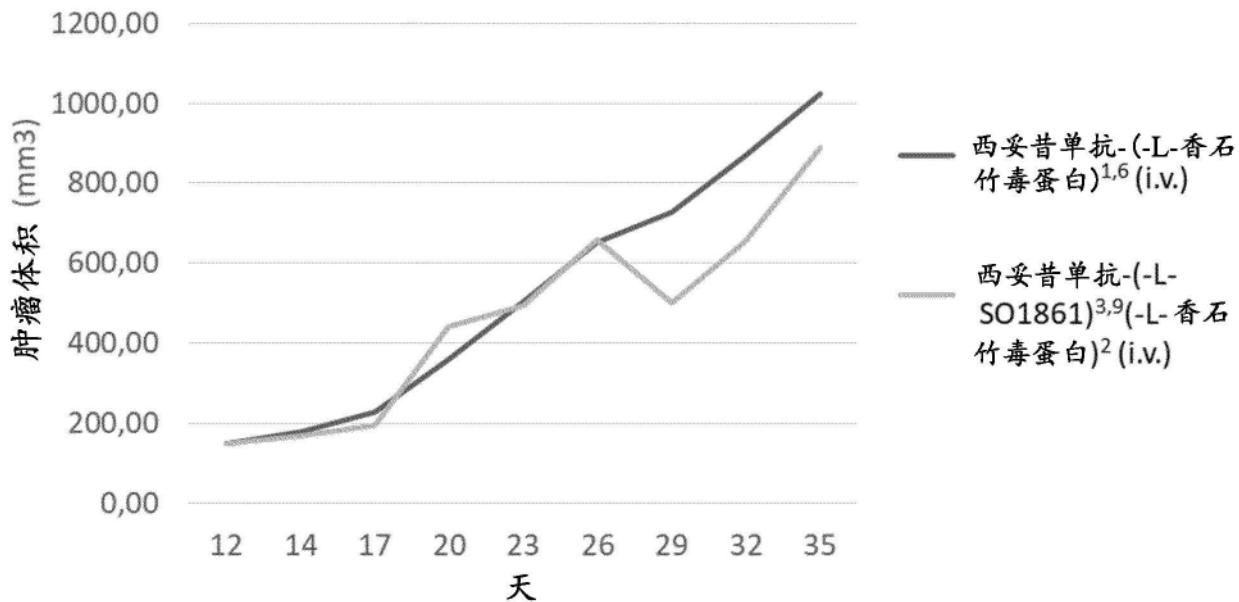


图8

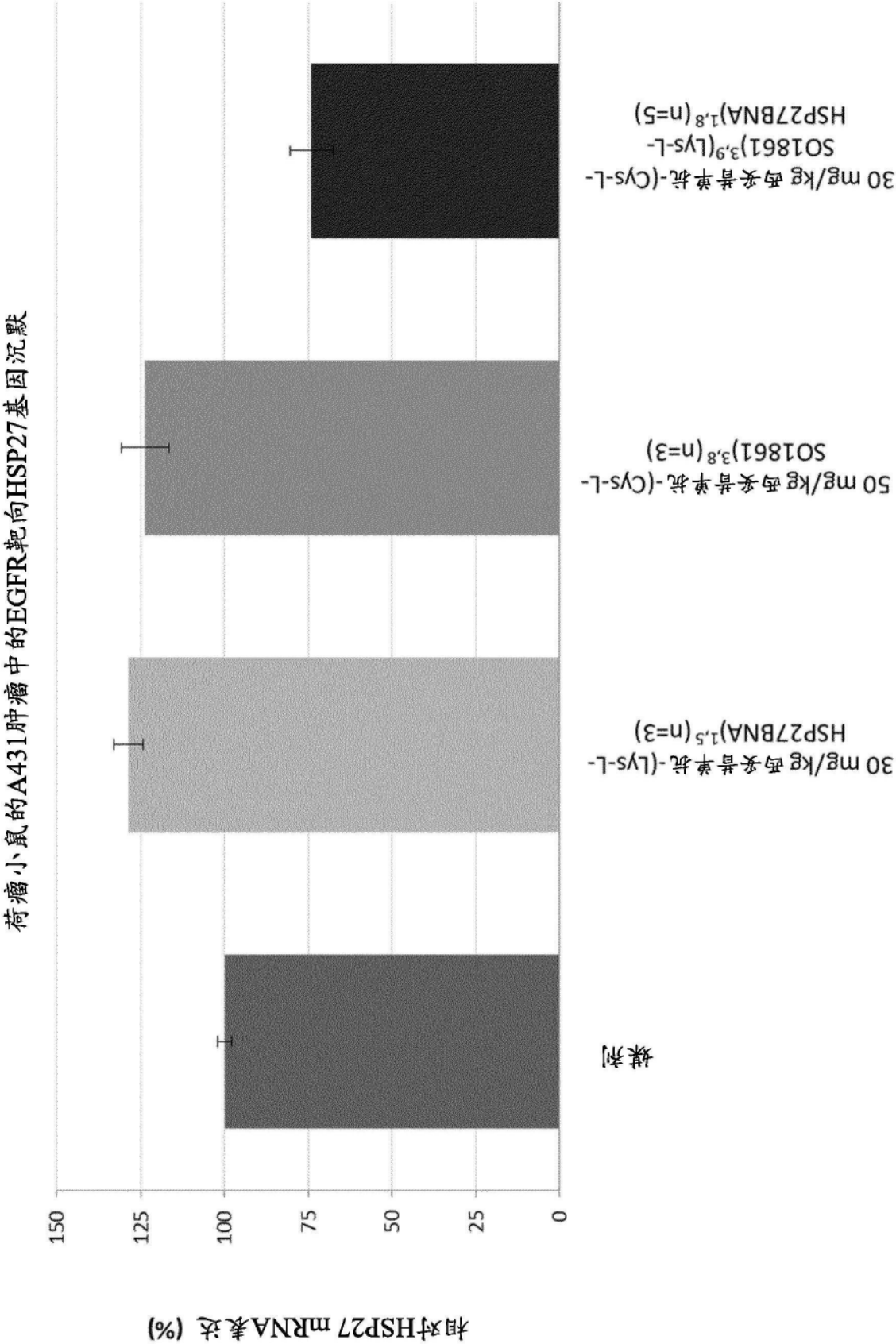


图9

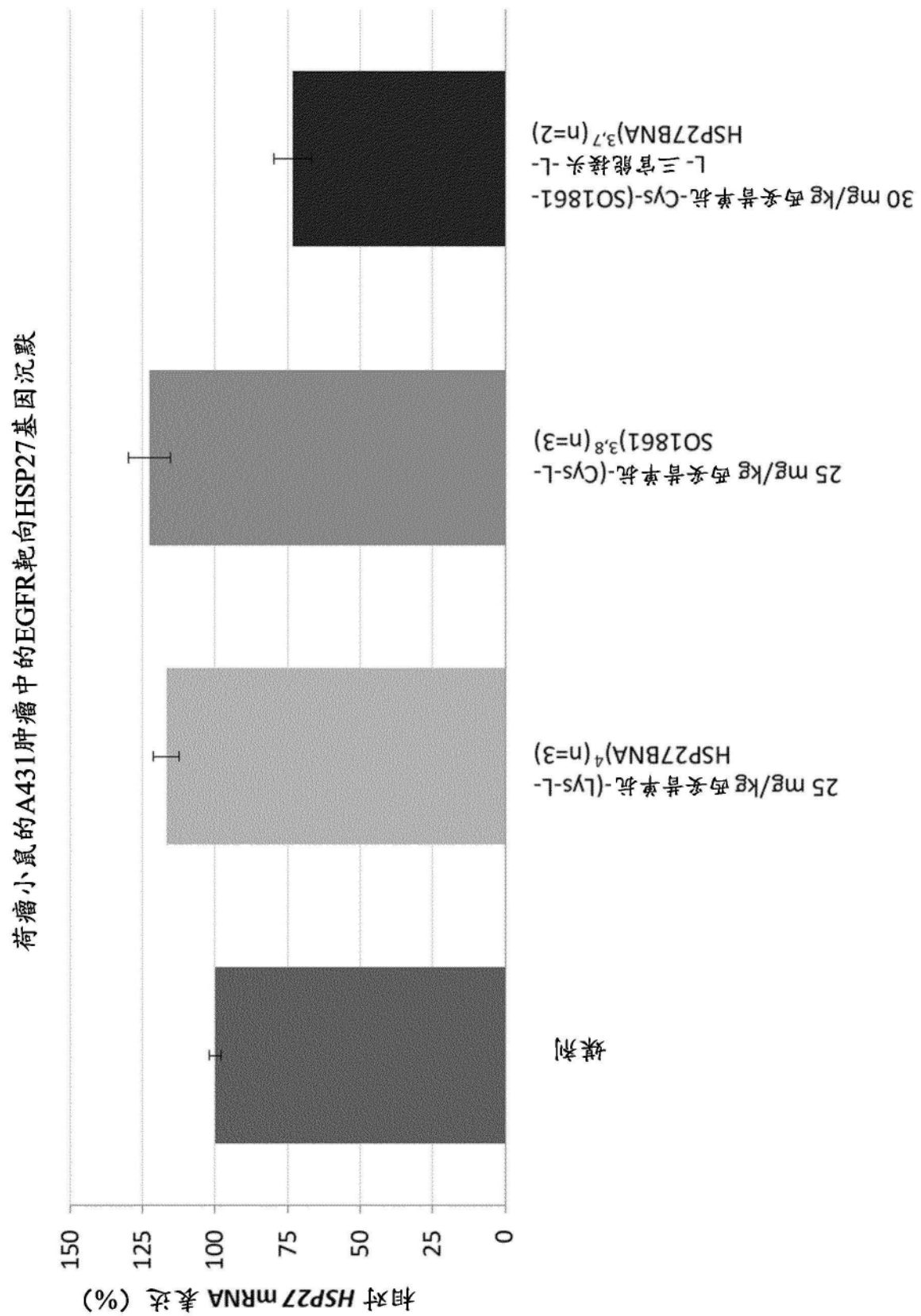


图10

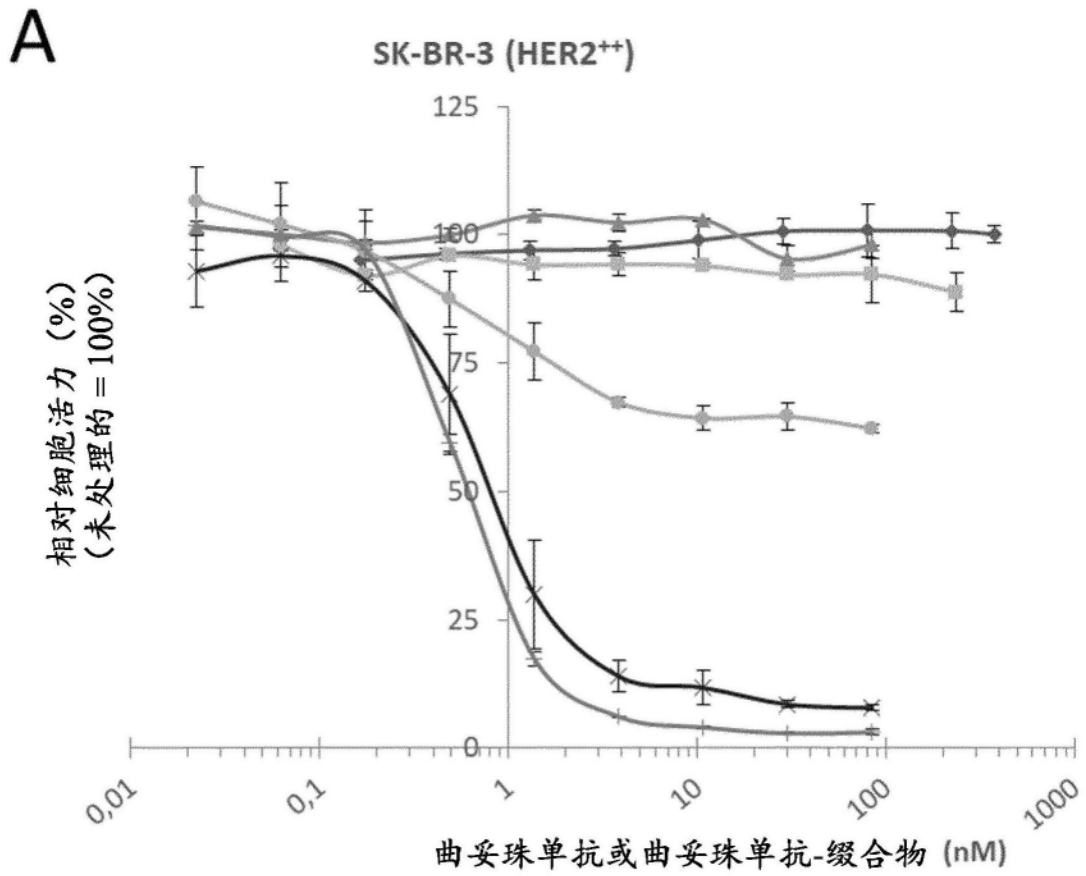


图11

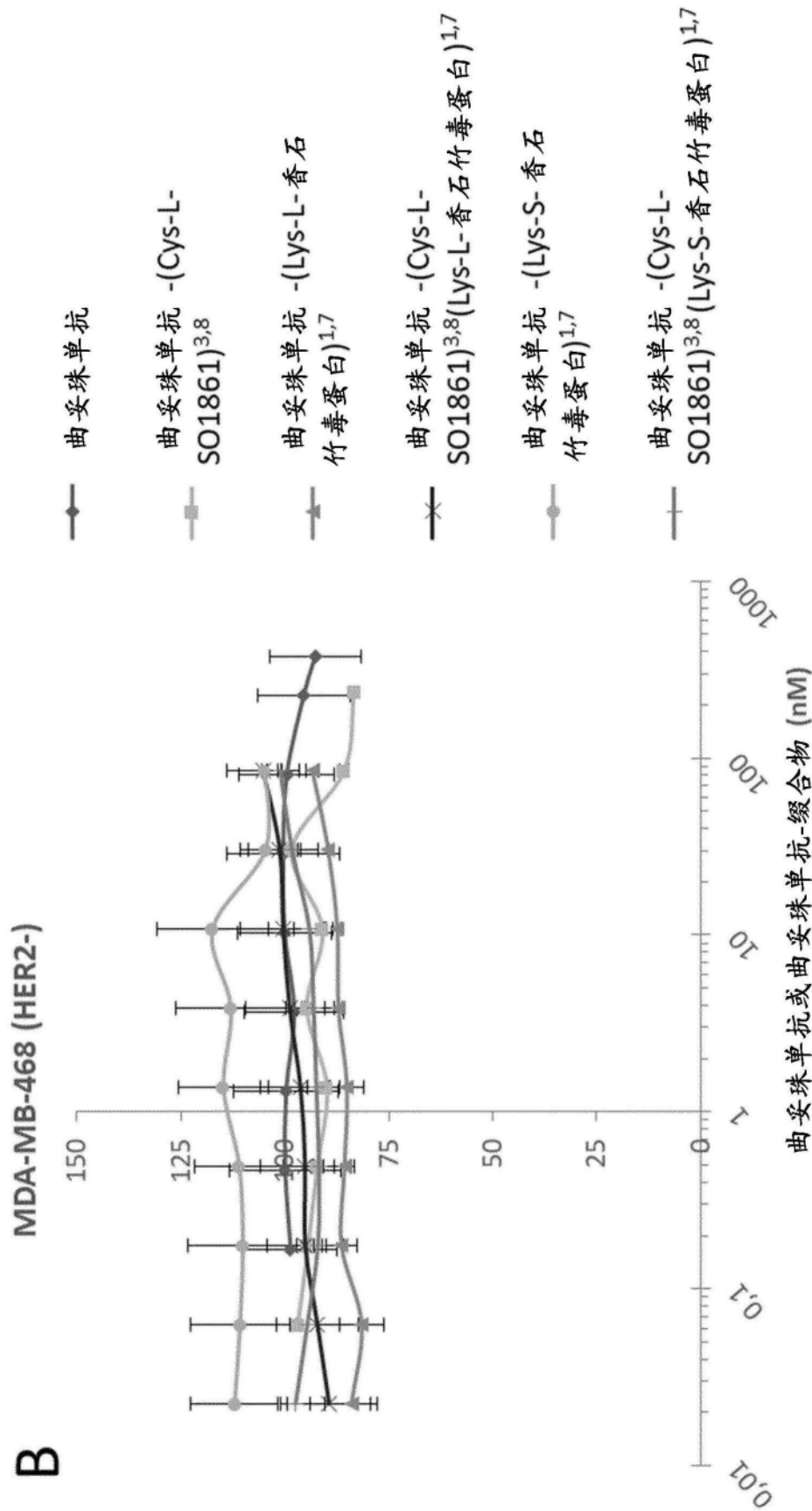


图11

C

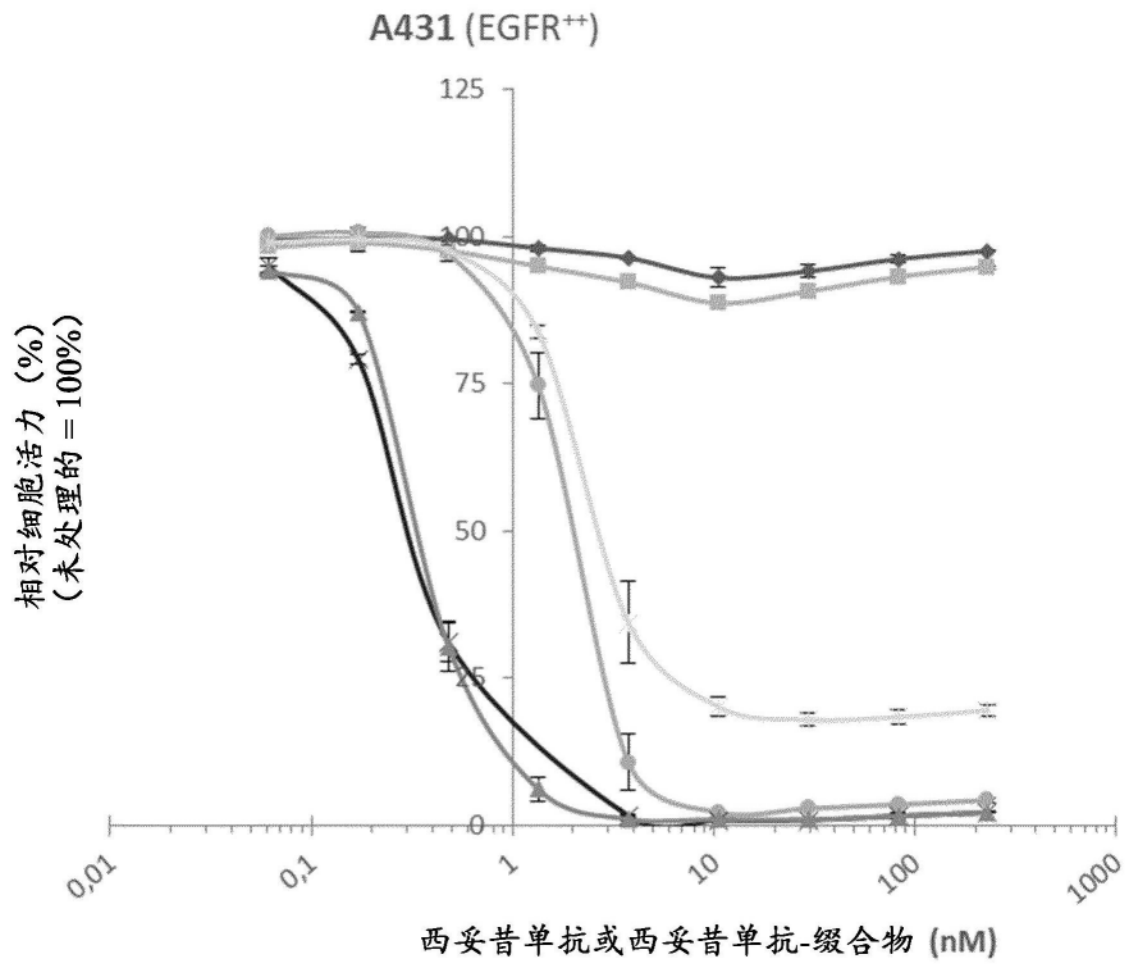


图11

D

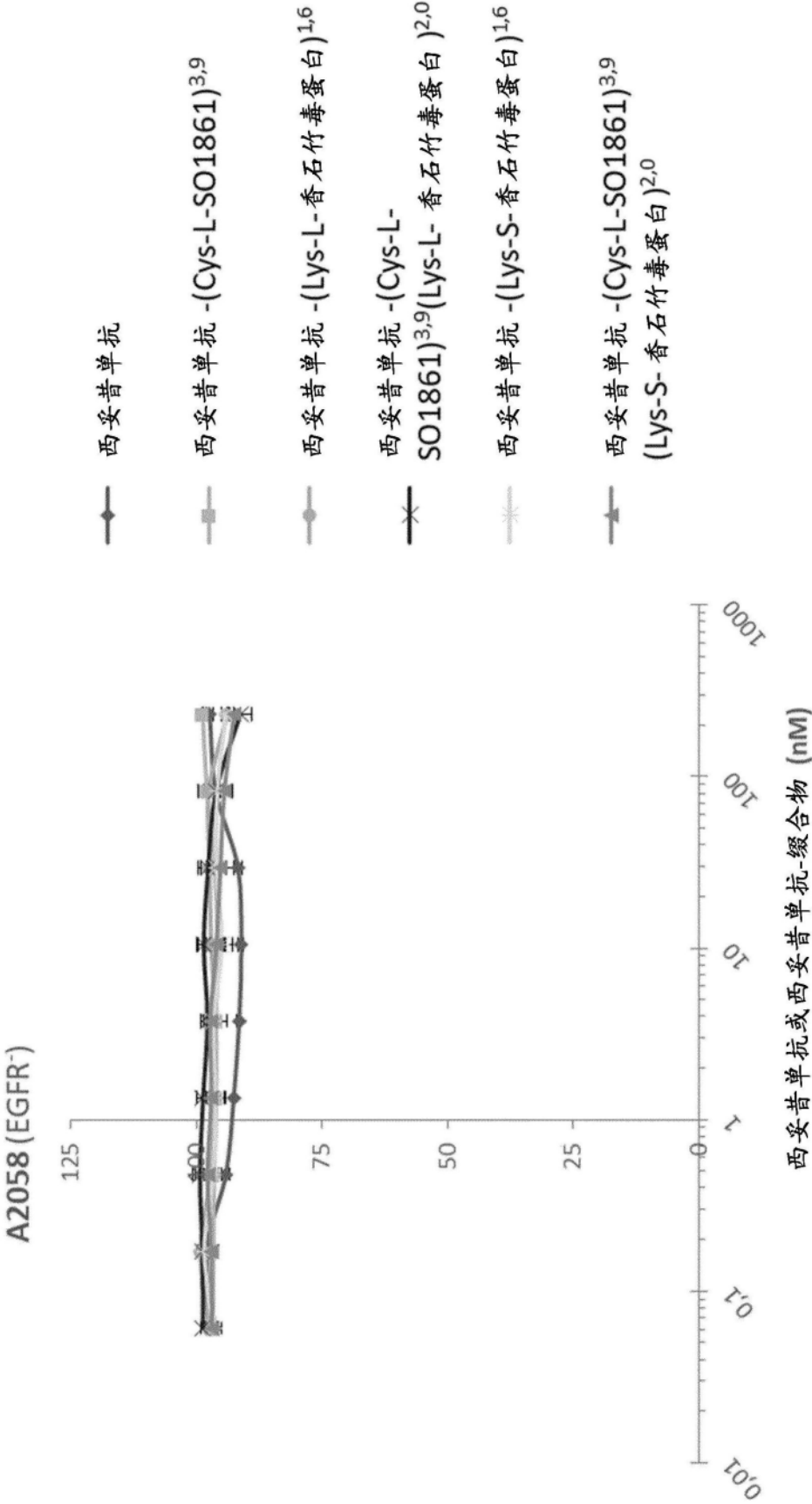


图11

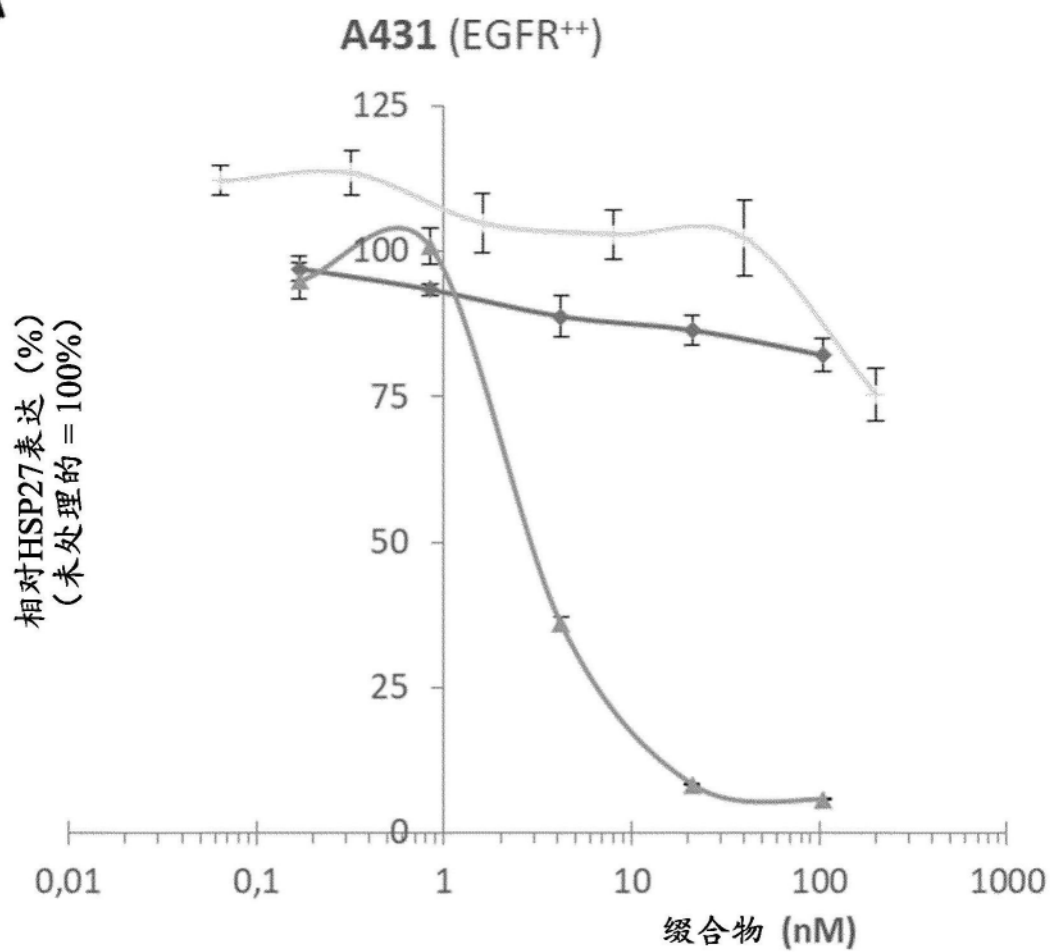
A

图12

B

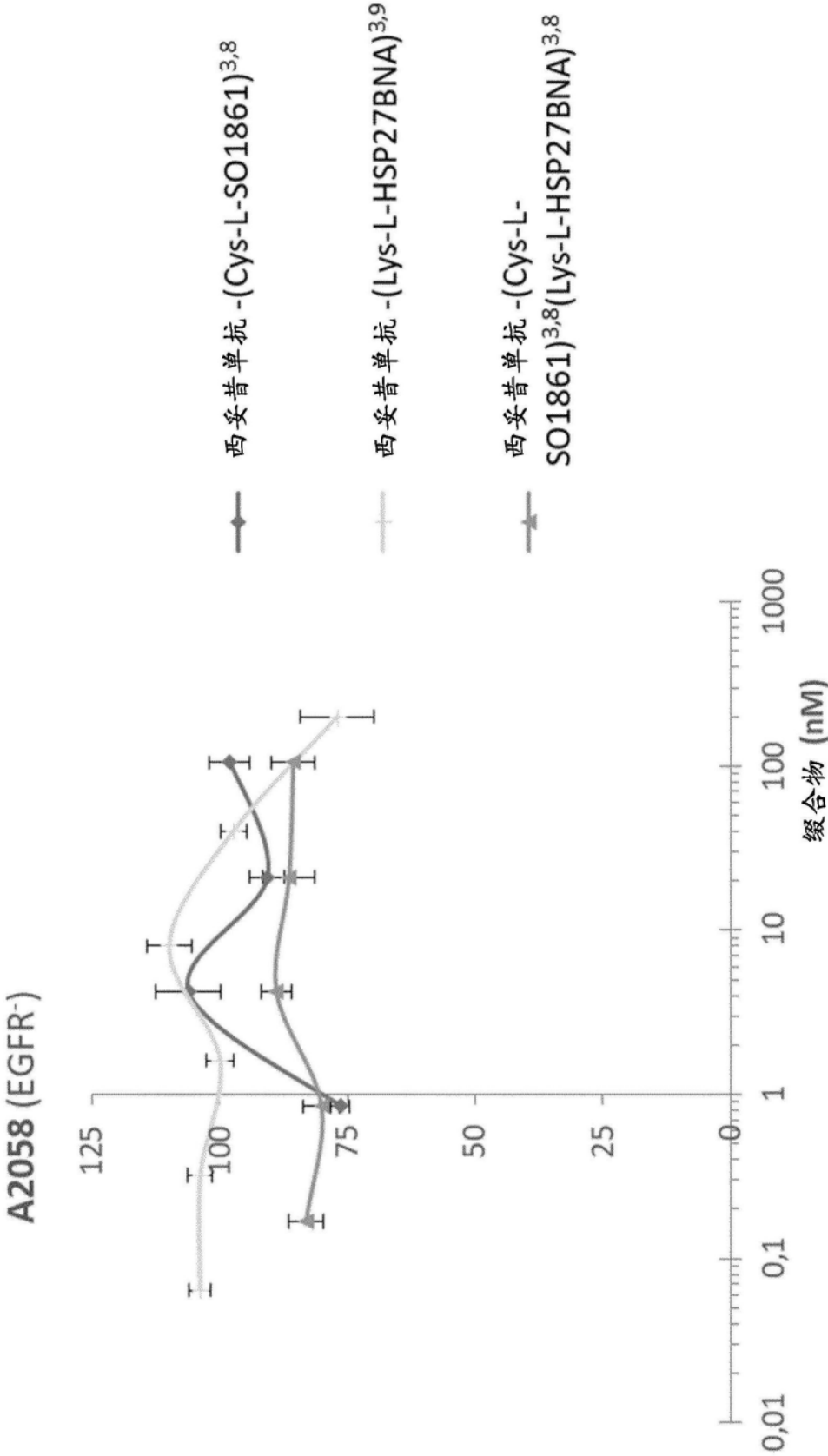


图12

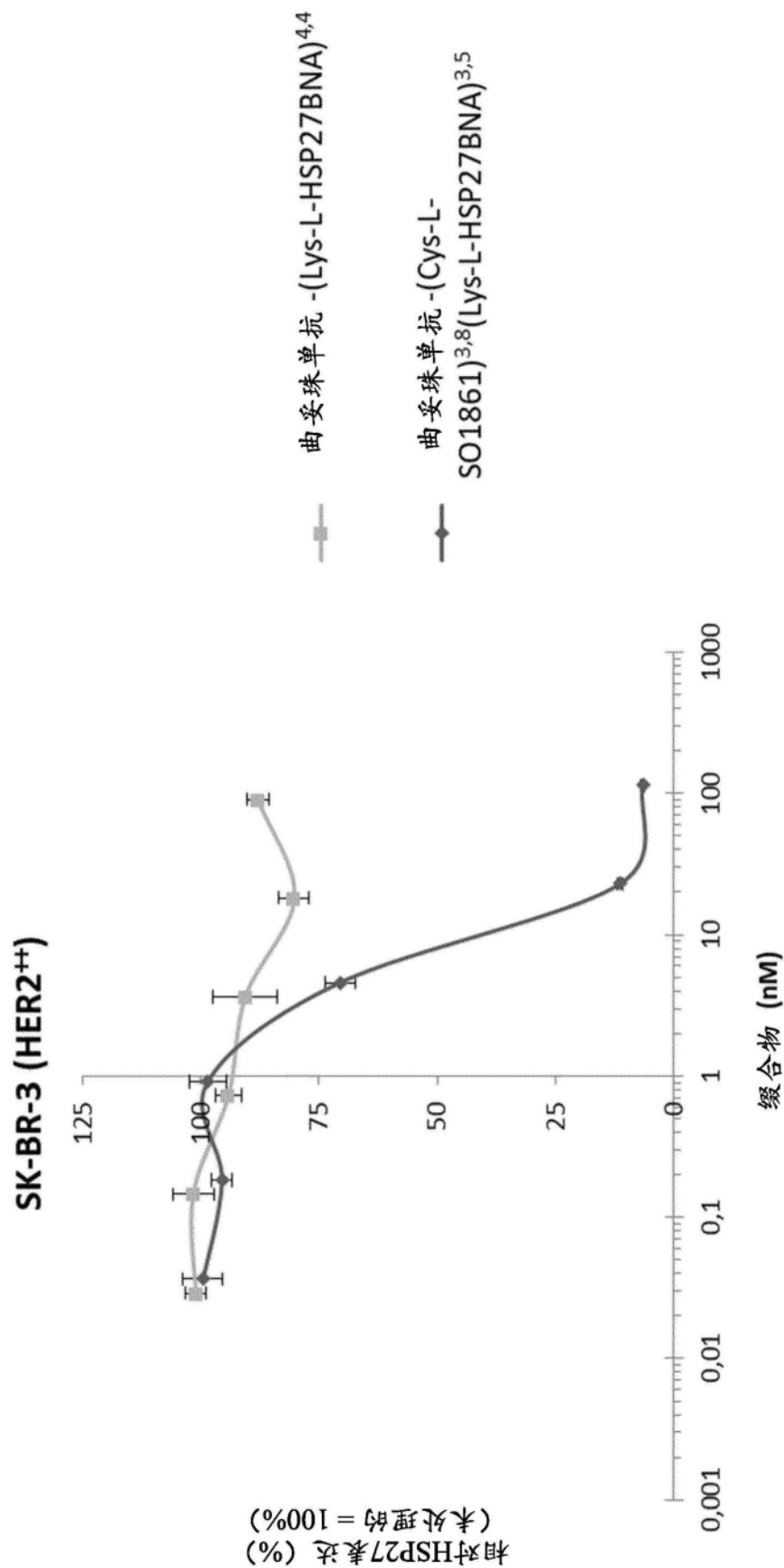
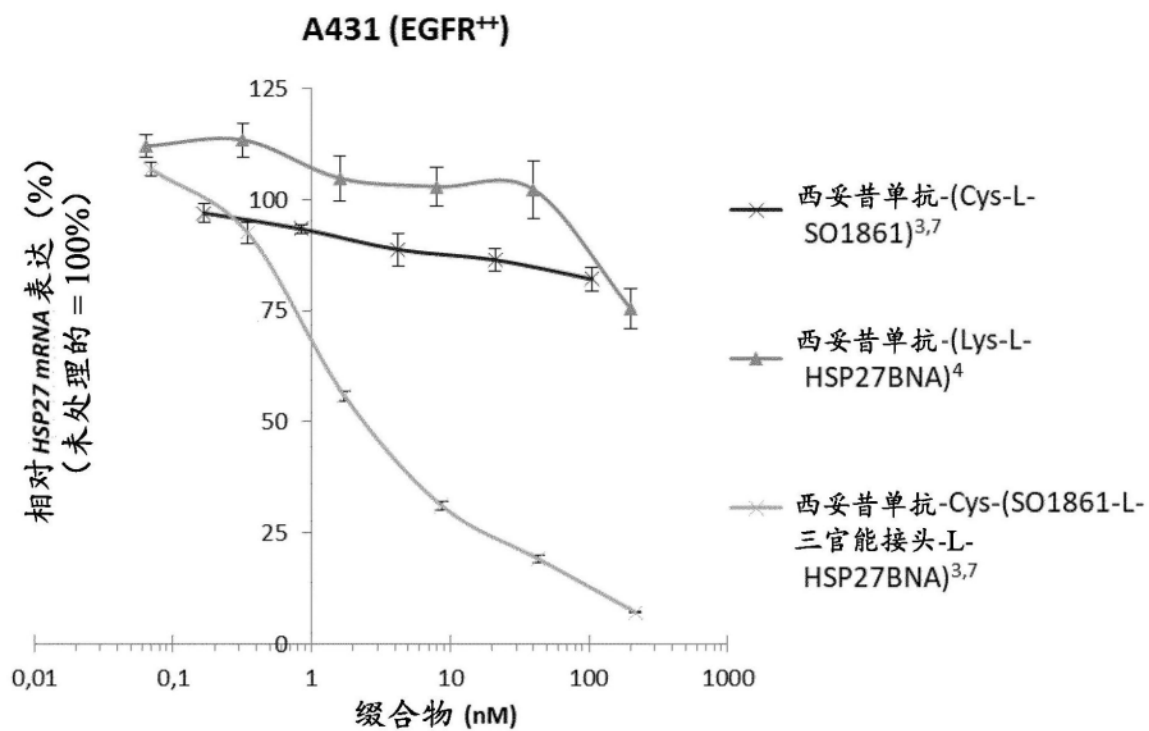


图13

A



B

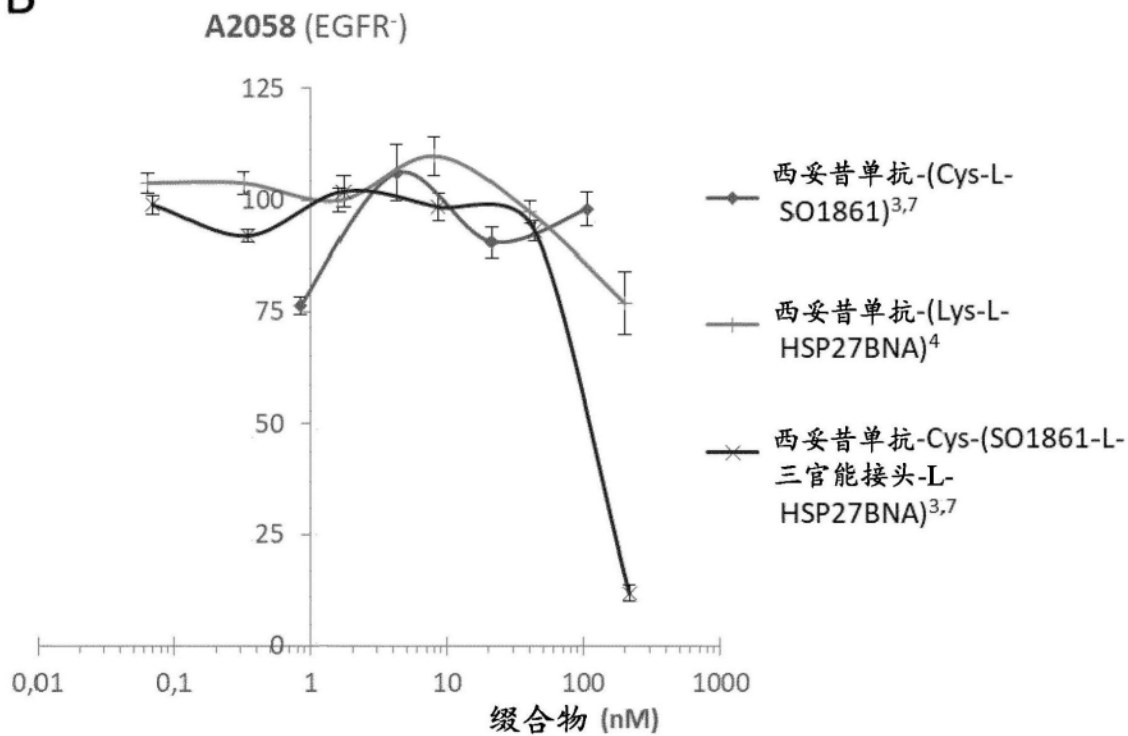


图14

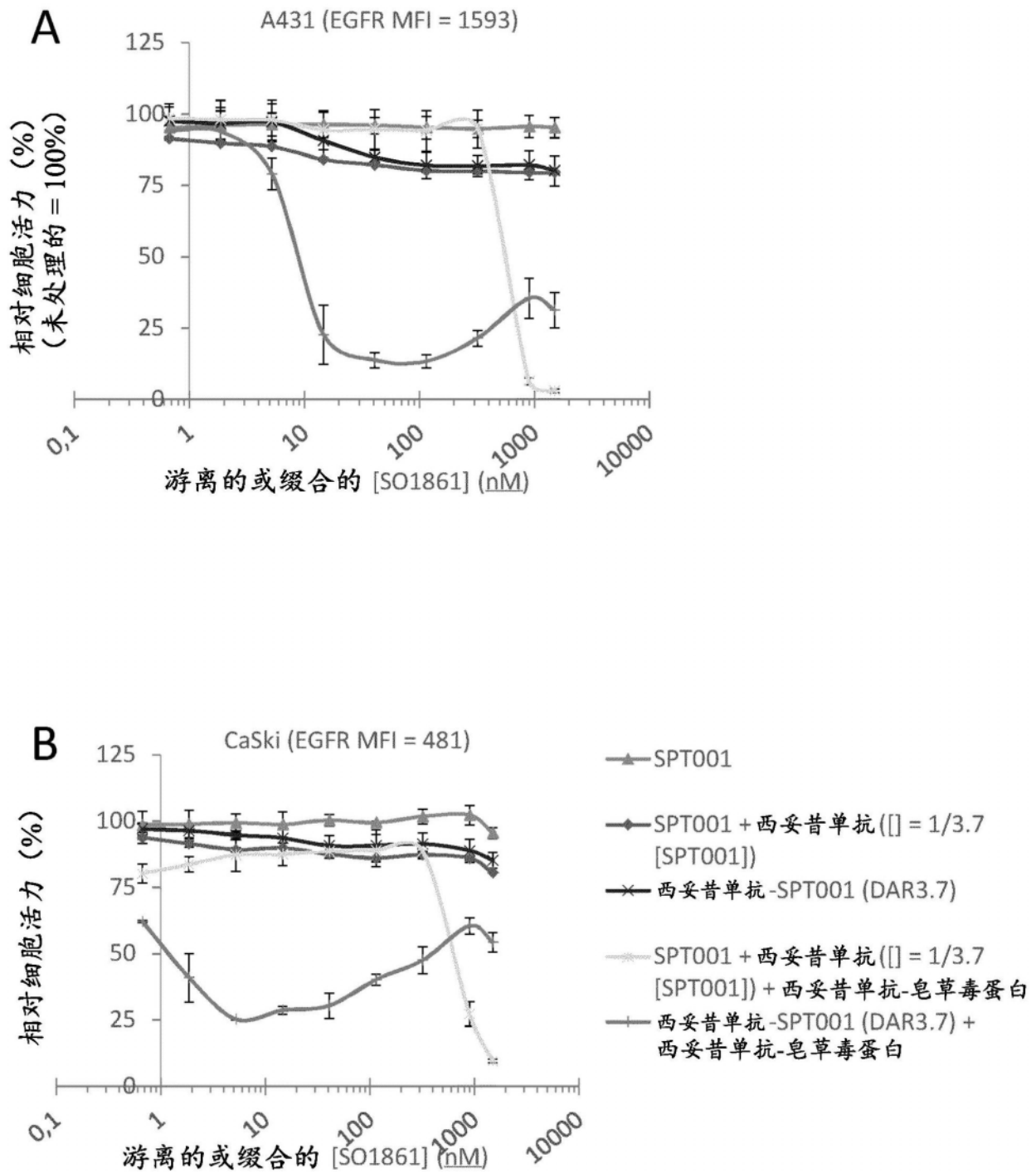


图15

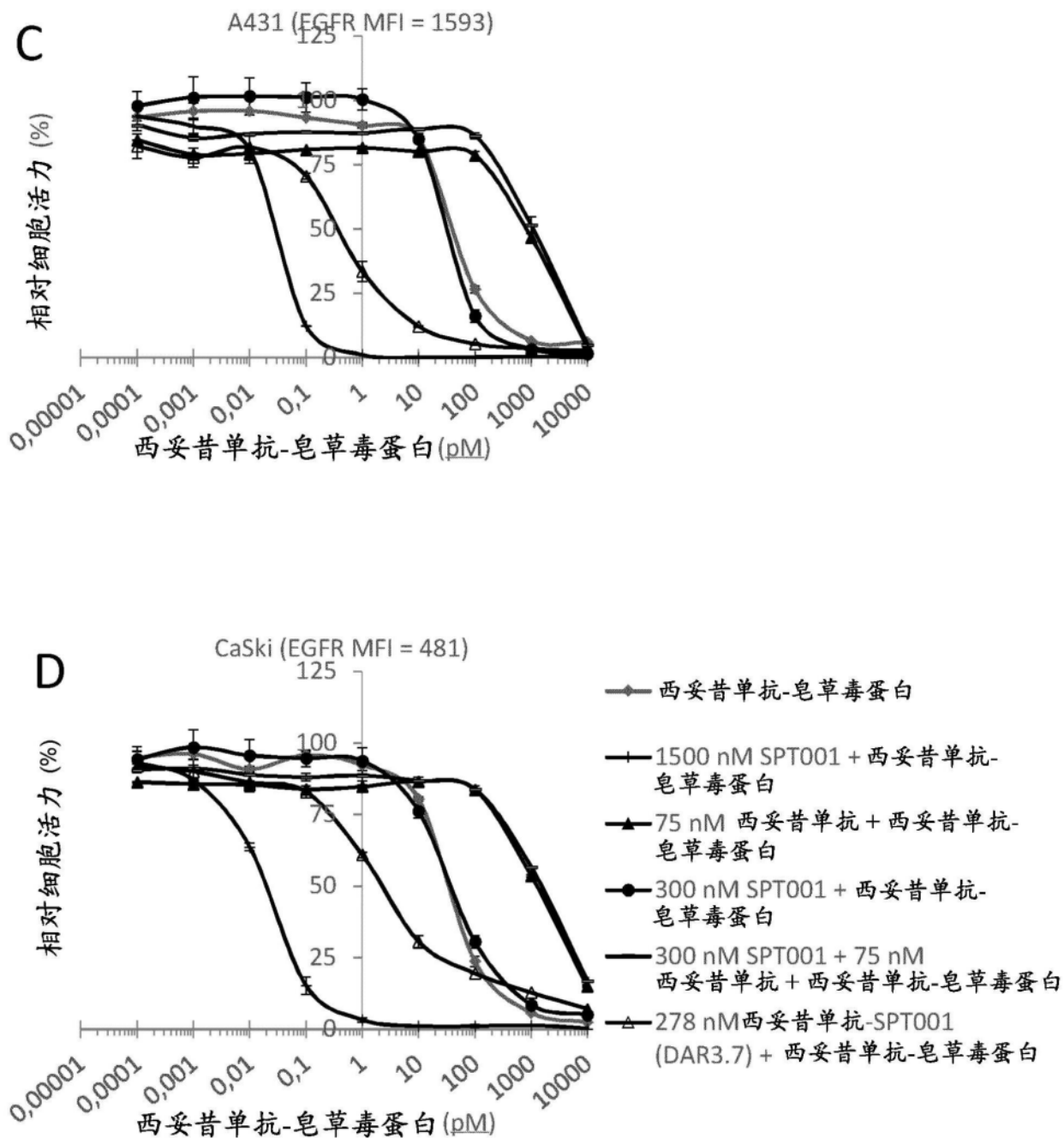


图15

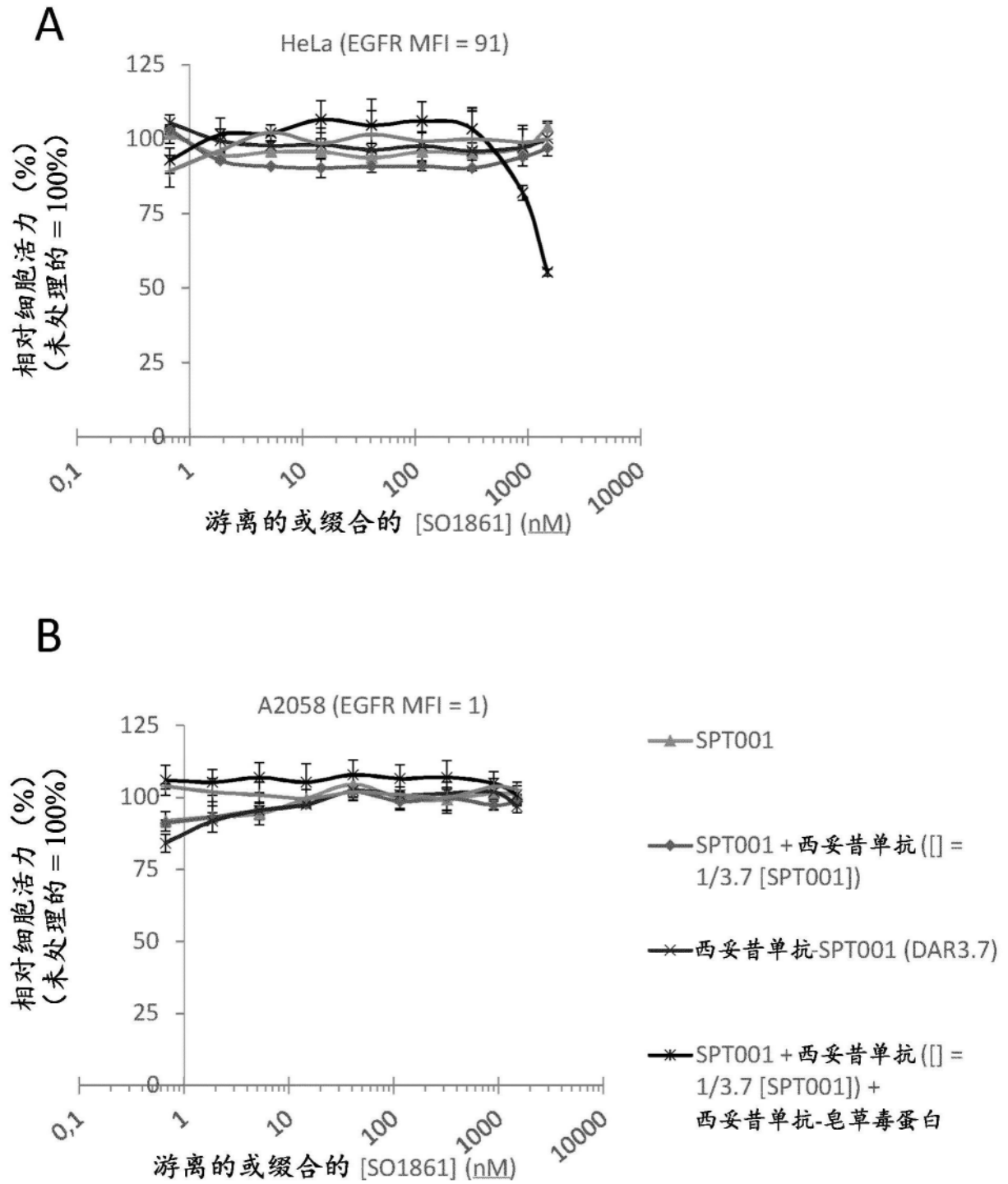


图16

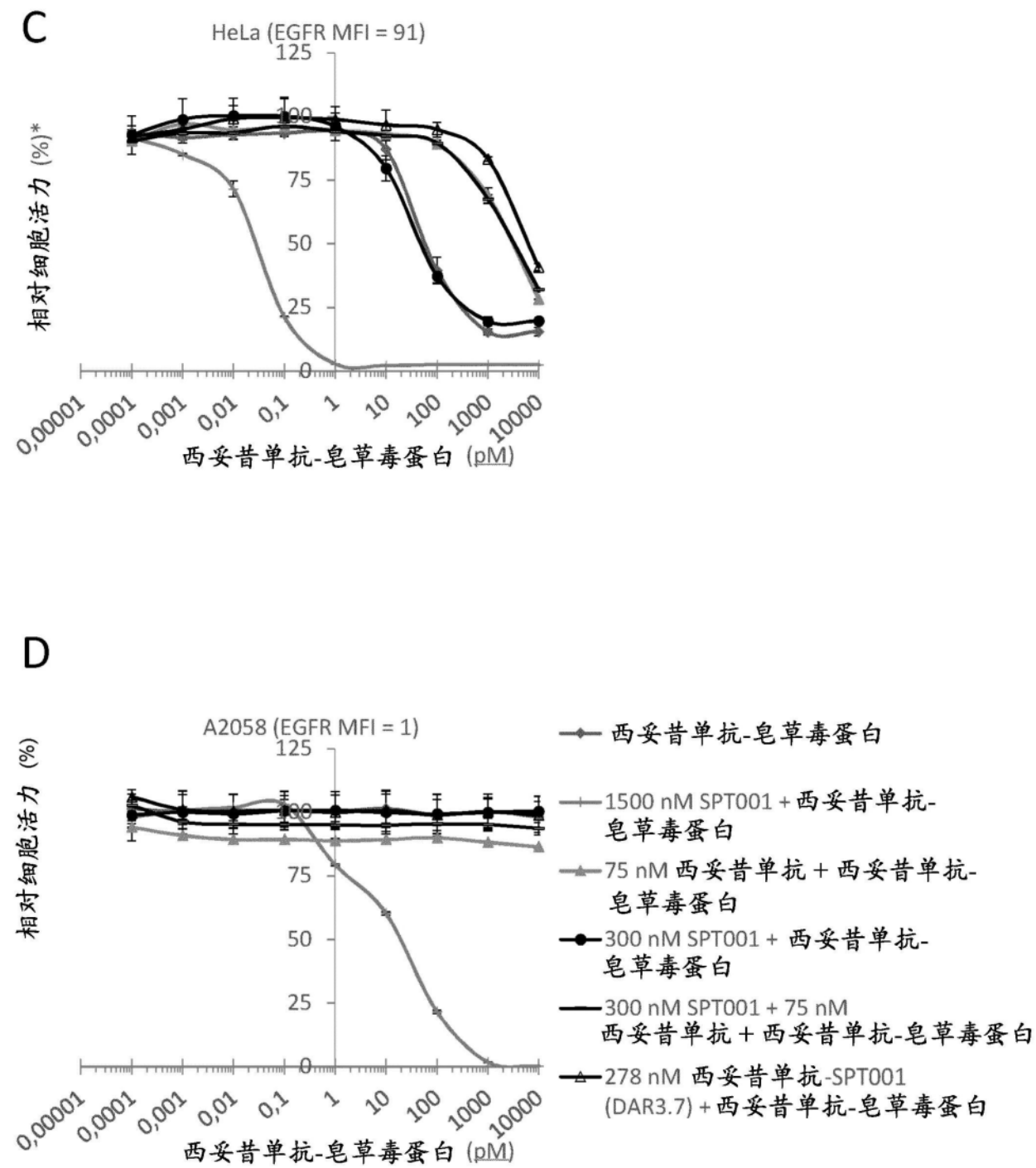


图16

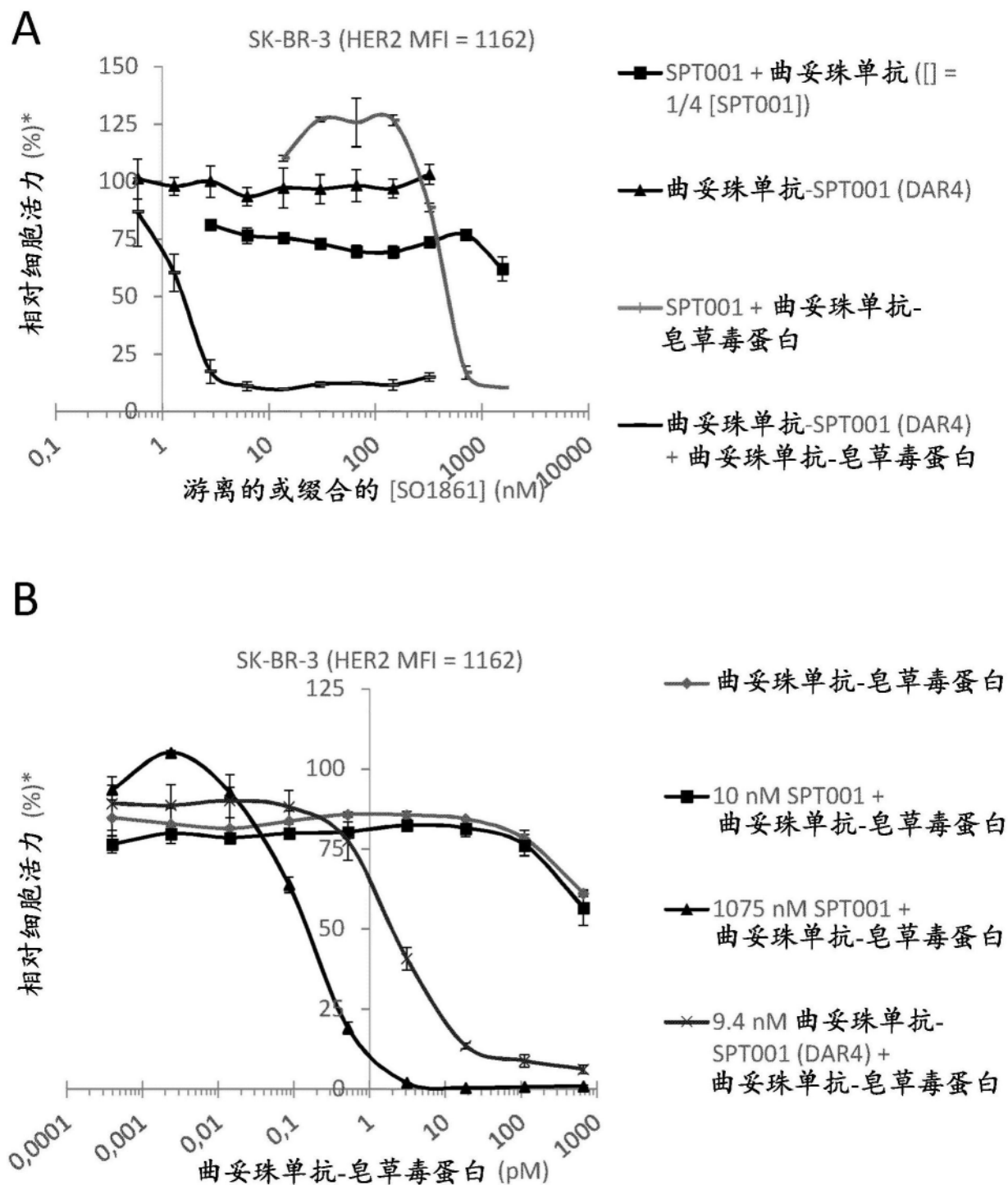


图17

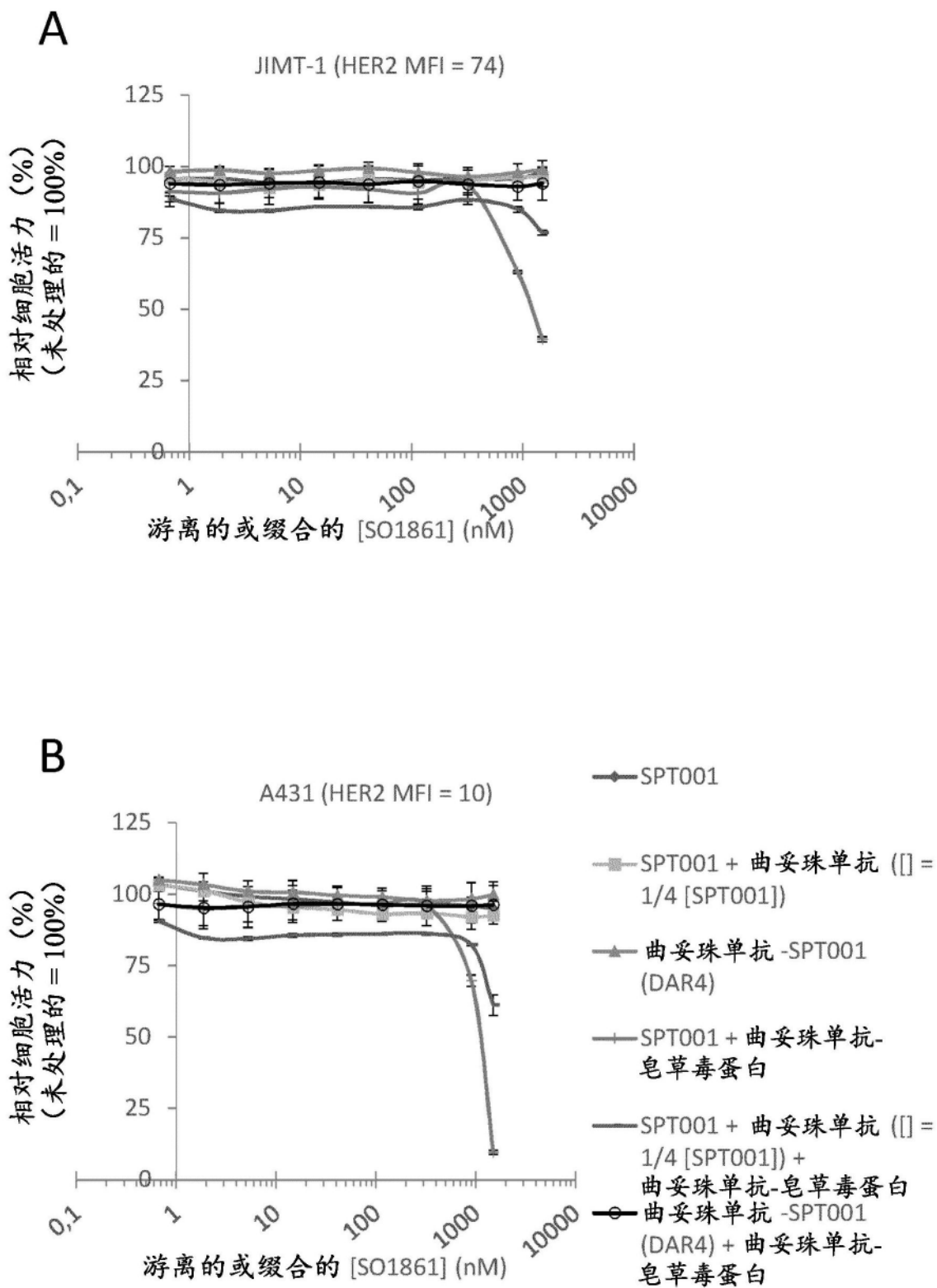


图18

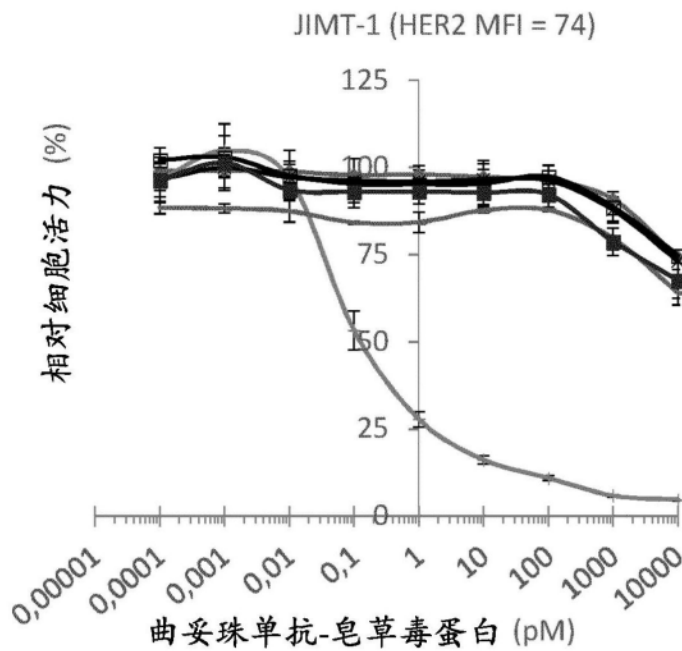
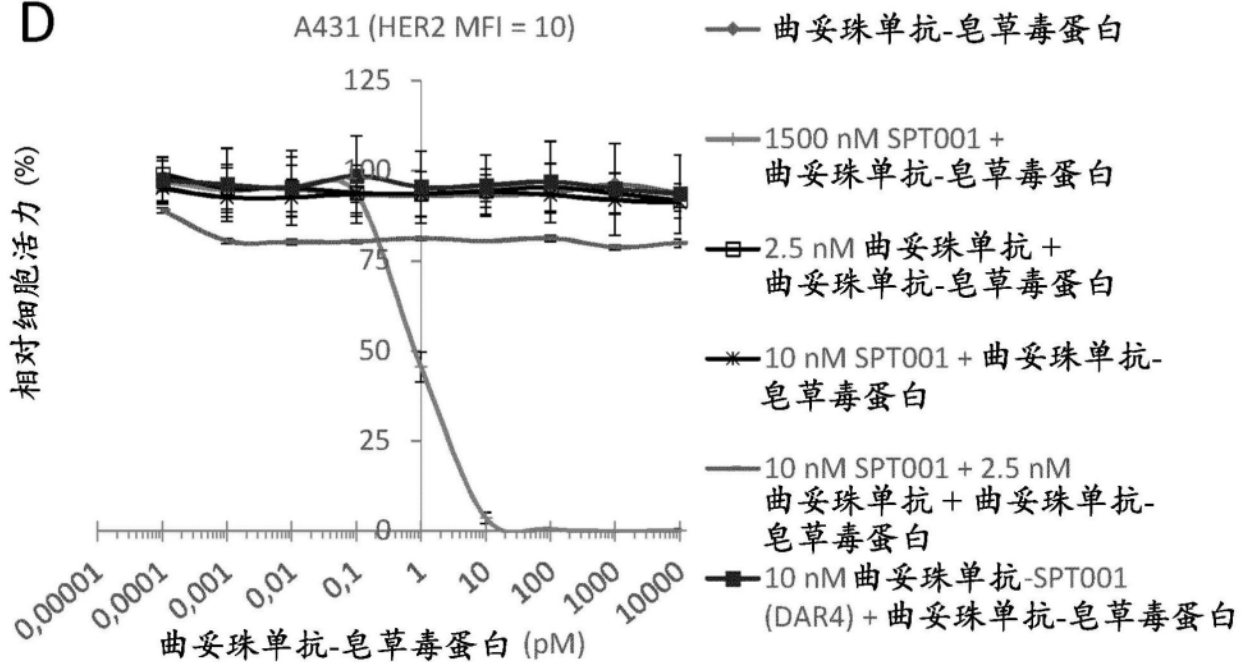
C**D**

图18

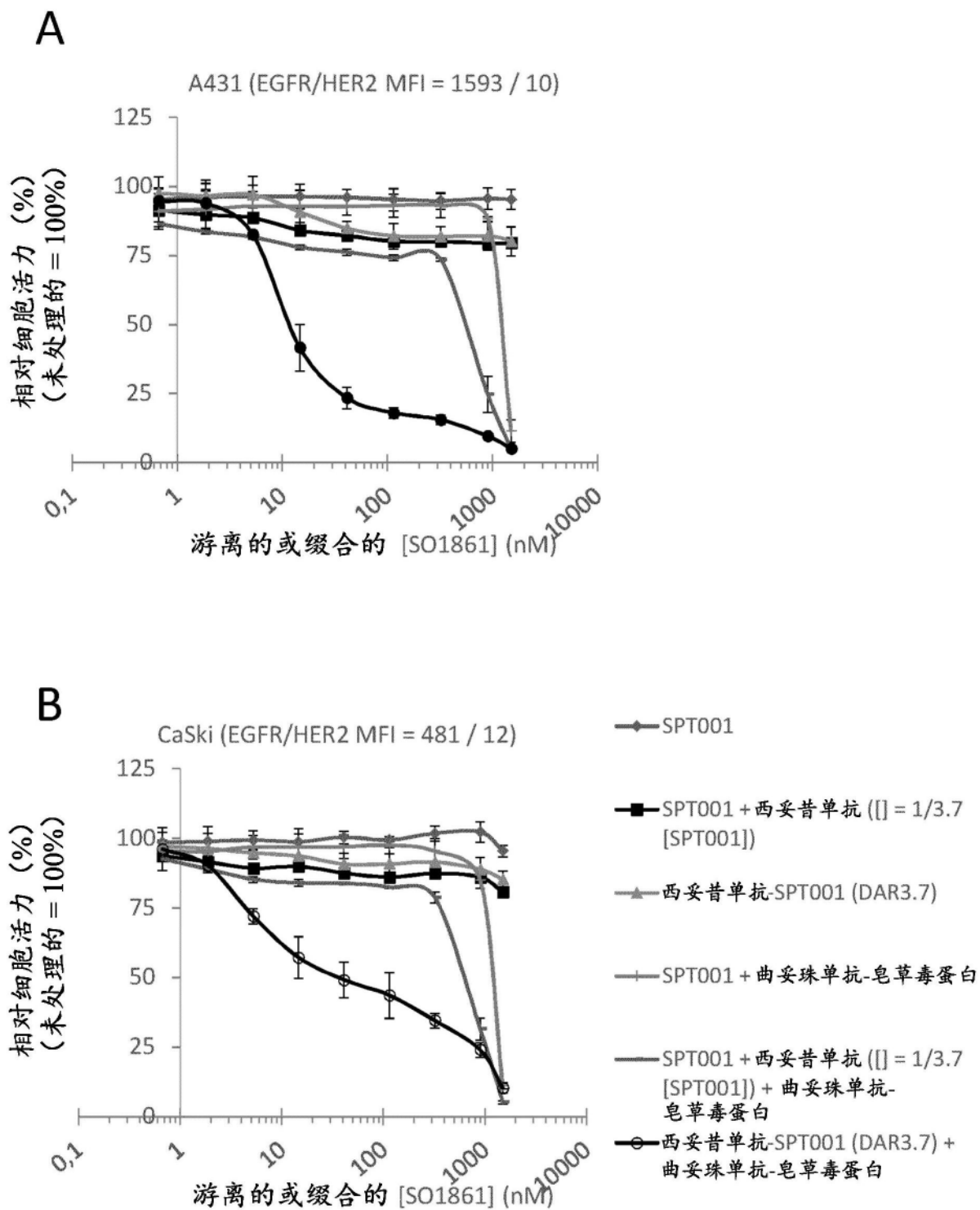


图19

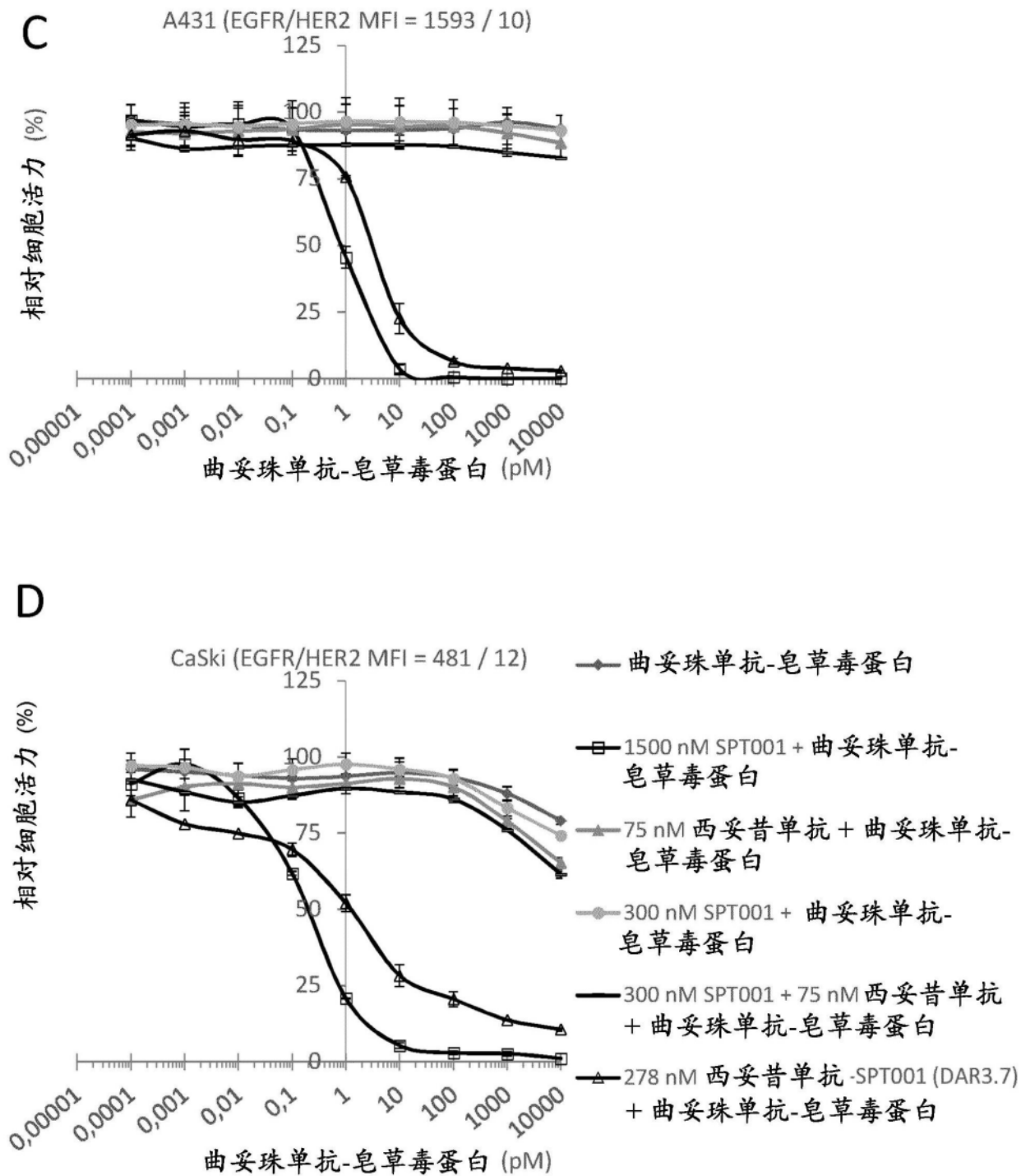


图19

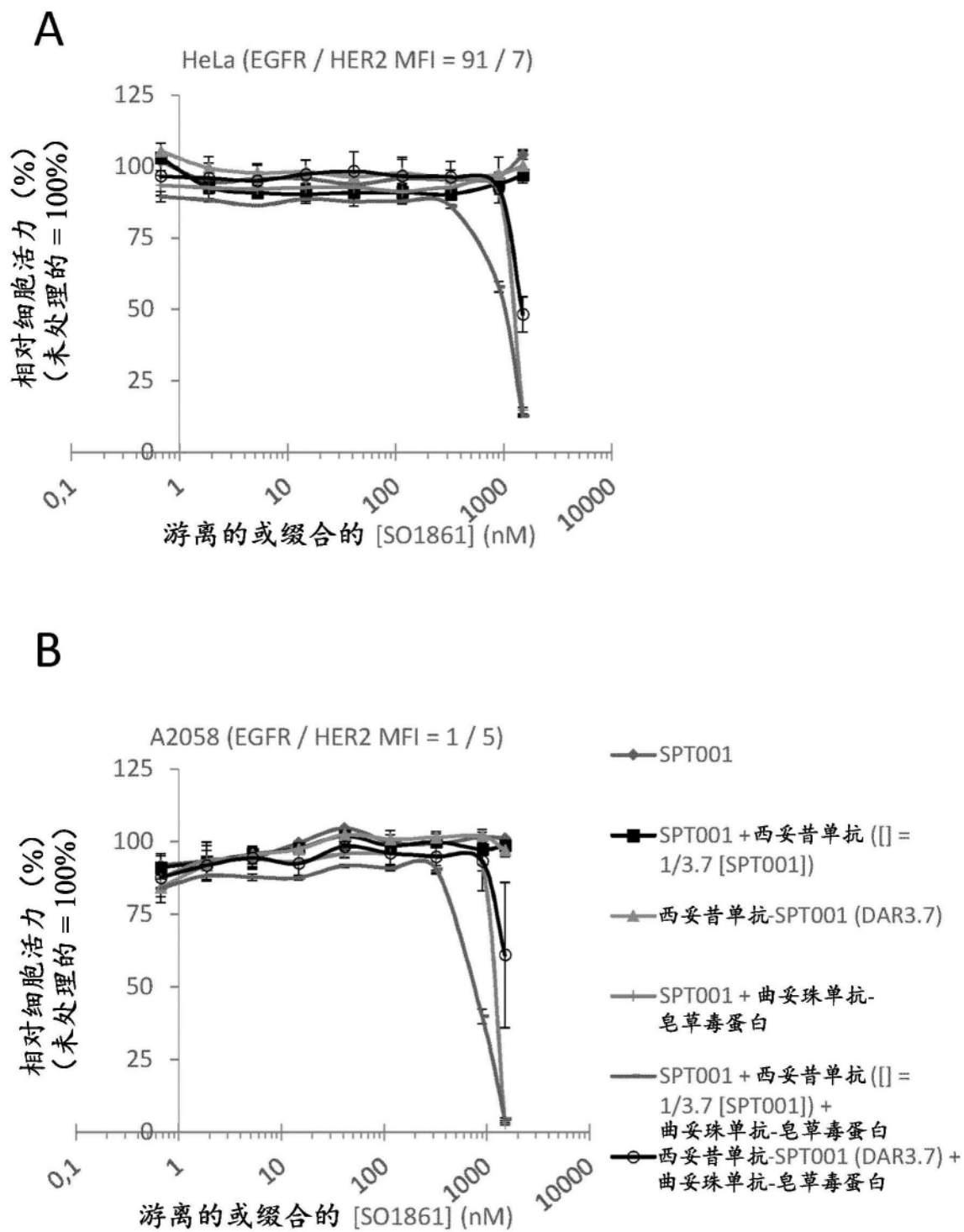
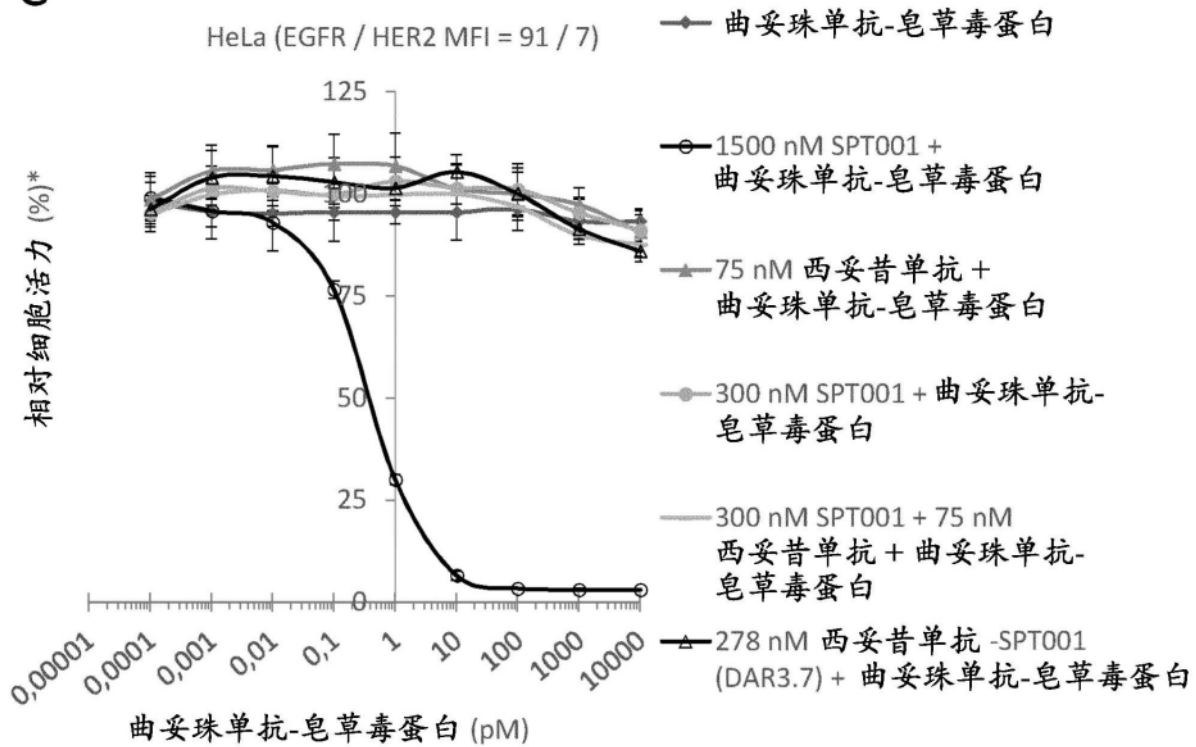


图20

C



D

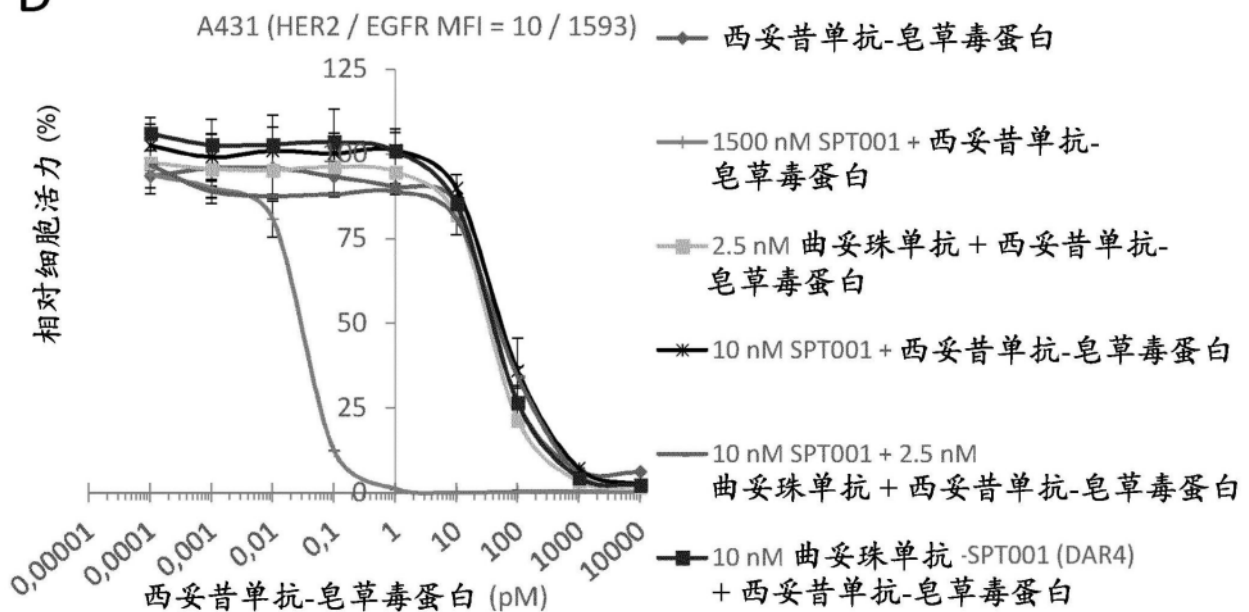


图20

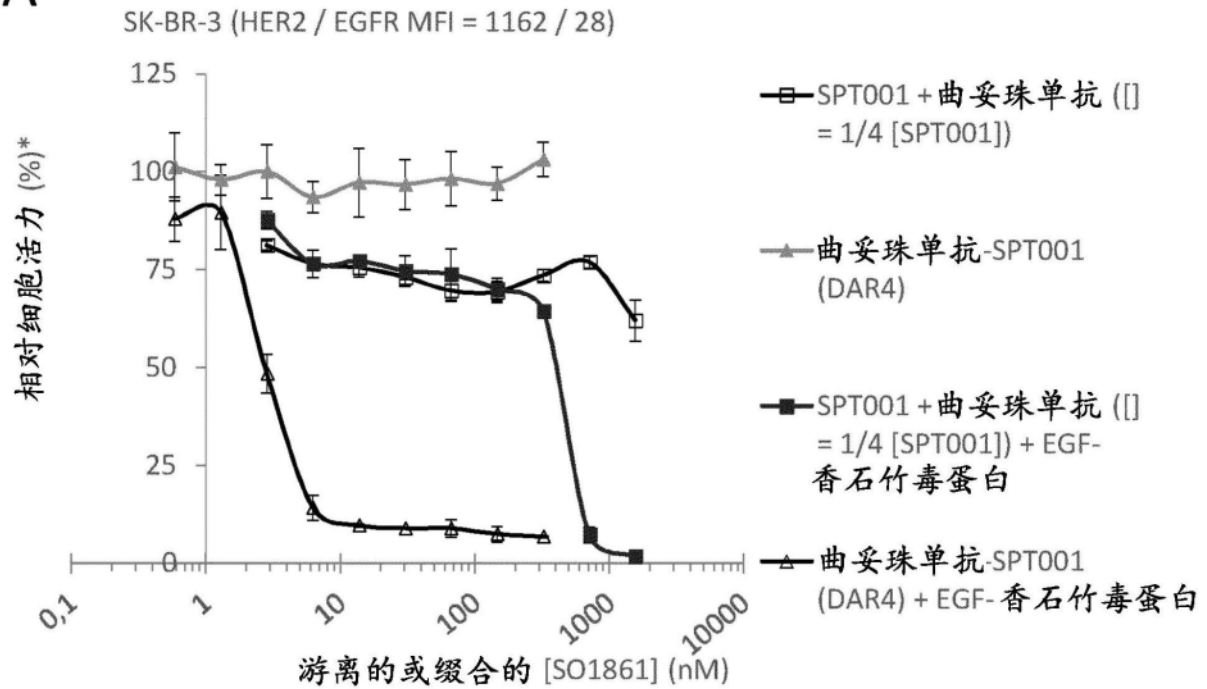
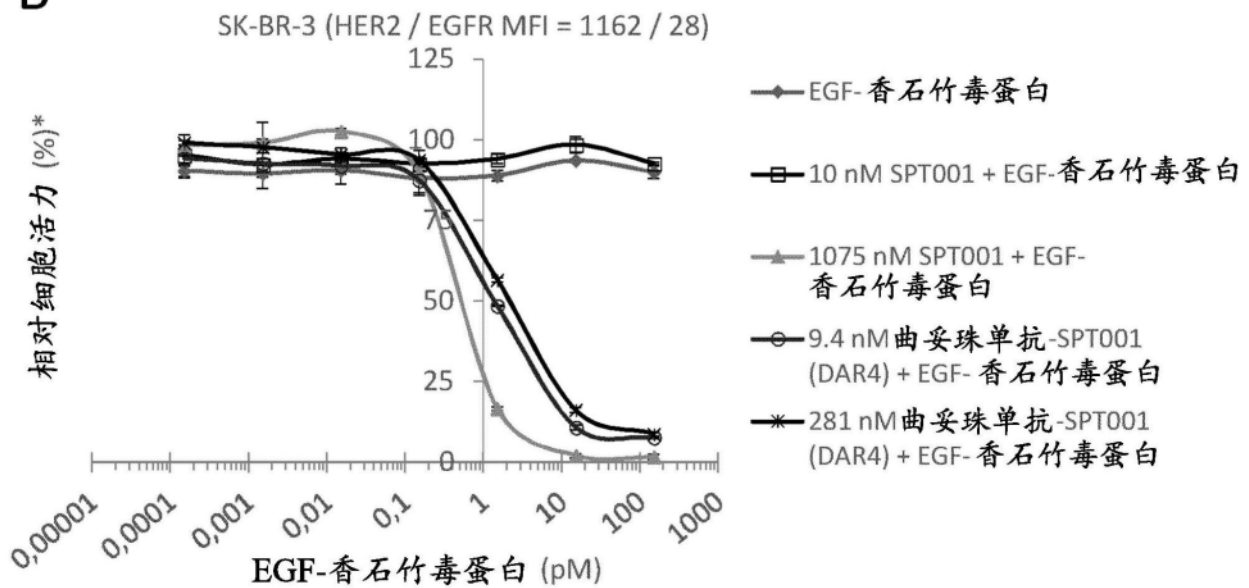
A**B**

图21

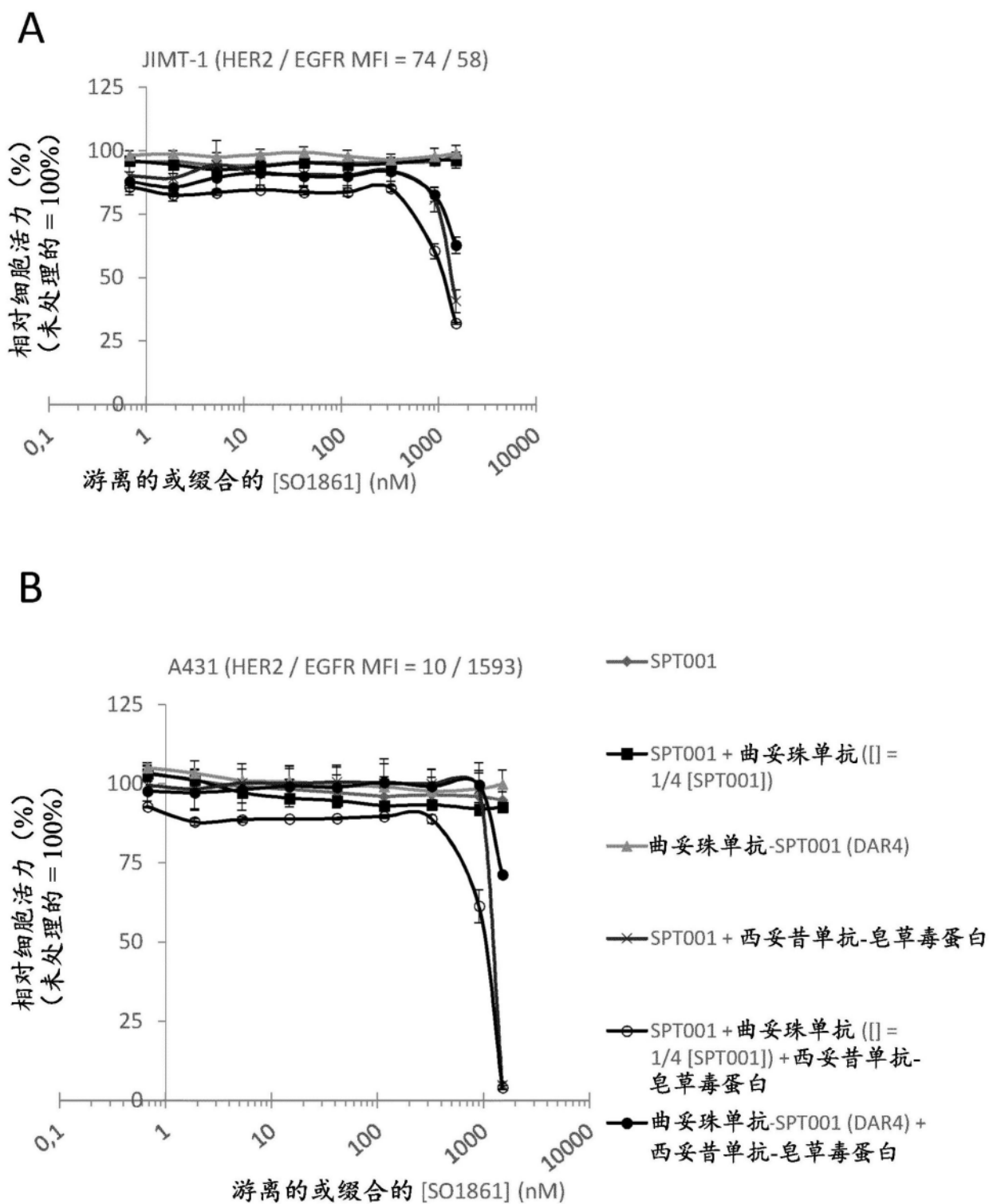
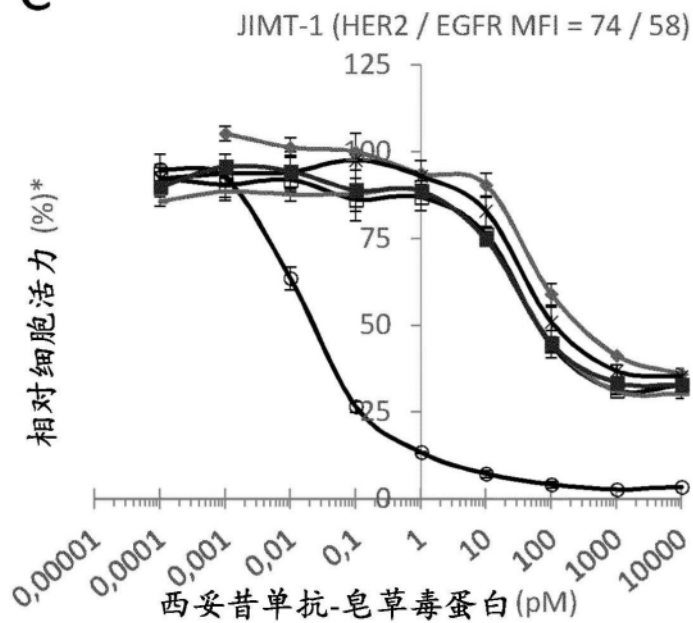


图22

C



D

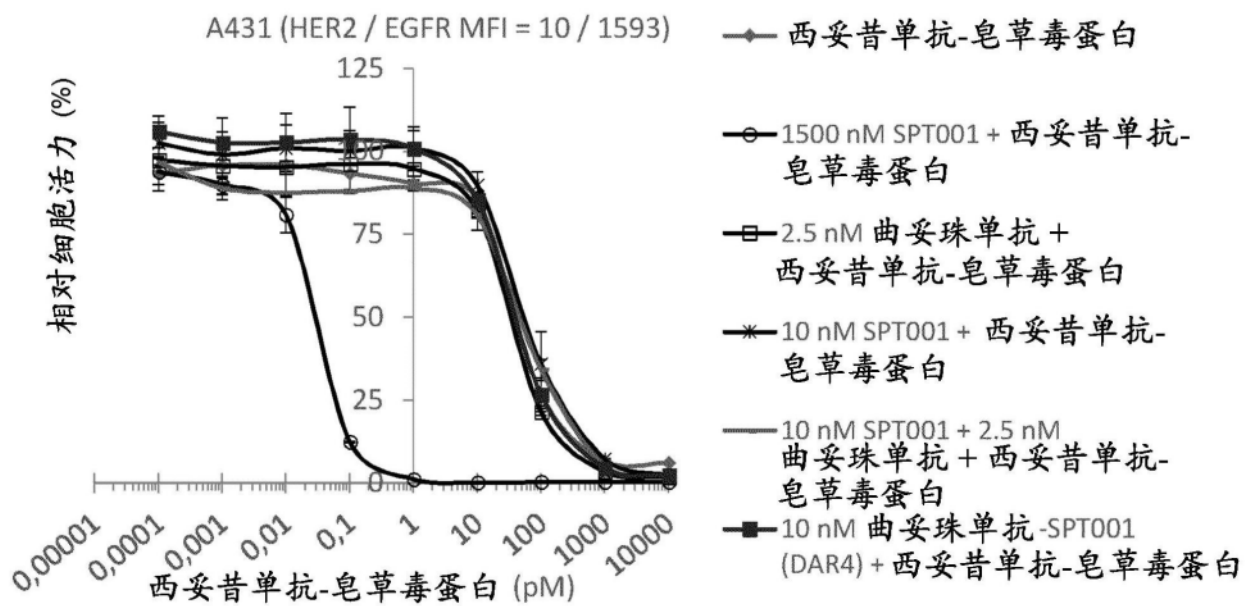


图22

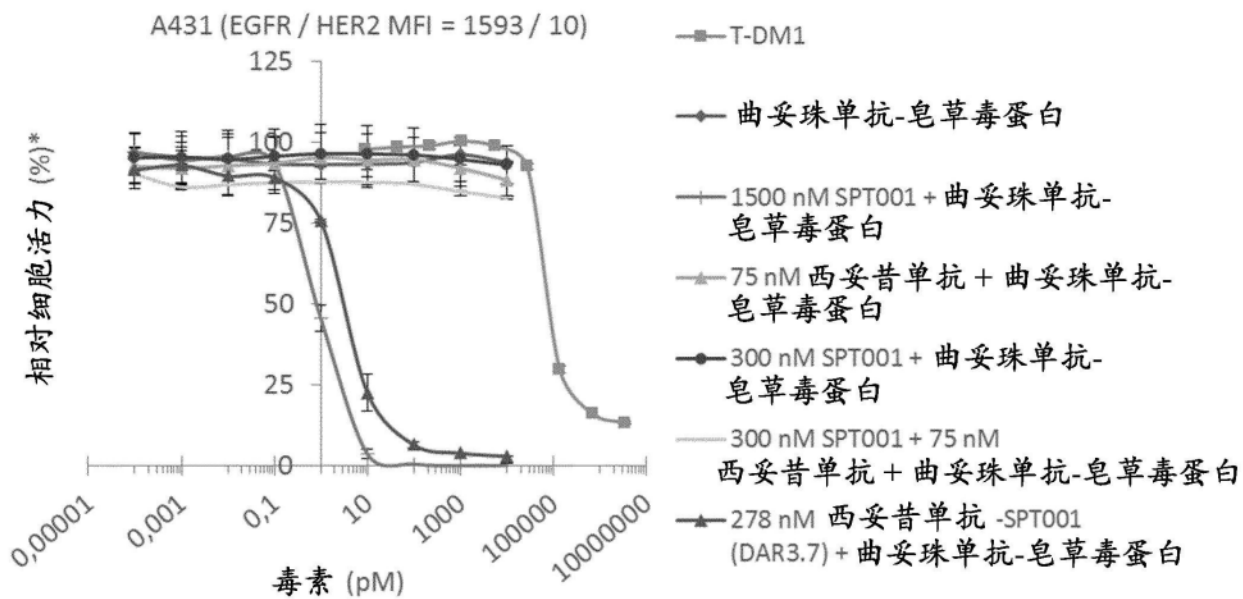


图23

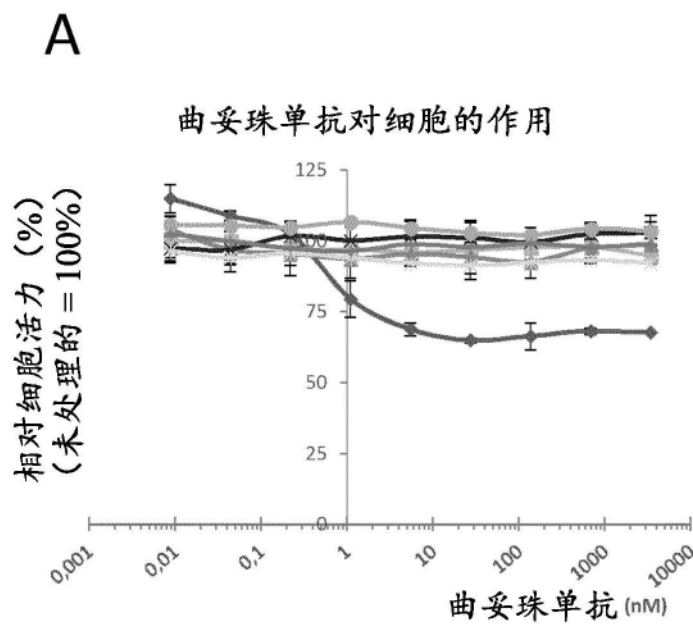
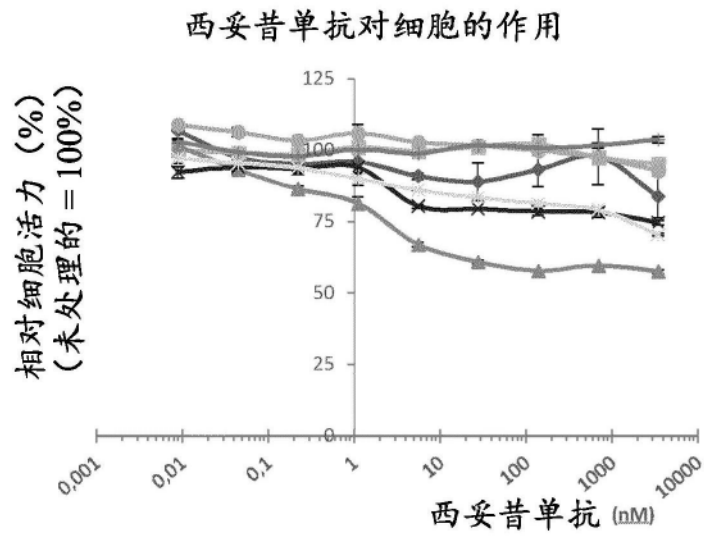


图24

B



C

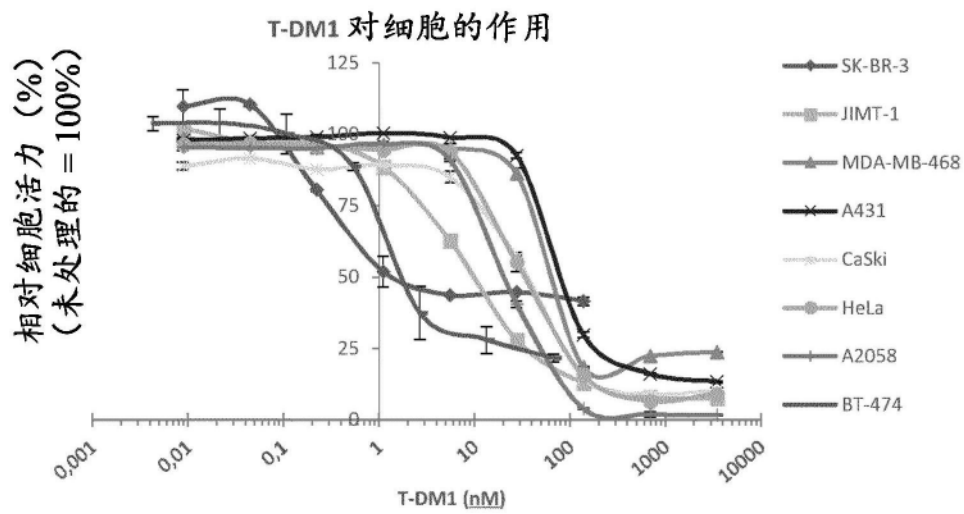
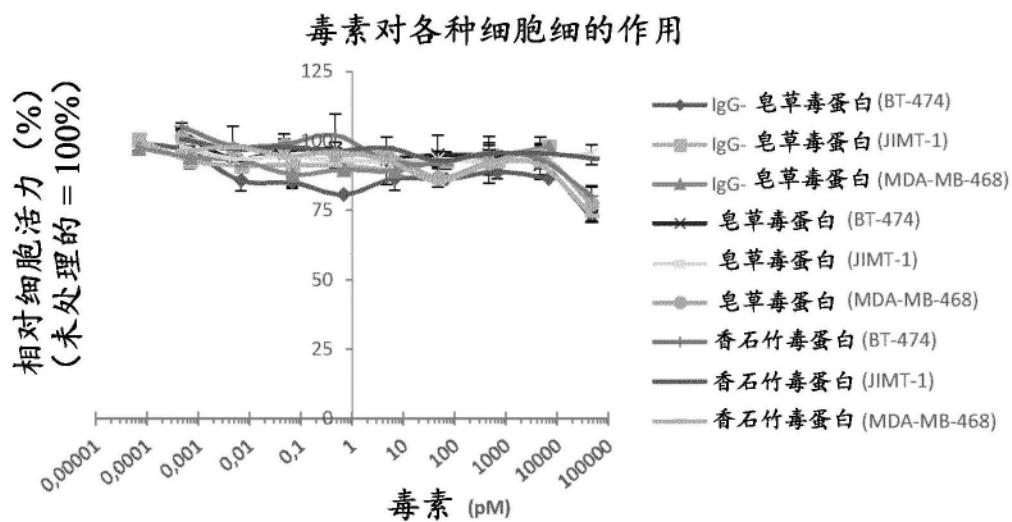


图24

D



E

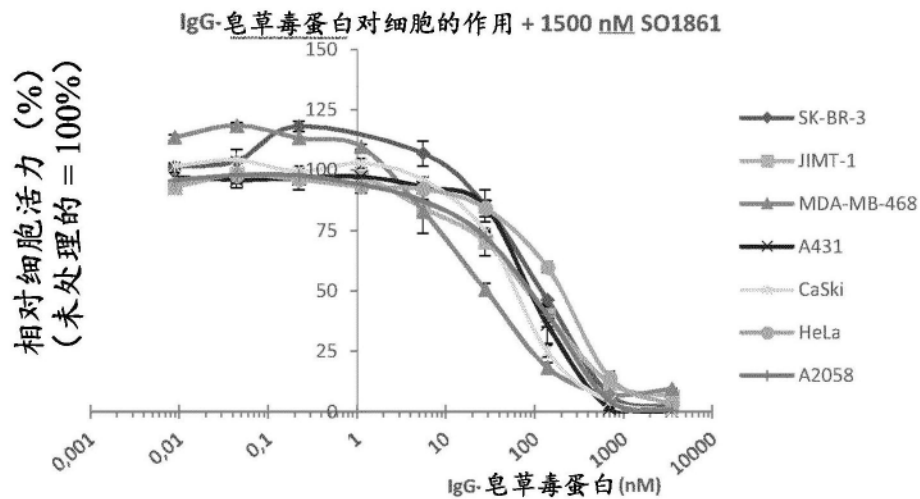


图24

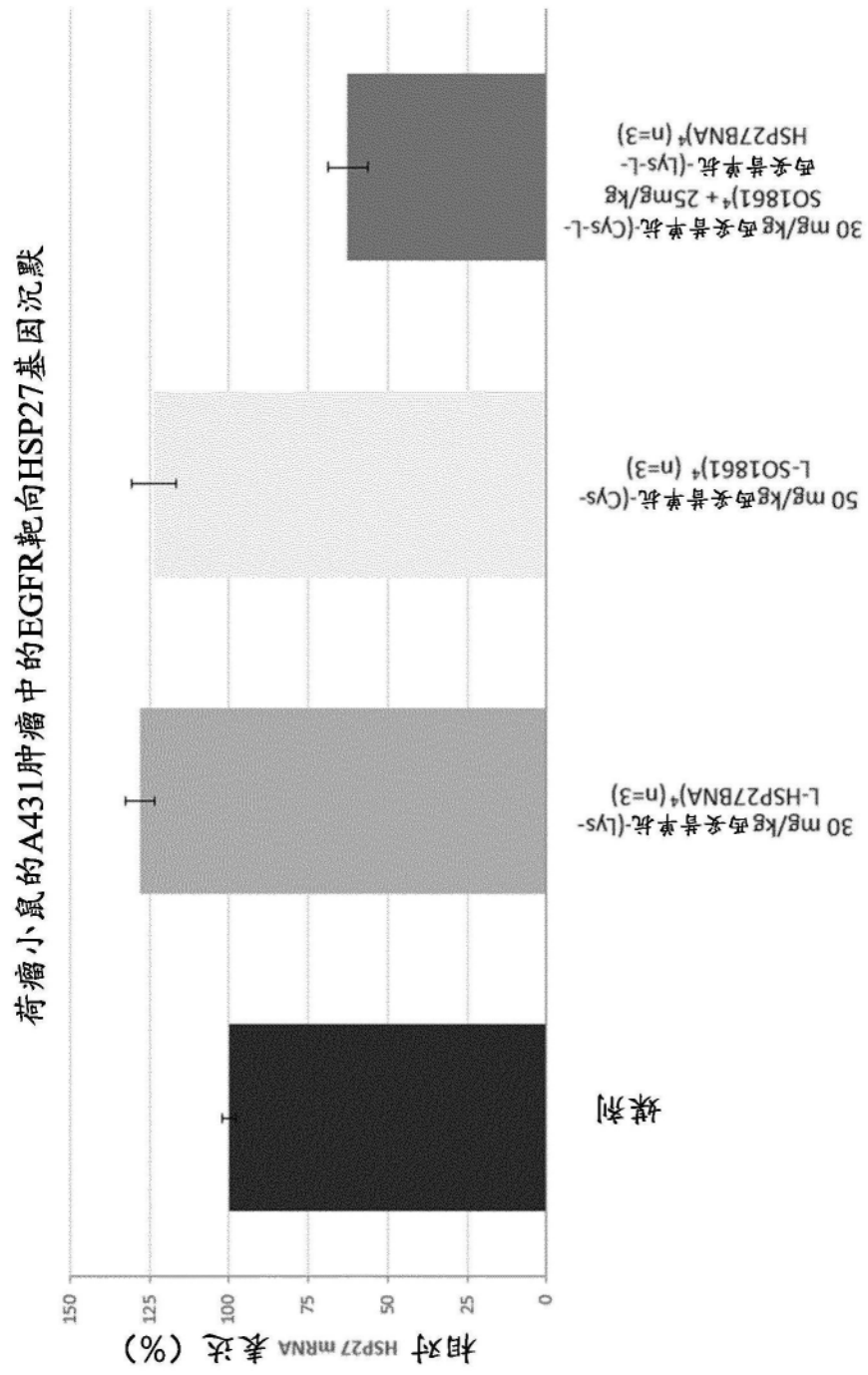


图25

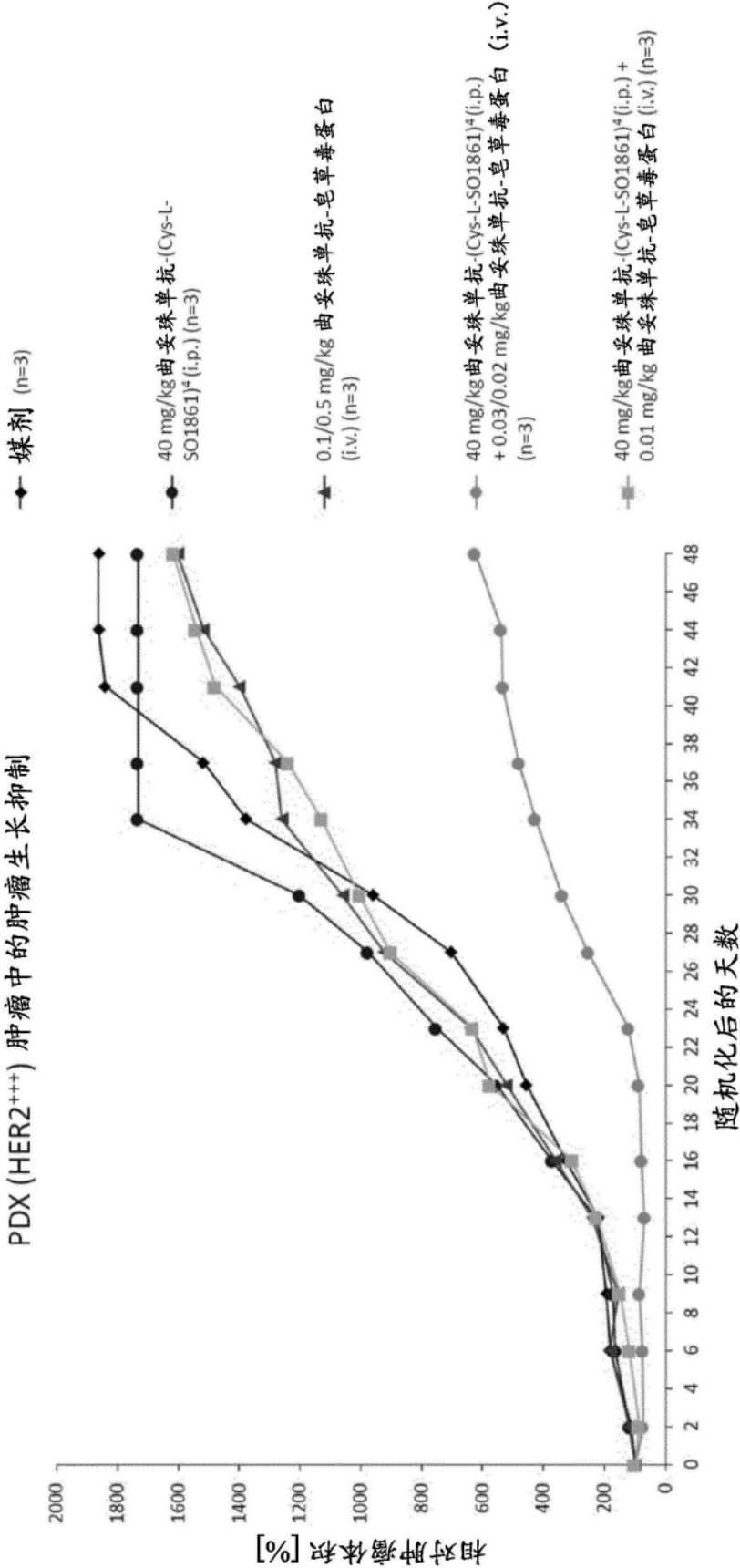


图26

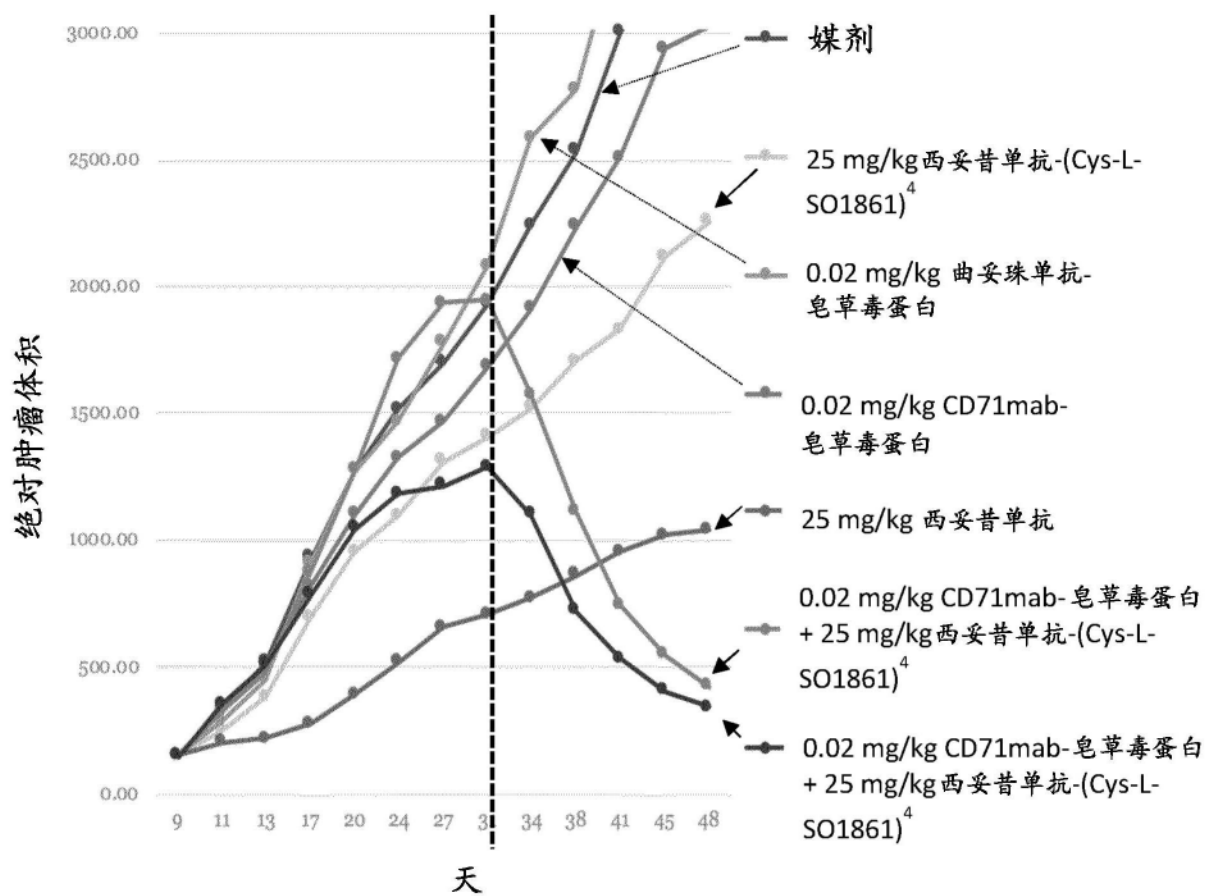
小鼠A431 (EGFR⁺⁺/HER2^{+/-}/CD71⁺) 肿瘤中的2T2C肿瘤消退

图27

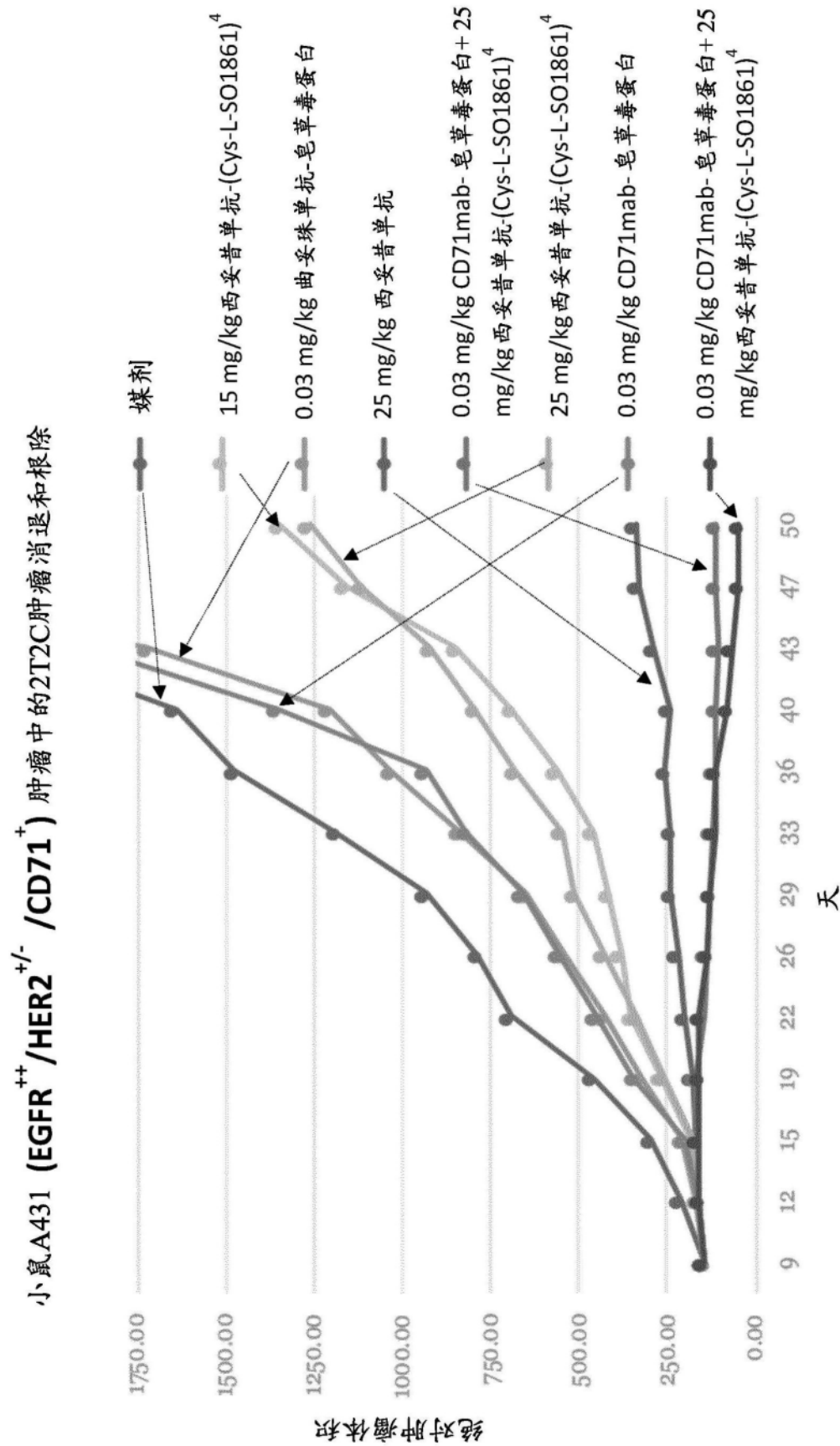


图28

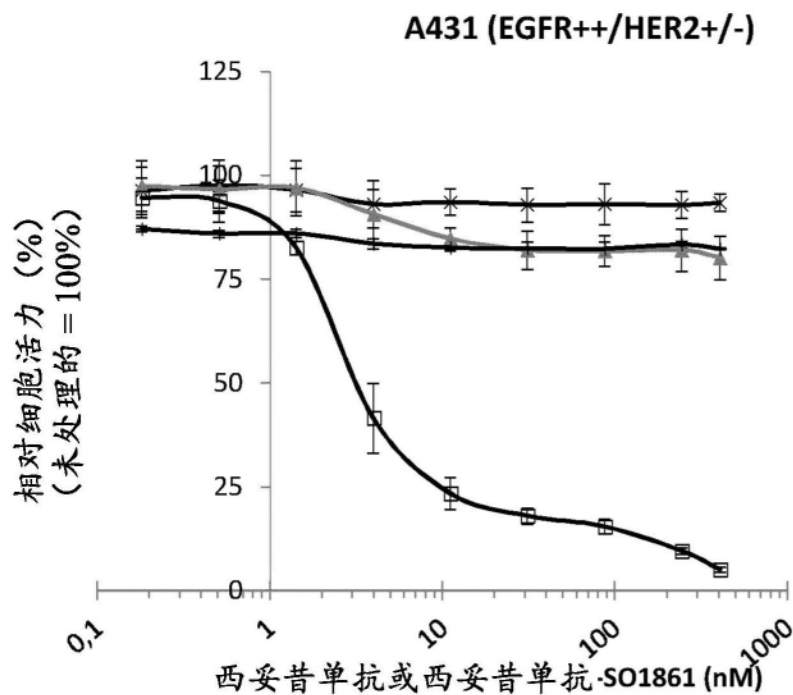
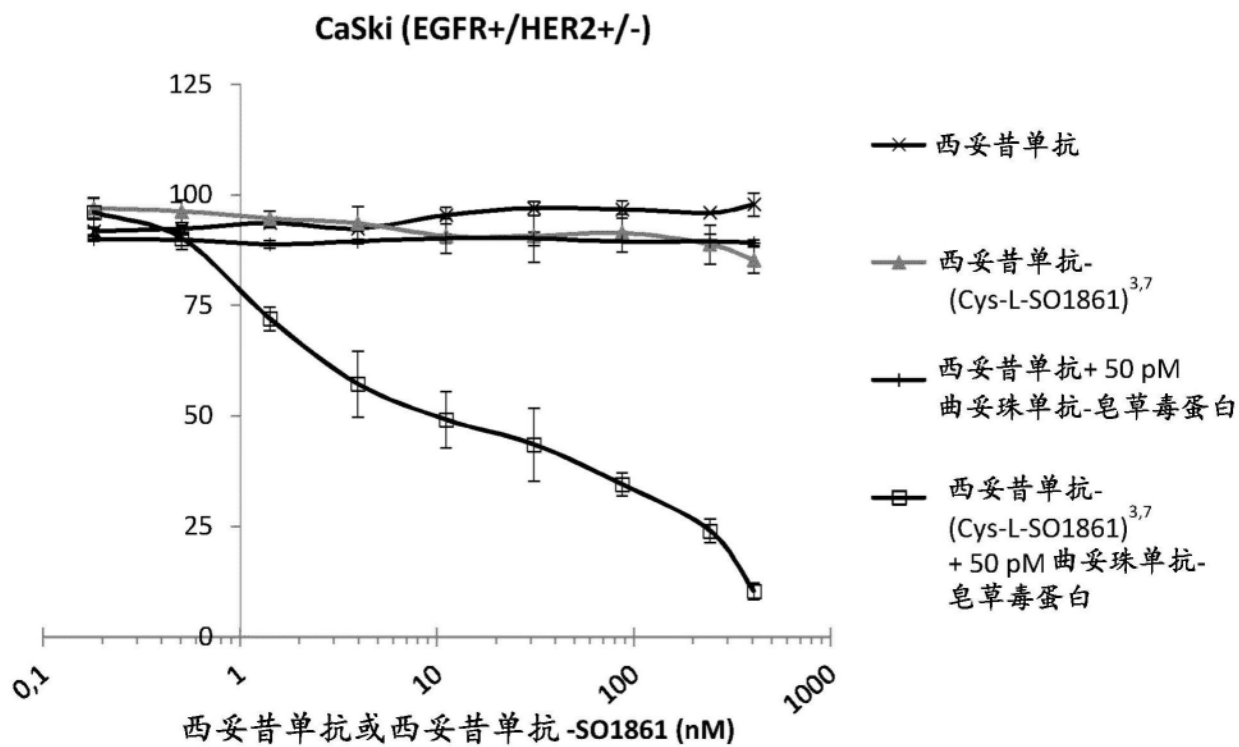
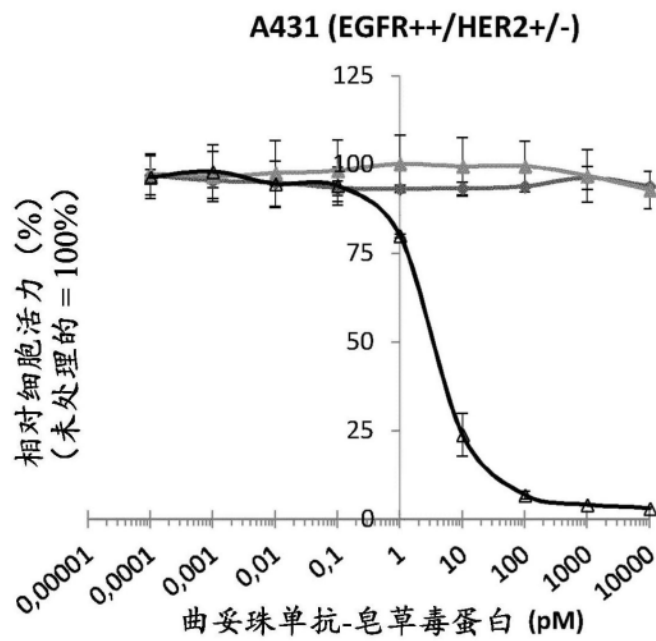
A**B**

图29

C



D

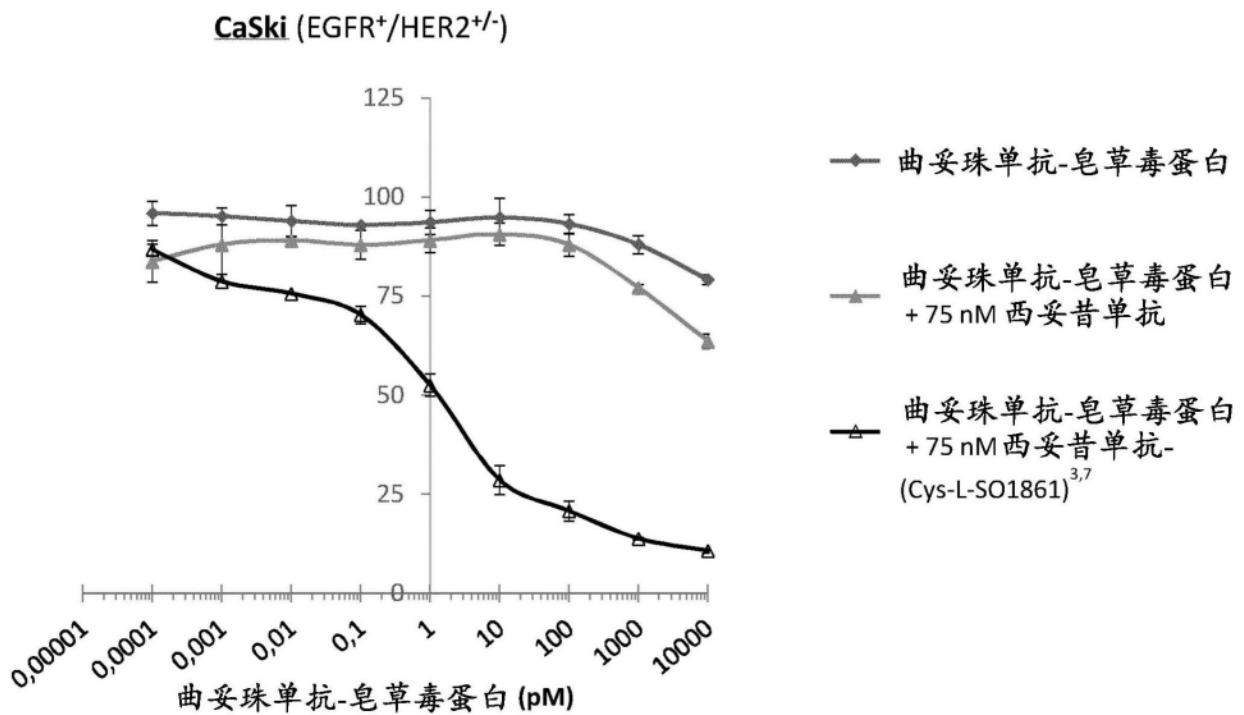


图29

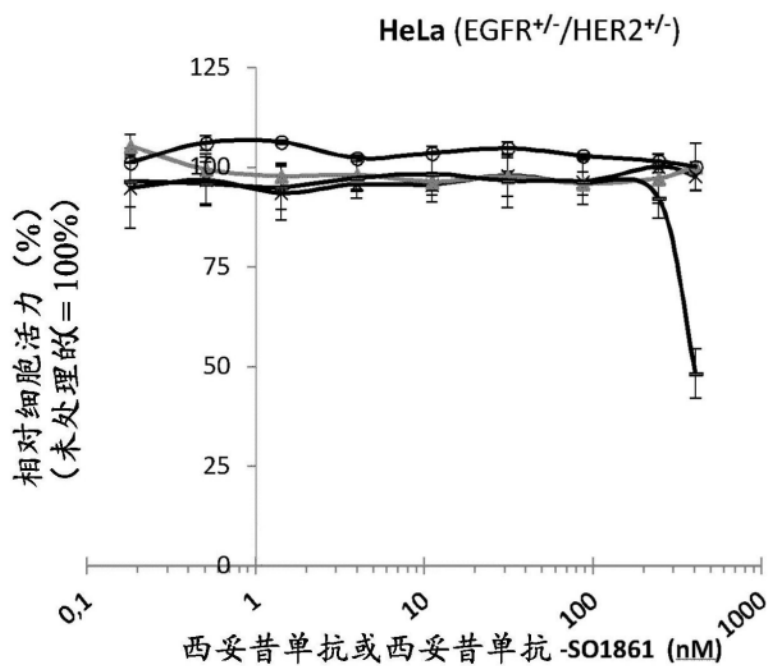
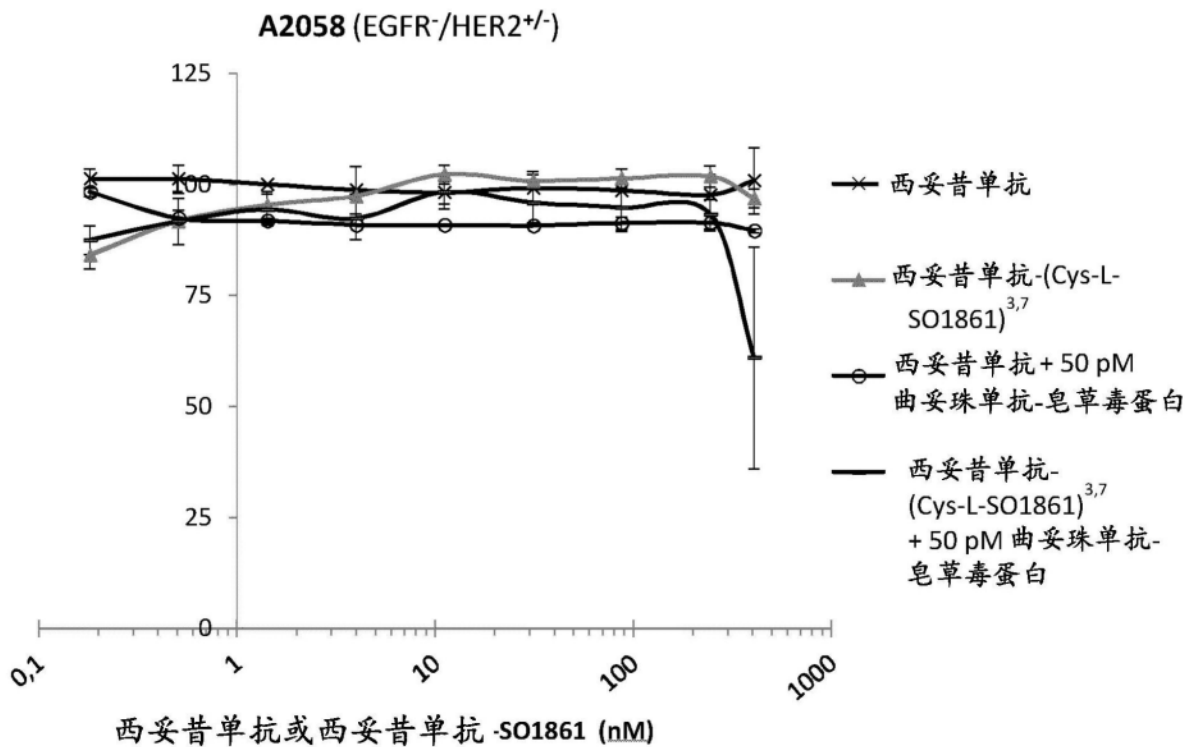
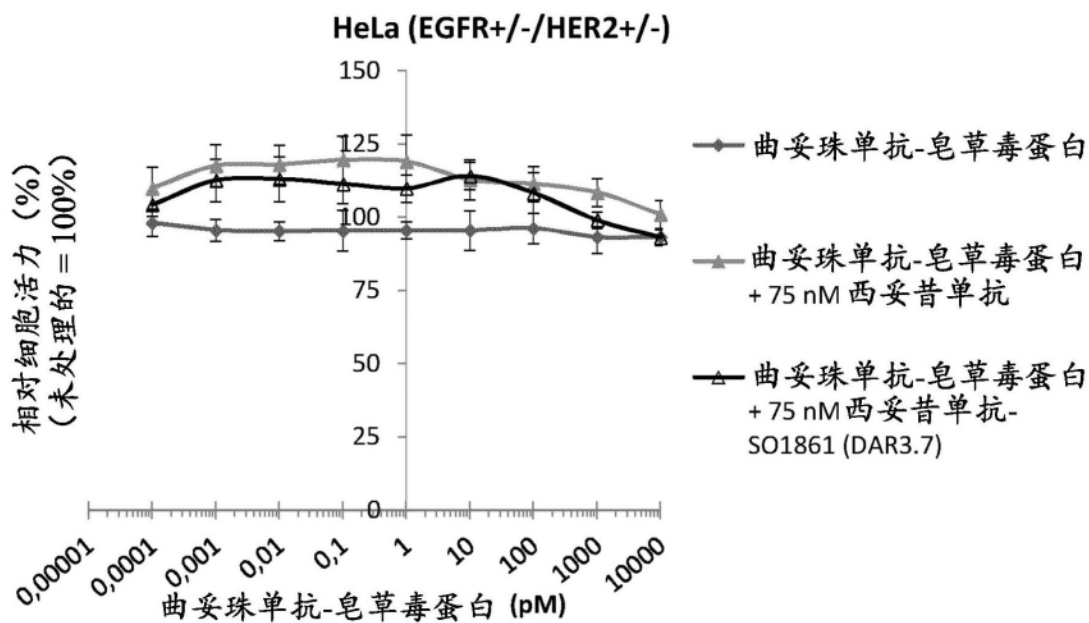
A**B**

图30

C



D

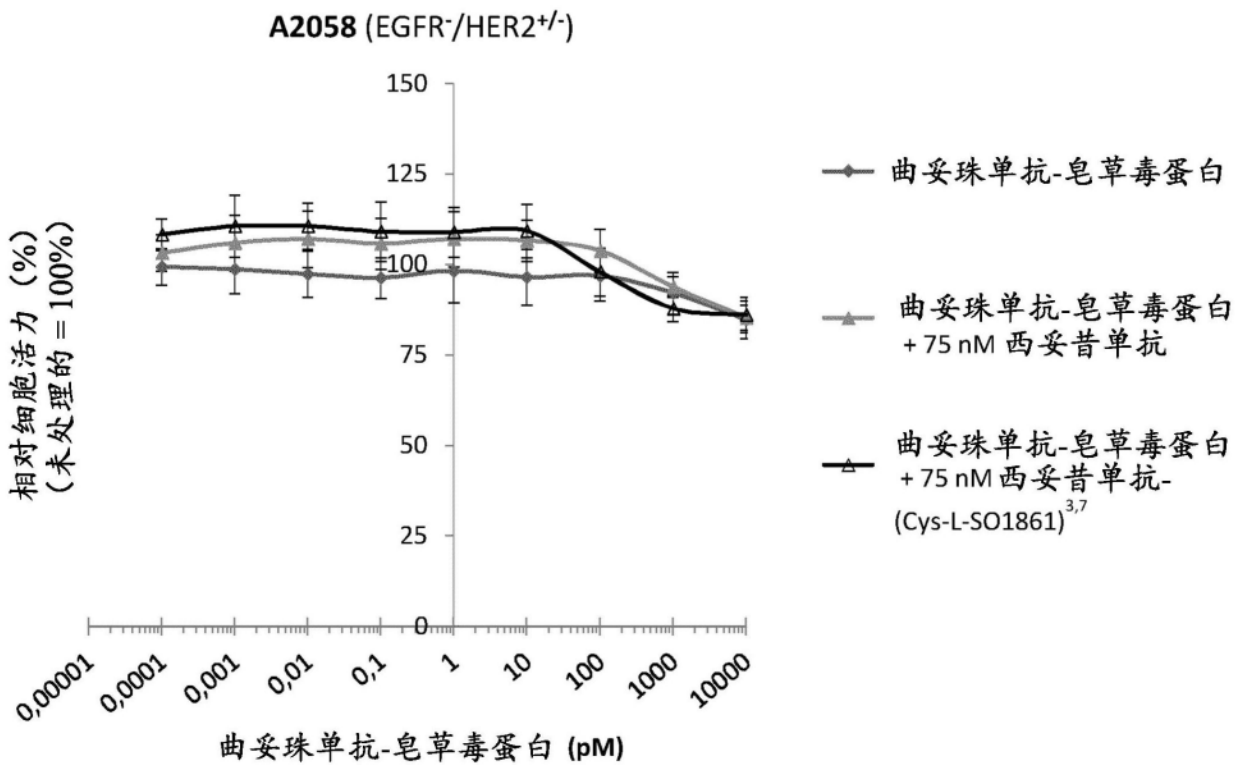


图30

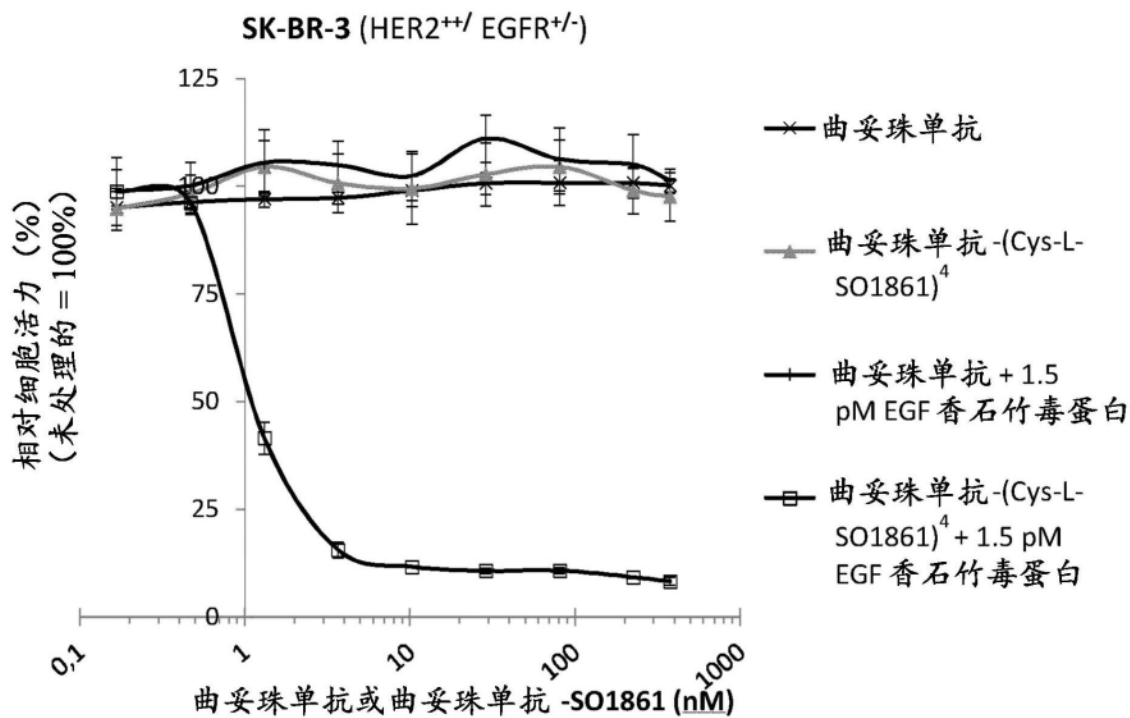
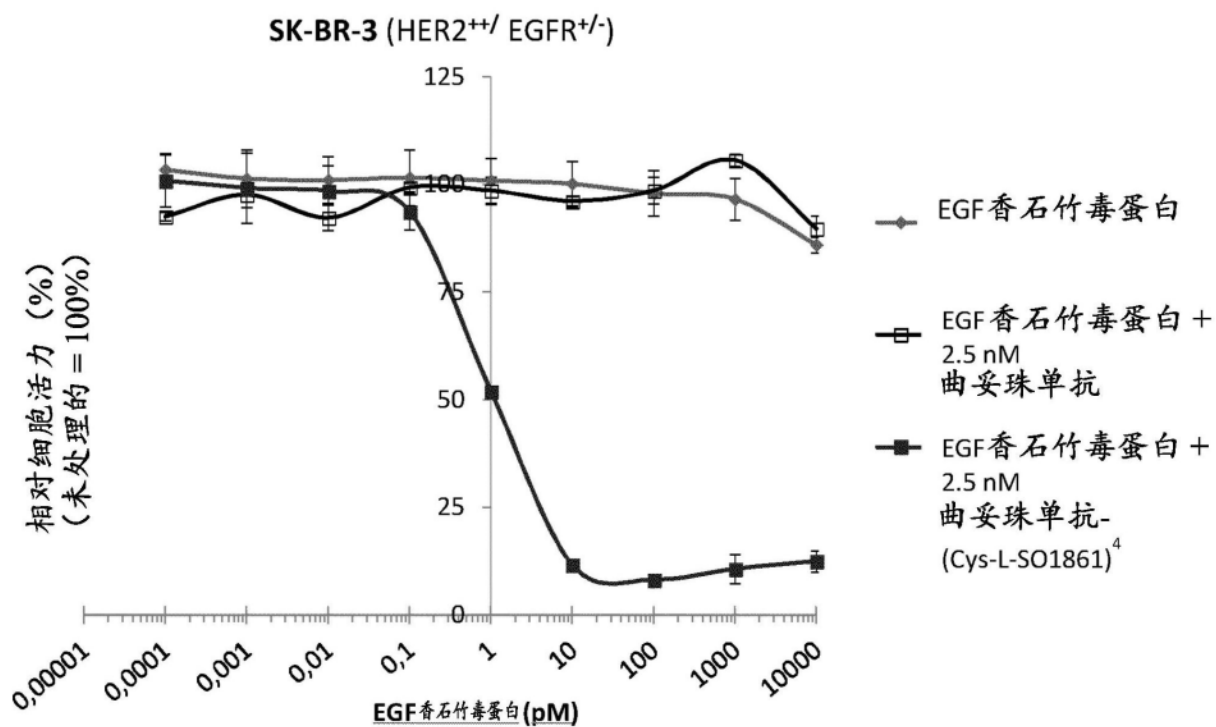
A**B**

图31

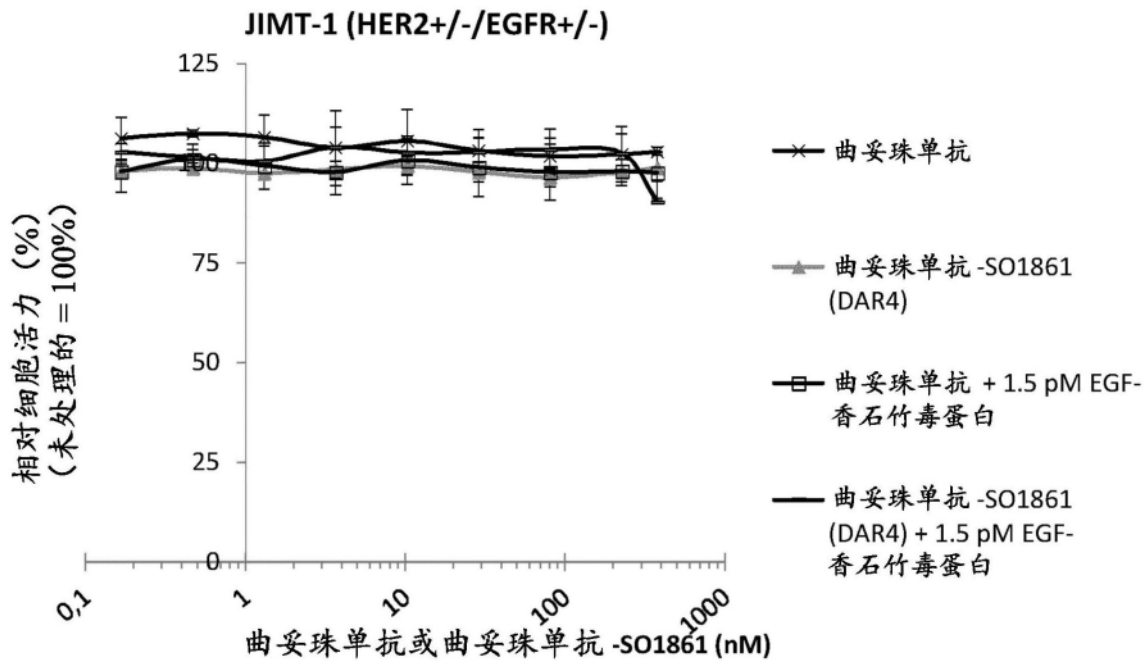
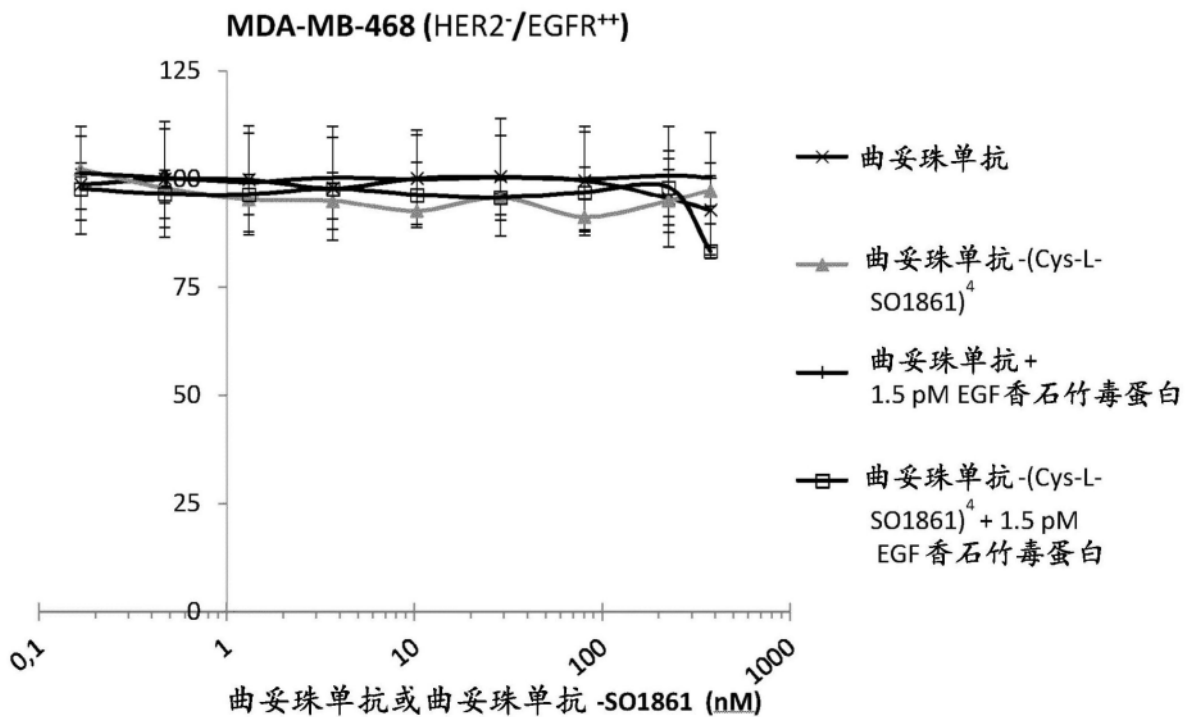
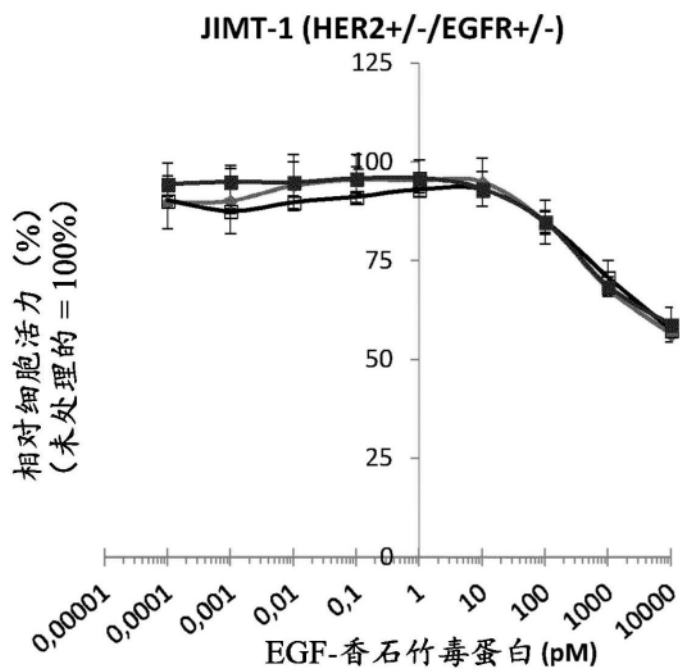
A**B**

图32

C



D

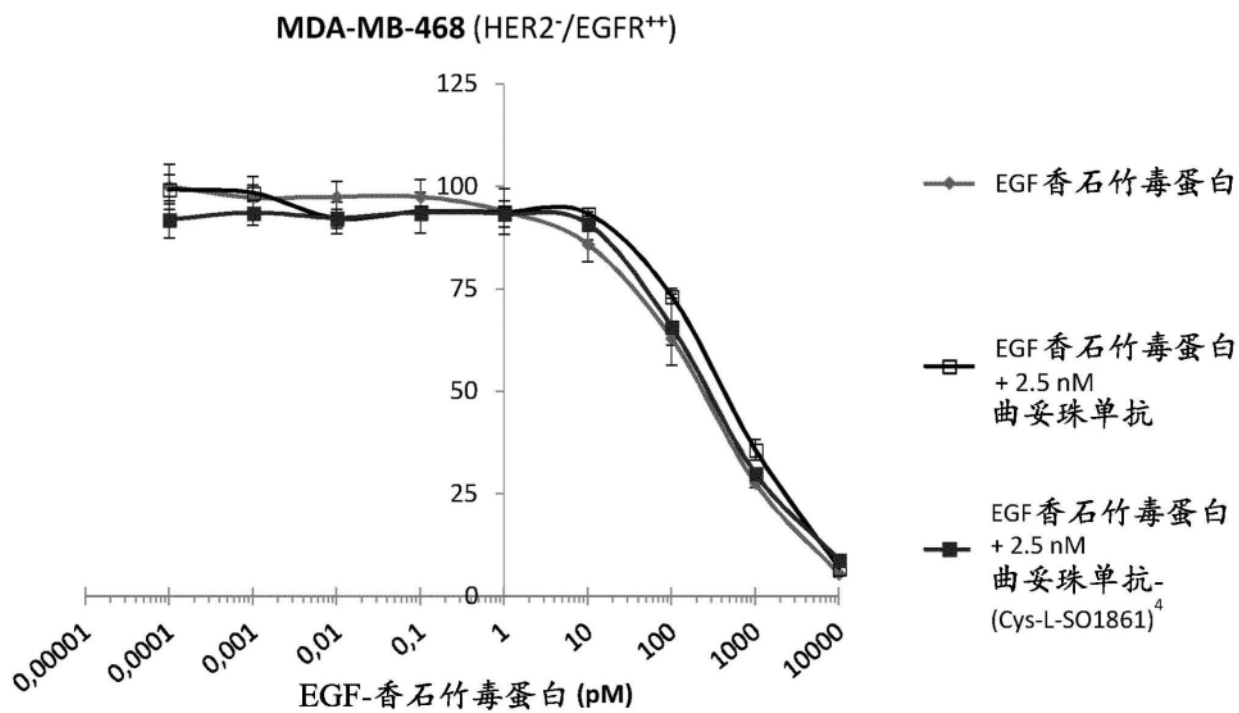


图32

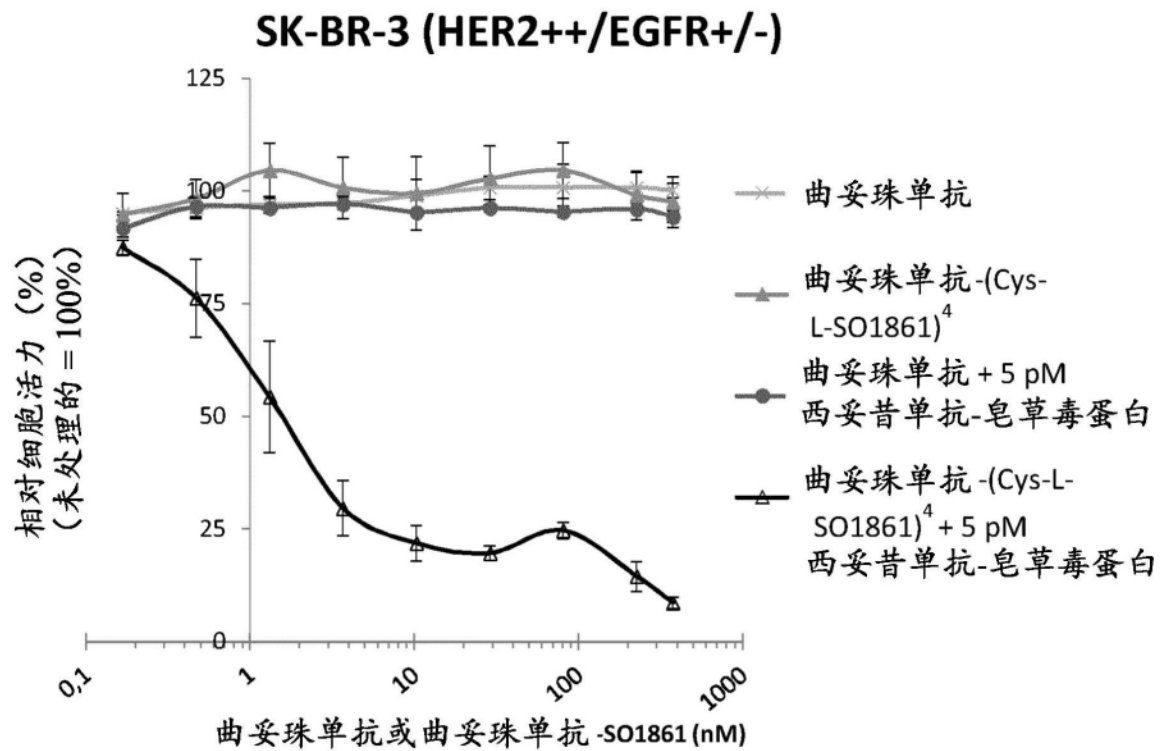
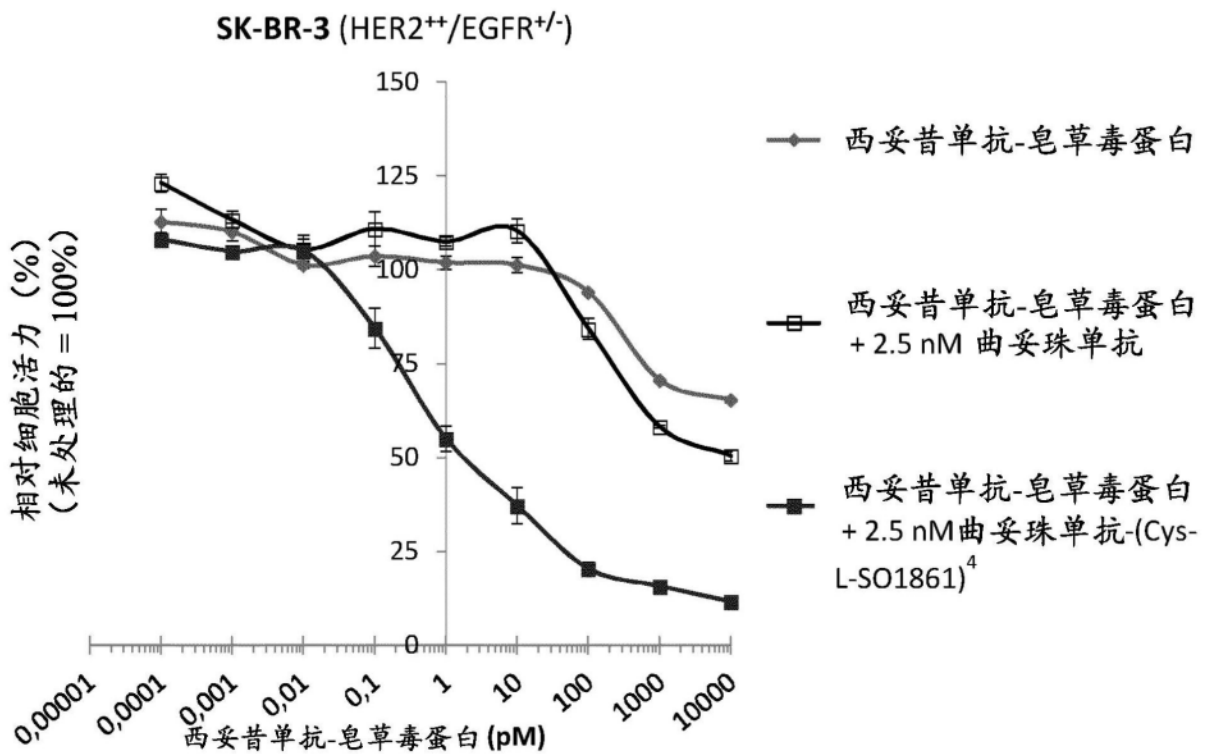
A**B**

图33

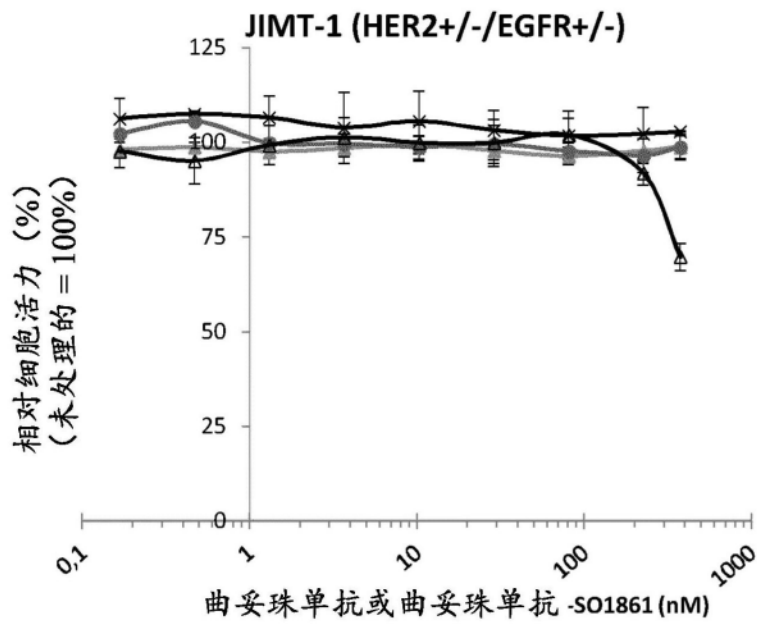
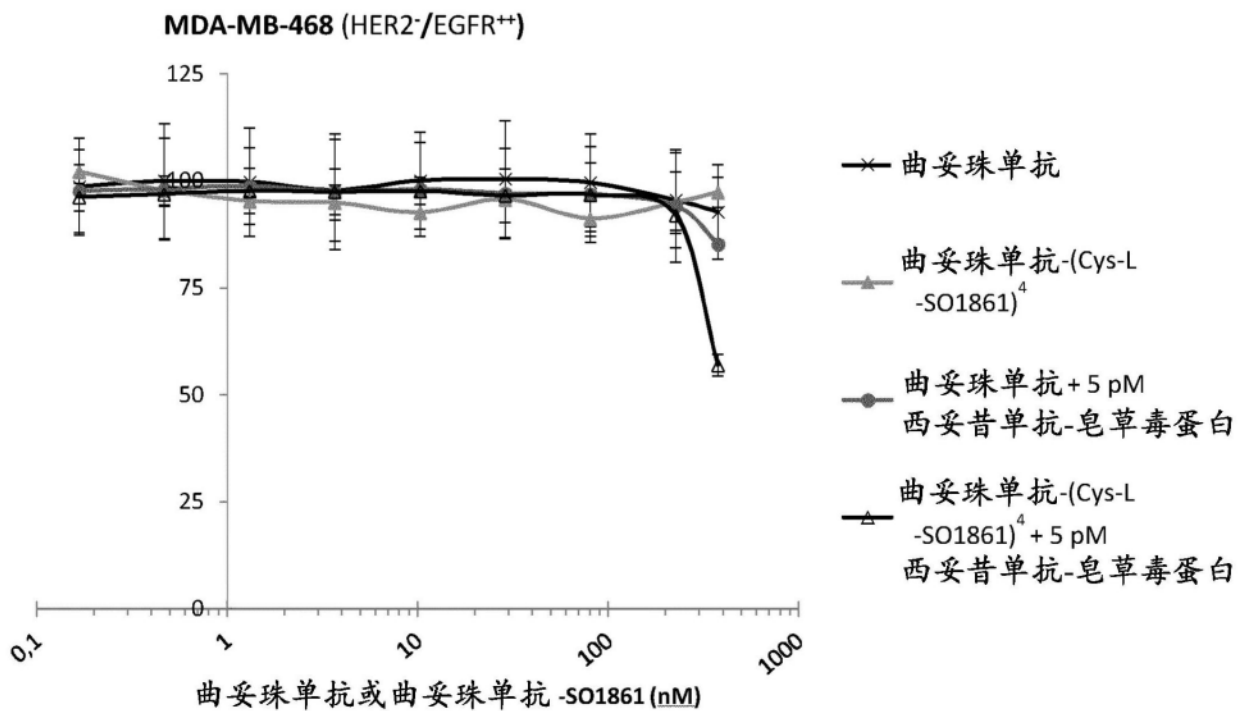
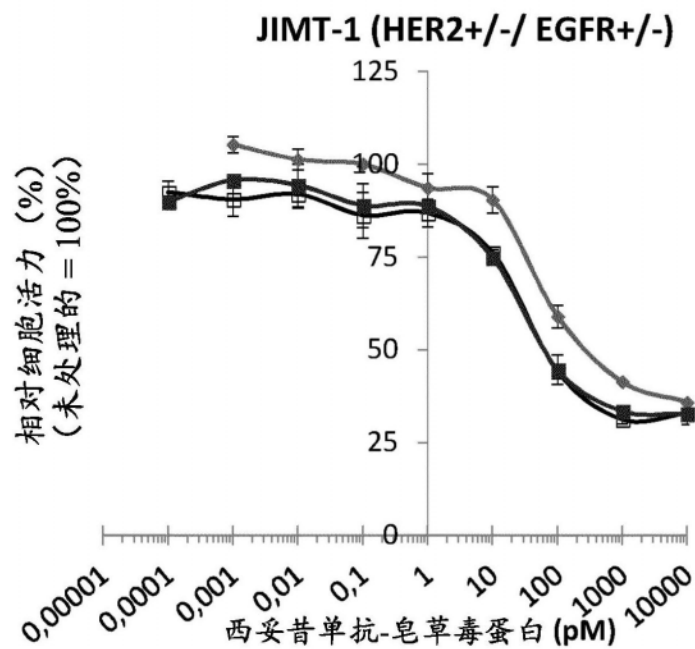
A**B**

图34

C



D

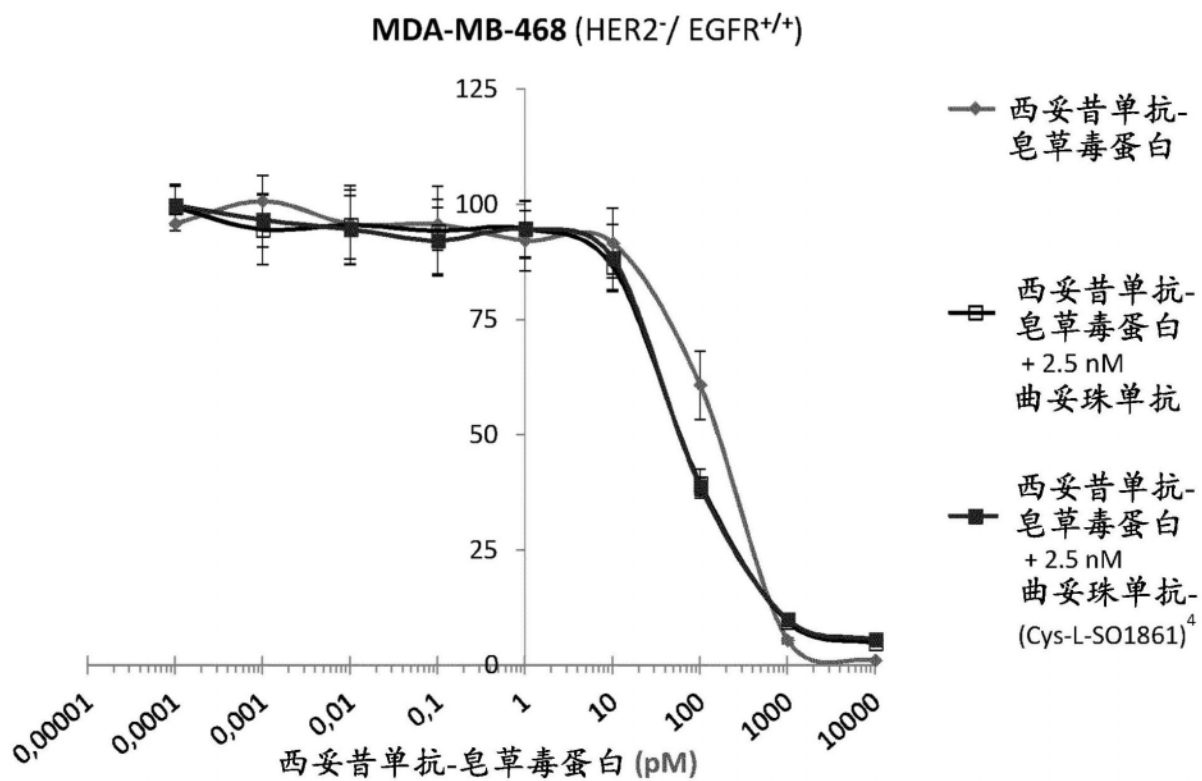


图34