



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116406302 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 07

(21) 申请号 202180064253.3

(22) 申请日 2021.09.20

(30) 优先权数据

20197056.3 2020.09.18 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/075831 2021.09.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/058594 EN 2022.03.24

(71) 申请人 阿拉里斯生物技术股份公司

地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 R·伯特兰 I·阿廷格-托勒

D·格拉布罗夫斯基 P·施皮歇尔

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

专利代理师 严罗一 臧建明

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书87页
序列表31页 附图2页

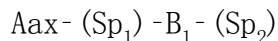
(54) 发明名称

用基于氨基酸的接头的谷氨酰胺转氨酶缀合方法

(57) 摘要

本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成抗体-有效载荷缀合物的方法。所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含或具有结构Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)的接头(以N→C方向显示)缀合至抗体的重链或轻链中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤;其中,Aax为具有结构NH₂-Y-COOH的氨基酸,其中,Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;(Sp₁)为化学间隔基或不存在;(Sp₂)为化学间隔基或不存在;并且B₁为连接部分或有效载荷。此外,本发明涉及已经用本发明的方法生成的抗体-接头缀合物及其用途。

1. 一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 生成抗体-接头缀合物的方法, 所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头 (以N→C方向显示) 缀合至所述抗体中包含的谷氨酰胺 (Gln) 残基的步骤:



其中

- Aax为具有结构 $\text{NH}_2-\text{Y}-\text{COOH}$ 的氨基酸, 其中, Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

- (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;
- (Sp_2) 为化学间隔基或不存在; 并且
- B_1 为连接部分或有效载荷。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中, Y包含结构 $-(\text{CH}_2)_n-$, 并且其中, n为1至20的整数。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中, n为2至20的整数。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体在 C_H2 结构域的N297位置 (EU编号) 处被糖基化。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中, 所述化学间隔基 (Sp_1) 和 (Sp_2) 分别包含0至12个氨基酸残基。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中, 所述接头包含至多25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6个氨基酸残基。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法, 其中, 所述接头的净电荷为中性的或正的。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法, 其中, 所述接头不包含带负电荷的氨基酸残基。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法, 其中, 所述接头包含至少一个带正电荷的氨基酸残基。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法, 其中, 所述接头包含第二连接部分或有效载荷 B_2 , 特别是其中, B_2 通过所述化学间隔基 (Sp_2) 连接至所述接头。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中, B_1 和 B_2 彼此相同或不同。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法, 其中, B_1 和/或 B_2 为连接部分。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中, 所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的至少一个包含

- 生物正交标志物基团, 或
- 用于交联的非生物正交实体。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述生物正交标志物基团或所述非生物正交实体由至少一种分子或部分组成或包含至少一种分子或部分, 所述分子或部分选自由以下组成的组:

- $-\text{N}-\text{N}\equiv\text{N}$, 或 $-\text{N}_3$;
- $\text{Lys}(\text{N}_3)$;
- 四嗪;
- 炔烃;
- 应变环辛炔;
- BCN;

- 应变烯烃;
- 光反应性基团;
- RCOH(醛);
- 酰基三氟硼酸酯;
- 蛋白质降解剂('PROTAC');
- 环戊二烯/螺环戊二烯;
- 硫代选择性亲电体;
- SH;以及
- 半胱氨酸。

15. 根据权利要求12至14中任一项所述的方法,所述方法包括:将一个或多个有效载荷连接至所述连接部分B₁和/或B₂中的至少一个的额外步骤。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述一个或多个有效载荷通过点击反应连接至所述连接部分B₁和/或B₂。

17. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中,B₁和/或B₂为有效载荷。

18. 根据权利要求15至17中任一项所述的方法,其中,所述一个或多个有效载荷包含以下中的至少一种:

- 毒素;
- 细胞因子;
- 生长因子;
- 放射性核素;
- 激素;
- 抗病毒剂;
- 抗菌剂;
- 荧光染料;
- 免疫调节剂/免疫刺激剂;
- 半衰期增加部分;
- 溶解性增加部分;
- 聚合物-毒素缀合物;
- 核酸;
- 生物素或链霉亲和素部分;
- 维生素;
- 蛋白质降解剂('PROTAC');
- 靶结合部分;和/或
- 抗炎剂。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,所述毒素为选自由以下组成的组中的至少一种

- 吡咯并苯并二氮杂草(PBD);
- 澳瑞他汀(例如,MMAE,MMAF);
- 美登素类(美登素,DM1,DM4,DM21);
- 倍癌霉素;

- 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 抑制剂;
- 微管溶素;
- 烯二炔类 (例如, 卡利奇霉素);
- PNU, 多柔比星;
- 基于吡咯的驱动蛋白纺锤体蛋白 (KSP) 抑制剂;
- 药物外排泵抑制剂;
- 山卓霉素;
- 念珠藻素;
- 鹅膏蕈碱 (例如, α -鹅膏蕈碱); 以及
- 喜树碱 (例如, 依喜替康, 德鲁替康)。

20. 根据权利要求15至19中任一项所述的方法, 其中, 所述一个或多个有效载荷还包含可切割部分或自裂解部分。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中, 所述可切割部分或所述自裂解部分包含能够被组织蛋白酶切割的基序和/或对氨基苄基氨甲酰基 (PABC) 部分。

22. 根据权利要求15至21中任一项所述的方法, 其中, 所述一个或多个有效载荷还包含用于将所述有效载荷连接至所述化学间隔基 (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 或连接至所述接头中包含的所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的反应性基团。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY抗体或其片段或重组变体, 其中, 所述其片段或重组变体保留了靶结合性质并且包含 CH_2 结构域。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中, 所述抗体为IgG抗体。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法, 其中, 所述接头缀合至所述抗体的Fc结构域中的Gln残基, 或其中, 所述接头缀合至已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链的Gln残基。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述抗体的Fc结构域中的Gln残基为IgG抗体的 CH_2 结构域的Gln残基Q295 (EU编号)。

27. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链的Gln残基包含在肽中, 所述肽已经 (a) 并入至所述抗体的重链或轻链中或 (b) 融合至所述抗体的重链或轻链的N端或C端。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中, 包含所述Gln残基的所述肽已经融合至所述抗体的重链的C端。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法, 其中, 所述接头缀合至所述Gln残基的酰胺侧链。

30. 根据权利要求29所述的方法, 其中, 所述接头适于缀合至糖基化的抗体, 缀合效率为至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法, 其中, 所述微生物谷氨酰胺转氨酶来源于链霉菌属物种, 特别是茂原链霉菌。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体与5-50摩尔当量的所述接头接触。

33. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法, 其中, 将所述微生物谷氨酰胺转氨酶以1-10U/mg抗体范围内的浓度添加至缀合反应中。

34. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法, 其中, 将所述抗体以1-10mg/mL范围内的浓度添加至缀合反应中。

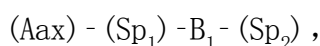
35. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法, 其中, 所述接头与所述抗体的缀合是以6-8.5范围内的pH实现的。

36. 一种抗体-接头缀合物, 其已经用根据权利要求1至35中任一项所述的方法生成。

37. 一种抗体-接头缀合物, 包含:

a) 抗体; 和

b) 包含以下结构的接头(以N→C方向显示)



其中

• Aax为具有结构 $NH_2-Y-COOH$ 的氨基酸, 其中, Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

• (Sp_1) 为化学间隔基;

• (Sp_2) 为化学间隔基或不存在; 并且

• B_1 为连接部分或有效载荷;

其中, 所述接头通过残基Aax中的伯胺缀合至包含在所述抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺(Gln)残基的酰胺侧链。

38. 根据权利要求37所述的缀合物, 其中, Y包含结构 $-(CH_2)_n-$, 并且其中, n为1至20的整数。

39. 根据权利要求38所述的缀合物, 其中, n为2至20的整数。

40. 根据权利要求37至39中任一项所述的缀合物, 其中, 所述抗体在 CH_2 结构域的N297位置(EU编号)处被糖基化。

41. 根据权利要求37至40中任一项所述的缀合物, 其中, 所述化学间隔基 (Sp_1) 和 (Sp_2) 分别包含0至12个氨基酸残基。

42. 根据权利要求37至41中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头包含至多25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6个氨基酸残基。

43. 根据权利要求37至42中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头的净电荷为中性的或正的。

44. 根据权利要求37至43中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头不包含带负电荷的氨基酸残基。

45. 根据权利要求37至44中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头包含至少一个带正电荷的氨基酸残基。

46. 根据权利要求37至45中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头包含第二连接部分或有效载荷 B_2 , 特别是其中, B_2 通过所述化学间隔基 (Sp_2) 连接至所述接头。

47. 根据权利要求46所述的缀合物, 其中, B_1 和 B_2 彼此相同或不同。

48. 根据权利要求37至47中任一项所述的缀合物, 其中, B_1 和/或 B_2 为连接部分。

49. 根据权利要求48所述的缀合物, 其中, 所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的至少一个包含

- 生物正交标志物基团,或
- 用于交联的非生物正交实体。

50. 根据权利要求49所述的缀合物,其中,所述生物正交标志物基团或所述非生物正交实体由至少一种分子或部分组成或包含至少一种分子或部分,所述分子或部分选自由以下组成的组:

- $-N-N\equiv N$,或 $-N_3$;
- Lys (N_3);
- 四嗪;
- 炔烃;
- 应变环辛炔;
- BCN;
- 应变烯烃;
- 光反应性基团;
- $-RCOH$ (醛);
- 酰基三氟硼酸酯;
- 蛋白质降解剂 ('PROTAC');
- 环戊二烯/螺环戊二烯;
- 硫代选择性亲电体;
- $-SH$; 以及
- 半胱氨酸。

51. 根据权利要求48至50中任一项所述的缀合物,其中,所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的至少一个连接至一个或多个有效载荷。

52. 根据权利要求51所述的缀合物,其中,所述一个或多个有效载荷通过点击反应连接至所述连接部分 B_1 和/或 B_2 。

53. 根据权利要求37至47中任一项所述的缀合物,其中, B_1 和/或 B_2 为有效载荷。

54. 根据权利要求53所述的缀合物,其中,所述一个或多个有效载荷包含以下中的至少一种:

- 毒素;
- 细胞因子;
- 生长因子;
- 放射性核素;
- 激素;
- 抗病毒剂;
- 抗菌剂;
- 荧光染料;
- 免疫调节剂/免疫刺激剂;
- 半衰期增加部分;
- 溶解性增加部分;
- 聚合物-毒素缀合物;

- 核酸；
- 生物素或链霉亲和素部分；
- 维生素；
- 蛋白质降解剂('PROTAC')；
- 靶结合部分；和/或
- 抗炎剂。

55. 根据权利要求54所述的缀合物，其中，所述毒素为选自由以下组成的组中的至少一种

- 吡咯并苯并二氮杂草 (PBD)；
- 澳瑞他汀 (例如，MMAE, MMAF)；
- 美登素类 (美登素, DM1, DM4, DM21)；
- 倍癌霉素；
- 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 抑制剂；
- 微管溶素；
- 烯二炔类 (例如，卡利奇霉素)；
- PNU, 多柔比星；
- 基于吡咯的驱动蛋白纺锤体蛋白 (KSP) 抑制剂；
- 念珠藻素；
- 药物外排泵抑制剂；
- 山卓霉素；
- 鹅膏蕈碱 (例如， α -鹅膏蕈碱)；以及
- 喜树碱 (例如，依喜替康，德鲁替康)。

56. 根据权利要求51至55中任一项所述的缀合物，其中，所述一个或多个有效载荷还包含可切割部分或自裂解部分。

57. 根据权利要求56所述的缀合物，其中，所述可切割部分或所述自裂解部分包含基序缬氨酸-瓜氨酸 (VC) 和/或对氨基苄基氨甲酰基 (PABC) 部分。

58. 根据权利要求37至57中任一项所述的抗体-接头缀合物，其中，所述抗体为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY抗体或其片段或重组变体，其中，所述其片段或重组变体保留了靶结合性质并且包含CH₂结构域。

59. 根据权利要求58所述的抗体-接头缀合物，其中，所述抗体为IgG抗体。

60. 根据权利要求37至59中任一项所述的抗体-接头缀合物，其中，与所述接头缀合的Gln残基包含在所述抗体的Fc结构域中，或已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链。

61. 根据权利要求60所述的抗体-接头缀合物，其中，所述抗体的Fc结构域中包含的所述Gln残基为IgG抗体的CH₂结构域的Gln残基Q295 (EU编号)。

62. 根据权利要求60所述的抗体-接头缀合物，其中，已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链的所述Gln残基包含在肽中，所述肽已经 (a) 并入至所述抗体的重链或轻链中或 (b) 融合至所述抗体的重链或轻链的N端或C端。

63. 根据权利要求62所述的抗体-接头缀合物，其中，包含所述Gln残基的所述肽已经融合至所述抗体的重链的C端。

64. 一种药物组合物, 包含根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物, 特别是其中, 所述抗体-接头缀合物包含至少一种有效载荷。

65. 根据权利要求64所述的药物组合物, 包含至少一种另外的药学上可接受的成分。

66. 根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据权利要求64或65所述的药物组合物, 用于治疗和/或诊断。

67. 根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据权利要求64或65所述的药物组合物, 用于治疗患者, 所述患者

- 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,
- 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中, 和/或

- 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

68. 根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据权利要求64或65所述的药物组合物, 用于治疗患有肿瘤性疾病的患者。

69. 根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据权利要求64或65所述的药物组合物, 用于手术前、手术中或手术后成像。

70. 根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据权利要求64或65所述的药物组合物, 用于手术中成像引导的癌症手术。

71. 根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据权利要求64或65所述的药物组合物在制备用于治疗患者的药物中的用途, 所述患者

- 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,
- 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中, 和/或

- 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

72. 一种治疗或预防肿瘤性疾病的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用根据权利要求37至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据权利要求64或65所述的药物组合物。

用基于氨基酸的接头的谷氨酰胺转氨酶缀合方法

技术领域

[0001] 本发明涉及通过微生物谷氨酰胺转氨酶生成抗体-接头缀合物的方法。本发明还提供了抗体-接头缀合物、包含本发明的抗体-接头缀合物的药物组合物及其用途。

背景技术

[0002] 发现将高效力的有效载荷连接于抗体对癌症或炎症性疾病的靶向治疗获得了越来越大的关注。这种连接产生的构建体被称为抗体-接头缀合物,或者,在接头包含药物的情况下,被称为抗体-药物缀合物(antibody-drug conjugate,ADC)。

[0003] 目前,10种ADC(Adcetris、Kadcyla、Besponsa、Mylotarg、Polivy、Padcev、Enhertu、Trodelvy、Blenrep和Zynlonta)已经获得FDA批准,所有这些ADC的有效载荷均以非位点特异性方式与抗体化学连接。因此,就抗体与有效载荷之间的化学计量关系(有效载荷-抗体比(payload-antibody ratio),或药物-抗体比(drug-to-antibody ratio,DAR))以及抗体上的缀合位点而言,所得产物是高度异质的。虽然在相同药物产品中,但每一种所得物质都可以具有不同的性质,这可能会导致各种不同的体内药代动力学性质和活性。

[0004] 在先前的体内研究(Lhospice et al.,Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-Cd30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models,Mol Pharm 12(6),1863-1871.2015)中,结果显示,与FDA批准的ADC相比,位点特异性药物连接导致显著更高的肿瘤摄取(约2倍)和非靶向组织中的摄取减少,并且最大耐受剂量至少高出3倍。这些数据表明,与化学修饰的ADC相比,化学计量明确定义的ADC显示出改进的药代动力学和更好的治疗指标。

[0005] 作为一种位点特异性技术,酶的缀合获得了极大的关注,因为这些缀合反应通常很快并且可以在生理条件下实施。在可用的酶中,来自茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)物种的微生物谷氨酰胺转氨酶(microbial transglutaminase,MTG)作为功能部分(包括抗体)的常规化学蛋白质缀合的有吸引力的可替代物,越来越受到关注。在生理条件下,MTG催化蛋白质或肽的“反应性”谷氨酰胺与蛋白质或肽的“反应性”赖氨酸残基之间的转酰胺基反应,而后者也可以是简单的低分子量伯胺,如5-氨基戊基(Jeger et al.,Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase.Angew Chem Int Ed Engl.2010Dec17;49(51):9995-7,Strop et al.,Versatility of Microbial Transglutaminase.Bioconjugate Chemistry2014,25(5),855-862)。

[0006] 形成的键是异肽键,它是一个酰胺键,其不形成各个多肽或蛋白质的肽键主链的一部分。它是在含有酰基谷氨酰胺的氨基酸供体序列的谷氨酰基残基的 γ -甲酰胺与含有氨基供体的底物的伯(1°)胺之间形成的。

[0007] 从发明人和其他人的经验来看,似乎MTG通常只靶向少数谷氨酰胺,因此使得MTG成为位点特异性和化学计量蛋白质修饰的有吸引力的工具。

[0008] 以前,谷氨酰胺295(Q295)被鉴定为不同IgG种类的重链上唯一的反应性谷氨酰胺,其可被具有低分子量伯胺底物的MTG特异性靶向(Jeger et al.Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase.Angew Chem Int Ed Engl.2010Dec17;49(51):9995-7)。

[0009] 然而,只有在使用PNGase F去除天冬酰胺残基297(N297)处的聚糖部分后,才可能与Q295定量缀合,而糖基化的抗体不能有效缀合(缀合效率<20%)。Mindt等人(Modification of different IgG1 antibodies via glutamine and lysine using bacterial and human tissue transglutaminase.Bioconjugate chemistry 2008,19(1),271-8)和Jeger等人(Site-specific and stoichiometric modification of antibodies by bacterial transglutaminase.Angew Chem Int Ed Engl.2010Dec 17;49(51):9995-7)、Strop等人(Location Matters:Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates,20,161-167,2013)和Dickgiesser等人(Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases.Bioconjug Chem.2020Mar 12.doi:10.1021/acs.bioconjchem.0c00061)的研究也支持此发现。

[0010] 为了消除去糖基化,也可以在残基N297处插入点突变,其导致被称为去糖基化的糖基化的消除。

[0011] 然而,这两种方法都有明显的缺点。在GMP方面,酶促去糖基化步骤是不希望的,这是因为必须确保去糖基化酶(例如,PNGase F)以及裂解的聚糖都从培养基中去除,以保证高纯度的产物。

[0012] 对另一种氨基酸的N297的取代也具有不需要的效果,这是因为它可以影响CH₂结构域的整体稳定性,并因此影响整个缀合物的功效。另外,存在于N297处的聚糖具有重要的免疫调节效果,因为它触发抗体依赖性细胞毒性(antibody dependent cellular cytotoxicity,ADCC)等。一旦去糖基化或对另一种氨基酸的N297的取代,这些免疫调节效果就会丧失。

[0013] 此外,用于有效载荷连接的抗体的基因工程可以具有以下缺点:序列插入可以增加免疫原性并降低抗体的整体稳定性。

[0014] Spycher等人公开了一种基于谷氨酰胺转氨酶的缀合方法,其不需要抗体的预先去糖基化(Spycher et al.,W02019057772)。更详细地,Spycher等人可以表明,使用含赖氨酸的肽,糖基化的抗体与Q295的位点特异性缀合确实是有效可行的。然而,本领域中尚未公开不含赖氨酸的肽与糖基化的抗体的MTG介导的缀合。

[0015] 因此,本发明的一个目的是提供一种基于谷氨酰胺转氨酶的蛋白质缀合方法。具体地,本发明的目的是提供基于谷氨酰胺转氨酶的抗体缀合方法,其不需要抗体(特别是N297)的预先去糖基化。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种基于谷氨酰胺转氨酶的抗体缀合方法,其不需要CH₂结构域中N297的取代或修饰。

[0017] 本发明的另一个目的是提供一种抗体缀合技术,其允许在缀合的化学计量以及位点特异性方面制备高度同质的缀合产物。

[0018] 根据本发明的独立权利要求的方法和手段满足了这些和进一步的目的。从属权利

要求涉及特定的实施方案。

发明内容

[0019] 换言之,本发明涉及以下实施方案:

[0020] 1.一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成蛋白质-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N→C方向显示)缀合至所述蛋白质中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0021] Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)

[0022] 其中

[0023] • Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;

[0024] • (Sp₁)为化学间隔基(spacer)或不存在;

[0025] • (Sp₂)为化学间隔基或不存在;并且

[0026] • B₁为连接部分或有效载荷。

[0027] 2.根据实施方案1所述的方法,其中,所述蛋白质为抗体,并且其中,所述Gln残基包含在所述抗体的重链或轻链中。

[0028] 3.根据实施方案1或2所述的方法,其中,所述残基Aax为一种氨基酸,其选自以下组成的组:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸或其氨基酸模拟物或衍生物。

[0029] 4.根据实施方案1至3中任一项所述的方法,其中,所述化学间隔基(Sp₁)和(Sp₂)分别包含0至12个氨基酸残基。

[0030] 5.根据实施方案1至4中任一项所述的方法,其中,所述接头包含至多25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6个氨基酸残基。

[0031] 6.根据实施方案1至5中任一项所述的方法,其中,所述接头的净电荷为中性的或正的。

[0032] 7.根据实施方案1至6中任一项所述的方法,其中,所述接头不包含带负电荷的氨基酸残基。

[0033] 8.根据实施方案1至7中任一项所述的方法,其中,所述接头包含至少一个带正电荷的氨基酸残基。

[0034] 9.根据实施方案1至8中任一项所述的方法,其中,所述接头包含第二连接部分或有效载荷B₂,特别是其中,B₂通过所述化学间隔基(Sp₂)连接至所述接头。

[0035] 10.根据实施方案9所述的方法,其中,B₁和B₂彼此相同或不同。

[0036] 11.根据实施方案1至8或9至10中任一项所述的方法,其中,B₁和/或B₂为连接部分。

[0037] 12.根据实施方案11所述的方法,其中,所述连接部分B₁和/或B₂的至少一个包含

[0038] • 生物正交标志物基团,或

[0039] • 用于交联的非生物正交实体(entity)。

[0040] 13.根据实施方案12所述的方法,其中,所述生物正交标志物基团或所述非生物正交实体由至少一种分子或部分组成或包含至少一种分子或部分,所述分子或部分选自以下组成的组:

- [0041] • -N-N≡N, 或 -N₃;
- [0042] • Lys (N₃);
- [0043] • 四嗪;
- [0044] • 炔烃;
- [0045] • 应变(strained)环辛炔;
- [0046] • BCN;
- [0047] • 应变烯烃;
- [0048] • 光反应性基团;
- [0049] • -RCOH(醛);
- [0050] • 酰基三氟硼酸酯;
- [0051] • 蛋白质降解剂('PROTAC');
- [0052] • 环戊二烯/螺环戊二烯;
- [0053] • 硫代选择性(thio-selective)亲电体;
- [0054] • -SH; 以及
- [0055] • 半胱氨酸。
- [0056] 14. 根据实施方案11至13中任一项所述的方法, 所述方法包括: 将一个或多个有效载荷连接至所述连接部分B₁和/或B₂的至少一个的额外步骤。
- [0057] 15. 根据实施方案14所述的方法, 其中, 所述一个或多个有效载荷通过点击反应连接至所述连接部分B₁和/或B₂。
- [0058] 16. 根据实施方案1至8或9至10中任一项所述的方法, 其中, B₁和/或B₂为有效载荷。
- [0059] 17. 根据实施方案14至16中任一项所述的方法, 其中, 所述一个或多个有效载荷包含以下中的至少一种:
 - [0060] • 毒素;
 - [0061] • 细胞因子;
 - [0062] • 生长因子;
 - [0063] • 放射性核素;
 - [0064] • 激素;
 - [0065] • 抗病毒剂;
 - [0066] • 抗菌剂;
 - [0067] • 荧光染料;
 - [0068] • 免疫调节剂/免疫刺激剂;
 - [0069] • 半衰期增加部分(moiety);
 - [0070] • 溶解性增加部分;
 - [0071] • 聚合物-毒素缀合物;
 - [0072] • 核酸;
 - [0073] • 生物素或链霉亲和素部分;
 - [0074] • 维生素;
 - [0075] • 蛋白质降解剂('PROTAC');
 - [0076] • 靶结合部分; 和/或

- [0077] • 抗炎剂。
- [0078] 18. 根据实施方案17所述的方法, 其中, 所述毒素为选自由以下组成的组中的至少一种
- [0079] • 吡咯并苯并二氮杂草 (pyrrolobenzodiazepine, PBD);
- [0080] • 澳瑞他汀 (auristatin) (例如, MMAE, MMAF);
- [0081] • 美登素类 (maytansinoid) (美登素 (maytansine), DM1, DM4, DM21);
- [0082] • 倍癌霉素 (duocarmycin);
- [0083] • 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 抑制剂;
- [0084] • 微管溶素 (tubulysin);
- [0085] • 烯二炔类 (enediyenes) (例如, 卡利奇霉素 (calicheamicin));
- [0086] • PNU, 多柔比星 (doxorubicin);
- [0087] • 基于吡咯的驱动蛋白纺锤体蛋白 (KSP) 抑制剂;
- [0088] • 药物外排泵抑制剂;
- [0089] • 山卓霉素 (sandracycline);
- [0090] • 念珠藻素 (cryptophycin);
- [0091] • 鹅膏蕈碱 (例如, α -鹅膏蕈碱); 以及
- [0092] • 喜树碱 (例如, 依喜替康 (exatecan), 德鲁替康 (deruxtecan))。
- [0093] 19. 根据实施方案14至18中任一项所述的方法, 其中, 所述一个或多个有效载荷还包含可切割部分或自裂解 (self-immolative) 部分。
- [0094] 20. 根据实施方案19所述的方法, 其中, 所述可切割部分或所述自裂解部分包含被组织蛋白酶可切割的基序和/或对氨基苄基氨甲酰基 (PABC) 部分。
- [0095] 21. 根据实施方案14至20中任一项所述的方法, 其中, 所述一个或多个有效载荷还包含用于将所述有效载荷连接至所述化学间隔基 (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 或连接至所述接头中包含的所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的反应性基团。
- [0096] 22. 根据实施方案2至21中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体为 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 或 IgY 抗体或其片段或重组变体, 其中, 所述其片段或重组变体保留了靶结合性质并且包含 CH_2 结构域。
- [0097] 23. 根据实施方案22所述的方法, 其中, 所述抗体为 IgG 抗体。
- [0098] 24. 根据实施方案22或23所述的方法, 其中, 所述抗体为糖基化的抗体、去糖基化的抗体或非糖基化的抗体。
- [0099] 25. 根据实施方案24所述的方法, 其中, 所述糖基化的抗体为在 CH_2 结构域的残基 N297 (EU 编号) 处糖基化的 IgG 抗体。
- [0100] 26. 根据实施方案2至25中任一项所述的方法, 其中, 所述接头缀合至所述抗体的 Fc 结构域中的 Gln 残基, 或其中, 所述接头缀合至已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链的 Gln 残基。
- [0101] 27. 根据实施方案26所述的方法, 其中, 所述抗体的 Fc 结构域中的所述 Gln 残基为 IgG 抗体的 CH_2 结构域的 Gln 残基 Q295 (EU 编号)。
- [0102] 28. 根据实施方案26所述的方法, 其中, 已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链中的所述 Gln 残基为非糖基化的 IgG 抗体的 CH_2 结构域的 N297Q (EU 编号)。

[0103] 29. 根据实施方案26所述的方法, 其中, 已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链的所述Gln残基包含在一种肽中, 所述肽已经(a) 并入至所述抗体的所述重链或轻链中或(b) 融合至所述抗体的所述重链或轻链的N端或C端。

[0104] 30. 根据实施方案29所述的方法, 其中, 包含所述Gln残基的所述肽已经融合至所述抗体的所述重链的所述C端。

[0105] 31. 根据实施方案1至30中任一项所述的方法, 其中, 所述接头缀合至所述Gln残基的酰胺侧链。

[0106] 32. 根据实施方案31所述的方法, 其中, 所述接头适于缀合至糖基化的抗体, 缀合效率为至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0107] 33. 根据实施方案1至32中任一项所述的方法, 其中, 所述微生物谷氨酰胺转氨酶来源于链霉菌属(*Streptomyces*) 物种, 特别是茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)。

[0108] 34. 一种蛋白质-接头缀合物, 其已经用根据实施方案1至32中任一项所述的方法生成。

[0109] 35. 一种蛋白质-接头缀合物, 包含:

[0110] a) 抗体; 和

[0111] b) 包含以下结构的接头(以N→C方向显示)

[0112] $(Aax) - (Sp_1) - B_1 - (Sp_2)$,

[0113] 其中

[0114] • Aax为氨基酸或氨基酸衍生物;

[0115] • (Sp_1) 为化学间隔基;

[0116] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在; 并且

[0117] • B_1 为连接部分或有效载荷;

[0118] 其中, 所述接头通过残基Aax中的伯胺缀合至包含在所述抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺(Gln) 残基的酰胺侧链。

[0119] 36. 根据实施方案35所述的缀合物, 其中, 所述蛋白质为抗体, 并且其中, 所述Gln残基包含在所述抗体的重链或轻链中。

[0120] 37. 根据实施方案35或36所述的缀合物, 其中, 所述残基Aax为一种氨基酸, 其选自由以下组成的组: 丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸或其氨基酸模拟物或衍生物。

[0121] 38. 根据实施方案35至37中任一项所述的缀合物, 其中, 所述化学间隔基 (Sp_1) 和 (Sp_2) 分别包含0至12个氨基酸残基。

[0122] 39. 根据实施方案35至38中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头包含至多25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6个氨基酸残基。

[0123] 40. 根据实施方案35至39中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头的净电荷为中性的或正的。

[0124] 41. 根据实施方案35至40中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头不包含带负电荷的氨基酸残基。

[0125] 42. 根据实施方案35至41中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头包含至少一个带

正电荷的氨基酸残基。

[0126] 43. 根据实施方案35至42中任一项所述的缀合物, 其中, 所述接头包含第二连接部分或有效载荷 B_2 , 特别是其中, B_2 通过所述化学间隔基(Sp_2)连接至所述接头。

[0127] 44. 根据实施方案43所述的缀合物, 其中, B_1 和 B_2 彼此相同或不同。

[0128] 45. 根据实施方案35至42或43至44中任一项所述的缀合物, 其中, B_1 和/或 B_2 为连接部分。

[0129] 46. 根据实施方案45所述的缀合物, 其中, 所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的至少一个包含

[0130] • 生物正交标志物基团, 或

[0131] • 用于交联的非生物正交实体。

[0132] 47. 根据实施方案46所述的缀合物, 其中, 所述生物正交标志物基团或所述非生物正交实体由至少一种分子或部分组成或包含至少一种分子或部分, 所述分子或部分选自自由以下组成的组:

[0133] • $-N-N\equiv N$, 或 $-N_3$;

[0134] • Lys(N_3);

[0135] • 四嗪;

[0136] • 炔烃;

[0137] • 应变环辛炔;

[0138] • BCN;

[0139] • 应变烯烃;

[0140] • 光反应性基团;

[0141] • $-RCOH$ (醛);

[0142] • 酰基三氟硼酸酯;

[0143] • 蛋白质降解剂('PROTAC');

[0144] • 环戊二烯/螺环戊二烯;

[0145] • 硫代选择性亲电体;

[0146] • $-SH$; 以及

[0147] • 半胱氨酸。

[0148] 48. 根据实施方案45至47中任一项所述的缀合物, 其中, 所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的至少一个连接至一个或多个有效载荷。

[0149] 49. 根据实施方案48所述的缀合物, 其中, 所述一个或多个有效载荷通过点击反应连接至所述连接部分 B_1 和/或 B_2 。

[0150] 50. 根据实施方案36至42或43至44中任一项所述的缀合物, 其中, B_1 和/或 B_2 为有效载荷。

[0151] 51. 根据实施方案48至50中任一项所述的缀合物, 其中, 所述一个或多个有效载荷包含以下中的至少一种:

[0152] • 毒素;

[0153] • 细胞因子;

[0154] • 生长因子;

[0155] • 放射性核素;

- [0156] • 激素;
- [0157] • 抗病毒剂;
- [0158] • 抗菌剂;
- [0159] • 荧光染料;
- [0160] • 免疫调节剂/免疫刺激剂;
- [0161] • 半衰期增加部分;
- [0162] • 溶解性增加部分;
- [0163] • 聚合物-毒素缀合物;
- [0164] • 核酸;
- [0165] • 生物素或链霉亲和素部分;
- [0166] • 维生素;
- [0167] • 蛋白质降解剂('PROTAC');
- [0168] • 靶结合部分;和/或
- [0169] • 抗炎剂。
- [0170] 52. 根据实施方案51所述的缀合物,其中,所述毒素为选自以下组成的组中的至少一种
 - [0171] • 吡咯并苯并二氮杂草(PBD);
 - [0172] • 澳瑞他汀(例如,MMAE,MMAF);
 - [0173] • 美登素类(美登素,DM1,DM4,DM21);
 - [0174] • 倍癌霉素;
 - [0175] • 烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)抑制剂;
 - [0176] • 微管溶素;
 - [0177] • 烯二炔类(例如,卡利奇霉素);
 - [0178] • PNU,多柔比星;
 - [0179] • 基于吡咯的驱动蛋白纺锤体蛋白(KSP)抑制剂;
 - [0180] • 念珠藻素;
 - [0181] • 药物外排泵抑制剂;
 - [0182] • 山卓霉素;
 - [0183] • 鹅膏蕈碱(例如, α -鹅膏蕈碱);以及
 - [0184] • 喜树碱(例如,依喜替康,德鲁替康)。
- [0185] 53. 根据实施方案48至52中任一项所述的缀合物,其中,所述一个或多个有效载荷还包含可切割部分或自裂解部分。
- [0186] 54. 根据实施方案53所述的缀合物,其中,所述可切割部分或所述自裂解部分包含基序缬氨酸-瓜氨酸(VC)和/或对氨基苄基氨甲酰基(PABC)部分。
- [0187] 55. 根据实施方案36至54中任一项所述的抗体-接头缀合物,其中,所述抗体为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY抗体或其片段或重组变体,其中,所述其片段或重组变体保留了靶结合性质并且包含CH₂结构域。
- [0188] 56. 根据实施方案55所述的抗体-接头缀合物,其中,所述抗体为IgG抗体。
- [0189] 57. 根据实施方案55或56所述的抗体-接头缀合物,其中,所述抗体为糖基化的抗

体、去糖基化的抗体或非糖基化的抗体。

[0190] 58. 根据实施方案57所述的抗体-接头缀合物, 其中, 所述糖基化的抗体为在CH₂结构域的残基N297 (EU编号) 处糖基化的IgG抗体。

[0191] 59. 根据实施方案36至58中任一项所述的抗体-接头缀合物, 其中, 与所述接头缀合的Gln残基包含在所述抗体的Fc结构域中, 或已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链中。

[0192] 60. 根据实施方案59所述的抗体-接头缀合物, 其中, 所述抗体的所述Fc结构域中包含的所述Gln残基为IgG抗体的CH₂结构域的Gln残基Q295 (EU编号)。

[0193] 61. 根据实施方案59所述的抗体-接头缀合物, 其中, 已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链中的所述Gln残基为非糖基化的IgG抗体的CH₂结构域的N297Q (EU编号)。

[0194] 62. 根据实施方案59所述的抗体-接头缀合物, 其中, 已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链中的所述Gln残基包含在肽中, 所述肽已经 (a) 并入至所述抗体的所述重链或轻链中或 (b) 融合至所述抗体的所述重链或轻链的N端或C端。

[0195] 63. 根据实施方案62所述的抗体-接头缀合物, 其中, 包含所述Gln残基的所述肽已经融合至所述抗体的所述重链的所述C端。

[0196] 64. 一种药物组合物, 包含根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物, 特别是其中, 所述抗体-接头缀合物包含至少一种有效载荷。

[0197] 65. 根据实施方案64所述的药物组合物, 包含至少一种另外的药学上可接受的成分。

[0198] 66. 根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据实施方案64或65所述的药物组合物, 用于治疗和/或诊断。

[0199] 67. 根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据实施方案64或65所述的药物组合物, 用于治疗患者, 所述患者

[0200] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[0201] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中, 和/或

[0202] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[0203] 68. 根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据实施方案64或65所述的药物组合物, 用于治疗患有肿瘤性疾病的患者。

[0204] 69. 根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据实施方案64或65所述的药物组合物, 用于手术前、手术中或手术后成像。

[0205] 70. 根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据实施方案64或65所述的药物组合物, 用于手术中成像引导的癌症手术。

[0206] 71. 根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据实施方案64或65所述的药物组合物在制备用于治疗患者的药物中的用途, 所述患者

[0207] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[0208] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的

的风险中,和/或

[0209] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[0210] 72.一种治疗或预防肿瘤性疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据实施方案36至63中任一项所述的抗体-接头缀合物或根据实施方案64或65所述的药物组合物。

[0211] 在详细描述本发明之前,应当理解,本发明不限于所述方法的特定组分或工艺步骤,因为这些装置和方法可以改变。还应当理解,本文使用的术语仅仅是为了描述特定的实施方案,而并非旨在限制。必须注意的是,如说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一种(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括单数和/或复数指代物,除非上下文另有明确说明。此外,应当理解,在给定由数值限定的参数范围的情况下,该范围被认为包括这些限制值。

[0212] 还应当理解的是,本文公开的实施方案不意味着被理解为彼此不相关的单个实施方案。结合一个实施方案讨论的特征意味着也结合本文示出的其它实施方案进行公开。在一种情况下,如果一个具体特征没有结合一个实施方案公开,而是结合另一个实施方案公开,则本领域技术人员会理解,这并不一定意味着该特征不打算结合其它实施方案公开。本领域技术人员会理解,本申请的主旨是也为另一个实施方案公开该特征,但是仅仅为了清楚的目的并且以将说明书保持在可管理的量中,而这尚未完成。

[0213] 此外,本文提及的文献的内容通过引用结合于此。特别地,这是指公开标准或常规方法的文献。在这种情况下,通过引用并入的目的主要是提供足够的公开内容,并避免冗长的重复。

[0214] 在特定实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成蛋白质-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N→C方向显示)缀合至蛋白质中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0215] $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$

[0216] 其中

[0217] • Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;

[0218] • (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;

[0219] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在;并且

[0220] • B_1 为连接部分或有效载荷。

[0221] 换言之,本发明的方法基于令人惊讶的发现:微生物谷氨酰胺转氨酶可以用于通过基于氨基酸的接头的N端氨基酸中的伯胺有效地将基于氨基酸的接头缀合至蛋白质的谷氨酰胺残基。在本领域中已经广泛接受的是,只有通过肽的赖氨酸部分的 ϵ -氨基,肽与蛋白质的谷氨酰胺残基的MTG介导的有效缀合才是可能的(WO 2019/057772)。然而,发明人在此意外地发现,也可以通过基于氨基酸的接头的N端氨基酸残基中包含的其它伯胺来实现基于氨基酸的接头与蛋白质的有效缀合。

[0222] 发明人已经表明,所请求保护的方法适合于非常成本有效且快速地生成位点特异性抗体-接头缀合物(例如,24-48小时),并且因此允许生成这类分子的大型文库,并且随后在高通量筛选系统中对其进行筛选。

[0223] 在本发明中,蛋白质可以是包含谷氨酰胺残基的任何蛋白质,该谷氨酰胺残基可以易于通过微生物谷氨酰胺转氨酶进行缀合。此外,包含一个或多个谷氨酰胺残基的蛋白质标签是本领域中已知的并在本文中公开(SEQ ID NO:5-38),该谷氨酰胺残基易于通过微生物谷氨酰胺转氨酶进行缀合。因此,本发明的方法的靶蛋白质可以是融合蛋白,其包含与含有谷氨酰胺的标签(如SEQ ID NO:5-38中所示的标签)融合的蛋白质。

[0224] 在某些实施方案中,该蛋白质可以是治疗性蛋白质。本文所使用的术语“治疗性蛋白质”是指那些已经证明生物活性并且可以通过可接受的施用途径递送至有需要的患者而用于治疗疾病或障碍的蛋白质。治疗性蛋白质的生物活性可以在体外或体内证明,并且是由蛋白质与受体和/或导致生物学效应的其它细胞内或细胞外组分的相互作用产生的。治疗性蛋白质的示例包括但不限于以下分子,例如,肾素,一种生长激素,包括人类生长激素;牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白;1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;血小板生成素;促卵泡激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子,如因子VIII、因子IX、组织因子和血管性血友病因子(von Willebrands factor);抗凝血因子,如蛋白质C;心房利钠因子(atrial natriuretic factor);肺表面活性剂;纤溶酶原激活剂,如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA);蛙皮素;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α ;肿瘤坏死因子- β ;脑啡肽酶;血清白蛋白,如人血清白蛋白;苗勒氏管抑制物质;松弛素A链;松弛素B链;前松弛素(prorelaxin);小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,如 β -内酰胺酶;脱氧核糖核酸酶(DNase);抑制素;激活素;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF);激素或生长因子的受体;整合素;蛋白质A或D;类风湿因子;神经营养因子,如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF),神经营养因子-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6),或神经生长因子,如NGF- β ;心肌营养素(心脏肥大因子),如心肌营养素-1(CT-1);血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF);成纤维细胞生长因子,如aFGF和bFGF;表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF);转化生长因子(transforming growth factor,TGF),如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF-p2、TGF-p3、TGF-p4或TGF-5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I),胰岛素样生长因子结合蛋白质;CD蛋白,如CD-3、CD-4、CD-8和CD-19;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP);干扰素,如干扰素- α 、干扰素- β 和干扰素- γ ;集落刺激因子(colony stimulating factor,CSF),例如,M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白细胞介素(IL),例如,IL-1至IL-3;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,例如,AIDS(艾滋病包膜)(envelope)的一部分;转运蛋白;归巢受体;地址素(addressin)以及调节蛋白。

[0225] 在某些实施方案中,所述蛋白质可以是可缀合至疫苗的载体蛋白,如载体蛋白CRM197。

[0226] 优选地,本发明的蛋白质可以是抗原结合蛋白,其可以用于将接头中包含的有效载荷递送至靶细胞或组织。在某些实施方案中,抗原结合蛋白可以是设计的锚蛋白重复蛋白(ankyrin repeat protein,DARPIN)或另一种抗体模拟物,如亲和体分子、affilin、affimer、affitin、 α 体、抗运载蛋白(anticalin)、亲和多聚体(avimer)、fynomer、kunitzdomain肽、单体(monobody)。

[0227] 最优选地,本发明的方法中使用的蛋白质是抗体。因此,在特定实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N→C方向显示)缀合至抗体的重链或轻链中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0228] $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$

[0229] 其中

[0230] • Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;

[0231] • (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;

[0232] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在;并且

[0233] • B_1 为连接部分或有效载荷。

[0234] 换言之,本发明的方法基于令人惊讶的发现:微生物谷氨酰胺转氨酶可以用于通过基于氨基酸的接头的N端氨基酸中的伯胺有效地将基于氨基酸的接头缀合至抗体的谷氨酰胺残基。在本领域中已经广泛接受的是,只有通过肽的赖氨酸部分的 ϵ -氨基,肽与抗体的谷氨酰胺残基的MTG介导的有效缀合才是可能的(WO 2019/057772)。然而,发明人在此意外地发现,也可以通过基于氨基酸的接头的N端氨基酸残基中包含的其它伯胺来实现基于氨基酸的接头与抗体的有效缀合。

[0235] 发明人已经表明,所请求保护的方法适合于非常成本有效且快速地生成位点特异性抗体-接头缀合物(例如,24-48小时),并且因此允许生成这类分子的大型文库,并且随后在高通量筛选系统中对其进行筛选。

[0236] 与之形成对比的是,Cys工程化方法则需要至少约3-4周,在该方法中产生抗体-有效载荷缀合物,其中有效载荷通过基因(分子)工程化的Cys残基缀合至抗体。

[0237] 一般而言,该方法允许大量有效载荷与抗体缀合。对于每种有效载荷,可以从大型接头池中鉴定合适的基于氨基酸的接头结构,以提供最佳的临床和非临床特征。这在接头结构固定的其它方法中是不可能的。此外,根据本发明的方法允许生成包含两种或更多种不同有效载荷的抗体-有效载荷缀合物,其中,每种有效载荷以位点特异性的方式缀合至抗体。因此,根据本发明的方法可以用于生成具有新的和/或更好的治疗或诊断能力的抗体。

[0238] 本发明的方法中使用的基于氨基酸的接头具有结构 $Aax-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)$ 。应当理解,接头通过包含在接头的N端氨基酸残基Aax中的伯胺缀合至抗体的谷氨酰胺残基。

[0239] Aax可以是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。应当理解,术语氨基酸不仅包括 α -氨基酸,还包括其它氨基酸,如 β -、 γ -或 δ -氨基酸等。在Aax为手性 α -氨基酸的实施方案中,Aax可以以其L-形式或D-形式存在。在Aax为手性 β -、 γ -或 δ -氨基酸的实施方案中,Aax可以以其S-形式或R-形式存在。因此,在其最广泛的意义上,如本文所使用的术语“氨基酸”可以指含有氨基($-NH_2$)和羧基($-COOH$)的任何有机化合物。因此,在本公开全文中,每当残基Aax被称为氨基酸残基时,应当理解术语氨基酸残基也可以包括氨基酸模拟物或衍生物。

[0240] 另外,应当理解,术语氨基酸不限于已知的蛋白源性氨基酸的组,即丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸,而且还包括非标准(non-canonical)氨基酸和非天然氨基酸。如本文所使用的“非标准氨基酸”可以

是并非蛋白源性氨基酸组的一部分的任何氨基酸,而是可以从天然来源获得。然而,必须注意,在天然存在的肽和/或蛋白质中也可以发现一些非标准氨基酸。

[0241] 如本文所使用的“非天然氨基酸”或“合成氨基酸”可以是属于氨基酸的一般定义的任何分子,即,其包含氨基和羧基,但未在自然界中被发现。因此,非天然氨基酸优选通过化学合成获得。应当理解,在某些情况下,非标准氨基酸与非天然氨基酸之间的区别可以是不确定的。例如,被定义为非天然氨基酸的氨基酸可能在随后的时间点在自然界中被识别,并因此被重新分类为非标准氨基酸。

[0242] 在某些实施方案中,残基Aax可以是氨基酸模拟物。如本文所使用的术语“氨基酸模拟物”是指一种化合物,其具有不同于特定氨基酸的结构,但以类似于该特定氨基酸的方式起作用,并因此可用于替换该特定氨基酸。如果氨基酸模拟物至少在某种程度上实现了与其模拟的氨基酸相似的结构特征和/或功能特征,则称其以类似于特定氨基酸的方式起作用。

[0243] 在某些实施方案中,残基Aax可以是氨基酸衍生物。如本文所使用的术语“氨基酸衍生物”是指一种氨基酸,其中,氨基酸中包含的一个或多个官能团被修饰或取代。氨基酸衍生物可以优选是蛋白源性氨基酸或非标准氨基酸的衍生物。在氨基酸衍生物中,任何官能团都可以被取代或修饰。然而,优选地,本发明的氨基酸衍生物包含允许结合至化学间隔基(Sp_1)或有效载荷 B_1 的游离羧基和允许缀合至抗体的谷氨酰胺残基的游离伯胺,优选氨基。

[0244] 基于氨基酸的接头可以通过接头的N端氨基酸残基Aax中包含的任何伯胺缀合至抗体的谷氨酰胺残基。然而,优选地,基于氨基酸的接头通过包含在接头的N端氨基酸残基Aax中的N端氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。换言之,在Aax位置的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物是 α -氨基酸的实施方案中,基于氨基酸的接头可以通过Aax的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。在Aax位置的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物是 β -氨基酸的实施方案中,基于氨基酸的接头可以通过Aax的 β -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。在Aax位置的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物是 γ -氨基酸的实施方案中,基于氨基酸的接头可以通过Aax的 γ -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。在Aax位置的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物是 δ -氨基酸的实施方案中,基于氨基酸的接头可以通过Aax的 δ -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。

[0245] 因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,N端残基Aax中的伯胺是N端残基Aax的N端氨基。

[0246] 因此,优选地,Aax的N端未被保护、修饰或取代。

[0247] 然而,在某些实施方案中,接头通过其缀合至抗体的谷氨酰胺残基的伯胺可以是除了N端残基Aax的N端氨基以外的伯胺。例如,在某些实施方案中,Aax可以是氨基酸衍生物,其中,N端氨基被修饰或取代,并因此不能作为MTG的底物。在此类实施方案中,Aax可以包含额外的伯胺,通过该伯胺,接头可以缀合至抗体的谷氨酰胺残基。在其它实施方案中,Aax可以是脯氨酸模拟物。脯氨酸不包含伯胺,并且因此不能通过MTG缀合至抗体中的谷氨酰胺残基。然而,在本发明的方法中可以使用脯氨酸模拟物,条件是该脯氨酸模拟物包含伯胺。

[0248] 如上所述,氨基酸残基Aax可以被广义地定义为包含氨基($-NH_2$)和羧基($-COOH$)的

分子。换言之,氨基酸残基Aax可以被定义为具有结构 $\text{NH}_2\text{-Y-COOH}$ 。

[0249] 在某些实施方案中,Y可以包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链。换言之,在特定实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N→C方向显示)缀合至抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0250] $\text{Aax}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$

[0251] 其中

[0252] • Aax为具有结构 $\text{NH}_2\text{-Y-COOH}$ 的氨基酸,其中,Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

[0253] • (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;

[0254] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在;并且

[0255] • B_1 为连接部分或有效载荷。

[0256] 如本文所使用的术语“烷基”是指1至20个碳原子(例如,2至20个碳原子、2至10个碳原子或2至6个碳原子)的支链或直链单价的饱和脂肪族烃基。如本文所使用的术语“杂烷基”是指如本文所定义的烷基,其中,一个或多个组成碳原子已被氮、氧或硫替换。(杂)烷基链可以是直链(杂)烷基链或支链(杂)烷基链。在某些实施方案中,该(杂)烷基链为直链(杂)烷基链。在某些实施方案中,直链杂烷基链可以是聚乙二醇(PEG)链。

[0257] 取代的烷基或杂烷基链是烷基或杂烷基,其中,一个或多个氢原子被另一个原子或原子的基团取代。例如,烷基或杂烷基链的氢原子可以被一个取代基取代,该取代基选自由以下组成的组:氰基、硝基、呋喃基、羟基、烷氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基羰基、烷氧羰基、烷基羰基氧基、单或二烷基氨基羰基、巯基、烷基-C(O)S-、胺、烷基胺、酰胺以及烷基酰胺。在某些实施方案中,(杂)烷基链被蛋白源性氨基酸的侧链取代。

[0258] Y可以具有任何大小。然而,优选地,Y具有2-200个原子的大小,优选2-100个原子,更优选2-40个原子。

[0259] 在某些实施方案中,Y为如上定义的取代的或未取代的烷基或杂烷基链。换言之,在特定实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N→C方向显示)缀合至抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0260] $\text{Aax}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$

[0261] 其中

[0262] • Aax为具有结构 $\text{NH}_2\text{-Y-COOH}$ 的氨基酸,其中,Y为取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

[0263] • (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;

[0264] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在;并且

[0265] • B_1 为连接部分或有效载荷。

[0266] 在某些实施方案中,Y可以是或可以包含结构 $-(\text{CH}_2)_n-$,其中,n为1至20的整数。在某些实施方案中,Y可以是或可以包含结构 $-(\text{CH}_2)_n-$,其中,n为1至10的整数。在某些实施方案中,Y可以是或可以包含结构 $-(\text{CH}_2)_n-$,其中,n为1至6的整数。在某些实施方案中,Y可以包含结构 $-(\text{CH}_2)_n-$,其中,n为2至20的整数。在某些实施方案中,Y可以包含结构 $-(\text{CH}_2)_n-$,其

中, n 为 2 至 10 的整数。在某些实施方案中, Y 可以包含结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 2 至 6 的整数。在某些实施方案中, Y 可以包含结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 3 至 20 的整数。在某些实施方案中, Y 可以包含结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 3 至 10 的整数。在某些实施方案中, Y 可以包含结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 3 至 6 的整数。

[0267] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 1 至 20 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 1 至 10 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 1 至 6 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 2 至 20 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 2 至 10 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 2 至 6 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 3 至 20 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 3 至 10 的整数。在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 3 至 6 的整数。

[0268] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 1。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是甘氨酸。

[0269] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 2。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 β -丙氨酸。

[0270] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 3。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 4-氨基丁酸。

[0271] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 4。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 5-氨基戊酸。

[0272] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 5。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 6-氨基己酸。

[0273] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 6。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 7-氨基庚酸。

[0274] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 7。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 8-氨基辛酸。

[0275] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 8。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 9-氨基壬酸。

[0276] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 9。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 10-氨基癸酸。

[0277] 在某些实施方案中, Y 可以具有结构 $-(CH_2)_n-$, 其中, n 为 10。换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以是 11-氨基十一烷酸。

[0278] 在某些实施方案中, Aax 可以具有结构 $NH_2-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-COOH$, 其中, Y 为取代的或未取代的烷基或杂烷基链, 并且其中, n 为 0-20、0-10 或 0-6 的整数。

[0279] 换言之, 在某些实施方案中, Aax 可以具有结构 $NH_2-(CH_2)_n-Y-COOH$, 其中, Y 为取代的或未取代的烷基或杂烷基链, 并且其中, n 为 1-20、1-10 或 1-6 的整数。在某些实施方案中, Aax 可以具有结构 $NH_2-Y-(CH_2)_n-COOH$, 其中, Y 为取代的或未取代的烷基或杂烷基链, 并且其中, n 为 1-20、1-10 或 1-6 的整数。在某些实施方案中, Aax 可以具有结构 $NH_2-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_n-COOH$, 其中, Y 为取代的或未取代的烷基或杂烷基链, 并且其中, n 为 1-20、1-10 或 1-6 的整数。

[0280] 在某些实施方案中, Aax 可以具有结构 $NH_2-(CH_2)_n-Y-COOH$, 其中, Y 为取代的或未取

$(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$, 其中, Y 为取代的或未取代的烷基或杂烷基链。

[0283] 在优选的实施方案中, 残基Aax包含至少一个亚甲基(CH_2)。更优选地, 至少一个亚甲基直接偶联至伯胺。换言之, Aax优选地包含结构 NH_2-CH_2- 。

[0284] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的方法, 其中, 所述残基Aax为一种氨基酸, 其选自由以下组成的组: 丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸或其氨基酸模拟物或衍生物。

[0285] 在本发明的一个实施方案中, 残基Aax可以是丙氨酸、丙氨酸模拟物或丙氨酸衍生物。在特定实施方案中, 残基Aax可以是丙氨酸。换言之, 在某些实施方案中, 本发明的接头可以通过丙氨酸、丙氨酸模拟物或丙氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。丙氨酸模拟物与丙氨酸的区别可以在于丙氨酸侧链的组成。换言之, 丙氨酸模拟物与丙氨酸的区别可以在于丙氨酸侧链的长度或组成。可替代地, 或者另外, 丙氨酸模拟物与丙氨酸的区别可以在于亚甲基本身。丙氨酸衍生物可以优选为丙氨酸或丙氨酸模拟物, 其中亚甲基被取代或修饰。因此, 在某些实施方案中, 接头可以具有结构 $\text{Ala}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$, 其中, Ala表示丙氨酸、丙氨酸模拟物或丙氨酸衍生物。在某些实施方案中, 丙氨酸衍生物可以是 β -取代的丙氨酸, 如 β -环丙基丙氨酸、苯基甘氨酸、 β -氰基丙氨酸、 β -(3-吡啶基)-丙氨酸、 β -(1, 2, 4-三唑-1-基)-丙氨酸或 β -(1-哌嗪基)-丙氨酸。在某些实施方案中, 丙氨酸模拟物可以是脱氢丙氨酸。

[0286] 在本发明的另一个实施方案中, 残基Aax可以是精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。在特定实施方案中, 残基Aax可以是精氨酸。换言之, 在某些实施方案中, 本发明的接头可以通过精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。精氨酸模拟物与精氨酸的区别可以在于连接胍基和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地, 或者另外, 精氨酸模拟物与精氨酸的区别可以在于胍基本身。换言之, 精氨酸模拟物可以包含具有与胍基类似的物理化学性质的官能团。精氨酸衍生物可以优选为精氨酸或精氨酸模拟物, 其中胍基被取代或修饰。因此, 在某些实施方案中, 接头可以具有结构 $\text{Arg}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$, 其中, Arg表示精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。在某些实施方案中, 精氨酸模拟物可以是高精氨酸或 β -脲基丙氨酸。在某些实施方案中, 精氨酸衍生物可以是 ω -甲基精氨酸。

[0287] 在本发明的另一个实施方案中, 残基Aax可以是天冬酰胺、天冬酰胺模拟物或天冬酰胺衍生物。在特定实施方案中, 残基Aax可以是天冬酰胺。换言之, 在某些实施方案中, 本发明的接头可以通过天冬酰胺、天冬酰胺模拟物或天冬酰胺衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。天冬酰胺模拟物与天冬酰胺的区别可以在于连接甲酰胺基(carboxamide group)和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地, 或者另外, 天冬酰胺模拟物与天冬酰胺的区别可以在于甲酰胺基本身。换言之, 天冬酰胺模拟物可以包含具有与甲酰胺基类似的物理化学性质的官能团。天冬酰胺衍生物可以优选为天冬酰胺或天冬酰胺模拟物, 其中甲酰胺基被取代或修饰。因此, 在某些实施方案中, 接头可以具有结构 $\text{Asn}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$, 其中, Asn表示天冬酰胺、天冬酰胺模拟物或天冬酰胺衍生物。在某些实施方案中, 天冬酰胺模拟物可以是L-苏型-3-羟基天冬酰胺、L-2-氨基-2-羧乙磺酰胺或5-重氮-4-氧代-L-正缬氨酸。在某些实施方案中, 天冬酰胺衍生物可以是N,N-二甲基-L-天冬酰胺。

[0288] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是天冬氨酸、天冬氨酸模拟物或天冬氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是天冬氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过天冬氨酸、天冬氨酸模拟物或天冬氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。天冬氨酸模拟物与天冬氨酸的区别可以在于连接侧链中羧酸基和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,天冬氨酸模拟物与天冬氨酸的区别可以在于羧酸基本身。换言之,天冬氨酸模拟物可以包含具有与羧酸基类似的物理化学性质的官能团。天冬氨酸衍生物可以优选为天冬氨酸或天冬氨酸模拟物,其中羧酸基被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构 $\text{Asp}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$,其中,Asp表示天冬氨酸、天冬氨酸模拟物或天冬氨酸衍生物。在某些实施方案中,天冬氨酸模拟物可以是 α -氨基己二酸、DL-苏型- β -羟基天冬氨酸或L-2-氨基庚二酸。在某些实施方案中,天冬氨酸衍生物可以是L-天冬氨酸- β -甲酯。

[0289] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是半胱氨酸、半胱氨酸模拟物或半胱氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是半胱氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过半胱氨酸、半胱氨酸模拟物或半胱氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。半胱氨酸模拟物与半胱氨酸的区别可以在于连接侧链中巯基和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,半胱氨酸模拟物与半胱氨酸的区别可以在于巯基本身。换言之,半胱氨酸模拟物可以包含具有与巯基类似的物理化学性质的官能团。半胱氨酸衍生物可以优选为半胱氨酸或半胱氨酸模拟物,其中巯基被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构 $\text{Cys}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$,其中,Cys表示半胱氨酸、半胱氨酸模拟物或半胱氨酸衍生物。在某些实施方案中,半胱氨酸模拟物可以是高半胱氨酸、青霉胺或硒代半胱氨酸。在某些实施方案中,半胱氨酸衍生物可以是丁硫氨酸-亚砷亚胺(buthionine-sulfoximine)。

[0290] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是谷氨酸、谷氨酸模拟物或谷氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是谷氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过谷氨酸、谷氨酸模拟物或谷氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。谷氨酸模拟物与谷氨酸的区别可以在于连接侧链中羧酸基和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,谷氨酸模拟物与谷氨酸的区别可以在于羧酸基本身。换言之,谷氨酸模拟物可以包含具有与羧酸基类似的物理化学性质的官能团。谷氨酸衍生物可以优选为谷氨酸或谷氨酸模拟物,其中羧酸基被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构 $\text{Glu}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$,其中,Glu表示谷氨酸、谷氨酸模拟物或谷氨酸衍生物。在某些实施方案中,谷氨酸模拟物可以是 α -氨基己二酸、 γ -亚甲基谷氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 γ -羟基谷氨酸或2-氨基庚二酸。在某些实施方案中,谷氨酸衍生物可以是谷氨酸-5-甲酯。

[0291] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是谷氨酰胺、谷氨酰胺模拟物或谷氨酰胺衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是谷氨酰胺。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过谷氨酰胺、谷氨酰胺模拟物或谷氨酰胺衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。谷氨酰胺模拟物与谷氨酰胺的区别可以在于连接甲酰胺(carboxamide)基团和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,谷氨酰胺模拟物与谷氨酰胺的区别可以在于甲酰胺基团本身。换言之,谷氨酰胺模拟物可以包含具有与甲酰胺基团类似的物理化学性质的官能团。谷氨酰胺衍生物可以优选为谷氨酰胺或谷氨酰胺模拟物,其

中甲酰胺基被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Gln- (Sp₁) -B₁- (Sp₂),其中,Gln表示谷氨酰胺、谷氨酰胺模拟物或谷氨酰胺衍生物。在某些实施方案中,谷氨酰胺模拟物可以是4-F- (2S,4R)-氟谷氨酰胺。在某些实施方案中,谷氨酰胺衍生物可以是γ-谷氨酰基甲基酰胺、茶氨酸、L-谷氨酸-γ-单羟基己酸酯(monohydroxamate)。

[0292] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是甘氨酸、甘氨酸模拟物或甘氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是甘氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过甘氨酸、甘氨酸模拟物或甘氨酸衍生物的α-氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Gly- (Sp₁) -B₁- (Sp₂),其中,Gly表示甘氨酸、甘氨酸模拟物或甘氨酸衍生物。

[0293] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是组氨酸、组氨酸模拟物或组氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是组氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过组氨酸、组氨酸模拟物或组氨酸衍生物的α-氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。组氨酸模拟物与组氨酸的区别可以在于连接咪唑环和α-碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,组氨酸模拟物与组氨酸的区别可以在于咪唑环本身。换言之,组氨酸模拟物可以包含具有与咪唑环类似的物理化学性质的可替代的环结构。组氨酸衍生物可以优选为组氨酸或组氨酸模拟物,其中咪唑环被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构His- (Sp₁) -B₁- (Sp₂),其中,His表示组氨酸、组氨酸模拟物或组氨酸衍生物。在某些实施方案中,组氨酸衍生物可以在咪唑环上被取代。例如,组氨酸衍生物可以是2,5-二碘组氨酸或1-甲基组氨酸。

[0294] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是异亮氨酸、异亮氨酸模拟物或异亮氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是异亮氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过异亮氨酸、异亮氨酸模拟物或异亮氨酸衍生物的α-氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。异亮氨酸模拟物与异亮氨酸的区别可以在于异亮氨酸侧链的组成。换言之,异亮氨酸模拟物可以包含具有不同化学组成但具有与异亮氨酸侧链类似的物理化学性质的侧链。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Ile- (Sp₁) -B₁- (Sp₂),其中,Ile表示异亮氨酸、异亮氨酸模拟物或异亮氨酸衍生物。在某些实施方案中,异亮氨酸模拟物可以是别异亮氨酸或(4S)-4-羟基-L-异亮氨酸。

[0295] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是亮氨酸、亮氨酸模拟物或亮氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是亮氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过亮氨酸、亮氨酸模拟物或亮氨酸衍生物的α-氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。亮氨酸模拟物与亮氨酸的区别可以在于亮氨酸侧链的组成。换言之,亮氨酸模拟物可以包含具有不同化学组成但具有与亮氨酸侧链类似的物理化学性质的侧链。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Leu- (Sp₁) -B₁- (Sp₂),其中,Leu表示亮氨酸、亮氨酸模拟物或亮氨酸衍生物。在某些实施方案中,亮氨酸模拟物可以是正亮氨酸或4,5-脱氢亮氨酸。

[0296] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是赖氨酸、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物。应当理解的是,赖氨酸包含两个伯胺,即包含在α-氨基中的伯胺和包含在赖氨酸侧链中的伯胺。因为,本领域已经报道了肽通过包含在赖氨酸侧链中的伯胺与抗体的谷氨酰胺残基缀合,所以,在某些实施方案中,赖氨酸可以不作为残基Aax。然而,应当理解的是,残基Aax可以是赖氨酸模拟物。具体地,赖氨酸模拟物可以在其侧链中包含与ε-氨基具有类似的

物理化学性质但是不能被MTG识别为底物的官能团。在此类实施方案中,赖氨酸模拟物将通过其N端氨基独占地缀合至谷氨酰胺残基。可替代地,Aax位置的氨基酸可以是赖氨酸衍生物。在此类实施方案中,赖氨酸衍生物可以优选为赖氨酸或赖氨酸模拟物,其中 ϵ -氨基被取代或修饰,使得它不能被MTG识别为底物。另外,在此类实施方案中,赖氨酸衍生物将通过其N端氨基独占地缀合至谷氨酰胺残基。因此,在本发明的某些实施方案中,残基Aax可以是赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,其中,赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物在其氨基酸侧链中不包含伯胺。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Lys-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Lys表示赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,优选地其中,赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物在其氨基酸侧链中不包含伯胺。在某些实施方案中,赖氨酸衍生物可以是(3-(3-甲基-3H-双吡丙啶-3-基)丙氨基)羰基-L-赖氨酸、N ϵ ,N ϵ ,N ϵ -三甲基赖氨酸、瓜氨酸,或瓜氨酸的模拟物或衍生物,如硫代瓜氨酸或高瓜氨酸。

[0297] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是甲硫氨酸、甲硫氨酸模拟物或甲硫氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是甲硫氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过甲硫氨酸、甲硫氨酸模拟物或甲硫氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。甲硫氨酸模拟物与甲硫氨酸的区别可以在于连接硫醚基团和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,甲硫氨酸模拟物与甲硫氨酸的区别可以在于硫醚基团本身。换言之,甲硫氨酸模拟物可以包含具有与硫醚基团类似的物理化学性质的官能团。甲硫氨酸衍生物可以优选为甲硫氨酸或甲硫氨酸模拟物,其中硫醚基被修饰,或与甲硫氨酸的情况相比不同地取代。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Met-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Met表示甲硫氨酸、甲硫氨酸模拟物或甲硫氨酸衍生物。在某些实施方案中,甲硫氨酸模拟物可以是S-甲基甲硫氨酸、L-甲硫氨酸砜、L-甲硫氨酸亚砜、L-甲硫氨酸亚砜亚胺或硒代甲硫氨酸。

[0298] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是苯丙氨酸、苯丙氨酸模拟物或苯丙氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是苯丙氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过苯丙氨酸、苯丙氨酸模拟物或苯丙氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。苯丙氨酸模拟物与苯丙氨酸的区别可以在于连接苯环和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,苯丙氨酸模拟物与苯丙氨酸的区别可以在于苯环本身。换言之,苯丙氨酸模拟物可以包含具有与苯环类似的物理化学性质的可替代的环结构。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Phe-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Phe表示苯丙氨酸、苯丙氨酸模拟物或苯丙氨酸衍生物。在某些实施方案中,苯丙氨酸衍生物可以在苯环上被取代。例如,苯丙氨酸衍生物可以是4-碘苯丙氨酸、五氟-苯丙氨酸、萘基-丙氨酸或4-氨基苯丙氨酸。

[0299] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是脯氨酸、脯氨酸模拟物或脯氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是脯氨酸。应当理解的是,脯氨酸由于其缺乏伯胺而不能作为MTG的底物。因此,在某些实施方案中,脯氨酸可以不作为残基Aax。然而,Aax位置的氨基酸可以是脯氨酸模拟物,优选地其中,脯氨酸模拟物包含伯胺。例如,脯氨酸模拟物可以在其吡咯烷环中包含一个或多个包含伯胺的取代基。因此,在本发明的某些实施方案中,残基Aax可以是脯氨酸模拟物,特别是其中,脯氨酸模拟物包含伯胺。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Pro-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Pro表示脯氨酸模拟物,特别是其中,

脯氨酸模拟物包含伯胺。在某些实施方案中,脯氨酸模拟物可以是反式-4-氨基-L-脯氨酸。

[0300] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是丝氨酸、丝氨酸模拟物或丝氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是丝氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过丝氨酸、丝氨酸模拟物或丝氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。丝氨酸模拟物与丝氨酸的区别可以在于连接侧链中的羟基和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,丝氨酸模拟物与丝氨酸的区别可以在于羟基本身。换言之,丝氨酸模拟物可以包含具有与羟基类似的物理化学性质的官能团。丝氨酸衍生物可以优选为丝氨酸或丝氨酸模拟物,其中羟基被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Ser-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Ser表示丝氨酸、丝氨酸模拟物或丝氨酸衍生物。在某些实施方案中,丝氨酸模拟物可以是高丝氨酸、 β -(2-噻吩基)-丝氨酸或 β -(3,4-二羟基苯基)-丝氨酸。在某些实施方案中,丝氨酸衍生物可以是O-磷酸丝氨酸。

[0301] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是苏氨酸、苏氨酸模拟物或苏氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是苏氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过苏氨酸、苏氨酸模拟物或苏氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。苏氨酸模拟物与苏氨酸的区别可以在于连接侧链中的羟基和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,苏氨酸模拟物与苏氨酸的区别可以在于羟基本身。换言之,苏氨酸模拟物可以包含具有与羟基类似的物理化学性质的官能团。苏氨酸衍生物可以优选为苏氨酸或苏氨酸模拟物,其中羟基被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Thr-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Thr表示苏氨酸、苏氨酸模拟物或苏氨酸衍生物。在某些实施方案中,苏氨酸模拟物可以是别苏氨酸。在某些实施方案中,苏氨酸衍生物可以是O-磷酸苏氨酸。

[0302] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是色氨酸、色氨酸模拟物或色氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是色氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过色氨酸、色氨酸模拟物或色氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。色氨酸模拟物与色氨酸的区别可以在于连接吲哚环和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,色氨酸模拟物与色氨酸的区别可以在于吲哚环本身。换言之,色氨酸模拟物可以包含具有与吲哚环类似的物理化学性质的可替代的环结构。色氨酸衍生物可以优选为色氨酸或色氨酸模拟物,其中吲哚环被取代或修饰。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Trp-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Trp表示色氨酸、色氨酸模拟物或色氨酸衍生物。在某些实施方案中,色氨酸衍生物可以在吲哚环上被取代。例如,色氨酸衍生物可以是5-羟基色氨酸或1-甲基色氨酸。

[0303] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是酪氨酸、酪氨酸模拟物或酪氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是酪氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过酪氨酸、酪氨酸模拟物或酪氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。酪氨酸模拟物与酪氨酸的区别可以在于连接苯酚基团和 α -碳原子的脂肪族链的长度或组成。可替代地,或者另外,酪氨酸模拟物与酪氨酸的区别可以在于苯酚基团本身。换言之,酪氨酸模拟物可以包含具有与苯环类似的物理化学性质的可替代的环结构或具有与苯环的羟基类似的物理化学性质的官能团。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Tyr-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Tyr表示酪氨酸、酪氨酸模拟物或酪氨酸衍生物。在某些实施方案中,

酪氨酸衍生物可以在苯酚环上被取代。例如,酪氨酸衍生物可以是3-氨基酪氨酸、甲状腺原氨酸、3,5-二硝基酪氨酸、3-羟甲基酪氨酸或0-磷酸-L-酪氨酸。

[0304] 在本发明的另一个实施方案中,残基Aax可以是缬氨酸、缬氨酸模拟物或缬氨酸衍生物。在特定实施方案中,残基Aax可以是缬氨酸。换言之,在某些实施方案中,本发明的接头可以通过缬氨酸、缬氨酸模拟物或缬氨酸衍生物的 α -氨基缀合至抗体的谷氨酰胺残基。缬氨酸模拟物与缬氨酸的区别可以在于缬氨酸侧链的组成。换言之,缬氨酸模拟物可以包含具有不同化学组成但具有与缬氨酸侧链类似的物理化学性质的侧链。因此,在某些实施方案中,接头可以具有结构Val-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中,Val表示缬氨酸、缬氨酸模拟物或缬氨酸衍生物。在某些实施方案中,缬氨酸模拟物可以是正缬氨酸或4,5-脱氢亮氨酸或 γ -羟基缬氨酸。

[0305] 在某些实施方案中,残基Aax可以是包含环部分的氨基酸,如4-氨基哌啶-4-羧酸或1-氨基环戊烷羧酸。在某些实施方案中,残基Aax可以是包含生物正交部分的氨基酸,优选可以用于点击反应的生物正交部分,如炔丙基甘氨酸、 α -烯丙基甘氨酸、L-叠氮基-高丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对-2-氟乙酰基-L-苯丙氨酸或(S)-2-氨基-3-(4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)丙酸。

[0306] 在某些实施方案中,残基Aax可以是 α -甲基氨基酸,如 α -甲基组氨酸或 α -氨基异丁酸。

[0307] 在某些实施方案中,Aax可以是 β -氨基酸(如 β -丙氨酸、D-3-氨基异丁酸或L- β -高丙氨酸)或 γ -氨基酸(如 γ -氨基丁酸)或 δ -氨基酸(如5-氨基戊酸)或 ϵ -氨基酸(如6-氨基己酸)。

[0308] 此外,接头可以包含一个或两个化学间隔基(Sp₁)和/或(Sp₂)。如本文所使用的术语“化学间隔基”描述了共价连接至接头的两个化学残基并插入其间的化学部分,特别是,在残基Aax与连接部分或有效载荷B₁之间和/或在连接部分或有效载荷B₁与B₂之间,从而在各个残基之间形成桥状结构。

[0309] 本文中优选的是,化学间隔基(Sp₁)和(Sp₂)包含氨基酸残基或由氨基酸残基组成。更优选地,(Sp₁)和(Sp₂)中的每个可以包含0至12个氨基酸残基或由0至12个氨基酸残基组成。因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述化学间隔基(Sp₁)和(Sp₂)分别包含0至12个氨基酸残基。

[0310] 在某些实施方案中,(Sp₁)和/或(Sp₂)可以不存在。换言之,在某些实施方案中,接头可以具有结构Aax-(Sp₁)-B₁、Aax-B₁-(Sp₂)或Aax-B₂。

[0311] 化学间隔基(Sp₁)和(Sp₂)可以包含本文所定义的任何氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,包括但不限于 α -氨基酸、 β -氨基酸、 γ -氨基酸、 δ -氨基酸和 ϵ -氨基酸。在 α -氨基酸的情况下,化学间隔基可以包含任何天然存在的L-或D-氨基酸。在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)和/或(Sp₂)可以仅仅由 α -氨基酸组成,特别是 α -L-氨基酸。

[0312] 此外,化学间隔基(Sp₁)和/或(Sp₂)可以包含氨基酸衍生物和/或氨基酸模拟物。在(Sp₁)和/或(Sp₂)包含一种或多种氨基酸衍生物的实施方案中,优选地,氨基酸衍生物具有游离的氨基和羧基,使得它们可以经历肽或异肽键的形成。在(Sp₁)和/或(Sp₂)包含一种或多种氨基酸模拟物的实施方案中,氨基酸模拟物可以具有游离的氨基和羧基,使得它们可以经历肽或异肽键的形成。然而,在某些实施方案中,氨基酸模拟物或衍生物可以具有不阻

止肽键的形成的取代的氨基。此类氨基酸模拟物或衍生物的示例可以是N-甲基化氨基酸,如肌氨酸或N-Me-亮氨酸。此外,氨基酸模拟物或衍生物可以是包含衍生的氨基的氨基酸,如脯氨酸或其它环状氨基酸的模拟物或衍生物,如氮杂环丁烷-2-羧酸、哌啶酸或菠菜素(spinacine)。另外,氨基酸模拟物还可以包含替换标准氨基酸的氨基和/或羧基的其它官能团,其允许氨基酸模拟物与相邻的氨基酸、氨基酸衍生物和/或氨基酸模拟物形成可替代的键并形成肽模拟物(peptidomimetic)。

[0313] 此外,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含一种或多种非标准氨基酸。非标准氨基酸可以是标准氨基酸的氨基酸模拟物或衍生物,或者可以在结构上与任何标准氨基酸无关。非标准氨基酸可以是但不限于D-氨基酸(如D-丙氨酸、D-甲硫氨酸),高氨基酸(如高丝氨酸、高精氨酸、高半胱氨酸、 α -氨基己二酸),N-甲基化氨基酸(如肌氨酸、N-Me-亮氨酸), α -甲基氨基酸(如 α -甲基组氨酸、 α -氨基异丁酸), β -氨基酸(如 β -丙氨酸、D-3-氨基异丁酸、L- β -高丙氨酸), γ -氨基酸(如 γ -氨基丁酸),丙氨酸模拟物或衍生物(如 β -环丙基丙氨酸、苯基甘氨酸、脱氢丙氨酸、 β -氰基丙氨酸、 β -(3-吡啶基)-丙氨酸、 β -(1,2,4-三唑-1-基)-丙氨酸、 β -(1-哌嗪基)-丙氨酸),苯丙氨酸模拟物或衍生物(如4-碘苯丙氨酸、五氟-苯丙氨酸、萘基-丙氨酸、4-氨基苯丙氨酸),精氨酸模拟物或衍生物(如 β -脲基丙氨酸、 ω -甲基精氨酸),赖氨酸模拟物或衍生物(如(3-(3-甲基-3H-双吡丙啶-3-基)丙氨基)羧基-L-赖氨酸、 $N\epsilon$, $N\epsilon$, $N\epsilon$ -三甲基赖氨酸),组氨酸模拟物或衍生物(如2,5-二碘组氨酸、1-甲基组氨酸),酪氨酸模拟物或衍生物(如3-氨基酪氨酸、甲状腺原氨酸、3,5-二硝基酪氨酸、3-羟甲基酪氨酸、O-磷酸-L-酪氨酸),色氨酸模拟物或衍生物(如5-羟基色氨酸、1-甲基色氨酸),丝氨酸模拟物或衍生物(如 β -(2-噻吩基)-丝氨酸、 β -(3,4-二羟基苯基)-丝氨酸、O-磷酸丝氨酸),苏氨酸模拟物或衍生物(如别苏氨酸、O-磷酸苏氨酸),脯氨酸模拟物或衍生物(如羟基脯氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、焦谷氨酸、硫代脯氨酸(Thiaproline)、顺式-八氢吡啶-2-羧酸),亮氨酸和异亮氨酸模拟物或衍生物(如别异亮氨酸、正亮氨酸、4,5-脱氢亮氨酸、(4S)-4-羟基-L-异亮氨酸),缬氨酸模拟物或衍生物(如正缬氨酸、 γ -羟基缬氨酸),瓜氨酸模拟物或衍生物(如硫代瓜氨酸、高瓜氨酸),半胱氨酸模拟物或衍生物(如青霉胺、硒代半胱氨酸、丁硫氨酸-亚砷亚胺),甲硫氨酸模拟物或衍生物(如S-甲基甲硫氨酸、L-甲硫氨酸砷、L-甲硫氨酸亚砷、L-甲硫氨酸亚砷亚胺、硒代甲硫氨酸),天冬氨酸模拟物或衍生物(如DL-苏型- β -羟基天冬氨酸、L-天冬氨酸- β -甲酯),谷氨酸模拟物或衍生物(如 γ -亚甲基谷氨酸、 γ -羧基谷氨酸、 γ -羟基谷氨酸、L-谷氨酸-5-甲酯、L-2-氨基庚二酸),天冬酰胺模拟物或衍生物(如L-苏型-3-羟基天冬酰胺、N,N-二甲基-L-天冬酰胺、L-2-氨基-2-羧乙磺酰胺、5-重氮-4-氧代-L-正缬氨酸),谷氨酰胺模拟物或衍生物(如4-F-(2S,4R)-氟谷氨酰胺、 γ -谷氨酰基甲基酰胺、茶氨酸、L-谷氨酸- γ -单羟基己酸酯),包含环部分的氨基酸(如4-氨基哌啶-4-羧酸、氮杂环丁烷-2-羧酸、哌啶酸、1-氨基环戊烷羧酸、菠菜素)或包含生物正交部分的氨基酸(如炔丙基甘氨酸、 α -烯丙基甘氨酸、L-叠氮基-高丙氨酸、对苯甲酰基-L-苯丙氨酸、对-2-氟乙酰基-L-苯丙氨酸、(S)-2-氨基-3-(4-(6-甲基-1,2,4,5-四嗪-3-基)苯基)丙氨酸)。

[0314] 除了上述的 α -氨基酸之外,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)也可以包含一种或多种 β -、 γ -、 δ -或 ϵ -氨基酸。因此,在某些实施方案中,接头可以是肽模拟物。肽模拟物可以不完全含有两个 α -氨基酸之间形成的传统的肽键,而是可以另外地或替代地包含一个或多个酰

胺键,所述酰胺键在 α -氨基酸与 β -、 γ -、 δ -或 ϵ -氨基酸之间形成,或者在两个 β -、 γ -、 δ -或 ϵ -氨基酸之间形成。因此,在本发明中接头被描述为肽的任何情况下,应当理解,接头也可以是肽模拟物,并且因此不完全由 α -氨基酸组成,而是可以替代地包含一个或多个 β -、 γ -、 δ -或 ϵ -氨基酸或未被分类为氨基酸的分子。可以包含在本发明的接头中的 β -、 γ -、 δ -或 ϵ -氨基酸的示例包括但不限于 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸、4-氨基-3-羟基-5-苯基戊酸、4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸、6-氨基己酸和抑胃酶氨酸(statine)。

[0315] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)和(Sp_2)可以包含0至12个氨基酸残基,包括氨基酸衍生物和氨基酸模拟物。换言之,在某些实施方案中,(Sp_1)可以包含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基,并且(Sp_2)可以包含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基。在某些实施方案中,(Sp_1)可以包含0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸残基,并且(Sp_2)可以不存在。特别地,当 B_1 是有效载荷时,优选地,(Sp_2)不存在。在 B_1 是连接部分的实施方案中,(Sp_2)可以存在,并且任选地连接至额外的有效载荷或连接部分(B_2)。

[0316] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以不仅仅由氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物组成。换言之,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含非氨基酸组分或可以仅仅由非氨基酸组分组成。在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含氨基酸和非氨基酸组分。例如,但非限制性的,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含,例如,1至200个原子的含碳骨架,任选地至少10个原子的含碳骨架,例如,10至100个原子或20至100个原子,在一个或多个原子上被取代,任选地其中,含碳骨架为直链烃或包含环状基团、对称或非对称支链烃、单糖、二糖、直链或支链寡糖(非对称支链的或对称支链的)、其它天然直链或支链低聚物(非对称支链的或对称支链的),或更一般地由任何链生长或分步生长聚合方法得到的任何二聚体、三聚体或高级低聚物(higher oligomer)(直链的、非对称支链的或对称支链的)。

[0317] 换言之,(Sp_1)和/或(Sp_2)可以是或包含任何直链的、支链的和/或环状的 C_{2-30} 烷基、 C_{2-30} 烯基、 C_{2-30} 炔基、 C_{2-30} 杂烷基、 C_{2-30} 杂烯基、 C_{2-30} 杂炔基,任选地其中,可以插入一个或多个同素环的芳香族化合物基团或杂环化合物基团;特别是,任何直链或支链 C_{2-5} 烷基、 C_{5-10} 烷基、 C_{11-20} 烷基、 $-O-C_{1-5}$ 烷基、 $-O-C_{5-10}$ 烷基、 $-O-C_{11-20}$ 烷基或 $(CH_2-CH_2-O)_{1-24}$ 或 $(CH_2)_{x1}-(CH_2-O-CH_2)_{1-24}-(CH_2)_{x2}$ -基,其中, $x1$ 和 $x2$ 独立地为选自0至20的范围的整数、氨基酸、寡肽、聚糖、硫酸酯、磷酸酯或羧酸酯。在一些实施方案中,(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含 C_{2-6} 烷基。

[0318] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含一个或多个聚乙二醇(PEG)部分或类似的缩聚物,如聚(甲基丙烯酸羧基甜菜碱酯)(pCBMA)、聚恶唑啉、聚丙三醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚(甲基丙烯酸羟乙酯)(pHEMA)。聚乙二醇(PEG)是聚醚化合物,具有从工业制造到医药的许多应用。取决于其分子量,PEG也被称为聚环氧乙烷(PEO)或聚氧化乙烯(POE)。PEG的结构通常表示为 $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ 。

[0319] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含葡聚糖。如本文所使用的术语“葡聚糖”是指由不同长度的链组成的复杂的支链葡聚糖,其可以具有3kDa至2000kDa的重量。直链通常由葡萄糖分子之间的 α -1,6糖苷键组成,而支链则从 α -1,3键开始。葡聚糖可以从蔗糖合成,例如通过乳酸菌合成。在本发明的上下文中,待用作载体的葡聚糖可以优选具有约15kDa至1500kDa的分子量。

[0320] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含寡核苷酸。如本文所使用的术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的低聚物或聚合物,以及非天然存在的寡核苷酸。由于较高的稳定性,寡核苷酸优选为DNA的聚合物。

[0321] 本发明的方法中使用的接头可以含有化学间隔基(Sp_1)和(Sp_2)。这些化学间隔基(Sp_1)和(Sp_2)可以相同也可以不同。在一些实施方案中,(Sp_1)和/或(Sp_2)可以是包含一个或多个自裂解部分的自消除间隔基。(Sp_1)和/或(Sp_2)可以是支链的或非支链的,并且可以包含 B_1 和/或 B_2 的一个或多个连接位点。根据本发明,能够仅释放单个部分的自消除间隔基被称为“单个释放间隔基”。能够释放两个或更多个部分的自消除间隔基被称为“多重释放间隔基”。间隔基可以是支链的或非支链的并且通过 $1,2+2n$ -消除($n \geq 1$)自消除,被称为“电子级联间隔基”。间隔基可以在形成环脲衍生物的情况下通过环合过程消除,被称为“ ω -氨基氨基羰基环合间隔基”。

[0322] 化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以是自消除的或非自消除的。“自消除的”间隔基单元允许在没有单独水解步骤的情况下释放有效载荷。当使用自消除间隔基时,在裂解或转化内置触发系统(例如,具有对氨基苄基单元的可切割序列)之后,这将最终从接头释放一个或多个部分 B_1 和/或 B_2 。例如,自消除间隔基可以是在W02002/083180和W02004/043493(其通过引用以其整体并入本文)中描述的那些中的一种,以及本领域技术人员已知的其它自消除间隔基。在某些实施方案中,接头的间隔基单元可以包含对氨基苄基单元。在一个此类实施方案中,对氨基苄醇可以通过酰胺键连接至氨基酸单元,并且在苄醇与有效载荷之间形成氨基甲酸酯、氨基甲酸甲酯或碳酸酯。在一个实施方案中,间隔基单元可以是对氨基苄氧羰基(PAB)。自消除间隔基的示例还包括但不限于,电子性质类似于对氨基苄醇的芳香族化合物(例如,参见US 2005/0256030 A1),如2-氨基咪唑-5-甲醛衍生物(methanoiderivative)(Hay et al.(1999) Bioorg.Med.Chem.Lett.9:2237)和邻或对-氨基苄基缩醛。间隔基可以在酰胺键水解的情况下发生环合反应,如取代的和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues et al., Chemistry Biology, 1995, 2, 223)和2-氨基苯丙酸酰胺(Amsberry, et al., J.Org.Chem., 1990, 55, 5867)。在甘氨酸的 α 位取代的含胺药物的消除也是自裂解间隔基的示例(Kingsbury, et al., J.Med.Chem., 1984, 27, 1447)。

[0323] 此外,化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)可以包含一个或多个自裂解基团。术语“自裂解基团”是指双功能化学部分,其能够将两个间隔的化学部分(即, Aax 和(Sp_1)、(Sp_1)和 B_1 、 B_1 和(Sp_2)、(Sp_2)和 B_2 或(Sp_1)和/或(Sp_2)中的两个氨基酸残基)共价连接成稳定的分子。本文提供了自裂解基团的示例。

[0324] 化学间隔基(Sp_1)可以与 Aax 共价连接。优选地, Aax 可以通过 Aax 中包含的羧基连接至(Sp_1)。更优选地, Aax 可以通过肽键或异肽键连接至(Sp_1)中包含的氨基酸残基,其中, Aax 是所形成的肽的N端氨基酸。

[0325] 此外,化学间隔基(Sp_1)或 Aax 可以共价连接至 B_1 。在某些实施方案中,(Sp_1)或 Aax 可以通过羧基连接至 B_1 ,优选地其中,羧基包含在(Sp_1)的C端氨基酸中。在 B_1 为氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物的实施方案中, B_1 可以通过 Aax 或(Sp_1)中包含的羧基与 B_1 中包含的氨基之间形成的肽键或异肽键连接至(Sp_1)或 Aax 。在某些实施方案中, Aax 或(Sp_1)中包含的羧基可以是 α -氨基酸的 α -羧基和/或 B_1 中包含的氨基可以是 α -氨基酸的 α -氨基。在其它实施方案中, B_1 可以连接至(Sp_1)中包含的氨基酸侧链。换言之, B_1 可以通过相容的官能团连

接至(Sp₁)中包含的氨基酸侧链的官能团。

[0326] 此外,化学间隔基(Sp₂)可以共价连接至B₁。在某些实施方案中,(Sp₂)可以通过氨基连接至B₁,优选地其中,氨基包含在(Sp₂)的N端氨基酸中。在B₁为氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物的实施方案中,B₁可以通过B₁中包含的羧基与(Sp₂)中包含的氨基之间形成的肽键或异肽键连接至(Sp₂)。在某些实施方案中,B₁中包含的羧基可以是 α -氨基酸的 α -羧基和/或(Sp₂)中包含的氨基可以是(Sp₂)中包含的N端 α -氨基酸的 α -氨基。

[0327] 在(Sp₁)和/或(Sp₂)包含氨基酸、氨基酸模拟物和/或氨基酸衍生物或由氨基酸、氨基酸模拟物和/或氨基酸衍生物组成的情况下,C端残基可以包含受保护的C端羧基。

[0328] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头包含至多25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6个氨基酸残基。

[0329] 换言之,在某些实施方案中,该接头包含25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。应当理解,接头中包含的氨基酸残基,包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物,优选是包含在Aax、化学间隔基(Sp₁)和/或(Sp₂)以及在某些实施方案中在B₁中的氨基酸残基,其中,B₁为基于氨基酸的连接部分或有效载荷。在接头仅包含单个氨基酸残基的实施方案中,所述单个氨基酸残基优选为位于Aax位置的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。在此类实施方案中,(Sp₁)和/或(Sp₂)不存在或不包含任何氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。在某些实施方案中,包含单个氨基酸残基的接头可以具有结构Aax-B₁。

[0330] 在某些实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的接头可以包含2至25个氨基酸残基,包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的接头可以包含2至20个氨基酸残基,其包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的接头可以包含2至15个氨基酸残基,其包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的接头可以包含2至10个氨基酸残基,其包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的接头可以包含3至10个氨基酸残基,其包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的接头可以包含3至8个氨基酸残基,其包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的接头可以包含4至8个氨基酸残基,其包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。

[0331] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头的净电荷为中性的或正的。

[0332] 在某些实施方案中,所述接头为肽接头(或本文公开的肽模拟物)。换言之,部分Aax、(Sp₁)和(Sp₂)仅仅由氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物组成。肽的净电荷通常于中性pH(7.0)时计算。在最简单的方法中,通过将带正电荷的氨基酸残基(Arg和Lys,以及任选地His)的数量与带负电荷的氨基酸残基(Asp和Glu)的数量相加,并计算这两组的差来确定该净电荷。在接头包含非标准氨基酸或其中带电荷的官能团被修饰或取代的氨基酸衍生物的情况下,本领域技术人员知晓于中性pH时测定非标准氨基酸或氨基酸衍生物的电荷的方法。

[0333] 在某些实施方案中,有效载荷或连接部分B₁和/或B₂以及(Sp₁)和(Sp₂)中包含的任

何非氨基酸部分也可以有助于接头的净电荷。然而,本领域技术人员知晓优选在中性pH(7.0)计算整个接头(包括任何非氨基酸部分)的净电荷的方法。

[0334] 在某些实施方案中,仅仅基于接头中包含的氨基酸残基(包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物)计算接头的净电荷。因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,接头中包含的氨基酸残基的净电荷是中性的或正的。

[0335] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头不包含带负电荷的氨基酸残基。

[0336] 换言之,接头可以不包含带负电荷的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。带负电荷的氨基酸残基是在中性pH(7.0)带负电荷的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。带负电荷的标准氨基酸是谷氨酸和天冬氨酸。然而,带负电荷的非标准氨基酸、氨基酸模拟物和氨基酸衍生物是本领域已知的。在某些实施方案中,接头可以包含谷氨酸、天冬氨酸或在Aax位置的另一种带负电荷的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。在此类实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,接头中包含的化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)不包含带负电荷的氨基酸残基。

[0337] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头包含至少一个带正电荷的氨基酸残基。

[0338] 换言之,该接头可以包含至少一个、至少两个或至少三个带正电荷的氨基酸残基,优选地在部分Aax、(Sp_1)和/或(Sp_2)的至少一个中。带正电荷的氨基酸残基是在中性pH(7.0)带正电荷的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。带正电荷的标准氨基酸是赖氨酸、精氨酸和组氨酸。然而,带正电荷的非标准氨基酸、氨基酸模拟物和氨基酸衍生物是本领域已知的。

[0339] 根据本发明的一个实施方案,接头,并且特别是化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2),包含至少一个、至少两个或至少三个氨基酸残基,该氨基酸残基选自由以下组成的组:

- [0340] • 赖氨酸,
- [0341] • 精氨酸,
- [0342] • 组氨酸,和/或
- [0343] • 其任何带正电荷的模拟物或衍生物。

[0344] 由于赖氨酸的氨基酸侧链中包含的伯胺,接头优选不含赖氨酸,而包含赖氨酸衍生物或赖氨酸模拟物,该赖氨酸衍生物或赖氨酸模拟物不包含伯胺,该伯胺可以例如被乙酰化。

[0345] 因此,在某些实施方案中,接头,并且特别是化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2),包含至少一个、至少两个或至少三个氨基酸残基,该氨基酸残基选自由以下组成的组:

- [0346] • 精氨酸,
- [0347] • 组氨酸,和/或
- [0348] • 其任何带正电荷的模拟物或衍生物。

[0349] 在某些实施方案中,接头,并且特别是化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2),包含至少一个精氨酸残基和/或其带正电荷的氨基酸模拟物或衍生物。

[0350] 在某些实施方案中,根据本发明的接头具有中性的或正的净电荷。在某些实施方案中,根据本发明的接头具有中性的或正的净电荷并且包含至少一个精氨酸和/或组氨酸

残基。在某些实施方案中,根据本发明的接头具有中性的或正的净电荷并且包含至少一个精氨酸残基。在某些实施方案中,根据本发明的接头不包含赖氨酸残基。在某些实施方案中,根据本发明的接头具有中性的或正的净电荷并且不包含赖氨酸残基。

[0351] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1$,其中,CONH是残基 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 的羧基与N端Aax残基的氨基之间形成的酰胺键;并且其中,n是1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。换言之,接头可以通过包含在N端氨基酸残基 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ 中的伯胺缀合至抗体。

[0352] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)可以由氨基酸组成或包含氨基酸。

[0353] 换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0354] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0355] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0356] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)可以包含带正电荷的氨基酸残基。在某些实施方案中,带正电荷的氨基酸残基可以是精氨酸、精氨酸衍生物或精氨酸模拟物。

[0357] 换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0358] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0359] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0360] 在某些实施方案中,精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以是化学间隔基(Sp_1)中包含的C端氨基酸残基。在某些实施方案中,C端精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以共价结合至有效载荷 B_1 。

[0361] 换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0362] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{Arg}-\text{B}_1$,

[0363] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0364] 在某些实施方案中,接头可以具有结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Thr}-\text{Arg}-\text{B}_1$, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Ile}-\text{Arg}-\text{B}_1$, $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Asp}-\text{Arg}-\text{B}_1$,或 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Trp}-\text{Arg}-\text{B}_1$ 。

[0365] 在某些实施方案中, B_1 可以是连接部分6-叠氮基-L-赖氨酸($\text{Lys}(\text{N}_3)$)。在某些实施方案中, $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 可以共价连接至(Sp_1)的C端Arg残基。

[0366] 换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0367] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-(\text{Aax})_o-\text{Arg}-\text{Lys}(\text{N}_3)$,

[0368] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中, $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0369] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)中包含的N端氨基酸可以是丙氨酸或甘氨酸。

[0370] 换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0371] $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Ala}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0372] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0373] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0374] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Ala} - (\text{Aax})_o - \text{B}_1$,

[0375] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0376] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0377] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Ala} - (\text{Aax})_o - \text{Arg} - \text{B}_1$,

[0378] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0379] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0380] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Ala} - (\text{Aax})_o - \text{Arg-Lys}(\text{N}_3)$,

[0381] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0382] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构 $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Ala-Arg-Lys}(\text{N}_3)$,其中,n为1至20的整数,优选1至10,更优选1至6。

[0383] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0384] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Gly} - (\text{Aax})_o - \text{B}_1$,

[0385] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0386] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0387] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Gly} - (\text{Aax})_o - \text{B}_1$,

[0388] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0389] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0390] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Gly} - (\text{Aax})_o - \text{Arg} - \text{B}_1$,

[0391] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0392] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0393] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Gly} - (\text{Aax})_o - \text{Arg-Lys}(\text{N}_3)$,

[0394] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,n为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0395] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构 $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Gly-Arg-Lys}(\text{N}_3)$,其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0396] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含基序Val-Aax或由基序Val-Aax组成。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0397] $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_n - \text{CONH-Val} - (\text{Aax})_o - \text{B}_1$,

[0398] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0399] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Val}-\text{Cit}-\text{B}_1$,其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0400] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{CONH}-\text{Val}-\text{Arg}-\text{B}_1$,其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0401] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构 $\text{Gly}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1$ 。换言之,该接头可以通过其N端甘氨酸残基缀合至抗体。

[0402] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)可以由氨基酸组成或包含氨基酸。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0403] $\text{Gly}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0404] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0405] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)可以包含带正电荷的氨基酸残基。在某些实施方案中,带正电荷的氨基酸残基可以是精氨酸、精氨酸衍生物或精氨酸模拟物。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0406] $\text{Gly}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0407] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0408] 在某些实施方案中,精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以是化学间隔基(Sp_1)中包含的C端氨基酸残基。在某些实施方案中,C端精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以共价结合至有效载荷 B_1 。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0409] $\text{Gly}-(\text{Aax})_o-\text{Arg}-\text{B}_1$,

[0410] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0411] 在某些实施方案中,接头可以具有结构 $\text{Gly}-\text{Thr}-\text{Arg}-\text{B}_1$ (SEQ ID NO:63), $\text{Gly}-\text{Ile}-\text{Arg}-\text{B}_1$ (SEQ ID NO:64), $\text{Gly}-\text{Asp}-\text{Arg}-\text{B}_1$ (SEQ ID NO:65) 或 $\text{Gly}-\text{Trp}-\text{Arg}-\text{B}_1$ (SEQ ID NO:66)。

[0412] 在某些实施方案中, B_1 可以是连接部分6-叠氮基-L-赖氨酸($\text{Lys}(\text{N}_3)$)。在某些实施方案中, $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 可以共价连接至(Sp_1)的C端Arg残基。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0413] $\text{Gly}-(\text{Aax})_o-\text{Arg}-\text{Lys}(\text{N}_3)$,

[0414] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中, $\text{Lys}(\text{N}_3)$ 为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0415] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp_1)中包含的N端氨基酸可以是丙氨酸或甘氨酸。

[0416] 换言之,在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0417] $\text{Gly}-\text{Ala}-(\text{Aax})_o-\text{B}_1$,

[0418] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0419] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0420] Gly-Ala- (Aax)_o-B₁,

[0421] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0422] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0423] Gly-Ala- (Aax)_o-Arg-B₁,

[0424] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0425] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0426] Gly-Ala- (Aax)_o-Arg-Lys (N₃),

[0427] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys (N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0428] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:Gly-Ala-Arg-Lys (N₃) (SEQ ID NO:39)。

[0429] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0430] Gly-Gly- (Aax)_o-B₁,

[0431] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,n为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0432] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0433] Gly-Gly- (Aax)_o-B₁,

[0434] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0435] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0436] Gly-Gly- (Aax)_o-Arg-B₁,

[0437] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0438] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0439] Gly-Gly- (Aax)_o-Arg-Lys (N₃),

[0440] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys (N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0441] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:Gly-Gly-Arg-Lys (N₃) (SEQ ID NO:40)。

[0442] 在某些实施方案中,化学间隔基 (Sp₁) 可以包含基序Val-Aax或由基序Val-Aax组成。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0443] Gly-Val- (Aax)_o-B₁,

[0444] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0445] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构Gly-Val-Cit-B₁ (SEQ ID NO:51),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0446] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构Gly-Val-Arg-B₁ (SEQ ID NO:52),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0447] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构β-Ala-(Sp₁)-B₁。换言之,该接头可以通过其N端β-丙氨酸残基缀合至抗体。

[0448] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以由氨基酸组成或包含氨基酸。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0449] β-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0450] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0451] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含带正电荷的氨基酸残基。在某些实施方案中,带正电荷的氨基酸残基可以是精氨酸、精氨酸衍生物或精氨酸模拟物。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0452] β-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0453] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0454] 在某些实施方案中,精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以是化学间隔基(Sp₁)中包含的C端氨基酸残基。在某些实施方案中,C端精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以共价结合至有效载荷B₁。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0455] β-Ala-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0456] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0457] 在某些实施方案中,接头可以具有结构β-Ala-Thr-Arg-B₁ (SEQ ID NO:67),β-Ala-Ile-Arg-B₁ (SEQ ID NO:68),β-Ala-Asp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:69)或β-Ala-Trp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:70)。

[0458] 在某些实施方案中,B₁可以是连接部分6-叠氮基-L-赖氨酸(Lys(N₃))。在某些实施方案中,Lys(N₃)可以共价连接至(Sp₁)的C端Arg残基。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0459] β-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0460] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0461] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)中包含的N端氨基酸可以是丙氨酸或甘氨酸。

[0462] 换言之,在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0463] β-Ala-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0464] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0465] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0466] β -Ala-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0467] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0468] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0469] β -Ala-Ala-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0470] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0471] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0472] β -Ala-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0473] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0474] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构: β -Ala-Ala-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:41)。

[0475] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0476] β -Ala-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0477] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0478] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0479] β -Ala-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0480] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0481] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0482] β -Ala-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0483] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0484] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0485] β -Ala-Gly-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0486] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0487] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构: β -Ala-Gly-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:42)。

[0488] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含基序Val-Aax或由基序Val-Aax组成。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0489] β -Ala-Val-(Aax)_o-B₁,

[0490] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0491] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构 β -Ala-Val-Cit- B_1 (SEQ ID NO:53),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0492] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构 β -Ala-Val-Arg- B_1 (SEQ ID NO:54),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0493] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构GABA- (Sp_1) - B_1 。换言之,该接头可以通过其N端 γ -氨基丁酸(GABA)残基缀合至抗体。

[0494] 在某些实施方案中,化学间隔基 (Sp_1) 可以由氨基酸组成或包含氨基酸。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0495] GABA- $(Aax)_o$ - B_1 ,

[0496] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0497] 在某些实施方案中,化学间隔基 (Sp_1) 可以包含带正电荷的氨基酸残基。在某些实施方案中,带正电荷的氨基酸残基可以是精氨酸、精氨酸衍生物或精氨酸模拟物。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0498] GABA- $(Aax)_o$ - B_1 ,

[0499] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0500] 在某些实施方案中,精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以是化学间隔基 (Sp_1) 中包含的C端氨基酸残基。在某些实施方案中,C端精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以共价结合至有效载荷 B_1 。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0501] GABA- $(Aax)_o$ -Arg- B_1 ,

[0502] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0503] 在某些实施方案中,接头可以具有结构GABA-Thr-Arg- B_1 (SEQ ID NO:71),GABA-Ile-Arg- B_1 (SEQ ID NO:72),GABA-Asp-Arg- B_1 (SEQ ID NO:73)或GABA-Trp-Arg- B_1 (SEQ ID NO:74)。

[0504] 在某些实施方案中, B_1 可以是连接部分6-叠氮基-L-赖氨酸(Lys(N_3))。在某些实施方案中,Lys(N_3)可以共价连接至 (Sp_1) 的C端Arg残基。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0505] GABA- $(Aax)_o$ -Arg-Lys(N_3),

[0506] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N_3)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0507] 在某些实施方案中,化学间隔基 (Sp_1) 中包含的N端氨基酸可以是丙氨酸或甘氨酸。

[0508] 换言之,在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0509] GABA-Ala- $(Aax)_o$ - B_1 ,

[0510] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0511] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0512] $\text{GABA-Ala-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0513] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0514] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0515] $\text{GABA-Ala-(Aax)}_o\text{-Arg-B}_1$,

[0516] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0517] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0518] $\text{GABA-Ala-(Aax)}_o\text{-Arg-Lys(N}_3\text{)}$,

[0519] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0520] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构: $\text{GABA-Ala-Arg-Lys(N}_3\text{)}$ (SEQ ID NO:43)。

[0521] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0522] $\text{GABA-Gly-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0523] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0524] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0525] $\text{GABA-Gly-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0526] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0527] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0528] $\text{GABA-Gly-(Aax)}_o\text{-Arg-B}_1$,

[0529] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0530] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0531] $\text{GABA-Gly-(Aax)}_o\text{-Arg-Lys(N}_3\text{)}$,

[0532] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0533] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构: $\text{GABA-Gly-Arg-Lys(N}_3\text{)}$ (SEQ ID NO:44)。

[0534] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含基序Val-Aax或由基序Val-Aax组成。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0535] $\text{GABA-Val-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0536] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0537] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构GABA-Val-Cit-B₁ (SEQ ID NO:55),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0538] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构GABA-Val-Arg-B₁ (SEQ ID NO:56),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0539] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构5-AVA-(Sp₁)-B₁。换言之,该接头可以通过其N端5-氨基戊酸(5-戊胺酸(5-aminovaleric acid,5-AVA))残基缀合至抗体。

[0540] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以由氨基酸组成或包含氨基酸。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0541] 5-AVA-(Aax)_o-B₁,

[0542] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0543] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含带正电荷的氨基酸残基。在某些实施方案中,带正电荷的氨基酸残基可以是精氨酸、精氨酸衍生物或精氨酸模拟物。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0544] 5-AVA-(Aax)_o-B₁,

[0545] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0546] 在某些实施方案中,精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以是化学间隔基(Sp₁)中包含的C端氨基酸残基。在某些实施方案中,C端精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以共价结合至有效载荷B₁。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0547] 5-AVA-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0548] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0549] 在某些实施方案中,接头可以具有结构5-AVA-Thr-Arg-B₁ (SEQ ID NO:75),5-AVA-Ile-Arg-B₁ (SEQ ID NO:76),5-AVA-Asp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:77)或5-AVA-Trp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:78)。

[0550] 在某些实施方案中,B₁可以是连接部分6-叠氮基-L-赖氨酸(Lys(N₃))。在某些实施方案中,Lys(N₃)可以共价连接至(Sp₁)的C端Arg残基。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0551] 5-AVA-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0552] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0553] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)中包含的N端氨基酸可以是丙氨酸或甘氨酸。

[0554] 换言之,在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0555] 5-AVA-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0556] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0557] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0558] 5-AVA-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0559] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0560] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0561] 5-AVA-Ala-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0562] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0563] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0564] 5-AVA-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0565] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0566] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:5-AVA-Ala-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:45)。

[0567] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0568] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0569] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0570] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0571] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0572] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0573] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0574] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0575] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0576] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0577] 5-AVA-Gly-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0578] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0579] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:5-AVA-Gly-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:46)。

[0580] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含基序Val-Aax或由基序Val-Aax组成。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0581] 5-AVA-Val-(Aax)_o-B₁,

[0582] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0583] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构5-AVA-Val-Cit-B₁ (SEQ ID NO:57),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0584] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构5-AVA-Val-Arg-B₁ (SEQ ID NO:58),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0585] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构EACA-(Sp₁)-B₁。换言之,该接头可以通过其N端6-氨基己酸(ε-氨基己酸(EACA))残基缀合至抗体。

[0586] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以由氨基酸组成或包含氨基酸。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0587] EACA-(Aax)_o-B₁,

[0588] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0589] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含带正电荷的氨基酸残基。在某些实施方案中,带正电荷的氨基酸残基可以是精氨酸、精氨酸衍生物或精氨酸模拟物。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0590] EACA-(Aax)_o-B₁,

[0591] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0592] 在某些实施方案中,精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以是化学间隔基(Sp₁)中包含的C端氨基酸残基。在某些实施方案中,C端精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以共价结合至有效载荷B₁。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0593] EACA-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0594] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0595] 在某些实施方案中,接头可以具有结构EACA-Thr-Arg-B₁ (SEQ ID NO:79),EACA-Ile-Arg-B₁ (SEQ ID NO:80),EACA-Asp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:81)或EACA-Trp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:82)。

[0596] 在某些实施方案中,B₁可以是连接部分6-叠氮基-L-赖氨酸(Lys(N₃))。在某些实施方案中,Lys(N₃)可以共价连接至(Sp₁)的C端Arg残基。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0597] EACA-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0598] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0599] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)中包含的N端氨基酸可以是丙氨酸或甘氨酸。

[0600] 换言之,在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0601] EACA-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0602] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0603] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0604] $\text{EACA-Ala-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0605] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0606] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0607] $\text{EACA-Ala-(Aax)}_o\text{-Arg-B}_1$,

[0608] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0609] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0610] $\text{EACA-Ala-(Aax)}_o\text{-Arg-Lys(N}_3\text{)}$,

[0611] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0612] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:EACA-Ala-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:47)。

[0613] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0614] $\text{EACA-Gly-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0615] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0616] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0617] $\text{EACA-Gly-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0618] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0619] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0620] $\text{EACA-Gly-(Aax)}_o\text{-Arg-B}_1$,

[0621] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0622] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0623] $\text{EACA-Gly-(Aax)}_o\text{-Arg-Lys(N}_3\text{)}$,

[0624] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0625] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:EACA-Gly-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:48)。

[0626] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含基序Val-Aax或由基序Val-Aax组成。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0627] $\text{EACA-Val-(Aax)}_o\text{-B}_1$,

[0628] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0629] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构EACA-Val-Cit-B₁ (SEQ ID NO:59),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0630] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构EACA-Val-Arg-B₁ (SEQ ID NO:60),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0631] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构7-AHA-(Sp₁)-B₁。换言之,该接头可以通过其N端7-氨基庚酸残基缀合至抗体。

[0632] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以由氨基酸组成或包含氨基酸。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0633] 7-AHA-(Aax)_o-B₁,

[0634] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物,并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0635] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含带正电荷的氨基酸残基。在某些实施方案中,带正电荷的氨基酸残基可以是精氨酸、精氨酸衍生物或精氨酸模拟物。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0636] 7-AHA-(Aax)_o-B₁,

[0637] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0638] 在某些实施方案中,精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以是化学间隔基(Sp₁)中包含的C端氨基酸残基。在某些实施方案中,C端精氨酸残基(或模拟物或衍生物)可以共价结合至有效载荷B₁。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0639] 7-AHA-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0640] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0641] 在某些实施方案中,接头可以具有结构7-AHA-Thr-Arg-B₁ (SEQ ID NO:83),7-AHA-Ile-Arg-B₁ (SEQ ID NO:84),7-AHA-Asp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:85)或7-AHA-Trp-Arg-B₁ (SEQ ID NO:86)。

[0642] 在某些实施方案中,B₁可以是连接部分6-叠氮基-L-赖氨酸(Lys(N₃))。在某些实施方案中,Lys(N₃)可以共价连接至(Sp₁)的C端Arg残基。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0643] 7-AHA-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0644] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0645] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)中包含的N端氨基酸可以是丙氨酸或甘氨酸。

[0646] 换言之,在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0647] 7-AHA-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0648] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0649] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0650] 7-AHA-Ala-(Aax)_o-B₁,

[0651] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0652] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0653] 7-AHA-Ala-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0654] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0655] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0656] 7-AHA-Ala-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0657] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0658] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:7-AHA-Ala-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:49)。

[0659] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0660] 7-AHA-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0661] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数。

[0662] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0663] 7-AHA-Gly-(Aax)_o-B₁,

[0664] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,至少一个Aax为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0665] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0666] 7-AHA-Gly-(Aax)_o-Arg-B₁,

[0667] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;并且其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[0668] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0669] 7-AHA-Gly-(Aax)_o-Arg-Lys(N₃),

[0670] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;其中,o为小于24、20、15、10、9、8、7、6、5的整数;其中,Arg为精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;并且其中,Lys(N₃)为6-叠氮基-L-赖氨酸。

[0671] 在某些实施方案中,接头可以具有或包含结构:7-AHA-Gly-Arg-Lys(N₃)(SEQ ID NO:50)。

[0672] 在某些实施方案中,化学间隔基(Sp₁)可以包含基序Val-Aax或由基序Val-Aax组成。换言之,根据本发明的接头可以具有或包含结构:

[0673] 7-AHA-Val-(Aax)_o-B₁,

[0674] 其中,Aax为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物;并且其中,o为小于24、20、15、

10、9、8、7、6、5的整数。

[0675] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构7-AHA-Val-Cit-B₁ (SEQ ID NO:61),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0676] 在某些实施方案中,根据本发明的接头可以具有或包含结构7-AHA-Val-Arg-B₁ (SEQ ID NO:62),其中,n为1至20,优选1至10,更优选1至6的整数。

[0677] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头包含第二连接部分或有效载荷B₂,特别是其中,B₂通过所述化学间隔基(Sp₂)连接至所述接头。

[0678] 换言之,本发明的接头可以包含第二有效载荷或连接部分B₂。有效载荷或连接部分B₂可以连接至化学间隔基(Sp₂)或直接连接至有效载荷或连接部分B₁。因此,在根据本发明的方法中使用的接头可以包括以下结构:Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂,Aax-B₁-(Sp₂)-B₂,Aax-(Sp₁)-B₁-B₂或Aax-B₁-B₂。有效载荷或连接部分B₂可以包含适于将B₂连接至(Sp₂)或B₁中包含的官能团的任何官能团。优选地,有效载荷或连接部分B₂包含通过其将B₂连接至(Sp₂)或B₁的氨基。换言之,B₂可以通过所述氨基连接至(Sp₂)或B₁中包含的羧基。在某些实施方案中,(Sp₂)中包含的羧基可以是化学间隔基(Sp₂)的C端氨基酸残基中包含的羧基。在某些实施方案中,B₂中包含的羧基可以是基于氨基酸的有效载荷或连接部分的α-羧基。在某些实施方案中,有效载荷或连接部分B₂可以连接至包含在(Sp₂)中的氨基酸侧链。换言之,B₂可以通过相容的官能团连接至(Sp₂)中包含的氨基酸侧链的官能团。

[0679] 在某些实施方案中,Aax、(Sp₁)和(Sp₂)仅仅由氨基酸、氨基酸模拟物和/或氨基酸衍生物组成。在某些实施方案中,B₁和/或B₂也包含氨基酸结构。在此类实施方案中,接头可以是线性肽或肽模拟物。在B₁是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物的实施方案中,接头可以具有结构Aax-(Sp₁)-B₁,其中Aax-(Sp₁)-B₁形成线性肽或肽模拟物。在B₁是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物的实施方案中,接头可以具有结构Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂),其中Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)形成线性肽或肽模拟物。在B₁和B₂是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物的实施方案中,接头可以具有结构Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂,其中Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂形成线性肽或肽模拟物。在B₁不是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物的实施方案中,接头可以具有结构Aax-(Sp₁)-B₁,其中Aax-(Sp₁)形成线性肽或肽模拟物,并且B₁连接至(Sp₁)中包含的C端羧基。在B₁是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物并且B₂不是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物的实施方案中,接头可以具有结构Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂,其中Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂形成线性肽或肽模拟物,并且B₂连接至(Sp₂)中包含的C端羧基。

[0680] 在此类实施方案中,可以生成例如抗体与有效载荷之比为2或4的抗体-有效载荷缀合物,例如,具有与每个Q295残基缀合的一个或两个有效载荷。

[0681] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,B₁和B₂彼此相同或不同。

[0682] 换言之,有效载荷或连接部分B₁和B₂可以相同,即具有相同的化学结构,或可以在结构上不同。在某些实施方案中,B₁和B₂都是有效载荷或都是连接部分。在B₁和B₂都是有效载荷的实施方案中,位置B₁和B₂的有效载荷可以是相同或不同的有效载荷。在B₁和B₂都是连接部分的实施方案中,位置B₁和B₂的连接部分可以是相同或不同的连接部分。在某些实施方案中,B₁可以是连接部分,而B₂可以是有效载荷,反之亦然。

[0683] 应当理解的是,并非所有的有效载荷或连接部分都能在位置B₁发挥链内有效载荷或连接部分的作用,例如,因为它们不具有用以在一侧与(Sp₁)或Aax以及在另一侧与(Sp₂)

或 B_2 形成共价键的官能团。因此,优选地,在 B_1 是链内有效载荷或连接部分的实施方案中, B_1 是二价或多价分子。例如, B_1 可以是氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。在此类实施方案中, B_1 可以通过其氨基与Aax或(Sp_1)的C端羧基连接,并且通过其羧基与(Sp_2)或 B_2 的N端氨基连接。

[0684] 本发明的方法可以用于以一步缀合方法或两步缀合方法生成抗体-接头缀合物或ADC。下表1阐明了本文使用的两个术语:

[0685] 表1:一步和两步缀合

	接头肽(示例性的)	方法类型	步骤
[0686]	Aax-(Sp_1)-有效载荷	一步缀合	步骤 1: 将包含有效载荷的接头缀合至抗体中的 Gln 残基
	Aax-(Sp_1)-连接部分	两步缀合	步骤 1: 将包含连接部分的接头缀合至抗体中的 Gln 残基 步骤 2: 将有效载荷缀合至连接部分

[0687] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中, B_1 和/或 B_2 为连接部分。

[0688] 换言之,包含在本发明的接头中的部分 B_1 和 B_2 中的至少一个可以是连接部分。如本文所使用的“连接部分”通常是指至少双功能的分子。在本发明中,连接部分包含允许将连接部分偶联至本发明的接头的第二官能团和在接头已经缀合至抗体之前或之后可以用于将另外的分子偶联至接头的第二官能团。在某些实施方案中,本发明的连接部分为氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。在此类实施方案中,连接部分优选通过其氨基连接至接头,而包含在氨基酸侧链中的官能团可以用于将另外的分子偶联至接头。

[0689] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的至少一个包含

[0690] • 生物正交标志物基团,或

[0691] • 用于交联的非生物正交实体。

[0692] 术语“生物正交标志物基团”是由Sletten和Bertozzi建立的(A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation.J Am Chem Soc 2011,133(44),17570-17573)用于指定可以导致生物系统内部发生化学反应而不干扰天然生化过程的反应性基团。“用于交联的非生物正交实体”可以是包含第一官能团或由第一官能团组成的任何分子,其中,该第一官能团可以化学交联或酶交联至包含相容的第二官能团的有效载荷。即使在交联反应是非生物正交反应的情况下,优选地,除了有效载荷与接头的交联之外,该反应不引入对抗体的其它修饰。鉴于上述情况,连接部分 B_1 和/或 B_2 可以由“生物正交标志物基团”或“非生物正交实体”组成,或者可以包含“生物正交标志物基团”或“非生物正交实体”。例如,在连接部分Lys(N_3)的情况下,在本发明中,整个Lys(N_3)和叠氮基都可以单独被视为生物正交标志物基团。Lys(N_3)是指6-叠氮基-L-赖氨酸,也可缩写为K(N_3)。

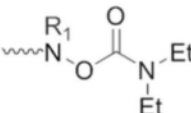
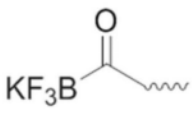
[0693] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述生物正交标志物基团或所述非生物正交实体由至少一种分子或部分组成或包含至少一种分子或部分,所述分子或部分选自自由以下组成的组:

[0694] • -N-N $\equiv$ N,或- N_3 ;

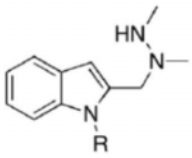
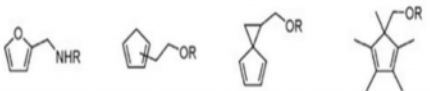
[0695] • Lys(N_3);

- [0696] • 四嗪；
- [0697] • 炔烃；
- [0698] • 应变环辛炔；
- [0699] • BCN；
- [0700] • 应变烯烃；
- [0701] • 光反应性基团；
- [0702] • -RCOH(醛)；
- [0703] • 酰基三氟硼酸酯；
- [0704] • 环戊二烯/螺环戊二烯；
- [0705] • 硫代选择性亲电体；
- [0706] • -SH；以及
- [0707] • 半胱氨酸。
- [0708] 例如,这些基团可以参与表2中所示的任何结合反应：
- [0709] 表2

[0710]

结合配偶体 (partner) 1	结合配偶体 2	反应类型
-N-N≡N	环辛炔衍生物 (例如 DIFO、BCN、DIBAC、DIBO、ADIBO/DBCO)	SPAAC
-N-N≡N	炔烃	CuAAC
-N-N≡N	三芳基膦	施陶丁格 (Staudinger) 连接反应
四嗪	环丙烯 降冰片烯 反式环辛烯 环辛炔 (BCN)	四嗪连接反应
-SH, 例如 Cys 残基的-SH	马来酰亚胺	巯基-马来酰亚胺缀合
胺	N-羟基琥珀酰亚胺	
-O-氨甲酰羟基胺 	酰基三氟硼酸酯 	KAT-连接反应 (酰基三氟硼酸钾)
R _x -S-S-R _y	R _z -SH + 还原剂 (例如 TCEP、DTT)	直接二硫键生物缀合
-CHO (醛基)	HIPS-探针	肼基-异-皮克特-施彭格勒 (Hydrazino-iso-Pictet-Spengler, HIPS)

[0711]

		
-CHO (醛基)	N-吡咯基丙氨酸衍生物	吡咯基丙氨酸皮克特-施彭格勒 (PAPS)
-CHO (醛基)	$R_1-N-N-R_2$ $HO-N-R_1$ $H_2N-CHR_1-CH_2-SH$	脞-连接反应 脞-连接反应 噻唑烷-连接反应
马来酰亚胺	-SH, 例如 Cys 残基的-SH	巯基-马来酰亚胺缀合
马来酰亚胺		巯基-环戊二烯缀合 (Diels-Alder 反应)
生物素	链霉亲和素	生物素-链霉亲和素相互作用

[0712] 连接部分 B_1 和/或 B_2 可以是或包含表2中所谓的“结合配偶体1”或“结合配偶体2”。

[0713] 在某些实施方案中,连接部分 B_1 和/或 B_2 为具有游离巯基的半胱氨酸、半胱氨酸模拟物或半胱氨酸衍生物。

[0714] 此类Cys残基(或模拟物或衍生物)的游离巯基可以缀合至包含硫代选择性亲电体(如马来酰亚胺)的毒素构建体。包含马来酰亚胺部分的毒素构建体已被频繁使用,并且也获得医疗机构的批准,如Adcetris。因此,包含MMAE毒素的毒素构建体可以偶联至本发明的接头中Cys残基的游离巯基。

[0715] 必须注意的是,在本发明的方法中,也可以使用其它硫代选择性亲电体(如3-芳基丙腈(APN)或亚磷酰胺(phosphoramidate))代替马来酰亚胺。

[0716] 因此,根据本发明在接头中提供Cys残基确实具有允许使用现成的毒素-马来酰亚胺构建体以产生抗体-有效载荷缀合物,或更普遍地,能够充分利用Cys-马来酰亚胺结合化学的优势的优点。同时,可以使用不需要去糖基化的现成的抗体。在具体的实施方案中,Cys残基可以是基于氨基酸的接头中的C端或链内残基。

[0717] 在另一个实施方案中,连接部分 B_1 和/或 B_2 包含叠氮基。本领域技术人员知晓可以并入根据本发明的接头中的包含叠氮基的分子,如6-叠氮基-赖氨酸(Lys(N_3))或4-叠氮基-高丙氨酸(Xaa(N_3))。包含叠氮基的连接部分可以用作各种生物正交反应(如菌株促进的叠氮化物-炔烃环加成(SPAAC)、铜催化的叠氮化物-炔烃环加成(CuAAC)或Staudinger连接反应)中的底物。例如,在某些实施方案中,包含环辛炔衍生物(如DBCO、DIBO、BCN或BARAC)的有效载荷可以通过SPAAC偶联至包含叠氮基的接头。

[0718] 在另一个实施方案中,连接部分 B_1 和/或 B_2 包含四嗪基团。本领域技术人员知晓可以并入根据本发明的接头中的包含四嗪的分子,优选包含四嗪基团的氨基酸衍生物。包含四嗪的连接部分可以用作生物正交四嗪连接反应中的底物。例如,在某些实施方案中,包含环丙烯、降冰片烯、降冰片烯衍生物或环辛炔基团(如双环[6.1.0]壬炔(BCN))的有效载荷可以偶联至包含四嗪基团的接头。

[0719] 在某些实施方案中,连接部分 B_1 和/或 B_2 可以包含环状二烯,如环戊二烯衍生物。Amant等人(Tuning the Diels-Alder Reaction for Bioconjugation to Maleimide Drug-Linkers;Bioconjugate Chem.2018,29,7,2406-2414)和Amant等人(A Reactive Antibody Platform for One-Step Production of Antibody-Drug Conjugates through a Diels-Alder Reaction with Maleimide;Bioconjugate Chem.2019,30,9,2340-2348)描述了可以与包含马来酰亚胺的有效载荷分子连接的环戊二烯衍生物。

[0720] 在某些实施方案中,连接部分 B_1 和/或 B_2 可以包含光反应性基团。如本文所使用的术语“光反应性基团”是指一种化学基团,其响应于所施加的外部能量源以经历活性物质生成,从而导致与相邻化学结构(例如,可提取的氢)的共价键合。光反应性基团的示例是但不限于芳基叠氮化物,如苯基叠氮化物、邻羟基苯基叠氮化物、间羟基苯基叠氮化物、四氟苯基叠氮化物、邻硝基苯基叠氮化物、间硝基苯基叠氮化物,或叠氮基-甲基香豆素、双吡丙啶、补骨脂素或二苯甲酮。

[0721] 本发明还包括包含两个不同的生物正交标志物基团和/或非生物正交实体的接头。例如,根据本发明的接头可以包含:包含叠氮化物的连接部分(如Lys(N_3)或Xaa(N_3))和包含巯基的连接部分(如半胱氨酸)。在某些实施方案中,根据本发明的接头可以包含:包含叠氮化物的连接部分(如Lys(N_3)或Xaa(N_3))和包含四嗪的连接部分(如四嗪修饰的氨基酸)。在某些实施方案中,根据本发明的接头可以包含:包含巯基的连接部分(如半胱氨酸)和包含四嗪的连接部分(如四嗪修饰的氨基酸)。包含两个不同的生物正交标志物基团和/或非生物正交实体的接头具有以下优点:它们能够接受两种不同的有效载荷,并因此产生包含多于一种有效载荷的抗体-有效载荷缀合物。

[0722] 以这种方式,可以得到2+2的抗体有效载荷比。使用第二种有效载荷可以允许开发一类全新的抗体有效载荷缀合物,其在疗效和效价方面超越了目前的治疗方法。

[0723] 此类实施方案尤其可以允许靶向细胞中的两个不同结构,例如,DNA和微管。因为一些癌症可能对一种药物有抗性,例如微管毒素,DNA-毒素仍然能够杀死癌细胞。

[0724] 根据另一个实施方案,可以使用两种药物,这两种药物在它们同时并在相同组织中释放时才是完全有效的。如果抗体在健康组织中部分降解或一种药物过早地丢失,这可以导致降低的脱靶毒性(off-target toxicity)。

[0725] 此外,双标记探针可以用于非侵入性成像和治疗或术中/术后成像/手术。在此类实施方案中,可以通过非侵入性成像来选择肿瘤患者。然后,可以使用其它成像剂(例如,荧光染料)通过外科手术去除肿瘤,这有助于外科医生或机器人在手术过程中鉴定所有癌组织。

[0726] 优选地,有效载荷通过共价键连接至连接部分。然而,在某些实施方案中,有效载荷可以通过强的非共价键连接至连接部分。换言之,在某些实施方案中,连接部分 B_1 和/或 B_2 可以包含生物素部分,例如但不限于,赖氨酸衍生物生物胞素(biotin)。在此类实施方案中,包含链霉亲和素部分的有效载荷可以连接至包含生物素部分的接头。

[0727] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,所述方法包括:将一个或多个有效载荷连接至所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的至少一个的额外步骤。

[0728] 代替在一步法中将包含一个或多个有效载荷的接头直接缀合至抗体,在某些实施方案中,本发明还涉及两步法,其中,在第一步中,将包含连接部分 B_1 和/或 B_2 的接头缀合至

抗体,并且在第二步中,一个或多个有效载荷可以随后偶联至接头的连接部分 B_1 和/或 B_2 。

[0729] 如本文所使用的术语“有效载荷”表示任何天然存在的或合成产生的分子,包括:可以化学合成的小分子量分子或化学实体,以及需要通过宿主细胞发酵产生的或也可以化学合成的并且将新功能赋予抗体的较大分子或生物实体。应当理解,有效载荷可以包含允许有效载荷与包含在接头中的连接部分或接头的其它部分偶联的其它结构或官能团,如化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2),或在某些实施方案中的Aax或 B_1 。

[0730] 在两步缀合方法中,有效载荷可以通过本领域已知的任何合适的方法连接至连接部分 B_1 和/或 B_2 。优选地,有效载荷可以连接至本文已经公开的用于交联的生物正交标志物基团或非生物正交实体中的任一种。换言之,有效载荷优选地包含与包含在连接部分 B_1 和/或 B_2 中的用于交联的生物正交标志物基团或非生物正交实体相容的官能团。

[0731] 可用于将有效载荷连接至连接部分 B_1 和/或 B_2 中包含的生物正交标志物基团的若干种生物正交反应是本领域已知的。例如,已经开发了许多满足生物正交性要求的化学连接策略,包括叠氮化合物与环辛炔之间的1,3-偶极环加成反应(也称为无铜点击化学, Baskin et al ("Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging". Proceedings of the National Academy of Sciences. 104(43):16793-7))、硝酮与环辛炔之间的1,3-偶极环加成反应(Ning et al ("Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition". Angewandte Chemie International Edition. 49(17):3065)),从醛和酮形成肟/腙(Yarema, et al ("Metabolic Delivery of Ketone Groups to Sialic Acid Residues. Application To Cell Surface Glycoform Engineering". Journal of Biological Chemistry. 273(47):31168-79)),四嗪连接反应(Blackman et al ("The Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation based on Inverse-electron-demand Diels-Alder Reactivity". Journal of the American Chemical Society. 130(41):13518-9)),基于异腈的点击反应(Stöckmann et al ("Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules". Organic & Biomolecular Chemistry. 9(21):7303))以及最近的四环庚烷连接反应(Sletten & Bertozzi (JACS, A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation. J Am Chem Soc 2011, 133(44), 17570-17573)),铜(I)催化的叠氮化物-炔烃环加成反应(CuAAC, Kolb & Sharpless ("The growing impact of click chemistry on drug discovery". Drug Discov Today. 8(24):1128-1137)),菌株促进的叠氮化物-炔烃环加成反应(SPAAC, Agard et al ("A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides". ACS Chem. Biol. 1:644-648)),或菌株促进的炔烃-硝酮环加成反应(SPANC, MacKenzie et al ("Strain-promoted cycloadditions involving nitrones and alkynes—rapid tunable reactions for bioorthogonal labeling". Curr Opin Chem Biol. 21:81-8))。所有这些文件都通过引用并入本文,以提供足够的公开内容,并避免冗长的重复。

[0732] 应当理解的是,在所述接头通过微生物谷氨酰胺转氨酶缀合至抗体的Gln残基后,有效载荷优选偶联至根据本发明的接头中包含的用于交联的生物正交标志物基团或非生物正交实体。然而,本发明还包括抗体-接头缀合物,其中,在第一步中,一个或多个有效载荷已经偶联至包含连接部分 B_1 和/或 B_2 的接头,并且其中,在第二步中,通过微生物谷氨酰胺转氨酶将得到的接头-有效载荷构建体缀合至抗体。

[0733] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述一个或多个有效载荷通过点击反应连接至所述连接部分 B_1 和/或 B_2 。

[0734] 换言之,一个或多个有效载荷可以在点击反应中连接至连接部分 B_1 和/或 B_2 ,特别是本文公开的任何点击反应。

[0735] 在一个特别优选的实施方案中,至少一个有效载荷可以通过巯基-马来酰亚胺缀合与包含在接头中的连接部分 B_1 和/或 B_2 缀合。换言之,在某些实施方案中,有效载荷可以包括马来酰亚胺基团,并且连接部分 B_1 和/或 B_2 可以是包含巯基的分子,例如但不限于半胱氨酸残基或半胱氨酸模拟物,如高半胱氨酸。然而, B_1 和/或 B_2 也可以是包含游离巯基的非氨基酸分子。在另一个实施方案中,有效载荷可以包含游离巯基,并且连接部分 B_1 和/或 B_2 可以包含马来酰亚胺基团。

[0736] 在另一个特别优选的实施方案中,至少一个有效载荷可以通过菌株促进的叠氮化物-炔烃环加成(SPAAC)与包含在接头中的连接部分 B_1 和/或 B_2 缀合。换言之,在某些实施方案中,有效载荷可以包含炔基,例如但不限于环辛炔基,并且连接部分 B_1 和/或 B_2 可以是包含叠氮基的分子,例如但不限于本文所公开的赖氨酸衍生物Lys(N_3)。然而, B_1 和/或 B_2 也可以是包含游离叠氮基的非氨基酸分子。在另一个实施方案中,有效载荷可以包含炔基,如环辛炔基,并且连接部分 B_1 和/或 B_2 可以包含叠氮基。

[0737] 在某些实施方案中, B_1 和 B_2 中的一个可以是包含巯基的连接部分,如半胱氨酸,而 B_1 和 B_2 中的另一个可以是包含叠氮化物部分的连接部分,如Lys(N_3)。在此类实施方案中,两个不同的有效载荷可以偶联至接头,一个通过巯基-马来酰亚胺缀合,而另一个则通过SPAAC反应。

[0738] 除了接头中的连接部分与有效载荷之间的点击反应之外,有效载荷可以通过本领域已知的任何酶促或非酶促反应共价结合至接头。为此,有效载荷可以例如结合至接头的C端或接头的氨基酸侧链。

[0739] 在某些实施方案中,有效载荷可以通过化学合成偶联至接头。本领域技术人员知晓通过化学合成将有效载荷偶联至基于氨基酸的接头的方法。例如,含有胺的有效载荷或含有巯基的有效载荷(例如对于美登素类似物)或含有羟基的有效载荷(例如对于SN-38类似物)可以通过化学合成连接至基于氨基酸的接头的C端。然而,本领域技术人员知晓可以用于通过化学合成将有效载荷偶联至氨基酸或氨基酸衍生物的C端或侧链的其它反应和反应性基团。可以用于通过化学合成将有效载荷偶联至基于氨基酸的接头的典型反应包括但不限于:肽偶联、活化的酯偶联(NHS酯、PFP酯)、点击反应(CuAAC、SPAAC)、迈克尔加成(巯基马来酰亚胺偶联)。在现有技术中已经广泛描述了有效载荷与肽的偶联,例如通过Costoplus等人(Peptide-Cleavable Self-immolative Maytansinoid Antibody-Drug Conjugates Designed To Provide Improved Bystander Killing.ACS Med Chem Lett.2019 Sep 27;10(10):1393-1399),Sonzini等人(Improved Physical Stability of an Antibody-Drug Conjugate Using Host-Guest Chemistry.Bioconjug Chem.2020Jan 15;31(1):123-129),Bodero等人(Synthesis and biological evaluation of RGD and isoDGR peptidomimetic- α -amanitin conjugates for tumor-targeting.Beilstein J.Org.Chem.2018,14,407-415),Nunes等人(Use of a next generation maleimide in combination with THIOMABTM antibody technology delivers a highly stable,potent

and near homogeneous THIOMABTM antibody-drug conjugate (TDC). RSC Adv., 2017, 7, 24828-24832), Doronina等人 (Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjug Chem. 2006 Jan-Feb; 17(1): 114-24), Nakada等人 (Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. Bioorg Med Chem Lett. 2016 Mar 15; 26(6): 1542-1545) 和 Dickgiesser等人 (Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases. Bioconjug Chem. 2020 Mar 12. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00061)。

[0740] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的方法, 其中, B₁和/或B₂为有效载荷。

[0741] 在某些实施方案中, 接头可以仅包含单个有效载荷B₁而不包含另外的连接部分。换言之, 该接头可以具有结构Aax-B₁、Aax-(Sp₁)-B₁或Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂), 其中, B₁为有效载荷。在其它实施方案中, 接头可以包含两个有效载荷B₁和B₂, 但是没有另外的连接部分, 并且接头可以具有结构Aax-B₁-B₂、Aax-(Sp₁)-B₁-B₂、Aax-B₁-(Sp₂)-B₂或Aax-(Sp₁)-B₁-(Sp₂)-B₂、Aax-B₁-B₂-(Sp₁), 其中, B₁和B₂为有效载荷。仅包含有效载荷的接头可以在一步方法中缀合至抗体。

[0742] 应当理解, 在B₁和B₂都是有效载荷的实施方案中, B₁和B₂在结构上可以相同或不同。在某些实施方案中, 包含一个或多个有效载荷的整个接头可以被化学合成。可替代地, 在接头缀合至抗体之前, 可以通过本文公开的任何方法将一个或多个有效载荷偶联至接头中包含的连接部分。

[0743] 在某些实施方案中, 本发明的接头可以允许将两种不同的有效载荷缀合至抗体的CH₂结构域的残基Q295。使用第二种有效载荷可以开发出一类全新的抗体-有效载荷缀合物, 其在疗效和效价方面超越了目前的治疗方法。还构想了新的应用领域, 例如, 用于成像和治疗或术中/术后手术的双类型成像 (参见Azhdarinia A. et al., Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. Mol Imaging Biol. 2012 Jun; 14(3): 261-276)。例如, 包含用于术前正电子发射断层扫描 (positron emission tomography, PET) 的分子成像剂和用于手术切缘的引导划定的近红外荧光 (near-infrared fluorescent, NIRF) 染料的双标记抗体可以显著增强癌症的诊断、分期与切除 (参见Houghton J. L. et al., Site-specifically labeled CA19.9-targeted immunoconjugates for the PET, NIRF, and multimodal PET/NIRF imaging of pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 29; 112(52): 15850-5)。PET和NIRF光学成像提供了互补的临床应用, 使得非侵入性全身成像能够在手术过程中分别定位疾病和鉴定肿瘤边缘。然而, 由于缺乏合适的位点特异性方法, 迄今为止, 这种双标记探针的产生是困难的; 由于探针的随机缀合, 通过化学手段连接两种不同的探针导致几乎不可能的分析和重现性 (reproducibility)。此外, 在Levengood M. 等人的研究中 (Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody-Drug Conjugates. Angewandte Chemie, Volume 56, Issue 3, January 16, 2017), 具有连接的两种不同的澳瑞他汀毒素 (具有不同的物理化学性质并发挥互补的抗癌活性) 的双药物标记的抗体在对由单独的澳瑞他汀组分组成的ADC无反应的细胞系和异种移植物模型中赋予活

性。这表明,与单独地单个常规ADC相比,双标记ADC能够更有效地解决癌症异质性和耐药性问题。由于对ADC的一种耐药机制包括来自癌细胞的细胞毒性部分的主动泵出,另一种双药物应用可以包括额外和同时递送特异性阻断细胞毒性药物的外排机制的药物。因此,此类双标记ADC可以有助于克服对ADC的癌症耐药性,其比传统ADC更有效。

[0744] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述一个或多个有效载荷包含以下中的至少一种:

- [0745] • 毒素;
- [0746] • 细胞因子;
- [0747] • 生长因子;
- [0748] • 放射性核素;
- [0749] • 激素;
- [0750] • 抗病毒剂;
- [0751] • 抗菌剂;
- [0752] • 荧光染料;
- [0753] • 免疫调节剂/免疫刺激剂;
- [0754] • 半衰期增加部分;
- [0755] • 溶解性增加部分;
- [0756] • 聚合物-毒素缀合物;
- [0757] • 核酸;
- [0758] • 生物素或链霉亲和素部分;
- [0759] • 维生素;
- [0760] • 蛋白质降解剂('PROTAC');
- [0761] • 靶结合部分;和/或
- [0762] • 抗炎剂。

[0763] 本文所公开的任一种有效载荷可以直接偶联至用于本文公开的一步缀合方法的接头,或者可以连接至包含在已经用本文公开的两步方法生成的抗体-接头缀合物中的连接部分。

[0764] 在某些实施方案中,有效载荷可以是细胞因子。如本文所使用的术语“细胞因子”是指影响其它细胞的功能并且调节免疫或炎症性反应中细胞间的相互作用的任何分泌的多肽。细胞因子包括但不限于单核因子、淋巴因子以及趋化因子,而无论是哪种细胞产生它们。例如,单核因子通常是指由单核细胞产生和分泌的,然而,许多其它细胞产生单核因子,如自然杀伤细胞、成纤维细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、内皮细胞、脑星形胶质细胞、骨髓基质细胞、表皮角质形成细胞以及B淋巴细胞。淋巴因子通常是指由淋巴细胞产生的。细胞因子的示例包括但不限于白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)以及肿瘤坏死因子 β (TNF β)。

[0765] 在某些实施方案中,有效载荷可以是抗炎剂。如本文所使用的术语“抗炎剂”是指其主要作用和使用模式在治疗炎症领域中的那些试剂类别,以及具有有用的抗炎效果的来自另一治疗类别的任何其它试剂。此类抗炎剂包括但不限于非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug,NSAID)、改善疾病的抗风湿药物(disease modifying anti-

rheumatic drug,DMARD)、大环内酯类抗生素以及他汀类药物。优选地,NSAID包括但不限于水杨酸盐(例如阿司匹林)、芳基丙酸(例如布洛芬)、氨基苯甲酸(例如甲芬那酸)、吡唑类(例如保泰松)、环乙酸(吲哚美辛)以及昔康类(例如吡罗昔康)。优选地,用于本发明的方法的抗炎剂包括舒林酸、双氯芬酸、替诺昔康、酮咯酸、萘普生、萘丁美酮、二氟尼柳、酮洛芬、芳基丙酸、替尼达普、羟氯喹、柳氮磺胺吡啶、塞来昔布、罗非昔布、美洛昔康、依托昔布、伐地昔布、甲氨蝶呤、依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、克拉霉素、阿奇霉素、罗红霉素、红霉素、布洛芬、右旋布洛芬、氟比洛芬、非诺洛芬、芬布芬、苯恶洛芬、右旋酮洛芬、托芬那酸、尼美舒利和奥沙普秦。

[0766] 在某些实施方案中,抗炎剂可以是抗炎细胞因子,其在缀合至靶特异性抗体时可以改善例如由自身免疫性疾病引起的炎症。具有抗炎活性的细胞因子可以是但不限于IL-1RA、IL-4、IL-6、IL-10、IL-11、IL-13或TGF- β 。

[0767] 在某些实施方案中,有效载荷可以是生长因子。如本文所使用的术语“生长因子”是指能够刺激细胞生长、增殖、细胞分化和/或细胞成熟的天然存在的物质。生长因子以蛋白质或甾体激素的形式存在。生长因子对于调节多种细胞过程是重要的。生长因子通常用作细胞之间的信号传导分子。然而,它们的促进细胞生长、增殖、细胞分化和细胞成熟的能力因生长因子之间的不同而异。生长因子的示例的非限制性清单包括:碱性成纤维细胞生长因子、肾上腺髓质素、血管生成素、自分泌运动因子、骨形态发生蛋白、脑源性神经营养因子、表皮生长因子、上皮生长因子、成纤维细胞生长因子、胶质细胞系源性神经营养因子、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、生长分化因子-9、肝细胞生长因子、肝癌衍生生长因子、胰岛素生长因子、胰岛素样生长因子、迁移刺激因子、肌肉生长抑制素、神经生长因子和其它神经营养因子、血小板源性生长因子、转化生长因子 α 、转化生长因子 β 、肿瘤坏死因子 α 、血管内皮生长因子、胎盘生长因子、胎牛生长激素以及细胞因子(例如,IL-3和IL-6的IL-1-辅助因子、IL-2- τ -细胞生长因子、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6和IL-7)。

[0768] 在某些实施方案中,有效载荷可以是激素。如本文所使用的术语“激素”是指身体的一个部位的细胞或腺体释放的化学物质,这种化学物质发出影响机体的其它部位的细胞的信息。可以用于本发明的激素的示例是但不限于褪黑素(MT)、5-羟色胺(5-HT)、甲状腺素(T4)、三碘甲腺原氨酸(T3)、肾上腺激素(epinephrine,EPI)或肾上腺素(adrenaline)、去甲肾上腺激素(norepinephrine,NRE)或降肾上腺素(noradrenaline)、多巴胺(DPM或DA)、抗苗勒氏管激素或苗勒氏管抑制激素(AMH)、脂联素(Acrp30)、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone,ACTH)或促皮质素(corticotrophin)、血管紧张素原和血管紧张素(AGT)、抗利尿激素(antidiuretic hormone,ADH)或血管加压素(vasopressin)、心房肽(atrial natriuretic peptide,ANP)或心钠素(atriopeptin)、降钙素(CT)、胆囊收缩素(CCK)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促红细胞生成素(EPO)、卵泡刺激素(FSH)、胃泌素(GRP)、胃饥饿素、胰高血糖素(GCG)、促性腺激素释放激素(GnRH)、生长激素释放激素(GHRH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、人胎盘催乳素(HPL)、生长激素(GH或hGH)、抑制素、胰岛素(INS)、胰岛素样生长因子或生长调节素(IGF)、瘦素(LEP)、促黄体激素(LH)、黑素细胞刺激激素(MSH或 α -MSH)、食欲素(orexin)、催产素(OXT)、甲状旁腺激素(PTH)、催乳素(PRL)、松弛素(RLN)、分泌素(SCT)、生长激素抑制素(SRIF)、血小板生成素(TPO)、甲状腺刺激激素(thyroid-stimulating hormone,TSH)或促甲状腺素(thyrotropin)、促甲状腺素释

放激素 (TRH)、皮质醇、醛固酮、睾酮、脱氢表雄酮 (DHEA)、雄烯二酮、二氢睾酮 (DHT)、雌酮、雌三醇 (E3)、孕酮、骨化三醇、钙二醇、前列腺素 (PG)、白三烯 (LT)、环前列腺素 (PGI₂)、血栓素 (TXA₂)、促乳素释放激素 (PRH)、促脂素 (PRH)、脑钠肽 (BNP)、神经肽Y (NPY)、组胺、内皮素、胰多肽、肾素和脑啡肽。

[0769] 在某些实施方案中,有效载荷可以是抗病毒剂。如本文所使用的术语“抗病毒剂”是指有效抑制哺乳动物中病毒的形成和/或复制的试剂(化合物或生物的)。这包括干扰哺乳动物中病毒的形成和/或复制所必需的宿主或病毒机制的试剂。抗病毒剂包括,例如利巴韦林、金刚烷胺、VX-497 (美泊地布 (merimepodib)、Vertex制药)、VX-498 (Vertex制药)、左旋韦林、韦拉密汀 (Viramidine)、二盐酸组胺 (Ceplene) (二盐酸组胺 (maxamine))、XTL-001 和 XTL-002 (XTL生物制药)。

[0770] 在某些实施方案中,有效载荷可以是抗菌剂。如本文所使用的术语“抗菌剂”是指能够: (i) 抑制、减少或防止细菌的生长; (ii) 抑制或降低细菌在受试者中产生感染的能力; 或 (iii) 抑制或降低细菌在环境中繁殖或保持感染性的能力的任何物质、化合物、物质的组合或化合物的组合。术语“抗菌剂”还指能够降低细菌的传染性或毒性的化合物。

[0771] 在某些实施方案中,有效载荷可以是免疫调节剂。如本文所使用的用于联合治疗的术语“免疫调节剂”是指用于抑制、遮盖或增强宿主的免疫系统的物质。免疫调节剂的示例包括但不限于蛋白质试剂,如细胞因子、肽模拟物和抗体(例如,人类、人源化、嵌合的、单克隆的、多克隆的、Fvs、ScFvs、Fab或F(ab)₂片段或表位结合片段),核酸分子(例如,反义核酸分子、iRNA和三重螺旋),小分子,有机化合物和无机化合物。特别是,免疫调节剂包括但不限于甲氨蝶呤、来氟米特、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、环磷酰胺 (cytoxan)、依木兰 (Immunan)、环孢霉素A、米诺环素、硫唑嘌呤、抗生素(例如,FK506 (他克莫司))、甲基强的松龙 (MP)、皮质类固醇、类固醇、霉酚酸吗啉乙酯 (mycophenolate mofetil)、雷帕霉素 (西罗莫司)、咪唑立宾、脱氧精肌菌素、布哇那、malononitriloamide (例如,来氟米特)、T细胞受体调节剂以及细胞因子受体调节剂。

[0772] 在某些实施方案中,免疫调节剂可以是免疫刺激剂。如本文所使用的术语“免疫刺激剂”优选地是指能引发免疫应答的任何物质(例如,针对特定病原体的免疫反应)。免疫细胞激活化合物包括Toll样受体 (TLR) 激动剂。此类激动剂包括病原体相关分子模式 (PAMP), 例如,模拟感染的组合物,如细菌来源的免疫调节剂(亦称为危险信号),以及损伤相关分子模式 (DAMP), 例如,模拟应激的或损伤的细胞的组合物。TLR激动剂包括核酸或脂质组分(例如,单磷酸脂质A (MPLA))。在一个示例中,TLR激动剂包括TLR9激动剂,如胞嘧啶-鸟嘌呤核苷寡核苷酸 (CpG-ODN), 聚(乙烯亚胺) (PEI) - 缩合寡核苷酸 (ODN), 如PEI-CpG-ODN或双链脱氧核糖核酸 (DNA)。在另一个示例中,TLR激动剂包括TLR3激动剂,如聚肌苷-聚胞苷酸 (聚 (I:C))、PEI-聚 (I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸 (聚 (A:U))、PEI-聚 (A:U) 或双链核糖核酸 (RNA)。其它示例性的疫苗免疫刺激化合物包括脂多糖 (LPS)、趋化因子/细胞因子、真菌 β -葡聚糖(如香菇多糖)、咪唑莫特、CRX-527和OM-174。

[0773] 在某些实施方案中,有效载荷可以是半衰期增加部分或溶解性增加部分。例如,半衰期增加部分是PEG部分(聚乙二醇部分;聚乙二醇化)、其它聚合物部分、PAS部分(包含脯氨酸、丙氨酸和丝氨酸的寡肽;PAS化 (PASylation))或血清白蛋白结合剂。例如,溶解性增加部分为PEG部分(聚乙二醇化)或PAS部分(PAS化)。

[0774] 在某些实施方案中,有效载荷可以是聚合物-毒素缀合物。聚合物-毒素缀合物是能够携带许多有效载荷分子的聚合物。此类缀合物有时也被称为柔性物(fleximer),例如由Mersana治疗公司销售的药物。聚合物-毒素缀合物可以包含本文公开的任何毒素。

[0775] 在某些实施方案中,有效载荷可以是核苷酸。核酸有效载荷的一个示例是MCT-485,它是一种非常小的非编码双链RNA,其具有溶瘤的和免疫激活的性质,由polycholl Technologies, Inc.开发。

[0776] 在某些实施方案中,有效载荷可以是荧光染料。如本文所使用的术语“荧光染料”是指染料,其在第一波长吸收光并在比第一波长更长的第二波长发射。在某些实施方案中,荧光染料是近红外荧光染料,其在650-900nm波长发射光。在该区域,组织自体荧光较低,较低的荧光消光增强了深度组织穿透,具有最小背景干扰。因此,近红外荧光成像可用于使被本发明的抗体-有效载荷缀合物结合的组织在手术期间可见。“近红外荧光染料”是本领域已知的并且是可商购的。在某些实施方案中,近红外荧光染料可以是IRDye 800CW、Cy7、Cy7.5、NIR CF750/770/790、DyLight 800或Alexa Fluor 750。

[0777] 在某些实施方案中,有效载荷可以包括放射性核素。如本文所使用的术语“放射性核素”是指医用放射性核素,例如包括放射性金属的带正电荷的离子,放射性金属如Y、In、Tb、Ac、Cu、Lu、Tc、Re、Co、Fe等,如⁹⁰Y、¹¹¹In、⁶⁷Cu、⁷⁷Lu、⁹⁹Tc、¹⁶¹Tb、²²⁵Ac等。放射性核素可以包含在螯合剂(如DOTA或NODA-GA)中。另外,放射性核素可以是治疗性放射性核素或可在如下所述的成像技术中用作造影剂的放射性核素。放射性核素或包含放射性核素的分子是本领域已知的并且是可商购的。

[0778] 在某些实施方案中,有效载荷可以是维生素。维生素可以选自叶酸类,包括叶酸、叶黄素和维生素B9。

[0779] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述毒素为选自由以下组成的组中的至少一种:

- [0780] • 吡咯并苯并二氮杂草(PBD);
- [0781] • 澳瑞他汀(例如, MMAE, MMAF);
- [0782] • 美登素类(美登素, DM1, DM4, DM21);
- [0783] • 倍癌霉素;
- [0784] • 烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)抑制剂;
- [0785] • 微管溶素;
- [0786] • 烯二炔类(例如, 卡利奇霉素);
- [0787] • PNU, 多柔比星;
- [0788] • 基于吡咯的驱动蛋白纺锤体蛋白(KSP)抑制剂;
- [0789] • 念珠藻素;
- [0790] • 药物外排泵抑制剂;
- [0791] • 山卓霉素;
- [0792] • 鹅膏毒素(amatoxin)(例如, α -鹅膏蕈碱);以及
- [0793] • 喜树碱(例如, 依喜替康, 德鲁替康)。

[0794] 换言之,用本发明的方法制备的抗体-接头缀合物优选包含毒素有效载荷。如本文所使用的术语“毒素”涉及由活细胞或生物体产生的并对细胞或生物体有毒的任何化合物。

因此,毒素可以是,例如,小分子、肽或蛋白质。具体的示例为神经毒素、坏死毒素、血毒素和细胞毒素。在某些实施方案中,所述毒素是用于治疗肿瘤性疾病的毒素。换言之,使用本发明的方法,毒素可以缀合至抗体,并由于抗体的靶特异性而被递送至或进入恶性细胞。

[0795] 在某些实施方案中,毒素可以是澳瑞他汀(auristatin)。如本文所使用的术语“澳瑞他汀”是指抗有丝分裂试剂家族。澳瑞他汀衍生物也包括在术语“澳瑞他汀”的定义中。澳瑞他汀的示例包括但不限于澳瑞他汀E(AE)、单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、单甲基澳瑞他汀F(MMAF)和多拉司他汀(dolastatin)的合成类似物。

[0796] 在某些实施方案中,毒素可以是美登素类。在本发明的上下文中,术语“美登素类”是指一类最初从以下物质中分离的高细胞毒性药物:非洲灌木卵叶美登木(Maytenus ovatus)和另外的美登醇(Maytansinol)和天然美登醇的C-3酯(US Pat.No.4,151,042);合成美登醇的C-3酯类似物(Kupchan et al.,J.Med.Chem.21:31-37,1978;Higashide et al.,Nature 270:721-722,1977;Kawai et al.,Chem.Farm.Bull.32:3441-3451;以及US Pat.No.5,416,064);简单羧酸的C-3酯(US Pat.4,248,870;4,265,814;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,317,821;4,322,348;以及4,331,598);以及与N-甲基-L-丙氨酸的C-3酯和衍生物(U.S.Pat.Nos.4,137,230;4,260,608;以及Kawai et al.,Chem.Pharm Bull.12:3441,1984)。可用于本发明的方法或可包含在本发明的抗体-有效载荷缀合物中的示例性美登素类为DM1、DM3、DM4和/或DM21。

[0797] 在某些实施方案中,毒素可以是倍癌霉素。例如,合适的倍癌霉素可以是倍癌霉素A、倍癌霉素B1、倍癌霉素B2、倍癌霉素CI、倍癌霉素C2、倍癌霉素D、倍癌霉素SA、倍癌霉素MA和CC-1065。术语“倍癌霉素”应理解为也指倍癌霉素的合成类似物,如阿多来新(adozelesin)、比折来新(bizelesin)、卡折来新(carzelesin)、KW-2189和CBI-TMI。

[0798] 在某些实施方案中,毒素可以是NAMPT抑制剂。如本文所使用的术语“NAMPT抑制剂”和“烟酰胺磷酸核糖转移酶抑制剂”是指减少NAMPT的活性的抑制剂。术语“NAMPT抑制剂”也可以包括NAMPT抑制剂的前药。NAMPT抑制剂的示例包括但不限于FK866(也称为AP0866)、GPP 78盐酸盐、ST 118804、STF31、吡啶基氰基胍(也称为CH-828)、GMX-1778和P7C3。其它NAMPT抑制剂是本领域已知的,并且可以适用于本文所描述的组合物和方法。例如,参见PCT公开号WO 2015/054060,美国专利第8211912号和第9676721号,其全部内容通过引用结合于此。在一些实施方案中,NAMPT抑制剂为FK866。在一些实施方案中,NAMPT抑制剂为GMX-1778。

[0799] 在某些实施方案中,毒素可以是微管溶素。微管溶素是细胞毒性肽,其包括9个成员(A-I)。微管溶素A具有作为抗癌剂的潜在应用。它在G2/M期阻滞细胞。微管溶素A比长春碱更有效地抑制聚合反应,并诱导分离的微管的解聚作用。微管溶素A对各种肿瘤细胞系具有强效细胞抑制效果,IC₅₀在皮摩尔范围内。可用于本发明的方法的其它微管溶素可以是微管溶素E。

[0800] 在某些实施方案中,所述毒素可以是烯二炔类。如本文所使用的术语“烯二炔类”是指一类细菌天然产物,其特征在于含有两个由双键隔开的三键的九元环和十元环(例如,参见K.C.Nicolaou;A.L.Smith;E.W.Yue(1993).“Chemistry and biology of natural and designed enediynes”.PNAS 90(13):5881-5888;其全部内容通过引用结合于此)。一些烯二炔能够发生Bergman环合反应,并且得到的双自由基,1,4-脱氢苯衍生物能够从DNA

的糖主链中提取氢原子,这导致DNA链裂解(例如,参见S.Walker;R.Landovitz;W.D.Ding;G.A.Ellestad;D.Kahne(1992).“Cleavage behavior of calicheamicin gamma and calicheamicin T”.Proc Natl Acad Sci U.S.A.89(10):4608-12;其全部内容通过引用结合于此)。它们与DNA的反应性将抗生素特性赋予许多烯二炔,并且一些烯二炔在临床上被研究作为抗癌抗生素。烯二炔类的非限制性示例为蒽环类抗生素(dynemicin)、新制癌菌素、卡利奇霉素、埃斯培拉霉素(esperamicin)(例如,参见Adrian L.Smith and K.C.Bicolaou,“The Eneidyne Antibiotics”J.Med.Chem.,1996,39(11),pp 2103-2117; and Donald Borders,“Eneidyne antibiotics as antitumor agents,”Informa Healthcare;1st edition(Nov.23,1994,ISBN-10:0824789385;其全部内容通过引用结合于此)。在特定实施方案中,毒素可以是卡利奇霉素。

[0801] 在某些实施方案中,毒素可以是多柔比星。如本文所使用的“多柔比星”是指来源于链霉菌属(*Streptomyces*)细菌波塞链霉菌表灰变种(*Streptomyces peucetius* var.*caesius*)的蒽环霉素家族的成员,并且包括多柔比星、柔红霉素、表柔比星和伊达比星。

[0802] 在某些实施方案中,毒素可以是驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂。术语“驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂”是指抑制驱动蛋白纺锤体蛋白的化合物,该驱动蛋白纺锤体蛋白涉及细胞分裂期间双极纺锤体的组装。目前正在研究驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂用于治疗癌症。驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂的示例包括伊斯平斯(ispinesib)。此外,术语“驱动蛋白纺锤体蛋白抑制剂”包括来自葛兰素史克(GlaxoSmithKline)的SB715992或SB743921以及来自CombinatoRx的戊烷脒/氯丙嗪。

[0803] 在某些实施方案中,毒素可以是如US20180078656A1中所描述的念珠藻素,其通过引用结合于此。

[0804] 在某些实施方案中,毒素可以是山卓霉素。山卓霉素是最先从类诺卡氏菌物种(*Nocardioide* sp.) (ATCC 39419)中分离得到的一种缩肽,并且已经显示具有细胞毒性和抗肿瘤活性。

[0805] 在某些实施方案中,毒素可以是鹅膏毒素。鹅膏毒素(包括 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱和鹅膏素)是由8个氨基酸组成的环肽。它们可以从毒鹅膏菌(*Amanita phalloides*)蘑菇中分离出来,或通过合成从构建模块中制备出来。鹅膏毒素特异性抑制哺乳动物细胞的DNA依赖性RNA聚合酶II,并通过这种转录,细胞的蛋白质生物合成受到影响。抑制细胞中的转录导致生长和增殖停止。虽然不是共价结合,但鹅膏蕈碱和RNA聚合酶II之间的复合非常紧密(KD=3nM)。鹅膏蕈碱与酶的解离是非常缓慢的过程,这使得受影响细胞的恢复不太可能。当细胞中对转录的抑制将持续过长时,细胞经历程序性细胞死亡(凋亡)。在一个优选的实施方案中,如本文所使用的术语“鹅膏毒素”是指如在例如W02010/115630、W02010/115629、W02012/119787、W02012/041504和W02014/135282中所描述的 α -鹅膏蕈碱或其变体。

[0806] 在某些实施方案中,毒素可以是喜树碱。如本文所使用的术语“喜树碱”意指用作拓扑异构酶I抑制剂的喜树碱或喜树碱衍生物。例如,示例性喜树碱包括拓扑替康、依喜替康、德鲁替康、伊立替康、DX-8951f、SN38、BN 80915、勒托替康、9-硝基喜树碱和氨基喜树碱。已经描述了多种喜树碱,包括用于治疗人类癌症患者的喜树碱。例如,在Kehrer等人的

文献(Anticancer Drugs,12(2):89-105,(2001))中描述了若干种喜树碱。

[0807] 在本发明的意义上,毒素也可以是药物外排转运体的抑制剂。包含毒素和药物外排转运体的抑制剂的抗体-有效载荷缀合物可具有以下优点:当内化到细胞中时,药物外排转运体的抑制剂防止毒素外排到细胞外。在本发明中,药物外排转运体可以是P-糖蛋白。P-糖蛋白的一些常见药理学抑制剂包括:胺碘酮、克拉霉素、环孢素、秋水仙碱、地尔硫卓、红霉素、非洛地平、酮康唑、兰索拉唑、奥美拉唑以及其它质子泵抑制剂,硝苯地平、帕罗西汀、利血平、沙奎那韦、舍曲林、奎尼丁、他莫昔芬、维拉帕米和度洛西汀。依克立达(Elacridar)和CP 100356是其它常见的P-gp抑制剂。唑喹达(Zosuquidar)和他立喹达(Tariquidar)也是用此理念开发的。最后,伐司扑达(valspodar)和reversan是此类试剂的其它示例。

[0808] 在某些实施方案中,实际的有效载荷可以包含在与本发明的接头连接的有效载荷分子中。有效载荷分子可以具有以下结构:

[0809] X-(间隔基)-有效载荷,

[0810] 其中,有效载荷代表实际的有效载荷,例如,本文公开的化合物之一,X表示适于将有效载荷分子连接至连接部分中(两步方法)或接头(一步方法)的残基Aax、(Sp₁)、B₁或(Sp₂)中的相容的官能团的反应性基团,并且其中,(间隔基)表示将实际有效载荷与反应性基团X在空间上隔开的化学间隔基。然而,应当理解的是,在某些实施方案中,反应性基团X可以是间隔基或实际有效载荷的一部分。例如,间隔基可以包含肽或氨基酸残基,其中反应性基团X可以是包含在该间隔基中的N端氨基酸残基的氨基。在其它实施方案中,间隔基可以不存在。在间隔基不存在的实施方案中,官能团可以包含在实际的有效载荷中。在某些实施方案中,间隔基可以用于将感兴趣的官能团(即,与连接部分中包含的官能团相容的官能团)连接至实际的有效载荷。在某些实施方案中,反应性基团X可以是马来酰亚胺基或环辛炔基,例如但不限于DBCO基或BCN基。

[0811] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述一个或多个有效载荷还包含可切割部分或自裂解部分。

[0812] 换言之,在某些实施方案中,有效载荷分子,更具体地,有效载荷分子中包含的间隔基,可以包含可切割部分或自裂解部分,其允许有效载荷从抗体-接头缀合物中有效释放。

[0813] 由于本文公开的许多接头是基于肽的,一旦本发明的抗体-接头缀合物内化到靶细胞中,它们就可能被宿主细胞肽酶水解。然而,在某些实施方案中,作为有效载荷分子的一部分的间隔基可以包含可切割部分。如本文所使用的“可切割部分”是化学单元,其可以通过酶促或非酶促水解与实际有效载荷分离。

[0814] 在某些实施方案中,可切割部分可以是肽酶切割位点。因此,可切割部分可以是可被特定肽酶或蛋白酶识别并切割的任何氨基酸基序。在某些实施方案中,可切割部分可以是可被组织蛋白酶切割的基序。如本文所使用的术语“组织蛋白酶”是指蛋白酶的家族。术语组织蛋白酶包括组织蛋白酶A、组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶D、组织蛋白酶E、组织蛋白酶F、组织蛋白酶G、组织蛋白酶H、组织蛋白酶K、组织蛋白酶L1、组织蛋白酶L2、组织蛋白酶O、组织蛋白酶S、组织蛋白酶W和组织蛋白酶Z。在特定实施方案中,可切割部分可以是被组织蛋白酶B特异性水解的基序,如缬氨酸-丙氨酸、缬氨酸-瓜氨酸或丙氨酸-丙氨酸。Salomon等人(Optimizing Lysosomal Activation of Antibody-Drug Conjugates

(ADCs) by Incorporation of Novel Cleavable Dipeptide Linkers, Mol Pharm. 2019, 16 (12), p. 4817-4825) 已经公开了可被肽酶特异性水解的其它基序。

[0815] ADC接头中使用的一种典型二肽结构是缬氨酸-瓜氨酸基序,如在本妥昔单抗 Vedotin 中提供,并在 Dubowchik 和 Firestone 中讨论的 (Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity; Bioconjug Chem; 2002; 13(4); p. 855-69)。该接头可以被组织蛋白酶 B 切割,以在疾病部位释放实际有效载荷。缬氨酸-丙氨酸基序也是如此,例如其在 SGN-CD33A 中被提供。

[0816] 可替代地,或者另外,有效载荷分子中包含的间隔基可以包含自裂解部分。术语“自裂解部分”是指双官能化学部分,其能够将两个化学部分共价连接成正常稳定的由三部分组成的 (tripartate) 分子。如果连接至第一部分的键被切割,则自裂解间隔基能够自发地与第二部分分离。在某些实施方案中,有效载荷分子可以包含自裂解的对位氨基苄氧羰基。

[0817] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述可切割部分或所述自裂解部分包含被组织蛋白酶可切割的基序和/或对氨基苄氧羰基氨甲酰基 (PABC) 部分。

[0818] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述可切割部分或所述自裂解部分包含基序缬氨酸-瓜氨酸 (VC) 和/或对氨基苄氧羰基氨甲酰基 (PABC) 部分。

[0819] 换言之,有效载荷分子中包含的间隔基可以包含组织蛋白酶 B-可切割的基序缬氨酸-瓜氨酸、自裂解部分 PABC 或两者。换言之,在某些实施方案中,有效载荷分子可以包括结构 X-Val-Cit-PABC, 其中, X 为包含反应性基团的分子。在某些实施方案中, X 可以包含马来酰亚胺基团 (例如,马来酰亚胺基己酰基) 或炔烃 (例如, DBCO 或 BCN)。在某些实施方案中, PABC 部分可以直接连接至实际有效载荷或可以通过另外的接头连接至实际有效载荷,例如但不限于对硝基苯酚 (PNP) 基团。因此,在某些实施方案中,有效载荷分子可以具有结构 X-Val-Cit-PABC-PNP-有效载荷。在某些实施方案中,有效载荷分子可以具有结构 X-Val-Cit-PABC-PNP-MMAE、X-Val-Cit-PABC-PNP-MMAF 或 X-Val-Cit-PABC-PNP- α -鹅膏蕈碱。

[0820] 必须指出的是,可切割部分也可以是被其它肽酶切割的基序,如半胱天冬酶 3、天冬酰胺内切酶 (Legumain) 或中性粒细胞弹性蛋白酶,或如 Dal Corso 等人 (Innovative Linker Strategies for Tumor-Targeted Drug Conjugates; Chemistry; 25 (65); p. 14740-14757) 所述。

[0821] 在其它实施方案中,有效载荷分子中包含的间隔基可以包含碳水化合物部分。在此类实施方案中,可切割部分可以是可被葡萄糖苷酶切割的基序。因此,在某些实施方案中,可切割部分可以是可被 β -葡萄糖苷酸酶或 β -半乳糖苷酶切割的基序。

[0822] 在其它实施方案中,有效载荷分子中包含的间隔基可以包含一个或多个磷酸酯部分。在此类实施方案中,可切割部分可以是可被磷酸酶切割的基序。因此,在某些实施方案中,可切割部分可以是可被 β 溶酶体酸焦磷酸酶或酸性磷酸酶切割的基序。

[0823] 可用于从接头分子中释放有效载荷的其它可切割部分的示例已经被 Bargh 等人描述 (Cleavable linkers in antibody-drug conjugates; Chem Soc Rev. 2019 Aug 12; 48 (16): 4361-4374)。

[0824] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述一个或多个有效载荷还包含用于将所述有效载荷连接至所述化学间隔基(Sp_1)和/或(Sp_2)或连接至所述接头中包含的所述连接部分 B_1 和/或 B_2 的反应性基团。

[0825] 如上所述,本发明的有效载荷分子可以包含用于将有效载荷分子偶联至接头的反应性基团X。在某些实施方案中,有效载荷分子可以连接至接头中包含的C端羧基,例如残基Aax、(Sp_1)、 B_1 或(Sp_2)中,以及特别是化学间隔基(Sp_1)或(Sp_2)中。在此类实施方案中,有效载荷分子可以通过酰胺键或肽键连接至接头的C端羧基。因此,有效载荷分子可以包含用于将有效载荷分子连接至接头的C端羧基的胺基。在某些实施方案中,胺基可以是间隔基Val-Cit、Val-Ala或Ala-Ala的 α -氨基。

[0826] 在其它实施方案中,有效载荷分子可以连接至包含在连接部分 B_1 和/或 B_2 中的官能团。在此类实施方案中,有效载荷分子可以包含与包含在 B_1 和/或 B_2 中的官能团相容的反应性基团X。例如,有效载荷分子中包含的反应性基团X和 B_1 和/或 B_2 中包含的相容的官能团可以是表2中公开的任何结合配偶体对。优选地,有效载荷分子中包含的反应性基团X可以包含马来酰亚胺基团,使得有效载荷分子可以连接至含巯基的连接部分 B_1 和/或 B_2 ,或者有效载荷分子中包含的反应性基团X可以包含炔基,使得有效载荷分子可以连接至含叠氮化物的连接部分 B_1 和/或 B_2 。

[0827] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述抗体为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY抗体或其片段或重组变体,其中,所述其片段或重组变体保留了靶结合性质并且包含 CH_2 结构域。

[0828] 本文中的术语“抗体”以最广泛的意义使用,并且具体包括单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体),和抗体片段,只要它们表现出所需的生物活性。术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”广义地包括抗体的天然存在形式(例如,IgG、IgA、IgM、IgE)。

[0829] 抗体优选为单克隆抗体。抗体可以是人类来源的,但同样可以来源于小鼠、大鼠、山羊、驴、仓鼠或兔。在缀合物用于治疗的情况下,鼠或兔抗体可以任选地嵌合或人源化。

[0830] 包含 CH_2 结构域的抗体的片段或重组变体可以是,例如,

[0831] • 仅包含重链结构域(鲨鱼抗体/IgNAR($V_H-C_H1-C_H2-C_H3-C_H4-C_H5$)₂或骆驼抗体/hcIgG($V_H-C_H2-C_H3$)₂)的抗体形式

[0832] • scFv-Fc($VH-VL-CH2-CH3$)₂

[0833] • 包含Fc结构域和一个或多个受体结构域的Fc融合肽。

[0834] 抗体也可以是双特异性的(例如,DVD-IgG、crossMab、添加的IgG-HC融合蛋白)或双旁原位移植的(biparatopic)。参见Brinkmann和Kontermann(Bispecific antibodies; Drug Discov Today;2015;20(7);p.838-47)了解概述。

[0835] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述抗体为IgG抗体。

[0836] 如本文所使用的“IgG”是指属于基本上由识别的免疫球蛋白 γ 基因编码的抗体种类的多肽。在人类中,IgG包含亚类或同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠中,IgG包含IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。全长IgG由两对相同的两条免疫球蛋白链组成,每对具有一条轻链和一条重链,每条轻链包括免疫球蛋白结构域VL和CL,并且每条重链包括免疫球蛋白结构域VH、 $C\gamma 1$ (也称为CH1)、 $C\gamma 2$ (也称为CH2)和 $C\gamma 3$ (也称为CH3)。在人类IgG1的情况下,根

据Kabat的EU指数,“CH1”指位置118-215,CH2结构域指位置231-340,CH3结构域指位置341-447。IgG1还包含铰链结构域(hinge domain),在IgG1的情况下,该铰链结构域指位置216-230。

[0837] 本方法的抗体或本发明的抗体-有效载荷缀合物可以是任何抗体,优选任何IgG型抗体。例如,抗体可以是但不限于本妥昔单抗(Brentuximab)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、奥英妥珠单抗(Inotuzumab)、阿维鲁单抗(Avelumab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、利妥昔单抗(Rituximab)、达雷木单抗(Daratumumab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、维多珠单抗(Vedolizumab)、奥瑞珠单抗(Ocrelizumab)、托珠单抗(Tocilizumab)、乌司奴单抗(Ustekinumab)、戈利木单抗(Golimumab)、阿托珠单抗(Obinutuzumab)、泊洛妥珠单抗(Polatuzumab)或恩诺单抗(Enfortumab)。

[0838] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述抗体为糖基化的抗体、去糖基化的抗体或非糖基化的(aglycosylated)抗体。

[0839] 换言之,抗体可以是糖基化的IgG抗体,优选在残基N297糖基化。因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述糖基化的抗体为在CH₂结构域的残基N297(EU编号)处糖基化的IgG抗体。

[0840] 如本文所讨论的,在残基N297处糖基化的IgG抗体比非糖基化抗体具有若干个优点。

[0841] 可替代地,抗体可以是去糖基化的抗体,优选地其中,残基N297处的聚糖已被酶PNGase F切断。另外,抗体可以是非糖基化的抗体,优选地其中,残基N297已被非天冬酰胺残基替换。用于去糖基化抗体和用于生成非糖基化的抗体的方法是本领域已知的。

[0842] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头缀合至所述抗体的Fc结构域中的Gln残基,或其中,所述接头缀合至已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链的Gln残基。

[0843] 换言之,本发明的接头可以缀合至抗体的Fc结构域中的内源性Gln残基或缀合至已经通过分子工程引入所述抗体的Gln残基。

[0844] 本发明的接头可以缀合至抗体的Fc结构域中的任何Gln残基,所述抗体可以作为微生物谷氨酰胺转氨酶的底物。通常,如本文所使用的术语Fc结构域是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域(CH2和CH3)以及IgE、IgY和IgM的最后三个恒定区结构域(CH2、CH3和CH4)。换言之,根据本发明的接头可以缀合至抗体的CH2、CH3和(如适用)CH4结构域。

[0845] 在某些实施方案中,内源性Gln残基可以是IgG抗体的CH2结构域的Gln残基Q295(EU编号)。因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述抗体的所述Fc结构域中的所述Gln残基为IgG抗体的CH2结构域的Gln残基Q295(EU编号)。

[0846] 重要的是理解Q295是IgG型抗体中极其保守的氨基酸残基。它在人类IgG1、2、3、4以及兔和大鼠抗体等中是保守的。因此,能够使用Q295对于制备治疗性抗体-有效载荷缀合物或诊断性缀合物具有相当大的优势,其中所述抗体通常是非人类来源的。因此,根据本发明的方法确实提供了一种极其通用和广泛适用的工具。尽管残基Q295在IgG型抗体中极为保守,但是某些IgG型抗体不具有该残基,如小鼠和大鼠IgG2a抗体。因此,应当理解,本发明的方法中使用的抗体优选是包含C_H2结构域的残基Q295(EU编号)的IgG型抗体。

[0847] 另外,已经表明,使用Q295用于有效载荷连接的工程化缀合物表现出良好的药代动力学和疗效(Lhospice et al., Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-Cd30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models, Mol Pharm; 2015; 12(6), p. 1863-1871), 并且能够携带甚至不稳定的易于降解的毒素(Dorywalska et al.; Site-Dependent Degradation of a Non-Cleavable Auristatin-Based Linker-Payload in Rodent Plasma and Its Effect on ADC Efficacy. PLoS ONE; 2015; 10(7): e0132282)。由于相同的残基被修饰,但是糖基化的抗体的残基被修饰,因此预期使用这种位点特异性方法将观察到类似的效果。糖基化可以进一步有助于总体ADC稳定性,使用上述方法去除聚糖部分已显示会导致抗体不太稳定(Zheng et al.; The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. Mabs-Austin; 2011, 3(6), p. 568-576)。

[0848] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链的Gln残基为非糖基化的IgG抗体的CH2结构域的N297Q (EU编号)。

[0849] 如本文所使用的术语“分子工程”是指使用分子生物学方法操纵核酸序列。在本发明中,分子工程可用于将Gln残基引入抗体的重链或轻链。一般而言,在本发明中设想了将Gln残基引入抗体的重链或轻链的两种不同策略。第一,抗体重链或轻链的单个残基可以被Gln残基取代。第二,由两个或更多个氨基酸残基组成的含Gln的肽标签可以并入至抗体的重链或轻链中。为此,肽标签可以并入重链或轻链的内部位置,即,在重链或轻链的两个现有氨基酸残基之间或通过替换它们,或者肽标签可以融合(添加)到抗体的重链或轻链的N端或C端。

[0850] 在讨论通过谷氨酰胺转氨酶将接头与CH2的Gln残基缀合的文献中,关注点已经是小的低分子量底物。然而,在现有技术文献中,为了完成这种缀合,在N297位置的去糖基化步骤或非糖基化的抗体的使用总是被描述为必要的(WO 2015/015448; WO 2017/025179; WO 2013/092998)。

[0851] 然而,特别意外地,出乎所有人的意料的是,通过使用上述讨论的接头结构,与糖基化抗体的Q295的位点特异性缀合实际上是有效可能的。

[0852] 尽管Q295与N297非常接近,N297在其天然状态下是糖基化的,使用指定的接头的根据本发明的方法仍然允许接头或有效载荷与其缀合。

[0853] 然而,如前所示,根据本发明的方法不需要N297的预先酶促去糖基化,也不需要使非糖基化的抗体,也不需要用于对另一种氨基酸的N297的取代,也不需要引入T299A突变以防止糖基化。

[0854] 这两点在制备方面提供了显著的优势。在GMP条件下,酶促去糖基步骤是不需要的,因为必须确保去糖基化酶(如PNGase F)以及切割的聚糖必须从培养基中去除。

[0855] 此外,不需要用于有效载荷连接的抗体的基因工程,从而可以避免可能增加免疫原性和降低抗体的整体稳定性的序列插入。

[0856] 对另一种氨基酸的N297的取代也有不希望的效果,因为它可以影响整个Fc结构域的整体稳定性(Subedi et al, The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. Structure 2015, 23(9), 1573-1583)以及整个缀合物的功效,从

而可导致增加的抗体聚集和降低的溶解性(Zheng et al.;The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability.Mabs-Austin 2011,3(6),568-576),其对于疏水性有效载荷(如PBD)特别重要。此外,存在于N297的聚糖具有重要的免疫调节效果,因为它引发抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)等。在去糖基化或以上讨论的任何其它方法以获得非糖基化的抗体时,将失去这些免疫调节效果。此外,已建立抗体的任何序列修饰也可以导致调节问题,这是有问题的,因为通常情况下,可接受的和临床验证的抗体被用作ADC缀合的起点。

[0857] 因此,根据本发明的方法允许容易且无缺点地制备具有位点特异性有效载荷结合的化学计量明确定义的ADC。

[0858] 鉴于上述情况,据说,本发明的方法优选用于在抗体的C_H2结构域的残基Q295(EU编号)处的IgG抗体的缀合,其中,抗体在C_H2结构域的残基N297(EU编号)处糖基化。然而,明确指出的是,本发明的方法还包括去糖基化或非糖基化的抗体在抗体的残基Q295或任何其它合适的Gln残基处的缀合,其中,Gln残基可以是内源性Gln残基或已经通过分子工程引入的Gln残基。

[0859] 因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链的所述Gln残基包含在肽中,所述肽已经(a)并入至所述抗体的所述重链或轻链中或(b)融合至所述抗体的所述重链或轻链的N端或C端。

[0860] 在第一种情况下,抗体的重链或轻链的任何氨基残基可以被Gln残基取代,条件是所得抗体可以通过微生物谷氨酰胺转氨酶与本发明的接头缀合。在某些实施方案中,该抗体是其中的IgG抗体的C_H2结构域的氨基酸残基N297(EU编号)被取代的抗体,特别是其中,该取代是N297Q取代。根据抗体的重链,包含N297Q突变的抗体可以缀合至大于1个的接头。例如,包含N297Q突变的抗体可以缀合至四个接头,其中,一个接头缀合至抗体的第一重链的残基Q295,一个接头缀合至抗体的第一重链的残基N297Q,一个接头缀合至抗体的第二重链的残基Q295,以及一个接头缀合至抗体的第二重链的残基N297Q。本领域技术人员知晓,用Gln残基替换IgG抗体的残基N297得到非糖基化的抗体。

[0861] 代替取代抗体的单个氨基酸残基,可以将包含谷氨酰胺转氨酶可及的Gln残基的肽标签引入抗体的重链或轻链。此类肽标签可以融合至抗体的重链或轻链的N端或C端。优选地,包含谷氨酰胺转氨酶可及的Gln残基的肽标签融合至抗体的重链的C端。甚至更优选地,包含谷氨酰胺转氨酶可及的Gln残基的肽标签融合至IgG抗体的重链的C端。在W0 2012/059882和W0 2016/144608中描述了可以融合至抗体的重链的C端并作为微生物谷氨酰胺转氨酶的底物的若干种肽标签。

[0862] 因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,包含所述Gln残基的所述肽已经融合至所述抗体的所述重链的所述C端。

[0863] 可以引入抗体的重链或轻链(特别是融合至抗体的重链的C端)的示例性肽标签为:LLQGG(SEQ ID NO:5)、LLQG(SEQ ID NO:6)、LSLSQG(SEQ ID NO:7)、GGGLLQGG(SEQ ID NO:8)、GLLQG(SEQ ID NO:9)、LLQ(SEQ ID NO:10)、GSPLAQSHGG(SEQ ID NO:11)、GLLQGGG(SEQ ID NO:12)、GLLQGG(SEQ ID NO:13)、GLLQ(SEQ ID NO:14)、LLQLLQGA(SEQ ID NO:15)、LLQGA(SEQ ID NO:16)、LLQYQGA(SEQ ID NO:17)、LLQSGG(SEQ ID NO:18)、LLQYQG(SEQ ID NO:19)、LLQLLQG(SEQ ID NO:20)、SLLQG(SEQ ID NO:21)、LLQLQ(SEQ ID NO:22)、

LLQLLQ(SEQ ID NO:23)、LLQGR(SEQ ID NO:24)、EEQYASTY(SEQ ID NO:25)、EEQYQSTY(SEQ ID NO:26)、EEQYNSTY(SEQ ID NO:27)、EEQYQS(SEQ ID NO:28)、EEQYQST(SEQ ID NO:29)、EQYQSTY(SEQ ID NO:30)、QYQS(SEQ ID NO:31)、QYQSTY(SEQ ID NO:32)、YRYRQ(SEQ ID NO:33)、DYALQ(SEQ ID NO:34)、FGLQRPY(SEQ ID NO:35)、EQKLISEEDL(SEQ ID NO:36)、LQR(SEQ ID NO:37)和YQR(SEQ ID NO:38)。

[0864] 本领域技术人员知晓取代抗体的氨基酸残基或将肽标签引入抗体的方法,例如通过如在Sambrook, Joseph中所描述的分子克隆方法((2001).Molecular cloning:a laboratory manual.Cold Spring Harbor,N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0865] 一般而言,本领域技术人员知晓确定接头在抗体的哪个位置缀合的方法。例如,可以通过抗体-有效载荷缀合物的蛋白水解消化(proteolytic digestion)和所得片段的LC-MS分析来确定缀合位点。例如,可根据使用说明手册,使用GlyciNATOR (Genovis)对样本进行去糖基化,然后分别使用金牌胰蛋白酶(trypsin gold,质谱级,Promega)进行消化。因此,1 μ g蛋白可与50ng胰蛋白酶在37 $^{\circ}$ C孵育过夜。可以使用与Synapt-G2质谱仪(Waters)耦合的nanoAcquity HPLC系统实施LC-MS分析。为此,可以将100ng肽溶液加载到Acquity UPLC对称C18捕集柱(Waters,零件号186006527)上,5 μ L/min的流速以1%缓冲液A(水,0.1%甲酸)和99%缓冲液B(乙腈,0.1%甲酸)捕集3min。然后,可以在25min内用3%至65%缓冲液B的线性梯度洗脱肽。可以在50至2000m/z的质量范围内以正极性分辨率模式采集数据。其它仪器设置可以如下:毛细管电压3.2kV,取样锥40V,提取锥4.0V,源温度130 $^{\circ}$ C,锥气35L/h,纳米流气体0.1bar,以及吹扫气体150L/h。可以用[Glu 1]-血纤维蛋白肽校准质谱仪。

[0866] 此外,本领域技术人员知晓确定抗体-有效载荷构建体的药物-抗体比(DAR)或有效载荷-抗体比的方法。例如,可以通过疏水作用色谱法(HIC)或LC-MS确定DAR。

[0867] 对于疏水作用色谱法(HIC),可以将样本调整至0.5M硫酸铵,并通过MAB PAK HIC丁基柱(5 μ m,4.6 $\times$ 100mm,Thermo Scientific),于1mL/min和30 $^{\circ}$ C使用从A(1.5M硫酸铵,25mM Tris HCl,pH 7.5)至B(20%异丙醇,25mM Tris HCl,pH 7.5)的全梯度评估20min。通常,可以使用40 μ g样本,并且可在280nm记录信号。可以通过用ADC DAR 2物质(species)的绝对保留时间除以相应未缀合的mAb的保留时间来计算相对HIC保留时间(HIC-RRT)。

[0868] 对于LC-MS DAR测定,可以用NH₄HCO₃将ADC稀释至最终浓度0.025mg/mL。随后,40 μ L该溶液可以在室温下用1 μ L TCEP(500mM)还原5min,然后通过添加10 μ L氯乙酰胺(200mM)进行烷基化,接着在37 $^{\circ}$ C的黑暗中孵育过夜。对于反相色谱法,可以使用Dionex U3000系统与软件Chromeleon相结合。该系统可以配备加热至70 $^{\circ}$ C的RP-1000色谱柱(1000 $\text{\AA}$,5 μ m,1.0 $\times$ 100mm,Sepax)和设定为214nm波长的UV检测器。溶剂A可以由具有0.1%甲酸的水组成,溶剂B可以包含具有0.1%甲酸的85%乙腈。可以将还原的和烷基化的样本装载到色谱柱上,并在14分钟内通过30-55%溶剂B的梯度进行分离。液相色谱系统可以偶联至Synapt-G2质谱仪,用于鉴别DAR物质。质谱仪的毛细管电压可设置为3kV,取样锥可设置为30V,而提取锥可设置为5V。源温度可设置为150 $^{\circ}$ C,去溶剂化温度可设置为500 $^{\circ}$ C,锥气体可设置为20l/h,去溶剂化气体可设置为600l/h,并且可以在600-5000Da的质量范围内以1s扫描时间以正模式进行采集。可使用碘化钠校准仪器。可以使用MassLynx的MaxEnt1算法对光谱实施反卷积

(deconvolution),直至收敛。将DAR物质分配至色谱峰后,可以根据反相色谱的积分峰面积计算DAR。

[0869] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头缀合至所述Gln残基的酰胺侧链。

[0870] 换言之,根据本发明的接头优选缀合至抗体中包含的Gln残基的侧链中的酰胺基,优选本文公开的任何一个Gln残基。

[0871] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头适于缀合至糖基化的抗体,缀合效率为至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0872] 换言之,在某些实施方案中,接头可以是能以至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的效率缀合至糖基化的抗体的接头。优选地,糖基化的抗体是糖基化的IgG抗体,更优选是在残基N297(EU编号)处糖基化的IgG抗体。

[0873] 本领域技术人员知晓确定具有特异性接头的抗体的糖基化效率的方法。例如,缀合效率可以如本文所述来确定。换言之,抗体,特别是IgG1抗体,可以以1-5mg/mL的浓度与5-20eq摩尔当量的接头和每mg抗体3-6U的微生物谷氨酰胺转氨酶在合适的缓冲液中于37℃孵育20-48小时。在孵育期之后,可以通过还原条件下的LC-MS分析确定缀合效率。微生物谷氨酰胺转氨酶可以是来自茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)的MTG谷氨酰胺转氨酶,其可从Zedira(德国)获得。合适的缓冲液可以是Tris、MOPS、HEPES、PBS或BisTris缓冲液。然而,应当理解,缓冲系统的选择可以改变,并且在很大程度上取决于接头的化学性质。然而,本领域技术人员能够基于本发明的公开内容鉴定最佳缓冲条件。可替代地,缀合效率可以如Spycher等人(Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase, ChemBioChem 2019 18(19): 1923-1927)所述确定,并如Benjamin等人(Thiolation of Q295: Site-Specific Conjugation of Hydrophobic Payloads without the Need for Genetic Engineering, Mol. Pharmaceutics 2019, 16: 2795-2807)所述分析。

[0874] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述微生物谷氨酰胺转氨酶来源于链霉菌属(*Streptomyces*)物种,特别是茂原链霉菌。

[0875] 换言之,本发明的方法中使用的微生物谷氨酰胺转氨酶可以来源于链霉菌属物种,特别是来源于茂原链霉菌,优选与天然酶具有80%的序列同一性。因此,MTG可以是天然酶或天然酶的工程化变体。

[0876] 一种这样的微生物谷氨酰胺转氨酶可以从Zedira(德国)购得。它是在大肠杆菌(*E. coli*.)中重组生产的。茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶具有如SEQ ID NO:1中公开的氨基酸序列。具有其它氨基酸序列的茂原链霉菌MTG变体已经被报道并且也包括在本发明中(SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3)。

[0877] 在另一个实施方案中,可以使用微生物谷氨酰胺转氨酶拉达卡链霉菌(*Streptomyces ladakanum*,以前被称为达卡链轮丝菌(*Streptoverticillium ladakanum*))。拉达卡链霉菌谷氨酰胺转氨酶(美国专利号US 6,660,510 B2)具有SEQ ID NO:4中公开的氨基酸序列。

[0878] 上述两种谷氨酰胺转氨酶都可以进行序列修饰。在一些实施方案中,可以使用与

SEQ ID NO:1-4具有80%、85%、90%或95%或更多序列同一性的谷氨酰胺转氨酶。

[0879] 另一种合适的微生物谷氨酰胺转氨酶可以从Ajinomoto购得,称为ACTIVA TG。与来自Zedira的谷氨酰胺转氨酶相比,ACTIVA TG缺少4个N端氨基酸,但具有相似的活性。

[0880] 在本发明的上下文中可以使用的其它微生物谷氨酰胺转氨酶公开于Kieliszek和Misiewicz (Folia Microbiol (Praha) .2014;59 (3) :241-250)、WO 2015/191883 A1、WO 2008/102007 A1和US 2010/0143970中,它们的内容通过引用完全结合于此。

[0881] 在某些实施方案中,微生物谷氨酰胺转氨酶的突变变体可以用于接头与抗体的缀合。换言之,用于本发明的方法的微生物谷氨酰胺转氨酶可以是如SEQ ID NO:1或2中所示的茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶的变体。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1中所示的重组茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶可以包含突变G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1中所示的重组茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶可以包含突变G254D和E304D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1中所示的重组茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶可以包含突变D4E和G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1中所示的重组茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶可以包含突变E124A和G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1中所示的重组茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶可以包含突变A216D和G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:1中所示的重组茂原链霉菌谷氨酰胺转氨酶可以包含突变G254D和K331T。

[0882] 可以将微生物谷氨酰胺转氨酶以允许抗体与接头有效缀合的任何浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,缀合反应中微生物谷氨酰胺转氨酶的浓度可以取决于在相同反应中使用的抗体的量。例如,可以将微生物谷氨酰胺转氨酶以小于100U/mg抗体、90U/mg抗体、80U/mg抗体、70U/mg抗体、60U/mg抗体、50U/mg抗体、40U/mg抗体、30U/mg抗体、20U/mg抗体、10U/mg抗体或6U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物谷氨酰胺转氨酶以1、3、5或6U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中。

[0883] 换言之,在某些实施方案中,可以将微生物谷氨酰胺转氨酶以1-20U/mg抗体,优选1-10U/mg抗体,更优选1-7.5U/mg抗体,甚至更优选2-6U/mg抗体,甚至更优选2-4U/mg抗体范围内的浓度添加至缀合反应中,最优选3U/mg抗体。

[0884] 根据本发明的方法包括微生物谷氨酰胺转氨酶的使用。然而,应当注意的是,等效反应可以通过非微生物来源的包含谷氨酰胺转氨酶活性的酶进行。因此,根据本发明的抗体-接头缀合物也可以用非微生物来源的包含谷氨酰胺转氨酶活性的酶生成。

[0885] 抗体可以任何浓度添加至缀合反应中。然而,优选地,将抗体以0.1-20mg/ml的浓度添加至缀合反应中。换言之,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,将抗体以0.1-20mg/ml,优选0.25-15mg/ml,更优选0.5-12.5mg/ml,甚至更优选1-10mg/ml,甚至更优选2-7.5mg/ml,最优选约5mg/ml的浓度添加至缀合反应中。

[0886] 为了获得有效的缀合,优选地,将摩尔过量的接头添加至抗体中。换言之,在某些实施方案中,将抗体与至少2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100摩尔当量的接头混合。

[0887] 换言之,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,抗体与2-100摩尔当量的接头,优选2-80摩尔当量的接头,更优选2-70摩尔当量的接头,甚至更优选2-60摩尔当量的接头,甚至更优选2-50摩尔当量的接头,甚至更优选2-40摩尔当量的接头,甚至更优选2-30摩尔当量的接头,甚至更优选5-30摩尔当量的接头,最优选5-20摩尔当量的接头接触。

[0888] 可替代地,抗体可以与5-100摩尔当量的接头,优选5-80摩尔当量的接头,更优选5-70摩尔当量的接头,甚至更优选5-60摩尔当量的接头,甚至更优选5-50摩尔当量的接头,甚至更优选5-40摩尔当量的接头,甚至更优选5-30摩尔当量的接头,最优选5-20摩尔当量的接头接触。

[0889] 优选在6-9范围内的pH实施根据本发明的方法。因此,在优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述接头与所述抗体的缀合是以6-8.5的pH实现的,更优选在7-8的pH范围内。在最优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,接头与抗体的缀合是在pH 7.6实现的。

[0890] 可以在适于有效载荷与接头缀合的任何缓冲液中实施本发明的方法。适于本发明的方法的缓冲液包括但不限于Tris、MOPS、HEPES、PBS或BisTris缓冲液。缓冲液的浓度取决于抗体和/或接头的浓度,其范围可以是10-1000mM、10-500mM、10-400mM、10至250mM、10至150mM或10至100mM。此外,所述缓冲液可以包含适于实施本发明的方法的任何盐浓度。例如,本发明的方法中使用的缓冲液可以具有 $\leq 150\text{mM}$ 、 $\leq 140\text{mM}$ 、 $\leq 130\text{mM}$ 、 $\leq 120\text{mM}$ 、 $\leq 110\text{mM}$ 、 $\leq 100\text{mM}$ 、 $\leq 90\text{mM}$ 、 $\leq 80\text{mM}$ 、 $\leq 70\text{mM}$ 、 $\leq 60\text{mM}$ 、 $\leq 50\text{mM}$ 、 $\leq 40\text{mM}$ 、 $\leq 30\text{mM}$ 、 $\leq 20\text{mM}$ 或 $\leq 10\text{mM}$ 的盐浓度,或者不含盐。在优选实施方案中,缓冲液为50mM Tris (pH 7.6),不含盐。

[0891] 应当注意的是,最佳反应条件(如pH、缓冲液、盐浓度)可以因有效载荷的不同而异,并在一定程度上取决于接头和/或有效载荷的物理化学性质。然而,本领域技术人员不需要过度的实验以鉴定适于实施本发明的方法的反应条件。

[0892] 应当理解,本申请包括以上公开的接头、抗体MTG和/或缓冲液液浓度的任何组合。

[0893] 在优选实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N $\rightarrow$ C方向显示)缀合至所述抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0894] $\text{Aax}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$

[0895] 其中

[0896] • Aax为具有结构 $\text{NH}_2-\text{Y}-\text{COOH}$ 的氨基酸,其中,Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

[0897] • (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;

[0898] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在;

[0899] • B_1 为连接部分或有效载荷;并且

[0900] 其中,抗体与2-80摩尔当量的接头接触;和/或

[0901] 其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以1-20U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中,并且,任选地其中,将抗体以0.1-20mg/mL的浓度添加至缀合反应中。

[0902] 在更优选的实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N $\rightarrow$ C方向显示)缀合至所述抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0903] $\text{Aax}-(\text{Sp}_1)-\text{B}_1-(\text{Sp}_2)$

[0904] 其中

[0905] • Aax为具有结构 $\text{NH}_2-\text{Y}-\text{COOH}$ 的氨基酸,其中,Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

[0906] • (Sp₁) 为化学间隔基或不存在;

[0907] • (Sp₂) 为化学间隔基或不存在;

[0908] • B₁ 为连接部分或有效载荷;并且

[0909] 其中,抗体与2-50摩尔当量的接头接触;和/或

[0910] 其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以1-10U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中,并且,任选地其中,将抗体以1-10mg/mL的浓度添加至缀合反应中。

[0911] 在甚至更优选的实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N→C方向显示)缀合至所述抗体中包含的谷氨酰胺 (Gln) 残基的步骤:

[0912] Aax- (Sp₁) -B₁ - (Sp₂)

[0913] 其中

[0914] • Aax为具有结构NH₂-Y-COOH的氨基酸,其中,Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

[0915] • (Sp₁) 为化学间隔基或不存在;

[0916] • (Sp₂) 为化学间隔基或不存在;

[0917] • B₁ 为连接部分或有效载荷;并且

[0918] 其中,抗体与2-30摩尔当量的接头接触;和/或

[0919] 其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以2-6U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中,并且,任选地其中,将抗体以2-7.5mg/mL的浓度添加至缀合反应中。

[0920] 在最优选的实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过N端残基Aax中的伯胺将包含以下结构的接头(以N→C方向显示)缀合至所述抗体中包含的谷氨酰胺 (Gln) 残基的步骤:

[0921] Aax- (Sp₁) -B₁ - (Sp₂)

[0922] 其中

[0923] • Aax为具有结构NH₂-Y-COOH的氨基酸,其中,Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

[0924] • (Sp₁) 为化学间隔基或不存在;

[0925] • (Sp₂) 为化学间隔基或不存在;

[0926] • B₁ 为连接部分或有效载荷;并且

[0927] 其中,抗体与约5-20摩尔当量的接头接触;和/或

[0928] 其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以约3U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中,并且,任选地其中,将抗体以约5mg/mL的浓度添加至缀合反应中。

[0929] 发明人进一步确定,糖基化的抗体的缀合效率可以通过调节缀合反应中接头与抗体的比例来提高。特别是,令人惊讶的是,发明人发现较低的接头-抗体比导致与糖基化的抗体的较高的缀合效率。

[0930] 在某些实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过伯胺NH₂将包含以下结构的接头缀合至糖基化的抗体中包含的谷氨酰胺 (Gln) 残基的步骤:

[0931] NH₂- (Sp₁) -B₁ - (Sp₂)

[0932] 其中

[0933] • (Sp₁) 为化学间隔基或不存在;

[0934] • (Sp₂) 为化学间隔基或不存在;

[0935] • B₁ 为连接部分或有效载荷;并且

[0936] 其中,糖基化的抗体与2-80摩尔当量,优选2-70摩尔当量,更优选2-60摩尔当量,甚至更优选2-50摩尔当量,甚至更优选2-40摩尔当量,甚至更优选2-30摩尔当量,甚至更优选5-30摩尔当量,最优选5-20摩尔当量的接头接触。

[0937] 可替代地,糖基化的抗体可以与5-80摩尔当量,优选5-70摩尔当量,更优选5-60摩尔当量,甚至更优选5-50摩尔当量,甚至更优选5-40摩尔当量,甚至更优选5-30摩尔当量,最优选5-20摩尔当量的接头接触。

[0938] 在某些实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过伯胺NH₂将包含以下结构的接头缀合至糖基化的抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0939] NH₂ - (Sp₁) - B₁ - (Sp₂)

[0940] 其中

[0941] • (Sp₁) 为化学间隔基或不存在;

[0942] • (Sp₂) 为化学间隔基或不存在;

[0943] • B₁ 为连接部分或有效载荷;并且

[0944] 其中,糖基化的抗体与2-80摩尔当量的接头接触;

[0945] 和/或其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以1-20U/mg抗体范围内的浓度添加至缀合反应中;

[0946] 并且,任选地其中,将糖基化的抗体以0.1-20mg/mL范围内的浓度添加至缀合反应中。

[0947] 在某些实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过伯胺NH₂将包含以下结构的接头缀合至糖基化的抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0948] NH₂ - (Sp₁) - B₁ - (Sp₂)

[0949] 其中

[0950] • (Sp₁) 为化学间隔基或不存在;

[0951] • (Sp₂) 为化学间隔基或不存在;

[0952] • B₁ 为连接部分或有效载荷;并且

[0953] 其中,糖基化的抗体与2-50摩尔当量的接头接触;

[0954] 和/或其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以1-10U/mg抗体范围内的浓度添加至缀合反应中;

[0955] 并且,任选地其中,将糖基化的抗体以1-10mg/mL范围内的浓度添加至缀合反应中。

[0956] 在某些实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTG) 生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过伯胺NH₂将包含以下结构的接头缀合至糖基化的抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0957] $\text{NH}_2 - (\text{Sp}_1) - \text{B}_1 - (\text{Sp}_2)$

[0958] 其中

[0959] • (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;

[0960] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在;

[0961] • B_1 为连接部分或有效载荷;并且

[0962] 其中,糖基化的抗体与2-30摩尔当量的接头接触;

[0963] 和/或其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以2-6U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中;

[0964] 并且,任选地其中,将糖基化的抗体以2-7.5mg/mL范围内的浓度添加至缀合反应中。

[0965] 在某些实施方案中,本发明涉及一种通过微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)生成抗体-接头缀合物的方法,所述方法包括通过伯胺 NH_2 将包含以下结构的接头缀合至糖基化的抗体中包含的谷氨酰胺(Gln)残基的步骤:

[0966] $\text{NH}_2 - (\text{Sp}_1) - \text{B}_1 - (\text{Sp}_2)$

[0967] 其中

[0968] • (Sp_1) 为化学间隔基或不存在;

[0969] • (Sp_2) 为化学间隔基或不存在;

[0970] • B_1 为连接部分或有效载荷;并且

[0971] 其中,糖基化的抗体与约5-20摩尔当量的接头接触;

[0972] 和/或其中,将微生物谷氨酰胺转氨酶以约3U/mg抗体的浓度添加至缀合反应中;

[0973] 并且,任选地其中,将糖基化的抗体以约5mg/mL的浓度添加至缀合反应中。

[0974] 在接头具有结构 $\text{NH}_2 - (\text{Sp}_1) - \text{B}_1 - (\text{Sp}_2)$ 的实施方案中,化学间隔基 (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 可以具有或包括本文其它地方定义的结构。

[0975] 特别是, (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 可以是或包含任何直链的、支链的和/或环状的 C_{2-30} 烷基、 C_{2-30} 烯基、 C_{2-30} 炔基、 C_{2-30} 杂烷基、 C_{2-30} 杂烯基、 C_{2-30} 杂炔基,任选地其中,可以插入一个或多个同素环的芳香族化合物基团或杂环化合物基团;特别是,任何直链或支链 C_{2-5} 烷基、 C_{5-10} 烷基、 C_{11-20} 烷基、 $-\text{O}-\text{C}_{1-5}$ 烷基、 $-\text{O}-\text{C}_{5-10}$ 烷基、 $-\text{O}-\text{C}_{11-20}$ 烷基或 $(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{1-24}$ 或 $(\text{CH}_2)_{x1}-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_{1-24}-(\text{CH}_2)_{x2}$ -基(其中, $x1$ 和 $x2$ 独立地为选自0至20范围的整数),氨基酸、寡肽、聚糖、硫酸酯、磷酸酯或羧酸酯。在一些实施方案中, (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 可以包含 C_{2-6} 烷基。

[0976] 在某些实施方案中,化学间隔基 (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 可以包含一种或多种聚乙二醇(PEG)部分或类似的缩聚物,如聚(甲基丙烯酸羧基甜菜碱酯)(pCBMA)、聚恶唑啉、聚丙三醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚(甲基丙烯酸羟乙酯)(pHEMA)。聚乙二醇(PEG)是聚醚化合物,具有从工业制造到医药的许多应用。取决于其分子量,PEG也被称为聚环氧乙烷(PEO)或聚氧化乙烯(POE)。PEG的结构通常表示为 $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ 。

[0977] 在某些实施方案中,化学间隔基 (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 可以包含葡聚糖(dextran)。如本文所使用的术语“葡聚糖”是指由不同长度的链组成的复杂的支链葡聚糖,其可以具有3kDa至2000kDa的重量。直链通常由葡萄糖分子之间的 α -1,6糖苷键组成,而支链则从 α -1,3糖苷键开始。葡聚糖可以从蔗糖合成,例如通过乳酸菌合成。在本发明的上下文中,待用作载体的葡聚糖可以优选具有约15kDa至1500kDa的分子量。

[0978] 在某些实施方案中,化学间隔基 (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 可以包含寡核苷酸。如本文所使

用的术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的低聚物或聚合物,以及非天然存在的寡核苷酸。由于较高的稳定性,寡核苷酸优选为DNA的聚合物。

[0979] 在某些实施方案中,结构 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)$ 可以是具有结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{Z}$ 的PEG-胺,其中, n 为1至20的整数;并且其中, Z 可以是包含适于将PEG-胺偶联至有效载荷 B_1 的官能团的分子。在某些实施方案中,结构 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)$ 可以是具有结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{NH}_2$ 的PEG二胺。

[0980] 在某些实施方案中,结构 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)$ 可以是或包括二胺,其中,第一胺缀合至糖基化的抗体中的谷氨酰胺残基,并且其中,第二胺适于将二胺偶联至有效载荷 B_1 。在某些实施方案中,二胺可以具有结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$,其中, n 为0至20的整数,优选0至10。在某些实施方案中,二胺可以是1,5-戊二胺($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$)。在某些实施方案中,二胺可以是丁二胺($\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$)。

[0981] 应当理解,接头 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)-\text{B}_1$ 中包含的连接部分或有效载荷 B_1 可以是本文公开的任何连接部分或有效载荷。此外, B_1 可以包含本文公开的可切割部分和/或自裂解部分中的任一种。

[0982] 接头 $\text{NH}_2-(\text{SP}_1)-\text{B}_1$ 可以直接或通过化学间隔基(SP_2)偶联至第二连接部分或有效载荷 B_2 。 B_2 和(SP_2)在本文其它地方有更详细的定义。

[0983] 还应当理解的是,本文提供的接头的定义既适用于根据本发明的方法,也适用于根据本发明的抗体-接头缀合物。

[0984] 在特定实施方案中,本发明涉及已经用上述任何步骤生成的抗体-接头缀合物。

[0985] 在特定实施方案中,本发明涉及蛋白质-接头缀合物,其包含:

[0986] a) 蛋白质;和

[0987] b) 包含以下结构的接头(以N→C方向显示)

[0988] $(\text{Aax})-(\text{SP}_1)-\text{B}_1-(\text{SP}_2)$,

[0989] 其中

[0990] • Aax为氨基酸或氨基酸衍生物;

[0991] • (SP_1)为化学间隔基或不存在;

[0992] • (SP_2)为化学间隔基或不存在;并且

[0993] • B_1 为连接部分或有效载荷;

[0994] 其中,所述接头通过残基Aax中的伯胺缀合至包含在所述蛋白质的谷氨酰胺(Gln)残基的酰胺侧链。

[0995] 蛋白质-接头缀合物中包含的蛋白质可以是本文公开的任一种蛋白质。然而,优选的蛋白质为抗体。

[0996] 因此,在特定实施方案中,本发明涉及抗体-接头缀合物,其包含:

[0997] a) 抗体;和

[0998] b) 包含以下结构的接头(以N→C方向显示)

[0999] $(\text{Aax})-(\text{SP}_1)-\text{B}_1-(\text{SP}_2)$,

[1000] 其中

[1001] • Aax为氨基酸或氨基酸衍生物;

[1002] • (SP_1)为化学间隔基或不存在;

[1003] • (SP_2)为化学间隔基或不存在;并且

[1004] • B₁为连接部分或有效载荷；

[1005] 其中，所述接头通过残基Aax中的伯胺缀合至包含在所述抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺(Gln)残基的酰胺侧链。

[1006] 换言之，本发明还涉及已经用本发明的方法生成的抗体-接头缀合物。特别是，本发明涉及已经在包含在抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺残基处与本文公开的任一种接头缀合的抗体。优选地，本发明的接头通过酰胺键缀合至抗体中的谷氨酰胺残基，在抗体中包含的谷氨酰胺残基的酰胺侧链与接头的残基Aax中包含的伯胺之间形成该酰胺键。在某些实施方案中，残基Aax中包含的伯胺是Aax的氨基，特别是Aax的 α -氨基。

[1007] 在特定实施方案中，本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物，其中，所述残基Aax为氨基酸，其选自由以下组成的组：丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸或其氨基酸模拟物或衍生物。

[1008] 接头中包含的残基Aax可以是本文公开的任何一个残基，接头通过该残基Aax缀合至抗体。换言之，根据本发明的抗体-有效载荷缀合物中的残基Aax可以是丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸或缬氨酸残基，或这些残基中任一个的氨基酸模拟物或衍生物。

[1009] 因此，在某些实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的丙氨酸、丙氨酸模拟物或丙氨酸衍生物。

[1010] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的精氨酸、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物。

[1011] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的天冬酰胺、天冬酰胺模拟物或天冬酰胺衍生物。

[1012] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的天冬氨酸、天冬氨酸模拟物或天冬氨酸衍生物。

[1013] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的半胱氨酸、半胱氨酸模拟物或半胱氨酸衍生物。

[1014] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的谷氨酸、谷氨酸模拟物或谷氨酸衍生物。

[1015] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的谷氨酰胺、谷氨酰胺模拟物或谷氨酰胺衍生物。

[1016] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的甘氨酸、甘氨酸模拟物或甘氨酸衍生物。

[1017] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的组氨酸、组氨酸模拟物或组氨酸衍生物。

[1018] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的异亮氨酸、异亮氨酸模拟物或异亮氨酸衍生物。

[1019] 在其它实施方案中，本发明涉及抗体药物缀合物，其中Aax是如本文所公开的亮氨酸、亮氨酸模拟物或亮氨酸衍生物。

[1020] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,特别是其中氨基酸侧链中的伯胺被取代或修饰的赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物。

[1021] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的甲硫氨酸、甲硫氨酸模拟物或甲硫氨酸衍生物。

[1022] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的苯丙氨酸、苯丙氨酸模拟物或苯丙氨酸衍生物。

[1023] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的脯氨酸模拟物或脯氨酸衍生物,特别是包含伯胺的脯氨酸衍生物或模拟物。

[1024] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的丝氨酸、丝氨酸模拟物或丝氨酸衍生物。

[1025] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的苏氨酸、苏氨酸模拟物或苏氨酸衍生物。

[1026] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的色氨酸、色氨酸模拟物或色氨酸衍生物。

[1027] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的酪氨酸、酪氨酸模拟物或酪氨酸衍生物。

[1028] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的缬氨酸、缬氨酸模拟物或缬氨酸衍生物。

[1029] 在其它实施方案中,本发明涉及抗体药物缀合物,其中Aax是如本文所公开的包含环部分的氨基酸、包含生物正交部分的氨基酸、 α -甲基氨基酸、 β -氨基酸或 γ -氨基酸。

[1030] 在特定实施方案中,本发明涉及抗体-接头缀合物,其包含:

[1031] a) 抗体;和

[1032] b) 包含以下结构的接头(以N $\rightarrow$ C方向显示)

[1033] (Aax) - (Sp₁) - B₁ - (Sp₂),

[1034] 其中

[1035] • Aax为具有结构NH₂-Y-COOH的氨基酸,其中,Y包含取代的或未取代的烷基或杂烷基链;

[1036] • (Sp₁) 为化学间隔基;

[1037] • (Sp₂) 为化学间隔基或不存在;并且

[1038] • B₁为连接部分或有效载荷;

[1039] 其中,所述接头通过残基Aax中的伯胺缀合至包含在所述抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺(Gln)残基的酰胺侧链。

[1040] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的缀合物,其中,Y包含结构-(CH₂)_n-,并且其中,n为1至20的整数。在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的缀合物,其中,n是1至10、1至6、2至20、2至10、2至6、3至20、3至10或3至6的整数。

[1041] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的缀合物,其中,Y包含结构-(CH₂)_n-,并且其中,n为1。在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的缀合物,其中,Y包含结构-(CH₂)_n-,并且其中,n为2。在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的缀合物,其中,Y包含

结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 3。在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的缀合物, 其中, Y 包含结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 4。在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的缀合物, 其中, Y 包含结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 5。在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的缀合物, 其中, Y 包含结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 6。在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的缀合物, 其中, Y 包含结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 7。在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的缀合物, 其中, Y 包含结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 8。在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的缀合物, 其中, Y 包含结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 9。在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的缀合物, 其中, Y 包含结构- $(\text{CH}_2)_n$ -, 并且其中, n 为 10。

[1042] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述化学间隔基 (Sp_1) 和 (Sp_2) 分别包含 0 至 12 个氨基酸残基。

[1043] 包含在根据本发明的抗体-接头缀合物中的化学间隔基 (Sp_1) 和 (Sp_2) 可以具有与包含在用于本发明的方法中的接头中的化学间隔基 (Sp_1) 和 (Sp_2) 相同的特性。

[1044] 在某些实施方案中, 包含在抗体-接头有效载荷中的化学间隔基 (Sp_1) 和 (Sp_2) 可以包含 0 至 12 个氨基酸残基, 包括氨基酸衍生物和氨基酸模拟物。换言之, 在某些实施方案中, (Sp_1) 可以包含 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个氨基酸残基, 并且 (Sp_2) 可以包含 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个氨基酸残基。在某些实施方案中, (Sp_1) 可以包含 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个氨基酸残基, 并且 (Sp_2) 可以不存在。特别地, 优选地, 当 B_1 是有效载荷时, (Sp_2) 不存在。在 B_1 是连接部分的实施方案中, (Sp_2) 可以存在, 并且任选地连接至额外的有效载荷或连接部分 (B_2)。

[1045] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述接头包含至多 25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6 个氨基酸残基。

[1046] 换言之, 在某些实施方案中, 包含在根据本发明的抗体-接头缀合物中的接头可以包含 25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。应当理解, 接头中包含的氨基酸残基, 包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物, 它们是包含在 A_{ax} 、化学间隔基 (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 以及在某些实施方案中也在 B_1 和/或 B_2 中的氨基酸残基, 其中, B_1 和/或 B_2 为基于氨基酸的连接部分或有效载荷。在接头仅包含单个氨基酸残基的实施方案中, 所述单个氨基酸残基优选为位于 A_{ax} 位置的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。在此类实施方案中, (Sp_1) 和/或 (Sp_2) 不存在或不包含任何氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。在某些实施方案中, 包含单个氨基酸残基的接头可以具有结构 $A_{ax}-B_1$ 。

[1047] 在某些实施方案中, 包含 A_{ax} 、(Sp_1)、 B_1 和 (Sp_2) 以及任选的 B_2 的包含在抗体-有效载荷缀合物中的接头, 可以包含 2 至 25 个氨基酸残基, 包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中, 包含 A_{ax} 、(Sp_1)、 B_1 和 (Sp_2) 以及任选的 B_2 的包含在抗体-有效载荷缀合物中的接头, 可以包含 2 至 20 个氨基酸残基, 包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中, 包含 A_{ax} 、(Sp_1)、 B_1 和 (Sp_2) 以及任选的 B_2 的包含在抗体-有效载荷缀合物中的接头, 可以包含 2 至 15 个氨基酸残基, 包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中, 包含 A_{ax} 、(Sp_1)、 B_1 和 (Sp_2) 以及任选的 B_2 的包含在抗体-有效载荷缀合物中的接头, 可以包含 2 至 10 个氨基酸残基, 包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中, 包含 A_{ax} 、(Sp_1)、 B_1 和 (Sp_2) 以及任选的 B_2 的包含在抗体-有效载荷缀合物中的接头, 可以包含 3 至 10 个

氨基酸残基,包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的包含在抗体-有效载荷缀合物中的接头,可以包含3至8个氨基酸残基,包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。在其它实施方案中,包含Aax、(Sp₁)、B₁和(Sp₂)以及任选的B₂的包含在抗体-有效载荷缀合物中的接头,可以包含4至8个氨基酸残基,包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。

[1048] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述接头的净电荷为中性的或正的。

[1049] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述接头不包含带负电荷的氨基酸残基。

[1050] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述接头包含至少一个带正电荷的氨基酸残基。

[1051] 换言之,抗体-接头缀合物中包含的接头可以包含已经公开的用于根据本发明的方法中使用的接头的任何物理化学性质或氨基酸残基。

[1052] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述接头包含第二连接部分或有效载荷B₂,特别是其中,B₂通过所述化学间隔基(Sp₂)连接至所述接头。

[1053] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,B₁和B₂彼此相同或不同。

[1054] 换言之,抗体-接头缀合物可以包含两个连接部分或有效载荷,其中,该两个连接部分和/或有效载荷可以相同或不同。连接部分和有效载荷可以是本文公开的用于本发明的方法的连接部分或有效载荷中的任一种。

[1055] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,B₁和/或B₂为连接部分。

[1056] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述连接部分B₁和/或B₂的至少一个包含:

[1057] • 生物正交标志物基团,或

[1058] • 用于交联的非生物正交实体。

[1059] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述生物正交标志物基团或所述非生物正交实体由至少一种分子或部分组成或包含至少一种分子或部分,所述分子或部分选自由以下组成的组:

[1060] • -N-N≡N,或-N₃;

[1061] • Lys(N₃);

[1062] • 四嗪;

[1063] • 炔烃;

[1064] • 应变环辛炔;

[1065] • BCN;

[1066] • 应变烯烃;

[1067] • 光反应性基团;

[1068] • -RCOH(醛);

- [1069] • 酰基三氟硼酸酯;
- [1070] • 环戊二烯/螺环戊二烯;
- [1071] • 硫代选择性亲电体;
- [1072] • -SH; 以及
- [1073] • 半胱氨酸。

[1074] 换言之, 包含在根据本发明的抗体-接头缀合物中的一个或多个连接部分可以具有与包含在用于本发明的方法的接头中的连接部分相同的特性。

[1075] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述连接部分B₁和/或B₂的至少一个连接至一个或多个有效载荷。

[1076] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述一个或多个有效载荷通过点击反应连接至所述连接部分B₁和/或B₂。

[1077] 换言之, 根据本发明的抗体-接头缀合物可以包含一个或多个有效载荷, 所述有效载荷已经通过本文公开的用于根据本发明的方法的任何反应连接至包含在接头中的一个或多个连接部分。

[1078] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, B₁和/或B₂为有效载荷。

[1079] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述一个或多个有效载荷包含以下中的至少一种:

- [1080] • 毒素;
- [1081] • 细胞因子;
- [1082] • 生长因子;
- [1083] • 放射性核素;
- [1084] • 激素;
- [1085] • 抗病毒剂;
- [1086] • 抗菌剂;
- [1087] • 荧光染料;
- [1088] • 免疫调节剂/免疫刺激剂;
- [1089] • 半衰期增加部分;
- [1090] • 溶解性增加部分;
- [1091] • 聚合物-毒素缀合物;
- [1092] • 核酸;
- [1093] • 生物素或链霉亲和素部分;
- [1094] • 维生素;
- [1095] • 蛋白质降解剂('PROTAC');
- [1096] • 靶结合部分; 和/或
- [1097] • 抗炎剂。

[1098] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述毒素为选自以下组成的组中的至少一种:

- [1099] • 吡咯并苯并二氮杂草(PBD);

- [1100] • 澳瑞他汀(例如, MMAE, MMAF);
- [1101] • 美登素类(美登素, DM1, DM4, DM21);
- [1102] • 倍癌霉素;
- [1103] • 烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)抑制剂;
- [1104] • 微管溶素;
- [1105] • 烯二炔类(例如, 卡利奇霉素);
- [1106] • PNU, 多柔比星;
- [1107] • 基于吡咯的驱动蛋白纺锤体蛋白(KSP)抑制剂;
- [1108] • 念珠藻素;
- [1109] • 药物外排泵抑制剂;
- [1110] • 山卓霉素;
- [1111] • 鹅膏蕈碱(例如, α -鹅膏蕈碱); 以及
- [1112] • 喜树碱(例如, 依喜替康, 德鲁替康)。
- [1113] 换言之, 包含在根据本发明的抗体-接头缀合物中的一种或多种有效载荷可以是本文公开的用于本发明的方法的任一种有效载荷。
- [1114] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述一个或多个有效载荷还包含可切割部分或自裂解部分。
- [1115] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述可切割部分或所述自裂解部分包含基序缬氨酸-瓜氨酸(VC)和/或对氨基苄基氨甲酰基(PABC)部分。
- [1116] 此外, 包含在抗体-接头缀合物中的接头可以包含公开的用于根据本发明的方法的任一种可切割部分或自裂解部分。可替代地, 与接头连接或包含在接头中的有效载荷分子可以包含公开的用于根据本发明的方法的任一种可切割部分或自裂解部分。
- [1117] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述抗体为IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY抗体或其片段或重组变体, 其中, 所述其片段或重组变体保留了靶结合性质并且包含CH2结构域。
- [1118] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述抗体为IgG抗体。
- [1119] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述抗体为糖基化的抗体、去糖基化的抗体或非糖基化的抗体。
- [1120] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述糖基化的抗体为在CH2结构域的残基N297(EU编号)处糖基化的IgG抗体。
- [1121] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 与所述接头缀合的Gln残基包含在所述抗体的Fc结构域中, 或已经通过分子工程引入所述抗体的重链或轻链。
- [1122] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 所述抗体的所述Fc结构域中包含的所述Gln残基为IgG抗体的CH2结构域的Gln残基Q295(EU编号)。
- [1123] 在特定实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物, 其中, 已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链的所述Gln残基为非糖基化的IgG抗体的CH2结构

域的N297Q(EU编号)。

[1124] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,已经通过分子工程引入所述抗体的所述重链或轻链的所述Gln残基包含在肽中,所述肽已经(a)并入至所述抗体的所述重链或轻链中或(b)融合至所述抗体的所述重链或轻链的N端或C端。

[1125] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,包含所述Gln残基的所述肽已经融合至所述抗体的所述重链的所述C端。

[1126] 换言之,根据本发明的抗体-接头缀合物可以包含本文公开的任一种抗体,特别是本发明的方法公开的任一种抗体。然而,优选地,包含在根据本发明的抗体-接头缀合物中的抗体是IgG抗体,更优选人类IgG抗体,甚至更优选人类IgG1抗体。

[1127] 因此,包含在本发明的抗体-接头缀合物中的抗体可以是任何抗体,优选任何IgG型抗体。例如,该抗体可以是但不限于本妥昔单抗、曲妥珠单抗、吉妥珠单抗、奥英妥珠单抗、阿维鲁单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、达雷木单抗、帕妥珠单抗、维多珠单抗、奥瑞珠单抗、托珠单抗、乌司奴单抗、戈利木单抗、阿托珠单抗、泊洛妥珠单抗或恩诺单抗。

[1128] 换言之,在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为本妥昔单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为曲妥珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为吉妥珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为奥英妥珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为阿维鲁单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为西妥昔单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为利妥昔单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为达雷木单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为帕妥珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为维多珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为奥瑞珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为托珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为乌司奴单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为戈利木单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为阿托珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为泊洛妥珠单抗。在另一个实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,该抗体为恩诺单抗。

[1129] 此外,优选地,包含在根据本发明的抗体-接头缀合物中的抗体包含抗体的重链的氨基酸残基Q295(EU编号),并且通过所述氨基酸残基缀合至接头。此外,优选地,包含在抗体-接头缀合物中的抗体被糖基化,优选在抗体的重链的N297位置(EU编号)。

[1130] 在特定实施方案中,本发明涉及一种药物组合物,包含根据本发明的抗体-接头缀合物,特别是其中,所述抗体-接头缀合物包含至少一种有效载荷。

[1131] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述抗体-接头缀合物包含至少一种毒素。

[1132] 换言之,本发明的抗体-接头缀合物包含缀合至至少一个接头的抗体,其中,一个接头包含至少一种毒素。在某些实施方案中,抗体-接头缀合物包含两个接头,其中,抗体的每条重链分别缀合至一个接头。在某些实施方案中,抗体-接头缀合物包含四个接头,其中,抗体的每条重链分别缀合至两个接头。在这种情况下,每个接头可以含有一个或多个有效载荷,如毒素。

[1133] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体-接头缀合物包含两个接头,其中每个接头包含一种有效载荷,例如毒素。在其它实施方案中,根据本发明的抗体-接头缀合物包含两个接头,其中每个接头包含两种有效载荷,例如,一种毒素和另一种有效载荷或两种相同或不同的毒素。在抗体-接头缀合物包含两个接头的实施方案中,优选地,接头缀合至IgG抗体的两条重链的残基Q295。甚至更优选地,抗体是在残基N297处糖基化的IgG抗体。

[1134] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体-接头缀合物包含四个接头,其中每个接头包含一种有效载荷,例如毒素。在其它实施方案中,根据本发明的抗体-接头缀合物包含四个接头,其中每个接头包含两种有效载荷,例如,一种毒素和另一种有效载荷或两种相同或不同的毒素。在抗体-接头缀合物包含四个接头的实施方案中,优选地,接头缀合至IgG抗体的两条重链的残基Q295和N297Q。

[1135] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,抗体-接头缀合物包含两种不同的毒素。

[1136] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体-接头缀合物包含两种不同的毒素。换言之,在某些实施方案中,抗体-接头缀合物可以包含两个接头,其中每个接头包含两种不同的毒素。包含两种不同毒素的抗体-接头缀合物的优点是它们可以具有增加的细胞毒性活性。这种增加的细胞毒性活性可以通过结合靶向两种不同细胞机制的两种毒素来实现。例如,根据本发明的抗体-接头缀合物可以包含抑制细胞分裂的第一毒素和干扰DNA的复制和/或转录的第二毒素。

[1137] 因此,在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,第一毒素是抑制细胞分裂的毒素,第二毒素是干扰DNA的复制和/或转录的毒素。

[1138] 抑制细胞分裂的毒素,如抗有丝分裂剂或纺锤体毒素,是一种可能抑制或阻止细胞的有丝分裂的试剂。纺锤体毒素是一种通过影响连接染色体的着丝粒区域的蛋白质丝(称为纺锤体)来破坏细胞分裂的毒素。纺锤体毒素通过在纺锤体装配检查点(SAC)中断细胞分裂的有丝分裂期,有效地停止了新细胞的产生。有丝分裂纺锤体由辅助的微管(聚合的微管蛋白)以及调节蛋白组成;在适当分离复制的染色体的活性中相互作用。影响有丝分裂纺锤体的某些化合物已被证明对实体瘤和恶性血液肿瘤高度有效。

[1139] 两个特定的抗有丝分裂试剂家族——长春花生物碱和紫杉烷类——通过微管动力学的搅动来中断细胞分裂。长春花生物碱通过抑制微管蛋白聚合成微管起作用,导致细胞周期内的G2/M抑制,并最终导致细胞死亡。相反,紫杉烷类通过稳定微管防止其解聚来抑制有丝分裂细胞周期。尽管存在许多其它可能成为新型化疗药物靶点的纺锤体蛋白,但微管蛋白结合剂是临床应用中唯一的类型。影响运动蛋白驱动蛋白的试剂开始进入临床试验。另一种类型,紫杉醇,通过连接至现有的微管内的微管蛋白发挥作用。在本发明中抑制细胞分裂的优选的毒素是澳瑞他汀(如MMAE和MMAF)和美登素类(如DM1、DM3、DM4和/或DM21)。

[1140] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,至少一种毒素是澳瑞他汀或美登素类。

[1141] 本领域技术人员已知若干种阻止DNA分子的正确复制和/或转录并已显示适用于癌症治疗的试剂。例如,抗代谢物,如被错误掺入新形成的DNA和/或RNA分子中的核苷酸或核苷类似物是本领域已知的并且已经由Tsesmetzis等人(Cancers (Basel), 2018, 10 (7) : 240) 总结。已知干扰DNA的复制和/或转录的其它毒素是倍癌霉素(duoromycin)。

[1142] 因此,在某些实施方案中,根据本发明的抗体-接头缀合物包含两种不同的毒素,其中,所述第一毒素是倍癌霉素,并且其中所述第二有效载荷是澳瑞他汀或美登素。

[1143] 在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,抗体-接头缀合物包含两种不同的澳瑞他汀。

[1144] 包含两种不同毒素的抗体-接头缀合物的一个主要优点是所述抗体-接头缀合物仍然可以针对已逃脱毒素之一的作用机制的靶细胞起作用,和/或所述抗体-有效载荷缀合物可以具有针对异种肿瘤的更高功效。

[1145] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,抗体-接头缀合物包含毒素和药物外排转运体的抑制剂。

[1146] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,抗体-接头缀合物包含毒素和溶解性增加部分。

[1147] 换言之,抗体-接头缀合物可以包含两个有效载荷,其中,第一有效载荷是毒素,第二有效载荷是溶解性增加部分。可替代地,可以通过将毒素点击至接头的含叠氮化物的连接部分,并通过将包含马来酰亚胺的溶解性增加部分点击至相同接头的半胱氨酸侧链而获得抗体-接头缀合物。可替代地,毒素和/或溶解性增加部分可以通过化学合成连接至接头。

[1148] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,抗体-接头缀合物包含毒素和免疫刺激剂。

[1149] 如本文所使用的并取决于上下文的,术语“免疫刺激剂”包括增加受试者对抗原的免疫应答的化合物。免疫刺激剂的示例包括免疫兴奋剂和免疫细胞激活化合物。本发明的抗体-接头缀合物可以包含免疫刺激剂,其有助于对免疫细胞编程以识别配体并增强抗原呈递。免疫细胞激活化合物包括Toll样受体(TLR)激动剂。此类激动剂包括病原体相关分子模式(PAMP),例如,模拟感染的组合物,如细菌来源的免疫调节剂(亦称为危险信号),以及损伤相关分子模式(DAMP),例如,模拟应激的或损伤的细胞的组合物。TLR激动剂包括核酸或脂质组分(例如,单磷酸脂质A(MPLA))。在一个示例中,TLR激动剂包括TLR9激动剂,如胞嘧啶-鸟嘌呤核苷寡核苷酸(CpG-ODN),聚(乙烯亚胺)(PEI)-缩合寡核苷酸(ODN),如PEI-CpG-ODN或双链脱氧核糖核酸(DNA)。在另一个示例中,TLR激动剂包括TLR3激动剂,如聚肌苷-聚胞苷酸(聚(I:C))、PEI-聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚(A:U))、PEI-聚(A:U)或双链核糖核酸(RNA)。其它示例性的疫苗免疫刺激化合物包括脂多糖(LPS)、趋化因子/细胞因子、真菌 β -葡聚糖(如香菇多糖)、咪喹莫特、CRX-527和OM-174。

[1150] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,抗体-接头缀合物包含两种不同的免疫刺激剂。

[1151] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,所述至少一种免疫刺激剂是TLR激动剂。

[1152] 如本文所使用的术语“TLR激动剂”是指一种分子,其能够通过TLR信号传导通路引起信号传导反应,作为直接配体,或通过产生内源性或外源性间接引起信号传导反应。TLR受体的激动配体为:(i)实际TLR受体的天然配体或其功能性等同的变体,其保存结合至TLR受体的能力并在其上诱导共刺激(co-stimulation)信号,或(ii)针对TLR受体的激动剂抗体,或其能够特异性结合至TLR受体的功能性等同的变体,并且更具体地涉及所述受体的胞外结构域,并且诱导由该受体和相关蛋白质控制的一些免疫信号。结合特异性可以是针对人类TLR受体的,也可以是针对与不同物种的人类受体同源的TLR受体的。

[1153] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,抗体-接头缀合物包含放射性核素和荧光染料。

[1154] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-接头缀合物,其中,放射性核素是适用于断层扫描,特别是单光子发射计算机断层扫描(single-photon emission computed tomography, SPECT)或正电子发射断层扫描(PET)的放射性核素,并且其中,荧光染料为近红外荧光染料。

[1155] 如本文所使用的术语“放射性核素”的含义与放射性核素(radioactive nuclide)、放射性同位素(radioisotope)或放射同位素(radioactive isotope)相同。

[1156] 优选可通过核医学分子成像技术检测放射性核素,如正电子发射断层扫描(PET)、单光子发射计算的断层扫描(SPECT)、SPECT和/或PET的混合体或它们的组合。本文中的单光子发射计算的断层扫描(SPECT)包括平面闪烁扫描(planar scintigraphy, PS)。

[1157] 例如,SPECT和/或PET的混合体为SPECT/CT、PET/CT、PET/IRM或SPECT/IRM。

[1158] SPECT和PET获取引入受试者体内的放射性核素的浓度(或摄取)的信息。PET通过检测由发射正电子的放射性核素间接发射的 γ 射线对来生成图像。PET分析在感兴趣的区域(如大脑、乳腺、肝脏等)上生成一系列身体的薄切片图像(slice image)。这些薄切片图像可以被组合成检查区域的三维表示。SPECT类似于PET,但SPECT中使用的放射性物质的衰变时间比PET中使用的要长,并且发射单 γ 射线而不是双 γ 射线。虽然,SPECT图像比PET图像表现出更低的灵敏度、更少的细节,但是,SPECT技术比PET便宜得多,并且提供了不需要接近粒子加速器的优点。实际临床PET表现出比SPECT更高的灵敏度和更好的空间分辨率,并且由于光子的高能量而表现出精确衰减校正的优点;因此,PET比SPECT提供了更准确的定量数据。平面闪烁扫描(PS)与SPECT的相似之处在于它使用相同的放射性核素。然而,PS仅生成2D信息。

[1159] SPECT产生计算机生成的局部放射性示踪剂摄取的图像,而CT产生人体的X射线密度的三维解剖图像。SPECT/CT联合成像依次提供了在单次检查过程中获得的来自SPECT的功能信息和来自CT的解剖信息。CT数据还用于对单光子发射数据进行快速和最佳的衰减校正。通过精确定位异常的和/或生理示踪剂摄取的区域,SPECT/CT改进灵敏度和特异性,但也可以有助于实现准确的剂量学估算以及指导介入治疗或更好地定义外照射放疗的靶体积。使用单光子发射放射性示踪剂的 γ 相机成像表示了大多数过程。

[1160] 放射性核素可以选自由以下组成的组:锝-99m(^{99m}Tc)、镓-67(^{67}Ga)、镓-68(^{68}Ga)、钇-90(^{90}Y)、铟-111(^{111}In)、铼-186(^{186}Re)、氟-18(^{18}F)、铜-64(^{64}Cu)、铽-149(^{149}Tb)或铊-201(^{201}Tl)。放射性核素可以包含在分子中或结合至螯合剂。

[1161] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明的药物组合物,其包含至少一种另外

的药理学上可接受的成分。

[1162] 换言之,本发明涉及一种药物组合物,其包含根据本发明的抗体-接头缀合物,优选地其中,该抗体-接头缀合物包含有效载荷。

[1163] 药理学上可接受的成分是指药物制剂中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药理学上可接受的成分包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[1164] 通过将具有所需纯度的此类缀合物与一种或多种任选的药理学上可接受的成分(Flemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980))混合来制备本文所描述的抗体-接头缀合物的药物制剂,以冻干制剂或水溶液的形式。在所采用的剂量和浓度下,药理学上可接受的成分对于接受者通常是无毒的,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯类,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子(salt-forming counter-ion),如钠;金属络合物(例如锌蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药理学上可接受的成分还包括间隙的药物分散剂,如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人类可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性的sHASEGPs(包括rHuPH20)和使用方法。在一方面,sHASEGP与一种或多种其它糖胺聚糖酶(glycosaminoglycanase)(如软骨素酶)组合。

[1165] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明所述的抗体-接头缀合物或根据本发明所述的药物组合物用于治疗 and/或诊断。

[1166] 换言之,本发明的抗体-接头缀合物可以用于治疗受试者或诊断受试者的疾病或病症。个体或受试者为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于饲养的动物(例如,乳牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人类,以及非人灵长类动物,如猕猴)、兔子和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者为人类。

[1167] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明所述的抗体-接头缀合物或根据本发明所述的药物组合物用于治疗患者或用于预防此类病症,所述患者

[1168] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[1169] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中,和/或

[1170] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[1171] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明所述的抗体-接头缀合物或根据本发明所述的药物组合物用于治疗患有肿瘤性疾病的患者。

[1172] 如本文所使用的术语“肿瘤性疾病”是指以细胞不受控制的异常生长为特征的病症。肿瘤性疾病包括癌症。癌症的示例包括但不限于,恶性上皮肿瘤(carcinoma)、淋巴瘤、

胚细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体的示例包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤(hepatoma)、结肠直肠癌、宫颈癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、肝脏癌(hepatic carcinoma)、皮肤癌、黑色素瘤、脑癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、骨髓瘤、各类头颈部肿瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)以及外周神经上皮瘤。优选的癌症包括肝癌、淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、尤文氏肉瘤和外周神经上皮瘤。

[1173] 换言之,本发明的抗体-接头缀合物优选用于治疗癌症。因此,在某些实施方案中,抗体-接头缀合物包含特异性结合至肿瘤细胞上存在的抗原的抗体。在某些实施方案中,所述抗原可以是肿瘤细胞表面上的抗原。在某些实施方案中,当抗体-接头缀合物与抗原结合时,肿瘤细胞表面上的抗原可以与抗体-接头缀合物一起内化到细胞中。

[1174] 如果抗体-接头缀合物用于治疗癌症,优选的是,所述抗体-接头缀合物包含至少一个有效载荷,所述有效载荷具有杀死或抑制所述抗体-接头缀合物结合的肿瘤细胞增殖的潜力。在某些实施方案中,在所述抗体-接头缀合物已经内化到肿瘤细胞中之后,所述至少一个有效载荷显示出其细胞毒性活性。在某些实施方案中,所述至少一个有效载荷是毒素。

[1175] 根据本发明的另一方面,提供了一种治疗或预防肿瘤性疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据以上描述的抗体-接头缀合物、根据以上描述的药物组合物、或根据以上描述的产物。

[1176] 炎症性疾病可以是自身免疫性疾病。传染性疾病可以是细菌感染或病毒感染。

[1177] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明所述的抗体-接头缀合物或根据本发明所述的药物组合物用于手术前、手术中或手术后成像。

[1178] 换言之,根据本发明的抗体-接头缀合物可以用于成像。为此,抗体-接头缀合物可以在结合特定靶分子、细胞或组织时被可视化。本领域已知不同的技术来可视化特定的有效载荷。例如,如果有效载荷是放射性核素,则可以通过PET或SPECT可视化抗体-接头缀合物结合的分子、细胞或组织。如果有效载荷是荧光染料,则可以通过荧光成像可视化抗体-接头缀合物结合的分子、细胞或组织。在某些实施方案中,根据本发明的抗体-接头缀合物包括两种不同的有效载荷,例如,放射性核素和荧光染料。在这种情况下,抗体-接头缀合物结合的分子、细胞或组织可以使用两种不同的和/或互补的成像技术来可视化,例如PET/SPECT和荧光成像。

[1179] 抗体-接头缀合物可以用于手术前、手术中和/或手术后成像。

[1180] 手术前成像包括可在手术前实施的所有成像技术,以在诊断某种疾病或病症时使特定靶分子、细胞或组织可见,并且任选地为手术提供指导。手术前成像可以包括在通过使用抗体-接头缀合物实施手术之前通过PET或SPECT使肿瘤可见的步骤,该抗体-接头缀合物包含特异性结合至肿瘤上抗原并缀合至包含放射性核素的有效载荷的抗体。

[1181] 手术中成像包括可在手术过程中实施的所有成像技术,以使特定靶分子、细胞或组织可见,并且因此为手术提供指导。在某些实施方案中,包含近红外荧光染料的抗体-接头缀合物可以用于在手术过程中通过近红外荧光成像使肿瘤可视化。手术中成像允许外科医生在手术过程中鉴定特定组织,例如肿瘤组织,并因此可以允许完全去除肿瘤组织。

[1182] 手术后成像包括可在手术之后实施的所有成像技术,以使特定靶分子、细胞或组织可见,并评估手术的结果。手术后成像可以如手术前手术类似地实施。

[1183] 在某些实施方案中,本发明涉及包含两种或更多种不同有效载荷的抗体-接头缀合物。例如,该抗体-接头缀合物可以包含放射性核素和近红外荧光染料。这种抗体-有效载荷缀合物可用于通过PET/SPECT成像和近红外荧光成像。这种抗体的优点是,它可用于通过PET或SPECT在手术前后可视化靶组织,例如肿瘤。同时,肿瘤可以在手术过程中通过近红外成像来可视化。

[1184] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明所述的抗体-接头缀合物或根据本发明所述的药物组合物用于手术中成像引导的癌症手术。

[1185] 如上所述,本发明的抗体-接头缀合物可以用于可视化靶分子、细胞或组织并在手术过程中指导外科医生或机器人。换言之,抗体-接头缀合物可以用于在手术过程中可视化肿瘤组织,例如通过近红外成像,并允许完全去除肿瘤组织。

[1186] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明所述的抗体-接头缀合物或根据本发明所述的药物组合物在制备用于治疗患者的药物中的用途,所述患者

[1187] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[1188] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中,和/或

[1189] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[1190] 在特定实施方案中,本发明涉及一种治疗或预防肿瘤性疾病的方法,所述方法包括向有需要的患者施用根据本发明的抗体-接头缀合物或根据本发明的药物组合物。

[1191] 以有效治疗疾病的量或剂量向人类或动物受试者施用所述缀合物或产物。可替代地,提供了相应的治疗方法。

[1192] 本发明的抗体-接头缀合物可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外施用、肺内施用和鼻内施用,并且如果是局部治疗所需的,则还包括病灶内施用、子宫内施用或膀胱内施用。胃肠外输注包括肌肉内施用、静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文设想了各种给药方案,包括但不限于在不同时间点的单次或多次施用、推注施用和脉冲输注。

[1193] 将以符合本发明的方式配制、给药和施用本发明的抗体-接头缀合物,并且将以符合良好医学实践的方式配制、给药和施用本发明的抗体-接头缀合物。在这种情况下,需要考虑的因素包括:正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、试剂的递送部位、施用方法、施用计划以及医务人员已知的其它因素。抗体-接头缀合物不必须,但任选地与目前用于预防或治疗正在考虑的病症的一种或多种试剂一起配制。此类其它试剂的有效量取决于制剂中存在的抗体-接头缀合物的量、病症或治疗的类型以及上述其它因素。它们通常以与本文所描述的相同的剂量和施用途径使用,或以约1%至99%的本文所描述的剂量使用,或以任何剂量并通过经验/临床确定为合适的任何途径使用。

[1194] 为了预防或治疗疾病,本发明的抗体-接头缀合物的合适剂量(当单独使用或与一

种或多种其它额外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体-有效载荷缀合物的类型、疾病的严重性和病程、抗体-接头缀合物是为了预防还是治疗目的而施用、既往治疗、患者的临床病史和对抗体-接头缀合物的反应,以及主治医生的判断。以一次或通过一系列治疗合适地向患者施用该抗体-接头缀合物。

附图说明

[1195] 图1示出了本发明的一个方面的图示。MTG=微生物谷氨酰胺转氨酶。星形符号表示有效载荷或连接部分B。位于肽中的N端的Aax残基是MTG的底物。注意,该过程允许维持N297处的糖基化。注意,在B/星形是连接部分的情况下,实际的有效载荷仍然必须缀合至该部分。

[1196] 图2示出了在实施例2-5中已经缀合至糖基化的抗体的接头。

具体实施方式

[1197] 实施例

[1198] 虽然在附图和前面的描述中已经详细说明和描述了本发明,但是这种说明和描述被认为是说明性的或示例性的,而不是限制性的;本发明不限于所公开的实施方案。通过研究附图、公开内容和所附权利要求,本领域技术人员在实践所要求保护的发明时可以理解并且实现对所公开的实施方案的其它改变。在权利要求中,词语“包含”不排除其它元素或步骤,不定冠词“一种(a)”或“一个(an)”不排除多个。在相互不同的从属权利要求中陈述某些措施的纯粹事实并不表明这些措施的组合不能被有利地使用。权利要求中的任何附图标记都不应被解释为对范围的限制。

[1199] 实施例1:缀合效率

[1200] 按所取得的使用接头,并按照制造商的说明以合适的储备浓度(例如25mM)溶解,制备等分试样并储存于-20℃。IgG亚类的两种抗体(抗体1:抗Her2 IgG1,抗体2:抗CD38 IgG1)修饰如下:将5mg/mL的非去糖基化的抗体(约33.33μM)与20摩尔当量的基于氨基酸的接头(即约667μM)、3U/mg的抗体和合适的缓冲液混合。将反应混合物在37℃孵育20h,然后在还原条件下进行LC-MS分析。如相应实施例中所示,使用了其它反应条件。

[1201] 实施例2:肽接头通过N端(修饰的)氨基酸的伯胺与天然非工程糖基化的抗体(抗Her2 IgG)缀合

[1202] 在序列开始处(在N端)具有各种氨基酸衍生物的接头用于缀合。

[1203] 方法

[1204] 抗体曲妥珠单抗(赫赛汀®,罗氏,从药房购买)以及所有肽接头(从LifeTein LLC购买)均可商购获得。

[1205] 为了缀合肽接头(参见图2的结构),使用5mg/mL在50mM Tris(pH 7.6)中的天然糖基化的单克隆抗体、在50mM Tris(pH 7.6)或水中浓度为3U/mg的微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG,Zedira)和20摩尔当量的指定的肽接头,并在旋转热混合器中于37℃孵育24小时。通过LC-MS在DTT还原条件下评估缀合效率。通过于37℃在50mM DTT(最终)和50mM Tris缓冲液中将抗体-接头-缀合物(ALC)孵育15min来实现样本的还原。在与Acquity UPLC H类系统(Waters)和ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱偶联的Xevo G2-XS QTOF(Waters)上分析探针。

从去卷积光谱(deconvoluted spectra)计算出缀合效率(CE),以%表示。根据以下公式,计算时考虑了由两种糖型(G1F和G0F)产生的强度:

$$[1206] \quad CE \% = \frac{\sum((Int(G0F + G1F))_{cj})}{\sum(Int(G0F + G1F))_{cj,ncj}}$$

[1207] 其中,cj=缀合的,ncj=非缀合的结果

[1208] 令人惊讶的是,在第一氨基酸(即,N端氨基酸)的伯胺与羧基之间具有烷基(例如,甲基)间隔基的所有肽提供了显著的缀合效率。值得注意的是,无论是甲基的长度还是肽的下一个(第二个)氨基酸的性质都不会对缀合效率具有显著影响。因此,令人惊讶地发现,在第一个(N端)氨基酸的伯胺与羧基之间具有烷基间隔基的任何肽都可以用于缀合天然的糖基化的抗体(表3)。伯胺与C-α和/或羧基之间没有烷基(例如甲基)间隔基的肽不能缀合至糖基化的抗体。

[1209] 表3.肽接头的缀合效率

肽接头	名称	与抗体的缀合效率(%)
NH ₂ -C1-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 40)	NT24	99%
NH ₂ -C1-ARK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 39)	NT28	89%
NH ₂ -C2-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 42)	NT37	70%
NH ₂ -C3-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 44)	NT38	53%
NH ₂ -C4-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 46)	NT41	99%
NH ₂ -C5-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 48)	NT36	84%
[1210] NH ₂ -C6-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 50)	NT42	67%
NH ₂ -C4-ValCit-NH ₂ (SEQ ID NO:57)	NT39	67%
NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO:58)	NT40	96%
NH ₂ -C5-ValCit-NH ₂ (SEQ ID NO:59)	NT43	83%
NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO:60)	NT44	100%
NH ₂ -C6-ThrArg-NH ₂ (SEQ ID NO:83)	NT64	95%
NH ₂ -C6-IleArg-NH ₂ (SEQ ID NO:84)	NT65	96%
NH ₂ -C6-AspArg-NH ₂ (SEQ ID NO:85)	NT66	64%
NH ₂ -C6-TrpArg-NH ₂ (SEQ ID NO:86)	NT67	82%
AARK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO:87)	-	0%
[1211] LGRC-NH ₂ (SEQ ID NO:88)	-	0%
VGRC-NH ₂ (SEQ ID NO:89)	-	0%
RGRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO:90)	-	0%
SAGRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO:91)	-	0%

[1212] 在使用的命名C1、C2、C3、C4、C5或C6中,数字(1至6)表示伯胺与羧基之间的间隔基的亚甲基单元数。换言之,C1对应于甘氨酸的间隔基,C2对应于β-丙氨酸的间隔基,C3对应于4-氨基丁酸的间隔基,C4对应于5-氨基丙酸的间隔基,C5对应于6-氨基己酸的间隔基,并且C6对应于7-氨基庚酸的间隔基。

[1213] 实施例3:肽接头通过N端(修饰的)氨基酸的伯胺与天然非工程糖基化的抗体(抗

CD38 IgG) 缀合

[1214] 在序列开始处(在N端)具有各种氨基酸衍生物的接头用于缀合。

[1215] 方法

[1216] 抗体达雷木单抗(Darzalex®, Janssen, 从药房购买)以及所有肽接头(从LifeTein LLC购买)均可商购获得。

[1217] 为了缀合肽接头(参见图2的结构),使用5mg/mL在50mM Tris(pH 7.6)中的天然糖基化的单克隆抗体、在50mM Tris(pH 7.6)或水中浓度为3U/mg的微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG, Zedira)和20摩尔当量的指定的肽接头,并在旋转热混合器中于37°C孵育24小时。通过LC-MS在DTT还原条件下评估缀合效率。通过于37°C在50mM DTT(最终)和50mM Tris缓冲液中将抗体-接头-缀合物(ALC)孵育15min来实现样本的还原。在与Acquity UPLC H类系统(Waters)和ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱偶联的Xevo G2-XS QTOF(Waters)上分析探针。从去卷积光谱(deconvoluted spectra)计算出缀合效率(CE),以%表示。根据以下公式,计算时考虑了由两种糖型(G1F和G0F)产生的强度:

$$[1218] \quad CE \% = \frac{\sum((\text{Int}(G0F + G1F))_{cj})}{\sum(\text{Int}(G0F + G1F))_{cj,ncj}}$$

[1219] 其中,cj=缀合的,ncj=非缀合的结果

[1220] 令人惊讶的是,在第一氨基酸(即,N端氨基酸)的伯胺与羧基之间具有烷基(例如,甲基)间隔基的所有肽提供了显著的缀合效率。值得注意的是,无论是甲基的长度还是肽的下一个(第二个)氨基酸的性质都不会对缀合效率具有显著影响。因此,令人惊讶地发现,在第一个(N端)氨基酸的伯胺与羧基之间具有烷基间隔基的任何肽都可以用于缀合天然的糖基化的抗体(表4)。

[1221] 表4. 肽接头的缀合效率

[1222]	肽接头	名称	与抗体的缀合效率(%)
	NH ₂ -C1-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 40)	NT24	95%
	NH ₂ -C4-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 46)	NT41	98%
	NH ₂ -C5-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 48)	NT36	93%
	NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO:58)	NT40	89%
[1223]	NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO:60)	NT44	95%
	NH ₂ -C6-ThrArg-NH ₂ (SEQ ID NO:83)	NT64	93%
	NH ₂ -C6-IleArg-NH ₂ (SEQ ID NO:84)	NT65	95%
	NH ₂ -C6-AspArg-NH ₂ (SEQ ID NO:85)	NT66	66%
	NH ₂ -C6-TrpArg-NH ₂ (SEQ ID NO:86)	NT67	83%

[1224] 在使用的命名C1、C2、C3、C4、C5或C6中,数字(1至6)表示伯胺与羧基之间的间隔基的亚甲基单元数。换言之,C1对应于甘氨酸的间隔基,C2对应于β-丙氨酸的间隔基,C3对应于4-氨基丁酸的间隔基,C4对应于5-氨基丙酸的间隔基,C5对应于6-氨基己酸的间隔基,并且C6对应于7-氨基庚酸的间隔基。

[1225] 实施例4:使用其它反应条件(条件2)的肽接头的缀合

[1226] 为了证明与接头的缀合耐受反应条件的改变,改变了一些参数(接头当量、MTG含

量、抗体浓度、反应时间)。

[1227] 方法

[1228] 抗体曲妥珠单抗(赫赛汀®,罗氏,从药房购买)以及所有肽接头(从LifeTein LLC购买)均可商购获得。

[1229] 为了缀合肽接头(参见图2的结构),使用1mg/mL在50mM Tris(pH 7.6)中的天然糖基化的单克隆抗体、在50mM Tris(pH 7.6)或水中浓度为6U/mg的微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG,Zedira)和80摩尔当量的指定的肽接头,并在旋转热混合器中于37℃孵育20小时。这些被定义为“条件2”。通过LC-MS在DTT还原条件下评估缀合效率。通过于37℃在50mM DTT(最终)和50mM Tris缓冲液中将抗体-接头-缀合物(ALC)孵育15min来实现样本的还原。在与Acquity UPLC H类系统(Waters)和ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱偶联的Xevo G2-XS QTOF(Waters)上分析探针。从去卷积光谱(deconvoluted spectra)计算出缀合效率(CE),以%表示。根据以下公式,计算时考虑了由两种糖型(G1F和G0F)产生的强度:

$$[1230] \quad CE \% = \frac{\sum((\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{\text{c}_j})}{\sum(\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{\text{c}_j, \text{nc}_j}}$$

[1231] 其中,c_j=缀合的,nc_j=非缀合的结果

[1232] 所有肽接头均以显著的缀合效率进行缀合(表5),表明接头耐受广泛的反应条件。总体上,实施例3中的条件产生了更高的缀合效率(即,使用小于6U/mg的酶、大于1mg/ml的抗体浓度和小于80摩尔当量的肽接头产生更好的结果)。

[1233] 表5. 使用条件2的肽接头的缀合效率

[1234]	肽接头	名称	使用条件 2 的与抗体的缀合效率(%)
	NH ₂ -C1-GRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO: 40)	NT24	78%
	NH ₂ -C2-GRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO: 42)	NT37	38%
	NH ₂ -C3-GRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO: 44)	NT38	36%
	NH ₂ -C4-GRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO: 46)	NT41	70%
	NH ₂ -C5-GRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO: 48)	NT36	56%
	NH ₂ -C6-GRK(N ₃)-NH ₂ (SEQ ID NO: 50)	NT42	38%
	NH ₂ -C4-ValCit-NH ₂ (SEQ ID NO: 57)	NT39	63%
	NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO: 58)	NT40	83%
	NH ₂ -C5-ValCit-NH ₂ (SEQ ID NO: 59)	NT43	79%
	NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO: 60)	NT44	88%

[1235] 在使用的命名C1、C2、C3、C4、C5或C6中,数字(1至6)表示伯胺与羧基之间的间隔基的亚甲基单元数。换言之,C1对应于甘氨酸的间隔基,C2对应于β-丙氨酸的间隔基,C3对应于4-氨基丁酸的间隔基,C4对应于5-氨基丙酸的间隔基,C5对应于6-氨基己酸的间隔基,并且C6对应于7-氨基庚酸的间隔基。

[1236] 实施例5:使用其它反应条件(条件3)的肽接头的缀合

[1237] 为了证明与接头的缀合耐受反应条件的改变,改变了一些参数(接头当量、MTG含量、抗体浓度、反应时间)。

[1238] 方法

[1239] 抗体曲妥珠单抗和达雷木单抗(赫赛汀®,罗氏,以及Darzalex®,Janssen,从药房购买)以及所有肽接头(从LifeTein LLC购买)均可商购获得。

[1240] 为了缀合肽接头(参见图2的结构),使用5mg/mL在50mM Tris (pH 7.6)中的天然糖基化的单克隆抗体、在50mM Tris (pH 7.6)或水中浓度为3U/mg的微生物谷氨酰胺转胺酶(MTG,Zedira)和5摩尔当量的指定的肽接头,并在旋转热混合器中于37°C孵育24小时。这些被定义为“条件3”。通过LC-MS在DTT还原条件下评估缀合效率。通过于37°C在50mM DTT(最终)和50mM Tris缓冲液中将抗体-接头-缀合物(ALC)孵育15min来实现样本的还原。在与Acquity UPLC H类系统(Waters)和ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱偶联的Xevo G2-XS QTOF(Waters)上分析探针。从去卷积光谱(deconvoluted spectra)计算出缀合效率(CE),以%表示。根据以下公式,计算时考虑了由两种糖型(G1F和G0F)产生的强度:

$$[1241] \quad CE \% = \frac{\sum((Int(G0F + G1F))_{cj})}{\sum(Int(G0F + G1F))_{cj,ncj}}$$

[1242] 其中,cj=缀合的,ncj=非缀合的结果

[1243] 所有肽接头均以显著的缀合效率进行缀合(表6),即使当仅使用低至5当量(eq)的肽接头时。

[1244] 表6. 使用条件3的肽接头的缀合效率

[1245]	肽接头	名称	使用条件 3 的与曲妥珠单抗的缀合效率(%)	使用条件 3 的与达雷木单抗的缀合效率(%)
	NH ₂ -C1-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 40)	NT24	97%	89%
	NH ₂ -C4-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 46)	NT41	88%	88%
	NH ₂ -C5-GRK(N3)-NH ₂ (SEQ ID NO: 48)	NT36	75%	72%
	NH ₂ -C4-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO: 58)	NT40	58%	51%
	NH ₂ -C5-ValArg-NH ₂ (SEQ ID NO: 60)	NT44	77%	73%
	NH ₂ -C6-ThrArg-NH ₂ (SEQ ID NO: 83)	NT64	92%	92%
	NH ₂ -C6-IleArg-NH ₂ (SEQ ID NO: 84)	NT65	78%	79%

[1246] 在使用的命名C1、C2、C3、C4、C5或C6中,数字(1至6)表示伯胺与羧基之间的间隔基的亚甲基单元数。换言之,C1对应于甘氨酸的间隔基,C2对应于β-丙氨酸的间隔基,C3对应于4-氨基丁酸的间隔基,C4对应于5-氨基丙酸的间隔基,C5对应于6-氨基己酸的间隔基,并且C6对应于7-氨基庚酸的间隔基。

序列表

- <110> 阿拉里斯生物技术股份公司
 <120> 用基于氨基酸的接头的谷氨酰胺转胺酶缀合方法
 <130> AD3002 PCT BS
 <140> EP20197056.3
 <141> 2020-09-18
 <160> 86
 <170> BiSSAP 1.3.6
 <210> 1
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 茂原链霉菌 MTG Zedira
 <400> 1

```

Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro
1           5           10           15
Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu
          20           25           30
Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His
          35           40           45
Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu
          50           55           60
Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro
65           70           75           80
Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn
          85           90           95
Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe
          100          105          110
Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln
          115          120          125
Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala
          130          135          140
His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn
145          150          155          160
Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser
          165          170          175
Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His

```

			180				185				190					
Asp	Pro	Ser	Arg	Met	Lys	Ala	Val	Ile	Tyr	Ser	Lys	His	Phe	Trp	Ser	
			195				200				205					
Gly	Gln	Asp	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala	Asp	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	
			210				215				220					
Asp	Ala	Phe	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Thr	Gly	Leu	Val	Asp	Met	Ser	Arg	
225							230				235				240	
Asp	Arg	Asn	Ile	Pro	Arg	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Gly	Glu	Gly	Phe	Val	
			245								250				255	
Asn	Phe	Asp	Tyr	Gly	Trp	Phe	Gly	Ala	Gln	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Asp	
			260				265				270					
Lys	Thr	Val	Trp	Thr	His	Gly	Asn	His	Tyr	His	Ala	Pro	Asn	Gly	Ser	
			275				280				285					
Leu	Gly	Ala	Met	His	Val	Tyr	Glu	Ser	Lys	Phe	Arg	Asn	Trp	Ser	Glu	
			290				295				300					
Gly	Tyr	Ser	Asp	Phe	Asp	Arg	Gly	Ala	Tyr	Val	Ile	Thr	Phe	Ile	Pro	
305							310				315				320	
Lys	Ser	Trp	Asn	Thr	Ala	Pro	Asp	Lys	Val	Lys	Gln	Gly	Trp	Pro		
			325								330				335	

 $\langle 210 \rangle$ 2

335

<212> PRT

〈213〉 人工序列(Artificial Sequence)

 $\langle 220 \rangle$

<223> 茂原链霉菌

 $\langle 400 \rangle$ 2

Phe	Arg	Ala	Pro	Asp	Ser	Asp	Glu	Arg	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Glu	Pro
1				5					10					15	
Leu	Asp	Arg	Met	Pro	Asp	Pro	Tyr	Arg	Pro	Ser	Tyr	Gly	Arg	Ala	Glu
			20					25					30		
Thr	Ile	Val	Asn	Asn	Tyr	Ile	Arg	Lys	Trp	Gln	Gln	Val	Tyr	Ser	His
		35					40					45			
Arg	Asp	Gly	Arg	Lys	Gln	Gln	Met	Thr	Glu	Glu	Gln	Arg	Glu	Trp	Leu
	50					55					60				
Ser	Tyr	Gly	Cys	Val	Gly	Val	Thr	Trp	Val	Asn	Ser	Gly	Gln	Tyr	Pro
65					70					75					80
Thr	Asn	Arg	Leu	Ala	Phe	Ala	Phe	Phe	Asp	Glu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Asn
			85						90					95	
Glu	Leu	Lys	Asn	Gly	Arg	Pro	Arg	Ser	Gly	Glu	Thr	Arg	Ala	Glu	Phe

100	105	110
Glu Gly Arg Val Ala Lys Asp Ser Phe Asp Glu Ala Lys Gly Phe Gln		
115	120	125
Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala		
130	135	140
His Asp Glu Gly Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn		
145	150	155
Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser		
165	170	175
Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Asp Arg Asn Gly Gly Asn His		
180	185	190
Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser		
195	200	205
Gly Gln Asp Arg Ser Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro		
210	215	220
Glu Ala Phe Arg Pro Asp Arg Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg		
225	230	235
Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Ser Phe Val		
245	250	255
Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp		
260	265	270
Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser		
275	280	285
Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Asp		
290	295	300
Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Val Thr Phe Val Pro		
305	310	315
Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Thr Gln Gly Trp Pro		
325	330	335

<210> 3

<211> 407

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 茂原链霉菌 MTG P81453

<400> 3

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val		
1	5	10
Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp		

20	25	30
Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu		
35	40	45
Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro		
50	55	60
Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp		
65	70	75
Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr		
85	90	95
Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg		
100	105	110
Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met		
115	120	125
Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr		
130	135	140
Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser		
145	150	155
Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg		
165	170	175
Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser		
180	185	190
Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val		
195	200	205
Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp		
210	215	220
Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu		
225	230	235
Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe		
245	250	255
Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val		
260	265	270
Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala		
275	280	285
Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly		
290	295	300
Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro		
305	310	315
Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly		
325	330	335

Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn
 340 345 350
 His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu
 355 360 365
 Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly
 370 375 380
 Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp
 385 390 395 400
 Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
 405

<210> 4

<211> 395

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 达卡链轮丝菌

<400> 4

Met His Arg Arg Ile His Ala Val Gly Gln Ala Arg Pro Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Met Ala Arg Gly Lys Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu
 20 25 30
 Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro
 35 40 45
 Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp
 50 55 60
 Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr
 65 70 75 80
 Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg
 85 90 95
 Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met
 100 105 110
 Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr
 115 120 125
 Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser
 130 135 140
 Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg
 145 150 155 160
 Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser
 165 170 175

Phe	Asp	Glu	Glu	Lys	Gly	Phe	Gln	Arg	Ala	Arg	Glu	Val	Ala	Ser	Val		
180						185						190					
Met	Asn	Arg	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala	His	Asp	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Asp		
195						200						205					
Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Leu	Ala	Asn	Gly	Asn	Asp	Ala	Leu	Arg	Asn	Glu		
210						215						220					
Asp	Ala	Arg	Ser	Pro	Phe	Tyr	Ser	Ala	Leu	Arg	Asn	Thr	Pro	Ser	Phe		
225						230						235				240	
Lys	Glu	Arg	Asn	Gly	Gly	Asn	His	Asp	Pro	Ser	Arg	Met	Lys	Ala	Val		
245						250						255					
Ile	Tyr	Ser	Lys	His	Phe	Trp	Ser	Gly	Gln	Asp	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala		
260						265						270					
Asp	Lys	Arg	Lys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Asp	Ala	Phe	Arg	Ser	Ala	Pro	Gly		
275						280						285					
Thr	Gly	Leu	Val	Asp	Met	Ser	Arg	Asp	Arg	Asn	Ile	Pro	Arg	Ser	Pro		
290						295						300					
Thr	Ser	Pro	Gly	Glu	Gly	Phe	Val	Asn	Phe	Asp	Tyr	Gly	Trp	Phe	Gly		
305						310						315				320	
Ala	Gln	Thr	Glu	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Thr	Val	Trp	Thr	His	Gly	Asn		
325						330						335					
His	Tyr	His	Ala	Pro	Asn	Gly	Ser	Leu	Gly	Cys	His	Ala	Cys	Leu	Thr		
340						345						350					
Arg	Ala	Ser	Ser	Ala	Thr	Gly	Ser	Glu	Gly	Tyr	Ser	Asp	Phe	Asp	Arg		
355						360						365					
Gly	Glu	Pro	Tyr	Val	Val	Ser	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg	Met	Leu	Glu		
370						375						380					
His	Arg	Pro	Arg	Gln	Gly	Lys	Ala	Gly	Leu	Ala							
385						390						395					

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Q-标签 1
 <400> 5
 Leu Leu Gln Gly Gly
 1 5
 <210> 6
 <211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 2
<400> 6
Leu Leu Gln Gly
1
<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 3
<400> 7
Leu Ser Leu Ser Gln Gly
1 5
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 4
<400> 8
Gly Gly Gly Leu Leu Gln Gly Gly
1 5
<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 5
<400> 9
Gly Leu Leu Gln Gly
1 5
<210> 10
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> Q-标签 6
<400> 10
Leu Leu Gln
1
<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 7
<400> 11
Gly Ser Pro Leu Ala Gln Ser His Gly Gly
1 5 10
<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 8
<400> 12
Gly Leu Leu Gln Gly Gly Gly
1 5
<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 9
<400> 13
Gly Leu Leu Gln Gly Gly
1 5
<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 10
<400> 14
Gly Leu Leu Gln

1
<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 11
<400> 15
Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly Ala
1 5
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 12
<400> 16
Leu Leu Gln Gly Ala
1 5
<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 13
<400> 17
Leu Leu Gln Tyr Gln Gly Ala
1 5
<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 14
<400> 18
Leu Leu Gln Gly Ser Gly
1 5
<210> 19
<211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 15
<400> 19
Leu Leu Gln Tyr Gln Gly
1 5
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 16
<400> 20
Leu Leu Gln Leu Leu Gln Gly
1 5
<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 17
<400> 21
Ser Leu Leu Gln Gly
1 5
<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 18
<400> 22
Leu Leu Gln Leu Gln
1 5
<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> Q-标签 19

<400> 23

Leu Leu Gln Leu Leu Gln

1 5

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Q-标签 20

<400> 24

Leu Leu Gln Gly Arg

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Q-标签 21

<400> 25

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Q-标签 22

<400> 26

Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Q-标签 23

<400> 27

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

1 5
<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 24
<400> 28
Glu Glu Gln Tyr Gln Ser
1 5
<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 25
<400> 29
Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr
1 5
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 26
<400> 30
Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr
1 5
<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 27
<400> 31
Gln Tyr Gln Ser
1
<210> 32
<211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 28
<400> 32
Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr
1 5
<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 29
<400> 33
Tyr Arg Tyr Arg Gln
1 5
<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 30
<400> 34
Asp Tyr Ala Leu Gln
1 5
<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 31
<400> 35
Phe Gly Leu Gln Arg Pro Tyr
1 5
<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> Q-标签 32
<400> 36
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10
<210> 37
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 33
<400> 37
Leu Gln Arg
1
<210> 38
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> Q-标签 34
<400> 38
Tyr Gln Arg
1
<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 39
Gly Ala Arg Xaa
1
<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 40
Gly Gly Arg Xaa
1
<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 β -丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 41
Xaa Ala Arg Xaa
1
<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 β -丙氨酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)

<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 42
Xaa Gly Arg Xaa
1
<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 γ -氨基丁酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 43
Xaa Ala Arg Xaa
1
<210> 44
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 γ -氨基丁酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 44
Xaa Gly Arg Xaa
1
<210> 45

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为5-氨基戊酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 45
Xaa Ala Arg Xaa
1
<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为5-氨基戊酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 46
Xaa Gly Arg Xaa
1
<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 47
Xaa Ala Arg Xaa
1
<210> 48
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 48
Xaa Gly Arg Xaa
1
<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为7-氨基庚酸
<220>

<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 49
Xaa Ala Arg Xaa
1
<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为7-氨基庚酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa为6-叠氮基-L-赖氨酸
<400> 50
Xaa Gly Arg Xaa
1
<210> 51
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) ... (3)
<223> Xaa为瓜氨酸
<400> 51
Gly Val Xaa
1
<210> 52
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<400> 52

Gly Val Arg

1

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 β -丙氨酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) ... (3)

<223> Xaa为瓜氨酸

<400> 53

Xaa Val Xaa

1

<210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 β -丙氨酸

<400> 54

Xaa Val Arg

1

<210> 55

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 γ -氨基丁酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) ... (3)

<223> Xaa为瓜氨酸

<400> 55

Xaa Val Xaa

1

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 γ -氨基丁酸

<400> 56

Xaa Val Arg

1

<210> 57

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为5-氨基戊酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) ... (3)
<223> Xaa为瓜氨酸
<400> 57
Xaa Val Xaa
1
<210> 58
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为5-氨基戊酸
<400> 58
Xaa Val Arg
1
<210> 59
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) ... (3)
<223> Xaa为瓜氨酸
<400> 59
Xaa Val Xaa
1
<210> 60
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸
<400> 60
Xaa Val Arg
1
<210> 61
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为7-氨基庚酸
<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) ... (3)
<223> Xaa为瓜氨酸
<400> 61
Xaa Val Xaa
1
<210> 62
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为7-氨基庚酸
<400> 62
Xaa Val Arg
1

<210> 63
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<400> 63
Gly Thr Arg
1
<210> 64
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<400> 64
Gly Ile Arg
1
<210> 65
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<400> 65
Gly Asp Arg
1
<210> 66
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<400> 66
Gly Trp Arg
1
<210> 67
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 β -丙氨酸

<400> 67

Xaa Thr Arg

1

<210> 68

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 β -丙氨酸

<400> 68

Xaa Ile Arg

1

<210> 69

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 β -丙氨酸

<400> 69

Xaa Asp Arg

1

<210> 70

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 β -丙氨酸

<220>

<223> 接头

<400> 70

Xaa Trp Arg

1

<210> 71

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 γ -氨基丁酸

<400> 71

Xaa Thr Arg

1

<210> 72

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 γ -氨基丁酸

<400> 72

Xaa Ile Arg

1

<210> 73

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 γ -氨基丁酸
<400> 73
Xaa Asp Arg
1
<210> 74
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为 γ -氨基丁酸
<400> 74
Xaa Trp Arg
1
<210> 75
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 接头
<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa为5-氨基戊酸
<400> 75
Xaa Thr Arg
1
<210> 76
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为5-氨基戊酸

<400> 76

Xaa Ile Arg

1

<210> 77

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为5-氨基戊酸

<400> 77

Xaa Asp Arg

1

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为5-氨基戊酸

<400> 78

Xaa Trp Arg

1

<210> 79

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸

<400> 79

Xaa Thr Arg

1

<210> 80

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸

<400> 80

Xaa Ile Arg

1

<210> 81

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸

<400> 81

Xaa Asp Arg

1

<210> 82

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为 ϵ -氨基己酸

<400> 82

Xaa Trp Arg

1

<210> 83

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为7-氨基庚酸

<400> 83

Xaa Thr Arg

1

<210> 84

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为7-氨基庚酸

<400> 84

Xaa Ile Arg

1

<210> 85

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为7-氨基庚酸

<400> 85

Xaa Asp Arg

1

<210> 86

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 接头

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa为7-氨基庚酸

<400> 86

Xaa Trp Arg

1

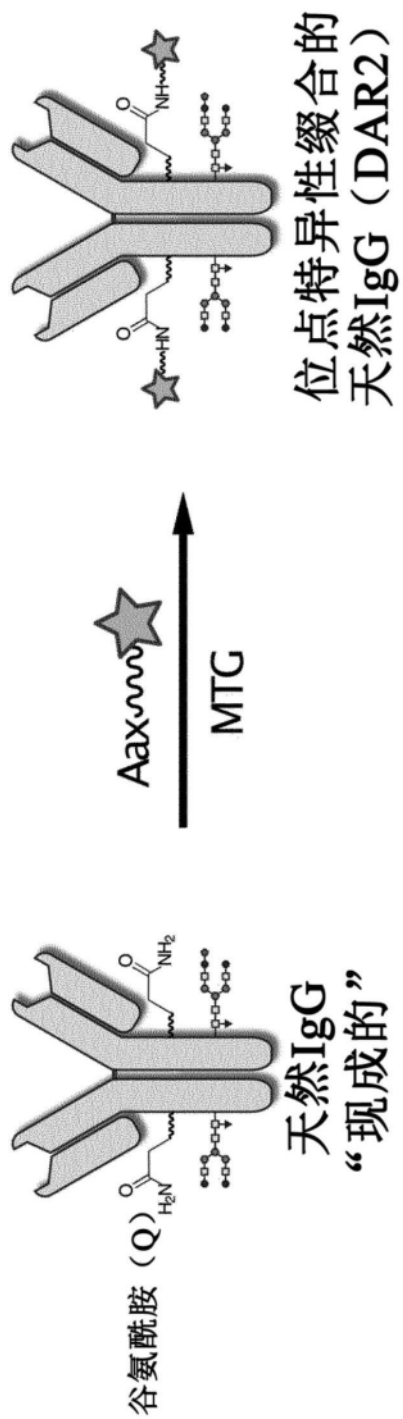


图1

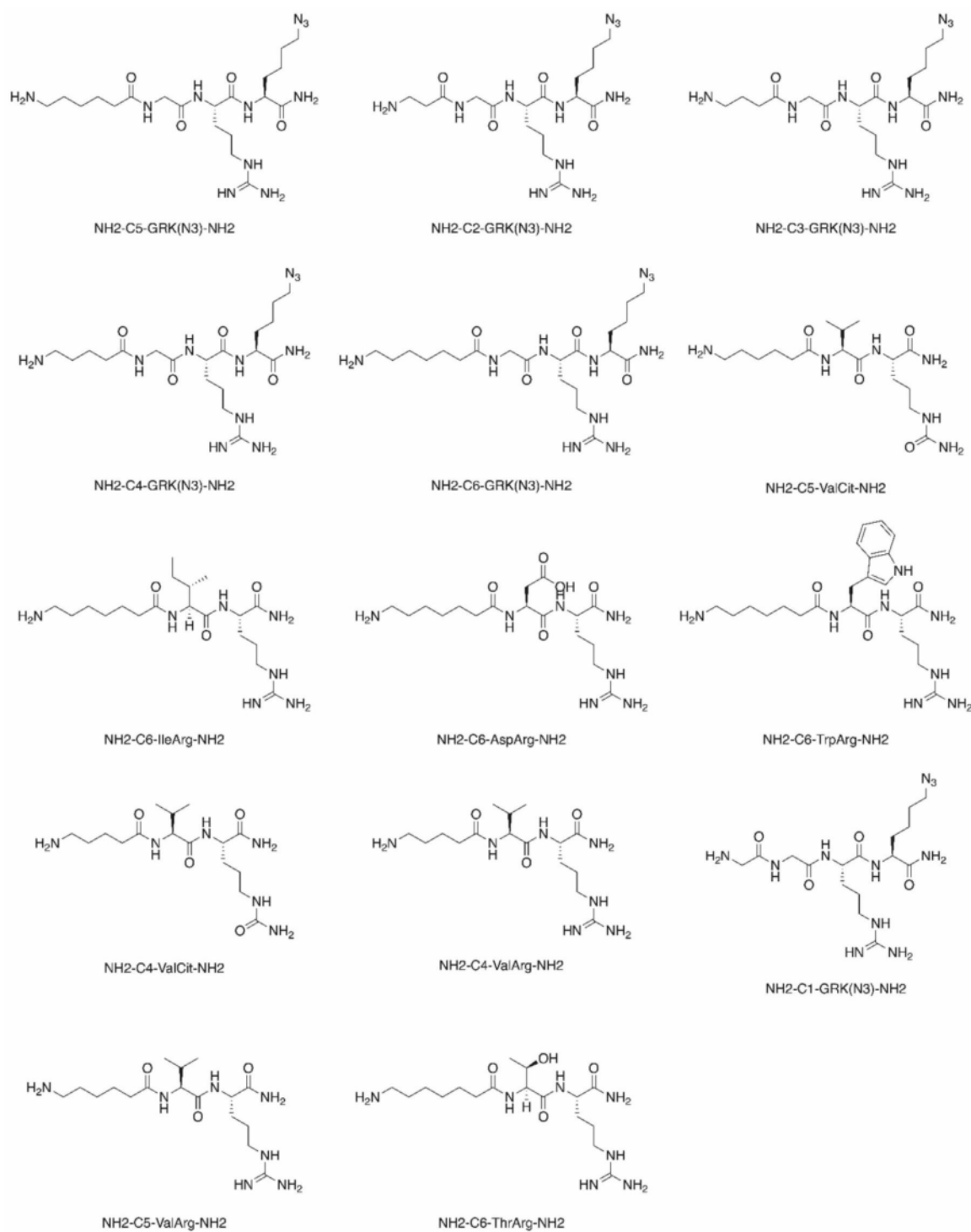


图2