



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105829543 B

(45) 授权公告日 2021.06.01

(21) 申请号 201480068027.2

(22) 申请日 2014.10.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105829543 A

(43) 申请公布日 2016.08.03

(30) 优先权数据
13188585.7 2013.10.14 EP
14165581.1 2014.04.23 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/NL2014/050717 2014.10.14

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/057066 EN 2015.04.23

(73) 专利权人 西纳福克斯股份有限公司
地址 荷兰奥斯

(72) 发明人 F·L·范代尔夫特 R·范吉尔
M·A·维基德文

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285
代理人 张广育 曲蕾

(51) Int.Cl.
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2007095506 A1, 2007.08.23
审查员 张娜

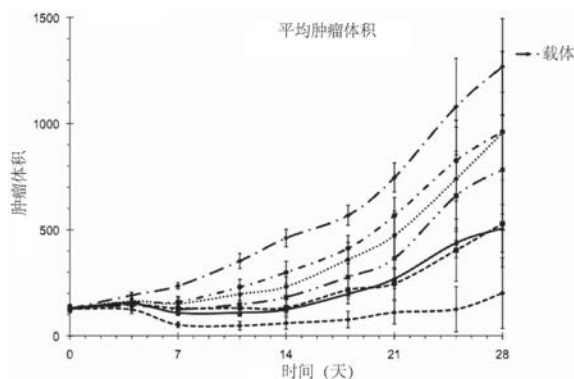
权利要求书5页 说明书49页
序列表20页 附图15页

(54) 发明名称

糖基改造的抗体、抗体-缀合物及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及糖基改造的抗体和抗体-缀合物。具体而言,本发明涉及一种抗体缀合物,其由在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体制备,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点。本发明也涉及用于制备本发明的抗体-缀合物的方法。



1. 用于制备经修饰的抗体的方法,所述方法包括在催化剂存在下使单糖衍生物 $Su(A)_x$ 与近端N-连接的GlcNAc残基连接,所述催化剂选自 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶、 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶、包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶和包含突变催化结构域的 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶;其中 $Su(A)_x$ 被定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;其中巯基前体基团被定义为 $-[C(R^7)_2]_oSC(O)CH_3$ 基团,其中 R^7 独立地选自氢、卤素和任选取代的 C_1-C_{24} 烷基并且o为0-24;其中所述近端N-连接的GlcNAc残基是通过N-糖苷键与IgG抗体的N-糖基化位点共价键合的GlcNAc残基;所述近端N-连接的GlcNAc-残基连接到IgG抗体的N-连接的糖基化位点,所述IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点;并且其中所述近端N-连接的GlcNAc-残基任选地被岩藻糖基化。

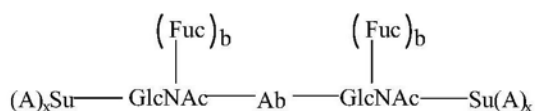
2. 根据权利要求1的方法,其中所述催化剂选自包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶和包含突变催化结构域的 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶。

3. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中所述催化剂为包含来自 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶的突变催化结构域的催化剂,所述 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶选自牛 $\beta(1,4)$ -Gal-T1 GalT Y289L、GalT Y289N、GalT Y289I、GalT Y289F、GalT Y289M、GalT Y289V、GalT Y289G和GalT Y289A。

4. 根据权利要求1或权利要求2的方法,其中 $Su(A)_x$ 选自GalNAz-UDP、6-AzGalNAc-UDP、6-GalNAcCl-UDP、6-GalNAcSH-UDP、2-GalNAcCl-UDP、2-GalNAcSH-UDP、6-ClGal-UDP、2-ClGal-UDP、2-HSGal-UDP、6-HSGal-UDP、2-GalNProSH-UDP和2-GalNBuSH-UDP。

5. 在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点,其中近端N-连接的GlcNAc- $Su(A)_x$ -取代基连接到所述抗体,其中所述近端N-连接的GlcNAc残基是通过N-糖苷键与IgG抗体的N-糖基化位点共价键合的GlcNAc残基;其中所述N-连接的GlcNAc- $Su(A)_x$ -取代基中的GlcNAc任选地被岩藻糖基化,并且其中 $Su(A)_x$ 定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;其中巯基前体基团被定义为 $-[C(R^7)_2]_oSC(O)CH_3$ 基团,其中 R^7 独立地选自氢、卤素和任选取代的 C_1-C_{24} 烷基并且o为0-24。

6. 根据权利要求5的抗体,其中所述抗体为式(140):



140

其中

Ab代表一种IgG抗体,其在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点;Su(A)和x如权利要求5中所定义;并且b为0或1。

7. 根据权利要求5或权利要求6的抗体,其中A为叠氮基、巯基或卤素。

8. 根据权利要求5-7中任一项的抗体在制备抗体-缀合物中的用途,其中抗体-缀合物被定义为通过接头L缀合到目的分子D的抗体。

9. 用于制备抗体-缀合物的方法,所述方法包括使根据权利要求5-7中任一项的经修饰的抗体与接头-缀合物反应,其中所述接头-缀合物包含官能团B和一个或多个目的分子,其中所述官能团B为能够与经修饰的糖蛋白的聚糖上的官能团A反应的官能团,并且其中官能团A如权利要求1中所定义。

10. 根据权利要求9的方法,其中:

(a) 当所述经修饰的抗体为经叠氮化物修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含环炔基、杂环炔基或炔基,以及一个或多个目的分子;或

(b) 当所述经修饰的抗体为经酮基修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含伯胺基团、氨基氧基或肼基,以及一个或多个目的分子;或

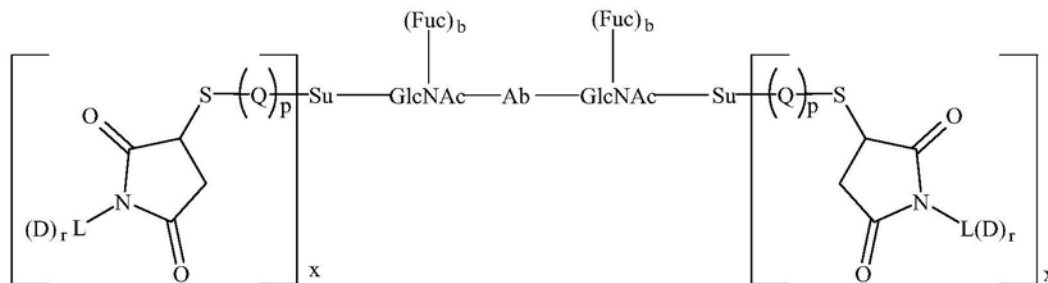
(c) 当所述经修饰的抗体为经炔烃修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含叠氮基,以及一个或多个目的分子;

(d) 当所述经修饰的抗体为经巯基修饰的抗体或经巯基乙酰胺修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含N-马来酰亚胺基团或卤代乙酰氨基或烯烃,以及一个或多个目的分子;或

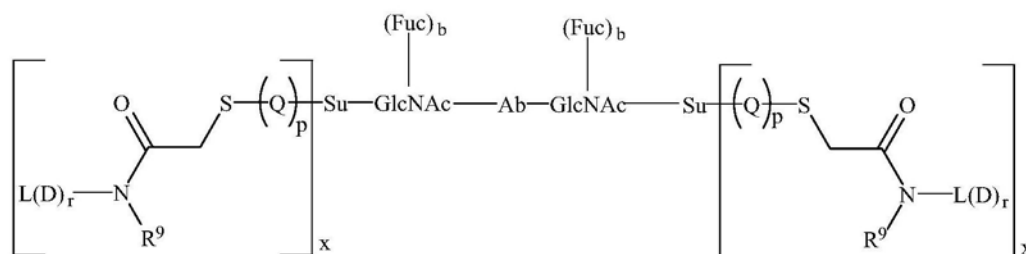
(e) 当所述经修饰的抗体为经卤素修饰的抗体、经卤代乙酰胺修饰的抗体、经磺酰氧基修饰的抗体或经磺酰化的羟基乙酰胺修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含巯基,以及一个或多个目的分子。

11. 通过权利要求9或10的方法可获得的抗体-缀合物。

12. 根据权利要求11的抗体-缀合物,其中抗体为式(154)、(155)、(156)或(157):



154



155

其中:

Ab如权利要求6中所定义;

Su为糖衍生物;

L为接头；

D为目的分子；

b为0或1；

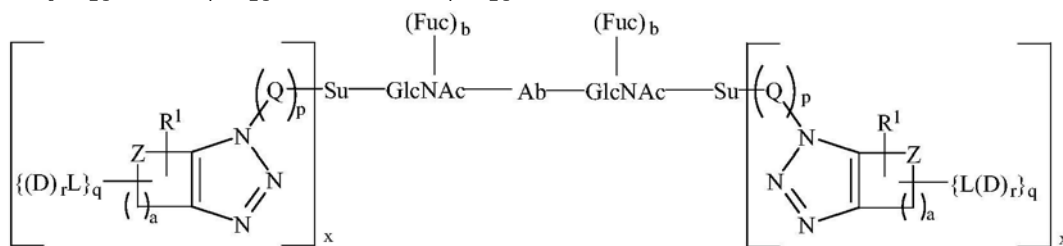
r为1至20；

x为1、2、3或4；

p为0或1；

Q为-N(H)C(O)CH₂-或-CH₂-；以及

R⁹选自L(D)_r、氢、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄芳基、C₇-C₂₄烷基芳基和C₇-C₂₄芳基烷基，所述C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄芳基、C₇-C₂₄烷基芳基和C₇-C₂₄芳基烷基任选地被取代；



156

其中：

Ab如权利要求6中所定义；

Su为糖衍生物；

L为接头；

D为目的分子；

b为0或1；

r为1-20；

x为1、2、3或4；

y为y为1-20；

R¹独立地选自氢、卤素、-OR⁵、-NO₂、-CN、-S(O)₂R⁵、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄芳基、C₆-C₂₄杂芳基、C₇-C₂₄烷基芳基、C₇-C₂₄烷基杂芳基、C₇-C₂₄芳基烷基和C₇-C₂₄杂芳基烷基，其中所述烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、芳基烷基和杂芳基烷基任选地被取代，其中两个取代基R¹可连接在一起以形成增环的环烷基、增环的芳烃或增环的杂芳烃取代基，并且其中R⁵独立地选自氢、卤素、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄芳基、C₆-C₂₄杂芳基、C₇-C₂₄烷基芳基、C₇-C₂₄烷基杂芳基、C₇-C₂₄芳基烷基和C₇-C₂₄杂芳基烷基；

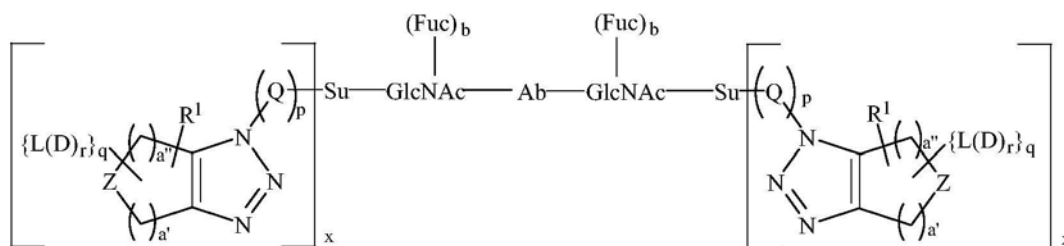
Z为C(R¹)₂、O、S或NR²，其中R²为R¹或L(D)_r，并且其中L、D和r如上文所定义；

p为0或1；

Q为-N(H)C(O)CH₂-或-CH₂-；

q为0或1，条件是如果q为0，则Z为N-L(D)_r；

a为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；



157

其中：

Ab如权利要求6中所定义；

Su为糖衍生物；

L为接头；

D为目的分子；

b为0或1；

r为1-20；

x为1、2、3或4；

y为y为1-20；

R^1 独立地选自氢、卤素、 $-OR^5$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^5$ 、 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} 芳基、 C_6-C_{24} 杂芳基、 C_7-C_{24} 烷基芳基、 C_7-C_{24} 烷基杂芳基、 C_7-C_{24} 芳基烷基和 C_7-C_{24} 杂芳基烷基，其中所述烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、芳基烷基和杂芳基烷基任选地被取代，其中两个取代基 R^1 可连接在一起以形成增环的环烷基、增环的芳烃或增环的杂芳烃取代基，并且其中 R^5 独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} 芳基、 C_6-C_{24} 杂芳基、 C_7-C_{24} 烷基芳基、 C_7-C_{24} 烷基杂芳基、 C_7-C_{24} 芳基烷基和 C_7-C_{24} 杂芳基烷基；

Z为 $C(R^1)_2$ 、O、S或 NR^2 ，其中 R^2 为 R^1 或 $L(D)_r$ ，并且其中L、D和r如上文所定义；

p为0或1；

Q为 $-N(H)C(O)CH_2-$ 或 $-CH_2-$ ；

q为0或1，条件是如果q为0，则Z为 $N-L(D)_r$ ；

a' 为0、1、2、3、4、5、6、7或8；

a'' 为0、1、2、3、4、5、6、7或8；以及

$a'+a'' < 10$ 。

13. 权利要求12的抗体-缀合物，其中 R^9 选自 $L(D)_r$ 、氢、 C_1-C_{12} 烷基、 C_6-C_{12} 芳基、 C_7-C_{12} 烷基芳基和 C_7-C_{12} 芳基烷基，所述 C_1-C_{12} 烷基、 C_6-C_{12} 芳基、 C_7-C_{12} 烷基芳基和 C_7-C_{12} 芳基烷基任选地被取代。

14. 权利要求13的抗体-缀合物，其中 R^9 选自 $L(D)_r$ 、氢、 C_1-C_6 烷基、 C_6-C_{12} 芳基、 C_7-C_{12} 烷基芳基和 C_7-C_{12} 芳基烷基，所述 C_1-C_6 烷基、 C_6-C_{12} 芳基、 C_7-C_{12} 烷基芳基和 C_7-C_{12} 芳基烷基任选地被取代。

15. 权利要求14的抗体-缀合物，其中 R^9 为H、 C_1 、 C_2 、 C_4 或 C_4 烷基或 C_6-C_{12} 芳基。

16. 权利要求15的抗体-缀合物，其中 R^9 为H或甲基。

17. 根据权利要求11-16中任一项的抗体-缀合物，其中x为1或2，和/或r为1或2。

18. 根据权利要求11-16中任一项的抗体-缀合物，其中所述目的分子选自药学活性物质。

19. 根据权利要求11-16中任一项的抗体-缀合物用于制备药物的用途。

糖基改造的抗体、抗体-缀合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体、经修饰的抗体和抗体-缀合物,尤其是涉及糖基改造的抗体、经修饰的抗体和抗体-缀合物。本发明还涉及用于制备本发明的经修饰的抗体和抗体-缀合物的方法。所述抗体可与活性物质缀合。因此,本发明也涉及抗体-药物缀合物(ADC)及其制备方法。

背景技术

[0002] 抗体-缀合物(即通过接头与目的分子缀合的抗体)是本领域已知的。人们对其中目的分子为药物(例如,细胞毒性化学物)的抗体-缀合物具有极大的兴趣。抗体-药物-缀合物是本领域已知的,并且由通过合成的接头与细胞毒性化学物共价键合的重组抗体组成(S.C.Alley等,Curr.Opin.Chem.Biol.2010,14,529-537,以引用的方式纳入)。抗体-药物-缀合物(ADC)(也称为免疫毒素)的主要目的是将单克隆抗体对肿瘤相关抗原的高特异性与“小”细胞毒性药物(通常300至1,000Da)的药理效力结合。ADC的实例包括吉妥单抗-奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)(Mylotarg;与刺孢霉素缀合的抗-CD33mAb,Pfizer/Wyeth);布妥昔单抗-维多汀(brentuximab vedotin)(SGN-35,Adcetris,由与MMAE(单甲基阿里他汀(monomethylauristatin))共价连接的布妥昔单抗组成的靶向CD30的ADC,Seattle Genetics);曲妥珠单抗(trastuzumab)-DM1缀合物(T-DM1,Kadcyla)。

[0003] 本领域的一个进展包括出现极其有效的毒素,尤其是紫杉醇(taxanes)、刺孢毒素(calicheamycins)、美登木素(maytansins)、吡咯并苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiazepines)、多卡米星(duocarmycins)和阿里他汀(auristatins)。这些物质的纳摩尔到皮摩尔的低毒性是对较早期应用的毒素的主要驱动改进。另一个重要的技术进展包括使用优化的接头,所述接头在细胞质中是可水解的,对蛋白酶具有抗性或对其敏感,或对与高细胞毒性药物相关的多重耐药性外排泵具有抗性。

[0004] 现有技术中已知的ADC通常是通过将所述接头-毒素分别通过酰化或烷基化缀合到氨基酸赖氨酸或半胱氨酸的侧链而制备。

[0005] 对于赖氨酸,缀合优选地发生在具有最高的空间可接近性(steric accessibility)、最低的pKa或其组合的赖氨酸侧链上。该方法的缺点是对缀合的位点控制(site-control)低。

[0006] 基于抗体中通常不存在游离的半胱氨酸的事实,通过半胱氨酸的烷基化获得对位点特异性的更好控制,由此提供了只对那些通过还原步骤被选择性释放的或作为游离的半胱氨酸被特异性地改造进入抗体的半胱氨酸进行烷基化(如在所谓的THIOmabs中)的选择。通过还原进行的选择性的半胱氨酸释放通常是通过用还原剂(例如TCEP或DTT)处理全抗体(whole antibody)来进行,导致二硫键转化成两个游离的巯基(主要在抗体的铰链区)。然后用亲电试剂对所释放的巯基进行烷基化(通常基于与接头-毒素连接的马来酰亚胺),这通常进行得很快且具有高度的选择性。关于将额外的(游离的)半胱氨酸改造进入抗体,实现对所加入的半胱氨酸的位置的增强的位点控制。而且在该策略中,使用马来酰亚胺化学

实现游离半胱氨酸的烷基化,但是不能达到完全同质。一份最近的报道(Okeley等, Bioconj.Chem.2013,24,1650-1655,以引文的方式纳入)记载了将6-硫代岩藻糖代谢掺入到单克隆抗体中。然而,人们发现掺入6-硫代岩藻糖的效率仅为70%,因此马来酰亚胺缀合后的DAR为1.3。

[0007] 同时,通过用马来酰亚胺进行烷基化获得ADC的一个缺点在于由于烷基化的逆转,即逆向-迈克尔反应(retro-Michael reaction),通常所得的缀合物可以是不稳定的,由此导致接头-毒素从抗体中释放。对半胱氨酸-马来酰亚胺缀合物的稳定性高度依赖于半胱氨酸在单克隆抗体中的位置已有记载。例如,高度的溶剂可接近性位点在血浆中通常因为马来酰亚胺与白蛋白、谷胱甘肽或其他蛋白质中反应性的巯基的交换而快速失去缀合。相反,在部分可接近位点和带正电的环境中,通过琥珀酰亚胺环的水解(巯基加成至马来酰亚胺的结果)来防止这种不需要的交换反应,而具有部分溶剂可接近性和中性电荷的位点表现出这两种特性。类似地,已发现相对于半胱氨酸马来酰亚胺缀合物,上述的6-硫代岩藻糖马来酰亚胺缀合物被发现具有些许提高的稳定性,但未提供解释。综上所述,基于半胱氨酸-马来酰亚胺烷基化作用的缀合不是开发ADC的理想技术,所述ADC优选地不应表现出毒素的过早释放。

[0008] 制备抗体-药物缀合物的可替代的策略包括在抗体的聚糖结构上产生一个或更多的醛官能团。在哺乳动物宿主体系中所产生的所有重组抗体均在天冬酰胺-297处含有保守的N-糖基化位点,其被复合体型的聚糖修饰。后者聚糖的特点为在各N-聚糖的非还原末端处具有0、1或2个末端半乳糖单元,其可通过化学方法(高碘酸钠)或通过酶方法(半乳糖氧化酶)应用于产生醛官能团。随后可将后者醛官能团用于选择性的缀合方法,例如通过与官能化的羟胺或肼分子缩合,由此分别产生肟连接的或腙连接的抗体缀合物。然而,已知尤其是由脂肪族醛衍生的肟和腙在水中或更低pH下随着时间表现出有限的稳定性。例如,吉妥单抗-奥佐米星为肟连接的抗体-药物缀合物,并且已知在体内经历过早的去缀合(deconjugation)。

[0009] 本领域中已知的抗体-缀合物通常具有几个缺点。对于抗体药物-缀合物,对抗体的毒素载量的量度通过药物-抗体比例(DAR)给出,DAR给出了每个抗体的活性物质分子的平均数目。但是,DAR没有给出关于这种ADC的同质性的任何指示。

[0010] 用于制备现有技术中已知的抗体-缀合物的方法通常产生DAR为1.5至4的产物,但是实际上这样的产物包含带有0至8个或更多个目的分子的抗体-缀合物的混合物。换句话说,所形成的现有技术中已知的抗体-缀合物的DAR通常具有高的标准偏差。

[0011] 例如,吉妥单抗-奥佐米星是50%的缀合物(每个IgG分子0至8个刺孢霉素基团,平均为2个或3个,随机连接到所述抗体的暴露于溶剂的赖氨酸残基)和50%的非缀合抗体(Bross等,Clin.Cancer Res.2001,7,1490;Labrijn等,Nat.Biotechnol.200927,767,都以引文的方式纳入)的异质混合物。但是同样地,对于布妥昔单抗-维多汀、T-DM1(Kadcyla)、布妥昔单抗-维多汀(Adcetris)和处于临床开发的其他ADC,确切地多少药物连接至任何给定的抗体(药物-抗体比例,DAR)仍是不可控制的,并且所获得的ADC为缀合物的统计学分布。不论每个抗体的药物的最佳数目是例如两个、四个还是更多个,通过具有窄范围的标准偏差的位点特异性缀合以可预测的数目和可预测的位置连接药物仍然是有问题的。

[0012] 可普遍适用于所有单克隆抗体的通用策略包括位点特异性缀合到Fc-连接的聚

糖,所述Fc-连接的聚糖天然存在于哺乳动物(或酵母)细胞培养物中表达的所有抗体中。几种基于该概念的策略是本领域已知的,如通过氧化末端半乳糖或通过酶将(非天然)唾液酸转移到相同的半乳糖部分。但是,出于ADC的目的,这样的策略是欠佳的,因为聚糖总是形成异构体(isoform)的复杂的混合物,其可包含不同水平的半乳糖基化(G0、G1、G2),并因此会提供了对药物-抗体比例(DAR,见下文)控制不佳的ADC。

[0013] Qasba等人在W0 2004/063344和J.Biol.Chem.2002,277,20833——二者以引用的方式纳入本文——中公开了突变的半乳糖基转移酶GalT(Y289L)、GalT(Y289I)和GalT(Y289N)可将GalNAc酶法连接到非还原的GlcNAc糖。例如,GlcNAc为一些复杂的N-聚糖(如在单克隆抗体(例如罗美华(Rituxan)、类克(Remicade)、赫赛汀(Herceptin))上的那些)的末端组分。

[0014] Qasba等人在Bioconjugate Chem.2009,20,1228——以引用的方式纳入本文——中公开了在W0 2004/063344中所公开的方法也用于在N-乙酰基上取代的非天然GalNAc-UDP变体。在包含C2-取代的叠氮基乙酰氨基部分(GalNAz)转移到聚糖的末端GlcNAc残基之后,将具有G0糖型的经 β -半乳糖苷酶处理的单克隆抗体完全半乳糖基化为G2糖型,产生了四叠氮基-取代的抗体,即每条重链两个GalNAz部分(见图3,3转化成6)。所述四叠氮基-取代的抗体例如通过Staudinger连接或使用炔烃的点击反应与目的分子缀合(见图3,6转化成7)可能引起对制备例如DAR为4的抗体-药物缀合物的兴趣,但并未公开四叠氮基-取代的抗体与目的分子的缀合。还公开了包含C2-取代的酮基的半乳糖部分(C2-keto-Gal)向G0糖型聚糖的末端GlcNAc残基的转移,以及C2-keto-Gal与氨基氧基生物素的连接。但是,如上所述,所得的脎缀合物因水性水解而可显示出有限的稳定性。

[0015] W0 2007/095506和W0 2008/029281(Invitrogen Corporation)——二者以引用的方式纳入本文——公开了GalT(Y289L)突变体与C2-取代的叠氮基乙酰氨基-半乳糖UDP-衍生物(UDP-GalNAz)的结合导致GalNAz在聚糖的末端非还原性GlcNAc处掺入。通过Staudinger连接或利用铜催化的点击化学进行随后的缀合随后提供其中荧光炔烃探针与抗体缀合的各抗体缀合物。W0 2007/095506和W0 2008/029281还公开了可用endo H对聚糖进行剪切,由此水解GlcNAc-GlcNAc糖苷键,并且释放GlcNAc用于通过酶法引入GalNAz。

[0016] 在W0 2004/063344和Bioconjugate Chem.2009,20,1228中公开的方法的缺点为四叠氮基-取代的抗体与目的分子的缀合将产生每个聚糖通常带有两个目的分子的抗体-缀合物(条件是所述缀合会进行完全转化)。在一些情况下,例如当所述目的是亲脂性毒素时,尤其是在亲脂性部分相接近时,每个抗体中存在太多的分子是不需要的,因为这可导致聚集体形成(BioProcess International 2006,4,42-43,以引用的方式纳入)。

[0017] 在W0 2007/133855(美国马里兰大学生物技术研究所)——以引用的方式纳入本文——中,公开了用于制备同质的糖蛋白或糖肽的化学酶法,其包括如下的两阶段策略:首先对接近完整的聚糖树进行剪切(在endo A、endo H或endo S的作用下),只留下核心N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)部分(所谓的GlcNAc-蛋白),然后进行再糖基化(reglycosylation)事件,其中在包含内切糖苷酶(ENGase)的催化剂存在下,将寡糖部分转移到GlcNAc-蛋白以产生同质的糖蛋白或糖肽。公开了用于经叠氮化物官能化的糖蛋白的策略,其中GlcNAc-蛋白在ENGase存在下与含有两个6-叠氮基甘露糖部分的四糖噁唑啉反应,由此同时在聚糖中引入两个叠氮化物。然后所述经叠氮化物官能化的糖蛋白可在催化剂(例如,Cu(I)催化剂)存

在下与具有目的官能部分X的末端炔烃在“点击化学”环加成反应中进行催化反应。没有公开所述点击化学的实际实例。

[0018] 在J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8030——以引用的方式纳入本文——中, Davis等公开了在糖苷合成酶EndoS存在下, 寡糖噁唑啉在完整抗体的核心-岩藻糖基化的以及未岩藻糖基化的核心-GlcNAc-Fc结构域上的转移。

[0019] 在J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308——以引用的方式引入本文——中, Wang等人公开了在糖苷合成酶突变体EndoS-D233A和EndoS-D233Q的存在下, 包含两个6-叠氮基甘露糖部分的四糖噁唑啉在完整抗体(利妥昔单抗)的核心-岩藻糖基化的以及未岩藻糖基化的核心-GlcNAc-Fc结构域上的转移。

[0020] 但是, 在W0 2007/133855、J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 8030和J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 12308中公开的糖苷合成酶策略的缺点是所需的含叠氮基的寡糖噁唑啉的合成冗长且复杂。

[0021] 用于通过N-聚糖制备抗体缀合物的现有技术的一个局限性为这种方法对于天然存在的N-糖基化位点的固有依赖性。IgG型的所有单克隆抗体在重链的天冬酰胺-297处(或附近)具有至少一个N-糖基化位点。在N297处的聚糖对于通过与Fc- γ 受体结合而诱导效应子功能(抗体依赖性的细胞的细胞毒性)是必需的。但是N297聚糖对于在血液中保持长循环时间——其通过抗体的C_H2-C_H3结构域界面与FcRn受体的相互作用来调控——不是必需的。除了N297糖基化位点之外, 约20%的单克隆抗体包含第二糖基化位点, 其通常在Fab结构域中。但是并不知道所述第二糖基化位点对于任何种类的抗体活性是必需的, 并且如果需要, 所述第二糖基化位点本身可以被改造而从抗体中去除(如同例如在研发曲妥珠单抗中所应用的)。

[0022] Wright等(EMBO J. 1991, 10, 2717, 以引用的方式纳入本文)记载了分别在两种不同的抗体TST2和TSU7的V_H中于特异性位置54或60处的糖基化位点的从头改造, 并且确定了所述位点对于糖基化过程、抗原亲和性和与衍生自抗体的(Fab')₂-片段的结合性的影响。

[0023] 在US6254868和EP97916787——以引用的方式纳入本文——中, 记载了10个新的糖基化位点是如何设计的, 并且如何将其改造进入人源化抗-CD22单克隆抗体hLL2中。两个CH₁结构域糖基化位点(HCN1和HCN5)被鉴定为位于有利于糖基化作用的位置。新的糖基化位点应用于螯合物和药物与衍生自抗体的(Fab')₂-片段的位点特异性缀合。通过高碘酸盐氧化、然后还原性的胺化来实现缀合, 对免疫反应性的影响可忽略。这两种CH₁附加的CHO同样有效地与小螯合物进行缀合, 推断HCN5-CHO因结构和位置的优越性似乎是大药物络合物的更好的缀合位点, 然后在抗体的可变结构域内进行缀合。

发明内容

[0024] 本发明涉及用于制备经修饰的抗体的方法, 所述方法包括在催化剂存在下使单糖衍生物Su(A)_x与近端N-连接的GlcNAc残基连接, 所述催化剂选自 β (1,4)-半乳糖基转移酶、 β (1,3)-N-半乳糖基转移酶、包含突变催化结构域的 β (1,4)-半乳糖基转移酶和包含突变催化结构域的 β (1,3)-N-半乳糖基转移酶; 其中Su(A)_x定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su, 其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基; 其中将所述近端N-连接的GlcNAc-残基

连接到IgG抗体的N-连接的糖基化位点,所述IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点;并且其中所述近端N-连接的GlcNAc-残基任选地被岩藻糖基化。

[0025] 本发明还涉及经修饰的IgG抗体,其在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点,其中将近端N-连接的GlcNAc-Su(A)_x-取代基连接到抗体,其中在所述N-连接的GlcNAc-Su(A)_x-取代基中GlcNAc任选地被岩藻糖基化,以及其中将Su(A)_x定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基。

[0026] 另外,本发明涉及本发明的经修饰的抗体在制备抗体-缀合物中的用途,其中将抗体-缀合物定义为通过接头L缀合到目的分子D的抗体。

[0027] 另外,本发明涉及用于制备抗体-缀合物的方法,所述方法包括使本发明的经修饰的抗体与接头-缀合物反应;其中所述接头-缀合物包含官能团B和一个或多个目的分子;其中所述官能团B为能够与经修饰的糖蛋白的聚糖上的官能团A反应的官能团;以及其中官能团A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基。

[0028] 本发明还涉及通过本发明的方法可获得的抗体-缀合物和抗体-药物缀合物。

[0029] 此外,本发明涉及本发明的抗体-缀合物,其用作药物。

附图说明

[0030] 图1示出在哺乳动物宿主中所产生的单克隆抗体的可能的糖基化特征的实例。仅示出双触角(biantennary)复合聚糖,其他的选择也是可能的,例如唾液酸化的聚糖和三触角(triantennary)结构。

[0031] 图2示出通过常规表达然后用内切糖苷酶(1)剪切可获得的单克隆抗体的不同糖型。可通过在苦马豆素存在下、于哺乳动物体系中表达mAb或通过在经改造的宿主生物体中(例如毕赤酵母)表达而获得糖型2。最后,可通过在唾液酸酶和半乳糖苷酶的联合作用下对常规的糖型混合物(G0、G1、G2、G0F、G1F和G2F)进行剪切而获得糖型3。

[0032] 图3示出mAb的糖型混合物在分别用内切糖苷酶或者唾液酸酶和半乳糖苷酶的混合物处理后转化成GlcNAc-封端的mAb 1或3。在Gal-T1(Y289L)存在下的UDP-GalNAz处理后,每个糖基化位点分别引入一个或两个GalNAz部分。通过例如菌株促进的(strain-promoted)环加成作用(4→5)或铜催化的点击反应(6→7),在4和6中的叠氮化物部分作为官能团引入的连接点。

[0033] 图4示出在半乳糖基转移酶(或其突变体)作用下,用于转移到GlcNAc-封端的糖上的经叠氮基修饰的半乳糖衍生物的结构(9-11)。

[0034] 图5示出在半乳糖转移酶(或其突变体)作用下,用于转移到GlcNAc-封端的糖上的其他半乳糖衍生物的结构(12-27)。

[0035] 图6示出在去除N297处的天然糖基化位点(例如Asn突变成Gln),并且在mAb的另一个位点——其可以是重链或轻链中的任何位置——从头改造出新的糖基化位点之后,单克隆抗体(例如IgG)的不同糖型。

[0036] 图7示出在半乳糖转移酶作用下,用于通过酶法掺入到GlcNAc-封端的聚糖上的经修饰的UDP-半乳糖核苷酸的结构28-31。

[0037] 图8示出用于合成BCN-MMAF缀合物(34)的反应方案。

[0038] 图9示出用于合成BCN-美登素生物碱(maytansinoid)缀合物(35)的反应方案。

[0039] 图10示出(A)在CHO中表达后分离出的曲妥珠单抗突变体-(N297Q,L196N)的质谱图,以及(B)在用endo F3(或endo F2)处理后的曲妥珠单抗-(N297Q,L196N)的质谱图。

[0040] 图11示出(A)在用endo F3(或endo F2)处理后和GalNAz在GalT1-介导下转移到末端GlcNAc之后,曲妥珠单抗突变体-(N297Q,L196N)的质谱图,以及(B)用BCN-vc-PABA-MMAF34处理之后由负载有叠氮化物的曲妥珠单抗突变体N297Q,L196N的缀合而产生的抗体药物缀合物的质谱图。

[0041] 图12示出一系列ADC对SK-Br-3细胞系的体外细胞毒性。

[0042] 图13示出一系列ADC对SK-OV-3细胞系的体外细胞毒性。

[0043] 图14示出一系列ADC对MDA-MB-231细胞系的体外细胞毒性(阴性对照)。

[0044] 图15示出一系列ADC的体内功效,所述ADC基于曲妥珠单抗的糖突变体并且和vc-PABA-美登素缀合。

具体实施方式

[0045] 定义

[0046] 在本说明书和权利要求书中使用的动词“包含”及其变化形式以其非限制性意义使用,意指包括该词之后的项,但不排除未具体提及的项。

[0047] 此外,用不定冠词“一”或“一个”提及要素时不排除存在超过一个所述要素的可能性,除非上下文明确要求有且只有一个要素。因此,不定冠词“一”或“一个”通常意指“至少一个”。

[0048] 本说明书和权利要求书中所公开的化合物可包含一个或多个不对称中心,并且可存在所述化合物的不同的非对映异构体和/或对映异构体。除非另有说明,对本说明书和权利要求书中的任何化合物的描述意指包括所有的非对映异构体及其混合物。此外,除非另有说明,对本说明书和权利要求书中的任何化合物的描述意指包括单独的对映异构体,以及对映异构体的任何混合物、外消旋体或其他形式。在描述一种化合物的结构为具体的对映异构体时,应理解为本申请的发明不限于该具体的对映异构体。

[0049] 所述化合物可以不同的互变异构的形式存在。除非另有说明,本发明的化合物意指包括所有的互变异构形式。在描述一种化合物的结构为具体的互变异构体时,应理解为本申请的发明不限于该具体的互变异构体。

[0050] 未取代的烷基具有通式 C_nH_{2n+1} 并且可为直链或支链的。未取代的烷基也可包含环状部分,从而具有伴随的通式 C_nH_{2n-1} 。任选地,所述烷基被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代。烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、2-丙基、叔丁基、1-己基、1-十二烷基等。

[0051] 芳基包含六至十二个碳原子并且可包括单环和双环结构。任选地,所述芳基可被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代。芳基的实例为苯基和萘基。

[0052] 芳基烷基和烷基芳基包含至少七个碳原子并且可包括单环和双环结构。任选地,

所述芳基烷基和烷基芳基可被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代。芳基烷基为例如苄基。烷基芳基为例如4-叔丁基苯基。

[0053] 杂芳基包含至少两个碳原子(即,至少 C_2)和一个或多个杂原子N、O、P或S。杂芳基可具有单环结构或双环结构。任选地,所述杂芳基可被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代。合适的杂芳基的实例包括吡啶基、喹啉基、嘧啶基、吡嗪基、吡唑基、咪唑基、噻唑基、吡咯基、呋喃基、三唑基、苯并呋喃基、吡啶基、嘌呤基、苯并噻唑基、噻吩基、磷基(phosphoryl)和噁唑基。

[0054] 杂芳基烷基和烷基杂芳基包含至少三个碳原子(即至少 C_3)并且可包括单环和双环结构。任选地,所述杂芳基可被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代。

[0055] 当芳基表示为(杂)芳基时,该表示法意指包括芳基和杂芳基。类似地,烷基(杂)芳基意指包括烷基芳基和烷基杂芳基,以及(杂)芳基烷基意指包括芳基烷基和杂芳基烷基。因此, C_2 - C_{24} (杂)芳基应解释为 C_2 - C_{24} 杂芳基和 C_6 - C_{24} 芳基。类似地, C_3 - C_{24} 烷基(杂)芳基意指包括 C_7 - C_{24} 烷基芳基和 C_3 - C_{24} 烷基杂芳基,以及 C_3 - C_{24} (杂)芳基烷基意指包括 C_7 - C_{24} 芳基烷基和 C_3 - C_{24} 杂芳基烷基。

[0056] 除非另有说明,烷基、烯基、炔基、炔基、(杂)芳基、(杂)芳基烷基和烷基(杂)芳基可被一个或多个选自下述的取代基取代: C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、 C_3 - C_{12} 环烷基、 C_5 - C_{12} 环烯基、 C_8 - C_{12} 环炔基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、 C_2 - C_{12} 烯氧基、 C_2 - C_{12} 炔氧基、 C_3 - C_{12} 环烷氧基、卤素、氨基、氧代和甲硅烷基,其中甲硅烷基可由式 $(R^{10})_3Si-$ 代表,其中 R^{10} 独立地选自 C_1 - C_{12} 烷基、 C_2 - C_{12} 烯基、 C_2 - C_{12} 炔基、 C_3 - C_{12} 环烷基、 C_1 - C_{12} 烷氧基、 C_2 - C_{12} 烯氧基、 C_2 - C_{12} 炔氧基和 C_3 - C_{12} 环烷氧基,其中烷基、烯基、炔基、环烷基、烷氧基、烯氧基、炔氧基和环烷氧基被任选地取代,所述烷基、烷氧基、环烷基和环烷氧基任选地被一个或多个选自O、N和S的杂原子间断。

[0057] 炔基包含碳碳三键。包含一个三键的未取代的炔基具有通式 C_nH_{2n-3} 。末端炔基是其中所述三键位于碳链的末端位置的炔基。任选地,所述炔基被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代,和/或被选自氧、氮和硫的杂原子间断。炔基的实例包括乙炔基、丙炔基、丁炔基、辛炔基等。

[0058] 环炔基是环状的炔基。包含一个三键的未取代的环炔基具有通式 C_nH_{2n-5} 。任选地,环炔基被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代。环炔基的实例为环辛炔基。

[0059] 杂环炔基是被选自氧、氮和硫的杂原子间断的环炔基。任选地,杂环炔基被一个或多个在本文中进一步具体指明的取代基取代。杂环炔基的实例为氮杂环辛炔基。

[0060] (杂)芳基包括芳基和杂芳基。烷基(杂)芳基包括烷基芳基和烷基杂芳基。(杂)芳基烷基包括芳基烷基和杂芳基烷基。(杂)炔基包括炔基和杂炔基。(杂)环炔基包括环炔基和杂环炔基。

[0061] 在本文中,(杂)环炔烃化合物定义为包含(杂)环炔基的化合物。

[0062] 可将本说明书和权利要求中所公开的几种化合物描述为稠合的(杂)环炔烃化合物,即(杂)环炔烃化合物——其中第二个环结构被稠合,即被增环至(杂)环炔基。例如在稠合的(杂)环辛炔化合物中,可将环烷基(例如环丙基)或芳基(例如苯)增环至(杂)环辛炔基。在稠合的(杂)环辛炔化合物中的(杂)环辛炔基的三键可位于三个可能位置中的任一个,即位于环辛炔部分的第2、3或4位(根据“IUPAC有机化学命名法”,A31.2条进行编号)。在本说明书和权利要求书中的任何稠合的(杂)环辛炔化合物的描述意指包括所述环辛炔部

分的所有三个单独的位置异构体。

[0063] 当烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基、(杂)芳基烷基、(杂)环炔基被任选地取代时,所述基团独立地任选地被一个或多个独立地选自下述的取代基取代: C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_{12} 烯基、 C_2-C_{12} 炔基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_2-C_{12} 烯氧基、 C_2-C_{12} 炔氧基、 C_3-C_{12} 环烷氧基、卤素、氨基、氧代和甲硅烷基;其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、烷氧基、烯氧基、炔氧基和环烷氧基被任选地取代,所述烷基、烷氧基、环烷基和环烷氧基任选地被一个或多个选自O、N和S的杂原子间断;其中甲硅烷基由式 $(R^6)_3Si-$ 代表,其中 R^6 独立地选自下述基团: C_1-C_{12} 烷基、 C_2-C_{12} 烯基、 C_2-C_{12} 炔基、 C_3-C_{12} 环烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 C_2-C_{12} 烯氧基、 C_2-C_{12} 炔氧基和 C_3-C_{12} 环烷氧基,其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、烷氧基、烯氧基、炔氧基和环烷氧基被任选地取代,所述烷基、烷氧基、环烷基和环烷氧基任选地被一个或多个选自O、N和S的杂原子间断。

[0064] 本文使用的通用术语“糖”表示单糖,例如葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)和岩藻糖(Fuc)。本文使用的术语“糖衍生物”表示单糖的衍生物,即包含取代基和/或官能团的单糖。糖衍生物的实例包括氨基糖和糖酸,例如葡糖胺($GlcNH_2$)、半乳糖胺($GalNH_2$)、N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、唾液酸(Sia)——其也称为N-乙酰神经氨酸(NeuNAc),以及N-乙酰胞壁酸(MurNAc)、葡糖醛酸(GlcA)和艾杜糖醛酸(IdoA)。糖衍生物的实例也包括本文中表示为 $Su(A)_x$ 的化合物,其中Su为糖或糖衍生物,并且其中Su包括x个官能团A。

[0065] 本文中的术语“核苷酸”指的是核碱基、五碳糖(核糖或脱氧核糖)和一个、两个或三个磷酸基团组成的分子。在没有磷酸基团时,由核碱基和糖组成核苷。因此核苷酸也可称为核苷单磷酸、核苷二磷酸或核苷三磷酸。核碱基可为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶。核苷酸的实例包括尿苷二磷酸(UDP)、鸟苷二磷酸(GDP)、胸苷二磷酸(TDP)、胞苷二磷酸(CDP)和胞苷单磷酸(CMP)。

[0066] 本文中使用的术语“蛋白质”为其常规的科学含义。在本文中,认为包含约10个或更多的氨基酸的多肽为蛋白质。蛋白质可包含天然氨基酸和非天然氨基酸。

[0067] 在本文中,术语“糖蛋白”指包含与蛋白质共价键合的一条或多条单糖链或寡糖链(“聚糖”)的蛋白质。聚糖可以连接到蛋白质上的羟基(O-连接的聚糖),例如连接到丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、羟赖氨酸或羟脯氨酸的羟基;或连接到蛋白质上的酰胺官能团(N-糖蛋白),例如天冬酰胺或精氨酸;或连接到蛋白质上的碳(C-糖蛋白),例如色氨酸。糖蛋白可包含超过一个的聚糖,可包含一个或多个单糖聚糖和一个或多个寡糖聚糖的结合物,以及可包含N-连接的聚糖、O-连接的聚糖和C-连接的聚糖的结合物。据估计所有蛋白质中超过50%的蛋白质具有糖基化的一些形式,因此可认为是糖蛋白。糖蛋白的实例包括PSMA(前列腺特异性膜抗原)、CAL(南极假丝酵母(*candida antartica*)脂肪酶)、gp41、gp120、EPO(红细胞生成素)、抗冻蛋白和抗体。

[0068] 在本文中,术语“聚糖”指的是与蛋白连接的单糖链或寡糖链。因此术语聚糖指的是糖蛋白的碳水化合物部分。聚糖通过一种糖的C-1碳与蛋白质连接,所述糖可不发生进一步取代(单糖)或可在其一个或多个羟基处被进一步取代(寡糖)。天然存在的聚糖通常包含1至约10个糖部分。但是,当更长的糖链连接到蛋白质时,所述糖链在本文中也被认为是聚糖。

[0069] 糖蛋白的聚糖可为单糖。通常,糖蛋白的单糖聚糖由与蛋白质共价连接的单个N-

乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、葡萄糖 (Glc)、甘露糖 (Man) 或岩藻糖 (Fuc) 组成。

[0070] 聚糖也可称为寡糖。糖蛋白的寡糖链可为直链或支链的。在寡糖中,直接连接到蛋白质的糖被称为核心糖。在寡糖中,不直接与蛋白质连接并且与至少两个其他糖连接的糖被称为内部糖。在寡糖中,不直接与蛋白质连接而是与单个其他糖连接(即在其一个或多个其他的羟基中不携带其他糖取代基)的糖被称为末端糖。为避免产生疑义,在糖蛋白的寡糖中可存在多个末端糖,但仅有一个核心糖。

[0071] 聚糖可为O-连接的聚糖、N-连接的聚糖或C-连接的聚糖。在O-连接的聚糖中,单糖聚糖或寡糖聚糖与蛋白质的氨基酸的O原子键合,通常是通过丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 的羟基连键合。在N-连接的聚糖中,单糖聚糖或寡糖聚糖通过蛋白质的氨基酸的N原子(通常是通过天冬酰胺 (Asn) 或精氨酸 (Arg) 的侧链中的酰胺氮) 与蛋白质键合。在C-连接的聚糖中,单糖聚糖或寡糖聚糖与蛋白质的氨基酸的C原子键合,通常是与色氨酸 (Trp) 的C原子键合。

[0072] 与蛋白质直接连接的寡糖的末端被称为聚糖的还原端。寡糖的另一末端被称为聚糖的非还原端。

[0073] 对于O-连接的聚糖,有多种链存在。天然存在的O-连接的聚糖通常的特征为色氨酸或苏氨酸连接的 α -O-GalNAc部分,其可进一步地被半乳糖、唾液酸和/或岩藻糖取代。携带聚糖取代基的羟基化氨基酸可以是蛋白质中任何氨基酸序列的一部分。

[0074] 对于N-连接的聚糖,有多种链存在。天然存在的N-连接的聚糖通常的特征为天冬酰胺连接的 β -N-GlcNAc部分,在其4-OH处进一步被 β -GlcNAc取代、在其4-OH处进一步被 β -Man取代、在其3-OH和6-OH处进一步被 α -Man取代,产生聚糖戊多糖 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 。核心GlcNAc部分可在其6-OH处被 α -Fuc进一步取代。戊多糖 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 为几乎所有的N-连接的糖蛋白的共同的寡糖骨架并且可携带多种其他的取代基,所述取代基包括但不限于Man、GlcNAc、Gal和唾液酸。在其侧链上被聚糖取代的天冬酰胺通常为序列Asn-X-Ser/Thr的一部分,X为除脯氨酸之外的任何氨基酸并且Ser/Thr为丝氨酸或苏氨酸。

[0075] 本文中使用的术语“抗体”为其常规的科学含义。抗体是由免疫系统产生的蛋白质,其能够识别并且结合特异性抗原。抗体是糖蛋白的实例。在本文中术语抗体以最宽泛的意义使用,并具体包括单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、抗体片段以及双链和单链抗体。术语“抗体”在本文也意指包括人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和特异性结合癌抗原的抗体。术语“抗体”意指包括全抗体,以及抗体片段,例如来自经裂解的抗体的抗体Fab片段、 $(\text{Fab}')_2$ 、Fv片段或Fc片段;scFv-Fc片段;小抗体;双特异抗体(diabody)或scFv。此外,所述术语包括经遗传改造的抗体和抗体的衍生物。抗体、抗体片段和经遗传改造的抗体可通过本领域已知的方法获得。合适的市售抗体包括阿昔单抗(abciximab)、利妥昔单抗(rituximab)、巴利昔单抗(basiliximab)、帕利珠单抗(palivizumab)、英夫利昔单抗(infiiximab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、阿仑珠单抗(alemtuzumab)、阿达木单抗(adalimumab)、托西莫单抗- ^{131}I (tositumomab- ^{131}I)、西妥昔单抗(cetuximab)、替伊莫单抗(ibrituximab tiuxetan)、奥马佐单抗(omalizumab)、贝伐单抗(bevacizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、雷珠单抗(ranibizumab)、帕木单抗(panitumumab)、依库珠单抗(eculizumab)、培化舍珠单抗(certolizumab pegol)、戈利木单抗(golimumab)、卡那奴单抗(canakinumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、乌司奴单抗

(ustekinumab)、托珠单抗(tocilizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、地舒单抗(denosumab)、贝利木单抗(belimumab)、伊匹木单抗(ipilimumab)和布妥昔单抗(brentuximab),以及其他抗体。

[0076] 术语“治疗”等是指获得所需的药理学和/或生理学效果。该效果就完全地或部分地预防疾病或其症状来说可为预防性的,和/或就部分地或完全地治愈疾病和/或由该疾病引起的副作用来说可为治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖对哺乳动物(尤其是人)中的疾病的任何治疗,并包括预防疾病在受试者中发生,所述受试者可为易患疾病但是还未被诊断出患有此病;抑制疾病,即阻止其发展;缓解疾病,即引起疾病的消退。

[0077] 制备经修饰的抗体的方法

[0078] 本发明涉及制备经修饰的抗体的方法,该方法包括在合适的催化剂存在下,使单糖衍生物 $Su(A)_x$ 连接到近端N连接的GlcNAc残基;其中合适的催化剂定义为以 $Su(A)_x$ 为底物的催化剂;其中 $Su(A)_x$ 定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;其中将所述近端N-连接的GlcNAc-残基连接到IgG抗体的N-连接的糖基化位点,所述IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点;并且其中所述近端N-连接的GlcNAc-残基任选地被岩藻糖基化。

[0079] 在一个特别优选的实施方案中,所述催化剂选自 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶、 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶、包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶和包含突变催化结构域的 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶。

[0080] 在下文中将更详细地描述通过本发明方法可获得的经修饰的抗体。

[0081] 在制备本发明的经修饰的抗体的方法中,在半乳糖基转移酶存在下,将单糖衍生物 $Su(A)_x$ 连接到近端N-连接的GlcNAc残基。所述近端N-GlcNAc残基通过N-糖苷键连接到IgG抗体的N-连接的糖基化位点,所述IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个且不多于一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点。

[0082] 当IgG抗体为全抗体时,所述抗体通常由两条免疫球蛋白(Ig)重链和两条Ig轻链组成。所述Ig重链包含由恒定结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 组成的恒定区以及可变区 V_H 。所述Ig轻链由可变区 V_L 和恒定区 C_L 组成。

[0083] 在本文中,术语“单条重链和单条轻链的结合体”指的是一条Ig重链和一条Ig轻链的结合体。由于全抗体是两条重链和两条轻链的对称二聚体,因此全抗体由两个所述的单条重链和单条轻链的结合体组成。除非另有说明,在本文中术语“单条重链和单条轻链的结合体”仅用作定义其中可存在所述N-糖基化位点的IgG抗体的部分的一种方式,并且在本文中不是指例如还原型IgG抗体。

[0084] 因此在本文中,术语“在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体”定义为一个或不多于一个N-连接的糖基化位点存在于所述结合体的重链的 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 或 V_H 结构域中,或存在于所述结合体的轻链的 C_L 或 V_L 结构域中。

[0085] 应当理解的是,当IgG抗体为全抗体时,由于单条重链和单条轻链的结合体包含一个N-连接的糖基化位点,因此所述全抗体包含两个且不多于两个N-连接的糖基化位点,在

每个单条重链和单条轻链的结合体上各有一个。

[0086] 如上所定义的,在本文中术语“抗体”不仅指全抗体,还指抗体片段,并且所述的在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体也可为抗体片段。例如在本文中也为在 C_H2 或 C_H3 结构域包含一个N-连接的糖基化位点的Fc片段是在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体,尽管所述片段并不包含轻链结构域。抗体片段——其在本文中被认为是在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体——的实例包括Fc片段、Fab片段、 $(Fab')_2$ 片段、Fab'片段、scFv片段、还原型抗体、双特异抗体、三特异抗体和四特异抗体等,条件是所述片段包含一个且仅有一个N-连接的糖基化位点。

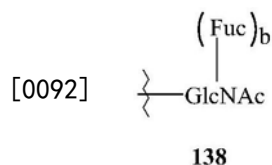
[0087] 在一个优选实施方案中,在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体为全抗体。当在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体为全抗体(即包含两条重链和两条轻链的抗体)时,则所述全抗体包含两个N-连接的糖基化位点。

[0088] 本文中术语“N-连接的糖基化位点”指的是在抗体上的位点,在该位点单糖或寡糖通过N-糖苷键连接到抗体上。在本文中连接到抗体上的单糖或寡糖也被称为聚糖。

[0089] IgG抗体的Fc区具有高度保守的N-糖基化位点。保守的N-连接的糖基化位点也可称为天然N-连接的糖基化位点。连接到该保守位点的N-聚糖主要为复合型的核心-岩藻糖基化的双触角结构。此外,少量的这些N-聚糖也具有等分的GlcNAc和 α -2,6-连接的唾液酸残基。IgG中的天然糖基化位点存在于天冬酰胺297(也称为Asn297或N297)处(或附近)。

[0090] 图6示出在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体的几个实例,任一个的糖基化位点均不是在N297处的保守糖基化位点。

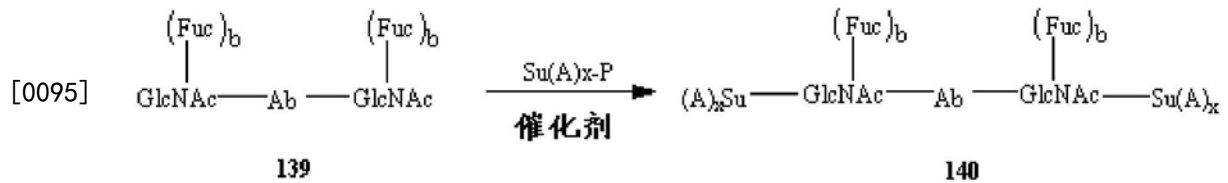
[0091] 术语“近端N-连接的GlcNAc-残基”——在本文中也称为“核心-GlcNAc-取代基”——指的是通过N-糖苷键与IgG抗体的N-糖基化位点共价键合的GlcNAc-残基,所述IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,优选通过所述GlcNAc残基的C1与抗体氨基酸的侧链中的酰胺基团共价键合,更优选与天冬酰胺或精氨酸的侧链中的酰胺键合。所述近端N-连接的GlcNAc-残基或核心-GlcNAc-取代基任选地被岩藻糖基化。近端N-连接的GlcNAc-残基为式(138):



[0093] 如上所述,在制备本发明的经修饰的抗体的方法中,在半乳糖基转移酶存在下,将单糖衍生物 $Su(A)_x$ 连接到近端N-连接的GlcNAc-残基。

[0094] 在一个优选实施方案中,所述方法包括在合适的催化剂存在下,使在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体与 $Su(A)_x$ -P接触,其中近端N-连接的GlcNAc-残基在所述糖基化位点处连接至抗体;其中N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点;其中 $Su(A)_x$ -P为包含x个官能团A的糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;其中P为核苷酸;以及其中合适的催

化剂被定义为以 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 为底物的催化剂。该方法的一个优选实施方案示于方案1中,其中所述IgG抗体为全抗体。



[0096] 方案1

[0097] 在方案1中,Ab指在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个且不多于一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体,其中N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点,b为0(未岩藻糖基化)或1(岩藻糖基化)并且 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 如上所定义。

[0098] 由于IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个且不多于一个N-连接的糖基化位点,并且全抗体由两个所述结合体组成,因此当IgG抗体为全抗体时,所述全抗体包含两个且不多于两个N-糖基化位点。

[0099] 用于制备本发明的经修饰的抗体的方法在合适的催化剂存在下进行,优选通过合适的催化剂作用进行。合适的催化剂被定义为以 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 为底物的催化剂。在一个优选实施方案中,所述催化剂为一种酶,优选半乳糖基转移酶,更优选所述催化剂为半乳糖基转移酶或包含突变的催化结构域的半乳糖基转移酶。所述催化剂优选地选自 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶、 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶、包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶和包含突变催化结构域的 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶。

[0100] 当所述催化剂为不含突变结构域的半乳糖基转移酶时,所述半乳糖基转移酶优选为野生型半乳糖基转移酶。当所述酶为包含突变催化结构域的半乳糖基转移酶时,所述突变GalT结构域可存在于全长GalT酶中,但是也可存在于包含催化结构域的重分子中。

[0101] 在一个实施方案中,所述催化剂为野生型半乳糖基转移酶,更优选为野生型 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶或野生型 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶,甚至更优选野生型 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶。 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶在本文中也称为GalT。甚至更优选地,所述 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶选自牛 $\beta(1,4)$ -Gal-T1、人 $\beta(1,4)$ -Gal-T1、人 $\beta(1,4)$ -Gal-T2、人 $\beta(1,4)$ -Gal-T3和人 $\beta(1,4)$ -Gal-T4。甚至更优选地,所述 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶为 $\beta(1,4)$ -Gal-T1。当催化剂为野生型 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶时,优选人 $\beta(1,3)$ -Gal-T5。

[0102] 当糖衍生物 $\text{Su}(\text{A})_x$ 中官能团A存在于所述糖衍生物的C2或C6——优选C6——上时,特别优选其中催化剂为野生型半乳糖基转移酶的该实施方案。在该实施方案中,还优选 $\text{Su}(\text{A})_x$ 包含一个官能团A,即优选x为1。在下文中将更详细地描述P、 $\text{Su}(\text{A})_x$ 和 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 。

[0103] 在本发明方法的一个具体实施方案中,所述方法包括在合适的催化剂存在下,使包含近端N-连接的GlcNAc-残基的IgG抗体与 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 接触;其中所述抗体的近端N-连接的GlcNAc-残基任选地被岩藻糖基化;其中合适的催化剂被定义为半乳糖基转移酶或包含突变催化结构域的半乳糖基转移酶,所述催化剂以 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 为底物;其中 $\text{Su}(\text{A})_x$ 为包含x个官能团A的糖衍生物,其中x为1、2、3或4且A独立地选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;其中P为核苷酸;条件是当催化剂为野生型半乳糖基转移酶时,则 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 包含一个官能团A(即x为1),并且所述官能团A存在于 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的C2或C6——优选C6——上。

[0104] 因此,在一个具体的实施方案中,制备经修饰的抗体的方法包括在合适的催化剂存在下,使包含近端N-连接的GlcNAc-残基的IgG抗体与 $Su(A)_x-P$ 接触;其中所述近端N-连接的GlcNAc-残基任选地被岩藻糖基化;其中合适的催化剂被定义为以 $Su(A)_x-P$ 为底物的野生型半乳糖基转移酶;其中 $Su(A)_x$ 为包含x个官能团A的糖衍生物,其中x为1,A存在于糖衍生物Su的C2或C6——优选C6——上,并且A独立地选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;其中P为核苷酸。

[0105] 优选地,在该具体实施方案中野生型半乳糖基转移酶为 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶或 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶,更优选 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶。甚至更优选地,野生型 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶为野生型人GalT,更优选地野生型人GalT选自野生型人 $\beta 4$ -Gal-T1、野生型人 $\beta(1,4)$ -Gal-T2、野生型人 $\beta(1,4)$ -Gal-T3和野生型人 $\beta(1,4)$ -Gal-T4。

[0106] 在制备本发明的抗体-缀合物的方法的另一个实施方案中,所述催化剂为包含突变催化结构域的半乳糖基转移酶,优选包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶或包含突变催化结构域的 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶,更优选包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶。在本文中 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶也被称为GalT。

[0107] 在一个优选实施方案中,所述催化剂为包含突变催化结构域的 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶,并且优选所述 $\beta(1,3)$ -N-半乳糖基转移酶为人 $\beta(1-3)$ -Gal-T5。

[0108] 更优选地,所述催化剂为包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -N-半乳糖基转移酶,更优选包含突变催化结构域的 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶I,甚至更优选地选自牛 $\beta(1,4)$ -Gal-T1、人 $\beta 4$ -Gal-T1、人 $\beta(1,4)$ -Gal-T2、人 $\beta(1,4)$ -Gal-T3和人 $\beta(1,4)$ -Gal-T4,其均包含突变催化结构域。

[0109] 最优选地,所述催化剂为包含突变催化结构域的牛 $\beta(1,4)$ -Gal-T1。

[0110] 用于制备本发明的经修饰的抗体的几种合适的催化剂为本领域已知的。合适的催化剂例如包含来自 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶I的突变催化结构域的催化剂。在本文中,催化结构域指折叠成结构域的氨基酸片段,所述结构域能够在本发明的具体方法中催化具体的糖衍生物核苷酸 $Su(A)_x-P$ 与末端非还原的GlcNAc-聚糖的连接。在本文中 $\beta(1,4)$ -半乳糖基转移酶I也被称为GalT。这种突变GalT催化结构域例如公开于J.Biol.Chem.2002,277,20833和W0 2004/063344(国立卫生研究所),其以引用的方式纳入本文。J.Biol.Chem.2002,277,20833和W0 2004/063344公开了牛 $\beta(1,4)$ -Gal-T1的Tyr-289突变体,其被称为Y289L、Y289N和Y289I。制备所述突变催化结构域Y289L、Y289N和Y289I的方法详细公开于W0 2004/063344,第34页第6行-第36页第2行中,其以引用的方式明确地纳入本文。

[0111] 催化葡萄糖- $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺键形成的突变GalT结构域公开于W02004/063344,第10页第25行-第12页第4行中(其以引用的方式明确地纳入本文)。催化N-乙酰基半乳糖胺- $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺键形成的突变GalT结构域公开于W0 2004/063344,第12页第6行-第13页第2行中(其以引用的方式明确地纳入本文)。催化N-乙酰葡萄糖胺键和甘露糖- $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺键形成的突变GalT结构域公开于W02004/063344,第12页第19行-第14页第6行中(其以引用的方式明确地纳入本文)。

[0112] 所述公开的突变Gal结构域可包含于全长GalT酶中,或包含于包含所述催化结构

域的重组分子中,如W0 2004/063344,第14页第31行-第16页第28行中所公开的,其以引用的方式明确地纳入本文。

[0113] 另一个突变GalT结构域为例如Y284L,由Bojarová等公开于Glycobiology 2009, 19,509中,其以引用的方式明确地纳入本文,其中Tyr284被亮氨酸替代。

[0114] 另一个突变GalT结构域为例如R228K,由Qasba等公开于Glycobiology 2002,12, 691中,其以引用的方式明确地纳入本文,其中Arg228被赖氨酸替代。

[0115] 所述催化剂也可包含来自牛 β (1,4)-半乳糖基转移酶的突变催化结构域,其选自GalT Y289N、GalT Y289F、GalT Y289M、GalT Y289V、GalT Y289G、GalT Y289I和GalT Y289A,优选地选自GalT Y289F和GalT Y289M。可以以与W0 2004/063344中、Qasba等在Prot.Expr.Pur.2003,30,219中和Qasba等在J.Biol.Chem.2002,277,20833(其全部以引用的方式纳入)中所公开的用于Y289L、Y289N和Y289I的方式类似的方式,通过定向位点诱变方法提供GalT Y289N、GalT Y289F、GalT Y289M、GalT Y289V、GalT Y289G、GalT Y289I和GalT Y289A。在GalT Y289N中289位的酪氨酸(Y)被天冬酰胺(N)替代,在GalT Y289F中289位的酪氨酸(Y)被苯丙氨酸(F)替代,在GalT Y289M中所述酪氨酸被甲硫氨酸(M)替代,在GalT Y289V中被缬氨酸(V)替代,在GalT Y289G中被甘氨酸(G)替代,在GalT Y289I中被异亮氨酸(I)替代,在GalT Y289A中被丙氨酸(A)替代。

[0116] 在制备本发明的经修饰的抗体的方法的一个优选实施方案中,所述催化剂为包含来自 β (1,4)-半乳糖基转移酶(优选来自牛 β (1,4)-Gal-T1)的突变催化结构域的催化剂。

[0117] 优选地,所述催化剂为包含来自 β (1,4)-半乳糖基转移酶的突变催化结构域的催化剂,所述突变催化结构域优选地选自牛 β (1,4)-Gal-T1GalT Y289L、GalT Y289N、GalT Y289I、GalT Y289F、GalT Y289M、GalT Y289V、GalT Y289G和GalT Y289A,更优选地选自牛 β (1,4)-Gal-T1GalT Y289L、GalT Y289N和GalT Y289I。

[0118] 在另一个优选的实施方案中,所述催化剂为包含GalT突变催化结构域的催化剂,所述突变催化结构域选自Y289L、Y289N、Y289I、Y284L、R228K、Y289F、Y289M、Y289V、Y289G和Y289A,优选选自Y289L、Y289N、Y289I、Y284L和R228K。在另一个优选的实施方案中,所述催化剂为包含牛 β (1,4)-Gal-T1突变催化结构域的催化剂,所述牛 β (1,4)-Gal-T1突变催化结构域选自Y289F、Y289M、Y289V、Y289G和Y289A;更优选所述催化剂为包含GalT突变催化结构域的催化剂,所述GalT突变催化结构域选自Y289L、Y289N和Y289I;最优选所述催化剂为包含GalT突变催化结构域的催化剂,所述GalT突变催化结构域选自Y289L。

[0119] 另一种类型合适的催化剂为基于 α (1,3)-N-半乳糖基转移酶(也被称为 α 3Gal-T)、优选 α (1,3)-N-乙酰半乳糖氨基转移酶(也被称为 α 3GalNAc-T)的催化剂,如W02009/025646中所公开的,其以引用的方式纳入本文。 α 3Gal-T的突变可拓宽酶的供体特异性,并使之成为 α 3GalNAc-T。 α 3GalNAc-T的突变可拓宽酶的供体特异性。 α (1,3)-N-乙酰半乳糖氨基转移酶的多肽片段和催化结构域公开于W0 2009/025646,第26页第18行-第47页第15行和第77页第21行-第82页第4行中(二者以引用的方式明确地纳入本文)。

[0120] 制备经修饰的抗体的方法优选在合适的缓冲溶液中进行,例如磷酸盐、缓冲盐水(例如,磷酸盐-缓冲盐水、tris-缓冲盐水)、柠檬酸盐、HEPES、tris和甘氨酸。合适的缓冲液是本领域已知的。优选地,所述缓冲溶液为磷酸盐-缓冲盐水(PBS)或tris缓冲液。

[0121] 所述方法优选在约4至约50°C的温度范围内、更优选在约10至约45°C的温度范围

内、甚至更优选在约20至约40℃的温度范围内、最优选在约30至约37℃的温度范围内进行。

[0122] 所述方法优选在约5至约9的pH范围内,优选在约5.5至约8.5的pH范围内,更优选在约6至约8的pH范围内进行。最优选地,所述方法在约7至约8的pH范围内进行。

[0123] $Su(A)_x$ 被定义为包含x个官能团A的糖衍生物,其中x为1、2、3或4且A独立地选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基。

[0124] $Su(A)_x$ -基团也可定义为“经修饰的糖”。在本文中经修饰的糖定义为糖或糖衍生物,所述糖或糖衍生物包含1、2、3或4个官能团A,其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基。

[0125] 当经修饰的糖或糖衍生物包含例如叠氮基时,所述糖或糖衍生物可被称为经叠氮基修饰的糖或糖衍生物。当经修饰的糖或糖衍生物包含例如酮基时,所述糖或糖衍生物可被称为经酮基修饰的糖或糖衍生物。当经修饰的糖或糖衍生物包含例如炔基时,所述糖或糖衍生物可被称为经炔基修饰的糖或糖衍生物。当经修饰的糖或糖衍生物包含例如巯基时,所述糖或糖衍生物可被称为经巯基修饰的糖或糖衍生物。当经修饰的糖或糖衍生物包含例如巯基前体基团时,所述糖或糖衍生物可被称为经巯基前体修饰的糖或糖衍生物。当经修饰的糖或糖衍生物包含例如卤素时,所述糖或糖衍生物可被称为经卤素修饰的糖或糖衍生物。当经修饰的糖或糖衍生物包含例如磺酰氧基时,所述糖或糖衍生物可被称为经磺酰氧基修饰的糖或糖衍生物。

[0126] 在本文中,叠氮基被定义为 $-[C(R^7)_2]_oN_3$ 基团,其中 R^7 独立地选自氢、卤素和(任选取代的) C_1-C_{24} 烷基,并且o为0-24。优选 R^7 为氢或 C_1 、 C_2 、 C_3 或 C_4 烷基,更优选 R^7 为氢或 $-CH_3$ 。优选o为0-10,更优选0、1、2、3、4、5或6。更优选地, R^7 为氢、 $-CH_3$ 或 C_2 烷基和/或o为0、1、2、3或4。甚至更优选 R^7 为氢并且o为1或2。最优选o为0。

[0127] 在本文中,酮基被定义为 $-[C(R^7)_2]_oC(O)R^6$ 基团,其中 R^6 为任选取代的甲基或任选取代的 C_2-C_{24} 烷基, R^7 独立地选自氢、卤素、甲基和 R^6 ,并且o为0-24,优选0-10,更优选0、1、2、3、4、5或6。优选地, R^7 为氢。在一个优选的实施方案中, R^6 为任选取代的 C_2-C_{24} 烷基。当 $Su(A)_x$ 衍生自氨基糖时,A为与氨基糖N-原子键合的酮基,并且o为0(即 $Su(A)$ 包含 $-NC(O)R^6$ 取代基), R^6 为任选取代的 C_2-C_{24} 烷基。

[0128] 炔基优选为如上所定义的末端炔基或(杂)环炔基。在一个实施方案中,所述炔基为 $-[C(R^7)_2]_oC\equiv C-R^7$ 基团,其中 R^7 和o如上所定义; R^7 优选为氢。更优选地,o为0、1、2、3、4、5或6,并且 R^7 为氢。最优选o为0。

[0129] 在本文中,巯基被定义为 $-[C(R^7)_2]_oSH$ 基团,其中 R^7 独立地选自氢、卤素和(任选取代的) C_1-C_{24} 烷基,并且o为0-24。优选 R^7 为氢或 C_1 、 C_2 、 C_3 或 C_4 烷基,更优选 R^7 为氢或 $-CH_3$ 。优选o为0-10,更优选0、1、2、3、4、5或6。更优选地, R^7 为氢、 $-CH_3$ 或 C_2 烷基和/或o为0、1、2、3或4。甚至更优选 R^7 为氢,并且o为0、1、2或3,更优选0、1或2,最优选o为0。在一个特别优选的实施方案中, R^7 为氢,并且o为0。在另一个特别优选的实施方案中, R^7 为氢,并且o为1。在另一个特别优选的实施方案中, R^7 为氢,并且o为2。在另一个特别优选的实施方案中, R^7 为氢,并且o为3。

[0130] 在本文中,巯基前体基团被定义为 $-[C(R^7)_2]_oSC(O)CH_3$ 基团,其中 R^7 和o,以及其优选的实施方案如上文对巯基所定义的。在一个特别优选的实施方案中, R^7 为氢,并且o为0。在另一个特别优选的实施方案中, R^7 为氢,并且o为1。在另一个特别优选的实施方案中, R^7

为氢,并且 o 为2。在另一个特别优选的实施方案中, R^7 为氢,并且 o 为3。最优选地,所述巯基前体为 $-SC(O)CH_3$ ($-SAc$)。在制备本发明的抗体-缀合物的方法的步骤(4)中,可使用其中A为巯基前体的糖衍生物 $Su(A)_x$ 。在所述方法的过程中,巯基前体可转化成巯基。

[0131] 在本文中卤素被定义为F、Cl、Br或I。优选地,所述卤素为Cl、Br或I,更优选为Cl。

[0132] 在本文中,磺酰氧基被定义为 $-[C(R^7)_2]_oOS(O)_2R^8$ 基团,其中 R^7 和 o 为如上文中对巯基所定义的,并且 R^8 选自 C_1-C_{24} 烷基、 C_7-C_{24} 烷基芳基和 C_7-C_{24} 芳基烷基。 R^8 优选为 C_1-C_4 烷基、 C_7-C_{12} 烷基芳基或 C_7-C_{12} 芳基烷基,更优选为 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 C_3 直链或支链烷基或 C_7 烷基芳基。 R^8 也可选自 C_1-C_{24} 芳基,优选为苯基。 R^8 最优选为甲基、乙基、苯基或对甲苯基。优选地, R^7 为氢或 C_1 、 C_2 、 C_3 或 C_4 烷基,更优选 R^7 为氢或 $-CH_3$ 。优选 o 为0-10,更优选0、1、2、3、4、5或6。更优选地, R^7 为氢、 $-CH_3$ 或 C_2 烷基和/或 o 为0、1、2、3或4。甚至更优选 R^7 为氢,并且 o 为1或2,最优选 o 为0。 R^8 优选为 C_1-C_4 烷基、 C_7-C_{12} 烷基芳基或 C_7-C_{12} 芳基烷基,更优选为 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 C_3 直链或支链烷基或 C_7 烷基芳基。也优选 R^8 为苯基。最优选地,所述磺酰氧基为甲磺酸酯基、 $-OS(O)_2CH_3$ 、苯磺酸酯基($-OS(O)_2(C_6H_5)$)或甲苯磺酸酯基($-OS(O)_2(C_6H_4CH_3)$)。

[0133] 在本文中,卤代乙酰氨基被定义为 $-NHC(O)[C(R^7)_2]_oX$ 基团,其中 R^7 独立地选自氢、卤素和(任选取代的) C_1-C_{24} 烷基,X为F、Cl、Br或I,并且 o 为0-24。优选地, R^7 为氢或 C_1 、 C_2 、 C_3 或 C_4 烷基,更优选 R^7 为氢或 $-CH_3$,最优选为氢。优选地, o 为0-10,更优选为0、1、2、3、4、5或6,甚至更优选为1、2、3或4,最优选 o 为1。更优选地, R^7 为氢、 $-CH_3$ 或 C_2 烷基和/或 o 为1、2、3或4,最优选地, R^7 为氢,并且 o 为1。优选地,X为Cl或Br,更优选X为Cl。最优选地, R^7 为氢,X为Cl并且 o 为1。

[0134] 在本文中,巯基乙酰氨基被定义为 $-NHC(O)[C(R^7)_2]_oSH$ 基团,其中 R^7 独立地选自氢、卤素和(任选取代的) C_1-C_{24} 烷基,并且 o 为0-24。优选 R^7 为氢或 C_1 、 C_2 、 C_3 或 C_4 烷基,更优选 R^7 为氢或 $-CH_3$,最优选为氢。优选 o 为0-10,更优选为1、2、3、4、5或6,甚至更优选为1、2、3或4,最优选 o 为2、3或4。更优选地, R^7 为氢、 $-CH_3$ 或 C_2 烷基和/或 o 为1、2、3或4。最优选地, R^7 为氢,并且 o 为1。优选的实例包括巯基乙酰氨基(mercaptoethanoylamido group)、巯基丙酰氨基(mercaptopropanoylamido group)、巯基丁酰氨基(mercapto-butanoylamido group)和巯基戊酰氨基(mercaptopentanoylamido group),优选巯基丙酰氨基。

[0135] 在本文中,磺酰化的羟基乙酰氨基被定义为 $-NHC(O)[C(R^7)_2]_oOS(O)_2R^8$ 基团,其中 R^7 独立地选自氢、卤素和(任选取代的) C_1-C_{24} 烷基, R^8 选自 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} 芳基、 C_7-C_{24} 烷基芳基和 C_7-C_{24} 芳基烷基,并且 o 为0-24。 R^8 优选 C_1-C_4 烷基、 C_6-C_{12} 芳基、 C_7-C_{12} 烷基芳基或 C_7-C_{12} 芳基烷基,更优选 $-CH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 C_3 直链或支链烷基、 C_6-C_9 芳基或 C_7 烷基芳基。最优选磺酰氧基为甲磺酸酯基 $-OS(O)_2CH_3$ 、苯磺酸酯基($-OS(O)_2(C_6H_5)$)或甲苯磺酸酯基($-OS(O)_2(C_6H_4CH_3)$)。优选 R^7 为氢或 C_1 、 C_2 、 C_3 或 C_4 烷基,更优选 R^7 为氢或 $-CH_3$,最优选为氢。优选 o 为0-10,更优选为1、2、3、4、5或6,甚至更优选为1、2、3或4,最优选 o 为1。更优选地, R^7 为氢、 $-CH_3$ 或 C_2 烷基和/或 o 为1、2、3或4。甚至更优选 R^7 为氢,并且 o 为1、2或3。还甚至更优选地, R^7 为H, o 为1并且 R^8 为甲磺酸酯基、苯磺酸酯基或甲苯磺酸酯基。最优选地, R^7 为氢, R^8 为 $-CH_3$ 并且 o 为1。

[0136] 糖衍生物 $Su(A)_x$ 包含一个或多个官能团A。当 $Su(A)_x$ 包含两个以上的官能团A时,各官能团A独立地选自(即一种 $Su(A)_x$ 可包含不同的官能团A)例如叠氮基和酮基等。在一个优选实施方案中, x 为1或2,更优选 x 为1。在另一个优选实施方案中,官能团A为叠氮基或酮基,更优选为叠氮基。在另一个优选实施方案中,官能团A为巯基或卤素,更优选为卤素。在另一

个优选的实施方案中, x 为1并且A为叠氮基、酮基、巯基或卤素。

[0137] 糖衍生物 $Su(A)_x$ 衍生自糖或糖衍生物 Su , 例如氨基糖或其他衍生化的糖。糖和糖衍生物的实例包括半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、葡萄糖 (Glc)、N-乙酰神经氨酸或唾液酸 (Sial) 和岩藻糖 (Fuc)。

[0138] 氨基糖为其中羟基 (OH) 被胺基团替代的糖, 实例包括葡糖胺 ($GlcNH_2$) 和半乳糖胺 ($GalNH_2$)。其他衍生化的糖的实例包括N-乙酰神经氨酸 (唾液酸、Sia或NeuNAc) 或岩藻糖 (Fuc)。

[0139] 糖衍生物 $Su(A)_x$ 优选地衍生自半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、N-乙酰葡糖胺 ($GlcNAc$)、葡萄糖 (Glc)、N-乙酰半乳糖胺 ($GalNAc$)、岩藻糖 (Fuc) 和N-乙酰神经氨酸 (唾液酸、Sia或NeuNAc), 优选地衍生自 $GlcNAc$ 、Glc、Gal 和 $GalNAc$ 。更优选 $Su(A)_x$ 衍生自 Gal 或 $GalNAc$, 最优选地 $Su(A)_x$ 衍生自 $GalNAc$ 。

[0140] $Su(A)_x$ 中的一个或多个官能团A可以用几种方式与糖或糖衍生物 Su 连接。所述一个或多个官能团A可与所述糖或糖衍生物的C2、C3、C4和/或C6键合而替代羟基 (OH)。应当注意的是, 由于岩藻糖在C6上没有OH-基团, 如果A与Fuc的C6键合, 则A替代H-原子。

[0141] 在一个优选实施方案中, $Su(A)_x$ 中的一个或多个官能团A存在于糖或糖衍生物 Su 的C2和/或C6位。当官能团A存在而替代糖或糖衍生物的C2上的OH-基团时, A优选地选自叠氮基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基。但是, 当A存在于2-氨基糖衍生物 (例如 $GalNAc$ 或 $GlcNAc$) 的C2位时, A优选地选自叠氮基、卤素、巯基或其衍生物和磺酰氧基, 更优选地选自叠氮基、卤素、巯基和磺酰氧基。

[0142] 当A为叠氮基时, 优选A与C2、C3、C4或C6键合。如上所述, $Su(A)_x$ 中的一个或多个叠氮化物取代基可与所述糖或糖衍生物S的C2、C3、C4或C6键合而替代羟基 (OH), 或者, 在6-叠氮基岩藻糖 (6-AzFuc) 的情况下, 替代氢原子。可替代地或另外地, 氨基糖衍生物的N-乙酰基取代基可被叠氮基乙酰基取代基取代。在一个优选的实施方案中, $Su(A)_x$ 选自2-叠氮基乙酰氨基半乳糖 ($GalNAz$)、6-叠氮基-6-脱氧半乳糖 (6-AzGal)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖 (6-AzGalNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖 (4-AzGalNAc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基半乳糖 (6-AzGalNAz)、2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖 ($GlcNAz$)、6-叠氮基-6-脱氧葡萄糖 (6-AzGlc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖 (6-AzGlcNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖 (4-AzGlcNAc) 和6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖 (6-AzGlcNAz), 更优选地选自 $GalNAz$ 、6-AzGal、4-AzGalNAc、 $GlcNAz$ 和6-AzGlcNAc。以下示出 $Su(A)_x$ -P 的实例, 其中A为叠氮基。

[0143] 当A为酮基时, 优选地A与C2键合而替代 Su 的OH-基团。另外, A可与氨基糖衍生物 (优选2-氨基糖衍生物) 的N-原子键合。然后, 所述糖衍生物包含-NC(O) R^6 取代基。 R^6 优选为任选地被取代的 C_2-C_{24} 烷基。更优选地, R^6 为乙基。在一个优选的实施方案中, $Su(A)_x$ 选自2-脱氧-(2-氧代丙基) 半乳糖 (2-酮基Gal)、2-N-丙酰基半乳糖胺 (2-N-丙酰基 $GalNAc$)、2-N-(4-氧代戊酰基) 半乳糖胺 (2-N-LevGal) 和2-N-丁酰基半乳糖胺 (2-N-丁酰基 $GalNAc$), 更优选2-酮基 $GalNAc$ 和2-N-丙酰基 $GalNAc$ 。以下示出 $Su(A)_x$ -P 的实例, 其中A为酮基。

[0144] 当A为炔基、优选为末端炔基或(杂)环炔基时, 优选所述炔基存在于2-氨基糖衍生物上。其中A为炔基的 $Su(A)_x$ 的一个实例为2-(丁-3-炔酸氨基)-2-脱氧-半乳糖 (2-(but-3-ynic acid amido)-2-deoxy-galactose)。以下示出了 $Su(A)_x$ -P 的一个实例, 其中A为炔

基。

[0145] 当A为巯基时,优选所述巯基存在于糖衍生物的6-位或存在于2-氨基糖衍生物上。其中A为巯基的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的一个实例为2-(巯基乙酰氨基)-2-脱氧-半乳糖。其中A为巯基的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的另一个实例为6-巯基-6-脱氧-半乳糖。

[0146] 当A为卤素时,优选所述卤素存在于糖衍生物的6-位或存在于2-氨基糖衍生物上。其中A为卤素的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的一个实例为2-(氯乙酰氨基)-2-脱氧-半乳糖。其中A为卤素的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的另一个实例为6-碘-6-脱氧-半乳糖。其中A为卤素的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的另一个实例为6-(氯乙酰氨基)-6-脱氧-半乳糖。

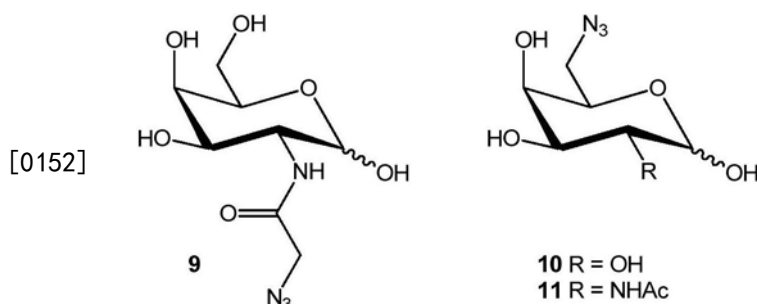
[0147] 当A为磺酰氧基时,优选所述磺酰氧基存在于糖衍生物的6-位或存在2-氨基糖衍生物上。其中A为磺酰氧基的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的一个实例为2-(甲基磺酰氧基乙酰氨基)-2-脱氧-半乳糖(2-GalNAcOMs)。其中A为磺酰氧基的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的另一个实例为2-(苯磺酰氧基乙酰氨基)-2-脱氧-半乳糖(2-GalNAcOMs)。其中A为磺酰氧基的 $\text{Su}(\text{A})_x$ 的另一个实例为6-(甲磺酰基)-半乳糖。

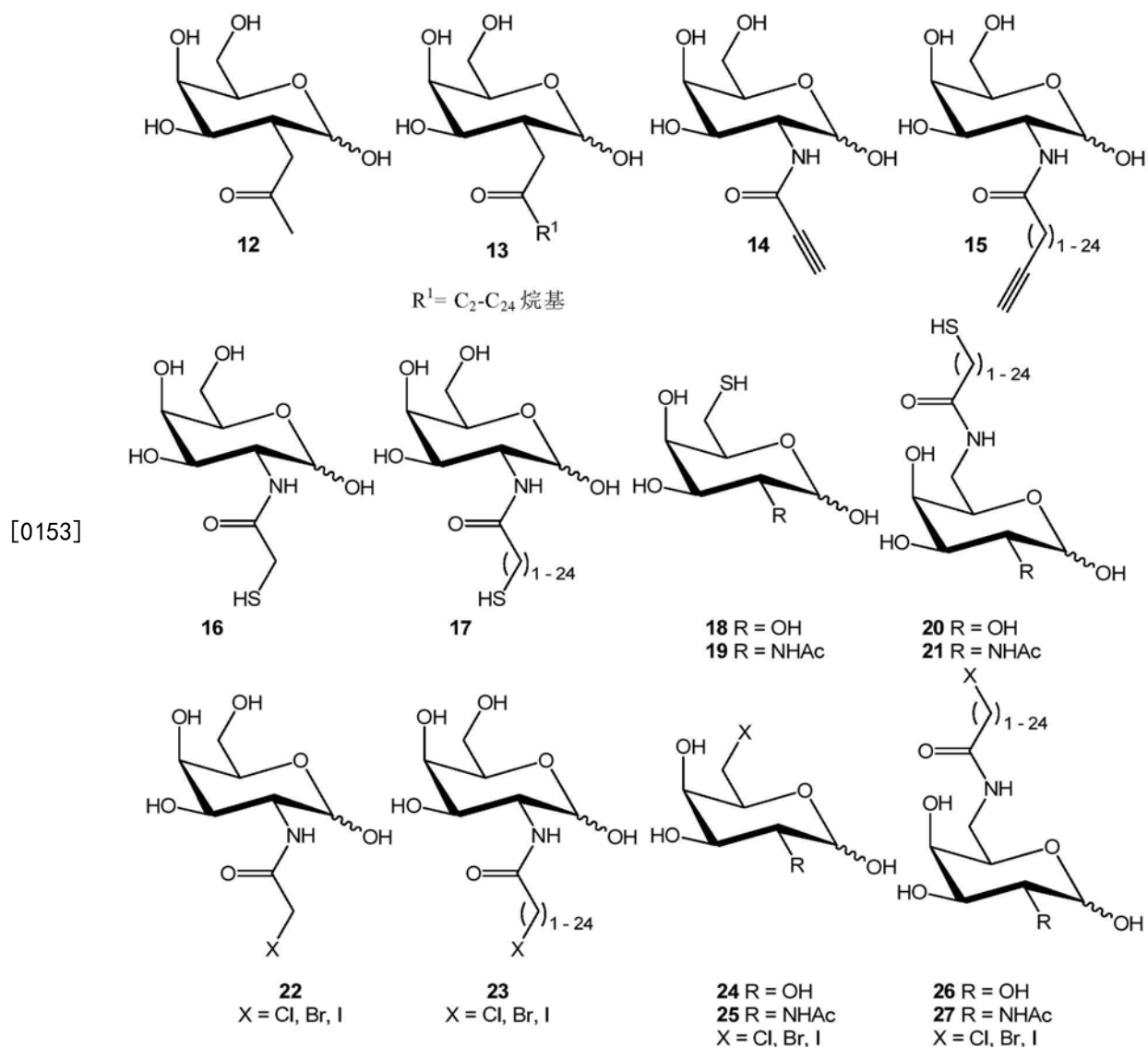
[0148] 当A为卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基或磺酰化的羟基乙酰氨基时,优选所述基团存在于糖衍生物的6-位。

[0149] 在本文中,P被定义为核苷酸。P优选地选自核苷单磷酸和核苷二磷酸,更优选地选自尿苷二磷酸(UDP)、鸟苷二磷酸(GDP)、胸苷二磷酸(TDP)、胞苷二磷酸(CDP)和胞苷单磷酸(CMP),更优选地选自尿苷二磷酸(UDP)、鸟苷二磷酸(GDP)、胞苷二磷酸和(CDP)。最优选地,P为UDP。

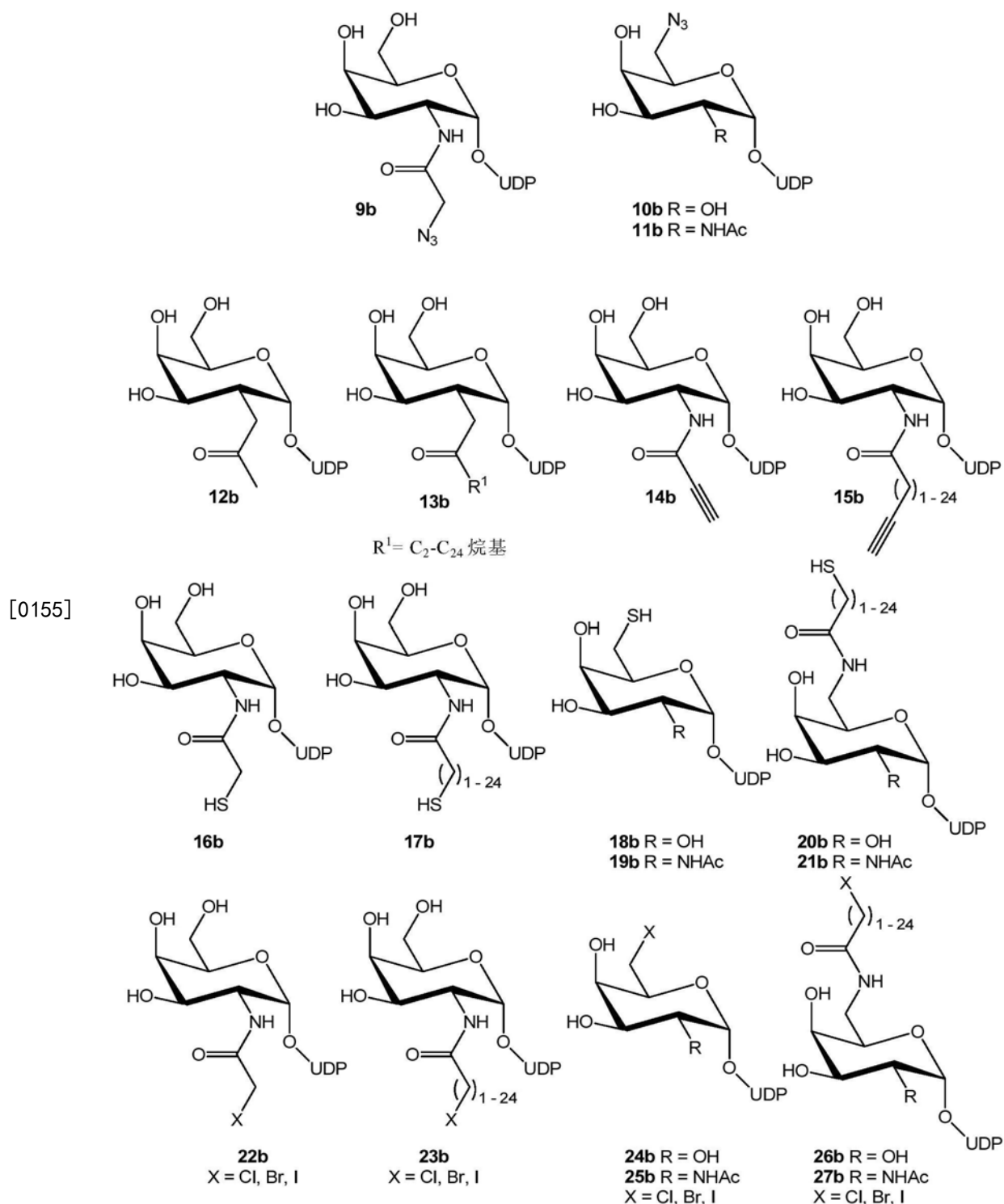
[0150] 本领域已知式 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 的几种化合物,其中将核苷单磷酸或核苷二磷酸P连接到糖衍生物 $\text{Su}(\text{A})_x$ 。例如,Wang等,Chem.Eur.J.2010,16,13343-13345、Piller等,ACS Chem.Biol.2012,7,753、Piller等,Bioorg.Med.Chem.Lett.2005,15,5459-5462和WO 2009/102820——全部以引用的方式纳入本文——中公开了许多化合物 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 及其合成。

[0151] 以下示出叠氮基、酮基、炔基、卤素、巯基、巯基化乙酰氨基和卤代乙酰氨基取代的糖和糖衍生物的一些实例(9-11)和(12-27),所有这些均可转化成其对应的UDP糖 $\text{Su}(\text{A})_x\text{-UDP}$ (9b-11b)和(12b-27b)。





[0154] 优选地, $Su(A)_x$ -P选自GalNAz-UDP (9b)、6-AzGal-UDP (10b)、6-AzGalNAc-UDP (11b)、4-AzGalNAz-UDP、6-AzGalNAz-UDP、6-AzGlc-UDP、6-AzGlcNAz-UDP、2-酮基Gal-UDP (12b)、2-N-丙酰基GalNAc-UDP (13b, 其中 R^1 为乙基) 和2-(丁-3-炔酸酰氨基)-2-脱氧-半乳糖-UDP (15b, $n=1$)。更优选地, $Su(A)_x$ -P为GalNAz-UDP (9b) 或6-AzGalNAc-UDP (11b)。



[0156] 优选地, $\text{Su}(\text{A})_x\text{-P}$ 为 GalNAz-UDP (9b) 或 6-AzGalNAc-UDP (11b)。GalNAz-UDP (9b) 和 6-AzGalNAc-UDP (11b) 的合成公开于 Piller 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15, 5459-5462 和 Wang 等, Chem. Eur. J. 2010, 16, 13343-13345 中, 二者以引用的方式纳入本文。

[0157] 2-酮基Gal-UDP (12b) 的合成公开于 Qasba 等, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 16162 中, 尤其是在辅助信息 (Supporting Information) 中, 二者以引用的方式纳入本文。

[0158] 2-(丁-3-炔酸酰氨基)-2-脱氧-半乳糖-UDP (15b) 的合成公开于 W0 2009/102820 中, 其以引用的方式纳入本文。

[0159] $Su(A)_x$ -P的其他的实例包括6-A-6-脱氧半乳糖-UDP (6-A-Gal-UDP), 例如6-氯-6-脱氧半乳糖-UDP (6-ClGal-UDP, (24b), X为Cl)、6-巯基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-HSGal-UDP, (18b)); 或2-A-2-脱氧半乳糖-UDP (2-A-Gal-UDP), 例如2-氯-2-脱氧半乳糖-UDP (2-ClGal-UDP)、2-巯基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-HSGal-UDP)。或者, A可作为乙酰氨基的一部分被间接取代到糖衍生物中, 所述乙酰氨基又取代羟基。实例包括6-A-乙酰氨基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-GalNAcA-UDP), 例如6-氯乙酰氨基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-GalNAcCl-UDP, (26b), X为Cl)、6-巯基乙酰氨基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-GalNAcSH-UDP, (20b)); 或2-A-乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcA-UDP), 例如2-氯乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcCl-UDP, (22b), X为Cl)、2-巯基乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcSH-UDP, (16b)) 和2-乙酰基巯基乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcSAc-UDP)。其他实例包括3-巯基丙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNProSH-UDP) 和4-巯基丁酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNBuSH-UDP)。或者, A可作为另一个官能团的一部分间接被取代到糖衍生物中, 所述另一个官能团又取代羟基或连接至羟基。这种其他官能团的实例包括(杂)烷基链或(杂)芳基链。

[0160] 优选地, $Su(A)_x$ -P选自GalNAz-UDP (9b)、6-AzGalNAc-UDP (11b)、6-GalNAcCl-UDP ((26b), X为Cl)、6-GalNAcSH-UDP (20b)、2-GalNAcCl-UDP ((22b), X为Cl)、2-GalNAcSH-UDP (16b)、6-ClGal-UDP ((24b), X为Cl)、2-ClGal-UDP、2-HSGal-UDP和6-HSGal-UDP (18b), 或选自2-GalNProSH-UDP和2-GalNBuSH-UDP。

[0161] 更优选地, $Su(A)_x$ -P选自GalNAz-UDP (9b)、6-AzGalNAc-UDP (11b)、6-GalNAcCl-UDP ((26b), X为Cl)、6-GalNAcSH-UDP (20b)、2-GalNAcCl-UDP ((22b), X为Cl)、2-GalNAcSH-UDP (16b)、6-ClGal-UDP ((24b), X为Cl) 和2-ClGal-UDP, 或选自2-GalNProSH-UDP和2-GalNBuSH-UDP。

[0162] 在制备经修饰的抗体的方法的一个优选实施方案中, $Su(A)_x$ 包含1或2个官能团, 即优选x为1或2。更优选地, x为1。在另一个优选的实施方案中, Su为半乳糖(Gal)。在另一个优选的实施方案中, x为1或2并且Su为Gal, 最优选x为1并且Su为Gal。

[0163] 在一个优选实施方案中, $Su(A)_x$ 选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal、2-ClGal、2-HSGal和6-HSGal, 更优选地选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal-和2-ClGal。在另一个优选实施方案中, $Su(A)_x$ 选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。

[0164] 在另一个优选的实施方案中, x为1并且 $Su(A)_x$ 选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal、2-ClGal、2-HSGal和6-HSGal, 更优选地选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal-和2-ClGal。在另一个进一步优选的实施方案中, x为1并且 $Su(A)_x$ 选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。

[0165] 在一个优选的实施方案中, A为叠氮基、巯基或卤素。

[0166] 在一个优选的实施方案中, 其中A为叠氮基, $Su(A)_x$ 优选地选自2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(GalNAz)、6-叠氮基-6-脱氧半乳糖(6-AzGal)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(4-AzGalNAc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAz)、2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(GlcNAz)、6-叠氮基-6-脱氧葡萄糖(6-AzGlc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAc)、4-叠氮基-4-

脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(4-AzGlcNAc)和6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAz)。在另一个优选的实施方案中, $Su(A)_x$ 选自GalNAz、6-AzGal、4-AzGalNAc、GlcNAz和6-AzGlcNAc。更优选地,x为1并且 $Su(A)_x$ 选自2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(GalNAz)、6-叠氮基-6-脱氧半乳糖(6-AzGal)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(4-AzGalNAc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAz)、2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(GlcNAz)、6-叠氮基-6-脱氧葡萄糖(6-AzGlc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(4-AzGlcNAc)和6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAz)。更优选地,x为1并且 $Su(A)_x$ 选自GalNAz、6-AzGal、4-AzGalNAc、GlcNAz和6-AzGlcNAc。

[0167] 在用于修饰本发明的经修饰的抗体的方法的一个特别优选实施方案中, $Su(A)_x$ 选自GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O)₂R⁸、6-GalNAcSH、6-GalNAcX和6-GalNAcOS(O)₂R⁸。在用于修饰本发明的经修饰的抗体的方法的另一个特别优选实施方案中, $Su(A)_x$ 选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。

[0168] 在一个甚至更优选的实施方案中,x为1或2并且 $Su(A)_x$ 选自GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O)₂R⁸、6-GalNAcSH、6-GalNAcX和6-GalNAcOS(O)₂R⁸。在另一个甚至更优选的实施方案中,x为1或2,并且 $Su(A)_x$ 选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。

[0169] 在一个最优选的实施方案中,x为1,并且 $Su(A)_x$ 选自GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O)₂R⁸、6-GalNAcSH、6-GalNAcX和6-GalNAcOS(O)₂R⁸。在另一个最优选的实施方案中,x为1,并且 $Su(A)_x$ 选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。

[0170] 在图4和5中示出了糖和糖衍生物的其他实例。图4示出经叠氮基修饰的半乳糖衍生物(9-11)的结构,其对应的UDP糖可用于在半乳糖基转移酶(或其突变体)的作用下转移到GlcNAc-封端的糖上。图5示出其他半乳糖衍生物的结构(12-27),其对应的UDP糖可用于在半乳糖转移酶(或其突变体)的作用下转移到GlcNAc-封端的糖上。

[0171] 图7示出经修饰的UDP-半乳糖核苷酸28-31的结构,其在于半乳糖基转移酶作用下,用于酶法掺入到GlcNAc-封端的聚糖上。

[0172] 可在制备本发明的经修饰的抗体的方法中使用的几种糖衍生物核苷酸 $Su(A)_x$ -P为野生型半乳糖基转移酶的底物。对于这些糖衍生物核苷酸 $Su(A)_x$ -P,本发明的方法可在野生型半乳糖基转移酶、优选野生型β(1,4)-半乳糖基转移酶、更优选野生型β(1,4)-半乳糖基转移酶I作为催化剂存在下而进行。更优选地,野生型β(1,4)-半乳糖基转移酶为野生型人GalT,更优选为选自野生型人β4-Gal-T1、野生型人β(1,4)-Gal-T2、野生型人β(1,4)-Gal-T3和野生型人β(1,4)-Gal-T4的野生型人GalT。

[0173] 当将野生型半乳糖基转移酶用作催化剂时,优选 $Su(A)_x$ -P选自这样的 $Su(A)_x$ -P,即其中x为1,并且其中A存在于糖衍生物的C2或C6、更优选C6上,以及其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基。A可被直接地取代至糖衍生物而替代羟基。实例包括6-A-6-脱氧半乳糖-UDP(6-A-Gal-UDP),例如6-叠氮基-6-脱氧半乳糖-UDP(6-AzGal-UDP, (10b))、6-氯-6-脱氧半乳糖-UDP(6-ClGal-UDP, (24b), X为Cl)、6-巯基-6-脱氧半乳糖-UDP(6-HSGal-UDP, (18b));或2-A-2-脱氧半乳糖-UDP(2-A-Gal-UDP),例如2-叠氮基-2-脱氧半乳糖-UDP(2-AzGal-UDP)、2-氯-2-脱氧半乳糖-UDP(2-ClGal-UDP)、2-巯基-2-脱氧半乳糖-UDP(2-HSGal-UDP)。或者,A可作

为乙酰氨基的一部分被间接取代至糖衍生物,所述乙酰氨基又取代羟基。实例包括6-A-乙酰氨基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-GalNAcA-UDP),例如6-叠氮基乙酰氨基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-GalNAcN₃-UDP)、6-氯乙酰氨基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-GalNAcCl-UDP, (26b), X为Cl)、6-巯基乙酰氨基-6-脱氧半乳糖-UDP (6-GalNAcSH-UDP, (20b));或2-A-乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcA-UDP),例如2-叠氮基乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcN₃-UDP, (9b))、2-氯乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcCl-UDP, (22b))、2-巯基乙酰氨基-2-脱氧半乳糖-UDP (2-GalNAcSH-UDP, (16b))。或者,A可作为另一种官能团的一部分被间接取代至糖衍生物,所述另一种官能团又取代羟基或连接至羟基。这类其他官能团的实例包括(杂)烷基链或(杂)芳基链。

[0174] 在用于制备本发明的经修饰的抗体的方法的一个特别优选实施方案中,Su(A)_x-P选自GalNAz-UDP (9b)、6-AzGalNAc-UDP (11b)、2-GalNAcSH-UDP (16b)、2-GalNAcX-UDP (22b)、2-GalNAcOS(O)₂R⁸-UDP、6-GalNAcSH-UDP (20b)、6-GalNAcX-UDP (26b)和6-GalNAcOS(O)₂R⁸-UDP,并且催化剂为包含突变催化结构域GalT(Y289L)的牛β(1,4)-Gal-T1;其中X为Cl、Br或I;并且其中R⁸为甲基、乙基、苯基或对甲苯基。在用于制备本发明的经修饰的抗体的方法的另一个特别优选实施方案中,Su(A)_x-P选自2-GalNProSH-UDP和2-GalNBuSH-UDP,并且催化剂为包含突变催化结构域GalT(Y289L)的牛β(1,4)-Gal-T1;其中X为Cl、Br或I;并且其中R⁸为甲基、乙基、苯基或对甲苯基。

[0175] 在另一个优选的实施方案中,2-GalNAcX-UDP为2-GalNAcCl-UDP或2-GalNAcBr-UDP,更优选为2-GalNAcCl-UDP;6-GalNAcX-UDP为6-GalNAcCl-UDP或6-GalNAcBr-UDP,更优选为6-GalNAcCl-UDP。在另一个优选的实施方案中,2-GalNAcOS(O)₂R⁸-UDP中R⁸为甲基、苯基或对甲苯基,最优选为甲基,并且6-GalNAcOS(O)₂R⁸-UDP中R⁸为甲基、苯基或对甲苯基,最优选R⁸为甲基。

[0176] 在用于制备本发明的经修饰的抗体的方法的另一个特别优选的实施方案中,Su(A)_x-P选自6-AzGalNAc-UDP (11b)、6-HSGal-UDP (18b)、6-XGal-UDP (24b)、6-R⁸S(O)₂Gal-UDP,并且催化剂为野生型人GalT;其中X为Cl、Br或I;并且其中R⁸为甲基、乙基、苯基或对甲苯基。X更优选为Cl或Br,最优选为Cl。R⁸更优选为甲基、苯基或对甲苯基,最优选为甲基。人GalT优选为人β4-Gal-T1、人β(1,4)-Gal-T2、人β(1,4)-Gal-T3和人β(1,4)-Gal-T4。

[0177] 如上所述,在用于修饰本发明的抗体的方法中,Su(A)_x-P可为对于合适的半乳糖剂转移酶催化剂而言为底物的任何糖衍生物核苷酸。

[0178] 在连接到IgG抗体的N-糖基化位点的近端N-连接的Su(A)_xGlcNAc-取代基中的糖衍生物Su(A)_x例如可通过β(1,4)-糖苷键与GlcNAc-部分的C4键合或通过α(1,3)-糖苷键与所述GlcNAc-部分的C3键合。Su(A)_xGlcNAc-取代基的近端N-连接的GlcNAc-残基通过C1与蛋白质键合或通过N-糖苷键与抗体键合,优选与蛋白质或抗体的天冬酰胺的侧链中的酰胺氮原子键合。在所述Su(A)_xGlcNAc-取代基中近端N-连接的GlcNAc-残基任选地被岩藻糖基化。连接到抗体的Su(A)_xGlcNAc-部分中的糖衍生物Su(A)_x是通过β(1,4)-糖苷键与所述GlcNAc-残基的C4键合,还是通过α(1,3)-糖苷键与所述GlcNAc-部分的C3键合,取决于本发明方法的步骤(4)和/或步骤(5b)中所用的催化剂。当所述步骤在β(1,4)-半乳糖基转移酶的存在下进行,则Su(A)_x的C1与近端GlcNAc-残基的C4通过β(1,4)-糖苷键发生结合。当所述方法在α(1,3)-半乳糖基转移酶的存在下进行,则Su(A)_x的C1与近端GlcNAc-残基的

C3通过 α (1,3) -糖苷键发生结合。

[0179] 当A为叠氮基官能团时,通过本发明的用于修饰抗体的方法可获得的包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经叠氮化物修饰的抗体。当A为酮基官能团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经酮基修饰的抗体。当A为炔基官能团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经炔基修饰的抗体。当A为巯基基团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经巯基修饰的抗体。当A为卤素基团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经卤素修饰的抗体。当A为磺酰氧基基团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经磺酰氧基修饰的抗体。当A为巯基乙酰氨基基团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经巯基化乙酰氨基修饰的抗体。当A为卤代乙酰氨基基团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经卤代乙酰氨基修饰的抗体。当A为磺酰化的羟基乙酰氨基基团时,包含Su(A)_xGlcNAc-残基的IgG抗体被称为经巯基乙酰氨基修饰的抗体。

[0180] 用于制备经修饰的抗体的方法(即将单糖衍生物Su(A)_x连接到近端N-连接的GlcNAc-残基的方法)优选在合适的缓冲溶液中进行,例如磷酸盐-缓冲盐水(例如,磷酸盐-缓冲盐水、tris-缓冲盐水)、柠檬酸盐、HEPES、tris和甘氨酸。合适的缓冲液是本领域已知的。优选地,所述缓冲溶液为磷酸盐-缓冲盐水(PBS)或tris缓冲液。

[0181] 所述方法优选在约4至约50℃的温度范围内、更优选在约10至约45℃的温度范围内、甚至更优选在约20至约40℃的温度范围内、最优选在约30至约37℃的温度范围内进行。

[0182] 所述方法优选在约5至约9的pH范围内,优选在约5.5至约8.5的pH范围内,更优选在约6至约8的pH范围内进行。最优选地,该方法在约7至约8的pH范围内进行。

[0183] 在用于制备本发明的经修饰的抗体的方法的一个实施方案中,所述方法包括下述步骤:

[0184] (1) 提供一种IgG抗体,其在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点,并且其中近端N-连接的GlcNAc-残基在所述糖基化位点处与所述抗体连接;以及

[0185] (2) 在合适的催化剂存在下,将单糖衍生物Su(A)_x连接到近端N-连接的GlcNAc-残基;其中合适的催化剂被定义为以Su(A)_x为底物的催化剂;其中Su(A)_x被定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;并且其中所述近端N-连接的GlcNAc-残基任选地被岩藻糖基化。

[0186] 在用于制备本发明的经修饰的抗体的方法的一个更具体的实施方案中,步骤(1)中,IgG抗体通过位点特异性诱变方法提供,所述IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点。

[0187] 在另一个更具体的实施方案中,所述用于制备经修饰的抗体的方法包括以下步骤:

[0188] (1) 提供一种IgG抗体,其在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点;以及

[0189] (2) 通过内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的作用,剪切连接到所述糖基化位点的寡糖,以在所述糖基化位点处得到近端N-连接的GlcNAc-残基;以及

[0190] (3) 在合适的催化剂存在下,将单糖衍生物Su(A)_x连接到近端N-连接的GlcNAc-残基;其中合适的催化剂被定义为以Su(A)_x为底物的催化剂;其中Su(A)_x被定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;

[0191] 其中所述近端N-连接的GlcNAc-残基在步骤(2)和(3)中任选地被岩藻糖基化。

[0192] 在步骤(1)中,可通过糖基改造法提供所述IgG抗体。例如,通过用于制备在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个且不多于一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体的方法提供所述IgG抗体,其中N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点,其中:

[0193] (i) 改变重链的氨基酸链以移除297位的N-糖基化位点,并且其中重链的经改变的氨基酸链与其野生型对应物相比包含一个经改变的N-糖基化位点;或

[0194] (ii) 改变重链的氨基酸链以移除297位的N-糖基化位点,并且其中轻链与其野生型对应物相比包含一个经改变的N-糖基化位点。

[0195] 在步骤(i)和(ii)的一个优选实施方案中,将重链的297位处的天冬酰胺改变成谷氨酰胺。因此,在该优选的实施方案中,所述重链包含N297Q突变。在包含N297Q突变的IgG抗体中,移除在N297处的保守的N-糖基化位点。

[0196] 因此,在用于制备所述IgG抗体的方法的一个优选实施方案中,在步骤(1)中:

[0197] (i) 改变重链的氨基酸链以移除297位的N-糖基化位点,并且重链的经改变的氨基酸链与其野生型对应物相比包含一个经改变的N-糖基化位点;或

[0198] (ii) 改变重链的氨基酸链以移除297位的N-糖基化位点,并且轻链与其野生型对应物相比包含一个经改变的N-糖基化位点。

[0199] 在本方法的另一个优选的实施方案中,步骤(i)中的重链或步骤(ii)中的轻链包含一个新引入的糖基化位点。在另一个优选的实施方案中,步骤(i)中重链的氨基酸序列或步骤(ii)中轻链的氨基酸序列包含共有序列Asn-X-Ser/Thr,其中X为除Pro以外的任何氨基酸。将所述共有序列引入到氨基酸序列中,优选得到存在于所述序列的天冬酰胺氨基酸处的N-糖基化位点。

[0200] 因此,在用于制备所述IgG抗体的一个优选实施方案中,在步骤(1)中:

[0201] (i) 改变重链的氨基酸链以移除297位的N-糖基化位点,并且所述重链的经改变的氨基酸链包含共有序列Asn-X-Ser/Thr,其中X为除Pro以外的任何氨基酸;或

[0202] (ii) 改变重链的氨基酸链以移除297位的N-糖基化位点,并且所述轻链的氨基酸包含共有序列Asn-X-Ser/Thr,其中X为除Pro以外的任何氨基酸。

[0203] 用于制备本发明的经修饰的抗体的方法的该具体实施方案的步骤(2)包括通过合适的酶的作用将连接到糖基化位点的寡糖进行剪切,以获得在所述糖基化位点处的近端N-连接的GlcNAc-残基,其中合适的酶被定义为以待剪切的寡糖为底物的酶。

[0204] 从图10所示的MS图可见如实施例5所述的用于剪切曲妥珠单抗糖突变体(glycomutant)-(N297Q,L196N)的方法,图10示出主要分子量为50935、51225和51517的起始抗体的一系列糖型,在内切糖苷酶剪切后其集中于质量为49224和49514的两个峰。由此可推断,抗体同质性的增加是剪切过程的结果。

[0205] 在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体中,

寡糖在N-糖基化位点处连接,优选连接到抗体氨基酸的酰胺侧链。所述寡糖通过N-糖苷键在大多数情况下连接到天冬酰胺(Asn)或精氨酸(Arg)氨基酸侧链。连接到抗体的寡糖也被称为聚糖。聚糖例如可通过GlcNAc-残基的C1连接到抗体,所述GlcNAc-残基键合至为抗体的一部分的天冬酰胺氨基酸的酰胺侧链。

[0206] 存在许多不同类型的聚糖。如上所述,IgG抗体的Fc区具有高度保守的N-糖基化位点。连接到该位点的N-聚糖主要为复合型的核心-岩藻糖基化双触角结构。另一种类型的聚糖为高甘露糖聚糖类。高-甘露糖通常包含两个N-乙酰甘露糖胺和不同数目的甘露糖残基。

[0207] 图1示出复合型的双触角聚糖,并且示出关于半乳糖基化(G0、G1和G2)和岩藻糖基化(G0F、G1F和G2F)的不同糖型。

[0208] 图2示出单克隆抗体的不同糖基化特征的实例,所述单克隆抗体可通过常规表达然后用内切糖苷酶(1)剪切或者通过用 α -和 β -甘露糖苷酶(2)剪切而获得。糖型3可通过在唾液酸酶和半乳糖苷酶的联合作用下对常规的糖型混合物(G0、G1、G2、G0F、G1F和G2F)进行剪切而获得。

[0209] 在一个优选实施方案中,在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点的IgG抗体中,在所述N-连接的糖基化位点处连接的寡糖为复合型的双触角聚糖,及其糖型。

[0210] 如上所述,聚糖可通过GlcNAc-残基与抗体键合,并且该GlcNAc残基可被岩藻糖基化。在图1和图2中,这由b表示:当b为0时,所述GlcNAc-残基为非岩藻糖基化;当b为1时,所述GlcNAc为岩藻糖基化。

[0211] 图2的(2)和(3)中也可看出,在大多数聚糖中,第二GlcNAc-残基与直接与抗体键合的GlcNAc-残基键合。在本发明方法的该实施方案的步骤(2)中,寡糖(聚糖)的剪切在这两个GlcNAc-残基之间进行。根据步骤(2)的聚糖的剪切提供了与IgG抗体上的N-糖基化位点共价键合的GlcNAc-残基。这也示出于图2的(1)中。这种——优选通过经由所述GlcNAc的C1的N-糖苷键和存在于抗体的氨基酸侧链中的酰胺——与N-糖基化位点共价键合的GlcNAc-残基在本文中被称为“近端N-连接的GlcNAc-残基”,也被称为“核心-GlcNAc-取代基”。所述近端N-连接的GlcNAc-残基或核心-GlcNAc-取代基任选地被岩藻糖基化。

[0212] 在用于制备本发明的经修饰的抗体的方法的该实施方案的步骤(2)中,通过合适的酶的作用对连接到N-糖基化位点的寡糖进行剪切,并且在剪切所述寡糖(也被称为聚糖)之后,获得岩藻糖基化(在图1(1)中b为1)或非岩藻糖基化(b为0)的近端N-连接的GlcNAc-残基(也被称为核心-GlcNAc-取代基)。

[0213] 一种“合适的酶”被定义为以待剪切的寡糖为底物的酶。在步骤(2)中待用的酶的优选类型取决于被剪切的具体的一种寡糖或多种寡糖。

[0214] 在本发明的方法的该具体实施方案的步骤(1)的一个优选实施方案中,步骤(2)中的酶选自内切糖苷酶。

[0215] 内切糖苷酶能够切开聚糖结构中的内部糖苷键,其为重塑和合成努力提供了另一种帮助。例如,当它们在保守的聚糖区内的可预期的位点处切割时,内切糖苷酶可用于异质聚糖群的简单同质化。在此方面最重要的一类内切糖苷酶包括内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(EC 3.2.1.96,通常已知为Endos和ENGases),一类通过水解N,N'-二乙酰壳二糖核心中的 β -1,4-糖苷键(见Wong等,Chem.Rev.2011,111,4259,以引用的方式纳入本文)从糖蛋白

中除去N-聚糖、留下单一蛋白质近端N-连接的GlcNAc残基的水解酶。已发现内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶广泛分布于自然界,其具有通常的化学酶变体,包括Endo D,其特异性针对寡甘露糖;Endo A和Endo H,其特异性针对高甘露糖;Endo F亚型,其适用范围从高甘露糖到双触角复合体;以及Endo M,其可切割除岩藻糖基化的聚糖之外的大多数N-聚糖结构(高甘露糖/复合体型/杂合体型),并且对高甘露糖型寡糖的水解活性明显地高于对复合体和杂合体型寡糖的水解活性。这些ENGases对于远端的N-聚糖结构具有特异性,但对于蛋白质没有特异性,这使其可用于在天然条件下从糖蛋白中切割出大部分的N-连接的聚糖。

[0216] 内切糖苷酶F1、F2和F3最适合用于天然蛋白质的去糖基化。Endo F1、F2和F3的键特异性表明了可除去所有类别的N-连接的寡糖而不使蛋白质变性的蛋白质去糖基化的通用策略。双触角和三触角结构可分别通过内切糖苷酶F2和F3立刻除去。寡甘露糖和杂合体结构可通过Endo F1除去。

[0217] Endo F3是独特的,因其切割易受寡糖的肽键状态以及核心岩藻糖基化状态的影响。内切糖苷酶F3切割天冬酰胺连接的双触角和三触角的复合寡糖。其将以缓慢的速率切割非岩藻糖基化的双触角和三触角结构,但仅在肽连接的情况下是这样。核心岩藻糖基化的双触角结构为Endo F3的有效底物,其活性高达400倍。在寡甘露糖和杂合体分子上没有活性。参见例如Tarentino等,Glycobiology 1995,5,599,其以引用的方式纳入本文。

[0218] Endo S为来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的分泌的内切糖苷酶,而且还属于糖苷水解酶家族18,如Collin等(EMBO J.2001,20,3046,以引用的方式纳入本文)所公开的。但是,与上述ENGases相比,所述Endo S具有更确定的特异性,并且其仅特异性地切割人IgG的Fc结构域中保守的N-聚糖(目前为止还没有确定其他的底物),这表明酶和IgG之间的蛋白质-蛋白质相互作用提供了该特异性。

[0219] Endo S49记载于WO 2013/037824 (Genovis AB),其以引用的方式纳入本文。Endo S49是从酿脓链球菌NZ131分离的,并且是Endo S的同源物。Endo S49对天然IgG具有特异性的内切糖苷酶活性且比Endo S切割更多种类的Fc聚糖。

[0220] 在另一个优选的实施方案中,该实施方案的步骤(2)中的酶为内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶。在另一个优选的实施方案中,所述内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶选自Endo S、Endo S49、Endo F1、Endo F2、Endo F3、Endo H、Endo M、Endo A及其任何组合。

[0221] 当待剪切的寡糖为复杂类型的双触角结构时,所述内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶优选地选自Endo S、Endo S49、Endo F1、Endo F2、Endo F3、及其组合。

[0222] 当待剪切的寡糖为复合型的双触角结构(即根据图2(3)),并且其存在于IgG的N297处的保守的N-糖基化位点时,所述内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶优选地选自Endo S、Endo S49、Endo F2、Endo F3,及其组合;更优选地选自Endo S、Endo S49,及其组合。

[0223] 当待剪切的寡糖为复合型的双触角结构,并且其不存在于IgG的N297处的保守的N-糖基化位点时,所述内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶优选地选自Endo F2、Endo F3,及其组合。

[0224] 当待剪切的寡糖为高甘露糖时,所述内切- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶优选地选自Endo H、Endo M、Endo A和Endo F1。

[0225] 本发明的方法的剪切步骤(2)优选在合适的缓冲溶液中进行,例如磷酸盐、缓冲盐水(例如,磷酸盐-缓冲盐水、tris-缓冲盐水)、柠檬酸盐、HEPES、tris和甘氨酸。合适的缓冲

液是本领域已知的。优选地,所述缓冲溶液为磷酸盐-缓冲盐水(PBS)或tris缓冲液。

[0226] 所述方法优选在约4至约50℃的温度范围内、更优选在约10至约45℃的温度范围内、甚至更优选在约20至约40℃的温度范围内、最优选在约30至约37℃的温度范围内进行。

[0227] 所述方法优选在约5至约9的pH范围内,优选在约5.5至约8.5的pH范围内,更优选在约6至约8的pH范围内进行。最优选地,所述方法在约7至约8的pH范围内进行。

[0228] 例如,通过上述本发明的方法提供了曲妥珠单抗突变体-(N297Q,L196N)。如实施例5所述,用内切-N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶处理所述曲妥珠单抗突变体-(N297Q,L196N)以在N196糖基化位点获得近端N-连接的GlcNAc残基。图10示出(A)在CHO表达后分离出的曲妥珠单抗突变体-(N297Q,L196N)的质谱图,以及(B)在用endo F3(或endo F2)处理后的曲妥珠单抗突变体-(N297Q,L196N)的质谱图。随后,将单糖衍生物Su(A)_x——GalNAz——连接到近端N-连接的GlcNAc残基。图11示出(A)在用endo F3(或endo F2)处理后(如实施例9所述)和GalNAz在GalT1-介导下转移到末端GlcNAc之后,曲妥珠单抗突变体(N297Q,L196N)的质谱图,以及(B)用BCN-vc-PABA-MMAF 34处理之后由负载有叠氮化物的曲妥珠单抗突变体N297Q,L196N的缀合而产生的抗体药物缀合物的质谱图,如实施例14所示。

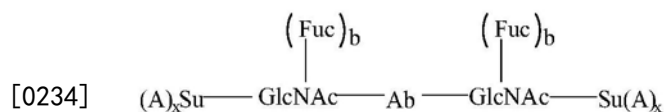
[0229] 经修饰的抗体

[0230] 本发明还涉及可通过制备本发明的经修饰的抗体的方法得到的经修饰的抗体。所述方法及其优选的实施方案在上文中已经进行了详细地描述。用于修饰抗体的方法的优选实施方案也适用于可通过该方法获得的经修饰的抗体。

[0231] 在一个优选实施方案中,x为1或2,更优选x为1,其中x为如上Su(A)_x中所定义的。

[0232] 本发明还涉及一种IgG抗体,其在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个且不多于一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点,其中近端N-连接的GlcNAc-Su(A)_x-取代基连接到抗体上,其中在N-连接的GlcNAc-Su(A)_x-取代基中的GlcNAc任选地被岩藻糖基化,并且其中Su(A)_x被定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su,其中x为1、2、3或4且其中A独立地选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基。

[0233] 在一个优选实施方案中,其中IgG抗体为全抗体,本发明的经修饰的抗体为根据式(140)的抗体:



140

[0235] 其中:

[0236] Ab代表一种IgG抗体,其在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个且不多于一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点;Su(A)和x如上文所定义;并且b为0(非岩藻糖基化)或1(岩藻糖基化)。

[0237] 在一个优选实施方案中,Su(A)_x包含1或2个官能团A,即优选x为1或2。更优选地,x为1。在另一个优选实施方案中,Su为半乳糖(Gal)。在另一个优选的实施方案中,x为1或2且Su为Gal,并且更优选地,x为1且Su为Gal。

[0238] 在一个优选实施方案中, $Su(A)_x$ 选自 GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal、2-ClGal、2-HSGal 和 6-HSGal, 更优选地选自 GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal 和 2-ClGal。在另一个优选实施方案中, $Su(A)_x$ 选自 2-GalNProSH 和 2-GalNBuSH。

[0239] 在进一步优选的实施方案中, x 为 1 且 $Su(A)_x$ 选自 GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal、2-ClGal、2-HSGal 和 6-HSGal, 更优选地选自 GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal 和 2-ClGal。在另一个进一步优选的实施方案中, x 为 1 且 $Su(A)_x$ 选自 2-GalNProSH 和 2-GalNBuSH。

[0240] 在根据本发明的经修饰的抗体的一个优选实施方案中, A 为叠氮基、巯基或卤素。所述经修饰的抗体优选为经叠氮基修饰的抗体、经巯基修饰的抗体或经卤素修饰的抗体。当所述抗体为经卤素修饰的抗体时, 优选经氯修饰的抗体、经溴修饰的抗体或经碘修饰的抗体, 更优选经氯修饰的抗体和经溴修饰的抗体, 最优选经氯修饰的抗体。更优选地, x 为 1 且所述经修饰的抗体优选为经叠氮基修饰的抗体、经巯基修饰的抗体或经卤素修饰的抗体 (优选经氯或溴修饰的抗体, 最优选经氯修饰的抗体)。

[0241] 在一个优选实施方案中, 其中 A 为叠氮基, $Su(A)_x$ 优选地选自 2-叠氮基乙酰氨基半乳糖 (GalNAz)、6-叠氮基-6-脱氧半乳糖 (6-AzGal)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖 (6-AzGalNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖 (4-AzGalNAc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基半乳糖 (6-AzGalNAz)、2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAz)、6-叠氮基-6-脱氧葡萄糖 (6-AzGlc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖 (6-AzGlcNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖 (4-AzGlcNAc) 和 6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖 (6-AzGlcNAz)。在进一步优选的实施方案中, $Su(A)_x$ 选自 GalNAz、6-AzGal、4-AzGalNAc、GlcNAz 和 6-AzGlcNAc。更优选地, x 为 1 且 $Su(A)_x$ 选自 2-叠氮基乙酰氨基半乳糖 (GalNAz)、6-叠氮基-6-脱氧半乳糖 (6-AzGal)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖 (6-AzGalNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖 (4-AzGalNAc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基半乳糖 (6-AzGalNAz)、2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAz)、6-叠氮基-6-脱氧葡萄糖 (6-AzGlc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖 (6-AzGlcNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖 (4-AzGlcNAc) 和 6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖 (6-AzGlcNAz)。更优选地, x 为 1 且 $Su(A)_x$ 选自 GalNAz、6-AzGal、4-AzGalNAc、GlcNAz 和 6-AzGlcNAc。

[0242] 在本发明的经修饰的抗体的一个特别优选的实施方案中, $Su(A)_x$ 选自 GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O) $_2R^8$ 、6-GalNAcSH、6-GalNAcX 和 6-GalNAcOS(O) $_2R^8$ 。在本发明的经修饰的抗体的另一个特别优选的实施方案中, $Su(A)_x$ 选自 2-GalNProSH 和 2-GalNBuSH。

[0243] 在一个甚至更优选的实施方案中, x 为 1 或 2 且 $Su(A)_x$ 选自 GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O) $_2R^8$ 、6-GalNAcSH、6-GalNAcX 和 6-GalNAcOS(O) $_2R^8$ 。在另一个甚至更优选的实施方案中, x 为 1 或 2 且 $Su(A)_x$ 选自 2-GalNProSH 和 2-GalNBuSH。

[0244] 在一个最优选的实施方案中, x 为 1 且 $Su(A)_x$ 选自 GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O) $_2R^8$ 、6-GalNAcSH、6-GalNAcX 和 6-GalNAcOS(O) $_2R^8$ 。 R^8 及其优选的实施方案如上文所定义。在另一个最优选的实施方案中, x 为 1 且 $Su(A)_x$ 选自 2-

GalNProSH和2-GalNBuSH。

[0245] 制备抗体-缀合物的方法

[0246] 本发明还涉及本发明的经修饰的抗体在制备抗体-缀合物中的用途,其中抗体-缀合物被定义为通过接头L缀合至目的分子的抗体。

[0247] 在本文中,抗体-缀合物被定义为通过接头L缀合至目的分子的抗体。本发明的抗体-缀合物可通过所述接头L缀合至一个或多于一个的目的分子D。

[0248] 目的分子可为例如报告分子、诊断分子、活性物质、酶、氨基酸(包括非天然氨基酸)、(非催化性的)蛋白质、肽、多肽、寡核苷酸、聚糖、(聚)乙二醇二胺(例如1,8-二氨基-3,6-二氧杂辛烷或包含更长的乙二醇链的等价物)、聚乙二醇链、聚环氧乙烷链、聚丙二醇链、聚环氧丙烷链和1,x-二氨基烷烃(其中x为烷烃中碳原子的数目)、叠氮化物或(杂)环炔基部分,优选二价的或双官能的(杂)环炔基部分。在一个优选实施方案中,所述目的分子选自氨基酸(特别是赖氨酸)、活性物质、报告分子、叠氮化物和(杂)环炔基部分。

[0249] 在本文中,活性物质被定义为药理学和/或生物学物质,即具有生物学和/或药理学活性的物质,例如药物或前药、诊断剂、氨基酸、蛋白质、肽、多肽、聚糖、脂质、维生素、类固醇、核苷酸、核苷、多核苷酸、RNA或DNA。合适的肽标签的实例包括细胞穿透肽如人乳铁蛋白或聚精氨酸。合适的聚糖的实例为寡甘露糖。

[0250] 在一个优选实施方案中,所述活性物质选自药物和前药。更优选地,所述活性物质选自药理学活性化合物,特别是低至中分子量的化合物(例如约200至约1500Da,优选约300至约1000Da),例如细胞毒素、抗病毒剂、抗菌剂、肽和寡核苷酸。细胞毒素的实例包括秋水仙碱(colchicine)、长春花生物碱(vinca alkaloids)、喜树碱(camptothecin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、紫杉烷(taxanes)、刺孢霉素(calicheamycins)、tubulysins、伊立替康(irinotecans)、抑制肽、鹅膏蕈碱(amanitin)、deBouganin、多卡米星、美登木素(maytansins)、阿里他汀(auristatins)或吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。在一个优选的实施方案中,细胞毒素选自喜树碱、多柔比星、柔红霉素、紫杉烷、刺孢霉素、多卡米星、美登木素、阿里他汀或吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。在另一个优选的实施方案中,细胞毒素选自秋水仙碱、长春花生物碱、tubulysins、伊立替康、抑制肽、鹅膏蕈碱和deBouganin。

[0251] 报告分子为一种容易检测其存在的分子,例如诊断剂、染料、荧光团、放射性同位素标记、造影剂、磁共振成像剂或质量标记剂。荧光团的实例包括Alexa Fluor(例如Alexa Fluor 555)、花青染料(例如Cy3或Cy5)、香豆素衍生物、荧光素、罗丹明、别藻蓝素和色霉素的所有种类。

[0252] 放射性同位素标记的实例包括^{99m}Tc、¹¹¹In、¹⁸F、¹⁴C、⁶⁴Cu、¹³¹I或¹²³I,其可通过或不通过螯合部分如DTPA、DOTA、NOTA或HYNIC连接。

[0253] 在本发明的抗体-缀合物中,所述目的分子D是通过接头L缀合至抗体。接头或连接单元是本领域中公知的,并更详细地描述于下文中。

[0254] 在一个优选实施方案中,用于制备本发明的抗体-缀合物的方法包括使IgG抗体与接头-缀合物反应,所述IgG抗体在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个且不多于一个N-连接的糖基化位点,其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点,并且其中近端GlcNASu(A)_x-取代基连接到所述N-连接的糖基化位点;其

中所述接头-缀合物包含官能团B和一个或多个目的分子D,其中所述官能团B是能够与所述抗体上的近端GlcNASu(A)_x-取代基的官能团A反应的官能团,其中Su(A)_x为包含x个官能团A的糖衍生物,其中x为1、2、3或4且A独立地选自叠氮基、酮基、炔基、巯基、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基;并且其中所述近端GlcNAcSu(A)_x-取代基任选地被岩藻糖基化。

[0255] 在用于制备抗体-缀合物的方法的一个优选实施方案中,Su(A)_x包含1或2个官能团A,即优选x为1或2。更优选地,x为1。在另一个优选实施方案中,Su为半乳糖(Gal)。在进一步优选的实施方案中,x为1或2且Su为Gal,并且最优选地,x为1且Su为Gal。在这些优选的实施方案中,进一步优选接头-缀合物包含1或2个、最优选1个目的分子。

[0256] 在一个优选的实施方案中,Su(A)_x选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal、2-ClGal、2-HSGal和6-HSGal,更优选地选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal-和2-ClGal。在另一个优选的实施方案中,Su(A)_x选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。在这些优选的实施方案中,进一步优选所述接头-缀合物包含1或2个、最优选1个目的分子。

[0257] 在进一步优选的实施方案中,x为1且Su(A)_x选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal、2-ClGal、2-HSGal和6-HSGal,更优选地选自GalNAz、6-AzGalNAc、6-GalNAcCl、6-GalNAcSH、2-GalNAcCl、2-GalNAcSH、6-ClGal-和2-ClGal。在另一个进一步优选的实施方案中,x为1且Su(A)_x选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。在这些优选的实施方案中,进一步优选所述接头-缀合物包含1或2个、最优选1个目的分子。

[0258] 在一个优选实施方案中,其中A为叠氮基,Su(A)_x优选地选自2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(GalNAz)、6-叠氮基-6-脱氧半乳糖(6-AzGal)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(4-AzGalNAc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAz)、2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(GlcNAz)、6-叠氮基-6-脱氧葡萄糖(6-AzGlc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(4-AzGlcNAc)和6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAz)。在进一步优选的实施方案中,Su(A)_x选自GalNAz、6-AzGal、4-AzGalNAc、GlcNAz和6-AzGlcNAc。更优选地,x为1且Su(A)_x选自2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(GalNAz)、6-叠氮基-6-脱氧半乳糖(6-AzGal)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基半乳糖(4-AzGalNAc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基半乳糖(6-AzGalNAz)、2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(GlcNAz)、6-叠氮基-6-脱氧葡萄糖(6-AzGlc)、6-叠氮基-6-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAc)、4-叠氮基-4-脱氧-2-乙酰氨基葡萄糖(4-AzGlcNAc)和6-叠氮基-6-脱氧-2-叠氮基乙酰氨基葡萄糖(6-AzGlcNAz)。更优选地,x为1且Su(A)_x选自GalNAz、6-AzGal、4-AzGalNAc、GlcNAz和6-AzGlcNAc。在这些优选的实施方案中,进一步优选所述接头-缀合物包含1或2个、最优选1个目的分子。

[0259] 在本发明的经修饰的抗体的一个特别优选的实施方案中,Su(A)_x选自GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O)₂R⁸、6-GalNAcSH、6-GalNAcX和6-GalNAcOS(O)₂R⁸。在本发明的经修饰的抗体的另一个特别优选的实施方案中,Su(A)_x选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。在一个甚至更优选的实施方案中,x为1或2且Su(A)_x选自GalNAz、

6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O)₂R⁸、6-GalNAcSH、6-GalNAcX和6-GalNAcOS(O)₂R⁸。在另一个甚至更优选的实施方案中,x为1或2且Su(A)_x选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。在一个最优选的实施方案中,x为1且Su(A)_x选自GalNAz、6-AzGalNAc、2-GalNAcSH、2-GalNAcX、2-GalNAcOS(O)₂R⁸、6-GalNAcSH、6-GalNAcX和6-GalNAcOS(O)₂R⁸。在另一个最优选的实施方案中,x为1且Su(A)_x选自2-GalNProSH和2-GalNBuSH。在这些优选的实施方案中,进一步优选所述接头-缀合物包含1或2个、最优选1个目的分子。R⁸及R⁸的优选实施方案如上文所定义。

[0260] 所述接头-缀合物优选为式B-L(D)_r,其中D为如上文所定义的目的分子,并且B和L如下文中所定义,并且r为1-20。优选r为1-10,更优选r为1-8,甚至更优选r为1、2、3、4、5或6,甚至更优选r为1、2、3或4,甚至更优选r为1或2,最优选r为1。换句话说,所述接头-缀合物优选与1或2个、更优选与1个目的分子连接。

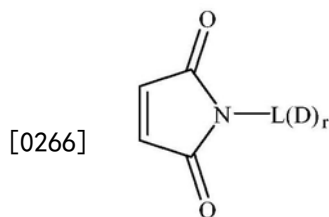
[0261] 所述经修饰的抗体上的官能团A(A为叠氮基、酮基、炔基、巯基、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基)的互补官能团B是本领域中已知的。

[0262] 当A是叠氮基时,所述经叠氮化物修饰的抗体和所述接头-缀合物的连接优选地通过环加成反应进行。官能团B随后优选地选自炔基,优选末端炔基和(杂)环炔基。

[0263] 当A为酮基时,所述经酮基修饰的抗体与所述接头-缀合物的连接优选地通过与羟胺衍生物或肼的选择性缀合进行,分别产生肟或腙。官能团B随后优选地为伯胺基(例如-NH₂基团)、氨基氧基(aminooxy)(例如-O-NH₂)或肼基(例如-N(H)NH₂)。所述接头-缀合物随后分别优选为H₂N-L(D)_r、H₂N-O-L(D)_r或H₂N-N(H)-L(D)_r,其中L、D和r如上文定义。

[0264] 当A为炔基时,所述经炔基修饰的抗体与所述接头-缀合物的连接优选地通过环加成反应(优选1,3-偶极环加成)进行。官能团B随后优选地为1,3-偶极子,例如叠氮化物、硝酮或氧化脒。所述接头-缀合物随后优选地为N₃-L(D)_r,其中L、D和r如上文定义。

[0265] 当A为巯基时,所述经巯基修饰的抗体与所述接头-缀合物的连接优选地通过迈克尔型加成反应进行。官能团B随后优选为用于迈克尔型加成反应的N-马来酰亚氨基、用于亲核取代反应的卤代乙酰氨基、或用于硫醇-烯反应的末端烯烃。所述接头-缀合物随后优选为X-CH₂C(O)NHL(D)_r或X-CH₂C(O)N[L(D)_r]₂,其中X为F、Cl、Br或I,或如以下所示的马来酰亚胺-接头-缀合物(141)。



141

[0267] 当A为经卤素修饰的抗体、经卤代乙酰氨基修饰的抗体、经磺酰氧基修饰的抗体或经巯基乙酰氨基修饰的抗体时,所述经修饰的抗体与所述接头-缀合物的连接优选地通过与硫醇反应以形成硫醚来进行。当A为卤素、卤代乙酰氨基、磺酰氧基或巯基乙酰氨基时,所述经修饰的抗体与所述接头-缀合物的连接优选地通过与硫醇反应以形成硫醚来进行。换句话说,当所述经修饰的抗体为经卤素修饰的抗体、经卤代乙酰氨基修饰的抗体、经磺酰氧基修饰的抗体或经巯基乙酰氨基修饰的抗体时,所述经修饰的抗体与所述接头-缀合物的

连接优选地通过与硫醇反应以形成硫醚来进行。

[0268] 官能团B随后优选地包含巯基,并且优选的接头-缀合物为 HS-L(D)_r 。但是,官能团B也可包含醇基团或胺基团。

[0269] 用于制备本发明的抗体-缀合物的方法的一个优选实施方案包括使经修饰的抗体与接头-缀合物反应,其中:

[0270] (a) 当所述经修饰的抗体为经叠氮基修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含(杂)环炔基或炔基以及一个或多个目的分子;或

[0271] (b) 当所述经修饰的抗体为经酮基修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含伯胺基团、氨基氧基或肼基,以及一个或多个目的分子;或

[0272] (c) 当所述经修饰的抗体为经炔烃修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含叠氮基、硝酮或氧化肼,以及一个或多个目的分子。

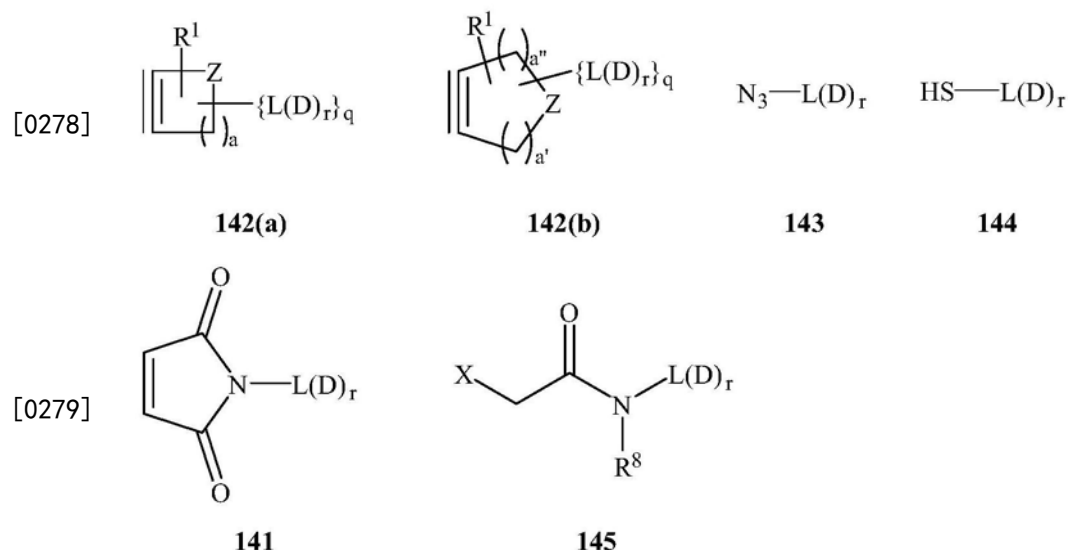
[0273] (d) 当所述经修饰的抗体为经巯基修饰的抗体或经巯基乙酰氨基修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含N-马来酰亚胺基团或卤代的乙酰氨基或末端烯烃,以及一个或多个目的分子;或

[0274] (e) 当所述经修饰的抗体为经卤素修饰的抗体、经卤代乙酰氨基修饰的抗体、经磺酰氧基修饰的抗体或经磺酰化的羟基乙酰氨基修饰的抗体时,所述接头-缀合物包含巯基,以及一个或多个目的分子。

[0275] 当所述经修饰的抗体为经卤素修饰的抗体且官能团B包含巯基时,所述巯基可为脂肪族或芳香族巯基。在一个优选实施方案中,所述巯基为芳香族巯基。

[0276] 在一个优选实施方案中,所述经修饰的抗体为经巯基修饰的抗体且官能团B包含N-马来酰亚胺基团或卤代乙酰氨基。

[0277] 在用于制备抗体-缀合物的方法的一个优选的实施方案中,接头-缀合物 B-L(D)_r 选自式(142a)、(142b)、(143)、(144)、(141)或(145)的接头-缀合物:



[0280] 其中:

[0281] L为接头;

[0282] D为目的分子;

[0283] r为1-20;

[0284] R^1 独立地选自氢、卤素、 $-OR^5$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^5$ 、 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} (杂)芳基、 C_7-C_{24} 烷基(杂)芳基和 C_7-C_{24} (杂)芳基烷基,其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基是任选取代的,其中两个取代基 R^1 可连接在一起以形成增环的环烷基或增环的(杂)芳基烷基,并且其中 R^5 独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} (杂)芳基、 C_7-C_{24} 烷基(杂)芳基和 C_7-C_{24} (杂)芳基烷基;

[0285] z 为 $C(R^1)_2$ 、 O 、 S 或 NR^2 ,其中 R^2 为 R^1 或 $L(D)_r$,并且其中 L 、 D 和 r 如上文所定义;

[0286] q 为0或1,条件是如果 q 为0,则 z 为 $N-L(D)_r$;

[0287] a 为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0288] a' 为0、1、2、3、4、5、6、7或8;

[0289] a'' 为0、1、2、3、4、5、6、7或8;

[0290] $a'+a''<10$;

[0291] X 为 F 、 Cl 、 Br 或 I ;以及

[0292] R^8 为 R^1 或 $-L(D)_r$,优选氢、 $-L(D)_r$ 或 C_1-C_{24} 烷基,更优选氢、 $-L(D)_r$ 或 C_1-C_6 烷基。

[0293] 在用于制备本发明的抗体-缀合物的方法的另一个优选实施方案中,接头-缀合物 $B-L(D)_r$ 选自如上文所定义的式(142a)、(143)、(144)、(141)或(145)的接头-缀合物。

[0294] 如上所述,优选 r 为1-10,更优选 r 为1-8,甚至更优选 r 为1、2、3、4、5或6,甚至更优选 r 为1、2、3或4,甚至更优选 r 为1或2,最优选 r 为1。换句话说,所述接头-缀合物优选地与1或2个,优选1个目的分子连接。

[0295] 在一个优选实施方案中,本发明的经修饰的抗体为经叠氮化物修饰的抗体、经炔基修饰的抗体、经卤素修饰的抗体或经巯基修饰的抗体。

[0296] 用于制备本发明的抗体-缀合物的合适的接头-缀合物是包含官能团 B 和目的分子的接头-缀合物。接头 L (也称为接头单元)是本领域熟知的。在如本文所述的接头-缀合物中, L 连接至目的分子 D 以及官能团 B ,如上所述。用于将所述官能团 B 和所述目的分子 D 连接到 L 的多种方法是本领域中已知的。本领域技术人员清楚的是,对于将官能团 B 连接到接头的一端并且将目的分子 D 连接到接头的另一端的合适方法的选择取决于官能团 B 、接头 L 和目的分子 D 的确切性质。

[0297] 接头可具有通用结构 $F^1-L(F^2)_r$,其中 F^1 代表如上所述的官能团 B 或能够与官能团 B 上的官能团 F 反应的官能团,例如(杂)环炔基、末端炔基、伯胺、氨基氧基、胍基、叠氮基、 N -马来酰亚胺基团、乙酰氨基或巯基。 F^2 代表能够与目的分子上的官能团 F 反应的官能团。

[0298] 由于多于一个的目的分子可与接头键合,所以在 L 上可存在多个官能团 F^2 。如上所述, r 为1至20,优选1至10,更优选1至8,甚至更优选1、2、3、4、5或6,甚至更优选1、2、3或4,最优选 r 为1或2。

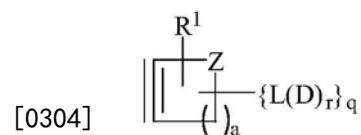
[0299] L 例如可选自直链或支链的 C_1-C_{200} 亚烷基、 C_2-C_{200} 亚烯基、 C_2-C_{200} 亚炔基、 C_3-C_{200} 亚环烷基、 C_5-C_{200} 亚环烯基、 C_8-C_{200} 亚环炔基、 C_7-C_{200} 亚烷基芳基、 C_7-C_{200} 亚芳基烷基、 C_8-C_{200} 亚芳基烯基、 C_9-C_{200} 亚芳基炔基。所述亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、亚烷基芳基、亚芳基烷基、亚芳基烯基和亚芳基炔基可被任选地取代,且任选地所述基团可被一个或多个杂原子(优选1至100个杂原子)间断,所述杂原子优选地选自 O 、 S 和 NR^5 ,其中 R^5 独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} (杂)芳基、 C_7-C_{24} 烷基(杂)芳基和 C_7-C_{24} (杂)芳基烷基。最优选地,所述杂原子为 O 。

[0300] F、F¹和F²例如可独立地选自氢、卤素、R⁵、C₄-C₁₀ (杂) 环炔基、-CH=C(R⁵)₂、-C≡CR⁵、-[C(R⁵)₂C(R⁵)₂O]_q-R⁵ (其中q在1至200范围内)、-CN、-N₃、-NCX、-XCN、-XR⁵、-N(R⁵)₂、-⁺N(R⁵)₃、-C(X)N(R⁵)₂、-C(R⁵)₂XR⁵、-C(X)R⁵、-C(X)XR⁵、-S(O)R⁵、-S(O)₂R⁵、-S(O)OR⁵、-S(O)₂OR⁵、-S(O)N(R⁵)₂、-S(O)₂N(R⁵)₂、-OS(O)R⁵、-OS(O)₂R⁵、-OS(O)OR⁵、-OS(O)₂OR⁵、-P(O)(R⁵)OR⁵、-P(O)(OR⁵)₂、-OP(O)(OR⁵)₂、-Si(R⁵)₃、-XC(X)R⁵、-XC(X)XR⁵、-XC(X)N(R⁵)₂、-N(R⁵)C(X)R⁵、-N(R⁵)C(X)XR⁵和-N(R⁵)C(X)N(R⁵)₂, 其中X为氧或硫并且其中R⁵如上文所定义。

[0301] 合适的连接单元的实例包括(聚)乙二醇二胺(例如1,8-二氨基-3,6-二氧杂辛烷或包含更长的乙二醇链的等价物)、聚乙二醇或聚环氧乙烷链、聚丙二醇或聚环氧丙烷链, 以及1,x-二氨基烷烃(其中x为烷烃中碳原子的数目)。

[0302] 另一类合适的接头包括可切开的接头。可切开的接头是本领域中熟知的。例如Shabat等, Soft Matter 2012, 6, 1073 (其以引用的方式纳入本文) 公开了包含在生物触发(例如酶切割或氧化事件)时释放的自我分解(self-immolative)部分的可切开的接头。合适的可切开的接头的一些实例为在被蛋白酶(例如组织蛋白酶(cathepsin)、血纤维蛋白溶酶(plasmin)或金属蛋白酶(metalloprotease))特异性识别后切开的肽-接头, 或在被糖苷酶(例如葡萄糖苷酸酶(glucoronidase))特异性识别后切开的基于糖苷的接头, 或在贫氧、缺氧区域内被还原的硝基芳族化合物。

[0303] 如上所述, 当所述经修饰的抗体为经叠氮化物修饰的抗体时, 优选所述接头-缀合物为式(142a)的(杂)环炔烃接头-缀合物。



142(a)

[0305] 其中:

[0306] L为接头;

[0307] D为目的分子;

[0308] r为1-20;

[0309] R¹独立地选自氢、卤素、-OR⁵、-NO₂、-CN、-S(O)₂R⁵、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基, 其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代, 其中两个取代基R¹可连接在一起以形成增环的环烷基或增环的(杂)芳基取代基, 并且其中R⁵独立地选自氢、卤素、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基;

[0310] z为C(R¹)₂、O、S或NR², 其中R²为R¹或L(D)_r, 并且其中L、D和r如上文所定义;

[0311] q为0或1、条件是如果q为0, 则z为N-L(D)_r; 以及

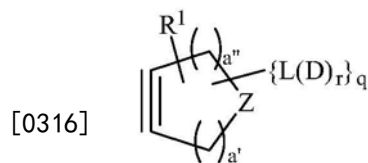
[0312] a为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0313] 在进一步优选的实施方案中, a为5, 即所述(杂)环炔基优选为(杂)环辛炔基。

[0314] 在另一个优选的实施方案中, z为C(R²)₂或NR²。当z为C(R²)₂时, 优选R²为氢。当z为NR²时, 优选R²为L(D)_r。在又一个优选的实施方案中, r为1-10, 更优选r为1、2、3、4、5或6, 甚至更优选r为1、2、3或4, 甚至更优选r为1或2, 并且最优选r为1。在另一个优选实施方案中, q

为1或2,更优选q为1。甚至更优选r为1且q为1,最优选a为5且r为1且q为1。

[0315] 在另一个进一步优选的实施方案中,当经修饰的糖蛋白为经叠氮化物修饰的糖蛋白时,所述接头-缀合物为式(142b)的(杂)环炔炔接头-缀合物:



142(b)

[0317] 其中:

[0318] L为接头;

[0319] D为目的分子;

[0320] r为1-20;

[0321] R^1 独立地选自氢、卤素、 $-OR^5$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^5$ 、 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} (杂)芳基、 C_7-C_{24} 烷基(杂)芳基和 C_7-C_{24} (杂)芳基烷基,其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基 R^1 可连接在一起以形成增环的环烷基或增环的(杂)芳基取代基,并且其中 R^5 独立地选自氢、卤素、 C_1-C_{24} 烷基、 C_6-C_{24} (杂)芳基、 C_7-C_{24} 烷基(杂)芳基和 C_7-C_{24} (杂)芳基烷基;

[0322] z为 $C(R^1)_2$ 、O、S或 NR^2 ,其中 R^2 为 R^1 或 $L(D)_r$,并且其中L、D和r如上文所定义;

[0323] q为0或1、条件是如果q为0,则z为 $N-L(D)_r$;

[0324] a' 为0、1、2、3、4、5、6、7或8;

[0325] a'' 为0、1、2、3、4、5、6、7或8;以及

[0326] $a'+a'' < 10$ 。

[0327] 在进一步优选的实施方案中, $a'+a''$ 为4、5、6或7,更优选 $a'+a''$ 为4、5或6并且最优选 $a'+a''$ 为5,即所述(杂)环炔基优选为(杂)环辛炔基。

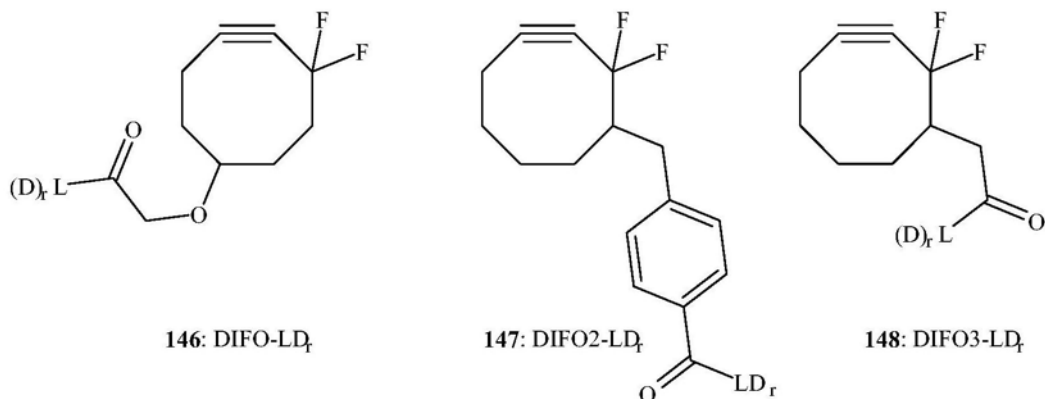
[0328] 在另一个优选实施方案中,z为 $C(R^2)_2$ 或 NR^2 。当z为 $C(R^2)_2$ 时,优选 R^2 为氢。当z为 NR^2 时,优选 R^2 为 $L(D)_r$ 。在又一个优选实施方案中,r为1-10,更优选r为1、2、3、4、5或6,甚至更优选r为1、2、3或4,甚至更优选r为1或2,且最优选r为1。在另一个优选实施方案中,q为1或2,更优选q为1。甚至更优选r为1且q为1,最优选 $a'+a''$ 为5且r为1且q为1。

[0329] 所述 $L(D)_r$ 取代基可存在于所述(杂)环炔基中的C-原子上,或在杂环炔基的情况下,存在于所述杂环炔基的杂原子上。当所述(杂)环炔基包含取代基(例如增环的环烷基)时,所述 $L(D)_r$ 取代基也可存在于所述取代基上。

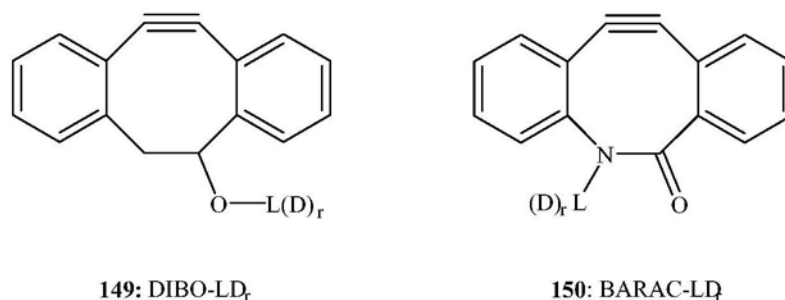
[0330] 将接头L的一端连接至(杂)环炔基以及将其另一端连接至目的分子以得到接头-缀合物的方法取决于所述接头、所述(杂)环炔基和所述目的分子的确切的性质。合适的方法是本领域中已知的。

[0331] 优选地,所述接头-缀合物包含(杂)环辛炔基,更优选有张力的(strained)(杂)环辛炔基。合适的(杂)环炔基部分是本领域中已知的。例如DIF0、DIF02和DIF03公开于US 2009/0068738中,其以引用的方式纳入。DIB0公开于WO 2009/067663中,其以引用的方式纳入。BARAC公开于J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 3688-3690和US 2011/0207147中,二者以引用的方式纳入。

[0332] 包含(杂)环辛炔基的接头-缀合物的优选实例如下所示。

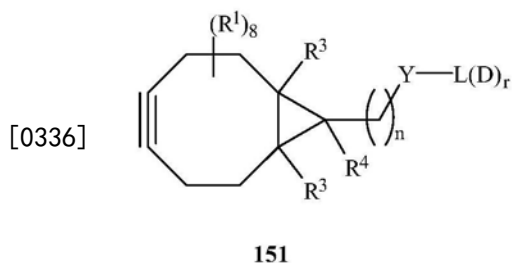


[0333]



[0334] 本领域中已知的其他环辛炔部分为DIBAC (也被称作ADIBO或DBC0) 和BCN。DIBAC公开于Chem. Commun. 2010, 46, 97-99中, 其以引用的方式纳入。BCN公开于WO 2011/136645中, 其以引用的方式纳入。

[0335] 在一个优选的实施方案中, 所述接头-缀合物具有式 (151) :



[0337] 其中:

[0338] R^1 、L、D和r如上文所定义;

[0339] Y为O、S或NR², 其中R²如上文所定义;

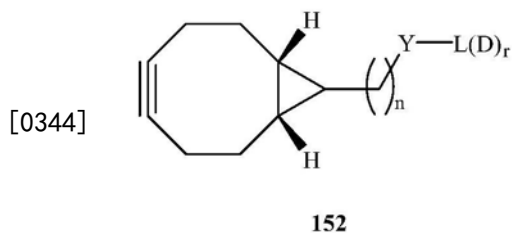
[0340] R³独立地选自氢、卤素、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基;

[0341] R⁴选自氢、Y-L(D)_r、-(CH₂)_n-Y-L(D)_r、卤素、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自O、N和S的杂原子间断, 其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基独立地任选地被取代; 以及

[0342] n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0343] 在进一步优选实施方案中, R¹为氢。在另一个优选的实施方案中, R³为氢。在另一个优选实施方案中, n为1或2。在另一个优选实施方案中, R⁴为氢、Y-L(D)_r或-(CH₂)_n-Y-L(D)_r。在另一个优选实施方案中, R²为氢或L(D)_r。在进一步优选的实施方案中, 所述接头-缀合物

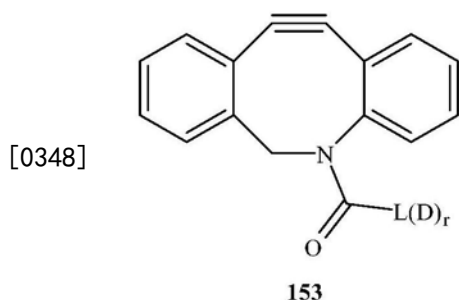
具有式 (152)：



[0345] 其中Y、L、D、n和r如上文定义。优选地，r为1或2，更优选r为1。

[0346] 式 (152) 的接头-缀合物的实例示于图8和图9中。图8示出合成BCN-MMAF缀合物 (34) 的反应方案。图9示出合成BCN-美登木素生物碱 (maytansinoid) 缀合物 (35) 的反应方案。

[0347] 在另一个优选实施方案中，所述接头-缀合物具有式 (153)：



[0349] 其中L、D和r如上文定义。优选地，r为1或2，更优选r为1。

[0350] 在用于制备本发明的抗体-缀合物的方法的一个优选实施方案中，经叠氮化物修饰的抗体与式 (142a)、(142b)、(146)、(147)、(148)、(149)、(150)、(151)、(152) 或 (153) 的接头-缀合物缀合，或与式 (142a)、(146)、(147)、(148)、(149)、(150)、(151)、(152) 或 (153) 的接头-缀合物缀合。优选地，所述接头-缀合物为式 (142a)、(142b)、(151)、(152) 或 (153)，或式 (142a)、(151)、(152) 或 (153)。在另一个优选实施方案中，所述接头-缀合物为式 (151)、(152) 或 (153)，更优选为式 (152) 或 (153)，甚至更优选为 (152)。

[0351] 如上所述，在一个优选实施方案中，所述经修饰的抗体为经巯基修饰的抗体且官能团B包含N-马来酰亚胺基团或卤代乙酰氨基。

[0352] 在用于制备抗体-缀合物的方法的一个具体实施方案中，所述方法包括以下步骤：

[0353] (1) 提供一种IgG抗体，其在单条重链和单条轻链的结合体上包含一个N-连接的糖基化位点，其中所述N-连接的糖基化位点与其野生型对应物相比为突变的N-连接的糖基化位点；以及

[0354] (2) 通过内切-β-N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶的作用，剪切连接到所述糖基化位点的寡糖，以在所述糖基化位点处得到近端N-连接的GlcNAc-残基；以及

[0355] (3) 在合适的催化剂存在下，将单糖衍生物Su(A)_x 连接到近端N-连接的GlcNAc-残基；其中合适的催化剂被定义为以Su(A)_x 为底物的催化剂；其中Su(A)_x 被定义为包含x个官能团A的单糖衍生物Su，其中x为1、2、3或4且其中A独立地选自叠氮基、酮基、炔基、巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺酰化的羟基乙酰氨基；

[0356] (4) 使近端N-连接的GlcNAc-Su(A)_x 取代基与接头-缀合物反应，其中所述接头-缀合物包含官能团(B) 和目的分子(D)，其中所述官能团(B) 为能够与所述GlcNAc-Su(A)_x 取代

基的官能团(A)反应的官能团,并且其中Su(A)_x如上文所定义,条件是A不为巯基前体;以及

[0357] 其中近端N-连接的GlcNAc-残基在步骤(2)、(3)和(4)中任选地被岩藻糖基化。

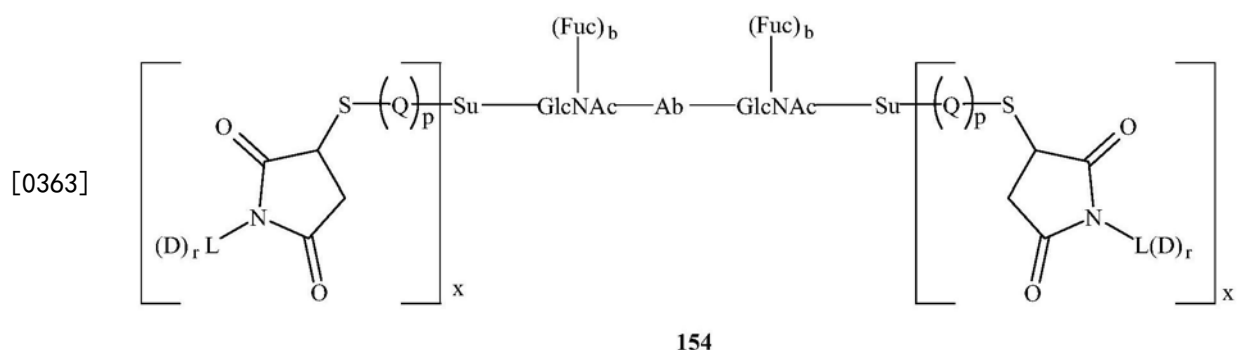
[0358] 在上文中详细地描述了该方法的步骤(1)、(2)、(3)和(4)。

[0359] 抗体-缀合物

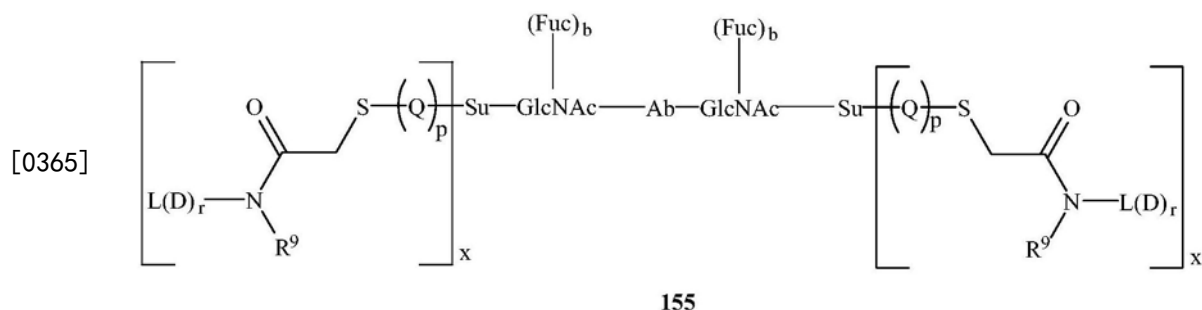
[0360] 本发明还涉及一种抗体-缀合物,其可通过制备本发明的抗体-缀合物的方法获得。

[0361] 在本发明的抗体-缀合物的一个优选实施方案中,x为1或2,更优选x为1。

[0362] 在一个优选实施方案中,通过经巯基修饰的抗体与包含马来酰亚胺官能团B的接头-缀合物的反应获得所述抗体-缀合物。在另一个优选实施方案中,所述抗体-缀合物为式(154):



[0364] 在另一个优选实施方案中,通过经巯基修饰的抗体与包含官能团B的接头-缀合物的反应获得所述抗体-缀合物,所述官能团B包含卤代乙酰氨基。在另一个优选实施方案中,所述抗体-缀合物为式(155):



[0366] 其中:

[0367] Ab为抗体;

[0368] Su为糖衍生物;

[0369] L为接头;

[0370] D为目的分子;

[0371] b为0或1;

[0372] r为1至20;

[0373] x为1、2、3或4;

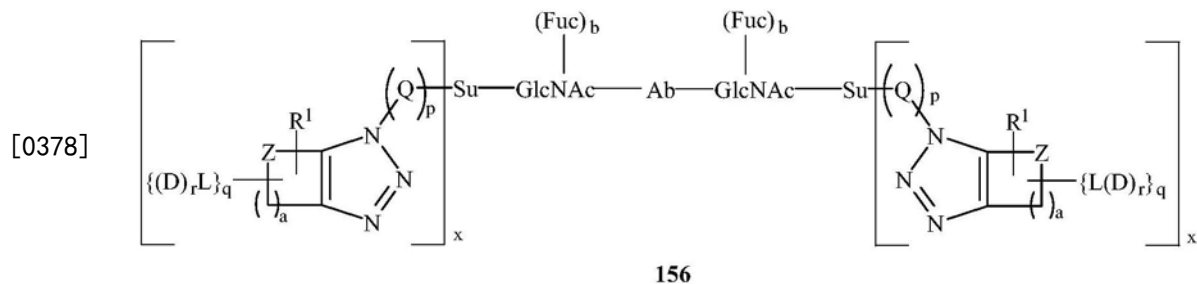
[0374] p为0或1;

[0375] Q为-N(H)C(O)CH₂-或-CH₂-;以及

[0376] R⁹选自L(D)_r、氢、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄芳基、C₇-C₂₄烷基芳基和C₇-C₂₄芳基烷基,所述

C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄芳基、C₇-C₂₄烷基芳基和C₇-C₂₄芳基烷基任选地被取代。优选地，R⁹选自L(D)_r、氢、C₁-C₁₂烷基、C₆-C₁₂芳基、C₇-C₁₂烷基芳基和C₇-C₁₂芳基烷基，所述C₁-C₁₂烷基、C₆-C₁₂芳基、C₇-C₁₂烷基芳基和C₇-C₁₂芳基烷基任选地被取代。更优选地，R⁹选自L(D)_r、氢、C₁-C₆烷基、C₆-C₁₂芳基、C₇-C₁₂烷基芳基和C₇-C₁₂芳基烷基，所述C₁-C₆烷基、C₆-C₁₂芳基、C₇-C₁₂烷基芳基和C₇-C₁₂芳基烷基任选地被取代。甚至更优选地，R⁹为H、C₁、C₂、C₄或C₄烷基或C₆-C₁₂芳基。最优选地，R⁹为H或甲基。

[0377] 在另一个优选实施方案中,通过经叠氮化物修饰的抗体与包含官能团B的接头-缀合物(优选式(142a)或(142b)的接头-缀合物)的反应获得所述抗体-缀合物,所述官能团B包含(杂)环辛炔基。在另一个优选实施方案中,所述抗体-缀合物为式(156):



[0379] 其中:

[0380] Ab为抗体:

[0381] Su为糖衍生物:

[0382] L为接头:

[0383] D为目的分子;

[0384] b为0或1;

[0385] r为1-20;

[0386] x为1、2、3或4;

[0387] y为y为1-20;

[0388] R¹独立地选自氢、卤素、-OR⁵、-NO₂、-CN、-S(O)₂R⁵、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基,其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基R¹可连接在一起以形成增环的环烷基或增环的(杂)芳烃取代基,并且其中R⁵独立地选自氢、卤素、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基;

[0389] z 为 $C(R^1)$ 、0、S或 NR^2 ，其中 R^2 为 R^1 或 $L(D)_r$ ，并且其中L、D和r如上文所定义；

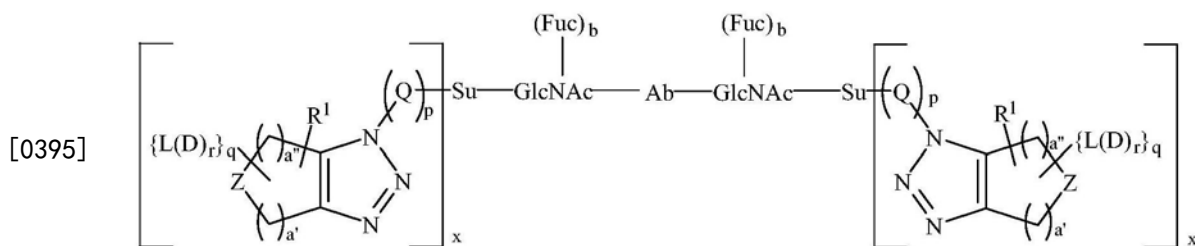
[0390] p为0或1:

[0391] Q为-N(H)C(O)CH₂-或-CH₂-;

[0392] q 为0或1,条件是如果 q 为0,则 z 为 $N-L(D)r$;

[0393] a为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0394] 在另一个优选实施方案中,所述抗体-缀合物为式(157):



157

[0396] 其中：

[0397] Ab为抗体；

[0398] Su为糖衍生物；

[0399] L为接头；

[0400] D为目的分子；

[0401] b为0或1；

[0402] r为1-20；

[0403] x为1、2、3或4；

[0404] y为1-20；

[0405] R¹独立地选自氢、卤素、-OR⁵、-NO₂、-CN、-S(O)₂R⁵、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基，其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代，其中两个取代基R¹可连接在一起以形成增环的环烷基或增环的(杂)芳基取代基，并且其中R⁵独立地选自氢、卤素、C₁-C₂₄烷基、C₆-C₂₄(杂)芳基、C₇-C₂₄烷基(杂)芳基和C₇-C₂₄(杂)芳基烷基；

[0406] z为C(R¹)₂、O、S或NR²，其中R²为R¹或L(D)_r，并且其中L、D和r如上文所定义；

[0407] p为0或1；

[0408] Q为-N(H)C(O)CH₂-或-CH₂-；

[0409] q为0或1，条件是如果q为0，则z为N-L(D)_r；

[0410] a'为0、1、2、3、4、5、6、7或8；

[0411] a''为0、1、2、3、4、5、6、7或8；以及

[0412] a'+a''<10。

[0413] 在进一步优选的实施方案中，通过经叠氮化物修饰的抗体与包含环辛炔基官能团的接头-缀合物的反应获得所述式(156)或(157)的抗体-缀合物，所述环辛炔基官能团为式(142a)或(142b)、(146)、(147)、(148)、(149)、(150)、(151)、(152)或(153)，更优选式(146)、(147)、(148)、(149)、(150)、(151)、(152)或(153)。优选地，所述接头-缀合物为式(142a)或(142b)、(151)、(152)或(153)，更优选所述接头-缀合物为式(151)、(152)或(153)，更优选为(152)或(153)，甚至更优选为(152)。

[0414] 在进一步优选的实施方案中，式(154)、(155)、(156)和(157)的抗体-缀合物中x为1或2，更优选x为1。在进一步优选的实施方案中，r为1或2，优选为1。在进一步优选的实施方案中，x为1且r为1或2，更优选x为1且r为1。在另一个优选实施方案中，x为2且r为1或2，更优选x为2且r为1。

[0415] 抗体-药物缀合物

[0416] 在本发明的抗体-缀合物的一个特别优选的实施方案中，目的分子选自药学活性

物质。在进一步优选的实施方案中,所述活性物质选自药物和前药。甚至更优选地,所述目的分子选自低至中分子量化合物。更优选地,所述目的分子选自细胞毒素、抗病毒剂、抗菌剂、肽和寡核苷酸,最优选地所述目的分子为细胞毒素。在另一个优选实施方案中,所述目的分子选自秋水仙碱、长春花生物碱、喜树碱、多柔比星、柔红霉素、紫杉烷、刺孢霉素、tubulysins、伊立替康、抑制肽、鹅膏蕈碱、deBouganin、多卡米星、美登木素、阿里他汀或吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。在一个优选的实施方案中,所述细胞毒素选自喜树碱、多柔比星、柔红霉素、紫杉烷、刺孢霉素、多卡米星、美登木素、阿里他汀和吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。在另一个优选实施方案中,所述细胞毒素选自秋水仙碱、长春花生物碱、tubulysins、伊立替康、抑制肽、鹅膏蕈碱和deBouganin。

[0417] 当本发明的抗体-缀合物中的目的分子为活性物质时,所述抗体-缀合物也可被称为“抗体-药物缀合物”(ADC)。

[0418] 作为一个实例,图11(B)示出本发明的抗体药物缀合物的质谱图,所述抗体药物缀合物是用BCN-vc-PABA-MMAF34处理后由带有叠氮化物的曲妥珠单抗突变体N297Q、L196N的缀合而产生。

[0419] 本发明还涉及本发明的抗体-缀合物用作药物,其中所述目的分子为活性物质。

[0420] 本发明还涉及本发明的抗体-缀合物用于治疗癌症的用途,其中所述目的分子为活性物质。

[0421] 本发明还涉及本发明的抗体-缀合物用于治疗乳腺癌、更优选地用于治疗HER2-阳性乳腺癌,其中所述目的分子为活性物质。

[0422] 本发明还涉及通过给予本发明的抗体-药物缀合物治疗癌症的方法。

[0423] 本发明还涉及通过给予本发明的抗体-药物缀合物治疗乳腺癌的方法。

[0424] 本发明还涉及通过给予本发明的抗体-药物缀合物治疗HER2-阳性乳腺癌的方法。

[0425] 如上文所述,本发明的抗体-缀合物相对于现有技术已知的抗体-缀合物具有几个优点。本发明的经修饰的抗体、抗体-缀合物及其制备方法的优点之一是这些抗体和抗体-缀合物在位点-特异性和化学计量方面都是同质的。所得的本发明的经修饰的抗体和抗体-缀合物具有非常接近理论值的DAR,并具有非常低的标准偏差。这也意味着本发明的抗体-缀合物产生了更一致的产物用于临床前测试。

[0426] 本发明的抗体缀合物的性质是通过设计、表达并加工成具有不同糖基化特征的单克隆抗体来调节的。可被调节的性质例如抗肿瘤活性、最大耐受剂量、药物代谢动力学比如血浆清除率、治疗指数(在功效和毒性两方面)、药物的衰减(attenuation)、聚集的倾向、药物结合的稳定性以及在到达靶点后药物的释放。特别地,在药物的定位和抗体-药物缀合物(ADC)的体内功效之间有关联。

[0427] 例如,如实施例17所述和表2中所列出的,除了糖基化位点以外,保持所有参数(抗体、接头、有效载荷)恒定时,不同的糖突变体的聚集倾向明显不同。

[0428] 由实施例18所述和图15中图示的体内功效研究,曲妥珠单抗的糖突变体之间的差异也是显而易见的,从一些糖突变体的微小功效到一种其他糖突变体的接近清除肿瘤。由实施例15所述和图12和13中图示的体外功效研究,以及图14中的阴性对照,不同的糖突变体之间的功效差异尽管更小,也是显而易见的。

[0429] 实施例

[0430] 合成

[0431] 实施例1:合成BCN-PEG₂-OSu碳酸酯(33)

[0432] 在氩气下制备N,N'-二琥珀酰亚氨基碳酸酯(1.82g,7.11mmol)的MeCN溶液(50mL)。在3h内逐滴加入BCN-PEG₂-OH(1.0g,3.55mmol)的MeCN溶液(50mL)。另外搅拌1h后,将反应混合物倒入EtOAc/H₂O(150mL/150mL)的混合物中。分离各层并用EtOAc(150mL)萃取水层。将合并的有机层干燥(Na₂SO₄)并浓缩。残留物通过柱色谱进行纯化,得到所需的产物为无色油状(0.79g,2.81mmol,79%)。¹H NMR(CDCl₃,400MHz) δ(ppm) 5.19(bs,1H),4.50-4.42(m,2H),4.16(d,J=8.0Hz,2H),3.77-3.71(m,2H),3.57(t,J=5.1Hz,2H),3.39(dd,J=10.5,5.4Hz,2H),2.85(s,4H),2.35-2.16(m,6H),1.65-1.51(m,2H),1.41-1.34(m,1H)。

[0433] 实施例2:合成BCN-vc-PABA-MMAF(34)

[0434] 向Val-Cit-PAB-MMAF.TFA(17.9mg,14.3μmol)的DMF溶液(2mL)中加入BCN-PEG₂-C(0)OSu(17.9mg,14.3μmol)(33)的DMF(0.78mL)和三乙胺(6.0μL)溶液。通过反相HPLC(C18,梯度H₂O/MeCN 1%AcOH)纯化后得到产物(7mg,5μmol,35%)。C₇₄H₁₁₄N₁₁O₁₈的LRMS(HPLC,ESI+)计算值(M+H⁺)1444.83,实测值1445.44。

[0435] 实施例3:合成BCN-vc-PABA-β-ala-美登木素生物碱(35)

[0436] 向Val-Cit-PABA-β-丙氨酰基(alaninoyl)-美登木素生物碱(购自Concortis)(27mg,0.022mmol)的MeCN悬浮液(2mL)中加入三乙胺(9.2μL,6.7mg,0.066mmol)和BCN-PEG₂-OSu碳酸酯33(9.2mg,0.022mmol)的MeCN溶液(1mL)。23小时后,将混合物倒入EtOAc(20mL)和水(20mL)的混合物中。在分离后,将有机相干燥(Na₂SO₄)并浓缩。通过柱层析(EtOAc→MeOH/EtOAc 1/4)纯化后得到22mg(0.015mmol,70%)所需产物35。C₇₀H₉₇ClN₁₀O₂₀的LRMS(ESI+)计算值(M+H⁺)1432.66,实测值1434.64。

[0437] 抗体糖基化突变体

[0438] 将天然的曲妥珠单抗和突变抗体通过Evitria(Zurich,Switzerland)在CHO K1细胞中瞬时表达,使用蛋白质A琼脂糖纯化,并且通过质谱法进行分析。

[0439] 曲妥珠单抗的特定突变体源自文献(Qu等,J.Immunol. Methods 1998,213,131),具体而言是L196N和G164S,或从头设计,具体而言是V363T。在所有的3种情况下,第二个突变包括天冬酰胺297突变成谷氨酰胺(N297Q)以除去天然的糖基化位点。所有的突变均定位于曲妥珠单抗的重链上。

[0440] 用于质谱分析IgG的通用方案

[0441] 将50μg(经修饰的)IgG、1M Tris-HCl(pH 8.0)、1mM EDTA和30mM DTT的总体积约为70μL的溶液在37℃下孵育20分钟以还原二硫键,从而可以分析轻链和重链。如果存在的话,叠氮化物官能团在这些条件下被还原为胺。使用Amicon Ultra-0.5,Ultracel-10Membrane(Millipore),将还原的样品用milliQ清洗三次并浓缩至10μM(经修饰的)IgG。通过电喷雾电离飞行时间质谱(ESI-TOF)在JEOL AccuTOF上分析还原的IgG。使用Magtran软件得到去卷积谱。

[0442] 使用EndoS剪切IgG聚糖的通用方案

[0443] 使用来自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的endo S(购自Genovis,Sweden)进行IgG聚糖的剪切。在37℃下在25mM Tris(pH 8.0)中将IgG(10mg/mL)与endo S(最终浓度40U/mL)孵育16小时。

[0444] 使用EndoF2或EndoF3剪切IgG聚糖的通用方案

[0445] 使用来自Elizabethkingia miricola的endoF2 (购自QA Bio) 或来自Elizabethkingia meningosepticum的endoF3 (购自QA Bio) 进行IgG聚糖的剪切。在37℃下在100mM柠檬酸钠 (pH 4.5) 中将IgG (10mg/mL) 与endo F2 (100mU/mg IgG) 或EndoF3 (25mU/mg IgG) 孵育16小时。将去糖基化的IgG浓缩, 并使用Amicon Ultra-0.5、Ultracel-10Membrane (Millipore) 用25mM Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤。

[0446] 实施例4: 剪切天然的曲妥珠单抗

[0447] 对曲妥珠单抗进行上述的使用endo S的剪切方案, 所述曲妥珠单抗在50444、50591和50753和50914Da处具有基础(base) MS峰, 对应于糖基化异构体G0、G0F、G1F和G2F。对峰进行去卷积之后, 质谱显示出一个轻链峰和两个重链峰。两个重链峰属于来自核心G1NAc (Fuc) 取代的曲妥珠单抗的一个主要产物 (49496Da, 总重链的90%), 以及来自核心GlcNAc取代的曲妥珠单抗的一个副产物 (49351Da, 总重链的±10%)。

[0448] 实施例5: 剪切曲妥珠单抗-突变体N297Q, L196N

[0449] 对曲妥珠单抗- (N297Q, L196N) 突变体进行如上所述的使用endo F3的剪切方案, 所述曲妥珠单抗- (N297Q, L196N) 突变体在50934、51225和51516Da处具有基础MS峰, 对应于糖基化异构体G2F、G2FS和G2FS2。对峰进行去卷积之后, 质谱显示出一个轻链峰和一个重链主峰 (49514Da, 总重链的90%), 其来自核心GlcNAc (Fuc) -取代的曲妥珠单抗- (N297Q, L196N) 突变体。如上所述, 使用endo F2代替endo F3孵育得到相同的核心GlcNAc (Fuc) -取代的重链产物。另一方面, 曲妥珠单抗- (N297Q, L196N) 突变体在endo S作用下对水解为完全惰性的。

[0450] 实施例6: 剪切曲妥珠单抗-突变体N297Q, G164S

[0451] 对曲妥珠单抗- (N297Q, G164S) 突变体进行如上所述的使用endo F3的剪切方案, 所述曲妥珠单抗- (N297Q, G164S) 在50961、51251和51542Da处具有主基础(major base) MS峰, 对应于糖基化异构体G2F、G2FS和G2FS2。对峰进行去卷积之后, 质谱显示出一个轻链峰和一个重链主峰 (49537Da, 总重链的90%), 其来自核心GlcNAc (Fuc) -取代的曲妥珠单抗- (N297Q, G164S) 突变体。

[0452] 实施例7: 剪切曲妥珠单抗-突变体N297Q, V363T

[0453] 对曲妥珠单抗- (N297Q, V363T) 突变体进行如上所述的使用Endo F3的剪切方案, 所述曲妥珠单抗- (N297Q, V363T) 在50934、51227和51517Da处具有主基础MS峰, 对应于糖基化异构体G2F、G2FS和G2FS2。对峰进行去卷积之后, 质谱显示出一个轻链峰和一个轻链峰和一个重链主峰 (49515Da, 总重链的90%), 其来自核心GlcNAc (Fuc) -取代的曲妥珠单抗- (N297Q, V363T) 突变体。如上所述, 还使用EndoF2孵育得到核心GlcNAc (Fuc) -取代的重链产物。

[0454] 经修饰的糖糖基转移到IgG的通用方案

[0455] 使用牛β (1,4) -半乳糖转移酶的突变体β (1,4) -Gal-T1 (Y289L) 实现通过酶法将经修饰的糖引入到IgG上。在30℃下将去糖基化的IgG (如上所述制备的, 10mg/mL) 与来自UDP-糖28-31中之一的经修饰的UDP-糖衍生物 (0.4mM) 和β (1,4) -Gal-T1 (Y289L) (1mg/mL) 在10mM MnCl₂和25mM Tris-HCl (pH 8.0) 中孵育15小时。

[0456] 在4℃下将经修饰的IgG与蛋白质A琼脂糖 (40μL/mg IgG) 孵育2小时。用PBS冲洗蛋

白质A琼脂糖三次,用100mM甘氨酸-HCl (pH 2.7)洗脱IgG。洗脱后的IgG用1M Tris-HCl (pH 8.0)中和并浓缩,并使用Amicon Ultra-0.5、Ultracel-10Membrane (Millipore)用PBS清洗至浓度为10mg/mL。

[0457] 实施例8:UDP-糖28 (UDP-GalNAz)糖基转移至去糖基化的曲妥珠单抗

[0458] 用UDP-GalNAz 28对去糖基化的曲妥珠单抗进行如上所述的糖基化转移方案。在蛋白质A亲和纯化之后,质谱分析表明形成了一个主要产物(49713Da,总重链的90%),其由GalNAz转移至核心GlcNAc (Fuc)取代的曲妥珠单抗而产生;和一个副产物(49566Da,总重链的±10%),其由GalNAz转移至核心GlcNAc取代的曲妥珠单抗而产生。

[0459] 实施例9:UDP-糖28 (UDP-GalNAz)糖基转移至去糖基化的曲妥珠单抗突变体

[0460] 用UDP-GalNAz 28对曲妥珠单抗-(N297Q,L196N)、曲妥珠单抗-(N297Q,G164S)和曲妥珠单抗-(N297Q,V363T)进行如上所述的糖基转移方案。可观察到曲妥珠单抗-(N297Q,L196N) (49733Da,总重链的90%)、曲妥珠单抗-(N297Q,G164S) (49757Da,总重链的90%)和曲妥珠单抗-(N297Q,V363T) (49734Da,总重链的90%)均有一个重链主峰。对于所有的三种突变体而言,这对应于核心GlcNAc (Fuc) GalNAz-取代的重链。

[0461] 实施例10:UDP-糖29 (UDP-GalNAcSAc)糖基转移至去糖基化的曲妥珠单抗

[0462] 在30℃下将剪切过的曲妥珠单抗与UDP-GalNAcSAc (29) (18.5μL,10mM)和β(1,4)-Gal-T1 (Y289L) (12.5μL,2mg/mL)在10mM MnCl₂和25mM Tris-HCl (pH 6.0)中孵育16小时。用ProtA纯化粗品混合物,为了维持低pH,使用25mM Tris-HCl (pH 6.0)洗涤柱,用甘氨酸-HCl缓冲液(pH 2.7,0.1M)洗脱之后,用Tris-HCl (pH 7.2,1M)中和洗脱缓冲液。

[0463] 通过该方案得到1.1mg IgG,对其进行AccUTOF分析显示95%的trast-(GalNAcSH)₂转化为单一的所需产物(除去乙酸酯基团的GalNAcSAc,这可能是由于DTT使其进行原位去保护)(质量49729,预期质量49730)。其余的5%是剩余的起始原料(质量49494)。

[0464] 实施例11:UDP-糖29 (UDP-GalNAcSAc)糖基转移至去糖基化的曲妥珠单抗(N297Q,V363T)

[0465] 在30℃下将剪切过的曲妥珠单抗(N297Q,V363T) (100μL,10mg/mL,6.6nmol)与UDP-GalNAcSAc (29) (14μL,10mM)和β(1,4)-Gal-T1 (Y289L) (10μL,2mg/mL)在10mM MnCl₂和25mM Tris-HCl (pH 6.0)中孵育16小时。用ProtA纯化粗品混合物,为了维持低pH,使用25mM Tris-HCl (pH 6.0)洗涤柱,用甘氨酸-HCl缓冲液(pH 2.7,0.1M)洗脱之后,用Tris-HCl (pH 7.2,1M)中和洗脱缓冲液。通过该方案得到0.25mg IgG,对其进行AccUTOF分析显示存在单一的所需产物trast (N297Q,V363T) - (GalNAcSH)₂ (除去乙酸酯基的GalNAcSAc,这可能是由于DTT使其进行原位去保护)(质量49744,预期质量49748)。

[0466] 实施例12:UDP-糖30 (UDP-GalNAcCl)糖基转移至去糖基化的曲妥珠单抗

[0467] 在30℃下将剪切过的曲妥珠单抗(100μL,10mg/mL,6.6nmol)与UDP-GalNAcCl (30) (5μL,10mM)和β(1,4)-Gal-T1 (Y289L) (5μL,2mg/mL)在10mM MnCl₂和25mM Tris-HCl (pH 6.0)中孵育16小时。根据用于GalNAcSAc的方案,用ProtA纯化粗品混合物以提供trast-(GalNAcCl)₂ (0.36mg)。AccUTOF分析显示完全转化为所需产物(质量49731,预期质量49732)。

[0468] 实施例13:UDP-糖30 (UDP-GalNAcCl)糖基转移至去糖基化的曲妥珠单抗(N297Q,

V363T)

[0469] 在30℃下将剪切过的曲妥珠单抗N297Q V363T突变体(100μL, 10mg/mL, 6.6nmol)与UDP-GalNAcCl (30) (5μL, 10mM) 和β(1,4)-Gal-T1 (Y289L) (5μL, 2mg/mL) 在10mM MnCl₂和25mM Tris-HCl (pH 6.0) 中孵育16小时。根据用于GalNAcSAc的方案, 用ProtA纯化粗品混合物以提供trast-(GalNAcCl)₂ (0.35mg)。AccuTOF分析显示完全转化为所需产物(质量49750, 预期质量49750)。

[0470] 实施例14: BCN-vc-PABA-美登木素生物碱35与曲妥珠单抗突变体的缀合

[0471] 在蛋白质A纯化后, 将曲妥珠单抗-(N297Q, L196N)、曲妥珠单抗-(N297Q, G164S) 和曲妥珠单抗-(N297Q, V363T) 与BCN-vc-PABA-美登木素生物碱35缀合。在PBS中将所有的三种曲妥珠单抗突变体浓缩至100μM, 然后加入到BCN-vc-PABA-美登木素生物碱(DMF中4当量)中并且在室温下孵育过夜。为得到至少90%的转化, 重复该步骤5次以获得曲妥珠单抗-(L196N, N297Q)-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂ (51100至51500Da之间的重链产物, 具有51187Da的主峰, 该主峰对应于与BCN-vc-PABA-美登木素生物碱缀合的重链, 总重链的±95%)、曲妥珠单抗-(N297Q, V363T)-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂ (51100至51500Da之间的重链产物, 具有51189Da的主峰, 该主峰对应于与BCN-vc-PABA-美登木素生物碱缀合的重链, 总重链的+80%) 和曲妥珠单抗-(G164S, N297Q)-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂ (51100至51500Da之间的重链产物, 具有51218Da的主峰, 该主峰对应于与BCN-vc-PABA-美登木素生物碱缀合的重链, 总重链的+90%)。

[0472] 实施例15: 体外功效

[0473] 将SK-Br-3 (Her2+)、SK-OV-3 (Her2+) 和MDA-MB-231 (Her2-) 细胞置于96孔板(5000个细胞/孔)中的补充有10%胎牛血清(FCS) (Invitrogen, 200μL/孔)的RPMI 1640GlutaMAX (Invitrogen) 中, 并在37℃下和5%CO₂中孵育过夜。在补充有10%FCS的RPMI 1640GlutaMAX中制备无菌过滤的化合物的三倍稀释系列(范围为±0.002至100nM)。在去除培养基后, 分四份添加所述浓度系列并在37℃下和5%CO₂中孵育三天。用补充有10%FCS的RPMI 1640GlutaMAX中的0.01mg/mL刃天青(resazurin) (Sigma Aldrich) 替换所述培养基。在37℃下和5%CO₂中4至6小时后, 用荧光光谱仪(Tecan Infinite 200)在540nm激发光和590nm发射光下检测荧光。通过设定无细胞的孔为0%的存活率以及具有最低剂量的化合物的孔为100%存活率而将相对荧光单位(RFU) 标准化为细胞存活百分数。对于每种条件, 示出了平均细胞存活百分数±sem。

[0474] 将曲妥珠单抗-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂、曲妥珠单抗(L196N, N297Q)-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂、曲妥珠单抗(G164S, N297Q)-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂、曲妥珠单抗(N297Q, V363T)-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂的体外细胞毒性与作为阳性对照的T-DM1和作为阴性对照的曲妥珠单抗和利妥昔单抗-(vc-PABA-美登木素生物碱)₂进行对比。所有基于曲妥珠单抗的ADC都影响Her阳性细胞系SK-Br-3和SK-OV-3的存活率, 但是不影响Her2-阴性细胞系MDA-MB-231的存活率, 这表明这些ADC特异性靶向Her2阳性细胞。在Her2阴性细胞系MDA-MB-231中, 只有T-DM1在最高浓度(100nM) 下显示出细胞存活率的轻微降低。

[0475] 实施例16: GalT突变体Y289N、Y289F、Y289M、Y289V、Y289A、Y289G和Y289I的克隆和表达

[0476] 通过重叠延伸PCR方法从包含编码由130-402氨基酸残基组成的GalT的催化结构域的序列的构建体来扩增GalT突变体基因。野生型酶是由SEQ ID NO:17代表。对于Y289N突变体(由SEQ ID NO:18代表),用一对引物扩增第一DNA片段:Oligo38_GalT_External_Fw (CAG CGA CAT ATG TCG CTG ACC GCA TGC CCT GAG GAG TCC,由SEQ ID NO:1代表)和Oligo19_GalT_Y289N_Rw (GAC ACC TCC AAA GTT CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA,由SEQ ID NO:2代表)。NdeI限制性位点加了下划线,同时突变位点用粗体突出显示。用一对引物扩增第二片段:Oligo29_GalT_External_Rw (CTG ATG GAT GGA TCC CTA GCT CGG CGT CCC GAT GTC CAC,由SEQ ID NO:3代表)和Oligo18_GalT_Y289N_Fw (CCT TAC GTG CAG AAC TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA,由SEQ ID NO:4代表)。BamHI限制性位点加了下划线,同时突变位点用粗体突出显示。使用Oligo38_GalT_External_Fw和Oligo29_GalT_External_Rw引物在第二轮PCR中将第一轮PCR产生的两个片段融合。在用NdeI和BamHI消化后,将此片段连接至用相同的限制性酶切割的pET16b载体中。新构建的表达载体包含编码Y289N突变体的基因和编码来自pET16b载体的His⁻标签的序列,其通过DNA测序结果确认。对于Y289F(由SEQ ID NO:19代表)、Y289M(由SEQ ID NO:20代表)、Y289I(由SEQ ID NO:21代表)、Y289V(由SEQ ID NO:22代表)、Y289A(由SEQ ID NO:23代表)和Y289G(由SEQ ID NO:24代表)突变体的构建,使用同样的方法,其中突变位点分别变为编码苯丙氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸或甘氨酸的TTT、ATG、ATT、GTG、GCG或GGC三联体。更具体而言,对于Y289F的构建,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:5的一对引物来扩增第一DNA片段,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:6(指的是表1的相关序列)的一对引物来扩增第二片段。此外,对于Y289M的构建,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:7的一对引物来扩增第一DNA片段,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:8的一对引物来扩增第二片段。对于Y289I的构建,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:9的一对引物来扩增第一DNA片段,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:10的一对引物来扩增第二片段。对于Y289V的构建,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:11的一对引物来扩增第一DNA片段,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:12的一对引物来扩增第二片段。对于Y289A的构建,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:13的一对引物来扩增第一DNA片段,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:14的一对引物来扩增第二片段。对于Y289G的构建,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:15的一对引物来扩增第一DNA片段,使用在本文中被定义为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:16(指的是表1的相关序列)的一对引物来扩增第二片段。

[0477] 根据Qasba等人报道的方法(Prot. Expr. Pur. 2003, 30, 219-229),将GalT突变体表达、分离并且从包含体重折叠。重折叠之后,去除沉淀物并使用Ni-NTA柱(HisTrap excel 1mL柱,GE Healthcare)分离可溶且折叠的蛋白质。在用25mM Tris-HCl (pH 8.0)、300mM NaCl和200mM咪唑洗脱后,在25mM Tris-HCl (pH 8.0)中透析所述蛋白质并使用旋转滤器(带有Ultracel-10膜的Amicon Ultra-15离心过滤单元,Merck Millipore)浓缩到2mg/mL。

[0478] 表1所用引物的序列识别

[0479]

SEQ ID NO	核苷酸序列
SEQ ID NO:1	CAG CGA <u>CAT ATG</u> TCG CTG ACC GCA TGC CCT GAG GAG TCC
SEQ ID NO:2	GAC ACC TCC AAA GTT CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA

SEQ ID NO:3	CTG ATG GAT <u>GGA TCC</u> CTA GCT CGG CGT CCC GAT GTC CAC
SEQ ID NO:4	CCT TAC GTG CAG AAC TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO:5	GAC ACC TCC AAA AAA CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO:6	CCT TAC GTG CAG TTT TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO:7	GAC ACC TCC AAA CAT CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO:8	CCT TAC GTG CAG ATG TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO:9	GAC ACC TCC AAA AAT CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO:10	CCT TAC GTG CAG ATT TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO:11	GAC ACC TCC AAA CAC CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO:12	CCT TAC GTG CAG GTG TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO:13	GAC ACC TCC AAA CGC CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO:14	CCT TAC GTG CAG GCG TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA
SEQ ID NO:15	GAC ACC TCC AAA GCC CTG CAC GTA AGG TAG GCT AAA
SEQ ID NO:16	CCT TAC GTG CAG GGC TTT GGA GGT GTC TCT GCT CTA

[0480] 实施例17:具有不同缀合位点的ADC的聚集研究

[0481] 使用来自不同的曲妥珠单抗变体的5种ADC研究了美登木素生物碱的缀合物位点对于对应的ADC聚集的影响。使用天然曲妥珠单抗和4种曲妥珠单抗突变体来制备这些ADC,所述曲妥珠单抗突变体g自在重链上含有单个糖基化位点(曲妥珠单抗(G164S,N300Q)、曲妥珠单抗(L196N,N300Q)、曲妥珠单抗(K291T,N300Q)和曲妥珠单抗(N300Q,V366T))。通过引入GalNAz而酶法重塑聚糖,然后与BCN-美登木素35缀合来制备所述ADC。通过尺寸排阻色谱法在Superdex200 10/300GL柱(GE Healthcare)上纯化所有的ADC以得到单体级分。纯化后,在37℃下在浓度为1mg/ml的磷酸盐缓冲盐水中孵育所述ADC。在0、1和2周后,使用Superdex200PC 3.2/30柱(GE Healthcare)对聚集的水平进行分析。与T0相比,1和2周后聚集的增加示于表2。与来自天然曲妥珠单抗的ADC相比,来自曲妥珠单抗(G164S,N300Q)和曲妥珠单抗(L196N,N300Q)的ADC显示出较少的聚集。

[0482] 表2.ADC的聚集研究

	由下述物质制备的 ADC	聚集的增加 (%)	
		1 周	2 周
	曲妥珠单抗	0.03	0.77
[0483]	曲妥珠单抗 (G164S, N300Q)	0.16	0.29
	曲妥珠单抗 (L196N, N300Q)	-0.12	-0.05
	曲妥珠单抗 (N300Q, K291T)	0.36	0.89
	曲妥珠单抗 (N300Q, V366T)	0.63	0.75

[0484] 实施例18:体内功效

[0485] 用氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉雌性SHO小鼠(Cr1:SHO-Prkdcscid Hrhr,实验阶段开始时为6至9周龄,从法国L'Arbresles的Charles River实验室得到),用氯己定溶液对皮肤进行灭菌,在肩胛间区的水平位置切开,将20mm³肿瘤块(来自HBCx-13B乳腺癌患者的异种移

植物模型)置于皮下组织中并用夹子闭合皮肤。当肿瘤体积在60至200mm³的范围内时,用载体、用曲妥珠单抗-(GalNAz-vc-PABA-美登木素)₂或用糖基化突变体曲妥珠单抗(G164S, N300Q)、曲妥珠单抗(L196N, N300Q)、曲妥珠单抗(K291T, N300Q)、曲妥珠单抗(N300Q, V366T)、曲妥珠单抗(L177N, N300Q)或曲妥珠单抗(LC-R18N, HC-N300Q)中的一种对具有十只小鼠的组进行静脉注射,剂量全部为6mg/kg。在第0、4、7、11、14、18、21、25和28天对肿瘤进行测量。

序列表

	<110> 西纳福克斯股份有限公司	
	<120> 糖基改造的抗体、抗体-缀合物及其制备方法	
	<130> P6047951PCT	
	<150> EP 14165581.1	
	<151> 2014-04-23	
	<150> EP 13188585.7	
	<151> 2013-10-14	
	<160> 24	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物序列	
	<400> 1	
	cagcgacata tgtcgctgac cgcatgccct gaggagtcc	39
[0001]	<210> 2	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物序列	
	<400> 2	
	gacacctcca aagttctgca cgtaaggtag gctaaa	36
	<210> 3	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物序列	
	<400> 3	
	ctgatggatg gatccctagc tcggcgtccc gatgtccac	39
	<210> 4	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物序列	

	<400> 4 ccttacgtgc agaactttgg aggtgtctct gctcta	36
	<210> 5 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
	<400> 5 gacacctcca aaaaactgca cgtaaggtag gctaaa	36
	<210> 6 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
	<400> 6 ccttacgtgc agtttttgg aggtgtctct gctcta	36
[0002]	<210> 7 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
	<400> 7 gacacctcca aacatctgca cgtaaggtag gctaaa	36
	<210> 8 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
	<400> 8 ccttacgtgc agatgtttgg aggtgtctct gctcta	36
	<210> 9 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	

	<220> <223> 引物序列	
	<400> 9 gacacctcca aaaatctgca cgtaaggtag gctaaa	36
	<210> 10 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
	<400> 10 ccttacgtgc agatttttgg aggtgtctct gctcta	36
	<210> 11 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
[0003]	<400> 11 gacacctcca aacacctgca cgtaaggtag gctaaa	36
	<210> 12 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
	<400> 12 ccttacgtgc aggtgtttgg aggtgtctct gctcta	36
	<210> 13 <211> 36 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物序列	
	<400> 13 gacacctcca aacgcctgca cgtaaggtag gctaaa	36
	<210> 14 <211> 36 <212> DNA	

	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物序列	
	<400> 14	
	ccttacgtgc aggcgtttgg aggtgtctct gctcta	36
	<210> 15	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物序列	
	<400> 15	
	gacacctcca aagccctgca cgtaaggtag gctaaa	36
	<210> 16	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物序列	
[0004]	<400> 16	
	ccttacgtgc agggctttgg aggtgtctct gctcta	36
	<210> 17	
	<211> 402	
	<212> PRT	
	<213> 牛	
	<400> 17	
	Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly	
	1 5 10 15	
	Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu	
	20 25 30	
	His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg	
	35 40 45	
	Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser	
	50 55 60	
	His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg	
	65 70 75 80	

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

[0005]

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Tyr Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

[0006]

<210> 18

<211> 402

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 牛 GalT Y289N

<400> 18

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser
50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

[0007] Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Asn Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

<210> 19

<211> 402

<212> PRT

<213> 人工的

[0008]

<220>

<223> 牛 GalT Y289F

<400> 19

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser
50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

[0009]

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Phe Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

<210> 20

<211> 402

<212> PRT

<213> 人工的

[0010]

<220>

<223> 牛 GalT Y289M

<400> 20

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser
50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

[0011] Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Met Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

<210> 21
<211> 402
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 牛 GalT Y289I

[0012]

<400> 21

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser
50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

[0013]

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Ile Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

<210> 22
<211> 402
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 牛 GalT Y289V

[0014]

<400> 22

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser
50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

[0015] Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Val Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

<210> 23

<211> 402

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 牛 GalT Y289A

<400> 23

[0016]

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser
50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

[0017]

Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Ala Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

<210> 24

<211> 402

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 牛 GalT Y289G

<400> 24

[0018]

Met Lys Phe Arg Glu Pro Leu Leu Gly Gly Ser Ala Ala Met Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu
20 25 30

His Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Arg
35 40 45

Arg Leu Pro Gln Leu Val Gly Val His Pro Pro Leu Gln Gly Ser Ser
50 55 60

His Gly Ala Ala Ala Ile Gly Gln Pro Ser Gly Glu Leu Arg Leu Arg
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Pro Pro Pro Leu Gln Asn Ser Ser Lys Pro Arg Ser
85 90 95

Arg Ala Pro Ser Asn Leu Asp Ala Tyr Ser His Pro Gly Pro Gly Pro
100 105 110

Gly Pro Gly Ser Asn Leu Thr Ser Ala Pro Val Pro Ser Thr Thr Thr
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Ala Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro
130 135 140

Met Leu Ile Glu Phe Asn Ile Pro Val Asp Leu Lys Leu Ile Glu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Pro Lys Val Lys Leu Gly Gly Arg Tyr Thr Pro Met Asp Cys
165 170 175

Ile Ser Pro His Lys Val Ala Ile Ile Ile Leu Phe Arg Asn Arg Gln
180 185 190

Glu His Leu Lys Tyr Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Met Val Gln Arg
195 200 205

Gln Gln Leu Asp Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Glu Ser
210 215 220

Met Phe Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Lys Glu Ala Leu
225 230 235 240

[0019] Lys Asp Tyr Asp Tyr Asn Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile
245 250 255

Pro Met Asn Asp His Asn Thr Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His
260 265 270

Ile Ser Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln
275 280 285

Gly Phe Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Ser Ile
290 295 300

Asn Gly Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Phe Arg Gly Met Ser Val Ser Arg Pro Asn
325 330 335

Ala Val Ile Gly Lys Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys
340 345 350

Asn Glu Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu
355 360 365

Thr Met Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Met Val Leu Glu
370 375 380

[0020] Val Gln Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Lys Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr
385 390 395 400

Pro Ser

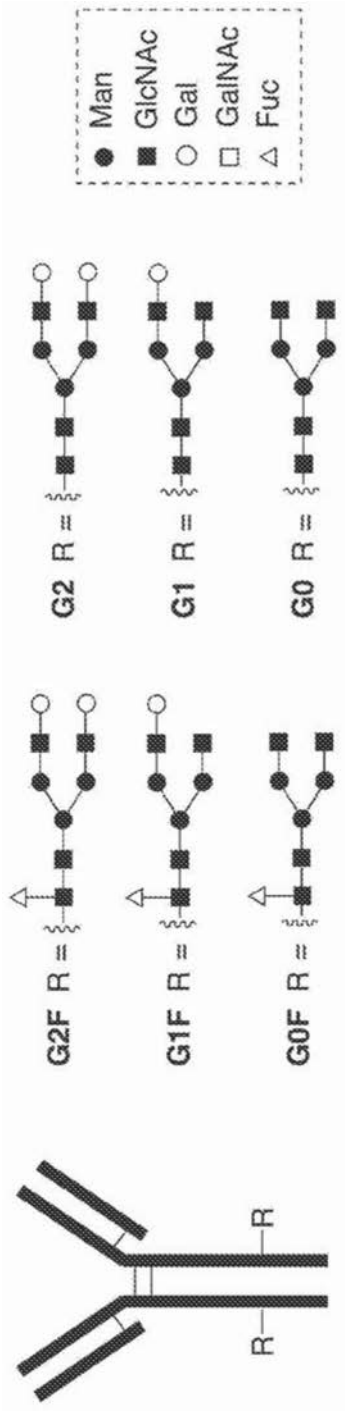


图1

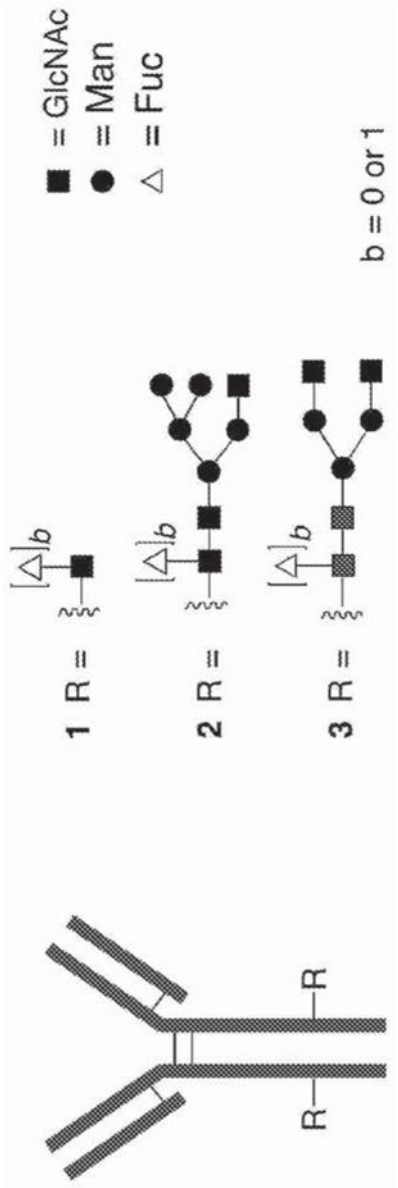


图2

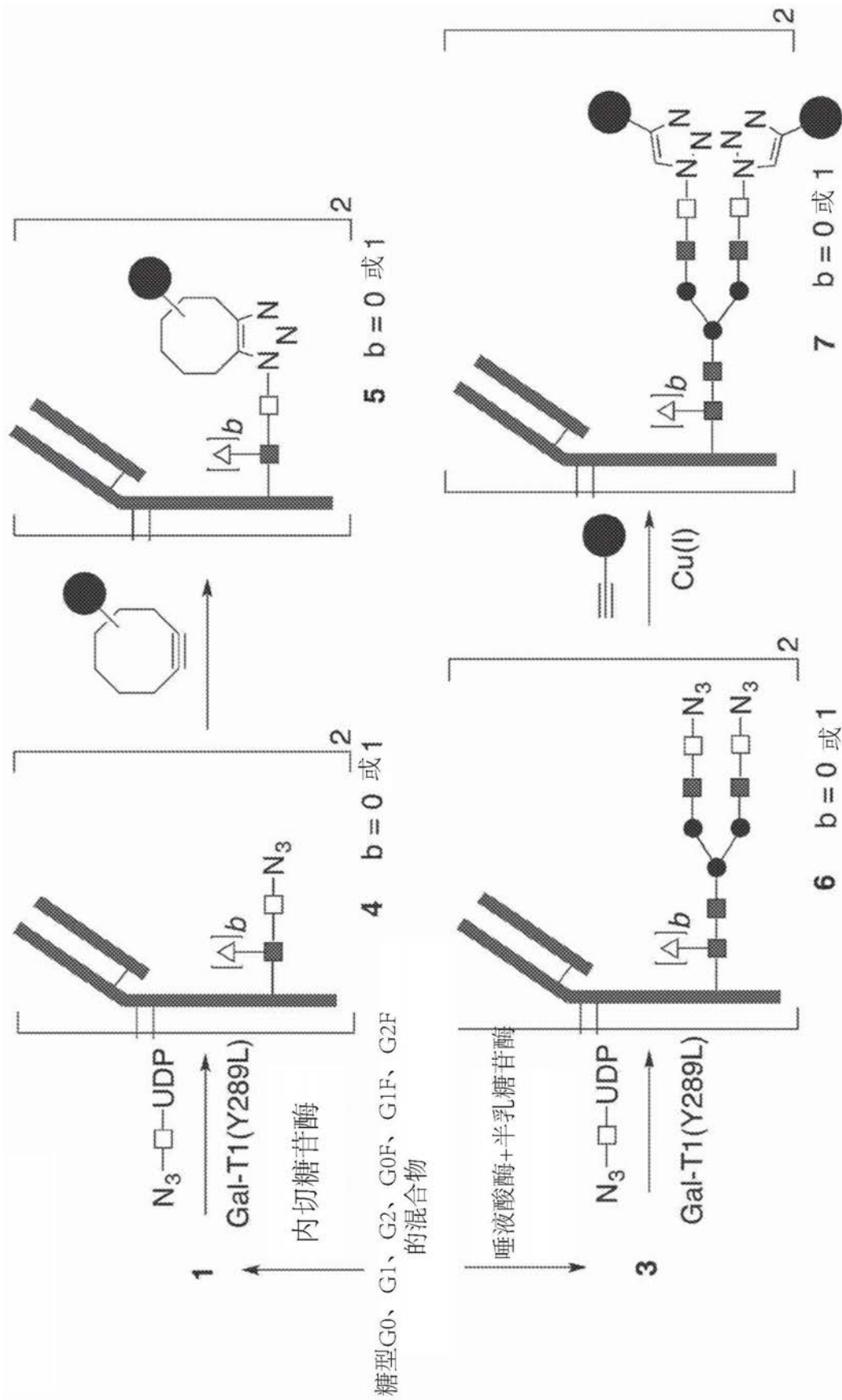


图3

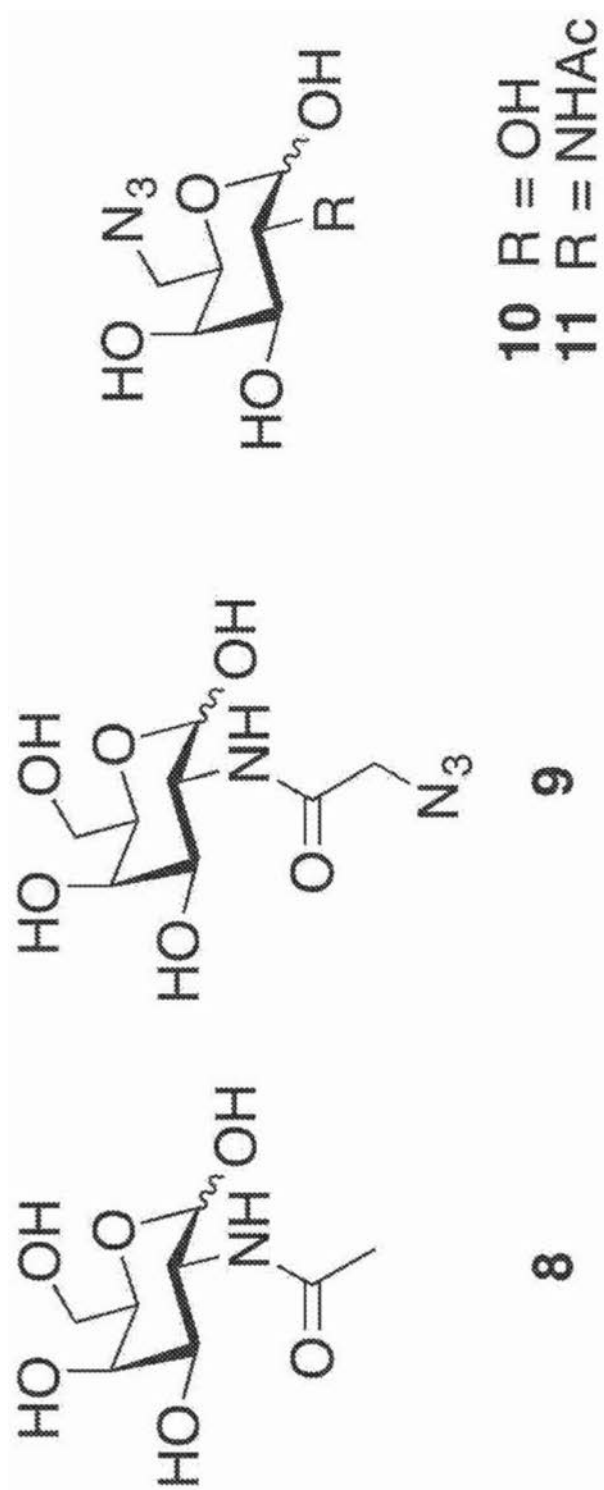


图4

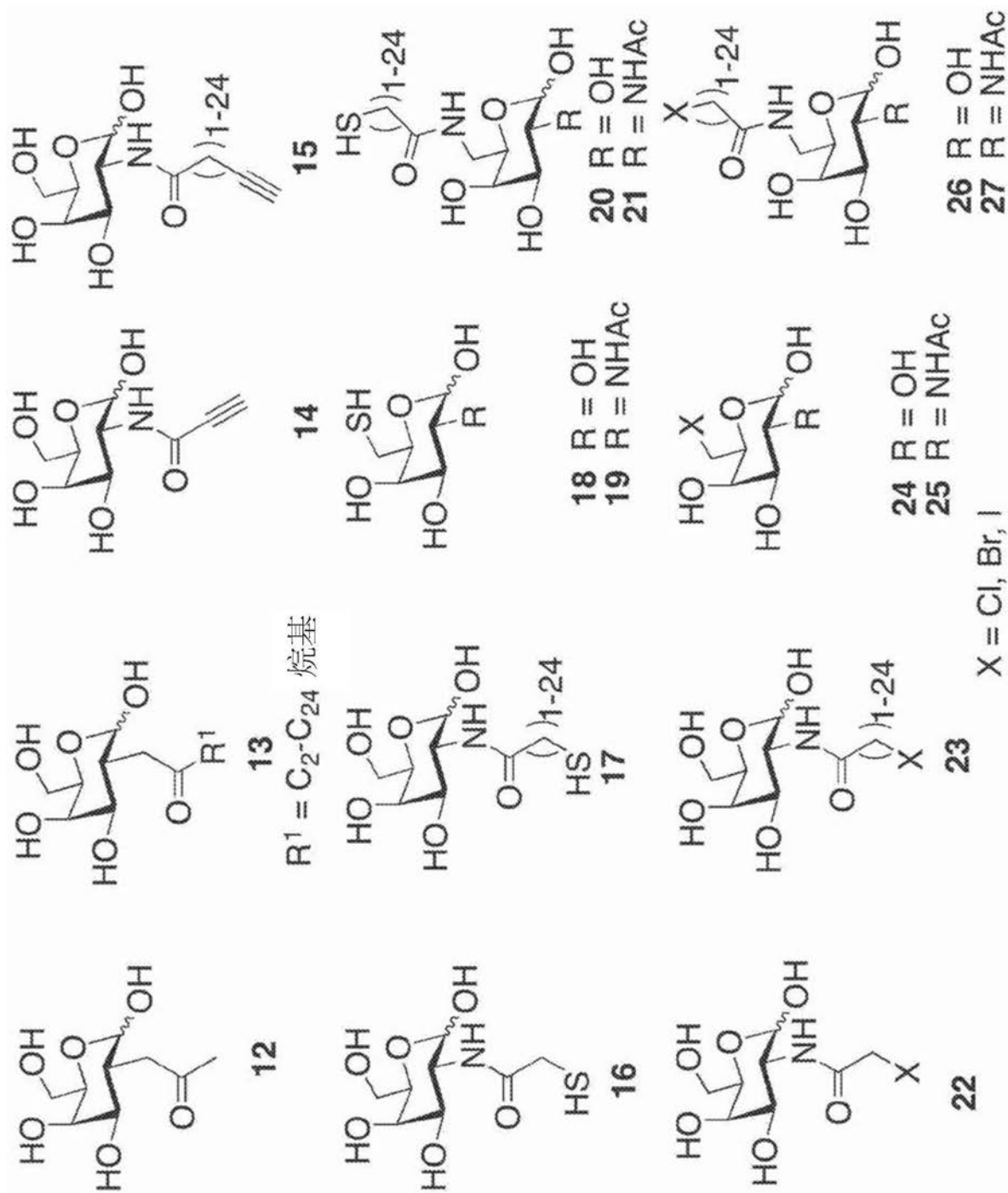


图5

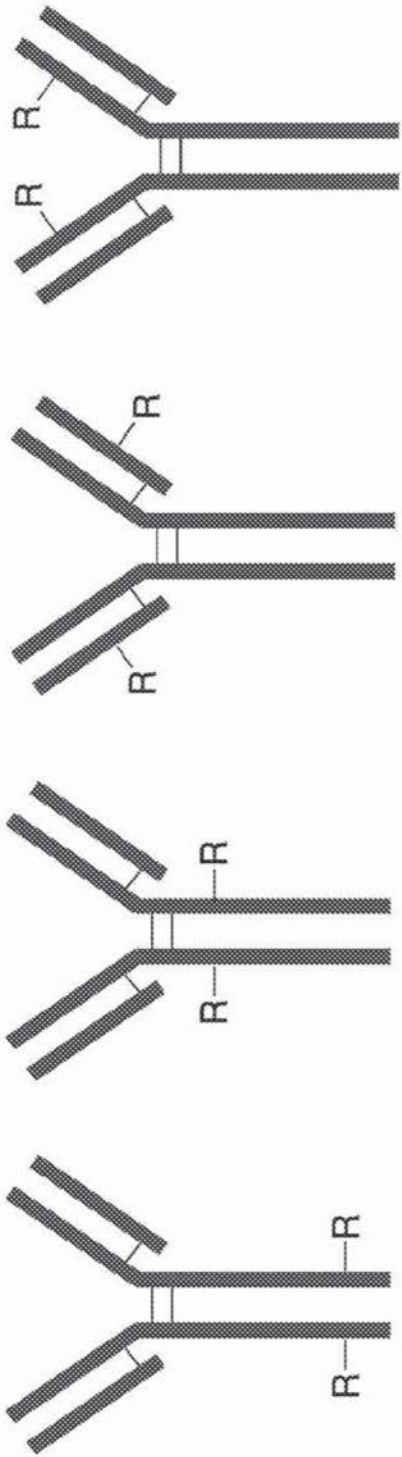


图6

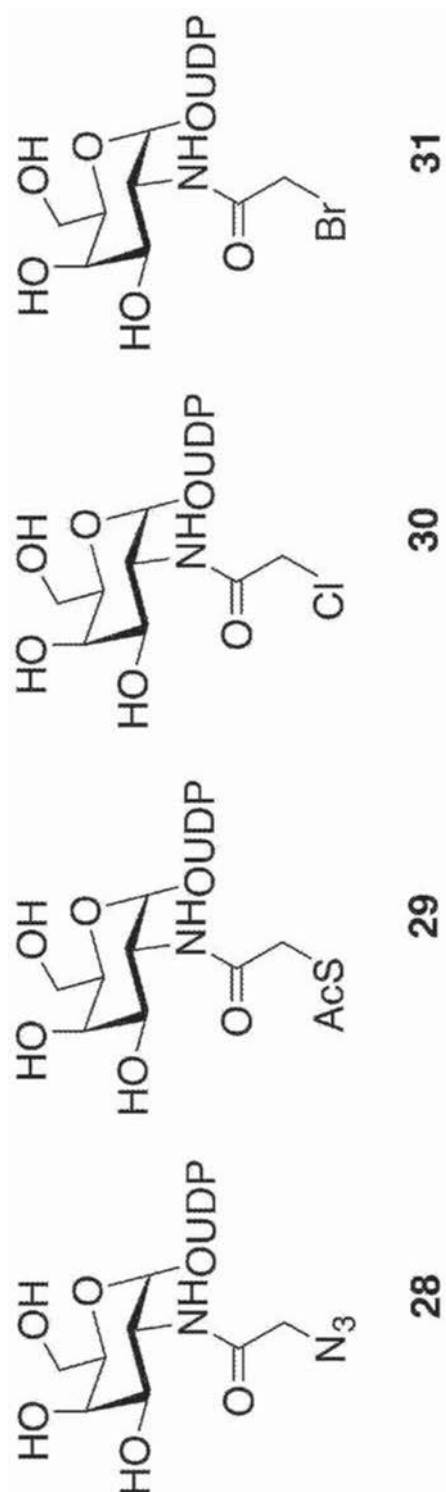


图7

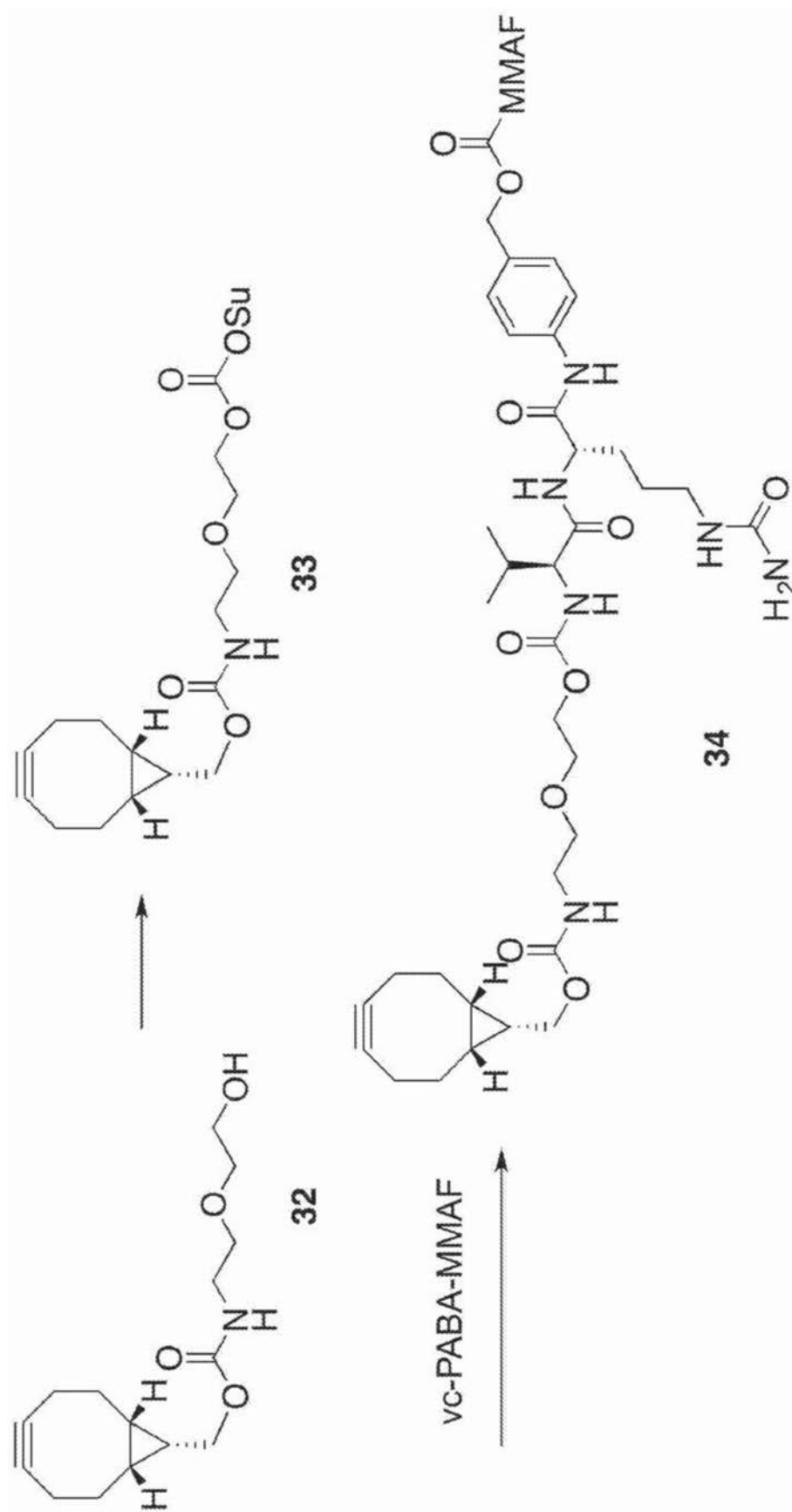


图8

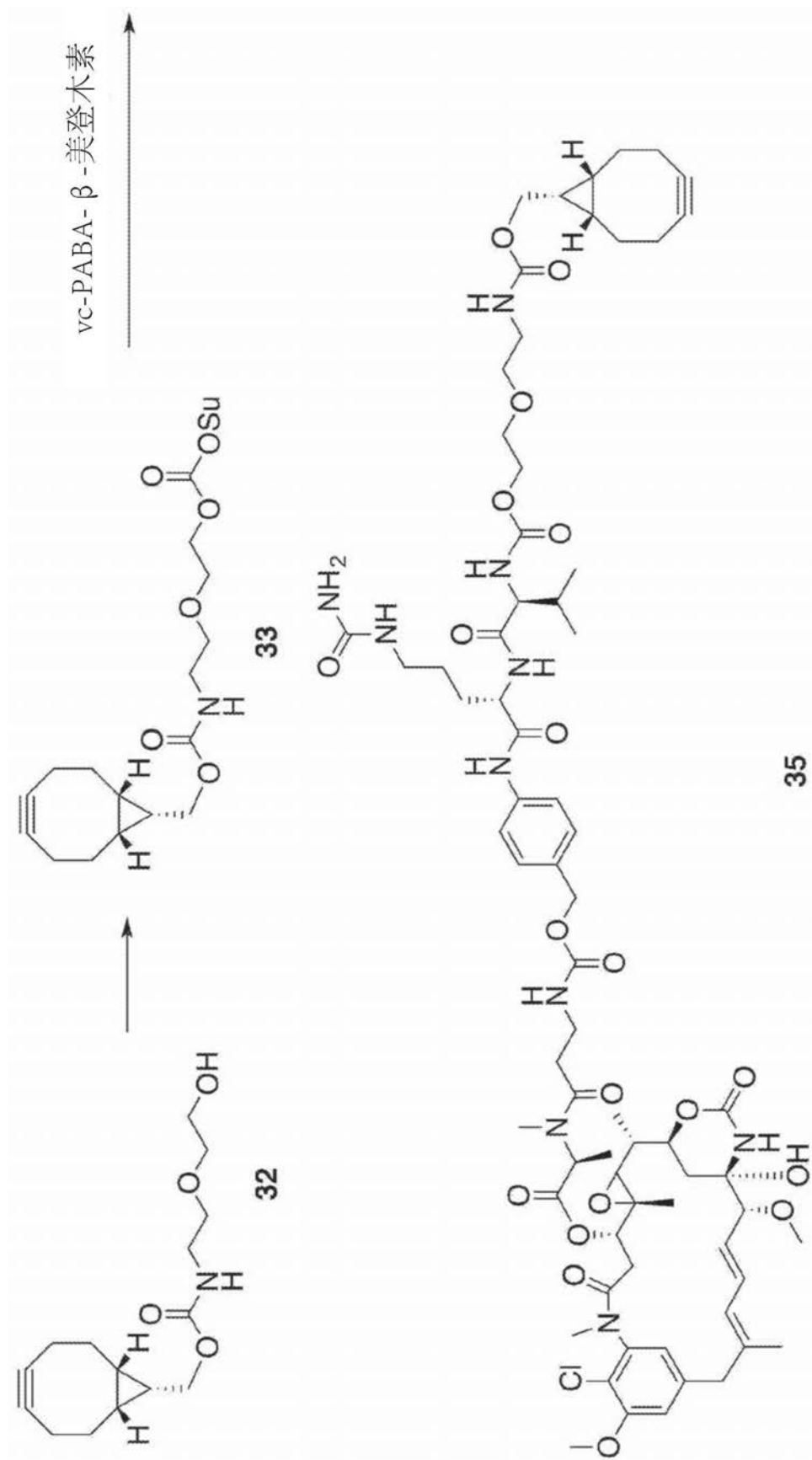


图9

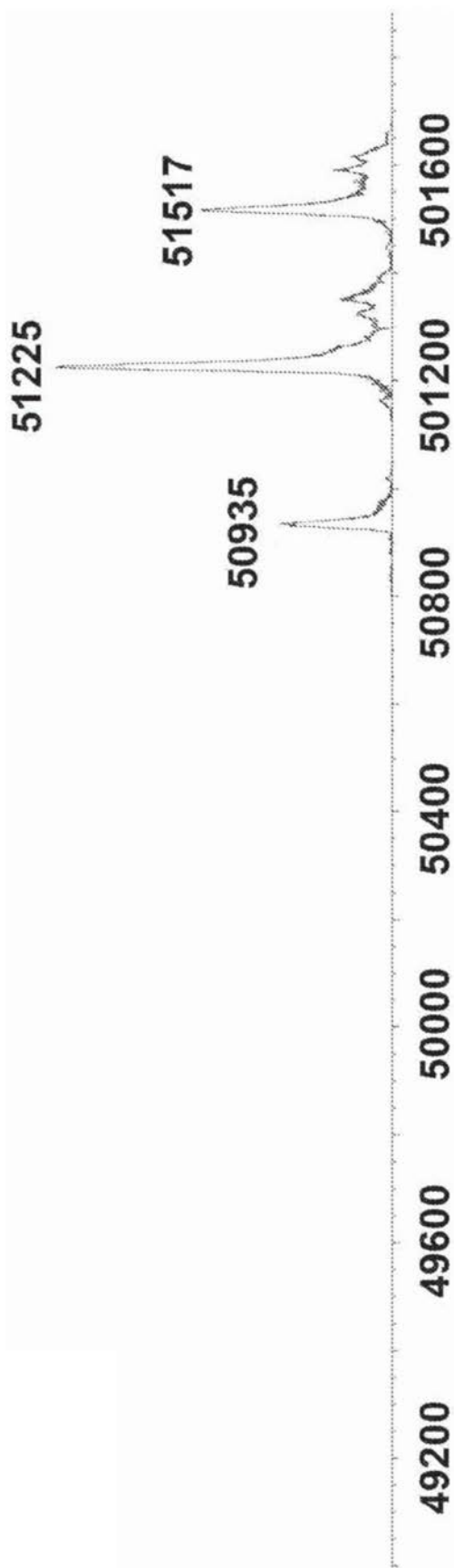


图 10a

49514

49224



图 10b

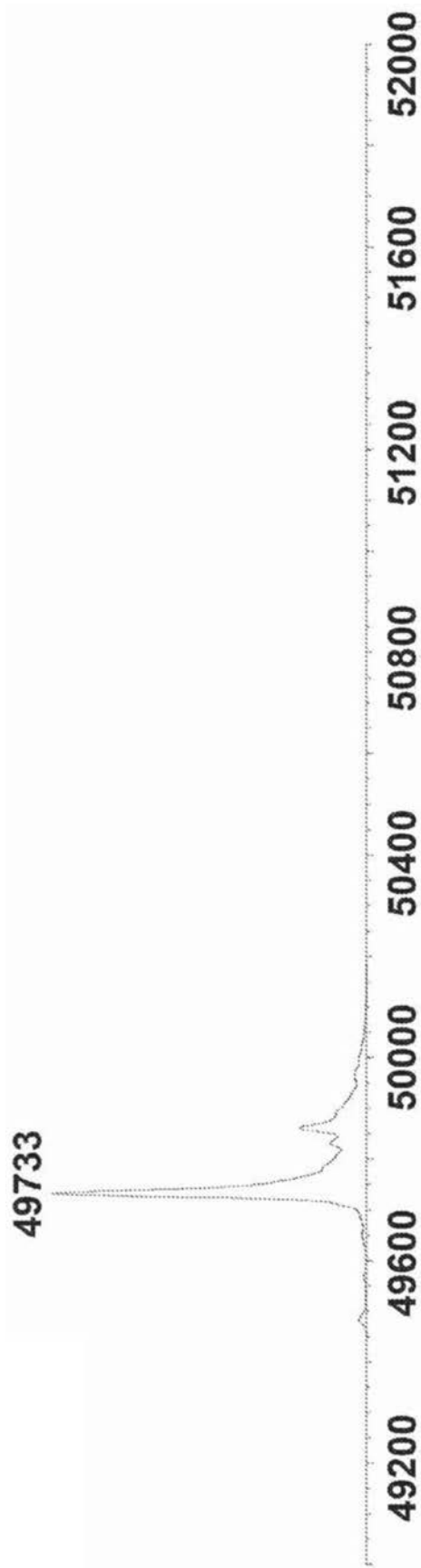


图 11a

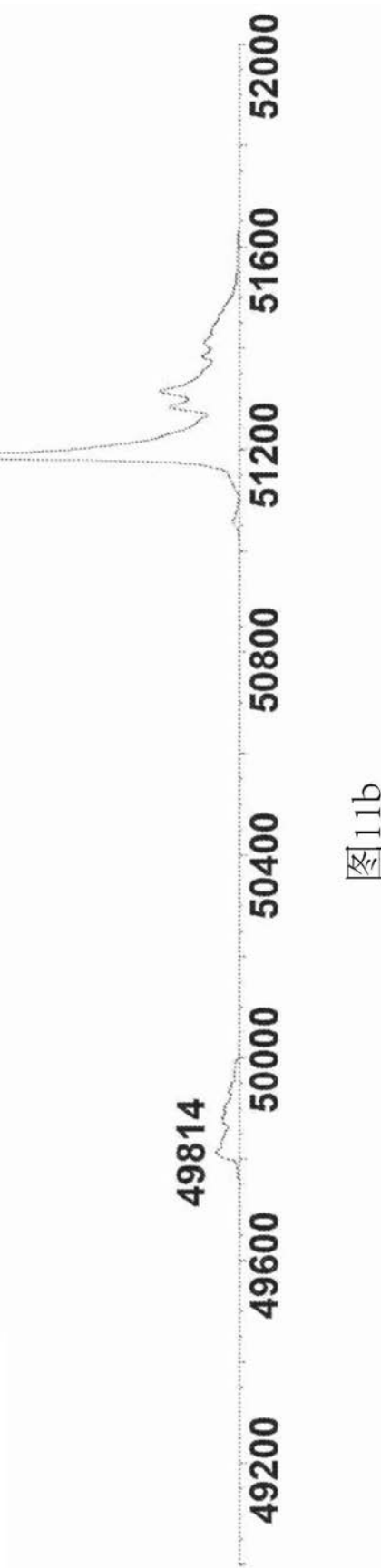


图 11b

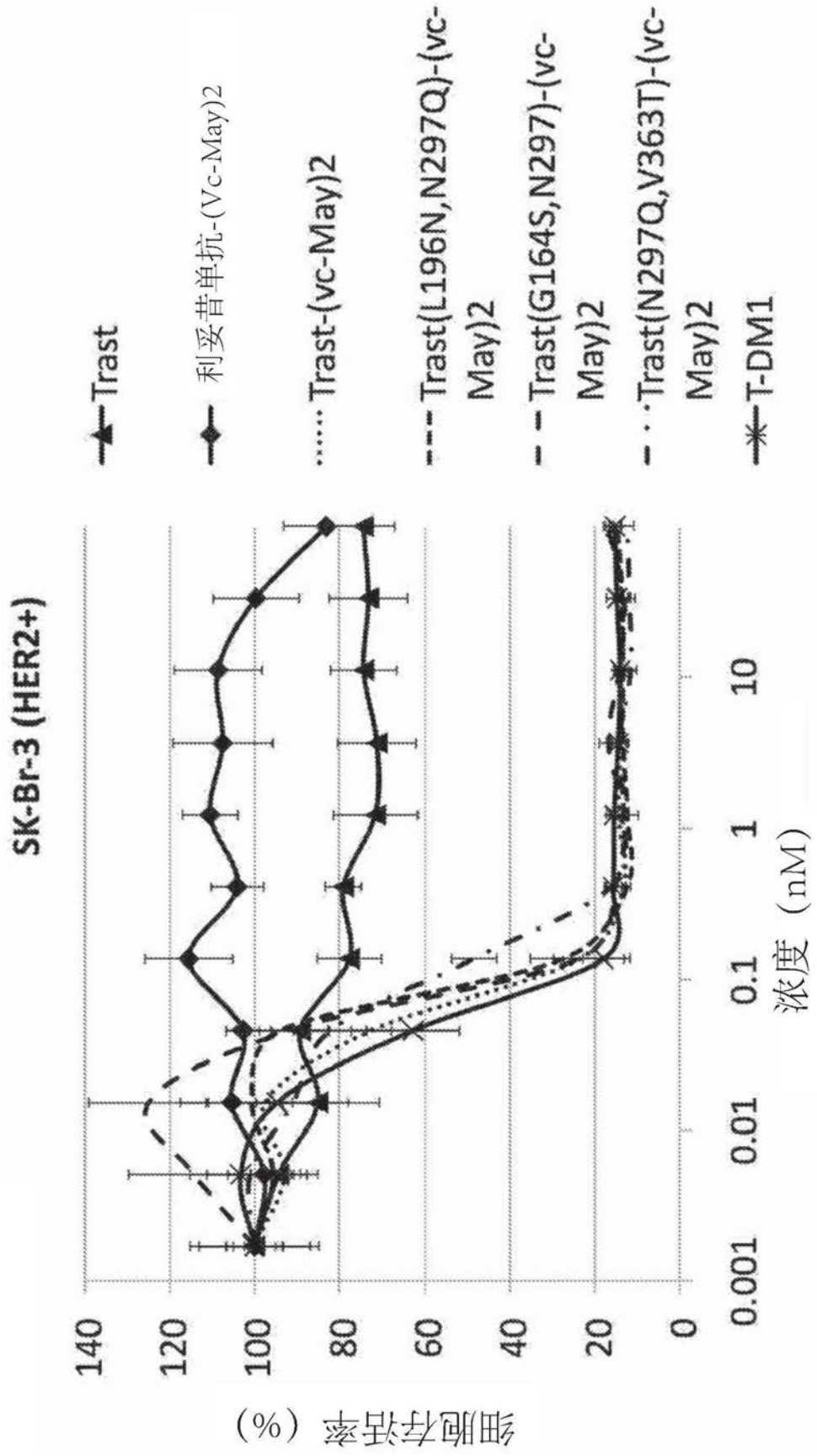


图12

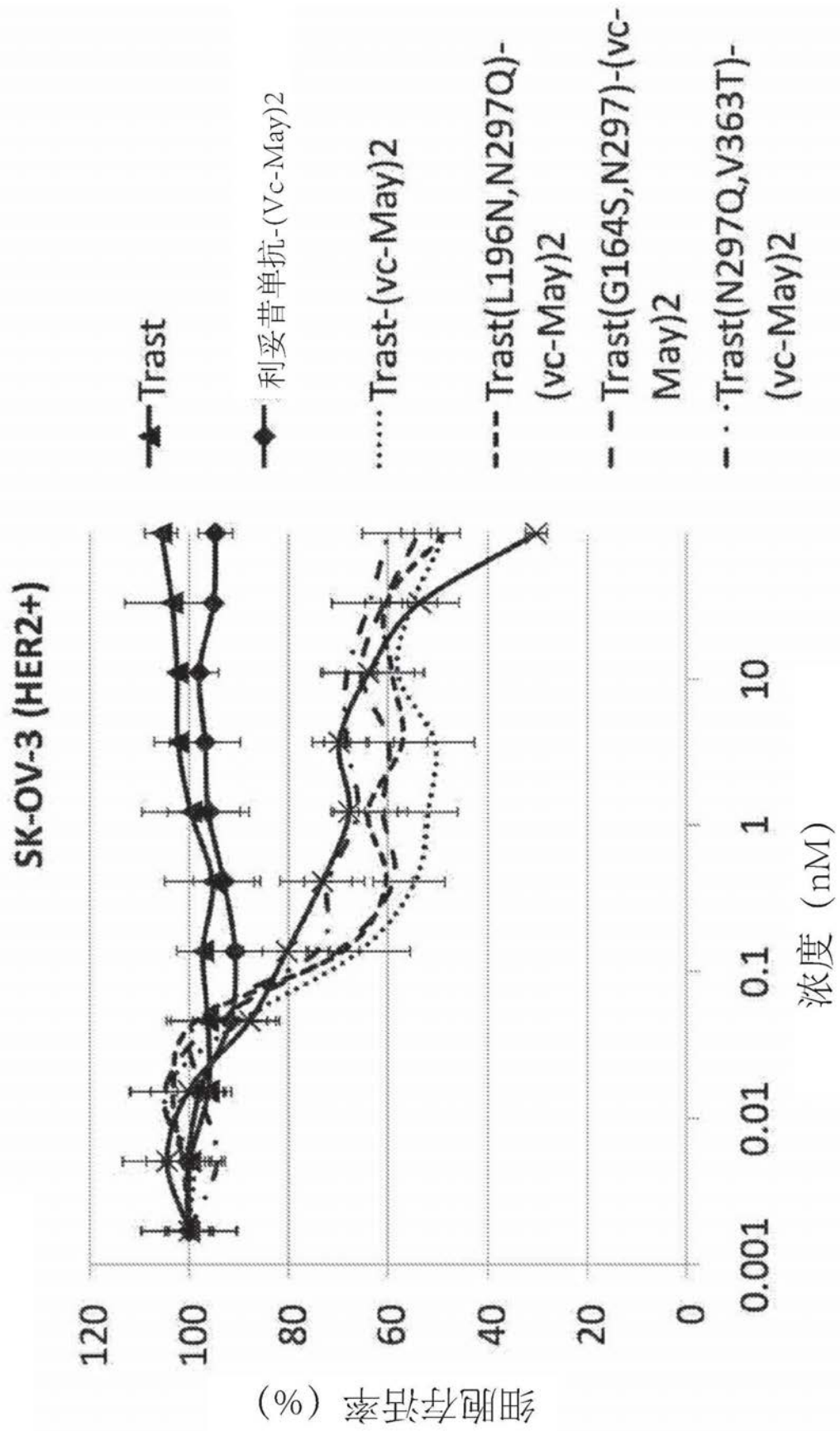


图13

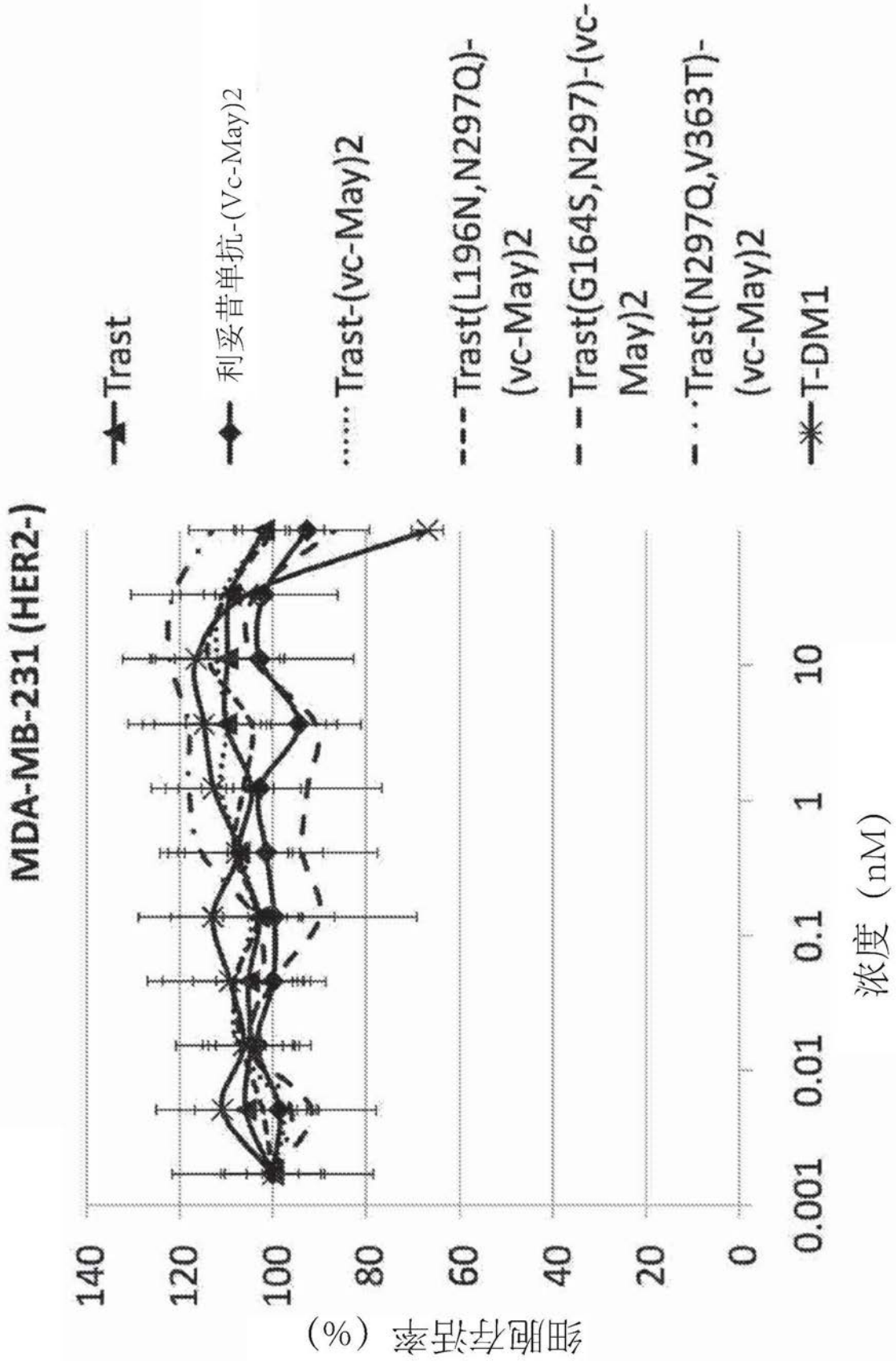


图14

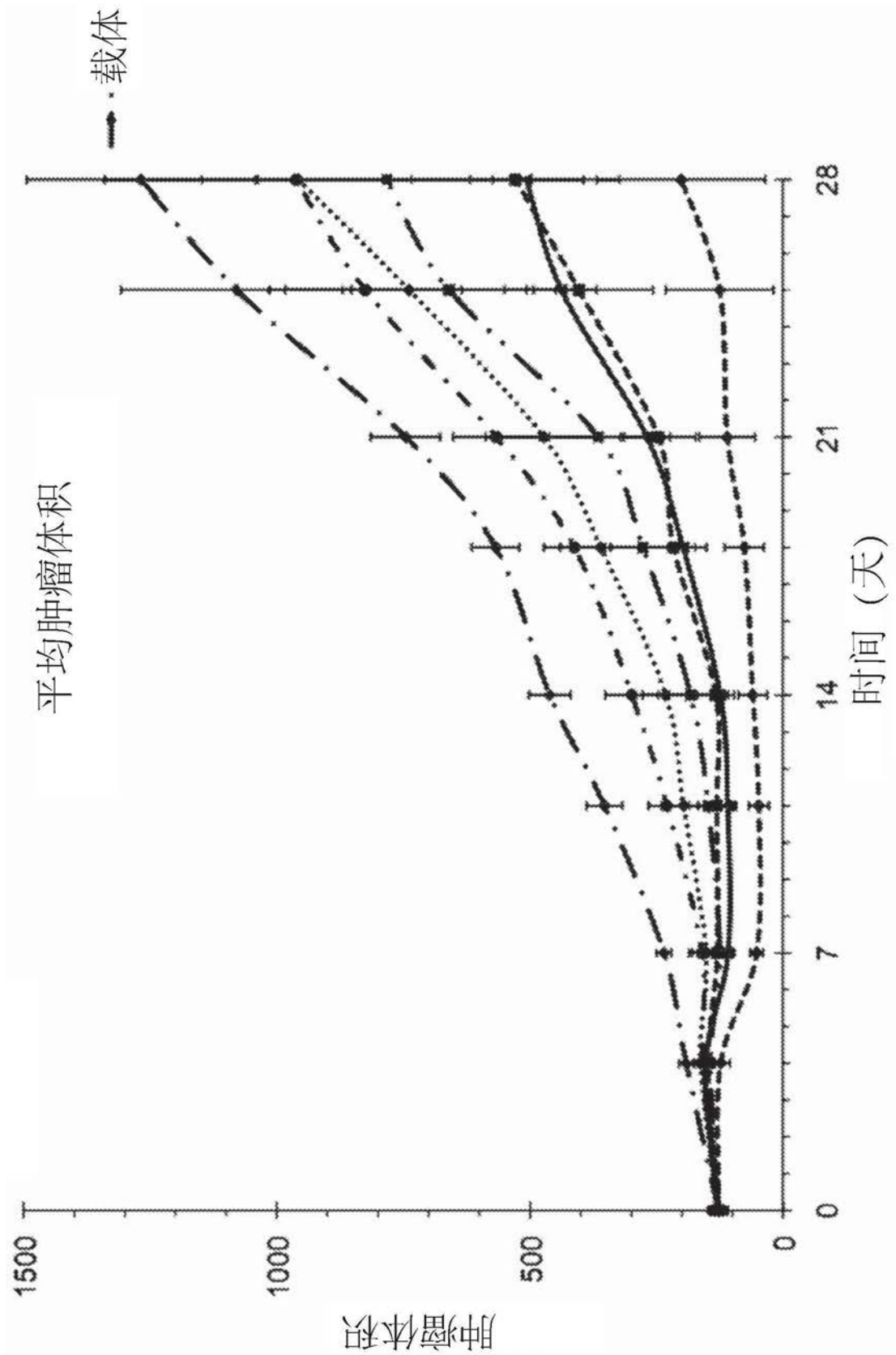


图15