



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114585382 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 03

(21) 申请号 202080072773.4

卡洛琳·R·贝尔托齐

(22) 申请日 2020.09.29

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据

专利代理师 李敏春 郑霞

62/908,305 2019.09.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2022.04.15

A61K 39/39 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 33/02 (2006.01)

PCT/US2020/053258 2020.09.29

A61P 37/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07H 21/04 (2006.01)

W02021/067261 EN 2021.04.08

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

(71) 申请人 小利兰·斯坦福大学理事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 伊迪特·萨吉夫-巴尔菲

罗纳德·莱维 凯特琳·米勒

詹妮弗·R·科克伦

权利要求书4页 说明书24页

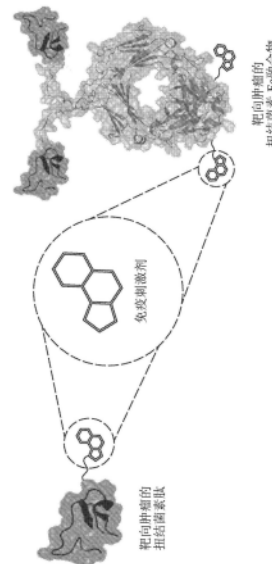
序列表15页 附图20页

(54) 发明名称

扭结菌素-免疫刺激缀合物和相关组合物和方法

(57) 摘要

提供了缀合物,其包含有包含与细胞表面分子结合的工程化环的扭结菌素肽以及通过接头与扭结菌素肽缀合的免疫刺激剂。根据一些实施方案,免疫刺激剂活化病原体识别受体(PRR)。例如,免疫刺激剂可以是Toll样受体(TLR)激动剂,例如TLR 7、TLR 8和/或TLR 9的激动剂。还提供了包含本公开的缀合物的组合物(例如药物组合物),以及包含此类组合物的试剂盒和使用此类组合物例如治疗患有癌症的个体的方法。还提供了制备本公开的缀合物的方法。



1. 一种缀合物,其包含:
包含与细胞表面分子结合的工程化环的扭结菌素肽;和
通过接头与所述扭结菌素肽缀合的免疫刺激剂。
2. 根据权利要求1所述的缀合物,其中所述免疫刺激剂活化病原体识别受体 (PRR)。
3. 根据权利要求2所述的缀合物,其中所述PRR选自由以下组成的组:To11样受体 (TLR)、RIG-I样受体 (RLR)、NOD样受体 (NLR)、C型凝集素受体 (CLR)、细胞溶质dsDNA传感器 (CDS)、干扰素基因刺激物 (STING) 及其任何组合。
4. 根据权利要求2所述的缀合物,其中所述免疫刺激剂是To11样受体 (TLR) 激动剂。
5. 根据权利要求4所述的缀合物,其中所述TLR激动剂是TLR 9激动剂。
6. 根据权利要求4或权利要求5所述的缀合物,其中所述TLR激动剂是基于寡核苷酸的TLR激动剂。
7. 根据权利要求6所述的缀合物,其中所述基于寡核苷酸的TLR激动剂包含一个或多个 CpG二核苷酸。
8. 根据权利要求7所述的缀合物,其中所述基于寡核苷酸的TLR激动剂是CpG寡聚脱氧核苷酸 (ODN)。
9. 根据权利要求8所述的缀合物,其中所述CpG ODN来自选自由以下组成的组的类别:A类 (D型)、B类 (K型) 和C类。
10. 根据权利要求4所述的缀合物,其中所述TLR激动剂是TLR 7、TLR8或两者的激动剂。
11. 根据权利要求10所述的缀合物,其中所述TLR激动剂包含咪唑喹啉 (IMZQ) 化合物。
12. 根据权利要求11,其中所述TLR激动剂选自由以下组成的组:T78a、Hybrid-2、对胺、间胺、XG1-236、DS802、CL075、CL097和R848。
13. 根据权利要求12所述的缀合物,其中所述TLR激动剂是T78a。
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽缀合至两个或更多个免疫刺激剂。
15. 根据权利要求14所述的缀合物,其中所述两个或更多个免疫刺激剂中的两个是相同的。
16. 根据权利要求14或权利要求15所述的缀合物,其中所述两个或更多个免疫刺激剂中的两个是不同的。
17. 根据权利要求14至16中任一项所述的缀合物,其中所述两个或更多个免疫刺激剂独立地选自根据权利要求2至13中任一项所定义的免疫刺激剂。
18. 根据权利要求1至17中任一项所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽进一步缀合至可检测标记。
19. 根据权利要求18所述的缀合物,其中所述可检测标记是体内显像剂。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽融合至一个或多个异源多肽。
21. 根据权利要求20所述的缀合物,其中所述一个或多个异源多肽包括Fc结构域、白蛋白、转铁蛋白、XTEN、同型氨基酸聚合物、脯氨酸-丙氨酸-丝氨酸聚合物、弹性蛋白样肽或其任何组合。
22. 根据权利要求21所述的缀合物,其中所述一个或多个异源多肽包含Fc结构域。

23. 根据权利要求22所述的缀合物,其中所述Fc结构域为人Fc结构域。
24. 根据权利要求20至23中任一项所述的缀合物,其中所述一个或多个异源多肽包括体内可检测的多肽。
25. 根据权利要求1至24中任一项所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽选自由以下组成的组:EETI-II肽、AgRP肽、 ω -芋螺毒素肽、Kalata B1肽、MCoTI-II肽、蜘蛛毒素肽和氯毒素肽。
26. 根据权利要求25所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽是EETI-II肽。
27. 根据权利要求26所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽包含与SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列具有70%或更大、80%或更大、90%或更大、95%或更大、或100%同一性的氨基酸序列。
28. 根据权利要求26所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽包含与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有70%或更大、80%或更大、90%或更大、95%或更大、或100%同一性的氨基酸序列。
29. 根据权利要求26所述的缀合物,其中所述扭结菌素肽包含与SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列具有70%或更大、80%或更大、90%或更大、95%或更大、或100%同一性的氨基酸序列。
30. 根据权利要求1至29中任一项所述的缀合物,其中所述细胞表面分子是癌细胞表面分子。
31. 根据权利要求30所述的缀合物,其中所述癌细胞表面分子存在于实体瘤的癌细胞上。
32. 根据权利要求30所述的缀合物,其中所述癌细胞表面分子存在于液体瘤的癌细胞上。
33. 根据权利要求1至32中任一项所述的缀合物,其中所述细胞表面分子是细胞表面受体。
34. 根据权利要求33所述的缀合物,其中所述细胞表面受体是细胞粘附受体。
35. 根据权利要求34所述的缀合物,其中所述细胞粘附受体是整合蛋白。
36. 根据权利要求35所述的缀合物,其中所述整合蛋白选自由以下组成的组: α v β 1整合蛋白、 α v β 3整合蛋白、 α v β 5整合蛋白、 α v β 6整合蛋白、 α 5 β 1整合蛋白以及其任何组合。
37. 根据权利要求34至36中任一项所述的缀合物,其中所述细胞粘附受体存在于肿瘤血管细胞上。
38. 根据权利要求33所述的缀合物,其中所述细胞表面受体选自由以下组成的组:生长因子受体、趋化因子受体、免疫细胞受体及其组合。
39. 根据权利要求1至32中任一项所述的缀合物,其中所述细胞表面分子是膜蛋白酶。
40. 一种组合物,其包含根据权利要求1至39中任一项所述的缀合物。
41. 根据权利要求40所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物,其包含:
所述缀合物;和
药学上可接受的载体。
42. 根据权利要求41所述的组合物,其中所述药物组合物被配制用于肠胃外施用。
43. 根据权利要求41所述的组合物,其中所述药物组合物被配制用于口服施用。

44. 一种试剂盒,其包含:
治疗有效量的根据权利要求41至43中任一项所述的药物组合物;以及
用于将所述药物组合物施用至有需要的个体的说明书。
45. 根据权利要求44所述的试剂盒,其中所述药物组合物以一个或多个单位剂量存在。
46. 一种方法,其包括将治疗有效量的根据权利要求41至43中任一项所述的药物组合物施用于有需要的个体。
47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述施用是通过全身施用进行。
48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述全身施用是通过肠胃外施用进行。
49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述肠胃外施用是通过静脉内施用进行。
50. 根据权利要求47所述的方法,其中所述全身施用是通过口服施用进行。
51. 根据权利要求46至50中任一项所述的方法,其中所述个体患有癌症,所述工程化环与所述个体中存在的癌细胞上的细胞表面分子结合,并且所述方法是治疗所述个体的所述癌症的方法。
52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述细胞表面分子是细胞表面受体。
53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述细胞表面受体是细胞粘附受体。
54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述细胞粘附受体是整合蛋白。
55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述整合蛋白选自由以下组成的组: $\alpha v \beta 1$ 整合蛋白、 $\alpha v \beta 3$ 整合蛋白、 $\alpha v \beta 5$ 整合蛋白、 $\alpha v \beta 6$ 整合蛋白、 $\alpha 5 \beta 1$ 整合蛋白以及其任何组合。
56. 根据权利要求51至55中任一项所述的方法,其中所述个体患有包含所述癌细胞的实体瘤。
57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述施用是通过全身施用进行,并且其中所述实体瘤的所述免疫细胞微环境的特征在于与向所述个体全身施用仅所述免疫刺激剂时所述肿瘤的所述免疫细胞微环境相比CD8+T细胞百分比增加、CD4+T细胞百分比增加、B细胞百分比增加和/或髓源性抑制细胞(MDSC)百分比降低中的一种或其任何组合。
58. 根据权利要求56所述的方法,其中所述施用是通过全身施用进行,并且其中通过所述CD8+T细胞百分比、所述CD4+T细胞百分比、所述B细胞百分比和/或所述髓源抑制细胞(MDSC)百分比中的一种或其任何组合评估的所述实体瘤的所述免疫细胞微环境与向所述个体肿瘤内施用仅所述免疫刺激剂时所述肿瘤的所述免疫细胞微环境相比没有统计学上的显著差异。
59. 根据权利要求51至55中任一项所述的方法,其中所述个体患有包含所述癌细胞的液体瘤。
60. 一种制备扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的方法,其包括通过接头将免疫刺激剂缀合至扭结菌素肽。
61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述缀合包括:
使所述免疫刺激剂官能化;和
将所述官能化免疫刺激剂缀合至所述扭结菌素肽。
62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述免疫刺激剂包含伯胺,并且其中使所述免疫刺激剂官能化包括使所述伯胺与胺反应性接头反应。
63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述胺反应性接头是胺反应性NHS酯接头。

64. 根据权利要求62或权利要求63所述的方法,其中所述胺反应性接头包含选自自由以下组成的组的部分:双环[6.1.0]壬炔(BCN)、二苯并环辛炔(DBCO)和叠氮化物部分。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中将所述官能化免疫刺激剂缀合至所述扭结菌素肽包括使所述胺反应性接头的所述部分与所述扭结菌素肽的部分反应。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述扭结菌素肽包含构成所述扭结菌素肽的所述部分的非天然氨基酸。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述非天然氨基酸是5-叠氨基-L-戊氨酸。

68. 根据权利要求65所述的方法,其中所述扭结菌素肽的所述部分是N-末端胺基团。

69. 根据权利要求60至68中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激剂是根据权利要求2至13中任一项所定义的免疫刺激剂。

70. 根据权利要求60至69中任一项所述的方法,其中所述扭结菌素肽是根据权利要求20至39中任一项所定义的扭结菌素肽。

扭结菌素-免疫刺激缀合物和相关组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年9月30日提交的美国临时专利申请62/908,305的权益,所述申请通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 原位癌症疫苗接种代表了一种治疗策略,涉及肿瘤内注射免疫增强剂,例如To11样受体(TLR)激动剂,以触发免疫活化并利用肿瘤部位可用的肿瘤相关抗原。这种方法的优点是几乎任何类型的癌症都可以在没有事先了解特异性肿瘤抗原的情况下进行治疗。该策略的主要限制是需要进行瘤内注射,这对于可及性有限的癌症(例如肺癌、胰腺癌、肾癌等)和原发性肿瘤已手术切除的转移性疾病的病例非常具有挑战性。

发明内容

[0004] 提供了缀合物,其包含有包含与细胞表面分子结合的工程化环的扭结菌素肽以及通过接头与扭结菌素肽缀合的免疫刺激剂。根据一些实施方案,免疫刺激剂活化病原体识别受体(PRR)。例如,免疫刺激剂可以是To11样受体(TLR)激动剂,例如TLR 7、TLR 8和/或TLR 9的激动剂。还提供了包含本公开的缀合物的组合物(例如药物组合物),以及包含此类组合物的试剂盒和使用此类组合物例如治疗患有癌症的个体的方法。还提供了制备本公开的缀合物的方法。

附图说明

[0005] 图1:使用整合蛋白结合的扭结菌素肽和扭结菌素-Fc融合物作为靶向剂的肿瘤靶向免疫刺激剂缀合物的示意图。

[0006] 图2:根据本公开的一些实施方案使免疫刺激剂官能化的策略。

[0007] 图3:根据本公开的一些实施方案的扭结菌素肽的序列和示意图。

[0008] 图4:根据本公开的一些实施方案将扭结菌素肽与官能化免疫刺激剂缀合的策略。

[0009] 图5:根据本公开的一些实施方案具有在不同位点结合的CpG的扭结菌素-CpG缀合物。

[0010] 图6:根据本公开的一些实施方案用不同接头合成的扭结菌素-CpG缀合物。

[0011] 图7:根据本公开的一些实施方案的扭结菌素-TLR7/8激动剂缀合物。

[0012] 图8:根据本公开的一些实施方案的扭结菌素-Fc免疫刺激剂缀合物。

[0013] 图9:根据本公开的一些实施方案的包含与可检测标记缀合以实现体内荧光跟踪的扭结菌素肽的缀合物。

[0014] 图10:示出肿瘤内和肿瘤周围施用的本公开的缀合物的体内荧光成像的数据。

[0015] 图11:示出静脉内施用的本公开的缀合物的体内荧光成像的数据。

[0016] 图12:示出本公开的缀合物在切除的肿瘤中的离体荧光成像的数据。

[0017] 图13:证明3CM-CpG在4T1-Luc乳腺癌中的治疗功效(n=9-10)的存活曲线。

[0018] 图14:示出4T1-Luc平均肿瘤随时间生长的数据。

[0019] 图15:示出个体4T1-Luc肿瘤生长曲线的数据。

[0020] 图16:提供免疫细胞浸润数据。根据示意图通过以下组的静脉内(IV)或瘤内(IT)注射来治疗具有4T1-luc细胞肿瘤的小鼠:媒介物IV、CpG IV、3CM-CpG IV和CpG IT。治疗后切除肿瘤,并通过FACS分析肿瘤浸润性免疫细胞。提供了示出不同免疫群体占总活单细胞的%的丰度的图表。

[0021] 图17:汇总对于图16所述的每个治疗组的免疫细胞群和两个未表征的细胞群(“其他”)的平均丰度(%总活单细胞)的饼图。

具体实施方式

[0022] 在更详细地描述本公开的缀合物、组合物、试剂盒和方法之前,应理解缀合物、组合物、试剂盒和方法不限于所描述的特定实施方案,因此当然可以对其进行改变。还应理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在限制,因为缀合物、组合物、试剂盒和方法的范围仅受所附权利要求的限制。

[0023] 在提供值的范围的情况下,应理解的是,除非上下文另有明确规定,否则在该范围的上限和下限之间的每个中间值,至下限单位的十分之一和所述范围内的任何其它所述值或中间值均涵盖在缀合物、组合物、试剂盒和方法中。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且还涵盖在缀合物、组合物、试剂盒和方法中,受所述范围内的任何具体排除的界限。在所述范围包括一个或两个界限的情况下,排除那些包括的界限之一或两者的范围也包括在缀合物、组合物、试剂盒和方法中。

[0024] 本文提供了某些范围,其中数值前面出现术语“约”。术语“约”在本文用于为其后面出现的精确数字以及接近或靠近所述术语后面的数字的数提供文字性支持。在确定数字是否接近或靠近具体叙述的数字时,接近或靠近的未叙述的数字可以为这样的数字,其在出现的上下文中,提供具体叙述的数字的基本等同形式。

[0025] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与缀合物、组合物、试剂盒和方法所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管任何与本文所述那些相似或等同的缀合物、组合物、试剂盒和方法也可用于缀合物、组合物、试剂盒和方法的实践或测试,但现在描述代表性的示例性缀合物、组合物、试剂盒和方法。

[0026] 本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文,如同每篇单独的出版物或专利被具体和单独地指出通过引用并入本文一样,并且通过引用并入本文以公开和描述与所引用的出版物相关的材料和/或方法。任何出版物的引用均为其在申请日之前的公开,并且不应被解释为承认本缀合物、组合物、试剂盒和方法无权先于此类出版物,因为所提供的出版日期可能与可能需要独立确认的实际出版日期不同。

[0027] 应当指出的是,除非上下文另外清楚地指明,否则如本文中以及所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包含复数指代物。另外注意,权利要求可以撰写为排除任何可选的要素。因此,本声明旨在充当对于此类与权利要求要素的叙述相结合的排除性术语(如“单独地”、“仅”等)的使用或“否定型”限制的使用的先行基础。

[0028] 应理解,为了清楚起见,在单独的实施方案的上下文中描述的缀合物、组合物、试剂盒和方法的某些特征也可以以组合形式提供在单个实施方案中。相反,为了简洁起见,在

单个实施方案的上下文中描述的缀合物、组合物、试剂盒和方法的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供。实施方案的所有组合由本公开具体包括,并且在本文中公开,就好像每一个组合被单独和明确地公开,在这个意义上这种组合包括可操作的方法和/或组合物。另外,描述此类变量的实施方案中列出的所有子组合也由本缀合物、组合物、试剂盒和方法具体包括,并且在本文中公开,就好像每一个这种子组合在本文中单独和明确地公开。

[0029] 本领域技术人员在阅读本公开时将理解,本文描述和示例的每个单独实施方案具有离散的组件和特征,其可以容易地与任何其它几个实施方案的特征分离或组合而不脱离本方法的范围或精神。任何记载的方法可以按照所记载事件的顺序或以逻辑上可能的任何其它顺序进行。

[0030] 缀合物

[0031] 本公开提供了扭结菌素肽-免疫刺激剂缀合物。缀合物包含有包含与细胞表面分子结合的工程化环的扭结菌素肽以及通过接头与扭结菌素肽缀合的免疫刺激剂。此类缀合物可用于多种应用。例如,在癌症治疗的背景下,并且如本文所证明的,缀合物出乎意料地能够在全身施用后定位于实体瘤并且实现比相应的非缀合免疫刺激剂显着更大的治疗功效。此外,与全身施用未与扭结菌素肽缀合的免疫刺激剂相比,缀合物出人意料地显着改变了肿瘤免疫情形,如CD8+T细胞、CD4+T细胞和B细胞的百分比增加以及髓源性抑制细胞(MDSC)减少所指示。使用扭结菌素肽-免疫刺激剂缀合物得到的免疫细胞分布的这种显着变化与使用瘤内(IT)施用的免疫刺激剂治疗所观察到的变化没有区别。现在将描述关于本公开的缀合物的细节。

[0032] “免疫刺激剂”意指直接或间接诱导一种或多种类型的免疫系统细胞活化或成熟的物质。在本公开的缀合物中可以提供各种类型的免疫刺激剂。可以使用的免疫刺激剂的非限制性实例包括多肽、核酸(例如寡核苷酸)、碳水化合物、抗体、配体、适体、纳米颗粒和小分子。在一些实施方案中,免疫刺激剂刺激非免疫细胞(例如,上皮细胞、内皮细胞、肿瘤细胞等)以产生促炎性细胞因子。

[0033] 根据一些实施方案,本公开的缀合物包含直接或间接诱导一种或多种类型的先天免疫系统细胞的活化或成熟的免疫刺激剂。可由免疫刺激剂直接或间接活化的先天免疫系统细胞类型的非限制性实例包括巨噬细胞、树突细胞、NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、朗格汉斯细胞、肥大细胞和/或单核细胞。在某些实施方案中,本公开的缀合物包含诱导一种或多种类型的适应性免疫系统细胞的活化或成熟的免疫刺激剂。可由免疫刺激剂活化的适应性免疫系统细胞类型的非限制性实例包括T细胞和B细胞。T细胞的实例包括幼稚T细胞(T_N)、细胞毒性T细胞(T_{CTL})、记忆T细胞(T_{MEM})、T记忆干细胞(T_{SCM})、中枢记忆T细胞(T_{CM})、效应记忆T细胞(T_{EM})、组织驻留记忆T细胞(T_{RM})、效应T细胞(T_{EFF})、调节性T细胞(T_{REGS})、辅助T细胞(T_H 、 T_{H1} 、 T_{H2} 、 T_{H17})、CD4+T细胞、CD8+T细胞、病毒特异性T细胞、 $\alpha\beta$ T细胞($T_{\alpha\beta}$)和 $\gamma\delta$ T细胞($T_{\gamma\delta}$)。

[0034] 在某些实施方案中,免疫刺激剂包含病原体相关分子模式(PAMP)。PAMP包括表示为病原体生命周期的一部分的病原体特异性糖、脂蛋白和/或核酸(例如,包含二核苷酸CpG的一个或多个未甲基化重复序列的DNA、双链RNA(dsRNA)、单链RNA(ssRNA)等)。能够识别此类特定微生物模式的宿主蛋白被称为病原体识别受体(PRR)。根据一些实施方案,本公开的

缀合物的免疫刺激剂活化病原体识别受体 (PRR)。在某些实施方案中, PRR选自Toll样受体 (TLR)、RIG-1样受体 (RLR)、核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 样受体 (NLR)、C型凝集素受体 (CLR)、细胞溶质dsDNA传感器 (CDS)、干扰素基因刺激物 (STING) 及其任何组合。根据一些实施方案, 免疫刺激剂活化PRR并且包含天然或非天然PAMP。可以使用的非天然PRR活化剂包括但不限于合成的小分子PRR激动剂。

[0035] 根据一些实施方案, 免疫刺激剂是Toll样受体 (TLR) 激动剂。TLR是I型跨膜PRR家族, 其感测入侵病原体或内源性损伤信号并启动先天性和适应性免疫反应。人有十个功能性TLR (TLR1-10) 并且小鼠有十二个 (TLR1-9、11-13)。TLR的各种组合由免疫和非免疫细胞类型的不同亚群表达, 所述细胞类型例如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、中性粒细胞、B细胞、T细胞、成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞。在人TLR中, TLR1、2、4、5、6和10在细胞表面上表达, 并且主要识别微生物膜和/或细胞壁组分, 而TLR3、7、8和9在内溶酶体区室的细胞膜上表达并识别核酸。TLR在其N末端具有可变数量的配体感应、富含亮氨酸的重复序列 (LRR) 和细胞质Toll/IL-1R (TIR) 结构域。TIR结构域介导TLR和参与调节TLR信号传导的衔接蛋白之间的相互作用, 所述衔接蛋白包括MyD88、TRIF、TRAM和TIRAP/MAL。在这些衔接分子下游活化的信号传导途径促进促炎性细胞因子、趋化因子以及I型和III型干扰素的表达。

[0036] 在某些实施方案中, 本公开的缀合物包含免疫刺激剂, 所述免疫刺激剂是TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9和TLR10中的一种或多种的激动剂。根据一些实施方案, 免疫刺激剂是TLR 9激动剂。人TLR9基因在转录过程中可以剪接成不同的亚型, 从而产生5种TLR9亚型 (TLR9A、B、C、D和E)。这些TLR9亚型在各种免疫器官和细胞中不同地表达, 所述器官和细胞例如脾脏、外周血单个核细胞 (PBMC) 和淋巴结。

[0037] 在一些实施方案中, 免疫刺激剂是基于寡核苷酸的TLR 9激动剂。如本文所用, “寡核苷酸”为核苷酸的5个到500个核苷酸, 例如5个到100个核苷酸的单链多聚体。寡核苷酸可以是合成的或者可以以酶促方式制备, 并且在一些实施方案中, 在长度上为5个到50个核苷酸。寡核苷酸可以含有核糖核苷酸单体 (即, 可以为寡核糖核苷酸或“RNA寡核苷酸”)、脱氧核糖核苷酸单体 (即, 可以为寡脱氧核糖核苷酸或“DNA寡核苷酸”) 或其组合。例如, 寡核苷酸在长度上可以为10个到20个、20个到30个、30个到40个、40个到50个、50个到60个、60个到70个、70个到80个、80个到100个、100个到150个或150个到200个或多达500个核苷酸。

[0038] 当免疫刺激剂是基于寡核苷酸的TLR 9激动剂时, 免疫刺激剂可以是包含一个或多个未甲基化CpG二核苷酸的寡核苷酸。TLR9在对含有未甲基化CpG基序的细菌和合成DNA的先天免疫反应中所起的作用已得到充分表征。例如, 参见Uematsu S, Akira S. (2006) 《分子医学杂志 (Journal of Molecular Medicine)》84 (9) : 712-725。根据一些实施方案, 当免疫刺激剂是基于寡核苷酸的TLR 9激动剂时, 免疫刺激剂是CpG寡聚脱氧核苷酸 (ODN)。CpG ODN是在特定序列背景 (CpG基序) 中含有未甲基化CpG二核苷酸的合成的单链DNA分子, 能够在体外和体内活化白细胞。根据其结构和生物学特征, 已鉴定出三个主要类别的CpG ODN, 并且分别命名为A类、B类和C类。A类寡核苷酸特征为含有中央回文CpG的硫代磷酸二酯 (PO) 结构和后接硫代磷酸酯 (PS) 均聚G-片段, 是干扰素- α (IFN- α) 产生和树突细胞成熟的强效诱导剂。相比之下, B类寡核苷酸通常含有完整的硫代磷酸酯 (PS) 主链。这些寡核苷酸也刺激IFN- α 的产生, 但程度较低。然而, 它们强烈地活化B细胞。C类寡核苷酸将A类和B类的特性组合, 并且其特征在于其完整的PS主链和含有回文CpG的基序。CpG ODN在特定序列背景中

含有一个或多个未甲基化CpG二核苷酸,由于这种结构在哺乳动物基因组中很稀有,所以哺乳动物细胞很容易将其识别为微生物入侵的指示。在某些实施方案中,本公开的缀合物包括来自选自A类(D型)、B类(K型)和C类的类别的CpG ODN。

[0039] 在一些实施方案中,当免疫刺激剂是包含一个或多个未甲基化CpG二核苷酸(例如,CpG ODN)的基于寡核苷酸的TLR 9激动剂时,免疫刺激剂包含至少5个核苷酸。在一些实施方案中,免疫刺激剂包含2至100个,例如约8至约40个核苷酸。在一些实施方案中,免疫刺激剂包含10至30个核苷酸。在一些实施方案中,免疫刺激剂包含15-25个核苷酸。在一些实施方案中,免疫刺激剂是富含T的寡核苷酸,其含有一个或多个多聚T序列和/或具有大于约25%的T核苷酸残基。在一些实施方案中,免疫刺激剂具有代替CG二核苷酸的GTC三核苷酸。在一些实施方案中,免疫刺激剂具有一个或多个修饰的胞嘧啶。在一些实施方案中,免疫刺激剂是部分单链、哑铃形和共价闭合的脱氧核糖核酸分子。在一些实施方案中,免疫刺激剂包含一种或多种以下结构: $[CGN]_x$ 、 $[N_aCG]_x$ 、 $[N_aCGNb]_x$ 、 $[NaCGTTNb]_x$ 和 $[N_aCGN_bCGN_c]_x$,其中N是任何核苷酸碱基,x是0-25,并且a、b和c独立地是1-15。例如,落入 $[N_aCGN_b]_x$ 内的序列包括ACGT、GTCGTT、TCGGTT、TGACGTT和ACGTACGT。

[0040] CpG基序表现出物种特异性。例如,最佳的小鼠CpG基序是GACGTT,而在人背景下使用的是GTCGTT。B类CpG ODN(CpG ODN 1826)是定义明确的鼠类TLR 9激动剂,并因此广泛用于啮齿动物模型。这种寡核苷酸可有效引发小鼠B细胞增殖、抗原呈递细胞成熟和极化Th1型细胞反应。CpG ODN 1826含有2个CpG二核苷酸,两者侧接5'末端的-GA和3'末端的-TT。与细菌或病毒基因组中发现的天然PO主链相反,它的主链是完全硫代磷酸酯化的,从而提供核酸酶抗性。

[0041] 在某些实施方案中,基于寡核苷酸的TLR 9激动剂是人CpG ODN。这种人CpG ODN可以包括CpG基序GTCGTT。这种人CpG ODN的非限制性实例具有序列TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT(SEQ ID NO:1)。根据一些实施方案,基于寡核苷酸的TLR 9激动剂是小鼠CpG ODN。这种小鼠CpG ODN可包括CpG基序GACGTT。这种小鼠CpG ODN的非限制性实例具有序列TCCATGACGTTCTGACGTT(SEQ ID NO:2)。

[0042] 基于寡核苷酸的免疫刺激剂可包含一种或多种修饰,例如以降低或防止核酸酶敏感性。此类修饰的实例包括对天然磷酸二酯寡聚脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸聚合物的修饰。例如,基于寡核苷酸的免疫刺激剂可以包含一个或多个硫代磷酸酯(PS)键。PS键用硫原子代替寡核苷酸磷酸主链中的非桥接氧。PS修饰使核苷酸间键更能抵抗核酸酶降解。

[0043] 根据一些实施方案,免疫刺激剂是TLR 7激动剂、TLR 8激动剂或两者。已知多种TLR 7和/或TLR 8激动剂。在某些实施方案中,TLR 7和/或TLR 8激动剂包括咪唑喹啉(IMZQ)化合物。咪唑喹啉是强大的免疫刺激剂,其通过Toll样受体发挥作用,特别是TLR7和TLR8。在某些实施方案中,包含IMZQ化合物的TLR 7和/或TLR 8激动剂是T78a,其结构在图2中提供。根据一些实施方案,包含IMZQ化合物的TLR7和/或TLR8激动剂是混合-2(1-(4-氨基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-2-甲基丙-2-醇);XG1-236(2-丁基-2H-吡唑并[3,4-c]喹啉-4-胺);DS802(2-丁基[1,3]恶唑并[4,5-c]喹啉-4-胺);CL075(2-丙基[1,3]噻唑并[4,5-c]喹啉-4-胺);CL097(2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑[4,5-c]喹啉-4-胺);R848(1-[4-氨基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]-2-甲基丙烷-2-醇);间胺或对胺。参见例如Kubli-Garfias等人(2017)《公共科学图书馆期刊(PLoS ONE)》12(6):

e0178846;和Ganapathi等人(2015)《公共科学图书馆期刊(PLoS ONE)》10(8):e0134640。

[0044] 在某些实施方案中,本公开的缀合物包含缀合至扭结菌素肽的两个或更多个免疫刺激剂。例如,扭结菌素肽可以缀合至2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、8个或更多个、9个或更多个或10个或更多个免疫刺激剂。当扭结菌素肽与两个或更多个免疫刺激剂缀合时,两个或更多个免疫刺激剂中的两个可以相同或不同。根据一些实施方案,两个或更多个免疫刺激剂独立地选自本文所述的任何免疫刺激剂(例如,TLR 9激动剂、TLR 7和/或8激动剂和/或类似物)。

[0045] 根据一些实施方案,本公开的缀合物的扭结菌素肽进一步缀合至可检测标记。“可检测标记”是指标记扭结菌素肽,使得可以在感兴趣的应用(例如,体外和/或体内研究和/或临床应用)中检测到缀合物的试剂。感兴趣的标记包括荧光标记(例如,AlexaFluor荧光团,例如本文实验部分中描述的AlexaFluor 680)、放射性同位素、产生可检测产物的酶(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光素酶等)、荧光蛋白质、顺磁性原子等。在某些方面,扭结菌素肽缀合至可检测标记的特异性结合配偶体,例如缀合至生物素,使得可通过包含抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白的可检测标记进行检测。

[0046] 在某些实施方案中,可检测标记可用于体内成像,例如近红外(NIR)光学成像、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)/CT成像、正电子发射断层扫描(PET)、核磁共振(NMR)光谱学等。可用于此类应用的可检测标记包括但不限于荧光标记、放射性同位素等。在某些方面,可检测标记是多模式体内成像剂,其允许使用两种或更多种成像方法进行体内成像(例如,参见Thorp-Greenwood和Coogan(2011)Dalton Trans.40:6129-6143)。

[0047] 在某些实施方案中,可检测标记是可用于近红外(NIR)成像应用的体内成像剂。此类试剂包括但不限于Kodak X-SIGHT染料、Pz 247、DyLight 750和800Fluors、Cy 5.5和7Fluors、Alexa Fluor 680和750Dyes、IRDye 680和800CW Fluors。根据一些实施方案,可检测标记是可用于SPECT成像应用的体内成像剂,其非限制性实例包括^{99m}Tc、¹¹¹In、¹²³In、²⁰¹Tl和¹³³Xe。在某些实施方案中,可检测标记是可用于正电子发射断层扫描(PET)成像应用的体内成像剂,例如¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、⁶⁴Cu、⁶²Cu、¹²⁴I、⁷⁶Br、⁸²Rb、⁶⁸Ga等。

[0048] 扭结菌素肽

[0049] 本公开的缀合物包括扭结菌素肽,其包括与细胞表面分子结合的工程化环。本公开的缀合物中采用的扭结菌素肽的类型可以变化。可以采用的扭结菌素肽的非限制性实例包括EETI-II肽、AgRP肽、 ω -芋螺毒素肽、Kalata B1肽、MCoTI-II肽、蜘蛛毒素(agatoxin)肽和氯毒素肽。扭结菌素肽的三维结构最低限度地由三个二硫键的特定排列限定。这种特有的拓扑结构形成了一个分子结,其中一个二硫键穿过由其他两个链内二硫键桥形成的大环。尽管它们的二级结构含量通常较低,但扭结菌素共享一个小的三链反平行 β -折叠,其由二硫键框架稳定。扭结菌素的折叠和功能活性通常由长度和氨基酸组成不同的环区域介导。虽然三个二硫键是限定该肽家族的折叠的最小数量,但扭结菌素还可以包含额外的半胱氨酸残基,产生在其结构中具有四个或更多个二硫键和额外约束环的分子。术语“胱氨酸”是指其中硫基团通过二硫键连接到另一个氨基酸的Cys残基;术语“半胱氨酸”是指该残基的-SH(“半胱氨酸”)形式。结合环部分可以与胱氨酸相邻,从而在结合环的一级序列中没有其他插入的胱氨酸。

[0050] 该扭结菌素肽可以是在线扭结菌素数据库中描述的肽,该数据库包括数千种被鉴

定为含有胱氨酸结基序的多肽的详细氨基酸序列、结构、分类和功能信息。扭结菌素存在于各种植物、动物、昆虫和真菌中。

[0051] 扭结菌素肽可以是全长的(即,野生型肽/多肽的长度),扭结菌素肽可以相对于野生型肽/多肽的长度被截短,或者扭结菌素肽可以包括额外的氨基酸,使得肽的长度相对于野生型肽/多肽更长。

[0052] 根据某些实施方案,本公开的扭结菌素-药物缀合物(KDC)包括基于以下中任一种的扭结菌素肽:喷瓜(Ecballium elaterium)胰蛋白酶抑制剂II(EETI-II)肽、刺豚鼠相关蛋白(AgRP)肽、 ω -芋螺毒素肽、Kalata B1肽、MCoTI-II肽、蜘蛛毒素(agatoxin)肽和氯毒素肽。在一些实施方案中,扭结菌素肽基于喷瓜胰蛋白酶抑制剂II(EETI-II)肽。在一些实施方案中,扭结菌素肽基于刺豚鼠相关蛋白(AgRP)肽。

[0053] “EETI”是指蛋白质数据库条目(PDB)2ETI。它在扭结菌素数据库中的条目是EETI-II。在某些方面,本公开的缀合物的扭结菌素肽基于具有以下氨基酸序列的EETI-II肽:

[0054] GCPRLMRCKQSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:3)

[0055] “AGRP”是指PDB条目1HYK和扭结菌素数据库条目SwissProt AGRP_HUMAN。AGRP是132个氨基酸的神经肽,其与人脑中的黑皮质素受体结合,并参与调节新陈代谢和食欲。AgRP的生物活性由其C端半胱氨酸结结构域介导,该结构域包含五个二硫键,但已开发出仅包含四个二硫键的完全活性的34个氨基酸的截短的AgRP。在某些方面,本公开的缀合物的扭结菌素肽基于具有以下氨基酸序列的截短的AGRP肽:

[0056] CVRLHESCLGQQVPCDPAATCYCRFFNAFCYCR (SEQ ID NO:4)

[0057] 根据一些实施方案,本公开的缀合物的扭结菌素肽基于具有以下氨基酸序列的Kalata B1肽:

[0058] CGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNLV (SEQ ID NO:5)

[0059] 在某些实施方案中,本公开的缀合物的扭结菌素肽基于具有以下氨基酸序列的MCoTI-II肽:

[0060] SGSDGGVCPKILKKRRDSDCPGACICRGNGYCG (SEQ ID NO:6)

[0061] 根据一些实施方案,本公开的缀合物的扭结菌素肽基于具有以下氨基酸序列的氯毒素肽:

[0062] MCMPCFITTDHQMARCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR (SEQ ID NO:7)

[0063] EETI-II、AgRP、 ω -芋螺毒素、Kalata B1、MCoTI-II、蜘蛛毒素(agatoxin)、氯毒素和本公开的缀合物的扭结菌素肽可以基于的其他扭结菌素肽的序列和结构(例如,环)信息可以在PDB、扭结菌素数据库和其他蛋白质数据库中找到。

[0064] 扭结菌素肽包括与细胞表面分子结合的工程化环,也就是说,该环被设计成与细胞表面的目标分子结合。扭结菌素包含三个二硫键,它们交织成一个分子‘结’,将环区域限制在反平行 β -折叠的核心。例如,野生型EETI由28个氨基酸组成,有三个二硫键约束的环:环1(胰蛋白酶结合环,残基3-8)、环2(残基10-14)和环3(残基22-26)扭结菌素家族成员,其包括蛋白酶抑制剂、毒素和抗菌剂,除了其核心半胱氨酸残基外,几乎没有序列同源性。因此,它们的二硫键约束的环可以承受很多序列多样性,这使得扭结菌素适用于需要将突变引入蛋白质而不破坏其三维折叠的蛋白质工程应用。

[0065] 工程化环可以包括在扭结菌素肽的现有环中的氨基酸取代、插入和/或缺失,或者

工程化环可以是添加到扭结菌素蛋白的环。即,除了野生型肽中存在的一个或多个环之外,缀合物的扭结菌素肽还可包括环。通过将定向进化与计算协方差分析相结合,已经阐明了将修饰(氨基酸序列和环长度两方面)引入扭结菌素支架的环区域中的指南。参见,例如,Lahti等人(2009)《PLOS计算生物学(PLoS Comput. Biol.)》5(9):e1000499。

[0066] 在一些实施方案中,扭结菌素的环被设计成与癌细胞表面分子结合。“癌细胞”是指表现出赘生性细胞表型的细胞,其特征可以是一种或多种,例如,异常细胞生长、异常细胞增殖、密度依赖性生长抑制的丧失、非贴壁依赖性生长潜能、在免疫受损的非人动物模型中促进肿瘤生长和/或发育的能力,和/或任何合适的细胞转化指标。“癌细胞”在本文中可与“肿瘤细胞”、“恶性细胞”或“癌性细胞”互换使用,并且包括实体瘤、半实体瘤、液体瘤、原发性肿瘤、转移性肿瘤等的癌细胞。这种工程化环赋予了扭结菌素肽一种在野生型肽中不存在的癌细胞表面分子识别特性。在某些方面,癌症是已知具有一种或多种肿瘤抗原的癌症。可以结合扭结菌素的工程化环的肿瘤抗原的非限制性实例包括5T4、AXL受体酪氨酸激酶(AXL)、B细胞成熟抗原(BCMA)、c-MET、C4.4a、碳酸酐酶6(CA6)、碳酸酐酶9(CA9)、钙粘蛋白-6、CD19、CD22、CD25、CD27L、CD30、CD33、CD37、CD44v6、CD56、CD70、CD74、CD79b、CD123、CD138、癌胚抗原(CEA)、cKit、Cripto蛋白、CS1、 δ 样经典Notch配体3(DLL3)、B型内皮素受体(EDNRB)、肝配蛋白A4(EFNA4)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFRvIII、外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶3(ENPP3)、EPH受体A2(EPHA2)、成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)、成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)、FMS样酪氨酸激酶3(FLT3)、叶酸受体1(FOLR1)、糖蛋白非转移性B(GPNMB)、鸟苷酸环化酶2C(GUCY2C)、人表皮生长因子受体2(HER2)、人表皮生长因子受体3(HER3)、整合蛋白 α 、溶酶体相关膜蛋白1(LAMP-1)、Lewis Y、LIV-1、富含亮氨酸重复序列15(LRRC15)、间皮素(MSLN)、粘蛋白1(MUC1)、粘蛋白16(MUC16)、钠依赖性磷酸盐转运蛋白2B(NaPi2b)、粘连蛋白-4、NMB、NOTCH3、p-钙粘蛋白(p-CAD)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、蛋白酪氨酸激酶7(PTK7)、溶质载体家族44成员4(SLC44A4)、SLIT样家族成员6(SLITRK6)、STEAP家族成员1(STEAP1)、组织因子(TF)、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白蛋白-1(TIM-1)和滋养层细胞表面抗原(TROP-2)。

[0067] 根据一些实施方案,结合扭结菌素的工程化环的细胞表面分子是受体,例如细胞粘附受体、可溶性因子(例如生长因子、趋化因子或其他可溶性因子受体)的受体、免疫细胞受体等。根据一些实施方案,结合扭结菌素的工程化环的细胞表面分子是细胞粘附受体,例如在癌细胞表面上表达、在肿瘤血管细胞表面和/或类似物上表达的细胞粘附受体(例如,整合蛋白)。在某些实施方案中,当受体是细胞粘附受体时,受体是整合蛋白。例如,本公开内容的缀合物可包括具有经工程改造以结合 $\alpha_v\beta_1$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_5$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白、 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白或其任何组合的环的扭结菌素肽。根据某些实施方案,工程化环结合 $\alpha_v\beta_1$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_5$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白和 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白中的每一个。

[0068] 可用于本公开的缀合物中的具有工程化结合环的基于EETI的扭结菌素肽(指定为EETI-2.5D)(该结合环与 $\alpha_v\beta_1$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_5$ 整合蛋白、 $\alpha_v\beta_6$ 整合蛋白和 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白中的每一个结合)具有以下氨基酸序列(带有下列下划线的是整合蛋白结合环):

[0069] GCPQGRGDWAPTSCKQDSDCRAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:8)

[0070] 可用于本公开的缀合物中的具有工程化结合环的基于EETI的扭结菌素肽(指定为

EETI-2.5F) (该结合环与 $\alpha v\beta 1$ 整合蛋白、 $\alpha v\beta 3$ 整合蛋白、 $\alpha v\beta 5$ 整合蛋白、 $\alpha v\beta 6$ 整合蛋白和 $\alpha 5\beta 1$ 整合蛋白中的每一个结合) 具有以下氨基酸序列(带有下划线的是整合蛋白结合环)：

[0071] GCPRRGDNPPLTCSQSDCLAGCVCGPNGFCG (SEQ ID NO:9)

[0072] 可用于本公开的缀合物中的具有工程化结合环的基于EETI的扭结菌素肽(指定为3CM) 具有以下氨基酸序列(带有下划线的是整合蛋白结合环), 其中Z=5-叠氨基-L-戊氨酸, 所述工程化结合环与 $\alpha v\beta 1$ 整合蛋白、 $\alpha v\beta 3$ 整合蛋白、 $\alpha v\beta 5$ 整合蛋白、 $\alpha v\beta 6$ 整合蛋白和 $\alpha 5\beta 1$ 整合蛋白中的每一个结合：

[0073] GCPRRGDNPPLTCZQSDCLAGCVCGPNGYCG (SEQ ID NO:10)

[0074] 在一些实施方案中, 本公开的缀合物的扭结菌素肽是如表1中所列的结合整合蛋白的基于EETI的扭结菌素肽。

[0075] 表1-示例EETI整合蛋白结合扭结菌素肽

肽标识符	序列	SEQ ID NO:
1.4A	GCA <u>EP</u> RGDMPWTWCKQSDCLAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 11)
1.4B	GC <u>V</u> GGRGDWSPKWCKQSDCPAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 12)
1.4C	GCAELRGDRSY <u>PE</u> CKQSDCLAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 13)
1.4E	GCRL <u>PR</u> GDVPRPHCKQSDCQAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 14)
1.4H	GCY <u>PL</u> RGDNPYAACKQSDCRAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 15)
[0076] 1.5B	GCT <u>I</u> GRGDWAP <u>SE</u> CKQSDCLAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 16)
1.5F	GCH <u>PP</u> RGDNPPVTCKQSDCLAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 17)
2.3A	GC <u>PE</u> RGDNPPPSCKQSDCRAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 18)
2.3B	GCL <u>PP</u> RGDNPPPSCKQSDCQAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 19)
2.3C	GCHLGRGDWAPV <u>G</u> CKQSDCPAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 20)
2.3D	GC <u>N</u> VGRGDWAP <u>SE</u> CKQSDCPAGCVC <u>GP</u> NGFCG	(SEQ ID NO: 21)

[0077]	2.3E	GCFPGRGDWAPSSCKQDSDCRAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 22)
	2.3F	GCPLPRGDNPPTECKQDSDCQAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 23)
	2.3G	GCSEARGDNPRLSCKQDSDCRAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 24)
	2.3H	GCLLGRGDWAPEACKQDSDCRAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 25)
	2.3I	GCHVGRGDWAPLKCKQDSDCQAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 26)
	2.3J	GCVRGRGDWAPPSCCKQDSDCPAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 27)
	2.4A	GCLGGRGDWAPPACKQDSDCRAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 28)
	2.4C	GCFVGRGDWAPLTCKQDSDCQAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 29)
	2.4D	GCPVGRGDWSPASCKQDSDCRAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 30)
	2.4E	GCPRPRGDNPPLTCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 31)
	2.4F	GCYQGRGDWSPSSCKQDSDCPAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 32)
	2.4G	GCAPGRGDWAPSECKQDSDCQAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 33)
	2.4J	GCVQGRGDWSPPSCKQDSDCPAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 34)
	2.5A	GCHVGRGDWAPEECKQDSDCQAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 35)
	2.5C	GCDGGRGDWAPPACKQDSDCRAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 36)
	2.5D	GCPQGRGDWAPTSCCKQDSDCRAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 8)
	2.5F	GCPRPRGDNPPLTCKQDSDCLAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 9)
	3CM	GCPRPRGDNPPLT CZQDSDCLAGCVCGPNGYCG	(SEQ ID NO: 10)
	2.5H	GCPQGRGDWAPEWCKQDSDCPAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 37)
	2.5J	GCPRGRGDWSPPACKQDSDCQAGCVCGPNGFCG	(SEQ ID NO: 38)

[0078] 在一些实施方案中,本公开的缀合物的扭结菌素肽是如表2中所列的结合整合蛋白的基于AgRP的扭结菌素肽。

[0079] 表2-示例AgRP整合蛋白结合扭结菌素肽

[0080]	克隆	环4序列
	7A (5E) (SEQ ID NO:39)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCSGRGDNDLVCYCR
	7B (SEQ ID NO:40)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCKGRGDARLQCYCR
	7E (SEQ ID NO:41)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCVGRGDDNLKCYCR
	7J (6B) (SEQ ID NO:42)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCEGRGDRDMKCYCR
	7C (SEQ ID NO:43)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYC YGRGDNDLR CYCR

[0081] 根据一些实施方案,本公开的缀合物的扭结菌素肽包含与蛋白酶缀合的工程化环。蛋白酶的非限制性实例包括膜蛋白酶,例如蛋白裂解酶 (matriptase)。

[0082] 在一些实施方案中,扭结菌素肽包括一种或多种非天然氨基酸。这种一种或多种非天然氨基酸可用于例如促进药物与扭结菌素肽的缀合。可以用于例如制备本公开的缀合物的非天然氨基酸包括具有选自以下中的官能团的那些:叠氮化物、炔烃、烯烃、氨基-氧基、肼、醛、硝酮、氧化脒、环丙烯、降冰片烯、异氰化物、芳基卤化物和硼酸官能团。可以被并

入本公开的扭结菌素-药物缀合物的扭结菌素肽的非天然氨基酸(可以选择该非天然氨基酸以提供感兴趣的官能团)是已知的并且描述于例如Maza等人(2015)《生物共轭化学(Bioconjug.Chem.)》26(9):1884-9;Patterson等人(2014)《ACS化学生物学(ACS Chem.Biol.)》9:592-605;Adumeau等人(2016)《分子成像生物学(Mol.Imaging Biol.)》(2):153-65;以及其他地方。在某些实施方案中,扭结菌素肽包含一个或多个5-叠氮基-L-正缬氨酸残基或其衍生物,例如在残基与官能化免疫刺激剂缀合时产生的衍生物。

[0083] 本公开的缀合物可包含与本文所述的扭结菌素肽的氨基酸序列,例如上表1或表2中提供的任何扭结菌素肽序列具有70%或更大、80%或更大、90%或更大、95%或更大或100%同一性的扭结菌素肽。

[0084] 根据一些实施方案,本公开的缀合物的扭结菌素肽融合至一种或多种异源多肽。扭结菌素肽可以直接融合至异源多肽。在某些实施方案中,扭结菌素肽通过接头直接融合至异源多肽。可以使用的接头的非限制性实例是丝氨酸-甘氨酸接头,例如包含氨基酸序列GGGGSGGGSGGGGS(G₄S)₃(SEQ ID NO:44)的丝氨酸-甘氨酸接头。感兴趣的异源多肽包括但不限于Fc结构域(例如,人或小鼠Fc结构域)、白蛋白、转铁蛋白、XTEN、同型氨基酸聚合物、脯氨酸-丙氨酸-丝氨酸聚合物、弹性蛋白样肽或其任何组合。在一些实施方案中,与不融合至异源多肽的相同扭结菌素肽相比,异源多肽在向有需要的个体施用增加扭结菌素肽的稳定性和/或血清半衰期。在某些实施方案中,提供了融合蛋白,其包括与人Fc结构域(例如,全长人Fc结构域或其片段)融合的本公开的任何扭结菌素肽。根据本公开的一些实施方案,包含融合至Fc结构域并缀合至免疫刺激剂的扭结菌素肽的缀合物的示意图示意性示出于图1中。根据一些实施方案,这种融合蛋白可用于例如根据本公开的方法向有需要的个体(例如,患有癌症的个体)施用。可以与本公开的缀合物的扭结菌素肽融合的人Fc结构域的非限制性实例是具有下表3中列出的序列(SEQ ID NO:45)或其片段的人IgG1 Fc结构域。

[0085] 表3:实施例人Fc结构域的氨基酸序列

	氨基酸序列
[0086] 示例人 Fc 结构域 (SEQ ID NO: 45)	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0087] 在一些实施方案中,当扭结菌素肽融合至一种或多种异源多肽时,扭结菌素肽融合至体内可检测的异源多肽。体内可检测多肽的非限制性实例包括生物发光报道分子。在某些实施方案中,生物发光报道分子是荧光素酶,例如纳米荧光素酶。

[0088] 具有与细胞表面分子结合的工程化环的扭结菌素肽的开发方式可以变化。理性和组合方法已被用于设计具有新分子识别特性的扭结菌素。例如,可以创建和筛选扭结菌素蛋白的文库,例如通过细菌展示、噬菌体展示、酵母表面展示、荧光活化细胞分选(FACS)和/或任何其他合适的筛选方法。

[0089] 酵母表面展示是一种强有力的组合技术,其已用于工程化具有新的分子识别性质、增加的靶结合亲和力、适当折叠和改进的稳定性的蛋白质。在该平台中,以高通量方式

生成和筛选蛋白质变体文库以分离具有所需生物化学和生物物理性质的突变体。酵母表面展示已被证明是一种成功的组合方法,可用于改造具有改变的分子识别的扭结菌素。酵母表面展示受益于真核分泌途径、伴侣辅助折叠和有效二硫键形成的质量控制机制。

[0090] 用于开发具有与目标细胞表面分子结合的工程化环的一个示例性方法涉及将所述肽遗传融合至酵母交配凝集素蛋白Aga2p,其通过两个二硫键与酵母细胞壁蛋白Aga1p结合。该Aga2p融合构建体和染色体整合的Aga1p表达盒可以在合适的启动子(如半乳糖诱导型启动子)的控制下表达。可以包括N-或C-端表位标记以通过使用荧光标记的初级或次级抗体的流式细胞术测量细胞表面表达水平。该构建体代表最广泛使用的展示形式,其中扭结菌素(或待改造的其他蛋白质)的N末端与Aga2融合,但已描述了酵母表面展示质粒的几种可选变体并且可用于开发本公开的缀合物中使用的扭结菌素肽。与噬菌体或mRNA展示所用的基于淘选的方法相比,该筛选平台的一个优点是双色FACS可用于定量区分对期望靶的结合亲和力差异小至两倍的克隆。

[0091] 为了在DNA水平上选择性地突变扭结菌素环区域,可以使用例如重叠延伸PCR通过寡核苷酸组装来引入简并密码子。接着,可以使用与酵母展示载体充分重叠的侧翼引物扩增遗传物质,用于在酵母中同源重组。这种组装和扩增方法允许以相对较低的成本和工作量创建扭结菌素库。已经开发了合成寡核苷酸文库和最新方法,其允许对文库组成进行确定的控制。

[0092] 在某些方面,通过FACS筛选展示文库(例如,酵母展示文库)用于与所关注的细胞表面分子结合。当通过FACS筛选扭结菌素库时,通常在4-7轮分拣中会出现富集粘合剂库。双色FACS可用于文库筛选,其中一种荧光标记可用于检测c-myc表位标签,另一种荧光标记用于测量扭结菌素突变与目标结合靶标的相互作用。不同的仪器激光器和/或滤光器组可用于以单细胞分辨率测量两种荧光团的激发和发射性质。这使得酵母表达水平能够用结合进行归一化。也就是说,表现出差的酵母表达但结合大量靶标的扭结菌素可以与高水平表达但与靶标弱结合的扭结菌素区分开。因此,表达对结合的二维流式细胞术图将导致与靶抗原结合的对角酵母细胞群体。可以使用文库分类门分离高亲和力的粘合剂。或者,在初始分类轮次中,清除不表达全长的不期望克隆的文库可能是有用的。筛选中使用的靶标在结构和功能上与最终应用相关,例如模拟感兴趣的细胞表面分子。

[0093] 在为针对感兴趣的细胞表面分子的粘合剂富集扭结菌素文库后,回收酵母质粒并进行测序。可以在增加的分选严格性下执行更多轮FACS。然后可以测量单个酵母展示的扭结菌素克隆的结合亲和力或动力学解离速率。

[0094] 一旦通过表面展示(例如酵母表面展示)鉴定了具有与感兴趣的细胞表面分子结合的工程化环的扭结菌素肽,就可以使用合适的方法生产工程化扭结菌素。小尺寸的扭结菌素使其适合通过化学合成和重组表达二者进行生产。根据某些实施方案,扭结菌素肽可以通过固相肽合成随后体外折叠产生。化学合成允许将非天然氨基酸或其他化学处理轻松结合到扭结菌素肽中。

[0095] 未与大异源结构域融合的扭结菌素肽很容易在自动合成仪上使用固相肽化学合成。例如,可以使用标准的基于9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)的固相肽化学。然后可以在促进半胱氨酸侧链硫醇氧化形成二硫键的条件下折叠线性肽,然后进行纯化,例如通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)。

[0096] 在某些方面,使用重组DNA方法产生扭结菌素肽或包含扭结菌素肽的融合蛋白。可以采用在多种宿主细胞类型中使用重组方法产生扭结菌素肽的任何合适的策略。例如,功能性扭结菌素已经用barnase作为遗传融合伴侣产生,其促进大肠杆菌周质空间中的折叠并且用作有用的纯化手柄。根据某些实施方案,工程化的扭结菌素肽在酵母中表达。例如,酵母菌株巴氏毕赤酵母(*Pichia pastoris*)已成功用于生产2-10mg/L的纯化的工程化扭结菌素。酵母表达构建体可编码一个或多个标签(例如,用于通过例如金属螯合色谱(Ni-NTA)纯化的C-端六聚组氨酸标签)。然后可以使用大小排阻色谱除去聚集体、错误折叠的多聚体等。

[0097] 本公开的方面包括编码在本公开的缀合物中使用的扭结菌素肽和融合蛋白的核酸。即,提供了编码本文所述的具有与感兴趣的细胞表面分子结合的工程化环的任何扭结菌素肽和融合蛋白的核酸。在某些方面,此种核酸存在于表达载体中。表达载体包括与编码扭结菌素肽的核酸可操作地连接的启动子,该启动子基于选择用于表达扭结菌素肽的宿主细胞的类型进行选择。还提供了包含本公开的任何扭结菌素肽编码核酸的宿主细胞,以及包含其的任何表达载体。

[0098] 使用直接结合或竞争结合测定来测量扭结菌素对细胞(例如,癌细胞,例如哺乳动物癌细胞)表面上表达的分子的亲和力的方法是可用的。在直接结合测定中,可以使用缀合至荧光团或放射性同位素的扭结菌素或含有N-或C-末端表位标签的扭结菌素测量平衡结合常数(K_D)以供通过标记的抗体进行检测。如果标记或标签不可行或不是期望的,可以使用竞争结合试验来确定半数最大抑制浓度(IC_{50})——可检测到标记的竞争物的最大信号的50%的未标记扭结菌素的量。然后可以从测得的 IC_{50} 值计算出 K_D 值。当在较低浓度范围内测量高亲和力相互作用时,配体耗竭将更为明显,并且可以通过减少实验中添加的细胞数量或通过增加结合反应体积来避免配体耗竭或使配体耗竭最小化。

[0099] 在某些方面,扭结菌素肽对细胞表面分子的平衡结合常数(K_D)为约0.01nM至100nM,例如约0.025nM至75nM、约0.05nM至50nm、约0.075nM至25nM或约0.1nM至10nM。在一些实施方案中,扭结菌素肽对细胞表面分子的平衡结合常数(K_D)为约0.1nM至10nM。在一些实施方案中,扭结菌素肽对细胞表面分子的平衡结合常数(K_D)为约0.1nM。在一些实施方案中,扭结菌素肽对细胞表面分子的平衡结合常数(K_D)为约0.5nM。在一些实施方案中,扭结菌素肽对细胞表面分子的平衡结合常数(K_D)为约1nM。在一些实施方案中,扭结菌素肽对细胞表面分子的平衡结合常数(K_D)为约5nM。在一些实施方案中,扭结菌素肽对细胞表面分子的平衡结合常数(K_D)为约10nM。

[0100] 通过酵母表面展示技术使扭结菌素工程化的详细指南和具体方案,包括扭结菌素文库构建和筛选,以及通过化学合成和重组表达生产扭结菌素,以及进一步使用直接结合或竞争结合测定的用于测量扭结菌素与细胞表面上表达的分子(受体)的亲和力的细胞结合测定,描述于Moore, S. 和Cochran, J. (2012) 作为新型粘合剂的工程化扭结菌素(Engineering Knottins as Novel Binding Agents),《酶学方法(Methods in Enzymology)》,503,223-251。

[0101] 接头

[0102] 本公开的免疫刺激剂可以通过多种合适的接头缀合至扭结菌素肽。可用于本发明的缀合物的接头包括酯接头、酰胺接头、马来酰亚胺或马来酰亚胺基接头;缬氨酸-瓜氨酸

接头;脞接头;N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)接头;琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)接头;乙烯基砜基接头;包括聚乙二醇(PEG)的接头,例如但不限于四甘醇;包括丙酸的接头;包括癸烯酸的接头,和包括其任何组合的接头。

[0103] 在某些方面,该接头是化学不稳定接头,诸如在中性pH(血流pH 7.3-7.5)下稳定但在内化到弱酸性胞内体(pH 5.0-6.5)以及靶细胞(例如,癌细胞)的溶酶体(pH 4.5-5.0)中时发生水解的酸可裂解接头。化学不稳定接头包括但不限于脞基接头、脞基接头、碳酸酯基接头、酯基接头等。根据某些实施方案,该接头是酶不稳定接头,诸如这样一种酶不稳定接头,其在血流中是稳定的,但在内化到靶细胞中时进行酶切(例如,通过靶细胞(例如,癌细胞)的溶酶体中的溶酶体蛋白酶(诸如组织蛋白酶或纤溶酶))。酶不稳定接头包括但不限于包括肽键的接头,例如,二肽基接头,诸如缬氨酸-瓜氨酸接头,诸如马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基(MC-vc-PAB)接头、缬氨酰-丙氨酰基-对氨基苄氧基(Val-Ala-PAB)接头等。化学不稳定接头、酶不稳定的和不可切割的接头是已知的并且详细描述于例如Ducry&Stump(2010)《生物共轭化学(Bioconjugate Chem.)》21:5-13中。

[0104] 在某些实施方案中,本公开的缀合物包含通过本公开的下文的制备缀合物的方法和实验部分以及附图中描述的接头与扭结菌素肽缀合的免疫刺激剂。

[0105] 制备缀合物的方法

[0106] 还提供了制备缀合物的方法。根据一些实施方案,提供了制备扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的方法,所述方法包括通过接头将免疫刺激剂缀合至扭结菌素肽。在某些实施方案中,缀合包括使免疫刺激剂官能化,以及将官能化的免疫刺激剂缀合至扭结菌素肽。根据一些实施方案,扭结菌素肽和/或免疫刺激剂选自上文和下文实验部分中描述的任何扭结菌素肽和/或免疫刺激剂。

[0107] 根据一些实施方案,免疫刺激剂包含伯胺,并且使免疫刺激剂官能化包括使伯胺与胺反应性接头反应。在实施制备扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的方法时,可以使用多种胺反应性接头。根据一个非限制性实例,胺反应性接头是胺反应性NHS酯接头。在某些实施方案中,当使用胺反应性接头时,胺反应性接头包含选自双环[6.1.0]壬炔(BCN)、二苯并环辛炔(DBCO)和叠氮化物部分的部分。当胺反应性接头包含这种部分时,将官能化免疫刺激剂缀合至扭结菌素肽可包括使胺反应性接头的部分与扭结菌素肽的部分反应。根据一些实施方案,扭结菌素肽包含构成扭结菌素肽的部分的非天然氨基酸。例如,非天然氨基酸可以提供叠氮部分。在一个非限制性实例中,通过将一个或多个5-叠氮基-L-正缬氨酸结合到扭结菌素肽的所需位置处来提供叠氮部分。在某些实施方案中,与官能化免疫刺激剂反应的扭结菌素肽的部分是N-末端胺基团。

[0108] 在一些实施方案中,本公开的扭结菌素-免疫刺激剂缀合物是根据图2-4、8和9中所示和/或如以下实验部分所述的任何方法制备的。

[0109] 图2提供了使免疫刺激剂官能化的示例策略。(A)具有可用于缀合的伯胺的免疫刺激剂可以与(B)带有点击化学手柄(例如BCN、DBCO、叠氮化物)的胺反应性NHS酯接头反应,从而产生(C)带有点击化学手柄(例如BCN、DBCO、叠氮化物)的官能化免疫刺激剂,它们用于将免疫刺激剂缀合至肿瘤靶向剂(图4中描述)。

[0110] 图3提供了扭结菌素肽的示例序列和图解。(A)具有整合蛋白结合环

(PRPRGDNPLT) 和所示半胱氨酸结支架的二硫键的扭结菌素肽2.5F和3CM的序列。(B) 具有所示N-末端胺基的2.5F和所示在X₁位置具有5-叠氮基-L-正缬氨酸的3CM的扭结菌素肽结构示意图。扭结菌素肽2.5F可以缀合在N末端胺基上,而3CM可以缀合在X₁叠氮位点(为此目的结合的非天然氨基酸)。3CM还具有可用的N端胺基,其可与免疫刺激剂或探针(例如荧光团)反应(参见图9)。此外,2.5F的X₂位置处的苯丙氨酸可以代替3CM中的酪氨酸,以便于通过UV吸收进行浓度测量。可以使用X₂处的任一氨基酸而不损害结合亲和力。

[0111] 图4示出了将扭结菌素肽与官能化免疫刺激剂缀合的示例策略。(A) 3CM的X₁叠氮化物可以使用应变促进的叠氮化物-炔烃环加成(SPAAC)来与BCN或DBCO官能化的免疫刺激剂(例如,包含一个或多个CpG二核苷酸(例如,CpG ODN)的基于寡核苷酸的TLR 9激动剂,有时在附图、其描述以及实验部分中称为“CpG”;或T78a)反应。(B) 2.5F的N末端胺可以使用叠氮化物-PEG4-NHS酯接头进行修饰,以结合N末端叠氮化物。N-末端叠氮化物可以使用SPAAC来与BCN或DBCO官能化免疫刺激剂反应。

[0112] 图8(上图)示意性地示出了根据本公开的实施方案制备扭结菌素-免疫刺激剂缀合物(在此实施例中为扭结菌素-Fc-T78a)的方法。如图所示,为了将扭结菌素-Fc(KFc)缀合至T78a以产生KFc-T78a,使用BCN修饰的KFc和叠氮基-T78a。

[0113] 图9(上图)示意性地示出了制备扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的方法,其中扭结菌素进一步缀合至可检测标记。在此实施例中,可检测标签是AlexaFluor 680。根据合成3CM-CpG-AF680的此示例方法,3CM在N末端用AF680-NHS酯(荧光团)修饰,并在X₁叠氮化物处用DBCO-CpG修饰。

[0114] 组合物

[0115] 如上所述,本公开提供了组合物。所述组合物可以包括本公开的任何缀合物,包括在以上缀合物部分中描述的任何缀合物,为了简洁起见,将其并入此处但不再重复。

[0116] 在某些方面,组合物包含存在于液体介质中的本公开的缀合物。液体介质可以是水性液体介质,诸如水、缓冲溶液等。一种或多种添加剂诸如盐(例如,NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄)、缓冲剂(Tris缓冲剂、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等)、蛋白酶抑制剂、甘油等可以存在于此类组合物中。

[0117] 还提供了药物组合物。药物组合物包含本公开的任何缀合物和药学上可接受的载体。药物组合物通常包含治疗有效量的缀合物。“治疗有效量”是指足以产生期望的结果的剂量,例如,足以产生有益的或期望的治疗(包括预防性)结果的量,诸如患有与工程化环结合的细胞表面分子相关联的细胞增殖性病症(例如,癌症)的个体中的细胞增殖减少等。有效量可以在一次或多次施用中施用。

[0118] 本公开的缀合物可以掺入各种用于治疗性施用的制剂中。更特别地,缀合物可以通过与适当的药学上可接受的赋形剂或稀释剂组合配制成药物组合物,并且可以配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏、溶液剂、注射剂、吸入剂和喷雾剂。

[0119] 适于对个体施用(例如,适于人施用)的本公开的缀合物的制剂通常是无菌的,并且还可以不含可检测的致热原或根据所选择的施用路径对个体施用禁忌的其它污染物。

[0120] 在药物剂型中,缀合物可以单独施用或适当联合施用,以及与其它药物活性化合

物联合施用。以下方法和赋形剂仅仅是实例，而绝不是限制性的。

[0121] 对于口服制剂，缀合物可单独使用或与适当的添加剂组合使用，以制备片剂、粉剂、颗粒剂或胶囊剂，例如，与常规添加剂，如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉；与粘合剂，如结晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯树胶、玉米淀粉或明胶；与崩解剂，如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羧甲基纤维素钠；与润滑剂，如滑石或硬脂酸镁；并且如果需要，与稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂 and 调味剂组合使用。

[0122] 可以将缀合物配制成制剂，通过将所述制剂溶解、悬浮或乳化在水性或非水性溶剂（诸如植物油或其它类似油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸酯或丙二醇）中进行注射；并且如果需要，可以使用常规添加剂，诸如增溶剂、等渗剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

[0123] 药物组合物可以是液体形式、冻干形式或由冻干形式重构的液体形式，其中冻干制剂在施用前用无菌溶液重构。重构冻干组合物的标准程序是加回一定体积的纯水（通常相当于冻干期间移除的体积）；然而，包括抗菌剂的溶液可以用于产生用于肠胃外施用的药物组合物。

[0124] 缀合物的水性制剂可以在pH缓冲溶液中制备，例如，在约4.0至约8.0、诸如约4.5至约7.5、例如约5.0至约7.0的pH范围内。适于此范围内的pH的缓冲剂的实例包括磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂和其它有机酸缓冲剂。缓冲剂浓度可为约1mM至约100mM，或约5mM至约50mM，这取决于例如缓冲剂和制剂的所需张力。

[0125] 试剂盒

[0126] 本公开的方面还包括试剂盒。在一些实施方案中，主题试剂盒包括本公开的任何缀合物（包括上文缀合物部分中描述的任何缀合物，出于简洁的目的将其并入此处但不再重复）或包含它们的药物组合物，以及用于向有需要的个体施用药物组合物的说明书。在某些实施方案中，缀合物包含扭结菌素肽，其包含与癌细胞表面分子和/或肿瘤血管细胞表面上的分子结合的工程化环（例如，与本文别处所述的任何肿瘤抗原、细胞粘附受体（例如，整合蛋白）等结合的工程化环），并且说明书用于向患有癌症的个体施用药物组合物以治疗癌症。

[0127] 在一些实施方案中，缀合物或药物组合物以一种或多种（例如，两种或更多种）单位剂量存在。如本文中所使用的，术语“单位剂量”是指适合作为用于人和动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位，每个单位包含按足以产生期望效果的量计算的预定量的缀合物或组合物。单位剂量的量取决于各种因素，例如所用的特定缀合物、要实现的效果和个体中与缀合物相关的药效学。在其它实施方案中，试剂盒可以包括单一多剂量的量的缀合物或药物组合物。

[0128] 试剂盒的组分可以存在于不同容器中，或者多个组分可以存在于单一容器中。

[0129] 试剂盒中所包括在说明书可以记录在合适的记录介质上。例如，说明书可以印刷在如纸或塑料等基材上。因此，说明书可以作为包装插页存在于试剂盒中、存在于试剂盒的容器或其组分的标签中（即与包装或次包装有关联）等。在其它实施方案中，说明书作为存在于合适的计算机可读存储介质（例如，便携式闪存驱动器、DVD、CD-ROM、软盘等）上的电子存储数据文件存在。在其它实施方案中，试剂盒中不存在实际说明书，但是提供了用于从远程源（例如经由因特网）获得说明书的方式。该实施方案的一个实例是包括网址的试剂盒，

可以在所述网址中查看说明书和/或可以从所述网址下载说明书。与说明书一样,用于获得说明书的手段记录在合适的基材上。

[0130] 使用方法

[0131] 如上所述,还提供了使用本公开的缀合物的方法。在一些实施方案中,所述方法包括使用以上缀合物部分中描述的任何缀合物,为了简洁起见,将其并入此处但不再重复。

[0132] 在一些实施方案中,提供的方法包括对有需要的个体施用治疗有效量的本公开的任何缀合物或任何药物组合物。在某些实施方案中,个体患有癌症,缀合物的扭结菌素肽包含与个体中存在的癌细胞和/或肿瘤血管细胞上的细胞表面分子结合的工程化环,并且向个体施用有效治疗癌症的量的包含缀合物的药物组合物。因此,本公开内容的方面包括通过向患有癌症的个体施用治疗有效量的本公开的任何缀合物或任何药物组合物来治疗癌症的方法。

[0133] 根据该主题方法,可以治疗各种各样的个体。通常这种个体是“哺乳动物”或“哺乳类动物”,其中这些术语广泛用于描述哺乳纲内的生物体,包括食肉目(例如狗和猫),啮齿目(例如小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长目(例如人、黑猩猩和猴)。在一些实施方案中,个体是人。在一些实施方案中,个体是动物模型,例如小鼠模型。

[0134] 在一些实施方案中,缀合物(或包含所述缀合物的药物组合物)的有效量是这样的量,与没有用缀合物或药物组合物治疗的个体中的症状相比,当单独(例如,在单一疗法中)或与一种或多种另外的治疗剂组合(例如,在组合疗法中)以一个或多个剂量施用,所述量有效地将个体的医学病状(例如,癌症等)的症状降低至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多。

[0135] 在一些实施方案中,个体患有癌症,并且本公开的方法可用于治疗个体的癌症。在一些实施方案中,个体患有以存在实体瘤、半实体瘤、原发性肿瘤、转移性肿瘤、液体肿瘤(例如白血病、淋巴瘤等)和/或类似肿瘤为特征的癌症。在一些实施方案中,个体患有选自以下的癌症:乳腺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、头颈癌、胃癌、卵巢癌、皮肤癌(例如,基底细胞癌、黑色素瘤等)、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、神经胶质瘤、膀胱癌、子宫内膜癌、肾癌、白血病(例如,急性髓性白血病(AML))、肝癌(例如,肝细胞癌(HCC)),诸如原发性或复发性HCC)、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、甲状腺癌、B细胞恶性肿瘤、其任何组合以及其任何亚型。根据某些实施方案,个体具有特征在于存在赘生性和/或恶性细胞的病状。

[0136] “治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指至少改善与个体的医学病状(例如,细胞增殖性疾病,例如,癌症)相关联的症状,其中改善在广义上用于指至少降低与所治疗的医学病状相关联的参数,例如症状的大小。因此,治疗还包括医学病状(例如,癌症)或至少与其相关联的症状被完全抑制(例如,防止发生)或停止(例如,终止)的状况,使得个体不再患有该医学病状,或至少不再患有表征该医学病状的症状。

[0137] 缀合物或药物组合物可以使用适于药物递送的任何可用方法和路径施用于个体,包括体内和体外方法,以及全身和局部施用路径。常规和药学上可接受的施用路径包括鼻内、肌内、气管内、皮下、皮内、局部应用、眼内、静脉内、动脉内、鼻、口服和其它肠内和肠胃外施用路径。在一些实施方案中,施用通过肠胃外施用进行。如果需要,可以组合施用途径,或根据缀合物和/或所需效果调节施用途径。缀合物或药物组合物可以以单个剂量或多个

剂量施用。在一些实施方案中,缀合物或药物组合物静脉内施用。在一些实施方案中,缀合物或药物组合物通过注射施用,例如,用于全身递送(例如,静脉内输注)或施用至局部位点,例如瘤内注射、瘤周注射和/或类似施用。

[0138] 在一些实施方案中,个体患有实体瘤。在一些实施方案中,当个体患有实体瘤时,所述方法包括向个体施用本公开的扭结菌素-免疫刺激剂缀合物。如本文所证明的,此类缀合物在全身施用后表现出意外的定位到实体瘤的能力,并实现比相应的非缀合免疫刺激剂显着更高的治疗功效。根据一些实施方案,个体患有实体瘤,施用是通过全身施用进行,并且实体瘤的免疫细胞微环境的特征在于与向个体全身施用仅免疫刺激剂时肿瘤的免疫细胞微环境相比CD8+T细胞百分比增加、CD4+T细胞百分比增加、B细胞百分比增加和/或髓源性抑制细胞(MDSC)百分比降低中的一种或其任何组合。根据一些实施方案,个体患有实体瘤,施用是通过全身施用进行,并且通过CD8+T细胞百分比、CD4+T细胞百分比、B细胞百分比和/或髓源抑制细胞(MDSC)百分比中的一种或其任何组合评估的实体瘤的免疫细胞微环境与向个体肿瘤内施用仅免疫刺激剂时肿瘤的免疫细胞微环境相比没有统计学上的显著差异。

[0139] 在一些实施方案中,个体患有癌症,其治疗需要缀合物穿过血脑屏障(BBB)。这种癌症的非限制性实例是脑肿瘤,例如,胶质母细胞瘤等。在一些实施方案中,当个体患有癌症而其治疗需要缀合物穿过BBB时,所述方法包括向个体施用本公开的低分子量缀合物,例如扭结菌素-免疫刺激剂缀合物。

[0140] 以下实施例以说明性方式而不是以限制性方式提供。

[0141] 实验

[0142] 实施例1-具有在不同位点结合的CpG的扭结菌素-CpG缀合物

[0143] 在此实施例中,扭结菌素肽-免疫刺激剂缀合物通过在不同位点结合免疫刺激剂来制备。此特定实施例涉及与结合在不同位点的CpG ODN(本文和图中称为“CpG”)缀合的扭结菌素肽2.5F和3CM。图5的左图示出氨基-CpG、3CM-CpG(X_1 叠氮化物)和2.5F-CpG(N-末端叠氮化物)的RAW-Blue NF- κ B活化测定结果。BCN-CpG缀合在括号中所示的位点。图5的右图示出了比较3CM、3CM-CpG(X_1 叠氮化物)和2.5F-CpG(N-末端叠氮化物)的竞争结合测定结果。

[0144] 与氨基-CpG(阳性对照)相比,扭结菌素-CpG缀合物(在任一缀合位点)表现出相似的NF- κ B活化谱,并且与未修饰的3CM(阳性对照)相比,也表现出相似的结合谱。因此,任一缀合位点(X_1 叠氮化物或N端叠氮化物)均可用于合成扭结菌素-CpG缀合物,而不会对TLR激动剂活性或结合亲和力产生负面影响。氨基-CpG表现出与未修饰的CpG相同的NF- κ B活化谱(数据未显示)。

[0145] 实施例2-用不同接头合成的扭结菌素-CpG缀合物

[0146] 在此实施例中,扭结菌素肽-免疫刺激剂缀合物是使用不同的接头制备的。此特定实施例涉及使用不同接头与CpG缀合的扭结菌素肽3CM。图6的左图示出氨基-CpG、3CM-CpG(DBCO)和3CM-CpG(BCN)的RAW-Blue NF- κ B活化测定结果。对于两种缀合物,CpG在3CM上缀合至 X_1 叠氮化物。图6的右图示出了比较3CM、3CM-CpG(DBCO)和3CM-CpG(BCN)的竞争结合测定结果。

[0147] 与氨基-CpG(阳性对照)相比,扭结菌素-CpG缀合物(具有任一接头)表现出相似的

NF- κ B活化谱,并且与未修饰的3CM(阳性对照)相比,也表现出相似的结合谱。因此,任一接头策略(DBCO或BCN)均可用于合成扭结菌素-CpG缀合物,而不会对TLR激动剂活性或结合亲和力产生负面影响。

[0148] 实施例3-扭结菌素-TLR7/8激动剂(T78a)缀合物

[0149] 在此实施例中,制备并测试了一种扭结菌素肽-免疫刺激剂,其中扭结菌素肽为3CM并且免疫刺激剂为TLR7/8激动剂T78a。图7的左图示出3CM、T78a和3CM-T78a的RAW-Blue NF- κ B活化测定结果。图7的右图示出了比较3CM和3CM-T78a的竞争结合测定结果。

[0150] TLR7/8激动剂(T78a)仅在测试的较高浓度(500-5,000nM)下活化NF- κ B,而3CM-T78a缀合物在较低浓度(50-5,000nM)下诱导活化。此外,3CM-T78a表现出与未缀合的3CM相似的结合特征,因此保留了对整合蛋白的高亲和力。

[0151] 实施例4-扭结菌素-Fc免疫刺激剂缀合物

[0152] 在此实施例中,合成并测试了包含融合到Fc结构域并缀合到免疫刺激剂的扭结菌素肽的缀合物。图8(上图)示意性地示出了制备缀合物(在此实施例中为扭结菌素-Fc-T78a)的方法。如图所示,为了将扭结菌素-Fc(KFc)缀合至T78a以产生KFc-T78a,使用BCN修饰的KFc和叠氮基-T78a。图8(下图)示出了KFc、T78a和KFc-T78a缀合物的RAW-Blue NF- κ B活化测定结果。

[0153] 在每个测试浓度下,KFc-T78a的NF- κ B活化显著高于KFc或T78a($p < 0.0001$)。为了合成,可以转换BCN和叠氮基团,使得KFc被叠氮基-NHS酯接头修饰并与BCN-T78a(或BCN-CpG)缀合。DBCO也可以代替BCN。

[0154] 实施例5-可检测标记的扭结菌素-免疫刺激物缀合物

[0155] 在此实施例中,合成并测试了包含与免疫刺激剂和可检测标记(此处为AlexaFluor 680)缀合的扭结菌素肽的缀合物。图9(上图)示意性地示出了此实施例中采用的方法。为了合成3CM-CpG-AF680,将3CM在N末端用AF680-NHS酯(荧光团)修饰,并在X₁叠氮化物用DBCO-CpG修饰。图9(下图)示出了3CM-CpG-AF680与3CM相比的竞争结合测定结果。

[0156] 3CM-CpG-AF680的结合亲和力与3CM没有显著差异(由未配对的学生t检验确定)。数据代表三个独立实验的平均值(\pm 标准偏差,SD)。

[0157] 实施例6-无创体内和离体荧光成像

[0158] 在此实施例中,对瘤内和瘤周注射的3CM-CpG-AF680缀合物进行了无创体内荧光成像。结果示出于图10中。向左肩和右肩上携带两个CT26结肠癌肿瘤的小鼠在瘤内(IT;在左侧肿瘤中)或瘤周(PT;在左侧肿瘤旁边)注射指定剂量的3CM-CpG-AF680。“剂量”是肿瘤内CpG治疗的典型剂量(等摩尔)=5.2nmol(50 μ g)。图像左侧以小时为单位示出的时间是注射后的小时数。在IT或PT注射4小时或26小时后,3CM-CpG-AF680缀合物未定位到未注射的肿瘤部位。

[0159] 同样在此实施例中,对静脉内注射的3CM-CpG-AF680缀合物进行了无创体内荧光成像。结果示出于图11中。向左肩和右肩上携带两个CT26结肠癌肿瘤的小鼠静脉内(IV;尾静脉)注射指定剂量的3CM-CpG-AF680。“剂量”是肿瘤内CpG治疗的典型剂量(等摩尔)=5.2nmol(50 μ g)。图像左侧以小时为单位示出的时间是注射后的小时数。3CM-CpG-AF680(4X剂量)在IV注射后4小时内定位于两个肿瘤,并在肿瘤部位保留超过24小时。较低剂量也可导致肿瘤定位,但无法通过体内荧光成像测量。

[0160] 26h后切除肿瘤,并观察注射2X剂量和4X剂量的小鼠的离体肿瘤荧光(参见图12)。结果显示出于图12中。向左肩和右肩上携带两个CT26结肠癌肿瘤的小鼠在瘤内(IT;在左侧肿瘤中)、瘤周(PT;在左侧肿瘤旁边)或静脉内(IV;尾静脉)注射指定剂量的3CM-CpG-AF680。“剂量”是肿瘤内CpG治疗的典型剂量(等摩尔)=5.2nmol(50ug)。在注射后26h切除肿瘤以进行成像。离体图像支持来自体内成像的观察结果。A)在IT或PT注射26h后,3CM-CpG-AF680不定位于未注射肿瘤(右侧肿瘤)。B)3CM-CpG-AF680递送的PT在注射后26h导致肿瘤吸收;缀合物也可能存在于瘤周注射部位(肿瘤周围区域)。C)IV递送的3CM-CpG-AF680(4X剂量)在注射后26h定位于两个肿瘤。在静脉内递送3CM-CpG-AF680(2X剂量)的一个肿瘤中也观察到了定位。

[0161] 实施例7-由肿瘤生长所指示的扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的治疗功效

[0162] 在此实施例中,评估了示例性扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的治疗功效。作为原理证明,在此实施例中使用3CM-CpG缀合物。使用侵袭性4T1乳腺癌小鼠模型。证明3CM-CpG在4T1-Luc乳腺癌(n=9-10)中的治疗功效的存活曲线示出在图13中。与用三个剂量的静脉内未修饰的CpG或媒介物对照治疗的小鼠相比,接受三个剂量的静脉内扭结菌素-CpG的已建立肿瘤的小鼠的存活期显着延长。

[0163] 此外,与媒介物处理的小鼠相比,扭结菌素-CpG治疗在9只小鼠中的6只中诱导了完全肿瘤消退,其余3只小鼠显示出肿瘤生长延迟。对于表现出完全肿瘤消退的小鼠,50%的小鼠(6只小鼠中的3只)在肿瘤消退后的几个月内治愈,没有肿瘤复发的迹象。这些结果意义重大且出乎意料,因为在4T1模型中通过替代性全身单一疗法实现治愈是前所未有的。

[0164] 还进行再攻击实验,其中在接种后141天,使用两倍数量的用于原始接种的细胞,将4T1-luc肿瘤细胞皮下重新注射到存活的小鼠腹部的另一侧中。幼稚的小鼠也被注射了相同数量的肿瘤细胞。在接种后16天,所有存活的小鼠都没有肿瘤,而所有未接种过的小鼠都已形成肿瘤。

[0165] 图14示出了4T1-Luc随时间的平均肿瘤生长。绘制每组的平均肿瘤体积,直到第一只小鼠被安乐死(来自媒介物组)。箭头表示接受3个剂量的组的治疗天数(7、9、11);1个剂量组仅第7天。数据代表平均值±SEM(n=9-10)。

[0166] 图15示出了个体4T1-Luc肿瘤生长曲线。每组中表现出完全缓解(CR)且没有复发的小鼠分数(“长期存活者”)和表现出CR且复发的小鼠分数显示在单个图上。CR被定义为完全肿瘤消退。复发的CR被定义为肿瘤完全消退,然后在肿瘤消退后的某个时间点再生长。

[0167] 实施例8-扭结菌素-免疫刺激剂缀合物对肿瘤免疫微环境的转化

[0168] 在此实施例中,通过测定肿瘤浸润性免疫细胞来评估静脉内施用的示例性扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的治疗功效机制。开发扭结菌素-免疫刺激剂缀合物的一个动机是实现全身注射并靶向递送至肿瘤部位。如果扭结菌素-免疫刺激剂到达肿瘤部位并刺激免疫反应,则预期肿瘤中的免疫细胞谱将发生变化以促进这种抗肿瘤免疫反应(例如,增加的CD8⁺T细胞)。作为原理证明,在此实施例中使用3CM-CpG缀合物。作为免疫细胞谱中所需转变的阳性对照,包括一组用直接注射到肿瘤中(从而到达肿瘤部位)的肿瘤内CpG治疗的小鼠,并且已知它们会局部刺激免疫反应。

[0169] 将4T1-luc细胞皮下植入BALB/c小鼠腹部的一侧并使其生长9天。一旦肿瘤发展,就根据示意图(图16,左上)对以下组(每组n=3只小鼠)用静脉内(IV)或瘤内(IT)注射对小

鼠进行两次处理：媒介物IV、CpG IV (18.2nmol)、3CM-CpG IV (18.2nmol) 和CpG IT (5.2nmol；典型的IT剂量)。在治疗后3天，切除肿瘤并通过FACS分析肿瘤浸润免疫细胞。图16示出了不同免疫群体的丰度图(占总活单细胞的百分比)，所述免疫群体包括CD8+T细胞、CD4+T细胞、B细胞、髓源性抑制细胞(MDSC)和NK细胞。使用带有Tukey多重比较测试的单向ANOVA进行统计分析。每组都与每个其他组进行比较。统计学上显著的组比较用在右侧具有星号的两组之间绘制的黑线进行标记： $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ ， $****P<0.0001$ 。所有其他未标记的组比较没有显著差异。图17示出了汇总每个治疗组的免疫细胞群和两个未表征的细胞群(“其他”)的平均丰度(%总活单细胞)的饼图。未表征的细胞可包括本分析中未定义的肿瘤、基质和其他免疫细胞，被分为两个群体以指示其CD11b表达。

[0170] 这些结果表明与媒介物IV和CpG IV治疗相比，3CM-CpG IV显著转换肿瘤免疫情形，如通过CD8+T细胞、CD4+T细胞和B细胞的百分比增加以及髓源性抑制细胞(MDSC)的减少所指示。此外，使用3CM-CpG IV的免疫细胞谱的这种显著变化与用CpG IT治疗所观察到的变化没有区别。这些结果表明，全身注射扭结菌素-免疫刺激剂缀合物可以诱导免疫细胞群转移，就好像免疫刺激剂直接注射到该肿瘤部位一样。

[0171] 材料和方法

[0172] 细胞系和小鼠

[0173] B16F10黑色素瘤和CT26结肠癌细胞系从ATCC获得，并且4T1-Luc乳腺癌细胞系作为礼物获得。在含有10%胎牛血清和1%青霉素/链霉素的完全培养基(具有50 μ M 2-巯基乙醇的RPMI 1640用于4T1-Luc和CT26；DMEM用于B16-F10)中培养肿瘤细胞。常规测试细胞系的支原体污染。6至8周大的雌性BALB/c小鼠购自查尔斯河实验室(Charles River Laboratory)。

[0174] NF- κ B活化测定

[0175] 使用源自鼠RAW 264.7巨噬细胞的RAW-Blue报告细胞系(Invivogen)评估激动剂效力。用TLR激动剂刺激报告细胞系诱导了信号通路，导致NF- κ B和AP-1的活化，以及随后分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)的产生。RAW-Blue细胞与不同浓度的TLR激动剂(游离或缀合)一起孵育24h。按照制造商的方案(Invivogen)，使用QUANTI-Blue检测介质，通过比色法定量上清液中的SEAP水平。数据报告为与未治疗的对照相比NF- κ B活性的倍数变化。误差棒代表一式三份进行的实验标准偏差。使用Prism软件(GraphPad)通过普通的双向ANOVA分析和Tukey的多重比较测试来确定治疗条件和未治疗对照之间的统计差异。对于统计学显著性，与未治疗的对照相比， $*p\leq 0.05$ 、 $**p\leq 0.01$ 、 $***p\leq 0.001$ 和 $****p\leq 0.0001$ 。

[0176] 竞争性结合测定

[0177] 为了比较未标记的扭结菌素和扭结菌素-TLR激动剂缀合物的相对结合亲和力，进行基于细胞的竞争结合测定，如先前在Cox等人(2016)《应用化学国际版(Angew Chem Int Ed.)》55(34):9894-7中所述，且存在一些修改。将Alexa Fluor 488标记的3CM(3CM-AF488)用作比较未标记配体(即非荧光3CM免疫刺激物缀合物)的结合亲和力的竞争者。

[0178] B16F10黑色素瘤细胞(每个样品 5×10^4 个)用细胞解离缓冲液分离，用PBS洗涤，并在200 μ L整合蛋白结合缓冲液(IBB:25mM Tris pH 7.4、150mM NaCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、1mM MnCl₂和0.1%BSA)中与0.5nM 3CM-AF488和不同浓度的未标记配体一起在4 $^{\circ}$ C下孵育3小时。对于涉及CpG的结合测定，在与整合蛋白结合剂孵育之前，用未修饰的CpG对细胞进行

预处理,以减少通过细胞表面DNA结合相互作用介导的配体消耗。将细胞在室温下用500nM未修饰的CpG (100 μ L/样品) 预处理10分钟,然后添加到竞争物和未标记配体的溶液中(最终体积为200 μ L/样品)。

[0179] 通过流式细胞术分析用PBS+0.5%BSA洗涤数次后剩余的细胞结合荧光。确定每个样品的几何平均荧光强度(MFI),并对数据集进行归一化,以使仅用竞争物处理的细胞的MFI等于100%结合。半最大抑制浓度(IC₅₀)值通过非线性回归分析确定,以使用Cheng-Prusoff关系转换为平衡解离常数(K_i)值。

[0180] 体内荧光成像

[0181] 将CT26结肠癌细胞(5 \times 10⁵)皮下注射到左肩和右肩。在两个肿瘤都建立5天后,向小鼠瘤内(IT;在左侧肿瘤中)、瘤周(PT;在左侧肿瘤旁边)或通过尾静脉静脉内(IV)注射指定剂量的3CM-CpG-AF680。“剂量”是CpG标准瘤内剂量的等摩尔量(5.2nmol,50 μ g)。因此,0.2X剂量=1nmol,1X剂量=5.2nmol,2X剂量=10.4nmol,并且4X剂量=20.8nmol。

[0182] 在注射后4h和26h,使用2%异氟醚气体麻醉小鼠并使用Spectral Instruments Imaging Ami Imager进行成像。在注射后26h最后一次扫描后,每组处死一只小鼠,切除肿瘤并成像。荧光成像设置:激发/发射:640/730nm,激发功率=10,分档=2,曝光时间=10秒,Fstop=2,FOV=25。

[0183] 肿瘤接种和治疗研究

[0184] 将4T1-Luc肿瘤细胞(1 \times 10⁴)皮下注射到BALB/c小鼠腹部右侧(第0天)。接种后七天,将小鼠随机分为实验组(每组n=9-10)。向小鼠通过尾静脉静脉内注射三个剂量(第7、9、11天)或单剂量(仅第7天)的CpG(18.2nmol,176 μ g)或等摩尔量的3CM-CpG(18.2nmol,250 μ g)。向媒介物组中的小鼠静脉注射无菌PBS(第7、9、11天)。所有治疗均在无菌PBS中配制并在注射前过滤(0.2 μ m无菌过滤器)。每2至3天用数字卡尺(三丰公司(Mitutoyo))监测肿瘤大小,并以体积(长 \times 宽 \times 高)表示。如果肿瘤大小达到最大直径1.5cm或肿瘤按照指南溃烂,则对小鼠实施安乐死。记录的存活日期表明给定小鼠何时达到安乐死标准。Kaplan-Meier方法用于存活分析。使用对数秩(Mantel-Cox)检验计算P值。

[0185] 合成-官能化免疫刺激剂

[0186] 免疫刺激剂通过点击化学手柄官能化,以使用应变促进的叠氮化物-炔烃环加成(SPAAC)连接到靶向剂。伯烷基胺修饰的TLR 7/8激动剂(称为T78a)和5'胺修饰的C类CpG-C792(称为氨基-CpG)分别购自阿克姆生物技术公司(Acme Biosciences)和整合DNA技术公司(Integrated DNATechnologies)。免疫刺激剂缀合在据报道可进行修饰的位点:咪唑啉的N1键和C类CpG的5'磷酸键。

[0187] 使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯接头对免疫刺激剂的伯烷基胺(氨基-CpG或T78a)进行官能化,以使用相应的接头结合双环壬炔(BCN)、二苯并环辛炔(DBCO)或叠氮化物手柄:BCN-PEG2-NHS酯、DBCO-PEG4-NHS酯或叠氮化物-PEG4-NHS酯(如图2所示)。将氨基-CpG(1当量)与NHS酯接头(15当量)在25%DMSO/75%100mM硼酸钠缓冲液(pH 8.5)中混合,并在室温下搅拌过夜。通过尺寸排阻使用Zeba旋转脱盐柱(7K MWCO)从剩余的NHS酯接头中纯化官能化CpG,在样品装载前将所述柱缓冲液交换到PBS中。将T78a(1.2当量)与NHS酯接头(1当量)在具有4.4当量三乙胺的无水DMSO中混合,并在室温下搅拌5-8小时。使用分析型C18柱使用分析型HPLC和/或LCMS监测反应物。用于监测CpG官能化的HPLC方法:在30分钟内从

5%到65%溶剂B的线性梯度(溶剂A:100mM三乙基乙酸铵水溶液,pH7;溶剂B:乙腈;35℃)。用于监测T78a官能化的HPLC方法:在5%溶剂B下等度保持2分钟,然后在15分钟内从5%到75%溶剂的线性梯度(溶剂A:水+0.1%TFA;溶剂B:乙腈+0.1%TFA;室温)。

[0188] 除了合成DBC0-CpG,还直接从整合DNA技术(Integrated DNA Technologies, IDT)订购DBC0-CpG。

[0189] 合成-扭结菌素肽缀合物

[0190] 固相肽合成(SPPS)用于使用标准Fmoc条件合成扭结菌素肽。肽合成、切割、折叠和HPLC纯化方案描述于Cox等人(2016)《应用化学国际版(Angew Chem Int Ed.)》55(34):9894-7。鉴于扭结菌素肽没有赖氨酸残基,使用叠氮化物-PEG4-NHS酯接头与DMSO中的4.4当量TEA,在室温下搅拌过夜,使2.5F位点特异性缀合在N末端胺,以产生N末端叠氮化物改性的2.5F,其通过RP-HPLC纯化。2.5F的修改版本称为3CM,是在2.5F序列的位置15处用非天然氨基酸5-叠氨基-L-正缬氨酸合成的,以提供替代性缀合位点(在图3A中示出为X₁叠氮化物)。此外,将位置31的苯丙氨酸(在图3A中示出为X₂)取代3CM中的酪氨酸,以促进通过UV吸收进行浓度测量。然而,在不影响结合亲和力的情况下,可以使用位置31的任一氨基酸。

[0191] 使含叠氮化物的扭结菌素(3CM或叠氮及-2.5F)(1.2当量)与BCN或DBC0修饰的CpG(1当量)在PBS中在30℃下反应过夜,以产生如图4所示的扭结菌素-CpG缀合物(3CM-CpG或2.5F-CpG)。使用Zeba自旋脱盐柱(7K MWC0)通过尺寸排阻从未反应的扭结菌素肽中纯化扭结菌素-CpG缀合物,在样品装载前将所述柱缓冲液交换到PBS中。为了产生3CM-T78a,将BCN-T78a(1.15当量)与3CM(1当量)在1:1DMSO/PBS中反应,在室温下搅拌过夜。在C18柱上通过RP-HPLC纯化反应物,使用的方法是在5%溶剂B等度保持2分钟开始,然后在30分钟内从5%到75%溶剂的线性梯度(溶剂A:水+0.1%TFA;溶剂B:乙腈+0.1%TFA;室温)。收集产物级分,将其在水中稀释,冷冻并冻干。使用分析型HPLC和/或LCMS监测反应,使用与CpG和T78a的“官能化免疫刺激剂”部分中列出的相同方法。

[0192] 合成-扭结菌素-Fc缀合物

[0193] 如前所述(B.H.Kwan等人,《实验医学期刊(J Exp Med.)》2017,214(6):1679-90),重组表达并纯化扭结菌素-Fc(KFc)融合蛋白。使用NHS酯标记,使用如图8所示的BCN-PEG2-NHS酯接头,通过可点击手柄(BCN基团)对KFc融合进行官能化。NHS酯与蛋白质中的伯胺(赖氨酸残基和N末端)反应以形成稳定的酰胺键。将KFc与BCN-PEG2-NHS酯接头(6当量)在100mM碳酸氢钠缓冲液(pH 8.3)中在室温下混合2小时。此标记方案通常会为每个KFc生成2-3个键。通过尺寸排阻使用Zeba旋转脱盐柱(7K MWC0)从剩余的接头中纯化BCN修饰的KFc,在样品装载前将所述柱缓冲液交换到PBS中。

[0194] 为了产生KFc-免疫刺激剂缀合物,将BCN修饰的KFc(1当量)与PBS中的叠氨基-T78a(6当量)在室温下搅拌过夜。通过尺寸排阻使用Zeba自旋脱盐柱(7K MWC0)从未反应的叠氨基-T78a中纯化KFc-T78a缀合物,在样品装载前将所述柱缓冲液交换到PBS中。

[0195] 对于合成,可以转换BCN和叠氨基团,使得KFc被叠氨基-NHS酯接头修饰并与BCN-T78a缀合。官能化CpG也可以替代官能化T78a。DBC0也可以随时替代BCN。

[0196] 免疫细胞浸润

[0197] 将4T1-luc细胞(2×10^4)皮下植入到BALB/c小鼠腹部的一侧并使其生长9天。一旦肿瘤发展(称为治疗后第0天),小鼠在治疗后第0天和第2天接受以下组(n=每组3只小鼠)

的静脉内 (IV) 或肿瘤内 (IT) 注射: 媒介物 IV (PBS)、CpG IV (18.2nmol)、3CM-CpG IV (18.2nmol) 和 CpG IT (5.2nmol)。CpG IT 剂量 (5.2nmol=50ug) 是在小鼠中给予的典型 IT 剂量, 并且低于 IV 剂量。第一次给药后三天, 切除肿瘤并机械分离成单细胞悬液。

[0198] 在抗体染色前, 将细胞与 LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain 一起孵育。用磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、1% 牛血清白蛋白和 0.01% 叠氮化钠中的荧光标记抗体对细胞进行表面染色, 将其固定在 2% 多聚甲醛中, 并通过流式细胞术进行分析。使用 Cytobank (www.cytobank.org) 存储并分析数据。

[0199] 为了数据分析, 将细胞门控以仅包含活的单个细胞。髓源性抑制细胞 (MDSC) 被表征为 $CD11b^+GR1^+$ 。NK 细胞被表征为 $CD3^-CD49b^+$ 。 $CD8^+$ T 细胞被表征为 $CD3^+CD8^+CD49b^-$ 。 $CD4^+$ T 细胞被表征为 $CD3^+CD4^+CD49b^-$ 。 $CD8^+$ B 细胞被表征为 $CD3^-B220^+CD49b^-$ 。

[0200] 因此, 以上仅说明本公开的原理。应当理解的是, 本领域技术人员能够设计各种布置, 尽管未在本文明确描述或示出, 但所述各种布置体现了本发明的原理并且包括在本发明的精神和范围内。此外, 本文列举的所有实例和条件性语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和发明人为促进本领域的发展而贡献的概念, 并且被解释为不限于这些具体列举的实例和条件。此外, 本文叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其具体实例的所有陈述旨在涵盖其结构和功能等同物。另外, 预期此类等同物包括当前已知的等同物以及未来开发的等同物, 即, 开发的不论结构如何执行相同功能的任何要素。因此, 本发明的范围并不旨在限于本文示出和描述的示范性实施方案。

序列表

<110> 小利兰·斯坦福大学理事会 (The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University)

凯特琳·米勒 (Miller, Caitlyn)

詹妮弗·R·科克伦 (Cochran, Jennifer R)

卡洛琳·R·贝尔托齐 (Bertozzi, Carolyn R)

伊迪特·萨吉夫-巴尔菲 (Sagiv-Barfi, Idit)

罗纳德·莱维 (Levy, Ronald)

<120> 扭结菌素-免疫刺激缀合物和相关组合物和方法

<130> STAN-1651W0

<150> US 62/908,305

<151> 2019-09-30

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 3

Gly Cys Pro Arg Ile Leu Met Arg Cys Lys Gln Asp Ser Asp Cys Leu

1 5 10 15

Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys Gly

20 25

<210> 4

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 4

Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys Cys

1 5 10 15

Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys Tyr

 20 25 30

Cys Arg

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 5

Cys Gly Glu Thr Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr Pro Gly Cys Thr

1 5 10 15

Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn Gly Leu Pro Val

 20 25

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 6

Ser Gly Ser Asp Gly Gly Val Cys Pro Lys Ile Leu Lys Lys Cys Arg

1 5 10 15

Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr

 20 25 30

Cys Gly

<210> 7

<211> 36

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 7

Met	Cys	Met	Pro	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	His	Gln	Met	Ala	Arg	Lys	Cys
1				5					10					15	
Asp	Asp	Cys	Cys	Gly	Gly	Lys	Gly	Arg	Gly	Lys	Cys	Tyr	Gly	Pro	Gln
				20				25						30	
Cys	Leu	Cys	Arg												
				35											

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 8

Gly	Cys	Pro	Gln	Gly	Arg	Gly	Asp	Trp	Ala	Pro	Thr	Ser	Cys	Lys	Gln
1				5					10					15	
Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
				20				25						30	
Gly															

<210> 9

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 9

Gly	Cys	Pro	Arg	Pro	Arg	Gly	Asp	Asn	Pro	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Gln
1				5					10					15	
Asp	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
				20				25						30	
Gly															

<210> 10

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 14

Gly Cys Arg Leu Pro Arg Gly Asp Val Pro Arg Pro His Cys Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 15

Gly Cys Tyr Pro Leu Arg Gly Asp Asn Pro Tyr Ala Ala Cys Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 16

Gly Cys Thr Ile Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Ser Glu Cys Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 20

Gly	Cys	His	Leu	Gly	Arg	Gly	Asp	Trp	Ala	Pro	Val	Gly	Cys	Lys	Gln
1				5					10					15	
Asp	Ser	Asp	Cys	Pro	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
				20				25						30	

Gly

<210> 21

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 21

Gly	Cys	Asn	Val	Gly	Arg	Gly	Asp	Trp	Ala	Pro	Ser	Glu	Cys	Lys	Gln
1				5					10					15	
Asp	Ser	Asp	Cys	Pro	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
				20				25						30	

Gly

<210> 22

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 22

Gly	Cys	Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp	Trp	Ala	Pro	Ser	Ser	Cys	Lys	Gln
1				5					10					15	
Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
				20				25						30	

Gly

<210> 23

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 23

Gly Cys Pro Leu Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Thr Glu Cys Lys Gln
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 24

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 24

Gly Cys Ser Glu Ala Arg Gly Asp Asn Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gln
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 25

Gly Cys Leu Leu Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Glu Ala Cys Lys Gln
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 26

Gly Cys His Val Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Leu Lys Cys Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 27

Gly Cys Val Arg Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Pro Ser Cys Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 28

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 28

Gly Cys Leu Gly Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Pro Ala Cys Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 29

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 29

Gly Cys Phe Val Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Leu Thr Cys Lys Gln
 1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 30

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 30

Gly Cys Pro Val Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Ala Ser Cys Lys Gln

1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

 20 25 30

Gly

<210> 31

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 31

Gly Cys Pro Arg Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Leu Thr Cys Lys Gln

1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

 20 25 30

Gly

<210> 32

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 32

Gly Cys Tyr Gln Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Ser Ser Cys Lys Gln

1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

 20 25 30

Gly

<210> 33

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 33

Gly	Cys	Ala	Pro	Gly	Arg	Gly	Asp	Trp	Ala	Pro	Ser	Glu	Cys	Lys	Gln
1				5				10					15		
Asp	Ser	Asp	Cys	Gln	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
			20					25					30		

Gly

<210> 34

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 34

Gly	Cys	Val	Gln	Gly	Arg	Gly	Asp	Trp	Ser	Pro	Pro	Ser	Cys	Lys	Gln
1				5				10					15		
Asp	Ser	Asp	Cys	Pro	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
			20					25					30		

Gly

<210> 35

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 35

Gly	Cys	His	Val	Gly	Arg	Gly	Asp	Trp	Ala	Pro	Glu	Glu	Cys	Lys	Gln
1				5				10					15		
Asp	Ser	Asp	Cys	Gln	Ala	Gly	Cys	Val	Cys	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Cys
			20					25					30		

Gly

<210> 36

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 36

Gly Cys Asp Gly Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Pro Ala Cys Lys Gln
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 37

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 37

Gly Cys Pro Gln Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Glu Trp Cys Lys Gln
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 38

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 38

Gly Cys Pro Arg Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Pro Ala Cys Lys Gln
 1 5 10 15
 Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys
 20 25 30

Gly

<210> 39

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 39

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys
 1 5 10 15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Ser Gly Arg Gly Asp Asn Asp
 20 25 30

Leu Val Cys Tyr Cys Arg
 35

<210> 40

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 40

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys
 1 5 10 15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Lys Gly Arg Gly Asp Ala Arg
 20 25 30

Leu Gln Cys Tyr Cys Arg
 35

<210> 41

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 41

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys
 1 5 10 15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Val Gly Arg Gly Asp Asp Asn
 20 25 30

Leu Lys Cys Tyr Cys Arg
 35

<210> 42

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 42

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys
 1 5 10 15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Glu Gly Arg Gly Asp Arg Asp
 20 25 30

Met Lys Cys Tyr Cys Arg
 35

<210> 43

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 43

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys
 1 5 10 15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Tyr Gly Arg Gly Asp Asn Asp
 20 25 30

Leu Arg Cys Tyr Cys Arg
 35

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 44

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 45

<211> 227

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
65					70					75					80
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
			85							90					95
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			100							105					110
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			115							120					125
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
															130
															135
															140
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
145															150
															155
															160
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
															165
															170
															175
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
															180
															185
															190
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
															195
															200
															205
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
															210
															215
															220
Pro	Gly	Lys													
225															

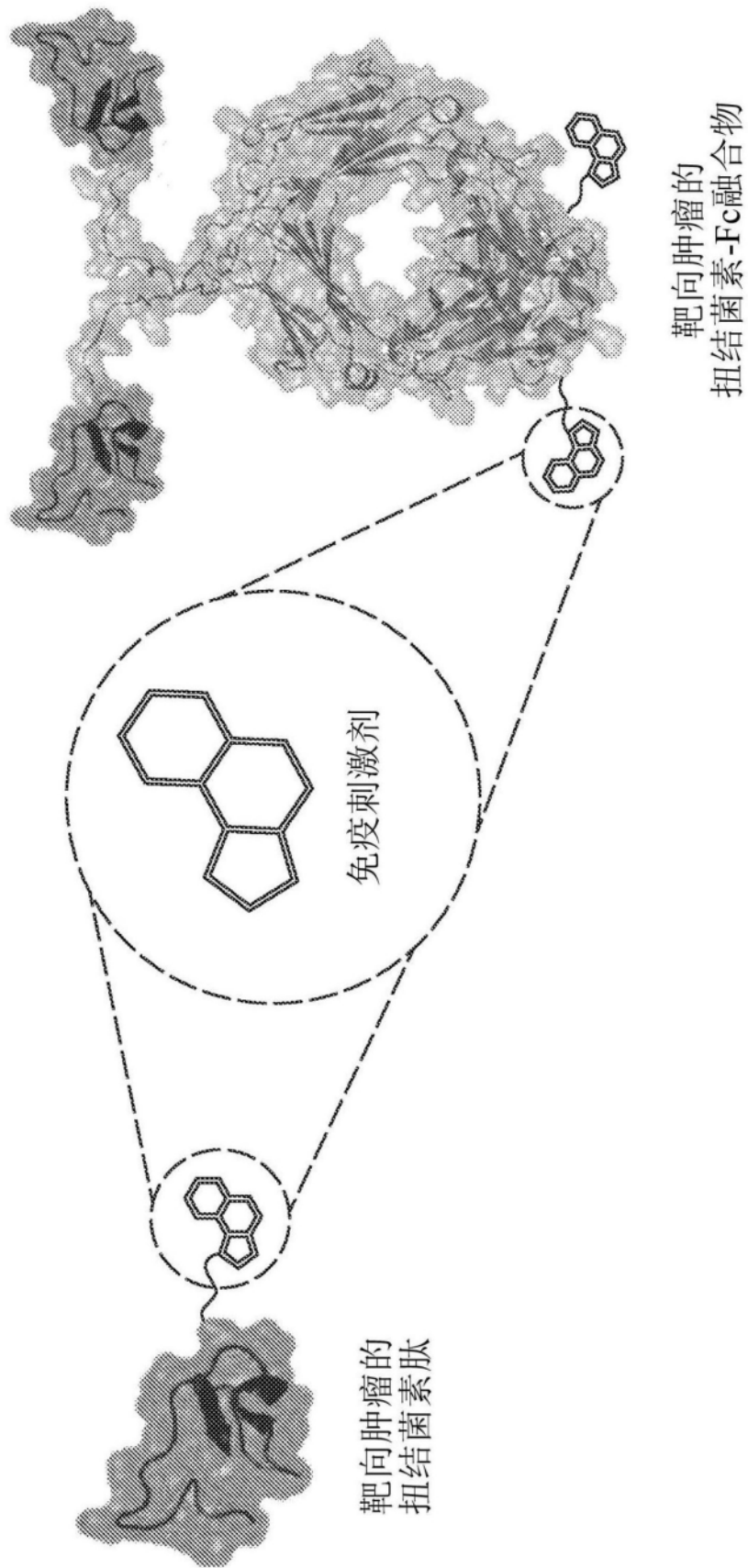


图1

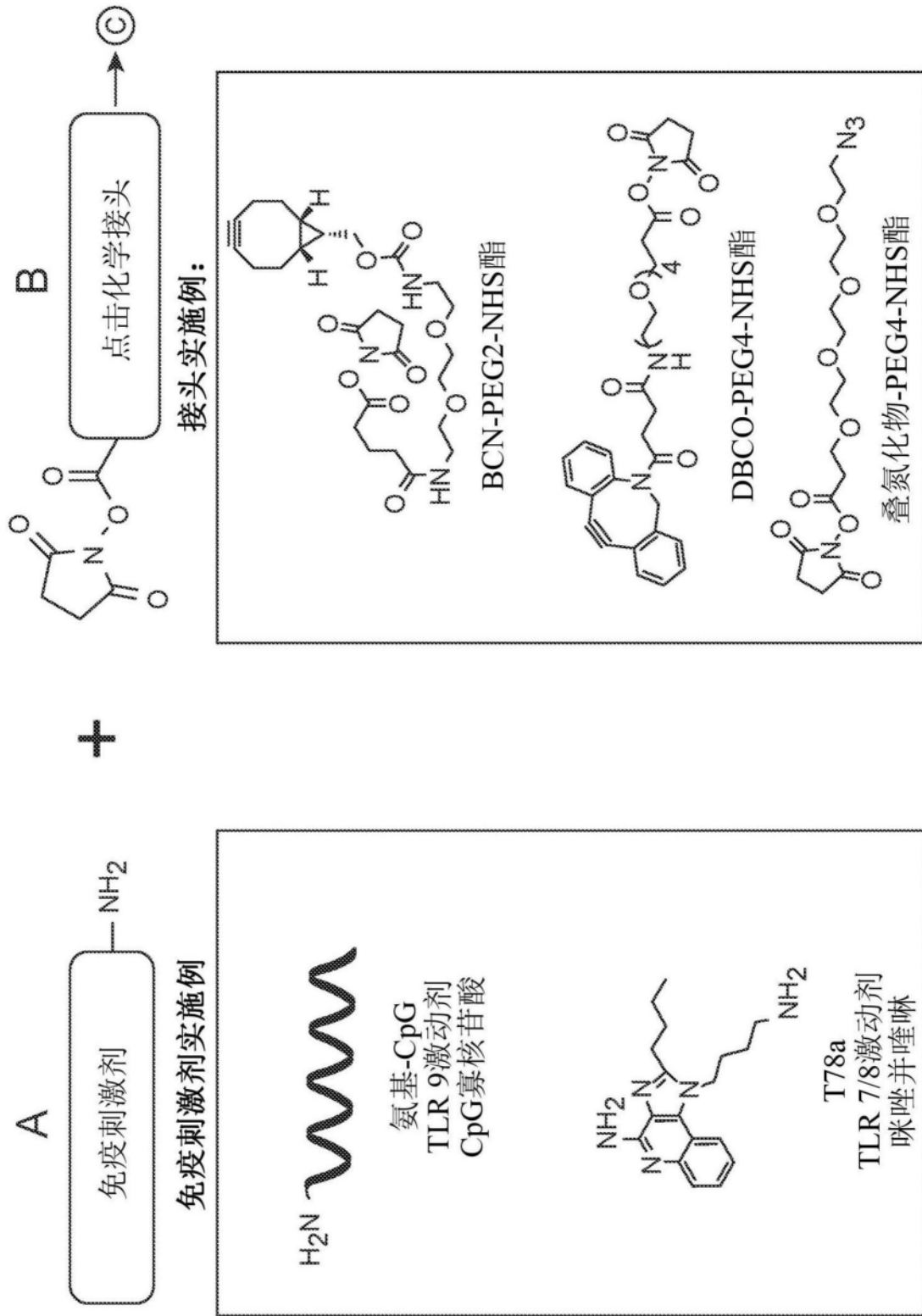


图2

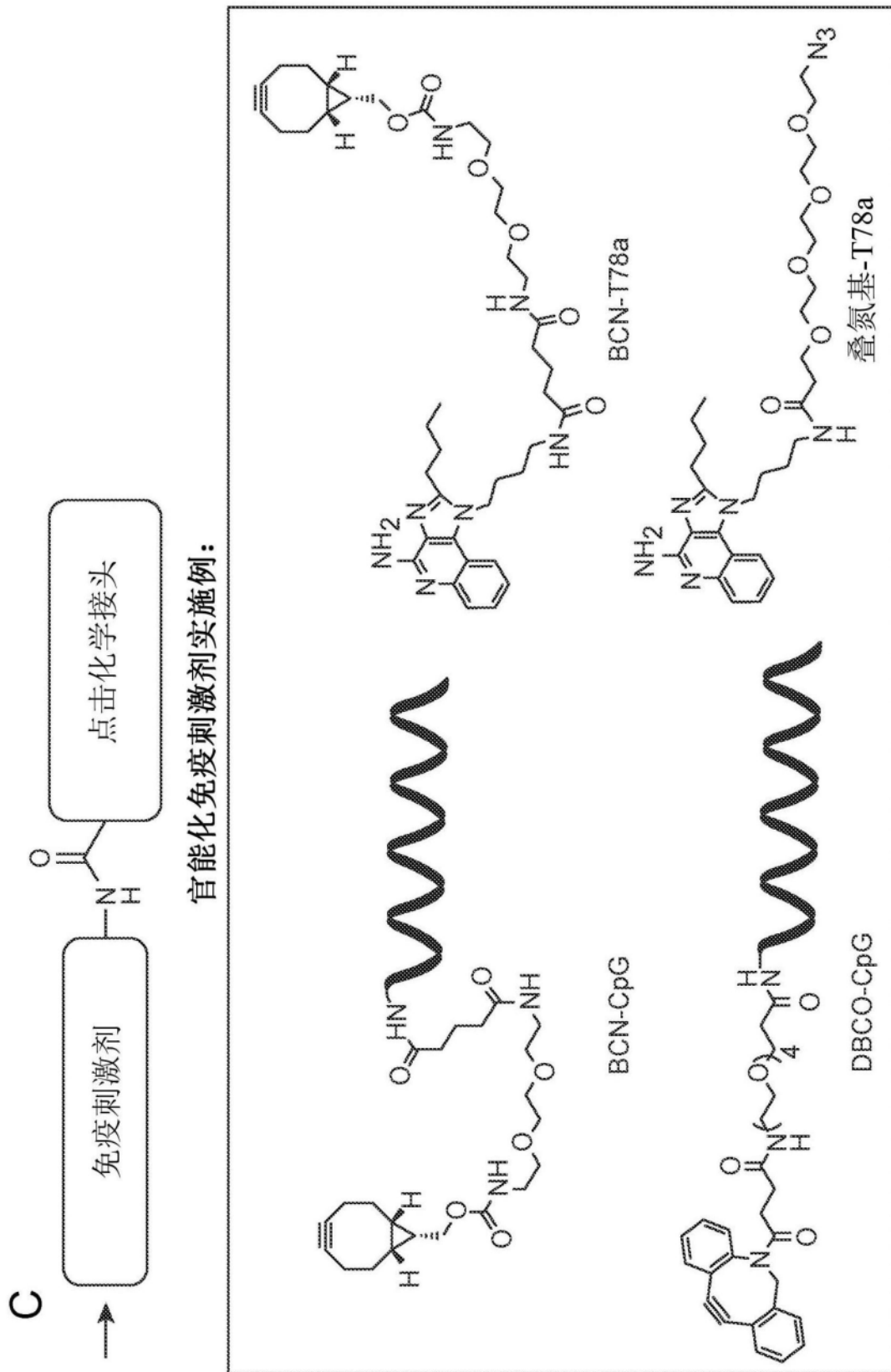
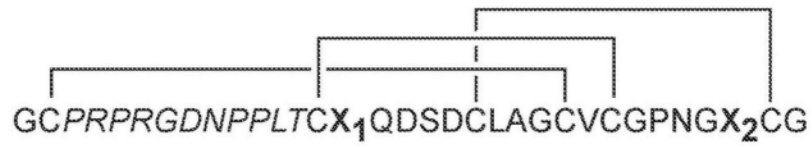


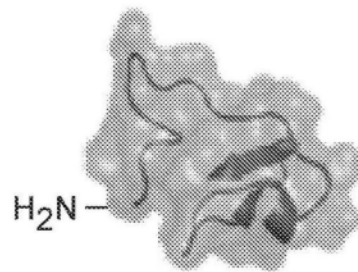
图2(续)

A

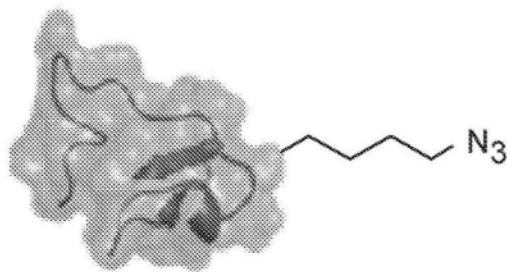


扭结菌素	X ₁	X ₂	缀合位点:
2.5F	丝氨酸	苯丙氨酸	N-末端
3CM	5-叠氨基-L-戊氨酸	酪氨酸	N-末端或X ₁ 叠氮化物

B



2.5F
(所示N-末端)



3CM
(所示X₁叠氮化物)

图3

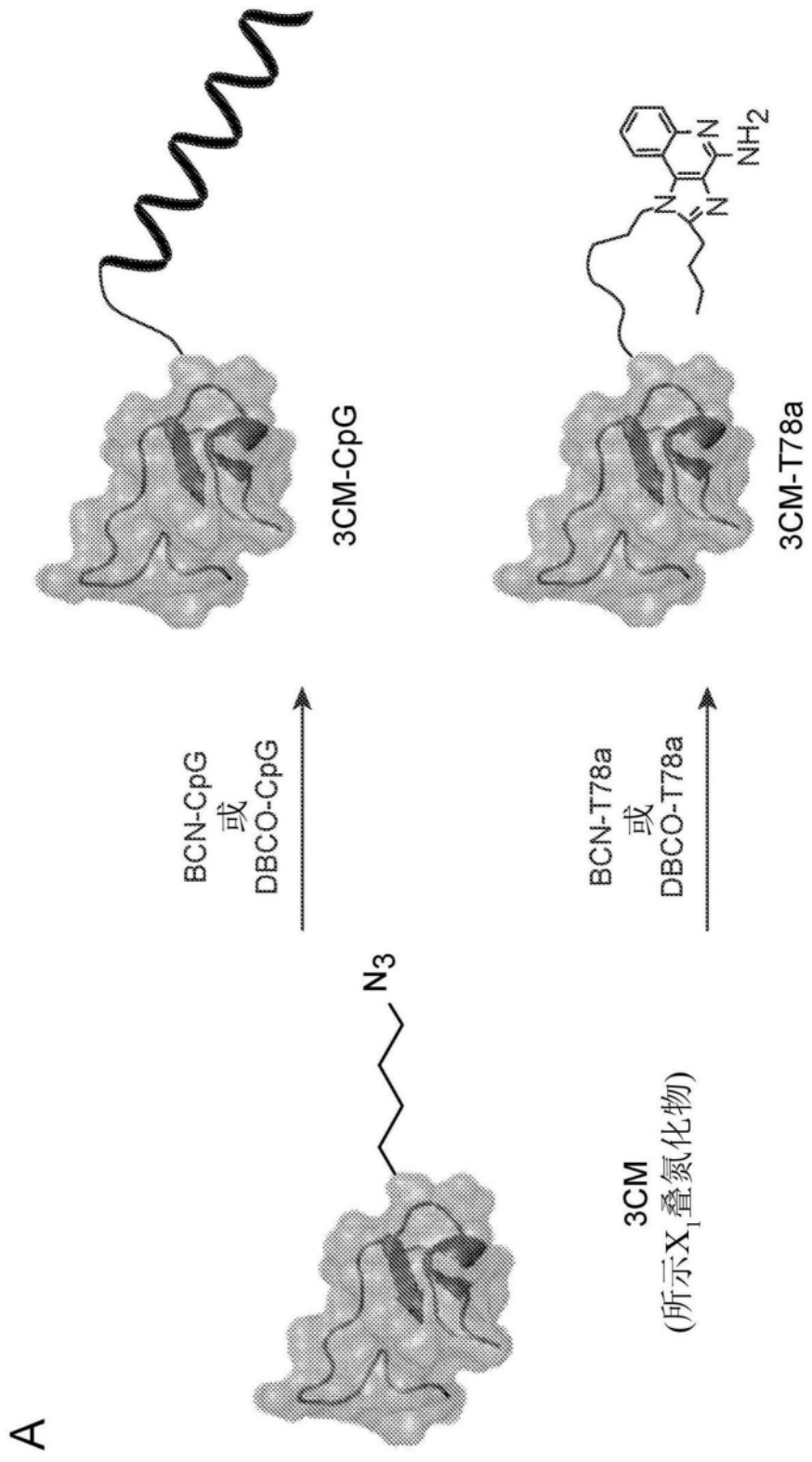


图4

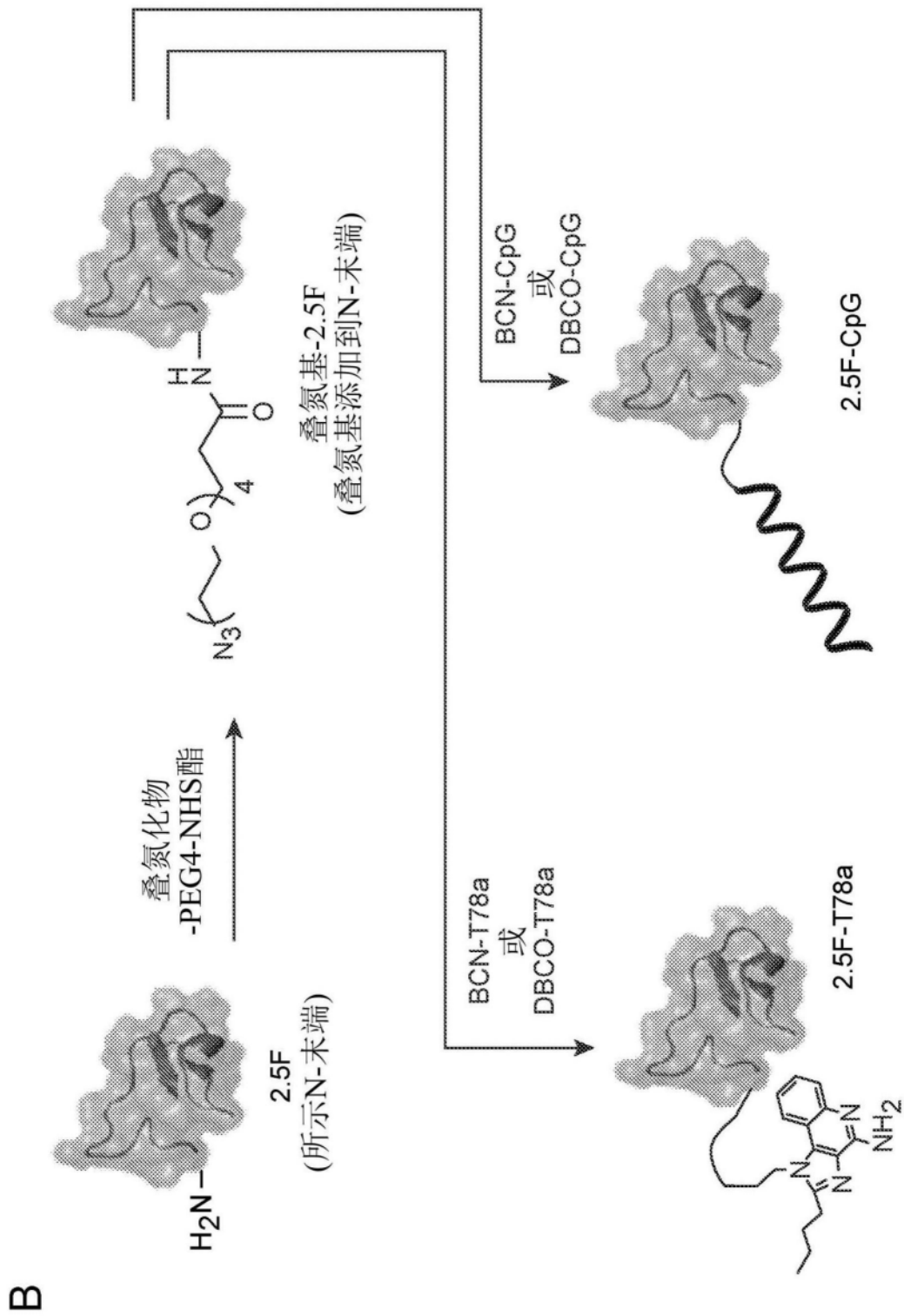


图4(续)

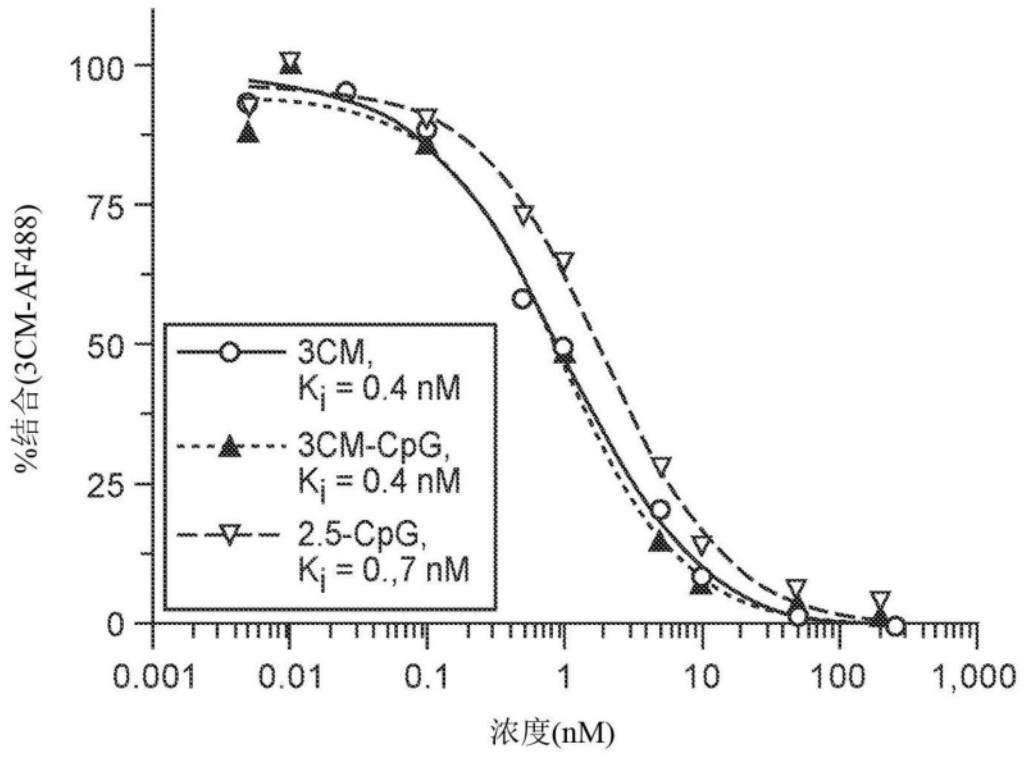
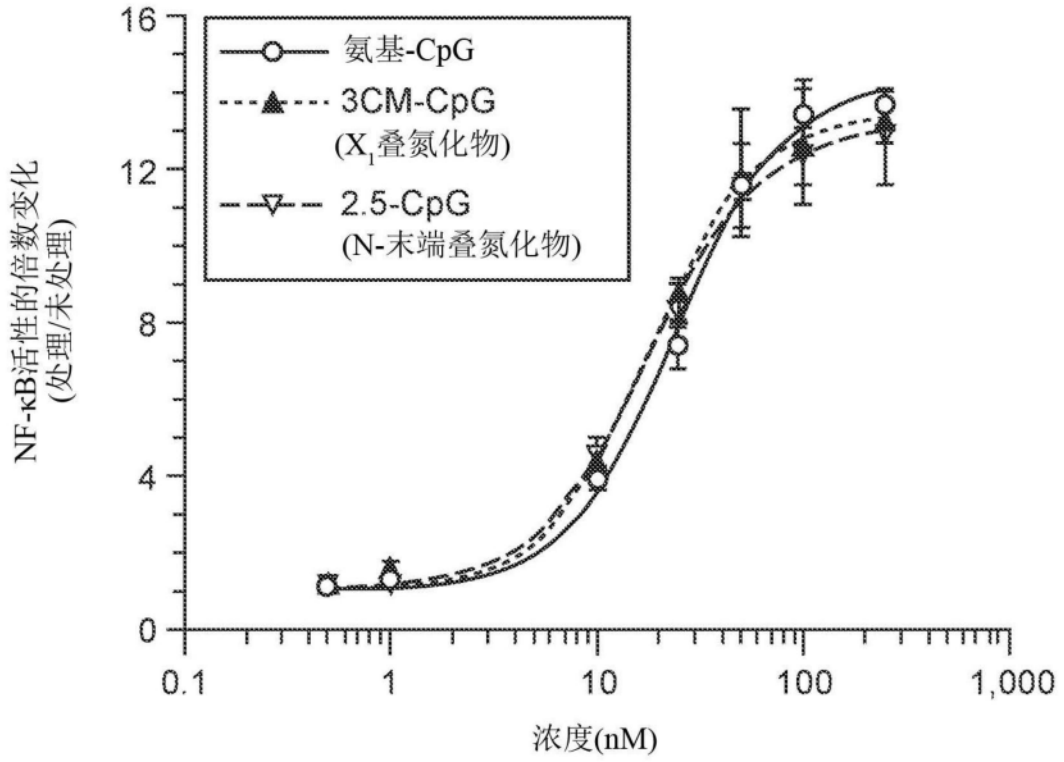


图5

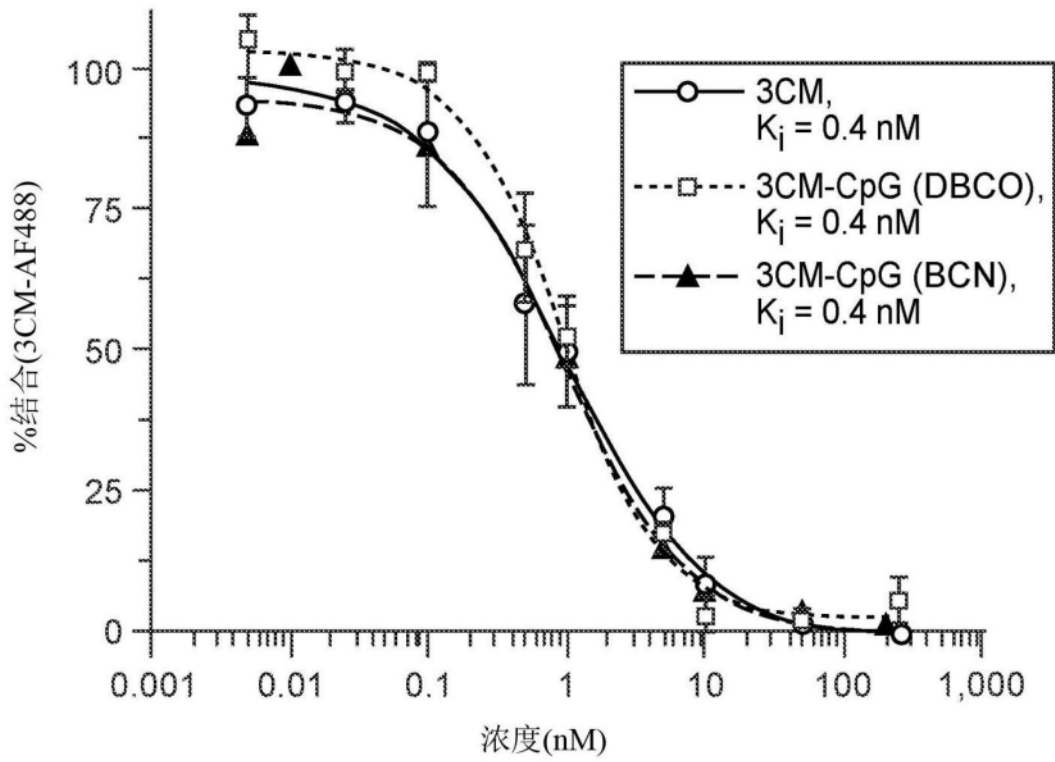
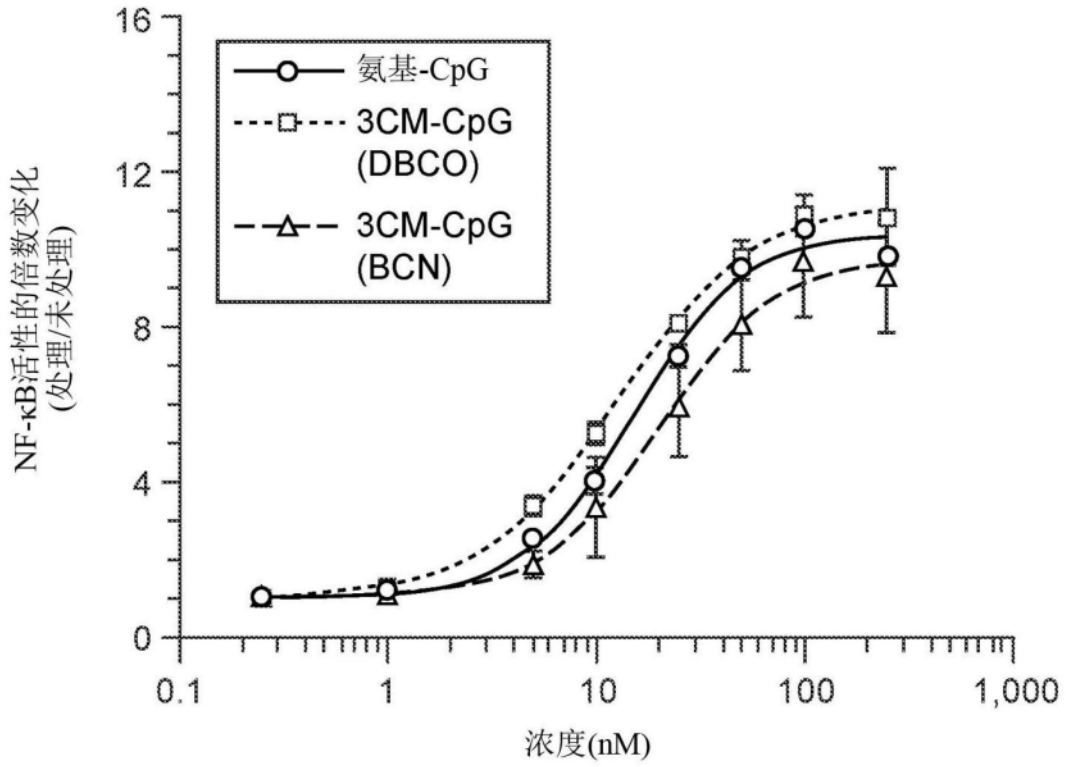


图6

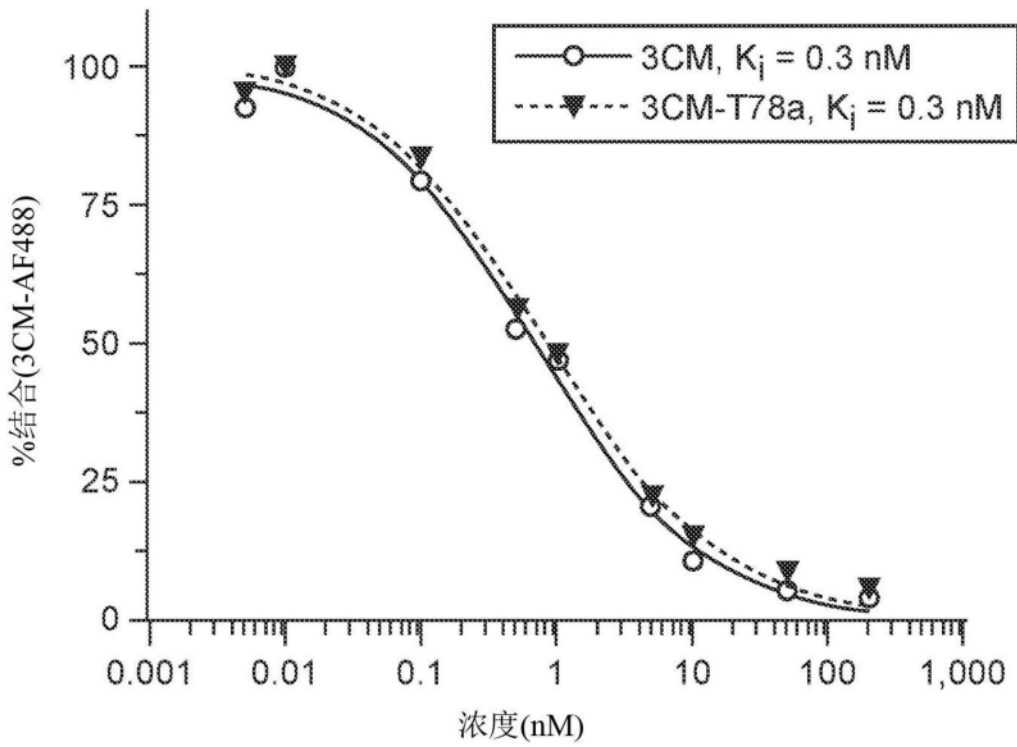
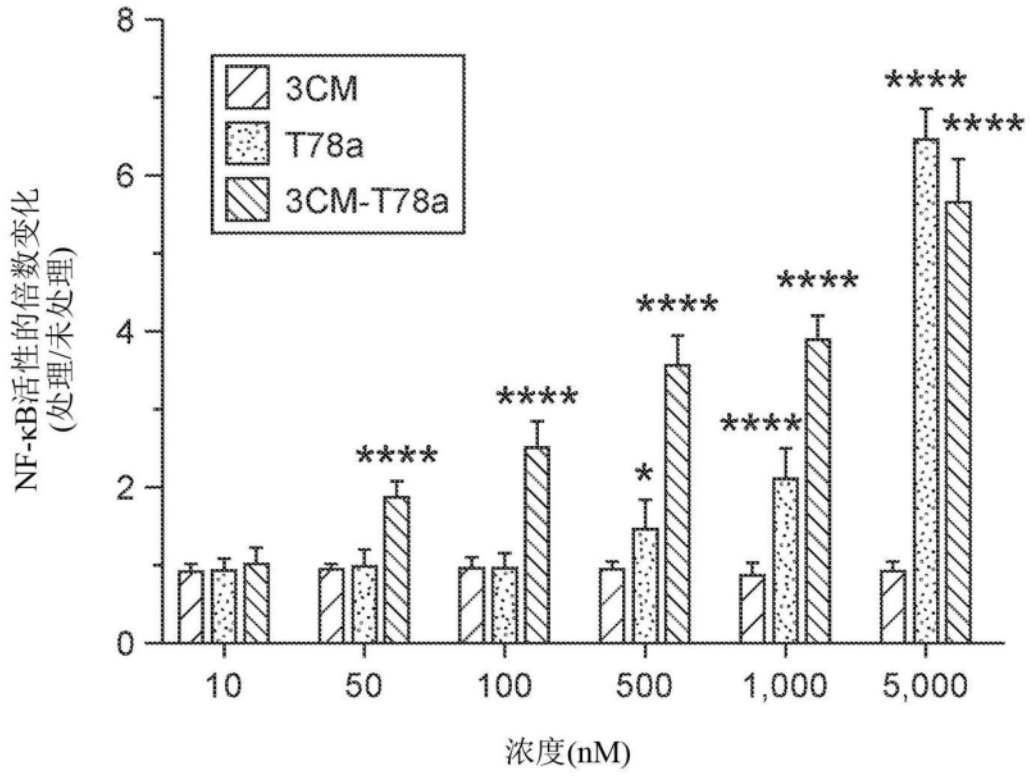


图7

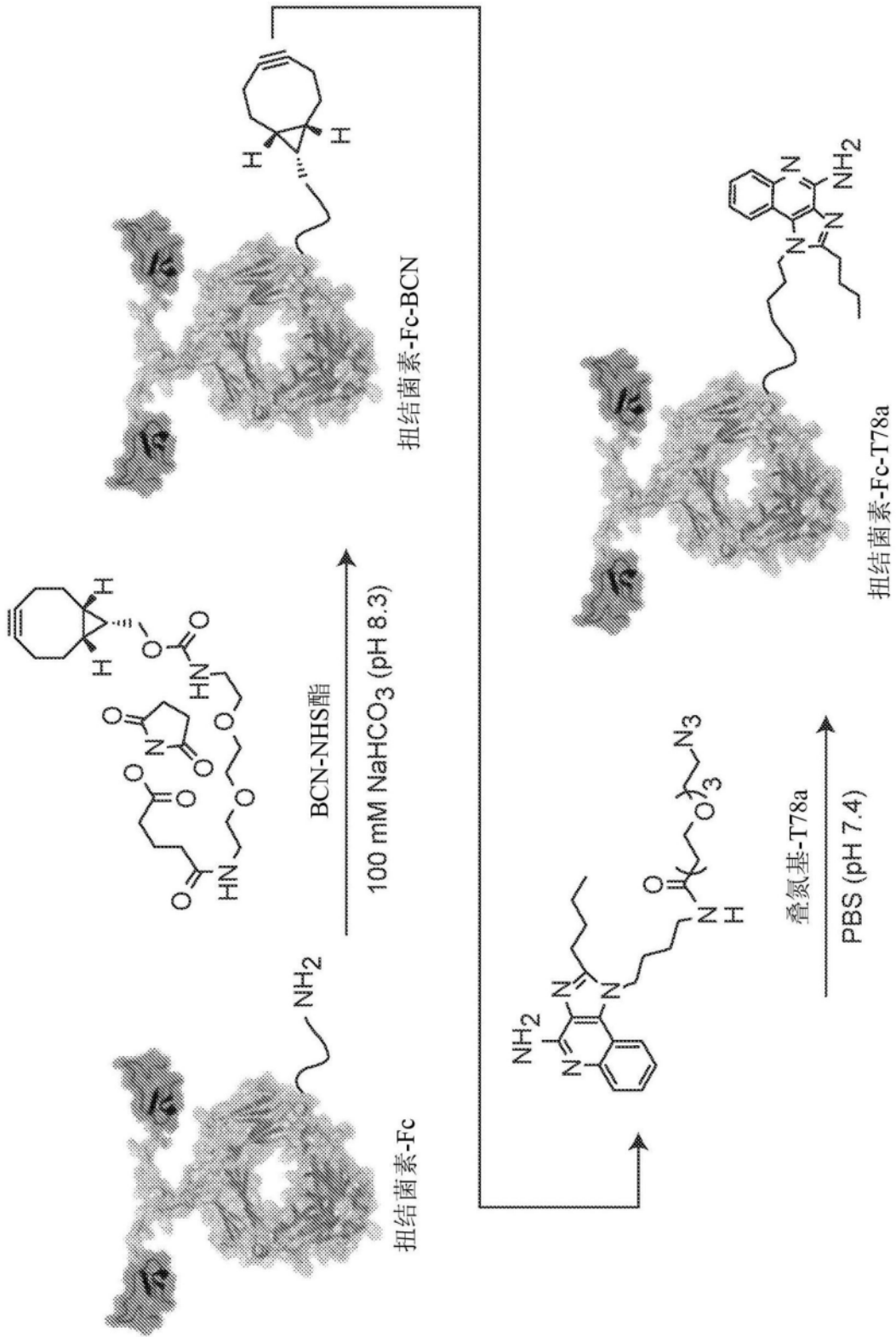


图8

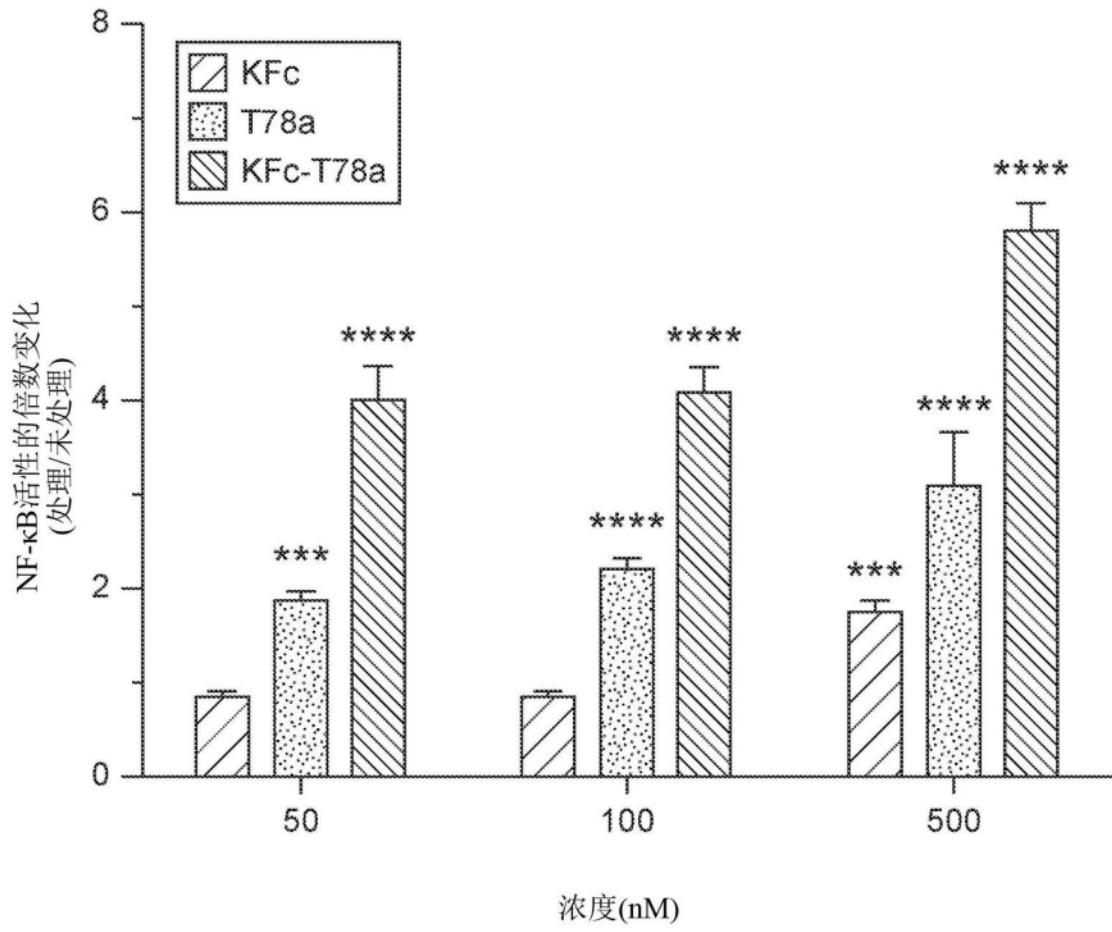


图8(续)

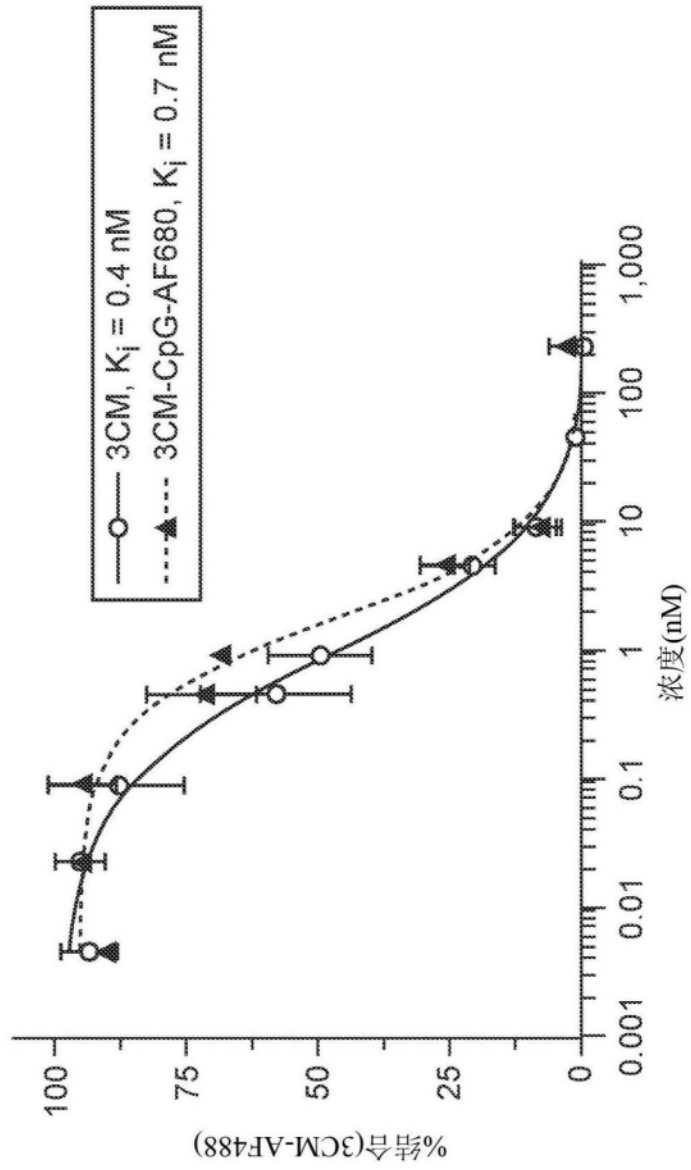
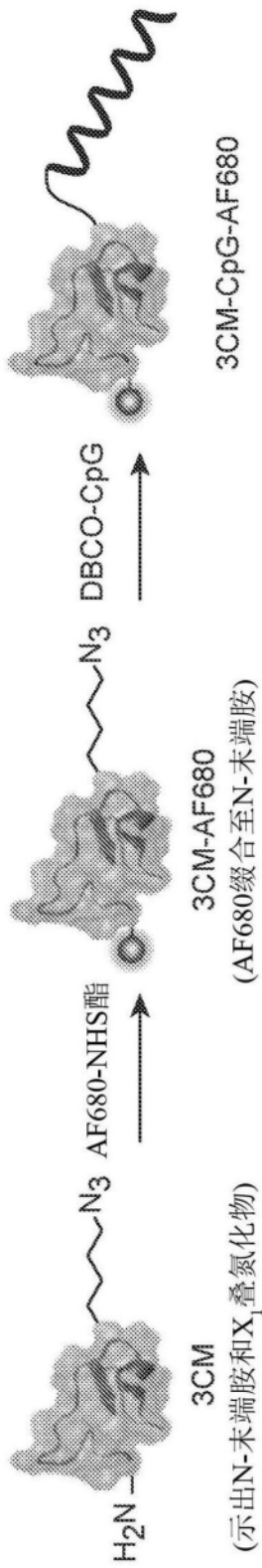


图9

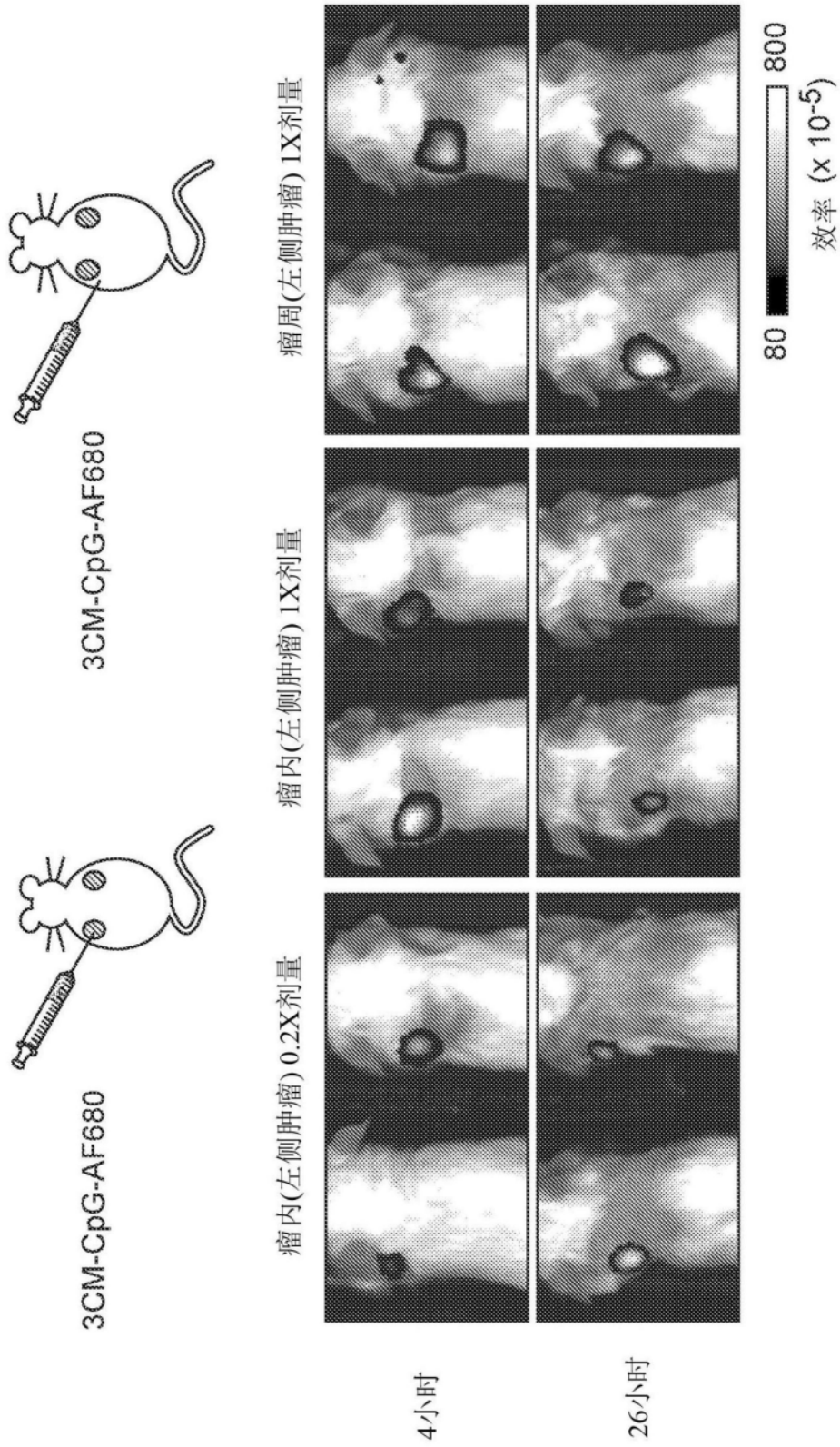


图10

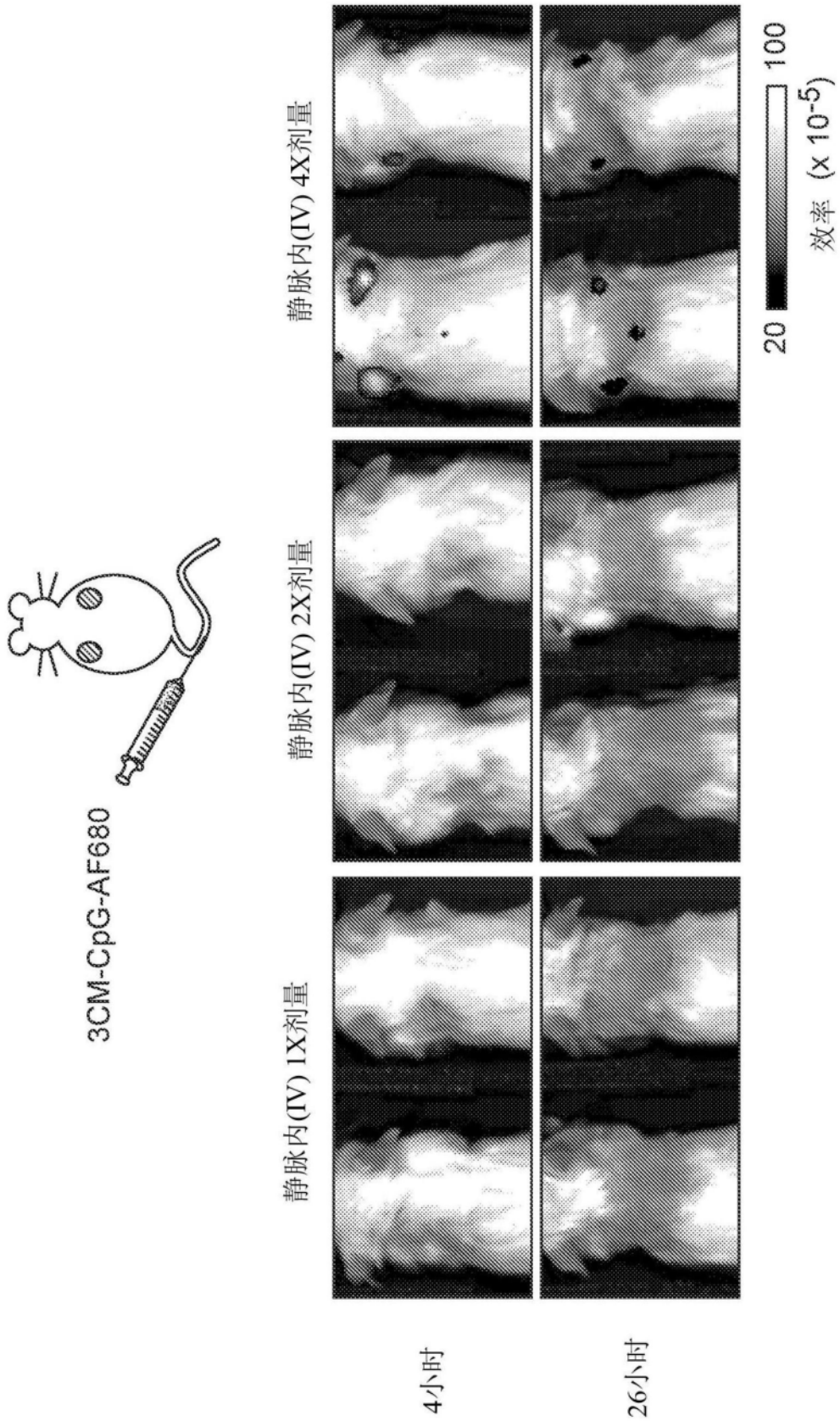


图11

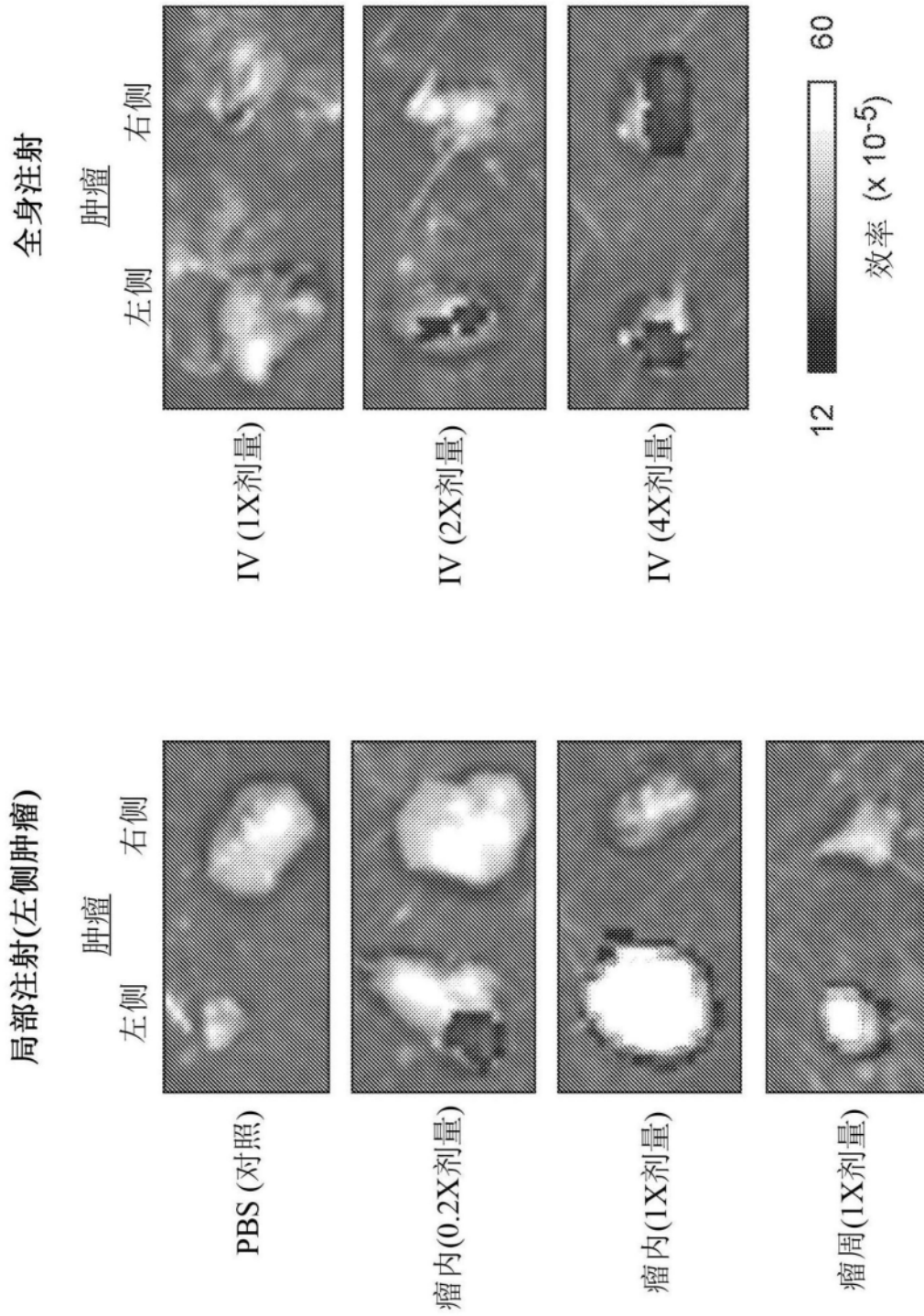


图12

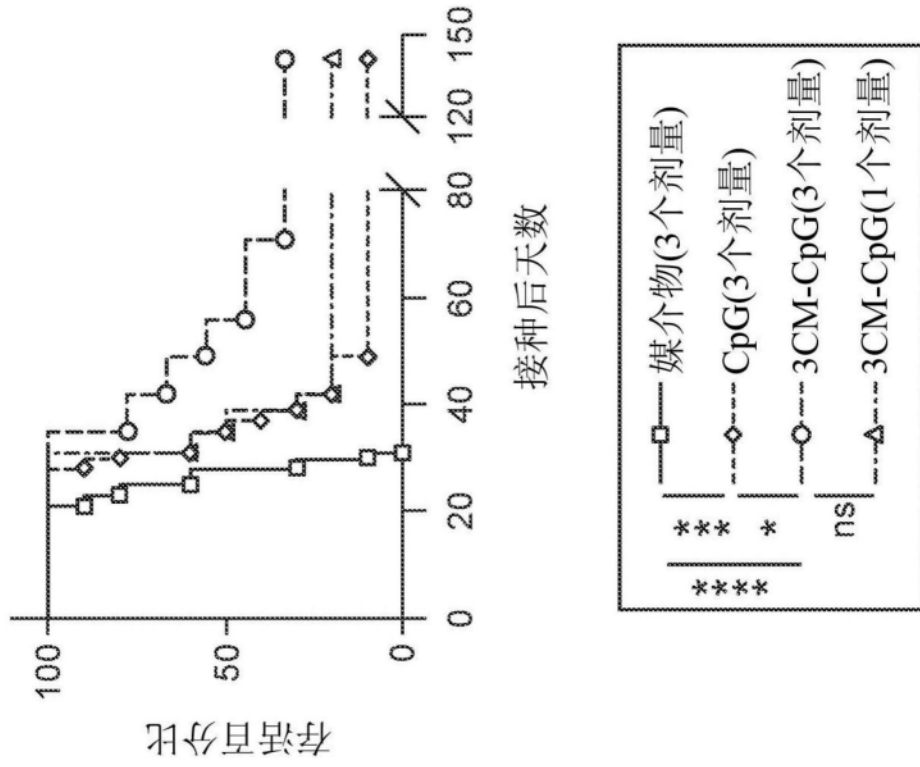


图13

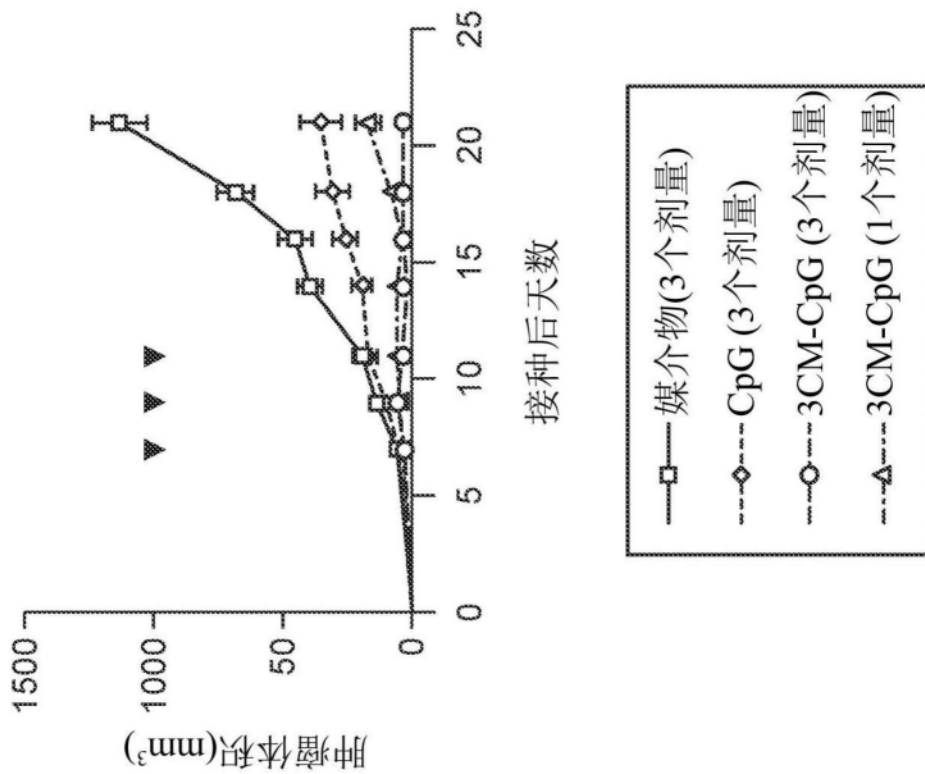


图14

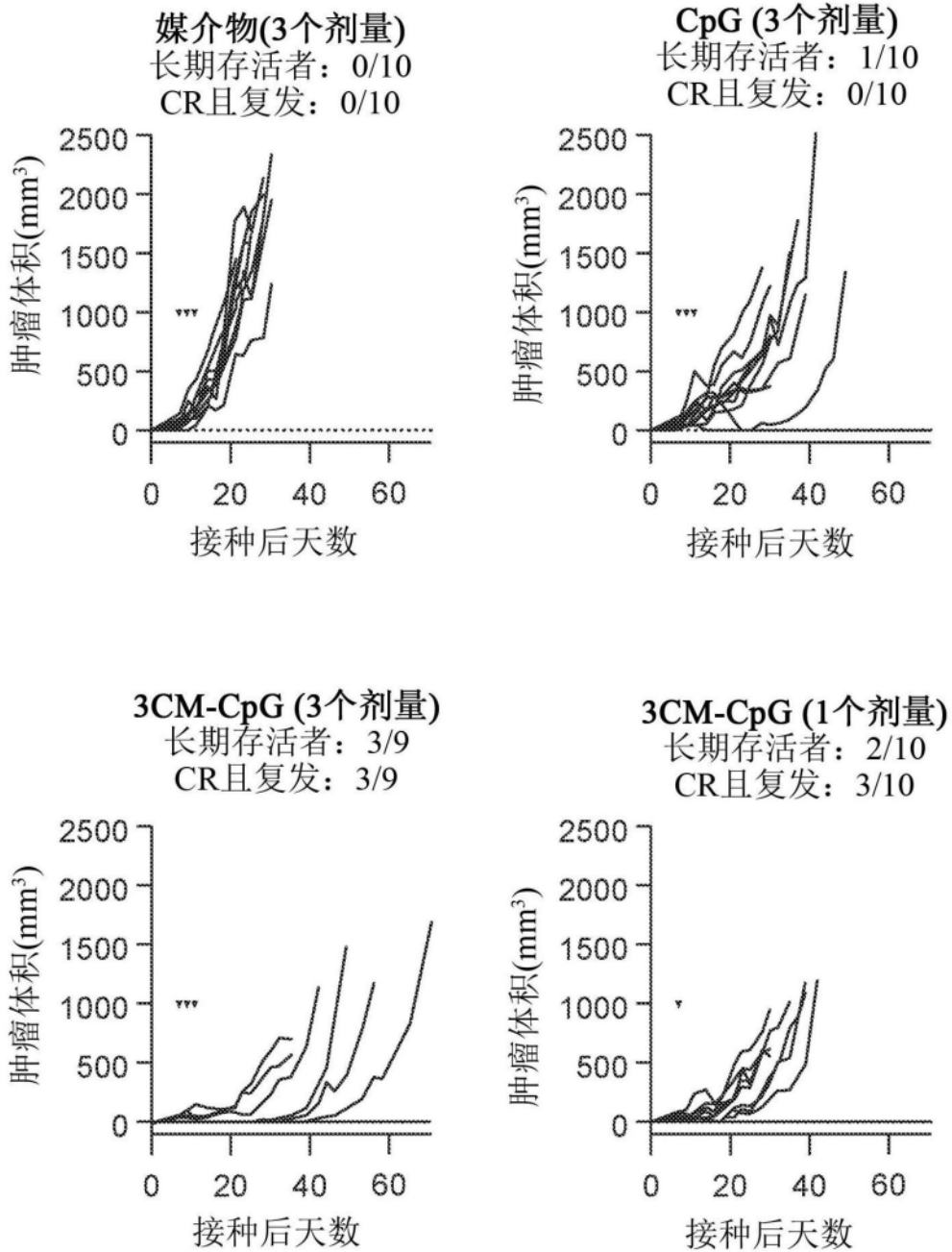


图15

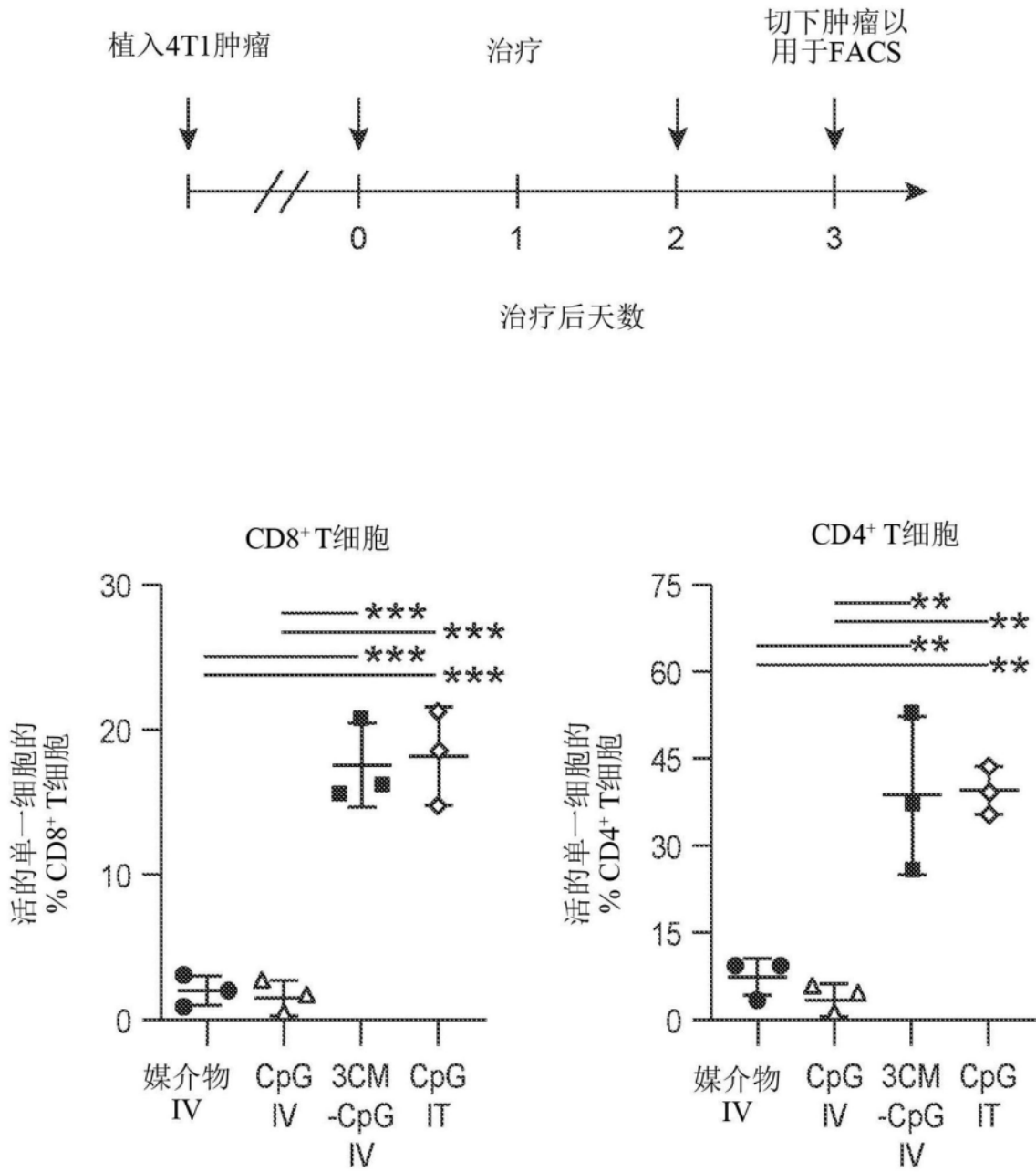


图16

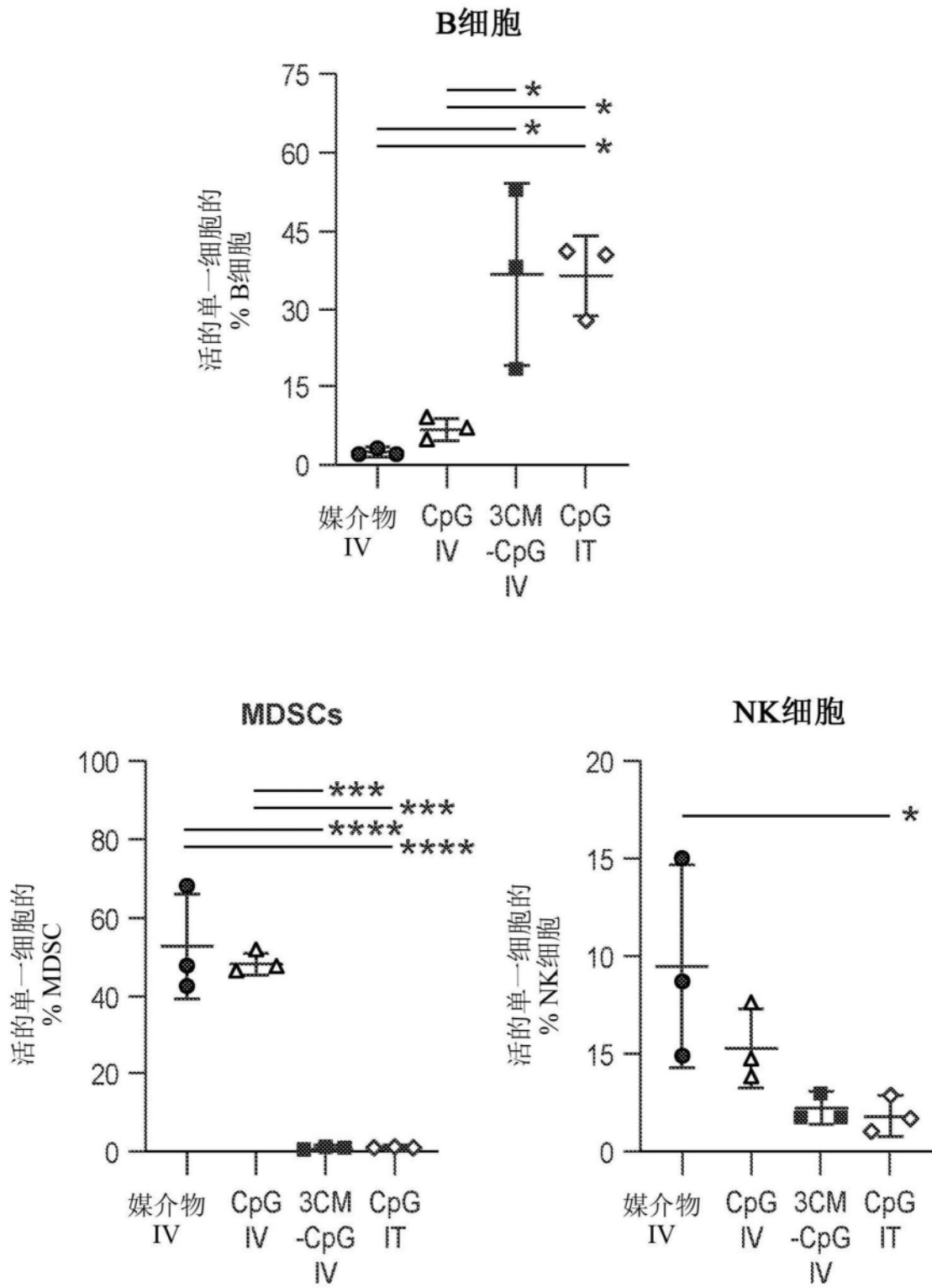


图16(续)

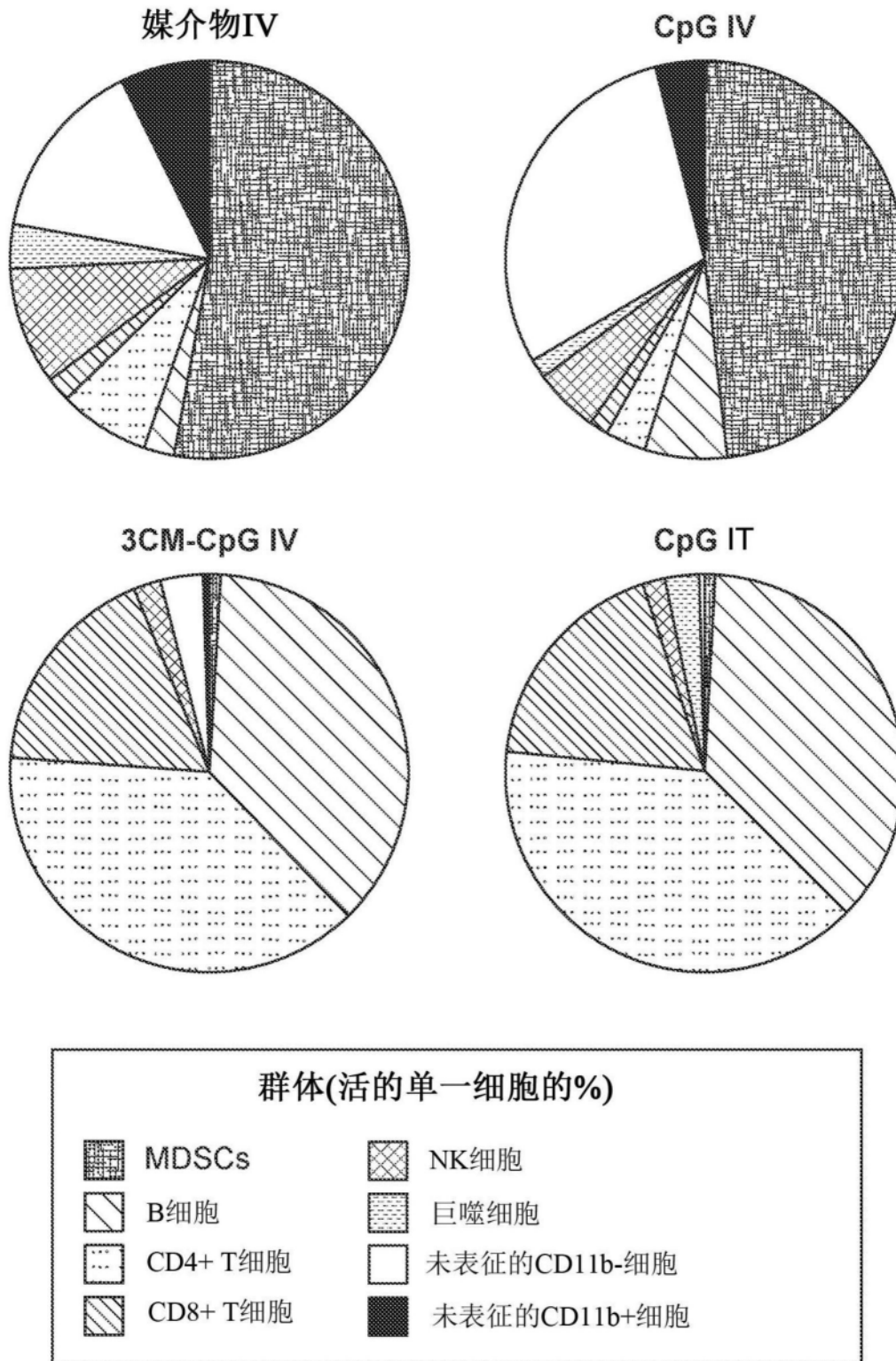


图17