(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119522097 A
(43)申请公布日 2025.02.25

(21)申请号 202380052757.2
(22)申请日 2023.05.10
(30)优先权数据
63/341,957 2022.05.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.01.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066811 2023.05.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/220620 EN 2023.11.16
(71)申请人 埃克塞里艾克西斯公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 西玛·坎塔克
布莱恩·艾伦·孟德尔颂
罗宾·M·巴菲尔德
斯迪潘·丘普拉科夫
佩妮罗普·M·德雷克
亚得林·欧刚科亚
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 梁非非 张奎燕
(51)Int.Cl.
*A61K 31/395*(2006.01)
*A61K 31/343*(2006.01)
*A61K 31/4353*(2006.01)
*A61K 47/50*(2006.01)
*A61K 47/51*(2006.01)
*A61K 31/33*(2006.01)

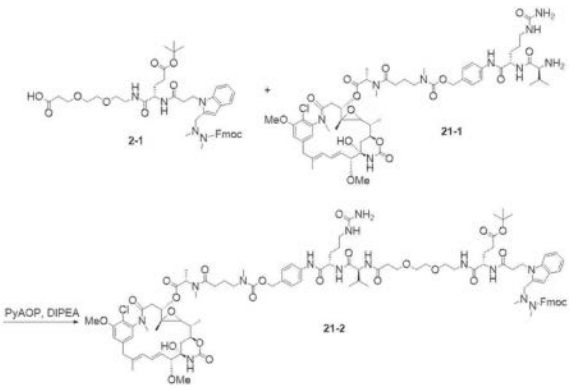
权利要求书12页 说明书125页
序列表（电子公布） 附图28页

(54)发明名称

5T4抗体-药物缀合物及其用途

(57)摘要

本公开提供5T4抗体-药物缀合物及其用途。

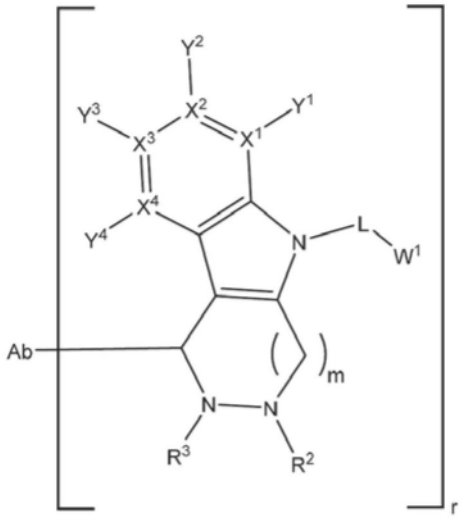



CN 119522097 A

1.一种式(IV)的抗体-药物缀合物(ADC),其包含:

a.结合至5T4的抗体;以及

b.一种或多种药物,其经由接头与一种或多种哒嗪-吡咯并偶合部分缀合



(IV)

其中:

Ab表示所述结合至5T4的抗体;

r为整数1至10;

m为0或1;

$R^2$和$R^3$各自独立地选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;或$R^2$与$R^3$环形连接形成5元或6元杂环基;

$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地选自由C、N、O和S组成的组;

$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$各自独立地选自由以下组成的组:氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基,或$Y^1$与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$,或$Y^3$与$Y^4$环形连接;

$W^1$为所述药物;

L表示接头且为$-(T^1V^1)_a-(T^2V^2)_b-(T^3V^3)_c-(T^4V^4)_d-(T^5V^5)_e-$,其中:

a、b、c、d和e各自独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5;

$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地包含$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、$-(CR^{13}OH)_h-$、哌啶-4-胺(P4A-$R^{12}$)、氨基甲酸间-氨基苯甲酯(MABC)基团、间-氨基苯甲氧基(MABO)基团、对-氨基苯甲氧基(PABO)基团、氨基甲酸对-氨基苯甲酯(PABC)基团、对-氨基苯甲基(PAB)基团、缩醛、二硫化物、肼、$(AA)_p$-MABC-$(AA)_p$、$(AA)_p$-MABO-$(AA)_p$、$(AA)_p$-PABO-$(AA)_p$或$(AA)_p$-PABC-$(AA)_p$,

w为整数1至20;

n为整数1至30;

各p独立地为零或整数1至20;

h为整数1至12;并且

各$R^{12}$为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;

各$R^{13}$为氢、烷基、取代的烷基、芳基或取代的芳基;

$V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地选自由以下组成的组:共价键、-C(=O)-、-$NR^{11}$-、-C(=O)$NR^{11}$-、-$NR^{11}$C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-O-、-S-、-S(=O)-、-$SO_2$-、-$SO_2NR^{11}$-、-$NR^{11}SO_2$-和-P(=O)OH-,其中$R^{11}$选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、PEG、芳基和取代的芳基。

2.如权利要求1所述的ADC,其中$W^1$选自由类美登素和奥瑞他汀组成的组。

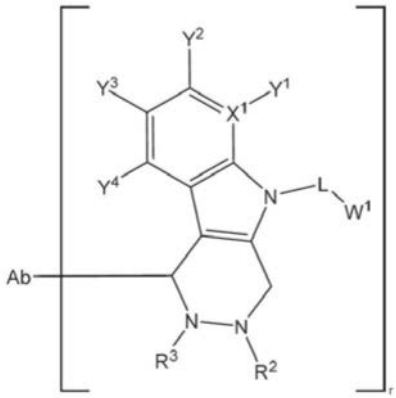
3.如权利要求1或2所述的ADC,其中所述奥瑞他汀为MMAE。

4.如权利要求1至3中任一项所述的ADC,其中$R^2$和$R^3$各自为烷基。

5.如权利要求1至4中任一项所述的ADC,其中$R^2$和$R^3$各自为甲基。

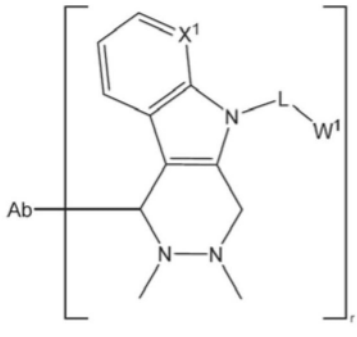
6.如权利要求1至5中任一项所述的ADC,其中$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地选自C和N。

7.如权利要求1至6中任一项所述的ADC,其中所述ADC由式(V)表示:




(V)。

8.如权利要求1至7中任一项所述的ADC,其中所述ADC由式(VI)表示:




(VI),

其中$X^1$为C或N。

9.如权利要求1至8中任一项所述的ADC,其中$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地选自由以下组成的组:$C_1$-$C_6$烷基、P4A-$R^{12}$、$(AA)_p$、$(AA)_p$-PABC和$(PEG)_n$,其中p为整数1至5,并且$R^{12}$为聚乙

二醇或经羧酸修饰的聚乙二醇。

10.如权利要求1至9中任一项所述的ADC,其中

$T^1$为$C_1$-$C_6$烷基;

$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地选自(PEG)$_n$、$C_1$-$C_6$烷基、(AA)$_p$、P4A-$R^{12}$、(AA)$_p$-(PABO-$R^{16}$)-(AA)$_p$、(AA)$_p$-(PABC-$R^{16}$)-(AA)$_p$、(AA)$_p$-(PABO-$R^{16}$)和(AA)$_p$-(PABC-$R^{16}$),其中$R^{12}$为经羧酸修饰的聚乙二醇且$R^{16}$为氢;并且

$V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地选自-CO-和-$NR^{11}$-,其中$R^{11}$选自氢和烷基。

11.如权利要求1至10中任一项所述的ADC,其中L为:

-($C_1$-$C_6$烷基)-($V^1$)-(P4A-$R^{12}$)-($V^2$)-($C_1$-$C_6$烷基)-($V^3$)-,

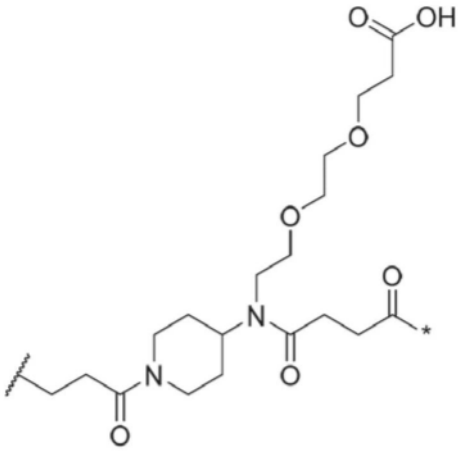
其中:

$V^1$、$V^2$和$V^3$各自独立地选自由-CO-和-$NR^{1111}$-组成的组;

各$R^{11}$独立地选自由氢和$C_1$-$C_6$烷基组成的组;并且

$R^{12}$为经羧酸修饰的聚乙二醇部分。

12.如权利要求1至11中任一项所述的ADC,其中L为:




其中:

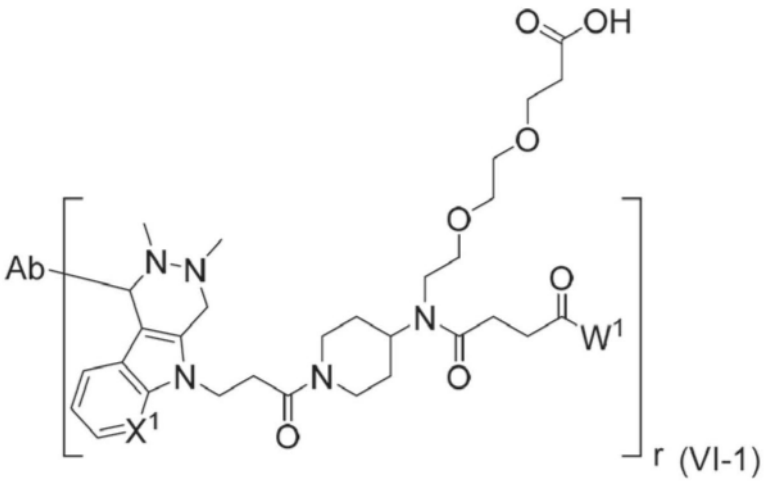
〰表示连接至所述哒嗪-吡咯并偶合部分的氮;并且

*表示连接至$W^1$。

13.一种式(VI-1)的抗体-药物缀合物(ADC),其包含:

a.结合至5T4的抗体;以及

b.一种或多种药物,其经由接头与一种或多种哒嗪-吡咯并偶合部分缀合



(VI-1)

其中：

Ab表示所述结合至5T4的抗体；

r为整数1至10；

$X^1$为C或N；并且

$W^1$为所述药物。

14.如权利要求13所述的ADC，其中$W^1$选自由类美登素和奥瑞他汀组成的组。

15.如权利要求14所述的ADC，其中所述奥瑞他汀为MMAE。

16.如权利要求13或14所述的ADC，其中$X^1$为C且$W^1$为脱酰化美登素。

17.如权利要求14至15中任一项所述的ADC，其中$X^1$为N且$W^1$为MMAE。

18.如权利要求13至17中任一项所述的ADC，其中L为：

$(C_1\text{-}C_6$烷基$)\text{-}V^1\text{-}(AA)\text{-}V^2\text{-}(PEG)_n\text{-}V^3\text{-}((AA)_p\text{-}(PABC\text{-}R^{16}))\text{-}V^4\text{-}(C_1\text{-}C_6$烷基$)\text{-}V^5$，

其中：

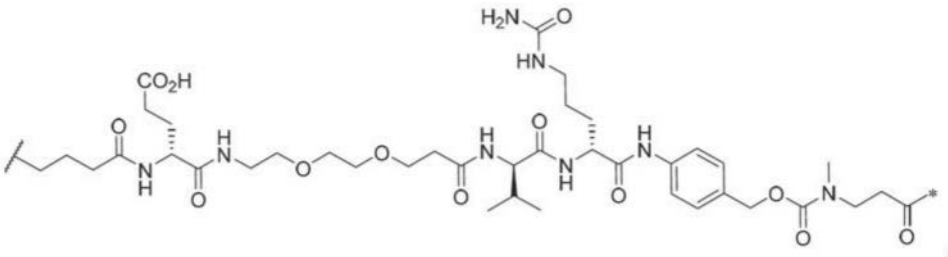
$R^{16}$为氢；

n和p各自独立地为整数1至20；

$V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地选自由-CO-和-$NR^{11}$-组成的组；并且

各$R^{1111}$独立地选自由氢和$C_1\text{-}C_6$烷基组成的组。

19.如权利要求13至17中任一项所述的ADC，其中L为：

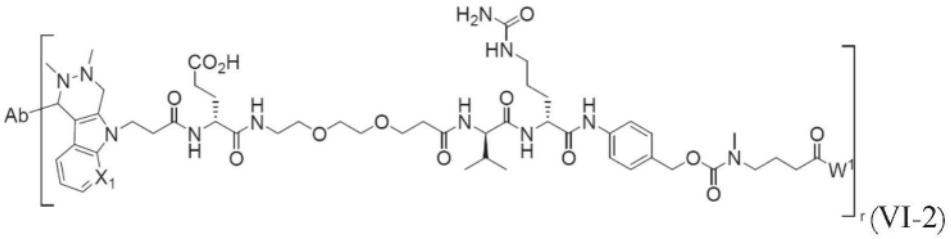


其中：

～～表示连接至所述哒嗪-吡咯并偶合部分的氮；并且

*表示连接至$W^1$。

20.一种抗体-药物缀合物(ADC)，其包含结合至5T4的抗体，所述抗体经由一种或多种哒嗪-吡咯并偶合部分与一种或多种药物缀合，如式(VI-2)所示：



(VI-2)

其中：

Ab表示所述结合至5T4的抗体；

r为整数1至10；

$X^1$为C或N；并且

$W^1$为所述药物。

21.如权利要求20所述的ADC，其中$W^1$选自类美登素和奥瑞他汀。

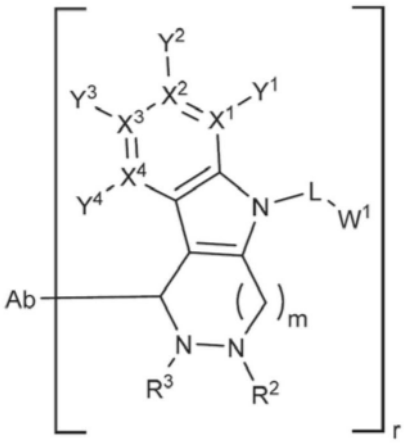
22.如权利要求21所述的ADC，其中所述奥瑞他汀为MMAE。

23.如权利要求20或21所述的ADC，其中$X^1$为C且$W^1$为脱酰化美登素。

24.一种式(IV)的抗体-药物缀合物(ADC)，其包含：

a.结合至5T4的抗体；以及

b.一种或多种药物，其经由接头与一种或多种哒嗪-吡咯并偶合部分缀合



(IV)

其中：

Ab表示所述结合至5T4的抗体；

$W^1$为所述药物；

r为整数1至10；

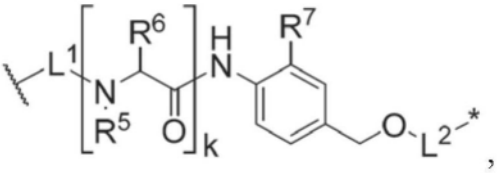
m为0或1；

$R^2$和$R^3$各自独立地选自由以下组成的组：氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基；或$R^2$与$R^3$环形连接形成5元或6元杂环基；

$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地选自由C、N、O和S组成的组；

$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$各自独立地选自由以下组成的组：氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、

酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基,或$Y^1$与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$,或$Y^3$与$Y^4$环形连接;

L为,

其中:

~~~表示连接至所述哒嗪-吡咯并偶合部分的氮;

*表示连接至$W^1$;

各$R^5$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;

各$R^6$独立地选自烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基;

$R^7$为可裂解部分;

k为整数1至10;

$L^1$包含$-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$;

$L^2$包含$-(T^5-V^5)_e-(T^6-V^6)_f-(T^7-V^7)_g-(T^8-V^8)_h-$;

a、b、c、d、e、f、g和h各自独立地为1或0;

$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$、$T^5$、$T^6$、$T^7$和$T^8$各自独立地选自由以下组成的组:共价键、$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、$-(CR^{13}OH)_m-$、P4A-$R^{12}$、缩醛、肼、二硫化物和酯;

各w为整数1至20;

各n为整数1至30;

各p为整数1至20;

各m为整数1至12;

$V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$、$V^5$、$V^6$、$V^7$和$V^8$各自独立地选自由以下组成的组:共价键、-CO-、$-NR^{15}-$、$-NR^{15}(CH_2)_q-$、$-NR^{15}(C_6H_4)-$、$-CONR^{15}-$、$-NR^{15}CO-$、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-、-S(O)-、$-SO_2-$、$-SO_2NR^{15}-$、$-NR^{15}SO_2-$和-P(O)OH-;

各q为整数1至6;

$R^{12}$选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基;

各$R^{13}$独立地选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、芳基和取代的芳基;并且

各$R^{15}$独立地选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、羧基、羧基酯、酰基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基。

25.如权利要求24所述的ADC,其中$W^1$选自类美登素和奥瑞他汀。
~~~

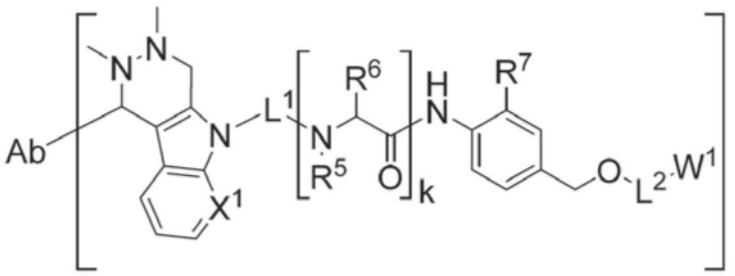
26.如权利要求25所述的ADC,其中所述奥瑞他汀为MMAE。

27.如权利要求24至26中任一项所述的ADC,其中$R^2$和$R^3$各自为烷基。

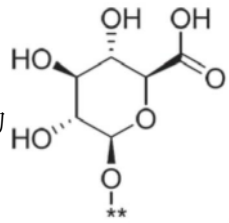
28.如权利要求27所述的ADC,其中$R^2$和$R^3$各自为甲基。

29.如权利要求24至28中任一项所述的ADC,其中$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地选自C和N。

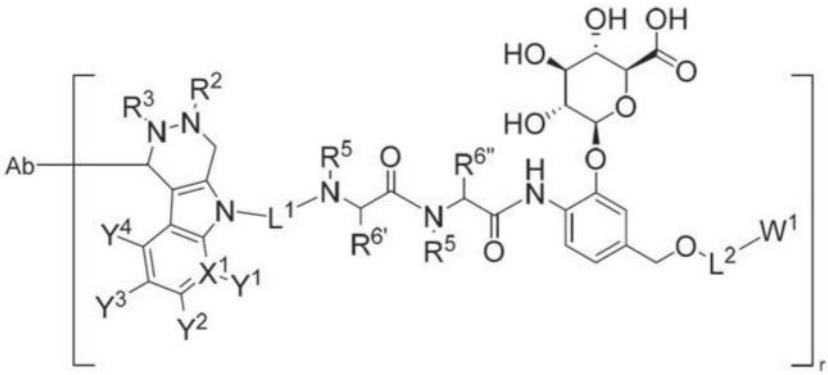
30.如权利要求24至29中任一项所述的ADC,其由式(VI-3)表示:



(VI-3)。

31.如权利要求30所述的ADC,其中R7为其中**表示连至式(VI-3)中的苯基的连接点。

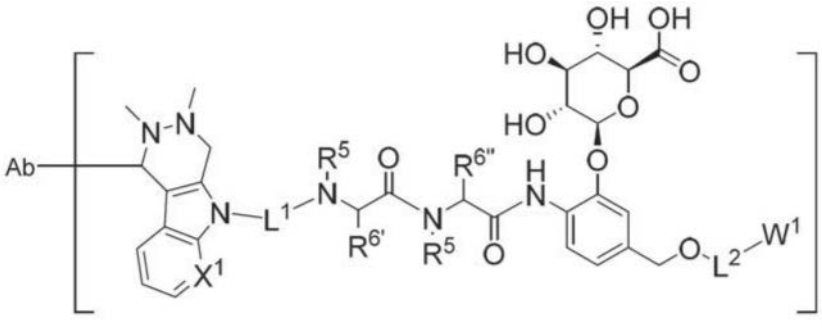
32.如权利要求24至31中任一项所述的ADC,其由式(V-5)表示:



(V-5),

其中$R^{6'}$和$R^{6''}$各自独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。

33.如权利要求24至32中任一项所述的ADC,其由式(VI-5)表示:

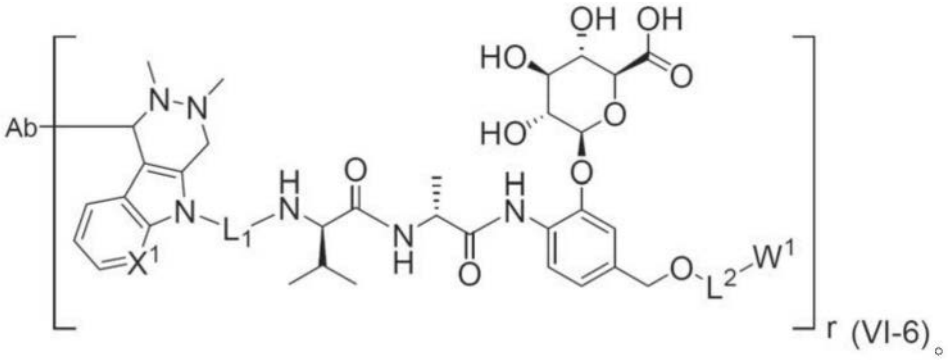


(VI-5),

其中$X^1$为C或N,其中$R^{6'}$和$R^{6''}$各自独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、

取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。

34.如权利要求24至33中任一项所述的ADC,其由式(VI-6)表示:



(VI-6)。

35.如权利要求24至34中任一项所述的ADC,其中

$L^1$包含-$(T^1-V^1)_a$-$(T^2-V^2)_b$-$(T^3-V^3)_c$-$(T^4-V^4)_d$-;

a、b和c各自为1;

d为0且因此$T^4$和$V^4$不存在;

$T^1$、$T^2$和$T^3$各自独立地选自由$C_1$-$C_{12}$烷基、$(PEG)_n$和$(AA)_p$组成的组,

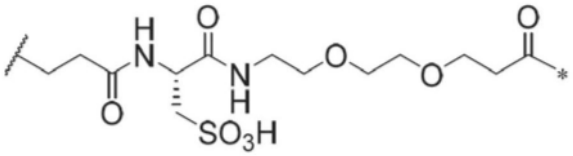
n为整数1至10;

p为整数1至10;

$V^1$、$V^2$和$V^3$各自独立地选自由-C(=O)-和-$NR^{11}$-组成的组;并且

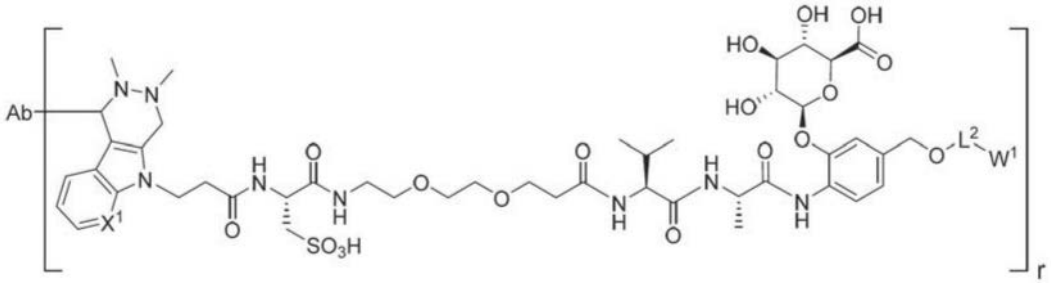
$R^{11}$选自氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、芳基和取代的芳基。

36.如权利要求24至35中任一项所述的ADC,其中$L^1$为



其中〰表示连至哒嗪-吡咯并偶合部分的氮的连接点,并且其中*表示在任何方向上连至所述接头的其余部分的连接点。

37.如权利要求24至36中任一项所述的ADC,其由式(VI-7)表示:

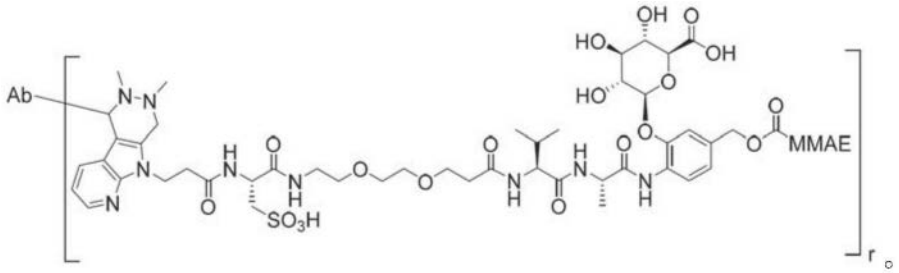


(VI-7),其中$X^1$为C或N。

38.如权利要求24至37中任一项所述的ADC,其中$L^2$为羰基。

39.如权利要求24至38中任一项所述的ADC,其中$X^1$为N且$W^1$为MMAE。

40.如权利要求24至39中任一项所述的ADC,其由式(VIb-82)表示:




41.如权利要求1至40中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;或

(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;或

(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

42.如权利要求1至41中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(a)VH区,其包含:

(1)VH CDR1,其具有选自由SEQ ID NO:1、7、12、13和18组成的组的氨基酸序列;

(2)VH CDR2,其具有选自由SEQ ID NO:2、8、14、19和24组成的组的氨基酸序列;以及

(3)VH CDR3,其具有选自由SEQ ID NO:3、9、15和20组成的组的氨基酸序列;以及

(b)VL区,其包含:

(1)VL CDR1,其具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列;

(2)VL CDR2,其具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列;以及

(3)VL CDR3,其具有选自由SEQ ID NO:6、17和23组成的组的氨基酸序列。

43.如权利要求1至42中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(i)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或

(ii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或

(iii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或

(iv)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VL CDR3;或

(v)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的VL CDR3;或

(vi)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3。

44.如权利要求1至41中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(a)VH区,其包含:

(1)VH CDR1,其具有选自由SEQ ID NO:27、31、34、35和39组成的组的氨基酸序列;

(2)VH CDR2,其具有选自由SEQ ID NO:28、32、36、40和43组成的组的氨基酸序列;以及

(3)VH CDR3,其具有选自由SEQ ID NO:29、33、37和41组成的组的氨基酸序列;以及

(b)VL区,其包含:

(1)VL CDR1,其具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列;

(2)VL CDR2,其具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列;以及

(3)VL CDR3,其具有选自由SEQ ID NO:30、38和42组成的组的氨基酸序列。

45.如权利要求1至41和44中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(i)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或

(ii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:33的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或

(iii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或

(iv)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的VL CDR3;或

(v)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的VL CDR3;或

(vi)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID

NO:43的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3。

46.如权利要求1至41中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(a)VH区,其包含:

(1)VH CDR1,其具有选自由SEQ ID NO:46、50、53、13和57组成的组的氨基酸序列;

(2)VH CDR2,其具有选自由SEQ ID NO:47、51、54、58和61组成的组的氨基酸序列;以及

(3)VH CDR3,其具有选自由SEQ ID NO:48、52、55和59组成的组的氨基酸序列;以及

(b)VL区,其包含:

(1)VL CDR1,其具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列;

(2)VL CDR2,其具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列;以及

(3)VL CDR3,其具有选自由SEQ ID NO:49、56和60组成的组的氨基酸序列。

47.如权利要求1至41和46中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(i)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或

(ii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:50的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:51的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或

(iii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或

(iv)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的VL CDR3;或

(v)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:60的VL CDR3;或

(vi)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:61的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;以及VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3。

48.如权利要求1至46中任一项所述的ADC,其中所述抗体进一步包含SEQ ID NO:25、26、44、45、62以及63中的任一者所示的框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4

(FR4)序列。

49.如权利要求1至48中任一项所述的ADC,其中所述抗体进一步包含人框架序列。

50.如权利要求1至49中任一项所述的ADC,其中所述抗体包含:

(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL;或

(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的VL;或

(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的VL。

51.一种药物组合物,其包含如权利要求1至50中任一项所述的ADC和药学上可接受的赋形剂。

52.如权利要求51所述的药物组合物,其中所述抗体-药物缀合物的药物/抗体比率为约1至约4。

53.如权利要求52所述的药物组合物,其中所述药物/抗体比率为约2。

54.一种用于治疗受试者的癌症或肿瘤的方法,其包括将如权利要求1-49中任一项所述的抗体-药物缀合物或如权利要求51至53中任一项所述的药物组合物施用给所述受试者。

# 5T4抗体-药物缀合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2022年5月13日提交的美国临时申请第63/341,957号的权益,所述美国临时申请的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以XML文件格式与本申请一起提交的计算机可读序列表,所述序列表的全部内容以全文引用的方式并入本文中。与本申请一起提交的序列表XML文件的名称为“14529-099-228_SEQ_LISTING.xml”,创建于2023年5月9日,并且大小为125,376个字节。

## 技术领域

[0005] 本公开大体上涉及结合至5T4(例如人5T4)的抗体-药物缀合物(ADC)和其使用方法。

## 背景技术

[0006] 5T4是含有八个富亮氨酸重复序列的N-糖基化跨膜72kDa糖蛋白。5T4,也已知为Wnt活化抑制因子1或WAIF1,因其表达于胎儿滋养层中而通常称为癌胚抗原(其首次发现于胎儿滋养层中),或称为滋养层糖蛋白(TPBG)。5T4发现于肿瘤(诸如结直肠、卵巢及胃肿瘤)中。其表达用作预后辅助手段。5T4在正常组织中的表达极其有限,但在恶性肿瘤中、在其整个发育过程中广泛存在。尽管其受到限制的表达似乎赋予5T4成为癌症疗法中的目标的可能性,但靶向5T4的抗体、ADC和疫苗的成功治疗尚未实现。

[0007] 本领域中仍需要能够靶向5T4的ADC,以治疗、预防或缓解5T4介导的疾病、病症或疾患,诸如涉及表达5T4的肿瘤细胞的那些疾病、病症或疾患。

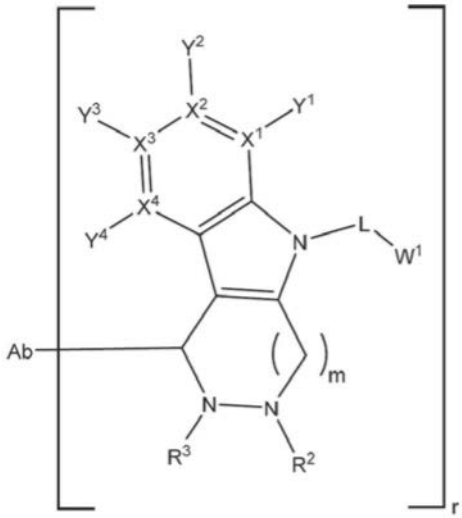
## 发明内容

[0008] 本公开提供包含结合至5T4的抗体的ADC(“5T4-ADC”)。在一些实施方案中,此类5T4-ADC与包含本文所述的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗体结合至人5T4的相同表位。

[0009] 本公开还提供包含5T4-ADC的药物组合物,所述5T4-ADC包含结合至5T4的抗体或其片段及与所述抗体或其片段缀合(直接地或间接地结合)的药物。在一些实施方案中,此类药物组合物包括5T4-ADC,所述5T4-ADC包含的抗体或其片段与包含本文所述的VH和VL的抗体结合至人5T4的基本相同表位。

[0010] 本公开还提供使用结合至5T4的5T4-ADC治疗、预防或减轻5T4介导的疾病、病症或疾患的方法,诸如减轻5T4介导的疾病、病症或疾患的一种或多种症状。

[0011] 更具体而言,本公开提供一种5T4-ADC,其包含(a)结合至5T4的抗体及(b)一个或多个哒嗪-吡咯并偶合部分,包含药物与哒嗪-吡咯并偶合部分经由接头的缀合。在一些实施方案中,5T4-ADC由式(IV)表示:

[0012] 

(IV),

[0013] 其中

[0014] Ab表示结合至5T4的抗体；

[0015] $R^2$和$R^3$各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；或$R^2$与$R^3$以环形连接以形成5元或6元杂环基；

[0016] L是接头且由-$(T^1V^1)_a$-$(T^2V^2)_b$-$(T^3V^3)_c$-$(T^4V^4)_d$-$(T^5V^5)_e$-表示；

[0017] $T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地为$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、-$(CR^{13}OH)_h$-、哌啶-4-胺(P4A-$R^{12}$)、氨基甲酸间氨基苯甲酯(MABC)基团、间氨基苯甲氧基(MABO)基团、对氨基苯甲氧基(PABO)基团、氨基甲酸对氨基苯甲酯(PABC)基团、对氨基苯甲基(PAB)基团、缩醛、二硫化物、肼、$(AA)_p$-MABC-$(AA)_p$、$(AA)_p$-MABO-$(AA)_p$、$(AA)_p$-PABO-$(AA)_p$或$(AA)_p$-PABC-$(AA)_p$；

[0018] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地为共价键、-C(=O)-、-$NR^{11}$-、-C(=O)$NR^{11}$-、-$NR^{11}$C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-O-、-S-、-S(=O)-、-$SO_2$-、-$SO_2NR^{11}$-、-$NR^{11}SO_2$-或-P(=O)OH-；

[0019] a、b、c、d和e各自独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5；

[0020] h独立地为整数1至12；

[0021] m为0或1；

[0022] n独立地为整数1至30；

[0023] p独立地为零或整数1至20；

[0024] r为整数1至10；

[0025] w独立地为整数1至20；

[0026] $X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地为C、N、O或S；

[0027] $Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$各自独立地为氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基,或$Y^1$

与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$或$Y^3$与$Y^4$以环形连接；

[0028] $W^1$为药物；

[0029] $R^{1111}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、PEG、芳基或取代的芳基；并且

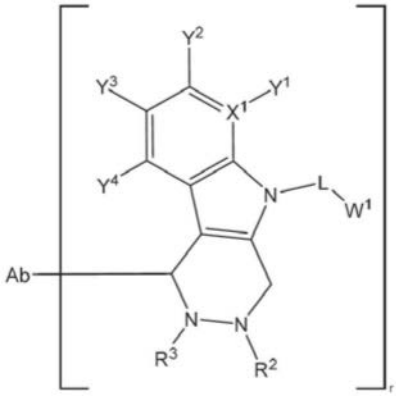
[0030] $R^{12}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基；并且

[0031] $R^{13}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基或取代的芳基。

[0032] 在一些实施方案中，药物是类美登素(maytansinoid)或奥瑞他汀(auristatin)，诸如MMAE或MMAF。

[0033] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(1IV)表示，其中$R^2$和$R^3$各自为烷基，例如甲基。在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(IV)表示，其中$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的每一者独立地为C或N。

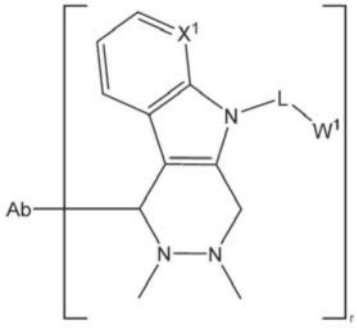
[0034] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(V)表示：

[0035] 

(V)，

[0036] 其中$X^1$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$、$Y^4$、$R^2$、$R^3$、L和$W^1$如本文所定义，诸如针对式(IV)所定义。

[0037] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI)表示：

[0038] 

(VI)，

[0039] 其中$X^1$是C或N，并且L和$W^1$如本文所定义，诸如针对式(IV)所定义。

[0040] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(IV)、(V)或(VI)表示，其中：

[0041] L是接头且由$-(T^1V^1)_a-(T^2V^2)_b-(T^3V^3)_c-(T^4V^4)_d-(T^5V^5)_e-$表示；

[0042] $T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地为$C_1$-$C_6$烷基、P4A-$R^{12}$、$(AA)_p$、$(AA)_p$-PABC或$(PEG)_n$；

[0043] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地选自由以下组成的组：共价键、-C(=O)-、-$NR^{11}$-、-C(=O)$NR^{11}$-、-$NR^{11}$C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-O-、-S-、-S(=O)-、-$SO_2$-、-$SO_2NR^{11}$-、-$NR^{11}SO_2$-和-P(=O)OH-；

[0044] a、b、c、d和e各自独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5;

[0045] p为整数1至20;

[0046] n为整数1至30;

[0047] $R^{11}$选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、PEG、芳基和取代的芳基;并且

[0048] $R^{12}$独立地为聚乙二醇或经羧酸修饰的聚乙二醇。

[0049] 在其他实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)或(VI)表示,其中:

[0050] a、b、c、d和e各自独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5;

[0051] p为整数1至20;

[0052] n为整数1至30;

[0053] L是接头且由-$(T^1V^1)_a$-$(T^2V^2)_b$-$(T^3V^3)_c$-$(T^4V^4)_d$-$(T^5V^5)_e$-表示;

[0054] $T^1$为$C_1$-$C_6$烷基;

[0055] $T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地为$(PEG)_n$、$C_1$-$C_6$烷基、$(AA)_p$、P4A-$R^{12}$、$(AA)_p$-(PABO-$R^{16}$)-$(AA)_p$、$(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$)-$(AA)_p$、$(AA)_p$-(PABO-$R^{16}$)或$(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$);

[0056] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地为-CO-或-$NR^{11}$;

[0057] $R^{11}$独立地为氢或烷基;

[0058] $R^{12}$独立地为经羧酸修饰的聚乙二醇;并且

[0059] $R^{16}$为氢。

[0060] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)或(VI)表示,其中:

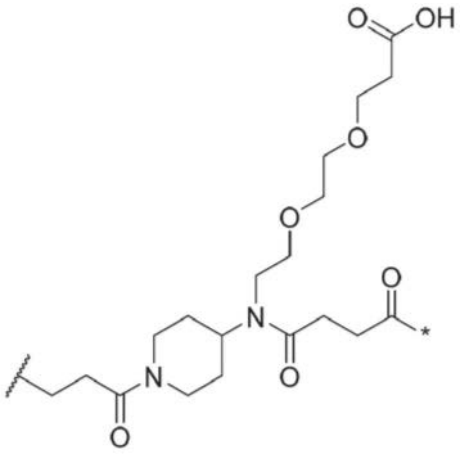
[0061] L为-($C_1$-$C_6$烷基)-($V^1$)-(P4A-$R^{12}$)-($V^2$)-($C_1$-$C_6$烷基)-($V^3$)-;

[0062] $V^1$、$V^2$和$V^3$各自独立地为-CO-或-$NR^{11}$-;

[0063] $R^{11}$独立地为氢或$C_1$-$C_6$烷基;并且

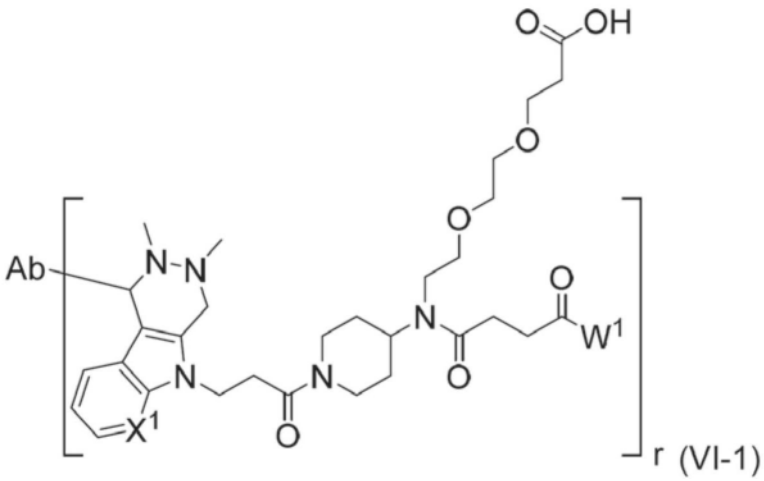
[0064] $R^{12}$为经羧酸修饰的聚乙二醇部分。

[0065] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)或(VI)表示,其中L为:

[0066] 

[0067] 其中~表示连接至哒嗪-吡咯并偶合部分的氮且*表示连至$W^1$的连接点。

[0068] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-1)表示:

[0069] 

[0070] 其中：

[0071] Ab表示结合至5T4的抗体；

[0072] r为整数1至10；

[0073] $X^1$为C或N；并且

[0074] $W^1$为药物。

[0075] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-1)表示，其中药物是类美登素或奥瑞他汀，诸如MMAE。在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-1)表示，其中$X^1$为C且$W^1$为美登素或脱酰化美登素。在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-1)表示，其中$X^1$为N且$W^1$为MMAE。

[0076] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(IV)、(V)或(VI)表示，其中：

[0077] L为($C_1$-$C_6$烷基)-$V^1$-(AA)-$V^2$-$(PEG)_n$-$V^3$-$((AA)_p$-(PABC-$R^{16}$))-$V^4$-($C_1$-$C_6$烷基)-$V^5$；

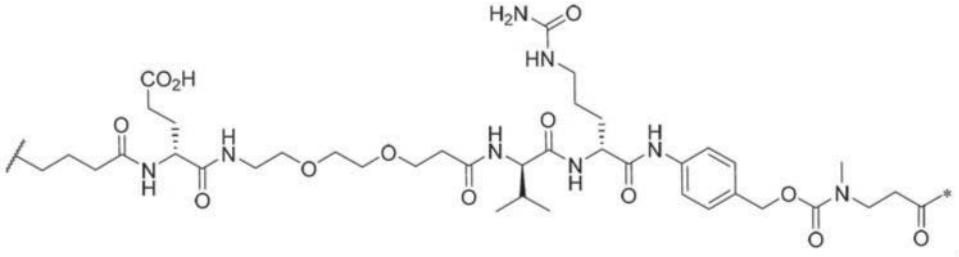
[0078] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地选自由-CO-和-$NR^{11}$-组成的组；

[0079] $R^{1111}$独立地为氢或$C_1$-$C_6$烷基；

[0080] $R^{16}$为氢；并且

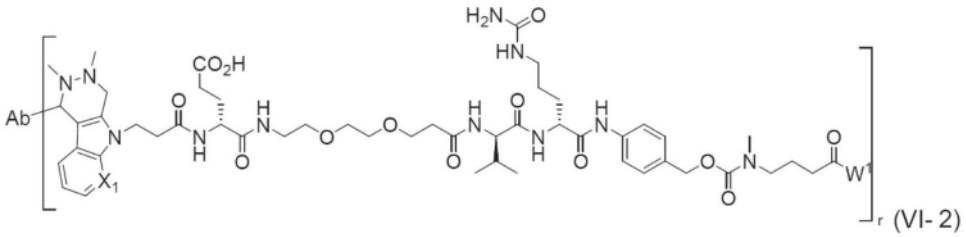
[0081] n和p各自独立地为整数1至20；

[0082] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(IV)、(V)或(VI)表示，其中L为：

[0083] 

[0084] 其中〰表示连接至哒嗪-吡咯并偶合部分的氮；并且*表示连至$W^1$的连接点。

[0085] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-2)表示：

[0086] 

[0087] 其中：

[0088] Ab表示结合至5T4的抗体;

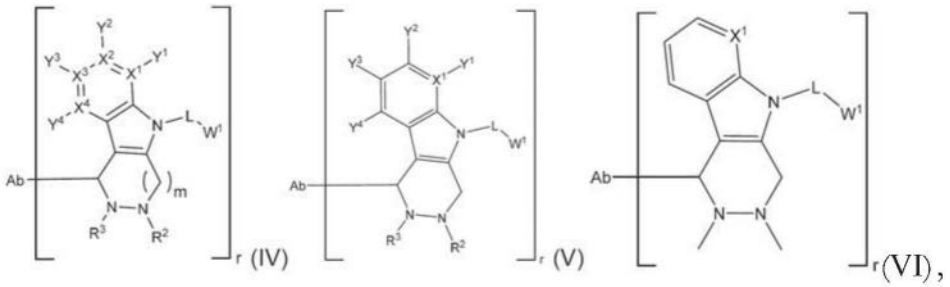
[0089] r为整数1至10;

[0090] $X^1$为C或N;并且

[0091] $W^1$为药物。

[0092] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-2)表示,其中药物是类美登素或奥瑞他汀,诸如MMAE。在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-2)表示,其中$X^1$为C且$W^1$为美登素或脱酰化美登素。

[0093] 本公开还提供式(IV)、(V)和(VI)的5T4-ADC:

[0094] 

[0095] 其中:

[0096] Ab表示结合至5T4的抗体;

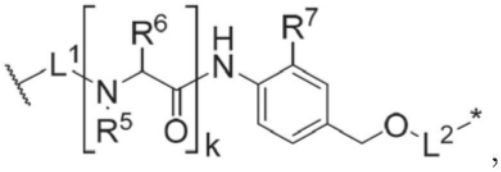
[0097] r为整数1至10;

[0098] m为0或1;

[0099] $R^2$和$R^3$各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;或$R^2$与$R^3$以环形连接以形成5元或6元杂环基;

[0100] $X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地选自由C、N、O和S组成的组;

[0101] $Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$各自独立地为氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基,或$Y^1$与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$或$Y^3$与$Y^4$以环形连接;

[0102] L为 ,

[0103] ～表示连至哒嗪-吡咯并偶合部分的氮的连接点;

[0104] *表示连至$W^1$的连接点;

[0105] $R^5$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;

[0106] $R^6$独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;

[0107] $R^7$为可裂解部分；

[0108] k为整数1至10；

[0109] $L^1$包含-$(T^1-V^1)_a$-$(T^2-V^2)_b$-$(T^3-V^3)_c$-$(T^4-V^4)_d$-；

[0110] $L^2$包含-$(T^5-V^5)_e$-$(T^6-V^6)_f$-$(T^7-V^7)_g$-$(T^8-V^8)_h$-；

[0111] $T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$、$T^5$、$T^6$、$T^7$和$T^8$各自独立地为共价键、$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、-$(CR^{13}OH)_m$-、P4A-$R^{12}$、缩醛、肼、二硫化物和酯；

[0112] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$、$V^5$、$V^6$、$V^7$和$V^8$各自独立地为共价键、-CO-、-$NR^{15}$-、-$NR^{15}(CH_2)_q$-、-$NR^{15}(C_6H_4)$-、-$CONR^{15}$-、-$NR^{15}$CO-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-、-S(O)-、-$SO_2$-、-$SO_2NR^{15}$-、-$NR^{15}SO_2$-和-P(O)OH-；

[0113] a、b、c、d、e、f、g和h各自独立地为1或0；

[0114] m独立地为整数1至12；

[0115] n独立地为整数1至30；

[0116] p独立地为整数1至20；

[0117] q独立地为整数1至6；

[0118] w独立地为整数1至20；

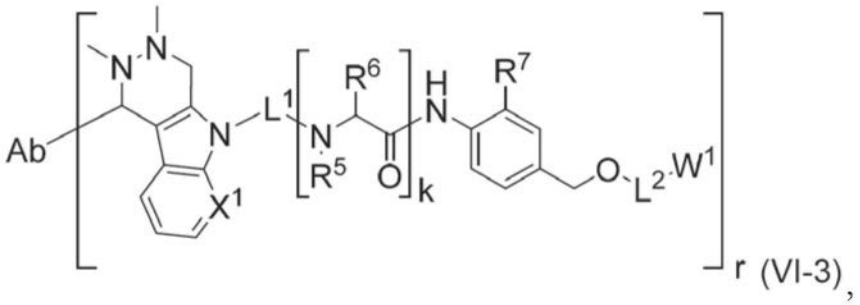
[0119] $R^{12}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0120] $R^{13}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基和取代的芳基；并且

[0121] $R^{15}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、羧基、羧基酯、酰基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。

[0122] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(IV)表示，其中$R^2$和$R^3$各自为烷基，例如甲基。在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(IV)表示，其中$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的每一者独立地为C或N。

[0123] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-3)表示：

[0124] 

(VI-3)，

[0125] 其中：

[0126] Ab表示结合至5T4的抗体；

[0127] $X^1$为C、N、O或S；

[0128] $R^5$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0129] $R^6$独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0130] $R^7$为可裂解部分；

[0131] $L^1$包含-$(T^1-V^1)_a$-$(T^2-V^2)_b$-$(T^3-V^3)_c$-$(T^4-V^4)_d$-；

[0132] $L^2$包含-$(T^5-V^5)_e$-$(T^6-V^6)_f$-$(T^7-V^7)_g$-$(T^8-V^8)_h$-；

[0133] $T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$、$T^5$、$T^6$、$T^7$和$T^8$各自独立地为共价键、$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、-$(CR^{13}OH)_m$-、P4A-$R^{12}$、缩醛、肼、二硫化物或酯；

[0134] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$、$V^5$、$V^6$、V7和V8各自独立地为共价键、-CO-、-$NR^{15}$-、-$NR^{15}(CH_2)_q$-、-$NR^{15}(C_6H_4)$-、-CONR$^{15}$-、-$NR^{15}$CO-、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-、-S(O)-、-$SO_2$-、-$SO_2NR^{15}$-、-$NR^{15}SO_2$-或-P(O)OH-；

[0135] a、b、c、d、e、f、g和h各自独立地为1或0；

[0136] k为整数1至10；

[0137] m独立地为整数1至12；

[0138] n独立地为整数1至30；

[0139] p独立地为整数1至20；

[0140] q独立地为整数1至6；

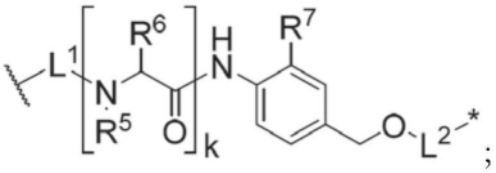
[0141] w独立地为整数1至20；

[0142] $R^{12}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

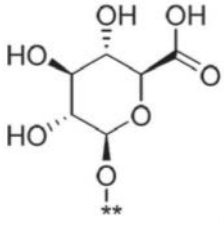
[0143] $R^{13}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基或取代的芳基；并且

[0144] $R^{15}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、羧基、羧基酯、酰基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。

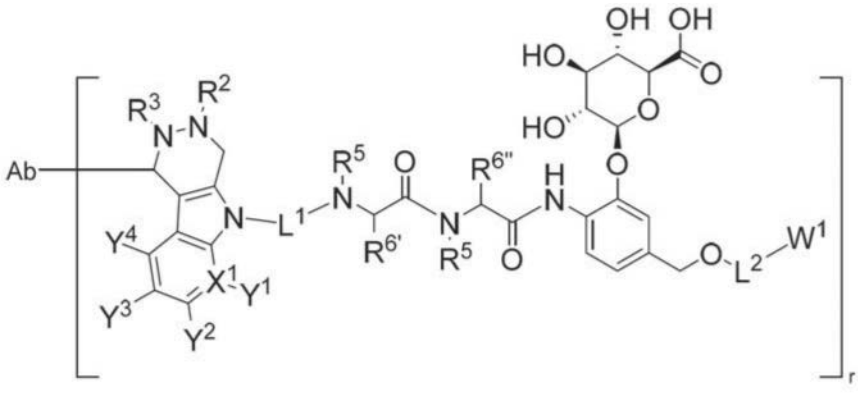
[0145] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(IV)、(V)或(VI)表示，其中：

[0146] L为；

[0147] $R^5$、$R^6$、$L^1$、$L^2$和k如本文所定义，诸如针对式(VI-3)所定义；并且

[0148] $R^7$为其中**表示连至本文所述的苯基的连接点，诸如式(VI-3)、(V-4)或(VI-4)。

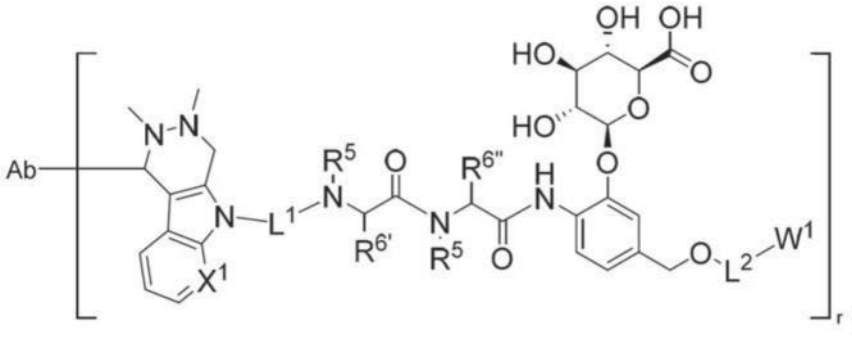
[0149] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(V-5)表示：

[0150] 

(V-5),

其中Ab、$L^1$、$L^2$、$R^2$、$R^3$、$R^5$、$X^1$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$、$Y^4$、$W^1$及r如本文所定义,诸如针对式(VI-3)所定义,并且$R^{6'}$和$R^{6''}$各自独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。

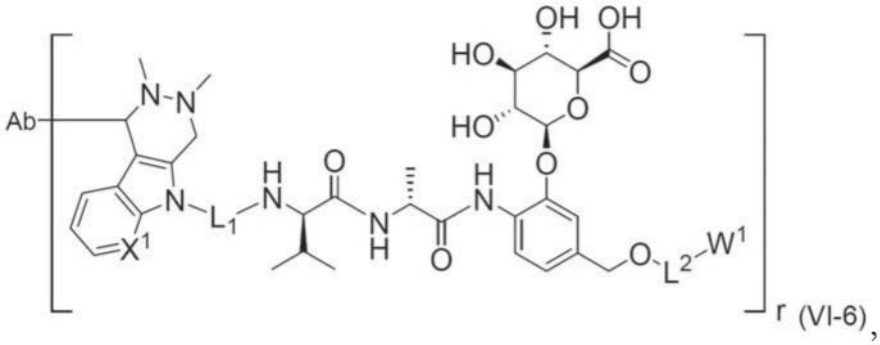
[0151] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-5)表示:

[0152] 

(VI-5),

其中Ab、$L^1$、$L^2$、$R^5$、$W^1$及r如本文所定义,诸如针对式(VI-3)所定义,并且$R^{6'}$和$R^{6''}$各自独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基,并且其中$X^1$为C或N。

[0153] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-6)表示:

[0154] 

(VI-6),

其中Ab、$L^1$、$L^2$、$W^1$及r如本文所定义,诸如针对式(VI-3)所定义并且其中$X^1$为C或N。

[0155] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-3)、(V-5)、(VI-5)或(VI-6)表示,其中:

[0156] $L^1$包含-$(T^1-V^1)_a$-$(T^2-V^2)_b$-$(T^3-V^3)_c$-;

[0157] $T^1$、$T^2$和$T^3$各自独立地选自由$C_1$-$C_{12}$烷基、$(PEG)_n$和$(AA)_p$组成的组;

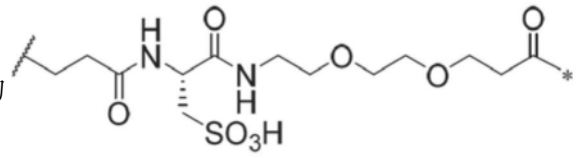
[0158] $V^1$、$V^2$和$V^3$各自独立地为-C(=O)-或-$NR^{1111}$-;

[0159] a、b和c各自为1;

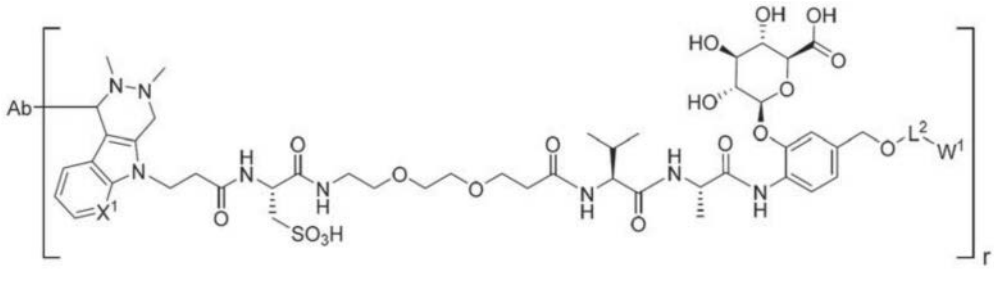
[0160] n独立地为整数1至10;

[0161] p独立地为整数1至10;

[0162] $R^{1111}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、芳基或取代的芳基。

[0163] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-3)、(V-5)、(VI-5)或(VI-6)表示,其中$L^1$为其中〰表示连至哒嗪-吡咯并偶合部分的氮的连接点,并且其中*表示连至接头中的末端氮的连接点,如本文所述,诸如式(VI-6)中所示。

[0164] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-7)表示:

[0165] (VI-7),

[0166] 其中Ab、$L^1$、$L^2$、$W^1$及r如本文所定义,诸如针对式(VI-3)所定义并且其中$X^1$为C或N。

[0167] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-7)表示,其中$L^2$为羰基。在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-7)表示,其中$X^1$为N且$W^1$为MMAE。

[0168] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;或(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的VH中所示的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的VL中所示的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。

[0169] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(a)VH区,其包含(1)具有选自由SEQ ID NO:1、7、12、13和18组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:2、8、14、19和24组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)具有选自由SEQ ID NO:3、9、15和20组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)具有选自由SEQ ID NO:6、17和23组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0170] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(i)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或(ii)VH区,其包含

含有氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:8的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:9的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或(iii)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:12的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或(iv)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:17的VL CDR3;或(v)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:23的VL CDR3;或(vi)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:24的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3。

[0171] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(a)VH区,其包含(1)具有选自由SEQ ID NO:27、31、34、35和39组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:28、32、36、40和43组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)具有选自由SEQ ID NO:29、33、37和41组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)具有选自由SEQ ID NO:30、38和42组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0172] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(i)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或(ii)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:31的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:32的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:33的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或(iii)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:34的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或(iv)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:35的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:37的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID

NO:11的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:38的VL CDR3;或(v)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:39的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:40的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:41的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:42的VL CDR3;或(vi)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:43的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3。

[0173] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(a)VH区,其包含(1)具有选自由SEQ ID NO:46、50、53、13和57组成的组的氨基酸序列的VH CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:47、51、54、58和61组成的组的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)具有选自由SEQ ID NO:48、52、55和59组成的组的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含(1)具有选自由SEQ ID NO:4、10、16和21组成的组的氨基酸序列的VL CDR1;(2)具有选自由SEQ ID NO:5、11和22组成的组的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)具有选自由SEQ ID NO:49、56和60组成的组的氨基酸序列的VL CDR3。

[0174] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(i)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或(ii)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:51的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:52的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或(iii)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:53的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或(iv)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:54的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:55的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:56的VL CDR3;或(v)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:58的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:59的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:60的VL CDR3;或(vi)VH区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:61的VH CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;和VL区,其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及含有氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3。

[0175] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-

5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含SEQ ID NO:25、26、44、45、62以及63中的任一者中所示的框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4(FR4)序列。

[0176] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含人框架序列。

[0177] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示,其中抗体(Ab)包含:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL;(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的VL;或(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的VL。

[0178] 本公开还提供一种药物组合物,其包含5T4-ADC,其中所述5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示;以及药学上可接受的赋形剂,其中所述抗体(Ab)如本文所述的任何实施方案中所述。在一些实施方案中,此类药物组合物中的5T4-ADC的药物/抗体比率(DAR)可为约1至约10,例如约1至约4、约1至约2、约1.5至约2、或约1.75至约1.9的DAR。

[0179] 本公开还提供一种用于治疗受试者的癌症或肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用5T4-ADC,其中所述5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)表示;或药物组合物,所述药物组合物包含式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VI-2)、(VI-3)、(V-5)、(VI-5)、(VI-6)或(VI-7)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂,其中抗体(Ab)如本文的任何实施方案中所述。

## 附图说明

[0180] 图1提供式VIA-21的接头-药物的例示性合成方案1。

[0181] 图2提供式VIa-11的接头-药物的例示性合成方案2。

[0182] 图3提供式VIb-11的接头-药物的例示性合成方案3。

[0183] 图4提供式VIb-82的接头-药物的例示性合成方案4。

[0184] 图5提供式VIb-81的接头-药物的例示性合成方案5。

[0185] 图6报告经式mAbA15-VIa-11或mAbA17-VIa-11ADC的5T4-ADC处理的MDA-MB-468细胞的细胞活力。

[0186] 图7报告经式mAbA15-VIa-11或mAbA17-VIa-11ADC的5T4-ADC处理的MCF-7细胞的细胞活力。

[0187] 图8报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA17-VIb-82的5T4-ADC处理的MDA-MB-468细胞的细胞活力。

[0188] 图9报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA17-VIb-82的5T4-ADC处理的MCF-7细胞的细胞活力。

[0189] 图10报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA17-VIb-82的5T4-ADC处理的MDA-MB-231细胞的细胞活力。

[0190] 图11报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA17-VIb-82的5T4-ADC处理的MCI-H226细胞的细胞活力。

[0191] 图12报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA17-VIb-82的5T4-ADC处理的BxPC3细胞的细

胞活力。

[0192] 图13报告经式mAbA15-VIa-11或mAbA17-VIa-11的5T4-ADC治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0193] 图14报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA17-VIb-82的5T4-ADC治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0194] 图15报告经式mAbA15-VIb-82的5T4-ADC的0.5mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg单次剂量治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0195] 图16报告经式mAbA15-VIb-82的5T4-ADC的0.25mg/kg、1.25mg/kg或2.5mg/kg的两次剂量(相隔1周)治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0196] 图17报告经式mAbA17-VIb-82的5T4-ADC的0.5mg/kg、2.5mg/kg或5.0mg/kg的单次剂量治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0197] 图18报告经式mAbA17-VIb-82的5T4-ADC的0.25mg/kg、1.25mg/kg或2.5mg/kg的两次剂量(相隔1周)治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0198] 图19报告经式mAbA15-VIa-11、mAbA15-VIb-81或mAbA15-VIb-82的5T4-ADC治疗的MDA-MB-468异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0199] 图20报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA15-VIa-11的5T4-ADC治疗的MDA-MB-231异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0200] 图21报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA15-VIa-11的5T4-ADC治疗的NCI-H226异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0201] 图22报告经式mAbA15-VIb-82或mAbA15-VIa-11的5T4-ADC治疗的BxPC3异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0202] 图23报告经式mAbA15-VIb-82的5T4-ADC治疗的Calu-6异种移植小鼠的平均肿瘤体积。

[0203] 图24A至图24C显示在毒代动力学(TK)研究中通过两种ELISA方法对经30mg/kg(图24A)、60mg/kg(图24B)和90mg/kg(图24C)的式mAbA15-VIb-82的5T4-ADC治疗的大鼠量化的总抗体及总ADC浓度(μg/mL)。

## 具体实施方式

[0204] 本公开提供结合至5T4的抗体-药物缀合物(ADC)和与其缀合(直接地或间接地结合)的药物。此类5T4-ADC适用于治疗、预防或减轻5T4介导的疾病、病症或疾患(包括所述疾病、病症或疾患的一种或多种症状)的组合物及方法中。5T4介导的疾病、病症及疾患包括多种癌症,包括(但不限于)其中肿瘤细胞表达或过表达5T4的任何癌症。另外,5T4-ADC适用于杀灭和/或去除肿瘤细胞。本文所述的5T4-ADC适用于治疗癌症的组合物及方法中。

[0205] 术语“烷基”是指单价饱和脂族烃基,其具有一至十二个碳原子,诸如1至10、1至6、1至5、1至4或1至3个碳原子。此术语包括例如直链及分支链烃基,诸如甲基(-$CH_3$)、乙基(-$CH_2CH_3$)、正丙基(-$CH_2CH_2CH_3$)、异丙基(-$CH(CH_3)_2$)、正丁基(-$CH_2CH_2CH_2CH_3$)、异丁基(-$CH_2CH(CH_3)_2$)、仲丁基(-$CH(CH_3)(CH_3CH_2)$)、叔丁基(-$C(CH_3)_3$)、正戊基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)和新戊基(-$CH_2C(CH_3)_3$)。

[0206] 术语“取代的烷基”是指如本文所定义的烷基,其中烷基链中的一个或多个碳原子

(除$C_1$碳原子之外)已任选地替换成杂原子,诸如-O-、-N-、-S-、-S(O)$_n$-(其中n为0至2)、-NR-(其中R为氢或烷基),并且具有一至五个选自由以下组成的组的取代基:烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、硫醇、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-芳基、-$SO_2$-杂芳基和-$NR^aR^b$,其中$R^a$与$R^b$可相同或不同且选自氢、任选地取代的烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基和杂环。

[0207] 术语"烯基"是指直链或分支链二价脂族烃基,其优选具有一至六个且更优选一至三个碳原子,并且任选地被一个或多个选自以下的基团取代:-O-、-$NR^{10}$-、-$NR^{10}$C(O)-、-C(O)$NR^{10}$-和其类似基团。此术语包括例如亚甲基(-$CH_2$-)、亚乙基(-$CH_2CH_2$-)、亚正丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)、亚异丙基(-$CH_2CH(CH_3)$-)、(-$C(CH_3)_2CH_2CH_2$-)、(-$C(CH_3)_2CH_2C(O)$-)、(-$C(CH_3)_2CH_2C(O)NH$-)、(-$CH(CH_3)CH_2$-)和其类似基团。

[0208] 术语"取代的烯基"是指其中一至三个氢用下文"取代的"定义中针对碳所述的取代基替换的亚烷基。

[0209] 术语"烷芳基"或"芳烷基"是指基团-亚烷基-芳基和-取代的亚烷基-芳基,其中亚烷基、取代的亚烷基和芳基如本文所定义。

[0210] 术语"烷氧基"是指基团-O-烷基,其中烷基如本文所定义。烷氧基包括例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基和其类似基团。术语"烷氧基"还指烯基-O-、环烷基-O-、环烯基-O-和炔基-O-,其中烯基、环烷基、环烯基和炔基如本文所定义。

[0211] 术语"取代的烷氧基"是指如下基团:取代的烷基-O-、取代的烯基-O-、取代的环烷基-O-、取代的环烯基-O-和取代的炔基-O-,其中取代的烷基、取代的烯基、取代的环烷基、取代的环烯基和取代的炔基如本文所定义。

[0212] 术语"烷氧基氨基"是指基团-NH-烷氧基,其中烷氧基如本文所定义。

[0213] 术语"烷基烷氧基"是指基团-亚烷基-O-烷基、亚烷基-O-取代的烷基、取代的亚烷基-O-烷基,和取代的亚烷基-O-取代的烷基,其中烷基、取代的烷基、亚烷基和取代的亚烷基如本文所定义。

[0214] 术语"烯基"是指直链或分支链烃基,其具有二至六个碳原子,诸如二至四个碳原子,并且具有至少一个、优选一至两个双键不饱和位。此术语包括例如双乙烯基、烯丙基和丁-3-烯-1-基。此术语包括顺式及反式异构体或这些异构体的混合物。

[0215] 术语"取代的烯基"是指具有一至五个取代基或一至三个取代基的如本文所定义的烯基,所述取代基选自烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、硫醇、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-芳基,及-$SO_2$-杂芳基。

[0216] 术语"炔基"是指直链或分支链单价烃基,其具有二至六个碳原子、优选二至三个

碳原子,并且具有至少一个、优选一至二个三键不饱和位。此类炔基的实例包括乙炔基(-C≡CH)和炔丙基(-$CH_2C$≡CH)。

[0217] 术语“取代的炔基”是指具有一至五个取代基或一至三个取代基的如本文所定义的炔基,所述取代基选自烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、硫醇、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-芳基,及-$SO_2$-杂芳基。

[0218] 术语“酰基氨基”是指选自以下的基团:-$NR^{20}C(O)$烷基、-$NR^{20}C(O)$取代的烷基、-$NR^{20}C(O)$环烷基、-$NR^{20}C(O)$取代的环烷基、-$NR^{20}C(O)$-环烯基、-$NR^{20}C(O)$-取代的环烯基、-$NR^{20}C(O)$烯基、-$NR^{20}C(O)$-取代的烯基、-$NR^{20}C(O)$炔基、-$NR^{20}C(O)$-取代的炔基、-$NR^{20}C(O)$芳基、-$NR^{20}C(O)$-取代的芳基、-$NR^{20}C(O)$-杂芳基、-$NR^{20}C(O)$取代的杂芳基、-$NR^{20}C(O)$-杂环,及-$NR^{20}C(O)$-取代的杂环,其中$R^{20}$为氢或烷基并且其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环如本文所定义。

[0219] 术语“酰基”是指选自以下的基团:H-C(O)-、烷基-C(O)-、取代的烷基-C(O)-、烯基-C(O)-、取代的烯基-C(O)-、炔基-C(O)-、取代的炔基-C(O)-、环烷基-C(O)-、取代的环烷基-C(O)-、环烯基-C(O)-、取代的环烯基-C(O)-、芳基-C(O)-、取代的芳基-C(O)-、杂芳基-C(O)-、取代的杂芳基-C(O)-、杂环基-C(O)-和取代的杂环基-C(O)-,其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环如本文所定义。例如,酰基包括“乙酰基”$CH_3C(O)$-。

[0220] 术语“氨基羰基”或术语“氨基酰基”是指基团-C(O)$NR^{21}R^{22}$,其中$R^{21}$和$R^{22}$独立地选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环并且其中$R^{21}$和$R^{22}$任选地与其所结合的氮结合在一起形成杂环基或取代的杂环基,并且其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环基和取代的杂环基如本文所定义。

[0221] 术语“酰氧基”是指选自以下的基团:烷基-C(O)O-、取代的烷基-C(O)O-、环烷基-C(O)O-、取代的环烷基-C(O)O-、芳基-C(O)O-、杂芳基-C(O)O-和杂环基-C(O)O-,其中烷基、取代的烷基、环烷基、取代的环烷基、芳基、杂芳基和杂环基如本文所定义。

[0222] 术语“氨基磺酰基”是指基团-$SO_2NR^{21}R^{22}$,其中$R^{21}$和$R^{22}$独立地选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环并且其中$R^{21}$和$R^{22}$任选地与其所结合的氮结合在一起形成杂环基或取代的杂环基,并且烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环基和取代的杂环基如本文所定义。

[0223] 术语“磺酰基氨基”是指基团-$NR^{21}SO_2R^{22}$,其中$R^{21}$和$R^{22}$独立地选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环并且其中$R^{21}$和$R^{22}$任选地与其所结合的原子结合在一起形成杂环基或取代的杂环基,并且其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环基和取代的杂环基如本文所定义。

[0224] 术语“芳基”是指具有六至十八个碳原子的单价芳族碳环基,其呈单个环形式(诸如以苯基存在)或具有多个稠环的环系统形式(此类芳族环系统的实例包括萘基、蒽基和二氢茚基),所述稠环可为或可不为芳族,限制条件为连接点是经由芳族环的原子。此术语包括例如苯基和萘基。除非被芳基取代基的定义另外限制,否则此类芳基可任选地被一至五个取代基或一至三个取代基取代,所述取代基选自酰氧基、羟基、硫醇、酰基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、取代的烷基、取代的烷氧基、取代的烯基、取代的炔基、取代的环烷基、取代的环烯基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、酰基氨基、烷芳基、芳基、芳氧基、叠氮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、氨基酰氧基、氧基酰基氨基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-芳基、-$SO_2$-杂芳基和三卤甲基。

[0225] 术语“芳氧基”是指基团-O—芳基,其中芳基如本文所定义,包括例如苯氧基、萘氧基和其类似基团,包括也如本文所定义的任选地取代的芳基。

[0226] 术语“氨基”是指基团-$NH_2$。

[0227] 术语“取代的氨基”是指基团-NRR,其中各R独立地选自由以下组成的组:氢、烷基、取代的烷基、环烷基、取代的环烷基、烯基、取代的烯基、环烯基、取代的环烯基、炔基、取代的炔基、芳基、杂芳基和杂环基,限制条件为至少一个R不为氢。

[0228] 术语“叠氮基”是指基团-$N_3$。

[0229] 术语“羧基(carboxyl)”、“羧基(carboxy)”或“羧酸盐”是指-$CO_2H$或其盐。

[0230] 术语“羧基酯(carboxyl ester)”或“羧基酯(carboxy ester)”或术语“羧烷基(carboxyalkyl)”或“羧基烷基(carboxylalkyl)”是指选自以下的基团:-C(O)O-烷基、-C(O)O-取代的烷基、-C(O)O-烯基、-C(O)O-取代的烯基、-C(O)O-炔基、-C(O)O-取代的炔基、-C(O)O-芳基、-C(O)O-取代的芳基、-C(O)O-环烷基、-C(O)O-取代的环烷基、-C(O)O-环烯基、-C(O)O-取代的环烯基、-C(O)O-杂芳基、-C(O)O-取代的杂芳基、-C(O)O-杂环及-C(O)O-取代的杂环,其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环如本文所定义。

[0231] 术语“氰基”或“腈”是指基团-CN。

[0232] 术语“环烷基”是指三至十个碳原子的环烷基,其具有单个或多个环,包括稠合、桥接及螺接环系统。适合环烷基的实例包括例如金刚烷基、环丙基、环丁基、环戊基、环辛基和其类似基团。

[0233] 术语“取代的环烷基”是指具有一至五个取代基或一至三个取代基的环烷基,其中所述取代基独立地选自烷基、取代的烷基、烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、

环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、硫醇、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-芳基,及-$SO_2$-杂芳基。

[0234] 术语“环烯基”是指三至十个碳原子的非芳族环烷基,其具有单个或多个环且具有至少一个双键,优选一或两个双键。

[0235] 术语“取代的环烯基”是指具有一至五个取代基或一至三个取代基的环烯基,其中所述取代基独立地选自烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、酮基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、硫醇、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-芳基,及-$SO_2$-杂芳基。

[0236] 术语“卤基”及“卤素”是指氟、氯、溴或碘。

[0237] 术语“羟基(hydroxy)”及“羟基(hydroxyl)”是指基团-OH。

[0238] 术语“杂芳基”是指一种芳族基团,其具有一至十五个碳原子,诸如一至十个碳原子,并且在环内具有一至十个选自由氧、氮及硫组成的组的杂原子。此类杂芳基可在环系统中具有单个环(诸如吡啶基、咪唑基或呋喃基)或多个稠环(例如以下基团:诸如吲哚嗪基、喹啉基、苯并呋喃、苯并咪唑基或苯并噻吩基),其中环系统内的至少一个环为芳族。为了满足原子价要求,此类杂芳基环中的任何杂原子可或可不键结至H或取代基,例如烷基或如本文所述的其他取代基。在一些实施方案中,杂芳基中的氮和/或硫环原子任选地被氧化以提供N-氧化物(N→O)、亚磺酰基或磺酰基部分。此术语包括例如吡啶基、吡咯基、吲哚基、噻吩基和呋喃基。除非被杂芳基取代基的定义另外限制,否则此类杂芳基可任选地被一至五个取代基或一至三个取代基取代,其中所述取代基独立地选自酰氧基、羟基、硫醇、酰基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、取代的烷基、取代的烷氧基、取代的烯基、取代的炔基、取代的环烷基、取代的环烯基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、酰基氨基、烷芳基、芳基、芳氧基、叠氮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、氨基酰氧基、氧基酰基氨基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-芳基和-$SO_2$-杂芳基和三卤甲基。

[0239] 术语“杂芳烷基”是指包含结合至杂芳基的亚烷基的基团,其中亚烷基和杂芳基如本文所定义。此术语包括例如吡啶基甲基、吡啶基乙基、吲哚基甲基和其类似基团。

[0240] 术语“杂芳基氧基”是指-O-杂芳基。

[0241] 术语“杂环(heterocycle)”、“杂环(heterocyclic)”、“杂环烷基”及“杂环基”本文中可互换使用以指具有单个环或多个稠环(包括稠合、桥接及螺接的环系统)的饱和或不饱和基团,所述基团具有三至二十个环原子,包括一至十个杂原子。这些环原子是选自氮、硫及氧,其中在稠环系统中,一个或多个环可为环烷基、芳基或杂芳基,限制条件为连接点是经由非芳族环。在一些实施方案中,杂环基中的氮原子和/或硫原子任选地被氧化以提供N-

氧化物、-S(O)-或-$SO_2$-部分。为了满足原子价要求,此类杂环中的任何杂原子可或可不键结至一个或多个H或一个或多个取代基,例如烷基或如本文所述的其他取代基。

[0242] 杂环及杂芳基的实例包括但不限于氮杂环丁烷、吡咯、咪唑、吡唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、吲哚嗪、异吲哚、吲哚、二氢吲哚、吲唑、嘌呤、喹嗪、异喹啉、喹啉、酞嗪、萘基吡啶、喹喔啉、喹唑啉、噌啉、蝶啶、呫唑、呫啉、菲啶、吖啶、菲咯啉、异噻唑、吩嗪、异噁唑、吩噁嗪、吩噻嗪、咪唑烷、咪唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚啉、邻苯二甲酰亚胺、1,2,3,4-四氢异喹啉、4,5,6,7-四氢苯并[b]噻吩、噻唑、噻唑烷、噻吩、苯并[b]噻吩、吗啉基、硫吗啉基(也称为噻吗啉基)、1,1-二氧杂硫吗啉基、哌啶基、吡咯烷、四氢呋喃基和其类似基团。

[0243] 除非被杂环取代基的定义另外限制,否则此类杂环基可任选地被一至五个取代基或一至三个取代基取代,所述取代基选自烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫代芳氧基、硫代杂芳氧基、硫代杂环氧基、硫醇、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环氧基、羟氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-芳基、-$SO_2$-杂芳基和稠合杂环。

[0244] 术语“羟氨基”是指基团-NHOH。

[0245] 术语“硝基”是指基团-$NO_2$。

[0246] 术语“氧代基”是指双键键结的氧原子(=O)。

[0247] 术语“磺酰基”是指基团-$SO_2$-烷基、-$SO_2$-取代的烷基、-$SO_2$-烯基、-$SO_2$-取代的烯基、-$SO_2$-环烷基、-$SO_2$-取代的环烷基、-$SO_2$-环烯基、-$SO_2$-取代的环烯基、-$SO_2$-芳基、-$SO_2$-取代的芳基、-$SO_2$-杂芳基、-$SO_2$-取代的杂芳基、-$SO_2$-杂环及-$SO_2$-取代的杂环,其中烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、杂环和取代的杂环如本文所定义。磺酰基包括例如甲基-$SO_2$-、苯基-$SO_2$-和4-甲基苯基-$SO_2$-。

[0248] 术语“硫醇”是指基团-SH。

[0249] 术语“硫酮基(thioxo)”或术语“硫酮基(thioketo)”是指双键键结的硫原子(=S)。

[0250] 术语“烷基硫基”或术语“硫代烷氧基”是指基团-S-烷基,其中烷基如本文所定义。在一些实施方案中,硫可氧化成-S(O)-。亚砜可以一种或多种立体异构体形式存在。

[0251] 术语“取代的硫代烷氧基”是指基团-S-取代的烷基。

[0252] 术语“硫代芳氧基”是指基团芳基-S-,其中所述芳基如本文所定义,包括本文也定义的任选地取代的芳基。

[0253] 术语“硫代杂芳氧基”是指基团杂芳基-S-,其中杂芳基如本文所定义,包括本文也定义的任选地取代的芳基。

[0254] 术语“硫代杂环氧基”是指基团杂环基-S-,其中所述杂环基如本文所定义,包括本文也定义的任选地取代的杂环基。

[0255] 除本文中的公开内容以外,术语“取代的”当用于修饰指定基团或自由基时,也可意指指定基团或自由基中的一个或多个氢原子彼此独立地各自用如下文中所定义的相同或不同取代基替换。

[0256] 除本文中关于个别术语所公开的基团之外,用于取代指定基团或自由基中的饱和碳原子上的一个或多个氢(单个碳上的任何两个氢可用=O、=$NR^{70}$、=N-$OR^{70}$、=$N_2$或=S替换)的取代基除非另外说明,否则也为-$R^{60}$、卤基、=O、-$OR^{70}$、-$SR^{70}$、-$NR^{80}R^{80}$、三卤甲基、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-$NO_2$、=$N_2$、-$N_3$、-$SO_2R^{70}$、-$SO_2O^-M^+$、-$SO_2OR^{70}$、-$OSO_2R^{70}$、-$OSO_2O^-M^+$、-$OSO_2OR^{70}$、-P(O)$(O^-)_2(M^+)_2$、-P(O)$(OR^{70})O^-M^+$、-P(O)$(OR^{70})_2$、-C(O)$R^{70}$、-C(S)$R^{70}$、-C$(NR^{70})R^{70}$、-C(O)$O^-M^+$、-C(O)$OR^{70}$、-C(S)$OR^{70}$、-C(O)$NR^{80}R^{80}$、-C$(NR^{70})NR^{80}R^{80}$、-OC(O)$R^{70}$、-OC(S)$R^{70}$、-OC(O)$O^-M^+$、-OC(O)$OR^{70}$、-OC(S)$OR^{70}$、-$NR^{70}$C(O)$R^{70}$、-$NR^{70}$C(S)$R^{70}$、-$NR^{70}CO_2^-M^+$、-$NR^{70}CO_2R^{70}$、-$NR^{70}$C(S)$OR^{70}$、-$NR^{70}$C(O)$NR^{80}R^{80}$、-$NR^{70}$C$(NR^{70})R^{70}$及-$NR^{70}$C$(NR^{70})NR^{80}R^{80}$,其中$R^{60}$选自由以下组成的组:任选地取代的烷基、环烷基、杂烷基、杂环烷基烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂芳基和杂芳基烷基,各$R^{70}$独立地为氢或$R^{60}$;各$R^{80}$独立地为$R^{70}$,或替代地两个$R^{80'}$与其所键结的氮原子一起形成5元、6元或7元杂环烷基,所述杂环烷基可任选地包括一至四个选自由O、N及S组成的组的相同或不同额外杂原子,其中N可存在-H或$C_1$-$C_6$烷基取代;并且各$M^+$为具有单个净正电荷的抗衡离子。各$M^+$可独立地为例如碱金属离子,诸如$K^+$、$Na^+$、$Li^+$;铵离子,诸如$^+N(R^{60})_4$;或碱土金属离子,诸如$[Ca^{2+}]_{0.5}$、$[Mg^{2+}]_{0.5}$或$[Ba^{2+}]_{0.5}$(“下标0.5意指此类二价碱土金属离子中的一个抗衡离子可为本发明化合物的离子化形式,并且另一者为典型抗衡离子(诸如氯离子),或本文所公开的两个离子化化合物可充当此类二价碱土金属离子的抗衡离子,或本发明的双重离子化化合物可充当此类二价碱土金属离子的抗衡离子)。作为具体实例,-$NR^{80}R^{80}$意图包括-$NH_2$、-NH-烷基、N-吡咯烷基、N-哌嗪基、4N-甲基-哌嗪-1-基和N-吗啉基。

[0257] 除本文中的公开内容之外,“取代”的烯基、炔基、芳基和杂芳基中的不饱和碳原子上的氢的取代基除非另外说明,否则也为-$R^{60}$、卤基、-$O^-M^+$、-$OR^{70}$、-$SR^{70}$、-$S^-M^+$、-$NR^{80}R^{80}$、三卤甲基、-$CF_3$、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-$NO_2$、-$N_3$、-$SO_2R^{70}$、-$SO_3^-M^+$、-$SO_3R^{70}$、-$OSO_2R^{70}$、-$OSO_3^-M^+$、-$OSO_3R^{70}$、-$PO_3^{2}(M^+)_2$、-P(O)$(OR^{70})O^-M^+$、-P(O)$(OR^{70})_2$、-C(O)$R^{70}$、-C(S)$R^{70}$、-C$(NR^{70})R^{70}$、-$CO_2^-M^+$、-$CO_2R^{70}$、-C(S)$OR^{70}$、-C(O)$NR^{80}R^{80}$、-C$(NR^{70})NR^{80}R^{80}$、-OC(O)$R^{70}$、-OC(S)$R^{70}$、-$OCO_2^-M^+$、-$OCO_2R^{70}$、-OC(S)$OR^{70}$、-$NR^{70}$C(O)$R^{70}$、-$NR^{70}$C(S)$R^{70}$、-$NR^{70}CO_2^-M^+$、-$NR^{70}CO_2R^{70}$、-$NR^{70}$C(S)$OR^{70}$、-$NR^{70}$C(O)$NR^{80}R^{80}$、-$NR^{70}$C$(NR^{70})R^{70}$及-$NR^{70}$C$(NR^{70})NR^{80}R^{80}$,其中$R^{60}$、$R^{70}$、$R^{80}$及$M^+$如本文所定义,限制条件为在取代的烯基或炔基的情况下,取代基不为-$O^-M^+$、-$OR^{70}$、-$SR^{70}$或-$S^-M^+$。

[0258] 除本文中关于个别术语所公开的基团之外,“取代”的杂烷基和环杂烷基中的氮原子上的氢的取代基除非另外说明,否则也为-$R^{60}$、-$OM^+$、-$OR^{70}$、-$SR^{70}$、-$SM^+$、-$NR^{80}R^{80}$、三卤甲基、-$CF_3$、-CN、-NO、-$NO_2$、-$S(O)_2R^{70}$、-$S(O)_2O^-M^+$、-$S(O)_2OR^{70}$、-$OS(O)_2R^{70}$、-$OS(O)_2O^-M^+$、-$OS(O)_2OR^{70}$、-P(O)$(O)_2(M^+)_2$、-P(O)$(OR^{70})O^-M^+$、-P(O)$(OR^{70})(OR^{70})$、-C(O)$R^{70}$、-C(S)$R^{70}$、-C$(NR^{70})R^{70}$、-C(O)$OR^{70}$、-C(S)$OR^{70}$、-C(O)$NR^{80}R^{80}$、-C$(NR^{70})NR^{80}R^{80}$、-OC(O)$R^{70}$、-OC(S)$R^{70}$、-OC(O)$OR^{70}$、-OC(S)$OR^{70}$、-$NR^{70}$C(O)$R^{70}$、-$NR^{70}$C(S)$R^{70}$、-$NR^{70}$C(O)$OR^{70}$、-$NR^{70}$C(S)$OR^{70}$、-$NR^{70}$C(O)$NR^{80}R^{80}$、-$NR^{70}$C$(NR^{70})R^{70}$及-$NR^{70}$C$(NR^{70})NR^{80}R^{80}$,其中$R^{60}$、$R^{70}$、$R^{80}$及$M^+$如本文所定义。

[0259] 取代的基团可存在一个、两个、三个或四个取代基,诸如一个、两个或三个取代基,或一或两个取代基,或一个取代基。

[0260] 除非另外指明,否则本文中未明确定义的取代基的命名系通过命名官能团的末端部分,随后向连接点命名相邻官能团来达成。例如,取代基“芳基烷氧基羰基”是指基团(芳基)-(烷基)-O-C(O)-。

[0261] 对于本文公开的含有一个或多个取代基的任一基团,当然应了解,此类基团不含在空间上不切实际和/或在合成上不可行的任何取代或取代模式。另外,本公开化合物包括由这些化合物的取代产生的所有立体化学异构体。

[0262] 术语“受试者”是指人及非人受试者,尤其哺乳动物受试者。

[0263] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指治疗(treating)或治疗(treatment)受试者(诸如哺乳动物(特别是人))的疾病或医学疾患,包括:(a)预防受试者出现疾病或医学疾患,诸如预防性治疗受试者;(b)改善受试者的疾病或医学疾患,诸如消除或促使受试者的疾病或医学疾患消退;(c)抑制受试者的疾病或医学疾患,例如通过减缓或阻滞受试者的疾病或医学疾患发展;或(d)减轻受试者的疾病或医学疾患的症状。在一些实施方案中,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”排除预防性治疗。

[0264] 如本文所用,术语“原生氨基酸序列”是指为了包括经修饰的氨基酸残基而进行修饰之前的多肽氨基酸序列。

[0265] 术语“氨基酸类似物”、“非天然氨基酸”及其类似物可互换使用,并且包括在结构和/或总体形状上与天然存在的蛋白质中通常发现的一个或多个氨基酸(例如Ala或A、Cys或C、Asp或D、Glu或E、Phe或F、Gly或G、His或H、Ile或I、Lys或K、Leu或L、Met或M、Asn或N、Pro或P、Gln或Q、Arg或R、Ser或S、Thr或T、Val或V、Trp或W、Tyr或Y)相似的氨基酸样化合物。氨基酸类似物还包括具有经修饰的侧链或主链的天然氨基酸。氨基酸类似物还包括与氨基酸类似物的天然存在的D形式以及L-形式具有相同立体化学构型的氨基酸类似物。在一些实施方案中,氨基酸类似物共用主链结构和/或一个或多个天然氨基酸的侧链结构,差异在于分子中的一个或多个经修饰基团。此类修饰可包括但不限于一原子(诸如N)对有关原子(诸如S)的取代、基团(诸如甲基或羟基和其类似基团)或原子(诸如Cl或Br及其类似原子)的加成、基团的缺失、共价键的取代(单键对双键的取代,及其类似者),或其组合。例如,氨基酸类似物可包括α-羟基酸及α-氨基酸,及其类似物。

[0266] 术语“氨基酸侧链”用于指连接至氨基酸残基的α碳的取代基,包括天然氨基酸、非天然氨基酸及氨基酸类似物。氨基酸侧链也可包括如在本文所述的经修饰氨基酸和/或缀合物的上下文中所述的氨基酸侧链。

[0267] 术语“碳水化合物”用于指单糖、双糖、寡糖及多糖的单体单元和/或聚合物。术语糖用于指较小碳水化合物,诸如单糖、双糖。术语“碳水化合物衍生物”包括其中所关注碳水化合物中的一个或多个官能团经取代(由任何方便的取代基替换)、经修饰(使用任何方便的化学反应转化成另一基团)或不存在(例如消去或由H替换)的化合物。多种碳水化合物及碳水化合物衍生物可获得且可经调适以用于本公开化合物及缀合物。

[0268] 术语“糖苷”或“糖基”是指经由糖苷键结合至部分的糖分子或基团。例如,糖苷所结合的部分可为如本文所述的可裂解接头。糖苷键可使糖苷经由各种类型的键连接至其他部分,所述键诸如(但不限于)O-糖苷键(O-糖苷)、N-糖苷键(糖基胺)、S-糖苷键(硫苷)或C-糖苷键(C-糖苷或C-糖基)。在一些情况下,糖苷可与连接至其的部分裂解,诸如通过化学介导的水解或酶介导的水解。

[0269] 除非另外指明,否则术语“5T4”是指来自任何脊椎动物来源的多肽(“多肽”与“蛋白质”在本文中可互换地使用)或任何原生5T4,包括哺乳动物,诸如灵长类动物(例如人、食蟹猴(cynomolgus monkey,cyno))、犬及啮齿动物(例如小鼠及大鼠)。5T4,也已知为“5T4癌

胚滋养层糖蛋白”或“Wnt活化抑制因子1”或“5T4癌滋养层糖蛋白”或“5T4癌胚抗原”或“WAIF1”或“M6P1”或“5T4-AG”或“5T4AG”或“TPBG”,为由TPBG基因编码的糖蛋白。术语5T4涵盖“全长”5T4,以及在细胞中加工而产生的任何形式的5T4或其任何片段。在一些实施方案中,5T4包含信号序列。在一些实施方案中,5T4不包括信号序列。在一些实施方案中,术语5T4是指全长5T4的包含5T4胞外域的片段。术语5T4还涵盖5T4的天然存在的变体,诸如SNP变体、剪接变体及对偶基因变体。下文提供人5T4的全长氨基酸序列(例示性信号序列=斜体文字;例示性胞外域=加下划线的文字):

[0270] *MPGGCSRGPA AGDGRLRLAR LALVLLGWVS SSSPTSSASS FSSSAPFLAS AVSAQPPLPD*
QCPALCECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP AYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL
AALNLSGSRL DEVRAGAFEH LPSLRQLDLS HNPLADLSPF AFSGSNASVS APSPLVELIL
NHIVPPEDER QNRSFEGMVV AALLAGRALQ GLRRLELASN HFLYLPRDVL AQLPSLRHLD
LSNNSLVSLT YVSFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNGTLAE LQGLPHIRVF LDNNPWVCDC
HMADMVTWLK ETEVVQGKDR LTCAYPEKMR NRVLLELNSA DLDCDPILPP SLQTSYVFLG
IVLALIGAIF LLVLYLNRKG IKKWMHNIRD ACRDHMEGYH YRYEINADPR LTNLSSNSDV
(SEQ ID NO:64)

[0271] 下文提供食蟹猴(cynomolgus monkey,cyno)5T4的全长氨基酸序列(例示性信号序列=斜体文字;例示性胞外域=加下划线的文字):

[0272] *MPGGCSRGPA AGDGRLRLAR LALVLLGWVS SSSSTSSASS SSSSAPFLAS AASAQPPLPD*
QCPALCECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP LYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL
AALNLSGSRL DEVRGGAFEH LPSLRQLDLS HNPLAYLSPF AFSGSNASIS APSPLVELIL
NHIVPPDDKR QNRSFEGMVA AALVAGRALQ GLHLLELASN HFLYLPRDVL AQLPSLRYLD
LSNNSLVSLT YVSFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNGTLAE LQGLPHVRVF LDNNPWVCDC
HMADMVTWLK QTGVVQGKDR LTCAFPEKMR NRVLLELNSA DLDCDPILPP SLQTSYVFLG
IVLALIGAIF LLVLYLNRKG IKKWMHNIRD ACRDHMEGYH YRYEINADPR LTNLSSNSDV
(SEQ ID NO:65)

[0273] 下文提供小鼠5T4的全长氨基酸序列(例示性信号序列=斜体文字;例示性胞外域=加下划线的文字):

[0274] *MPGAGSRGPS AGDGRLRLAR LALVLLGWVS* ASAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE
RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL
EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL
NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP
SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN
PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT
SYVFLGIVLA LIGAIFLLVL YLNRKGIKKW MHNIRDACRD HMEGYHYRYE INADPRLTNL
SSNSDV

[0275] (SEQ ID NO:66)

[0276] 术语“抗体”、“免疫球蛋白”或“Ig”在本文中可互换使用且在最广泛意义上使用且特别涵盖例如多克隆抗体、单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长单克隆抗体)、具有多表位或单表位特异性的抗体组合物、重组产生的抗体、单结构域抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、合成抗体、嵌合抗体、人源化抗体,或具有全长重链和/或轻链的抗体的人形式。抗体还包括保留5T4结合特征的单一抗体结构域以及抗体片段(和/或包含抗体片段的多肽)。抗体片段的非限制性实例包括抗体的抗原结合区和/或效应

子区域,例如Fab、Fab′、F(ab′)$_2$、Fv、scFv、(scFv)$_2$、单链抗体分子、双可变结构域抗体、单可变结构域抗体、线性抗体、V区、由抗体片段形成的多特异性抗体、F(ab)$_2$、Fd、Fc、双功能抗体、二-双功能抗体、二硫键连接的Fv(dsFv)、单结构域抗体(例如纳米抗体)或其他片段(例如由非共价偶合的重链及轻链的可变区组成的片段)。一般而言,可变(V)区可为免疫球蛋白重链(VH)和/或轻链(VL)可变区的任何适合布置。例如,抗体还包括包含两个重链及两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体及抗体重链单体。因此,例如,V区可为二聚体且含有结合5T4的VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。在任何实施方案中,VH区与VL区可直接或经由接头共价偶合以形成单链Fv(scFv)。为便于参考,本文中提及的scFv蛋白纳入"抗体片段"类别中。抗体片段的另一种形式为包含抗体的一个或多个互补决定区(CDR)的肽。CDR(也称为"最小识别单元"或"高变区")可通过构建编码一个或多个所关注CDR的多核苷酸来获得。此类多核苷酸如下制备:例如使用产抗体细胞的mRNA作为模板、利用聚合酶链反应合成可变区(参见例如Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology,2:1 06(1991);Courtenay-Luck,"Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,"in Monoclonal Antibodies Production,Engineering and Clinical Application,Ritter等人(编),第166页,Cambridge University Press(1995);及Ward等人,"Genetic Manipulation and Expression ofAntibodies,"in Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等人(编),第137页,Wiley-Liss,Inc.(1995))。抗体片段可并入例如单结构域抗体、最大抗体、微型抗体、胞内抗体、双功能抗体、三功能抗体、四功能抗体、新抗原受体的可变区(v-NAR)和双单链Fv区(参见例如Hollinger及Hudson,Nature Biotechnology,23(9):1126-1136,2005)。在一些实施方案中,包含VH和/或VL的抗体含有轻链和/或重链恒定区,诸如一个或多个恒定区,包括一个或多个IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4恒定区。在一些实施方案中,抗体可包括上述任一者的表位结合片段。本文所述的抗体可属于免疫球蛋白分子的任何类别(例如IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)或任何亚类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

[0277] 如本文所用,术语"单特异性"表示抗体具有一个或多个结合位,其中各结合位结合至相同抗原的相同表位。

[0278] 术语"双特异性"意指抗体可特异性结合至至少两种不同的抗原决定子,例如各由一对抗体重链可变区(VH)和抗体轻链可变区(VL)形成的两个结合位,所述抗体重链可变区及所述抗体轻链可变区结合至不同抗原或结合至相同抗原上的不同表位。此类双特异性抗体可具有1+1格式(包含一个针对第一抗原或表位的结合位及一个针对第二抗原或表位的结合位)。其他双特异性抗体格式可为2+1或1+2格式(包含两个针对第一抗原或表位的结合位及一个针对第二抗原或表位的结合位)或2+2形式(包含两个针对第一抗原或表位的结合位及两个针对第二抗原或表位的结合位)。当双特异性抗体包含两个抗原结合位时,各结合位可结合至不同抗原决定子。此类双特异性抗体可结合至相同抗原上的两个不同表位(例如5T4上的表位)。

[0279] 在两种或更多种核酸或多肽的上下文中,术语"一致"或"一致性"百分比是指当根据最大一致性比较及比对(必要时,引入空位)时,两种或更多种序列或子序列相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基,不考虑任何保守氨基酸取代作为序列一致性的一部分。一致性百分比可使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量。本领域中熟知可

用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的各种算法及软件。这些算法及软件包括(但不限于)基本局部比对搜索工具(BLAST)、ALIGN、MegAlign、BestFit、GCG Wisconsin套装及其变型。在一些实施方案中,两种核酸或多肽基本上一致,意指其当根据最大一致性比较及比对时,具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%且在一些实施方案中,具有至少95%、96%、97%、98%或99%核苷酸或氨基酸残基一致性,如使用序列比较算法或通过目视检查所测量。在一些实施方案中,长度为至少约10个残基、至少约20个残基、至少约40至60个残基、至少约60至80个残基或其间任何整数值的氨基酸序列区域存在一致性。在一些实施方案中,一致性存在于比60至80个残基更长(诸如至少约80至100个残基)的区域上,并且在一些实施方案中,序列在所比较的序列(诸如目标蛋白或抗体的编码区)的全长上基本上一致。在一些实施方案中,长度为至少约10个碱基、至少约20个碱基、至少约40至60个碱基、至少约60至80个碱基或其间任何整数值的核苷酸序列区域内存在一致性。在一些实施方案中,在比60至80个碱基更长的区域(诸如至少约80至1000或更多个碱基)内存在一致性,并且在一些实施方案中,序列在所比较的序列(诸如编码所关注蛋白质的核苷酸序列)的全长内基本上一致。

[0280] “保守氨基酸取代”为一个氨基酸残基被具有类似化学特征的侧链的另一氨基酸残基替换的取代。本领域中已大体定义具有类似侧链的氨基酸残基家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸取代酪氨酸为保守取代。一般而言,本公开的多肽、可溶性蛋白质和/或抗体的序列中的保守取代不消除含有氨基酸序列的多肽、可溶性蛋白质或抗体对目标结合位的结合。鉴别出不消除结合的氨基酸保守取代的方法在本领域中已熟知。

[0281] 术语“多肽”是指任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可为线性或分支的,其可包含经修饰的氨基酸,并且其可包括非氨基酸(例如经非氨基酸取代)。术语还涵盖已经天然修饰或通过介入而经修饰的氨基酸聚合物;例如二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其他操纵或修饰,诸如与诸如标记组分或药物(例如毒素)的部分连接或缀合(直接地或间接地)。所述定义内还包括例如含有氨基酸的一种或多种类似物(包括例如非天然氨基酸)以及本领域中已知的其他修饰的多肽。应了解,由于本公开的多肽可基于抗体或免疫球蛋白超家族的其他成员,但在一些实施方案中,多肽可以单链或单链二聚体形式存在。

[0282] 如本文所用,“抗原”为含有抗体可特异性结合的表位的部分或分子。因此,抗原可被抗体结合。在一些实施方案中,本文所述抗体所结合的抗原为5T4(例如人5T4),或其片段,诸如包含5T4的一个或多个区域的片段。

[0283] 如本文所用,“表位”为本领域中的术语且是指抗原中可供抗体特异性结合的局部区域。表位可为线性表位或可为构象、非线性或不连续的表位。例如,在多肽抗原的情况下,表位可为多肽的邻接氨基酸(“线性”表位)或表位可包含来自多肽的两个或更多个非邻接区域(“构象”、“非线性”或“不连续”表位)的氨基酸,例如人5T4。所属领域技术人员应了解,一般而言,线性表位可以或可以不依赖于二级、三级或四级结构。例如,在一些实施方案中,抗体结合至一组氨基酸,不论其是否折叠成天然三维蛋白质结构。在其他实施方案中,抗体

需要构成表位的氨基酸残基展现特定构象(例如弯曲、扭转、转弯或折叠)以便识别及结合表位。

[0284] 一种抗体与参考抗体结合“表位”、“基本上相同的表位”或“相同的表位”。用于确定两种抗体在三维空间中是否结合至相同、重叠或相邻表位的最广泛使用的快速方法为竞争分析,其可配置成多种不同格式,例如使用经标记的抗原或经标记的抗体。在一些分析中,使抗原固定于96孔板上,或表达于细胞表面上,并且使用放射性、荧光或酶标记来测量未标记的抗体阻断经标记的抗体结合的能力。

[0285] “表位分组”为基于抗体所识别的表位而将抗体分组的方法。更特定而言,表位分组包含利用竞争分析与计算方法的组合来区分不同抗体的表位识别特性的方法及系统,以便基于其表位识别特性而将抗体聚类且鉴别具有不同结合特异性的抗体。本文中描述了关于表位分组及测定抗体的表位结合的方法的其他细节,如实施例5所示。

[0286] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”、“免疫特异性结合”、“选择性地结合”、“免疫特异性识别”及“免疫特异性”在抗体的上下文中为类似术语且是指结合至抗原(例如表位)的分子,如所属领域技术人员所了解。

[0287] 在一些实施方案中,“特异性结合”意指例如多肽或分子与表位、蛋白质或目标分子的相互作用比替代物质(包括相关及不相关蛋白质)更频繁、更快速、持续时间更长、亲和力更大或上述一些组合。例如,特异性结合至抗原的分子通常可以较低亲和力结合至其他肽或多肽,如通过例如免疫分析、BIACORE™、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments,Boise,ID)、OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)或本领域中已知的其他分析所测定。在一些实施方案中,抗体或抗原结合结构域当结合至一种抗原的亲和力高于任何交叉反应性抗原时,其结合至或特异性结合至所述抗原,如使用诸如放射免疫分析(RIA)和酶联免疫吸附分析(ELISA)的实验技术所测定。典型地,特异性或选择性反应为背景信号或噪声的至少两倍且可超过背景的十倍。关于结合特异性的论述,参见例如Fundamental Immunology 332-36(Paul编,第2版,1989)。在一些实施方案中,一种抗体或抗原结合区对“非目标”蛋白质的结合程度为所述抗体或抗原结合区对其目标抗原的结合的小于约10%,例如通过荧光活化细胞分选(FACS)分析或RIA所测定。在一些实施方案中,特异性结合至一种抗原的分子结合至所述抗原的KA为至少2log、2.5log、3log、4log或大于所述分子结合至另一种抗原时的KA。在一些实施方案中,特异性结合至抗原的分子与其他蛋白质不发生交叉反应。在另一特定实施方案中,特异性结合至抗原的分子与非5T4蛋白质不发生交叉反应。在一些实施方案中,“特异性结合”意指例如多肽或分子以约0.1mM或更小、但更通常小于约1 μM的$K_D$结合蛋白质或目标。在一些实施方案中,“特异性结合”意指多肽或分子以至少约0.1μM或更小、至少约0.01 μM或更小、或至少约1 nM或更小的$K_D$结合目标。由于不同物种的同源蛋白质之间存在序列一致性,因此特异性结合可包括多肽或分子识别超过一种物种的蛋白质或目标。同样,由于不同蛋白质的多肽序列的某些区域内的同源性,因此特异性结合可包括多肽或分子识别超过一种蛋白质或目标。应了解,在一些实施方案中,特异性结合第一目标的抗体或分子可或可不特异性结合第二目标。因此,“特异性结合”不一定需要(尽管其可包括)排他性结合,例如结合至单一目标。因此,在一些实施方案中,多肽或分子可特异性结合超过一种目标。在一些实施方案中,多个目标可被多肽或分子上的同一抗原结合位结合。例如,在一些实施方案中,抗体可包含两个相同抗原结合位,其各自特异性结

合两种或更多种蛋白质上的相同表位。在替代实施方案中,抗体可为双特异性的且包含至少两个具有不同特异性的抗原结合位。一般而言,但不非必定,提及“结合”意指“特异性结合”。

[0288] 术语“结合亲和力”一般是指分子(例如抗体)的单一结合位与其结合搭配物(例如抗原,诸如5T4)之间非共价相互作用力的总和。除非另外指明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对(例如抗体与抗原)成员之间1:1相互作用的固有结合亲和力。结合分子X对其结合搭配物Y的亲和力通常可由解离常数($K_D$)表示。可通过本领域中已知的常见方法(包括本文所述的方法)测量亲和力。低亲和力抗体一般缓慢结合抗原且倾向于容易解离,而高亲和力抗体一般较快结合抗原且倾向于较长时间保持结合状态。本领域中已知多种测量结合亲和力的方法,其中任一者可用于本公开的目的。在一个实施方案中,“$K_D$”或“$K_D$值”可通过生物层干涉术(BLI)、使用例如OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)测量。或者,也可在放射性标记的抗原结合分析(RIA)中测量$K_D$,例如使用所关注的抗体的Fab版及其抗原所执行(Chen等人,(1999)J.Mol Biol 293:865-881)或使用表面等离激元共振(SPR)分析、通过BIACORE™所执行,例如使用BIACORE™-2000或BIACORE™-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ)。“缔合速率(on-rate)”或“缔合速率(rate of association)”或“缔合速率(association rate)”或“$k_{on}$”以及“解离速率(offrate)”或“解离速率(rate of dissociation)”或“解离速率(dissociation rate)”或“$k_{off}$”也可使用本文所述的相同SPR或BLI技术、分别使用例如OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)或BIACORE™-2000或BIACORE™-3000(BIACORE™,Inc.,Piscataway,NJ)测定。

[0289] 术语“竞争”当在5T4抗体的上下文中使用时,描述一种结合剂在另一种结合剂存在下,由于另一种结合剂的结合而至少部分地被抑制结合至表位或结合位。可通过分析来测定竞争,其中所研究的结合剂阻止或抑制参考分子(例如参考配体,或参考抗原结合蛋白,诸如参考抗体)特异性结合至共用抗原(例如5T4)。可以利用多种类型的竞争结合分析来确定测试抗体是否与参考分子竞争结合至5T4(例如人5T4)。可使用的分析实例包括固相直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见例如Stahli等人(1983),Methods in Enzymology 9:242-253);直接固相生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如Kirkland等人(1986),J.Immunol.137:3614-3619或Cheung等人(1990)Virology 176:546-552);固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见例如Harlow和Lane,(1988),Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见例如Morel等人(1988),Molec.ImmunOl.25:7-1 5);以及直接标记RIA (Moldenhauer等人,(1990)Scand.J.Immunol.32:77-82)。通常,此类分析涉及使用与固体表面或细胞结合的纯化抗原(例如5T4,诸如人5T4),所述固体表面或细胞携有未标记的测试抗原结合蛋白(例如测试5T4抗体或ADC)或经标记的参考抗原结合蛋白(例如参考5T4抗体或ADC)。可通过在测试免疫球蛋白存在下测定与固体表面或细胞结合的标记的量来测量竞争性抑制。测试抗原结合蛋白通常过量存在。通过竞争分析(竞争抗体)鉴别的抗体包括与参考抗体结合至相同表位的抗体,和/或结合至邻近表位的抗体,所述邻近表位充分靠近参考抗体所结合的表位以致抗体出现空间位阻(例如相似表位或重叠表位)。通常,当竞争抗体过量存在时,其将参考抗体对共用抗原的特异性结合抑制至少20%,例如至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些实施方

案中,结合被抑制至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更大。

[0290] 术语“恒定区”及“恒定结构域”在本文中可互换使用,为本领域中熟知的抗体术语,并且是指抗体部分,例如不直接参与抗体结合至抗原、但可展现各种效应功能(诸如与Fc受体相互作用)的轻链和/或重链的羧基端部分。所述术语包括免疫球蛋白分子的一部分,相对于免疫球蛋白可变区,所述部分具有通常更保守的氨基酸序列。

[0291] 抗体“效应功能”是指可归因于抗体的Fc区(例如原生序列Fc区或氨基酸序列变异型Fc区)并因抗体同型而异的那些生物活性。抗体效应功能的实例包括:C1q结合及补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;以及B细胞活化。

[0292] 在本文中,术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C端区域,包括例如原生序列Fc区、重组型Fc区及变异型Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可变化,但人IgG重链Fc区通常定义成自位置Cys226(EU编号系统)或Pro230(EU编号系统)的氨基酸残基延伸至其羧基端。可去除Fc区的C端赖氨酸(EU编号系统的残基447),例如在抗体的制备或纯化期间,或通过以重组方式工程化编码抗体重链的核酸。下文提供例示性Fc区序列(CH2结构域=粗体文字;CH3结构域=加下划线的文字):

[0293] CPPCP**APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAK**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:67)。

[0294] “功能Fc区”具有原生序列Fc区的“效应功能”。例示性“效应功能”包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调及其类似者。此类效应功能通常需要将Fc区与结合区或结合结构域(例如抗体可变区或结构域)组合且可以使用所公开的各种分析加以评估。

[0295] “原生序列Fc区”包含与自然界中所发现的Fc区的氨基酸序列一致且未被人操纵、修饰和/或改变(例如分离、纯化、选择,包括或与其他序列(诸如可变区序列)组合)的氨基酸序列。原生序列人Fc区包括原生序列人IgG1 Fc区(非A及A异型);原生序列人IgG2 Fc区;原生序列人IgG3 Fc区;以及原生序列人IgG4 Fc区;以及天然存在的其变体。

[0296] “变异型Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰(例如取代、添加或缺失,优选为一个或多个氨基酸取代)而与原生序列Fc区的氨基酸序列不同的氨基酸序列。在一些实施方案中,相较于原生序列Fc区或相较于亲本多肽的Fc区,变异型Fc区在原生序列Fc区中或亲本多肽的Fc区中具有至少一个氨基酸取代,例如约一至约十个氨基酸取代,并且优选约一至约五个氨基酸取代。本文所述的变异型Fc区与原生序列Fc区和/或亲本多肽Fc区可具有至少约80%同源性,或与其具有至少约90%同源性,例如与其具有至少约95%同源性。本文中所述的变异型Fc区在本文中可具有效应丧失功能(例如沉默Fc)。下文提供例示性变异型Fc区(“沉默Fc”)序列(CH2结构域=粗体文字,其中氨基酸变化加下划线;CH3结构域=加下划线的文字):

[0297] CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALK APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO:68)。

[0298] 术语“重链”当结合抗体使用时,是指约50至70kDa的多肽链,其中氨基端部分包括约120至130个或更多个氨基酸的可变区,并且羧基端部分包括一个或多个恒定区。基于恒定区的氨基酸序列,术语“重链”可指任何不同类型,例如alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ε)、gamma(γ)和mu(μ),其分别产生IgA、IgD、IgE、IgG及IgM类别的抗体,包括IgG子类,例如IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。

[0299] 如本文所用,术语“轻链”当结合抗体使用时,可指约25kDa的多肽链,其中氨基端部分包括约100至约110或更多个氨基酸的可变区,并且羧基端部分包括恒定区。轻链的大致长度为211至217个氨基酸。基于恒定区的氨基酸序列,存在两种不同类型,称为kappa(K)或lambda(λ)。轻链氨基酸序列在本领域中已熟知。

[0300] 术语“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗原结合区”及类似术语是指抗体的一部分,所述部分包含与抗原相互作用的氨基酸残基,所述氨基酸残基将其针对抗原的特异性及亲和力赋予结合片段或区域(例如CDR)。如本文所用,“抗原结合片段”包括“抗体片段”,其包含抗体的一部分,所述部分包括一个或多个CDR,诸如抗体的抗原结合区或可变区。

[0301] 本文所述的抗体包括(但不限于)合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(例如包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、胞内抗体、单链Fv(scFv)(例如包括单特异性、双特异性及其类似者)、骆驼化抗体、Fab片段、F(ab′)片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体及上述任一者的表位结合片段。

[0302] 在一些实施方案中,本文所述的抗体包括免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子的免疫活性部分,诸如含有一个或多个结合至5T4的抗原结合位的分子。

[0303] 如本文所述的5T4抗体可为任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2)或任何亚类(例如IgG2a或IgG2b)的免疫球蛋白分子。在一些实施方案中,如本文所述的5T4抗体为IgG抗体(例如人IgG)或类别(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)或其亚类。

[0304] 在一些实施方案中,5T4抗体为包含两个重(H)链/轻(L)链对的4链抗体单元,其中H链的氨基酸序列一致且L链的氨基酸序列一致。在一些实施方案中,H和/或L链包含恒定区,例如人恒定区。在一些实施方案中,5T4抗体的L链恒定区为K或λ轻链恒定区,例如人K或λ轻链恒定区。在一些实施方案中,5T4抗体的H链恒定区包含γ重链恒定区,例如人γ重链恒定区。在一些实施方案中,5T4抗体包含IgG恒定区,例如人IgG恒定区(例如IgG1、IgG2、IgG3和/或IgG4恒定区)。

[0305] 如本文所用,“5T4抗体”及“结合至5T4的抗体”可互换使用且是指优先结合至5T4的抗体。抗体或其片段可优先结合至5T4,诸如人5T4,此意指所述抗体或其片段以比其结合至不相关对照蛋白质更大的亲和力结合至5T4,诸如人5T4。例如,所述抗体或其片段可特异性识别且结合至5T4或其一部分。“特异性结合”意指5T4抗体或其片段结合至5T4的亲和力比结合至不相关对照蛋白质(例如母鸡卵清溶菌酶)的亲和力大至少5、10、15、20、25、50、

100、250、500、1000或10,000倍。在一些实施方案中,5T4抗体或其片段可排他性地实质性结合5T4(例如能够将5T4与其他已知多肽区分开来,例如根据结合亲和力的可测量差异)。在一些实施方案中,5T4抗体可与除人5T4序列之外的5T4序列(例如食蟹猴5T4序列)反应。

[0306] 术语“可变区”与“可变结构域”可互换使用且是指抗体的轻链或重链的一部分,所述部分通常位于轻链或重链的氨基端,在重链中具有约120至130个氨基酸的长度,在轻链中具有约100至110个氨基酸的长度,并且用于各种抗体对其抗原的结合及特异性。重链可变区在本文中称为“VH”。轻链可变区在本文中称为“VL”。术语“可变”是指可变区的某些区段的序列在抗体间广泛不同的事实。V区介导抗原结合且限定特定抗体对其抗原的特异性。然而,可变性不均匀分布于可变区的110个氨基酸跨度内。实际上,V区由约15至30个氨基酸的较小可变性(例如相对无变化)链段(称为框架区(FR))组成,所述链段被较大可变性(例如极其可变性)的较短区域(称为“高变区”或替代地称为“互补决定区”)分隔。重链及轻链的可变区各自包含基本上采用β片构型的四个框架(FR1、FR2、FR3及FR4),所述框架通过三个高变区连接,从而形成连接β片结构的环且在一些情况下形成β片结构的一部分。各链中的高变区通过框架紧密接近结合在一起,并且与来自另一链的高变区一起促成抗体的抗原结合位形成(参见例如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest第5版,公共卫生处(Public Health Service),国立卫生研究院(National Institutes of Health),Bethesda,MD,(1991))。恒定区不直接涉及抗体对抗原的结合,而是展现多种效应功能,诸如使抗体参与抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。可变区的序列在不同抗体之间广泛不同。序列中的可变性集中于CDR中,而可变区中较小可变的部分称为框架区(FR)。轻链及重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用。在特定实施方案中,可变区为人可变区。

[0307] 术语“高变区”、“HVR”、“HV”、“互补决定区”及“CDR”当在本文中使用时,是指抗体可变区中的区域,所述区域在序列上高变且/或形成结构上限定的环。一般而言,抗体包含六个高变区:三个高变区位于VH中(H1或VH CDR1、H2或VH CDR2,及H3或VH CDR3),并且三个高变区位于VL中(L1或VL CDR1、L2或VL CDR2,和L3或VL CDR3)。本文中使用且涵盖若干个高变区定界。Kabat CDR是基于序列可变性且最常用(参见例如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest第5版,公共卫生处(Public Health Service),美国国家卫生研究院(National Institutes of Health),Bethesda,MD.(1991))。Chothia实际上提及结构环的位置(参见例如Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。使用Kabat编号规约进行编号时,Chothia CDR-H1环末端在H32与H34之间变化,此取决于环的长度(此原因为Kabat编号方案将插入置于H35A及H35B;若既不存在35A、也不存在35B,则环末端位于32;若仅存在35A,则环末端位于33;若35A与35B均存在,则环末端位于34)。AbM高变区表示Kabat CDR与Chothia结构环之间的平衡,并且被Oxford Molecular的AbM抗体模型化软件利用(参见例如Martin,于Antibody Engineering,第2卷第3章,Springer Verlag)。“contact”高变区是基于可利用的复杂晶体结构的分析。来自这些高变区或CDR中的每一者的残基标示于下文中。

[0308] v开发及广泛采用一种通用编号系统:ImMunoGene Tics(IMGT®)信息系统(Lafranc等人,Dev.Comp.Immunol.27(1):55-77(2003))。IMGT®为专用于人及其他脊椎动物的免疫球蛋白(IG)、T细胞受体(TR)和主要组织相容性复合体(MHC)的整合式信息系统。

本文中,依据氨基酸序列与轻链或重链内的位置提及CDR。由于免疫球蛋白可变区结构内的CDR的“位置”在各物种之间为保守的且存在于称为环的结构中,因此通过使用比对结构特征的可变区序列的编号系统容易鉴别出CDR及框架残基。此信息可用于将来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基移植及替换至典型地来自人抗体的受体框架中。Honegger及Plückthun,J.Mol.Biol.309:657-670(2001)已开发出另一种编号系统(AHon)。编号系统(包括例如Kabat编号及IMGT®独特编号系统)之间的一致性已为所属领域技术人员熟知(参见例如Kabat,同上;Chothia和Lesk,同上;Martin,同上;Lefranc等人,同上)并且也说明于下文。本领域中已知或本文所述的各种系统代表定界CDR的不同方法,并且当其用于界定相同抗体时,其通常被视为等效的。本文所示的例示性系统是将Kabat与Chothia组合。

[0309]

| | 例示性 | IMGT® | Kabat | AbM | Chothia | Contact |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $V_H$ CDR1 | 26-35 | 27-38 | 31-35 | 26-35 | 26-32 | 30-35 |
| $V_H$ CDR2 | 50-65 | 56-65 | 50-65 | 50-58 | 53-55 | 47-58 |
| $V_H$ CDR3 | 95-102 | 105-117 | 95-102 | 95-102 | 96-101 | 93-101 |
| $V_L$ CDR1 | 24-34 | 27-38 | 24-34 | 24-34 | 26-32 | 30-36 |
| $V_L$ CDR2 | 50-56 | 56-65 | 50-56 | 50-56 | 50-52 | 46-55 |
| $V_L$ CDR3 | 89-97 | 105-117 | 89-97 | 89-97 | 91-96 | 89-96 |

[0310] 高变区可以包含如下“延长的高变区”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3),以及VH中的26-35或26-35A(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。如本文所用,术语“高变区”、“HVR”、“HV”、“互补决定区”或“CDR”可互换使用。

[0311] 术语“载体”是指用于携载或包括例如核酸序列以将核酸序列引入宿主细胞中的物质。载体实例包括表达载体、质粒、噬菌体载体、病毒载体、游离体(episome)及人工染色体,其可包括可操作以稳定整合至宿主细胞染色体中的选择序列或标记物。另外,载体可包括一个或多个可选标记物基因及适当的表达控制序列。可包括在内的可选标记物基因例如提供针对抗生素或毒素、补体营养缺陷型缺乏的抗性,或供应培养基中不存在的关键营养。表达控制序列可包括本领域中熟知的组成型及诱导型启动子、转录增强子、转录终止子及其类似物。当两种或更多种核酸分子共表达(例如抗体重链与轻链或抗体VH与VL区)时,可将两种核酸分子例如插入单一表达载体或单独表达载体中。对于单一载体表达而言,编码核酸可操作地连接至一个共用表达控制序列,或连接至不同表达控制序列,诸如一个诱导型启动子及一个组成型启动子。可使用本领域中熟知的方法证实核酸分子引入宿主细胞中。此类方法包括例如核酸分析,诸如北方印迹法或聚合酶链反应(PCR)扩增mRNA;或基因产物表达的免疫印迹法,或测试所引入的核酸序列或其对应基因产物的表达的其他适合分析方法。所属领域技术人员应了解,核酸分子的表达量足以产生所需产物(例如5T4抗体),并且进一步了解,可以使用本领域中熟知的方法优化表达量以达成足够的表达。

[0312] 术语“5T4介导的疾病”、“5T4介导的病症”及“5T4介导的疾患”可互换使用且是指与表达5T4的细胞(诸如表达5T4的肿瘤细胞)相关或以其为特征的任何疾病、病症或疾患。5T4介导的疾病包括癌症,包括(但不限于)表达或过表达5T4的癌症。

[0313] 在本文的任何实施方案中,术语“肿瘤”是指任何赘生性细胞生长或增殖(不论恶

性或良性),及所有癌前及癌细胞及组织。

[0314] 术语“癌症”及“癌性”是指或描述哺乳动物中典型地以细胞生长调节异常为特征的生理学疾患。

[0315] 术语“ADC”是指抗体-药物缀合物,在本发明的上下文中,其是指5T4抗体与另一部分(包括如本文所述的药物)的偶合。

[0316] 如本文所用,“药物”是指具有生物活性的化合物,诸如细胞毒性化合物(例如细胞毒性小分子、细胞毒性合成肽及其类似物)。

[0317] 药物的实例包括小分子药物,诸如癌症化学治疗剂。例如,在多肽为对肿瘤细胞具有特异性的抗体(或其片段)的情况下,抗体可如本文所述经修饰以包括经修饰的氨基酸,随后可使其与癌症化学治疗剂缀合。癌症化学治疗剂包括减少癌细胞增殖的非肽(即,非蛋白质)化合物,并且涵盖细胞毒性剂及细胞生长抑制剂。化学治疗剂的非限制性实例包括烷基化剂、亚硝基脲、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、植物(长春花)生物碱及类固醇激素。也可使用肽化合物。

[0318] 适合的癌症化学治疗剂包括海兔毒素(dolastatin)和其活性类似物及衍生物;以和奥瑞他汀(auristatin)和其活性类似物及衍生物(例如单甲基奥瑞他汀D(MMAD)、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF)和其类似物)。参见例如WO 96/33212、WO 96/14856和U.S.6,323,315。例如,海兔毒素10或奥瑞他汀PE可包括于本公开的5T4-ADC中。适合的癌症化学治疗剂还包括类美登素及其活性类似物及衍生物(参见例如EP 1391213;和Liu等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623);倍癌霉素(duocarmycins)和其活性类似物及衍生物(例如包括合成类似物KW-2189和CB 1-TM1);以及苯二氮䓬及其活性类似物及衍生物(例如吡咯并苯二氮䓬(PBD))。

[0319] 用于减少细胞增殖的药剂是本领域中已知的且被广泛使用。此类药剂包括烷基化剂,诸如氮芥(nitrogen mustards)、亚硝基脲、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐及三氮烯,包括(但不限于)二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)(CYNOTAN™)、美法仑(melphalan)(L-溶肉瘤素(L-sarcolysin))、卡莫司汀(carmustine)(BCNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、司莫司汀(semustine)(甲基-CCNU)、链脲菌素(streptozocin)、氯脲菌素(chlorozotocin)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、双氯乙基甲胺(chlormethine)、异环磷酰胺(而sfamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、哌泊溴烷(pipobroman)、三亚乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三亚乙基硫代磷胺(triethylenethiophosphoramine)、白消安(busulfan)、达卡巴嗪(dacarbazine)和替莫唑胺(temozolomide)。

[0320] 抗代谢物药剂包括叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物及腺苷脱氨酶抑制剂,包括(但不限于)阿糖胞苷(cytarabine)(CYTOSAR-U®)、胞嘧啶阿拉伯糖苷、氟尿嘧啶(fluorouracil)(5-FU)、氟尿苷(floxuridine)(FudR)、6-硫鸟嘌呤、6-巯基嘌呤(6-MP)、喷司他汀(pentostatin)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲氨蝶呤、10-炔丙基-5,8-二脱氮叶酸酯(PDDF、CB3717)、5,8-二脱氮四氢叶酸(DDATHF)、甲酰四氢叶酸、氟达拉滨磷酸盐(fludarabine phosphate)、喷司他汀(pentostatin)和吉西他滨(gemcitabine)。

[0321] 适合的天然产物及其衍生物(例如长春花生物碱、抗肿瘤抗生素、酶、淋巴因子及表鬼臼毒素(epipodophyllotoxins))包括(但不限于)Ara-C、紫杉醇(paclitaxel)(TAXOL®)、多西他赛(docetaxel)(TAXOTERE®)、脱氧助间型霉素(deoxycoformycin)、丝

裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤(azathioprine);布喹那(brequinar);生物碱,例如长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、长春瑞滨(vinorelbine)、长春地辛(vindesine)和其类似物;鬼臼毒素(podophyllotoxins),例如依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)和其类似物;抗生素,例如蒽环霉素(anthracycline)、盐酸道诺霉素(daunorubicin hydroehloride)(柔红霉素(daunomycin)、红比霉素(rubidomycin)、色鲁比定(cerubidine))、艾达霉素(idarubicin)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)和吗啉基衍生物及其类似物;酚噁腙双环肽(phenoxizone biscyclopeptides),例如更生霉素(dactinomycin);碱性糖肽,例如博莱霉素(basic glycopeptides);蒽醌糖苷,例如普卡霉素(plicamycin)(光神霉素(mithramycin));蒽二酮,例如米托蒽醌(mitoxantrone);氮杂环丙烯并吡咯并吲哚二酮,例如丝裂霉素(mitomycin);大环免疫抑制剂,例如环孢灵(cyclosporine)、FK-506(他克莫司(taerolimus)、普咯格(prograf))、雷帕霉素(rapamycin)和其类似物;以及其类似物。

[0322] 其他抗增殖细胞毒性剂包括诺维本(navelbene)、CPT-11、阿那曲唑(anastrazole)、来曲唑(letrazole)、卡培他滨(capecitabine)、瑞洛萨芬(reloxafine)、环磷酰胺、异环磷酰胺(ifosamide)和屈洛昔芬(droloxafine)。

[0323] 具有抗增殖活性的影响微管的药剂也适用且包括(但不限于)别秋水仙碱(allocolchicine)(NSC 406042)、软海绵素B(NSC 609395)、秋水仙碱(NSC 757)、秋水仙碱衍生物(例如NSC 33410)、海兔毒素10(NSC 376128)、美登素(NSC 153858)、根瘤菌素(NSC 332598)、紫杉醇(TAXOL®)、TAXOL®衍生物、多西他赛(TAXOTERE®)、硫代秋水仙碱(NSC 361792)、三苯甲基半胱氨酸、硫酸长春碱、长春新碱硫酸盐、天然及合成埃博霉素(epothilones)(包括但不限于埃博霉素A、埃坡霉素B)、圆皮海绵内酯(discodermolide);雌氮芥(estramustine)、诺考达唑(nocodazole),及其类似物。

[0324] 适合使用的激素调节剂及类固醇(包括合成类似物)包括(但不限于)肾上腺皮质类固醇,例如强的松(prednisone)、地塞米松(dexamethasone)和其类似物;雌激素及孕激素,例如羟孕酮巳酯(hydroxyprogesterone caproate)、乙酸甲羟孕酮(medroxyprogesteroneacetate)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、雌二醇(estradiol)、氯米芬(clomiphene)、他莫昔芬(tamoxifen)和其类似物;肾上腺皮质抑制剂,例如氨鲁米特(aminoglutethimide);17α-炔雌醇;己烯雌酚(diethylstilbestrol)、睾固酮(testosterone)、氟羟甲基睾酮(fluoxymesterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、睾内酯(testolactone)、甲基强的松龙(methylprednisolone)、甲基睾固酮、强的松龙(prednisolone)、曲安西龙(triamcinolone)、氯烯雌醚(chlorotrianisene)、羟基孕酮(hydroxyprogesterone)、氨鲁米特(aminoglutethimide)、雌氮芥、乙酸甲羟孕酮、亮丙立德(leuprolide)、氟他胺(flutamide)(DROGENIL®)、托瑞米芬(toremifene)(FARESTON®)和戈舍瑞林(goserelin)(ZOLADEX®)和其类似物。雌激素刺激增殖及分化;因此,结合至雌激素受体的化合物用于阻断此活性。皮质类固醇可抑制T细胞增殖。

[0325] 其他适合的化学治疗剂包括金属络合物,例如顺铂(cisplatin)(cis-DDP)、卡铂(carboplatin)和其类似物;脲,例如羟脲;肼,例如N-甲基肼;表叶毒素(epidophyllotoxin);拓朴异构酶抑制剂;丙卡巴肼(procarbazine);米托蒽醌(mitoxantrone);甲酰四氢叶酸;替加氟(tegafur)和其类似物。所关注的其他抗增殖剂包括免疫抑制剂,例如霉酚酸

(mycophenolic acid)、沙立度胺(thalidomide)、脱氧精胍素(desoxyspergualin)、氮杂孢菌素(azasporine)、来氟米特(leflunomide)、咪唑立宾(mizoribine)、氮杂螺烷(azaspirane)(SKF 105685);吉非替尼(gefitinib)(IRESSA®、ZD1839、4-(3-氯-4-氟苯氨基)-7-甲氧基-6-(3-(4-吗啉基)丙氧基)喹唑啉);以及其类似物。

[0326] 紫杉烷适合使用。"紫杉烷"包括紫杉醇,以及任何活性紫杉烷衍生物或前药。"紫杉醇"(在本文中应理解为包括类似物、制剂及衍生物,诸如多西他赛、TAXOL®、TAXOTERE®(多西他赛制剂)、紫杉醇的10-脱乙酰基类似物及紫杉醇的3′N-脱苯甲酰基-3′N-叔丁氧基羰基类似物)可容易使用所属领域技术人员已知的技术制备(也参见WO94/07882、WO 94/0788 1、WO 94/07880、WO 94/07876、WO 93/23555、WO93/10076;美国专利第5,294,637号;第5,283,253号;第5,279,949号;第5,274,137号;第5,202,448号;第5,200,534号;第5,229,529号;以及EP 590,267),或获自多种商业来源,包括例如Sigma Chemical Co.,St.Louis,Mo.(来自短叶红豆杉(Taxus brevifolia)的T7402;或来自云南红豆杉(Taxus.yannanensis)的T-1912)。应理解,紫杉醇不仅指化学上可获得的常见形式的紫杉醇,而且指类似物及衍生物(例如本文所指出的TAXOTERE®多西他赛)和紫杉醇缀合物(例如紫杉醇-PEG、紫杉醇-葡聚糖,或紫杉醇-木糖)。

[0327] 术语"紫杉烷"还包括多种已知衍生物,包括亲水性衍生物与疏水性衍生物。紫杉烷衍生物包括(但不限于)国际专利申请第WO 99/18113号中所述的半乳糖及甘露糖衍生物;WO 99/14209中所述的哌嗪基和其他衍生物;WO 99/09021、WO 98/22451及美国专利第5,869,680号中所述的紫杉烷衍生物;WO 98/28288所述中的6-硫基衍生物;美国专利第5,821,263号中所述的亚磺酰胺衍生物;以及美国专利第5,415,869号中所述的紫杉醇衍生物。其进一步包括紫杉醇的前药,包括(但不限于)WO 98/58927;WO 98/13059;以及美国专利第5,824,701号中所述的那些。

[0328] 适合使用的生物反应调节剂包括(但不限于)(1)酪氨酸激酶(RTK)活性抑制剂;(2)丝氨酸/苏氨酸激酶活性抑制剂;(3)肿瘤相关抗原拮抗剂,诸如特异性结合至肿瘤抗原的抗体;(4)细胞凋亡受体激动剂;(5)白细胞介素-2;(6)IFN-α;(7)IFN-γ;(8)集落刺激因子;以及(9)血管生成抑制剂。

[0329] "有效量"通常为足以达成以下效果的量:降低症状的严重度和/或频率、消除症状和/或潜在病因、防止症状和/或其潜在病因出现和/或改善或修复疾病、病症或疾患所致或与疾病、病症或疾患相关的损伤。在一些实施方案中,有效量为治疗有效量。

[0330] 如本文所用,术语"治疗有效量"是指本文所述的抗体或ADC足以降低和/或改善所指定疾病、病症或疾患和/或与其相关的症状的严重度和/或持续时间的量。药剂(包括治疗剂)的治疗有效量可为达成以下而必需的量:(i)降低或改善所指定疾病、病症或疾患的进展或进程,(ii)降低或改善所指定疾病、病症或疾患的复发、发展或发作和/或(iii)改善或增强另一种疗法(例如除本文所述的抗体或ADC的施用以外的疗法)的治疗作用。本公开的物质/分子/药剂(例如5T4抗体或ADC)的"治疗有效量"可基于多种因素而改变,诸如个体的疾病状态、年龄、性别及体重,以及所述物质/分子/药剂诱导个体的所需反应的能力。治疗有效量涵盖其中所述物质/分子/药剂的治疗有益作用超过任何毒性或有害作用的量。在一些实施方案中,术语"治疗有效量"是指抗体或其他药剂(例如或药物)有效地"治疗"受试者或哺乳动物的疾病、病症或疾患的量。

[0331] 在一些实施方案中,药物为具有抗增殖活性的影响微管的药剂,诸如类美登素。在一些实施方案中,药物为抗有丝分裂剂,诸如奥瑞他汀或其活性奥瑞他汀类似物或衍生物。在一些实施方案中,药物为DNA烷基化剂。

[0332] 如本文所用,术语“药学上可接受”意指经联邦或州政府的管制机构批准或列于美国药典(U.S.Pharmacopia)、欧洲药典(European Pharmacopeia)或其他公认药典中用于动物,更具体而言,用于人。

[0333] “赋形剂”包括载剂、赋形剂、防腐剂或稳定剂,其在所用剂量及浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒且可为了例如达成稳定性、增积配制或赋予最终剂型中的活性成分的治疗性增强(例如促进吸收、减小粘度、增强溶解性)而包括在内。“赋形剂”可为天然或合成的有机或无机成分,活性成分与其合并以促进活性成分的利用,例如活性成分施用给受试者。赋形剂实例包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约十个氨基酸残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;以及/或非离子型表面活性剂,诸如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™。术语“赋形剂”还可指与治疗剂一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(Freund's adjuvant)(完全或不完全))、赋形剂或媒介物。此类赋形剂可为无菌液体,诸如水及油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油及其类似物。静脉内施用组合物(例如药物组合物)时,水为例示性赋形剂。也可使用生理盐水溶液及右旋糖水溶液及甘油溶液作为液体赋形剂,尤其用于可注射溶液。适合的赋形剂(例如药物赋形剂)包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂牛乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇及其类似物。在任何实施方案中,组合物也可含有少量湿润剂或乳化剂,或pH缓冲剂。组合物可呈溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、散剂、持续释放制剂及其类似形式。口服组合物(诸如制剂)可包括标准赋形剂,诸如药物级甘露糖醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁及其类似物。适合赋形剂的实例描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy(2020)(Elsevier Science,Amsterdam,Netherlands),包括药物化合物,可含有有效量或治疗有效量的5T4-ADC,例如分离或纯化形式,以及适量的赋形剂以提供正确施用给受试者的形式。制剂应适于施用模式。

[0334] 5T4抗体

[0335] 本文所述的5T4-ADC包含药物及与其缀合的5T4抗体。在一些实施方案中,5T4抗体是指一种抗体,其特异性结合至5T4,诸如5T4蛋白、5T4多肽、5T4多肽片段、5T4肽或5T4表位。在一些实施方案中,5T4抗体为结合至5T4的人或人源化抗体(例如包含人恒定区)。在一些实施方案中,5T4抗体可结合至哺乳动物(例如人)细胞(包括表达5T4的肿瘤细胞)的表面上所表达的5T4。在一些实施方案中,5T4抗体结合细胞(诸如肿瘤细胞)上所表达的5T4胞外表位(例如胞外5T4表位)。在一些实施方案中,5T4为人5T4。人5T4的例示性氨基酸序列描述于本文中。

[0336] 在一些实施方案中,5T4抗体与参考5T4抗体竞争结合至5T4,所述参考抗体包含本文所述的任一种抗体的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2以及/或

VL CDR3,诸如表1至3中的任一者中所述的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,5T4抗体与参考5T4抗体竞争结合至5T4,所述参考抗体包含来自以下抗体的一个、二个和/或三个VH CDR和/或一个、二个和/或三个VL CDR:(a)命名为mAbA4的抗体;或(b)命名为mAbA15的抗体;或(c)命名为mAbA17的抗体。在一些实施方案中,5T4-ADC包含药物(直接地或间接地)缀合至5T4抗体,所述抗体与包含来自以下抗体的一个、二个和/或三个VH CDR及一个、二个和/或三个VL CDR的参考5T4抗体竞争结合至5T4:(a)命名为mAbA4的抗体;或(b)命名为mAbA15的抗体;或(c)命名为mAbA17的抗体。在一些实施方案中,5T4抗体与包含来自以下抗体的VH区和VL区的参考5T4抗体竞争结合至5T4:(a)命名为mAbA4的抗体;或(b)命名为mAbA15的抗体;或(c)命名为mAbA17的抗体。在一些实施方案中,5T4抗体与参考5T4抗体竞争结合至5T4,所述参考抗体包含:(a)包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH区及包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL区;或(b)包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的VH区及包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的VL区;或(c)包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的VH区及包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的VL区。

[0337] 在一些实施方案中,5T4抗体包含本文所述的任一种抗体的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3,诸如表1至3中的任一者中所述的VH区、VL区、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3的氨基酸序列。因此,在一些实施方案中,5T4抗体包含来自以下抗体的一个、二个和/或三个重链CDR和/或一个、二个和/或三个轻链CDR:(a)命名为mAbA4的抗体;或(b)命名为mAbA15的抗体;或(c)命名为mAbA17的抗体。在一些实施方案中,5T4抗体包含来自以下抗体的一个、二个和/或三个重链CDR及一个、二个和/或三个轻链CDR;(a)命名为mAbA4的抗体;或(b)命名为mAbA15的抗体;或(c)命名为mAbA17的抗体。

[0338] 在一些实施方案中,5T4抗体包含VH区,所述VH区包含如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3中的一者或多者(诸如一者、二者或三者);以及/或VL区,所述VL区包含如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3中的一者或多者(诸如一者、二者或三者)。在一些实施方案中,5T4抗体具双特异性且包含第一结合区,所述第一结合区包含如表1至3中的任一者中所述的一个、二个和/或三个重链CDR和/或一个、二个和/或三个轻链CDR;以及第二区,所述第二区包含结合剂的一个、二个和/或三个重链CDR和/或一个、二个和/或三个轻链CDR,所述结合剂结合至并非5T4的第二目标抗原。在一些实施方案中,5T4抗体具双特异性且包含第一结合结构域,所述第一结合结构域包含如表1至3中的任一者中所述的一个、二个和/或三个重链CDR和/或一个、二个和/或三个轻链CDR;以及第二结合结构域,所述第二结合结构域包含来自结合剂的一个、二个和/或三个重链CDR和/或一个、二个和/或三个轻链CDR,所述结合剂结合至第二5T4表位。

[0339] 命名为mAbA4的抗体包含SEQ ID NO:25的VH氨基酸序列及SEQ ID NO:26的VL氨基酸序列。

[0340] 命名为mAbA15的抗体包含SEQ ID NO:44的VH氨基酸序列及SEQ ID NO:45的VL氨基酸序列。

[0341] 命名为mAbA17的抗体包含SEQ ID NO:62的VH氨基酸序列及SEQ ID NO:63的VL氨基酸序列。

[0342]

表 1：抗体 mAbA4

| | | 例示性 | IMGT® | Kabat | Chothia | Contact | AbM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VH CDR Seq. | VH CDR1 | GFTFSRYYIH (SEQ ID NO:1) | GFTFSRYY (SEQ ID NO:7) | RYYIH (SEQ ID NO:12) | GFTFSRY (SEQ ID NO:13) | SRYYIH (SEQ ID NO:18) | GFTFSRYYIH (SEQ ID NO:1) |
| | VH CDR2 | FISPGGSYTYYA DSVKG (SEQ ID NO:2) | ISPGGSYT (SEQ ID NO:8) | FISPGGSYTYYA DSVKG (SEQ ID NO:2) | PGGS (SEQ ID NO:14) | WVAFISPGGS YTY (SEQ ID NO:19) | FISPGGSYTY (SEQ ID NO:24) |
| | VH CDR3 | EYYSMGVLDY (SEQ ID NO:3) | AREYYSMGVL DY (SEQ ID NO:9) | EYYSMGVLDY (SEQ ID NO:3) | YYSMGVLD (SEQ ID NO:15) | AREYYSMGV LD (SEQ ID NO:20) | EYYSMGVLDY (SEQ ID NO:3) |
| VL CDR Seq. | VL CDR1 | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) | QSVSSA (SEQ ID NO:10) | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) | SQSVSSA (SEQ ID NO:16) | SSAVAWY (SEQ ID NO:21) | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) |
| | VL CDR2 | SASSLYS (SEQ ID NO:5) | SAS (SEQ ID NO:11) | SASSLYS (SEQ ID NO:5) | SAS (SEQ ID NO:11) | LLIYSASSLY (SEQ ID NO:22) | SASSLYS (SEQ ID NO:5) |
| | VL CDR3 | QQAYESPYT (SEQ ID NO:6) | QQAYESPYT (SEQ ID NO:6) | QQAYESPYT (SEQ ID NO:6) | AYESPY (SEQ ID NO:17) | QQAYESPY (SEQ ID NO:23) | QQAYESPYT (SEQ ID NO:6) |
| VH 氨基酸序列：<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYYIHWVRQAPGKGLEWVAFISPGGSYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS<br>LRAEDTAVYYCAREYYSMGVLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:25) | | | | | | | |
| VL 氨基酸序列：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC<br>QQAYESPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:26) | | | | | | | |

[0343]

表 2：抗体 **mAbA15**

| | | 例示性 | IMGT® | Kabat | Chothia | Contact | AbM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VH CDR Seq. | VH CDR1 | GFTFSSYYIH (SEQ ID NO:27) | GFTFSSYY (SEQ ID NO:31) | SYYIH (SEQ ID NO:34) | GFTFSSY (SEQ ID NO:35) | SSYYIH (SEQ ID NO:39) | GFTFSSYYIH (SEQ ID NO:27) |
| | VH CDR2 | YITSTGSYTEYA DSVKG (SEQ ID NO:28) | ITSTGSYT (SEQ ID NO:32) | YITSTGSYTEYA DSVKG (SEQ ID NO:28) | STGS (SEQ ID NO:36) | WVAYITSTGSY TE (SEQ ID NO:40) | YITSTGSYTE (SEQ ID NO:43) |
| | VH CDR3 | YDRSTRYSGLD Y (SEQ ID NO:29) | ARYDRSTRYSG LDY (SEQ ID NO:33) | YDRSTRYSGLD Y (SEQ ID NO:29) | DRSTRYSGLD (SEQ ID NO:37) | ARYDRSTRYSG LD (SEQ ID NO:41) | YDRSTRYSGLD Y (SEQ ID NO:29) |
| VL CDR Seq. | VL CDR1 | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) | QSVSSA (SEQ ID NO:10) | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) | SQSVSSA (SEQ ID NO:16) | SSAVAWY (SEQ ID NO:21) | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) |
| | VL CDR2 | SASSLYS (SEQ ID NO:5) | SAS (SEQ ID NO:11) | SASSLYS (SEQ ID NO:5) | SAS (SEQ ID NO:11) | LLIYSASSLY (SEQ ID NO:22) | SASSLYS (SEQ ID NO:5) |
| | VL CDR3 | QQAYATPVT (SEQ ID NO:30) | QQAYATPVT (SEQ ID NO:30) | QQAYATPVT (SEQ ID NO:30) | AYATPV (SEQ ID NO:38) | QQAYATPV (SEQ ID NO:42) | QQAYATPVT (SEQ ID NO:30) |
| VH 氨基酸序列：<br>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYIHWVRQAPGKGLEWVAYITSTGSYTEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARYDRSTRYSGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:44) | | | | | | | |
| VL 氨基酸序列：<br>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ AYATPVTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:45) | | | | | | | |

[0344]

表 3：抗体 mAbA17

| | | 例示性 | IMGT® | Kabat | Chothia | Contact | AbM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| VH CDR Seq. | VH CDR1 | GFTFSRYWIH (SEQ ID NO:46) | GFTFSRYW (SEQ ID NO:50) | RYWIH (SEQ ID NO:53) | GFTFSRY (SEQ ID NO:13) | SRYWIH (SEQ ID NO:57) | GFTFSRYWIH (SEQ ID NO:46) |
| | VH CDR2 | AIFPYSGSTLYA DSVKG (SEQ ID NO:47) | IFPYSGST (SEQ ID NO:51) | AIFPYSGSTLYA DSVKG (SEQ ID NO:47) | PYSG (SEQ ID NO:54) | WVAAIFPYSGS TL (SEQ ID NO:58) | AIFPYSGSTL (SEQ ID NO:61) |
| | VH CDR3 | SPSRSILPSGLD Y (SEQ ID NO:48) | ARSPSRSILPSG LDY (SEQ ID NO:52) | SPSRSILPSGLD Y (SEQ ID NO:48) | PSRSILPSGLD (SEQ ID NO:55) | ARSPSRSILPSG LD (SEQ ID NO:59) | SPSRSILPSGLD Y (SEQ ID NO:48) |
| VL CDR Seq. | VL CDR1 | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) | QSVSSA (SEQ ID NO:10) | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) | SQSVSSA (SEQ ID NO:16) | SSAVAWY (SEQ ID NO:21) | RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:4) |
| | VL CDR2 | SASSLYS (SEQ ID NO:5) | SAS (SEQ ID NO:11) | SASSLYS (SEQ ID NO:5) | SAS (SEQ ID NO:11) | LLIYSASSLY (SEQ ID NO:22) | SASSLYS (SEQ ID NO:5) |
| | VL CDR3 | QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49) | QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49) | QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49) | GDGSPY (SEQ ID NO:56) | QQGDGSPY (SEQ ID NO:60) | QQGDGSPYT (SEQ ID NO:49) |
| VH 氨基酸序列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWIHWVRQAPGKGLEWVAAIFPYSGSTLYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSRSILPSGLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:62) | | | | | | |
| VL 氨基酸序列：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGDGSPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:63) | | | | | | | |

[0345] 在一些实施方案中,5T4抗体包含VH区。在一些实施方案中,5T4抗体包含VL区。在一些实施方案中,5T4抗体具有(i)VH区;以及(ii)VL区的组合。

[0346] 在一些实施方案中,5T4抗体包含具有以下的组合的重链:(i)如本文所述的VH,诸

如表1至3中的任一者所述;以及(ii)一个或多个重链恒定区(例如CH1、铰链、CH2以及CH3)。例示性IgG重链可包含如本文所述的任何VH氨基酸序列及以下CH1、铰链、CH2以及CH3氨基酸序列:

[0347] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:69)。

[0348] 另一种例示性IgG重链可包含如本文所述的任何VH氨基酸序列及以下CH1、铰链、CH2以及CH3氨基酸序列:

[0349] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALKAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:70)。

[0350] 在一些实施方案中,5T4抗体包含具有以下的组合的轻链:(i)如本文所述的VL区,诸如表1至3中的任一者所述;以及(ii)轻链恒定区(CL)。例示性轻链(例如与IgG重链成对)可包含本文所述的任何VL氨基酸序列及以下CL氨基酸序列:

[0351] RTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:71)。

[0352] 在一些实施方案中,5T4抗体包含(a)具有以下的组合的重链:(i)如本文所述的VH,诸如表1至3中的任一者所述,及(ii)一个或多个重链恒定区(例如CH1、铰链、CH2以及CH3);以及(b)具有以下的组合的轻链:(i)如本文所述的VL,诸如表1至3中的任一者所述,及(ii)呈IgG格式的轻链恒定区(CL1)。

[0353] 在一些实施方案中,结合至5T4的抗体可包含:重链,其具有氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYYIHWVRQAPGKGLEWVAFISPG GSYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYSMGVLDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL

[0354] CTPSRGS (SEQ ID NO:90);以及轻链,其具有氨基酸序列

[0355] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYESPYTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:91)。

[0356] 在一些实施方案中,结合至5T4的抗体可为重链,所述重链已被修饰以包括甲酰基甘氨酸残基且因此具有氨基酸序列

[0357] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYYIHWVRQAPGKGLEWVAFISPG GSYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYSMGVLDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL

(fGly)TPSRGS (SEQ ID NO:92),其中f(Gly)为甲酰基甘氨酸残基。

[0358] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含:重链,其具有氨基酸序列

[0359] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYYIHWVRQAPGKGLEWVAFISPG GSYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYSMGVLDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL

*n*TPSRGS (SEQ ID NO:93),其中n为氨基酸,其侧链由如本文所公开的接头-药物替换,例如式(XIV)、(XV)或(XVI)的接头-药物。

[0360] 在一些实施方案中,结合至5T4的抗体包含:重链,其具有氨基酸序列

[0361] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYIHWVRQAPGKGLEWVAYITSTGSY TEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDRSTRYSGLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSLCT

PSRGS (SEQ ID NO:94);以及轻链,其具有氨基酸序列

[0362] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQAYATPVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:95)。

[0363] 在一些实施方案中,结合至5T4的抗体可为重链,所述重链已被修饰以包括甲酰基甘氨酸残基且因此具有氨基酸序列

[0364] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYIHWVRQAPGKGLEWVAYITST GSYTEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDRSTRYSGLDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL

(*fGly*)TPSRGS (SEQ ID NO:96),其中f(Gly)为甲酰基甘氨酸残基。

[0365] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含:重链,其具有氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYIHWVRQAPGKGLEWVAYITSTGSY
TEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYDRSTRYSGLDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSL*n*T

PSRGS (SEQ ID NO:97),其中n为氨基酸,其侧链由如本文所公开的接头-药物替换,例如式(XIV)、(XV)或(XVI)的接头-药物。

[0366] 在一些实施方案中,结合至5T4的抗体包含:重链,其具有氨基酸序列

[0367] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWIHWVRQAPGKGLEWVAAIFP
YSGSTLYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSRSILPSGLD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS

LCTPSRGS (SEQ ID NO:98) ;以及轻链,其具有氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA
SQSVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFA
TYYCQQGDGSPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:99)。

[0368] 在一些实施方案中,结合至5T4的抗体可为重链,所述重链已被修饰以包括甲酰基甘氨酸残基且因此具有氨基酸序列

[0369] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWIHWVRQAPGKGLEWVAAIFP
YSGSTLYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSRSILPSGLD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS

L*fGly*TPSRGS (SEQ ID NO:100),其中f(Gly)为甲酰基甘氨酸残基。

[0370] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含:重链,其具有氨基酸序列

[0371] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWIHWVRQAPGKGLEWVAAIFP
YSGSTLYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPSRSILPSGLD
YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGS

L*n*TPSRGS (SEQ ID NO:101),其中n为氨基酸,其侧链由如本文所公开的接头-药物替换,例如式(XIV)、(XV)或(XVI)的接头-药物。

[0372] 在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个、三个、四个、五个或六个CDR),例如表1中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个、三个、四个、五个或六个CDR),例如表2中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个、三个、四个、五个或六个CDR),例如表3中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。

[0373] 在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VH CDR),例如表1中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VL CDR),例如表1中所述的VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VH CDR),例如表1中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3;以及一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VL CDR),例如表1中所述的VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。

[0374] 在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VH CDR),例如表2中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在其他实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VL CDR),例如表2中所述的VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VH CDR),例如表2中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3;以及一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VL CDR),例如表2中所述的VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。

[0375] 在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VH CDR),例如表3中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VL CDR),例如表3中所述的VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VH CDR),例如表3中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3;以及一个或多个CDR(例如一个、二个或三个VL CDR),例如表3中所述的VL CDR1、VL CDR2以及/或VL CDR3。

[0376] 在一些实施方案中,5T4抗体包含如本文所述的一个或多个(例如一个、二个或三个)VH CDR,诸如表1至3中所述。在其他实施方案中,5T4抗体包含如本文所述的一个或多个(例如一个、二个或三个)VL CDR,诸如表1至3中所述。在一些实施方案中,5T4抗体包含如本文(诸如表1至3)所述的一个或多个(例如一个、二个或三个)VH CDR及如本文(诸如表1至3)所述的一个或多个(例如一个、二个或三个)VL CDR。因此,在一些实施方案中,5T4抗体包含氨基酸序列含有SEQ ID NO:1、7、12、13、18、27、31、34、35、39、46、50、53及57中的任一者的VH CDR1。在一些实施方案中,5T4抗体包含氨基酸序列含有SEQ ID NO:2、8、14、19、24、28、32、36、40、43、47、51、54、58和61中的任一者的VH CDR2。在一些实施方案中,5T4抗体包含含有SEQ ID NO:3、9、15、20、29、33、37、41、48、52、55和59中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含独立地选自以下的VH CDR1和/或VH CDR2以及/或VH CDR3:表1至3中的任一者中所述的VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含含有SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1。在一些实施方案中,5T4抗体包含含有SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。在一些实施方案中,5T4抗体包含含有SEQ ID NO:6、17、23、30、38、42、49、56和60中的任一者的氨基

酸序列的VL CDR3。在一些实施方案中,5T4抗体包含独立地选自以下的VL CDR1和/或VL CDR2以及/或VL CDR3:如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3。

[0377] 在一些实施方案中,5T4抗体包含重链可变区(VH),其包含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46、(ii)SEQ ID NO:7、31或50、(iii)SEQ ID NO:12、34或53、(iv)SEQ ID NO:13或53及(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47、(ii)SEQ ID NO:8、32或51、(iii)SEQ ID NO:14、36或54、(iv)SEQ ID NO:19、40或58和(v)SEQ ID NO:24、43或61;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48、(ii)SEQ ID NO:9、33或52、(iii)SEQ ID NO:15、37或55和(iv)SEQ ID NO:20、41或59;以及/或VL区,其包含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、(ii)SEQ ID NO:10、(iii)SEQ ID NO:16和(iv)SEQ ID NO:21;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5、(ii)SEQ ID NO:11和(iii)SEQ ID NO:22;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49、(ii)SEQ ID NO:17、38或56和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0378] 在一些实施方案中,5T4抗体包含VH区,其包含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46、(ii)SEQ ID NO:7、31或50、(iii)SEQ ID NO:12、34或53、(iv)SEQ ID NO:53及(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47、(ii)SEQ ID NO:8、32或51、(iii)SEQ ID NO:14、36或54、(iv)SEQ ID NO:19、40或58和(v)SEQ ID NO:24、43或61;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48、(ii)SEQ ID NO:9、33或52、(iii)SEQ ID NO:15、37或55和(iv)SEQ ID NO:20、41或59。

[0379] 在一些实施方案中,5T4抗体包含VL区,其包含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、(ii)SEQ ID NO:10、(iii)SEQ ID NO:16和(iv)SEQ ID NO:21;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5、(ii)SEQ ID NO:11和(iii)SEQ ID NO:22;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49、(ii)SEQ ID NO:17、38或56和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0380] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46、(ii)SEQ ID NO:7、31或50、(iii)SEQ ID NO:12、34或53、(iv)SEQ ID NO:53及(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47、(ii)SEQ ID NO:8、32或51、(iii)SEQ ID NO:14、36或54、(iv)SEQ ID NO:19、40或58和(v)SEQ ID NO:24、43或61;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48、(ii)SEQ ID NO:9、33或52、(iii)SEQ ID NO:15、37或55和(iv)SEQ ID NO:20、41或59;以及/或VL区,其包含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、(ii)SEQ ID NO:10、(iii)SEQ ID NO:16和(iv)SEQ ID NO:21;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5、(ii)SEQ ID NO:11和(iii)SEQ ID NO:22;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49、(ii)SEQ ID NO:17、38或56和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0381] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含VH区,其包

含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1:(i)SEQ ID NO:1、27或46、(ii)SEQ ID NO:7、31或50、(iii)SEQ ID NO:12、34或53、(iv)SEQ ID NO:13、35或53及(v)SEQ ID NO:18、39或57;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2:(i)SEQ ID NO:2、28或47、(ii)SEQ ID NO:8、32或51、(iii)SEQ ID NO:14、36或54、(iv)SEQ ID NO:19、40或58和(v)SEQ ID NO:24、43或61;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3:(i)SEQ ID NO:3、29或48、(ii)SEQ ID NO:9、33或52、(iii)SEQ ID NO:15、37或55和(iv)SEQ ID NO:20、41或59。

[0382] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含VL区,其包含:(1)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1:(i)SEQ ID NO:4、(ii)SEQ ID NO:10、(iii)SEQ ID NO:16和(iv)SEQ ID NO:21;(2)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2:(i)SEQ ID NO:5、(ii)SEQ ID NO:11和(iii)SEQ ID NO:22;以及(3)包含以下中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3:(i)SEQ ID NO:6、30或49、(ii)SEQ ID NO:17、38或56和(iii)SEQ ID NO:23、42或60。

[0383] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含来自以下抗体的所有三个重链CDR和/或所有三个轻链CDR:(a)命名为mAbA4的抗体,其包含SEQ ID NO:25的VH氨基酸序列及SEQ ID NO:26的VL氨基酸序列;或(b)命名为mAbA15的抗体,其包含SEQ ID NO:44的VH氨基酸序列及SEQ ID NO:45的VL氨基酸序列;或(C)命名为mAbA17的抗体,其包含SEQ ID NO:62的VH氨基酸序列及SEQ ID NO:63的VL氨基酸序列。在一些实施方案中,5T4-ADC包含5T4抗体,其中所述5T4抗体包含来自命名为mAbA4的抗体的所有三个重链CDR和/或所有三个轻链CDR。在一些实施方案中,5T4-ADC包含5T4抗体,其中所述5T4抗体包含来自命名为mAbA15的抗体的所有三个重链CDR和/或所有三个轻链CDR。在一些实施方案中,5T4-ADC包含5T4抗体,其中所述5T4抗体包含来自命名为mAbA17的抗体的所有三个重链CDR和/或所有三个轻链CDR。

[0384] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)包含如本文(诸如表1至3)所述的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列的VH区;以及/或(b)包含如本文(诸如表1至3)所述的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列的VL区。在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:VH区,其包含如本文(诸如表1至3)所述的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3氨基酸序列。在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含VL区,其包含如本文(诸如表1至3)所述的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3氨基酸序列。

[0385] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:VL CDR1,其包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列;以及(2)VL CDR2,其包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列。

[0386] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2。

[0387] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2。

[0388] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2。

[0389] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2。

[0390] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0391] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2。

[0392] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0393] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2。

[0394] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0395] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2。

[0396] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0397] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2。

[0398] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0399] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,

其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1;和VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2。

[0400] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0401] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2。

[0402] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0403] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2。

[0404] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0405] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2。

[0406] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0407] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2。

[0408] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0409] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2。

[0410] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:50的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ

ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0411] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:50的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2。

[0412] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0413] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2。

[0414] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0415] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的VH CDR1;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1;以及(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2。

[0416] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:1、7、12、13和18中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1;(2)包含SEQ ID NO:2、8、14、19和24中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:3、9、15和20中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:6、17和23中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3。

[0417] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3。

[0418] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3。

[0419] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含

氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3。

[0420] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VL CDR3。

[0421] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的VL CDR3。

[0422] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3。

[0423] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:27、31、34、35和39中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1;(2)包含SEQ ID NO:28、32、36、40和43中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:29、33、37和41中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:30、38和42中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3。

[0424] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3。

[0425] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:33的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3。

[0426] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3。

[0427] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的VL CDR3。

[0428] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的VL CDR3。

[0429] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3。

[0430] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:13、46、50、53及57中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1;(2)包含SEQ ID NO:47、51、54、58和61中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:48、52、55和59中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:49、56和60中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3。

[0431] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3。

[0432] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:50的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:51的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3。

[0433] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3。

[0434] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的

VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的VL CDR3。

[0435] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:60的VL CDR3。

[0436] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:(a)VH区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:61的VH CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1;(2)包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2;以及(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3。

[0437] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含:VH区,其包含:氨基酸序列选自由SEQ ID NO:27、31、34、35和39组成的组的VH CDR1;以及VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;以及(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2。

[0438] 在一些实施方案中,5T4-ADC包含结合至5T4的抗体,其中所述抗体包含本文所述的VH区和/或VL区,其中VH和/或VL包含人框架序列。在一些实施方案中,VH区和/或VL区包含框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4(FR4)序列,诸如人FR1、人FR2、人FR3和/或人FR4。

[0439] 在一些实施方案中,5T4抗体的CDR可通过Kabat系统测定(Kabat等人,(1971)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391及Kabat等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest第五版,美国卫生与公众服务部(U.S.Department of Health and Human Services),NIH公告第91-3242号)。

[0440] 在一些实施方案中,5T4抗体的CDR可通过Chothia系统测定,其在本文中称为"Chothia CDR"(参见例如Chothia和Lesk,1987,J.Mol.Biol.,196:901-917;Al-Lazikani等人,1997,J.Mol.Biol.,273:927-948;Chothia等人,1992,J.Mol.Biol.,227:799-817;Tramontano A.等人,1990,J.Mol.Biol.215(1):175-82;以及美国专利第7,709,226号)。

[0441] 在一些实施方案中,5T4抗体的CDR可通过ImMunoGeneTics(IMGT®)系统测定,例如以下文献中所述:Lefranc,M.-P.,1999,The Immunologist,7:132-136和Lefranc,M.-P.等人,1999,Nucleic Acids Res.,27:209-212("IMGT®CDR")。

[0442] 在一些实施方案中,5T4抗体的CDR可通过AbM系统测定,其在本文中称为"AbM CDR",例如MacCallum等人,1996,J.Mol.Biol.,262:732-745中所述。也参见例如Martin,A.,"Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains,"于Antibody Engineering,Kontermann和Dübel编,第31章,第422-439页,Springer-Verlag,Berlin(2001)。

[0443] 在一些实施方案中,5T4抗体的CDR可通过Contact系统测定,其在本文中将称为"Contact CDR"(参见例如MacCallum RM等人,1996,J Mol Biol 5:732-745)。Contact CDR

是基于可获得的复杂晶体结构的分析。

[0444] 在一些实施方案中,沿着5T4抗体的VH(例如CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如CDR1、CDR2或CDR3)区的一个或多个(例如一个、二个、三个)CDR的位置可改变一个、二个、三个、四个、五个或六个氨基酸位置,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。例如,在一些实施方案中,可通过将CDR的N端和/或C端边界相对于当前CDR位置位移一个、二个、三个、四个、五个或六个氨基酸来改变表1、2或3中的任一者的界定CDR的位置,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。另外或可替代地,在一些实施方案中,沿着本文所述的5T4抗体(例如人5T4抗体)的VH(例如CDR1、CDR2或CDR3)和/或VL(例如CDR1、CDR2或CDR3)区的一个或多个(例如一个、二个、三个)CDR的长度可改变(例如更短或更长)一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。例如,在一些实施方案中,VH和/或VL CDR1、CDR2以及/或CDR3可比SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或多个CDR短一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。在其他实施方案中,VH和/或VL CDR1、CDR2以及/或CDR3可比SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或多个CDR长一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。另外或可替代地,在一些实施方案中,相较于SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或多个CDR,VH和/或VL CDR1、CDR2以及/或CDR3的氨基端可延长一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。另外或可替代地,在一些实施方案中,相较于SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或多个CDR,VH和/或VL CDR1、CDR2以及/或CDR3的羧基端可延长一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。另外或可替代地,在一些实施方案中,相较于SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或多个CDR,VH和/或VL CDR1、CDR2以及/或CDR3的氨基端可缩短一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。在一些实施方案中,相较于SEQ ID NO:1-24、27-43或46-61所述的一个或多个CDR,VH和/或VL CDR1、CDR2以及/或CDR3的羧基端可缩短一个、二个、三个、四个、五个或更多个氨基酸,限制条件为维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)对5T4(例如人5T4)的结合。本领域中已知的任何方法可用于确定对5T4(例如人5T4)的结合是否得到维持,例如本文所述的“实例”章节中所述的结合分析及条件。例如,本文所述的实例2描述一种用于测量对5T4(例如人5T4)的结合的分析。

[0445] 在一些实施方案中,5T4-ADC可包含5T4抗体,所述抗体包含一个或多个(例如一个、二个、三个、四个或更多个)保守序列修饰。就作为5T4抗体(诸如人5T4抗体)的多肽而

言,保守序列修饰包括其中氨基酸残基经具有相似侧链的氨基酸残基替换的保守氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已定义。本文中公开这些家族。因此,在一些实施方案中,5T4抗体中经预测的非必需氨基酸残基可经来自相同侧链家族的另一氨基酸残基替换。鉴别不消除抗原结合的保守氨基酸取代及编码其的核苷酸的方法在本领域中已熟知(参见例如Brummell等人,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等人,Protein Eng.12(10):879-884(1999);及Burks等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。在一些实施方案中,本文所述的保守序列修饰将5T4抗体(例如人5T4抗体)的氨基酸序列修饰50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些实施方案中,氨基酸序列修饰是指对CDR的至多一个、二个、三个、四个、五个或六个氨基酸取代,诸如表1至3中的任一者中所述的那些修饰。因此,例如,此类各CDR可含有至多五个保守氨基酸取代,例如至多(不超过)四个保守氨基酸取代,例如至多(不超过)三个保守氨基酸取代,例如至多(不超过)二个保守氨基酸取代,或不超过一个保守氨基酸取代。在一些实施方案中,5T4-ADC包含5T4抗体,所述抗体含有与mAbA4、mAbA15或mAbA17的CDR(参见例如表1、2或3)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的一个或多个CDR(例如一个、二个、三个、四个、五个或六个CDR)。在一些实施方案中,5T4-ADC包含5T4抗体,所述抗体含有CDR与mAbA4、mAbA15或mAbA17的CDR(参见例如表1、2或3)一致的VH和VL。在一些实施方案中,氨基酸序列修饰不包括特异性决定残基(SDR)内的任何修饰。在一些实施方案中,氨基酸序列修饰不包括CDR(诸如CDR1、CDR2、CDR3或其任何组合)内的任何修饰。在其他实施方案中,氨基酸序列修饰位于框架或恒定区中。

[0446] 在一些实施方案中,5T4-ADC中的抗体包含氨基酸序列与SEQ ID NO:25具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VH和氨基酸序列与SEQ ID NO:26具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VL,并且维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)抗体对5T4(例如人5T4)的结合。

[0447] 在一些实施方案中,5T4-ADC中的抗体包含氨基酸序列与SEQ ID NO:44具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VH和氨基酸序列与SEQ ID NO:45具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VL,并且维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)抗体对5T4(例如人5T4)的结合。

[0448] 在一些实施方案中,5T4-ADC中的抗体包含氨基酸序列与SEQ ID NO:62具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VH和氨基酸序列与SEQ ID NO:63具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VL,并且维持(例如基本上维持,例如至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%)抗体对5T4(例如人5T4)的结合。

[0449] 另外提供编码如本文所公开的5T4结合剂(例如抗体或抗体片段)或融合多肽的核酸、与其互补的核酸、包含如本文所公开的核酸的载体、包含如本文所公开的核酸或载体的细胞。在一些实施方案中,细胞表达5T4结合剂。在一些实施方案中,细胞复制核酸或载体。在一些实施方案中,进一步提供用于产生5T4抗体(包括人5T4抗体)、适用于制备ADC的材料。就此而言,细胞(例如经分离的细胞)可产生包含如本文所述的VH和VL的抗体。在一些实

施方案中,多核苷酸可包含编码5T4抗体或抗体片段的一种或多种核酸序列。在一些实施方案中,多核苷酸为经分离的和/或重组的多核苷酸。在一些实施方案中,经分离的多核苷酸包含编码抗体重链可变区(VH)和/或抗体轻链可变区(VL)的核苷酸序列,其中VH和VL包含与如本文所述的CDR一致的CDR。

[0450] 在一些实施方案中,一种或多种载体(例如表达载体)可包含一种或多种多核苷酸,以便一种或多种多核苷酸在适合宿主细胞中的表达。使用重组技术,此类载体适用于例如扩增宿主细胞中的多核苷酸以产生其适用数量,及用于表达结合剂,诸如抗体或抗体片段。

[0451] 在一些实施方案中,一种或多种载体为表达载体,其中一种或多种多核苷酸可操作地连接至包含表达控制序列的一种或多种多核苷酸。特别考虑了自控复制的重组表达构建体,诸如并有一种或多种多核苷酸的质粒及病毒DNA载体,所述多核苷酸编码结合5T4的抗体序列。表达控制DNA序列包括启动子、增强子及操纵子,并且通常基于其中将使用表达构建体的表达系统来选择。启动子及增强子序列通常根据其增强基因表达的能力来选择,而操纵子序列通常根据其调节基因表达的能力来选择。表达构建体也可包括编码一种或多种可选标记物的序列,所述可选标记物允许鉴别携载构建体的宿主细胞。表达构建体也可包括有助于(例如促进)在宿主细胞中进行同源重组的序列。在一些实施方案中,表达构建体还包括宿主细胞中复制所必需的序列。

[0452] 在一些实施方案中,表达控制序列可包括启动子/增强子序列,例如细胞巨大病毒启动子/增强子(Lehner等人,J.ClinMicrobiol.,29:2494-2502,1991;Boshart等人,Cell,41:521-530,1985);劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)启动子(Davis等人,Hum.GeneTher.,4:151,1993);Tie启动子(Korhonen等人,Blood,86(5):1828-1835,1995);猿猴病毒40启动子;DRA(在腺瘤中下调;Alrefai等人,Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.,293:G923-G934,2007);MCT1(单羧酸转运蛋白1;Cuff等人,Am.J.Physiol.Gastrointest.LiverPhysiol.,G977-G979.2005);以及Math1(小鼠无调同源物1;Shroyer等人,Gastroenterology,132:2477-2478,2007),用于在哺乳动物细胞中表达,所述启动子可操作地连接于多肽编码序列的上游(例如5′)。在一些实施方案中,启动子可为上皮特异性启动子或内皮特异性启动子。多核苷酸也可任选地包括适合的聚腺苷酸化序列(例如SV40或人生长激素基因聚腺苷酸化序列),所述聚腺苷酸化序列可操作地连接于多肽编码序列的下游(例如3′)。

[0453] 在任何实施方案中,一种或多种多核苷酸可任选地另外包含一种或多种核苷酸序列,所述核苷酸序列编码与多肽序列同框融合的一种或多种分泌信号肽。一种或多种分泌信号肽可引导表达一种或多种多核苷酸的细胞分泌抗体多肽且可通过细胞与所分泌的多肽裂解。在任何实施方案中,一种或多种多核苷酸可任选地进一步包含预定功能仅为促进载体大规模产生的一种或多种序列。

[0454] 表达载体可使用例如以下文献中所述的标准重组DNA技术制备:Sambrook等人,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989),及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,New York,N.Y.(1994)。任选地使得病毒载体为复制缺乏型,例如通过使病毒复制所必需的选择基因缺失或中断。

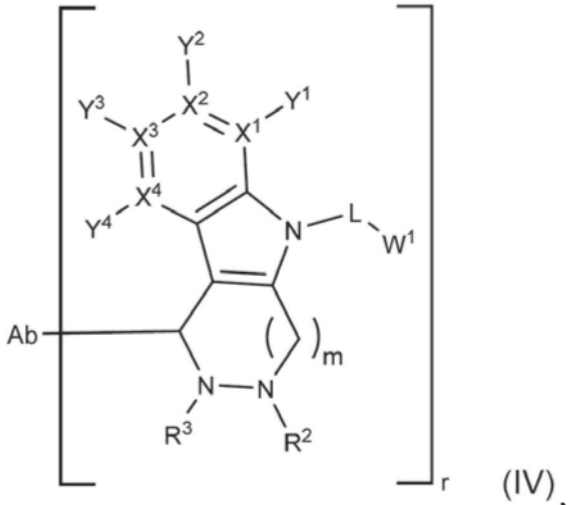
[0455] 细胞可包含一种或多种多核苷酸和/或一种或多种载体。例如,在任何实施方案中,细胞可用编码5T4抗体(例如人5T4抗体)的一种或多种多核苷酸或包含一种或多种编码5T4抗体(例如人5T4抗体)的多核苷酸的一种或多种载体转化或转染。在一些实施方案中,细胞可表达5T4抗体(例如人5T4抗体),其含有与如本文所述的CDR(诸如mAbA4、mAbA15和/或mAbA17(参见例如表1、2以及/或3))具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的一个或多个(例如一个、二个、三个、四个、五个或六个)CDR。在一些实施方案中,细胞可表达5T4抗体(例如人5T4抗体),所述抗体含有CDR与如本文所述的CDR(诸如mAbA4、mAbA15和/或mAbA17的CDR(参见例如表1、2以及/或3))一致的VH区和VL区。适用于产生如本文所述的5T4抗体的细胞包括原核细胞,诸如大肠杆菌(参见例如Plückthun等人,Methods Enzymol.,178:497-515,1989);以及真核细胞,诸如动物细胞(例如骨髓瘤细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或融合瘤细胞)、酵母(例如酿酒酵母)或植物细胞(例如烟草、玉米、大豆或水稻细胞)。使用哺乳动物宿主细胞可提供翻译修饰(例如糖基化、截断、脂质化及磷酸化),翻译修饰可为赋予重组表达产物最佳生物活性所需的。类似地,在任何实施方案中,多肽(例如5T4抗体,包括人5T4抗体)可经糖基化或非糖基化和/或已经共价修饰以包括一个或多个水溶性聚合物连接,诸如聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。

[0456] 用于将DNA或RNA引入宿主细胞中的方法已熟知且包括(但不限于)转化、转染、电穿孔、核注入及与诸如脂质体、微胞、影细胞及原生质体的运载体融合。此类宿主细胞适用于扩增多核苷酸及表达由多核苷酸编码的多肽。就此而言,产生5T4抗体的方法可包括将编码如本文所述的5T4抗体的RNA或DNA引入宿主细胞中;培养所述宿主细胞;以及分离出由此产生的5T4抗体。

[0457] 自多核苷酸产生抗体的多种方法通常已熟知。例如,基本分子生物学程序描述于Maniatis等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1989(也参见Maniatis等人,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,2001)。另外,许多出版物描述通过操纵DNA、建立表达载体及将适当细胞转化及培养而适于制备抗体的技术(参见例如Mountain和Adair,Biotechnology and Genetic Engineering Reviews中的第1章,Tombs编,Intercept,Andover,UK,1992);以及Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel编,Wiley Interscience,NewYork,1999)。

[0458] 5T4-ADCS

[0459] 结合至5T4的抗体与药物可彼此直接地或间接地经由哒嗪-吡咯并偶合部分连接以形成如本文所述的5T4-ADC。在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)表示:

[0460] 

(IV),

[0461] 其中:

[0462] Ab为结合至5T4的抗体;

[0463] r为整数1至10;

[0464] m为0或1;

[0465] $R^2$和$R^3$各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;或$R^2$与$R^3$以环形连接以形成5元或6元杂环基;

[0466] $X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地为C、N、O或S;

[0467] $Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$各自独立地为氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基,或$Y^1$与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$或$Y^3$与$Y^4$以环形连接;

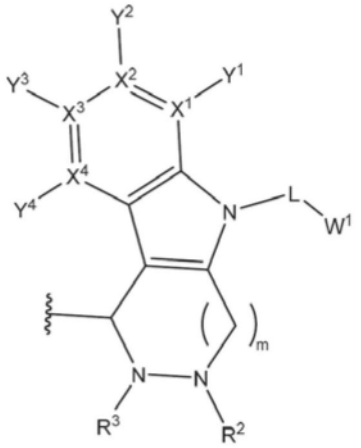
[0468] L为如本文所述的接头;并且

[0469] $W^1$为药物。

[0470] 式(IV)先前已描述于WO 2015/081282中,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

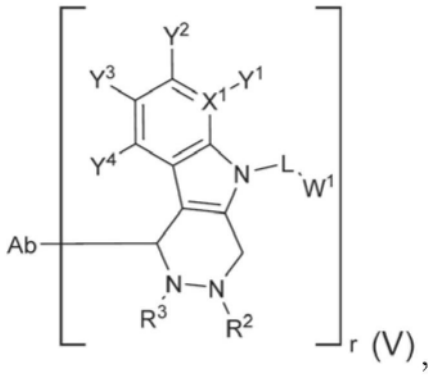
[0471] 在一些实施方案中,m为0或1且$R^2$和$R^3$各自为烷基。例如,$R^2$和$R^3$可各自独立地为$C_1$-$C_{10}$烷基(例如$C_1$-$C_6$烷基)。在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$各自独立地为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基。在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$中的至少一者为甲基。在一些实施方案中,$R^2$与$R^3$均为甲基。在一些实施方案中,$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的每一者独立地为C或N。在一些实施方案中,$X^1$为C。在一些实施方案中,$X^1$为N。在一些实施方案中,$X^2$为C或N。在一些实施方案中,$X^2$为C。在一些实施方案中,$X^3$为C或N。在一些实施方案中,$X^3$为C。在一些实施方案中,$X^4$为C或N。在一些实施方案中,$X^4$为C。$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$的各种组合为可能的。例如,在一些实施方案中,$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的每一者为C。在其他实施方案中,$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的三者为C且$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$之一为N。在一些实施方案中,$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$中的每一者为氢。

[0472] 在式(IV)的5T4-ADC的上下文中,式(IV)的接头-药物可由下式(XIV)表示:

[0473] 
(XIV),

[0474] 其中〰表示结合至5T4的抗体的连接点,例如SEQ ID NO:93、97或101的残基n。式(XIV)的接头-药物的全部其他变数可如本文所定义,诸如关于式(IV)所定义,和/或如本文所述。

[0475] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(V)表示:

[0476] 
(V),

[0477] 其中:

[0478] Ab为结合至5T4的抗体;

[0479] r为整数1至10;

[0480] $R^2$和$R^3$各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;或$R^2$与$R^3$以环形连接以形成5元或6元杂环基;

[0481] $X^1$为C或N;

[0482] $Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$各自独立地为氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基,或$Y^1$与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$或$Y^3$与$Y^4$以环形连接;

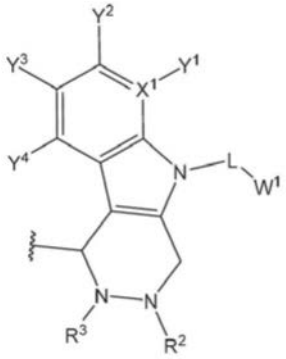
[0483] L为如本文所述的接头;并且

[0484] $W^1$为药物。

[0485] 式(V)先前已描述于WO 2015/081282中,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0486] 在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$各自为烷基。例如,$R^2$和$R^3$可各自独立地为$C_1$-$C_{10}$烷基(例如$C_1$-$C_6$烷基)。在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$各自独立地为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基。在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$中的至少一者为甲基。在一些实施方案中,$R^2$与$R^3$均为甲基。在一些实施方案中,$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$中的每一者为氢。

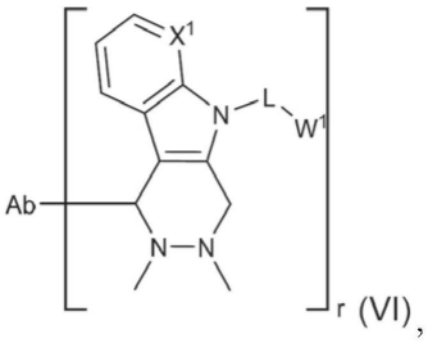
[0487] 在式(V)的5T4-ADC的上下文中,式(V)的接头-药物可由下式(XV)表示:

[0488] 

(XV),

[0489] 其中〰表示结合至5T4的抗体的连接点,例如SEQ ID NO:93、97或101的残基n。式(XV)的接头-药物的全部其他变数可如本文所定义,诸如关于式(V)所定义,和/或如本文所述。

[0490] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI)表示:

[0491] 

(VI),

[0492] 其中:

[0493] Ab为结合至5T4的抗体;

[0494] r为整数1至10;

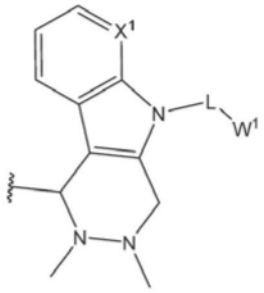
[0495] $X^1$为C或N;

[0496] L为如本文所述的接头;并且

[0497] $W^1$为药物。

[0498] 式(IV)先前已描述于WO 2015/081282中,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0499] 在式(VI)的5T4-ADC的上下文中,式(VI)的接头-药物可由下式(XVI)表示:

[0500] 

(XVI),

[0501] 其中〰表示结合至5T4的抗体的连接点,例如SEQ ID NO:93、97或101的残基n。式(XVI)的接头-药物的全部其他变数可如本文所定义,诸如关于式(VI)所定义,和/或如本文所述。

[0502] 接头

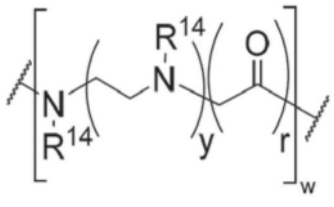
[0503] 在一些实施方案中,5T4-ADC可包含接头(L)部分,其将如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分连接至药物。在任何实施方案中,接头L可由以下结构表示:

[0504] $-(T^1V^1)_a-(T^2V^2)_b-(T^3V^3)_c-(T^4V^4)_d-(T^5V^5)_e-$,

[0505] 其中a、b、c、d和e各自独立地为0或1并且其中a、b、c、d和e的总和为1至5。在一些实施方案中,a、b、c、d和e的总和为3。在一些实施方案中,a、b、c、d和e的总和为5。

[0506] 在接头L中,$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地为$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、$-(CR^{13}OH)_h-$、哌啶-4-胺(P4A)、氨基甲酸间氨基苯甲酯(MABC)基团、间氨基苯甲氧基(MABO)基团、对氨基苯甲氧基(PABO)基团、氨基甲酸对氨基苯甲酯(PABC)基团、对氨基苯甲基(PAB)基团、缩醛、二硫化物、肼、蛋白酶可裂解部分、葡糖醛酸酶可裂解部分、β-内酰胺酶可裂解部分、酯、$(AA)_p$-MABC-$(AA)_p$、$(AA)_p$-MABO-$(AA)_p$、$(AA)_p$-PABO-$(AA)_p$或$(AA)_p$-PABC-$(AA)_p$,其中w为整数1至20,n为整数1至30,各p独立地为零或整数1至20,h为整数1至12,并且各$R^{13}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基或取代的芳基。

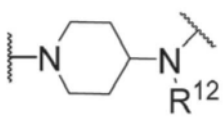
[0507] 如本文所用,“$(EDA)_w$”为具有以下结构的乙二胺部分:

[0508] 

,

[0509] 其中y为整数1至6,r为0或1,w为整数1至20,并且各$R^{14}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、PEG、芳基或取代的芳基,并且其中任何二个相邻$R^{14}$基团可以环形连接以形成哌嗪基环,其中各〰表示在任何方向上连至相邻化学部分的连接点。

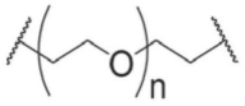
[0510] 哌啶-4-胺部分可任选地在一个或多个位置经任何取代基取代,例如烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、酰基、取代的酰基、芳基或取代的芳基。因此,如本文所用,哌啶-4-胺如本文所用可通过对应于以下结构的术语“P4A-$R^{12}$”描述:

[0511] 


[0512] 其中$R^{12}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分(例如聚乙二醇或经修饰的聚乙二醇)、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨

基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基，其中各〰表示在任何方向上连至相邻化学部分的连接点。

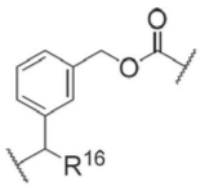
[0513] 如本文所用，$(PEG)_n$为具有以下结构的聚乙二醇：

[0514] 

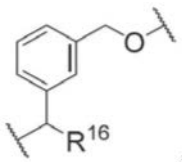
[0515] 其中n为整数1至50，诸如1至40、1至30、1至20、1至12或1至6，诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20，其中各〰表示在任何方向上连至相邻化学部分的连接点。

[0516] 如本文所用，“AA”是指如本文所述的氨基酸，包括(但不限于)天然存在的任何氨基酸、天然存在的氨基酸类似物、天然存在的氨基酸的镜像异构体，及非天然存在的氨基酸。在$(AA)_p$中，各氨基酸残基可独立地选自本文所述的氨基酸残基且p可为整数1至50，诸如1至40、1至30、1至20、1至12或1至6，诸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。

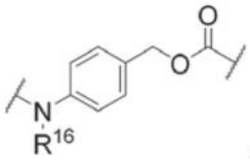
[0517] 如本文所用，MABC基团可通过术语“MABC-$R^{16}$”及以下结构描述：

[0518] 

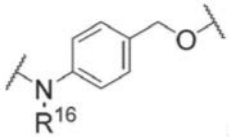
[0519] 如本文所用，MABO基团可通过术语“MABO-$R^{16}$”及以下结构描述：

[0520] 

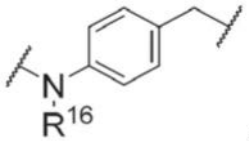
[0521] 如本文所用，PABC基团可通过术语“PABC-$R^{16}$”及以下结构描述：

[0522] 

[0523] 如本文所用，PABO基团可通过术语“PABO-$R^{16}$”及以下结构描述：

[0524] 

[0525] 如本文所用，对氨基苯甲基(PAB)基团可通过术语“PAB-$R^{16}$”及以下结构描述：

[0526] 

[0527] 在MABC-$R^{16}$、MABO-$R^{16}$、PABC-$R^{16}$、PABO-$R^{16}$和PAB-$R^{16}$中，各〰表示在任何方向上连至相邻化学部分的连接点，并且$R^{16}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。

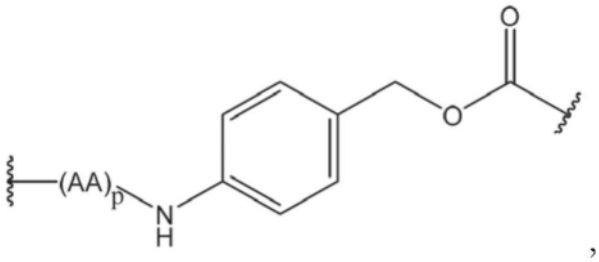
[0528] 在一些实施方案中，$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$中的一者或多者为$C_1$-$C_6$烷基。在一些实施方案中，$T^1$独立地为$C_1$-$C_6$烷基。在一些实施方案中，$T^1$为乙基。在一些实施方案中，$T^1$和$T^3$中的每一者为$C_1$-$C_6$烷基。在一些实施方案中，$T^1$和$T^3$中的每一者为乙基。

[0529] 在一些实施方案中，$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$中的一者或多者为P4A-$R^{12}$。在一些实施方案中，各$R^{12}$独立地为聚乙二醇部分。在一些实施方案中，各$R^{12}$独立地为经羧酸修饰的聚乙二醇。在一些实施方案中，$T^2$为P4A-$R^{12}$，其中$R^{12}$为经羧酸修饰的聚乙二醇。

[0530] 在一些实施方案中，$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$中的一者或多者为$(PEG)_n$。在一些实施方案中，n为2。在一些实施方案中，$T^3$为$(PEG)_n$，其中n为2。

[0531] 在一些实施方案中，$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$中的一者或多者为$(AA)_p$。在一些实施方案中，p为1。在一些实施方案中，$T^2$为$(AA)_p$，其中p为1。在一些实施方案中，$(AA)_p$中的AA为具有极性不带电荷侧链的氨基酸(例如丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺)。在一些实施方案中，$(AA)_p$中的AA为谷氨酰胺。

[0532] 在一些实施方案中，$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$中的一者或多者为$(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$)-$(AA)_p$。在一些实施方案中，$R^{16}$为氢。在一些实施方案中，p为0。在一些实施方案中，$R^{16}$为氢，并且p为0。因此，在一些实施方案中，$T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$中的一者或多者为通过以下结构描述的AA-PABC：

[0533] 

，

[0534] 其中各〰表示在任何方向上连至接头中的相邻化学部分的连接点。

[0535] 在一些实施方案中，AA-PABC中的p为2。在一些实施方案中，$T^4$为AA-PABC，其中p为2。在一些实施方案中，$(AA)_2$中的两个氨基酸为缬氨酸及瓜氨酸。

[0536] 接头L中的$V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$可各自独立地为共价键、氨基、羰基、酰氨基、氧基羰基、羧基、磺酰基、亚砜、磺酰基氨基、氨基磺酰基、硫基、氧基、磷酰基、氨基磷酸酯或硫代氨基磷酸酯。在一些实施方案中，$V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地为共价键、-C(=O)-、-$NR^{11}$-、-C(=O)$NR^{11}$-、-$NR^{11}$C(=O)-、-C(=O)O-、-OC(=O)-、-O-、-S-、-S(=O)-、-$SO_2$-、-$SO_2NR^{11}$-、-$NR^{11}SO_2$-和-P(=O)OH-，其中$R^{11}$为氢、烷基、取代的烷基、PEG、芳基或取代的芳基。在一些实施方案中，$V^1$、$V^2$和$V^3$独立地为C(=O)或-$NR^{11}$-，其中$R^{11}$独立地为氢或$C_1$-$C_6$烷基。

[0537] 在一些实施方案中，接头L可由以下结构表示：

[0538] -$(T^1V^1)_a$-$(T^2V^2)_b$-$(T^3V^3)_c$-$(T^4V^4)_d$-$(T^5V^5)_e$-，

[0539] 其中：

[0540] a、b、c、d和e各自独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5;

[0541] $T^1$为$C_1$-$C_6$烷基;

[0542] $T^2$、$T^3$、$T^4$和$T^5$各自独立地为$(PEG)_n$、$C_1$-$C_6$烷基、$(AA)_p$、P4A-$R^{12}$、$(AA)_p$-(PABO-$R^{16}$)-$(AA)_p$、$(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$)-$(AA)_p$、$(AA)_p$-(PABO-$R^{16}$)或$(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$);

[0543] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地为共价键、-CO-或-$NR^{11}$-;

[0544] 各$R^{11}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇、芳基或取代的芳基;

[0545] 各$R^{12}$独立地为氢、烷基、取代的烷基,或经修饰或未修饰的聚乙二醇部分;

[0546] $R^{16}$为氢;

[0547] n为整数1至30;并且

[0548] p为整数1至20。

[0549] 在一些实施方案中,$R^{12}$为$(PEG)_n$。在一些实施方案中,$R^{12}$为末端经羧酸修饰的$(PEG)_n$。在一些实施方案中,$R^{1111}$为氢或$C_1$-$C_{12}$烷基。在一些实施方案中,p为1。在一些实施方案中,p为2。在一些实施方案中,在接头中的一个位置,p为1,并且在接头中的另一位置,p为2。在一些实施方案中,n为整数1至5。在一些实施方案中,n为2。

[0550] 不可裂解的接头

[0551] 在一些实施方案中,接头L可由以下结构表示:

[0552] $(T^1V^1)_a$-$(T^2V^2)_b$-$(T^3V^3)_c$-$(T^4V^4)_d$-$(T^5V^5)_e$-,

[0553] 其中:

[0554] a、b、c、d和e各自独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5;

[0555] $T^1$为$C_1$-$C_6$烷基;

[0556] $T^2$和$T^3$各自独立地为$C_1$-$C_6$烷基或P4A-$R^{12}$;

[0557] $T^4$和$T^5$各自独立地为$(PEG)_n$、$C_1$-$C_6$烷基、$(AA)_p$、P4A-$R^{12}$、$(AA)_p$-(PABO-$R^{16}$)-$(AA)_p$、$(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$)-$(AA)_p$、$(AA)_p$-(PABO-$R^{16}$)或$(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$);

[0558] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地为共价键、-CO-或-$NR^{11}$-;并且

[0559] 各$R^{11}$独立地为氢或$C_1$-$C_6$烷基;并且

[0560] 各$R^{12}$独立地为经修饰或未修饰的聚乙二醇部分。

[0561] 在一些实施方案中,$T^1$和$T^3$中的每一者独立地为$C_1$-$C_6$烷基,独立地为诸如甲基、乙基或丙基。在一些实施方案中,$T^1$和$T^3$中的每一者为乙基。在一些实施方案中,$T^2$为P4A-$R^{12}$,其中$R^{12}$为经修饰或未修饰的聚乙二醇部分。在一些实施方案中,d和e为0。

[0562] 在一些实施方案中,接头L可由以下结构表示:

[0563] -($C_1$-$C_6$烷基)-($V^1$)-(P4A-$R^{12}$)-($V^2$)-($C_1$-$C_6$烷基)-($V^3$)-,

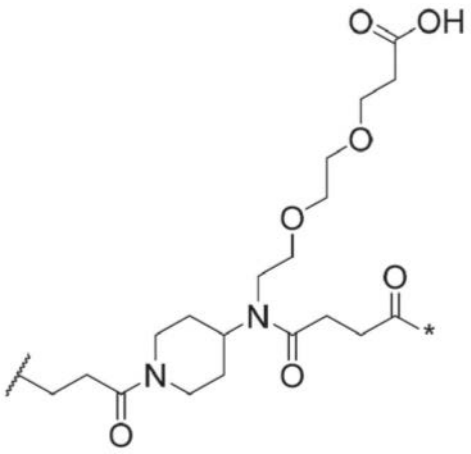
[0564] 其中:

[0565] $V^1$、$V^2$和$V^3$各自独立地为-CO-或-$NR^{11}$-;

[0566] 各$R^{11}$独立地为氢或$C_1$-$C_6$烷基;并且

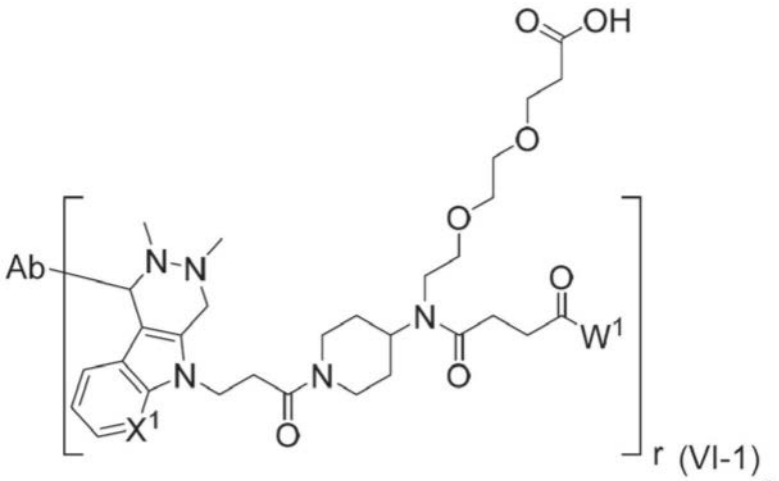
[0567] 各$R^{12}$独立地为经羧酸修饰的聚乙二醇部分。

[0568] 在一些实施方案中,接头L为接头(L-1):

[0569] 
(L-1)，

[0570] 其中〰表示连至如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分的氮的连接点，并且*表示连至$W^1$的连接点。

[0571] 因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-1)表示：

[0572] 
(VI-1)，

[0573] 其中：

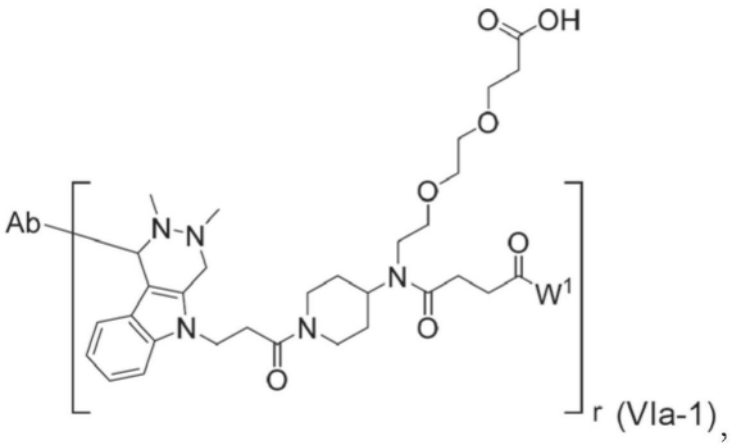
[0574] Ab为结合至5T4的抗体；

[0575] r为整数1至10；并且

[0576] $W^1$为药物。

[0577] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0578] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-1)表示，其中$X^1$为C。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VIa-1)表示：

[0579] 

[0580] 其中：

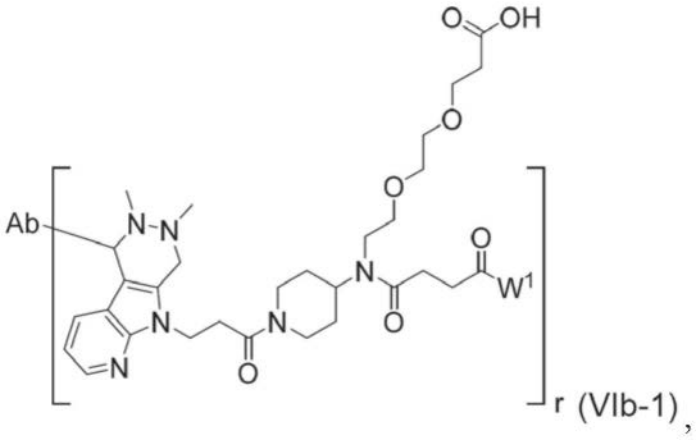
[0581] Ab为结合至5T4的抗体；

[0582] r为整数1至10；并且

[0583] $W^1$为药物。

[0584] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0585] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-1)表示，其中$X^1$为N。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VIb-1)表示：

[0586] 

[0587] 其中：

[0588] Ab为结合至5T4的抗体；

[0589] r为整数1至10；并且

[0590] $W^1$为药物。

[0591] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0592] 可裂解接头

[0593] 在一些实施方案中，抗体与药物彼此经由可裂解接头缀合。可裂解接头为包括一个或多个可裂解部分的接头，其中所述可裂解部分包括可在一些条件下解离的一个或多个键，从而将可裂解接头分离成两个或更多个可分离部分。例如，可裂解部分可包括一个或多个共价键，其在一些条件下可解离或分解以将可裂解接头分离成两个或更多个部分。因此，可裂解接头可包括于5T4-ADC中，使得在某些条件下，可裂解接头经裂解以使药物在药物的所需作用靶点处自抗体分离或释放。

[0594] 在一些实施方案中，可裂解接头可为酶可裂解接头。酶可裂解接头可经由酶的酶

作用而分离成如上文所述的两个或更多个部分。酶可裂解接头可包含可经由酶的酶作用而裂解的任何可裂解部分,诸如(但不限于)肽、糖苷及其类似物。在一些情况下,使酶可裂解接头裂解的酶存在于所需作用靶点,诸如待自抗体-药物缀合物释放的药物的所需作用靶点。在一些情况下,使酶可裂解接头裂解的酶未大量存在于其他区域中,诸如全血、血浆或血清中。从而可控制酶可裂解部分的裂解,使得实质性裂解发生于所需作用部位,而在其他区域中或在抗体-药物缀合物到达所需作用部位之前不会显著发生裂解。

[0595] 在一些实施方案中,酶可裂解接头包含肽。肽可为适用于可裂解接头且可经由酶的酶作用裂解的任何肽。可用作酶可裂解部分的肽的非限制性实例包括例如Val-Ala;Phe-Lys;以及其类似物。

[0596] 在一些实施方案中,接头L为可裂解的且可由以下结构表示:

[0597] $-(T^1V^1)_a-(T^2V^2)_b-(T^3V^3)_c-(T^4V^4)_d-(T^5V^5)_e-$,

[0598] 其中:

[0599] a、b、c、d和e各自独立地为0或1,其中a、b、c、d和e的总和为1至5;

[0600] $T^1$和$T^5$各自为$C_1$-$C_6$烷基;

[0601] $T^2$、$T^3$和$T^4$各自独立地为$(PEG)_n$、$(AA)_p$或$(AA)_p$-PABC-$R^{16}$;

[0602] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地为共价键、-CO-或-$NR^{11}$-;

[0603] $R^{11}$如本文所述;

[0604] $R^{16}$如本文所述;

[0605] 各n独立地为整数1至30;并且

[0606] 各p独立地为整数1至20。

[0607] 在一些实施方案中,n为整数1至5。在一些实施方案中,n为2。

[0608] 在一些实施方案中,p为1。在一些实施方案中,p为2。在一些实施方案中,在接头L中的一个位置,p为1,并且在接头L中的另一位置,p为2。

[0609] 在一些实施方案中,$T^2$为氨基酸残基。在一些实施方案中,$T^2$为具有极性不带电荷侧链的氨基酸残基。在一些实施方案中,$T^2$为谷氨酰胺残基。

[0610] 在一些实施方案中,$T^3$为$(PEG)_n$,其中n为整数1至30,诸如1至5。在一些实施方案中,n为2。

[0611] 在一些实施方案中,$T^4$为$(AA)_p$-PABC-$R^{16}$,其中p为整数1至20,诸如1至5,并且$R^{16}$为氢。在一些实施方案中,p为2。在一些实施方案中,氨基酸(AA)为缬氨酸及瓜氨酸。

[0612] 在一些实施方案中,接头L可由以下结构表示:

[0613] -($C_1$-$C_6$烷基)-$V^1$-(AA)-$V^2$-$(PEG)_n$-$V^3$-(($(AA)_p$-(PABC-$R^{16}$))-$V^4$-($C_1$-$C_6$烷基)-$V^5$-,

[0614] 其中:

[0615] $R^{16}$为氢;

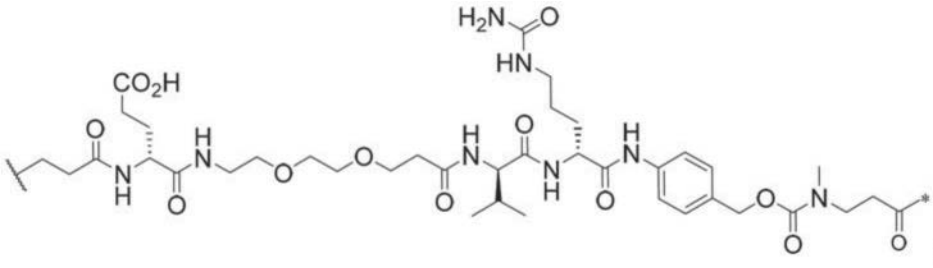
[0616] n和p中的每一者独立地为整数1至30、1至20或1至5;

[0617] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$和$V^5$各自独立地为共价键、-CO-或-$NR^{11}$-;并且

[0618] 各$R^{11}$独立地为氢或$C_1$-$C_6$烷基。

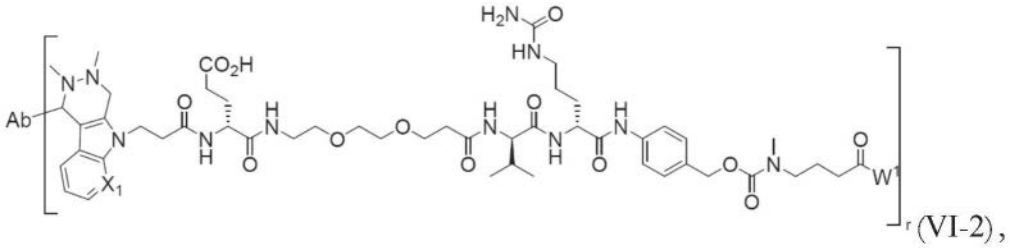
[0619] 在一些实施方案中,n与p均为2。

[0620] 在一些实施方案中,接头L可为接头(L-2):

[0621] 
(L-2),

[0622] 其中〰表示连接至如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分且*表示连至$W^1$的连接点。

[0623] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-2)表示:

[0624] 
(VI-2),

[0625] 其中:

[0626] Ab为结合至5T4的抗体;

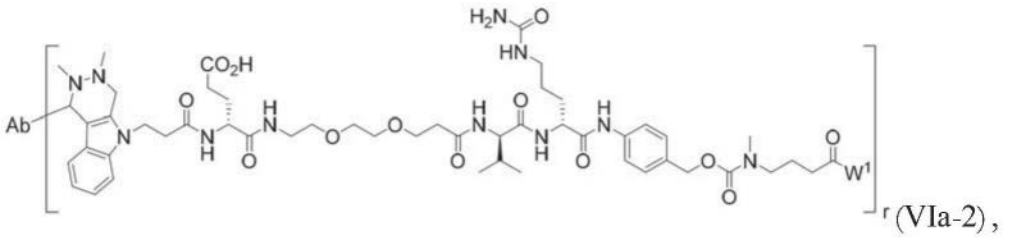
[0627] r为整数1至10;并且

[0628] $W^1$为药物。

[0629] 在一些实施方案中,$X^1$为N或C。

[0630] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0631] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-2)表示,其中$X^1$为C。因此,在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VIa-2)表示:

[0632] 
(VIa-2),

[0633] 其中:

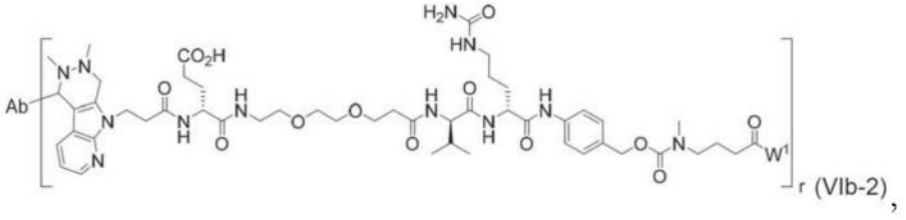
[0634] Ab为结合至5T4的抗体;

[0635] r为整数1至10;并且

[0636] $W^1$为药物。

[0637] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0638] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-2)表示,其中$X^1$为N。因此,在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VIb-2)表示:

[0639] 
(VIb-2),

[0640] 其中：

[0641] Ab为结合至5T4的抗体；

[0642] r为整数1至10;并且

[0643] $W^1$为药物。

[0644] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0645] 双重裂解接头

[0646] 在一些实施方案中,可裂解接头包括二个可裂解部分,诸如第一可裂解部分及第二可裂解部分。可裂解部分可经配置以使得需要裂解两个可裂解部分,以便例如在药物的所需作用靶点将药物自抗体分离或释放。例如,可通过首先使二个可裂解部分之一裂解且接着使二个可裂解部分中的另一者裂解来达成可裂解接头的裂解。在一些实施方案中,可裂解接头包括第一可裂解部分及阻碍第一可裂解部分裂解的第二可裂解部分。“阻碍裂解”意指未裂解的第二可裂解部分的存在减少第一可裂解部分裂解的可能性或基本上抑制第一可裂解部分的裂解,从而实质上减少可裂解接头的裂解量或阻止可裂解接头裂解。在实施方案中,未裂解的第二可裂解部分的存在可阻碍第一可裂解部分的酶和/或化学裂解。第二可裂解部分的存在对第一可裂解部分裂解的阻碍作用又实质上减少药物自抗体释放的量或阻止释放。例如,可实质上减少或阻止药物自抗体的过早释放,直至5T4-ADC位于药物的所需作用靶点处或附近。

[0647] 在一些实施方案中,第二可裂解部分阻碍第一可裂解部分的裂解,并且可裂解接头的裂解可通过首先使第二可裂解部分裂解且接着使第一可裂解部分裂解来达成。第二可裂解部分的裂解可减少或排除第一可裂解部分裂解的位阻,从而允许第一可裂解部分裂解。第一可裂解部分的裂解可引起可裂解接头解离或分离成如本文所述的两个或更多个部分,以使药物自5T4-ADC释放。在一些实施方案中,在未裂解的第二可裂解部分存在下,第一可裂解部分基本上不发生裂解。术语“基本上”在本文中意指在未裂解的第二可裂解部分存在下,第一可裂解部分发生约10％或更少的裂解,诸如在未裂解的第二可裂解部分存在下,第一可裂解部分发生约9％或更少、或约8％或更少、或约7％或更少、或约6％或更少、或约5％或更少、或约4％或更少、或约3％或更少、或约2％或更少、或约1％或更少、或约0.5％或更少、或约0.1％或更少的裂解。

[0648] 换言之,第二可裂解部分可防止第一可裂解部分裂解。在实施方案中,未裂解的第二可裂解部分的存在可防止第一可裂解部分裂解,并且从而基本上减少或防止药物自5T4抗体过早释放,直至5T4-ADC位于药物的所需作用靶点处或附近。因此,第二可裂解部分的裂解使第一可裂解部分暴露(例如将第一可裂解部分的保护基脱除),从而允许第一可裂解部分裂解,引起可裂解接头的裂解,此又使药物在药物的所需作用靶点自抗体分离或释放,如本文所述。在一些实施方案中,第二可裂解部分的裂解使第一可裂解部分暴露而随后裂解,但第二可裂解部分的裂解不引起且本身不引起可裂解接头的裂解(例如为了使可裂解接头裂解,仍需要第一可裂解部分裂解)。

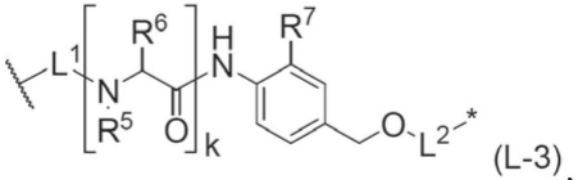
[0649] 适用于可裂解接头中的可裂解部分的实例包括化学可裂解部分及酶可裂解部分。例如,第一可裂解部分可为化学可裂解部分且第二可裂解部分可为化学可裂解部分,所述第二可裂解部分与第一可裂解部分可相同或不同。在其他实施方案中,第一可裂解部分可为酶可裂解部分且第二可裂解部分可为化学可裂解部分。在又其他实施方案中,第一可裂

解部分可为化学可裂解部分且第二可裂解部分可为酶可裂解部分。在又其他实施方案中，第一可裂解部分可为酶可裂解部分且第二可裂解部分可酶可裂解部分，所述第二可裂解部分与第一可裂解部分相同或不同。

[0650] 化学可裂解部分包括可在某些化学条件存在下裂解的可裂解部分。在一些实施方案中，化学可裂解部分包括可在某些化学条件存在下解离的一个或多个键，从而将可裂解部分分离成两个或更多个可分离部分。例如，化学可裂解部分在可引起化学可裂解部分水解的化学条件存在下可裂解，诸如酸性条件或碱性条件。在一些实施方案中，化学可裂解部分藉以裂解的化学条件可存在于所需作用靶点，诸如待自5T4-ADC释放的药物的所需作用靶点。在一些实施方案中，在化学可裂解部分的所需裂解位发现的化学条件未显著存在于其他区域中，诸如全血、血浆或血清中。从而可控制化学可裂解部分的裂解，使得实质性裂解发生于所需作用部位，而在其他区域中或在5T4-ADC到达所需作用部位之前不会显著发生裂解。

[0651] 在一些实施方案中，可裂解部分可为酶可裂解部分。酶可裂解部分为可经由酶的酶作用而分离成如上文所述的两个或更多个部分的可裂解部分。酶可裂解部分可为经由酶的酶作用而可裂解的任何可裂解部分，诸如(但不限于)肽、糖苷及其类似物。在一些实施方案中，使酶可裂解部分裂解的酶存在于所需作用靶点，诸如待自5T4-ADC释放的药物的所需作用靶点。在一些实施方案中，使酶可裂解部分裂解的酶未大量存在于其他区域中，诸如全血、血浆或血清中。从而可控制酶可裂解部分的裂解，使得实质性裂解发生于所需作用部位，而在其他区域中或在5T4-ADC到达所需作用部位(例如癌细胞)之前不会显著发生裂解。

[0652] 在一些实施方案中，接头L可为接头(L-3)：

[0653] 
(L-3)，

[0654] 其中：

[0655] 〰表示连至如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分(例如式IV、V和VI中的任一者)的连接点；

[0656] *表示连至$W^1$的连接点；

[0657] 各$R^5$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0658] 各$R^6$独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0659] $R^7$为可裂解部分；

[0660] k为整数1至10；

[0661] $L^1$包含-$(T^1\text{-}V^1)_a$-$(T^2\text{-}V^2)_b$-$(T^3\text{-}V^3)_c$-$(T^4\text{-}V^4)_d$-，

[0662] $L^2$包含-$(T^5\text{-}V^5)_e$-$(T^6\text{-}V^6)_f$-$(T^7\text{-}V^7)_g$-$(T^8\text{-}V^8)_h$-；

[0663] $T^1$、$T^2$、$T^3$、$T^4$、$T^5$、$T^6$、$T^7$和$T^8$各自独立地为共价键、$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、-$(CR^{13}OH)_m$-、P4A-$R^{12}$、缩醛、肼、二硫化物或酯；

[0664] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$、$V^5$、$V^6$、$V^7$和$V^8$各自独立地为共价键、-CO-、$-NR^{15}-$、$-NR^{15}(CH_2)_q-$、$-NR^{15}(C_6H_4)-$、$-CONR^{15}-$、$-NR^{15}CO-$、-C(O)O-、-OC(O)-、-O-、-S-、-S(O)-、$-SO_2-$、$-SO_2NR^{15}-$、$-NR^{15}SO_2-$或-P(O)OH-；

[0665] a、b、c、d、e、f、g和h中的每一者独立地为1或0；

[0666] m独立地为整数1至12；

[0667] n独立地为整数1至30；

[0668] p独立地为整数1至20；

[0669] q独立地为整数1至6；

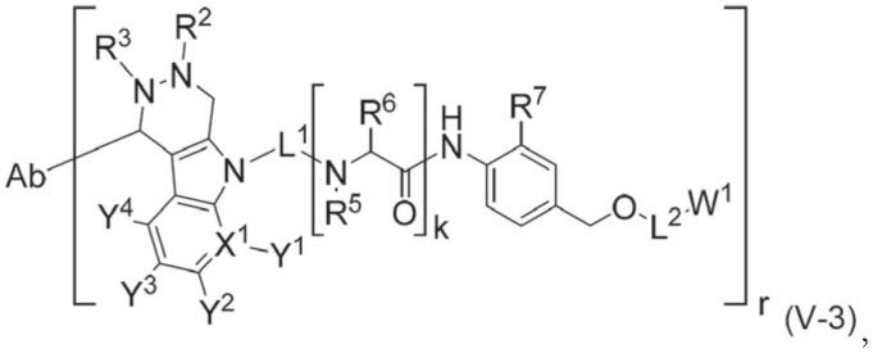
[0670] w独立地为整数1至20；

[0671] 各$R^{12}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分(例如聚乙二醇或经修饰的聚乙二醇)、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0672] 各$R^{13}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、芳基或取代的芳基；并且

[0673] 各$R^{15}$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、羧基、羧基酯、酰基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。

[0674] 在一些实施方案中，式(V)的5T4-ADC包括接头(L-3)。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(V-3)表示

[0675] 

(V-3)，

[0676] 其中：

[0677] Ab为结合至5T4的抗体；

[0678] r为整数1至10；

[0679] $X^1$为C或N；

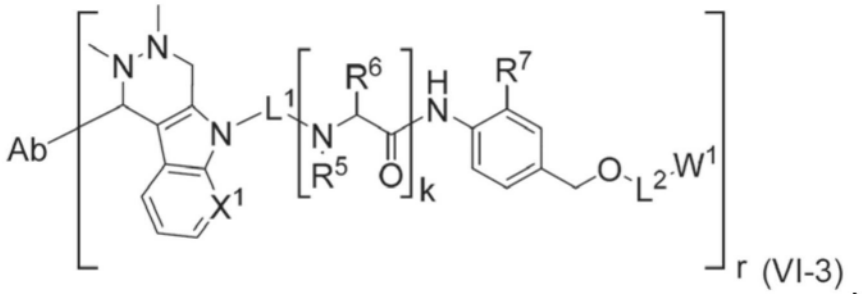
[0680] $W^1$为药物；

[0681] $R^2$、$R^3$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$如本文所定义，诸如关于式(V)所定义；并且

[0682] $L^1$、$L^2$、$R^5$、$R^6$、$R^7$和k如本文所定义，诸如关于接头(L-3)所定义。

[0683] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为整数1至2。

[0684] 在一些实施方案中，式(VI)的5T4-ADC包括接头(L-3)。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-3)表示

[0685] 

(VI-3),

[0686] 其中：

[0687] Ab为结合至5T4的抗体；

[0688] r为整数1至10；

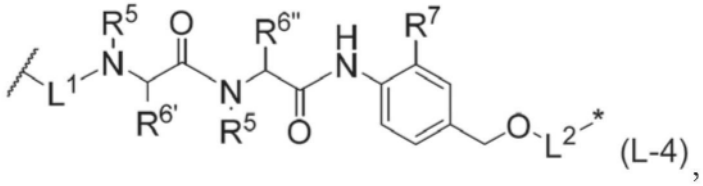
[0689] $X^1$为C或N；

[0690] $W^1$为药物；并且

[0691] $L^1$、$L^2$、$R^5$、$R^6$、$R^7$和k如本文所定义，诸如关于接头(L-3)所定义。

[0692] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0693] 在接头(L-3)的一些实施方案中，k为2。因此，接头L可为接头(L-4)：

[0694] 

(L-4),

[0695] 其中：

[0696] 〰表示连至如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分(例如式IV、V和VI中的任一者)的连接点；

[0697] *表示连至W的连接点；

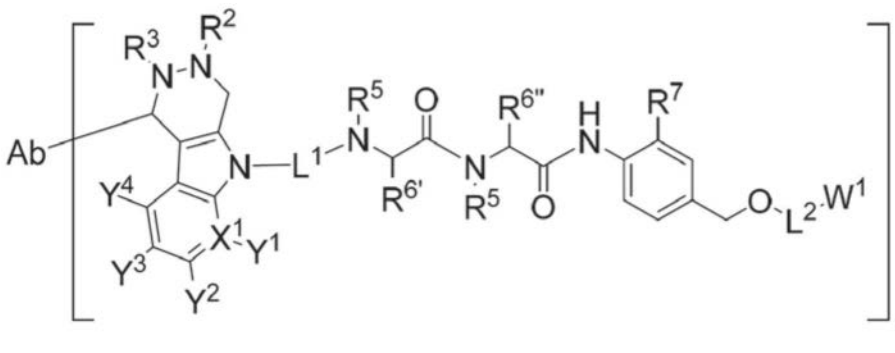
[0698] 各$R^5$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0699] $R^{6'}$和$R^{6''}$各自独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0700] $R^7$为可裂解部分；并且

[0701] $L^1$和$L^2$如本文所定义，诸如关于接头(L-3)所定义。

[0702] 在一些实施方案中，式(V)的5T4-ADC包括接头(L-4)。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(V-4)表示：

[0703] 

(V-4),

[0704] 其中：

[0705] Ab为结合至5T4的抗体；

[0706] r为整数1至10；

[0707] $X^1$为C或N；

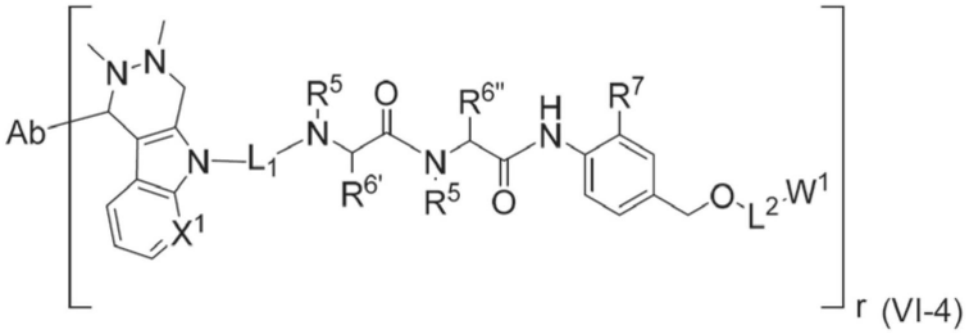
[0708] $W^1$为药物；

[0709] $R^2$、$R^3$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$如本文所定义，诸如关于式(V)所定义；

[0710] $L^1$、$L^2$、$R^5$、$R^{6'}$、$R^{6''}$和$R^7$如本文所定义，诸如关于接头(L-4)所定义。

[0711] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0712] 在一些实施方案中，式(VI)的5T4-ADC包括接头(L-4)。在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-4)表示

[0713] 


[0714] 其中：

[0715] Ab为结合至5T4的抗体；

[0716] r为整数1至10；

[0717] $X^1$为C或N；

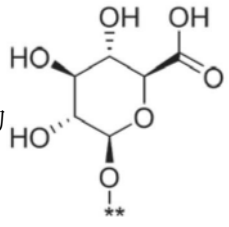
[0718] $W^1$为药物；

[0719] $L^1$、$L^2$、$R^5$、$R^{6'}$、$R^{6''}$和$R^7$如本文所定义，诸如关于接头(L-4)所定义。

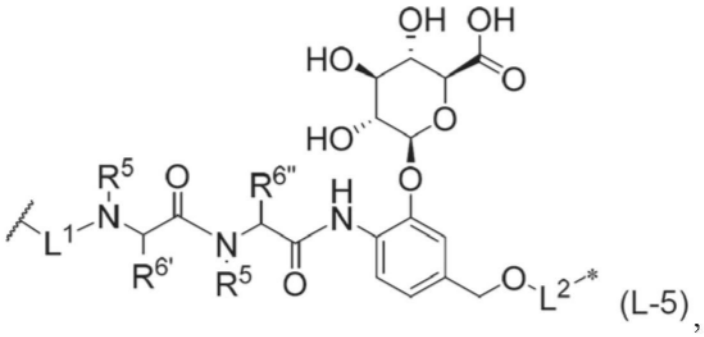
[0720] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0721] 在一些实施方案中，$R^7$为酶可裂解部分，其包含糖部分，诸如糖苷或糖基。在一些实施方案中，相较于不包括糖苷的可裂解接头，糖苷可有助于可裂解接头的亲水性的增强。糖苷可为适用于可裂解接头且可经由酶的酶作用裂解的任何糖苷。

[0722] $R^7$部分中的糖苷可经由糖苷键连接至5T4-ADC的其余部分。糖苷键可使糖苷经由各种类型的键连接至5T4-ADC，所述键诸如(但不限于)O-糖苷键(O-糖苷)、N-糖苷键(糖基胺)、S-糖苷键(硫苷)或C-糖苷键(C-糖苷或C-糖基)。在一些实施方案中，糖苷键为O-糖苷键(O-糖苷)。

[0723] 在一些实施方案中，$R^7$为 

，其中**表示连至本文所述的苯基的连接点，诸如式(VI-3)、(V-4)或(VI-4)。因此，接头L可为接头(L-5)：

[0724] 

[0725] 其中：

[0726] 〰表示连至如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分(例如式IV、V和VI中的任一者)的连接点；

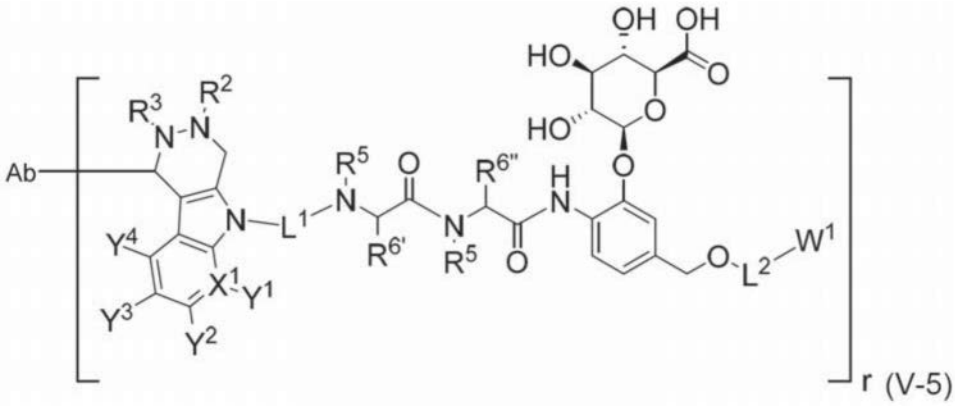
[0727] *表示连至$W^1$的连接点；

[0728] 各$R^5$独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0729] $R^{6'}$和$R^{6''}$各自独立地为烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；并且

[0730] $L^1$和$L^2$如本文所定义，诸如关于接头(L-3)所定义。

[0731] 在一些实施方案中，接头(L-5)连接至式(V)。在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(V-5)表示：

[0732] 

[0733] 其中：

[0734] Ab为结合至5T4的抗体；

[0735] r为整数1至10；

[0736] $X^1$为C或N；

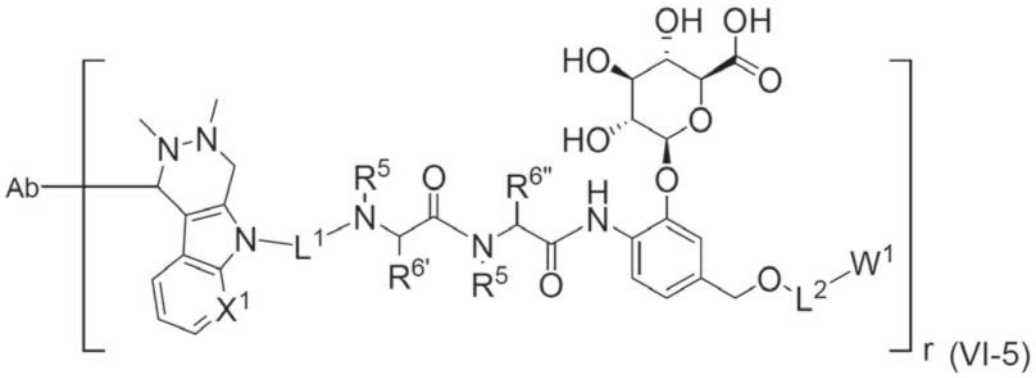
[0737] $W^1$为药物；

[0738] $R^2$、$R^3$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$如本文所定义，诸如关于式(V)所定义；

[0739] $L^1$、$L^2$、$R^5$、$R^{6'}$和$R^{6''}$如本文所定义，诸如关于接头(L-5)所定义。

[0740] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0741] 在一些实施方案中，式(VI)的5T4-ADC可包括接头(L-5)。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-5)表示：

[0742] 

[0743] 其中：

[0744] Ab为结合至5T4的抗体；

[0745] r为整数1至10；

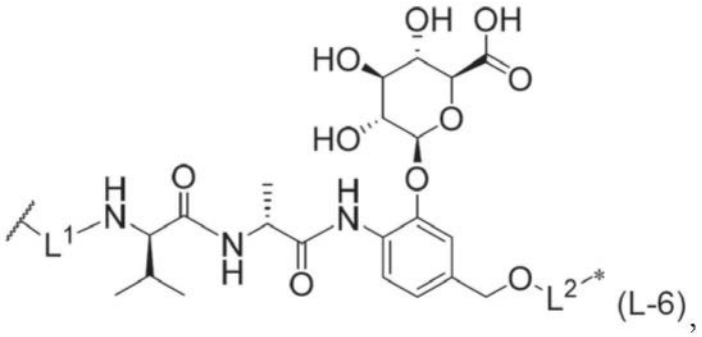
[0746] $X^1$为C或N；

[0747] $W^1$为药物；

[0748] $L^1$、$L^2$、$R^5$、$R^{6'}$和$R^{6''}$如本文所定义，诸如关于接头(L-5)所定义。

[0749] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0750] 在接头(L-5)的一些实施方案中，$R^5$为氢，$R^{6'}$为异丙基且$R^{6''}$为甲基。因此，在一些实施方案中，接头L可为接头(L-6)：

[0751] 

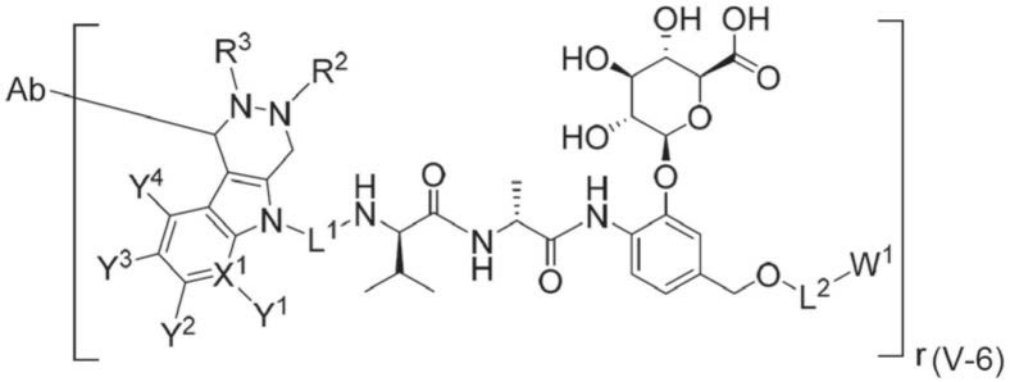
[0752] 其中：

[0753] 〰表示连至哒嗪-吡咯并偶合部分(例如式IV、V和VI中的任一者)的连接点；

[0754] *表示连至$W^1$的连接点；并且

[0755] $L^1$和$L^2$如本文所定义，诸如关于接头(L-5)所定义。

[0756] 在一些实施方案中，式(V)的5T4-ADC包括接头(L-6)。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(V-6)表示：

[0757] 

[0758] 其中：

[0759] Ab为结合至5T4的抗体；

[0760] r为整数1至10；

[0761] $X^1$为C或N；

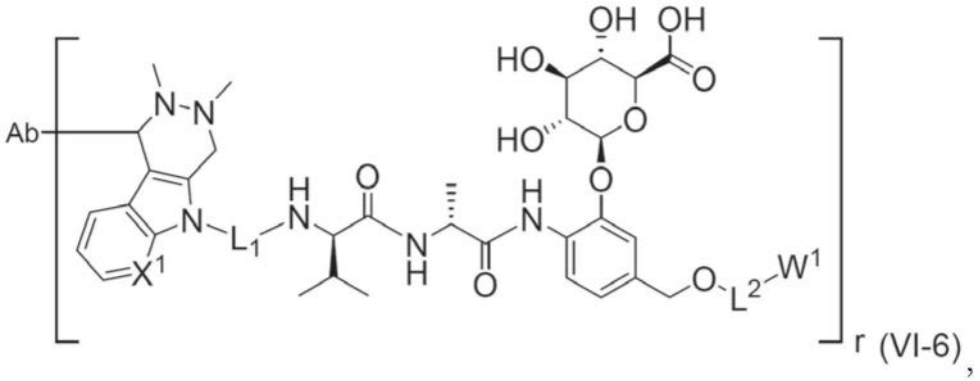
[0762] $R^2$、$R^3$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$如本文所定义，诸如关于式(V)所定义；

[0763] $W^1$为药物；并且

[0764] $L^1$和$L^2$如本文所定义，诸如关于接头(L-6)所定义。

[0765] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0766] 在一些实施方案中，式(VI)的5T4-ADC包括接头(L-6)。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-6)表示：

[0767] 

(VI-6)，

[0768] 其中：

[0769] Ab为结合至5T4的抗体；

[0770] r为整数1至10；

[0771] $X^1$为C或N；

[0772] $W^1$为药物；并且

[0773] $L^1$和$L^2$如本文所定义，诸如关于接头(L-6)所定义。

[0774] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0775] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(V-3)、(V-4)、(V-5)、(V-6)、(VI-3)、(VI-4)、(VI-5)或(VI-6)表示，其中：

[0776] $L^1$包含-$(T^1\text{-}V^1)_a$-$(T^2\text{-}V^2)_b$-$(T^3\text{-}V^3)_c$-$(T^4\text{-}V^4)_d$-；

[0777] $L^2$包含-$(T^5\text{-}V^5)_e$-$(T^6\text{-}V^6)_f$-$(T^7\text{-}V^7)_g$-$(T^8\text{-}V^8)_h$-；

[0778] $T^1$、$T^2$和$T^3$各自独立地为$C_1$-$C_{12}$烷基、$(PEG)_n$或$(AA)_p$；

[0779] $T^5$、$T^6$、$T^7$和$T^8$各自独立地为共价键、$C_1$-$C_{12}$烷基、取代的$C_1$-$C_{12}$烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基和取代的杂环基、$(EDA)_w$、$(PEG)_n$、$(AA)_p$、-$(CR^{13}OH)_m$-、P4A-$R^{12}$、缩醛、肼、二硫化物和酯；

[0780] $V^1$、$V^2$、$V^3$、$V^4$、$V^5$、$V^6$、$V^7$和$V^8$各自独立地为-C(=O)-或-$NR^{1111}$-；

[0781] a、b和c各自为1；

[0782] d为0且因此，$T^4$和$V^4$不存在；

[0783] e、f、g和h中的每一者独立地为1或0；

[0784] n为整数1至10；

[0785] p为整数1至10；并且

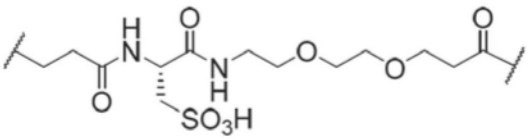
[0786] $R^{1111}$为氢、烷基、取代的烷基、聚乙二醇部分、芳基或取代的芳基。

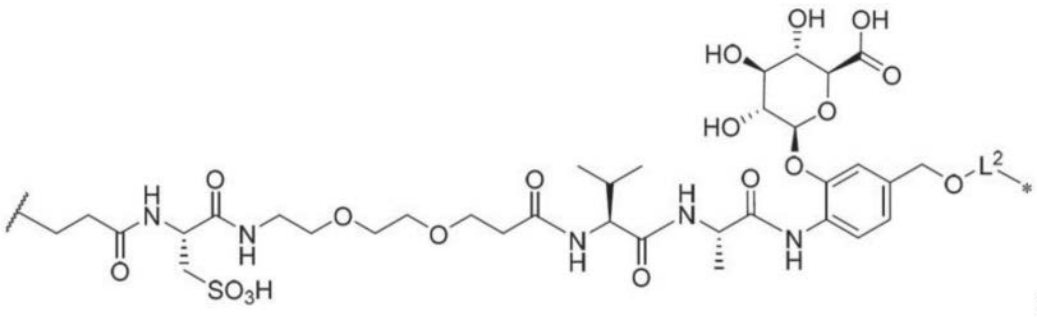
[0787] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(V-3)、(V-4)、(V-5)、(V-6)、(VI-3)、(VI-4)、(VI-5)或(VI-6)表示,其中$T^1$、$T^2$和$T^3$为$C_1$-$C_6$烷基、$(AA)_p$或$(PEG)_n$,并且p和n独立地为整数1至10。在一些实施方案中,p为1。在一些实施方案中,n为2。在一些实施方案中,$(AA)_p$可包括非天然存在的氨基酸,诸如半胱氨酸磺酸氨基酸。在一些实施方案中,$V^1$、$V^2$和$V^3$独立地为-C(=O)-或-$NR^{15}$-,其中$R^{15}$为氢。

[0788] 在本文所述的任何实施方案中,$L^1$可如下:

[0789] -($C_1$-$C_6$烷基)-$V^1$-$(AA)_p$-$V_2$-$(PEG)_n$-$V^3$

[0790] 其中$V^1$、$V^2$、$V^3$、AA、p和n如本文所述,诸如关于接头(L-3)所定义。在一些实施方案中,$V^1$、$V^2$和$V^3$为-C(=O)或-$NR^{15}$-,其中$R^{15}$为氢。在一些实施方案中,p为1且n为2。在一些实施方案中,$(AA)_p$可包括非天然存在的氨基酸,诸如半胱氨酸磺酸氨基酸。

[0791] 在一些实施方案中,$L^1$为,其中各〰表示在任何方向上连至接头中的相邻化学部分的连接点。因此,在一些实施方案中,接头L可为接头(L-7):

[0792] (L-7),

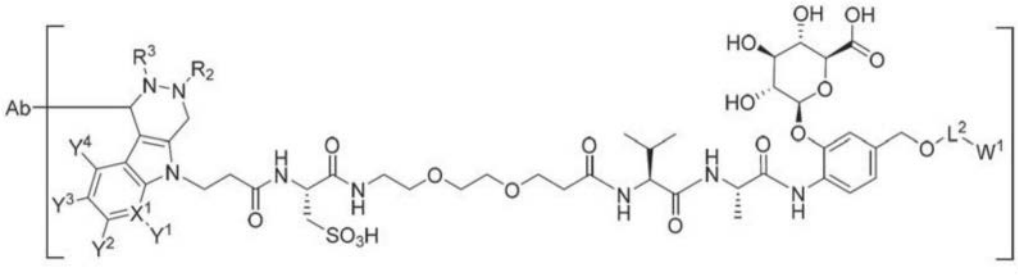
[0793] 其中:

[0794] 〰表示连至如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分(例如式IV、V和VI中的任一者)的连接点;

[0795] *表示连至$W^1$的连接点;并且

[0796] $L^2$如本文所定义,诸如关于接头(L-3)所定义。

[0797] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(V-7)表示:

[0798] r(V-7),

[0799] 其中:

[0800] Ab为结合至5T4的抗体;

[0801] r为整数1至10;

[0802] $X^1$为C或N;

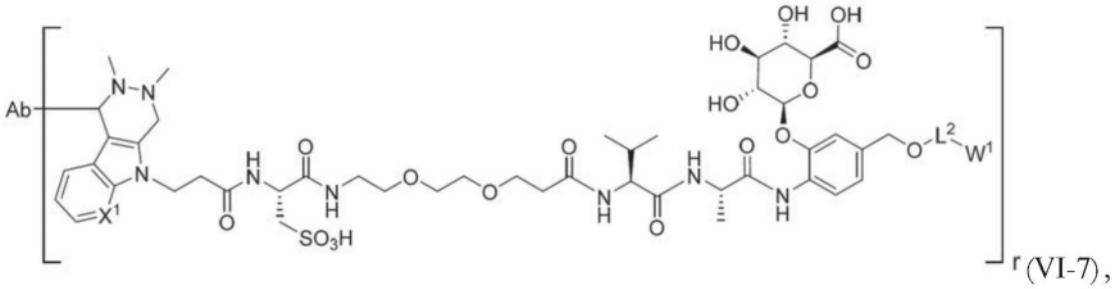
[0803] $R^2$、$R^3$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$如本文所定义,诸如关于式(V)所定义;

[0804] $W^1$为药物;并且

[0805] $L^2$如本文所定义,诸如关于接头(L-7)所定义。

[0806] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0807] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-7)表示:

[0808] 

(VI-7),

[0809] 其中:

[0810] Ab为结合至5T4的抗体;

[0811] r为整数1至10;

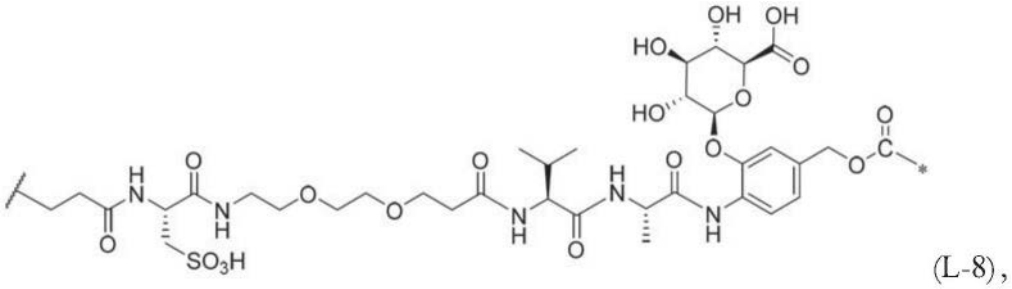
[0812] $X^1$为C或N;

[0813] $W^1$为药物;并且

[0814] $L^2$如本文所定义,诸如关于接头(L-7)所定义。

[0815] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0816] 在$L^2$的一些实施方案中,e为1,$T^5$为共价键,$V^5$为羰基,并且f、g和h中的每一者为0。在一些实施方案中,$L^2$为羰基(C=O)。因此,在一些实施方案中,接头L可为接头(L-8):

[0817] 

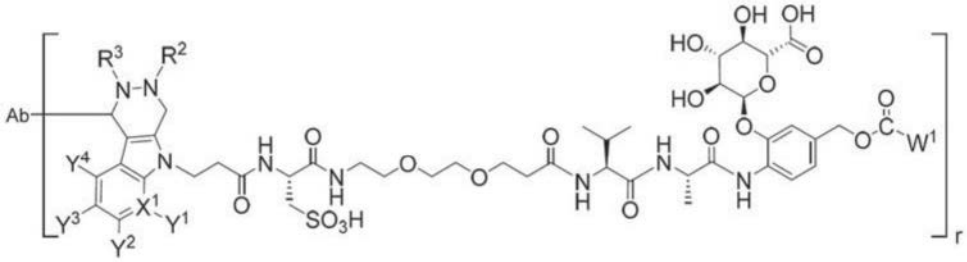
(L-8),

[0818] 其中:

[0819] 〰表示连至如本文所述的哒嗪-吡咯并偶合部分(例如式IV、V和VI中的任一者)的连接点;并且

[0820] *表示连至$W^1$的连接点。

[0821] 在一些实施方案中,式(V)的5T4-ADC中的接头(L)可为接头(L-8)。因此,在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(V-8)表示:

[0822] 

(V-8)

[0823] 其中：

[0824] Ab为结合至5T4的抗体；

[0825] r为整数1至10；

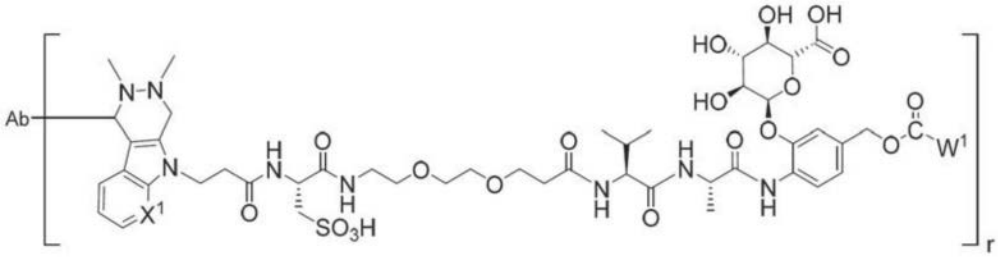
[0826] $X^1$为C或N；

[0827] $R^2$、$R^3$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$如本文所定义，诸如关于式(V)所定义；并且

[0828] $W^1$为药物。

[0829] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0830] 在一些实施方案中，式(VI)的5T4-ADC中的接头(L)可为接头(L-8)。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-8)表示：

[0831] 

(VI-8)，

[0832] 其中：

[0833] Ab为结合至5T4的抗体；

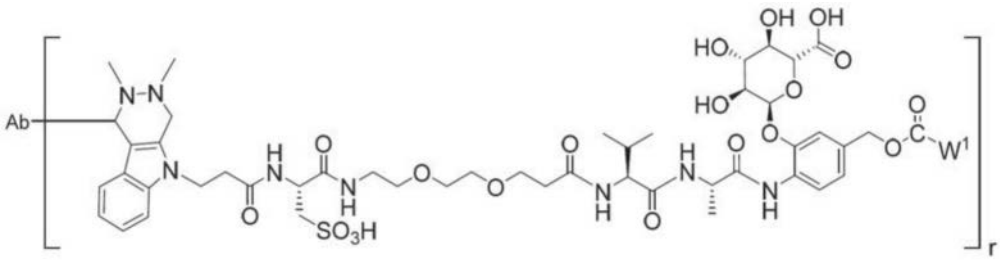
[0834] r为整数1至10；

[0835] $X^1$为C或N；并且

[0836] $W^1$为药物。

[0837] 在一些实施方案中，r为整数1至4。在一些实施方案中，r为1或2。

[0838] 在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VI-8)表示，其中$X^1$为C。因此，在一些实施方案中，5T4-ADC可由式(VIa-8)表示：

[0839] 

(VIa-8)，

[0840] 其中：

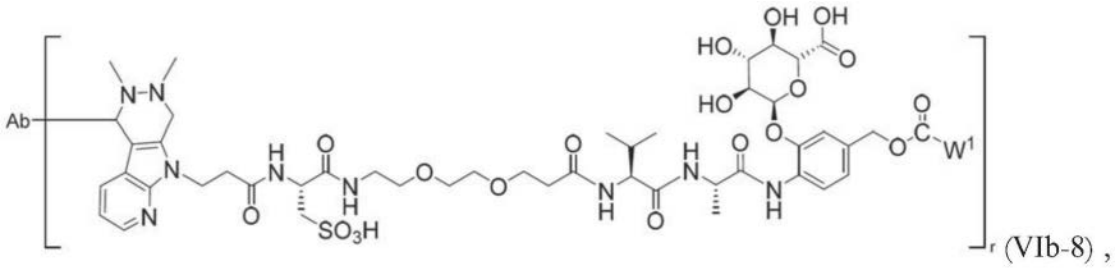
[0841] Ab为结合至5T4的抗体；

[0842] r为整数1至10；并且

[0843] $W^1$为药物。

[0844] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0845] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-8)表示,其中$X^1$为N。因此,在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VIb-8)表示:

[0846] 

(VIb-8),

[0847] 其中:

[0848] Ab为结合至5T4的抗体;

[0849] r为整数1至10;并且

[0850] $W^1$为药物。

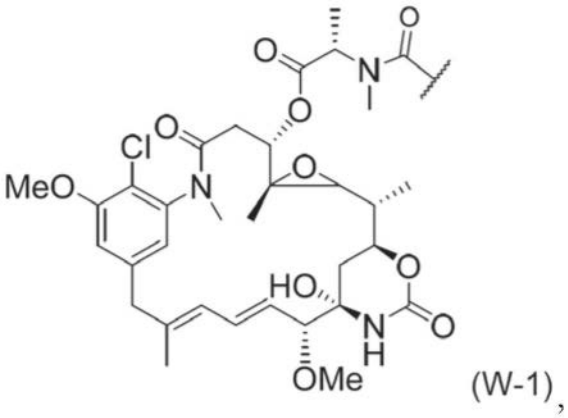
[0851] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0852] 药物

[0853] 适用于如本文所述的5T4-ADC中的药物(在本文提供的各式中表示为$W^1$)不受特别限制。适合药物的实例包括(但不限于)小分子药物,诸如癌症化学治疗剂。例如,药物可为影响微管的药剂。在一些实施方案中,药物为具有抗增殖活性的影响微管的药剂,诸如类美登素或奥瑞他汀。

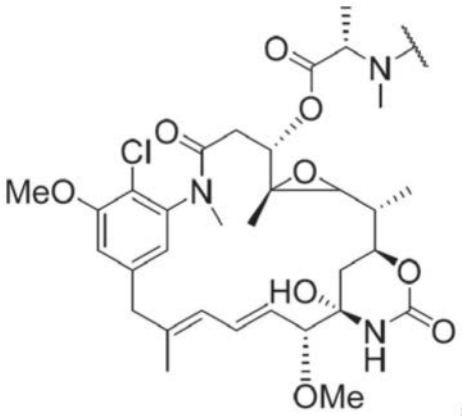
[0854] 美登素

[0855] 在一些实施方案中,药物为类美登素。例如,药物可为美登素,其具有以下结构(W-1):

[0856] 

(W-1),

[0857] 或其衍生物,诸如脱酰化美登素(W-1′):

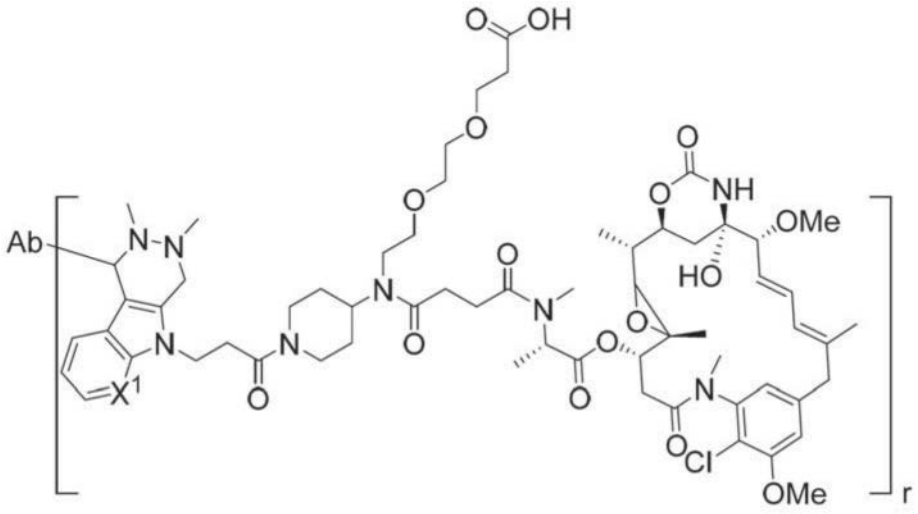
[0858] 

(W-1'),

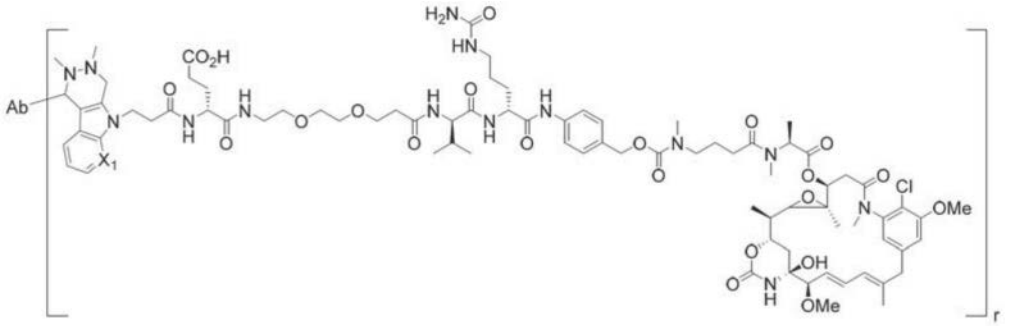
[0859] 其中〰指示类美登素的连至5T4-ADC中的接头的连接点。

[0860] 例如,在由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)和(VIb-8)表示的任一种5T4-ADC中,$W^1$可为类美登素,诸如W-1或W-1′的类美登素,其中〰指示类美登素与L或$L^2$之间的连接点。

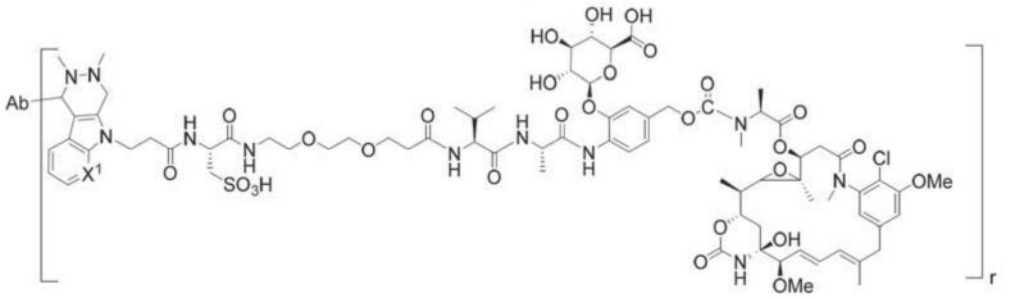
[0861] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-11)、式(VI-21)或式(VI-81)表示:

[0862] 

(VI-11),

[0863] 

(VI-21),



(VI-81),

[0864] 其中:

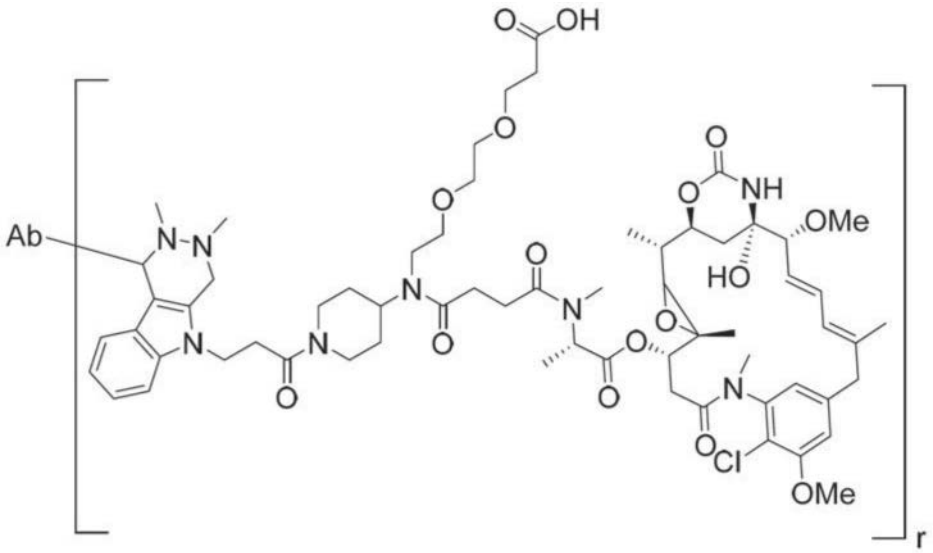
[0865] Ab为结合至5T4的抗体;

[0866] r为整数1至10;并且

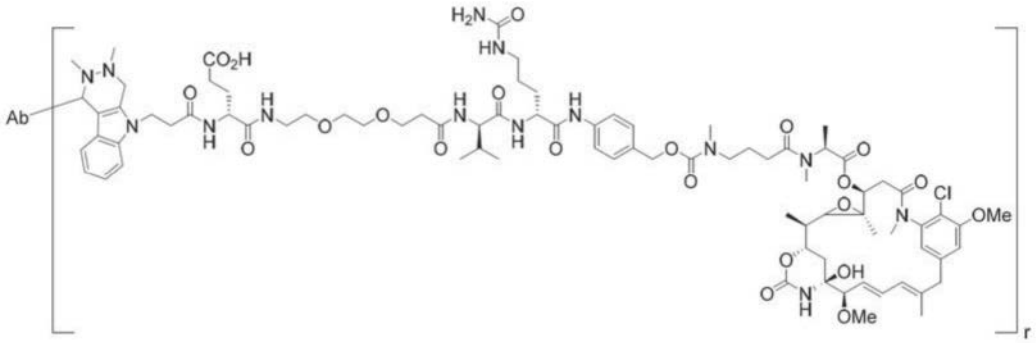
[0867] $X^1$为C或N。

[0868] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0869] 在一些实施方案中,$X^1$为C,并且5T4-ADC可由式(VIa-11)或式(VIa-21)表示:

[0870] 

(VIa-11),

[0871] 

(VIa-21),

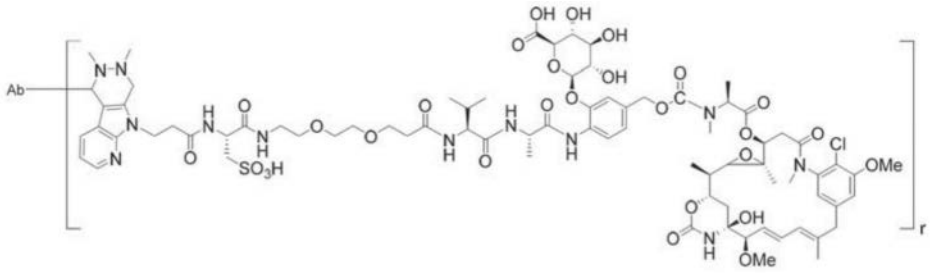
[0872] 其中:

[0873] Ab为结合至5T4的抗体;并且

[0874] r为整数1至10。

[0875] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0876] 在一些实施方案中,$X^1$为N,并且5T4-ADC可由式(VIb-81)表示:

[0877] 

(VIb-81),

[0878] 其中:

[0879] Ab为结合至5T4的抗体;并且

[0880] r为整数1至10。

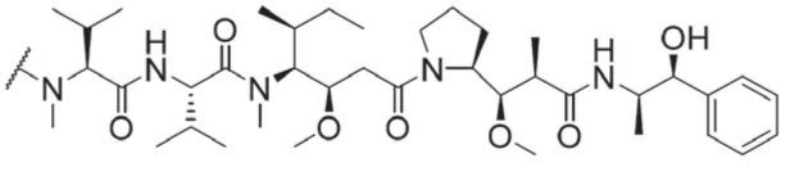
[0881] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0882] 在一些实施方案中,以上结构的类美登素可称为脱酰化美登素或脱酰基美登素。

[0883] 奥瑞他汀

[0884] 在一些实施方案中,药物为抗有丝分裂剂,诸如奥瑞他汀或其活性奥瑞他汀类似物或衍生物(例如单甲基奥瑞他汀D(MMAD)、单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF)和其类似物)。例如,在表示本文所述的5T4-ADC的任一式中,$W^1$可为MMAE、MMAF或MMAD。

[0885] 在一些实施方案中,$W^1$为MMAE,其具有以下结构(W-2):

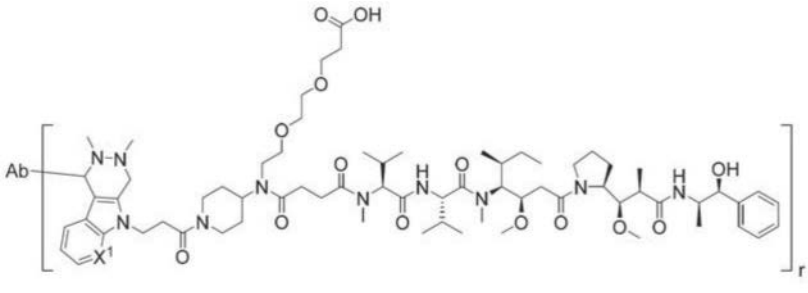
[0886] 

(W-2),

[0887] 其中〰指示5T4-ADC中的MMAE与接头L(诸如如本文所公开的$L^2$部分)之间的连接点。

[0888] 例如,MMAE可包括于包含接头(L-1)的5T4-ADC中。因此,在一些实施方案中,5T4-

ADC可由式(VI-12)表示：

[0889] 
(VI-12),

[0890] 其中：

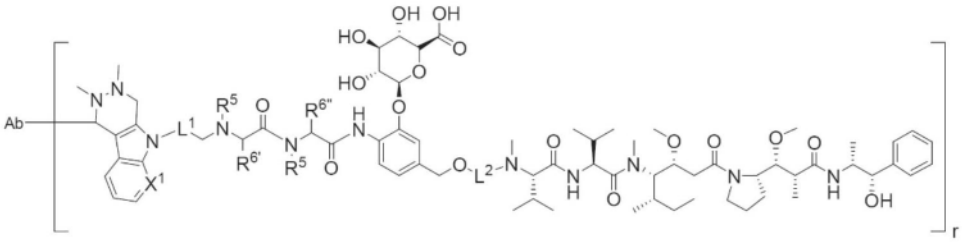
[0891] Ab为结合至5T4的抗体；

[0892] r为整数1至10;并且

[0893] $X^1$为C或N。

[0894] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0895] 在一些实施方案中,MMAE可包括于包含接头(L-5)的5T4-ADC中。因此,在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-52)表示：

[0896] 
(VI-52),

[0897] 其中：

[0898] Ab为结合至5T4的抗体；

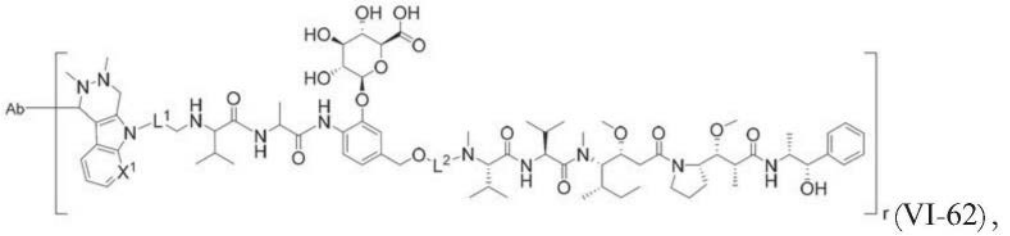
[0899] r为整数1至10；

[0900] $X^1$为C或N;并且

[0901] $L^1$和$L^2$如本文所定义,诸如关于接头(L-3)所定义。

[0902] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0903] 在一些实施方案中,MMAE可包括于包含接头(L-6)的5T4-ADC中。因此,在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-62)表示：

[0904] 
(VI-62),

[0905] 其中：

[0906] Ab为结合至5T4的抗体；

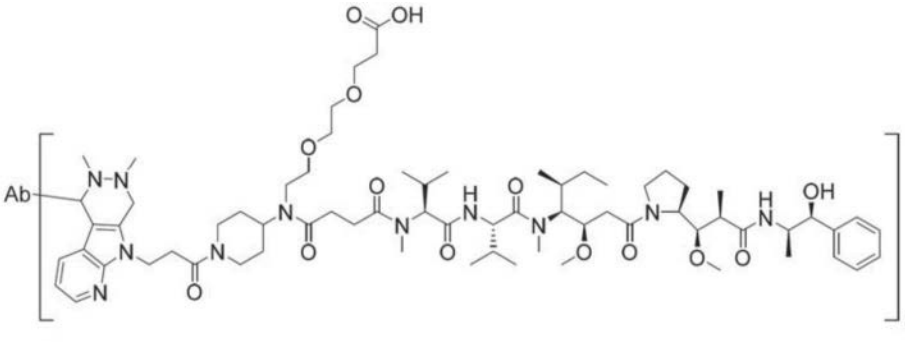
[0907] r为整数1至10；

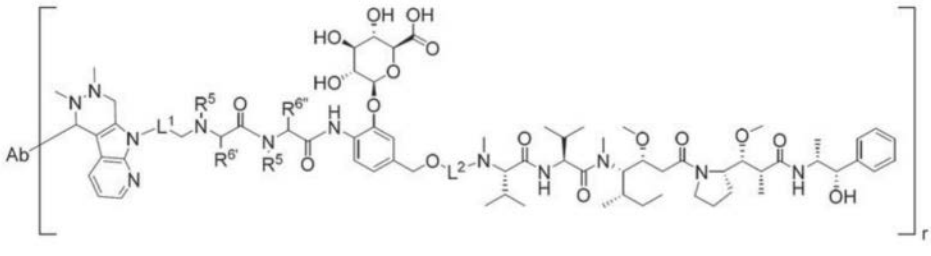
[0908] $X^1$为C或N;并且

[0909] $L^1$和$L^2$如本文所定义,诸如关于接头(L-3)所定义。

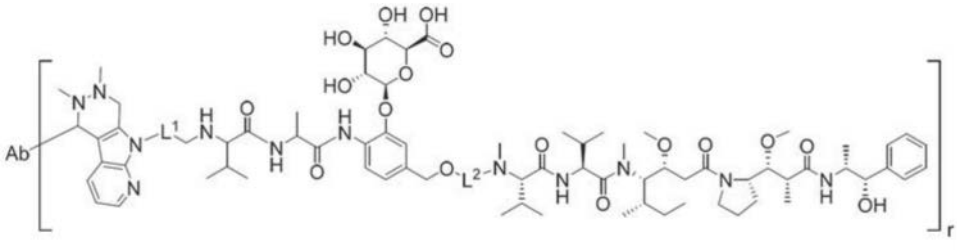
[0910] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0911] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VI-12)、(VI-52)和(VI-62)表示,其中$X^1$为N。在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(VIb-12)、式(VIb-52)或式(VIb-62)表示:

[0912] 
(VIb-12),


(VIb-52),

或

[0913] 
(VIb-62),

其中

[0914] Ab为结合至5T4的抗体;

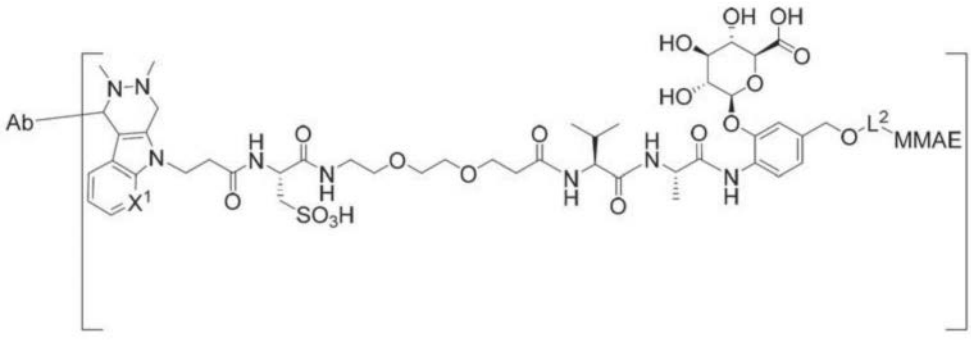
[0915] r为整数1至10;

[0916] $R^5$、$R^{6'}$、$R^{6''}$、$L^1$和$L^2$如本文所定义,诸如关于接头(L-5)所定义;并且

[0917] r为整数1至10。

[0918] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0919] 在一些实施方案中,MMAE可包括于包含接头(L-7)的5T4-ADC中。因此,5T4-ADC可由式(VIb-72)表示:

[0920] 
(VIb-72),

[0921] 其中:

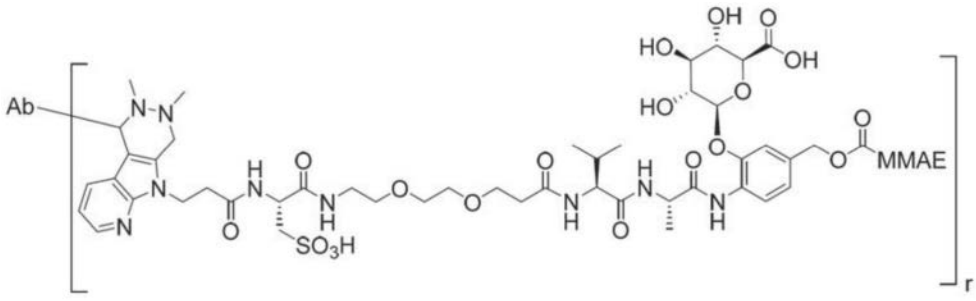
[0922] Ab为结合至5T4的抗体;

[0923] r为整数1至10;并且

[0924] $L^2$如本文所定义,诸如关于接头(L-6)所定义。

[0925] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0926] 在一些实施方案中,MMAE可包括于包含接头(L-8)的5T4-ADC中。因此,5T4-ADC可由式(VIb-82)表示:

[0927] 

(VIb-82),

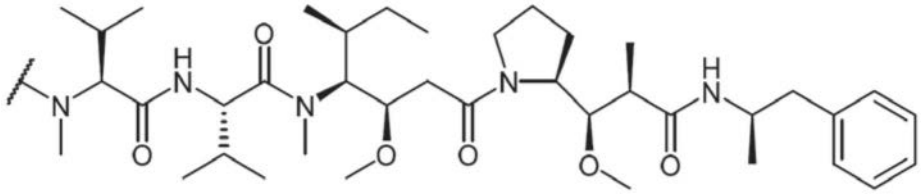
[0928] 其中

[0929] Ab为结合至5T4的抗体;并且

[0930] r为整数1至10。

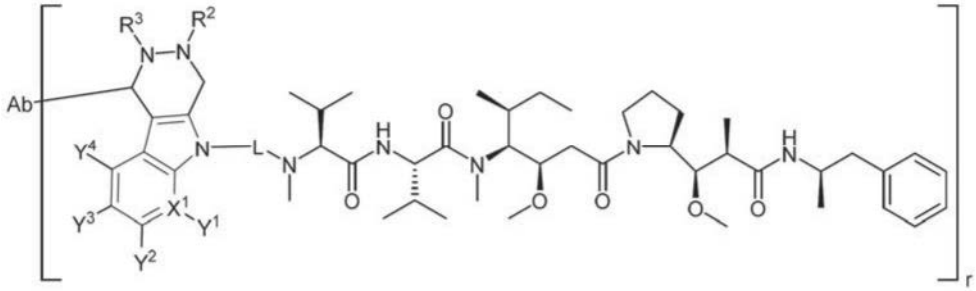
[0931] 在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0932] 在一些实施方案中,$W^1$为MMAE,其具有以下结构(W-3):

[0933] 
(W-3),

[0934] 其中〰指示5T4-ADC中的MMAF与接头之间的连接点。

[0935] 例如,MMAF可包括于5T4-ADC中,例如如下:

[0936] 


[0937] 其中:

[0938] Ab为结合至5T4的抗体;

[0939] r为整数1至10;并且

[0940] $Y^1$、$Y^2$、$Y^3$、$Y^4$、$X^1$、$R^2$、$R^3$和L如本文所定义,诸如关于式(V)所定义。

[0941] 在一些实施方案中,L是选自接头(L-1)、(L-2)、(L-3)、(L-4)、(L-5)、(L-6)、(L-7)和(L-8)。在一些实施方案中,$X^1$为C或N。在一些实施方案中,$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$中的每一者为氢。在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$独立地为$C_1$-$C_6$烷基,诸如甲基。在一些实施方案中,r为整数1至10。在一些实施方案中,r为整数1至4。在一些实施方案中,r为1或2。

[0942] 总结章节

[0943] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为本文所公开的结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含VH,所述VH包含与如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的CDR一致或基本上一致的一个或多个(诸如一个、二个或三个)CDR。另外或可替代地,在一些实施方案中,抗体包含VL,所述VL包含与如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的CDR一致或基本上一致的一个或多个(诸如一个、二个或三个)CDR。

[0944] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为本文所公开的结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含与如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的VH一致或基本上一致的VH。另外或可替代地,在一些实施方案中,抗体包含与如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的VL一致或基本上一致的VL。

[0945] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(V1-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(V1-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL;或(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的VL;或(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的VL。

[0946] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为本文所公开的结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含(a)VH区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:1、7、12、13和18中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1;(2)包含SEQ ID NO:2、8、14、19和24中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:3、9、15和20中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:6、17和23中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3。

[0947] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、

(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含(i)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2、包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或(ii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或(iii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3;或(iv)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:17的VL CDR3;或(v)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:18的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:19的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的VL CDR3;或(vi)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的VL CDR3。

[0948] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体且包含(a)VH区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:27、31、34、35和39中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1;(2)包含SEQ ID NO:28、32、36、40和43中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:29、33、37和41中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:30、38和42中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3。

[0949] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含(i)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2

以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或(ii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:33的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或(iii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:34的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3;或(iv)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的VL CDR3;或(v)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:41的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:42的VL CDR3;或(vi)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:43的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的VL CDR3。

[0950] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含(a)VH区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:46、50、53、13和57中的任一者的氨基酸序列的VH CDR1;(2)包含SEQ ID NO:47、51、54、58和61中的任一者的氨基酸序列的VH CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:48、52、55和59中的任一者的氨基酸序列的VH CDR3;以及(b)VL区,其包含:(1)包含SEQ ID NO:4、10、16和21中的任一者的氨基酸序列的VL CDR1;(2)包含SEQ ID NO:5、11和22中的任一者的氨基酸序列的VL CDR2;以及(3)包含SEQ ID NO:49、56和60中的任一者的氨基酸序列的VL CDR3。

[0951] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体且包含(i)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;(ii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:50的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:51的VH

CDR2、包含氨基酸序列SEQ ID NO:52的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:10的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或(iii)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:53的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:47的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3;或(iv)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的VH CDR1及包含氨基酸序列SEQ ID NO:54的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:55的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:56的VL CDR3;或(v)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:57的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:58的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:59的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:21的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:22的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:60的VL CDR3;或(vi)VH区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:46的VH CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:61的VH CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:48的VH CDR3;和VL区,其包含:包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的VL CDR1、包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的VL CDR2以及包含氨基酸序列SEQ ID NO:49的VL CDR3。

[0952] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体进一步包含SEQ ID NO:25、26、44、45、62以及63中的任一者中所示的框架1(FR1)、框架2(FR2)、框架3(FR3)和/或框架4(FR4)序列。

[0953] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-1 2)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-1 2)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4且包含人框架序列的抗体。

[0954] 在一些实施方案中,5T4-ADC可由式(IV)、(V)、(VI)、(VI-1)、(VIa-1)、(VIb-1)、(VI-2)、(VIa-2)、(VIb-2)、(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)、(VIb-8)、(VI-11)、(VI-21)、(VI-81)、(VIa-11)、(VIa-21)、(VIb-81)、(VI-12)、(VI-52)、(VI-62)、(VIb-12)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)表示,其中Ab为结合至5T4的抗体。在一些实施方案中,抗体包含:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的VL;或(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:44的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:45的VL;或(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:62的VH和包含氨基酸序列SEQ ID NO:63的VL。

[0955] 抗体-接头-药物缀合

[0956] 在一些实施方案中,抗体可在与接头-药物缀合之前被修饰。抗体的修饰可产生经修饰的抗体,其含有适合与接头-药物缀合的一个或多个反应性基团。

[0957] 在一些实施方案中,抗体可在一个或多个氨基酸残基处被修饰以提供适合与接头-药物缀合的一个或多个反应性基团。例如,引入多肽中的羰基可选择性地与α-亲核体(诸如携有氨基氧基和酰肼的化合物)反应。对蛋白质上的羰基官能团具选择性的化学物质及增强的动力学、部位选择性及缀合物稳定性可使得生物缀合物改善。

[0958] 在一些实施方案中,抗体可被修饰以包括反应性醛基(例如反应性醛)。反应性醛可包括于"醛标签"或"ald标签"中,所述标签意指来源于硫酸酯酶基序的氨基酸序列,所述氨基酸序列已通过产甲酰基甘氨酸酶(FGE)的作用转化而含有2-甲酰基甘氨酸残基(在本文中称为"fGly")。通过FGE产生的fGly残基在文献中也称为"甲酰基甘氨酸"。换言之,术语"醛标签"在本文中用于指氨基酸序列,其包含"转化"的硫酸酯酶基序(即,其中半胱氨酸或丝氨酸残基已通过FGE的作用转化成fGly的硫酸酯酶基序,例如L(fGly)TPSR(SEQ ID NO:102))。转化的硫酸酯酶基序可来源于包含"未转化"的硫酸酯酶基序的氨基酸序列(即,其中半胱氨酸或丝氨酸残基尚未通过FGE转化成fGly、但能够转化的硫酸酯酶基序,例如具有序列:L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)的未转化的硫酸酯酶基序)。在产甲酰基甘氨酸酶(FGE)对硫酸酯酶基序的作用的上下文中使用的"转化"是指硫酸酯酶基序中的半胱氨酸或丝氨酸残基被生物化学修改成甲酰基甘氨酸(fGly)残基(例如Cys修改成fGly,或Ser修改成fGly)。如本文所用,醛标记的抗体是指其中半胱氨酸或丝氨酸残基已被修饰以形成甲酰基甘氨酸残基的抗体。醛标签及其用于部位特异性蛋白质修饰的其他方面描述于美国7,985,783及美国申请公布第2011/0117621号中,所述文献的公开内容各自以引用的方式并入本文中。

[0959] 为了包括fGly而使多肽发生的转化可通过基于细胞(体内)或游离方法(体外)完成。类似地,为了产生适于缀合的多肽而对多肽的修饰(例如为了产生含有适于缀合的反应性基团的多肽而进行的修饰)可通过基于细胞(体内)或游离方法(体外)完成。

[0960] 抗体的氨基酸序列可被修饰以包括含有丝氨酸或半胱氨酸残基的硫酸酯酶基序,所述丝氨酸或半胱氨酸残基能够在体内(例如在细胞中翻译含有醛标签的蛋白质时)或体外(例如通过使含有醛标签的蛋白质与FGE在游离系统中接触)通过FGE的作用转化(氧化)成FGly残基。用于产生5T4-ADC的5T4抗体包括至少一个Ig恒定区,例如Ig重链恒定区(例如至少CH1结构域;至少CH1和CH2结构域;CH1、CH2以及CH3结构域;或CH1、CH2、CH3和CH4结构域),或Ig轻链恒定区。

[0961] 硫酸酯酶基序可引入抗体中的任何方便部位。如本文中所指出,在一些实施方案中,目标多肽的原生氨基酸序列的修饰程度降至最低,以使插入、缺失、经取代(替换)和/或添加(例如N端或C端添加)的氨基酸残基数目降至最低。使目标抗体的氨基酸序列的修饰程度最小化可使此类修饰对抗体功能和/或结构可具有的影响降至最低。

[0962] 在一些实施方案中,醛标记的抗体包含醛标记的Ig重链恒定区(例如至少CH1结构域;至少CH1和CH2结构域;CH1、CH2以及CH3结构域;或CH1、CH2、CH3和CH4结构域)。醛标记的Ig重链恒定区可包括IgA、IgM、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型重链或其任何同种异型变体的重链恒定区序列,例如人重链恒定区序列或小鼠重链恒定区序列、杂合体重链恒定区、合成重链恒定区,或共有重链恒定区序列及其类似序列,所述序列经修饰以包括至少一个硫酸酯酶基序,所述硫酸酯酶基序可通过FGE修饰以产生经fGly修饰的Ig多肽。Ig重链的同种异型变体在本领域中已知。参见例如Jefferis和Lefranc(2009)MAbs1:4。

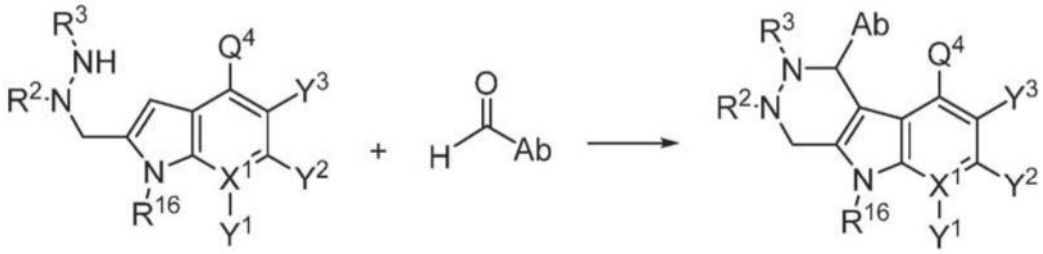
[0963] 在一些实施方案中,醛标记的抗体包含醛标记的Ig轻链恒定区。醛标记的Ig轻链恒定区可包括K轻链、λ轻链的恒定区序列,例如K或λ轻链恒定区、杂合体轻链恒定区、合成轻链恒定区或共有轻链恒定区序列及其类似序列,所述恒定区序列经修饰以包括至少一个硫酸酯酶基序,所述硫酸酯酶基序可通过FGE修饰以产生fGly修饰的抗体。

[0964] 或者,经分离的未修饰多肽可在缺乏适合酶的宿主细胞中重组产生之后或通过合成产生之后加以分离。接着可使经分离的多肽与适合酶在对多肽达成所需修饰以包括fGly的条件下接触。可通过本领域中已知的方法(例如使用加热、调节pH、离液剂(例如尿素及其类似物)、有机溶剂(例如烃类:辛烷、苯、氯仿)和其类似物)使多肽展开且使变性蛋白质与适合酶接触。接着可使经修饰的多肽在适合条件下再折叠。

[0965] 在一些实施方案中,可通过fGly与接头-药物上的偶合部分(诸如本文所述的肼基-吡咯并偶合部分)的反应而使含有fGly残基的经修饰抗体与接头-药物缀合。例如,可自产生来源(例如产生重组宿主细胞的来源、合成产生的来源)分离出含fGly抗体,并且与含有反应性搭配物的药物或其他部分(例如可检测标记)在适于达成药物或其他部分与5T4抗体缀合的条件下接触。例如,含有反应性搭配物的药物或其他部分可包括缀合部分(例如本文所述的肼基-吡咯并偶合部分)。可使含有肼基吡咯并的药物与抗体反应以产生如本文所述的5T4-ADC。

[0966] 用于使抗体与哒嗪-吡咯并偶合部分偶合的通用方案如下所示。

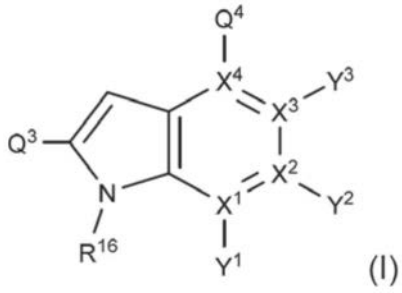
[0967]




azaHIPS 具有fGly残基的抗体 式(III)

[0968] 在本文中可互换地称为氮杂-肼基-异-皮克特-施彭格勒(aza-hydrazino-iso-Pictet-Spengler,azaHIPS)偶合部分的肼基-吡咯并偶合部分在与甲酰基-甘氨酸缀合后形成哒嗪-吡咯并偶合部分,诸如式(III)所示。5T4抗体可包括与azaHIPS偶合部分反应的2-甲酰基甘氨酸残基(fGly),从而将二者缀合在一起。为了产生5T4-ADC,可使药物直接地或间接地(例如经由接头部分)与azaHIPS部分在azaHIPs部分的任何位置(例如$R^{16}$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$或$Q^4$)偶合。$R^2$和$R^3$可各自独立地为任何所需取代基,诸如(但不限于)氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基。$R^{16}$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$及$Q^4$可如本文所述,诸如关于式(I)或式(II)所述。

[0969] 下式(I)表示肼基-吡咯并偶合部分,其可用于使结合至5T4的抗体与药物在本文所述的任何5T4-ADC中连接。

[0970] 

[0971] 其中：

[0972] $R^{16}$、$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$及$Q^4$中的一者为-L-$W^1$，

[0973] 其中$Q^3$及$Q^4$中的一者为-$(CH_2)_mNR^3NHR^2$；

[0974] m为0或1；

[0975] $R^2$和$R^3$各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；或$R^2$与$R^3$以环形连接以形成5元或6元杂环基；

[0976] 若$Q^3$不为-$(CH_2)_mNR^3NHR^2$，则$Q^3$为$Y^4$；

[0977] 若$Q^4$不为-L-$W^1$或-$(CH_2)_mNR^3NHR^2$，则$Q^4$为$Y^4$；

[0978] $X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地为C、N、O或S，其中$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的一者任选地不存在；

[0979] $Y^1$、$Y^2$、$Y^3$(若不为-L-$W^1$)和$Y^4$各自独立地为氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；或$Y^1$与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$或$Y^4$与$Y^3$(若$Q^4$为$Y^4$)可任选地以环形连接；

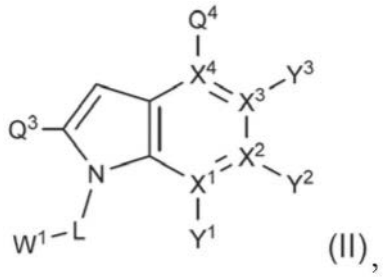
[0980] 若$R^{16}$不为L-$W^1$，则$R^{16}$为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；

[0981] L为如本文所述的接头；并且

[0982] $W^1$为药物。

[0983] 式(I)先前已描述于WO 2015/081282中，所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0984] 在一些实施方案中，肼基-吡咯并偶合部分可由式(II)表示：

[0985] 

[0986] 其中：

[0987] $Q^3$及$Q^4$中的一者为[-$(CH_2)_mNR^3NR^2$]；

[0988] $Q^3$及$Q^4$中的另一者为$Y^4$;

[0989] m为0或1;并且

[0990] $R^2$和$R^3$各自独立地为氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;或$R^2$与$R^3$以环形连接以形成5元或6元杂环基;

[0991] $X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$各自独立地为C、N、O或S,其中$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的一者任选地不存在;

[0992] $Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$各自独立地为氢、卤素、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、烷氧基、取代的烷氧基、氨基、取代的氨基、羧基、羧基酯、酰基、酰氧基、酰基氨基、氨基酰基、烷基酰胺、取代的烷基酰胺、磺酰基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基;或$Y^1$与$Y^2$、$Y^2$与$Y^3$或$Y^3$与$Y^4$(若$Q^4$为$Y^4$)可任选地以环形连接;

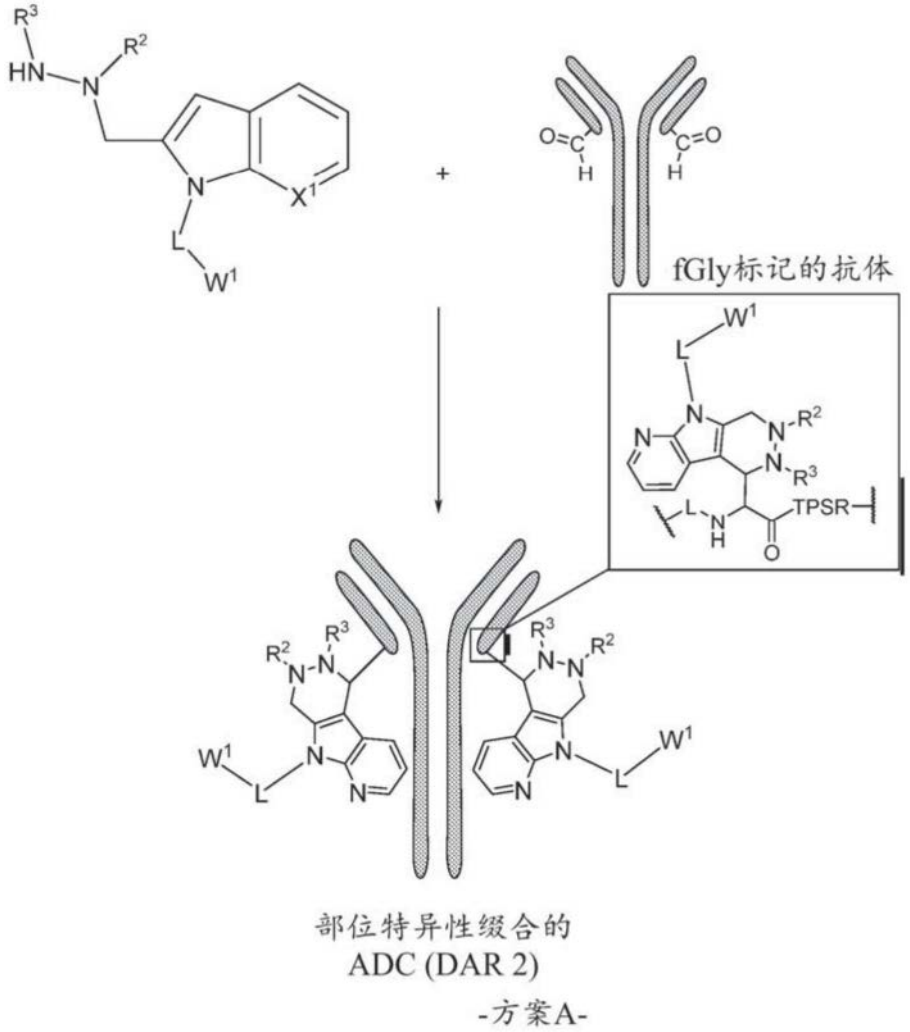
[0993] L为如本文所述的接头;并且

[0994] $W^1$为药物。

[0995] 式(II)先前已描述于WO 2015/081282以及WO 2020/154437中,所述文献各自以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,m为0或1且$R^2$和$R^3$各自为烷基。例如,$R^2$和$R^3$可各自独立地为$C_1$-$C_{10}$烷基(例如$C_1$-$C_6$烷基)。在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$各自独立地为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基。在一些实施方案中,$R^2$和$R^3$中的至少一者为甲基。在一些实施方案中,$R^2$与$R^3$均为甲基。在一些实施方案中,$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的每一者各自独立地为C或N。在一些实施方案中,$X^1$为C。在一些实施方案中,$X^1$为N。在一些实施方案中,$X^2$为C或N。在一些实施方案中,$X^2$为C。在一些实施方案中,$X^3$为C或N。在一些实施方案中,$X^3$为C。在一些实施方案中,$X^4$为C或N。在一些实施方案中,$X^4$为C。$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$的各种组合为可能的。例如,在一些实施方案中,$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的每一者为C。在其他实施方案中,$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$中的三者为C且$X^1$、$X^2$、$X^3$和$X^4$之一为N。在一些实施方案中,$Y^1$、$Y^2$、$Y^3$和$Y^4$中的每一者为氢。

[0996] 用于制备5T4-ADC的例示性方案显示于方案A中:

[0997]

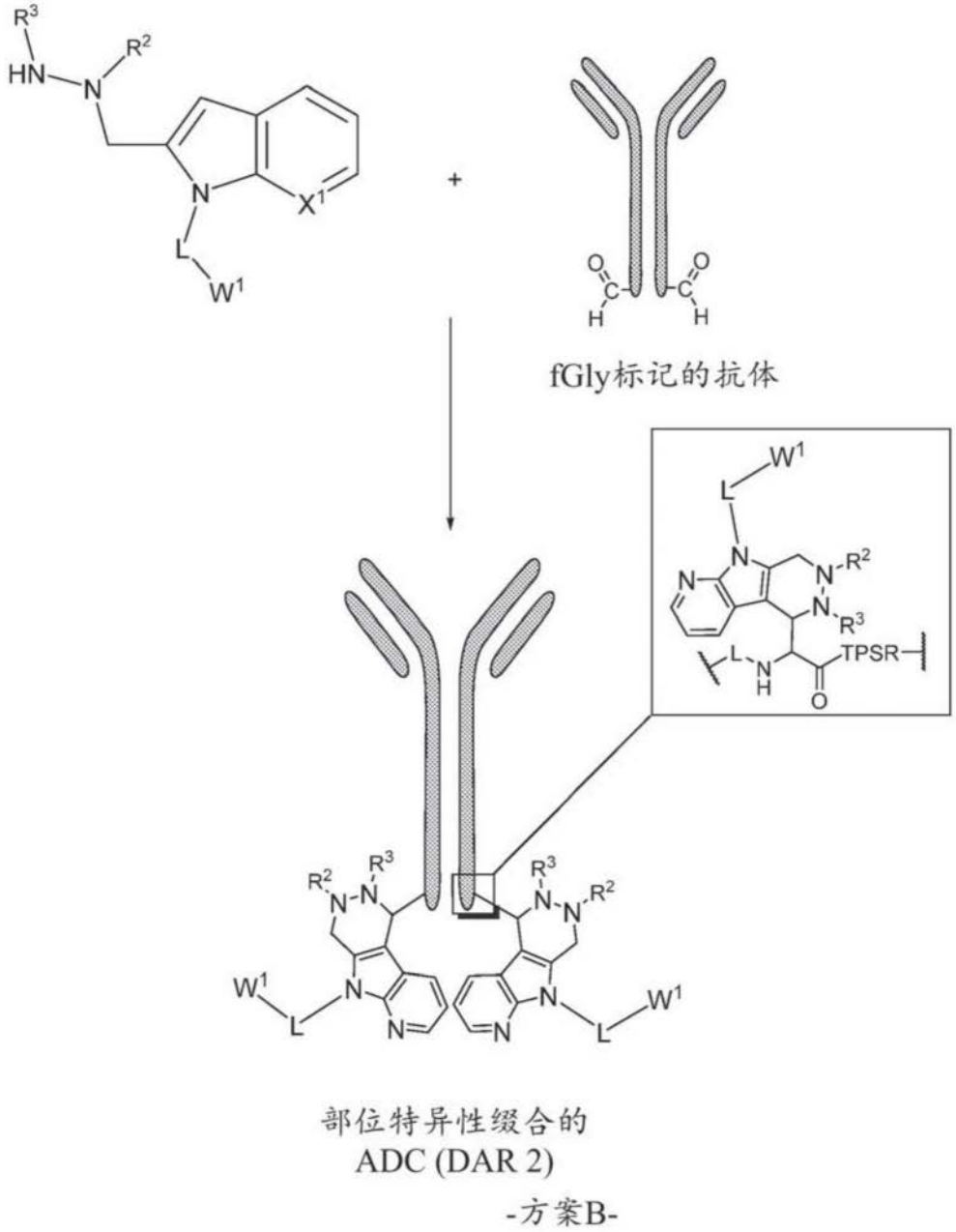



-方案A-

[0998] 在方案A中,使接头-药物与缀合至5T4的抗体结合。5T4抗体在轻链的恒定区中具有识别基序,例如L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序(例如SEQ ID NO:90、94、98中)。L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序的半胱氨酸残基可转化成甲酰基甘氨酸(fGly)并随后与azaHIPs部分经由皮克特-施彭格勒反应(Pictet-Spengler reaction)缀合。

[0999] 用于制备5T4-ADC的例示性方案显示于方案B中:

[1000]

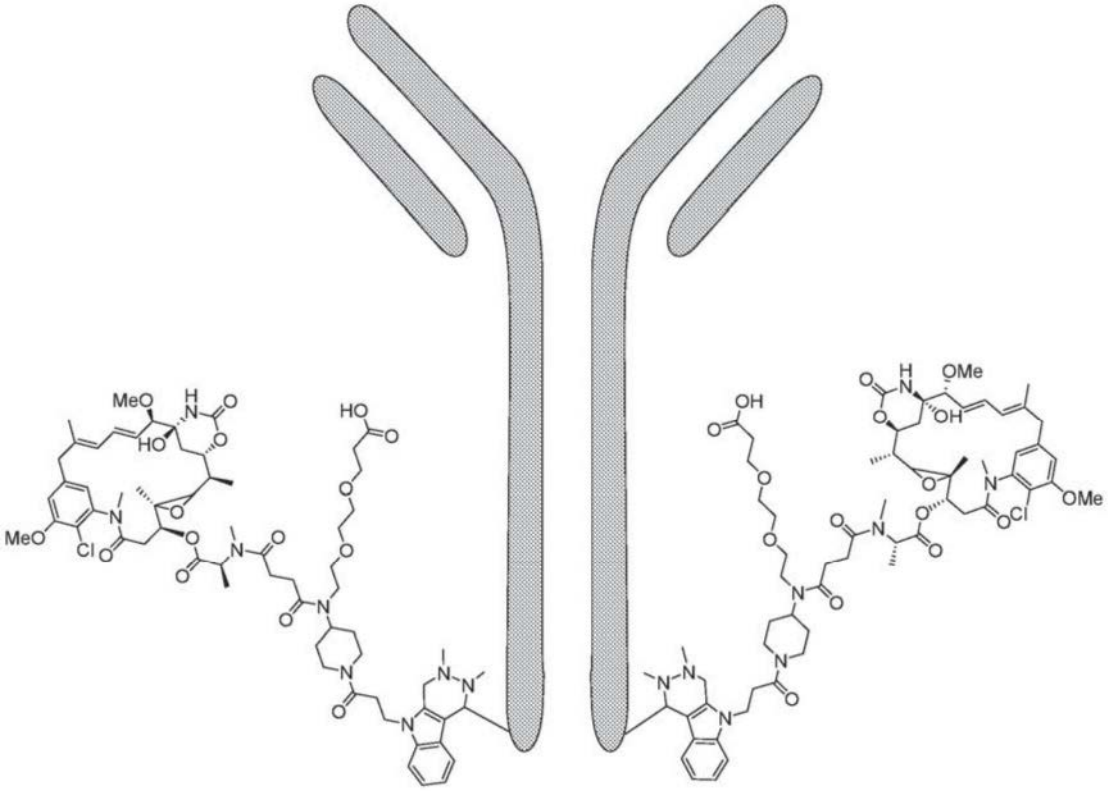



-方案B-

[1001] 在方案B中,使接头-药物与缀合至5T4的抗体结合。5T4抗体在重链的恒定区中具有识别基序,例如L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序(例如SEQ ID NO:90、94、98中)。L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序的半胱氨酸残基可转化成甲酰基甘氨酸(fGly)并随后与azaHIPs部分经由皮克特-施彭格勒反应(Pictet-Spengler reaction)缀合。

[1002] 在一些实施方案中,5T4-ADC包括经由哒嗪-吡咯并偶合部分与5T4抗体的各重链恒定区的C端缀合的接头-药物且可以1至4、1至2、1.75至2、或1.9至2的抗体/接头-药物化学计量比率为特征。在另一个实施方案中,5T4-ADC包括仅与一个重链恒定区的C端连接的哒嗪-吡咯并偶合部分,其中抗体与药物之间的化学计量比率为0.5至1、0.75至1、或0.9至1。

[1003] 在一些实施方案中,5T4-ADC包括经由哒嗪-吡咯并偶合部分与5T4抗体缀合的接头-药物,其中所述接头-药物包含经由接头(L-1)与哒嗪-吡咯并偶合部分缀合的美登素,如以下方案C所示:

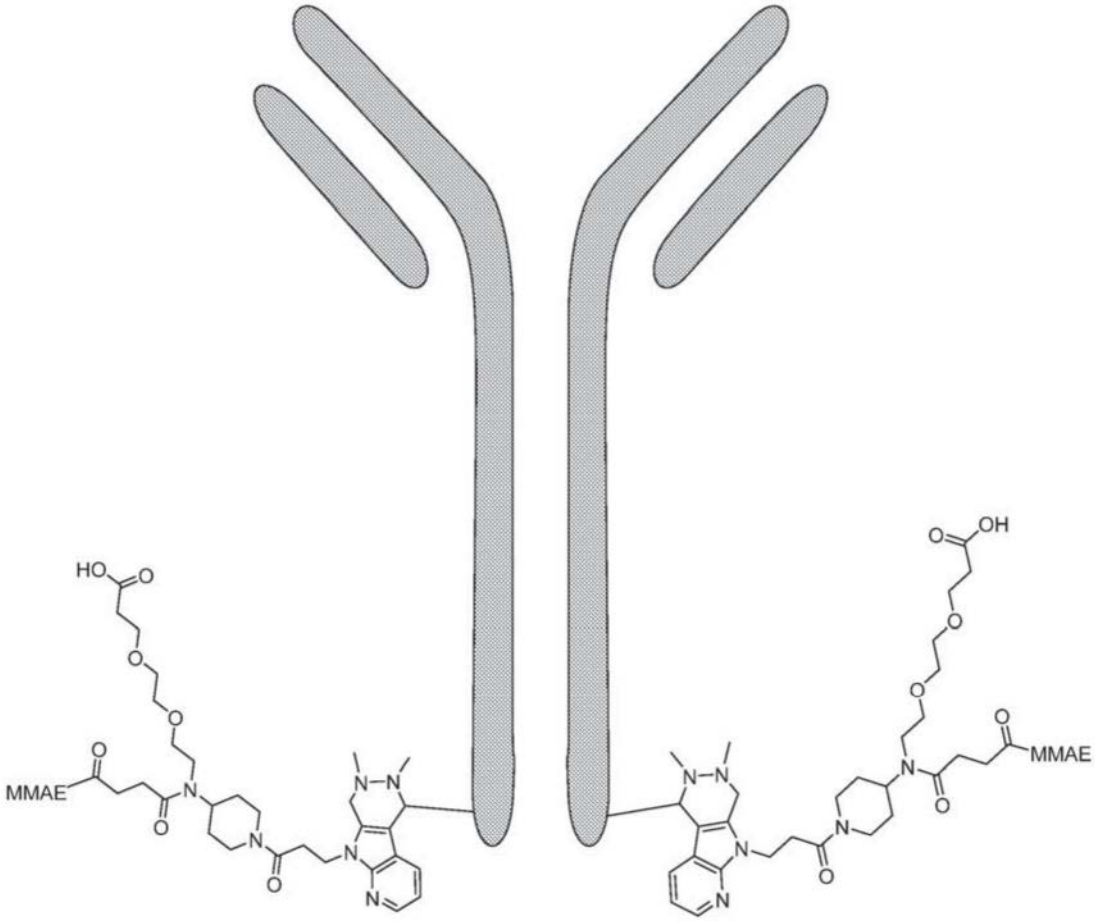
[1004] 

-方案C-

[1005] 在一些实施方案中,5T4抗体在重链的恒定区中具有识别基序,例如L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序(例如SEQ ID NO:90、94、98中)。L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序的半胱氨酸残基可转化成甲酰基甘氨酸(fGly)并随后经由皮克特-施彭格勒反应与azaHIPs部分缀合,所述azaHIPs部分经由接头(L-1)与MMAE缀合。

[1006] 在一些实施方案中,5T4-ADC包括经由哒嗪-吡咯并偶合部分与5T4抗体缀合的接头-药物,其中所述接头-药物包含经由接头(L-2)与哒嗪-吡咯并偶合部分缀合的MMAE,如以下方案D所示:

[1007]

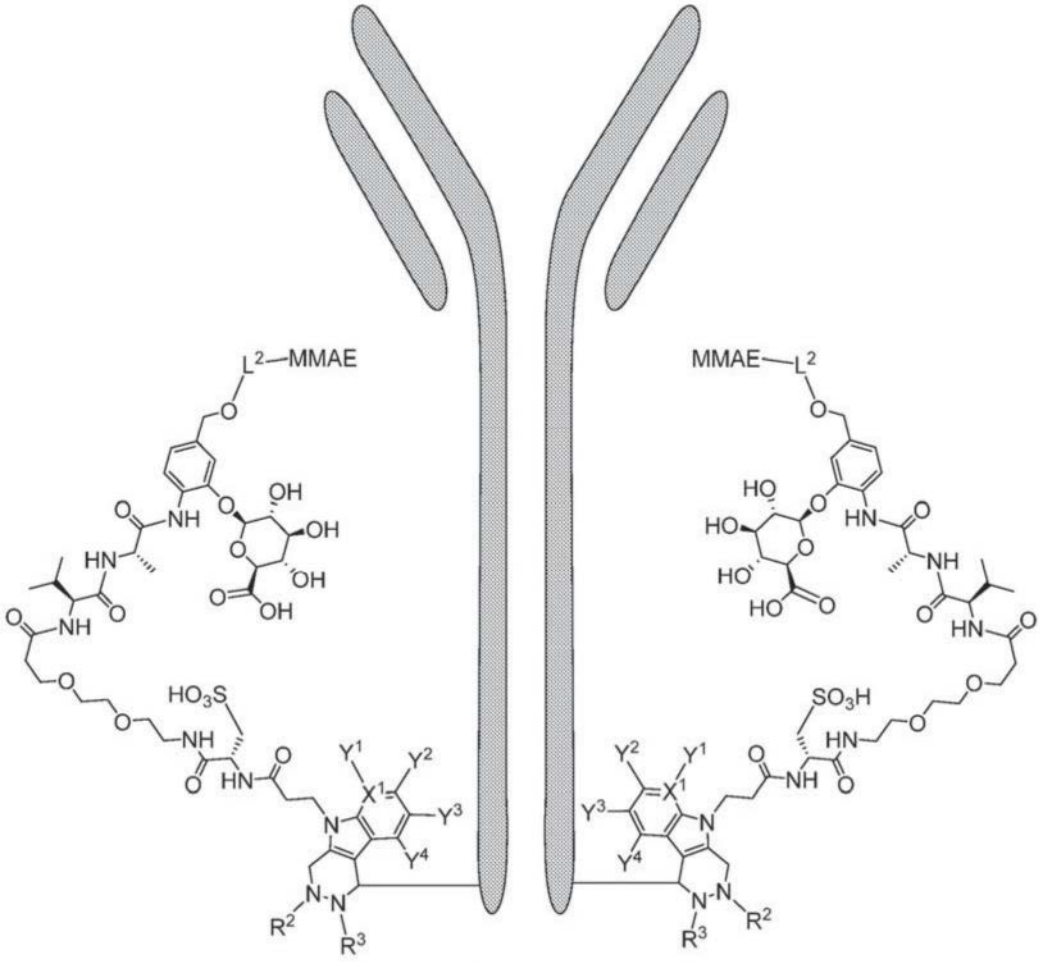



-方案D-

[1008] 在一些实施方案中,5T4抗体在重链的恒定区中具有识别基序,例如L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序。L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序的半胱氨酸残基可转化成甲酰基甘氨酸(fGly)并随后经由皮克特-施彭格勒反应与azaHIPs部分缀合,所述azaHIPs部分经由接头(L-2)与MMAE缀合。

[1009] 在一些实施方案中,5T4-ADC包括经由哒嗪-吡咯并偶合部分与5T4抗体缀合的接头-药物,其中所述接头-药物包含经由接头(L-7)与哒嗪-吡咯并偶合部分缀合的MMAE,如以下方案E所示:

[1010]

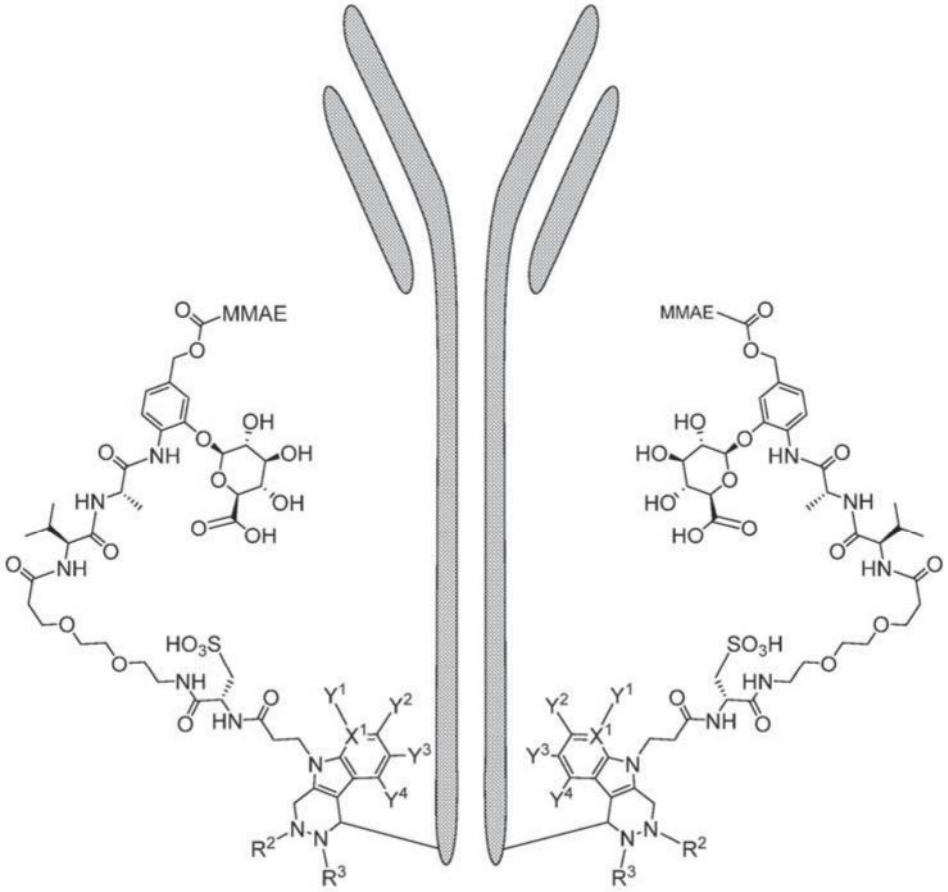


-方案E-

[1011] 在一些实施方案中,5T4抗体在重链的恒定区中具有识别基序,例如L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序(例如SEQ ID NO:90、94、98中)。L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序的半胱氨酸残基可转化成甲酰基甘氨酸(fGly)并随后经由皮克特-施彭格勒反应与azaHIPs部分缀合,所述azaHIPs部分经由接头(L-7)与MMAE缀合。

[1012] 在一些实施方案中,5T4-ADC包括经由哒嗪-吡咯并偶合部分与5T4抗体缀合的接头-药物,其中所述接头-药物包含经由接头(L-8)与哒嗪-吡咯并偶合部分缀合的MMAE,如以下方案F所示:

[1013]




-方案F-

[1014] 在一些实施方案中,结合至5T4的抗体在重链的恒定区中具有识别基序,例如L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序(例如SEQ ID NO:90、94、98中)。L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:103)识别基序的半胱氨酸残基可转化成甲酰基甘氨酸(fGly)并随后经由皮克特-施彭格勒反应与azaHIPs部分缀合,所述azaHIPs部分经由接头(L-8)与MMAE缀合。

[1015] 制剂和组合物

[1016] 5T4-ADC可包括于药物组合物中以便施用给例如受试者,用于治疗疾病、病症或疾患。药物组合物可包含平均而言可展现约1至约2的药物/抗体比率("DAR")的5T4-ADC。换言之,使各种抗体与一种或两种接头-药物缀合物进行缀合。测定DAR的方法已为所属领域技术人员所熟知且包括使用反相色谱或HPLC-MS进行的方法。

[1017] 例如,在任何实施方案中,包含5T4-ADC的药物组合物可展现约1至约1.9、或约1至约1.8、约1至约1.7、约1.5至约1.9、约1.5至约1.8、约1.5至约1.7、约1.7至约1.9、约1.7至约1.8、或约1.8至约1.9的DAR。在一些实施方案中,药物组合物包含5T4-ADC,所述5T4-ADC包含如本文所述的结合至5T4的抗体,包括如本文(诸如表1至3中的任一者)所述的mAbA4、mAbA15和mAbA17;以及药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含式(IV)、(V)或(VI)的5T4-ADC,并且L是选自接头(L-1)、(L-2)、(L-3)、(L-4)、(L-5)、(L-6)、(L-7)和(L-8)。在一些实施方案中,药物组合物包含含有MMAE、MMAF、美登素或其任何衍生物的5T4-ADC。在一些实施方案中,药物组合物包含式(VI-1)、(VIa-1)或(VIb-1)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含式(VI-2)、(VIa-2)或(VIb-2)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含式(V-3)、(VI-

3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)或(VIb-8)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含式(VI-11)、(VI-12)、(VIa-11)或(VIb-12)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含式(VI-21)或(VIa-21)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含式(VI-52)、(VI-62)、(VI-81)、(VIb-81)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含mAbA4-VIa-21(即,与抗体mAbA4缀合的式VIa-21的接头-药物)、mAbA15-VIa-21(即,与抗体mAbA15缀合的式VIa-21的接头-药物)、mAbA15-VIb-82(即,与抗体mAbA15缀合的式VIb-82的接头-药物)或mAbA17-VIb-82(即,与抗体mAbA17缀合的式VIb-82的接头-药物)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。

[1018] 5T4-ADC可以多种不同方法中的任一者配制。本公开的5T4-ADC可以任何适合形式提供,例如以药学上可接受的盐形式提供,并且可根据任何适合的施用途径配制,例如口服、外用或胃肠外施用。在5T4-ADC以可注射液形式提供的情况下(诸如在其可静脉内或直接施用给组织的那些实施方案中),5T4-ADC可以即用剂型或以由药学上可接受的赋形剂及赋形剂构成的储存稳定性复原用散剂或液体提供。

[1019] 用于配制5T4-ADC的方法可利用本领域中可利用的那些方法调适。例如,5T4-ADC可以包含有效量的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂(例如生理盐水)的药物组合物提供。药物组合物可任选地包括其他添加剂(例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂及其类似物)。在一些实施方案中,制剂适合施用给哺乳动物,诸如适合施用给人的那些制剂。

[1020] 本文还提供含有有效量的本文所述5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,5T4-ADC包含如本文所述的结合至5T4的抗体,包括mAbA4、mAbA15和mAbA17,如表1至3中的任一者所述。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的式(IV)、(V)或(VI)的5T4-ADC,并且L是选自接头(L-1)、(L-2)、(L-3)、(L-4)、(L-5)、(L-6)、(L-7)或(L-8)。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的5T4-ADC,所述5T4-ADC包含MMAE、MMAF、美登素或其任何衍生物。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的式(VI-1)、(VIa-1)或(VIb-1)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的式(VI-2)、(VIa-2)或(VIb-2)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的式(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(V1-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)或(VIb-8)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的式(VI-11)、(VI-12)、(VIa-11)或(VIb-12)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的式(VI-21)或(VIa-21)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的式(VI-52)、(VI-62)、(VI-81)、(VIb-81)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物包含有效量的mAbA4-VIa-21、mAbA1 5-VIa-21、mAbA1 5-VIb-82或mAbA1 7-VIb-82的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。

[1021] 药学上可接受的赋形剂可为适合施用给人或兽医学受试者的一种或多种相容固体或液体填充剂、稀释剂、其他赋形剂或囊封物质(例如生理学上可接受的和/或药理学上可接受的)。当药物组合物中存在超过一种药学上可接受的赋形剂时,可将药学上可接受的

赋形剂与一种或多种活性组分(例如杂合体分子)以避免大幅度降低所需药物功效的方式彼此间共混。药学上可接受的材料通常能够施用给受试者,而不产生显著的非所需生理学作用,诸如恶心、眩晕、皮疹或胃不适。例如,包含药学上可接受的赋形剂的组合物当施用给人受试者用于治疗目的时,需要无免疫原性。

[1022] 本发明的药物组合物可另外含有适合缓冲剂,包括例如呈盐形式的乙酸、呈盐形式的柠檬酸、呈盐形式的硼酸及呈盐形式的磷酸。药物组合物也可任选地含有适合防腐剂,诸如苯扎氯铵、氯丁醇、对羟苯甲酸酯及硫柳汞。本发明的药物组合物可以单位剂型呈现且可通过任何适合方法制备,其中多种方法在制药技术中已熟知。此类方法包括使本发明的抗体或抗原结合片段与构成一种或多种附属成分的赋形剂合并的步骤。一般而言,通过使活性剂与液体赋形剂、细粉状固体赋形剂或两者均匀且紧密地合并且接着必要时使产物成形来制备药物组合物。

[1023] 适合于胃肠外施用的组合物宜包含组合物的无菌水性制剂,其优选对接受者的血液具有等张性。此水性制剂可使用适合的分散剂或湿润剂及悬浮剂、由已知方法配制。无菌可注射制剂也可为存在于胃肠外可接受的无毒稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的媒介物及溶剂中,可使用水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等张氯化钠溶液。另外,常规使用无菌不挥发油作为溶剂或悬浮介质。出于此目的,可使用任何温和的不挥发油,诸如合成的单甘油酯或二甘油酯。另外,可使用脂肪酸(诸如油酸)制备可注射剂。适合于口服、皮下、静脉内、肌肉内施用及其类似施用的赋形剂制剂可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,PA。

[1024] 本发明的药物组合物的制备及其各种施用途径可根据本领域中熟知的方法进行。适用于本发明的上下文中的递送系统包括定时释放型、延迟释放型及持续释放型递送系统,使得组合物的递送发生于所治疗的部位敏感化之前及足以引起所治疗的部位敏感化的时间后。组合物可结合其他治疗剂或疗法使用。此类系统可避免组合物重复施用,从而增加受试者及医师的便利性,并且可特别适合于本发明的一些组合物。

[1025] 许多类型的释放递送系统可以获得且为一般技术者所知。适合的释放递送系统包括聚合物基质系统,诸如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚已内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羟丁酸及聚酸酐。含有药物的前述聚合物的微胶囊描述于例如美国专利5,075,109中。递送系统还包括非聚合物系统,其为脂质,包括固醇,诸如胆固醇、胆固醇酯及脂肪酸;或中性脂肪,诸如单酸甘油酯、二酸甘油酯及三酸甘油酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡包衣;使用常规粘合剂及赋形剂的压缩片剂;部分融合的植入物;以及其类似物。特定实例包括但不限于:(a)侵蚀系统,其中活性组合物以基质内的形式包含在内,诸如美国专利4,452,775、4,667,014、4,748,034及5,239,660中所述的那些系统,及(b)扩散系统,其中活性组分以可控速率自聚合物渗透,诸如美国专利3,832,253及3,854,480中所述。另外,可使用基于泵的硬件递送系统,其中一些适于植入。

[1026] 一般而言,5T4-ADC或药物组合物宜封装于例如小瓶、袋囊、安瓿和/或适于治疗方法的任何容器中。组分可以浓缩物形式(包括冻干组合物)提供,其可在使用之前进一步稀释,或其可在使用浓度下提供。体内使用5T4-ADC时,可以具有所需量及浓度的组分的灭菌容器提供单次剂量。

[1027] 治疗方法

[1028] 本文还提供使用包含结合至5T4(诸如人5T4)的抗体及与所述抗体直接或间接缀合的药物的5T4-ADC治疗、预防或减轻5T4介导的疾病、病症或疾患(包括5T4介导的疾病、病症或疾患的一种或多种症状)的方法。本文还提供使用包含结合至5T4(诸如人5T4)的抗体及与所述抗体直接或间接缀合的药物的5T4-ADC杀灭肿瘤细胞的方法。

[1029] 结合至5T4的抗体可包括如本文所述的任何抗体,诸如mAbA4、mAbA15和mAbA17,如表1至3中的任一者所述。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与式(IV)、(V)或(VI)的5T4-ADC接触,其中L为接头(L-1)、(L-2)、(L-3)、(L-4)、(L-5)、(L-6)、(L-7)或(L-8)。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与包含MMAE、MMAF、美登素或其任何衍生物的5T4-ADC接触。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与式(VI-1)、(VIa-1)或(VIb-1)的5T4-ADC接触。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与式(VI-2)、(VIa-2)或(VIb-2)的5T4-ADC接触。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与式(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)或(VIb-8)的5T4-ADC接触。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与式(VI-11)、(VI-12)、(VIa-11)或(VIb-12)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂接触。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与式(VI-21)或(VIa-21)的5T4-ADC接触。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与式(VI-52)、(VI-62)、(VI-81)、(VIb-81)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)的5T4-ADC接触。在一些实施方案中,杀灭肿瘤细胞的方法包括使肿瘤细胞与mAbA4-VIa-21、mAbA1 5-VIa-21、mAbA1 5-VIb-82或mAbA1 7-VIb-82的5T4-ADC接触。在一些实施方案中,接触为体内或体外的。

[1030] 在任何实施方案中,肿瘤细胞与5T4-ADC接触的方法可包括使肿瘤细胞与包含5T4-ADC和一种或多种药学上可接受的赋形剂的组合物接触。在一些实施方案中,组合物中的5T4-ADC可以约1至约10、约1至约4、约1至约2、约1.5至约2、或约1.75至约1.9的DAR为特征。

[1031] 本文还提供一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,包括向所述受试者施用有效量的5T4-ADC,其中所述5T4-ADC包含结合至5T4的抗体及经由接头与其缀合的药物,如本文所述。在一些实施方案中,结合至5T4的抗体为mAbA4、mAbA15或mAbA17,如本文所述,诸如表1至3中的任一者所述。

[1032] 在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的式(IV)、(V)或(VI)的5T4-ADC,其中L为(L-1)、(L-2)、(L-3)、(L-4)、(L-5)、(L-6)、(L-7)或(L-8)。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的如本文所述的5T4-ADC,其包含MMAE、MMAF、美登素或其任何衍生物。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-1)、(VIa-1)或(VIb-1)的5T4-ADC。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-2)、(VIa-2)或(VIb-2)的5T4-ADC。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的式(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)或(VIb-8)的5T4-ADC。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施

用有效量的(VI-11)、(VI-12)、(VIa-11)或(VIb-12)的5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-21)或(VIa-21)的5T4-ADC。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-52)、(VI-62)、(VI-81)、(VIb-81)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)的5T4-ADC。在一些实施方案中,治疗有需要的受试者的癌症的方法包括向所述受试者施用有效量的mAbA4-VIa-21、mAbA1 5-VIa-21、mAbA1 5-VIb-82或mAbA1 7-VIb-82的5T4-ADC。

[1033] 在任何实施方案中,治疗受试者的有需要的癌症的方法可包括向所述受试者施用药物组合物,所述药物组合物包含5T4-ADC和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,药物组合物中的5T4-ADC可以约1至约10、约1至约4、约1至约2、约1.5至约2、或约1.75至约1.9的DAR为特征。

[1034] 在一些实施方案中,治疗受试者的有需要的癌症的方法有效地增强受试者中的癌细胞(例如肿瘤细胞)的去除。

[1035] “增强”癌细胞或肿瘤细胞的去除不需要100%增强去除。在此考虑了去除速率的任何增强。类似地,“调节”肿瘤生长是指减小肿瘤尺寸、减缓肿瘤生长或抑制现有肿瘤尺寸的增大。不需要肿瘤完全消除;肿瘤尺寸的任何减小或减缓肿瘤生长构成受试者的有益生物作用。就此而言,相较于所述方法不存在下所观测的去除水平(例如未暴露于所述方法的药剂的生物学匹配对照受试者或试样),肿瘤细胞去除可增强例如至少约5%、至少约10%或至少约20%。所述作用是根据以下来检测:例如肿瘤尺寸的减小、肿瘤标记物含量的减少或维持,或肿瘤细胞群的减少或维持。在一些实施方案中,相较于所述方法的5T4结合剂(例如抗体)不存在下的肿瘤细胞去除,肿瘤细胞的去除增强例如至少约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%或更大(约100%)。

[1036] 本公开还提供一种调节(例如抑制、减少、预防)有需要的受试者的肿瘤生长的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效调节所述受试者中的肿瘤生长的量的5T4-ADC,所述5T4-ADC包含结合至5T4的抗体及经由接头与所述抗体连接的药物,如本文所述。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括施用有效量的5T4-ADC,所述5T4-ADC包含结合至5T4的抗体及经由接头与所述抗体缀合的药物,如本文所述。在一些实施方案中,结合至5T4的抗体为mAbA4、mAbA15或mAbA17,如表1至3中的任一者所述。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的式(IV)、(V)或(VI)的5T4-ADC,其中L为(L-1)、(L-2)、(L-3)、(L-4)、(L-5)、(L-6)、(L-7)或(L-8)。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的包含MMAE、MMAF、美登素或其任何衍生物的5T4-ADC。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-1)、(VIa-1)或(VIb-1)的5T4-ADC。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-2)、(VIa-2)或(VIb-2)的5T4-ADC。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的式(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)或(VIb-8)的5T4-ADC。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-11)、(VI-12)、(VIa-11)或(VIb-12)的5T4-ADC。在一些实施方案中,调节有需要的受

试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-21)或(VIa-21)的5T4-ADC。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-52)、(VI-62)、(VI-81)、(VIb-81)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)的5T4-ADC。在一些实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法包括向所述受试者施用有效量的mAbA4-VIa-21、mAbA15-VIa-21、mAbA15-VIb-82或mAbA1 7-VIb-82的5T4-ADC。

[1037] 在任何实施方案中,调节有需要的受试者的肿瘤生长的方法可包括向所述受试者施用包含5T4-ADC和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物中的5T4-ADC可以约1至约10、约1至约4、约1至约2、约1.5至约2、或约1.75至约1.9的DAR为特征。

[1038] 在一些实施方案中,可通过本文所述方法治疗和/或杀灭的本文所述癌症及肿瘤细胞表达例如癌症或肿瘤细胞表面上的5T4。在一些实施方案中,肿瘤或癌症细胞可过表达5T4。如本文所用,术语“过表达”意指转录及翻译的遗传产物比正常(诸如正常细胞中)的遗传产物更多,其过程通常具有癌细胞的特征。

[1039] 可用本文所述的5T4-ADC治疗的癌症实例包括但不限于:乳腺癌、结肠癌、肾癌、肺癌、鳞状细胞骨髓性白血病、血管瘤、黑色素瘤、星形细胞瘤及胶质母细胞瘤,以及其他细胞增殖性疾病状态,包括但不限于心脏增生性疾病,诸如肉瘤(血管肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肉瘤)、粘液瘤、横纹肌瘤、纤维瘤、脂肪瘤及畸胎瘤;肺增生性疾病,诸如支气管癌(例如鳞状细胞、未分化小细胞、未分化大细胞腺癌)、肺泡(例如细支气管)癌瘤、支气管腺瘤、肉瘤、淋巴瘤、软骨瘤性错构瘤、间皮瘤;胃肠道系统的增生性疾病,诸如食道(例如鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、淋巴瘤)、胃(例如癌瘤、淋巴瘤、平滑肌肉瘤)、胰腺(例如胰腺管腺癌、胰岛素瘤、升糖素瘤、胃泌素瘤、类癌肿瘤、血管活性肠肽瘤)、小肠(例如腺癌、淋巴瘤、类癌肿瘤、卡波西氏肉瘤(Karposi's sarcoma)、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤、纤维瘤)、大肠(例如腺癌、管腺瘤、绒毛腺瘤、错构瘤、平滑肌瘤);生殖泌尿道的增生性疾病,诸如肾(例如腺癌、维尔姆斯氏肿瘤(例如肾母细胞瘤)、淋巴瘤、白血病、肾细胞癌)、膀胱及尿道(例如鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌)、前列腺(例如腺癌、肉瘤、前列腺小细胞癌瘤)、睾丸(例如精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎性癌、畸胎癌、绒毛膜癌、肉瘤、间质细胞癌瘤、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样肿瘤、脂肪瘤);肝脏的增生性疾病:肝肿瘤(例如肝细胞癌)、胆管癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤、血管瘤;骨骼的增生性疾病,诸如骨原性肉瘤(例如骨肉瘤)、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's-sarcoma)、恶性淋巴瘤(例如网状细胞肉瘤)、恶性巨细胞瘤脊索瘤、骨软骨瘤(例如骨软骨外生骨疣)、良性软骨瘤、软骨母细胞瘤、软骨粘液性纤维瘤、骨样骨瘤及巨细胞肿瘤;神经系统的增生性疾病,诸如颅骨(例如骨瘤、血管瘤、肉芽肿、黄瘤、变形性骨炎)、脑膜(例如脑脊髓膜瘤、脑膜肉瘤、神经胶质瘤病)、脑(例如星形细胞瘤、髓母细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、胚细胞瘤(例如松果体瘤)、多形性胶质母细胞瘤、少突神经胶质瘤、许旺氏细胞瘤(schwannoma)、视网膜母细胞瘤、先天性肿瘤)、脊髓神经纤维瘤、脑脊髓膜瘤、神经胶质瘤、肉瘤);妇科系统的增生性疾病,诸如子宫(例如子宫内膜癌)、宫颈(例如宫颈癌、肿瘤前宫颈发育异常)、卵巢(例如卵巢癌瘤)浆液性囊腺癌、粘液性囊腺癌、未分类的癌瘤、粒层细胞-卵泡膜细胞肿瘤、塞尔托利-莱迪希氏细胞肿瘤(Sertoli-Leydig cell tumors)、无性细胞瘤、恶性畸胎瘤)、外阴(例如鳞状细胞癌、上皮内癌瘤、腺癌、纤维肉瘤、黑色素瘤)、阴道(例如透明细胞癌瘤、鳞状

细胞癌、葡萄状肉瘤(胚胎性横纹肌肉瘤)、输卵管(例如癌瘤);血液(例如骨髓性白血病(急性及慢性)、急性淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病、骨髓增生性疾病、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征)、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤(例如恶性淋巴瘤);皮肤的增生性疾病,诸如恶性黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西氏肉瘤、痣发育不良痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、瘢痕瘤、牛皮癣;肾上腺的增生性疾病,诸如神经母细胞瘤;以及甲状腺的增生性疾病,包括甲状腺髓样癌。在一些实施方案中,肿瘤或癌症为复发肿瘤或癌症。在一些实施方案中,肿瘤或癌症为转移性肿瘤或癌症。在一些实施方案中,肿瘤或癌症为原发肿瘤或癌症。另外或可替代地,肿瘤或癌症对化学疗法或其他非5T4目标抗癌疗法具有抗性。

[1040] 另外,包含结合至5T4的抗体的5T4-ADC可用于缓解或减少与癌症相关的副作用,诸如骨骼退化、椎体塌陷及麻痹。在一个实施方案中,受试者罹患骨骼转移或处于罹患骨骼转移的风险中且包含结合至5T4的抗体的5T4-ADC是以减少周围骨骼退化的量施用。因此,在一些实施方案中,包含结合至5T4的抗体的5T4-ADC预防因骨骼转移所致的骨骼退化,其中减少或不减少肿瘤细胞增殖。在一些实施方案中,5T4结合剂(例如抗体或ADC)(包含结合至5T4的抗体的5T4-ADC)预防因骨骼转移所致的骨骼退化且减少肿瘤细胞增殖。一般而言,对肿瘤细胞增殖的影响(例如抑制增殖或对增殖无影响)依赖于特定转移的微环境。例如,可抑制位于具有实质量的1型胶原蛋白的微环境中的转移增殖。相比之下,位于缺乏实质量的1型胶原蛋白的微环境中的转移增殖无法抑制,但转移附近的骨骼退化受到减少或阻止。

[1041] 因此,本公开还提供一种减轻或减少与癌症相关的副作用的方法,包括向有需要的受试者施用有效量的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括施用有效量的5T4-ADC,所述5T4-ADC包含结合至5T4的抗体及经由接头与所述抗体缀合的药物,如本文所述。在一些实施方案中,结合至5T4的抗体为mAbA4、mAbA15或mAbA17,如表1至3中的任一者所述。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的式(IV)、(V)或(VI)的5T4-ADC,其中L为(L-1)、(L-2)、(L-3)、(L-4)、(L-5)、(L-6)、(L-7)或(L-8)。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的包含MMAE、MMAF、美登素或其任何衍生物的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-1)、(VIa-1)或(VIb-1)的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-2)、(VIa-2)或(VIb-2)的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的式(V-3)、(VI-3)、(V-4)、(VI-4)、(V-5)、(VI-5)、(V-6)、(VI-6)、(V-7)、(VI-7)、(V-8)、(VI-8)、(VIa-8)或(VIb-8)的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-11)、(VI-12)、(VIa-11)或(VIb-12)的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的式(V1-21)和(VIa-21)的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的式(VI-52)、(VI-62)、(VI-81)、(VIb-81)、(VIb-52)、(VIb-62)、(VIb-72)或(VIb-82)的5T4-ADC。在一些实施方案中,减轻或减少与癌症相关的副作用的方法包括向所述受试者施用有效量的mAbA4-VIa-21、mAbA1 5-VIa-21、mAbA1 5-VIb-82或mAbA1 7-VIb-82的5T4-ADC。

[1042] 在任何实施方案中,减轻或减少有需要的受试者的与癌症相关的副作用的方法可包括向所述受试者施用包含如本文所公开的5T4-ADC和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,药物组合物中的5T4-ADC可以约1至约10、约1至约4、约1至约2、约1.5至约2、或约1.75至约1.9的DAR为特征。

[1043] 应了解,在本文所述的主题的定义内还提供基本上不影响本文所述的各种实施方案的活性的修改。因此,以下实施例意图说明而非限制本公开。

[1044] 实施例

[1045] 实施例1.抗体产生

[1046] 为了获得针对人5T4的结合剂,通过噬菌体展示来执行抗体发现。

[1047] 为了获得针对人5T4的结合剂,通过对人Fab文库进行噬菌体展示来执行抗体发现且使用标准方案执行。自Acro Biosystems(经生物素化的人5T4 His-AVITAG™ Acro目录号TPG-H83Eb)购得或产生人5T4的胞外域。所产生的抗原由人5T4、食蟹猴5T4及小鼠5T4组成,其都克隆到含有C端6-his-Avi标签的载体中且在可能的情况下,使用共表达的生物素连接酶、使用标准程序、在体外进行生物素化。

[1048] 筛选出能够结合至经生物素化的人5T4的噬菌体克隆。简言之,使用能够在噬菌体(也称为噬菌粒)中复制及表达的表达载体构建Fab格式化噬菌体文库。重链与轻链均在同一表达载体中编码,其中重链与噬菌体衣壳蛋白pIII的截断变体融合。轻链及重链-pIII融合物是以单独多肽形式表达且组装于细菌胞外质中,其中氧化还原电位能够使二硫键形成,从而形成候选抗体的抗原结合结构域(Fab)。

[1049] 使用来源于特定人重链可变结构域及特定人轻链可变结构域的序列建立文库。在所筛选文库内产生具有多样性的轻链可变结构域,引入VL CDR3(L3)中,并且其中轻链VL CDR1(L1)和CDR2(L2)保留人生殖系序列。在所筛选的文库中,VH区的所有三个CDR是根据人抗体谱系中发现的CDR长度多样化,以与位置氨基酸频率匹配。

[1050] 文库中所使用的噬菌体展示重链(SEQ ID NO:72)和轻链(SEQ ID NO:73)支架列举如下,其中"x"表示为了建立文库而改变的CDR氨基酸,并且粗斜体表示恒定的CDR序列。

[1051] SEQ ID NO:72的序列为EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS

CAASGFTFSXXXXXWVRQAPGKGLEWVAXXXXXXXXXXXXXXXXXRFTISADTS
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC。

[1052] SEQ ID NO:73的序列为DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI

TC***RASQSVSSAVA***WYQQKPGKAPKLLIY***SASSLYS***GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYC***XXXXXXXXX***FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[1053] 使用简并的DNA寡核苷酸引物、经由突变诱发来建立多样性,以将多样性引入VL CDR3(L3)和VH CDR1(H1)、CDR2(H2)和CDR3(H3),从而模拟天然抗体谱系中所发现的多样性,如Kunkel,TA(PNAS1985年1月1日,82(2)488-492)中更详细所述,所述文献以全文引用的方式并入本文中。简言之,利用标准程序、自经分离的噬菌体制备并有尿嘧啶的单链环状DNA且执行Kunkel突变诱发以将多样性引入四个CDR。接着经由电穿孔将化学合成的DNA引

入TG1细胞,随后回收。对回收的细胞进行传代培养且用M13K07辅助噬菌体感染以产生噬菌体文库。

[1054] 利用标准程序执行噬菌体淘选。简言之,在PBST-2%BSA中,以1mL的体积、利用所制备的文库、对固定于链霉抗生物素蛋白磁性珠粒上的目标执行第一轮噬菌体淘选,所述磁性珠粒上存在大约$1x10^{12}$个噬菌体。培育一小时之后,使用磁性台架自上清液中分离出珠粒所结合的噬菌体。洗涤珠粒三次以去除非特异性结合的噬菌体且接着以大约0.6的$OD_{600}$添加至ER2738细胞(5mL)中。在室温下培育20分钟之后,使感染细胞在25mL 2xYT+氨苄青霉素(Ampicillin)和M13K07辅助噬菌体(最终浓度为大约$1x10^{10}$pfu/mL)中传代培养且允许在37℃下、在剧烈摇振下生长过夜。次日,利用标准程序,通过PEG沉淀来制备噬菌体。淘选之前,预清除对SAV涂覆的珠粒具有特异性的噬菌体。使用KingFisher磁珠处置器,使用50或100nM经珠粒固定的5T4抗原,利用标准程序执行第二轮淘选(第3轮使用100nM 5T4,第4轮使用50nM5T4)。总之,执行3至4轮噬菌体淘选,以富集展示对5T4抗原具有特异性的Fab的噬菌体。使用多株ELISA证实5T4特异性富集,并且分离出个别克隆并且通过执行单株噬菌体ELISA来进一步验证。使用DNA测序来测定含有候选抗体的经分离Fab克隆的CDR序列。

[1055] 将编码候选抗体的重链及轻链可变结构域的基因单独克隆到哺乳动物表达载体中以便作为全长IgG表达于哺乳动物细胞中。

[1056] 对于全长IgG而言,重链恒定区(例如CH1=常规文字;铰链=斜体文字;CH2=粗体文字;以及CH3=加下划线文字)包括以下氨基酸序列:

[1057] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC*DKTHTCPPC* ***PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK***GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)。

[1058] 对于全长IgG而言,轻链恒定区(例如CL)包括以下氨基酸序列:

[1059] RTVAAPSVFIFPPSDSQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:75)。

[1060] 使用蛋白质A树脂自培养上清液中纯化IgG抗体。

[1061] 实施例2.筛选分析

[1062] 利用二价结合分析来提供关于实施例1中通过噬菌体展示而获得的具有VH/VL的抗体是否结合来自临床上相关的所有三种物种的固定5T4的数据:人、食蟹猴(cynomolgus monkey,cyno)和小鼠。对于二价结合及交叉反应性分析而言,使用来自蛋白质数据库的序列合成人、食蟹猴及小鼠5T4抗原且作为生物素化的蛋白质进行表达,所述蛋白质使用his-avi标签且体内使用共表达的BirA酶进行生物素化。

[1063] 使用基于Octet的标准分析定性地测定各种抗体是否结合至各种抗原。对这些分析而言,使200nM生物素化抗原在1X动力学缓冲液(ForteBio)中固定于链霉抗生物素蛋白生物传感器上。接着将所负载的传感器浸渍于含有500nM的所关注抗体的孔中且监测缔合结合信号。缔合步骤期间的信号增加高于阴性对照则被视为结合至抗原。

[1064] 根据使用Octet定性测定的结合亲和力,测试的所有二十七种抗体都显示结合至

人5T4,其中十三种抗体也显示结合至食蟹猴5T4,并且其中十三种抗体也显示结合至小鼠5T4。例示性抗体的数据显示于下表4中。

[1065] 表4.通过Octet定性测定的二价结合亲和力

[1066]

| 抗体 | 人 5T4 Octet (二价) | 食蟹猴 5T4 Octet (二价) | 小鼠 5T4 Octet (二价) |
|---|---|---|---|
| mAbA5 | + | + | - |
| mAbA15 | + | + | + |
| mAbA17 | + | + | + |

[1067] 利用单价结合分析来测定实施例1中通过噬菌体展示而获得的各种5T4结合剂对人5T4的相对亲和力。人5T4是购自Acro Biosystems(Acro目录号TPGH52E)并且也单独产生。使用Octet(Pall ForteBio)仪器监测结合剂与人5T4的单价相互作用。对于这些分析而言,使36nM抗体在1X动力学缓冲液(ForteBio)中固定于抗人Fc(AHC)传感器上。接着将传感器浸渍于含有人5T4的3倍连续稀释液(在1 μM至1.37nM范围内)的孔中。允许缔合达到平衡。接着将传感器移至仅含有1X动力学缓冲液的孔中且允许解离至平衡。测量缔合及解离速率且根据这些速率、使用内建分析软件(ForteBio)计算单价$K_D$。

[1068] 在测试的所有二十七种抗体中,大部分抗体在内部的单价结合亲和力分析(批号20-019-62)中显示弱结合。在所有三个批次中,mAbA4、mAbA15和mAbA17为展现强或中度结合的那些抗体。数据显示于下表5中。

[1069] 表5.通过Octet定性测定的单价结合亲和力

[1070]

| 抗体 | 单价结合亲和力 - Acro TPGH52E5 (批号 B465-87AF1-K2) | 单价结合亲和力 - 内部(批号 20-019-62) | 单价结合亲和力 - Acro TPGH52E5 (批号 B465-87AF1-JP) |
|---|---|---|---|
| | Octet | Octet | Octet |
| | $K_D$ [nM] | $K_D$ [nM] | $K_D$ [nM] |
| mAbA4 | 0.01 | 83 | 30.2 |
| mAbA15 | 3.62 | 10.4 | 11.2 |
| mAbA17 | 2.81 | 9.34 | 21.1 |

[1071] 实施例3:其他筛选及选择

[1072] 评估针对5T4的结合而选出的抗体,例如实施例2中所述的抗体,对于表达5T4的细胞的结合。分析当天,收集70-90%汇合(confluence)的细胞。在+4℃,在v形底96孔板(Costar 3897)中,将每孔100,000个细胞与每孔50μL 8点或12点抗体稀释系列一起培育30分钟。培育之后,通过200x g离心5分钟,用PBS洗涤细胞一次。接着在+4℃下,将细胞与每孔50μL Alexa Fluor 488山羊抗人IgG Fab(Jackson Immuno Research 109-547-003)一起以1:100稀释度培育30分钟。通过200x g离心5分钟,用PBS洗涤细胞两次且在iQue Screener Plus(Sartorius)上获取细胞。将BL1(Alexa-Fluor-488)通道的平均荧光强度相对于抗体浓度作图,以产生剂量反应曲线及EC50值。

[1073] 在测试的二十七种抗体中,二十六种抗体对HEK-5T4细胞显示结合亲和力,十六种

抗体对MCF-7细胞显示结合亲和力,并且二十六种抗体对HEK-cyno-5T4细胞显示结合亲和力。

[1074] 进一步在使用HEK-5T4及MCF-7细胞的内化分析中评价抗体,所述抗体是根据对所有三种HEK-5T4、MCF-7及HEK-cyno-5T4细胞系的结合而选出(包括mAbA4、mAbA15和mAbA17)。

[1075] 收集70-90%汇合的粘附细胞且接种在96孔黑色、透明/平底半区域板(Corning 3882)中以每孔20,000个细胞于50μL培养基中在37℃过夜。对于悬浮细胞系而言,在37℃用聚-L-鸟氨酸溶液(Millipore-Sigma)涂覆96孔板1小时且在分析之前的约1至2小时,将细胞以每孔40,000个细胞的密度接种在50μL培养基中。抗体在细胞培养基中稀释,与3X摩尔浓度的Incucyte人FabFluor-pH红色抗体标记试剂混合且在室温下培育15分钟。制备抗体/FabFluor混合物的2X最终浓度的所有稀释液。接着将50μL的2X抗体/Fab-Fluor混合物双重复直接添加至预接种有细胞的每个孔中,并且快速地将培养板转移至Incucyte中。接着在长达24小时期间每30分钟扫描培养板。注意在抗体/FabFluor混合物添加至细胞的2至3分钟内开始首次扫描(0小时)。通过读取随时间产生的红色信号(相对于所述孔中的细胞汇合%归一化)来分析培养板。少数抗体是在不同浓度下针对目标细胞系测试,并且基于良好的信号:噪声比来选择最佳浓度。

[1076] 在内化分析中,六种抗体(包括mAbA4及mAbA15)在HEK-5T4细胞中显示强内化,一种抗体在HEK-5T4细胞中显示中度内化,并且七种抗体在HEK-5T4细胞中未显示内化或显示非特异性内化。在其他分析中,两种抗体在MCF-7细胞中显示强内化,四种抗体在HEK-5T4细胞中显示中度内化,并且八种抗体在MCF-7细胞中未显示内化或显示非特异性内化。

[1077] 实施例4:可开发性分析

[1078] 通过评估可开发性的各种方法来测试抗体,所述抗体是根据对5T4的结合而选出,诸如实施例2和3中所述的那些抗体。例如,利用各种色谱方法(包括尺寸排阻色谱(SEC)、疏水性相互作用色谱(HIC)和立式单层吸附色谱(SMAC))评估各因素,诸如单体百分比、溶解性及抗体聚集或沉淀。

[1079] 在Agilent 1100HPLC上,使用配有6mm x 4cm保护柱(PN 08543)的7.8mm ID x30cm TSKgel G3000SWXL柱(Tosoh Bioscience LLC,PN 08541)执行尺寸排阻色谱(SEC)分析。将抗体在杜尔贝科氏PBS(Dulbecco′s PBS)(pH 7.4,无$Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$)中相对于1mg/mL浓度归一化且经由离心澄清,得到集结粒,同时仍保留可溶聚集体。流动相缓冲液为2X浓度(自10X储备液浓度稀释)的杜尔贝科氏PBS(pH 7.4,无$Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$)。各样品负载10μL且在环境温度下以每分钟1.0mL等度洗脱20分钟。监测280nm吸光度。对色谱峰求积分以测定均一性百分比及滞留时间。除分子分级之外,柱固定相以及流动相的选择也支持疏水性及静电相互作用(二级相互作用比SMAC轻得多)。使用Agilent ChemStation B.04.03 SP1执行数据分析。

[1080] 结果显示,基于SEC分析,mAbA4、mAbA15和mAbA17(在测试的其他抗体中)具有强可开发性。

[1081] 在Agilent 1100HPLC上,使用4.6mm ID x 3.5cm TSKgel丁基-NPR柱(Tosoh Bioscience LLC,PN 14947)执行疏水性相互作用色谱(HIC)分析。抗体在杜尔贝科氏PBS(pH 7.4,无$Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$)中相对于1mg/mL浓度归一化。柱在环境温度下用每分钟1mL流量的

100％流动相缓冲液A(2M硫酸铵/20mM磷酸钠,pH 7.0)平衡。各样品负载10μL且使用100％流动相缓冲液A至100％流动相缓冲液B(20mM磷酸钠,pH 7.0)的梯度、以每分钟1.0mL洗脱15分钟,在100％B保持3分钟以洗涤柱,并且历时2分钟恢复100％A达成平衡。监测280nm吸光度。计算样品滞留时间且与一组标准对照进行比较以鉴别出滞留时间延长(疏水性增加)并存在多个物种的抗体。使用Agilent ChemStation B.04.03S P1执行数据分析。

[1082] 疏水性相互作用色谱(HIC)分析结果显示,某些抗体具有强可开发性,而其他抗体具有中度可开发性。基于HIC分析,mAbA4、mAbA15和mAbA17为具有强可开发性的那些抗体。抗体疏水性可影响抗体聚集、溶解性及粘度。结果表明这些抗体的聚集及沉淀倾向低。

[1083] 在Agilent 1100HPLC上,使用配有4.6mm x 50mm保护柱(PN 213300P-4605)的4.6mm ID x 300mm Zenix SEC 300柱(Sepax Technologies,PN 21 3300P-4630)执行立式单层吸附色谱(SMAC)分析。将抗体在杜尔贝科氏PBS(Dulbecco′s PBS)(pH 7.4,无$Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$)中相对于1mg/mL浓度归一化且经由离心澄清,得到集结粒,同时仍保留可溶聚集体。流动相缓冲液为2X浓度(自10X储备液浓度稀释)的杜尔贝科氏PBS(pH7.4,无$Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$)。各样品负载10μL且在环境温度下以每分钟0.4mL等度洗脱32分钟。监测280nm吸光度。计算样品滞留时间且与一组标准对照进行比较,以鉴别出滞留时间延长(形成聚集体的倾向增加和/或疏水性/静电相互作用增加)的抗体,原因在于柱固定相以及流动相选择促进除分子分级之外的二级相互作用。使用Agilent ChemStation B.04.03SP1执行数据分析。

[1084] 立式单层吸附色谱(SMAC)分析结果显示,某些抗体具有强可开发性,而其他抗体具有中度可开发性。基于SMAC分析,mAbA4、mAbA15和mAbA17为具有强可开发性的那些抗体。测定是基于良好的滞留时间,其表示胶体稳定性及低聚集倾向。

[1085] 实施例5:表位分组分析

[1086] 利用表位分组分析测定实施例1中通过噬菌体展示而获得的各种抗体结合至5T4的哪个表位。

[1087] 为了维持5T4蛋白的整体结构,同时仍能够测定表位结合,通过克隆人5T4的七种邻接序列(表位1至7)中的每一者以替换对应小鼠序列中的每一者来产生小鼠-人嵌合体。为了产生嵌合体,通过GenScript合成人及小鼠全长5T4基因且克隆到带有6-His-Avi标签的哺乳动物载体中。接着自人基因中去除如本文所述的七种序列(表位1至7)中的每一者且使用适当引物分别克隆到小鼠基因中。人5T4的表位1(H1)对应于SSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAART (SEQ ID NO:76);人5T4的表位2(H2)对应于VKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARRPPL AELAALNLSGSRLDEVR(SEQ ID NO:77);人5T4的表位3(H3)对应于AGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSG(SEQ ID NO:78);人5T4的表位4(H4)对应于SNASVSAPSPLVELILNHIVPPED ERQNRSFEGMVVAALLAGRALQGLRRLE(SEQ ID NO:79);人5T4的表位5(H5)对应于LASNHFLYLPRDVLAQLPSLRHLDLSNNSL VSLTYVSFRNLTHLESL(SEQ ID NO:80);人5T4的表位6(H6)对应于HLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFL(SEQ ID NO:81);并且人5T4的表位7(H7)对应于DNNPWVCDCHMADMVTWLKET EVVQGKDRLTCAYPEKMRNRVLLELNSADLDCDPILPPSLQTS(SEQ ID NO:82)。使用Expi293蛋白质表达系统(Thermo Fisher)短暂表达抗原且在体外使用共表达的BirA生物素连接酶进行生物素化且利用Ni-NTA亲和色谱进行纯化。如表6中所示,所产生的人(H)和小鼠(M)序列的七种嵌合构建体为:(1)H1 M2 M3 M4 M5 M6 M7(SEQ ID NO:83);(2)M1 H2 M3 M4 M5 M6 M7(SEQ ID NO:84);(3)M1 M2 H3 M4 M5 M6 M7

(SEQ ID NO:85);(4)M1 M2 M3 H4 M5 M6 M7(SEQ ID NO:86);(5)M1 M2 M3 M4 H5M6 M7(SEQ ID NO:87);(6)M1 M2 M3 M4 M5 H6 M7(SEQ ID NO:88);以及(7)M1 M2 M3 M4 M5 M6 H7(SEQ ID NO:89)。接着测试各种抗体对嵌合构建体及全长人蛋白中的每一者的结合。对嵌合体的任何显著结合信号指示抗体特异性结合的区域。

[1088] 表6.5T4嵌合构建体

[1089]

| | | |
|---|---|---|
| 人5T4表位1 | H1 M2 M3 M4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:83) | SSPTSSASS FSSSAPFLAS AVSAQPPLPD QCPALCECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S |
| 人5T4表位2 | M1 H2 M3 M4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:84) | SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLTEVPTDLP AYVRNLFLTG NQLAVLPAGA FARRPPLAEL AALNLSGSRL DEVRAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S |
| 人5T4表位3 | M1 M2 H3 M4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:85) | SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPSLRQLDLS HNPLADLSPF AFSGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S |
| 人5T4表位4 | M1 M2 M3 H4 M5 M6 M7 (SEQ ID NO:86) | SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLVELIL NHIVPPEDER QNRSFEGMVV AALLAGRALQ GLRRLELASN HFLFLPRDLL AQLPSLRYLD LRNNSLVSLT YASFRNLTHL ESLHLEDNAL KVLHNSTLAE WHGLAHVKVF LDNNPWVCDC YMADMVAWLK ETEVVPDKAR LTCAFPEKMR NRGLLDLNSS DLDCDAVLPQ SLQTS |

[1090]

| | | |
|---|---|---|
| 人5T4表位5 | M1 M2 M3 M4 H5 M6 M7 (SEQ ID NO:87) | SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLY LPRDVLAQLP SLRHLDLSNN SLVSLTYVSF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S |
| 人5T4表位6 | M1 M2 M3 M4 M5 H6 M7 (SEQ ID NO:88) | SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NGTLAELQGL PHIRVFLDNN PWVCDCYMAD MVAWLKETEV VPDKARLTCA FPEKMRNRGL LDLNSSDLDC DAVLPQSLQT S |
| 人5T4表位7 | M1 M2 M3 M4 M5 M6 H7 (SEQ ID NO:89) | SAPSSSVPS SSTSPAAFLA SGSAQPPPAE RCPAACECSE AARTVKCVNR NLLEVPADLP PYVRNLFLTG NQMTVLPAGA FARQPPLADL EALNLSGNHL KEVCAGAFEH LPGLRRLDLS HNPLTNLSAF AFAGSNASVS APSPLEELIL NHIVPPEDQR QNGSFEGMVA FEGMVAAALR SGLALRGLTR LELASNHFLF LPRDLLAQLP SLRYLDLRNN SLVSLTYASF RNLTHLESLH LEDNALKVLH NSTLAEWHGL AHVKVFLDNN PWVCDCHMAD MVTWLKETEV VQGKDRLTCA YPEKMRNRVL LELNSADLDC DPILPPSLQT S |

[1091] 表位分组分析是使用基于Octet的标准分析来确定各种抗体的表位组。在这些分析中,使50nM生物素化抗原在1X动力学缓冲液(ForteBio)中固定于链霉抗生物素蛋白传感器上。接着将传感器浸渍于含有100nM的所讨论的抗体的孔中且监测缔合信号。有效地剔除抗体结合的嵌合体接着对应于抗体所结合的特异性表位。分析中包括人全长5T4作为参照。

[1092] 结果显示,九种抗体特异性结合至5T4的表位4,三种抗体特异性结合至5T4的表位7,并且三种抗体特异性结合至5T4的表位2,一种抗体特异性结合至5T4的表位4与表位6,并且十一种抗体结合至全长5T4(FL)。例示性表位分组结果(对于mAbA4、mAbA15和mAbA17而言)概述于表7中。

[1093] 表7.表位分组分析

[1094]

| 抗体 | 表位组 |
|---|---|
| mAbA4 | 4 |

| | |
|---|---|
| mAbA15 | 2 |
| mAbA17 | 7 |

[1095] 如本文所述,在如实施例1所述自噬菌体文库筛选的所有抗体中,在形成IgG之后仍能够结合至5T4的二十七种抗体进一步如实施例2至5中所述进行测试。命名为mAbA4、mAbA15和mAbA17的三种抗体是基于多种活性加以选择,包括其结合人5T4的特异性、其对食蟹猴5T4的结合、其细胞表面结合信号及其强可开发性,如通过多种方法(诸如SEC、HIC和SMAC)所评估。这些抗体的VH、VL和CDR序列描述于本文中,例如表1至3中。

[1096] 实施例6:ADC的制备

[1097] A.经标记的抗体的制备

[1098] 经标记的抗体是根据本领域中已知的方法制备,诸如以下文献中所述的方法:Rabuka D.等人,"Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags,"Nat Protoc.,2012;7(6):1052-1067及美国专利第7,985,783B2号,所述文献各自以全文引用的方式并入本文中。简言之,可使含有异源硫酸酯酶基序的抗体与产甲酰基甘氨酸酶接触以将基序中的半胱氨酸或丝氨酸转化成具有醛部分的甲酰基甘氨酸,从而产生"醛标记的抗体"。可使用任何产甲酰基甘氨酸酶,诸如结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)或结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)。

[1099] B.接头-有效负载的制备

[1100] 1.接头-有效负载VIa-21的合成。

[1101] 接头-药物VIa-21的合成显示于图1的方案1中。自上海美迪西生物医药有限公司(Shanghai Medicilon Inc.)(中国上海)商购化合物2-1且按原样使用。化合物2-1也可根据国际专利申请公布WO 2015/081282中所公开的合成程序制备,所述公布以全文引用的方式并入本文中。化合物21-1是根据例如以下文献中所公开的程序制备:Kudirka等人,ACS Med.Chem.Lett.2016,7(11):94-998及国际专利申请公布WO 2015/081282,所述文献各自以全文引用的方式并入本文中。所用的所有其他试剂都获自商业来源且不经纯化即使用。

[1102] 在室温下,将化合物21-1(62mg,54μmol)和30μLDIPEA添加至化合物2-1(45mg,54μmol)于2mL无水DMF中的搅拌溶液中。在室温下添加(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷鏻六氟磷酸盐("PyAOP",28mg,54μmol)。30分钟后,将反应混合物倾入20mL盐水中且用DCM(2×25mL)萃取。有机层经硫酸钠干燥,在真空下浓缩且通过硅胶色谱(5-10%MeOH/DCM)纯化,获得70mg(36μmol,67%产率)呈无色固体状的中间体3。固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1986.0[M+Na]$^+$,正如对$C_{101}H_{135}ClN_{14}O_{24}$所预期。

[1103] 在室温下,将含有$SnCl_4$的DCM(1M,0.36mL)缓慢添加至中间体Fmoc-VIa-21(70mg,36μmol)于无水DCM(2mL)中的溶液中。添加之后,允许反应混合物在室温下搅拌30分钟且用含有两滴水的2mL乙腈淬灭反应。所得溶液在真空下浓缩且通过反相色谱(C18柱,0-100%乙腈-水+0.05%三氟乙酸("TFA"))纯化残余物。合并纯洗脱份且冻干,得到25mg(13μmol,36%产率)呈无色固体状的Fmoc-VIa-21。固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1929.8[M+Na]$^+$,正如对$C_{97}H_{127}ClN_{14}O_{24}$所预期。

[1104] 在室温下,将哌啶(26μL)添加至Fmoc-VIa-21(25mg,13μmol)于2mL无水DMA中的溶液中。20分钟之后,通过反相HPLC(C18柱,0-75%乙腈-水+0.05%TFA)直接纯化反应混合物。合并纯洗脱份且冻干,得到8mg呈白色固体状的接头-药物VIa-21(5μmol,39%产率)。白

色固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1685.9[M+H]$^+$,正如对$C_{82}H_{117}ClN_{14}O_{22}$所预期。

[1105] 2.接头-有效负载VIa-11的合成。接头-有效负载VIa-11的合成显示于图2的方案2中。将4-哌啶酮盐酸盐单水合物(1.53g,10mmol)、Boc酸酐(2.39g,11mmol)、碳酸钠(1.22g,11.5mmol)、二噁烷(10mL)和水(1mL)添加至含有磁性搅拌棒的100mL圆底烧瓶中。在室温下搅拌反应混合物1小时。混合物用水(100mL)稀释并用乙酸乙酯("EtOAc",3×100mL)萃取。合并的有机层用盐水洗涤,经$Na_2SO_4$干燥,过滤且在减压下浓缩。所得物质真空干燥,产生呈白色固体状的4-氧代哌啶-1-甲酸叔丁酯(1.74g,87%产率)。$^1$H NMR($CDCl_3$)δ3.73(t,4H,J=6.0),2.46(t,4H,J=6.0),1.51(s,9H)。

[1106] 将4-氧代哌啶-1-甲酸叔丁酯(399mg,2mmol)、3-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)丙酸叔丁酯(550mg,2.4mmol)、4 Å分子筛(活化粉末,200mg)和1,2-二氯乙烷(5mL)添加至含有磁性搅拌棒的干燥闪烁瓶中。在室温下搅拌混合物1小时。将三乙酰氧基硼氢化钠(845mg,4mmol)添加至反应混合物中。在室温下搅拌混合物3天,接着分配于EtOAc与$NaHHCO_3$饱和水溶液之间。有机层用盐水洗涤,经$Na_2SO_4$干燥,过滤且在减压下浓缩,产生呈粘稠油状的中间体1-1(4-((2-(2-(3-(叔丁氧基)-3-氧代丙氧基)乙氧基)乙基)氨基)哌啶-1-甲酸叔丁酯)(850mg,>100%产率)。油状物的MS(ESI)分析揭露峰值位于m/z417.2,正如所预期。

[1107] 将中间体1-1(220mg,0.5mmol)、丁二酸酐(55mg,0.55mm01)、4-(二甲氨基)吡啶(5mg,0.04mmol)和二氯甲烷(3mL)添加至含有磁性搅拌棒的干燥闪烁瓶中。在室温下搅拌混合物24小时。通过快速色谱(洗脱剂=50-100%EtOAc/己烷)部分地纯化反应混合物,产生呈透明油状的中间体1-2(13-(1-(叔丁氧基羰基)哌啶-4-基)-2,2-二甲基-4,14-二氧代-3,7,10-三氧杂-13-氮杂十七烷-17-烷酸)(117mg)。

[1108] 将中间体1-2(55mg,0.1mmol)、脱酰基美登素(65mg,0.1mmol)、1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡锭3-氧化物六氟磷酸盐("HATU",43mg,0.11mmol)、二甲基甲酰胺("DMF",1mL)和二氯甲烷("DCM",0.5mL)添加至含有磁性搅拌棒的干燥闪烁瓶中。在室温下搅拌混合物8小时。通过C18快速色谱(洗脱剂=5-100%MeCN/水)直接纯化反应混合物,产生呈白色膜状的中间体11-1(18mg,16%产率)。膜状物的MS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1148.7,正如所预期。

[1109] 将中间体11-1(31mg,0.027mm01)和二氯甲烷(1mL)添加至含有磁性搅拌棒的干燥闪烁瓶中。将溶液冷却至0℃且添加四氯化锡(IV)(1.0M于DCM中的溶液,0.3mL,0.3mmol)。在0℃下搅拌反应混合物1小时。通过C18快速色谱(洗脱剂=5-100%MeCN/水)直接纯化反应混合物,产生呈白色固体状的中间体11-2(16mg,60%产率)。白色固体的MS(ESI)分析揭露峰值位于m/z992.6,正如所预期。

[1110] 将中间体11-2(16mg,0.016mmol)、Fmoc-VIa(13mg,0.02mmol,显示于方案6中)、N,N-二异丙基乙胺("DIPEA",8μL,0.05mmol)和DMF(1mL)添加至含有磁性搅拌棒的干燥闪烁瓶中。在室温下搅拌溶液18小时。通过C18快速色谱(洗脱剂=5-100%MeCN/水)直接纯化反应混合物,产生呈白色固体状的Fmoc-VIa-11(18mg,77%产率)。白色固体的MS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1457.9,正如所预期。

[1111] 将Fmoc-VIa-11(18mg,0.012mmol)、哌啶(20μL,0.02mmol)和DMF(1mL)添加至含有磁性搅拌棒的干燥闪烁瓶中。在室温下搅拌溶液20分钟。通过C18快速色谱(洗脱剂=1-60%MeCN/水)直接纯化反应混合物,产生呈白色固体状的接头-药物VIa-11(15mg,98%产

率)。白色固体的MS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1236.0,正如所预期。

[1112] 3.接头-有效负载VIb-11的合成。

[1113] 接头-药物VIb-11的合成显示于图3的方案3中。

[1114] 自上海美迪西生物医药有限公司商购化合物1-1且按原样使用。化合物1-1也可根据国际专利申请公布WO 2015/081282、WO 2015/187428及Albers等人,Eur.J.Med.Chem.2014,83:3-9中所公开的合成程序制备,所述文献各自以全文引用的方式并入本文中。单甲基奥瑞他汀F(MMAF)获自商业来源且不经纯化即使用。

[1115] 在室温下,将DIPEA(35μL,0.2mmol)、接着将HATU(30mg,0.08mmol)添加至化合物1-1(90mg,0.09mmol)于0.6mL无水DMF中的溶液中。所得混合物搅拌30分钟且与MMAF(50mg,0.07mmol)合并。在室温下搅拌反应混合物2小时且通过反相色谱(C18,40-100%乙腈-水+0.05%TFA)直接纯化,得到98mg呈黄色油状的中间体12-1(0.06mmol,86%产率)。白色固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1717.7[M+H]$^+$,正如对$C_{98}H_{128}N_{10}O_{17}$所预期。

[1116] 在室温下,将哌啶(40μL,0.4mmol)添加至中间体12-1(98mg,0.06mmol)于0.8mL无水DMA中的溶液中。30分钟后,通过反相HPLC(C18柱,10-70%乙腈-水+0.05%TFA)直接纯化反应混合物。合并纯洗脱份且冻干,得到45mg呈白色固体状的接头-药物VIb-12(0.03mmol,50%产率)。白色固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1317.8[M+H]$^+$,正如对$C_{69}H_{108}N_{10}O_{15}$所预期。

[1117] 4.接头-有效负载VIb-82的合成。

[1118] 接头-药物VIb-82的合成显示于图4的方案4中。

[1119] 化合物8-1及2,3,4,5,6-五氟苯酚自上海美迪西生物医药有限公司商购且按原样使用。单甲基奥瑞他汀E(MMAE)是购自BroadPharm(San Diego,CA,USA)。所有其他试剂都获自商业来源且不经纯化即使用。

[1120] 将化合物8-1(1.33g,1.67mmol)与2,3,4,5,6-五氟苯酚(1.23g,6.68mmol)合并于6.5mL无水DMF中。此混合物在室温下用1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺("EDCI-HCl",0.64g,3.34mmol)一次性处理并搅拌20小时,直至化合物8-1完全消耗为止,如HPLC分析所证明。将反应混合物负载于C18柱(BIOTAGE®,60g样品)并用ACN/水+0.05%TFA的0-80%梯度(10个柱体积)洗脱。合并纯洗脱份,在旋转式蒸发器上浓缩直至稍微浑浊为止,并且冻干,得到呈浅棕色粉末状的中间体8-2(1.40g,1.46mmol,87%产率),在氮气下、在-20℃下储存直至进一步使用为止。浅棕色粉末的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 961.2[M+H]$^+$,正如对$C_{44}H_{45}F_5N_6O_{11}S$所预期。

[1121] 在室温下,在20mL玻璃瓶中,将MMAE(720mg,1.0mmol)、5mL无水DMF及0.35mL DIPEA(2.0mmol)合并。将所得混合物搅拌并用固体状的化合物8-3(1014mg,1.0mmol)、分几小份处理,随后在室温下一次性添加HOAt(136mg,1.0mmol)。搅拌反应混合物6小时直至反应完成,如HPLC分析所证明。将反应混合物倾入30mL水中。所得白色沉淀物通过离心分离并收集,用5mL水洗涤,并且在高真空下短暂干燥,得到1.87g呈黄色固体状的中间体8-4,其不经纯化即根据下述公开内容进一步反应。

[1122] 中间体8-4(1.87g)于15mL THF中的溶液在冰浴中冷却至0℃且用1M氢氧化锂水溶液(3mL)缓慢处理。反应混合物在0℃下搅拌3小时,接着升温至环境温度,用3mL的1M氢氧化锂水溶液处理并用3mL甲醇稀释。在室温下搅拌所得混合物3小时,直至水解完成为止,如

HPLC分析所证明。接着通过添加1M HCl水溶液以使反应混合物达到pH 7来淬灭反应。接着在减压下浓缩反应混合物且用10mL甲基叔丁基醚(“MTBE”)洗涤。通过反相色谱(C18柱,0-40％乙腈-水+0.05％TFA)纯化水层。合并纯产物洗脱份,在减压下浓缩并冻干,得到呈白色粉末状的中间体8-5(735mg,0.60mmol,60％产率,经两个步骤)。白色粉末的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z1229.7[M+H]$^+$,正如对$C_{61}H_{96}N_8O_{18}$所预期。

[1123] 在室温下,将DIPEA(0.21mL,1.2mmol)和中间体8-2(575mg,0.60mmol)于2mL DMA中的溶液添加至中间体8-5(735mg,0.60mmol)于3mL无水DMA中的搅拌溶液中。1-接着添加羟基-7-氮杂苯并三唑(“HOAt”,84mg,0.60mmol)。搅拌所得混合物30分钟,直至偶合完成,如HPLC所证明。接着在室温下用1.2mL哌啶处理反应混合物。15分钟之后,通过反相色谱(C18柱,乙腈-水的0-40％梯度)纯化反应混合物。合并纯洗脱份,在减压及室温下浓缩并冻干,得到呈白色蓬松粉末状的接头-药物VIb-82(808mg,0.45mmol,75％产率)。白色粉末的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于m/z 1783.9[M+H]$^+$,正如对$C_{84}H_{130}N_{14}O_{26}S$所预期。

[1124] 5.接头-有效负载VIb-81的合成。

[1125] 接头-药物VIb-81的合成显示于图5的方案5中。

[1126] 将3-羟基-4-硝基苯甲醛(204mg,1.22mmol)和乙酰基溴-α-D-半乳糖(500mg,1.22mmol)与20mL无水乙腈合并于50mL圆底烧瓶中。溶液用氧化银(I)(986mg,4.3mmol)处理并所得混合物在室温下、在暗处剧烈搅拌24小时。在真空下浓缩反应混合物之后,使用乙酸乙酯-己烷混合物作为洗脱剂(0-100％梯度)、在硅胶上纯化残余物,获得420mg(0.85mmol,70％产率)呈浅黄色固体状的三乙酸(2R,3S,4S,5R,6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(2-氨基-5-(羟甲基)苯氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基酯。黄色固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于520.0[M+Na]$^+$,正如对$C_{21}H_{23}NO_{13}$所预期。

[1127] 将钯/碳(30mg,10％wt.)和30μL三甲胺添加至三乙酸((2R,3S,4S,5R,6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(5-甲酰基-2-硝基苯氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基酯(350mg,0.70mmol)于3mL乙酸乙酯中的溶液中。去除空气之后,向烧瓶配备氢气球且在室温下搅拌反应混合物48小时。经由硅藻土垫过滤之后,在真空下去除溶剂并且所得残余物在高真空下干燥,得到呈白色固体状的300mg三乙酸(2R,3S,4S,5R,6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(2-氨基-5-(羟甲基)苯氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基酯,其不经另外纯化即进一步用于合成。白色固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于470.1[M+H]$^+$,正如对$C_{21}H_27NO_{11}$所预期。

[1128] 将Boc-L-丙氨酸(220mg,1.11mmol)和三乙酸(2R,3S,4S,5R,6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(2-氨基-5-(羟甲基)苯氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基酯(520mg,1.16mmol)合并于5mL无水二氯甲烷及0.50mL无水甲醇中。所得溶液在室温下用N-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉(“EEDQ”,280mg,1.13mmol)处理。反应混合物在暗处搅拌一小时,随后真空去除溶剂。所得中间体8-7在高真空下干燥一小时且在室温下溶解于TFA与DCM的6mL 1:1混合物中。允许溶液静置一小时,随后去除溶剂并且所得中间体8-8在高真空下保持数小时。

[1129] 在单独的20mL闪烁瓶中,将Fmoc-L-缬氨酸(375mg,1.1mmol)与HATU(420mg,1.1mmol)和DIPEA(375μL,2.15mmol)混合于3mL无水DMF中。在室温下搅拌混合物30分钟,与中间体8-8合并且搅拌过夜直至反应完成(如LCMS分析所证明)。反应混合物直接在反相C18柱($CH_3CN$-$H_2O$/0.05％TFA,0-80％梯度)上纯化,产生中间体8-9,其为含有少量杂质的混合物。产物在高真空下充分干燥且不经另外纯化即经历下一步骤。

[1130] 将中间体8-9溶解于6mL无水DCM中且用DIPEA(375μL,2.15mmol)处理,随后在室温下一次性添加686mg(2.26mmol)双(4-硝基苯基)碳酸酯。搅拌反应混合物一小时,随后在真空下去除溶剂。所得残余物在硅胶(EtOAc-己烷,10-100%梯度)上通过柱色谱纯化,产生呈微黄色固体状的中间体8-10(640mg,0.62mmol,56%产率,经四个步骤)。中间体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于1049.3[M+Na]$^+$,正如对$C_{51}H_{s4}N_4O_{19}$所预期。

[1131] 将4-(甲氨基)丁酸(61mg,0.52mmol)、61μL(0.35mmol)DIPEA及1mL无水DMF添加至20mL闪烁瓶中。在室温下将所得溶液与180mg(0.175mmol)中间体8-10合并。搅拌反应混合物一小时,直至中间体8-10完全消耗(如LCMS分析所证明)。在真空下去除溶剂,并且将残余物溶解于3mL甲醇中。将所得溶液冷却至0℃且用3mL 1M氢氧化锂水溶液处理。搅拌反应混合物30分钟,接着升温至室温且在真空下浓缩。残余物直接在反相C18柱($CH_3CN$-$H_2O$/0.05%TFA,0-50%梯度)上纯化,获得90mg(0.146mmol,83%产率,经两个步骤)呈黄色油状的中间体8-11。油状物的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于615.3[M+H]$^+$,正如对$C_{27}H_{42}N_4O_{12}$所预期。

[1132] 将中间体8-11(84mg,0.14mmol)、1mL无水DMF及DIPEA(48μL,0.28mmol)添加至20mL闪烁瓶中,随后添加130mg(0.14mmol)中间体8-2。搅拌所得混合物30分钟,直至偶合完成(如LCMS分析所证明)。将美登素(89mg,0.14mmol)于0.5mL DMF中的溶液直接添加至反应混合物中,随后添加HATU(52mg,0.14mmol)。30分钟后,反应混合物在反相C18柱($CH_3CN$-$H_2O$/0.05%TFA,10-95%梯度)上纯化。溶剂完全去除之后,将所得中间体8溶解于3mL DMF中且在室温下用150μL哌啶处理。30分钟后,反应混合物直接在反相制备型HPLC(C18柱,$CH_3CN$-$H_2O$/0.05%TFA,0-50%梯度)上纯化。将纯洗脱份冻干,得到58mg(0.032mmol,23%产率,经三个步骤)接头-药物VIb-81。冻干固体的LRMS(ESI)分析揭露峰值位于1801.8[M+H]$^+$,正如对$C_{82}H_{118}ClN_{13}O_{28}S$所预期。

[1133] C.5T4 ADC的生物缀合

[1134] 如下使醛标记的抗体(15mg/mL)与合成的接头-药物(8mol当量的药物:抗体)缀合:使接头-药物与醛标记的抗体在37℃下、在20mM柠檬酸钠PH 5.5、含有0.85%DMA的50mM氯化钠中反应72小时。在一些情况下,为了改良接头-药物溶解性,添加0.25TX-100和/或最高10%vol/vol DMA。缀合之后,通过使用具有30kDa TFF盒(Sigma-Aldrich,目录号P3C030C00)的115V Labscale切向流过滤(TFF)系统(Millipore,目录号XX42LSS11)进行渗滤并在20mM柠檬酸钠pH 5.5、50mM NaCl中交换12个渗滤体积(600mL)来去除残余游离药物。或者,通过在20mM柠檬酸钠PH 5.5、50mM氯化钠使用多轮稀释并使用AMICON®0.5mL 30kD截止分子量(MWCO)(Millipore Sigma,目录号#UFC5030BK)或ZEBA®脱盐柱(Fisher Scientific,目录号P187766)浓缩来去除残余游离药物。为了测定最终产物的药物/抗体比率(DAR),通过分析型疏水性相互作用色谱(HIC)或聚合物反相色谱(PLRP)来检查抗体-药物缀合物。使用1.5M硫酸铵及25mM磷酸钠(PH 7.0)作为流动相A且使用25%异丙醇及18.75mM磷酸钠(PH 7.0)作为流动相B,运作HIC柱(Tosoh Bioscience,目录号14947)。使用含有0.1%三氟乙酸的$H_2O$作为流动相A及含有0.1%三氟乙酸的$CH_3CN$作为流动相B,运作PLRP柱(Agilent,目录号PL1912-1802),其中将柱加热至80℃。为了测定聚集,使用分析型尺寸排阻色谱(Tosoh Bioscience,目录号08541)、使用300mM NaCl、25mM磷酸钠及5%异丙醇(pH 6.8)的流动相分析样品。

[1135] D.ADC表征:执行以下分析以表征最终ADC产物:

[1136] 1.解链温度分析

[1137] 使用APPLIED BIOSYSTEMS™ PROTEIN THERMAL SHIFT™染料试剂盒(ThermoFisher Scientific目录号4461146)制备用于蛋白质热漂移实验的样品(解链温度)。使用QUANTSTUDIO™ 3仪器(ThermoFisher Scientific目录号A28567),利用PROTEIN THERMAL SHIFT™软件v1.4(ThermoFisher Scientific目录号466038)收集数据。简言之,将PROTEIN THERMAL SHIFT™染料(1000X)在水中、在去离子水中稀释8X。在冰上通过将5μLPROTEIN THERMAL SHIFT™缓冲液、12.5μL蛋白质溶液及2.5μL经稀释的PROTEIN THERMAL SHIFT™染料(8X)合并以获得20μL的总反应溶液体积来制备样品。用移液管将反应溶液混合10次。接着以1000rpm将管离心1分钟且接着在冰上培育直至分析。将样品负载于仪器板上,接着负载于QUANTSTUDIO™ 3实时PCR系统仪器中。使用标准解链曲线实验、在以下条件下收集数据:步骤1温度:25℃,历时2分钟;步骤2温度:99℃,历时2分钟,使用连续快速匀变模式(步骤1:1.6℃/秒;步骤2:0.05℃/秒)。解链温度原始数据在QUANTSTUDIO™ 3分析软件内去卷积。下表8报告各种ADC的所测解链温度。

[1138] 表8.ADC的解链温度

[1139]

| mAb或ADC | CH2 $T_m$ | Fab $T_m$ |
|---|---|---|
| mAbA4 WT | 69.18 | 89.94 |
| mAbA15 WT | 70.07 | 86.38 |
| mAbA17 WT | 70.06 | 81.92 |
| mAbA4-VIa-11 | 69.03 | 89.63 |
| mAbA1 5-VIa-11 | 69.34 | 89.95 |
| mAbA1 7-VIa-11 | 69.04 | 80.9 |
| mAbA4-VIb-82 | 69.3 | 89.59 |
| mAbA1 5-VIb-82 | 69.74 | 86.04 |
| mAbA1 7-VIb-82 | 69.46 | 80.87 |
| mAbA15-VIb-12 | 69.48 | 85.94 |

[1140] 2.药物/抗体比率(DAR)。分析型疏水性相互作用色谱(HIC)(Tosoh#14947)联合UV/Vis检测。通过反相液相色谱(RP-HPLC)(Agilent目录号PL1912-1802)联合UV/Vis检测来分析最终产物的还原形式,以验证DAR。RP色谱提供的数据也验证仅重链经修饰且存在仅一种修饰。下表9报告所测试的各种ADC的DAR。

[1141] 表9.ADC的药物/抗体测量值

[1142]

| 抗体 | 接头-有效负载 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | VIa-21 | VIa-11 | VIb-12 | VIb-82 | VIb-81 |
| mAbA4 | 1.8 | 1.8 | - | 1.8 | - |
| mAbA15 | 1.8 | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 1.9 |
| mAbA17 | 1.9 | 1.8 | - | 1.8 | - |

[1143] 上述经鉴别的各种分析方法的具体方案进一步详细如下。

[1144] 分析型疏水性相互作用色谱(HIC):在配备有Tosoh(#14947)的4.6mm x 35mm TSK凝胶丁基-NPR柱的Agilent 1100仪器上分析样品,所述柱在25℃下保持。通过添加20μL

50mM NaCl(pH 5.5)和20μL流动相A至20μg样品中来制备样品且在室温下注射。梯度洗脱使用流动相A(25mM $Na_3PO_4$、1.5M$(NH_4)_2SO_4$,pH 7.0)和流动相B(18.75mM $Na_3PO_4$ PH 7.0、25%异丙醇),利用表10中所报告的程序,流量为每分钟1.0mL。检测经由215nm、252nm及280nm UV。

[1145] 表10.HIC分析用的梯度洗脱程序

[1146]

| 时间(min) | 流动相B(%) |
|---|---|
| 0.0 | 12 |
| 5.5 | 42 |
| 7.5 | 70 |
| 8.5 | 100 |
| 9.5 | 100 |
| 10 | 12 |
| 12 | 12 |

[1147] 反相HPLC:在配备有Agilent的50x 2.1mm PL1912-1802(8μm,1000 Å)柱的Agilent 1100仪器上分析样品,所述柱在80℃下保持。通过将0.5mM DTT、50μL 8M胍HC、130mM tris及1mM EDTA(PH 7.6)的10μL混合物添加至20μg样品中且添加PBS直至100μL最终体积来制备样品。制备之后,在37℃下培育样品30分钟。在25%乙腈+0.1%TFA中以每分钟2.0mL的流量洗脱样品且经由215nm、252nm及280nm UV检测。

[1148] 尺寸排阻HPLC:在配备有Tosoh(#08541)的7.8mm x 300mm G300 SW XL柱的Agilent 1100仪器上分析样品,所述柱在25℃下保持。在室温下注射样品(1mg/mL,20μg),在25mM NaPO4缓冲液、300mM NaCl pH 6.8中以每分钟1.0mL的流量洗脱,并且经由215nm、252nm及280nm UV检测。

[1149] LC-MRM/MS:此方法如下测定接头-药物的游离药物浓度:将制备ADC时通过RP-HPLC-MRM产生的接头-药物及其已知修饰的信号与使用接头-药物作为校正标准及二丁卡因-HCl(dibucaine-HCl)作为内标的内标曲线进行比较。

[1150] 使用0.457nM至1000nM范围内的样品产生标准曲线。通过添加0.75μL 100μM接头-药物至74.25μL基质中且经由移液管抽吸(10次)达成混合来制备1000nM接头-药物标准物。制得的标准物在-80℃下储存。标准物1:3如下稀释:添加25μL至50μL基质中,经由移液管抽吸(10次)达成混合且涡旋,以产生333.33nM标准物。通过在50μL基质中稀释25μL 333.33nM标准物而以相同方式产生111.11nM标准物。以类似方式进行进一步稀释,产生具有以下浓度的八种标准物:1000、333.33、111.11、37.04、12.35、4.12、1.37和0.46nM。

[1151] 将ADC(50μL)添加至八个离心管中的每一者中。将内标(150μL)添加至每一者中以在各具有不同浓度的接头-药物的各离心管中建立200μL的最终体积。所有离心管涡旋5分钟,随后溶液变得混浊,因为蛋白质变性且沉淀,从而在溶液中留下游离药物。所有样品在冰上培育30分钟以有助于沉淀,接着再次涡旋10分钟。

[1152] 为了分离出所沉淀的mAb,将各样品离心(10分钟,15,000xg)。移出上清液(75μL)并置于自动取样瓶中且用75μL水稀释。使用以下HPLC/MS方法三重复运作各样品。

[1153] 在配备有Agilent的2.1x 100mm ZORBAX® RRHD Eclipse Plus C18柱(95A,1.8μm)的Agilent 1100仪器上分析样品,所述柱在50℃下保持。在室温下注射样品(1mg/mL,20μ

g)并在1％乙腈+0.1％TFA中以每分钟0.5mL的流量洗脱。使用质谱法进行检测。

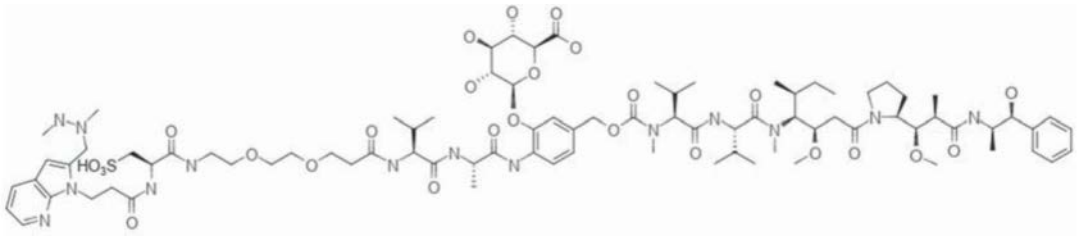
[1154] 使用SCIEX的Analyst软件的“化合物优化”函数建立质谱方法。仪器输出分子的MRM转换集,其接着用于LC-MS方法。还使用“化合物优化”产生二丁卡因的MRM转换。

[1155] 下表11中所标识的转换用于测定接头-药物VIb-82的游离浓度(此可基于质谱仪而变化)。使用类似转换测定VIa-21、VIb-12和VIa-11游离浓度。各转换物种的属性描绘于下表11中。

[1156] 表11.用于测定接头-有效负载VIb-82的游离浓度的转换物种

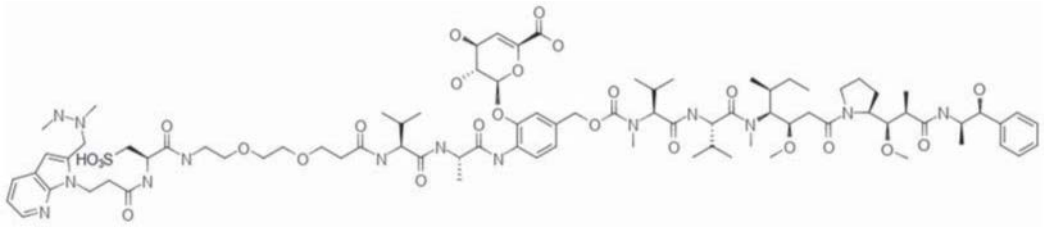
[1157]

| Q1 (Da) | Q3 (Da) | 时间(ms) | 转换物种 | DP (伏) | CE (伏) | CXP (伏) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 892.536 | 718.2 | 30 | VIb-82 亲本 | 1 | 29 | 26 |
| 892.536 | 501.1 | 30 | VIb-82 亲本 | 1 | 35 | 18 |
| 892.536 | 725 | 30 | VIb-82 亲本 | 1 | 29 | 26 |
| 898.527 | 718.2 | 30 | VIb-82 +12 Da | 1 | 29 | 30 |
| 898.527 | 737.1 | 30 | VIb-82+12 Da | 1 | 29 | 12 |
| 898.527 | 513 | 30 | VIb-82+12 Da | 1 | 39 | 54 |
| 883.684 | 718.1 | 30 | VIb-82-18 Da | 136 | 31 | 30 |
| 883.684 | 501 | 30 | VIb-82-18 Da | 136 | 37 | 20 |
| 883.684 | 725 | 30 | VIb-82-18 Da | 136 | 27 | 12 |
| 343.968 | 271.1 | 10 | IS | 31 | 29 | 24 |
| 343.968 | 215.1 | 10 | IS | 31 | 39 | 16 |

[1158] 

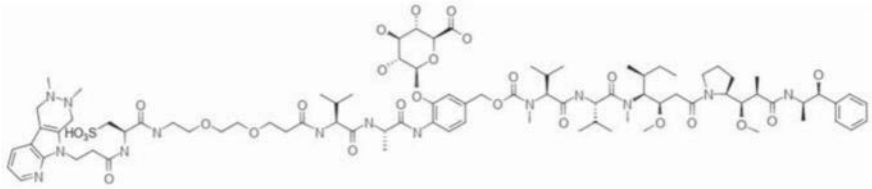
[1159] VIb-82,亲本,$C_{84}H_{130}N_{14}O_{26}S$

[1160] 单同位素质量:1782.9001

[1161] 

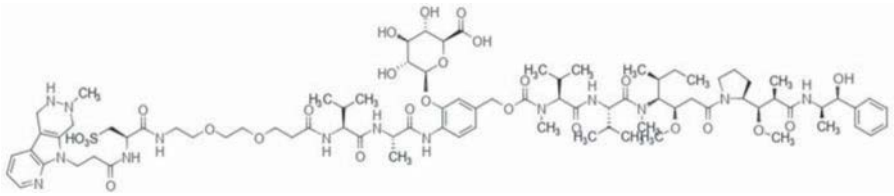
[1162] VIb-82,-18Da,$C_{84}H_{128}N_{14}O_{25}S$

[1163] 单同位素质量:1764.8896

[1164] 

[1165] VIb-82,+1 2Da,$C_{85}H_{130}N_{14}O_{26}S$

[1166] 单同位素质量:1794.9001

[1167] 

[1168] VIb-82,-2Da,$C_{84}H_{128}N_{14}O_{26}S$

[1169] 单同位素质量:1780.8845

[1170] 为了计算游离药物百分比,产生线性校准曲线。质谱方法中所鉴别出的各种转换产生其自身色谱图。对所有标准物的各种转换的峰求积分,以求得峰面积。将所有转换的峰面积(包括“亲本”、“-18Da”及“+12Da”)加在一起,以产生“VIb-82面积”值。同样将内标的所有转换的峰面积相加,以产生“IS面积”值。计算VIb-82面积相对于IS面积的比率且产生散布图,其中x轴为浓度且y轴为比率。利用作图的数据产生趋势线,其中趋势线方程的x截距为ADC浓度。使用以下方程计算游离药物%:

[1171] $$游离药物\% = \frac{游离药物浓度}{总ADC浓度} * 100\%$$

[1172] 实施例7:未缀合的抗体对人5T4的结合(ELISA)

[1173] A.正常结合。利用ELISA测试未缀合的抗体结合至人5T4(hu5T4)的能力。第1天,将具有c端聚组氨酸及Avi(AVITAG™)标签(AcroBiosystems(Newark,DE,USA),目录号TPG-H52E5)的未缀合的人TPBG/5T4蛋白在PBS中稀释至2μg/mL,充分混合,在96孔板(Nunc MAXISORP®)中每孔涂覆100μL且在4℃培育过夜。

[1174] 第2天,培养板用含有0.1%Tween®-20的PBS(“PBS-T”)洗涤四次。孔用200μL含有酪蛋白的PBS(BLOCKER™酪蛋白,获自ThermoFisher Scientific)阻断且在室温下、在摇振的同时培育2小时。

[1175] 在PBS中制备IgG-ADC的1:3稀释系列且以每孔100pL体积添加于96孔板中。在室温下,在摇振的同时培育板1小时。

[1176] 山羊抗人IgG Fcγ特异性HRP缀合物(Jackson Immunoresearch,目录号109-035-098)在PBS中以1:15000的系数稀释。使用洗板器(BIOTEK®ELx405™)、使用PBS-T将ELISA板洗涤六次,随后向各孔中添加100μL山羊抗人IgG Fcγ特异性HRP缀合物。接着在室温下,在摇振的同时培育板30分钟。

[1177] 使用洗板器(BIOTEK ELx405™)、使用PBS-T将ELISA板洗涤六次,随后向各孔中添加100μL的3,3′,5,5′-四甲基联苯胺(TMB)。允许培养板显色直至深蓝色变得可见。接着添加$H_2SO_4$(2N,100μL)以淬灭反应并且在读板器(获自Molecular Devices的SPETRAMAX® M5,其配备有SOFTMAX®Pro软件)读取各孔的吸光度。

[1178] B.应激测试

[1179] 1.高pH应激测试。利用ELISA,在碱性(高pH)条件下测试若干未缀合的抗体结合至5T4的能力。含有1mg/mL抗体的0.1%w/w $H_2O_2$/1x PBS在室温下、在暗处储存24至48小时,随后添加50mM甲硫氨酸。在如A部分中所述经由ELISA进行分析之前,将样品冷冻储存。下表12报告针对各种测试抗体计算的$EC_{50}$。

[1180] 表12.未缀合的抗体在高pH下对hu5T4的结合

[1181]

| mAb | 条件 | $EC_{50}$(nM) |
|---|---|---|
| mAbA4 | pH 8.5,第0天 | 0.120 |
| mAbA4 | pH 8.5,第1天 | 0.127 |
| mAbA4 | pH 8.5,第4天 | 0.114 |
| mAbA4 | pH 8.5,第7天 | 0.128 |
| mAbA4 | pH 8.5,第14天 | 0.136 |
| mAbA15 | pH 8.5,第0天 | 0.134 |
| mAbA15 | pH 8.5,第1天 | 0.128 |
| mAbA15 | pH 8.5,第4天 | 0.133 |
| mAbA15 | pH 8.5,第7天 | 0.143 |
| mAbA15 | pH 8.5,第14天 | 0.131 |
| mAbA17 | pH 8.5,第0天 | 0.153 |
| mAbA17 | pH 8.5,第1天 | 0.174 |
| mAbA17 | pH 8.5,第4天 | 0.150 |
| mAbA17 | pH 8.5,第7天 | 0.158 |
| mAbA17 | pH 8.5,第14天 | 0.167 |

[1182] 2.低pH应激测试。利用ELISA,在酸性(低pH)条件下测试若干未缀合的抗体结合至5T4的能力。制备抗体于20mM Tris/10mM EDTA中的1mg/mL至10mg/mL溶液(PH 8.5)并在37℃下储存1至2周。在如A部分中所述经由ELISA进行分析之前,将样品冷冻储存。下表13报告针对各种测试抗体计算的$EC_{50}$。

[1183] 表13.未缀合的抗体在低pH下对hu5T4的结合

[1184]

| mAb | 条件 | $EC_{50}$(nM) |
|---|---|---|
| mAbA4 | pH 5.5,第0天 | 0.133 |
| mAbA4 | pH 5.5,第1天 | 0.132 |
| mAbA4 | pH 5.5,第4天 | 0.125 |
| mAbA4 | pH 5.5,第7天 | 0.124 |
| mAbA4 | pH 5.5,第14天 | 0.122 |
| mAbA15 | pH 5.5,第0天 | 0.124 |
| mAbA15 | pH 5.5,第1天 | 0.134 |
| mAbA15 | pH 5.5,第4天 | 0.123 |
| mAbA15 | pH 5.5,第7天 | 0.132 |
| mAbA15 | pH 5.5,第14天 | 0.138 |
| mAbA17 | pH 5.5,第0天 | 0.164 |

| | | |
|---|---|---|
| mAbA17 | pH 5.5,第1天 | 0.159 |
| mAbA17 | pH 5.5,第4天 | 0.157 |
| mAbA17 | pH 5.5,第7天 | 0.190 |
| mAbA17 | pH 5.5,第14天 | 0.153 |

[1185] 3.氧化应激。利用ELISA,在氧化环境中测试若干未缀合的抗体结合至5T4的能力。制备抗体于20mM柠檬酸盐/50mM NaCl中的1mg/mL至10mg/mL溶液(pH 5.5)并在37℃下储存1至2周。在如A部分中所述经由ELISA进行分析之前,将样品冷冻储存。下表14报告针对各种测试抗体计算的$EC_{50}$。

[1186] 表14.未缀合的抗体在氧化应激下对hu5T4的结合

[1187]

| mAb | 条件 | $EC_{50}$(nM) |
|---|---|---|
| mAbA4 | PBS,0时 | 0.182 |
| mAbA4 | PBS,第24小时 | 0.200 |
| mAbA4 | PBS,第48小时 | 0.189 |
| mAbA4 | PBS+$H_2O_2$,0时 | 0.225 |
| mAbA4 | PBS+$H_2O_2$,第24小时 | 0.393 |
| mAbA4 | PBS+$H_2O_2$,第48小时 | 0.386 |
| mAbA15 | PBS,0时 | 0.229 |
| mAbA15 | PBS,第24小时 | 0.212 |
| mAbA15 | PBS,第48小时 | 0.203 |
| mAbA15 | PBS+$H_2O_2$,0时 | 0.191 |
| mAbA15 | PBS+$H_2O_2$,第24小时 | 0.190 |
| mAbA15 | PBS+$H_2O_2$,第48小时 | 0.189 |
| mAbA17 | PBS,0时 | 0.198 |
| mAbA17 | PBS,第24小时 | 0.186 |
| mAbA17 | PBS,第48小时 | 0.185 |
| mAbA17 | PBS+$H_2O_2$,0时 | 0.188 |
| mAbA17 | PBS+$H_2O_2$,第24小时 | 0.183 |
| mAbA17 | PBS+$H_2O_2$,第48小时 | 0.207 |

[1188] 实施例8.未缀合的抗体对食蟹猴、大鼠及小鼠5T4的交叉反应性(ELISA及OCTET)

[1189] 利用ELISA及Octet测试未缀合的抗体结合至非人5T4-Ts的能力。使用实施例7中所述的ELISA方案,其中将人5T4抗原替换成重组食蟹猴5T4-Fc(源自R&D Systems(Minneapolis,MN,USA),目录号2280-TG-100或LSBio(Seattle,WA,USA)、目录号LS-G137131)、重组小鼠5T4-Fc(R&D Systems,目录号5049-TG-100)、具有N端标签6His-SUMO的重组大鼠TPBG/5T4(LSBio目录号G56592)、具有N端标签His的重组小鼠TPBG/5T4(LSBio目录号G12168)抗原。对于Octet分析而言,蛋白质A生物芯片用抗体涂覆,用PBS洗涤且接着与如上文所鉴别的抗原反应。测试的所有抗体都结合至人、食蟹猴及大鼠5T4。未观测到对小鼠5T4的显著结合交叉反应性。

[1190] 实施例9.未缀合的抗体对经5T4转染的CHo和HEK293细胞的细胞结合

[1191] 测试未缀合的抗体结合至HEK293和CHO细胞的能力,所述细胞经转染以表达人、食

蟹猴、大鼠或小鼠5T4。未转染的细胞作为对照用于观测非特异性结合。mAbA4、mAbA15和mAbA17对经转染以表达人及食蟹猴5T4的HEK293和CHO细胞具有反应性,但对经转染以表达大鼠或小鼠5T4的细胞无反应性。

[1192] 实施例10.5T4 ADC的体外细胞毒性

[1193] 将MDA-MB-468、MDA-MB-231、MCF-7、NCI-H226或BxPC3细胞以每孔1500个细胞的密度接种于Costar 3610板(Corning(Corning NY,USA),VWR目录号VWR#29444-010)中,添加100μL生长培养基且培育过夜。对于待测试的各种ADC而言,制备6倍稀释系列。将20μL各种所制备的ADC溶液添加至细胞中,从而产生100nM至0.02nM的最终稀释范围,并且在37℃、5%$CO_2$下培育5天。利用Cell TITER-GLO®活力分析(Promega(Madison,WI,USA),目录号G7573)测量细胞活力且与未处理的(对照)细胞进行比较。

[1194] A.VIa-11。图6报告经mAbA15-VIa-11、mAbA17-VIa-11和与美登素直接缀合的mAbA17处理的MDA-MB-468细胞的细胞活力。图7报告经mAb15-VIa-11、mAb15-VIa-11和与美登素直接缀合的mAbA17处理的MCF-7细胞的细胞活力。

[1195] B.VIa-82。图8报告经mAbA15-VIb-82、mAbA17-VIb-82、同型对照及游离MMAE处理的MDA-MB-468细胞的细胞活力。图9报告经mAbA15-VIb-82、mAbA17-VIb-82、同型对照及游离MMAE处理的MCF-7细胞的细胞活力。图10报告经与接头-药物VIb-82缀合的各种抗体处理的MDA-MB-231细胞的细胞活力。图11报告经与接头-药物VIb-82缀合的各种抗体处理的NCI-H226细胞的细胞活力。下文所提供的图12报告经与接头-药物VIb-82缀合的各种抗体处理的BxPC3细胞的细胞活力。

[1196] 实施例11.针对癌症异种移植模型的5T4 ADC的体内功效

[1197] MCF-7.1乳腺癌异种移植模型。向雌性NCr NU/NU小鼠(n=8)注射(侧腹)含有1x$10^7$个MCF-7.1肿瘤细胞的50%MATRIGEL®(Corning Life Sciences)基质。当平均肿瘤体积达到150至250$mm^3$时,将小鼠随机分成相应治疗组并接受媒介物、同型对照或ADC的静脉内注射。第1天及第4天,在注射MCF-7.1细胞之后静脉内输注5mg/kg浓度的ADC,或第1天单次静脉内注射媒介物、同型对照或测试物(5mg/kg)。在整个研究过程中,对任一治疗组的体重不存在不利影响。

[1198] 图13示出治疗对MCF-7.1异种移植小鼠的肿瘤消退及抑制的影响,所述小鼠经mAbA15-VIa-11和mAbA17-VIa-11治疗。如箭头所示,小鼠在第1天及第4天接受静脉内注射,如图x轴上的箭头所示。

[1199] 图14示出治疗对MCF-7.1异种移植小鼠的肿瘤消退及抑制的影响,所述小鼠经mAbA15-VIb-82以及mAbA17-VIb-82治疗。如箭头所示,小鼠在第1天接受单次静脉内注射,如图x轴上的箭头所示。

[1200] 图15示出单次给药对MCF-7.1异种移植小鼠的肿瘤消退及抑制的剂量反应影响,所述小鼠经mAbA15-VIb-82的三种不同剂量浓度中的一者治疗。如箭头所示,小鼠接受媒介物、同型对照(5mg/kg)或ADC(0.5mg/kg、2.5mg/kg或5mg/kg)的单次静脉内注射。图16报告每周给药对经mAbA15-VIb-82治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的肿瘤消退及抑制的剂量反应影响。如箭头所示,小鼠在第1天及第8天接受媒介物、同型对照(2.5mg/kg)或ADC(0.25mg/kg、1.25mg/kg或2.5mg/kg)的分次剂量。

[1201] 图17报告单次给药对经mAbA17-VIb-82治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的肿瘤消退

及抑制的剂量反应影响。如箭头所示,小鼠接受媒介物、同型对照(5mg/kg)或ADC(0.5mg/kg、2.5mg/kg或5mg/kg)的单次静脉内注射。

[1202] 图18报告每周给药对经mAbA17-VIb-82治疗的MCF-7.1异种移植小鼠的肿瘤消退及抑制的剂量反应影响。如箭头所示,小鼠在第1天及第8天接受媒介物、同型对照(2.5mg/kg)或ADC(0.25mg/kg、1.25mg/kg或2.5mg/kg)的分次剂量。

[1203] MDA-MB-468乳腺癌异种移植模型:向雌性SCID Beige小鼠(n=8)注射(侧腹)含有$1x10^7$个MDA-MB-468肿瘤细胞的50%MATRIGEL®(Corning Life Sciences)基质。当平均肿瘤体积达到100至150$mm^3$时,将小鼠随机分成相应治疗组并接受媒介物、5mg/kg同型对照或5mg/kg ADC的静脉内注射。在整个研究过程中,对任一治疗组的体重不存在不利影响。

[1204] 在图19中,将mAbA15与接头-药物VIb-82的缀合物对肿瘤消退及抑制的影响与mAbA15与接头-药物VIb-81的缀合物及与MMAF直接缀合的缀合物的影响进行比较。小鼠在第1天及第4天接受ADC静脉内注射,如图x轴上的箭头所示。

[1205] MDA-MB-231乳腺癌异种移植模型:将$1x10^6$个MDA-MB-231肿瘤细胞接种至雌性BalbC/裸小鼠(n=8)的乳腺脂肪垫中。当平均肿瘤体积达到50至150$mm^3$时,将小鼠随机分成相应治疗组并接受媒介物、同型对照或5mg/kg ADC的静脉内注射。在整个研究过程中,对任一治疗组的体重不存在不利影响。mAbA15-VIb-82以及mAbA15-VIa-11对肿瘤消退及抑制的影响显示于图20中。在将小鼠分成实验组之后的第1天及第4天,小鼠接受静脉内注射(图x轴上的箭头指示在MCF-7细胞注射之后给药的日期)。

[1206] NCI-H226肺癌异种移植模型:将含有$1x10^7$个NCI-H226肿瘤细胞的1:1MATRIGEL®基质接种至雌性BalbC/裸小鼠(n=8)。当平均肿瘤体积达到150至200$mm^3$时,将小鼠随机分成相应治疗组并接受媒介物、同型对照或5mg/kg ADC的静脉内注射。在整个研究过程中,对任一治疗组的体重不存在不利影响。mAbA15-VIb-82以及mAbA15-VIa-11对肿瘤消退及抑制的影响显示于图21中。小鼠在第1天及第4天接受静脉内注射,如图x轴上的箭头所示。

[1207] BxPC3胰腺癌异种移植模型:将含有$1x10^7$个BxPC3肿瘤细胞的1:1MATRIGEL®基质接种至雌性BalbC/裸小鼠(n=8)。当平均肿瘤体积达到150至200$mm^3$时,将小鼠随机分成相应治疗组并接受媒介物、同型对照或5mg/kg ADC的静脉内注射。在整个研究过程中,对任一治疗组的体重不存在不利影响。mAbA15-VIb-82以及mAbA15-VIa-11对肿瘤消退及抑制的影响显示于图22中。小鼠在第1天及第4天接受静脉内注射,如图x轴上的箭头所示。

[1208] Calu-6肺癌异种移植模型:向含有$5x10^6$个Calu-6肿瘤细胞的PBS接种至雌性BalbC/裸小鼠(n=10)。当平均肿瘤体积达到100至200$mm^3$时,将小鼠随机分成相应治疗组并接受媒介物、同型对照或1.25、2.5或5mg/kg ADC的静脉内注射。此标示为治疗的“第1天”。小鼠在第1天接受单次静脉内注射。在整个研究过程中,对任一治疗组的体重不存在不利影响。mAbA15-VIb-82对肿瘤消退及抑制的影响显示于图23中。

[1209] 大鼠毒代动力学(TK)研究:将如上文实施例中所述产生的5mg/kg单次剂量的mAbA15-VIb-82静脉内给与雄性Sprague-Dawley大鼠(每组3只)。在给药后的0.5小时、6小时及24小时以及第2、4、7、10、14及21天收集$K_2$EDTA稳定化的血浆。通过两种ELISA方法来量化总抗体及总ADC浓度。对于总抗体测量而言,利用抗人IgG特异性抗体捕获缀合物并且用HRP缀合的抗人Fc特异性抗体加以检测。对于总ADC测量而言,利用抗人Fab特异性抗体捕获缀合物并且用小鼠抗有效负载一级抗体检测,随后用HRP缀合的抗小鼠IgG-亚类1特异性二

级抗体检测。使用Ultra TMB One-Step ELISA底物(ThermoFisher)检测所结合的二级抗体。利用硫酸淬灭反应之后,通过在配备有SoftMax Pro软件的Molecular Devices Spectra Max M5读板器上获取450nm吸光度来读取信号。使用GraphPad Prism及Microsoft Excel软件分析数据并绘制于图24A(30mg/kg)、图24B(60mg/kg)和图24C(90mg/kg)中。

[1210] *****

[1211] 在通篇本申请中,已提及多个公布、专利、专利申请及其他文献。这些公布、专利、专利申请及其他文献的公开内容特此以引用的方式并入本申请中用于所有目的,包括为了更充分地描述本文中所公开的主题所关于的目前先进技术。虽然所公开的主题已结合上文提供的实施例加以描述,但应了解,可在不偏离所公开的主题精神的情况下进行各种修改。所属领域技术人员在审阅本说明书后将清楚了解诸多变型。

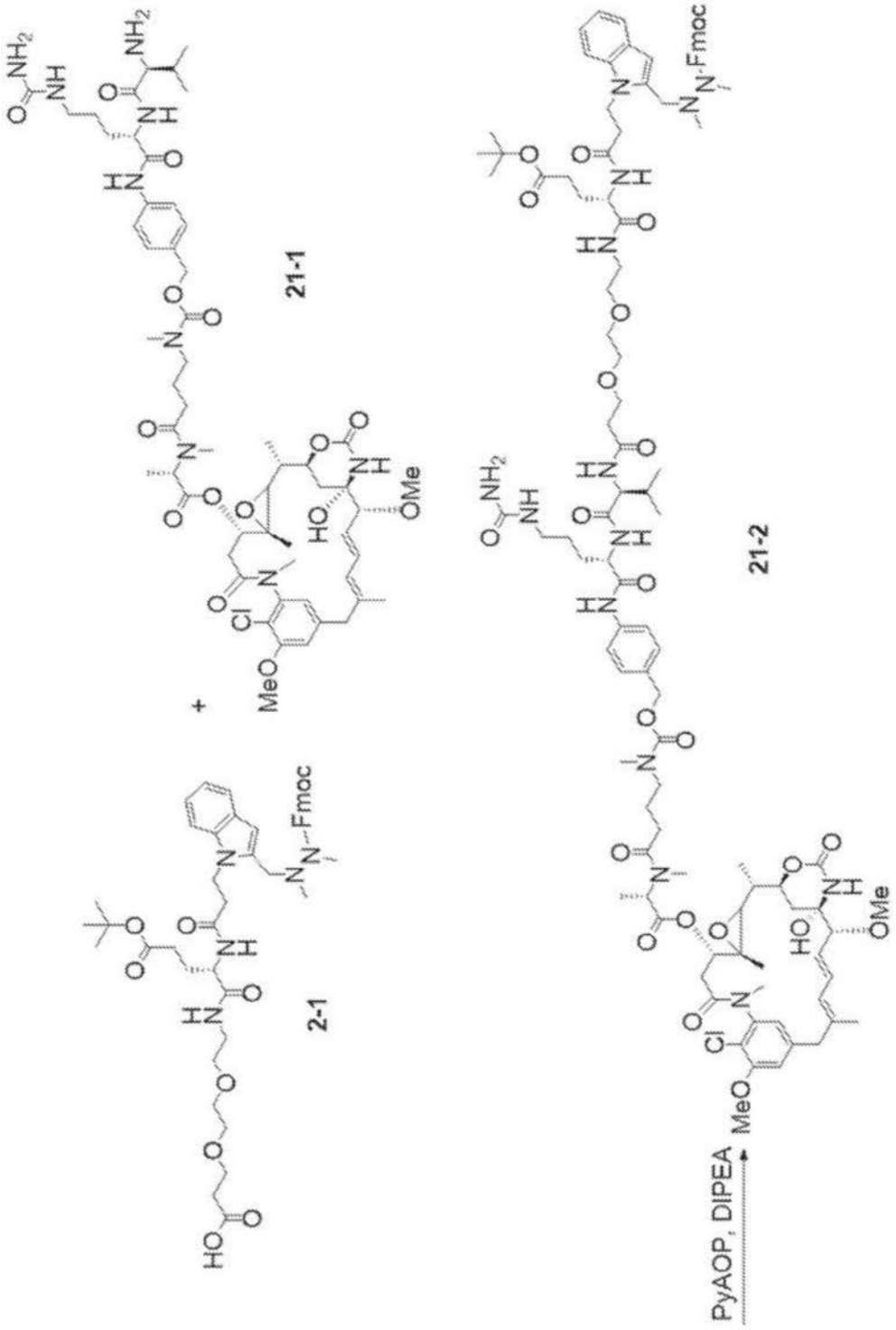



图1

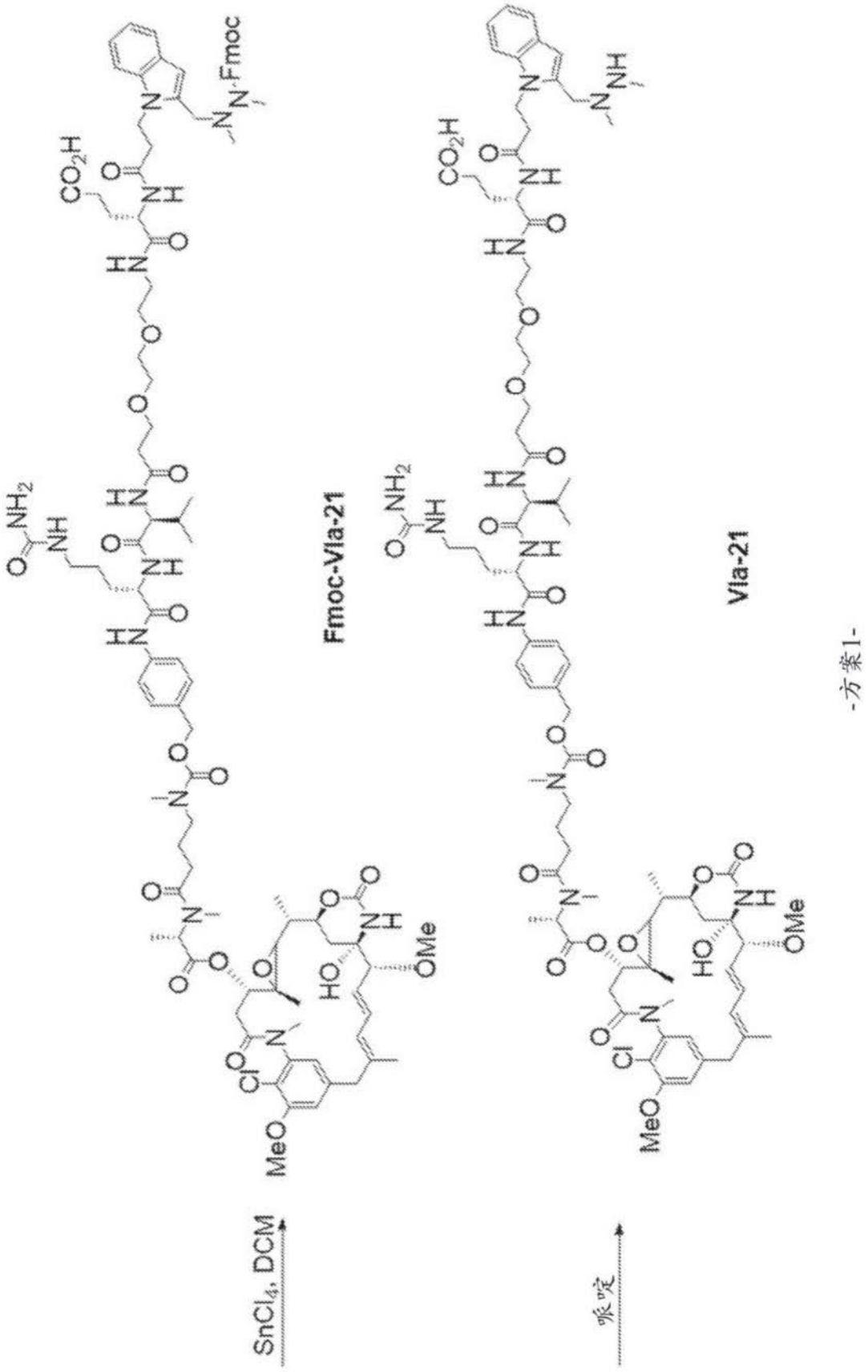



图1(续)

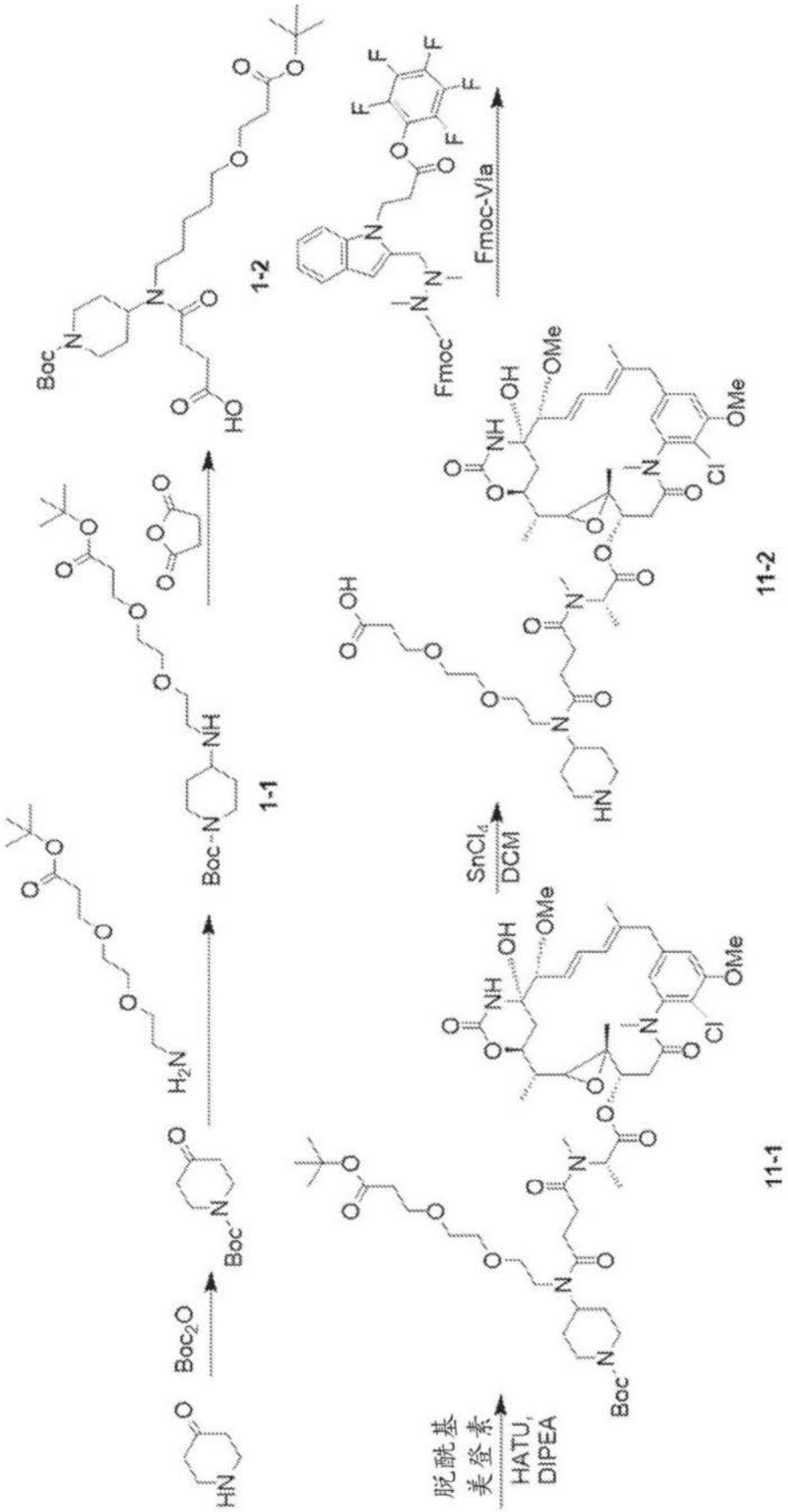



图2

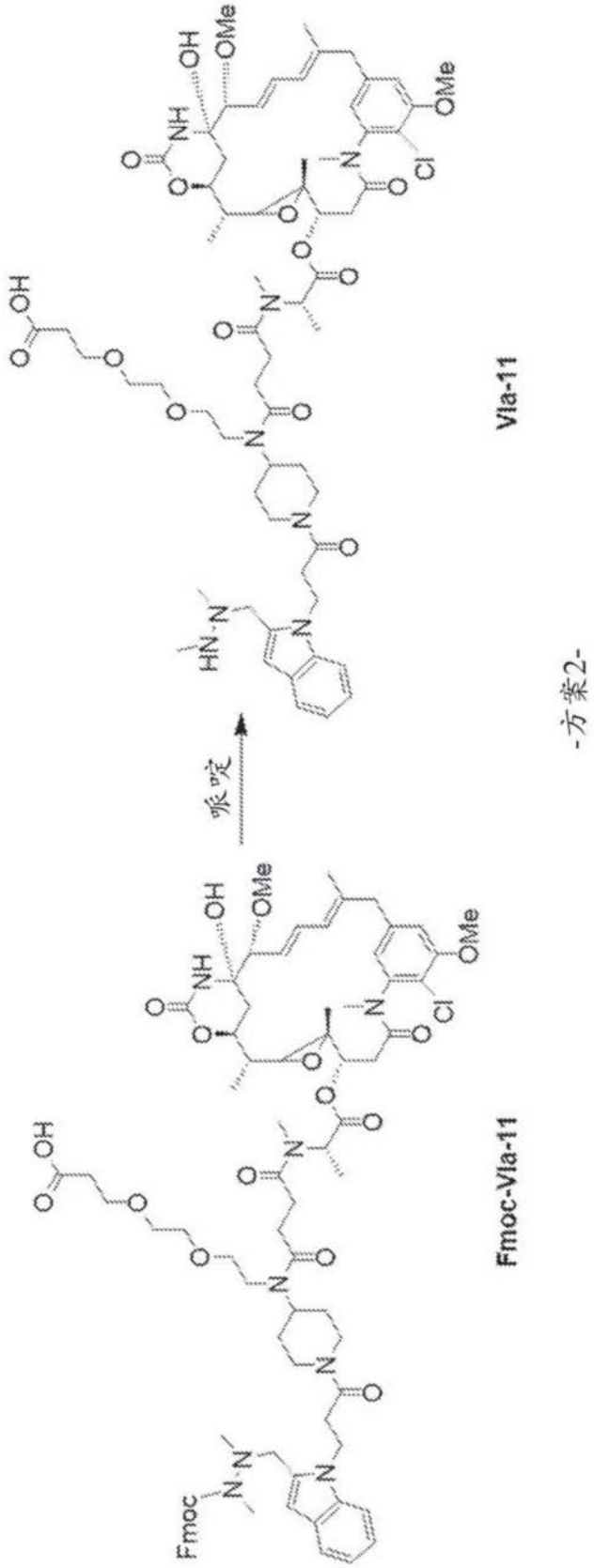
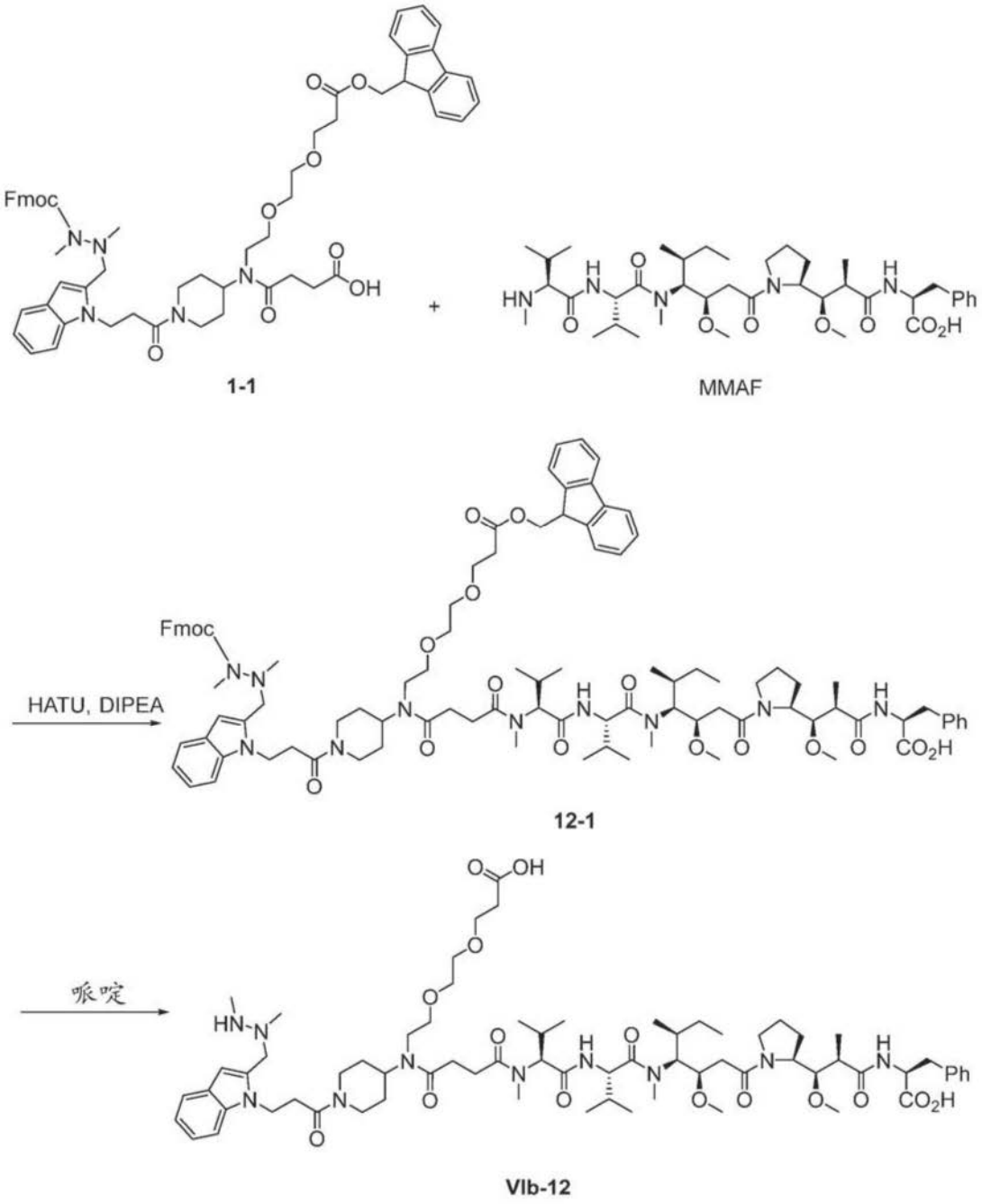



图2(续)




-方案3-

图3

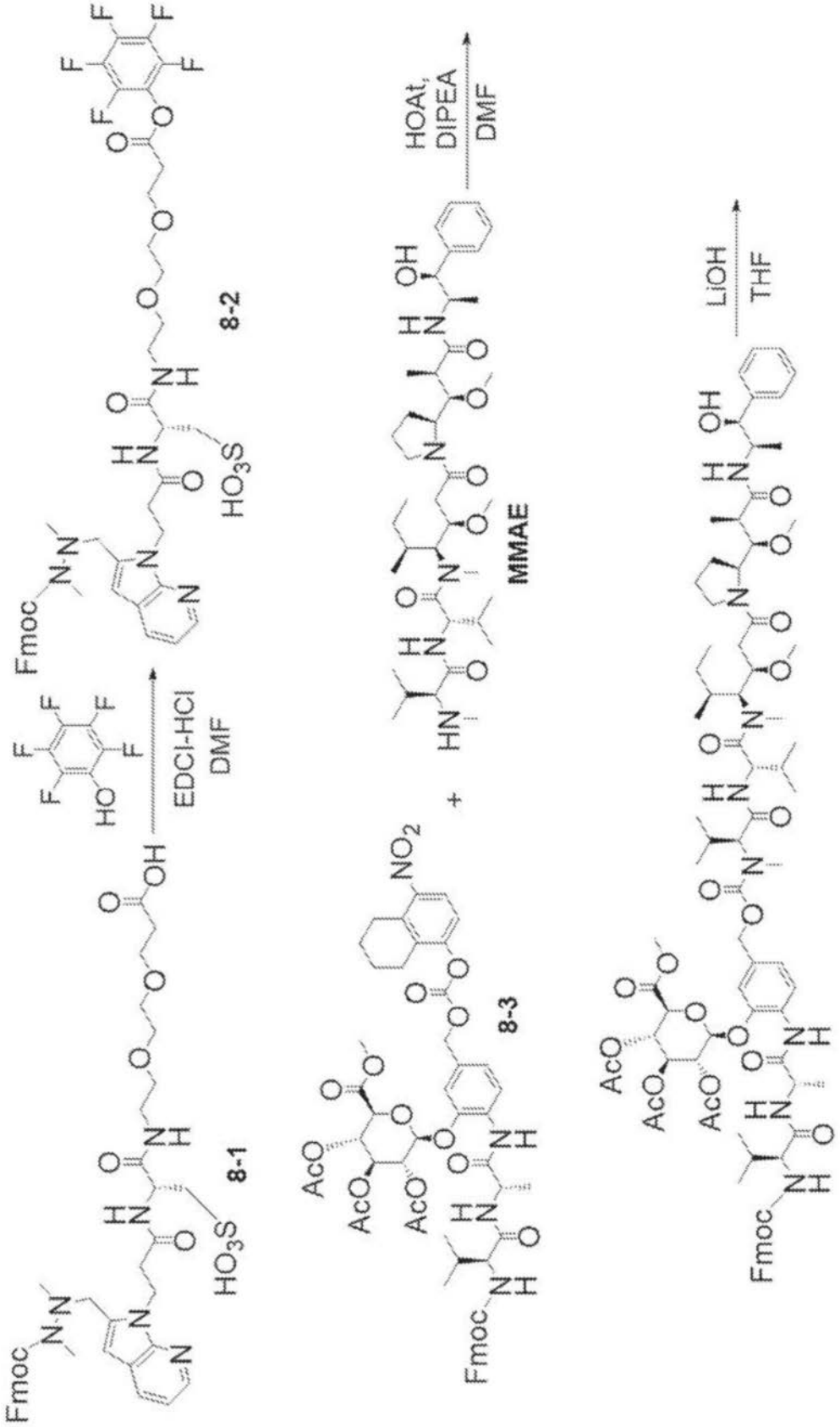



图4

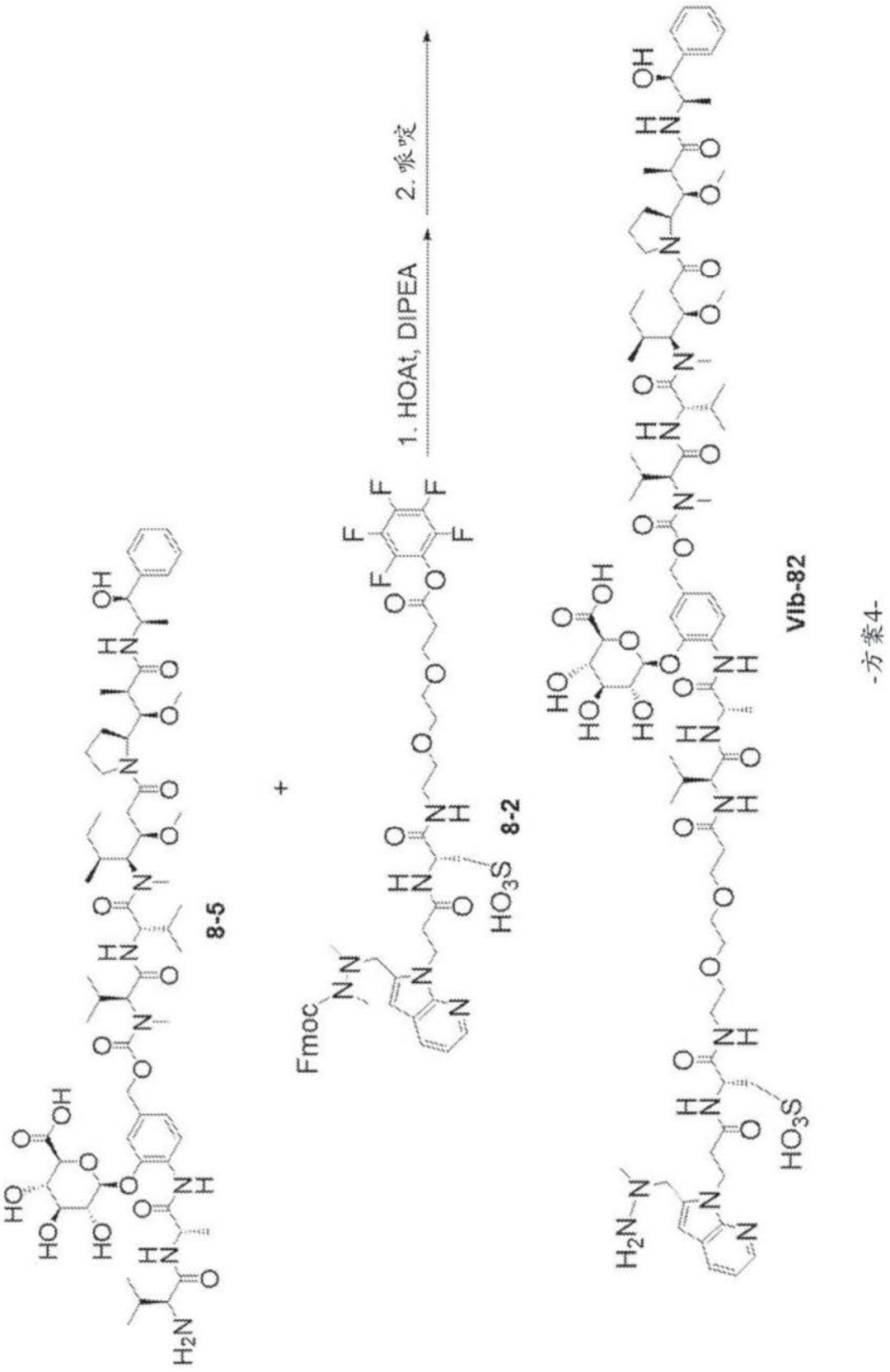



图4(续)

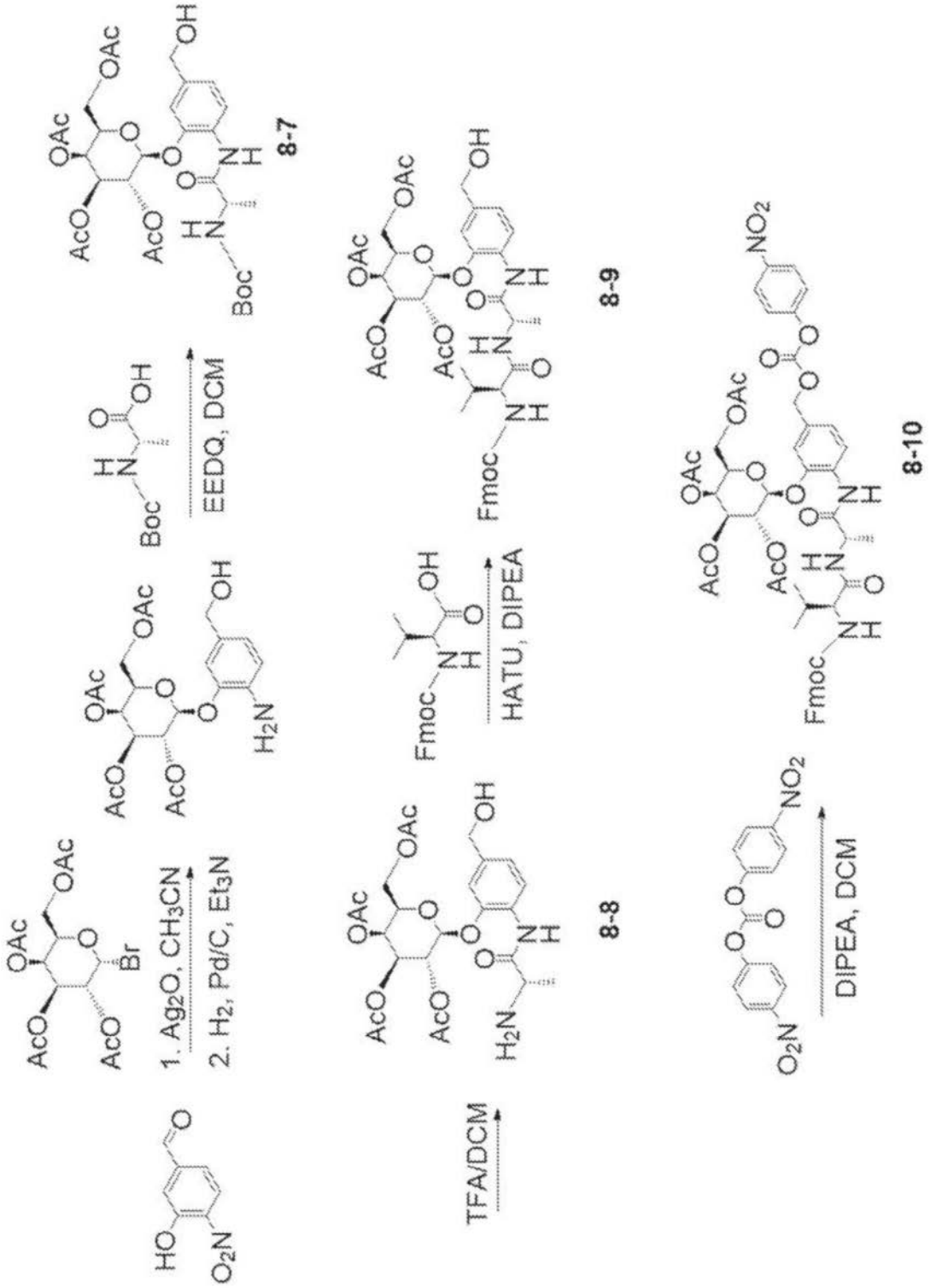

8-7
8-8
8-9
8-10
1. $Ag_2O$, $CH_3CN$
2. $H_2$, Pd/C, $Et_3N$
EEDQ, DCM
HATU, DIPEA
TFA/DCM
DIPEA, DCM

图5

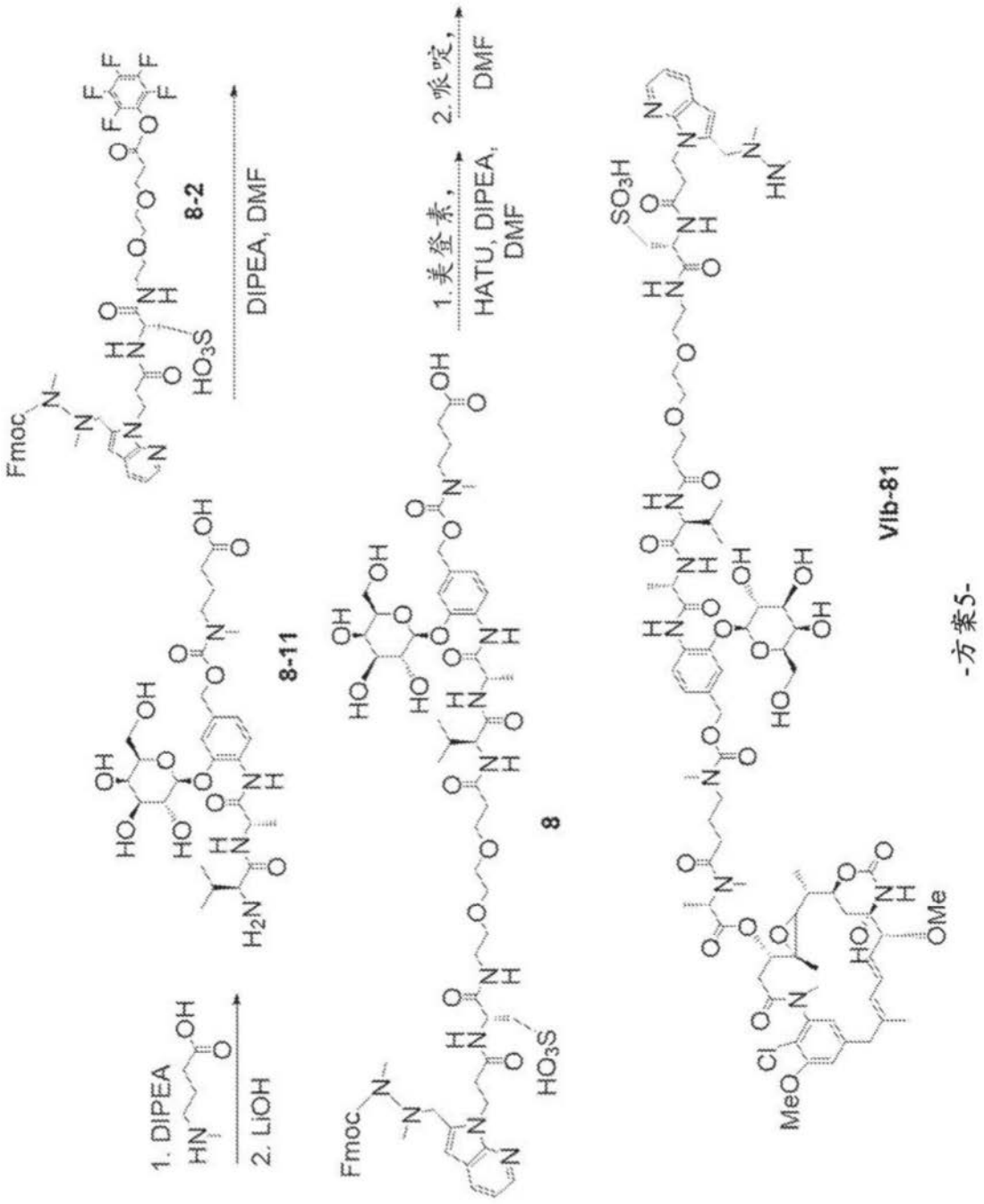

8-2
DIPEA, DMF
8-11
1. DIPEA
2. LiOH
1. 美登素，
HATU, DIPEA,
DMF
2. 哌啶，
DMF
8
VIb-81
-方案5-

图5(续)

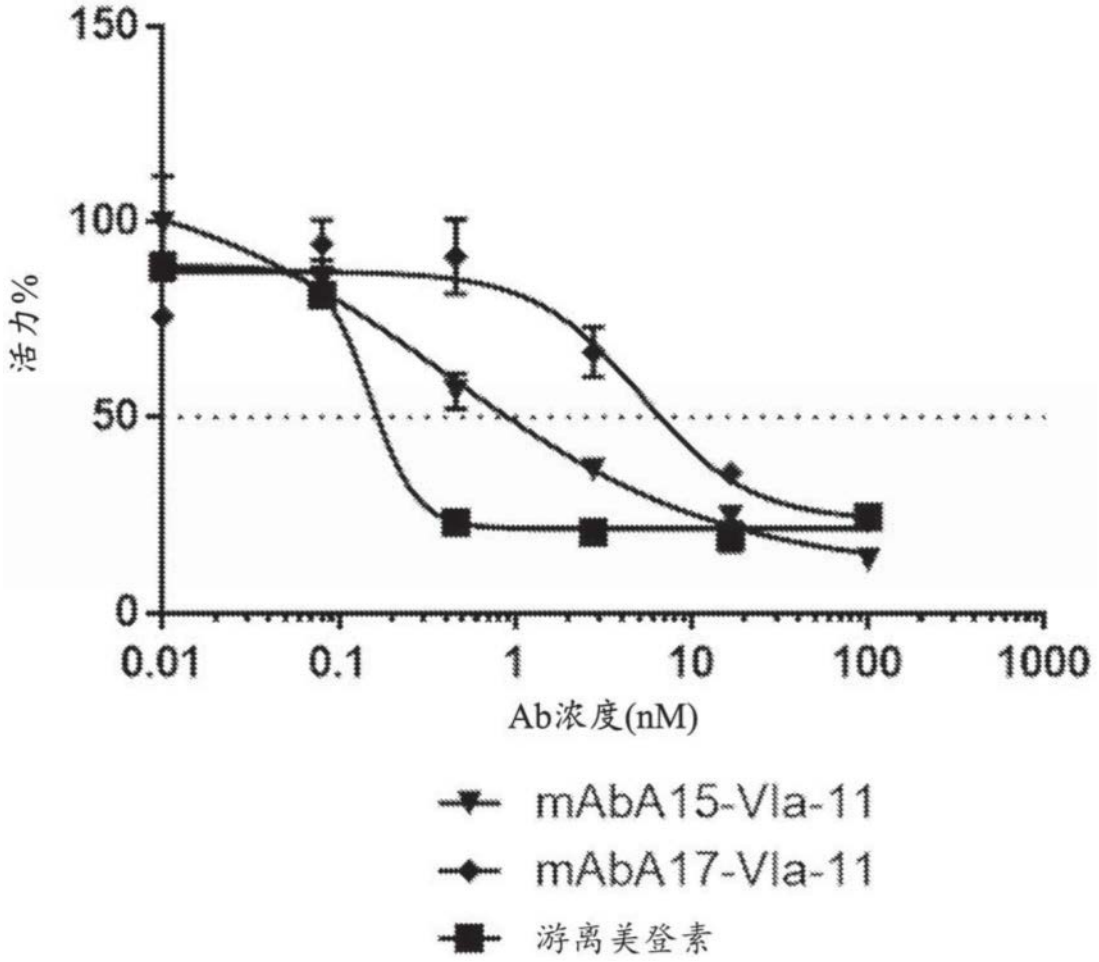

150
100
50
0
活力%
0.01
0.1
1
10
100
1000
Ab浓度(nM)
mAbA15-Vla-11
mAbA17-Vla-11
游离美登素

图6

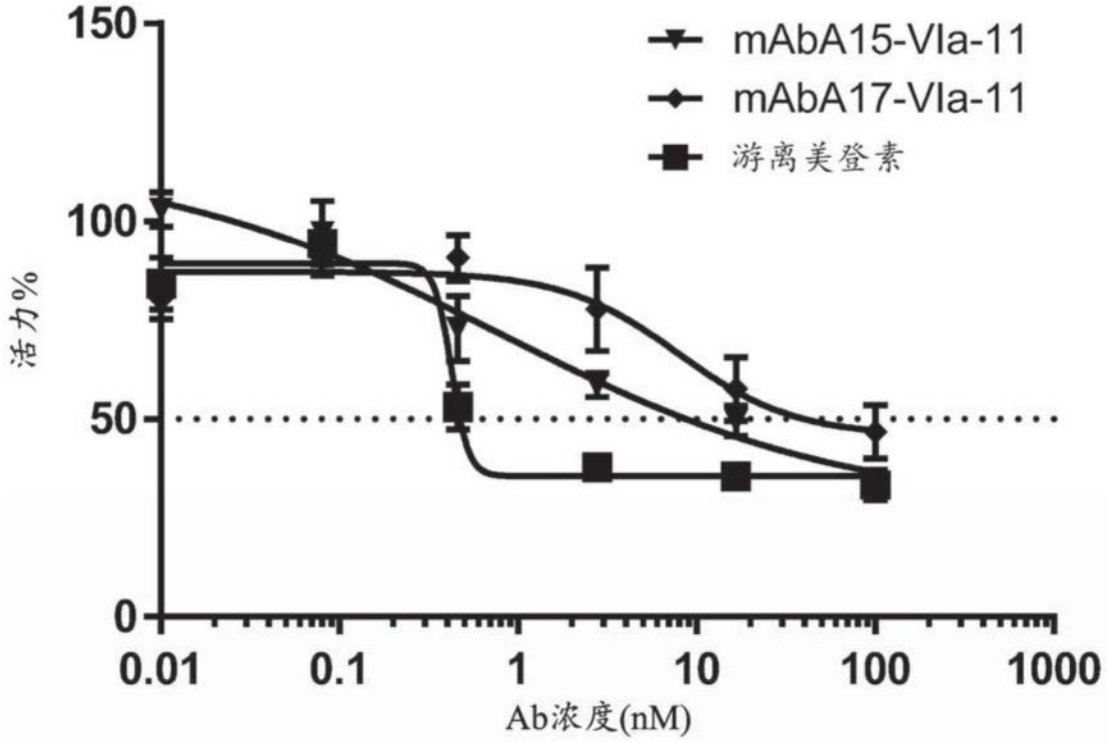

150
100
50
0
活力%
0.01
0.1
1
10
100
1000
Ab浓度(nM)
mAbA15-VIa-11
mAbA17-VIa-11
游离美登素

图7

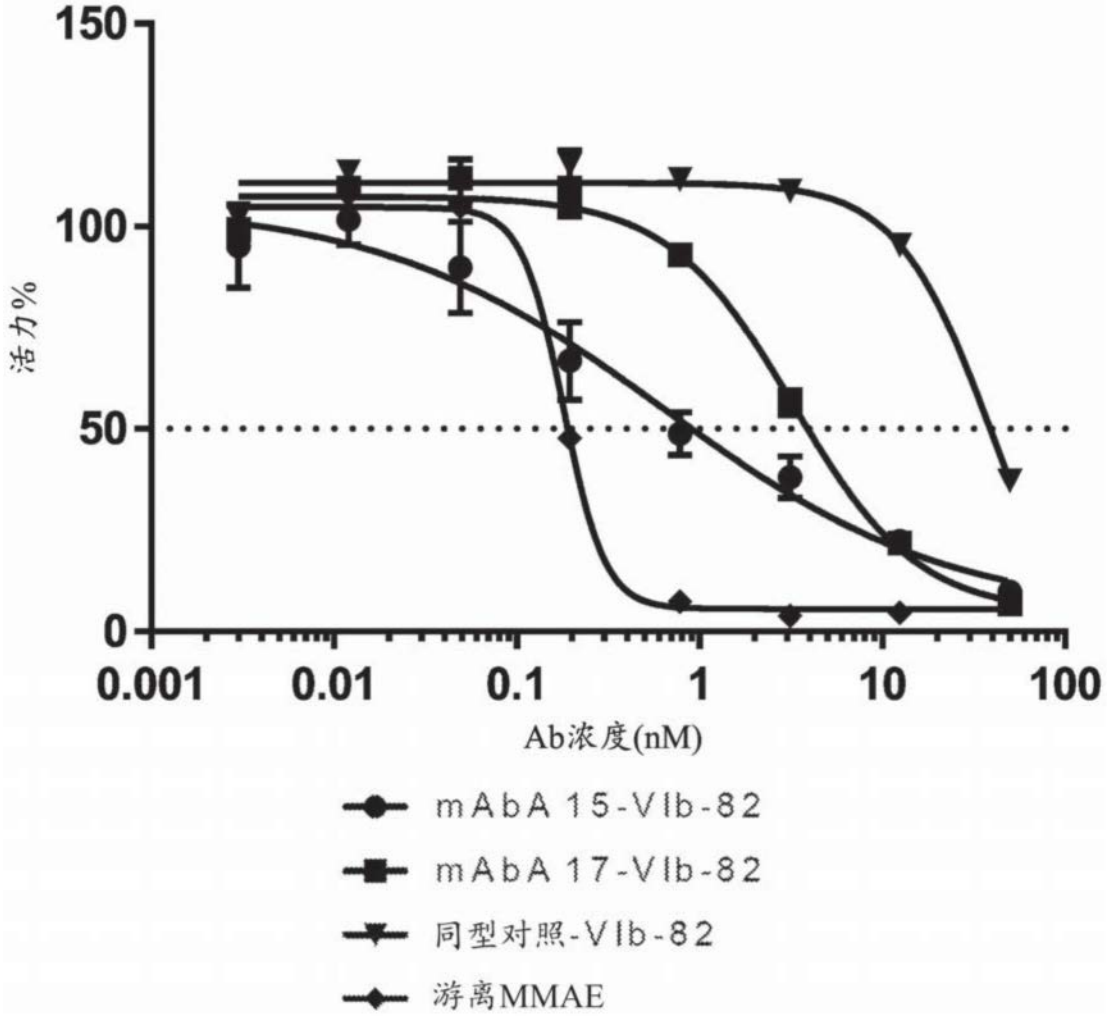

150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab浓度(nM)
mAbA 15-Vlb-82
mAbA 17-Vlb-82
同型对照-Vlb-82
游离MMAE

图8

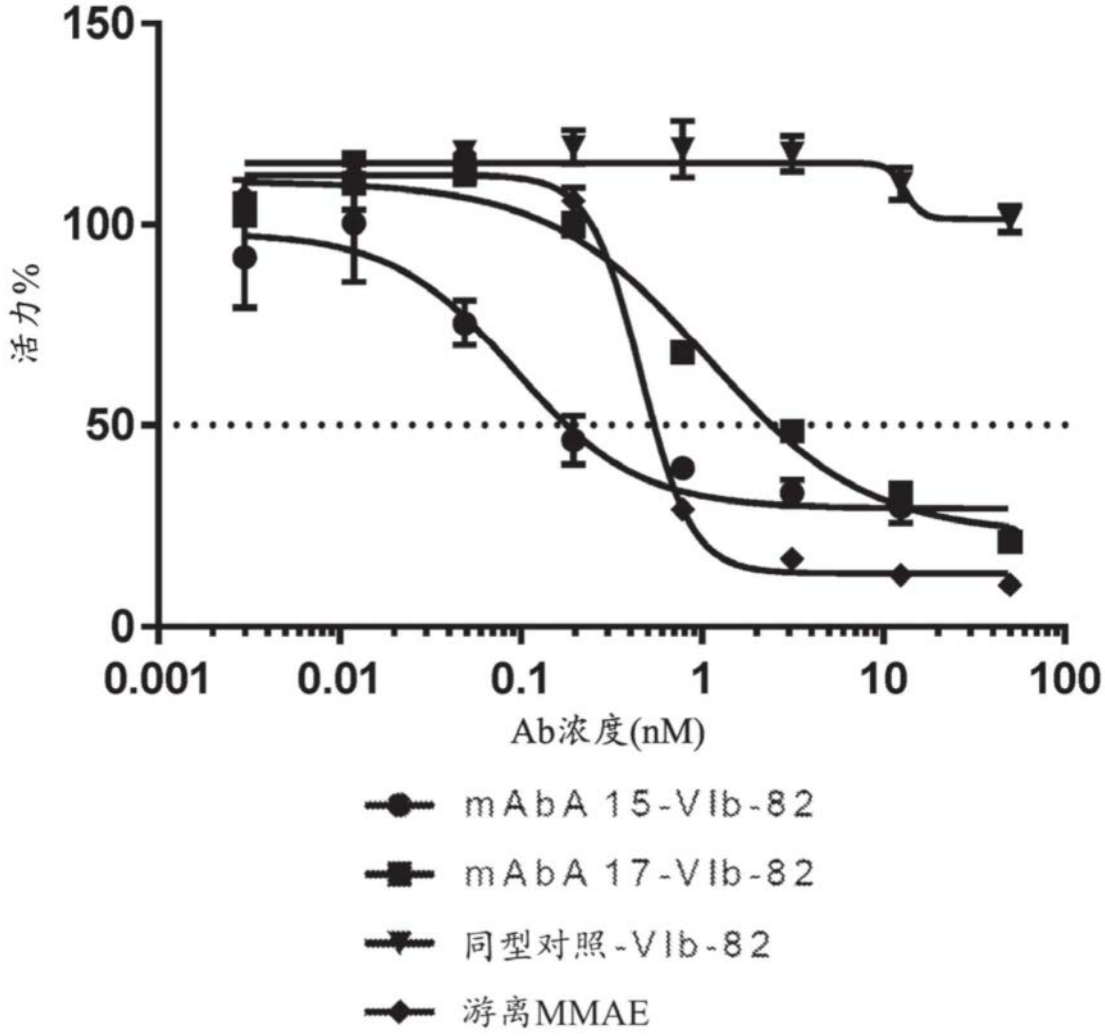

150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab浓度(nM)
mAbA 15-Vlb-82
mAbA 17-Vlb-82
同型对照-Vlb-82
游离MMAE

图9

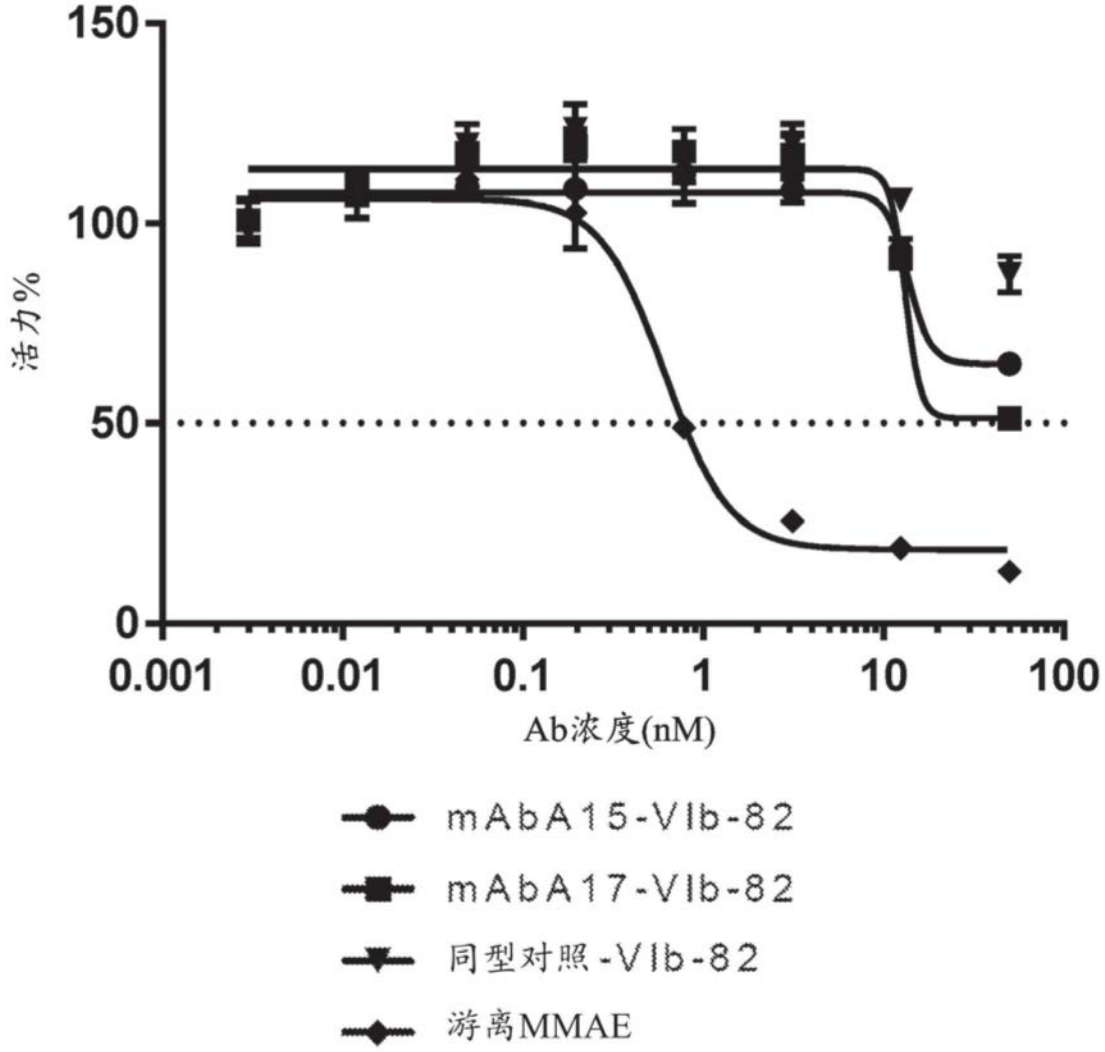

150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab浓度(nM)
mAbA15-Vlb-82
mAbA17-Vlb-82
同型对照-Vlb-82
游离MMAE

图10

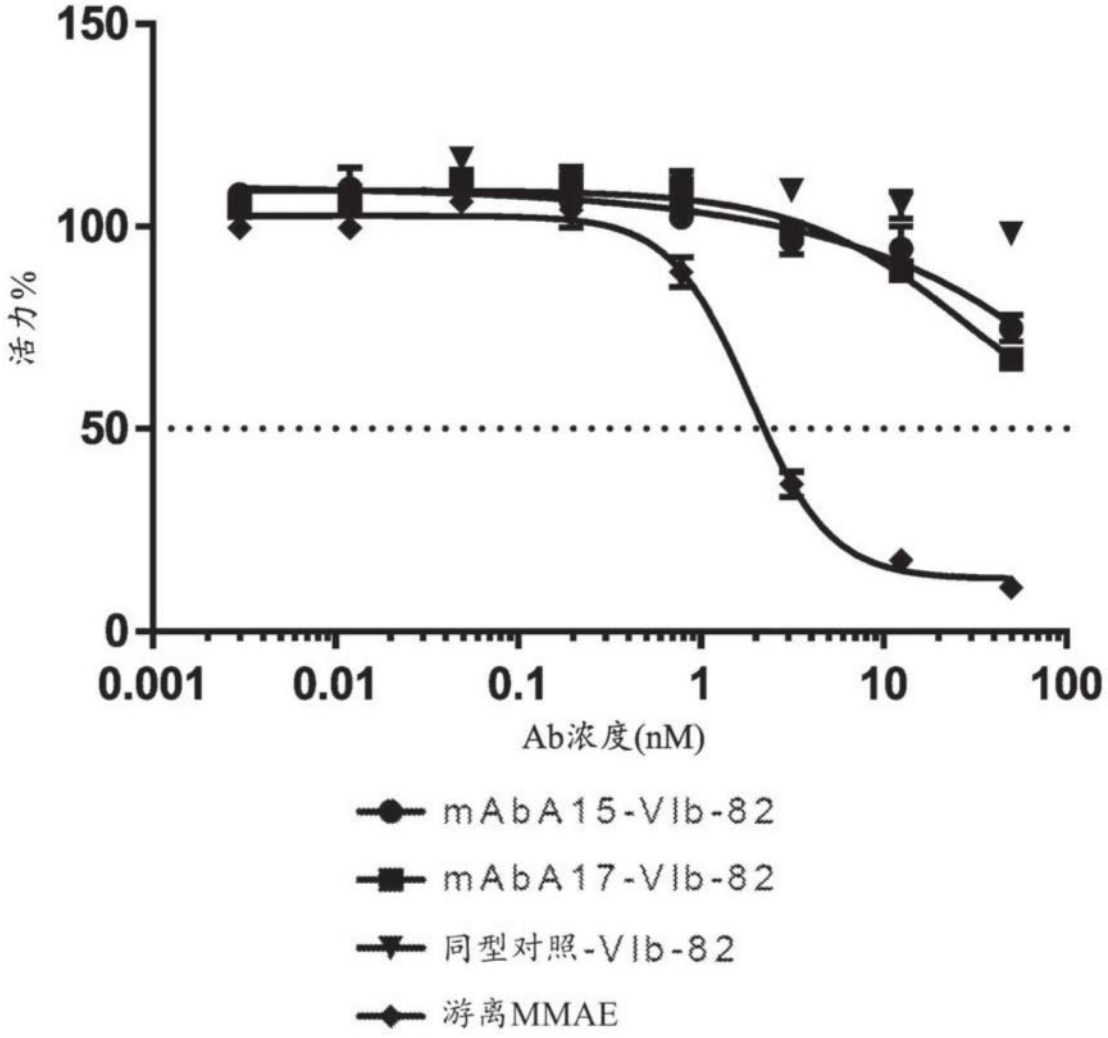

150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab浓度(nM)
mAbA15-Vlb-82
mAbA17-Vlb-82
同型对照-Vlb-82
游离MMAE

图11

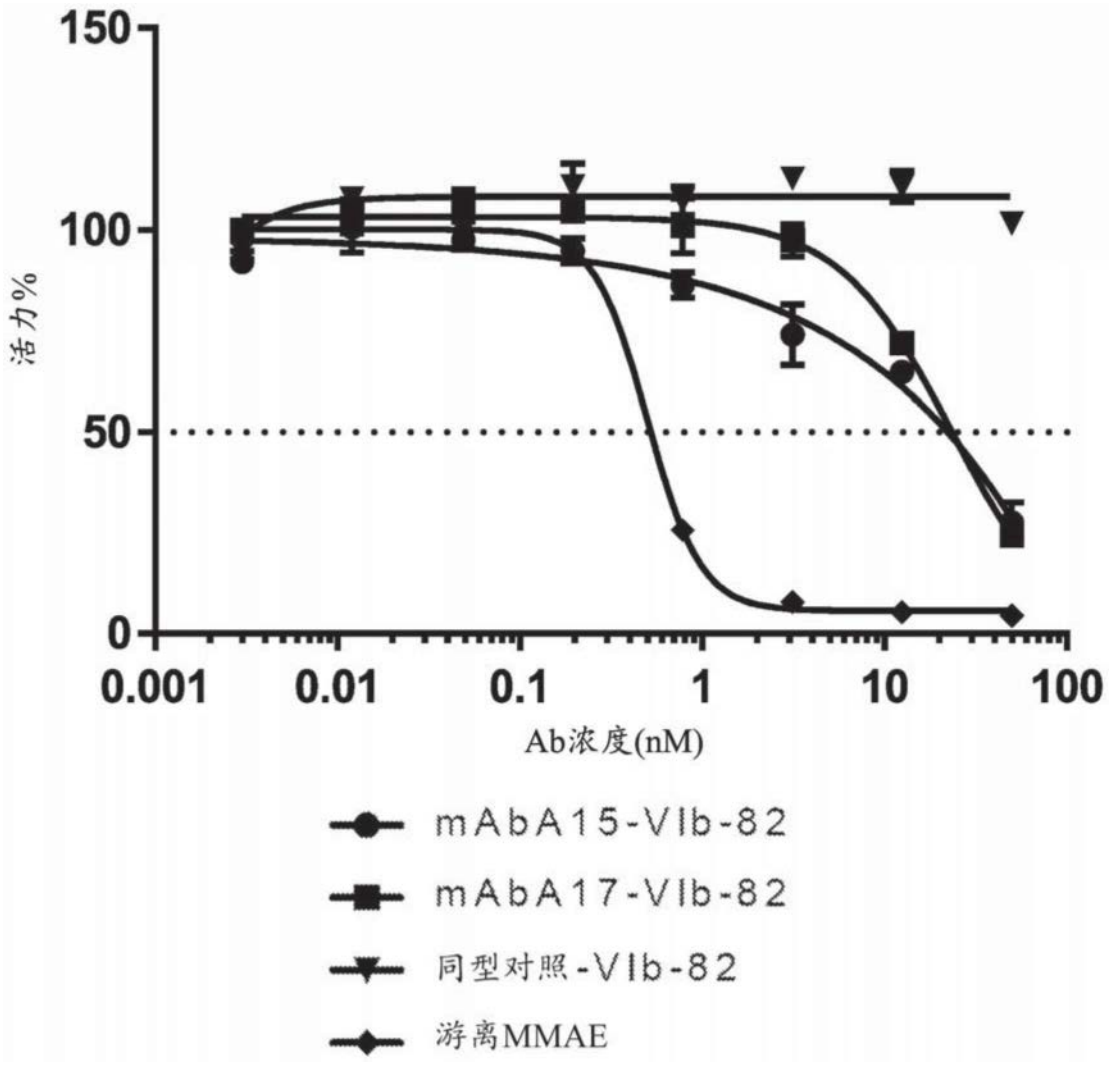

150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Ab浓度(nM)
mAbA15-Vlb-82
mAbA17-Vlb-82
同型对照-Vlb-82
游离MMAE

图12

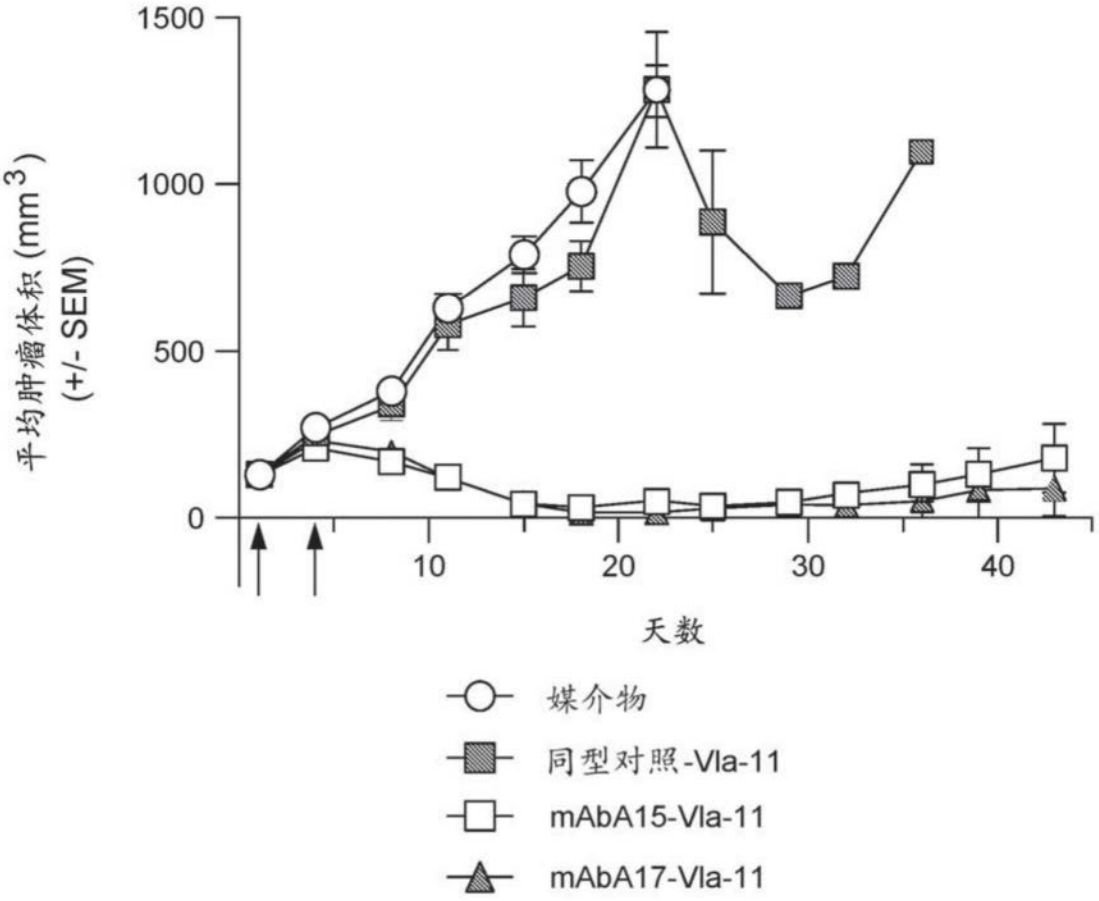

1500
1000
500
0
10
20
30
40
平均肿瘤体积 (mm3)
(+/- SEM)
天数
媒介物
同型对照-Vla-11
mAbA15-Vla-11
mAbA17-Vla-11

图13

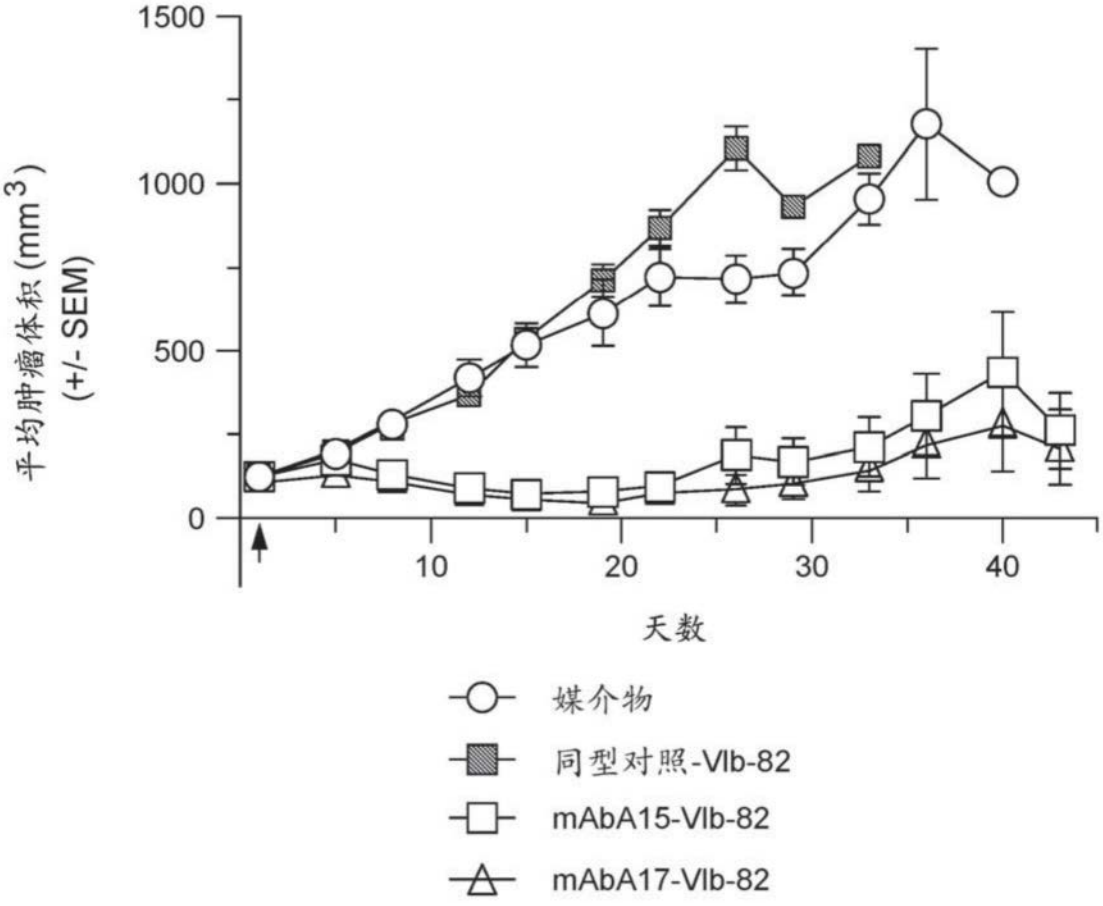

1500
1000
500
0
10
20
30
40
平均肿瘤体积 (mm3)
(+/- SEM)
天数
媒介物
同型对照-Vlb-82
mAbA15-Vlb-82
mAbA17-Vlb-82

图14

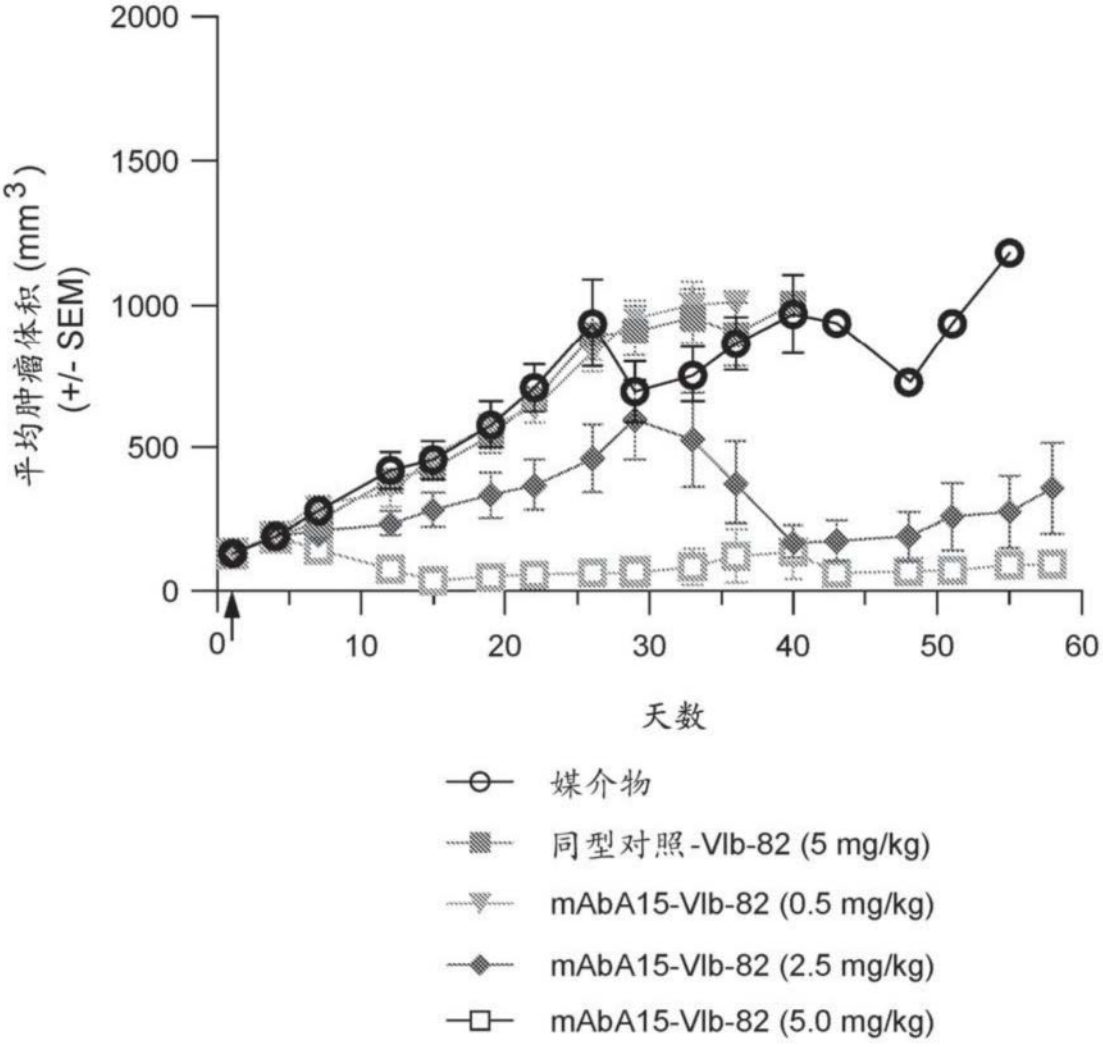

2000
1500
1000
500
0
平均肿瘤体积 (mm3)
(+/- SEM)
0
10
20
30
40
50
60
天数
媒介物
同型对照-Vlb-82 (5 mg/kg)
mAbA15-Vlb-82 (0.5 mg/kg)
mAbA15-Vlb-82 (2.5 mg/kg)
mAbA15-Vlb-82 (5.0 mg/kg)

图15

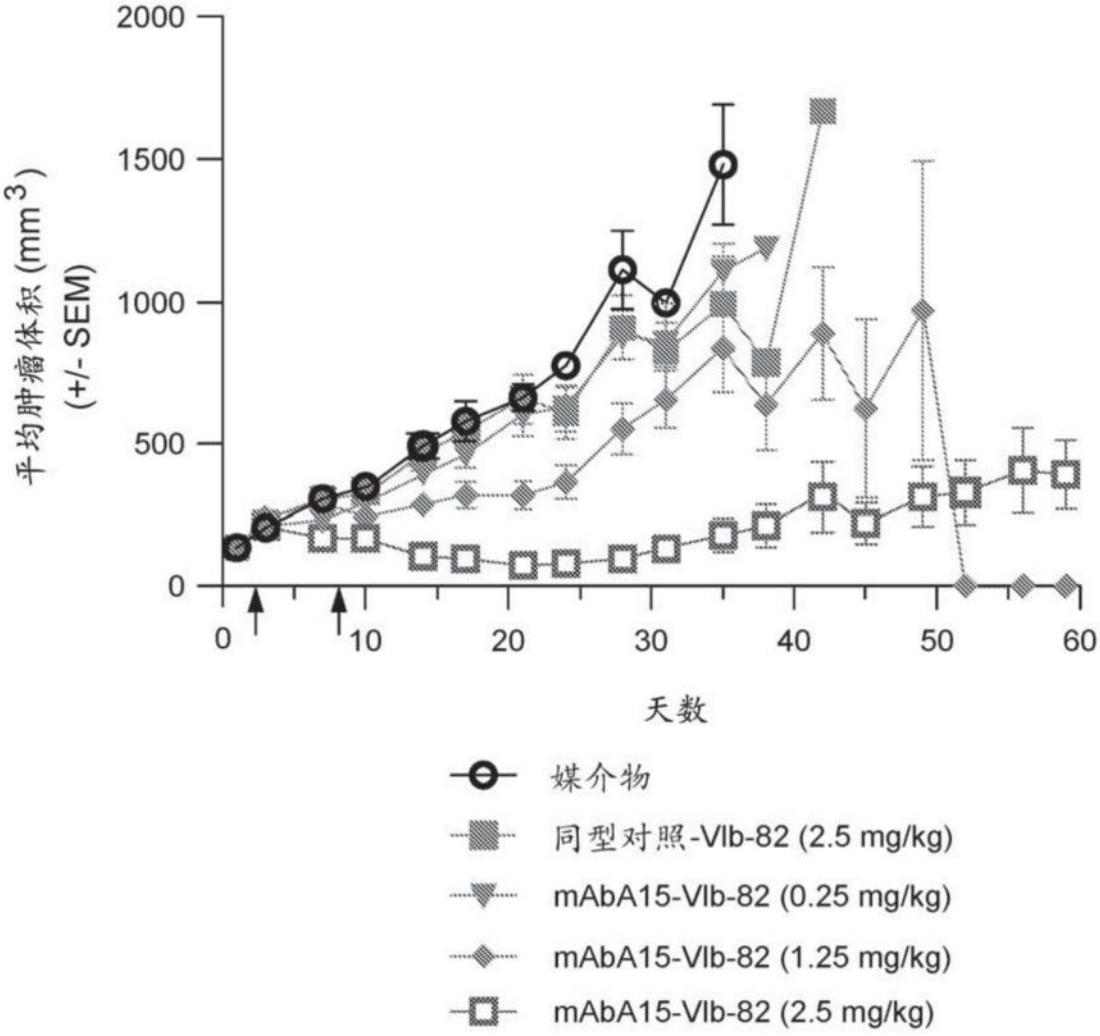

2000
1500
1000
500
0
平均肿瘤体积 (mm3)
(+/- SEM)
0
10
20
30
40
50
60
天数
媒介物
同型对照-Vlb-82 (2.5 mg/kg)
mAbA15-Vlb-82 (0.25 mg/kg)
mAbA15-Vlb-82 (1.25 mg/kg)
mAbA15-Vlb-82 (2.5 mg/kg)

图16

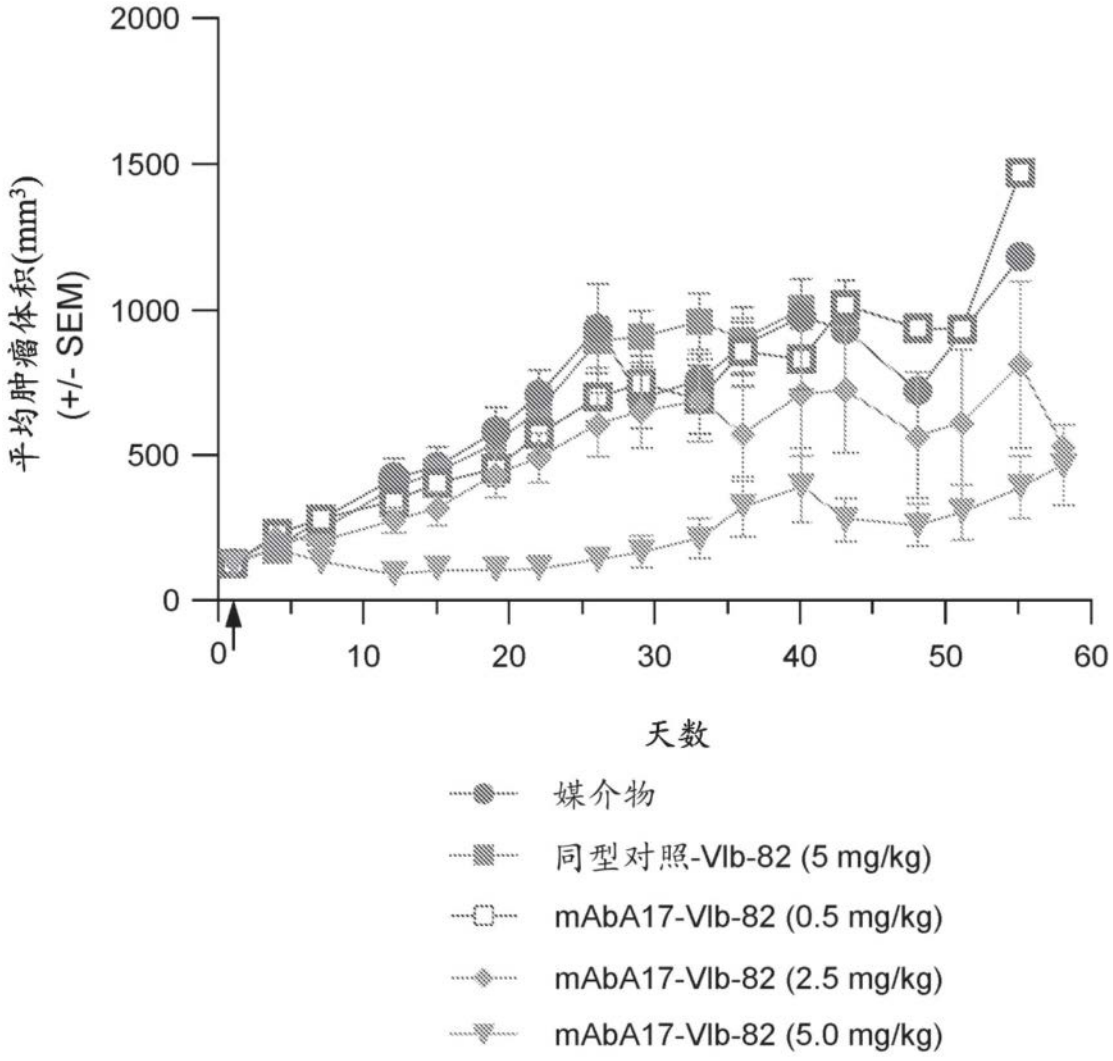

2000
1500
1000
500
0
平均肿瘤体积(mm3)
(+/- SEM)
0
10
20
30
40
50
60
天数
媒介物
同型对照-Vlb-82 (5 mg/kg)
mAbA17-Vlb-82 (0.5 mg/kg)
mAbA17-Vlb-82 (2.5 mg/kg)
mAbA17-Vlb-82 (5.0 mg/kg)

图17

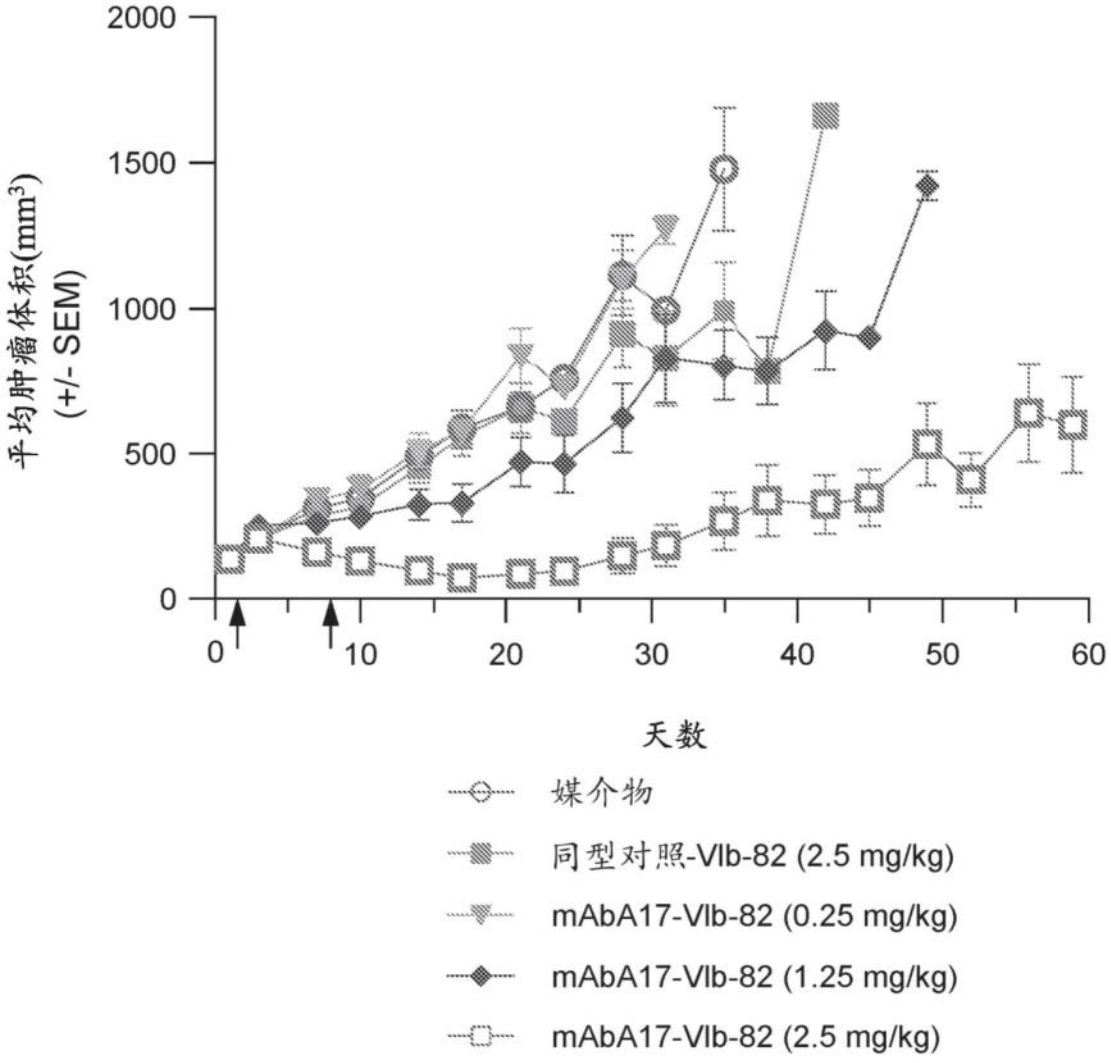

2000
1500
1000
500
0
平均肿瘤体积(mm3)
(+/- SEM)
0
10
20
30
40
50
60
天数
媒介物
同型对照-Vlb-82 (2.5 mg/kg)
mAbA17-Vlb-82 (0.25 mg/kg)
mAbA17-Vlb-82 (1.25 mg/kg)
mAbA17-Vlb-82 (2.5 mg/kg)

图18

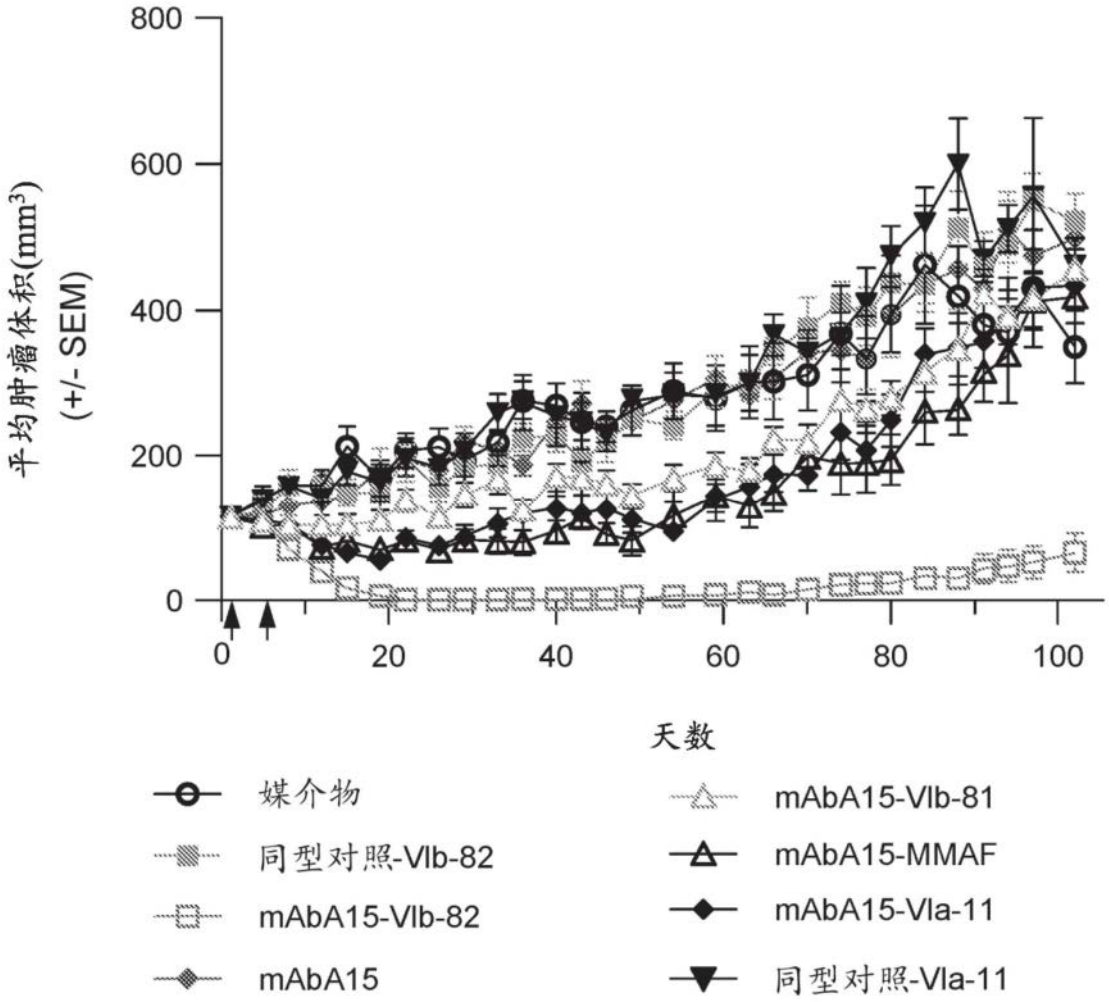

800
600
400
200
0
平均肿瘤体积(mm³)
(+/- SEM)
0
20
40
60
80
100
天数
媒介物
同型对照-Vlb-82
mAbA15-Vlb-82
mAbA15
mAbA15-Vlb-81
mAbA15-MMAF
mAbA15-Vla-11
同型对照-Vla-11

图19

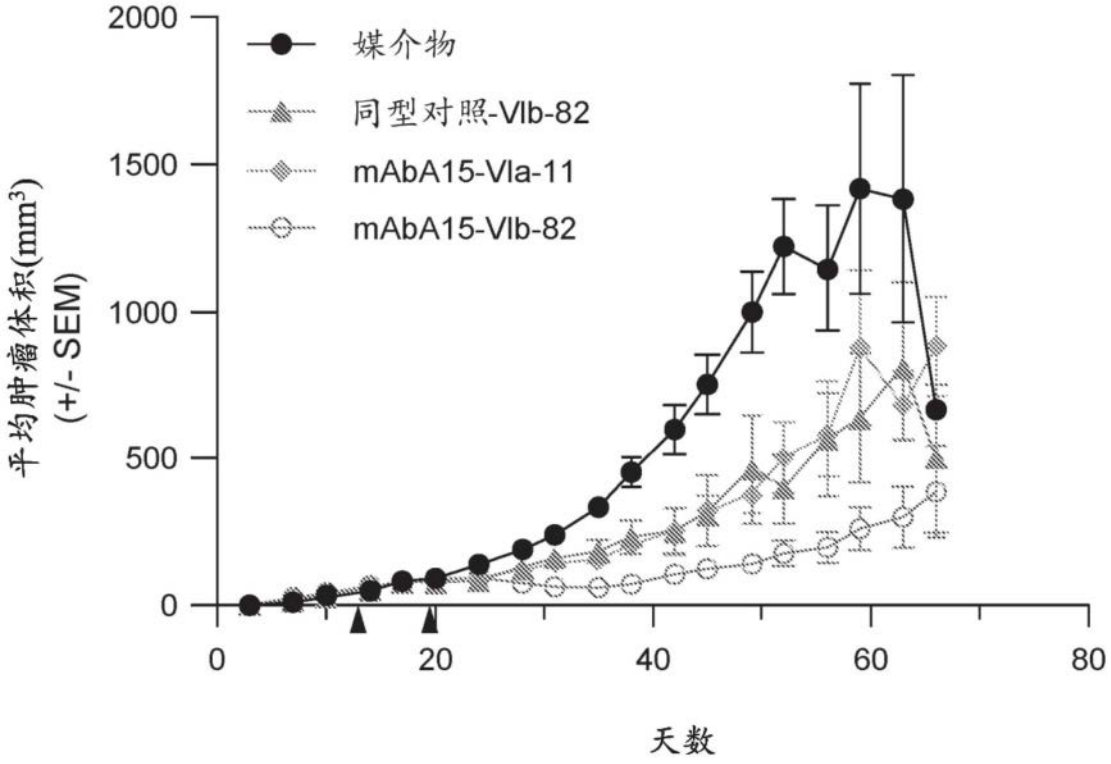

2000
1500
1000
500
0
媒介物
同型对照-Vlb-82
mAbA15-Vla-11
mAbA15-Vlb-82
平均肿瘤体积(mm³)
(+/- SEM)
0
20
40
60
80
天数

图20

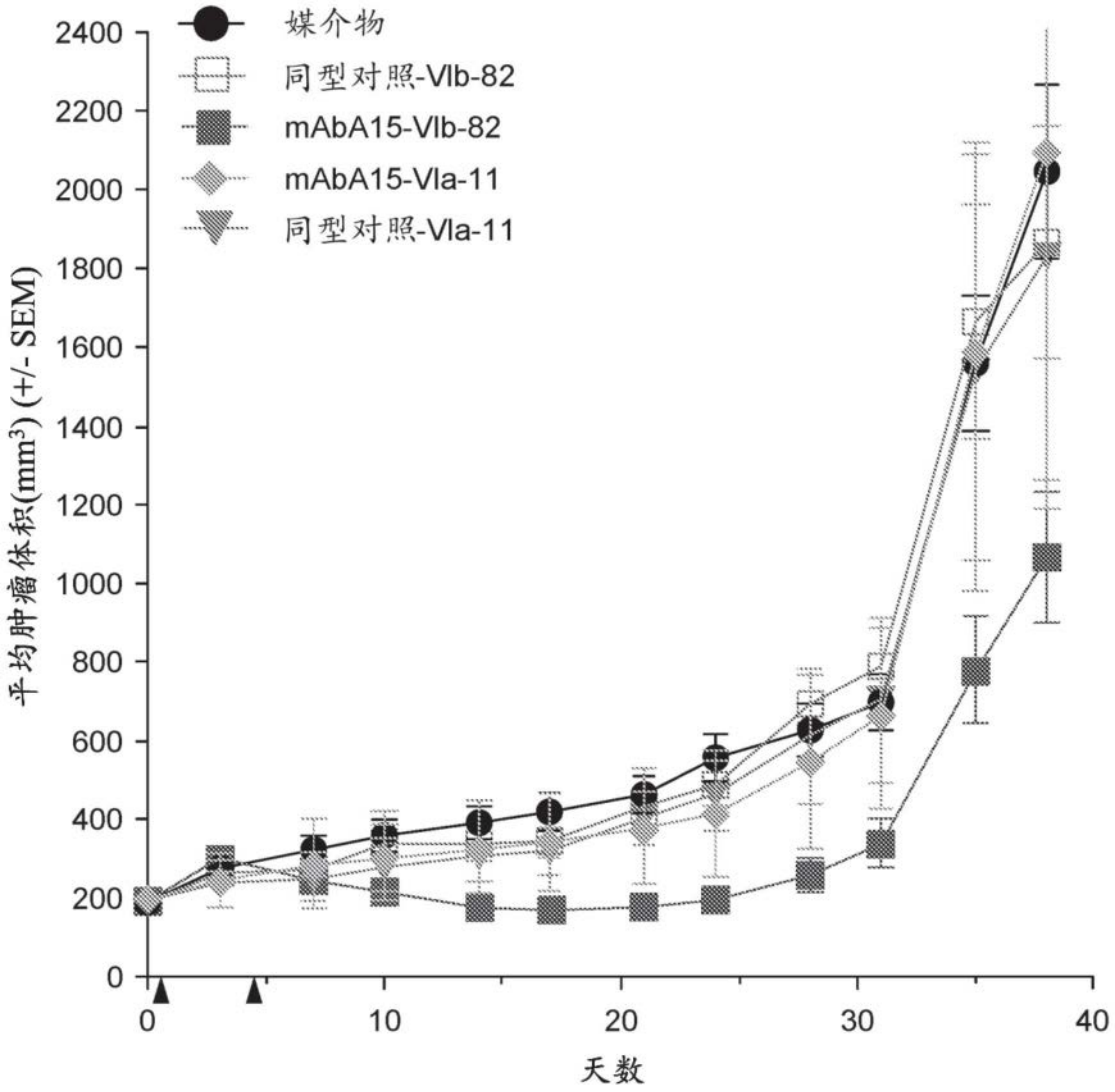

媒介物
同型对照-Vlb-82
mAbA15-Vlb-82
mAbA15-Vla-11
同型对照-Vla-11
平均肿瘤体积(mm³) (+/- SEM)
天数
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
2400
0
10
20
30
40

图21

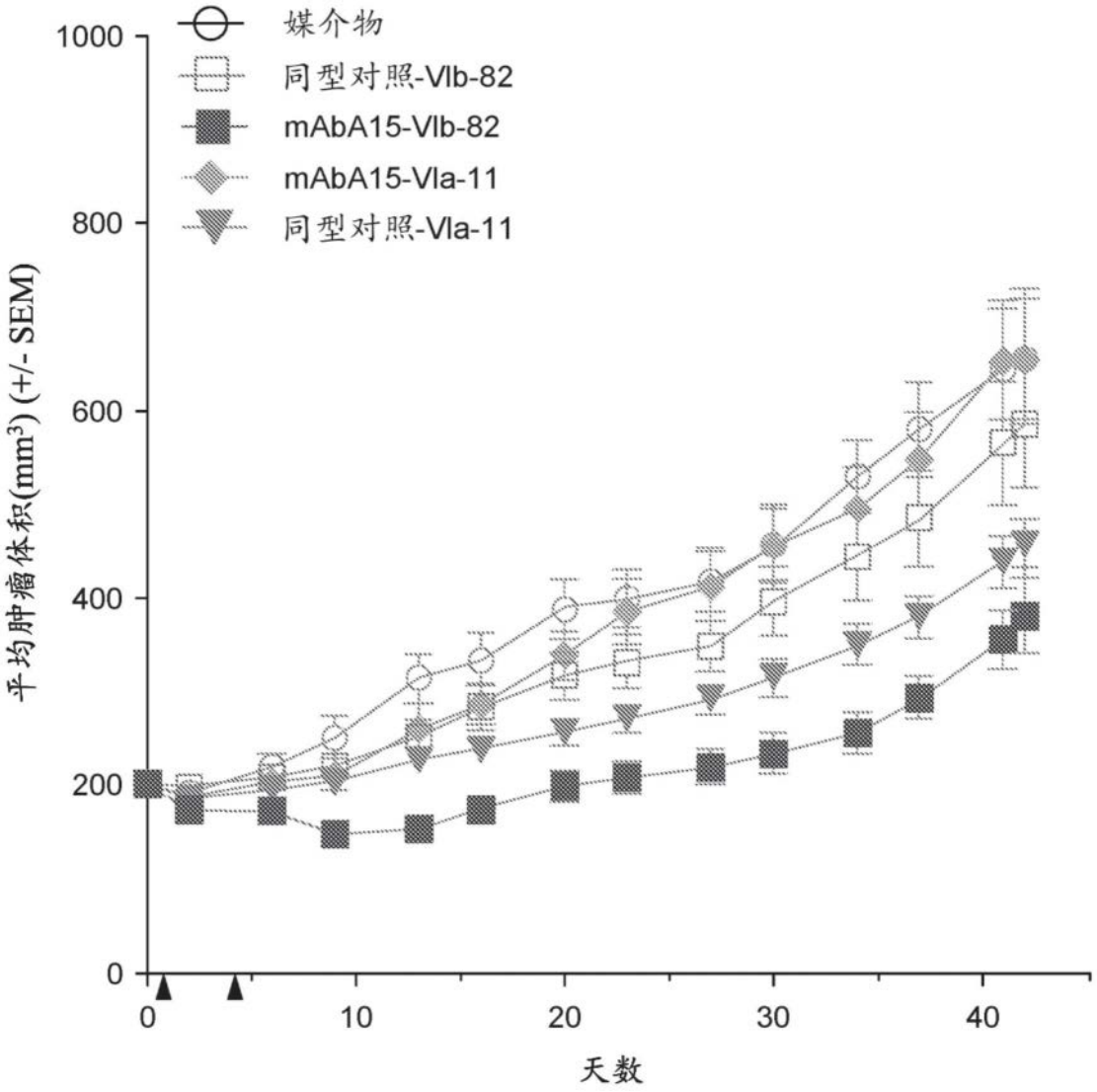

媒介物
同型对照-Vlb-82
mAbA15-Vlb-82
mAbA15-Vla-11
同型对照-Vla-11
平均肿瘤体积(mm3) (+/- SEM)
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
天数

图22

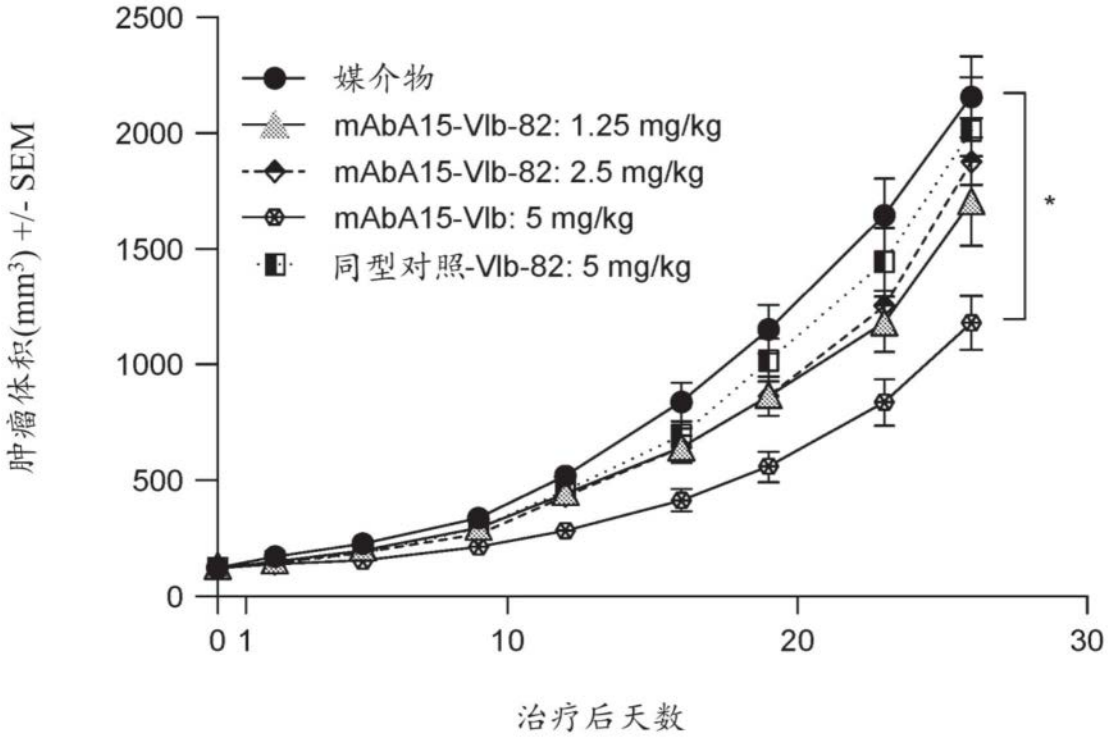

2500
2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积(mm³) +/- SEM
媒介物
mAbA15-Vlb-82: 1.25 mg/kg
mAbA15-Vlb-82: 2.5 mg/kg
mAbA15-Vlb: 5 mg/kg
同型对照-Vlb-82: 5 mg/kg
*
0 1
10
20
30
治疗后天数

图23

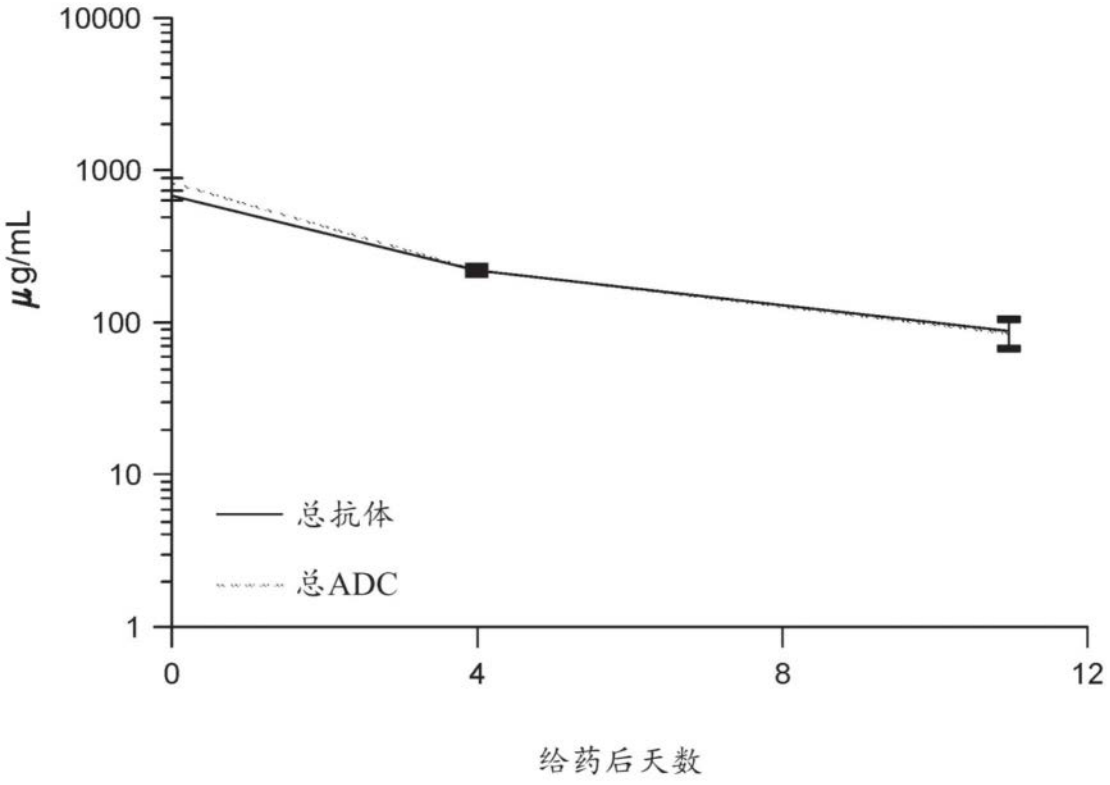

10000
1000
100
10
1
μg/mL
总抗体
总ADC
0
4
8
12
给药后天数

图24A

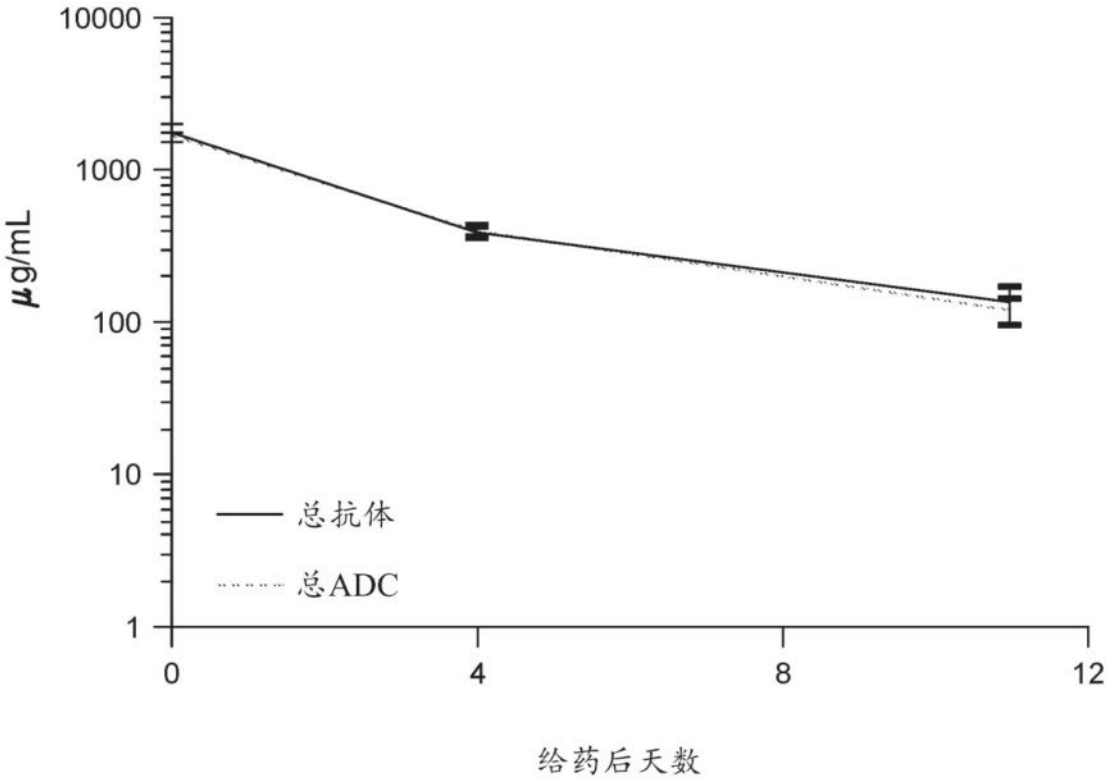

10000
1000
100
10
1
μg/mL
总抗体
总ADC
0
4
8
12
给药后天数

图24B

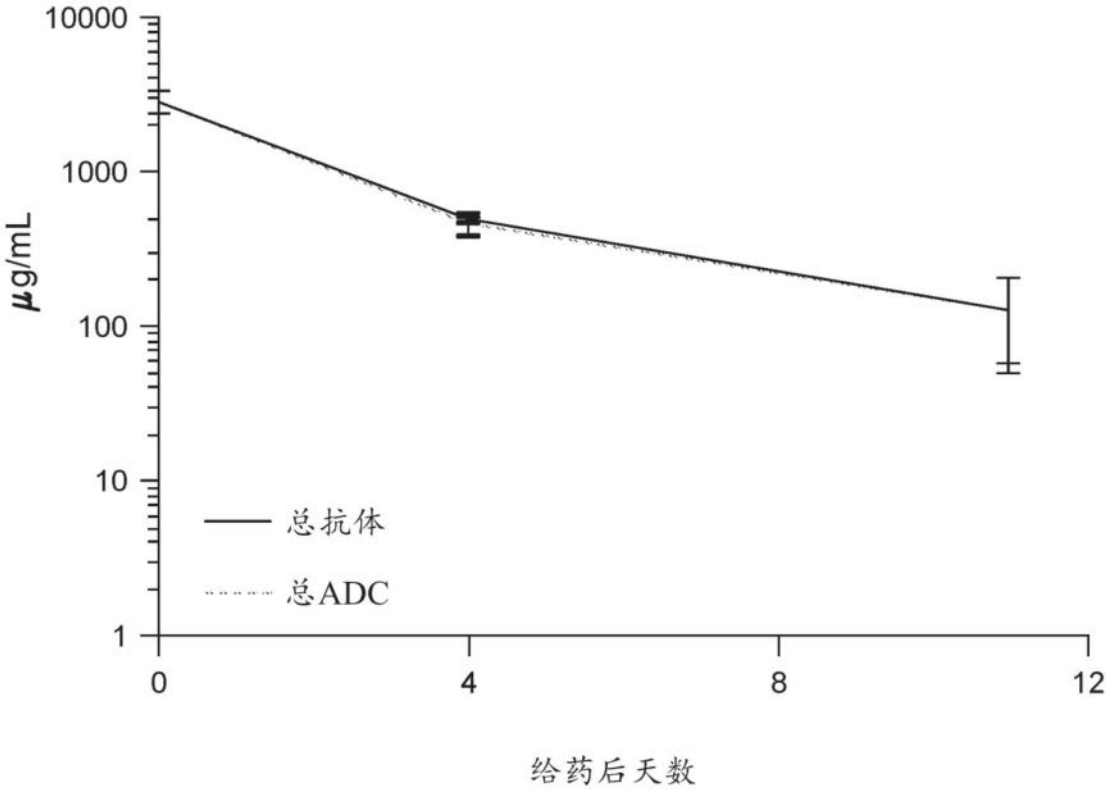

10000
1000
100
10
1
μg/mL
总抗体
总ADC
0
4
8
12
给药后天数

图24C