



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118742328 A

(43) 申请公布日 2024.10.01

(21) 申请号 202380022807.2

(22) 申请日 2023.02.22

(30) 优先权数据

22158100.2 2022.02.22 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/054455 2023.02.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/161291 EN 2023.08.31

(71) 申请人 阿拉里斯生物技术股份公司

地址 瑞士

(72) 发明人 R·伯特兰 I·阿廷格-托勒

R·费伊 D·格拉布罗夫斯基

P·施皮歇尔

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

专利代理师 禹超 刘芳

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 47/65 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书65页

序列表(电子公布) 附图37页

(54) 发明名称

包含两个或更多个有效载荷的肽接头

(57) 摘要

本发明涉及一种肽接头,其包含:(a)包含伯胺的氨基酸残基;和(b)两个或更多个有效载荷;其中,所述两个或更多个有效载荷中的每一个能够独立地连接到:(i)所述肽接头的N端,(ii)所述肽接头的C端,或(iii)包含在所述肽接头中的氨基酸残基的侧链。此外,本发明涉及包含本发明的肽接头的抗体-有效载荷缀合物、产生所述抗体-有效载荷缀合物的方法及其用途。

1. 一种肽接头,包含:
 - a) 包含伯胺的氨基酸残基;和
 - b) 两个或更多个有效载荷;其中,所述两个或更多个有效载荷中的每一个能够独立地连接到:
 - i) 所述肽接头的N端,
 - ii) 所述肽接头的C端,或
 - iii) 包含在所述肽接头中的氨基酸残基的侧链。
2. 根据权利要求1所述的肽接头,其中,所述氨基酸残基中包含的所述伯胺是
 - a) 赖氨酸、赖氨酸衍生物或赖氨酸模拟物的侧链中的伯胺;或
 - b) 包含在具有结构 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ 的N端氨基酸残基中的伯胺。
3. 根据权利要求2所述的肽接头,其中,Y是 $(\text{R}_2\text{C})_n$,并且其中n是1至20、1至15、1至10的整数。
4. 根据权利要求3所述的肽接头,其中,每个 $-(\text{R}_2\text{C})-$ 单体的至少一个R部分是氢,或其中每个 $-(\text{R}_2\text{C})-$ 单体的两个R部分都是氢。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含不超过25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4个氨基酸残基。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含至少一个精氨酸和/或组氨酸残基。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含序列基序RK。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含SEQ ID NO:1-29或SEQ ID NO:82-93中所示的氨基酸序列中的任一个。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含2至4个有效载荷。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的肽接头,其中,所述接头由以下结构组成或包含以下结构(在N→C方向上):

[有效载荷1] - [(Aa)_m - (Lys) - (Aa)_n - (Arg/His) - (Aa)_o] - [有效载荷2];其中:
[有效载荷1]和[有效载荷2]是有效载荷,
(Aa)可以是任何氨基酸残基;
m、n和o可以是0-10的整数,优选0-6,更优选0-4;
(Arg)可以是精氨酸残基、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;
(His)可以是组氨酸残基、组氨酸模拟物或组氨酸衍生物;
(Lys)是赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,
其中,[有效载荷1]直接或间接连接到(Aa)或(Lys)残基的N端,和
其中,[有效载荷2]直接或间接连接到(Aa)或(Arg/His)残基的C端。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载荷中的至少一个通过化学接头连接到所述肽接头。
12. 根据权利要求11所述的肽接头,其中,所述化学接头是酶促可切割的接头和/或化学可切割的接头。
13. 根据权利要求11或12所述的肽接头,其中,所述化学接头是或包含自我牺牲型接头。

14. 根据权利要求13所述的肽接头,其中,所述自我牺牲型接头包含:

- a) 对氨基苄醇部分;或
- b) 2,4-双(羟甲基)苯胺部分;或
- c) 对氨基苄基季铵;或
- d) 基于乙二胺的部分;或
- e) 基于(氨甲基)吡咯烷的部分;或
- f) 基于氨甲基的部分。

15. 根据权利要求14所述的肽接头,其中,所述对氨基苄醇部分中包含的羟基与有效载荷形成氨基甲酸酯。

16. 根据权利要求14所述的肽接头,其中,所述2,4-双(羟甲基)苯胺部分中包含的每个羟基与有效载荷形成氨基甲酸酯。

17. 根据权利要求14所述的肽接头,其中,所述对氨基苄基季铵中包含的季铵阳离子源自所述有效载荷中包含的胺。

18. 根据权利要求14所述的肽接头,其中,包含在所述基于乙二胺的部分或所述基于(氨甲基)吡咯烷的部分中的氨基与有效载荷形成氨基甲酸酯。

19. 根据权利要求14所述的肽接头,其中,包含在所述基于氨甲基的部分中的氨基与有效载荷形成半缩醛胺或硫半缩醛胺。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的肽接头,其中,至少一个有效载荷连接到所述肽接头中包含的氨基酸残基的侧链。

21. 根据权利要求20所述的肽接头,其中,至少一个有效载荷连接至谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基或其各自的衍生物或模拟物的侧链。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的肽接头,其中,所述肽接头包含两个肽部分,并且其中,所述两个肽部分通过其N端氨基酸残基与二羧酸接头或其活化版本连接。

23. 根据权利要求22所述的肽接头,其中,所述接头由以下结构组成或包含以下结构:

[有效载荷1]-[肽1]-[二羧酸]-[肽2]-[有效载荷2];其中:

[有效载荷1]和[有效载荷2]是有效载荷,

[肽1]是第一肽部分,

[肽2]是第二肽部分,并且

[二羧酸]是二羧酸;

其中,[肽1]和/或[肽2]中的至少一个包含游离胺,优选地其中,所述游离胺包含在赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的侧链中,

其中,[肽1]的N端和[肽2]的N端通过二羧酸连接,

其中,[有效载荷1]优选通过化学接头连接到[肽1]的C端,并且

其中,[有效载荷2]优选通过化学接头连接到[肽2]的C端。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的肽接头,其中,所述有效载荷是以下至少一种:

- 毒素;
- 细胞因子;
- 生长因子;

- 放射性核素；
- 激素；
- 抗病毒剂；
- 抗菌剂；
- 荧光染料；
- 免疫调节剂/免疫刺激剂；
- 半衰期增加部分；
- 溶解度增加部分；
- 聚合物-毒素缀合物；
- 核酸；
- 生物素或链霉亲和素部分；
- 维生素；
- 蛋白质降解剂(“PROTAC”)；
- 受体的配体或底物；
- 靶结合部分；和/或
- 抗炎剂。

25. 根据权利要求24所述的肽接头,其中,所述毒素是选自由以下组成的组中的至少一种:

- 吡咯并苯并二氮杂草(例如,PBD)；
- 澳瑞他汀(例如,MMAE, MMAF)；
- 美登素生物碱(例如,美登素, DM1, DM4, DM21)；
- 多卡霉素；
- 烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)抑制剂；
- 微管蛋白抑制剂；
- 烯二炔类(例如,卡利奇霉素)；
- 蒽环霉素衍生物(PNU)(如多柔比星)；
- 基于吡咯的纺锤体驱动蛋白(KSP)抑制剂；
- 念珠藻素；
- 药物外排泵抑制剂；
- 山卓霉素；
- 胸苷酸合酶抑制剂；
- 鹅膏蕈碱(例如, α -鹅膏蕈碱)；和
- 喜树碱(例如依喜替康, 德鲁替康)。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载荷是相同的。

27. 根据权利要求1至25中任一项所述的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载荷中的至少两个彼此不同。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的肽接头,其中,所述接头适合用作转谷氨酰胺酶的底物。

29. 一种抗体-有效载荷缀合物,其包含缀合至根据权利要求1至28中任一项所述的肽接头的抗体。

30. 根据权利要求29所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头通过在所述抗体中包含的谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基和所述肽接头的氨基酸残基中包含的伯胺之间形成的异肽键与所述抗体缀合。

31. 根据权利要求29或30所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体是IgG抗体。

32. 根据权利要求31所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头与包含在所述抗体的Fc结构域中的谷氨酰胺残基缀合。

33. 根据权利要求32所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基是IgG抗体的C_H2结构域的谷氨酰胺残基Q295(EU编号)。

34. 根据权利要求31所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中。

35. 根据权利要求34所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基是非糖基化IgG抗体的C_H2结构域的N297Q(EU编号)。

36. 根据权利要求34所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基包含在肽中,所述肽已经(a)整合到所述抗体的重链或轻链中,或(b)融合到所述抗体的重链或轻链的N端或C端。

37. 根据权利要求36所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,包含Gln残基的肽已经融合到所述抗体的重链的C端。

38. 根据权利要求31至34或36至37中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述IgG抗体是糖基化IgG抗体。

39. 根据权利要求38所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述IgG抗体在所述C_H2结构域的残基N297(EU编号)处被糖基化。

40. 根据权利要求29至39中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体选自自由以下组成的组:本妥昔单抗、曲妥珠单抗、吉妥珠单抗、奥英妥珠单抗、阿维鲁单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、达雷妥木单抗、珀妥珠单抗、维多利珠单抗、奥瑞利珠单抗、托西利珠单抗、优特吉努单抗、戈利木单抗、奥比妥珠单抗、沙西妥珠单抗、贝兰妥单抗、泊洛妥珠单抗、恩诺单抗、Endrecolomab、吉妥珠单抗、朗妥昔单抗、Mecbotamab、阿迪妥木单抗、D93、伽妥珠单抗、拉贝妥珠单抗、特赛妥单抗、尤匹菲妥单抗、利法妥珠单抗、米妥昔单抗、索非妥珠单抗、阿奈妥单抗、替索妥单抗、Cofituzumab、普罗妥单抗、Ladriatuzumab、贝兰妥单抗、帕曲妥单抗、西妥昔单抗、尼莫妥珠单抗、马妥珠单抗、Portuzumab、西他土珠单抗、西莫白介素单抗和Endrecolomab。

41. 根据权利要求29至40中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体选自自由以下组成的组:本妥昔单抗、吉妥珠单抗、曲妥珠单抗、奥英妥珠单抗、泊洛妥珠单抗、恩诺单抗、沙西妥珠单抗和贝兰妥单抗。

42. 根据权利要求29至41中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体是泊洛妥珠单抗或曲妥珠单抗或恩诺单抗。

43. 一种制备抗体-有效载荷缀合物的方法,包括将根据权利要求1至28中任一项所述

的肽接头缀合至抗体的步骤。

44. 一种使用转谷氨酰胺酶 (TG) 将包含两个或更多个有效载荷的肽接头与抗体缀合的方法, 所述方法包括: a) 在流体中混合所述抗体、所述肽接头和所述 TG, 从而在所述 TG 的催化作用下在一个步骤中将所述接头-有效载荷与所述抗体缀合, 以及 b) 从所述流体中提取步骤 a) 中获得的所述缀合物。

45. 根据权利要求 44 所述的方法, 其中, 所述肽接头是根据权利要求 1 至 28 中任一项所述的肽接头。

46. 根据权利要求 44 或 45 所述的方法, 其中, 所述肽接头通过所述肽接头的氨基酸残基中包含的伯胺与所述抗体中包含的谷氨酰胺残基缀合。

47. 根据权利要求 43 至 46 中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体是抗体片段。

48. 根据权利要求 43 至 46 中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体是 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM 抗体。

49. 根据权利要求 43 至 48 中任一项所述的方法, 其中, 所述肽接头与包含在所述抗体的 Fc 结构域中的谷氨酰胺残基缀合。

50. 根据权利要求 43 至 49 中任一项所述的方法, 其中, 所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基是 IgG 抗体的 C_H2 结构域的谷氨酰胺残基 Q295 (EU 编号)。

51. 根据权利要求 43 至 49 中任一项所述的方法, 其中, 所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中。

52. 根据权利要求 51 所述的方法, 其中, 已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基是非糖基化 IgG 抗体的 C_H2 结构域的 N297Q (EU 编号)。

53. 根据权利要求 52 所述的方法, 其中, 已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基包含在肽中, 所述肽已经 (a) 整合到所述抗体的重链或轻链中, 或 (b) 融合到所述抗体的重链或轻链的 N 端或 C 端。

54. 根据权利要求 53 所述的方法, 其中, 所述包含 Gln 残基的肽已经融合到所述抗体的重链的 C 端。

55. 根据权利要求 43 至 51 或 53 至 54 中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体是糖基化 IgG 抗体。

56. 根据权利要求 55 所述的方法, 其中, 所述 IgG 抗体在所述 C_H2 结构域的残基 N297 (EU 编号) 处被糖基化。

57. 根据权利要求 43 至 56 中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体选自由以下组成的组: 本妥昔单抗、曲妥珠单抗、吉妥珠单抗、奥英妥珠单抗、阿维鲁单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、达雷妥木单抗、珀妥珠单抗、维多利珠单抗、奥瑞利珠单抗、托西利珠单抗、优特吉努单抗、戈利木单抗、奥比妥珠单抗、沙西妥珠单抗、贝兰妥单抗、泊洛妥珠单抗、恩诺单抗、Endrecolomab、吉妥珠单抗、朗妥昔单抗、Mecbotamab、阿迪妥木单抗、D93、伽妥珠单抗、拉贝妥珠单抗、特赛妥单抗、尤匹菲妥单抗、利法妥珠单抗、米妥昔单抗、索非妥珠单抗、阿奈妥单抗、替索妥单抗、Cofituzumab、普罗妥单抗、Ladriatuzumab、贝兰妥单抗、帕曲妥单抗、西妥昔单抗、尼莫妥珠单抗、马妥珠单抗、Portuzumab、西他土珠单抗、西莫白介素单抗和 Endrecolomab。

58. 根据权利要求 43 至 57 中任一项所述的方法, 其中, 所述抗体选自由以下组成的组:

本妥昔单抗、吉妥珠单抗、曲妥珠单抗、奥英妥珠单抗、泊洛妥珠单抗、恩诺单抗、沙西妥珠单抗和贝兰妥单抗。

59. 根据权利要求43至58中任一项所述的方法,其中,所述抗体是泊洛妥珠单抗或曲妥珠单抗或恩诺单抗。

60. 根据权利要求43至59中任一项所述的方法,其中,所述肽接头缀合至所述抗体中包含的Gln残基的 γ -羧酰胺基。

61. 根据权利要求43至60中任一项所述的方法,其中,所述肽接头适于以至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的缀合效率缀合至糖基化抗体。

62. 根据权利要求43至61中任一项所述的方法,其中,所述转谷氨酰胺酶是微生物转谷氨酰胺酶(MTG)。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中,所述微生物转谷氨酰胺酶源自链霉菌属物种,特别是茂原链霉菌。

64. 根据权利要求43至63中任一项所述的方法,其中,所述抗体与2至100摩尔当量的接头接触。

65. 根据权利要求43至64中任一项所述的方法,其中,所述抗体以0.1-50mg/mL的浓度添加到缀合反应中。

66. 根据权利要求43至65中任一项所述的方法,其中,所述转谷氨酰胺酶以小于200U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。

67. 根据权利要求43至66中任一项所述的方法,其中,所述缀合反应在缓冲溶液中进行。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中,所述缓冲溶液包含:

- a) 在5至10范围内的pH;和/或
- b) 在10mM至1000mM范围内的缓冲液浓度;和/或
- c) 范围低于250mM的盐浓度。

69. 一种抗体-有效载荷缀合物,其通过根据权利要求43至68中任一项所述的方法生产。

70. 一种药物组合物,其包含根据权利要求29至42或权利要求69中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物和至少一种药学上可接受的成分。

71. 根据权利要求70所述的药物组合物,其包含至少一种额外的治疗活性剂。

72. 根据权利要求29至42或权利要求69中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,或根据权利要求70或71所述的药物组合物,用于治疗 and/或 诊断。

73. 根据权利要求29至42或权利要求69中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,或根据权利要求68或69所述的药物组合物,用于治疗患者,所述患者

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

74. 根据权利要求73所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含泊洛妥珠单抗,并且其中,所述肿瘤性疾病为B细胞相关的癌症。

75. 根据权利要求74所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述B细胞相关的癌症为非霍奇金淋巴瘤,特别地,其中,所述B细胞相关的癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤。

76. 根据权利要求74或75所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物或所述药物组合物与苯达莫司汀和/或利妥昔单抗联合施用。

77. 根据权利要求73所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含曲妥珠单抗,并且其中,所述肿瘤性疾病为HER2阳性癌症,特别是HER2阳性乳腺癌、胃癌、卵巢癌或肺癌。

78. 根据权利要求77所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物或所述药物组合物与拉帕替尼、卡培他滨和/或紫杉烷联合施用。

79. 根据权利要求73所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含恩诺单抗或恩诺单抗变体,并且其中,所述肿瘤性疾病为结合素-4阳性癌症,特别是结合素-4阳性胰腺癌、肺癌、膀胱癌或乳腺癌。

80. 根据权利要求79所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物或所述药物组合物与基于铂的化疗剂和/或派姆单抗联合施用。

81. 根据权利要求29至42或权利要求69中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物或根据权利要求70或71所述的药物组合物用于制造用于治疗患者的药物的用途,所述患者

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

82. 一种治疗或预防肿瘤性疾病的方法,所述方法包括:向有需要的患者施用根据权利要求29至42或权利要求69中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,或者根据权利要求70或72所述的药物组合物。

包含两个或更多个有效载荷的肽接头

背景技术

[0001] 本发明涉及通过转谷氨酰胺酶产生抗体-有效载荷缀合物的方法。本发明进一步提供了包含两个或更多个有效载荷的肽接头,用于产生抗体-有效载荷缀合物。还包括包含本发明的抗体-有效载荷缀合物的药物组合物及其用途。

[0002] 基于抗体的治疗剂在针对各种病症(如癌症和免疫性疾病)的靶向治疗中发挥了重要作用。近年来,抗体药物缀合物(antibody drug conjugate,ADC)已被广泛研究用于将药物有效递送至靶位点。虽然许多ADC已经显示出令人印象深刻的抗癌活性,但是许多患者对这些治疗没有反应,在出现疗效迹象之前经历了严重的副作用,或在一段时间后经历了复发,因此仍然对新型ADC形式存在巨大医学需求,所述新型ADC形式具有良好的药物样性质,能够以合理的成本以足够的数量和质量生产以支持药物开发,并且适合作为治疗剂。

[0003] 制备ADC的关键步骤是有效载荷与抗体的共价缀合步骤。目前临床开发中的大多数ADC都是通过与抗体的内源性赖氨酸或半胱氨酸残基缀合,小心控制修饰的平均程度以产生3.5-4.0范围内的平均药物-抗体比(drug-to-antibody ratio,DAR)而制成的。最近,具有DAR7-8的ADC显示出显著改善的功效,因为向肿瘤部位递送了更多的毒性有效载荷(Ogitani et al.,2016.Clin Cancer Res,22(20):5097-5108)。

[0004] 酶促缀合表现出极大的价值,因为这些缀合反应通常是快速的、位点特异性的,并且可以在生理条件下完成。在可用的酶中,来自茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)物种的微生物转谷氨酰胺酶(microbial transglutaminase,MTG)作为包括抗体在内的功能部分的常规化学蛋白质缀合物的有吸引力的替代物,已经越来越受到关注。MTG在生理条件下催化蛋白质或肽的“反应性”谷氨酰胺与蛋白质或肽的“反应性”赖氨酸残基之间的转酰胺基反应,而后者也可以是简单的低分子量伯胺,如5-氨基戊基(Jeger S.et al.,2010,Angew.Chem.Int.Ed.,49,9995-9997)。因此,转谷氨酰胺酶(TGase)通过转谷氨酰胺作用将具有胺供体基团的部分转移至受体谷氨酰胺残基。

[0005] 人同种型的全长IgG抗体在重链的295位(Q295)含有保守的谷氨酰胺残基。因为该谷氨酰胺295残基非常接近N-糖基化位点(N297),通常认为当抗体被N-糖基化时,全长抗体上的Q295不可接近TGase。为了使TGase作用于全长抗体,在TGase介导的缀合之前,抗体的Fc区被去糖基化或突变以去除N-糖基化位点。例如,Jeger等人描述了使用转谷氨酰胺酶作为酶的抗体的缀合发生在Q295残基,然而,缀合仅在用PNGase F去除天冬酰胺残基297(N297)处的聚糖部分时才可能,而糖基化抗体不能有效地缀合(缀合效率低于20%)(Jeger S.et al.,2010,Angew.Chem.Int.Ed.,49,9995-9997;Mindt T.et al.2008,Bioconj Chem,9,271-278)。

[0006] 可替代地,将含谷氨酰胺的序列“标签”插入抗体的轻链或重链,以提供受体谷氨酰胺位点(参见例如WO 2012/059882)。因此,在过去位点特异性ADC技术依赖于工程化的抗体突变体,这可能导致潜在的免疫原性和体内不稳定性。

[0007] Hu和Allen发现了在天然糖基化抗体的Q295处的缀合可以用工程化的转谷氨酰胺酶实现(WO 2015/191883)。事实上,与野生型转谷氨酰胺酶相比,作者显示了使用工程化转

谷氨酰胺酶的更高缀合效率。

[0008] 最近, Spycher等人公开了一种基于野生型转谷氨酰胺酶的缀合方法, 其不需要预先将抗体去糖基化用于有效载荷缀合 (Spycher et al., WO 2019/057772和WO 2020/188061)。令人惊讶的是, Spycher等人显示了基于赖氨酸或甘氨酸的接头的高缀合效率。

[0009] 示意性地, Hu和Allen (WO 2015/191883) 以及Spycher等人 (WO 2019/057772和WO 2020/188061) 描述了两步和一步缀合方法。然而, Hu和Allen以及Spycher等人没有在实验中证明包含两个或更多个有效载荷的接头在单一步骤中与天然糖基化抗体缀合。相比之下, 假设获得DAR4 ADC需要两步工艺, 其中, 在第一步中将包含两个官能团的接头缀合至抗体, 然后在第二步中将有效载荷化学偶联至抗体-接头缀合物。特别地, 假设由于在转谷氨酰胺酶的结合口袋处存在空间位阻, 则在单个步骤中包含两个或更多个有效载荷的接头与抗体的直接缀合将是低效的。另一个问题是, 据报道, 包含两个或更多个有效载荷的接头溶解度低, 并且倾向于聚集。

[0010] 最近, 一个研究小组报道了使用野生型转谷氨酰胺酶制备DAR4 ADC (Yamazaki et al. 2021, Nat Comm)。ADC的合成需要抗体再工程化 (N297突变为丙氨酸, 因此去除了天冬酰胺残基297处的聚糖部分) 和两步化学-酶促方法, 这进一步表明难以以直接的一步法获得DAR4ADC。

[0011] 从制造角度来看, 一步法显然是优选的。不幸的是, 迄今为止还没有实现天然糖基化抗体与包含两个或更多个有效载荷的接头的有效缀合。因此, 本领域需要具有两个或更多个有效载荷的接头, 其可以有效地缀合至天然糖基化抗体。

[0012] 因此, 本发明的客观技术问题可以表述为提供包含两个或更多个有效载荷的接头, 用于与天然糖基化抗体有效缀合。

发明内容

[0013] 本发明的特征在于本文提供的实施方案和权利要求。特别地, 本发明尤其涉及以下实施方案:

[0014] 1. 一种肽接头, 包含:

[0015] a) 包含伯胺的氨基酸残基; 和

[0016] b) 两个或更多个有效载荷;

[0017] 其中, 所述两个或更多个有效载荷中的每一个能够独立地连接到:

[0018] i) 所述肽接头的N端,

[0019] ii) 所述肽接头的C端, 或

[0020] iii) 包含在所述肽接头中的氨基酸残基的侧链。

[0021] 2. 根据实施方案1所述的肽接头, 其中, 所述氨基酸残基中包含的伯胺是

[0022] a) 赖氨酸、赖氨酸衍生物或赖氨酸模拟物的侧链中的伯胺; 或

[0023] b) 包含在具有结构 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ 的N端氨基酸残基中的伯胺。

[0024] 3. 根据实施方案2所述的肽接头, 其中, Y是 $(\text{R}_2\text{C})_n$, 并且其中n是1至20、1至15、1至10的整数。

[0025] 4. 根据实施方案3所述的肽接头, 其中, 每个 $-(\text{R}_2\text{C})-$ 单体的至少一个R部分是氢, 或其中每个 $-(\text{R}_2\text{C})-$ 单体的两个R部分都是氢。

- [0026] 5. 根据实施方案1至4中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含不超过25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4个氨基酸残基。
- [0027] 6. 根据实施方案1至5中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含至少一个精氨酸和/或组氨酸残基。
- [0028] 7. 根据实施方案1至6中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含序列基序RK。
- [0029] 8. 根据实施方案1至7中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含SEQ ID NO:1-29中所示的氨基酸序列中的任一个。
- [0030] 9. 根据实施方案1至8中任一项所述的肽接头,其中,所述接头包含2至4个有效载荷。
- [0031] 10. 根据实施方案1至9中任一项所述的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载荷中的至少一个通过化学接头连接到所述肽接头。
- [0032] 11. 根据实施方案10所述的肽接头,其中,所述化学接头是酶促可切割的接头和/或化学可切割的接头。
- [0033] 12. 根据实施方案10或11所述的肽接头,其中,所述化学接头是或包含自我牺牲型接头。
- [0034] 13. 根据实施方案12所述的肽接头,其中,所述自我牺牲型接头包含:
- [0035] a) 对氨基苄醇部分;或
- [0036] b) 2,4-双(羟甲基)苯胺部分;或
- [0037] c) 对氨基苄基季铵;或
- [0038] d) 基于乙二胺的部分;或
- [0039] e) 基于(氨甲基)吡咯烷的部分;或
- [0040] f) 基于氨甲基的部分。
- [0041] 14. 根据实施方案13所述的肽接头,其中,所述对氨基苄醇部分中包含的羟基与有效载荷形成氨基甲酸酯。
- [0042] 15. 根据实施方案13所述的肽接头,其中,所述2,4-双(羟甲基)苯胺部分中包含的每个羟基与有效载荷形成氨基甲酸酯。
- [0043] 16. 根据实施方案13所述的肽接头,其中,所述对氨基苄基季铵中包含的季铵阳离子源自所述有效载荷中包含的胺。
- [0044] 17. 根据实施方案13所述的肽接头,其中,包含在所述基于乙二胺的部分或所述基于(氨甲基)吡咯烷的部分中的氨基与有效载荷形成氨基甲酸酯。
- [0045] 18. 根据实施方案13所述的肽接头,其中,包含在所述基于氨甲基的部分中的氨基与有效载荷形成半缩醛胺或硫半缩醛胺。
- [0046] 19. 根据实施方案1至18中任一项所述的肽接头,其中,至少一个有效载荷连接到所述肽接头中包含的氨基酸残基的侧链。
- [0047] 20. 根据实施方案19所述的肽接头,其中,至少一个有效载荷连接至谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基或其各自的衍生物或模拟物的侧链。
- [0048] 21. 根据实施方案1至20中任一项所述的肽接头,其中,所述肽接头包含两个肽部分,并且其中,所述两个肽部分通过其N端氨基酸残基与二羧酸接头或其活化版本连接。

- [0049] 22. 根据实施方案1至21中任一项所述的肽接头,其中,所述有效载荷是以下至少一种:
- [0050] • 毒素;
 - [0051] • 细胞因子;
 - [0052] • 生长因子;
 - [0053] • 放射性核素;
 - [0054] • 激素;
 - [0055] • 抗病毒剂;
 - [0056] • 抗菌剂;
 - [0057] • 荧光染料;
 - [0058] • 免疫调节剂/免疫刺激剂;
 - [0059] • 半衰期增加部分;
 - [0060] • 溶解度增加部分;
 - [0061] • 聚合物-毒素缀合物;
 - [0062] • 核酸;
 - [0063] • 生物素或链霉亲和素部分;
 - [0064] • 维生素;
 - [0065] • 蛋白质降解剂(“PROTAC”);
 - [0066] • 受体的配体或底物;
 - [0067] • 靶结合部分;和/或
 - [0068] • 抗炎剂。
- [0069] 23. 根据实施方案22所述的肽接头,其中,所述毒素是选自由以下组成的组中的至少一种:
- [0070] • 吡咯并苯并二氮杂萘(pyrrrolobenzodiazepine) (例如,PBD);
 - [0071] • 澳瑞他汀(auristatin) (例如,MMAE,MMAF);
 - [0072] • 美登素生物碱(maytansinoid) (例如,美登素,DM1,DM4,DM21);
 - [0073] • 多卡霉素(duocarmycin);
 - [0074] • 烟酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT) 抑制剂;
 - [0075] • 微管蛋白抑制剂(tubulysin);
 - [0076] • 烯二炔类(例如,卡利奇霉素(calicheamicin));
 - [0077] • 蒽环霉素衍生物(PNU) (如多柔比星);
 - [0078] • 基于吡咯的纺锤体驱动蛋白(KSP) 抑制剂;
 - [0079] • 念珠藻素(cryptophycin);
 - [0080] • 药物外排泵抑制剂;
 - [0081] • 山卓霉素(sandrmycin);
 - [0082] • 胸苷酸合酶抑制剂;
 - [0083] • 鹅膏蕈碱(amanitin) (例如, α -鹅膏蕈碱);和
 - [0084] • 喜树碱(例如依喜替康(exatekans), 德鲁替康(deruxtecans))。
- [0085] 24. 根据实施方案1至23中任一项所述的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载

荷是相同的。

[0086] 25. 根据实施方案1至23中任一项所述的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载荷中的至少两个彼此不同。

[0087] 26. 根据实施方案1至25中任一项所述的肽接头,其中,所述接头适合用作转谷氨酰胺酶的底物。

[0088] 27. 一种抗体-有效载荷缀合物,其包含缀合至根据实施方案1至26中任一项所述的肽接头的抗体。

[0089] 28. 根据实施方案27所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头通过在所述抗体中包含的谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基和所述肽接头的氨基酸残基中包含的伯胺之间形成的异肽键与所述抗体缀合。

[0090] 29. 根据实施方案27或28所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体是IgG抗体。

[0091] 30. 根据实施方案29所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头与包含在所述抗体的Fc结构域中的谷氨酰胺残基缀合。

[0092] 31. 根据实施方案30所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基是IgG抗体的 C_H2 结构域的谷氨酰胺残基Q295(EU编号)。

[0093] 32. 根据实施方案29所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中。

[0094] 33. 根据实施方案32所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基是非糖基化IgG抗体的 C_H2 结构域的N297Q(EU编号)。

[0095] 34. 根据实施方案32所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基包含在肽中,所述肽已经(a)整合到所述抗体的重链或轻链中,或(b)融合到所述抗体的重链或轻链的N端或C端。

[0096] 35. 根据实施方案34所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,包含Gln残基的肽已经融合到所述抗体的重链的C端。

[0097] 36. 根据实施方案29至32或34至35中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述IgG抗体是糖基化IgG抗体。

[0098] 37. 根据实施方案36所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述IgG抗体在所述 C_H2 结构域的残基N297(EU编号)处被糖基化。

[0099] 38. 根据实施方案27至37中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体选自自由以下组成的组:本妥昔单抗(Brentuximab)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、奥英妥珠单抗(Inotuzumab)、阿维鲁单抗(Avelumab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、利妥昔单抗(Rituximab)、达雷妥木单抗(Daratumumab)、珀妥珠单抗(Pertuzumab)、维多利珠单抗(Vedolizumab)、奥瑞利珠单抗(Ocrelizumab)、托西利珠单抗(Tocilizumab)、优特吉努单抗(Ustekinumab)、戈利木单抗(Golimumab)、奥比妥珠单抗(Obinutuzumab)、沙西妥珠单抗(Sacituzumab)、贝兰妥单抗(Belantamab)、泊洛妥珠单抗(Polatuzumab)、恩诺单抗(Enfortumab)、Endrecolomab、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、朗妥昔单抗(Loncastuximab)、Mecbotamab、阿迪妥木单抗(Adecatumumab)、D93、伽妥珠单抗

(Gatipotuzumab)、拉贝妥珠单抗(Labetuzumab)、特赛妥单抗(Tusamitamab)、尤匹菲妥单抗(Upifitamab)、利法妥珠单抗(Lifastuzumab)、米妥昔单抗(Mirvetuximab)、索非妥珠单抗(Sofituzumab)、阿奈妥单抗(Anetumab)、替索妥单抗(Tisotumab)、Cofituzumab、普罗妥单抗(Praluzatamab)、Ladriatuzumab、贝兰妥单抗(Belantamab)、帕曲妥单抗(Patritumab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、尼莫妥珠单抗(Nimotuzumab)、马妥珠单抗(Matuzumab)、Portuzumab、西他土珠单抗(Citatuzumab)、西莫白介素单抗(Tucotuzumab)和Endrecolomab。

[0100] 39. 根据实施方案27至38中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体选自自由以下组成的组:本妥昔单抗、吉妥珠单抗、曲妥珠单抗、奥英妥珠单抗、泊洛妥珠单抗、恩诺单抗、沙西妥珠单抗和贝兰妥单抗。

[0101] 40. 根据实施方案27至39中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体是泊洛妥珠单抗或曲妥珠单抗或恩诺单抗。

[0102] 41. 一种制备抗体-有效载荷缀合物的方法,包括将根据实施方案1至26中任一项所述的肽接头缀合至抗体的步骤。

[0103] 42. 一种使用转谷氨酰胺酶(TG)将包含两个或更多个有效载荷的肽接头与抗体缀合的方法,所述方法包括:a)在流体中混合所述抗体、所述肽接头和所述TG,从而在所述TG的催化作用下在一个步骤中将所述接头-有效载荷与所述抗体缀合,以及b)从所述流体中提取步骤a)中获得的所述缀合物。

[0104] 43. 根据实施方案42所述的方法,其中,所述肽接头是根据实施方案1至26中任一项所述的肽接头。

[0105] 44. 根据实施方案42或43所述的方法,其中,所述肽接头通过所述肽接头的氨基酸残基中包含的伯胺与所述抗体中包含的谷氨酰胺残基缀合。

[0106] 45. 根据实施方案41至44中任一项所述的方法,其中,所述抗体是抗体片段。

[0107] 46. 根据实施方案41至44中任一项所述的方法,其中,所述抗体是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。

[0108] 47. 根据实施方案41至46中任一项所述的方法,其中,所述肽接头与包含在所述抗体的Fc结构域中的谷氨酰胺残基缀合。

[0109] 48. 根据实施方案41至47中任一项所述的方法,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基是IgG抗体的C_H2结构域的谷氨酰胺残基Q295(EU编号)。

[0110] 49. 根据实施方案41至47中任一项所述的方法,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中。

[0111] 50. 根据实施方案49所述的方法,其中,已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基是非糖基化IgG抗体的C_H2结构域的N297Q(EU编号)。

[0112] 51. 根据实施方案50所述的方法,其中,已经通过分子工程化引入到所述抗体的重链或轻链中的所述谷氨酰胺残基包含在肽中,所述肽已经(a)整合到所述抗体的重链或轻链中,或(b)融合到所述抗体的重链或轻链的N端或C端。

[0113] 52. 根据实施方案51所述的方法,其中,包含Gln残基的肽已经融合到所述抗体的重链的C端。

[0114] 53. 根据实施方案41至49或51至52中任一项所述的方法,其中,所述抗体是糖基化

IgG抗体。

[0115] 54. 根据实施方案53所述的方法,其中,所述IgG抗体在所述C_H2结构域的残基N297 (EU编号)处被糖基化。

[0116] 55. 根据实施方案41至54中任一项所述的方法,其中,所述抗体选自由以下组成的组:本妥昔单抗、曲妥珠单抗、吉妥珠单抗、奥英妥珠单抗、阿维鲁单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、达雷妥木单抗、珀妥珠单抗、维多利珠单抗、奥瑞利珠单抗、托西利珠单抗、优特吉努单抗、戈利木单抗、奥比妥珠单抗、沙西妥珠单抗、贝兰妥单抗、泊洛妥珠单抗、恩诺单抗、Endrecolomab、吉妥珠单抗、朗妥昔单抗、Mecbotamab、阿迪妥木单抗、D93、伽妥珠单抗、拉贝妥珠单抗、特赛妥单抗、尤匹菲妥单抗、利法妥珠单抗、米妥昔单抗、索非妥珠单抗、阿奈妥单抗、替索妥单抗、Cofituzumab、普罗妥单抗、Ladriatuzumab、贝兰妥单抗、帕曲妥单抗、西妥昔单抗、尼莫妥珠单抗、马妥珠单抗、Portuzumab、西他土珠单抗、西莫白介素单抗和Endrecolomab。

[0117] 56. 根据实施方案41至55中任一项所述的方法,其中,所述抗体选自由以下组成的组:本妥昔单抗、吉妥珠单抗、曲妥珠单抗、奥英妥珠单抗、泊洛妥珠单抗、恩诺单抗、沙西妥珠单抗和贝兰妥单抗。

[0118] 57. 根据实施方案41至56中任一项所述的方法,其中,所述抗体是泊洛妥珠单抗或曲妥珠单抗或恩诺单抗。

[0119] 58. 根据实施方案41至57中任一项所述的方法,其中,所述肽接头缀合至所述抗体中包含的Gln残基的 γ -羧酰胺基。

[0120] 59. 根据实施方案41至58中任一项所述的方法,其中,所述肽接头适于以至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的缀合效率缀合至糖基化抗体。

[0121] 60. 根据实施方案41至59中任一项所述的方法,其中,所述转谷氨酰胺酶是微生物转谷氨酰胺酶(MTG)。

[0122] 61. 根据实施方案60所述的方法,其中,所述微生物转谷氨酰胺酶源自链霉菌属物种,特别是茂原链霉菌。

[0123] 62. 根据实施方案41至61中任一项所述的方法,其中,所述抗体与2至100摩尔当量的接头接触。

[0124] 63. 根据实施方案41至62中任一项所述的方法,其中,所述抗体以0.1-50mg/mL的浓度添加到缀合反应中。

[0125] 64. 根据实施方案41至63中任一项所述的方法,其中,所述转谷氨酰胺酶以小于200U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。

[0126] 65. 根据实施方案41至64中任一项所述的方法,其中,所述缀合反应在缓冲溶液中进行。

[0127] 66. 根据实施方案65所述的方法,其中,所述缓冲溶液包含:

[0128] a) 范围为5至10的pH;和/或

[0129] b) 范围为10至1000mM的缓冲液浓度;和/或

[0130] c) 范围低于250mM的盐浓度。

[0131] 67. 一种抗体-有效载荷缀合物,其通过根据实施方案41至66中任一项所述的方法

生产。

[0132] 68. 一种药物组合物,其包含根据实施方案27至40或实施方案67中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物和至少一种药学上可接受的成分。

[0133] 69. 根据实施方案68所述的药物组合物,其包含至少一种额外的治疗活性剂。

[0134] 70. 根据实施方案27至40或实施方案67中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,或根据实施方案68或69所述的药物组合物,用于治疗 and/或 诊断。

[0135] 71. 根据实施方案27至40或实施方案67中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,或根据实施方案68或69所述的药物组合物,用于治疗患者,所述患者

[0136] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[0137] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中,和/或

[0138] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[0139] 72. 根据实施方案71所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含泊洛妥珠单抗,并且其中,所述肿瘤性疾病为B细胞相关的癌症。

[0140] 73. 根据实施方案72所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述B细胞相关的癌症为非霍奇金淋巴瘤,特别地,其中,所述B细胞相关的癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤。

[0141] 74. 根据实施方案72或73所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物或所述药物组合物与苯达莫司汀和/或利妥昔单抗联合施用。

[0142] 75. 根据实施方案71所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含曲妥珠单抗,并且其中,所述肿瘤性疾病为HER2阳性癌症,特别是HER2阳性乳腺癌、胃癌、卵巢癌或肺癌。

[0143] 76. 根据实施方案75所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物或所述药物组合物与拉帕替尼、卡培他滨和/或紫杉烷联合施用。

[0144] 77. 根据实施方案71所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含恩诺单抗或恩诺单抗变体,并且其中,所述肿瘤性疾病为结合素-4阳性癌症,特别是结合素-4阳性胰腺癌、肺癌、膀胱癌或乳腺癌。

[0145] 78. 根据实施方案77所述使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物或所述药物组合物与基于铂的化疗剂和/或派姆单抗联合施用。

[0146] 79. 根据实施方案27至40或实施方案67中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物或根据实施方案68或69所述的药物组合物用于制造用于治疗患者的药物的用途,所述患者

[0147] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[0148] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中,和/或

[0149] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[0150] 80. 一种治疗或预防肿瘤性疾病的方法,所述方法包括:向有需要的患者施用根据实施方案27至40或实施方案67中任一项所述的抗体-有效载荷缀合物,或者根据实施方案

68或69所述的药物组合物。

[0151] 也就是说,本发明至少部分基于令人惊讶的发现,即包含两个或更多个有效载荷的肽接头可以有效地缀合至天然糖基化抗体。如在所附实施例中可以看到的,包含两个或更多个有效载荷的肽接头可以在单个反应步骤中以至少60%的异常高的效率与天然糖基化抗体缀合。此外,包含两个有效载荷的肽接头可以在单个反应步骤中以80-100%的效率与天然糖基化抗体缀合。

[0152] 令发明人惊讶的是,发现了根据本发明的肽接头特别适用于具有 $DAR \geq 4$ 的ADC的1步缀合,相比之下,非肽接头仅获得低于30%的缀合效率(如本领域已知的氨基-PEG接头;见实施例9)。

[0153] 更令人惊讶的是,所有肽接头都获得了高级合效率。值得注意的是,从未报道过天然糖基化抗体与包含两个或更多个有效载荷的接头在一个步骤中的定量缀合。鉴于此,被认为更令人惊讶的是,包含两个或更多个大体积(bulky)有效载荷的肽接头可以如此高效地与天然糖基化抗体缀合。

[0154] 除了这些异常高的缀合效率之外,发明人发现已经与本发明的肽接头缀合的抗体在体内是有活性的(参见实施例11)。此外,令人惊讶地发现,与在其N端和C端包含有效载荷的肽接头缀合的抗体比基准抗体维汀-恩诺单抗(Enfortumab vedotin)具有更强的抗肿瘤活性。

[0155] 在一个具体实施方案中,本发明涉及一种肽接头,其包含:

[0156] a) 包含伯胺的氨基酸残基;和

[0157] b) 两个或更多个有效载荷;

[0158] 其中,所述两个或更多个有效载荷中的每一个能够独立地连接到:

[0159] i) 所述肽接头的N端,

[0160] ii) 所述肽接头的C端,或

[0161] iii) 包含在所述肽接头中的氨基酸残基的侧链。

[0162] 因此,本发明涉及包含共价连接到肽部分的两个或更多个有效载荷的肽接头。在现有技术中,已经假设了用于生成包含药物-抗体比(DAR) >4 的抗体-有效载荷缀合物的两步方法,其中,在第一步中,包含两个反应基团的接头通过微生物转谷氨酰胺酶与糖基化抗体缀合,并且在第二步中,有效载荷分子与抗体-接头缀合物中包含的反应基团偶联(WO 2019/057772和WO 2015/191883)。特别地,由于内源性缀合位点Q295的有限的可及性和转谷氨酰胺酶的底物结合口袋中的有限空间,已经认为很难在单一反应步骤中将包含大体积有效载荷(如毒素)的接头与天然糖基化抗体缀合。尽管存在这些已知的困难,但本发明人惊奇地发现,包含两个或更多个有效载荷的本发明的肽接头可以以异常高的缀合效率与糖基化抗体缀合。

[0163] 在本发明的含义中,“肽接头”是包含至少两个氨基酸残基的分子,其中两个氨基酸残基通过肽键偶联。设想肽接头适合作为微生物转谷氨酰胺酶的底物。具体地,设想肽接头适于与抗体中包含的谷氨酰胺残基缀合。为此,根据本发明的肽接头必须包含至少一个包含伯胺的氨基酸残基。

[0164] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中氨基酸残基中包含的伯胺是:

[0165] a) 赖氨酸、赖氨酸衍生物或赖氨酸模拟物的侧链中的伯胺;或

[0166] b) 包含在具有结构 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ 的N端氨基酸残基中的伯胺。

[0167] 也就是说,在一个优选实施方案中,包含伯胺的氨基酸残基是赖氨酸残基。在此类实施方案中,肽接头包含含有至少一个赖氨酸残基的肽部分。

[0168] 然而,根据本发明的接头也可包含赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,条件是赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物在氨基酸侧链中包含游离伯胺。

[0169] 在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸残基可以是赖氨酸模拟物。本文所用的术语“赖氨酸模拟物(lysine mimetic)”是指具有不同于赖氨酸的结构,但具有与赖氨酸相似的特征的化合物,因此可用于取代肽或蛋白质中的赖氨酸,而不会显著改变所述肽或蛋白质的功能和/或结构。在某些实施方案中,赖氨酸模拟物可以在连接伯胺和 α -碳原子的脂肪链的长度或组成上不同于赖氨酸。因此,在某些实施方案中,赖氨酸模拟物可以是鸟氨酸、高赖氨酸或2,7-二氨基庚酸(含有高赖氨酸的示例性接头显示在图23中)。在某些实施方案中,赖氨酸模拟物可以是 β -氨基酸,如 β -高赖氨酸。

[0170] 在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸残基可以是赖氨酸衍生物。本文所用术语“赖氨酸衍生物”是指赖氨酸或赖氨酸模拟物,其中赖氨酸或赖氨酸模拟物中包含的一个或多个官能团被修饰或取代。在本发明中,优选赖氨酸衍生物的侧链中的氨基未被修饰,从而可用于缀合蛋白质中的谷氨酰胺残基。因此,包含在本发明肽接头中的“赖氨酸衍生物”优选包含修饰的或取代的 α -氨基和/或 α -羧基。

[0171] 在某些实施方案中,氨基酸残基中包含的伯胺可以是具有结构 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ 的N端氨基酸残基中包含的伯胺。

[0172] 在某些实施方案中,伯胺可以是 α -氨基酸的 α -氨基。 α -氨基酸可以是任何蛋白原性 α -氨基酸,包括:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

[0173] 在一个特别优选的实施方案中,伯胺可以是甘氨酸残基的 α -氨基。在此类实施方案中,优选地,甘氨酸残基是肽接头的N端氨基酸残基,使得 α -氨基可用于通过微生物转谷氨酰胺酶与甘氨酸残基缀合。

[0174] 包含伯胺的氨基酸可以是非标准的(non-canonical)或合成的氨基酸。如本文所使用的“非标准氨基酸”可以是并非蛋白源性氨基酸组的一部分的任何氨基酸,而是可以从天然来源获得。然而,必须注意,在天然存在的肽和/或蛋白质中也可以发现一些非标准氨基酸。本文所用的“合成氨基酸”可以是属于氨基酸($\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$)的一般定义的任何分子,即包含氨基和羧基,但不是天然存在的。因此,非天然氨基酸优选通过化学合成获得。应当理解,在某些情况下,非标准氨基酸和合成氨基酸之间的区别可能是不确定的。例如,被定义为合成氨基酸的氨基酸可能在以后的时间点上在自然界中被鉴定,并因此被重新分类为非标准氨基酸。非标准氨基酸或合成氨基酸可以是 α -、 β -、 γ -、 δ -或 ϵ -氨基酸。

[0175] 在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $\text{NH}_2 - (\text{Y}) - \text{COOH}$ 。

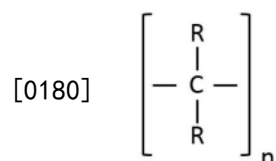
[0176] 在某些实施方案中,部分Y可包含1至200个原子的含碳框架,任选地至少10个原子的含碳框架,例如10至100个原子或20至100个原子,在一个或多个原子上被取代,任选地其中,含碳框架是直链烃或包含环状基团、对称或不对称支链烃、单糖、二糖、直链或支链寡糖

(不对称支链或对称支链),其他天然直链或支链低聚物(不对称支链或对称支链),或更一般地,由任何链增长或逐步增长聚合过程产生的任何二聚体、三聚体或更高级的低聚物(直链、不对称支链或对称支链)。

[0177] Y还可以是或包含任何直链的、支链的和/或环状的 C_{2-30} 烷基、 C_{2-30} 烯基、 C_{2-30} 炔基、 C_{2-30} 杂烷基、 C_{2-30} 杂烯基、 C_{2-30} 杂炔基,任选地其中,可以插入一个或多个同素环的芳香族化合物基团或杂环化合物基团;特别是,任何直链或支链 C_{2-5} 烷基、 C_{5-10} 烷基、 C_{11-20} 烷基、 $-O-C_{1-5}$ 烷基、 $-O-C_{5-10}$ 烷基、 $-O-C_{11-20}$ 烷基或 $(CH_2-CH_2-O-)_1-24$ 或 $(CH_2)_{x1}-(CH_2-O-CH_2)_{1-24}-(CH_2)_{x2}$ -基(其中 $x1$ 和 $x2$ 独立地为选自0至20的范围的整数)、氨基酸、寡肽、聚糖、硫酸酯、磷酸酯或羧酸酯。在一些实施方案中,Y可以包括 C_{2-6} 烷基。

[0178] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,Y是 $-(R_2C)_n-$,并且其中 n 是1至20、1至15、1至10的整数。

[0179] 也就是说,Y可以具有以下结构:



[0181] 在某些实施方案中,Y可以是取代或未取代的烷基或烯基链。当Y是取代或未取代的烯基链时,应理解为必须缺少至少两个连接到连续碳分子上的R部分。

[0182] 本文所用的术语“取代的烷基”通常是指具有连接到烷基的任何碳上的一个或多个附加基团的烷基。也就是说,取代的烷基可以包括结构 $-(R_2C)_n-$,其中每个R可以独立地是氢或官能团,如烷基、低级烷基、芳基、酰基、卤素、卤代烷基、羟基、氨基、烷氧基、烷基氨基、酰氨基、酰氧基、芳氧基、芳氧基烷基、巯基、饱和及不饱和的环烃、杂环和其它有机基团。

[0183] 在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(R_2C)_n-$,并且其中 n 是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在某些实施方案中,结构 $-(R_2C)_n-$ 中包含的至少1、2、3、4或5个部分R可以是官能团,如烷基、低级烷基、芳基、酰基、卤素、卤代烷基、羟基、氨基、烷氧基、烷基氨基、酰氨基、酰氧基、芳氧基、芳氧基烷基、巯基、饱和及不饱和的环烃、杂环和其它有机基团。

[0184] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,每个 $-(R_2C)-$ 单体中的至少一个R部分是氢。

[0185] 也就是说,在某些实施方案中,每个 $-(R_2C)-$ 单体中的一个R部分可以是氢,而另一个R部分可以是官能团,如烷基、低级烷基、芳基、酰基、卤素、卤代烷基、羟基、氨基、烷氧基、烷基氨基、酰氨基、酰氧基、芳氧基、芳氧基烷基、巯基、饱和及不饱和的环烃、杂环和其它有机基团。可替代地,每个 $-(R_2C)-$ 单体中的一个R部分可以是氢,另一个R部分可以不存在(在烯烃的情况下)。在某些实施方案中,部分Y中包含的一些 $-(R_2C)-$ 单体可以包含两个氢取代基,并且同一部分Y中包含的一些 $-(R_2C)-$ 单体可以包含一个氢取代基和一个如本文所定义的取代基R。

[0186] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中每个 $-(R_2C)-$ 单体中的两个R部分都是氢。

[0187] 在某些实施方案中,结构 $-(R_2C)_n-$ 可以是未取代的烷基链,其中结构 $-(R_2C)_n-$ 中包

含的所有部分R是氢原子。也就是说,在某些实施方案中,结构- $(R_2C)_n$ -可以是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基或十八烷基。

[0188] 也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(CH_2)_n-$,并且其中n是1至20的整数。在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(CH_2)_n-$,并且其中n是1至15的整数。在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(CH_2)_n-$,并且其中n是1至10的整数。在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(CH_2)_n-$,并且其中n是1至9的整数。在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(CH_2)_n-$,并且其中n是1至8的整数。在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(CH_2)_n-$,并且其中n是1至7的整数。在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$,其中Y是 $-(CH_2)_n-$,并且其中n是1至6的整数。

[0189] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是1。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是甘氨酸。

[0190] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是2。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是 β -丙氨酸。

[0191] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是3。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是4-氨基丁酸。

[0192] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是4。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是5-氨基戊酸(含有5-氨基戊酸的示例性接头显示在图24中)。

[0193] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是5。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是6-氨基己酸。

[0194] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是6。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是7-氨基庚酸。

[0195] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是7。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是8-氨基辛酸。

[0196] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是8。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是9-氨基壬酸。

[0197] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是9。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是10-氨基癸酸。

[0198] 在某些实施方案中,Y可以具有结构 $-(CH_2)_n-$,其中n是10。也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以是11-氨基十一酸。

[0199] 在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(CH_2)_n-X-(CH_2)_n-COOH$,其中X是取代或未取代的烷基或杂烷基链,并且其中n是0-20、0-10或0-6的整数。

[0200] 也就是说,在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-(CH_2)_n-X-COOH$,其中X是取代或未取代的烷基或杂烷基链,并且其中n是1-20、1-10或1-6的整数。

[0201] 在某些实施方案中,包含伯胺的氨基酸可以具有结构 $NH_2-X-(CH_2)_n-COOH$,其中X是取代或未取代的烷基或杂烷基链,并且其中n是1-20、1-10或1-6的整数。

[0202] 在一个优选的实施方案中,包含伯胺的氨基酸包含至少一个亚甲基(CH₂)。更优选地,至少一个亚甲基直接偶联至伯胺。也就是说,包含伯胺的氨基酸优选包含结构NH₂-CH₂-。

[0203] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中氨基酸残基中包含的伯胺是:

[0204] a) 赖氨酸、赖氨酸衍生物或赖氨酸模拟物的侧链中的伯胺;或

[0205] b) 包含在具有结构NH₂-(CH₂)_n-COOH的N端氨基酸残基中的伯胺,其中,n是从1至10的整数。

[0206] 在某些实施方案中,有效载荷连接至肽接头的N端。在此类实施方案中,优选地包含在氨基酸残基中的伯胺是赖氨酸、赖氨酸衍生物或赖氨酸模拟物的侧链中的伯胺;更优选赖氨酸残基的侧链中的伯胺。

[0207] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述接头包含不超过25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4个氨基酸残基。

[0208] 根据本发明的肽接头优选包含至少两个氨基酸残基且不超过25个氨基酸残基。在一个优选的实施方案中,包含在根据本发明的肽接头中的所有氨基酸残基形成单个肽。然而,应当理解,肽接头可以包含两个或更多个肽部分。例如,在某些实施方案中,肽接头可以包含两个肽部分,其中两个肽部分彼此共价连接,但不是通过肽键连接。这种肽接头的实例将在下面进一步给出。

[0209] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头的净电荷是中性的或正的。

[0210] 肽的净电荷通常于中性pH(7.0)计算。在最简单的方法中,通过将带正电荷的氨基酸残基(Arg、Lys和His)的数量和带负电荷的氨基酸残基(Asp和Glu)的数量相加,并计算两组的差值来确定净电荷。在接头包含含有带电官能团的非标准氨基酸或氨基酸衍生物的情况下,技术人员能够相应地计算中性pH下的净电荷。

[0211] 在某些实施方案中,有效载荷也可以导致接头的净电荷。然而,技术人员知道计算整个接头的净电荷的方法,包括任何有效载荷,优选在中性pH(7.0)。

[0212] 在某些实施方案中,肽接头的净电荷仅基于接头中包含的氨基酸残基计算,包括氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。因此,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中包含在肽接头中的氨基酸残基的净电荷是中性的或正的。

[0213] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头不包含带负电荷的氨基酸残基。

[0214] 也就是说,接头可以不含带负电荷的氨基酸残基,包括带负电荷的氨基酸模拟物和氨基酸衍生物。带负电荷的氨基酸残基是在中性pH(7.0)下带负电荷的氨基酸、氨基酸模拟物或氨基酸衍生物。带负电荷的标准的氨基酸是谷氨酸和天冬氨酸。然而,带负电荷的非标准氨基酸、氨基酸模拟物和氨基酸衍生物是本领域已知的。

[0215] 必须注意,根据本发明的肽接头可以包含一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基。然而,优选天冬氨酸或谷氨酸侧链中包含的羧基与有效载荷偶联。

[0216] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头包含至少一个带正电荷的氨基酸残基。

[0217] 在某些实施方案中,肽接头包含带正电荷的赖氨酸残基,其为转谷氨酰胺酶介导

的与抗体的缀合提供伯胺。然而,本文优选地肽接头包含至少一个额外的带正电荷的氨基酸。额外的带正电荷的氨基酸可以是标准氨基酸残基,如精氨酸或组氨酸。然而,额外的带正电荷的氨基酸也可以是非标准氨基酸。

[0218] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头包含至少一个精氨酸残基。

[0219] 本文已经证明,包含精氨酸残基的接头可以高效地与糖基化抗体缀合。因此,本文优选地根据本发明的肽接头包含至少一个精氨酸残基。应当注意,精氨酸残基也可以被精氨酸模拟物或精氨酸衍生物替代。

[0220] 精氨酸残基可以位于肽接头的任何位置。在某些实施方案中,精氨酸残基与包含伯胺的氨基酸残基相邻。在某些实施方案中,精氨酸残基偶联至包含伯胺的氨基酸,即赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的N端(例如,RK基序)。在某些实施方案中,精氨酸残基偶联至包含伯胺的氨基酸,即赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的C端(例如,KR基序)。在某些实施方案中,精氨酸残基通过另一个氨基酸残基(优选丙氨酸残基)与包含伯胺的氨基酸(即赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物)偶联(KAR或RAK基序)。在某些实施方案中,肽接头包含精氨酸和组氨酸残基。

[0221] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头包含至少一个组氨酸残基。

[0222] 本文已经证明,包含组氨酸残基的接头可以高效地与糖基化抗体缀合。因此,本文优选根据本发明的肽接头包含至少一个组氨酸残基。应当注意,组氨酸残基也可以被组氨酸模拟物或组氨酸衍生物替代。

[0223] 组氨酸残基可以位于肽接头的任何位置。在某些实施方案中,组氨酸残基与包含伯胺的氨基酸残基相邻。在某些实施方案中,组氨酸残基偶联至包含伯胺的氨基酸,即赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的N端(例如,HK基序)。在某些实施方案中,组氨酸残基偶联至包含伯胺的氨基酸,即赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的C端(例如,KH基序)。在某些实施方案中,组氨酸残基通过另一个氨基酸残基,优选丙氨酸残基与包含伯胺的氨基酸(即赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物)偶联(KAH或HAK基序)。在某些实施方案中,肽接头包含组氨酸和精氨酸残基。

[0224] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头包含序列基序RK。

[0225] 本发明人已经表明,即使接头包含两个或更多个有效载荷,包含序列基序RK(精氨酸酰基-赖氨酸酰基(argynyl-lysyl))的肽接头也可以以特别高的效率与糖基化抗体缀合。应当理解,RK基序中包含的赖氨酸残基含有伯胺,肽接头通过该伯胺与抗体中包含的谷氨酰胺残基缀合。也就是说,包含在RK基序中的赖氨酸残基优选是包含伯胺的氨基酸。

[0226] 本文优选的是,基序RK由氨基酸精氨酸和赖氨酸组成。然而,应当理解,精氨酸和/或赖氨酸残基可以被精氨酸模拟物/衍生物和/或赖氨酸模拟物/衍生物取代。

[0227] 也就是说,在某些实施方案中,基序RK可以包含精氨酸模拟物。本文所用的术语“精氨酸模拟物”是指具有不同于精氨酸的结构,但具有与精氨酸相似的特征的化合物,因此可用于取代肽或蛋白质中的精氨酸,而不会显著改变所述肽或蛋白质的功能和/或结构。精氨酸模拟物可以在连接胍基和 α -碳原子的脂肪链的长度或组成上不同于精氨酸。可替代

地,或另外,精氨酸模拟物可以在胍基本身上不同于精氨酸。也就是说,精氨酸模拟物可以包含与胍基具有相似物理化学性质的官能团。在某些实施方案中,精氨酸模拟物可以是高精氨酸、2-氨基-3-胍基-丙酸、 β -脲基丙氨酸或瓜氨酸。

[0228] 在某些实施方案中,基序RK可以包含精氨酸衍生物。本文所用术语“精氨酸衍生物”是指精氨酸或精氨酸模拟物,其中精氨酸或精氨酸模拟物中包含的一个或多个官能团被修饰或取代。精氨酸衍生物可以是精氨酸或精氨酸模拟物,其中胍基被取代或修饰。在某些实施方案中,精氨酸衍生物可以是 ω -甲基精氨酸。在残基R位于接头的N端位置的实施方案中,R可以是精氨酸衍生物,其中 α -氨基被修饰或取代。在某些实施方案中,精氨酸或精氨酸模拟物的 α -氨基可以被乙酰化。

[0229] 在某些实施方案中,基序RK可包含本文别处定义的赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物。

[0230] 在某些实施方案中,基序RK可包含赖氨酸模拟物/衍生物和精氨酸模拟物/衍生物。

[0231] 在某些实施方案中,赖氨酸残基、或赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物可以与精氨酸残基、或精氨酸模拟物或精氨酸衍生物相隔一个氨基酸残基。也就是说,本发明的肽接头可以包含序列基序RXK或KXR,其中X可以是任何氨基酸。在一个优选的实施方案中,赖氨酸残基或赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物可以通过丙氨酸残基与精氨酸残基或精氨酸模拟物或精氨酸衍生物隔开。也就是说,本发明的肽接头可以包含序列基序RAK或KAR。在实施例10中已经证明,包含序列基序KAR的接头可以以异常高的缀合效率与糖基化抗体缀合。

[0232] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头包含序列基序HK。

[0233] 发明人已经表明,即使接头包含两个或更多个有效载荷(例如,实施例3),包含序列基序HK(组氨酰基-赖氨酰基)的肽接头可以非常高效地与糖基化抗体缀合。应当理解,HK基序中包含的赖氨酸残基含有伯胺,肽接头通过该伯胺与抗体中包含的谷氨酰胺残基缀合。也就是说,包含在HK基序中的赖氨酸残基优选是包含伯胺的氨基酸。

[0234] 本文优选的是,基序HK由氨基酸组氨酸和赖氨酸组成。然而,应当理解,组氨酸和/或赖氨酸残基可以被组氨酸模拟物/衍生物和/或赖氨酸模拟物/衍生物取代。

[0235] 也就是说,在某些实施方案中,基序HK可以包含组氨酸模拟物。本文所用的术语“组氨酸模拟物”是指具有不同于组氨酸的结构,但具有与组氨酸相似的特征的化合物,因此可用于取代肽或蛋白质中的组氨酸,而不会显著改变所述肽或蛋白质的功能和/或结构。组氨酸模拟物可以在连接咪唑基和 α -碳原子的脂肪链的长度或组成上不同于组氨酸。可替代地,或另外,组氨酸模拟物可以在咪唑基本身上不同于组氨酸。也就是说,组氨酸模拟物可以包含与咪唑基具有相似物理化学性质的官能团。在某些实施方案中,组氨酸模拟物可以是高组氨酸。

[0236] 在某些实施方案中,基序HK可以包含组氨酸衍生物。本文所用术语“组氨酸衍生物”是指组氨酸或组氨酸模拟物,其中组氨酸或组氨酸模拟物中包含的一个或多个官能团被修饰或取代。组氨酸衍生物可以是组氨酸或组氨酸模拟物,其中咪唑基被取代或修饰。在残基H位于接头的N端位置的实施方案中,H可以是组氨酸衍生物,其中 α -氨基被修饰或取代。在某些实施方案中,组氨酸或组氨酸模拟物的 α -氨基可以被乙酰化。

[0237] 在某些实施方案中,基序HK可包含本文别处定义的赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物。

[0238] 在某些实施方案中,基序HK可以包含赖氨酸模拟物/衍生物和组氨酸模拟物/衍生物。

[0239] 在某些实施方案中,赖氨酸残基、或赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物可以与精氨酸残基、或精氨酸模拟物或精氨酸衍生物相隔一个氨基酸残基。也就是说,本发明的肽接头可以包含序列基序HXK或KXH,其中X可以是任何氨基酸。在一个优选的实施方案中,赖氨酸残基或赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物可以通过丙氨酸残基与精氨酸残基或精氨酸模拟物或精氨酸衍生物隔开。也就是说,本发明的肽接头可以包含序列基序HAK或KAH。

[0240] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头包含SEQ ID NO:1-29或82-93中所示的氨基酸序列中的任一种氨基酸序列。

[0241] 也就是说,根据本发明的肽接头可以包含SEQ ID NO:1-29或82-93中所示的氨基酸序列中的任一种氨基酸序列。

[0242] 也就是说,在某些实施方案中,肽接头可以包含肽序列RKAA (SEQ ID NO:1)。本文显示了包含序列RKAA的若干个接头(见图1、2、3、4、13、14、17、20、21、30、35、36、37和39)。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAA的N端和/或C端。

[0243] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列ARK (SEQ ID NO:2)。包含序列ARK的接头在图5中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽ARK的N端和/或C端。

[0244] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKARA (SEQ ID NO:3)。包含序列RKARA的接头在图6中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKARA的N端和/或C端。

[0245] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKAAAA (SEQ ID NO:4)。包含序列RKAAAA的接头在图7中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAAAA的N端和/或C端。

[0246] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKAAAAAA (SEQ ID NO:5)。包含序列RKAAAAAA的接头在图8中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAAAAAA的N端和/或C端。

[0247] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKAASGSG (SEQ ID NO:6)。包含序列RKAASGSG的接头在图9中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAASGSG的N端和/或C端。

[0248] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKHA (SEQ ID NO:7)。包含序列RKHA的接头在图10中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKHA的N端和/或C端。

[0249] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKHAAA (SEQ ID NO:8)。包含序列RKHAAA的接头在图11中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKHAAA的N端和/或C端。

[0250] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列GGR (SEQ ID NO:9)。包含序列GGR的接头在图15中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽GGR的N端和/或C端。

[0251] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列GGRG (SEQ ID NO:10)。包含序列GGRG的接头在图16和18中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽GGRG的N端和/或C端。

[0252] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列EARKAA (SEQ ID NO:11)。包含序列EARKAA的接头在图19中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽EARKAA的N端和/或C端。此外,优选地将一个或多个有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链。应当理解,当包含胺

的有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链时,接头的肽序列也可以被视为QARKAA (SEQ ID NO: 84)。

[0253] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKAEA (SEQ ID NO:12)。包含序列RKAEA的接头在图22中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAEA的N端和/或C端。此外,优选地将一个或多个有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链。应当理解,当包含胺的有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链时,接头的肽序列也可以被视为RKAQA (SEQ ID NO:85)。

[0254] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列HKA (SEQ ID NO:13)。包含序列HKA的接头在图12中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽HKA的N端和/或C端。

[0255] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RhKAA (SEQ ID NO:14)。包含序列RhKAA的接头在图23中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RhKAA的N端和/或C端。

[0256] 在某些实施方案中,肽接头可以包含肽序列XGRG (SEQ ID NO:15),其中X具有结构 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$,其中,n是1-20的整数,优选1-10。包含序列XGRG的接头在图24中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接到肽XGRG的C端。

[0257] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKVCit (SEQ ID NO:16)。包含序列RKVCit的接头在图25中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKVCit的N端和/或C端。

[0258] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKAR (SEQ ID NO:17)。包含序列RKAR的接头在图26中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAR的N端和/或C端。

[0259] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKVA (SEQ ID NO:18)。包含序列RKVA的接头在图27中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKVA的N端和/或C端。

[0260] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列KAR (SEQ ID NO:19)。包含序列KAR的接头在图28和42中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽KAR的N端和/或C端。

[0261] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKEAA (SEQ ID NO:20)。包含序列RKEAA的接头在图29中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKEAA的N端和/或C端。此外,优选地将一个或多个有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链。应当理解,当包含胺的有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链时,接头的肽序列也可以被视为RKQAA (SEQ ID NO:86)。

[0262] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKDA (SEQ ID NO:82)。包含序列RKDA的接头在图43中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKDA的N端和/或C端。此外,优选地将一个或多个有效载荷连接到天冬氨酸残基的侧链。应当理解,当包含胺的有效载荷连接到天冬氨酸残基的侧链时,接头的肽序列也可以被视为RKNA (SEQ ID NO:83)。

[0263] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列ERKAA (SEQ ID NO:21)。包含序列ERKAA的接头在图30中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽ERKAA的N端和/或C端。此外,优选地将一个或多个有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链。应当理解,当包含胺的有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链时,接头的肽序列也可以被视为QRKAA (SEQ ID NO:87)。

[0264] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKAH (SEQ ID NO:22)。包含序列RKAH的接头在图31中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAH的N端和/或C端。

[0265] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKAN (SEQ ID NO:23)。包含序列RKAN的接头在图32中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKAN的N端和/或C端。

[0266] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKGFG (SEQ ID NO:24)。包含序列

RKGGFG的接头在图33中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKGGFG的N端和/或C端。

[0267] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列RKGP (SEQ ID NO:25)。包含序列RKGP的接头在图34中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽RKGP的N端和/或C端。

[0268] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列KRKAA (SEQ ID NO:26)。包含序列KRKAA的接头在图36中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽KRKAA的N端和/或C端。此外,优选地将一个或多个有效载荷连接到一个赖氨酸残基(优选N端赖氨酸残基)的侧链。

[0269] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列SRKAA (SEQ ID NO:27)。包含序列SRKAA的接头在图37中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽SRKAA的N端和/或C端。此外,优选将一个或多个有效载荷连接到丝氨酸残基的侧链。

[0270] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列DDRKAA (SEQ ID NO:28)。包含序列DDRKAA的接头在图39中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽DDRKAA的N端和/或C端。此外,优选将一个或多个有效载荷连接到天冬氨酸残基的侧链。应当理解,当包含胺的有效载荷连接到天冬氨酸残基的侧链时,接头的肽序列也可以被视为DNRKAA (SEQ ID NO:88)、NDRKAA (SEQ ID NO:89) 或NNRKAA (SEQ ID NO:90)。

[0271] 在某些实施方案中,肽接头可包含肽序列EERKValCit (SEQ ID NO:29)。包含序列EERKValCit的接头在图40中举例说明。优选地,一个或多个有效载荷连接至肽EERKValCit的N端和/或C端。此外,优选地将一个或多个有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链。应当理解,当包含胺的有效载荷连接到谷氨酸残基的侧链时,接头的肽序列也可以被视为EQRKValCit (SEQ ID NO:91)、QERKValCit (SEQ ID NO:92) 或QQRKValCit (SEQ ID NO:93)。

[0272] 在某些实施方案中,肽接头是图1-40或42-43中所示的任一种接头。

[0273] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中接头包含2至4个有效载荷。

[0274] 根据本发明的肽接头可以用于通过微生物转谷氨酰胺酶生成具有4或更高的有效载荷与抗体比率的抗体-有效载荷缀合物。天然糖基化抗体在重链的谷氨酰胺残基295 (Q295) 处具有单一缀合位点。由于抗体包含两条重链,将具有两个有效载荷的接头与每个谷氨酰胺残基缀合,产生包含4个有效载荷的抗体-有效载荷缀合物。类似地,将具有三个或四个有效载荷的接头与每个谷氨酰胺残基缀合,产生分别包含6个或8个有效载荷的抗体-有效载荷缀合物。因此,在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含2、3或4个有效载荷。

[0275] 本发明人鉴定了将两个或更多个有效载荷缀合至肽接头的不同方法。在某些实施方案中,两个有效载荷可以偶联至肽接头的C端(参见图1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、28、36、37和40)。在其他实施方案中,两个有效载荷可以偶联至肽接头的N端(参见图20)。在另一个实施方案中,一个或两个有效载荷可以分别偶联至肽接头的N端和肽接头的C端(参见图3、14、20、21、22、26、27、31、32、33、34和38)。

[0276] 在没有有效载荷连接到肽接头的N端或C端的实施方案中,优选各自的末端被修饰。也就是说,肽接头的N端优选乙酰化,肽接头的C端优选酰胺化。

[0277] 除了将有效载荷偶联至肽接头的末端外,一个或多个有效载荷也可以偶联至氨基酸侧链(参见图19、22、29、30、35、36、37、39和40)。技术人员知道在其氨基酸侧链中具有允许有效载荷偶联的官能团的氨基酸残基。在其侧链中具有官能团的氨基酸包括但不限于

deGruiter等人在Biochemistry 2017, 56, 30, 3863-3873中描述的那些。此外,有效载荷也可以偶联至非标准氨基酸的侧链,包括但不限于pAcF、CpK、pAMF、SCpHK、AzK、Sec。

[0278] 也就是说,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中至少一个有效载荷连接到包含在肽接头中的谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的侧链。

[0279] 在一个特定的实施方案中,一个或两个有效载荷可以连接到谷氨酸或天冬氨酸侧链的羧酸(参见图19、22、29、30、39和40)。

[0280] 在一个特定的实施方案中,一个或两个有效载荷可以连接到赖氨酸侧链的胺(参见图36)。

[0281] 在一个特定的实施方案中,一个或两个有效载荷可以连接到半胱氨酸侧链的硫醇(参见图35)。

[0282] 在一个特定的实施方案中,一个或两个有效载荷可以连接到丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸侧链的羟基(参见图37)。

[0283] 有效载荷可以直接偶联至肽接头。例如,含胺的有效载荷可以通过异肽键与肽接头的C端偶联(参见图27)。类似地,含羧基的有效载荷可以通过异肽键偶联至肽接头的N端(参见图32),或含硫醇的有效载荷可以偶联至肽接头中包含的半胱氨酸残基的侧链。

[0284] 然而,本文优选的是,有效载荷通过化学接头与肽接头偶联。特别地,当两个有效载荷连接到肽接头的N端或C端时,优选在两个有效载荷与N端或C端之间使用化学接头。

[0285] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载荷中的至少一个通过化学接头连接到所述肽接头。

[0286] 在本发明中,优选地两个或更多个有效载荷中的至少一个通过化学接头与肽接头偶联。然而,甚至更优选地,所有有效载荷通过化学接头与肽接头偶联。

[0287] 化学接头可以具有各种目的。在某些实施方案中,化学接头仅用作将一个有效载荷偶联至肽接头的“衔接子”。例如,包含胺基的化学接头可用于通过酰胺键将有效载荷偶联至肽接头的C端。在此类实施方案中,优选地化学接头包含一个或多个除胺以外的官能团,以允许有效载荷通过这些额外的官能团偶联至化学接头。

[0288] 在某些实施方案中,化学接头用作“扩增子部分”以将若干个有效载荷与肽接头偶联。例如,包含双取代胺的化学接头可以用作树突状分子以连接两个有效载荷(包含扩增子的示例性接头显示在图36和37中)。扩增子的另一个示例是2,6-双(羟甲基)-对甲酚部分(如图28所示)。

[0289] 类似地,包含羧基的化学接头可用于通过酰胺键将一个或多个有效载荷偶联至肽接头的N端。例如,二羧酸分子可用于将含胺的有效载荷偶联至肽的N端(参见图22、31和33)。

[0290] 此外,包含相容官能团的化学接头可用于将有效载荷偶联至包含在肽接头中的氨基酸侧链。

[0291] 在上面公开的任何实施方案中,技术人员能够鉴定适合将有效载荷偶联至肽接头的化学接头,无论该化学接头是作为“衔接子”还是“扩增子部分”。也就是说,技术人员能够鉴定具有对于将感兴趣的有效载荷偶联至肽接头中包含的官能团所需的官能团的接头。

[0292] 然而,化学接头不仅可以作为有效载荷和肽接头之间的衔接子,还可以实现其他

功能。

[0293] 也就是说,在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述化学接头是酶促可切割的和/或化学可切割的接头。

[0294] 可切割的接头可以是本领域已知的任何酶促可切割的和/或化学可切割的接头,包括但不限于Bargh等人(Chem. Soc. Rev., 2019, 48, 4361)描述的那些,其通过引用全部并入本文。

[0295] 可切割接头具有可以控制和/或促进有效载荷从抗体释放的优点。例如,一个或多个有效载荷可以通过酶促可切割的和/或化学可切割的化学接头与肽接头偶联。

[0296] 在某些实施方案中,化学接头在体内是可切割的。可切割接头可包括化学或酶促不稳定的或可降解的连接。可切割的接头通常依赖于生物过程来释放有效载荷,如细胞质的减少、暴露于溶酶体中的酸性条件、或被细胞内或细胞外的特定蛋白酶或其它酶切割。可切割的接头通常掺入一个或多个化学键,这些化学键是化学或酶促可切割的。在某些实施方案中,接头包含化学不稳定基团,如脘和/或二硫化物基团。包含化学不稳定基团的接头利用了血浆和一些细胞质区室之间的不同性质。促进含脘接头的有效载荷释放的细胞内条件是核内体和溶酶体的酸性环境,而含二硫化物的接头在含有高浓度硫醇(例如谷胱甘肽)的胞质溶胶中被还原。在某些实施方案中,包含化学不稳定基团的接头的血浆稳定性可以通过使用化学不稳定基团附近的取代基引入空间位阻来增加。

[0297] 酸不稳定基团,如脘或碳酸根,在血液的中性pH环境(pH 7.3-7.5)的体循环中保持完整,并且一旦ADC被内化到细胞的弱酸性核内体的(pH 5.0-6.5)和溶酶体的(pH 4.5-5.0)室中,就会经受水解并释放有效载荷。这种pH依赖的释放机制与有效载荷的非特异性释放有关。为了增加接头的脘基团的稳定性,可以通过化学修饰(例如取代)来改变接头,从而允许调节以实现在溶酶体中更有效的释放,同时使循环中的损失最小化。含脘或碳酸根的接头可含有额外的切割位点,如额外的酸不稳定切割位点和/或酶促不稳定切割位点。具有碳酸根酸不稳定基团的示例性接头显示在图34中。

[0298] 可包含在化学接头中的其它酸不稳定基团包括含顺乌头基(cis-aconityl)的接头。顺乌头基化学使用与酰胺键并置的羧酸来加速酸性条件下的酰胺水解。

[0299] 可切割的化学接头也可以包括二硫化物基团。二硫化物在生理pH下是热力学稳定的,并且被设计成在细胞内部内化时释放有效载荷,其中,与细胞外环境相比,胞质溶胶提供了明显更具还原性的环境。二硫键的断裂通常需要细胞质硫醇辅因子的存在,如(还原型)谷胱甘肽(GSH),使得含二硫键的接头在循环中相当稳定,选择性地释放胞质溶胶中的有效载荷。细胞内酶蛋白质二硫键异构酶或能够切割二硫键的类似酶也可能有助于细胞内二硫键的优先切割。据报道,GSH以0.5-10mM的浓度范围存在于细胞中,相比之下,GSH或半胱氨酸(最丰富的低分子量硫醇)在循环中的浓度明显较低,约为5 μ M。其中不规则血流导致缺氧状态的肿瘤细胞,导致还原酶活性增强且因此谷胱甘肽浓度甚至更高。在某些实施方案中,含二硫键的接头的体内稳定性可以通过接头的化学修饰来增强,例如,使用二硫键附近的空间位阻。具有二硫化物基团的示例性接头显示在图35中。

[0300] 可以使用的另一种类型的可切割接头是被酶特异性切割的化学接头。这种接头通常是基于肽的,或包括作为酶底物的肽区域。基于肽的接头在血浆和细胞外环境中比化学不稳定的接头更稳定。肽键通常具有良好的血清稳定性,因为与溶酶体相比,由于内源性抑

制剂和不利的血液高pH值,溶酶体的蛋白水解酶在血液中具有非常低的活性。由于溶酶体的蛋白酶(例如组织蛋白酶、豆球蛋白(legumain)和纤溶酶)的作用,从抗体释放有效载荷特异性地发生。这些溶酶体的蛋白酶可能在某些肿瘤细胞中以高水平存在,但也可以在细胞外的肿瘤微环境中发现。基于肽的接头也可以被非溶酶体的胞外蛋白酶(如基质金属蛋白酶)切割。基于非肽的接头也可以被糖苷酶特异性切割。

[0301] 在示例性实施方案中,可切割的肽选自四肽,如Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:30)、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:31)、Gly-Gly-Phe-Gly (SEQ ID NO:32);或二肽,如Ala-Ala、Ala-Arg、Val-Cit、Val-Ala、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Val-(D)Asp、Phe-Lys、Ile-Val、Asp-Val、His-Val、NorVal-(D)Asp、Ala-(D)Asp、Met-Lys、Asn-Lys、Ile-Pro、Me3Lys-Pro、苯基Gly-(D)Lys、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Pro-(D)Lys、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys。在某些实施方案中,由于较长肽的疏水性,二肽优于较长多肽。也就是说,包含SEQ ID NO:1-29或82-93中所示氨基酸的接头可以进一步包含上面所示的任何二肽或四肽基序。优选地,上面所示的二肽或四肽基序直接与有效载荷偶联,或通过自我牺牲型间隔子与有效载荷偶联。

[0302] 可酶切的接头可以包括自我牺牲型间隔子,以在空间上将有效载荷与酶切位点隔开。有效载荷与肽接头的直接连接可导致有效载荷的氨基酸加合物的蛋白水解释放,从而削弱其活性。自我牺牲型间隔子的使用允许在酰胺或糖苷键水解时消除完全活性的、化学上未修饰的有效载荷。

[0303] 在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中所述自我牺牲型接头包含:

[0304] a) 对氨基苄醇部分;或

[0305] b) 2,4-双(羟甲基)苯胺部分;或

[0306] c) 对氨基苄基季铵;或

[0307] d) 基于乙二胺的部分;或

[0308] e) 基于(氨甲基)吡咯烷的部分;或

[0309] f) 基于氨甲基的部分。

[0310] 一种自我牺牲型间隔子是双官能的对氨基苄醇基,它通过氨基与肽连接,形成酰胺键,而含胺的药物可以通过氨基甲酸酯官能团与接头的苄羟基连接(PABC)。所得的前药在蛋白酶介导的裂解下被活化,导致1,6-消除反应,释放未修饰的药物、二氧化碳和接头基团的残余物。还描述了这种自我牺牲型基团的杂环变体。例如参见美国专利号No.7,989,434,其通过引用并入本文。对氨基苄醇部分也可用于通过形成碳酸酯来连接含酚或羟基的有效载荷(参见图34)。对氨基苄基部分也可用于通过形成季铵(PABQ)来连接含叔胺或杂芳基胺的有效载荷(参见图32)。也就是说,在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述对氨基苄基季铵中包含的季铵阳离子源自所述有效载荷中包含的胺。优选地,有效载荷中包含的胺是叔胺或杂芳基胺。

[0311] 另一个自我牺牲型间隔子是2,4-双(羟甲基)苯胺基团,其通过氨基连接到肽,形成酰胺键,而含胺药物可以经由接头的两个苄羟基通过两个氨基甲酸酯官能团连接。产生的前药在蛋白酶介导的切割下被激活,通过连续的1,6-和1,4-消除过程导致有效载荷释放。

[0312] 对于含羟基的药物,合适的自我牺牲型间隔子包括但不限于基于乙二胺的氨基甲酸酯(EDA)(参见图22,31)、基于(氨甲基)吡咯烷的氨基甲酸酯(AMP)(参见图33),或氨甲基部分(AM)(参见图30、39和40)。后者的释放机制利用了半缩醛胺(hemiaminal)官能团的不稳定性,其易于经受1,2-消除以释放所需的醇。

[0313] 对于含硫醇的药物,合适的自我牺牲型间隔子包括但不限于氨甲基部分(AM)(参见图35)。后者的释放机制利用了硫半缩醛胺(thiohemiaminal)官能团的不稳定性,其易于经受1,2-消除以释放所需的硫醇。

[0314] 在一些实施方案中,可酶切的接头是基于 β -葡萄糖醛酸的接头。可以通过溶酶体的酶 β -葡萄糖醛酸酶对 β -葡萄糖醛酸苷糖苷键的切割来实现有效载荷的容易释放。这种酶在溶酶体中大量存在,并在某些肿瘤类型中过表达,而在细胞外酶活性很低。由于 β -葡萄糖醛酸苷的亲水性,基于 β -葡萄糖醛酸的接头可用于避免抗体-有效载荷缀合物进行聚集的趋势(图38)。

[0315] 如上所述,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中化学接头是或包含自我牺牲型接头。

[0316] 本文中优选的是,有效载荷通过自我牺牲型接头连接到肽接头,以促进未修饰药物的释放。甚至更优选地,自我牺牲型接头偶联至被蛋白酶或肽酶有效切割的肽序列。可切割肽可被定义为肽接头的一部分或连接肽接头和有效载荷的化学接头的一部分。

[0317] 自我牺牲型接头可以是本领域已知的任何自我牺牲型接头。然而,优选地,自我牺牲型接头包含对氨基苄醇部分或2,4-双(羟甲基)苯胺部分。

[0318] 也就是说,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中自我牺牲型接头包含对氨基苄醇部分或2,4-双(羟甲基)苯胺部分。

[0319] 包含对氨基苄醇部分的自我牺牲型接头可用于将有效载荷偶联至肽的C端。也就是说,对氨基苄醇部分的氨基可以通过酰胺键偶联至肽接头的C端羧基(参见例如图3)。可替代地,或另外,对氨基苄醇部分的氨基可以通过酰胺键偶联至肽接头中天冬氨酸或谷氨酸残基的侧链中的羧基(参见例如图19或22)

[0320] 有效载荷可以通过氨基甲酸酯偶联至对氨基苄醇部分的羟基。在某些实施方案中,可与对氨基苄醇部分偶联的肽接头的C端氨基酸可包含在被肽酶有效切割的基序中,例如但不限于序列基序缬氨酸-瓜氨酸。

[0321] 应当理解,根据本发明的肽接头可以包含一个以上的对氨基苄醇部分。例如,根据本发明的肽接头可以包含两个肽部分,其中这两个肽部分通过它们的N端彼此连接。在此类实施方案中,肽接头具有两个C端,并且两个C端可以通过对氨基苄醇部分缀合至有效载荷。图3中显示了具有连接到两个末端(通过对氨基苄醇部分连接到C端,通过第二肽部分和对氨基苄醇部分连接到N端)的有效载荷的示例性接头。

[0322] 对氨基苄醇部分也可用于将有效载荷偶联至氨基酸侧链。例如,有效载荷可以通过对氨基苄醇部分偶联至谷氨酸或天冬氨酸残基的侧链中的羧基。如图19、22、30、39和40所示,对氨基苄醇部分可直接或通过一个或多个氨基酸残基偶联至谷氨酸或天冬氨酸残基的侧链中的羧基。在某些实施方案中,对氨基苄醇部分可以通过缬氨酸-瓜氨酸或丙氨酸-丙氨酸序列偶联至谷氨酸或天冬氨酸残基的侧链中的羧基。

[0323] 在某些实施方案中,包含有效载荷的胺可以通过两个或更多个氨基苄醇部分偶联

至肽接头中的羧基(参见图3)

[0324] 包含2,4-双(羟甲基)苯胺部分的自我牺牲型接头可用于将两个有效载荷偶联至肽接头中包含的单个官能团上。也就是说,2,4-双(羟甲基)苯胺部分可以通过其氨基与肽接头中包含的羧基偶联。然后,有效载荷可以通过氨基甲酸酯偶联至每个羟基。图1显示了一种示例性的肽接头,其中,两个有效载荷通过2,4-双(羟甲基)苯胺部分偶联至肽接头的C端。

[0325] 通过使用包含2,4-双(羟甲基)苯胺部分的接头,可以获得包含两个以上有效载荷的肽接头。例如,可以通过将两个有效载荷通过2,4-双(羟甲基)苯胺部分(间接通过第二肽部分)缀合至肽接头的N端,并将另外两个有效载荷通过另一个2,4-双(羟甲基)苯胺部分缀合至肽接头的C端来获得包含四个有效载荷的接头(参见图20)。类似地,可以通过将两个有效载荷通过2,4-双(羟甲基)苯胺部分偶联至肽接头,并将第三个有效载荷通过对氨基苄醇部分偶联至肽接头来获得包含三个有效载荷的肽接头(参见图19)。

[0326] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述对氨基苄醇部分中包含的羟基与有效载荷形成氨基甲酸酯。

[0327] 如上所述,有效载荷可以通过氨基甲酸酯连接到对氨基苄醇部分。也就是说,有效载荷优选包含适于形成氨基甲酸酯的游离胺基。技术人员知道在对氨基苄醇部分和含胺有效载荷之间形成氨基甲酸酯的方法。

[0328] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中包含在对氨基苄醇部分中的羟基与有效载荷形成碳酸酯。

[0329] 有效载荷可以通过碳酸酯连接到对氨基苄醇部分。也就是说,有效载荷优选包含适于形成碳酸酯的游离羟基(参见图34)。技术人员知道在对氨基苄醇部分和含羟基有效载荷之间形成碳酸酯的方法。

[0330] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中包含在2,4-双(羟甲基)苯胺部分中的每个羟基与有效载荷形成氨基甲酸酯。

[0331] 也就是说,包含在根据本发明的肽接头中的2,4-双(羟甲基)苯胺部分可以与两个单独的包含胺的有效载荷形成两个氨基甲酸酯。

[0332] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中对氨基苄基部分与有效载荷形成季铵。

[0333] 如上所述,有效载荷可以通过季铵连接到对氨基苄基。也就是说,有效载荷优选包含适合于形成季铵的叔胺或杂芳基胺。技术人员知道在对氨基苄基部分和含叔胺或杂芳基胺的有效载荷之间形成季铵的方法。

[0334] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中自我牺牲型接头包含乙二胺氨基甲酸酯(EDA)部分。

[0335] 也就是说,有效载荷可以通过乙二胺氨基甲酸酯(EDA)部分偶联至根据本发明的肽接头。EDA部分可以通过酰胺键直接偶联至肽的C端或天冬氨酸或谷氨酸侧链。EDA部分优选与包含羟基的有效载荷一起形成氨基甲酸酯。图22和31显示了包含EDA部分的接头的示例。EDA部分也可用于连接与两个有效载荷相连的扩增子,如图28所示。

[0336] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中自我牺牲型接头包含基于(氨甲基)吡咯烷的氨基甲酸酯(AMP)部分。

[0337] 也就是说,有效载荷可以通过基于(氨甲基)吡咯烷的氨基甲酸酯(AMP)部分偶联至根据本发明的肽接头。AMP部分可以通过酰胺键直接偶联至肽的C端或天冬氨酸或谷氨酸侧链。AMP部分优选与包含羟基的有效载荷一起形成氨基甲酸酯。图33显示了包含AMP部分的接头的示例。

[0338] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中自我牺牲型接头包含氨甲基(AM)部分。

[0339] 也就是说,有效载荷可以通过氨甲基(AM)部分偶联至根据本发明的肽接头。AM部分可以通过酰胺键直接偶联至肽的C端或天冬氨酸或谷氨酸侧链。AM部分优选用于连接包含羟基的有效载荷,从而形成半缩醛胺。图30、39和40显示了包含AM部分的接头的示例。然而,AM部分也可以用于连接包含巯基的有效载荷,从而形成硫半缩醛胺。图35显示了包含AM部分的接头以及含硫醇有效载荷的示例。

[0340] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中至少一个有效载荷连接到包含在肽接头中的谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的侧链。

[0341] 如上所述,一个或多个有效载荷可以偶联至包含在肽接头中的氨基酸侧链。技术人员知道适于将有效载荷缀合至氨基酸侧链(即谷氨酸或天冬氨酸残基的侧链中的羧基,半胱氨酸残基的侧链中的巯基,赖氨酸残基的侧链中的氨基,或者酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的侧链中的羟基)的化学接头。图19、22、29、30、35、36、37、39和40显示了在氨基酸侧链上包含有效载荷的接头的示例。

[0342] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述肽接头包含两个肽部分,并且其中,所述两个肽部分通过其N端氨基酸残基与二羧酸接头($\text{HO}_2\text{C}-\text{R}-\text{CO}_2\text{H}$)连接。

[0343] 属于本发明范围的某些接头包含两个肽部分,其中这两个肽部分通过它们的N端氨基酸残基连接(参见图3的示例)。两个肽部分的N端氨基酸可以通过二羧酸连接,其中,包含在二羧酸中的每个羧基团与肽部分的N端氨基形成酰胺键。

[0344] 任何二羧酸都可以用于通过它们的N端氨基酸残基连接两个肽部分。在某些实施方案中,二羧酸可以是脂肪族二羧酸。也就是说,二羧酸可以是乙二酸、丙二酸、丁二酸、戊二酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸或癸二酸。在某些实施方案中,两个肽部分通过它们的N端氨基酸与丁二酸分子连接(参见图3、14、20、21、27和34)。在某些实施方案中,两个肽部分通过它们的N端氨基酸与戊二酸分子连接(参见图26)。脂肪族二羧酸可以包含取代或未取代的烷基或烯基链。

[0345] 在某些实施方案中,二羧酸可以是芳香族二羧酸。芳香族二羧酸包括但不限于邻苯二甲酸、间苯二甲酸或对苯二甲酸。

[0346] 应当理解,通过它们的N端氨基酸连接两个肽部分产生不含游离N端氨基的肽构建体,该肽构建体可能适合与抗体中包含的谷氨酰胺残基缀合。因此,包含两个N端连接的肽部分的肽接头优选包含赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,以使肽接头能够与抗体中包含的谷氨酰胺部分缀合。

[0347] 在某些实施方案中,包含在肽接头中的第一肽部分可以包含SEQ ID NO:1-8、11-14、16-29或82-93中所示的任一氨基酸序列。第二肽部分可以具有任何氨基酸序列。在某些

实施方案中,第二肽部分可以具有2-100,优选2-50,更优选2-25,甚至更优选2-10,最优选2-5个氨基酸残基的长度。在某些实施方案中,第二肽部分可以是二肽或三肽。然而,应当注意,第二肽部分也可以是单个氨基酸或更长的肽。为了能够有效释放有效载荷,第二肽部分优选包含被肽酶有效切割的肽序列。在某些实施方案中,第二肽部分可以具有序列Asn、Ala、Ala-Ala、Ala-Asn、Val-Ala、Val-Cit、Ala-Arg、Arg-Ala、Ala-Ala-Arg (SEQ ID NO:34)、Ala-Arg-Ala (SEQ ID NO:35)、Ala-Ala-Asn (SEQ ID NO:36)。

[0348] 也就是说,在某些实施方案中,肽接头可以具有以下结构:

[0349] [有效载荷1]-[肽1]-[二羧酸]-[肽2]-[有效载荷2];其中:

[0350] [有效载荷1]和[有效载荷2]是有效载荷,

[0351] [肽1]是第一肽部分,

[0352] [肽2]是第二肽部分,并且

[0353] [二羧酸]是二羧酸;

[0354] 其中,肽部分1和/或肽部分2中的至少一个包含游离胺,

[0355] 其中,肽1的N端和肽2的N端通过二羧酸连接,

[0356] 其中,有效载荷1优选通过化学接头连接到肽1的C端,并且

[0357] 其中,有效载荷2优选通过化学接头连接到肽2的C端。

[0358] 优选地,包含游离胺基的肽部分是包含赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的肽部分,如本文其它地方所定义的,或是包含SEQ ID NO:1-8、11-14、16-29或82-93中所示的任一氨基酸序列的肽接头。

[0359] 在某些实施方案中,肽接头可包含第一肽部分和第二肽部分,所述第一肽部分包含SEQ ID NO:1-8、11-14、16-29或82-93中所示的序列,所述第二肽部分包含序列Ala-Ala,其中,第一肽部分和第二肽部分通过它们的N端氨基酸与丁二酸分子连接。

[0360] 在某些实施方案中,肽接头可以包含含有序列RKAA的第一肽部分和含有序列Ala-Ala的第二肽部分,其中,第一肽部分和第二肽部分通过它们的N端氨基酸与丁二酸分子连接。

[0361] 第二肽部分也可以与第一肽部分的氨基酸侧链偶联,而不是通过它们的N端氨基酸残基偶联两个肽部分。也就是说,包含在肽接头中的第一肽部分可以包含SEQ ID NO:6、11-12、20-21、23、26-29或82-93中所示的任一氨基酸序列。第二肽部分,即位于氨基酸侧链上的肽部分,可以具有任何氨基酸序列。在某些实施方案中,第二肽部分可以是二肽或三肽。然而,应当注意,第二肽部分也可以是单个氨基酸或更长的肽。为了能够有效释放有效载荷,第二肽部分优选包含被肽酶有效切割的肽序列。在某些实施方案中,第二肽部分可以具有序列Asn、Ala、Ala-Ala、Ala-Asn、Val-Ala、Val-Cit、Ala-Arg、Arg-Ala、Ala-Ala-Arg (SEQ ID NO:34)、Ala-Arg-Ala (SEQ ID NO:35)、Ala-Ala-Asn (SEQ ID NO:36)。

[0362] 根据本发明的肽接头包含两个或更多个有效载荷。包含两个或更多个有效载荷的肽接头优选通过化学合成获得。

[0363] 技术人员知道通过化学合成将有效载荷偶联至基于氨基酸的接头的方法。例如,含胺的有效载荷(例如瑞奥西汀类似物),或含硫醇的有效载荷(例如美登素类似物),或含羟基的有效载荷(例如SN-38类似物)可以通过化学合成连接到基于氨基酸的接头的C端。然而,技术人员知道可用于通过化学合成将有效载荷偶联至氨基酸或氨基酸衍生物的N端、C

端或侧链的进一步反应和反应基团。可用于通过化学合成将有效载荷偶联至基于氨基酸的接头的典型反应包括但不限于：肽偶联、活化酯偶联(NHS酯、PFP酯)、点击反应(CuAAC、SPAAC)、迈克尔加成(Michael addition)(硫醇马来酰亚胺缀合)。

[0364] 有效载荷与肽的偶联在现有技术中已有广泛描述,例如由:Costoplus等人(Peptide-Cleavable Self-immolative Maytansinoid Antibody-Drug Conjugates Designed To Provide Improved Bystander Killing.ACS Med Chem Lett.2019Sep 27; 10(10):1393-1399),Sonzini等人(Improved Physical Stability of an Antibody-Drug Conjugate Using Host-Guest Chemistry.Bioconjug Chem.2020Jan 15;31(1):123-129),Bodero等人(Synthesis and biological evaluation of RGD and isoDGR peptidomimetic- α -amanitin conjugates for tumor-targeting.Beilstein J.Org.Chem.2018,14,407-415),Nunes等人(Use of a next generation maleimide in combination with THIOMABTM antibody technology delivers a highly stable,potent and near homogeneous THIOMABTM antibody-drug conjugate(TDC).RSC Adv.,2017,7, 24828-24832),Doronina等人(Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery:effects of linker technology on efficacy and toxicity.Bioconjug Chem.2006Jan-Feb;17(1):114-24),Nakada等人(Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads.Bioorg Med Chem Lett.2016Mar 15;26(6):1542-1545),以及Dickgiesser等人(Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases.Bioconjug Chem.2020Mar 12.doi:10.1021/acs.bioconjchem.0c00061)。

[0365] 应当理解,根据本发明,有效载荷可以偶联至基于肽或包含肽的接头的N端和/或C端。在某些实施方案中,有效载荷可以直接偶联至肽或氨基酸残基的N端氨基或C端羧基。

[0366] 技术人员知道适于将有效载荷缀合至氨基酸残基上的反应基团。例如,含胺的有效载荷可以通过酰胺键与氨基酸残基的C端羧基偶联。可替代地,包含巯基或和羟基的有效载荷可分别通过硫酯或酯键与氨基酸的C端羧基偶联(参见图34)。包含羧酸基团的有效载荷可以通过酰胺键与氨基酸残基的N端氨基偶联(参见图32)。

[0367] 在某些实施方案中,有效载荷可以间接偶联至包含在根据本发明的接头中的肽或氨基酸残基的N端和/或C端。技术人员知道可用于将有效载荷偶联至根据本发明的接头中包含的氨基酸残基的N端氨基或C端羧基的接头分子。

[0368] 在某些实施方案中,包含羟基的有效载荷可以通过接头分子偶联至氨基酸残基的N端。例如,包含羟基的有效载荷可以通过氨基甲酸酯接头偶联至N端氨基。

[0369] 在某些实施方案中,包含巯基的有效载荷可以通过接头分子偶联至氨基酸残基的N端。例如,包含巯基的有效载荷可以通过硫代氨基甲酸酯接头偶联至N端氨基。可替代地,包含巯基的有效载荷可以通过包含羧基和巯基的烷基接头分子偶联至N端氨基。在某些实施方案中,烷基接头分子可以是3-巯基丙酸接头分子,其中有效载荷与包含在3-巯基丙酸接头分子中的巯基形成二硫键。

[0370] 在某些实施方案中,包含酰胺基的有效载荷可以通过接头分子偶联至氨基酸残基的N端。例如,包含胺基的有效载荷可以通过二羧酸接头分子偶联至N端氨基,其中,包含在

二羧酸接头中的每个羧酸基团与有效载荷和N端氨基酸残基的氨基形成酰胺键。可在本发明中用作接头分子的二羧酸的示例是但不限于琥珀酸或庚二酸。

[0371] 用于将有效载荷间接偶联至包含在根据本发明的肽接头中的氨基酸残基的N端的可替代的接头分子,或适用于将有效载荷间接偶联至包含在根据本发明的肽接头中的氨基酸残基的C端的接头分子,已在本领域中有所描述,并包含在本发明中。

[0372] 本发明人惊奇地发现,具有连接到肽接头的N端和C端的有效载荷的肽接头比所有有效载荷都连接到肽接头的C端的接头具有更强的抗肿瘤活性(参见实施例11和实施例12)。

[0373] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,一个或多个有效载荷连接到含胺的肽接头的N端,并且其中,一个或多个有效载荷连接到所述含胺的肽接头的C端。

[0374] 在某些实施方案中,一个或两个有效载荷可以连接到含胺的肽接头的N端,并且一个或两个有效载荷可以连接到所述含胺的肽接头的C端。也就是说,肽接头可以是DAR4、DAR6或DAR8接头。

[0375] 在某些实施方案中,一个有效载荷可以连接到含胺的肽接头的N端,并且一个有效载荷可以连接到所述含胺的肽接头的C端。在此类实施方案中,肽接头可以是“直链的”DAR4接头。

[0376] 含胺的肽接头可以是本文公开的任一种含赖氨酸的肽接头,包括包含本文定义的赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的肽接头。

[0377] 在某些实施方案中,“直链的”DAR4接头可具有以下结构(在N→C方向):

[0378] [有效载荷1]-[(Aa)_m-(Lys)-(Aa)_n]-[有效载荷2];其中:

[0379] [有效载荷1]和[有效载荷2]是有效载荷,

[0380] Aa可以是任何氨基酸残基;

[0381] m和n可以是0-10的整数,优选0-6,更优选0-4;并且

[0382] Lys是赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,

[0383] 其中,[有效载荷1]直接或间接连接到(Aa)或(Lys)残基的N端,和

[0384] 其中,[有效载荷2]直接或间接连接到(Aa)或(Lys)残基的C端。

[0385] 在某些实施方案中,“直链的”DAR4接头可具有以下结构:

[0386] [有效载荷1]-[(Aa)_m-(Arg/His)-(Aa)_n-(Lys)-(Aa)_o]-[有效载荷2];其中:

[0387] [有效载荷1]和[有效载荷2]是有效载荷,

[0388] Aa可以是任何氨基酸残基;

[0389] m、n和o可以是0-10,优选0-6,更优选0-4的整数;并且

[0390] Arg可以是精氨酸残基、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;

[0391] His可以是组氨酸残基、组氨酸模拟物或组氨酸衍生物;

[0392] Lys是赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,

[0393] 其中,[有效载荷1]直接或间接连接到(Aa)或(Arg/His)残基的N端,和

[0394] 其中,[有效载荷2]直接或间接连接到(Aa)或(Lys)残基的C端。

[0395] 在某些实施方案中,“直链的”DAR4接头可具有以下结构:

[0396] [有效载荷1]-[(Aa)_m-(Lys)-(Aa)_n-(Arg/His)-(Aa)_o]-[有效载荷2];其中:

[0397] [有效载荷1]和[有效载荷2]是有效载荷,

[0398] Aa可以是任何氨基酸残基;

[0399] m、n和o可以是0-10,优选0-6,更优选0-4的整数;并且

[0400] Arg可以是精氨酸残基、精氨酸模拟物或精氨酸衍生物;

[0401] His可以是组氨酸残基、组氨酸模拟物或组氨酸衍生物;

[0402] Lys是赖氨酸残基、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物,

[0403] 其中,[有效载荷1]直接或间接连接到(Aa)或(Lys)残基的N端,和

[0404] 其中,[有效载荷2]直接或间接连接到(Aa)或(Arg/His)残基的C端。

[0405] 应当理解,有效载荷可以直接或间接连接到肽接头的N端和C端。在一个实施方案中,第一有效载荷可以直接连接到肽接头的N端氨基,而第二有效载荷可以直接连接到肽接头的C端羧基。

[0406] 然而,优选的是,有效载荷间接连接到肽接头的N端和C端,例如用本文所述的任一种化学接头。特别地,有效载荷可以通过二羧酸和第二肽部分间接连接到肽接头的N端,如本文其他地方更详细描述。此外,优选地所有有效载荷通过自我牺牲型部分(如本文公开的任一种自我牺牲型部分)连接到肽接头或化学接头。

[0407] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中有效载荷是以下至少一种:

[0408] • 毒素;

[0409] • 细胞因子;

[0410] • 生长因子;

[0411] • 放射性核素;

[0412] • 激素;

[0413] • 抗病毒剂;

[0414] • 抗菌剂;

[0415] • 荧光染料;

[0416] • 免疫调节剂/免疫刺激剂;

[0417] • 半衰期增加部分;

[0418] • 溶解度增加部分;

[0419] • 聚合物-毒素缀合物;

[0420] • 核酸;

[0421] • 生物素或链霉亲和素部分;

[0422] • 维生素;

[0423] • 蛋白质降解剂(“PROTAC”);

[0424] • 受体的配体;

[0425] • 靶结合部分;和/或

[0426] • 抗炎剂。

[0427] 在某些实施方案中,有效载荷可以是细胞因子。如本文所使用的术语“细胞因子”是指影响其它细胞功能并调节免疫或炎症反应中细胞间相互作用的任何分泌的多肽。细胞因子包括但不限于单核因子、淋巴因子和趋化因子,而无论是哪种细胞产生的。例如,单核

因子通常被认为是由单核细胞产生和分泌的,然而,许多其他细胞也产生单核因子,如自然杀伤细胞、成纤维细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、内皮细胞、脑星形细胞、骨髓基质细胞、表皮角质细胞和B淋巴细胞。淋巴因子通常被认为是由淋巴细胞产生的。细胞因子的示例包括但不限于白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)和肿瘤坏死因子 β (TNF β)。

[0428] 在某些实施方案中,有效载荷可以是抗炎剂。如本文所使用的术语“抗炎剂”是指其主要作用方式和用途是在治疗炎症领域的那些药剂类别,以及来自另一治疗类别的具有有用抗炎作用的任何其它药剂。这种抗炎剂包括但不限于非甾体抗炎药(NSAID)、缓解疾病的抗风湿药物(DMARD)、大环内酯类抗生素和他汀类药物。优选地,NSAID包括但不限于水杨酸盐(例如阿司匹林)、芳基丙酸(例如布洛芬)、邻氨基苯甲酸(例如甲芬那酸)、吡唑(例如苯基丁氮酮)、环乙酸(吡唑美辛)和昔康类(例如吡罗昔康)。优选地,用于本发明的方法的抗炎剂包括舒林酸、双氯芬酸、替诺昔康、酮咯酸、萘普生、萘丁美酮、二氟尼柳、酮洛芬、芳基丙酸、替尼达普、羟氯喹、柳氮磺胺吡啶、塞来昔布、罗非昔布、美洛昔康、依托昔布、伐地昔布、甲氨蝶呤、依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、阿托伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、克拉霉素、阿奇霉素、罗红霉素、红霉素、布洛芬、右旋布洛芬、氟比洛芬、非诺洛芬、芬布芬、苯恶洛芬、右旋酮洛芬、托芬那酸、尼美舒利和奥沙普秦。

[0429] 在某些实施方案中,抗炎剂可以是抗炎细胞因子,其在缀合至靶特异性抗体时可以改善例如由自身免疫性疾病引起的炎症。具有抗炎活性的细胞因子可以是但不限于IL-1RA、IL-4、IL-6、IL-10、IL-11、IL-13或TGF- β 。

[0430] 在某些实施方案中,有效载荷可以是生长因子。如本文所使用的术语“生长因子”是指能够刺激细胞生长、增殖、细胞分化和/或细胞成熟的天然存在的物质。生长因子以蛋白质或甾体激素的形式存在。生长因子对于调节多种细胞过程是重要的。生长因子通常用作细胞之间的信号传导分子。然而,它们的促进细胞生长、增殖、细胞分化和细胞成熟的能力因生长因子之间的不同而异。生长因子的示例的非限制性清单包括:碱性成纤维细胞生长因子、肾上腺髓质素、血管生成素、自分泌运动因子、骨形态发生蛋白、脑源性神经营养因子、表皮生长因子、上皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经胶质细胞系源性神经营养因子、粒细胞集落刺激因子、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、生长分化因子-9、肝细胞生长因子、肝癌衍生生长因子、胰岛素生长因子、胰岛素样生长因子、迁移刺激因子、肌肉生长抑制素、神经生长因子和其它神经营养因子、血小板源性生长因子、转化生长因子 α 、转化生长因子 β 、肿瘤坏死因子 α 、血管内皮生长因子、胎盘生长因子、胎牛生长激素以及细胞因子(例如,IL-3和IL-6的IL-1-辅助因子、IL-2-t-细胞生长因子、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6和IL-7)。

[0431] 在某些实施方案中,有效载荷可以是激素。如本文所使用的术语“激素”是指身体的一个部位的细胞或腺体释放的化学物质,这种化学物质发出影响机体的其它部位的细胞的信息。可以用于本发明的激素的示例是但不限于褪黑素(MT)、5-羟色胺(5-HT)、甲状腺素(T4)、三碘甲腺原氨酸(T3)、肾上腺激素(epinephrine,EPI)或肾上腺素(adrenaline)、去甲肾上腺激素(norepinephrine,NRE)或降肾上腺素(noradrenaline)、多巴胺(DPM或DA)、抗苗勒氏管激素或苗勒氏管抑制激素(AMH)、脂联素(Acrp30)、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone,ACTH)或促皮质素(corticotrophin)、血管紧张素原和血管紧张素(AGT)、抗利尿激素(antidiuretic hormone,ADH)或血管加压素(vasopressin)、

心房肽(atrial natriuretic peptide, ANP)或心钠素(atriopeptin)、降钙素(CT)、胆囊收缩素(CCK)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促红细胞生成素(EPO)、卵泡刺激素(FSH)、胃泌素(GRP)、胃饥饿素、胰高血糖素(GCG)、促性腺激素释放激素(GnRH)、生长激素释放激素(GHRH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、人胎盘催乳素(HPL)、生长激素(GH或hGH)、抑制素、胰岛素(INS)、胰岛素样生长因子或生长调节素(IGF)、瘦素(LEP)、促黄体激素(LH)、黑素细胞刺激激素(MSH或 α -MSH)、食欲素(orexin)、催产素(OXT)、甲状旁腺激素(PTH)、催乳素(PRL)、松弛素(RLN)、分泌素(SCT)、生长激素抑制素(SRIF)、血小板生成素(TPO)、甲状腺刺激激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)或促甲状腺素(thyrotropin)、促甲状腺素释放激素(TRH)、皮质醇、醛固酮、睾酮、脱氢表雄酮(DHEA)、雄烯二酮、二氢睾酮(DHT)、雌酮、雌三醇(E3)、孕酮、骨化三醇、钙二醇、前列腺素(PG)、白三烯(LT)、环前列腺素(PGI₂)、血栓素(TXA₂)、催乳素释放激素(PRH)、促脂素(PRH)、脑钠肽(BNP)、神经肽Y(NPY)、组胺、内皮素、胰多肽、肾素和脑啡肽。在一个特定的实施方案中,激素是皮质醇。

[0432] 在某些实施方案中,有效载荷可以是抗病毒剂。如本文所使用的术语“抗病毒剂”是指有效抑制哺乳动物中病毒的形成和/或复制的试剂(化合物或生物的)。这包括干扰哺乳动物中病毒的形成和/或复制所必需的宿主或病毒机制的试剂。抗病毒剂包括,例如利巴韦林、金刚烷胺、VX-497(美泊地布(merimepodib)、Vertex制药)、VX-498(Vertex制药)、左旋韦林(Levovirin)、韦拉密汀(Viramidine)、二盐酸组胺(Ceplene)(二盐酸组胺(maxamine))、XTL-001和XTL-002(XTL生物制药)。

[0433] 在某些实施方案中,有效载荷可以是抗菌剂。如本文所使用的术语“抗菌剂”是指能够:(i)抑制、减少或防止细菌的生长;(ii)抑制或降低细菌在受试者中产生感染的能力;或(iii)抑制或降低细菌在环境中繁殖或保持感染性的能力的任何物质、化合物、物质的组合或化合物的组合。术语“抗菌剂”还指能够降低细菌的传染性或毒性的化合物。

[0434] 可在本发明中用作有效载荷的合适的抗生素包括但不限于:大环内酯、青霉素、头孢菌素、喹诺酮、氟喹诺酮、磺酰胺、四环素、单环内酰胺(monobactam)、碳青霉烯、氨基糖苷、利福霉素、 β -内酰胺、安沙霉素(ansamycin)、噁唑烷酮、链阳霉素类(streptogramin)、糖肽、多肽和脾凡纳明(arsphenamine)或其药学上可接受的盐,更优选地其中所述抗生素选自:红霉素、阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素、克林霉素、多西环素、米诺环素、替加环素、甲氧苄啶、绿脓菌素、万古霉素、链霉素、双氢链霉素、阿米卡星、安普霉素、阿贝卡星、阿司米星、卡那霉素B(beknamycin)、地贝卡星、弗拉霉素(framycetin)、庆大霉素、潮霉素、异帕米星、卡那霉素、新霉素、奈替米星、巴龙霉素、rhodostreptomycin、核糖霉素、紫苏霉素、大观霉素(spectinomycin)、妥布霉素、威大霉素(verdamycin)、多粘菌素、甘氨酸环素、碳青霉烯、碳头孢烯、氯霉素、克林霉素、林可霉素、达托霉素、新生霉素、克林霉素、乙胺丁醇、磷霉素、夫西地酸、呋喃唑酮、异烟肼、利奈唑胺、甲硝唑、莫匹罗星、呋喃妥因、平板霉素(platensimycin)、奎奴普汀(quinupristine)、苯甲烃铵(benzalkonium)、达福普汀(dalfopristine)、利福平(rifampine)、利福平(rifampicin)、利福布汀、利福昔明、rifalog、替硝唑(tinidazole)、紫霉素和卷曲霉素,或其药学上可接受的盐。

[0435] 在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含rifalog作为有效载荷(参见图32)。

[0436] 在某些实施方案中,有效载荷可以是免疫调节剂。如本文所使用的用于联合治疗的术语“免疫调节剂”是指用于抑制、遮盖或增强宿主的免疫系统的物质。免疫调节剂的示

例包括但不限于蛋白质试剂,如细胞因子、肽模拟物和抗体(例如,人类、人源化、嵌合的、单克隆的、多克隆的、Fvs、ScFvs、Fab或F(ab)₂片段或表位结合片段),核酸分子(例如,反义核酸分子、iRNA和三重螺旋),小分子,有机化合物和无机化合物。特别地,免疫调节剂包括但不限于甲氨蝶呤、来氟米特、环磷酰胺(cyclophosphamide)、环磷酰胺(cytoxan)、依木兰(Immuran)、环孢霉素A、米诺环素、硫唑嘌呤、抗生素(例如,FK506(他克莫司))、甲基强的松龙(MP)、皮质类固醇、类固醇、霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil)、雷帕霉素(西罗莫司)、咪唑立宾、脱氧精肌菌素、布喹那、malononitriloamide(例如,来氟米特)、T细胞受体调节剂以及细胞因子受体调节剂。

[0437] 在某些实施方案中,免疫调节剂可以是免疫刺激剂。如本文所使用的术语“免疫刺激剂”优选地是指能引发免疫应答的任何物质(例如,针对特定病原体的免疫反应)。免疫细胞激活化合物包括Toll样受体(TLR)激动剂。此类激动剂包括病原体相关分子模式(PAMP),例如,模拟感染的组合物,如细菌来源的免疫调节剂(亦称为危险信号),以及损伤相关分子模式(DAMP),例如,模拟应激的或损伤的细胞的组合物。TLR激动剂包括核酸或脂质组分(例如,单磷酸脂质A(MPLA))。在一个示例中,TLR激动剂包括TLR9激动剂,如胞嘧啶-鸟嘌呤核苷寡核苷酸(CpG-ODN),聚(乙烯亚胺)(PEI)-缩合寡核苷酸(ODN),如PEI-CpG-ODN或双链脱氧核糖核酸(DNA)。在另一个示例中,TLR激动剂包括TLR3激动剂,如聚肌苷-聚胞苷酸(聚(I:C))、PEI-聚(I:C)、聚腺苷-聚尿苷酸(聚(A:U))、PEI-聚(A:U)或双链核糖核酸(RNA)。其他示例性疫苗免疫刺激性化合物包括STING激动剂(例如:STING激动剂-3,摘自专利W02017175147A1,实施例10)、脂多糖(LPS)、趋化因子/细胞因子、真菌 β -葡聚糖(例如香菇多糖)、咪喹莫特、CRX-527和OM-174。

[0438] 在某些实施方案中,免疫刺激剂可以是Toll样受体(TLR)7/8激动剂,例如但不限于咪喹莫德(Imiquimod)、瑞喹莫德(Resiquimod)、852-A、维沙莫德(Vesatolimod)、AZD8848、莫托莫德(Motolimod)或塞尔甘托莫德(Selgantolimod)。

[0439] 在某些实施方案中,本发明的肽接头可包含两种不同的免疫刺激剂。例如,本发明的肽接头可以包含STING激动剂3和瑞喹莫德(参见图34)。

[0440] 在某些实施方案中,有效载荷可以是半衰期增加部分或溶解度增加部分。半衰期增加部分例如是PEG部分(聚乙二醇部分;聚乙二醇化)、其它聚合物部分、PAS部分(包含脯氨酸、丙氨酸和丝氨酸的寡肽;PAS化(PASylation))或血清白蛋白结合物。增加溶解度的部分是例如PEG部分(聚乙二醇化)或PAS部分(PAS化)。

[0441] 在某些实施方案中,有效载荷可以是聚合物-毒素缀合物。聚合物-毒素缀合物是能够携带一个或多个有效载荷分子的聚合物。示例包括由Mersana治疗开发的Fleximer聚合物-毒素,由Mablink开发的PSAR聚合物-毒素,由Amunix开发的XTEN聚合物-毒素。或聚合物-毒素缀合物可以包含本文公开的任何毒素。

[0442] 在某些实施方案中,有效载荷可以是核苷酸。核酸有效载荷的一个示例是MCT-485,它是一种非常小的非编码双链RNA,其具有溶瘤和免疫激活性质,由MultiCell Technologies公司开发。

[0443] 在某些实施方案中,有效载荷可以是荧光染料。如本文所使用的术语“荧光染料”是指染料,其在第一波长吸收光并在比第一波长更长的第二波长发射。在某些实施方案中,荧光染料是近红外荧光染料,其在650-900nm波长发射光。在该区域,组织自体荧光较低,较

低的荧光消光增强了深度组织穿透,具有最小背景干扰。因此,近红外荧光成像可用于使被本发明的抗体-有效载荷缀合物结合的组织在手术期间可见。“近红外荧光染料”是本领域已知的并且是可商购的。在某些实施方案中,近红外荧光染料可以是IRDye 800CW、Cy7、Cy7.5、NIR CF750/770/790、DyLight 800或Alexa Fluor 750。

[0444] 在某些实施方案中,有效载荷可以包括放射性核素。如本文所使用的术语“放射性核素”是指医用放射性核素,例如包括放射性金属的带正电荷的离子,放射性金属如Y、In、Tb、Ac、Cu、Lu、Tc、Re、Co、Fe等,如 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{67}Cu 、 ^{77}Lu 、 ^{99}Tc 、 ^{161}Tb 、 ^{225}Ac 等。放射性核素可以包含在螯合剂(如DOTA或NODA-GA)中。另外,放射性核素可以是治疗性放射性核素或可在如下所述的成像技术中用作造影剂的放射性核素。放射性核素或包含放射性核素的分子是本领域已知的并且是可商购的。

[0445] 在某些实施方案中,有效载荷可以是受体的配体或受体的底物。特别地,有效载荷可以是已知在癌细胞中强烈表达的受体的配体或底物。也就是说,通过本发明的肽接头将这种受体的配体或底物偶联至抗体可以提高抗体-有效载荷缀合物的特异性,并且可以进一步提高抗体-有效载荷缀合物内化到靶细胞(如癌细胞)中。例如,有效载荷可以是叶酸,以提高过表达叶酸受体FR α 的癌细胞的靶向性。然而,有效载荷也可以是以高亲和力结合FR α 的叶酸的衍生物或类似物。此外,有效载荷可以是FR α 的任何其它配体或底物,特别是以高亲和力结合FR α 的配体或底物。

[0446] 在其他实施方案中,有效载荷可以是生物素受体的配体或底物。也就是说,有效载荷可以是生物素、生物素类似物或衍生物,或以高亲和力结合生物素受体的任何其他分子。

[0447] 在其他实施方案中,有效载荷可以是表皮生长因子受体(EGFR)的配体或底物。也就是说,有效载荷可以是表皮生长因子(EGF)或其任何衍生物、类似物或片段,其以高亲和力与EGFR结合。此外,有效载荷也可以是以高亲和力结合EGFR的任何分子。

[0448] 可以用作靶向已知在癌细胞中强烈表达的受体的有效载荷的肽/小分子配体的其他示例包括但不限于肿瘤归巢肽:RGD肽及其衍生物(iRGD、西仑吉肽(cilengitide)、SFITGv6、CNGRC等)、细胞外基质归巢肽(DAG、ZD2、CSG、PlGF-2、BT1718)、肿瘤相关巨噬细胞靶向剂(RP-182、M2pep、mUNO)、EGFR靶向肽(GE11)、Angiopep-2、靶向异常细胞信号传导途径的肽(LP4、NBD、H1)、PSMA结合物(基于尿素或基于氨基磷酸酯的结合物)。

[0449] “配体”和“底物”在本文中都被定义为以一定亲和力结合受体的分子。然而,应该理解“配体”通常是小分子,而“底物”通常是大分子,如肽或蛋白质。应当理解,包含在根据本发明的肽接头中的配体或底物可以是天然存在的配体或底物、天然存在的配体或底物的衍生物或天然存在的配体或底物的化学修饰形式。

[0450] 在某些实施方案中,有效载荷可以是维生素。维生素可以选自叶酸类,包括叶酸、叶酸素和维生素B9。维生素可选自生物素、维生素B7。

[0451] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述毒素是选自由以下组成的组中的至少一种:

- [0452] • 吡咯并苯并二氮杂草(例如,PBD);
- [0453] • 澳瑞他汀(例如,MMAE,MMAF);
- [0454] • 美登素生物碱(例如,美登素,DM1,DM4,DM21);
- [0455] • 多卡霉素;

- [0456] • 烟酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT) 抑制剂;
- [0457] • 微管蛋白抑制剂;
- [0458] • 烯二炔类 (例如, 卡利奇霉素);
- [0459] • 蒽环霉素衍生物 (PNU) (如多柔比星);
- [0460] • 基于吡咯的纺锤体驱动蛋白 (KSP) 抑制剂;
- [0461] • 念珠藻素;
- [0462] • 药物外排泵抑制剂;
- [0463] • 山卓霉素;
- [0464] • 胸苷酸合酶抑制剂;
- [0465] • 鹅膏蕈碱 (例如, α -鹅膏蕈碱); 和
- [0466] • 喜树碱 (例如依喜替康, 德鲁替康)。

[0467] 也就是说, 本发明的肽接头优选包含毒素有效载荷。如本文所使用的术语“毒素”涉及对细胞或有机体有毒的任何化合物。优选地, 毒素由细胞或有机体产生。然而, 毒素也可以是由细胞或有机体产生的毒素的化学衍生物或类似物。毒素可以是但不限于小分子、肽或蛋白质。具体的示例为神经毒素、坏死毒素、血毒素和细胞毒素。在某些实施方案中, 所述毒素是用于治疗肿瘤性疾病的毒素。换言之, 使用本发明的方法, 毒素可以缀合至抗体, 并由于抗体的靶特异性而被递送至或进入恶性细胞。

[0468] 在某些实施方案中, 毒素可以是澳瑞他汀。如本文所使用的术语“澳瑞他汀”是指抗有丝分裂试剂家族。澳瑞他汀衍生物也包括在术语“澳瑞他汀”的定义中。澳瑞他汀的示例包括但不限于澳瑞他汀E (AE)、单甲基澳瑞他汀E (MMAE)、单甲基澳瑞他汀F (MMAF) 和多拉司他汀 (dolastatin) 的合成类似物。

[0469] 在某些实施方案中, 毒素可以是美登素生物碱。在本发明的上下文中, 术语“美登素生物碱”是指一类最初从以下物质中分离的高细胞毒性药物: 非洲灌木卵叶美登木 (*Maytenus ovatus*) 和另外的美登醇 (Maytansinol) 和天然美登醇的C-3酯 (US Pat.No.4, 151,042); 合成美登醇的C-3酯类似物 (Kupchan et al., J.Med.Chem.21:31-37,1978; Higashide et al., Nature 270:721-722,1977; Kawai et al., Chem.Farm.Bull.32:3441-3451; 以及US Pat.No.5,416,064); 简单羧酸的C-3酯 (US Pat.4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348 以及 4,331,598); 以及与N-甲基-L-丙氨酸的C-3酯和衍生物 (U.S.Pat.Nos.4,137,230; 4,260,608; 以及Kawai et al., Chem.Pharm Bull.12:3441,1984)。可用于本发明的方法或可包含在本发明的抗体-有效载荷缀合物中的示例性美登素生物碱为DM1、DM3、DM4和/或DM21。

[0470] 在某些实施方案中, 毒素可以是多卡霉素。例如, 合适的多卡霉素可以是多卡霉素A、多卡霉素B1、多卡霉素B2、多卡霉素C1、多卡霉素C2、多卡霉素D、多卡霉素SA、多卡霉素MA和CC-1065。术语“多卡霉素”应理解为也指多卡霉素的合成类似物, 如阿多来新 (adozelesin)、比折来新 (bizelesin)、卡折来新 (carzelesin)、KW-2189和CBI-TMI。

[0471] 在某些实施方案中, 毒素可以是NAMPT抑制剂。如本文所使用的术语“NAMPT抑制剂”和“烟酰胺磷酸核糖转移酶抑制剂”是指减少NAMPT的活性的抑制剂。术语“NAMPT抑制剂”也可以包括NAMPT抑制剂的前药。NAMPT抑制剂的示例包括但不限于FK866 (也称为AP0866)、GPP 78盐酸盐、ST 118804、STF31、吡啶基氰基胍 (也称为CH-828)、GMX-1778和

P7C3。其它NAMPT抑制剂是本领域已知的,并且可以适用于本文所描述的组合物和方法。例如,参见PCT公开号WO 2015/054060,美国专利第8211912号和第9676721号,其全部内容通过引用结合于此。在一些实施方案中,NAMPT抑制剂是FK866。在一些实施方案中,NAMPT抑制剂是GMX-1778。

[0472] 在某些实施方案中,毒素可以是微管蛋白抑制剂。微管蛋白抑制剂是细胞毒性肽,其包括9个成员(A-I)。微管蛋白抑制剂A具有作为抗癌剂的潜在应用。它在G2/M期阻滞细胞。微管蛋白抑制剂A比长春碱更有效地抑制聚合反应,并诱导分离的微管的解聚作用。微管蛋白抑制剂A对各种肿瘤细胞系具有强效细胞抑制效果,IC₅₀在皮摩尔范围内。可用于本发明的方法的其它微管蛋白抑制剂可以是微管蛋白抑制剂E。

[0473] 在某些实施方案中,毒素可以是烯二炔。如本文所使用的术语“烯二炔类”是指一类细菌天然产物,其特征在于含有两个由双键隔开的三键的九元环和十元环(例如,参见K.C.Nicolaou;A.L.Smith;E.W.Yue(1993).“Chemistry and biology of natural and designed enediynes”.PNAS 90(13):5881-5888;其全部内容通过引用结合于此)。一些烯二炔能够发生Bergman环合反应,并且得到的双自由基,1,4-脱氢苯衍生物能够从DNA的糖主链中提取氢原子,这导致DNA链裂解(例如,参见S.Walker;R.Landovitz;W.D.Ding;G.A.Ellestad;D.Kahne(1992).“Cleavage behavior of calicheamicin gamma land calicheamicin T”.Proc Natl Acad Sci U.S.A.89(10):4608-12;其全部内容通过引用结合于此)。它们与DNA的反应性将抗生素特性赋予许多烯二炔,并且一些烯二炔在临床上被研究作为抗癌抗生素。烯二炔类的非限制性示例为蒽环类抗生素(dynemicin)、新制癌菌素、卡利奇霉素、埃斯培拉霉素(esperamicin)(例如,参见Adrian L.Smith and K.C.Bicolaou,“The Eneidyne Antibiotics”J.Med.Chem.,1996,39(11),pp 2103-2117;和Donald Borders,“Eneidyne antibiotics as antitumor agents,”Informa Healthcare;第1版(Nov.23,1994,ISBN-10:0824789385;其全部内容通过引用结合于此)。在一个具体实施方案中,毒素可以是卡利奇霉素。

[0474] 在某些实施方案中,毒素可以是多柔比星。如本文所使用的“多柔比星”是指来源于链霉菌属(*Streptomyces*)细菌波塞链霉菌表灰变种(*Streptomyces peucetius* var.*caesius*)的蒽环霉素家族的成员,并且包括多柔比星、柔红霉素(daunorubicin)、表柔比星(epirubicin)和伊达比星(idarubicin)。

[0475] 在某些实施方案中,毒素可以是纺锤体驱动蛋白抑制剂。术语“纺锤体驱动蛋白抑制剂”是指抑制纺锤体驱动蛋白的化合物,该纺锤体驱动蛋白涉及细胞分裂期间双极纺锤体的组装。目前正在研究纺锤体驱动蛋白抑制剂用于治疗癌症。纺锤体驱动蛋白抑制剂的示例包括伊斯平斯(ispinesib)。此外,术语“纺锤体驱动蛋白抑制剂”包括来自葛兰素史克(GlaxoSmithKline)的SB715992或SB743921以及来自CombinatoRx的戊烷脒/氯丙嗪。

[0476] 在某些实施方案中,毒素可以是念珠藻素或衍生物,如US20180078656A1、US20210163458 A1、US20210228726A1中所述,这些文献通过引用并入本文。

[0477] 在某些实施方案中,毒素可以是山卓霉素。山卓霉素是最先从类诺卡氏菌物种(*Nocardioides* sp.) (ATCC 39419)中分离得到的一种缩肽,并且已经显示具有细胞毒性和抗肿瘤活性。

[0478] 在某些实施方案中,毒素可以是胸苷合酶(或胸苷酸合酶)抑制剂。胸苷酸合成酶

抑制剂是抑制胸苷酸合成酶的化学试剂,并且具有作为抗癌化学疗法的潜力。这种抑制阻止了脱氧尿苷单磷酸(dUMP)的C5的甲基化,从而抑制了脱氧胸苷单磷酸(dTMP)的合成。下游效应是促进细胞死亡,因为细胞如果缺乏dTMP(dTTP的必要前体),则不能正常进行DNA合成。在本发明中,胸苷酸合酶抑制剂可以是,但不限于,雷替曲塞、培美曲塞、诺拉曲塞(nolatrexed)、ZD9331、GS7904L、氟脲嘧啶(flourourcail)、BGC-945和OSI-7904L。

[0479] 在某些实施方案中,毒素可以是鹅膏毒素(amatoxin)。鹅膏毒素(包括 α -鹅膏蕈碱、 β -鹅膏蕈碱和鹅膏蕈碱)是由8个氨基酸组成的环肽。它们可以从毒鹅膏菌(*Amanita phalloides*)蘑菇中分离出来,或通过合成从构建模块中制备出来。鹅膏毒素特异性抑制哺乳动物细胞的DNA依赖性RNA聚合酶II,并通过这种转录,细胞的蛋白质生物合成受到影响。抑制细胞中的转录导致生长和增殖停止。虽然不是共价结合,但鹅膏蕈碱和RNA聚合酶II之间的复合非常紧密(KD=3nM)。鹅膏蕈碱与酶的解离是非常缓慢的过程,这使得受影响细胞的恢复不太可能。当细胞中对转录的抑制将持续过长时,细胞经历程序性细胞死亡(凋亡)。在一个优选的实施方案中,如本文所使用的术语“鹅膏毒素”是指如在例如W02010/115630、W02010/115629、W02012/119787、W02012/041504和W02014/135282中所描述的 α -鹅膏蕈碱或其变体。

[0480] 在某些实施方案中,毒素可以是喜树碱。如本文所使用的术语“喜树碱”意指用作拓扑异构酶I抑制剂的喜树碱或喜树碱衍生物。例如,示例性喜树碱包括拓扑替康(topotecan)、依喜替康(exatecan)、德鲁替康(deruxtecan)、伊立替康(irinotecan)、DX-8951f、SN38、BN 80915、勒托替康(lurtotecan)、9-硝基喜树碱和氨基喜树碱。已经描述了多种喜树碱,包括用于治疗人类癌症患者的喜树碱。例如Kehrer等人(*Anticancer Drugs*, 12(2):89-105, (2001))或Li等人(*ACS Med.Chem.Lett.*2019,10,10,1386-1392)描述了若干种喜树碱。在某些实施方案中,喜树碱是如Li等人(*ACS Med.Chem.Lett.*2019,10,10,1386-1392)的化合物10所示的依喜替康衍生物。在某些实施方案中,喜树碱衍生物是甘氨酸化的依喜替康(G-Exa;图13和16)。

[0481] 在本发明的意义上,毒素也可以是药物外排转运体的抑制剂。包含毒素和药物外排转运体的抑制剂的抗体-有效载荷缀合物可具有以下优点:当内化到细胞中时,药物外排转运体的抑制剂防止毒素外排到细胞外。在本发明中,药物外排转运体可以是P-糖蛋白。P-糖蛋白的一些常见药理学抑制剂包括:胺碘酮、克拉霉素、环孢素、秋水仙碱、地尔硫卓、红霉素、非洛地平、酮康唑、兰索拉唑、奥美拉唑以及其它质子泵抑制剂,硝苯地平、帕罗西汀、利血平、沙奎那韦、舍曲林、奎尼丁、他莫昔芬、维拉帕米和度洛西汀。依克立达(Elacridar)和CP 100356是其它常见的P-gp抑制剂。唑喹达(Zosuquidar)和他立喹达(Tariquidar)也是用此理念开发的。最后,伐司扑达(valspodar)和reversan是此类试剂的其它示例。

[0482] 根据本发明的肽接头包含至少两个有效载荷。这两个或更多个有效载荷在结构上可以相同,也可以不同。

[0483] 也就是说,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中两个或更多个有效载荷是相同的。

[0484] 将两个或更多个相同的有效载荷偶联至肽接头允许增加抗体-有效载荷缀合物的靶组织或细胞中的有效载荷浓度。例如,如果抗体-有效载荷缀合物的肽接头包含两种或更多种相同的毒素(导致DAR>4ADC),则与常规DAR2 ADC相比,靶组织或细胞中的毒素浓度将

更高。使用本发明的肽接头,可以获得包含4、6或8个相同有效载荷分子的ADC。

[0485] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述两个或更多个有效载荷中的至少两个彼此不同。

[0486] 在某些实施方案中,本发明的肽接头可以允许将两种不同的有效载荷缀合至抗体。使用第二种有效载荷可以开发出一类全新的抗体-有效载荷缀合物,其在疗效和效价方面超越了目前的治疗方法。还构想了新的应用领域,例如,用于成像和治疗或术中/术后手术的双类型成像(参见Azhdarinia A. et al., Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. *Mol Imaging Biol.* 2012 Jun; 14 (3) : 261-276)。例如,包含用于术前正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)的分子成像剂和用于手术切缘的引导划定的近红外荧光(near-infrared fluorescent, NIRF)染料的双标记抗体可以显著增强癌症的诊断、分期与切除(参见Houghton J.L. et al., Site-specifically labeled CA19.9-targeted immunoconjugates for the PET, NIRF, and multimodal PET/NIRF imaging of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Dec 29; 112 (52) : 15850-5)。PET和NIRF光学成像提供了互补的临床应用,使得非侵入性全身成像能够在手术过程中分别定位疾病和鉴定肿瘤边缘。然而,由于缺乏合适的位点特异性方法,迄今为止,这种双标记探针的产生是困难的;由于探针的随机缀合,通过化学手段连接两种不同的探针导致几乎不可能的分析和重现性(reproducibility)。

[0487] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中一个有效载荷用于成像/检测目的(荧光分子或放射性配体),一个有效载荷用于治疗目的,提供治疗诊断剂(将治疗与诊断相结合的策略)。

[0488] 此外,在Levengood M.等人的研究中(Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody-Drug Conjugates. *Angewandte Chemie*, Volume 56, Issue 3, January 16, 2017),具有连接的两种不同的澳瑞他汀毒素(具有不同的物理化学性质并发挥互补的抗癌活性)的双药物标记的抗体在对由单独的澳瑞他汀组分组成的ADC无反应的细胞系和异种移植物模型中赋予活性。这表明,与单独地单个常规ADC相比,双标记ADC能够更有效地解决癌症异质性和耐药性问题。

[0489] 因此,在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含至少两种不同的毒素。所述至少两种不同的毒素可以是本领域已知的和/或本文公开的任何毒素。特别地,与根据本发明的肽接头偶联的两种或更多种毒素可以具有不同的作用模式。

[0490] 在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含一种或多种澳瑞他汀和一种或多种喜树碱。在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含一种或多种MMAE分子和一种或多种依喜替康或依喜替康衍生物(参见图21)。

[0491] 在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含两种不同的澳瑞他汀。在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含MMAE和MMAF。

[0492] 在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含毒素和激素。在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含毒素和皮质醇。在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含澳瑞他汀和皮质醇。在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含MMAE和皮质醇(参见图22)。在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含澳瑞他汀、美登素生物碱和皮质醇。

[0493] 由于对ADC的一种耐药机制包括来自癌细胞的细胞毒性部分的主动泵出,另一种双药物应用可以包括额外和同时递送特异性阻断细胞毒性药物的外排机制的药物。因此,此类双标记ADC可以有助于克服对ADC的癌症耐药性,其比传统ADC更有效。

[0494] 在某些实施方案中,根据本发明的肽接头可包含至少一种毒素和至少一种受体的配体,优选地其中,受体是在癌细胞中表达的受体。在某些实施方案中,根据本发明的肽接头可包含至少一种毒素和叶酸分子。

[0495] 在某些实施方案中,根据本发明的肽接头包含三种不同的有效载荷。

[0496] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的肽接头,其中,所述接头适合用作转谷氨酰胺酶的底物。

[0497] 也就是说,根据本发明的肽接头被设计用作转谷氨酰胺酶的底物。转谷氨酰胺酶是在自然界中主要催化谷氨酰胺残基侧链的 γ -羧酰胺基团($-(C=O)NH_2$)和赖氨酸残基侧链的 ϵ -氨基($-NH_2$)之间形成异肽键并随后释放氨(NH_3)的酶。然而,本领域已知该酶是相当混杂的,除了赖氨酸的 ϵ -氨基以外,它还接受其它伯胺。

[0498] 本文优选肽接头通过转谷氨酰胺酶与抗体的谷氨酰胺残基缀合。因此,肽接头必须包含伯胺以作为转谷氨酰胺酶的底物。伯胺优选包含在赖氨酸、赖氨酸模拟物或赖氨酸衍生物的侧链中,或包含在具有结构 $NH_2-(Y)-COOH$ 的氨基酸残基中,如上文所定义。转谷氨酰胺酶可以是本文定义的任何转谷氨酰胺酶,优选本文定义的微生物转谷氨酰胺酶。

[0499] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及抗体-有效载荷缀合物,其包含与根据本发明的肽接头缀合的抗体。

[0500] 也就是说,本发明进一步包括包含本文定义的任何肽接头的抗体-接头缀合物。本文优选的是,根据本发明的包含胺的肽接头与抗体中的谷氨酰胺残基缀合。

[0501] 因此,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头通过在所述抗体中包含的谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基和所述肽接头的氨基酸残基中包含的伯胺之间形成的异肽键与所述抗体缀合。

[0502] 本文中的术语“抗体”以最广泛的意义使用,并且具体包括单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的生物活性。术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”广义地包括抗体的天然存在形式(例如,IgG、IgA、IgM、IgE)。

[0503] 抗体优选为单克隆抗体。抗体可以是人类来源的,但同样可以来源于小鼠、大鼠、山羊、驴、仓鼠或兔。在缀合物用于治疗的情况下,鼠或兔抗体可以任选地嵌合或人源化。

[0504] 抗体也可以是双特异性的(例如,DVD-IgG、crossMab、添加的IgG-HC融合蛋白)或双旁原位移植的(biparatopic)。参见Brinkmann和Kontermann(Bispecific antibodies; Drug Discov Today;2015;20(7);p.838-47)了解概述。

[0505] 术语“抗体”还包括抗体的抗原结合片段。优选地,根据本发明的肽接头与IgG抗体的 C_H2 结构域中的谷氨酰胺残基295(Q295)缀合。因此,本文优选地本发明的抗体或抗体片段包含 C_H2 结构域。

[0506] 包含 C_H2 结构域的抗体的片段或重组变体可以是,例如,

[0507] • 仅包含重链结构域的抗体形式(鲨鱼抗体/IgNAR($V_H-C_H1-C_H2-C_H3-C_H4-C_H5$)₂或骆驼抗体/hcIgG($V_H-C_H2-C_H3$)₂)

[0508] • scFv-Fc (VH-VL-CH2-CH3)₂

[0509] • Fc融合肽,其包含Fc结构域和一个或多个受体结构域。

[0510] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中抗体是IgG抗体。

[0511] 如本文所使用的“IgG”是指属于基本上由识别的免疫球蛋白 γ 基因编码的抗体种类的多肽。在人类中,IgG包含亚类或同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在小鼠中,IgG包含IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。全长IgG由两对相同的两条免疫球蛋白链组成,每对具有一条轻链和一条重链,每条轻链包括免疫球蛋白结构域VL和CL,并且每条重链包括免疫球蛋白结构域VH、C γ 1(也称为CH1)、C γ 2(也称为CH2)和O γ 3(也称为CH3)。在人类IgG1的情况下,根据Kabat的EU指数,“CH1”指位置118-215,CH2结构域指位置231-340,CH3结构域指位置341-447。IgG1还包含铰链结构域(hinge domain),在IgG1的情况下,该铰链结构域指位置216-230。

[0512] 在一个优选实施方案中,抗体是IgG1抗体。在一个特别优选的实施方案中,抗体是人IgG1抗体。

[0513] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头与包含在所述抗体的Fc结构域中的谷氨酰胺残基缀合。

[0514] 也就是说,根据本发明的肽接头优选与包含在抗体Fc结构域中的谷氨酰胺残基缀合。本发明的接头可以与抗体的Fc结构域中的任何Gln残基缀合,所述抗体可以作为转谷氨酰胺酶的底物。通常,如本文所使用的术语Fc结构域是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域(C_H2和C_H3)以及IgE、IgY和IgM的最后三个恒定区结构域(C_H2、C_H3和C_H4)。换言之,根据本发明的接头可以缀合至抗体的C_H2、C_H3和(如果适用)C_H4结构域。

[0515] 例如,根据本发明的肽接头可以通过基因工程与内源性谷氨酰胺残基(例如,IgG1抗体的Q295)或已引入抗体的Fc结构域的谷氨酰胺残基缀合。

[0516] 也就是说,在具体抗体中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基是IgG抗体的C_H2结构域的谷氨酰胺残基Q295(EU编号)。

[0517] 重要的是理解Q295是IgG型抗体中极其保守的氨基酸残基。它在人类IgG1、2、3、4以及兔和大鼠抗体等中是保守的。因此,能够使用Q295对于制备治疗性抗体-有效载荷缀合物或诊断性缀合物具有相当大的优势,其中所述抗体通常是非人类来源的。因此,根据本发明的方法确实提供了一种极其通用和广泛适用的工具。尽管残基Q295在IgG型抗体中极为保守,但是某些IgG型抗体不具有该残基,如小鼠和大鼠IgG2a抗体。因此,应当理解,本发明的方法中使用的抗体优选是包含C_H2结构域的残基Q295(EU编号)的IgG型抗体。

[0518] 在讨论通过转谷氨酰胺酶将接头与C_H2的Gln残基缀合的文献中,关注点已经是小的低分子量底物。然而,在现有技术文献中,为了完成这种缀合,在N297位置的天冬酰胺残基的去糖基化或非糖基化的抗体的使用总是被描述为必要的(WO 2015/015448;WO 2017/025179;WO 2013/092998)。

[0519] 然而,非常令人惊讶的是,与所有预期相反,通过使用上述讨论的肽接头结构,糖基化抗体的Q295位点特异性缀合确实是有效可行的。具体地,对于它们中的大多数来说,包含两个或更多个有效载荷的肽接头的偶联是以大于90%的偶联效率实现的。

[0520] 尽管Q295与N297非常接近,N297在其天然状态下是糖基化的,使用指定的肽接头

的根据本发明的方法仍然允许与Q295有效缀合。

[0521] 如前所示,根据本发明的方法不需要N297的预先酶促去糖基化,也不需要非糖基化的抗体,也不需要用于对另一种氨基酸的N297的取代,也不需要引入T299A突变以防止糖基化。

[0522] 这两点在制备方面提供了显著的优势。在GMP条件下,酶促去糖基步骤是不需要的,因为必须确保去糖基化酶(如PNGase F)以及切割的聚糖必须从培养基中去除。

[0523] 此外,不需要用于有效载荷连接的抗体的基因工程,从而可以避免可能增加免疫原性和降低抗体的整体稳定性的序列插入。

[0524] 对另一种氨基酸的N297的取代也有不希望的效果,因为它可以影响整个Fc结构域的整体稳定性(Subedi et al, The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. Structure 2015, 23(9), 1573-1583)以及整个缀合物的功效,从而可导致增加的抗体聚集和降低的溶解性(Zheng et al.; The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. Mabs-Austin 2011, 3(6), 568-576)。此外,存在于N297的聚糖具有重要的免疫调节效果,因为它引发抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)等。在去糖基化或以上讨论的任何其它方法以获得非糖基化的抗体时,将失去这些免疫调节效果。此外,已构建的抗体的任何序列修饰也可能导致调节问题,这是有问题的,因为通常使用公认的和临床验证的抗体作为ADC缀合的起点。

[0525] 因此,使用本发明的肽接头的根据本发明的方法允许容易且没有缺点地制造具有位点特异性有效载荷结合的化学计量明确定义的ADC。

[0526] 鉴于以上所述,本发明的方法优选用于IgG抗体在抗体的C_H2结构域的残基Q295(EU编号)处的缀合,其中抗体在C_H2结构域的残基N297(EU编号)处被糖基化。然而,明确声明本发明的方法还包括:去糖基化或非糖基化抗体在残基Q295或抗体的任何其他合适的Gln残基处的缀合,其中,Gln残基可以是内源性Gln残基或通过分子工程引入的Gln残基。

[0527] 因此,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述肽接头缀合的谷氨酰胺残基已经通过分子工程引入到所述抗体的重链或轻链中。

[0528] 如本文所使用的术语“分子工程”是指使用分子生物学方法操纵核酸序列。在本发明中,分子工程可用于将Gln残基引入抗体的重链或轻链。一般而言,在本发明中设想了将Gln残基引入抗体的重链或轻链的两种不同策略。第一,抗体重链或轻链的单个残基可以被Gln残基取代。第二,由两个或更多个氨基酸残基组成的含Gln的肽标签可以并入至抗体的重链或轻链中。为此,肽标签可以并入重链或轻链的内部位置,即,在重链或轻链的两个现有氨基酸残基之间或通过替换它们,或者肽标签可以融合(添加)到抗体的重链或轻链的N端或C端。

[0529] 例如,抗体的重链或轻链的氨基残基可以被Gln残基取代,条件是所得抗体可以通过微生物转谷氨酰胺酶与本发明的接头缀合。在某些实施方案中,抗体是其中IgG抗体的C_H2结构域的氨基酸残基N297(EU编号)被取代的抗体,特别是其中该取代是N297Q取代。包含N297Q突变的抗体可以在抗体的每个重链上缀合至一个以上的接头。例如,包含N297Q突变的抗体可以与四个接头缀合,其中一个接头与抗体的第一重链的残基Q295缀合,一个接头与抗体的第一重链的残基N297Q缀合,一个接头与抗体的第二重链的残基Q295缀合,并且

一个接头与抗体的第二重链的残基N297Q缀合。技术人员知道用Gln残基替换IgG抗体的N297残基会产生非糖基化的(aglycosylated)抗体。

[0530] 也就是说,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,已经通过分子工程引入到所述抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺残基是非糖基化IgG抗体的C_H2结构域的N297Q(EU编号)。

[0531] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,已经通过分子工程引入到所述抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺残基包含在肽中,所述肽已经(a)整合到所述抗体的重链或轻链中,或(b)融合到所述抗体的重链或轻链的N端或C端。

[0532] 代替取代抗体的单个氨基酸残基,可以将包含转谷氨酰胺酶可及的Gln残基的肽标签引入抗体的重链或轻链。此类肽标签可以融合至抗体的重链或轻链的N端或C端。可替代地,可以将肽标签插入抗体的重链或轻链的合适位置。优选地,包含转谷氨酰胺酶可及的Gln残基的肽标签融合至抗体的重链的C端。甚至更优选地,包含转谷氨酰胺酶可及的Gln残基的肽标签融合至IgG抗体的重链的C端。在WO 2012/059882和WO 2016/144608中描述了可以融合至抗体的重链的C端并作为微生物转谷氨酰胺酶的底物的若干种肽标签。

[0533] 因此,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,包含Gln残基的肽已经融合到所述抗体的重链的C端。

[0534] 可以引入抗体的重链或轻链(特别是融合至抗体的重链的C端)的示例性肽标签为:LLQGG(SEQ ID NO:70)、LLQG(SEQ ID NO:37)、LSLSQG(SEQ ID NO:38)、GGLLQGG(SEQ ID NO:39)、GLLQG(SEQ ID NO:40)、LLQ(SEQ ID NO:41)、GSPLAQSHGG(SEQ ID NO:42)、GLLQGGG(SEQ ID NO:43)、GLLQGG(SEQ ID NO:44)、GLLQ(SEQ ID NO:45)、LLQLLQGA(SEQ ID NO:46)、LLQGA(SEQ ID NO:47)、LLQYQGA(SEQ ID NO:48)、LLQSG(SEQ ID NO:49)、LLQYQG(SEQ ID NO:50)、LLQLLQG(SEQ ID NO:51)、SLLQG(SEQ ID NO:52)、LLQLQ(SEQ ID NO:53)、LLQLLQ(SEQ ID NO:54)、LLQGR(SEQ ID NO:55)、EEQYASTY(SEQ ID NO:56)、EEQYQSTY(SEQ ID NO:57)、EEQYNSTY(SEQ ID NO:58)、EEQYQS(SEQ ID NO:59)、EEQYQST(SEQ ID NO:60)、EQYQSTY(SEQ ID NO:61)、QYQS(SEQ ID NO:62)、QYQSTY(SEQ ID NO:63)、YRYRQ(SEQ ID NO:64)、DYALQ(SEQ ID NO:65)、FGLQRPY(SEQ ID NO:66)、EQKLISEEDL(SEQ ID NO:67)、LQR(SEQ ID NO:68)和YQR(SEQ ID NO:69)。

[0535] 本领域技术人员知晓取代抗体的氨基酸残基或将肽标签引入抗体的方法,例如通过如在Sambrook, Joseph中所描述的分子克隆方法((2001).Molecular cloning:a laboratory manual.Cold Spring Harbor,N.Y.:Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0536] 一般而言,本领域技术人员知晓确定肽接头在抗体的哪个位置缀合的方法。例如,缀合位点可以通过抗体-有效载荷缀合物的蛋白水解消化(proteolytic digestion)和所得片段的LC-MS分析来确定。例如,可根据使用说明手册,使用GlyciNATOR(Genovis)对样本进行去糖基化,然后分别使用金牌胰蛋白酶(trypsin gold,质谱级,Promega)进行消化。因此,1μg蛋白可与50ng胰蛋白酶在37°C孵育过夜。可以使用与Synapt-G2质谱仪(Waters)耦合的nanoAcquity HPLC系统实施LC-MS分析。为此,可以将100ng肽溶液加载到Acquity UPLC对称C18捕集柱(Waters,零件号186006527)上,5μL/min的流速以1%缓冲液A(水,0.1%甲酸)和99%缓冲液B(乙腈,0.1%甲酸)捕集3min。然后,可以在25min内用3%至65%

缓冲液B的线性梯度洗脱肽。可以在50至2000m/z的质量范围内以正极性分辨率模式采集数据。其它仪器设置可以如下：毛细管电压3.2kV, 取样锥40V, 提取锥4.0V, 源温度130℃, 锥气35L/h, 纳米流气体0.1bar, 以及吹扫气体150L/h。可以用[Glu 1]-血纤维蛋白肽校准质谱仪。

[0537] 此外, 本领域技术人员知晓确定抗体-有效载荷构建体的药物-抗体比 (DAR) 或有效载荷-抗体比的方法。例如, 可以通过疏水作用色谱法 (HIC) 或LC-MS确定DAR。

[0538] 对于疏水作用色谱法 (HIC), 可以将样本调整至0.5M硫酸铵, 并通过MAB PAK HIC 丁基柱 (5 μ m, 4.6 \times 100mm, Thermo Scientific), 于1mL/min和30℃使用从A (1.5M硫酸铵, 25mM Tris HCl, pH 7.5) 至B (20%异丙醇, 25mM Tris HCl, pH 7.5) 的全梯度评估20min。通常, 可以使用40 μ g样本, 并且可在280nm记录信号。可以通过用ADC DAR 2物质 (species) 的绝对保留时间除以相应未缀合的mAb的保留时间来计算相对HIC保留时间 (HIC-RRT)。

[0539] 对于LC-MSDAR测定, 可以用NH₄HCO₃将ADC稀释至最终浓度0.025mg/mL。随后, 40 μ L该溶液可以在室温下用1 μ L TCEP (500mM) 还原5min, 然后通过添加10 μ L氯乙酰胺 (200mM) 进行烷基化, 接着在37℃的黑暗中孵育过夜。对于反相色谱法, 可以使用Dionex U3000系统与软件Chromleon相结合。该系统可以配备加热至70℃的RP-1000色谱柱 (1000 Å , 5 μ m, 1.0 \times 100mm, Sepax) 和设定为214nm波长的UV检测器。溶剂A可以由具有0.1%甲酸的水组成, 溶剂B可以包含具有0.1%甲酸的85%乙腈。可以将还原的和烷基化的样本装载到色谱柱上, 并在14分钟内通过30-55%溶剂B的梯度进行分离。液相色谱系统可以偶联至Synapt-G2质谱仪, 用于鉴别DAR物质。质谱仪的毛细管电压可设置为3kV, 取样锥可设置为30V, 而提取锥可设置为5V。源温度可设置为150℃, 去溶剂化温度可设置为500℃, 锥气体可设置为20l/h, 去溶剂化气体可设置为600l/h, 并且可以在600-5000Da的质量范围内以1s扫描时间以正模式进行采集。可使用碘化钠校准仪器。可以使用MassLynx的MaxEnt1算法对光谱实施反卷积 (deconvolution), 直至收敛。将DAR物质分配至色谱峰后, 可以根据反相色谱的积分峰面积计算DAR。

[0540] 在一个具体实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物, 其中, 所述IgG抗体是糖基化IgG抗体。

[0541] 也就是说, 本文优选根据本发明的肽接头与糖基化IgG抗体缀合。特别优选的是, 根据本发明的肽接头与天然糖基化IgG抗体缀合。天然IgG抗体包含谷氨酰胺残基295 (Q295) 处的单一缀合位点。因此, 本文特别优选的是, 根据本发明的肽接头与天然糖基化抗体的残基Q295缀合。天然IgG抗体的唯一糖基化位点是天冬酰胺残基297 (N297)。

[0542] 因此, 在一个具体的实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物, 其中IgG抗体在CH2结构域的残基N297 (EU编号) 处被糖基化。

[0543] 在一个特别优选的实施方案中, 根据本发明的肽接头与在N297位糖基化的IgG抗体的Q295位缀合。更优选地, 抗体是IgG1抗体。

[0544] 在一个具体实施方案中, 本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物, 其中抗体选自自由以下组成的组: 本妥昔单抗 (抗-CD30)、曲妥珠单抗 (抗-Her2/neu)、吉妥珠单抗 (抗-CD33)、奥英妥珠单抗 (抗-CD22)、阿维鲁单抗 (抗-PD-L1)、塞妥昔单抗 (抗-EGFR)、利妥昔单抗 (抗-CD20)、达雷木单抗 (抗-CD38)、珀妥珠单抗 (抗-HER2)、维多利珠单抗 (抗-整合素 α 4 β 7)、奥瑞利珠单抗 (抗-CD20)、托西利珠单抗 (抗-IL-6-R)、优特吉努单抗 (抗-IL-12/

23)、戈利木单抗(抗-TNF α)、奥比妥珠单抗(抗-CD20)、沙西妥珠单抗(抗-Trop-2)、贝兰妥单抗(抗-BCMA)、泊洛妥珠单抗(抗-CD79b)、恩诺单抗(抗-结合素-4)、Endrecolomab(抗-EpCAM)、吉妥珠单抗(抗-CD33)、朗妥昔单抗(抗-CD19)、Mecbotamab(抗-AXL)、阿迪妥木单抗(抗-EpCAM)、D93(抗-dn-胶原蛋白)、伽妥珠单抗(抗-TA-MUC1)、拉贝妥珠单抗(抗癌胚细胞粘附分子5)、特赛妥单抗(抗-CEACAM5)、尤匹菲妥单抗(抗-NaPi2b)、利法妥珠单抗(抗-NaPi2b)、米妥昔单抗(抗-FR α)、索非妥珠单抗(抗-MUC16)、阿奈妥单抗(抗-间皮素)、替索妥单抗(抗-TF)、Cofituzumab(抗-Trop-2)、普罗妥单抗(抗-CD166)、Ladriatuzumab(抗-LIV-1)、贝兰妥单抗(抗-BCMA)、帕曲妥单抗(抗-ERBB3)、西妥昔单抗(抗-EGFR)、尼莫妥珠单抗(抗-EGFR)、马妥珠单抗(抗-EGFR)、Portuzumab(抗-HER2)、西他土珠单抗(抗-TACSTD1)、西莫白介素单抗(抗-EpCAM)以及Endrecolomab(抗-EpCAM)。

[0545] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中抗体选自由以下组成的组:本妥昔单抗(抗-CD30)、吉妥珠单抗(抗-CD30)、曲妥珠单抗(抗-Her2/neu)、奥英妥珠单抗(抗-CD22)、泊洛妥珠单抗(抗-CD79b)、恩诺单抗(抗-结合素-4)、沙西妥珠单抗(抗-Trop-2)以及贝兰妥单抗(抗-BCMA)。

[0546] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中,所述抗体是泊洛妥珠单抗(抗-CD79b)或曲妥珠单抗(抗-Her2/neu)或恩诺单抗(抗-结合素-4)。

[0547] 在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,其中抗体特异性结合至选自以下的抗原:CD30、Her2/neu、CD33、CD22、PD-L1、EGFR、CD20、CD38、HER2、整合素 $\alpha 4\beta 7$ 、CD20、IL-6-R、IL-12、IL-23、TNF α 、CD20、Trop-2、BCMA、CD79b、结合素-4、EpCAM、CD33、CD19、AXL、dn-胶原蛋白、TA-MUC1、癌胚细胞粘附分子5、CEACAM5、NaPi2b、FR α 、MUC16、间皮素、TF、CD166、LIV-1、ERBB3、EGFR以及TACSTD1,优选地,CD30、Her2/neu、CD22、CD79b、结合素-4、Trop-2以及BCMA,更优选地,CD79b、Her2/neu以及结合素-4。

[0548] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及一种制备抗体-有效载荷缀合物的方法,包括将根据本发明的肽接头缀合至抗体的步骤。

[0549] 也就是说,本文公开的包含两个或更多个有效载荷的任何肽接头可以与抗体缀合。特别地,本文公开的任何含胺的肽接头可以通过转谷氨酰胺酶与抗体的谷氨酰胺残基缀合。如本文别处所公开的,肽接头所缀合的谷氨酰胺残基可以是内源性谷氨酰胺残基(例如IgG抗体的Q295)或可以通过分子工程引入抗体的谷氨酰胺残基。

[0550] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及一种使用转谷氨酰胺酶(TG)将包含两个或更多个有效载荷的肽接头与抗体缀合的方法,所述方法包括:(a)在流体中混合所述抗体、所述肽接头和所述TG,从而在所述TG的催化作用下在一个步骤中将所述接头-有效载荷与所述抗体缀合,以及(b)从所述流体中提取步骤(a)中获得的缀合物。

[0551] 因此,本发明还包括在一步反应中通过转谷氨酰胺酶将包含两个或更多个有效载荷的肽接头与抗体缀合的方法。为此,抗体可以与根据本发明的肽接头和转谷氨酰胺酶在流体中混合。在本发明的含义中,“流体”是液体。优选地,液体是水溶液,甚至更优选缓冲水溶液。

[0552] 通过将包含所述肽接头的溶液与包含抗体的溶液和包含转谷氨酰胺酶的溶液混合,可以将根据本发明的肽接头与抗体和转谷氨酰胺酶混合。可替代地,可以将分别包含肽

接头、抗体和转谷氨酰胺酶的溶液加入水溶液中。特别地,每种组分可以以确定的浓度添加到水溶液中。根据本发明的肽接头在转谷氨酰胺酶的催化作用下与抗体缀合。也就是说,可以在适合肽接头与抗体有效缀合的条件下混合各个组分。这些条件在本文的其他地方有定义。

[0553] 在第二方法步骤中,必须从液体中除去获得的抗体-有效载荷缀合物。技术人员知道从水溶液中分离抗体-有效载荷缀合物的方法。此外,技术人员知道将抗体-有效载荷缀合物与未缀合的抗体或肽接头或不完全缀合的抗体分离的方法。例如,根据本发明的抗体有效载荷缀合物可以通过HPLC从混合物中分离。

[0554] 应当理解,“从流体中提取缀合物”与“从混合物中分离缀合物”同义。也就是说,也可以通过从流体中去除转谷氨酰胺酶和未结合的抗体和肽接头来提取缀合物。

[0555] 在根据本发明的方法中使用的肽接头可以是本文公开的任一种肽接头,特别是落入上文提供的定义内的任何肽接头或实验实施例中显示的任何肽接头。

[0556] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中肽接头是本发明的肽接头。

[0557] 此外,抗体可以是本文其他地方更详细定义的抗体,即根据本发明的抗体-有效载荷缀合物。

[0558] 特别地,肽接头可以包含如SEQ ID NO:1-29或82-93中所示的氨基酸序列。此外,接头可以是图1-40或42-43中所示的接头中的任一种。

[0559] 也就是说,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述肽接头通过所述肽接头的氨基酸残基中包含的伯胺与所述抗体中包含的谷氨酰胺残基缀合。

[0560] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体是抗体片段。

[0561] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体是IgA、IgD、IgE、IgG或IgM抗体。

[0562] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,肽接头与包含在抗体的Fc结构域中的谷氨酰胺残基缀合。

[0563] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,肽接头缀合的谷氨酰胺残基是IgG抗体的C_H2结构域的谷氨酰胺残基Q295(EU编号)。

[0564] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,肽接头缀合的谷氨酰胺残基已经通过分子工程引入到抗体的重链或轻链中。

[0565] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,已经通过分子工程引入到抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺残基是非糖基化IgG抗体的C_H2结构域的N297Q(EU编号)。

[0566] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,已经通过分子工程引入到抗体的重链或轻链中的谷氨酰胺残基包含在肽中,所述肽已经(a)整合到抗体的重链或轻链中,或(b)融合到抗体的重链或轻链的N端或C端。

[0567] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,包含Gln残基的肽已经融合到所述抗体的重链的C端。

[0568] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体是糖基化IgG抗

体。

[0569] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中IgG抗体在C_H2结构域的残基N297(EU编号)处被糖基化。

[0570] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体选自由以下组成的组:本妥昔单抗(抗-CD30)、曲妥珠单抗(抗-Her2/neu)、吉妥珠单抗(抗-CD33)、奥英妥珠单抗(抗-CD22)、阿维鲁单抗(抗-PD-L1)、塞妥昔单抗(抗-EGFR)、利妥昔单抗(抗-CD20)、达雷木单抗(抗-CD38)、珀妥珠单抗(抗-HER2)、维多利珠单抗(抗-整合素 α 4 β 7)、奥瑞利珠单抗(抗-CD20)、托西利珠单抗(抗-IL-6-R)、优特吉努单抗(抗-IL-12/23)、戈利木单抗(抗-TNF α)、奥比妥珠单抗(抗-CD20)、沙西妥珠单抗(抗-Trop-2)、贝兰妥单抗(抗-BCMA)、泊洛妥珠单抗(抗-CD79b)、恩诺单抗(抗-结合素-4)、Endrecolomab(抗-EpCAM)、吉妥珠单抗(抗-CD33)、朗妥昔单抗(抗-CD19)、Mecbotamab(抗-AXL)、阿迪妥木单抗(抗-EpCAM)、D93(抗-dn-胶原蛋白)、伽妥珠单抗(抗-TA-MUC1)、拉贝妥珠单抗(抗癌胚细胞粘附分子5)、特赛妥单抗(抗-CEACAM5)、尤匹菲妥单抗(抗-NaPi2b)、利法妥珠单抗(抗-NaPi2b)、米妥昔单抗(抗-FR α)、索非妥珠单抗(抗-MUC16)、阿奈妥单抗(抗-间皮素)、替索妥单抗(抗-TF)、Cofituzumab(抗-Trop-2)、普罗妥单抗(抗-CD166)、Ladriatuzumab(抗-LIV-1)、贝兰妥单抗(抗-BCMA)、帕曲妥单抗(抗-ERBB3)、西妥昔单抗(抗-EGFR)、尼莫妥珠单抗(抗-EGFR)、马妥珠单抗(抗-EGFR)、Portuzumab(抗-HER2)、西他土珠单抗(抗-TACSTD1)、西莫白介素单抗(抗-EpCAM)以及Endrecolomab(抗-EpCAM)。

[0571] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体选自由以下组成的组:本妥昔单抗(抗-CD30)、吉妥珠单抗(抗-CD30)、曲妥珠单抗(抗-Her2/neu)、奥英妥珠单抗(抗-CD22)、泊洛妥珠单抗(抗-CD79b)、恩诺单抗(抗-结合素-4)、沙西妥珠单抗(抗-Trop-2)以及贝兰妥单抗(抗-BCMA)。

[0572] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中所述抗体是泊洛妥珠单抗(抗-CD79b)或曲妥珠单抗(抗-Her2/neu)或恩诺单抗(抗-结合素-4)。

[0573] 在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体特异性结合至选自以下的抗原:CD30、Her2/neu、CD33、CD22、PD-L1、EGFR、CD20、CD38、HER2、整合素 α 4 β 7、CD20、IL-6-R、IL-12、IL-23、TNF α 、CD20、Trop-2、BCMA、CD79b、结合素-4、EpCAM、CD33、CD19、AXL、dn-胶原蛋白、TA-MUC1、癌胚细胞粘附分子5、CEACAM5、NaPi2b、FR α 、MUC16、间皮素、TF、CD166、LIV-1、ERBB3、EGFR以及TACSTD1,优选地,CD30、Her2/neu、CD22、CD79b、结合素-4、Trop-2以及BCMA,更优选地,CD79b、Her2/neu以及结合素-4。

[0574] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,肽接头缀合至抗体中包含的Gln残基的 γ -羧酰胺基。

[0575] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,肽接头适于以至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的缀合效率缀合至糖基化抗体。

[0576] 也就是说,在某些实施方案中,根据本发明的肽接头可以以至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的效率缀合至糖基化抗体。在一个优选的实施方案中,根据本发明的肽接头可以以至少70%的效率缀合至糖基化抗体。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的肽接头可以以至少75%的效率缀合至糖基化抗体。在另一个

优选的实施方案中,根据本发明的肽接头可以以至少80%的效率缀合至糖基化抗体。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的肽接头可以以至少85%的效率缀合至糖基化抗体。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的肽接头可以以至少90%的效率缀合至糖基化抗体。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的肽接头可以以至少95%的效率缀合至糖基化抗体。优选地,糖基化抗体是糖基化IgG抗体,更优选在残基N297 (EU编号)糖基化的IgG抗体。

[0577] 技术人员知道确定抗体与特异性肽接头的缀合效率的方法。例如,缀合效率可以如本文所述来确定。换言之,抗体,特别是IgG1抗体,可以以1-5mg/mL的浓度与5-20eq摩尔当量的接头和每mg抗体3-6U的微生物转谷氨酰胺酶在合适的缓冲液中于37°C孵育20-48小时,或者如实施例1中所述。在孵育期之后,可以在还原条件下通过LC-MS分析确定缀合效率。微生物转谷氨酰胺酶可以是来自茂原链霉菌 (*Streptomyces mobaraensis*) 的MTG,例如,其可从Zedira (德国) 获得。合适的缓冲液可以是Tris、MOPS、HEPES、PBS或BisTris缓冲液。然而,应当理解,缓冲系统的选择可以改变,并且在很大程度上取决于接头的化学性质。然而,本领域技术人员能够基于本发明的公开内容鉴定最佳缓冲条件。可替代地,缀合效率可以如Spycher等人 (Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase, *ChemBioChem* 2019 18(19): 1923-1927) 所述确定,并如Benjamin等人 (Thiolation of Q295: Site-Specific Conjugation of Hydrophobic Payloads without the Need for Genetic Engineering, *Mol. Pharmaceutics* 2019, 16: 2795-2807) 所述分析。

[0578] 在某些实施方案中,可以通过在旋转热混合器中,在50mM Tris pH 7.6中,将5mg/ml天然糖基化单克隆抗体与浓度为5-10U/mg抗体的微生物转谷氨酰胺酶 (MTG, Zedira) 和5摩尔当量的所示接头-有效载荷在37°C下孵育24小时,来缀合抗体。然而,应当理解,可以根据有效载荷的性质调节条件,特别是缓冲液条件和肽接头浓度。然而,技术人员能够基于本文提供的教导确定最佳反应条件。

[0579] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述转谷氨酰胺酶是微生物转谷氨酰胺酶 (MTG)。

[0580] 用于本发明的方法的转谷氨酰胺酶可以是任何适于将本发明的肽接头与抗体缀合的转谷氨酰胺酶。转谷氨酰胺酶可以是任何来源的,例如,转谷氨酰胺酶可以是细菌来源的、古细菌来源的或真核生物来源的。

[0581] 在某些实施方案中,转谷氨酰胺酶可以是哺乳动物转谷氨酰胺酶,包括人转谷氨酰胺酶。在某些实施方案中,转谷氨酰胺酶可以是微生物转谷氨酰胺酶,包括细菌转谷氨酰胺酶和真菌转谷氨酰胺酶。

[0582] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述微生物转谷氨酰胺酶来自链霉菌属物种,特别是茂原链霉菌。

[0583] 也就是说,本发明的方法中使用的微生物转谷氨酰胺酶可以来源于链霉菌属物种,特别是茂原链霉菌,优选与天然酶具有80%的序列同一性。因此,MTG可以是天然酶或天然酶的工程化变体。

[0584] 一种这样的微生物转谷氨酰胺酶可以从Zedira (德国) 购得。它是在大肠杆菌 (*E. coli.*) 中重组生产的。茂原链霉菌转谷氨酰胺酶具有如SEQ ID NO: 78中公开的氨基酸

序列。具有其它氨基酸序列的茂原链霉菌MTG变体已经被报道并且也包括在本发明中 (SEQ ID NO:79和SEQ ID NO:80)。

[0585] 一种这样的微生物转谷氨酰胺酶也可以是Jin等人(2016, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic)中描述的来自茂原链霉菌的MTG-TX变体,其表现出高耐盐性和宽范围的pH和温度稳定性。

[0586] 在另一个实施方案中,可以使用来自拉达卡链霉菌(*Streptomyces ladakanum*,以前被称为达卡链轮丝菌(*Streptoverticillium ladakanum*))的微生物转谷氨酰胺酶。拉达卡链霉菌转谷氨酰胺酶(美国专利号US 6,660,510 B2)具有SEQ ID NO:81中公开的氨基酸序列。

[0587] 上述两种转谷氨酰胺酶都可以进行序列修饰。在一些实施方案中,可以使用与SEQ ID NO:78-81中任一个具有80%、85%、90%或95%或更高序列同一性的转谷氨酰胺酶。

[0588] 另一种合适的微生物转谷氨酰胺酶可以从Ajinomoto购得,称为ACTIVA TG。与来自Zedira的转谷氨酰胺酶相比,ACTIVA TG缺少4个N端氨基酸,但具有相似的活性。

[0589] 在本发明的上下文中可以使用的其它微生物转谷氨酰胺酶公开于Kieliszek和Misiewicz (*Folia Microbiol (Praha)* .2014;59 (3) :241-250)、WO 2015/191883 A1、WO 2008/102007 A1和US2010/0143970中,它们的内容通过引用完全结合于此。

[0590] 在某些实施方案中,微生物转谷氨酰胺酶的突变变体可以用于接头与抗体的缀合。换言之,用于本发明的方法的微生物转谷氨酰胺酶可以是如SEQ ID NO:78或79中所示的茂原链霉菌转谷氨酰胺酶的变体。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:78中所示的重组茂原链霉菌转谷氨酰胺酶可以包含突变G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:78中所示的重组茂原链霉菌转谷氨酰胺酶可以包含突变G254D和E304D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:78中所示的重组茂原链霉菌转谷氨酰胺酶可以包含突变D8E和G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:78中所示的重组茂原链霉菌转谷氨酰胺酶可以包含突变E124A和G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:78中所示的重组茂原链霉菌转谷氨酰胺酶可以包含突变A216D和G254D。在某些实施方案中,如SEQ ID NO:78中所示的重组茂原链霉菌转谷氨酰胺酶可以包含突变G254D和K331T。

[0591] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述转谷氨酰胺酶以小于200U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。

[0592] 可以将微生物转谷氨酰胺酶以允许抗体与接头有效缀合的任何浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,缀合反应中微生物转谷氨酰胺酶的浓度可以取决于在相同反应中使用的抗体的量。例如,可以将微生物转谷氨酰胺酶以小于200U/mg抗体、150U/mg抗体、100U/mg抗体、90U/mg抗体、80U/mg抗体、70U/mg抗体、60U/mg抗体、50U/mg抗体、40U/mg抗体、30U/mg抗体、20U/mg抗体、10U/mg抗体或6U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。

[0593] 在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以1U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以3U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以5U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以6U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以7.5U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以10U/mg抗体的浓度添加到缀合反应

中。

[0594] 在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以1-100U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以3-50U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。在某些实施方案中,可以将微生物转谷氨酰胺酶以5-25U/mg抗体的浓度添加到缀合反应中。

[0595] 在某些实施方案中,可以以1-20U/mg抗体的浓度,优选以3-15U/mg抗体的浓度,更优选以5-10U/mg抗体的浓度,将微生物转谷氨酰胺酶添加到缀合反应中。

[0596] 优选地,用于本发明方法的转谷氨酰胺酶是微生物转谷氨酰胺酶。然而,要注意的是,可以通过包含非微生物来源的转谷氨酰胺酶活性的酶进行等效的反应。因此,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物也可以用包含非微生物来源的转谷氨酰胺酶活性的酶生成。

[0597] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体以0.1-50mg/mL的浓度添加到缀合反应中。

[0598] 抗体可以以适于获得抗体的有效缀合的任何浓度添加到缀合反应中。然而,优选将抗体以0.1-50mg/mL的浓度范围添加到缀合反应中。也就是说,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中将抗体以0.1-50mg/mL,优选0.25-25mg/mL,更优选0.5-12.5mg/mL,甚至更优选1-10mg/mL,甚至更优选2-7.5mg/mL,最优选约5mg/mL的浓度添加到缀合反应中。

[0599] 可替代地,可以将抗体以1-20mg/mL,优选2.5-20mg/mL,更优选5-20mg/mL,最优选5-17mg/mL的浓度添加到缀合反应中。

[0600] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2-100摩尔当量的肽接头接触。

[0601] 为了获得有效的缀合,优选地,将摩尔过量的接头添加至抗体中。换言之,在某些实施方案中,将抗体与至少2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100摩尔当量的接头混合。

[0602] 也就是说,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,抗体与2-100摩尔当量的接头,优选2-80摩尔当量的接头,更优选2-70摩尔当量的接头,甚至更优选2-60摩尔当量的接头,甚至更优选2-50摩尔当量的接头,甚至更优选2-40摩尔当量的接头,甚至更优选2-30摩尔当量的接头,甚至更优选2-25摩尔当量的接头,甚至更优选2-20摩尔当量的接头,甚至更优选2-15摩尔当量的接头,最优选2-10摩尔当量的接头接触。

[0603] 可替代地,抗体可以与2.5-100摩尔当量的接头,优选2.5-80摩尔当量的接头,更优选2.5-70摩尔当量的接头,甚至更优选2.5-60摩尔当量的接头,甚至更优选2.5-50摩尔当量的接头,甚至更优选2.5-40摩尔当量的接头,甚至更优选2.5-30摩尔当量的接头,甚至更优选2.5-20摩尔当量的接头,甚至更优选2.5-15摩尔当量的接头,甚至更优选2.5-10摩尔当量的接头,最优选2.5-8摩尔当量的接头接触。

[0604] 可替代地,抗体可以与5-100摩尔当量的接头,优选5-80摩尔当量的接头,更优选5-70摩尔当量的接头,甚至更优选5-60摩尔当量的接头,甚至更优选5-50摩尔当量的接头,甚至更优选5-40摩尔当量的接头,甚至更优选5-30摩尔当量的接头,甚至更优选5-20摩尔当量的接头,甚至更优选5-15摩尔当量的接头,最优选5-10摩尔当量的接头接触。

[0605] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述缀合反应在缓冲溶液中进行。

[0606] 优选在5-10范围内的pH处实施根据本发明的方法。因此,在一个优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,接头与抗体的缀合在5至10范围内的pH处实现,优选在6至9范围内的pH处内,更优选在6至8.5范围内的pH处,甚至更优选在6.5至8范围内的pH处,最优选在6.6至7.6范围内的pH处。

[0607] 在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中接头与抗体的缀合于pH 6.6处实现。

[0608] 在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中接头与抗体的缀合于pH 7.6处实现。

[0609] 可以在适于有效载荷与接头缀合的任何缓冲液中实施本发明的方法。适于本发明的方法的缓冲液包括但不限于Tris、MOPS、HEPES、PBS或BisTris缓冲液。缓冲液的浓度取决于抗体和/或接头的浓度,其范围可以是10-1000mM、10-500mM、10-400mM、10mM至250mM、10mM至150mM或10mM至100mM。此外,所述缓冲液可以包含适于实施本发明的方法的任何盐浓度。例如,本发明的方法中使用的缓冲液可以具有 $\leq 250\text{mM}$ 、 $\leq 200\text{mM}$ 、 $\leq 150\text{mM}$ 、 $\leq 140\text{mM}$ 、 $\leq 130\text{mM}$ 、 $\leq 120\text{mM}$ 、 $\leq 110\text{mM}$ 、 $\leq 100\text{mM}$ 、 $\leq 90\text{mM}$ 、 $\leq 80\text{mM}$ 、 $\leq 70\text{mM}$ 、 $\leq 60\text{mM}$ 、 $\leq 50\text{mM}$ 、 $\leq 40\text{mM}$ 、 $\leq 30\text{mM}$ 、 $\leq 20\text{mM}$ 或 $\leq 10\text{mM}$ 的盐浓度,或者不含盐。

[0610] 也就是说,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述缓冲溶液包含:

[0611] a) 在5至10范围内的pH;和/或

[0612] b) 在10mM至1000mM范围内的缓冲液浓度;和/或

[0613] c) 低于250mM的盐浓度。

[0614] 在优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述缓冲溶液包含:

[0615] a) 在6至9范围内的pH;和/或

[0616] b) 在10mM至1000mM范围内的缓冲液浓度;和/或

[0617] c) 低于250mM的盐浓度。

[0618] 在更优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述缓冲溶液包含:

[0619] a) 在6至8范围内的pH;和/或

[0620] b) 在10mM至500mM范围内的缓冲液浓度;和/或

[0621] c) 低于150mM的盐浓度。

[0622] 在甚至更优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中,所述缓冲溶液包含:

[0623] a) 在6至8范围内的pH;和/或

[0624] b) 在10mM至200mM范围内的缓冲液浓度;和/或

[0625] c) 低于50mM的盐浓度。

[0626] 在一个优选的实施方案中,本发明的方法在50mM Tris (pH 7.6) 中进行,优选不含盐。

[0627] 在另一个优选的实施方案中,本发明的方法在50mM BisTris (pH 6.6) 中进行,优选不含盐。

[0628] 在另一个优选的实施方案中,本发明的方法在50mM BisTris (pH 7.5) 中进行,优

选不含盐。

[0629] 应当注意的是,最佳反应条件(如pH、缓冲液、盐浓度)可以因有效载荷的不同而异,并在一定程度上取决于接头和/或有效载荷的物理化学性质。然而,本领域技术人员不需要过度的实验以鉴定适于实施本发明的方法的反应条件。

[0630] 应当理解,本申请包括以上公开的接头、抗体、MTG和/或缓冲液浓度的任何组合。

[0631] 在某些实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2-80摩尔当量的接头接触;和/或其中,所述微生物转谷氨酰胺酶以1-20U/mg抗体范围内的浓度添加到缀合反应中,并且任选地,其中,所述抗体以0.1-20mg/mL范围内的浓度添加到缀合反应中。

[0632] 在一个优选实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2-50摩尔当量的接头接触;和/或其中,所述微生物转谷氨酰胺酶以1-15U/mg抗体范围内的浓度添加到缀合反应中,并且任选地,其中,所述抗体以1-20mg/mL范围内的浓度添加到缀合反应中。

[0633] 在更优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2-30摩尔当量的接头接触;和/或其中,所述微生物转谷氨酰胺酶以2-15U/mg抗体范围内的浓度添加到缀合反应中,并且任选地,其中,所述抗体以2.5-20mg/mL范围内的浓度添加到缀合反应中。

[0634] 在甚至更优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2-20摩尔当量的接头接触;和/或其中,所述微生物转谷氨酰胺酶以5-15U/mg抗体范围内的浓度添加到缀合反应中,并且任选地,其中,所述抗体以2.5-20mg/mL范围内的浓度添加到缀合反应中。

[0635] 在甚至更优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2-15摩尔当量的接头接触;和/或其中,所述微生物转谷氨酰胺酶以5-15U/mg抗体范围内的浓度添加到缀合反应中,并且任选地,其中,所述抗体以5-20mg/mL范围内的浓度添加到缀合反应中。

[0636] 在最优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2.5-12.5摩尔当量的接头接触;和/或其中,所述微生物转谷氨酰胺酶以5-15U/mg抗体范围内的浓度添加到缀合反应中,并且任选地,其中,所述抗体以5-20mg/mL范围内的浓度添加到缀合反应中。

[0637] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及根据本发明的方法,其中抗体与2-20摩尔当量的接头接触;和/或其中,所述微生物转谷氨酰胺酶以5-15U/mg抗体范围内的浓度添加到缀合反应中,并且任选地,其中,所述抗体以2.5-20mg/mL范围内的浓度添加到缀合反应中。

[0638] 应当注意,上面公开的特定反应混合物可以与本文公开的任何缓冲条件自由组合。然而,优选的是,如上定义的特定组分在6-8范围内的pH处混合。

[0639] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及用根据本发明的方法产生的抗体-有效载荷缀合物。

[0640] 也就是说,本发明进一步涉及用任何前述方法步骤产生的抗体-接头缀合物。

[0641] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及包含根据本发明的抗体-有效载荷缀合物和至少一种药学上可接受的成分的药物组合物。

[0642] 也就是说,本发明进一步涉及包含根据本发明的抗体-有效载荷缀合物的药物组合物。

[0643] 如本文所使用的术语“药物组合物”是指包含化学物质或活性成分的任何组合物，该组合物旨在用于疾病的医学治愈、治疗或预防，并且是以允许活性成分有效的形式。特别地，药物组合物不含对施用该组合物的受试者具有不可接受毒性的赋形剂。药物组合物是灭菌的，即无菌的并且不含任何活的微生物及其孢子。本发明的药物组合物优选为液体。

[0644] 药物组合物中包含的抗体-有效载荷构建体中包含的有效载荷类型取决于药物组合物的预期用途。在药物组合物用于治疗疾病的实施方案中，有效载荷优选为药物。如果疾病是肿瘤性疾病，那么有效载荷优选是毒素。在药物组合物用于诊断的实施方案中，有效载荷优选为成像剂。

[0645] 根据本发明的药物组合物可以包含本文公开的抗体-药物缀合物。包含抗体-药物缀合物的药物组合物优选用于治疗疾病。

[0646] 根据本发明的药物组合物可以包含至少一种药学上可接受的成分。

[0647] 药学上可接受的成分是指药物制剂中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的成分包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0648] 通过将具有所需纯度的此类缀合物与一种或多种任选的药学上可接受的成分 (Flemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)) 混合来制备本文所描述的抗体-有效载荷缀合物的药物制剂，以冻干制剂或水溶液的形式。在所采用的剂量和浓度下，药学上可接受的成分对于接受者通常是无毒的，并且包括但不限于：缓冲剂，如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（如十八烷基二甲基苄基氯化铵；氯化六甲双铵；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；对羟苯甲酸烷基酯类，如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（小于约10个残基）多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如EDTA；糖类，如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐反离子 (salt-forming counter-ion)，如钠；金属络合物（例如锌蛋白络合物）；和/或非离子表面活性剂，如聚乙二醇 (PEG)。本文的示例性药学上可接受的成分还包括间隙的药物分散剂，如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白 (sHASEGP)，例如，人类可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白，如rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性的sHASEGP（包括rHuPH20）和使用方法。例如，sHASEGP可以与一种或多种其它糖胺聚糖酶 (glycosaminoglycanase)（如软骨素酶）组合。

[0649] 在一个具体的实施方案中，本发明涉及根据本发明的药物组合物，其包含至少一种额外的治疗活性剂。

[0650] 也就是说，包含抗体-有效载荷缀合物的药物组合物可以包含一种或多种额外的治疗活性剂。应当理解，抗体-有效载荷缀合物可用于各种治疗领域。因此，药物组合物中的额外的治疗活性剂可以根据药物组合物的用途而改变。

[0651] 在某些实施方案中，包含根据本发明的抗体-有效载荷缀合物的药物组合物可用于治疗癌症。在此类实施方案中，药物组合物可以包含一种或多种另外的抗癌药物。本文使用的术语“抗癌”药物是指常规用于治疗癌症的一种药物或多种药物的组合。

[0652] 例如，包含根据本发明的抗体-有效载荷缀合物的药物组合物可以进一步包含一

种或多种化疗剂。如本文所使用的,术语“化疗剂”或“化学治疗剂”或“化疗性药物”是指这样的试剂:其减少、预防、减轻、限制和/或延迟转移瘤或肿瘤的生长,或通过肿瘤的坏死或凋亡或任何其它机制直接杀死肿瘤细胞,或以药物有效量用于减少、预防、减轻、限制和/或延迟肿瘤性疾病受试者的转移瘤或肿瘤生长。化疗剂包括,例如,氟嘧啶;嘧啶核苷;嘌呤核苷;抗叶酸剂、铂剂;蒽环霉素/蒽二酮类;表鬼臼毒素;喜树碱;激素;激素复合物;抗激素;酶、蛋白质、肽和多克隆抗体和/或单克隆抗体;长春花生物碱;紫杉烷类;埃博霉素;抗微管剂;烷基化剂;抗代谢物;拓扑异构酶抑制剂;抗病毒药物;和各种其他细胞毒性剂和细胞生长抑制剂。

[0653] 在一个具体实施方案中,本发明涉及用于治疗 and/或诊断的根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,或根据本发明的药物组合物。

[0654] 也就是说,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物可用于治疗受试者或诊断受试者的疾病或病症。个体或受试者优选是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养的动物(例如,牛、羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人类和非人灵长类动物,例如猕猴)、兔子和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者是人类。当在治疗中使用根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或包含抗体-有效载荷缀合物的药物组合物时,优选地有效载荷是药物。当在诊断学中使用根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或包含抗体-有效载荷缀合物的药物组合物时,优选地接头包含至少一种成像剂作为有效载荷。

[0655] 在一个具体实施方案中,本发明涉及用于治疗患者的根据本发明的抗体-有效载荷缀合物,或根据本发明的药物组合物,所述患者

[0656] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[0657] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中,和/或

[0658] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[0659] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及用于治疗患有肿瘤性疾病的患者的根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或根据本发明的药物组合物。

[0660] 患有癌症的患者可以是先前未用任何抗癌疗法治疗的患者。然而,患有癌症的患者也可能是对先前的抗癌治疗难以治愈的患者。

[0661] 如本文所使用的术语“肿瘤性疾病”是指以细胞不受控制的异常生长为特征的病症。肿瘤性疾病包括癌症。癌症的示例包括但不限于,恶性上皮肿瘤(carcinoma)、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体的示例包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃肠道癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝细胞瘤(hepatoma)、结肠直肠癌、宫颈癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、肝脏癌(hepatic carcinoma)、皮肤癌、黑色素瘤、脑癌、卵巢癌、神经母细胞瘤、骨髓瘤、各类头颈部肿瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)以及外周神经上皮瘤。优选的癌症包括肝癌、淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、尤文氏肉瘤和外周神经上皮瘤。

[0662] 也就是说,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物优选用于治疗癌症。因此,在某些实施方案中,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物包含特异性结合至肿瘤细胞上存在的抗

原的抗体。在某些实施方案中,抗原可以是肿瘤细胞表面上的抗原。在某些实施方案中,在抗体-有效载荷缀合物与抗原结合后,肿瘤细胞表面上的抗原可以与抗体-有效载荷缀合物一起被内在化到细胞中。

[0663] 如果根据本发明的抗体-有效载荷缀合物用于治疗癌症,优选地抗体-有效载荷缀合物包含至少一种有效载荷,其具有杀死或抑制抗体-有效载荷缀合物结合的肿瘤细胞的增殖的潜力。在某些实施方案中,在抗体-有效载荷缀合物已经内化到肿瘤细胞中之后,至少一种有效载荷显示出其细胞毒性活性。在某些实施方案中,所述至少一个有效载荷是毒素。

[0664] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及用于治疗患有自身免疫性疾病的患者的根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或根据本发明的药物组合物。

[0665] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及用于治疗患有细菌感染或病毒感染的患者的根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或根据本发明的药物组合物。

[0666] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物和/或药物组合物可用于治疗B细胞相关的癌症。

[0667] 因此,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含泊洛妥珠单抗,并且其中,所述肿瘤性疾病为B细胞相关的癌症。

[0668] 为此,优选地抗体-有效载荷缀合物包含本文公开的抗CD79b抗体,优选地其中,抗CD79b抗体在与CD79b结合后被内化到靶细胞中。在某些实施方案中,抗CD79b抗体是泊洛妥珠单抗,其重链如SEQ ID NO:71所示,并且其轻链如SEQ ID NO:72所示。此外,优选地,抗体-有效载荷缀合物包含至少一种毒素。

[0669] 在某些实施方案中,包含在抗体-有效载荷缀合物或药物组合物中的抗CD79b抗体可以与图1-40所示的任一种接头或本文公开的任一种接头缀合。

[0670] B细胞相关的癌症可以是选自以下的任一种:高、中、低度淋巴瘤(包括B细胞淋巴瘤,例如粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和T细胞淋巴瘤)和白血病(包括继发性白血病、慢性淋巴细胞白血病(CLL),如B细胞白血病(CD5+B淋巴细胞)、髓性白血病,如急性髓性白血病、慢性髓性白血病、淋巴细胞性白血病(如急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和脊髓发育不良),以及其他血液和/或B细胞或T细胞相关的癌症,包括其他造血细胞的癌症,包括多形核白细胞,如嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和单核细胞、树突细胞、血小板、红细胞和自然杀伤细胞。还包括选自以下的癌性B细胞增殖性疾病:淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、侵袭性NHL、复发性侵袭性NHL、复发性惰性NHL、难治性NHL、难治性惰性NHL、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

[0671] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,B细胞相关的癌症是非霍奇金淋巴瘤,特别是其中,B细胞相关的癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤。

[0672] 此外,抗CD79b抗体-有效载荷缀合物和/或包含抗CD79b抗体-有效载荷缀合物的药物组合物可与适用于治疗B细胞相关的癌症的其他疗法联合使用。

[0673] 因此,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物与苯达莫司汀和/或利妥昔单抗联合施用。

[0674] 应当理解,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物不一定必须与另外的治疗剂(如苯达莫司汀和/或利妥昔单抗)同时施用。相反,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物可以以不同的施用方案施用,并因此在不同的日期作为用于治疗相同疾病的其他治疗剂施用。

[0675] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物和/或药物组合物可用于治疗HER2阳性癌症。

[0676] 也就是说,在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,抗体-有效载荷缀合物包含曲妥珠单抗,并且其中,肿瘤性疾病是HER2阳性癌症,特别是HER2阳性乳腺癌、胃癌、卵巢癌或肺癌。

[0677] 为此,优选抗体-有效载荷缀合物包含本文公开的抗HER2/neu抗体,优选地其中,抗HER2/neu抗体在与HER2/neu结合后被内化到靶细胞中。在某些实施方案中,抗HER2/neu抗体是曲妥珠单抗,其重链如SEQ ID NO:73所示,并且其轻链如SEQ ID NO:74所示。此外,优选地,抗体-有效载荷缀合物包含至少一种毒素。

[0678] 在某些实施方案中,包含在抗体-有效载荷缀合物或药物组合物中的抗HER2/neu抗体可以与图1-40所示的任一种接头或本文公开的任一种接头缀合。

[0679] 如本文所使用的,HER2阳性癌症可以是但不限于HER2阳性乳腺癌、胃癌、卵巢癌或肺癌。技术人员能够确定癌症是否是HER2阳性癌症。例如,可以在活组织检查中分离肿瘤细胞,并且可以用本领域已知的任何方法确定HER2/neu的存在。

[0680] 此外,抗HER2/neu抗体-有效载荷缀合物和/或包含抗HER2/neu抗体-有效载荷缀合物的药物组合物可与适用于治疗HER2阳性癌症的其他疗法联合使用。

[0681] 因此,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物与拉帕替尼、卡培他滨和/或紫杉烷联合施用。

[0682] 应当理解,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物不一定必须与另外的治疗剂(如拉帕替尼、卡培他滨和/或紫杉烷)同时施用。相反,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物可以以不同的施用方案施用,并因此在不同的日期作为用于治疗相同疾病的其他治疗剂施用。

[0683] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物和/或药物组合物可用于治疗结合素-4阳性癌症。

[0684] 也就是说,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物。其中,所述抗体-有效载荷缀合物包含恩诺单抗或恩诺单抗变体,并且其中,所述肿瘤性疾病为结合素-4阳性癌症,特别是结合素-4阳性胰腺癌、肺癌、膀胱癌或乳腺癌。

[0685] 为此,优选地抗体-有效载荷缀合物包含本文公开的抗结合素-4抗体,优选地其中,抗结合素-4抗体在与结合素-4结合后被内化到靶细胞中。在某些实施方案中,抗结合素-4抗体是恩诺单抗,其重链如SEQ ID NO:75所示,并且其轻链如SEQ ID NO:76或77所示。此外,优选地,抗体-有效载荷缀合物包含至少一种毒素。

[0686] 在某些实施方案中,包含在抗体-有效载荷缀合物或药物组合物中的抗结合素-4

抗体可以与图1-40所示的任一种接头或本文公开的任一种接头缀合。

[0687] 如本文所使用的,结合素-4阳性癌症可以是但不限于结合素-4阳性胰腺癌、肺癌、膀胱癌或乳腺癌。技术人员能够确定癌症是否是结合素-4阳性癌症。例如,可以在活组织检查中分离肿瘤细胞,并且可以用本领域已知的任何方法确定结合素-4的存在。

[0688] 根据本发明的抗结合素-4抗体-有效载荷缀合物和/或包含抗结合素-4抗体-有效载荷缀合物的药物组合物可以在手术前或手术后单独施用于先前接受了PD-1或PD-L1抑制剂与基于铂的化疗剂组合的患者。

[0689] 此外,抗结合素-4抗体-有效载荷缀合物和/或包含抗结合素-4抗体-有效载荷缀合物的药物组合物可与适用于治疗结合素-4阳性癌症的其他疗法联合使用。

[0690] 因此,在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明使用的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,其中,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物与基于铂的化疗剂和/或派姆单抗联合施用。

[0691] 应当理解,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物不一定必须与另外的治疗剂(如基于顺铂的化疗剂和/或派姆单抗)同时施用。相反,抗体-有效载荷缀合物或药物组合物可以以不同的方案施用,并因此在不同的日期作为用于治疗相同疾病的其他治疗剂施用。

[0692] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或根据本发明的药物组合物在制备用于治疗患者的药物中的用途,所述患者

[0693] • 患有肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病,

[0694] • 处于发展肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病的风险中,和/或

[0695] • 被诊断出肿瘤性疾病、神经性疾病、自身免疫性疾病、炎症性疾病或传染性疾病。

[0696] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及一种治疗或预防肿瘤性疾病的方法,所述方法包括:向有需要的患者施用根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或根据本发明的药物组合物。

[0697] 在特定实施方案中,本发明涉及根据本发明所述的抗体-有效载荷缀合物或根据本发明所述的药物组合物用于手术前、手术中或手术后成像。

[0698] 换言之,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物可以用于医学成像。为此,抗体-有效载荷缀合物可以在结合特定靶分子、细胞或组织时被可视化。本领域已知不同的技术来可视化特定的有效载荷。例如,如果有效载荷是放射性核素,则可以通过PET或SPECT可视化抗体-有效载荷缀合物结合的分子、细胞或组织。如果有效载荷是荧光染料,则可以通过荧光成像可视化抗体-有效载荷缀合物结合的分子、细胞或组织。在某些实施方案中,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物包括两种不同的有效载荷,例如,放射性核素和荧光染料。在这种情况下,抗体-有效载荷缀合物结合的分子、细胞或组织可以使用两种不同的和/或互补的成像技术来可视化,例如PET/SPECT和荧光成像。

[0699] 抗体-有效载荷缀合物可以用于手术前、手术中和/或手术后成像。

[0700] 手术前成像包括可在手术前实施的所有成像技术,以在诊断某种疾病或病症时使用特定靶分子、细胞或组织可见,并且任选地为手术提供指导。手术前成像可以包括在通过使用抗体-接头缀合物实施手术之前通过PET或SPECT使肿瘤可见的步骤,该抗体-接头缀合物

包含特异性结合至肿瘤上抗原并缀合至包含放射性核素的有效载荷的抗体。

[0701] 手术中成像包括可在手术过程中实施的所有成像技术,以使特定靶分子、细胞或组织可见,并且因此为外科医生提供指导。在某些实施方案中,包含近红外荧光染料的抗体-接头缀合物可以用于在手术过程中通过近红外荧光成像使肿瘤可视化。手术中成像允许外科医生在手术过程中鉴定特定组织,例如肿瘤组织,并因此可以允许完全去除肿瘤组织。

[0702] 手术后成像包括可在手术之后实施的所有成像技术,以使特定靶分子、细胞或组织可见,并评估手术的结果。手术后成像可以如手术前手术类似地实施。

[0703] 特别地,本发明涉及包含两个或更多个不同有效载荷的抗体-有效载荷缀合物。例如,该抗体-接头缀合物可以包含放射性核素和近红外荧光染料。这种抗体-有效载荷缀合物可用于通过PET/SPECT成像和近红外荧光成像。这种抗体的优点是,它可用于通过PET或SPECT在手术前后可视化靶组织,例如肿瘤。同时,肿瘤可以在手术过程中通过近红外荧光成像来可视化。

[0704] 在一个具体实施方案中,本发明涉及根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物,特别是其中,抗体-有效载荷缀合物包含两种有效载荷,用于术中成像引导的癌症手术。

[0705] 如上所述,本发明的抗体-有效载荷缀合物可用于可视化靶分子、细胞或组织,并在手术过程中指导外科医生或机器人。也就是说,抗体-有效载荷缀合物可用于在手术过程中可视化肿瘤组织,例如通过近红外成像,并允许完全去除肿瘤组织。

[0706] 根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物可以以有效治疗疾病或足以用于诊断目的的量或剂量施用于人类或动物受试者。

[0707] 根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物可以通过任何合适的方式施用,包括肠胃外施用、肺内施用和鼻内施用,并且如果需要进行局部治疗,可以通过病灶内施用、子宫内施用或膀胱内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径,例如通过注射,如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文设想了各种给药方案,包括但不限于在不同时间点的单次或多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0708] 根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物可以以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在本文中要考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床病症、病症的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用时间安排、以及医学从业者已知的其他因素。根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物不是必须的,而是任选地与一种或多种目前正在考虑用于预防或治疗所述病症的药剂一起配制。这种其它药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体-有效载荷缀合物的量、病症或治疗的类型以及上述其它因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用途径使用,或本文所述剂量的约1%至99%,或以根据经验/临床确定合适的任何剂量和任何途径使用。

[0709] 为了预防或治疗疾病,根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物的合适剂量(当单独使用或与一种或多种其它额外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体-有效载荷缀合物的类型、疾病的严重性和病程、抗体-接头缀合物是为了预防还是治疗目的而施用、既往治疗、患者的临床病史和对抗体-接头缀合物的反应,以及主治医

生的判断。以一次或通过一系列治疗合适地向患者施用根据本发明的抗体-有效载荷缀合物或药物组合物。

附图说明

- [0710] 图1:接头Ac-RKAA-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0711] 图2:接头Ac-RKAA-PABC-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0712] 图3:接头MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE的化学结构。
- [0713] 图4:接头Ac-RKAA-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0714] 图5:接头Ac-ARK-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0715] 图6:接头Ac-RKARA-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0716] 图7:接头Ac-RKAAAA-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0717] 图8:接头Ac-RKAAAAA-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0718] 图9:接头Ac-RKAASGSG-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0719] 图10:接头Ac-RKHA-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0720] 图11:接头Ac-RKHAAA-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0721] 图12:接头Ac-HKA-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0722] 图13:接头Ac-RKAA-PABC-(G-Exa)₂的化学结构。
- [0723] 图14:接头Exa-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-Exa的化学结构。
- [0724] 图15:接头GGR-PABC-(Exa)₂的化学结构。
- [0725] 图16:接头GGRG-PABC-(G-Exa)₂的化学结构。
- [0726] 图17:接头Ac-RKAA-PABC-(G-Exa')₂的化学结构。
- [0727] 图18:接头GGRG-PABC-(G-Exa')₂的化学结构。
- [0728] 图19:接头Ac-E(A-PABC-MMAE)ARKAA-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0729] 图20:接头(MMAE)₂-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0730] 图21:接头Exa-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0731] 图22:接头May-C5-RKAE(A-PABC-MMAE)A-EDA-皮质醇的化学结构。
- [0732] 图23:接头RhKAA-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0733] 图24:接头NH₂-C5-GRG-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0734] 图25:接头RKVCit-PABC-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0735] 图26:接头Exa-PABC-RA-C3-RKAR-PABC-MMAE的化学结构。
- [0736] 图27:接头念珠藻素-AA-C2-RKVA-念珠藻素的化学结构。
- [0737] 图28:接头KAR-PABC-EDA-BHMC-(MMAF)₂的化学结构。
- [0738] 图29:接头RK-E(PEG12-FA)AA-PABC-MMAE的化学结构。
- [0739] 图30:接头E(AA-AM-Dxd)RKAA-AM-Dxd的化学结构。
- [0740] 图31:接头cRGD-PEG4-RKAH-PABC-EDA-PNU的化学结构。
- [0741] 图32:接头生物素-RKAN-PABQ-Rifalog的化学结构。
- [0742] 图33:接头May-RKGGFG-PABC-AMP-AE的化学结构。
- [0743] 图34:接头瑞喹莫德-CitV-C2-RKGP-STING的化学结构。
- [0744] 图35:接头C(May)-RKAA-AM-May的化学结构。

- [0745] 图36:接头K(SMCC-May)-RCAA-(ValCit-PABC-MMAE)₂的化学结构。
- [0746] 图37:接头S(Glyco)-RCAA-(AA-PABC-MMAE)₂的化学结构。
- [0747] 图38:接头Exa-gluc-C3-RK-C3-gluc-Exa的化学结构。
- [0748] 图39:接头D(AA-AM-Dxd)-D(AA-AM-Dxd)-RCAA-AM-Dxd的化学结构。
- [0749] 图40:接头(E(AA-PABC-G-Dxd))₂RKVCit-PABC-PABC-(G-Dxd)₂的化学结构。
- [0750] 图41:接头NH₂-PEG2-PABC-(MMAE)₂的化学结构。
- [0751] 图42:接头MMAE-PABC-AA-C2-KAR-PABC-MMAE的化学结构。
- [0752] 图43:接头RKN(PABC-MMAE)A-PABC-MMAE的化学结构。
- [0753] 图44:在结合素-4阳性实体肿瘤模型中,本发明的两种DAR4接头与基准抗体维汀-恩诺单抗的抗肿瘤功效比较。
- [0754] 图45:本发明的两种DAR4接头在CD79b阳性液体肿瘤模型中的抗肿瘤功效。

实施例

[0755] 一般方法

[0756] 抗体曲妥珠单抗是市售的(赫赛汀[®],Roche,购自药店),以及所有的肽-接头和接头-有效载荷(分别由LifeTein和Levena Biopharma定制合成)。将编码具有由SEQ ID NO:71和72的序列组成的重链和轻链的泊洛妥珠单抗以及具有由SEQ ID NO:75和76的序列组成的重链和轻链的恩诺单抗的DNA构建体瞬时转染到悬浮适应的CHO-K1细胞中,并在不含血清/不含动物组分的培养基中表达。通过蛋白A亲和层析法(Mab Select Sure柱;GE Healthcare)从上清液中纯化蛋白质。

[0757] 通过在37°C在旋转热混合器中,将5mg/ml天然糖基化单克隆抗体、浓度为5-10U/mg的微生物转谷氨酰胺酶(MTG,Zedira)和5-20摩尔当量的所示接头-有效载荷在Tris 50mM(pH 7.6)或BisTris(pH 6.0-6.8)中混合24小时来进行缀合反应。在DTT还原条件下,通过LC-MS或RPLC评估缀合效率。通过将样本在37°C在50mM DTT(最终)和50mM Tris缓冲液中孵育15分钟来实现样本的还原。

[0758] LCMS:还原后,样本在Xevo G2-XS QTOF(Waters)(连接至Acquity UPLC H-Class系统(Waters)和ACQUITY UPLC BEH C18柱)上进行分析。从反卷积的光谱计算缀合效率(CE),并以%表示。根据以下公式,计算中考虑了由两种糖型(G1F和G0F)产生的强度:

$$[0759] \quad CE \% = \frac{\sum(\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{c_j}}{\sum(\text{Int}(\text{G0F} + \text{G1F}))_{c_j,nc_j}}$$

[0760] 其中,c_j=缀合的,nc_j=非缀合的

[0761] RPLC:还原后,使用BioResolve RP mAb聚苯柱在UHPLC Dionex Ultimate 3000(Thermo Fisher)上分析样本。根据公式使用从RPLC色谱图提取的相对峰面积计算缀合效率(CE),并以%表示:

$$[0762] \quad CE \% = \frac{\sum(\text{Int}(\text{相对峰面积}))_{c_j}}{\sum(\text{Int}(\text{相对峰面积}))_{c_j,nc_j}}$$

[0763] 其中,c_j=缀合的,nc_j=非缀合的实施例1:用于制备曲妥珠单抗DAR 4ADC的各种MMAE接头-有效载荷构建体的缀合

[0764] 方法

[0765] 反应条件:5mg/ml天然的、购自药店的、完全糖基化的曲妥珠单抗抗体(购自药店的赫赛汀(Herceptin)[®])、浓度为5U/mg的MTG和5摩尔当量的所示接头-有效载荷,在Tris 50mM pH 7.6中,在旋转热混合器中于37°C持续24小时。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0766] 结果

[0767] 令人惊讶的是,对于DAR 4ADC的制备,使用根据本发明的各种MMAE-接头-有效载荷构建体(表1)与天然的完全糖基化的曲妥珠单抗获得了优异的缀合效率。

[0768] 表1.使用各种MMAE接头-有效载荷构建体制备曲妥珠单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

	用于制备 DAR 4 ADC 的具有 MMAE 的接头-有效载荷	与曲妥珠单抗的缀合效率(%)
[0769]	RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 1)	90%
	RKAA-PABC-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 2)	90%
	MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:1; 图 3)	95%

[0770] 实施例2:用于制备DAR 4ADC的各种MMAE接头-有效载荷构建体与两种其他不同抗体的缀合

[0771] 为了证明本发明的多功能性,使用两种不同的亲本抗体,将各种MMAE接头-有效载荷用于产生DAR 4MMAE ADC:泊洛妥珠单抗和恩诺单抗。

[0772] 方法

[0773] 在37°C在旋转热混合器中在Tris 50mM (pH 7.6)中,通过将5mg/ml所示天然糖基化抗体、6-7.5U/mg浓度的MTG和5摩尔当量的所示接头-有效载荷混合24小时来实施缀合反应。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0774] 结果

[0775] 令人惊讶的是,使用根据本发明的各种MMAE-接头-有效载荷构建体分别与天然的、完全糖基化的泊洛妥珠单抗(表2a)和恩诺单抗(表2b)抗体缀合以制备DAR 4ADC,获得了优异的缀合效率。

[0776] 表2a.使用各种MMAE接头-有效载荷构建体制备泊洛妥珠单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

	用于制备 DAR 4 泊洛妥珠单抗 ADC 的具有 MMAE 的接头-有效载荷	与泊洛妥珠单抗的缀合效率(%)
[0777]	RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 1)	91%
	RKAA-PABC-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 2)	89%
	MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:1; 图 3)	96%

[0778] 表2b.使用各种MMAE接头-有效载荷构建体制备恩诺单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

[0779]	用于制备 DAR4 恩诺单抗 ADC 的具有 MMAE 的接头-有效载荷	与恩诺单抗的缀合效率(%)
	RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 1)	90%
[0780]	RKAA-PABC-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 2)	92%
	MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:1; 图 3)	96%

[0781] 实施例3:用于制备曲妥珠单抗DAR 4ADC的各种依喜替康接头-有效载荷构建体的缀合

[0782] 为了证明本发明的广泛适用性,设计并评估了具有依喜替康(拓扑异构酶I抑制剂)的接头-有效载荷,用于制备曲妥珠单抗DAR 4依喜替康ADC。

[0783] 方法

[0784] 反应条件:5mg/ml天然糖基化的曲妥珠单抗抗体,浓度为10U/mg的MTG和7.5-12.5摩尔当量的所示接头-有效载荷,在BisTris(pH 6.6)中,于37°C在旋转热混合器中24小时。如上所述通过LCMS或RPLC评估缀合效率。

[0785] 结果

[0786] 令人惊讶的是,对于DAR 4ADC的制备,使用根据本发明的各种依喜替康接头-有效载荷构建体(表3)与天然的完全糖基化的曲妥珠单抗获得了优异的缀合效率。

[0787] 表3.使用各种依喜替康接头-有效载荷构建体制备曲妥珠单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

	用于制备 DAR4 ADC 的具有依喜替康的接头-有效载荷	与曲妥珠单抗的缀合效率 (%)
	RKAA-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 4)	92%
	ARK-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:2; 图 5)	91%
	RKARA-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:3; 图 6)	90%
	RKAAAA-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:4; 图 7)	99%
	RKAAAAAA PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:5; 图 8)	95%
[0788]	RKAASGSG-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:6; 图 9)	92%
	RKHA-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:7; 图 10)	94%
	RKHAAA-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:8; 图 11)	98%
	HKA-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:13; 图 12)	80%
	RKAA PABC-(G-Exa) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 13)	91%
	Exa-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-Exa (SEQ ID NO:1; 图 14)	88%
	GGR-PABC-(Exa) ₂ (SEQ ID NO:9; 图 15)	98%
	GGRG-PABC-(G-Exa) ₂ (SEQ ID NO:10; 图 16)	99%

[0789] 实施例4:用于制备DAR 4ADC的各种依喜替康类似物接头-有效载荷构建体与曲妥珠单抗的缀合

[0790] 为了证明反应的高耐受性,使用Li等人(2019年,化合物10)中描述的依喜替康类

似物评估了用于制备DAR 4ADC的接头-有效载荷构建体。在实施例4和实施例5的区域中,该类似物被称为依喜替康' (或Exa')。

[0791] 方法

[0792] 反应条件:5mg/ml天然糖基化的曲妥珠单抗抗体,浓度为10U/mg的MTG和7.5摩尔当量的所示接头-有效载荷,在BisTris (pH 6.6) 中,于37°C在旋转热混合器中24小时。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0793] 结果

[0794] 令人惊讶的是,对于DAR 4ADC的制备,使用根据本发明的各种依喜替康' 接头-有效载荷构建体(表4)与天然的完全糖基化的曲妥珠单抗获得了优异的缀合效率。

[0795] 表4.使用各种依喜替康' 接头-有效载荷构建体制备曲妥珠单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

[0796]	用于制备 DAR4 ADC 的具有依喜替康类似物的接头-有效载荷	与曲妥珠单抗的缀合效率(%)
	RKAA-PABC-(G-Exa') ₂ (SEQ ID NO:1; 图 17)	99%
	GGRG-PABC-(G-Exa') ₂ (SEQ ID NO:10; 图 18)	99%

[0797] 实施例5:用于制备DAR 4ADC的各种依喜替康(或依喜替康类似物)接头-有效载荷构建体与两种其他不同抗体的缀合

[0798] 为了证明反应的通用性,将各种依喜替康(Exa)或依喜替康类似物(Exa')接头-有效载荷构建体与另外两种抗体缀合:泊洛妥珠单抗和恩诺单抗,以产生泊洛妥珠单抗DAR 4Exa或泊洛妥珠单抗DAR 4Exa'和恩诺单抗DAR 4Exa或恩诺单抗DAR 4Exa'ADC。

[0799] 方法

[0800] 在37°C在旋转热混合器中在Tris 50mM (pH 7.6) 中,通过将5mg/ml所示天然糖基化抗体、7.5U/mg浓度的MTG和10摩尔当量的所示接头-有效载荷混合24小时来实施缀合反应。如上所述通过RPLC评估缀合效率。

[0801] 结果

[0802] 令人惊讶的是,使用根据本发明的各种依喜替康(或类似物)接头-有效载荷构建体分别与天然的、完全糖基化的泊洛妥珠单抗(表5a)和恩诺单抗(表5b)抗体缀合来制备DAR 4ADC,获得了优异的缀合效率。

[0803] 表5a.使用各种依喜替康(Exa)或依喜替康类似物(Exa')接头-有效载荷构建体生成泊洛妥珠单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

[0804]	用于制备泊洛妥珠单抗 DAR4 ADC 的具有依喜替康(或类似物)的接头-有效载荷	与泊洛妥珠单抗的缀合效率(%)
	RKAA-PABC-(G-Exa) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 13)	95%
	RKAA-PABC-(G-Exa') ₂ (SEQ ID NO:1; 图 17)	100%
[0805]	GGRG-PABC-(G-Exa) ₂ (SEQ ID NO:10; 图 16)	98%
	GGRG-PABC-(G-Exa') ₂ (SEQ ID NO:10; 图 18)	100%

[0806] 表5b.使用各种依喜替康(Exa)或依喜替康类似物(Exa')接头-有效载荷构建体生

成恩诺单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

	用于制备恩诺单抗 DAR4 ADC 的具有依喜替康(或类似物)的接头-有效载荷	与恩诺单抗的缀合效率 (%)
[0807]	RKAA-PABC-(G-Exa) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 13)	95%
	RKAA-PABC-(G-Exa') ₂ (SEQ ID NO:1; 图 17)	98%
	GGRG-PABC-(G-Exa) ₂ (SEQ ID NO:10; 图 16)	100%
	GGRG-PABC-(G-Exa') ₂ (SEQ ID NO:10; 图 18)	100%

[0808] 实施例6:用于制备曲妥珠单抗DAR 6或DAR 8ADC的各种MMAE接头-有效载荷构建体的缀合

[0809] 为了证明本发明的广泛适用性,我们的目标是生成DAR>4的ADC。为此,设计并评估了各种MMAE接头-有效载荷构建体,以生成DAR 6或DAR 8ADC。

[0810] 方法

[0811] 反应条件:5mg/ml天然糖基化的曲妥珠单抗抗体,浓度为8U/mg的MTG和5摩尔当量的所示接头-有效载荷,在50mM BisTris (pH 7.5)中,于37°C在旋转热混合器中22小时。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0812] 结果

[0813] 引人注目的是,根据本发明的每个接头-有效载荷构建体含有3或4个MMAE部分的结构导致对天然的、完全糖基化的曲妥珠单抗的良好或优异的缀合效率(表6),产生曲妥珠单抗-DAR 6MMAE或DAR 8MMAE ADC。如历史上对于产生DAR2 ADC的基于赖氨酸的接头所显示的(参见WO 2015/191883的实施例5,其中只能实现40%的缀合效率),缀合效率>67%,令人惊讶地显著更高。

[0814] 表6.使用各种MMAE接头-有效载荷构建体以生成曲妥珠单抗DAR 6-MMAE或DAR 8-MMAE ADC获得的缀合效率(%)

	用于制备 DAR 6 或 DAR 8 ADC 的具有 MMAE 的接头-有效载荷	与曲妥珠单抗的缀合效率 (%)
[0815]	E(A-PABC-MMAE)-ARKAA-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:11; 图 19))	99%
	(MMAE) ₂ -PABC-AA-RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 20)	67%

[0816] 实施例7:用于制备包含4个MMAE和2个依喜替康的DAR 6曲妥珠单抗双有效载荷ADC的MMAE-依喜替康接头-有效载荷构建体的缀合

[0817] 为了证明本发明还可以包括在一个接头-有效载荷中包含不同药物类型的接头-有效载荷,设计了包含两种不同药物(MMAE和依喜替康)的结构,并将其与曲妥珠单抗缀合,产生包含4个MMAE和2个依喜替康的DAR6曲妥珠单抗双有效载荷ADC。

[0818] 方法

[0819] 反应条件:5mg/ml天然糖基化的曲妥珠单抗抗体,浓度为8U/mg的MTG和5摩尔当量的所示接头-有效载荷,在50mM BisTris (pH 7.5)中,于37°C在旋转热混合器中22小时。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0820] 结果

[0821] 令人惊讶的是,根据本发明的每个接头-有效载荷构建体包含两种不同药物类型(即2xMMAE和1x依喜替康)的结构导致了与天然的完全糖基化的曲妥珠单抗的良好缀合效率(表7),产生了包含4个MMAE和2个依喜替康的DAR6曲妥珠单抗-双有效载荷ADC。

[0822] 表7.使用MMAE-依喜替康接头-有效载荷以产生包含4个MMAE和2个依喜替康的DAR6曲妥珠单抗双有效载荷ADC获得的缀合效率(%)

[0823]	包含双有效载荷 MMAE-依喜替康的接头-有效载荷, 用于制备包含 4 个 MMAE 和 2 个依喜替康的 DAR 6 ADC	与曲妥珠单抗的缀合效率 (%)
	Exa-PABC-AA-RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 21)	79%

[0824] 实施例8:用于制备包含2个MMAE、2个美登素和2个皮质醇的DAR6曲妥珠单抗-三有效载荷ADC的MMAE-美登素-皮质醇接头-有效载荷构建体的缀合

[0825] 为了证明本发明也可以在一个接头-有效载荷构建体上包括三种不同的药物类型和有效载荷类别,设计了一种包含三种不同有效载荷(MMAE、美登素和皮质醇CS)的结构,并将其与曲妥珠单抗缀合,产生DAR6曲妥珠单抗三有效载荷ADC,其包含2个MMAE、2个美登素和2个皮质醇。

[0826] 方法

[0827] 反应条件:5mg/ml天然糖基化的曲妥珠单抗抗体,浓度为8U/mg的MTG和5摩尔当量的所示接头-有效载荷,在50mM BisTris(pH 7.5)中,于37°C在旋转热混合器中22小时。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0828] 结果

[0829] 令人惊讶的是,根据本发明的每个接头-有效载荷构建体含有三种不同的有效载荷类型(即1x MMAE、1x May和1x CS)的结构导致与天然的完全糖基化的曲妥珠单抗的优异缀合效率(表8),产生了包含2个MMAE、2个美登素和2个皮质醇的DAR6曲妥珠单抗三-有效载荷ADC。

[0830] 表8.使用MMAE-美登素-皮质醇接头-有效载荷以产生曲妥珠单抗DAR6曲妥珠单抗三有效载荷ADC获得的缀合效率(%),其中ADC包含2个MMAE、2个美登素和2个皮质醇

[0831]	用于制备包含 2 个 MMAE、2 个美登素和 2 个皮质醇的 DAR 6 ADC 的含有三有效载荷 MMAE-May-CS 的接头-有效载荷	与曲妥珠单抗的缀合效率 (%)
	May-RKAE(A-PABC-MMAE)A-皮质醇 (SEQ ID NO:12; 图 22)	99%

[0832] 实施例9:用于制备曲妥珠单抗DAR 4ADC的含有肽(根据本发明)或不含肽(不根据本发明)的MMAE接头-有效载荷构建体的缀合

[0833] 方法

[0834] 反应条件:5mg/ml天然糖基化的曲妥珠单抗抗体,浓度为8U/mg的MTG和5摩尔当量的所示接头-有效载荷,在50mM BisTris(pH 7.5)中,于37°C在旋转热混合器中22小时。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0835] 结果

[0836] 包含肽和两个MMAE的根据本发明的接头提供了与天然的完全糖基化曲妥珠单抗的优异缀合效率(表9),产生了曲妥珠单抗-DAR 4MMAE ADC,而与此形成鲜明对比的是,具有氨基-PEG和两个MMAE(但没有肽,因此不根据本发明)的结构与天然的完全糖基化的曲妥

珠单抗的缀合非常差。

[0837] 表6. 使用MMAE接头-有效载荷构建体生成曲妥珠单抗DAR 4ADC获得的缀合效率(%)

[0838]	用于制备 DAR 4 ADC 的具有 MMAE 的接头-有效载荷	与曲妥珠单抗的缀合效率 (%)
	RKAA-PABC-(MMAE) ₂ (SEQ ID NO:1; 图 1)	95%
	NH2-PEG2-PABC-(MMAE) ₂ (图 41)*	26%

[0839] *不根据本发明

[0840] 实施例10:最佳反应条件的确定

[0841] 为了证明接头-有效载荷浓度对达到最佳缀合效率的重要性,测试了用于缀合曲妥珠单抗的各种接头序列和接头-有效载荷浓度。

[0842] 方法

[0843] 作为标准缀合方案,使用以下参数:3.5mg/ml的天然糖基化的曲妥珠单抗抗体和浓度为5U/mg的MTG,在Tris(50mM, pH 7.6)中,于37°C在旋转热混合器中24小时。将接头-有效载荷MMAE-PABC-AA-C2-KAR-PABC-MMAE、RKN(PABC-MMAE)A-PABC-MMAE和RKAA-PABC-(MMAE)₂以2-80摩尔当量的不同浓度添加到反应混合物中。参数如表7中所示。如上所述通过LCMS评估缀合效率。

[0844] 结果

[0845] 令人惊讶的是,当向反应中加入5-20当量的接头-有效载荷时,不管测试的接头-有效载荷序列如何,都获得了异常高的缀合效率。

[0846] 表7. 不同反应条件下MMAE-PABC-AA-C2-KAR-PABC-MMAE、RKN(PABC-MMAE)A-PABC-MMAE和RKAA-PABC-(MMAE)₂与曲妥珠单抗的缀合效率

[0847]	反应参数对缀合效率的影响					
参数	MMAE-PABC-AA-C2-KAR-PABC-MMAE 的摩尔当量(图 42)与曲妥珠单抗					
	2	5	10	20	40	80
CE (%)	54%	94%	99%	96%	75%	31%
参数	RKN(PABC-MMAE)A-PABC-MMAE 的摩尔当量(SEQ ID NO:83; 图 43)与曲妥珠单抗					
	2	5	10	20	40	80
CE (%)	50%	82%	84%	56%	19%	2%
参数	RKAA-PABC-(MMAE) ₂ 的摩尔当量(SEQ ID NO:1; 图 1)与曲妥珠单抗					
	2	5	10	20	40	80
CE (%)	69%	97%	100%	99%	91%	68%

[0849] 实施例11:在结合素-4阳性实体肿瘤模型中抗结合素-4DAR4 ADC在体内显示出有效的肿瘤生长抑制

[0850] 在SUM190PT(结合素-4阳性,实体肿瘤)异种移植物模型中,体内研究了根据本发明的抗结合素-4ADC ARA-04-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE(DAR 4.0)和ARA-04-RKAA-PABC-(MMAE)₂(DAR 3.8)的肿瘤生长抑制。

[0851] 方法

[0852] 对于SUM190PT异种移植物,将 2×10^6 个细胞注射到CB17 SCID小鼠(Janvier)的乳腺脂肪垫中。每周三次记录肿瘤尺寸和体重。根据公式体积 = (宽度)² × 长度 × 0.5计算肿瘤体积。当平均肿瘤大小达到约200mm³时,使用非随机分层方案将小鼠分成治疗组,每组包括6只小鼠。在随机化当天静脉注射一次ADC。如实施例2所述,根据本发明的ADC内部生产。维汀-恩诺单抗(DAR 4)可从药店购得。以相当于每kg小鼠体重10μg有效载荷剂量(10μg/kg)的ADC剂量注射ARA-04-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE(DAR 4.0)和ARA-04-RKAA-PABC-(MMAE)₂(DAR 3.8)。维汀-恩诺单抗(DAR 4)注射剂量为每kg小鼠体重15μg有效载荷剂量(15μg/kg)。对照组的小鼠注射PBS。所有小鼠实验均按照瑞士指南实施,并经瑞士苏黎世兽医办公室(Veterinarian Office of Zürich,Switzerland)批准。

[0853] 结果

[0854] 在SUM190PT异种移植物模型中,将根据本发明的ADCARA-04-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE和ARA-04-RKAA-PABC-(MMAE)₂与维汀-恩诺单抗进行比较。

[0855] 对于根据本发明的ADC,10μg/kg体重的单次静脉内注射在所有小鼠中产生有效的抗肿瘤反应(图44)。剂量为15μg/kg的维汀-恩诺单抗在治疗后20天显示出短暂的肿瘤消退,没有无肿瘤个体,并且在第40天后有6/6的动物出现显著的肿瘤再生长。最令人惊讶的是,ARA-04-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE在4/6小鼠中表现出更好的功效,导致完全的长期反应,与以相同剂量注射的ARA-04-RKAA-PABC-(MMAE)₂相反,其导致在6/6小鼠中肿瘤控制约20天,随后肿瘤再生长。因此,非常令人惊讶的是,这些数据显示:与有效载荷仅偶联至肽接头的C端的ARA-04-RKAA-PABC-(MMAE)₂相比,ARA-04-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE更有效的抗肿瘤活性,其中,有效载荷偶联至肽接头的每个N端和C端。

[0856] 据总结,根据本发明的抗结合素-4ADC,

[0857] ARA-04-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE和ARA-04-RKAA-PABC-(MMAE)₂由与它们各自的基准ADC(维汀-恩诺单抗)相同的抗体和有效载荷组成,在体内是有活性的。令人惊讶的是,只有ARA-04-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE(其中有效载荷与肽接头的每个N端和C端偶联)显示出提供存活优势的优异功效。

[0858] 实施例12:在CD79b阳性液体肿瘤模型中抗CD79b DAR4 ADC在体内显示出有效的肿瘤生长抑制

[0859] 在Ramos(CD79b阳性,液体肿瘤)异种移植物模型中,研究了根据本发明的抗CD79b ADC ARA-01-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE(DAR 4.0)和

[0860] ARA-01-RKAA-PABC-(MMAE)₂(DAR 3.9)的体内肿瘤生长抑制。

[0861] 方法

[0862] 对于Ramos异种移植物,将 20×10^6 个细胞皮下注射到CB17 SCID小鼠(Janvier)中。每周三次记录肿瘤尺寸和体重。根据公式体积 = (宽度)² × 长度 × 0.5计算肿瘤体积。当平均肿瘤大小达到约200mm³时,使用非随机分层方案将小鼠分成治疗组,每组包括6只小鼠。在随机化当天静脉注射一次ADC。如实施例2所述根据本发明的ADC内部生产。

[0863] ARA-01-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE(DAR 4.0)和

[0864] ARA-01-RKAA-PABC-(MMAE)₂(DAR 3.9)以相当于每kg小鼠体重25μg有效载荷剂量(25μg/kg)的ADC剂量静脉注射一次。对照组的小鼠注射PBS。所有小鼠实验均按照瑞士指南实施,并经瑞士苏黎世兽医办公室(Veterinarian Office of Zürich,Switzerland)批准。

[0865] 结果

[0866] 根据本发明的ADC ARA-01-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE和ARA-01-RKAA-PABC-(MMAE)₂在Ramos异种移植模型中相互比较。

[0867] 与PBS处理的对照组相比,25μg/kg的单次静脉内注射导致根据本发明的ADC在所有小鼠中的有效抗肿瘤反应(图45)。令人惊讶的是,与以相同剂量注射的ARA-01-RKAA-PABC-(MMAE)₂(其导致肿瘤体积短暂减小,随后所有动物中的肿瘤再生长)相比,ARA-01-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE显示出优异的功效,在治疗后第21天,5/6小鼠中的肿瘤完全消除。这些数据证实了来自实施例11的结果,并证实了以下发现:有效载荷与肽接头的N端和C端偶联的ADC令人惊讶地显示出比有效载荷仅与C端偶联的比较器ADC更有效的抗肿瘤活性。

[0868] 据总结,根据本发明的抗CD79b ADC,ARA-01-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE和ARA-01-RKAA-PABC-(MMAE)₂,在体内是有活性的。令人惊讶的是,与其中有效载荷仅与肽接头的C端偶联的ARA-01-RKAA-PABC-(MMAE)₂相比,其中有效载荷与肽接头的每个N端和C端偶联的ARA-01-MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE显示出提供存活优势的优异功效,证实了图11中所示的数据,其中,显示出与RKAA-PABC-(MMAE)₂相比,MMAE-PABC-AA-C2-RKAA-PABC-MMAE接头导致优异的抗肿瘤功效。

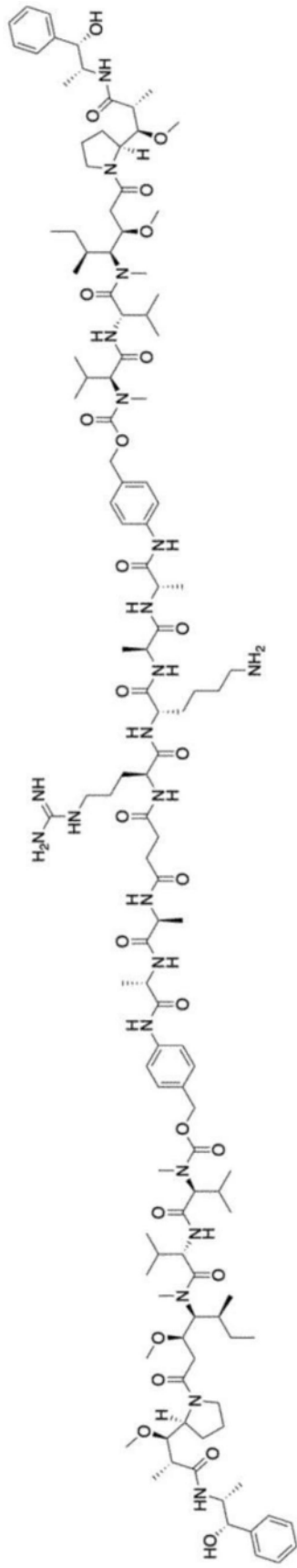


图3

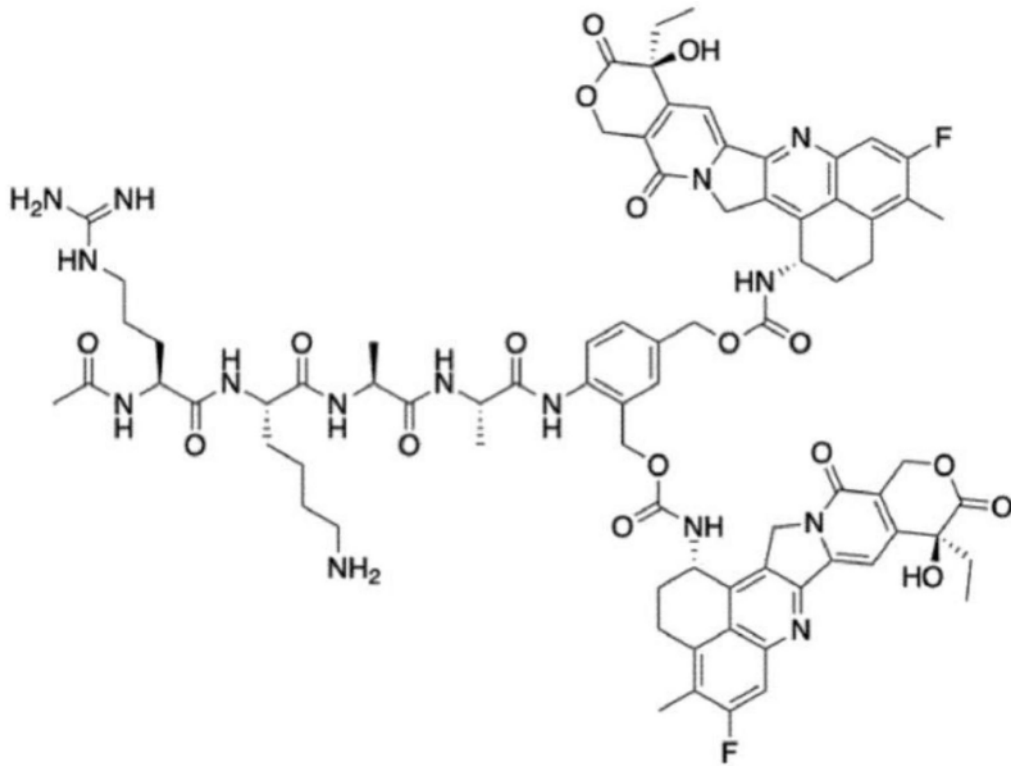


图4

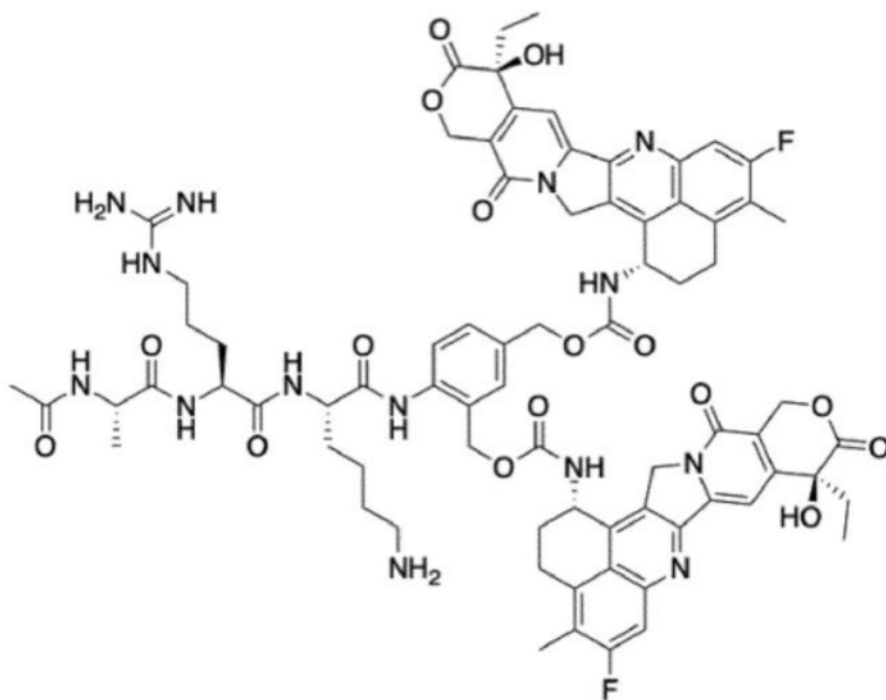


图5

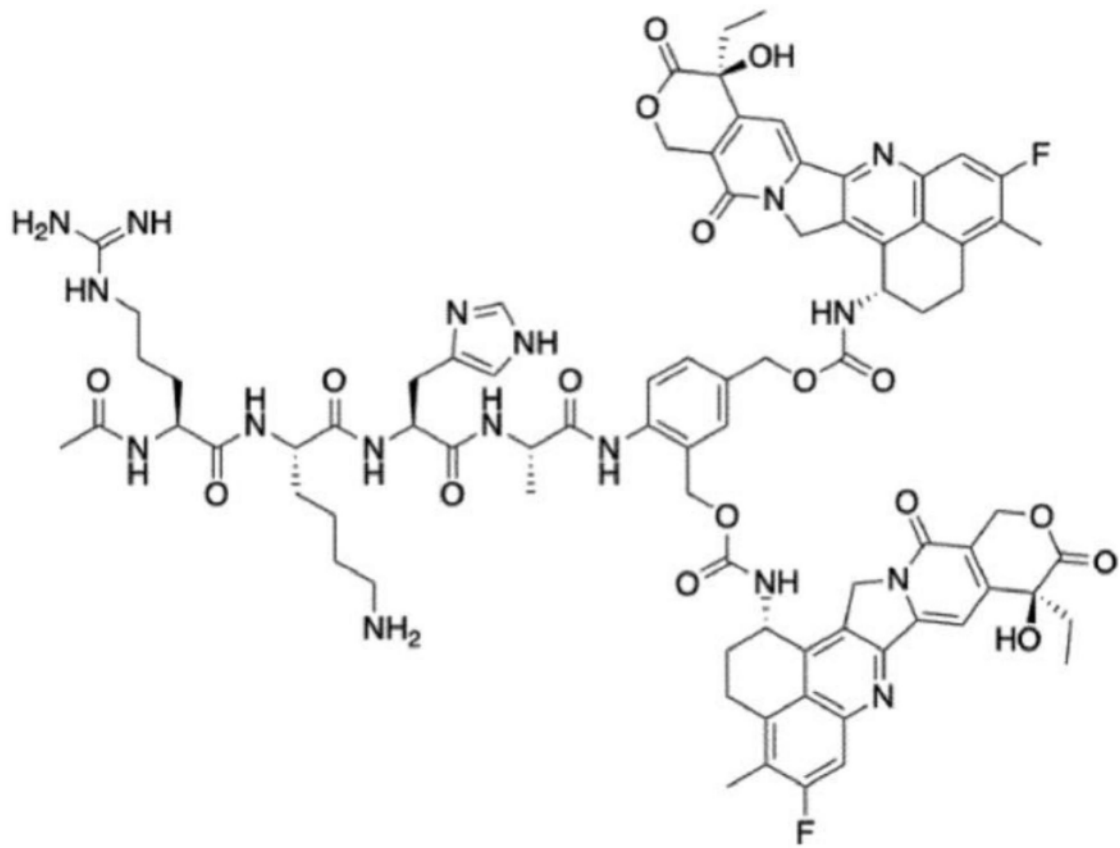


图10

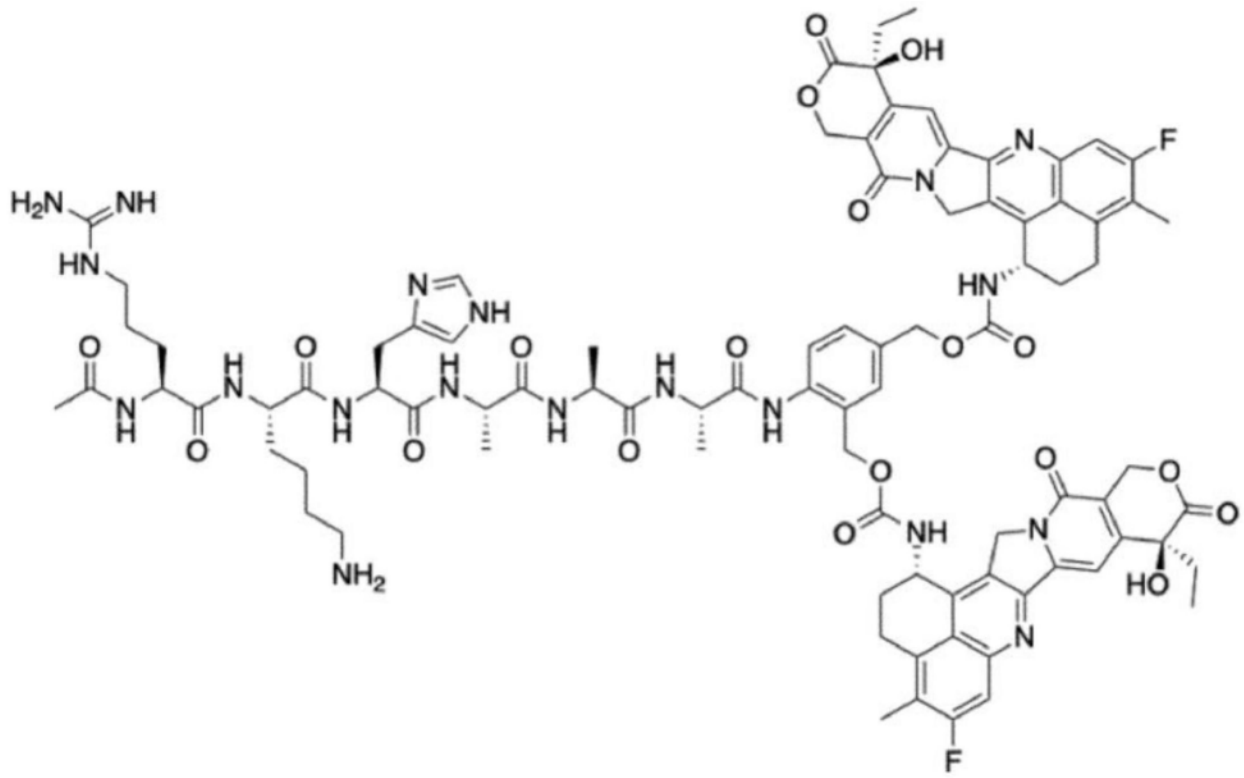


图11

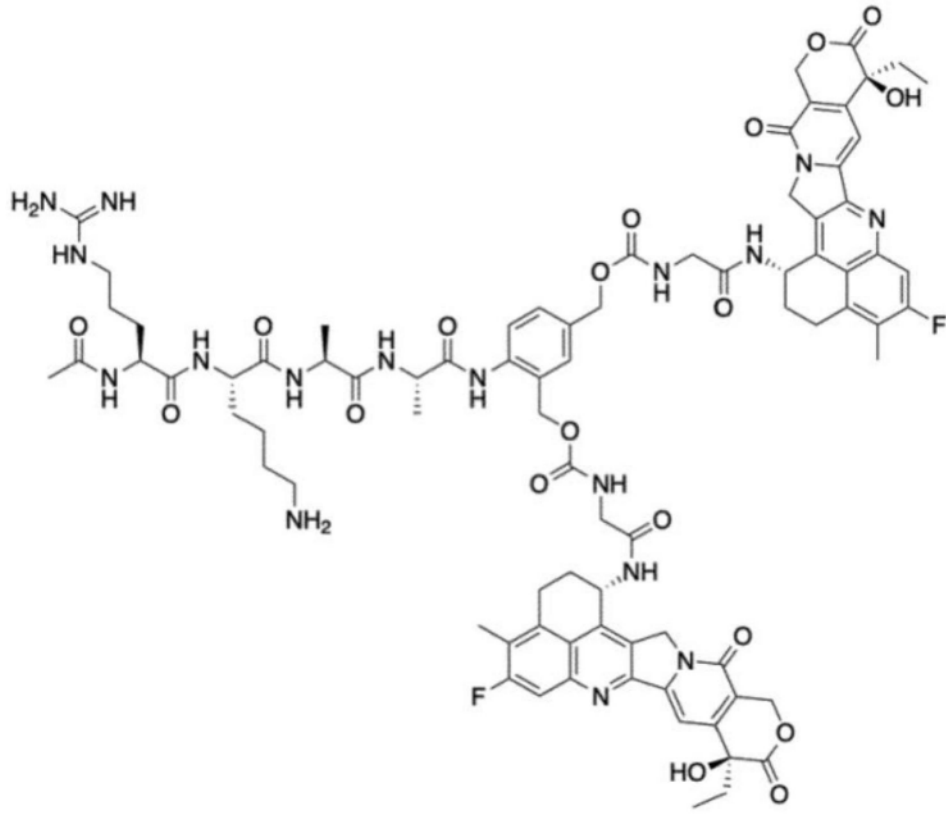


图13

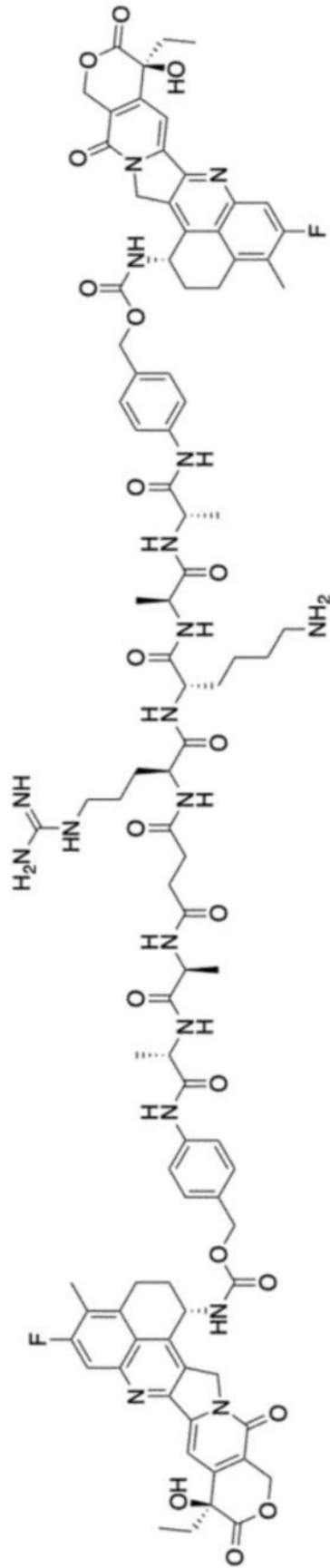


图14

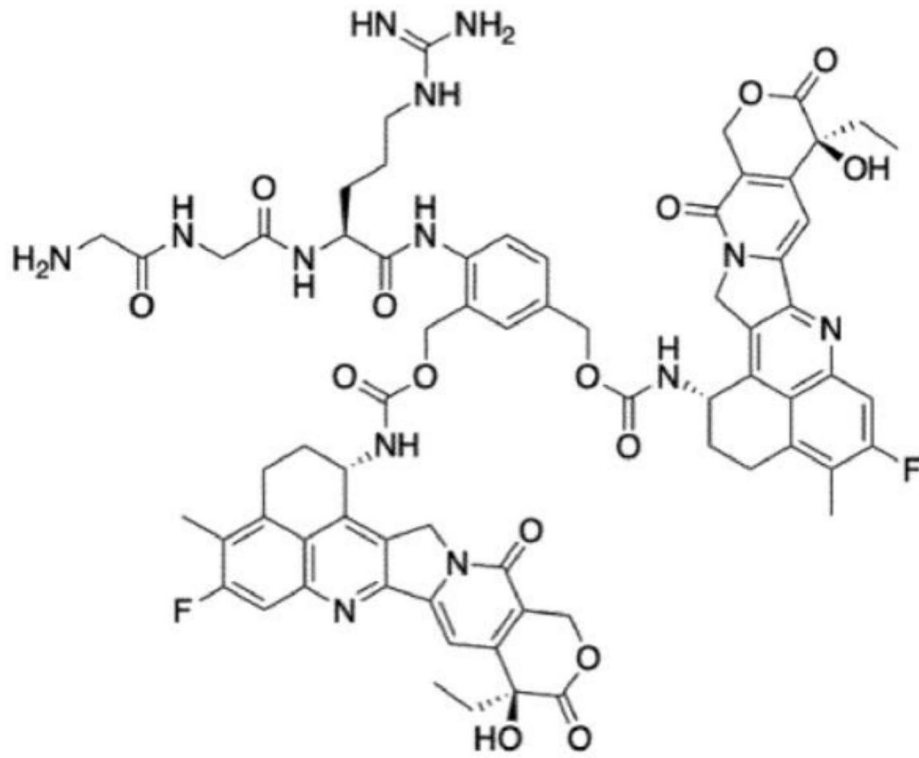


图15

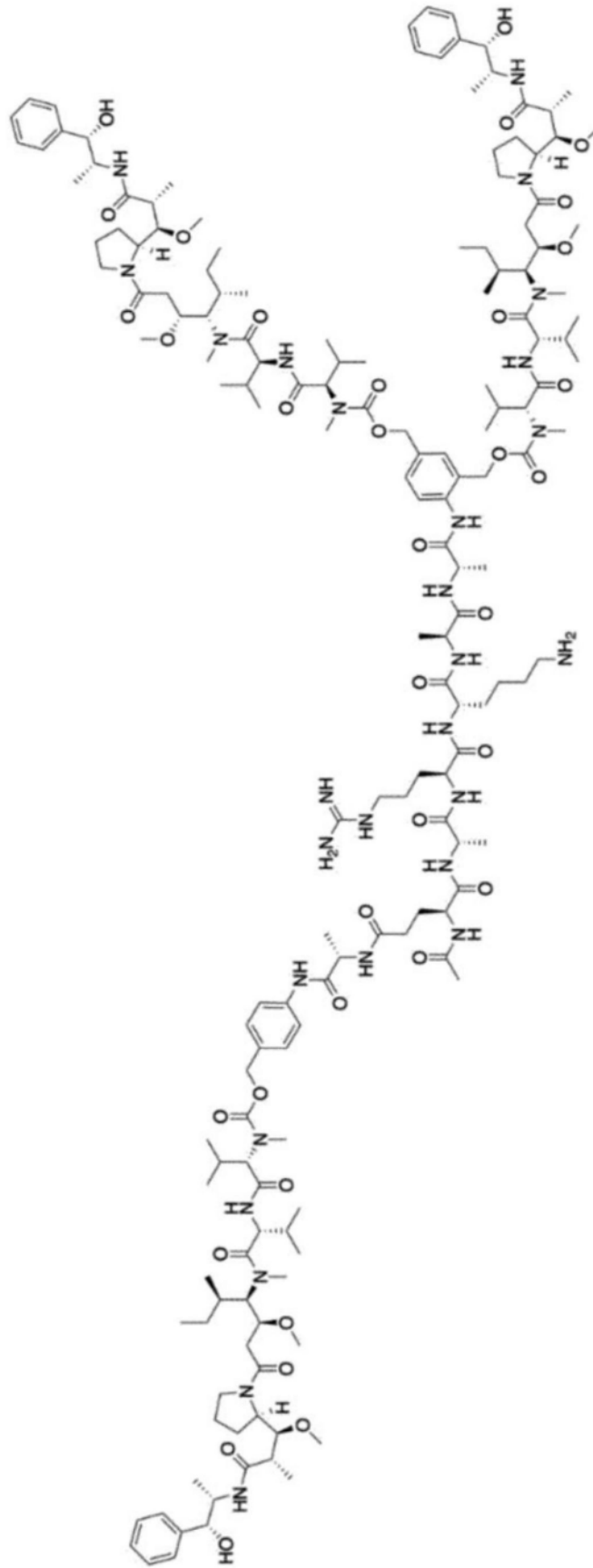


图19

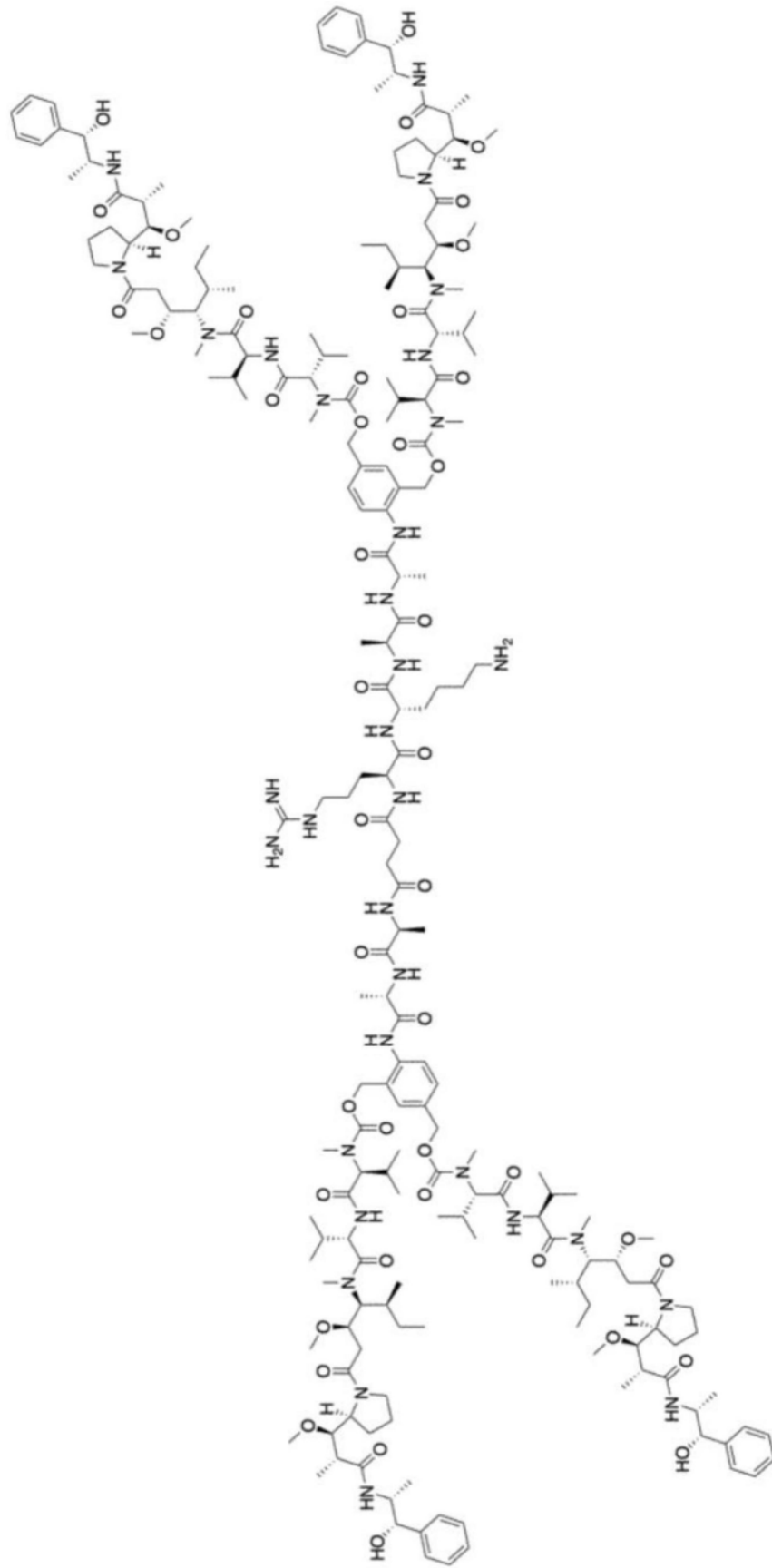


图20

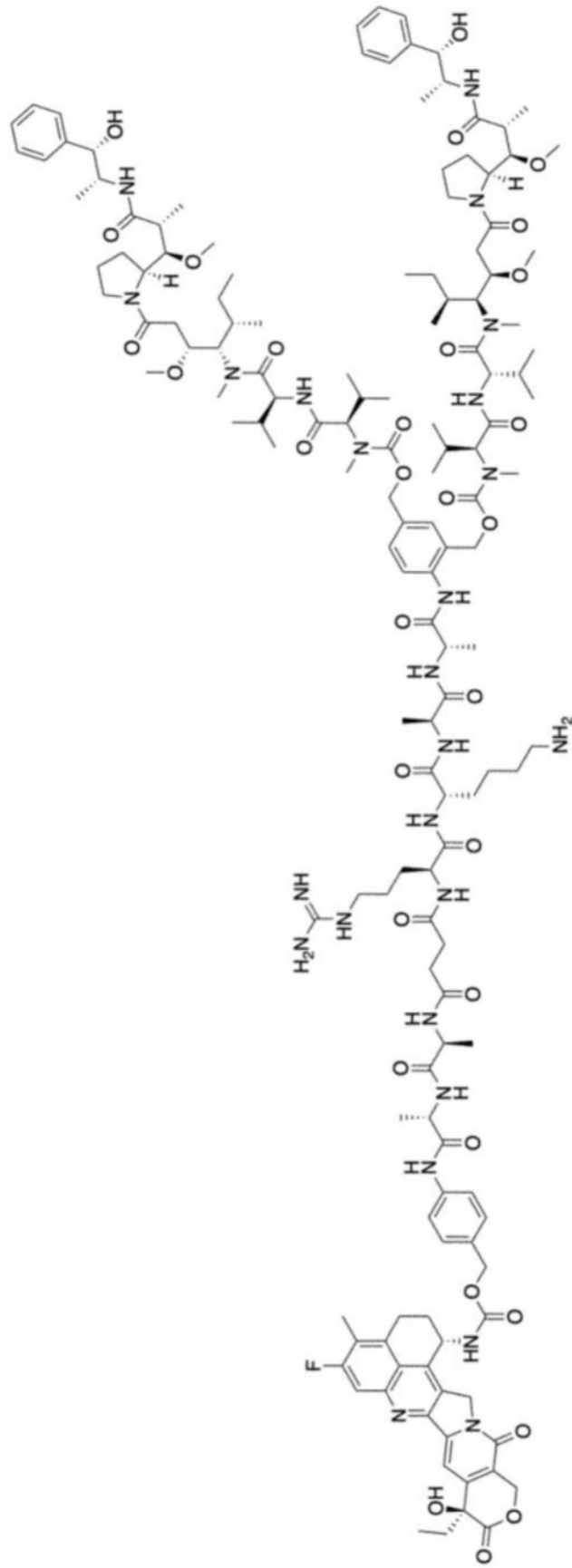


图21

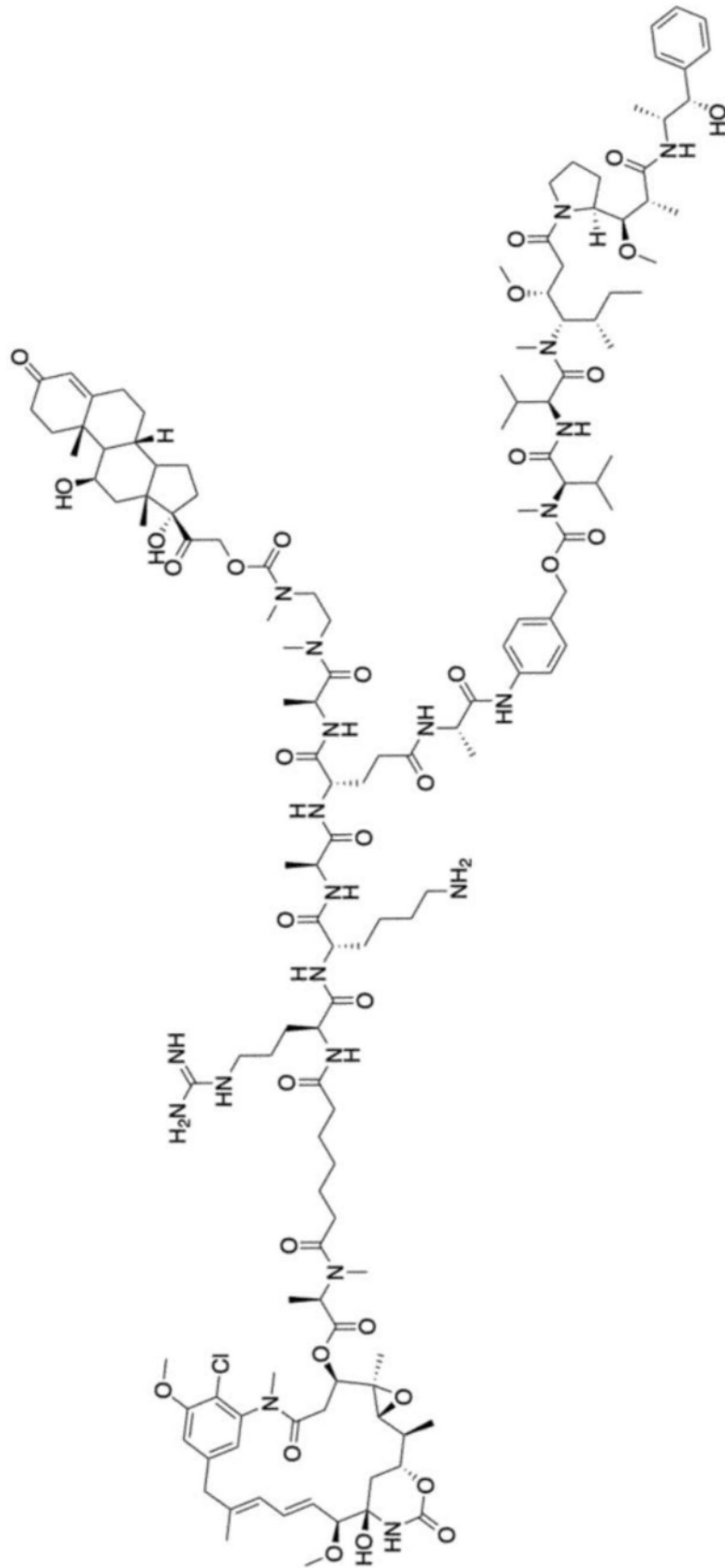


图22

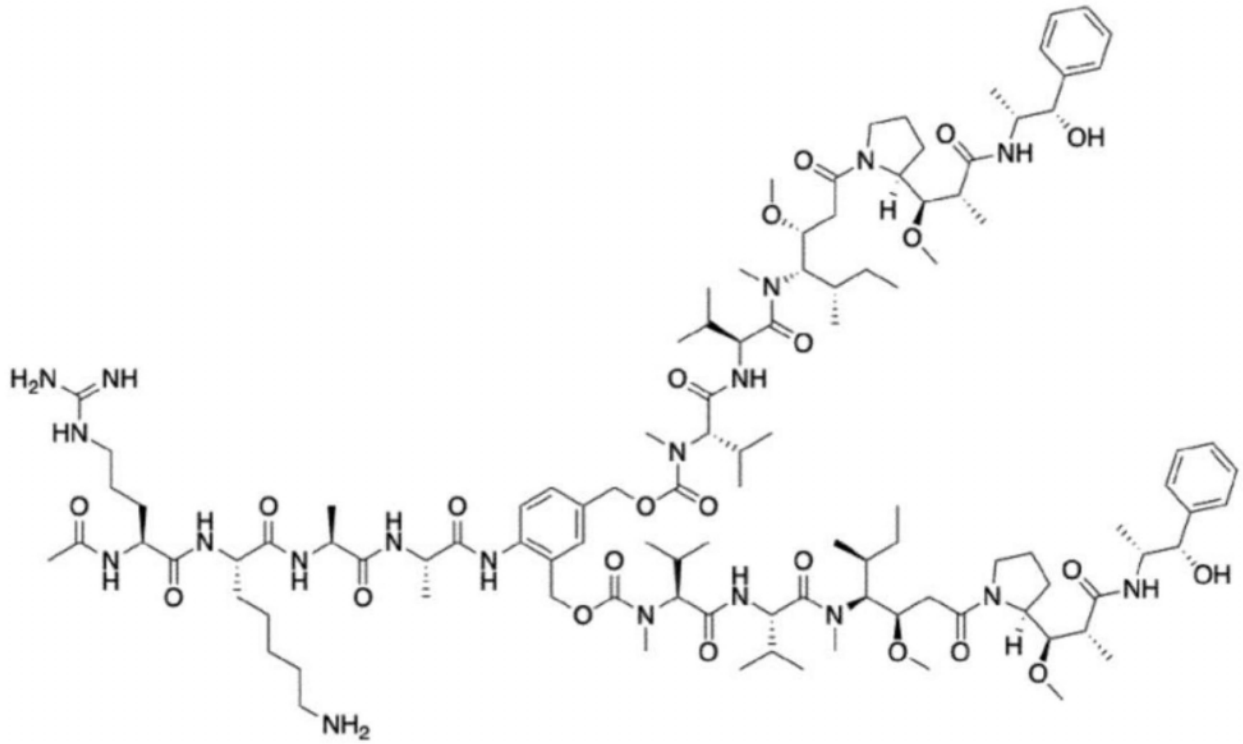


图23

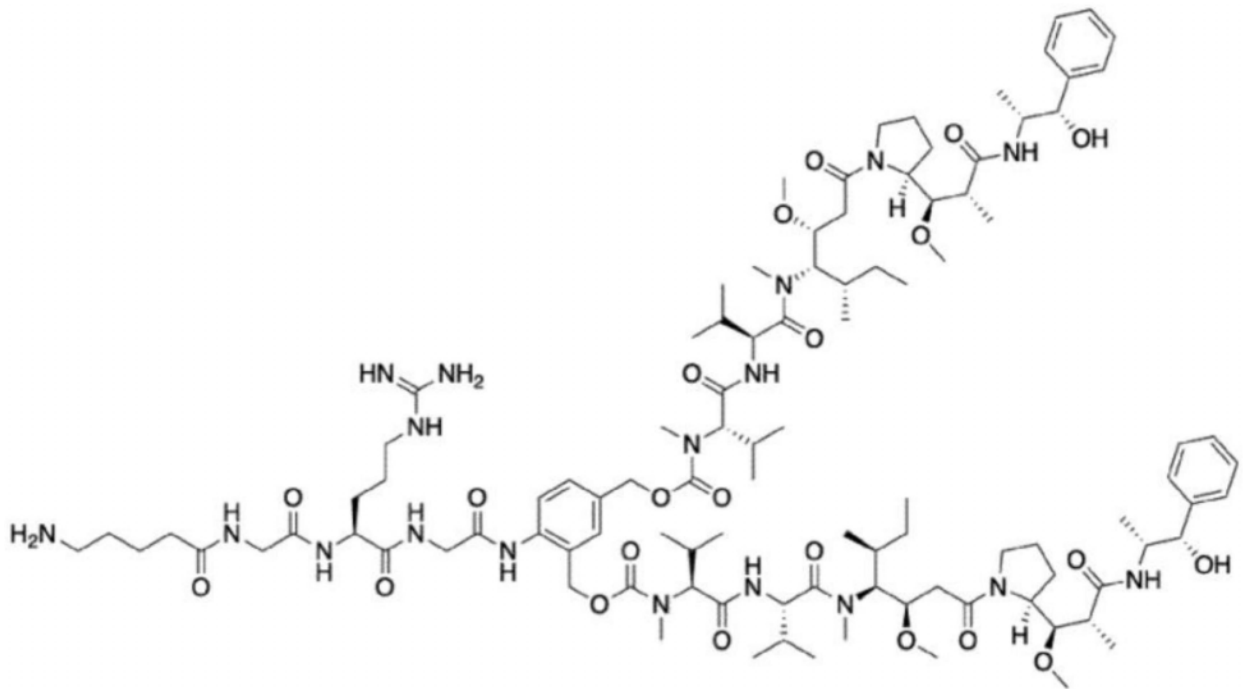


图24

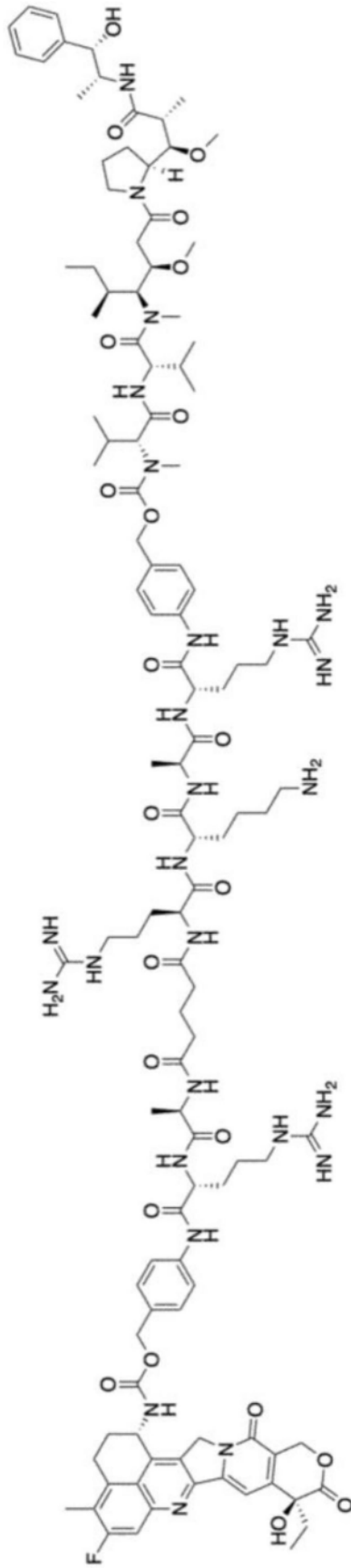


图26

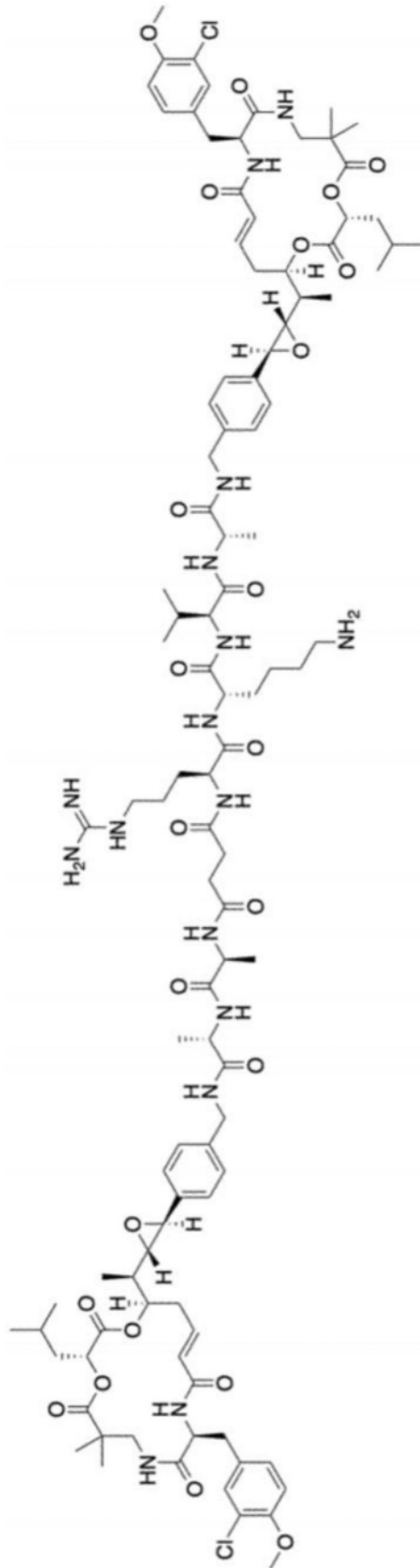


图27

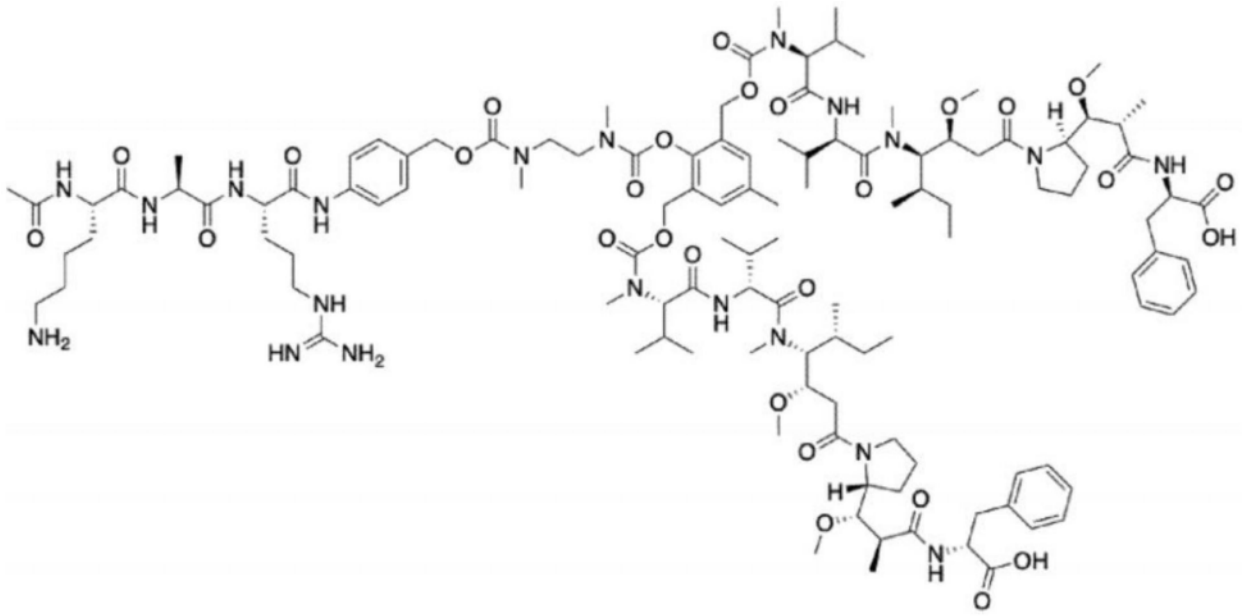


图28

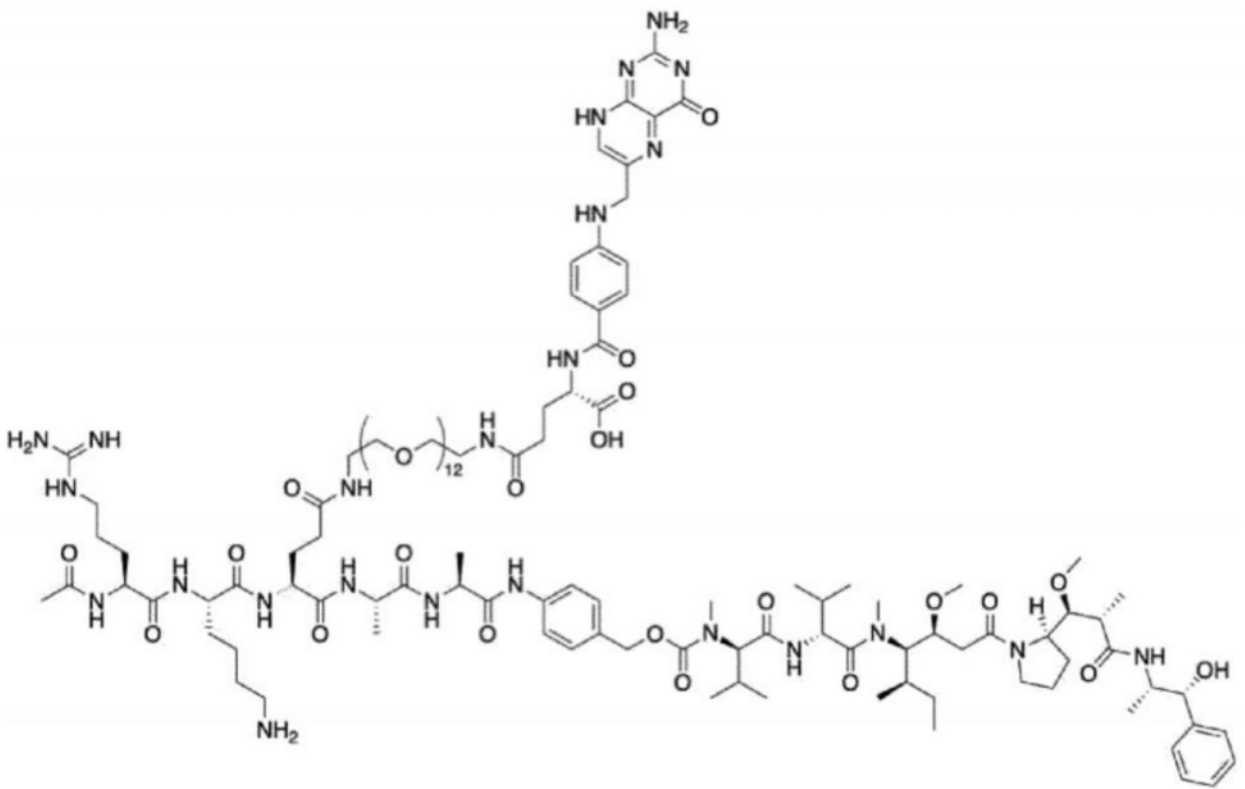


图29

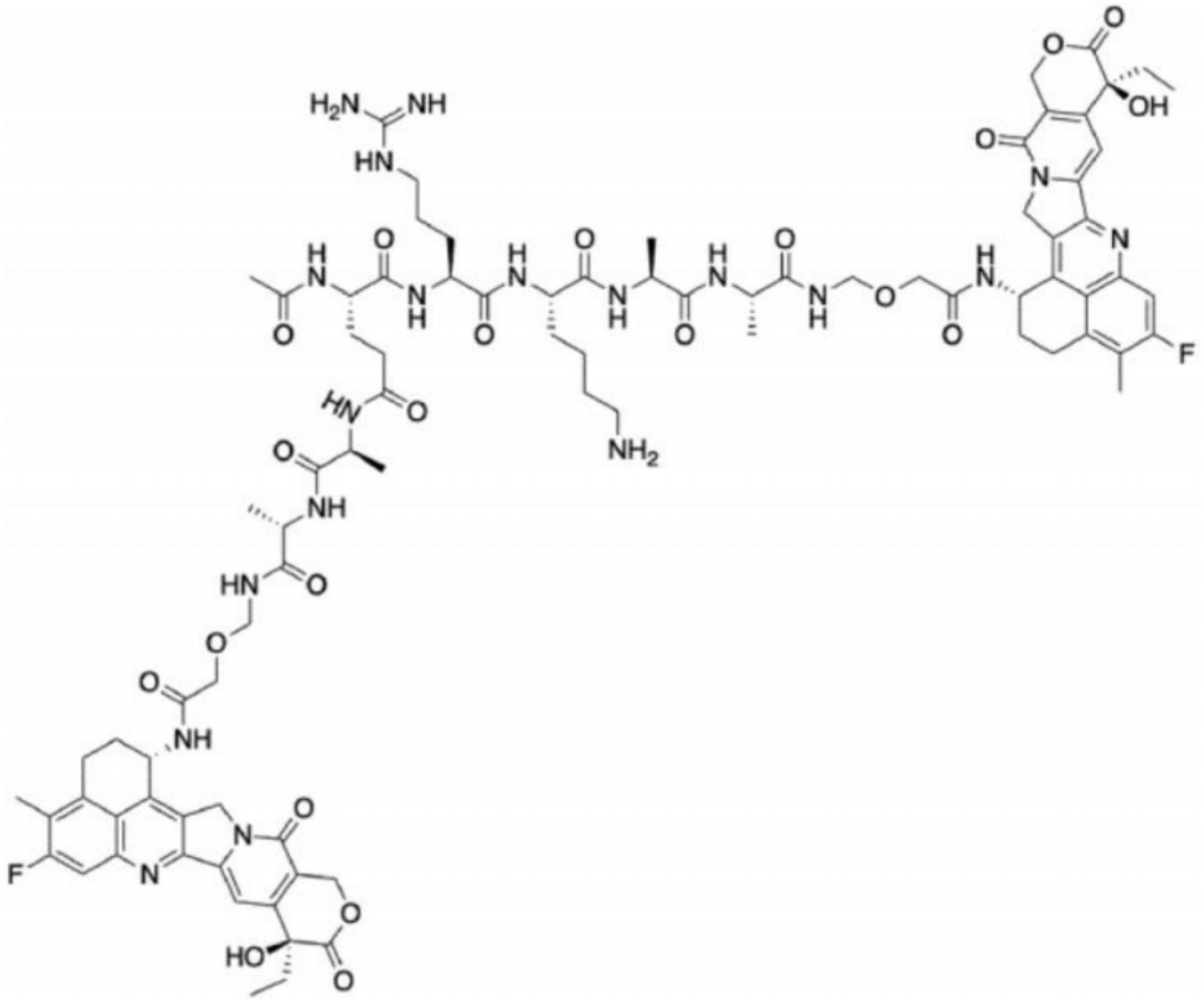


图30

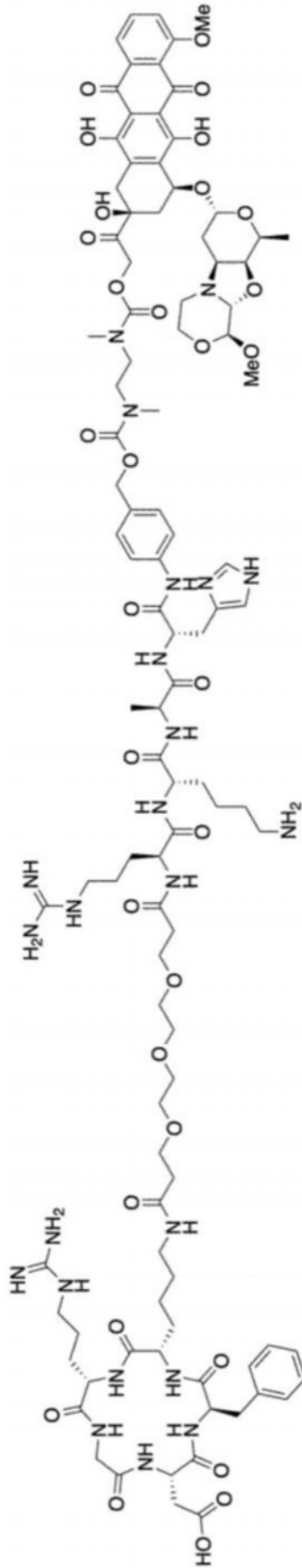


图31

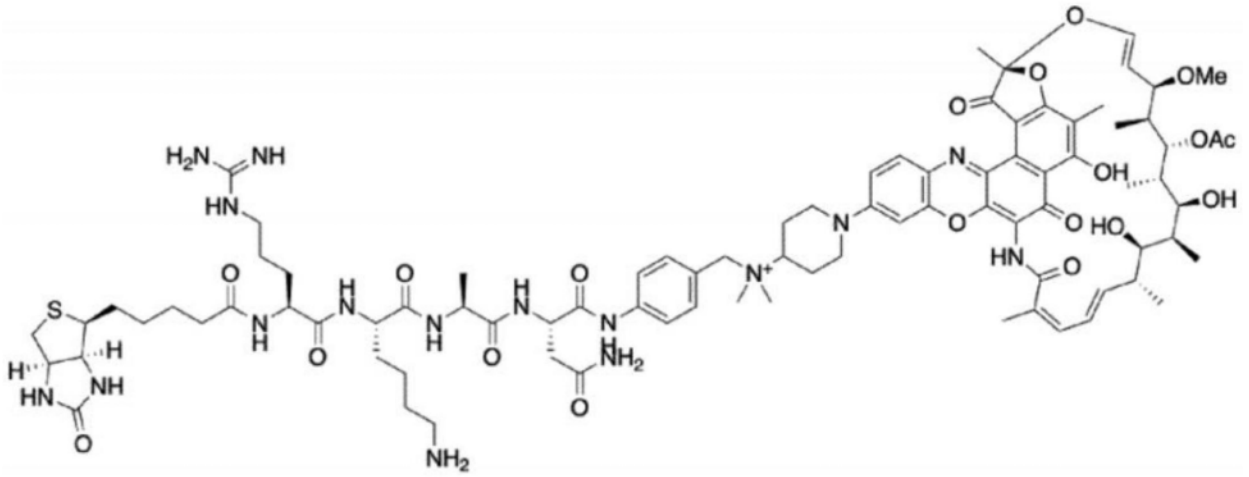


图32

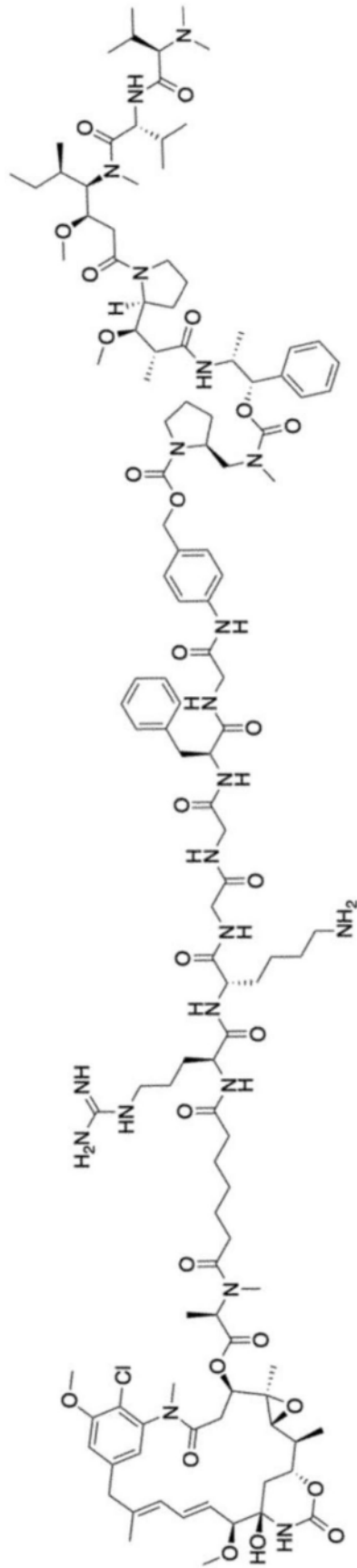


图33

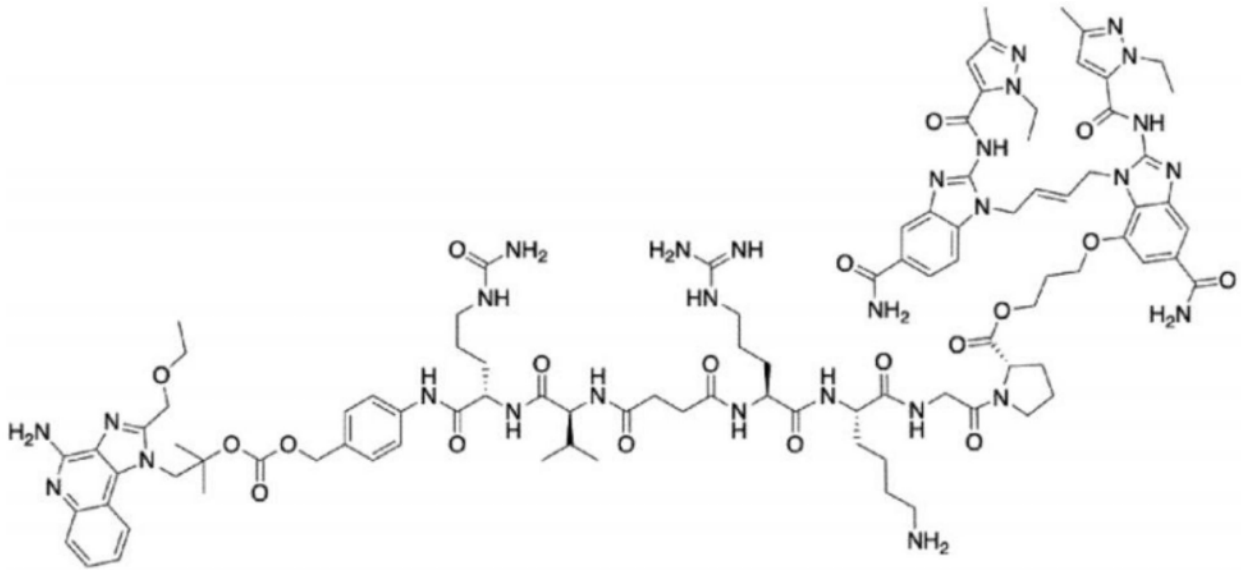


图34

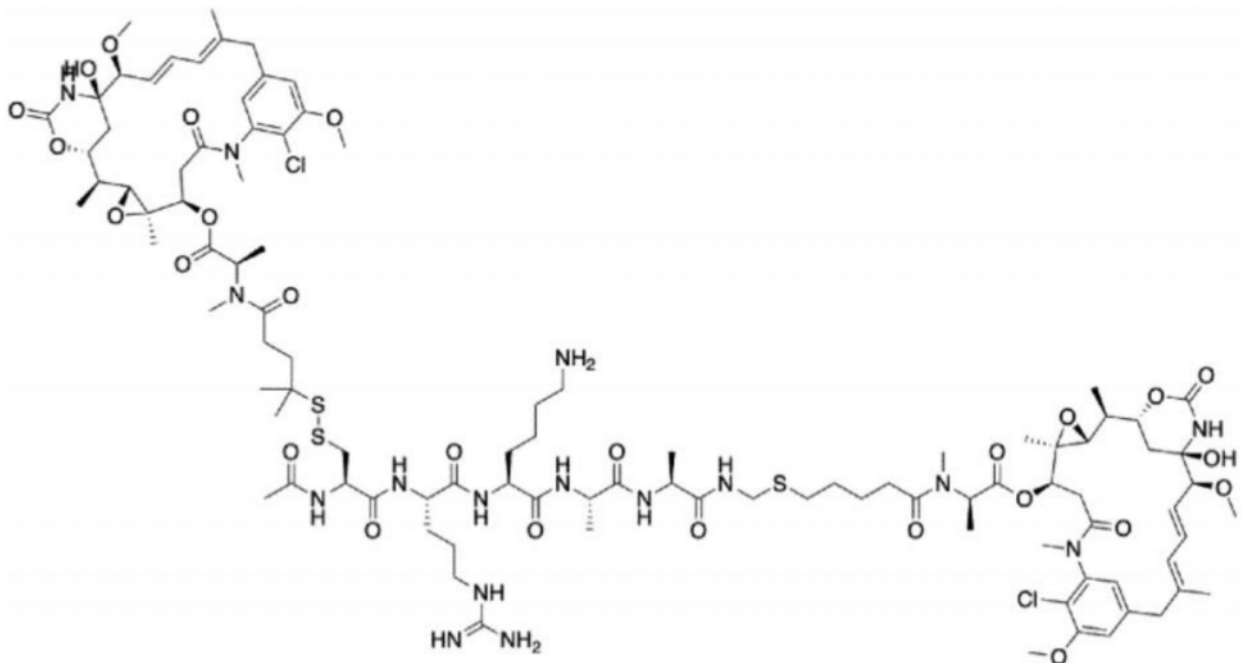


图35

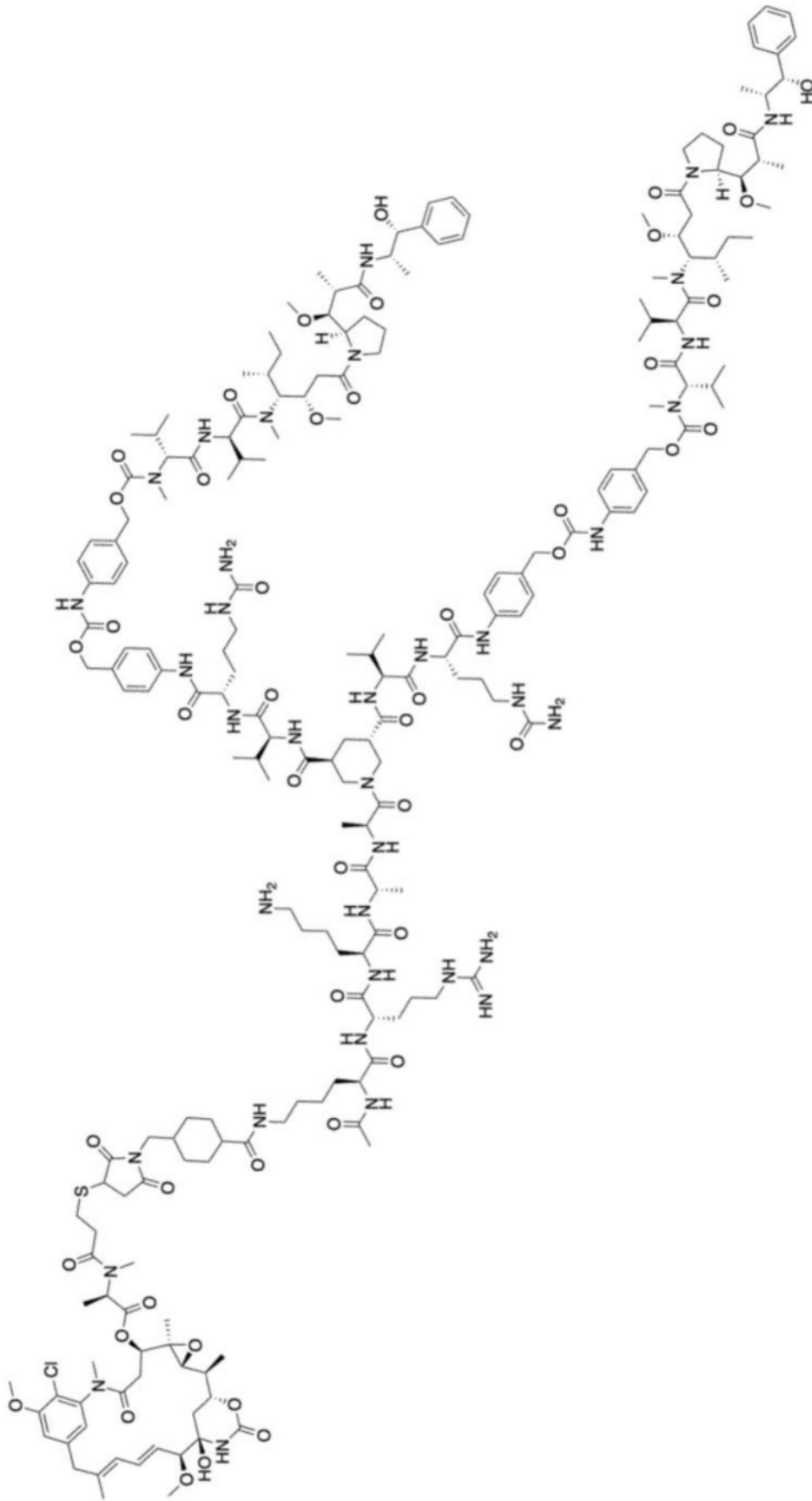


图36

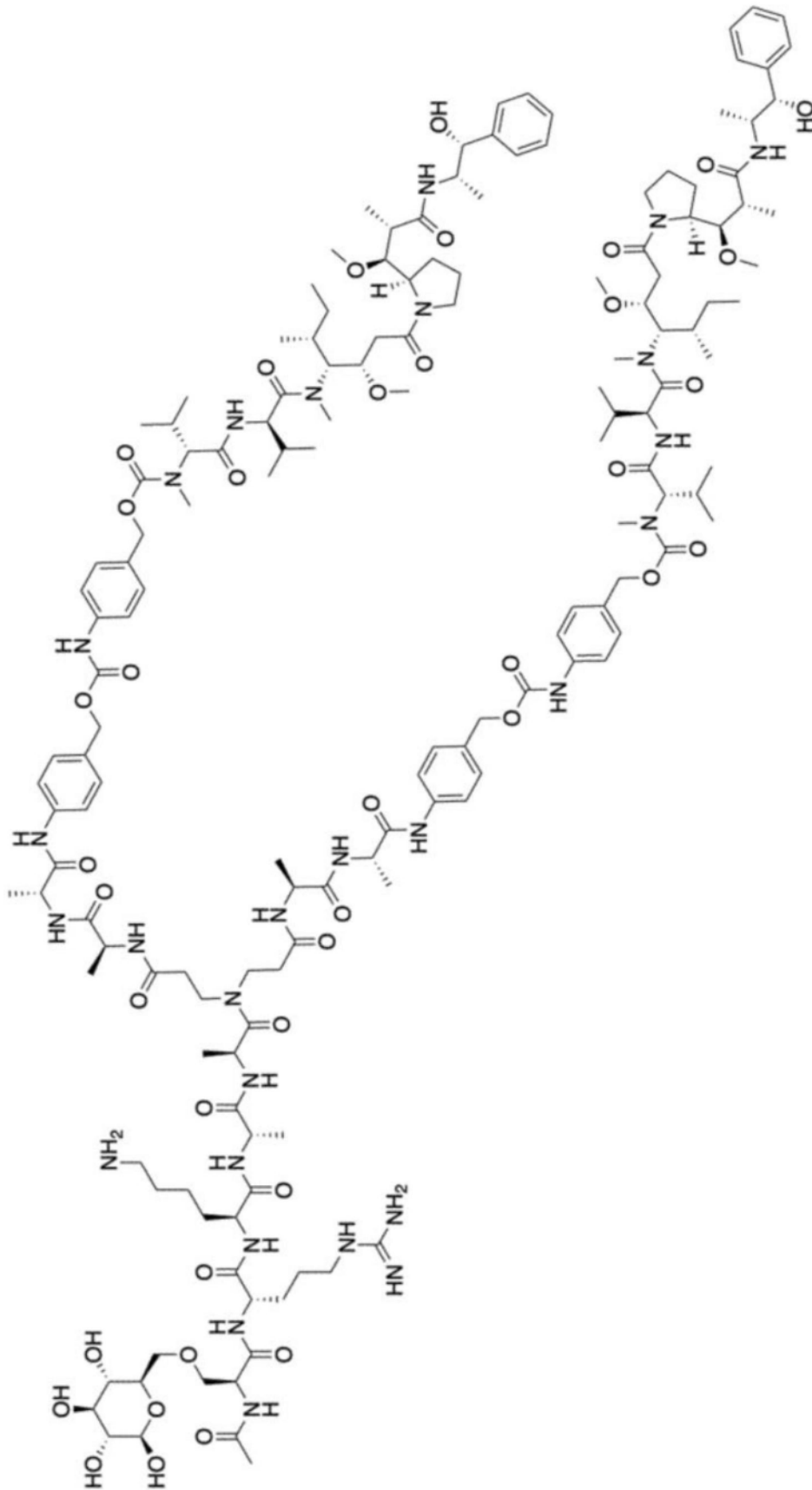


图37

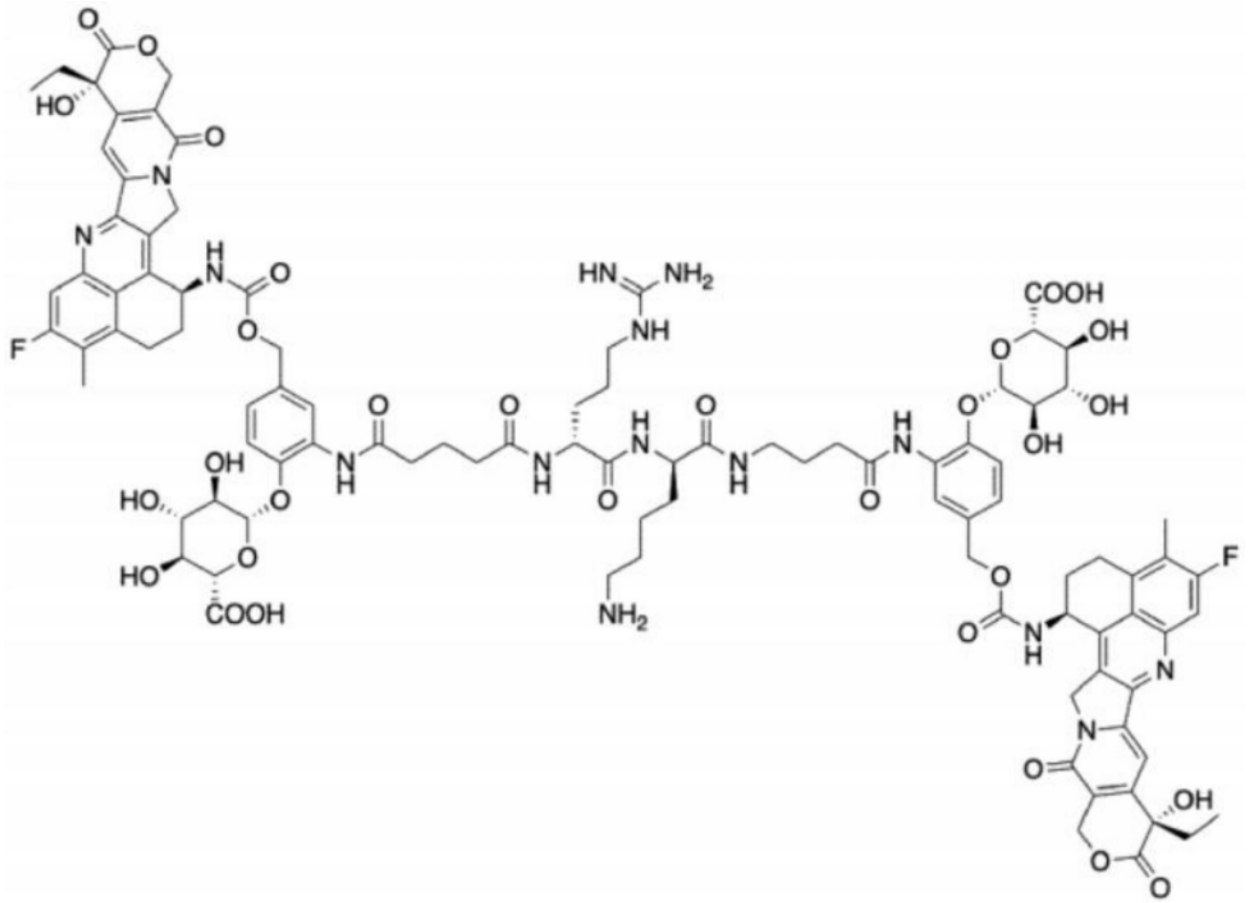


图38

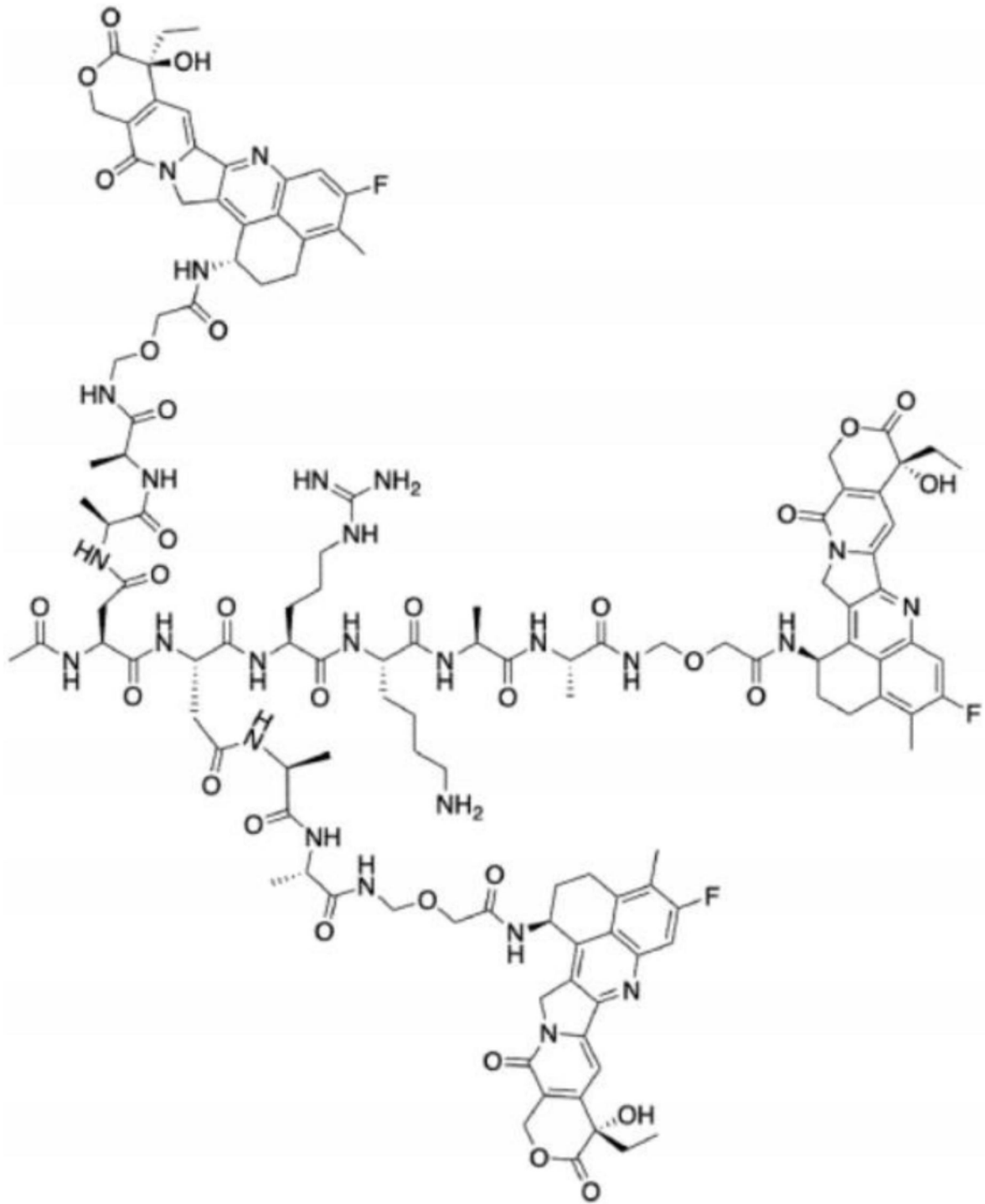


图39

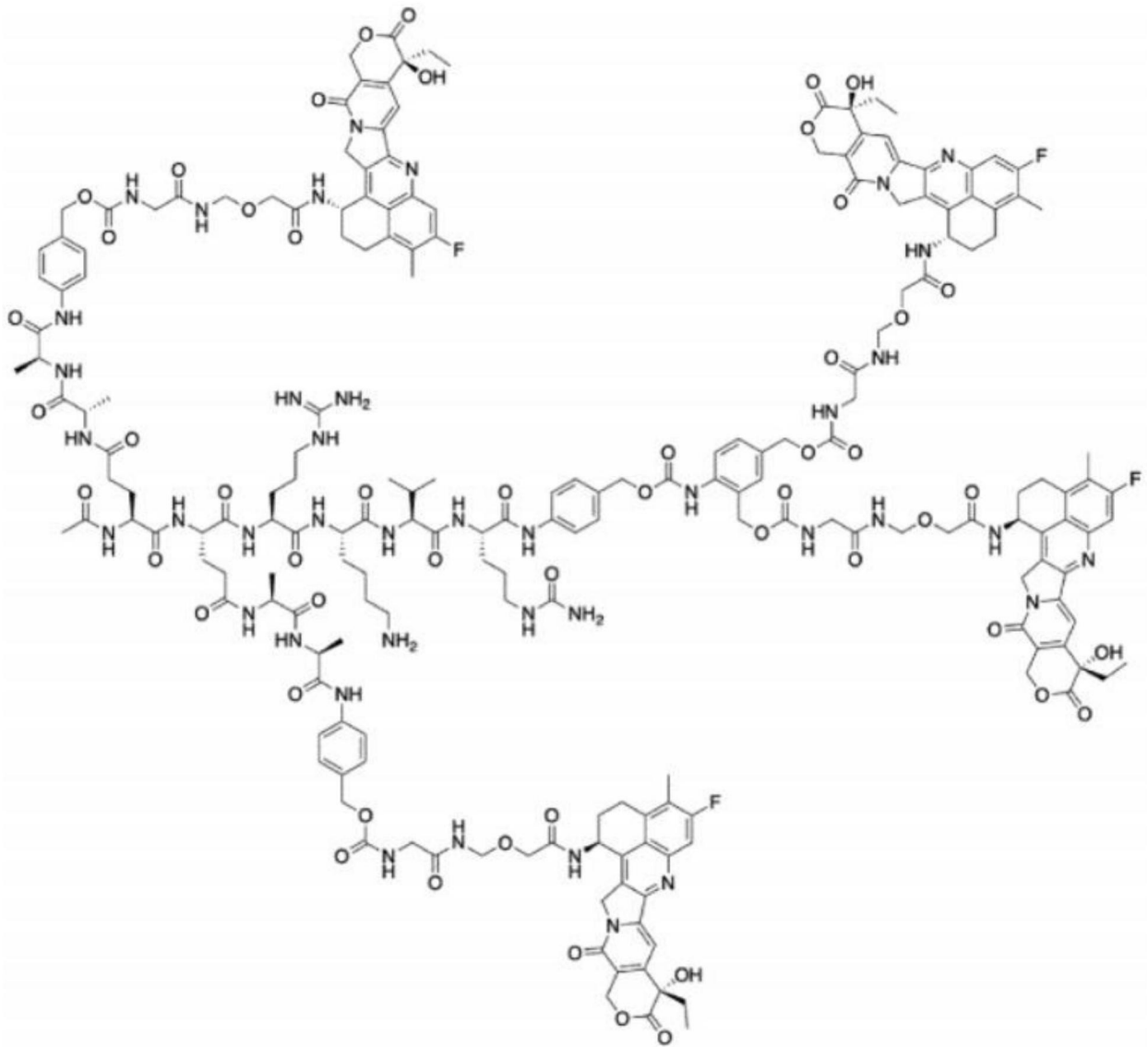


图40

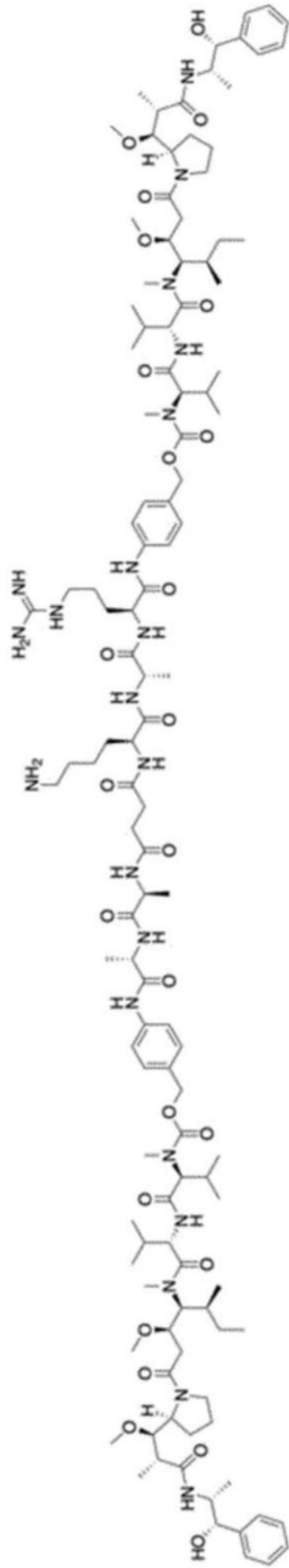


图42

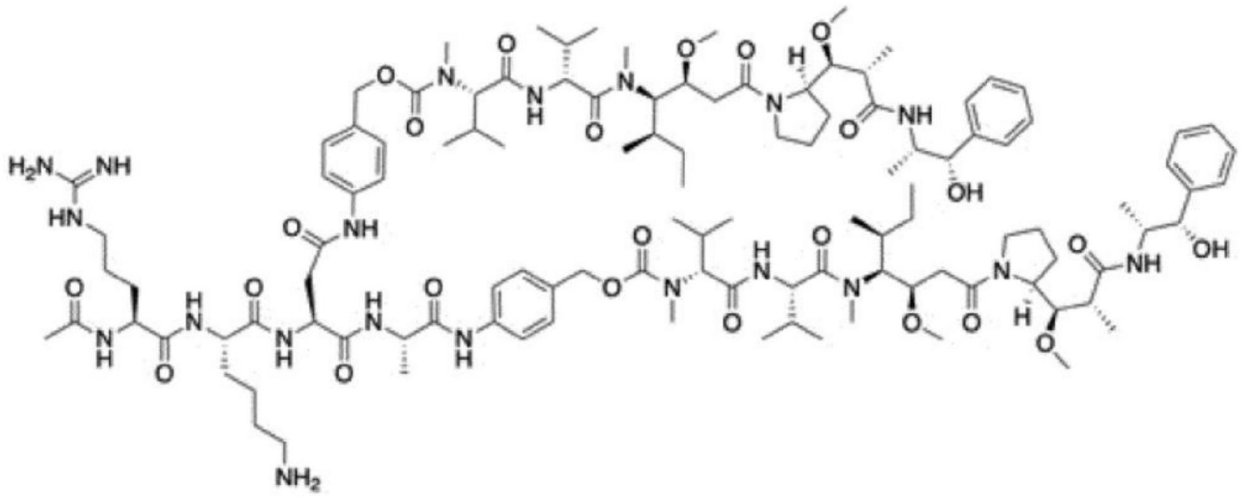


图43

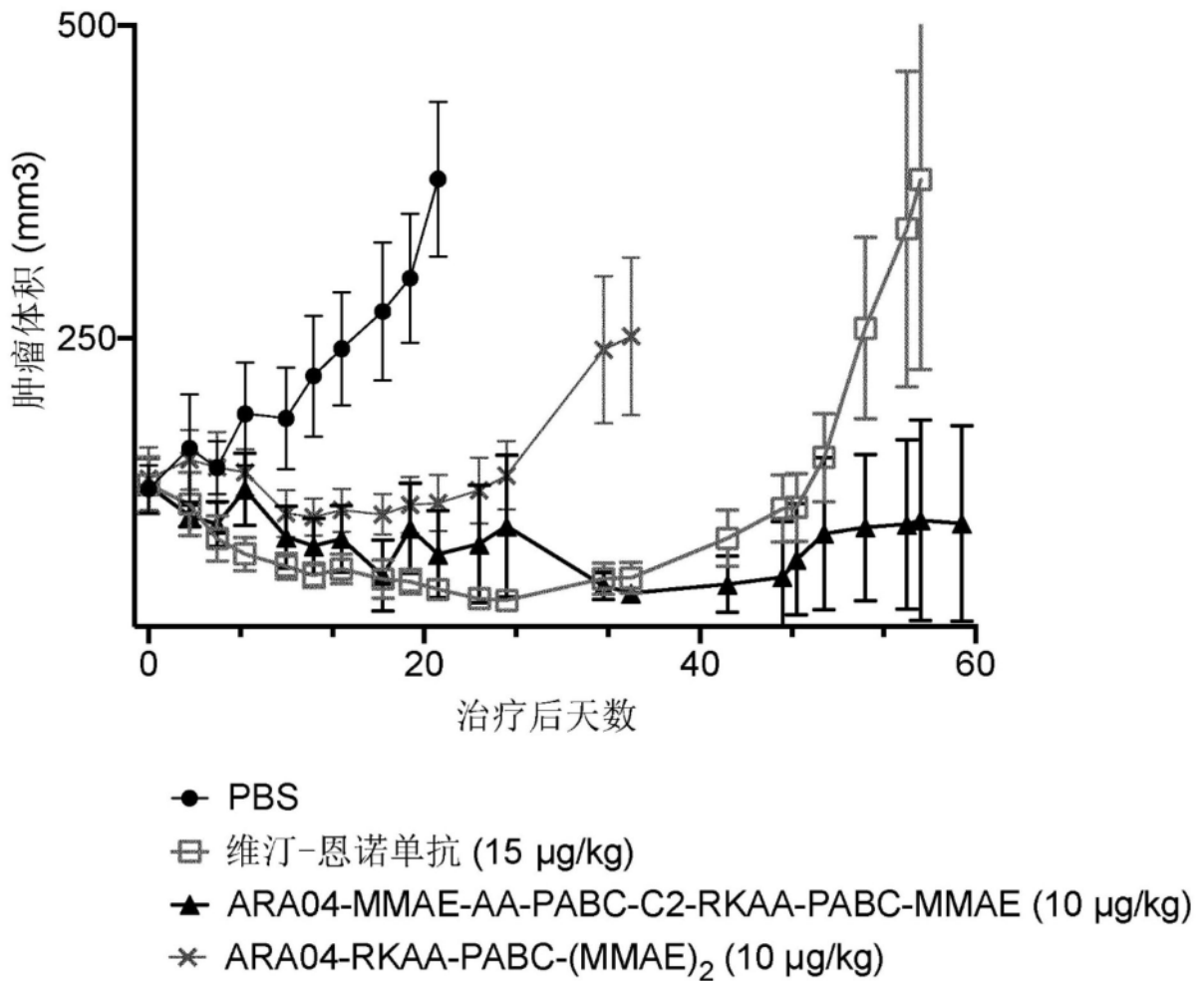


图44

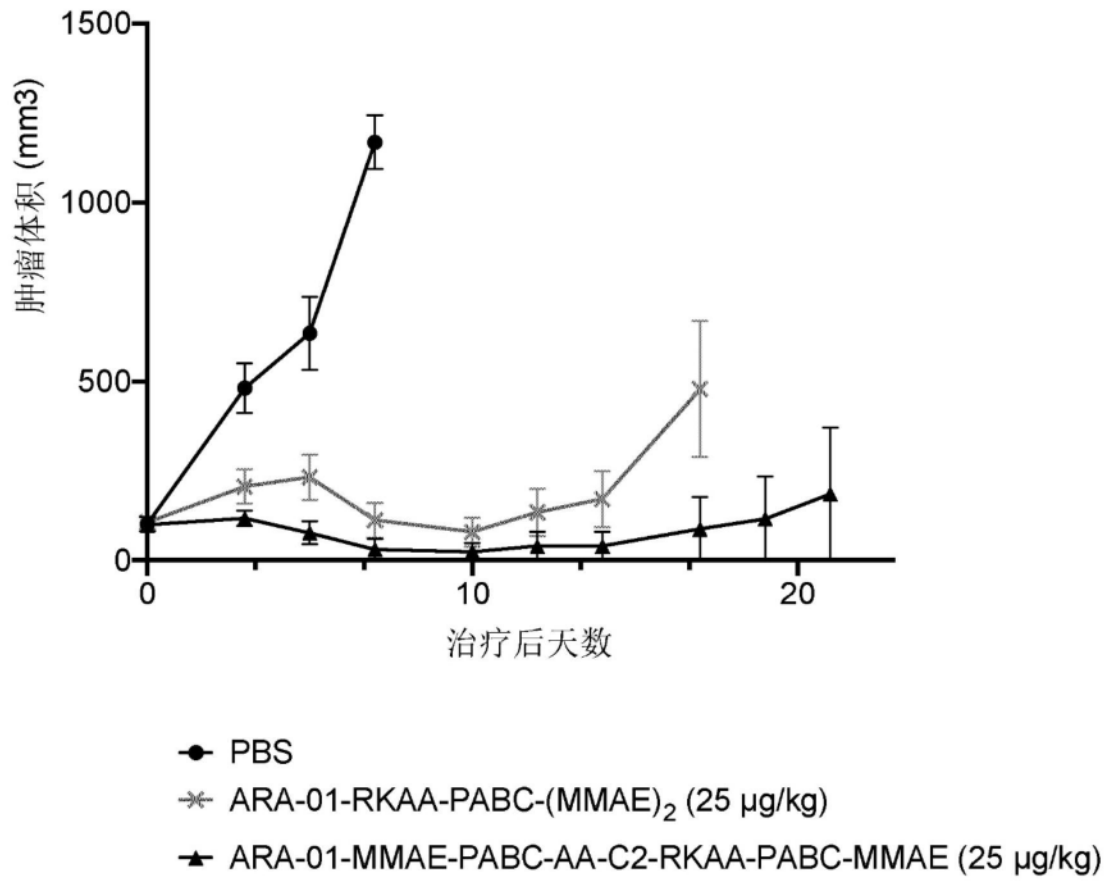


图45