

半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种化合物及其制备方法，特别涉及一类半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物及其制备方法。

技术背景

抗体-毒素偶联物 (Antibody drug conjugate, ADC) 是靶向治疗的热点领域，已在美国获批上市的两个药物 Adcetris 和 Kadcyla 表现出良好的临床疗效，并且有超过 50 个 ADC 药物在进行临床阶段研究。

发明内容

本发明的化合物半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物 (TDC)，半胱氨酸插入位点包含选自以下 3 个插入位点的一个或多个位点：轻链第 205 位 (Kabat 编号，其氨基酸序列为 GLSSPCVTKSF)，轻链第 206 位 (Kabat 编号，其氨基酸序列为 GLSSPVCTKSF)，重链第 439 位 (Kabat 编号，其氨基酸序列为 YTQKSLSCLSPGK)。包含一个或多个上述半胱氨酸插入突变的抗体保持了其亲本抗体与抗原结合的能力 (亲和力)。本发明通过其轻链第 205 位或/和第 206 位或/和重链第 439 位插入的半胱氨酸巯基与 linker-drug 进行抗体-毒素偶联物 (TDC) 定点偶联。

氨酸改造的抗体-毒素偶联物，抗体为半胱氨酸定点插入抗体，半胱氨酸插入位点包含选自以下 3 个插入位点的一个或多个位点：kappa/λ 轻链恒定区第 205 位 (Kabat 编号)，轻链恒定区第 206 位 (Kabat 编号) 或 IgG 抗体重链恒定区第 439 位 (Kabat 编号)。

半胱氨酸插入位点氨基酸序列包含以下 3 个序列的一个或多个：LC-205ins:GLSSPCVTKSF；LC-206ins:GLSSPVCTKSF 或 HC-439ins:TQKSLSCLSPGK。

高活性细胞毒素通过连接子与插入的半胱氨酸游离巯基 (-SH) 进行定点偶联，连接子与插入的半胱氨酸偶联的抗体轻链氨基酸序列为：GLSSPCVTKSF 和 GLSSPVCTKSF，连接子与插入的半胱氨酸偶联的抗体重链氨基酸序列为：TQKSLSCLSPGK，其中，C 为目标抗体轻链 205 位或 206 位或重链第 439 位插入的半胱氨酸。

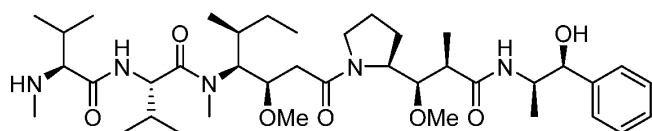
作为优选，其中所述抗体轻链包括 kappa 或 λ 同种型。

作为优选，其中所述抗体重链包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。

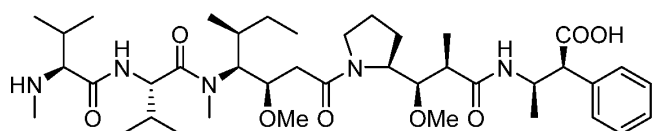
作为优选，其中所述半胱氨酸包含巯基(-SH)。

作为优选，其中巯基(-SH)能够进行化学偶联。

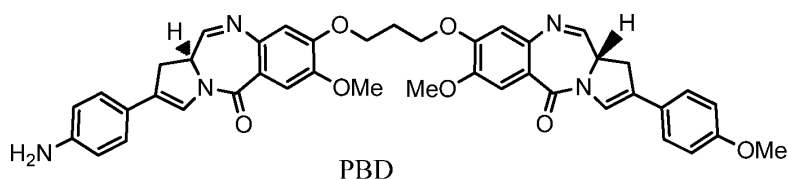
作为优选，通过连接子与半胱氨酸插入突变的游离巯基进行定点偶联的小分子高活性细胞毒素包括但不限于 MMAE、MMAF、PBD、SN-38、Dox 及其类似物，MMAE、MMAF、PBD、SN-38 及 Dox 分子式为：



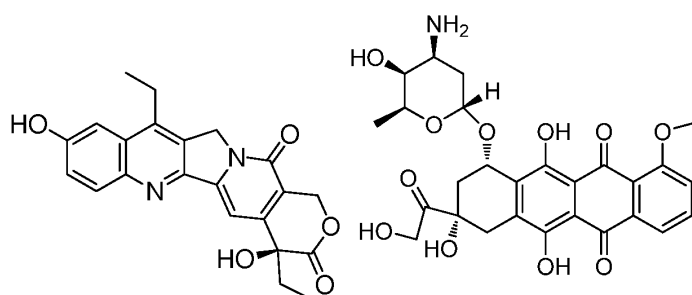
MMAE



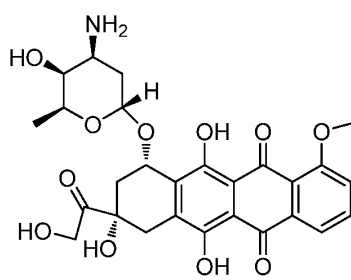
MMAF



PBD



SN-38



DOX

主要定点偶联步骤为：首先使用还原剂（如 DTT、TCEP 等）还原抗体，解除抗体上改造的半胱氨酸残基上的屏蔽，并通过阳离子交换层析或超滤换液等方式去除 DTT 与屏蔽物，然后使用氧化剂（如 DHAA、CuSO₄ 等）氧化抗体，使抗体的链间二硫键重新连接。最后加入 Linker-drug 与半胱氨酸残基上的游离巯基偶联，并通过阳离子交换层析或超滤换液等方式去除未偶联上抗体分子 Linker-

drug。

本发明氨基酸简表：

中文名称	英文名称	符号与缩写
丙氨酸	Alanine	A 或 Ala
精氨酸	Arginine	R 或 Arg
天冬酰胺	Asparagine	N 或 Asn
天冬氨酸	Aspartic acid	D 或 Asp
半胱氨酸	Cysteine	C 或 Cys
谷氨酰胺	Glutamine	Q 或 Gln
谷氨酸	Glutamic acid	E 或 Glu
甘氨酸	Glycine	G 或 Gly
组氨酸	Histidine	H 或 His
异亮氨酸	Isoleucine	I 或 Ile
亮氨酸	Leucine	L 或 Leu
赖氨酸	Lysine	K 或 Lys
蛋氨酸	Methionine	M 或 Met
苯丙氨酸	Phenylalanine	F 或 Phe
脯氨酸	Proline	P 或 Pro
丝氨酸	Serine	S 或 Ser
苏氨酸	Threonine	T 或 Thr
色氨酸	Tryptophan	W 或 Trp
酪氨酸	Tyrosine	Y 或 Tyr
缬氨酸	Valine	V 或 Val

SEQ ID NO:6 LC-Cys205ins 轻链恒定区 (Kappa) 氨基酸序列

>LC-Cys205ins-Kappa

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCVTKSFNRGEC

其中, GLSSPCVTKSFN 序列中标示出的 C 为定点偶联位点, 与 mc-vc-PAB-payload 进行定点偶联。

SEQ ID NO:8 LC-Cys206ins 轻链恒定区 (Kappa) 氨基酸序列

>LC-Cys206ins-Kappa

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSLSS
TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVCTKSFNRGEC

其中, GLSSPVCTKSFN 序列中标示出的 C 为定点偶联位点, 与 mc-vc-PAB-payload 进行定点偶联。

SEQ ID NO:10 IgG1-Fc-Cys439ins 重链恒定区 (Fc) 氨基酸序列

>IgG1-Fc-Cys439ins

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSCLSPGK

其中, TQKSLSCLSPGK 序列中标示出的 C 为定点偶联位点, 与 mc-vc-PAB-payload 进行定点偶联。

SEQ ID NO:12 LC-V205C 轻链恒定区 (Kappa) 氨基酸序列

>LC-V205C-Kappa

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSLSS
TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC

其中, GLSSPCTKSFN 序列中标示出的 C 为定点偶联位点, 与 mc-vc-PAB-payload 进行定点偶联。

本发明披露的全新半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物 (TDC) 相较非定点偶联的 ADC 具有药物均一性好, 副作用小等优点, 临床前研究结果显示其显著优于非定点偶联 ADC。

附图说明

图 1 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 2 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 3 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 4 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 5 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 6 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 7 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 8 为实施例 25 中 HIC-HPLC 检测 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 的结果图。

图 9 为实施例 26 中 RP-HPLC 检测 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 毒素比抗体比例的结果图。

图 10 为实施例 27 中 SEC-HPLC 检测 TDC 抗体骨架 4D3 的聚集情况结果图。

图 11 为实施例 27 中 SEC-HPLC 检测 TDC 抗体骨架 4D3-LC-Cys205ins 的聚集情况结果图。

图 12 为实施例 27 中 SEC-HPLC 检测 TDC 抗体骨架 4D3-LC-Cys206ins 的聚集情况结果图。

图 13 为实施例 27 中 SEC-HPLC 检测 TDC 抗体骨架 4D3-HC-Cys439ins 的聚集情况结果图。

图 14 为实施例 28 中实验结果图。

图 15 为实施例 29 中 4E1-LC-Cys205ins-MVPM、4E1-LC-Cys206ins-MVPM、4E1-HC-Cys439ins-MVPM 抗体与抗原 c-met 的亲和力结果图。

图 16 为实施例 29 中 TDC 4D3-LC-Cys205ins-MVPM、4D3-LC-Cys206ins-MVPM、4D3-HC-Cys439ins-MVPM 抗体与抗原 Trop2 的亲和力结果图。

图 17 为 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE、2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 对 EGFRwt 过表达的人皮肤鳞癌细胞 A431 的 IC₅₀ 检测结果图。

图 18 为 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE、2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 对 FGRvIII 过表达的人脑胶质瘤细胞株 U87-EGFRvIII 的 IC₅₀ 检测结果图。

图 19 为 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1 对 c-Met 中高度表达的恶性胶质瘤细胞株 U87-MG 的 IC₅₀ 检测结果图。

图 20 为 D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3 对 trop2 高度表达的胰腺癌细胞株 BXPC-3 的 IC₅₀ 检测结果图。

图 21 为 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE 在人血浆中稳定性的考察结果图。

图 22 为 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 在人血浆中稳定性的考察结果图。

图 23 为 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 在人血浆中稳定性的考察结果图。

图 24 为 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE 在人血浆中稳定性的考察结果图。

图 25 为 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 在人血浆中稳定性的考察结果图。

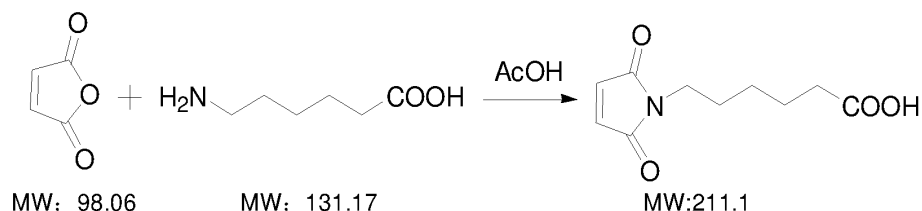
图 26 为 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 在人血浆中稳定性的考察结果图。

图 27 为 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3 亲本抗体在荷瘤小鼠药效上测试结果图。

图 28 为 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3 亲本抗体在荷瘤小鼠药效上测试结果图。

具体实施方式

实施例 1 mc 的合成

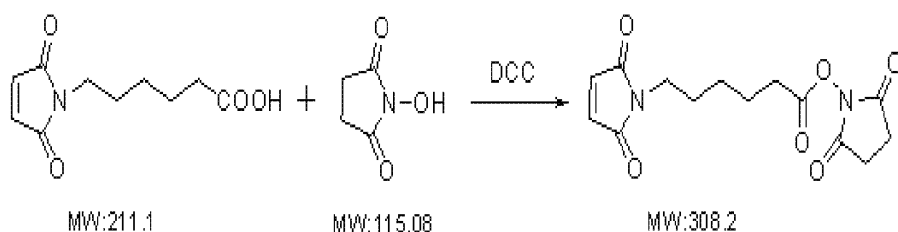


于 30ml 冰醋酸中加入 6-氨基己酸 3.9g (0.03mol) 和 1.2eq 的马来酸酐 3.5g (0.036mol)。反应液于 120℃ 搅拌反应 4~6h。反应完毕后，停止加热，自

然冷却到室温。60℃减压浓缩除去大部分醋酸。所得棕黄色粘稠液倒入水中，再加入乙酸乙酯 20ml×3 萃取，合并有机层。有机层依次用水、饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到棕黄色油状物，加入 50ml 水搅拌，有类白色固体析出，过滤，50℃减压干燥的目标产品 5.08g，收率 80%。

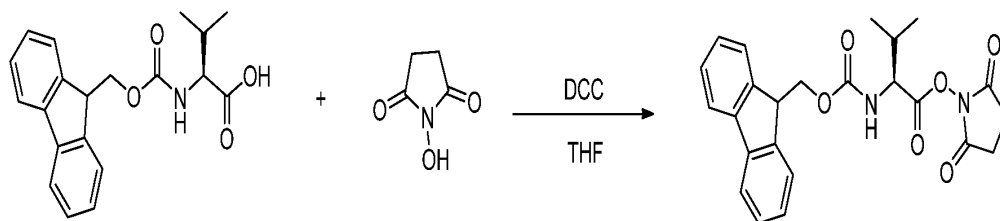
mp : 89–92 °C 。 m/z : 212.2 [M+H]⁺ 。 ¹HNMR (400Mz, DMSO) : 13.21 (br, 1H, COOH)、6.75 (s, 2H, COCH=CHCO)、3.63 (t, 2H, J=7.2Hz, NCH₂CH₂)、2.42 (t, 2H, J=7.4Hz, CH₂COOH)、1.52 –1.68 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₂)、1.30 –1.42 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH₂)。

实施例 2 Mc-OSu 的合成



在氮气保护下于 50ml 乙腈中加入 4.7g(22mmol)MC 和 25g (22mmol) HOSu。另取 4.5g (22mmol) DCC 溶于 25ml 乙腈中，保持内温在 0℃左右，将其缓慢滴入反应液中。反应液于 0℃反应 2 小时后再室温反应过夜。过滤，滤饼用乙腈 10ml×3 洗涤，滤液减压浓缩至干。所得油状物于室温减压干燥 6h 得到浅棕色固体 6.4 g，收率 95%。(不纯化直接投下一步反应) m/z : 309.2 [M+H]⁺ 。 ¹HNMR (400Mz , CDCl₃) : 1 ~ 2 (m, 6H, CCH₂CH₂CH₂C)、2.68 (t, 2H, CH₂CO)、2.95 (s, 4H, COCH₂CH₂CO)、3.68 (t, 2H, CH₂N)、6.81 (s, 2H, CH=CH)。

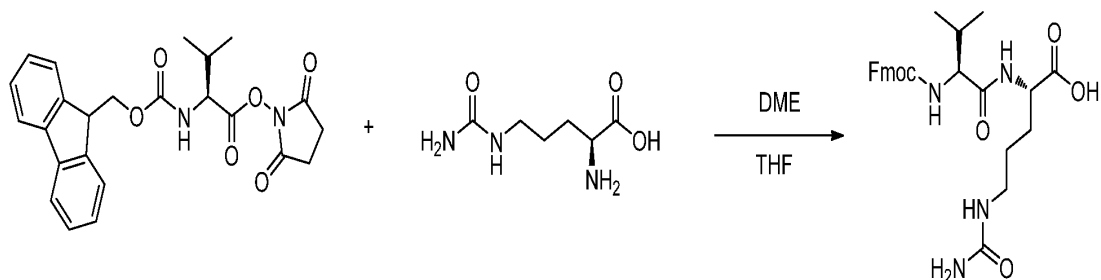
实施例 3 Fmoc-Val-OSu 的合成



于 100ml THF 中加入 Fmoc-Val 10g 和 HOSu 3.4g。另取 DCC6g 溶于 50ml 乙腈

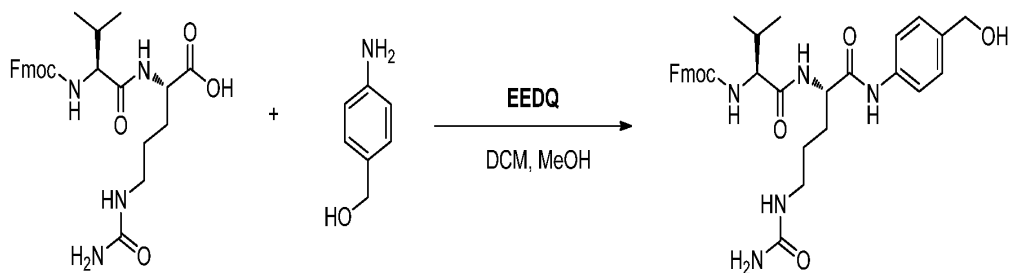
中, 保持内温在 0℃左右, 将其缓慢滴入反应液中。反应液于室温搅拌反应 24 小时。过滤, 滤饼用 THF 洗涤, 滤液减压浓缩得到透明油状物。油状物未经纯化直接投下一步反应。m/z: 437.4 [M+H]⁺。

实施例 4. Fmoc-vc 的合成



于 20ml THF 中加入 Cit 4.0g (1.05eq) 和碳酸氢钠的水溶液 60ml (NaHCO₃ 2g, 1.05eq)。另取 22.35mmol Fmoc-Val-OSu 溶于 60ml DME 中, 再将其加入反应液中。反应液于室温下搅拌反应 24 小时。反应完毕后, 向体系中加入 15% 柠檬酸水溶液 110ml, 然后再用 EA 萃取两次, 合并有机层, 减压浓缩得到白色固体。并向白色固体中加入甲基叔丁基醚 100ml 搅洗, 过滤, 滤饼于 40℃ 减压干燥 4h 得产品 4.83g, 收率 65%。m/z: 497.6 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO): 0.92 (6H, m)、1.35 ~ 1.65 (4H, m)、2.10 (1H, m)、3.01 (2H, q)、3.99 (1H, t)、4.01 -4.45 (2H, m)、4.45 (2H, t)、5.46 (2H, br)、6.03 (1H, t)、7.20-8.02 (8H, m)、8.25 (1H, d)。

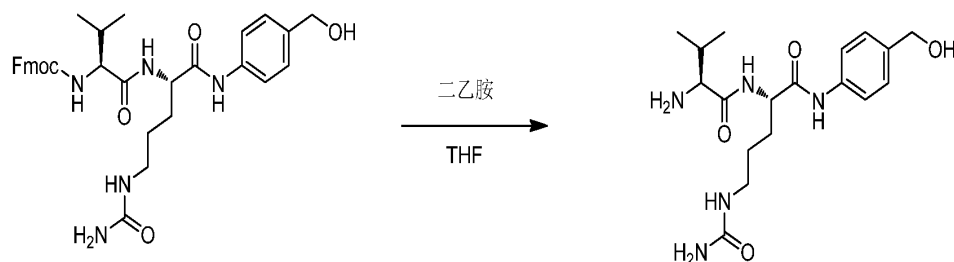
实施例 5. Fmoc-vc-PABOH 的合成



于反应瓶中加入 DCM/MeOH=2/1 混合溶剂 60ml, 再加入 Fmoc-vc 2g (4.2mmol) 和 PABOH 1.04g (2eq), 搅拌溶解部分后再加入 EEDQ 2.0g (2eq)。反应体系在室温条件下避光搅拌反应 2.0d。反应完毕后, 40℃ 减压浓缩得到白色固体。收集白色固体, 加入甲基叔丁基醚 100ml 搅洗, 过滤, 滤饼用甲基叔丁基醚洗涤, 所得白色固体 40℃ 减压干燥得到 2.2g, 收率约 88%。m/z: 602.6

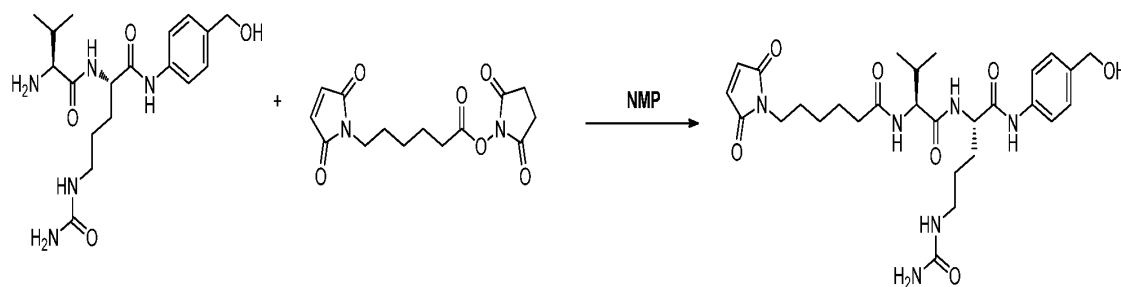
(M+H)⁺. ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0.95 (6H, m)、1.45~1.69 (4H, m)、2.10 (1H, m)、3.11 (2H, m)、3.99 (1H, m)、4.30 (2H, d)、4.05~4.66 (2H, m)、4.55 (2H, d)、5.21 (1H, t)、5.51 (2H, br)、6.11 (1H, t)、7.09 - 8.10 (12H, m)、8.21 (1H, d)、10.51 (1H, br)。

实施例 6. vc-PABOH 的合成



于 10ml NMP 中加入 Fmoc-vc-PABOH 490mg (0.815mmol) 搅拌溶解, 再加入二乙胺 2ml。于室温下搅拌反应 24h。反应完毕后, 于 40℃ 减压浓缩, 所得油状物中加入 20ml DCM 搅拌析晶, 过滤, 滤饼用 DCM 洗涤, 所得固体减压干燥得到 277mg, 收率 90%。m/z: 380.2 (M+H)⁺。 ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0.89 (6H, m), 1.31~1.61 (4H, m), 1.82 (1H, m), 2.86 (1H, m), 2.89 (2H, d), 4.38 (2H, d), 4.44 (1H, m), 5.01 (1H, br), 5.35 (2H, br), 5.84 (1H, br), 7.14 (2H, d), 7.42 (2H, d), 8.08 (1H, br), 9.88 (1H, br)。

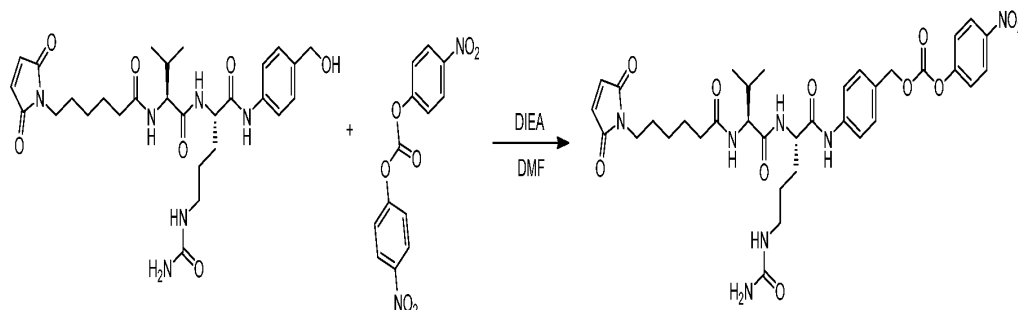
实施例 7. mc-vc-PABOH 的合成



于 10ml NMP 中加入 vc-PABOH 205mg (0.54 mmol) 和 MC-OSu 184mg (1.1eq), 加毕于室温下搅拌反应 24h。反应完毕, 于 40℃ 减压浓缩, 所得油状物中加入 20ml 甲基叔丁基醚搅拌析晶。过滤, 滤饼用甲基叔丁基醚洗涤, 得到 310mg 产品, 收率 100%。m/z: 573.3 (M+H)⁺。 ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0.89 (6H, m)、1.15-1.99 (10H, m)、2.11 (1H, m)、2.31 (2H, t)、3.21 (2H, m)、3.53 (2H, t)、4.32 (1H, t)、4.51 (1H, m)、4.59 (2H, br)、5.24 (1H, br)、5.56

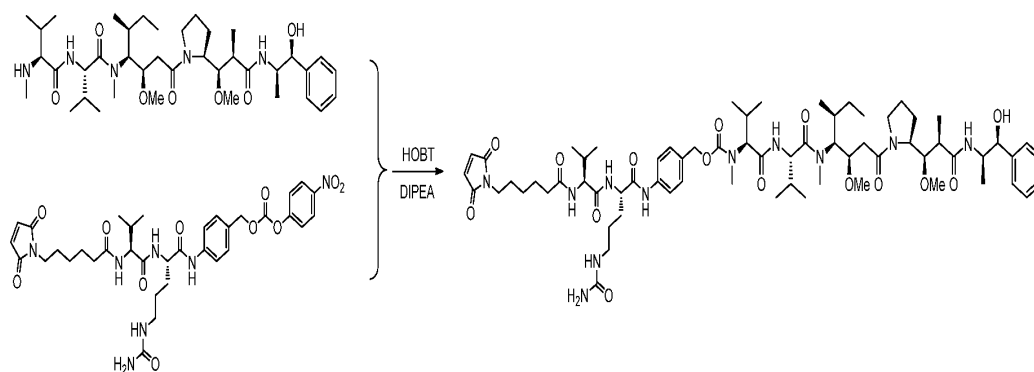
(2H, br)、6.20 (1H, br)、7.12 (2H, s)、7.23 (2H, d), 7.58 (2H, d)、7.94 (1H, d), 8.17 (1H, d)、10.21 (1H, br)。

实施例 8. mc-vc-PAB-PNP 的合成



在氮气保护下取 mc-vc-PABOH 168.6mg (0.294mmol) 溶于 5ml 无水吡啶中, 反应体系冷却到 0℃左右。另取 PNP179mg (3eq) 溶于 5mlDCM 中, 再将其缓慢加入到反应体系中。并于 0℃左右保持 10min 后除去冰浴, 再于室温搅拌反应 3h。反应完毕, 加入 70mlEA 和 100ml 15%柠檬酸水溶液, 分取有机层。有机层依次用柠檬酸, 水, 饱和食盐水洗涤, 再无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至干得到浅黄色油状物, 加入甲基叔丁基醚析晶得到类白色固体 86mg, 收率 40%。 m/z : 738 (M+H)⁺。 ¹HNMR (400Mz, CDC13/CD3OD): 0.84 (6H, m)、1.11–1.84 (10H, m)、2.05 (1H, m)、2.15 (2H, t)、3.09 (2H, m)、3.32 (2H, t)、4.12 (1H, m)、4.38 (1H, m)、5.15 (2H, s)、6.61 (2H, s)、6.84 (1H, d), 7.61 (1H, d)、7.21 (2H, d), 7.50 (2H, d)、7.61 (2H, d), 8.18 (2H, d)、9.59 (1H, br)。

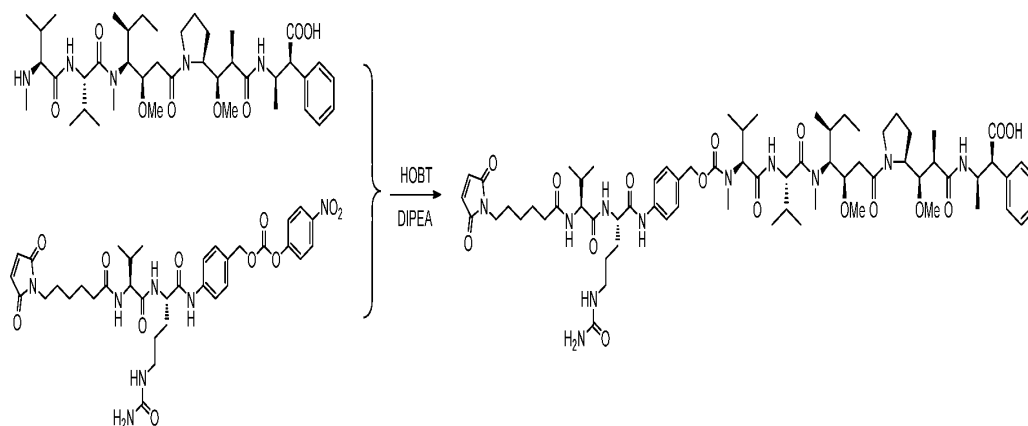
实施例 9. mc-vc-PAB-MMAE 的合成



于 2mlDMF 中加入 20mg mc-vc-PAB-PNP (1.5eq) 和 3mgHOBt。室温搅拌片刻后,

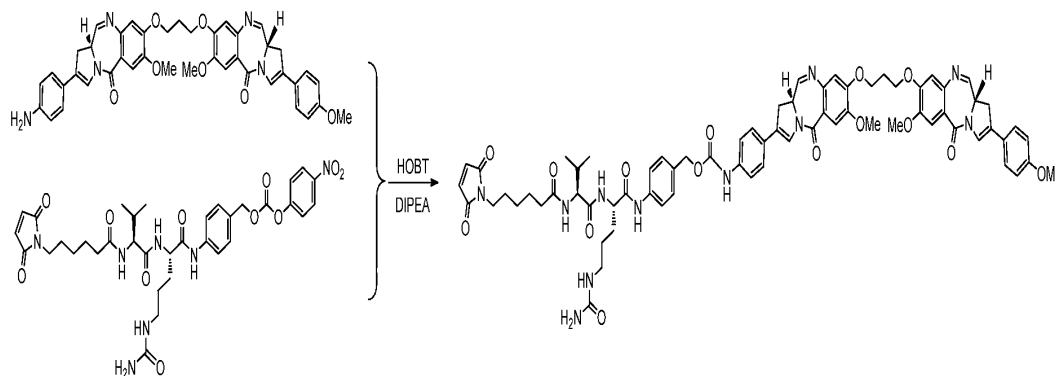
加入 13mgMMAE, 0.5ml 吡啶, 25 μ lDIEA。反应液于室温下搅拌反应 2d。反应完毕后, 反应液直接用制备柱纯化, 收集所需成分浓缩后冻干, 得到约 10mg 产品, 收率约 42%。m/z: 1317.1 (M+H)⁺。

实施例 10. mc-vc-PAB-MMAF 的合成



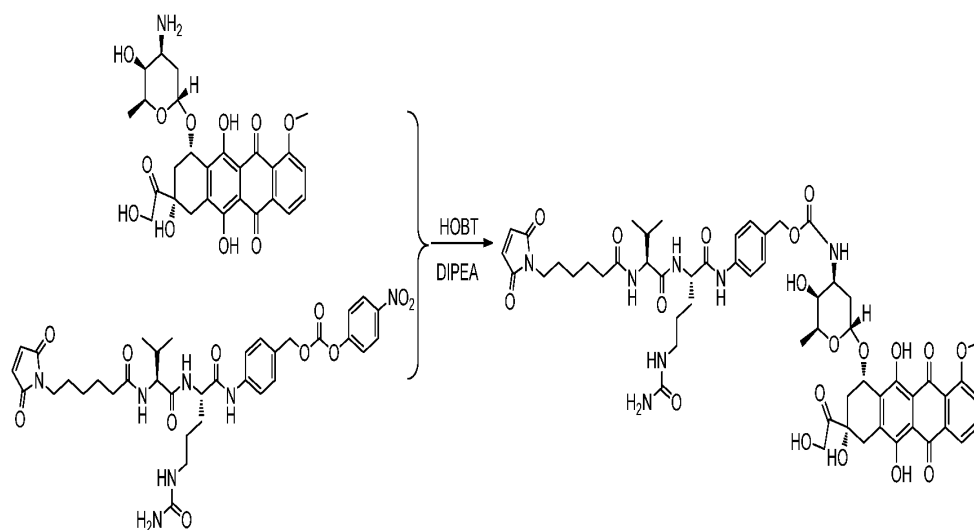
按照实施例 9 的操作, 得到 mc-vc-PAB-MMAF 约 12.5mg, 收率 45.2%, m/z: 1345.7 (M+H)⁺。

实施例 11 mc-vc-PAB-PBD 的合成



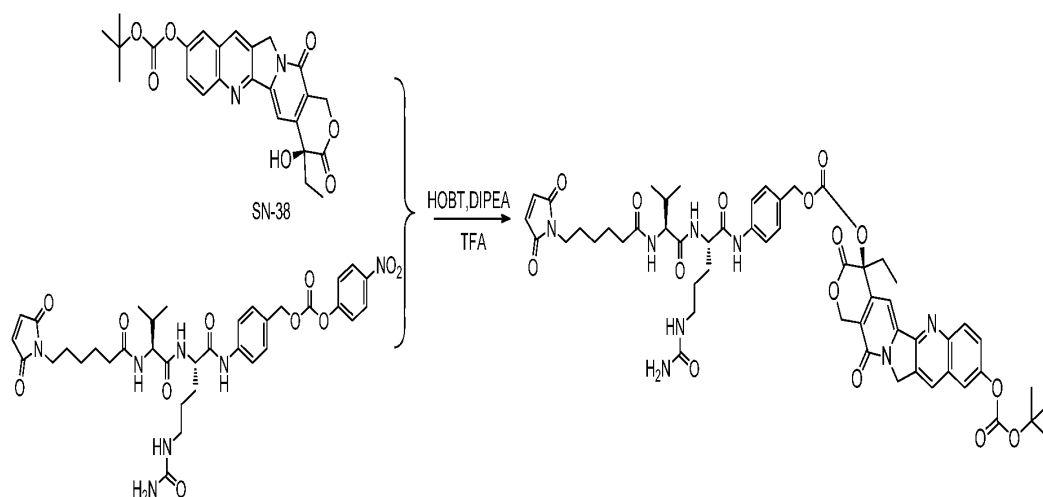
按照实施例 9 的操作, 得到 mc-vc-PAB-PBD 约 9.5mg, 收率 32.5%, m/z: 1325.4 (M+H)⁺。

实施例 12 mc-vc-PAB-DOX 的合成



按照实施例 9 的操作，得到 mc-vc-PAB-DOX 约 11.2mg，收率 38.9%， m/z ：1143.2 (M+H)⁺。

实施例 14 mc-vc-PAB-SN-38 的合成



将 100mg 购买的 10-O-Boc-SN-38 用 10ml 干燥的二氯甲烷溶解后，加入 25.6mg (1eq) DMAP，于 0℃ 下滴加三光气的二氯甲烷溶液 (62mg 三光气用 2ml 二氯甲烷溶解)，滴毕，继续于 0℃ 下反应 12h，减压除去二氯甲烷，用 10ml 干燥的 DMF 溶解后，加入 144mg mc-vc-PABOH，转至室温搅拌 24h，经过制备液相分离得到 mc-vc-PAB-SN-38 41mg，两步收率总的为 19.7%， m/z ：1063.2 (M+H)⁺。

实施例 15、目标抗体的表达与纯化

使用 Freestyle™ 293-F (Invitrogen) 悬浮细胞表达目标抗体。转染前一

天，以 6×10^5 个/mL 密度将细胞接种于含 300mL F17 完全培养基

(Freestyle™ F17 表达培养基, Gibco 公司) 的 1L 摇瓶中, 37℃, 5%CO₂, 120rpm 细胞培养摇床过夜培养。次日, 用 PEI 进行抗体表达质粒的转染, 其中质粒:PEI 比例为 2:1。转染后一天, 按 2.5% (v/v) 加入 TN1 补料培养基, 继续培养 4 天后离心收集上清。

收集得到的细胞表达上清, 经 Protein A 亲和层析柱 (Mabselect Sure LX, GE 公司), 以 0.1M 柠檬酸 (pH3.0) 洗脱, 捕获的抗体用 1M Tris-HCl (pH9.0) 按 1/10 (v/v) 调节至 pH7.0, 再通过凝胶过滤层析柱 SEC (Superdex 200, GE 公司) 去除多聚体和内毒素等杂质, 同时将抗体缓冲液置换成 PBS (pH7.4), 收集 UV280nm 目标峰样品经超滤离心管 (30KD, Pall 公司) 浓缩至 2mg/ml。通过此方法获得的目标抗体单体 (POI%) 大于 90%, 用于后续试验。

实施例 16、通过偶联 2A1-HC-Cys439ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 2A1-HC-Cys439ins 抗体, 经过 Mabselect Sure 纯化, 低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和, 并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE, 白色粉末, 将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物, 需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 2A1-HC-Cys439ins 抗体溶液中, 混匀后 20℃ 反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0, 并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中, 25℃ 避光反应 4 小时, 使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液, 使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联, 充分混匀后 25℃ 反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE, 得到 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 17、通过偶联 2A1-LC-Cys205ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 2A1-LC-Cys205ins 抗体, 经过 Mabselect Sure 纯化, 低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和, 并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物

mc-vc-PAB-MMAE, 白色粉末, 将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物, 需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 2A1-LC-Cys205ins 抗体溶液中, 混匀后 20℃反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0, 并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中, 25℃避光反应 4 小时, 使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液, 使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联, 充分混匀后 25℃反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE, 得到 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 18、通过偶联 2A1-LC-Cys206ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 2A1-LC-Cys206ins 抗体, 经过 Mabselect Sure 纯化, 低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和, 并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE, 白色粉末, 将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物, 需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 2A1-LC-Cys206ins 抗体溶液中, 混匀后 20℃反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0, 并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中, 25℃避光反应 4 小时, 使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液, 使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联, 充分混匀后 25℃反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE, 得到 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 19、通过偶联 4D3-HC-Cys439ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 4D3-HC-Cys439ins 抗体, 经过 Mabselect Sure 纯化, 低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和, 并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE, 白色粉末, 将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物, 需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 4D3-HC-Cys439ins 抗体溶液中, 混匀后 20℃反应 2 小时。反应时间到后将

样品的 pH 调整至 5.0, 并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中, 25℃ 避光反应 4 小时, 使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液, 使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联, 充分混匀后 25℃ 反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE, 得到 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 20、通过偶联 4D3-LC-Cys205ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 4D3-LC-Cys205ins 抗体, 经过 Mabselect Sure 纯化, 低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和, 并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE, 白色粉末, 将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物, 需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 4D3-LC-Cys205ins 抗体溶液中, 混匀后 20℃ 反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0, 并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中, 25℃ 避光反应 4 小时, 使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液, 使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联, 充分混匀后 25℃ 反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE, 得到 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 21、通过偶联 4D3-LC-Cys206ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 4D3-LC-Cys206ins 抗体, 经过 Mabselect Sure 纯化, 低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和, 并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE, 白色粉末, 将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物, 需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 4D3-LC-Cys206ins 抗体溶液中, 混匀后 20℃ 反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0, 并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中, 25℃ 避光反应 4 小时, 使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液, 使得

mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联,充分混匀后 25℃反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE,得到 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 22、通过偶联 4E1-HC-Cys439ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 4E1-HC-Cys439ins 抗体,经过 Mabselect Sure 纯化,低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和,并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE,白色粉末,将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物,需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 4E1-HC-Cys439ins 抗体溶液中,混匀后 20℃反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0,并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中,25℃避光反应 4 小时,使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液,使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联,充分混匀后 25℃反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE,得到 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 23、通过偶联 4E1-LC-Cys205ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 4E1-LC-Cys205ins 抗体,经过 Mabselect Sure 纯化,低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和,并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE,白色粉末,将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物,需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 4E1-LC-Cys205ins 抗体溶液中,混匀后 20℃反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0,并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中,25℃避光反应 4 小时,使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液,使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联,充分混匀后 25℃反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE,得到 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 24、通过偶联 4E1-LC-Cys206ins 抗体和 mc-vc-PAB-MMAE 制备 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品

细胞表达的 4E1-LC-Cys206ins 抗体，经过 Mabselect Sure 纯化，低 pH 洗脱后马上加入 Tris 溶液中和，并换液为 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。化合物 mc-vc-PAB-MMAE，白色粉末，将其溶解于 DMA 中备用。为了去除突变半胱氨酸残基上的屏蔽物，需要先将抗体还原。按照 40 倍分子比将 1M 的 DTT 水溶液加入 4E1-LC-Cys206ins 抗体溶液中，混匀后 20℃ 反应 2 小时。反应时间到后将样品的 pH 调整至 5.0，并通过 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除样品中的 DTT 和屏蔽物。随后按照 20 倍分子比将 DHAA 溶液加入样品中，25℃ 避光反应 4 小时，使抗体链间二硫键重新连接。然后加入 mc-vc-PAB-MMAE 溶液，使得 mc-vc-PAB-MMAE 与抗体突变半胱氨酸进行偶联，充分混匀后 25℃ 反应 2 小时。反应结束后使用 SP Sepharose F.F. 阳离子交换层析去除未偶联上抗体分子的 mc-vc-PAB-MMAE，得到 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 样品。

实施例 25、HIC-HPLC 检测毒素比抗体比例 DAR

用高效液相色谱疏水层析方法分析 TDC 样品，根据对应峰面积计算 DAR。具体方法如下：

色谱柱：Proteomix® HICBu - NP5 (5 μ m, 4.6 x 35 mm)；

流动相：A：2M 硫酸铵，0.025M、pH7 的磷酸盐缓冲液；B：0.025M、pH7 的磷酸盐缓冲液；C：100%异丙醇；

缓冲液 A 平衡，缓冲液 B 与缓冲液 C 梯度洗脱，25℃，214nm 和 280 波长下检测。

根据附图 1-3 计算得到定点偶联 DAR 在 1.6-1.7 之间，其化合物均一性很好。

根据附图 4-6 计算得到定点偶联 DAR 在 1.60-1.95 之间，其化合物均一性很好。

根据附图 7-8 计算得到定点偶联 DAR 在 1.60-1.90 之间，其化合物均一性很好。

实施例 26、RP-HPLC 检测毒素比抗体比例 DAR

RP-HPLC 检测毒素比抗体比例 DAR，采用反相疏水高效液相色谱法分析用 DTT 处理的样品，根据对应峰面积计算 DAR。具体方法如下：

色谱柱：Proteomix RP-1000（5 μm，4.6×100mm）

流动相：A：0.1%TFA 水溶液；B：0.1%乙腈溶液

流动相 A 与流动相 B 按比例梯度洗脱，80℃，214nm 和 280 波长下检测。

根据附图 9 计算得到定点偶联 DAR 为 1.82，其化合物均一性很好。

附表 1. 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 的偶联效率 DAR 表。

	化合物名称	DAR
定点偶联 (TDC)	2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.81
	2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.72
	2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.65
	2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.74
	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.92
	4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.64
	4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.75
	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.81
	4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.74
	4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1.82

附表 1 显示，通过半胱氨酸插入突变改造进行定点偶联的 TDC 化合物偶联效率均较高（理论最高值为 2.0），DAR≥1.6。

实施例 27、SEC-HPLC 检测 TDC 抗体骨架聚集情况

将 TDC 抗体骨架样品保存于 37℃，第 0、7、21、29 天分别用 SEC-HPLC 分析其聚集情况，具体方法如下：

色谱柱：TSKgel SuperSW mAb HR（7.8mm×30cm）

流动相：0.1M 硫酸钠、0.1M，pH6.7 的磷酸盐缓冲液。

25℃，280nm 检测

附图 10-13, SEC-HPLC 检测 TDC 抗体骨架 4D3、4D3-LC-Cys205ins、4D3-LC-Cys206ins 和 4D3-HC-Cys439ins 的聚集情况, 样品于 37℃ 存放 4 周, 聚集体含量基本没有变化。

同上述抗体的检测方法, 将 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 进行 SEC 检测。

附表 2. 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE、4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 目标单体含量列表

	化合物名称	POI%
定点偶联 (TDC)	2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC	96.0%
	2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	90.0%
	2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	90.4%
	2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	90.0%
	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	98.18%
	4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	94.34%
	4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	95.77%
	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	97.27%
	4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	96.06%
	4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	96.98%

附表 2 显示, 通过半胱氨酸定点偶联的 TDC 化合物目标单体含量在 90%以上。
实施例 28、经半胱氨酸定点突变和插入突变改造后的骨架抗体与亲本抗体 2A1

对于 EGFRvIII 的亲和力, 4E1 对于 c-met 的亲和力, 4D3 对于 Trop2 的亲和力。

用间接 ELISA 法对比 2A1-LC-V205C、2A1-LC-Cys205ins、2A1-LC-Cys206ins、2A1-HC-Cys439ins 及 2A1 对于 EGFRvIII 的相对亲和力。具体步骤如下:

重组 EGFRvIII-His*6 抗原包板; 鱼皮明胶封闭; 分别稀释 2A1、2A1-LC-V205C、2A1-LC-Cys205ins、2A1-LC-Cys206ins 和 2A1-HC-Cys439ins, 最高浓度 10ug/ml, 4 倍梯度稀释, 共 11 个浓度; HRP 标记的二抗孵育; TMB 显色, 检测 450nm 处吸收。检测结果以 A450 对浓度作图, 半胱氨酸定点突变或插入突变后的抗体 2A1-LC-V205C、2A1-LC-Cys205ins、2A1-LC-Cys206ins 和 2A1-HC-Cys439ins 保持了与 2A1 相似的亲和力, EC50 值很接近; 说明 2A1 上轻链 V205C 的定点突变、第 205 位插入突变或第 206 位插入突变, 或重链第 439 位插入突变不影响其与 EGFRvIII 抗原的亲和力。

如附图可见, 2A1-LC-V205C、2A1-LC-Cys205ins、2A1-LC-Cys206ins、2A1-HC-Cys439ins 抗体保持了 2A1 与抗原 EGFRvIII 的亲和力。

实施例 29、经半胱氨酸定点突变和插入突变改造后的骨架抗体与 TDC 对于相应抗原的亲和力。4E1 对于 c-met 的亲和力, 4D3 对于 Trop2 的亲和力。

用间接 ELISA 法对比 4E1-LC-Cys205ins-MVPM、4E1-LC-Cys206ins-MVPM、4E1-HC-Cys439ins-MVPM 及 4E1 对于 EGFRvIII 的相对亲和力。具体步骤如下:

重组 c-met-His*10 抗原包板; 鱼皮明胶封闭; 分别稀释 4E1-LC-Cys205ins-MVPM、4E1-LC-Cys206ins-MVPM、4E1-HC-Cys439ins-MVPM 和 4E1, 最高浓度 10ug/ml, 4 倍梯度稀释, 共 11 个浓度; HRP 标记的二抗孵育; TMB 显色, 检测 450nm 处吸收。检测结果以 A450 对浓度作图, 半胱氨酸定点插入突变后偶联得到的 TDC4E1-LC-Cys205ins-MVPM、4E1-LC-Cys206ins-MVPM、4E1-HC-Cys439ins-MVPM 保持了与亲本抗体 4E1 相似的亲和力, EC50 值很接近; 说明 4E1 轻链第 205 位插入突变或第 206 位插入突变, 或重链第 439 位插入突变所得到的 TDC 不影响其与 c-met 抗原的亲和力。

用间接 ELISA 法对比 4D3-LC-Cys205ins-MVPM、4D3-LC-Cys206ins-MVPM、4D3-HC-Cys439ins-MVPM 及 4D3 对于 EGFRvIII 的相对亲和力。具体步骤如下:

重组 Trop2-His*10 抗原包板; 鱼皮明胶封闭; 分别稀释 4D3-LC-

Cys205ins-MVPM、4D3-LC-Cys206ins-MVPM、4D3-HC-Cys439ins-MVPM 和 4D3，最高浓度 10ug/ml，4 倍梯度稀释，共 11 个浓度；HRP 标记的二抗孵育；TMB 显色，检测 450nm 处吸收。检测结果以 A450 对浓度作图，半胱氨酸定点插入突变后偶联得到的 TDC4D3-LC-Cys205ins-MVPM、4D3-LC-Cys206ins-MVPM、4D3-HC-Cys439ins-MVPM 保持了与亲本抗体 4D3 相似的亲和力，EC50 值很接近；说明 4D3 轻链第 205 位插入突变或第 206 位插入突变，或重链第 439 位插入突变所得到的 TDC 不影响其与 Trop2 抗原的亲和力。

如图 15，4E1-LC-Cys205ins-MVPM、4E1-LC-Cys206ins-MVPM、4E1-HC-Cys439ins-MVPM 抗体保持了 4E1 与抗原 c-met 的亲和力。

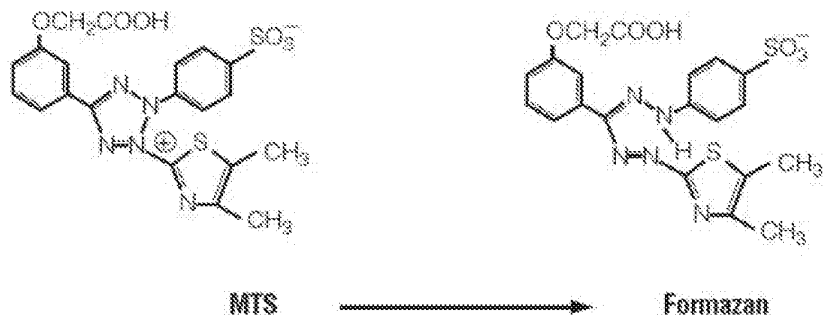
如图 16，4D3-LC-Cys205ins-MVPM、4D3-LC-Cys206ins-MVPM、4D3-HC-Cys439ins-MVPM 抗体保持了 4D3 与抗原 Trop2 的亲和力。

实施例 30、细胞毒性药效检测

通过下列实验过程测定 TDC 细胞毒性活性：将 TDC 分别加入到 EGFR 过量表达或 EGFRVIII 表达的人的肿瘤细胞培养基中，细胞培养 72 小时后测定细胞存活率。基于细胞的体外实验用于测定细胞存活率、细胞毒性和本发明 TDC 诱导的细胞程序性死亡。

通过细胞增殖试验测定抗体-毒素偶联物的体外药效。CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 为商购的 (Promega Corp., Madison, WI)。CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (a) 是一种用比色法来检测细胞增殖和细胞毒性实验中的活细胞数量的检测试剂。此试剂含有一个新型的四唑化合物[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]和一种电子偶联剂(phenazine ethosulfate; PES)。PES 具有增强的化学稳定性，这使它可与 MTS 混合形成稳定的溶液。这种方便的“单溶液”模式，是在第一代 CellTiter 96®Aqueous Assay 的基础上的改进，CellTiter 96®Aqueous Assay 中使用的电子偶联剂 PMS 与 MTS 溶液是分开的。MTS (Owen's reagent) 被细胞生物还原成为一种有色的甲臞产物，可直接溶解于培养基中 (图 1)。这种转化很可能是在代谢活跃的细胞中的脱氢酶产生的 NADPH 或 NADH 的作用下完成的。检测时，只需

将少量的 CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent 直接加入培养板孔的培养基中，孵育 1 - 4 小时，然后以酶标仪读取 490nm 的吸光度值。



在 490nm 处检测到的甲臞产物的量与培养中的活细胞数成正比。由于 MTS 的甲臞产物在组织培养基中可溶，CellTiter 96® AQueous One Solution Assay 与 MTT 或 INT 法相比操作步骤更少。

本发明中采用 A431 (EGFR 过表达细胞)、U87-EGFRVIII (EGFR 突变体稳定细胞系)、U87-MG (c-Met 中高度表达的恶性胶质瘤细胞株) 和 BXPc-3 (trop2 高度表达的胰腺癌细胞株) 作为体外药效检测的研究体系。在 96 孔板中，进行细胞铺板 6000/孔，24 小时后，进行抗体加药。A431, U87-EGFRVIII 细胞株对应的各种 TDC 始浓度为 10uM, 依次按照 5 倍梯度稀释, U87-MG, BXPc-3 细胞株对应的各种 TDC 始浓度为 1uM, 依次按照 5 倍梯度稀释。处理 72 小时后 MTS 检测细胞活性。

附表 3、TDC、ADC 对 EGFRwt 过表达细胞系 A431 及 EGFRvIII 表达稳定性株 U87-EGFRVIII 细胞毒性 IC₅₀ 检测结果

	化合物	MTS			
		A431	U87MG-EGFRvIII	U87-MG	BXPc-3
抗体 2A1	2A1	>10 μ M	>10 μ M	/	/
	2A1-LC-V205C	>10 μ M	>10 μ M	/	/
	2A1-LC-Cys205ins	>10 μ M	>10 μ M	/	/
	2A1-LC-Cys206ins	>10 μ M	>10 μ M	/	/
	2A1-HC-Cys439ins	>10 μ M	>10 μ M	/	/

定点偶联 (TDC)	2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE	92.16 nM	296.11 nM	/	/
	2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	133.67 nM	492.14 nM	/	/
	2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	179.26 nM	457.48 nM	/	/
	2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	26.62 nM	118.52 nM	/	/
抗体 4E1	4E1	/	/	>1 μ M	/
定点偶联 (TDC)	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	120.50nM	/
	4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	79.57nM	/
	4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	7.41nM	/
抗体 4D3	4D3	/	/	/	>1 μ M
定点偶联 (TDC)	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	/	0.38nM
	4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	/	0.45nM
	4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	/	0.23nM

附表 3 结果显示, 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys205Cins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、2A1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 对 EGFRwt 过表达细胞系 A431 及 EGFRvIII 表达稳定性株 U87-EGFRvIII 细胞毒性活性相当, 439 位插入的突变的 TDC 活性略好于 205 位和 206 位插入突变的 TDC,

4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 在 U87-MG 细胞毒性活性和偶联位置有一定的关联, 439 位插入的突变的 TDC 活性略好于 205 位和 206 位插入突变的 TDC, TDC 的活性要显著好于亲本抗体的活性。

4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 在胰腺癌细胞株 BXP-3 上细胞

毒性活性上相当, 439 位插入的突变的 TDC 活性略好于 205 位和 206 位插入突变的 TDC, TDC 的活性要显著好于亲本抗体的活性。

实施例 31、血浆稳定性检测

取一定量的 ADC 样品, 加入到已去除人 IgG 的人血浆中, 每种 ADC 重复 2 管, 放置 37℃ 水浴中孵育, 分别孵育 0h, 72h 后, 取出 ADC 样品, 每管加入 ProteinA (MabSelect SuRe™ LX Lot:#10221479 GE, 用取 PBS 洗涤过的) 100ul, 垂直混合仪晃动吸附 2h, 经过洗涤洗脱步骤, 获得孵育后的 ADC。对孵育特定时间的 ADC 样品进行 HIC-HPLC 和 RP-HPLC 检测, 判定样品的血浆稳定性。

附图 21-23, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 在人血浆中稳定性的考察结果, 其中 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE 的检测方法是 RP-HPLC, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 的检测方法是 HIC-HPLC。

附图 24-26, 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、在人血浆中稳定性的考察结果, 检测方法为 HIC-HPLC。

附表 4. TDC 血浆稳定性检测结果表(以 DAR 的变化情况计算)

	化合物名称	DAR	
		37℃ 0h	37℃ 72h
定点偶联 (TDC)	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1. 89	1. 77
	4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1. 81	1. 62
	4E1-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1. 85	1. 83
	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1. 86	1. 71
	4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1. 76	1. 52
	4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC	1. 81	1. 80

上述 TDC 加入人血浆样品中 37℃ 孵育 72 小时后均相对稳定, 具备良好的成药性。比较而言, 439 位插入突变的 TDC 稳定性最佳, 205 位、206 位插入突变的 TDC 次之。

实施例 32、荷瘤小鼠药效检测

本发明中建立了 BXPC-3 荷瘤小鼠模型, 以评价 TDC 和亲本抗体的体内药效。即以 3×10^6 BXPC-3 细胞通过皮下注射到 4~6 周鼠龄的 BALB/c 裸鼠背部一侧, 待小鼠肿瘤平均大小生长至 400~500mm³, 随机分组, 每组 5 只, 在第 0 天和第 7 天, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 分别以 5mg/kg 剂量进行单次静脉给药, 亲本抗体 4D3 以 5mg/kg 剂量给药。数据 A 显示为测量时肿瘤平均体积 $\pm$ SE, 数据 B 显示为测量时小鼠平均体重 $\pm$ SE。

附图 27、4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 以及 4D3 亲本抗体在荷瘤小鼠药效上测试结果, 相对于亲本抗体, TDC 能显著体现出体内抑瘤效果。

附图 28、4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC、4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 和 4D3-HC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC 以及 4D3 亲本抗体在荷瘤小鼠药效上测试, 小鼠体重没有明显的改变, 证明 TDC 体内毒性较小或无体内毒性。

本发明并不限于由实施例中披露的具体实施方案的范围, 这些实施例用来例示本发明的几个方面, 在功能上等价的任意实施方案均属于本发明的范围。实际上, 除本文所示和所述的以外, 本发明的各种变型对本领域技术人员而言也是显而易见的并且属于本文所附权利要求的范围。

权利要求书

1、半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：抗体为半胱氨酸定点插入抗体，所述半胱氨酸插入位点包含选自以下 3 个插入位点的一个或多个位点：kappa/λ 轻链恒定区 Kabat 编号第 205 位、轻链恒定区 Kabat 编号第 206 或 IgG 抗体重链恒定区 Kabat 编号第 439 位。

2、如权利要求 1 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：所述半胱氨酸插入位点氨基酸序列包含以下 3 个序列的一个或多个：

LC-205ins:GLSSPCVTKSF、LC-206ins:GLSSPVCTKSF 或 HC-439ins:TQKSLSCLSPGK，其中，C为目标抗体轻链 205 位或 206 位或重链第 439 位插入的半胱氨酸。

3、如权利要求 1 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：高活性细胞毒素通过连接子与插入的半胱氨酸游离巯基进行定点偶联，连接子与插入的半胱氨酸偶联的抗体轻链氨基酸序列为：GLSSPCVTKSF 和 GLSSPVCTKSF；连接子与插入的半胱氨酸偶联的抗体重链氨基酸序列为：TQKSLSCLSPGK；

其中，C为目标抗体轻链 205 位或 206 位或重链第 439 位插入的半胱氨酸。

4、如权利要求 1 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：所述抗体轻链包括 kappa 或 λ 同种型。

5、如权利要求 1 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：所述抗体重链包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型。

6、如权利要求 1 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：所述半胱氨酸包含巯基。

7、如权利要求 5 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：所述巯基能够进行化学偶联。

8、如权利要求 1 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物，其特征在于：通过连接子与半胱氨酸插入突变的游离巯基进行定点偶联的高活性细胞毒素选自：MMAE、MMAF、PBD、SN-38 或 Dox 及其类似物。

9、一种如权利要求 1 所述的半胱氨酸改造的抗体-毒素偶联物的制备方法，其特征在于：定点偶联步骤为：首先使用还原剂还原抗体，解除抗体上改

造的半胱氨酸残基上的屏蔽，并通过阳离子交换层析或超滤换液等方式去除 DTT 与屏蔽物；然后使用氧化剂氧化抗体，使抗体的链间二硫键重新连接；最后加入 Linker-drug 与胱氨酸残基上的游离巯基偶联，并通过阳离子交换层析或超滤换液等方式去除未偶联上抗体分子 Linker-drug。