



(21) 申请号 202311769186.2

(22) 申请日 2023.12.21

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 117838879 A

(43) 申请公布日 2024.04.09

(73) 专利权人 上海药明合联生物技术有限公司  
地址 200120 上海市浦东新区中国(上海)  
自由贸易试验区富特北路211号302部  
位368室

(72) 发明人 王泽坤 蔡永凤 李雨鑫 范启睿  
李志强

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

专利代理师 刘锴

(51) Int. Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2023036137 A1, 2023.03.16

审查员 陈瑶

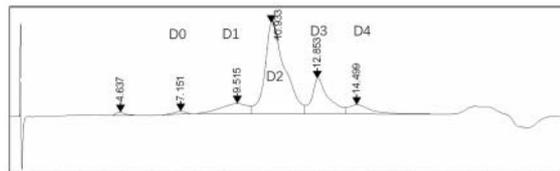
权利要求书2页 说明书14页 附图5页

(54) 发明名称

一种提高抗体-药物缀合物同质性的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种提高抗体-药物缀合物同质性的制备方法及其应用,所述制备方法包括:  
(1) 将还原剂和待缀合的抗体在含有过渡金属离子的缓冲体系中温育,还原抗体内链间二硫键产生还原的巯基;  
(2) 将携带有两个反应性基团的药物-连接子的复合物与步骤(1)得到的还原的巯基基团进行共价偶联;由此制得抗体-药物缀合物混合物。所述方法在不对抗体序列进行修改的同时,利用任意给定的具有反应活性的连接子,选择性地在抗体的铰链区修饰上两个药物分子。所述方法能够产生具有改善的、同质性的ADC,同时所述方法操作简单能够实现降本增效。



1. 一种提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:

(1) 将还原剂和待缀合的抗体在含有过渡金属离子的缓冲体系中温育,还原抗体内链间二硫键产生还原的巯基;

(2) 将携带有至少两个反应性基团的药物-连接子的复合物与步骤(1)得到的还原的巯基基团进行共价偶联;由此制得抗体-药物缀合物混合物;

步骤(2)中,所述复合物中的连接子中偶联抗体的接头部分含有至少两个反应性基团,分别共价偶联抗体上的两个巯基;

步骤(1)中,所述过渡金属离子为 $Zn^{2+}$ ;

步骤(2)中,所述复合物中反应性基团独立选自:马来酰亚胺、有机溴化物、碘化物、砜类化合物或带有缺电子基团的烯、炔类化合物中至少两种的组合;

步骤(2)中,所述共价偶联的条件为:共价偶联的体系中药物的物质的量浓度至少大于抗体浓度的2倍及以上。

2. 根据权利要求1所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述还原剂选自:三(2-羧乙基)膦、二苯基膦基乙酸、2-[2-(二苯基膦基)乙基]吡啶、3-(二苯基膦基)苯磺酸、4-(二苯基膦基)苯甲酸、2-(二苯基膦基)乙胺、3-(二苯基膦基)丙胺、3-(二苯基膦基)丙酸、2-(二异丙基膦基)乙胺、2-(二苯基膦基)苯甲酸、(2-羟基苯基)二苯基膦、1,3,5-三氮杂-7-磷杂三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷、正丁基二(1-金刚烷基)膦、三乙酰氧基硼氢化钠或氰基硼氢化钠中任意一种或至少两种的组合;

步骤(1)中,所述还原剂在温育体系中的终浓度为0.04-0.4mM。

3. 根据权利要求1所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述过渡金属离子以过渡金属盐的形式添加在缓冲体系中,所述过渡金属盐选自: $ZnCl_2$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $Zn(CH_3COO)_2$ 、 $ZnI_2$ 、 $ZnBr_2$ 、 $Zn(HCOO)_2$ 或 $Zn(BF_4)_2$ 中任意一种或至少两种的组合;

步骤(1)中,所述过渡金属离子在温育体系中的终浓度为0.01-0.2mM。

4. 根据权利要求1所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述缓冲体系选自:HEPES缓冲液、组氨酸缓冲液、PBS缓冲液或MES缓冲液中任意一种或至少两种的组合;

步骤(1)中,所述缓冲体系的pH为5.5-7.5。

5. 根据权利要求1所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,步骤(1)中,所述温育的温度为 $0^{\circ}C \sim 20^{\circ}C$ ;

步骤(1)中,所述温育的时间为8-24小时。

6. 根据权利要求1所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,步骤(2)中,所述复合物中的药物具有细胞毒性、抗肿瘤或标记效果;

步骤(2)中,反应温度为 $-10^{\circ}C \sim 37^{\circ}C$ ,反应时间为0.5-24小时;

所述反应温度为 $0^{\circ}C \sim 20^{\circ}C$ ;

所述共价偶联的体系中还包含有机溶剂,所述有机溶剂使体系保持澄清;

所述共价偶联的体系中还包含金属螯合剂,所述金属螯合剂调节药物的反应活性;

所述金属螯合剂的种类包括EDTA、DPTA或DOTA中任意一种或至少两种的组合;

所述金属螯合剂的浓度为抗体浓度的0-3倍。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,还包括采用氧化剂将步骤(2)中未反应的巯基再氧化的步骤;

所述氧化剂选自:脱氢抗坏血酸、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)、氧气或空气中任意一种或至少两种的组合;

所述氧化剂的终浓度为0.04-0.8mM;

所述氧化的反应条件为:氧化剂的浓度至少高于抗体的浓度,温度为0°C ~ 20°C;反应时间为0.5-24小时。

8. 根据权利要求7所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,步骤(2)后,还包括纯化步骤,所述纯化包括:采用EDTA作为螯合剂去除过渡金属离子的步骤;

所述纯化的方法包括:使用脱盐柱、尺寸排阻层析、疏水相互作用色谱、超滤管或切向流过滤系统中任意一种或至少两种的组合进行纯化。

9. 根据权利要求8所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:

(1) 将含有Zn<sup>2+</sup>的过渡金属离子的过渡金属盐加入缓冲体系中,所述缓冲体系选自:HEPES缓冲液、组氨酸缓冲液、PBS缓冲液或MES缓冲液中任意一种或至少两种的组合,所述缓冲体系的pH为5-8;将还原剂和待缀合的抗体在有含有过渡金属离子的缓冲体系中于-10°C ~ 37°C温育8-24小时,选择性地还原抗体内链间二硫键产生还原的巯基;所述还原剂在温育体系中的终浓度为0.04-0.4mM,所述过渡金属离子在温育体系中的终浓度为0.01-0.2mM;

(2) 将具有细胞毒性、抗肿瘤或标记效果的药物与含有至少两个反应性基团的连接子共价结合,得到携带有至少两个反应性基团的药物-连接子的复合物;所述连接子中的两个反应性基团分别共价偶联抗体上的两个巯基;将过量的携带有至少两个反应性基团的药物-连接子的复合物与步骤(1)得到的还原的巯基基团进行共价偶联;所述共价偶联的条件为:共价偶联的体系中药物的物质的量浓度至少大于抗体浓度的2倍及以上,反应温度为-10°C ~ 37°C,反应时间为0.5-24小时;

采用氧化剂将未反应的巯基再氧化,所述氧化剂的终浓度为0.04-0.8mM;所述氧化的反应条件为:氧化剂的浓度至少高于抗体的浓度,温度为:-10°C ~ 37°C;反应时间为0.5-24小时;使用脱盐柱、尺寸排阻层析、疏水相互作用色谱、超滤管或切向流过滤系统中任意一种或至少两种的组合进行纯化,回收获得的抗体-药物缀合物。

10. 权利要求1-9中任一项所述的提高抗体-药物缀合物DAR2同质性的制备方法在制备ADC药物中的应用。

## 一种提高抗体-药物缀合物同质性的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物制药技术领域,具体涉及一种提高抗体-药物缀合物同质性的制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] ADC(抗体-药物缀合物,antibody-drug conjugate,ADC)含有用于靶向的抗体、用于药物连接的连接子和作为效应物的高效力有效载荷(例如,药物)。自从US FDA在2011年批准Adcetris(维布妥昔单抗)以来,ADC药物速度逐渐增加,现在已经广泛扩展用于治疗癌症。目前包括Adcetris,Kadcyla(曲妥珠单抗-美坦新偶联物),Besponsa(奥英妥珠单抗),Mylotarg(吉妥珠单抗),Polivy(泊洛妥珠单抗),Blenrep(玛贝妥单抗),Enhertu(德曲妥珠单抗),Padcev(恩诺单抗),Trodely(戈沙妥珠单抗),Tivdak(替索单抗),Zynlonta(朗妥昔单抗),Akalux,Lumoxiti(帕克莫单抗)或爱地希等药物。同时,有更多的药物处在临床阶段的研究过程中。

[0003] Kadcyla和Enhertu都使用了trastuzumab(曲妥珠单抗),但分别使用了DM1(美登素DM1,Mertansine DM1)和DXD(DNA拓扑异构酶I抑制剂)作为载荷,其DAR值(小分子毒素抗体比DAR,drug-to-antibody ratio)分别选择了3.5和8。这说明DAR值的选择要与载荷的种类相适应。在上市药物中,Zynlonta(朗妥昔单抗)是一个较为特殊的案例,其使用的小分子药物PBD(吡咯并苯二氮杂草二聚体,PBD Dimer)在所有ADC的载荷中具有最高的毒性。以此相对应的,是其具有现有已上市ADC中最低的药物-抗体比值2:1。这一药物的设计说明,DAR值的选择中需要考虑的一个重要参数是载荷的毒性。毒性越高,则应适配更低的DAR值,以此避免载荷非特异性释放时对人体造成不必要的损害。

[0004] 对于DAR值的高低,本行业内部并没有一个绝对的标准,而是在一定范围内浮动的。以载荷为Exatecan(依喜替康甲磺酸盐)类似物的ADC为例,Exatecan类似物为较低毒性的载荷,在Enhertu中的DAR值为8;但在SHR-A1811中的DAR值则为5.7。它们的DAR值均高于4.0(此为中毒性载荷MMAE(单甲基澳瑞他汀E,Monomethyl auristatin E)的常见DAR值),但他们的DAR值差值却高达2.3。因此,在ADC研发过程中,尝试多种DAR值是必经之路。

[0005] 对于平均DAR值,也需要考虑DAR值的分布带来的不同。例如,同样是DAR值为2的ADC,由75%不带药物的无毒抗体与25% DAR值为8的高毒ADC混合得到的产品;与纯净的DAR值为2的ADC,其在生物体内的表现并不相同。因为这两组在给药量较低时,实际参与毒性对比的物质为DAR2的ADC和1/4量的DAR8的ADC。因此,在尝试多种DAR值的过程中,应该以具有尽可能专一的DAR值的ADC进行尝试,以保证药理实验的结果更有参考价值。

[0006] 为了满足这一需求,多种偶联技术被开发出来以期更好地制备具有更好均质性的ADC。对于药物连接,利用对于抗体和连接子-有效载荷(即,连接子-药物)两者都具有高度反应性和稳定性的官能团进行偶联,以形成稳定的共价键。常规的连接方式,即将药物部分与抗体经由连接子共价结合,通常导致异质分子混合物,其中药物部分连接在抗体的数个位点上。例如,细胞毒性药物已经典型地通过抗体中通常含有的多个赖氨酸残基缀合于抗

体,产生异质的抗体-药物缀合物混合物。

[0007] 例如,抗体-药物缀合物通常通过两种常规化学策略产生:基于赖氨酸(Lys)的缀合和基于半胱氨酸的缀合,所述半胱氨酸(Cys)来自链间二硫键(S-S键)还原。对于赖氨酸残基上的伯胺基团的反应而言,最广泛使用的连接子-有效载荷上的反应性基团是NHS酯(即,N-羟基琥珀酰亚胺)。但是NHS酯在抗体-药物缀合物生产中的应用受限于其固有性质,例如NHS酯和伯胺之间的反应在酸性条件下非常慢,因此缀合需要在高pH值(即>7.0)的缓冲液中进行,然而高pH值对于抗体有时并不友好,并且NHS倾向于在碱性条件下水解,这使得缀合后游离药物的纯化和鉴定变得更复杂。此外,由于NHS酯与抗体上的伯胺的低反应性,反应需要在高温(即22°C)下进行。此外,由于低溶解度,通过NHS酯(即SMCC-DM1)制备的连接子-有效载荷需要更多的有机溶剂来完全溶解于反应体系中,这增加了抗体聚集的风险。

[0008] 对于来自链间二硫键还原的半胱氨酸的缀合,它包括在各种还原剂(如TCEP(三(2-羧乙基)膦),DTT(二硫苏糖醇)等等)的存在下打开链间二硫键的步骤,接着发生巯基的亲核反应。在该缀合过程中,抗体-药物缀合物典型地如下形成:将一个或多个抗体半胱氨酸巯基与一个或多个与药物结合的连接子部分缀合,由此形成抗体-连接子-药物复合物。与大多数胺(其在pH7附近质子化和亲核性低)不同,半胱氨酸巯基在中性pH下具有反应性。由于游离巯基(RSH,硫氢基)基团相对具有反应性,所以具有半胱氨酸的蛋白经常以它们的氧化形式作为二硫键连接的寡聚物存在或者具有内部桥连的二硫键。与抗体胺或羟基相比,抗体半胱氨酸巯基对于亲电缀合试剂通常是更具反应性的,即更亲核的。但是,通过将蛋白的多个氨基酸残基突变为半胱氨酸而对半胱氨酸巯基进行改造有可能存在问题。在浓缩的蛋白溶液中,无论在大肠杆菌的周质、培养物上清液,还是部分或完全纯化的蛋白中,蛋白表面上的未配对的Cys残基可以配对和氧化以形成分子间二硫键,并且因此可以形成蛋白二聚体或多聚体形式。二硫键二聚体形成使得新Cys对于与药物、配体或其他标记的缀合不起反应。此外,如果蛋白在新改造的Cys和已有的Cys残基之间氧化形成分子内二硫键,则两个Cys基团都不能用于活性位点参与和相互作用。另外,通过错误折叠或者丧失三级结构,可以使得失去蛋白无或者变成非特异性的蛋白。

[0009] 因此,开发新的作为治疗剂的ADC是非常重要的。然而,常规的缀合方法总是导致异质分子混合物,其中药物部分连接于抗体上的数个位点。在不同的反应条件下,异质混合物一般含有具有从0至约8或更多的连接的药物部分的抗体分布。另外,在具有特定整数比率的药物部分/单个抗体的每个缀合物亚类中,存在药物部分与抗体的各个位点连接的潜在的异质混合物。分析和制备方法不足以分离和表征由缀合反应获得的异质混合物中抗体-药物缀合物种类。异质混合物的促成十分复杂以致于表征和纯化是困难和昂贵的。在这样的混合物中的每个缀合产物可能具有不同药动学、分布、毒性和功效曲线,并且非特异性缀合还经常影响抗体的功能。抗体是一个具有许多反应性官能团的、大而复杂的和结构多样的生物分子。抗体与连接子试剂和药物-连接子中间体的反应性取决于诸如pH、浓度、盐浓度和助溶剂等因素。此外,由于控制反应条件和表征反应物和中间体的困难,多步缀合方法的重复性难以保证。

[0010] 控制与单个抗体分子偶联的药物的数目是获得的ADC的功效和安全性的一个重要因素。例如,在基于天然链间二硫键还原的缀合方法中,链间S-S键比其他二硫键对于溶剂

更可及。因此,链间二硫键可以用作药物(或药物-连接子)与抗体偶联的结合位点。通常,属于IgG1或IgG4亚类的一个治疗剂抗体分子具有4个链间S-S键,每个S-S键由两个-SH基团(巯基)形成,因此与单个抗体分子偶联的药物的数目是2、4、6或8。如果与单个抗体分子偶联的药物的数目是0,则产物称为D0。因此,D2是指两个药物分子与一个单个抗体分子偶联的ADC,其中两个药物分子可以与通过还原重链和轻链之间的S-S键产生的-SH基团偶联,或者可以与通过还原重链和重链之间的S-S键产生的-SH基团偶联。D4是指其中四个药物分子与一个单个抗体分子偶联的ADC。D6是指其中六个药物分子与一个单个抗体分子偶联的ADC。并且D8是指其中八个药物分子与一个单个抗体分子偶联的ADC,即一个抗体分子中的所有四个链间S-S键被还原成八个-SH基团并且每个-SH基团连接一个药物分子。

[0011] 通常,通过常规缀合方法产生的ADC分子的异质混合物是D0、D2、D4、D6和D8的混合物。本领域公知,异质ADC产物通常是不稳定的并且具有高免疫原性。对于优化功效和确保剂量之间恒定,保证每个抗体的缀合药物部分的数目相同并且每个部分与每个抗体中相同氨基酸残基特异性缀合十分重要。因此,已经被开发出来以改善抗体-药物缀合物的同质性的方法。其中,选择性制备D4和D2的方案被研究得较为广泛。

[0012] 选择性制备D4的技术例如硫桥方案,IgG1或IgG4亚类的抗体分子具有4个链间S-S键,硫桥方案中,将4个S-S键完全还原,其药物-连接子中的接头会同时与两个巯基反应。因此,当药物-连接子的反应经过优化达到理想状态时。其与被完全还原的抗体分子充分反应的产物即为D4产品。由于桥联分子是一种设计理念,因此只要具有两个能与巯基反应活性位点的分子,我们都可以将其理解为是一种桥联分子。

[0013] 专利W02016064749A2公开了一种基于二溴马来酰亚胺的连接子,使用两个溴原子,取代了传统马来酰亚胺上的两个氢原子。在反应机理上,马来酰亚胺与巯基的反应为加成反应,而二溴马来酰亚胺与巯基的反应则为加成-消除反应,且可以发生两次。就反应结果来看,相当于每次反应发生一次巯基对溴的取代反应。

[0014] 目前的桥联分子的反应位点是巯基,其反应模式与传统的连接子相近,从机理上划分,一般为加成、取代或加成-消除。桥联分子存在的问题也较为统一:巯基连接反应过程中存在错配的可能性,主要表现为其可能生成较多的半抗产物;此外,这一系列分子的目标DAR值仅为4,当目标的DAR值发生变化时,桥联分子便无法保持其高选择性;从反应过程上看,由于反应总是分步发生的,巯基亲核取代要求底物缺电子,但现有连接子设计中,时常出现多个反应中心与连接子母体间存在共轭的现象,这意味着反应发生第一步之后,反应物的活性是钝化的,这需要通过其他方法控制反应,以避免桥联分子的半连接现象。

[0015] 专利W02020164561A1提供了另一种选择性制备D4的方案,其使用金属离子锁定抗体的铰链区的两个S-S键,使其在一般还原剂的作用下不能发生还原。在这一作用下,一个抗体上只有两个二硫键能被打开,释放出4个巯基,因此其能够选择性地制备D4的产品。与桥联分子相同,这一方法虽然能够适应多种不同的连接子,但其目标DAR值局限于4。

[0016] 选择性制备D2的技术之一-位点特异性标记技术,其已经被开发和应用用于制备用于临床前和临床研究的ADC。例如已经开发了改善的抗体-药物缀合物THIOMAB™,其通过在特定位点的半胱氨酸置换提供了药物与抗体的位点特异性缀合。在所述位点改造的半胱氨酸可用于缀合细胞毒性药物但是不干扰免疫蛋白折叠和组装或者不改变抗原结合和效应子功能。但是,位点特异性标记技术涉及蛋白改造和/或酶催化,因而存在诸如抗体表达水

平低,纯化复杂和成本高等缺点。

[0017] 另一些在序列中插入非天然氨基酸的技术,也被应用于制备D2缀合物,插入非天然氨基酸的抗体的反应与天然抗体能进行的反应正交,除了在抗体上总计插入两个非天然氨基酸时可以制备同质性的抗体-药物1:2缀合物之外,也可以利用常规的反应制备多药物ADC。与半胱氨酸编辑的蛋白类似,非天然氨基酸编辑同样受到表达水平低,纯化复杂的限制。除此之外,其还需要建立一套用于翻译非天然氨基酸的tRNA体系,较插入半胱氨酸的抗体更加昂贵且复杂。

[0018] 要实现制备同质性的抗体-药物1:2缀合物,还可以通过亲和肽对抗体序列进行区域识别,并对所识别区域进行偶联,从而实现同质性的抗体-药物缀合物制备。例如,利用带有对苯甲酰基苯基的Fc-III亲和肽在365nm光照下与甲硫氨酸发生反应;但亲和肽技术所使用的肽段需要在偶联完成之后纯化去除,由于多肽的分子量较一般的小分子药物更大,所以其纯化难度更高,花费较大。

[0019] 目前市场上存在大量的对D2类型的抗体-药物缀合物的研发及生产需求,但是目前的选择性生产D2的方案存在需要修改序列、纯化工艺复杂且昂贵等问题,因此开发出一种操作简单且成本较低的制备较高同质性的D2 ADC的方案具在ADC药物制备过程中具有重要的应用。

## 发明内容

[0020] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种提高抗体-药物缀合物同质性的制备方法及其应用。本发明开发了一种新的选择性生产D2的生物缀合方法,在不对抗体序列进行修改的同时,利用任意给定的具有反应活性的连接子,选择性地在抗体的铰链区修饰上两个药物分子。所述方法能够产生具有改善的、同质性的ADC,同时所述方法操作简单能够实现降本增效。

[0021] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0022] 第一方面,本发明提供一种提高抗体-药物缀合物同质性的制备方法,所述制备方法包括:

[0023] (1) 将还原剂和待缀合的抗体在含有过渡金属离子的缓冲体系中温育,还原抗体内链间二硫键产生还原的巯基;

[0024] (2) 将携带有两个反应性基团的药物-连接子的复合物与步骤(1)得到的还原的巯基基团进行共价偶联;由此制得抗体-药物缀合物混合物。

[0025] 本发明开发了一种新的生物缀合方法,所述方法能够产生具有改善的、同质性的ADC,并且制备方法操作简单,能达到降本增效的效果。通过本发明的生物缀合方法产生的ADC安全性高、功效更好。本发明的操作过程较为简单,使用市售的产品,在简单的操作下就可以完成纯化。

[0026] 具体地,本发明的方法与使用还原剂和巯基的亲核反应的常规缀合方法相比,所述方法产生的抗体-药物缀合物(ADC)的同质性可以得到显著改善。D2的含量普遍高于60%,而传统工艺的D2含量则普遍低于40%。

[0027] 本发明中,过渡金属离子的存在能够实现二硫键的选择性还原。在过渡金属离子的存在下,Fab区域中的两个链间S-S键被选择性还原。因此,两个携带两个反应性基团的连

接子-有效载荷与一个抗体连接以形成D2。在获得的ADC中高含量的D2无疑改善了ADC的同质性。

[0028] 优选地,步骤(1)中,所述还原剂选自:三(2-羧乙基)膦(TCEP)、二苯基膦基乙酸、2-[2-(二苯基膦基)乙基]吡啶、3-(二苯基膦基)苯磺酸、4-(二苯基膦基)苯甲酸、2-(二苯基膦基)乙胺、3-(二苯基膦基)丙胺、3-(二苯基膦基)丙酸、2-(二异丙基膦基)乙胺、2-(二苯基膦基)苯甲酸、(2-羟基苯基)二苯基膦、1,3,5-三氮杂-7-磷杂三环[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]癸烷、正丁基二(1-金刚烷基)膦或其盐、三乙酰氧基硼氢化钠或氰基硼氢化钠中任意一种或至少两种的组合。

[0029] 优选地,步骤(1)中,所述还原剂在温育体系中的终浓度为0.04-0.4mM,例如可以是0.04mM、0.08mM、0.1mM、0.12mM、0.15mM、0.2mM、0.25mM、0.3mM、0.35mM或0.4mM等。

[0030] 优选地,步骤(1)中,所述过渡金属离子选自: $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 或 $Hg^{2+}$ 中任意一种或至少两种的组合。

[0031] 优选地,步骤(1)中,所述过渡金属离子以过渡金属盐的形式添加在缓冲体系中,所述过渡金属盐选自: $ZnCl_2$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $Zn(CH_3COO)_2$ 、 $ZnI_2$ 、 $ZnBr_2$ 、 $Zn(HCOO)_2$ 、 $Zn(BF_4)_2$ 、 $CdCl_2$ 、 $Cd(NO_3)_2$ 、 $CdSO_4$ 、 $Cd(CH_3COO)_2$ 、 $CdI_2$ 、 $CdBr_2$ 、 $Cd(HCOO)_2$ 、 $Cd(BF_4)_2$ 、 $HgCl_2$ 、 $Hg(NO_3)_2$ 、 $HgSO_4$ 、 $Hg(CH_3COO)_2$ 、 $HgBr_2$ 、 $Hg(HCOO)_2$ 或 $Hg(BF_4)_2$ 中任意一种或至少两种的组合。

[0032] 在本发明中,适合用于本发明的生物缀合方法中的过渡金属离子可以包括但不限于 $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 等。其中,由于 $Zn^{2+}$ 相对容易可获得和低成本,可以使用 $Zn^{2+}$ 。例如,在步骤(1)中可以加入适当的过渡金属盐,只要它们在反应溶液中可溶以便游离的过渡金属离子可以释放到反应溶液中即可。

[0033] 在本发明中,以 $Zn^{2+}$ 的过渡金属盐为例,包括 $ZnCl_2$ 、 $Zn(NO_3)_2$ 、 $ZnSO_4$ 、 $Zn(CH_3COO)_2$ 、 $ZnI_2$ 、 $ZnBr_2$ 、甲酸锌或四氟硼酸锌等。同样,可以在反应溶液中添加可溶并且可以释放游离 $Cd^{2+}$ 或 $Hg^{2+}$ 离子的其他过渡金属盐,其可以包括但不限于: $CdCl_2$ 、 $Cd(NO_3)_2$ 、 $CdSO_4$ 、 $Cd(CH_3COO)_2$ 、 $CdI_2$ 、 $CdBr_2$ 、 $Zn(HCOO)_2$ 、 $Zn(BF_4)_2$ 、 $HgCl_2$ 、 $Hg(NO_3)_2$ 、 $HgSO_4$ 、 $Hg(CH_3COO)_2$ 、 $HgBr_2$ 、 $Hg(HCOO)_2$ 或 $Hg(BF_4)_2$ 等等。

[0034] 优选地,步骤(1)中,所述过渡金属离子在温育体系中的终浓度为0.01-0.2mM,例如可以是0.01mM、0.02mM、0.04mM、0.05mM、0.06mM、0.08mM、0.1mM、0.12mM、0.14mM、0.15mM、0.16mM、0.18mM或0.2mM等。

[0035] 本发明中,过渡金属离子是负责获得的ADC中高水平的D2和低水平的D0、D1、D3和D4的关键因素。

[0036] 优选地,步骤(1)中,所述缓冲体系选自:HEPES缓冲液、组氨酸缓冲液、PBS缓冲液或MES缓冲液中任意一种或至少两种的组合。

[0037] 本发明中,缓冲溶液体系需要在指定pH范围内具有缓冲能力,且对应缓冲体系不应引起过渡金属离子的沉淀,且不能与过渡金属离子发生强烈的螯合作用。

[0038] 优选地,步骤(1)中,所述缓冲体系的pH为5-8,例如可以是5、5.5、6、6.5、7、7.5或8等,优选为5.5-7.5。

[0039] 优选地,步骤(1)中,所述温育的温度为:-10°C~37°C,例如可以是-10°C、-5°C、0°C、5°C、10°C、15°C、20°C、30°C或37°C等,优选为0~20°C。

[0040] 优选地,步骤(1)中,所述温育的时间为8-24小时,例如可以是8、10、12、14、16、18、

20、22或24等。

[0041] 优选地,步骤(2)中,所述复合物中的连接子中偶联抗体的接头部分含有至少两个反应性基团,分别共价偶联抗体上的两个巯基。

[0042] 本发明中,本发明对采用所述生物缀合方法与连接子-药物缀合的抗体没有特别限制。抗体的选择取决于通过抗体-药物缀合物(ADC)治疗的疾病或病症(例如,癌症)。抗体可以特异性地结合在癌细胞上表达的相应的抗原(也称为肿瘤相关抗原(TAA))、病毒抗原或微生物抗原,具有抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)活性,并且具有体内抗肿瘤、抗病毒或抗微生物活性。抗体中的链间S-S键是连接药物-连接子复合物的位点。

[0043] 在一些实施方案中,抗体可以包括但不限于单克隆抗体或多克隆抗体。抗体的具体实例包括:人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0044] 在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体,例如,人抗体或人源化抗体。

[0045] 优选地,步骤(2)中,所述复合物中反应性基团选自:二溴马来酰亚胺、4,5-二溴-1,2-二氢嗒吡-3,6-二酮、马来酰亚胺、有机溴化物、碘化物、砒类化合物或带有缺电子基团的烯、炔类化合物中任意一种或至少两种的组合。

[0046] 本发明中,对于所需药物和所选连接子,本领域技术人员可以选择适当的方法将它们偶联在一起。由于本发明所涉及的药物与反应性基团的比例为1:2,因此其连接子中与抗体分子偶联的接头部分可为专门的双反应性基团接头例如:二溴马来酰亚胺等。或是常规接头的任意组合。最常见的能够在ADC制备中与巯基键合的反应性基团是马来酰亚胺。另外,还经常使用有机溴化物、碘化物、砒类化合物、带有缺电子基团的烯、炔类化合物。

[0047] 本发明中,所述方法对连接子的种类具有较高的容忍度,可以有效适配多种不同的连接子。

[0048] 优选地,步骤(2)中,所述复合物中的药物具有细胞毒性、抗肿瘤或标记效果。

[0049] 优选地,步骤(2)中,所述共价偶联的条件为:共价偶联的体系中药物的物质的量浓度至少大于抗体浓度的2倍及以上,反应温度为-10°C~37°C,例如可以是-10°C、-5°C、0°C、5°C、10°C、15°C、20°C、30°C或37°C等,反应时间为0.5-24小时,例如可以是0.5、1、6、12、18或24等。

[0050] 优选地,所述反应温度为0°C~20°C。

[0051] 优选地,所述共价偶联的体系中还包含有机溶剂,所述有机溶剂使体系保持澄清。

[0052] 优选地,所述共价偶联的体系中还包含金属螯合剂,所述金属螯合剂调节药物的反应活性。

[0053] 优选地,所述金属螯合剂的种类包括EDTA、DPTA或DOTA中任意一种或至少两种的组合。

[0054] 优选地,所述金属螯合剂的浓度为抗体浓度的0-3倍。

[0055] 本发明中在进行共价偶联时,药物的物质的量浓度至少大于抗体浓度的2倍及以上;根据药物的溶解度的情况,可以在共价偶联时,在反应体系中加入有机溶剂以使体系保持澄清;根据药物的反应活性的情况,可以在共价偶联时,在反应体系中加入抗体浓度0-3倍量的金属螯合剂,例如EDTA、DPTA或DOTA等,以调节药物的反应活性。具体的反应温度和时间根据药物反应活性而定,反应温度通常为-10°C~37°C,优选为0°C~20°C,反应时间通常为0.5-24小时。

[0056] 本发明对于可以用于本发明的生物缀合方法中的药物和连接子没有特别限制,药物分子需要具有所需的(例如,细胞毒性、抗肿瘤或标记等)效果和具有允许与连接子结构连接的至少一个取代基团或部分结构,并且所述连接子中与抗体偶联的接头部分含有至少两个反应性基团,分别共价偶联抗体上的两个巯基。

[0057] 本领域已知的各种各样的诊断剂、治疗剂和标记剂均可以与抗体分子缀合。例如,在最广泛意义上,待缀合的药物可以包括诊断剂、药物分子,例如,细胞毒性剂、毒素、放射性核素、荧光剂。其中,荧光剂例如,胺衍生的荧光探针,诸如5-二甲基氨基萘-1-(N-(2-氨基乙基))磺酰胺-丹酰乙二胺、或Oregon Green®488尸胺(cadaverine)(目录号O-10465, Molecular Probes)、或丹磺酰尸胺、或N-(2-氨基乙基)-4-氨基-3,6-二硫-1,8-萘亚胺、或二钾盐(荧光黄乙二胺)、或罗丹明B乙二胺(目录号L-2424, Molecular Probes)、或巯基衍生荧光探针,例如BODIPY®FLL-半胱氨酸(目录号B-20340, Molecular Probes)。

[0058] 优选地,还包括采用氧化剂将步骤(2)中未反应的巯基再氧化的步骤。

[0059] 优选地,所述氧化剂选自:脱氢抗坏血酸、5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)、氧气或空气中任意一种或至少两种的组合。

[0060] 优选地,步骤(3)中,所述氧化剂的终浓度为0.04-0.8mM,例如可以是0.04mM、0.06mM、0.08mM、0.1mM、0.15mM、0.2mM、0.25mM、0.3mM、0.35mM、0.4mM、0.45mM、0.5mM、0.55mM、0.6mM、0.65mM、0.7mM、0.75mM或0.8mM等。

[0061] 优选地,步骤(3)中,所述氧化的反应条件为:氧化剂的浓度至少高于抗体的浓度,温度为:-10°C~37°C,优选为0°C~20°C;反应时间为0.5-24小时。

[0062] 优选地,步骤(2)中,还包括纯化步骤,所述纯化包括:采用EDTA作为螯合剂去除过渡金属离子的步骤。

[0063] 优选地,所述纯化的方法包括:使用脱盐柱、尺寸排阻层析、疏水相互作用色谱、超滤管或切向流过滤系统中任意一种或至少两种的组合进行纯化。

[0064] 本发明中,氧化步骤后进一步包括纯化步骤,所述过渡金属离子可以在后续的纯化步骤中除去,降低对最终产品的质量的影响。示例性的,通过使用EDTA作为螯合剂,在纯化步骤中去除过渡金属离子,所述螯合剂将在随后的渗析、超滤或凝胶过滤中滤去。

[0065] 优选地,所述制备方法包括:

[0066] (1) 将含有Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>或Hg<sup>2+</sup>中任意一种的过渡金属离子的过渡金属盐加入缓冲体系中,所述缓冲体系选自:HEPES缓冲液、组氨酸缓冲液、PBS缓冲液或MES缓冲液中任意一种或至少两种的组合,所述缓冲体系的pH为5-8;将还原剂和待缀合的抗体在有含有过渡金属离子的缓冲体系中于-10°C~37°C温育8-24小时,选择性地还原抗体内链间二硫键;所述还原剂在温育体系中的终浓度为0.04-0.4mM,所述过渡金属离子在温育体系中的终浓度为0.01-0.2mM;

[0067] (2) 将具有细胞毒性、抗肿瘤或标记效果的药物与含有至少两个反应性基团的连接子共价结合,得到携带有两个反应性基团的药物-连接子的复合物;所述反应性基团分别共价偶联抗体上的两个巯基;将过量的携带有两个反应性基团的药物-连接子的复合物与步骤(1)得到的还原的巯基基团进行共价偶联;所述共价偶联的条件为:共价偶联的体系中药物的物质的量浓度至少大于抗体浓度的2倍及以上,反应温度为-10°C~37°C,反应时间为0.5-24小时;

[0068] 采用氧化剂将未反应的巯基再氧化,所述氧化剂的终浓度为0.04-0.8mM;所述氧化的反应条件为:氧化剂的浓度至少高于抗体的浓度,温度为:-10°C ~ 37°C;反应时间为0.5-24小时;使用脱盐柱、尺寸排阻层析、疏水相互作用色谱、超滤管或切向流过滤系统中任意一种或至少两种的组合进行纯化,回收获得的抗体-药物缀合物。

[0069] 第二方面,本发明提供第一方面所述的提高抗体-药物缀合物同质性的制备方法在制备ADC药物中的应用。

[0070] 本发明所述的数值范围不仅包括上述列举的点值,还包括没有列举出的上述数值范围之间的任意的点值,限于篇幅及出于简明的考虑,本发明不再穷尽列举所述范围包括的具体点值。

[0071] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0072] (1) 本发明可以选择性的制备同质性的抗体-药物1:2缀合物,本发明成功地证明了过渡金属离子是负责获得的ADC中高水平的D2和低水平的D0、D1、D3和D4的关键因素。此外,本发明还证实了所述方法产生了具有高Fab偏好性的ADC产物。所述方法已经用数种商业治疗剂抗体进行了证实并且显示出极大的一致性。

[0073] (2) 本发明中抗体-药物1:2缀合物占产物总组分的60%wt%以上,通过使用本发明的生产抗体-药物缀合物的方法,抗体-药物缀合物的同质性高于通过常规缀合方法生产的产品。具体地,在通过本发明的方法制备的ADC中,D0+D4的含量低于20wt%,并且D3的含量低于20wt%。此外,D2的含量通常超过60wt%,并且例如超过70wt%。而在通过常规缀合方法制备的ADC中D2的含量通常低于40wt%。

[0074] (3) 本发明中药物与抗体的连接部位集中于抗体的轻链-重链间的二硫键上,使用金属络合铰链区后,有利于减少重链间二硫键被打开。本发明的方法回避了对蛋白改造或酶催化,而是基于天然的链间二硫键,仅需要过渡金属离子,不使用昂贵的酶催化剂,进一步减少了成本。因此,与常规的制备ADC的方法相比,本发明的方法复杂性较低,操作简单,并且得到的抗体-药物缀合物的同质性显著改善,并且成本大大降低。

## 附图说明

[0075] 图1是通过本发明的方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的HIC。

[0076] 图2是通过使用常规方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的HIC。

[0077] 图3是通过本发明的方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的经Lys-C酶切的LC-MS。

[0078] 图4是通过常规方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的经Lys-C酶切的LC-MS。

[0079] 图5是通过本发明的方法制备的Rituxan-MMAF缀合物的HIC。

[0080] 图6是通过使用常规方法制备的Rituxan-MMAF缀合物的HIC。

[0081] 图7是通过本发明的方法制备的Erbix-MMAF缀合物的HIC。

[0082] 图8是通过使用常规方法制备的Erbix-MMAF缀合物的HIC。

[0083] 图9是通过使用本发明的方法制备的Herceptin-diBrPD-MMAE缀合物的HIC。

[0084] 图10是通过使用本发明的方法制备的Rituxan-diBrPD-MMAE缀合物的HIC。

[0085] 图11是通过使用本发明的方法制备的Erbix-diBrPD-MMAE缀合物的HIC。

[0086] 图12是通过使用本发明的方法制备的Herceptin-bismaleimide-MMAE缀合物的

HIC。

[0087] 图13是通过使用本发明的方法制备的Rituxan-bismaleimide-MMAE缀合物的HIC。

[0088] 图14是通过使用本发明的方法制备的Erbitux-bismaleimide-MMAE缀合物的HIC。

### 具体实施方式

[0089] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0090] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0091] 实施例1制备Herceptin-DBM-MMAF缀合物以及所述缀合物的同质性检测

[0092] Herceptin-DBM-MMAF缀合物以一罐法反应制备,具体步骤如下所示:

[0093] (1) 将ZnCl<sub>2</sub> (0.12mM) 和TCEP (0.098mM) 加入Herceptin的溶液(根据公开的相应蛋白序列,通过用于制备单克隆抗体的标准方法,由WuXi Biologics制备,0.03mM,在磷酸盐缓冲液中,pH 7,20mM) 并且使得反应混合物在4°C静置过夜。

[0094] (2) 引入在DMA(二甲基乙酰胺,可商购自Aldrich Sigma) 中的DBM-MMAF(可商购自WuXi Apptec.,0.12mM), 并且反应在4°C持续2小时。

[0095] (3) 加入N-乙酰基半胱氨酸(0.24mM) 以耗尽过量的DBM-MMAF。

[0096] (4) 加入EDTA (0.24mM) 以捕获Zn<sup>2+</sup> 并且加入DHAA(可商购自Aldrich Sigma, 0.24mM) 以氧化过量的巯基。

[0097] (5) 使用脱盐柱(类型:40K,0.5mL,REF:87766, Lot#SJ251704, 制造商:Thermo) 将反应混合物进行纯化。

[0098] 作为对照,在0.06mM TCEP存在下但没有ZnCl<sub>2</sub>情况下以相同步骤进行反应。

[0099] 进行同质性测定。使用HIC-HPLC分析药物/抗体比率(DAR) 和产物分布。在Tosoh TSKgel Butyl-NPR 4.6mm I.D. × 3.5cm, 2.5μm上以0.6mL/min的流速,在环境温度下,通过疏水相互作用色谱法(HIC) 进行D0、D1、D2、D3和D4的纯化。进样量为50μg, 溶剂A为1.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 和50mM磷酸钠pH 7。溶剂B为75% v/v 50mM磷酸钠pH 7和25% v/v 异丙醇。不同的负载药物的物质通过顺序的分级梯度来洗脱。测定结果显示在表1和图1-2中,图1是通过本发明的方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的HIC,图2是通过使用常规方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的HIC。

[0100] 表1

样品名称	D0%	D1%	D2%	D3%	D4%	HIC DAR
Herceptin-DBM-MMAF (有 ZnCl <sub>2</sub> , 图 1)	0.05	9.46	71.43	15.51	3.54	2.1
Herceptin-DBM-MMAF (无 ZnCl <sub>2</sub> , 图 2)	6.26	26.01	39.32	18.47	9.0	2.0

[0102] 从表1中可知,用本发明的方法和常规方法制备得到的两种Herceptin,具有很接近的HIC DAR值,代表两个产品中每个抗体上平均被偶联上了接近两个MMAF。与此相对应的,本发明的方法合成的样品的D2组分含量为71.43%,显著高于常规方法样品中的

39.32%。因此,以本发明的方法合成的样品更能反映D2组分的特性,而D2组分是理想的样品,每个抗体上带有两个药物的组分被称为D2组分,因此本发明的方法合成的样品更接近于理想。另一方面,可以看见,图2中的D2组分的图像比图1中的更加复杂。由于抗体上可供偶联的巯基有4对,因此可能生成多种偶联在不同位点的异构体,其中差异较大的有3种异构体,对应图2中D2组分的三个难以分离的三个小峰。而图1中的D2峰则为单峰,意味着利用本发明的方法合成的D2样品具有较好的位点选择性,为了证明这一点,本实施例中对结合位点进行了测定。

[0103] 进行结合位点测定。使用HPLC-MS联合使用Lys-C试剂盒(商购自和光纯药),分别在15 $\mu$ g的经本发明方法和常规方法制备的Herceptin-DBM-MMAF溶液中加入1 $\mu$ L的Lys-C酶(10单位溶于蒸馏水中),3 $\mu$ L的1M Tris缓冲液(pH=8.0),之后将溶液体积以超纯水补加至15 $\mu$ L,于37 $^{\circ}$ C下温育15分钟后于HPLC-MS上(色谱柱型号:Agilent PLRP-S1000A,8 $\mu$ m,50 $\times$ 2.1mm)对其进行分析。结果显示在表2和图3-4中。图3是通过本发明的方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的经Lys-C酶切的LC-MS,图4是通过常规方法制备的Herceptin-DBM-MMAF缀合物的经Lys-C酶切的LC-MS。

[0104] 表2

[0105]	样品名称	峰序号及峰对应成分和峰面积占比				
		1 Lys-C	2 Fc-0	3 Fab-0&1	4 Half antibody-2	5 Fc-2
[0106]	Herceptin-DBM-MMAF (有 ZnCl <sub>2</sub> , 图 3)	3.16	22.31	74.53 (0:1=29.2:100)	NA	NA
	Herceptin-DBM-MMAF (无 ZnCl <sub>2</sub> , 图 4)	2.91	16.27	58.49 (Fab0:Fab1=58:42)	8.73	13.60

[0107] Lys-C酶会将完整的抗体选择性的水解为两个Fab和一个Fc,其中Fab含有一个可被还原的二硫键,Fc含有两个可被还原的二硫键。表2为对图3和图4原始数据的总结,从表2的结果可知,以本发明的方法合成的Herceptin-DBM-MMAF,其偶联反应修饰位点集中于抗体的Fab区域,在Fc区域没有质谱可见的偶联化合物的信号;反应在区位选择性上是高度专一的。而仅以常规方法合成的Herceptin-DBM-MMAF,药物的偶联位点则随机分布于抗体的Fc区域及Fab区域。根据抗体偶联药物研发的一般认识,药物偶联在抗体的不同位点上,其最终成药的性能存在一定的区别。若能在研究早期阶段使用偶联位点专一的样品,将为后续样品选择提供很大的便利。从图3和图4中也可以很直观地看出,图3的谱峰显著更少,更加均一。

[0108] 实施例2. 制备其它抗体的DBM-MMAF缀合物以及所述缀合物的同质性检测

[0109] 为了证明本方法适用于更多的抗体种类,本实施例选择了另外两种商售抗体(Rituxan/Erbitux)进行本发明的方法以及常规方法的偶联,本实施例对抗体的选择仅基于抗体的市场易得性。

[0110] 抗体的DBM-MMAF缀合物以一罐法反应制备,具体步骤如下所示:

[0111] (1) 将ZnCl<sub>2</sub> (0.12mM) 和TCEP (0.098mM) 顺序加入Rituxan/Erbitux的溶液(根据公开的相应蛋白序列,通过用于制备单克隆抗体的标准方法,由WuXi Biologics制备,

0.03mM,在磷酸盐缓冲液中,pH 7,20mM)并且使得反应混合物在4°C静置过夜。

[0112] (2) 引入在DMA(可商购自Aldrich Sigma)中的DBM-MMAF(可商购自WuXi Apptec., 0.12mM),并且反应在4°C持续2小时。

[0113] (3) 加入N-乙酰基半胱氨酸(0.24mM)以耗尽过量的DBM-MMAF。

[0114] (4) 加入EDTA(0.24mM)以捕获 $Zn^{2+}$ 并且加入DHAA(可商购自Aldrich Sigma, 0.24mM)以氧化过量的巯基。

[0115] (5) 使用脱盐柱(类型:40K,0.5mL,REF:87766, Lot#SJ251704, 制造商:Thermo)将反应混合物进行纯化。

[0116] 作为对照,在0.06mM TCEP存在下但没有 $ZnCl_2$ 情况下以相同步骤进行反应。

[0117] 进行同质性测定。使用HIC-HPLC分析药物/抗体比率(DAR)和产物分布。在Tosoh TSKgel Butyl-NPR 4.6mm I.D.×3.5cm,2.5 $\mu$ m上以0.6mL/min的流速,在环境温度下,通过疏水相互作用色谱法(HIC)进行D0、D1、D2、D3和D4的纯化。进样量为50 $\mu$ g,溶剂A为1.5M  $(NH_4)_2SO_4$ 和50mM磷酸钠pH 7。溶剂B为75%v/v 50mM磷酸钠pH 7和25%v/v异丙醇。不同的负载药物的物质通过顺序的分级梯度来洗脱。结果显示在表3和图5-8中。图5是通过本发明的方法制备的Rituxan-DBM-MMAF缀合物的HIC,图6是通过使用常规方法制备的Rituxan-DBM-MMAF缀合物的HIC。图7是通过本发明的方法制备的Erbix-DBM-MMAF缀合物的HIC,图8是通过使用常规方法制备的Erbix-DBM-MMAF缀合物的HIC。

[0118] 表3

样品名称	D0%	D1%	D2%	D3%	D4%	HIC DAR
Rituxan-DBM-MMAF (有 $ZnCl_2$ , 图 5)	2.01	9.49	60.18	20.26	8.06	2.2
Rituxan-DBM-MMAF (无 $ZnCl_2$ , 图 6)	11.31	29.26	38.12	13.14	6.42	1.7
Erbix-DBM-MMAF (有 $ZnCl_2$ , 图 7)	1.1	0.98	69.98	18.38	9.56	2.3
Erbix-DBM-MMAF (无 $ZnCl_2$ , 图 8)	9.09	35.18	34.99	13.05	6.29	1.7

[0120] 通过上述实施例1-2中的检测结果可知,如表1、3和图1、5和7中所示,结果证明:D2的含量通常超过60wt%,例如超过70wt%(图1、5和7)。相比之下,通过在没有过渡金属离子的情况下的对照缀合方法制备的ADC中D2含量通常少于40wt%(图2、6和8),同时对应的色谱图也表明无过渡金属离子参与的情况下,所制得的D2产物为多种反应位点的混合物。

[0121] 由表2和图3-4还可以看出,通过常规方法制备的Herceptin-DBM-MMAF,尽管其与通过本发明方法制备的Herceptin-MMAF具有相似的DAR值,但其所连接的药物在单个抗体上的分布随机,不具备同质性。通过本方法制备的产物的药物在抗体上的分布则具有高度的同质性。

[0122] 上述检测结果清楚地表明,使用过渡金属离子通过本发明的方法制备的ADC具有显著改善的同质性,体现在产物DAR值的同质性,以及药物在抗体上分布的同质性上。

[0123] 实施例3制备抗体的diBrPD-VC-MMAE缀合物以及所述缀合物的同质性检测

[0124] 为了进一步说明本发明方法除了对多种蛋白的偶联具有普适性外,也对多种桥连接头有效,本实施例选取了另一种桥连接子-药物diBrPD-VC-MMAE,应用本方法制备缀合物。

[0125] 抗体的diBrPD-VC-MMAE缀合物以一罐法反应制备,具体步骤如下所示:

[0126] (1) 将ZnCl<sub>2</sub> (0.12mM) 和TCEP (0.105mM) 加入Herceptin/Rituxan/Erbix的溶液(根据公开的相应蛋白序列,通过用于制备单克隆抗体的标准方法,由WuXi Biologics制备,0.03mM,在磷酸盐缓冲液中,pH 7,20mM) 并且使得反应混合物在12°C静置过夜。

[0127] (2) 引入在DMA(二甲基乙酰胺,可商购自Aldrich Sigma)中的diBrPD-VC-MMAE(可商购自SyntaBio.,0.45mM),以及EDTA(0.09mM)以捕获部分锌离子并且反应在12°C持续24小时。

[0128] (3) 加入N-乙酰基半胱氨酸(0.24mM)以耗尽过量的diBrPD-VC-MMAE。

[0129] (4) 加入EDTA(0.24mM)以完全捕获Zn<sup>2+</sup>并且加入DHAA(可商购自Aldrich Sigma,0.24mM)以氧化过量的巯基。

[0130] (5) 使用脱盐柱(类型:40K,0.5mL,REF:87766, Lot#SJ251704, 制造商:Thermo)将反应混合物进行纯化。

[0131] 进行同质性测定。使用HIC-HPLC分析药物/抗体比率(DAR)和产物分布。在Tosoh TSKgel Butyl-NPR 4.6mm I.D.×3.5cm,2.5μm上以0.6mL/min的流速,在环境温度下,通过疏水相互作用色谱法(HIC)进行D0、D1、D2、D3和D4的纯化。进样量为30μg,溶剂A为1.5M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和50mM磷酸钠pH 7。溶剂B为75%v/v 50mM磷酸钠pH 7和25%v/v异丙醇。不同的负载药物的物质通过顺序的分级梯度来洗脱。结果显示在表4和图9-11中,图9是通过使用本发明方法制备的Herceptin-diBrPD-VC-MMAE缀合物的HIC,图10是通过本发明的方法制备的Rituxan-diBrPD-VC-MMAE缀合物的HIC,图11是通过本发明的方法制备的Erbix-diBrPD-VC-MMAE缀合物的HIC。

[0132] 表4

样品名称	D0%	D1%	D2%	D3%	D4%	D5%	D6%	HIC DAR
[0133] Herceptin-diBrPD-VC-MMAE (图9)	4.18	20.85	65.63	7.51	1.59	0.15	0.11	1.8
Rituxan-diBrPD-VC-MMAE (图10)	2.87	18.81	67.55	8.37	2.09	0.14	0.18	1.9
[0134] Erbitux-diBrPD-VC-MMAE (图11)	5.10	23.35	63.23	6.28	1.79	0.15	0.11	1.8

[0135] 从表4可知,利用本发明的方法,可以将抗体的diBrPD-VC-MMAE的缀合物的D2组分含量有效控制在60%以上,且无需对反应过程进行较大的改动。

[0136] 实施例4制备抗体-bismaleimide-VC-MMAE缀合物以及所述缀合物的同质性检测

[0137] 在上述实施例之外,为了进一步证明本专利的普适性,本实施例另选择了一种连接子-药物:Bismaleimide-VC-MMAE以证明本方法的普适性。需要说明的是,maleimide(马来酰亚胺)抗体偶联药物领域最广泛应用的药物接头,Bismaleimide(双马来酰亚胺)分子上带有两个maleimide接头以实现桥联功能,并且能够毫无疑问的适用于最大范围的桥联需求。

[0138] 抗体-bismaleimide-VC-MMAE缀合物以一罐法反应制备,具体步骤如下所示:

[0139] (1) 将 $ZnCl_2$  (0.12mM) 和TCEP (0.105mM) 加入Herceptin/Rituxan/Erbitux的溶液(根据公开的相应蛋白序列,通过用于制备单克隆抗体的标准方法,由WuXi Biologics制备,0.03mM,在磷酸盐缓冲液中,pH 7,20mM) 并且使得反应混合物在12°C静置过夜。

[0140] (2) 引入在DMA(二甲基乙酰胺,可商购自Aldrich Sigma)中的Bismaleimide-VC-MMAE(可商购自Quanta Biodesign,0.45mM),并且反应在12°C持续24小时。

[0141] (3) 加入N-乙酰基半胱氨酸(0.24mM)以耗尽过量的Bismaleimide-VC-MMAE。

[0142] (4) 加入EDTA (0.24mM) 以捕获 $Zn^{2+}$ 并且加入DHAA(可商购自Aldrich Sigma, 0.24mM)以氧化过量的巯基。

[0143] (5) 使用脱盐柱(类型:40K,0.5mL,REF:87766, Lot#SJ251704, 制造商:Thermo)将反应混合物进行纯化。

[0144] 进行同质性测定。使用HIC-HPLC分析药物/抗体比率(DAR)和产物分布。在Tosoh TSKgel Butyl-NPR 4.6mm I.D.×3.5cm,2.5 $\mu$ m上以0.6mL/min的流速,在环境温度下,通过疏水相互作用色谱法(HIC)进行D0、D1、D2、D3和D4的纯化。进样量为30 $\mu$ g,溶剂A为1.5M  $(NH_4)_2SO_4$ 和50mM磷酸钠pH 7。溶剂B为75%v/v 50mM磷酸钠pH 7和25%v/v异丙醇。不同的负载药物的物质通过顺序的分级梯度来洗脱。结果显示在表5和图12-14中,图12是通过使用本发明的方法制备的Herceptin-bismaleimide-VC-MMAE缀合物的HIC,图13是通过使用本发明的方法制备的Rituxan-bismaleimide-VC-MMAE缀合物的HIC,图14是通过使用本发明的方法制备的Erbitux-bismaleimide-VC-MMAE缀合物的HIC。

[0145] 表5

样品名称	D0%	D1%	D2%	D3%	D4%	HIC DAR
Herceptin-bismaleimide-VC-MMAE (图 12)	1.15	11.66	64.27	16.91	6.01	2.2
Rituxan-bismaleimide-VC-MMAE (图 13)	0.37	10.74	66.14	15.66	7.10	2.2
Erbitux-bismaleimide-VC-MMAE (图 14)	1.26	14.11	62.24	16.03	6.36	2.1

[0147] 从表5可知,本发明所述方法对基于本领域内现今最常用的马来酰亚胺开发出的bismaleimide-VC-MMAE依旧适用。证明本发明所述方法对于偶联药物的选择,仅要求偶联药物具有与巯基反应活性即可,并不局限于反应类型和接头的官能团种类。

[0148] 综上,本发明开发了一种新的生物缀合方法,在不对抗体序列进行修改的同时,利用任意给定的具有反应活性的连接子,选择性地在抗体的Fab区修饰上两个药物分子。所述方法能够产生具有改善的、同质性的ADC,并且操作步骤简单,能够降本增效。本发明中抗

体-药物1:2缀合物占产物总组分的60%wt%以上,通过使用本发明的生产抗体-药物缀合物的方法,抗体-药物缀合物的同质性高于通过常规缀合方法生产的产品。

[0149] 申请人声明,以上所述仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,所属技术领域的技术人员应该明了,任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

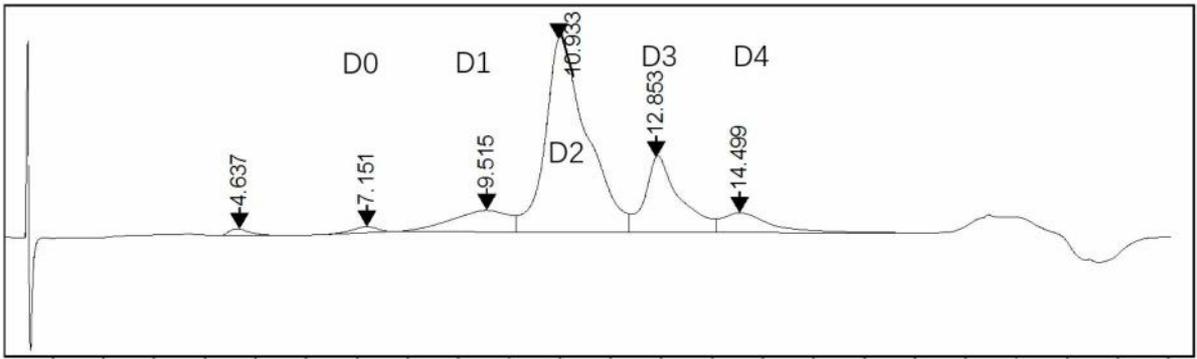


图1

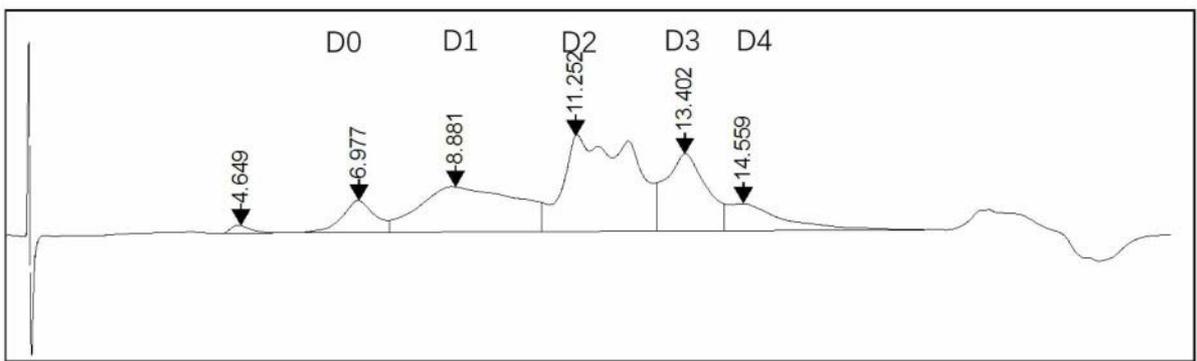


图2

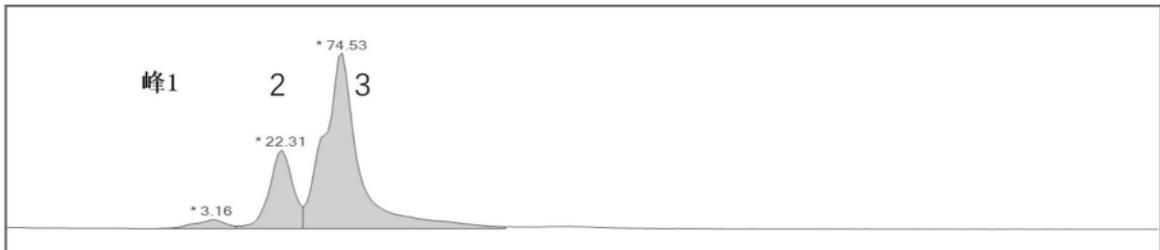


图3

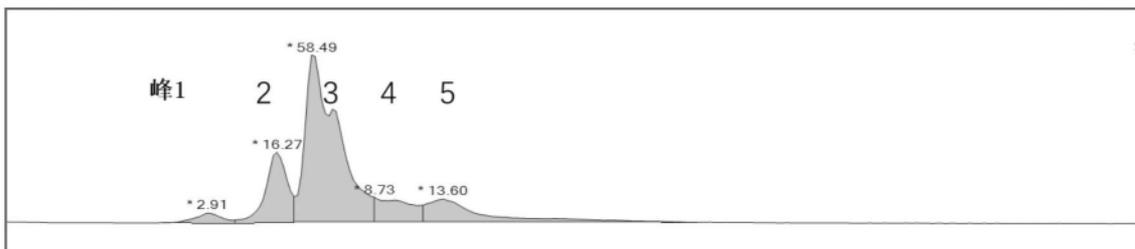


图4

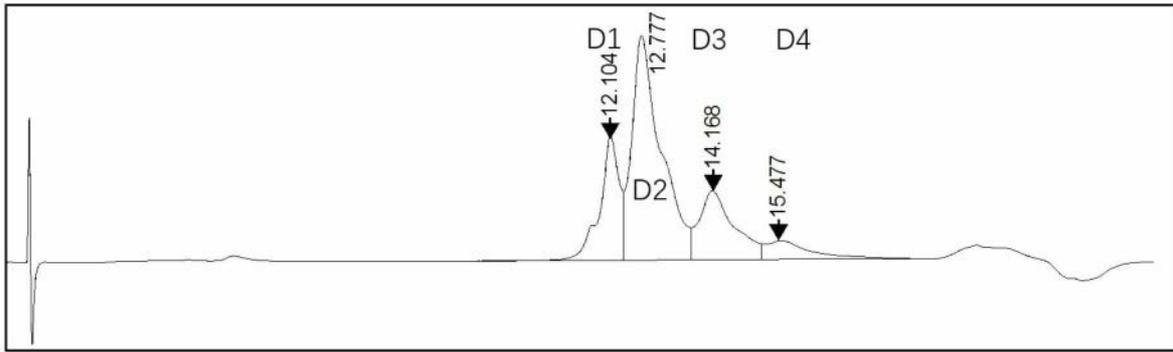


图5

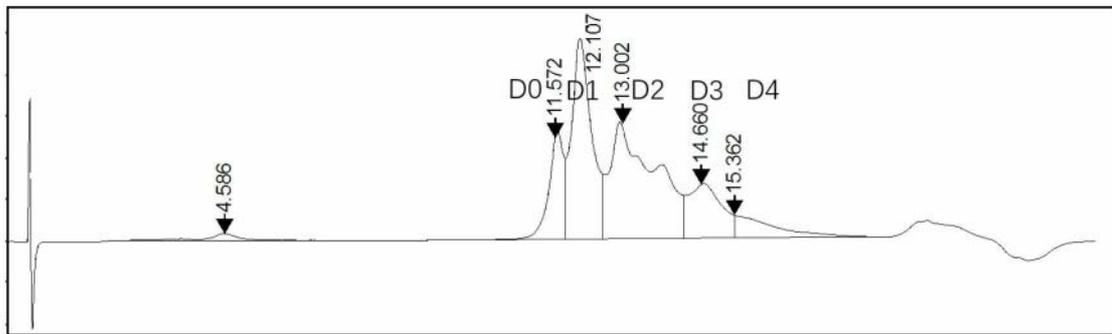


图6

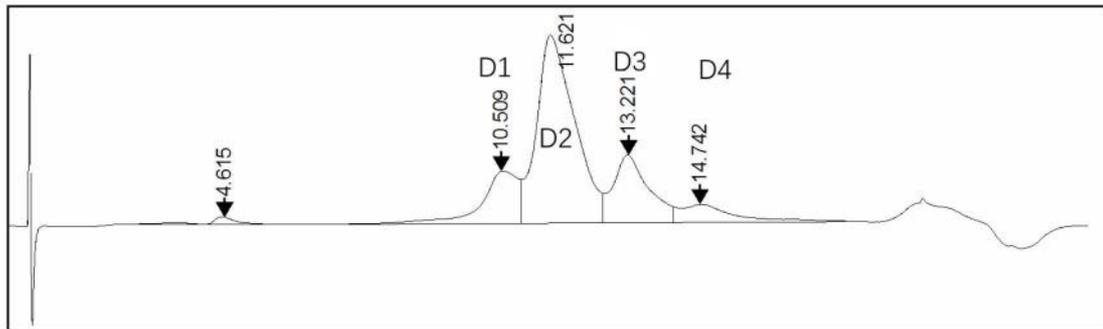


图7

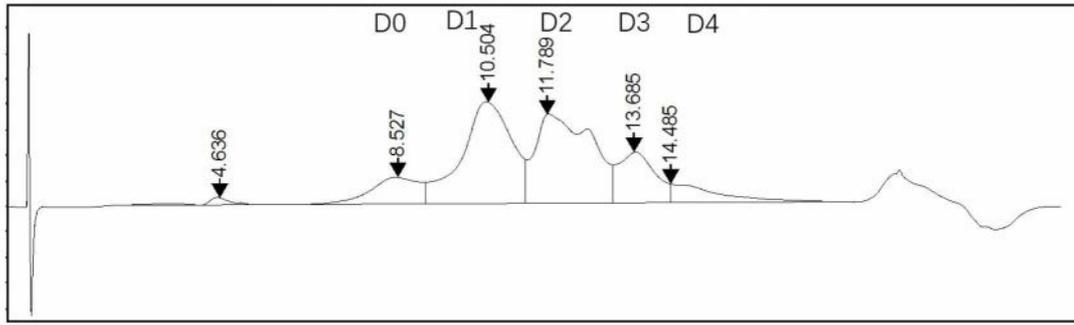


图8

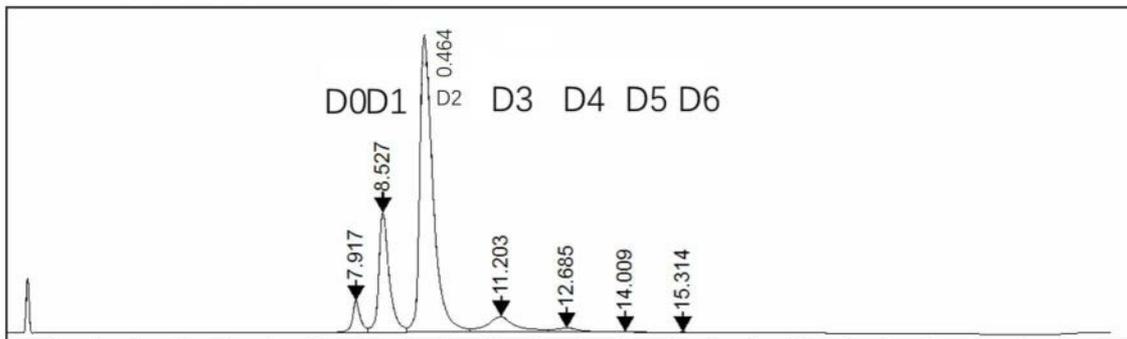


图9

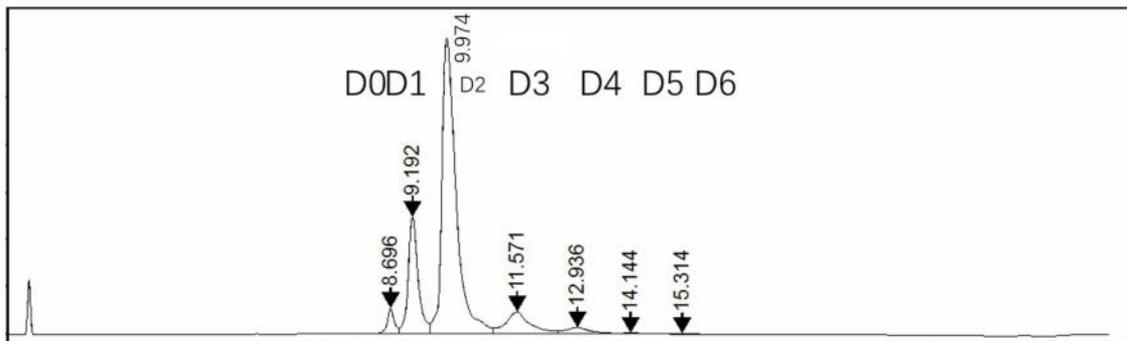


图10

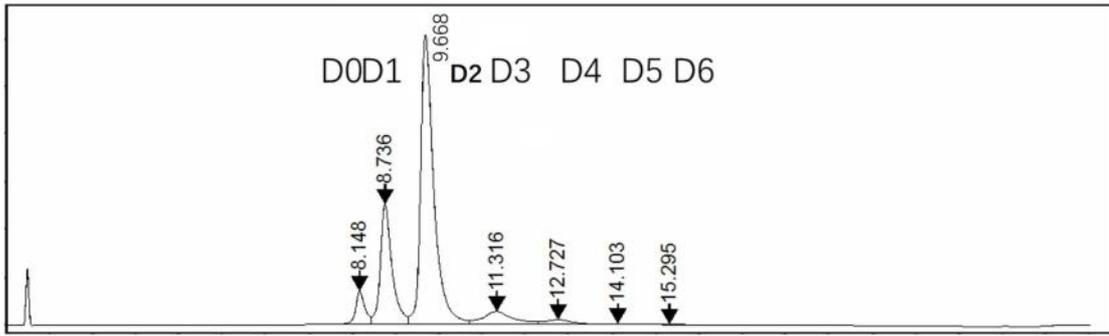


图11

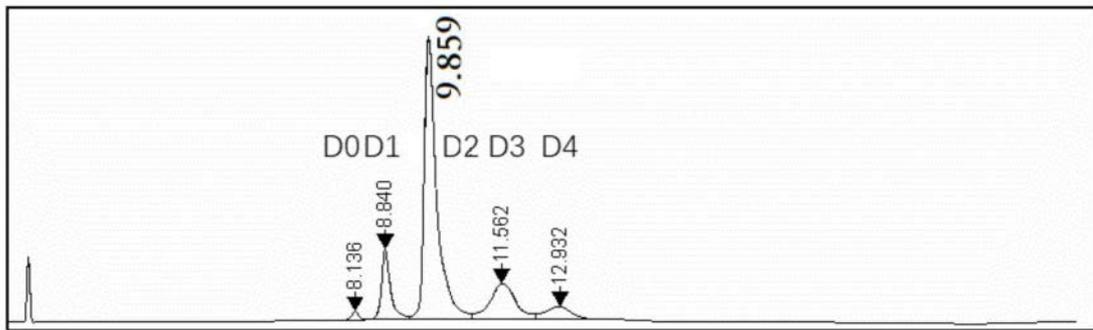


图12

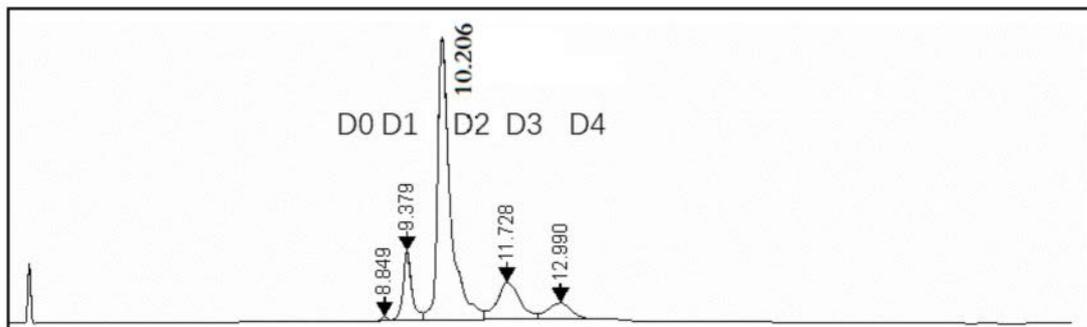


图13

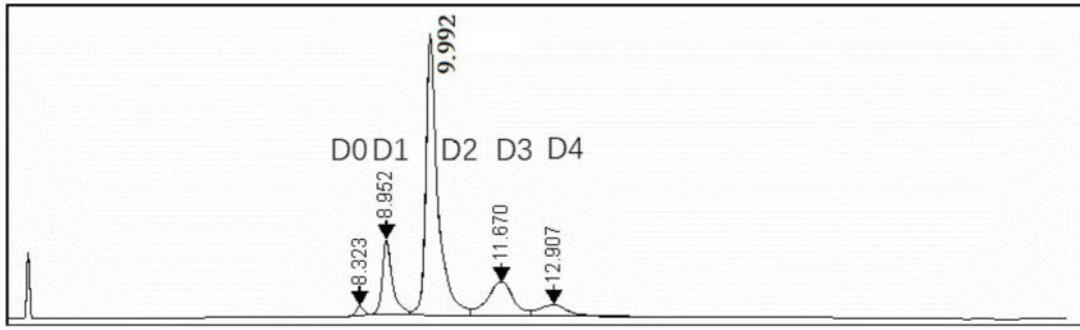


图14