



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110167355 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201780077877.2

(22)申请日 2017.12.14

(30)优先权数据

2017-115832 2017.06.13 JP

62/434,333 2016.12.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/066504 2017.12.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/112253 EN 2018.06.21

(71)申请人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 M·R·列文古德

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 马莉华 徐迅

(51)Int.Cl.

A23K 50/10(2006.01)

A61K 31/351(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书14页 说明书60页

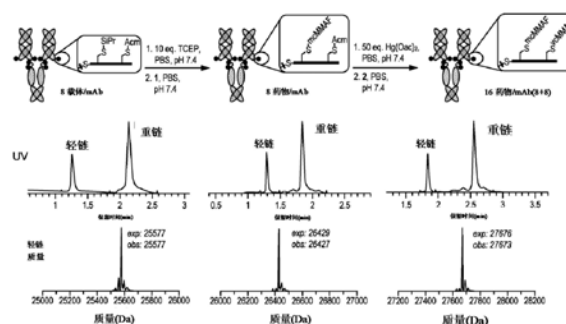
序列表7页 附图16页

(54)发明名称

多药抗体药物偶联物

(57)摘要

本公开提供尤其多药物抗体药物偶联物(MD-ADC)和连接组装(LA)单元,其通过在位点特异性物质中“正交”脱保护和药物负载构建。还提供了受保护的链接组装单元,其允许“正交”脱保护并构建本公开的MD-ADC和LA单元。



1. 一种多药抗体药物偶联物 (MD-ADC), 其包含抗体和八个共价连接的链接组装单元 (LA), 每个链接组装单元具有两个不同的药物单元 D^1 和 D^2 , 其中八个所述共价连接的链接组装单元中的每一个与通过还原所述抗体中的链间二硫键产生的硫醇连接, 并且其中每个所述共价连接的链接组装单元具有两至四个与其连接的总药物单元和任选的分配剂 (Y)。

2. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, D^1 和 D^2 分别是第一抗癌剂和第二抗癌剂。

3. 如权利要求2所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述第一抗癌剂和第二抗癌剂具有互补的活性谱。

4. 如权利要求2所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述第一抗癌剂和第二抗癌剂是 MMAE 和 MMAF。

5. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述第一抗癌剂和第二抗癌剂是喜树碱和多柔比星。

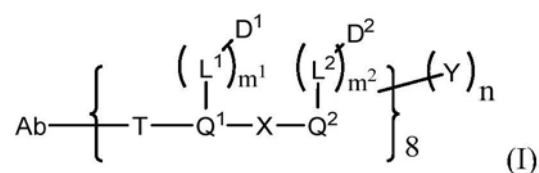
6. 如权利要求1-5所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 连接至所述链接组装单元的所述两至四个总药物单元通过硫醇/马来酰亚胺偶联产生。

7. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述链接组装单元还包括分配剂。

8. 如权利要求7所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述分配剂是聚乙二醇单元。

9. 如权利要求7所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, 所述分配剂是环糊精单元。

10. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物, 具有式 (I) :



其中,

Ab是抗体, 为非工程化抗体;

T是附着到通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇的拴系基团;

Q^1 是第一连接基团;

Q^2 是第二连接基团;

X是连接基团接头;

D^1 是第一药物单元;

D^2 是第二药物单元;

L^1 是任选的链接基团, 将 D^1 连接到 Q^1 ;

L^2 是任选的链接基团, 将 D^2 连接到 Q^2 ;

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1;

Y是附着到 L 、 Q^1 、X、 Q^2 、 L^1 或 L^2 上的位点的分配剂; 和

下标n为0或1。

11. 如权利要求10所述的抗体药物偶联物, 其特征在于, Q^1 是具有通过 L^1 连接到 Q^1 中存在的硫醇的 D^1 的半胱氨酸基团; 和 Q^2 是具有通过 L^2 连接到 Q^2 中存在的硫醇的 D^2 的半胱氨酸基团。

Q^1 是第一连接基团；

Q^2 是第二连接基团；

每个X独立地是一个连接基团接头；

D^1 是第一药物单元；

D^2 是第二药物单元；

L^1 是任选的连接基团，将 D^1 连接到 Q^1 ；

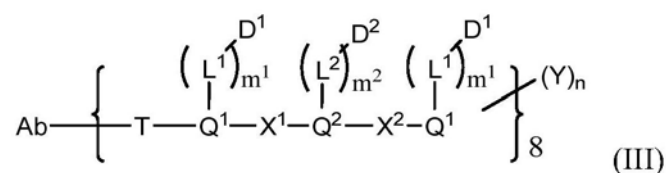
L^2 是任选的连接基团，将 D^2 连接到 Q^2 ；

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1；

Y是附着到 L 、 Q^1 、X、 Q^2 、 L^1 或 L^2 上的位点的分配剂；和

下标n为0或1。

25. 权利要求23所述的抗体药物偶联物，具有式 (III)：



其中，

Ab是抗体，为非工程化抗体；

T是附着到通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇的拴系基团；

每个 Q^1 都是独立选择的第一连接基团；

Q^2 是第二连接基团；

X^1 和 X^2 各自独立地为连接基团接头；

D^1 是第一药物单元；

D^2 是第二药物单元；

每个 L^1 都是任选的连接基团，将 D^1 连接到 Q^1 ；

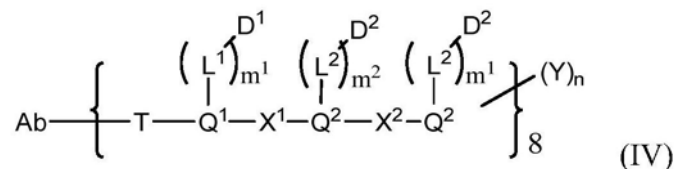
L^2 是任选的连接基团，将 D^2 连接到 Q^2 ；

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1；

Y是附着到 L 、 Q^1 、 X^1 、 X^2 、 Q^2 、 L^1 或 L^2 上的站点的分配剂；和

下标n为0或1。

26. 如权利要求23所述的抗体药物偶联物，具有式 (IV)：



其中，

Ab是抗体，为非工程化抗体；

T是附着到通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇的拴系基团；

Q^1 是独立选择的第一连接基团；

每个 Q^2 都是第二连接基团；

X^1 和 X^2 各自独立地为连接基团接头；

D¹是第一药物单元；

D²是第二药物单元；

L¹是任选的链接基团，将D¹连接到Q¹；

每个L²都是任选的链接基团，将D²连接到Q²；

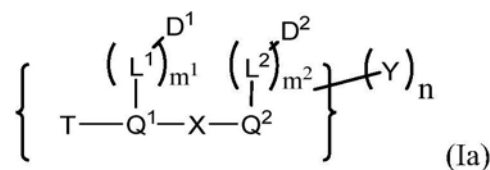
下标m¹和m²各自独立地为0或1；

Y是附着到L、Q¹、X¹、X²、Q²、L¹或L²上的站点的分配剂；和

下标n为0或1。

27. 如权利要求10-24所述的抗体药物偶联物，其特征在于，D¹和D²是选自由以下药物对组成的组：MMAE/MMAF、MMAE/喜树碱、Superdox/喜树碱、Superdox/MMAE、尾海兔素10/MMAE、尾海兔素10/MMAF、长春碱/MMAE和长春碱/MMAF。

28. 具有式 (Ia) 的药物链接组装单元：



其中，

T是拴系基团，它可以与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇连接；

Q¹是第一连接基团；

Q²是第二连接基团；

X是连接基团接头；

D¹是第一药物单元；

D²是第二药物单元；

L¹是任选的链接基团，将D¹连接到Q¹；

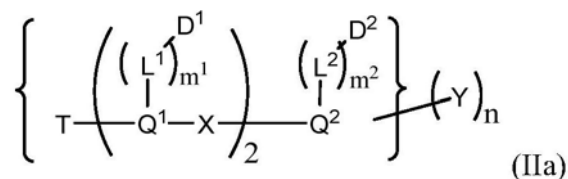
L²是任选的链接基团，将D²连接到Q²；

下标m¹和m²各自独立地为0或1；

Y是附着到L、Q¹、X、Q²、L¹或L²上的位点的分配剂；和

下标n为0或1。

29. 具有式 (IIa) 的药物链接组装单元：



其中，

T是拴系基团，它可以与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇连接；

Q¹是第一连接基团；

Q²是第二连接基团；

每个X独立地是连接基团接头；

D¹是第一药物单元；

D²是第二药物单元；

L^1 是任选的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 ;

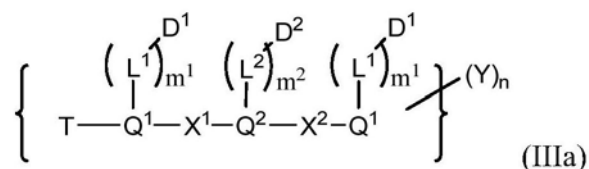
L^2 是任选的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 ;

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1;

Y 是附着到 L 、 Q^1 、 X 、 Q^2 、 L^1 或 L^2 上的位点的分配剂;和

下标 n 为0或1。

30. 具有式 (IIIa) 的药物链接组装单元:



其中,

T 是拴系基团,它可以与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇连接;

Q^1 是第一连接基团;

Q^2 是第二连接基团;

X^1 和 X^2 各自独立地为附接基团接头;

D^1 是第一药物单元;

D^2 是第二药物单元;

L^1 是任选的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 ;

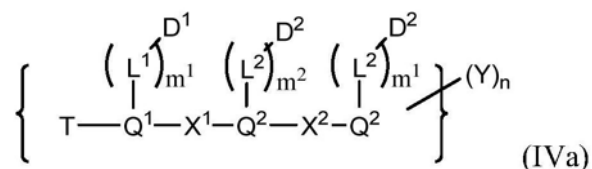
L^2 是任选的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 ;

下标 m^1 和 m^2 各自独立地选自0和1;

Y 是附着到 L 、 Q^1 、 X^1 、 Q^2 、 X^2 、 L^1 或 L^2 上的位点的分配剂;和

下标 n 为0或1。

31. 具有式 (IVa) 的药物链接组装单元:



其中,

T 是拴系基团,它可以与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇连接;

Q^1 是第一连接基团;

Q^2 是第二连接基团;

X^1 和 X^2 各自独立地为连接基团接头;

D^1 是第一药物单元;

D^2 是第二药物单元;

L^1 是任选的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 ;

L^2 是任选的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 ;

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1;

Y 是附着到 L 、 Q^1 、 X^1 、 Q^2 、 X^2 、 L^1 或 L^2 上的位点的分配剂;和

下标 n 为0或1。

32. 如权利要求28、29、30或31中任一项所述的药物链接组装单元,其特征在于,L包含马来酰亚胺基。

33. 如权利要求28、29、30或31中任一项所述的药物链接组装单元,其特征在于,L包含马来酰亚胺基,并且 X 、 X^1 、 X^2 、 Q^1 和 Q^2 中的每一个是氨基酸。

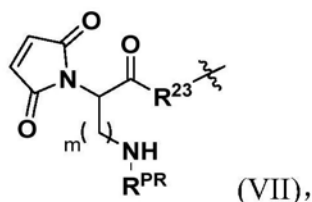
34. 如权利要求33所述的药物链接组装单元,其特征在于,下标 n 为0且 Y 不存在。

35. 如权利要求33所述的药物链接组装单元,其特征在于,下标 n 为0, Y 不存在,且 L^1 和 L^2 各自独立地选自自由以下组成的组:马来酰亚胺基-己酰基(mc)、马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸(mc-vc),和马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(mc-vc-PABC)。

36. 如权利要求28-35所述的药物链接组装单元,其特征在于,T包括末端马来酰亚胺基。

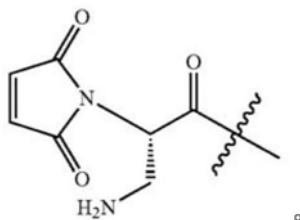
37. 如权利要求36所述的药物链接组装单元,其特征在于,T是自稳定接头。

38. 如权利要求36所述的药物链接组装单元,其特征在于,T包括下式的式(VII):



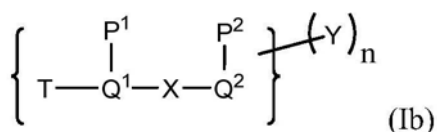
其中 R^{PR} 是氢或保护基团,下标 m 是1或2,且 R^{23} 是 $-NH-C_{1-5}$ 亚烷基- $C(=O)-$,或单、二肽、三肽、四肽或五肽。

39. 如权利要求36所述的药物链接组装单元,其特征在于,T包括下式:



40. 如权利要求36所述的药物链接组装单元,其特征在于,T是MDPr-vc接头。

41. 具有式(Ib)的正交保护的链接组装单元:



其中,

T是具有末端马来酰亚胺部分的拴系基团;

Q^1 是包含第一半胱氨酸部分或其类似物的第一连接基团;

Q^2 是包含第二半胱氨酸部分或其类似物的第二连接基团;

X是连接基团接头;

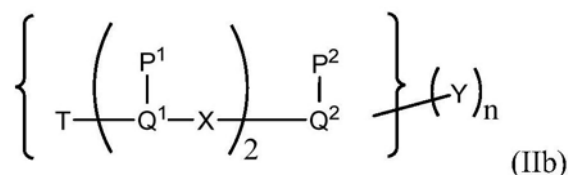
P^1 是第一硫醇保护基团;

P^2 是第二硫醇保护基团,且 P^1 和 P^2 不同;

Y是附加到L、 Q^1 、X或 Q^2 的分配剂;和

下标n为0或1。

42. 具有式 (IIb) 的正交保护的链接组装单元:



其中,

T是具有末端马来酰亚胺部分的拴系基团;

Q¹是包含第一半胱氨酸部分或其类似物的第一连接基团;

Q²是包含第二半胱氨酸部分或其类似物的第二连接基团;

每个X都是连接基团接头;

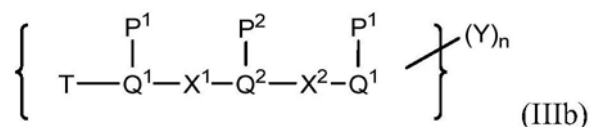
P¹是第一硫醇保护基团;

P²是第二硫醇保护基团,且P¹和P²不同;

Y是附加到L、Q¹、X或Q²的分配剂;和

下标n为0或1。

43. 具有式 (IIIb) 的正交保护的链接组装单元:



其中,

T是具有末端马来酰亚胺部分的拴系基团;

Q¹是包含第一半胱氨酸部分或其类似物的第一连接基团;

Q²是包含第二半胱氨酸部分或其类似物的第二连接基团;

X¹和X²各自独立地为连接基团接头;

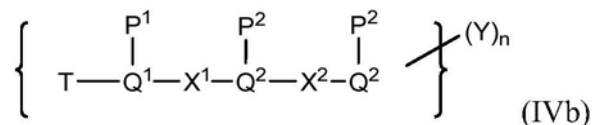
P¹是第一硫醇保护基团;

P²是第二硫醇保护基团,且P¹和P²不同;

Y是附加到L、Q¹、X或Q²的分配剂;和

下标n为0或1。

44. 具有式 (IVb) 的正交保护的链接组装单元:



其中,

T是具有末端马来酰亚胺部分的拴系基团;

Q¹是包含第一半胱氨酸部分或其类似物的第一连接基团;

Q²是包含第二半胱氨酸部分或其类似物的第二连接基团;

X¹和X²各自独立地为连接基团接头;

P¹是第一硫醇保护基团;

P²是第二硫醇保护基团,且P¹和P²不同;

Y是附加到L、Q¹、X或Q²的分配剂；和

下标n为0或1。

45. 如权利要求41、42、43或44中任一项所述的正交保护的链接组装单元，其特征在于，P¹选自自由以下组成的组：-S-异丙基 (SiPr)、-S-叔丁基 (StBu) 和-S-甲基 (SMe)；且P²是-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙酰氨基甲基)。

46. 如权利要求41、42、43或44中任一项所述的正交保护的链接组装单元，其特征在于，T为MDPr-Val-Cit-；P¹选自自由以下组成的组：-S-异丙基 (SiPr)、-S-叔丁基 (StBu) 和-S-甲基 (SMe)；-且P²是-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙酰氨基甲基)。

47. 如权利要求41、42、43或44中任一项所述的正交保护的链接组装单元，其特征在于，X选自甘氨酸和丙氨酸；T是-MDPr-Val-Cit-；P¹选自自由以下组成的组：-S-异丙基 (SiPr)、-S-叔丁基 (StBu) 和-S-甲基 (SMe)；-且P²是-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙酰氨基甲基)。

48. 如权利要求41、42、43或44中任一项所述的正交保护的链接组装单元，其特征在于，T为MDPr-Val-Cit-；Q¹和Q²均为半胱氨酸；X是甘氨酸；P¹选自自由以下组成的组：-S-异丙基 (SiPr)、-S-叔丁基 (StBu) 和-S-甲基 (SMe)；且P²是-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙酰氨基甲基)。

49. 如权利要求41、42、43或44中任一项所述的正交保护的链接组装单元，其特征在于，T为MDPr-Val-Cit-；Q¹和Q²均为半胱氨酸；X是甘氨酸；P¹选自自由以下组成的组：-S-异丙基 (SiPr)、-S-叔丁基 (StBu) 和-S-甲基 (SMe)；P²是-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙酰氨基甲基)；下标n为1，且Y包含PEG或环糊精。

50. 具有1至8个如权利要求41-49中任一项所述的正交保护的链接组装单元的抗体-接头偶联物。

51. 一种多药抗体药物偶联物 (MD-ADC)，其包含抗体和一个或多个共价连接的链接组装单元 (LA)，每个链接组装单元具有两个不同的药物单元D¹和D²，其中所述一个或多个共价连接的链接组装单元在所述抗体的重链或轻链中与工程半胱氨酸或其衍生物的硫原子连接，或与通过还原所述抗体中链间二硫键产生的硫醇连接，并且其中每个所述共价连接的链接组装单元具有2至4个与其连接的总药物单元和任选的分配剂 (Y)。

52. 如权利要求51所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述一个或多个共价连接的链接组装单元中的每一个与所述抗体的重链或轻链中的工程化半胱氨酸或其衍生物的硫原子连接。

53. 如权利要求51所述的抗体药物偶联物，其特征在于，D¹和D²分别是第一抗癌剂和第二抗癌剂。

54. 如权利要求53所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述第一抗癌剂和第二抗癌剂具有互补的活性谱。

55. 如权利要求53所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述第一抗癌剂和第二抗癌剂是MMAE和MMAF。

56. 如权利要求53所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述第一抗癌剂和第二抗癌剂是喜树碱和多柔比星。

57. 如权利要求51-56所述的抗体药物偶联物，其特征在于，连接至链接组装单元的所述两至四个总药物单元通过硫醇/马来酰亚胺偶联产生。

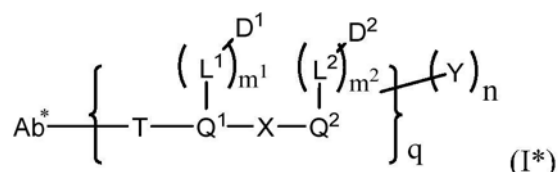
58. 如权利要求51所述的抗体药物偶联物，其特征在于，所述链接组装单元还包括分配

剂。

59. 如权利要求58所述的抗体药物偶联物,其特征在于,所述分配剂是聚乙二醇单元。

60. 如权利要求58所述的抗体药物偶联物,其特征在于,所述分配剂是环糊精单元。

61. 如权利要求51所述的抗体药物偶联物,具有式(I*):



其中,

Ab*是包含一个或多个工程化半胱氨酸残基的抗体;

T是与所述抗体的重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子或与通过还原所述抗体中的链间二硫键而产生的硫醇连接的拴系基团;

Q¹是第一连接基团;

Q²是第二连接基团;

X是连接基团接头;

D¹是第一药物单元;

D²是第二药物单元;

L¹是任选的链接基团,将D¹连接到Q¹;

L²是任选的链接基团,将D²连接到Q²;

下标m¹和m²各自独立地为0或1;

Y是附着到L、Q¹、X、Q²、L¹或L²上的位点的分配剂;

下标n为0或1;和

下标q是1到10的整数。

62. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,T是连接在所述抗体重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子上的拴系基团。

63. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,Q¹是具有通过L¹连接到Q¹中存在的硫醇的D¹的半胱氨酸基团;和Q²是具有通过L²连接到Q²中存在的硫醇的D²的半胱氨酸基团。

64. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,下标n为0。

65. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,下标n是1,且Y包括聚乙二醇基团。

66. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,X是氨基酸或二肽或三肽。

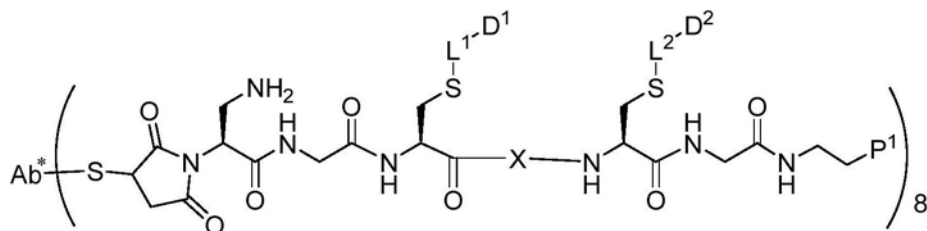
67. 如权利要求66所述的抗体药物偶联物,其特征在于,X中存在的每个氨基酸选自以下组成的组:甘氨酸和丙氨酸。

68. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,T是自稳定接头组装件。

69. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,各自L¹和L²独立地选自马来酰亚胺基-己酰基(mc)、马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸(mc-vc)、马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(mc-vc-PABC)和马来酰亚胺二氨基丙酰基-缬氨酸-瓜氨酸(MDPr-vc)。

70. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,其特征在于,下标n为0,并且L¹和L²中的至少一个包含连接的分配剂(Y)。

71. 如权利要求61所述的抗体药物偶联物,具有以下结构:



其中P¹是聚乙二醇基团。

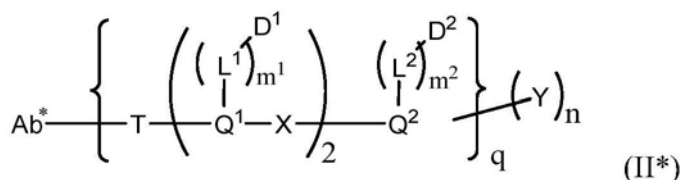
72. 如权利要求71所述的抗体药物偶联物,其特征在于,L¹和L²各自独立地选自由以下组成的组:马来酰亚胺基-己酰基(mc),马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸(mc-vc)和马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(mc-vc-PABC)。

73. 如权利要求71所述的抗体药物偶联物,其特征在于,D¹和D²独立地选自由以下组成的组:MMAE、奥瑞他汀T、MMAF和尾海兔素10。

74. 如权利要求71所述的抗体药物偶联物,其特征在于,D¹和D²独立地选自由以下组成的组:MMAE、喜树碱、Superdiox、尾海兔素10、长春碱和环丙沙星。

75. 如权利要求51所述的多药抗体药物偶联物(MD-ADC),其包含抗体和一个或多个共价连接的链接组装单元(LA),其中所述一个或多个共价连接的LA单元中的每一个连接至所述抗体的重链或轻链中工程化的半胱氨酸或其衍生物的硫原子上,并且其中各个所述共价连接的LA单元具有总共三个与其连接的药物单元D¹和D²,其中D¹与D²的摩尔比为2:1。

76. 如权利要求75所述的抗体药物偶联物, 具有式(II*):



其中，

Ab*是包含一个或多个工程化半胱氨酸残基的抗体;

T是与所述抗体的重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子或与通过还原所述抗体中的链间二硫键而产生的硫醇连接的拴系基团；

Q^1 是第一连接基团:

Q^2 是第二连接基团:

每个X都是连接基团接头:

D¹是第一药物单元:

D²是第二药物单元:

L^1 是任选的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 :

L^2 是任选的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 :

下标 m^1 和 m^2 各自独立地选自0和1:

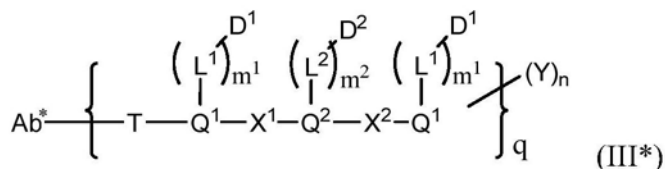
Y是附着到L、Q1、X、Q2、L1或L2上的位点的分配剂；

下标n为0或1;和

下标q是1到10的整数。

77. 如权利要求76所述的抗体药物偶联物,其特征在于,T是连接在所述抗体重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子上的拴系基团。

78. 如权利要求75所述的抗体药物偶联物,具有式(III*):



其中,

Ab*是包含一个或多个工程化半胱氨酸残基的抗体;

T是与所述抗体的重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子或与通过还原所述抗体中的链间二硫键而产生的硫醇连接的拴系基团;

每个Q¹都是独立选择的第一连接基团;

Q²是第二连接基团;

X¹和X²各自独立地为连接基团接头;

D¹是第一药物单元;

D²是第二药物单元;

每个L¹都是任选的链接基团,将D¹连接到Q¹;

L²是任选的链接基团,将D²连接到Q²;

下标m¹和m²各自独立地为0或1;

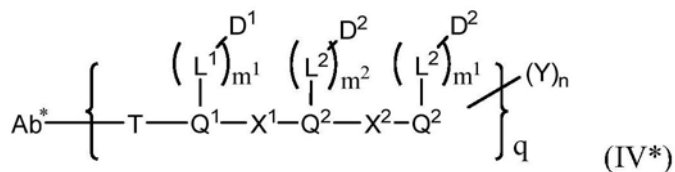
Y是附着到L、Q¹、X¹、X²、Q²、L¹或L²上的站点的分配剂;

下标n为0或1;和

下标q是1到10的整数。

79. 如权利要求78所述的抗体药物偶联物,其特征在于,T是连接在所述抗体重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子上的拴系基团。

80. 权利要求75所述的抗体药物偶联物,具有式(IV*):



其中,

Ab*是包含一个或多个工程化半胱氨酸残基的抗体;

T是与所述抗体的重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子或与通过还原所述抗体中的链间二硫键而产生的硫醇连接的拴系基团;

Q¹是一个独立选择的第一连接基团;

每个Q²都是第二连接基团;

X¹和X²各自独立地为连接基团接头;

D¹是第一药物单元;

D²是第二药物单元；

L¹是任选的链接基团，将D¹连接到Q¹；

每个L²都是任选的链接基团，将D²连接到Q²；

下标m¹和m²各自独立地为0或1；

Y是附着到L、Q¹、X¹、X²、Q²、L¹或L²上的站点的分配剂；

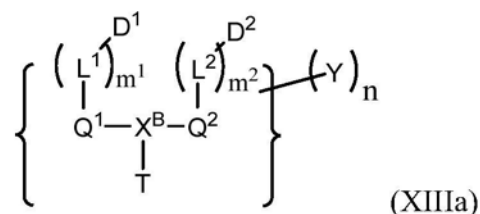
下标n为0或1；和

下标q是1到10的整数。

81. 如权利要求80所述的抗体药物偶联物，其特征在于，T是连接在所述抗体重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子上的拴系基团。

82. 如权利要求61-76所述的抗体药物偶联物，其特征在于，D¹和D²选自由以下药物对组成的组：MMAE/MMAF、MMAE/喜树碱、Superdox/喜树碱、Superdox/MMAE、尾海兔素10/MMAE、尾海兔素10/MMAF、长春碱/MMAE和长春碱/MMAF。

83. 具有式 (XIIIa) 的药物链接组装单元：



其中，

T是拴系基团，其可以与所述抗体的重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子附着，或者与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇连接；

Q¹是第一连接基团；

Q²是第二连接基团；

X^B是分支的连接基团接头；

D¹是第一药物单元；

D²是第二药物单元；

L¹是任选的链接基团，将D¹连接到Q¹；

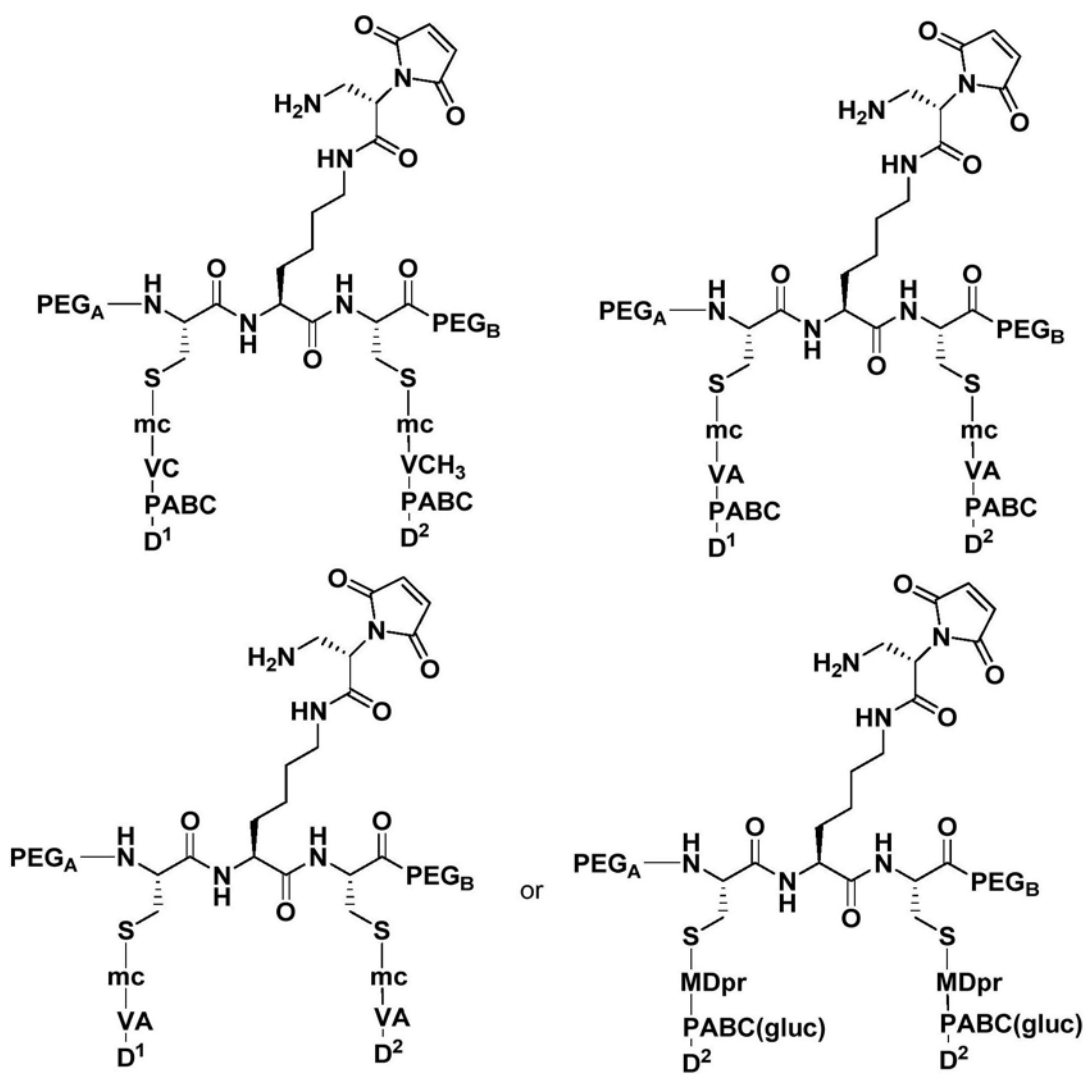
L²是任选的链接基团，将D²连接到Q²；

下标m¹和m²各自独立地为0或1；

Y是附加到L、Q¹、X^B、Q²、L¹或L²上的位点的分配剂；和

下标n为0, 1或2。

84. 如权利要求83所述的药物链接组装单元，具有以下式：



其中PEG_A具有结构

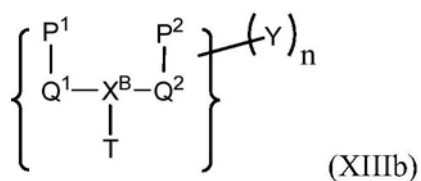
PEG_B具有结构

$$\text{HN} \left[\text{CH}_2 \text{O} \right]_{n_B} \text{R}^{21}$$

R²¹是C₁₋₄烷基或-CH₂CH₂CO₂H; 和

下标 n_A 和 n_B 各自独立地为8至24之间的整数。

85. 具有式 (XIIIb) 的正交保护的链接组装单元:



其中，

T是具有末端马来酰亚胺部分的拴系基团；

Q¹是包含第一半胱氨酸部分的第一连接基团；
Q²是包含第二半胱氨酸部分的第二连接基团，；
X^B是分支的连接基团接头；
P¹是第一硫醇保护基团；
P²是第二硫醇保护基团，且P¹和P²不同；
Y是附着到L、Q¹、X^B或Q²的分配剂；且
下标n为0、1或2。

多药抗体药物偶联物

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请在35U.S.C. §119 (e) 下要求2016年12月14日提交的美国临时申请No. 62/434,333的国内优先权,以及在35U.S.C. §119 (a) 下的2017年6月13日提交的日本专利申请No. 2017-115832的外国优先权,其要求2016年12月14日提交的美国临时申请62/434,333的优先权,其内容出于所有目的通过引用并入本文。

关于在联邦政府资助下研究和开发的发明的权利的声明

[0002] 不适用

在光盘上提交的“序列表”、表格或计算机程序列表附录的参考

[0003] 2017年12月12日创建的名称为4200-00111PC-ST25.txt的12KB的序列表通过引用并入本文。

背景技术

[0004] 抗体-药物偶联物 (ADC) 将单克隆抗体的肿瘤靶向特异性与细胞毒性弹头的有效细胞杀伤活性相结合。部分由于最近ADC的临床成功,其中包括本妥昔单抗 (ADCETRIS™) 在复发性霍奇金淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤中,和曲妥珠单抗 (ado-trastuzumab mertansine) (KADCYLA™) 在HER2阳性转移性乳腺癌中的批准,因此人们对设计新的ADC形式产生了浓厚的兴趣。这些新方法中的大多数都集中在解决现有临床分子的一些缺点,例如异质药物负载、有限的药物-接头稳定性,以及具有限制的癌症类型子集的活性的弹头。为了实现改进的ADC,在该领域已经取得了显著的进步。这些包括能够实现同质负载的位点特异性药物-接头偶联策略,具有改善的稳定性的药物-接头连接模式,有力的新有效负载以及利用替代释放机制的接头策略。

[0005] 几乎所有有效的癌症化学疗法都使用旨在克服异质肿瘤细胞群体内不同药物敏感性的互补药物组合。该策略最近已应用于ADC,目前正在与未偶联的,临床批准的抗癌药物联合进行测试。此外,新兴的ADC临床和临床前数据已经证明,通过使用相同的抗体施用单独的ADC,可以通过提供替代弹头来克服对特定ADC的不敏感性。在这里,我们通过描述用于靶向癌细胞抗原的抗体的可获得的双细胞毒性药物偶联技术,在单个ADC内公开了互补药物有效负载,这构成了靶向药物递送领域的重大进步。该技术适用于其他靶向剂,证明了正交硫醇保护基团首次用于制备不依赖于工程化抗体的ADC。我们提供了第一个数据,证明与常规ADC相比,具有双重偶联药物 (MD-ADC) 的多种药物ADC表现出增强的体外和体内活性。

[0006] 在MD-ADC技术的一个示例中,具有互补生理化学性质的两种不同的,高效的他汀 (奥瑞他汀) 分子与单一抗体偶联,其增强对异质癌细胞群的ADC活性。通常使用的他汀药物-接头,也称为他汀链接组装单元,包括mc-MMAF (1)、mc-vc-MMAF (2) 和mc-vc-MMAE (3)。来自mc-vc-MMAE药物接头的释放药物单甲基他汀E (MMAE) 是细胞可渗透的并且表现出旁观者活性,或杀死相邻的抗原阴性癌细胞。然而,MMAE也是多重耐药 (MDR) 输出物的底物,因此对具有高MDR表达的细胞的活性降低。相反,分别从mc-vc-MMAF和mc-MMAF ADC释放的MMAF和

cys-mc-MMAF对药物输出不易感并且保留对MDR(+)细胞的活性,但是细胞可渗透性最小。因此,它们没有表现出旁观者活性并且对抗原阴性肿瘤细胞几乎没有活性。结合两种类型药物的特征可以提供癌症的互补活性,产生具有增强的细胞毒性谱的ADC。

[0007] 迄今为止,仅报道了MD-ADC的单个实例,但是该工作是在抗体Fab片段上进行的,并且需要遗传引入工程化半胱氨酸(eCys)残基以实现位点特异性区分偶联位点(Puthenveetil等,Bioconjugate Chem. (2016) 27 (4):1030-1039)。已经提出了许多其他方法用于将两种单独的试剂与抗体的位点特异性偶联(Maruani等,Org. Biomol. Org. (2016) 14 (26):6165-6178),但是这些方法中的大多数需要专门的试剂,包括位点特异性氨基酸突变或定制酶,有时需要两个不同的偶联手柄。所有这些因素都增加了生成和筛选MD-ADC所需的试剂的复杂性。一种这样的方法利用吡嗪-二酮重新连接还原的天然抗体二硫化物,然后进行双击功能化以构建基本上同质的产物,但该方法仅用于产生荧光团-药物抗体偶联物并且在消耗抗体上两个可偶联的位点,从而减少潜在的总药物负载。

[0008] 所需要的是将双重药物结合到单个链接组装单元中的方法(和ADC),每个单元仅需要一个可偶联位点,并且导致两种药物以特定比例同质地和位点特异性地负载。该方法不应依赖于需要限制性eCys位点或酶介导的偶联的工程化抗体,并且应该适用于可以在一系列抗体上筛选的药物组合,包括商业抗体和杂交瘤抗体库。本公开解决了这些和其他需要。

发明内容

[0009] 本文提供了多药抗体药物偶联物(MD-ADC),其包含抗体和一至八个共价连接的链接组装单元(LA),其中多达八个共价连接的链接组装单元中的每一个连接至通过还原抗体中的链间二硫键产生的硫醇和/或每个共价连接的LA单元与来自工程化半胱氨酸残基的硫醇连接,并且其中每个共价连接的链接组装单元具有与其相连的2-4个药物部分,也称为药物单元,其中两个药物单元是不同的,并且具有任选的分配剂(Y)。这些MD-ADC的具体实施方式提供在式(I)、(II)、(III)和(IV)中,以及式(I*)、(II*)、(III*)和(IV*)中。

[0010] 本文还提供了可用于制备MD-ADC的链接组装单元,其由式(Ia)、(IIa)、(IIIa)、(IVa)和(XIIIa)表示。

[0011] 另一方面,本文提供了受保护的链接组装单元(用于制备链接组装单元和MD-ADC),其由下述式(Ib)、(IIb)、(IIIb)、(IVb)和(XIIIb)体现。

[0012] 另一方面,本文提供了具有1至8个正交保护的链接组装单元的抗体偶联物。

[0013] 在其他方面,本文提供了使用所述MD-ADC的药物组合物和治疗疾病的方法。

附图的简要说明

[0014] 图1A和1B显示在偶联(A)和脱保护(B)后轻链和重链抗体的反相分离后的总离子色谱图(TIC)和UV色谱图(280nm)。主要轻链和重链种类的解卷积质谱显示在色谱仪的右侧,显示了预期和观察到的质量。注意,由于N-连接聚糖的异质性,存在多种重链质量种类。仅注意到重链的G0糖型质量。LC=轻链,HC=重链。

[0015] 图2A和2B显示在乙酰氨基甲基(Acm)脱保护和随后的N-乙基马来酰亚胺(NEM)添加后cAC10-mc-Cys的解卷积轻链质量,其包括用QMP树脂先前处理(A)或不包括(B)。仅在(A)中观察到向释放的硫醇中添加NEM。

[0016] 图3表明汞介导的Acm脱保护不影响抗体链间二硫键的完整性。将马来酰亚胺己酰-Cys (Acm) 与cAC10 (S239C) 偶联,每个抗体2个载体。该偶联物具有完整的链间二硫键。使偶联物经受汞介导的Acm脱保护条件和随后的N-乙基马来酰亚胺 (NEM) 偶联 (约20摩尔当量)。显示了轻链和重链的反相分离后轻链和重链的解卷积质谱。该分析表明,只有一个NEM分子被添加到重链中,并且没有发生轻链的修饰。这表明汞处理不会影响抗体链间二硫键。如果汞处理破坏了二硫键,预计会增加多个NEM。注意,由于N-连接聚糖的异质性,存在多种重链质量种类。仅注意到重链的G0糖型质量。LC=轻链,HC=重链

[0017] 图4显示反应示意图,其包括对载体4上的Cys (SiPr) 和Cys (Acm) 残基进行连续暴露的条件和导致位点特异性药物-接头偶联。通过反相UPLC-MS分析每种偶联物。每个中间体下面显示的是反相分离后的UV色谱图和去卷曲的轻链质量。每个步骤都进行近乎定量的转化,主要产生单一的轻链和重链种类。图6中提供了每种偶联物的去卷曲重链质量。

[0018] 图5显示轻链和重链反相分离后的总离子色谱图 (TIC) 和UV色谱图 (280nm)。轻链和重链种类的解卷积质谱显示在色谱仪的右侧,显示了预期和观察到的质量。注意,由于N-连接聚糖的异质性,存在多种重链质量种类。仅注意到重链的G0糖型质量。LC=轻链,HC=重链

[0019] 图6显示了去除-SiPr和1的偶联 (中间),以及去除-Acm和3的偶联之前 (顶部) 和之后,药物-载体偶联cAC10-4的去卷积重链质量。图4中所示的每种中间体的UV色谱图。注意,由于N-连接聚糖的异质性,存在多种重链质量种类。仅注意到重链的G0糖型质量。

[0020] 图7显示使用药物载体4制备的MD-ADC cAC10-1-3的SEC表征。偶联物为98%单体 (6.77min)。

[0021] 图8显示cAC10抗体、cAC10-4- (3-1) ADC或CD30 (+) L540cy细胞上的非结合IgG₁同型对照的饱和结合。计算的cAC10裸抗体和cAC10-4- (3-1) 的K_D值分别为0.35nM和0.50nM。cAC10或cAC10-4- (3-1) 均未与CD30 (-) U-266细胞结合 (未显示)。

[0022] 图9A和9B显示cAC10ADC对一组细胞系的体外活性。所有三个ADC都使用多功能药物载体4。对于单药负载的ADC,第二个Cys残基用8拷贝的N-乙基马来酰亚胺封端。ADC活性用IC₅₀报告,以ng/mL计。在图A中,用ADC处理细胞96小时,并使用Cell TiterGlo (Promega) 测定细胞存活力,而在图B中,使用Bright-Glo荧光素酶测定系统 (Promega) 测定细胞存活力。HL=霍奇金淋巴瘤,ALCL=间变性大细胞淋巴瘤。

[0023] 图10显示同型对照ADC (IgG1-4- (1-3)) 在CD30 (+) L540cy细胞上无活性,而cAC10-4- (1-3) 具有高活性。

[0024] 图11显示在体内MDR (+) DEL-BVR异种移植模型上的双药物ADC活性。使用药物载体4制备每个MD-ADC。对于单药偶联物,第二个Cys残基用8拷贝的N-乙基马来酰亚胺封端。

[0025] 图12显示具有异质CD30表达的体内异种移植模型中的MD-ADC活性。异种移植模型由Karpas 299 (CD30+) 和Karpas 35R (CD30-) 细胞的1:1混合物组成。使用药物载体4制备每个MD-ADC。对于单药偶联物,第二个Cys残基用8拷贝的N-乙基马来酰亚胺封端。

[0026] 图13显示在慢性治疗试验中,与具有单药物负载的ADC (仅Comp. Aa或仅Comp. Ab) 相比,包含Comp. Aa和Comp. Ab的多药物ADC限制了ADC抗性细胞的生长。该实验用JHH-7细胞进行。

[0027] 图14显示在集落形成试验中,与具有单药物负载的ADC (仅Comp. Aa或仅Comp. Ab)

或未处理的细胞相比,包含Comp.Aa和Comp.Ab的多药物ADC限制了ADC抗性细胞的生长。该实验用JHH-7细胞进行。

[0028] 图15显示在集落形成试验中,与具有单药物负载的ADC(仅Comp.Aa或仅MMAE)或未处理的细胞相比,包含Comp.Aa和MMAE的多药物ADC限制了ADC抗性细胞的生长。该实验用MCF-7细胞进行。

[0029] 图16A-B显示了用于制备载有3个半胱氨酸用于16+8药物载量的药物载体的分析数据。(A) 24负载MD ADC的轻链和重链的反相分离后的UV色谱图(280nm)。注意,存在单个轻链和重链峰。在1.44min洗脱的峰是满载轻链(LC)。在1.91min洗脱的峰是满载重链(HC);(B) 在cAC10抗体上使用药物载体3的24载荷(16+8)MD ADC的解卷积轻链质量观察到的m/z对应于完全偶联的轻链载体3和3个总药物单元(分裂2+1)。

[0030] 图17A-E显示了用于制备没有PEG基团的双负载L49-链接组装单元Ab(8)-Comp.Aj(8)-Comp.Ak(8)的分析数据。(A) MD ADC的轻链和重链的反相分离后的UV色谱图(280nm)。在1.07min洗脱的峰是满载LC。在1.62min洗脱的峰是满载的HC。在1.46min洗脱的峰对于第二种偶联药物而言载荷不足(每HC 2种药物而不是3种);(B) 使用不含PEG臂的药物载体的16载荷(8+8)MD ADC的解卷积轻链质量;(C) 使用不含PEG臂的药物载体的完全偶联的16-载荷(8+8)MD ADC的解卷积重链质量;(D) 没有PEG基团的L49-链接组装单元Ab(8)-Comp.Aj(8)-Comp.Ak(8)的尺寸排阻色谱图。非聚乙二醇化支架上的共偶联物具有最小的聚集;(E) 没有PEG基团L49-链接组装单元Ab(8)-Comp.Aa(8)-Comp.Ak(8)。非聚乙二醇化支架上的共偶联物具有最小的聚集。

具体实施方式

通用

[0031] 本文提供了多药物抗体药物偶联物(MD-ADC),其以位点特异性方式构建,导致同质的药物负载(例如,16种药物,24种药物或32种药物形式)并且用不需要设计引入其他天然或非天然氨基酸的抗体制备。MD-ADC的制备利用正交保护策略构建链接组装单元,其在MD-ADC偶联物中将双重药物与靶向抗体偶联,其方法是在确定的组装中实现高药物负载,而具有允许药物的不同化学计量的灵活性(药物1与药物2的比例)。更进一步地,对于每个药物链接组装单元或其正交保护的中间体与MD-ADC的连接,仅需要对抗体的单一附着化学。正交保护在抗体-链接组装单元中间体的链接组装单元中,在共价附着D¹和D²之一或两者或多药物接头(MD-Linker)化合物之前,其用于制备MD-ADC,其中D¹和D²中的一个或两个共价连接。本领域技术人员将认识到,药物链接组装单元是药物单元(D¹和/或D²)共价连接到链接组装单元的链接组装单元,而正交保护的链接组装单元是保护基团(P¹和P²)与链接组装单元共价连接的链接组装单元。但是,有时,本申请涉及没有指定药物或正交保护的链接组装单元。基于该段的上下文,对于熟练的读者来说,如果提及链接组装单元是指药物链接组装单元、正交保护的链接组装单元,两者,或其中间体,是显而易见的。

[0032] 本文提供的MD-ADC进一步提供了以下优点:通过与同一抗体偶联可以成功地将多种药物靶向特定结合位点,这克服了与递送相关的困难,例如ADC1/ADC2组合的递送,其中ADC1具有两种不同药物中的一种,ADC2含有另一种药物。在涉及共同递送例如ADC1和ADC2的方法中,(1)偶联物竞争抗原结合,导致药物递送和细胞活性的巨大差异,特别是具有较

低抗原拷贝数的那些,或(2)以不同的速率被清除导致两种药物暴露于相同靶细胞的药理学变异性。

定义

[0033] 除非另有说明,本文使用的以下术语和句子是指具有以下含义。当商品名用于本文时,除非文内另有说明,商品名包括产品制剂,通用药物和商品名产品的一种或多种活性药物组分。

[0034] 本文使用的术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且具体涵盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和表现出所需生物活性的抗体片段,条件是抗体片段具有药物接头的必需数量的附着位点。抗体的天然形式是四聚体,由两对相同的免疫球蛋白链组成,每对具有一条轻链和一条重链。在每对中,轻链和重链可变区(VL和VH)一起主要负责结合抗原。轻链和重链可变结构域由被三个高变区中断的框架区组成,也称为“互补决定区”或“CDR”。恒定区可以被免疫系统识别并与免疫系统相互作用。(参见,例如,Janeway等,2001,免疫生物学,第五版,Garland Publishing,New York)。抗体包括其任何同型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。抗体可衍生自任何合适的物种。在一些方面,抗体是人或鼠来源的,并且在其他方面,抗体是人、人源化或嵌合抗体。

[0035] 术语“单克隆抗体”用于本文是指从实质上均质的抗体群获得的抗体,即,构成该群的各抗体是相同的,除了可能有小量存在的天然发生的突变外单克隆。抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。修饰词“单克隆”是指抗体的特性为获自实质上均质的抗体群,并不应解释为需要通过任何特定方法生产抗体。

[0036] 完整的抗体是这样一种抗体,其包括抗原结合可变区以及轻链恒定区(C_L)和重链恒定区C_H 1,C_H 2,C_H 3和C_H 4,根据适合的抗体种类。恒定区可以是天然序列恒定区(如人天然序列恒定区)或其氨基酸序列变体。

[0037] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,其包含其抗原结合区或可变区。为了在本发明中使用,抗体片段必须具有用于连接药物-接头的必需数量的位点,在本文中称为药物链接组装单元。也就是说,本公开的抗体片段通常包括形成天然抗体中发现的4个二硫键的所有8个半胱氨酸残基,使得当完全还原时,每个半胱氨酸残基可通过链接组装单元用于药物负载。

[0038] “抗原”是抗体能够特异性结合的实体。

[0039] 术语“特异性结合”和“特异性地结合”是指抗体或其抗体片段以选择的方式与其相应的靶抗原结合,而不与众多其他抗原结合,典型地,抗体或抗体衍生物以至少约 1×10^{-7} M,优选 10^{-8} M到 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M或 10^{-12} M的亲合力进行结合,并且与预定抗原的结合亲和力比除预定抗原或紧密相关抗原之外的非特异性抗原(例如BSA,酪蛋白)的亲合力大至少两倍。

[0040] 术语“抑制”或“抑制的”是指降低可检测的量,或指完全阻止。

[0041] 术语“治疗有效量”是指有效治疗哺乳动物疾病或病症的偶联物的量。在癌症的情况下,治疗有效量的偶联物提供以下一种或多种生物学效应:减少癌细胞的数量;减小肿瘤大小;抑制癌细胞浸润到外周器官中(即,在一定程度上减缓,优选停止);抑制(即,在一定程度上减缓,优选停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与

癌症相关的一种或多种症状。在从偶联物释放的游离药物抑制生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,它具有细胞抑制和/或细胞毒性。对于癌症治疗,通常通过评估疾病进展时间(TTP)和/或确定响应率(RR)来测量某些方面的功效。

[0042] 术语“实质性”或“实质上”是指某群体,混合物或样本中的多数,即>50%,优选某群体中大于50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0043] 术语“细胞内切割的”和“细胞内切割”是指MD-ADC上细胞内的代谢过程或反应,其中药物单元(D¹或D²)与链接组装单元(LA)或抗体(Ab)之间的共价连接被破坏,导致游离药物从细胞内的MD-ADC解离,包括其降解产物。因此解离产生的部分是细胞内代谢物。

[0044] 术语“细胞毒活性”是指药物或MD-ADC或MD-ADC的细胞内代谢物的细胞杀伤作用。细胞毒活性通常由IC₅₀值表示,IC₅₀值是每单位体积的浓度(摩尔或质量),其中一半细胞在暴露于细胞毒剂后存活。

[0045] 术语“细胞抑制活性”是指除细胞抑制剂的细胞杀伤以外的抗增殖作用,或具有细胞生长抑制剂作为其药物单元或其细胞内代谢物的MD-ADC,其中所述代谢物是细胞抑制剂。

[0046] 如本文所用的术语“细胞毒剂”是指具有细胞毒活性并导致细胞破坏的物质。该术语旨在包括化学治疗剂和毒素,例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其合成类似物和衍生物。

[0047] 如本文所用的术语“细胞抑制剂”是指具有细胞抑制活性的物质,例如,抑制负责或促成细胞生长或增殖的细胞功能。细胞抑制剂包括抑制剂,例如蛋白质抑制剂,例如酶抑制剂。

[0048] 术语“癌症”和“癌的”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况或病症。“肿瘤”包括一种或多种癌细胞。

[0049] 本文的“自身免疫疾病”是由个体自身组织或蛋白质引起并针对个体自身组织或蛋白质的疾病或病症。

[0050] 如本文所用的“患者”是指施用MD-ADC的受试者。“患者”的实例包括但不限于人、大鼠、小鼠、豚鼠、非人灵长类动物、猪、山羊、牛、马、狗、猫、鸟和家禽。通常,患者是大鼠、小鼠、狗、非人灵长类动物或人。在一些方面,患者是需要有效量的MD-ADC的人。

[0051] 除非上下文另有说明,否则术语“处理”或“治疗”是指治疗性治疗和预防复发的预防措施,其中目的是抑制或减缓(减轻)不希望的生理变化或病症,比如,例如,癌症的发展或扩散。出于本发明的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于:症状的缓解,疾病程度的减少,疾病状态的稳定(即,即不恶化),疾病进展的延迟或减缓,改善或缓解疾病状态,缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。在某些方面,“治疗”还意味着与未接受治疗的预期存活相比延长存活期。需要治疗的那些包括已经患有症状或病症的那些,并且在一些方面还包括那些易患症状或病症的人。

[0052] 在癌症的背景下,术语“治疗的”包括以下任何或全部:抑制肿瘤细胞、癌细胞或肿瘤的生长;抑制肿瘤细胞或癌细胞的复制、减轻整体肿瘤负担或减少癌细胞的数量,并改善与疾病相关的一种或多种症状。

[0053] 如本文所用,术语“盐”是指化合物(例如,药物,链接组装单元或MD-ADC)的有机或

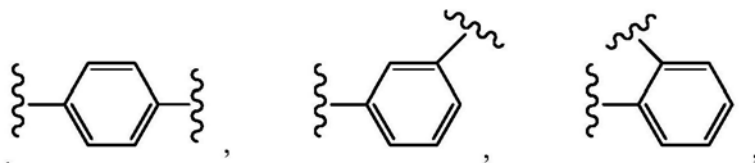
无机盐。在一些方面,该化合物含有至少一个氨基,因此氨基可以形成酸加成盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、p-甲苯磺酸盐和双羟萘酸(即,1,1-亚甲基-双--(2-羟基-3-萘甲酸))盐。盐可以包括包含另一种分子,例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分。此外,盐在其结构中具有一个或多个带电原子。在存在多个带电原子作为盐的一部分的情况下,有时存在多个抗衡离子。因此,盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。“药学上可接受的盐”是适合于如本文所述施用于受试者的盐,并且在一些方面包括如编辑P.H.Stahl和C.G.Wermuth的药用盐手册所述的盐:性质,选择和使用,Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA,2002,其列表通过引用明确地并入本文。

[0054] 除非另有说明,术语“烷基”本身或作为另一术语的一部分是指具有指定碳原子数的未取代的直链或支链饱和烃(例如,“-C₁-C₈烷基”或“-C₁-C₁₀”烷基分别指具有1至8或1至10个碳原子的烷基。当未指出碳原子数时,烷基具有1-8个碳原子。代表性的直链“-C₁-C₈烷基”包括但不限于-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、--正己基、--正庚基和--正辛基;支链-C₁-C₈烷基包括但不限于-异丙基、-仲-丁基、-异丁基、-叔-丁基、-异戊基和-2-甲基丁基;术语“烯基”本身或作为另一术语的一部分是指不饱和的-C₂-C₈烷基包括但不限于-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-异丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、--3-甲基-丁烯基、2-甲基-2-丁-烯基、-2,3-二甲-基丁烯基、-1--己烯-基、2-己烯基、-3-己-烯基-,术语“炔基”本身或作为另一术语的一部分是指具有一个或多个三键的不饱和-C₂-C₈烷基,例如,-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基和-3-甲基丁炔基。-----

[0055] 除非另有说明,“亚烷基”本身作为另一术语的一部分,是指具有所述碳原子数,通常1-10个碳原子的取代或未取代的饱和或不饱和的支链或直链或环状烃基,且具有两个单价基团中心,其通过从母体烷烃的相同或两个不同碳原子上去除两个氢原子而得到。典型的亚烷基包括但不限于:亚甲基(-CH₂-)、1,2-亚乙基(-CH₂CH₂-)、1,3-亚丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亚丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。在一些方面,亚烷基是支链或直链烃(即,它不是环烃)。在其他方面,亚烷基是饱和亚烷基,其通常不是环烃。

[0056] 除非另有说明,否则“芳基”本身或作为另一术语的一部分,是指通过从母体芳环系统的单个碳原子上去除一个氢原子衍生的取代或未取代的6-20个碳(优选6-14个碳)原子的单价碳环芳烃基团。一些芳基在示例性结构中表示为“Ar”。典型的芳基包括但不限于衍生自苯、取代的苯、萘、蒽、联苯等的基团。示例性芳基是苯基。

[0057] 除非另有说明,“亚芳基”本身或作为另一术语的一部分,是如上定义的芳基,其中芳基的一个氢原子被键取代(即,它是二价的)并且可以在邻位,间位或对位取向如以下结构所示,苯基作为示例性基团:



[0058] 除非另有说明,否则“C₃-C₈杂环基(heterocycle)”本身或作为另一术语的一部分,是指具有3至8个碳原子(也称为环成员)的单价取代或未取代的芳族或非芳族单环或双环系统和一至四个独立地选自N、O、P或S的杂原子环成员,并通过从母体环系统的环原子上去除一个氢原子而得到。杂环中的一个或多个N、C或S原子可被氧化。包含杂原子的环可以是芳族或非芳族的。除非另有说明,否则杂环在任何杂原子或碳原子上与其侧基连接,从而产生稳定的结构。一个C₃-C₈杂环的代表性实例包括,但不限于,吡咯烷基、氮杂环丁烷基、哌啶基、吗啉基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、苯并呋喃基、苯并噻吩、吲哚基、苯并吡啶基、吡咯基、噻吩基(噻吩)、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡、嘧啶基、吡啶基、吡嗪基、哒嗪基、异噻唑基和异恶唑基。

[0059] 除非另有说明,“C₃-C₈杂亚环基(heterocyclo)”,其本身或作为另一术语的部分,指的是上述限定的C₃-C₈杂环基其中所述杂环基的氢原子之一被键代替(即,它是二价的)。在选择实施方式中,例如,当链接组装单元的一部分包含杂亚环基时,杂亚环基是如上定义的杂环基团,其中杂环基的一个或两个氢原子被键取代(即,杂亚环基可以是二价的或三价)。

[0060] 除非另有说明,“C₃-C₈碳环基”本身或作为另一术语的一部分,是3-、4-、5-、6-、7-或8-元单价,取代或未取代的,饱和或不饱和的通过从母环系统的环原子上去除一个氢原子衍生的非芳族单环或双环碳环。代表性的-C₃-C₈碳环包括,但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环戊二烯基、环己基、环己烯基、1,3-环己二烯基、1,4-环己二烯基、环庚基、1,3-环庚二烯基、1,3,5-环庚三烯基、环辛基和环辛二烯基。

[0061] 除非另有说明,“C₃-C₈亚碳环基(carbocyclo)”,其本身或作为另一术语的部分,指的是上述限定的C₃-C₈碳环基其中另一个所述碳环基的氢原子被一个键替换(即,它是二价)。在选择实施方式中,例如,当链接组装单元的一部分包含亚碳环基时,亚碳环基是上面定义的碳环基,其中碳环基的一个或两个氢原子被键替换(即,亚碳环基可以是二价的或三价)。

[0062] 除非另有说明,否则术语“杂烷基”本身或与另一术语组合,除非另有声明,否则是指稳定的直链或支链烃或其组合,完全饱和或含有1至3个不饱和度,由1至10个声明的碳原子数组成,优选1至3个,杂原子选自由以下组成的组:O、N、Si和S,其中氮和硫原子可任选被氧化,氮杂原子可任选被氧化被季铵化。所述杂原子O、N和S可以位于杂烷基的任何内部位置或烷基与分子其余部分连接的位置。杂原子Si可以位于杂烷基的任何位置,包括烷基与分子其余部分连接的位置。实例包括-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-O-CH₃、和-CH=CH-N(CH₃)-CH₃。最多两个杂原子可以是连续的,例如-CH₂-NH-OCH₃和-CH₂-O-Si(CH₃)₃。在优选的实施方式中,C₁至C₄杂烷基或杂亚烷基具有1至4个碳原子和1个或2个杂原子和C₁至C₃杂烷基或杂亚烷基具有1至3个碳原子和1个或2个杂原子。在一些方面,杂烷基或杂亚烷基是饱和的。

[0063] 除非另有说明,否则术语“杂亚烷基”本身或作为另一取代基的一部分是指衍生自杂烷基的二价基团(如上所述),例如 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 。对于杂亚烷基,杂原子也可占据链末端中的任一个或两个。此外,对于亚烷基和杂亚烷基链接基团,没有暗示链接基团的取向。在某些方面,例如,当链接基团或拴系基团包含杂亚烷基时,杂亚烷基是如上定义的杂烷基,其中杂烷基的氢原子中的一个或两个被键取代(即,杂亚烷基可以是二价或三价的)。

[0064] “取代的烷基”和“取代的芳基”分别表示烷基和芳基,其中一个或多个氢原子各自独立地被取代基取代。典型的取代基包括,但不限于, $-\text{X}$ 、 $-\text{O}^-$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{S}^-$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{NR}_3$ 、 $=\text{NR}$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCN}$ 、 $-\text{SCN}$ 、 $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{N}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NRC}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{AsO}_2\text{H}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{X}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{OR}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{SR}$ 、 $\text{C}(=\text{S})\text{SR}$ 、 $\text{C}(=\text{S})\text{NR}_2$ 或 $\text{C}(=\text{NR})\text{NR}_2$,其中每个X独立地为卤素: $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 或 $-\text{I}$;每个R独立地为 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 烷基、 $-\text{C}_6-\text{C}_{20}$ 芳基、 $-\text{C}_3-\text{C}_{14}$ 杂环基、保护基团或前药部分。典型的取代基还包括 $(=\text{O})$ 。如上所述的亚烷基、碳环基、亚碳环基、亚芳基、杂烷基、杂亚烷基、杂环基和杂亚环基是未取代的或类似取代的。在一些实施方式中,“烷基”和“亚烷基”的取代基包括 $-\text{X}$ 、 $-\text{O}^-$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{S}^-$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCN}$ 、 $-\text{SCN}$ 、 $-\text{NRC}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$,或 $-\text{CO}_2\text{R}$ 。在一些实施方式中,“芳基”、“碳环基”、“碳亚环基”、“亚芳基”、“杂烷基”、“杂亚烷基”、“杂环基”和“杂亚环基”-的取代基包括 $-\text{X}$ 、 $-\text{O}^-$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 烷基、 OR 、 SR 、 S^- 、 NR_2 、 CX_3 、 CN 、 OCN 、 SCN 、 $\text{NRC}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 、 SO_3^- 、 SO_3H ,或 $-\text{CO}_2\text{R}$ 。

[0065] 如本文所用,术语“游离药物”是指生物活性药物部分,其直接或间接地共价连接至MD-ADC的任何其他部分或MD-ADC的降解产物。因此,游离药物是指偶联之前的药物,或者是在通过释放机制从MD-ADC的药物链接组装单元切割后立即存在,其可以由MD-ADC中的任选链接基团提供,或随后的细胞内转化或代谢。在一些方面,游离药物将具有H-D形式,其-在一些方面作为带电荷部分存在。游离药物是能够发挥所需生物效应的药理活性物质。在一些方面,所述药理学活性物质是母体药物,并且在其他方面,包括链接组装单元的组分或残留物,其未经历随后的细胞内代谢。

[0066] 如本文所用,术语“分配剂”是掩盖特定药物单元或链接组装单元的疏水性的结构单元。在一些方面,“分配剂”增加了药物链接组装单元的亲水性。在其他方面,分配剂改善了它们所连接的链接组装单元或MD-ADC的药代动力学性质。

[0067] 如本文所用,术语“自稳定接头组装件”是指具有接近琥珀酰亚胺的碱性官能团的取代的琥珀酰亚胺,其能够催化取代的琥珀酰亚胺的羰基-氮键的水解。通过碱性官能团水解,取代的琥珀酰亚胺形成自稳定的连接基。WO2013/173337中描述了自稳定接头组装件的进一步细节。在一些方面,自稳定接头组装件是MDPr,其具有本文公开的结构。

[0068] 如本文所用,术语“工程化半胱氨酸残基”或“eCys残基”是指掺入抗体中的半胱氨酸氨基酸或其衍生物。可以将一个或多个eCys残基掺入抗体中,并且通常将eCys残基掺入抗体的重链或轻链中。通常,将eCys残基掺入抗体,通过诱变亲本抗体的核酸序列以用半胱氨酸或其衍生物编码一个或多个氨基酸残基来进行。合适的突变包括用半胱氨酸或其衍生物替换抗体轻链或重链中的所需残基,在抗体的轻链或重链中的所需位置掺入另外的半胱氨酸或其衍生物,以及在所需的氨基酸重链或轻链的N-和/或C-末端加入另外的半胱氨酸或其衍生物。

或其衍生物。半胱氨酸 (Cys) 的衍生物包括但不限于 β -2-Cys、 β -3-Cys、高半胱氨酸和N-甲基半胱氨酸。

方面和实施方式

[0069] 本文提供了多药抗体药物偶联物 (MD-ADC, 如下所述), 以及药物链接组装单元 (DLA) (具有多个药物单元的连接物, 其中存在两种不同的药物单元 (D^1 和 D^2)) 和正交保护的链接组装单元 (PLA) 或支架, 两者都具有用于连接抗体和 D^1 和 D^2 的官能团。MD-ADC、DLA 单元或 PLA 单元中的每一个将任选的地具有附接在 DLA 或 PLA 单元的部位或组件处或 MD-ADC 的一部分处的分配剂 (Y)。

多药抗体药物偶联物

[0070] 在一个方面, 本文提供了多药抗体药物偶联物 (MD-ADC), 其中两种不同的药物单元共价连接至抗体, 用于在治疗方案中同时靶向递送两种不同的药物。对于每种抗体, 两种药物以整数比率连接, 并且在一些方面, 在每个链接组装单元上以 1:1 的比例、2:1 的比例或 3:1 的比例。通常, MD-ADC 的抗体具有 1 至 8 个连接于其上的链接组装单元, 其在一些方面连接至两个不同的药物单元, 每个抗体总共 2 至 32 个药物单元 ($D^1 + D^2$), 更通常地, 2 至 10 个, 总共 2 到 20 个药物单元。

[0071] 在一些实施方式中, 通过完全还原抗体使得四个链间二硫键中的每一个被切割以产生八个用于链接组装单元或正交保护的链接组装单元的硫醇来实现 16 的总药物负载量 (D^1 与 D^2 药物单元的比例为 1:1)。链接组装单元和正交保护的链接组装单元进一步设计为具有连接到分配剂 (例如, PEG 组) 的任选的附着位点。分配剂可连接到链接组装单元或正交保护的链接组装单元上的各种站点, 这将在下面更全面地讨论。

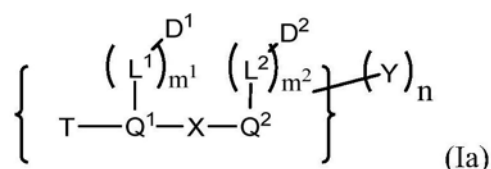
[0072] 在一些实施方式中, 链接组装单元在一个或多个工程化半胱氨酸 (eCys) 残基处与抗体连接。eCys 残基是掺入抗体重链或轻链中的半胱氨酸氨基酸或其衍生物。应理解, 可将一个或多个 eCys 残基掺入单一抗体中。通常, 通过诱变亲本抗体的核酸序列以用半胱氨酸编码一个或多个氨基酸残基来制备包含 eCys 残基的抗体。本领域技术人员可以确定掺入 eCys 残基的合适位置, 并且可以在美国专利 No. 9,000,130 中找到进一步的信息, 其内容为了所有目的并入本文。

[0073] 为了便于组装, 药物链接组装单元 (即链接组装单元与连接的药物单元) 通常在连接到抗体之前构建-并且在下面在组装的链接组装单元和附着的药物单元的背景下讨论。然而, 本领域技术人员将理解, 构建的顺序可以改变。例如, 将具有保护基团的组装单元连接至抗体, 其中, 在添加至抗体后去除保护基团并添加药物单元。

链接组装单元

[0074] 链接装配 (LA) 单元具有以下特征: (1) 抗体拴系基团, 其促进 LA 与抗体硫醇的连接; (2) 脱保护形式的连接基团 (Q^1 和 Q^2) 允许药物单元 (D^1 和 D^2) 的共价连接; (3) 连接基团接头, 提供两个连接基团 (X) 之间的连接; 和任选的组, 包括药物链接基团 (L^1 和 L^2) 和分配剂 (Y)。药物连接组件 (DLA) 单元附着有药物单元。

[0075] 在某些实施方式中, DLA 单元的特征在于式 (Ia) 的结构:



其中,

T是拴系基团,它提供LA与通过还原抗体的链间二硫键产生的抗体硫醇的共价连接;

Q¹是第一连接基团,为第一药物单元(D¹)提供共价附着;

Q²是第二连接基团,为第二药物单元(D²)提供共价附着;

每个X都是一个连接基团接头,它提供两个连接基团之间的连接或间隔;

D¹是第一药物单元;

D²是第二药物单元;

L¹是一个任选的链接基团,将D¹连接到Q¹;

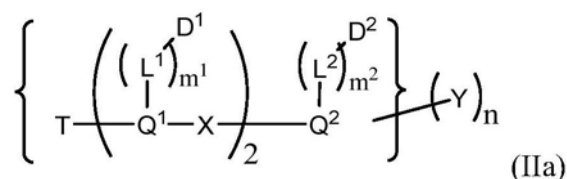
L²是一个任选的链接基团,将D²连接到Q²;

下标m¹和m²各自独立地为0或1;

Y是分配剂;和

下标n为0或1。

[0076] 在另一组实施方式中,DLA单元的特征在于式(IIa)的结构:



其中,

T是拴系基团,提供LA与通过还原抗体的链间二硫键产生的抗体硫醇的共价连接;

每个Q¹是第一连接基团,提供第一药物单元(D¹)的共价附着;

Q²是第二连接基团,提供第二药物单元(D²)的共价附着;

X是连接基团接头;

D¹是第一药物单元;

D²是第二药物单元;

L¹是一个任选的链接基团,将D¹连接到Q¹;

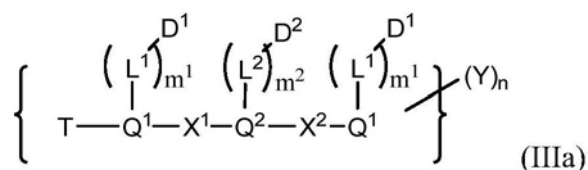
L²是一个任选的链接基团,将D²连接到Q²;

下标m¹和m²各自独立地为0或1;

Y是分配剂;和

下标n为0或1。

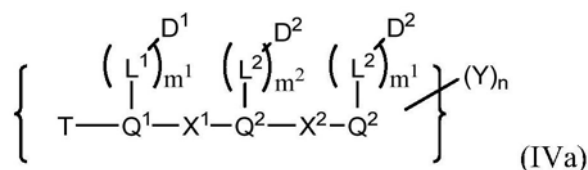
[0077] 在又一组实施方式中,DLA单元的特征在于式(IIIa)的结构:



其中,

T是拴系基团,它提供LA与通过还原抗体的链间二硫键产生的抗体硫醇的共价连接;
 每个 Q^1 是独立选择的第一连接基团,提供独立选择的第一药物单元(D^1)的共价连接;
 Q^2 是第二连接基团,提供第二药物单元(D^2)的共价附着;
 X^1 和 X^2 都是连接基团接头;
 D^1 是第一药物单元;
 D^2 是第二药物单元;
 L^1 是一个任选的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 ;
 L^2 是一个任选的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 ;
 下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1;
 Y是分配剂;和
 下标n为0或1。

[0078] 在又一组实施方式中,DLA单元的特征在于式(IVa)的结构



其中,

T是拴系基团,它提供LA与通过还原抗体的链间二硫键产生的抗体硫醇的共价连接;
 每个 Q^1 是独立选择的第一连接基团,提供独立选择的第一药物单元(D^1)的共价连接;
 Q^2 是第二连接基团,提供第二药物单元(D^2)的共价附着;
 X^1 和 X^2 均为独立选择的连接基团接头;
 D^1 是第一药物单元;
 D^2 是第二药物单元;
 L^1 是一个任选的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 ;
 L^2 是一个任选的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 ;
 下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1;
 Y是分配剂;和
 下标n为0或1。

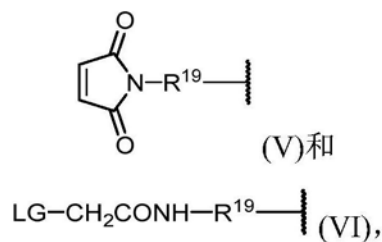
拴系基团(T)

[0079] 拴系基团(T)是指链接组装单元的一部分,其提供与抗体硫醇的共价和均一附着。

(T)的目的结构要求包括提供与抗体硫醇的共价连接的官能团,和提供与第一连接基团(Q^1)共价连接的官能团。在一些实施方式中,拴系基团(T)将具有提供与分配剂(Y)的共价连接的位点。

[0080] 在文献中已经描述了许多适合作为拴系基团的官能团,并且包括设计用于连接抗体中存在的硫醇部分的那些官能团。那些官能团包括马来酰亚胺基部分(例如,马来酰亚胺己酰基和自稳定部分,例如mDPR,参见W02013/173337)。

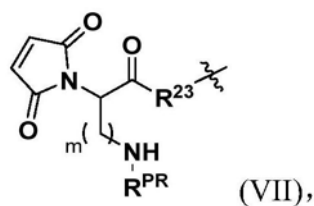
[0081] 在共价连接抗体硫醇之前,在本公开的范围内的拴系基团的实例包括式(V)和(VI)的基团



其中, LG是离去基团, 右边的波浪线是连接基团(Q¹和Q²), R¹⁹如下定义。本领域技术人员将认识到式(V)的马来酰亚胺能够与抗体的硫醇反应, 并且参考式VI, 抗体的硫醇将通过亲核攻击替代离去基团(LG)共价连接到携带LG的碳。合适的离去基团是本领域技术人员熟知的, 包括卤素、甲苯磺酸酯和甲磺酸酯。

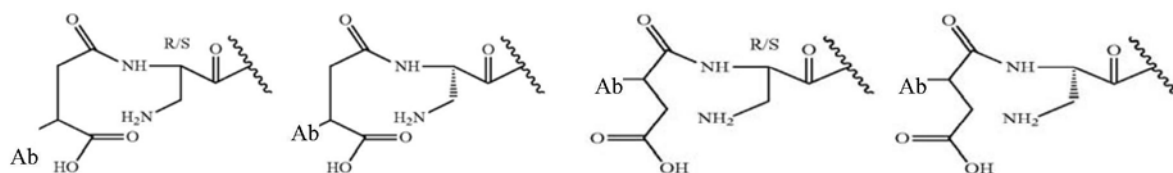
[0082] 在一些实施方式中, R¹⁹是C₁-C₁₀亚烷基-、C₁-C₁₀杂亚烷基-、C₃-C₈亚碳环基-、-O-(C₁-C₈烷基)-、-亚芳基-、C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-、C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈亚碳环基)-、(C₃-C₈亚碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-、C₃-C₈杂亚环基-、C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂亚环基)-、(C₃-C₈杂亚环基)-C₁-C₁₀亚烷基-、C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、C₁-C₁₀杂亚烷基-C(=O)-、C₃-C₈亚碳环基-C(=O)-、-O-(C₁-C₈烷基)-C(=O)-、-亚芳基-C(=O)-、C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-C(=O)-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、C₁-C₈亚烷基-(C₃-C₈亚碳环基)-C(=O)-、(C₃-C₈亚碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、C₃-C₈杂亚环基-C(=O)-、C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂亚环基)-C(=O)-、(C₃-C₈杂亚环基)-C₁-C₁₀亚烷基-C(=O)-、C₁-C₁₀亚烷基-NH-、C₁-C₁₀杂亚烷基-NH-、C₃-C₈亚碳环基-NH-、-O-(C₁-C₈烷基)-NH-、-亚芳基-NH-、C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-NH-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-NH-、C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈亚碳环基)-NH-、(C₃-C₈亚碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-NH-、C₃-C₈杂亚环基-NH-、C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂亚环基)-NH-、(C₃-C₈杂亚环基)-C₁-C₁₀亚烷基-NH-、C₁-C₁₀亚烷基-S-、C₁-C₁₀杂亚烷基-S-、C₃-C₈亚碳环基-S-、-O-(C₁-C₈烷基)-S-、-亚芳基-S-、C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-S-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-S-、C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈亚碳环基)-S-、(C₃-C₈亚碳环基)-C₁-C₈亚烷基-S-、C₃-C₈杂亚环基-S-、C₁-C₁₀亚烷基-(C₃-C₈杂亚环基)-S-、(C₃-C₈杂亚环基)-C₁-C₁₀亚烷基-S-。任何R¹⁹取代基可以是取代的或非取代的。在一些实施方式中, R¹⁹取代基是未取代的。

[0083] 在一些实施方式中, 在共价连接至抗体硫醇之前的拴系基团具有式(VII)



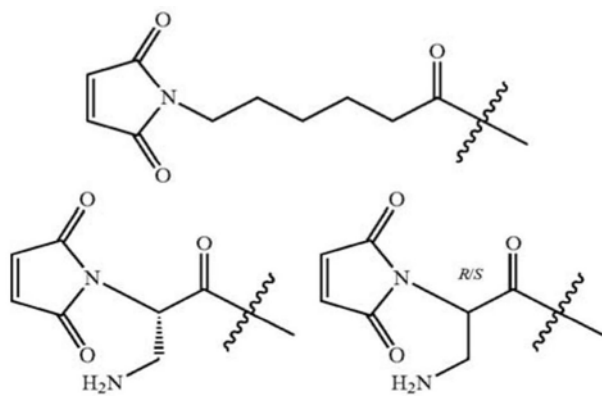
其中R^{PR}是氢或保护基团, 下标m是1或2, R²³是-NH-C₁₋₅亚烷基-C(=O)-, 或单、二、三、四-或五-肽。在一些实施方式中, R²³是-NH-CH₂-C(=O)-。在一些实施方式中, R²³是二肽或三肽。在一些实施方式中, R²³的肽单元中的氨基酸独立地选自缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸和瓜氨酸。

[0084] 还应理解, 在一些实施方式中, 式(V)和式(VII)所示的取代的马来酰亚胺在与抗体硫醇连接后以水解形式存在。即, 在示例性实施方式中, 所得的取代的琥珀酰亚胺是水解形式, 如下所示:

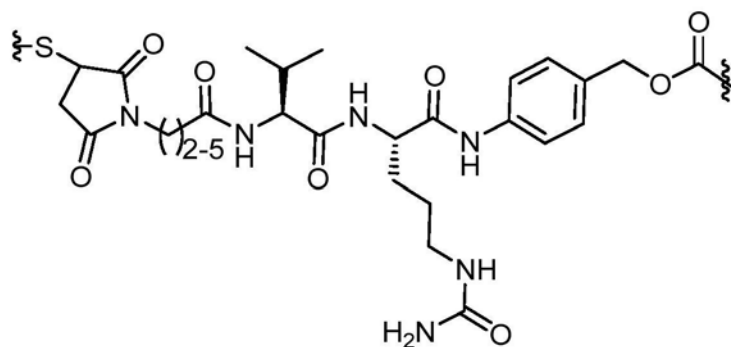


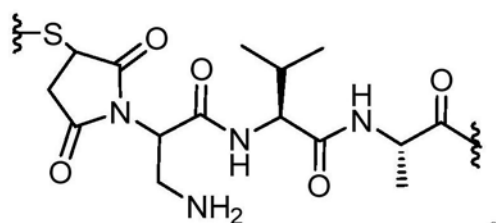
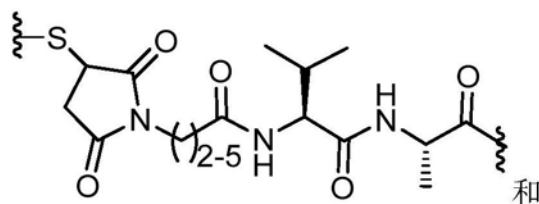
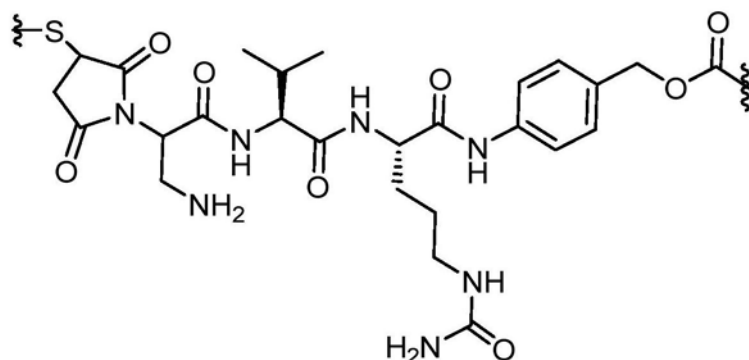
[0085] 在一些方面,式(V)和(VI)的 R^{19} 取代基任选被取代。在一些实施方式中,式(V)的 R^{19} 取代基被基本单元取代,例如 $(CH_2)_xNH_2$ 、 $(CH_2)_xNHR^a$ 和 $(CH_2)_xNR^a_2$,其中下标 x 是1-4的整数,每个 R^a 是独立地选自 C_1 - C_6 烷基,或两个 R^a 基团与它们所连接的氮结合形成氮杂环丁烷基、吡咯烷基或哌啶基。

[0086] 在一些实施方式中,在与抗体硫醇共价连接之前,拴系基团(T)选自由以下组成的组:



[0087] 在一些选定的实施方式中,在连接抗体硫醇之前,拴系基团(T)是例如可被蛋白酶切割的含马来酰亚胺的连接元件部分。因此,用于与本文所述的MD-ADC一起使用的蛋白酶可切割的示例性T单元包括以下结构,其中,S是抗体硫醇的硫原子,右边的波浪线是连接基团接头,和波浪线左边是抗体:





连接基团(Q¹和Q²)

[0088] 在本文所述的LA单元中可用的连接基团是具有可以被“正交”保护的官能团的那些基团-受保护以允许在进行药物单元(D¹或D²)的附着时进行选择脱保护。在后面的部分中更详细地讨论了本公开的保护基团(P¹和P²)。

[0089] 在一组实施方式中,连接基团是天然或非天然氨基酸,其包含用于连接保护基团、药物单元或任选链接基团的反应性官能团。具有例如硫醇、胺、羟基、羧酸或酰胺官能团那些包括的氨基酸,例如半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。这些官能团能够与保护基团、药物单元或任选的链接基团中的合适相应基团进行反应。

[0090] 在一些实施方式中,连接基团(Q¹和Q²)独立地选自氨基酸,例如半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、赖氨酸、瓜氨酸和精氨酸。在一些实施方式中,连接基团(Q¹和Q²)独立地选自由以下组成的组:半胱氨酸、丝氨酸和赖氨酸。在一些实施方式中,连接基团(Q¹和Q²)是半胱氨酸。

[0091] 在一些实施方式中,连接基团(Q¹和Q²)独立地选自半胱氨酸(Cys)衍生物,例如Cys(StBu)、H-Cys(Acm)-OH、H-Cys(Trt)-OH、H-Cys(StBu)-OH、H-Cys(Bzl)-OH、H-Cys(S-Et)-OH、H-Cys(SO₃H)-OH、H-Cys(氨基乙基)-OH、H-Cys(氨基甲酰基)-OH、H-Cys(S-苯基)-OH、H-Cys(Boc)-OH和H-Cys(羟乙基)-OH。

[0092] 在一些实施方式中,连接基团(Q¹和Q²)独立地选自半胱氨酸(Cys)衍生物,例如Cys(Stmp)、Cys(Mmt)、硫脯氨酸、Cys(Dpm)、Cys(Thp)、Cys(4-MeOBzl)、Cys(Npys)、Cys(Cys)。

[0093] 在一些实施方式中,连接基团(Q¹和Q²)独立地选自半胱氨酸(Cys)衍生物,例如β-2-Cys、β-3-Cys、高半胱氨酸和N-甲基半胱氨酸。

[0094] 根据本文所述的连接基团、保护基团、药物单元或任选的连接基团, 附接基团与相邻基团或包括二硫键、硫醚、肽、肼、酯或氨基甲酸酯键的键之间适当的共价连接。

[0095] 应理解, 连接基团不必包括氨基酸残基。只要连接基团包含能够被“正交”保护/脱保护的官能团, 并且还包括能够共价附着到连接基团接头和/或任选的连接单元的化学基团, 所述连接基团也是链接组装单元的合适组件。

连接基团接头 (X , X^1 , X^2 和 X^B)

[0096] 为了在连接基团之间提供合适的间隔, 在一些实施例中, 本文提供的链接组装单元包括连接基团接头 (X , X^1 和 X^2)。那些连接基团接头通常是这样的基团, 除了在连接基团 (Q^1 和 Q^2) 之间提供间隔外, 当 MC-ADC 组合物体内代谢时, 将产生良性的组件。典型的连接基团接头是例如甘氨酸、丙氨酸、 β -丙氨酸和二肽或三肽。尽管在本文中多种氨基酸是可用的, 但优选的氨基酸是具有在 LA 构建期间侧链不需要保护/脱保护步骤的氨基酸。例如, 在构建 LA 期间不需要保护/脱保护步骤的合适氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、 β -丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸。在连接基团接头是氨基酸的实施方式中, 每个氨基酸上的氨基位置可以是取代的或未取代的。

[0097] 在一些实施方式中, 连接基团接头 (X , X^1 或 X^2) 是二肽, 其中每个肽独立地选自自由以下组成的组: 甘氨酸、丙氨酸、 β -丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸。

[0098] 在一些实施方式中, 连接基团接头 (X , X^1 或 X^2) 是三肽, 其中每个肽独立地选自自由以下组成的组: 甘氨酸、丙氨酸、 β -丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸。

[0099] 在一些实施方式中, 连接基团接头是分支的。即连接基团 (Q^1 和 Q^2) 附加到单个连接基团接头 (X^B)。在这样的实施方式中, 支链连接基团接头 (X^B) 直接连接到拴系基团 (T)。例如, 典型的支链连接基团接头是在其侧链中包含另外的官能团的氨基酸, 其提供了共价连接支链连接基团接头和拴系基团的简单方法。合适的氨基酸包括但不限于赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。在一些实施方式中, 支链连接基团接头是赖氨酸。尽管, 通过氨基酸的侧链将支链连接基团接头 (X^B) 共价连接到拴系基团是合适的附着手段, 但本领域技术人员将认识到上面列出的三官能团氨基酸中的每个官能团可用于将附接基团、 Q^1 和 Q^2 , 以及拴系基团 (T) 共价连接到支链连接基团接头 (X^B)。

[0100] 在一些实施方式中, 每个氨基酸上的氨基位置独立地被甲基取代。

[0101] 应理解, 鉴于连接基团接头的作用, 不需要氨基酸单元。只要连接基团接头包含用于与接头组装单元中的两个或多个连接基团 (Q^1 和 Q^2) 共价连接的化学基团, 所述基团就是链接组装单元中的合适组件。

任选的连接基团 (L^1 和 L^2)

[0102] 链接组装单元的其他组件还有任选的连接基团 (L^1 和 L^2), 出于促进药物单元连接到 LA 单元或引入可切割的连接基团等原因其可能包括在内。在一些实施方式中, 本公开的药物连接组装 (DLA) 单元在药物单元和连接基团 (Q^1 或 Q^2) 之间包括任选的连接基团。本领域技术人员将认识到“任选的”表示接头可以被例如药物单元和连接基团接头之间的直接键替换。

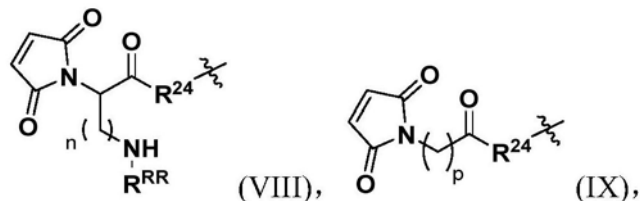
[0103] 本领域已知许多用于将药物单元连接到抗体或接头上的位点中存在的官能团的接头一并且在本文中都可用于将药物单元连接到链接组装单元的连接基团。

[0104] 在一些实施方式中, 任选的连接基团包括末端马来酰亚胺, 允许连接单元 Q^1 或 Q^2 之

间的可靠键接。应理解,末端马来酰亚胺官能团最适用于共价连接至Q¹或Q²部分,所述Q¹或Q²部分包括亲核基团,例如羟基、硫醇或胺,特别是抗体硫醇。如在拴系基团部分中所述,从含马来酰亚胺的拴系基团获得的连接的琥珀酰亚胺在一些实施方式中以水解形式存在,或当碱性基团如胺位于取代的琥珀酰亚胺的近端时,琥珀酰亚胺能够反应形成自稳定组装件(如W02013/173337中进一步详细描述)。

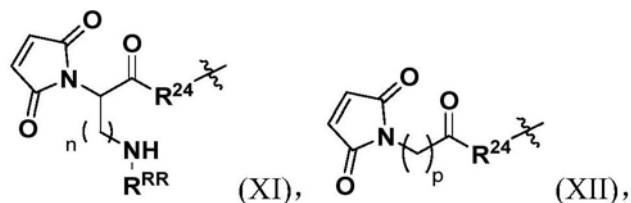
[0105] 在一些实施方式中,任选的链接基团包括与药物单元(D¹或D²)共价连接的对氨基苄氧基-羰基(PABC)基团。在这些实施方式的一些中,PABC基团被糖如葡萄糖或其衍生物取代以形成葡糖苷酸单元(如WO 2007/011968中进一步详细描述)。

[0106] 在一些实施方式中,任选的链接基团具有式(VIII)或(IX):



其中R^{RR}是氢或保护基,n是1或2,p是1-5的整数,且R²⁴是-NH-C₁₋₅亚烷基-C(=O)-、-NH-C₁₋₅亚烷基-C(=O)-NH-亚苯基-CH₂-OC(=O)-、-(二肽)-NH-亚苯基-CH₂-OC(=O)-、或单、二、三、四-或-或五肽。前述基团中的亚苯基可任选地被糖如葡萄糖或其衍生物取代。R²⁴的氨基任选地包括甲基(CH₃)代替H。在一些实施方式中,R²⁴是二肽或三肽。在一些实施方式中,R²⁴是-NH-CH₂-C(=O)-。在一些实施方式中,R²⁴中肽单元的氨基酸独立地选自缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸和瓜氨酸。应理解,上述化学式是显示键接到连接基团(X)之前。“波浪线”表示与药物单元的附着点。取决于药物单元和药物单元与任选的链接基团之间使用的链接化学,上面列出的R²⁴基团中的末端部分在某些方面还包括亲核基团,例如与末端羰基连接的胺或羟基。

[0107] 在一些实施例中,任选的链接基团具有式(XI)或(XII):



其中R^{RR}是氢或保护基,下标n是1或2,下标p是1-5的整数,并且

R^{24} 是-NH-C₁₋₅亚烷基-C(=O)-NH-亚苯基-CH₂-O-C(=O)-杂环基-C₁₋₄亚烷基-b¹-杂环基-b²-;-(二-肽)-NH-亚苯基-CH₂-O-C(=O)-杂环基-C₁₋₄亚烷基-b¹杂环基-b²-;其中b¹和b²独立地为键或选自NH或O的杂原子,其中每个杂环基是具有1-3个选自N、O和S的杂原子的环成员的5或6元环;其中每个杂环基任选地被1-3个选自C₁₋₄烷基、羟基、烷氧基、羧基和-C(=O)-C₁₋₄烷基的基团取代。在一些实施方式中,b¹和b²各自为选自NH或O的杂原子。 R^{24} 的氨基还可包括甲基(CH₃)而代替H。在一些实施方式中, R^{24} 是二肽或三肽。在一些实施方式中, R^{24} 是-NH-CH₂-C(=O)-。在一些实施方式中, R^{24} 中肽单元的氨基酸独立地选自缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸和瓜氨酸。应理解,上述化学式为显示连接到连接基团(X)之前。“波浪线”表示药物单元D¹或D²的附着点。

[0108] 在一些实施方式中,任选的链接基团是可释放链接基团, L^{R1} 或 L^{R2} 。在某些其他方

面,任选的链接基团不包括可释放链接基团。在没有可释放链接基团的实施方式中,药物单元的释放是通过总蛋白质降解途径(即,即不可切割的途径)。

[0109] 对于其中任选的链接基团是可释放链接基团(L^{R1} 或 L^{R2})的那些实施方式,该基团允许在靶细胞上有效释放游离药物,足以诱导例如细胞毒性或细胞抑制性。优选地,可释放链接基团设计用于一旦偶联物已内化到靶细胞中就有效释放游离药物,但也可设计成在靶细胞附近释放游离药物。用于切割的合适识别位点是允许有效释放MD-ADC的药物单元的那些。优选地,识别位点是肽切割位点(例如在基于肽的可释放接头组装体中),糖切割位点(例如在基于糖的可释放接头组件体中,其是或由葡萄糖苷酸单元组成),或者二硫键切割位点(例如在基于二硫键的可释放接头组装体中)。肽切割位点的实例包括由细胞内蛋白酶识别的那些,例如存在的那些是溶酶体。糖切割位点的实例包括由糖苷酶识别的那些,包括葡萄糖醛糖苷酶,例如 β -葡萄糖醛糖苷酶。

[0110] 在一些实施方式中,可释放链接基团(L^{R1} 或 L^{R2})是二肽。在一些实施方式中,二肽是-Val-Cit-、-Phe-Lys-或-Val-Ala-。

[0111] 在一些实施方式中, L^1 和 L^2 独立地选自以下组成的组:马来酰亚胺基-己酰基(mc)、马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸(mc-vc)、马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(mc-vc-PABC)和MDPr-vc。应当理解,在一些实施方式中, L^1 和 L^2 进一步被碱性部分例如胺取代,以形成上文讨论的自稳定琥珀酰亚胺接头,并且在(WO2013/173337)中有更详细的描述。

[0112] 将药物单元共价连接至任选的链接基团(L^1 或 L^2)的一般方法是本领域已知的,并且本领域已知的接头或传统的ADC可以与本公开的MD-ADC一起使用。例如,奥瑞他汀和美登素ADC目前正在用于癌症治疗临床开发中。单甲基奥瑞他汀E通过蛋白酶可切割的肽接头与抗体偶联,单甲基奥瑞他汀F通过马来酰亚胺己酸与抗体直接偶联,DM1通过二硫键偶联或通过异双功能SMCC接头直接偶联,DM4通过二硫键接头偶联。这些接头系统可与本文所述的MD-ADC一起使用,并根据所用的接头系统通过酶促可切割或非酶促可切割的系统提供药物释放。二硫化物、硫醚、肽、肼、酯或氨基甲酸酯键都是键的实例,其也可用于将药物单元 D^1 或 D^2 连接至第一或第二任选的链接基团(L^1 或 L^2)。

[0113] 任选的分配剂(Y)可以通过任选的链接基团的任何合适的原子链接。制造这种链接的方法在本领域中是已知的。

任选的分配剂(Y)

[0114] 本文描述的MD-ADC还可包括附着的分配剂(Y)。例如,分配剂可用于掩盖特定药物单元或链接组装单元的疏水性。因此,许多分配剂将起到增加它们所附着的MD-ADC的亲水性的作用。

[0115] 代表性的分配剂包括聚乙二醇(PEG)单元、环糊精单元、聚酰胺、亲水肽、多糖和树枝状大分子。

[0116] 当任选的分配剂包括在基团T、 L^1 、 L^2 、X、 X^1 或 X^2 、 Q^1 或 Q^2 中的一个或多个中时,在一些实施方式中,分配剂包括赖氨酸残基,其允许分配剂共价连接至链接组装单元。

聚乙二醇单元(PEG)

[0117] 多分散PEGs、单分散PEGs和离散PEG可用于制备本发明化合物。多分散PEG是在尺寸和分子量上的异质混合物,而单分散PEG通常是从异质混合物中纯化,因此提供单一链长

度和分子量。优选的PEG单元是离散的PEG,是以逐步方式而不是通过聚合方法合成的化合物。离散PEG提供具有确定和指定链长的单个分子。

[0118] 本文提供的PEG单元包含一个或多个聚乙二醇链。聚乙二醇链可以连接在一起,例如,以线性、支链或星形构型。通常,PEG链中的至少一个在一端衍生用于共价附着至链接组装单元的组件上的适当位点(例如 Q^1 、 Q^2 、 X 、 X^1 或 X^2 ,或任选的链接基团(L^1 或 L^2))。示例性附着到链接组装单元的是通过非条件可切割的键或通过条件可切割的键。示例性附着是通过酰胺键、醚键、酯键、腙键、肟键、二硫键、肽键或三唑键。在一些方面,附着到链接组装单元是通过非条件可切割的键。在一些实施方式中,附着到链接组装单元不是通过酯键、腙键、肟键或二硫键。在一些实施方式中,附着到链接组装单元不是通过腙键连接。

[0119] 条件可切割的键是指在血浆中循环时对切割基本上不敏感但对细胞内或瘤内环境中的切割敏感的键。非条件可切割的键是对任何生物环境中的切割基本上不敏感的键。腙的化学水解、二硫化物的还原和肽键或糖苷键的酶促切割是条件可切割的键的实例。

[0120] PEG单元将直接连接到链接组装单元的MD-ADC(或其中间件)。PEG单元的另一个终端(或末端)是游离的和不受束缚的,并且可以采取甲氧基、羧酸、醇或其他合适的官能团的形式。甲氧基、羧酸、醇或其他合适的官能团充当PEG单元的末端PEG子单元的帽。通过不受限制,意味着PEG单元不会在该未受束缚的位点附着药物单元、抗体或连接药物单元和/或抗体的连接组件。对于其中PEG单元包含多于一个PEG链的那些实施方式,多个PEG链可以是相同或不同的化学部分(例如,不同分子量或子单元数目的PEG)。多个PEG链在单个附着位点处连接到链接组装单元。本领域技术人员将理解,PEG单元除了包含重复的聚乙二醇子单元之外还可以包含非PEG材料(例如,以促进多个PEG链彼此偶联或促进与链接组装单元的偶联)。非PEG材料是指PEG单元中不是重复 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 子单元的一部分的原子。在本文提供的一些实施方式中,PEG单元包含经由非PEG元件彼此连接的两个单体PEG链。在本文提供的其他实施方式中,PEG单元包含连接至中心核心的两条线性PEG链,所述中心核心连接至链接组装单元(即,PEG单元本身是分支的)。

[0121] 本领域技术人员可以使用许多PEG连接方法,[参见,例如,Goodson等.(1990) *Bio/Technology* 8:343(定点诱变后在其糖基化位点聚合白细胞介素-2);EP 0 401 384(将PEG与G-CSF偶联);Malik等,(1992) *Exp.Hematol.* 20:1028-1035(使用三氟代乙烷磺酰氯(Tresyl chloride)聚乙二醇化GM-CSF);ACT Pub.No.WO 90/12874(使用半胱氨酸特异性mPEG衍生物聚乙二醇化含有重组导入的半胱氨酸残基的促红细胞生成素);美国专利号5,757,078(EPO肽的PEG化);美国专利号5,672,662(用于生物技术的聚(乙二醇)和用丙酸或丁酸单取代的相关聚合物及其功能衍生物);美国专利号6,077,939(肽的N-末端 α -碳的PEG化);Veronese等,(1985) *Appl.Biochem.Bioelectron* 11:141-142(用PEG-硝基苯基碳酸酯(PEG-NPC)或PEG-三氯苯基碳酸酯聚乙二醇化肽的N-末端 α -碳);和Veronese(2001) *Biomaterials* 22:405-417(关于肽和蛋白质PEG化的综述文章)]。

[0122] 例如,PEG可以通过反应性基团与氨基酸残基共价结合。反应性基团是可以结合活化的PEG分子的那些(例如,游离氨基或羧基)。例如,N-末端氨基酸残基和赖氨酸(K)残基具有游离氨基;和C-末端氨基酸残基具有游离羧基。巯基(例如,如在半胱氨酸残基上发现的)也可用作连接PEG的反应性基团。此外,已经描述了用于在多肽的C-末端特异性地引入活化基团(例如,酰肼、醛和芳族氨基)的酶辅助方法(参见Schwarz,等.(1990) *Methods*

Enzymol.184:160;罗斯,等.(1991)Bioconjugate Chem.2:154;和Gaertner,等(1994) J.Biol.Chem.269:7224].

[0123] 在一些实施方式中,使用具有不同反应性部分的甲氧基化PEG(“mPEG”)将PEG分子连接至氨基。这种反应性部分的非限制性实例包括琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(SS)、琥珀酰亚胺基碳酸酯(SC)、mPEG-亚氨酸酯、对硝基苯基碳酸酯(NPC)、琥珀酰亚胺基丙酸酯(SPA)和氰尿酸氯。这种mPEG的非限制性实例包括mPEG-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(mPEG-SS),mPEG₂-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(mPEG₂-SS);mPEG-琥珀酰亚胺基碳酸酯(mPEG-SC),mPEG₂-琥珀酰亚胺基碳酸酯(mPEG₂-SC);mPEG-亚氨酸酯,mPEG-对硝基苯基碳酸酯(mPEG-NPC),mPEG-亚氨酸酯;mPEG₂-对硝基苯基碳酸酯(mPEG₂-NPC);mPEG-琥珀酰亚胺基丙酸酯(mPEG-SPA);mPEG₂-琥珀酰亚胺基丙酸酯(mPEG₂-SPA);mPEG-N-羟基-琥珀酰亚胺(mPEG-NHS);mPEG₂-N-羟基-琥珀酰亚胺(mPEG₂-NHS);mPEG-氰尿酸氯;mPEG₂-氰尿酸氯;mPEG₂-Lysinol-NPC和mPEG₂-Lys-NHS。

[0124] 通常,构成PEG单元的至少一个PEG链被官能化,使得它能够共价连接到链接组装单元。官能化包括,例如,通过胺、硫醇、NHS酯、马来酰亚胺、炔烃、叠氮化物、羰基或其他官能团。在一些实施方式中,PEG单元还包含非PEG材料(即,不由-CH₂CH₂O-组成的材料),其提供与链接组装单元的偶联或两个或更多个PEG链的偶联。

[0125] 可以使用多种聚乙二醇(PEG),并且可以使用基本上任何合适的反应性PEG试剂。在一些实施方式中,反应性PEG试剂在连接至链接组装单元时将导致形成氨基甲酸酯或酰胺键(例如Q¹、Q²、X、X¹或X²,或任选的链接基团(L¹或L²))。以下PEG试剂可用于各种实施方式:mPEG₂-NHS、mPEG₂-ALD、多臂PEG、mPEG(MAL)₂、mPEG₂(MAL)、mPEG-NH₂、mPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG-硫酯、mPEG-双酯、mPEG-BTC、mPEG-ButyrALD、mPEG-ACET、异功能PEG(NH₂-PEG-COOH、Boc-PEG-NHS、Fmoc-PEG-NHS、NHS-PEG-VS、NHS-PEG-MAL)、PEG丙烯酸酯(ACRL-PEG-NHS)、PEG-磷脂(例如,mPEG-DSPE)、SUNBRITE™系列的多臂PEG,包括通过本领域技术人员选择的化学活化的基于甘油的PEG的GL系列,任何SUNBRITE活化的PEG(包括但不限于羧基-PEG、p-NP-PEG、三氟代乙烷磺酰-PEGs、醛PEGs、缩醛-PEG、氨基-PEG、硫醇-PEG、马来酰亚胺-PEG、羟基-PEG-胺、氨基-PEG-COOK羟基-PEG-醛、羧酸酐型-PEG、官能化PEG-磷脂,以及本领域技术人员根据其特定应用和用途选择的其他类似和/或合适的反应性PEG。

[0126] 药物链接组装单元中PEG单元的存在能够对所得MD-ADC的药代动力学产生两种潜在影响。期望的影响是由药物单元的暴露的疏水性元素诱导的非特异性相互作用的减少引起的清除降低(以及随后的暴露增加)。第二种影响是不期望的,并且是有时由MD-ADC的分子量增加引起的体积和分布速率的降低。增加PEG子单元的数量会增加偶联物的流体动力学半径,通常导致扩散性降低。反过来,降低的扩散性通常会降低MD-ADC渗透到肿瘤中的能力(Schmidt和Wittrup,Mol Cancer Ther2009;8:2861-2871)。由于这两种竞争性的药代动力学效应,所以希望使用足够大的PEG来降低MD-ADC的清除,从而增加血浆暴露,但不要大到可以大大降低其扩散性,达到了它干扰了MD-ADC达到预期靶细胞群的能力的程度。为特定药物-接头选择最佳PEG大小的方法参见实施例(例如,US2016/0310612的实施例1、18和21),其通过引用并入本文。

[0127] 在一组实施方式中,PEG单元包含至少6个子单元、至少7个子单元、至少8个子单元、至少9个子单元、至少10个子单元、至少11个子单元、至少12个子单元、至少13个子单元、

至少14个子单元、至少15个子单元、至少16个子单元、至少17个子单元、至少18个子单元、至少19个子单元、至少20个子单元、至少21个子单元、至少22个子单元、至少23个子单元,或至少24个子单元。如本文所用,PEG单元的子单元是指具有式 $\text{---}\zeta\text{---}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})\zeta\text{---}$ 的聚乙二醇部分。

在一些这样的实施方式中,PEG单元包含不超过约72个子单元。

[0128] 在一组实施方式中,PEG单元包含一个或多个线性PEG链,每个链具有至少2个子单元、至少3个子单元、至少4个子单元、至少5个子单元、至少6个子单元、至少7个子单元、至少8个子单元、至少9个子单元、至少10个子单元、至少11个子单元、至少12个子单元、至少13个子单元、至少14个子单元、至少15个子单元、至少16个子单元、至少17个子单元、至少18个子单元、至少19个子单元、至少20个子单元、至少21个子单元、至少22个子单元、至少23个子单元或至少24个子单元。在优选的实施方式中,PEG单元包含总共至少6个子单元、至少8个子单元、至少10个子单元或至少12个子单元。在一些这样的实施方式中,PEG单元包含总共不超过约72个子单元,优选总共不超过约36个子单元。

[0129] 在另一组实施方式中,PEG单元包含总共4至72、4至60、4至48、4至36或4至24个子单元,5至72、5至60、5至48、5至36或5至24个子单元,6至72、6至60、6至48、6至36或6至24个子单元,7至72、7至60、7至48、7至36或7至24个子单元,8至72、8至60、8至48、8至36或8至24个子单元,9至72、9至60、9至48、9至36或9至24个子单元,10至72、10至60、10至48、10至36或10至24个子单元,11至72、11至60、11至48、11至36或11至24个子单元,12至72、12至60、12至48、12至36或12至24个子单元,13至72、13至60、13至48、13至36或13至24个子单元,14至72、14至60、14至48、14至36或14至24个子单元,15至72、15至60、15至48、15至36或15至24个子单元,16至72、16至60、16至48、16至36或16至24个子单元,17至72、17至60、17至48、17至36或17至24个子单元,18至72、18至60、18至48、18至36或18至24个子单元,19至72、19至60、19至48、19至36或19至24个子单元,20至72、20至60、20至48、20至36或20至24个子单元,21至72、21至60、21至48、21至36或21至24个子单元,22至72、22至60、22至48、22至36或22至24个子单元,23至72、23至60、23至48、23至36或23至24个子单元,或24至72、24至60、24至48、24至36或24个子单元。

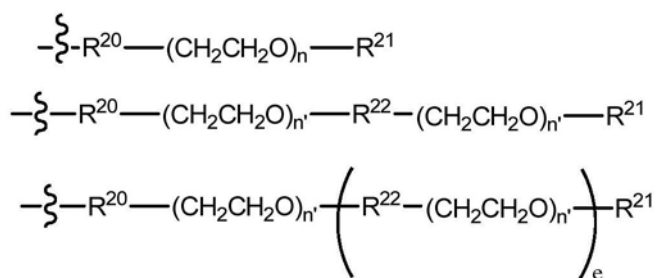
[0130] 在另一组实施方式中,PEG单元包含一个或多个线性PEG链,其具有总共4至72、4至60、4至48、4至36或4至24个子单元,5至72、5至60、5至48、5至36或5至24个子单元,6至72、6至60、6至48、6至36或6至24个子单元,7至72、7至60、7至48、7至36或7至24个子单元,8至72、8至60、8至48、8至36或8至24个子单元,9至72、9至60、9至48、9至36或9至24个子单元,10至72、10至60、10至48、10至36或10至24个子单元,11至72、11至60、11至48、11至36或11至24个子单元,12至72、12至60、12至48、12至36或12至24个子单元,13至72、13至60、13至48、13至36或13至24个子单元,14至72、14至60、14至48、14至36或14至24个子单元,15至72、15至60、15至48、15至36或15至24个子单元,16至72、16至60、16至48、16至36或16至24个子单元,17至72、17至60、17至48、17至36或17至24个子单元,18至72、18至60、18至48、18至36或18至24个子单元,19至72、19至60、19至48、19至36或19至24个子单元,20至72子单元,20至60、20至48、20至36或20至24个子单元,21至72、21至60、21至48、21至36或21至24个子单元,22至72、22至60、22至48、22至36或22至24个子单元,23至72、23至60、23至48、23至36或23至24个子单元,或24至72、24至60、24至48、24至36或24个子单元。

[0131] 在另一组实施方式中,PEG单元是衍生的线性单PEG链,其具有至少2个子单元、至少3个子单元、至少4个子单元、至少5个子单元、至少6个子单元、至少7个子单元、至少8个子单元、至少9个子单元、至少10个子单元、至少11个子单元、至少12个子单元、至少13个子单元、至少14个子单元、至少15个子单元、至少16个子单元、至少17个子单元、至少18个子单元、至少19个子单元、至少20个子单元、至少21个子单元、至少22个子单元、至少23个子单元或至少24个子单元。

[0132] 在另一组实施方式中,PEG单元是衍生的线性单PEG链,其具有6至72、6至60、6至48、6至36或6至24个子单元,7至72、7至60、7至48、7至36或7至24个子单元,8至72、8至60、8至48、8至36或8至24个子单元,9至72、9至60、9至48、9至36或9至24个子单元,10至72、10至60、10至48、10至36或10至24个子单元,11至72、11至60、11至48、11至36或11至24个子单元,来自12至72、12至60、12至48、12至36或12至24个子单元,13至72、13至60、13至48、13至36或13至24个子单元,14至72、14至60、14至48、14至36或14至24个子单元,15至72、15至60、15至48、15至36或15至24个子单元,16至72、16至60、16至48、16至36或16至24个子单元,17至72、17至60、17至48、17至36或17至24个子单元,18至72、18至60、18至48、18至36或18至24个子单元,19至72、19至60、19至48、19至36或19至24个子单元,20至72、20至60、20至48、20至36或20至24个子单元,21至72、21至60、21至48、21至36或21至24个子单元,22至72个子单元,22至60、22至48、22至36或22至24个子单元,23至72、23至60、23至48、23至36或23至24个子单元,或24至72、24至60、24至48、24至36或24个子单元。

[0133] 在另一组实施方式中,PEG单元是衍生的线性单PEG链,其具有2至72、2至60、2至48、2至36或2至24个子单元,2至72、2至60、2至48、2至36或2至24个子单元,3至72、3至60、3至48、3至36或3至24个子单元,3至72、3至60、3至48、3至36或3至24个子单元,4至72、4至60、4至48、4至36或4至24个子单元,5至72、5至60、5至48、5至36或5至24个子单元。

[0134] 在本文提供的任何实施方式中可用作分配剂的示例性线性PEG单元如下:



其中波浪线表示并联接头单元的连接位置,

R^{20} 是PEG附着单元,

R^{21} 是PEG加帽单元;

R^{22} 是PEG偶联单元(即,用于将多个PEG子单元链偶联在一起)

下标n独立地选自2至72(优选4至72,更优选6至72、8至72、10至72、12至72或6至24);

下标e是2到5

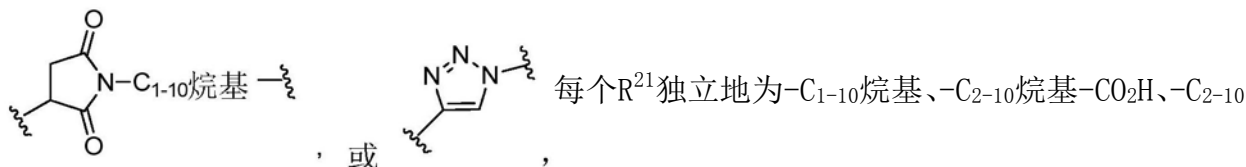
每个下标n'独立地选自1至72。在优选的实施方式中,PEG单元中存在至少6个,优选至少8个,至少10个或至少12个PEG子单元。在一些实施方式中,PEG单元中不超过72或36个PEG子单元。

[0135] 在优选的实施方式中,下标n为8或约8、12或约12、24或约24。

[0136] PEG附着单元是PEG单元的一部分,并且将PEG单元共价连接到链接组装单元的其他部分。因此,链接组装单元的一部分(T、Q¹、L¹、D¹、X、Q²、L²、D²、X¹或X²)具有为PEG单元提供键的官能团。用于将PEG单元连接到链接组装单元上的位点的官能团包括形成二硫键或硫醚键的巯基,形成脲键的醛、酮或肼基团,形成脲键的羟胺,形成肽键的羧基或氨基基团,形成酯键的羧基或羟基,形成磺酰胺键的磺酸,形成氨基甲酸酯键的醇,形成磺酰胺键或氨基甲酸酯键或酰胺键的胺。因此,在一些实施方式中,PEG单元共价连接至链接组装单元上的位点,例如,通过二硫化物、硫醚、脲、脲、肽、酯、磺酰胺、氨基甲酸酯或酰胺键。在其他实施方式中,PEG附着单元通过点击化学(叠氮化物和炔官能团之间的环加成的产物)、加成反应、添加/消除或取代反应连接,当将PEG单元连接到链接组装单元时发生。

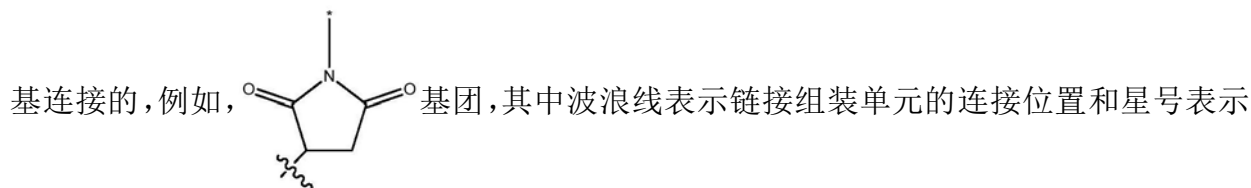
[0137] PEG偶联单元是PEG单元的一部分,并且是非PEG材料,其用于连接两个或更多个重复CH₂CH₂O-子单元链。在示例性实施方式中,PEG偶联单元R²²是-C₁₋₁₀亚烷基-C(O)-NH-、-C₁₋₁₀亚烷基-NH-C(O)-、-C₂₋₁₀亚烷基-NH-、-C₂₋₁₀亚烷基-O-、-C₁₋₁₀亚烷基-S-、或-C₂₋₁₀亚烷基-NH-。

[0138] 在示例性实施方式中,PEG连接单元R²⁰是-C(O)-、-O-、-S-、-S(O)-、-NH-、-C(O)-O-、-C(O)C₁₋₁₀烷基、-C(O)C₁₋₁₀烷基-O-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-CO₂-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-NH-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-S-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-C(O)-NH-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-NH-C(O)-、-C₁₋₁₀烷基、-C₁₋₁₀烷基-O-、-C₁₋₁₀烷基-CO₂-、-C₁₋₁₀烷基-NH-、-C₁₋₁₀烷基-S-、-C₁₋₁₀烷基-C(O)-NH-、-C₁₋₁₀烷基-NH-C(O)-、-CH₂CH₂SO₂-C₁₋₁₀烷基-、-CH₂C(O)-C₁₋₁₀烷基-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-O-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-NH-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-CO₂-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-S-、



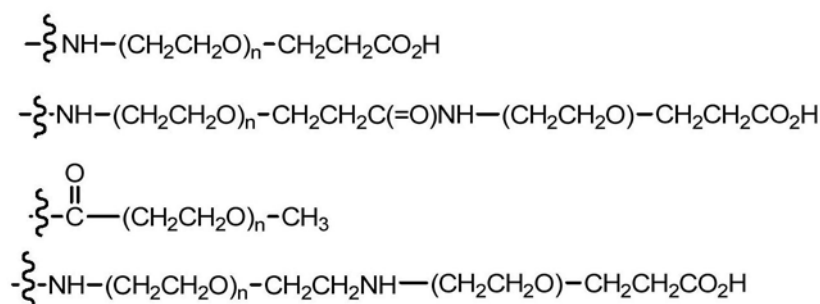
烷基-OH、-C₂₋₁₀烷基-NH₂、-C₂₋₁₀烷基-NH(C₁₋₃烷基)或-C₂₋₁₀烷基-N(C₁₋₃烷基)₂,并且每个R²²独立地为-C₁₋₁₀烷基-C(O)-NH-、-C₁₋₁₀烷基-NH-C(O)-、-C₂₋₁₀烷基-NH-、-C₂₋₁₀烷基-O-、-C₁₋₁₀烷基-S-或-C₂₋₁₀烷基-NH-。

[0139] 在一些实施方式中,R²⁰是-NH-、-C(=O)-、三唑连接的基团,或-S-,或马来酰亚胺



与PEG单元的附着位置。在一些这样的方面,R²¹是C₁₋₁₀烷基、-C₂₋₁₀烷基-CO₂H、-C₂₋₁₀烷基-OH或-C₂₋₁₀烷基-NH₂。

[0140] 可用于本文提供的任何实施方式中的说明性线性PEG单元如下:



其中波浪线表示链接组装单位的连接位置,每个下标n独立地选自4至72、6至72、8至72、10至72、12至72、6至24或8至24。在一些实施方式中,下标n为约8、约12或约24。

[0141] 在一些实施例中,PEG单元被添加到链接组装单元的末端连接基团(Q)。这可以使用具有末端胺的衍生化PEG单元来实现。在一些实施方式中,具有末端胺的衍生化PEG通过1-3个氨基酸(例如单肽、二肽或三肽)与链接组装单元的末端连接基团(Q)连接。例如,在一些实施方式中,PEG单元与末端连接基团(Q)连接,其具有下式:Q-甘氨酸-PEG单元。

[0142] 如本文所述,选择PEG单元使得其改善所得MD-ADC的清除但不显著影响偶联物渗入肿瘤的能力。在其中MD-ADC的药物单元和链接组装单元具有与马来酰亚胺基葡萄糖苷酸MMAE药物-接头相当的疏水性的实施方式中,待选择使用的PEG单元优选具有8个子单元至约24个子单元,更优选约12个子单元。在其中MD-ADC的药物单元和链接组装单元的疏水性大于马来酰亚胺基葡萄糖苷酸MMAE药物-接头的疏水性的实施方式中,有时需要具有更多子单元的PEG单元。

[0143] 在本发明的优选实施方式中,PEG单元为约300道尔顿至约5千道尔顿;从约300道尔顿到约4千道尔顿;从约300道尔顿到约3千道尔顿;从约300道尔顿到约2千道尔顿;或约300道尔顿,约1千道尔顿。在一些这样的方面,PEG单元具有至少6个子单元或至少8、10或12个子单元。在一些这样的方面,PEG单元具有至少6个子单元或至少8、10或12个子单元但不超过72个子单元,优选不超过36个子单元。

[0144] 在本发明的优选实施方式中,除了PEG单元外,在药物链接组装单元中不存在其他PEG子单元(即,在本文提供的偶联物的任何其他组分和其中间体中没有PEG子单元)。在本发明的其他实施方式中,除PEG单元外,不超过8、不超过7、不超过6、不超过5、不超过4、不超过3、不超过2或不超过1个其他聚乙二醇子单元存在于药物链接组装单元中(即,本文提供的偶联物及其中间体的其他组件中不超过8、7、6、5、4、3、2或1个其他聚乙二醇(-OCH₂CH₂-)子单元。)

[0145] 应当理解,当提及PEG子单元时,取决于上下文,子单元的数量可以表示平均数,例如,当提及MD-ADC或中间化合物群,并且使用多分散PEG时。

药物单元(D¹和D²)

[0146] 两个或多个药物单元有两个不同的药物单元(D¹+D²)通过连接基团(Q¹或Q²)共价连接到LA单元。如前一部分所述,在一些实施方式中,LA单元包括任选的链接基团(L¹和L²)。应当理解,任选的链接基团可以在LA单元附着之前附着于药物部分,或者任选的链接基团可以在药物部分附着之前附着于LA单元。

[0147] 在药物单元本质上是疏水的实施方案中,本发明的效果将更加明显。因此,本发明的游离药物优选本质上是疏水性的。

[0148] 药物单元(D)是细胞毒性或细胞抑制药物,在本文中也称为细胞毒性或细胞抑制剂。药物单元具有与第一或第二连接基团(Q^1 或 Q^2)提供共价键的原子。在一些实施方案中,药物单元(D^1 或 D^2)具有氮原子,其可以分别与第一或第二连接基团(Q^1 或 Q^2)形成键。在其他实施方案中,药物单元(D^1 或 D^2)具有与第一或第二连接基团(Q^1 或 Q^2)提供键的羧酸部分。在其他实施方案中,药物单元(D^1 或 D^2)含有巯基官能团残基,其与第一或第二连接基团(Q^1 或 Q^2)提供键。在其他实施方案中,药物单元具有羟基或酮官能团残基,其与第一或第二连接基团(Q^1 或 Q^2)提供键。

[0149] 可用的细胞毒性剂类别包括,例如,抗微管蛋白剂、DNA小沟结合剂、DNA复制抑制剂、烷化剂、抗生素、抗叶酸剂、抗代谢物、化学疗法敏化剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。可用的细胞毒性剂类别的具体实例包括,例如,DNA小沟结合剂、DNA烷化剂和微管蛋白抑制剂。示例性细胞毒性剂包括例如奥瑞他汀、喜树碱、倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊苷、美登素和美登木素生物碱、紫杉烷、苯二氮卓类或含苯二氮的药物(例如,吡咯并[1,4]-苯二氮卓类(PBD)、吲哚并苯二氮卓类和恶唑烷基苯二氮卓类)和长春花生物碱。选择含苯二氮的药物描述于W02010/091150,W02012/112708,W02007/085930和W02011/023883中。

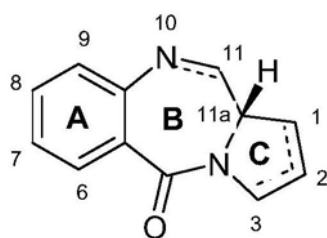
[0150] 在一些实施方案中,至少一种药物单元是奥瑞他汀。在一些实施方案中,所有药物单元是奥瑞他汀。在一些实施方案中,至少一种药物单元是MMAE、奥瑞他汀T、MMAF或尾海兔素10。在一些实施方案中,所有药物单元是MMAE、奥瑞他汀T、MMAF或尾海兔素10。在一些实施方案中,药物单元是MMAE和MMAF。

[0151] 在一些实施方案中,至少一种药物单元是MMAE、喜树碱、超级多克斯(Superdox)、尾海兔素10、长春碱和环丙沙星。

[0152] 在某些实施方案中,细胞毒性剂是美登素或美登木素生物碱(例如DM1、DM4)的另一组抗微管蛋白剂。(ImmunoGen, Inc.; 参见Chari等,1992,Cancer Res.52:127-131和美国专利No.8,163,888)。

[0153] 在一些实施方案中,药物是苯二氮卓类(benzodiazepine)(包括含有苯二氮卓类的药物,例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBD)、吲哚并苯二氮卓类和恶唑烷基苯二氮卓类)。

[0154] PBD具有一般结构:

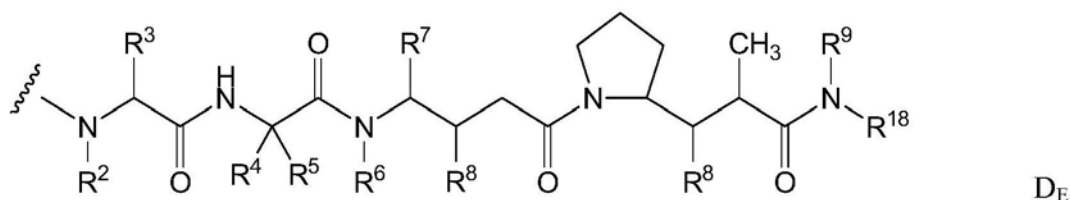


但在芳香族A环和吡咯并C环中的任一个或两个中,取代基的数量、类型和/或位置不同,和/或C环的饱和度不同。在B环中,在 N^{10} - C^{11} 位置有亚胺($N=C$)、碳酰胺($NH-CH(OH)$)或碳酰胺烷基醚($NH-CH(O\text{烷基})$),这是用于烷基化DNA的亲电子中心。所有已知的天然产物在手性 C^{11a} 位置具有(S)取向,当从C环朝向A环观察时,它们提供右旋。这使得它们具有用于与B型DNA的小沟的等螺旋性的适当的三维形状,从而在结合位点处形成滑动配合。PBD在小沟中形成加合物的能力使它们能够干扰DNA进程,因此它们用作抗肿瘤剂。这些分子的生物活性有时通过,例如通过柔性亚烷基接头将两个PBD单元通过它们的 $C8/C'$ -羟基官能团连接在一起而得到加强。认为PBD二聚体造成序列选择性DNA损伤,例如回文5'-Pu-GATC-Py-

3'链间交联,这被认为是其生物活性的主要原因。

[0155] 在一些实施方案中,药物单元(D¹或D²)是具有与单甲基奥瑞他汀E相当或更大的疏水性的不同的奥瑞他汀或非奥瑞他汀偶联的药物。在其他实施方案中,选择两种不同的药物单元以使得D¹和D²彼此的IC₅₀值在1到2个对数单元,更优选的是0.5到1个对数单元,或者具有这些值之间的差距,可通过适当选择在DLA上的D¹/D²比率来补偿,以便有效量的每种药物同时或几乎同时递送到所需的细胞内作用位点。在优选的实施方案中,D¹或D²是MMAE或具有与单甲基奥瑞他汀E相当或更大的疏水性的奥瑞他汀。D¹或D²奥瑞他汀药物单元分别与第一或第二连接基团(Q¹或Q²)共价连接,例如,通过其N或C末端。MMAE的SlogP值为2.59。在更优选的实施方案中,在本发明中用作D¹或D²药物单元的药物SlogP值为1.5或更高、2.0或更高,或2.5或更高。在一些方面,在本发明中用作D¹或D²药物单元的药物将具有(a)约1.5、约2或2.5至约7,(b)约1.5、约2或2.5至约6,(c)约1.5、约2或约2.5至约5,(d)约1.5、约2或2.5至约4,或(e)约1.5、约2或约2.5至约3的SlogP值。

[0156] 奥瑞他汀D¹或D²药物单元优选具有如下所示的式D_E,其通过N末端与第一或第二连接基团(Q¹或Q²)连接:



其中,在每个位置独立地:

R²选自由以下组成的组:H和C₁-C₈烷基;

R³选自由以下组成的组:H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳环)、C₃-C₈杂环基和C₁-C₈烷基-(C₃-C₈杂环基);

R⁴选自由以下组成的组:H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳环)、C₃-C₈杂环基和C₁-C₈烷基-(C₃-C₈杂环基);

R⁵选自由以下组成的组:H和甲基;

或R⁴和R⁵共同形成碳环并-具有式(CR^aR^b)_n-,其中R^a和R^b独立地选自由以下组成的组:H、C₁-C₈烷基和C₃-C₈碳环,且n选自由以下组成的组:2、3、4、5和6;

R⁶选自由以下组成的组:H和C₁-C₈烷基;

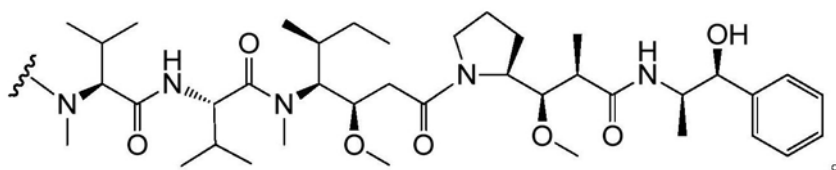
R⁷选自由以下组成的组:H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环基、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳环基)、C₃-C₈杂环基和C₁-C₈烷基-(C₃-C₈杂环基);

每个R⁸独立地选自由以下组成的组:H、OH、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环和O-(C₁-C₈烷基);

R⁹选自由以下组成的组:H和C₁-C₈烷基;

R¹⁸选自由以下组成的组:C(R⁸)₂C(R⁸)₂芳基、C(R⁸)₂C(R⁸)₂(C₃-C₈杂环基),和C(R⁸)₂C(R⁸)₂(C₃-C₈-碳环基)。

[0157] 通过其N末端偶联的MMAE如下所示:



[0158] 在一些实施方案中, D^1 或 D^2 药物单元是长春花碱化合物、喜树碱或蒽环霉素细胞毒性化合物。当存在于 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$ 部分中时那些药物单元的实例结构在本文中描述为药物-接头中间体。

[0159] 在一些实施方案中, D^1 和 D^2 是选自由以下药物对组成的组: MMAE/MMAF、MMAE/喜树碱、Superdox/喜树碱、Superdox/MMAE、尾海兔素10/MMAE、尾海兔素10/MMAF、长春碱/MMAE 和长春碱/MMAF。

[0160] 有许多不同的测定可用于确定 MD-ADC 是否对细胞系发挥细胞抑制或细胞毒性作用。在用于确定 MD-ADC 是否对细胞系发挥细胞抑制或细胞毒性作用的一个实例中, 使用了胸苷掺入测定法。例如, 将 96 孔板中密度为 5,000 个细胞/孔的细胞培养 72 小时, 并在 72 小时的最初 8 小时内暴露于 $0.5\mu\text{Ci}$ 的 ^3H -胸苷, 并且在存在和不存在 MD-ADC 的情况下测量培养细胞中 ^3H -胸苷掺入。与在相同条件下培养但未与 MD-ADC 接触的相同细胞系的细胞相比, 如果培养物的细胞具有降低的 ^3H -胸苷掺入, 则 MD-ADC 对细胞系具有细胞抑制或细胞毒性作用。

[0161] 在另一个实例中, 为了确定 MD-ADC 是否对癌细胞系发挥细胞抑制或细胞毒性作用, 通过在细胞中测定染料如中性红、台盼蓝或 ALAMAR TM 蓝的摄取来测量细胞活力 (参见, 例如, Page 等, 1993, Intl. J. of Oncology 3:473-476)。在这种测定中, 将细胞在含有染料的培养基中培养, 细胞经洗涤, 并用分光光度法测量反映染料细胞摄取的剩余染料。蛋白结合染料磺酰罗丹明 B (SRB) 也可用于测量细胞毒性 (Skehan 等, 1990, J. Natl Cancer Inst. 82:1107-12)。优选的 MD-ADC 包括那些在细胞系中具有小于 1000 ng/ml, 优选小于 500 ng/ml, 更优选小于 100 ng/ml, 最优选小于 50 或甚至小于 10 ng/ml 的 IC_{50} 值 (定义为产生 50% 细胞杀伤的 mAB 浓度)。

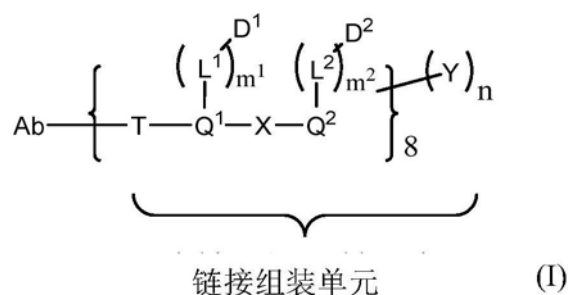
[0162] 将药物与接头连接的一般程序是本领域已知的。参见, 例如, 美国专利号 8,163,888、7,659,241、7,498,298, 美国公开号 US20110256157 和国际申请号 W02011023883, 以及 W02005112919。

抗体 (Ab) 和 (Ab*)

[0163] 可用于本文所述的 MD-ADC 的抗体基本上是具有四个可用的链间二硫键, 或通过还原那些链间二硫键产生的八个硫醇的任何抗体, 为了使在 1:1 的比例时 MD-ADC 具有 2 至 16 个 D^1+D^2 。抗体通常是非工程化抗体-不进行修饰以引入额外氨基酸或肽的抗体, 但在一些实施方案中, 是基因工程改造的包含可偶联半胱氨酸残基, 为了使当比例为 1:1 时 MD-ADC 具有范围为 2 至 32 的 D^1+D^2 。

[0164] 在一些实施方案中, 本公开的抗体包括一个或多个工程化的半胱氨酸 (eCys) 残基。eCys 残基是掺入抗体重链或轻链中的半胱氨酸氨基酸或其衍生物, 通常通过诱变亲本抗体将一个或多个 eCys 残基掺入抗体中。进一步的信息可以在美国专利号 9,000,130 找到, 其内容为了所有目的并入本文。在一些实施方案中, 半胱氨酸 (Cys) 的衍生物包括但不限于 β -2-Cys、 β -3-Cys、高半胱氨酸和 N-甲基半胱氨酸。

[0165] 在一组实施方案中, 多药抗体药物偶联物 (MD-ADC) 由式 (I) 表示:



其中，

Ab是抗体，为非工程化抗体；

T是与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇的硫原子连接的拴系基团；

Q¹是第一连接基团；

Q²是第二连接基团；

X是连接基团接头；

D¹是第一药物单元；

D²是第二药物单元；

L¹是一个任选的链接基团，将D¹连接到Q¹；

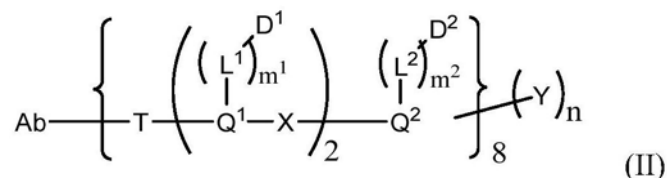
L²是一个任选的链接基团，将D²连接到Q²；

下标m¹和m²各自独立地为0或1；

Y是分配剂；和

下标n为0或1。

[0166] 在另一组实施方案中，MD-ADC由式 (II) 表示：



其中，

Ab是抗体，为非工程化抗体；

T是与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇的硫原子连接的拴系基团；

Q¹是第一连接基团；

Q²是第二连接基团；

X是连接基团接头；

D¹是第一药物单元；

D²是第二药物单元；

L¹是一个任选的链接基团，将D¹连接到Q¹；

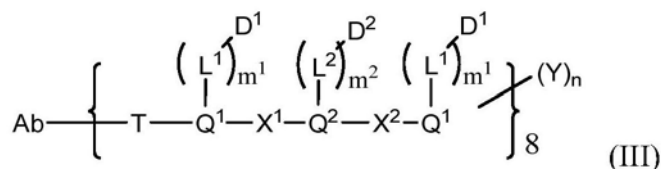
L²是一个任选的链接基团，将D²连接到Q²；

下标m¹和m²各自独立地为0或1；

Y是分配剂；和

下标n为0或1。

[0167] 在又一组实施方案中，MD-ADC由式 (III) 表示：



其中,

Ab是抗体,为非工程化抗体;

T是与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇的硫原子连接的拴系基团;

每个 Q^1 都是独立选择的第一个连接基团;

Q^2 是第二连接基团;

X^1 和 X^2 均为独立选择的连接基团接头;

D^1 是第一药物单元;

D^2 是第二药物单元;

每个 L^1 都是一个独立选择的任意的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 ;

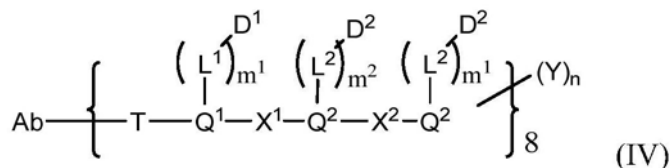
L^2 是一个任意的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 ;

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1;

Y是分配剂;和

下标n为0或1。

[0168] 在又一组实施方案中,MD-ADC由式(IV)表示:



其中,

Ab是抗体,为非工程化抗体;

T是与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇的硫原子连接的拴系基团;

Q^1 是第一连接基团;

每个 Q^2 都是独立选择的第二连接基团;

X^1 和 X^2 均为独立选择的连接基团接头;

D^1 是第一药物单元;

D^2 是第二药物单元;

L^1 是一个任意的链接基团,将 D^1 连接到 Q^1 ;

每个 L^2 都是一个独立选择的任意的链接基团,将 D^2 连接到 Q^2 ;

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1;

Y是附着到 L^1 、 Q^1 、 X^1 、 X^2 、 Q^2 、 L^2 或 L^1 上的站点的分配剂;和

下标n为0或1。

[0169] 在每个上述实施方案中, L^1 、 Q^1 、 Q^2 、 X^1 、 X^2 、 L^1 、 L^2 、 D^1 、 D^2 和Y如上述部分中所述。

[0170] 关于上述式(I)、(II)、(III)和(IV),合适的抗体(Ab)是完整或完全还原的抗体。术语“完全还原”意指其中所有四个链间二硫键已经被还原以提供可连接至拴系基团(T)的八个硫醇的抗体。

[0171] 在一些实施方案中,式(I)、(II)(III)和(IV)中的Ab被Ab*取代。Ab*是包含一个或多个工程化半胱氨酸(eCys)残基的抗体,eCys残基是游离的使得硫醇可以连接到拴系基团(T)。在此类实施方案中,T是在抗体的重链或轻链中与工程化半胱氨酸或其衍生物的硫原子连接的拴系基团,并且在一些实施方案中,还连接至所述抗体通过还原链间二硫键产生的硫醇。

[0172] 在一组实施方案中,抗体直接针对癌细胞抗原。在另一组实施方式中,抗体直接针对细菌相关抗原。在另一组实施方式中,抗体直接针对自身免疫细胞抗原。

[0173] 可用的多克隆抗体是衍生自免疫动物血清的异源抗体分子群。可用的单克隆抗体是针对特定抗原决定簇(例如,癌细胞抗原、病毒抗原、微生物抗原、蛋白质、肽、碳水化合物、化学物质、核酸或其片段)的同质抗体群。可通过使用本领域已知的任何技术制备针对目标抗原的单克隆抗体(mAb),其通过培养连续细胞系提供抗体分子的产生。

[0174] 可用的单克隆抗体包括但不限于人单克隆抗体、人源化单克隆抗体或嵌合人-小鼠(或其他物种)单克隆抗体。抗体包括全长抗体及其抗原结合片段。人单克隆抗体可以通过本领域已知的许多技术中的任何一种制备(例如,Teng等,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.80:7308-7312;Kozbor等,1983,Immunology Today4:72-79;和Olsson等,1982,Meth.Meth.Enzymol.92:3-16)。

[0175] 抗体可以是抗体的功能活性片段、衍生物或类似物,其免疫特异性结合靶细胞(例如,癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原)或与肿瘤细胞或基质结合的其他抗体。在这方面,“功能活性”是指能够免疫特异性结合靶细胞的片段、衍生物或类似物。为了确定哪些CDR序列与抗原结合,含有CDR序列的合成肽可以通过本领域已知的任何结合测定方法(例如,BIA核心测定)用于与抗原的结合测定中(参见,例如,Kabat等,1991,免疫学蛋白质序列,第五版,国立卫生研究院,Bethesda,Md;Kabat E等,1980,J.Immunology125(3):961-969)。

[0176] 另外,可用的抗体包含人和非人部分的重组抗体,例如嵌合和人源化单克隆抗体,优选使用标准重组DNA技术制备。嵌合抗体是其中不同部分衍生自不同动物物种的分子,例如具有衍生自鼠单克隆的可变区和人免疫球蛋白的恒定区的那些。(参见,例如,美国专利No.4,816,567;和美国专利No.4,816,397,它们通过引用整体并入本文。)人源化抗体是来自非人物种的抗体分子,其具有来自非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。(参见,例如,美国专利No.5,585,089,其全部内容通过引用并入本文。)这种嵌合和人源化单克隆抗体优选通过本领域已知的重组DNA技术产生,例如使用国际公开号W0 87/02671;欧洲专利公开号0 184 187;欧洲专利公开号0 171 496;欧洲专利公开号0 173 494;国际公开号W0 86/01533;美国专利号4,816,567;欧洲专利公开号012 023;Berter等,1988,Science240:1041-1043;Liu等,1987年,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:3439-3443;Liu等,1987,J.Immunol.139:3521-3526;Sun等,1987年,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:214-218;Nishimura等,1987,Cancer.Res.47:999-1005;Wood等,1985,Nature 314:446-449;和Shaw等,1988,J.Natl.Cancer Inst.80:1553至1559年;莫里森,1985年,科学229:1202-1207;Oi等,1986,BioTechniques 4:214;美国专利No.5,225,539;Jones等,1986,Nature321:552-525;Verhoeyan等,1988,Science 239:1534;和贝德勒等,1988,141:4053-4060中描述的方法;其全部内容通过引用并入本文。

[0177] 完全人抗体是特别理想的,并且优选使用不能表达内源免疫球蛋白重链和轻链基

因的转基因小鼠产生,在一些实施方式中,其表达人重链和轻链基因。

[0178] 对癌细胞抗原具有免疫特异性的抗体优选商业上获得或通过本领域技术人员已知的任何方法产生,比如,例如,化学合成或重组表达技术。编码对癌细胞抗原具有免疫特异性的抗体的核苷酸序列有时是从例如GenBank数据库或类似数据库、文献出版物获得,有时通过常规克隆和测序获得。

[0179] 在一个具体实施方式中,使用已知的用于治疗癌症的抗体。对癌细胞抗原具有免疫特异性的抗体有时从商业上获得,有时通过本领域技术人员已知的任何方法产生,例如,重组表达技术。编码对癌细胞抗原具有免疫特异性的抗体的核苷酸序列有时是从,例如GenBank数据库或类似数据库、文献出版物以及有时通过常规克隆和测序获得的。

[0180] 在某些实施方式中,可用的抗体可以结合在活化的淋巴细胞上表达的受体或受体复合物。受体或受体复合物可包含免疫球蛋白基因超家族成员、TNF受体超家族成员、整合蛋白、细胞因子受体、趋化因子受体、主要组织相容性蛋白、凝集素或补体调控蛋白。

[0181] 在一些方面,抗体将特异性结合CD19、CD20、CD30、CD33、CD70、 α -v- β -6、Liv-1或Lewis Y抗原。

[0182] 抗CD30抗体可以是,例如,嵌合AC10抗体、本妥昔单抗。抗CD30抗体可具有具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的重链可变区,具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的轻链可变区,具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的人 γ I恒定区和具有SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的人 κ 恒定区。

[0183] 抗CD30抗体优选为人源化AC10抗体或具有具有SEQ ID No:9所示的氨基酸序列的重链可变区,具有SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的轻链可变区。优选地,该抗体还包含具有SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的人 γ I恒定区,其任选地在239位具有丝氨酸至半胱氨酸取代(根据EU索引),和具有SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的人 κ 恒定区。

[0184] 抗CD70抗体优选是人源化抗体(参见,例如,US2009/0148942)。在一个示例性实施方式中,抗CD70抗体具有具有SEQ ID No:3所示的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0185] 抗CD19抗体优选是人源化抗体(参见,例如,US2009/0136526,其为了所有目的通过引用整体并入本文)。在一个示例性实施方式中,hBU12抗体具有具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0186] 另一种优选的抗体是人源化抗CD33抗体(US2013/0309223,其为了所有目的通过引用整体并入本文),人源化抗B6抗体(参见例如W02013/123152,其为了所有目的通过引用整体并入本文),人源化抗Liv-1抗体(参见,例如,US2013/0259860,其为了所有目的通过引用整体并入本文),或人源化AC10抗体(参见,例如,US8,257,706,其为了所有目的通过引用整体并入本文)。

[0187] 抗体的示例性附着是通过硫醚键。

癌细胞抗原位点

[0188] 可用于治疗癌症的抗体的实例包括但不限于:用于治疗转移性乳腺癌患者的人源化抗HER2单克隆抗体HERCEPTIN®(曲妥珠单抗;Genentech);用于治疗非霍奇金淋巴瘤患者的嵌合抗-CD20单克隆抗体,利妥昔单抗®(利妥昔单抗;Genentech);用于治疗卵巢癌的鼠抗体,OvaRex(AltaRex Corporation,MA);用于治疗结肠直肠癌的小鼠IgG_{2a}抗体,

Panorex (Glaxo Wellcome, NC); 用于治疗表皮生长因子阳性癌症, 如头颈癌的抗EGFR IgG嵌合抗体, 如西妥昔单抗 (Cetuximab Erbitux) (Imclone Systems Inc., NY); 用于治疗肉瘤的人源化抗体, 维他辛 (Vitaxin) (MedImmune, Inc., MD); 用于治疗慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 的人源化IgG₁抗体, Campath 1/H (Leukosite, MA); 用于治疗急性髓性白血病 (AML) 的人源化抗CD33 IgG抗体, Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA); 用于治疗非霍奇金淋巴瘤的人源化抗CD22 IgG抗体, 依帕珠单抗 (LymphoCide) (Immunomedics, Inc., NJ); 用于治疗非霍奇金淋巴瘤的人源化抗HLA-DR抗体, Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA); 用于治疗非霍奇金淋巴瘤的放射性标记的鼠抗HLA-Dr10抗体, Oncolym (Techniclone, Inc., CA); 用于治疗霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤的人源化抗CD2单克隆抗体, Allomune (BioTransplant, CA); 用于治疗肺癌和结肠直肠癌的抗VEGF人源化抗体, 阿瓦斯丁 (Avastin) (Genentech, Inc., CA); 用于治疗非霍奇金淋巴瘤的抗CD22抗体, 依帕珠单抗 (Epratuzamab) (Immunomedics, Inc., NJ和Amgen, CA); 和用于治疗结肠直肠癌的人源化抗CEA抗体, CEAcide (Immunomedics, NJ)。

[0189] 用于治疗癌症的其他抗体包括但不限于针对以下抗原的抗体: CA125 (卵巢)、CA15-3 (癌)、CA19-9 (癌)、L6 (癌)、Lewis Y (癌)、Lewis X (癌)、甲胎蛋白 (癌)、CA 242 (结肠直肠)、胎盘碱性磷酸酶 (癌)、前列腺特异性抗原 (前列腺)、前列腺酸性磷酸酶 (前列腺)、表皮生长因子 (癌)、MAGE-1 (癌)、MAGE-2 (癌)、MAGE-3 (癌)、MAGE-4 (癌)、抗转铁蛋白受体 (癌)、p97 (-黑色素瘤)、MUC1-KLH (乳腺癌)、CEA (结肠直肠)、gp100 (黑色素瘤)、MART1 (黑色素瘤)、PSA (前列腺)、IL-2受体 (T-细胞白血病和淋巴瘤)、CD20 (非霍奇金淋巴瘤)、CD52 (白血病-)、CD33 (白血病)、CD22 (淋巴瘤)、人绒毛膜促性腺激素 (癌)、CD38 (多发性骨髓瘤)、CD40 (淋巴瘤)、粘蛋白 (癌)、P21 (癌)、MPG (黑色素瘤) 和Neu癌基因产物 (癌)。一些特异的有用抗体包括但不限于: BR96mAb (Trail, P.A., Willner, D., Lasch, S.J., Henderson, A.J., Hofstead, S.J., Casazza, A.M., Firestone, R.A., Hellström, I., Hellström, K.E., “应用br96-阿霉素免疫偶联物治疗异种移植癌” Science 1993, 261, 212-215), BR64 (Trail, PA, Willner, D., Knipe, J., Henderson, A.J., Lasch, S.J., Zoekler, M.E., Trailsmith, M.D., Doyle, T.W., King, H.D., Casazza, A.M., Braslawsky, G.R., Brown, J.P., Hofstead, S.J., (Greenfield, R.S., Firestone, R.A., Mosure, K., Kadow, D.F., Yang, M.B., Hellstrom, K.E., 和 Hellstrom, I. “接头变异对癌症反应性BR64-阿霉素免疫偶联物的稳定性、效力和功效的影响” Cancer Research 1997, 57, 100105, 针对CD40抗原的mAb, 例如S2C6mAb (Francisco, J.A., Donaldson, K.L., Chace, D., Siegall, C.B., and Wahl, A.F. “抗CD-40抗体SGN-14的激动特性和体内抗肿瘤活性” Cancer Res. 2000, 60, 3225-3231), 针对CD70抗原的mAb, 例如1F6mAb和2F2mAb, 以及针对CD30抗原的mAb, 例如AC10 (Bowen, M.A., Olsen, K.J., Cheng, L., Avila, D., and Podack, E.R. “CD30对大颗粒淋巴瘤细胞系YT的功能影响” J. Immunol., 151, 5896-5906, 1993; Wahl等, 2002 Cancer Res. 62 (13): 3736-42)。可以使用许多其他与肿瘤相关抗原结合的内化抗体, 并且已经对其进行了综述 (Franke, A.E., Sievers, E.L., and Scheinberg, D.A., “细胞表面受体靶向治疗急性髓性白血病: 综述” Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15, 45976; Murray, J.L., “实体瘤的单克隆抗体治疗: 即将到来” Semin Oncol. 2000, 27, 64-70; Breitling, F., and Dubel, S., Recombinant Antibodies, John Wiley, 和 Sons, New York, 1998)。

链接组装单元和MD-ADC的选择实施方式

[0190] 由式Ib、IIb、IIb或IVb表示的药物链接组装单元,其中T包含马来酰亚胺基。

[0191] 由式Ib、IIb、IIb或IVb表示的药物链接组装单元,其中T包含马来酰亚胺基, X 、 X^1 、 X^2 、 Q^1 和 Q^2 各自为氨基酸。

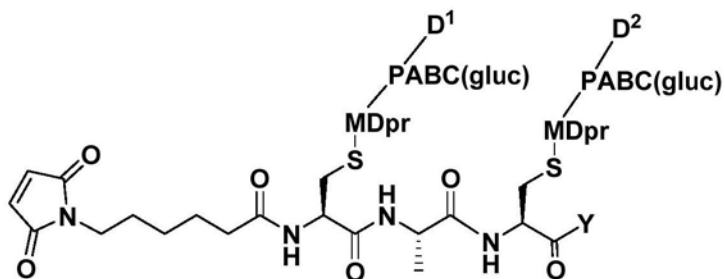
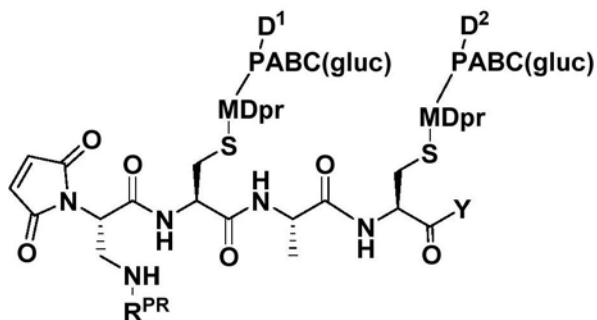
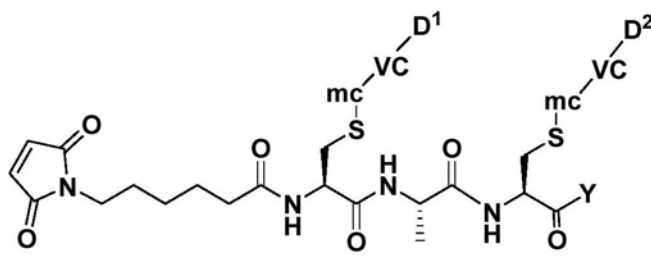
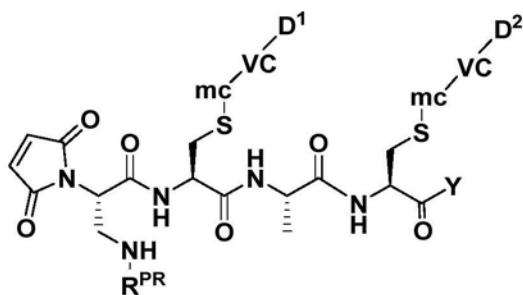
[0192] 由式Ib、IIb、IIb或IVb表示的药物链接组装单元,其中 n 为0且 Y 不存在。

[0193] 由式Ia、IIa、IIa或IVa表示的药物链接组装单元,其中 n 为0, Y 不存在,并且 L^1 和 L^2 各自独立地选自由以下组成的组:马来酰亚胺基-己酰基(mc)、马来酰亚胺基-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸(mc-vc),和马来酰亚胺-己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基(mc-vc-PABC)。

[0194] 由式Ia、IIa、IIa或IVa表示的药物链接组装单元,其中T是自稳定接头。

[0195] 由式Ia、IIa、IIa或IVa表示的药物链接组装单元,其中T是MDPr-vc接头。

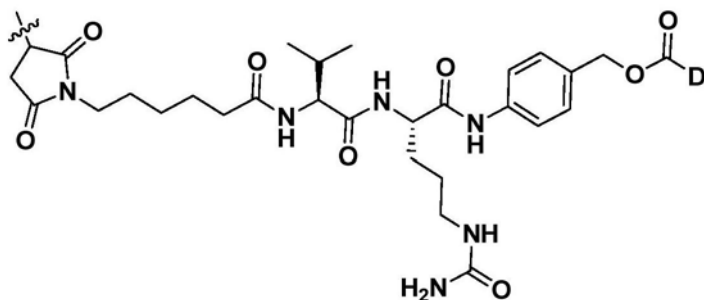
[0196] 本文提供的示例性药物链接组装单元是包含两个药物单元(D^1 和 D^2)的那些单元,并且包括由以下结构表示的那些:



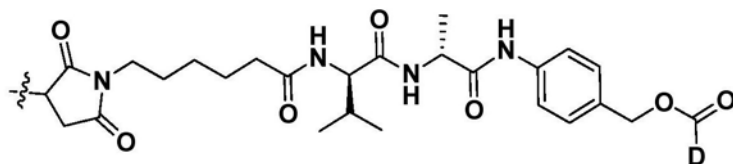
和 $mc-VC-PABC-D^1$ 被 $mc-VA-PABC-D^1$ 或 $mc-VA-D^1$ 或任何其他 L^1-D^1 单元取代的那些结构；
和/或 $mc-VC-PABC-D^2$ 替换为 $mc-VA-PABC-D^2$ 或 $mc-VA-D^2$ 或任何其他 L^2-D^2 单元；

其中 R^{PR} 是氢或保护基，例如酸不稳定的保护基，例如BOC；

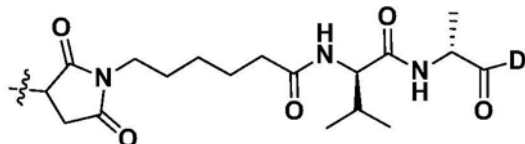
[0197] 为便于参考本文所述的化合物和组装物，组件 $mc-VC-PABC-D$ 具有以下结构：



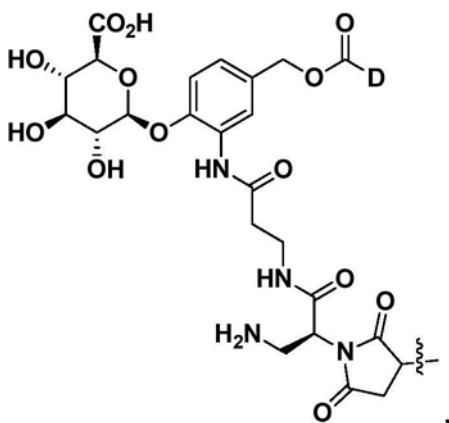
组件mc-VA-PABC-D具有以下结构：



组件mc-VA-D具有以下结构：

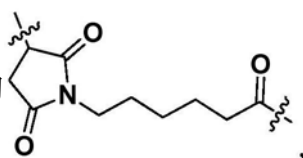


和MDPr-PABC (gluc) -D组件具有以下结构：

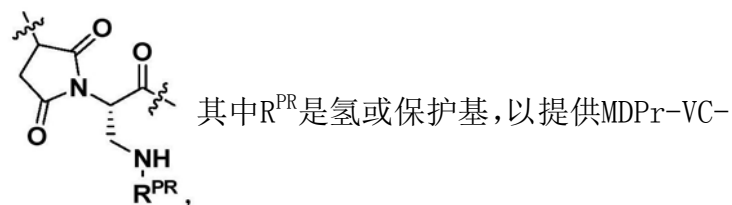


其中mc-VC-PABC-D、mc-VA-PABC-D、mc-VA-D和MDPr-PABC (gluc) -D是通过连接基团 (Q^1 和 Q^2) 与药物连接组件键合的示例性-L¹-D¹或-L²-D²部分,并且其中波浪线表示mc或MDPr的琥珀酰亚胺环与存在于 Q^1 或 Q^2 之一上的硫醇的共价键合;

[0198] 在一些实施方式中,mc-VC-PABC-D、mc-VA-D和mc-VA-PABC-D中的mc部分,其中mc

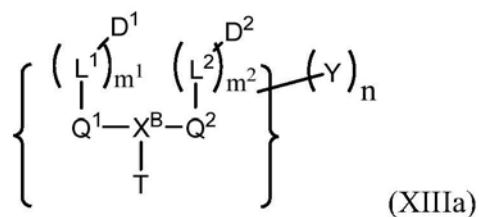
部分具有结构  其中琥珀酰亚胺部分的波浪线表示通过连接基团 Q^1 和

Q^2 与药物链接组装单元 (DLA) 共价键合,并且其中与羰基相邻的波浪线表示与-D¹或-D²的其余部分的共价键合。在任何上述结构中,mc部分可以被MDPr部分取代,MDPr部分具有结构



PABC-D、MDPr-VA-D和MDPr-VA-PABC-D,它们是-L¹-D¹或-L²-D²部分进一步的示例。

[0199] 在一些实施方式中,药物链接组装单元具有式 (XIIIa) :



其中，

T是拴系基团，其可以与所述抗体的重链或轻链中的工程化半胱氨酸的硫原子附着，或者与通过还原抗体的链间二硫键产生的硫醇连接；

Q^1 是第一连接基团；

Q^2 是第二连接基团；

X^B 是分支的连接基团接头；

D^1 是第一药物单元

D^2 是第二药物单元；

L^1 是一个任选的链接基团，将 D^1 连接到 Q^1 ；

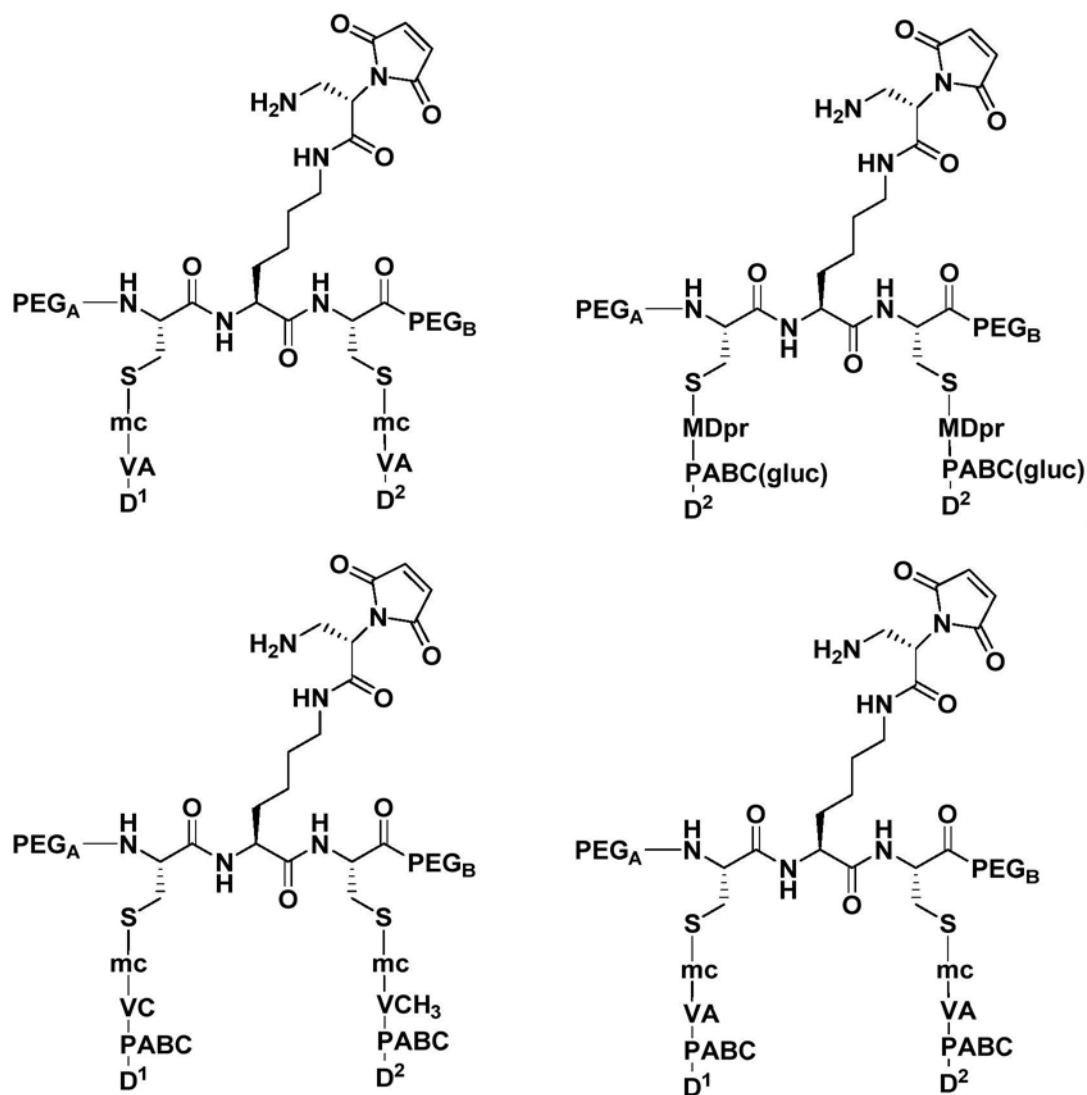
L^2 是一个任选的链接基团，将 D^2 连接到 Q^2 ；

下标 m^1 和 m^2 各自独立地为0或1；

Y是附加到L、 Q^1 、 X^B 、 Q^2 、 L^1 或 L^2 上的位点的分配剂；和

下标n为0、1或2。

[0200] 提供2倍药物负载的本发明的其他示例性药物接头组装单元包括以下



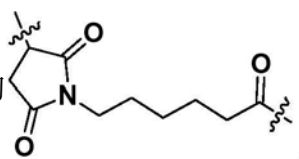
其中mc-VA-D、mc-VC-PABC-D、mc-VA-PABC-D和MDPr-PABC (gluc)-D是如上述2倍药物负载结构所述的示例性-L¹-D¹或-L²-D²部分,且其中PEG_A和PEG_B,独立地选择,如本文任何实施

方式中所述提供的PEG单元。在一些实施方式中,PEG_A是具有结构的非分散

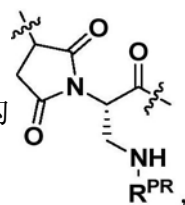
PEG单元和/或PEG_B是具有 结构的非分散PEG单元:其中每个R²¹是独立选

择的PEG加帽单元,独立选择的每个n的实例是8-24或12-38的整数。在优选的实施方式中,一个R²¹是-CH₃,另一个是-CH₂CH₂CO₂H。

[0201] 在一些实施方式中,mc部分具有结构、任何上述结构中的mc



部分被MDPr部分取代,所述MDPr部分具有结构



其中 R^{PR} 为氢或保护基,提供

MDPr-VC-PABC-D、MDPr-VA-D和MDPr-VA-PABC-D作为 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$,

[0202] 在其他实施方式中,上述结构中的MDPr部分被mc部分取代,以提供mc-PABC (gluc) D作为 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$ 。

[0203] 应当理解,任何一种含MDPr的 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$ 部分中的MDPr中的取代的琥珀酰亚胺可以以水解形式存在(即,水分子加在一个而不是两个羰基-氮键上)。

[0204] 在一些实施方式中,作为 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$ 部分的MDPr-PABC (gluc) -D被mc-PABC (gluc) -D替换。

[0205] 应当理解,任何一种含MDPr的 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$ 部分中的MDPr中的取代的琥珀酰亚胺可以以水解形式存在(即,水分子加在一个而不是两个羰基-氮键上)。由mc组成的 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$ 部分也可以具有水解形式的琥珀酰亚胺环。

使用方法

治疗癌症

[0206] MD-ADC可用于抑制肿瘤细胞或癌细胞的增殖,引起肿瘤或癌细胞的细胞凋亡,或用于治疗患者的癌症。MD-ADC可以相应地用于癌症治疗的各种环境中。MD-ADC可用于将药物递送至肿瘤细胞或癌细胞。不受理论束缚,在一个实施方式中,MD-ADC的抗体与癌细胞或肿瘤细胞相关抗原结合或缔合,并且MD-ADC可以通过受体介导的内吞作用或其他内化机制被摄取(内化)到肿瘤细胞或癌细胞内。抗原可以附着到肿瘤细胞或癌细胞,或者可以是与肿瘤细胞或癌细胞相关的细胞外基质蛋白。一旦进入细胞内,通过可切割的机制,药物就会在细胞内释放出来。在另一个实施方式中,药物或药物单元从肿瘤细胞或癌细胞外的MD-ADC切割下来,药物或药物单元随后穿透细胞。

[0207] 在一个实施方式中,抗体结合肿瘤细胞或癌细胞。

[0208] 在另一个实施方式中,抗体结合肿瘤细胞或癌细胞表面上的肿瘤细胞或癌细胞抗原。

[0209] 在另一个实施方式中,抗体结合肿瘤细胞或癌细胞抗原,其是与肿瘤细胞或癌细胞相关的细胞外基质蛋白。

[0210] 抗体对特定肿瘤细胞或癌细胞的特异性对于确定最有效治疗的肿瘤或癌症是重要的。例如,靶向造血系统癌症中存在的癌细胞抗原的MD-ADC可用于治疗血液系统恶性肿瘤(例如,抗CD30、抗CD70、抗CD19、抗CD33结合抗体可用于治疗恶性血液病)。靶向存在于实体瘤上的可接近的癌细胞抗原的MD-ADC可用于治疗这种实体瘤。

[0211] 可用MD-ADC治疗的癌症包括但不限于造血系统癌症,例如淋巴瘤(霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)和白血病和实体瘤。造血系统癌症的实例包括滤泡性淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性髓细胞白血病、慢性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。实体瘤的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮瘤、淋巴瘤、

间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、胰腺癌、骨癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、食道癌、胃癌、口腔癌、鼻咽癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管肺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎瘤、肾母细胞瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸癌、小细胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、皮肤癌、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

癌症的多模态疗法

[0212] 可以通过施用MD-ADC来治疗或抑制癌症,包括但不限于肿瘤,转移或以不受控制的细胞生长为特征的其他疾病或病症。

[0213] 在其他实施方式中,提供了用于治疗癌症的方法,包括向有需要的患者施用有效量的MD-ADC和化学治疗剂。在一个实施方式中,化学治疗剂是尚未发现癌症治疗难以治愈的化学治疗剂。在另一个实施方式中,化学治疗剂是已经发现癌症治疗难以治愈的化学治疗剂。在一些实施方式中,将MD-ADC施用于也经历过手术作为癌症治疗的患者。

[0214] 在一些实施方式中,患者还接受另外的治疗,例如放射疗法。在一个具体实施方式中,MD-ADC与化学治疗剂或放射疗法一起施用。在另一个具体实施方式中,化学治疗剂或放射疗法在施用MD-ADC之前或之后施用。

[0215] 在其他实施方式中,化学治疗剂在一系列疗程中施用。那些实施方式包括给予化学治疗剂中的任何一种或组合,例如标准护理化学治疗剂。

[0216] 另外,提供了用MD-ADC治疗癌症的方法作为化学疗法或放射疗法的替代方式,其中化学疗法或放射疗法已被证实或可证明毒性太大,例如,导致受治疗的受试者不可接受或难以忍受的副作用。被治疗的患者任选地用另一种癌症治疗例如手术、放射疗法或化学疗法治疗,这取决于发现哪种治疗是可接受的或可忍受的。

治疗自身免疫性疾病

[0217] MD-ADC可用于杀死或抑制产生自身免疫疾病的细胞的复制或用于治疗自身免疫疾病。MD-ADC可以相应地用于治疗患者的自身免疫疾病的各种环境中。MD-ADC可用于将药物递送至靶细胞。不受理论束缚,在一个实施方式中,MD-ADC与靶细胞表面上的抗原结合,然后MD-ADC通过受体介导的内吞作用被摄入到靶细胞内。一旦进入细胞内,接头单元就被切割,导致药物或药物单元的释放。然后释放的药物在胞质溶胶中自由迁移并诱导细胞毒性或细胞抑制活性。在另一个实施方式中,药物从靶细胞外的MD-ADC上切下,药物或药物单元随后穿透细胞。

[0218] 在一个实施方式中,抗体结合自身免疫抗原。在一个方面,抗原位于参与自身免疫病症的细胞表面上。

[0219] 在另一个实施方式中,抗体结合细胞表面上的自身免疫抗原。

[0220] 在一个实施方式中,抗体结合与自身免疫疾病状态相关的活化的淋巴细胞。

[0221] 在进一步的实施方式中,MD-ADC杀死或抑制产生与特定自身免疫疾病相关的自身免疫抗体的细胞的增殖。

[0222] 可用MD-ADC治疗的特定类型的自身免疫疾病包括但不限于:Th2淋巴细胞相关病症(例如,特应性皮炎、特应性哮喘、鼻结膜炎、过敏性鼻炎、欧门氏症候群、系统性硬化症和

移植物抗宿主病)；Th1淋巴细胞-相关疾病(例如，类风湿性关节炎、多发性硬化症、牛皮癣、干燥综合症(Sjorgren's syndrome)、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病和结核病)；和活化-的B淋巴细胞相关疾病(例如，系统性红斑狼疮、肺出血肾炎综合症、类风湿性关节炎和I型糖尿病)。

自身免疫性疾病的多药物治疗

[0223] 还公开了治疗自身免疫疾病的方法，包括向有此需要的患者给予有效量的MD-ADC和另一种已知用于治疗自身免疫疾病的治疗剂。

组合物和给药方法

[0224] 本发明提供药物组合物，其包含本文所述的MD-ADC和药学上可接受的载体。MD-ADC是任何形式，其允许将偶联物施用于患者以治疗与抗体结合的抗原表达相关的病症。例如，偶联物优选为液体或固体形式。优选的给药途径是肠胃外给药。肠胃外给药包括皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内注射或输注技术。在一个实施方式中，组合物是胃肠外施用的。在优选的实施方式中，偶联物是静脉内施用的。通过任何方便的途径进行给药，例如通过输注或推注。

[0225] 配制药物组合物以便在将组合物给予患者时使化合物具有生物可利用性。组合物将采取一个或多个剂量单元的形式，其中例如片剂可以是单一剂量单元。

[0226] 用于制备药物组合物的材料在使用量方面是无毒的。对于本领域普通技术人员显而易见的是，药物组合物中活性成分的最佳剂量将取决于多种因素。相关因素包括但不限于动物的类型(例如，人)、化合物的特定形式、给药方式和所用组合物。

[0227] 在一些实施方式中，组合物是液体形式，优选用于通过注射递送的组合物。在通过注射给药的组合物中，任选存在一种或多种表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂。

[0228] 液体组合物，无论是溶液、悬浮液还是其他类似形式，包括下列中的一种或多种：无菌稀释剂如注射用水、盐溶液，优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、固定油如可作为溶剂或悬浮介质的合成单或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、环糊精、丙二醇或其他溶剂；抗菌剂如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，如乙二胺四乙酸；缓冲剂，如氨基酸、乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；洗涤剂，如非离子表面活性剂，多元醇；和用于调节张力的试剂，例如氯化钠或葡萄糖。肠胃外组合物优选包封在安瓿、一次性注射器或由玻璃、塑料或其他材料制成的多剂量小瓶中。生理盐水是示例性佐剂。可注射组合物优选是无菌的。

[0229] 在治疗特定病症或症状中有效的偶联物的量将取决于病症或症状的性质，并且可以通过标准临床技术确定。此外，任选地使用体外或体内测定来帮助确定最佳剂量范围。组合物中使用的精确剂量还取决于给药途径和疾病或病症的严重性，并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。

[0230] 该组合物包含有效量的化合物，从而获得合适的剂量。通常，该量为化合物重量至少约0.01%，以组合物重量计。

[0231] 对于静脉内施用，组合物优选包含每kg动物体重约0.01至约100mg的MD-ADC。在一个实施方式中，组合物包含每kg动物体重约1μg至约100mg的MD-ADC。在其他实施方式中，施用的量为约0.1至约25mg/kg体重范围的化合物。

[0232] 通常,给予受试者的偶联物的剂量通常为约0.01mg/kg至约100mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约0.01mg/kg至约15mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约0.1mg/kg至约15mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,给予患者的剂量为约0.1mg/kg至约20mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,施用的剂量为约0.1mg/kg至约5mg/kg或约0.1mg/kg至约10mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,施用的剂量为约1mg/kg至约15mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,施用的剂量为约1mg/kg至约10mg/kg受试者体重。在一些实施方式中,在结束治疗周期后,给药剂量为约0.1至4mg/kg,甚至更优选0.1至3.2mg/kg,或甚至更优选0.1至2.7mg/kg受试者体重。

[0233] 术语“载体”是指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂或赋形剂。此类药物载体包括液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油。其他载体包括盐水、阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶体二氧化硅、尿素。此外,任选使用辅助剂,稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方式中,当给予患者时,所述一种或多种化合物和药学上可接受的载体是无菌的。当静脉内施用化合物时,水是示例性载体。盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液优选用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物载体还包括赋形剂,例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水和乙醇。如果需要,本发明的组合物还可含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。

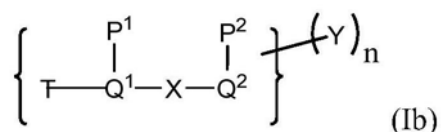
[0234] 在一个实施方式中,根据常规程序将偶联物配制成适于静脉内施用于动物,特别是人的药物组合物。优选地,用于静脉内施用的载体或载体是无菌等渗水性缓冲溶液。必要时,组合物还可包含增溶剂。用于静脉内施用的组合物任选地包含局部麻醉剂,例如利多卡因,以缓解注射部位的疼痛。通常,成分单独供应或以单元剂量形式混合在一起,例如,作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物,在密封容器如安瓿或小药囊中,指明活性剂的量。当通过输注施用偶联物时,其用例如含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。当通过注射施用偶联物时,提供一安瓿的无菌注射用水或盐水,以便可以在施用前混合成分。

[0235] 药物组合物通常配制成无菌的,基本上等渗的并且完全符合美国食品和药物管理局的所有良好生产规范(GMP)规定。

正交保护的抗体-药物偶联物接头

[0236] 本公开内容提供了“正交”保护(即保护以允许在进行药物单元的附着时选择性脱保护)的抗体-药物偶联物(ADC)接头。正交保护的抗体药物偶联的接头的特征在于连接组装(LA)单元,其包括每个连接基团上的保护基团(例如 Q^1 和 Q^2)。如链接组装单元部分所述,连接基团允许药物单元的共价连接;然而,本公开的保护基团阻断药物部分与连接组件的共价连接,并且在特定条件下是可去除的。正交保护的链接组装单元设计用于包含不同的保护基团,允许选择性脱保护和添加选定的药物单元。

[0237] 在某些实施方式中,正交保护的链接组装单元的特征在于式(Ib)的结构:

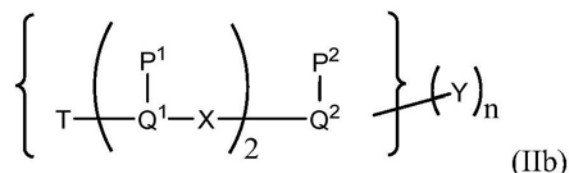


其中,

T是拴系基团,其促进通过减少抗体的链间二硫键产生的抗体硫醇的附着;

Q^1 是第一连接基团,允许共价附着第一药物单元(D^1);
 Q^2 是第二连接基团,允许共价附着第二药物单元(D^2);
 P^1 是阻断第一药物单元(D^1)共价连接的第一保护基团;
 P^2 是阻止第一药物单元(D^1)共价连接的第二个保护基团,且 P^1 和 P^2 是不同的;
 X 是附接基团接头,它提供两个连接基团之间的连接;
 Y 是分配剂;和
 下标 n 为0或1。

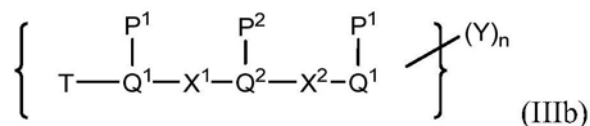
[0238] 在另一组实施方式中,正交保护的链接组装单元的特征在于式(IIb)的结构:



其中,

T 是拴系基团,其促进通过减少抗体的链间二硫键产生的抗体硫醇的附着;
 每个 Q^1 都是第一连接基团,允许共同连接第一药物单元(D^1);
 Q^2 是第二连接基团,允许共价附着第二药物单元(D^2);
 P^1 是阻断第一药物单元(D^1)共价连接的第一保护基团;
 P^2 是阻断第一药物单元(D^1)共价连接的第二个保护基团,且 P^1 和 P^2 不同;
 X 是连接基团接头;
 Y 是一个分配基团;和
 下标 n 为0或1。

[0239] 在另一组实施例中,正交保护的链接组装单元的特征在于式(IIIb)



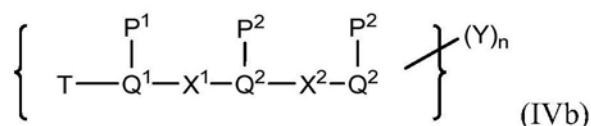
其中,

T 是拴系基团,其促进通过减少抗体的链间二硫键产生的抗体硫醇的附着;
 每个 Q^1 都是独立选择的第一连接基团,允许独立选择的第一药物单元(D^1)的共价连接;

Q^2 是第二连接基团,允许共价附着第二药物单元(D^2);
 P^1 是阻断第一药物单元(D^1)共价连接的第一保护基团;
 P^2 是阻断第一药物单元(D^1)共价连接的第二个保护基团,且 P^1 和 P^2 不同;
 X^1 和 X^2 都是连接基团接头;
 Y 是一个分配基团;和

下标 n 为0或1。

[0240] 在另一组实施方式中,正交保护的链接组装单元的特征在于式(IVb)



其中,

T是具有末端马来酰亚胺部分的拴系基团;

Q^1 是包含第一半胱氨酸部分或其类似物的第一连接基团;

Q^2 是包含第二半胱氨酸部分或其类似物的第二连接基团;

X^1 和 X^2 都是连接基团接头;

P^1 是第一硫醇保护基团;

P^2 是第二硫醇保护基团,且 P^1 和 P^2 不同;

Y是附加到L、 Q^1 、X或 Q^2 的分配剂;和

下标n为0或1。

[0241] 在本文所述的正交保护的链接组装单元中,拴系基团(T)、连接基团(Q^1 和 Q^2 ,连接基团接头(X, X^1 和 X^2)、任选的分配剂(Y)如前面的链接组装单元部分所定义。一旦选择性地去除一个或多个保护基团,可以将药物单元添加到选择性脱保护的接头中。如链接组装单元部分所述,药物单元可包括任选的连接基团 L^1 和 L^2 。

[0242] 在式Ib、IIb、IIIb和IVb的一些实施方式中,

T是具有末端马来酰亚胺部分的拴系基团。

[0243] 在式Ib、IIb、IIIb和IVb的一些实施方式中,

Q^1 是包含第一半胱氨酸部分或其类似物的第一连接基团;

Q^2 是包含第二半胱氨酸部分或其类似物的第二连接基团;

P^1 是第一硫醇保护基团;和

P^2 是第二硫醇保护基团,且 P^1 和 P^2 不同。

保护基团(P^1 和 P^2)

[0244] 具有适当保护的接头组装单元的‘正交’脱保护(即选择性脱保护)允许合成具有特定所需比例的 D^1 与 D^2 药物单元的药物接头组装单元以及将该所需比例的药物均匀递送至靶标位点的机制。因此,保护基团(P^1 和 P^2)是选择性移除的单元,可以连接到附着单元(Q^1 和 Q^2)。为了“正交”脱保护, P^1 和 P^2 的特性不同。

[0245] 在一些实施方式中, P^1 和 P^2 是硫醇保护基团。在一些实施方式中, P^1 选自自由以下组成的组:-S-异丙基(SiPr)、S-叔丁基(StBu)和-S-甲基(SMe);-且 P^2 是-CH₂NH-C(O)CH₃(乙酰氨基甲基)。

[0246] 在一些实施方式中,正交保护的链接组装单元由式Ib、IIb、IIIb或IVb表示,且T是MDPr-Val-Cit;- P^1 选自自由以下组成的组:-S-异丙基(SiPr)、S-叔丁基(StBu)和S-甲基(SMe);且 P^2 是-CH₂NH-C(O)CH₃(乙酰氨基甲基)。

[0247] 在一些实施方式中,正交保护的链接组装单元由式Ib、IIb、IIIb或IVb表示,且X选自甘氨酸和丙氨酸;T是MDPr-Val-Cit; P^1 选自自由以下组成的组:-S-异丙基(SiPr)、S-叔丁基(StBu)和S-甲基(SMe);且 P^2 是-CH₂NH-C(O)CH₃(乙酰氨基甲基)。

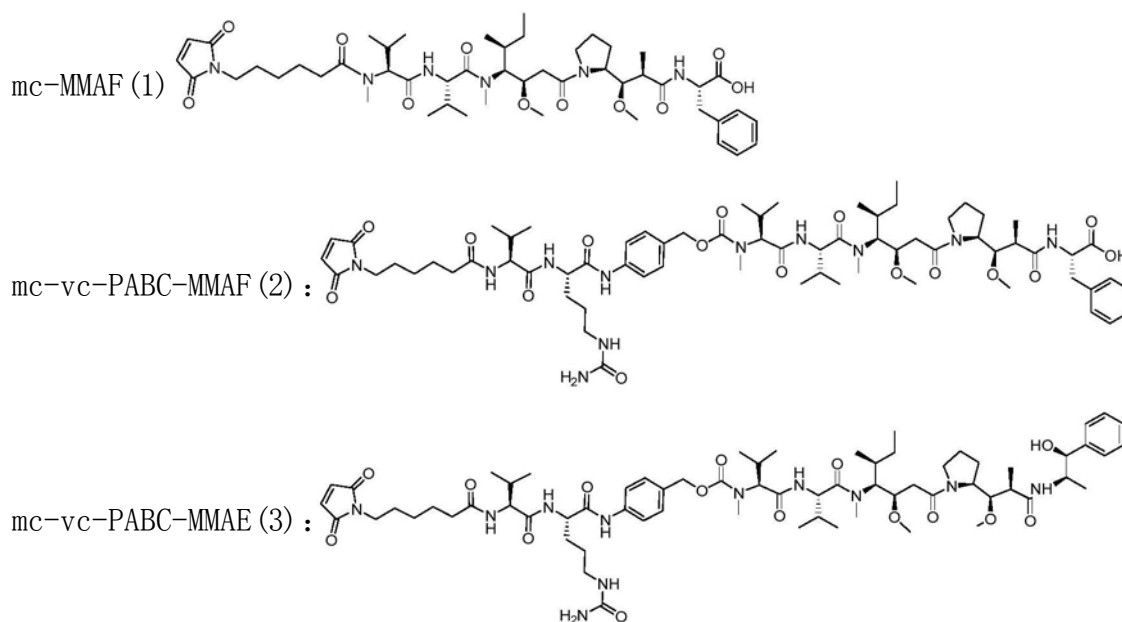
[0248] 在一些实施方式中,正交保护的链接组装单元由式Ib、IIb、IIIb或IVb表示,且T是MDPr-Val-Cit; Q^1 和 Q^2 均为半胱氨酸;X是甘氨酸; P^1 选自自由以下组成的组:-S-异丙基(SiPr)、S-叔丁基(StBu)和-S-甲基(SMe);且 P^2 是-CH₂NH-C(O)CH₃(乙酰氨基甲基)。

[0249] 在一些实施方式中,正交保护的链接组装单元由式Ib、IIb、IIIb或IVb表示,且T是MDPr-Val-Cit;- Q^1 和 Q^2 均为半胱氨酸;X是甘氨酸; P^1 选自自由以下组成的组:-S-异丙基

(SiPr)、S-叔丁基 (StBu)-和S-甲基-(SMe); P^2 是 $-\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ (乙酰氨基甲基); 下标n为1,且Y包含PEG或环糊精。

实施例

[0250] 除非另有说明,否则所有溶剂和试剂均以尽可能高的纯度从商业来源购买,并且在使用前不进一步纯化。无水二甲基甲酰胺 (DMF) 和 CH_2Cl_2 购自Aldrich。Fmoc-保护的氨基酸和2-Cl-三苯甲基氯树脂 (1mmol/g取代, 200-300目, 1%DVB) 购自Novabiochem。Fmoc-保护的氨基-dPEG₂₄-COOH购自Quanta Biodesign。如前所述制备MDPr。如前所述合成了^[1]马来酰亚胺己酰基-MMAF (1)、马来酰亚胺基己酰基-Val-Cit-PABC-MMAF (2) 和马来酰亚胺基己酰基-Val-Cit-PABC-MMAE (3)。^{[2][3]}固相合成在塑料注射器 (National Scientific Company) 中进行,所述塑料注射器装配有由fritware PE中等级多孔片 (Scienceware) 裁出的过滤器。小分子LC-MS在Waters Xevo G2ToF质谱仪上进行,该质谱仪与配备有Acquity UPLC BEH C18 $2.1 \times 50\text{mm}$, $1.7\mu\text{m}$ 反相柱的Waters Acquity H-Class Ultra Performance LC接口。酸性流动相 (0.1% 甲酸) 由3% 乙腈/97% 水至100% 乙腈 (流速=0.7mL/min) 的梯度组成。制备型反相HPLC在配置有Varian ProStar 330PDA检测器的Varian ProStar 210 溶剂输送系统上进行。产物经Phenomenex Synergy MAX-RP $30.0 \times 250\text{mm}$, $4\mu\text{m}$, $80\text{\AA}$ 反相柱纯化,用0.05% 三氟乙酸水溶液 (溶剂A) 和0.05% 三氟乙酸的乙腈溶液 (溶剂B) 洗脱。纯化方法通常由溶剂A与溶剂B的线性梯度,从90% 水性溶剂A升至10% 溶剂A组成。流速为5.0mL/min,在220nm监测。



实施例1:固相肽合成

[0251] 使用Fmoc合成法在固相上合成马来酰亚胺己酰-Cys (Acm) (mc-Cys (Acm)) 和药物载体4。

肽合成的一般程序:

[0252] 树脂装载:在10mL固相反应容器 (含有PET玻璃料的塑料注射器) 中加入0.15g 2-Cl-三苯甲基氯树脂 (0.225mmol), 然后在3mL干燥 CH_2Cl_2 中,加入Fmoc-氨基酸或Fmoc-氨基-PEG₂₄-COOH (0.225mmol, 1.0当量) 和N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA) (0.338mmol, 1.5当量) 的溶

液。将容器摇动5min,然后加入更多DIPEA (0.225mmol,1.0当量),并将容器再摇动30min。通过添加MeOH (1.0mL) 淬灭未反应的树脂共5min。然后用DMF (5×5mL)、CH₂Cl₂ (5×5mL)、乙醚 (5×5mL) 洗涤树脂,并真空干燥。

[0253] Fmoc去除程序:含有Fmoc保护的肽的树脂用20%哌啶的DMF (5×3mL) 处理总共30min。然后在进一步操作之前用DMF (5×5mL) 洗涤树脂。

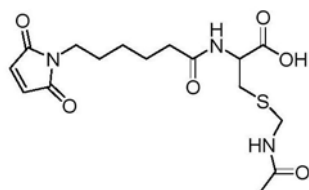
[0254] 标准耦合程序:向树脂脱保护的N-末端氨基酸 (1当量) 中,加入含有Fmoc-氨基酸或马来酰亚胺酸 (3当量)、HATU (3当量) 和DIPEA (6当量) 的DMF (5mL) 溶液。将反应容器振荡1小时。然后用DMF (5×5mL) 洗涤树脂。通过添加含有Fmoc-Cys (4当量)、羟基苯并三唑 (HOBT) (4当量) 和N,N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC) (4当量) 的溶液来偶联Fmoc-Cys氨基酸 (1当量)。

[0255] 树脂裂解:在5mL塑料注射器中向干燥的树脂中加入2mL 10%三氟乙酸 (TFA) 的CH₂Cl₂溶液,其中还含有2.5%H₂O和2.5%三异丙基硅烷。1min后,将反应混合物转移到20mL硼硅酸盐玻璃闪烁瓶中。该程序重复三次。将裂解溶液在N₂流下干燥,用0.5mL乙醚洗涤3次,然后真空干燥。粗产物或者在没有后续纯化的情况下使用,或者使用上述程序通过反相HPLC纯化。

药物载体表征:

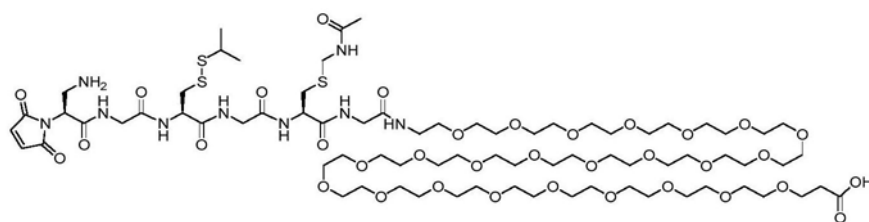
[0256] 马来酰亚胺己-半胱氨酸 (ACM):

[0257] 预期精确质量:385.13;观察m/z:384.3 (M+H)⁺,LC-MS t_R=0.66min。判断粗产物纯度>95%并用于抗体偶联而无需后续纯化。



[0258] 药物载体4:

[0259] 预期精确质量:1833.9;观察m/z:1835.1 (M+H)⁺,LC-MS t_R=0.88min,制备型LC t_R=24min。



实施例2:偶联方法

材料和通用方法

[0260] 如前所述制备嵌合抗CD30单克隆抗体cAC10^[4]。在与Waters Acquity H-Class UPLC系统联用的Waters Xevo GS-S QTof上获得蛋白质LC-MS数据。用10mM二硫苏糖醇 (DTT) 在37℃下将样品还原10min,然后在80℃下,在分析型反相柱 (Agilent Technologies, PLRP-S, 300Å, 2.1mm ID×50mm, 3μm) 上进行色谱分离,用0.01%TFA的乙腈溶液在0.05%TFA水溶液中从25%-65%线性洗脱5min,然后用65%0.01%TFA的乙腈等度洗脱0.5min,流速为1.0毫升/min。使用质量范围500-4000m/z以ESI+模式获得质谱数据,并

使用MaxEnt1对其进行解卷积以确定所得偶联物的质量。在Waters 2695HPLC系统上使用分析型SEC柱(Sepax SRT-C 300 7.8mm ID×30cm, 5μm)通过尺寸排阻色谱法(SEC)测定偶联物的聚集程度。使用92.5% 25mM磷酸钠(pH6.8)、350mM NaCl和7.5%异丙醇的等度混合物以1mL/min的流速洗脱注射的物质。

[0261] 如前所述,通过还原抗体链间二硫键,然后加入25-100%过量的马来酰亚胺制备ADC^[5]。通过加入12当量的三(2-羧乙基)-膦(TCEP)到抗体溶液(PBS中1-10mg/mL, pH7.4)中,完成每抗体8个硫醇的完全还原。通过反相LC-MS监测抗体减少的程度,并根据需要添加额外的TCEP以完成反应。然后通过超滤(3次,10倍稀释到pH7.4的PBS中,含有1mM EDTA,通过30kDa MWC0过滤器以4000xg离心)去除TCEP。将PBS-EDTA中的完全还原的抗体与10-16摩尔当量(25-100%过量)的药物-接头或药物-载体偶联,作为10mM DMSO原液。涡旋所得溶液并在室温下放置10-20min。如上所述通过反相LC-MS评估偶联程度,并根据需要添加另外的药物-接头或药物-载体。一旦所有可用的Cys硫醇被烷基化,通过使用Nap-5脱盐柱(GE Healthcare)或通过3-5轮超滤将缓冲液交换到PBS中来纯化粗ADC溶液。通过分光光度法测定最终的ADC浓度。

mc-Cys (Acm) 的偶联和脱保护试验:

[0262] 为了在PBS-EDTA中完全还原cAC10抗体,加入10当量来自100mM DMSO原液的mc-Cys (Acm)。涡旋所得溶液并在室温下放置15min。此时,反相LC-MS表明抗体硫醇完全烷基化,而没有丧失Acm保护基团的保真度。根据上述程序通过超滤纯化偶联物,并且偶联物的色谱和质谱表征在图1A中显示。然后将得到的每个抗体具有8个载体的偶联物cAC10-mc-Cys (Acm)进行脱保护条件。向pH7.4的PBS中的偶联物中加入50当量的乙酸汞水溶液(Hg(OAc)₂)作为10mM原液。将反应混合物在室温下温育45min。向反应混合物中加入Quadrasil MP树脂(Sigma Aldrich, 0.025mmol/g硫醇容量, 1当量树脂加入1当量乙酸汞)的含水浆液,并将混合物剧烈涡旋15min。此时,将混合物以13,200×g离心2min并去除上清液。向上清液中加入10-20当量N-乙基马来酰亚胺(NEM)以封端释放的半胱氨酸硫醇。通过LC-MS观察修饰程度。如图1B所示,产生了其中所有8个Acm基团已被去除,并且每个释放的硫醇用NEM封端的偶联物。

实施例3:双修饰抗体偶联物的一般程序。

[0263] 载体4偶联:为了在PBS-EDTA中完全还原cAC10抗体,加入16当量来自10mM DMSO原液的载体4。涡旋所得溶液并在室温下放置15min。此时,反相LC-MS表明抗体硫醇完全烷基化,而没有丧失Acm保护基团的保真度。根据上述程序通过超滤纯化偶联物。

[0264] Cys (SiPr) 脱保护:向cAC10-4 (8个载体/抗体) 中加入10-12当量TCEP。将反应混合物在37℃下温育45min,此时反相LC-MS表明还原完成(通过评估解卷积的轻链和重链质量,以图2为例)。反应完成后,如上所述,通过3轮超滤去除过量的TCEP和释放的异丙基硫醇到PBS-EDTA中。

[0265] 第一次偶联:为了完全还原cAC10-4,从10mM DMSO储液中加入50%摩尔过量的马来酰亚胺药物-接头。涡旋所得溶液并在室温下放置15min。此时,使用反相LC-MS来判断反应进程,并且根据需要添加另外的药物-接头或NEM,直到所有硫醇被烷基化。根据上述程序通过凝胶过滤或超滤纯化偶联物。

[0266] Acm脱保护:向含有cAC10-4-药物/NEM的溶液中加入50当量Hg(OAc)₂的水溶液。涡

旋所得溶液并在室温下放置45min。向反应混合物中加入Quadrasil MP树脂的水性浆液(0.025mmol/g硫醇容量,1当量树脂加入1当量乙酸汞),并将混合物剧烈涡旋15min。此时,将混合物以13,200×g离心2min并去除上清液。带有8个游离硫醇的偶联物或者在没有后续纯化的情况下使用,或者如上所述通过三轮超滤纯化到PBS-EDTA中。

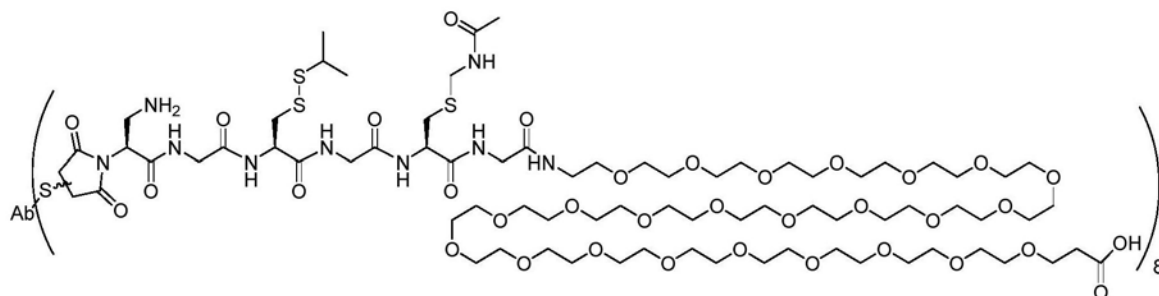
[0267] 第二次偶联:向含有具有8个游离硫醇的cAC10-4-药物/NEM的溶液中加入50-100%摩尔过量的马来酰亚胺药物-接头或来自10mM DMSO原液的NEM。涡旋所得溶液并在室温下放置15min。此时,使用反相LC-MS来判断反应进程,并且根据需要添加另外的药物-接头或NEM,直到所有硫醇被烷基化。根据上述程序通过凝胶过滤或超滤纯化偶联物。

[0268] 通过反相HPLC测定,在偶联过程的每个步骤期间每抗体的平均药物在完全药物负载的2.5%(8种药物/mAb)内。

[0269] 本文所述的偶联和脱保护步骤和分析表征总结于图4-7中。

偶联物和偶联物中间体的分析表征:

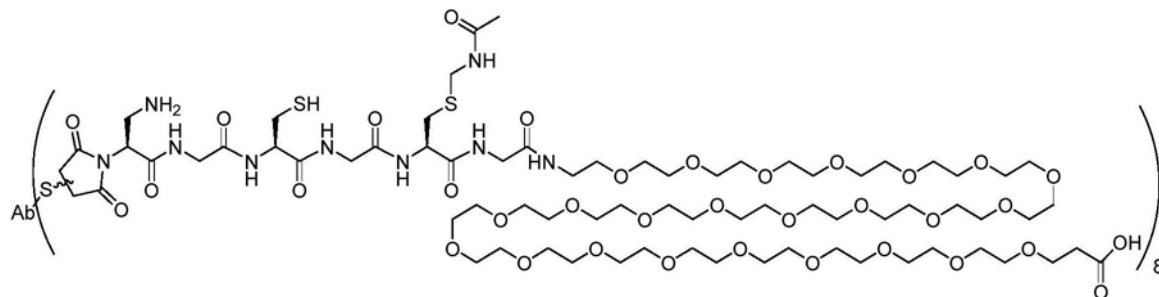
[0270] cAC10-4:



轻链: $t_R=1.41\text{min}$;预期质量:25577,观察到25577

重链: $t_R=2.34\text{min}$;预期质量:55880(重链+3个载体),观察到55880

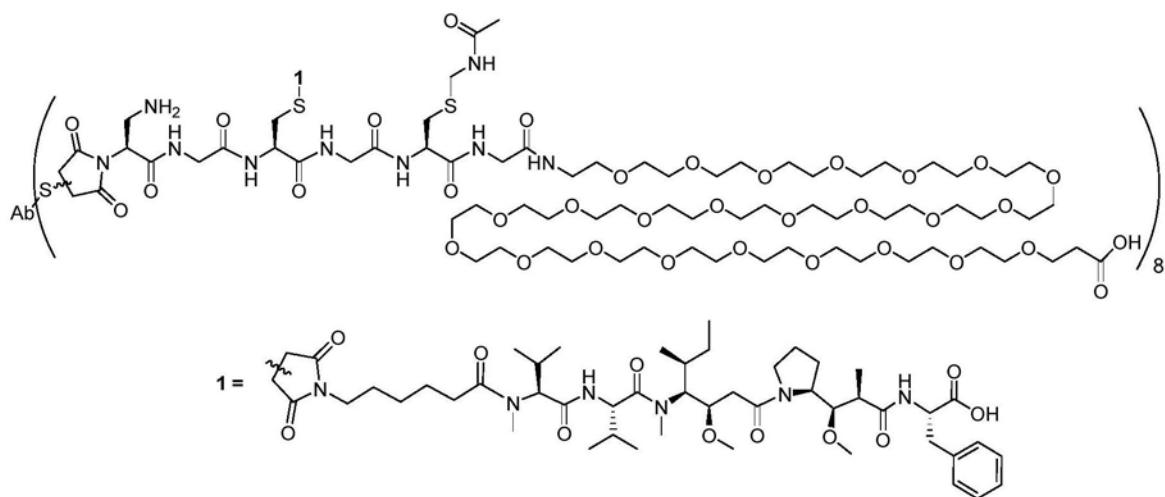
[0271] cAC10-4(-SiPr):



轻链: $t_R=1.38\text{min}$;预期质量:25503,观察到25504

重链: $t_R=2.34\text{min}$;预期质量:55658(重链-3-SiPr),观察到55659

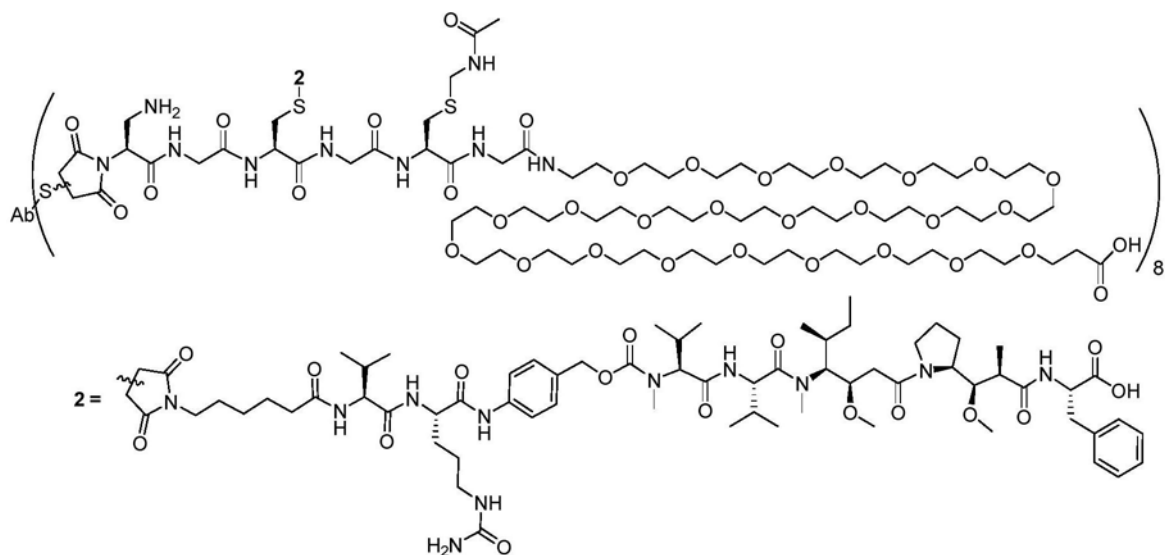
[0272] cAC10-4-1:



轻链: $t_R = 1.28 \text{ min}$; 预期质量: 26429, 观察到 26427

重链: $t_R = 1.84 \text{ min}$; 预期质量: 58434 (重链+3种药物), 观察到 58430

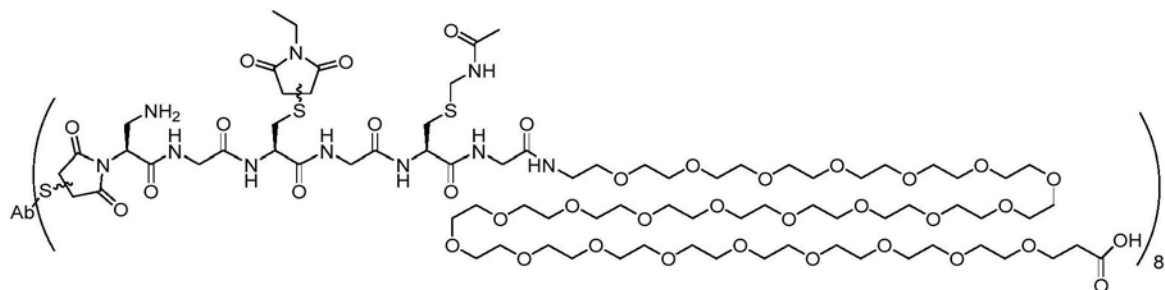
[0273] cAC10-4-2:



轻链: $t_R = 1.49 \text{ min}$; 预期质量: 26834, 观察到 26382

重链: $t_R = 2.09 \text{ min}$; 预期质量: 59651 (重链+3种药物), 观察到 59646

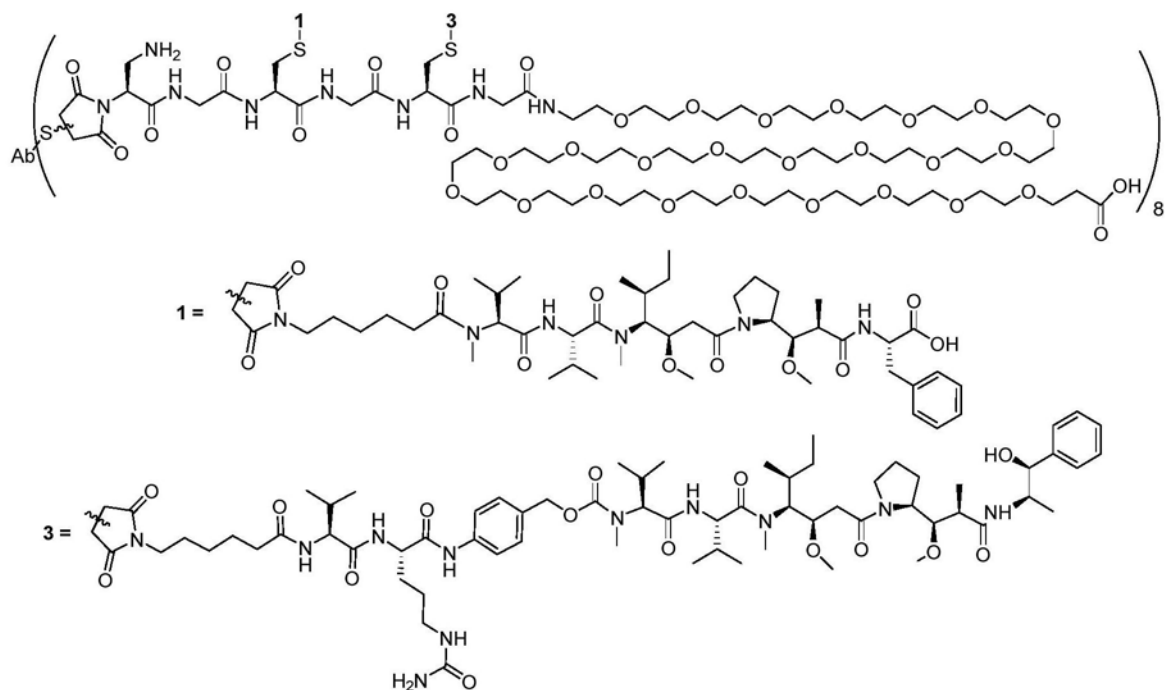
[0274] cAC10-4-NEM:



轻链: $t_R = 0.98 \text{ min}$; 预期质量: 25629, 观察到 25627

重链: $t_R = 1.38 \text{ min}$; 预期质量: 56034 (重链+3NEM), 观察到 56031

[0275] cAC10-4-1-3:

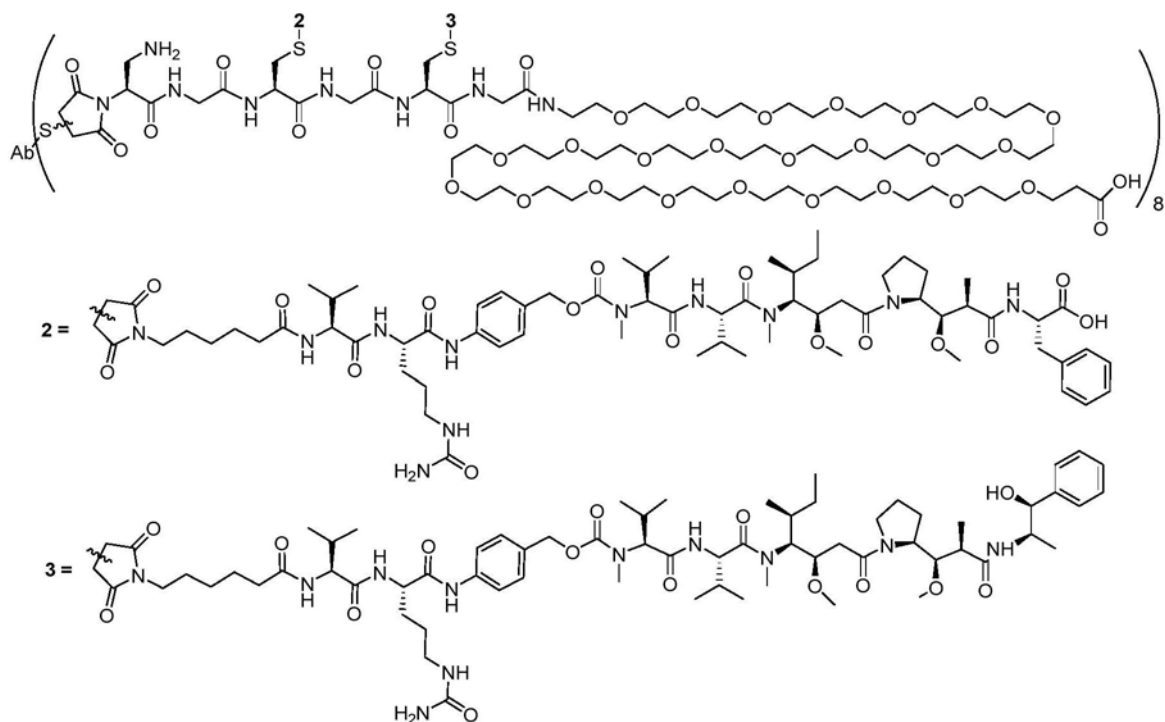


轻链: t_R = 1.83min; 预期质量: 27675, 观察到 27673

重链: t_R = 2.56min; 预期质量: 62172 (重链+3种药物), 观察到 62170

SEC t_R = 6.77min, 98.0% 单体

[0276] cAC10-4-2-3:

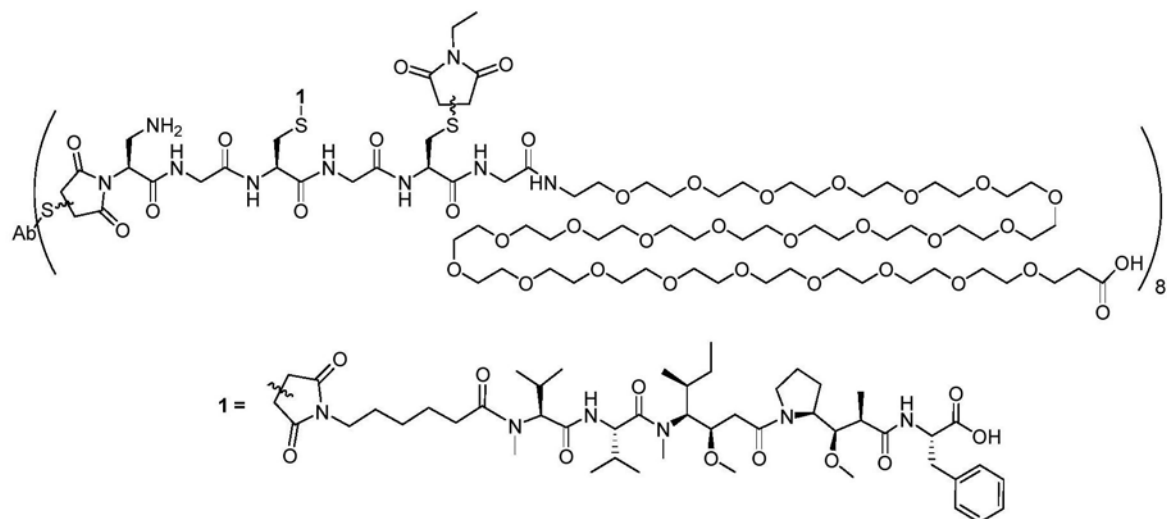


轻链: t_R = 2.04min; 预期质量: 28080, 观察到 28081

重链: t_R = 2.76min; 预期质量: 63389 (重链+3种药物), 观察到 63389

SEC t_R = 6.69min, 95.0% 单体

[0277] cAC10-4-1-NEM:

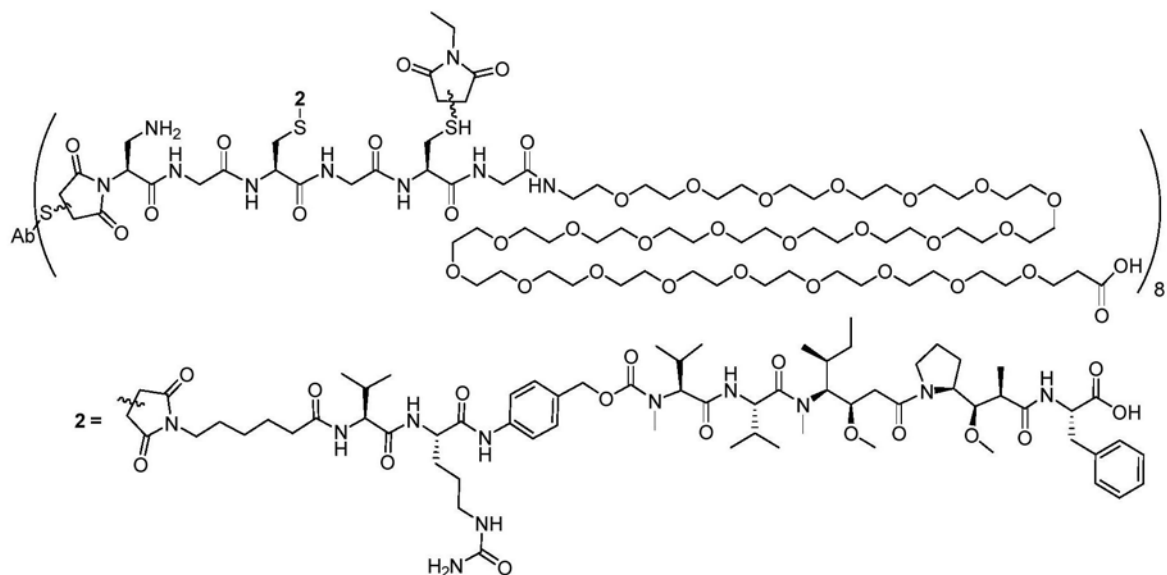


轻链: $t_R=1.33\text{min}$; 预期质量: 26483, 观察到 26482

重链: $t_R=1.90\text{min}$; 预期质量: 58596 (重链+3NEM), 观察到 58598

SEC $t_R=6.91\text{min}$, 97.5% 单体

[0278] cAC10-4-2-NEM:

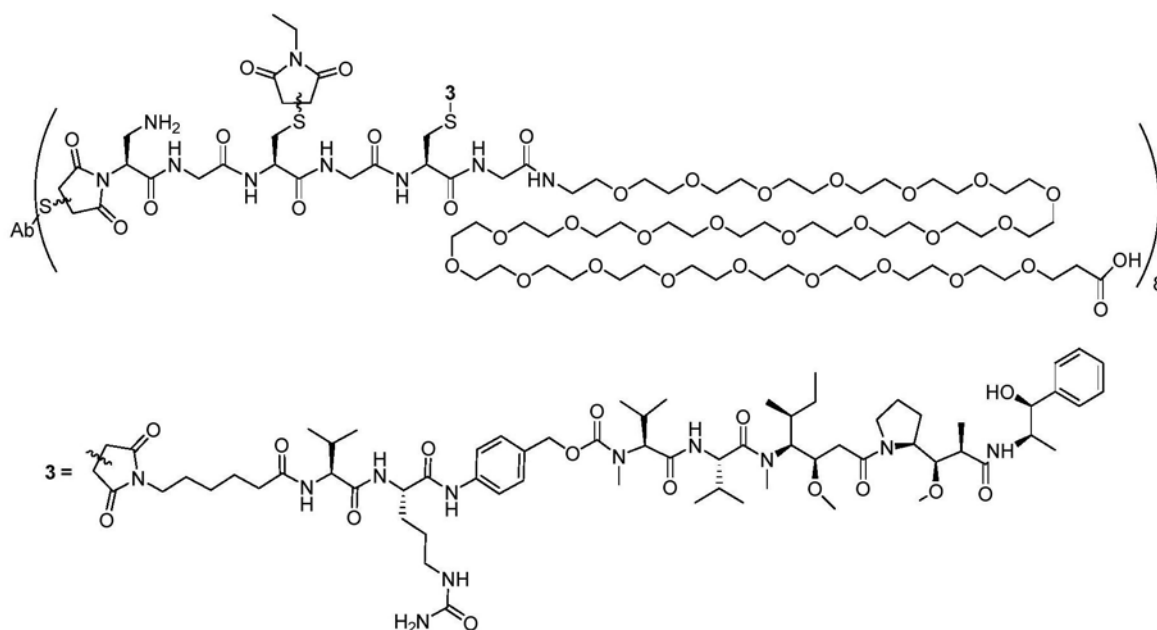


轻链: $t_R=1.53\text{min}$; 预期质量: 26888, 观察到 26889

重链: $t_R=2.14\text{min}$; 预期质量: 59813 (重链+3NEM), 观察到 59815

SEC $t_R=6.74\text{min}$, 97.4% 单体

[0279] cAC10-4-NEM-3:



轻链: t_R = 1.55min; 预期质量: 26875, 观察到 26875

重链: t_R = 2.19min; 预期质量: 59772 (重链+3种药物), 观察到 59772

SEC t_R = 7.03min, 97.8% 单体

实施例4: 细胞结合分析

[0280] 通过流式细胞术在CD30(+) L540cy霍奇金淋巴瘤细胞上评估抗体或ADC与细胞表面CD30的结合。将细胞(2×10^5)与每种抗体处理的4倍系列稀释液在流动缓冲液(PBS, 2%胎牛血清, 0.2%NaN₃)中组合, 总体积为100 μ L。将细胞在冰上孵育30min, 然后用冰冷的流动缓冲液洗涤两次。此时, 在推荐的稀释度下, 在总体积为100 μ L的流动缓冲液中加入FITC标记的山羊抗人Fc二抗(109-095-098, Jackson ImmunoResearch)。将细胞在冰上孵育30min, 然后用冰冷的流动缓冲液洗涤两次。在Attune NxT流式细胞仪(Thermo Fisher Scientific)上通过流式细胞术检查标记的细胞。使用FlowJo软件分析数据并使用GraphPad Prism 6绘图。使用一个位点结合模型通过非线性回归确定结合常数。结果显示在图8中。

实施例5: 体外细胞毒性实验

[0281] 在多种癌细胞系上评估体外效力: L540cy(霍奇金淋巴瘤)和DEL、和DEL-BVR^[6](间变性大细胞淋巴瘤)、U-266(多发性骨髓瘤)。L540cy和DEL从DSMZ获得, U-266从ATCC获得。使用Cell Check 16面板(IDEXX Bioresearch)确认细胞系的真实性。使用来自GenTarget, Inc. (San Diego, CA)的体内准备好的慢病毒颗粒产生稳定表达萤火虫荧光素酶的U-266细胞。使U-266细胞生长至 1×10^6 细胞/mL(>90%存活), 并用慢病毒颗粒在RPMI 1640培养基+10%FBS中转导72小时。将细胞置于新霉素中进行选择, 通过稀释克隆到96孔板中产生稳定的克隆。使用EnVision Multilabel Plate Reader(Perkin Elmer), 使用Bright-Glo荧光素酶测定系统(Promega)选择稳定的U-266luc细胞系。对于所有细胞毒性实验, 将细胞以对数期生长培养, 然后在含有150 μ L补充有10-20%FBS的RPMI-1640的96孔板中接种24小时。在4倍工作浓度下制备细胞培养基中ADC的系列稀释液, 并将50 μ L各稀释液加入96孔板中。加入ADC后, 将细胞在37 $^{\circ}$ C下培养4^天。96小时后, 通过CellTiter-Glo(Promega)评估生长抑

制,并在Envision读板器上测量发光。实验重复三次测定的IC₅₀值在此定义为在滴定曲线过程中导致半数最大生长抑制的浓度。对于体内体外旁观者测定,将L540cy和荧光素酶(+)U-266细胞(U-266luc)以1:1的比例接种在96孔板中。如上所述将测试物稀释液加入细胞中。96小时后,通过BrightGlo评估U-266luc细胞的生长抑制,并在Envision读板仪上测量发光。结果显示在图9和10。

实施例6:2种ADC的共同给药与2种药物在1种ADC上共偶联的比较

[0282] 以相同的总抗体浓度将ADC加入细胞中,并如上所述测量细胞毒性。受体结合的竞争导致共同施用的活性降低(基于抗体)。在具有低受体拷贝数的细胞系上,效果可能更明显。

	细胞系	抗原 #	共偶联 IC ₅₀ (ng / mL)	共同给药 IC ₅₀ (ng / mL)	倍数差异
CD30 (cAC10)	L540cy	400,000	0.3	1.3	4
	Karpas 299	320,000	0.5	1.5	3
CD19 (hBU12)	SU-DHL-16	10,000	0.2	0.5	2.5
	Granta-519	10,000	3	124.5	41.5

实施例7:体内异种移植实验

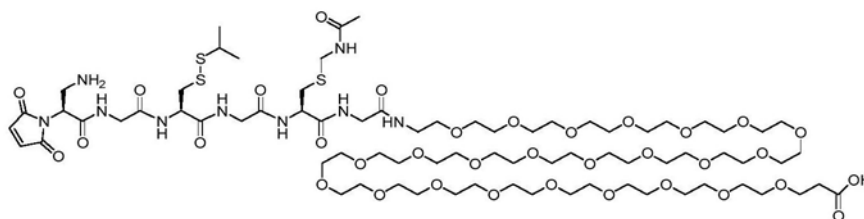
[0283] 所有实验均与机构动物护理和使用委员会一起在完全由实验动物保护协会和认可机构认可的设施中进行。使用DEL-BVR、Karpas 299或Karpas-35R细胞进行治疗实验,所述细胞皮下植入重症综合性免疫缺陷(SCID)小鼠(Harlan,Indianapolis,IN)。将混合的肿瘤模型植入含有250万个Karpas 299和250万个Karpas-35R细胞的混合物中。^[7]在肿瘤移植后,当平均肿瘤体积达到约100mm³时,将小鼠随机分到研究组。通过腹膜内注射给予ADC一次。当肿瘤体积达到1000mm³时,使动物安乐死。用公式(体积=1/2×长度×宽度×宽度)计算肿瘤体积。在植入后第40-65天左右终止显示持久消退的小鼠。结果显示在图11和12中。

实施例8:双ADC与8负载和/或16负载单药ADC的比较

[0284] 具有mcMMAF(Comp.Aa)或mc-vc-MMAE(Comp.Ab)的ADC与载有Comp.Aa/Comp.Ab的双奥瑞他汀ADC进行比较,在每抗体有16药物的匹配药物负载。在大多数细胞系和不同的抗体上,共偶联(具有Comp.Aa和Comp.Ab)与hBU12-链接组装单元Aa(8)-Comp.Aa(16)(单药16负载ADC,只有Comp.Aa作为药物单元)相比具有相等的ADC活性。尽管hBU12-链接组装单元Aa(8)-Comp.Ab(16)ADC(单药16负载ADC,只有Comp.Ab作为药物单元)具有显著较低的活性。与单药16负荷ADC相比,使用hLIV22抗体靶向LIV-1的双重奥瑞他汀ADC具有显著更高的体外活性。该数据表明共偶联的奥瑞他汀ADC显示出独立于抗体或细胞系的改善的细胞毒活性。

[0285] 除了显示具有奥瑞他汀药物的共偶联的ADC具有广泛活性之外,下表还显示递送其他有效载荷的共偶联的ADC可具有高活性。例如,可以将喜树碱、海兔毒素和长春碱掺入共偶联的ADC中以提供增强的活性。

链接组装单元Aa,以上称为药物载体4:



链接组装单元Aa包含MDPr、PEG24、1SiPr和1Acm保护的Cys残基。

将保护基团(-S-iPr和-CH₂-NH-C(=O)CH₃)单独地去除,并将所需的药物基团连接在上面所示的链接组装单元中。

靶向CD19:

	hBU12-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)				
细胞系	Comp. Ab (8)	Comp. Aa (8)	Comp. Ab (8)-Comp. Aa (8)	Comp. Ab (16)	Comp. Aa(16)
Raji	11.3	8.8	1.6	6.9	2.1
WSU-DLCL2	72.0	13.3	1.3	8.6	1.5

靶向β6整合素:

	h2A2-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)				
细胞系	Comp. Ab (8)	Comp. Aa(8)	Comp. Ab (8)-Comp. Aa (8)	Comp. Ab (16)	Comp. Aa(16)
BxPC3	21.8	24.8	6.6	6.9	10.8
SW780	51.5	3.1	1.8	5.5	1.7

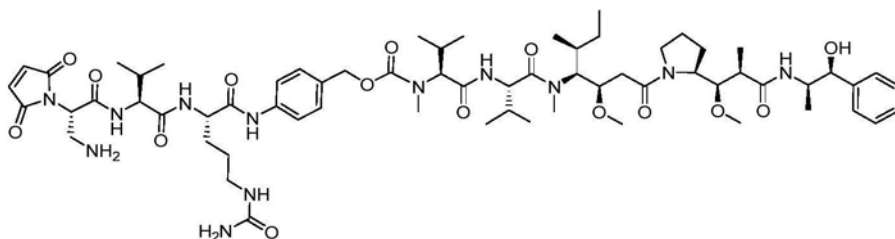
靶向肝癌:

	h25G5-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)				
细胞系	Comp. Ab (8)	Comp. Aa (8)	Comp. Ab (8)-Comp. Aa (8)	Comp. Ab (16)	Comp. Aa (16)
JHH-7	> 2000	45.0	16.7	125.9	13.7
Hep3B	45.1	36.4	8.0	40.4	9.4

靶向LIV-1:

	hLIV22-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)				
细胞系	Comp.Ac(8)	Comp.Aa(8)	Comp.Ac(8)- Comp.Aa (8)	Comp.Ac(16)	Comp.Aa(16)
SK-MEL-5	173.5	21.6	0.6	2.8	5.5

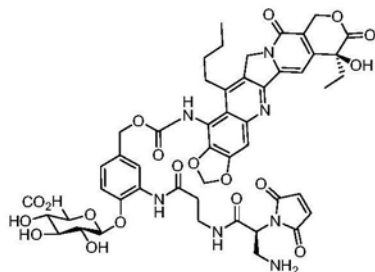
Comp.Ac (MDPr-vc-PABC-MMAE)



基于喜树碱和superdiox的共偶联物

1. MMAE/喜树碱偶联物靶向CD30

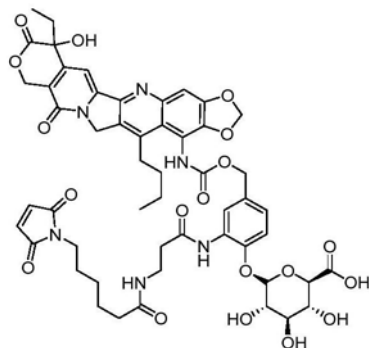
Comp Ad:



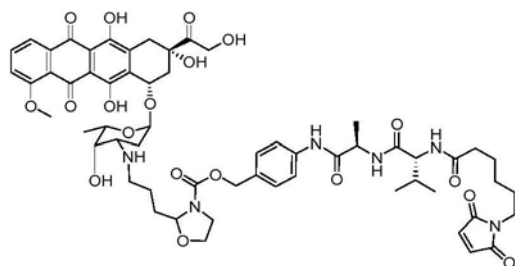
	cAC10-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)				
细胞系	CD30	MDR	Comp.Ab(8)	Comp.Ad(8)	Comp.Ad(8)- Comp.Ab(8)
DEL-BVR	212,000	8,000	> 2000	2.0	4.1
U-266luc + L540cy(1: 1)	-- (400,000)	--	3.9	> 1000	5.2

2. Superdiox/喜树碱偶联物靶向抗原1

Comp.Ae:



Comp.Af:

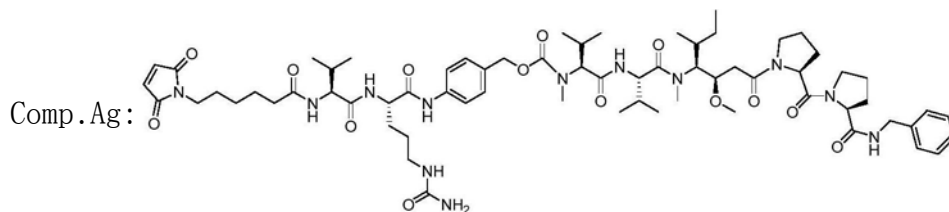


	抗体 1-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)		
细胞系	Comp.Ae(8)	Comp.Af(8)	Comp.Ae (8)-Comp.Af(8)
L428	649	280	49
L540cy	73	54	20
Raji	74	52	11

3.Superdox结合MMAE:

	抗体 1-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)		
细胞系	MMAE(8)	Comp.Af(8)	MMAE (8)-Comp.Af(8)
L428	456	280	62
HuH-7	131	173	28

尾海兔素10联合奥瑞他汀



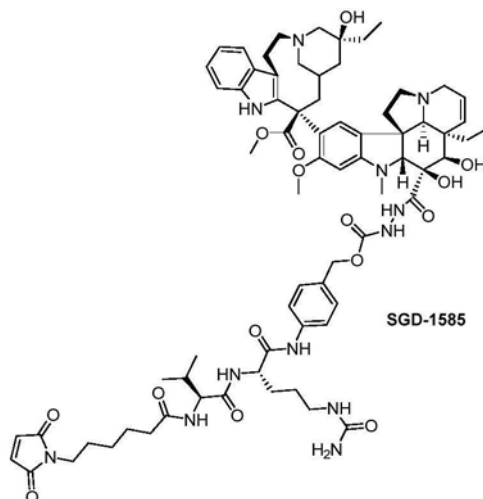
	抗体 1-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)		
细胞系	Comp.Ag(8)	Comp.Aa(8)	Comp.Ag (8)-Comp.Aa(8)
MDA-MB-231	> 2000	20	7

	抗体 1-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)		
细胞系	Comp.Ag(8)	MMAE(8)	Comp.Ag(8)-MMAE(8)
L428	> 2000	456	32

长春碱/奥瑞他汀共偶联

靶向 CD19

Comp.Ah:



		hBU12-链接组装单元 Aa-偶联物(x50 ng / mL)				
细胞系	CD19	Comp.Aa(8)	Comp.Ab(8)	Comp.Ah (8)	Comp.Aa (8)- Comp.Ab(8)	Comp.Aa (8)- Comp.Ah (8)
Raji	100k	33	80	97	3	5
RL	27k	4	340	60	1	2
Nalm-6	70k	8	5	9	2	3
WSU-DLCL2	30k	6	10	7	1	2

靶向抗原1

抗体 1-链接组装单元 Aa-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)			
细胞系	Comp.Aa(8)	Comp.Ah (8)	Comp.Aa (8)-Comp.Ah(8)
HuH-7	8	> 2000	3
MDA-MB-231	20	1860	11

实施例9:体外耐药性测定

[0286] 使用两种不同的测定来评估双奥瑞他汀ADC是否更有效地限制ADC抗性细胞的生长:慢性暴露测定或集落形成测定。使用抗原特异性双奥瑞他汀ADC对JHH-7 (肝癌细胞) 或MCF-7 (LIV-1阳性) 细胞进行该分析。尽管使用Cell Titer Glo细胞增殖试验与16-负载的mcMMAF ADC提供类似的IC₅₀值,但靶向肝癌细胞的双奥瑞他汀偶联物在限制抗性细胞的生长方面更有效。与单药物ADC相比,靶向MCF-7细胞上的LIV-1抗原的双奥瑞他汀ADC也允许较少的抗性集落生长。

慢性暴露试验

[0287] 对于慢性暴露测定,将1000万个细胞接种在适当细胞培养基中的T225烧瓶中。以100ng/mL的浓度添加ADC。每四天更换一次含有新ADC的培养基。15天后,用PBS洗涤细胞,用3.7%多聚甲醛固定,然后用0.5%结晶紫溶液染色。然后计数剩余细胞集落(>5个细胞)的

数量。

h25G5 ADC的结果:

治疗 h25G5-链接组装 单元 Aa (8)-	细胞滴度 Glo IC ₅₀	集落
-Comp.Ab(16)	124	≈ 5800
-Comp.Aa(16)	14	≈ 2500
-Comp.Aa (8)- Comp.Ab(8)	17	≈ 650

上面提供的表格中的数据在图13中以图形方式示出。

集落形成试验:

[0288] 为了测试靶向肝癌细胞的ADC, JHH-7肝癌细胞 (以每孔1000个细胞的密度接种在6孔组织培养板中)。将ADC以50ng/mL的浓度添加至细胞48小时。此时, 去除培养基并用PBS洗涤细胞。加入新鲜培养基, 使细胞恢复7-9天。然后用PBS洗涤细胞, 用3.7%多聚甲醛固定, 用0.5%结晶紫染色, 然后计数。每种条件在N=2下进行。

[0289] 为了测试靶向LIV-1的ADC, 将MCF-7乳腺癌细胞 (ATCC) 以每孔10,000个细胞的密度接种在6孔组织培养板中。将ADC以100ng/mL的浓度添加至细胞48小时。此时, 去除培养基并用PBS洗涤细胞。加入新鲜培养基, 使细胞恢复7-9天。然后用PBS洗涤细胞, 用3.7%多聚甲醛固定, 用0.5%结晶紫染色, 然后计数。每种条件在N=2下进行。

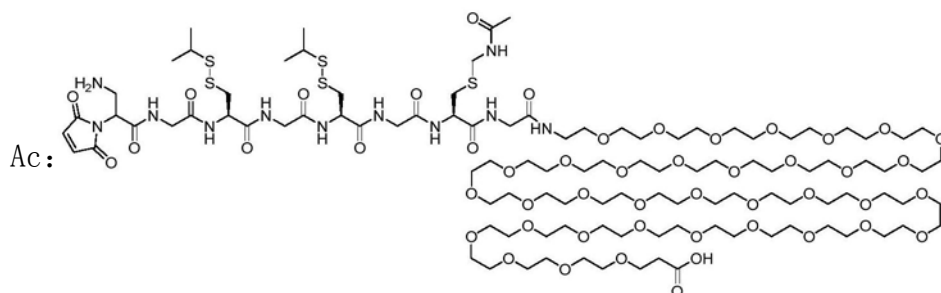
治疗 h25G5-链接组装 单元 Aa (8)-	细胞滴度 Glo IC ₅₀	集落形成 单元
未处理	--	178.5
-Comp.Ab(16)	124	118.5
-Comp.Aa(16)	14	48
-Comp.Aa (8)- Comp.Ab(8)	17	14.5

治疗 hLIV22-链接组装 单元 Aa (8)-	集落形成 单元
未处理	91
-MMAE(16)	42.5
-Comp.Aa(16)	26
-Comp.Aa(8)- MMAE(8)	19.5

上表中提供的数据分别在图14和15中以图形方式示出。

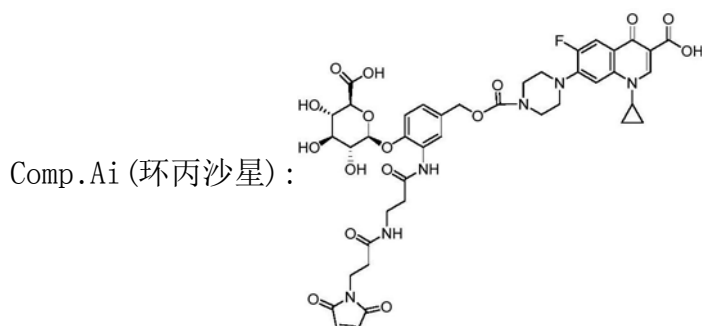
实施例10:载有3个半胱氨酸的药物载体,用于16+8载药量:

链接组装单元

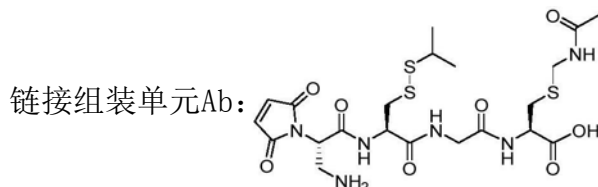


cAC10链接组装单元Ac (8)-Comp.Ai (16)-Comp.Ah (8) 的制备:

[0290] 除了25当量TCEP用于还原-SiPr基团,使用与带有单个Cys (SiPr) 残基的载体的双重偶联相同的程序。表征数据显示在图16A和16B中。

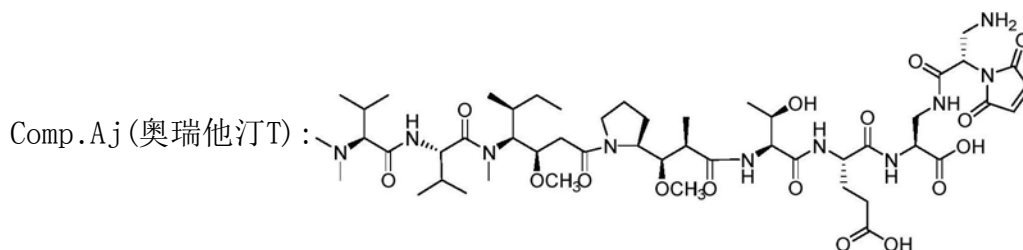


实施例11:携带亲水性药物的双重偶联物不需要PEG臂。

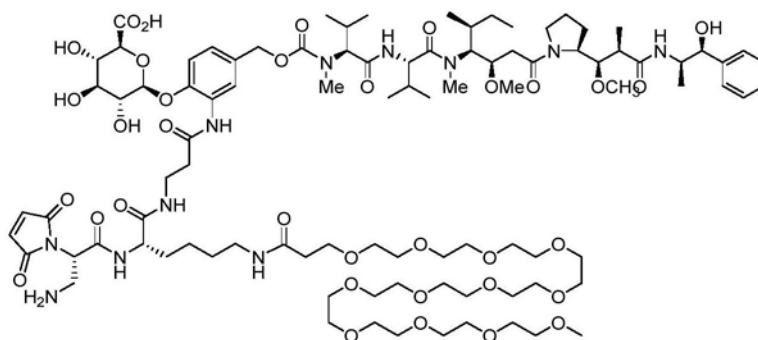


预期精确质量:593.1;观察到 m/z :593.2 (M+H)⁺, LC-MS t_R =0.68min。

[0291] 将保护基团(-S-iPr和-CH₂-NH-C(=O)CH₃)单独去除,并将所需的药物基团连接在上面所示的链接组装单元中。如上所述,遵循相同的程序制备双重偶联物。将Comp.Aj和Comp.Ak掺入到链接组装单元Ab和抗体L49制备的共偶联物的分析数据显示在图17A-E中。



Comp.Ak (MMAE) :



实施例12: 靶向MFI2 (p97) 的L49抗体上的双奥瑞他汀ADC的体外细胞毒性

[0292] 使用与上述类似的方法测试各种双奥瑞他汀ADC的体外细胞毒活性。结果如下表所示。

L49-链接组装单元Ab (8) -ADCS

细胞系	L49-链接组装单元 Ab-偶联物(IC ₅₀ , 以 ng / mL 计)							
	Comp. Ak(8)	Com.Ak (16)	Comp.Aj (8)	Comp.Aj (16)	Comp.Aa (8)	Comp.Aa (16)	Comp.Aj (8)- Comp.Ak(8)	Comp.Aa (8)- Comp.Ak(8)
A375	43.9	13.5	7.7	2.4	9.7	2.5	1.3	2.4
IGR37	2.2	0.9	1.5	0.5	2.5	1.5	0.06	0.8
Colo-853	27.4	13.3	5.2	1.6	7.8	5.2	3.5	4.8

参考文献:

[1] R.P.Lyon, J.R.Setter, T.D.Bovee, S.O.Doronina, J.H.Hunter, M.E.Anderson, C.L.Balasubramanian, S.M.Duniho, C.I.Leiske, F.Li, P.D.Senter, Nat.Biotechnol.2014,32,1059-1062.

[2] S.O.Doronina, B.E.Toki, M.Y.Torgov, B.A.Mendelsohn, C.G.Cerveny, D.F.Chace, R.L.DeBlanc, R.P.Gearing, T.D.Bovee, C.B.Siegall, J.A.Francisco, A.F.Wahl, D.L.Meyer, P.D.Senter, Nat.Biotechnol.2003,21,778-784.

[3] S.O.Doronina, B.A.Mendelsohn, T.D.Bovee, C.G.Cerveny, S.C.Alley, D.L.Meyer, E.Oflazoglu, B.E.Toki, R.J.Sanderson, R.F.Zabinski, A.F.Wahl, P.D.Senter, Bioconjug.Chem.2006,17,114-124.

[4] A.F.Wahl, K.Klussman, J.D.Thompson, J.H.Chen, L.V.Francisco, G.Risdon, D.F.Chace, C.B.Siegall, J.A.Francisco, Cancer Res.2002,62,3736-3742.

[5] R.P.Lyon, D.L.Meyer, J.R.Setter, P.D.Senter, Methods Enzymol.2012,502,123-138.

[6] T.S.Lewis, K.Gordon, F.Li, A.Weimann, R.Bruders, J.Miyamoto, N.M.Okeley, X.Zhang, D.Chace, C.-L.Law, Cancer Res.2014,74,688-688.

[7] F.Li, K.K.Emmerton, M.Jonas, X.Zhang, J.B.Miyamoto, J.R.Setter, N.D.Nicholas, N.M.Okeley, R.P.Lyon, D.R.Benjamin, C.L.Law, Cancer Res.2016.

[0293] 尽管为了清楚和理解的目的已经通过说明和实施例详细地描述了前述内容,但是本领域技术人员将理解,可以在所附权利要求的范围内实施某些改变和修改。另外,本文提供的每篇参考文献通过引用整体并入本文,其程度如同每篇参考文献通过引用单独并入。

序列表

<110> 西雅图基因公司

<120> 多药抗体药物偶联物

<130> 4200-00111PC

<150> 62/434,333

<151> 2016-12-14

<150> JP 2017-115832

<151> 2017-06-13

<160> 10

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

```

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
           20           25           30
Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
           35           40           45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65           70           75           80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
           85           90           95
Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
           100          105          110
Val Thr Val Ser Ala
           115

```

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15

```

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr	Ile Asn Cys Arg	Ala Ser Lys Ser	Val Ser Thr Ser
20	25	30	
Gly Tyr Ser Phe	Met His Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Gly Gln Pro Pro
35	40	45	
Lys Leu Leu Ile	Tyr Leu Ala Ser	Asn Leu Glu Ser	Gly Val Pro Asp
50	55	60	
Arg Phe Ser Gly	Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Phe Thr	Leu Thr Ile Ser
65	70	75	80
Ser Leu Gln Ala	Glu Asp Val Ala	Val Tyr Tyr Cys	Gln His Ser Arg
85	90	95	
Glu Val Pro Trp	Thr Phe Gly Gln	Gly Thr Lys Val	Glu Ile Lys Arg
100	105	110	

<210> 5

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 5

Gln Val Gln Leu	Gln Glu Ser Gly	Pro Gly Leu Val	Lys Pro Ser Gln
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu	Thr Cys Thr Val	Ser Gly Gly Ser	Ile Ser Thr Ser
20	25	30	
Gly Met Gly Val	Gly Trp Ile Arg	Gln His Pro Gly	Lys Gly Leu Glu
35	40	45	
Trp Ile Gly His	Ile Trp Trp Asp	Asp Asp Lys Arg	Tyr Asn Pro Ala
50	55	60	
Leu Lys Ser Arg	Val Thr Ile Ser	Val Asp Thr Ser	Lys Asn Gln Phe
65	70	75	80
Ser Leu Lys Leu	Ser Ser Val Thr	Ala Ala Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr
85	90	95	
Cys Ala Arg Met	Glu Leu Trp Ser	Tyr Tyr Phe Asp	Tyr Trp Gly Gln
100	105	110	
Gly Thr Leu Val	Thr Val Ser Ser		
115	120		

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 6

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1			5					10					15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
		20						25				30			
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
	35						40				45				
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
65				70					75					80	
Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Val	Tyr	Pro	Phe	Thr
			85					90						95	
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg					
		100						105							

<210> 7

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 7

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1			5					10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
		20						25				30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
	35						40				45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70					75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115						120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160

Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
					165				170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
					180				185					190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
					195				200					205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
									210					215	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
									225					230	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
									235					240	
									245					250	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
									255					260	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
									265					270	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
									275					280	
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
									285					290	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					295	
									300					305	
									310					315	
									320					325	
									325					330	

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 8

Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
1				5					10					15	
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
									20					25	
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
									30					35	
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
									40					45	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
65									50					55	
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
									60					65	
									70					75	
									80					85	
									90					95	

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 111

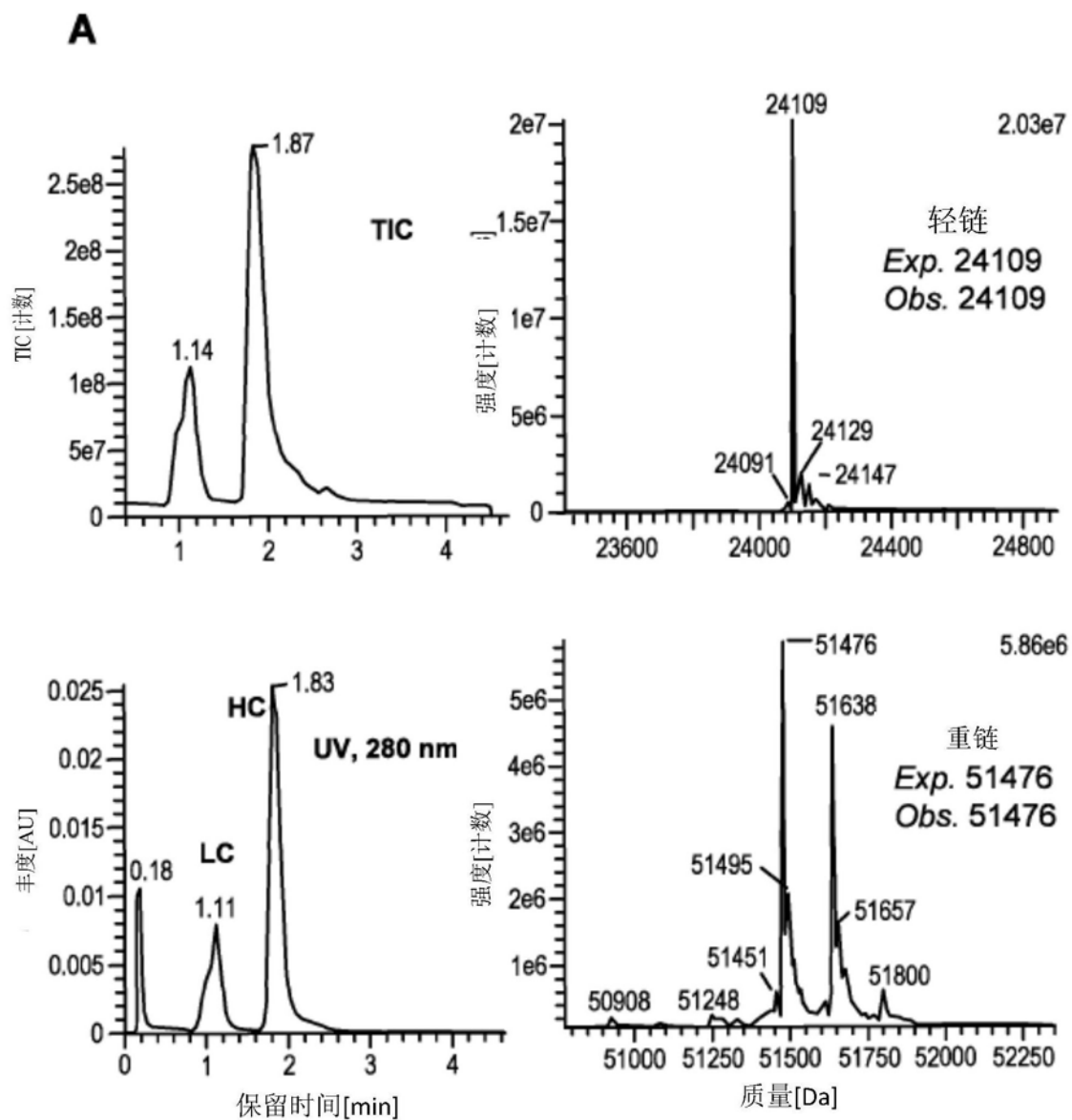
<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

				85					90					95			
Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
				100					105					110			



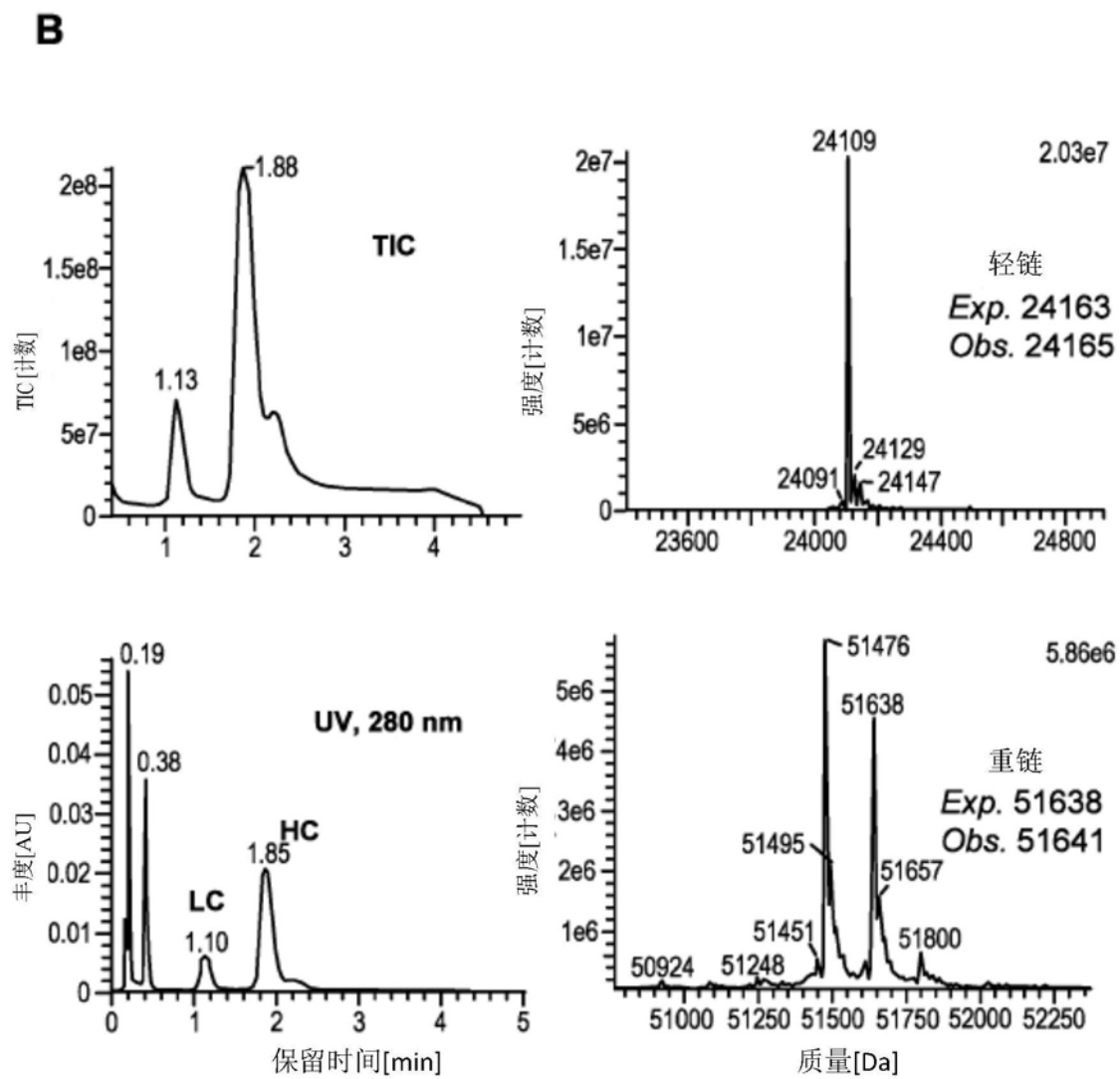


图1

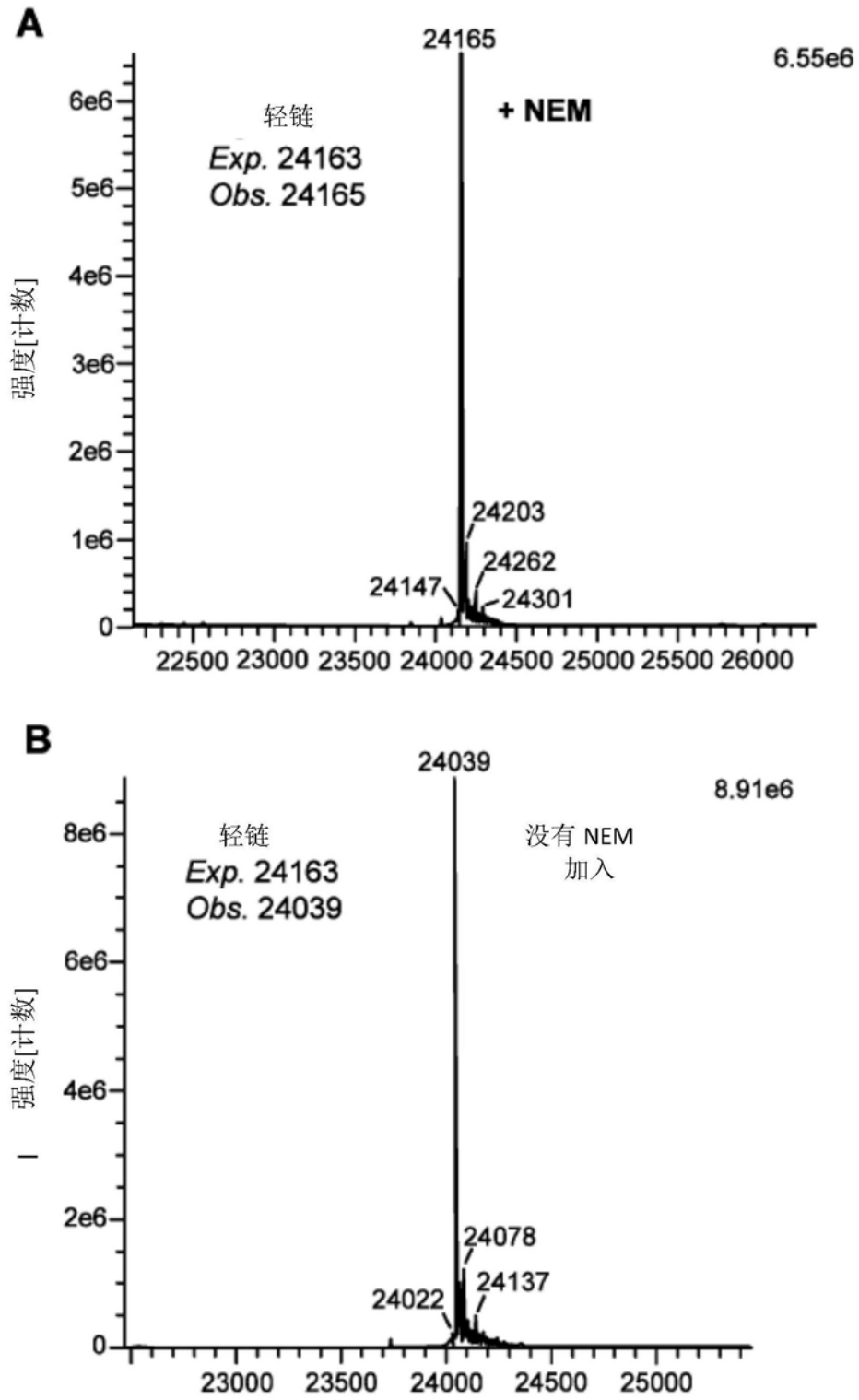


图2

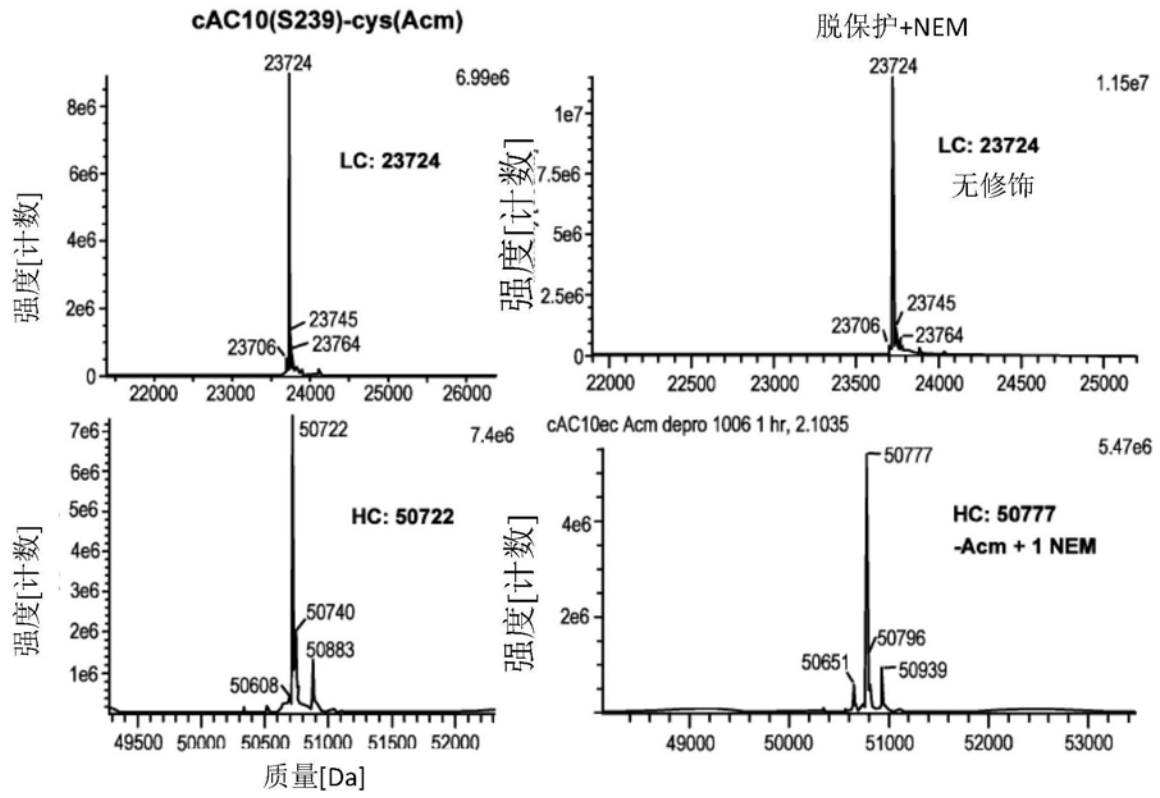


图3

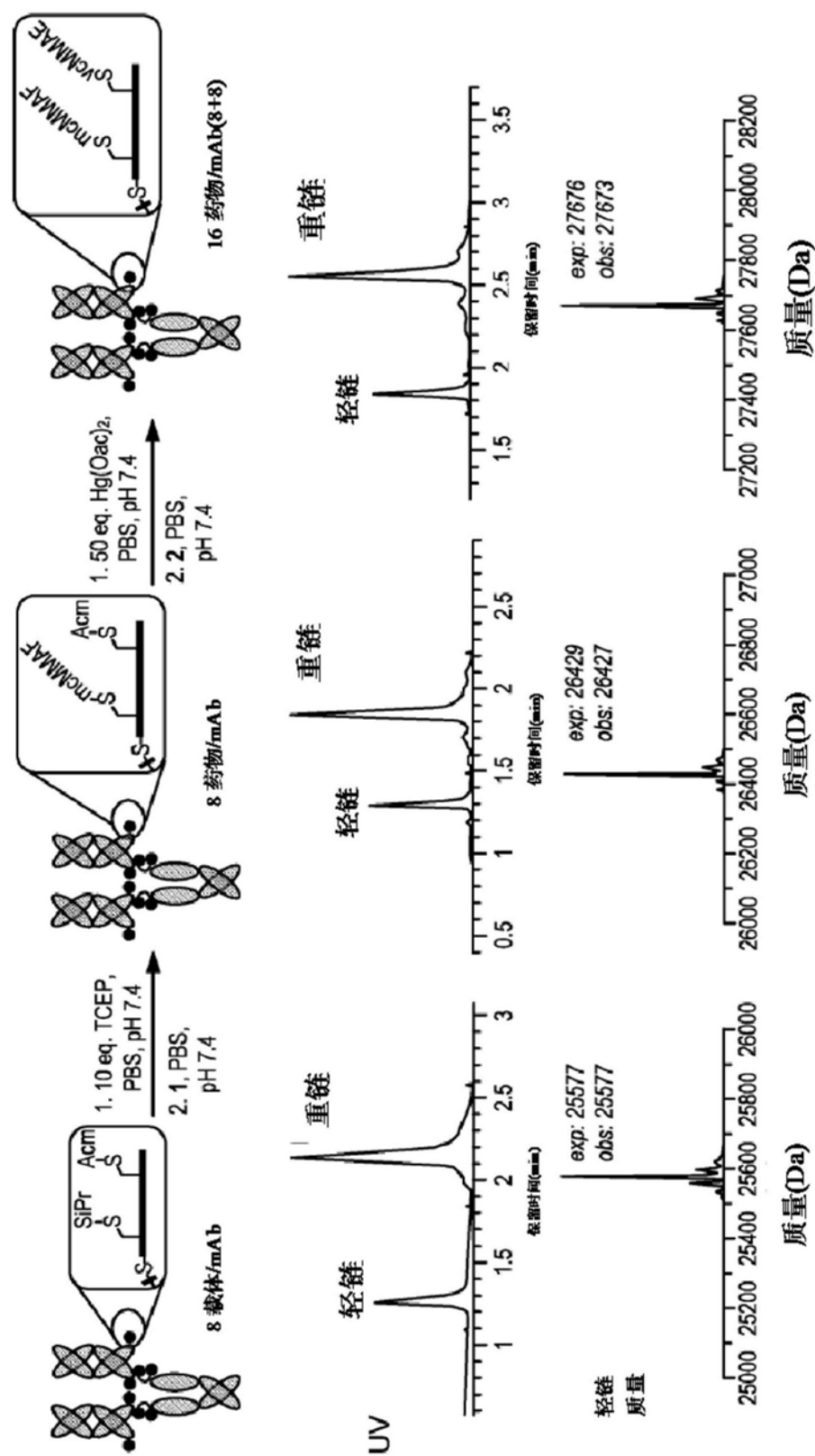


图4

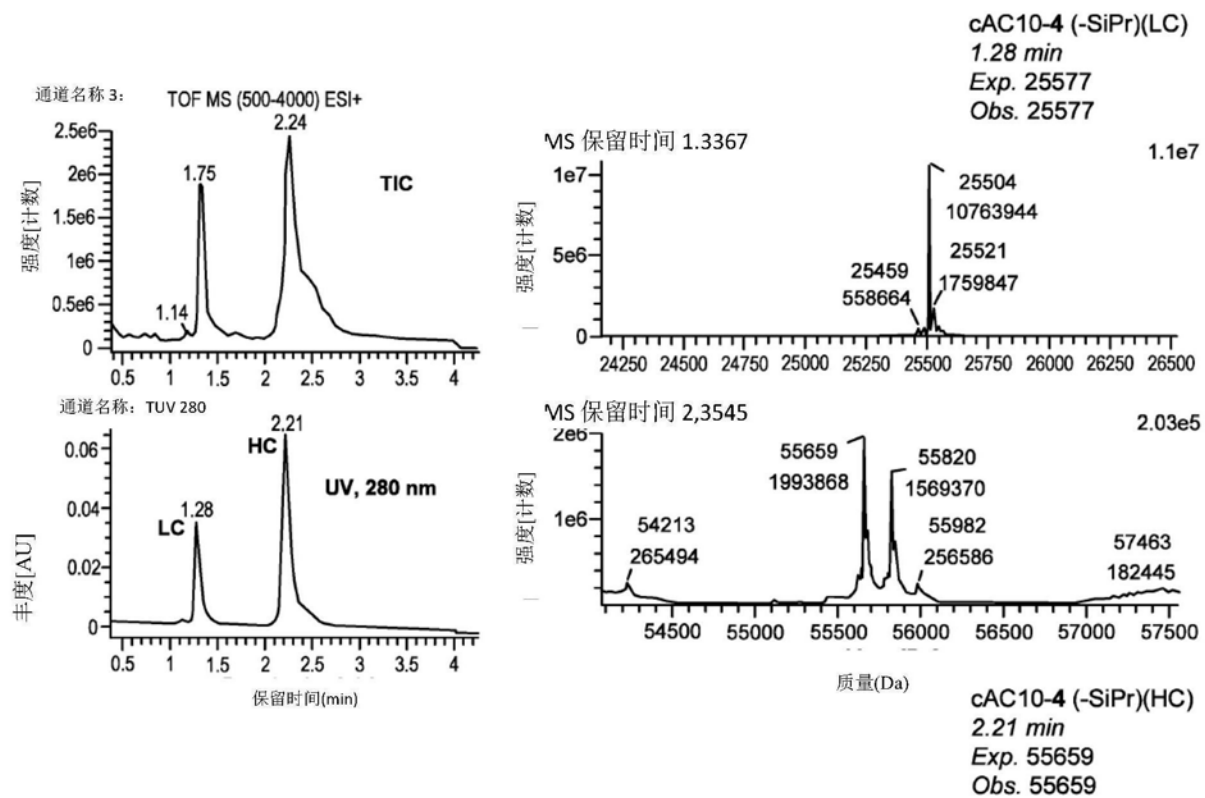


图5

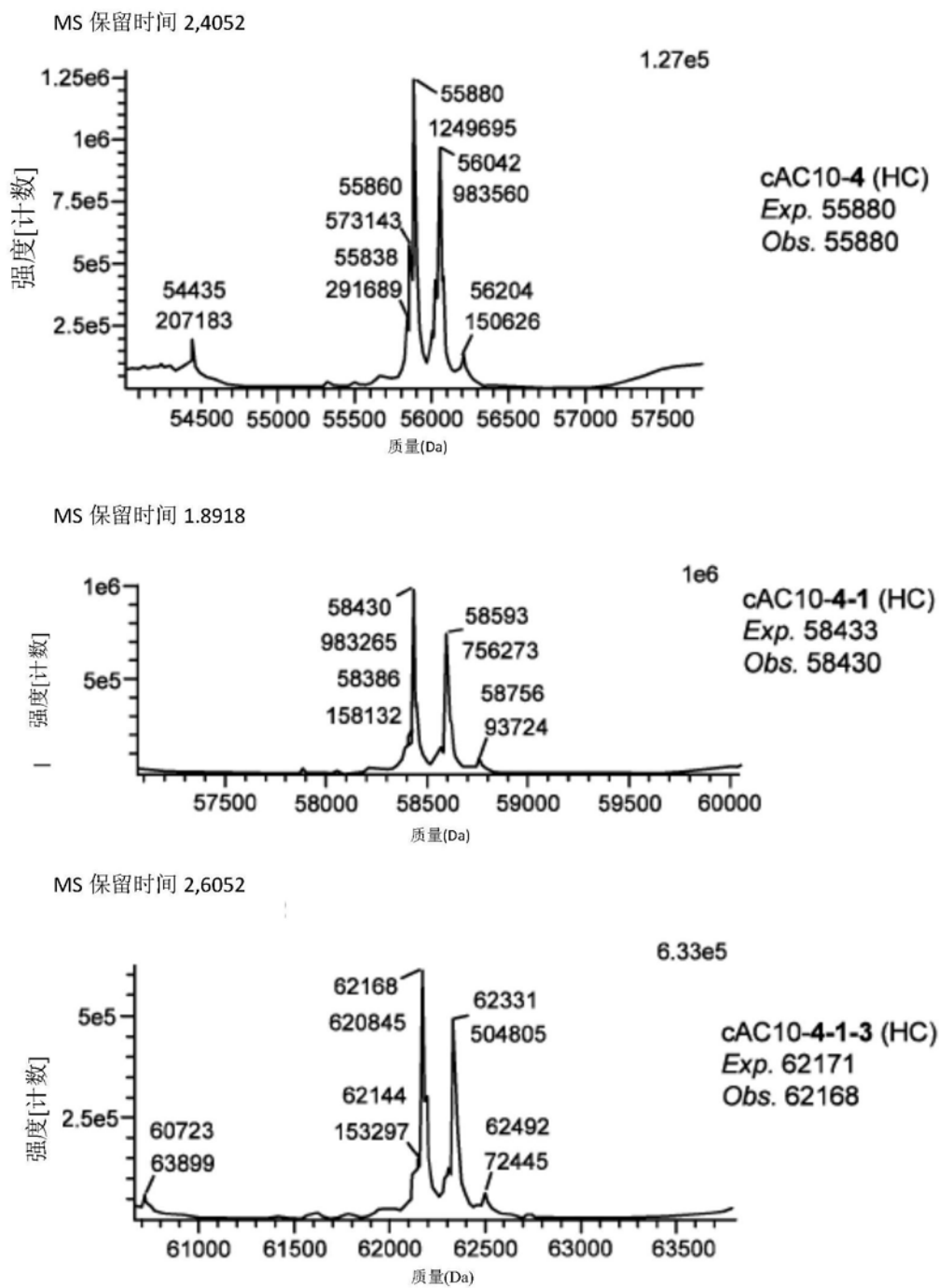


图6

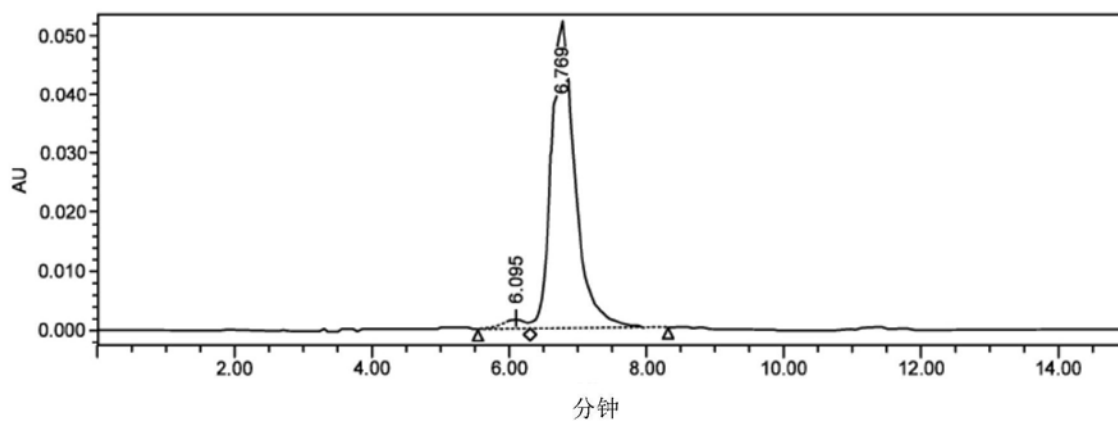


图7

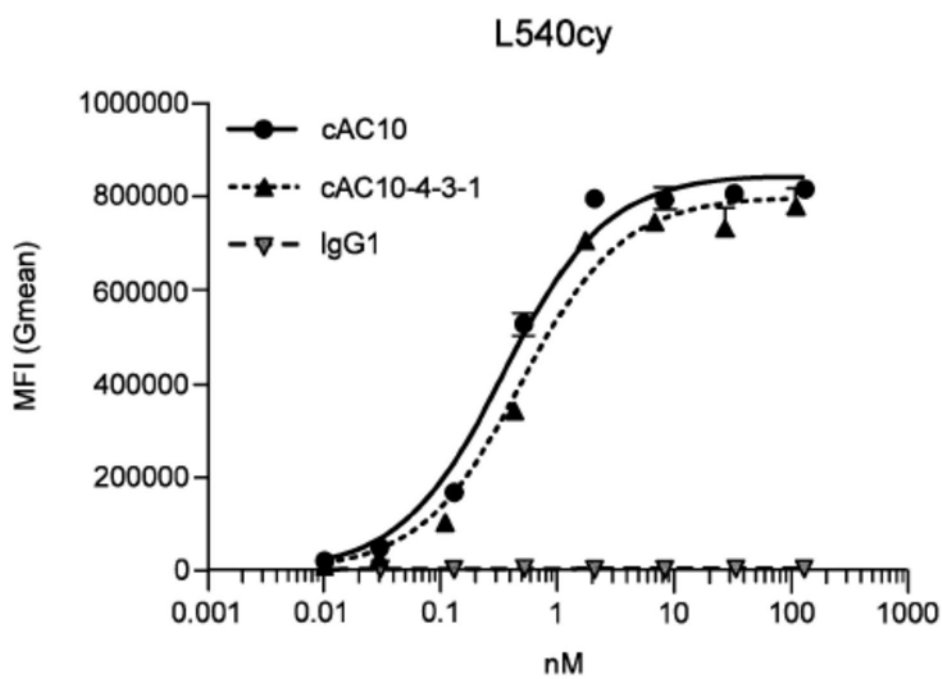
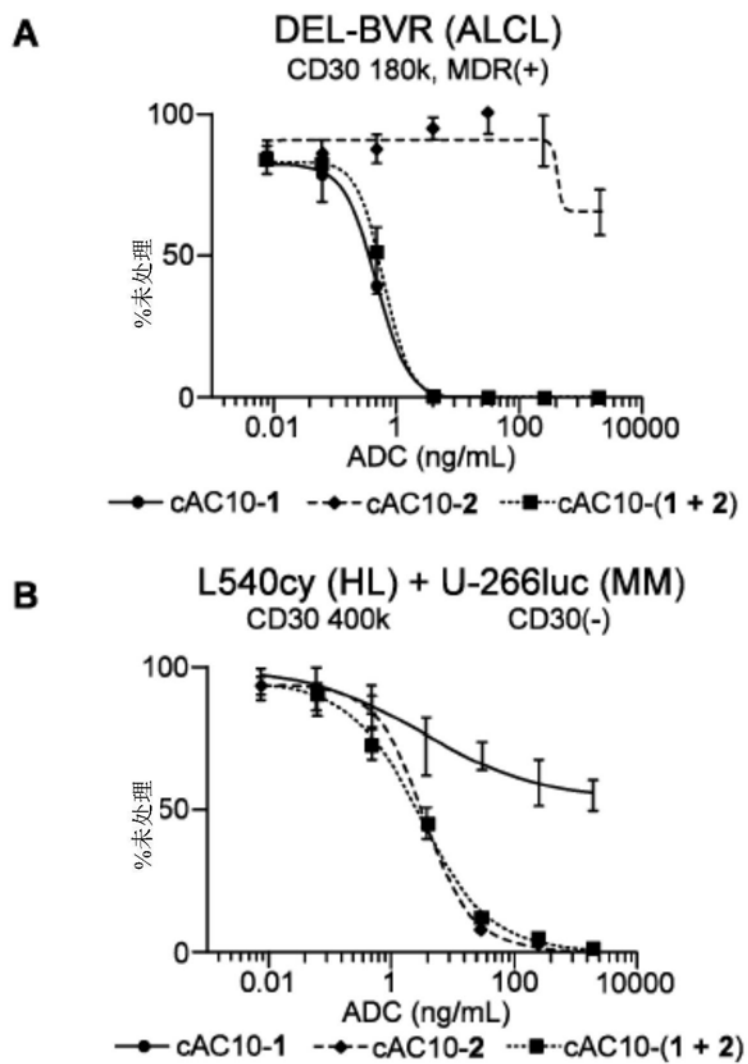


图8



ADC	L540cy CD30(+) MDR(-) HL	DEL CD30(+) MDR(-) ALCL	DEL-BVR CD30(+) MDR(+) ALCL	L540cy + U-266luc 旁观者 模型	U-266luc CD30(-) 多发性 骨髓瘤
cAC10-1	0.6	0.5	1.0	>1000	>1000
cAC10-2	2.3	1.4	>2000	3.9	>1000
cAC10-(1+2)	0.5	0.3	0.8	3.9	>1000

图9

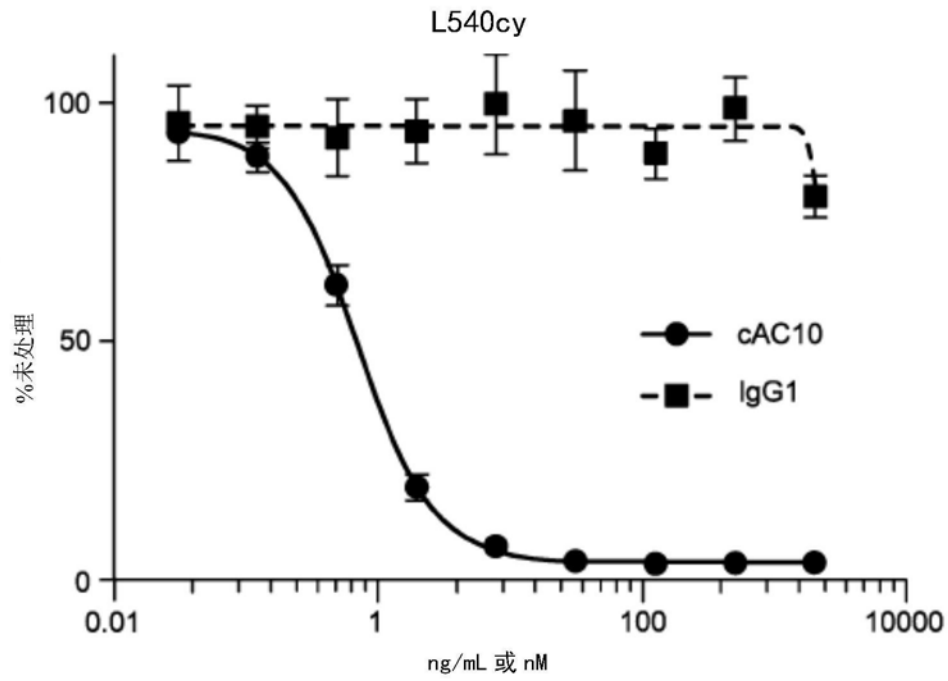


图10

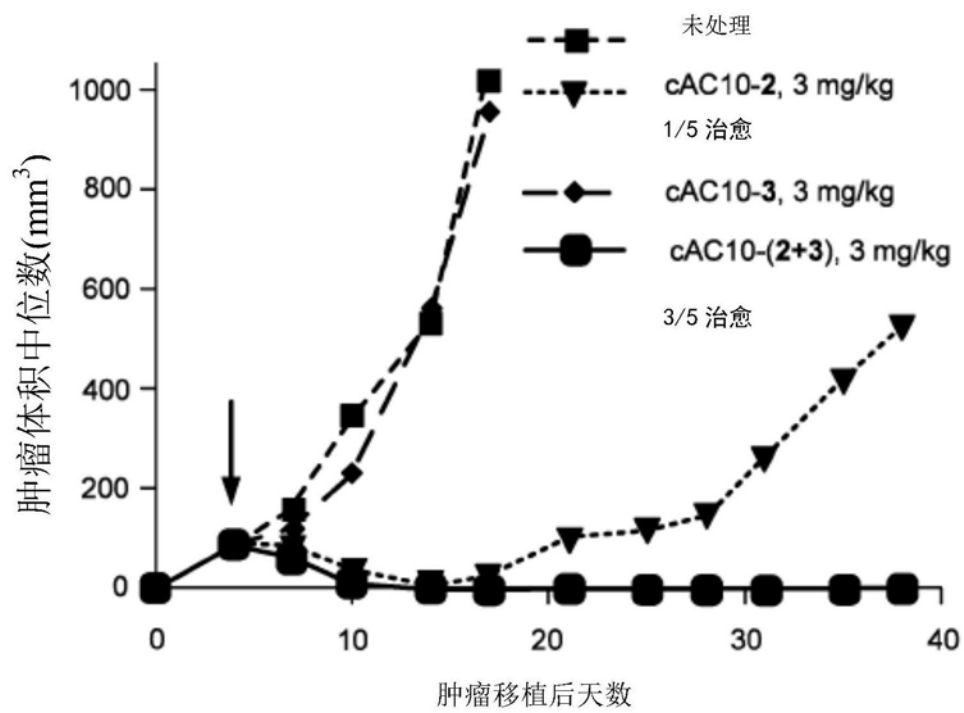


图11

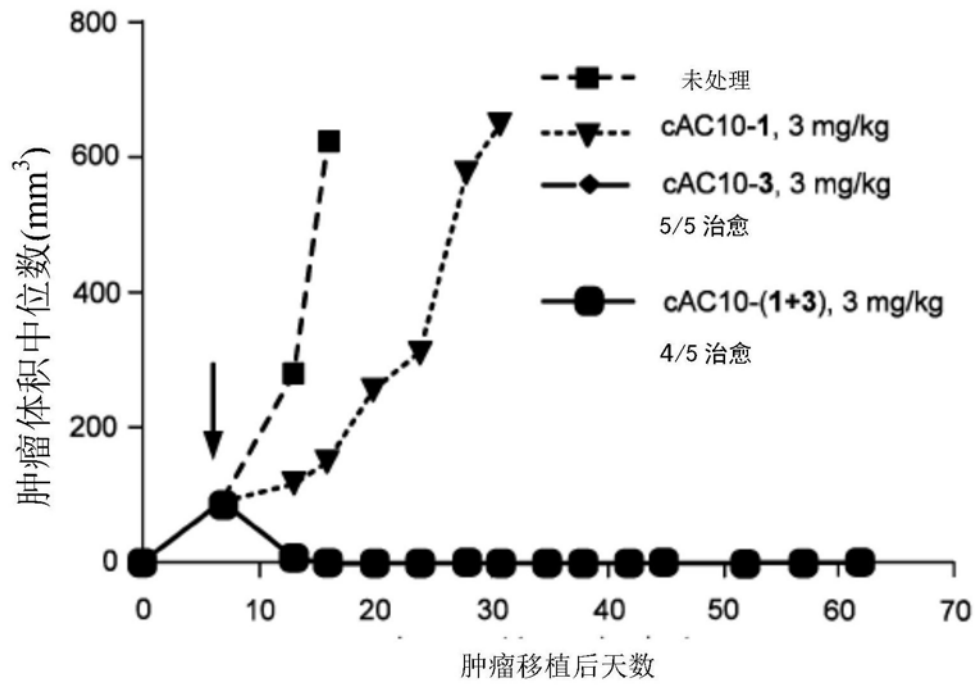


图12

JHH-7 慢性治疗

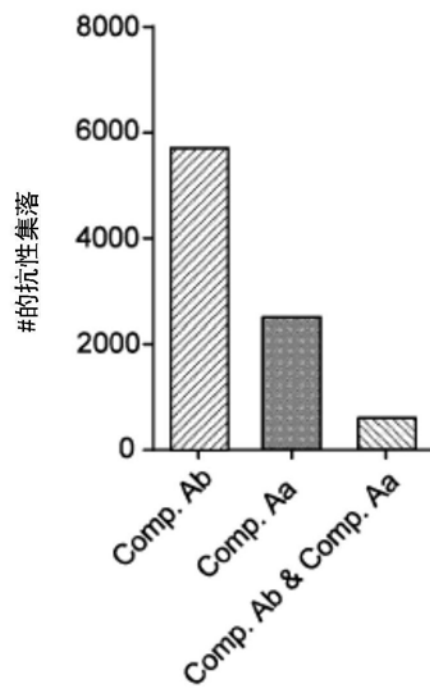


图13

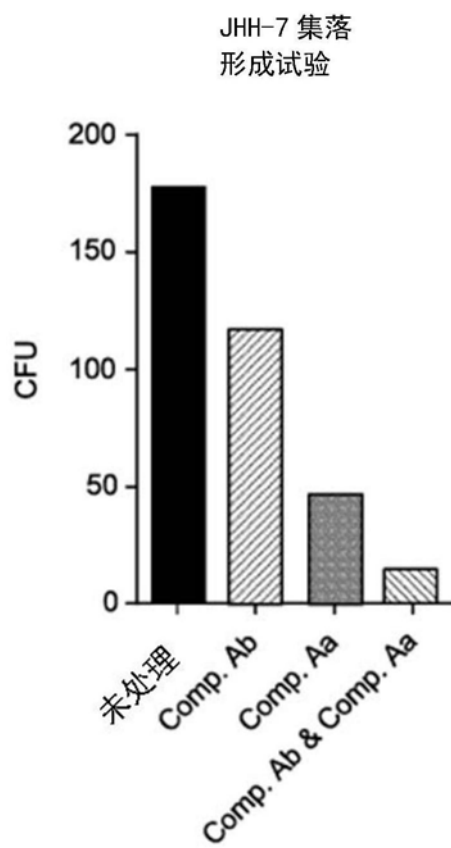


图14

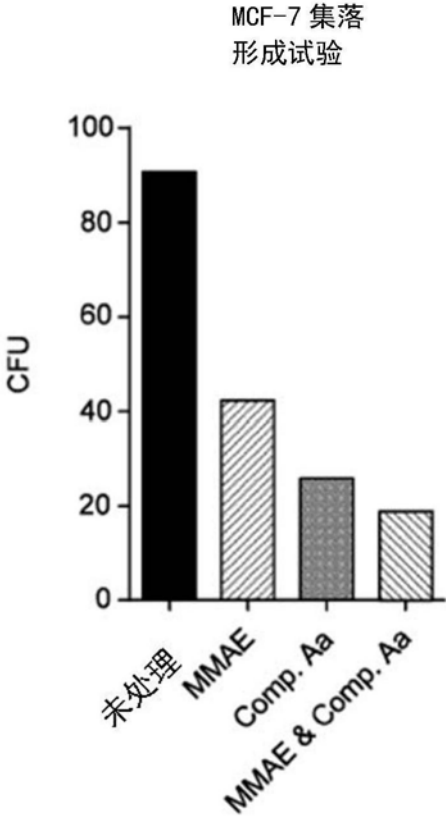


图15

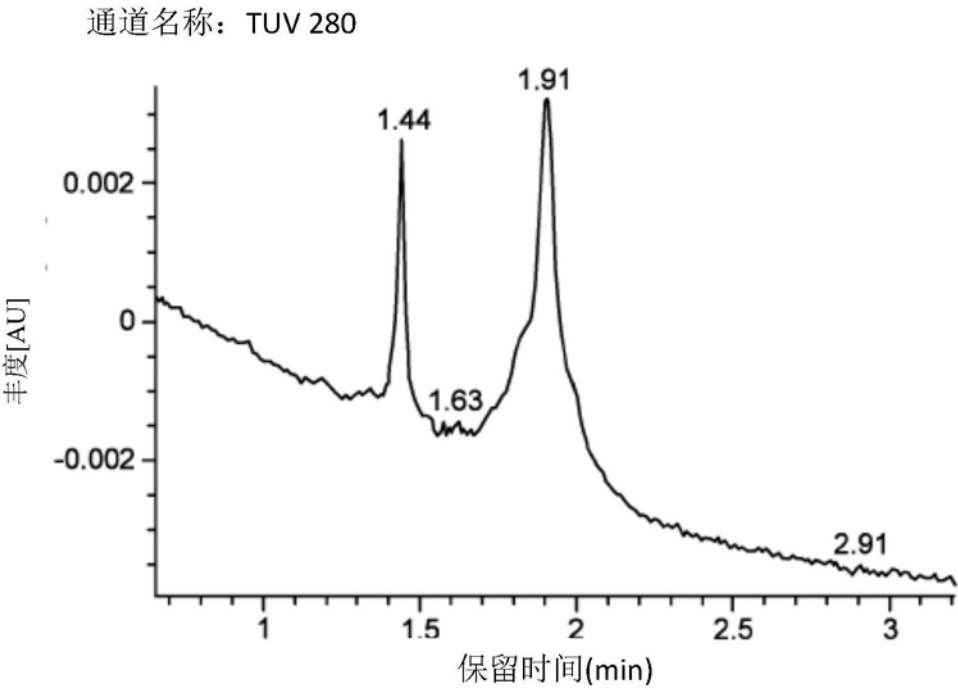


图16A

最大 Ent1:合计的: 平均时间 1.4859 分钟: :1: TOF MS(500-4000) ESI+ 8.52e5

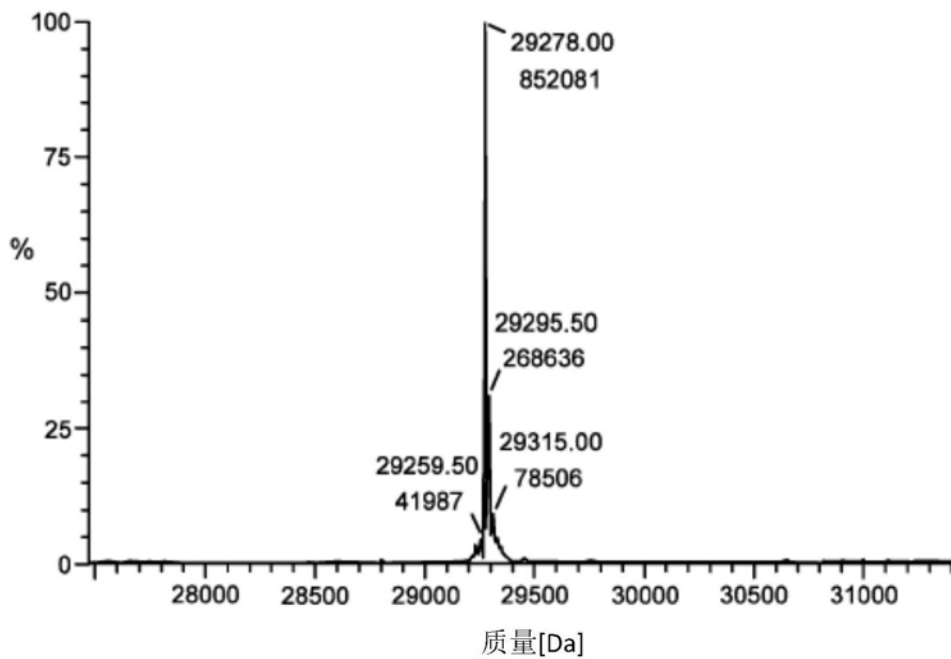


图16B

项目名称: HL49-6248-4830-5088 DC
通道名称: TUV 280

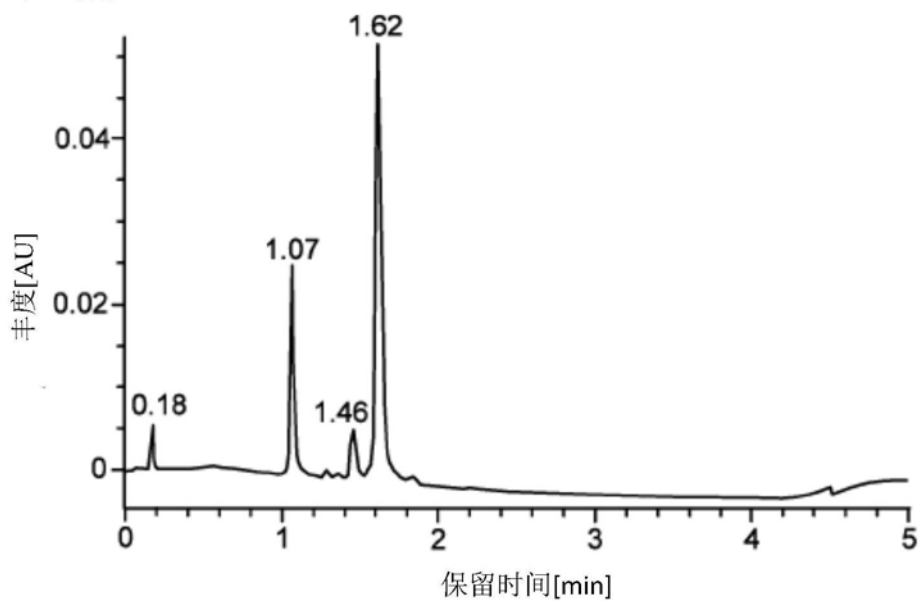


图17A

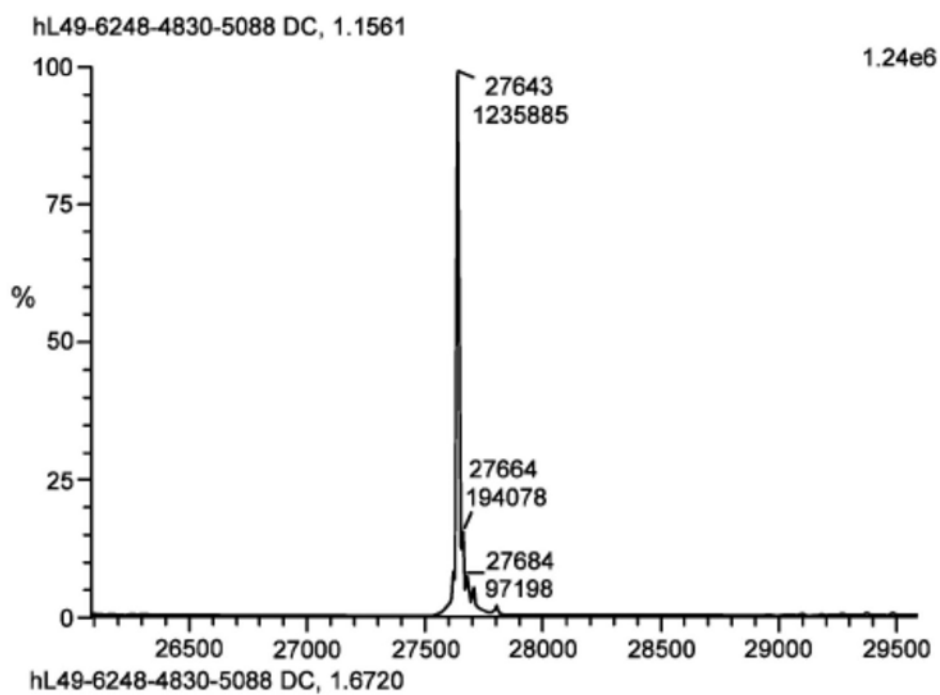


图17B

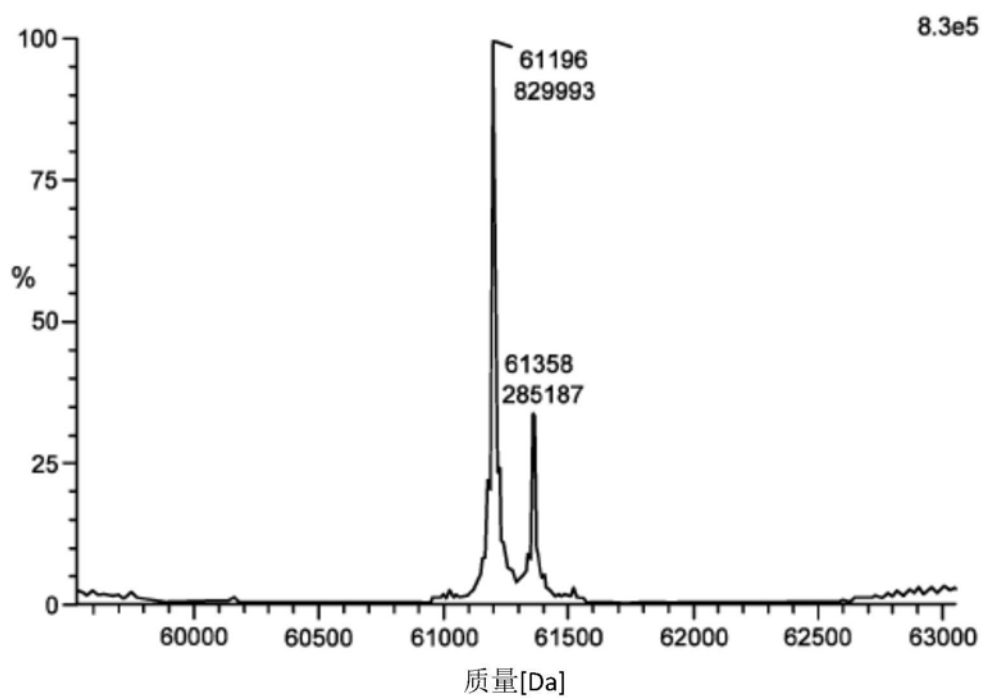


图17C

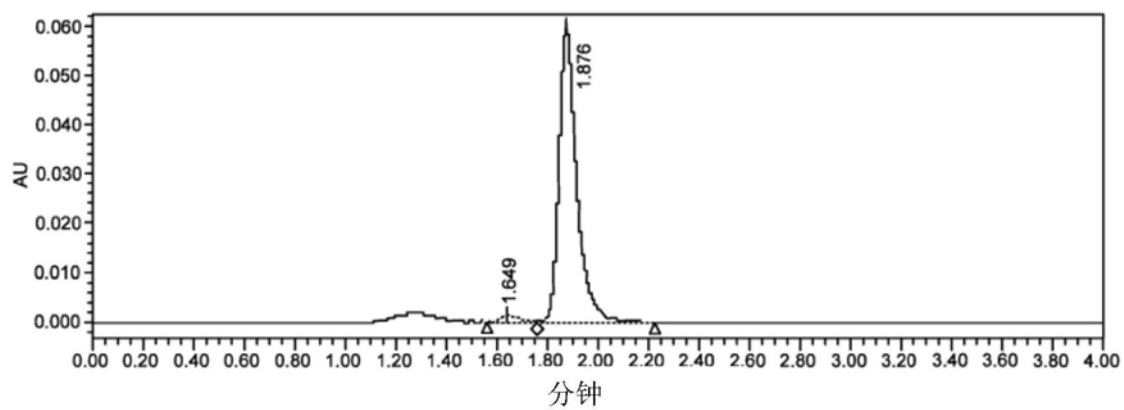


图17D

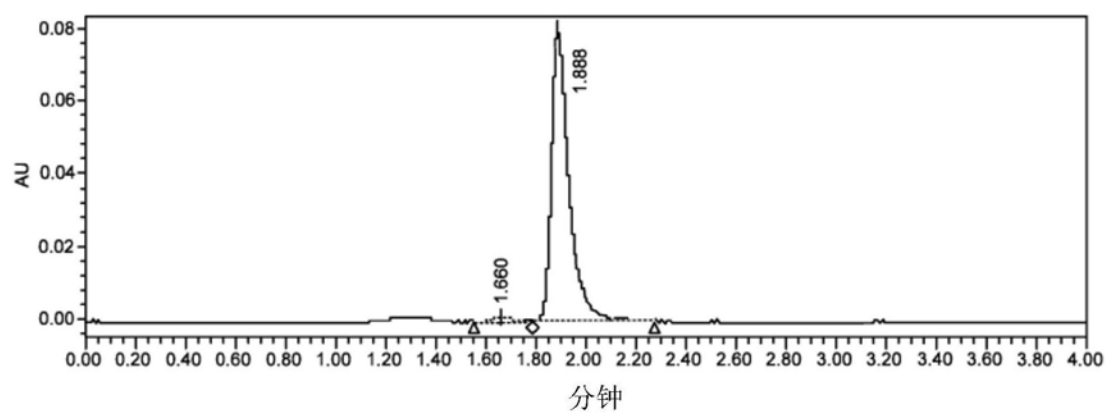


图17E