



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105848685 B

(45) 授权公告日 2020.09.22

(21) 申请号 201480068353.3

(22) 申请日 2014.12.16

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105848685 A

(43) 申请公布日 2016.08.10

(30) 优先权数据  
61/916,675 2013.12.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.06.15

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/070493 2014.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02015/095124 EN 2015.06.25

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司  
地址 美国加利福尼亚州  
专利权人 麦迪穆有限责任公司

(72) 发明人 约翰·弗吕加勒  
珍妮特·贡斯纳尔-托斯特  
托马斯·皮洛 布赖恩·萨菲纳

维萨·维尔马 魏彬庆 赵桂玲  
利安娜·施塔本  
菲利普·威尔逊·霍华德  
卢克·马斯特森

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240  
代理人 张英 宫传芝

(51) Int.Cl.  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/5517 (2006.01)  
A61K 31/4015 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2013177055 A2, 2013.11.28  
WO 2013041606 A1, 2013.03.28  
CN 103998450 A, 2014.08.20  
CN 102933236 A, 2013.02.13  
WO 2011130598 A1, 2011.10.20

审查员 高玉婕

权利要求书10页 说明书82页 附图3页

### (54) 发明名称

拟肽化合物及其抗体药物偶联物

### (57) 摘要

本发明涉及拟肽接头及其抗体药物偶联物、包含它们的药物组合物以及它们在癌症的预防或治疗中的用途。

1. 式 (I) 表示的抗体药物偶联物

$\text{Ab}-(\text{L}-\text{D})_p$ ,

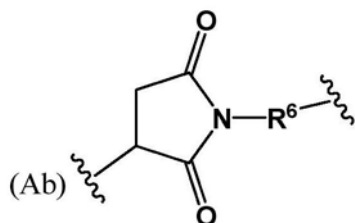
Ab 是抗体;

L 是下式表示的拟肽接头

$-\text{Str}-(\text{PM})-\text{Sp}-$

其中

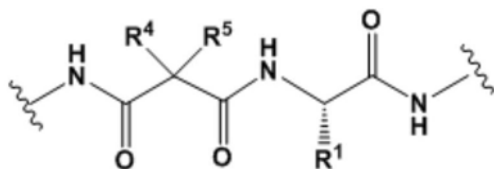
Str 是与 Ab 共价连接的延伸物单元并且是下式表示的化学部分:



其中  $\text{R}^6$  选自由  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  亚烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  烯基、 $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$  环烷基、 $(\text{C}_1$ - $\text{C}_8$  亚烷基)  $\text{O}-$  和  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  亚烷基- $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^a)-\text{C}_2$ - $\text{C}_6$  亚烷基组成的组, 其中每个亚烷基可以被一个至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、 $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$  环烷基、 $\text{C}_4$ - $\text{C}_7$  杂环烷基、杂芳烷基和杂芳基组成的组的取代基取代, 每个  $\text{R}^a$  独立地是 H 或  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷基;

$\text{Sp}$  是与药物部分共价连接的  $-\text{Ar}-\text{R}^b-$ , 其中 Ar 是芳基或杂芳基,  $\text{R}^b$  是  $(\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  亚烷基)- $\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ;

PM 是下式的非肽化学部分:

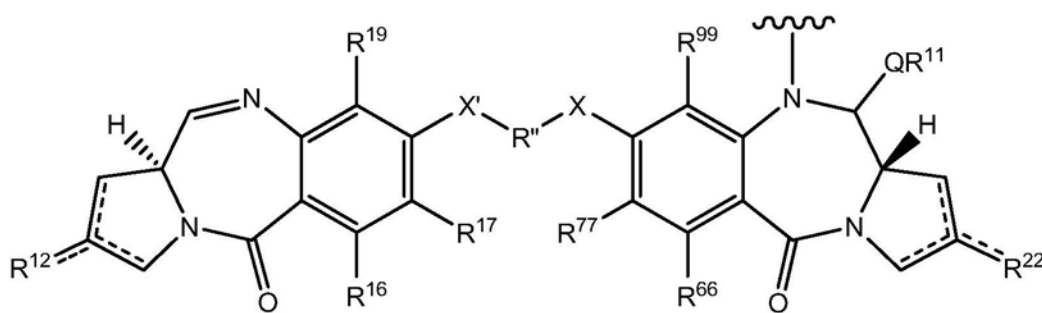


$\text{R}^1$  是  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  烯基、 $(\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  烷基)  $\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$  或  $(\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$  烷基)  $\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ ;

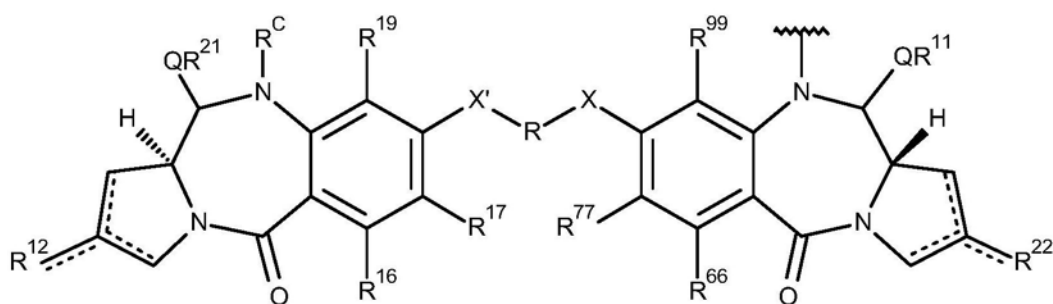
$\text{R}^4$  和  $\text{R}^5$  一起形成  $\text{C}_3$ - $\text{C}_7$  环烷基环;

p 是 1 到 8 的整数;

D 是式 A 或式 B 的药物部分



A



B

以及其盐和溶剂化物,其中:

波浪线表示与所述接头的共价连接位点；

虚线表示在C1和C2或C2和C3之间任选存在双键；

$R^{22}$ 独立地选自H、OH、=O、=CH<sub>2</sub>、CN、R<sup>m</sup>、OR<sup>m</sup>、=CH-R<sup>D</sup>、=C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>、O-SO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>和COR<sup>m</sup>,并且任选地还选自卤代或二卤代,其中R<sup>D</sup>独立地选自R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>、COR<sup>m</sup>、CHO、CO<sub>2</sub>H和卤代;

$R^{66}$ 和 $R^{99}$ 独立地选自H、 $R^m$ 、OH、 $OR^m$ 、SH、 $SR^m$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^m$ 、 $NR^mR^p$ 、 $NO_2$ 、 $Me_3Sn$ 和卤代；

$R^{77}$ 独立地选自H、 $R^m$ 、OH、 $OR^m$ 、SH、 $SR^m$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^m$ 、 $NR^mR^p$ 、 $NO_2$ 、 $Me_3Sn$ 和卤代；

Q独立地选自0、S和NH:

$R^{11}$  是 H 或  $R^m$ , 或者, 其中 Q 是 O、 $SO_3M$ , 其中 M 是金属阳离子;

$R^m$ 和 $R^p$ 各自独立地选自任选地取代的 $C_{1-8}$ 烷基、 $C_2-C_8$ 烯基、 $C_2-C_8$ 炔基、 $C_3-C_8$ 环烷基、 $C_{3-8}$ 杂环基、 $C_{5-20}$ 芳基和 $C_{5-20}$ 杂芳基,并且任选地相对于基团 $NR^mR^p$ 、 $R^m$ 和 $R^p$ 与它们连接的氮原子一起形成任选地取代的4、5、6或7元杂环;

$R^{12}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{21}$ 和 $R^{17}$ 分别如 $R^{22}$ 、 $R^{66}$ 、 $R^{99}$ 、 $R^{11}$ 和 $R^{77}$ 定义;

R"是C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>亚烷基,其链可以被一个或多个杂原子例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环例如苯或吡啶间断,所述环是任选地取代的;

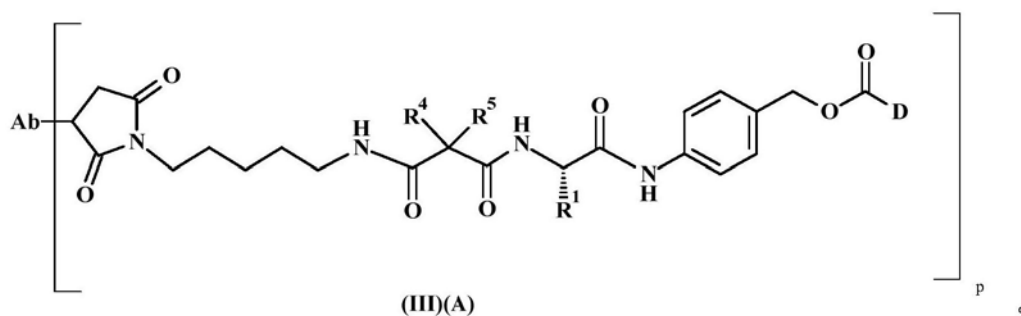
X和X' 独立地选自O、S和N(H) ; 以及

$R^C$ 是封端基团。

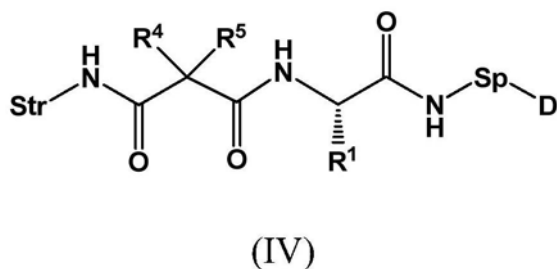
2. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物, 其中 $R^4$ 和 $R^5$ 一起形成环丁基环。

3. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物化合物, 其中R<sup>1</sup>是(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>。

4. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物化合物,其由下式表示:

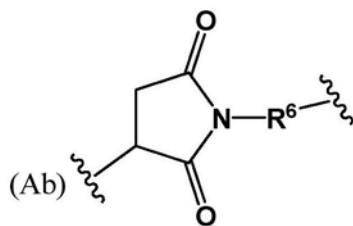


5. 式 (IV) 的非肽化合物:



其中

Str是可以与抗体共价连接的延伸物单元并且是下式表示的化学部分:



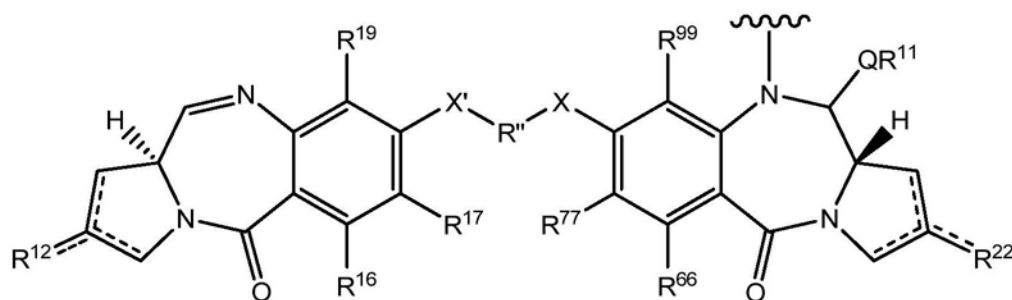
其中 $R^6$ 选自由 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基、 $C_1$ - $C_{10}$ 烯基、 $C_3$ - $C_8$ 环烷基、 $(C_1$ - $C_8$ 亚烷基) O-和 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-C(=O)N( $R^a$ )- $C_2$ - $C_6$ 亚烷基组成的组, 其中每个亚烷基可以被一个至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、 $C_3$ - $C_8$ 环烷基、 $C_4$ - $C_7$ 杂环烷基、杂芳烷基和杂芳基组成的组的取代基取代, 每个 $R^a$ 独立地是H或 $C_1$ - $C_6$ 烷基;

Sp是与药物部分共价连接的—Ar— $R^b$ —, 其中Ar是芳基或杂芳基, $R^b$ 是 $(C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基)-C(=O)O—;

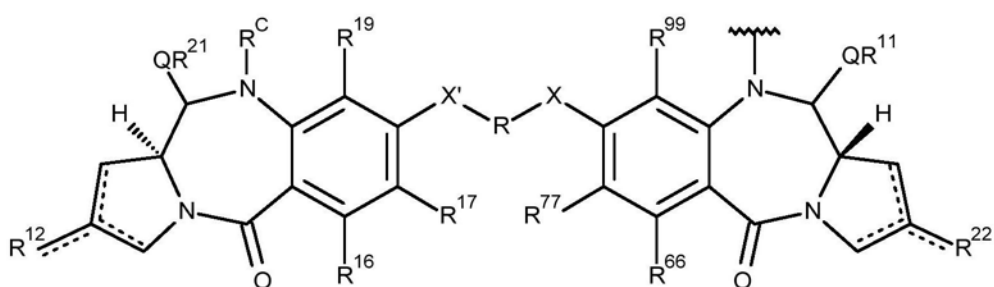
$R^1$ 是 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $(C_1$ - $C_{10}$ 烷基)NHC(NH)NH<sub>2</sub>或 $(C_1$ - $C_{10}$ 烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>;

$R^4$ 和 $R^5$ 形成 $C_3$ - $C_7$ 环烷基环;

D是式A或式B的药物部分:



A



B

以及其盐和溶剂化物,其中:

波浪线表示与接头的共价连接位点;

虚线表示在C1和C2或C2和C3之间任选存在双键;

$R^{22}$ 独立地选自H、OH、 $=O$ 、 $=CH_2$ 、CN、 $R^m$ 、 $OR^m$ 、 $=CH-R^D$ 、 $=C(R^D)_2$ 、 $O-SO_2-R^m$ 、 $CO_2R^m$ 和 $COR^m$ ,并且任选还选自卤代或二卤代,其中 $R^D$ 独立地选自 $R^m$ 、 $CO_2R^m$ 、 $COR^m$ 、CHO、 $CO_2H$ 和卤代;

$R^{66}$ 和 $R^{99}$ 独立地选自H、 $R^m$ 、OH、 $OR^m$ 、SH、 $SR^m$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^m$ 、 $NR^mR^P$ 、 $NO_2$ 、 $Me_3Sn$ 和卤代;

$R^{77}$ 独立地选自H、 $R^m$ 、OH、 $OR^m$ 、SH、 $SR^m$ 、 $NH_2$ 、 $NHR^m$ 、 $NR^mR^P$ 、 $NO_2$ 、 $Me_3Sn$ 和卤代;

Q独立地选自O、S和NH;

$R^{11}$ 是H,或 $R^m$ ,或者其中Q是O、 $SO_3M$ ,其中M是金属阳离子;

$R^m$ 和 $R^P$ 各自独立地选自任选取代的 $C_{1-8}$ 烷基、 $C_2-C_8$ 烯基、 $C_2-C_8$ 炔基、 $C_3-C_8$ 环烷基、 $C_{3-8}$ 杂环基、 $C_{5-20}$ 芳基和 $C_{5-20}$ 杂芳基,并且任选地相对于基团 $NR^mR^P$ 、 $R^m$ 和 $R^P$ 与它们连接的氮原子一起形成任选地取代的4、5、6或7元杂环;

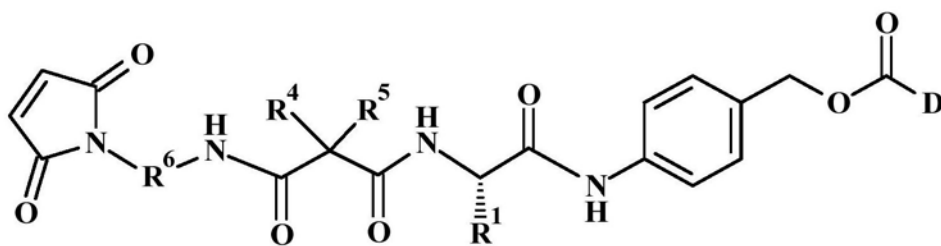
$R^{12}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{21}$ 和 $R^{17}$ 分别如 $R^{22}$ 、 $R^{66}$ 、 $R^{99}$ 、 $R^{11}$ 和 $R^{77}$ 定义;

$R''$ 是 $C_3-C_{12}$ 亚烷基,其链可以被一个或多个杂原子例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环例如苯或吡啶间断,所述环是任选地取代的;

X和X'独立地选自O、S和N(H);以及

$R^C$ 是封端基团。

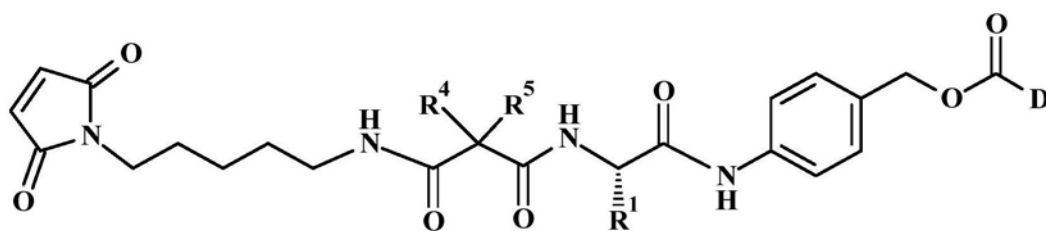
6. 下式表示的如权利要求5所述的化合物



(IV)(A)

其中 $R^6$ 是 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基; $R^4$ 和 $R^5$ 一起形成 $C_3$ - $C_7$ 环烷基环。

7. 下式表示的如权利要求5所述的化合物



(IV)(B)。

8. 如权利要求5所述的化合物, 其中 $R_6$ 是 $-(CH_2)_q$ 是1-10。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体药物偶联物, 其中p是2。

10. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体药物偶联物, 其中所述抗体与选自由以下组成的组的一种或多种多肽结合:

BMPRI1B;

E16;

STEAP1;

0772P;

MPF;

Napi3b;

Sema 5b;

PSCA hlg;

ETBR;

MSG783;

STEAP2;

TrpM4;

CRIP10;

CD21;

CD79b;

FcRH2;

HER2;

NCA;  
MDP;  
IL20R $\alpha$ ;  
短蛋白聚糖;  
EphB2R;  
ASLG659;  
PSCA;  
GEDA;  
BAFF-R;  
CD22;  
CD79a;  
CXCR5;  
HLA-DOB;  
P2X5;  
CD72;  
LY64;  
FcRH1;  
IRTA2;  
TENB2;  
PMEL17;  
TMEFF1;  
GDNF-Ra1;  
Ly6E;  
TMEM46;  
Ly6G6D;  
LGR5;  
RET;  
LY6K;  
GPR19;  
GPR54;  
ASPHD1;  
酪氨酸酶;  
TMEM118;  
GPR172A;  
MUC16和  
CD33。

11. 有效量的如权利要求1所述的抗体药物偶联物在制备用于治疗有需要的人的疾病  
的药物中的用途,其中所述治疗包括对所述人施用所述药物。

12. 一种药物组合物,其包含如权利要求1所述的化合物和其在药学上可接受的载体。

13. 如权利要求10所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体与选自由以下组成的组的一种或多种多肽结合:

STEAP1;  
Napi3b;  
STEAP2;  
TrpM4;  
CRIPT0;  
CD21;  
CD79b;  
FcRH2;  
HER2;  
CD22;  
CD79a;  
CD72;  
LY64;  
Ly6E;  
MUC16;和  
CD33。

14. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体与CD33结合。

15. 如权利要求14所述的抗体药物偶联物,其中所述抗CD33抗体包含含有SEQ ID NO: 11的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L3、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H3。

16. 如权利要求14所述的抗体药物偶联物,其中所述抗CD33抗体包含含有SEQ ID NO: 17的氨基酸序列的VL结构域和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH结构域。

17. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体与NaPi3b结合。

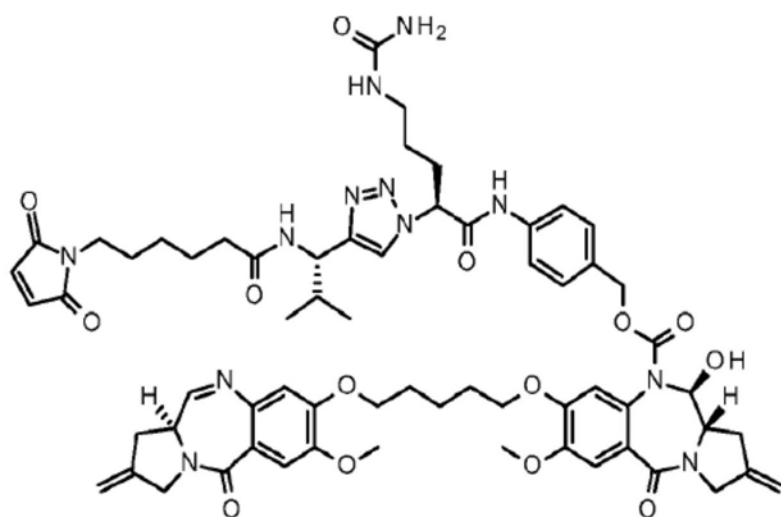
18. 如权利要求14所述的抗体药物偶联物,其中所述NaPi3b抗体包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-L2、含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L3、含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-H3。

19. 如权利要求14所述的抗体药物偶联物,其中所述NaPi3b抗体包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL结构域和含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH结构域。

20. 如权利要求14所述的抗体药物偶联物,其中所述NaPi3b抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

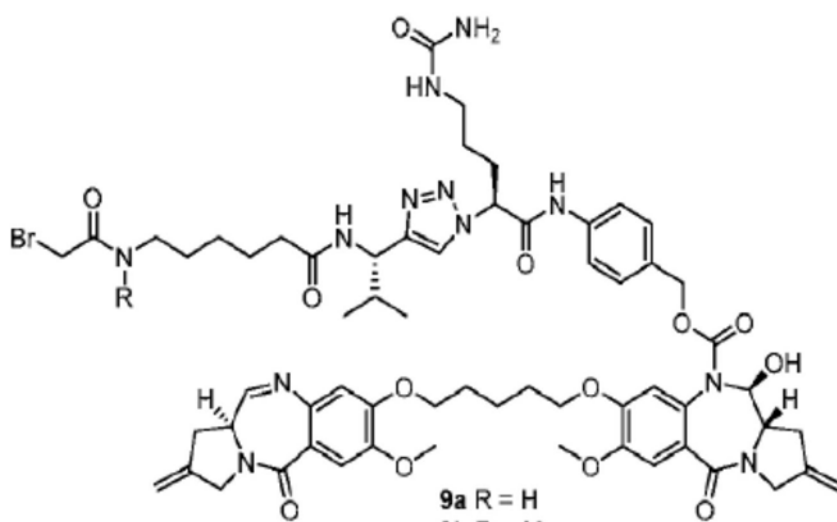
21. 一种非肽化合物,选自由以下组成的组:





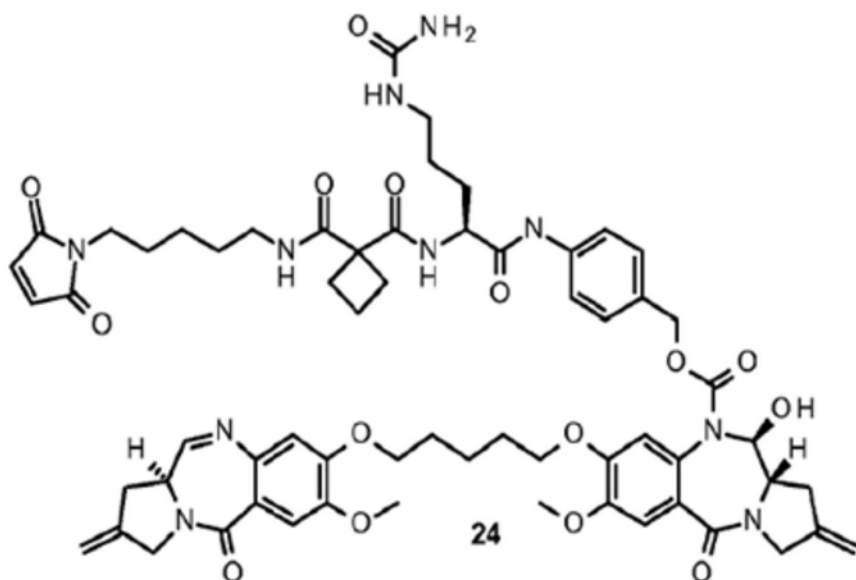
7

;

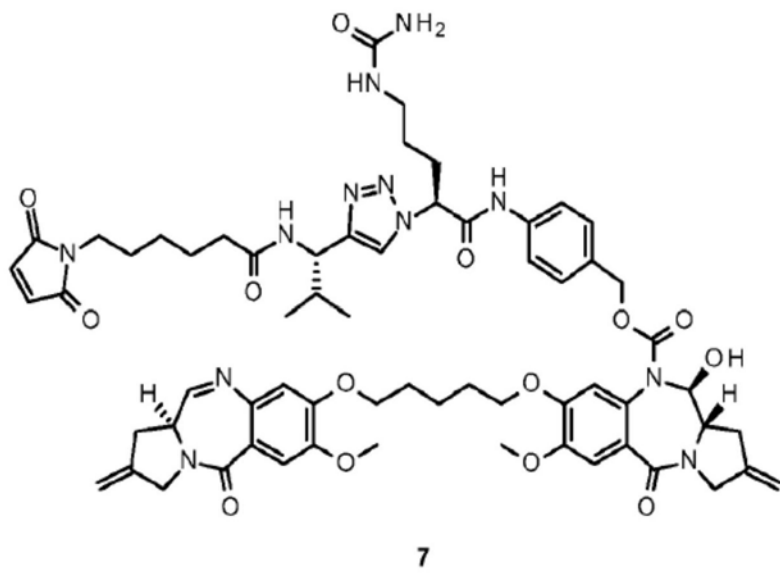


9a R = H  
9b R = Me

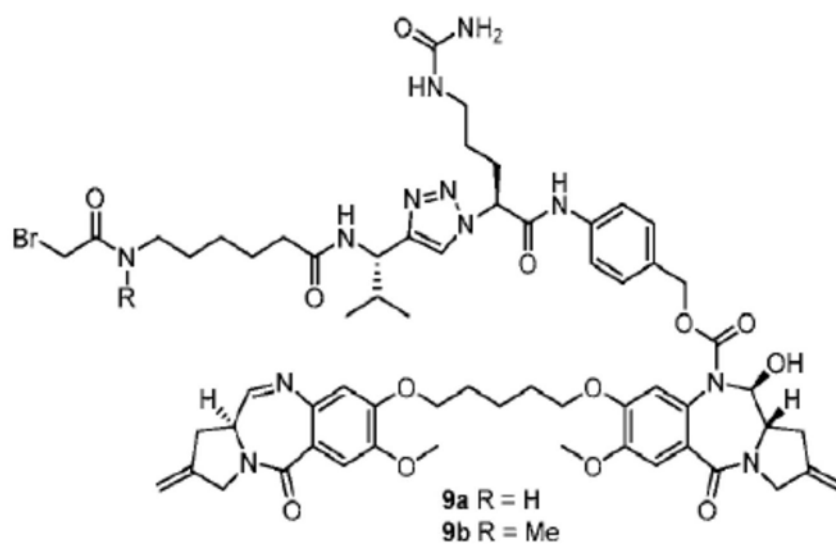
; 和



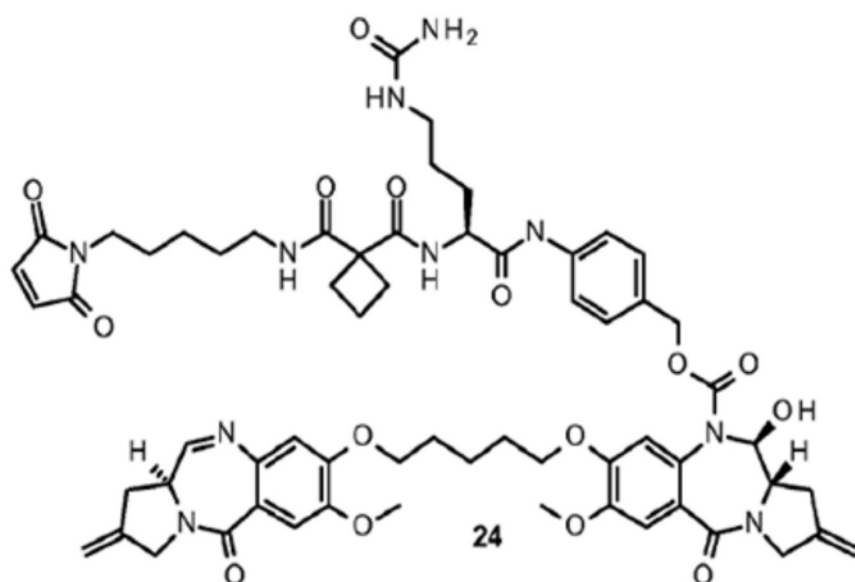
22. 如权利要求1所述的抗体药物偶联物,通过抗体与选自由以下组成的组的接头药物中间体的偶联而制备:



;



； 和



23. 如权利要求22所述的抗体药物偶联物,其中所述抗体选自Napi3b和CD33。

## 拟肽化合物及其抗体药物偶联物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及可用作抗体药物偶联物 (ADC) 接头的新型拟肽化合物。本发明还涉及包含拟肽接头和吡咯并苯并二氮卓 (PBD) 的 ADC。本发明还涉及治疗人类疾病的方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 近年来使用单克隆抗体 (mAb) 向肿瘤细胞直接递送抗癌药吸引了大量关注。两种新的抗体药物偶联物已经被 FDA 批准用于治疗癌症。**Adcetris®** (贝伦妥单抗维多汀) 是 CD30 引导的抗体药物偶联物 (ADC), 其适应症为复发性或难治性霍奇金淋巴瘤和系统性渐变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。**Kadcyla®** (ado-曲妥珠单抗 emtansine) 是批准用于患有 HER2 阳性、晚期 (转移性) 乳腺癌患者的新疗法。为了在 ADC 中同时获得有效的抗肿瘤活性和可接受的治疗指数的治疗剂, 可以对设计的几个方面进行优化。特别是, 众所周知接头的化学结构可能对 ADC 的效力和安全性具有显著的影响 (Ducry & Stump, Bioconjugate Chem, 2010, 21, 5-13)。选择正确的接头影响对目标癌细胞的细胞腔的适当的药物输送。接头一般来讲可以分成两种类型: 可断裂的 (如肽、脲 (hydrzone) 或二硫化物) 或不可断裂的 (如硫醚)。可以被溶酶体酶 (如组织蛋白酶 B) 水解的肽接头如缬氨酸-瓜氨酸 (Val-Cit) 已经用于连接药物与抗体 (US6214345)。它们是特别有用的, 部分是由于其在体循环中的相对稳定性及在肿瘤中有效释放药物的能力。包含 Val-Cit 接头的 ADC 已经证明在活体内是相对稳定的 (药物释放的  $t_{1/2}$  为约 7 天 (Doronina 等人 (2008), Bioconjugate Chem., 19, 1960-1963)。然而, 天然肽提供的化学间隔是有限的; 因此, 希望有多种非肽接头起到肽一样的作用并且可以被溶酶体蛋白酶有效断裂。更丰富的非肽结构多样性可能得到肽接头不提供的新颖、有益的性质。本文中提供可以被溶酶体酶断裂的用于 ADC 的不同类型非肽接头。

### 发明内容

[0004] 本发明涉及式 (I) 表示的抗体药物偶联物

[0005]  $Ab-(L-D)_p$ ,

[0006] Ab 是抗体;

[0007] L 是下式表示的拟肽接头

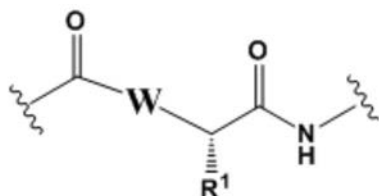
[0008]  $-Str-(PM)-Sp-$

[0009] 其中

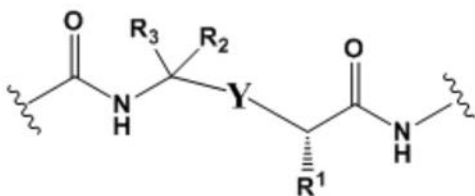
[0010] Str 是与 Ab 共价连接的延伸物单元;

[0011] Sp 是与药物部分共价连接的键或间隔臂单元;

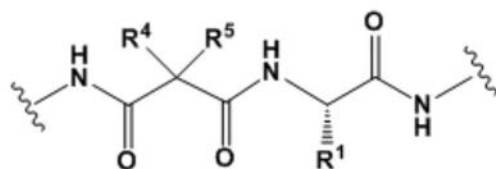
[0012] PM 是选自由以下组成的组的非肽化学部分:



[0013]



和

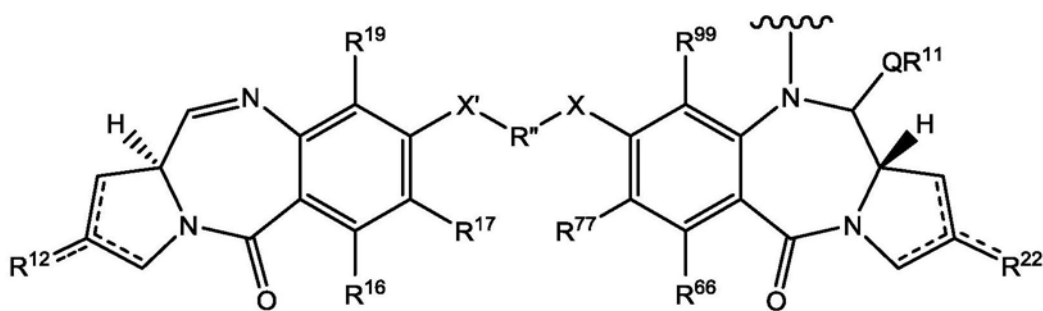


[0014] W是-NH-杂环烷基-或杂环烷基；

[0015] Y是杂芳基、芳基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烯基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷烯基或-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基-NH-；[0016] 每个R<sup>1</sup>独立地是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基)NHC(NH)NH<sub>2</sub>或(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>；[0017] R<sup>3</sup>和R<sup>2</sup>各自独立地是H、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、芳烷基或杂芳烷基，或R<sup>3</sup>和R<sup>2</sup>可以一起形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烯基；[0018] R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、芳烷基、杂芳烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基)OCH<sub>2</sub>-，或R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>可以形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基环；

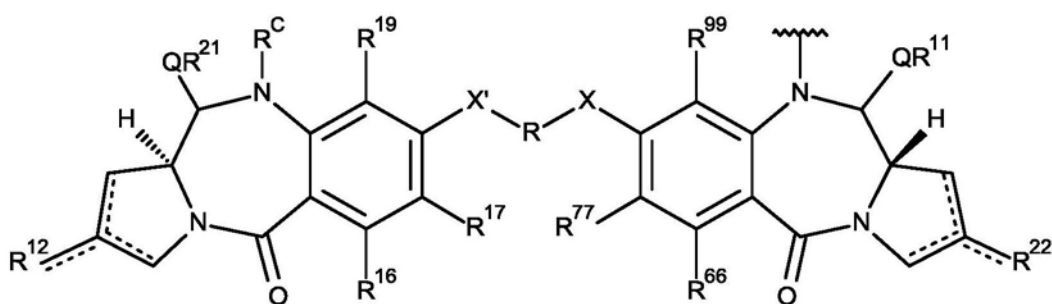
[0019] p是1到8的整数；

[0020] D是式A或式B的药物部分



A

[0021]



B

[0022] 以及其盐和溶剂化物,其中:

[0023] 波浪线表示与接头的共价连接位点;

[0024] 虚线表示在C1和C2或C2和C3之间任选存在双键;

[0025]  $R^{22}$ 独立地选自H、OH、=O、=CH<sub>2</sub>、CN、R<sup>m</sup>、O R<sup>m</sup>、=CH-R<sup>D</sup>、=C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>、O-SO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>和CO R<sup>m</sup>,并且任选地还选自卤代或二卤代,其中R<sup>D</sup>独立地选自R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>、CO R<sup>m</sup>、CHO、CO<sub>2</sub>H和卤代;

[0026] R<sup>66</sup>和R<sup>99</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;[0027] R<sup>77</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;

[0028] Q独立地选自O、S和NH;

[0029] R<sup>11</sup>是H,或R<sup>m</sup>,或者,其中Q是O、SO<sub>3</sub>M,其中M是金属阳离子;

[0030] R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>各自独立地选自任选地取代的C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环基、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>芳基和C<sub>5-20</sub>杂芳基,并且任选地相对于基团N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>与它们连接的氮原子一起形成任选地取代的4、5、6或7元杂环;

[0031] R<sup>12</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>19</sup>、R<sup>21</sup>和R<sup>17</sup>分别如R<sup>22</sup>、R<sup>66</sup>、R<sup>99</sup>、R<sup>11</sup>和R<sup>77</sup>定义;

[0032] R''是C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>亚烷基,其链可以被一个或多个杂原子例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环例如苯或吡啶间断,所述环是任选地取代的;

[0033] X和X'独立地选自O、S和N(H);以及

[0034] R<sup>C</sup>是帽化基团。

[0035] 本发明还涉及式(I)抗体药物偶联物的药物组合物。

[0036] 本发明还涉及治疗癌症的方法、式(I)抗体药物偶联物在治疗中的用途以及式(I)

抗体药物偶联物在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

[0037] 本发明还涉及制备式(I)抗体药物偶联物的方法。

## 附图说明

[0038] 图1示出带有OVCA3X2.1人卵巢肿瘤SCID-浅褐色小鼠中的NaPi3b ADC (NaPi3b PBD ADC1-1和ADC2-1)的效力比较。

[0039] 图2示出带有OVCA3X2.1人卵巢肿瘤SCID-浅褐色小鼠中的NaPi3b ADC (NaPi3b PBD ADC1-1和ADC3-1)的效力比较。

[0040] 图3示出各种剂量的CD33PBD ADC2-2在带有EOL-1人急性骨髓性白血病肿瘤的SCID小鼠中的效力。

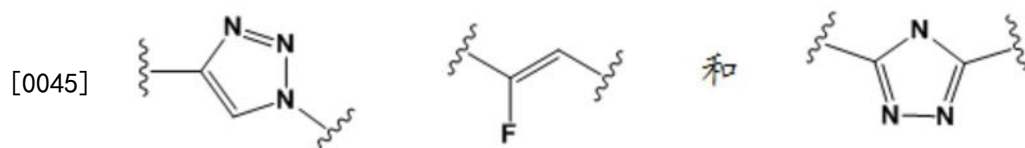
## 具体实施方式

[0041] 本文中提供用于ADC的不同类型的非肽接头,其可被溶酶体酶断裂。例如,在二肽(例如Val-Cit)中间的酰胺键被酰胺拟似物替换;和/或整个氨基酸(例如,Val-Cit二肽中的缬氨酸氨基酸)被非氨基酸部分(例如,环烷基二羰基结构(例如,环大小=4或5))替换。

[0042] 本发明涉及式(I)抗体偶联物。

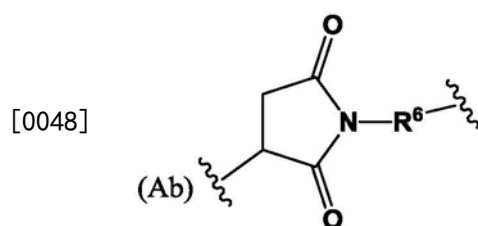
[0043] 本发明还涉及式(I)抗体偶联物,其中Y是杂芳基; $R^4$ 和 $R^5$ 一起形成环丁基环。

[0044] 本发明还涉及式(I)抗体偶联物,其中Y是选自由以下组成的组的部分



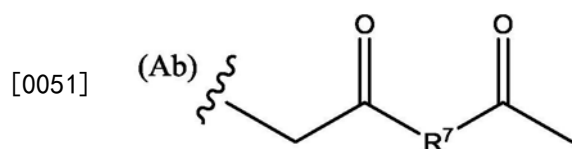
[0046] 本发明还涉及式(I)抗体偶联物,其中

[0047] Str是下式表示的化学部分:



[0049] 其中 $R^6$ 选自由 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基、 $C_1$ - $C_{10}$ 烯基、 $C_3$ - $C_8$ 环烷基、( $C_1$ - $C_8$ 亚烷基)O-和 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基-C(=O)N( $R^a$ )- $C_2$ - $C_6$ 亚烷基组成的组,其中每个亚烷基可以被一至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、 $C_3$ - $C_8$ 环烷基、 $C_4$ - $C_7$ 杂环烷基、杂芳烷基和杂芳基组成的组的取代基取代,每个 $R^a$ 独立地是H或 $C_1$ - $C_6$ 烷基;Sp是-Ar- $R^b$ -,其中Ar是芳基或杂芳基, $R^b$ 是( $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基)-C(=O)O-。

[0050] 本发明还涉及式(I)抗体偶联物,其中Str具有式:

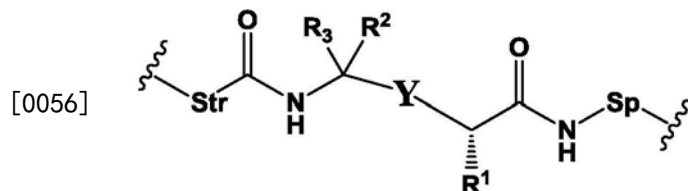


[0052] 其中 $R^7$ 选自 $C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基、 $C_1$ - $C_{10}$ 烯基、 $(C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基)O-、 $N(R^c)-(C_2$ - $C_6$ 亚烷基)- $N(R^c)$ 和 $N(R^c)-(C_2$ - $C_6$ 亚烷基);其中每个 $R^c$ 独立地是H或 $C_1$ - $C_6$ 烷基;Sp是 $-Ar-R^b-$ ,其中Ar是芳基或杂芳基, $R^b$ 是 $(C_1$ - $C_{10}$ 亚烷基)- $C(=O)O-$ 。

[0053] 本发明还涉及式(I)抗体偶联物,其由下式表示:

[0054]  $Ab-(L-D)_p$

[0055] 其中Ab是抗体;L是下式表示的非肽化学部分



[0057]  $R^1$ 是 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $C_1$ - $C_6$ 烯基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)NHC(NH)NH<sub>2</sub>或 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>;

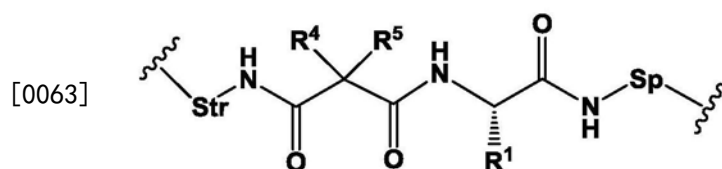
[0058]  $R^3$ 和 $R^2$ 各自独立地是H、 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基。

[0059] 本发明还涉及式(I)抗体偶联物,其由下式表示:

[0060]  $Ab-(L-D)_p$

[0061] 其中Ab是抗体;

[0062] L是下式表示的非肽化学部分



[0064]  $R^1$ 是 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)NHC(NH)NH<sub>2</sub>或 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>;

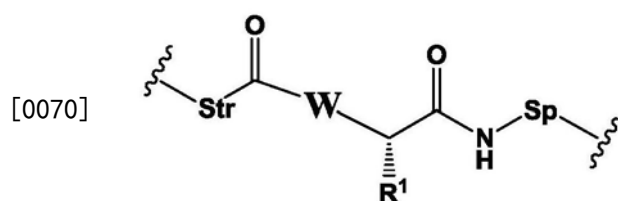
[0065]  $R^4$ 和 $R^5$ 一起形成 $C_3$ - $C_7$ 环烷基环。

[0066] 本发明还涉及式(I)抗体偶联物,其由下式表示:

[0067]  $Ab-(L-D)_p$

[0068] 其中Ab是抗体;

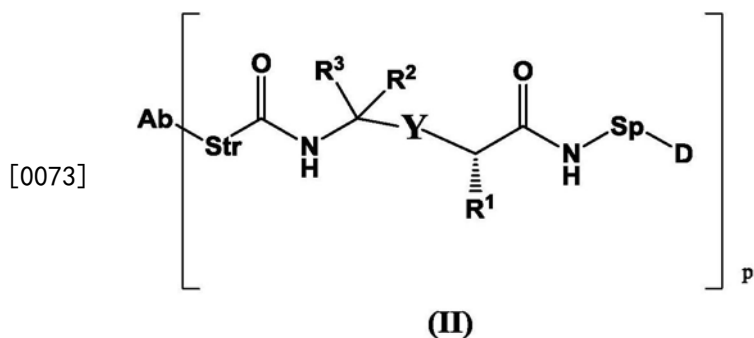
[0069] L是下式表示的非肽化学部分



[0071]  $R^1$ 是 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)NHC(NH)NH<sub>2</sub>或 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>。

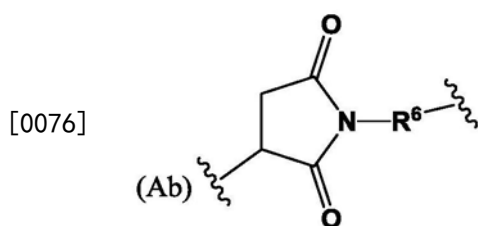
[0072] 本发明还涉及下式表示的式(I)抗体偶联物:





[0074] 其中

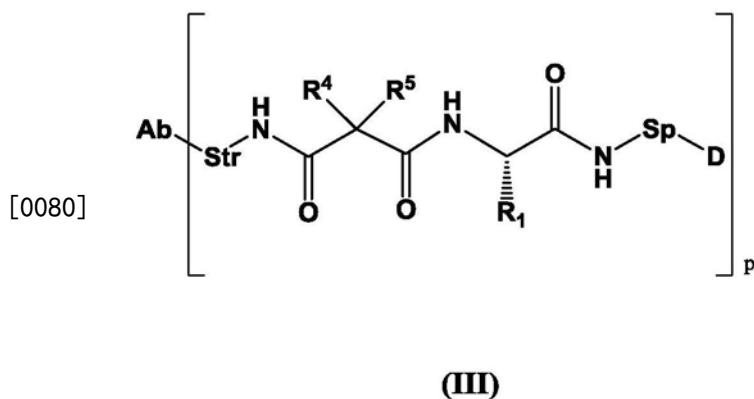
[0075] Str是下式表示的化学部分：



[0077] 其中 $\text{R}^6$ 选自由 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$ 亚烷基和 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$ 亚烷基- $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)$ - $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$ 亚烷基组成的组,其中每个亚烷基可以被一至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、 $\text{C}_3$ - $\text{C}_8$ 环烷基、 $\text{C}_4$ - $\text{C}_7$ 杂环烷基、杂芳烷基和杂芳基组成的组的取代基取代,每个 $\text{R}^a$ 独立地是H或 $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷基;

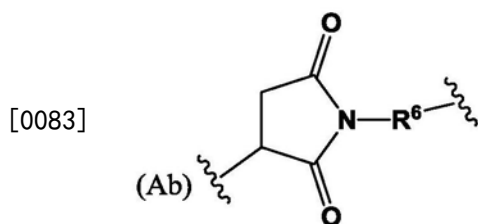
[0078]  $p$ 是1、2、3或4。

[0079] 本发明还涉及下式表示的式(I)抗体偶联物：



[0081] 其中

[0082] Str是下式表示的化学部分：



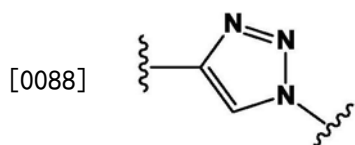
[0084] 其中 $\text{R}^6$ 选自由 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$ 亚烷基和 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{10}$ 亚烷基- $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)$ - $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$ 亚烷基组成的组,其中每个亚烷基可以被一至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰

基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>杂环烷基、杂芳烷基和杂芳基组成的组的取代基取代,每个R<sup>a</sup>独立地是H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

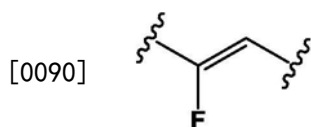
[0085] p是1、2、3或4。

[0086] 本发明还涉及以上抗体偶联物中的任一种,其中Y是杂芳基、芳基或烯基;R<sup>6</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基。

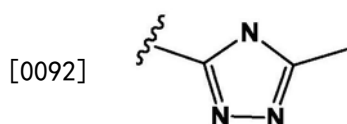
[0087] 本发明还涉及以上抗体偶联物中的任一种,其中Y是



[0089] 本发明还涉及以上抗体偶联物中的任一种,其中Y是

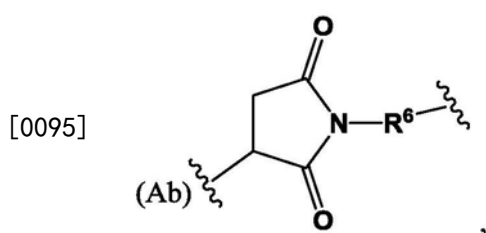


[0091] 本发明还涉及以上抗体偶联物中的任一种,其中Y是



[0093] 本发明还涉及以上抗体偶联物中的任一种,其中

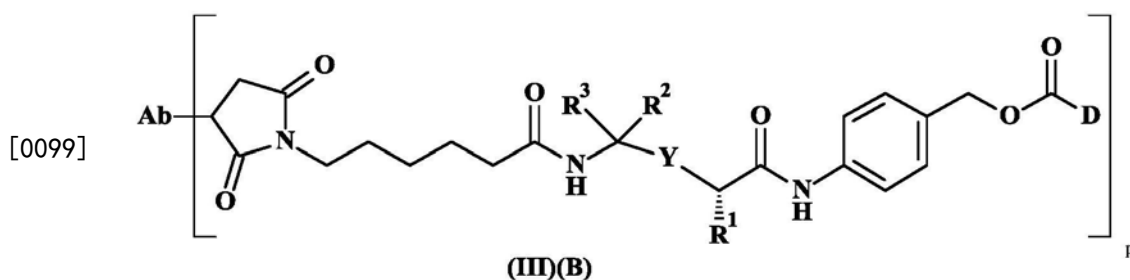
[0094] Str是下式表示的化学部分:



[0096] R<sup>6</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基;

[0097] Sp是—Ar—R<sup>b</sup>—,其中Ar是芳基,R<sup>b</sup>是(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>亚烷基)-C(=O)O—。

[0098] 本发明还涉及下式表示的以上抗体偶联物中的任一种:

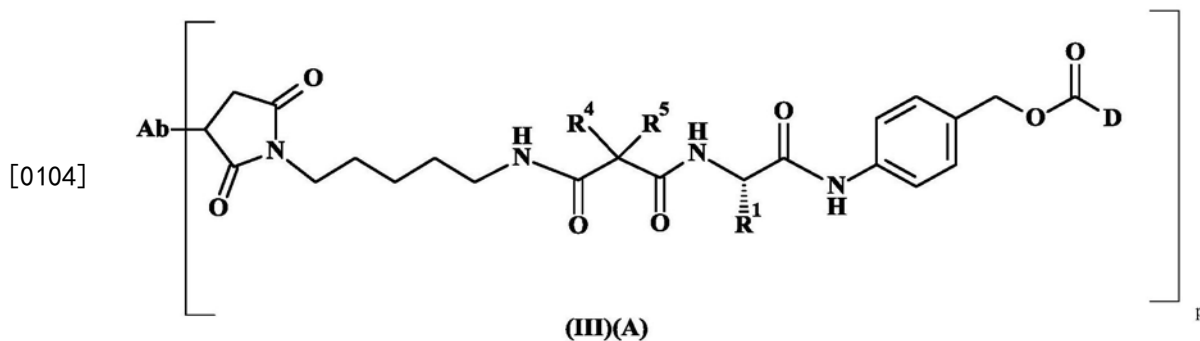


[0100] 其中

[0101] R<sup>1</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基-NH<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)NHC(NH)NH<sub>2</sub>或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>

[0102] p是1、2、3或4。

[0103] 本发明还涉及下式表示的以上抗体偶联物中的任一种:



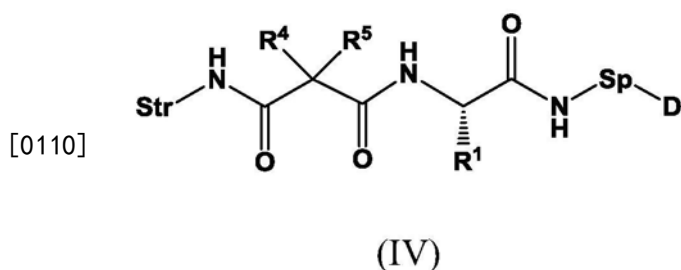
[0105] 其中

[0106] p是1、2、3或4；

[0107] R<sup>1</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基-NH<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) NHC (NH) NH<sub>2</sub>或 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) NHC (O) NH<sub>2</sub>；

[0108] R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，其中所述烷基是未取代的，或R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>可以形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基环。

[0109] 本发明还涉及式 (IV) 非肽化合物：



[0111] 其中

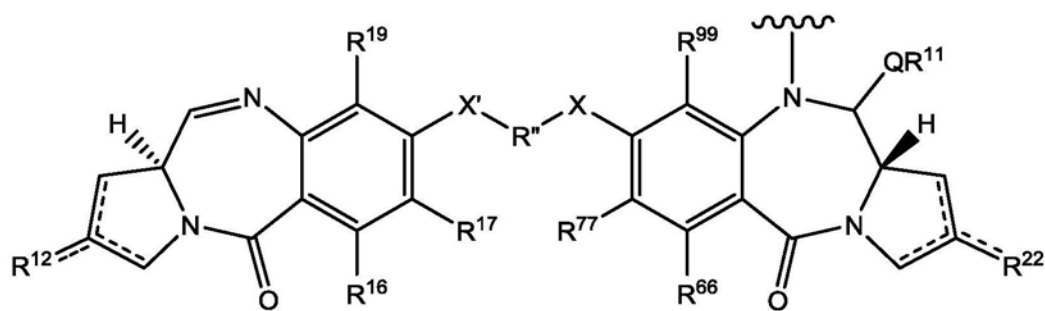
[0112] Str是可以与抗体共价连接的延伸物单元；

[0113] Sp是与药物部分共价连接的键或间隔臂单元；

[0114] R<sup>1</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基) NHC (NH) NH<sub>2</sub>或 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基) NHC (O) NH<sub>2</sub>；

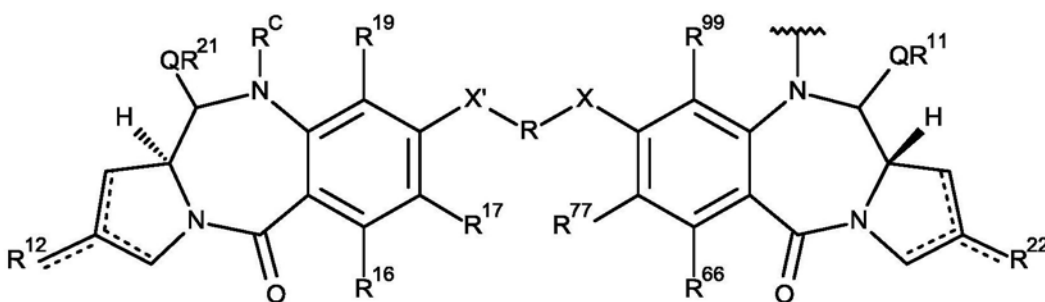
[0115] R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、芳烷基、杂芳烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基) OCH<sub>2</sub>-，或R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>可以形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基环；

[0116] D是式A或式B的药物部分：



A

[0117]



B

[0118] 以及其盐和溶剂化物,其中:

[0119] 波浪线表示与接头的共价连接位点;

[0120] 虚线表示在C1和C2或C2和C3之间任选存在双键;

[0121]  $R^{22}$ 独立地选自H、OH、=O、=CH<sub>2</sub>、CN、R<sup>m</sup>、O R<sup>m</sup>、=CH-R<sup>D</sup>、=C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>、O-SO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>和CO R<sup>m</sup>,并且任选还选自卤代或二卤代,其中R<sup>D</sup>独立地选自R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>、CO R<sup>m</sup>、CHO、CO<sub>2</sub>H和卤代;[0122] R<sup>66</sup>和R<sup>99</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;[0123] R<sup>77</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;

[0124] Q独立地选自O、S和NH;

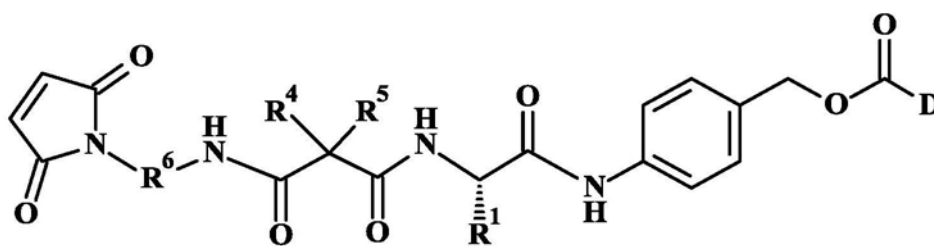
[0125] R<sup>11</sup>是H或R<sup>m</sup>,或者,其中Q是O、SO<sub>3</sub>M,其中M是金属阳离子;[0126] R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>各自独立地选自任选取代的C<sub>1-8</sub>烷基、C<sub>2-8</sub>烯基、C<sub>2-8</sub>炔基、C<sub>3-8</sub>环烷基、C<sub>3-8</sub>杂环基、C<sub>5-20</sub>芳基和C<sub>5-20</sub>杂芳基,并且任选地相对于基团N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>与它们连接的氮原子一起形成任选地取代的4、5、6或7元杂环;[0127] R<sup>12</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>19</sup>、R<sup>21</sup>和R<sup>17</sup>分别如R<sup>22</sup>、R<sup>66</sup>、R<sup>99</sup>、R<sup>11</sup>和R<sup>77</sup>定义;[0128] R''是C<sub>3-12</sub>亚烷基,其链可以被一个或多个杂原子例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环例如苯或吡啶间断,所述环是任选地取代的;

[0129] X和X'独立地选自O、S和N(H);

[0130] 以及R<sup>C</sup>是帽化基团。

[0131] 本发明还涉及下式表示的非肽化合物

[0132]

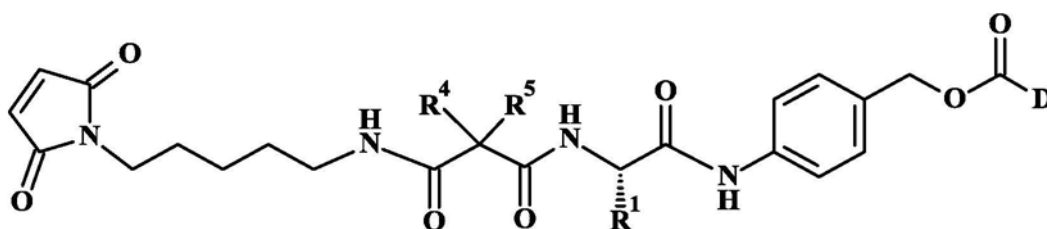


(IV)(A)

[0133] 其中R<sub>6</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基；R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>一起形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基环。

[0134] 本发明还涉及下式表示的非肽化合物

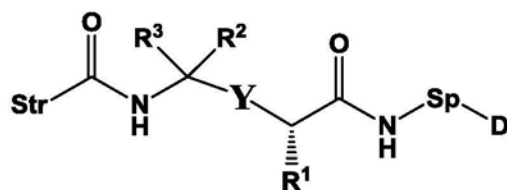
[0135]



(IV)(B)

[0136] 本发明还涉及下式非肽化合物：

[0137]



(V)

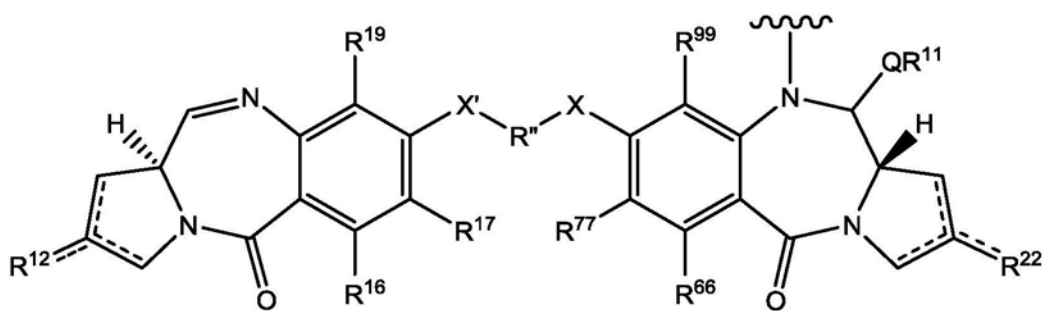
[0138] 其中

[0139] Str是可以与抗体共价连接的延伸物单元；

[0140] Sp是与药物部分共价连接的任选的间隔臂单元；

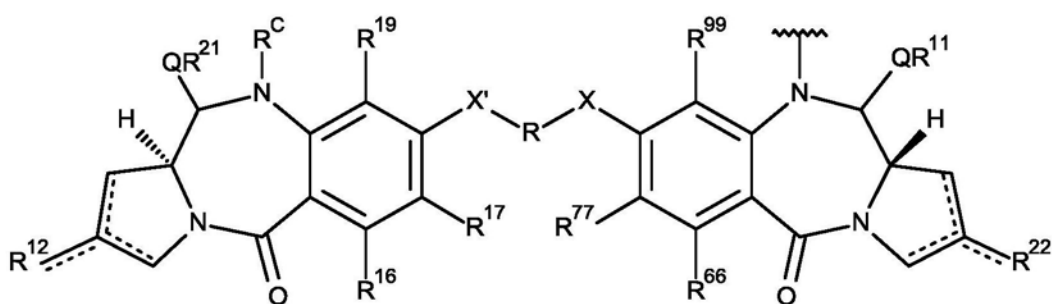
[0141] Y是杂芳基、芳基、-C(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烯基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烯基或-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烯基-NH-；[0142] R<sup>1</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基)NHC(NH)NH<sub>2</sub>或(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基)NHC(O)NH<sub>2</sub>；[0143] R<sup>3</sup>和R<sup>2</sup>各自独立地是H、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、芳烷基或杂芳烷基，或R<sup>3</sup>和R<sup>2</sup>可以一起形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基；

[0144] D是式A或式B的药物部分：



A

[0145]



B

[0146] 以及其盐和溶剂化物,其中:

[0147] 波浪线表示与接头的共价连接位点;

[0148] 虚线表示在C1和C2或C2和C3之间任选存在双键;

[0149]  $R^{22}$ 独立地选自H、OH、=O、=CH<sub>2</sub>、CN、R<sup>m</sup>、O R<sup>m</sup>、=CH-R<sup>D</sup>、=C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>、O-SO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>和CO R<sup>m</sup>,并且任选还选自卤代或二卤代,其中R<sup>D</sup>独立地选自R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>、CO R<sup>m</sup>、CHO、CO<sub>2</sub>H和卤代;[0150] R<sup>66</sup>和R<sup>99</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;[0151] R<sup>77</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;

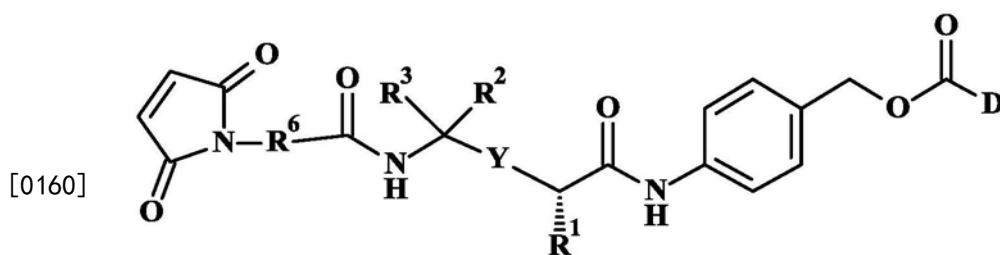
[0152] Q独立地选自O、S和NH;

[0153] R<sup>11</sup>是H,或R<sup>m</sup>,或者,其中Q是O、SO<sub>3</sub>M,其中M是金属阳离子;[0154] R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>各自独立地选自任选取代的C<sub>1-8</sub>烷基、C<sub>2-8</sub>烯基、C<sub>2-8</sub>炔基、C<sub>3-8</sub>环烷基、C<sub>3-8</sub>杂环基、C<sub>5-20</sub>芳基和C<sub>5-20</sub>杂芳基,并且任选地相对于基团N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>与它们连接的氮原子一起形成任选地取代的4、5、6或7元杂环;[0155] R<sup>12</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>19</sup>和R<sup>17</sup>分别如R<sup>22</sup>、R<sup>66</sup>、R<sup>99</sup>和R<sup>77</sup>定义。[0156] R''是C<sub>3-12</sub>亚烷基,其链可以被一个或多个杂原子例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环例如苯或吡啶间断,所述环是任选地取代的;

[0157] X和X'独立地选自O、S和N(H);

[0158] 以及R<sup>C</sup>是帽化基团。

[0159] 本发明还涉及下式表示的非肽化合物:

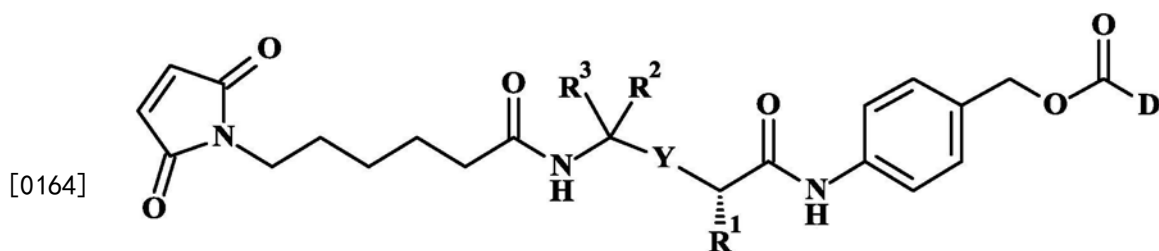


(V)(A)

[0161] 其中

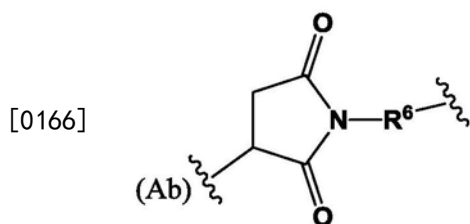
[0162]  $R_6$  是  $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基。

[0163] 本发明还涉及下式表示的非肽化合物：



(V)(B)

[0165] 本发明还涉及任何以上非肽化合物，其中 Str 具有下式：

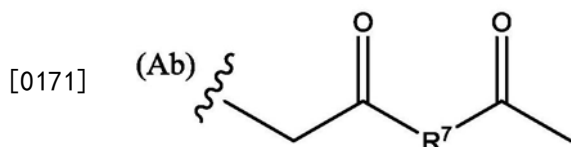


[0167] 其中  $R^6$  选自由  $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基、 $C_3$ - $C_8$  环烷基、 $O$ - ( $C_1$ - $C_8$  亚烷基) 和  $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基- $C(=O)N(R^a)-C_2$ - $C_6$  亚烷基组成的组，其中每个亚烷基可以被一至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、 $C_3$ - $C_8$  环烷基、 $C_4$ - $C_7$  杂环烷基和杂芳基组成的组的取代基取代，每个  $R^a$  独立地是 H 或  $C_1$ - $C_6$  烷基； $Sp$  是  $-Ar-R^b-$ ，其中 Ar 是芳基或杂芳基， $R^b$  是 ( $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基)- $C(=O)-O-$ 。

[0168] 本发明还涉及非肽化合物，其中  $R^6$  是  $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基， $Sp$  是  $-Ar-R^b-$ ，其中 Ar 是芳基， $R^b$  是 ( $C_1$ - $C_6$  亚烷基)- $C(=O)-O-$ 。

[0169] 本发明还涉及非肽化合物，其中  $R_6$  是  $-(CH_2)_q$  是 1-10；

[0170] 本发明还涉及非肽化合物，其中 Str 具有式：



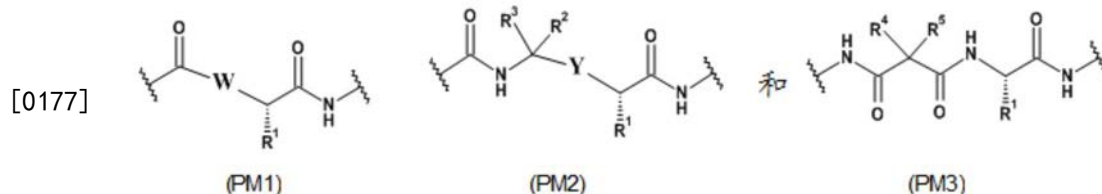
[0172] 其中  $R^7$  选自由  $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基、 $C_1$ - $C_{10}$  亚烷基- $O$ 、 $N(R^c)-(C_2-C_6$  亚烷基)- $N(R^c)$  和  $N(R^c)-(C_2-C_6$  亚烷基)；其中每个  $R^c$  独立地是 H 或  $C_1$ - $C_6$  烷基；

[0173] Sp是—Ar—R<sup>b</sup>—,其中Ar是芳基或杂芳基,R<sup>b</sup>是(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基)-C(=O)-O-。

[0174] 本发明还涉及非肽化合物,其中R<sup>6</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基,Sp是—Ar—R<sup>b</sup>—,其中Ar是芳基,R<sup>b</sup>是(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基)-C(=O)-O-。

[0175] PM

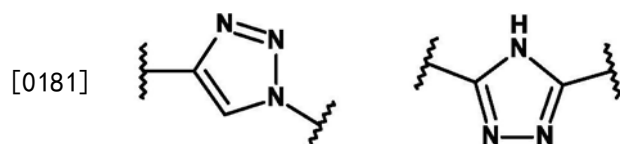
[0176] 如上所述,PM是选自由以下组成的组的非肽化学部分:



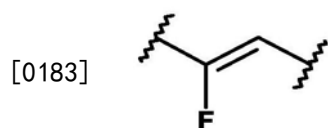
[0178] 在PM1、PM2和PM3的每个中,R<sup>1</sup>独立地是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基) NHC (NH) NH<sub>2</sub>或(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基) NHC (O) NH<sub>2</sub>。在一些实施方案中,R<sup>1</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) NHC (NH) NH<sub>2</sub>或(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) NHC (O) NH<sub>2</sub>。在一些实施方案中,R<sup>1</sup>是C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NHC (O) NH<sub>2</sub>。

[0179] 在PM1中,W是-NH-杂环烷基-或杂环烷基。在一些实施方案中,...

[0180] 在PM2中,Y是杂芳基、芳基、-C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烯基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷烯基或-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基-NH-。在一些实施方案中,Y是杂芳基。在这些实施方案的一些中,Y是

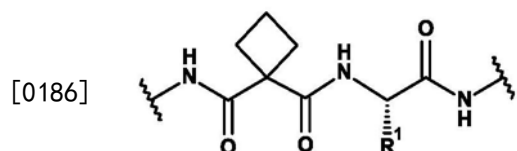


[0182] 在其他实施方案中,Y是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基。在这些实施方案的一些中,Y是



[0184] 在PM2中,R<sup>3</sup>和R<sup>2</sup>各自独立地是H、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、芳烷基或杂芳烷基,或R<sup>3</sup>和R<sup>2</sup>可以一起形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基(与它们连接的碳原子)。在一些实施方案中,R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>各自独立地是H或C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基。在一个这种实施方案中,R<sup>2</sup>是H并且R<sup>3</sup>是异丙基。

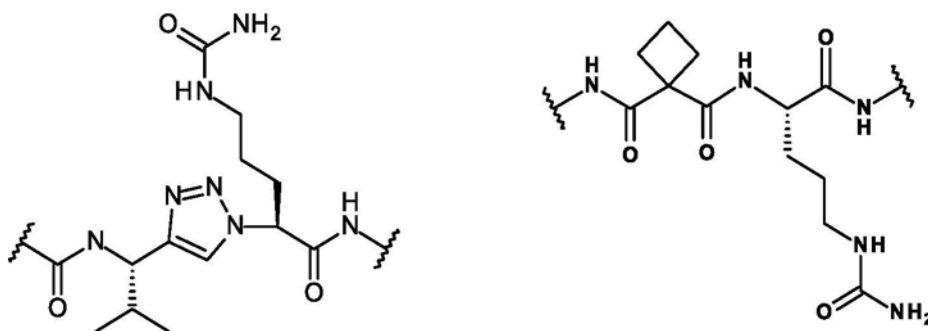
[0185] 在PM3中,R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、芳烷基、杂芳烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基) OCH<sub>2</sub>-,或R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>可以形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基环(与它们连接的碳原子)。在这些实施方案的一些中,R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>一起形成C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基环(与它们连接的碳原子)。具体来讲,它们可以形成环丁基,因此PM3是:



[0187] 在一些实施方案中,PM基团可以是:



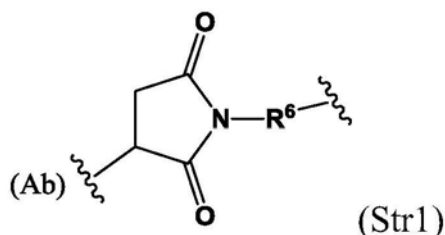
[0188]

[0189] Str

[0190] 如上所述, Str是与Ab共价连接的延伸物单元。

[0191] 在一些实施方案中, Str是下式表示的化学部分:

[0192]



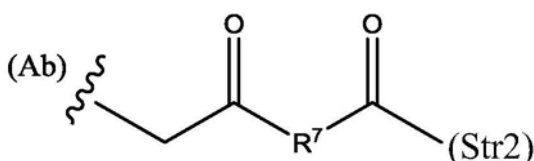
[0193] 其中R<sup>6</sup>选自由C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>亚烷基) O-和C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-C(=O)N(R<sup>a</sup>)-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基组成的组, 其中每个亚烷基可以被一至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>杂环烷基、杂芳烷基和杂芳基组成的组的取代基取代, 每个R<sup>a</sup>独立地是H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基; Sp是—Ar—R<sup>b</sup>—, 其中Ar是芳基或杂芳基, R<sup>b</sup>是(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基) O-。

[0194] 在这些实施方案的一些中, R<sup>6</sup>选自由C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基和C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基-C(=O)N(R<sup>a</sup>)-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基组成的组, 其中每个亚烷基可以被一至五个选自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>杂环烷基、杂芳烷基和杂芳基组成的组的取代基取代, 每个R<sup>a</sup>独立地是H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。

[0195] 在这些实施方案的一些中, R<sup>6</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基、C<sub>1-6</sub>亚烷基。在特定的实施方案中, R<sup>6</sup>是C<sub>5</sub>亚烷基。

[0196] 在一些实施方案中, Str具有式:

[0197]



[0198] 其中R<sup>7</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基) O-、N(R<sup>c</sup>)-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基)-N(R<sup>c</sup>)和N(R<sup>c</sup>)-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基); 其中每个R<sup>c</sup>独立地是H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。

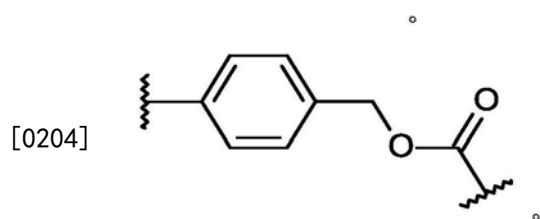
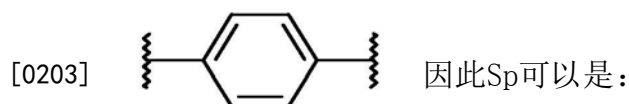
[0199] 在这些实施方案的一些中, R<sup>7</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烯基、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基) O-、N(R<sup>c</sup>)-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基)-N(R<sup>c</sup>)和N(R<sup>c</sup>)-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基); 其中每个R<sup>c</sup>独立地是H或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。

[0200] Sp

[0201] Sp是与药物部分共价连接的键或间隔臂单元。

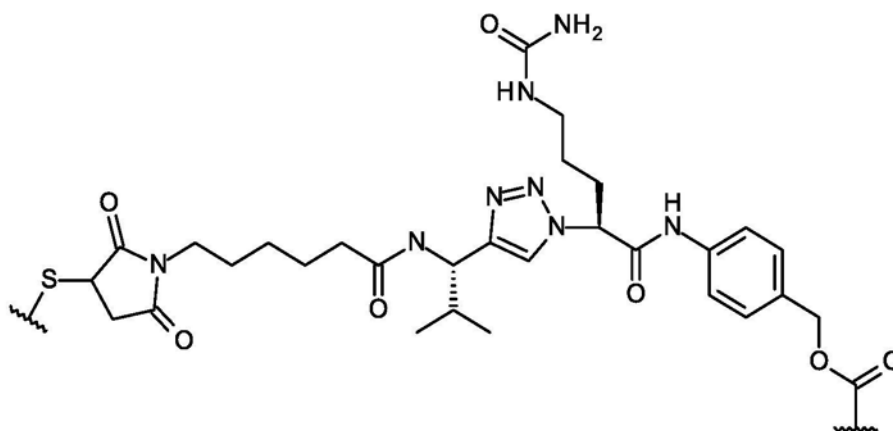
[0202] 在一些实施方案中, Sp是—Ar—R<sup>b</sup>—, 其中Ar是芳基或杂芳基, R<sup>b</sup>是(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>亚烷基)

OC(=O)-。在这些实施方案的一些中, $R^b$ 是(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>亚烷基)OC(=O)-。在这些实施方案的再一些中, $R^b$ 是-CH<sub>2</sub>-OC(=O)-。在一些实施方案中,Ar是亚苯基并且其可以是:

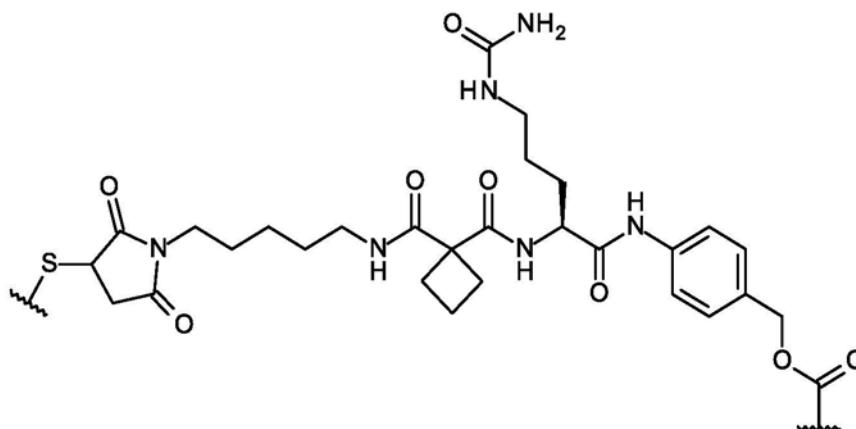


[0205] Str、PM、Sp

[0206] 在一些实施方案中,-Str-PM-Sp-选自:



[0207]



[0208]  $R^c$

[0209] 基团 $R^c$ 可从PBD部分的N10位移除以剩下N10-C11亚胺键、甲醇胺、取代的甲醇胺,其中 $QR^{11}$ 是OSO<sub>3</sub>M、亚硫酸氢盐加合物、硫代甲醇胺、取代的硫代甲醇胺或取代的胺基甲胺(carbinalamine)。

[0210] 在一个实施方案中, $R^c$ 可以是可移除以剩下N10-C11亚胺键、甲醇胺、取代的甲醇胺的保护基,或者,其中 $QR^{21}$ 是OSO<sub>3</sub>M、亚硫酸氢盐加合物。在一个实施方案中, $R^c$ 是可移除以剩下N10-C11亚胺键的保护基。

[0211] 基团 $R^c$ 旨在于断裂拟肽接头需要的相同条件下是可移除的,例如得到N10-C11亚

胺键、甲醇胺等。帽化基团起保护基的作用用于在N10位的需要的功能。封端基团对抗体没有反应性,因此,例如, $R^C$ 不是Str-(PM)-Sp-。

[0212] 帽化基团可以称为治疗上可移除氮的保护基,如WO 00/12507中定义,其定义在此以引用的方式并入本文。

[0213] 在一个实施方案中,基团 $R^C$ 可在断裂拟肽基团PM的条件下移除。因此,在一个实施方案中,帽化基团可在酶的作用下断裂。

[0214] 帽化基团可以用作N10-C11亚胺键的屏蔽。帽化基团可以在此时除去因为亚胺官能团在化合物中是需要的。帽化基团还是如上所述的甲醇胺、取代的甲醇胺和亚硫酸氢盐加合物的屏蔽。

[0215] 在一个实施方案中, $R^C$ 是氨基甲酸酯保护基。

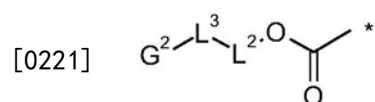
[0216] 在一个实施方案中,氨基甲酸酯保护基选自:

[0217] Alloc、Fmoc、Boc、Troc和Teoc。

[0218] 在一个实施方案中, $R^C$ 衍生自缺少与抗体连接的官能团的接头基团Str-(PM)-Sp-。

[0219] 本申请尤其涉及是氨基甲酸酯的那些 $R^C$ 基团。

[0220] 在一个实施方案中, $R^C$ 是基团:



[0222] 其中星号表示与N10位的连接点, $G^2$ 是封端基团, $L^3$ 是共价键或可断裂的接头, $L^1$ , $L^2$ 是共价键或与 $OC(=O)$ 一起形成自脱落接头。此外, $L^3$ 可以是PM并且 $L^2$ 与 $OC(=O)$ 一起形成Sp。

[0223] 其中 $L^3$ 和 $L^2$ 都是共价键, $G^2$ 和 $OC(=O)$ 一起形成如上定义的氨基甲酸酯保护基。

[0224]  $L^1$ 优选是可断裂的接头,并且可以称为用于激活接头断裂的触发器。

[0225]  $L^1$ 和 $L^2$ 存在时的性质可以广泛变化。这些基团是根据其断裂特性选择的,其可由偶联物被递送的位置的条件所要求。尽管还可以使用通过改变pH(例如酸或碱不稳定的)、温度或在照射后(例如对光不稳)而可断裂的接头,在酶的作用下断裂的那些接头是优选的。在还原或氧化条件下可断裂的接头也可以应用于本发明。

[0226]  $L^1$ 可以包含氨基酸的连续序列。氨基酸序列可以是酶断裂的靶底物,由此允许 $R^{10}$ 从N10位释放。

[0227] 在一个实施方案中, $L^1$ 是可在酶的作用下断裂的。在一个实施方案中,酶是酯酶或肽酶。

[0228] 在一个实施方案中, $L^2$ 存在并且与 $-C(=O)O-$ 一起形成自脱落接头。在一个实施方案中, $L^2$ 是酶活性的底物,从而使 $R^{10}$ 从N10位释放。

[0229] 在一个实施方案中,其中 $L^1$ 可在酶的作用下断裂并且 $L^2$ 存在,酶断裂 $L^1$ 和 $L^2$ 之间的键。

[0230]  $L^1$ 和 $L^2$ 存在时可以通过选自以下的键连接:

[0231]  $-C(=O)NH-$ ,

[0232]  $-C(=O)O-$ ,

[0233]  $-\text{NHC}(=\text{O})-$ ,

[0234]  $-\text{OC}(=\text{O})-$ ,

[0235]  $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}-$ ,

[0236]  $-\text{NHC}(=\text{O})\text{O}-$ ,

[0237]  $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}-$ , 和

[0238]  $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NH}-$ 。

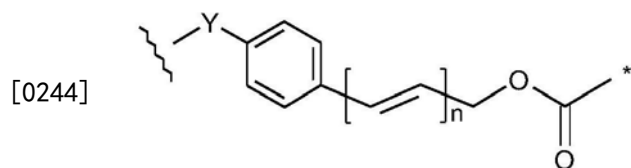
[0239] 与 $\text{L}^2$ 连接的 $\text{L}^1$ 的氨基可以是氨基酸的N端或可以衍生自氨基酸侧链,例如赖氨酸侧链的氨基。

[0240] 与 $\text{L}^2$ 连接的 $\text{L}^1$ 的羧基可以是氨基酸的C端或可以衍生自氨基酸侧链,例如谷氨酸侧链的羧基。

[0241] 与 $\text{L}^2$ 连接的 $\text{L}^1$ 的羟基可以衍生自氨基酸侧链,例如丝氨酸侧链的羟基。

[0242] 术语“氨基酸侧链”包括下面的那些基团:(i)天然存在的氨基酸如丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸;(ii)小的氨基酸如鸟氨酸和瓜氨酸;(iii)非天然氨基酸、 $\beta$ -氨基酸、合成类似物和天然存在的氨基酸衍生物;和(iv)其所有的对映异构体、非对映异构体、富含异构体的、同位素标记的(例如 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ )、受保护的形式及其外消旋混合物。

[0243] 在一个实施方案中, $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 和 $\text{L}^2$ 一起形成基团:



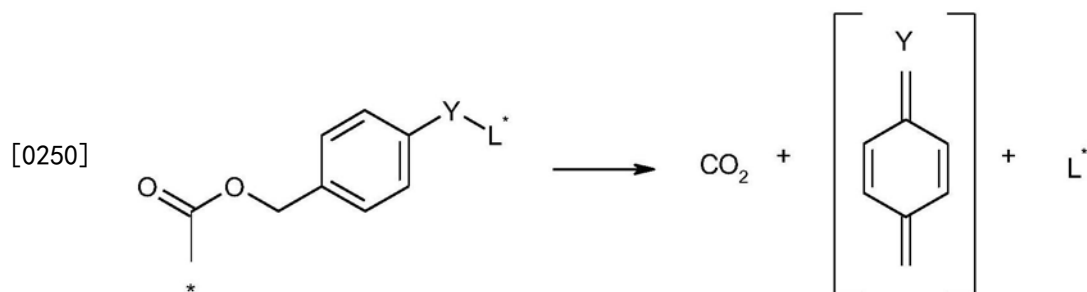
[0245] 其中星号表示与N10位的连接点,波浪线表示与接头 $\text{L}^1$ 的连接点,Y是 $-\text{N}(\text{H})-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-$ 或 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,并且n是0至3。亚苯基环任选地被一个、两个或三个如本文所述的取代基取代。在一个实施方案中,亚苯基任选地被卤代、 $\text{NO}_2$ 、R或OR取代。

[0246] 在一个实施方案中,Y是NH。

[0247] 在一个实施方案中,n是0或1。优选地,n是0。

[0248] 其中Y是NH并且n是0,自脱落接头可以称为对氨基苄基羰基接头(PABC)。

[0249] 自脱落接头在远距离位点被激活时将允许释放受保护的化合物,沿着下面显示的线进行(对于n=0):

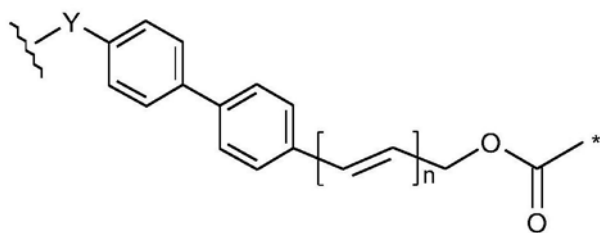


[0251] 其中 $\text{L}^*$ 是接头剩余部分的活化形式。这些基团具有将激活位点与受保护的化合物区分开的优点。如上所述,亚苯基可以是任选取代的。

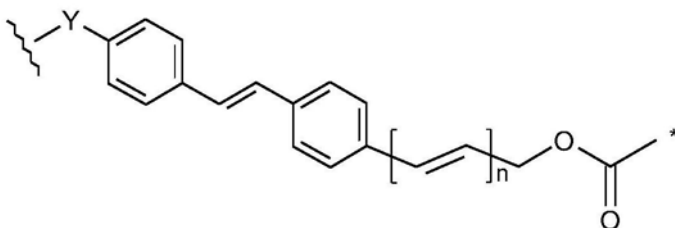
[0252] 在本文中描述的一个实施方案中,基团 $\text{L}^*$ 是如本文所述的接头 $\text{L}^1$ ,其可以包括二肽

基团。

[0253] 在另一个实施方案中,  $-C(=O)O-$  和  $L^2$  一起形成选自以下的基团:

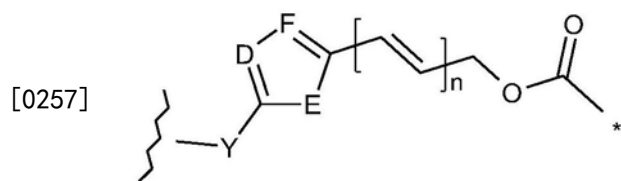


[0254]



[0255] 其中星号、波浪线、Y和n如上定义。每个亚苯基环任选被一个、两个或三个如本文所述的取代基取代。在一个实施方案中, 具有Y取代基的亚苯基环是任选取代的并且不具有Y取代基的亚苯基环是未取代的。在一个实施方案中, 具有Y取代基的亚苯基环是未取代的并且不具有Y取代基的亚苯基环是任选取代的。

[0256] 在另一个实施方案中,  $-C(=O)O-$  和  $L^2$  一起形成选自以下的基团:



[0258] 其中星号、波浪线、Y和n如上定义, E是O、S或NR, D是N、CH或CR, 并且F是N、CH或CR。

[0259] 在一个实施方案中, D是N。

[0260] 在一个实施方案中, D是CH。

[0261] 在一个实施方案中, E是O或S。

[0262] 在一个实施方案中, F是CH。

[0263] 在一个优选实施方案中, 接头是组织蛋白酶不稳定的接头。

[0264] 在一个实施方案中,  $L^1$  包含二肽。二肽可以呈现为  $-NH-X_1-X_2-CO-$ , 其中  $-NH-$  和  $-CO-$  分别代表氨基酸基团  $X_1$  和  $X_2$  的N端和C端。二肽中的氨基酸可以是天然氨基酸的任何组合。在接头是组织蛋白酶不稳定的接头时, 二肽可以是组织蛋白酶介导的断裂的作用位点。

[0265] 此外, 对于那些分别具有羧基或氨基侧链官能团的氨基酸基团, 例如Glu和Lys, CO和NH可以代表该侧链官能团。

[0266] 在一个实施方案中, 二肽、 $-NH-X_1-X_2-CO-$  中的基团  $-X_1-X_2-$  选自:

[0267]  $-Phe-Lys-$ ,

[0268]  $-Val-Ala-$ ,

[0269]  $-Val-Lys-$ ,

[0270]  $-Ala-Lys-$ ,

[0271]  $-Val-Cit-$ ,

[0272]  $-Phe-Cit-$ ,

- [0273] -Leu-Cit-,
- [0274] -Ile-Cit-,
- [0275] -Phe-Arg-,
- [0276] -Trp-Cit-
- [0277] 其中Cit是瓜氨酸。
- [0278] 优选地,二肽、-NH-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-CO-中的基团-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-选自:
- [0279] -Phe-Lys-,
- [0280] -Val-Ala-,
- [0281] -Val-Lys-,
- [0282] -Ala-Lys-,
- [0283] -Val-Cit-。
- [0284] 最优选地,二肽、-NH-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-CO-中的基团-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-是-Phe-Lys-或-Val-Ala-。
- [0285] 可以使用其他二肽组合,包括Dubowchik等人,Bioconjugate Chemistry,2002, 13, 855-869描述的那些,以引用方式并入本文。
- [0286] 在一个实施方案中,在适当的情况下,氨基酸侧链是衍生化的。例如,氨基酸侧链的氨基或羧基可以被衍生化。
- [0287] 在一个实施方案中,侧链氨基酸如赖氨酸的氨基NH<sub>2</sub>是选自由NHR和NRR'组成的组的衍生形式。
- [0288] 在一个实施方案中,侧链氨基酸如天冬氨酸的羧基COOH是选自由COOR、CONH<sub>2</sub>、CONHR和CONRR'组成的组的衍生化形式。
- [0289] 在一个实施方案中,在适当的情况下,氨基酸侧链是化学保护的。侧链保护基可以是下面相对于基团R<sup>1</sup>讨论的基团。本发明的发明人证实受保护的氨基酸序列可被酶断裂。例如,已经证实包含Boc侧链保护的Lys残基的二肽序列可被组织蛋白酶断裂。
- [0290] 用于氨基酸侧链的保护基在本领域是熟知的并且在Novabiochem Catalog中描述。其他保护基策略在Protective Groups in Organic Synthesis, Greene和Wuts中列出。
- [0291] 用于具有反应性侧链官能团的那些氨基酸的可能的侧链保护基在下面示出:
- [0292] Arg:Z、Mtr、Tos;
- [0293] Asn:Trt、Xan;
- [0294] Asp:Bzl、t-Bu;
- [0295] Cys:Ac、Bzl、Bzl-OMe、Bzl-Me、Trt;
- [0296] Glu:Bzl、t-Bu;
- [0297] Gln:Trt、Xan;
- [0298] His:Boc、Dnp、Tos、Trt;
- [0299] Lys:Boc、Z-Cl、Fmoc、Z、Alloc;
- [0300] Ser:Bzl、TBDMS、TBDPS;
- [0301] Thr:Bz;
- [0302] Trp:Boc;
- [0303] Tyr:Bzl、Z、Z-Br。
- [0304] 在一个实施方案中,选择侧链保护与作为帽化基团或其一部分(存在时)提供的基

团互不相关。因此,除去侧链保护基不会除去帽化基团,或是帽化基团一部分的任何保护基官能团。

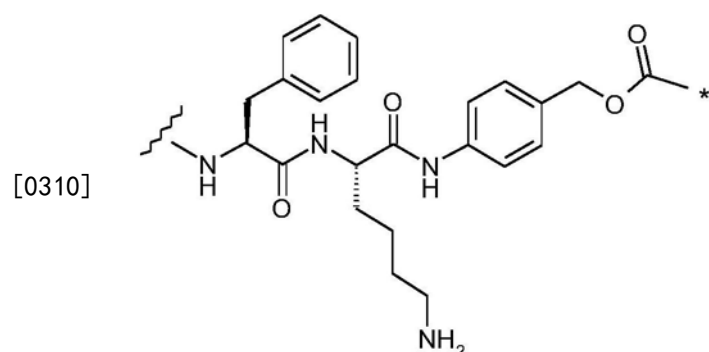
[0305] 在本发明的其他实施方案中,选择的氨基酸是那些不具有反应性侧链官能团的。例如,氨基酸可以选自:Ala、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Pro和Val。

[0306] 在一个实施方案中,二肽与自脱落接头组合使用。自脱落接头可以与 $-X_2-$ 连接。

[0307] 当存在自脱落接头时, $-X_2-$ 与自脱落接头直接连接。优选基团 $-X_2-CO-$ 与Y连接,其中Y是NH,从而形成基团 $-X_2-CO-NH-$ 。

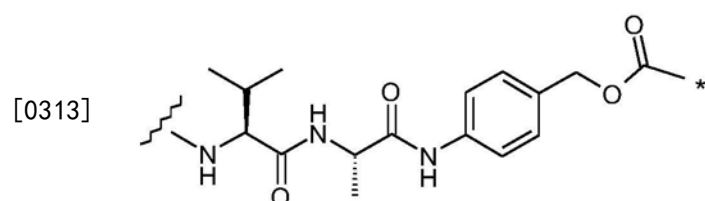
[0308]  $-NH-X_1-$ 与A直接连接。A可以包含官能团 $-CO-$ ,从而形成与 $-X_1-$ 的酰胺连接。

[0309] 在一个实施方案中, $L^1$ 和 $L^2$ 与 $-OC(=O)-$ 一起包含基团 $NH-X_1-X_2-CO-PABC-$ 。PABC基团与N10位直接连接。优选地,自脱落接头和二肽一起形成基团 $-NH-Phe-Lys-CO-NH-PABC-$ ,其在下面图示:



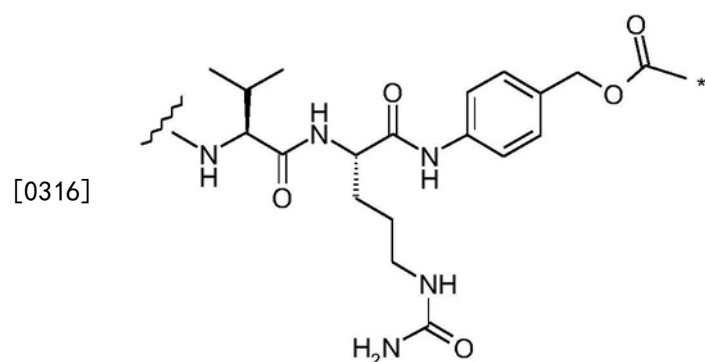
[0311] 其中星号表示与N10位的连接点,波浪线表示与接头 $L^1$ 其余部分的连接点或与A的连接点。优选地,波浪线表示与A的连接点。Lys氨基酸的侧链可以用例如,如上所述的Boc、Fmoc或Alloc保护。

[0312] 此外,自脱落接头和二肽一起形成基团 $-NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-$ ,其在下面图示:



[0314] 其中星号和波浪线如上定义。

[0315] 此外,自脱落接头和二肽一起形成基团 $-NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-$ ,其在下面图示:



[0317] 其中星号和波浪线如上定义。

[0318] 各种封端基团如下所述,包括基于众所周知的保护基的那些。

[0319] 在一个实施方案中, $L^3$ 是可断裂的接头 $L^1$ ,并且 $L^2$ 与 $OC(=O)$ 一起形成自脱落接头。在该实施方案中, $G^2$ 是Ac(乙酰基)或Moc,或选自以下的氨基甲酸酯保护基:

[0320] Alloc、Fmoc、Boc、Troc、Teoc、Psec、Cbz和PNZ。

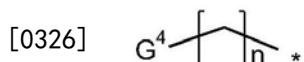
[0321] 任选地,氨基甲酸酯保护基进一步选自Moc。

[0322] 在另一个实施方案中, $G^2$ 是酰基- $C(=O)G^3$ ,其中 $G^3$ 选自烷基(包括环烷基、烯基和炔基)、杂烷基、杂环基和芳基(包括杂芳基和碳芳基)。这些基团可以是任选取代的。在适当的情况下,酰基与 $L^3$ 或 $L^2$ 的氨基一起可以形成酰胺键。在适当的情况下,酰基与 $L^3$ 或 $L^2$ 的羟基一起可以形成酯键。

[0323] 在一个实施方案中, $G^3$ 是杂烷基。杂烷基可以包含聚乙二醇。杂烷基可以具有杂原子,如O或N,靠近酰基,从而在适当的情况下与基团 $L^3$ 或 $L^2$ 中存在的杂原子(在适当的情况下)形成氨基甲酸酯或碳酸酯基团。

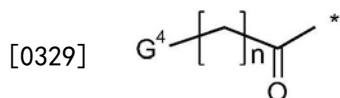
[0324] 在一个实施方案中, $G^3$ 选自 $NH_2$ 、 $NHR$ 和 $NRR'$ 。优选地, $G^3$ 是 $NRR'$ 。

[0325] 在一个实施方案中 $G^2$ 是基团:



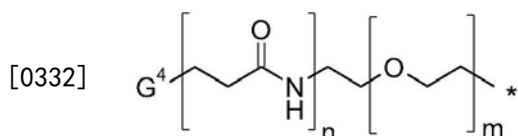
[0327] 其中星号表示与 $L^3$ 的连接点, $n$ 是0至6并且 $G^4$ 选自OH、OR、SH、SR、COOR、CONH<sub>2</sub>、CONHR、CONRR'、NH<sub>2</sub>、NHR、NRR'、NO<sub>2</sub>和卤代。基团OH、SH、NH<sub>2</sub>和NHR是受保护的。在一个实施方案中, $n$ 是1至6,并且优选 $n$ 是5。在一个实施方案中, $G^4$ 是OR、SR、COOR、CONH<sub>2</sub>、CONHR、CONRR'和NRR'。在一个实施方案中, $G^4$ 是OR、SR和NRR'。优选 $G^4$ 选自OR和NRR',最优选 $G^4$ 是OR。最优选 $G^4$ 是OMe。

[0328] 在一个实施方案中,基团 $G^2$ 是:



[0330] 其中星号表示与 $L^3$ 的连接点,并且 $n$ 和 $G^4$ 如上定义。

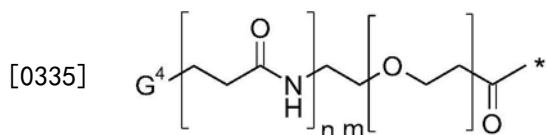
[0331] 在一个实施方案中,基团 $G^2$ 是:



[0333] 其中星号表示与 $L^3$ 的连接点, $n$ 是0或1, $m$ 是0至50,并且 $G^4$ 选自OH、OR、SH、SR、COOR、CONH<sub>2</sub>、CONHR、CONRR'、NH<sub>2</sub>、NHR、NRR'、NO<sub>2</sub>和卤代。在一个优选实施方案中, $n$ 是1并且 $m$ 是0至10、1至2,优选4至8,并且最优选4或8。在另一个实施方案中, $n$ 是1并且 $m$ 是10至50,优选20至40。基团OH、SH、NH<sub>2</sub>和NHR是受保护的。在一个实施方案中, $G^4$ 是OR、SR、COOR、CONH<sub>2</sub>、CONHR、CONRR'和NRR'。在一个实施方案中, $G^4$ 是OR、SR和NRR'。优选 $G^4$ 选自OR和NRR',最优选 $G^4$ 是OR。优选 $G^4$ 是OMe。

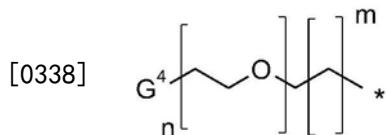
[0334] 在一个实施方案中,基团 $G^2$ 是:





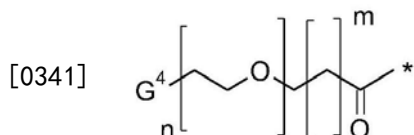
[0336] 其中星号表示与L<sup>3</sup>的连接点,并且n、m和G<sup>4</sup>如上定义。

[0337] 在一个实施方案中,基团G<sup>2</sup>是:



[0339] 其中n是1-20,m是0-6,并且G<sup>4</sup>选自OH、OR、SH、SR、COOR、CONH<sub>2</sub>、CONHR、CONRR'、NH<sub>2</sub>、NHR、NRR'、NO<sub>2</sub>和卤代。在一个实施方案中,n是1-10。在另一个实施方案中,n是10至50,优选20至40。在一个实施方案中,n是1。在一个实施方案中,m是1。基团OH、SH、NH<sub>2</sub>和NHR是受保护的。在一个实施方案中,G<sup>4</sup>是OR、SR、COOR、CONH<sub>2</sub>、CONHR、CONRR'和NRR'。在一个实施方案中,G<sup>4</sup>是OR、SR和NRR'。优选G<sup>4</sup>选自OR和NRR',最优选G<sup>4</sup>是OR。优选G<sup>4</sup>是OMe。

[0340] 在一个实施方案中,基团G<sup>2</sup>是:



[0342] 其中星号表示与L<sup>3</sup>的连接点,并且n、m和G<sup>4</sup>如上定义。

[0343] 在以上每个实施方案中,G<sup>4</sup>可以是OH、SH、NH<sub>2</sub>和NHR。这些基团优选是受保护的。

[0344] 在一个实施方案中,OH用Bzl、TBDMS或TBDPS保护。

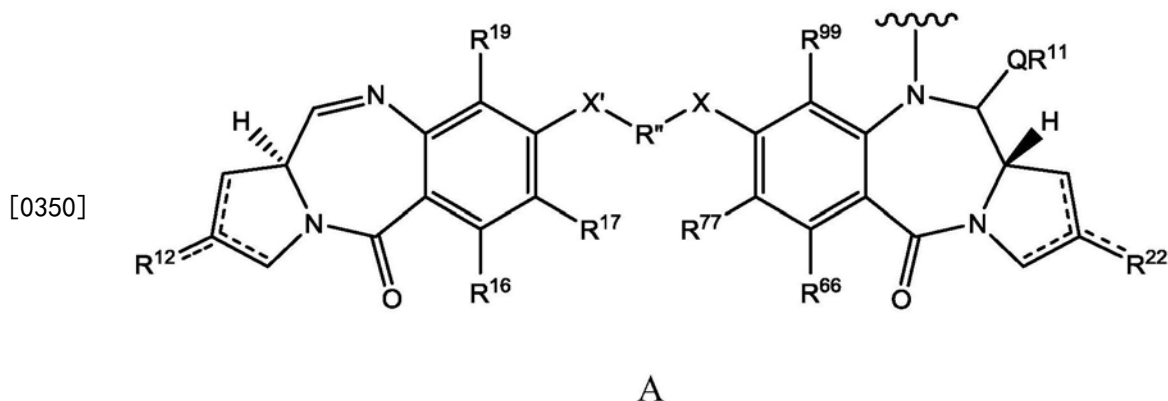
[0345] 在一个实施方案中,SH是用Acm、Bzl、Bzl-OMe、Bzl-Me或Trt保护的。

[0346] 在一个实施方案中,NH<sub>2</sub>或NHR是用Boc、Moc、Z-Cl、Fmoc、Z或Alloc保护的。

[0347] 在一个实施方案中,基团G<sup>2</sup>与基团L<sup>3</sup>组合存在,该基团L<sup>3</sup>是二肽。

[0348] 不希望帽化基团与细胞结合剂连接。因此,存在于二聚体中的其他单体作为借助于接头与细胞结合剂的连接点。因此,优选存在于帽化基团中的官能团不可与细胞结合剂反应。因此,优选避免诸如OH、SH、NH<sub>2</sub>、COOH等反应性官能团。然而,如果被保护这些官能团可以存在于帽化基团中,如上所述。

[0349] 在本发明的一些实施例中,D是式A的药物部分



[0351] 以及其盐和溶剂化物,其中:

- [0352] 波浪线表示与接头的共价连接位点；
- [0353] 虚线表示在C1和C2或C2和C3之间任选存在双键；
- [0354]  $R^{22}$ 独立地选自H、OH、=O、=CH<sub>2</sub>、CN、R<sup>m</sup>、O R<sup>m</sup>、=CH-R<sup>D</sup>、=C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>、O-SO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>和CO R<sup>m</sup>，并且任选地还选自卤代或二卤代，其中R<sup>D</sup>独立地选自R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>、CO R<sup>m</sup>、CHO、CO<sub>2</sub>H和卤代；
- [0355] R<sup>66</sup>和R<sup>99</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NHR<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代；
- [0356] R<sup>77</sup>独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代；
- [0357] Q独立地选自O、S和NH；
- [0358] R<sup>11</sup>是H或R<sup>m</sup>，或者，其中Q是O是O、SO<sub>3</sub>M，其中M是金属阳离子；
- [0359] R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>各自独立地选自任选地取代的C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环基和C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>芳基，并且任选相对于基团N R<sup>m</sup> R<sup>p</sup>、R<sup>m</sup>和R<sup>p</sup>与它们连接的氮原子一起形成任选取代的4-、5-、6-或7-元杂环；
- [0360] R<sup>12</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>19</sup>和R<sup>17</sup>分别如R<sup>22</sup>、R<sup>66</sup>、R<sup>99</sup>和R<sup>77</sup>定义。
- [0361] R''是C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>亚烷基，其链可以被一个或多个杂原子例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环例如苯或吡啶间断，所述环是任选地取代的；
- [0362] X和X'独立地选自O、S和N(H)。
- [0363] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物，其中p是2。
- [0364] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物，其中抗体与一种或多种选自由以下组成的组的多肽结合：
- [0365] BMPR1B；
- [0366] E16；
- [0367] STEAP1；
- [0368] 0772P；
- [0369] MPF；
- [0370] Napi3b；
- [0371] Sema 5b；
- [0372] PSCA hlg；
- [0373] ETBR；
- [0374] MSG783；
- [0375] STEAP2；
- [0376] TrpM4；
- [0377] CRIPTO；
- [0378] CD21；
- [0379] CD79b；
- [0380] FcRH2；
- [0381] HER2；
- [0382] NCA；
- [0383] MDP；
- [0384] IL20Rα；

- [0385] 短蛋白聚糖；
- [0386] EphB2R；
- [0387] ASLG659；
- [0388] PSCA；
- [0389] GEDA；
- [0390] BAFF-R；
- [0391] CD22；
- [0392] CD79a；
- [0393] CXCR5；
- [0394] HLA-DOB；
- [0395] P2X5；
- [0396] CD72；
- [0397] LY64；
- [0398] FcRH1；
- [0399] IRTA2；
- [0400] TENB2；
- [0401] PMEL17；
- [0402] TMEFF1；
- [0403] GDNF-Ra1；
- [0404] Ly6E；
- [0405] TMEM46；
- [0406] Ly6G6D；
- [0407] LGR5；
- [0408] RET；
- [0409] LY6K；
- [0410] GPR19；
- [0411] GPR54；
- [0412] ASPHD1；
- [0413] 酪氨酸酶；
- [0414] TMEM118；
- [0415] GPR172A；
- [0416] MUC16和
- [0417] CD33。
- [0418] 本发明还涉及治疗有需要的人的疾病的方法，其包括对所述人施用有效量的如权利要求1所述的抗体药物偶联物。
- [0419] 本发明还涉及药物化合物，其包含权利要求1的化合物及其在药学上可接受的载体。
- [0420] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物，其中抗体与一种或多种选自由以下组成的组的多肽结合：

[0421] STEAP1;  
[0422] Napi3b;  
[0423] STEAP2;  
[0424] TrpM4;  
[0425] CRIPTO;  
[0426] CD21;  
[0427] CD79b;  
[0428] FcRH2;  
[0429] HER2;  
[0430] CD22;  
[0431] CD79a;  
[0432] CD72;  
[0433] LY64;  
[0434] Ly6E;  
[0435] MUC16;和  
[0436] CD33。

[0437] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物,其中抗体与CD33结合。

[0438] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物,其中所述抗体与CD33结合并且所述抗CD33抗体包含含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2、含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L3、含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H3。

[0439] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物,其中抗体与CD33结合并且所述抗CD33抗体包含含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL结构域和含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VH结构域。

[0440] 在一些实施方案中,抗体药物偶联物的抗体结合CD33。在一些实施方案中,抗体药物偶联物的抗体包含(a)含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H1;(b)含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H2;(c)含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H3;(d)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L1;(e)含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)含有选自SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-L3。

[0441] 在一些实施方案中,抗体含有如上提供的任一种实施方案中的VH和如上提供的任一种实施方案中的VL。在一个实施方案中,抗体分别含有SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26中的VL和VH序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0442] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物,其中抗体与NaPi3b结合。

[0443] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物,其中所述抗体与NaPi3b结合并且所述NaPi3b抗体包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-L2、含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-L3、含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-H3。

[0444] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物,其中抗体与NaPi3b结合并且所述NaPi3b抗体包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VL结构域和含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VH结构域。

[0445] 本发明还涉及任何一种以上抗体药物偶联物,其中抗体与NaPi3b结合并且所述NaPi3b抗体含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0446] 定义

[0447] 除非另外说明,否则本文中使用的以下术语和短语旨在具有以下含义:当本文中使用商品名时,申请人旨在独立地包括商品名产品配方、通用名药和商品名产品的活性药物成分。

[0448] 本文中使用的术语“拟肽”或PM表示非肽化学部分。肽是通过肽(酰胺)键连接的氨基酸单体的短链,当一个氨基酸的羧基与另一个的氨基反应时形成共价化学键。最短的肽是二肽,由2个通过单个肽键连接的氨基酸组成,接着是三肽、四肽等。拟肽化学部分包括非氨基酸化学部分。拟肽化学部分也可以包括一个或多个由一个或多个非氨基酸化学单元隔开的氨基酸。拟肽化学部分在其化学结构任何部分都不含有两个或两个以上由肽键连接的邻近氨基酸。

[0449] 本文中使用的术语“氨基酸”表示甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺或瓜氨酸。

[0450] 本文中的术语“抗体”是以广义使用的并且特定地涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出希望的生物活性(Miller等人(2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861)。抗体可以是鼠、人、人源、嵌合的,或来源于其他物种。抗体是由免疫系统形成的蛋白质,其能够识别并结合特定的抗原。(Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 第五版, Garland Publishing, New York)。靶抗原一般来讲具有众多结合位点,也称为表位,由多个抗体上的CDR识别。特定地结合不同表位的每个抗体具有不同结构。因此,一个抗原可能具有一种以上对应抗体。抗体包括全长免疫球蛋白分子或全长免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有抗原结合位点免疫特异性结合目标靶抗原或其部分的分子,这些靶标包括但不限于癌细胞或产生与自身免疫疾病有关的自身免疫抗体的细胞。本文中公开的免疫球蛋白可以具有任何类型(例如, IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、种类(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可以来源于任何物种。然而,在一个方面中,免疫球蛋白是人、鼠或兔来源。

[0451] 本文中使用的术语“抗体片段”含有全长抗体的一部分,一般来讲是抗原结合区或其可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体(diabodies);线性抗体;小抗体(minibodies) (Olafsen等人(2004) *Protein Eng. Design&Sel.* 17(4):315-323),由Fab表达库产生的片段、抗独特型(抗Id)抗体、CDR(互补决定区域)和免疫特异性结合至癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原的以上任何一种的表位结合片段、单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0452] 本文中使用的术语“单克隆抗体”是指从基本同源抗体群获得的抗体,即,除了可能以小量存在的可能的天然存在的突变之外,构成该群的各个抗体是相同的。单克隆抗体

是高度特异性的,其针对单个抗原位点。此外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体的优势在于它们可以被合成而不被其他抗体污染。修饰语“单克隆”表明抗体的特性是由基本同源的抗体群获得,不应理解为需要通过任何特定方法制备该抗体。例如,根据本发明有待使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人(1975) *Nature*, 256:495首次描述的杂交瘤法制备,或者可以通过重组DNA方法(参见例如:US 4816567;US 5807715)制备。单克隆抗体还可以使用Clackson等人(1991) *Nature*, 352:624-628;Marks等人(1991) *J.Mol.Biol.*, 222:581-597等描述的技术从噬菌体抗体库中分离。

[0453] 本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体以及这些抗体的片段,其中重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体种类或亚类的抗体的相应序列完全相同或同源,而该一种或多种链的剩余部分与源于其他物种或属于其他抗体种类或亚类的抗体的相应序列完全相同或同源,只要它们表现出希望的生物活性(US 4816567;和Morrison等人(1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81:6851-6855)。本文中感兴趣的嵌合抗体包括含有来源于非人灵长类动物(例如,猕猴科(Old World Monkey)或猩猩科(Ape)等)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类动物化(primatized)”抗体。

[0454] 本文中使用的术语“完整抗体”是包含VL和VH结构域以及轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的抗体。恒定结构域可以天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。完整抗体可以具有一个或多个“效应子功能”,其是指可归因于抗体的Fc恒定区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物活性。抗体效应子功能的实例包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;和诸如B细胞受体和BCR等细胞表面受体的下调。

[0455] 本文中使用的术语“Fc区”表示含有至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延长到重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文中另外指出,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991所述。

[0456] 本文中使用的术语“骨架”或“FR”是指除了高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR一般来讲由四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常出现在VH(或VL)中的以下序列序列中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0457] 取决于其重链的恒定结构域的氨基酸序列,完整抗体可以分成不同“种类”。有五种主要类别的完整的免疫球蛋白抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的一些可以进一步分成“亚类”(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同抗体种类的重链恒定结构域分别称作 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。Ig形式包括铰接修饰或无铰链形式(Roux等人(1998) *J.Immunol.* 161:4083-4090;Lund等人(2000) *Eur.J.Biochem.* 267:7246-7256;US 2005/0048572;US 2004/0229310)。

[0458] 本文中使用的术语“人抗体”是指具有对应于人或人细胞产生的或来源于使用人抗体指令或其他人抗体编码序列的非人源的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义特定地

排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0459] 本文中使用的术语“人共有骨架”是指代表人免疫球蛋白VL或VH骨架序列选择中最常出现的氨基酸残基的骨架。一般来讲,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。一般来讲,序列的亚组是Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,亚组是上述Kabat等人中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,亚组是上述Kabat等人中的亚组III。

[0460] 本文中使用的术语“人源化抗体”是指包含来自非人HVR和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含大体上所有至少一个以及通常两个可变结构域,其中所有或大体上所有HVR(例如,CDR)对应于非人抗体的那些,并且所有或大体上所有FR对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分来源于人抗体的抗体恒定区。抗体的“人源化形式”,例如,非人抗体,是指已经进行人源化的抗体。

[0461] 本文中使用的术语“超可变区”或“HVR”是指序列和/或形式结构上定义的环(“超可变环”)超可变的抗体可变结构域的每个区域。一般来讲,天然四链抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。HVR一般来讲包含来自超可变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列变异性和/或涉及抗原识别。示例性超可变环出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)。(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。示例性CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)出现在L1的氨基酸残基24-34、L2的50-56、L3的89-97、H1的31-35B、H2的50-65和H3的95-102(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。除VH中的CDR1外,CDR通常包含形成超可变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”,其是接触抗原的残基。SDR包含在称为简写-CDR或a-CDR之内的CDR的区域中。示例性a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2和a-CDR-H3)出现在L1的氨基酸残基31-34、L2的50-55、L3的89-96、H1的31-35B、H2的50-58和H3的95-102。(参见Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008))。除非另外指出,否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如,FR残基)在本文中是根据上述Kabat等人编号的。

[0462] 本文中使用的术语“可变区”或“可变结构域”是指涉及使抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链(分别是VH和VL)的可变结构域通常具有相似结构,每个结构域包含四个保守的骨架区(FR)和三个超可变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等人 *Kuby Immunology*, 第六版, W.H. Freeman and Co., 91页 (2007))。单个VH或VL结构域可以足以带来抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合所述抗原的抗体的VH或VL结构域来分离以分别筛选互补VL或VH结构域的库。参见,例如,Portolano等人, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson等人, *Nature* 352:624-628 (1991)。

[0463] 本文中使用的术语“载体”是指能够使与其连接的另一种核酸增殖的核酸分子。该术语包括载体作为自我复制核酸结构以及载体并入已经将其引入的宿主细胞的基因组中。某些载体能够引导与载体可操作连接的核酸的表达。这些载体在本文中称为“表达载体”。

[0464] 本文中使用的术语“游离半胱氨酸氨基酸”是指已经工程化为亲代抗体,具有硫醇

官能团(-SH)并且没有作为分子内或分子间二硫键成对的半胱氨酸氨基酸残基。

[0465] 本文中使用的术语“接头”“接头单元”或“连接”表示含有共价连接药物部分与抗体的原子链的化学部分。在多种实施方案中,接头是二价基,表示为L。

[0466] 本文中使用的术语“药物部分”表示抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如,At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、Pb<sup>212</sup>和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如,甲氨蝶呤、adriamycin、长春花生物碱(长春新碱、长春花碱、依托泊苷)、多柔比星、美法仑、丝裂霉素C、苯丁酸氮芥、柔红霉素或其他嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段如核酸酶;以及下面公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0467] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“酰基”是指基团-C(O)R',其中R'是烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基或杂环基,各自如本文所定义。

[0468] 除非在权利要求中另外定义,否则术语“烷氧基”是指基团-OR',其中R'是如上定义的C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基或C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基。“烷氧基”的实例包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、异丁氧基、环丙氧基和环丁氧基以及其卤化形式,例如氟甲氧基和二氟甲氧基。

[0469] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“烷基”是指具有一个到十二个(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)碳原子的直链或支链、一价或二价烃链基团,其可以是具有多个取代度的未取代或取代的,例如一个、两个、三个、四个、五个或六个包括在本发明之内。取代基的实例选自自由卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、羧酸和烷硫基组成的组。本文中使用的“烷基”的实例包括但不限于甲基(Me、-CH<sub>3</sub>)、乙基(Et、-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、1-丙基(n-Pr、正丙基、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-丙基(i-Pr、异丙基、-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、1-丁基(n-Bu、正丁基、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-甲基-1-丙基(i-Bu、异丁基、-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-丁基(s-Bu、仲丁基、-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-甲基-2-丙基(t-Bu、叔丁基、-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)、1-苯基(正戊基、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-苯基(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-苯基(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-甲基-2-丁基(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-甲基-2-丁基(-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3-甲基-1-丁基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-甲基-1-丁基(-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、1-己基(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、2-己基(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-己基(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>))、2-甲基-2-苯基(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、3-甲基-2-苯基(-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)、4-甲基-2-苯基(-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3-甲基-3-苯基(-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2-甲基-3-苯基(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、2,3-二甲基-2-丁基(-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)、3,3-二甲基-2-丁基(-CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)以及二价(“亚烷基”)及其取代形式。取代的烷基的实例包括但不限于羟甲基、二氟甲基和三氟甲基。

[0470] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“烯基”表示具有两个到八个碳原子(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)的任何长度并带有至少一个不饱和位点(即碳-碳,sp<sup>2</sup>双键)的直链或支链、一价或二价烃链基团,其中烯基可以独立地任选取代有一个或多个在上面“烷基”定义中描述的取代基,并且包括具有“顺式”和“反式”取向的基团,或者“E”和“Z”取向。烯基的实例包括但不限于乙烯基(-CH=CH<sub>2</sub>)、丙-1-烯基(-CH=CHCH<sub>3</sub>)、丙-2-烯基(-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>)、2-甲基丙-1-烯基、丁-1-烯基、丁-2-烯基、丁-3-烯基、丁-1,3-二烯基、2-甲基丁-1,3-二烯基、己-1-烯基、己-2-烯基、己-3-烯基、己-4-烯基、己-1,3-二烯基以及其二价(“亚烯基”)和取代形式。



[0471] 除非另外在权利要求中定义,否则本文中使用的术语“炔基”是指具有两个到八个碳原子(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)的任何长度并带有至少一个不饱和位点的直链或支链、一价或二价烃基,即碳-碳,sp三键,其中炔基可以独立地任选取代有一个或多个在上面烷基定义中描述的取代基,炔基的实例包括但不限于乙炔基(-C≡CH)、丙-1-炔基(-C≡CCH<sub>3</sub>)、丙-2-炔基(炔丙基,-CH<sub>2</sub>C≡CH)、丁-1-炔基、丁-2-炔基和丁-3-炔基,以及其二价(“亚炔基”)和取代形式。

[0472] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“烷氨基”是指基团-NR'R",其中R'是H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基或C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基,并且R"是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基或C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基,烷氨基的实例包括但不限于甲基氨基、二甲基氨基、乙氨基、二乙基氨基、丙氨基和环丙基氨基。

[0473] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“酰胺”是指基团-C(O)NR'R",其中R'和R"各自独立地是H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基或C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基;酰胺的实例包括但不限于-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHCH<sub>3</sub>和-C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0474] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“芳基”是指芳香族、烃类、环系统。环系统可以是单环或稠合多环(例如,双环、三环等)、取代的或未取代的。在多种实施方案中,单环芳基环是C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>或C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>或C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>,其中这些碳数是指形成环系统的碳原子数目。C<sub>6</sub>环系统,即苯基环,是芳基。在多种实施方案中,多环环是双环芳基,其中双环芳基的实例包括C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>或C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>。萘基环(具有10个碳原子)是多环芳基。芳基取代基的实例如下面在“任选取代的”定义中所述。

[0475] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“氰基”是指基团-CN。

[0476] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的“环烷基”是指非芳香族、取代的或未取代的、饱和或部分不饱和烃类环基团。取代基的实例在“任选取代的”定义中描述。在一个实例中,环烷基是3至12个碳原子(C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>)。在其他实例中,环烷基是C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>或C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>。在其他实例中,环烷基(作为单环)是C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>或C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>。在另一个实例中,环烷基基团(作为二环)是C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>。在另一个实施例中,环烷基,作为螺环系统,是C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>。单环环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、全氘代环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环己二烯基、环庚基、环辛基、环壬基、环癸基、环十一基和环十二基。具有7至12个环原子的二环环烷基的示例性排列包括(但不限于)[4,4]、[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]环系统。示例性桥二环环烷基包括但不限于二环[2.2.1]庚烷、二环[2.2.2]辛烷和二环[3.2.2]壬烷。螺环烷基的实例包括螺[2.2]戊烷、螺[2.3]己烷、螺[2.4]庚烷、螺[2.5]辛烷和螺[4.5]癸烷。

[0477] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“酯”是指基团-C(O)OR',其中R'是C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基或C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基。

[0478] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“杂环”“杂环烷基”或“杂环基”是指含有2至12个环碳原子和1至3个杂原子的未取代的和取代的单或多环非芳环系统。多环环系统可以是稠合双或三环、螺式或桥接。杂原子的实例包括N、O和S,包括N-氧化物、硫氧化物和二氧化物。在一个实施方案中,环是三至八元环并且是充分饱和或具有一个或多个不饱和度。多个取代度包括在本定义之内。取代基的实例在下面定义。“杂环”基团的实例包括但不限于四氢呋喃基、吡喃基、1,4-二噁烷基、1,3-二噁烷基、氧杂戊环基、氧杂环丁基、2-氧杂-6-氮杂螺[3.3]庚-6-基、哌啶基、吡咯烷基、吗啉基、氮杂环丁基、哌嗪基、吡咯烷酮基(pyrrolidinonyl)、哌嗪酮基(piperazinonyl)、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基及其

各种互变异构体。

[0479] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“杂芳基”是指含有1至9个碳和至少一个杂原子的芳环系统。杂原子的实例包括N、O和S。杂芳基可以是单环或多环,取代的或未取代的。单环杂芳基在环中可以具有2至6个环碳原子和1至3个环杂原子,而多环杂芳基可以含有3至9个环碳原子和1至5个环杂原子。多环杂芳基环可以含有稠合、螺式或桥接环连接,例如,二环杂芳基是多环杂芳基。二环杂芳基环可以含有8至12个成员原子。单环杂芳基环可以含有5至8个成员原子(碳和杂原子)。示例性杂芳基包括但不限于:苯并呋喃基、苯并噻吩基、呋喃基、咪唑基、吡咯基、氮杂吡咯基、氮杂苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并三唑基、苯并咪唑基、四嗪基、四唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹啉基、喹唑啉基、喹噁啉基、三嗪基、三唑基、噻唑基和苯硫基。杂芳基取代基的实例如下“任选取代的”定义所述。

[0480] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“杂芳烷基”表示基团(杂芳基) $C_1-C_3$ 烷基。

[0481] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“芳烷基”表示基团(芳基) $C_1-C_3$ 烷基。

[0482] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“尿素”是指基团 $-NR' C(O)NR''$ ,其中 $R'$ 和 $R''$ 各自独立地是H、 $C_1-C_6$ 烷基或 $C_3-C_6$ 环烷基。

[0483] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“任选地”表示随后描述的事件可以发生或不发生,并且包括同时包括事件发生和事件不发生。

[0484] 除非另外定义,否则本文中使用的短语“任选取代的”、“取代的”或其变型表示任选的替换,包括具有一个或多个取代基团的多个取代度,例如,一个、两个或三个。所述短语不应该理解为本文中描述和描绘的双重取代。示例性任选取代基团包括酰基、 $C_1-C_6$ 烷基、磺酰基、氨基、磺酰胺、亚砷、烷氧基、氰基、卤代、尿素、酯、羧酸、酰胺、羟基、氧代和硝基。

[0485] 卤代:F、Cl、Br和I。

[0486] 羟基:OH。

[0487] 烷氧基:OR,其中R是烷基,例如, $C_1-8$ 烷基。 $C_1-8$ 烷氧基的实例包括但不限于-OMe(甲氧基)、-OEt(乙氧基)、-O(nPr)(正丙氧基)、-O(iPr)(异丙氧基)、-O(nBu)(正丁氧基)、-O(sBu)(仲丁氧基)、-O(iBu)(异丁氧基)和-O(tBu)(叔丁氧基)。

[0488] 氧代(酮、-酮):=O。

[0489] 酰基(酮): $-C(=O)R$ ,其中R是酰基取代基,例如, $C_1-8$ 烷基(也称为 $C_1-8$ 烷酰基或 $C_1-8$ 烷酰基)、 $C_2-8$ 烯基(也称为 $C_2-8$ 烯酰基)、 $C_2-8$ 炔基(也称为 $C_2-8$ 炔酰基)、 $C_3-8$ 环烷基(也称为 $C_3-8$ 环烷酰基)、 $C_3-20$ 杂环基(也称为 $C_3-20$ 杂环酰基)、 $C_5-20$ 芳基(也称为 $C_5-20$ 芳酰基)或 $C_5-20$ 杂芳基(也称为 $C_5-20$ 杂芳酰基),优选 $C_1-8$ 烷基。酰基的实例包括但不限于 $-C(=O)CH_3$ (乙酰基)、 $-C(=O)CH_2CH_3$ (丙酰基)、 $-C(=O)C(CH_3)_3$ (t-丁酰基)和 $-C(=O)Ph$ (苯甲酰、苯基酮)。

[0490] 羧基(羧酸): $-C(=O)OH$ 。

[0491] 酯(羧酯、羧酸酯、氧羰基): $-C(=O)OR$ ,其中R是酯取代基,例如, $C_1-8$ 烷基、 $C_2-8$ 烯基、 $C_2-8$ 炔基、 $C_3-8$ 环烷基、 $C_3-8$ 杂环基、 $C_5-20$ 芳基或 $C_5-20$ 杂芳基,优选 $C_1-8$ 烷基。酯基的实例包括但不限于 $-C(=O)OCH_3$ 、 $-C(=O)OCH_2CH_3$ 、 $-C(=O)OC(CH_3)_3$ 和 $-C(=O)OPh$ 。

[0492] 氨基: $-NR^1R^2$ ,其中 $R^1$ 和 $R^2$ 独立地是氨基取代基,例如,氢、 $C_1-8$ 烷基、 $C_2-8$ 烯基、 $C_2-$

C<sub>8</sub>炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环基、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>芳基或C<sub>5</sub>-20杂芳基,优选H或C<sub>1-8</sub>烷基,或在“环状”氨基的情况下,R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>与它们连接的氮原子一起形成具有4至8个环原子的杂环。氨基可以是伯胺(-NH<sub>2</sub>)、仲胺(-NHR<sup>1</sup>)或叔胺(-NHR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>),并且阳离子形式可以是季胺(-<sup>+</sup>NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>)。氨基的实例包括但不限于-NH<sub>2</sub>、-NHCH<sub>3</sub>、-NHC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>和-NHPh。环状氨基的实例包括但不限于氮丙啶基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉代和硫吗啉代。

[0493] 酰氨基(氨基甲酰基、氨甲酰基、氨基羰基、甲酰胺): -C(=O)NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>,其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地是氨基取代基,如氨基定义。酰胺基的实例包括但不限于-C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)NHCH<sub>3</sub>、-C(=O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-C(=O)NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>和-C(=O)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,以及其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>与它们连接的氮原子一起形成例如哌啶羰基、吗啉羰基、硫吗啉羰基和哌嗪羰基中的杂环构造的酰胺基。

[0494] 硝基:-NO<sub>2</sub>。

[0495] 氰基(腈、甲腈):-CN。

[0496] 硫氧化物(亚磺酰基、亚磺):-S(=O)R,其中R是硫氧化物取代基,例如,C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环基、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>芳基或C<sub>5</sub>-20杂芳基,优选C<sub>1-8</sub>烷基。硫氧化物基团的实例包括但不限于-S(=O)CH<sub>3</sub>和-S(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0497] 磺(磺酰基):-S(=O)<sub>2</sub>R,其中R是磺取代基,例如,C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>杂环基、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>芳基或C<sub>5</sub>-20杂芳基,优选C<sub>1-8</sub>烷基,包括,例如,氟化或全氟化C<sub>1-8</sub>烷基。磺基团的实例包括但不限于-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(甲基磺酰基、甲磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(三氟甲磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>(乙磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>(九氟乙磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>(三氟乙磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>(氨基乙磺酰基)、-S(=O)<sub>2</sub>Ph(苯磺酰基, besyl)、4-甲基苯磺酰基(甲苯磺酰基)、4-氯苯磺酰基(氯苯磺酰基)、4-溴苯磺酰基(溴苯磺酰基)、4-硝基苯基(硝基苯基)、2-萘磺酸酯(萘磺酸酯基)和5-二甲基氨基-萘-1-基磺酸酯(丹磺酰基)。

[0498] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“治疗”是指减轻特定病状,消除或减少病状的一种或多种症状,减缓或消除病状的发展。

[0499] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“有效量”表示引起例如研究者或临床医师寻求的组织、系统、动物或人的生物或医学反应的药物或药剂的量。

[0500] 除非在权利要求中另外定义,否则本文中使用的术语“治疗有效量”表示与没有接受这种量的对应受试者相比引起疾病、病症或副作用的治疗或降低疾病或病症发展速率的降低的任何量。所述术语还包括在其范畴内有效增强正常生理功能的量。对于治疗中的使用,治疗有效量的式I化合物以及其盐可以作为粗制的化学品施用。此外,活性成分可以作为药物组合物提供。

[0501] 本发明还涉及实验部分中的任何一个实施例。

[0502] 本文中使用的短语“药学上可接受的盐”是指抗体药物偶联物(ADC)或接头药物部分的在药学上可接受的有机或无机盐。示例性的盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐、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、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐(gentisinate)、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))盐。药学上可接受的盐可以涉及包含

诸如醋酸根离子、琥珀酸根离子或其他反离子等的另一种分子。反离子可以稳定母化合物上的电荷的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐在其结构中可以具有一个以上带电原子。多个带电原子的情况是可以具有多个反离子的药学上可接受的盐的一部分。因此,药学上可接受的盐可以具有一个或多个带电原子和/或一个或多个反离子。

[0503] 不是在药学上可接受的其他盐可以用于制备本发明的化合物并且这些应该考虑形成本发明的其他方面。这些盐,诸如草酸或三氟醋酸盐等,虽然本身不是在药学上可接受的,但可在获得本发明化合物及其药学上可接受的盐中用于制备有用中间体的盐。

[0504] 本发明化合物可以以固体或液体形式存在。在固态,其可以以结晶或非结晶形式或作为其混合物存在。本领域技术人员将理解对于结晶或非结晶化合物在药学上可接受的溶剂化物形成溶剂化物。在结晶溶剂化物中,溶剂分子在结晶期间并入晶格。溶剂化物可以涉及诸如但不限于乙醇、异丙醇、DMSO、乙酸、乙醇胺或乙酸乙酯等非水溶剂,或它们可能涉及水作为并入晶格的溶剂。水作为并入晶格的溶剂的溶剂化物通常称为“水合物”。水合物包括化学计量水合物以及含有可变量水的组合物。本发明包括所有这些溶剂化物。

[0505] 本领域技术人员将进一步理解某些本发明化合物以晶形存在,包括其各种溶剂化物,可以显示多晶型现象(即出现不同晶体结构的能力)。这些不同晶形通常称为“多晶型物”。本发明包括所有这些多晶型物。多晶型物具有相同化学组成但是在结晶固态的堆积、几何排列及其他描述性质方面不同。因此,多晶型物可能具有不同的物理性质,如形状、浓密、硬度、变形性、稳定性和溶解性质。多晶型物通常显示不同熔点、IR光谱和X射线粉末衍射图案,其可以用于鉴别。本领域技术人员将理解例如,可以通过改变或调节制备化合物使用的反应条件或试剂来产生不同的多晶型物。例如,温度、压力或溶剂的改变可以产生多晶型物。此外,在一定条件下一个多晶型物可以自发转化成另一种多晶型物。

[0506] 本发明化合物或其盐可以以立体异构体形式存在(例如,其含有一个或多个不对称碳原子)。这些的单个立体异构体(对映异构体和非对映异构体)和混合物包括在本发明的范畴之内。同样地,应理解式(I)化合物或盐除了以化学式示出的之外可以以互变异构形式存在并且这些也包括在本发明的范畴之内。应理解本发明包括上文定义的特定基团的所有组合和亚型。本发明的范畴包括立体异构体的混合物以及纯化的对映异构体或对映体/非对映体富集的混合物。应理解本发明包括上文定义的特定基团的所有组合和亚型。

[0507] 本发明还包括本发明化合物的同位素标记的形式,但是事实是一个或多个原子被具有不同于在自然界中通常发现的原子质量或质量数不同的原子质量或质量数的原子替换。可以并入本发明化合物及其药学上可接受的盐的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素,如 $2\text{H}$ 、 $3\text{H}$ 、 $11\text{C}$ 、 $13\text{C}$ 、 $14\text{C}$ 、 $15\text{N}$ 、 $17\text{O}$ 、 $18\text{O}$ 、 $31\text{P}$ 、 $32\text{P}$ 、 $35\text{S}$ 、 $18\text{F}$ 、 $36\text{Cl}$ 、 $123\text{I}$ 和 $125\text{I}$ 。

[0508] 含有上述同位素和/或其他原子的其他同位素的本发明化合物及所述化合物的药学上可接受的盐在本发明范畴之内。本发明的同位素标记化合物,例如向其中并入诸如 $3\text{H}$ 、 $14\text{C}$ 等放射性同位素的那些,可用于药物和/或底物组织分布试验。氚代(即 $3\text{H}$ )和碳14(即 $14\text{C}$ )同位素是常用的,因为它们制备的容易性和检测限。 $11\text{C}$ 和 $18\text{F}$ 同位素可用于PET(电子发射断层扫描), $125\text{I}$ 同位素可用于SPECT(单光子发射计算机断层扫描),都在脑成像中有用。此外,用诸如氘(即 $2\text{H}$ )等重同位素取代由于更高的代谢稳定性可以提供某些治疗优势,例如增加活体内半衰期或降低用量需要,并且因此在某些情况下是优选的。本发明式I和之

后的同位素标记化合物一般来讲可以通过流程图和/或下面实施例中公开的操作实现,通过用易得的同位素标记试剂替代非同位素标记试剂。

[0509] ADC的药物组合物

[0510] 本发明的治疗性抗体药物偶联物(ADC)的药物配方通常制备用于肠胃外施用,即用在药学上可接受的肠胃外媒介物大剂量、静脉、肿瘤内注射并且以单元剂量可注射的形式。具有希望纯度的抗体药物偶联物(ADC)任选与在药学上可接受的稀释剂、载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences(1980)第16版,0sol,A.Ed.)混合,以冻干配方或水溶液形式。

[0511] 半胱氨酸工程抗体

[0512] 本发明化合物包括含有半胱氨酸工程抗体的抗体药物偶联物,其中野生型或亲代抗体的一个或多个氨基酸被半胱氨酸氨基酸替换。抗体的任何形式都可以这样工程化,即突变。例如,亲代Fab抗体片段可以被工程化形成半胱氨酸工程化Fab,本文中称为“ThioFab”。类似地,亲代单克隆抗体可以工程化形成“ThioMab”。应该注意,由于IgG抗体的二聚性质,在ThioFab中单位点突变得得到单个工程化半胱氨酸残基,而在ThioMab中单位点突变得得到两个工程化半胱氨酸残基。评价带有替换的(“工程化”)半胱氨酸(Cys)残基新引入的工程化半胱氨酸硫醇基的反应性。硫醇反应性值是在0至1.0范围内的相对、数值术语并且任何半胱氨酸工程化抗体都可以测定。本发明的半胱氨酸工程化抗体的硫醇反应性数值在0.6至1.0、0.7至1.0或0.8至1.0范围内。

[0513] 为了通过诱变制备半胱氨酸工程化抗体,通过多种本领域已知方法制备编码起始多肽的氨基酸序列变体的DNA。这些方法包括但不限于通过早期制备的编码所述多肽的DNA的位点引导(或寡核苷酸介导)诱变、PCR诱变和盒式诱变。重组抗体的变体还可以通过限制性片断操作或通过带有合成寡核苷酸的重叠延伸PCR来构建。致突变引物编码半胱氨酸密码子替换。可以采用标准诱变技术来产生编码这些突变型半胱氨酸工程化抗体的DNA。一般指南可以在Sambrook等人Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989和Ausubel等人Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley-Interscience,New York,N.Y.,1993中找到。

[0514] 半胱氨酸氨基酸可以在抗体中的活性位点工程化并且不形成链内或分子间二硫键(Junutula等人2008b Nature Biotech.,26(8):925-932;Dornan等人(2009)Blood 114(13):2721-2729;US7521541;US 7723485;W02009/052249,Shen等人(2012)Nature Biotech.,30(2):184-191;Junutula等人(2008)Jour of Immun.Methods332:41-52)。工程化半胱氨酸硫醇可以与具有硫醇反应性、亲电基团(如马来酰亚胺或 $\alpha$ 卤代酰胺)的本发明接头试剂或接头药物中间体反应形成带有半胱氨酸工程化抗体(ThioMab)和药物(D)部分的ADC。药物部分的位置因此可以是设计、控制和已知的。药物负载可以控制,因为工程化半胱氨酸硫醇基通常与硫醇反应性接头试剂或接头药物中间体反应产率高。通过在重链或轻链上的单个位点的取代将抗体工程化以引入半胱氨酸氨基酸可在对称的抗体上得到两个新的半胱氨酸。可以实现接近2的药物负载并且缀合产品ADC接近同质。

[0515] 本发明的半胱氨酸工程化抗体优选保留其野生型、亲代抗体对应物的抗原结合性能。因此,半胱氨酸工程化抗体能够结合(优选特异性地)抗原。这些抗原包括,例如肿瘤相

关抗原 (TAA)、细胞表面受体蛋白和其他细胞表面分子、跨膜蛋白、信号蛋白、细胞生存调节因子、细胞增殖调节因子、组织发育或分化相关分子 (例如, 已知的或猜想功能上有贡献)、淋巴因子、细胞因子、涉及细胞周期调控的分子、涉及血管发生的分子和血管生成相关分子 (例如, 已知的或猜想功能上有贡献)。肿瘤相关抗原可以是簇分化因子 (即, CD 蛋白)。半胱氨酸工程化抗体能够结合的抗原可以是上述类型之一的亚型的成员, 其中所述类型的其他亚型包含具有独特特性 (相对于目标抗原) 的其他分子/抗原。制备半胱氨酸工程化抗体用于与接头药物中间体通过链内二硫基的还原和再氧化来缀合。

[0516] 肿瘤相关抗原:

[0517] 在癌症治疗中可用于本发明抗体药物偶联物的抗体 (包括但不限于半胱氨酸工程抗体) 包括但不限于抗细胞表面受体抗体和肿瘤相关抗原 (TAA)。某些肿瘤相关抗原在本领域是已知的, 并且可以使用本领域熟知的方法和资料制备用于在形成抗体中使用。在发现癌症诊断和治疗的有效细胞目标的尝试中, 研究者设法确定与一种或多种正常非癌细胞相比在一种或多种特定类型的癌细胞表面上特定表达的跨膜或肿瘤相关多肽。经常地, 与非癌细胞表面上相比, 这些肿瘤相关多肽更大量地在癌细胞表面上表达。识别这些肿瘤相关细胞表面抗原多肽可为借助于基于抗体的疗法的破坏带来更特定地靶向癌细胞的能力。

[0518] 肿瘤相关抗原 TAA 的实例包括但不限于下面列出的那些。为了方便起见, 与这些抗原 (所有的在本领域是已知的) 有关的信息都列在下面并且包括名称、备用名称、Genbank 登记号和主要参考文献, 之后是国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的核酸和蛋白序列识别常规。列在下面的对应于 TAA 的核酸和蛋白序列是在诸如 GenBank 等公共数据库中可得到的。抗体靶向的肿瘤相关抗原包括相对于引用参考文献中确定序列具有至少约 70%、80%、85%、90% 或 95% 序列一致性的所有氨基酸序列变体和同工型, 和/或显示与具有引用参考文献中发现的序列的 TAA 大体上相同的生物性质或特性的那些。例如, 具有变体序列的 TAA 一般来讲能够与特定结合具有列出的对应序列的 TAA 的抗体特定地结合。本文中具体叙述的参考文献中的序列和公开内容明确地以引用方式并入。

[0519] (1) BMPRI1B (骨形态发生蛋白受体-IB 型, Genbank 登记号 NM\_001203)

[0520] ten Dijke, P. 等人, Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11): 1377-1382 (1997); W02004063362 (权利要求 2); W02003042661 (权利要求 12); US2003134790-A1 (页码 38-39); W02002102235 (权利要求 13; 页码 296); W02003055443 (页码 91-92); W0200299122 (实施例 2; 页码 528-530); W02003029421 (权利要求 6); W02003024392 (权利要求 2; 图 112); W0200298358 (权利要求 1; 页码 183); W0200254940 (页码 100-101); W0200259377 (页码 349-350); W0200230268 (权利要求 27; 页码 376); W0200148204 (实施例; 图 4)

[0521] NP\_001194 骨形态发生蛋白受体, IB 型/pid=NP\_001194.1-

[0522] 交叉引用: MIM: 603248; NP\_001194.1; AY065994

[0523] (2) E16 (LAT1, SLC7A5, Genbank 登记号 NM\_003486)

[0524] Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699): 288-291 (1998), Gaugitsch, H. W. 等人, (1992) J. Biol. Chem. 267 (16): 11267-11273; W02004048938 (实施例 2); W02004032842 (实施例 IV); W02003042661 (权利要求 12);

W02003016475 (权利要求1); W0200278524 (实施例2); W0200299074 (权利要求19; 页码127-129); W0200286443 (权利要求27; 页码222, 393); W02003003906 (权利要求10; 页码293); W0200264798 (权利要求33; 页码93-95); W0200014228 (权利要求5; 页码133-136); US2003224454 (图3); W02003025138 (权利要求12; 页码150);

[0525] NP\_003477 7类溶质载体(阳离子氨基酸转运蛋白,y+系统), 成员5/pid=NP\_003477.3-智人

[0526] 交叉引用:MIM:600182; NP\_003477.3; NM\_015923; NM\_003486\_1

[0527] (3) STEAP1 (六个前列腺跨膜上皮抗原, Genbank登记号NM\_012449)

[0528] Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R. S. 等人, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (25): 14523-14528; W02004065577 (权利要求6); W02004027049 (图1L); EP1394274 (实施例11); W02004016225 (权利要求2); W02003042661 (权利要求12); US2003157089 (实施例5); US2003185830 (实施例5); US2003064397 (图2); W0200289747 (实施例5; 页码618-619); W02003022995 (实施例9; 图13A, 实施例53; 页码173, 实施例2; 图2A);

[0529] NP\_036581 六个前列腺跨膜上皮抗原

[0530] 交叉引用:MIM:604415; NP\_036581.1; NM\_012449\_1

[0531] (4) 0772P (CA125, MUC16, Genbank登记号AF361486)

[0532] J. Biol. Chem. 276 (29): 27371-27375 (2001); W02004045553 (权利要求14); W0200292836 (权利要求6; 图12); W0200283866 (权利要求15; 页码116-121); US2003124140 (实施例16); 交叉引用: GI: 34501467; AAK74120.3; AF361486\_1

[0533] (5) MPF (MPF, MSLN, SMR、巨核细胞强化因子、间皮蛋白, Genbank登记号NM\_005823) Yamaguchi, N. 等人, Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (20): 11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1): 136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37): 21984-21990 (1995); W02003101283 (权利要求14); (W02002102235 (权利要求13; 页码287-288); W02002101075 (权利要求4; 页码308-309); W0200271928 (页码320-321); W09410312 (页码52-57); 交叉引用: MIM: 601051; NP\_005814.2; NM\_005823\_1

[0534] (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2、34类溶质载体(磷酸钠), 成员2, II型钠依赖性磷酸盐转运蛋白3b, Genbank登记号NM\_006424)

[0535] J. Biol. Chem. 277 (22): 19665-19672 (2002), Genomics 62 (2): 281-284 (1999), Feild, J. A. 等人, (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3): 578-582; W02004022778 (权利要求2); EP1394274 (实施例11); W02002102235 (权利要求13; 页码326); EP875569 (权利要求1; 页码17-19); W0200157188 (权利要求20; 页码329); W02004032842 (实施例IV); W0200175177 (权利要求24; 页码139-140);

[0536] 交叉引用: MIM: 604217; NP\_006415.1; NM\_006424\_1

[0537] (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm. 42015, SEMA5B, SEMAG, Semaphorin 5b Hlog, sema结构域, 七个凝血蛋白重复(1型和类1型), 跨膜结构域(TM)和短细胞质结构域, (semaphorin) 5B, Genbank登记号AB040878)

[0538] Nagase T. 等人, (2000) DNA Res. 7 (2): 143-150; W02004000997 (权利要求1); W02003003984 (权利要求1); W0200206339 (权利要求1; 页码50); W0200188133 (权利要求1;

页码41-43,48-58);W02003054152(权利要求20);W02003101400(权利要求11);

[0539] 登记号:Q9P283;EMBL;AB040878;BAA95969.1.Genew;HGNC:10737;

[0540] (8)PSCA hlg(2700050C12Rik,C530008016Rik,RIKEN cDNA 2700050C12,RIKEN cDNA 2700050C12gene,Genbank登记号AY358628);Ross等人(2002)Cancer Res.62:2546-2553;US2003129192(权利要求2);US2004044180(权利要求12);US2004044179(权利要求11);US2003096961(权利要求11);US2003232056(实施例5);W02003105758(权利要求12);US2003206918(实施例5);EP1347046(权利要求1);W02003025148(权利要求20);

[0541] 交叉引用:GI:37182378;AAQ88991.1;AY358628\_1

[0542] (9)ETBR(内皮素B型受体,Genbank登记号AY275463);

[0543] Nakamuta M.等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.177,34-39,1991;Ogawa Y.等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.178,248-255,1991;Arai H.等人,Jpn.Circ.J.56,1303-1307,1992;Arai H.等人,J.Biol.Chem.268,3463-3470,1993;Sakamoto A.,Yanagisawa M.等人,Biochem.Biophys.Res.Comm.178,656-663,1991;Elshourbagy N.A.等人,J.Biol.Chem.268,3873-3879,1993;Haendler B.等人,J.Cardiovasc.Pharmacol.20,s1-S4,1992;Tsutsumi M.等人,Genes 228,43-49,1999;Strausberg R.L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.99,16899-16903,2002;Bourgeois C.等人,J.Clin.Endocrinol.Metab.82,3116-3123,1997;Okamoto Y.等人,Biol.Chem.272,21589-21596,1997;Verheij J.B.等人,Am.J.Med.Genet.108,223-225,2002;Hofstra R.M.W.等人,Eur.J.Hum.Genet.5,180-185,1997;Puffenberger E.G.等人,Cell 79,1257-1266,1994;Attie T.等人,Hum.Mol.Genet.4,2407-2409,1995;Auricchio A.等人,Hum.Mol.Genet.5:351-354,1996;Amiel J.等人,Hum.Mol.Genet.5,355-357,1996;Hofstra R.M.W.等人,Nat.Genet.12,445-447,1996;Svensson P.J.等人,Hum.Genet.103,145-148,1998;Fuchs S.等人,Mol.Med.7,115-124,2001;Pingault V.等人,(2002)Hum.Genet.111,198-206;W02004045516(权利要求1);W02004048938(实施例2);W02004040000(权利要求151);W02003087768(权利要求1);W02003016475(权利要求1);W02003016475(权利要求1);W0200261087(图1);W02003016494(图6);W02003025138(权利要求12;页码144);W0200198351(权利要求1;页码124-125);EP522868(权利要求8;图2);W0200177172(权利要求1;页码297-299);US2003109676;US6518404(图3);US5773223(权利要求1a;Col 31-34);W02004001004;

[0544] (10)MSG783(RNF124,假设蛋白FLJ20315,Genbank登记号NM\_017763);

[0545] W02003104275(权利要求1);W02004046342(实施例2);W02003042661(权利要求12);W02003083074(权利要求14;页码61);W02003018621(权利要求1);W02003024392(权利要求2;图93);W0200166689(实施例6);

[0546] 交叉引用:LocusID:54894;NP\_060233.2;NM\_017763\_1

[0547] (11)STEAP2(HGNC\_8639,IPCA-1,PCANAP1,STAMP1,STEAP2,STMP、前列腺癌相关基因1、前列腺癌相关蛋白1、前列腺2的六个跨膜上皮抗原、六个跨膜前列腺蛋白,Genbank登记号AF455138)

[0548] Lab.Invest.82(11):1573-1582(2002);W02003087306;US2003064397(权利要求1;图1);W0200272596(权利要求13;页码54-55);W0200172962(权利要求1;图4B);



W02003104270 (权利要求11); W02003104270 (权利要求16); US2004005598 (权利要求22); W02003042661 (权利要求12); US2003060612 (权利要求12; 图10); W0200226822 (权利要求23; 图2); W0200216429 (权利要求12; 图10);

[0549] 交叉引用: GI: 22655488; AAN04080.1; AF455138\_1

[0550] (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B、瞬时受体电位阳离子通道、亚家族M、成员4, Genbank登记号NM\_017636)

[0551] Xu, X.Z. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19): 10692-10697 (2001), Cell 109 (3): 397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33): 30813-30820 (2003); US2003143557 (权利要求4); W0200040614 (权利要求14; 页码100-103); W0200210382 (权利要求1; 图9A); W02003042661 (权利要求12); W0200230268 (权利要求27; 页码391); US2003219806 (权利要求4); W0200162794 (权利要求14; 图1A-D);

[0552] 交叉引用: MIM: 606936; NP\_060106.2; NM\_017636\_1

[0553] (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1、畸胎瘤源生长因子, Genbank登记号NP\_003203或NM\_003212)

[0554] Ciccodicola, A. 等人, EMBO J. 8 (7): 1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3): 555-565 (1991); US2003224411 (权利要求1); W02003083041 (实施例1); W02003034984 (权利要求12); W0200288170 (权利要求2; 页码52-53); W02003024392 (权利要求2; 图58); W0200216413 (权利要求1; 页码94-95, 105); W0200222808 (权利要求2; 图1); US5854399 (实施例2; Col 17-18); US5792616 (图2);

[0555] 交叉引用: MIM: 187395; NP\_003203.1; NM\_003212\_1

[0556] (14) CD21 (CR2 (补体受体2) 或 C3DR (C3d/Epstein Barr 病毒受体) 或 Hs.73792 Genbank 登记号 M26004)

[0557] Fujisaku 等人 (1989) J. Biol. Chem. 264 (4): 2118-2125; Weis J.J. 等人, J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M. 等人, Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K. 等人, (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; W02004045520 (实施例4); US2004005538 (实施例1); W02003062401 (权利要求9); W02004045520 (实施例4); W09102536 (图9.1-9.9); W02004020595 (权利要求1);

[0558] 登记号: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1。

[0559] (15) CD79b (CD79B, CD79 $\beta$ , Ig $\beta$  (免疫球蛋白-相关 $\beta$  (immunoglobulin-associated beta)), B29, Genbank 登记号 NM\_000626 或 11038674)

[0560] Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7): 4126-4131, Blood (2002) 100 (9): 3068-3076, Muller 等人 (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6): 1621-1625; W02004016225 (权利要求2, 图140); W02003087768, US2004101874 (权利要求1, 页码102); W02003062401 (权利要求9); W0200278524 (实施例2); US2002150573 (权利要求5, 页码15); US5644033; W02003048202 (权利要求1, 页码306和309); WO 99/558658, US6534482 (权利要求13, 图17A/B); W0200055351 (权利要求11, 页码1145-1146);

[0561] 交叉引用: MIM: 147245; NP\_000617.1; NM\_000626\_1

[0562] (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (SH2结构域含磷酸酶锚定蛋白1a), SPAP1B, SPAP1C, Genbank登记号NM\_030764, AY358130)

[0563] Genome Res. 13 (10) : 2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2) : 87-95 (2002), Blood 99 (8) : 2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17) : 9772-9777 (2001), Xu, M.J. 等人, (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3) : 768-775; W02004016225 (权利要求2); W02003077836; W0200138490 (权利要求5; 图18D-1-18D-2); W02003097803 (权利要求12); W02003089624 (权利要求25);

[0564] 交叉引用: MIM: 606509; NP\_110391.2; NM\_030764\_1

[0565] (17) HER2 (ErbB2, Genbank登记号M11730)

[0566] Coussens L. 等人, Science (1985) 230 (4730) : 1132-1139; Yamamoto T. 等人, Nature 319, 230-234, 1986; Semba K. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M. 等人, J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J. 等人, J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S. 等人, Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A. 等人, (1993) Genomics 15, 426-429; W02004048938 (实施例2); W02004027049 (图1I); W02004009622; W02003081210; W02003089904 (权利要求9); W02003016475 (权利要求1); US2003118592; W02003008537 (权利要求1); W02003055439 (权利要求29; 图1A-B); W02003025228 (权利要求37; 图5C); W0200222636 (实施例13; 页码95-107); W0200212341 (权利要求68; 图7); W0200213847 (页码71-74); W0200214503 (页码114-117); W0200153463 (权利要求2; 页码41-46); W0200141787 (页码15); W0200044899 (权利要求52; 图7); W0200020579 (权利要求3; 图2); US5869445 (权利要求3; Col 31-38); W09630514 (权利要求2; 页码56-61); EP1439393 (权利要求7); W02004043361 (权利要求7); W02004022709; W0200100244 (实施例3; 图4);

[0567] 登记号: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1。

[0568] (18) NCA (CEACAM6, Genbank登记号M18728);

[0569] Barnett T. 等人, Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y. 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 16899-16903, 2002; W02004063709; EP1439393 (权利要求7); W02004044178 (实施例4); W02004031238; W02003042661 (权利要求12); W0200278524 (实施例2); W0200286443 (权利要求27; 页码427); W0200260317 (权利要求2);

[0570] 登记号: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

[0571] (19) MDP (DPEP1, Genbank登记号BC017023)

[0572] Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26) : 16899-16903 (2002); W02003016475 (权利要求1); W0200264798 (权利要求33; 页码85-87); JP05003790 (图6-8); W09946284 (图9);

[0573] 交叉引用: MIM: 179780; AAH17023.1; BC017023\_1

[0574] (20) IL20R $\alpha$  (IL20Ra, ZCYTOR7, Genbank登记号AF184971);

[0575] Clark H.F. 等人, Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J. 等人, Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H. 等人, Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L. 等人, J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J. 等人, J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S. 等人, (2003) Biochemistry 42: 12617-12624; Sheikh F. 等人,

(2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; EP1394274 (实施例11); US2004005320 (实施例5); W02003029262 (页码74-75); W02003002717 (权利要求2; 页码63); W0200222153 (页码45-47); US2002042366 (页码20-21); W0200146261 (页码57-59); W0200146232 (页码63-65); W09837193 (权利要求1; 页码55-59);

[0576] 登记号: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

[0577] (21) 短蛋白聚糖 (BCAN, BEHAB, Genbank 登记号 AF229053)

[0578] Gary S.C. 等人, Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F. 等人, Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; US2003186372 (权利要求11); US2003186373 (权利要求11); US2003119131 (权利要求1; 图52); US2003119122 (权利要求1; 图52); US2003119126 (权利要求1); US2003119121 (权利要求1; 图52); US2003119129 (权利要求1); US2003119130 (权利要求1); US2003119128 (权利要求1; 图52); US2003119125 (权利要求1); W02003016475 (权利要求1); W0200202634 (权利要求1);

[0579] (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, Genbank 登记号 NM\_004442)

[0580] Chan, J. 和 Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5): 897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21: 309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196: 177-244 (2000); W02003042661 (权利要求12); W0200053216 (权利要求1; 页码41); W02004065576 (权利要求1); W02004020583 (权利要求9); W02003004529 (页码128-132); W0200053216 (权利要求1; 页码42);

[0581] 交叉引用: MIM: 600997; NP\_004433.2; NM\_004442\_1

[0582] (23) ASLG659 (B7h, Genbank 登记号 AX092328)

[0583] US20040101899 (权利要求2); W02003104399 (权利要求11); W02004000221 (图3); US2003165504 (权利要求1); US2003124140 (实施例2); US2003065143 (图60); W02002102235 (权利要求13; 页码299); US2003091580 (实施例2); W0200210187 (权利要求6; 图10); W0200194641 (权利要求12; 图7b); W0200202624 (权利要求13; 图1A-1B); US2002034749 (权利要求54; 页码45-46); W0200206317 (实施例2; 页码320-321, 权利要求34; 页码321-322); W0200271928 (页码468-469); W0200202587 (实施例1; 图1); W0200140269 (实施例3; 页码190-192); W0200036107 (实施例2; 页码205-207); W02004053079 (权利要求12); W02003004989 (权利要求1); W0200271928 (页码233-234, 452-453); WO 0116318;

[0584] (24) PSCA (前列腺干细胞抗原前体, Genbank 登记号 AJ297436)

[0585] Reiter R.E. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z. 等人, Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275 (3): 783-788; W02004022709; EP1394274 (实施例11); US2004018553 (权利要求17); W02003008537 (权利要求1); W0200281646 (权利要求1; 页码164); W02003003906 (权利要求10; 页码288); W0200140309 (实施例1; 图17); US2001055751 (实施例1; 图1b); W0200032752 (权利要求18; 图1); W09851805 (权利要求17; 页码97); W09851824 (权利要求10; 页码94); W09840403 (权利要求2; 图1B);

[0586] 登记号: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

[0587] (25) GEDA (Genbank 登记号 AY260763);

- [0588] AAP14954脂肪瘤HMGIC融合伴侣样蛋白/pid=AAP14954.1-智人物种:智人(人类)
- [0589] W02003054152(权利要求20);W02003000842(权利要求1);W02003023013(实施例3,权利要求20);US2003194704(权利要求45);
- [0590] 交叉引用:GI:30102449;AAP14954.1;AY260763\_1
- [0591] (26)BAFF-R(B细胞活化因子受体,BLyS受体3,BR3,Genbank登记号AF116456);BAFF受体/pid=NP\_443177.1-智人
- [0592] Thompson,J.S.等人,Science 293(5537),2108-2111(2001);W02004058309;W02004011611;W02003045422(实施例;页码32-33);W02003014294(权利要求35;图6B);W02003035846(权利要求70;页码615-616);W0200294852(Col 136-137);W0200238766(权利要求3;页码133);W0200224909(实施例3;图3);
- [0593] 交叉引用:MIM:606269;NP\_443177.1;NM\_052945\_1;AF132600
- [0594] (27)CD22(B细胞受体CD22-B同工型,BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, Genbank登记号AK026467);
- [0595] Wilson等人(1991)J.Exp.Med.173:137-146;W02003072036(权利要求1;图1);
- [0596] 交叉引用:MIM:107266;NP\_001762.1;NM\_001771\_1
- [0597] (28)CD79a(CD79A,CD79 $\alpha$ 、免疫球蛋白相关 $\alpha$ ,与Ig $\beta$ 共价相互作用并且表面上与IgM分子形成复合物的B细胞特异性蛋白(CD79B),转导涉及B细胞分化的信号),pI:4.84,MW:25028TM:2[P]Gene Chromosome:19q13.2,Genbank登记号NP\_001774.10)
- [0598] W02003088808,US20030228319;W02003062401(权利要求9);US2002150573(权利要求4,页码13-14);W09958658(权利要求13,图16);W09207574(图1);US5644033;Ha等人(1992)J.Immunol.148(5):1526-1531;Mueller等人(1992)Eur.J.Biochem.22:1621-1625;Hashimoto等人(1994)Immunogenetics 40(4):287-295;Preud'homme等人(1992)Clin.Exp.Immunol.90(1):141-146;Yu等人(1992)J.Immunol.148(2)633-637;Sakaguchi等人(1988)EMBO J.7(11):3457-3464;
- [0599] (29)CXCR5(伯基特氏淋巴瘤受体1,由CXCL13趋化因子活化的G蛋白偶联受体,在淋巴细胞迁移和体液防卫中起作用,在HIV-2感染以及或许AIDS、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病的发展中发挥作用);372aa,pI:8.54MW:41959TM:7[P]Gene Chromosome:11q23.3,Genbank登记号NP\_001707.1)
- [0600] W02004040000;W02004015426;US2003105292(实施例2);US6555339(实施例2);W0200261087(图1);W0200157188(权利要求20,页码269);W0200172830(页码12-13);W0200022129(实施例1,页码152-153,实施例2,页码254-256);W09928468(权利要求1,页码38);US5440021(实施例2,col 49-52);W09428931(页码56-58);W09217497(权利要求7,图5);Dobner等人(1992)Eur.J.Immunol.22:2795-2799;Barella等人(1995)Biochem.J.309:773-779;
- [0601] (30)HLA-DOB(结合肽并且将其呈递给CD4+T淋巴细胞的MHC II类分子(Ia抗原)的 $\beta$ 亚基);273aa,pI:6.56MW:30820TM:1[P]Gene Chromosome:6p21.3,Genbank登记号NP\_002111.1)
- [0602] Tonnelle等人(1985)EMBO J.4(11):2839-2847;Jonsson等人(1989)Immunogenetics 29(6):411-413;Beck等人(1992)J.Mol.Biol.228:433-441;Strausberg

等人(2002)Proc.Natl.Acad.Sci USA99:16899-16903;Serenius等人(1987)J.Biol.Chem.262:8759-8766;Beck等人(1996)J.Mol.Biol.255:1-13;Naruse等人(2002)Tissue Antigens 59:512-519;W09958658(权利要求13,图15);US6153408(Col 35-38);US5976551(col 168-170);US6011146(col 145-146);Kasahara等人(1989)Immunogenetics 30(1):66-68;Larhammar等人(1985)J.Biol.Chem.260(26):14111-14119;

[0603] (31) P2X5(嘌呤能受体P2X配体门离子通道5,由胞外ATP设门的离子通道,可能涉及突触传导和神经发生,缺乏可能促进特发逼尿肌不稳定性的病理生理学);422aa,pI:7.63,MW:47206TM:1[P]Gene Chromosome:17p13.3,Genbank登记号NP\_002552.2)

[0604] Le等人(1997)FEBS Lett.418(1-2):195-199;W02004047749;W02003072035(权利要求10);Touchman等人(2000)Genome Res.10:165-173;W0200222660(权利要求20);W02003093444(权利要求1);W02003087768(权利要求1);W02003029277(页码82);

[0605] (32) CD72(B细胞分化抗原CD72, L y b-2) PROTEIN SEQUENCE Full maeaity...tafrfpd(1..359;359aa),pI:8.66,MW:40225TM:1[P]Gene Chromosome:9p13.3,Genbank登记号NP\_001773.1)

[0606] W02004042346(权利要求65);W02003026493(页码51-52,57-58);W0200075655(页码105-106);Von Hoegen等人(1990)J.Immunol.144(12):4870-4877;Strausberg等人(2002)Proc.Natl.Acad.Sci USA 99:16899-16903;

[0607] (33) LY64(淋巴细胞抗原64(RP105),富亮氨酸重复(LRR)家族的I型膜蛋白,调节B细胞活化和细胞凋亡,功能丧失与系统性红斑狼疮患者疾病活动增加相关联);661aa,pI:6.20,MW:74147TM:1[P]Gene Chromosome:5q12,Genbank登记号NP\_005573.1)

[0608] US2002193567;W09707198(权利要求11,页码39-42);Miura等人(1996)Genomics 38(3):299-304;Miura等人(1998)Blood 92:2815-2822;W02003083047;W09744452(权利要求8,页码57-61);W0200012130(页码24-26);

[0609] (34) FcRH1(Fc受体样蛋白1,含有C2型Ig样和ITAM结构域的免疫球蛋白Fc结构域的假设受体,可能在B淋巴细胞分化中发挥作用);429aa,pI:5.28,MW:46925TM:1[P]Gene Chromosome:1q21-1q22,Genbank登记号NP\_443170.1)

[0610] W02003077836;W0200138490(权利要求6,图18E-1-18-E-2);Davis等人(2001)Proc.Natl.Acad.Sci USA 98(17):9772-9777;W02003089624(权利要求8);EP1347046(权利要求1);W02003089624(权利要求7);

[0611] (35) IRTA2(免疫球蛋白超家族受体转位相关2,在B细胞发育和淋巴瘤生成中可能发挥作用的假设免疫受体;在一些B细胞恶性肿瘤中出现通过转位的基因反常);977aa,pI:6.88MW:106468TM:1[P]Gene Chromosome:1q21,Genbank登记号Human:AF343662,AF343663,AF343664,AF343665,AF369794,AF397453,AK090423,AK090475,AL834187,AY358085;Mouse:AK089756,AY158090,AY506558;NP\_112571.1

[0612] W02003024392(权利要求2,图97);Nakayama等人(2000)Biochem.Biophys.Res.Comm.277(1):124-127;W02003077836;W0200138490(权利要求3,图18B-1-18B-2);

[0613] (36) TENB2(TMEFF2,tomoregulin,TPEF,HPP1,TR、假设跨膜蛋白多糖,与生长因子

和卵泡抑素的EGF/heregulin家族相关);374aa,NCBI登记号:AAD55776,AAF91397,AAG49451,NCBI RefSeq:NP\_057276;NCBI Gene:23671;OMIM:605734;SwissProt Q9UIK5;Genbank登记号AF179274;AY358907,CAF85723,CQ782436

[0614] W02004074320 (SEQ ID NO 810);JP2004113151 (SEQ ID NOS 2,4,8);W02003042661 (SEQ ID NO 580);W02003009814 (SEQ ID NO 411);EP1295944 (页码69-70);W0200230268 (页码329);W0200190304 (SEQ ID NO 2706);US2004249130;US2004022727;W02004063355;US2004197325;US2003232350;US2004005563;US2003124579;Horie等人(2000) Genomics 67:146-152;Uchida等人(1999) Biochem.Biophys.Res.Comm.266:593-602;Liang等人(2000) Cancer Res.60:4907-12;Glynne-Jones等人(2001) Int J Cancer.Oct 15;94(2):178-84;

[0615] (37) PMEL17 (银同源物 (silver homolog);SILV;D12S53E;PMEL17;(SI);(SIL);ME20;gp100) BC001414;BT007202;M32295;M77348;NM\_006928;McGlinchey,R.P.等人(2009) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.106(33),13731-13736;Kummer,M.P.等人(2009) J.Biol.Chem.284(4),2296-2306;

[0616] (38) TMEFF1 (具有EGF样和两个卵泡抑素样结构域1的跨膜蛋白;Tomoregulin-1;H7365;C9orf2;C9ORF2;U19878;X83961) NM\_080655;NM\_003692;Harms,P.W.(2003) Genes Dev.17(21),2624-2629;Gery,S.等人(2003) Oncogene 22(18):2723-2727;

[0617] (39) GDNF-Ra1 (GDNF家族受体 $\alpha$ 1;GFRA1;GDNFR;GDNFRA;RETL1;TRNR1;RET1L;GDNFR- $\alpha$ 1;GFR-ALPHA-1;U95847;BC014962;NM\_145793) NM\_005264;Kim,M.H.等人(2009) Mol.Cell.Biol.29(8),2264-2277;Treanor,J.J.等人(1996) Nature 382(6586):80-83;

[0618] (40) Ly6E (淋巴细胞抗原6复合物,位点E;Ly67,RIG-E,SCA-2,TSA-1) NP\_002337.1;NM\_002346.2;de Nooij-van Dalen,A.G.等人(2003) Int.J.Cancer 103(6),768-774;Zammit,D.J.等人(2002) Mol.Cell.Biol.22(3):946-952;

[0619] (41) TMEM46 (shisa同源物2 (非洲爪蟾);SHISA2) NP\_001007539.1;NM\_001007538.1;Furushima,K.等人(2007) Dev.Biol.306(2),480-492;Clark,H.F.等人(2003) Genome Res.13(10):2265-2270;

[0620] (42) Ly6G6D (淋巴细胞抗原6复合物,位点G6D;Ly6-D,MEGT1) NP\_067079.2;NM\_021246.2;Mallya,M.等人(2002) Genomics 80(1):113-123;Ribas,G.等人(1999) J.Immunol.163(1):278-287;

[0621] (43) LGR5 (含有富亮氨酸重复的G蛋白偶联受体5;GPR49,GPR67) NP\_003658.1;NM\_003667.2;Salanti,G.等人(2009) Am.J.Epidemiol.170(5):537-545;Yamamoto,Y.等人(2003) Hepatology 37(3):528-533;

[0622] (44) RET (ret原癌基因;MEN2A;HSCR1;MEN2B;MTC1;(PTC);CDHF12;Hs.168114;RET51;RET-ELE1) NP\_066124.1;NM\_020975.4;Tsukamoto,H.等人(2009) Cancer Sci.100(10):1895-1901;Narita,N.等人(2009) Oncogene 28(34):3058-3068;

[0623] (45) LY6K (淋巴细胞抗原6复合物,位点K;LY6K;HSJ001348;FLJ35226) NP\_059997.3;NM\_017527.3;Ishikawa,N.等人(2007) Cancer Res.67(24):11601-11611;de Nooij-van Dalen,A.G.等人(2003) Int.J.Cancer 103(6):768-774;

[0624] (46) GPR19 (G蛋白偶联受体19;Mm.4787) NP\_006134.1;NM\_006143.2;Montpetit,

A.和Sinnott,D.(1999) Hum.Genet.105 (1-2):162-164;O'Dowd,B.F.等人(1996) FEBS Lett.394 (3):325-329;

[0625] (47) GPR54 (KISS1受体;KISS1R;GPR54;HOT7T175;AXOR12) NP\_115940.2;NM\_032551.4;Navenot,J.M.等人(2009) Mol.Pharmacol.75 (6):1300-1306;Hata,K.等人(2009) Anticancer Res.29 (2):617-623;

[0626] (48) ASPHD1 (含有天冬氨酸β羟化酶结构域的1;LOC253982) NP\_859069.2;NM\_181718.3;Gerhard,D.S.等人(2004) Genome Res.14 (10B):2121-2127;

[0627] (49) 酪氨酸酶(TYR;OCAIA;OCA1A;酪氨酸酶;SHEP3) NP\_000363.1;NM\_000372.4;Bishop,D.T.等人(2009) Nat.Genet.41 (8):920-925;Nan,H.等人(2009) Int.J.Cancer 125 (4):909-917;

[0628] (50) TMEM118 (无名指蛋白,跨膜2;RNFT2;FLJ14627) NP\_001103373.1;NM\_001109903.1;Clark,H.F.等人(2003) Genome Res.13 (10):2265-2270;Scherer,S.E.等人(2006) Nature 440 (7082):346-351

[0629] (51) GPR172A (G蛋白偶联受体172A;GPCR41;FLJ11856;D15Erttd747e) NP\_078807.1;NM\_024531.3;Ericsson,T.A.等人(2003) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.100 (11):6759-6764;Takeda,S.等人(2002) FEBS Lett.520 (1-3):97-101。

[0630] 在一个实施方案中,抗体结合一个或多个以下多肽:BMPRI1B;E16;STEAP1;0772P;MPF;Napi3b;Sema 5b;PSCA hlg;ETBR;MSG783;STEAP2;TrpM4;CRIPTO;CD21;CD79b;FcRH2;HER2;NCA;MDP;IL20Rα;短蛋白聚糖;EphB2R;ASLG659;PSCA;GEDA;BAFF-R;CD22;CD79a;CXCR5;HLA-DOB;P2X5;CD72;LY64;FcRH1;IRTA2;TENB2;PMEL17;TMEFF1;GDNF-Ra1;Ly6E;TMEM46;Ly6G6D;LGR5;RET;LY6K;GPR19;GPR54;ASPHD1;酪氨酸酶;TMEM118;GPR172A;和CD33。

[0631] 在一个实施方案中,该抗体与BMPRI1B结合;

[0632] 在一个实施方案中,该抗体与E16结合;

[0633] 在一个实施方案中,该抗体与STEAP1结合;

[0634] 在一个实施方案中,该抗体与0772P结合;

[0635] 在一个实施方案中,该抗体与MPF结合;

[0636] 在一个实施方案中,该抗体与Napi3b结合;

[0637] 在一个实施方案中,该抗体与Sema 5b结合;

[0638] 在一个实施方案中,该抗体与PSCA hlg结合;

[0639] 在一个实施方案中,该抗体与ETBR结合;

[0640] 在一个实施方案中,该抗体与MSG783结合;

[0641] 在一个实施方案中,该抗体与STEAP2结合;

[0642] 在一个实施方案中,该抗体与TrpM4结合;

[0643] 在一个实施方案中,该抗体与CRIPTO结合;

[0644] 在一个实施方案中,该抗体与CD21结合;

[0645] 在一个实施方案中,该抗体与CD79b结合;

[0646] 在一个实施方案中,该抗体与FcRH2结合;

[0647] 在一个实施方案中,该抗体与HER2结合;

- [0648] 在一个实施方案中,该抗体与NCA结合;
- [0649] 在一个实施方案中,该抗体与MDP结合;
- [0650] 在一个实施方案中,该抗体与IL20R $\alpha$ 结合;
- [0651] 在一个实施方案中,该抗体与短蛋白聚糖结合;
- [0652] 在一个实施方案中,该抗体与EphB2R结合;
- [0653] 在一个实施方案中,该抗体与ASLG659结合;
- [0654] 在一个实施方案中,该抗体与PSCA结合;
- [0655] 在一个实施方案中,该抗体与GEDA结合;
- [0656] 在一个实施方案中,该抗体与BAFF-R结合;
- [0657] 在一个实施方案中,该抗体与CD22结合;
- [0658] 在一个实施方案中,该抗体与CD79a结合;
- [0659] 在一个实施方案中,该抗体与CXCR5结合;
- [0660] 在一个实施方案中,该抗体与HLA-DOB结合;
- [0661] 在一个实施方案中,该抗体与P2X5结合;
- [0662] 在一个实施方案中,该抗体与CD72结合;
- [0663] 在一个实施方案中,该抗体与LY64结合;
- [0664] 在一个实施方案中,该抗体与FcRH1结合;
- [0665] 在一个实施方案中,该抗体与IRTA2结合;
- [0666] 在一个实施方案中,该抗体与TENB2结合;
- [0667] 在一个实施方案中,该抗体与PMEL17结合;
- [0668] 在一个实施方案中,该抗体与TMEFF1结合;
- [0669] 在一个实施方案中,该抗体与GDNF-Ra1结合;
- [0670] 在一个实施方案中,该抗体与Ly6E结合;
- [0671] 在一个实施方案中,该抗体与TMEM46结合;
- [0672] 在一个实施方案中,该抗体与Ly6G6D结合;
- [0673] 在一个实施方案中,该抗体与LGR5结合;
- [0674] 在一个实施方案中,该抗体与RET结合;
- [0675] 在一个实施方案中,该抗体与LY6K结合;
- [0676] 在一个实施方案中,该抗体与GPR19结合;
- [0677] 在一个实施方案中,该抗体与GPR54结合;
- [0678] 在一个实施方案中,该抗体与ASPHD1结合;
- [0679] 在一个实施方案中,该抗体与酪氨酸酶结合;
- [0680] 在一个实施方案中,该抗体与TMEM118结合;
- [0681] 在一个实施方案中,该抗体与GPR172A结合;
- [0682] 在一个实施方案中,该抗体与CD33结合。
- [0683] 亲代抗体还可以是包含白蛋白结合肽 (ABP) 序列的融合蛋白 (Dennis等人 (2002) “Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins” J Biol Chem.277:35035-35043;W0 01/45746)。本发明的抗体包括以下文献讲述的具有ABP序列的融合蛋白: (i) Dennis等人 (2002) J Biol Chem.277:35035-35043,在表



III和IV中,35038页;(ii)US 20040001827,在[0076];和(iii)WO 01/45746在12-13页,并且所有均以引用方式并入本文。

[0684] 抗体可以使用重组方法和组合物产生,例如,如US 4816567中所述并且是本领域已知的。在一些实施方案中,抗体是在真核宿主细胞中产生的(例如,哺乳动物宿主细胞)。在一些实施方案中,抗体是在原核宿主细胞中产生的(例如,大肠杆菌)。

[0685] 在某些实施方案中,可以向本文中提供的抗体的Fc区引入一个或多个氨基酸修饰,从而产生Fc区变体。所述Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置含有氨基酸修饰(例如替换)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区)。

[0686] 在某些实施方案中,本发明涵盖具有一些但不全有的效应子功能的抗体变体,这使其在抗体活体内半衰期是重要的而某些效应子功能(如补体和ADCC)是不必要或有害的应用中成为希望的候选药物。为了证明CDC和/或ADCC活性降低/消除,可以进行体外和/或活体内细胞毒性试验。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合试验以保证抗体缺少Fc $\gamma$ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。

[0687] ADC的药物负载

[0688] 药物负载是每个抗体的药物部分的平均数。药物负载可以在每个抗体(Ab) 1至8个药物(D)范围内,即其中1、2、3、4、5、6、7和8个药物部分与抗体共价连接。ADC的组成包括与范围从1到8的药物偶联的抗体集合。在由偶联反应制备ADC中的每个抗体的药物平均数可以通过诸如质谱、ELISA试验、电泳和HPLC等传统方法表征。还可以测定以p表示的ADC的数量分布。通过ELISA,可以测定在ADC的特定制备中的p的平均值(Hamblett等人(2004) Clin.Cancer Res.10:7063-7070;Sanderson等人(2005) Clin.Cancer Res.11:843-852)。然而,通过抗体抗原结合和ELISA的检测限,不能辨别p(药物)值的分布。此外,用于检测抗体药物偶联物的ELISA试验不确定药物部分与抗体连接的部位,如重链或轻链片段,或特定氨基酸残基。在一些情况下,其中p是来自具有其他药物负载的特定值的均质ADC的分离、纯化和表征可以通过诸如反相HPLC或电泳等方法实现。对于一些抗体药物偶联物,p可能受到抗体上的连接位点的数量的限制。例如,抗体可能只有一个或几个半胱氨酸硫醇基,或可能只有一个或几个有足够反应性的通过其于接头连接的硫醇基。较高的药物负载,例如p>5,可能引起某些抗体药物偶联物的聚集、不溶性、毒性或细胞渗透性的损失。

[0689] 通常,少于理论最大值的药物部分在偶联反应中与抗体偶联。抗体可以包含,例如,许多不与接头-药物中间体(X-L-D)或接头试剂反应的赖氨酸残基。只有最具有反应性的赖氨酸基团可以与胺-反应性接头试剂反应。此外,只有最具有反应性的半胱氨酸硫醇基可以与硫醇-反应性接头试剂或接头药物中间体反应。一般来讲,抗体不含有许多(如果有)可以与药物部分连接的游离并具有反应性半胱氨酸硫醇基。化合物的抗体中的大部分半胱氨酸硫醇残基以二硫键存在并且在部分或完全还原条件下必须被还原剂诸如二硫苏糖醇(DTT)或TCEP等还原。ADC的负载(药物/抗体比率,“DAR”)可以以几种不同的方式来控制,包括:(i)相对于抗体限制接头-药物中间体或接头试剂的摩尔过量,(ii)限制偶联反应时间或温度,和(iii)部分或限制用于半胱氨酸硫醇修饰的还原条件。

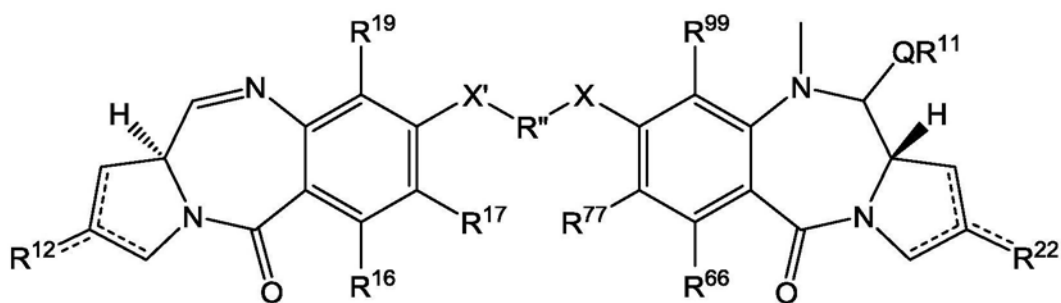
[0690] 在抗体的一种以上亲核或亲电基团与接头药物中间体反应时,或接头试剂接着二聚体药物部分试剂,随后得到的产物是具有与抗体连接的药物部分的分布的抗体药物偶联物的混合物,例如1、2、3等。诸如聚合物反相(PLRP)和疏水作用(HIC)等液相色谱方法可以

通过药物负载值分离混合物中的化合物。可以分离具有单一药物负载值(p)的ADC制剂,然而,这些单一负载值ADC可能仍然是非均质混合物,因为药物部分可能是在抗体上的不同位点借助于接头连接的。因此本发明的抗体-药物偶联物组合物包括抗体-药物偶联物化合物的混合物,其中该抗体具有一个或多个药物部分并且其中该药物部分可能在多个氨基酸残基处与抗体连接。

[0691] 因此,本发明还包含每个偶联物除p之外具有相同化学式的许多偶联物集合。

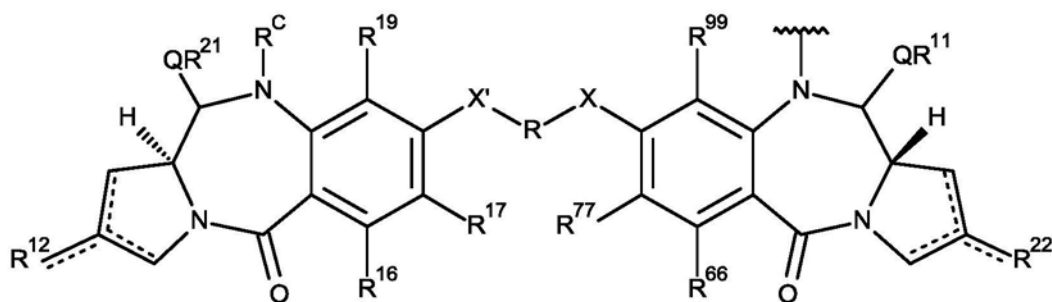
[0692] 示例性药物部分

[0693] ADC的非限制性示例性PBD二聚体组分具有式A或B:



A

[0694]



B

[0695] 以及其盐和溶剂化物,其中:

[0696] 波浪线表示与接头的共价连接位点;

[0697] 虚线表示在C1和C2或C2和C3之间任选存在双键;

[0698]  $R^{22}$ 独立地选自H、OH、=O、=CH<sub>2</sub>、CN、R<sup>m</sup>、O R<sup>m</sup>、=CH-R<sup>D</sup>、=C(R<sup>D</sup>)<sub>2</sub>、O-SO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>和CO R<sup>m</sup>,并且任选还选自卤代或二卤代,其中R<sup>D</sup>独立地选自R<sup>m</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>、CO R<sup>m</sup>、CHO、CO<sub>2</sub>H和卤代;

[0699]  $R^{66}$ 和 $R^{99}$ 独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>P</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;

[0700]  $R^{77}$ 独立地选自H、R<sup>m</sup>、OH、O R<sup>m</sup>、SH、S R<sup>m</sup>、NH<sub>2</sub>、NH R<sup>m</sup>、N R<sup>m</sup> R<sup>P</sup>、NO<sub>2</sub>、Me<sub>3</sub>Sn和卤代;

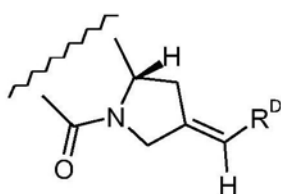
[0701] Q独立地选自O、S和NH;

[0702]  $R^{11}$ 是H,或R<sup>m</sup>,或者,其中Q是O是O、SO<sub>3</sub>M,其中M是金属阳离子;

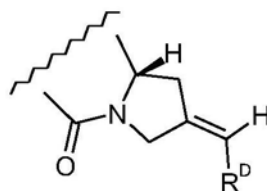
[0703] R<sup>m</sup>和R<sup>P</sup>各自独立地选自任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基、C<sub>3</sub>-8杂环基、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>芳基和C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>杂芳基,并且任选相对于基团N R<sup>m</sup> R<sup>P</sup>、R<sup>m</sup>和R<sup>P</sup>与它们连接的氮原子一起形成任选取代的4、5、6或7元杂环;

- [0704]  $R^{12}$ 、 $R^{16}$ 、 $R^{19}$ 、 $R^{21}$ 和 $R^{17}$ 分别如 $R^{22}$ 、 $R^{66}$ 、 $R^{99}$ 、 $R^{11}$ 和 $R^{77}$ 定义；
- [0705]  $R''$ 是 $C_3$ - $C_{12}$ 亚烷基，其链可以被一个或多个杂原子例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环例如苯或吡啶间断，所述环是任选地取代的；并且
- [0706] X和X'独立地选自O、S和N(H)；
- [0707]  $R^C$ 是封端基团。
- [0708] 在一些实施方案中， $R^{99}$ 和 $R^{19}$ 是H。
- [0709] 在一些实施方案中， $R^{66}$ 和 $R^{16}$ 是H。
- [0710] 在一些实施方案中， $R^{77}$ 是 $R^{17}$ 都是 $OR^{7A}$ ，其中 $R^{7A}$ 是任选取代的 $C_1$ - $C_4$ 烷基。在一些实施方案中， $R^{7A}$ 是Me。在其他实施方案中， $R^{7A}$ 是 $CH_2Ph$ 。
- [0711] 在一些实施方案中，X是O。
- [0712] 在一些实施方案中， $R^{11}$ 是H。在其他实施方案中， $R^{11}$ 是 $SO_3M$ ，其中M是金属阳离子。所述阳离子可以是 $Na^+$ 。
- [0713] 在一些实施方案中，在C1和C2以及C2和C3之间不存在双键。
- [0714] 在一些实施方案中，在每个单体单元中的C2和C3之间有双键。
- [0715] 在一些实施方案中，当 $R^{12}$ 和/或 $R^{22}$ 是 $C_{5-20}$ 芳基或 $C_{1-8}$ 烷基时，在C2和C3之间存在双键。
- [0716] 在一些实施方案中，在每个单体单元中的C1和C2之间有双键。
- [0717] 在一些实施方案中，当 $R^{12}$ 和/或 $R^{22}$ 是 $C_{5-20}$ 芳基或 $C_{1-8}$ 烷基时，在C1和C2之间存在双键。
- [0718] 在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地选自H、=O、=CH<sub>2</sub>、 $R^m$ 、=CH- $R^D$ 和=C( $R^D$ )<sub>2</sub>。
- [0719] 在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地选自H和 $R^m$ 。
- [0720] 在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 是H。
- [0721] 在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地是 $R^m$ 。在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地是任选取代的 $C_5$ - $C_{20}$ 芳基。在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地是任选取代的 $C_{5-7}$ 芳基。在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地是任选取代的 $C_{8-10}$ 芳基。在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地是任选取代的苯基。
- [0722] 在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地带有有一个至三个取代基团，更优选是1个和2个，并且单独取代的基团是最优选的。取代基可以是任何位置。
- [0723]  $R^{22}$ 和/或 $R^{12}$ 是 $C_{5-7}$ 芳基时，单个取代基优选在使键不邻近化合物其余部分的环原子上，即优选使键在化合物其余部分的 $\beta$ 或 $\gamma$ 位。因此， $C_{5-7}$ 芳基是苯基时，取代基优选在间位或对位，并且更优选是对位。
- [0724]  $R^{22}$ 和/或 $R^{12}$ 是任选取代的 $C_5$ - $C_{20}$ 芳基时，取代基可以选自：卤代、羟基、醚、甲酰基、酰基、羧基、酯、酰氧基、氨基、酰胺基、酰基酰胺基、氨基羧基、脲基、硝基、氰基和硫醚。
- [0725] 在一些实施方案中， $R^{22}$ 和 $R^{12}$ 独立地选自=O、=CH<sub>2</sub>、=CH- $R^D$ 和=C( $R^D$ )<sub>2</sub>。在PBD化合物中，基团=CH- $R^D$ 可以具有下面示出的任何一个构型：

[0726]



(I)



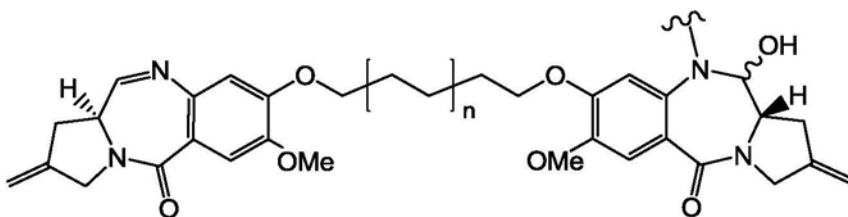
(II)

[0727] 在一些实施方案中,构型是构型(I)。

[0728] 在一些实施方案中,R<sup>22</sup>和R<sup>12</sup>是=CH<sub>2</sub>。[0729] 在一些实施方案中,R''选自C<sub>3</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>7</sub>、C<sub>9</sub>和C<sub>11</sub>亚烷基。[0730] 在一些实施方案中,R''选自C<sub>3</sub>、C<sub>5</sub>和C<sub>7</sub>亚烷基。[0731] 在一些实施方案中,R''是C<sub>3</sub>亚烷基或C<sub>5</sub>亚烷基。

[0732] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A(I)结构:

[0733]

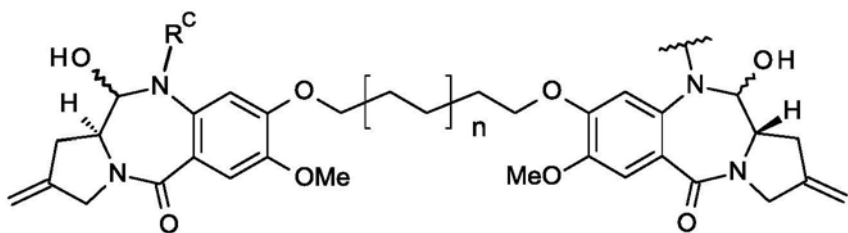


A(I);

[0734] 其中n是0或1。

[0735] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式B(I)结构:

[0736]

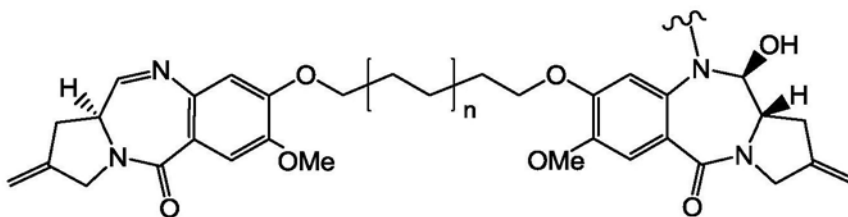


B(I);

[0737] 其中n是0或1。

[0738] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A(II)结构:

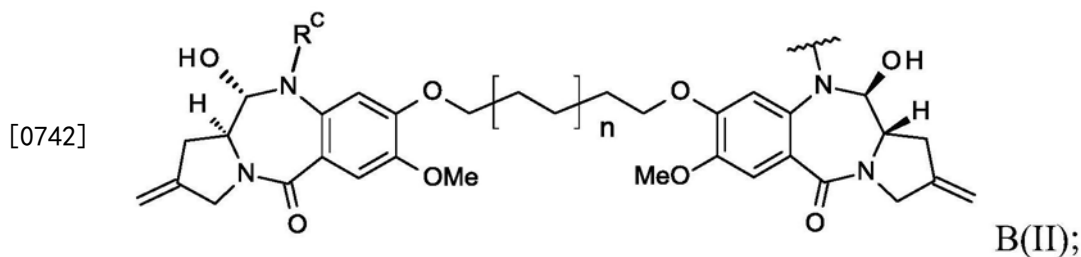
[0739]



A(II);

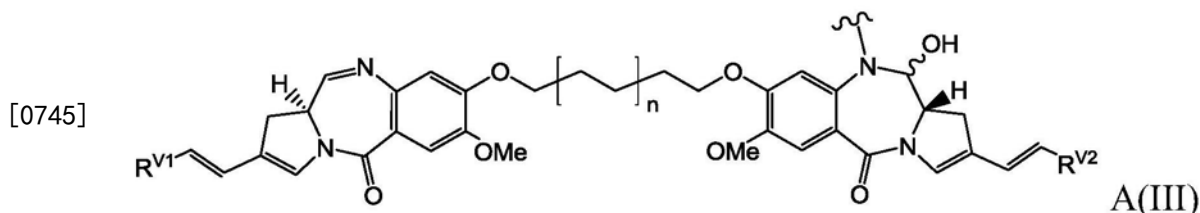
[0740] 其中n是0或1。

[0741] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式B(II)结构:



[0743] 其中n是0或1。

[0744] ADC的其他非限制性示例性PBD二聚体组分具有式A(III)：



[0746] 其中：

[0747] 波浪线表示与接头的共价连接位点；

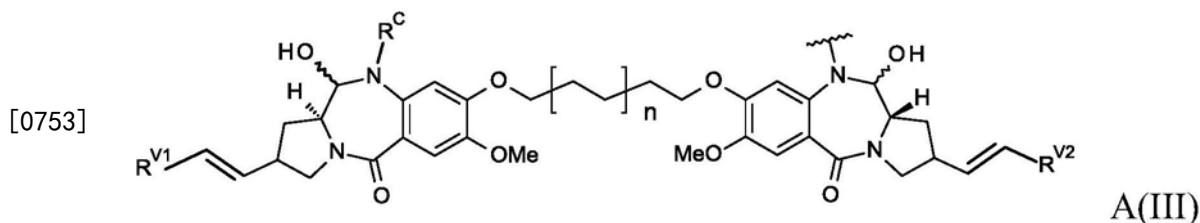
[0748] 与OH连接的波浪线表示S或R构型；

[0749]  $R^{V1}$ 和 $R^{V2}$ 独立地选自H、甲基、乙基和苯基(苯基可以任选被氟取代,特别是4位)和C<sub>5-6</sub>杂环烷基；并且

[0750] n是0或1。

[0751] 在一些实施方案中, $R^{V1}$ 和 $R^{V2}$ 独立地选自H、苯基和4-氟苯基。

[0752] ADC的其他非限制性示例性PBD二聚体组分具有式B(III)：



[0754] 其中：

[0755] 波浪线表示与接头的共价连接位点；

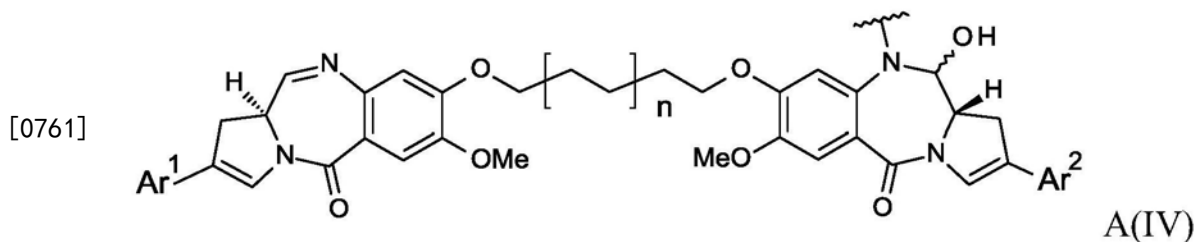
[0756] 与OH连接的波浪线表示S或R构型；

[0757]  $R^{V1}$ 和 $R^{V2}$ 独立地选自H、甲基、乙基和苯基(苯基可以任选被氟取代,特别是4位)和C<sub>5-6</sub>杂环烷基；并且

[0758] n是0或1。

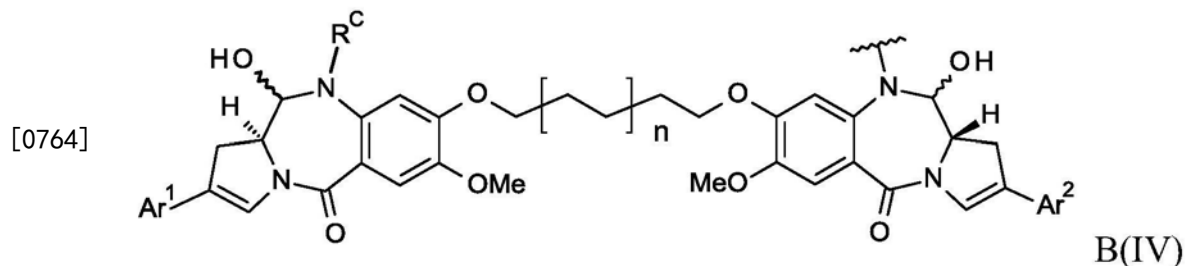
[0759] 在一些实施方案中, $R^{V1}$ 和 $R^{V2}$ 独立地选自H、苯基和4-氟苯基。

[0760] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A(IV)结构：



[0762] 其中 $Ar^1$ 和 $Ar^2$ 各自独立地是任选取代的 $C_{5-20}$ 芳基或 $C_{5-20}$ 杂芳基,并且n是0或1。 $Ar^1$ 和 $Ar^2$ 可以相同或不同。

[0763] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式B (IV) 结构:



[0765] 其中 $Ar^1$ 和 $Ar^2$ 各自独立地是任选取代的 $C_{5-20}$ 芳基或 $C_{5-20}$ 杂芳基,并且n是0或1。 $Ar^1$ 和 $Ar^2$ 可以相同或不同。

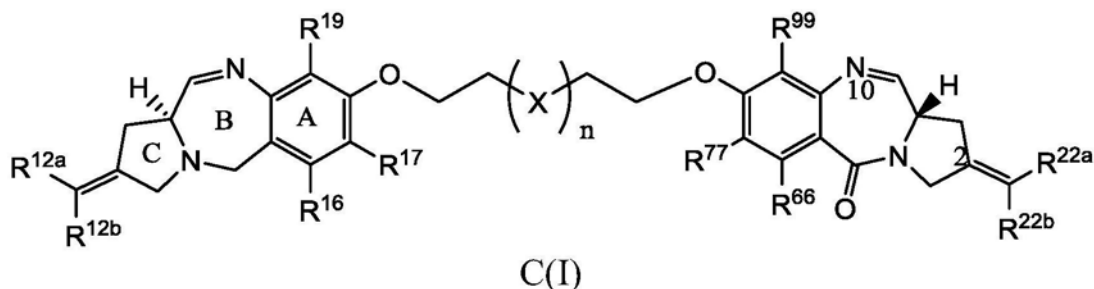
[0766] 在一个实施方案中,在每个以上实施方案中的 $Ar^1$ 和 $Ar^2$ 各自独立地选自任选取代的苯基、呋喃基、苯硫基和吡啶基。

[0767] 在一个实施方案中,在以上每个实施方案中的 $Ar^1$ 和 $Ar^2$ 是任选取代的苯基。

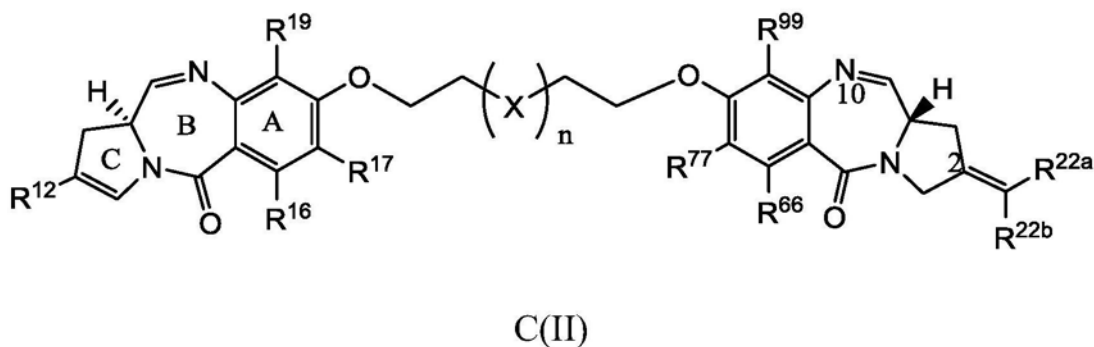
[0768] 在一个实施方案中,在每个以上实施方案中的 $Ar^1$ 和 $Ar^2$ 是任选取代的噻吩-2-基或噻吩-3-基。

[0769] 在一些实施方案中,接头可以在PBD二聚体药物部分的多个位点之一连接,包括B环的N10亚胺、C环的C-2内/外位或连接A环的系链(tether)单元(参见以下结构C (I) 和C (II))。

[0770] ADC的非限制性示例性PBD二聚体组分包括式C (I) 和C (II) :

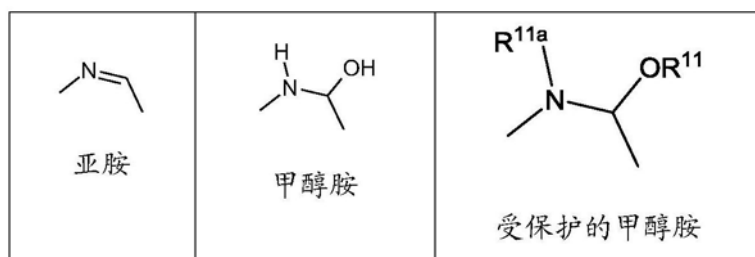


[0771]



[0772] 式C (I) 和C (II) 以其N10-C11亚胺形式示出。示例性的PBD药物部分还包括甲醇胺和保护甲醇胺形式,如以下表格所示:

[0773]

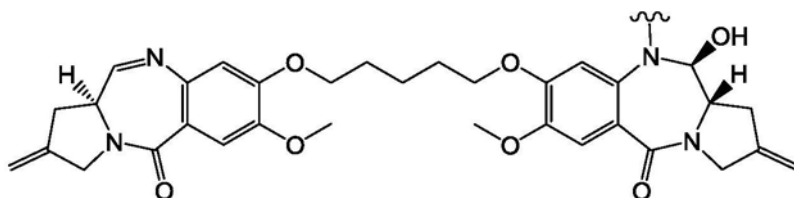


[0774] 其中:

[0775] X是CH<sub>2</sub> (n=1至5)、N或O;[0776] R<sup>77</sup>和R<sup>17</sup>独立地选自OR<sup>m</sup>和NR<sup>22b</sup>,其中R<sup>m</sup>是包含1至5个碳原子的伯、仲或叔烷基链;[0777] R<sup>22a</sup>、R<sup>12a</sup>、R<sup>22b</sup>和R<sup>12b</sup>各自独立地选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>芳基(包括取代的芳基)、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>杂芳基、-NH<sub>2</sub>、-NHMe、-OH和-SH,其中,在一些实施方案中,烷基、烯基和炔基链包含多达5碳原子;[0778] R<sup>66</sup>和R<sup>16</sup>独立地选自H、OR、NHR和NR<sup>22b</sup>,其中R是包含1至5个碳原子的伯、仲或叔烷基链;[0779] R<sup>99</sup>和R<sup>19</sup>独立地选自H、Me和OMe;[0780] R<sup>11a</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>5</sub>-<sub>20</sub>芳基(包括被卤代、硝基、氰基、烷氧基、烷基、杂环基取代的芳基)和C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>杂芳基,其中,在一些实施方案中,烷基、烯基和炔基链包含多达5个碳原子;[0781] R<sup>11</sup>是H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基或保护基(如乙酰基、三氟乙酰基、t-丁氧羰基(BOC)、苄氧羰基(CBZ)、9-芴甲氧羰基(Fmoc)或包含自脱落单元如缬氨酸-瓜氨酸-PAB的部分);[0782] R<sup>11a</sup>是H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基或保护基;[0783] 其中R<sub>1</sub>、R<sup>22a</sup>、R<sup>12a</sup>、R<sup>22b</sup>、R<sup>12b</sup>或R<sup>11a</sup>之一的氢或在A环之间的-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(X)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-间隔臂的氢被与ADC的接头连接的键替换。

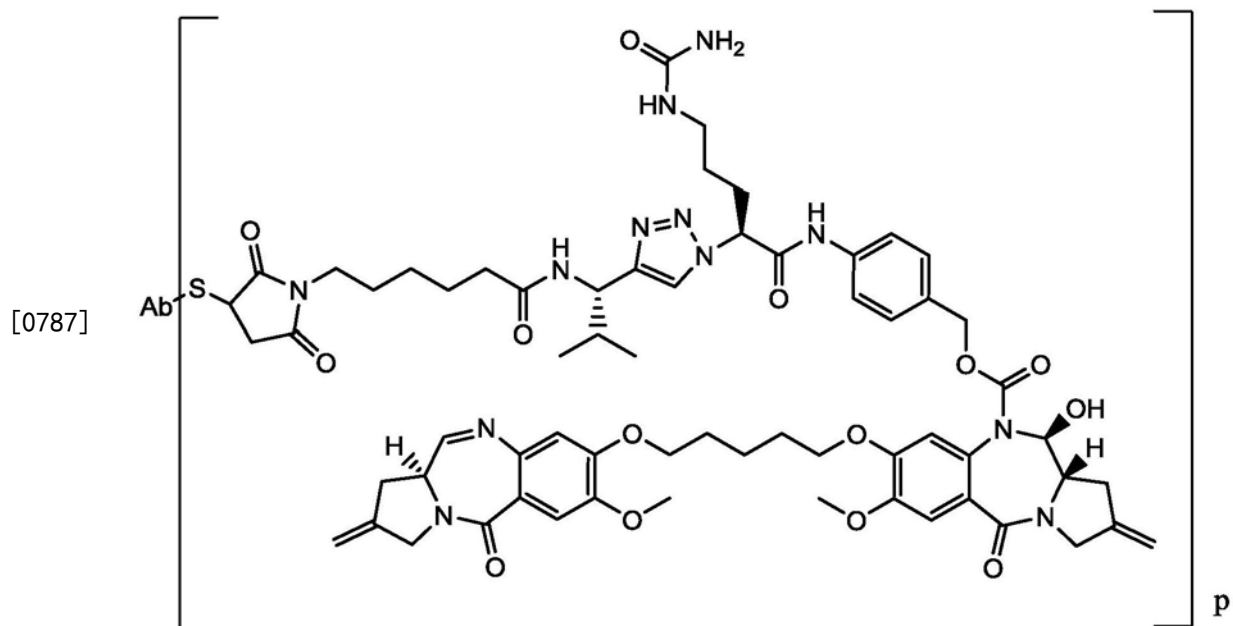
[0784] ADC的示例性PDB二聚体部分包括但不限于(波浪线表示与接头的共价连接位点):

[0785]

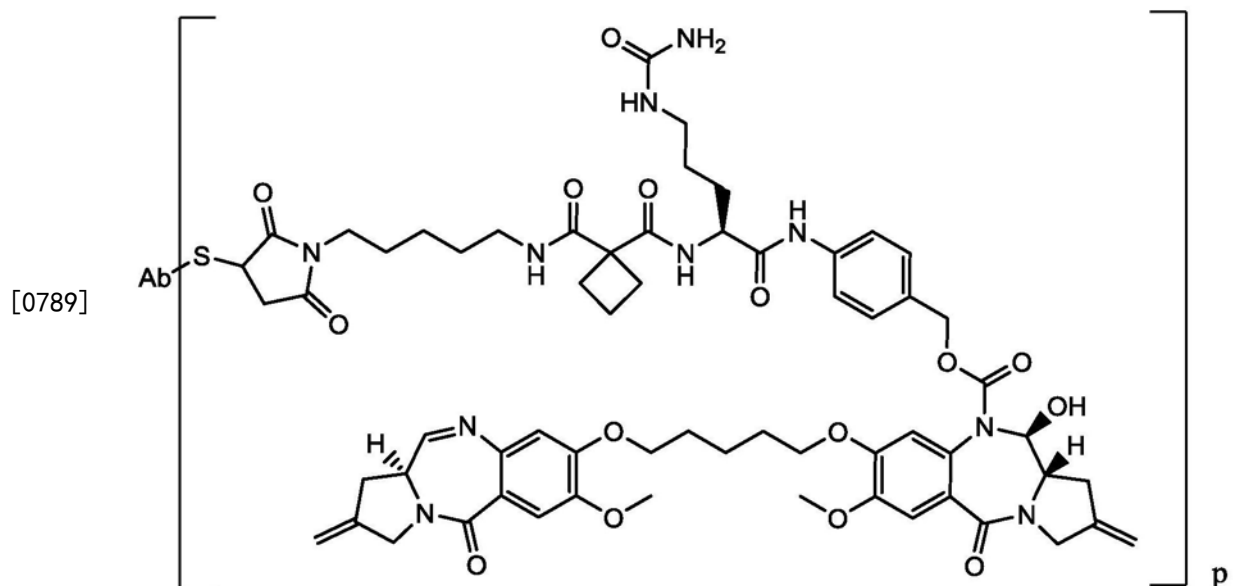


PDB二聚体;

[0786] 包含PDB二聚体和拟肽接头的ADC的非限制性示例性实施包括以下结构:



[0788] PBD二聚体-PML-PAB-Ab;



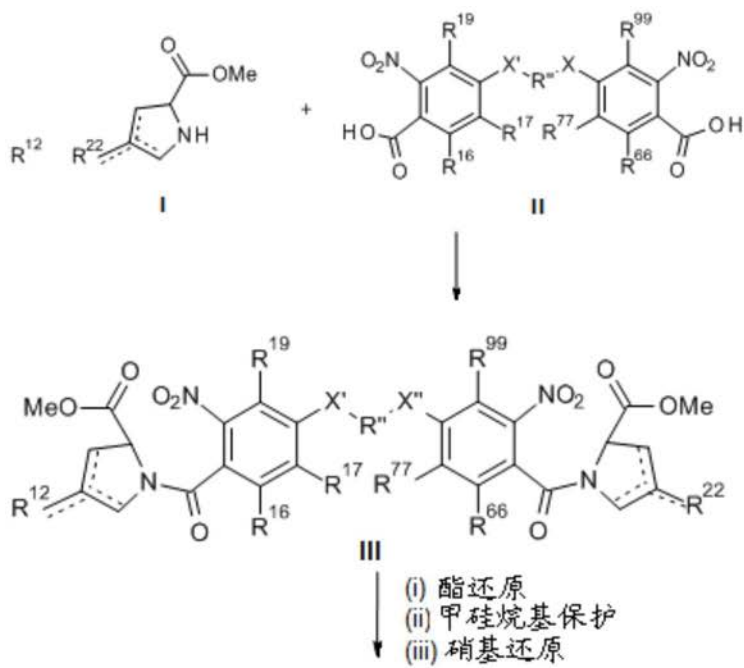
[0790] PBD二聚体-PML-PAB-Ab;

[0791] PBD二聚体和包含PBD二聚体的ADC可以根据本领域已知方法制备。参见,例如W0 2009/016516;US 2009/304710;US2010/047257;US 2009/036431;US 2011/0256157;W0 2011/130598;W0 2013/055987。

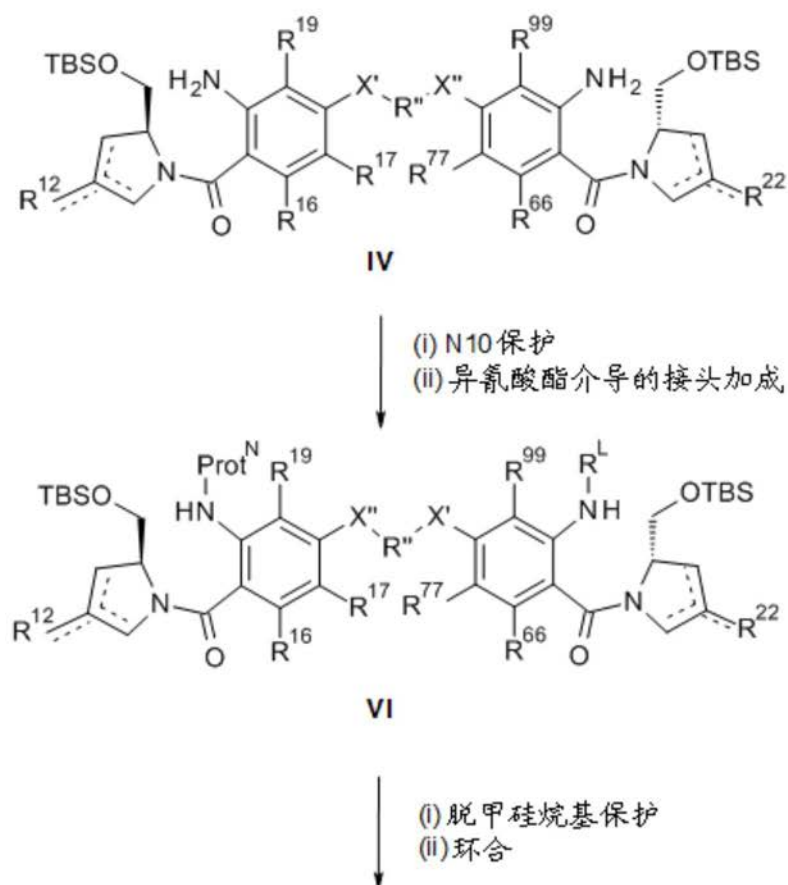
[0792] 合成

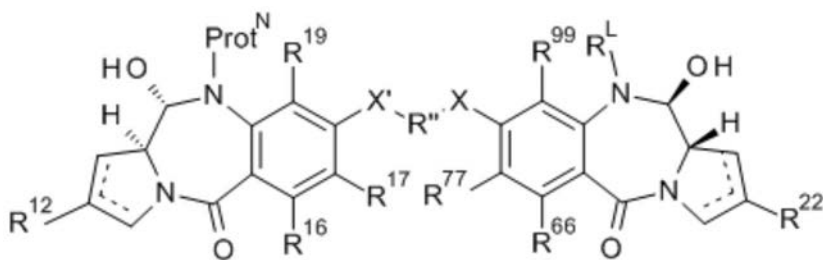
[0793] 式VIII二聚体中间体的一种可能的合成路径示出如下:





[0794]

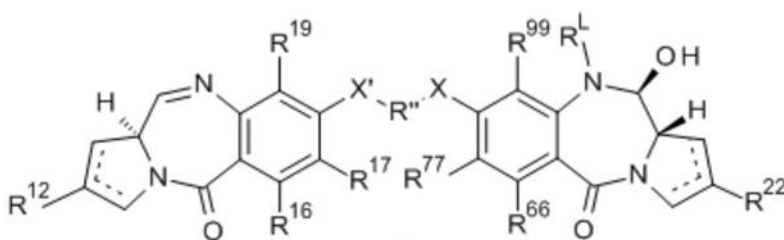




VII

[0795]

(i) N10 脱保护



VIII

[0796] 在以上流程图中,  $R^L$  表示与抗体连接的基团, 即 L/Str-PM-Sp- 或那个基团的前体。在一些合成方法中, 添加的初始基团可以是 PM-Sp- 的保护形式, Str 基团是在脱保护之后向其添加的。

[0797] 非结合 PBD 单元在 N10 位具有  $R^C$  的化合物可以通过以上方法的变型来制备, 其中  $Prot^N$  被  $R^C$  代替或前体, 随后转化)。

[0798] 一般来讲, 不对称的二聚体, 相对于其 N10-C11 键, 可以通过用一当量的氯甲酸酯试剂处理式 IV 双氨基化合物来制备, 以便破坏分子的对称性。随后可以将其余的游离胺基独立地官能团化从而导入连接基团前体 ( $R^L$ )。进行闭合 PBD 的 B 环、除去保护基的其他官能团操作得到目标分子。

[0799] 式 IV 化合物通常是通过将适当官能团化的 C 环片段 (I) 偶联到包含式 II 二聚体核的 A 环上制备的。C 环片段可以由已知的氨基甲酸酯保护的 4-氧代脯氨酸甲酯结构单元制备。可以采用在 Wittig 或 Horner-Emmons 条件下烯化来提供内或外不饱和烯烃。C 环和 A 环片段可以在三乙胺存在下使用 A 环片段的酰氯衍生物在标准条件下偶联, 得式 III 分子。在该阶段对称性还可能通过导入不同 C 环破坏。III 型化合物可以在醋酸或甲酸中用锌还原得到式 IV 分子, 不影响内或外 C 环不饱和。

[0800] 此外, 可将适合的 4-羟基吡咯烷结构单元偶合到与式 II 二聚体核中。羟基可被氧化成酮并且随后转化成烯醇三氟甲磺酸酯。可以使用 Suzuki 偶合来引入 pro C2 取代基 (例如芳基、烯基等)。随后可以将硝基还原成胺, 保护一个胺, 使其他的胺游离以携带接头基团。

[0801] VI 型不对称的氨基甲酸酯可以通过用一当量的市售 (或易于制备的) 氯甲酸酯在吡啶或三乙胺存在下处理 IV 型的二胺来制备。可以选择氯甲酸酯以提供适当的基于氨基甲酸酯的氮保护基 ( $Prot^N$ ), 其与 pro-接头基团 ( $R^L$ ) 中使用的那些是正交的。 $R^L$  氨基甲酸酯可以通过将其余氨基转化成异氰酸酯并且用  $R^L$  醇将其淬灭来引入。此外  $R^L$  醇可以转化成氯甲

酸酯或功能等价物(氟甲酸酯、对硝基碳酸酯、五氟碳酸酯或羟基苯并三唑碳酸酯)。最后,可将剩余氨基转化成反应性对硝基氨基甲酸酯、五氟氨基甲酸酯或羟基苯并三唑氨基甲酸酯,它们可以使用 $R^1$ 醇置换以得到式VI的分子。

[0802] 式VII分子可以由式VI的分子通过用例如乙酸水溶液除去甲硅烷基保护基来制备。用戴斯-马丁高碘剂(或者TPAP/NMO、PDC,或者在Swern条件下)进行氧化得到闭环产物。

[0803] 式V偶联物可以通过除去基于氨基甲酸酯的氮气保护基从式VII分子制备。

[0804] 化合物II

[0805] 式(II)化合物的合成在WO 2006/111759中描述并且Gregson等人也在(J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174)中描述。其中描述的化合物(II)的制备特定地以引用的方式并入本文。

[0806] 还可参考合成PBD二聚体的已知方法,包括在Antonow, D. 和Thurston, D. E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864中综述的那些。

[0807] 其他相关公开内容可以在WO 2010/091150中找到。WO 2010/091150中描述的中间体化合物也可以应用在上述方法中。

[0808] 适应症和治疗方法

[0809] 预期本发明的抗体药物偶联物(ADC)可用于治疗各种疾病或病症,例如特征是肿瘤抗原过表达的疾病或病症。示例性病状或过度增殖性病症包括良性或恶性实体肿瘤和血液病症,如白血病和淋巴恶性肿瘤。其他的包括神经元的、神经胶质的、星形胶质细胞的、下丘脑的、腺体的、巨噬细胞的、上皮的、间质的、囊胚腔的、炎性的、血管生成的和免疫学(包括自身免疫)的病症。

[0810] 在某些实施方案中,包含抗NaPi3b抗体(如上述那些)的本发明ADC可用于治疗实体肿瘤(例如卵巢)的方法中,

[0811] 在另一个实施方案中,包含抗CD33抗体(如本文中描述的那些)的本发明ADC用于治疗诸如非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大造血淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病(AML)和骨髓细胞白血病(MCL)等血液恶性肿瘤的方法中,并且包括B细胞相关癌症和增殖病症。参见:US 8226945; Li等人(2013) Mol. Cancer. Ther. 12 (7):1255-1265; Polson等人(2010) Leukemia 24:1566-1573; Polson等人(2011) Expert Opin. Investig. Drugs 20 (1):75-85,其内容以引用方式并入。

[0812] 在另一个实施方案中,包含抗MUC16抗体(如本文中描述的那些)的本发明ADC用于治疗卵巢癌、乳腺癌和胰腺癌的方法中。所述癌症可能与MUC16/CA125/0772P多肽的表达或活动相关联。参见:WO 2007/001851; US 7989595; US 8449883; US 7723485; Chen等人(2007) Cancer Res. 67 (10):4924-4932; Junutula等人(2008) Nature Biotech., 26 (8):925-932,其内容以引用方式并入。

[0813] 在某些实施方案中,包含抗HER2抗体(如上述那些)的本发明ADC用于治疗癌症(例如,乳腺癌或胃癌,更具体地是HER2+乳腺癌或胃癌)的方法中,其中该方法包括对需要此治疗的患者施用这种ADC。在一个这种实施方案中,ADC包含抗HER2抗体曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0814] 一般来讲,要治疗的疾病或病症是诸如癌症等过度增殖性疾病。本文中要治疗的癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。这些癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌),肺癌(包括小细胞肺癌、非小细

胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌),腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃的癌(包括胃肠癌),胰腺癌,胶质母细胞癌,子宫颈癌,卵巢癌,肝癌,膀胱癌,肝细胞瘤,乳癌,结肠癌,直肠癌,结肠直肠癌,子宫内膜癌或子宫癌,唾液腺癌,肾癌或肾脏的癌,前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。

[0815] 抗体药物偶联物可以用于治疗的自身免疫疾病包括风湿性病症(例如,类风湿性关节炎、**Sjögren** 综合征、硬皮病、狼疮如系统性红斑狼疮(SLE)和狼疮性肾炎、多肌炎/皮肤肌炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗体综合征和银屑病关节炎)、骨关节炎、自身免疫胃肠和肝脏病症(例如,炎症肠病(例如,溃疡性结肠炎和克罗恩氏病)、自身免疫胃炎和恶性贫血、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎和乳糜泻)、脉管炎(例如,ANCA相关性脉管炎,包括Churg-Strauss脉管炎、韦格纳氏肉芽肿病和多动脉炎)、自身免疫神经紊乱(例如,多发性硬化、斜视眼阵挛-肌阵挛综合症、重症肌无力、视神经脊髓炎、帕金森氏病、阿尔茨海默病和自身免疫多神经病)、肾脏病症(例如,肾小球肾炎、古德帕斯丘氏综合征和Berger氏疾病)、自身免疫皮肤病症(例如,银屑病、荨麻疹、假膜性喉头炎(hives)、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和皮肤红斑狼疮)、血液病症(例如,血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜、输血后紫癜和自身免疫性溶血性贫血)、动脉粥样硬化、葡萄膜炎、自身免疫听觉疾病(例如,内耳疾病和听力丧失)、贝切特病、雷诺氏综合征、器官移植和自身免疫内分泌病症(例如,糖尿病相关自身免疫疾病,如胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、爱迪生氏病和自身免疫性甲状腺病(例如,格雷夫氏症和甲状腺炎))。更优选的这些疾病包括例如,类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、ANCA相关脉管炎、狼疮、多发性硬化、**Sjögren** 氏综合征、格雷夫氏症、IDDM、恶性贫血、甲状腺炎和肾小球肾炎。

[0816] 对于疾病的预防或治疗,ADC的适当的剂量将取决于治疗的疾病类型(如上定义)、疾病的严重程度和过程、施用该分子是预防或治疗目的、先前的治疗、患者对抗体的临床史和反应以及主治医师的判断。该分子适于对患者一次施用或在一系列治疗中施用。取决于疾病的类型和严重程度,约1 $\mu$ g/kg至15mg/kg(例如0.1-20mg/kg)分子是对患者施用的初始候选药物剂量,例如,通过一次或多次单独的给药或通过连续输注。典型的每日剂量可以在约1 $\mu$ g/kg至100mg/kg范围内或更多,取决于上述因素。对患者施用的示例性的ADC剂量在约0.1至约10mg/kg患者体重范围内。

[0817] 实验

[0818] 一般实验方法

[0819] 分析HPLC方法

[0820] LC/MS(Shimadzu LCMS-2020)使用水(A)(甲酸0.1%)和乙腈(B)(甲酸0.1%)的流动相。梯度:初始组成5%B保持0.25分钟,随后在2分钟时间从5%B增加到100%B。组成在100%B保持0.50分钟,随后在0.05分钟内回到5%B并且在那里保持0.05分钟。总的梯度运行时间等于3分钟。流速0.8mL/min。波长检测范围:190至800nm。恒温箱温度:50℃。色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH Shield RP181.7 $\mu$ m 2.1x50mm。

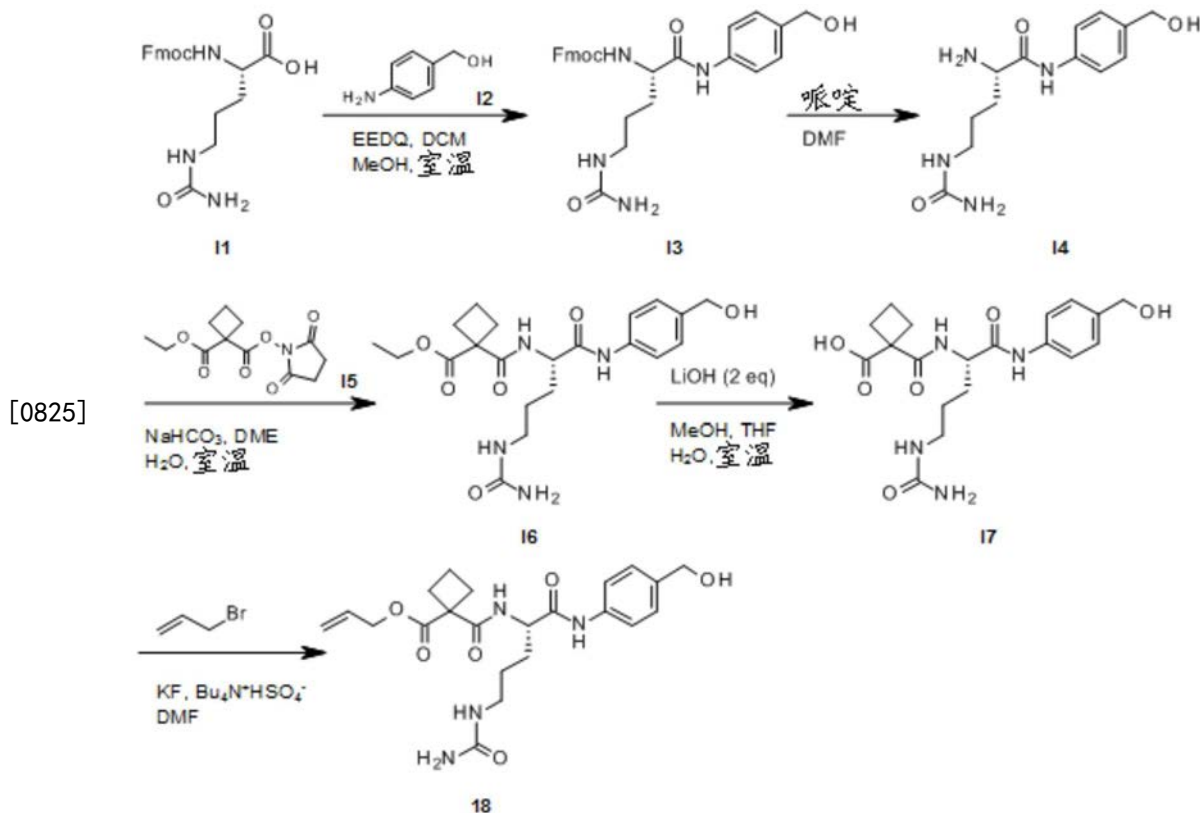
[0821] 制备型HPLC方法

[0822] 反相超高效液相色谱(UPLC)是在用于制备操作的Phenomenex Gemini NX 5 $\mu$ C-18 150x 21.20mm柱子上进行的。所有实验都是用梯度条件进行的:初始固定组成经15min从

13%B到75%B,在75%B保持2.0min,随后在0.10min内从75%B到13%B,在13%B保持2.90min。梯度运行总持续时间是20.00min。使用的洗脱剂是溶剂A(具有0.1%甲酸的H<sub>2</sub>O)和溶剂B(具有0.1%甲酸的CH<sub>3</sub>CN)。制备HPLC使用的流速是20.0mL/min。检测在254和280nm。

[0823] 中间体合成

[0824] a) 烯丙基1-[[ (1S)-1-[[4-(羟甲基)苯基]氨甲酰基]-4-脲基-丁基]氨甲酰基]环丁烷羧酸酯(18)



[0826] (i) 向化合物I1 (4.0g, 10.0mmol) 在DCM和MeOH (100mL/50mL) 混合溶剂中的溶液中添加4-氨基-苯基-甲醇 (I2) (1.60g, 13mmol, 1.3当量) 和EEDQ (3.2g, 13mmol, 1.3当量)。在N<sub>2</sub>下将混合物在室温搅拌16小时之后, LCMS显示化合物I1消耗完。浓缩混合物得褐色固体, 添加MTBE (200mL) 并且将混合物在15℃搅拌2小时。收集固体并用MTBE (50mL x 2) 冲洗得橙色固体I3 (4.2g, 84%)。LCMS (ESI, 5-95/1.5min): RT=0.807min, M+H<sup>+</sup>=503.0; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.98 (s, 1H), 7.89 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.73 (d, J=4.8Hz, 2H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.56 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.41 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.33-7.32 (m, 2H), 7.24 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.99 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.11-5.08 (t, J=5.6Hz, 1H), 4.36 (d, J=5.6Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 4.26-4.18 (m, 2H), 3.33-2.94 (m, 2H), 1.67-1.59 (m, 2H), 1.47-1.40 (m, 2H)。

[0827] (ii) 在室温下向搅拌的化合物I3 (4.2g, 8.3mmol) 在干燥DMF (20mL) 中的溶液中逐滴添加哌啶 (1.65mL, 17mmol, 2.0当量)。将混合物在室温搅拌30分钟, 固体开始沉淀。添加干燥DCM (50mL), 混合物立即变透明。将混合物在室温再搅拌30min, LCMS显示化合物I3消耗完。将其在减压下浓缩除去哌啶, 残余物在EtOAc和H<sub>2</sub>O (50mL/20mL) 之间分配。用EtOAc (50mL x 2) 洗涤水相并浓缩得油状化合物I4 (2.2g, 94%, 含有少量DMF)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.95 (s, 1H), 7.58 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.23 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.96-5.93 (m, 1H),

5.37 (s, 2H), 5.15–5.05 (m, 1H), 4.42 (s, 2H), 3.25 (m, 1H), 3.0–2.9 (m, 2H), 1.65–1.35 (m, 4H)。

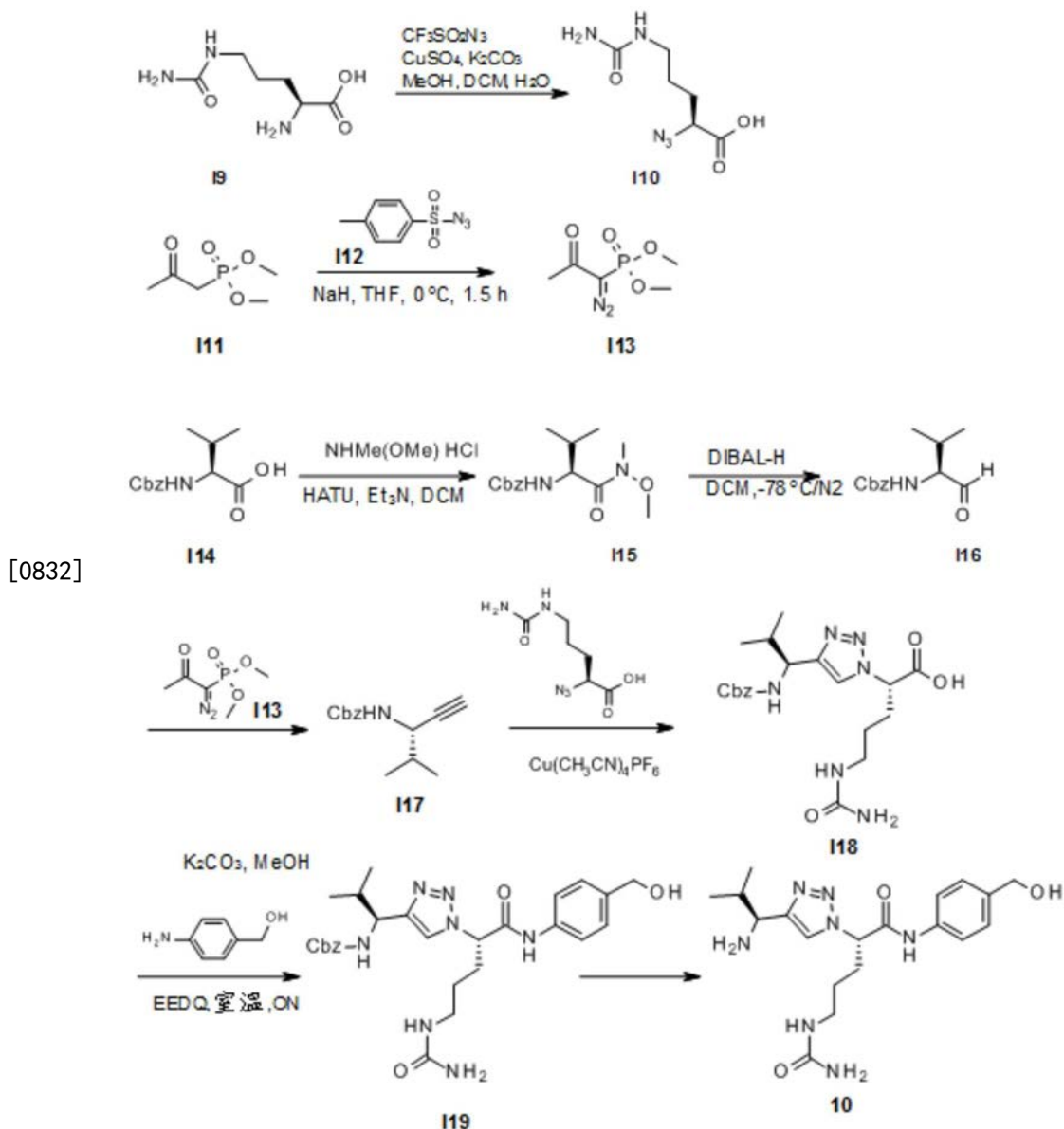
[0828] (iii) 向化合物I5 (8.0g, 29.7mmol) 在DME (50mL) 中的溶液中添加化合物I4 (6.0g, 21.4mmol) 和NaHCO<sub>3</sub> (7.48g, 89.0mmol) 的水溶液 (30mL)。将混合物在室温搅拌16小时。将混合物在减压下浓缩干, 残余物通过柱层析法纯化 (DCM:MeOH=10:1) 得白色固体粗制化合物I6 (6.4g, 68.7%)。LCMS (ESI, 5–95/1.5min): RT=0.692min, M+H<sup>+</sup>=435.0。

[0829] (iv) 在室温下向搅拌的化合物I6 (6.4g, 14.7mmol) 在THF/MeOH (20mL/10mL) 中的溶液中添加LiOH·H<sub>2</sub>O (1.2g, 28.6mmol) 的H<sub>2</sub>O溶液 (20mL)。将反应混合物在室温搅拌16小时之后, 减压除去溶剂, 通过制备型HPLC纯化残余物得化合物I7 (3.5g, 58.5%)。LCMS (ESI, 5–95/1.5min): RT=0.575min, M+H<sup>+</sup>=406.9。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ8.86 (d, J=8.4Hz, 2H), 8.51 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.88–5.86 (m, 2H), 5.78 (s, 2H), 4.51–4.49 (m, 3H), 4.38–4.36 (m, 1H), 3.86–3.84 (m, 1H), 3.84–3.82 (m, 2H), 3.82–3.80 (m, 1H), 3.30–3.06 (m, 3H), 2.96–2.91 (m, 1H), 2.82–2.74 (m, 2H)。

[0830] (v) 向化合物I7 (1.30g, 3.2mmol) 在DMF (10mL) 中的混合物中添加KF (0.557g, 9.6mmol) 和Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> (0.101g, 0.9mmol)。逐滴添加化合物I8 (0.50mL, 过量)。将混合物在13℃搅拌2小时, LCMS在254nm显示形成化合物18 (86%)。将混合物浓缩并通过柱层析法纯化 (DCM中含有10%~15%MeOH) 得油状产物 (1.1g)。将油状物溶于水并冷冻干燥得粉末18 (1.0g, 70%)。SFC分析显示89.4% ee。LCMS (ESI, 5–95/1.5min): RT=0.721min, M+H<sup>+</sup>=447.0。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ7.58 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.31 (d, J=8.0Hz, 2H), 6.01–5.93 (m, 1H), 5.35 (dd, J=16.8Hz, 1H), 5.24–5.21 (m, J=9.6Hz, 1H), 4.69–4.68 (d, J=5.6Hz, 1H), 4.56–4.53 (m, 3H), 3.25–3.05 (m, 2H), 2.70–2.50 (m, 4H), 2.10–2.00 (m, 1H), 2.00–1.89 (m, 2H), 1.76–1.58 (m, 1H), 1.58–1.49 (m, 2H)。

[0831] b) (2S)-2-[4-[(1S)-1-氨基-2-甲基-丙基]三唑-1-基]-N-[4-(羟甲基)苯基]-5-脲基-戊酰胺 (10)





[0833] (i) 将NaN<sub>3</sub> (20g, 285.7mmol) 的溶液溶于蒸馏H<sub>2</sub>O (75mL) 中并添加DCM (100mL)。将其在冰浴中冷却并经30min缓慢添加Tf<sub>2</sub>O (19.2mL, 114.28mmol), 同时继续搅拌3h。将混合物放在分液漏斗中并且收集CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相。水溶液部分用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mL×2) 萃取。将含有三氟甲磺酰基叠氮化物的有机部分集中并且用饱和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (150mL) 洗涤一次, 不经进一步纯化即使用。化合物I9 (10g, 57.14mmol) 与K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (11.83g, 85.7mmol) 和CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (1.43g, 5.71mmol) 组合蒸馏水 (50mL) 和MeOH (100mL)。添加上面形成的在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120mL) 中的三氟甲磺酰基叠氮化物并将混合物在室温搅拌过夜。随后, 减压除去有机溶剂并用H<sub>2</sub>O (100mL) 稀释水浆。用浓HCl将其酸化至pH 6并用0.2M pH 6.2磷酸盐缓冲液 (150mL) 稀释, 用EtOAc (100mL×3) 洗涤除去磺酰胺副产物。随后用浓HCl将水相酸化至pH 2。将其用EtOAc/MeOH (20:1) (100mL×4) 萃取。合并EtOAc/MeOH萃取液, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并蒸发得化合物I10不经进一步纯化 (10g, 87%)。

[0834] (ii) 在0℃向化合物I11 (18.00g, 108.36mmol) 在无水THF (300mL) 中的溶液中添加NaH (5.2g, 130.03mmol)。将混合物在0℃搅拌1小时, 随后向混合物中缓慢添加化合物I12 (25.64g, 130.03mmol)。将反应混合物在0℃搅拌0.5小时。将混合物过滤、浓缩, 通过硅胶柱

层析法纯化(PE:EtOAc=1:1)得目标产物I13(20g,96%)。

[0835]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ 3.84(s, 3H), 3.81(s, 3H), 2.25(s, 3H)。

[0836] (iii) 向化合物I14(20.0g, 79.59mmol) 在无水DCM(150mL) 中的混合物中添加 $\text{Et}_3\text{N}$ (24.16g, 238.77mmol) 和HATU(45.40g, 119.39mmol)。将混合物在室温搅拌15分钟, 随后添加NHMe(OMe)HCl(11.65g, 119.39mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。用DCM稀释混合物, 用饱和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 水溶液(100mL $\times$ 3)、饱和柠檬酸水溶液(100mL $\times$ 3)和盐水(100mL)洗涤。将有机层干燥、浓缩, 通过硅胶柱层析法纯化(PE:EtOAc=10:1)得目标产物I15(20.0g, 85.4%)。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 7.97(s, 1H), 7.73(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 7.36-7.29(m, 5H), 6.01(s, 1H), 5.40(dd,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 5.08-4.99(m, 2H), 4.58(dd,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 2.99-2.94(m, 2H), 2.21-2.02(m, 4H), 1.02-1.33(m, 2H), 0.86-0.77(m, 6H)。

[0837] (iv) 将化合物I15(12g, 40.77mmol) 溶于无水DCM(40mL) 并用干冰/丙酮浴将所得溶液冷却到 $-78^\circ\text{C}$ 。逐滴添加DIBAL-H(122.3mL, 122.3mmol, 1.0M甲苯溶液) 并将所得溶液在 $-78^\circ\text{C}$ 搅拌4小时。通过在 $-78^\circ\text{C}$ 添加MeOH(40mL) 淬灭过量的氢化物并使所得溶液升至室温。将溶液蒸发得化合物I16(约9.2g, 96%), 不经进一步纯化。

[0838] (v) 向化合物I16(粗制, 约9.2g, 39.1mmol) 和化合物I13(11.27g, 58.65mmol) 在MeOH(150mL) 中的溶液中添加 $\text{K}_2\text{CO}_3$ (16.2g, 117.3mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。将混合物在真空中浓缩, 通过硅胶柱层析法纯化(PE:EtOAc=50:1)得目标产物I17(4g, 44%)。

[0839] (vi) 向化合物I17(4.0g, 17.29mmol) 和化合物I10(4.17g, 20.75mmol) 在DMF(15mL) 中的溶液中添加 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$ (1.29g, 3.46mmol)。将反应混合物在 $60^\circ\text{C}$ 下搅拌2小时。纯化混合物得化合物I18(5.0g, 66.8%)。

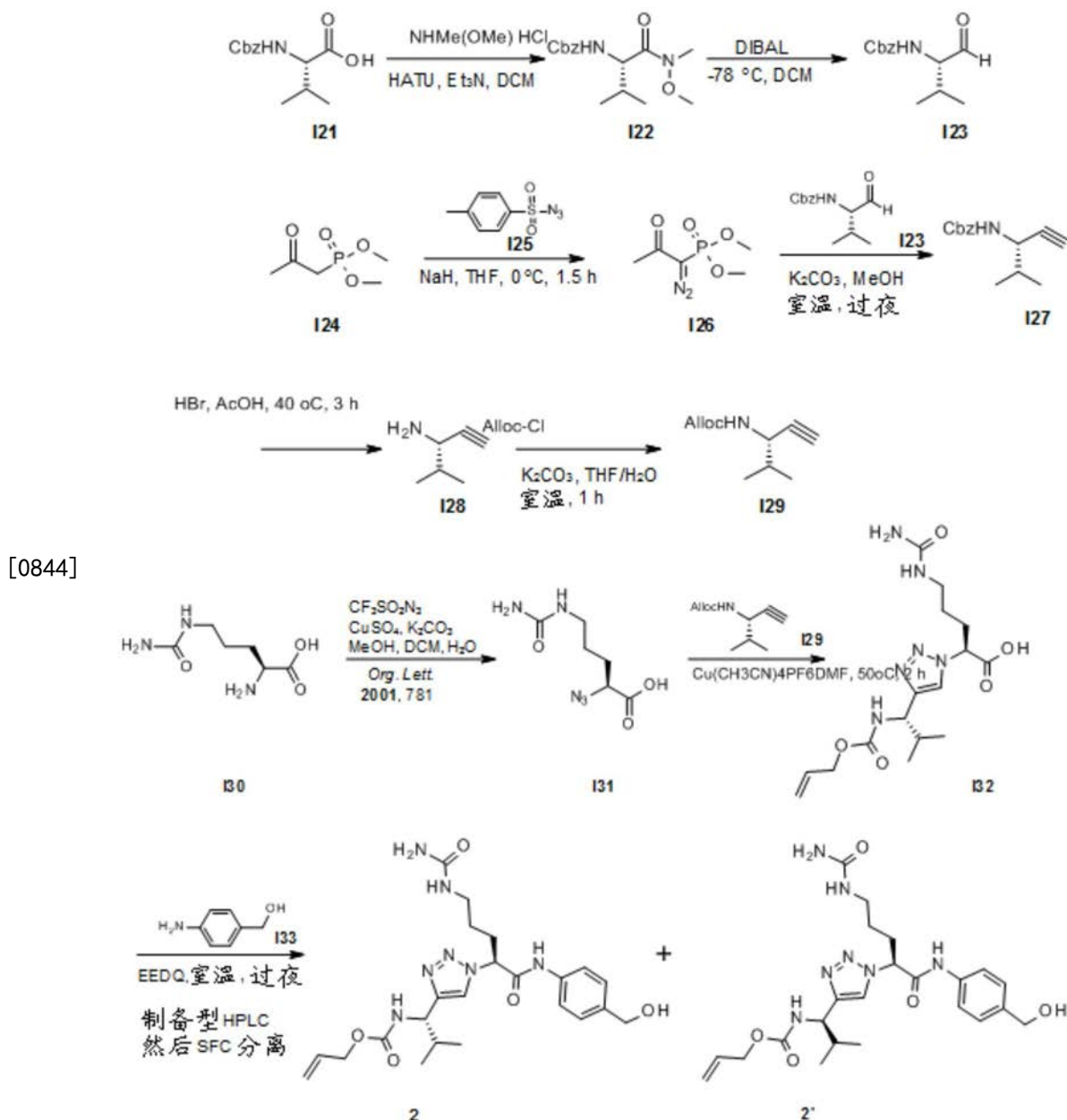
[0840]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 7.97(s, 1H), 7.73(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 1H), 7.36-7.29(m, 5H), 6.01(s, 1H), 5.40(dd,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 5.08-4.99(m, 2H), 4.58(dd,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 2.99-2.94(m, 2H), 2.21-2.02(m, 4H), 1.02-1.33(m, 2H), 0.86-0.77(m, 6H)。

[0841] (vii) 在 $0^\circ\text{C}$ 向化合物I18(粗制, 约3.8g, 8.79mmol) 在DMF(15mL) 中的溶液中添加EEDQ(4.34g, 17.58mmol) 和化合物I19(1.62g, 13.18mmol)。在 $\text{N}_2$ 下将反应混合物在室温搅拌过夜。混合物通过制备型HPLC纯化得化合物I20(650mg, 13.7%)。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 10.52(d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H), 8.05(s, 1H), 7.72(d,  $J=9.2\text{Hz}$ , 2H), 7.33-7.23(m, 7H), 6.01(s, 1H), 5.47-5.43(m, 3H), 5.04-4.96(m, 2H), 4.59-4.54(m, 1H), 4.41(s, 2H), 3.04-2.94(m, 3H), 2.09-1.97(m, 4H), 1.24(t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 0.82-0.74(m, 6H)。

[0842] (viii) 向化合物I20(650mg, 1.21mmol) 在MeOH(15mL) 中的反应中添加Pd/C(300mg)。在 $\text{H}_2$ 下将反应混合物在室温搅拌2小时。过滤反应混合物并浓缩滤液得10(450mg, 92%)。LCMS(ESI): RT=0.611min,  $\text{M}+\text{H}^+=404.0$ 。方法=5-95/1.5min。 $^1\text{H}$  NMR(400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ 10.55(s, 1H), 8.03(d,  $J=7.6\text{Hz}$ , 1H), 7.51(d,  $J=8.4\text{Hz}$ , 2H), 7.23(d,  $J=8.4$ , 2H), 6.05(t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 5.46-5.42(m, 3H), 5.14(s, 1H), 4.40(s, 2H), 3.76(d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 2H), 3.00-2.93(m, 3H), 2.09-2.04(m, 2H), 1.90-1.87(m, 1H), 1.25-1.21(m, 2H), 0.82-0.77(m, 6H)。

[0843] (c) 烯丙基N-[(1S)-1-[1-[(1S)-1-[[4-(羟甲基)苯基]氨甲酰基]-4-脲基-丁基]三唑-4-基]-2-甲基-丙基]氨基甲酸酯(2)





[0845] (i) 向化合物I21 (20.0g, 79.59mmol) 在无水DCM (150mL) 中的混合物中添加 $\text{Et}_3\text{N}$  (24.16g, 238.77mmol) 和HATU (45.40g, 119.39mmol)。将混合物在室温搅拌15分钟之后, 添加 $\text{NHMe(OMe)HCl}$  (11.65g, 119.39mmol)。将反应混合物在室温搅拌过夜。用DCM稀释混合物, 用饱和 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 水溶液 (100mL  $\times$  3)、饱和柠檬酸水溶液 (100mL  $\times$  3) 和盐水 (100mL) 洗涤。将有机层干燥、浓缩, 通过硅胶柱层析法纯化 ( $\text{PE:EtOAc}=2:1$ ) 得目标产物I22 (20.0g, 85.4%)。

[0846] (ii) 将化合物I22 (5.0g, 16.99mmol) 溶于无水 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20mL) 并在干冰/丙酮浴中将所得溶液冷却到 $-78^\circ\text{C}$ 。逐滴添加DIBAL-H (51.0mL, 51.0mmol, 1.0M甲苯溶液) 并将所得溶液在 $-78^\circ\text{C}$ 搅拌4小时。通过在 $-78^\circ\text{C}$ 添加MeOH (10mL) 淬灭过量的氢化物并使所得溶液升至室温。蒸发溶液得化合物I23 (约3.2g, 80%), 不经进一步纯化。

[0847] (iii) 在 $0^\circ\text{C}$ 向化合物I24 (6.00g, 36.12mmol) 在无水THF (200mL) 中的溶液中添加NaH (1.73g, 43.34mmol)。将混合物在 $0^\circ\text{C}$ 搅拌1小时, 随后缓慢添加化合物I25 (7.12g, 36.12mmol)。将所得混合物在 $0^\circ\text{C}$ 搅拌0.5小时。将混合物过滤、浓缩, 通过硅胶柱层析法纯

化(EtOAc)得目标产物(6.0g,86.5%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ3.76(s,3H),3.73(s,3H),2.22(s,3H)。

[0848] (iv)向化合物I23(粗制,约3.20g,13.60mmol)和化合物I26(5.23g,27.20mmol)在MeOH(50mL)中的溶液中添加K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(5.64g,40.80mmol)。将反应混合物在室温下搅拌过夜。将混合物在真空中浓缩,通过硅胶柱层析法纯化(PE:EtOAc=5:1)得目标产物I27(2.00g,63.6%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.77(d,J=8.8Hz,1H),7.39-7.30(m,5H),5.04(s,2H),4.12-4.07(m,1H),3.19(d,J=2.4Hz,1H),1.83-1.74(m,1H),0.94(d,J=6.8Hz,3H),0.90(d,J=6.8Hz,3H)。

[0849] (v)向化合物I27(2.90g,12.54mmol)在H<sub>2</sub>O(20mL)中的溶液中添加HBr水溶液(30mL,148.31mmol)。将反应混合物在40℃搅拌3小时之后,将其在真空中浓缩除去溶剂。将残余物溶于H<sub>2</sub>O(40mL)中,用EtOAc(20mL×3)洗涤。用Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液将水层调整至pH 10,并用EtOAc再次萃取(20mL×3)。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥、过滤、用HCOOH调节至pH 5,浓缩得目标产物I28的盐(1.20g,66.8%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ3.89(dd,J=5.2Hz,2.0Hz,1H),3.59(d,J=2.4Hz,1H),1.83-1.74(m,1H),0.96(dd,J=6.4,4.8Hz,6H)。

[0850] (vi)向化合物I28(1.30g,9.08mmol)在THF/H<sub>2</sub>O(20mL/4mL)中的溶液中添加K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(3.76g,27.24mmol)。在0℃向混合物中逐滴添加Alloc-Cl(1.64g,13.62mmol)。将反应混合物在室温搅拌0.5小时。用EtOAc萃取混合物(20mL×3)并用H<sub>2</sub>O(20mL)洗涤。合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且浓缩。残余物通过硅胶柱层析法纯化(PE:EtOAc=5:1)得化合物I29(1.3g,79.0%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.71(d,J=8.8Hz,1H),5.96-5.86(m,1H),5.31-5.26(m,1H),5.20-5.16(m,1H),4.48(d,J=5.2Hz,2H),4.09-4.04(m,1H),3.19(d,J=2.0Hz,1H),1.82-1.73(m,1H),0.94(d,J=6.8Hz,3H),0.89(d,J=6.8Hz,3H)。

[0851] (vii)将NaN<sub>3</sub>(7.80g,119.98mmol)的溶液溶于蒸馏H<sub>2</sub>O(20mL)并添加CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(40mL)。将其在冰浴中冷却并经5min缓慢添加Tf<sub>2</sub>O(3.0mL,19.65mmol),再搅拌2小时。将混合物放在分液漏斗中并且收集CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相。水溶液部分用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(30mL×2)萃取。将含有三氟甲磺酰基叠氮化物的有机部分集中并且用饱和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(40mL)洗涤一次,不经进一步纯化即使用。将化合物I30(1.80g,10.27mmol)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2.13g,15.41mmol)和CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O(257mg,1.03mmol)在蒸馏水(40mL)和MeOH(80mL)中混合。添加上面形成的在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL)中的三氟甲磺酰基叠氮化物并将混合物在室温搅拌过夜。随后,减压除去有机溶剂并用H<sub>2</sub>O(50mL)稀释水浆。浓HCl将其酸化至pH 6并用0.2M pH 6.2磷酸盐缓冲液(50mL)稀释,用EtOAc(100mL×3)洗涤除去磺酰胺副产物。随后用浓HCl将水相酸化至pH 2。将其用EtOAc/MeOH(20:1)(100mL×4)萃取。将这些EtOAc/MeOH萃取液合并,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并蒸发得化合物I31(1.6g,77.4%),不经进一步纯化。

[0852] (viii)向化合物I31(1.70g,8.45mmol)并化合物I29(1.23g,6.76mmol)在DMF(10mL)中的溶液中添加Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>(315mg,0.85mmol)。将反应混合物在50℃搅拌2小时,混合物直接用于下一步。

[0853] (ix)向化合物I32(粗制,约2.50g,6.54mmol)在DMF(15mL)中的混合物添加EEDQ(2.42g,9.81mmol)和化合物I33(1.21g,9.81mmol)。在N<sub>2</sub>保护下就反应混合物在0℃~室温下搅拌过夜。通过制备型HPLC(FA)纯化混合物得粗产物,随后用MTBE洗涤得纯产物。SFC分离之后,获得2(1.10g,34.5%)和2'(220mg,6.9%)。

[0854] 2:LCMS (ESI):RT=0.973min,M+H<sup>+</sup>=488.0.方法=10-80/2min.<sup>1</sup>H NMR (400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ10.53 (s,1H),8.08 (s,1H),7.66 (d,J=9.6Hz,1H),7.54 (dd,J=6.8,2.0Hz,2H),7.26 (d,J=8.4Hz,2H),6.02 (t,J=5.6Hz,1H),5.94-5.87 (m,1H),5.48 (dd,J=8.8,6.8Hz,1H),5.41 (s,2H),5.28 (dd,J=17.2,1.6Hz,1H),5.16 (dd,J=10.4,1.2Hz,1H),5.13 (t,J=5.6Hz,1H),4.58 (dd,J=9.2,6.8Hz,1H),4.49-4.46 (m,2H),4.44 (d,J=5.6Hz,2H),3.04-2.97 (m,2H),2.14-2.01 (m,3H),1.29-1.23 (m,2H),0.85 (d,J=6.8Hz,3H),0.78 (d,J=6.8Hz,3H)。

[0855] 2':LCMS (ESI):RT=0.980min,M+H<sup>+</sup>=488.0.方法=10-80/2min.<sup>1</sup>H NMR (400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ10.52 (s,1H),8.07 (s,1H),7.64 (d,J=9.2Hz,1H),7.54 (d,J=8.4Hz,2H),7.27 (d,J=8.8Hz,2H),6.02 (t,J=5.6Hz,1H),5.95-5.86 (m,1H),5.47 (dd,J=8.8,6.8Hz,1H),5.42 (s,2H),5.28 (dd,J=16.8,1.2Hz,1H),5.16 (d,J=11.6Hz,1H),5.13 (t,J=6.0Hz,1H),4.57 (dd,J=9.2,7.2Hz,1H),4.49-4.46 (m,2H),4.44 (d,J=5.6Hz,2H),3.06-2.94 (m,2H),2.16-2.02 (m,3H),1.29-1.25 (m,2H),0.85 (d,J=6.8Hz,3H),0.78 (d,J=6.8Hz,3H)。

[0856] HPLC分离条件 (2&2'):

[0857] 仪器:SHIMADZU LC-8A

[0858] 色谱柱:synergi-10μm,250×50mm I.D。

[0859] 流动相:A为H<sub>2</sub>O (添加2%FA,v/v),B为MeCN

[0860] 梯度:B 10-50%

[0861] 流速:80mL/min

[0862] 检测波长:220nm/254nm

[0863] 运行时间:22min/25min

[0864] SFC分离条件 (2&2'):

[0865] 仪器:Thar SFC 80

[0866] 柱子:手性PAK AD,5μm,Daicel Chemical Industries,Ltd250×30mm I.D。

[0867] 流动相:A:超临界CO<sub>2</sub>,B:EtOH (含有0.1%NH<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O),A:B=70:30,流速60ml/min

[0868] 柱温:38℃

[0869] 喷嘴压力:100Bar

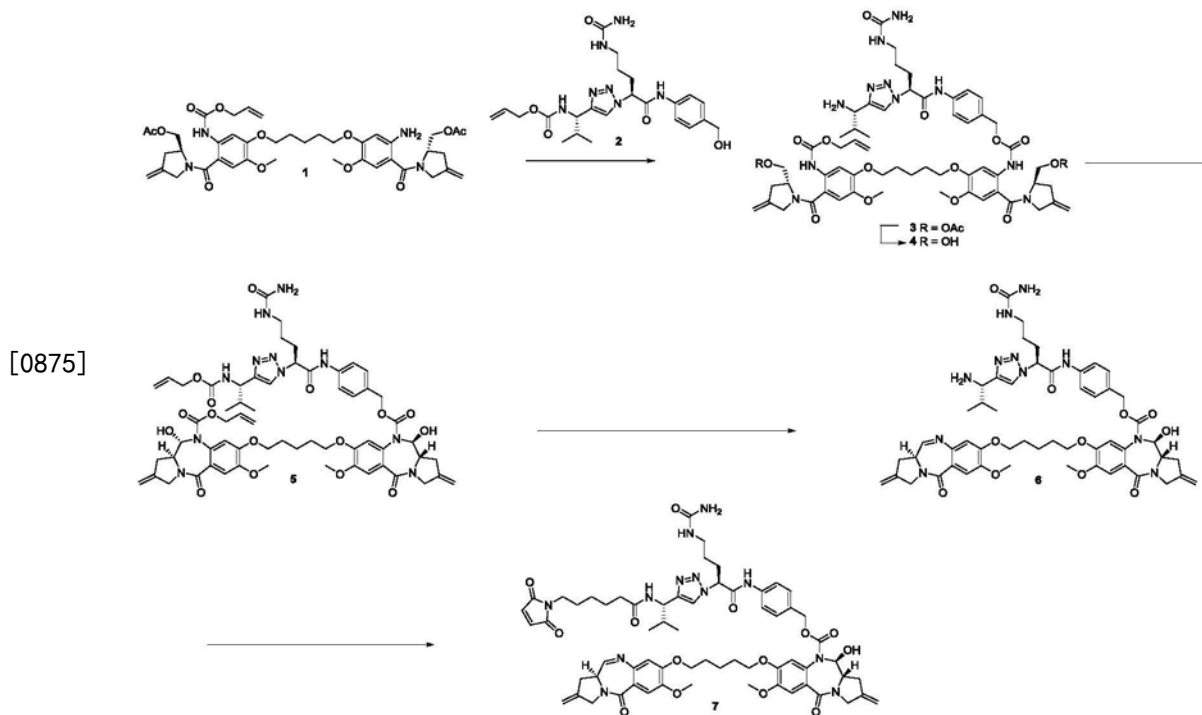
[0870] 喷嘴温度:60℃

[0871] 蒸发器温度:20℃

[0872] 休整器温度:25℃

[0873] 波长:220nm

[0874] 实施例1:[4-[[ (2S)-2-[4-[(1S)-1-[6-(2,5-二氧代吡咯-1-基)己酰基氨基]-2-甲基-丙基]三唑-1-基]-5-脲基-戊酰基]氨基]苯基]甲基 (6S,6aS)-3-[5-[[ (6aS)-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-7,9-二氢-6aH-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-3-基]氧基]戊氧基]-6-羟基-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-6,6a,7,9-四氢吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-5-羧酸酯 (PBD-LD2) 的制备



[0876] 化合物1是WO 2011/130598的化合物6

[0877] (i) 4-((S)-2-(4-((S)-1-氨基-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基(5-((5-(5-((烯丙氧基)羰基)氨基)-4-((R)-2-(乙酰氧甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)戊基)氧基)-2-((R)-2-(乙酰氧甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酸酯(3)

[0878] 在室温向氩气氛下搅拌的单alloc保护二苯胺1(1.98g, 2.5mmol, 1.0当量)和三光气(0.27g, 0.9mmol, 0.36当量)在干燥THF(25mL)中的溶液中添加三乙胺(0.55g, 0.76mL, 5.5mmol, 2.2当量)。将反应混合物加热至40℃, 用甲醇处理样品并作为氨基甲酸甲酯通过LCMS分析。

[0879] 向新制备的异氰酸酯中逐滴添加苄醇2(1.58g, 3.24mmol, 1.3当量)在干燥THF/DMF(40mL/5mL)中的溶液。通过LCMS检测反应混合物, 在40℃反应4.5小时之后结束。过滤反应混合物并将滤液减压蒸发。残余物通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱CHCl<sub>3</sub>/MeOH 3%至6%, 以1%增加]得白色泡沫状产物(1.83g, 56%)。分析数据: RT 1.72min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1306 ([M+H]<sup>+</sup>, 40)。

[0880] (ii) 4-((S)-2-(4-((S)-1-氨基-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基(5-((5-(5-((烯丙氧基)羰基)氨基)-4-((R)-2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)戊基)氧基)-2-((R)-2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酸酯(4)

[0881] 向乙酸酯3(1.82g, 1.39mmol, 1.0当量)在MeOH(40mL)中的溶液中添加K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(0.96g, 7.0mmol, 5.0当量)在H<sub>2</sub>O(7mL)中的溶液。将反应混合物在室温下搅拌1小时。将甲醇减压蒸发, 残余物用H<sub>2</sub>O(100mL)稀释并用1M柠檬酸酸化至pH3。混合物用DCM萃取(5x 100mL)。合并的萃取液用饱和盐水(200mL)洗涤, 干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发得白色泡沫状产物(1.51g, 88%)。分析数据: RT 1.57min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1222 ([M+H]<sup>+</sup>, 45)。

[0882] (iii) 烯丙基 (11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-((4-((S)-2-(4-((S)-1-(((烯丙氧基)羰基)氨基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基)氧基)羰基)-11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,10,11,11a-六氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯(5)

[0883] 向二醇4 (1.46g, 1.19mmol, 1.0当量) 在干燥DMSO (90mL) 中的溶液中整批添加稳定的45wt% 2-碘酰基苯甲酸 (IBX) (1.78g, 2.9mmol, 2.4当量)。将溶液在30℃搅拌32小时。将反应混合物加入H<sub>2</sub>O (500mL) 中, 用DCM萃取 (5x 150mL)。合并的萃取液用饱和碳酸氢钠水溶液 (300mL)、H<sub>2</sub>O (300mL)、盐水 (300mL) 洗涤并干燥 (MgSO<sub>4</sub>)。在减压下旋转蒸发除去溶剂得粗产物。通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱CHCl<sub>3</sub>/MeOH 0%至8%, 以1%增加]得到白色固体产物 (0.8g, 55%)。分析数据: RT 1.52min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1218 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)。

[0884] (iv) 4-((S)-2-(4-((S)-1-氨基-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基 (11S,11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯(6)

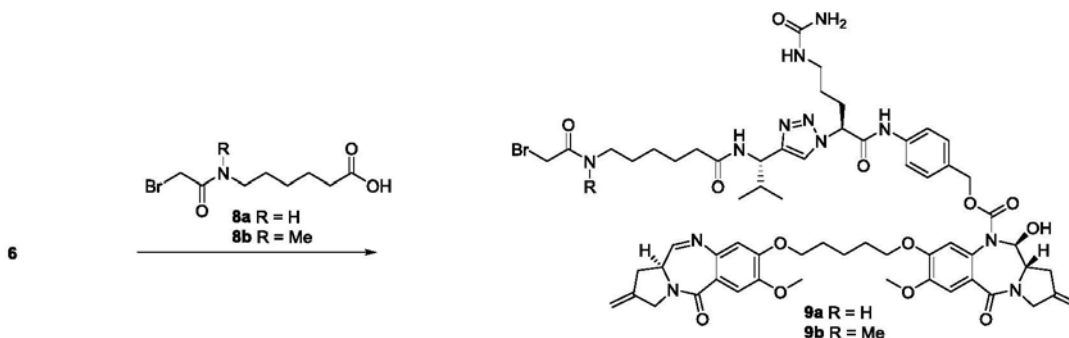
[0885] 在氩气氛下向双-alloc化合物5 (0.30g, 0.25mmol, 1.0当量) 和吡咯烷 (39mg, 45μL, 0.86mmol, 2.2当量) 在干燥DCM (20mL) 中的溶液中添加Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (14mg, 12.4μmol 0.05当量)。将溶液在室温搅拌30min得混浊混悬液。在减压下将溶剂蒸发一半并随后用乙醚稀释。沉淀的产物通过过滤收集, 用乙醚洗涤 (x 2)。这提供白色粉末状产物, 不经进一步纯化即使用 (0.25g, 100%)。分析数据: RT 1.15min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1032 ([M+H]<sup>+</sup>, 10)。

[0886] (v) 4-((S)-2-(4-((S)-1-(6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基 (11S,11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯(7)

[0887] 向胺/亚胺6 (35mg, 34μmol, 1.0当量) 和马来酰亚胺己酸 (7.2mg, 34μmol 1.0当量) 在干燥DCM/MeOH (5mL/1mL) 中的溶液中添加EEDQ (12.6mg, 51μmol, 1.5当量)。将溶液在室温搅拌18小时。添加其他部分EEDQ (12.6mg, 51μmol, 1.5当量), 并将反应再搅拌18小时。将溶剂减压蒸发并通过制备型HPLC纯化残余物, 冷冻干燥之后得白色泡沫状产物 (5.5mg, 13%)。分析数据: RT 1.41min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1225 ([M+H]<sup>+</sup>, 60)。

[0888] 实施例2

[0889]



[0890] (a) 4-((S)-2-(4-((S)-1-(6-(2-溴乙酰胺)己酰胺基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-

三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺) 苄基 (11S, 11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯 (9a)

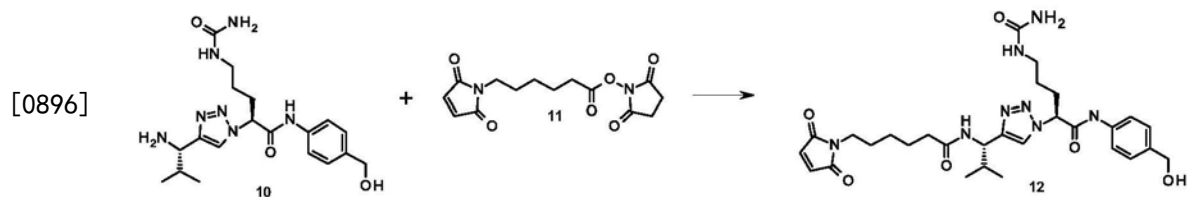
[0891] 向胺/亚胺6 (101mg, 98 $\mu$ mol, 1.0当量) 和溴乙酰胺基己酸8a (30mg, 0.12mmol, 1.2当量) 在干燥DCM/MeOH (6mL/3mL) 中的溶液中添加EEDQ (36mg, 0.15mmol, 1.5当量)。将溶液在室温搅拌5天。将溶剂减压蒸发并通过制备型HPLC纯化残余物, 冷冻干燥得白色泡沫状产物 (25mg, 20%)。分析数据: RT 1.42min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1267 ([M+H]<sup>+</sup>, 20)。

[0892] (b) 4-((S)-2-(4-((S)-1-(6-(2-溴-N-甲基乙酰胺)己酰胺基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基 (11S, 11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯 (9b)

[0893] 向胺/亚胺6 (100mg, 98 $\mu$ mol, 1.0当量) 和N-甲基溴乙酰胺基己酸8b (30mg, 0.12mmol, 1.2当量) 在干燥DCM/MeOH (6mL/3mL) 中的溶液中添加EEDQ (36mg, 0.15mmol, 1.5当量)。将溶液在室温搅拌5天。将溶剂减压蒸发并通过制备型HPLC纯化残余物, 冷冻干燥得白色泡沫状产物 (16mg, 13%)。分析数据: RT 1.44min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1280 ([M+H]<sup>+</sup>, 20)。

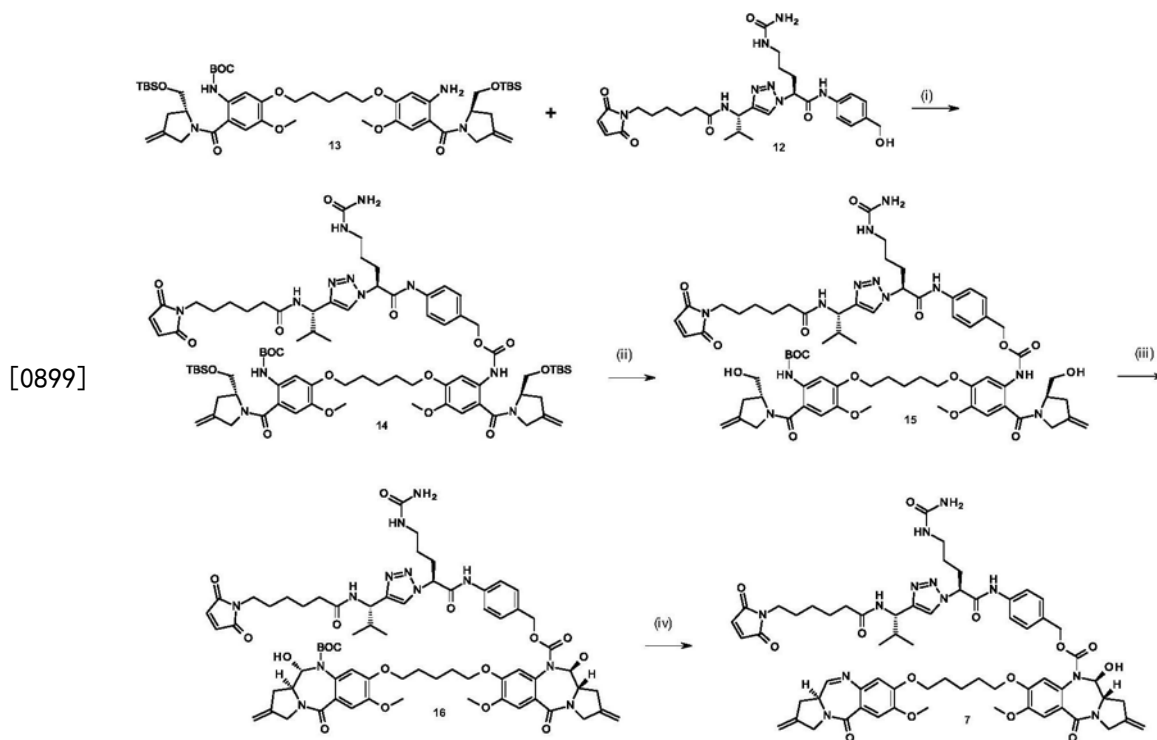
[0894] 实施例3: 4-[[ (2S)-2-[4-[(1S)-1-[6-(2,5-二氧代吡咯-1-基)己酰基氨基]-2-甲基-丙基]三唑-1-基]-5-脲基-戊酰基]氨基]苄基]甲基 (6S, 6aS)-3-[5-[[ (6aS)-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-7,9-二氢-6aH-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-3-基]氧基]戊氧基]-6-羟基-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-6,6a,7,9-四氢吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-5-羧酸酯 (PBD-LD2) 的备选制备方法

[0895] (a) 6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-((S)-1-(1-((S)-1-(4-(羟甲基)苄基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)-2-甲基丙基)己酰胺 (12)



[0897] 在搅拌下将胺10 (4.37g, 10.8mmol, 1.0当量) 和2,5-二恶吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯11 (3.67g, 11.9mmol, 1.1当量) 溶于无水DMF (100mL)。将反应混合物在室温搅拌2小时。将溶剂减压蒸发得粘性黄色油状产物12 (6.0g, 92%)。分析数据: RT 1.20min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 597 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)。

[0898] (b) 4-[[ (2S)-2-[4-[(1S)-1-[6-(2,5-二氧代吡咯-1-基)己酰基氨基]-2-甲基-丙基]三唑-1-基]-5-脲基-戊酰基]氨基]苄基]甲基 (6S, 6aS)-3-[5-[[ (6aS)-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-7,9-二氢-6aH-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-3-基]氧基]戊氧基]-6-羟基-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-6,6a,7,9-四氢吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-5-羧酸酯 (7, PBD-LD2)



[0900] 概要

[0901] (i) 三光气、吡啶、THF

[0902] (ii) AcOH、THF、H<sub>2</sub>O

[0903] (iii) IBX、DMSO

[0904] (iv) 95% TFA

[0905] 化合物13是W0 2013/055987的化合物9。

[0906] (i) 4-((S)-2-(4-((S)-1-(6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基(5-((5-(5-((叔丁氧羰基)氨基)-4-((R)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)戊基)氧基)-2-((R)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酸酯(14)

[0907] 在室温向搅拌的氩气氛下的单boc保护的二苯胺13(0.555g,0.58mmol,1.0当量)和三光气(0.062g,0.21mmol,0.36当量)在干燥THF(15mL)中的溶液中添加三乙胺(0.13g,0.18mL 1.3mmol,2.2当量)。将反应混合物加热至40℃,用甲醇处理样品并作为氨基甲酸酯通过LCMS分析。

[0908] 向新制备的异氰酸酯中逐滴添加苄醇12(0.51g,0.85mmol,1.45当量)在干燥THF/吡啶(3mL/3mL)中的溶液。通过LCMS检测反应混合物,在40℃反应4小时之后结束。过滤反应混合物并将滤液减压蒸发。将残余物溶于CHCl<sub>3</sub>(100mL)并用饱和CuSO<sub>4</sub>溶液(2x 150mL)、饱和盐水(150mL)洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发得黄色泡沫。通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱CHCl<sub>3</sub>/2%MeOH至5%MeOH,以1%增加]得到白色泡沫状产物(0.26g,29%)。分析数据:RT 2.23min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1577([M+H]<sup>+</sup>,100)。

[0909] (ii) 4-((S)-2-(4-((S)-1-(6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基(5-((5-(5-((叔丁氧羰基)

氨基)-4-((R)-2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)戊基)氧基)-2-((R)-2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酸酯(15)

[0910] 向化合物14(0.934g,0.6mmol,1.0当量)在THF(17mL)中的溶液中添加AcOH/H<sub>2</sub>O(1.5/1)(42mL)并将所得溶液在室温搅拌72小时。用饱和碳酸氢钠溶液将反应混合物碱化至pH8。用DCM(4x 100mL)萃取混合物并用饱和碳酸氢钠溶液(300mL)、H<sub>2</sub>O(200mL)、饱和盐水(250mL)洗涤合并的萃取液、干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发。通过快速柱色谱法纯化残余物[梯度洗脱CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2%至9%,以1%增加]得到白色泡沫状产物(0.573g,72%)。分析数据:RT 1.6min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1347([M+H]<sup>+</sup>,100)。

[0911] (iii)叔丁基(11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-(4-((S)-1-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基)氧基)羰基)-11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,10,11,11a-六氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯(16)

[0912] 向二醇(15)(0.573g,0.425mmol,1.0当量)在干燥DMSO(30mL)中的溶液中整批添加稳定的45wt%2-碘酰基苯甲酸(IBX)(0.635g,1.02mmol,2.4当量)。将溶液在30℃搅拌21小时。再添加一部分IBX(26mg,42.5μmol,0.1当量)并使反应再继续24h。将反应混合物加入盐水溶液(500mL)中,用DCM萃取(5x 100mL)。合并的萃取液用饱和碳酸氢钠水溶液(300mL)、H<sub>2</sub>O(200mL)、盐水(300mL)洗涤并干燥(MgSO<sub>4</sub>)。在减压下旋转蒸发除去溶剂得粗产物。通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱CHCl<sub>3</sub>/MeOH 0%至6%,以1%增加]得到白色固体产物(0.35g,61%)。分析数据:RT 1.53min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1343([M+H]<sup>+</sup>,97)。

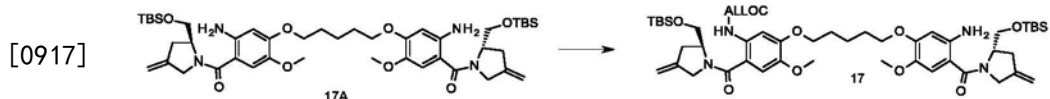
[0913] (iv)4-((S)-2-(4-((S)-1-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-2-甲基丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)-5-脲基戊酰胺)苄基(11S,11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-(((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯(7)

[0914] 向已经在冰浴中冷却的化合物16中添加95%三氟乙酸(16mL)的冷(冰浴)溶液。在LCMS显示结束时将溶液在0℃搅拌15分钟。将反应混合物逐滴添加到冰并饱和碳酸氢钠溶液的混合物中以中和三氟乙酸溶液。用10%MeOH/CHCl<sub>3</sub>(4x 100mL)萃取混合物并用饱和盐水(200mL)洗涤合并的萃取液,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发得黄色固体产物(0.337g,106%)。分析数据:RT 1.45min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1225([M+H]<sup>+</sup>,100)。

[0915] 实施例4:4-[[ (2S)-2-[[1-[5-(2,5-二氧代吡咯-1-基)戊基氨甲酰基]环丁烷羰基]氨基]-5-脲基-戊酰基]氨基]苯基]甲基(6S,6aS)-3-[5-[[ (6aS)-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-7,9-二氢-6aH-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-3-基]氧基]戊氧基]-6-羟基-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-6,6a,7,9-四氢吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-5-羧酸酯(24,PBD-LD3)的制备

[0916] (a)烯丙基(5-((5-(5-氨基-4-((S)-2-(((叔丁基二甲基硅基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)戊基)氧基)-2-((S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酸酯(17)

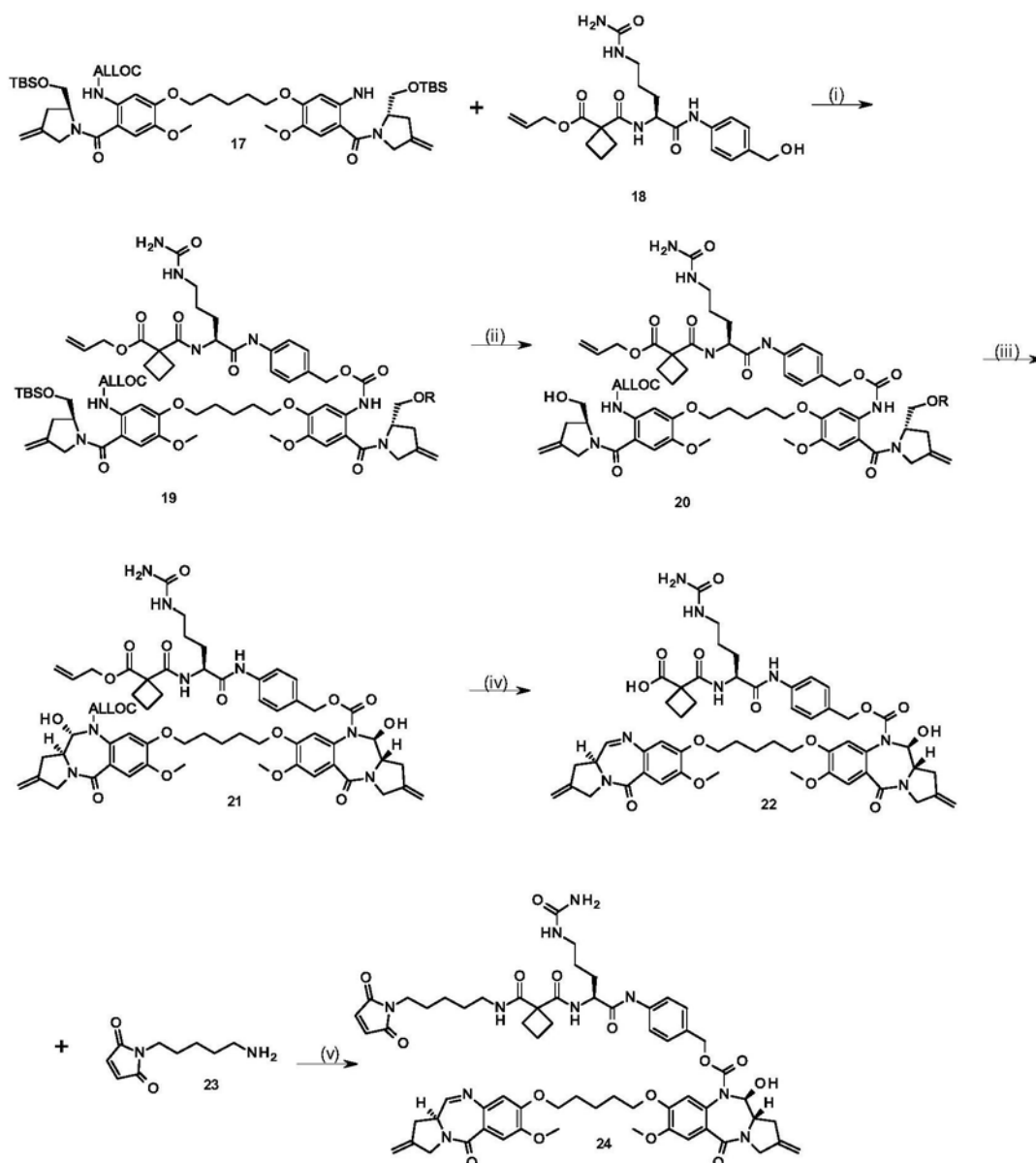




[0918] 化合物17A是WO 2013/055987的化合物8。

[0919] 在-78℃(干冰/丙酮)向氩气氛下的二苯胺(2.72g, 3.2mmol, 1.0当量)和干燥吡啶(0.5g, 0.52mL, 6.4mmol, 2.0当量)在干燥DCM(30mL)中的溶液中逐滴添加烯丙基氯甲酸酯17A(0.38g, 0.34mL, 3.2mmol, 1.0当量)在干燥DCM(10mL)中的溶液。将所得溶液在-78℃搅拌1小时随后使其达到室温。将反应混合物用DCM(50mL)稀释并用饱和硫酸铜溶液(2x 200mL)、水(200mL)、盐水(200mL)洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发。通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱60%正己烷/40%EtOAc至100%EtOAc,以10%增加]得到黄白色泡沫状产物(1.45g, 48%)。分析数据:RT 2.25min;MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 937 ([M+H]<sup>+</sup>, 100), 959 ([M+Na]<sup>+</sup>, 60)。

[0920] (b) [4-[[ (2S)-2-[[1-[5-(2,5-二氧代吡咯-1-基) 戊基氨甲酰基] 环丁烷羰基] 氨基]-5-脲基-戊酰基] 氨基] 苯基] 甲基 (6S, 6aS)-3-[5-[[ (6aS)-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-7,9-二氢-6aH-吡咯并[2,1-c][1,4] 苯并二氮卓-3-基] 氧基] 戊氧基]-6-羟基-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-6,6a,7,9-四氢吡咯并[2,1-c][1,4] 苯并二氮卓-5-羧酸酯 (24)



[0922] 概要

[0923] (i) 三光气、吡啶、THF

[0924] (ii) TBAF、THF

[0925] (iii) IBX、DMSO

[0926] (iv) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>、吡咯烷、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

[0927] (v) BOP-Cp、DIEA、DMF

[0928] (i) 烯丙基1-(((S)-1-((4-(((5-((5-5-((烯丙氧基)羰基)氨基)-4-((S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)戊基)氧基)-2-((S)-2-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-羧酸酯(19)

[0929] 在室温向搅拌的氩气氛下的单alloc保护的二苯胺17(0.79g,0.84mmol,1.0当量)和三光气(90mg,0.3mmol,0.36当量)在干燥THF(20mL)中的溶液中添加三乙胺(1.85g,

0.26mL 1.85mmol, 2.2当量)。将反应混合物加热至40℃,用甲醇处理样品并作为氨基甲酸酯通过LCMS分析。

[0930] 向新制备的异氰酸酯中逐滴添加苄醇18 (0.49g, 1.1mmol, 1.3当量) 在干燥THF (20mL) 中的溶液。通过LCMS检测反应混合物, 在40℃反应5小时之后结束。过滤反应混合物并将滤液减压蒸发。通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱EtOAc/0%MeOH至6%MeOH, 以1%增加]得到白色泡沫状产物(0.73g, 61%)。分析数据: RT 2.20min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1410 ([M+H]<sup>+</sup>, 50), 1431 ([M+Na]<sup>+</sup>, 50)。

[0931] (ii) 烯丙基1-((S)-1-((4-(((5-((5-((5-((烯丙氧基)羰基)氨基)-4-((S)-2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基苯氧基)戊基)氧基)-2-((S)-2-(羟甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-4-甲氧基苯基)氨甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨甲酰基)环丁烷-1-羧酸酯(20)

[0932] 在氩气氛下向双-TBS化合物19 (0.7g, 0.5mmol, 1.0当量) 在干燥THF (20mL) 中的溶液中添加四正丁基氟化铵 (1.0M THF溶液, 1.1mL, 2.2当量)。将反应混合物在室温搅拌15min。将溶剂减压蒸发并将残余物重新溶于DCM, 用盐水洗涤(x1), 干燥(MgSO<sub>4</sub>)并蒸发得浅黄色油状物。通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱EtOAc/MeOH 5%至15%, 以2.5%增加]得到白色泡沫状product (0.46g, 79%)。分析数据: RT 1.55min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1181 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)。

[0933] (iii) 烯丙基(11S, 11aS)-8-((5-(((11S, 11aS)-10-((4-((S)-2-(1-((烯丙氧基)羰基)环丁烷-1-甲酰胺)-5-脲基戊酰胺)苄基)氧基)羰基)-11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,10,11,11a-六氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯(21)

[0934] 向二醇20 (0.43g, 0.365mmol, 1.0当量) 在干燥DMSO (31mL) 中的溶液中整批添加稳定的45wt% 2-碘酰基苯甲酸 (IBX) (0.545g, 0.88mmol, 2.4当量)。将溶液在30℃搅拌18小时。将反应混合物添加到盐水溶液中并用DCM萃取(5x 75mL)。合并的萃取液用饱和碳酸氢钠水溶液(200mL)、水(200mL)、盐水(200mL)洗涤并干燥(MgSO<sub>4</sub>)。在减压下旋转蒸发除去溶剂得粗产物。通过快速柱色谱法纯化[梯度洗脱CHCl<sub>3</sub>/MeOH 0%至6%, 以1%增加]得到白色泡沫状产物(0.21g, 48%)。分析数据: RT 1.48min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1177 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)。

[0935] (iv) 1-((S)-1-((4-(((11S, 11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,10,11,11a-六氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10-羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨甲酰基)环丁烷-1-羧酸(22)

[0936] 在氩气氛下向化合物21 (0.1g, 85μmol, 1.0当量) 和吡咯烷 (15mg, 17μL, 0.21mmol, 2.5当量) 在干燥DCM (5mL) 中的溶液中添加Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (6mg, 5.1μmol 0.06当量)。将溶液在室温搅拌35分钟。将反应混合物用乙醚(xs)稀释以沉淀产物, 通过过滤收集产物, 用乙醚冲洗(x 2)。得到白色粉末状产物, 不经进一步纯化即使用。分析数据: RT 1.34min; MS (ES<sup>+</sup>) m/z (相对强度) 1035 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)。

[0937] (v) 4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺)-5-脲基戊酰胺)苄基(11S,11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-10(5H)-羧酸酯(24)

[0938] 搅拌下在氩气氛下向双(2-氧代-3-噁唑烷基)氯膦(12mg,46.4 $\mu$ mol,1.2当量)和酸22(40mg,39.1 $\mu$ mol,1.0当量)在干燥DMF(5mL)中的溶液中添加N,N-二异丙基乙胺(15mg,20 $\mu$ L,116 $\mu$ mol,3.0当量)。添加5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊烷-1-氯化铵23(9mg,39.1 $\mu$ mol,1.0当量)并在室温下将混合物搅拌过夜。用柠檬酸淬灭混合物并用DCM萃取(3x 50mL)。用饱和盐水(100mL)洗涤合并的萃取液,干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压蒸发得黄色固体。通过制备型HPLC纯化并冷冻干燥得白色泡沫状产物(4.5mg,10%)。分析数据:RT 1.42min;MS(ES<sup>+</sup>)m/z(相对强度)1199([M+H]<sup>+</sup>,60)。

[0939] ADC的制备方法

[0940] 用于通过还原和再氧化缀合的半胱氨酸工程抗体制剂

[0941] 在一定条件下,半胱氨酸工程化抗体可以制备成反应性的用于与本发明的接头药物中间体缀合,如表4中的那些,通过用诸如DTT(Cleland试剂,二硫苏糖醇)或TCEP(三(2-羧基乙基)膦盐酸盐;Getz等人(1999)Anal.Biochem.Vol 273:73-80;Soltec Ventures,Beverly,MA)等的还原剂处理。CHO细胞中的全长半胱氨酸工程化单克隆抗体(ThioMab)表达(Gomez等人(2010)Biotechnology and Bioeng.105(4):748-760;Gomez等人(2010)Biotechnol.Prog.26:1438-1445)下降,例如用约50倍过量的DTT在室温下过夜从而还原可以在新引入半胱氨酸残基和培养基中存在的半胱氨酸之间形成的二硫键。

[0942] 轻链氨基酸是根据Kabat编号的(Kabat等人,Sequences of proteins of immunological interest,(1991)第五版,US Dept of Health and Human Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)。重链氨基酸是根据EU编号系统(Edelman等人(1969)Proc.Natl.Acad.of Sci.63(1):78-85)编号的,除了表示为Kabat系统之外。使用单个字母氨基酸缩写。

[0943] CHO细胞中表达的全长半胱氨酸工程化单克隆抗体(ThioMab)由于细胞培养条件在工程化半胱氨酸上带有半胱氨酸加合物(胱氨酸)或谷胱甘肽化。为了释放工程化半胱氨酸的反应性硫醇基,在约pH8.0将ThioMab溶于500mM硼酸钠和500mM氯化钠并且用约50-100倍过量的1mM TCEP(三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(Getz等人(1999)Anal.Biochem.Vol 273:73-80;Soltec Ventures,Beverly,MA)在37℃还原约1-2小时。此外,DTT可以用作还原剂。链内二硫键的形成是通过非还原性SDS-PAGE或变性反相HPLC PLRP柱色谱法监测的。将还原的ThioMab稀释并且加载到在10mM乙酸钠、pH 5的HiTrap SP FF柱子上,并且用含有0.3M氯化钠的PBS或含有150mM氯化钠的50mM Tris-Cl、pH 7.5洗脱。

[0944] 通过进行再氧化重建存在于亲代Mab半胱氨酸残基之间的二硫键。洗脱的还原的ThioMab用15X或2mM脱氢抗坏血酸(dhAA)在pH 7处理3小时或在50mM Tris-Cl、pH 7.5处理3小时,或在室温下用2mM硫酸铜(CuSO<sub>4</sub>)水溶液处理过夜。可以使用在本领域已知的其他氧化剂(氧化试剂)和氧化条件。环境空气氧化也可能是有效的。这种轻微的部分再氧化步骤有效地形成高精确度的链内二硫化物。缓冲液通过Sephadex G25树脂洗脱替换并且用含有

1mM DTPA的PBS洗脱。硫醇/Ab值是通过从溶液在280nm的吸光度测定还原的抗体浓度和通过与DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) 反应测定硫醇浓度并且测定在412nm的吸光度来检验的。

[0945] 在具有延长质量范围TSQ Quantum三级四极<sup>TM</sup>质谱仪 (Thermo Electron, San Jose California) 上进行液相色谱/质谱分析。在加热至75℃的PRLP-S<sup>®</sup>、1000A、微孔柱子 (50mm×2.1mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK) 上对样品进行色谱分析。使用30-40%B的线性梯度 (溶剂A: 含0.05% TFA的水, 溶剂B: 含0.04% TFA的乙腈) 并且使用电喷雾直接电离洗脱液。通过Xcalibur<sup>®</sup>数据系统收集数据并且使用ProMass<sup>®</sup> (Novatia, LLC, New Jersey) 进行反演。在LC/MS分析之前, 在37℃用PNGase F (2单位/ml; PR0zyme, San Leandro, CA) 处理抗体或药物偶联物 (50微克) 2小时以除去N连接的碳水化合物。

[0946] 将疏水作用色谱法 (HIC) 样品注射到Butyl HIC NPR柱子 (2.5微米粒径, 4.6mm×3.5cm) (Tosoh Bioscience) 上并且用0至70%B的线性梯度以0.8mL/min洗脱 (A: 在50mM磷酸钾中的1.5M硫酸铵, pH 7, B: 50mM磷酸钾pH 7, 20% 异丙醇)。使用配备多波长检测器和Chemstation软件的Agilent 1100系列HPLC系统拆分和定量每个抗体具有不同药物比值的抗体物种。本发明的半胱氨酸工程化抗体可以根据上述一般方法制备。

[0947] 接头药物中间体与抗体缀合 (工序1)

[0948] 用CHO细胞中表达的谷胱甘肽和/或半胱氨酸作为混合二硫化物阻断工程化抗体半胱氨酸。这些半胱氨酸必须在缀合之前“去阻断”。

[0949] 将在20mM琥珀酸盐、150mM NaCl、2mM EDTA中的去阻断抗体 (5-12mg/mL) 加到75-100mM Tris, pH 7.5-8 (使用1M Tris)。向抗体溶液中添加共溶剂 (DMSO、DMF或DMA), 接着添加接头药物 (在DMSO或DMF中) 得最终10-13%的%-有机溶剂和相对于抗体浓度的接头药物2.5-10X最终浓度。使反应在室温下进行1-12小时 (直到实现最大缀合)。借助阳离子交换色谱法和/或凝胶过滤使用一次性柱子 (分别是S maxi或Zeba) 纯化缀合反应。如果根据分析SEC (例如, >10%) 粗制偶联物明显聚集, 通过制备凝胶过滤 (S200柱子) 进行其他纯化。随后使用凝胶过滤或渗析将偶联物替换成配方缓冲液 (20mM His-醋酸盐, pH 5.5, 240mM蔗糖)。随后添加Tween-20纯化偶联物以达到0.02%的最终浓度。最终偶联物浓度在2.4至7.5mg/mL范围内 (%产率: 34-81% 来自去阻断抗体)。通过LCMS分析偶联物以获得药物抗体比值 (DAR) 的测量结果, 其在1.3至2.1范围内 (平均值: 1.8)。还使用分析SEC (Zenix或Shodex柱子) 分析了偶联物中存在的高分子量聚集; 最终, 纯化偶联物显示聚集在0-10%范围内。还评价了偶联物的内毒素污染, 在任何情况下, 都不超过1.3EU/mg。游离、非缀合药物不超过最终偶联物的1%。

[0950] 接头药物中间体与抗体缀合 (工序2, 替代工序)

[0951] 在以上实施例的还原和再氧化工序之后, 将抗体溶于PBS (磷酸盐缓冲盐水) 缓冲液并且在冰上冷却。将过量 (约1.5摩尔至20当量) 带有诸如马来酰亚胺基或溴-乙酰胺等硫醇反应性官能团的接头药物中间体溶于DMSO, 在乙腈和水中稀释, 并且添加到冷却的在PBS中的还原、再氧化抗体。约一小时之后, 添加过量马来酰亚胺以淬灭反应并封住任何未反应的抗体硫醇基。可以将缀合混合物加载并通过HiTrap SP FF柱子洗脱以除去过量药物接头中间体和杂质。通过离心超滤浓缩反应混合物并且通过在PBS中经G25树脂洗脱使半胱氨酸工程化抗体药物偶联物纯化和脱盐, 在无菌条件下经0.2μm过滤器过滤, 并且冷冻储

存。

[0952] 本发明ADC可以根据以上部分中描述的工序制备。

[0953] 试验

[0954] 随后检测选择接头并且发现在体外和活体内试验中有活性。断裂数据在下表中示出

[0955] 组织蛋白酶B断裂试验

[0956] 类似肽接头,为了适当的药物释放,期望ADC的非肽接头在溶酶体中是可断裂的。作为细胞的消化细胞器,溶酶体富含一些在酸性pH显示最佳水解活性的蛋白酶。组织蛋白酶B是代表性溶酶体蛋白酶并且已经显示促进ADC肽接头(ref)的活化。作为初始筛选,使用纯化组织蛋白酶B开发试验来确定适用于与抗体缀合的可断裂接头药物构建物。诺氟沙星用于表示接头药物的药物组分。在给定时间点测定了相对于对照肽(如Val-Cit)的百分比以及断裂反应动力学参数( $K_m$ 和 $V_{max}$ )。试验详细描述示出如下。从这个试验,确定了多种蛋白水解酶活性和结构上不同的接头并且稍后用于制备ADC。

[0957] 使用实验接头药物作为底物的组织蛋白酶B断裂活性是通过使用LC/MS监测诺氟沙星的释放测定的。将不同浓度的接头药物(3倍连续稀释)在含有20nM组织蛋白酶B(EMD Millipore cat.#219364,人肝脏)、10mM MES pH 6.0、1mM DTT、0.03%CHAPS和25nM诺氟沙星-d5内标物(Santa Cruz Biotechnology,cat.#sc-301482)的20uL反应中孵育。反应在37℃孵育1小时,接着添加60uL 2%甲酸淬灭反应。在Waters Acquity UPLC BEH苯基柱子(2.1mm x 50mm,Waters cat.#186002884)上注射2uL停止的反应分析样品。在Water Acquity UPLC上使用线性2分钟梯度(0%至80%)的乙腈、0.1%甲酸纯化样品。使用在正MRM模式运行的AB Sciex QTrap 5500三级四极质谱仪检测诺氟沙星和诺氟沙星-d5内标物(诺氟沙星320→233m/z,诺氟沙星-d5 325→233m/z)。定量的诺氟沙星(用内标物归一化)对接头药物浓度绘图,得到的图像使用GraphPad Prism软件对动力学常数 $K_m$ 和 $V_{max}$ 用Michaelis-Menten拟合进行曲线拟合。

[0958] 体外细胞增殖试验

[0959] ADC的效力是采用以下流程通过细胞增殖试验测定的(CELLTITER GLO™ Luminescent Cell Viability Assay,Promega Corp.Technical Bulletin TB288;Mendoza等人(2002)Cancer Res.62:5485-5488):

[0960] 1.将100μl在培养基中含有约 $10^4$ 细胞(SKBR-3、BT474、MCF7或MDA-MB-468)的细胞培养物试样放置在96孔不透明壁板的每个孔中。

[0961] 2.制备含有培养基并且不含细胞的对照孔。

[0962] 3.向实验孔添加ADC并且孵育3-5天。

[0963] 4.将板平衡至室温大约30分钟。

[0964] 5.添加体积等于每个孔中存在的细胞培养基体积的CELLTITER GLO™试剂。

[0965] 6.将内容物在轨道振荡器上混合2分钟以引起细胞断裂。

[0966] 7.将板在室温下孵育10分钟以稳定荧光信号。

[0967] 8.记录荧光并在图表中报告RLU=相对荧光单位。

[0968] 数据作为每组平行测定的荧光平均值绘图,带有标准偏差误差线。所述流程是CELLTITER GLO™ Luminescent Cell的改进。

[0969] 培养基:SK-BR-3在50/50/10%FBS/谷氨酰胺/250 $\mu$ g/mL中生长,G-418OVCAR-3在RPMI/20%FBS/谷氨酰胺中生长。

[0970] 活体内试验

[0971] 1.在HL-60或EOL-1(人类急性骨髓性白血病)小鼠异种移植模型中研究了抗CD33抗体-药物偶联物(ADC)的效力。HL-60细胞系从ATCC(American Type Culture Collection;Manassas,VA)获得,EOL-1细胞系来源于DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures;Braunschweig,Germany)。

[0972] 雌性C.B-17SCID小鼠(Charles River Laboratories;Hollister,CA)各在侧腹区域皮下注射接种五百万HL-60或EOL-1细胞。当异种移植肿瘤达到100-300mm<sup>3</sup>平均肿瘤体积时(称为第0天),将动物随机分成各7-10只小鼠的组并且接受单次ADC静脉注射。在施用ADC大约4小时之前,用过量(30mg/kg)抗gD对照抗体对动物腹腔注射给药以阻断肿瘤细胞上的可能的非特异性抗体结合位点。在研究期间一周测量1-2次小鼠的肿瘤和体重。当体重损失大于其起始质量20%时立即将小鼠执行安乐死。所有动物都在肿瘤达到3000mm<sup>3</sup>或显示即将发生溃疡的体征之前执行安乐死。

[0973] 2.在OVCAR3-X2.1(人卵巢癌)小鼠异种移植模型中研究了抗Napi2B抗体药物偶联物(ADC)的效力。OVCAR3细胞系从ATCC(American Type Culture Collection;Manassas,VA)获得并且为了在小鼠中有最佳生长在Genentech产生了亚细胞系OVCAR3-X2.1。

[0974] 雌性C.B-17SCID-浅褐色小鼠(Charles River Laboratories;San Diego,CA)各在胸部乳腺脂肪垫区域中接种一千万OVCAR3-X2.1细胞。当异种移植肿瘤达到100-300mm<sup>3</sup>平均肿瘤体积时(称为第0天),将动物随机分成各7-10只小鼠的组并且接受单次ADC静脉注射。在研究期间一周测量1-2次小鼠的肿瘤和体重。当体重损失大于其起始质量20%时立即将小鼠执行安乐死。所有动物都在肿瘤达到3000mm<sup>3</sup>或显示即将发生溃疡的体征之前执行安乐死。

[0975] 3.在BJAB-luc(人Burkitt's淋巴瘤)或WSU-DLCL2(人扩散性大B细胞淋巴瘤)中研究了抗CD22抗体药物偶联物(ADC)的效力。BJAB细胞系是从DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures;Braunschweig,Germany)获得,并且在Genentech产生亚细胞系BJAB-luc以稳定表达荧光素酶基因。WSU-DLCL2细胞系也来源于DSMZ。

[0976] 雌性C.B-17SCID小鼠(Charles River Laboratories;Hollister,CA)各在侧腹区域皮下注射接种两千万BJAB-luc或WSU-DLCL2细胞。当异种移植肿瘤达到100-300mm<sup>3</sup>平均肿瘤体积时(称为第0天),将动物随机分成各7-10只小鼠的组并且接受单次ADC静脉注射。在研究期间一周测量1-2次小鼠的肿瘤和体重。当体重损失大于其起始质量20%时立即将小鼠执行安乐死。所有动物都在肿瘤达到3000mm<sup>3</sup>或显示即将发生溃疡的体征之前执行安乐死。

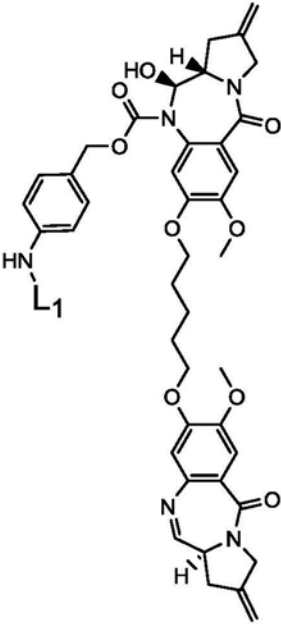
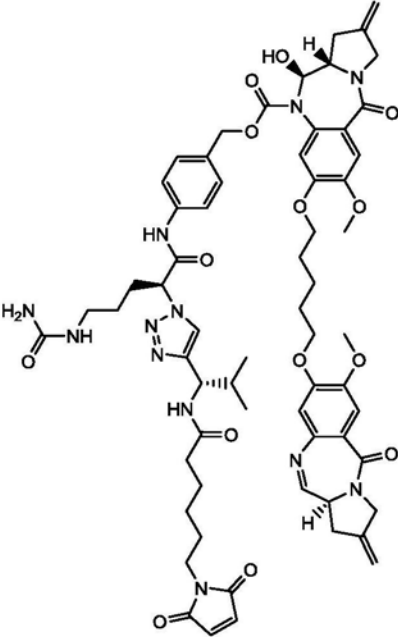
[0977] 4.在MMTV-HER2Founder#5(鼠乳腺肿瘤)小鼠异源移植模型中研究了抗Her2抗体药物偶联物(ADC)的效力。MMTV-HER2Founder#5(Fo5)模型(在Genentech开发)是人类HER2基因(在鼠乳腺肿瘤病毒启动子(MMTV-HER2)的转录调控下)在乳腺上皮中过表达的转基因小鼠模型。过表达引起过表达人HER2受体的乳腺肿瘤的自发发育。来自founder动物(founder#5,Fo5)之一的乳腺肿瘤已经通过肿瘤碎片串行移植在FVB小鼠(Charles River Laboratories)中增殖。

[0978] 对于效力研究,通过外科手术将Fo5转基因乳腺肿瘤作为大约2mm x 2mm尺寸的肿瘤碎片移植到雌性nu/nu小鼠 (Charles River Laboratories;Hollister,CA) 中。当异源移植肿瘤达到100-300mm3平均肿瘤体积时 (称为第0天),将动物随机分成各7-10只小鼠的组并且接受单次ADC静脉注射。在研究期间一周测量1-2次小鼠的肿瘤和体重。当体重损失大于其起始质量20%时立即将小鼠执行安乐死。所有动物都在肿瘤达到3000mm3或显示即将发生溃疡的体征之前执行安乐死。

[0979] 生物数据

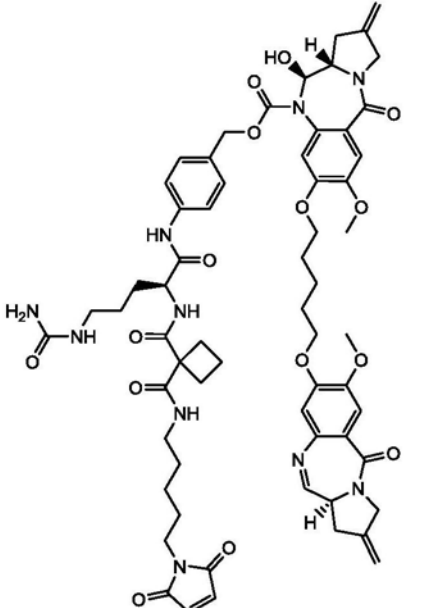
[0980] ADC接头药物结构

[0981]

实施例	对应ADC	结构	名称
PBD-L D1	Napi3b PBD ADC1-1		L <sub>1</sub> 是可断裂接头
PBD-L D2	Napi3b PBD ADC2-1, CD33 CBI-PB D ADC2-2, MUV16 PBD ADC2-4		[4-[[[(2S)-2-[4-[(1S)-1-[6-(2,5-二氧代吡咯-1-基)己酰基氨基]-2-甲基-丙基]三唑-1-基]-5-脲基-戊酰基]氨基]苯基]甲基 (6S,6aS)-3-[5-[[[(6aS)-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-7,9-二氢-6aH-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-3-基]氧基]戊氧基]-6-羟基-2-甲氧基-8-亚甲基-11-氧代-6,6a,7,9-四氢吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮卓-5-羧酸酯



[0982]

PBD-L D3	Napi3b PBD ADC3- 1 和 CD33 CBI-PB D ADC3- 2		[4-[[[(2S)-2-[[1-[5-(2,5- 二氧代吡咯-1-基)戊基 氨基]环丁烷羰基] 氨基]-5-脲基-戊酰基] 氨基]苯基]甲基 (6S,6aS)-3-[5-[[[(6aS)-2 -甲氧基-8-亚甲基-11- 氧代-7,9-二氢-6aH-吡 咯并[2,1-c][1,4]苯并二 氮卓-3-基]氧基]戊氧 基]-6-羟基-2-甲氧基 -8-亚甲基-11-氧代 -6,6a,7,9-四氢吡咯并 [2,1-c][1,4]苯并二氮卓 -5-羧酸酯
-------------	--	--	--

[0983] PBD-LD1是W0 2011/130598的化合物87。

[0984] 序列

[0985] NaPi3b人源化抗体：

[0986] 在一个实施方案中，本发明ADC的Napi3b抗体包含三个轻链超可变区和三个重链超可变区 (SEQ ID NO:1-6)，其序列在下面示出。

[0987] 在一个实施方案中，本发明ADC的Napi3b抗体包含SEQ ID NO:7的可变轻链序列和SEQ ID NO:8的可变重链序列。

[0988] 在一个实施方案中，本发明ADC的NaPi3b抗体包含SEQ ID NO:9的轻链序列和SEQ ID NO:10的重链序列。

[0989]

10H1.11.4B HVR-L1	RSSETLVHSSGNTYLE	Seq ID No: 1
10H1.11.4B HVR-L2	RVSNRFS	Seq ID No: 2
10H1.11.4B HVR-L3	FQGSFNPLT	Seq ID No: 3
10H1.11.4B HVR-H1	GFSFSDFAMS	Seq ID No: 4
10H1.11.4B HVR-H2	ATIGRVAFHTYYPDSMKG	Seq ID No: 5
10H1.11.4B HVR-H3	ARHRGFDVGHFDF	Seq ID No: 6
10H1.11.4B V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSETLVHSSGNTYLEWYQQK PGKAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCFQGSFNPLTFGQGTKVEIKR	SEQ ID NO: 7
10H1.11.4B V <sub>H</sub>	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFAMSWVRQAPGK GLEWVATIGRVAFTYYPDSMKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHRGFDVGHFDFWGQGTLLTVSS	SEQ ID NO: 8
10H1.11.4B 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSETLVHSSGNTYLEWYQQK PGKAPKLLIYRVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCFQGSFNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO: 9
10H1.11.4B 重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFAMSWVRQAPGK GLEWVATIGRVAFTYYPDSMKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARHRGFDVGHFDFWGQGTLLTVSSCSTKGPSVF	SEQ ID NO: 10

[0990]

	PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	
--	--	--

[0991] 抗CD33人源化抗体:

[0992] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含三个轻链超可变区和三个重链超可变区,其序列(SEQ ID NO:11-16)在下面示出。

[0993] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含SEQ ID NO:17的可变轻链序列和SEQ ID NO:18的可变重链序列。

[0994]

15G15.33-HVR L1	RSSQSLLHSNGYNYLD	SEQ ID NO:11
15G15.33-HVR L2	LGVNSVS	SEQ ID NO:12
15G15.33-HVR L3	MQALQTPWT	SEQ ID NO:13
15G15.33-HVR H1	NHAIS	SEQ ID NO:14
15G15.33-HVR H2	GIIPIFGTANYAQKFQG	SEQ ID NO:15
15G15.33-HVR H3	EWADVFDI	SEQ ID NO:16
15G15.33 V <sub>L</sub>	EIVLTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGVNSVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEIK	SEQ ID NO:17
15G15.33 V <sub>H</sub>	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGIFSNHAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAFMELSSLRSEDTAVYYCAREWADVFDIWGQGTMTVTVSS	SEQ ID NO:18

[0995] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含SEQ ID NO:19的轻链序列和SEQ ID NO:20的重链序列。

[0996] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含三个轻链超可变区和三个重链超可变区,其序列(Seq ID NO:19-24)在下面示出。

[0997] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含SEQ ID NO:25的可变轻链序列和SEQ ID NO:26的可变重链序列。

[0998] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含SEQ ID NO:27的可变轻链序列和SEQ ID NO:28的可变重链序列。

[0999] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含SEQ ID NO:29的可变轻链序列和SEQ ID NO:30的可变重链序列。

[1000] 在一个实施方案中,本发明ADC的抗CD33抗体包含SEQ ID NO:31的可变轻链序列和SEQ ID NO:32的可变重链序列。

[1001]

9C3-HVR L1	RASQGIRNDLG	Seq ID NO:19
9C3-HVR L2	AASSLQS	Seq ID NO:20
9C3-HVR L3	LQHNSYPWT	Seq ID NO:21
9C3-HVR H1	GNYMS	Seq ID NO:22
9C3-HVR H2	LIYSGDSTYYADSVKG	Seq ID NO:23
9C3-HVR H3	DGYVSDMVV	Seq ID NO:24
9C3 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNDLGWYQQ KPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKLEIK	Seq ID NO:25
9C3 V <sub>H</sub>	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVR QAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFNISRDISK TVYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGYVSDMVVWGKG TTVTVSS	Seq ID NO:26
9C3.2 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNDLGWYQQ KPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKLEIK	Seq ID NO:27

9C3.2 V <sub>H</sub>	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVR QAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFTISRDISKNT VYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGYVSDMVVWGKG TTVTVSS	Seq ID NO:28
9C3.3 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNDLGWYQQ KPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKLEIK	Seq ID NO:29
9C3.3 V <sub>H</sub>	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVR QAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFSISRDISKNT VYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGYVSDMVVWGKG TTVTVSS	Seq ID NO:30
9C3.4 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNDLGWYQQ KPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPEDFATYYCLQHNSYPWTFGQGTKLEIK	Seq ID NO:31
9C3.4 V <sub>H</sub>	EVQLVESGGALIQPGGSLRLSCVASGFTISGNYMSWVR QAPGKGLEWVSLIYSGDSTYYADSVKGRFAISRDISKN TVYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGYVSDMVVWGKG TTVTVSS	Seq ID NO:32

[1002] ADC体外数据

[1003] 以下ADC在上述体外试验中进行检测并且发现是有活性的。所述ADC的活性在下表中说明。

[1004]

代码	抗体 ID	EOL-1 IC <sub>50</sub> (ng/mL)
Napi3b PBD ADC1-1	10H1.11.4B	NA
gD PBD ADC1-3		NA
Napi3b PBD ADC2-1	10H1.11.4B	NA
CD33 PBD ADC2- 2	15G15.33	0.49
MUC16 PBD ADC2-4		196.3
Napi3b PBD ADC3-1	10H1.11.4B	65.2
CD33 PBD ADC3- 2	15G15.33	0.18

[1005] ADC活体内数据

[1006] 以下ADC在上述活体内试验中进行检测并且发现是有活性的。所述ADC的活性在图1-3中图示并且在下面描述。

[1007] 图1示出NaPi3b ADC在带有OVCAR3X2.1人类卵巢肿瘤SCID-浅褐色小鼠中的效力比较。NaPi3b PBD ADC1-1和ADC2-1与媒介物组相比都显示肿瘤生长的剂量依赖性抑制。非靶向对照gD或CD33PBD ADC对肿瘤生长具有显著影响；然而，对应的NaPi3b PBD ADC在匹配剂量下的效果更佳。

[1008] 图2示出NaPi3b ADC在带有OVCAR3X2.1人类卵巢肿瘤SCID-浅褐色小鼠中的效力比较。NaPi3b PBD ADC1-1和ADC3-1与媒介物组相比都显示肿瘤生长的剂量依赖性抑制。非靶向对照CD33PBD ADC3-2对肿瘤生长具有微弱的影响。

[1009] 图3示出各种剂量的CD33PBD ADC2-2在带有EOL-1人急性骨髓性白血病肿瘤的SCID小鼠中的效力。CD33PBD ADC2-2显示肿瘤生长的剂量依赖性抑制；在0.2mg/kg的抗体剂量导致肿瘤停滞并且在0.5mg/kg或更高剂量下导致肿瘤症状缓解。

(OVCAR3X2.1)

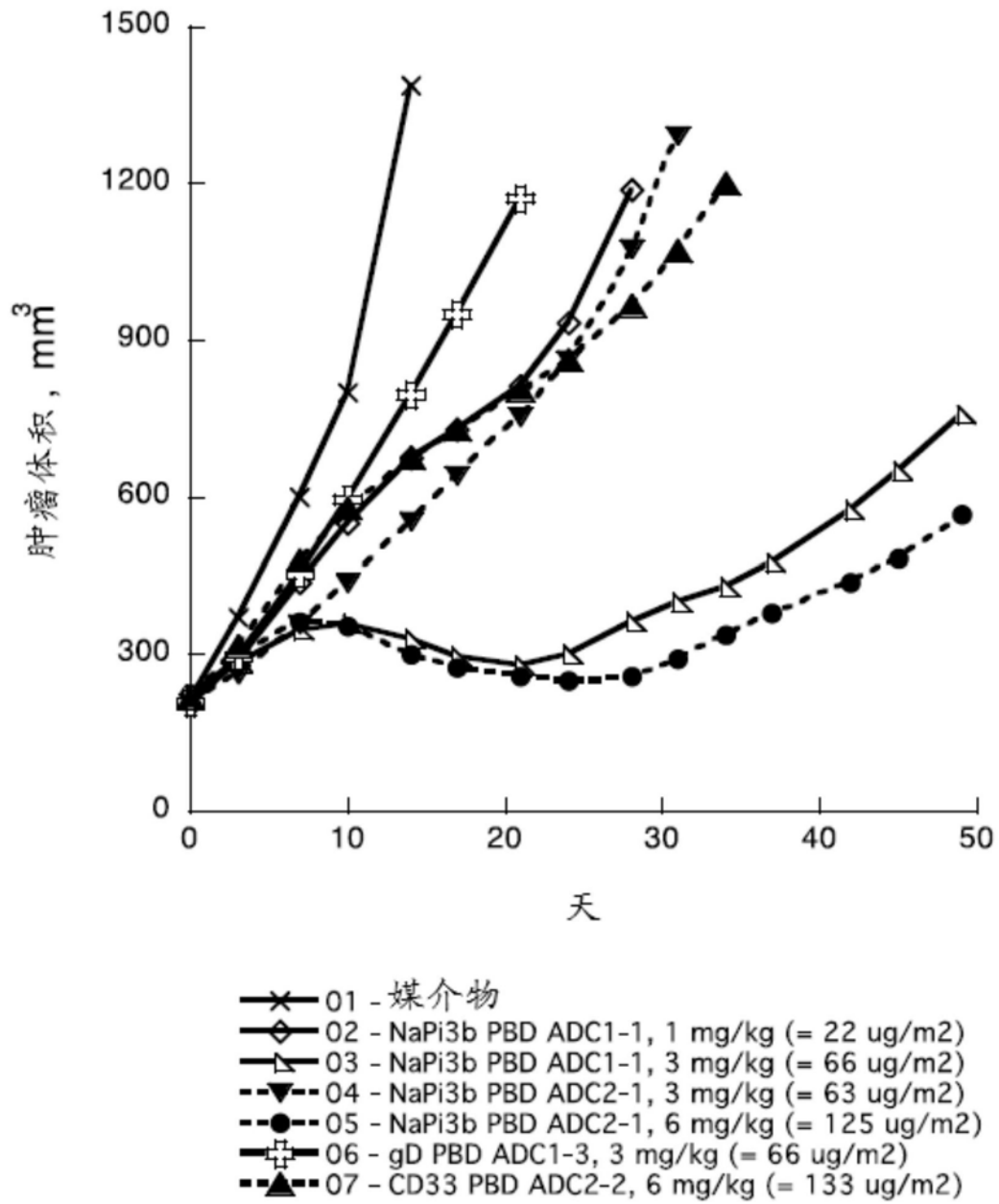


图1

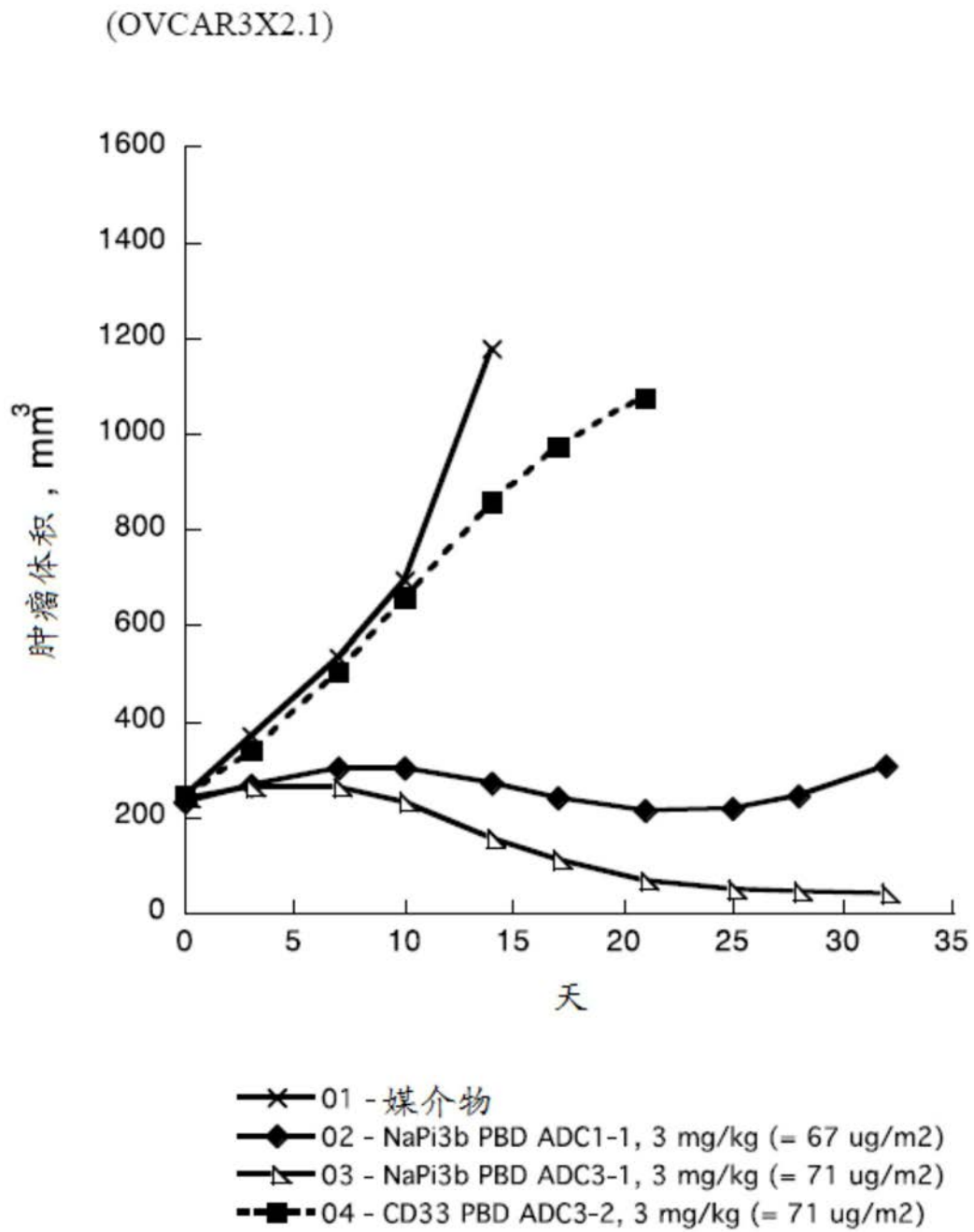


图2

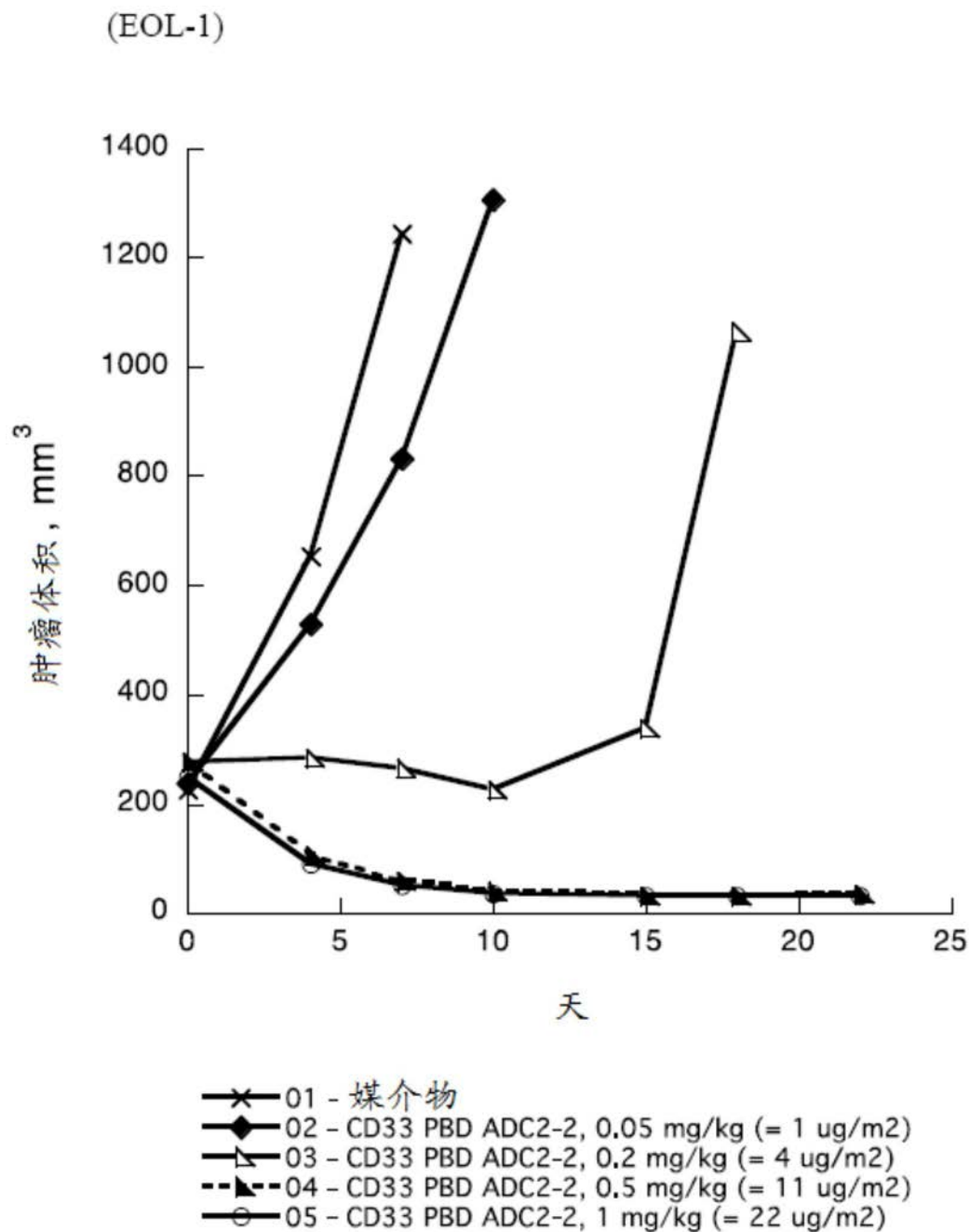


图3