



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106922129 B

(45) 授权公告日 2024.02.20

(21) 申请号 201580053082.9

A61K 47/68 (2017.01)

(22) 申请日 2015.10.01

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106922129 A

(56) 对比文件

CN 101309933 A, 2008.11.19

(43) 申请公布日 2017.07.04

CN 103288957 A, 2013.09.11

(30) 优先权数据

CN 103333246 A, 2013.10.02

62/058502 2014.10.01 US

Kunio Fujiwara, et al. Novel enzyme immunoassay for thyrotropin-releasing hormone using N-(4-diazophenyl)maleimide as a coupling agent.《FEBS LETTERS》.1986, 第202卷(第2期), 197-201.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Felix Kratz, et al. A Novel

2017.03.30

Macromolecular Prodrug Concept Exploiting Endogenous Serum Albumin as a Drug Carrier for Cancer Chemotherapy.《J. Med. Chem.》.2000, 第43卷1253-1256.

(86) PCT国际申请的申请数据

Aaron D. Baldwin, et al. Tunable degradation of maleimide-thiol adducts in reducing Environments.《Bioconjug Chem.》.2011, 第22卷(第10期), 1946-1953.

PCT/US2015/053397 2015.10.01

审查员 齐丹丹

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/054315 EN 2016.04.07

(73) 专利权人 免疫医疗有限责任公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 R.J.克里斯蒂 高长寿 N.迪马西

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理人 梁谋 周李军

(51) Int.Cl.

权利要求书2页 说明书65页 附图42页

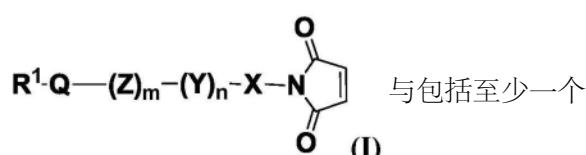
A61K 47/60 (2017.01)

(54) 发明名称

轭合多肽的方法

(57) 摘要

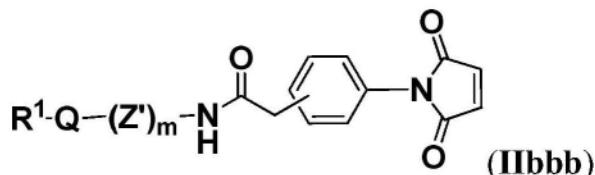
本披露涉及轭合具有化学式(I)的化合物

5 R₁-Q-(ZL-CO_n-X-N₀(I)

疏基团的多肽的方法,以及从所述方法获得的分子。

1. 一种用于制备轭合到有效负载上的多肽的方法, 其中该多肽是抗体或其结合片段, 所述方法包括以下步骤:

a) 用以下项进行迈克尔加成反应: 具有化学式 (IIbbb) 的分子中的马来酰亚胺实体或其药学上可接受的盐:



以及包括至少一个巯基基团的多肽分子, 其中:

该苯基具有1、2、3或4个独立地选自卤素的取代基;

m是0或1;

Q是一个键或来自轭合组分的一个残基;

Z' 代表-C₁₋₁₂亚烷基-或-(CH₂CH₂O)₁₋₈-;

R¹是有效负载分子, 其选自毒素、药物分子、聚合物、抗体或其结合片段;

b) 水解通过具有化学式 (IIbbb) 的化合物和该多肽的反应形成的所得硫代琥珀酰亚胺实体。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中基团R¹Q(Z')_mNC(0)-处于苯环的间位或对位。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中该药物分子选自奥瑞他汀、微管溶素或吡咯并苯并二氮杂草 (PBD)。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中该药物分子选自MMAE (单甲基奥瑞他汀E) 以及MMAF (单甲基奥瑞他汀F)。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中该药物分子选自美登木素生物碱。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中该药物分子选自N 2'-脱乙酰基-N 2'- (3-巯基-1-氧代丙基) -美登素 (DM1) 、N 2'-脱乙酰基-N2' - (4-巯基-1-氧代戊基) -美登素 (DM3) 和N 2'-脱乙酰基-N 2' (4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基) -美登素 (DM4)。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中R¹是毒素。

8. 根据权利要求1所述的方法, 其中该聚合物是天然聚合物或者是合成聚合物。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中该聚合物是淀粉、白蛋白或PEG。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法, 其中该迈克尔加成是在5至9范围内的pH下进行的。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中该迈克尔加成是在5.5至8.6范围内的pH下进行的。

12. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法, 其中该迈克尔加成是在4℃至37℃范围内的温度下进行的。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中该迈克尔加成是在8℃至37℃范围内的温度下进行的。

14. 根据权利要求12所述的方法, 其中该迈克尔加成是在8℃至30℃范围内的温度下进行的。

15. 根据权利要求12所述的方法, 其中该迈克尔加成是在8℃至25℃范围内的温度下进

行的。

16. 根据权利要求12所述的方法,其中该迈克尔加成是在21℃至31℃范围内的温度下进行的。

17. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中该迈克尔加成反应是在选自下组的缓冲液中进行:磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))和MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)。

18. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中该水解步骤是在7至12范围内的pH下进行的。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中该水解步骤是在7.4至9范围内的pH下进行的。

20. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中该水解步骤是在选自下组的缓冲液中进行:磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MES(2-(N-吗啉代)乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))和MOPS(3-(N-吗啉代)丙磺酸)。

21. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中该水解步骤是在4℃至37℃范围内的温度下进行的。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中该水解步骤是在8℃至37℃范围内的温度下进行的。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中该水解步骤是在8℃至30℃范围内的温度下进行的。

24. 根据权利要求21所述的方法,其中该水解步骤是在8℃至25℃范围内的温度下进行的。

25. 根据权利要求21所述的方法,其中该水解步骤是在21℃至31℃范围内的温度下进行的。

轭合多肽的方法

[0001] 本披露涉及将一种多肽诸如蛋白在不损坏该多肽的条件下轭合至一种有效负载以提供稳定的分子的方法。本披露还涉及通过所述方法制备的或可获得的分子以及包括该分子的组合物。本披露进一步涉及从该方法制备或获得的分子在疗法例如免疫疗法和/或癌症疗法中的用途。

[0002] 背景

[0003] 轲合技术在药物制剂的背景下是非常重要的,例如许多市售的药物/生物制剂与聚乙二醇(PEG)分子轭合。PEG具有若干功能之一,在于PEG被认为降低一些分子的免疫原性和/或增加分子的半衰期。市售疗法的实例包括:培奈萨肽(peginesatide)、培罗替酶(pegloticase)、赛舍珠单抗(certolizumab pegol)(Cimzia)、甲氧基聚乙二醇-β依泊汀(Mircera)、哌加他尼(pegaptanib)(Macugen)、培非司亭(Neulasta)、培维索孟(Somavert)、聚乙二醇干扰素α-2a(派罗欣)、多柔比星HC1脂质体(Doxil/Caelyx)、聚乙二醇干扰素α-2b(佩乐能)、培门冬酶(Oncaspar)和牛培加酶(Adagen)。

[0004] 抗体药物轭合物(ADC)也是重要的治疗分子类别。它们是高度有效的并且类似于“导弹(guided missile)”,因为抗体组分与有效负载(例如细胞毒素)轭合,其通过抗体组分被导向预期的靶标。ADC的实例包括布伦土昔单抗威多廷(brentuximab vedotin)和曲妥珠单抗埃姆坦西尼(emtansine)。在轭合化学中形成的接头在ADC中是至关重要的。

[0005] 许多轭合技术使用在轭合分子中给出琥珀酰亚胺组分的1,4迈克尔加成反应中的马来酰亚胺元素。然而,如WO 2013/173337中所讨论的,该反应是可逆的,并且显现作为动态平衡存在。也就是说,纯化不能解决提供单一纯实体的问题。

[0006] 有一些出版物表明这在血浆中发生,并且部分轭合分子可以被血清白蛋白替代(阿利(Alley)等人,生物轭合化学(Bioconjugate Chem.)2008,19,759-765)。这是一个问题,特别是在ADC的背景下。

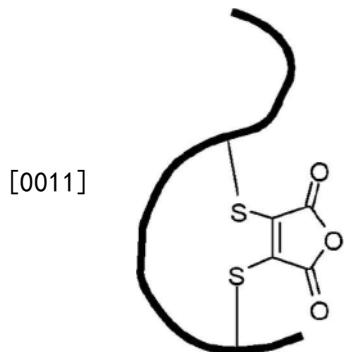
[0007] 一个答案是水解所得琥珀酰亚胺。然而,这需要相对苛刻的条件,例如在pH 9.2和45°C下50mM硼酸盐缓冲液持续约12小时。这可能导致抗体聚集/降解以及还有有效负载或弹头的降解。

[0008] 在WO 2013/173337(西雅图基因公司(Seattle Genetics Inc))中披露了该问题的解决方案,其采用在马来酰亚胺环的氮的β位具有胺取代基的马来酰亚胺衍生物。所得琥珀酰亚胺可在较温和的条件下水解。然而,在巯基轭合步骤之前,显现存在显著的马来酰亚胺水解。此外,轭合步骤在约8的碱性pH下进行。后一种条件可以促进蛋白质性材料如抗体和抗体片段的聚集,从而在轭合步骤中导致这种宝贵材料的损失。此外,有效负载与抗体的比率通常必须增加以确保所有抗体轭合。

[0009] 胺催化的解轭合机制在Md罗肖恩阿拉姆(Rowshon Alam)等人(生物轭合化学(Bioconjugate Chem.)2011,22,1673-1681)的论文中讨论,其显示西雅图遗传学策略不是普遍适用的(参见其中的方案2)。

[0010] 在WO 2013/121175中提供了一种替代解决方案,其披露了在所谓的SN2反应中使用马来酰亚胺的溴衍生物。然而,在低pH条件下,反应性物质即马来酸酐被重整,参见例如

第54页：



[0012] “然后通过超滤……将pH改变为pH 4.5。将抗体轭合物在37℃下进行孵育，并且在2、6、24、48和72小时后通过LCMS分析等分试样。多柔比星在接头去组装和曲妥珠单抗-Fab-马来酸酐形成时释放。(The pH was then changed by ultrafiltration……to pH 4.5. The antibody conjugate was incubated at 37°C and aliquots were analysed after 2, 6, 24, 48 and 72 hours by LCMS. Doxorubicin was released upon linker disassembly and Trastuzumab-Fab-maleic anhydride formed.)”

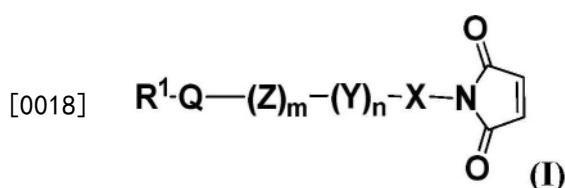
[0013] 诸位发明人认为,这种轭合物的不稳定性,即形成马来酸环的能力是一个缺点,因为在体内有许多低pH环境,并且这限制了WO 2013/1211175分子的功用,因为有效负载可以断开连接。

[0014] 本披露提供了采用温和条件的方法,其在制备后提供稳定的分子且因此适于体内给予且特别适合用于治疗。

〔0015〕 本披露的概述

〔0016〕 因此提供了用于制备结合到有效负载的多肽的方法，包括以下步骤：

〔0017〕 a) 用以下项进行迈克尔加成反应:具有化学式 (I) 的分子中的马来酰亚胺实体:



[0019] 以及包括至少一个巯基基团的多肽分子

[0020] 其中在化学式(I)中：

[0021] n是0或1:

[0022] m是0或1：

[0023] n是0或1：

[0024] a 是0或是1至12例如1至6的范围内的整数,诸如2或3:

〔0025〕 Q是一个键或来自铂合组分的一个残基。

[0026] X是C₀₋₁₈亚烷基C₆₋₃₆芳基(-CR²=CH-)_p、C₀₋₁₈亚烷基C₆₋₃₆芳基-CH₂-CR²=CH-、C₀₋₁₈亚烷基C₅₋₃₆元杂芳基(-CR=CH-)_p、C₀₋₁₈亚烷基C₅₋₃₆元杂芳基-CH₂CR²=CH-、C₀₋₁₈亚烷基-CR²=CH-、C₀₋₁₈亚烷基-C≡C-，

[0027] 其中该芳基或杂芳基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-COOR^3$ 、 $-COR^3$ 、 $-CN$ 、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-PO_4$ 、 $-$

$(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_q\text{-OR}^3$;

[0028] Y是氧;

[0029] Z是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₃₀亚烷基链,其中一个或多个碳(例如1、2、3、4、5、6、7或8个)任选独立地被-O-、N替代,并且该链任选地具有一个或多个(例如1、2、3或4个)氧代取代基;

[0030] R¹是H、固体表面或有效负载分子;

[0031] R²是取代基,例如选自H、卤素、羟基、-C₁₋₆烷基、-C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄、C₆₋₁₀芳基C₀₋₆亚烷基-、₆₋₁₀元杂芳基C₀₋₆亚烷基-;

[0032] R³是H或C₁₋₆烷基;

[0033] R⁴是H或C₁₋₆烷基;

[0034] R⁵是H或C₁₋₆烷基;以及

[0035] 其药学上可接受的盐,

[0036] b) 其中R¹是有效负载分子或固体表面,该方法包括水解通过具有化学式(I)的化合物和该多肽的反应形成的所得琥珀酰亚胺实体的另外的步骤,或者

[0037] c) 其中R¹是H,该方法包括与有效负载或固体表面进行轭合,随后水解通过具有化学式(I)的化合物与该多肽分子的反应形成的琥珀酰亚胺实体的另外的步骤。

[0038] 有利地,本披露的轭合物可以在酸性pH如约pH 5下制备,并且琥珀酰亚胺水解可以在温和条件下进行。在某些实施例中,这些轭合物中的琥珀酰亚胺可以在温和条件下快速水解。此外,一旦制备,本披露的分子在使用中是稳定的,例如在血清中是稳定的。

[0039] 不希望受理论束缚,假定了不饱和系统如芳基、苯基、乙烯基、炔基或其组合的共振能力是重要的,因为它们促进温和的水解。图1中的示意图显示了与琥珀酰亚胺环中的氮附接的不饱和系统如何通过水促进环中的任一羰基上的亲核攻击。

[0040] 在一个实施例中,该芳基具有1、2、3或4个氟取代基。

[0041] 本文的披露内容还延伸至由所述方法获得或可获得的化合物/产物,例如轭合后获得的产物或琥珀酰亚胺水解后获得的产物。

[0042] 在一个方面,提供了本文披露的例如与多肽和/或有效负载轭合的具有化学式(I)、(II)、(IIa)、(IIaa)、(IIaa')、(IIaaa)、(IIb)、(IIbb)、(IIbb')、(IIIbbb)、(IIc)、(IIcc)、(IId)、(IIdd)、(IIddd)、(III)、(IIIa)、(IIIaa)、(IIIaa')、(IIIaaa)、(IIIb)、(IIIbb)、(IIIc)、(IIIcc)以及(IIIcc')的化合物,或其衍生物。

[0043] 在一个实施例中,提供了本文示例的分子/化合物。

[0044] 在一个方面,还提供了本文披露的化合物在轭合化学中的用途。

[0045] 附图简述

[0046] 图1本披露的化合物的水解的示意图

[0047] 图1A未反应的mAb的光谱

[0048] 图1B烷基马来酰亚胺-PEG-生物素轭合物的光谱

[0049] 图2A烷基马来酰亚胺-PEG-生物素的光谱(比较器)

[0050] 图2B苯基马来酰亚胺-PEG-生物素的光谱

[0051] 图2C氟苯基马来酰亚胺-PEG-生物素的光谱

- [0052] 图3 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在22℃的结合效率
- [0053] 图4 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在22℃的结合效率
- [0054] 图5 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 5.5、22℃的结合动力学
- [0055] 图6x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 7.4、22℃的结合动力学
- [0056] 图7x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 8.6、22℃的结合动力学
- [0057] 图8预孵育后x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb的反应动力学:马来酰亚胺水解的间接测量
- [0058] 图9在pH 5.5、22℃下马来酰亚胺水解动力学
- [0059] 图10在pH 7.4、22℃下马来酰亚胺水解动力学
- [0060] 图11在pH 8.6、22℃下马来酰亚胺水解动力学
- [0061] 图12在pH 7.4、22℃下PEG-生物素T289C mAb结合物的硫代琥珀酰亚胺水解
- [0062] 图13在pH 7.4、37℃下PEG-生物素T289C mAb的硫代琥珀酰亚胺水解
- [0063] 图14在pH 8.6、22℃下PEG-生物素T289C mAb的硫代琥珀酰亚胺水解
- [0064] 图15孵育1小时之后,PEG-生物素T289C-mAb结合物的x-硫代琥珀酰亚胺水解,n=3
- [0065] 图16在存在钼酸钠的情况下,PEG-生物素T289C mAb结合物的x-硫代琥珀酰亚胺-PEG-生物素水解
- [0066] 图17在包含巯基的缓冲液中T289C mAb结合物对巯基交换的敏感度
- [0067] 图18在包含BME的缓冲液中PEG-生物素T289C mAb结合物的稳定性图19在BME激发测定中观察到的PEG-生物素T289C mAb结合物在pH7.2、37℃下的硫代琥珀酰亚胺水解
- [0068] 图20在BME激发测定中观察到的硫代琥珀酰亚胺解结合和水解之间的关系
- [0069] 图21温和水解之后在缓冲液中T289C mAb结合物对巯基交换的敏感度图22 mc-PAB-MMAE T289C mAb ADC的分析
- [0070] 图23在包含巯基(BME)的缓冲液中MMAE T289C mAb结合物的稳定性
- [0071] 图24在T289C mAb结合物中MMAE-硫代琥珀酰亚胺的水解
- [0072] 图25在包含巯基(BME)的缓冲液中MMAE T289C mAb结合物的稳定性
- [0073] 图26在BME激发中观察到的PEG-生物素和MMAE硫代琥珀酰亚胺水解的比较
- [0074] 图27在存在β-巯基乙醇的情况下解结合的比较:PEG-生物素对比MMAE有效负载
- [0075] 图28小鼠血清中MMAE-T289C ADC的稳定性
- [0076] 图29小鼠血清中MMAE-T289C ADC的稳定性
- [0077] 图30在小鼠血清中孵育之后ADC对MDA-MB-361癌细胞的活性
- [0078] 图31巯基连接的ADC的稳定化的替代形式
- [0079] 图32 N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb结合物的质谱分析
- [0080] 图33 N-氟苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb结合物的质谱分析
- [0081] 图34 N-烷基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb结合物的质谱分析
- [0082] 图35 x-马来酰亚胺-PEG-BCN与T289C mAb的结合效率
- [0083] 图36 x-马来酰亚胺-PEG-BCN结合物的硫代琥珀酰亚胺水解动力学
- [0084] 图37 mAb-BCN-Ac4G1cNAz结合物的分析
- [0085] 图38在储存后mAb-BCN结合物的反应性

- [0086] 图39 mAb-PBD轭合物的分析
- [0087] 图40 mAb-BCN-PBD ADC对MDA-MB-361乳腺癌细胞的体外活性
- [0088] 本披露的详细说明
- [0089] 在一个实施例中, n是0。在一个实施例中, n是1。在一个实施例中, m是0。在一个实施例中, m是1。在一个实施例中, p是0。在一个实施例中, p是1。
- [0090] 在一个实施例中, X是C₀₋₁₈亚烷基C₆₋₁₀芳基(-CR²=CH-)_p、C₀₋₁₈亚烷基C₆₋₁₀芳基-CH₂-CR²=CH-、C₀₋₁₈亚烷基₅₋₁₀元杂芳基(-CR=CH-)_p、C₀₋₁₈亚烷基₅₋₁₀元杂芳基-CH₂CR²=CH-、C₀₋₁₈亚烷基-CR²=CH-、C₀₋₁₈亚烷基-C≡C-，
- [0091] 其中该芳基或杂芳基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄、以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。
- [0092] 在一个实施例中, X是C₀₋₁₅亚烷基C₆₋₁₀芳基(-CR²=CH-)_p、C₀₋₁₅亚烷基C₆₋₁₀芳基-CH₂-CR²=CH-、C₀₋₁₈亚烷基₅₋₁₀元杂芳基(-CR=CH-)_p、C₀₋₁₅亚烷基₅₋₁₀元杂芳基-CH₂CR²=CH-、C₀₋₁₅亚烷基-CR²=CH-、C₀₋₁₅亚烷基-C≡C-，
- [0093] 其中该芳基或杂芳基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄、-(CH₂-O-CH₂)_q-O-R³。
- [0094] 在一个实施例中, X是C₀₋₁₅亚烷基C₆₋₁₀芳基(-CR²=CH-)_p,其中该芳基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄、以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。
- [0095] 在一个实施例中, X是C₀₋₁₅亚烷基C₆₋₁₀芳基(-CH₂CR²CH₂-)_p,例如C₀₋₆亚烷基C₆₋₁₀芳基如C₆₋₁₀芳基,特别是苯基。
- [0096] Z是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₂₅亚烷基链,其中一个或多个碳(例如1、2、3、4、5、6、7或8个)任选独立地被-O-、N替代,并且该链任选地具有一个或多个(例如1、2、3或4个)氧代取代基。
- [0097] 通常芳基如苯基将通过共价键直接连接到马来酰亚胺环的氮上,除了p是1的情况。
- [0098] 在一个实施例中,芳基如苯基在邻位、间位或对位(例如间位或对位,如对位)具有包含“R¹-Q-(Z)_m”的取代基。
- [0099] 在一个实施例中,芳基如苯基可以被一个、两个、三个或四个独立地选自给电子、吸电子和中性取代基的取代基取代。在一个实施例中,芳基如苯基被一个、两个、三个或四个吸电子基团取代。在一个实施例中,芳基如苯基被一个、两个、三个或四个给电子基团取代。在一个实施例中,芳基如苯基被一个、两个、三个或四个具有中性电子性质的基团取代。适合时,类似的取代模式也可适用于杂芳基。
- [0100] 在一个实施例中,芳基如苯基被一个、两个、三个或四个取代基取代,这些取代基例如独立地选自卤素、C₁₋₃烷基、三氟甲基,例如氯或氟,特别是一个、两个、三个或四个氟原子。含有一个或多个氟原子的分子可用于成像技术,例如正电子发射断层摄影术。
- [0101] 在一个实施例中,芳基如苯基在邻位、间位或对位具有一个取代基,例如在连接到马来酰亚胺的环的间位或对位。

[0102] 在一个实施例中,芳基如苯基在例如连接到马来酰亚胺的环的间位、对位;间位、邻位;间对位;间位、间位;或对位、对位具有两个取代基。

[0103] 在一个实施例中,芳基如苯基在例如连接到马来酰亚胺的环的邻位、间位和对位;邻位、间位、间位;邻位、邻位、对位;或间位、间位、对位具有三个取代基。

[0104] 在一个实施例中,芳基如苯基没有取代基。

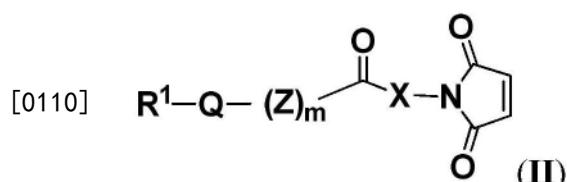
[0105] 本披露还延伸至适用于杂芳基时上述关于芳基和苯基的取代基模式。

[0106] 在一个实施例中,该杂芳基不是吡啶。

[0107] 与固体表面的结合是本披露的重要方面,因为其允许多肽附接到珠子或板上,例如合成材料如塑料或树脂,以便于纯化或筛选,例如高通量筛选。

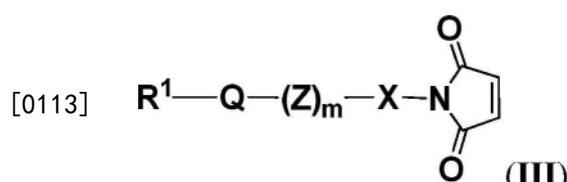
[0108] 在一个实施例中, R^1 是有效负载分子,其实例在下文定义部分中给出。在一个实施例中, R^1 是 H。在一个实施例中, R^1 是固体表面。

[0109] 在一个实施例中,根据本披露的方法(其中 n 是 1)采用了具有化学式 (II) 的化合物:



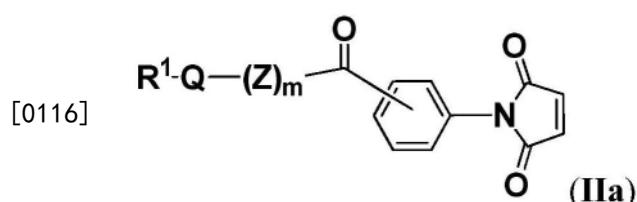
[0111] 及其药学上可接受的盐,其中 R^1 、Q、Z、X 和 m 是如上文对具有化学式 (I) 的化合物所定义的。

[0112] 在一个实施例中,根据本披露的方法(其中 n 是 0)采用了具有化学式 (III) 的化合物:



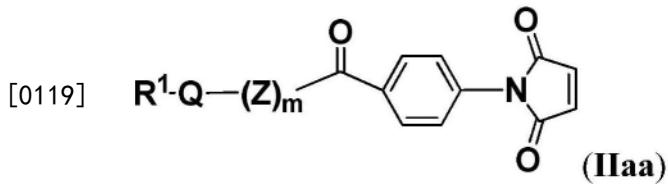
[0114] 及其药学上可接受的盐,其中 R^1 、Q、Z、X 和 m 是如上文对具有化学式 (I) 的化合物所定义的。

[0115] 在一个实施例中,马来酰亚胺分子处于具有化学式 (IIa) 的化合物:



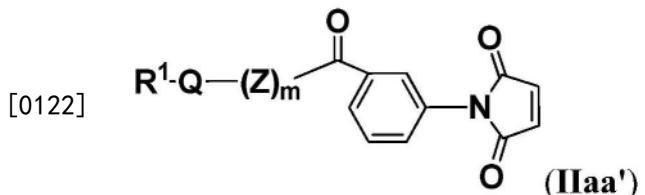
[0117] 及其药学上可接受的盐中,其中 R^1 、Q、Z 和 m 如上文对具有化学式 (I) 的化合物所定义,并且该苯基具有 0、1、2、3 或 4 个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 $-COOR^3$ 、 $-COR^3$ 、 $-CN$ 、 $-CF_3$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_2$ 、 $-SO_3$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-PO_4$ 以及 $-(OCH_2CH_2)_q-OR^3$ 。

[0118] 在一个实施例中,基团 $R^1Q(Z)_mC(O)-$ 处于对位,如示于具有化学式 (IIaa) 的化合物:



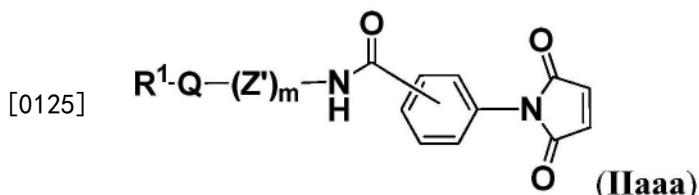
[0120] 及其药学上可接受的盐,其中R¹、Q、Z和m是如上文对具有化学式(I)的化合物所定义的,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基:卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。

[0121] 在一个实施例中,基团R¹Q(Z)_mC(O)-处于间位,如示于具有化学式(IIaa')的化合物:



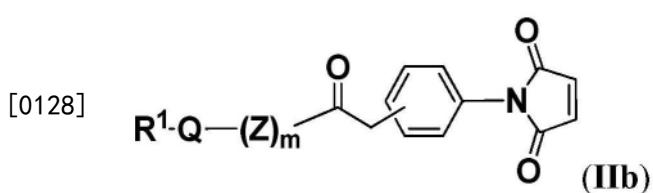
[0123] 及其药学上可接受的盐,其中R¹、Q、Z和m是如上文对具有化学式(I)的化合物所定义的,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基:卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。

[0124] 在一个实施例中,马来酰亚胺分子处于具有化学式(IIaaa)的化合物:



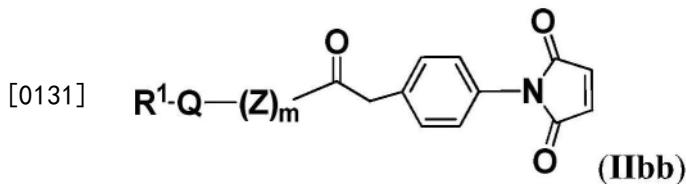
[0126] 及其药学上可接受的盐中,其中R¹、Q、和m是如上文对具有化学式(I)的化合物所定义的,该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括:卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄-(OCH₂CH₂)_q-OR³,并且Z'是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₂₄亚烷基链,其中一个或多个碳任选独立地被-O-、N替代,并且该链任选地具有一个或多个氧代取代基。在一个实施例中,基团R¹Q(Z')_mNC(O)-处于对位。在一个实施例中,基团R¹Q(Z')_mNC(O)-处于间位。

[0127] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIb)的分子:



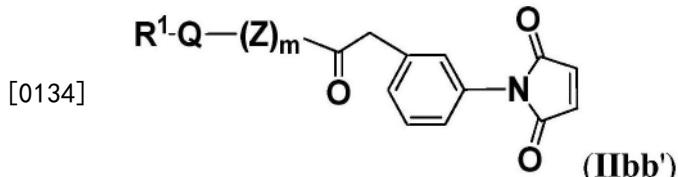
[0129] 及其药学上可接受的盐中,其中R¹、Q、Z和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。

[0130] 在一个实施例中,基团R¹Q(Z)_mC(O)-处于对位,如示于具有化学式(IIbb)的化合物:



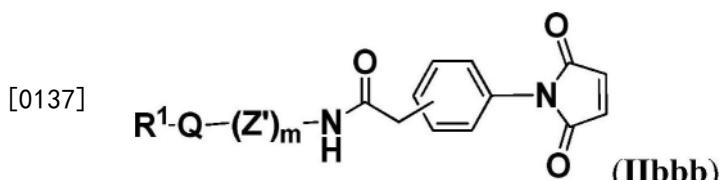
[0132] 及其药学上可接受的盐中,其中Q、Z、X、R¹和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义。

[0133] 在一个实施例中,基团R¹Q(Z)_mC(0)-处于间位,如示于具有化学式(IIbb')的化合物:



[0135] 及其药学上可接受的盐,其中Q、Z、X、R¹和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义。

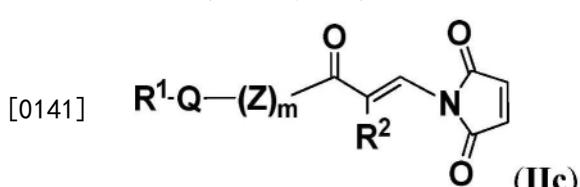
[0136] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIbbb)的分子:



[0138] 及其药学上可接受的盐中,其中R¹、Q、和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³,

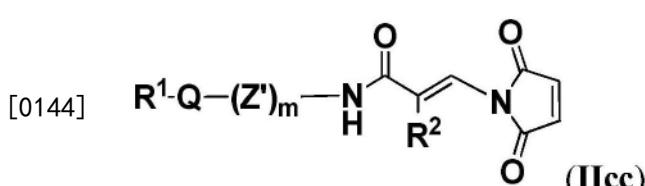
[0139] Z'是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₂₄亚烷基链,其中一个或多个碳任选独立地被-O-、N替代,并且该链任选地具有一个或多个氧代取代基。在一个实施例中,基团R¹Q(Z')_mNC(0)-处于苯环的对位。在一个实施例中,基团R¹Q(Z')_mNC(0)-处于苯环的间位。

[0140] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIc)的分子:



[0142] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(0)-被换位的异构体中,其中Q、Z、R¹、R²和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义,及其药学上可接受的盐。

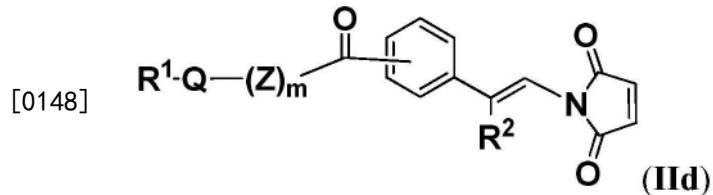
[0143] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIcc)的分子:



[0145] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(0)-被换位的异构体中,

[0146] 其中Q、Z、R¹、R²和m是上文权利要求1中所定义的,并且Z'是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₂₄亚烷基链,其中一个或多个碳任选独立地被-O-、N替代,并且该链任选地具有一个或多个氧化取代基,及其药学上可接受的盐。

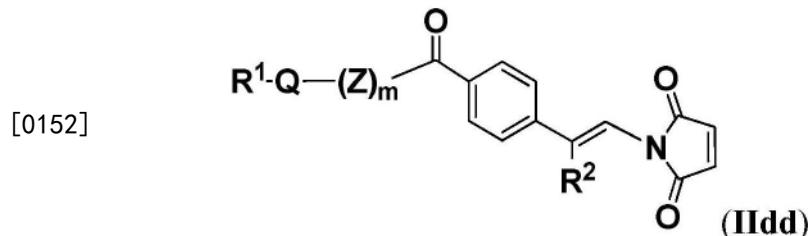
[0147] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIId)的分子:



[0149] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)Ph-被换位的异构体中,

[0150] 或其中Q、Z、R¹、R²和m是上文权利要求1中所定义的,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³,及其药学上可接受的盐。

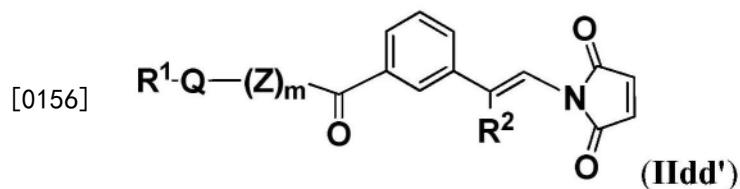
[0151] 在一个实施例中,基团R¹Q(Z)_mC(O)-处于对位,如示于具有化学式(IIdd)的化合物:



[0153] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)-被换位的异构体,

[0154] 其中Q、Z、R¹、R²和m是上文权利要求1中所定义的,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³,及其药学上可接受的盐。

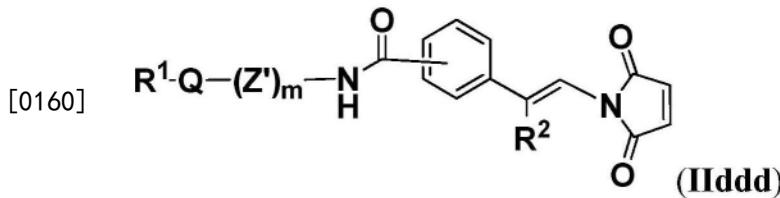
[0155] 在一个实施例中,基团R¹Q(Z)_mC(O)-处于对位,如示于具有化学式(IIdd')的化合物:



[0157] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)-被换位的异构体,

[0158] 其中Q、Z、R¹、R²和m是上文权利要求1中所定义的,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³,及其药学上可接受的盐。

[0159] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIddd)的分子:



[0161] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)-被换位的异构体中，

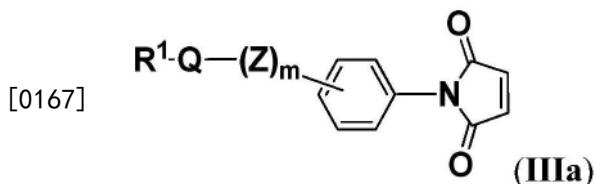
[0162] 该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基，该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³，

[0163] Z'是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₂₄亚烷基链，其中一个或多个碳任选独立地被-O-、N替代，并且该链任选地具有一个或多个氧代取代基，及其药学上可接受的盐。在一个实施例中，基团R¹Q(Z')_mNC(O)-处于苯环的对位。在一个实施例中，基团R¹Q(Z')_mNC(O)-处于苯环的间位。

[0164] 在一个实施例中，具有化学式IIc、IIcc、IIId、IIdd的化合物或其衍生物作为E异构体提供。

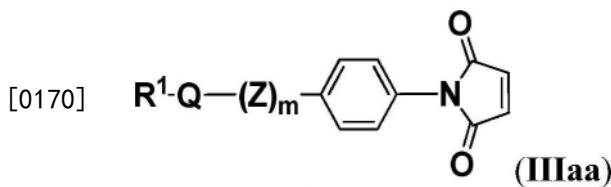
[0165] 在一个实施例中，具有化学式IIc、IIcc、IIId、IIdd的化合物或其衍生物作为Z异构体提供。

[0166] 在一个实施例中，马来酰亚胺分子处于具有化学式(IIIa)的化合物：



[0168] 及其药学上可接受的盐中，其中R¹、Q、Z和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义，并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基，该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。

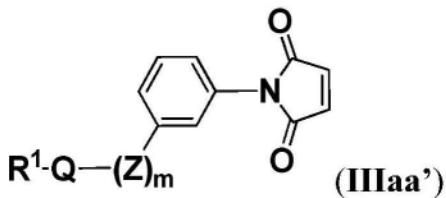
[0169] 在一个实施例中，基团R¹Q(Z)_m-处于对位，如示于具有化学式(IIIaa)的化合物：



[0171] 或其药学上可接受的盐中，其中R¹、Q、Z和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义，并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基，该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。

[0172] 在一个实施例中，基团R¹Q(Z)_m-处于间位，如示于具有化学式(IIIaa')的化合物：

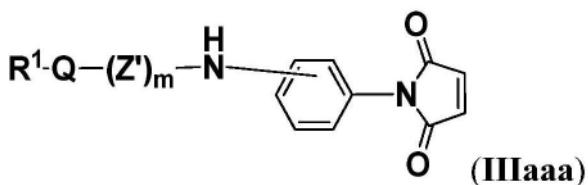
[0173]



[0174] 及其药学上可接受的盐中,其中R¹、Q、Z和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义,并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄、以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³。

[0175] 在一个实施例中,马来酰亚胺分子处于具有化学式(IIIaaa)的化合物:

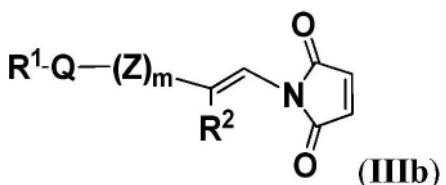
[0176]



[0177] 及其药学上可接受的盐中,其中R¹、Q、和m如上文对具有化学式(I)的化合物所定义,该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基,该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄、以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³,并且Z'是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₂₄亚烷基链,其中一个或多个碳任选独立地被-O-、N替代,并且该链任选地具有一个或多个氧代取代基。在一个实施例中,R¹Q(Z')_mNH-处于苯环的对位。在一个实施例中,R¹Q(Z')_mNH-处于苯环的间位。

[0178] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIIb)的分子:

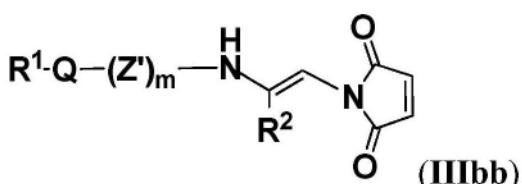
[0179]



[0180] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)-被换位的异构体,其中Q、Z、R¹、R²和m是对具有化学式(I)的化合物所定义的,及其药学上可接受的盐。

[0181] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIIbb)的分子:

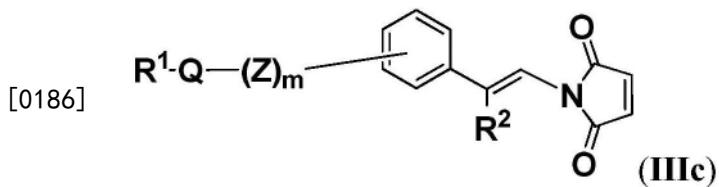
[0182]



[0183] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)-被换位的异构体中,

[0184] 其中Q、Z、R¹、R²和m是对于具有化学式(I)所定义的,并且Z'是饱和或不饱和支链或非支链C₁₋₂₄亚烷基链,其中一个或多个碳任选独立地被-O-、N替代,并且该链任选地具有一个或多个氧代取代基,及其药学上可接受的盐。

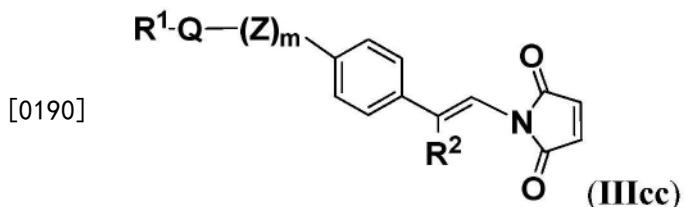
[0185] 在一个实施例中,马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIIc)的分子:



[0187] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)Ph-被换位的异构体中，

[0188] 或其中Q、Z、R¹、R²和m是对于具有化学式(I)的化合物所定义的，并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基，该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³，及其药学上可接受的盐。

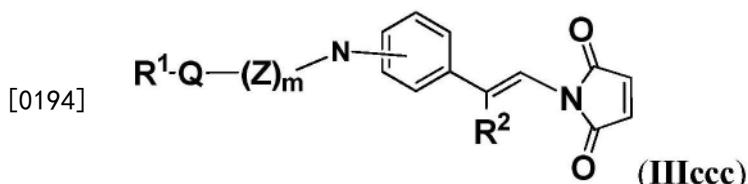
[0189] 在一个实施例中，马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIIcc)的分子：



[0191] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)Ph-被换位的异构体中，

[0192] 或其中Q、Z、R¹、R²和m是对于具有化学式(I)的化合物所定义的，并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基，该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄及其药学上可接受的盐。

[0193] 在一个实施例中，马来酰亚胺实体处于具有化学式(IIIcc')的分子：



[0195] 或它的其中R²和R¹Q(Z')_mNHC(O)Ph-被换位的异构体中，

[0196] 或其中n、Q、Z、R¹、R²和m是对于具有化学式(I)的化合物所定义的，并且该苯基具有0、1、2、3或4个独立地选自下组的取代基，该组包括卤素、羟基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、-COOR³、-COR³、-CN、-CF₃、-NO₂、-SO₂、-SO₃、-NR⁴R⁵、-PO₄以及-(OCH₂CH₂)_q-OR³，及其药学上可接受的盐。

[0197] 在一个实施例中，具有化学式IIc、IIcc、IId、IIdd、IIdd'、IIddd、IIIb、IIIbb、IIIc、IIIcc、IIIccc、IIId的化合物或其衍生物作为E异构体提供。

[0198] 在一个实施例中，具有化学式IIc、IIcc、IId、IIdd、IIdd'、IIddd、IIIb、IIIbb、IIIc、IIIcc、IIIccc、IIId的化合物或其衍生物作为Z异构体提供。

[0199] 在一个实施例中，R²是氟。

[0200] 在一个实施例中，适合时，给定结构中的片段-QZ(即m是1时)或-QZ'NH(m是1时)代表：

[0201] -QOC(O)(CH₂CH₂O)₁₋₈(CH₂)₀₋₁NH，例如-QOC(O)(CH₂CH₂O)₁₋₆(CH₂)₀₋₁NH如-QOC(O)(CH₂CH₂O)_{2,3,4,5}(CH₂)₀₋₁NH，更确切地-QOC(O)(CH₂CH₂O)₄NH。

[0202] 在一个实施例中，Q是一个键。在一个实施例中，Q是一种轭合组分。轭合组分是可被用以将一个分子或片段轭合到另一个分子或片段上的实体。

[0203] 在一个实施例中, Q包括或是例如选自下组的官能团, 该组包括四嗪、官能化四嗪、NHS酯(N-羟基琥珀酰亚胺酯)、四氟苯基酯、及其组合。

[0204] 在一个实施例中, Q是例如选自下组的可聚合官能团, 该组包括炔、四嗪、衍生化四嗪、脂质、纳米粒子、树状聚合物、金属螯合剂及其组合。

[0205] 在一个实施例中, 鞩合组分Q是点击化学组分。点击化学组分的实例包括残基Click-matesTM集合体如:

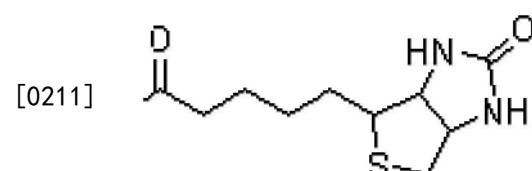
[0206] • Click-matesTM炔其包括5-炔丙基氨基-dU CEP、5-辛二炔基-du CEP、炔基-修饰剂-C6-dT CEP、5-(炔丙基氨基)-2'-脱氧尿苷、5-(1,7-辛二炔-1-基)-2'-脱氧尿苷、5-辛二炔基-TMS-dU CEP、5-辛二炔基-TMS-dC CEP、5-辛二炔基-dC CEP、5-辛二炔基-TIPS-dU CEP; 以及

[0207] • Click-easy[®]炔(针对无铜点击修饰)其包括BCN CEP I、BCN CEP II、BCN-N-羟基琥珀酰亚胺酯I、BCN-N-羟基琥珀酰亚胺酯II、MFCO-N-羟基琥珀酰亚胺酯和MFCO CEP;

[0208] 本文使用的残基是指将该分子结合到一个或多个其他分子片段(组分)的相关反应发生之后余下的结构。

[0209] 在一个实施例中, 该鞠合组分是BCN。

[0210] 在一个实施例中, 该鞠合组分Q是生物素。在一个实施例中, Q是以下片段:



[0212] 在一个实施例中, Z独立地选自-C₁₋₁₂亚烷基、-OC(0)(CH₂CH₂O)₁₋₈(CH₂)₀₋₁NH, 例如-OC(0)(CH₂CH₂O)₁₋₆(CH₂)₀₋₁NH如-OC(0)(CH₂CH₂O)_{2,3,4,5}(CH₂)₀₋₁NH, 更确切地-OC(0)(CH₂CH₂O)₄NH。

[0213] 在一个实施例中, Z'独立地选自-C₁₋₁₂亚烷基、-OC(0)(CH₂CH₂O)₁₋₈(CH₂)₀₋₁, 例如-OC(0)(CH₂CH₂O)₁₋₆(CH₂)₀₋₁如-OC(0)(CH₂CH₂O)_{2,3,4,5}(CH₂)₀₋₁, 更确切地-OC(0)(CH₂CH₂O)₄。

[0214] 在一个实施例中, 具有化学式(I)的分子中的Y-X是C(0)CH₂苯基(马来酰亚胺或琥珀酰亚胺), 并且m是0且Q是一个键, 并且有效负载通过酰胺键与片段Y-X中的氧代基团连接。

[0215] 在一个实施例中, 有效负载是通过不稳定键例如腙(低pH释放)、二硫化物、亚胺或类似物连接的。

[0216] 适合时, 对具有化学式(I)的化合物来说本文给出的优选同样适用于本文描述的具有其他化学式的化合物。

[0217] 可以使用药学上可接受的盐, 例如无机酸盐, 如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐以及硫酸盐; 或者有机酸盐, 如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐以及苯甲酸盐。

[0218] 在一个实施例中, 马来酰亚胺实体通过多肽中的天然半胱氨酸鞠合。在一个实施例中, 马来酰亚胺通过工程化到多肽中的半胱氨酸(在本文也称为工程化半胱氨酸)鞠合。在一个实施例中, 该半胱氨酸是溶剂暴露半胱氨酸。

[0219] 在一个实施例中, 一个或多个鞠合步骤(例如将马来酰亚胺鞠合到多肽)是在如下范围内的pH进行: 5至9, 例如pH 5.5至8.6, 诸如5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、

6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5或8.6或者一个或多个所述pH值的组合。

[0220] 在一个实施例中,一个或多个轭合步骤(例如将马来酰亚胺轭合到多肽)是在如下范围内的温度进行:约4°C至约37°C,例如8°C至37°C、8°C至30°C、8°C至25°C或21°C至31°C,诸如5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、11°C、12°C、13°C、14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C或37°C或者一个或多个所述温度的组合。

[0221] 在一个实施例中,一个或多个轭合步骤是在适合的缓冲液中进行,例如选自下组的缓冲液,该组包括:磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MES (2-(N-吗啉代)乙磺酸)、PIPES (哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、MOPS (3-(N-吗啉代)丙磺酸),例如磷酸盐。

[0222] 在一个实施例中,该缓冲液不包括伯胺,例如TRIS等。

[0223] 在一个实施例中,一个或多个轭合反应(例如马来酰亚胺轭合到多肽)的效率是50%或更大,例如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0224] 因此在一个实施例中,反应之后存在低百分比的未轭合多肽(例如抗体),例如5%或更少,诸如4%、3%、2%、1%或更少。

[0225] 在一个实施例中,在轭合步骤中具有化学式(I)和本文描述的其他化学式的化合物与多肽的比率分别是1比1到5比1,诸如2比1、3比1或4比1。

[0226] 在一个实施例中,巯基-轭合物进一步与有效负载、纳米颗粒或固体表面反应,其通过Cu(I)催化的叠氮化物-炔烃环加成(CuAAC),使用铜盐,还原剂如抗坏血酸钠和/或Cu(I)稳定配体如2-[4-{(双[(1-叔丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]氨基)-甲基}-1H-1,2,3-三唑-1-基]乙基硫酸氢盐(BTGES);

[0227] 三[(1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺(TBTA);

[0228] 三[(1-羟基丙基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺(THTPA)等,以形成三唑键。

[0229] 在一个实施例中,巯基-轭合物与有效负载、纳米粒子或固体表面进一步反应,其通过应变促进的叠氮化物-炔烃环加成(SPAAC),使用环炔烃如联芳基氮杂环辛酮(BARAC)、二苯甲酰环辛炔(DBCO)、双环[6.1.0]壬炔(BCN)等,以形成三唑键。

[0230] 在一个实施例中,通过四嗪-反式环辛烯反应,巯基-轭合物进一步与有效负载、纳米颗粒或固体表面反应,以形成二氢吡嗪键。

[0231] 在一个实施例中,该方法中采用的水解步骤如所得琥珀酰亚胺的水解是在如下范围内的pH进行:7至12,例如pH 7.4至9,诸如7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9或9.0或一个或多个所述pH的组合。

[0232] 在一个实施例中,水解步骤中采用了缓冲液,例如选自下组的缓冲液,该组包括:磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)、MES (2-(N-吗啉代)乙磺酸)、PIPES (哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、MOPS (3-(N-吗啉代)丙磺酸),例如磷酸盐。

[0233] 在一个实施例中,一个或多个水解步骤(例如马来酰亚胺的水解)是在如下范围内的温度进行:约4°C至约37°C,例如8°C至37°C、8°C至30°C、8°C至25°C或21°C至31°C,诸如5

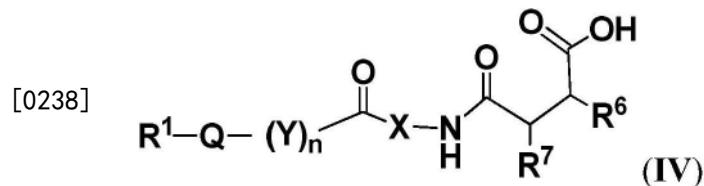
°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、11°C、12°C、13°C、14°C、15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、20°C、21°C、22°C、23°C、24°C、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°C、36°C或37°C或者一个或多个所述温度的组合。

[0234] 在一个实施例中,本方法中的一个或多个反应如轭合反应,是在催化剂的存在下进行。催化剂的实例包括过渡金属催化剂如铜、锡,无机氧化物如钼酸盐。

[0235] 在一个实施例中,本方法中的一个或多个反应如轭合反应不使用催化剂。

[0236] 还应注意,在宽范围的条件下,水解在轭合后高度有效地发生,因此可以容易地选择条件,使得轭合和水解在相同的反应中顺序进行。实际上,这是期望的,因为它使步骤的数量最小化。可以选择备选/附加条件用于下游步骤(例如过滤、储存、缓冲液交换、在柱上纯化),以确保轭合物水解。在一个实施例中,水解未使用低pH以及低温的组合。

[0237] 本披露还延伸至水解分子,例如由该方法制备或可获得的水解分子。在一个实施例中,该分子具有化学式(IV) :

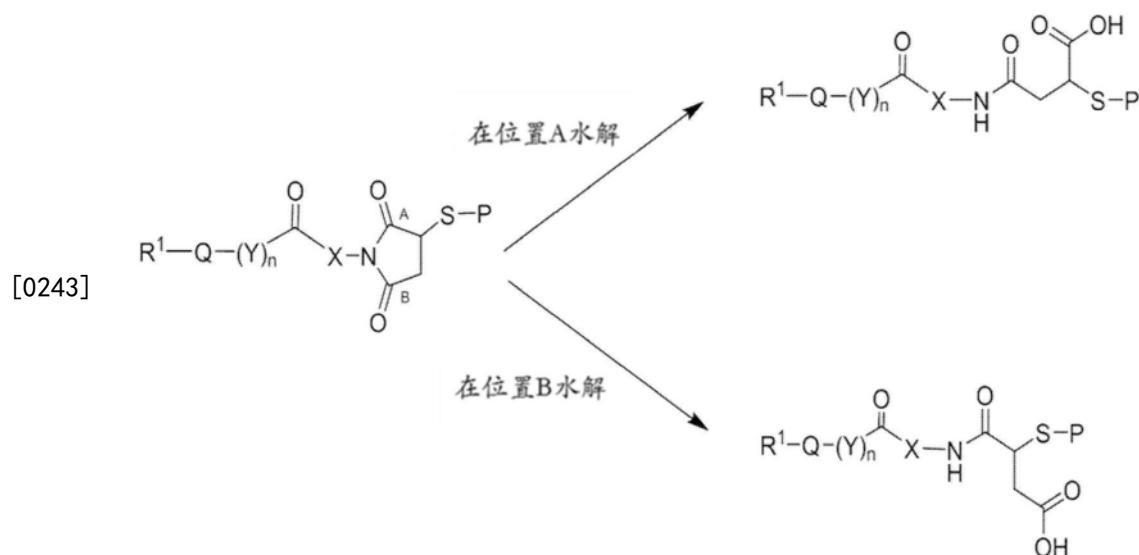


[0239] 及其药学上可接受的盐,其中:

[0240] Q、R¹、Z和m是上文对具有化学式(I)的化合物所定义的,并且

[0241] R⁶是H或多肽残基,R⁷是H或多肽残基,其中R⁶或R⁷中的至少一个是多肽残基,并且另一个是H。

[0242] 水解可以在如方案1所示的两个位置之一处发生:



[0244] 其中P表示多肽。

[0245] 本披露延伸至从本文的方法获得或可获得的化合物/分子。

[0246] 在一个实施例中,制备的分子是稳定的,例如物理稳定的、化学稳定的和热稳定的。物理不稳定性证据是例如聚集,其可以通过常规技术如尺寸排阻色谱法测量。化学不稳定性证据是例如分子的降解或分解,例如有效负载的断开。热不稳定性证据是例如变性。

[0247] 在一个实施例中,在本披露的水解分子中,在用 β -巯基乙醇孵育后,存在有效负载的20%损失或更少,例如10%损失或更少,例如5%损失或更少。在一个实施例中,损失发生的时间段为1至36小时,例如2至24小时。

[0248] 在一个实施例中,在本披露的水解分子中,在用血清(例如鼠血清或牛血清)孵育后,有效负载有20%损失或更少,例如10%损失或更少,例如5%损失或更少。在一个实施例中,损失发生的时间段为1至36小时,例如24小时。

[0249] 在一个实施例中,在血清孵育后,例如通过IC50测量的,效力降低20%或更低,例如10%或更低,例如5%或更低,更确切地4%、3%、2%或1%。

[0250] 定义

[0251] 迈克尔加成(本文也称为1,4-迈克尔加成)是碳负离子或其他阴离子向 α - β 不饱和羰基化合物的亲核加成。

[0252] 本文所用的烷基是指直链或支链烷基,例如但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基和叔丁基。在一个实施例中,烷基是指直链烷基。烷基是端基,也就是说在链的末端。 C_{1-6} 烷基包括 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 以及 C_6 。

[0253] 本文所用的烷氧基是指直链或支链烷氧基,例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基。本文所用的烷氧基还延伸至其中氧原子位于烷基链内的实施例,例如 $-CH_2CH_2OCH_3$ 或 $-CH_2OCH_3$ 。在一个实施例中,烷氧基通过氧连接到分子的其余部分。在一个实施例中,本披露涉及直链烷氧基。

[0254] 本文所用的芳基是指 C_6 至 C_{36} 碳环系统,例如包括至少一个芳环的 C_6 至 C_{10} 碳环系统,例如亚萘基、苯基、茚、茚满、1,2,3,4-四氢萘、薁,例如亚萘基或苯基,例如苯基。

[0255] 杂芳基是包括一个或多个(例如1、2、3或4个)独立地选自O、N和S的杂原子的 $5-36$ 元芳族碳环或双环系统。杂芳基的实例包括:吡咯、噁唑、噻唑、异噻唑、咪唑、吡唑、异噁唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、苯并噻吩、苯并呋喃或1,2,3和1,2,4-三唑。在双环系统中,如果至少一个环含有杂原子并且至少一个环是芳族的,则将满足杂芳基的定义。杂芳基可以通过碳环或包括杂原子的环与分子的其余部分连接。

[0256] 本文所用的氧化是指 $C=O$,并且通常表示为 $C(0)$ 。

[0257] 关于饱和或不饱和的、支链或非支链的 C_{1-25} 亚烷基链,其中至少一个碳(例如1、2或3个碳,合适地1或2个,特别是1个)被选自O、N的杂原子代替,并且所述链任选被一个或多个氧化基团取代,本领域技术人员将清楚,在技术上合适时,杂原子可以代替伯、仲或叔碳,即 CH_3 、 $-CH_2-$ 或 $-CH-$ 或支链碳基团。该定义也适用于在除了1至25个碳之外的长度的链的情况下使用该语言的情况。

[0258] 亚烷基是连接基团,即在每个末端连接到分子的其他部分/组分。 C_{1-25} 亚烷基包括 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 或 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 、 C_{22} 、 C_{23} 、 C_{24} 以及 C_{25} 。

[0259] C_0 是该“特征”不存在的情况。

[0260] 本文所用的卤素(Halo或halogen)指的是碘、溴、氯或氟,例如氟。

[0261] 本文所用的轭合是指通过将两种化合物或分子或片段连接在一起而形成的化合物/分子。

[0262] 本文所用的水解是指通过加入水分子与切割环或分子反应。

[0263] 本文所用的吸电子基团是指从其所附接的实体吸取电子(或吸引电子)的取代基。

[0264] 本文所用的给电子基团是指向其所附接的实体给予“供给”电子的取代基。

[0265] 同样地,在本披露的上下文中,中性基团不涉及电荷本身,而是指给电子或吸电子性质。这些基团对它们所附接的实体的电子性质没有影响。

[0266] 用于在本披露中使用的多肽

[0267] 本文可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指具有任何长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是线性或支化的,它可以包括修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。这些术语还包括已被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,诸如与标记组分轭合。该定义中还包括,例如,含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如,非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。应当理解,由于本披露的多肽是基于抗体的。

[0268] 本文所用的多肽指具有5个或更多个氨基酸的序列,具有或不具有包括至少一个巯基的二级或三级结构。因此,在本披露中,术语“多肽”包括肽、多肽和蛋白质。除非另有说明,这些可互换使用。

[0269] 在一个实施例中,该多肽是一种蛋白质。蛋白质通常包含二级和/或三级结构,并且可以是单体或多聚体形式。

[0270] 在一个实施例中,该蛋白质是作为单链或相关链的抗体或其结合片段。

[0271] 如本文可互换使用的术语“抗体”或“免疫球蛋白”包括完整抗体及其任何抗原结合片段或单链。

[0272] 典型抗体包括由二硫键互连的至少两个重(H)链和两个轻(L)链。每个重链由一个重链可变区(本文缩写成VH、VH区或VH结构域)和一个重链恒定区组成。重链恒定区由三个或四个恒定结构域CH1、CH2、CH3、以及CH4组成。Fc区包括含有抗体除第一恒定区免疫球蛋白结构域之外的恒定区的多肽及其片段。因此,对于IgG,“Fc区”是指CH2和CH3以及任选地这些结构域N末端的柔性铰链区的全部或一部分。术语“Fc区”可以指分离的这个区域,或在抗体、抗体片段、或Fc融合蛋白的背景下的这个区域。

[0273] 每个轻链由轻链可变区(本文缩写为VL、VL区或VL结构域)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。

[0274] VH和VL区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其间插入更保守的称为框架区(FW)的区域。每个VH和VL由三个CDR和四个FW构成,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4。框架区可以根据它们各自的VH和VL区来指定。因此,例如,VH-FW1将指VH的第一框架区。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的不同细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))的结合。

[0275] 术语“抗体”意指通过位于免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点(也称为结合位点)识别并特异性地结合一个靶标如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或上述物质的组合的一个免疫球蛋白分子或其抗原结合片段。如本文所使用的,术语“抗体”包括完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')2、以及Fv片段)、单链抗体片段(scFv和二硫化物稳定化的scFv(dsFv))、从至少两个不同抗体产生的多特异性抗体(如双特异性抗体)或从抗体片段形成的多特异性抗体(参见例如PCT公开

WO 96/27011、WO 2007/024715 WO 2009018386、WO 2009/080251、WO 2013006544、WO 2013/070565、以及 WO 2013/096291)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包括抗体的抗原结合片段的融合蛋白、以及包括抗原结合片段的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要这些抗体展现所希望的生物活性。

[0276] 抗体可以是以下五大类免疫球蛋白中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG、以及 IgM,或子类(同种型)(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)或同种异型(例如, Gm, 如 G1m (f、z、a 或 x)、G2m (n)、G3m (g、b、或 c), Am, Em, 以及 Km (1、2 或 3))。不同类的免疫球蛋白具有不同的且众所周知的亚基结构以及三维构型。抗体可以源自任何哺乳动物,包括但不限于人、猴、猪、马、兔、狗、猫、小鼠等等,或其他动物,如鸟类(例如鸡)。

[0277] 术语“抗原结合片段”是指包括完整抗体的抗原决定可变区的片段。本领域已知,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段进行。抗体片段的实例包括但不限于:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、scFv、线性抗体、单链抗体以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0278] 因此,在一个实施例中,本发明中使用的抗体可以包括具有全长重链和轻链或其片段的完整抗体分子,并且可以是但不限于Fab,修饰的Fab, Fab', 修饰的Fab', F(ab')₂, Fv, 单结构域抗体(例如VH或VL或VHH), scFv, 二价、三价或四价抗体, 双-scFv, 双抗体, 三抗体, 四抗体, 其组合以及上述任一项的表位结合片段。

[0279] 特别考虑的其他抗体是“寡克隆”抗体,其为不同单克隆抗体的预定混合物。参见例如PCT公开WO 95/20401;美国专利号5,789,208和6,335,163。优选地,寡克隆抗体是由在单个细胞中产生由针对一个或多个表位的抗体的预定混合物组成。更优选地,寡克隆抗体包括能够与共同轻链配对的多个重链以产生具有多种特异性的抗体(例如,PCT公开WO 04/009618)。当希望靶向单个靶分子上的多个表位时,寡克隆抗体是特别有用的。本领域技术人员将知道或可以确定什么类型的抗体或抗体混合物适用于预期目的和期望的需要。

[0280] 特别考虑用于本披露中的其他部分是小的工程化蛋白结构域,例如支架(参见例如美国专利公开号2003/0082630和2003/0157561)。支架是基于已知的天然存在的非抗体结构域家族,特别是蛋白质胞外结构域,其通常具有小尺寸(约100至约300AA),并且含有与具有高构象耐受性允许插入、缺失或其他取代的可变结构域相关联的高度结构化的核。这些可变结构域可以针对任何靶蛋白产生推定的结合界面。通常,通用蛋白质支架的设计包括两个主要步骤:(i)选择具有期望特点的合适的核心蛋白,和(ii)通过诱变接受高结构变异性的部分或所有结构域产生复杂组合文库,以合适的形式(即噬菌体、核糖体、细菌或酵母)显示这些文库并对文库进行具有期望结合特征(例如靶特异性和/或亲和力)的诱变处理支架的筛选。亲本支架的结构可以是高度多样的并且包括高度结构化的蛋白质结构域,包括但不限于FnIII结构域(例如AdNectin,参见例如蛋白质工程设计与选择杂志(Protein Eng. Des. Sel.) 18, 435-444 (2005), US 2008/00139791, 以及 WO 2005/056764; TN3, 参见例如 WO 2009/058379 和 WO 2011/130324);蛋白A的Z结构域(亲和体(Affibody),参见例如蛋白质工程设计与选择杂志(Protein Eng. Des. Sel.) 17, 455-462 (2004) 以及 EP 1641818A1);LDL受体的结构域A(高亲和性多聚体(Avimer),参见例如自然生物技术(Nature Biotechnology) 23 (12), 1556-1561 (2005) 以及调研药物的专家评论(Expert Opinion on Investigational Drugs) 16 (6), 909-917 (2007年6月));锚蛋白重复结构域(DARPin,分子生物学(J. Mol. Biol.) 332, 489-503 (2003), PNAS (2003) 以及生物学(Biol.)

369, (2007) 以及 WO 02/20565); C-型凝集素结构域(四连接素 (Tetranectin), 参见例如 WO 02/48189)。如果需要, 两个或多个这样的工程化支架结构域可以连接在一起, 形成多价结合蛋白。各个结构域可以靶向单一类型的蛋白质或几种, 这取决于用途/疾病指征。

[0281] 实际上任何分子(或其部分, 例如亚基、结构域、基序或表位)可以被靶向和/或并入包括但不限于以下各项的部分: 内在膜蛋白, 包括离子通道、离子泵、G-蛋白偶联受体、结构蛋白; 粘附蛋白诸如整联蛋白; 转运蛋白; 参与信号转导的蛋白质和包括G蛋白质的脂质锚定蛋白质, 酶如激酶(包括膜锚定激酶), 膜结合酶, 蛋白酶, 脂肪酶, 磷酸酶, 脂肪酸合成酶, 消化酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶, 溶菌酶, 聚合酶; 受体如激素受体、淋巴因子受体、单核因子受体、生长因子受体、细胞因子受体; 细胞因子; 以及更多。

[0282] 在一些方面中, 本披露中使用的多肽靶向和/或并入选自以下的生长因子、细胞因子、细胞因子相关蛋白、生长因子、受体配体或受体的全部或一部分(例如亚基、结构域、基序或表位): 例如 BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、EPO、FGF1 (α FGF)、FGF2 (β FGF)、FGF3 (int-2)、FGF4 (HST)、FGF5、FGF6 (HST-2)、FGF7 (KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、FGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FGFRL1、FGFRL6、IGF1、IGF2、IGF1R、IGF2R、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、IFNAR1、IFNAR2、IFNB1、IFNG、IFNW1、FIL1、FIL1 (EPSILON)、FIL1 (ZETA)、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、IL2RA、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL17RA、IL17RB、IL17RC、IL17RD、IL18R1、IL20RA、IL20RB、IL21R、IL22R、IL22RA1、IL23R、IL27RA、IL28RA、PDGFA、PDGFB、PDGFRA、PDGFRB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TGFBR1、TGFBR2、TGFBR3、ACVRL1、GFRA1、LTA (TNF- β)、LTB、TNF (TNF- α)、TNFSF4 (OX40配体)、TNFSF5 (CD40配体)、TNFSF6 (FasL)、TNFSF7 (CD27配体)、TNFSF8 (CD30配体)、TNFSF9 (4-1BB配体)、TNFSF10 (TRAIL)、TNFSF11 (TRANCE)、TNFSF12 (AP03L)、TNFSF13 (April)、TNFSF13B、TNFSF14 (HVEM-L)、TNFSF15 (VEGI)、TNFSF18、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF10A (Trail-受体)、TNFRSF10B (Trail-受体2)、TNFRSF10C (Trail-受体3)、TNFRSF10D (Trail-受体4)、FIGF (VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、KDR、FLT1、FLT4、NRP1、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AIF1、HGF、LEP (瘦素)、PTN、ALK以及THPO。

[0283] 在一些方面中, 本披露中使用的多肽靶向和/或并入选自以下的趋化因子、趋化因子受体、或趋化因子相关蛋白的全部或一部分(例如亚基、结构域、基序或表位): 例如 CCL1 (I-309)、CCL2 (MCP-1/MCAF)、CCL3 (MIP-1a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCL11 (嗜酸性粒细胞活化趋化因子)、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-1d)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MIP-3b)、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (SLC/二级淋巴组织趋化因子 (exodus-2))、CCL22 (MDC/STC-1)、CCL23 (MPIF-1)、CCL24 (MPIF-2/嗜酸性粒细胞活化趋化因子-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (嗜酸性粒细胞活化趋化因子-3)、CCL27 (CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1 (GR01)、CXCL2 (GR02)、CXCL3 (GR03)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL6 (GCP-2)、CXCL9 (MIG)、CXCL10 (IP-10)、CXCL11 (I-TAC)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、

CXCL16、PF4 (CXCL4) 、PPBP (CXCL7) 、CX3CL1 (SCYD1) 、SCYE1、XCL1 (淋巴细胞趋化因子) 、XCL2 (SCM-1b) 、BLR1 (MDR15) 、CCBP2 (D6/JAB61) 、CCR1 (CKR1/HM145) 、CCR2 (mcp-1RB/RA) 、CCR3 (CKR3/CMKBR3) 、CCR4、CCR5 (CMKBR5/ChemR13) 、CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6) 、CCR7 (CKR7/EBI1) 、CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1) 、CCR9 (GPR-9-6) 、CCRL1 (VSHK1) 、CCRL2 (L-CCR) 、XCR1 (GPR5/CCXCR1) 、CMKLR1、CMKOR1 (RDC1) 、CX3CR1 (V28) 、CXCR4、GPR2 (CCR10) 、GPR31、GPR81 (FKSG80) 、CXCR3 (GPR9/CKR-L2) 、CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo) 、HM74、IL8RA (IL8Ra) 、IL8RB (IL8Rb) 、LTB4R (GPR16) 、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10 (C10) 、EPO、FY (DARC) 、GDF5、HIF1A、IL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2、以及VHL。

[0284] 在一些方面中,本披露中使用的多肽靶向和/或并入选自以下各项中的蛋白质的全部或一部分(例如亚基、结构域、基序或表位):例如肾素;生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;副甲状腺激素;促甲状腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促滤泡激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子如因子VII、因子VIIIC、因子IX、组织因子(TF)以及血管性假血友病因子(von Willebrands factor);抗凝血因子例如蛋白质C;心钠素;肺表面活性物质;纤溶酶原激活剂如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活剂(t-PA);蛙皮素;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶(enkephalinase);RANTES(受激活调节正常T细胞表达和分泌的因子);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白如人血清白蛋白;缪氏抑制物质(Muellerian-inhibiting substance);松弛素A-链;松弛素B-链;松弛素原(prorelaxin);小鼠促性腺激素关联肽;微生物蛋白如 β -内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原(CTLA)如CTLA-4;抑制素;活化素,激活素;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子如骨源性神经营养因子(BDNF),神经营养蛋白-3、-4、-5、或-6(NT-3、NT-4、NT-5、或NT-6)或神经生长因子;表皮生长因子(EGF);胰岛素样生长因子结合蛋白;CD蛋白如CD2、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD14、CD18、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD40、CD40L、CD52、CD63、CD64、CD80和CD147;红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;超氧化物歧化酶;T-细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原如,例如AIDS被膜的部分,例如gp120;转运蛋白;归巢受体;地址素;调控蛋白;细胞粘附分子如LFA-1、Mac 1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、ICAM-3和VCAM, a4/p7整联蛋白,和(Xv/p3整联蛋白,包括a或其亚基,整联蛋白 α 亚基例如CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、 α 7、 α 8、 α 9、 α D、CD11a、CD11b、CD51、CD11c、CD41、 α IIb、 α IELb;整联蛋白 β 亚基,例如CD29、CD18、CD61、CD104、 β 5、 β 6、 β 7和 β 8;整联蛋白亚基组合,包括但不限于 α V β 3、 α V β 5和 α 4 β 7;凋亡途径的成员;IgE;血型抗原;f1k2/f1t3受体;肥胖(OB)受体;mp1受体;CTLA-4;蛋白C;Eph受体如EphA2、EphA4、EphB2等;人白细胞抗原(HLA)如HLA-DR;补体蛋白如补体受体CR1、C1Rq和其他补体因子如C3以及C5;糖蛋白受体如GpIba、GPIIb/IIIa和CD200。

[0285] 还考虑了特异性结合和/或包括癌抗原的部分,包括但不限于ALK受体(多营养因子受体)、多营养因子、KS1-4全癌抗原;卵巢癌抗原(CA125);前列腺酸性磷酸盐;前列腺特异性抗原(PSA);黑色素瘤相关抗原p97;黑色素瘤抗原gp75;高分子量黑色素瘤抗原(HMW-MAA);前列腺特异性膜抗原;癌胚抗原(CEA);多态上皮粘蛋白抗原;人乳脂肪球抗原;结肠直肠肿瘤相关抗原如:CEA、TAG-72、C017-1A、GICA 19-9、CTA-1和LEA;伯基特淋巴瘤抗原-

38.13;CD19;人B淋巴瘤抗原-CD20;CD33;黑色素瘤特异性抗原如神经节苷脂GD2、神经节苷脂GD3、神经节苷脂GM2和神经节苷脂GM3;肿瘤特异性移植型细胞表面抗原(TSTA);病毒诱导的肿瘤抗原,包括T-抗原、DNA肿瘤病毒和RNA肿瘤病毒的包膜抗原;癌胚抗原- α -甲胎蛋白如结肠CEA、5T4癌胚胎滋养层糖蛋白和膀胱肿瘤癌胚抗原;分化抗原如人肺癌抗原L6和L20;纤维肉瘤抗原;人白血病T细胞抗原-Gp37;拟糖蛋白;鞘脂;乳房癌抗原如EGFR(表皮生长因子受体);NY-BR-16、NY-BR-16、HER2抗原(p185HER2)、以及HER3;多态上皮粘蛋白(PEM);人恶性淋巴细胞抗原-AP0-1;分化抗原如在胎儿红细胞中发现的I抗原;在成年红细胞中发现的原内胚层I抗原;植入前胚胎;胃腺癌中发现的I(Ma);在乳腺上皮中发现的M18、M39;在骨髓细胞中发现的SSEA-1;VEP8;VEP9;My1;VIM-D5;在结肠直肠癌中发现的D156-22;TRA-1-85(血型H);睾丸和卵巢癌中发现的SCP-1;结肠腺癌中发现的C14;肺腺癌中发现的F3;胃癌中发现的AH6;Y半抗原;胚胎癌细胞中发现的Ley;TL5(血型A);A431细胞中发现的EGF受体;胰腺癌中发现的E1系列(血型B);胚胎癌细胞中发现的FC10.2;胃腺癌抗原;腺癌中发现的CO-514(血型Lea);腺癌中发现的NS-10;CO-43(血型Leb);A431细胞的EGF受体中发现的G49;结肠腺癌中发现的MH2(血型ALeb/Ley);结肠癌中发现的19.9;胃癌粘蛋白;骨髓细胞中发现的T5A7;黑色素瘤中发现的R24;胚胎癌细胞中发现的4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2及M1:22:25:8和在4至8-细胞期胚胎中发现的SSEA-3和SSEA-4;皮肤T细胞淋巴瘤抗原;MART-1抗原;Sialy Tn(STn)抗原;结肠癌抗原NY-CO-45;肺癌抗原NY-LU-12变体A;腺癌抗原ART1;副肿瘤相关的脑-睾丸癌抗原(肿瘤神经元抗原(onconeuronal antigen)MA2;周围肿瘤神经元抗原);神经肿瘤腹侧抗原2(NOVA2);肝细胞癌抗原基因520;肿瘤相关抗原CO-029;肿瘤相关抗原MAGE-C1(癌/睾丸抗原CT7)、MAGE-B1(MAGE-XP抗原)、MAGE-B2(DAM6)、MAGE-2、MAGE-4a、MAGE-4b和MAGE-X2;癌-睾丸抗原(NY-EOS-1)以及任一上述多肽的片段。

[0286] 在一个实施例中,所用的多肽是重组的。“重组”多肽或蛋白质是指经由重组DNA技术产生的多肽或蛋白质。如同已经通过任何合适的技术分离、分馏或部分纯化或基本上纯化的天然或重组多肽一样,出于本披露的目的,在工程化宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质也被视为是分离的。本文披露的多肽可以是使用本领域已知的方法重组产生。可替代地,本文披露的蛋白质和肽可以是化学合成的。

[0287] 有效负载分子

[0288] 本文所用的有效负载是指旨在通过与多肽结合而“递送”到靶区域位置的分子或组分。一般来说,有效负载通常是效应分子,例如选自下组,该组由以下各项组成:毒素如细胞毒素(例如化疗剂),药物,前药,酶,免疫调节剂,抗血管生成剂试剂,促细胞凋亡剂,细胞因子,激素,抗体或其片段,合成或天然存在的聚合物,核酸及其片段如DNA、RNA及其片段(例如反义分子或基因),放射性核素特别是放射性碘,放射性同位素,螯合金属,纳米颗粒和报告基团(例如荧光化合物或可通过NMR或ESR光谱法检测的化合物)。

[0289] 在一个实施例中,该有效负载选自包括以下项的组:毒素、药物、放射性核素、免疫调节剂、细胞因子、淋巴因子、趋化因子、生长因子、肿瘤坏死因子、激素、激素拮抗剂、酶、寡核苷酸、DNA、RNA、siRNA、RNAi、微小RNA、肽核酸、光敏治疗剂、抗血管生成剂、促凋亡剂、非天然氨基酸、肽、脂质、聚合物、碳水化合物、支架分子、荧光标签、可视化肽、生物素、血清半衰期延长剂、捕获标签、螯合剂、固相支撑体、或其组合。

[0290] 在一个实施例中,有效负载是药物分子(在本文也称为药物)。用于在本披露中使用的药物分子的实例包括氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸酯、亚硝基脲、吉西他滨、三氮烯、叶酸类似物、蒽环类、紫杉烷、COX-2抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶抑制剂、表鬼臼毒素、铂配位化合物、长春花生物碱、取代的脲、甲基肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、激素拮抗剂、内皮抑素、紫杉醇、喜树碱、多柔比星、多柔比星类似物、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、mTOR抑制剂、热休克蛋白(HSP90)抑制剂、蛋白体抑制剂、HDAC抑制剂、促凋亡剂、甲氨蝶呤、CPT-11、或其组合,并且其中轭合是。

[0291] 在具体方面中,该药物是氨磷汀、顺铂、达卡巴嗪、更生霉素、氮芥、链佐星、环磷酰胺、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀、多柔比星脂、吉西他滨、柔红霉素、柔红霉素脂、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇、多西他赛、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、吉非替尼、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司钠、干扰素 α 、干扰素 β 、依立替康、米托蒽醌、拓扑替康、亮丙立德、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、链佐星、他莫昔芬、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、塞替派、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、苯丁酸氮芥芳香酶抑制剂,以及其组合。

[0292] 在一个实施例中,药物选自烷基磷酸胆碱、拓扑异构酶I抑制剂、紫杉烷和苏拉明。

[0293] 在一个实施例中,毒素包括细胞毒素或细胞毒性剂,包括对细胞有害(例如杀死)的任何试剂。实例包括阿普利啶(aplidin)、阿那曲唑(anastrozole)、氮杂胞苷(azacytidine)、硼替佐米(bortezomib)、苔藓抑素(bryostatin)-1、白消安(busulfan)、考布他汀、卡莫司汀(carmustine)、海兔毒素、埃博霉素、星形孢菌素、美登木素生物碱、海绵抑制素、根瘤菌素、软海绵素、杆菌素、哈米特林(hemimasterlin)、紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔以及嘌呤霉素以及它们的类似物或同系物。

[0294] 在一个实施例中,该药物(连同本例子中的细胞毒素)包括抗代谢物(例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺)、烷基化剂(例如氮芥、塞替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素C和顺式二胺二氯铂(II)(DDP)顺铂)、卡铂(carboplatin)、蒽环类抗生素(例如柔红霉素(旧称道诺霉素)和多柔比星或多柔比星葡萄糖苷酸)、抗生素类(例如放线菌素D(旧称放线菌素)、博来霉素、光辉霉素、安曲霉素(AMC)、卡利奇霉素(calicheamicin)或多卡霉素(duocarmycin))以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春花碱)。

[0295] 在一些方面中,该药物是奥瑞斯他汀(美国专利号5,635,483;5,780,588),例如MMAE(单甲基奥瑞斯他汀E)或MMAF(单甲基奥瑞斯他汀F)。在其他方面中,该药物是多拉司他汀或多拉司他汀肽类似物或衍生物。多拉司他汀和奥瑞斯他汀已显示干扰微管动力学、GTP水解以及核与细胞分裂(沃伊克(Woyle)等人,抗微生物制剂与化学疗法(Antimicrob. Agents and Chemother)45:3580-3584(2001))并且具有抗癌活性(美国专利

号5,663,149)。多拉司他汀或奥瑞斯他汀药物部分可以通过肽药物部分的N(氨基)末端或C(羧基)末端附接到轭合化合物。参见例如国际公开号WO 2002/088172,其通过引用以其全文结合在此。

[0296] 在其他方面中,该药物是美登木素生物碱。在一些方面中,该美登木素生物碱是N 2'-脱乙酰基-N 2'- (3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1)、N 2'-脱乙酰基-N2'- (4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)或N 2'-脱乙酰基-N 2' (4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白聚合而起作用的有丝分裂抑制剂。美登素从东非灌木齿叶美登木(*Maytenus serrata*)中首次分离(美国专利号3,896,111)。随后地,发现某些微生物也产生诸如美登醇和C-3美登醇酯的美登木素生物碱(美国专利号4,151,042)。例如,在美国专利号4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663;以及4,371,533(它们通过引用以其全文结合在此)中披露了合成的美登醇以及其衍生物和类似物。

[0297] 美登木素生物碱药物部分是抗体药物轭合物中有吸引力的药物部分,因为它们:(i)通过发酵或化学修饰、发酵产物的衍生相对易于制备,(ii)可以与适于通过非二硫化接头轭合至抗体的官能团进行衍生作用,(iii)在血浆中稳定,以及(iv)有效抵抗各种肿瘤细胞系。在美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP0425235B1;刘(Liu)等人,美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)93:8618-8623(1996)(描述的包含名为DM1的美登木素生物碱的免疫轭合物);以及沙里(Chari)等人,癌症研究(Cancer Research)52:127-131(1992)(它们通过引用以其全文结合在此)中描述了包括美登木素生物碱的轭合物、制备该轭合物的方法以及它们的治疗性用途。

[0298] 美登木素生物碱是本领域中熟知的并且可以通过已知技术合成或从天然来源分离。例如在美国专利号5,208,020中披露了适合的美登木素生物碱。示例性美登木素生物碱药物部分包括具有修饰芳环的那些,诸如:C-19-脱氯(美国专利号4,256,746)(通过氢化锂铝还原安丝菌素(*ansamytocin*)P2来制备);C-20-羟基(或C-20-脱甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利号4,361,650和4,307,016)(通过使用链霉菌属或放线菌进行脱甲基作用或使用LAH进行脱氯作用来制备);以及C-20-脱甲基、C-20-酰氧基(-OCOR)、+/-脱氯(美国专利号4,294,757)(通过使用酰氯进行酰化作用来制备),以及具有在其他位置处的修饰的那些药物部分。示例性美登木素生物碱药物部分还包括具有诸如以下修饰的那些:C-9-SH(通过美登醇与H2S或P2S5反应来制备(美国专利号4,424,219));C-14-烷氧基甲基(脱甲氧基/CH2OR)(美国专利号4,331,598);C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH2OH或CH2OAc)(由诺卡氏菌属制备(美国专利号4,450,254));C-15-羟基/酰氧基(通过用链霉菌属转化美登醇来制备(美国专利号4,364,866));C-15-甲氧基(从滑桃树(*Trewia nudiflora*)分离(美国专利号4,313,946和4,315,929));C-18-N-脱甲基(通过由链霉菌属脱甲基美登醇来制备(美国专利号4,362,663和4,322,348));以及4,5-脱氧(通过三氯化钛/LAH还原美登醇来制备(美国专利号4,371,533))。根据连接的类型,已知美登素化合物上的许多位置适用作连接位置。例如,对于形成酯键,具有羟基的C-3位置、用羟甲基修饰的C-14位置、用羟基修饰的C-15位置以及具有羟基的C-20位置均是适合的。

[0299] 在一些方面中,该药物是卡利奇霉素。抗生素的卡利奇霉素家族能够在亚皮摩尔

浓度下产生双链DNA断裂。对于制备卡利奇霉素家族的轭合物,参见例如,美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001、5,877,296,它们通过引用以其全文结合在此。可以使用的卡利奇霉素结构类似物包括但不限于 γ 1I、 α 2I、 α 3I、N-乙酰基- γ 1I、PSAG以及 θ 11(辛曼(Hinman)等人,癌症研究53:3336-3342(1993);洛德(Lode)等人,癌症研究58:2925-2928(1998);以及上述的美国氰胺公司(American Cyanamid)的美国专利)。

[0300] 在一些方面中,该药物是微管溶素。微管溶素是从粘细菌物种分离出的一类天然产物中的成员(沙瑟(Sasse)等人,抗生素杂志(J.Antibiot)53:879-885(2000))。作为细胞骨架相互作用剂,微管溶素是抑制微管蛋白聚合并且导致细胞周期停滞和细胞凋亡的有丝分裂毒物(斯坦梅茨(Steinmetz)等人,国际版应用化学(Chem. Int. Ed)43:4888-4892(2004);卡里尔(Khalil)等人,生物化学(ChemBioChem.7):678-683(2006);考尔(Kaur)等人,生物化学杂志(Biochem. J)396:235-242(2006))。微管溶素是极强的细胞毒性分子,超过了任何临床相关传统化学治疗剂(例如,埃博霉素、紫杉醇和长春碱)的细胞生长抑制。此外,它们有效抵抗多重耐药性细胞系(德姆林(Domling)等人,分子多样性(Mol. Diversity)9:141-147(2005))。这些化合物在低皮摩尔范围内显示针对具有IC₅₀值的一组癌细胞系测试的高细胞毒性;因此,它们作为抗癌治疗是有意义的。参见例如国际公开号W0/2012019123,其通过引用以其全文结合在此。例如在美国专利号7,776,814中披露了微管溶素轭合物。

[0301] 在一些方面中,该药物是吡咯并苯并二氮杂草(PBD)。PBD是相对小的分子并且一些具有识别并共价结合DNA小沟中的特异性序列的能力并且因此展现抗生素/抗肿瘤活性。许多PBD及其衍生物是本领域已知的,例如PBD二聚体(例如,SGJ-136或SG2000)、C2不饱和PBD二聚体、带有C2芳基取代的吡咯并苯并二氮杂草二聚体(例如,SG2285)、通过水解活化的PBD二聚体前药(例如,SG2285),以及聚吡咯PBD(例如,SG2274)。国际公开号W0 2000/012507、W0 2007/039752、W0 2005/110423、W0 2005/085251、以及W0 2005/040170,以及美国专利号7,612,062中进一步描述PBD,这些专利各自通过引用以其全文结合在此。

[0302] 在一些方面中,该毒素包括例如相思豆毒素、马钱子碱、毒芹素、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、志贺毒素、内毒素、破伤风毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、霍乱毒素、镰叶芹醇、 α 毒素、格尔德霉素、白树毒素、百脉根昔、蓖麻毒素、番木鳖碱、河豚毒素、皂昔、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、假单胞菌外毒素、假单胞菌内毒素、或其组合。在其他方面中,该毒素包括例如蒴莲根毒素A链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制剂、丝林霉素(mitogellin)、局限曲霉素、酚霉素、新霉素、单端孢菌毒素(tricothecenes)或其组合。参见,例如,国际公开号W0 1993/021232。

[0303] 在一些方面中,该螯合剂是DTPA、EC、DMSA、EDTA、Cy-EDTA、EDTMP、DTPA、CyDTPA、Cy2DTPA、BOPTA、DTPA-MA、DTPA-BA、DTPMP、DOTA、TRITA、TETA、DOTMA、DOTA-MA、HP-D03A、pNB-DOTA、DOTP、DOTMP、DOTEPE、DOTPP、DOTBzP、DOTPME、HEDP、DTTP、N3S三酰胺疏基、DADS、MAMA、DADT、N2S4联胺四疏基、N2P2二疏基-二膦、6-肼基烟酸、丙烯胺肟、四胺、环拉胺或其组合。

[0304] 在一个实施例中,该药物是奥瑞斯他汀、微管溶素或吡咯并苯并二氮杂草(PBD)。

[0305] 在一个实施例中,该奥瑞斯他汀是MMAE(单甲基奥瑞斯他汀E)或MMAF(单甲基奥瑞斯他汀F)。

[0306] 在一个实施例中,该药物是美登木素生物碱,例如N 2'-脱乙酰基-N 2'- (3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1)、N 2'-脱乙酰基-N2'- (4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)或N 2'-脱乙酰基-N 2' (4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

[0307] 放射性核素的实例包括³H、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸F、³²P、³³P、³⁵S、⁴⁷Sc、⁵¹Cr、⁵⁴Mn、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶²Cu、⁶⁵Zn、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ge、⁷⁵Br、⁷⁵Se、⁷⁶Br、⁷⁷Br、^{80m}Br、⁸⁵Sr、⁸⁹Sr、⁹⁰Y、⁹⁵Ru、⁹⁷Ru、⁹⁹Mo以及^{99m}Tc、¹⁰³Pd、^{103m}Rh、¹⁰³Ru、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁵Ru、¹⁰⁷Hg、¹⁰⁹Pd、¹⁰⁹Pt、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹¹²In、^{113m}In、¹¹³Sn、¹¹⁵In、¹¹⁷Sn、¹¹⁹Sb、^{121m}Te、¹²¹I、^{122m}Te、¹²⁵I、¹²⁶I、¹³¹I、¹³³I、¹³³Xe、¹⁴⁰La、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁴⁹Pm、¹⁵²Dy、¹⁵³Sm、¹⁵³Gd、¹⁵⁹Gd、¹⁶¹Ho、¹⁶¹Tb、¹⁶⁵Tm、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁸Tm、¹⁶⁹Er、¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁸W、^{189m}Os、¹⁸⁹Re、¹⁹²Ir、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁷Pt、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²⁰¹Tl、²⁰³Hg、²¹¹At、²¹¹Bi、²¹¹Pb、²¹²Pb、²¹²Bi、²¹³Bi、²¹⁵Po、²¹⁷At、²¹⁹Rn、²²¹Fr、²²³Ra、²²⁴Ac、²²⁵Ac、²²⁵Fm、²⁵²Cf及其组合。

[0308] 在一个实施例中,该放射性核素是选自下组,该组包括或由以下各项组成:铬(⁵¹Cr)、钴(⁵⁷Co)、氟(¹⁸F)、钆(¹⁵³Gd、¹⁵⁹Gd)、镥(⁶⁸Ge)、钬(¹⁶⁶Ho)、铟(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In)、碘(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I)、镧(¹⁴⁰La)、镥(¹⁷⁷Lu)、锰(⁵⁴Mn)、钼(⁹⁹Mo)、钯(¹⁰³Pd)、磷(³²P)、镨(¹⁴²Pr)、钷(¹⁴⁹Pm)、铼(¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re)、铑(¹⁰⁵Rh)、钌(⁹⁷Ru)、钐(¹⁵³Sm)、钪(⁴⁷Sc)、硒(⁷⁵Se)、锶(⁸⁵Sr)、硫(³⁵S)、锝(⁹⁹Tc)、铊(²⁰¹Tl)、锡(¹¹³Sn、¹¹⁷Sn)、氚(³H)、氙(¹³³Xe)、镱(¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb)、钇(⁹⁰Y)、锌(⁶⁵Zn)、或其组合。

[0309] 在一个实施例中,该放射性核素通过螯合剂附接至本披露的轭合化合物。

[0310] 在一个实施例中,R¹是血清半衰期延长剂,例如包括白蛋白、白蛋白结合多肽、PAS、人绒毛膜促性腺激素C-末端肽(CTP)的β亚基、聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉(HES)、XTEN、白蛋白结合小分子、或其组合。

[0311] 当效应分子为聚合物时,它可以总体上为合成或天然存在的聚合物,例如任选被取代的直链或分支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化烯聚合物或者支链或非支链多糖,例如同多糖或杂多糖。

[0312] 可能存在于上述合成聚合物上的特定任选取代基包括一个或多个羟基、甲基或甲氧基基团。

[0313] 特定的天然存在的聚合物包括乳糖、透明质酸、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、藻酸盐、纤维素直链淀粉、葡聚糖、糖原或其衍生物。

[0314] 在一些实施例中,该聚合物是聚乙二醇(PEG)、支链PEG、聚唾液酸(PSA)、羟烷基淀粉(HAS)、羟乙基淀粉(HES)、碳水化合物、多糖、支链淀粉、壳聚糖、透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、淀粉、葡聚糖、羧甲基-葡聚糖、聚环氧烷(PAO)、聚亚烷基二醇(PAG)、聚丙二醇(PPG)聚噁唑啉、聚丙烯酰吗啉、聚乙烯醇(PVA)、聚羧酸盐、聚乙烯吡咯烷酮、聚磷腈、聚噁唑啉、聚乙烯-共-马来酸酐、聚苯乙烯-共-马来酸酐、聚(1-羟甲基乙烯羟甲基甲醛)(PHF)、2-甲基丙烯酰氧基-2'-乙基三甲基磷酸铵(MPC)。在一些实施例中,该聚合物是聚乙二醇。在本发明的一个实施例中,聚乙二醇的分子量范围为300至10,000,000、500至100,000、1000至50,000、1500至30,000、2,000至20,000Da、3,000至5,000Da以及4,000至5,000Da。在其他实施例中,聚乙二醇具有约1,000Da、约1,500Da、约2,000Da、约3,000Da、约4,000Da、约5,000Da、约10,000Da、或约20,000Da的分子量。

[0315] 在一个实施例中, R¹或该多肽(特别是R¹)包括可视化标记。可视化标记包括但不限于,发色团、荧光团、荧光蛋白、磷光染料、叠层染料、颗粒、半抗原、酶、放射性同位素或其组合。

[0316] 在一个实施例中,该可视化标记是可视化肽。在一些方面中,该可视化肽能够在体外、体内、离体或其任何组合中可视化或定位轭合化合物。在一些方面中,该可视化肽是例如生物素受体肽、硫辛酸受体肽、荧光蛋白、用于连接双砷染料或用于轭合亚稳态锝的含半胱氨酸肽、用于轭合基于荧光共振能量转移(FRET)的亲近测定法所用的铕化合物的肽、或其任何组合。在一些方面中,该荧光蛋白是例如绿色荧光蛋白(GFP)、红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、增强型黄色荧光蛋白(EYFP)、或其任何组合。在一些方面中,该荧光蛋白是藻胆蛋白或其衍生物。

[0317] 荧光蛋白,特别是藻胆蛋白,适用于产生叠层染料标记的标记试剂。出于获得较大的斯托克斯位移的目的,这些叠层染料包括荧光蛋白和荧光团,其中发射光谱从荧光蛋白的吸收光谱的波长发生更远的位移。这可以有效于检测样品中的低量的靶标,其中发射的荧光被最大限度地优化,换言之很少甚至没有发射光被荧光蛋白重吸收。为了实现这一点,荧光蛋白和荧光团充当能量转移对,其中荧光蛋白在荧光团所吸收的波长下发射,并且荧光团随后在距离荧光蛋白比仅存在荧光蛋白时所能够获得的波长更远的波长下发射。功能组合可以是本领域中已知的藻胆蛋白和碘基罗丹明荧光团或碘化花青荧光团。该荧光团有时充当能量供体并且荧光蛋白是能量受体。

[0318] 在其他方面中,该双砷染料是4',5'-双(1,3,2-二硫砷杂环戊烷-2-基)荧光素(F1AsH)。在一些方面中,该生物素受体肽有助于基于抗生物素蛋白的试剂和基于链霉抗生物素蛋白的试剂的轭合。在一些方面中,该硫辛酸受体肽有助于巯基反应性探针轭合至结合硫辛酸或直接连接荧光硫辛酸类似物。

[0319] 在一个实施例中, R¹或该多肽(特别是R¹)包括荧光标签。在一些方面中,该荧光标签包括例如荧光素型染料、罗丹明型染料、丹酰型染料、丽丝胺型染料、花青型染料、藻红蛋白型染料、德克萨斯红型染料、或其任何组合。适于轭合至本文披露的半胱氨酸工程化抗体或其抗原结合片段的荧光团包括但不限于;芘(包括任选相应的衍生化合物)、蒽、萘、吖啶、芪、吲哚或苯并吲哚、噁唑或苯并噁唑、噻唑或苯并噻唑、4-氨基-7-硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑(NBD)、花青(包括任何相应的化合物)、羰花青(包括任何相应的化合物)、7-氨基-4-甲基-2-喹啉酮(carbostyryl)、卟啉、水杨酸酯、邻氨基苯甲酸酯、薁、二萘嵌苯、吡啶、喹啉、硼聚氮杂引达省(包括任何相应的化合物)、咕吨(包括任何相应的化合物)、噁嗪(包括任何相应的化合物)或苯并噁嗪、卡巴秦(包括任何相应的化合物)、芴酮、香豆素(包括披露的相应化合物)、苯并呋喃(包括相应的化合物)以及苯甲酮(benzphenalenone)(包括任何相应的化合物)以及其衍生物。如本文所用,噁嗪包括试卤灵(包括任何相应化合物)、氨基噁嗪酮、二氨基噁嗪、以及其苯并取代的类似物、或其任何组合。

[0320] 在某些方面中,该荧光团包括例如咕吨(对甲氨基酚、罗丹明、荧光素以及其衍生物)、香豆素、花青、芘、噁嗪、硼聚氮杂引达省、或其任何组合。在一些实施例中,此类荧光团是例如碘化咕吨、氟化咕吨、碘化香豆素、氟化香豆素、碘化花青、或其任何组合。还包括以下列商品名出售且通常称为以下各项的染料: ALEXA FLUOR®、DYLIGHT®、CY DYES®、BODIPY®、OREGON GREEN®、PACIFIC BLUE®、IRDYES®、FAM®、

FITC®、以及ROX®。

[0321] 如本文披露的通过接头“Z”附接的荧光团的选择将决定最终化合物的吸收和荧光发射特性。可以使用的荧光团标记的物理特性包括但不限于，光谱特征(吸收、发射和斯托克斯位移)、荧光强度、寿命、极化以及光致漂白率、或其组合。所有这些物理特性可以用于将一个荧光团与另一个荧光团区分开，并且从而允许多元分析。在某些方面中，荧光团在大于480nm的波长下具有吸收极大值。在一些方面中，荧光团在处于或接近488nm至514nm(特别适用于由氩离子激光激发源的输出激发)或在接近546nm(特别适用于由水银弧光灯激发)处吸收。在一些方面中，荧光团可以针对组织或完整生物体应用在NIR(近红外区域)中发射。荧光标记的其他所希望的特性可以包括细胞渗透性和低毒性，例如，如果将在细胞或生物体(例如，活体动物)中执行抗体的标记。

[0322] 在一个实施例中，R¹或该多肽(特别是R¹)包括捕获标签。在一些方面中，该捕获标签是生物素或His6标签。生物素是有用的，这是因为它可以在酶系统中起作用以进一步放大可检测的信号并且它还可以充当用于分离目的亲和色谱中使用的标签。出于检测目的，可以使用对于生物素具有亲和力的酶轭合物，诸如抗生物素蛋白-HRP。

[0323] 随后可以加入过氧化物酶底物以产生可检测的信号。除生物素之外，可以使用其他半抗原，包括激素、天然发生和合成的药物、污染物、过敏原、效应分子、生长因子、趋化因子、细胞因子、淋巴因子、氨基酸、肽、化学中间体、核苷酸及类似物。

[0324] 在一个实施例中，R¹包括酶。酶是有效标记物，因为可以获得可检测的信号的放大，从而得到增加的测定灵敏度。酶自身通常不产生可检测的响应，但是当它被适当的底物接触时，起到分解底物的作用，这样使得转化的底物产生荧光信号、比色信号或发光信号。因为标记试剂上的一种酶可以导致多个底物被转化成可检测的信号，所以酶将可检测的信号放大。选择酶底物以产生可测量的产物，例如，比色发光、荧光发光或化学发光。这类底物在本领域中广泛使用且是本领域已知的。

[0325] 在一些实施例中，比色或荧光底物和酶组合使用氧化还原酶如辣根过氧化物酶和底物如3,3' - 二氨基联苯胺(DAB)和3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)，这产生有区别的颜色(分别是棕色和红色)。产生可检测的产物的其他比色氧化还原酶底物包括但不限于：2,2-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、邻苯二胺(OPD)、3,3',5,5' - 四甲基联苯胺(TMB)、邻联茴香胺、5-氨基水杨酸、4-氯-1-萘酚。荧光底物包括但不限于，高香草酸或4-羟基-3-甲氧基苯乙酸、还原的吩噁嗪和还原的苯并噻嗪，包括Amplex®Red试剂及其变体和还原的二氢咁吨，包括二氢荧光素以及二氢若丹明，包括二氢若丹明123。

[0326] 本披露延伸至使用作为酪胺酰胺的过氧化物酶底物，其表示一类独特的过氧化物酶底物，在于它们在酶作用之前可以是固有地可检测，但在如酪胺酰胺信号放大(TSA)所描述的过程中通过过氧化物酶作用“固定在适当位置”。这些底物广泛地用于标记样品(这些样品是细胞、组织或阵列)中的靶标以用于其随后通过显微术、流式细胞术、光学扫描以及荧光测定法进行检测。

[0327] 本披露延伸至比色(并且在一些情况下是荧光)底物和酶组合有时使用磷酸酶诸如酸性磷酸酶、碱性磷酸酶或这种磷酸酶的重组型式与比色底物诸如5-溴-6-氯-3-吲哚基磷酸酯(BCIP)、6-氯-3-吲哚基磷酸酯、5-溴-6-氯-3-吲哚基磷酸酯、对硝基苯基磷酸酯或邻硝基苯基磷酸酯或者与荧光底物诸如4-甲基伞形酮基磷酸酯、6,8-二氟-7-羟基-4-甲基

香豆素基磷酸酯(DiFMUP,美国专利号5,830,912)、荧光素二磷酸酯、3-邻甲基荧光素磷酸酯、试卤灵磷酸酯、9H-(1,3-二氯-9,9-二甲基吖啶-2-酮-7-基)磷酸酯(DDAO磷酸酯)或ELF 97、ELF 39或相关磷酸酯的组合。

[0328] 本披露延伸至包括糖苷酶的R¹,具体地说β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖醛酸糖苷酶和β-葡萄糖苷酶是另外适合的酶。适当的比色底物包括但不限于,5-溴-4-氯-3-吲哚基β-D-吡喃半乳糖苷(X-gal)和类似的吲哚基半乳糖苷、葡萄糖苷和葡萄糖苷酸、邻硝基苯基β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、以及对硝基苯基β-D-吡喃半乳糖苷。在一些实施例中,荧光底物包括试卤灵β-D-吡喃半乳糖苷、荧光素二半乳糖苷(FDG)、荧光素二葡萄糖苷以及它们的结构变体4-甲基伞形酮基β-D-吡喃半乳糖苷、羧基伞形酮基β-D-吡喃半乳糖苷、以及氟化香豆素β-D-吡喃半乳糖苷。

[0329] 另外的酶包括但不限于,水解酶如胆碱酯酶和肽酶、氧化酶如葡萄糖氧化酶和细胞色素氧化酶、以及还原酶,对于这些酶适合的底物是已知的。

[0330] 酶以及其产生化学发光的适当底物适用于并入本发明的分子中。这些包括但不限于天然和重组形式的荧光素酶和水母发光蛋白。磷酸酶、糖苷酶和氧化酶的产生化学发光的底物,如含有稳定的二氧杂环丁烷、鲁米诺、异氨基苯二酰肼以及吖啶酯的那些也是产生的。

[0331] 其中此类异源部分是核酸。该核酸可以是选自下组,该组由DNA、RNA、短干扰RNA(siRNA)、微小RNA、发夹结构或核酸模拟物(诸如肽核酸)组成。在某些方面中,该结合核酸是至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少100、至少200、至少500、至少1000、至少5000或更多个碱基对。该结合核酸可以是单链的。在不同方面中,该结合核酸可以是双链的。在一些方面中,该结合核酸编码开放阅读框。在一些方面中,由该结合核酸编码的开放阅读框对应于凋亡诱导蛋白、病毒蛋白、酶或癌抑制蛋白。用于递送此类核酸至细胞的技术是本领域已知的。

[0332] 其他定义

[0333] 在详细描述提供的实施例之前,应当理解本披露并不限于特定的组合物或方法步骤,并且这些组合物或方法步骤可以改变。如在本说明书和随附权利要求书中所使用,除非上下文另外明确说明,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“该(the)”包括复数参考对象。术语“一个”(或“一种”)、以及术语“一个或多个/一种或多种”和“至少一个”本文可以互换地使用。

[0334] 此外,本文使用“和/或”应当理解为在有或没有另一者的情况下,两个指定的特征或组分中的每一者的特定披露。因此,如本文的短语诸如“A和/或B”中所使用的术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、以及“B”(单独)。同样,如在短语诸如“A、B和/或C”中使用的术语“和/或”旨在包括以下各方面:A、B以及C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0335] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本披露涉及的领域所属的技术人员通常所理解的相同的意义。例如,生物医学和分子生物学简明词典(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology),Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC出版社;细胞和分子生物学词典(The Dictionary of Cell and Molecular Biology),第3版,1999,学术出版社(Academic Press);以及生物化学和分子生物学牛津词

典 (Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology) , 修订版, 2000, 牛津大学出版社 (Oxford University Press) , 为技术人员提供本披露中使用的许多术语的一般词典。

[0336] 单位、前缀和符号均以它们的国际单位系统 (SI) 接受形式表示。数值范围包括限定该范围的数字。除非另外说明, 氨基酸序列以氨基至羧基取向从左向右书写。本文提供的标题不是对不同方面的限制, 其可以通过参考作为整体的说明书而得到。因此, 下面直接定义的术语通过以其全文参考说明书更完整地定义。

[0337] 氨基酸在此通过它们的通常已知的三字母符号或通过由 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会 (IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission) 推荐的单字母符号来提及。同样地, 核苷酸通过它们的普遍公认的单字母代码来提及。

[0338] 术语“受试者”是指有待成为特定治疗的接受者的任何动物 (例如, 哺乳动物) , 包括但不限于人类、非人类灵长动物、啮齿类等。典型地, 术语“受试者”和“患者”在提及人类受试者时可以互换地使用。

[0339] 术语“药物组合物”是指一种呈关于允许活性成分 (例如, 本文披露的轭合化合物) 的生物活性有效的这种形式的制剂, 以及不包含对于该组合物将给予的受试者而言具有不可接受毒性的额外组分的制剂。这种组合物可以包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。这种组合物可以是无菌的。

[0340] 如本文披露的轭合化合物的“有效量”是足以实施具体阐述目的的量。关于阐述的目的, “有效量”可以经验为主地并且以常规方式来确定。

[0341] 术语“治疗有效量”是指本文披露的轭合化合物或其他药物足以“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或障碍的量。

[0342] 当在此使用时, 词语“标记”是指一种直接或间接轭合至本文披露的工程化抗体或其片段 (例如半胱氨酸工程化抗体或其片段) 以便产生“标记的”轭合化合物的可检测化合物或组合物。该标记可以是本身可检测的 (例如, 放射性同位素标记或荧光标记) , 或在酶标记的情况下可以催化可检测底物化合物或组合物的化学改变。

[0343] 术语诸如“治疗 (treating/treatment/to treat)”是指 (1) 治愈、减缓已诊断病理病症或障碍、减少其症状和/或停止其进展的治疗措施, 以及 (2) 防止和/或减缓目标病理病症或障碍进展的预防性或防御性措施。因此, 需要治疗的那些包括已经患有障碍的患者; 具有患障碍的倾向的患者; 以及障碍有待预防的那些患者。在某些方面中, 如果患者表现出例如, 一种疾病或病症 (例如某种类型的癌症) 的全部、部分或暂时缓解, 则受试者根据本披露的方法被成功“治疗”该疾病或病症 (例如癌症) 。

[0344] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文可互换使用, 并且是指任何长度的核苷酸的聚合物, 包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基, 和/或它们的类似物, 或可以通过DNA或RNA聚合酶并入聚合物的任何底物。多核苷酸可以包括修饰的核苷酸, 诸如甲基化核苷酸和它们的类似物。

[0345] 如本文所用的, 术语“载体”是指一种构建体, 该构建体能够在宿主细胞中递送一个或多个感兴趣的基因或序列并且在一些方面中, 能够表达这些基因或序列。载体的实例包括但不限于病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂缔合的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体, 以及某些真核细胞 (诸如

生产细胞)。

[0346] 如本文所用的,在本说明书上下文中术语“包括 (comprising)”应该被解读为“包含 (including)”。

[0347] 如本文所用的“在本披露中使用”是指在本文披露的方法中使用,在本文披露的分子(包括中间体)中使用或两者,适用于所使用的术语的上下文。

[0348] 应当理解,无论在什么情况下在此用语言“包括”描述方面时,也提供了用“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其他类似方面。

[0349] 本文所述的任何肯定实施例或其组合可以是否定排除(即放弃权项)的基础。

[0350] 组合物

[0351] 本披露延伸至包括本文所述分子(例如本披露的水解分子)的组合物,特别是包括本披露的分子以及药物赋形剂、稀释剂或载体的药物组合物(或诊断组合物)。

[0352] 该组合物通常将作为无菌药物组合物(其一般将包括药学上可接受的载体)的一部分提供。在疫苗配制品背景下,本发明的药物组合物可以另外地包括药学上可接受的佐剂。

[0353] 本披露还延伸至制备所述组合物的方法,例如制备药物或诊断组合物,包括加入并且混合本披露的分子(例如本发明披露的水解分子)连同药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体中的一者或多者。

[0354] 本披露的抗体可以是药物或诊断组合物中唯一的活性成分或者可以伴随其他活性成分。

[0355] 该药物组合物适当地包括治疗有效量的根据本披露所述的分子。如本文所使用的术语“治疗有效量”是指对治疗、改善或预防目标疾病或病症所需的治疗剂的量或对展现出可检测的治疗或预防作用所需的治疗剂的量。治疗有效量可以最初或者在细胞培养分析中或者在动物模型中,通常在啮齿类动物、兔、狗、猪或灵长类动物中估算。动物模型也可用于确定合适的浓度范围和给药途径。然后可以使用这类信息来确定在人中给药的有用的剂量和途径。

[0356] 人受试者的精确治疗有效量将取决于疾病状态的严重性,患者的总体健康状态,患者的年龄、体重和性别,饮食,给药时间和频率,联合用药,反应敏感性以及对治疗的耐受/应答。这个量可以通过常规实验测定并且在临床医生的判断范围内。总体而言,治疗有效量将为从0.01mg/kg到50mg/kg,例如0.1mg/kg到20mg/kg。药物组合物可以便利地以每剂包含预定量的本发明的活性剂的单位剂型呈现。本披露的分子给予的实际剂量取决于待治疗病症的性质,例如存在的疾病/炎症的程度,以及该分子是被防治性地使用还是用于治疗已存在的病症。

[0357] 组合物可以单独给予患者,或者可以与其他药剂、药物或激素一起组合(例如同时、相继或分开)给药。

[0358] 药学上可接受的载体本身不应诱导产生对接受组合物的个体有害的抗体并且不应有毒。适合的载体可以为大的、代谢缓慢的大分子,如蛋白、多肽、脂质体、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物以及失活的病毒粒子。

[0359] 治疗组合物中的药学上可接受的载体可以另外地包含液体,如水、盐水、甘油以及乙醇。另外,辅助物质如润湿剂或乳化剂或pH缓冲物质,可以存在于这类组合物中。这些载

体使药物组合物能够配制为片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液以及悬浮液，用于被患者摄取。

[0360] 用于给药的适合形式包括适于胃肠外给药的形式，例如通过注射或输注，例如通过快速注射或持续输注。当产品用于注射或输注时，它可以采取在油性或水性运载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式，并且它可以包含制剂，如助悬剂、防腐剂、稳定剂和/或分散剂。可替代地，本披露的分子可以呈干燥的形式，用于使用前用适当无菌液体重构。

[0361] 适当地，在根据本披露的配制品中，最终配制品的pH值不类似于抗体的等电点的值，举例来说，如果配制品的pH是7，那么pI为从8-9或更高可能是适当的。尽管不希望受理论所约束，但认为这可最终提供具有改进的稳定性的最终配制品，例如抗体保持在溶液中。

[0362] 本发明的药物组合物可以通过许多途径给予，包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、透皮、经皮（例如参见W098/20734）、皮下、腹膜内、鼻内、肠内、局部、舌下、阴道内或直肠途径。无针注射器（hypospray）也可以用于给予本发明的药物组合物。典型地，可将这些治疗组合物制备为液体溶液或悬浮液形式的注射剂。也可以制备在注射前适于溶于或悬浮于液体运载体中的固体形式。

[0363] 组合物的直接递送总体上将通过皮下、腹膜内、静脉内或肌内注射或者递送到组织的间质间隙来实现。组合物还可以给予到病灶内。剂量治疗可以是单剂量方案或多剂量方案。

[0364] 应当理解，组合物包括多肽，并且因此它将易于在胃肠道中降解。因此，如果组合物有待通过使用胃肠道的途径给予，那么组合物将需要包含保护多肽免受降解但一旦它们从胃肠道吸收就释放抗体的药剂。

[0365] 药学上可接受的载体的全面论述在雷明登氏制药科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）（马克出版公司（Mack Publishing Company），新泽西州（N.J.）1991）中是可获得的。

[0366] 在一个实施例中，配制品作为用于包括吸入在内的局部给药的配制品提供。

[0367] 适合的可吸入制剂包括可吸入粉剂、包含推进剂气体的计量气雾剂或不含推进剂气体的可吸入溶液。包含活性物质的根据本披露的可吸入粉剂可以仅由上述活性物质或上述活性物质与生理学上可接受的赋形剂的混合物组成。

[0368] 这些可吸入粉剂可以包括单糖（例如葡萄糖或阿拉伯糖）、二糖（例如乳糖、蔗糖、麦芽糖）、寡聚糖和多糖（例如葡聚糖）、多元醇（例如山梨醇、甘露糖醇、木糖醇）、盐（例如氯化钠、碳酸钙）或这些彼此的混合物。适合使用单糖或二糖，使用乳糖或葡萄糖，尤其但非独占地以其水合物的形式。

[0369] 用于肺中沉积的粒子要求粒度小于10微米，如1-9微米，例如从0.1到5 μm ，特别地从1到5 μm 。活性成分（如抗体）的粒度是最重要的。

[0370] 可以用于制备可吸入气雾剂的推进剂气体为本领域中已知。适合的推进剂气体是选自以下各项中：烃，如正丙烷、正丁烷或异丁烷；和卤代烃，如甲烷、乙烷、丙烷、丁烷、环丙烷或环丁烷的氯化和/或氟化衍生物。上述推进剂气体可以单独使用或以其混合物使用。

[0371] 具体来说，适合的推进剂气体为选自以下各项中的卤代烷烃衍生物：TG11、TG 12、TG 134a以及TG227。在上述卤代烃中，TG134a（1,1,1,2-四氟乙烷）和TG227（1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷）和其混合物是特别适合的。

[0372] 包含推进剂气体的可吸入气雾剂还可以包含其他成分,如共溶剂、稳定剂、表面活性剂(表面活性物质)、抗氧化剂、润滑剂以及用于调节pH值的器件。所有这些成分均为本领域已知。

[0373] 根据本发明的包含推进剂气体的可吸入气雾剂可以包含按重量计最多5%的活性物质。根据本发明的气雾剂包含例如按重量计0.002%到5%、按重量计0.01%到3%、按重量计0.015%到2%、按重量计0.1%到2%、按重量计0.5%到2%或按重量计0.5%到1%的活性成分。

[0374] 可替代地,对肺的局部给药还可以通过液体溶液或悬浮液配制品给予,例如采用如喷雾器例如连接到压缩器的喷雾器(例如连接到由弗吉尼亚州里奇蒙的帕里呼吸设备公司(Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.)生产的Pari Master(R)压缩器的Pari LC-Jet Plus(R)喷雾器)的装置。

[0375] 本披露的分子可以分散于溶剂中例如以溶液或悬浮液的形式递送。它可以悬浮于适当生理溶液例如盐水或其他药理学上可接受的溶剂或缓冲溶液中。

[0376] 治疗性悬浮液或溶液配制品还可以包含一种或多种赋形剂。赋形剂为本领域熟知,并且包括缓冲液(例如柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液以及碳酸氢盐缓冲液)、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸、磷脂、蛋白(例如血清白蛋白)、EDTA、氯化钠、脂质体、甘露糖醇、山梨糖醇以及甘油。溶液或悬浮液可以囊封在脂质体或生物可降解微球体内。配制品总体上将采用无菌生产工艺以基本上无菌的形式提供。

[0377] 这可以包括通过以下方式产生和灭菌:利用本领域的普通技术人员熟悉的方法,过滤用于配制分子于无菌缓冲溶剂溶液中的无菌悬浮液的缓冲溶剂/溶液,并且将该配制品分配到无菌容器中。

[0378] 治疗

[0379] 本披露还延伸到通过给予治疗有效量的根据本披露的分子或组合物(例如包括该分子的药物组合物)来治疗对其有需要的患者的方法。

[0380] 在一个实施例中,提供了本披露的分子或包括该分子的组合物,其用于治疗,特别是用于治疗本文所述的疾病或病症(例如癌症)。

[0381] 在一个实施例中,提供了本披露的分子或包括该分子的组合物在生产用于治疗本文所述的病症或疾病(例如癌症)的药剂中的用途。

[0382] 因此,本发明的分子在治疗和/或预防病理状态中是有用的。

[0383] 因此,提供了用于通过给予例如在药物配制品中的治疗有效量的分子在治疗中使用的根据本发明的分子。在一个实施例中,根据本披露的分子被局部给予至肺,例如通过吸入。

[0384] 本发明提供的抗体在治疗包括炎性疾病和障碍、免疫疾病和障碍、纤维化障碍和癌症的疾病或障碍中是有用的。

[0385] 术语“炎性疾病”或“障碍”和“免疫疾病或障碍”包括类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、斯提耳氏病(still's disease)、穆克尔韦尔斯病(Muckle Wells disease)、牛皮癣、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、SLE(系统性红斑狼疮)、哮喘、过敏性鼻炎、特应性皮炎、多发性硬化、血管炎、I型糖尿病、移植和移植物抗宿主病。

[0386] 术语“纤维化障碍”包括特发性肺纤维化(IPF)、系统性硬化症(或硬皮病)、肾纤维

化、糖尿病性肾病、IgA肾病、高血压、终末期肾病、腹膜纤维化(连续不卧床腹膜透析)、肝硬化、年龄相关性黄斑变性(ARMD)、视网膜病变、心脏反应性纤维化、瘢痕形成、瘢痕疙瘩、烧伤、皮肤溃疡、血管成形术、冠状动脉搭桥手术、关节成形术和白内障手术。

[0387] 术语“癌症”包括由在皮肤或更常见地身体器官例如:乳腺、卵巢、前列腺、结肠、肺、肾、胰腺、胃、膀胱或肠的衬里中发现的上皮产生的恶性新生长。癌症倾向于渗入邻近组织并扩散(转移)至远处器官,例如:骨、肝、肺或脑。

[0388] 待治疗的受试者可以是动物。然而,在一个或多个实施例中,组合物适合给予人受试者。

[0389] 实例

[0390] 以下实例采用了本文称为T289C的单克隆抗体。

[0391] AC₄G1cNAz 四酰基化的N-叠氮乙酰基葡萄糖胺

[0392] ADC 抗体药物轭合物。

[0393] BCN 二环[6.1.0]壬炔

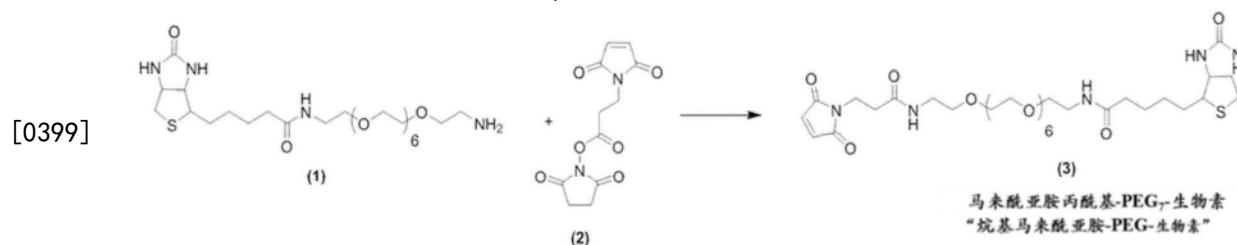
[0394] BME β -巯基乙醇

[0395] DTT 二硫苏糖醇

[0396] MMAE 三(2-羧基乙基)膦

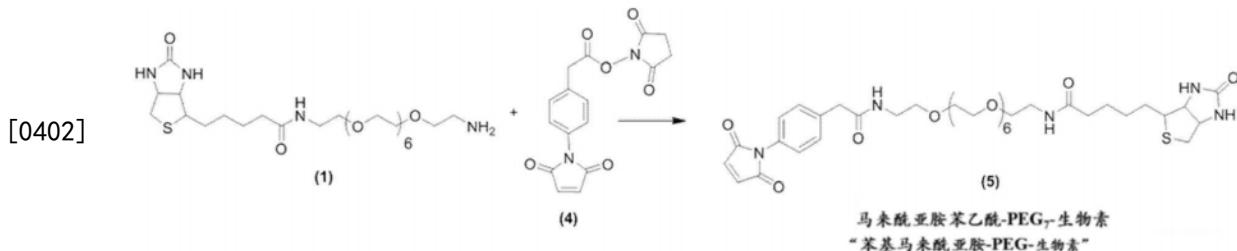
[0397] PAB 对-氨基苄基醇

[0398] 实例1 马来酰亚胺丙酰基-PEG₇-生物素的合成



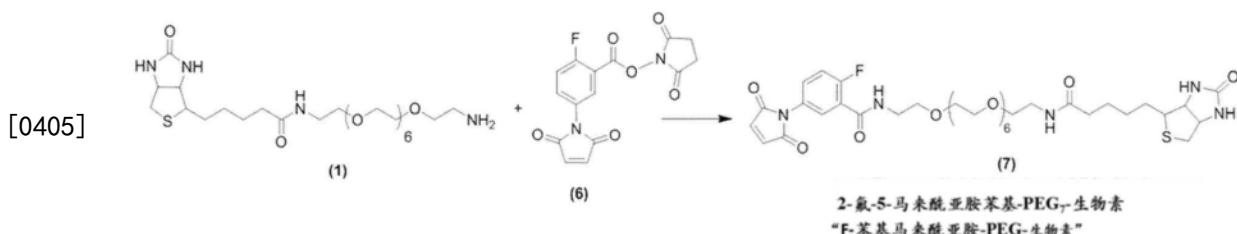
[0400] 在室温,在N₂下,向生物素-PEG7胺(1) (100mg, 0.168mmol)于无水二氯甲烷(7mL)中的搅拌溶液中加入马来酰亚胺丙酸NHS酯(2) (49.2mg, 0.186mmol, 1.1当量)。搅拌1h之后, TLC分析表明反应的完成,届时加入1N HCl (2mL)。分离有机溶液,用盐水进行洗涤并且经Na₂S0₄干燥。将在真空下蒸发之后获得的粗产物通过硅胶快速柱色谱法纯化,用分级梯度的在二氯甲烷中的MeOH (v/v=1:30、1:20和1:10)洗脱,以提供靶化合物,呈蜡状固体的马来酰亚胺丙酰基-PEG₇-生物素(3) (65mg, 0.087mmol, 52%产率)。¹H NMR (CDCl₃) δ 7.01 (br s, 1H), 6.96 (br s, 1H), 6.70 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 4.51 (m, 1H), 4.33 (m, 1H), 3.84 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.62-3.66 (m, 24H), 3.53 (m, 4H), 3.40 (m, 4H), 3.15 (m, 1H), 2.88-2.96 (m, 1H), 2.73 (d, J=12.6Hz, 1H), 2.52 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.24 (t, J=7.0Hz, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.45 (m, 2H).

[0401] 实例2 马来酰亚胺苯基乙酰基-PEG₇-生物素的合成



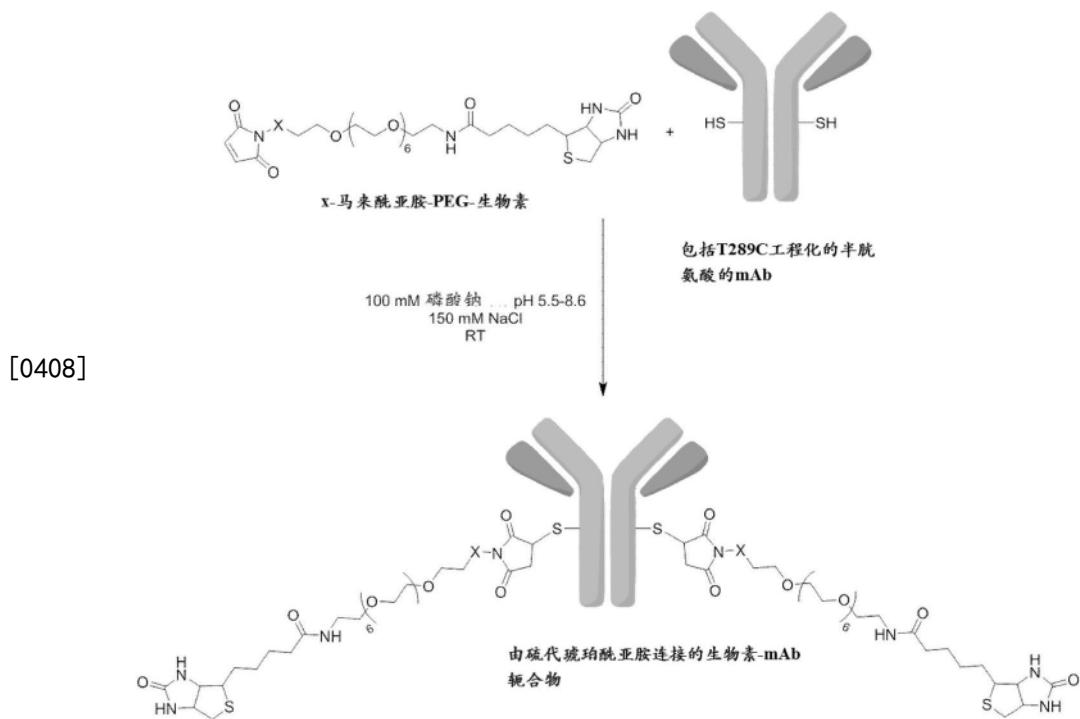
[0403] 在环境温度,在N₂下,将生物素-PEG₇-NH₂(1) (0.25g, 0.42mmol)和马来酰亚胺苯基乙酸NHS酯(4) (0.2g, 0.609mmol)于乙腈(10mL)中的混合物搅拌过夜。在真空下去除溶剂,并且将获得的残余物通过硅胶快速柱色谱法纯化,用分级梯度的在二氯甲烷中的二氯甲烷与MeOH(v/v 1:30、1:20、1:10:1和1:5的比率)洗脱,以提供靶产物,呈油状的马来酰亚胺苯基乙酰基-PEG₇-生物素(5) (70mg, .087mmol, 21%产率),连同如通过¹H NMR显示的期望产物和水解形态在3:1比率的190mg混合物,以及15mg的1:2混合物。¹H NMR (CDCl₃) δ 7.41, 7.30 (AB类型, J_{AB} = 8.3Hz, 4H) [7.64, 7.24 (AB类型, J_{AB} = 9.2Hz, 4H) 副成分], 6.85 (s, 2H) [6.23 (d, J = 7.5Hz, 1H), 6.47 (d, J = 7.5Hz, 1H), 副成分], 6.63 (br s, 1H), 6.55 (br s, 1H), 5.83 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 3.63-3.40 (m, 34H), 3.15 (m, 1H), 2.90 (d-AB类型, J_{AB} = 12.9, J = 4.7Hz, 1H), 2.72 (AB类型, J_{AB} = 12.9Hz, 1H), 2.22 (t, J = 7.1Hz, 2H), 1.68 (m, 4H), 1.46 (m, 2H)。MS (ESI) m/z 830 (M+Na), 825 (M+NH₄, 基峰), 808 (M+1)。

[0404] 实例3 2-氟-5-马来酰亚胺苯基-PEG₇-生物素的合成



[0406] 在环境温度,在N2下,将生物素-PEG7-NH2(1) (0.1g, 0.168mmol, 1当量)以及2-氟-5-马来酰亚胺苯酚NHS酯(6) (0.084g, 0.252mmol, 1.5当量)于二氯甲烷(1mL)中的混合物搅拌过夜。在真空下去除溶剂,并且将获得的残余物通过LH20柱尺寸排阻色谱法(SEC)纯化,用MeOH/二氯甲烷(v/v 1:1)洗脱,以提供靶产物,呈油状的2-氟-5-马来酰亚胺苯基-PEG7-生物素(7) (28mg, 0.034mmol, 20.5%产率),如通过HPLC显示的,其包含大约10%水解形态。还获得额外的期望产物和水解形态在3:2比率的90mg混合物。¹H NMR (CDCl₃) δ 8.05 (dd, J = 6.7, 2.9Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 4.5, 2.7Hz, 1H), 7.23 (m, 1H) [8.20 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.19 (m, 1H), 副成分], 6.88 (s, 2H) [6.45, 6.24 (AB类型, JAB = 12.9Hz, 2H), 副成分], 6.63 (br s, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 3.66-3.54 (m, 32H), 3.43 (m, 2H), 3.14 (m, 1H), 2.90 (d-AB类型, JAB = 12.7, J = 5.0Hz, 1H), 2.73 (AB类型, JAB = 12.7Hz, 1H), 2.22 (m, 2H), 1.73 (m, 4H), 1.44 (m, 2H)。MS (ESI) m/z 835 (M+Na), 829 (M+NH4), 813 (M+1, 基峰)。

[0407] 实例4用以轭合x-马来酰亚胺-PEG-生物素与mAb的通用程序



[0409] 其中x代表如上针对具有化学式(I)的化合物所定义的X,并且任选地进一步包括如针对具有化学式(I)的化合物所定义的Y。

[0410] x-马来酰亚胺-PEG-生物素分几个步骤与mAb(包括Fc的T289C突变)结合。首先,通过将5mL在10mM PBS中的1.6mg/mL mAb溶液(pH 7.2)(8mg mAb, 53.3nM, 1当量)与43μL在水中的50mM TCEP溶液(2.15μmol, 40当量)合并,随后在37℃温和混合1小时,将mAb轻微还原以产生游离巯基。将还原的mAb转移至slide-a-lizer透析盒(10K MWCO)中,并用PBS, 1mM EDTA, pH 7.2-7.8, 4℃透析24小时,更换缓冲液几次。通过加入脱氢抗坏血酸(21μL的在DMSO中的50mM储备液, 1.1μmol, 20当量),随后在室温下轻轻混合4小时,将还原的mAb氧化以重整内部二硫键。通过加入1M磷酸钠(一碱针对pH 5.5, 二碱针对pH 8.6, 或储备液调节至pH 7.4)至100mM的最终磷酸盐浓度和1.3mg/mL的mAb浓度,将氧化的mAb溶液调节到期望pH。接下来,将1.15mL mAb溶液(1.5mg, 10nmol, 1当量)等分到小瓶中,随后添加x-马来酰亚胺-PEG-生物素储备液(2μL的在DMAc中的10mM储备液, 20nmol, 2当量)。将该反应混合物简短涡旋并进一步孵育所期望的时间量,随后添加N-乙酰基半胱氨酸(10μL的在水中的100mM溶液, 1μmol, 100当量),并进一步孵育15分钟以淬灭未反应的马来酰亚胺。所有结合反应在室温(22℃)在环境气氛下进行。注意,相对于mAb而言的2当量x-马来酰亚胺-PEG-生物素=相对于mAb中包含的游离半胱氨酸而言1当量x-马来酰亚胺-PEG-生物素。根据需要修改该通用程序以获得期望反应化学计量(即不同的马来酰亚胺:mAb进料)。

[0411] ADC样品是使用配备有RP-HPLC柱(安捷伦Poroshell 300SB-C3; 5μm, 2.1mm x 75mm; 部件号码660750-909)的安捷伦6520B Q-TOF质谱仪分析。高效液相色谱(HPLC)参数如下:流速, 0.4ml/min;流动相A是0.1% (v/v) 甲酸于HPLC级H₂O中,并且流动相B是0.1% (v/v) 甲酸于乙腈中。将柱以90% A/10% B平衡,其也被用以将ADC样品脱盐,随后以40% A/60% B洗脱。针对100-3000m/z, 阳极, 气体温度350℃, 喷雾器压力481b/in², 以及毛细管电压5,000V收集质谱数据。使用供应商提供的(安捷伦v.B.04.00)MassHunter定性分析软件分析数据,并且使用来自去卷积光谱的峰强度来导出反应物和产物的相对比例以及反应动

力学。

[0412] 实例5轭合效率和水解百分比的计算

[0413] 轭合效率的计算

[0414] 使用以下方程从去卷积质谱的峰强度计算轭合效率和药物:抗体比率 (DAR) :

$$[0415] \text{ 轲合效率} = \frac{a+b+c}{a+b+c+d+e} \times 100$$

方程 1

$$[0416] DAR = \frac{a+b+c}{a+b+c+d+e} \times 2$$

方程 2

[0417] a=G0+1峰强度

[0418] b=G0+1+Na/H₂O峰强度

[0419] c=G0+1+Na/H₂O+Na峰强度

[0420] d=G0峰强度

[0421] e=G0+Na/H₂O峰强度

[0422] DAR=药物:抗体比率。对于此研究,轭合到mAb的任何分子都被认为是“药物”

[0423] 计算针对T289C mAb-轭合的硫代琥珀酰亚胺的水解百分比的方法

[0424] 使用以下方程从去卷积质谱的峰强度计算水解百分比值:

$$[0425] \text{ 水解百分比} = \frac{b+c-[a*(l+m)]}{a+[b-(a*l)]+[c-(a*m)]} \times 100$$

方程 3

[0426] a==重链轭合物的峰强度=(HC+1)

[0427] b==重链轭合物+H₂O/Na的峰强度=(HC+1+H₂O/Na)

[0428] 注意:重链轭合物+23amu和+18amu两者都包括在此值中。在中间水解值这些峰不可解析,并且在针对 (HC+1+H₂O) 以及 (HC+1+Na) 预期的值之间出现了单个峰。

[0429] c=重链轭合物+H₂O+Na的峰强度=(HC+1+H₂O+Na)。

[0430] l=在T=0时b/a

[0431] m=在T=0时c/a

[0432] 实例6半衰期计算

[0433] 针对伪一级反应(水解和解轭合)使用方程4并且针对二级反应(轭合)使用方程5从导出的速率常数计算半衰期:

$$[0434] T_{1/2} = \frac{0.693}{k_{obs}}$$

方程 4

$$[0435] T_{1/2} = \frac{1}{k[SH_0]}$$

方程 5

[0436] [SH]₀=初始巯基浓度

[0437] 实例7 1当量马来酰亚胺:巯基的x-马来酰亚胺-PEG-生物素轭合的分析

[0438] 通过用PBS pH 7.2稀释到0.2mg/mL,随后将50μL的mAb溶液与5μL的TCEP (0.5M于水中) 合并,制备x-马来酰亚胺-PEG-生物素mAb轭合物以用于LC/MS分析。在注射 (15μL) 至 LC/MS中之前,将此混合物在室温下孵育5min以还原二硫键。代表性数据示于图1A和1B中。

[0439]

表 1	未反应的 mAb		烷基马来酰亚胺-PEG-生物素轭合物	
	峰	强度	峰	强度
轻链	23616.0	2241350	23616.7	1859865
重链 (G0)	50756.7	2520546	50758.6	94051
重链 (G0+Na)	50777.3	703916	N/D	-----
重链 (G1)	50918.7	954244	N/D	-----
重链 (G1+Na)	50939.3	288623	N/D	-----
重链 (G0+1)	-----	-----	51503.9	860388
重 链 (G0+1+Na/H ₂ O)	-----	-----	51524.4	303709

[0440] 实例8 0.5当量马来酰亚胺:巯基的x-马来酰亚胺-PEG-生物素轭合物的分析

[0441] 如上实例7所述的制备x-马来酰亚胺-PEG-生物素mAb轭合物,除了使用1当量马来酰亚胺:mAb。注意,1当量x-马来酰亚胺-PEG-生物素等于0.5当量x-马来酰亚胺-PEG-生物素:巯基。

[0442] 1) 烷基马来酰亚胺-PEG-生物素 (比较器) 参见图2A

[0443]

表 2	未反应的 mAb	
	峰	强度
重链 (G0)	50757.9	811198
重链 (G0+Na)	50777.7	234247
重链 (G0+1)	51503.4	781791

[0444]	重链 (G0+1+Na/H ₂ O)	51523.9	254456
	重链 (G0+1+Na/H ₂ O+Na)	51545.6	115361
	计算的轭合和 DAR	52%, 1.05	

[0445] 2) 苯基马来酰亚胺-PEG-生物素参见图2B

[0446]	表 3	未反应的 mAb	
		峰	强度
	重链 (G0)	50756.9	790494
	重链 (G0+Na)	50776.7	237800
	重链 (G0+1)	51564.8	559793
	重链 (G0+1+Na/H ₂ O)	51583.7	266980
	重链 (G0+1+Na/H ₂ O+Na)	51605.8	103090
	计算的轭合和 DAR	48%, 0.95	

[0447] 3) 氟苯基马来酰亚胺-PEG-生物素参见图2C

[0448]	表 3	未反应的 mAb	
		峰	强度
	重链 (G0)	50757.7	913288
	重链 (G0+Na)	50777.7	265152
	重链 (G0+1)	51569.3	434825
	重链 (G0+1+Na/H ₂ O)	51587.7	420700
	重链 (G0+1+Na/H ₂ O+Na)	51609.5	145829
[0449]	计算的轭合和 DAR	51%, 1.02	

[0450] 此数据显示该分析方法是可靠的,即50%反应进料给出约50%轭合。

[0451] 实例9 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在22℃的轭合效率

[0452] 如上所述的制备x-马来酰亚胺-PEG-生物素mAb轭合物,使用2当量x-马来酰亚胺-PEG-生物素:mAb。注意,2当量x-马来酰亚胺-PEG-生物素:mAb等于1当量x-马来酰亚胺-PEG-生物素:巯基。通过还原糖基化质谱分析反应产物,并使用方程式1计算轭合效率。结果示于图3和图4中。

[0453] 实例10 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 5.5、22℃的轭合动力学

[0454] 以摩尔浓度单位分析轭合数据以确定动力学常数。由对1/[SH]与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定二级速率常数。结果示于图5中。

[0455] 实例11 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 7.4、22℃的轭合动力学

[0456] 以摩尔浓度单位分析轭合数据以确定动力学常数。由对1/[SH]与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定二级速率常数。结果示于图6中。

[0457] 实例12 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 8.6、22℃的轭合动力学

[0458] 以摩尔浓度单位分析轭合数据以确定动力学常数。由对1/[SH]与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定二级速率常数。结果示于图7中。

[0459] 关于与T289C mAb轭合的x-马来酰亚胺-PEG-生物素动力学的总结

表 4	pH 5.5		pH 7.4		pH 8.6	
	二级速率常数 ($k_2, M^{-1}s^{-1}$)	轭合 $T_{1/2}$ (min)	二级速率常数 ($k_2, M^{-1}s^{-1}$)	轭合 $T_{1/2}$ (min)	二级速率常数 ($k_2, M^{-1}s^{-1}$)	轭合 $T_{1/2}$ (min)
[0460]	烷基马来酰亚胺-PEG-生物素	13	74.2	0.5×10^3	1.73	$\sim 2.8 \times 10^4$
[0461]	苯基马来酰亚胺-PEG-生物素	23.8	40.3	1.3×10^3	0.72	$\sim 3.4 \times 10^4$
	F-苯基马来酰亚胺-PEG-生物素	55.4	17.4	4.5×10^3	0.21	$\sim 3.9 \times 10^4$

[0462] 文献比较:

[0463] 1)N-乙基马来酰亚胺与半胱氨酸在pH 7.0的反应, $k_2 = 1.62 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$

[0464] 李(Li), J.; 徐(Xu), Q.; 科尔特斯(Cortes), D. 等人, 细菌钾通道的两亲N-端末尾中取代的半胱氨酸与亲水和疏水的马来酰亚胺的反应 (Reaction of cysteines

substituted in the amphipathic N-terminal tail of a bacterial potassium channel with hydrophilic and hydrophobic maleimides). PNAS 2002, 99(18), 11605-11610.

[0465] 2) N-乙基马来酰亚胺与β-巯基乙醇在pH 7.0的反应, $k_2 = 0.71 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$

[0466] 莫瑟 (Mosser), G., 味细胞刺激的响应的N-取代的马来酰亚胺失活 (N-Substituted maleimide inactivation of the response of taste cell stimulation). 神经生物学杂志 (J. Neurobiol.) 1976, 7(5), 457-468。

[0467] 实例13预孵育后x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb的反应动力学: 马来酰亚胺水解的间接测量

[0468] 将x-马来酰亚胺-PEG-生物素预孵育于具有不同pH的缓冲溶液中以评估其随着时间的稳定性和巯基结合效率。此测定间接监测马来酰亚胺水解, 因为水解的马来酰亚胺与巯基是不反应的。如上所述的, 具有T289C Fc突变的抗体被还原和氧化, 并于包含50mM磷酸钠的PBS (pH 7.4) 中被调节至1.5mg/mL。通过将20μL x-马来酰亚胺-PEG-生物素溶液 (10mM 溶液于DMAc中) 和180μL缓冲液在期望pH合并 (最终x-马来酰亚胺-PEG-生物素浓度 = 1mM) 在缓冲液 (100mM磷酸钠pH 5.5、7.4、8.6) 中制备马来酰亚胺溶液, 并在22°C孵育持续确定的时间间隔, 之后与mAb反应。针对结合反应, 将267μL mAb (1.5mg/mL, 2.7nmol, 1当量) 与5.3μL缓冲液孵育的x-马来酰亚胺-PEG-生物素溶液 (5.4nmol, 2当量) 合并。添加马来酰亚胺溶液不影响mAb溶液的pH。该结合反应在22°C在pH 7.4进行1.5小时。反应之后在室温下将样品用DTT还原5min并且通过质谱法分析。使用方程1计算结合百分比。结果示于图8中。

[0469] 此数据显示马来酰亚胺反应性由于水解随着时间损失。在N-芳基马来酰亚胺的情况下, 马来酰亚胺水解速率增加。总的来说, 马来酰亚胺水解慢于巯基-马来酰亚胺结合, 这解释了为什么在pH 8.6观察到N-芳基马来酰亚胺的有效结合。可以使用随后的数据比较半衰期。

[0470] 实例14在pH 5.5、22°C下马来酰亚胺水解动力学

[0471] 也以摩尔浓度单位分析马来酰亚胺水解数据以确定动力学常数。由对ln[马来酰亚胺]与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定伪一级速率常数。结果示于图9中。

[0472] 实例15在pH 7.4、22°C下马来酰亚胺水解动力学

[0473] 也以摩尔浓度单位分析马来酰亚胺水解数据以确定动力学常数。由对ln[马来酰亚胺]与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定伪一级速率常数。结果示于图10中。

[0474] 实例16在pH 8.6、22°C下马来酰亚胺水解动力学

[0475] 也以摩尔浓度单位分析马来酰亚胺水解数据以确定动力学常数。由对ln[马来酰亚胺]与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定伪一级速率常数。结果示于图11中。

[0476] x-马来酰亚胺水解动力学的总结

表 5 在 22°C 马 来酰亚 胺水解 的动 力学常数	pH 5.5 ^a		pH 7.4		pH 8.6	
	伪一级速 率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	水解 T _{1/2} (hr)	伪一级 速率常 数 (k_{obs} , s ⁻¹)	水解 T _{1/2} (hr)	伪一级 速率常 数 (k_{obs} , s ⁻¹)	水解 T _{1/2} (hr)
[0477]	烷基马来酰亚胺-PEG-生物素	ND	ND	2.3x10 ⁻⁵	7.7	2x10 ⁻⁴
	苯基马来酰亚胺-PEG-生物素	ND	ND	8.5x10 ⁻⁵	2.3	7.6x10 ⁻⁴
[0478]	F-苯基马来酰亚胺-PEG-生物素	ND	ND	1.7x10 ⁻⁴	1.1	1.9x10 ⁻³

- [0479] a) 孵育60min之后未检测到显著水解
- [0480] 文献比较:
- [0481] 1) N-苯基马来酰亚胺在pH 7.6、25°C的水解 $k_{obs} = 7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$
- [0482] 奥莱克桑德(Oleksandr), K.; 勒里什(Leriche), G. 等人, 用3-芳基丙炔腈进行的半胱氨酸的选择性不可逆的化学示踪(Selective Irreversible chemical tagging of cysteine with 3-arylpropionitriles). 生物轭合化学(Bioconjug. Chem.) 2014, 25, 202-206。
- [0483] 2) 马来酰亚胺(未取代)在pH 8.38、30°C的水解, $k_{obs} = 1.51 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
- [0484] 卡恩(Khan), M.N., 马来酰亚胺的碱法水解的动力学和机制(Kinetics and mechanism of the alkaline hydrolysis of maleimide). 药物科学杂志(J. Pharm. Sci.) 1984, 73(12), 1767-1171。
- [0485] 此数据显示马来酰亚胺水解比巯基-马来酰亚胺轭合慢得多, 因此N-芳基马来酰亚胺对于轭合是有用的试剂。甚至在F-苯基马来酰亚胺于pH 8.6的最极端的例子中, 马来酰亚胺水解半衰期是6分钟而巯基轭合在15秒完成。
- [0486] 实例17 x-马来酰亚胺-PEG-生物素T289C mAb轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解动力学
- [0487] 将x-马来酰亚胺-PEG-生物素mAb轭合物在缓冲溶液中孵育, 并通过LC/MS随着时

间进行监测,以观察硫代琥珀酰亚胺水解。首先,包含该T289C Fc突变(0.75mg,5nmol,1当量)的mAb与577mL PBS(pH 7.2)中的 α -马来酰亚胺-PEG-生物素(50nmol,5mL的在DMAC中的10mM储备液,10当量)反应。允许轭合反应进行5分钟并且然后用N-乙酰基半胱氨酸(500nmol,4mL的在水中的100mM储备液,100当量)淬灭并进一步孵育5分钟。然后将该反应混合物与包含0.5mM EDTA和1M磷酸钠的PBS在期望pH合并以实现0.65mg/mL mAb、100mM磷酸盐、0.5M EDTA以及150mM NaCl的最终浓度。样品制备之后,去除一个等分试样,并且用75mM磷酸盐缓冲液(pH 5.5)1:3稀释以获得起始时间点样品。然后在期望条件进一步孵育样品,在测定时间点去除等分试样。所有样品立即用75mM磷酸盐缓冲液(pH 5.5)1:3稀释以停止水解反应。然后将样品无菌过滤,用TCEP还原,并通过LC/MS分析。通过向质谱中的mAb轭合物峰添加18amu来证实硫代琥珀酰亚胺水解。使用去卷积质谱中的峰强度和方程3(包括使用 $T=0$ 测量的背景扣除)进行水解的半定量分析。然后将数据转化为硫代琥珀酰亚胺(M)随着时间的损失,并对 $\ln[\text{硫代琥珀酰亚胺}]$ 与秒作图。最佳拟合线的斜率产生硫代琥珀酰亚胺水解的伪一级速率常数。进行额外的实验以确定在1小时处的硫代琥珀酰亚胺水解($n=3$)。

- [0488] 实例18在pH 7.4、22°C下PEG-生物素T289C mAb轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解
- [0489] 也以摩尔浓度单位分析硫代琥珀酰亚胺水解数据以确定动力学常数。由对 $\ln[\text{马来酰亚胺}]$ 与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定伪一级速率常数。结果示于图12中。
- [0490] 实例19在pH 7.4、37°C下PEG-生物素T289C mAb轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解
- [0491] 也以摩尔浓度单位分析硫代琥珀酰亚胺水解数据以确定动力学常数。由对 $\ln[\text{马来酰亚胺}]$ 与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定伪一级速率常数。结果示于图13中。
- [0492] 实例20在pH 8.6、22°C下PEG-生物素T289C mAb轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解
- [0493] 也以摩尔浓度单位分析硫代琥珀酰亚胺水解数据以确定动力学常数。由对 $\ln[\text{马来酰亚胺}]$ 与时间作图和线性回归分析得到的曲线斜率测定伪一级速率常数。结果示于图14中。
- [0494] T289C mAb-PEG-生物素轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解动力学的总结
- [0495] 表6:PEG-生物素轭合物在mAb位置T289C处的硫代琥珀酰亚胺水解的动力学常数

	pH 7.4, 22°C		pH 7.4, 37°C		pH 8.6, 22°C	
	伪一级速率常数 (k_{obs} , s^{-1})	$T_{1/2}$ (hr)	伪一级速率常数 (k_{obs} , s^{-1})	$T_{1/2}$ (hr)	伪一级速率常数 (k_{obs} , s^{-1})	$T_{1/2}$ (hr)
[0496]	烷基硫代琥珀酰亚胺	2.0×10^{-6}	96.3	1.1×10^{-5}	17.5	1.9×10^{-5}
						10.1

[0497]

苯基硫代琥珀酰亚胺	3.0×10^{-5}	6.4	1.3×10^{-4}	1.5	2.0×10^{-4}	1.0
F-苯基硫代琥珀酰亚胺	4.6×10^{-5}	4.3	2.8×10^{-4}	0.7	4.9×10^{-4}	0.4

[0498] 此数据显示N-芳基硫代琥珀酰亚胺的水解以可易于应用到生产而不会大幅改变标准轭合程序的时间尺度发生。例如,在pH 7.4、22°C进行24小时有效负载轭合将允许轭合和硫代琥珀酰亚胺水解两者在一个步骤中发生。

[0499] 实例21孵育1小时之后,PEG-生物素T289C-mAb轭合物的x-硫代琥珀酰亚胺水解,n=3

[0500] 结果示于图15,绘制为平均值±标准差,n=3。此数据证实用单个样品动力学实验(具有扩展样本集)观察到的趋势。硫代琥珀酰亚胺水解的轻易取决于如下附接至环头氮(ring-head nitrogen)的化学过程:N-烷基<<N-苯基<N-氟苯基。这些实验的相对误差通常小于5%。

[0501] 实例22在存在钼酸钠的情况下,PEG-生物素T289C mAb轭合物的x-硫代琥珀酰亚胺水解

[0502] 在包含钼酸钠的缓冲溶液中孵育x-马来酰亚胺-PEG-生物素mAb轭合物以研究此化合物是否能够增加硫代琥珀酰亚胺水解。随着时间通过LC/MS监测样品,以观察如上所述的硫代琥珀酰亚胺水解。首先,包含该T289C Fc突变(0.5mg,3.3nmol,1当量)的mAb与0.365mL PBS(pH 7.2)中的x-马来酰亚胺-PEG-生物素(50nmol,5mL的在DMAC中的10mM储备液,15当量)反应。允许轭合反应进行5分钟并且然后用N-乙酰基半胱氨酸(500nmol,4mL的在水中的100mM储备液,151当量)淬灭并进一步孵育5分钟。然后将该反应混合物与包含1M钼酸钠的1M PBS在期望pH合并以实现100mM磷酸根盐100mM钼酸盐的最终浓度。加入钼酸盐之后,将该混合物在22°C孵育1小时。1小时之后,将样品用75mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)1:5稀释以停止水解。然后将样品无菌过滤,用TCEP还原,并通过LC/MS分析。通过向质谱中的mAb轭合物峰添加18amu来证实硫代琥珀酰亚胺水解。使用去卷积质谱中的峰强度和方程3进行水解的半定量分析。结果示于图16中。

[0503] 2个样品观察到水解显著增强:

[0504] A)F-苯基马来酰亚胺-PEG-生物素pH 5.5

[0505] B)F-苯基马来酰亚胺-PEG-生物素pH 7.4

		相对水解 ^a (+ 铬酸钠/- 铬酸钠)		
		pH 5.5	pH 7.4	pH 8.6
[0506]	N-烷基硫代琥珀酰亚胺	---	---	---
	N-苯基硫代琥珀酰亚胺	---	1.6	1.2
	N-氟苯基硫代琥珀酰亚胺	52	2.2	1

[0507] a) 未分析显示少于10%水解的样品

[0508] 此数据显示仅N-氟苯基硫代琥珀酰亚胺响应于钼酸盐催化的水解,其他没有。同样,如预期的,催化剂作用在高pH下被削弱。

[0509] 实例23在包含巯基的缓冲液中T289C mAb轭合物对巯基交换的敏感度

[0510] 将生物素-mAb轭合物在含有 β -巯基乙醇(BME)的水性缓冲液中孵育,以激发硫代琥珀酰亚胺键对抗解轭合。 α -马来酰亚胺-PEG-生物素与包含具有很少修饰的如上所述的T289C突变的mAb轭合。在22°C以1当量 α -PEG-马来酰亚胺:巯基进行轭合反应持续15min,随后立即用包含0.5mM EDTA的1X PBS pH 7.2稀释至0.2mg/mL(1.33 μ M mAb)。省略了N-乙酰基半胱氨酸淬灭步骤。对于含有BME的样品,添加BME至1% v/v(143mM)的最终浓度。将样品在环境气氛下在37°C下进一步孵育,无需搅拌。在各个时间点去除等分试样,无菌过滤,用DTT还原,并且然后通过LC/MS分析。分别使用方程1和方程2从质谱的峰高度确定轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解的百分比。将解轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解数据绘制为 \ln [浓度]与时间(s),以从最佳拟合线的斜率获得伪一级速率常数。结果示于图17中。

[0511] 实例24在包含BME的缓冲液中PEG-生物素T289C mAb轭合物的稳定性

表 8: PEG-生物素的解轭合的动力学参数

	pH 7.2, 37°C		pH 7.2, 37°C, +BME	
	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
N-烷基硫代琥珀酰亚胺	1.4x10 ⁻⁷	1375	1.6x10 ⁻⁶	120

[0512]	亚胺			
--------	----	--	--	--

[0513]	表 9: 初始水解和解轭合数据的总结	初始水解 (%)	最大解轭合 - BME (%)	最大解轭合 +BME (%)
		<1%	8%	35
	N-烷基硫代琥珀酰亚胺	<1%	未观察到	18
	N-氟苯基硫代琥珀酰亚胺	<1%	未观察到	10

[0514] 结果示于图18中。此数据显示:1) 在存在游离巯基的情况下,在不同硫代琥珀酰亚胺类型之间观察到可变的稳定性。水解更快的种类显示更少解轭合,2) 在缺少游离巯基的样品缓冲液中,N-烷基硫代琥珀酰亚胺解轭合。同样,此数据显示在N-氟苯基硫代琥珀酰亚胺的情况下,快速去稳定作用可以通过轭合之后不经任何特别处理立即实现。

[0515] 实例25在BME激发测定中观察到的PEG-生物素T289C mAb轭合物在pH 7.2、37°C下的硫代琥珀酰亚胺水解

[0516] 结果示于图19中。

[0517]	表 10: PEG- 生物素 T289C mAb 轲合物在 pH 7.2、37°C 下的硫代琥珀酰亚胺水解的动力学	pH 7.2, 37°C		pH 7.2, 37°C, +BME	
		伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
	N-烷基硫代琥珀酰亚胺 -PEG-生物素	7.1x10 ⁻⁶	27	6.1x10 ⁻⁶	31
	N-苯基硫代琥珀酰亚胺 -PEG-生物素	>3.1x10 ⁻⁵	<6	>3.1x10 ⁻⁵	<6
	N-氟苯基硫代琥珀酰亚胺-PEG-生物素	>3.1x10 ⁻⁵	<6	>3.3x10 ⁻⁵	<6

[0518] 此数据显示N-苯基和N-氟苯基硫代琥珀酰亚胺在前24小时完全水解,这与其他水解数据一致。N-烷基硫代琥珀酰亚胺水解慢得多。

[0519] 实例26在BME激发测定中观察到的硫代琥珀酰亚胺解轭合和水解之间的关系

[0520] 结果示于图20中。

表 11: 从 BME 测定确定的硫代琥珀酰亚胺水解和解轭合的动力学参数

[0521]

	pH 7.2, 37°C, +BME, 水解		pH 7.2, 37°C, +BME, 解轭合	
	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
N-烷基硫代琥珀酰亚胺	6.5x10 ⁻⁶	31	1.6x10 ⁻⁶	120

[0522] 将此数据绘制为:左轴上为解轭合,右轴上为水解。水解和解轭合明显相关。更快的水解速率限制了解轭合的最大量。

[0523] 实例27在温和水解之后,在存在游离巯基的情况下,mAb-生物素轭合物的稳定性

[0524] 将生物素-mAb轭合物在含有β-巯基乙醇(BME)的水性缓冲液中孵育,以激发硫代琥珀酰亚胺键对抗解轭合。在此实验中,使硫代琥珀酰亚胺轭合物在弱碱性条件下经受短暂停育以在稳定性激发之前促进硫代琥珀酰亚胺水解。x-马来酰亚胺-PEG-生物素与包含具有很少修饰的如上所述的T289C突变的mAb轭合。在22°C以1当量x-PEG-马来酰亚胺:巯基进行轭合反应持续15min,随后用N-乙酰基半胱氨酸(相对于mAb而言100当量)猝灭并且进一步反应5分钟。通过加入10% v/v磷酸钠(1M,二碱)将反应混合物调节至pH 8.6并且然后在37°C孵育1小时。然后在4°C针对包含0.5mM EDTA的PBS (pH 7.2)将反应透析24小时。透析之后,通过A280测量(NanoDrop)确认mAb浓度并将样品用包含0.5mM EDTA的1X PBS pH 7.2稀释至0.2mg/mL (1.33μM mAb)。对于含有BME的样品,添加BME至1% v/v (143mM)的最终浓度。将样品在环境气氛下在37°C下进一步孵育,无需搅拌。在各个时间点去除等分试样,无菌过滤,用DTT还原,并且然后通过LC/MS分析。分别使用方程1和方程2从质谱的峰高度确定轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解的百分比。将解轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解数据绘制为ln[浓度]与时间(s),以从最佳拟合线的斜率获得伪一级速率常数。

[0525] 实例28温和水解之后在缓冲液中T289C mAb轭合物对巯基交换的敏感度

[0526]

表 12: 烷基硫代琥珀酰亚胺轭合物的解轭合的动力学参数

	观察到的种类	pH 7.2, 37°C	pH 7.2, 37°C, +BME	
		伪一级速率 常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	伪一级速率 常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
	N-烷基硫代琥珀酰亚胺	ND	1.4x10 ⁻⁶	138

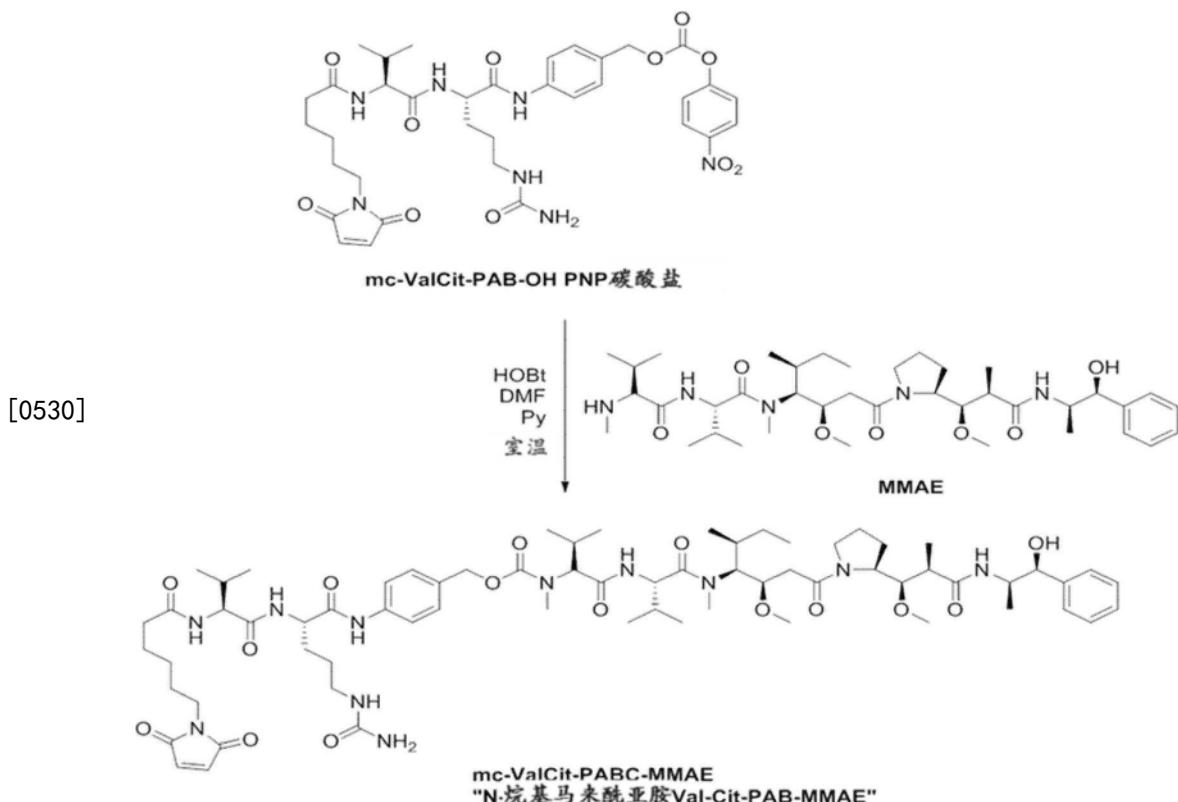
表 13：PEG- 生物素
T289C mAb 链合物的初
始水解和解链合数据的
总结

[0527]

	初始水解 (%)	最大解链合 -BME (%)	最大解链合 +BME (%)
N-烷基硫代琥珀酰亚胺	18	4	27
N-苯基硫代琥珀酰亚胺	91	未观察到	未观察到
N-氟苯基硫代琥珀酰亚胺	96	未观察到	未观察到

[0528] 此数据显示:1)温和水解完全稳定了N-芳基硫代琥珀酰亚胺,但未稳定N-烷基硫代琥珀酰亚胺。同样,来自此实验的巯基介导的N-烷基硫代琥珀酰亚胺解链合的伪一级速率常数与来自该实验而没有预水解的值密切匹配(数据是可再现的)。

[0529] 实例29 N-烷基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE的合成



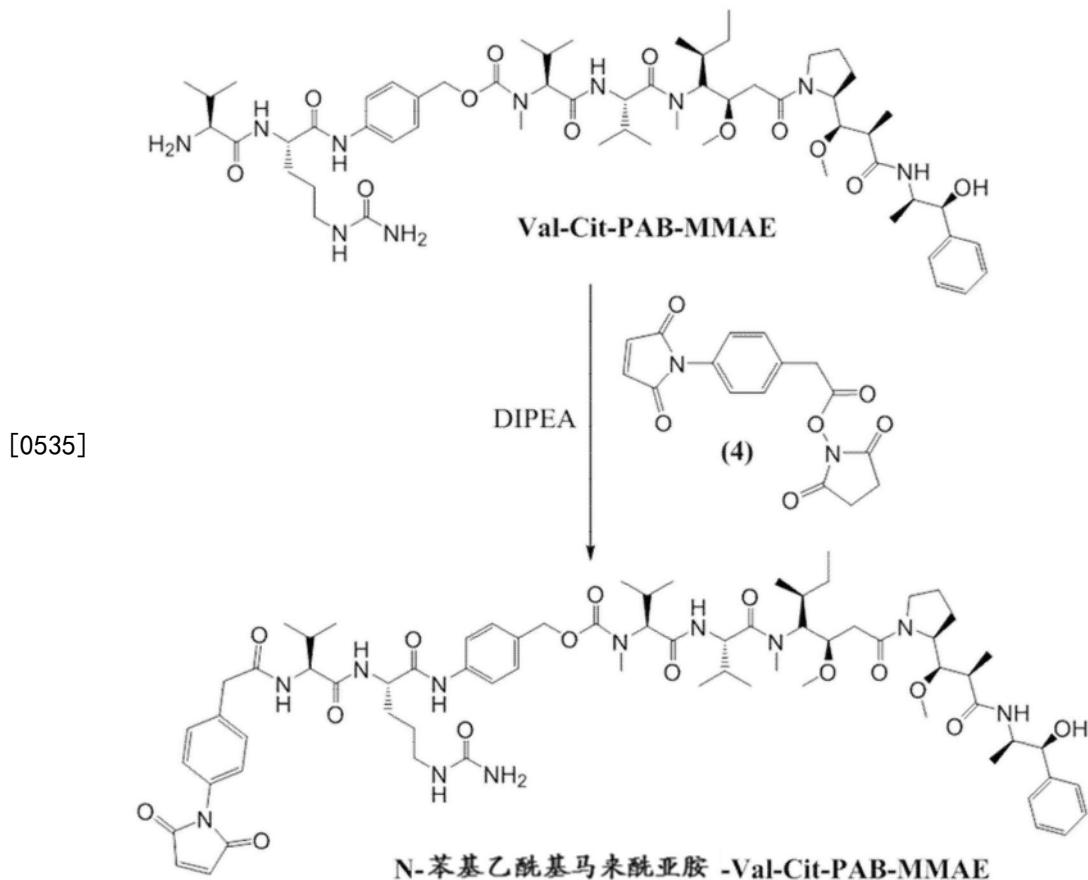
[0531] 根据修饰的文献方法¹,制备马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄基羧基-单-甲基-奥瑞他汀-E (mc-ValCit-PABC-MMAE)。因此,将根据文献方法²新鲜制备的mc-Val-Cit-对氨基苄基醇对硝基苯基碳酸酯(8) (265mg, 0.36mmol, 1.5当量)、MMAE (9) (169mg, 0.24mmol, 1当量)以及N-羟基苯并三唑 (HOEt) (6.48mg, 0.048mmol, 0.2当量)的混合物在DMF (5mL) 中在室温搅拌2min,随后添加吡啶 (38mg, 0.48mmol, 2当量)。搅拌24h之后,在真空下去除挥发性有机物。将获得的残余物用乙酸乙酯和甲醇 (1L) 研磨以提供呈白色粉末状的mc-Val-Cit-PAB-MMAE (10) (220mg, 0.17mmol, 71%产率),通过RP-HPLC分析,其通常

是>95%纯的。如果必要,可以通过C18反相制备型HPLC或尺寸排阻柱色谱法进行进一步纯化。电喷射(ES)-MS m/z 1339(M+Na, 基峰), 1317(M+1)。

[0532] 参考文献:1) 多罗尼娜(Doronina) S0、国(Toki) BE、托葛芙(Torgov) MY、门德尔松(Mendelsohn) BA、考文尼(Cerveny) CG、蔡斯(Chace) DF、德布兰克(DeBlanc) RL、杰亚林(Gearing) RP、博韦(Bovee) TD、西埃加尔(Siegall) CB、弗朗西斯科(Francisco) JA、瓦尔(Wahl) AF、迈耶(Meyer) DL、森特(Senter) PD. 用于癌症治疗的有潜力的单克隆抗体奥瑞他汀轭合物的开发(Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy). 自然生物技术(Nat Biotechnol.) 2003; 21:778-784。

[0533] 2) 杜鲍奇科(Dubowchik) GM、费尔斯通(Firestone) RA、帕迪利亚(Padilla) L、威尔纳(Willner) D、霍夫斯特德(Hofstead) SJ、莫休尔(Mosure) K、科尼普(Knipe) J0、拉斯奇(Lasch) SJ、特雷尔(Trail) PA. 用于从内化免疫轭合物经溶酶体释放多柔比星的组织蛋白酶B-不稳定的二肽接头:酶促药物释放和抗原特异性体外抗癌活性的模型研究(Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity). 生物轭合化学(Bioconjug Chem.) 2002; 13:855-869。

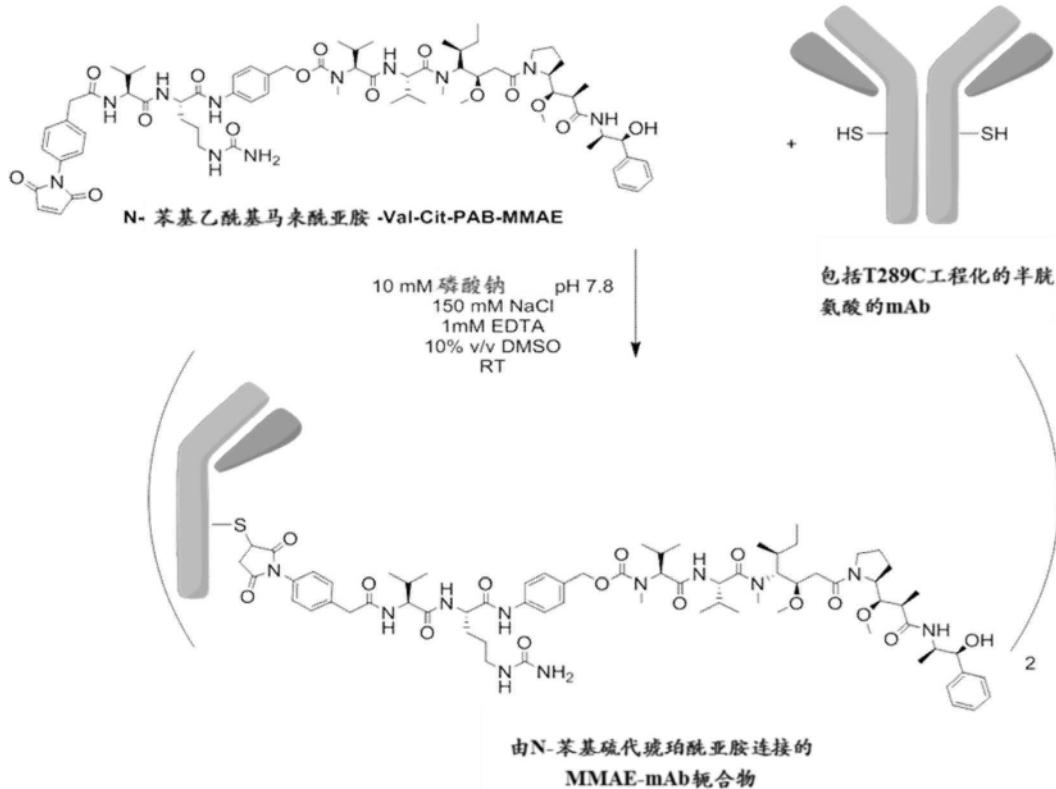
[0534] 实例30 N-苯基乙酰基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE的合成



[0536] 在环境温度,在 N_2 下,向Val-Cit-PAB-MMAE(100mg, 0.089mmol)和马来酰亚胺苯基乙酸NHS酯(4)(43.8mg, 0.133mmol)于DMF(1mL)中的搅拌溶液中加入DIPEA(57.5mg, 0.445mmol)。搅拌过夜之后,MS分析表明产物构造中具有小量起始材料存在。将混合物通过

尺寸排阻色谱法 (SEC) 在LH-20柱上进行初始分离, 用MeOH/二氯甲烷 (v/v 1:1) 洗脱。通过MS监测各级分并将具有期望产物的那些合并。在真空下蒸发至干燥之后, 获得25mg (0.0187mmol, 21%产率) 油状材料。MS在m/z 1391 (M+C1+Na) , 1369 (M+C1, 基峰) , 1360 (M+Na) 和1337 (M+1) 处展现离子簇, 而HPLC显示大约2:1的比率的两个峰。通过半制备型HPLC进一步纯化, 蒸发之后得到2个分别为5mg和6mg的主要级分。然而, 这两种样品显示基本上相同的HPLC和MS。

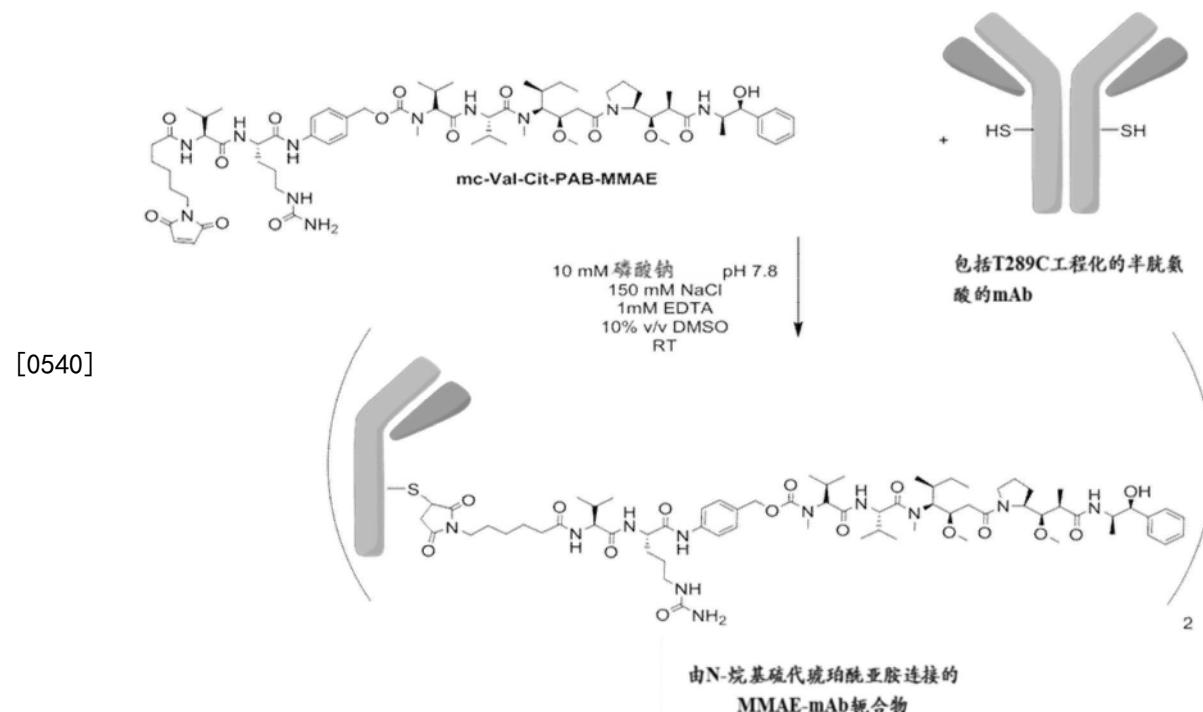
[0537] 实例31制备N-苯基马来酰亚胺Val-Cit-PAB-MMAE T289C mAb轭合物



[0538]

[0539] N-苯基乙酰基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE与mAb (包括Fc的T289C突变) 以若干步轭合。首先, 通过将5mL在10mM PBS中的1.6mg/mL mAb溶液 (pH 7.2) (8mg mAb, 53.3nM, 1当量) 与43μL在水中的50mM TCEP溶液 (2.15μmol, 40当量) 合并, 随后在37℃温和混合1小时, 将mAb轻微还原以产生游离巯基。将还原的mAb转移至slide-a-lizer透析盒 (10K MWCO) 中, 并用PBS, 1mM EDTA, pH 7.2-7.8, 4℃透析24小时, 更换缓冲液几次。通过加入脱氢抗坏血酸 (21μL的在DMSO中的50mM储备液, 1.1μmol, 20当量), 随后在室温下轻轻混合4小时, 将还原的mAb氧化以重整内部二硫键。将氧化的mAb溶液 (2.5mL, 27nmol, 1当量) 与10% v/v DMSO合并, 随后添加N-苯基乙酰基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE (27μL的在DMSO中的10mM 储备液, 270nmol, 10当量)。该反应在室温下进行, 混合1小时并且然后添加N-乙酰基半胱氨酸 (21μL的在水中的100mM储备液, 2.2μmol, 80当量) 以停止该反应。然后将该反应混合物用蒸馏水3倍稀释并且经受CHT色谱以去除游离的未轭合的药物 (Bio-Scale迷你盒CHT II型 40μm介质柱)。经25分钟用从缓冲液A (10mM磷酸盐, pH 7.0) 至缓冲液B (包含2M NaCl的10mM 磷酸盐, pH 7.0) 的梯度洗脱ADC。CHT色谱之后, 在4℃, 通过slide-a-lyzer盒透析将该样品经缓冲液交换至补充有0.5mM EDTA (pH 7.2) 的1X PBS中。对于经受了温和水解的样品, 添加10% v/v磷酸钠溶液 (1M, 二碱), 并且将溶液在37℃孵育1小时。然后将水解样品缓冲液通

过透析交换至补充有0.5mM EDTA的1X PBS (pH 7.2) 中。ADC通过如上所述的还原糖基化的LC/MS表征。分别使用方程1和方程2计算轭合效率和DAR。



[0541] N-烷基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE以与N-苯基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE(见上文)相同的方式与mAb(包括Fc的T289C突变)轭合。

[0542] 实例32 mc-PAB-MMAE T289C mAb ADC的分析

[0543] x-马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE-T289C mAb轭合物的代表性还原糖基化质谱数据示于图22中。

[0544]

表 14

	未反应的 mAb		烷基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE 轼合物		苯基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE 轼合物	
	峰	强度	峰	强度		
轻链	23616.0	2241350	23616.0	638228	23615.9	681096
重链 (G0)	50756.6	2351111	50756.0	32756	50756.0	92886
重链 (G0+Na)	50776.3	693019	未观察	-----	未观察	-----

[0545]

			到		到	
重链 (G0+2Na)	50798.4	357830	未观察到	----	-----	-----
重链 (G1)	50918.7	905663	未观察到	----	-----	-----
重链 (G1+Na)	----	----	未观察到	-----	-----	-----
重链 (G0+1)	----	----	52072.9	509271	52093.2	547416
重 链 (G0+1+Na/H ₂ O)	----	----	52094.1	142968	52110.9	725547
重 链 (G0+1+Na/H ₂ O+Na)	----	----	52115.8	132594	52133.4	275808

[0546] MMAE T289C mAb轭合数据的总结

[0547]

表 15 耦合 1

	耦合 (%)	DAR	水解 CHT 前	水解 CHT 后	水解 pH 8.6, 37°C, 1 小时之后
N-苯基 Val-Cit-PAB- MMAE	91	1.82	ND	ND	100

[0548]

表 16
耦合 2

	耦合 (%)	DAR	水解 CHT 前 (%)	水解 CHT 前 + pH 8.6, 37°C, 1 小时 (%)	水解 CHT 后 (%)	水解 CHT 后 + pH 8.6, 37°C, 1 小时 (%)
N-苯基 Val- Cit-PAB-	93	1.86	ND	95	ND	94

MMAE							
[0549]	N-烷基 Val-Cit-PAB-MMAE	96	1.91	9.6	ND	7.3	ND

[0550]	表 17 轭合 3	轭合 (%)	DAR	水解 CHT 前 (%)	水解 CHT 前 + pH 8.6, 37°C, 1 小时 (%)	水解 CHT 后 (%)	水解 CHT 后 + pH 8.6, 37°C, 1 小时 (%)
	N-苯基 Val-Cit-PAB-MMAE	97	1.94	ND	ND	55	93
	N-烷基 Val-Cit-PAB-MMAE	97	1.94	ND	ND	1	2

[0551] 实例32在包含巯基的缓冲液中MMAE-T289C mAb轭合物的稳定性

[0552] 将MMAE-mAb轭合物在含有 β -巯基乙醇(BME)的水性缓冲液中孵育,以向着巯基交换反应激发硫代琥珀酰亚胺键。如上所述将MMAE与含有T289C突变的mAb轭合。轭合后,立即通过CHT色谱法纯化轭合物以除去未轭合的药物。然后使样品经受简短透析(Slide-a-lizer盒,10kDa MWCO,4°C,2小时),以将缓冲液交换为含有0.5mM EDTA的1X PBS,pH 7.2。透析之后,将样品用包含0.5mM EDTA的1X PBS pH 7.2稀释至0.2mg/mL(1.33 μ M mAb)。对于含有BME的样品,添加BME至1% v/v(143mM)的最终浓度。将样品在环境气氛下在37°C下进一步孵育,无需搅拌。在各个时间点去除等分试样,无菌过滤,用DTT还原,并且然后通过LC/MS分析。分别使用方程1和方程2从质谱的峰高度确定轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解的百分比。将解轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解数据绘制为 \ln [浓度]与时间(s),以从最佳拟合线的斜率获得伪一级速率常数。

[0553] 实例33在包含巯基(BME)的缓冲液中MMAE T289C mAb轭合物的稳定性

[0554] 结果示于图23中。

[0555]

表 18: 烷基硫代琥珀酰亚胺轭合物的解轭合的动力学参数

	pH 7.2, 37°C		pH 7.2, 37°C, +BME	
	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
N- 烷基马来酰亚胺 - Val-Cit-PAB-MMAE	1.4x10 ⁻⁷	1375	2.1x10 ⁻⁶	91.6

[0556]

表 19: 初始水解和解轭合数据的总结

	N-烷基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	初始水解 (%)	最大解轭合 - BME (%)	最大解轭合 +BME (%)
		1	8	60
N-苯基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	55	7	12	

[0557] 此数据显示MMAE在包含巯基的缓冲液中解轭合,并且用N-烷基马来酰亚胺制备的轭合物不如与N-苯基马来酰亚胺轭合的MMAE稳定。

[0558] 实例34在T289C mAb轭合物中MMAE-硫代琥珀酰亚胺的水解结果示于图24中。

[0559]

表 20: 烷基硫代琥珀酰亚胺轭合物的解轭合的动力学参数

	pH 7.2, 37°C		pH 7.2, 37°C, +BME	
	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)	伪一级速率常数 (k_{obs} , s ⁻¹)	T _{1/2} (hr)
N- 烷基马来酰亚胺 - Val-Cit-PAB-MMAE	1.3x10 ⁻⁶	148	1.4x10 ⁻⁶	138

[0560] 此数据显示在存在游离巯基的情况下,与N-烷基马来酰亚胺轭合的MMAE不如与N-苯基马来酰亚胺轭合的MMAE稳定。未显示用以计算速率常数的Ln绘图。

[0561] 实例35在包含巯基 (BME) 的缓冲液中MMAE T289C mAb轭合物的稳定性

[0562] 结果示于图25中。

表 21: MMAE 鞩合物的初始水解和解鞠合数据的总结		有意的水解	初始水解 (%)	最大解鞠合 - BME (%)	最大解鞠合 +BME (%)
[0563]	N-烷基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	否	1	16	61
	N-苯基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	否	57	4	15
	N-烷基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	是	5	23	68
	N-苯基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	是	93	3	8

[0564] 此数据显示:1) 在存在游离巯基的情况下,与N-烷基马来酰亚胺鞠合的MMAE不如与N-苯基马来酰亚胺鞠合的MMAE稳定,2) N-烷基马来酰亚胺MMAE鞠合物比PEG-生物素类似物对温和水解更不敏感,3) 温和水解未改善N-烷基马来酰亚胺-MMAE鞠合物的稳定性,4) N-苯基马来酰亚胺-MMAE鞠合物对温和水解有非常大的响应,但这个步骤对实现高稳定性不是必需的,5) 当经受相同纯化工艺时,N-苯基马来酰亚胺自发水解比N-烷基马来酰亚胺显著更多。

[0565] 实例36在BME激发中观察到的PEG-生物素和MMAE硫代琥珀酰亚胺水解的比较

[0566] 结果示于图26中。

表 22: T289C mAb 鞍合物的硫代琥珀酰亚胺水解动力学		pH 7.2, 37°C		pH 7.2, 37°C, +BME	
鞍合的化合物		硫代琥珀酰亚胺水解伪一级速率常数 (k_{obs})	$T_{1/2}$ (hr)	硫代琥珀酰亚胺水解伪一级速率常数 (k_{obs} , s^{-1})	$T_{1/2}$ (hr)

[0568]

	s^{-1}			
N-烷基马来酰亚胺- Val-Cit-PAB-MMAE	1.3×10^{-6}	148	1.4×10^{-6}	138
N-烷基马来酰亚胺生 物素	7.1×10^{-6}	27	6.5×10^{-6}	31

[0569] 此数据显示缓慢水解硫代琥珀酰亚胺显著受马来酰亚胺的上游化学影响。与疏水的MMAE有效负载相比,亲水PEG-生物素化学将水解速率增加约3-5倍。

[0570] 实例37在存在 β -巯基乙醇的情况下解轭合的比较:PEG-生物素对比MMAE有效负载结果示于图27中。

[0571] 表23:从BME测定确定的硫代琥珀酰亚胺水解和解轭合的动力学参数

[0572]

轭合的种类	解轭合伪一级速率常数 (k_{obs}, s^{-1})	最大解轭合 (%)
N-烷基马来酰亚胺 Val-Cit-PAB-MMAE	1.9×10^{-6}	60
N-烷基马来酰亚胺-PEG-生物素	1.6×10^{-6}	35

[0573] 实例38小鼠血清中MMAE-T289C ADC的稳定性

[0574] 将MMAE ADC在小鼠血清中孵育以向着解轭合激发硫代琥珀酰亚胺键。如上所述将MMAE与含有T289C突变的mAb轭合以产生期望的ADC。药物轭合后,立即通过CHT色谱法纯化ADC以除去未轭合的药物。然后使样品经受简短透析(slide-a-lyzer盒,10kDa MWCO,4°C,2小时),以将缓冲液交换为含有0.5mM EDTA的1X PBS,pH 7.2。透析后,通过A280测量(NanoDrop)测定mAb浓度,并且然后添加到正常小鼠血清(杰克逊免疫研究(Jackson ImmunoResearch))中,以实现0.2mg/mL(1.33 μ M mAb)的最终浓度。添加至血清中的ADC的总体积小于10%。将ADC-血清混合物无菌过滤并在37°C下在密封容器中孵育,无需搅拌。在各个时间点去除等分试样,并冷冻。通过使用FC-特异性抗人IgG-琼脂糖树脂(西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich))的免疫沉淀从小鼠血清中回收轭合和非轭合的人抗体。首先,用PBS冲洗树脂两次,用IgG洗脱缓冲液冲洗一次,并且然后用PBS冲洗两次。然后将ADC-小鼠血清样品与抗人IgG树脂(100 μ L ADC-血清混合物,50 μ L树脂浆液)合并,并在室温下轻轻混合15分钟。通过离心回收树脂,并且然后用PBS洗涤两次。将树脂粒料重悬于100 μ L IgG洗脱缓冲液(赛默科技(Thermoscientific))中,并在室温下进一步孵育5分钟。通过离心除去树脂,并且然后将20 μ L的1M Tris(pH 8.0)加入到上清液中。将回收的人抗体溶液无菌过滤,用DTT还原,并且然后通过LC/MS分析。分别使用方程1和方程2从质谱的峰高度确定轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解的百分比。将解轭合的mAb和硫代琥珀酰亚胺水解数据绘制为1n[浓

度]与时间(s),以从最佳拟合线的斜率获得伪一级速率常数。

[0575] 结果示于图28中。

表 24: 从小鼠血清稳定性测定确定的硫代琥珀酰亚胺水解和解轭合的动力学参数

[0576]

有意的水解	初始硫代琥珀酰亚胺水解(%)	最大解轭合(%)	解轭合伪一级速率常数(k_{obs}, s^{-1})	硫代琥珀酰亚胺水解伪一级速率常数(k_{obs}, s^{-1})
N-烷基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	否	1	67	1.8×10^{-6}
N-苯基马来酰亚胺-Val-Cit-PAB-MMAE	否	57	5	ND

[0577] 此数据表明:1)用N-苯基马来酰亚胺制备的ADC比用N-烷基马来酰亚胺制备的ADC更稳定,2)N-苯基硫代琥珀酰化物的水解发生得比N-烷基硫代琥珀酰亚胺的水解快,3)针对N-烷基硫代琥珀酰亚胺,巯基解轭合发生得比硫代琥珀酰亚胺水解稍慢,因此没有观察到完全解轭合,对于可溶性和不溶性有效负载,速率是相似的。在可溶性有效负载的情况下,观察到的最大解轭合会更低,这可能是由于更高的硫代琥珀酰亚胺水解速率。

[0578] 图29A显示在pH 7.2、37℃加BME下,烷基硫代琥珀酰亚胺解轭合和水解。此数据表明,解轭合与硫代琥珀酰亚胺水解有关。达到最大硫代琥珀酰亚胺水解后的解轭合平台,与BME激发实验一致。

[0579] 图29B显示在37℃下7天的小鼠血清中的ADC解轭合,为平均+/-标准偏差(n=3)。此实验是上述相同的血清稳定性测定,在一个时间点一式三份进行。数据显示N-烷基马来酰亚胺Val-Cit-PAB-MMAE ADC不如N-苯基马来酰亚胺Val-Cit-PAB-MMAE ADC稳定。此实验的相对误差通常小于10%。

[0580] 实例39在小鼠血清中孵育之后ADC对MDA-MB-361癌细胞的活性

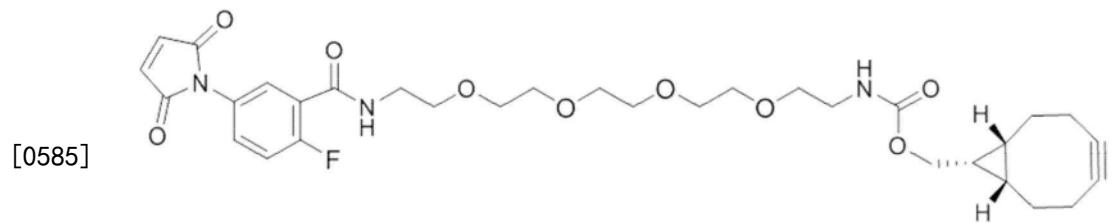
[0581] 在这些研究中使用具有高5T4表达的MDA-MB-361乳腺癌细胞。将细胞以2,000个MDA-MB-361细胞/孔铺板到96孔平底板中于具有10%FBS的80μL RPMI1640中。允许细胞附着过夜。通过在培养基中稀释测试制品来制备5X浓度的每种ADC。将二十微升的每种测试制品以一式两份加入细胞中,使得最终剂量曲线以逐步1:4连续稀释系列范围为50ng/mL降至0.76pg/mL。将处理的细胞在37℃/5%CO₂下培养6天,并用来自普洛麦格(Promega)的CellTiter-Glo发光活力测定评估细胞活力。每孔加入100μL重构的CTG试剂,在室温下轻微振荡10分钟,并且使用珀金埃尔默(Perkin Elmer)EnVision光度计读取每个样品在560nm的吸光度。通过下式计算细胞活力百分比:(处理样品的平均发光/未处理对照样品的平均发光) x 100。使用GraphPadPrism软件的逻辑非线性回归分析确定IC₅₀值。

[0582] 结果示于图30中,显示为平均值±相对误差,n=2。此数据显示对于稳定的(N-苯

基)ADC来说ADC效力被保存,而对于不稳定的(N-烷基马来酰亚胺)ADC来说效力损失。

[0583] 实例40用于硫代琥珀酰亚胺稳定化和有效负载轭合的异双官能接头

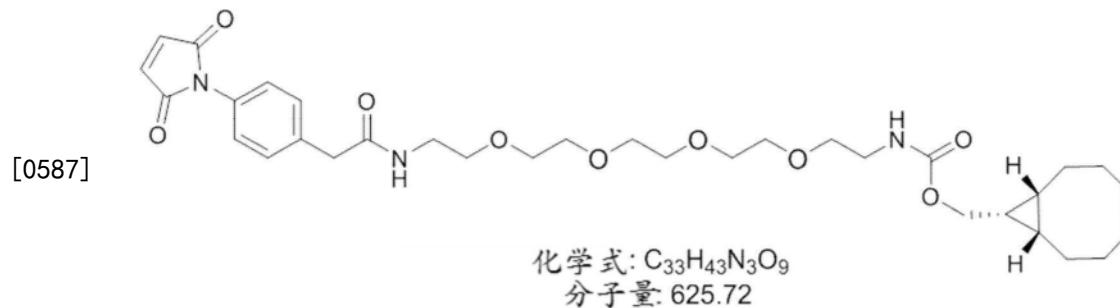
[0584] 1)N-氟苯基马来酰亚胺-PEG4-BCN



化学式: $C_{32}H_{40}FN_3O_9$
分子量: 629.68

;

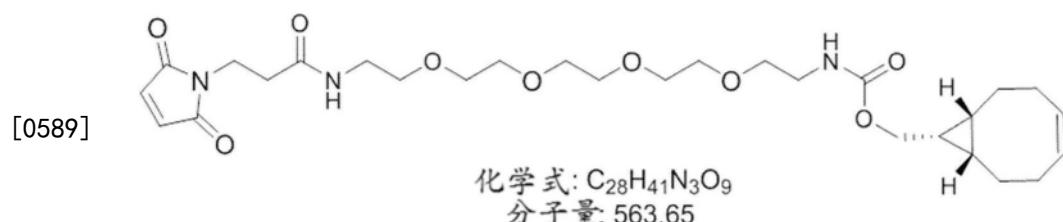
[0586] 2)N-苯基马来酰亚胺-PEG4-BCN



化学式: $C_{33}H_{43}N_3O_9$
分子量: 625.72

;

[0588] 3)N-烷基马来酰亚胺-PEG4-BCN SynChem目录产品号SC5009495%纯度

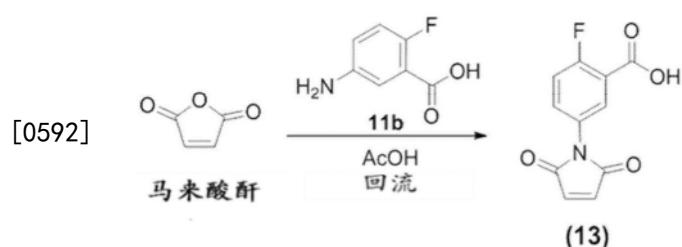


化学式: $C_{28}H_{41}N_3O_9$
分子量: 563.65

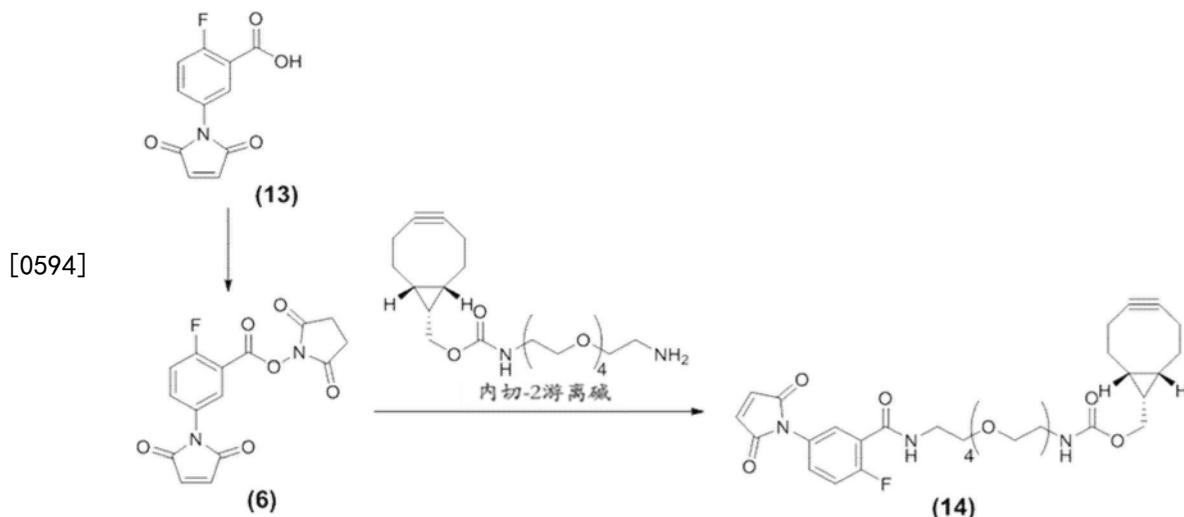
。

[0590] 制备了包括基于烷基-或N-芳基的马来酰亚胺和PEG-BCN官能度两者的异双官能接头系列。在称为“无铜点击轭合”的反应中BCN基团对叠氮化物是反应性的。

[0591] 实例41 N-氟苯基马来酰亚胺-PEG-BCN的合成

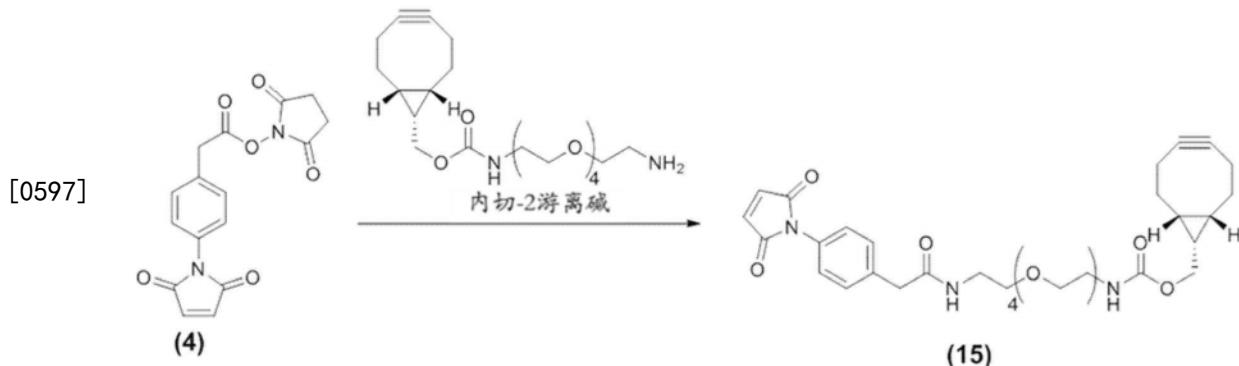


[0593] 在处理后,在回流下马来酸酐(10a, 0.313g, 3.19mmol)和5-氨基-2-氟苯甲酸(11b, 0.5g, 3.22mmol)于冰AcOH中的反应提供呈黄色固体状的粗9c(0.72g)。将粗产物进一步通过硅胶柱色谱法纯化以提供0.21g(0.89mmol, 28%产率)的呈浅黄色固体状的9c。



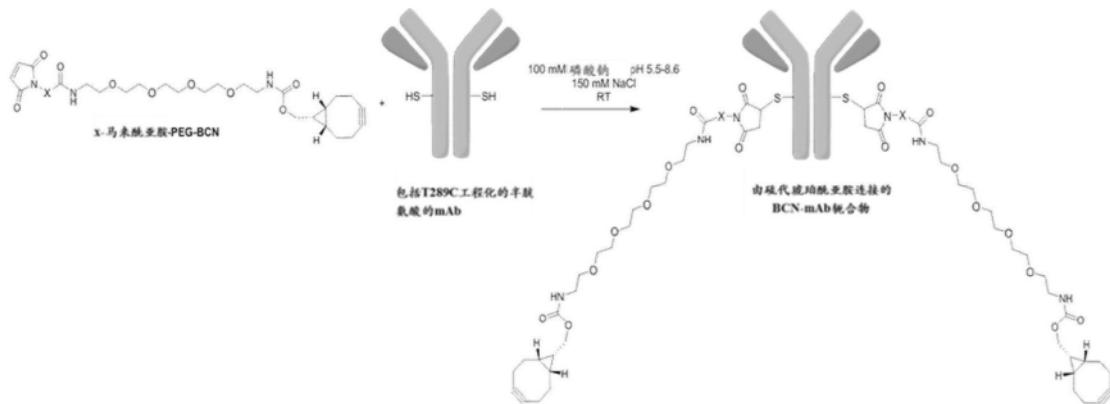
[0595] 从(13)原位制备NHS活化的马来酰亚胺(6)并且不经纯化即使用。因此,在室温下,在存在DCC(0.144g,0.698mmol)的情况下,(13)(0.137g,0.582mmol)与N-羟基琥珀酰亚胺(0.074g,0.64mmol)于DME(5mL)中反应1h。通过过滤去除沉淀的固体(DCU)之后,伴随着搅拌,在室温,在N₂下,将包含活化酯(6)的滤液逐滴加入内切-2(0.2g,0.485mmol)于DME(2mL)中的溶液中。1h之后,TLC和MS分析指示反应完成。真空浓缩过量DME,并且在N₂下将获得的粗残余物通过硅胶柱色谱法纯化,用乙酸乙酯随后4%MeOH于DCM中洗脱,以提供呈浅黄色油状的(14)(0.24g,0.38mmol,78.6%产率)。¹H NMR和MS数据确认化学结构;HPLC指示94%纯。MS(ESI)m/z 629.3(M+1),647.8(M+H₂O),652.8(M+Na,基峰)。

[0596] 实例42 N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN的合成



[0598] 在室温,在N₂下,在DME(5mL)中(4)(0.191g,0.582mmol)和内切-2(0.2g,0.485mmol)之间的反应在1h内完成,如通过TLC和MS两者指示的。在真空下去除过量DME,并且在N₂压力下将获得的粗残余物通过硅胶柱色谱法纯化,用乙酸乙酯随后4%MeOH于DCM中洗脱。汇集包含该产物的级分并在真空下浓缩。在N₂下,将残余物溶解于DCM中并转移至小瓶中。通过N₂鼓泡去除过量溶剂以提供呈浅黄色油状的(15)(0.26g,85%产率)。¹H NMR和MS数据确认化学结构,具有残余溶剂的污染物。MS(ESI)m/z 626.5(M+1),643.5(M+H₂O),648.8(M+Na,基峰)。

[0599] 实例43 用以结合x-马来酰亚胺-PEG-BCN与mAb的通用程序



[0600] x-马来酰亚胺-PEG-BCN分几个步骤中与mAb(包括Fc的T289C突变)轭合。首先,通过将5mL在10mM PBS中的1.6mg/mL mAb溶液(pH 7.2)(8mg mAb, 53.3nM, 1当量)与43μL在水中的50mM TCEP溶液(2.15μmol, 40当量)合并,随后在37℃温和混合1小时,将mAb轻微还原以产生游离巯基。将还原的mAb转移至slide-a-lizer透析盒(10K MWCO)中,并用PBS, 1mM EDTA, pH 7.2-7.8, 4℃透析24小时,更换缓冲液几次。通过加入脱氢抗坏血酸(21μL的在DMSO中的50mM储备液, 1.1μmol, 20当量),随后在室温下轻轻混合4小时,将还原的mAb氧化以重整内部二硫键。通过添加PBS将氧化的mAb溶液调节至1.3mg/mL mAb。接下来,将1.15mL mAb溶液(1.5mg, 10nmol, 1当量)等分到小瓶中,然后添加x-马来酰亚胺-PEG-BCN储备液(于DMAc中的10mM储备液, 20nmol, 2当量)。将该反应混合物短暂涡旋并在22℃孵育1小时,随后添加N-乙酰基半胱氨酸(10μL的在水中的100mM溶液, 1μmol, 100当量),并进一步孵育15分钟以淬灭未反应的马来酰亚胺。所有轭合反应在室温(22℃)在环境气氛下进行。注意,相对于mAb而言的2当量x-马来酰亚胺-PEG-BCN=相对于mAb中包含的游离半胱氨酸而言1当量x-马来酰亚胺-PEG-BCN。根据需要修改该通用程序以获得期望反应化学计量(即不同的马来酰亚胺:mAb进料)。通过还原糖基化质谱分析轭合物,并使用方程式1确定轭合效率。

[0601] 实例44 N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物的质谱分析

[0602] 以4当量交联剂制备的N-苯基-PEG-BCN-mAb轭合物的代表性质谱数据示于图31和表25中:

[0603]	表 25	未反应的 mAb		N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb 鞣合物	
		峰	强度	峰	强度
	轻链	23745.4	2241350	23745.3	1859865
	重链 (G0)	50756.4	2520546	50757	-----
	重链 (G0+Na)	50777.3	703916	N/D	-----
	重链 (G1)	50918.7	954244	N/D	-----
	重链 (G1+Na)	50939.3	288623	N/D	-----
	重链 (G0+1)	-----	-----	51382.1	1026822
	重 链	-----	-----	51400.8	515263
[0604]	(G0+1+Na/H ₂ O)				
	重 链 (G0+H ₂ O+Na)			51421.9	188687

[0605] N-苯基-马来酰亚胺-PEG-BCN有效且特异性地与包含T289C突变的mAb轭合。在多达10摩尔当量交联剂的重链或轻链上没有观察到额外的轭合。

[0606] 实例45 N-氟苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物的质谱分析

[0607] 以4当量交联剂制备的N-氟苯基-PEG-BCN-mAb轭合物的代表性质谱数据在图32和表26中：

[0608]

表 26

	未反应的 mAb		N-氟苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb 鞍合物	
	峰	强度	峰	强度
轻链	23745.4	2241350	23745.3	1859865
重链 (G0)	50756.4	2520546	50757	-----
重链 (G0+Na)	50777.3	703916	N/D	-----
重链 (G1)	50918.7	954244	N/D	-----
重链 (G1+Na)	50939.3	288623	N/D	-----
重链 (G0+1)	-----	-----	51385.9	689372
重 链 (G0+1+Na/H ₂ O)	-----	-----	51404.4	476344

[0609] N-氟苯基-马来酰亚胺-PEG-BCN有效且特异性地与包含T289C突变的mAb轭合。在多达10摩尔当量交联剂的重链或轻链上没有观察到额外的轭合。

[0610] 实例46 N-烷基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物的质谱分析

[0611] 在图33和下文中以4当量交联剂制备的N-烷基-PEG-BCN-mAb轭合物的质谱数据的总结：

[0612]

表 27

	未反应的 mAb		N-烷基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb 鞍合物	
	峰	强度	峰	强度
轻链	23615.9	501138	23615.9	350163
重链 (G0)	50756.3	566918	50757	-----
重链 (G0+Na)	50777.5	208504	N/D	-----
重链 (G1)	50918.4	337042	N/D	-----
重链 (G1+Na)	50939.6	126619	N/D	-----
重链 (G0+1)	-----	-----	51320.2	244596
重 链 (G0+1+Na/H ₂ O)	-----	-----	51340.4	122749

[0613] N-烷基-马来酰亚胺-PEG-BCN有效且特异性地与包含T289C突变的mAb轭合。在多达10摩尔当量交联剂的重链或轻链上没有观察到额外的轭合。

[0614] 实例47 x-马来酰亚胺-PEG-BCN与T289C mAb的轭合效率

[0615] 结果示于图35中。所有交联剂有效地与包含T289C突变的mAb轭合。在2当量的马来酰亚胺上观察到完全轭合。

[0616] 实例48 PEG-BCN轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解动力学

[0617] 将x-马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物在缓冲溶液中孵育，并通过LC/MS随着时间进行监测，以观察硫代琥珀酰亚胺水解。将轭合的T289C mAb用含有0.5mM EDTA的1X PBS (pH 7.2) 稀释至0.22mg/mL，并且然后添加二硫苏糖醇(在水中的0.5M储备液)，以实现42mM的最终浓度。将样品置于22°C的LC/MS自动进样器中并定期注射。通过向质谱中的mAb轭合物峰添加18amu来证实硫代琥珀酰亚胺水解。使用去卷积质谱中的峰强度和方程3(包括使用T=0测量的背景扣除)进行水解的半定量分析。然后将数据转化为硫代琥珀酰亚胺(M)随着时间的损失，并对ln[硫代琥珀酰亚胺]与秒作图。最佳拟合线的斜率产生硫代琥珀酰亚胺水解的伪一级速率常数。结果示于图36和表28中。

表 28 : mAb-PEG-BCN

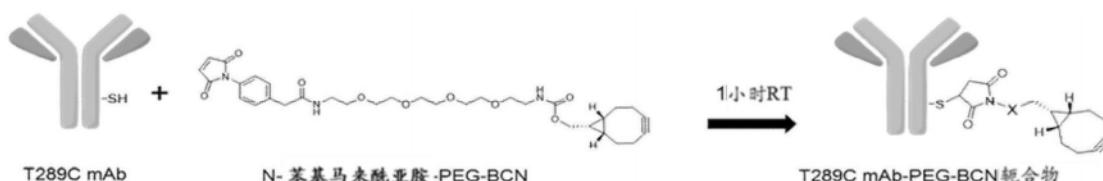
轭合物在 T289C 处的硫代琥珀酰亚胺水解的动力学常数

[0618]

pH 7.2, 22°C		
	伪一级速率常数 (k_{obs} , s^{-1})	半衰期 (hr)
烷基硫代琥珀酰亚胺	1.6×10^{-6}	120.3
苯基硫代琥珀酰亚胺	1.9×10^{-5}	10.1
F-苯基硫代琥珀酰亚胺	3.1×10^{-5}	6.2

[0619] X-马来酰亚胺-PEG-BCN轭合物以对PEG-生物素轭合物观察到的类似趋势水解;即F-苯基硫代琥珀酰亚胺>苯基硫代琥珀酰亚胺>>烷基硫代琥珀酰亚胺。

[0620] 实例49有效负载与T289C mAb的顺序加成



[0621]



[0622] 将N-苯基-马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物(100 μ L的在具有0.5mM EDTA的PBS中的1.3mg/mL溶液, 0.87nmol)与AC₄GlcNAz(1 μ L的在DMSO中的500mM储备液, 500nmol)合并。将该反应溶液不经搅拌在室温下在22°C孵育1小时。为了长期反应性研究, 将mAb-BCN轭合物储存在4°C于具有0.5mM EDTA的PBS(pH 7.2)中, 并且去除等分试样, 并如上所述的与AC₄GlcNAz反应。通过还原糖基化质谱分析轭合物, 并使用方程式1确定轭合效率。

[0623] mAb-BCN-Ac4GlcNAz轭合物的分析示于图37中。BCN基团与AC₄GlcNAz完全反应。

[0624] 实例50在储存后mAb-BCN轭合物的反应性结果示于图38和表29中。

[0625] 表29:在交联剂与mAb轭合并在4°C储存之后BCN的反应性的总结。

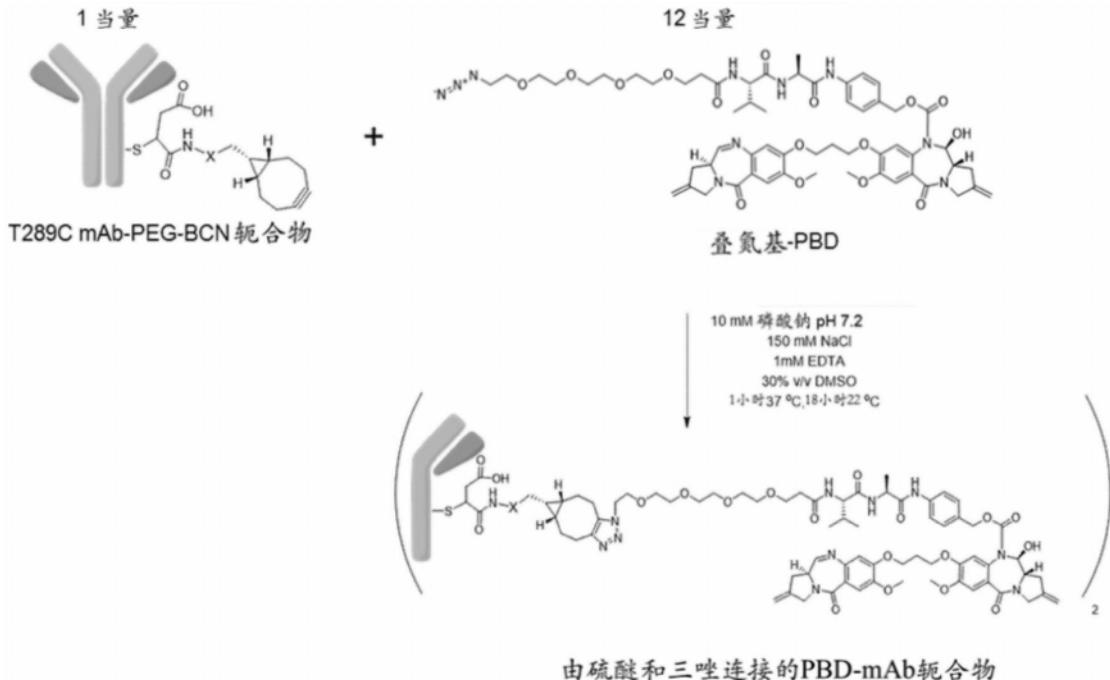
[0626]

在4°C储存的天数	叠氮化物轭合
1	定量
4	定量
7	定量
10	定量

15	定量
21	定量

[0627] 观察所有样品的BCN定量反应。未反应的mAb-BCN可通过质谱法检测。结合和4℃储存之后,BCN基团显示未损失反应性持续>21天。

[0628] 实例51叠氮基-PBD与BCN修饰的mAb的结合



[0630] 如上所述制备N-苯基-马来酰亚胺-PEG-BCN-T289C mAb结合物(1.5mg/mL mAb)并在4℃储存直至与叠氮基-PBD反应。对于PBD结合,mAb溶液首先与DMSO合并以实现30% v/v DMSO和1.05mg/mL mAb-BCN的最终浓度。接着,将mAb-BCN/DMSO溶液(1.89mL,13nmol mAb,1当量)转移至小瓶中,并添加叠氮基-PBD(16μL的在DMSO中的10mM储备液,160nmol,12当量)。将该反应混合物在37℃孵育一小时并且然后在22℃孵育18小时。将该反应混合物首先通过透析(10K MWCO slide-a-lyzer盒,具有0.5mM EDTA的1X PBS,pH 7.2,4℃,18小时)并且然后经如上所述的CHT色谱进行纯化。通过还原糖基化质谱法分析反应产物。分别使用方程1和方程2计算结合效率和DAR。

[0631] 实例52 mAb-PBD结合物的分析

[0632] 5T4靶向的T289C mAb-N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN结合物的代表性质谱数据示于图38中。

[0633]

表 30：通过顺序加成到 T289C 制备的 mAb-PBD 鞣合物的总结。

	N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN mAb 鞣合物	N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN -PBD mAb 鞣合物		
	鞣合 (%)	DAR	鞣合 ^a (%)	DAR ^b
5T4 靶向的 T289C mAb	94	1.87	81	1.52
虚拟 T289C mAb	90	1.80	81	1.45

[0634] a) 相对于BCN基团计算

[0635] b) 相对于mAb计算。未反应的mAb和mAb+BCN被认为未鞣合

[0636] 实例53 mAb-BCN-PBD ADC对MDA-MB-361乳腺癌细胞的体外活性

[0637] 在这些研究中使用具有高5T4表达的MDA-MB-361乳腺癌细胞。将细胞以2,000个MDA-MB-361细胞/孔铺板到96孔平底板中于具有10 % FBS的80 μ L RPMI1640中。允许细胞附着过夜。通过在培养基中稀释测试制品来制备5X浓度的每种ADC。将二十微升的每种测试制品以一式三份加入细胞中,使得最终剂量曲线以逐步1:4连续稀释系列范围为50ng/mL降至0.76pg/mL。将处理的细胞在37 °C / 5 % CO₂下培养6天,并用来自普洛麦格 (Promega) 的CellTiter-Glo发光活力测定评估细胞活力。每孔加入100 μ L重构的CTG试剂,在室温下轻微振荡10分钟,并且使用珀金埃尔默 (Perkin Elmer) EnVision光度计读取每个样品在560nm的吸光度。通过下式计算细胞活力百分比: (处理样品的平均发光/未处理对照样品的平均发光) x 100。使用GraphPad Prism软件的逻辑非线性回归分析确定IC₅₀值。

[0638] 结果示于图40和表25中。

[0639]

表 31：PBD 鞣合物 DAR 值和体外效力的总结

	PBD DAR	IC ₅₀ ng/mL
虚拟 mAb T289C-BCN	0	>10,000
5T4 mAb T289C-BCN	0	>10,000
虚拟 mAb T289C-BCN-PBD	1.45	~10,000
5T4 mAb T289C-BCN-PBD	1.52	4.6

* 一个水解位点

* 一个水解位点

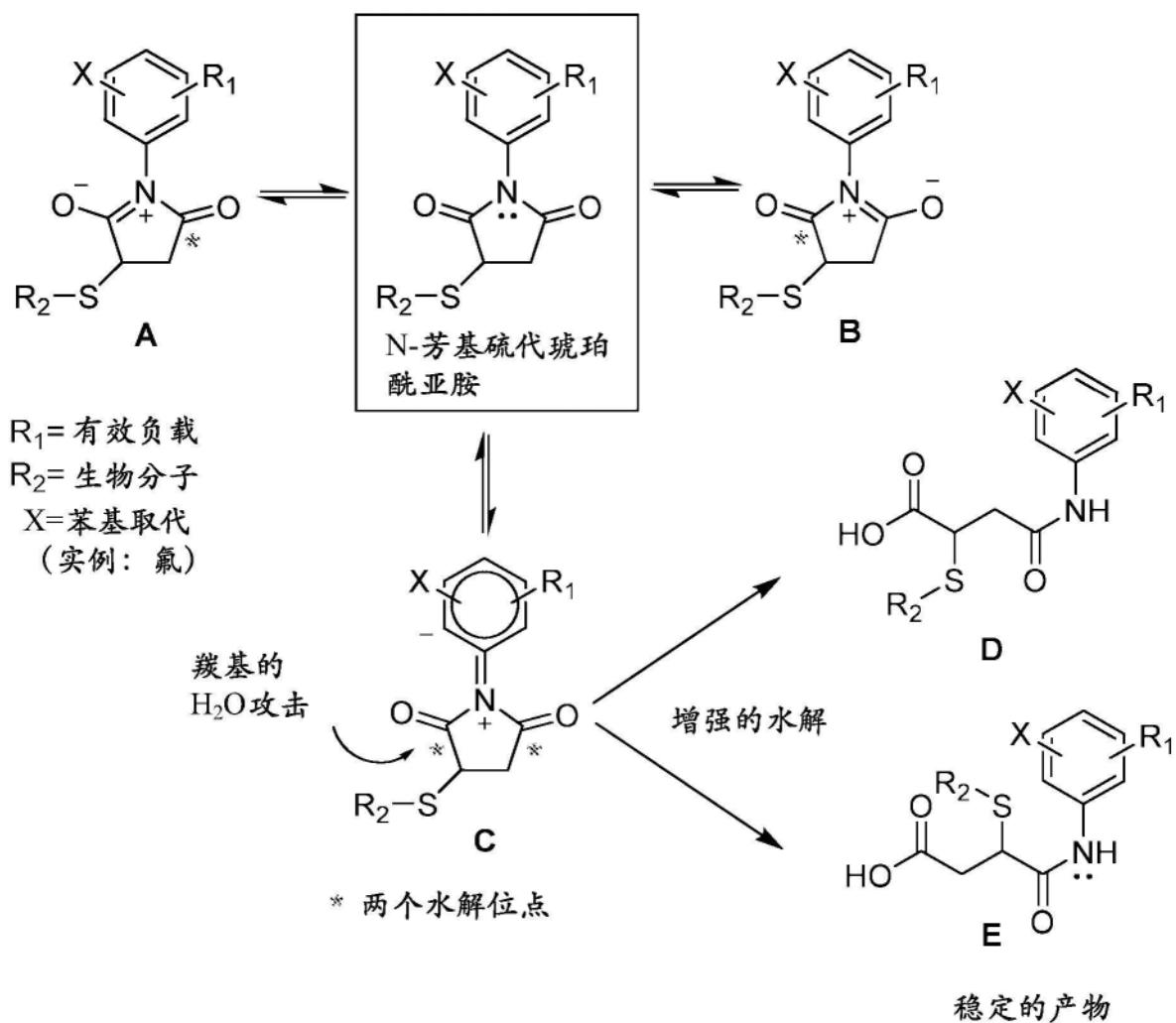
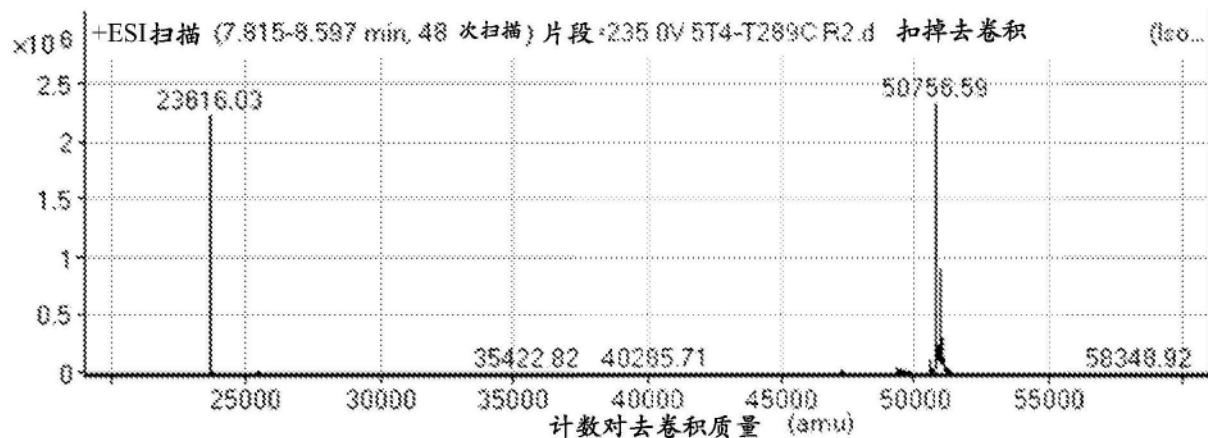


图1 本披露的化合物的水解的示意图

全光谱



重链放大

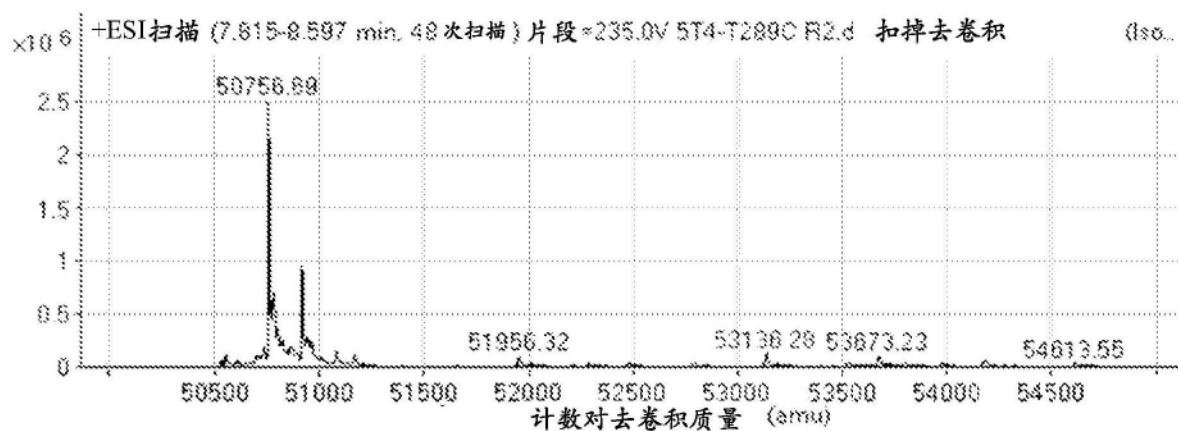
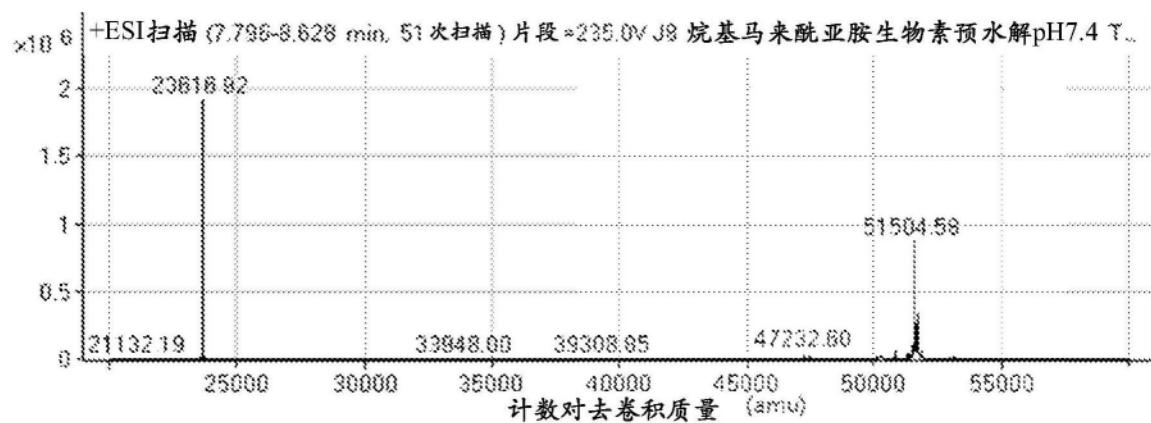


图1A 未反应的mAb的光谱

全光谱



重链放大

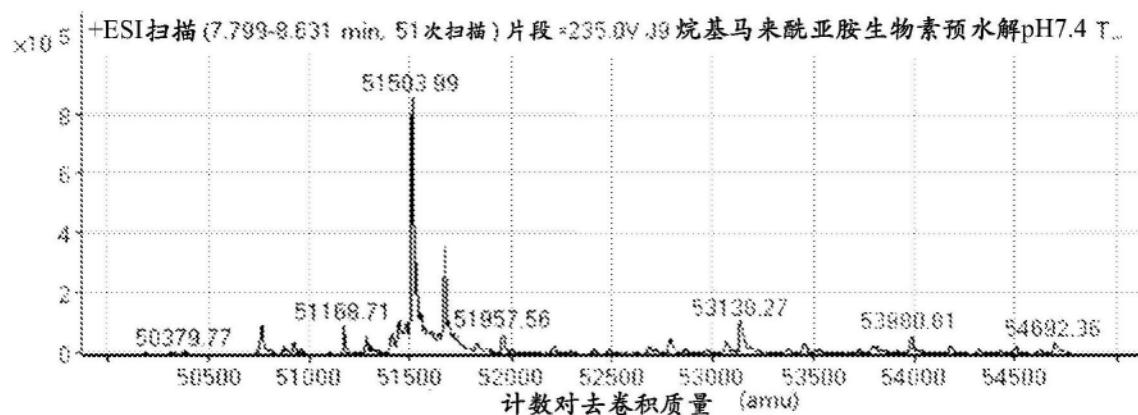


图1B 烷基马来酰亚胺-PEG-生物素轭合物的光谱

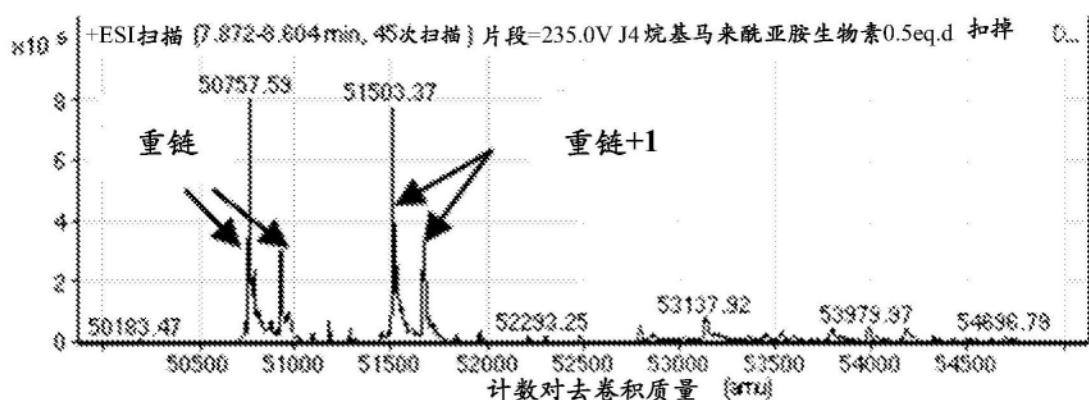


图2A 烷基马来酰亚胺-PEG-生物素的光谱(比较器)

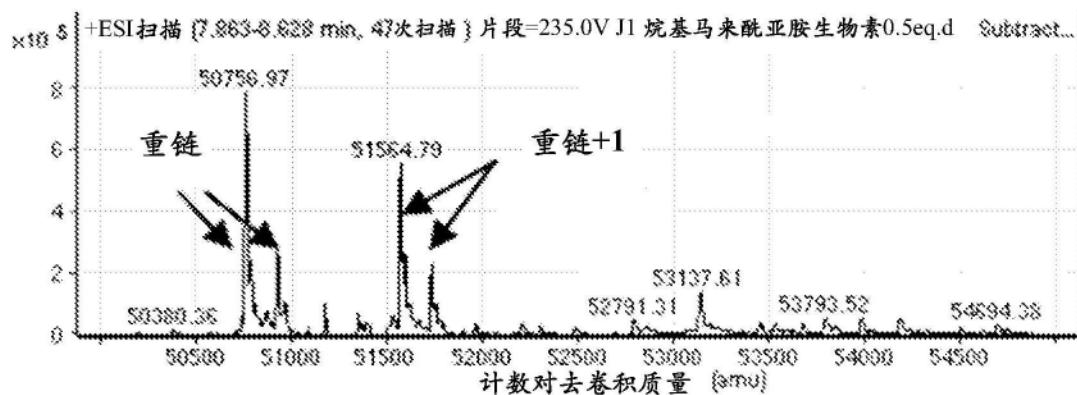


图2B 苯基马来酰亚胺-PEG-生物素的光谱

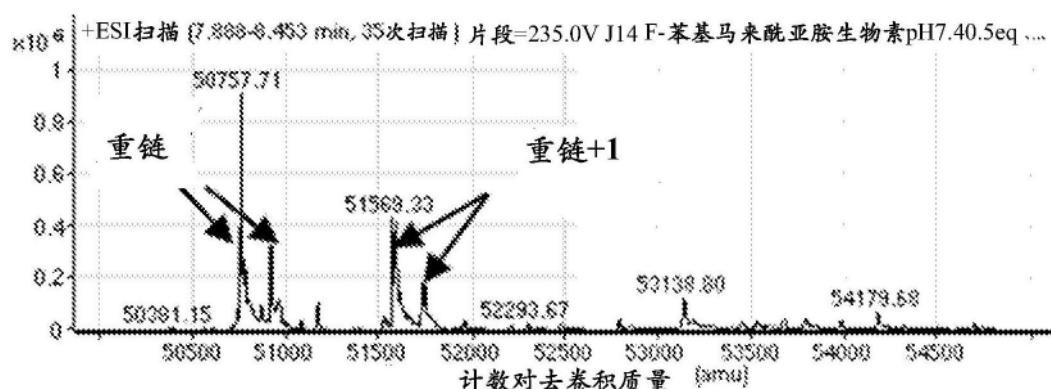
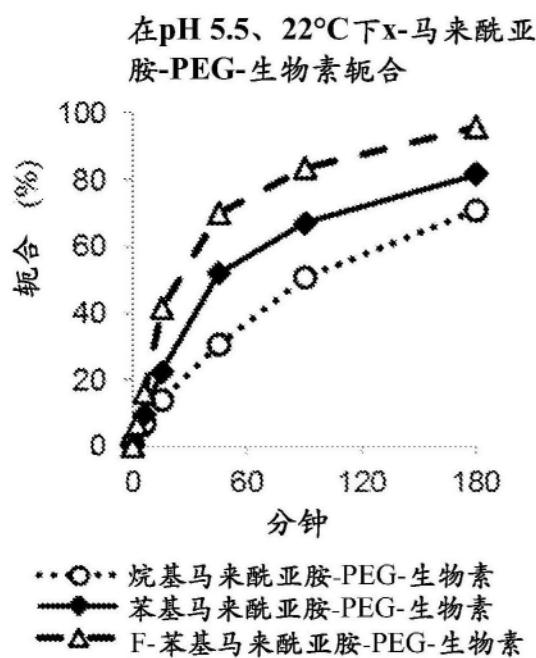
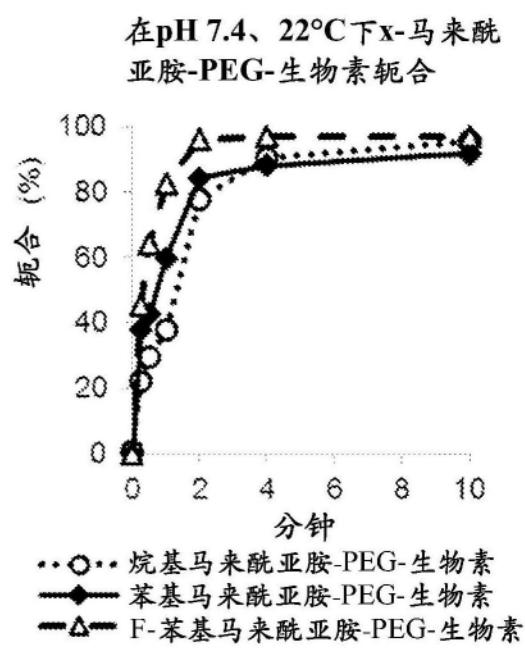


图2C 氟苯基马来酰亚胺-PEG-生物素的光谱

A



B



C

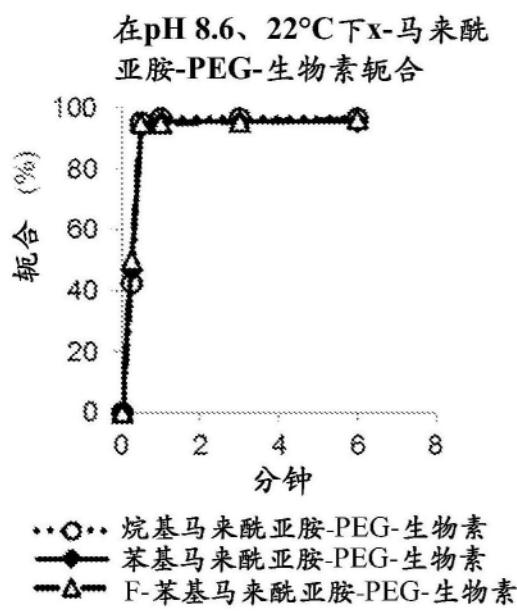


图3 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在22°C的轭合效率

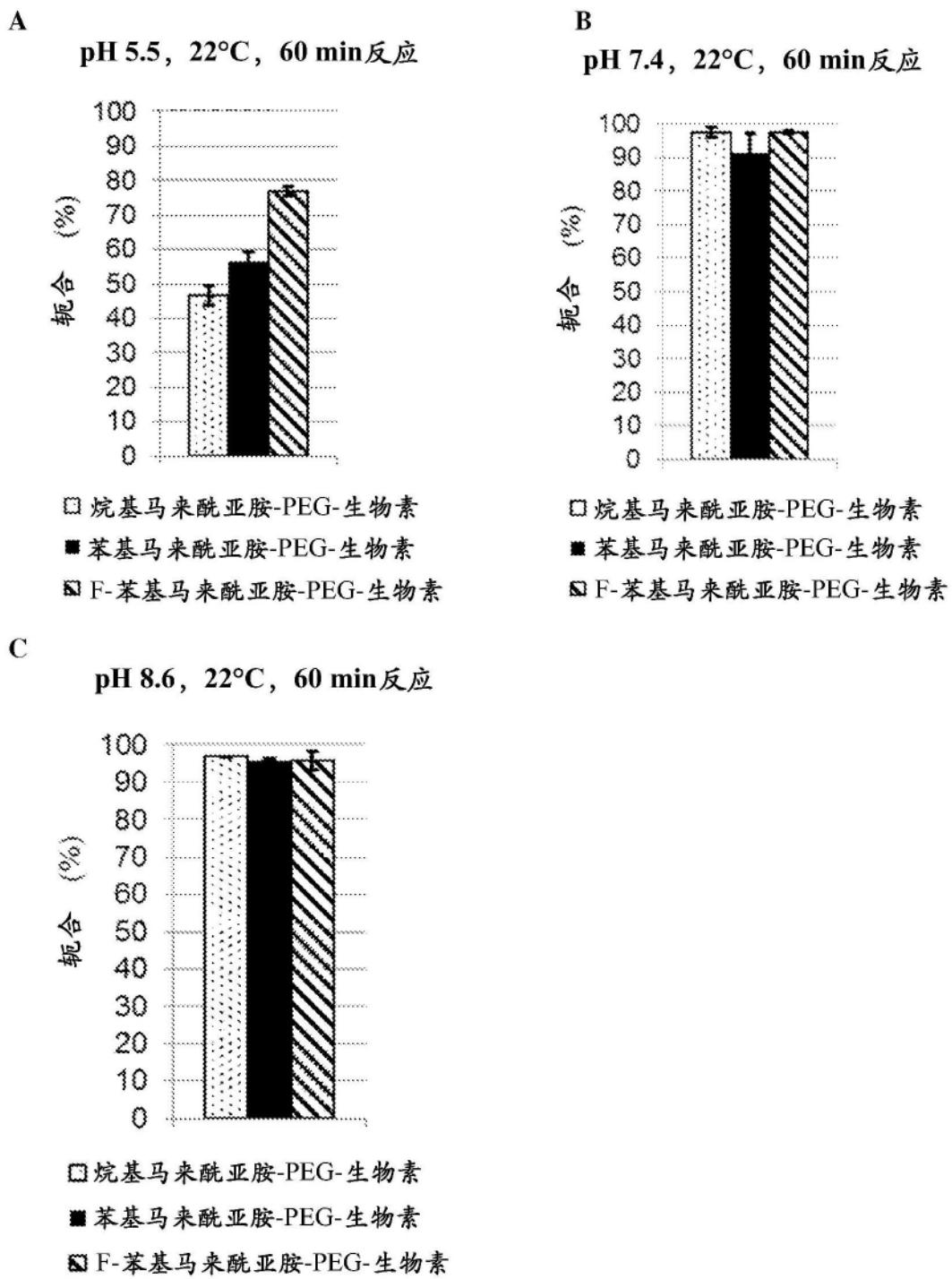
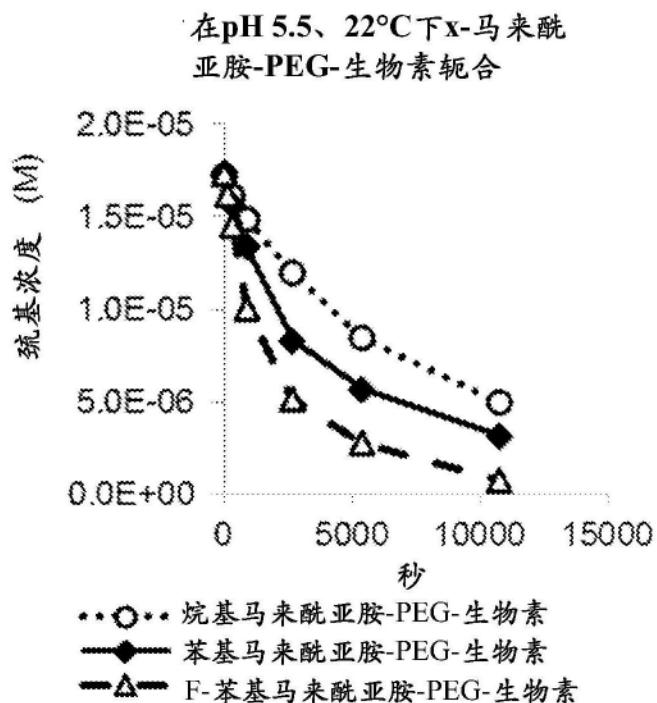
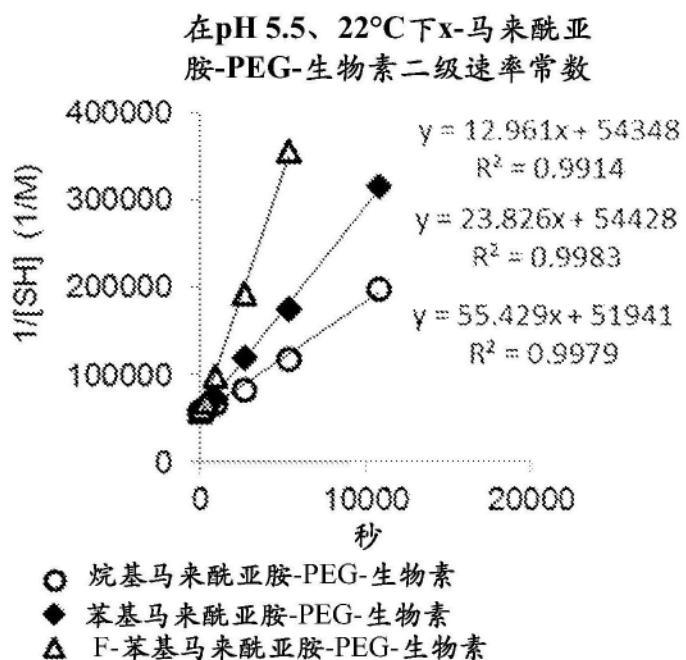


图4 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在22°C的耦合效率

A



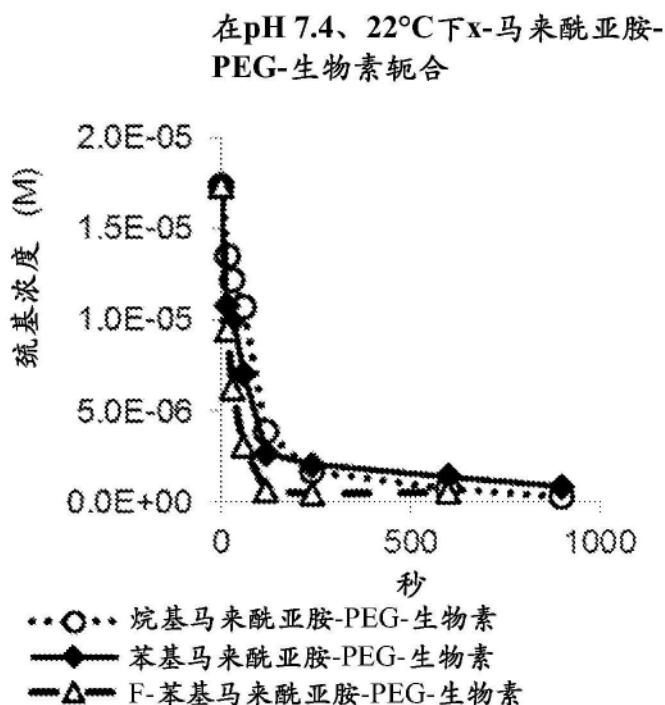
B



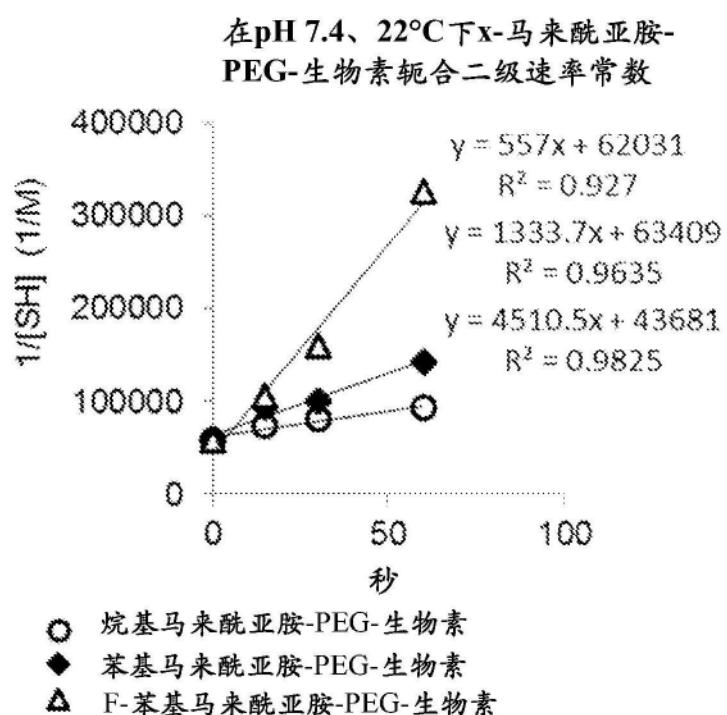
所有趋势线以与图例相同的顺序列出

图5 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 5.5、22°C的轭合动力学

A



B

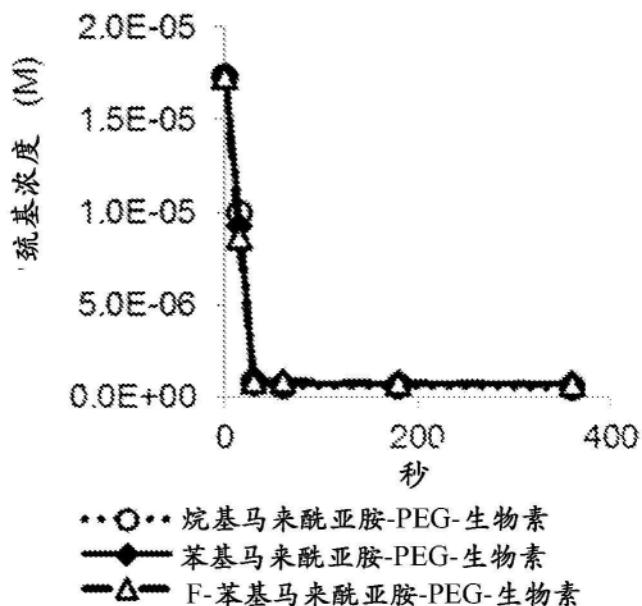


所有趋势线以与图例相同的顺序列出

图6 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 7.4、22°C的轭合动力学

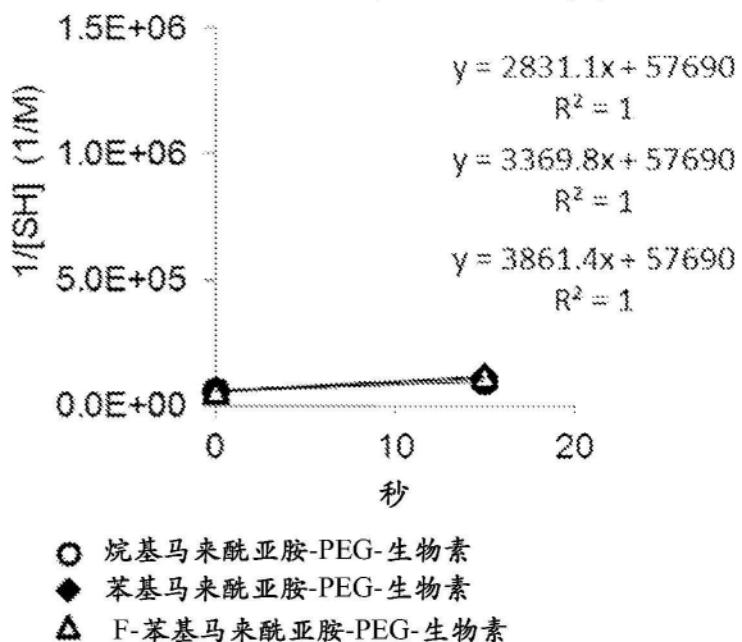
A

在pH 8.6、22°C下x-马来酰亚胺-PEG-生物素轭合



B

在pH 8.6、22°C下x-马来酰亚胺-PEG-生物素轭合二级速率常数

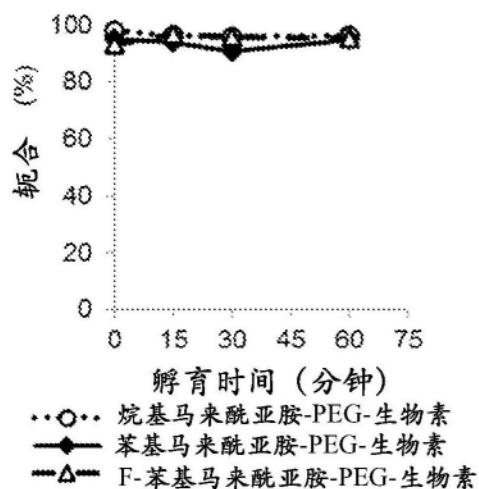


所有趋势线以与图例相同的顺序列出

图7 x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb在pH 8.6、22°C的轭合动力学

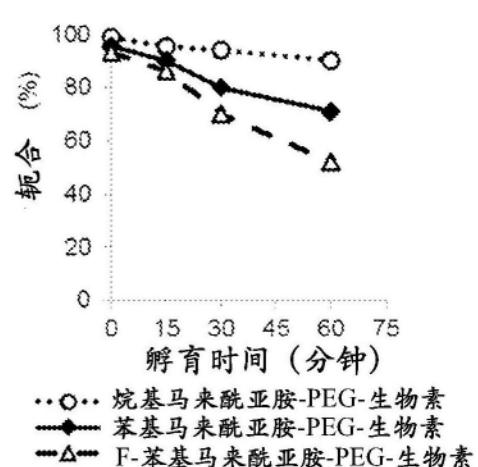
A

pH 5.5孵育之后x-马来酰亚胺的反应性



B

pH 7.4孵育之后x-马来酰亚胺的反应性



C

pH 8.6孵育之后x-马来酰亚胺的反应性

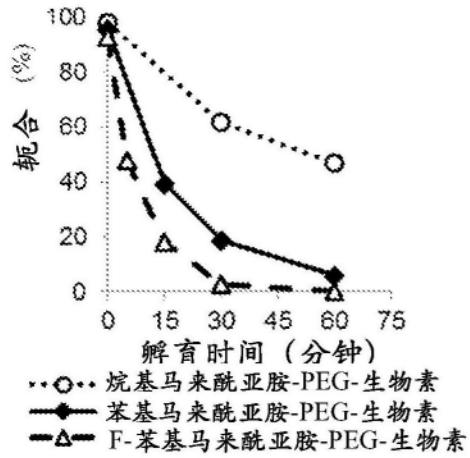
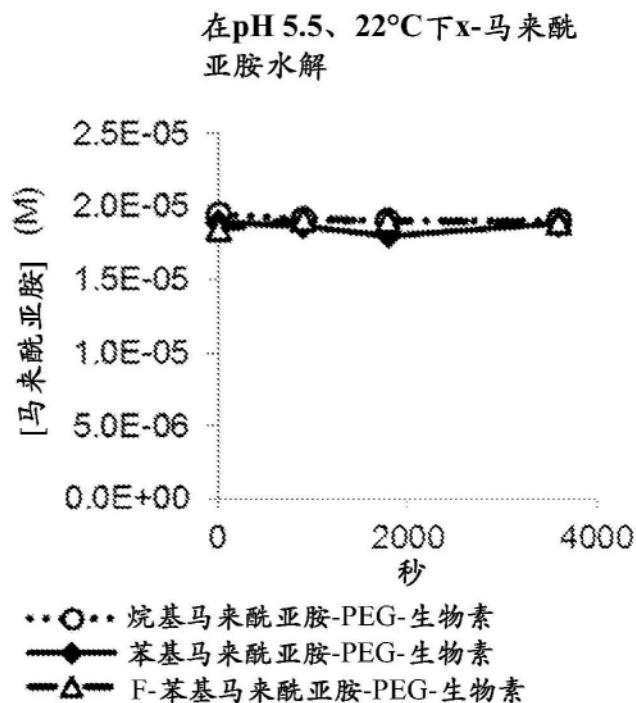
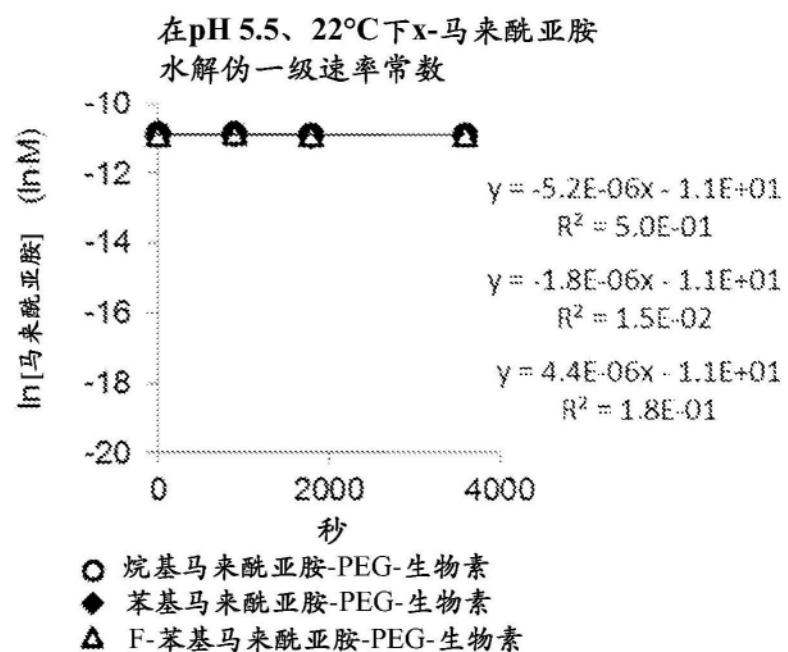


图8 预孵育后x-马来酰亚胺-PEG-生物素与T289C mAb的反应动力学:马来酰亚胺水解的间接测量

A



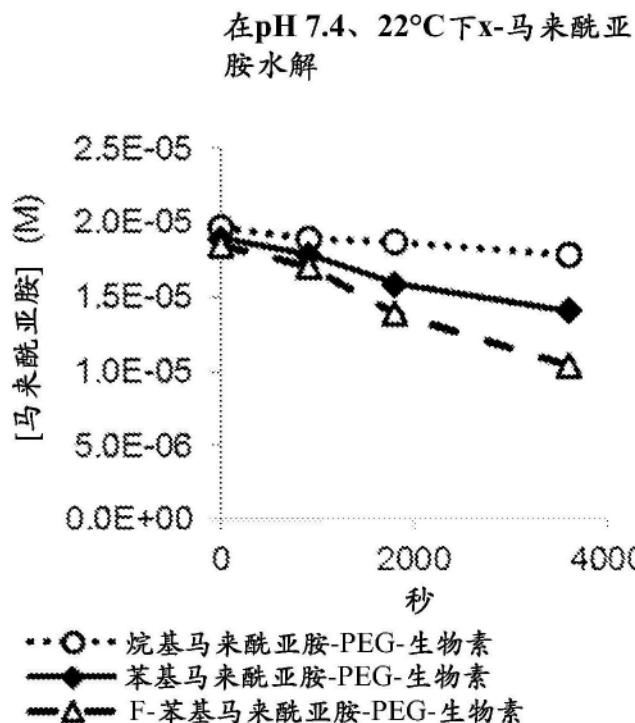
B



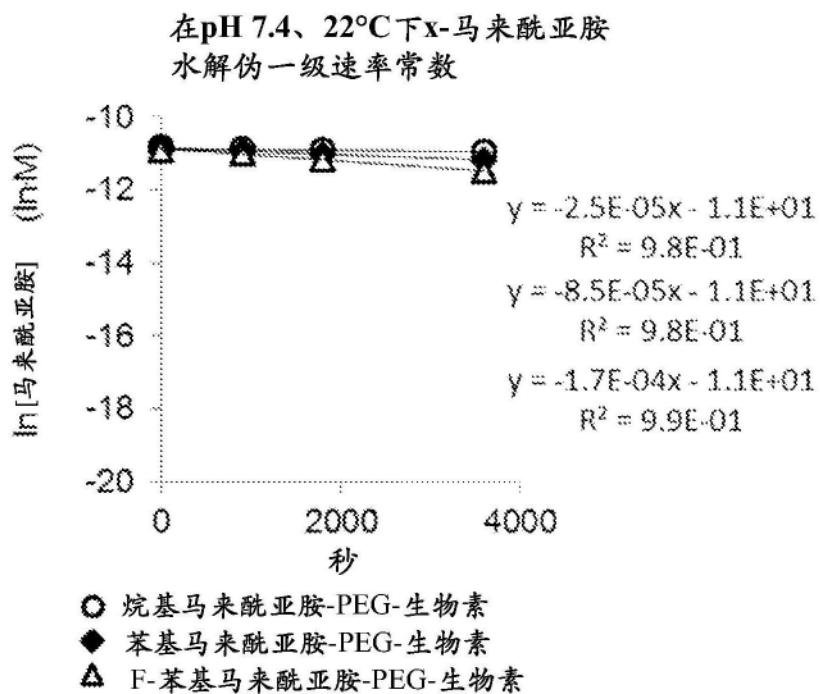
所有趋势线以与图例相同的顺序列出

图9 在pH 5.5、22°C下马来酰亚胺水解动力学

A



B

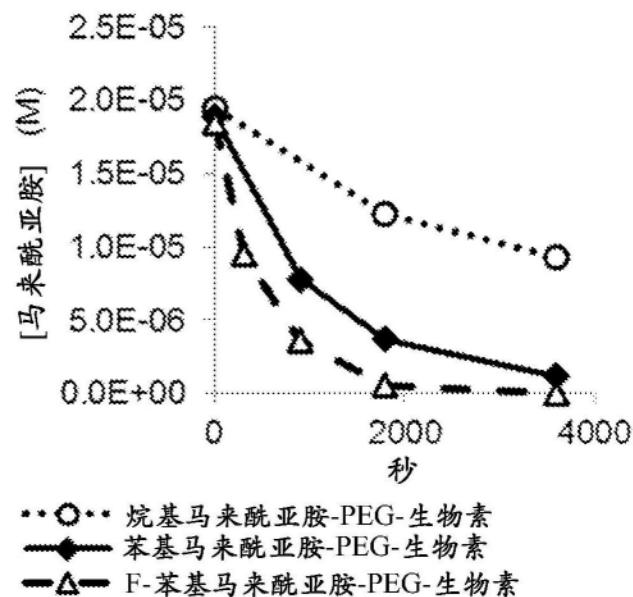


所有趋势线以与图例相同的顺序列出

图10 在pH 7.4、22°C下马来酰亚胺水解动力学

A

在pH 8.6、22°C下x-马来酰亚胺水解动力学



B

在pH 8.6、22°C下x-马来酰亚胺水解伪一级速率常数

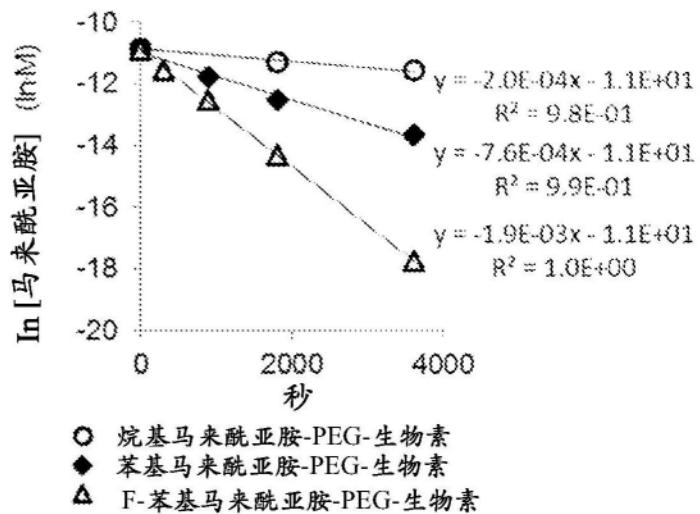
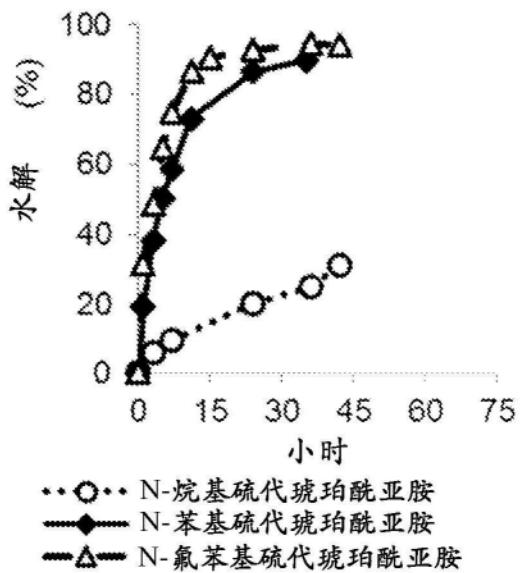


图11 在pH 8.6、22°C下马来酰亚胺水解动力学

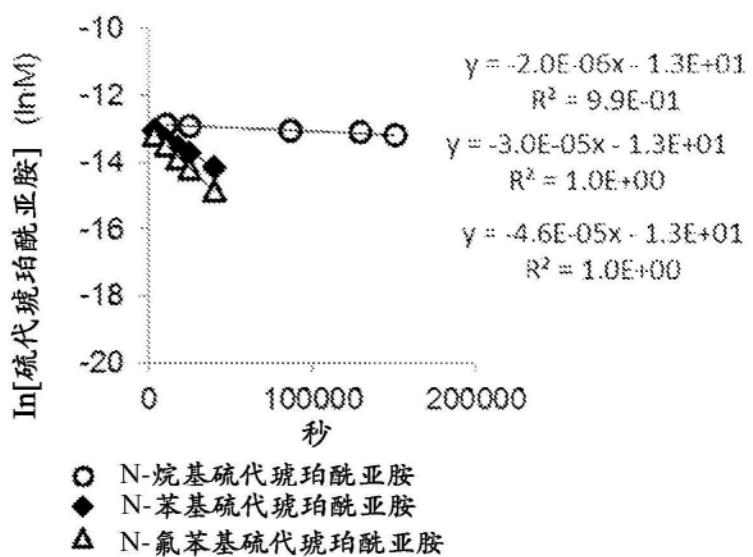
A

在pH 7.4、22°C下硫代琥珀酰亚胺水解



B

在pH 7.4、22°C下的硫代琥珀酰亚胺水解伪一级速率常数

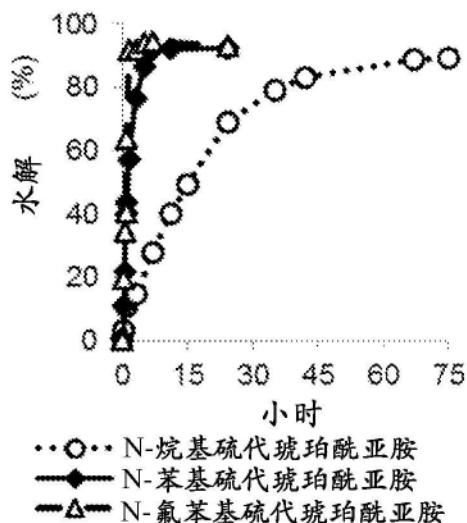


所有趋势线以与图例相同的顺序列出

图12 在pH 7.4、22°C下PEG-生物素T289C mAb轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解

A

在 pH 7.4、37°C 下硫代琥珀酰亚胺水解



B

在 pH 7.4、37°C 下硫代琥珀酰亚胺水解伪一级速率常数

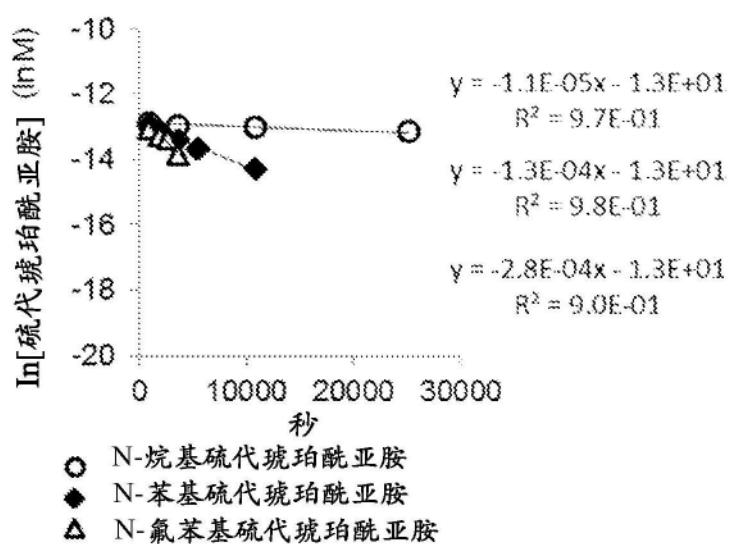


图13 在 pH 7.4、37°C 下PEG-生物素T289C mAb的硫代琥珀酰亚胺水解

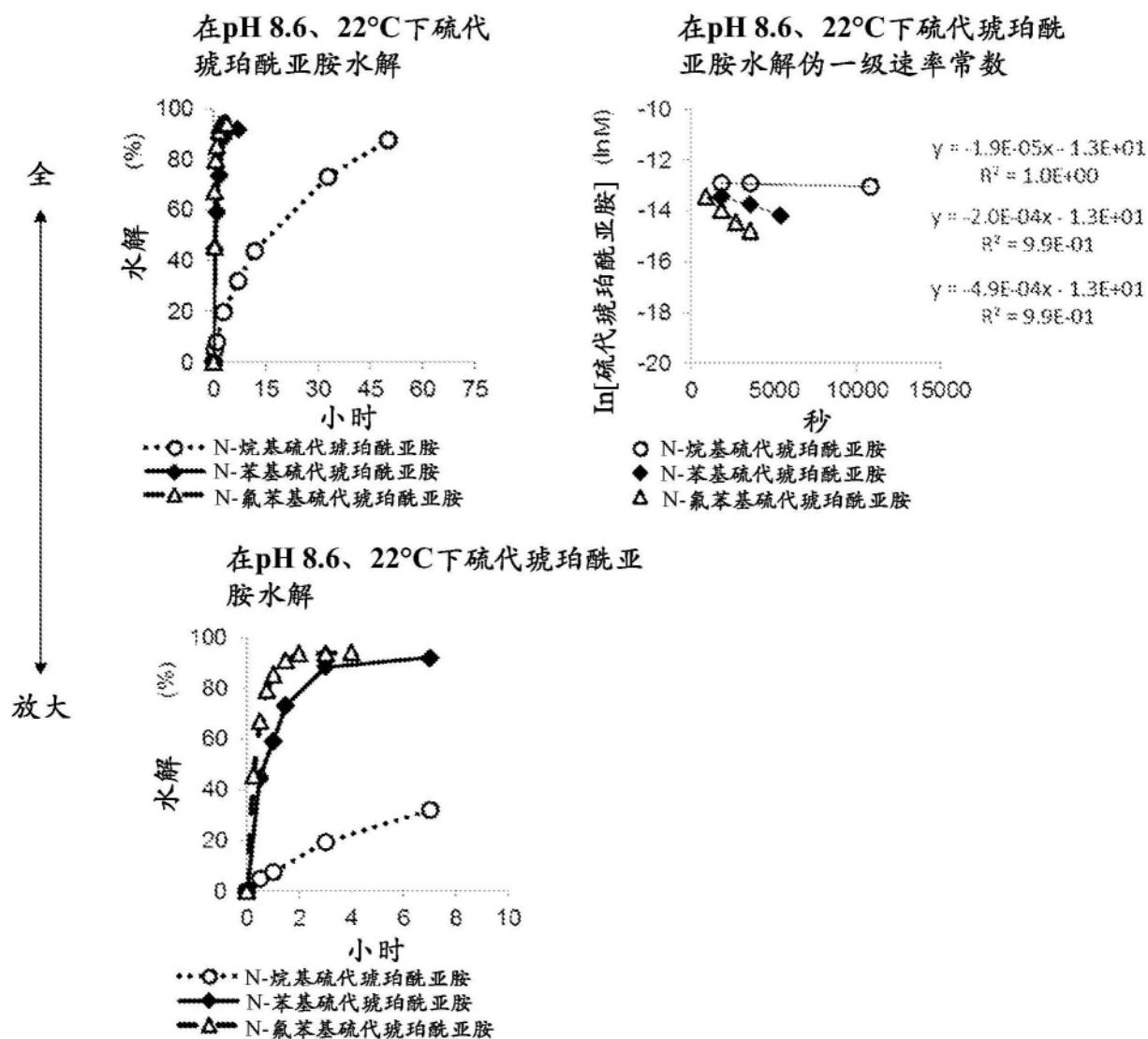
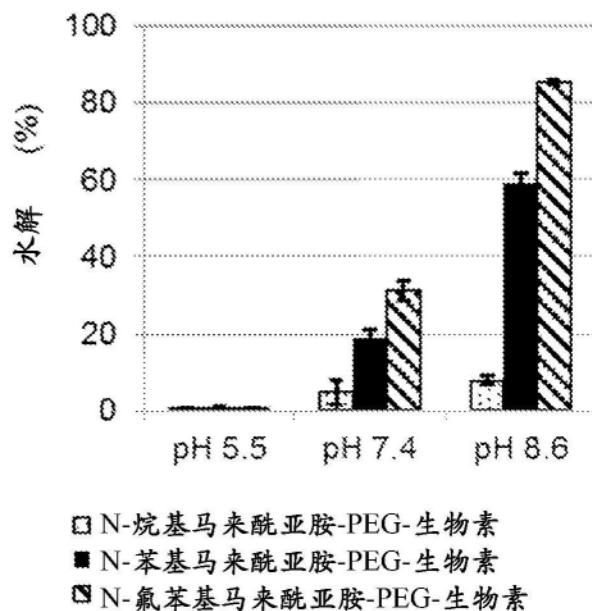


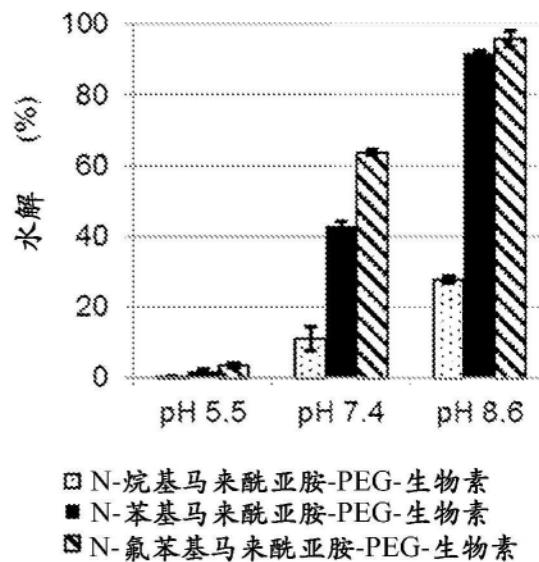
图14 在 pH 8.6、22°C 下 PEG-生物素 T289C mAb 的硫代琥珀酰亚胺水解

A

在22°C硫代琥珀酰亚胺水解1小时



B

在37°C硫代琥珀酰亚胺水解
1小时图15 孵育1小时之后,PEG-生物素T289C-mAb轭合物的 α -硫代琥珀酰亚胺水解,n=3

钼酸盐对PEG-生物素轭合物的硫代琥珀酰亚胺水解 (1小时, 22°C) 的影响

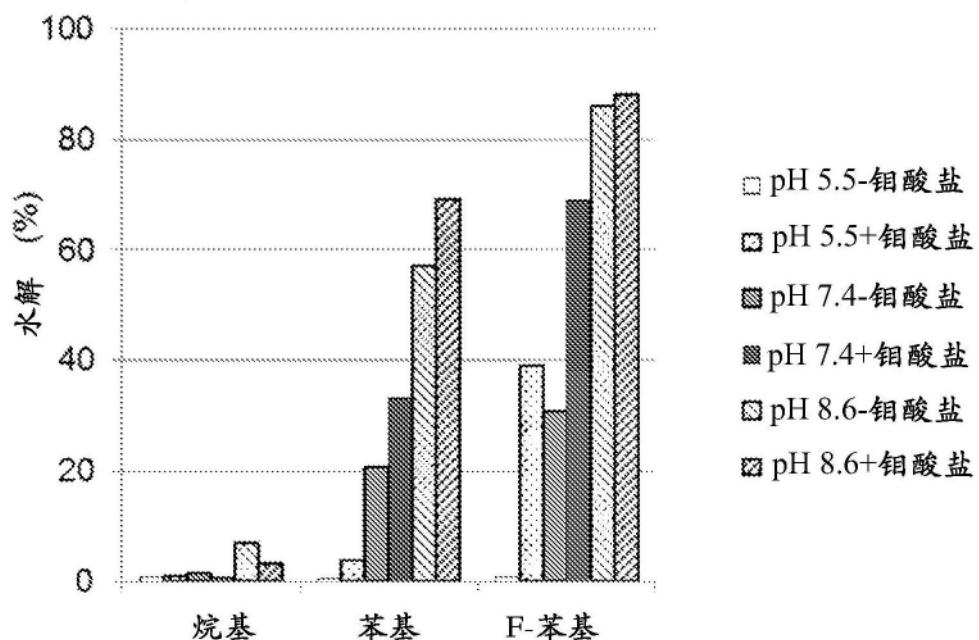
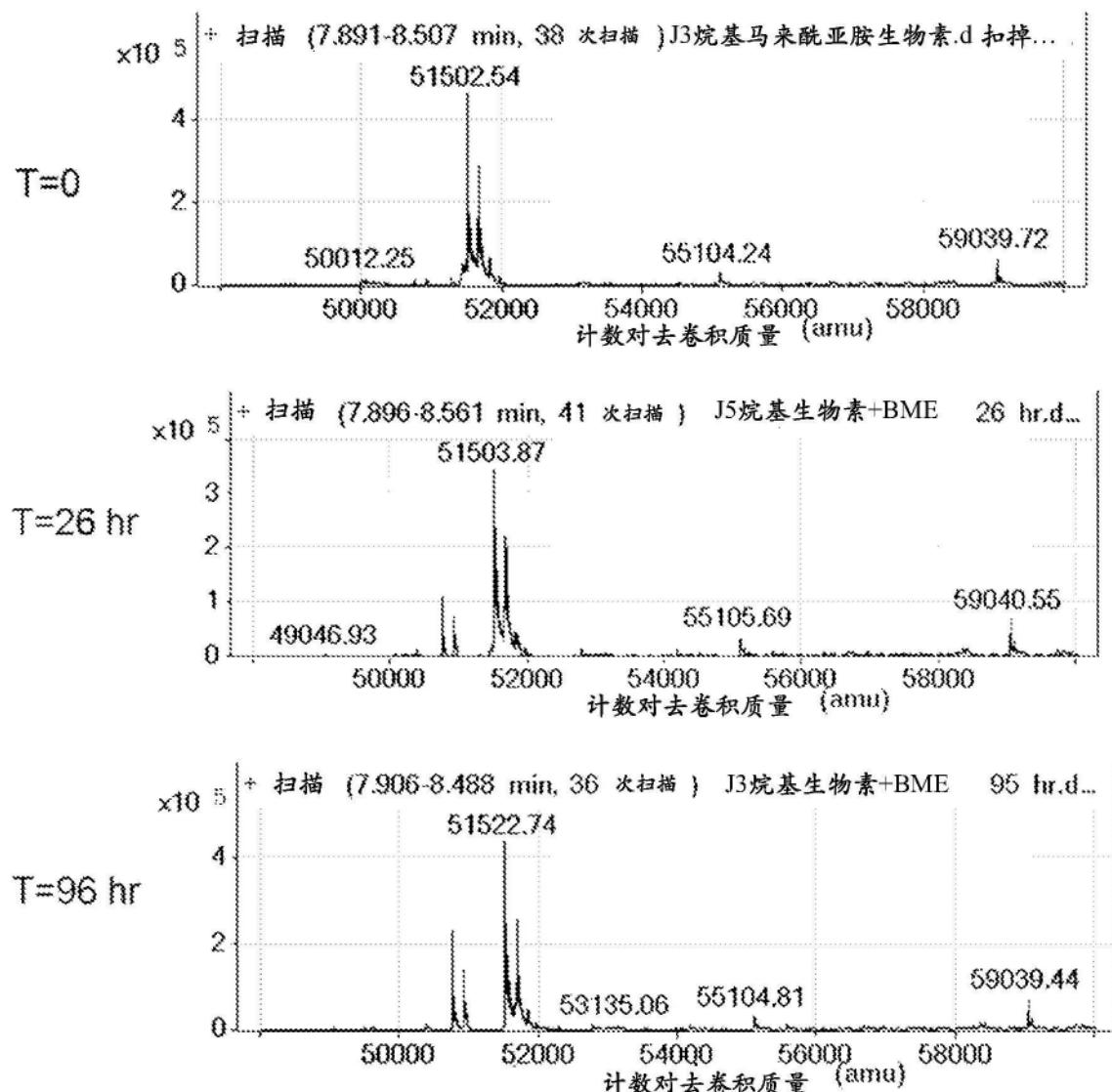


图16 在存在钼酸钠的情况下,PEG-生物素T289C mAb轭合物的x-硫代琥珀酰亚胺-PEG-生物素水解

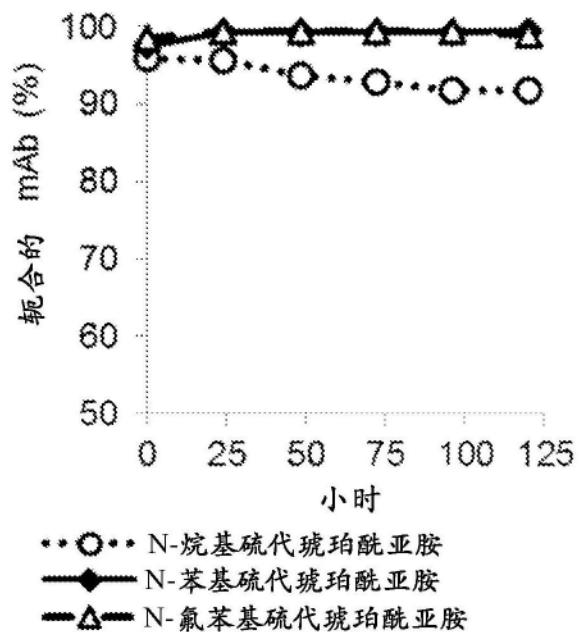


代表性质谱数据：烷基-马来酰亚胺-生物素-mAb轭合物的BME激发

图17 在包含巯基的缓冲液中T289C mAb轭合物对巯基交换的敏感度

A

在pH 7.2、37°C下解轭合



B

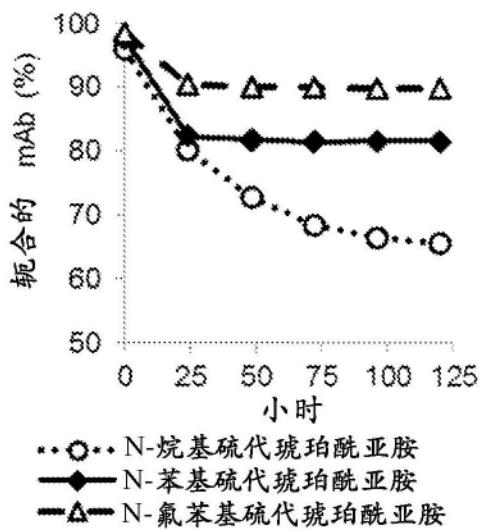
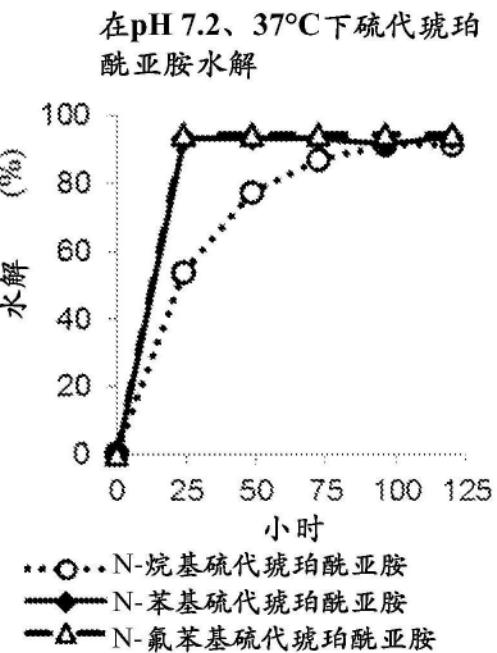
在pH 7.2、37°C、+BME下解
轭合

图18 在包含BME的缓冲液中PEG-生物素T289C mAb轭合物的稳定性

A



B

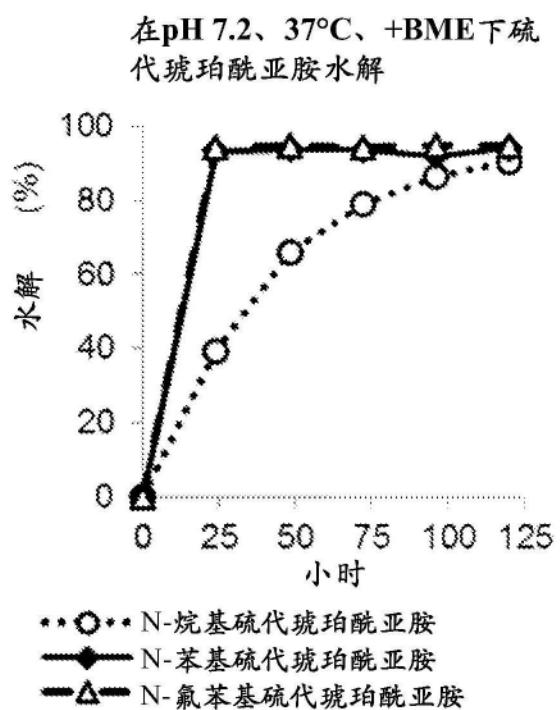


图19 在BME激发测定中观察到的PEG-生物素T289C mAb轭合物在pH 7.2、37°C下的硫代琥珀酰亚胺水解

在pH 7.2、37°C、+BME下烷基硫代琥珀酰亚胺解轭合和水解

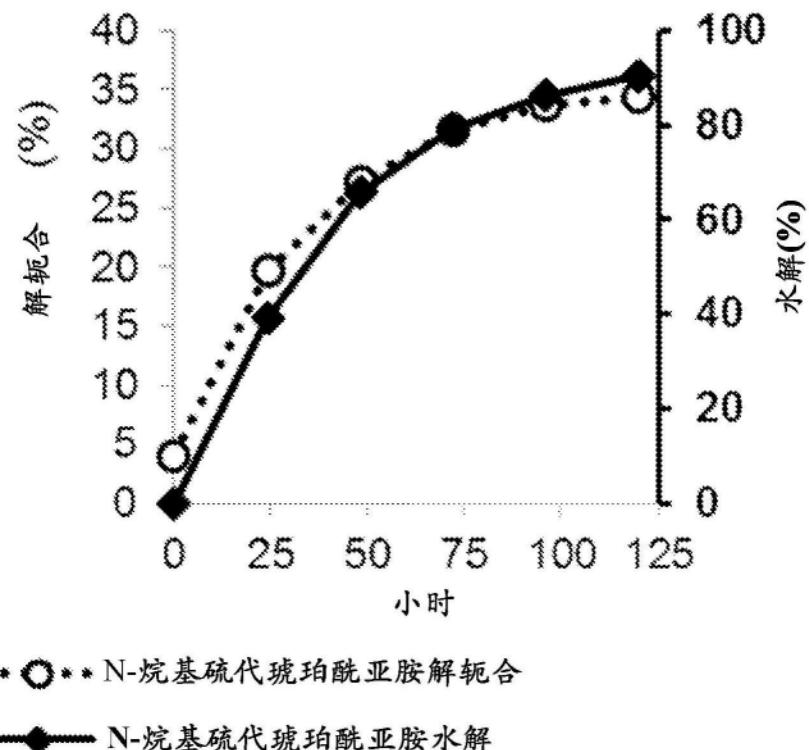
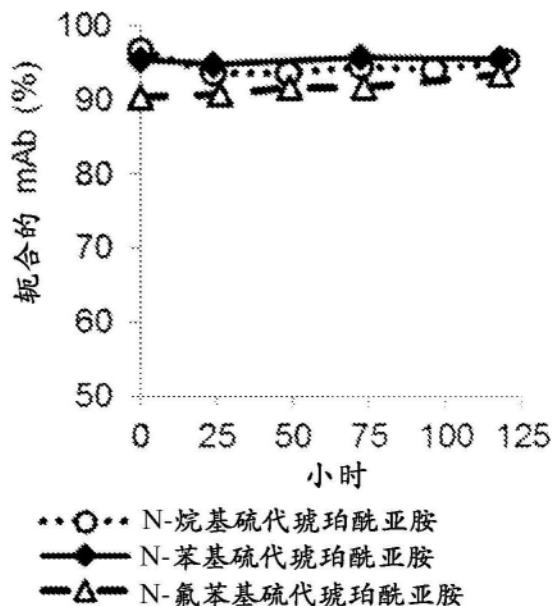


图20 在BME激发测定中观察到的硫代琥珀酰亚胺解轭合和水解之间的关系

A

在pH 7.2、37°C下解轭合



B

在pH 7.2、37°C、+BME下解轭合,

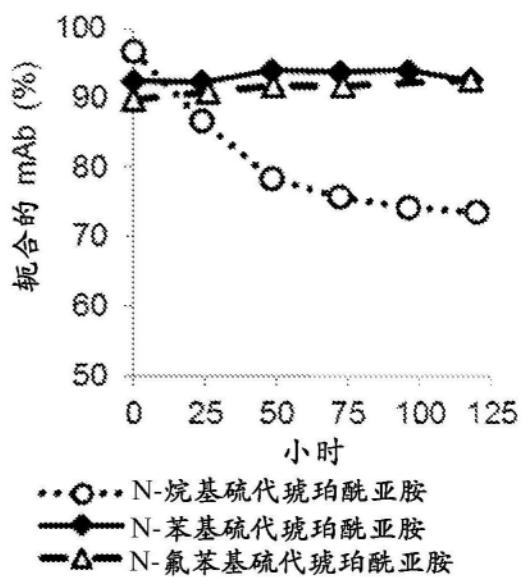


图21 温和水解之后在缓冲液中T289C mAb轭合物对巯基交换的敏感度

未反应的T289C mAb

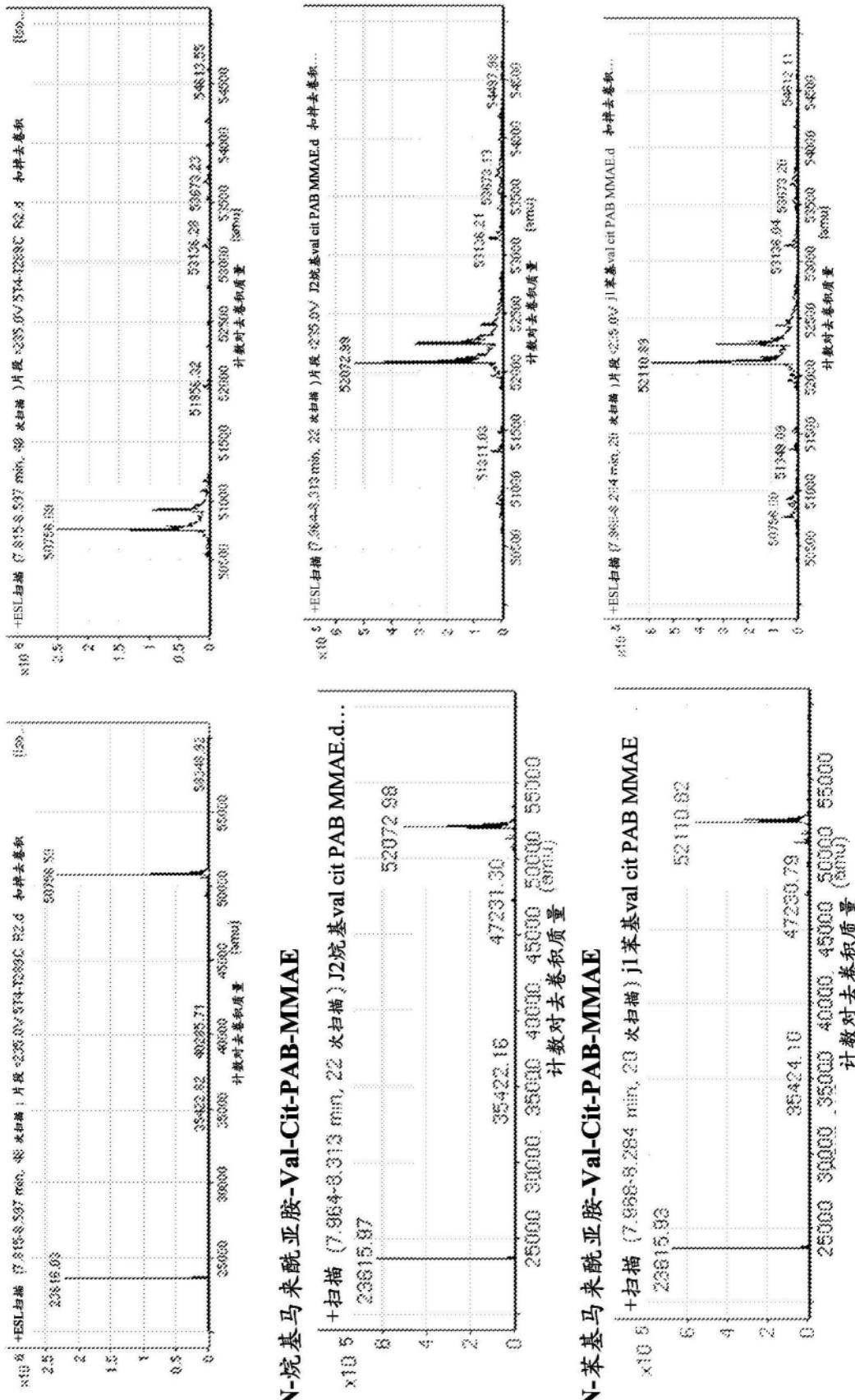
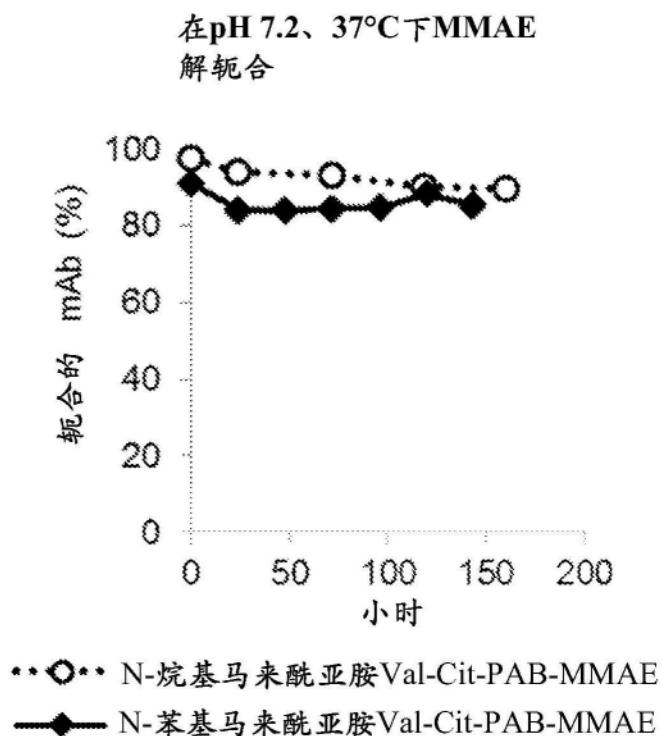


图22 mc-PAB-MMAE T289C mAb ADC的分析

A



B

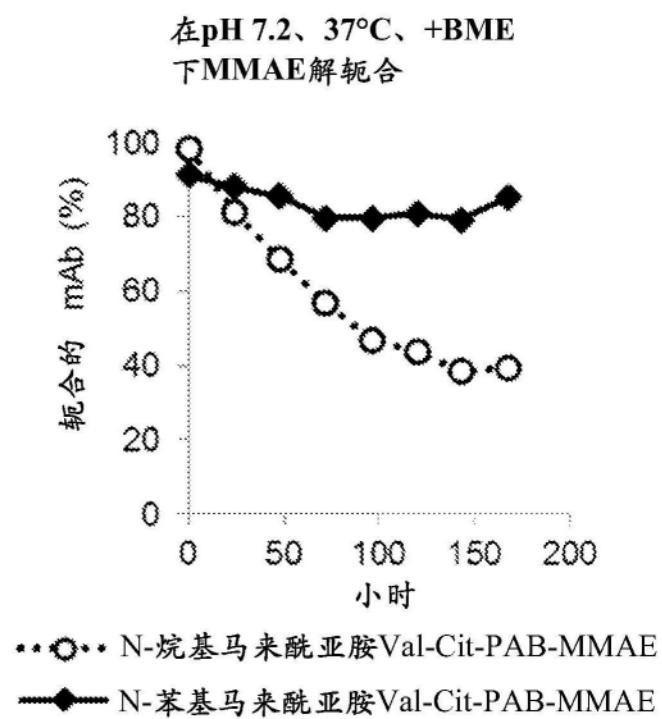
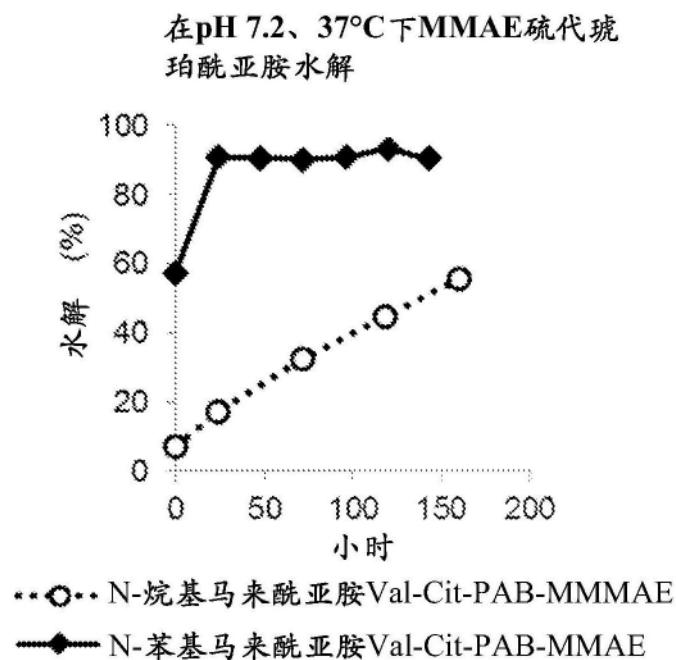


图23 在包含巯基 (BME) 的缓冲液中 MMAE T289C mAb 鞣合物的稳定性

A



B

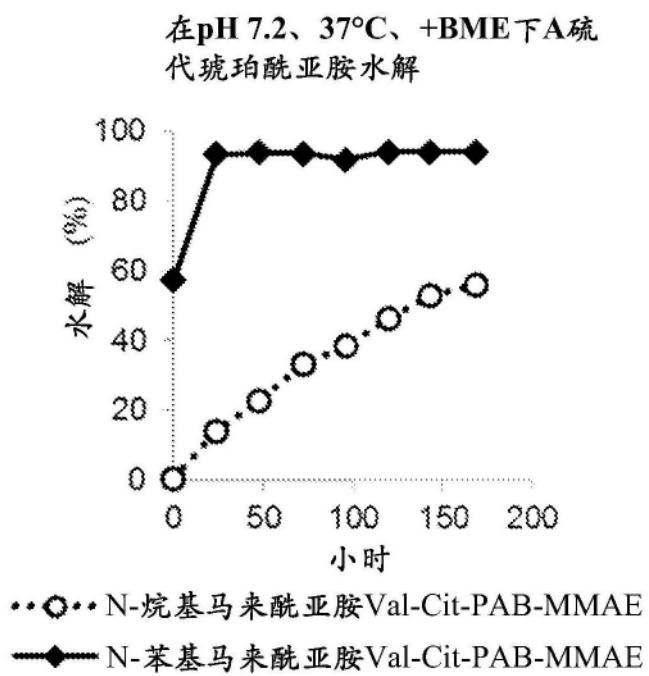


图24 在T289C mAb轭合物中MMAE-硫代琥珀酰亚胺的水解

在pH 7.2、37°C下MMAE解轭合7天

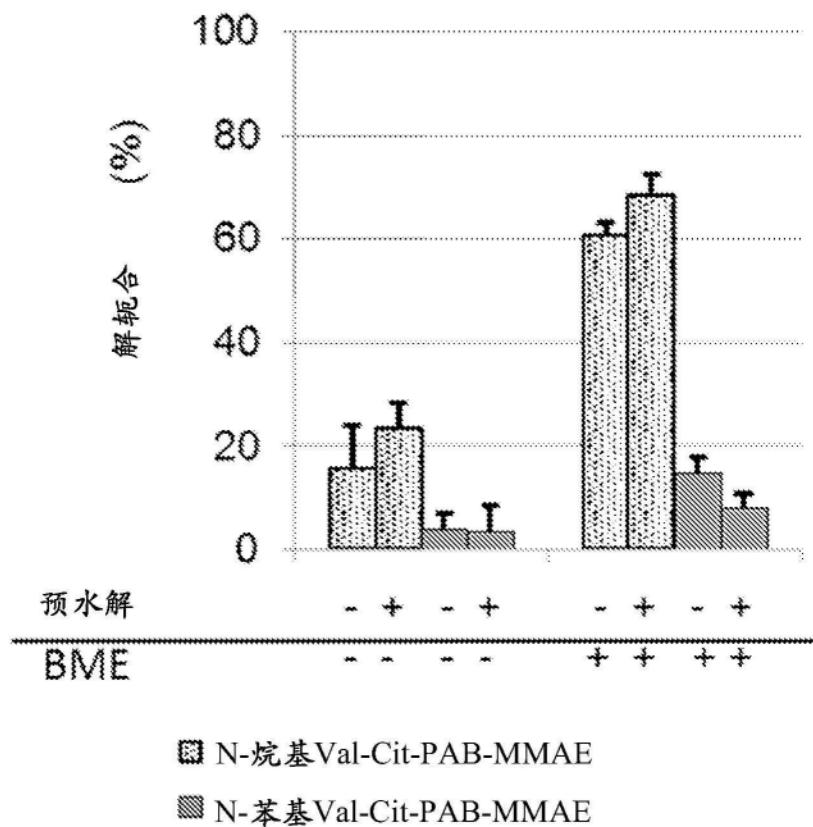


图25 在包含巯基(BME)的缓冲液中MMAE T289C mAb轭合物的稳定性

在pH 7.2、37°C下硫代琥珀酰亚胺水解

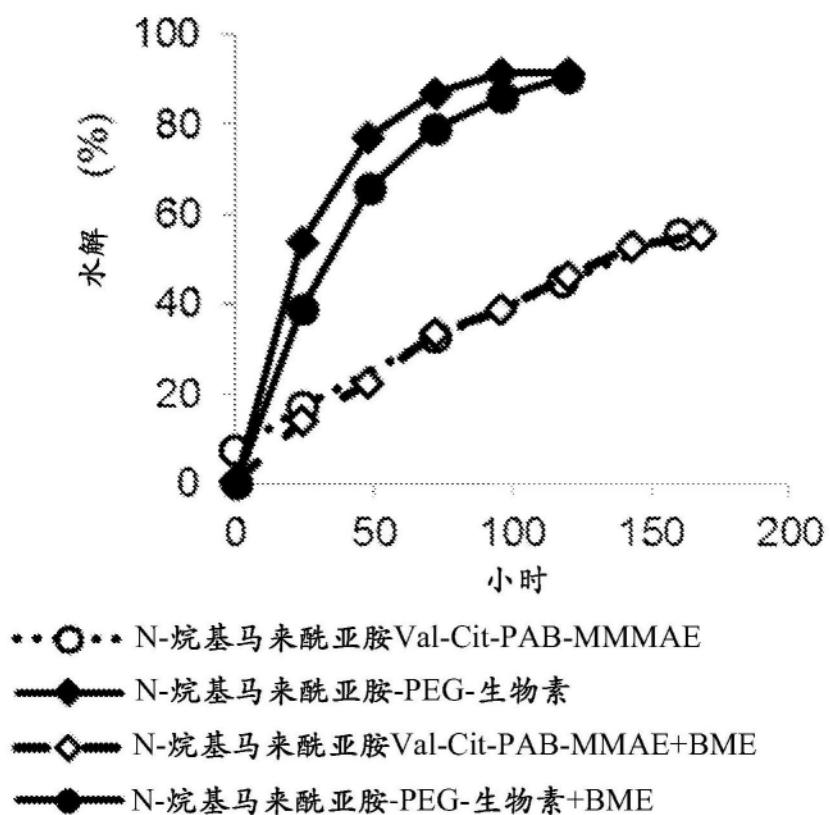
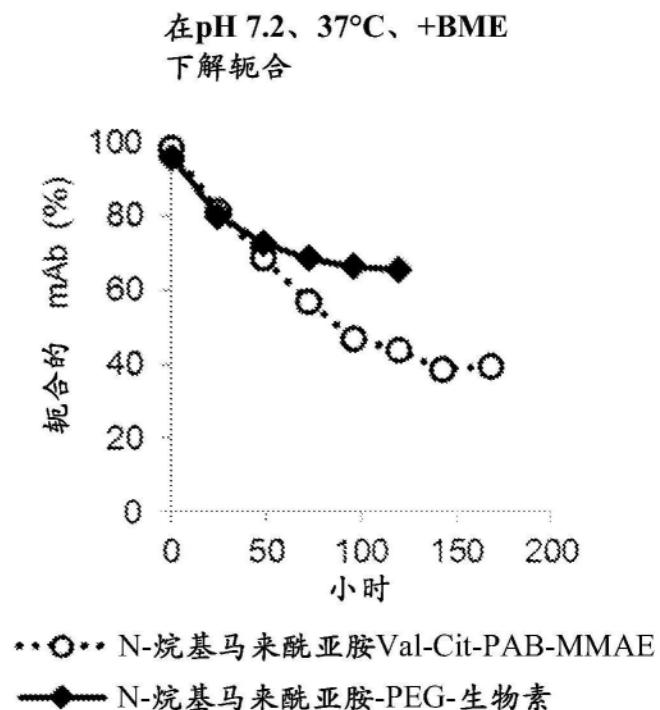


图26 在BME激发中观察到的PEG-生物素和MMMAE硫代琥珀酰亚胺水解的比较

A



B

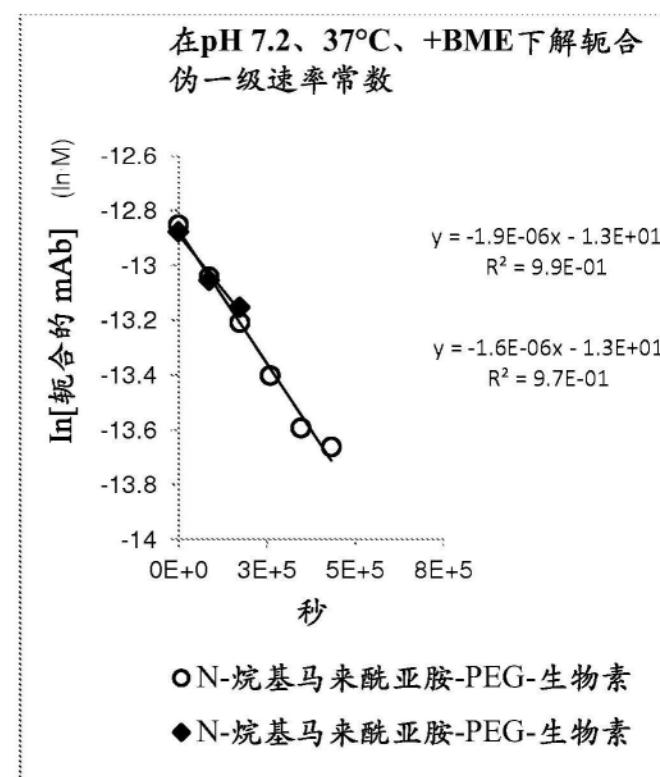
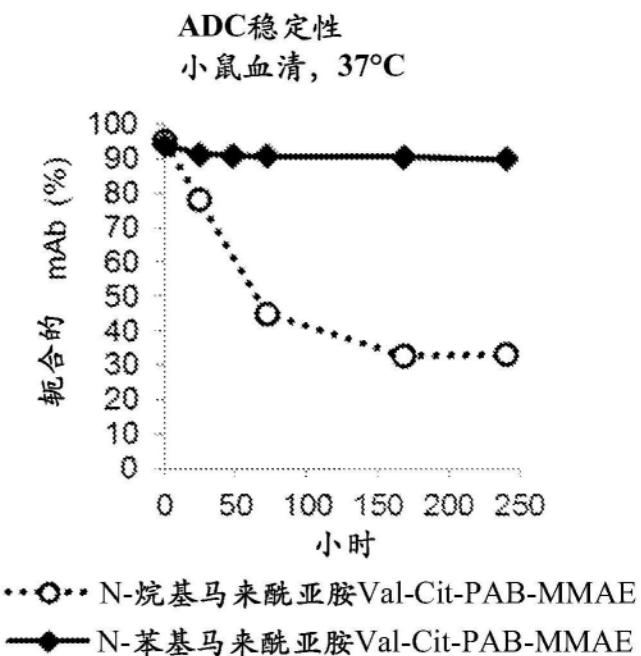


图27 在存在β-巯基乙醇的情况下解轭合的比较:PEG-生物素对比MMAE有效负载

A



B

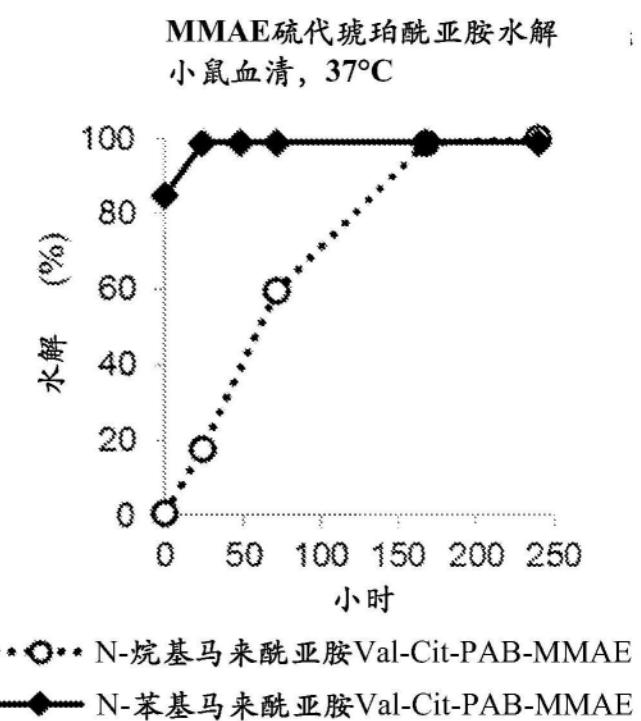
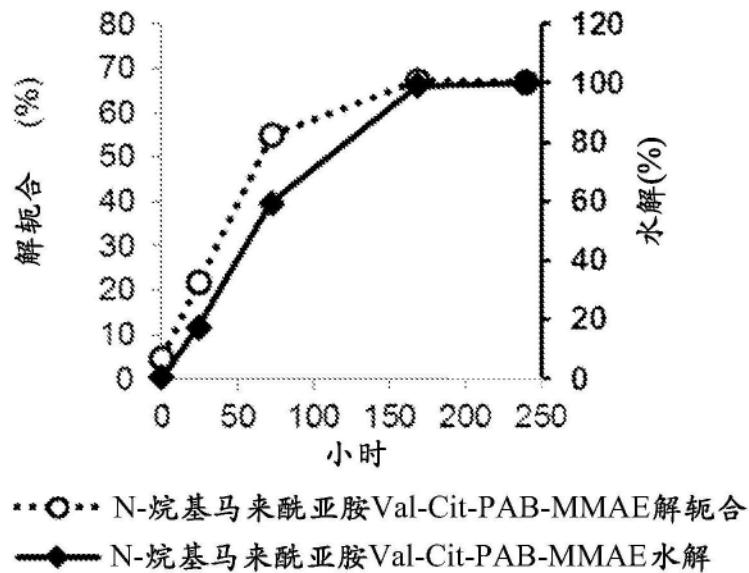


图28 小鼠血清中MMAE-T289C ADC的稳定性

A

在pH 7.2、37°C、+BME下烷基硫代琥珀酰
亚胺解轭合和水解



B

在小鼠血清中在37°C下ADC解
轭合7天

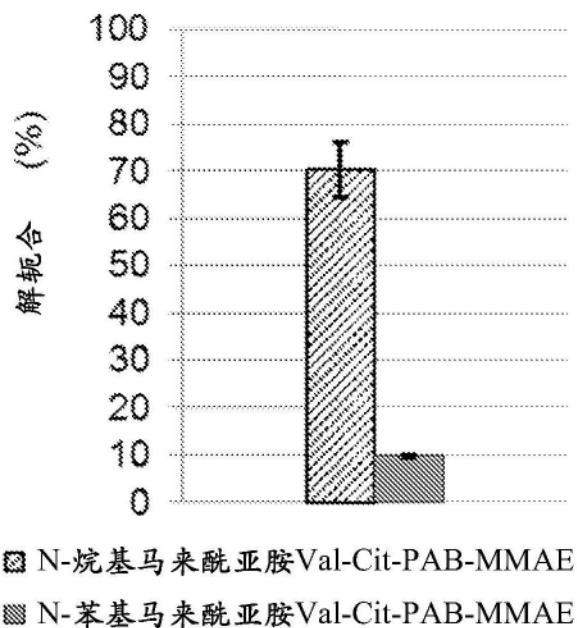


图29 小鼠血清中MMAE-T289C ADC的稳定性

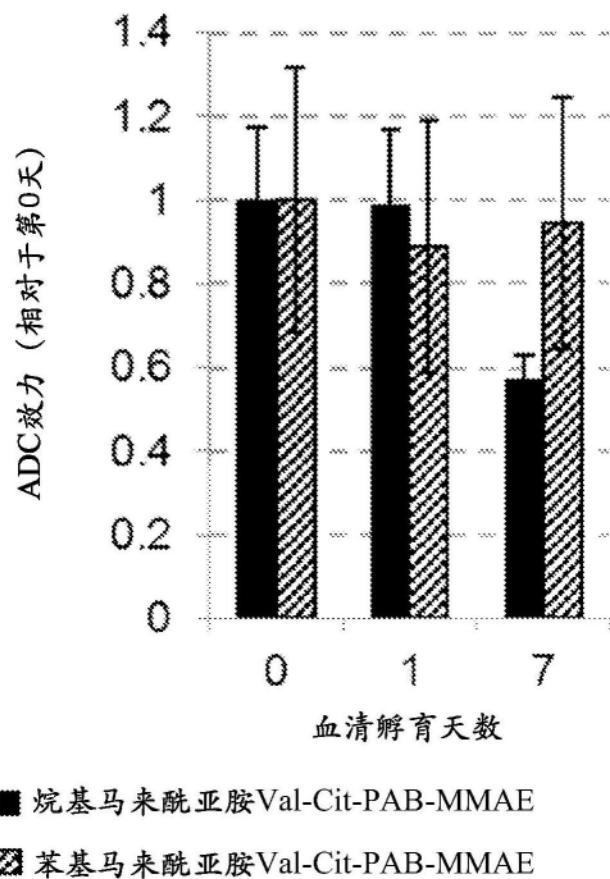


图30 在小鼠血清中孵育之后ADC对MDA-MB-361癌细胞的活性

通用概念:

- 1) 用双官能N-芳基马来酰亚胺修饰巯基
- 2) 钝合有效负载以修饰巯基

异双官能接头

- 反应性化学1: N-芳基马来酰亚胺
- 反应性化学2: 可变的 (实例: 叠氮化物、炔烃、烯烃等)

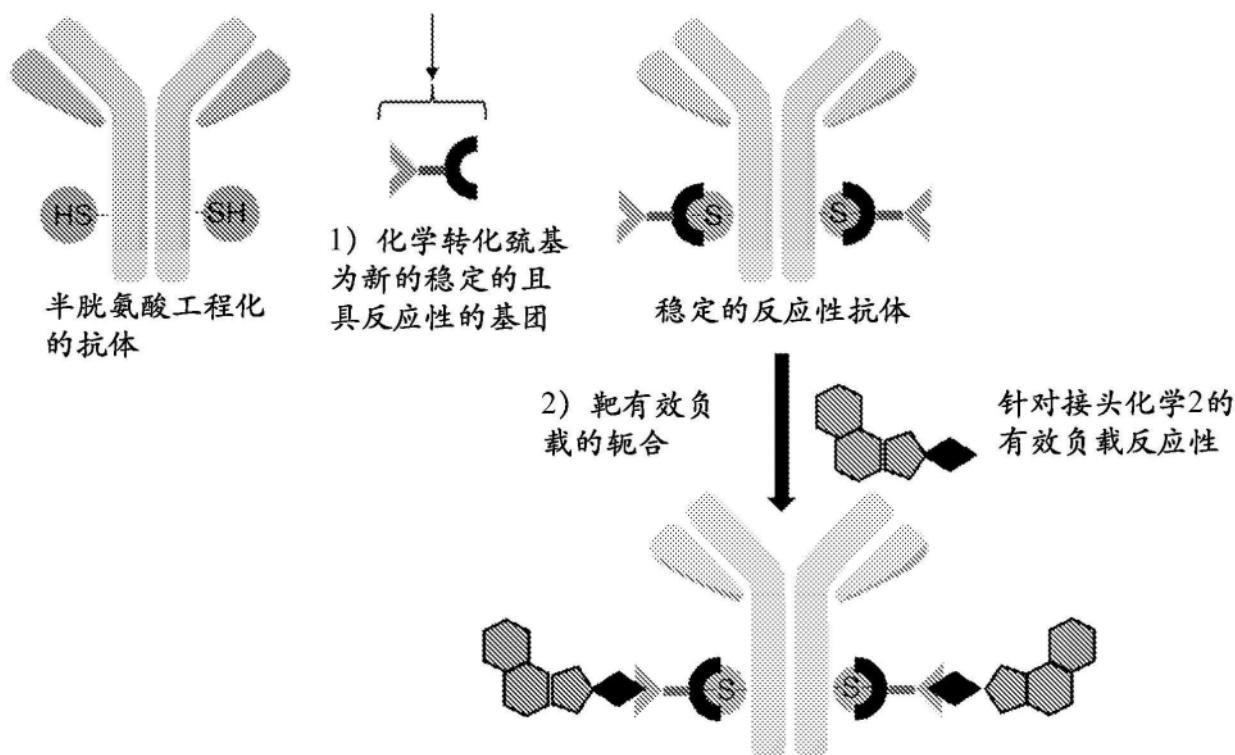


图31 羒基连接的ADC的稳定化的替代形式

未处理的mAb

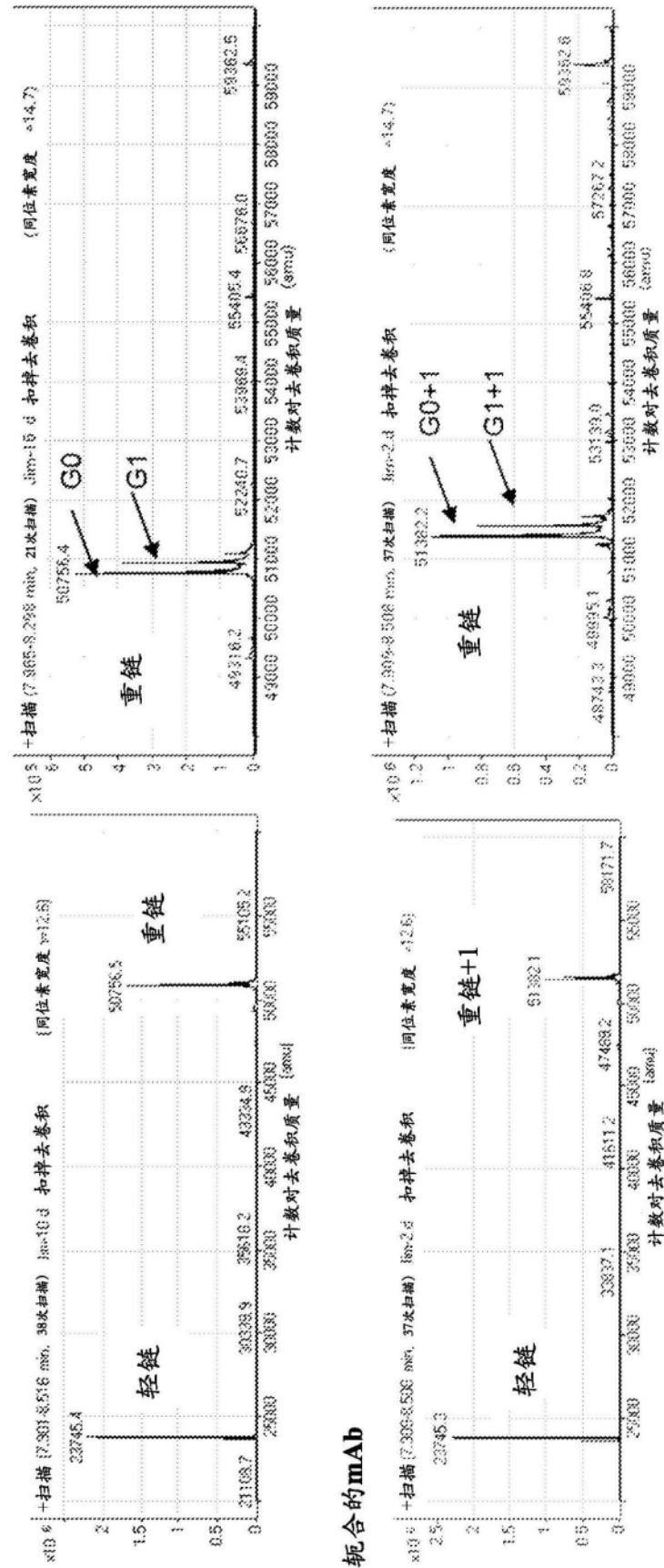


图32 N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物的质谱分析

未处理的mAb

结合的mAb

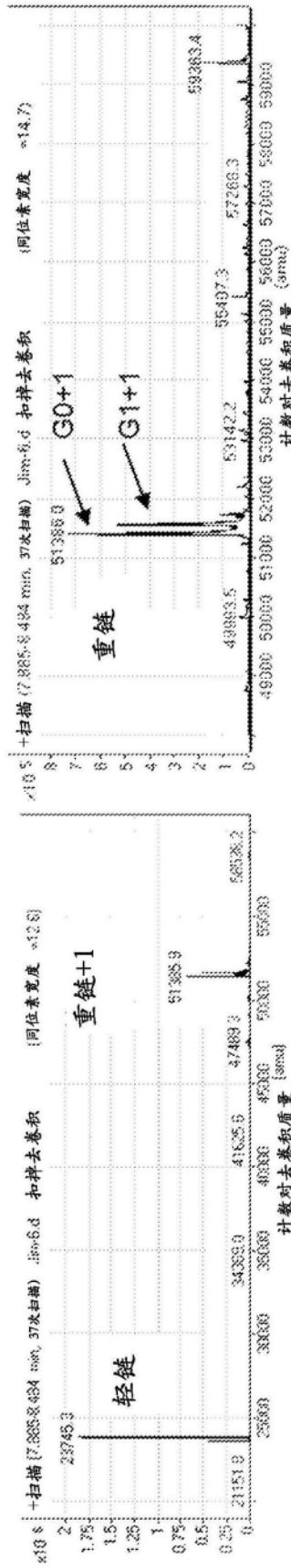


图33 N-氟苯基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物的质谱分析

未处理的mAb

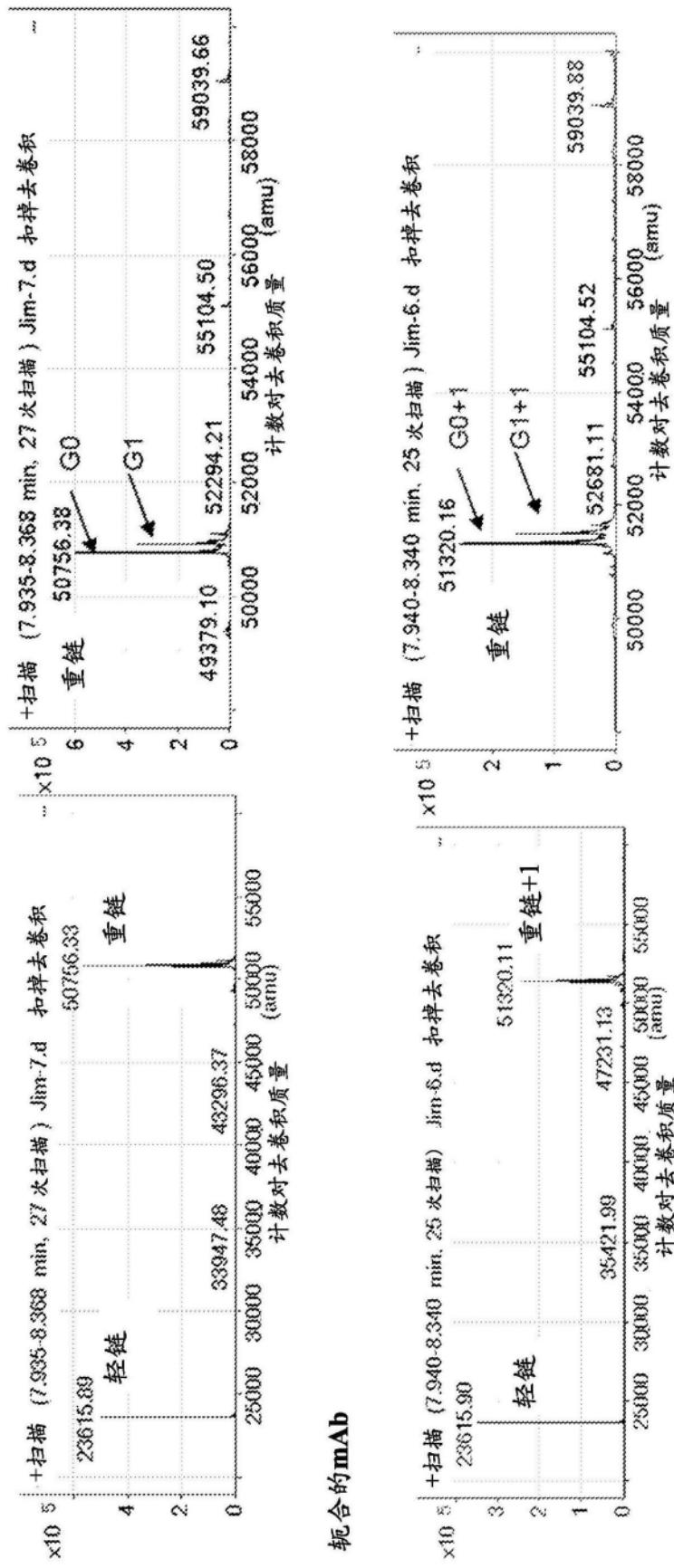


图34 N-烷基马来酰亚胺-PEG-BCN-mAb轭合物的质谱分析

x-马来酰亚胺-BCN与T289C mAb的轭合

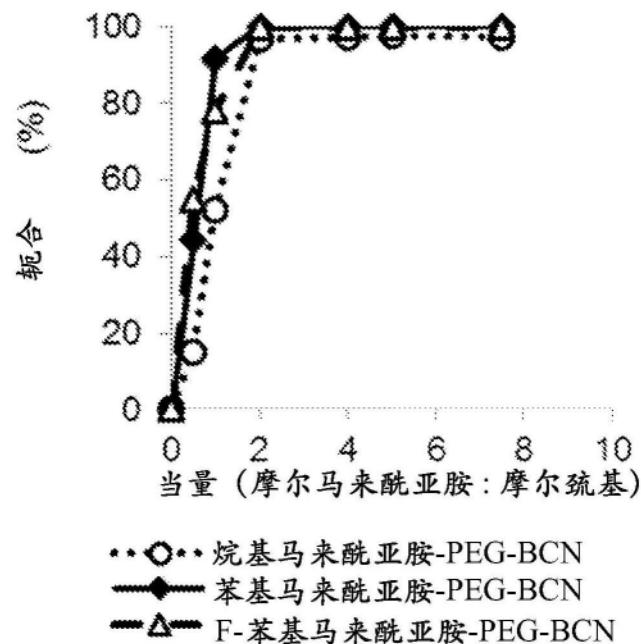
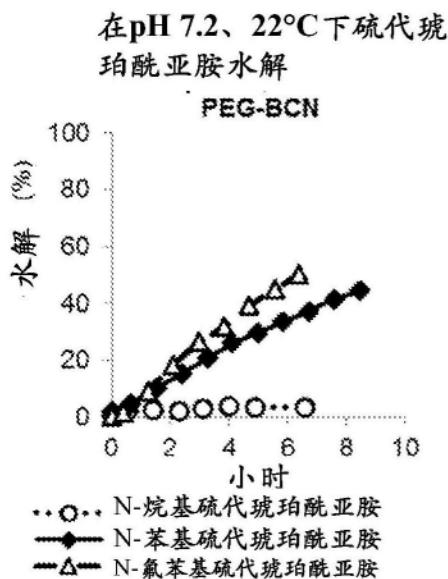
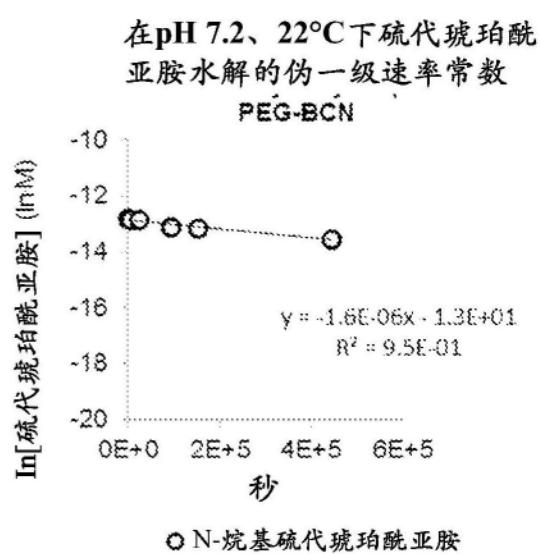


图35 x-马来酰亚胺-PEG-BCN与T289C mAb的轭合效率

A



B



C

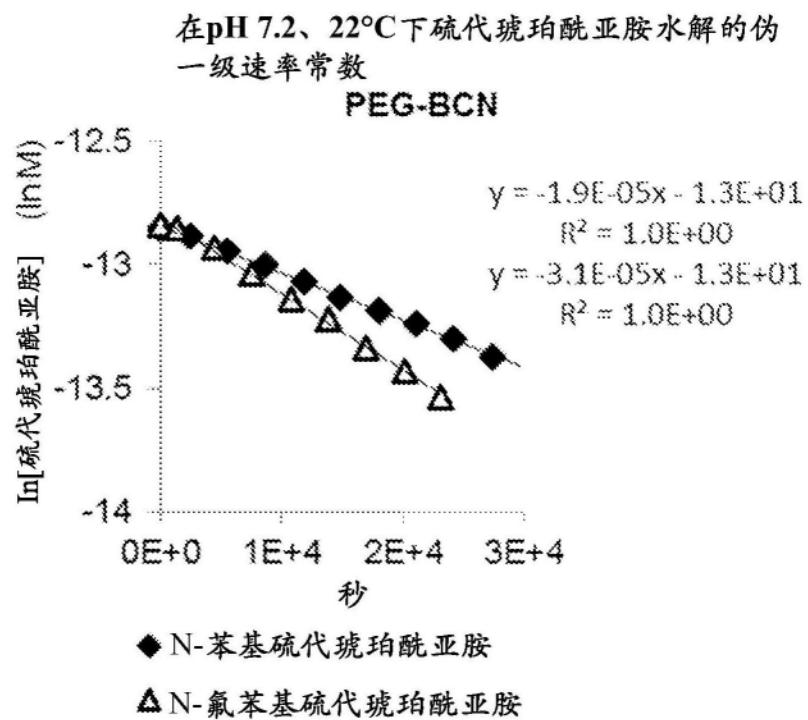


图36 x-马来酰亚胺-PEG-BCN复合物的硫代琥珀酰亚胺水解动力学

还原LCMS

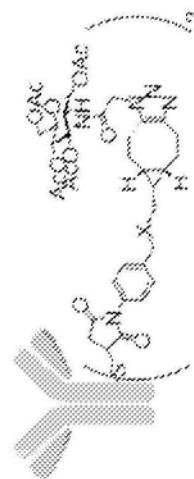
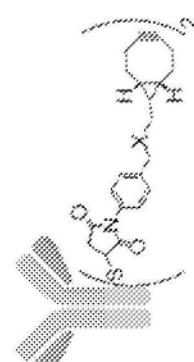
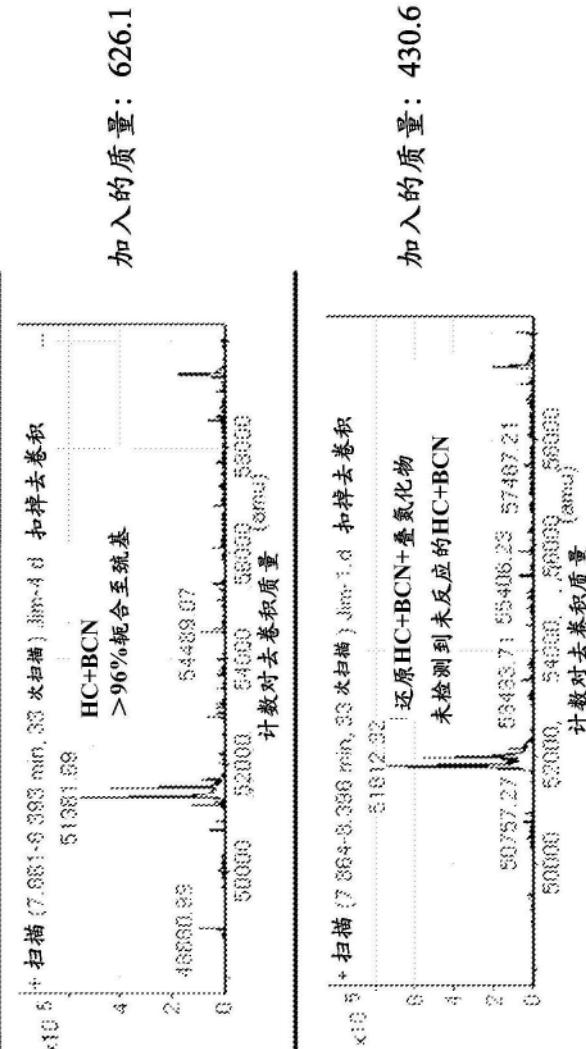
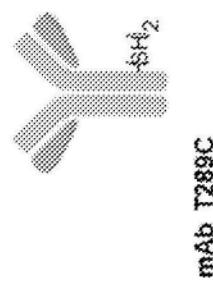
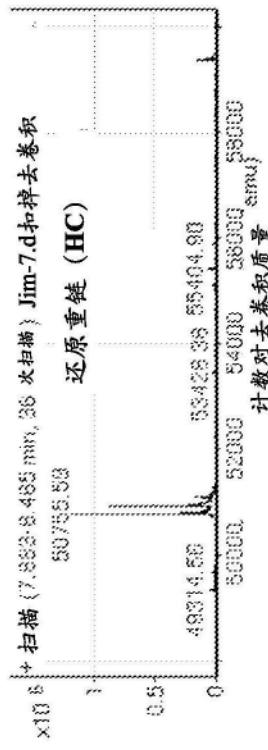


图37 Ab-BCN-Ac4GlcNAz轭合物的分析

还原糖基化质谱法

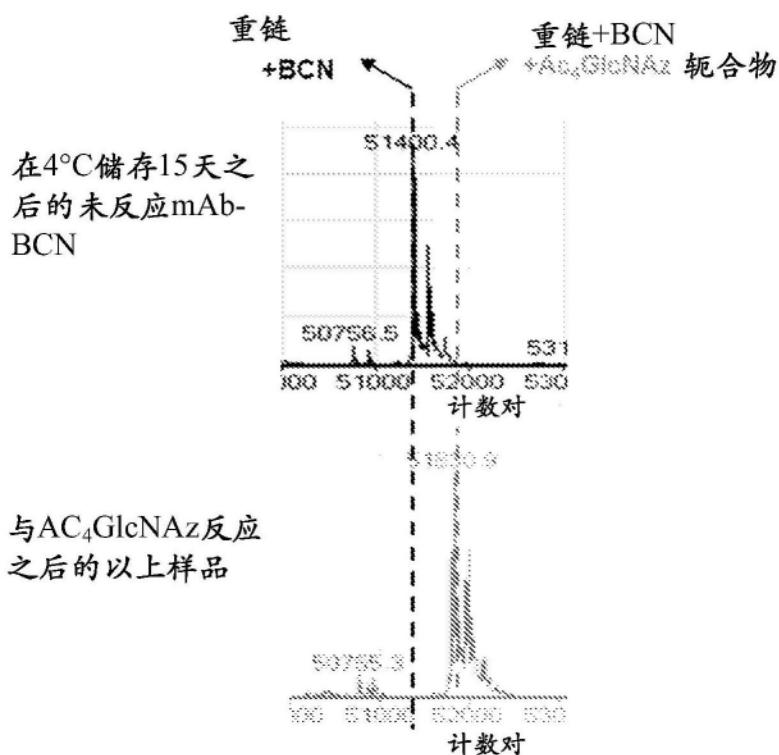


图38 在储存后mAb-BCN轭合物的反应性

5T4靶向的T289C mAb - N-苯基马来酰亚胺-PEG-BCN轭合物

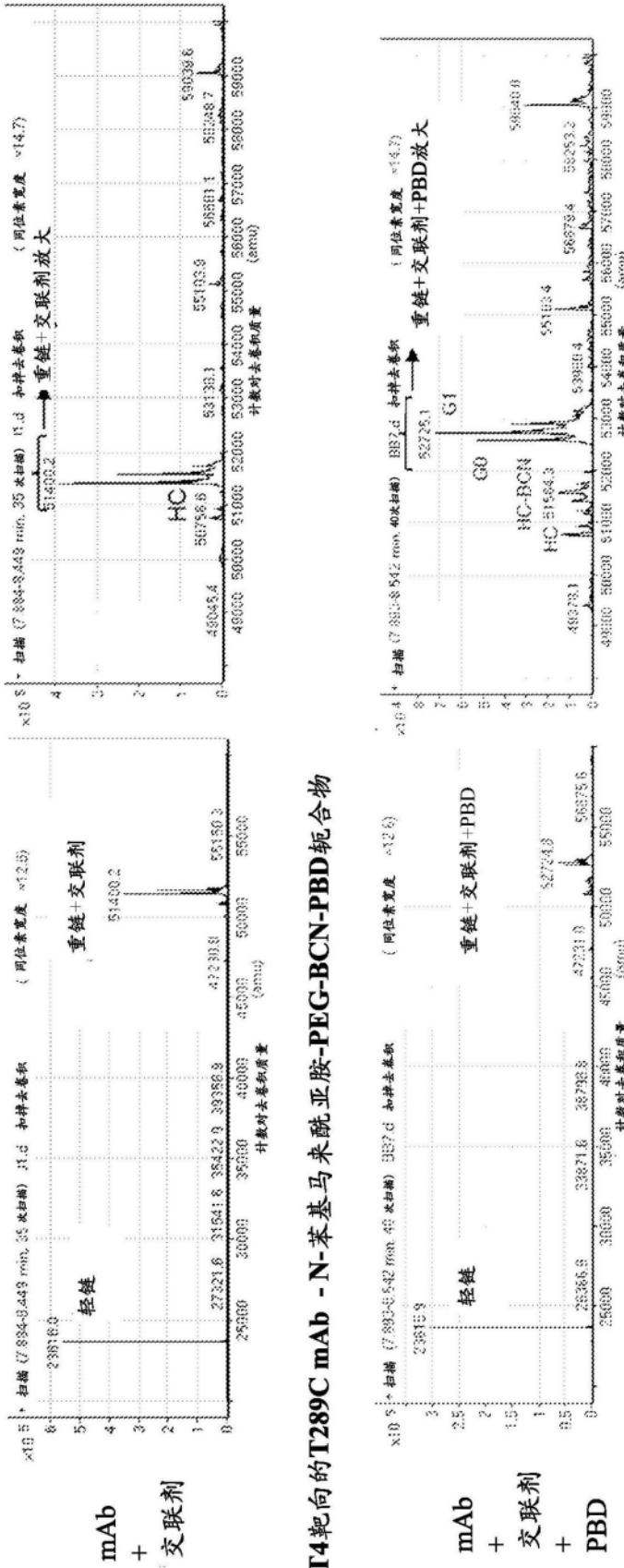


图39 mAb-PBD轭合物的分析

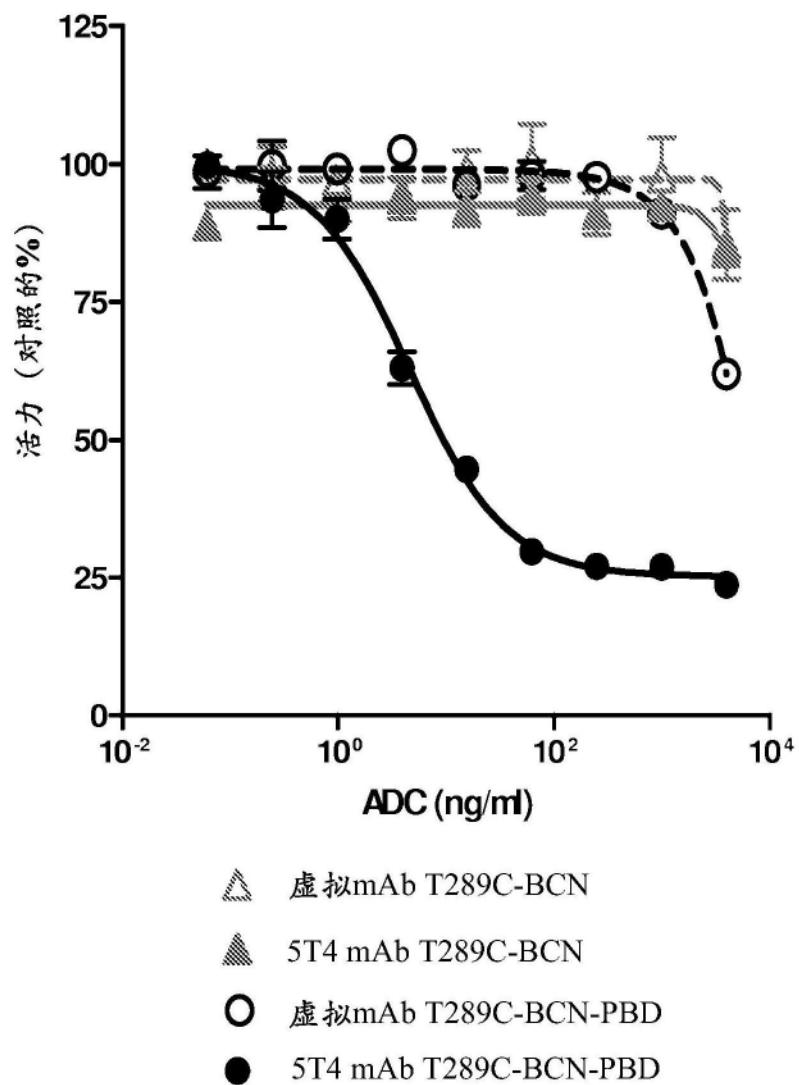


图40 mAb-BCN-PBD ADC对MDA-MB-361乳腺癌细胞的体外活性