



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117642185 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 01

(21) 申请号 202180094477.9

(22) 申请日 2021.12.22

(30) 优先权数据

20216838.1 2020.12.23 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/087312 2021.12.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/136555 EN 2022.06.30

(71) 申请人 路德维希-马克西米利安慕尼黑大学

地址 德国慕尼黑兄弟学校广场1号

申请人 柏林合作研究协会

(72) 发明人 H·莱昂哈特 J·海尔玛·斯梅茨

D·舒马赫 M·格拉赫

C·哈肯伯格 M-A·卡斯珀

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

专利代理师 曹津燕

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/65 (2006.01)

权利要求书5页 说明书95页
序列表10页 附图19页

(54) 发明名称

改进的CD30靶向抗体药物偶联物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含:(a) 维布妥昔,其中维布妥昔在维布妥昔的轻链、重链或全部重链和轻链的C末端包含微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列和非天然氨基酸;和(b) 至少一种药物部分;其中药物部分经由连接子偶联至所述非天然氨基酸中的每一个。本发明还涉及制备所述化合物的方法、包含所述化合物的药物组合物及其用途。

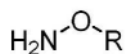
1. 一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含:
 - (a) 维布妥昔(Brentuximab),其中维布妥昔在所述维布妥昔的轻链、重链或全部重链和轻链的C末端包含微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列和非天然氨基酸;以及
 - (b) 至少一种药物部分;其中药物部分经由连接子偶联至所述非天然氨基酸中的每一个。
2. 根据权利要求1所述的ADC,其中维布妥昔的重链具有包含SEQ ID NO:1或由其组成的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1具有至少95%的序列同一性;和/或其中维布妥昔的轻链具有包含SEQ ID NO:2或由其组成的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2具有至少95%的序列同一性。
3. 根据权利要求2所述的ADC,其中维布妥昔由重链和轻链组成,所述重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC,其中所述药物部分选自喜树碱类、美登木素生物碱(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamycin)、倍癌霉素(duocarmycin)、微管溶素(tubulysin)、鹅膏毒素(amatotoxin)、尾海兔素(dolastatin)和澳瑞他汀(auristatin),例如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、吡咯并苯并二氮杂卓二聚体、吲哚并苯并二氮杂卓二聚体、放射性同位素、治疗性蛋白质和肽(或其片段)、核酸、PROTAC、激酶抑制剂、MEK抑制剂、KSP抑制剂及其类似物或前药。
5. 根据权利要求4所述的ADC,其中所述药物部分是MMAE。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC,其中微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列具有至少氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4$ (SEQ ID NO:3),其中 X_1 和 X_2 是任何氨基酸, X_3 是E、D或C且 X_4 是E。
7. 根据权利要求6所述的ADC,其中 X_2 为G、S、A、V或F和/或其中 X_1 为E、D、A、K或P。
8. 根据权利要求7所述的ADC,其中所述识别序列是EGEE(SEQ ID NO.4)。
9. 根据权利要求7所述的ADC,其中所述识别序列是VDSVEGEGEEGEE(SEQ ID No.5)、SVEGEGEEGEE(SEQ ID No.6)、SADGEDEGEE(SEQ ID No.7)、SVEAEAEDEGEE(SEQ ID No.8)、SYEDEDEGEE(SEQ ID No.9)或SFEEENEGEE(SEQ ID No.10)。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC,其中所述非天然氨基酸是2-取代、3-取代或4-取代的酪氨酸或在苄基位置取代的酪氨酸衍生物。
11. 根据权利要求10所述的ADC,其中所述3-取代或4-取代的酪氨酸衍生物是3-硝基酪氨酸、3-氨基酪氨酸、3-叠氮基酪氨酸、3-甲酰基酪氨酸、3-乙酰基酪氨酸或4-氨基苯丙氨酸。
12. 根据权利要求11所述的ADC,其中所述3-取代或4-取代的酪氨酸衍生物是3-甲酰酪氨酸。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC,其中所述连接子是可切割的。
14. 根据权利要求13所述的ADC,其中连接子是蛋白酶可切割的。
15. 根据权利要求14所述的ADC,其中所述蛋白酶是组织蛋白酶,例如组织蛋白酶B。
16. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC,其中所述连接子包含缬氨酸-瓜氨酸部分。
17. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC,其中所述连接子包含羟胺基团,所述非天然氨基酸包含位于芳环中羟基邻位的甲酰基,其中偶联后所述连接子的羟胺基团与所述非天然氨基酸的甲酰基形成肟。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC, 其中维布妥昔与两个、四个、六个或八个药物部分偶联。

19. 根据权利要求18所述的ADC, 其中维布妥昔与两个或四个药物部分偶联。

20. 根据权利要求19所述的ADC, 其中维布妥昔与两个药物部分偶联。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC, 其中所述连接子在偶联至所述非天然氨基酸之前具有结构1所示的结构:

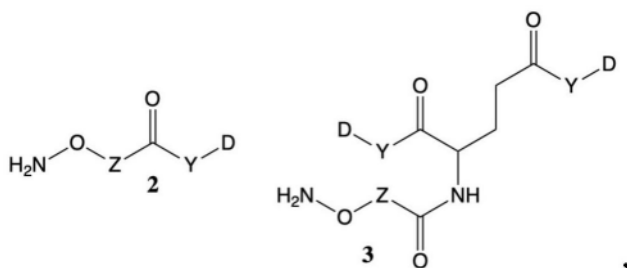


1 ,

其中R是一个或多个药物部分, 其任选地通过一个或多个切割位点偶联至结构1的羟胺。

22. 根据权利要求21所述的ADC, 其中所述结构1的羟胺偶联到所述非天然氨基酸。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC, 其中所述连接子在偶联至所述非天然氨基酸之前具有结构2或3所示的结构:



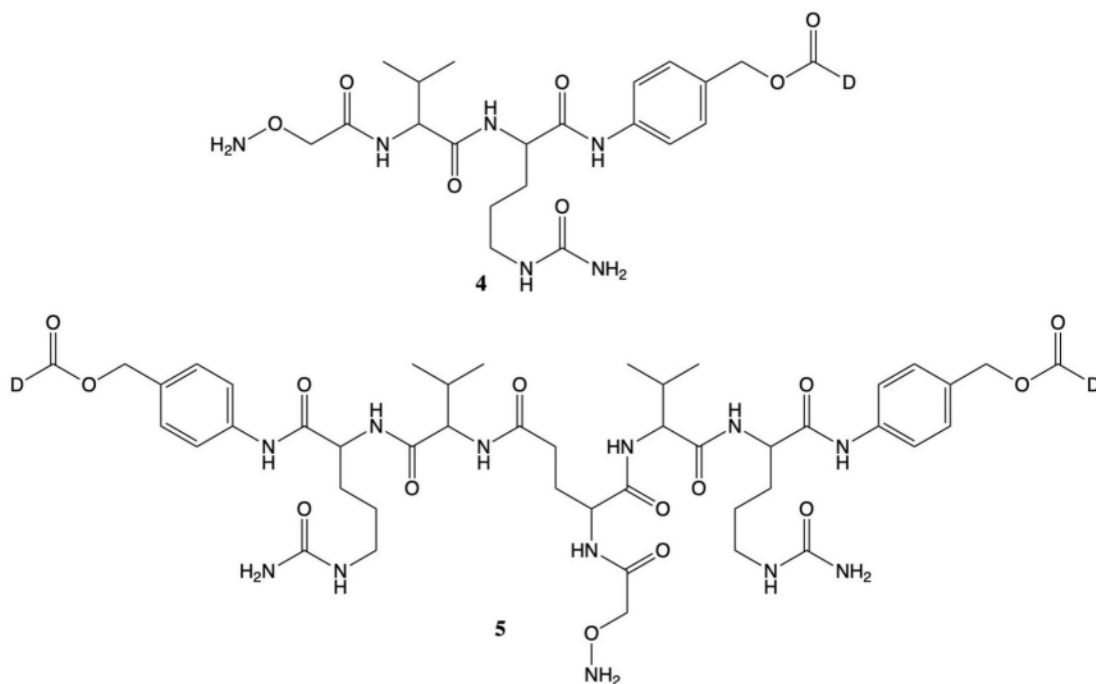
其中Z选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基;

其中D是一个或多个药物部分; 以及

其中Y是切割位点, 例如组织蛋白酶如组织蛋白酶B的切割位点。

24. 根据权利要求23所述的ADC, 其中所述结构2或3的羟胺偶联到所述非天然氨基酸。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的ADC, 其中所述连接子在偶联至所述非天然氨基酸之前具有结构4或5所示的结构, 其中D是药物部分:



26. 根据权利要求25所述的ADC,其中所述非天然氨基酸是3-甲酰基酪氨酸,所述连接子的所述羟胺基团与所述非天然氨基酸的3-甲酰基形成肟。

27. 根据权利要求26所述的ADC,其中所述药物部分是MMAE。

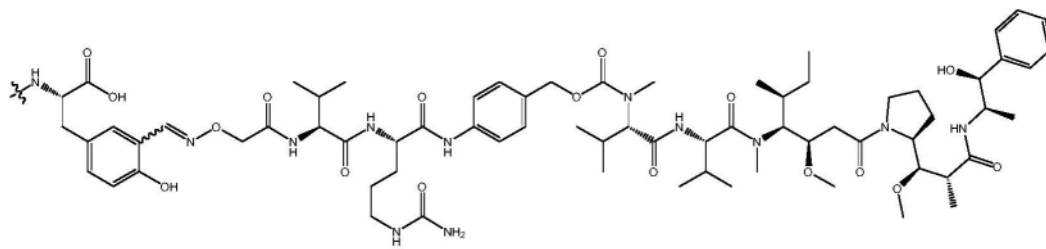
28. 一种抗体-药物偶联 (ADC), 其包含:

(a) 维布妥昔, 其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

每条轻链,包括所述识别序列,具有SEQ ID NO:11;以及

维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1;以及

(b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:



其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。

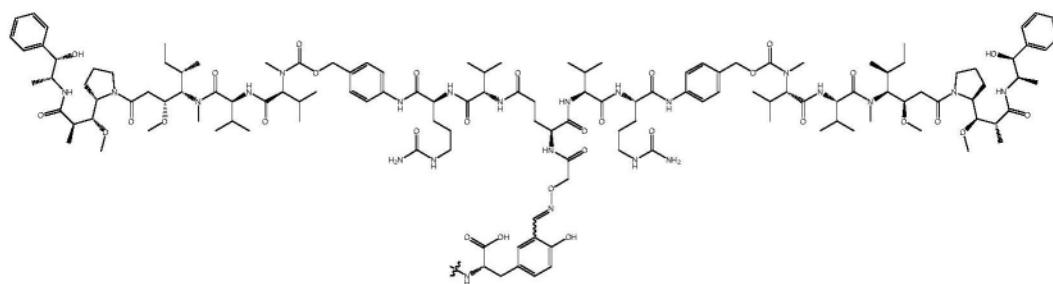
29. 一种抗体-药物偶联物 (ADC), 其包含:

(a) 维布妥昔, 其中维布妥昔在每条轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

每条轻链,包括所述识别序列,具有SEQ ID NO:11;以及

维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1;以及

(b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:



其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。

30. 一种生产根据权利要求1-29中任一项所述的ADC的方法, 包括

(a) 在维布妥昔的轻链、重链或轻链和重链两者的C端引入或添加微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列;

(b) 在微管蛋白酪氨酸连接酶和非天然氨基酸的存在下, 在适于微管蛋白酪氨酸连接酶将所述维布妥昔与所述非天然氨基酸连接的条件, 使步骤(a)中获得的维布妥昔接触; 以及

(c) 将包含药物部分的任选可切割的连接子与步骤(b)中得到的所述经连接的维布妥昔偶联。

31. 一种ADC, 其可通过权利要求30的方法获得或者正在获得。

32. 一种药物组合物, 其包含权利要求1至29或31中任一项所述的ADC。

33. 根据权利要求1-29或31中任一项所述的ADC用于治疗疾病的方法中。

34. 根据权利要求33所述供使用的ADC, 其中所述疾病与CD30的过表达相关。

35. 根据权利要求33或34所述供使用的ADC, 其中所述疾病选自淋巴瘤, 例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL); 白血病, 例如急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病; 生殖细胞癌; 移植物抗宿主病(GvHD)和狼疮, 特别是系统性红斑狼疮(SLE); 或

其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-未特别指明(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

36. 根据权利要求35所述的ADC, 其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL); 或

其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤(PTCL), 包括间变性大细胞淋巴瘤(ALCL); 或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL), 包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤(pcALCL)。

37. 权利要求32所述的药物组合物用于治疗疾病的方法中。

38. 根据权利要求37所述供使用的药物组合物, 其中所述疾病与CD30的过表达有关。

39. 根据权利要求37或38所述供使用的药物组合物, 其中所述疾病选自淋巴瘤, 例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL); 白血病, 例如急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病; 生殖细胞癌; 移植物抗宿主病(GvHD)和狼疮, 特别是系统性红斑狼疮(SLE); 或

其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-未特别指明 (PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤 (AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤 (EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤 (ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤 (ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

40. 根据权利要求39所述供使用的药物组合物, 其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤 (HL) 或间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL); 或

其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤 (PTCL), 包括间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL); 或皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL), 包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤 (pcALCL)。

41. 权利要求1-29或31中任一项所述的ADC在制备用于治疗与CD30过表达相关的疾病的药物中的用途。

42. 根据权利要求41所述的用途, 其中所述疾病选自淋巴瘤, 例如霍奇金淋巴瘤 (HL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤 (EATL); 白血病, 例如急性髓性白血病 (AML)、急性淋巴母细胞白血病 (ALL) 和肥大细胞白血病; 生殖细胞癌; 移植物抗宿主病 (GvHD) 和狼疮, 特别是系统性红斑狼疮 (SLE); 或

其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-未特别指明 (PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤 (AITL)、肠病相关性T细胞淋巴瘤 (EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤 (ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤 (ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

43. 根据权利要求42所述的用途, 其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤 (HL) 或间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL); 或

其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤 (PTCL), 包括间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL); 或皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL), 包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤 (pcALCL)。

44. 权利要求32所述的药物组合物在制备用于治疗与CD30过表达相关的疾病的药物中的用途。

45. 根据权利要求44所述的用途, 其中所述疾病选自淋巴瘤, 例如霍奇金淋巴瘤 (HL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关性T细胞淋巴瘤 (EATL); 白血病, 例如急性髓性白血病 (AML)、急性淋巴母细胞白血病 (ALL) 和肥大细胞白血病; 生殖细胞癌; 移植物抗宿主病 (GvHD) 和狼疮, 特别是系统性红斑狼疮 (SLE); 或

其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-未特别指明 (PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤 (AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤 (EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤 (ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤 (ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

46. 根据权利要求45所述的用途, 其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤 (HL) 或间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL); 或

其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤 (PTCL), 包括间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL); 或皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL), 包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤 (pcALCL)。

改进的CD30靶向抗体药物偶联物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月23日递交的欧洲专利申请20216838.1的优先权的权益,其内容在此通过引用而整体并入用于所有目的。

技术领域

[0003] 本发明涉及包含维布妥昔 (Brentuximab) 和至少一种药物部分的抗体-药物偶联物 (ADC)、其制备方法、包含其的药物组合物及其用途。

[0004] 发明背景

[0005] 淋巴细胞恶性肿瘤占有所有癌症的约4-5%,且源自淋巴系统。在经典的霍奇金淋巴瘤和几种非霍奇金淋巴瘤,如间变性大细胞淋巴瘤和外周T细胞淋巴瘤中,CD30已被证明是近年来靶向治疗的有价值的肿瘤生物标志物。随着2011年维布妥昔多汀 (Brentuximab vedotin) 首次同类产品的批准,第一种CD30特异性生物药物已经进入市场,并且从此成为具有良好总体反应的不可缺少的治疗选择。维布妥昔多汀由靶向肿瘤的嵌合IgG1抗体成分维布妥昔和连接子-有效载荷组分组成,该连接子-有效载荷组分包含与有效载荷部分单甲基-澳瑞他汀E化学连接的组织蛋白酶B可切割的缬氨酸-瓜氨酸连接子部分,其在细胞内递送和释放时有效诱导凋亡。

[0006] 维布妥昔多汀是抗体药物偶联物 (ADC),是一种近年来已经受到广泛关注的相对新颖的治疗方式。这些生物药物将有效的细胞毒性药物直接递送至肿瘤细胞,因此与常规化疗相比具有拓宽治疗窗口的潜力。迄今为止,已经批准了九种随机偶联的ADC。这些分子基于随机与暴露的赖氨酸残基反应的活化的羧酸(例如Mylotarg、Benspoa、Kadcya)偶联。或者,马来酰亚胺已经成为链内二硫化物还原后将连接子-有效载荷部分偶联至游离半胱氨酸的最重要的偶联试剂(例如维布妥昔多汀(以 **Adcetris®** 提供)、Polivy、Padecv、Enhertu、Trodely、Blenrep)。

[0007] 然而,已知维布妥昔多汀在临床常规中会引起敏感和持久的毒性副作用,例如血小板减少症。

[0008] 因此,仍然需要一种改进的含维布妥昔的ADC,优选具有较少的副作用。本发明旨在解决这种需要。

[0009] 发明简述

[0010] 这一需求通过如权利要求书和本文所述的实施方案中所限定的主题来解决。

[0011] 因此,本发明涉及抗体-药物偶联物 (ADC),其包含:

[0012] (a) 维布妥昔,其中维布妥昔在维布妥昔的轻链、重链或所有重链和轻链的C末端包含微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列和非天然氨基酸;以及

[0013] (b) 至少一种药物部分;

[0014] 其中药物部分经由连接子偶联至所述非天然氨基酸中的每一个。

[0015] 维布妥昔的重链可以具有包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:1具有至少95%的序列同一性,和/或其中维布妥昔的轻链具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列

或与SEQ ID NO:2具有至少95%的序列同一性,优选地,维布妥昔由重链和轻链组成,重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,轻链由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0016] 药物部分可以选自喜树碱类、美登木素生物碱(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamycin)、倍癌霉素(duocarmycin)、微管溶素(tubulysin)、鹅膏毒素(amatotoxin)、尾海兔素(dolastatin)和澳瑞他汀(auristatin),例如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、吡咯并苯并二氮杂卓二聚体、吡咯并苯并二氮杂卓二聚体、放射性同位素、治疗性蛋白质和肽(或其片段)、核酸、PROTAC、激酶抑制剂、MEK抑制剂、KSP抑制剂及其类似物或前药,优选地,药物部分是MMAE。

[0017] 微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列可至少具有氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4$ (SEQ ID NO:3),其中 X_1 和 X_2 是任何氨基酸, X_3 是E、D或C, X_4 是E,优选地,其中 X_2 是G、S、A、V或F,和/或其中 X_1 是E、D、A、K或P。

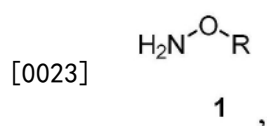
[0018] 所述识别序列可以是EGEE(SEQ ID NO.4),优选地,所述识别序列是VDSVEGEGEE(SEQ ID NO.5)、SVEGEGEE(SEQ ID NO.6)、SADGEDEGEE(SEQ ID NO.7)、SVEAEAE(SEQ ID NO.8)、SYEDEDEGEE(SEQ ID NO.9)或SFEEENEGEE(SEQ ID NO.10)。

[0019] 所述非天然氨基酸可以是2-取代、3-取代或4-取代的酪氨酸或在苄基位置取代的酪氨酸衍生物。所述3-或4-取代的酪氨酸衍生物可以是3-硝基酪氨酸、3-氨基酪氨酸、3-叠氮基酪氨酸、3-甲酰基酪氨酸、3-乙酰基酪氨酸或4-氨基苯丙氨酸,优选地,所述非天然氨基酸是3-甲酰基酪氨酸。

[0020] 所述连接子可以是可切割的,优选被蛋白酶切割,更优选被组织蛋白酶如组织蛋白酶B切割。所述连接子可包含缬氨酸-瓜氨酸部分。所述连接子可包含羟胺基团且所述非天然氨基酸包含位于芳环例如3-甲酰基酪氨酸中的羟基邻位的甲酰基,且其中所述连接子的羟胺基团偶联后与非天然氨基酸的甲酰基形成肟。

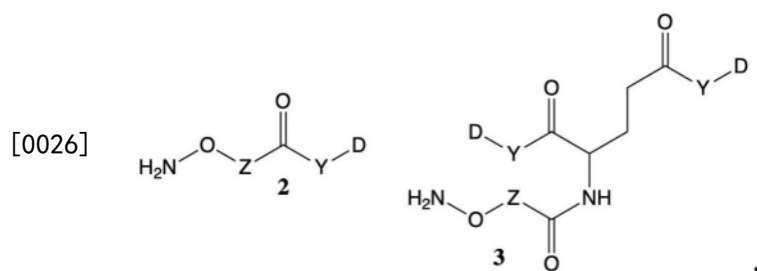
[0021] 维布妥昔可偶联至两个、四个、六个或八个,优选两个或四个药物部分,更优选两个药物部分。

[0022] 在偶联至非天然氨基酸之前,所述连接子可具有结构1中所描绘的结构:



[0024] 其中R是一个或多个药物部分,其任选地通过一个或多个切割位点偶联至结构1的羟胺上,优选地,其中结构1的羟胺偶联至所述非天然氨基酸。

[0025] 在偶联至所述非天然氨基酸之前,所述连接子可具有结构2或3中所描绘的结构:



[0027] 其中Z选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取

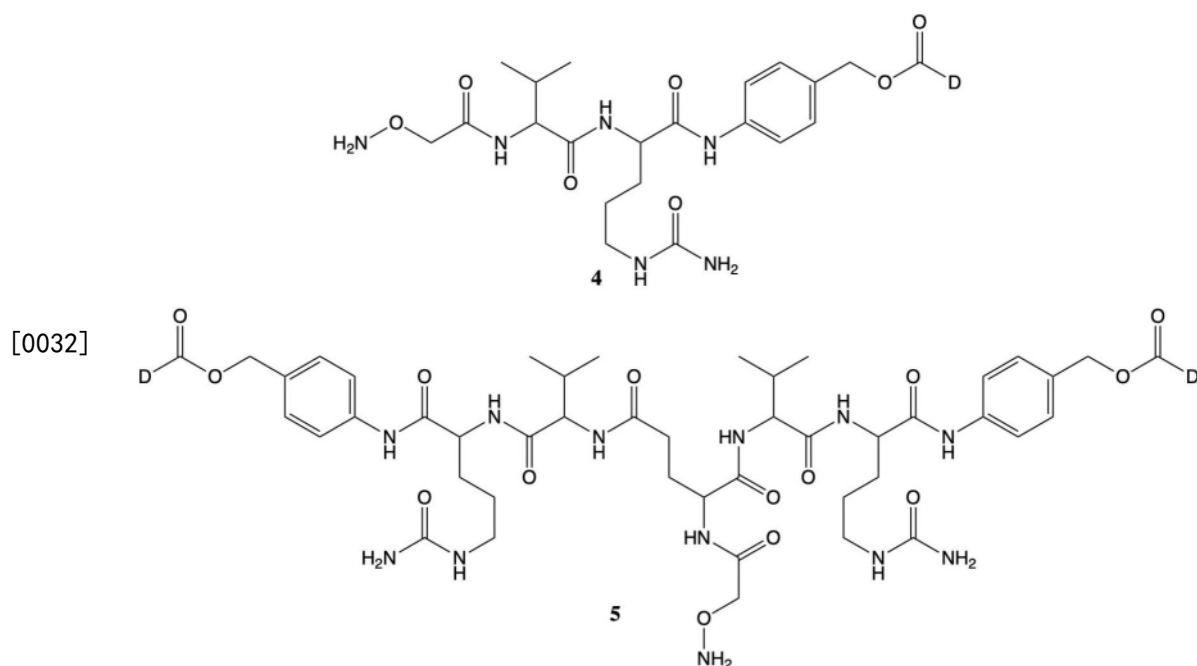
代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基；

[0028] 其中D是一个或多个药物部分；以及

[0029] 其中Y是切割位点，例如组织蛋白酶如组织蛋白酶B的切割位点；

[0030] 优选地，其中结构2或3的羟胺偶联至所述非天然氨基酸。

[0031] 在偶联至所述非天然氨基酸之前，所述连接子可具有结构4或5中所述的结构，其中D为药物部分，优选MMAE：



[0033] 所述非天然氨基酸可为3-甲酰基酪氨酸且连接子的羟胺基团可与非天然氨基酸的3-甲酰基形成肟。

[0034] 本发明还涉及一种生产本文所定义的ADC的方法，包括：

[0035] (a) 在维布妥昔的轻链、重链或轻链和重链两者的C端引入或添加微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列；

[0036] (b) 在微管蛋白酪氨酸连接酶和非天然氨基酸存在的下，在适于微管蛋白酪氨酸连接酶将所述维布妥昔与所述非天然氨基酸连接的条件，使步骤(a)中获得的维布妥昔接触；以及

[0037] (c) 将包含药物部分的任选可切割的连接子与步骤(b)中得到的所述经连接的维布妥昔偶联。

[0038] 本发明还涉及一种可通过本文定义的制备ADC的方法获得的ADC。本发明还涉及一种通过本文定义的制备ADC的方法获得的ADC。

[0039] 本发明还涉及一种包含本发明的ADC的药物组合物。

[0040] 本发明还涉及本发明的ADC或本发明的药物组合物在治疗疾病的方法中的用途。优选地，该疾病与CD30的过表达有关。更优选地，所述疾病选自淋巴瘤，例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)；白血病，例如急性髓性白血病(AML)、急性淋

巴母细胞白血病 (ALL) 和肥大细胞白血病;生殖细胞癌;移植物抗宿主病 (GvHD) 和狼疮,特别是系统性红斑狼疮 (SLE),优选霍奇金淋巴瘤 (HL) 或间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。

[0041] 附图简要说明

[0042] 当结合非限制性实施例和附图考虑时,参考详细描述将更好地理解本发明,其中:

[0043] 图1显示分析性尺寸排阻色谱 (SEC) 的色谱图,图1A显示未修饰的维布妥昔的SEC,图1B-D显示蛋白A色谱 (PAC) 后维布妥昔的Tub-Tag变体的SEC。单克隆抗体 (mAb) 在表达和纯化后是高度单体化的。

[0044] 图2显示维布妥昔 (黑色) 和维布妥昔的Tub-tag类似物 (维布妥昔缩写为“Bren”) 的分析,该类似物表示为Bren.LC-Tub (灰色,虚线),Bren.HC-Tub (灰色),Bren.LCHC-Tub (黑色,虚线)。图2A是显示在220nm处记录的归一化吸收光谱的亲水相互作用色谱 (HIC) 的色谱图。保留时间是疏水性的量度。图2B显示用于测定熔点 (T_m) 的差示扫描荧光测定法 (DSF)。

[0045] 图3显示通过分析性SEC和HIC对维布妥昔Tub-tag ADC的分析。表达维布妥昔的每个变体 (维布妥昔缩写为“Bren.”) 经表达、以PAC纯化,并与有效载荷2偶联产生DAR 2,且与有效载荷2或有效载荷3偶联产生DAR 4ADC,其中图3A和D显示Bren.HC-vc-PAB-MMAE DAR 2 (本文也表示为“Bren HC-2”),图3B和E显示Bren.LC-vc-PAB-MMAE DAR 2 (本文也表示为“Bren LC-2”),图3C和F显示Bren.LCHC-vc-PAB-MMAE DAR 4 (本文也表示为“Bren LCHC-2”)。在用HIC和缓冲液交换进行最终抛光后,就聚集物含量和DAR同质性来分析Tub-tag ADC,所有Tub-tag ADC含有非常低含量的HMWS (<1%) 并显示优异的DAR同质性。

[0046] 图4显示在原始光谱解叠后通过中上蛋白质MS对维布妥昔Tub-tag ADC的分析。图4A显示Bren.HC-Tub的结果。图4B示出Bren.LCHC-Tub的结果。图4C显示Bren-LC-Tub的结果,图4D显示Bren.HC-vc-PAB-MMAE (本文也称为“Bren.HC-2”) 的结果,图4E显示Bren-LCHC-vc-PAB-MMAE (本文也称为“Bren.LCHC-2”) 的结果,图4F显示Bren.LC-2 (vc-PAB-MMAE) (本文也表示为“Bren.LC-3”) 的结果。1369m/z的质量位移是由于3-甲酰基-L-酪氨酸1的掺入且与有效载荷2连接所致。与有效载荷3连接后,观察到2604m/z的质量差。这些结果与计算值一致。

[0047] 图5显示在图5A中用蛋白酶组织蛋白酶B (每个vc部分1:1000) 消化反应期间含缬氨酸-瓜氨酸 (vc) 的有效载荷2和3的RP-HPLC分析。在分析之前,用E-64终止反应。150分钟的反应时间后,在220nm处记录色谱图。图5B的图示出游离MMAE随时间的增加 (黑色) 和有效载荷2的减少 (灰色,圆形)。图5C显示有效载荷3的切割。在与组织蛋白酶B反应期间,形成含有一个MMAE部分的中间体 (灰色,三角形)。

[0048] 图6示出在高温下维布妥昔多汀和维布妥昔Tub-tag ADC的存储结果。图6A显示在研究过程中HMWS的增加 (Bren.LC-2 (vc-PAB-MMAE) (本文也表示为“Bren LC-3”);Bren.LC-vc-PAB-MMAE (本文也表示为“Bren LC-2”);Bren.HC-vc-PAB-MMAE (本文也表示为“Bren HC-2”)。可从维布妥昔多汀中看出聚集物含量增加最高。相比之下,Tub-tag ADC的HMWS含量几乎保持恒定。图6B和6C显示SEC色谱图,其显示在220nm处记录的维布妥昔多汀 (平均药物与抗体之比 (DAR_{av}) 和与有效载荷3偶联的Bren.LC (Bren LC-3,DAR 4) 的归一化吸收光谱。

[0049] 图7示出小鼠血浆中维布妥昔Tub-tag ADC稳定性的示例性说明。图7A和7B显示在

小鼠血浆中在37℃下储存维布妥昔多汀的结果,图7C和7D显示Bren.LC-3DAR 4在37℃下在小鼠血浆中的储存结果。

[0050] 图8显示维布妥昔Tub-tag ADC在过表达CD30的细胞系Karpas299和CD30阴性细胞系HL60中的体外效力。

[0051] 图9显示以肿瘤体积(cm^3)表示的Bren.LC-2的体内功效。为了评估Bren.LC-2的体内功效,将携带肿瘤体积100-150 mm^3 的小鼠随机分配,并在肿瘤移植后第7天和第10天两次注射1.5mg/kg进行治疗。

[0052] 图10显示以肿瘤体积(cm^3)和治疗动物的存活百分比表示的Bren.LC-2的体内功效。为了评估Bren.LC-2的体内功效,将携带肿瘤体积100-150 mm^3 的小鼠随机分配,并用单次注射1.0mg/kg进行治疗。

[0053] 图11显示以肿瘤体积(cm^3)和治疗动物的存活百分比表示(Kaplan-Meier-Plot)的Bren.LC-3的体内功效。为了评估Bren.LC-3的体内功效,将携带肿瘤体积100-150 mm^3 的小鼠随机分配,并在肿瘤移植后第8天和第11天两次注射0.5mg/kg进行治疗。

[0054] 图12显示维布妥昔Tub-tag MMAE (Bren.LC-2)的PK分析。在图12A中,示出与维布妥昔多汀相比完整ADC的量。在图12B中,显示通过MS-Analysis分析的转移到血液蛋白的MMAE量。

[0055] 图13显示与维布妥昔多汀相比,在第1、8、15和22天以10mg/kg静脉内(推注)施用维布妥昔Tub-tag ADC后,雄性和雌性大鼠中完整ADC和总抗体的平均血清浓度。

[0056] 图14显示与维布妥昔多汀(黑色条)相比,在雄性和雌性大鼠中维布妥昔Tub-tag ADC (Bren.LC-2) (灰色条)的示例性毒性特征。图14中描述的参数是以计数/微升为单位的网织红细胞(RET,以 $\text{K}/\mu\text{L}$ 计)、以百万/微升为单位的红细胞的(RBC,以 $\text{M}/\mu\text{L}$ 计)、以百万/微升为单位的血红蛋白(Hb,以 $\text{M}/\mu\text{L}$ 计)、血细胞比容的体积百分比(HTC,以%计)、以计数/微升为单位的嗜酸性粒细胞(EOS,以 $\text{K}/\mu\text{L}$ 计)、以秒为单位的活化部分凝血时间(APPT)(秒)、以毫摩尔/升(mmol/L)为单位的葡萄糖水平、以克数(g)为单位的胸腺重量和以克数(g)为单位的睾丸重量。

[0057] 图15显示纯化后HA-VC-PAB-MMAE的色谱图。

[0058] 图16显示纯化后Boc-Glu-(VC-PAB-MMAE)₂的色谱图。

[0059] 图17显示纯化后Boc-HA-Glu-(VC-PAB-MMAE)₂的色谱图。

[0060] 图18显示纯化后HA-Glu-(VC-PAB-MMAE)₂的色谱图。

[0061] 图19显示在给药12&15mg/kg的食蟹猴中维布妥昔Tub-tag MMAE的毒动力学分析。通过ELISA测定mAb和完整ADC的总量。完整ADC和总mAb曲线的高度重叠显示两剂量水平下维布妥昔Tub-tag MMAE的高稳定性。

[0062] 图20显示在食蟹猴中的维布妥昔Tub-tag MMAE (Bren.LC-2)的重复剂量研究中收集的体重和不同血液值的选择。图20左侧上图显示随时间变化的体重。图20右侧上图显示淋巴细胞浓度随时间的变化。图20左侧下图显示随时间变化的中性粒细胞浓度。图20右侧下图显示白细胞浓度随时间的变化。数据显示,与使用维布妥昔多汀(Adcetris)的类似研究的文献值比较,在每种情况下,重复给予6、12和15mg/kg维布妥昔Tub-tag MMAE (Bren.LC-2)的两只雌性动物的三组平均值和误差。体重以千克表示,淋巴细胞以十亿/升表示,中性粒细胞以十亿/升表示,白细胞以十亿/升表示。

[0063] 图21显示维布妥昔的重链和轻链的氨基酸序列,如2013年厚生劳动省药品与食品安全局评估及许可处关于维布妥昔多汀的审议结果报告所述,该报告可在以下链接获得:
<https://www.pmda.go.jp/files/000229787.pdf>。

[0064] 发明详述

[0065] 本发明将在下面详细描述,并且还将通过所附的实施例和附图进一步举例说明。

[0066] 淋巴恶性肿瘤占所有癌症的约4至5%,并源自淋巴系统。在经典的霍奇金淋巴瘤和几种非霍奇金淋巴瘤,如间变性大细胞淋巴瘤和外周T细胞淋巴瘤中,CD30已被证明是近年来靶向治疗的有价值的肿瘤生物标志物。随着2011年维布妥昔多汀(Adcetris®)的首次同类产品的批准,第一种CD30特异性生物药物已经进入市场,并且后来已经成为具有良好总体反应的不可缺少的治疗选择。维布妥昔多汀由靶向肿瘤的嵌合IgG1抗体组分维布妥昔和连接子-有效载荷组分组成,所述连接子-有效载荷组分包含与强效的有效载荷部分单甲基-澳瑞他汀E化学连接的组织蛋白酶B可裂解的缬氨酸-瓜氨酸连接子部分,其在细胞内传递和释放时有效诱导凋亡。

[0067] 然而,已知维布妥昔多汀在临床常规中引起敏感和持久的毒性作为副作用,例如血小板减少症。

[0068] 本发明人可显示,微管蛋白酪氨酸连接酶的使用令人惊奇地使药物部分与维布妥昔高度特异性和化学计量上确定的偶联,所述维布妥昔已通过轻链和/或重链的C末端添加TTL识别序列而修饰。TTL可用于将非天然氨基酸(如3-甲酰基酪氨酸)偶联到TTL识别序列上。药物部分(例如MMAE)可通过连接子(例如通过包含可与非天然氨基酸上的活性基团反应的活性基团的连接子)特异性地与非天然氨基酸偶联。例如,连接子可包含羟胺,其与非天然氨基酸的甲酰基反应形成肟(参见实施例1)。总之,发明人表明,通过本文所述的偶联策略将维布妥昔的功能组分维布妥昔和MMAE组合,可以令人惊讶地改善维布妥昔多汀。本发明的ADC令人惊奇地显示更高的体外稳定性(参见实施例2)、更高的体内功效(参见实施例4)、更高的体内稳定性(参见实施例5)和具有改进的毒理学特征(参见实施例6)。因此,可以令人惊讶地减少维布妥昔多汀的副作用。

[0069] 因此,本发明涉及抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

[0070] (a) 维布妥昔(brentuximab),其中维布妥昔在维布妥昔的轻链、重链或全部重链和轻链的C末端包含微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列和非天然氨基酸;以及

[0071] (b) 至少一种药物部分;

[0072] 其中药物部分经由连接子偶联至所述非天然氨基酸中的每一个。

[0073] 本文所用的术语“抗体-药物偶联物”(ADC)通常指抗体(例如维布妥昔或其抗原结合片段)与另一种试剂(例如化疗剂、毒素、免疫治疗剂、成像探针等)的连接。连接可以是共价键或例如通过静电力的非共价相互作用,优选共价键。可以使用本领域已知和本文所述的各种连接子以形成抗体药物偶联物。本发明的ADC还可以描述为具有通式 $Ab-(L-(D)_x)_y$ 。“Ab”代表抗体如维布妥昔或其抗原结合片段,“L”代表连接子,“D”代表药物部分。“x”可以是1-10的整数。“y”可以是1-10的整数。因此,x可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。因此,y可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。作为纯粹的说明性实例,x或y可以是1至8、1至6、1至4或1至2的整数。

[0074] “Ab”:抗体

[0075] 维布妥昔

[0076] 如本文所述,本发明的ADC可以用通式 $Ab-(L-(D)_x)_y$ 来描述,本发明的ADC的“Ab部分”是维布妥昔。维布妥昔,也称为cAC10或SGN-30,是本领域技术人员公知的抗体(参见例如Wahl等人(2002),Cancer Res,62:3736-3742)。维布妥昔是与靶细胞表面的CD30特异性结合的单克隆抗体。与CD30的结合使维布妥昔开始内化,然后其运输至溶酶体隔室。在细胞内,ADC的药物部分可以从单克隆抗体释放,例如通过连接子的裂解或降解。本发明的ADC中包含维布妥昔。

[0077] CD30,也称为TNFRSF8,是肿瘤坏死因子受体家族和肿瘤标记物的细胞膜蛋白。该受体由活化的T细胞和B细胞表达,但不是由静止的T细胞和B细胞表达。TRAF2和TRAF5可与此受体相互作用,并介导导致NF- κ B活化的信号传递。其是细胞凋亡的正调节剂,且已被显示限制自身反应性CD8效应T细胞的增殖潜力并保护身体免受自身免疫。已经报道编码有不同同种型的该基因的两种选择性剪接的转录变体。CD30与间变性大细胞淋巴瘤有关。其在胚胎癌中表达,但在精原细胞瘤中不表达,因此是区分这些生殖细胞肿瘤的有用标志。CD30和CD15也在典型霍奇金淋巴瘤的Reed-Sternberg细胞上表达。

[0078] 作为批准药物并且如本文所用的维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列(其也在图21中示出)。本发明也可以使用重链与SEQ ID NO:1具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的抗体,例如,如图21所示。如果需要,可以省略位置447的最后一个残基K。这样的重链可以被认为是维布妥昔重链的变体。类似地,可以删除例如维布妥昔重链的前两个或前三个N-末端残基。与维布妥昔相比,这样的重链将具有三个或四个突变,并因此与维布妥昔重链的序列同一性为约99.2%(四个氨基酸差异)至99.8%(一个氨基酸差异)。

[0079] 作为批准药物并在此使用的维布妥昔的每条轻链具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列(也在图21中显示)。本发明也可以使用轻链与SEQ ID NO:2具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的抗体,例如,如果需要,可以省略位置218处的最后一个残基C。这样的轻链可以被认为是维布妥昔轻链的变体。类似地,可以删除例如维布妥昔轻链的前两个或前三个N-末端残基。与维布妥昔相比,这样的轻链将具有三个或四个突变,因此与维布妥昔轻链的序列同一性为98.2%(四个氨基酸差异)至99.5%(一个氨基酸差异)。

[0080] 在一个具体的实施方案中,维布妥昔包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链,在另一个具体的实施方案中,维布妥昔由重链和轻链组成,所述重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,所述轻链由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0081] 通常,当在本文中使用时,在两个或更多个核酸或多肽序列的背景下,术语“百分比(%)同一的”或“百分比(%)同一性”是指两个或更多个序列或子序列相同的程度。如果两个序列在被比较的区域上具有相同的氨基酸或核苷酸序列,则它们是“同一的”。当在比较范围或指定区域上比较和比对最大对应性时,如果两个序列具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,在指定区域上,或当未指定时,在整个序列上,60%同一性,任选地65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性),则两个序列是“基本上同一的”,如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量。任选地,同一性存在于长

度为至少约30个核苷酸(或10个氨基酸)的区域上,或更优选地存在于长度为100至500或1000或更多个核苷酸(或20、50、200或更多个氨基酸)的区域上。

[0082] 序列同源性或序列同一性的百分比可以,例如,在本文中使用程序BLASTP,blastp 2.2.5版本(2002年11月16日)来确定(参见Altschul等人,Nucleic Acids Res,1997)。在该实施方案中,同源性百分比基于包括前肽序列的整个多肽序列(矩阵:BLOSUM 62;空位成本(gap costs):11.1;截断值设定为 10^{-3})的比对,优选使用野生型蛋白质支架作为成对比较中的参照。其计算为BLASTP程序输出中显示为结果的“阳性”(同源氨基酸)数除以程序选择用于比对的氨基酸总数的百分比。

[0083] TTL识别序列和非天然氨基酸与维布妥昔的偶联

[0084] 在本发明的ADC中,维布妥昔可以与一个或多个TTL识别序列融合,例如在轻链、重链或轻链和重链的C末端。该TTL识别序列使TTL能将非天然氨基酸偶联到维布妥昔轻链和/或重链C末端的TTL识别序列上。因此,本发明ADC中包含的维布妥昔在维布妥昔轻链、重链或所有重链和轻链的C末端包含微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列(“TTL识别序列”)。在本发明的ADC中,非天然氨基酸与该TTL识别序列相连。通过连接子与该非天然氨基酸偶联的是药物部分。当在本文中使用,“Tub-tag”涉及TTL的识别序列或TTL识别序列,优选SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5。

[0085] 如本文和整个说明书中所用,术语“微管蛋白酪氨酸连接酶”,在本文中有时缩写为“TTL”,包括能够使多肽功能化的多肽,即将本文定义的非天然氨基酸共价连接到多肽上的多肽。对于该作用,优选所述多肽包含TTL识别序列。所述术语包括来自真核生物,优选哺乳动物,更优选来自狼的TTL。优选的TTL如SEQ ID No:13。所述术语还涵盖在其整个氨基酸序列中与SEQ ID No:13中示出的TTL的氨基酸序列具有70%、80%、90%或95%或更多同一性的TTL。优选地,具有与前述共有同一性的氨基酸序列的此类多肽具有TTL活性。TTL活性可如本领域已知或本文所述进行测试。序列同一性的百分比可以例如如上所述在本文中确定。优选地,SEQ ID NO:13中示出的氨基酸序列在成对比较中作为参考。

[0086] 如本文和整个说明书中所用,本文所用的所有语法形式的术语“官能化”是指“将非天然氨基酸共价连接”到多肽(如维布妥昔)上。不希望受特定理论的束缚,可以设想TTL将本文定义的非天然氨基酸添加到TTL识别序列的最终C-末端氨基酸上。

[0087] W02016/066749和W02017/186855中描述利用微管蛋白酪氨酸连接酶(TTL)修饰蛋白质的方法,将其引入本文作为参考。为了使TTL将非天然氨基酸连接到感兴趣的蛋白上,例如本文所述的ADC的抗体,TTL需要识别序列。本文所述的ADC可被修饰以在维布妥昔的轻链、重链或轻链和重链两者的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶(TTL)的识别序列,其至少包含氨基酸序列 $X_4X_3X_2X_1$ 。术语“识别序列”或“识别基序”在本文中可互换使用,是指被TTL识别的一段氨基酸。这样的识别序列是本领域已知的;参见,例如,Ruediger等人(1994),Eur.J.Biochem.220,309-320或Prota等人(2013),J.Cell.Biol.200,No.3,259-270。此外,本领域技术人员可以通过应用例如Ruediger等人所述的“通过TTL使肽酪氨酸化”分析来容易地测试感兴趣的氨基酸序列是否是TTL识别序列。被TTL“识别”包括TTL结合至识别基序。所述识别基序有利地包含至少4个氨基酸,本文命名为 X_4 、 X_3 、 X_2 和 X_1 。通常,除非本文另有说明,“X”可以表示任何氨基酸。氨基酸包括但不限于二十种“标准”氨基酸:异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、甲硫氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、苏氨酸(Thr,T)、

色氨酸 (Trp, W)、缬氨酸 (Val, V)、丙氨酸 (Ala, A)、天冬酰胺 (Asn, N)、天冬氨酸 (Asp, D)、半胱氨酸 (Cys, C)、谷氨酸 (Glu, E)、谷氨酰胺 (Gln, Q)、甘氨酸 (Gly, G)、脯氨酸 (Pro, P)、丝氨酸 (Ser, S)、酪氨酸 (Tyr, Y)、精氨酸 (Arg, R) 和组氨酸 (His, H)。本发明还包括但不限于D-型氨基酸、 β -氨基酸、具有侧链的氨基酸以及本领域技术人员已知的所有非天然氨基酸。

[0088] 微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列可至少具有氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4$ (SEQ ID NO: 3), 其中 X_1 和 X_2 是任何氨基酸, X_3 是E、D或C, X_4 是E, 优选其中 X_2 是G、S、A、V或F, 和/或其中 X_1 是E、D、A、K或P。识别序列可以是EGEE (SEQ ID NO: 4), 优选识别序列是VDSVEGEGEEEGEE (SEQ ID NO: 5)、SVEGEGEEEGEE (SEQ ID NO: 6)、SADGEDEGEE (SEQ ID NO: 7)、SVEAEAEEGEE (SEQ ID NO: 8)、SYEDEDEGEE (SEQ ID NO: 9) 或SFEEENEDEGEE (SEQ ID NO: 10)。在一个实施方案中, 识别序列是VDSVEGEGEEEGEE (SEQ ID NO: 5)。

[0089] 本发明ADC中所包含的维布妥昔中存在的TTL识别序列的数目决定了药物与抗体的比率 (DAR)。尽管药物与抗体的比率 (DAR) 对于特定的偶联物分子具有确定的化学计量值 (例如, 在式 $Ab-(L-(D)_x)_y$ 中 y 乘以 x), 但应理解, 当用于描述含有许多分子的样品时, 由于某种程度的不均匀性, 该值可能是平均值, 通常与偶联步骤有关。因此, 在本文上下文所述的抗体药物偶联物中的任一种的情况下, 抗体药物偶联物样品的平均载量被称为药物与抗体的比率, 或“DAR”, 然而, 优选地, 本发明提供这样的ADC, 其中基本上所有或全部ADC都具有所需的DAR, 或换句话说, 是化学计量确定的。

[0090] 本发明的ADC基于单克隆IgG抗体维布妥昔。IgG抗体包含两条“轻链”和两条“重链”或由两条“轻链”和两条“重链”组成。由于TTL识别序列仅可融合到轻链、重链或轻链和重链两者的C末端, 因此维布妥昔的TTL识别序列的最大数目限于4。在重链或轻链在C末端包含TTL识别序列的情况下, 本发明的ADC中所包含的维布妥昔中有2个TTL识别序列。在重链和轻链在C末端包含TTL识别序列的情况下, 本发明的ADC中包含的维布妥昔中有4个TTL识别序列。

[0091] 在本发明的ADC中, TTL识别序列可直接融合到抗体维布妥昔链的C末端。参见本文, 维布妥昔重链 (SEQ ID NO: 12): 其中TTL识别序列直接融合 (即其间没有任何氨基酸残基) 到重链的C-末端。或者, 可在TTL识别序列和抗体链之间排列有 (肽) 连接子。因此, 维布妥昔轻链、重链或轻链和重链两者可包括位于TTL识别序列和相应C-末端之间的氨基酸连接子序列。作为说明性实例, 参见SEQ ID NO: 11的轻链, 其中TTL识别序列通过GGGGS (G4S) 连接子融合至维布妥昔轻链的C-末端。氨基酸连接子可以具有任何合适的长度, 只要TTL识别序列的功能得以保持。例如, 氨基酸连接子可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸残基。再次参见SEQ ID NO: 11的轻链, 其中GGGGS (G4S) 连接子位于TTL识别序列和维布妥昔的C-末端之间。也可以使用其它标准连接子, 例如 $(G4S)_2$ 或 $(G4S)_3$, 其通常用作使不同链的重组抗体分子例如单链Fv片段相互融合的连接子。因此, 在这些实施例中, 连接子的长度可以是10个氨基酸残基 ($(G4S)_2$) 或15个氨基酸残基 ($(G4S)_3$)。然而, 连接子决不限于至多15个氨基酸残基的长度, 而是, 根据以上公开, 氨基酸连接子序列可以包含甚至多于15个氨基酸。

[0092] 同样根据上述公开内容, 可构建本发明的ADC, 使得在TTL识别序列和各自抗体链之间没有抗体链包含肽连接子。在这种ADC中, TTL识别序列可直接融合到维布妥昔的轻链和重链。然而, 也可以这样构建本发明的ADC, 使得抗体链之一在TTL识别序列和相应抗体链

之间包含肽连接子。在这种ADC中,TTL识别序列可通过连接子(例如,如SEQ ID NO:11的轻链中的GGGS-连接子)融合到每条轻链,而TTL识别序列可直接融合到维布妥昔的两条重链中的每一条。最后,也可构建本发明的ADC,使得抗体轻链和抗体重链均包含在TTL识别序列和各自抗体链之间的肽连接子。在这种ADC中,TTL识别序列可通过连接子(例如GGGS-连接子或(G4S)₂连接子)融合到维布妥昔的两条轻链中的每一条以及两条重链中的每一条上。

[0093] 在一个实施方案中,维布妥昔在轻链的C末端包含TTL识别序列,即总共2个。TTL识别序列可通过氨基酸连接子序列(例如GGGS)融合到轻链的C末端。TTL识别序列可直接结合到轻链的C末端。维布妥昔重链可包含具有SEQ ID NO:1所示序列的多肽,维布妥昔轻链可包含具有SEQ ID NO:11所示序列的多肽。维布妥昔重链可包含具有SEQ ID NO:1所示序列的多肽,维布妥昔轻链可包含具有SEQ ID NO:14所示序列的多肽。维布妥昔重链可由具有SEQ ID NO:1所示序列的多肽所组成,维布妥昔轻链可由具有SEQ ID NO:11所示序列的多肽所组成。维布妥昔重链可由具有SEQ ID NO:1所示序列的多肽所组成,维布妥昔轻链可由具有SEQ ID NO:14所示序列的多肽所组成。

[0094] 在一个实施方案中,维布妥昔在轻链和重链的C末端包含TTL识别序列,即总共4个。TTL识别序列可通过氨基酸连接子序列(例如GGGS)融合到轻链的C末端,并且TTL识别序列可直接结合到重链的C末端。TTL识别序列可通过氨基酸连接子(例如GGGS)结合到轻链的C末端,TTL识别序列可通过氨基酸连接子(例如GGGS)结合到重链的C末端。TTL识别序列可直接结合到轻链的C末端,TTL识别序列可直接结合到重链的C末端。维布妥昔重链可包含具有SEQ ID NO:12所示序列的多肽,维布妥昔轻链可包含具有SEQ ID NO:11所示序列的多肽。维布妥昔重链可包含具有SEQ ID NO:12所示序列的多肽,维布妥昔轻链可包含具有SEQ ID NO:14所示序列的多肽。维布妥昔重链可由具有SEQ ID NO:12所示序列的多肽所组成,维布妥昔轻链可由具有SEQ ID NO:11所示序列的多肽所组成。维布妥昔重链可由具有SEQ ID NO:12所示序列的多肽所组成,维布妥昔轻链可由具有SEQ ID NO:14所示序列的多肽所组成。

[0095] 在一个实施方案中,维布妥昔在重链的C末端包含TTL识别序列,即总共2个。TTL识别序列可直接结合到重链的C末端。TTL识别序列可通过氨基酸连接子序列(例如GGGS)结合到重链的C末端。维布妥昔重链可包含具有SEQ ID NO:12所示序列的多肽,维布妥昔轻链可包含具有SEQ ID NO:2所示序列的多肽。维布妥昔重链可由具有SEQ ID NO:12所示序列的多肽组成,维布妥昔轻链可由具有SEQ ID NO:2所示序列的多肽组成。

[0096] 然而,TTL识别序列的数目不一定等于与非天然氨基酸偶联的药物部分的数目,即不一定等于DAR。本发明还涵盖一个以上药物部分与非天然氨基酸偶联(经由连接子)。例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个,优选2个药物部分可通过连接子偶联到一个非天然氨基酸上。在这种情况下,连接子可以充当支架,2、3、4、5、6、7、8、9或10个,优选2个药物部分可以偶联到所述支架上。连接子又与非天然氨基酸偶联。作为两个药物部分的支架的示例性连接子是结构3或5,因此,抗体可以偶联至两个、四个、六个或八个,优选两个或四个药物部分,更优选两个药物部分。

[0097] 非天然氨基酸

[0098] 非天然氨基酸是本发明ADC“Ab”部分中连接子的锚点(anchor point)。在这点上,再次提及本文所述的“ADC化学式”:Ab-(L-(D)_x)_y。因此,可通过TTL偶联到在其C末端具有

TTL识别序列的多肽(例如本发明ADC中所包含的维布妥昔)的C末端的非天然氨基酸包含可与连接子L的官能团反应以形成共价键的官能团。

[0099] 通常,非天然氨基酸可被视为酪氨酸衍生物。优选地,酪氨酸衍生物包含允许药物部分经由连接子偶联的活性基团。

[0100] 酪氨酸衍生物可以(进一步)含有非天然(非天然)官能团,其优选用于化学选择性或生物正交修饰。该官能团可以适用于点击化学。术语“点击化学”是指由Kolb,Finn和Sharpless在2001年引入的化学原理,且涵盖一组强有力的连接反应,其能够通过将包含反应性基团的小单元连接在一起而快速且可靠地产生共价键。点击化学反应通常是模块化的,范围广泛,产生高化学产率,产生无影响的副产物,是立体特异性的,和/或可以使用容易获得的起始材料和试剂在简单的生理反应条件下进行。此外,点击化学反应优选不使用毒性溶剂或使用温和或容易除去的溶剂(优选水),和/或通过非色谱法(结晶或蒸馏)提供简单的产物分离。明显的放热反应使反应物“弹簧加载(spring loaded)”。

[0101] 点击化学反应包括,例如,环加成反应,尤其是来自1,3-偶极家族的环加成反应,杂-狄尔斯-阿尔德反应(hetero-Diels-Alder);亲核开环反应,例如应变杂环亲电试剂,如环氧化物、氮丙啶、环状硫酸酯、环状氨基磺酸酯、氮丙啶鎓离子和表硫鎓离子的亲核开环反应;非羧醛型羰基化学(例如肟醚、脞和芳族杂环的形成);以及碳-碳多重键的加成;例如氧化反应,如环氧化、二羟基化、氮丙啶化和亚硝酰基和硫基卤化物加成,以及某些迈克尔加成反应(Michael addition)。点击化学反应的一般原理已由Kolb,Finn和Sharpless(2001)描述。选择适合通过连接子将所需药物部分连接到酪氨酸衍生物或非天然氨基酸上的点击化学反应是本领域技术人员所知的,所述酪氨酸衍生物或非天然氨基酸共价键合到本发明ADC中包含的维布妥昔上。

[0102] 如本文所用,术语“点击化学柄”是指可参与点击化学反应的反应物或反应基团。这样的反应物或反应基团优选地是用于化学选择性或生物正交修饰的非天然(非天然)官能团;然而,其可以可选地是用于化学选择性或生物正交修饰的天然官能团。例如,应变炔烃(strained alkyne),例如环辛炔,是点击化学手柄,因为其可参与应变促进的环加成,例如应变促进的叠氮化物-炔烃环加成(SPAAC)。通常,点击化学反应需要至少两个包含可彼此反应的点击化学柄的分子。彼此反应的此类点击化学柄对在本文中有时称为“配对点击化学柄(partner click chemistry handle)”。例如,叠氮化物是环辛炔或任何其它炔的配对点击化学柄。在本发明的上下文中,点击化学柄可以优选选自末端炔、叠氮化物、应变炔烃、二烯、亲二烯体、烷氧基胺、羰基、 β -芳基乙胺、膦、酰肼、肼、硫醇、四嗪、烯炔、环辛烯、降冰片烯、四嗪、硝酮、氰基苯并噻唑和环辛炔。本领域技术人员容易获得其它合适的点击化学柄。

[0103] 在通过点击化学偶联的情况下,偶联是通过由点击化学柄的反应形成的共价键。在某些实施方案中,缔合是共价的,并且实体被称为彼此“偶联”。

[0104] 应当注意,本发明不限于前述,示例性点击化学柄和另外的点击化学柄、反应性点击化学柄对和用于这样的点击化学柄对的反应条件对本领域技术人员将是显而易见的。

[0105] 适于将连接子偶联至本发明ADC中所包含的维布妥昔所包含的非天然氨基酸的其它方法包括以下:施陶丁格反应(例如施陶丁格-连接、施陶丁格-亚磷酸酯反应、施陶丁格-亚膦酸酯反应)、应变促进的环加成、四嗪连接、逆电子需求狄尔斯-阿尔德反应、醛或酮与

1,2-氨基硫醇的四氢噻唑形成反应、醛的噁唑烷形成反应、肟形成、腈形成、或酮与1,2-氨基醇的缩醛形成反应、醛或酮与1,2-二醇的缩醛形成反应、皮克泰-斯宾格勒反应(Pictet-Spengler反应)、捕获的克脑文盖尔(Knoevenagel)连接、串联的克脑文盖尔缩合、硫醇与烯炔或炔炔的加成反应、交叉复分解、金属催化、特别是Pd-、Cu-、Ni和Fe-催化的与被吸电子基团取代的酪氨酸衍生物的交叉偶联,优选为肟形成。

[0106] 设想药物部分可连接于通过连接子与维布妥昔共价键合的非天然氨基酸,例如通过点击化学或本文所述的任何其它合适方法。因此,药物部分可通过非肽键经由连接子与非天然氨基酸偶联,然而,在替代方案中,其也可通过肽键经由连接子与非天然氨基酸偶联。

[0107] 非天然氨基酸可以是2-取代、3-取代或4-取代的酪氨酸,或在苄基位置取代的酪氨酸衍生物。3-取代或4-取代的酪氨酸衍生物可以是3-硝基酪氨酸、3-氨基酪氨酸、3-叠氮基酪氨酸、3-甲酰基酪氨酸、3-乙酰基酪氨酸或4-氨基苯丙氨酸。3-取代的酪氨酸可以是3-硝基酪氨酸。3-取代的酪氨酸可以是3-氨基酪氨酸。3-取代的酪氨酸可以是3-叠氮基酪氨酸。3-取代的酪氨酸可以是3-甲酰酪氨酸。3-取代的酪氨酸可以是3-乙酰基酪氨酸。取代的酪氨酸可以是取代的苯丙氨酸。4-取代的酪氨酸可以是4-氨基苯丙氨酸。特别优选的非天然氨基酸是3-甲酰基酪氨酸。

[0108] 如在此和在说明书中所使用的,术语“任选取代的”或“取代的”表示一个或多个(例如1至与基团键合的氢原子的最大数目,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或至多10个,例如1至5、1至4或1至3个,或1或2个)氢原子可以被不同于氢的基团代替,例如烷基(优选 C_{1-6} 烷基)、烯基(优选 C_{2-6} 烯基)、炔基(优选 C_{2-6} 炔基)、芳基(优选3至14元芳基)、杂芳基(优选3至14元杂芳基)、环烷基(优选3至14元环烷基)、杂环基(优选3至14元杂环基)、卤素、CN、叠氮基、 NO_2 、 OR^{71} 、 $N(R^{72})(R^{73})$ 、 $ON(R^{72})(R^{73})$ 、 $N^+(O^-)(R^{72})(R^{73})$ 、 $S(O)_{02}R^{71}$ 、 $S(O)_{02}OR^{71}$ 、 $OS(O)_{02}R^{71}$ 、 $OS(O)_{02}OR^{71}$ 、 $S(O)_{02}N(R^{72})(R^{73})$ 、 $OS(O)_{02}N(R^{72})(R^{73})$ 、 $N(R^{71})S(O)_{02}R^{71}$ 、 $NR^{71}S(O)_{02}OR^{71}$ 、 $NR^{71}S(O)_{02}N(R^{72})(R^{73})$ 、 $C(=W^1)R^{71}$ 、 $C(=W^1)W^1R^{71}$ 、 $W^1C(=W^1)R^{71}$ 、和 $-W^1C(=W^1)W^1R^{71}$;其中 R^{71} 、 R^{72} 和 R^{73} 独立选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、3-至7-元环烷基、5-或6-元芳基、5-或6-元杂芳基和3-至7-元杂环基,其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基各自任选被选自以下的一个、两个或三个取代基取代: C_{1-3} 烷基、卤素、 CF_3 、CN、叠氮基、 NO_2 、OH、 $O(C_{1-3}$ 烷基)、 $S(C_{1-3}$ 烷基)、 NH_2 、 $NH(C_{1-3}$ 烷基)、 $N(C_{1-3}$ 烷基) $_2$ 、 $NHS(O)_2(C_{1-3}$ 烷基)、 $S(O)_2NH_{2-z}(C_{1-3}$ 烷基) $_z$ 、 $C(=O)OH$ 、 $C(=O)O(C_{1-3}$ 烷基)、 $C(=O)NH_{2z}(C_{1-3}$ 烷基) $_z$ 、 $NHC(=O)(C_{1-3}$ 烷基)、 $NHC(=NH)NH_{2z}(C_{1-3}$ 烷基) $_z$ 、及 $N(C_{1-3}$ 烷基) $C(=NH)NH_{2-z}(C_{1-3}$ 烷基) $_z$,其中z为0、1或2,且 C_{1-3} 烷基是甲基、乙基、丙基或异丙基; W^1 独立地选自O、S和 NR^{84} ,其中 R^{84} 为-H或 C_{1-3} 烷基。

[0109] 如本文和整个说明书中所用,术语“烷基”是指饱和直链或支链烃的单价基团。优选地,烷基包含1至12个(如1至10个)碳原子,即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个碳原子(如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子),更优选1至8个碳原子,如1至6或1至4个碳原子。在一些实施方案中,本发明所用的烷基包含1-20个碳原子(C_{1-20} 烷基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-15个碳原子(C_{1-15} 烷基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-10个碳原子(C_{1-10} 烷基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-8个碳原子(C_{1-8} 烷基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-6个碳原子(C_{1-6} 烷基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-5个碳原子(C_{1-5} 烷基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-4个碳原子(C_{1-4} 烷基)。

基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-3个碳原子(C_{1-3} 烷基)。在另一个实施方案中,所用的烷基含有1-2个碳原子(C_{1-2} 烷基)。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、仲戊基、新戊基、1,2-二甲基-丙基、异戊基、正己基、异己基、仲己基、正庚基、异庚基、正辛基、2-乙基-己基、正壬基、正癸基、正十一烷基、正十二烷基等,其可以带有一个或多个取代基。烷基取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。在一些实施方案中,烷基链是直链的。在一些实施方案中,烷基链是支链的。在一些实施方案中,烷基链是取代的。在一些实施方案中,烷基链是未取代的。在一些实施方案中,烷基链是直链的且为取代或未取代的。在一些实施方案中,烷基链是支链的且为取代或未取代的。

[0110] 如本文和整个说明书中所用,术语“亚烷基”是指饱和直链或支链烃的双自由基。优选地,亚烷基包含1至10个碳原子,即1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子,更优选1至8个碳原子,例如1至6或1至4个碳原子。示例性的亚烷基包括亚甲基、亚乙基(即1,1-亚乙基、1,2-亚乙基)、亚丙基(即1,1-亚丙基、1,2-亚丙基($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 2,2-亚丙基($-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$), 和1,3-亚丙基),亚丁基异构体(例如1,1-亚丁基、1,2-亚丁基、2,2-亚丁基、1,3-亚丁基、2,3-亚丁基(顺式或反式或其混合物)、1,4-亚丁基、1,1-亚异丁基、1,2-亚丁基、和1,3-亚丁基)、亚戊基异构体(例如1,1-亚戊基、1,2-亚戊基、1,3-亚戊基、1,4-亚戊基、1,5-亚戊基、1,1-异戊基、1,1-仲戊基、1-新戊基)、亚己基异构体(例如1,1-亚己基、1,2-亚己基、1,3-亚己基、1,4-亚己基、1,5-亚己基、1,6-亚己基、及1,1-亚异己基)等。亚烷基可以是环状或非环状的、支链或非支链的、取代或未取代的。亚烷基取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。

[0111] 如本文和整个说明书中所用,术语“卤素”或“卤代”是指氟、氯、溴或碘。

[0112] 如本文和整个说明书中所用,术语“叠氮基”是指 N_3 。

[0113] 如本文和整个说明书中所用,术语“烯基”是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和直链或支链烃的单价基团。通常,烯基中碳-碳双键的最大数目可以等于通过将烯基中碳原子数除以2计算的整数,并且如果烯基中碳原子数是奇数,则将除法的结果四舍五入到下一个整数。例如,对于具有9个碳原子的链烯基,碳-碳双键的最大数目为4。优选地,链烯基具有1至4个,即1、2、3或4个碳-碳双键。优选地,烯基包含2至10个碳原子,即2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子,更优选2至8个碳原子,如2至6个碳原子或2至4个碳原子。因此,在优选的实施方案中,烯基包含2至10个碳原子和1、2、3、4或5个碳-碳双键,更优选其包含2至8个碳原子和1、2、3或4个碳-碳双键,例如2至6个碳原子和1、2或3个碳-碳双键或2至4个碳原子和1或2个碳-碳双键。在某些实施方案中,本发明所用的烯基包含2-20个碳原子(C_{2-20} 烯基)。在一些实施方案中,本发明所用的烯基包含2-15个碳原子(C_{2-15} 烯基)。在另一实施方案中,所用烯基包含2-10个碳原子(C_{2-10} 烯基)。在其它实施方案中,烯基包含2-8个碳原子(C_{2-8} 烯基)。在其它实施方案中,烯基包含2-6个碳原子(C_{2-6} 烯基)。在其它实施方案中,烯基包含2-5个碳原子(C_{2-5} 烯基)。在其它实施方案中,烯基包含2-4个碳原子(C_{2-4} 烯基)。在其它实施方案中,烯基包含2-3个碳原子(C_{2-3} 烯基)。在其它实施方案中,烯基包含2个碳原子(C_2 烯基)。碳-碳双键可以是顺式(Z)或反式(E)构型。示例性的烯基包括乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基(即烯丙基)、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、1-庚烯基、2-庚烯基、3-庚烯基、4-庚烯基、5-庚烯基、6-庚烯基、

1-辛烯基、2-辛烯基、3-辛烯基、4-辛烯基、5-辛烯基、6-辛烯基、7-辛烯基、1-壬烯基、2-壬烯基、3-壬烯基、4-壬烯基、5-壬烯基、6-壬烯基、7-壬烯基、8-壬烯基、1-癸烯基、2-癸烯基、3-癸烯基、4-癸烯基、5-癸烯基、6-癸烯基、7-癸烯基、8-癸烯基、9-癸烯基等。如果烯基与氮原子相连,则双键不能在氮原子的 α 位。在一些实施方案中,烯基链是直链的。在一些实施方案中,烯基链是支链的。在一些实施方案中,烯基链是取代的。在一些实施方案中,烯基链是未取代的。在一些实施方案中,烯基链是直链的且为取代或未取代的。在一些实施方案中,烯基链是支链的且为取代或未取代的。烯基取代基包括但不限于本文所述的导致形成稳定部分的任何取代基。

[0114] 如本文和整个说明书中所用,术语“亚烯基”是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和和直链或支链烃的双自由基。通常,亚烯基中碳-碳双键的最大数目可以等于通过将亚烯基中碳原子数除以2计算的整数,并且如果亚烯基中碳原子数为奇数,则将除法的结果四舍五入到下一个整数。例如,对于具有9个碳原子的亚烯基,碳-碳双键的最大数目为4,优选地,亚烯基具有1至4个,即1、2、3或4个碳-碳双键。优选地,亚烯基包含2至10个碳原子,即2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子,更优选2至8个碳原子,例如2至6个碳原子或2至4个碳原子。因此,在优选的实施方案中,亚烯基包含2至10个碳原子和1、2、3、4或5个碳-碳双键,更优选其包含2至8个碳原子和1、2、3或4个碳-碳双键,例如2至6个碳原子和1、2或3个碳-碳双键或2至4个碳原子和1或2个碳-碳双键。碳-碳双键可以是顺式(Z)或反式(E)构型。示例性亚烯基包括亚乙烯基-1,2-二基、亚乙烯基-1-丙烯-1,2-二基、1-丙烯-1,3-二基、1-丙烯-2,3-二基、亚烯丙基-1-丁烯-1,2-二基、1-丁烯-1,3-二基、1-丁烯-1,4-二基、1-丁烯-2,3-二基、1-丁烯-2,4-二基、1-丁烯-3,4-二基、2-丁烯-1,2-二基、2-丁烯-1,3-二基、2-丁烯-1,4-二基、2-丁烯-2,3-二基、2-丁烯-2,4-二基、2-丁烯-3,4-二基等。如果亚烯基连接到氮原子上,则双键不能在氮原子的 α 位。亚烯基可以是环状或非环状的、支链或非支链的、取代或未取代的。亚烯基取代基包括但不限于本文所述的导致形成稳定部分的任何取代基。

[0115] 如本文和整个说明书中所用,术语“炔基”是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和和直链或支链烃的单价基。通常,炔基中碳-碳三键的最大数目可等于通过将炔基中碳原子数除以2计算的整数,并且如果炔基中碳原子数为奇数,则将除法的结果四舍五入到下一个整数。例如,对于具有9个碳原子的炔基,碳-碳三键的最大数目为4,优选地,炔基具有1至4个,即1、2、3或4个,更优选1或2个碳-碳三键。优选地,炔基包含2至10个碳原子,即2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子,更优选2至8个碳原子,例如2至6个碳原子或2至4个碳原子。因此,在优选的实施方案中,炔基包含2至10个碳原子和1、2、3、4或5个(优选1、2或3个)碳-碳三键,更优选其包含2至8个碳原子和1、2、3或4个(优选1或2个)碳-碳三键,例如2至6个碳原子和1、2或3个碳-碳三键或2至4个碳原子和1或2个碳-碳三键。在某些实施方案中,本发明所用的炔基含有2-20个碳原子(C_{2-20} 炔基)。在一些实施方案中,本发明所用的炔基含有2-15个碳原子(C_{2-15} 炔基)。在另一个实施方案中,所用炔基含有2-10个碳原子(C_{2-10} 炔基)。在其它实施方案中,炔基含有2-8个碳原子(C_{2-8} 炔基)。在其它实施方案中,炔基含有2-6个碳原子(C_{2-6} 炔基)。在其它实施方案中,炔基含有2-5个碳原子(C_{2-5} 炔基)。在其它实施方案中,炔基含有2-4个碳原子(C_{2-4} 炔基)。在其它实施方案中,炔基含有2-3个碳原子(C_{2-3} 炔基)。在其它实施方案中,炔基含有2个碳原子(C_2 炔基)。示例性炔基包括乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、

3-己炔基、4-己炔基、5-己炔基、1-庚炔基、2-庚炔基、3-庚炔基、4-庚炔基、5-庚炔基、6-庚炔基、1-辛炔基、2-辛炔基、3-辛炔基、4-辛炔基、5-辛炔基、6-辛炔基、7-辛炔基、1-壬炔基、2-壬炔基、3-壬炔基、4-壬炔基、5-壬炔基、6-壬炔基、7-壬炔基、8-壬炔基、1-癸炔基、2-癸炔基、3-癸炔基、4-癸炔基、5-癸炔基、6-癸炔基、7-癸炔基、8-癸炔基、9-癸炔基等等,其可以带有一个或多个取代基的取代基。炔基取代基包括但不限于导致形成稳定部分的本文所述的任何取代基。如果炔基基团与氮原子连接,则三键不能在氮原子的 α 位。在一些实施方案中,炔基链是直链的。在一些实施方案中,炔基链是支链的。在一些实施方案中,炔基链是取代的。在一些实施方案中,炔基链是未取代的。在一些实施方案中,炔基链是直链的且为取代或未取代的。在一些实施方案中,炔基链是支链的且为取代或未取代的。

[0116] 如本文和整个说明书中所用,术语“亚炔基”是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和直链或支链烃的双自由基。通常,亚炔基中碳-碳三键的最大数目可以等于通过将亚炔基中的碳原子数除以2计算的整数,并且如果亚炔基中的碳原子数是奇数,则将除法的结果四舍五入为下一个整数。例如,对于具有9个碳原子的亚炔基,碳-碳三键的最大数目为4,优选地,亚炔基具有1至4个,即1、2、3或4个,更优选1或2个碳-碳三键。优选地,亚炔基包含2至10个碳原子,即2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子,更优选2至8个碳原子,例如2至6个碳原子或2至4个碳原子。因此,在优选的实施方案中,亚炔基包含2至10个碳原子和1、2、3、4或5个(优选1、2或3个)碳-碳三键,更优选其包含2至8个碳原子和1、2、3或4个(优选1或2个)碳-碳三键,例如2至6个碳原子和1、2或3个碳-碳三键或2至4个碳原子和1或2个碳-碳三键。示例性的亚炔基基团包括乙炔-1,2-二基、1-丙炔-1,3-二基、1-丙炔-3,3-二基、1-丁炔-1,4-二基、1-丁炔-3,4-二基、2-丁炔-1,4-二基等。如果亚炔基与氮原子连接,则三键不能在氮原子的 α 位。亚炔基可以是环状或非环状的、支链或非支链的、取代或未取代的。亚炔基取代基包括但不限于本文所述的导致形成稳定部分的任何取代基。

[0117] 如本文和整个说明书中所用,术语“环烷基”或“脂环族”或“碳环”表示具有优选3至14个碳原子,例如3至10个碳原子,即3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子,更优选3至8个碳原子,甚至更优选3至7个碳原子的“烷基”和“烯基”的环状非芳族变体。在某些实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-14个碳原子(C_{3-14} 环烷基)。在某些实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-12个碳原子(C_{3-12} 环烷基)。在另一个实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-10个碳原子(C_{3-10} 环烷基)。在另一个实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-8个碳原子(C_{3-8} 环烷基)。在另一个实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-7个碳原子(C_{3-7} 环烷基)。在另一个实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-6个碳原子(C_{3-6} 环烷基)。在另一个实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-5个碳原子(C_{3-5} 环烷基)。在另一个实施方案中,本发明所用的环烷基含有3-4个碳原子(C_{3-4} 环烷基)。在另一个实施方案中,本发明所用的环烷基含有3个碳原子(C_3 环烷基)。示例性的环烷基包括环丙基、环丙烯基、环丁基、环丁烯基、环戊基、环戊烯基、环己基、环己烯基、环庚基、环庚烯基、环辛基、环辛烯基、环壬基、环壬烯基、环癸基、环癸烯基和金刚烷基。术语“环烷基”还包括其双环和三环形式。如果形成双环,优选各环在两个相邻碳原子处彼此连接,然而,或者两个环通过相同碳原子连接,即它们形成螺环体系或它们形成“桥”环体系。环烷基的优选实例包括 C_3 - C_8 -环烷基,特别是环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、螺[3,3]庚基、螺[3,4]辛基、螺[4,3]辛基、双环[4.1.0]庚基、双环[3.2.0]庚基、双环[2.2.1]庚基、双环[2.2.2]辛基、双环[5.1.0]辛基和

双环[4.2.0]辛基。环烷基取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。

[0118] 如本文和整个说明书中所使用的,术语“亚环丙基”是指如上定义的环丙基,其中一个氢原子被除去,而形成双自由基。亚环丙基可以通过相同的碳原子(1,1-亚环丙基,即偕二自由基)或通过两个碳原子(1,2-亚环丙基)连接两个原子或部分。

[0119] 如本文和整个说明书中所用,本文所用的术语“芳基”或“芳环”是指具有3-20个环原子的芳族单环或多环体系,其中所有环原子都是碳,并且其可以是取代或未取代的。在本发明的某些实施方案中,“芳基”是指具有一个、两个或三个芳环的单、双或三环 C_4 - C_{20} 芳环体系,所述芳环包括但不限于苯基、联苯基、萘基等,其可带有一个或多个取代基。优选地,芳基含有3至14(例如5至10,如5、6或10)个碳原子,更优选6至10个碳原子,其可以排列成一个环(例如苯基)或两个或更多个稠环(例如萘基)。示例性的芳基包括环丙烯基、环戊二烯基、苯基、茚基、萘基、蒽基、茈萘基、蒽基和菲基。优选地,“芳基”是指含有6个碳原子的单环或含有10个碳原子的芳族双环体系。优选的实例是苯基和萘基。在某些实施方案中,本发明所用的芳基含有3-20个碳原子(C_{3-20} 芳基)。在某些实施方案中,本发明所用的芳基包含3-18个碳原子(C_{3-18} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有3-16个碳原子(C_{3-16} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有6-16个碳原子(C_{6-16} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有7-16个碳原子(C_{7-16} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基包含6-14个碳原子(C_{6-14} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有7-14个碳原子(C_{7-14} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基包含6-12个碳原子(C_{6-12} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有7-12个碳原子(C_{7-12} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有6-11个碳原子(C_{6-11} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有7-11个碳原子(C_{7-11} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基包含6-10个碳原子(C_{6-10} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有7-10个碳原子(C_{7-10} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基包含6-8个碳原子(C_{6-8} 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有6个碳原子(C_6 芳基)。在另一个实施方案中,本发明所用的芳基含有10个碳原子(C_{10} 芳基)。在一些实施方案中,Z不是取代的单环六元芳基或未取代的单环六元芳基。在一些实施方案中,Z不是取代的苯基或未取代的苯基。在一些实施方案中,Z不是被1、2、3、4或5个选自 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、卤素、 $-NH_2$ 、羟基、 $-OR^{11}$ 和 $-C(=O)R^{11}$ 的取代基取代的苯基,其中 R^{11} 是氢、取代的烷基或取代的炔基。芳基取代基包括但不限于导致形成稳定部分的本文所述的任何取代基。

[0120] 如本文和整个说明书中所用,术语“亚芳基”是指通过除去两个氢原子而衍生自如本文所定义的芳基的芳基双自由基。亚芳基可以是取代或未取代的。亚芳基取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。另外,亚芳基可作为连接基团并入如本文所定义的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基或亚杂炔基中。

[0121] 如本文和整个说明书中所用,术语“杂芳基”或“杂芳环”是指如上定义的芳基,其中芳基中的一个或多个碳原子被O、S或N杂原子代替。优选地,杂芳基是指其中1、2或3个碳原子被相同或不同的O、N或S杂原子替代的五元或六元芳香单环,或者,是指其中1、2、3、4或5个碳原子被相同或不同的O、N或S杂原子替代的芳香双环或三环体系。优选地,在杂芳基的每个环中,O原子的最大数目是1,S原子的最大数目是1,并且O和S原子的最大总数是2。在某

些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为五元芳族单环,其中1、2或3个碳原子被相同或不同的O、N或S杂原子代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为五元芳族单环,其中1、2或3个碳原子被相同或不同的O杂原子代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为五元芳族单环,其中1、2或3个碳原子被相同或不同的O及N杂原子代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为五元芳族单环,其中1、2或3个碳原子被相同或不同的O及S杂原子代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为五元芳族单环,其中1、2或3个碳原子被相同或不同的N及S杂原子代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为六元芳族单环,其中1、2或3个碳原子被相同或不同的O、S或N杂原子代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为六元芳族单环,其中1、2或3个碳原子被N代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为芳族双环体系,其中1、2、3、4或5个碳原子被相同或不同的O、N或S杂原子代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为芳族双环体系,其中1个碳原子被O代替。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为芳族双环体系,其中1个碳原子被N代替。在某些实施方案中,杂芳基为取代或未取代的吡啶基。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为芳族双环体系,其中2个碳原子被N代替。在某些实施方案中,杂芳基是取代或未取代的7-氮杂吡啶基。在某些实施方案中,杂芳基是取代或未取代的6-氮杂吡啶基。在某些实施方案中,杂芳基是取代或未取代的5-氮杂吡啶基。在某些实施方案中,杂芳基是取代或未取代的4-氮杂吡啶基。在某些实施方案中,杂芳基是取代或未取代的咪唑基。在某些实施方案中,本发明中所用的杂芳基为芳族双环体系,其中3个碳原子被N代替,优选为取代或未取代的二氮杂吡啶基。示例性的杂芳基包括呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基(1,2,5-和1,2,3-)、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基(1,2,3-和1,2,4-)、四唑基、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基(1,2,3-和1,2,5-)、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基(1,2,3-、1,2,4-和1,3,5-)、苯并呋喃基(1-和2-)、吡啶基、氮杂吡啶基(4-、5-、6-和7-)、二氮杂吡啶基、异吡啶基、苯并噻吩基(1-和2-)、1H-吡唑基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、吡啶基、苯并异噁唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并三唑基、喹啉基、异喹啉基、苯并二嗪基、喹啉基、喹唑啉基、苯并三嗪基(1,2,3-和1,2,4-苯并三嗪基)、哒嗪基、吩噻嗪基、噻唑并吡啶基、吡咯并噻唑基、吩噻嗪基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、吩噻嗪基、吡咯基、吡嗪基、咪唑基、咪唑基、酞嗪基、萘啶基(1,5-、1,6-、1,7-、1,8-和2,6-)、吡啶基(cinnoliny1)、蝶啶基、呋喃基、吩啶基、吡啶基、嘧啶基、吩啶基(1,7-、1,8-、1,10-、3,8-和4,7-)、吩噻基、噁唑并吡啶基、异噁唑并吡啶基、吡咯并噻唑基、吡咯并吡啶基等,其可以带有一个或多个取代基。杂芳基取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。示例性的5或6元杂芳基包括呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基(1,2,5-和1,2,3-)、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基(1,2,3-和1,2,4-)、噻唑基、异噻唑基、噻二唑基(1,2,3-和1,2,5-)、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基(1,2,3-、1,2,4-和1,3,5-)、和哒嗪基。示例性的双环杂芳基为7-氮杂吡啶基、6-氮杂吡啶基、5-氮杂吡啶基、4-氮杂吡啶基、二氮杂吡啶基和吡啶基。

[0122] 如本文和整个说明书中所用,术语“二氮杂吡啶基”或“二氮杂吡啶”是指具有吡啶核结构的化合物,其中成环的苯环的2个碳原子被N代替,优选吡啶核的4、5、6和/或7个碳原子被N代替,优选吡啶核的4和5个碳原子被N代替,优选吡啶核的4和6个碳原子被N代替,优选吡啶核的4和7个碳原子被N代替,优选吡啶核的5和6个碳原子被N代替,优选吡啶核的6和7个碳原子被N代替,优选吡啶核的5和7个碳原子被N代替,在某些实施方案中,二氮杂吡啶

基被取代。在一些实施方案中,二氮杂吡啶基是未取代的。

[0123] 如本文和整个说明书中所用,术语“亚芳基”是指通过除去两个氢原子而衍生自如本文所定义的杂芳基的双自由基。杂亚芳基可以是取代或未取代的。另外,亚杂芳基可作为连接基团并入如本文定义的亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基或亚杂炔基中。亚杂芳基取代基包括但不限于任何本文所述的导致形成稳定部分的取代基。

[0124] 在此和整个说明书中,术语“芳烷基”和“杂芳烷基”包括其中芳基和杂芳基分别与烷基(例如苄基、苄乙基、吡啶基甲基等)相连的基团,所述烷基包括其中碳原子(例如亚甲基)被例如氧原子取代的烷基(例如苯氧基甲基、2-吡啶氧基甲基、3-(1-萘氧基)丙基等)。优选地,芳基烷基是取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基(C₁-C₆)烷基。优选地,芳基烷基是取代或未取代的(C₆-C₁₀)芳基(C₁-C₆)烷基。优选地,杂芳基烷基是取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基(C₁-C₆)烷基。优选地,杂芳基烷基是取代或未取代的(C₃-C₁₀)杂芳基(C₁-C₆)烷基。在一些实施方案中,烷基链是直链的。在一些实施方案中,烷基链是支链的。在一些实施方案中,烷基链是取代的。在一些实施方案中,烷基链是未取代的。在一些实施方案中,烷基链是直链的且为取代或未取代的。在一些实施方案中,烷基链是支链的且为取代或未取代的。

[0125] 如本文和整个说明书中所用,术语“杂环基”或“杂环(heterocyclic ring)”或“杂环(heterocycle)”是指环状杂脂肪族基团。杂环基指非芳香的、部分不饱和或完全饱和的3-10元环体系,其包括大小为3-8个原子的单环,以及双环和三环体系,其可包括与非芳香环耦合的芳香五元或六元芳基或杂芳基。杂环基可以是取代的或未取代的。这些杂环包括具有一至三个独立选自氧、硫和氮的杂原子的那些,其中氮和硫杂原子可任选被氧化,氮杂原子可任选被季铵化。在某些实施方案中,术语杂环是指非芳族的5、6或7元环或多环基团,其中至少一个环原子为选自O、S和N的杂原子(其中氮和硫杂原子可任选被氧化),其余的环原子为碳,该基团通过任何环原子与分子的其余部分连接。杂环基包括但不限于二环或三环基,其包含耦合的五、六或七元环,所述环具有一至三个独立选自氧、硫和氮的杂原子,其中(i)每个5元环具有0至2个双键,每个6元环具有0至2个双键,且每个7元环具有0至3个双键,(ii)氮和硫杂原子可任选被氧化,(iii)氮杂原子可任选被季铵化,且(iv)任何上述杂环可耦合至芳基或杂芳基环。优选地,在杂环基的每个环中,O原子的最大数目为1,S原子的最大数目为1,O和S原子的最大总数为2。术语“杂环基”还包括上述杂芳基的部分或完全氢化形式(例如二氢、四氢或全氢形式)。示例性的杂环基包括吗啉基、异色满基、色满基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、哌啶基、哌嗪基、吡啶基、异吡啶基、二-和四氢呋喃基、二-和四氢噻吩基、二-和四氢噁唑基、二-和四氢异噻唑基、二-和四氢噁二唑基(1,2,5-和1,2,3-)、二氢吡咯基、二氢咪唑基、二氢吡唑基、二-和四氢三唑基(1,2,3-和1,2,4-)、二-和四氢噻唑基、二-和四氢噻二唑基(1,2,3-和1,2,5-)、二-和四氢吡啶基、二-和四氢嘧啶基、二-和四氢吡嗪基、二-和四氢三嗪基(1,2,3-、1,2,4-和1,3,5-)、二-和四氢苯并呋喃基(1-和2-)、二-和四氢吡啶基、二-和四氢异吡啶基、二-和四氢苯并噻吩基(1-和2-)、二-和四氢-1H-吡唑基、二-和四氢苯并咪唑基、二-和四氢苯并噁唑基、二-和四氢吡啶基、二-和四氢苯并异噻唑基、二-和四氢苯并噻唑基、二-和四氢苯并异噻唑基、二-和四氢苯并三唑基、二-和四氢喹啉基、二-和四氢异喹啉基、二-和四氢苯并二嗪基、二-和四氢喹喔啉基、二-和四氢喹唑啉基、二-和四氢苯并三嗪基(1,2,3-及1,2,4-)、二-和四氢哒嗪基、二-和四氢吩噻嗪基、二-和四氢噻唑并吡啶基(诸如4,5,6-7-四氢[1,3]噻唑并[5,4-c]吡啶基或4,5,6-7-四

氢[1,3]噻唑并[4,5-c]吡啶基,例如4,5,6-7-四氢[1,3]噻唑并[5,4-c]吡啶-2-基或4,5,6-7-四氢[1,3]噻唑并[4,5-c]吡啶-2-基)、二-和四氢吡咯并噻唑基(诸如5,6-二氢-4H-吡咯并[3,4-d][1,3]噻唑基)、二-和四氢吩噻嗪基、二-和四氢异苯并呋喃基、二-和四氢色烯基、二-和四氢咕吨基、二-和四氢吩噻嗪基、二-和四氢吡咯嗪基、二-和四氢吲哚嗪基、二-和四氢吲唑基、二-和四氢嘌呤基、二-和四氢喹嗪基、二-和四氢酞嗪基、二-和四氢噻啉基(1,5-、1,6-、1,7、1,8-及2,6-)、二-和四氢啉基、二-和四氢噻啉基、二-和四氢吡啶基、二-和四氢吡啶基、二-和四氢吡啶基(1,7-、1,8-、1,10-、3,8-及4,7-)、二-和四氢吩嗪基、二-和四氢噻唑并吡啶基、二-和四氢异噻唑并吡啶基、二-和四氢吡咯并噻唑基、以及二-和四氢吡咯并吡咯基。示例性的5或6元杂环基包括吗啉基、吡咯啉基、咪唑啉基、吡唑啉基、哌啶基、哌嗪基、二-和四氢呋喃基、二-和四氢噻吩基、二-和四氢噻唑基、二-和四氢异噻唑基、二-和四氢噻二唑基(1,2,5-及1,2,3-)、二氢吡咯基、二氢咪唑基、二氢吡唑基、二-和四氢三唑基(1,2,3-及1,2,4-)、二-和四氢噻唑基、二-和四氢异噻唑基、二-和四氢噻二唑基(1,2,3-及1,2,5-)、二-和四氢吡啶基、二-和四氢嘧啶基、二-和四氢吡嗪基、二-和四氢三嗪基(1,2,3-、1,2,4-及1,3,5-)、二-和四氢哒嗪基等,其可带有一个或多个取代基。优选为2H-1-苯并吡喃基(2H-色烯基)、苯并二氢吡喃基(色基)、4H-1-苯并吡喃基(4H-色烯基)、1H-2-苯并吡喃基(1H-异色烯基)、异色基、3H-2-苯并吡喃基(3H-异色烯基)、1-苯并吡喃-4-酮-基(色酮基)、4-色基、1-苯并吡喃-2-酮-基(香豆素基)、二氢香豆素基、3-异色酮基、2-香豆满酮基(coumaranonyl)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的2H-1-苯并吡喃基(2H-色烯基)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的苯并二氢吡喃基(色满基)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的4H-1-苯并吡喃基(4H-色烯基)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的1H-2-苯并吡喃基(1H-异色烯基)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的异色满基。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的3H-2-苯并吡喃基(3H-异色烯基)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的1-苯并吡喃-4-酮-基(色酮基)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的4-苯并二氢吡喃基。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的1-苯并吡喃-2-酮-基(香豆素基)。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的二氢香豆素基。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的3-异色酮基。在一些实施方案中,杂环基是取代或未取代的2-香豆满酮基。在一些实施方案中,杂环基为取代的或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被相同或不同的杂原子O、N或S替代。在一些实施方案中,杂环基为取代的或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被O替代。在一些实施方案中,杂环基为取代的或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被N替代。在一些实施方案中,杂环基为取代的或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被S替代。在一些实施方案中,杂环基为取代的或未取代的(C₉-C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被相同或不同的O、N或S杂原子替代。在一些实施方案中,杂环基为取代的或未取代的(C₉-C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被O替代。在一些实施方案中,杂环基为取代或未取代的(C₉-C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4、或5个碳原子被N代替。在一些实施方案中,杂环基为取代或未取代的(C₉-C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被S代替。在一些实施方案中,杂环基为取代或未取代的(C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被相同或不同的O、N或S杂原子替代。在一些实施方案中,杂环基为取代或未取代的(C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被

O替代。在一些实施方案中,杂环基为取代或未取代的(C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被N替代。在一些实施方案中,杂环基为取代或未取代的(C₁₀)杂环基,其中1、2、3、4或5个碳原子被S替代。

[0126] 如本文和整个说明书中所用,术语“杂烷基”如本文所用是指如本文所定义的烷基部分,其在碳原子之间含有一个或多个杂原子(例如氧、硫、氮、磷或硅原子)。杂烷基可以是取代的或未取代的。在某些实施方案中,杂烷基含有1-20个碳原子和1-6个杂原子(C₁₋₂₀杂烷基)。在某些实施例中,杂烷基含有1-10个碳原子和1-4个杂原子(C₁₋₁₀杂烷基)。在某些实施例中,杂烷基含有1-6个碳原子和1-3个杂原子(C₁₋₆杂烷基)。在某些实施例中,杂烷基含有1-5个碳原子和1-3个杂原子(C₁₋₅杂烷基)。在某些实施例中,杂烷基含有1-4个碳原子和1-2个杂原子(C₁₋₄杂烷基)。在某些实施方案中,杂烷基含有1-3个碳原子和1个杂原子(C₁₋₃杂烷基)。在某些实施方案中,杂烷基含有1-2个碳原子和1个杂原子(C₁₋₂杂烷基)。如本文所用,术语“亚杂烷基”是指通过移除两个氢原子而衍生自如本文所定义的杂烷基基团的二价基团(双自由基)。亚杂烷基可以是环状或非环状的、支链或非支链的、取代或未取代的。在某些实施方案中,杂烷基为含有1-6个碳原子和1-3个杂原子的取代杂烷基(C₁₋₆杂烷基)。在某些实施方案中,杂烷基为含1-6个碳原子和1-3个杂原子的未取代的杂烷基(C₁₋₆杂烷基)。在一些实施方案中,杂烷基为其中亚甲基上被S替代的烷基部分。在一些实施方案中,杂烷基为其中亚甲基上被O替代的烷基部分。在一些实施方案中,杂烷基为其中亚甲基上被NR¹替代的烷基部分,其中其选自以下:氢、取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₂-C₆)烯基、取代或未取代的(C₂-C₆)炔基、取代或未取代的(C₃-C₈)环烷基、取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基和取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基。在一些实施方案中,杂烷基是-CH₂SCH₃。在一些实施方案中,杂烷基是-CH₂OCH₃。

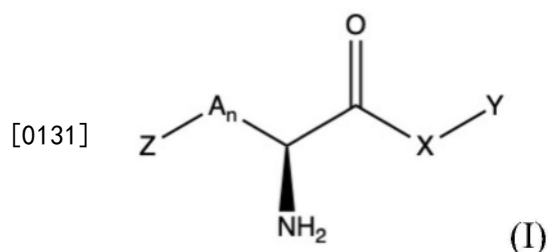
[0127] 如本文和整个说明书中所用,亚杂烷基(杂亚烷基)取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。

[0128] 如本文和整个说明书中所用,术语“杂烯基”是指如本文所定义的烯基部分,其在碳原子之间还含有一个或多个杂原子(例如氧、硫、氮、磷或硅原子)。在某些实施方案中,杂烯基包含2-20个碳原子和1-6个杂原子(C₂₋₂₀杂烯基)。在某些实施方案中,杂烯基包含2-10个碳原子和1-4个杂原子(C₂₋₁₀杂烯基)。在某些实施方案中,杂烯基包含2-6个碳原子和1-3个杂原子(C₂₋₆杂烯基)。在某些实施方案中,杂烯基包含2-5个碳原子和1-3个杂原子(C₂₋₅杂烯基)。在某些实施方案中,杂烯基包含2-4个碳原子和1-2个杂原子(C₂₋₄杂烯基)。在某些实施方案中,杂烯基包含2-3个碳原子和1个杂原子(C₂₋₃杂烯基)。如本文所用,术语“亚杂烯基”是指通过移除两个氢原子而衍生自如本文所定义的杂烯基基团的二价基团。亚杂烯基可以是环状或非环的、支链或非支链的、取代或未取代的。在某些实施方案中,杂烯基是含有1-6个碳原子和1-3个杂原子的取代的杂烯基(C₁₋₆亚杂烯基)。在某些实施方案中,杂烯基是含有1-6个碳原子和1-3个杂原子的未取代的杂烯基(C₁₋₆亚杂烯基)。

[0129] 如本文和整个说明书中所用,术语“杂炔基”是指如本文所定义的炔基部分,其在碳原子之间还含有一个或多个杂原子(例如氧、硫、氮、磷或硅原子)。在某些实施方案中,杂炔基含有2-20个碳原子和1-6个杂原子(C₂₋₂₀杂炔基)。在某些实施方案中,杂炔基含有2-10个碳原子和1-4个杂原子(C₂₋₁₀杂炔基)。在某些实施方案中,杂炔基含有2-6个碳原子和1-3个杂原子(C₂₋₆杂炔基)。在某些实施方案中,杂炔基含有2-5个碳原子和1-3个杂原子(C₂₋₅杂

炔基)。在某些实施方案中,杂炔基含有2-4个碳原子和1-2个杂原子(C_{2-4} 杂炔基)。在某些实施方案中,杂炔基含有2-3个碳原子和1个杂原子(C_{2-3} 杂炔基)。如本文所用,术语“亚杂炔基”是指通过移除两个氢原子而衍生自如本文所定义的杂炔基的二价基团。亚杂环基可以是环状或非环状的、支链或非支链的、取代或未取代的。在某些实施方案中,杂炔基是含有1-6个碳原子和1-3个杂原子的取代的杂炔基(C_{1-6} 亚杂炔基)。在某些实施方案中,杂炔基是含有1-6个碳原子和1-3个杂原子的未取代的杂炔基(C_{1-6} 亚杂炔基)。

[0130] 本文所述的非天然氨基酸也可由具有式I的氨基酸描述:



[0132] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征在于,X是O、 NR^1 或S;Y是氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基;Z选自以下:取代或未取代的(C_1-C_6)烷基、取代或未取代的(C_2-C_6)烯基、取代或未取代的(C_2-C_6)炔基、取代或未取代的(C_3-C_8)环烷基、取代或未取代的(C_6-C_{14})芳基、取代或未取代的(C_6-C_{14})芳基(C_1-C_6)烷基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂芳基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂芳基(C_1-C_6)烷基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂环基、取代或未取代的(C_1-C_6)杂烷基、取代或未取代的(C_2-C_6)杂烯基和取代或未取代的(C_2-C_6)杂炔基; R^1 为氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基,其中A为亚甲基且n为0或1,优选n为1。

[0133] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征在于,X是O、 NR^1 或S;Y是氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基;Z选自以下:取代或未取代的(C_1-C_6)烷基、取代或未取代的(C_6-C_{14})芳基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂芳基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂环基和取代或未取代的(C_1-C_6)杂烷基; R^1 为氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基,其中A为亚甲基且n为0或1,优选n为1。

[0134] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征可以在于,X是O;Y是氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基;Z选自:取代或未取代的(C_1-C_6)烷基、取代或未取代的(C_6-C_{14})芳基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂芳基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂环基和取代或未取代的(C_1-C_6)杂烷基,其中A为亚甲基,n为0或1,优选n为1。

[0135] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征在于,X是O、 NR^1 或S;Y是氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基;Z选自取代或未取代的(C_6-C_{14})芳基、未取代的(C_3-C_{14})杂芳基和取代或未取代的(C_3-C_{14})杂环基; R^1 为氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基,其中A为亚甲基且n为0或1,优选n为1。

[0136] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征可以在于,X是O;Y是氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基;Z选自取代或未取代的(C_6-C_{14})芳基、取代或未取代的(C_3-C_{14})杂芳基和取代或未取代的(C_3-C_{14})杂环基,其中A是亚甲基,n是0或1,优选n是1。

[0137] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征在于,X是O、 NR^1 或S;Y是氢或取代或未取代的(C_1-C_6)烷基;Z选自:取代或未取代的2H-1-苯并吡喃基(2H-色烯基),取代或未取代的苯并二氢吡喃基(色满基),取代或未取代的4H-1-苯并吡喃基(4H-色烯基),

取代或未取代的1H-2-苯并吡喃基(1H-异色烯基),取代或未取代的异色满基,取代或未取代的3H-2-苯并吡喃基(3H-异色烯基),取代或未取代的1-苯并吡喃-4-酮基(色酮基),取代或未取代的4-色满壬基,取代或未取代的1-苯并吡喃-2-酮基(香豆子基),取代或未取代的二氢香豆素基,取代或未取代的3-异色满酮基,取代或未取代的2-香豆满酮基,取代或未取代的(C₁-C₆)烷基,取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基,取代或未取代的咪唑基,取代或未取代的氮杂吡啶基,包括7-氮杂吡啶基,6-氮杂吡啶基,5-氮杂吡啶基和4-氮杂吡啶基,取代或未取代的吡啶基和未取代的二氮杂吡啶基;R¹为氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基,其中A为亚甲基且n为0或1,优选n为1。

[0138] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征可以在于,X是0;Y是氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基;Z选自:取代或未取代的2H-1-苯并吡喃基(2H-色烯基),取代或未取代的苯并二氢吡喃基(色满基),取代或未取代的4H-1-苯并吡喃基(4H-色烯基),取代或未取代的1H-2-苯并吡喃基(1H-异色烯基),取代或未取代的异色满基,取代或未取代的3H-2-苯并吡喃基(3H-异色烯基),取代或未取代的1-苯并吡喃-4-酮基(色酮基),取代或未取代的4-色满壬基,取代或未取代的1-苯并吡喃-2-酮基(香豆子基),取代或未取代的二氢香豆素基,取代或未取代的3-异色满酮基,取代或未取代的2-香豆满酮基,取代或未取代的(C₁-C₆)烷基,取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基,取代或未取代的咪唑基,取代或未取代的氮杂吡啶基包括7-氮杂吡啶基,6-氮杂吡啶基,5-氮杂吡啶基和4-氮杂吡啶基,取代或未取代的吡啶基,其中A为亚甲基且n为0或1,优选n为1。

[0139] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征在于,X是0、NR¹或S;Y是氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基;Z选自取代或未取代的1-苯并吡喃-2-酮基(香豆素基)、取代或未取代的二氢香豆素基、取代或未取代的咪唑基、取代或未取代的氮杂吡啶基,包括7-氮杂吡啶基、6-氮杂吡啶基、5-氮杂吡啶基和4-氮杂吡啶基,和取代或未取代的吡啶基;R¹为氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基,其中A为亚甲基且n为0或1,优选n为1。

[0140] 在一些实施方案中,具有式I的结构式的化合物的特征可以在于,X是0;Y是氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基;Z选自:取代或未取代的1-苯并吡喃-2-酮基(香豆素基)、取代或未取代的二氢香豆素基、取代或未取代的咪唑基、取代或未取代的氮杂吡啶基,包括7-氮杂吡啶基、6-氮杂吡啶基、5-氮杂吡啶基和4-氮杂吡啶基,和取代或未取代的吡啶基,其中A是亚甲基,n是0或1,优选n是1。

[0141] 在一些具有式I的化合物的实施方案中,X为0。在一些具有式I的化合物的实施方案中,X为S。在一些具有式I的化合物的实施方案中,X为NR¹,其中R¹选自氢、取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₂-C₆)烯基、取代或未取代的(C₂-C₆)炔基、取代或未取代的(C₃-C₈)环烷基、取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基和取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基,优选氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基,更优选氢,更优选取代或未取代的(C₁-C₆)烷基,甚至更优选未取代的(C₁-C₆)烷基。

[0142] 在具有根据式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y选自:氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂链烯基和取代或未取代的杂炔基。在具有根据式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y选自:氢、取代或未取代的

烷基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基和取代或未取代的杂烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y选自取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₂-C₆)烯基、取代或未取代的(C₂-C₆)炔基、取代或未取代的(C₃-C₈)环烷基、取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基、取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基、取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基、取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基、取代或未取代的(C₂-C₆)杂烯基和取代或未取代的(C₂-C₆)杂炔基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是氢。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的烷基,优选取代或未取代的(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的烯基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)烯基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的炔基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)炔基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的环烷基,优选取代或未取代的(C₃-C₈)环烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的芳基,优选取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的芳基烷基,优选取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的杂芳基,优选取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的杂芳基烷基,优选取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的杂环基,优选取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的杂烷基,优选取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的杂烯基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)杂烯基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Y是取代或未取代的杂炔基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)杂炔基。

[0143] 在具有根据式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基;且条件是Z不是取代或未取代的单环六元芳基。在具有根据式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基和取代或未取代的杂烷基;且条件是Z不是取代或未取代的单环六元芳基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z选自取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₂-C₆)烯基、取代或未取代的(C₂-C₆)炔基、取代或未取代的(C₃-C₈)环烷基、取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基、取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基、取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基、取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基、取代或未取代的(C₂-C₆)杂烯基和取代或未取代的(C₂-C₆)杂炔基;且条件是Z不是取代或未取代的单环六元芳基。在具有式I

的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是氢或取代或未取代的(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是氢。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的烷基,优选取代或未取代的(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的链烯基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)烯基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的炔基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)炔基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的环烷基,优选取代或未取代的(C₃-C₈)环烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的芳基,优选取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基,优选条件是Z不是取代或未取代的单环六元芳基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的芳烷基,优选取代或未取代的(C₆-C₁₄)芳基(C₁-C₆)烷基,优选条件是Z不是取代或未取代的单环六元芳基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的杂芳基,优选取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的杂芳基烷基,优选取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂芳基(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的杂环基,优选取代或未取代的(C₃-C₁₄)杂环基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的杂烷基,优选取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的杂烯基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)杂烯基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的杂炔基,优选取代或未取代的(C₂-C₆)杂炔基。在具有根据式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z选自取代或未取代的2H-1-苯并吡喃基(2H-色烯基)、取代或未取代的苯并二氢吡喃基(色烯基)、取代或未取代的4H-1-苯并吡喃基(4H-色烯基)、取代或未取代的1H-2-苯并吡喃基(1H-异色烯基)、取代或未取代的异色烯基、取代或未取代的3H-2-苯并吡喃基(3H-异色烯基)、取代或未取代的1-苯并吡喃-4-酮基(色酮基)、取代或未取代的4-色壬基、取代或未取代的1-苯并吡喃-2-酮基(香豆素基)、取代或未取代的二氢香豆素基、取代或未取代的3-异色烯酮基、取代或未取代的2-香豆酮基、取代或未取代的(C₁-C₆)烷基、取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基、取代或未取代的咪唑基、取代或未取代的氮杂吡啶基,包括7-氮杂吡啶基、6-氮杂吡啶基和5-吡啶基和吡啶基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的2H-1-苯并吡喃基(2H-色烯基)。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的苯并二氢吡喃基(色烯基)。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的4H-1-苯并吡喃基(4H-色烯基)。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的1H-2-苯并吡喃基(1H-异苯并色烯基)。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的异色满基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的3H-2-苯并吡喃基(3H-异苯并色烯基)。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的1-苯并吡喃-4-酮基(色酮基)。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的4-苯并二氢吡喃基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的1-苯并吡喃-2-酮基(香豆素基)。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的二氢香豆素基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的3-异色酮基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z为取代或未取代的2-香豆满酮基。在具有式I的结构式的化合

物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的(C₁-C₆)烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的(C₁-C₆)杂烷基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的咪唑基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的氮杂吡啶基,包括7-氮杂吡啶基、6-氮杂吡啶基、5-氮杂吡啶基和4-氮杂吡啶基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z是取代或未取代的吡啶基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z不是取代的单环六元芳基或未取代的单环六元芳基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z不是取代的苯基或未取代的苯基。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,Z不是被1、2、3、4或5个选自-NO₂、-N₃、卤素、-NH₂、羟基、-OR¹¹和-C(=O)R¹¹的取代基取代的苯基,其中R¹¹是氢、取代的烷基或取代的炔基。

[0144] 在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,A是亚甲基,n是1。在具有式I的结构式的化合物的一些实施方案中,A是亚甲基,n是2。

[0145] 如本文和整个说明书中所用,术语“脂族”包括饱和和不饱和、非芳族、直链(即非支链)、支链、非环和环状(即碳环)烃,其任选被一个或多个官能团取代。如本领域普通技术人员将理解的,“脂族”在本文中意在包括但不限于烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基和环炔基部分。因此,如本文所用,术语“烷基”包括直链、支链和环状烷基。类似的惯例适用于其它通用术语,例如“烯基”、“炔基”等。此外,如本文所用,术语“烷基”、“烯基”、“炔基”等涵盖取代和未取代的基团。在某些实施方案中,如本文所用,“脂族”用于表示具有1-20个碳原子的那些脂族基团(环状、非环、取代、未取代、支链或非支链)(C₁₋₂₀脂族)。在某些实施方案中,脂族基团具有1-10个碳原子(C₁₋₁₀脂族)。在某些实施方案中,脂族基团具有1-6个碳原子(C₁₋₆脂族)。在某些实施方案中,脂族基团具有1-5个碳原子(C₁₋₅脂族)。在某些实施方案中,脂族基团具有1-4个碳原子(C₁₋₄脂族)。在某些实施方案中,脂族基团具有1-3个碳原子(C₁₋₃脂族)。在某些实施方案中,脂族基团具有1-2个碳原子(C₁₋₂脂族)。脂族基团取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。在一些实施方案中,脂族基团是饱和或不饱和的、非支链或支链烷基,优选(C₁-C₂₀)烷基,更优选(C₁-C₁₀)烷基,甚至更优选(C₁-C₆)烷基。

[0146] 如本文和整个说明书中所用,术语“杂脂肪族”是指如本文所定义的脂肪族部分,其包括饱和与不饱和、非芳香族、直链(即,非支链)、支链、非环、环状(即,杂环)或多环烃,其任选经一个或多个官能团取代,且其进一步在碳原子之间含有一个或多个杂原子(例如,氧、硫、氮、磷或硅原子)。在某些实施方案中,杂脂肪族部分通过用一个或多个取代基独立取代其上的一个或多个氢原子而被取代。如本领域普通技术人员将理解的,“杂脂肪族”在本文中旨在包括但不限于杂烷基、杂烯基、杂炔基、杂环烷基、杂环烯基和杂环炔基部分。因此,术语“杂脂肪族”包括术语“杂烷基”、“杂链烯基”、“杂链炔基”等。此外,如本文所用,术语“杂烷基”、“杂烯基”、“杂炔基”等涵盖取代和未取代的基团。在某些实施方案中,如本文所用,“杂脂肪族基团”用于表示具有1-20个碳原子和1-6个杂原子(C₁₋₂₀杂脂肪族基团)的那些杂脂肪族基团(环状、无环、取代、未取代、分支或未分支)。在某些实施方案中,杂脂肪族基团含有1-10个碳原子和1-4个杂原子(C₁₋₁₀杂脂肪族基团)。在某些实施方案中,杂脂肪族基团含有1-6个碳原子和1-3个杂原子(C₁₋₆杂脂肪族基团)。在某些实施方案中,杂脂肪族基团含有1-5个碳原子和1-3个杂原子(C₁₋₅杂脂肪族基团)。在某些实施方案中,杂脂肪族基

团含有1-4个碳原子和1-2个杂原子 (C_{1-4} 杂脂肪族基团)。在某些实施方案中,杂脂肪族基团含有1-3个碳原子和1个杂原子 (C_{1-3} 杂脂肪族基团)。在某些实施方案中,杂脂肪族基团含有1-2个碳原子和1个杂原子 (C_{1-2} 杂脂肪族基团)。杂脂肪族基团取代基包括但不限于本文所述的任何取代基,其导致形成稳定部分。在一些实施方案中,脂肪族基团为饱和或不饱和的、非支链或支链烷基,优选 (C_1-C_{20}) 杂烷基,更优选 (C_1-C_{10}) 杂烷基,甚至更优选 (C_1-C_6) 杂烷基。

[0147] “L”:连接子

[0148] 本文提供抗体药物偶联物,其中如本文所述修饰的维布妥昔与药物部分连接。根据本发明,可以通过连接子共价连接将维布妥昔连接到药物部分上。如本文所用,“连接子”是能够将抗体如维布妥昔、抗体片段(例如抗原结合片段)或功能等同物连接到另一部分如药物部分的任何化学部分。在这点上,再次参考本文所述的“ADC公式”: $Ab-(L-(D)_x)_y$ 。因此,药物部分D可以通过连接子L连接到维布妥昔。L是能够将维布妥昔Ab连接到药物部分D的任何化学部分,优选地,连接子L通过共价键将维布妥昔Ab连接到药物部分D。连接子试剂是双功能或多功能部分,其可用于连接药物部分D和维布妥昔Ab以形成抗体药物偶联物。抗体药物偶联物可以使用具有用于结合药物部分D和抗体Ab的反应性官能团的连接子来制备。术语“连接子试剂”、“交联试剂”、“衍生自交联试剂的连接子”和“连接子”在本公开中可以互换使用。

[0149] 连接子可以是对切割(可切割连接子)敏感的,例如酶切割、酸诱导的切割、光诱导的切割和二硫化物键切割。酶切割包括但不限于蛋白酶诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割、糖苷酶诱导的切割、磷酸酶诱导的切割和硫酸酯酶诱导的切割,优选在化合物或抗体保持活性的条件下进行。或者,连接子可以基本上抗切割(例如,稳定连接子或不可切割连接子)。在一些方面,连接子可以是预先带电的连接子、亲水性连接子、基于PEG的连接子或基于二羧酸的连接子。因此,在本文公开的任一种抗体药物偶联物的一些实施方案中,连接子(L)选自:可切割连接子、不可切割连接子、亲水连接子、基于PEG的连接子、预带电的连接子和基于二羧酸的连接子。在一些实施方案中,L是可切割的连接子。在一些实施方案中,L是不可切割的连接子。在一些实施方案中,L是对酶切割敏感的连接子。在一些实施方案中,L是酸不稳定连接子、光不稳定连接子、肽酶可切割连接子、蛋白酶可切割连接子、酯酶可切割连接子、糖苷酶可切割连接子、磷酸酶可切割连接子、硫酸酯酶可切割连接子、二硫化物键可还原连接子、亲水性连接子、预带电荷连接子、基于PEG的连接子或基于二羧酸的连接子。优选肽酶可切割的连接子。其它优选的连接子可被蛋白酶切割。

[0150] 不可切割连接子是能够以稳定的共价方式将药物连接到抗体的任何化学部分,并且不属于以上对于可切割连接子的类别。因此,不可切割的连接子基本上抗酸诱导的切割、肽酶诱导的切割、蛋白酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫化物键切割。此外,不可切割是指连接子中或与连接子邻接的化学键在药物或抗体不丧失其活性的条件下经受由酸、光不稳定切割剂、肽酶、蛋白酶、酯酶、或切割二硫化物键的化学或生理化合物诱导的切割的能力。

[0151] 酸不稳定连接子是在酸性pH下可切割的连接子。例如,某些细胞内区室,如胞内体和溶酶体,具有酸性pH(pH 4-5),并提供适于切割酸不稳定连接物的条件。

[0152] 一些连接子可以被肽酶切割,即肽酶可切割的连接子。在这点上,某些肽易于在细胞内或细胞外切割,参见例如Trout等人,79Proc.Natl.Acad.Sci.USA,626-629(1982)以及

Umemoto等人43Int.J.Cancer,677-684(1989)。肽由 α -氨基酸和肽键组成,肽键在化学上是一个氨基酸的羧酸酯与第二个氨基酸的氨基之间的酰胺键。

[0153] 一些连接子可以被酯酶切割,即酯酶可切割的连接子。在这点上,某些酯可被存在于细胞内部或外部的酯酶切割。酯是通过羧酸和醇的缩合形成的。简单酯是用简单醇如脂族醇和小的环状和小的芳族醇产生的酯。

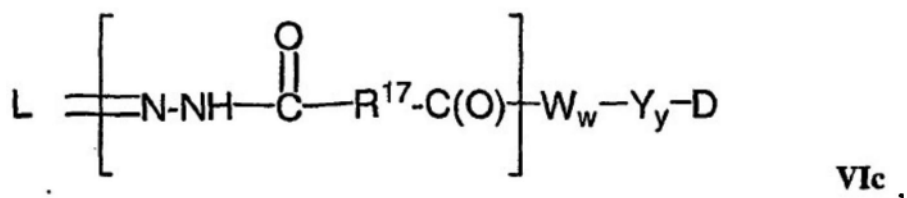
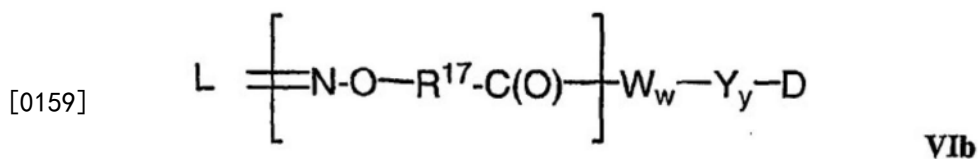
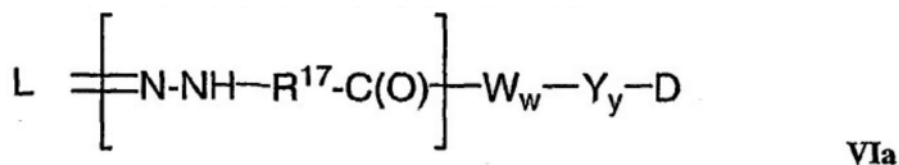
[0154] 预带电的连接子衍生自带电的交联试剂,其在掺入抗体药物偶联物后保留其电荷。预带电荷连接物的实例可在US2009/0274713中找到。

[0155] 连接子可为可切割的,优选为蛋白酶可切割的,更优选为组织蛋白酶(诸如组织蛋白酶B)可切割的。连接子可包含缬氨酸-瓜氨酸部分,其可被组织蛋白酶如组织蛋白酶B切割。连接子可包含羟胺基团,并且所述非天然氨基酸包含位于芳环如3-甲酰基酪氨酸中羟基邻位的甲酰基,并且其中连接子的羟胺基团在偶联后与非天然氨基酸的甲酰基形成肟。连接子可以包含切割位点。“切割位点”是被蛋白酶或肽酶识别并被所述蛋白酶或肽酶水解的氨基酸序列。优选地,切割位点是缬氨酸瓜氨酸部分。

[0156] 在一个实施方案中,本发明ADC的连接子具有下式: $-A_a-X_x-W_w-Y_y$, 其中: $-A-$ 是延伸子单元(stretcher unit); a 是0或1; 其中 $-X-$ 是第二间隔子单元; x 独立地为0至12范围内的整数; 每个 $-W-$ 独立地是氨基酸单元; w 独立地为0至12范围内的整数; $-Y-$ 是第一间隔子单元; y 独立地是0-12的整数, 优选0、1或2。

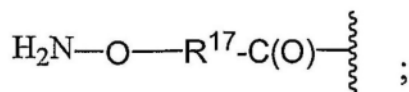
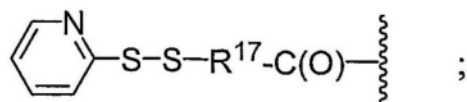
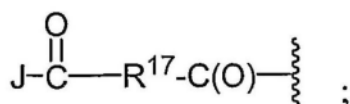
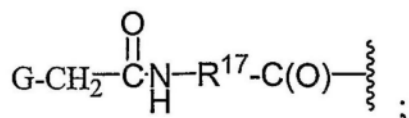
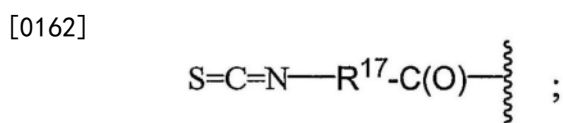
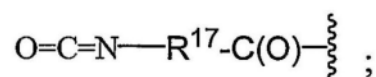
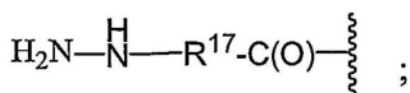
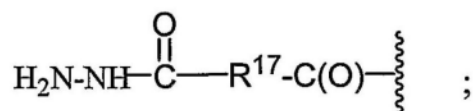
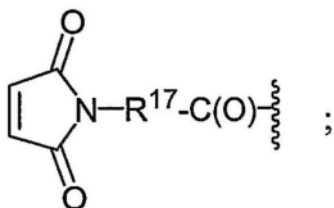
[0157] 当延伸子单元($-A-$)存在时,其能够将配体单元,即包含在本发明ADC中的维布妥昔的非天然氨基酸,与氨基酸单元($-W-$)连接。在这方面,非天然氨基酸具有可与延伸子的官能团形成键的官能团。可天然地或经由化学操作存在于非天然氨基酸上的有用官能团包括(但不限于)巯基($-SH$)、氨基、叠氮基、炔基、羟基、羧基、碳水化合物的异头羟基、甲酰基和羧基。在一个方面中,非天然氨基酸官能团是巯基和氨基。优选地,非天然氨基酸的官能团是甲酰基。巯基可以通过还原配体的分子内二硫化物键而产生。或者,巯基可通过使用2-亚氨基硫烷(特劳特试剂(Traut's Reagent))或另一种巯基产生试剂与非天然氨基酸的赖氨酸部分的氨基反应而产生。

[0158] 延伸子的反应性基团可含有与可存在于非天然氨基酸上的经修饰碳水化合物($-CHO$)基团反应的反应性位点。例如,可以使用如高碘酸钠的试剂来温和氧化碳水化合物,或者可以利用TTL将非天然甲酰基酪氨酸氨基酸连接至配体,并且可以将得到的($-CHO$)单元与含有官能团的延伸子缩合,所述官能团如酰肼、肟、吡唑酮、硫代吡唑酮、伯胺或仲胺、胍、氨基硫脲、胍羧酸酯和芳基酰肼,如Kaneko, T. (1991) Bioconjugate Chem 2:133-41所述的那些,在结构VIa、VIb和VIc的方括号内描绘了偶联至该实施方案的非天然氨基酸后的代表性延伸子单元,其中 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D-$ 、 w 和 y 如上文所定义,并且 L 是本发明ADC中包含的维布妥昔的非天然氨基酸。



[0160] 其中 R^{17} 选自:取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基。

[0161] 延伸子单元还可以包括以下中的一个或多个:

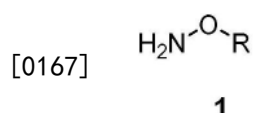


[0163] 其中G选自-C1、-Br、-I、-O-甲磺酰基和-O-甲苯磺酰基；

[0164] 其中J选自-C1、-Br、-I、-F、-OH、-O-N-琥珀酰亚胺、-O(4-硝基苯基)、-O-五氟苯基、-O-四氟苯基和-O-C(O)-OR¹⁸；R¹⁸为-C₁-C₈烷基或-芳基和

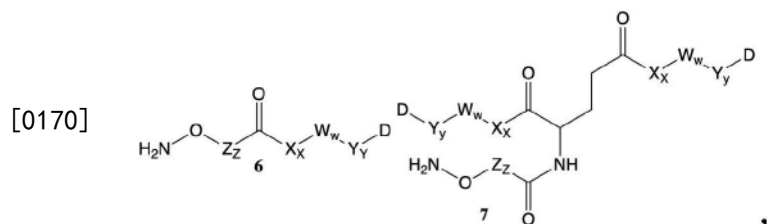
[0165] 其中R¹⁷选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基。波浪线表示与氨基酸单元W的共价键(如果存在)、间隔子单元W(如果不存在氨基酸且存在间隔子单元)的共价键、或药物部分(如果不存在氨基酸单元或间隔子单元)的共价键。

[0166] 在与非天然氨基酸偶联之前,延伸子单元可包含如1中所述的结构或由其组成:



[0168] 其中R可以表示与第二间隔子单元X、氨基酸单元W、第一间隔子单元W或药物部分的共价键。

[0169] 在如本文所述的连接子中,延伸子单元在偶联至非天然氨基酸之前可包含如6或7中所述的结构或由其组成:



[0171] 其中Z选自:取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂链烯基和取代或未取代的杂炔基;z独立地为0至12范围内的整数;

[0172] 其中X是如本文定义的任意的第二间隔子单元,优选选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂链烯基和取代或未取代的杂炔基,或基于聚乙二醇的连接基如PEG_i,其中i是2至12的整数,优选选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12,优选2;x独立地为0至12范围内的整数;

[0173] 其中Y是如本文定义的任意的第一间隔子单元;y独立地为0至12范围内的整数;

[0174] 其中W是如本文定义的任意的氨基酸单元;w独立地为0至12范围内的整数;

[0175] 以及

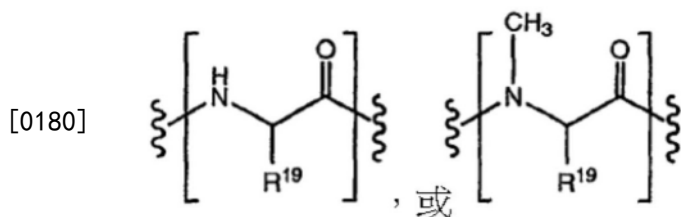
[0176] 其中D是药物部分,

[0177] 优选地,其中结构6或7的羟胺与本发明ADC中包含的维布妥昔的非天然氨基酸偶联,从而在偶联后形成肟。

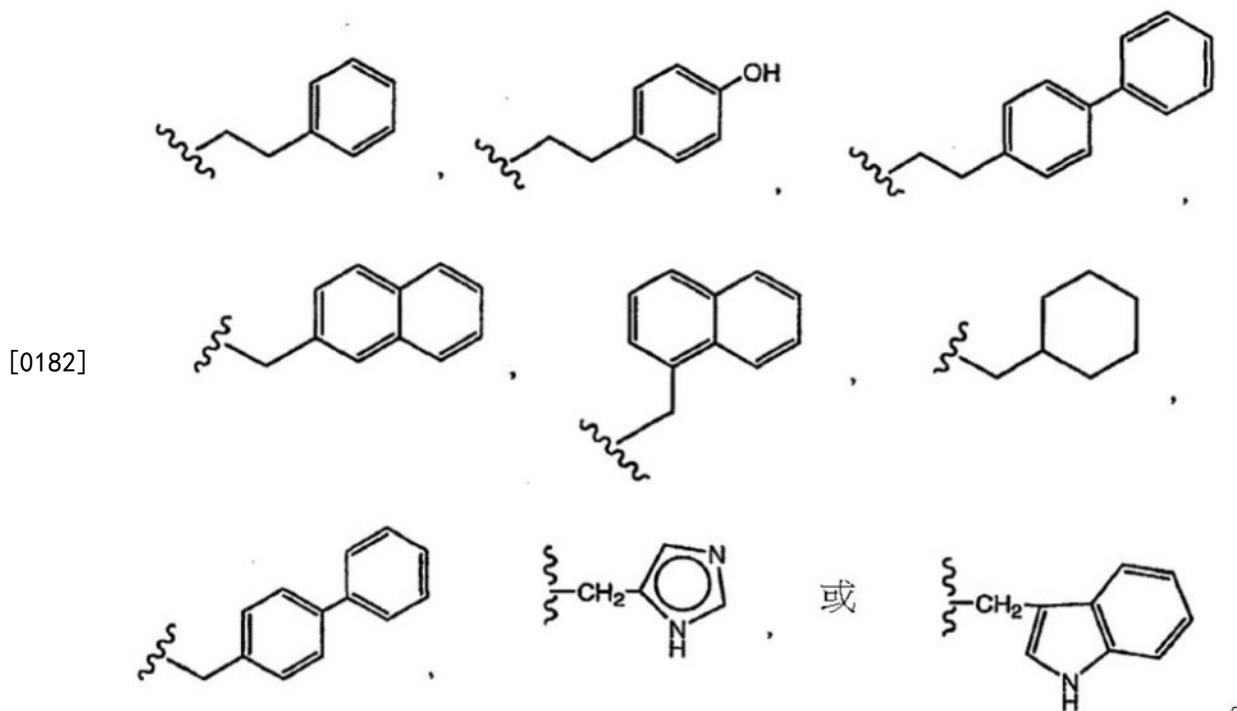
[0178] 当氨基酸单元(-W-)存在时,如果间隔子单元存在,则将延伸子单元连接到间隔子

单元上,如果间隔子单元不存在,则将延伸子单元连接到药物部分上,如果延伸子单元和间隔子单元不存在,则将配体单元连接到药物部分上。

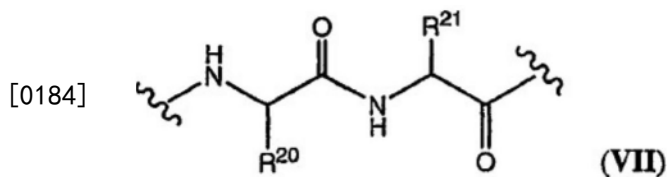
[0179] W_w -是二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。每个-W-单元独立地具有以下方括号中所示的式,并且w是0至12范围内的整数:



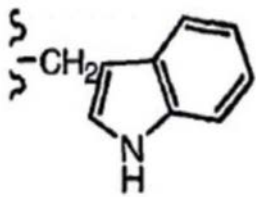
[0181] 其中 R^{19} 为氢、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、环己基,



[0183] 氨基酸单元可以被一种或多种酶(包括肿瘤相关蛋白酶)酶切割以释放药物部分(-D),在一个实施方案中,其在体内释放时质子化以提供药物(D)。说明性的 W_w 单元由式(VII)-(IX)表示:



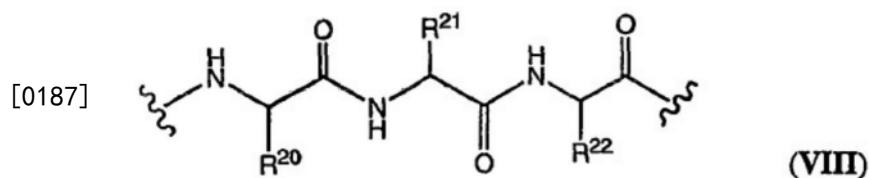
[0185] 其中 R^{20} 和 R^{21} 如下:

	R ²⁰	R ²¹
	苄基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
	甲基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
	异丙基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
	异丙基	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
	苄基	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
[0186]	异丁基	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
	二级-丁基	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
		(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;

苄基

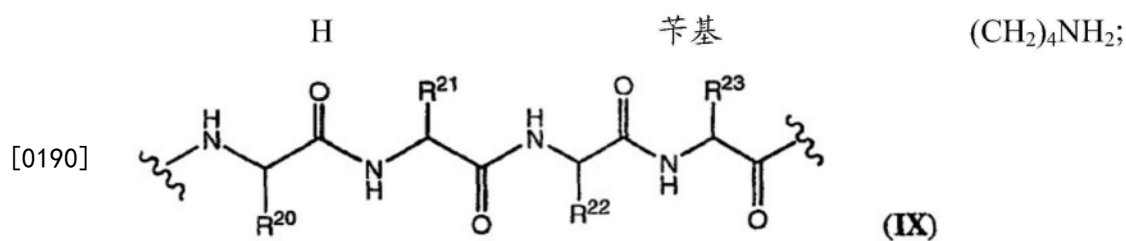
甲基; 以及

苄基

(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂;

[0188] 其中R²⁰、R²¹和R²²如下:

	R ²⁰	R ²¹	R ²²
	苄基	苄基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
[0189]	异丙基	苄基	(CH ₂) ₄ NH ₂ ; 以及



[0191] 其中R²⁰、R²¹、R²²和R²³如下:

	R ²⁰	R ²¹	R ²²	R ²³
	H	苄基	异丁基	H; 以及
[0192]	甲基	异丁基	甲基	异丁基

[0193] 其他合适的连接子公开于Salomon等人Mol.Pharmaceutics 2019,16,12,4817-4825,其通过引用结合到本文中。

[0194] 示例性的氨基酸单元包括但不限于式(VII)的单元,其中:R²⁰为苄基,R²¹为-(CH₂)₄NH₂;R²⁰为异丙基,R²¹为-(CH₂)₄NH₂;R²⁰为异丙基,R²¹为-(CH₂)₃NHCONH₂。另一个示例性氨基

酸单元是式(VIII)的单元,其中 R^{20} 是苄基, R^{21} 是苄基, R^{22} 是 $-(CH_2)_4NH_2$ 。

[0195] 可以设计有用的 $-W_w-$ 单元,并优化其对特定酶(例如肿瘤相关蛋白酶)的酶切割的选择性。在一个实施方案中, $-W_w-$ 单元是由组织蛋白酶B、C和D或纤溶酶蛋白酶(“肿瘤相关蛋白酶”)催化其切割的单元。

[0196] 在一个实施方案中, $-W_w-$ 是二肽、三肽、四肽或五肽。

[0197] 当 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 不是氢时,与 R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 连接的碳原子是手性的。

[0198] R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 所连接的每个碳原子独立地为(S)或(R)构型。

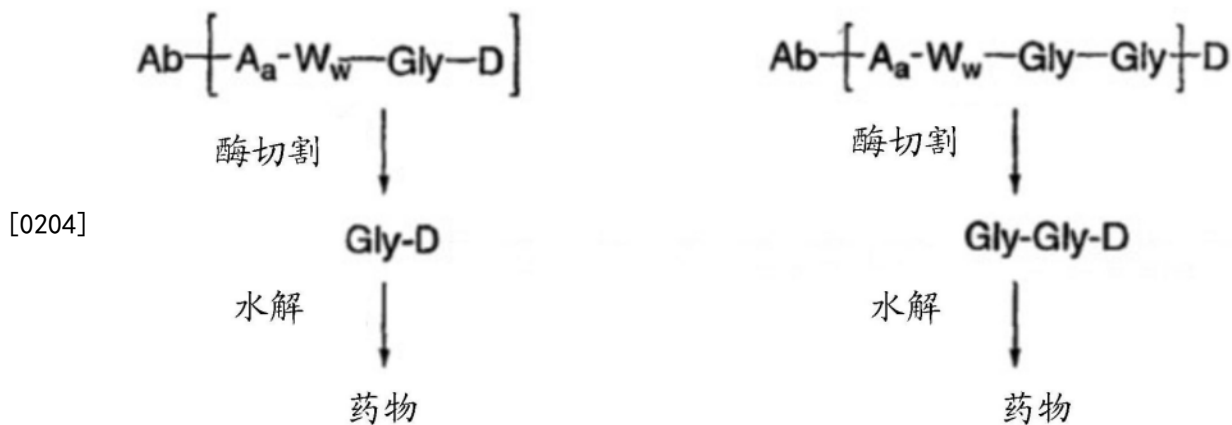
[0199] 在氨基酸单元的一个方面,氨基酸单元是缬氨酸-瓜氨酸。在另一个方面,氨基酸单元是苯丙氨酸-赖氨酸(即fk)。在氨基酸单元的另一方面,氨基酸单元是N-甲基缬氨酸。在另一个方面,氨基酸单元是5-氨基戊酸、高苯丙氨酸赖氨酸、四异喹啉羧酸赖氨酸、环己基丙氨酸赖氨酸、异表皮酸赖氨酸、 β -丙氨酸赖氨酸、甘氨酸丝氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺和异表皮酸。

[0200] 在某些实施方案中,氨基酸单元可以包含天然氨基酸。在其它实施方案中,氨基酸单元可包含非天然氨基酸。

[0201] 当存在氨基酸单元时,第一间隔子单元(-Y-) (当存在时)可以将氨基酸单元与药物部分连接。或者,当氨基酸单元不存在时,第一间隔子单元可将延伸子单元连接至药物部分。当氨基酸单元和延伸子单元都不存在时,第一间隔子单元也可将药物部分连接至配体单元。当第二间隔子单元(-X-)存在时,可以将延伸子单元与氨基酸单元连接。或者,在不存在氨基酸单元的情况下,第二间隔子单元可将延伸子单元连接至第一间隔子单元。或者,在不存在第一间隔子单元和氨基酸单元的情况下,第二间隔子单元也可将延伸子单元连接至药物部分。两个间隔子单元可以相同或不同。“间隔子单元”的公开内容一般适用于第一和第二间隔子单元两者。第一和第二间隔子单元可以是相同的。第一和第二间隔子单元可以不同,其中各自独立地选自间隔子单元的以下实例。

[0202] 间隔子单元有两种一般类型:自消耗(self-immolative)型及非自消耗型。非自消耗型间隔子单元是其中在从药物-连接子-配体偶联物或药物-连接子化合物上切割(特别是酶切割)氨基酸单元之后,部分或全部间隔子单元保持与药物部分结合的间隔子单元。非自消耗型间隔子单元的实例包括但不限于(甘氨酸-甘氨酸)间隔子单元和甘氨酸间隔子单元(均在方案1中描述)(下文)。当含有甘氨酸-甘氨酸间隔子单元或甘氨酸间隔子单元的示例性化合物通过肿瘤细胞相关蛋白酶、癌细胞相关蛋白酶或淋巴细胞相关蛋白酶进行酶切割时,甘氨酸-甘氨酸-药物部分或甘氨酸-药物部分从 $L-A_a-W_w$ 上被切割。在一个实施方案中,在靶细胞内发生独立的水解反应,切割甘氨酸-药物部分键并释放药物。

[0203] 方案1



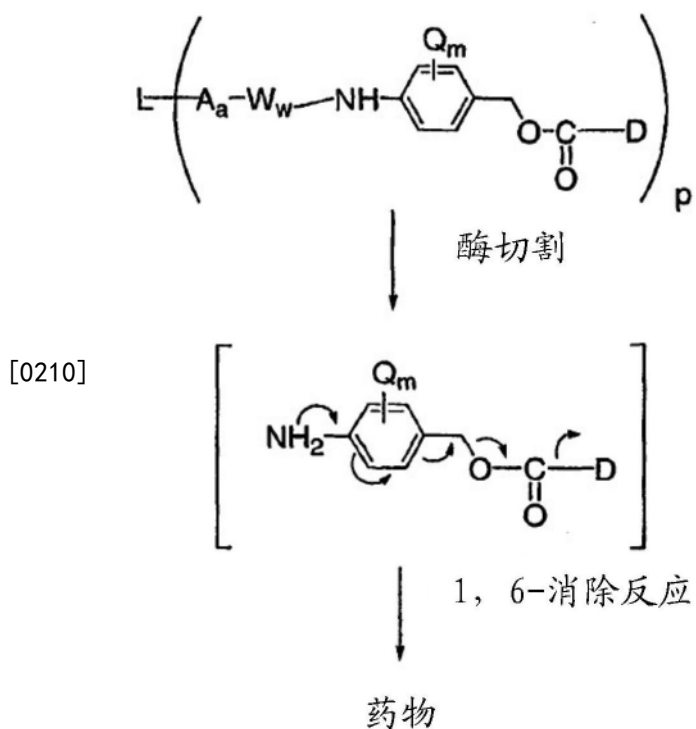
[0205] 在另一个实施方案中,间隔子单元是对氨基苯甲醇(PAB)单元(参见方案2和3),其亚苯基部分被 Q_m 取代,其中Q是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m为0~4的整数。

[0206] 在一个实施方案中,非自消耗型间隔子单元是 $-Gly-Gly-$ 。在另一个实施方案中,非自消耗型间隔子单元是 $-Gly-$ 。

[0207] 在一个实施方案中,提供其中不存在第一间隔子单元($y=0$)的ADC,或其药学上可接受的盐或溶剂化物。在一个实施方案中,提供其中不存在第二间隔子单元($x=0$)的ADC,或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0208] 或者,包含自消耗型间隔子单元的示例性化合物可以在不需要单独的水解步骤的情况下释放-D。在该实施方案中,间隔子单元是PAB基团,其通过PAB基团的氨基氮原子连接到 $-W_w-$,并通过碳酸酯、氨基甲酸酯或醚基团直接连接到-D。不受任何特定理论或机理的约束,方案2描述PAB基团的药物释放的可能机转,该PAB基团经由胺甲酸酯或碳酸酯基团与-D直接连接,上述机转由Toki等人et al. (2002) J Org.Chem.67:1866-1872所支持。

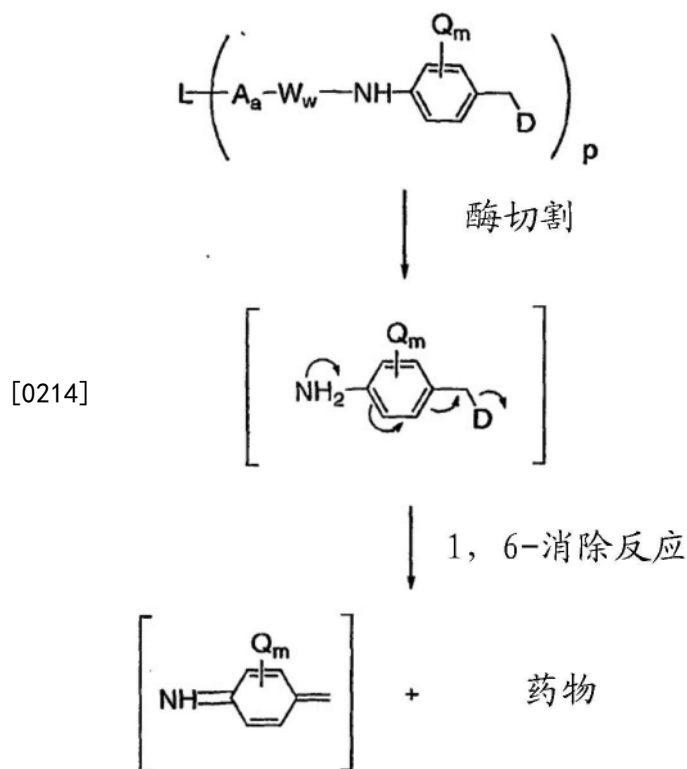
[0209] 方案2



[0211] 其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4的整数;和p为1至约20。

[0212] 不受任何特定理论或机理的约束,方案3描述了PAB基团的药物释放的可能机理,所述PAB基团通过醚或胺键直接连接到-D。

[0213] 方案3

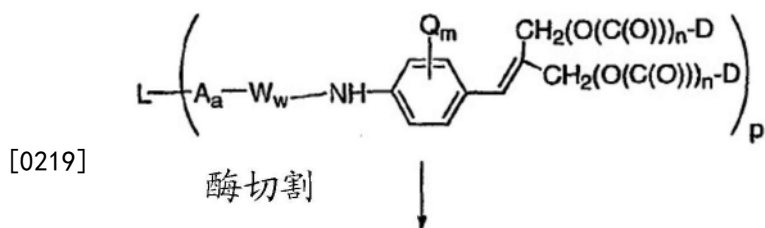


[0215] 其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4的整数;和p为1至约20。

[0216] 自消耗型间隔子的其它实例包括但不限于电子上类似于PAB基团的芳族化合物,例如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999)Bioorg Med Chem Lett.9:2237)和邻或对氨基苯甲酰基乙缩醛。可以使用在酰胺键水解时进行环化的间隔子,例如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等人,Chemistry Biology,1995,2,223),适当取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系(Storm等人,J.Amer.Chem.Soc.,1972,94,5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等人,J.Org.Chem.,1990,55,5867)。消除在甘氨酸的α-位被取代的含胺药物(Kingsbury等人,J.Med.Chem.,1984,27,1447)也是可用于示例性化合物的自消耗型间隔子的实例。

[0217] 在一个实施方案中,间隔子单元是如方案4中所示的支链双(羟甲基)苯乙烯(BHMS)单元,其可以用于掺入和释放多种药物。

[0218] 方案4

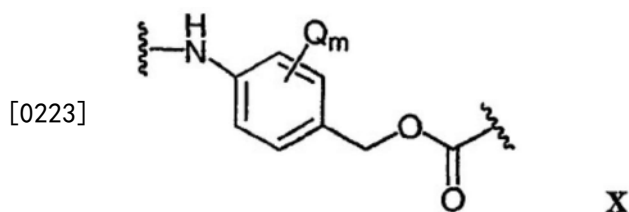


2 药物

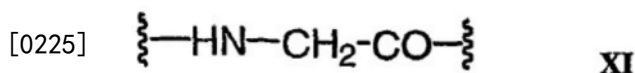
[0220] 其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4的整数;n是0或1;p的范围为1至约20。

[0221] 在一个实施方案中,-D部分是相同的。在另一个实施方案中,-D部分是不同的。

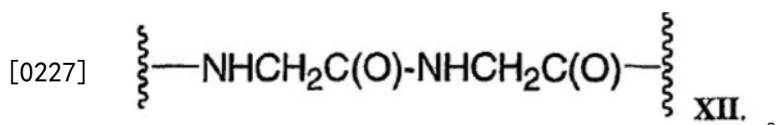
[0222] 在一个方面,间隔子单元由式(X)-(XII)表示:



[0224] 其中Q是-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;和m是0-4的整数;



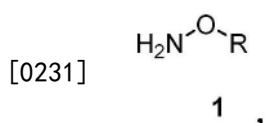
[0226] 以及



[0228] 第一间隔子单元(-X-)可选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基,或基于聚乙二醇的连接子如PEG_i,其中i为2至12的整数,优选选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12,优选2;x独立地为0至12的整数。

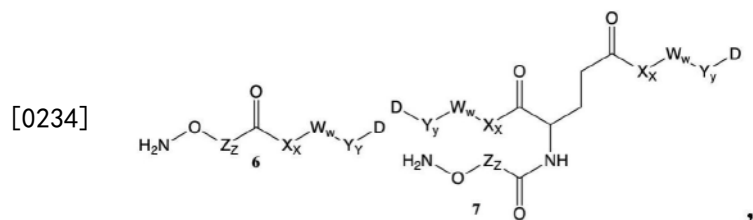
[0229] 第二间隔子单元(-Y-)可选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基,或基于聚乙二醇的连接基如PEG_i,其中i为2至12的整数,优选选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12,优选2;x独立地为0至12的整数。

[0230] 所述连接子在偶联至非天然氨基酸之前可具有或包含如1中所述的结构:



[0232] 其中R是一个或多个药物部分,其任选地通过一个或多个切割位点偶联到羟胺1,优选其中羟胺1与非天然氨基酸偶联。

[0233] 所述连接子在与非天然氨基酸偶联之前可包含如6或7中所述的结构或由其组成:



[0235] 其中Z选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基; z独立地为0至12范围内的整数;

[0236] 其中X是如本文定义的第二间隔子单元,优选选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基,或基于聚乙二醇的连接基如PEG_i,其中i是2至12的整数,优选选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12,优选2; x独立地为0至12范围内的整数;

[0237] 其中Y是如本文所定义的第一间隔子单元; y独立地为0至12范围内的整数;

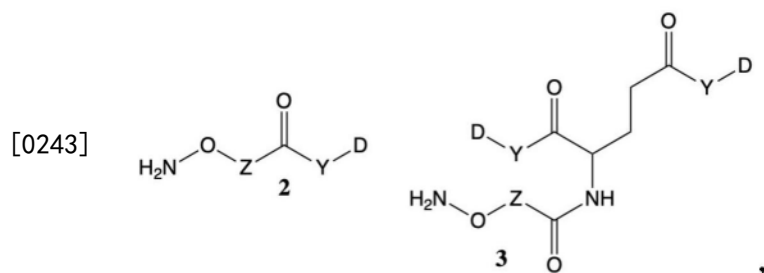
[0238] 其中W是如本文定义的任选的氨基酸单元; w独立地为0至12范围内的整数;

[0239] 以及

[0240] 其中D是药物部分,

[0241] 优选地,其中结构6或7的羟胺与本发明ADC中包含的维布妥昔的非天然氨基酸偶联,从而在偶联后形成肟。

[0242] 所述连接子在与非天然氨基酸之前可具有或包含如2或3中所示的结构:



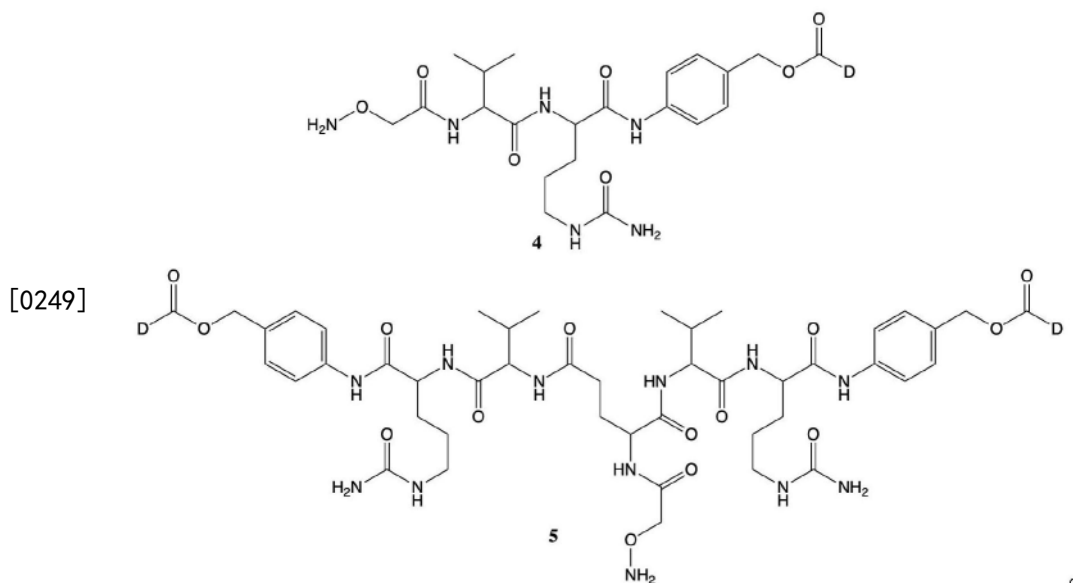
[0244] 其中Z选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基;

[0245] 其中D是一个或多个药物部分; 以及

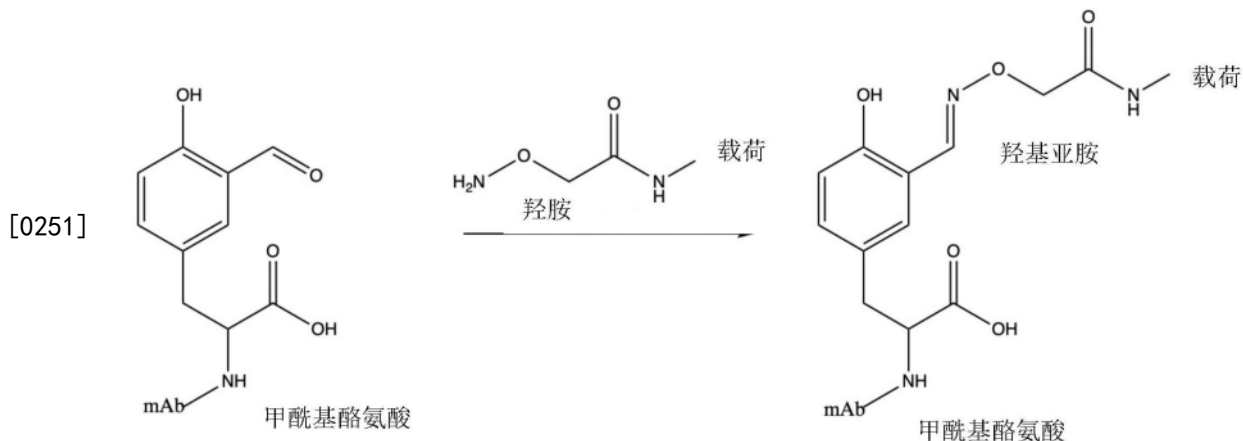
[0246] 其中Y是切割位点,例如组织蛋白酶如组织蛋白酶B的切割位点;

[0247] 优选其中结构2或3的羟胺与非天然氨基酸缀合。

[0248] 在与非天然氨基酸偶联之前,连接子可具有结构4或5中所述的结构,其中D为本文所述的药物部分,优选MMAE:



[0250] 本文所用“在与非天然氨基酸偶联之前”描述一种化学实体,例如在与其对应物(非天然氨基酸)形成共价键之前的连接子。然而,对于本文的连接子或药物部分也是如此,其未被描绘为彼此共价偶联。本领域技术人员可以容易地认识到作为两种化学实体反应的结果形成的所得结构。在如本文所定义的结构1到5的情况下,对应物是非天然氨基酸,其包含甲酰基。非天然氨基酸可为3-甲酰基酪氨酸,且具有结构1到5中任一结构的连接子的羟胺基团可与所述非天然氨基酸的3-甲酰基形成肟/羟基亚胺。反应机理如下:

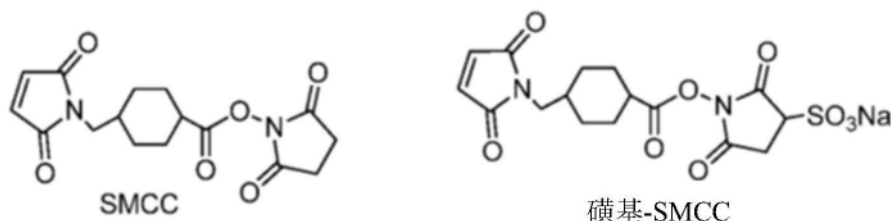


[0252] 在本文中,mAb对应于维布妥昔,有效载荷是指本文定义的药物部分,其通过本文定义的连接子与非天然氨基酸(此处为3-甲酰基酪氨酸)偶联。

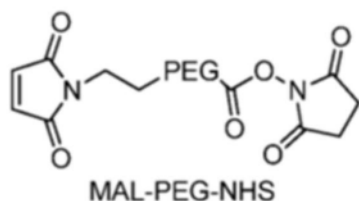
[0253] 在药物部分D和维布妥昔Ab之间形成不可切割的连接子的合适交联剂是本领域公知的,并且可以形成包含硫原子(例如SMCC)或没有硫原子的不可切割的连接子。在药物部分D和维布妥昔Ab之间形成不可切割的连接子的交联试剂包含马来酰亚胺基或卤代乙酰基部分。根据本公开,这种不可切割的连接子据说衍生自马来酰亚胺基或卤代乙酰基部分。

[0254] 包含马来酰亚胺基部分的交联试剂包括但不限于,N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺基酯(磺基-SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-(6-酰胺

基己酸酯), 其是SMCC的“长链”类似物(LC-SMCC), κ -马来酰亚胺基十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA), γ -马来酰亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS), ϵ -马来酰亚胺基己酸N-琥珀酰亚胺基酯(EMCS), 间-马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS), N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMSA), 琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酸)己酸酯(SMPH), N-琥珀酰亚胺基-4-(对-亚氨基苯基)-丁酸酯(SMPB), N-(对-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酯(PMIP), 和含有聚乙二醇间隔物的马来酰亚胺基交联剂, 如马来酰亚胺-PEG-NHS, 在本文中也称为MAL-PEG-NHS。这些交联试剂形成衍生自马来酰亚胺基部分的不可切割的连接子。基于马来酰亚胺基交联试剂的代表性结构如下所示。

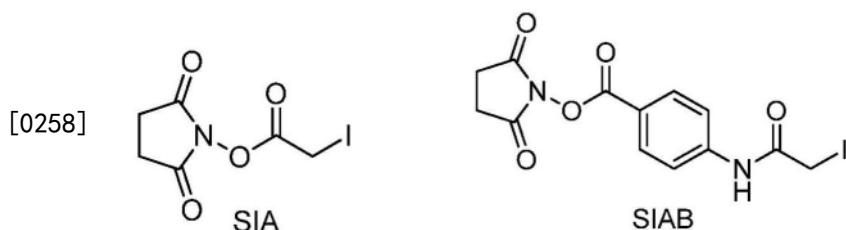


[0255]



[0256] 在一些实施方式中, 连接子L衍生自N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、碘基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯(碘基-SMCC)或MAL-PEG-NHS。

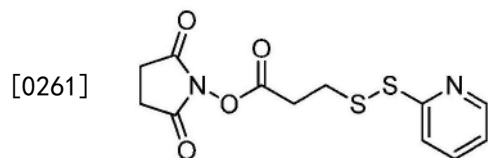
[0257] 包含基于卤乙酰基的部分的交联试剂包括N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP)。这些交联试剂形成衍生自基于卤代乙酰基的部分的不可切割的连接子。基于卤乙酰基的交联试剂的代表性结构如下所示。



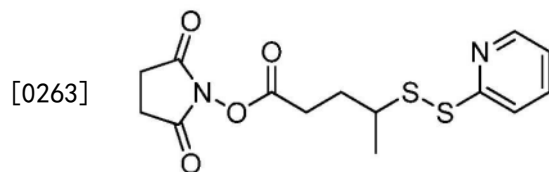
[0259] 在一些实施方式中, 连接子L衍生自N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)或N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。

[0260] 在药物部分D和维布妥昔Ab之间形成可切割连接子的合适交联试剂是本领域公知的。含有二硫化物的连接子是可通过二硫化物交换而切割的连接子, 其可在生理条件下发生。根据本公开, 这种可切割连接子据说衍生自基于二硫化物的部分。合适的二硫化物交联试剂包括N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)和N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶基二硫代)2-碘基丁酸酯(碘基-SPDB), 其结构如下所示。这些二硫化物交联试剂

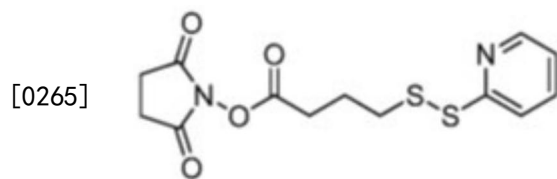
形成衍生自基于二硫化物的部分的可裂解连接子。



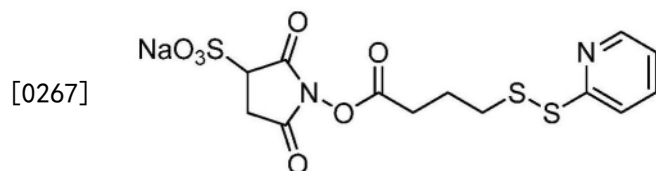
[0262] N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SP DP)



[0264] N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯 (SPP)



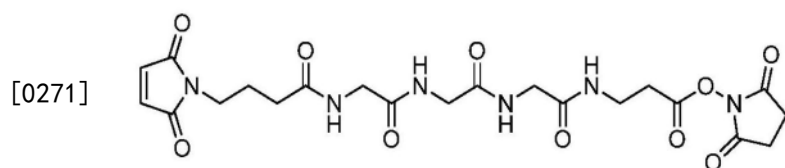
[0266] N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPD B)



[0268] N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶基二硫代)2-磺基丁酸酯 (磺基-SPDB)

[0269] 在一些实施方式中,连接子L衍生自N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB)。

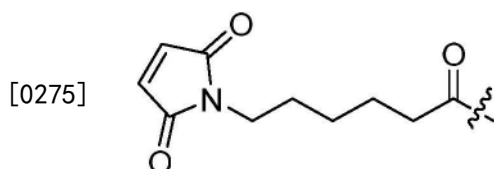
[0270] 在药物部分D和维布妥昔Ab之间形成带电荷的连接子的合适的交联剂被称为带电荷的交联剂。在一个实施方案中,连接基L衍生自CX1-1的预带电荷交联试剂,CX1-1的结构如下所示:



[0272] 2,5-二氧吡咯啶-1-基-17-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四氧-4,7,10,13-四氮杂十七-癸-1-酸酯 (CX1-1)

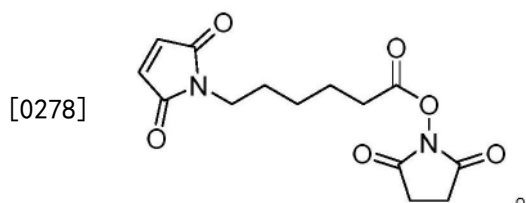
[0273] 可适用于本文公开的维布妥昔药物偶联物的其他连接子是马来酰亚氨基己酰基 (MC)、具有自切割肽的马来酰亚氨基己酰基 (MC)、具有自切割肽的马来酰亚氨基二氨基丙酰基 (mPDR) 和4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羰基 (MCC)。

[0274] 在一些实施方案中,连接子是马来酰亚胺基己酰基 (MC)。马来酰亚胺基己酰基具有以下结构:

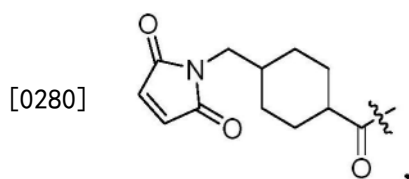


[0276] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分共价连接,特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D) 的共价连接,优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例,在包含MC连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接至马来酰亚胺部分,并且药物部分 (D) 可以共价连接至连接子的羰基碳原子,如以上结构式中的波浪线所示。

[0277] 马来酰亚氨基己酰基连接子可以例如衍生自交联试剂,其是具有以下结构的NHS酯:



[0279] 在一些实施方案中,连接子是4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羰基 (MCC)。MCC具有以下结构:



[0281] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D), 优选与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 的共价连接。作为非限制性实例,在包含MCC连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接到连接子的羰基碳原子上,如以上结构式中的波浪线所示,并且药物部分 (D) 可以共价连接到马来酰亚胺部分上。

[0282] 在一些实施方案中,连接子是具有自切割肽的马来酰亚胺己酰基 (MC)。具有自切割肽的马来酰亚氨基己酰基连接子的非限制性实例描述如下。

[0283] 在一些实施方案中,连接子是具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基 (mDPR)。具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基 (mDPR) 连接子的非限制性实例描述如下。

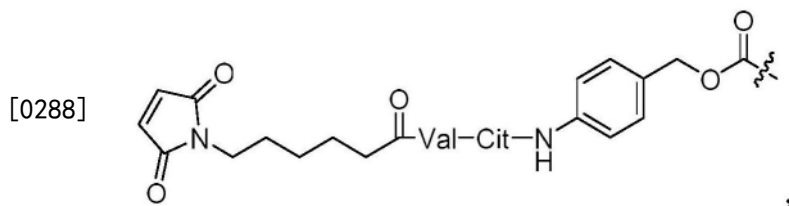
[0284] 在一些实施方式中,本文所述的维布妥昔药物偶联物 $Ab-(L-(D)_x)_y$ 中的任一种的连接子(L)衍生自交联试剂,所述交联试剂选自N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯 (SPP)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯 (SPDB)、N-琥珀酰亚氨基-4-(2-吡啶基二硫代)2-碘基-丁酸酯 (碘基-SPDB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯 (SIA)、N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯 (SIAB)、马来酰亚胺-PEG-NHS、马来酰亚胺基己酰基 (MC)、具有自切割肽的马来酰亚胺基己酰基 (MC)、具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基 (mDPR)、4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己

烷-1-羰基(MCC)、N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、N-磺基琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)、及2,5-二氧吡咯啶-1-基-17-(2,5-二氧-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四氧-4,7,10,13-四氮杂十七-癸-1-酸酯(CX1-1)。在优选的实施方案中,连接子衍生自交联试剂,该交联试剂选自N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、马来酰亚胺基己酰基(MC)、具有自切割肽的马来酰亚胺基己酰基(MC)、具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基(mDPR)、4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羰基(MCC)、N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)。因此,在一些实施方案中,连接子衍生自N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)。

[0285] 在一些实施方案中,连接子衍生自马来酰亚胺己酰基(MC)。在一些实施方案中,连接子衍生自具有自切割肽的马来酰亚胺己酰基(MC)。在一些实施方案中,连接子衍生自具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基(mDPR)。在一些实施方案中,连接子衍生自4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羰基(MCC)。在一些实施方案中,连接子衍生自N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)。

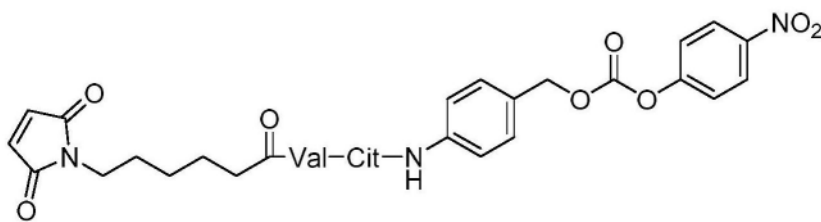
[0286] 如上文所述,连接子可以是具有自切割肽的马来酰亚胺己酰基(MC)。在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子选自马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-VC-PAB)、马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-丙氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-VA-PAB)、马来酰亚胺己酰基-赖氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-KF-PAB)、马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-赖氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-VK-PAB)。具有自切割肽的马来酰亚胺基己酰基(MC)连接子公开于例如美国专利申请公开US2006/0074008、G.M.Dubowchik等人,Bioconjugate Chem.2002,13,855-869、或S.O.Doronina等人,Nature Biotechnology,vol.21,778-784(2003)中,这些文献的内容在此通过引用而并入。

[0287] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚胺己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-VC-PAB)。MC-VC-PAB连接子具有以下结构:



[0289] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接。作为非限制性实例,在包含MC-VC-PAB连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段(Ab)可以共价连接到马来酰亚胺部分,并且药物部分(D)可以共价连接到连接子的羰基碳原子,如以上结构式中的波浪线所示。该连接子和随后的含有对氨基苄氧羰基的具有自切割肽的马来酰亚胺己酰基连接子可以例如衍生自交联试剂,其中在波浪线所示位置连接对硝基苯氧基(参见例如,G.M.Dubowchik等人,Bioconjugate Chem.2002,13,855-869,或S.O.Doronina et al.,Nature Biotechnology,vol.21,778-784(2003))。在MC-VC-PAB连接子的情况下,交联试剂可因此具有以下结构:

[0290]

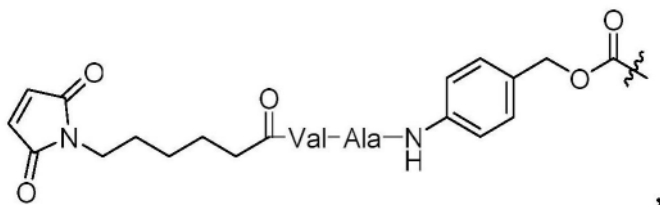


[0291] 当例如这种交联试剂与药物部分反应时,对硝基苯氧基可以被药物部分代替。

[0292] 不希望受任何理论的束缚,在MC-VC-PAB连接子和在具有自切割肽的马来酰亚氨基己酰基连接子中,其中所述自切割肽含有下文描述的对氨基苄氧羰基基团,蛋白酶的切割可以发生在肽部分和对氨基苄氧羰基部分之间(参见,例如,G.M.Dubowchik等人,Bioconjugate Chem.2002,13,855-869,或S.O.Doronina等人,Nature Biotechnology, vol.21,778-784(2003))。对氨基苄氧羰基部分然后可作为自消耗型基团。在这方面,术语“自消耗型基团”是指能够将两个间隔开的化学部分共价地连接在一起成为正常稳定的三部分分子的双功能化学部分。如果其与第一化学部分的键被裂解,则其将自发地与第二化学部分分离。

[0293] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-丙氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-VA-PAB)。MC-VA-PAB连接子具有以下结构:

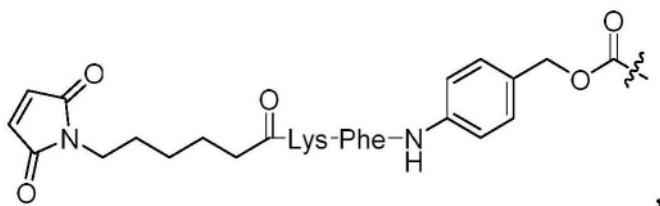
[0294]



[0295] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接。作为非限制性实例,在包含MC-VA-PAB连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段(Ab)可以共价连接至马来酰亚胺部分,并且药物部分(D)可以共价连接至连接子的羰基碳原子,如以上结构式中的波浪线所示。

[0296] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚氨基己酰基-赖氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基(MC-KF-PAB)。MC-KF-PAB连接子具有以下结构:

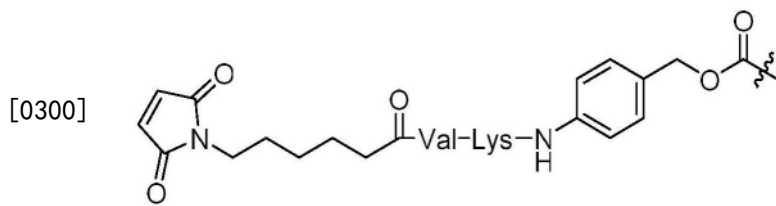
[0297]



[0298] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接。作为非限制性实例,在包含MC-KF-PAB连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段(Ab)可共价连接于马来酰亚胺部分,且药物部分(D)可共价连接于连接子的羰基碳原子,如以上结构式中的波浪线所示。

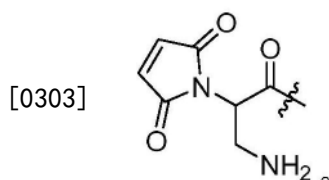
[0299] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚氨基己酰基-缬氨酸-赖氨酸-

酸-对氨基苄氧羰基 (MC-VK-PAB)。MC-VK-PAB连接子具有以下结构：



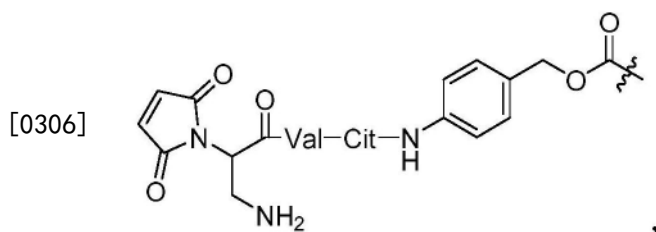
[0301] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D), 优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例,在包含MC-VK-PAB连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接到马来酰亚胺部分,并且药物部分 (D) 可以共价连接到连接子的羰基碳原子上,如以上结构式中的波浪线所示。

[0302] 如上文所述,连接子可以是具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基 (mDPR)。这种连接子包含具有以下结构的马来酰亚胺基二氨基丙酰基部分 (mPDR) :



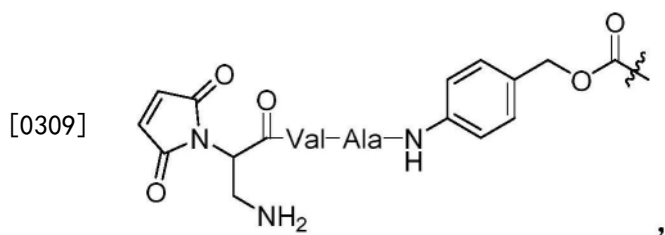
[0304] 在一些实施方案中,具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基 (mDPR) 连接子选自马来酰亚胺基二氨基丙酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (mDPR-VC-PAB)、马来酰亚胺基二氨基丙酰基-缬氨酸-丙氨酸-对氨基苄氧羰基 (mDPR-VA-PAB)、马来酰亚胺基二氨基丙酰基-赖氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基 (mDPR-KF-PAB)、马来酰亚胺基二氨基丙酰基-缬氨酸-赖氨酸-对氨基苄氧羰基 (mDPR-VK-PAB)。具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基 (mPDR) 连接子公开于例如美国专利申请公开US2013/0309256中,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0305] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚胺基二氨基丙酰基-缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧羰基 (mPDR-VC-PAB)。所述的mPDR-VC-PAB连接子具有以下结构：



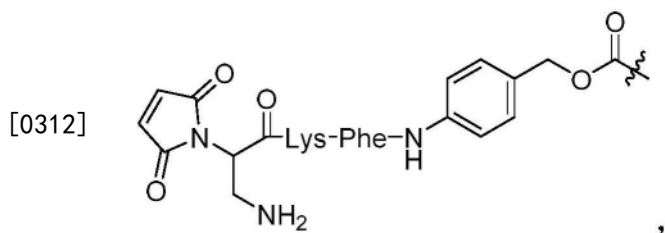
[0307] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D), 优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例,在包含mPDR-VC-PAB连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接到马来酰亚胺部分上,并且药物部分 (D) 可以共价连接到连接子的羰基碳原子上,如以上结构式中的波浪线所示。不希望受任何理论的束缚,在mPDR-VC-PAB连接子和在随后的具有自切割肽的马来酰亚胺基二氨基丙酰基连接子中,所述自切割肽含有对氨基苄氧羰基,在肽部分和对氨基苄氧羰基部分之间可发生蛋白酶的切割。对氨基苄氧羰基部分然后可作为自消耗型基团。

[0308] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚胺基二氨基丙酰基-缬氨酸-丙氨酸-对氨基苄氧羰基 (mPDR-VA-PAB)。所述mPDR-VA-PAB连接子具有以下结构:



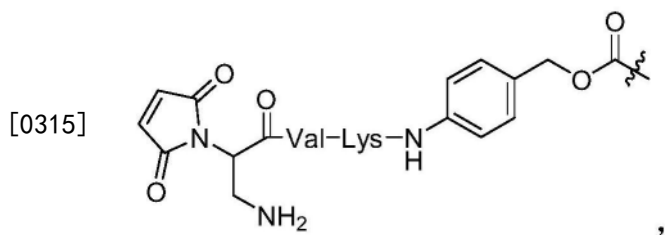
[0310] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接。作为非限制性实例,在包含mPDR-VA-PAB连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段(Ab)可以共价连接到马来酰亚胺部分上,并且药物部分(D)可以共价连接到连接子的羰基碳原子上,如以上结构式中的波浪线所示。

[0311] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚氨基二氨基丙酰基-赖氨酸-苯丙氨酸-对氨基苄氧羰基(mDPR-KF-PAB)。所述mDPR-KF-PAB连接子具有以下结构:



[0313] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接。作为非限制性实例,在包含mDPR-KF-PAB连接子的维布妥昔药物缀合物中,维布妥昔或其抗原结合片段(Ab)可共价连接于马来酰亚胺部分,且药物部分(D)可共价连接于连接子的羰基碳原子,如以上结构式中的波浪线所示。

[0314] 在一些实施方案中,具有自切割肽的连接子是马来酰亚氨基二氨基丙酰基-缬氨酸-赖氨酸-对氨基苄氧羰基 (mDPR-VK-PAB)。所述mDPR-VK-PAB连接子具有以下结构:



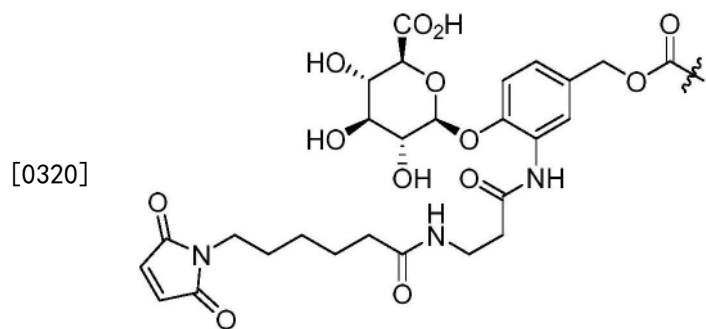
[0316] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接。作为非限制性实例,在包含mPDR-VK-PAB连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段(Ab)可共价连接于马来酰亚胺部分,且药物部分(D)可共价连接于连接子的羰基碳原子,如以上结构式中的波浪线所示。

[0317] 在一些实施方案中,本文所公开的维布妥昔药物偶联物的连接子包含葡萄糖醛酸修饰。对于具有葡萄糖醛酸修饰的连接子,参见例如S.C.Jeffrey等人,Bioconjugate

Chem. 2006, 17, 831-840、R.P.Lyon等人, Nature Biotechnology, vol. 33, 733-736 (2015)、美国专利申请公开US2013/0309256、及国际专利申请公开W0 2015/057699, 这些文献的全部公开内容通过引用并入本文。

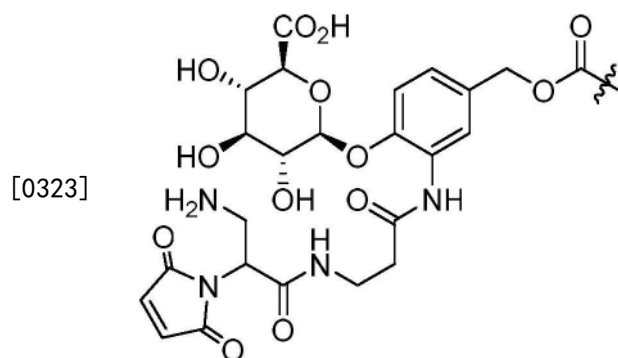
[0318] 在一些实施方案中, 包含葡萄糖醛酸修饰的连接子可以是马来酰亚胺基己酰基-葡萄糖苷酸 (MC-G) 或马来酰亚胺基二氨基丙酰基-葡萄糖苷酸 (mPDR-G)。

[0319] 所述马来酰亚胺基己酰基-葡萄糖苷酸 (MC-G) 连接子具有以下结构:



[0321] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分, 特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D), 优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例, 在包含MC-G连接子的维布妥昔药物偶联物中, 维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接到马来酰亚胺部分, 并且药物部分 (D) 可以共价连接到连接子的羰基碳原子上, 如以上结构式中的波浪线所示。

[0322] 所述马来酰亚胺基二氨基丙酰基-葡萄糖苷酸 (mPDR-G) 连接子具有以下结构:

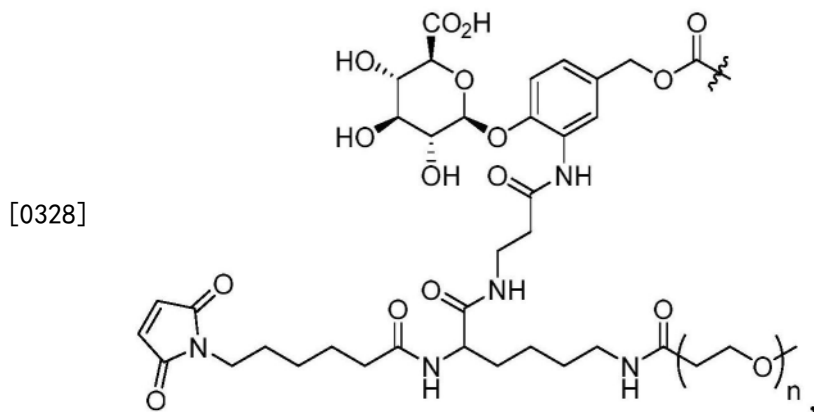


[0324] 其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分, 特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D), 优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例, 在包含mPDR-G连接子的维布妥昔药物偶联物中, 维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接至马来酰亚胺部分, 并且药物部分 (D) 可以共价连接至连接子的羰基碳原子上, 如以上结构式中的波浪线所示。

[0325] 在一些实施方案中, 所述包含葡萄糖醛酸修饰的连接子进一步包含聚乙二醇修饰。对于具有葡萄糖醛酸修饰和聚乙二醇修饰的连接子, 参见例如, P.Lyon等人, Nature Biotechnology, vol. 33, 733-736 (2015) 及国际专利申请公开案W0 2015/057699中描述的, 这些文献的全部公开内容通过引用并入本文。

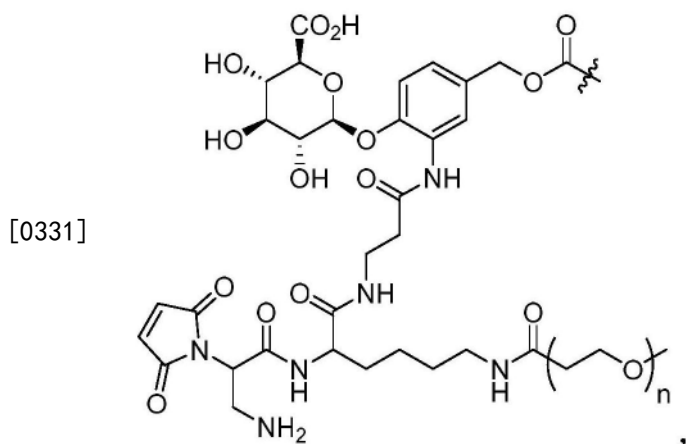
[0326] 在一些实施方案中, 包含葡萄糖醛酸修饰并且还包含聚乙二醇修饰的连接子可以是马来酰亚胺基己酰基-葡萄糖苷酸-聚乙二醇 (MC-G-PEG)、马来酰亚胺基二氨基丙酰基-葡萄糖苷酸-聚乙二醇 (mPDR-G-PEG) 或马来酰亚胺基丙酰基-葡萄糖苷酸-聚乙二醇 (MP-G-PEG)。

[0327] 所述马来酰亚胺基己酰基-葡萄糖苷酸-聚乙二醇 (MC-G-PEG) 连接子具有以下结构:



[0329] 其中n是6至72、8至72、12至72、10至72、12至36或38、6至24或8至24的整数;并且其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D), 优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例,在包含MC-G-PEG连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接到马来酰亚胺部分,药物部分 (D) 可以共价连接到连接子的羰基碳原子上,如以上结构式中的波浪线所示。

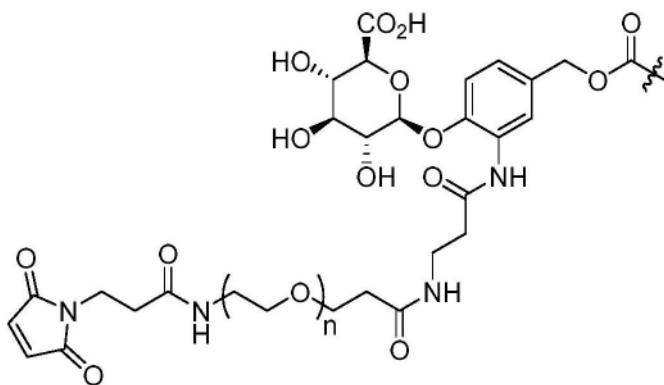
[0330] 所述马来酰亚胺基二氨基丙酰基-葡萄糖苷酸-聚乙二醇 (mPDR-G-PEG) 连接子具有以下结构:



[0332] 其中n是6至72、8至72、10至72、12至36或38、6至24或8至24的整数;并且其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D), 优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例,在包含mPDR-G-PEG连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接到马来酰亚胺部分,并且药物部分 (D) 可以共价连接到连接子的羰基碳原子上,如以上结构式中的波浪线所示。

[0333] 所述马来酰亚胺基丙酰基-葡萄糖苷酸-聚乙二醇 (MP-G-PEG) 连接子具有以下结构:

[0334]



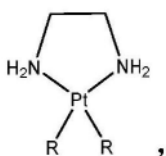
[0335] 其中n是6至72、8至72、10至72、12至36或38、6至24或8至24范围内的整数；并且其中波浪线表示连接子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分，特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或与药物部分 (D)，优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例，在包含MP-G-PEG连接子的维布妥昔药物偶联物中，维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可以共价连接到马来酰亚胺部分，药物部分 (D) 可以共价连接到连接子的羰基碳原子上，如以上结构式中的波浪线所示。

[0336] 不希望受任何理论的束缚，药物从包含所述MC-G、mPDR-G、MC-G-PEG、mPDR-G-PEG或MP-G-PEG连接子的维布妥昔药物偶联物的释放可以通过葡萄糖醛酸部分被葡萄糖醛酸酶裂解来引发 (参见，例如，S.C.Jeffrey等人，Bioconjugate Chem.2006,17,831-840)。

[0337] 在一些实施方案中，连接子是铂络合物连接子。对于铂络合物类的连接子，参见例如N.J.Sijbrandi等人，Cancer Res.2016,77 (2) ,257-267、D.Walboer等人，ChemMedChem 2015,10,797-803、或美国专利申请案US2014/377174，这些文献的全部内容在此通过引用而并入。

[0338] 在一些实施方案中，所述铂络合物连接子是具有以下结构的乙二胺铂 (II) 连接子：

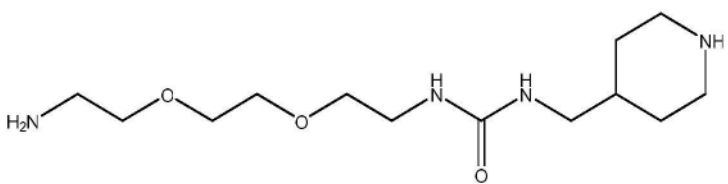
[0339]



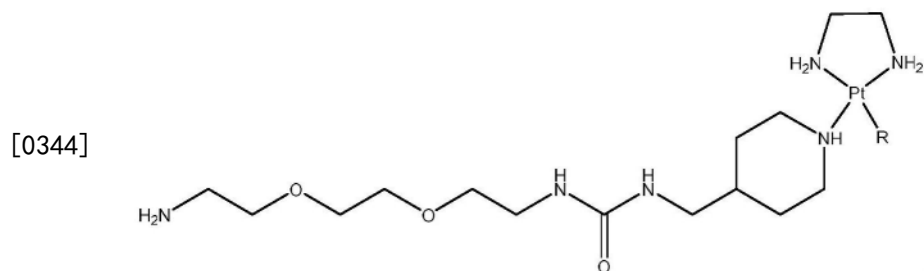
[0340] 其中R独立地代表卤素原子，例如Cl、Br、F或I，优选为Cl。作为非限制性实例，在包含铂络合物连接子的维布妥昔药物偶联物中，一个维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 和一个药物部分 (D) 可以与铂络合物结合。

[0341] 在一些实施方案中，所述铂复合物连接子，特别是乙二胺铂 (II) 连接子，和维布妥昔药物偶联物的另一部分，特别是维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或药物部分 (D)，优选药物部分 (D)，可以被间隔子隔开。合适的间隔子在长度、组成或可切割性上可具有不同的特性。在一些实施方案中，所述间隔子是具有下式的1-(2-(2-(2-氨基乙氧基)乙基)-3-(哌啶-4-基甲基)脲：

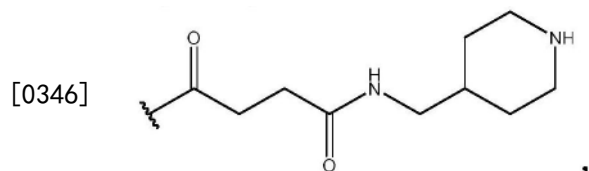
[0342]



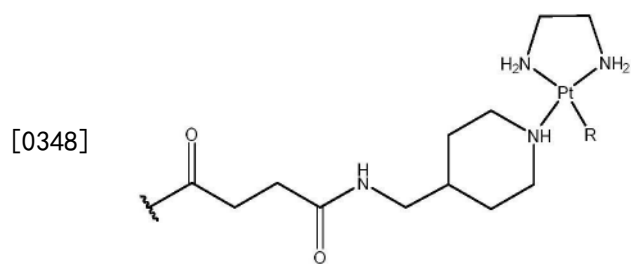
[0343] 其中间隔子的 NH_2 基团结合到维布妥昔药物偶联物的另一部分上,特别是维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或药物部分(D),优选结合到药物部分(D),并且哌啶基的氮原子结合到所述铂络合物连接子上。以下结构示出了使用这种间隔子的优选实施例:



[0345] 其中 NH_2 基团结合维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是结合维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或结合药物部分(D),优选结合药物部分(D),且R表示与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或结合药物部分(D),优选与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)的连接。优选地, NH_2 基团共价连接到药物部分(D),所述铂络合物连接子结合到维布妥昔或抗原结合片段(Ab),如R所示。在一些实施方案中,间隔子是具有以下结构的4-氧代-4-((哌啶-4-基甲基)氨基)丁酰基:



[0347] 其中波浪线表示间隔子的羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接,并且其中哌啶基的氮原子与所述铂络合物连接子结合。以下结构示出了使用这种间隔子的优选实施例:

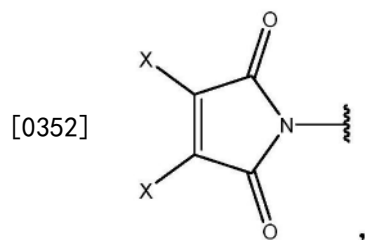


[0349] 其中波浪线表示羰基碳原子与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或与药物部分(D),优选与药物部分(D)的共价连接,R表示与维布妥昔药物偶联物的另一部分,特别是与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)或药物部分(D),优选与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)的连接。优选地,羰基碳如波浪线所示与药物部分(D)共价连接,铂复合物连接子如R所示与维布妥昔或抗原结合片段(Ab)结合。

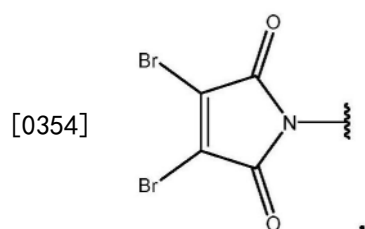
[0350] 在一些实施方案中,连接子是替代二硫化物键的连接子。本文通篇使用的术语“二硫化物键替代连接子”表示能够替代由维布妥昔单抗(Ab)的两个半胱氨酸产生的二硫化物键的连接子。因此,在这种二硫化物键替代连接子与药物部分(D)结合的情况下,药物部分(D)被引入到维布妥昔(Ab)的两个半胱氨酸之间的空间中。对于二硫化物键替代连接子,参见例如M.E.B.Smith等人,J.Am.Chem.Soc.2010,132,1960-1965和国际专利申请WO 2013/

173393, 这些文献的全部内容通过引用并入本文。

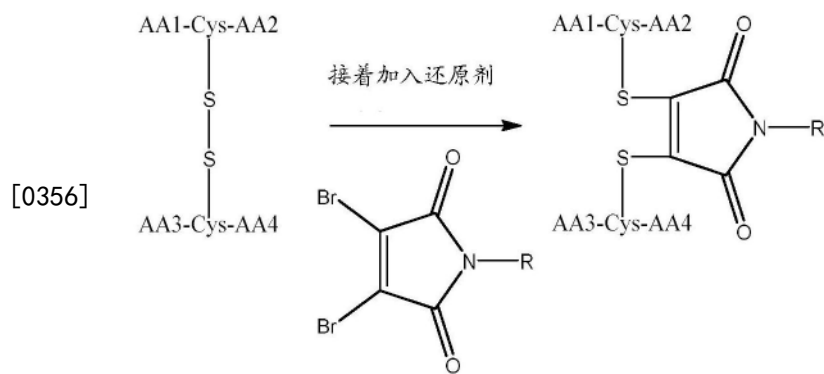
[0351] 在一些实施方案中, 所述二硫化物键替代连接子可以是具有以下结构的马来酰亚胺连接子:



[0353] 其中X代表卤原子, 例如Cl、Br、F或I, 优选Cl或Br, 更优选Br, 并且其中波浪线表示氮原子与药物部分(D)的共价连接。对于这种连接子, 参见M.E.B. Smith等人, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 1960-1965。优选的实施方案是具有以下结构的二溴马来酰亚胺:

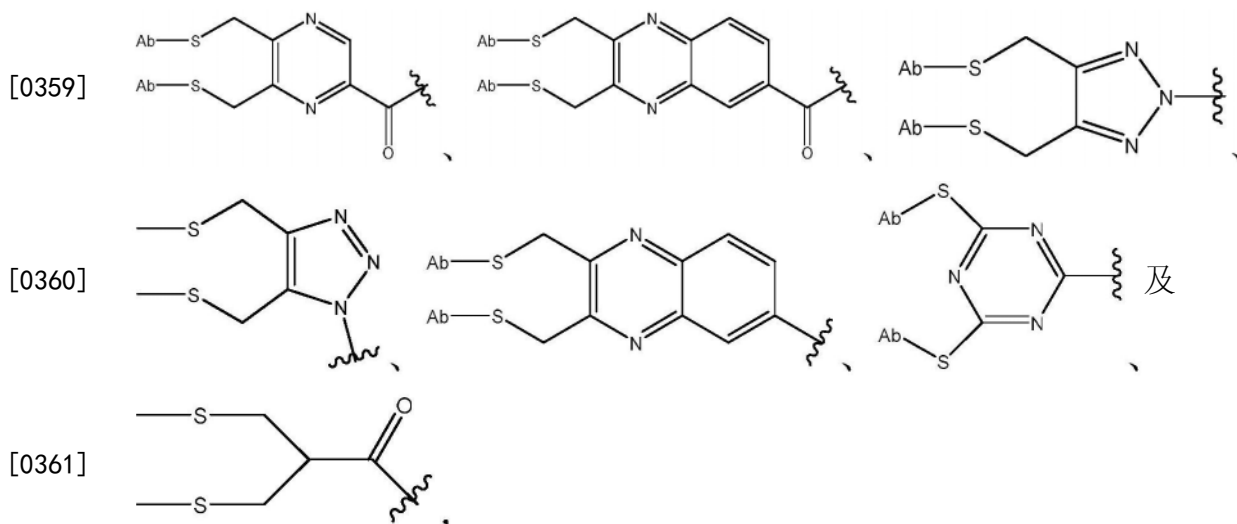


[0355] 其中波浪线表示药物部分(D)与马来酰亚胺部分的共价连接。一个或两个溴原子可以与巯基反应, 所述巯基通过从维布妥昔或抗原结合片段(Ab)的二硫桥还原而获得, 例如, 如下列反应方案所示:

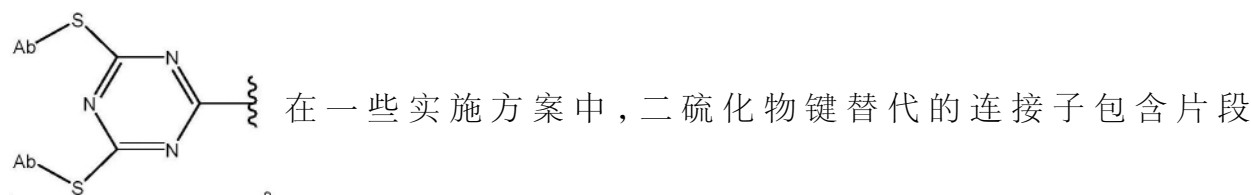
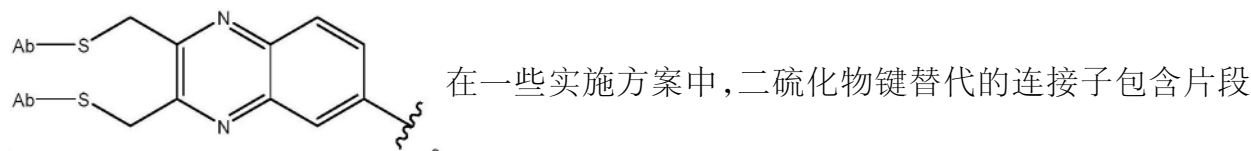
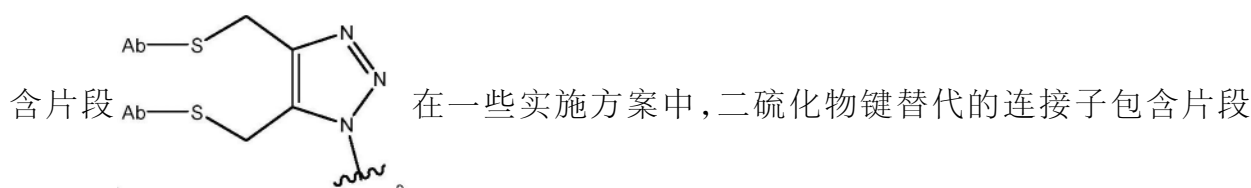
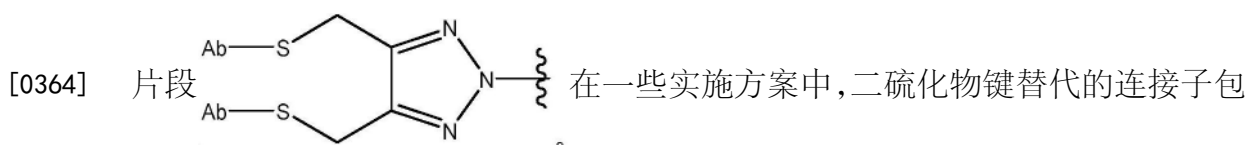
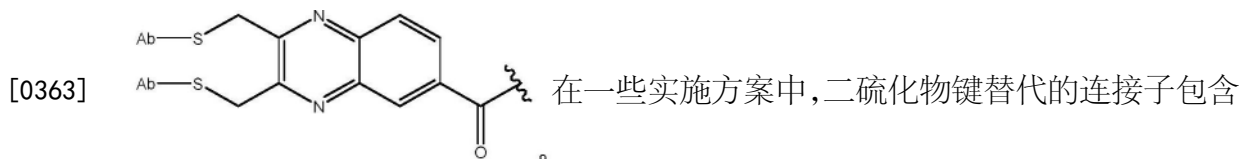
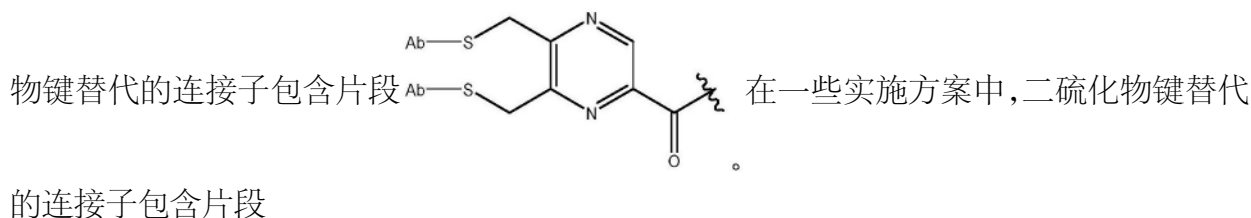


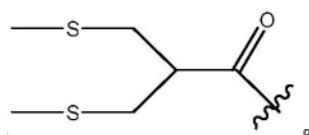
[0357] 其中AA1、AA2、AA3和AA4包含维布妥昔或抗原结合片段(Ab)的肽链。AA1、AA2、AA3和AA4可以是单个肽链的一部分, 或者可以不是单个肽链的一部分。在优选的实施方案中, 药物部分共价连接到马来酰亚胺部分上, 如R所示。在与二溴马来酰亚胺反应之前, 用还原剂还原维布妥昔或抗原结合片段(Ab)的二硫化物键, 以获得游离的巯基。合适的还原剂包括例如二硫苏糖醇(DTT)、连二亚硫酸钠、硫代硫酸钠、亚硫酸钠或三(2-羧乙基)膦(TCEP), 优选三(2-羧乙基)膦(TCEP)。在还原步骤之后, 将二溴马来酰亚胺加入维布妥昔(Ab)中, 并且所述二溴马来酰亚胺与游离巯基反应以在所述一或多个肽链的半胱氨酸的两个巯基之间形成桥键。

[0358] 在一些实施方案中, 二硫化物键替代连接子包含选自以下的片段:



[0362] 其中Ab表示与维布妥昔单抗或抗原结合片段的肽链的连接,波浪线表示与维布妥昔单抗药物偶联物的药物部分(D)的连接。对于这样的连接子,参见WO 2013/173393。因此,在一些实施方案中,二硫化物键替代的连接子包含片段。





关于波浪线所示的药物部分 (D) 的连接, 在这些实施方案中, 药物可

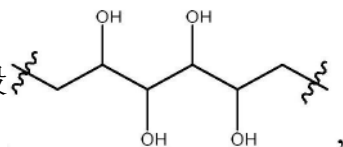
通过任选的间隔子与片段连接。这种间隔子可例如衍生自乙二醇寡聚物, 诸如例如



[0365] 在一些实施方案中, 连接子是糖连接子。如本公开通篇使用的术语“糖连接子”一般表示包含单糖或寡糖片段的连接子。例如描述在F.S.Ekholm等人, ChemMedChem 2016, 11, 2501-2505、美国专利申请US 2016/0820797、美国专利申请US2016/0257764、国际专利申请W0 2016/053107、美国专利申请US2016/0106860、及国际专利申请W0 2016/001485中, 这些文献的全部公开内容在此引入作为参考。

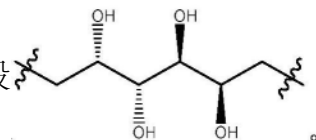
[0366] 因此, 本文所用的糖连接子可包含片段-G-, 其中G是单糖, 或包含2至20个, 优选2至12个, 更优选2至10个, 甚至更优选2至8个, 最优选2至6个糖部分的直链或支链寡糖。片段-G-中可能存在的糖部分是本领域技术人员已知的, 包括例如葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、岩藻糖 (Fuc)、N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc)、N-乙酰神经氨酸 (NeuNAc) 或唾液酸、木糖 (Xyl)。

[0367] 在一些实施方案中, 糖连接子可包含片段

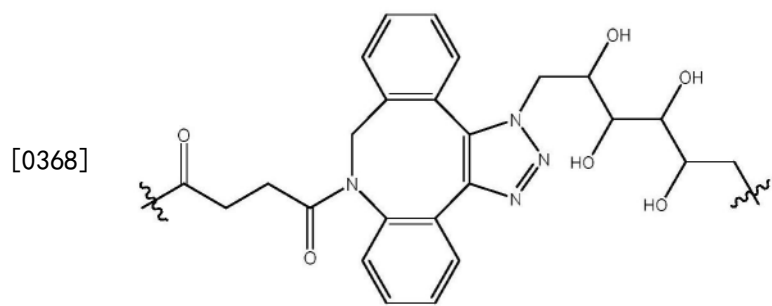


示与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 以及与维布妥昔药物偶联物的药物部分 (D) 的连接。例

如, 在一些实施方案中, 可使用来自半乳糖的糖连接子, 其包含片段

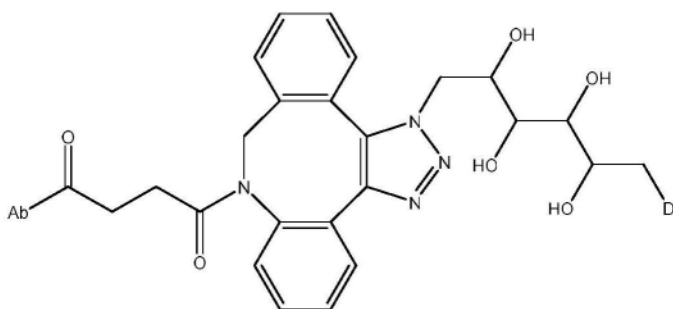


在一些实施方案中, 片段可通过任选的间隔子与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 及/或与药物部分 (D) 连接。例如, 包含单糖片段及间隔子的糖连接子可具有以下结构:



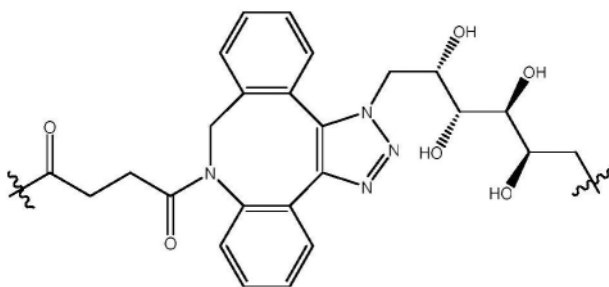
[0369] 其中波浪线表示维布妥昔单抗或抗原结合片段 (Ab) 与维布妥昔单抗药物偶联物的药物部分 (D) 的连接。例如, 维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 可以在羰基碳原子处与糖连接子连接, 并且药物部分 (D) 可以与单糖片段连接, 从而产生以下结构:

[0370]



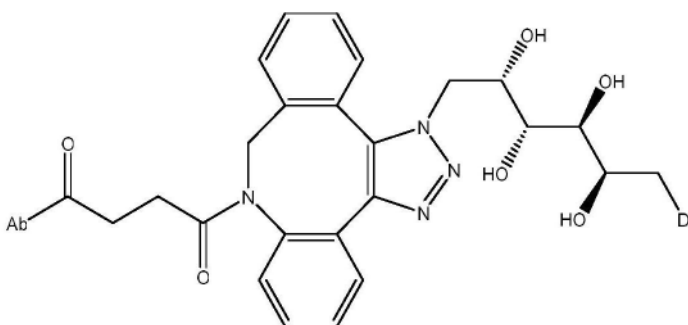
[0371] 其中Ab是维布妥昔或抗原结合片段,D是药物部分。在一些实施方案中,在单糖片段是半乳糖的情况下,糖连接子可具有以下结构:

[0372]

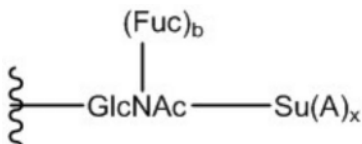


[0373] 其中波浪线表示维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 与维布妥昔药物偶联物的药物部分 (D) 的连接。例如,维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 可以在羰基碳原子处与糖连接子连接,并且药物部分 (D) 可以与单糖片段连接,从而产生以下结构:

[0374]

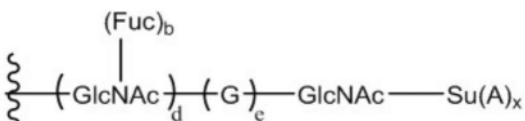


[0375] 其中Ab是维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 并且D是药物部分。这些实施方案的糖连接子描述在F.S.Ekholm等人,ChemMedChem 2016,11,2501-2505中。

[0376] 在一些实施方案中,糖连接子具有结构  其中波浪线表

示与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 的连接,其中Su(A)_x是包含x个官能团A的糖衍生物Su,其中A独立地选自:巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺化羧基乙酰氨基,其中x是1、2、3或4,并且其中b是0或1。糖衍生物Su(A)_x衍生自糖或糖衍生物Su,例如氨基糖或其它衍生的糖。糖和糖衍生物的实例包括半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、葡萄糖 (Glc)、N-乙酰神经氨酸 (NeuNAc) 或唾液酸和岩藻糖 (Fuc)。糖衍生物Su(A)_x优选衍生自半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、岩藻糖 (Fuc) 和N-乙酰神经氨酸 (唾液Sia或NeuNAc),优选选自GlcNAc、Glc、Gal和GalNAc。更优选地,Su(A)_x衍生自Gal或GalNAc,最优选地,Su(A)_x衍生自GalNAc。维布妥昔药物偶联物的药物部分 (D) 可通过与官

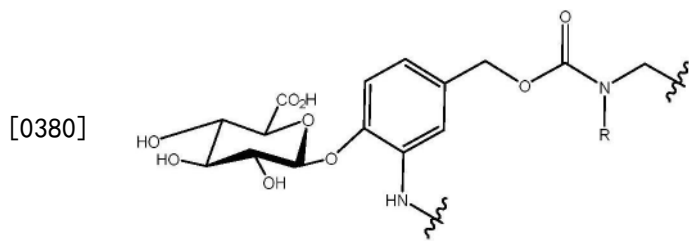
能团A反应的方式与糖连接子连接。这些实施方案的糖连接子描述于例如美国专利申请US2016/0280797中。

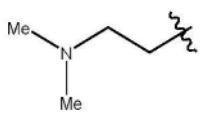
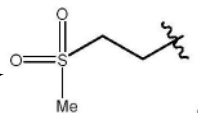
[0377] 在一些实施方案中,糖连接子具有结构  其

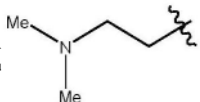
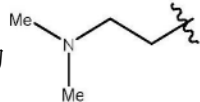
中波浪线表示与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 的连接,其中Su(A)_x是包含x个官能团A的糖衍生物Su,其中A独立地选自巯基或其前体、卤素、磺酰氧基、卤代乙酰氨基、巯基乙酰氨基和磺化羟基乙酰氨基,其中x是1、2、3或4,其中b是0或1,其中d是0或1,其中e是0或1,并且其中G是单糖,或包含2至20个糖部分的直链或支链寡糖。糖衍生物Su(A)_x衍生自糖或糖衍生物Su,例如氨基糖或其它衍生的糖。糖和糖衍生物的实例包括半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、葡萄糖 (Glc)、N-乙酰神经氨酸 (NeuNAc) 或唾液酸和岩藻糖 (Fuc)。糖衍生物Su(A)_x优选衍生自半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、岩藻糖 (Fuc) 和N-乙酰神经氨酸 (唾液酸Sia或NeuNAc),优选选自GlcNAc、Glc、Gal和GalNAc。更优选地,Su(A)_x衍生自Gal或GalNAc,最优选地,Su(A)_x衍生自GalNAc。G表示单糖,或包含2至20个,优选2至12个,更优选2至10个,甚至更优选2至8个,最优选2至6个糖部分的直链或支链寡糖。片段G中可能存在的糖部分是本领域技术人员已知的,包括例如葡萄糖 (Glc)、半乳糖 (Gal)、甘露糖 (Man)、岩藻糖 (Fuc)、N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺 (GalNAc)、N-乙酰神经氨酸 (NeuNAc) 或唾液酸、木糖 (Xyl)。维布妥昔药物偶联物的药物部分 (D) 可通过与官能团A反应的方式与糖连接子连接。这些实施方案的糖连接子描述于例如美国专利申请US2016/0280797中。

[0378] 在一些实施方案中,连接子是亚甲基烷氧基氨基甲酸酯连接子。对于亚甲基烷氧基氨基甲酸酯连接子,参见,例如R.V.Kolakowski等人,Angew.Chem.Int.Ed.2016,55,7948-7951或国际专利申请W0 2015/095755,这些文献的全部公开内容在此引入作为参考。

[0379] 在一些实施方案中,所述亚甲基烷氧基氨基甲酸酯连接子具有以下结构:

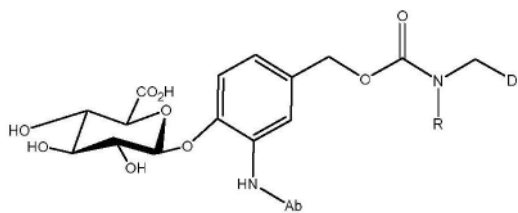


[0381] 其中波浪线表示与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 以及与维布妥昔药物偶联体的药物部分 (D) 的连接,且R基团选自C₁-C₄烷基、 及  优选地,R为

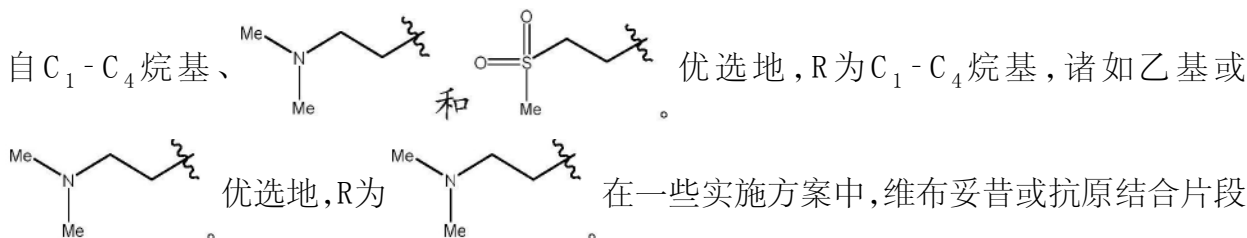
C₁-C₄烷基,诸如乙基或  优选地,R为  在一些实施方案中,维布

妥昔或抗原结合片段 (Ab) 及药物部分 (D) 与亚甲基烷氧基胺基甲酸酯连接子连接,如以下结构所示:

[0382]

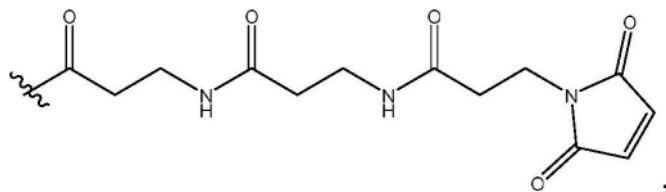


[0383] 其中Ab为维布妥昔或抗原结合片段,且D为药物部分。在这些实施方案中,R基团选自



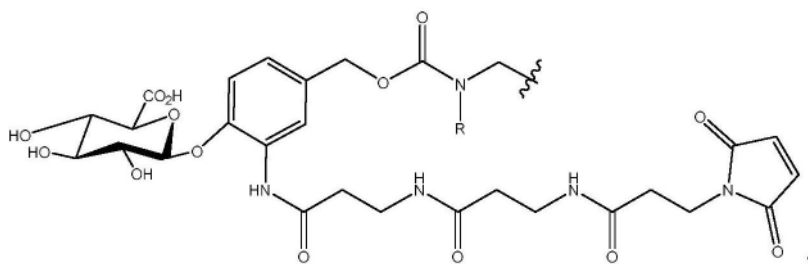
(Ab) 及/或药物部分 (D) 通过任选的间隔子与亚甲基烷氧基胺基甲酸酯连接子连接。这种间隔子可例如具有以下结构:

[0384]



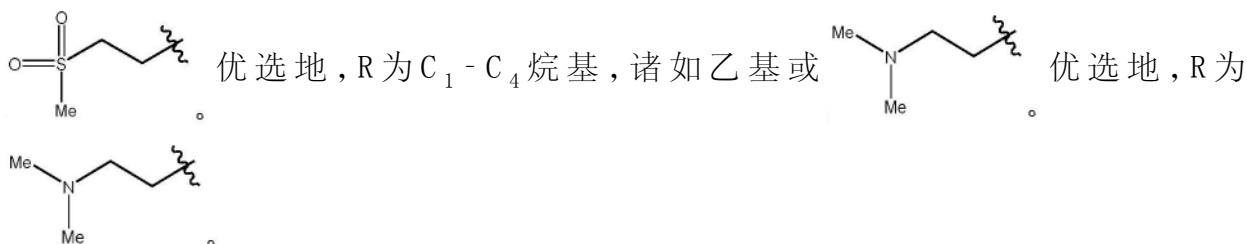
[0385] 其中波浪线表示与亚甲基烷氧基胺基甲酸酯连接子的连接。这导致以下结构:

[0386]



[0387] 其中波浪线表示连接子与维布妥昔药物偶联物的另一部分的共价连接,特别是与维布妥昔或抗原结合片段 (Ab) 或药物部分 (D) 的共价连接,优选与药物部分 (D) 的共价连接。作为非限制性实例,在包含这种亚甲基烷氧基胺基甲酸酯连接子的维布妥昔药物偶联物中,维布妥昔或其抗原结合片段 (Ab) 可与马来酰亚胺部分连接,且药物部分 (D) 可与由波

浪线指示的位置连接。在这些实施方案中,R基团选自 $C_1 - C_4$ 烷基、 及



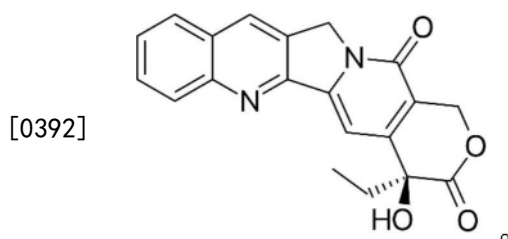
[0388] 在一些实施方案中,连接子 (L) 选自以下: - (丁二酰亚胺-3-基-N) - $CH_2CH_2 - C(=O) - GGFG - NH - CH_2CH_2CH_2 - C(=O) -$ 、- (丁二酰亚胺-3-基-N) - $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2 - C(=O) - GGFG - NH -$

CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、-(丁二酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-、-(丁二酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-、-(丁二酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、及-(丁二酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-, 优选选自-(丁二酰亚胺-3-基-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-。

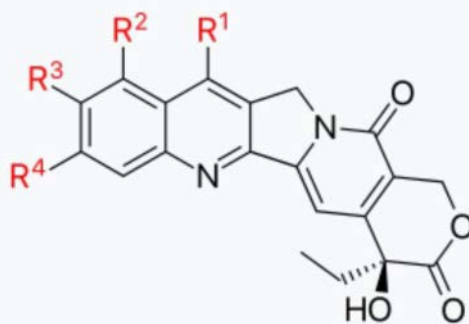
[0389] “D”: 药物部分

[0390] 本文提供包含药物部分的抗体药物偶联物。术语“药物部分”或“有效载荷”, 两者可互换使用, 如本文所用, 是指偶联至抗体或抗原结合片段的化学或生化部分。在这点上, 再次提及本文所述的“ADC结构式”: Ab-(L-(D)_x)_y。可以使用本文所述的或本领域已知的任何方法将维布妥昔偶联到几种相同或不同的药物部分。在一些优选的实施方案中, 药物部分是抗癌剂。因此, 药物可以选自喜树碱类、拓扑异构酶抑制剂、美登木素生物碱(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamycin)、倍癌霉素(duocarmycin)、微管溶素(tubulysin)、鹅膏毒素(amatoxin)、尾海兔素(dolastatin)和澳瑞他汀(auristatin), 例如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、吡咯并苯并二氮杂卓二聚体、吲哚并苯并二氮杂卓二聚体、放射性同位素、治疗性蛋白质和肽(或其片段)、核酸、PROTAC、激酶抑制剂、MEK抑制剂、KSP抑制剂及其类似物或前药。在优选的实施方案中, 药物部分是MMAE。

[0391] 本文所用的“喜树碱”(CPT) 涉及拓扑异构酶毒物。1966年由M.E.Wall及M.C.Wani在系统筛选抗癌药物的天然产物时所发现。其是从喜树(Camptotheca acuminata, Happy tree)的树皮和茎中分离的, 喜树是中国本土的树, 在传统的中药中用作癌症治疗。术语喜树碱也可以包括CPT类似物。目前, 四种CPT类似物已经被批准并用于癌症化疗, 拓扑替康(topotecan)、伊立替康(irinotecan)、贝洛替康(belotecan)和曲妥珠单抗德鲁替康(trastuzumab deruxtecan)。喜树碱具有以下结构:



[0393] 术语CPT也包括下列CPT类似物:



[0394]

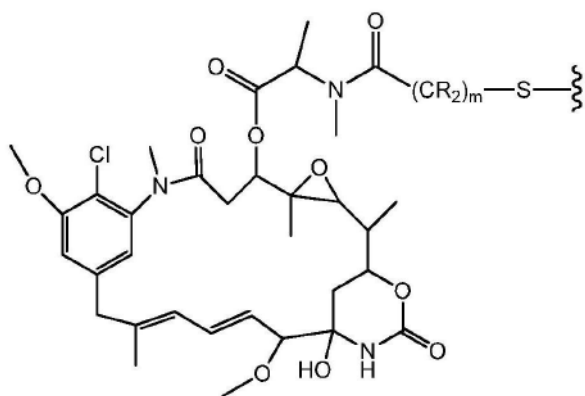
类似物	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
拓扑替康	—H		—OH	—H
伊立替康(CPT-11)		—H		—H
西拉替康 (silatecan)(DB-67 、AR-67)		—H	—OH	—H
科西替康(cositecan)(BNP-1350)		—H	—H	—H
依沙替康(exatecan)		—H	—CH ₃	—F

[0395]

勒托替康(lurtotecan)		—H		
吉马替康(gimatecan)(ST1481)		—H	—H	—H
贝洛替康(CKD-602)		—H	—H	—H
卢比替康(rubitecan)	—H		—H	—H

[0396] 在一些实施方案中,药物部分是美登木素生物碱药物部分,包括具有以下结构的那些:

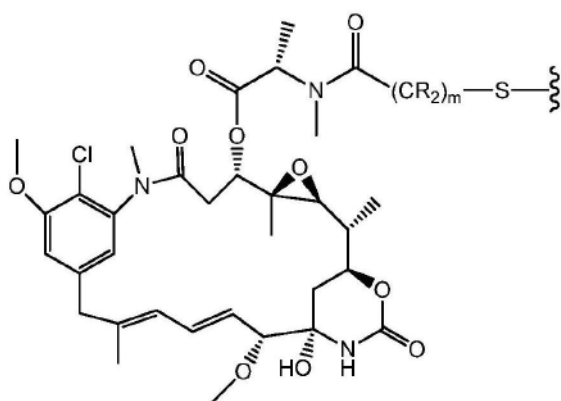
[0397]



[0398] 其中波浪线表示美登木素生物碱的硫原子与抗体药物偶联物的连接子的共价连接。R在每次出现时独立地为H或C₁-C₆烷基。将酰胺基连接到硫原子上的亚烷基链可以是甲基、乙基或丙基,即m是1、2或3。(美国专利号633,410、美国专利号5,208,020、Chari等人(1992)Cancer Res.52:127-131、Lui等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.93:8618-8623)。

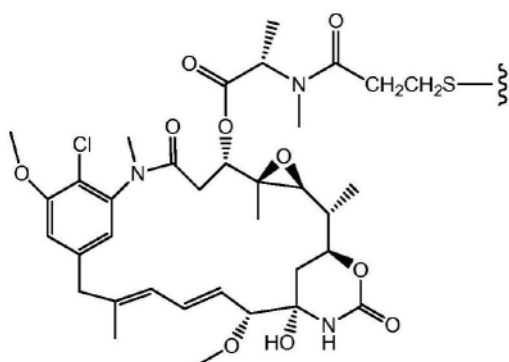
[0399] 本文公开的抗体药物偶联物考虑了美登木素生物碱药物部分的所有立体异构体,即美登木素生物碱的手性碳上的R和S构型的任何组合。在一些实施方案中,美登木素生物碱药物部分具有以下立体化学:

[0400]



[0401] 在一些实施方案中,美登木素生物碱药物部分是N²'-脱乙酰基-N²'-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(maytansine)(也称为DM1)。DM1由以下结构表示:

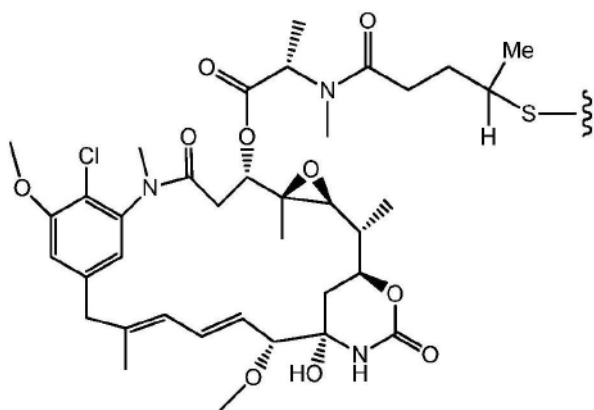
[0402]



DM1。

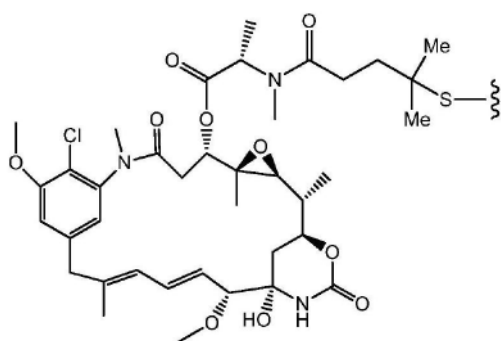
[0403] 在一些实施方案中,美登木素生物碱药物部分是N²'-脱乙酰基-N²'-(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(也称为DM3)。DM3由以下结构表示:

[0404]

**DM3**。

[0405] 在一些实施方案中,美登木素生物碱药物部分是 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(也称为DM4)。DM4由以下结构表示:

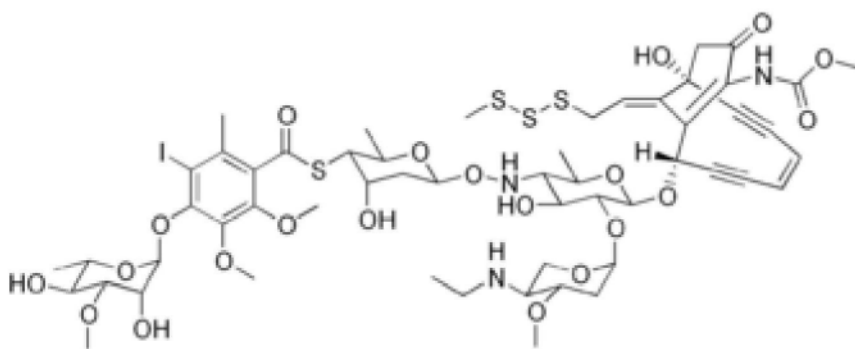
[0406]

**DM4**。

[0407] 优选地,在本文公开的包含美登木素生物碱药物部分的抗体药物偶联物中,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)或 $N^{2'}$ -脱乙酰基- $N^{2'}$ -(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

[0408] 药物部分可以是卡奇霉素。本文所用的“卡奇霉素”涉及一类衍生自棘孢小单孢菌(*Micromonospora echinospora*)的烯二炔抗肿瘤抗生素,卡奇霉素 γ 1是最引人注目的。其最初在1980年代中期从位于克萨斯州的克尔维尔的白垩土壤或“钙质层坑”中分离。其对所有细胞都具有极大毒性。因此,药物部分可以是由以下结构示例的卡奇霉素 γ 1:

[0409]

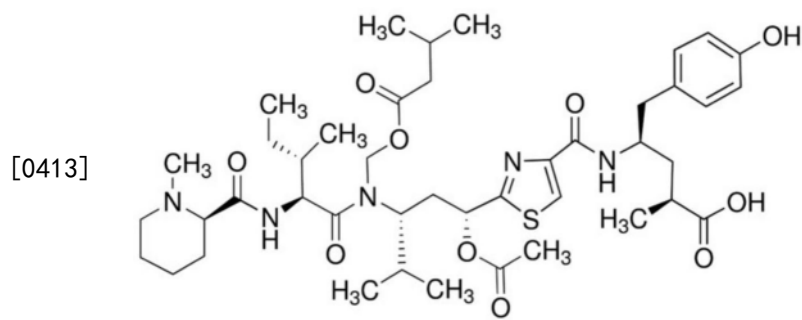


[0410] 药物部分可以是倍癌霉素。本文所用的“倍癌霉素”描述小分子、合成、与DNA小沟结合的烷基化剂。倍癌霉素可能适合靶向实体瘤。其结合DNA的小沟并在N3位烷基化核碱基腺嘌呤。DNA的不可逆烷基化破坏核酸结构,最终导致肿瘤细胞死亡。倍癌霉素的实例包括但不限于CC-1065、道诺霉素(daunorubicin)、丝裂霉素C(mitomycin C)、博来霉素

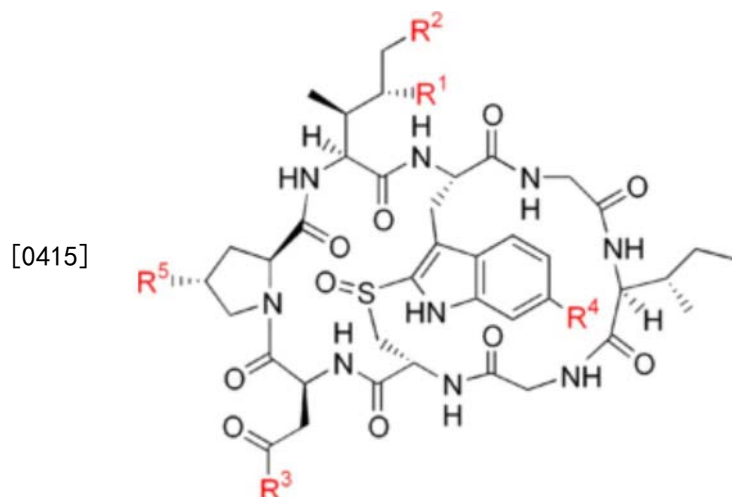
(bleomycin)、环胞苷(cyclocytidine)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、氨甲蝶呤和紫杉醇及其衍生物。

[0411] 药物部分可以是基于铂的抗肿瘤剂,例如顺铂(cisplatin)或其衍生物。

[0412] 药物部分可以是微管溶素。微管溶素具有抗微管、抗有丝分裂、细胞凋亡诱导剂、抗癌、抗血管生成和抗增殖的功能。微管溶素是细胞毒素肽,包括9个成员(A-I)。优选地,微管溶素是微管溶素A。微管溶素A具有作为抗癌剂的潜在应用。其阻止细胞处于G2/M期。微管溶素A具有以下结构:



[0414] 药物部分可以是鹅膏毒素。鹅膏毒素是至少八种相关毒性化合物的亚组的总称,所述化合物存在于几个毒蘑菇属中,最显著的是毒鹅膏(*Amanita phalloides*)及若干其他鹅膏菌属成员,以及一些锥盖伞属(*Conocybe*)、盔孢伞属(*Galerina*)及环柄菇属(*Lepiota*)蘑菇物种。鹅膏毒素即使在小剂量下也是致命的。这些化合物具有类似的结构,即八个氨基酸残基排列在保守的大双环基序(当计算脯氨酸和色氨酸衍生的残基中固有的环时,其为总体的五环结构)中。所有鹅膏毒素都是寡肽,其合成为35个氨基酸的蛋白原,最后八个氨基酸被脯氨酰寡肽酶切除。鹅膏毒素的示意性氨基酸序列为Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Pro, Trp和Cys之间通过亚砷($S=O$)部分交联,并在分子变体中羟基化。目前有十种已知的可能是药物部分的鹅膏毒素:



[0416]

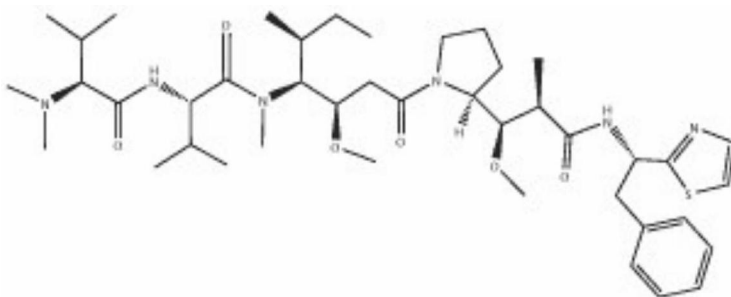
名称	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
α -鹅膏菌素(amanitin)	OH	OH	NH ₂	OH	OH
β -鹅膏菌素	OH	OH	OH	OH	OH
γ -鹅膏菌素	OH	H	NH ₂	OH	OH
ϵ -鹅膏菌素	OH	H	OH	OH	OH

[0417]

鹅膏无毒环肽(amanullin)	H	H	NH ₂	OH	OH
一羟鹅膏毒肽羧酸(amanullinic acid)	H	H	OH	OH	OH
三羟鹅膏毒肽酰胺(amaninamide)	OH	OH	NH ₂	H	OH
鹅膏素(amanin)	OH	OH	OH	H	OH
鹅膏蕈碱(proamanullin)	H	H	NH ₂	OH	H

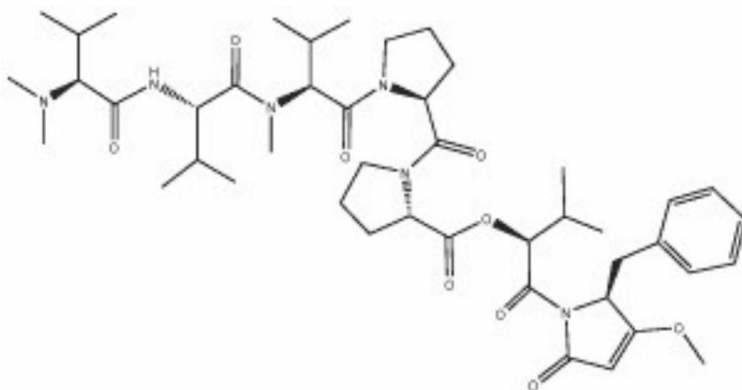
[0418] 药物部分可以是海兔毒素,如海兔毒素10或海兔毒素15,都是从印度洋海兔龙骨海鹿(*Dolabella auricularia*)中分离的海洋天然产物。这种有效的抗肿瘤剂也从帕劳的海洋蓝细菌(*cyanobacterium Symploca* sp.VP642)中分离。作为小的线性肽分子,海兔毒素10和15被认为是抗癌药物,其显示抗乳腺癌、肝癌、实体瘤和一些白血病的效力。临床前研究表明其在实验性抗肿瘤和微管蛋白组装系统中的效力。海兔毒素是有丝分裂抑制剂。其通过干扰微管蛋白形成来抑制微管组装,从而通过有丝分裂破坏细胞分裂,并在几种恶性细胞类型中诱导凋亡和Bcl-2磷酸化。海兔毒素10 (N,N-二甲基-L-缬氨酰-N-[(3R,4S,5S)-3-甲氧基-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-甲氧基-2-甲基-3-氧代-3-[(1S)-2-苯基-1-(1,3-噻唑-2-基)乙基]氨基}丙基]-1-吡咯烷基]-5-甲基-1-氧代-4-庚烷基]-N-甲基-L-缬氨酰胺)具有以下结构:

[0419]



[0420] 海兔毒素15 ((2S)-1-[(2S)-2-苄基-3-甲氧基-5-氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基]-3-甲基-1-氧代-2-丁烷基N,N-二甲基-L-缬氨酰-N-甲基-L-缬氨酰-L-脯氨酰)具有以下结构:

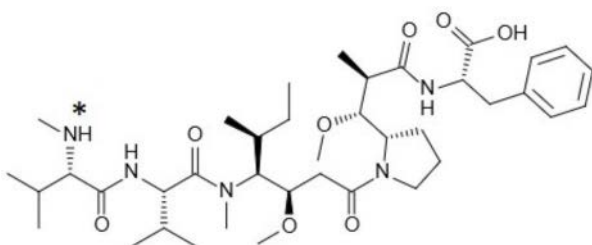
[0421]



[0422] 在本文公开的抗体药物偶联物的一些实施方案中,药物部分是澳瑞他汀。优选的澳瑞他汀为单甲基澳瑞他汀F(MMAF)或单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

[0423] 在本文所述的抗体药物偶联物的一些实施方案中,药物部分是单甲基澳瑞他汀F(也称为MMAF)。MMAF由以下结构式表示:

[0424]

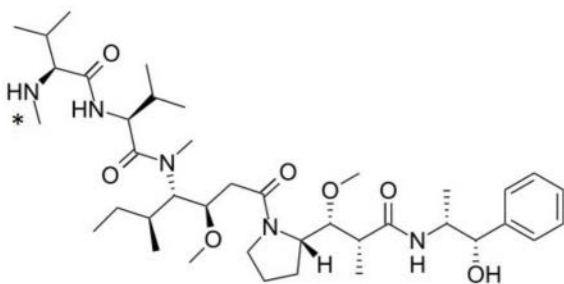


MMAF。

[0425] 单甲基澳瑞他汀F(MMAF)可通过用星号(*)标记的氮原子与连接子结合。

[0426] 在一些实施方案中,澳瑞他汀药物部分是单甲基澳瑞他汀E(也称为MMAE)。MMAE由以下结构式表示:

[0427]



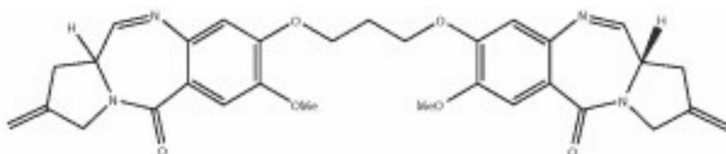
MMAE。

[0428] 单甲基澳瑞他汀E(MMAE)可以通过用星号(*)标记的氮原子与连接子结合。

[0429] 这些分子非竞争性地抑制长春新碱与微管蛋白的结合(在称为长春花/肽区域的位置),但已显示与RZX/MAY区域结合。

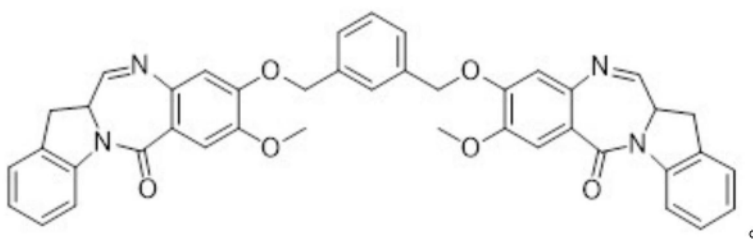
[0430] 药物部分可以是吡咯并苯并二氮杂卓二聚体,例如具有以下结构的化合物:

[0431]



[0432] 药物部分可以是吡咯并苯并二氮杂卓二聚体,例如具有以下结构的化合物:

[0433]



[0434] 药物部分可以是放射性同位素。如本文所述的典型放射性同位素可涉及小辐射源,通常是 γ 或 β 发射体,例如碘-125、碘-131、铯-137或钷-103。

[0435] 药物部分可以是治疗性蛋白质或肽或其片段。典型的例子是细胞因子,例如白介素、蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素PE38。

[0436] 药物部分可以是激酶抑制剂,优选与致癌功能相关的激酶抑制剂。示例性的激酶抑制剂包括伊马替尼(imatinib)、尼罗替尼(nilotinib)、达沙替尼(dasatinib)、伯舒替尼(bosutinib)、普纳替尼(ponatinib)、吉非替尼(gefitinib)、埃罗替尼(erlotinib)、阿法替尼(afatinib)、奥希替尼(osimertinib)、拉帕替尼(lapatinib)、来那替尼(neratinib)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(axitinib)、乐伐替尼(lenvatinib)、卡博替尼(cabozatinib)、凡德他尼(vandetanib)、瑞戈非尼(regorafenib)、维罗非尼(vemurafenib)、达拉非尼(dabrafenib)、曲美替尼(trametinib)、考比替尼(cobimetinib)、克唑替尼(crizotinib)、色瑞替尼(certinib)、艾乐替尼(alectinib)、布加替尼(brigatinib)、劳拉替尼(lorlatinib)、依鲁替尼(ibrutinib)、阿卡替尼(acalibrutinib)、米哚妥林(midostaurin)、芦可替尼(ruxolitinib)、艾德昔布(idelalisib)、考班昔布(copanlisib)、帕泊昔布(palbociclib)、瑞博西尼(ribociclib)、或阿贝力布(abemaciclib)。

[0437] 药物部分可以是MEK抑制剂。本文所用的MEK抑制剂描述抑制促分裂原活化蛋白激酶MEK1和/或MEK2的化学物质或药物。其可用于影响通常在某些癌症中过度活跃的MAPK/ERK路径。因此,MEK抑制剂具有治疗一些癌症的潜力,尤其是BRAF-突变的黑色素瘤和KRAS/BRAF突变的结肠直肠癌。典型的MEK抑制剂包括曲美替尼(GSK1120212)、考比替尼或XL518、宾尼替尼(binimetinib)(MEK162)、司美替尼(selumetinib)、PD-325901、CI-1040、PD035901或TAK-733。

[0438] 药物部分可以是KSP(纺锤体驱动蛋白)抑制剂。KSP抑制剂的实例包括伊斯平斯(Ispinesib)(SB-715992)、SB743921、AZ 3146、GSK923295、BAY 1217389、MPI-0479605和ARQ 621。

[0439] 药物部分可以是核酸。当用作药物部分时,核酸可涉及DNA/RNA分子,例如具有免疫调节功能(优选对先天免疫)的DNA/RNA分子。免疫调节可涉及增加或降低免疫应答,优选降低。DNA/RNA分子也可以是siRNA,优选设计用于(特异性)调节/操纵(例如减少)靶蛋白表达(示例性的靶可以是肌强直性营养不良蛋白激酶(DMPK))。

[0440] 药物部分可以是PROTAC。靶向蛋白水解的嵌合体(PROTAC)是异双功能小分子,其包含两个活性结构域和能够去除特定的不需要的蛋白的连接子。PROTAC不是作为常规的酶抑制剂起作用,而是优选通过诱导选择性细胞内蛋白水解起作用。PROTAC通常包含两个共价连接的蛋白质结合分子:一个能够结合E3泛素连接酶,另一个结合意图降解的靶蛋白。E3连接酶募集到靶蛋白会导致泛蛋白化,且随后靶蛋白被蛋白酶体降解。示例性PROTACS描述

于Sakamoto等人(2001),PNAS,98(15):8554-9中,在此通过引入作为参考。

[0441] 生产ADC的方法

[0442] 生产本发明的ADC的方法是本领域已知的。特别地,WO 2016/066749、WO 2017/186855、Schumacher等人,Angew.Chem.Int.Ed.2015,54,13787-13791中已经描述了在多肽的C-末端引入或添加微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列,并在微管蛋白酪氨酸连接酶的存在下使多肽(此处为维布妥昔)与非天然氨基酸接触,以及将包含药物部分的连接子与所述连接的维布妥昔偶联,所有上述文献均在此通过引用而并入。实施例的材料和方法部分还包括如何制备或获得本发明的ADC的指导。

[0443] 因此,本发明还涉及一种生产本文所定义的ADC的方法,其包括:

[0444] (a) 在维布妥昔的轻链、重链或轻链和重链两者的C端引入或添加微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列;

[0445] (b) 在微管蛋白酪氨酸连接酶和非天然氨基酸的存在下,在适于微管蛋白酪氨酸连接酶将所述维布妥昔与所述非天然氨基酸连接条件下,使步骤(a)中获得的维布妥昔接触;以及

[0446] (c) 将包含药物部分的任选可切割的连接子与步骤(b)中得到的所述经连接的维布妥昔偶联。

[0447] 如本文所述,在维布妥昔的C末端引入或添加TTL识别序列。例如,这样的识别序列可以通过基因工程或通过合成,化学蛋白合成或通过合成生物学引入或添加。

[0448] 本发明还涉及可通过本文定义的制备ADC的方法获得的ADC。本发明还涉及通过本文定义的制备ADC的方法获得的ADC。

[0449] 药物组合物

[0450] 本发明还涉及包含本发明的ADC的药物组合物。本发明的药物组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的载体。在一个具体实施方案中,术语“药学上可接受的”意指由管理机构或其他公认的药典批准的用于动物,并且更具体地用于人。药学上可接受的载体是本领域公知的,包括例如水溶液,如水、5%葡萄糖,或生理缓冲盐水或其它溶剂或媒介物,如乙二醇、甘油、油如橄榄油,或适于给予人或非人受试者的可注射有机酯。特别示例性的药学上可接受的载体包括(生物可降解的)脂质体;由可生物降解的聚合物聚(D,L-乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)制成的微球、白蛋白微球;合成聚合物(可溶性);纳米纤维、蛋白-DNA复合物;蛋白偶联物;红细胞;或病毒体。各种基于载体的剂型包含以下:固体脂质纳米颗粒(SLN)、聚合物纳米颗粒、陶瓷纳米颗粒、水凝胶纳米颗粒、共聚肽纳米颗粒、纳米晶体及纳米悬浮液、纳米晶体、纳米管及纳米线、官能化纳米载体、纳米球、纳米胶囊、脂质体、脂质乳剂、脂质微管/微柱、脂质微泡、脂球体、脂复合物(lipopolyplexe)、逆脂质胶束、树枝状聚合物、醇质体(ethosome)、多组分超薄胶囊、水质体(aquasome)、药质体(pharmacosome)、胶体(colloidosome)、囊泡(niosome)、盘状体(discome)、原核生物质体(proniosome)、微球、微乳液、及聚合物胶束。其他合适的医药上可接受的载体及赋形剂特别描述在Remington's Pharmaceutical Sciences,15thEd.,Mack Publishing Co.,New Jersey(1991)中。也请见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st edition;Lippincott Williams&Wilkins,2005。

[0451] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体或组合物是无菌的。药物组合物除了活

性剂之外,还可以包含生理上可接受的化合物,其例如作为填充剂、增溶剂、稳定剂、渗透剂、吸收增强剂等起作用。生理上可接受的化合物包括,例如,碳水化合物,如葡萄糖、蔗糖、乳糖;葡聚糖;多元醇,例如甘露醇;抗氧化剂,例如抗坏血酸或谷胱甘肽;防腐剂;螯合剂;缓冲剂;或其它稳定剂或赋形剂。

[0452] 药学上可接受的载体和/或生理上可接受的化合物的选择可以取决于例如活性剂的性质,例如溶解度、相容性(意味着物质可以在普通使用情况下将显著降低药物组合物的药物功效的方式一起存在于组合物中而不相互作用)和/或组合物的施用途。

[0453] 本发明的药物组合物包含治疗有效量的本文所述的ADC,并且可以以各种形式,例如以固体、液体、气体或冻干形式构成,并且可以尤其是呈软膏、乳膏、透皮贴剂、凝胶、粉末、片剂、溶液、气雾剂、颗粒、丸剂、悬浮液、乳液、胶囊、糖浆、液体、酏剂、提取物、酏剂或流体提取物的形式,或呈特别适合于局部或口服施用的形式。多种途径可用于本发明多肽的给药,包括但不限于口服、局部、经皮、皮下、静脉内、腹膜内、肌肉或眼内。然而,如果需要,本领域技术人员可以容易地选择任何其它途径。

[0454] 在治疗方法中的用途

[0455] 如实施例4和5所示,本发明的ADC可用于治疗,特别是治疗癌症。因此,本发明还涉及本发明的ADC或本发明的药物组合物在治疗疾病的方法中的用途,所述方法任选地包括向有需要的受试者或患者施用有效量的本发明的ADC或本发明的药物组合物。优选地,该疾病与CD30的过表达有关。该疾病可以是与CD30过表达相关的癌症。更优选地,所述疾病选自淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关性T细胞淋巴瘤(EATL);白血病,例如急性髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病;生殖细胞癌;移植物抗宿主病(GvHD)和狼疮,特别是系统性红斑狼疮(SLE);优选霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。所述疾病可以选自外周T细胞淋巴瘤-非特指的(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关性T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。该疾病可以是外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。该疾病可以是皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤(pcALCL)。该疾病可以是霍奇金淋巴瘤(HL)。

[0456] 本发明还涉及本发明的ADC在制备用于治疗疾病的药物中的用途。本发明还涉及本发明的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的用途。优选地,该疾病与CD30的过表达有关。该疾病可以是与CD30过表达相关的癌症。更优选地,所述疾病选自淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关性T细胞淋巴瘤(EATL);白血病,例如急性髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病;生殖细胞癌;移植物抗宿主病(GvHD)和狼疮,特别是系统性红斑狼疮(SLE);优选霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。所述疾病可以选自外周T细胞淋巴瘤-非特指的(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关性T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。该疾病可以是外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括间变性大细

胞淋巴瘤 (ALCL)。该疾病可以是皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL), 包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤 (pcALCL)。该疾病可以是霍奇金淋巴瘤 (HL)。

[0457] 本发明还涉及治疗疾病的方法, 包括向有此需要的受试者或患者施用有效量的本发明的ADC。本发明还涉及治疗疾病的方法, 包括向有此需要的受试者或患者施用有效量的本发明的药物组合物。优选地, 该疾病与CD30的过表达有关。该疾病可以是与CD30过表达相关的癌症。更优选地, 所述疾病选自淋巴瘤, 例如霍奇金淋巴瘤 (HL)、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关性T细胞淋巴瘤 (EATL); 白血病, 例如急性髓性白血病 (AML)、急性淋巴母细胞白血病 (ALL) 和肥大细胞白血病; 生殖细胞癌; 移植物抗宿主病 (GvHD) 和狼疮, 特别是系统性红斑狼疮 (SLE); 优选霍奇金淋巴瘤 (HL) 或间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。所述疾病可以是, 但不限于, 外周T细胞淋巴瘤-非特指的 (PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤 (AITL)、肠病相关性T细胞淋巴瘤 (EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤 (ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤 (ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤或滤泡T细胞淋巴瘤。该疾病也可以是外周T细胞淋巴瘤 (PTCL), 包括间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 或皮肤T细胞淋巴瘤 (CTCL), 包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤 (pcALCL)。该疾病也可以是霍奇金淋巴瘤 (HL)。

[0458] 术语“有效量”是指治疗剂 (例如, 本发明的ADC) 的量, 当单独使用或与另一种治疗剂组合使用时, 其保护受试者抵抗疾病的发作或促进疾病消退, 这通过疾病症状的严重程度的降低、无疾病症状时期的频率和持续时间的增加或由于疾病痛苦引起的损伤或残疾的预防来证明。治疗剂促进疾病消退的能力可以使用本领域技术人员已知的多种方法来评估, 例如在临床试验期间在人类受试者中, 在预测在人类中的功效的动物模型系统中, 或通过体外测定中测定试剂的活性。确切的量将取决于治疗的目的, 并且本领域技术人员可以使用已知的技术 (参见, 例如, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*) 确定。

[0459] 此外, 本发明涉及如本文所公开的抗体药物偶联物, 其用于治疗患者的癌症的方法中。根据本发明, 术语“患者”是指人类、非人灵长类动物或另一种动物, 特别是哺乳动物, 例如牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类动物, 例如小鼠和大鼠。在特别优选的实施方案中, 患者是人。除非另有说明, 术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。术语“治疗”在其所有语法形式中包括治疗性或预防性治疗。“治疗性或预防性治疗”包括旨在完全预防临床和/或病理表现的预防性治疗或旨在改善或缓解临床和/或病理表现的治疗性治疗。因此, 术语“治疗”还包括疾病的改善或预防。

[0460] 本发明的ADC可以以治疗有效的任何剂量施用。上限通常是指在副作用方面仍然可安全施用的剂量。通常, 本发明的ADC可以以0.5-20mg/kg的 (有效) 剂量施用。本发明的ADC可以以1-10mg/kg的 (有效) 剂量施用。本发明的ADC可以以1-9mg/kg的 (有效) 剂量施用。本发明的ADC可以以1.2-9mg/kg的 (有效) 剂量施用。本发明的ADC可以以1.8-8mg/kg的 (有效) 剂量施用。本发明的ADC可以以2-6mg/kg的 (有效) 剂量施用。作为说明性的例子, 本发明的ADC可以以20mg/kg、18mg/kg、16mg/kg、14mg/kg、12mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg或1mg/kg的 (有效) 剂量施用。如果认为有利或必要, 则也可使用其他剂量。

[0461] 本发明的ADC可以与其它试剂,特别是抗癌药,或增强这些试剂的作用的化合物共同给药。共同给药包括顺序给药和同时给药。合适的抗癌药物包括例如一种或多种本文所述的药物部分。本发明的ADC可以与环磷酰胺、多柔比星(doxorubicin)及泼尼松(prednisone)共同给药(ChP方案)。本发明的ADC可以与抗癌药物,如免疫调节药物、检查点抑制剂、化疗药物(例如环磷酰胺、盐酸多柔比星(羟基柔红霉素)、硫酸长春新碱(Oncovin)和泼尼松(CHOP方案)依托泊苷(etoposide)、长春新碱、氮芥(chlormethine))、蛋白抑制剂共同施用。

[0462] “肿瘤”是指由失调的细胞增殖形成的一组细胞或组织,特别是癌症。肿瘤可能显示部分或完全缺乏结构组织以及与正常组织的功能协调,并且通常形成独特的组织肿块,其可以是良性的或恶性的。特别地,术语“肿瘤”是指恶性肿瘤。根据一个实施方案,术语“肿瘤”或“肿瘤细胞”还指非实体癌和非实体癌细胞,例如白血病细胞。根据另一个实施方案,术语“肿瘤”和“肿瘤细胞”不包括相应的非实体癌或其细胞。

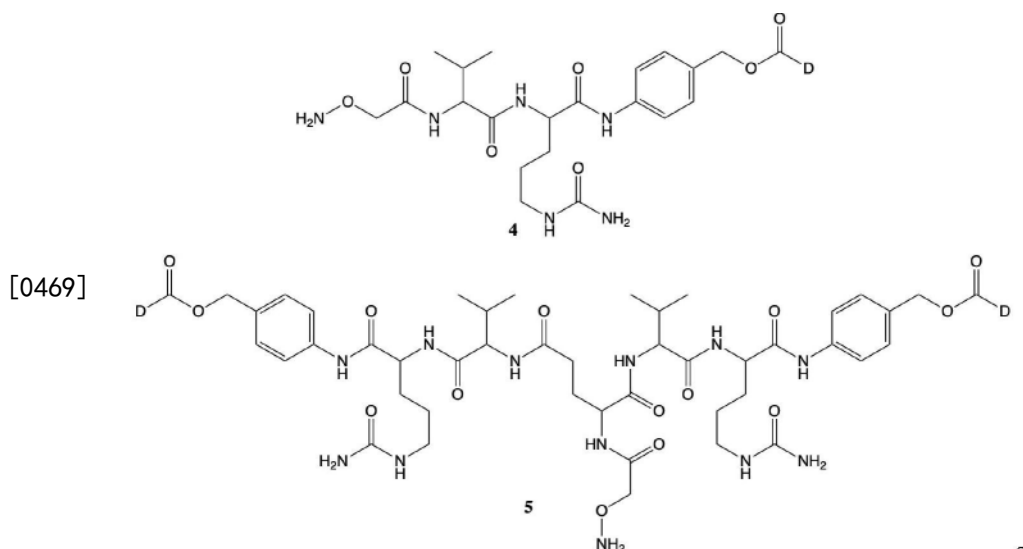
[0463] “转移”是指癌细胞从其原始部位扩散到身体的另一部分。转移的形成是非常复杂的过程,通常涉及癌细胞从原发肿瘤脱离,进入身体循环并沉降以在身体其它地方的正常组织内生长。当肿瘤细胞转移时,新肿瘤被称为继发性或转移性肿瘤,并且其细胞通常类似于原始肿瘤中的那些。这意味着,例如,如果乳腺癌转移至肺,则继发性肿瘤会由异常乳腺细胞组成,而不是由异常肺细胞组成。肺中的肿瘤则被称为转移性乳腺癌,而不是肺癌。

[0464] 本发明的示例性ADC

[0465] 在下表中,公开了示例性ADC的概述。在那些示例性ADC中,非天然氨基酸是3-甲酰基酪氨酸,药物部分(D)是如本文定义的药物部分,优选MMAE:

	维布妥昔轻链	维布妥昔重链	连接子
	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12 (包含 TTL 识别序列)	结构 4
	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12	结构 5
[0466]	SEQ ID NO: 11 (包含 TTL 识别序列)	SEQ ID NO: 1	结构 4
	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 1	结构 5
	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	结构 4
	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	结构 5
	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 1	结构 4
	(包含 TTL 识别序列)		
[0467]	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 1	结构 5
	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 12	结构 4
	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 12	结构 5

[0468] 结构4和5重复如下:



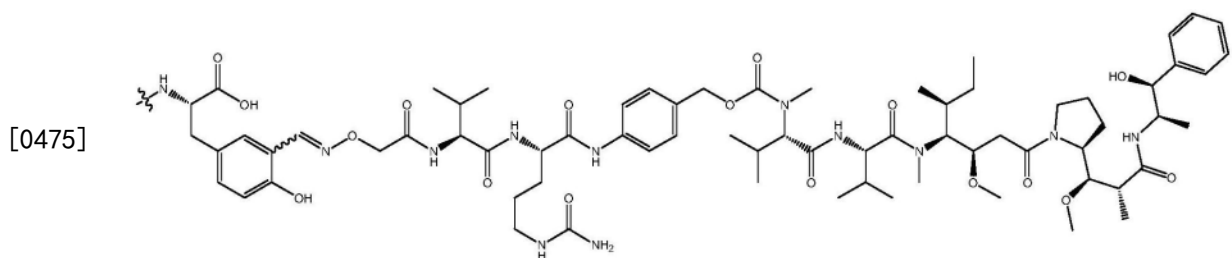
[0470] 在一些实施方案中,本发明涉及抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

[0471] (a) 维布妥昔,其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0472] 每条轻链,包括识别序列,具有SEQ ID NO:11;以及

[0473] 维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1;以及

[0474] (b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:



[0476] 其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。

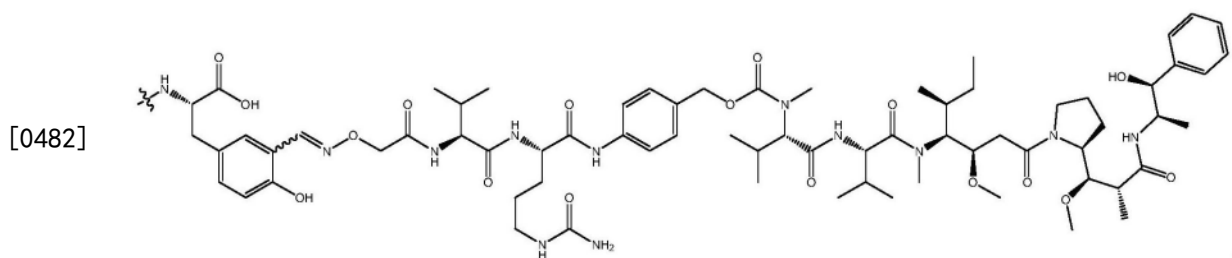
[0477] 在一些实施方案中,本发明涉及抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

[0478] (a) 维布妥昔,其中维布妥昔在每个重链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0479] 每条重链,包括识别序列,具有SEQ ID NO:12;以及

[0480] 维布妥昔的每条轻链具有SEQ ID NO:2;以及

[0481] (b) 每条重链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:



[0483] 其中波浪线表示与每条重链的识别序列的C末端的连接。

[0484] 在一些实施方案中,本发明涉及抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

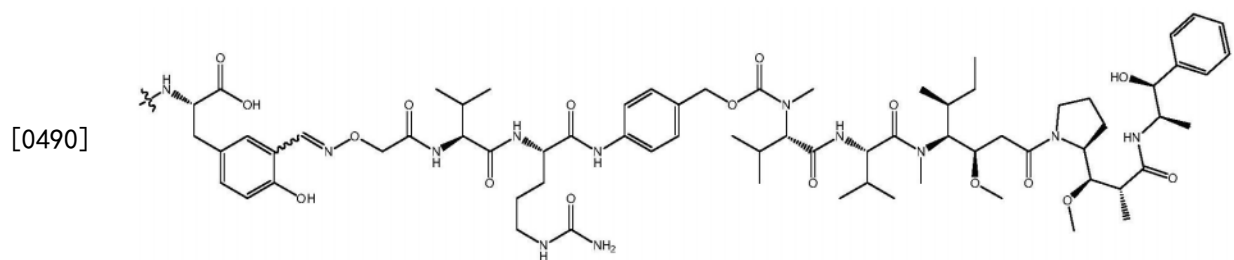
[0485] (a) 维布妥昔, 其中维布妥昔在每个重链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0486] 每条重链, 包括识别序列, 具有SEQ ID NO:12; 以及

[0487] 其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0488] 每条轻链, 包括识别序列, 具有SEQ ID NO:11; 以及

[0489] (b) 每条重链的识别序列的C-末端和每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:



[0491] 其中波浪线表示与每条重链的识别序列的C末端和每条轻链的识别序列的C末端的连接。

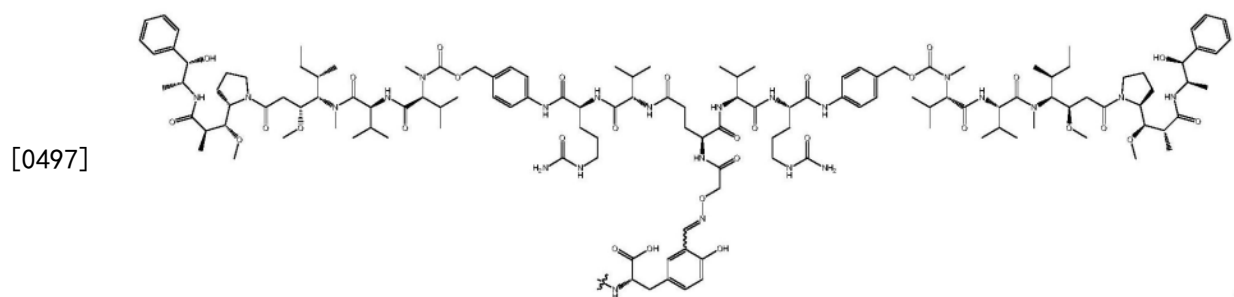
[0492] 在一些实施方案中, 本发明涉及抗体-药物偶联物 (ADC), 其包含:

[0493] (a) 维布妥昔, 其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0494] 每条轻链, 包括识别序列, 具有SEQ ID NO:11; 以及

[0495] 维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1; 以及

[0496] (b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:



[0498] 其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。在一些实施方案中, 本发明涉及抗体-药物偶联物 (ADC), 其包含:

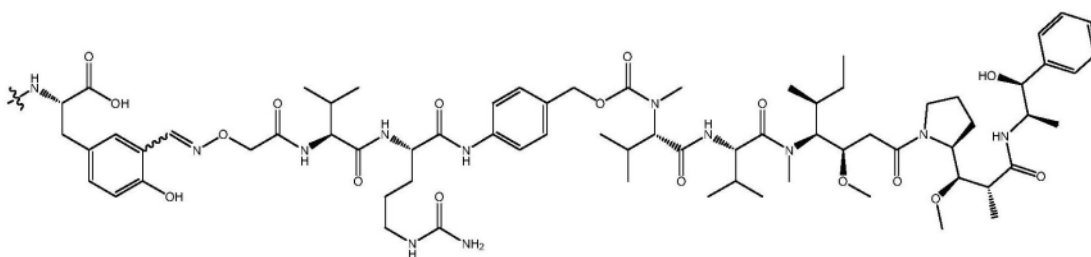
[0499] (a) 维布妥昔, 其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0500] 每条轻链, 包括识别序列, 具有SEQ ID NO:14; 以及

[0501] 维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1; 以及

[0502] (b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:

[0503]



[0504] 其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。

[0505] 在一些实施方案中,本发明涉及抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

[0506] (a) 维布妥昔,其中维布妥昔在每个重链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

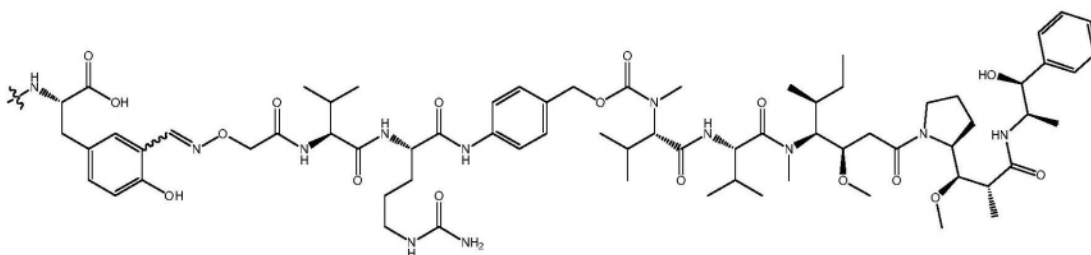
[0507] 每条重链,包括识别序列,具有SEQ ID NO:12;以及

[0508] 其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0509] 每条轻链,包括识别序列,具有SEQ ID NO:14;以及

[0510] (b) 每条重链的识别序列的C-末端和每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:

[0511]



[0512] 其中波浪线表示与每条重链的识别序列的C末端和每条轻链的识别序列的C末端的连接。

[0513] 在一些实施方案中,本发明涉及抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

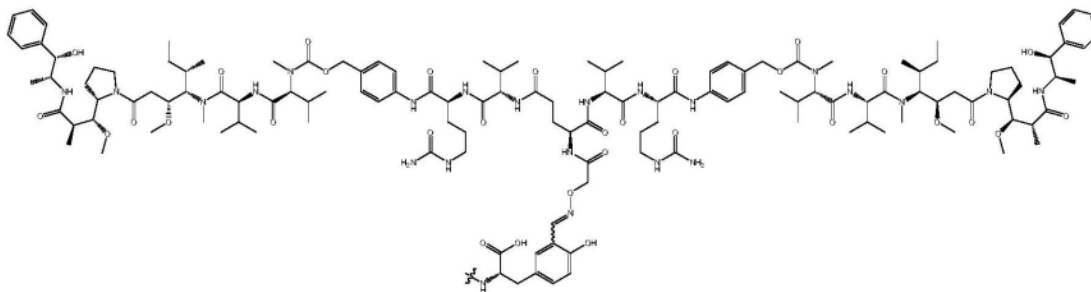
[0514] (a) 维布妥昔,其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0515] 每条轻链,包括识别序列,具有SEQ ID NO:14;以及

[0516] 维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1;以及

[0517] (b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:

[0518]



[0519] 其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。

[0520] 序列

[0521] 本文尤其涉及以下序列。

[0522] 维布妥昔/cAC10重链(SEQ ID NO:1):

[0523] Gln-Ile-Gln-Leu-Gln-Gln-Ser-Gly-Pro-Glu-Val-Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Lys-Ile-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Asp-Tyr-Tyr-Ile-Thr-Trp-Val-Lys-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Gly-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-Trp-Ile-Tyr-Pro-Gly-Ser-Gly-Asn-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Phe-Met-Gln-Leu-Ser-Ser-Leu-Thr-Ser-Glu-Asp-Thr-Ala-Val-Tyr-Phe-Cys-Ala-Asn-Tyr-Gly-Asn-Tyr-Trp-Phe-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Gln-Val-Thr-Val-Ser-Ala-Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Ser-Thr-Ser-Gly-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gly-Cys-Leu-Val-Lys-Asp-Tyr-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Trp-Asn-Ser-Gly-Ala-Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ala-Val-Leu-Gln-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Val-Val-Thr-Val-Pro-Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Thr-Gln-Thr-Tyr-Ile-Cys-Asn-Val-Asn-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Lys-Val-Glu-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Asp-Glu-Leu-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys

[0524] 维布妥昔/cAC10轻链 (SEQ ID NO:2) :

[0525] Asp-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Gln-Arg-Ala-Thr-Ile-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Phe-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn-Trp-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Pro-Lys-Val-Leu-Ile-Tyr-Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser-Gly-Ile-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Asn-Ile-His-Pro-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Ser-Asp-Glu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Thr-Ala-Ser-Val-Val-Cys-Leu-Leu-Asn-Asn-Phe-Tyr-Pro-Arg-Glu-Ala-Lys-Val-Gln-Trp-Lys-Val-Asp-Asn-Ala-Leu-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser-Gln-Glu-Ser-Val-Thr-Glu-Gln-Asp-Ser-Lys-Asp-Ser-Thr-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-Lys-Ala-Asp-Tyr-Glu-Lys-His-Lys-Val-Tyr-Ala-Cys-Glu-Val-Thr-His-Gln-Gly-Leu-Ser-Ser-Pro-Val-Thr-Lys-Ser-Phe-Asn-Arg-Gly-Glu-Cys

[0526] TTL识别序列 (SEQ ID NO:3) :

[0527] Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Glu,

[0528] 其中:

[0529] Xaa₁是任何氨基酸;作为说明性实例,Xaa₁可以是Glu、Asp、Ala、Lys或Pro;

[0530] Xaa₂是任何氨基酸;作为说明性实例,Xaa₂可以是Gly、Ser、Ala、Val或Phe;以及

[0531] Xaa₃是Glu、Asp或Cys。

[0532] TTL识别序列(SEQ ID NO:4):

[0533] Glu-Gly-Glu-Glu

[0534] TTL识别序列(SEQ ID NO:5):

[0535] Val-Asp-Ser-Val-Glu-Gly-Glu-Gly-Glu-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu

[0536] TTL识别序列(SEQ ID NO:6):

[0537] Ser-Val-Glu-Gly-Glu-Gly-Glu-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu

[0538] TTL识别序列(SEQ ID NO:7):

[0539] Ser-Ala-Asp-Gly-Glu-Asp-Glu-Gly-Glu-Glu

[0540] TTL识别序列(SEQ ID NO:8):

[0541] Ser-Val-Glu-Ala-Glu-Ala-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu

[0542] TTL识别序列(SEQ ID NO:9):

[0543] Ser-Tyr-Glu-Asp-Glu-Asp-Glu-Gly-Glu-Glu

[0544] TTL识别序列(SEQ ID NO:10):

[0545] Ser-Phe-Glu-Glu-Glu-Asn-Glu-Gly-Glu-Glu

[0546] 维布妥昔轻链,其包含Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-连接子,以及在C-末端的TTL识别序列(SEQ ID NO:11):

[0547] Asp-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Gln-Ar g-Ala-Thr-Ile-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Phe-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn-Trp-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Pro-Lys-Val-Leu-Ile-Tyr-Ala-Al a-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser-Gly-Ile-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Asn-Ile-His-Pro-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Ser-Asp-Glu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Thr-Ala-Ser-Val-Val-Cys-Leu-Leu-Asn-Asn-Phe-Tyr-Pro-Arg-Glu-Ala-Lys-Val-Gln-Trp-Lys-Val-Asp-Asn-Ala-Leu-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser-Gln-Glu-Ser-Val-Thr-Glu-Gln-Asp-Ser-Lys-Asp-Ser-Thr-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-Lys-Ala-Asp-Tyr-Glu-Lys-His-Lys-Val-Tyr-Ala-Cys-Glu-Val-Thr-His-Gln-Gly-Leu-Ser-Ser-Pro-Val-Thr-Lys-Ser-Phe-Asn-Arg-Gly-Glu-Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Val-Asp-Ser-Val-Glu-Gly-Glu-Gly-Glu-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu

[0548] 在C端融合TTL识别序列的维布妥昔重链(SEQ ID NO:12):

[0549] Gln-Ile-Gln-Leu-Gln-Gln-Ser-Gly-Pro-Glu-Val-Val-Lys-Pro-Gly-Ala-Ser-Va l-Lys-Ile-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Asp-Tyr-Tyr-Ile-Thr-Trp-Va l-Lys-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Gly-Leu-Glu-Trp-Ile-Gly-Trp-Ile-Tyr-Pro-Gly-Ser-Gl y-Asn-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Thr-Val-Asp-Th r-Ser-Ser-Ser-Thr-Ala-Phe-Met-Gln-Leu-Ser-Ser-Leu-Thr-Ser-Glu-Asp-Thr-Ala-

Val-Tyr-Phe-Cys-Ala-Asn-Tyr-Gly-Asn-Tyr-Trp-Phe-Ala-Tyr-Trp-Gly-Gln-Gly-Thr-Gln-Val-Thr-Val-Ser-Ala-Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Ser-Thr-Ser-Gly-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gly-Cys-Leu-Val-Lys-Asp-Tyr-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Trp-Asn-Ser-Gly-Ala-Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ala-Val-Leu-Gln-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Val-Val-Thr-Val-Pro-Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Thr-Gln-Thr-Tyr-Ile-Cys-Asn-Val-Asn-His-Lys-Pro-Ser-Asn-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Lys-Val-Glu-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Asp-Glu-Leu-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys-Val-Asp-Ser-Val-Glu-Gly-Glu-Gly-Glu-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu

[0550] 来自狼 (*Canis Lupus*) 的TTL (SEQ ID NO:13) :

[0551] Met-Tyr-Thr-Phe-Val-Val-Arg-Asp-Glu-Asn-Ser-Ser-Val-Tyr-Ala-Glu-Val-Ser-Arg-Leu-Leu-Leu-Ala-Thr-Gly-His-Trp-Lys-Arg-Leu-Arg-Arg-Asp-Asn-Pro-Arg-Phe-Asn-Leu-Met-Leu-Gly-Glu-Arg-Asn-Arg-Leu-Pro-Phe-Gly-Arg-Leu-Gly-His-Glu-Pro-Gly-Leu-Met-Gln-Leu-Val-Asn-Tyr-Tyr-Arg-Gly-Ala-Asp-Lys-Leu-Cys-Arg-Lys-Ala-Ser-Leu-Val-Lys-Leu-Ile-Lys-Thr-Ser-Pro-Asp-Leu-Ala-Glu-Ser-Cys-Thr-Trp-Phe-Pro-Glu-Ser-Tyr-Val-Ile-Tyr-Pro-Thr-Asn-Leu-Lys-Thr-Pro-Val-Ala-Pro-Ala-Gln-Asn-Gly-Ile-His-Pro-Pro-Ile-His-Asn-Ser-Arg-Thr-Asp-Glu-Arg-Glu-Phe-Phe-Leu-Ala-Ser-Tyr-Asn-Arg-Lys-Lys-Glu-Asp-Gly-Glu-Gly-Asn-Val-Trp-Ile-Ala-Lys-Ser-Ser-Ala-Gly-Ala-Lys-Gly-Glu-Gly-Ile-Leu-Ile-Ser-Ser-Glu-Ala-Thr-Glu-Leu-Leu-Asp-Phe-Ile-Asp-Asn-Gln-Gly-Gln-Val-His-Val-Ile-Gln-Lys-Tyr-Leu-Glu-His-Pro-Leu-Leu-Leu-Glu-Pro-Gly-His-Arg-Lys-Phe-Asp-Ile-Arg-Ser-Trp-Val-Leu-Val-Asp-His-Gln-Tyr-Asn-Ile-Tyr-Leu-Tyr-Lys-Glu-Gly-Val-Leu-Arg-Thr-Ala-Ser-Glu-Pro-Tyr-His-Val-Asp-Asn-Phe-Gln-Asp-Lys-Thr-Cys-His-Leu-Thr-Asn-His-Cys-Ile-Gln-Lys-Glu-Tyr-Ser-Lys-Asn-Tyr-Gly-Lys-Tyr-Glu-Glu-Gly-Asn-Glu-Met-Phe-Phe-Glu-Glu-Phe-Asn-Gln-Tyr-Leu-Ile-Ser-Ala-Leu-Asn-Ile-Thr-Leu-Glu-Ser-Ser-Ile-Leu-Leu-Gln-Ile-Lys-His-Ile-Ile-Arg-Ser-Cys-Leu-Met-Ser-Val-Glu-Pro-Ala-Ile-Ser-Thr-Arg-Tyr-Leu-Pro-Tyr-Gln-Ser-Phe-Gln-Leu-Phe-Gly-Phe-Asp-Phe-Met-Val-Asp-Glu-Thr-Leu-Lys-Val-Trp-Leu-Ile-Glu-Val-Asn-Gly-Ala-Pro-Ala-Cys-Ala-Gln-

Arg-Leu-Tyr-Ala-Glu-Leu-Cys-Gln-Gly-Ile-Val-Asp-Ile-Ala-Ile-Ser-Ser-Val-Phe-Pro-Pro-Pro-Asp-Val-Glu-Pro-Gln-His-Ile-Gln-Pro-Ala-Ala-Phe-Ile-Lys-Leu

[0552] 在C端包含TTL识别序列的维布妥昔轻链(SEQ ID NO:14):

[0553] Asp-Ile-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Pro-Ala-Ser-Leu-Ala-Val-Ser-Leu-Gly-Gln-Arg-Ala-Thr-Ile-Ser-Cys-Lys-Ala-Ser-Gln-Ser-Val-Asp-Phe-Asp-Gly-Asp-Ser-Tyr-Met-Asn-Trp-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Gly-Gln-Pro-Pro-Lys-Val-Leu-Ile-Tyr-Ala-Ala-Ser-Asn-Leu-Glu-Ser-Gly-Ile-Pro-Ala-Arg-Phe-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Asp-Phe-Thr-Leu-Asn-Ile-His-Pro-Val-Glu-Glu-Glu-Asp-Ala-Ala-Thr-Tyr-Tyr-Cys-Gln-Gln-Ser-Asn-Glu-Asp-Pro-Trp-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Ser-Asp-Glu-Gln-Leu-Lys-Ser-Gly-Thr-Ala-Ser-Val-Val-Cys-Leu-Leu-Asn-Asn-Phe-Tyr-Pro-Arg-Glu-Ala-Lys-Val-Gln-Trp-Lys-Val-Asp-Asn-Ala-Leu-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser-Gln-Glu-Ser-Val-Thr-Glu-Gln-Asp-Ser-Lys-Asp-Ser-Thr-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser-Thr-Leu-Thr-Leu-Ser-Lys-Ala-Asp-Tyr-Glu-Lys-His-Lys-Val-Tyr-Ala-Cys-Glu-Val-Thr-His-Gln-Gly-Leu-Ser-Ser-Pro-Val-Thr-Lys-Ser-Phe-Asn-Arg-Gly-Glu-Cys-Val-Asp-Ser-Val-Glu-Gly-Glu-Gly-Glu-Glu-Glu-Gly-Glu-Glu

[0554] 本发明的项目

[0555] 本发明还涉及以下项目:

[0556] 1. 一种抗体-药物偶联物(ADC), 其包含:

[0557] (a) 维布妥昔(brentuximab), 其中维布妥昔在维布妥昔的轻链、重链或全部重链和轻链的C末端包含微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列和非天然氨基酸; 以及

[0558] (b) 至少一种药物部分;

[0559] 其中药物部分经由连接子偶联至所述非天然氨基酸中的每一者。

[0560] 2. 根据项目1所述的ADC, 其中维布妥昔的重链具有包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少95%的序列同一性, 和/或其中维布妥昔的轻链具有包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或与SEQ ID NO:2具有至少95%的序列同一性, 优选地, 维布妥昔由重链和轻链组成, 所述重链由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成, 所述轻链由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0561] 3. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述药物部分选自喜树碱类、美登木素生物碱(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamycin)、倍癌霉素(duocarmycin)、微管溶素(tubulysin)、鹅膏毒素(amatoxin)、尾海兔素(dolastatin)和澳瑞他汀(auristatin), 例如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)、吡咯并苯并二氮杂卓二聚体、吲哚并苯并二氮杂卓二聚体、放射性同位素、治疗性蛋白质和肽(或其片段)、核酸、PROTAC、激酶抑制剂、MEK抑制剂、KSP抑制剂及其类似物或前药, 优选所述药物部分是MMAE。

[0562] 4. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列至少具有氨基酸序列 $X_1X_2X_3X_4$ (SEQ ID NO:3), 其中 X_1 和 X_2 是任何氨基酸, X_3 是E、D或C, 且 X_4 是E, 优选地其中 X_2 是G、S、A、V或F, 和/或其中 X_1 是E、D、A、K或P。

[0563] 5. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述识别序列是EGEE (SEQ ID NO.4), 优选其中所述识别序列是VDSVEGEGEEEGEE (SEQ ID NO.5)、SVEGEGEEEGEE (SEQ ID NO.6)、

SADGEDEGEE (SEQ ID NO.7)、SVEAEAEDEGEE (SEQ ID NO.8)、SYEDEDEGEE (SEQ ID NO.9) 或 SFEEENEDEGEE (SEQ ID NO.10)。

[0564] 6. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述非天然氨基酸是2-取代、3-取代或4-取代的酪氨酸或在苄基位置取代的酪氨酸衍生物。

[0565] 7. 根据项目6所述的ADC, 其中所述3-或4-取代的酪氨酸衍生物是3-硝基酪氨酸、3-氨基酪氨酸、3-叠氮基酪氨酸、3-甲酰基酪氨酸、3-乙酰基酪氨酸或4-氨基苯丙氨酸, 优选所述非天然氨基酸是3-甲酰基酪氨酸。

[0566] 8. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述连接子是可切割的, 优选被蛋白酶切割, 更优选被组织蛋白酶如组织蛋白酶B切割。

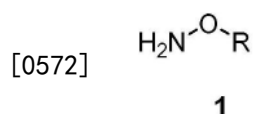
[0567] 8a. 根据项目1至7中任一项所述的ADC, 其中所述连接子是不可切割的。

[0568] 9. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述连接子包含缬氨酸-瓜氨酸部分。

[0569] 10. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述连接子包含羟胺基团, 并且所述非天然氨基酸包含位于芳环例如3-甲酰基鸟嘌呤中的羟基邻位的甲酰基, 并且其中所述连接子的羟胺基团与所述非天然氨基酸的甲酰基在偶联后形成肟。

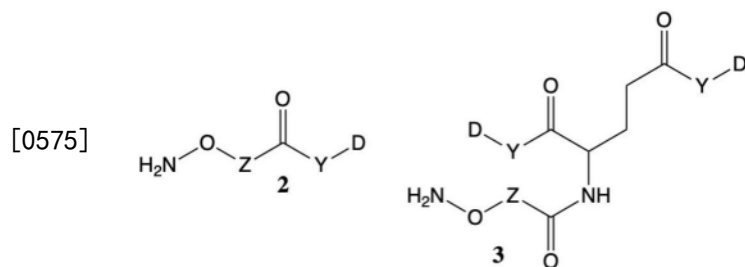
[0570] 11. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中维布妥昔与两个、四个、六个或八个, 优选两个或四个药物部分, 更优选两个药物部分偶联。

[0571] 12. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述连接子在与所述非天然氨基酸偶联之前具有结构1中所示的结构:



[0573] 其中R是一个或多个药物部分, 其任选地通过一个或多个切割位点偶联到结构1的羟胺, 优选其中结构1的所述羟胺与所述非天然氨基酸偶联。

[0574] 13. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述连接子在与所述非天然氨基酸偶联之前具有结构2或3中所示的结构:



[0576] 其中Z选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的烯基、取代或未取代的炔基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的芳烷基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的杂芳烷基、取代或未取代的杂环基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂烯基和取代或未取代的杂炔基;

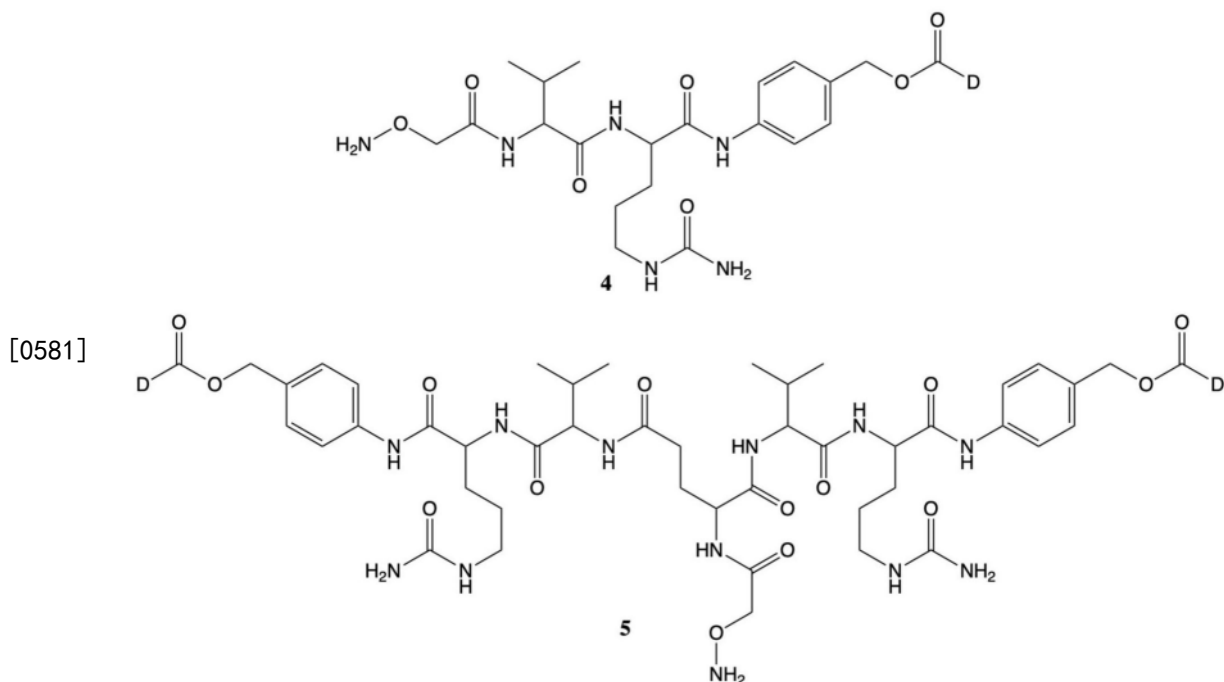
[0577] 其中D是一个或多个药物部分; 以及

[0578] 其中Y是切割位点, 例如组织蛋白酶如组织蛋白酶B的切割位点;

[0579] 优选其中结构2或3的所述羟胺与所述非天然氨基酸偶联。

[0580] 14. 根据前述项目中任一项所述的ADC, 其中所述连接子在与所述非天然氨基酸偶

联之前具有结构4或5中所示的结构,其中D是药物部分,优选MMAE:



[0582] 15. 根据项目14所述的ADC,其中D是MMAE,其中所述非天然氨基酸是3-甲酰基酪氨酸且所述连接子的羟胺基团与所述非天然氨基酸的3-甲酰基形成肟。

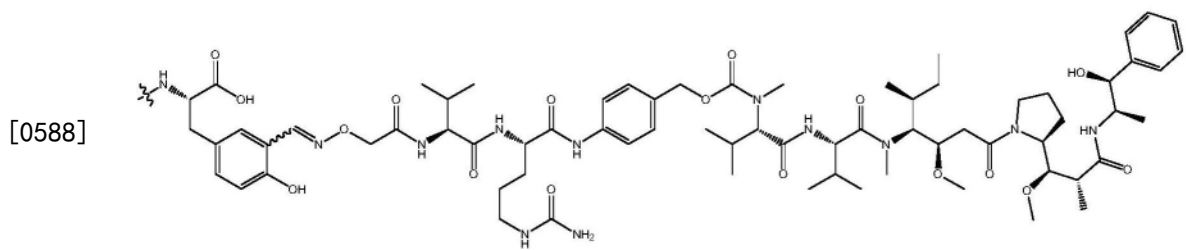
[0583] 16. 一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

[0584] (a) 维布妥昔,其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0585] 每条轻链,包括识别序列,具有SEQ ID NO:11;以及

[0586] 维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1;以及

[0587] (b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:



[0589] 其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。

[0590] 17. 一种抗体-药物偶联物(ADC),其包含:

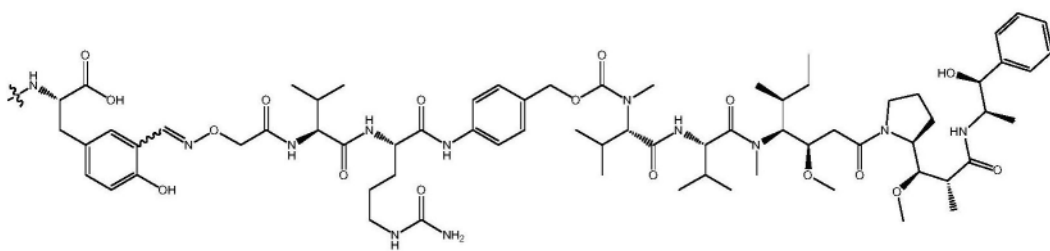
[0591] (a) 维布妥昔,其中维布妥昔在每个重链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0592] 每条重链,包括识别序列,具有SEQ ID NO:12;以及

[0593] 维布妥昔的每条轻链具有SEQ ID NO:2;以及

[0594] (b) 每条重链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:

[0595]



[0596] 其中波浪线表示与每条重链的识别序列的C末端的连接。

[0597] 18. 一种抗体-药物偶联物 (ADC), 其包含:

[0598] (a) 维布妥昔, 其中维布妥昔在每个重链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

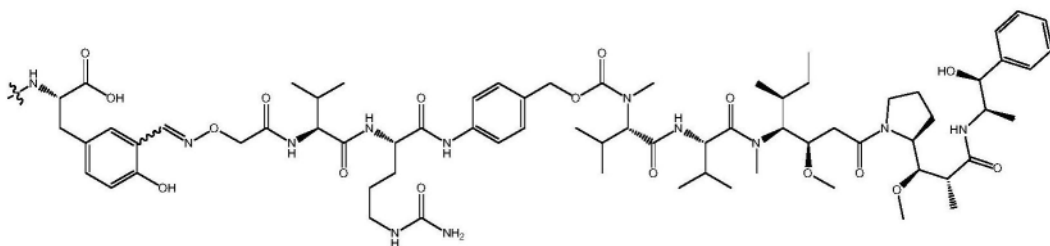
[0599] 每条重链, 包括识别序列, 具有SEQ ID NO:12; 以及

[0600] 其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0601] 每条轻链, 包括识别序列, 具有SEQ ID NO:11; 以及

[0602] (b) 每条重链的识别序列的C-末端和每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:

[0603]



[0604] 其中波浪线表示与每条重链的识别序列的C末端和每条轻链的识别序列的C末端的连接。

[0605] 19. 一种抗体-药物偶联物 (ADC), 其包含:

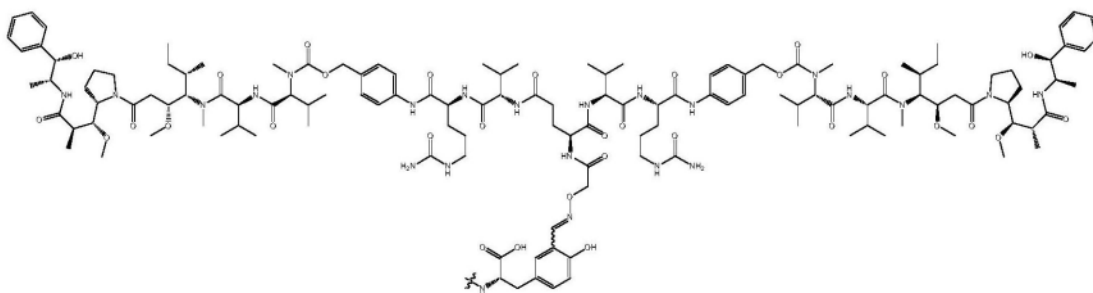
[0606] (a) 维布妥昔, 其中维布妥昔在每个轻链的C末端包含微管蛋白-酪氨酸连接酶的识别序列;

[0607] 每条轻链, 包括识别序列, 具有SEQ ID NO:11; 以及

[0608] 维布妥昔的每条重链具有SEQ ID NO:1; 以及

[0609] (b) 每条轻链的识别序列的C-末端通过酰胺键与具有以下结构的基团结合:

[0610]



[0611] 其中波浪线表示与每条轻链的识别序列的C末端的连接。

[0612] 20. 一种生产如项目1-19中任一项所定义的ADC的方法, 包括

[0613] (a) 在维布妥昔的轻链、重链或轻链和重链两者的C端引入或添加微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列;

[0614] (b) 在微管蛋白酪氨酸连接酶和非天然氨基酸的存在下,在适于微管蛋白酪氨酸连接酶将所述维布妥昔与所述非天然氨基酸连接的条件,使步骤(a)中获得的维布妥昔接触;以及

[0615] (c) 将包含药物部分的任选可切割的连接子与步骤(b)中得到的所述经连接的维布妥昔偶联。

[0616] 21. 一种ADC,其可通过项目20所述的方法获得或正在获得。

[0617] 22. 一种药物组合物,其包含项目1至19或项目21中任一项所述的ADC。

[0618] 23. 项目1至19或21中任一项所述的ADC或项目22所述的药物组合物用于治疗疾病的方法中。

[0619] 24. 根据项目23所述的供使用的ADC或药物组合物,其中所述疾病与CD30的过表达有关。

[0620] 25. 根据项目23或24所述的供使用的ADC或药物组合物,其中所述疾病选自淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL);白血病,例如急性髓细胞性白血病(AML)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和肥大细胞性白血病;生殖细胞癌;移植物抗宿主病(GvHD);和狼疮,特别是系统性红斑狼疮(SLE);优选霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0621] 25a. 根据项目23或24所述的供使用的ADC或药物组合物,其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-非特指的(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

[0622] 25b. 根据项目23或24所述的供使用的ADC或药物组合物,其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括间变性大细胞淋巴瘤(ALCL);或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤(pcALCL)。

[0623] 26. 项目1至19或项目21中任一项所述的ADC在制备用于治疗与CD30过表达相关的疾病的药物中的用途。

[0624] 27. 根据项目26所述的用途,其中所述疾病选自淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL);白血病,例如急性髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病;生殖细胞癌;移植物抗宿主病(GvHD);和狼疮,特别是系统性红斑狼疮(SLE)。

[0625] 28. 根据项目27所述的用途,其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0626] 28a. 根据项目26所述的用途,其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-非特指的(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

[0627] 28b. 根据项目26所述的用途,其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括间变性大细胞淋巴瘤(ALCL);或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤

(pcALCL)。

[0628] 29. 项目22所述的药物组合物在制备用于治疗与CD30过表达相关的疾病的药物中的用途。

[0629] 30. 根据项目26所述的用途,其中所述疾病选自淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL);白血病,例如急性髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病;生殖细胞癌;移植物抗宿主病(GvHD);和狼疮,特别是系统性红斑狼疮(SLE)。

[0630] 31. 根据项目30所述的用途,其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0631] 31a. 根据项目29所述的用途,其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-非特指的(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

[0632] 31b. 根据项目29所述的用途,其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括间变性大细胞淋巴瘤(ALCL);或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤(pcALCL)。

[0633] 32. 一种治疗与CD30过表达相关的疾病的方法,其包括将有效量的项目1至19中任一项所述的ADC施用于有需要的受试者或患者。

[0634] 33. 根据项目32所述的方法,其中所述疾病是与CD30过表达相关的癌症。

[0635] 34. 根据项目32或33所述的方法,其中所述疾病选自淋巴瘤,例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL);白血病,例如急性髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病;生殖细胞癌;移植物抗宿主病(GvHD)和狼疮,特别是系统性红斑狼疮(SLE),优选霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0636] 35. 根据项目34所述的方法,其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0637] 35a. 根据项目32或33所述的方法,其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-非特指的(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

[0638] 35b. 根据项目32或33所述的方法,其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤(PTCL),包括间变性大细胞淋巴瘤(ALCL);或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤(pcALCL)。

[0639] 36. 根据项目32至35b中任一项所述的方法,其中ADC以14mg/kg、12mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg或1mg/kg的剂量施用;或以2-6mg/kg的剂量施用。

[0640] 37. 一种治疗与CD30过表达相关的疾病的方法,其包括将有效量的根据项目22所述的药物组合物施用到有需要的受试者或患者。

[0641] 38. 根据项目37所述的方法, 其中所述疾病是与CD30过表达相关的癌症。

[0642] 39. 根据项目37或38所述的方法, 其中所述疾病选自淋巴瘤, 例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、大B细胞淋巴瘤、儿科淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和肠病相关性T细胞淋巴瘤(EATL); 白血病, 例如急性髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)和肥大细胞白血病; 生殖细胞癌; 移植物抗宿主病(GvHD); 和狼疮, 特别是系统性红斑狼疮(SLE), 优选霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0643] 40. 根据项目39所述的方法, 其中所述疾病是霍奇金淋巴瘤(HL)或间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[0644] 40a. 根据项目37或38所述的方法, 其中所述疾病选自外周T细胞淋巴瘤-非特指的(PTCL-NOS)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、结外自然杀伤/T细胞淋巴瘤(ENKTCL)、肝脾和肠道 γ/δ -T细胞淋巴瘤、具有TFH表型的结外周T细胞淋巴瘤和滤泡T细胞淋巴瘤。

[0645] 40b. 根据项目37或38所述的方法, 其中所述疾病是外周T细胞淋巴瘤(PTCL), 包括间变性大细胞淋巴瘤(ALCL); 或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL), 包括原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤(pcALCL)。

[0646] 41. 根据项目37至40b中任一项所述的方法, 其中ADC以14mg/kg、12mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg或1mg/kg的剂量施用; 或以2-6mg/kg的剂量施用。

[0647] ****

[0648] 注意, 如本文所用, 单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代, 除非上下文另有明确指示。因此, 例如, 提及“一种试剂”包括一种或多种这样的不同试剂, 并且提及“该方法”包括提及本领域普通技术人员已知的等同步骤和方法, 其可以被修改或替代本文所述的方法。

[0649] 除非另有说明, 在一系列元件之前的术语“至少”应理解为是指该系列中的每个元件。本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。这些等同物也包括在本发明中。

[0650] 术语“和/或”无论在本文何处使用都包括“和”、“或”和“由所述术语连接的元件的全部或任何其它组合”的含义。

[0651] 术语“小于”或“大于”不包括具体的数字。

[0652] 例如, 小于20意味着小于所指示的数目。类似地, 大于或大于意味着大于或大于指示的数目, 例如大于80%意味着大于或大于指示的80%的数目。

[0653] 在整个说明书和随后的权利要求书中, 除非上下文另有要求, 词语“包括”及其变体如“包含”和“含有”应理解为暗示包括所述的整体或步骤或整体或步骤的组, 但不排除任何其它整体或步骤或整体或步骤的组。当在本文中使用时, 术语“包含”可以用术语“含有”或“包括”代替, 或者有时当在本文中使用时用术语“具有”代替。当在本文中使用时, “由组成”排除未指定的任何要素、步骤或成分。

[0654] 术语“包括”是指“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可互换使用。

[0655] 如本文所用, 术语“约”、“大约”或“基本上”是指在给定值或范围的20%内, 优选在15%内, 优选在10%内, 更优选在5%内。它还包括具体的数字, 即“约20”包括20的数字。

[0656] 应当理解,本发明不限于本文所述的特定方法、方案、材料、试剂和物质等,因此可以变化。本文所用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不是要限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求书限定。

[0657] 本说明书全文中引用的所有出版物(包括所有专利、专利申请、科学出版物、说明书等),无论在上文或下文中,均全文以引用方式并入本文。本文没有任何内容被解释为承认本发明无权凭借在先发明而早于这些公开。在通过引用并入的材料与本说明书矛盾或不一致的程度上,本说明书将取代任何这样的材料。

[0658] 在此引用的所有文献和专利文献的内容通过引用整体并入。

实施例

[0659] 从以下仅用于说明目的实施例,将清楚地了解本发明及其优点。这些实施例不以任何方式限制本发明的范围。

[0660] 材料和方法

[0661] 化学品、材料、试剂和溶剂

[0662] 化学品和溶剂购自Merck (Merck Group,德国)、TCI (Tokyo chemical industry CO.,LTD.,日本)和Acros Organics (Thermo Fisher Scientific,美国)、Sigma-Aldrich (Merck Group,德国)、Carl Roth (Carl Roth GmbH,德国)、Cytiva (Cytiva UK Limited,英国),并且无需进一步纯化而使用。干燥溶剂购自Acros Organics (Thermo Fisher Scientific,USA)。

[0663] TTL表达和纯化

[0664] 如前所述 (Schumacher等人 (2015), *Angewandte Chemie (Internationale)* in English), 54:13787-13791、WO 2016/066749、WO 2017/186855), 微管蛋白-酪氨酸连接酶 (TTL) 在具有N-末端His-及SUMO3溶解性标签的大肠杆菌BL21 (DE3) 中表达。在补充有卡那霉素 (kanamycin) (30 μ g/mL) 的LB培养基中,在37 $^{\circ}$ C、180rpm下进行培养,直至OD₆₀₀达到0.6-0.8。将培养物冷却至18 $^{\circ}$ C后,用0.5mM IPTG诱导细胞,并在18 $^{\circ}$ C下完成蛋白质表达18小时。

[0665] 通过离心收获培养物后,通过在补充有溶菌酶 (100 μ g/mL)、DNase (25 μ g/mL) 和PMSF (1mM) 的TTL结合缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 8.2、250mM NaCl、20mM咪唑、3mM β -巯基乙醇) 中超声处理进行裂解,然后在20,000g下进行碎片离心30分钟,并过滤上清液。

[0666] 使用5mL His-Trap HP (Cytiva) 对洗脱缓冲液 (20mM Tris/HCl pH 8.2, 250mM NaCl, 500mM咪唑, 3mM β -巯基乙醇) 采用超过4CV线性梯度,以纯化His-SUMO3-TTL。纯化的蛋白质随后在PD-10Sephadex G-25M柱 (Cytiva) 上通过交换到TTL贮存缓冲液 (20mM MOPS/KCl pH 7.4、100mM KCl、10mM MgCl₂、50mM L-精氨酸, 3mM β -巯基乙醇) 的缓冲液脱盐。将蛋白质等分试样急速冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0667] 维布妥昔Tub-tag表达和纯化

[0668] 在悬浮适应的CHO细胞中进行维布妥昔Tub-tag的重组表达。种子在化学限定的条件下生长;通过离心和随后的过滤收获不含动物组分的培养基和上清液。使用蛋白A亲和层析 (MabSelect SuRe, Cytiva) 实现纯化。将HCCF的pH调节至7.5,并用结合缓冲液 (20mM NaH₂PO₄、50mM NaCl、1mM EDTA pH 7.5) 平衡柱。根据培养物的滴度调节流速以实现在柱上的最佳停留时间。洗脱在洗脱缓冲液 (100mM柠檬酸三钠, pH 3.0) 的步骤中进行。在洗脱物

中和并将缓冲液交换到储存缓冲液 (PBS、100mM L-精氨酸) 后,将抗体以8-15mg/mL储存,2-8℃ (短期储存) 或急速冷冻并储存在-80℃ (长期储存)。

[0669] 应用TTL的维布妥昔Tub-tag偶联反应

[0670] 根据先前的出版物 (Schumacher等人 (2015), *Angewandte Chemie (Internationale)* in English, 54:13787-13791, WO 2016/066749, WO 2017/186855) 进行TTL催化连接。简言之,在由20mM MOPS/KCl、100mM KCl、10mM MgCl₂、5mM ATP、5mM 3-甲酰基-L-酪氨酸、pH 7.0组成的各种体积中,将3-甲酰基-L-酪氨酸连接到维布妥昔Tub-tag mAb。调节pH值后,加入维布妥昔Tub-tag和TTL,反应在18℃进行12小时以对抗体进行酪氨酸化作用。

[0671] 酪氨酸化维布妥昔-Tub-tag的纯化

[0672] 将粗制的酪氨酸化反应稀释以降低电导率 (<10mS/cm)。随后将混合物上样到5mL HiTrap Canto Q ImpRes柱 (Cytiva) 中。用5CV AEX结合缓冲液 (14.4mM Na₂HPO₄, 5.6mM NaH₂PO₄, pH 4.5) 和5CV 10% AEX洗脱缓冲液 (14.4mM Na₂HPO₄, 5.6mM NaH₂PO₄, 1M NaCl, pH 4.5) 洗涤柱后,以超过10CV线性梯度到50%的洗脱缓冲液来实现酪氨酸化维布妥昔Tub-tag的洗脱。用UV280方法 (NanoPhotometer NP80, IMPLN) 测量含有馏分的汇集 (pooled) 产物的蛋白质浓度。

[0673] TTL-反应后的肽连接

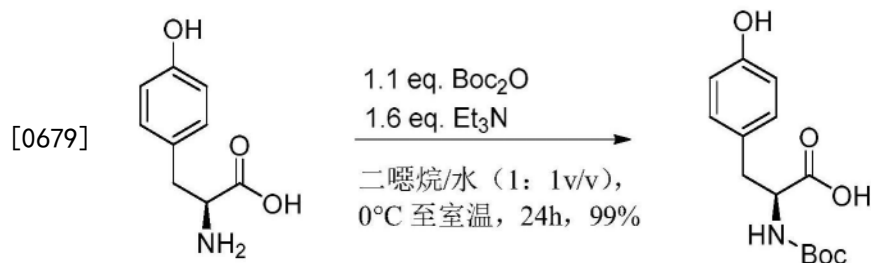
[0674] 调节通过阴离子交换层析纯化后酪氨酸化维布妥昔Tub-Tag的蛋白质浓度,并加入DMSO作为共溶剂 (2% 最终v/v)。在18℃下,用稍微过量的2 (HA-VC-PAB-MMAE) 或3 (HA-(VC-PAB-MMAE)₂) 进行肽连接,直到反应完成。有效载荷2和3的结构在方案2中描述。

[0675] 维布妥昔Tub-tag ADC的纯化

[0676] 用CEX结合缓冲液 (1-1v/v, 14.4mM Na₂HPO₄, 5.6mM NaH₂PO₄, pH 4.5) 稀释粗的肽-连接物,并将其上样到5mL HiTrap Capt S Impact柱 (Cytiva) 中。在用10CV CEX洗涤缓冲液 (14.4mM Na₂HPO₄, 5.6mM NaH₂PO₄, 0.1% Triton-x-114, pH 4.5) 和5CV CEX结合缓冲液洗涤柱之后,以超过20CV线性梯度到100%的CEX洗脱缓冲液 (14.4mM Na₂HPO₄, 5.6mM NaH₂PO₄, 1M NaCl pH 4.5) 来实现TUB-010的洗脱。将合并的级分的pH调节至7.2。经由TFF (Vivaflow 50R) 进行缓冲液交换,以配置缓冲液。

[0677] 3-甲酰基-L-酪氨酸的合成

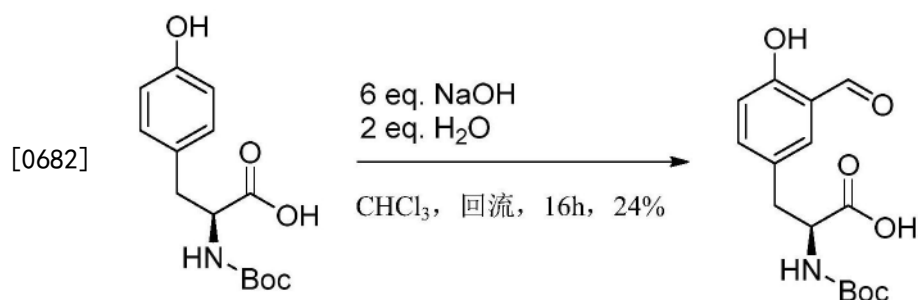
[0678] N-[(叔丁氧羰基)-L-酪氨酸



[0680] 向20g L-酪氨酸 (0.110mol, 1当量) 在300ml H₂O和300ml 1,4-二恶烷中的溶液中缓慢加入24.5ml三乙胺 (0.176mol, 1.6当量)。将反应混合物冷却至0℃,分批加入26.4g二碳酸二叔丁酯 (0.121mol, 1.1当量)。然后,使反应混合物缓慢升温至室温过夜。减压除去有机溶剂,用2N HCl将溶液酸化至pH 1。用200ml EtOAc萃取水相三次,合并有机部分,用

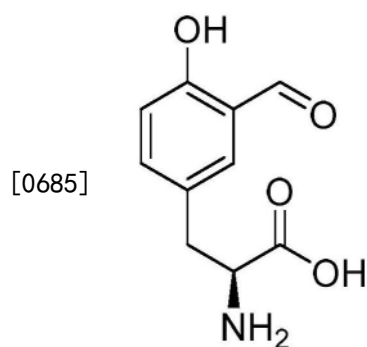
MgSO₄干燥,减压除去所有挥发物。得到所需化合物,为白色固体(30.6g,0.109mmol,99%)。分析数据与以前报道的结果一致(Schumacher等人(2015),Angewandte Chemie (Internationale d.in English),54:13787-13791)。

[0681] N-[(叔丁氧羰基)-L-甲酰酪氨酸



[0683] 向20g N-[(叔丁氧基)羰基]-L-酪氨酸(0.071mol,1当量)在300ml氯仿中的悬浮液中,分批加入2.56ml H₂O(0.142mol,2当量)和17.1mg粉末状氢氧化钠(0.427mol,6当量)。在剧烈搅拌下将反应混合物加热回流过夜。然后将混合物冷却至室温,用300ml H₂O稀释。分离有机层并弃去。用2N HCl将水层酸化至pH 1,用200ml EtOAc萃取三次。合并有机级分,用MgSO₄干燥,减压除去所有挥发物。粗产物通过硅胶柱色谱纯化(5% MeOH/CH₂Cl₂+0.5%甲酸),得到浅黄色固体。(5.26g,0.017mol,24%)。分析数据与以前报道的结果一致(Schumacher等人(2015),Angewandte Chemie(International ed.in English),54:13787-13791)。

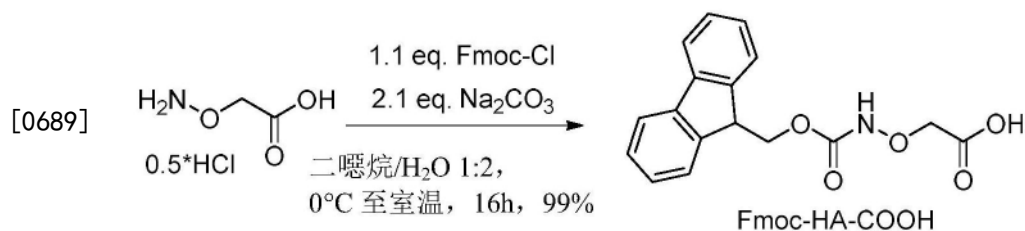
[0684] L-甲酰酪氨酸TFA盐



[0686] 将500mg N-[(叔丁氧基)羰基]-L-甲酰酪氨酸(1.616mmol,1当量)悬浮在1ml CH₂Cl₂中并冷却至0℃,加入0.1ml H₂O,然后滴加1ml三氟乙酸。将反应混合物在0℃搅拌3小时,在氮气流中除去所有挥发物,粗产物通过制备HPLC(Gilson Inc)用VP 250/32Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum柱(Macherey-Nagel GmbH)纯化,梯度如下:(A=H₂O+0.1% TFA,B=MeCN(乙腈)+0.1% TFA,流速30ml/min,5% B 0-5min,5-30% B 5-50min,99% B 50-60min。冷冻干燥后得到TFA盐,为淡黄色粉末(397mg,1.228mmol,76%)。分析数据与以前报道的结果一致(Schumacher等人(2015),Angewandte Chemie (International ed.in English),54:13787-13791)。

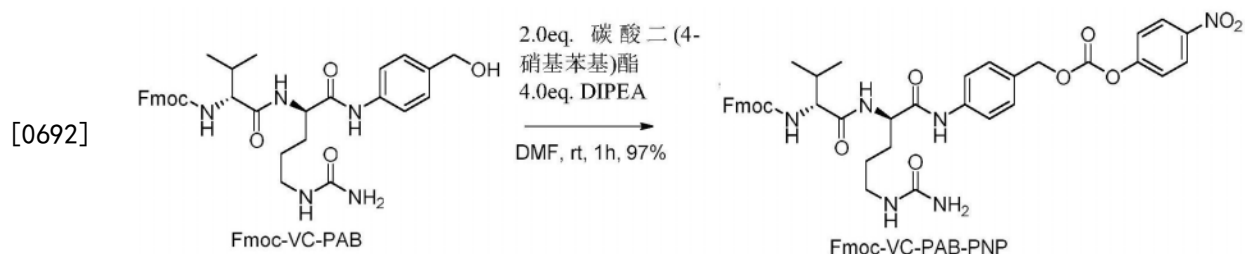
[0687] 羟胺-MMAE(HA-VC-PAB-MMAE)的合成

[0688] (Fmoc-氨基)乙酸(FMOC-HA-COOH)



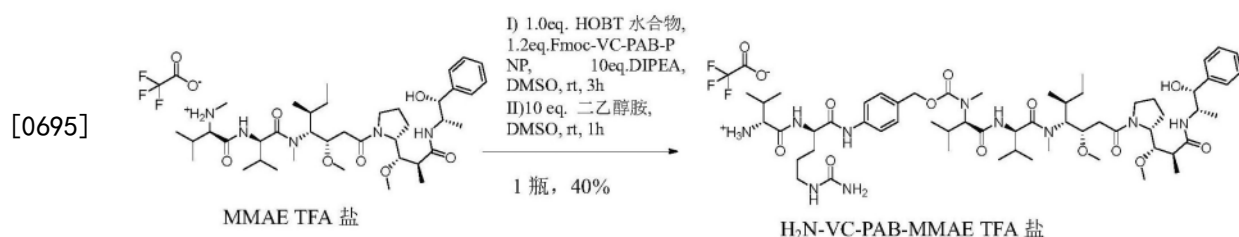
[0690] 在50ml圆底烧瓶中加入100mg (0.915mmol, 1.0当量) 0- (羧甲基) 羟胺半盐酸盐 (Sigma-Aldrich), 溶解在4ml水中, 并分批加入240mg (2.264mmol, 2.1当量) 碳酸钠。将溶液冷却到0°C, 滴加260mg (1.005mmol, 1.1当量) 茛基甲氧基羰基氯 (TCI-Chemicals) 的2ml 1, 4-二噁烷溶液, 将溶液温热到室温过夜, 减压除去二噁烷, 加入50ml水, 用2mol/l HCl酸化溶液, 用乙酸乙酯萃取水相三次, 合并的有机相用MgSO₄干燥, 减压除去所有挥发物, 得到的所需化合物为白色固体 (283mg, 99.0%), 分析数据与以前报道的结果一致 (Clavé等人 (2008), Organic&Biomolecular Chemistry, 6:3065-3078)。

[0691] Fmoc-VC-PAB-PNP



[0693] 在10ml的螺帽小瓶中加入200mg Fmoc-VC-PAB (0.333mmol, 1.0当量)、202mg碳酸二 (4-硝基苯基) 酯 (0.333mmol, 1.0当量) 和1ml DMF。加入232μl DIPEA (1.332mmol, 4.0当量), 反应物在室温下搅拌1小时, 将反应混合物倒入冰冷的二乙醚中, 离心收集滤液。将滤液再次溶解在1ml DMF中, 并用冰冷的二乙醚第二次沉淀。通过离心收集沉淀物, 真空干燥, 得到所需产物, 为黄色粉末。 (247mg, 97.0%)。分析数据与以前报道的结果一致 (WO2004010957)。

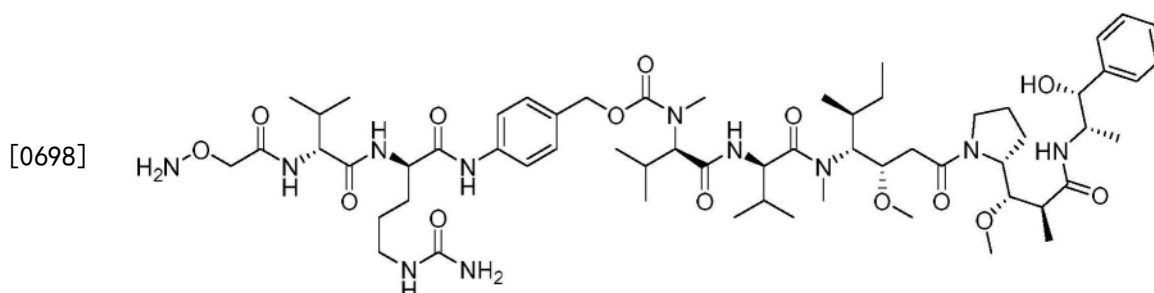
[0694] H₂N-VC-PAB-MMAE



[0696] 在10ml螺旋盖小瓶中加入60μl 1 mol/L MMAE TFA盐的DMSO溶液 (50mg, 0.06mmol, 1.0当量)、180μl 0.4 mol/L Fmoc-VC-PAB-PNP的DMSO溶液 (0.072mmol, 1.2当量) 和60μl 1 mol/L羟基苯并三唑水合物的DMSO溶液 (0.06mmol, 1.0当量)。加入105μl DIPEA (0.6mmol, 10.0当量), 将黄色溶液在室温下搅拌三小时。在通过UPLC/MS监测的MMAE原料完全消耗后, 加入120μl二乙醇胺在DMSO中的50% (w/w) 溶液, 并将黄色溶液进一步搅拌一小时。加入1.5ml乙腈和3ml水, 并通过制备HPLC (Gilson Inc) 用VP 250/32Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum柱 (Macherey-Nagel GmbH) 纯化溶液, 梯度如下: (A=H₂O+0.1% TFA, B=MeCN (乙腈) +0.1% TFA, 流速30ml/min, 30% B 0-5min, 30-60% B 5-25min, 99%

B 25-35min冷冻干燥后得到TFA盐白色粉末形式的所需产品(29.5mg,39.7%)。分析数据与以前报道的结果一致(Tang等人(2016),Organic&Biomolecular Chemistry,14(40):9501-9518)。

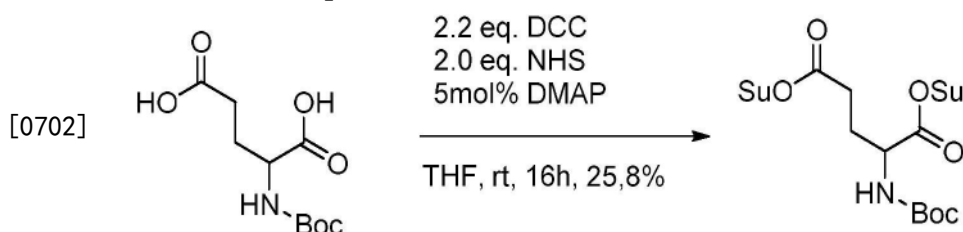
[0697] HA-VC-PAB-MMAE



[0699] 在10ml螺帽小瓶中加入23.3mg $\text{H}_2\text{N-VC-PAB-MMAE}$ (0.0188mmol,1.0当量)、38 μl 0.6mol/L Fmoc-HA-COOH的DMSO溶液(0.0226mmol,1.2当量)及38 μl 0.6mol/L Pybop的DMSO溶液(0.0226mmol,1.2当量)。加入33 μl DIPEA(0.1880mmol,10.0当量),溶液在室温下搅拌两小时。加入150 μl 150% (w/w) 二乙醇胺的DMSO溶液,将溶液进一步搅拌一小时。加入1.5ml乙腈和3ml水,并通过制备型HPLC(Gilson Inc)用VP 250/32Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum柱(Macherey-Nagel GmbH)纯化溶液,梯度如下:(A= H_2O +0.1% TFA,B=MeCN(乙腈)+0.1% TFA,流速30ml/min,30%B 0-5min,30-99% B 5-60min,99% B 60-70min。冷冻干燥后得到TFA盐,为白色粉末(20.1mg,81.6%);HR-MS测定 $\text{C}_{60}\text{H}_{98}\text{N}_{11}\text{O}_{14}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值:1196.7290,实测值:1196.7278。纯化物质的HPLC层析图请见图15。

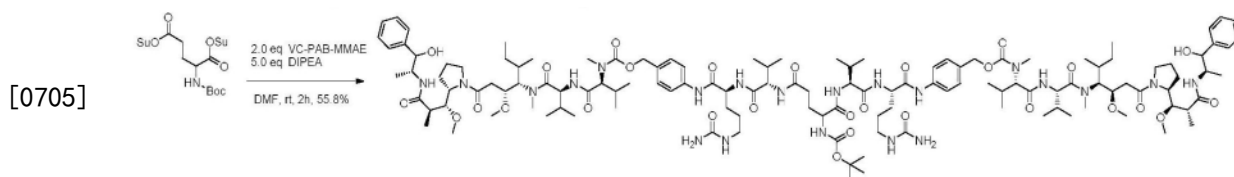
[0700] 支链MMAE羟胺(HA-(VC-PAB-MMAE)₂)的合成

[0701] BOC-Glu(OSu)₂



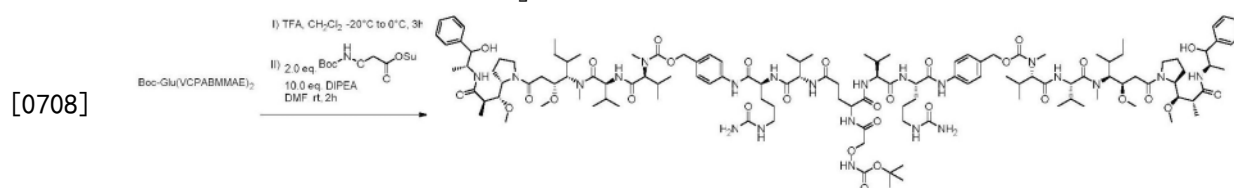
[0703] 在50mL圆底烧瓶中加入溶于20mL无水THF中的1.00g Boc-Glu-OH(4.04mmol,1.00当量)、0.93g N-羟基琥珀酰亚胺(8.08mmol,2.00当量)和25mg DMAP(0.20mmol,0.05当量)。将悬浮液冷却至0℃,滴加溶解在10mL无水THF中的1.84g二环己基碳二亚胺(8.88mmol,2.2当量)。使白色悬浮液在过夜内升温至室温。将混合物过滤,蒸发滤液,并将残余物通过硅胶快速柱色谱法纯化。得到所需产物,为无色油状物。(460mg,1.04mmol,25.8%)。分析数据与以前报道的结果一致(Koshi等人,J.Am.Chem.Soc.2008,130,1,245-251)。

[0704] Boc-Glu-(VC-PAB-MMAE)₂



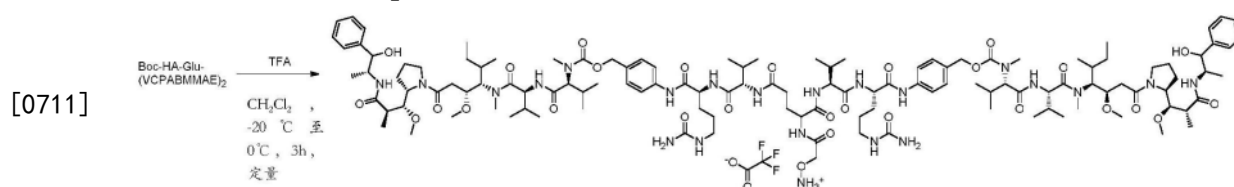
[0706] 在10ml螺帽小瓶中加入15.83mg $\text{H}_2\text{N-VC-PAB-MMAE}$ TFA盐 (0.012mmol, 2.00当量)、2.84mg Boc-Glu(OSu)_2 (0.06mmol, 1.00当量) 和150 μL DMF。加入4.5 μL DIPEA (0.0256mmol, 4.0当量), 并将该溶液在室温下搅拌两小时。加入1.5ml乙腈和3ml水, 并使用Gilson PLC 2020系统 (Gilson Inc, WI, Middleton, 美国) 经由制备型HPLC以VP 250/21Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum柱 (Macherey-Nagel GmbH&Co.Kg, 德国) 来纯化溶液, 梯度洗脱如下: (A= H_2O +0.1% TFA, B= MeCN (乙腈)+0.1% TFA, 流速10ml/min, 30% B 0-5min, 30-99% B 5-60min, 99% B 60-70min。冷冻干燥后得到白色粉末形式的所需产物 (8.84mg, 0.0036mmol, 55.8%)。HR-MS测定 $\text{C}_{126}\text{H}_{203}\text{N}_{21}\text{O}_{28}^{2+} [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 计算值: 1229, 7565, 实测值1229, 7567; 纯化物质的HPLC色谱图见图16。

[0707] $\text{Boc-HA-Glu-(VC-PAB-MMAE)}_2$



[0709] 向10ml带螺纹盖的小瓶中加入3.99mg $\text{Boc-Glu-(VC-PAB-MMAE)}_2$ (1.63 μmol , 1.00当量), 溶于100 μL CH_2Cl_2 中, 冷却至 -20°C 。滴加100 μL 三氟乙酸。在 -20°C 下3小时后, 将溶液温热至 0°C , 并在 N_2 流中除去所有挥发物。加入溶于100 μL DMF中的0.94mg Boc-HA-OSu (3.26 μmol , 2.00当量), 然后加入2.8 μL DIPEA (0.163 μmol , 10.0当量), 溶液在室温下搅拌两小时。加入1.5ml乙腈和3ml水, 并使用Gilson PLC 2020系统 (Gilson Inc, WI, Middleton, 美国) 经由制备型HPLC以VP 250/10Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum柱 (Macherey-Nagel GmbH&Co.Kg, 德国) 来纯化溶液, 梯度如下: (A= H_2O +0.1% TFA, B= MeCN (乙腈)+0.1% TFA, 流速5ml/min, 30% B 0-5min, 30-99% B 5-60min, 99% B 60-70min。冻干后得到白色粉末形式的所需产物 (2.11mg, 0.748 μmol , 46%) ; HR-MS测定 $\text{C}_{128}\text{H}_{206}\text{N}_{22}\text{O}_{30}^{2+} [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 计算值: 1266, 2647 实测值1266, 2644; 纯化物质的HPLC色谱图见图17。

[0710] $\text{HA-(VC-PAB-MMAE)}_2$



[0712] 在10ml螺帽小瓶中加入2.11mg $\text{Boc-Glu-(VC-PAB-MMAE)}_2$ (0.75 μmol), 溶解在100 μL CH_2Cl_2 中, 冷却至 -20°C , 滴加100 μL 三氟乙酸。在 -20°C 下3小时后, 将溶液温热至 0°C , 并在 N_2 流中除去所有挥发物。从50% $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ 冷冻干燥后得到所需产物, 为白色粉末。(1.90毫克, 0.748 μmol , 定量)。HR-MS测定 $\text{C}_{123}\text{H}_{198}\text{N}_{22}\text{O}_{28}^{2+} [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 计算值: 1216, 2384; 实测值: 1216, 2326。纯化物质的HPLC色谱图见图18。

[0713] 快速和薄层色谱法

[0714] 使用NORMASIL 60 $\text{\textcircled{R}}$ 硅胶40-63 μm (VWR International, USA) 进行快速柱层析。涂覆有荧光指示剂F254s的玻璃TLC板, 硅胶60W购自Merck (Merck Group, Germany)。通过用

254nm灯荧光消耗或锰染色(10g K_2CO_3 、1.5g $KMnO_4$ 、0.1g NaOH在200ml H_2O 中)然后加热,观察斑点。

[0715] 制备型HPLC

[0716] 制备型HPLC在Gilson PLC 2020系统(Gilson Inc,WI,Middleton,USA)上使用VP 250/32Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum柱(Macherey-Nagel GmbH&Co.Kg,德国)进行。使用以下梯度:方法C:(A= H_2O +0.1% TFA(三氟乙酸),B=MeCN(乙腈)+0.1% TFA,流速30ml/min,5% B 0-5min,5-90% B 5-60min,90% B 60-65min。方法D:(A= H_2O +0.1% TFA,B=MeCN++0.1% TFA),流速30ml/min,5% B 0-5min,5-25% B 5-10min,25%-45% B 10-50min,45-90% B 50-60min,90% B 60-65min。方法E:0.1% TFA,流速18ml/min,5% B 0-5min,5-90% B 5-60min,90% B 60-65min,使用VP 250/21Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum管柱(Macherey-Nagel GmbH&Co.Kg,德国)。

[0717] HR-MS

[0718] 在配备有四元溶剂管理器、Waters样品管理器-FTN、Waters PDA检测器、及Waters管柱管理器的Waters H类仪器上纪录高分辨率ESI-MS谱,该仪器具有Acquity UPLC蛋白BEH C18柱(1.7 μ m,2.1mm x 50mm)。样品以0.3mL/分钟的流速洗脱。使用以下梯度:A:0.01% FA的 H_2O 溶液;B:0.01% FA的MeCN溶液。5% B:0-1min;5至95% B:1-7min;95% B:7至8.5min。以Waters XEVO G2-XS QToF分析仪进行质量分析。

[0719] UPLC-UV/MS

[0720] 在配备有四元溶剂管理器、Waters自动进样器、Waters TUV检测器、及Waters Acquity QDa检测器的Waters H类仪器上记录UPLC-UV/MS迹线,该仪器具有Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m,2.1x 50mm RP柱,流速为0.6mL/分钟(Waters Corp.,美国)。使用以下梯度进行纯度分析:A:0.1% TFA的 H_2O 溶液;B:0.1% TFA的MeCN溶液。5% B 0-1.5min,5-95% B 1.5-11min,95% B 11-13min,5% B 13-15min。

[0721] 完整蛋白MS

[0722] 使用配备有四元溶剂管理器、Waters样品管理器-FTN、Waters PDA检测器、及Waters管柱管理器的Waters H类仪器分析完整蛋白,该仪器具有Acquity UPLC蛋白BEH C4柱(300 Å,1.7 μ m,2.1mm x 50mm)。蛋白以0.3mL/分钟的流速洗脱。使用以下梯度:A:0.01% FA的 H_2O 溶液;B:0.01%FA的MeCN溶液。5到95% B 0到6分钟。以Waters XEVO G2-XS QToF分析仪进行质量分析。以施加40kV的锥电压的正离子模式电离蛋白。以MaxEnt 1分析原始数据。

[0723] 刃天青(resazurin)测定

[0724] HL60和Karpas细胞系培养在补充有10% FCS和0.5%青霉素-链霉素的RPMI-1640中。将细胞以 5×10^3 细胞/孔的密度接种在96孔细胞培养微板中。在细胞培养基中进行ADC或抗体的1:4系列稀释,起始终浓度为3 μ g/mL,并一式两份转移至微量培养板的各孔中。平板在37℃5% CO_2 下温育96小时。随后,加入刃天青至终浓度50 μ M,随后在37℃,5% CO_2 下温育3-4小时。在Tecan Infinite M1000微平板读数器上通过试卤灵(resorufin)的荧光信号($\lambda_{EX}=560$ nm和 $\lambda_{EM}=590$ nm)来定量刃天青至试卤灵的代谢转化。从一式两份计算平均值和标准偏差,对未处理的对照标准化并对手抗体浓度作图。用MatLab R2016软件进行数据分析。

[0725] 通过A-SEC对ADC进行表征和稳定性评估

[0726] 将ADC调节至在PBS (Dulbecco磷酸盐缓冲生理盐水, Sigma-Aldrich Merck KGaA) 中的1mg/mL的蛋白质浓度, 并过滤除菌 (Ultrafree-MC Centrifugal filter units, Merck Millipore)。样品在4-8℃、37℃和40℃下储存长达14天。对于在高温下储存的样品, 确保没有冷凝物形成。在通过A-SEC分析之前, 将样品在4℃、4000×g下离心4分钟。

[0727] 体内异种移植模型

[0728] 体内功效实验根据动物福利法进行并得到地方当局批准。简言之, 在第0天将Karpas 299细胞皮下注射到CB 17-Scid小鼠中。当肿瘤达到一定的平均肿瘤体积时开始治疗。在小鼠随机分成治疗组和对照组后, 以静脉内注射的形式施用ADC。在整个研究中记录肿瘤体积、体重和一般健康状况。

[0729] 药物动力学分析

[0730] 根据动物福利法进行实验, 并得到地方当局的批准。在第1天, 通过单次静脉内 (快速注射) 注射将试验项目施用于Sprague Dawley大鼠。为了进行生物分析, 在各个时间点通过目标体积为1mL的颈静脉收集血液, 收集时间长达504小时。将样品在室温下保持至少1小时以允许凝结。将样品在1500g、4℃下离心10分钟。将所得血清保存在-20℃下, 使用Phoenix (WinNonlin) 药代动力学软件1.4 (Certara, 6.4) 计算PK参数, 使用与静脉内 (快速注射) 给药途径一致的非隔室方法, 采取体内形成曲线方法 (血管外) 用于游离有效载荷。

[0731] 重复剂量毒性研究

[0732] 根据动物福利法进行实验, 并得到地方当局的批准。雄性和雌性Sprague Dawley大鼠 (10只/性别/组) 每周 (第1、8、15和22天) 用对照 (媒介物)、维布妥昔Tub-tag ADC (10mg/kg) 或维布妥昔vedotin (10mg/kg) 给药, 主要给药期在第26天进行尸检 (5只/性别/组), 恢复期在第51天进行尸检 (5只/性别/组)。在整个研究中每天测定临床观察、体重和食物消耗。在每次给药前、每次给药后15分钟和在尸检时从每只动物获得药代动力学样品。将所有动物尸体解剖, 称重器官并保留在固定剂中。临床病理学 (血液学、临床化学和凝固终点) 也在尸检时采集样品。

[0733] 实施例1: 用于治疗CD30+适应症的维布妥昔Tub-tagADC

[0734] Tub-tag技术利用天然 α -微管蛋白衍生肽, 其是高度极性的并且充当微管蛋白酪氨酸连接酶 (TTL) 的识别序列, 即, 是本公开内容含义内的微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列。

[0735] TTL识别短的亲水肽标签 (tub-tag) 并催化与酪氨酸衍生物及类氨基酸结构单元形成肽键。在此, 发明人证明, Tub-tag技术可用于将有效载荷偶联至抗体维布妥昔 (cAC10), 促进CD30结合ADC, 就稳定性、功效和毒理学而言, 其令人惊讶地胜过批准的基于维布妥昔的ADC维布妥昔vedotin。

[0736] 图22示出通过Tubulis专有的**Tub-tag[®]** (“TTL识别序列”) 技术, 使药物部分经由连接子 (有效载荷) 与单克隆抗体 (诸如维布妥昔) 进行位点特异性融合。TTL: 微管蛋白酪氨酸连接酶。

[0737] 本发明人通过如下开启他们的研究: 将微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列 (在核酸水平上) 融合到单克隆抗体cAC10 (融合到图23中示例性示出的轻链维布妥昔Tub-tag) 的轻链 (轻链SEQ ID NO:11, 重链: SEQ ID NO:1)、重链 (轻链SEQ ID NO:2, 重链: SEQ ID NO:12) 或轻链和重链 (轻链SEQ ID NO:11, 重链: SEQ ID NO:12), 任选地与排列在微管蛋白酪

胺酸连接酶的识别序列和相应抗体链之间的Gly4Ser胺基酸连接符的序列融合。

[0738] 图23示出用于ADC制造的化学酶偶联。(蓝色)Tub-tag识别序列,(黑色)酪氨酸衍生物,(黄色)具有生物正交手柄的有效载荷。可以将Tub-tag置于轻链和/或重链,使得能够药物对抗体的比率(DAR)范围为2到8的均质ADC,这取决于所用Tub-tag的数目。还描述了有效载荷2和3。

[0739] 使用已建立的细胞培养方法重组表达这些维布妥昔变体,随后用蛋白A层析成功纯化。用尺寸排阻层析(SEC)分析显示,Tub-tag抗体的纯度极好,并且仅观察到最小量的高分子量物质(HMWS)(HMWS=1.5-7%)。结果如图1所示,这些结果显示抗体在表达和纯化后是高度单体的。如图1B中所示,Tub-tag识别序列与维布妥昔重链的连接导致高分子量物质从11%降低到仅1.5%,即降低10倍。

[0740] 图1A示出在蛋白A层析(PAC)后未经修饰的维布妥昔的尺寸排阻层析图,其在本文中也仅表示为“维布妥昔”。“HMWC”代表“高分子量组分”。

[0741] 图1B示出在蛋白A层析(PAC)后包含与重链(轻链:SEQ ID NO:2,重链:SEQ ID NO:12)融合的TTL识别序列(Tub-tag)的维布妥昔的尺寸排阻层析图,其在本文中也表示为“Bren.HC-tub”。

[0742] 图1C示出在蛋白A层析(PAC)后维布妥昔的尺寸排阻层析图,该尺寸排阻层析图包含与轻链(轻链:SEQ ID NO:11,重链:SEQ ID NO:1)融合的TTL识别序列(Tub-tag),其在本文中也表示为“Bren.LC-Tub”。

[0743] 图1D示出在蛋白A层析(PAC)后维布妥昔的尺寸排阻层析图,该尺寸排阻层析图包含与轻链及重链(轻链:SEQ ID NO:11,重链:SEQ ID NO:12)融合的TTL识别序列(Tub-tag),其在本文中也表示为“Bren.LCHC-Tub”。

[0744] 在显示了在维布妥昔的轻链、重链或所有重链和轻链的C末端包含微管蛋白酪氨酸连接酶的识别序列(“Tub-tag变体”或“维布妥昔Tub-tag”)的维布妥昔的可制造性之后,发明人通过亲水性相互作用色谱(HIC)确定保留时间,其是疏水性的常用量度。该研究揭示了所有Tub-Tag变体与未修饰的cAC10(维布妥昔)相比具有更高的亲水性和表面极性(图2A)。

[0745] 图2A示出维布妥昔(黑色),Bren.LC-Tub(灰色,虚线)、Bren.HC-Tub(灰色)和Bren.LCHC-Tub(黑色,虚线)的分析性疏水相互作用色谱图。色谱图示出在220nm处记录的归一化吸收光谱。保留时间是疏水性的量度。疏水相互作用色谱图中的较长保留时间表明较大的疏水性。较短的保留时间表示较大的亲水性。

[0746] 由于抗体骨架的改变可导致结构和稳定性的扰动,因此用差示扫描荧光法(DSF)测量维布妥昔和Tub-tag变体的熔点(T_m)。这些实验证实,Tub-tag变体具有与未修饰mAb相同的熔点($T_m=70.9-71.8^{\circ}\text{C}$),因此具有相同的抗热应激稳定性($T_m=71.0^{\circ}\text{C}$)(图2B)。

[0747] 图2B示出用于测定维布妥昔、Bren.LC-Tub、Bren.HC-Tub、及Bren.LCHC-Tub熔点(T_m)的差示扫描荧光测定曲线。

[0748] 本发明人测试了不同的酪氨酸衍生物对Tub-tag-抗体的酶修饰,而3-甲酰基-L-酪氨酸被证明是ADC生产的最佳选择。简言之,本发明人将不同的维布妥昔Tub-tag变体与TTL一起孵育,以将3-甲酰基-L-酪氨酸共价连接至Tub-tag的末端谷氨酸残基。特别地,3-甲酰基-L-酪氨酸的氨基被连接到Tub-tag的C-末端。然后,用蛋白A层析或阴离子交换层析

(AEX)除去过量的3-L-甲酰基-酪氨酸和残余TTL。随后,通过生物正交反应使连接子-有效载荷(“连接子-药物部分”)共价连接。用阳离子交换层析(CEX)纯化所得ADC,以除去过量的连接子有效载荷,并改善ADC的纯度。该方法的最后一步包括通过切向流过滤(TFF)和无菌过滤的配制。为了产生药物与抗体之比(DAR)为2的ADC,我们应用线性有效载荷2(如图23中示出,如说明书及权利要求中限定的与MMAE偶联的“结构4”)。为了制造DAR为4的ADC,我们应用支化有效载荷3(如图23中示出,如说明书及权利要求中限定的与MMAE偶联的“结构5”)。特别地,有效载荷2和有效载荷3的H₂N-O-部分与结合到TTL识别序列的3-甲酰基-L-酪氨酸的甲酰基反应,得到具有-C=N-O-结构的脒。该方法得到纯的、均质的ADC,并且例如通过SEC、HIC(图3)和中间MS(图4)控制质量,显示了优异的纯度和均质性。

[0749] 制备下列ADC,并在实施例中进行进一步研究(有效载荷2和3示于图23):

ADC	维布妥昔轻链	维布妥昔重链	非天然胺基酸	有效载荷	药物对抗体的比率(DAR)
Bren. HC-2	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12	3-甲酰基-L-酪氨酸	有效载荷 2	2
		(包含 TTL 识别序列)			
[0750] Bren. LC-2	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 1	3-甲酰基-L-酪氨酸	有效载荷 2	2
		(包含 TTL 识别序列)			
Bren. LCHC-2	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	3-甲酰基-L-酪氨酸	有效载荷 2	4
Bren. LC-3	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 1	3-甲酰基-L-酪氨酸	有效载荷 3	4

[0751] 图3示出通过SEC(图3A至C)和HIC(图3D至F)的维布妥昔Tub-tag ADC的分析。图3A及3D示出Bren.HC-vc-PAB-MMAE DAR2(本文也称作Bren.HC-2)的结果,图3B及3E示出Bren.LC-vc-PAB-MMAE DAR2(本文也称作Bren.LC-2)的结果,且图3C及3F示出Bren.LCHC-vc-PAB-MMAE DAR4(本文也称作Bren.LCHC-2)的结果。每种维布妥昔变体都用PAC表达、纯化,并与有效载荷2偶联产生DAR 2,与有效载荷2或有效载荷3偶联产生DAR 4ADC。在用HIC和缓冲液交换进行最终抛光后,根据聚集体含量和DAR均匀性分析Tub-tagADC。所有Tub-tag ADC含有非常低含量的HMWS(<1%)并显示出优异的DAR均匀性。

[0752] 图4示出脱糖基化后通过中上蛋白质MS对维布妥昔Tub-Tag ADC的分析,显示了去卷积谱。图4A示出Bren.HC-Tub的结果;图4B示出Bren.LCHC-Tub的结果;图4C示出Bren-LC-Tub的结果;图4D示出Bren.HC-vc-PAB-MMAE(本文也称为“Bren.HC-2”)的结果;图4E示出Bren-LCHC-vc-PAB-MMAE(本文也称为“Bren.LCHC-2”)的结果;且图4F示出Bren.LC-2(vc-

PAB-MMAE) (本文也称为“Bren.LC-3”)的结果。1369m/z的质量位移是由于掺入3-甲酰基-L-酪氨酸且与有效载荷2的连接所导致。在与有效载荷3连接后,观察到2604m/z的质量差。这些结果与计算值一致。

[0753] 在与抗体偶联之前,分析有效载荷2和3对蛋白酶组织蛋白酶B切割的敏感性(图5)。结果表明,有效载荷2和3被组织蛋白酶B切割,释放出游离药物单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

[0754] 图5示出在图5A中在用蛋白酶组织蛋白酶B(每个vc部分1:1000)消化反应期间,含缬氨酸-瓜氨酸(vc)的有效载荷2的RP-HPLC分析。在分析前,用E-64终止反应,在220nm处记录150分钟反应时间后的色谱图。图5B的图曲线显示在与组织蛋白酶B反应期间,游离MMAE随时间的增加(黑色)及有效载荷2的减少(灰色,圆圈)。图5C示出有效载荷3的切割。在有效载荷3与组织蛋白酶B反应期间,形成含有一个MMAE部分的中间体(灰色,三角形)。

[0755] 实施例2:ADC的体外稳定性

[0756] 为了阐明实施例1中所述的维布妥昔ADC的稳定性,本发明人基于荧光染料SYPRO Orange进行了热应力测试。DSF实验阐明,维布妥昔Tub-tag ADC具有与相应mAb相似的熔点(维布妥昔 $T_m=71.0^{\circ}\text{C}$,维布妥昔Tub-tag ADC $T_m=70.9-72.9^{\circ}\text{C}$)。这说明了维布妥昔Tub-tag ADC的类抗体稳定性。用于比较的维布妥昔vedotin(维布妥昔多汀)显示 68.5°C 的较低熔点,并且熔融曲线覆盖较高温范围。此外,在缓冲液和小鼠血浆中进行ADC的稳定性研究。通过SEC分离缓冲液中储存的样品,以分析HMWS(高分子量物质)的形成。在 4°C 下储存两周后,没有观察到色谱图的显著变化。然而,在升高温度的储存期间,差异变得明显。根据制造商的指导溶解维布妥昔多汀之后,测定HMWS为0.74%。在 40°C 储存14天期间,该值增加到11.44%,代表HMWS增加了15.5倍。与这些值相比,测得维布妥昔Tub-tag ADC非常稳定, HMWS含量增加1.0-5.0倍(图6A)。尽管维布妥昔单抗LC-3DAR_{av} 4含有与维布妥昔多汀(DAR_{av} 4)相同的药物载量,并因此表征为有效载荷引起的高疏水性,但测量到HMWS含量的低增加。在以DAR_{av} 4制造Tub-tag ADC Bren.LC-3后,测得HMWS为0.47%。在 40°C 下储存期间,仅观察到HMWS少量增加至2.34%。(图6C,为了比较,图6B中示出维布妥昔多汀的结果)。

[0757] 图6示出了在高温下维布妥昔多汀和维布妥昔Tub-tag ADC的储存结果。图6A显示了在Bren研究过程中HMWS的增加(Bren.

[0758] LC-2(vc-PAB-MMAE) (本文也称为“Bren.LC-3”); Bren.

[0759] LC-vc-PAB-MMAE(本文也称为“Bren.LC-2”); Bren.HC-vc-PAB-MMAE(本文也称为“Bren.HC-2”);以及维布妥昔多汀。可以看到维布妥昔多汀聚集体含量增加最高。相比之下,Tub-tag ADC的HMWS含量几乎保持恒定。图6B和6C显示SEC色谱图,其显示在220nm处记录的维布妥昔多汀(平均药物与抗体比率(DAR_{av}) 4)和与有效载荷3偶联的Bren.LC (Bren.LC-3,DAR_{av} 4)在220nm处记录的归一化吸收光谱。

[0760] 此外,已在小鼠血浆中评价维布妥昔Tub-tag ADC的稳定性,显示Tub-tag ADC的优异稳定性。相反,维布妥昔多汀被迅速分解(图7,表1)。最近已经显示马来酰亚胺连接的ADC如维布妥昔多汀的快速分解,逆迈克尔加成可能是我们观察到的一种解释。

[0761] 表1:在 37°C 下,将维布妥昔多汀和维布妥昔Tub-tag ADC在小鼠血浆中储存7天。

	ADC	血浆培养前的 DAR	血浆培养后的 $DAR_{av, n=2}$	有效载荷损失 [%]
[0762]	Bren. HC-2	2	1.8	10
	Bren. LC-2	2	1.8	10
	Bren. LCHC-2	3.8	3.63	5
[0763]	Bren. LC-3	4	3.59	10
	维布妥昔多汀	4.02	1.53	62

[0764] 图7示出与维布妥昔多汀相比,维布妥昔Tub-tag ADC在小鼠血浆中的稳定性的示例性说明。图7A和7B显示在小鼠血浆中在37℃下保存维布妥昔多汀的结果。图7C和7D示出在小鼠血浆中在37℃下储存Bren.LC-3DAR 4的结果。

[0765] 实施例3:ADC的体外效力

[0766] 然后,本发明人在基于细胞的活力测定中评价了维布妥昔Tub-tag ADC的体外效力,并将结果与维布妥昔多汀进行比较。过表达CD30的细胞系Karpas299以及CD30阴性细胞系HL60用于该刃天青测定(图8)。在抗原阳性细胞系Karpas299中测定的维布妥昔多汀的 IC_{50} 值($IC_{50}=2.08$)与文献数据一致。总之,维布妥昔Tub-tag的ADC显示低 IC_{50} 值和良好的体外效力(表2)。

[0767] 表2:通过刃天青测定确定维布妥昔多汀和维布妥昔Tub-tag ADC的 IC_{50} 值。

[0768]	ADC	IC_{50} Karpas299细胞
	Bren.HC-2	5.24n=1*2
	Bren.LC-2	5.63n=4*2
	Bren.LCHC-2	1.70n=2*2
	Bren.LC-3	1.06n=5*2
	维布妥昔多汀	2.08n=5*2

[0769] 图8显示了维布妥昔Tub-tag ADC在过表达CD30的细胞系Karpas299和CD30阴性细胞系HL60中的体外效力。

[0770] 实施例4:维布妥昔Tub-tag ADC的体内功效

[0771] 在免疫缺陷CB17-SCID小鼠中,用Karpas299衍生的肿瘤模型评价维布妥昔Tub-tag ADC的体内功效。如图9和10中所示,Bren.LC-2显示出与维布妥昔多汀类似的出乎意料的高的体内功效。尽管维布妥昔LC-2具有一半的载药量,因为与偶联至4个MMAE分子的维布妥昔多汀相比,其是DAR 2MMAE ADC,但仍进行了观察。此外,出乎意料的是,Bren.LC-3显著胜过维布妥昔多汀的体内功效,其存活中位数增加2.5倍(图11)。

[0772] 图9示出以肿瘤体积(cm^3)表示的Bren.LC-2的体内功效。为了评估Bren.LC-2的体内功效,肿瘤体积在100到150 mm^3 之间的小鼠被随机分配,并在肿瘤移植后第7天及第10天两次注射1.5mg/kg进行治疗。

[0773] 图10示出Bren.LC-2的体内功效,以肿瘤体积(cm^3)及治疗动物的存活百分比表示(卡普兰-麦尔图)。为了评估Bren.LC-2的体内功效,肿瘤体积在100到150 mm^3 之间的小鼠被

随机分配,并以单次注射1.0mg/kg进行治疗。

[0774] 图11示出Bren.LC-3的体内功效,以肿瘤体积(cm^3)及治疗动物的存活百分比表示。为了评估Bren.LC-3的体内功效,肿瘤体积在100到150 mm^3 之间的小鼠被随机分配,并在肿瘤移植后第8天及第11天两次注射0.5mg/kg进行治疗。

[0775] 实施例5:维布妥昔Tub-tag ADC的药代动力学

[0776] 维布妥昔Tub-tag ADC具有高活体外稳定性及优异活体内功效的特点,在这一惊人发现的激励下,本发明人希望阐明体外稳定性是否转化为活的生物体,并在Sprague Dawley大鼠中进行药物动力学分析。在第1天通过单次静脉内(推注)注射对动物施用测试项目。为了分析ADC随时间的含量,已经开发基于ELISA的测定法来检测抗体和完整的ADC(通过测量与抗体连接的有效载荷)。总抗体测定递送关于抗体清除的有用信息,并且与完整ADC测定相比的检测差异可以解释抗体的有效载荷损失。此外,本发明人开发了一种基于MS的测定,其便于确定有效载荷损失和有效载荷转移至血液蛋白。研究显示,维布妥昔Tub-tag ADC具有优异的体内稳定性(图12A)。此外,与维布妥昔多汀相反,维布妥昔Tub-tag ADC不具有能够使有效载荷转移并共价连接至血液蛋白的特点(图12B)。

[0777] 图12显示了维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)的药代动力学(PK)分析。在图12A中,示出了与布鲁西多汀相比完整ADC的量。在图12B中,显示通过MS-analysis分析的转移MMAE到血液蛋白的量。

[0778] 实施例6:TUB-010的重复剂量毒性研究

[0779] 迄今为止,已经表明维布妥昔Tub-tag ADC具有增加体内功效和稳定性的特点。因此,本发明人想知道增加体内稳定性是否导致维布妥昔Tub-tag ADC的有益毒理学曲线。这是有利的,因为改善的毒理学特性与改善的功效的组合可以导致显著拓宽的治疗窗,并因此导致用于治疗患者的强烈优势。因此,本发明人评价维布妥昔Tub-Tag ADC在Sprague Dawley雄性和雌性大鼠中的毒性和毒性动力学,并将该曲线与维布妥昔多汀的曲线进行了比较。雄性和雌性Sprague Dawley大鼠每周(第1、8、15和22天)用对照(媒介物)、维布妥昔Tub-tag ADC(Bren LC-2)(10mg/kg)或维布妥昔多汀(10mg/kg)给药,其中主给药期尸检在第26天(5/性别/组),并且恢复期尸检在第51天(5/性别/组)。在整个研究中每天测定临床观察、体重和食物消耗。在每次给药前、每次给药后15分钟和在尸检时从每只动物获得药代动力学样品。将所有动物尸体解剖,称重器官并保留在固定剂中。临床病理学(血液学、临床化学和凝血终点)样品也在尸检时采集。完整ADC和总抗体的平均血清浓度显示于图13中,该图清楚地证明用Bren LC-2给药在重复给药后导致体内合理水平的血清浓度。完整ADC和Bren LC-2的总抗体之间的高度重叠再次突出构建体在体内的优异稳定性,并使其与维布妥昔多汀组区分开来。

[0780] 图13显示与维布妥昔多汀相比,在第1、8、15和22天以10mg/kg静脉内(推注)施用维布妥昔Tub-tag ADC后,雄性和雌性大鼠中完整ADC和总抗体的平均血清浓度。

[0781] 与维布妥昔多汀相反,用维布妥昔Tub-tag ADC(Bren LC-2)未观察到对红细胞群体的影响。这可以抵消在临床实践中用维布妥昔多汀观察到的贫血(和潜在的血小板减少症)。预期的MMAE驱动的睾丸变化在Bren LC-2和维布妥昔多汀中都观察到,但是在Bren LC-2中发生延迟,其中维布妥昔Tub-tag ADC的稳定性可能在睾丸毒性的延迟发生中起作用。Bren.LC-2的示例性毒性特征示于图14中。

[0782] 图14显示与维布妥昔多汀(右柱)相比,在雄性和雌性大鼠中维布妥昔Tub-tag ADC(Bren LC-2)(左柱)的示例性毒性特征。图14中描述的维布妥昔Tub-tag ADC Bren LC-2的参数是以计数/微升为单位的网织红细胞(RET,以K/ μ L为单位)、以百万/微升为单位的红细胞(RBC,以M/ μ L为单位)、以计数/微升为单位的血红蛋白(Hb,以M/ μ L为单位)、血细胞比容体积百分比(HTC,以%为单位)、以计数/微升为单位的嗜酸性粒细胞(EOS,以K/ μ L为单位)、活化部分凝血酶原激酶时间(APPT)(以秒为单位)、以毫摩尔/升为单位的葡萄糖水平(以mmol/L为单位)、胸腺重量(以g为单位)和睾丸重量(以g为单位)。作为参考,大鼠用对照(载体)给药(数据未显示)。

[0783] 特别地,图14示出:

[0784] 网织红细胞:用维布妥昔多汀处理对网织红细胞计数具有显著影响,而在用维布妥昔Tub-tag ADC处理下未观察到影响。因此,与用维布妥昔多汀治疗(与红细胞、血红蛋白和血细胞比容数据一致)相比,预期用维布妥昔Tub-tag ADC治疗在临床上导致更少的贫血。

[0785] 红细胞:用维布妥昔多汀处理对红细胞计数具有显著影响,而在用维布妥昔Tub-tag ADC处理下未观察到显著作用。因此,与用维布妥昔多汀(与网织红细胞、血红蛋白和血细胞比容数据一致)治疗相比,预期用维布妥昔Tub-tag ADC治疗在临床上导致更少的贫血。

[0786] 血红蛋白:用维布妥昔多汀治疗会降低血红蛋白水平(主要在男性中),而在用维布妥昔Tub-tag ADC治疗下未观察到显著的作用。因此,与用维布妥昔多汀(与红细胞、网织红细胞和血细胞比容数据一致)治疗相比,预期维布妥昔Tub-tag ADC治疗在临床上导致更少的贫血。

[0787] 血细胞比容:用维布妥昔多汀处理会降低血细胞比容(主要在男性中),而在用维布妥昔Tub-tag ADC处理下未观察到显著作用。因此,与使用维布妥昔多汀(与红细胞、血红蛋白和网织红细胞数据一致)治疗相比,预期使用维布妥昔Tub-tag ADC治疗在临床上导致更少的贫血。

[0788] 嗜酸性粒细胞:与用维布妥昔Tub-tag ADC的处理相比,用维布妥昔多汀的处理导致较低的嗜酸性粒细胞计数。假定这是对白细胞的普遍效应,与用维布妥昔多汀治疗相比,用维布妥昔Tub-tag ADC治疗预期在临床上导致较少的中性白细胞减少。

[0789] APTT:与用维布妥昔Tub-tag ADC的处理相比,用维布妥昔多汀的处理导致更低的APTT值。由于维布妥昔多汀在临床上对凝血时间/APTT没有任何影响,因此鉴于所提供的数据,也预期维布妥昔Tub-tag ADC不会引起关于凝血时间的任何问题。

[0790] 葡萄糖:与用维布妥昔Tub-tag ADC的治疗相比,用维布妥昔多汀的治疗导致更高水平的葡萄糖。因此,与用维布妥昔多汀治疗相比,用维布妥昔Tub-tag ADC治疗导致较低的葡萄糖水平。因此,使用维布妥昔Tub-tag ADC的治疗较少预期导致高血糖,这在临床上使用维布妥昔多汀治疗时已经观察到。

[0791] 胸腺:与用维布妥昔Tub-tag ADC的治疗相比,用维布妥昔多汀的治疗导致更低的胸腺重量。在用包含MMAE的ADC处理下观察到的胸腺重量变化是典型的靶无关/与游离毒素的相关毒性,其由MMAE引起的细胞耗尽所致。因此,与维布妥昔多汀相比,预期维布妥昔Tub-tag ADC在较少的靶无关/与游离MMAE相关的毒性方面具有更有利的临床安全性特征。

[0792] 睾丸:与用维布妥昔Tub-tag ADC的治疗相比,用维布妥昔多汀的治疗导致睾丸重量降低。在用包含MMAE的ADC治疗下观察到的睾丸重量变化是典型的靶无关/与游离毒素相关的毒性。因此,与维布妥昔多汀相比,维布妥昔Tub-tag ADC预期在较少的靶无关/与游离MMAE相关的毒性方面具有更有利的临床安全性特征。

[0793] 总之,提供的数据显示与大鼠中的维布妥昔多汀相比,维布妥昔Tub-tag ADC具有更好的安全性。因此,在临床上,维布妥昔Tub-tagADC不太可能导致维布妥昔多汀的特定剂量限制性毒性,包括贫血、中性粒细胞减少症和高血糖症。对于维布妥昔Tub-tag ADC,缺乏与维布妥昔多汀相关的靶无关/与游离毒素相关的毒性,也可抵消在许多包含MMAE的ADC(包括维布妥昔多汀)中所见的周边神经病变等特性变化。

[0794] 实施例7:维布妥昔Tub-tag MMAE在食蟹猴中的重复剂量毒性研究

[0795] 接着,在食蟹猴中评价维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)的毒性。本研究的目的是评价维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)在食蟹猴中的毒性和毒性动力学(TK)。以6、12和15mg/kg(6mg/kg为Q3Wx4,12和15mg/kg为Q3 Wx2)施用维布妥昔Tub-tag ADC。在整个研究中评价临床状况(包括体重、食物消耗和临床观察)、临床病理学和免疫表型(T、B和NK细胞),频繁取样用于TK和抗药物抗体测定。所有动物都进行全面尸体剖检,详细肉眼观察。维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)在6、12和15mg/kg下在临床上良好耐受,对体重没有影响。基于FDA PharmTox审查,食蟹猴对6mg/kg Adcetris的耐受性差(MTD为3mg/kg),在第一次给药后11至15天死亡并早期安乐死。相反,在该研究中对于维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)没有观察到死亡率和宏观或严重的显微发现。对于维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)在12和15mg/kg时,已经注意到红细胞、血红蛋白和中性白细胞的减少,这与用Adcetris在3mg/kg时观察到的那些相对一致(历史数据)。此外,如图19所示,维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)在毒药动力学分析中具有高稳定性的特点。

[0796] 为了分析食蟹猴血清中ADC含量随时间的变化,开发了基于ELISA的测定,检测抗体和完整ADC含量(通过测量与抗体连接的有效载荷;在大鼠的药代动力学和重复剂量毒性研究中使用相同的ELISA测定设置,区别在于该测定已进一步验证可用于食蟹猴血清)。总抗体测定提供关于抗体清除的有用信息,且与完整ADC测定相比的检测差异可以解释抗体的有效载荷损失。图19中完整ADC和总mAb曲线的高度重叠显示维布妥昔Tub-tag MMAE的有效载荷损失最小和ADC稳定性高。

[0797] 图19显示给药12&15mg/kg的食蟹猴中的维布妥昔Tub-tag MMAE(即Bren LC-2)的毒动力学分析。通过ELISA测定mAb和完整ADC的总量。完整ADC和总mAb曲线的高度重叠显示两剂量水平下维布妥昔Tub-tag MMAE的高稳定性。在维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)的重复剂量研究期间,监测食蟹猴的体重和不同血液值,即淋巴细胞、中性粒细胞和白细胞的浓度。

[0798] 图20显示在食蟹猴中在维布妥昔Tub-tag MMAE(即Bren LC-2)的重复剂量研究中收集的体重和不同血液值的选择获得的值。更详细地,图20左侧的上图显示出随着时间变化的体重。图20右侧的上图显示淋巴细胞浓度随时间的变化。图20左侧的下图显示随时间变化的中性粒细胞浓度。图20右侧的下图显示白细胞随时间的浓度。在每种情况下,数据显示为三组两只雌性动物重复给予6、12和15mg/kg维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)的平均值和误差,与FDA报告“Clinical Pharmacology And Biopharmaceutics Review(s) (申请

号:1253880rig1S00)”(可购自https://www.accessdata.fda.gov/DrugsatFDA_FDA/NDA/2011/1253880rig1S000_Clincaprmpdf)中所述的维布妥昔多汀(Adcetris)的毒性研究结果进行比较。体重以千克表示,淋巴细胞以十亿/升表示,中性粒细胞以十亿/升表示,白细胞以十亿/升表示。

[0799] 临床上维布妥昔多汀的剂量限制毒性之一是中性粒细胞减少症。图20中左下图所示的数据组显示,与维布妥昔多汀直接相比,即使施用两倍(6mg/kg)、四倍(12mg/kg)和五倍(15mg/kg)维布妥昔多汀剂量(3mg/kg),维布妥昔Tub-tag MMAE(Bren LC-2)有利地不引起中性粒细胞的更高量的减少。此外,观察到体重增加(图20左侧上图)。没有测定到淋巴细胞浓度和白细胞浓度的显著变化。(图20右侧上图和右侧下图)。

[0800] 观察到的嗜中性粒细胞浓度、在整个研究中所有动物的体重增加和白细胞和淋巴细胞浓度无显著变化的组合,清楚地显示本公开内容的ACD具有良好的耐受性,其超过维布妥昔多汀的耐受性。因此,数据清楚地表明在临床中良好的耐受性,其超过维布妥昔多汀的耐受性。

[0801] 总之,所呈现的结果显示,维布妥昔Tub-tag ADC的特点在于出乎意料的体外和体内高稳定性,其转化为优异的体内功效和毒理学曲线。

序列表

- <110> 路德维希-马克西米利安慕尼黑大学
 柏林合作研究协会
 <120> 改进的CD30靶向抗体药物偶联物及其用途
 <130> LC23310015P
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 维布妥昔/cAC10重链
 <400> 1

Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Ile	Thr	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35				40						45			
Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55				60					
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Phe
65				70				75						80	
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85					90					95		
Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
		100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
		115					120					125			
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
		130				135				140					
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145				150				155						160	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
			165					170				175			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180					185				190			

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210>	2	
<211>	218	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	维布妥昔/cAC10轻链	
<400>	2	

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp
			20					25					30		
Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Val	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
		50				55						60			
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65					70				75					80	
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
				85					90					95	
Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
			100					105					110		
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
			115					120					125		
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
		130					135					140			
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145					150					155				160	
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165					170					175	
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			180					185					190		
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
		195					200					205			
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
		210					215								

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (2)

<223> X可以是任何氨基酸

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3) .. (3)

<223> X 可以是 E, D 或 C

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Glu

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<400> 4

Glu Gly Glu Glu

1

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<400> 5

Val Asp Ser Val Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Gly Glu Glu

1

5

10

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<400> 6

Ser Val Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Gly Glu Glu

1

5

10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<400> 7

Ser Ala Asp Gly Glu Asp Glu Gly Glu Glu

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<400> 8

Ser Val Glu Ala Glu Ala Glu Glu Gly Glu Glu

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<400> 9

Ser Tyr Glu Asp Glu Asp Glu Gly Glu Glu

1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TTL识别序列

<400> 10

Ser Phe Glu Glu Glu Asn Glu Gly Glu Glu

1 5 10

<210> 11

<211> 237

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 维布妥昔轻链在C末端包括TTL识别序列

<400> 11

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp		
20	25	30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
35	40	45
Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His		
65	70	75
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn		
85	90	95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		
165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		
180	185	190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
195	200	205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Val		
210	215	220
Asp Ser Val Glu Gly Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu		
225	230	235
<210> 12		
<211> 461		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 维布妥昔重链在C末端融合至TTL识别序列		
<400> 12		
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30

Tyr	Ile	Thr	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
35				40				45							
Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
50				55				60							
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Phe
65				70				75				80			
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85				90				95			
Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
100				105				110							
Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
115				120				125							
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
130				135				140							
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145				150				155				160			
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				165				170				175			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
180				185				190							
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
195				200				205							
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
210				215				220							
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225				230				235				240			
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245				250				255			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
260				265				270							
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
275				280				285							
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
290				295				300							
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305				310				315				320			
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325				330				335			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro

340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		400
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Val		
435	440	445
Asp Ser Val Glu Gly Glu Gly Glu Glu Glu Gly Glu Glu		
450	455	460
<210> 13		
<211> 377		
<212> PRT		
<213> 灰狼 (Canis lupus)		
<400> 13		
Met Tyr Thr Phe Val Val Arg Asp Glu Asn Ser Ser Val Tyr Ala Glu		
1	5	10
Val Ser Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly His Trp Lys Arg Leu Arg Arg		15
20	25	30
Asp Asn Pro Arg Phe Asn Leu Met Leu Gly Glu Arg Asn Arg Leu Pro		
35	40	45
Phe Gly Arg Leu Gly His Glu Pro Gly Leu Met Gln Leu Val Asn Tyr		
50	55	60
Tyr Arg Gly Ala Asp Lys Leu Cys Arg Lys Ala Ser Leu Val Lys Leu		
65	70	75
Ile Lys Thr Ser Pro Asp Leu Ala Glu Ser Cys Thr Trp Phe Pro Glu		
85	90	95
Ser Tyr Val Ile Tyr Pro Thr Asn Leu Lys Thr Pro Val Ala Pro Ala		
100	105	110
Gln Asn Gly Ile His Pro Pro Ile His Asn Ser Arg Thr Asp Glu Arg		
115	120	125
Glu Phe Phe Leu Ala Ser Tyr Asn Arg Lys Lys Glu Asp Gly Glu Gly		
130	135	140
Asn Val Trp Ile Ala Lys Ser Ser Ala Gly Ala Lys Gly Glu Gly Ile		

145	150	155	160
Leu Ile Ser Ser Glu Ala Thr Glu Leu Leu Asp Phe Ile Asp Asn Gln			
	165	170	175
Gly Gln Val His Val Ile Gln Lys Tyr Leu Glu His Pro Leu Leu Leu			
	180	185	190
Glu Pro Gly His Arg Lys Phe Asp Ile Arg Ser Trp Val Leu Val Asp			
	195	200	205
His Gln Tyr Asn Ile Tyr Leu Tyr Lys Glu Gly Val Leu Arg Thr Ala			
	210	215	220
Ser Glu Pro Tyr His Val Asp Asn Phe Gln Asp Lys Thr Cys His Leu			
225	230	235	240
Thr Asn His Cys Ile Gln Lys Glu Tyr Ser Lys Asn Tyr Gly Lys Tyr			
	245	250	255
Glu Glu Gly Asn Glu Met Phe Phe Glu Glu Phe Asn Gln Tyr Leu Ile			
	260	265	270
Ser Ala Leu Asn Ile Thr Leu Glu Ser Ser Ile Leu Leu Gln Ile Lys			
	275	280	285
His Ile Ile Arg Ser Cys Leu Met Ser Val Glu Pro Ala Ile Ser Thr			
	290	295	300
Arg Tyr Leu Pro Tyr Gln Ser Phe Gln Leu Phe Gly Phe Asp Phe Met			
305	310	315	320
Val Asp Glu Thr Leu Lys Val Trp Leu Ile Glu Val Asn Gly Ala Pro			
	325	330	335
Ala Cys Ala Gln Arg Leu Tyr Ala Glu Leu Cys Gln Gly Ile Val Asp			
	340	345	350
Ile Ala Ile Ser Ser Val Phe Pro Pro Pro Asp Val Glu Pro Gln His			
	355	360	365
Ile Gln Pro Ala Ala Phe Ile Lys Leu			
	370	375	
<210>	14		
<211>	232		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	维布妥昔轻链在C末端包括TTL识别序列		
<400>	14		
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp			

				20				25				30			
Gly	Asp	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
35				40				45							
Lys	Val	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
50				55				60							
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65				70				75				80			
Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
85				90				95							
Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
100				105				110							
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
115				120				125							
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
130				135				140							
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145				150				155				160			
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
165				170				175							
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
180				185				190							
His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
195				200				205							
Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	Val	Asp	Ser	Val	Glu	Gly
210				215				220							
Glu	Gly	Glu	Glu	Glu	Gly	Glu	Glu								
225				230											

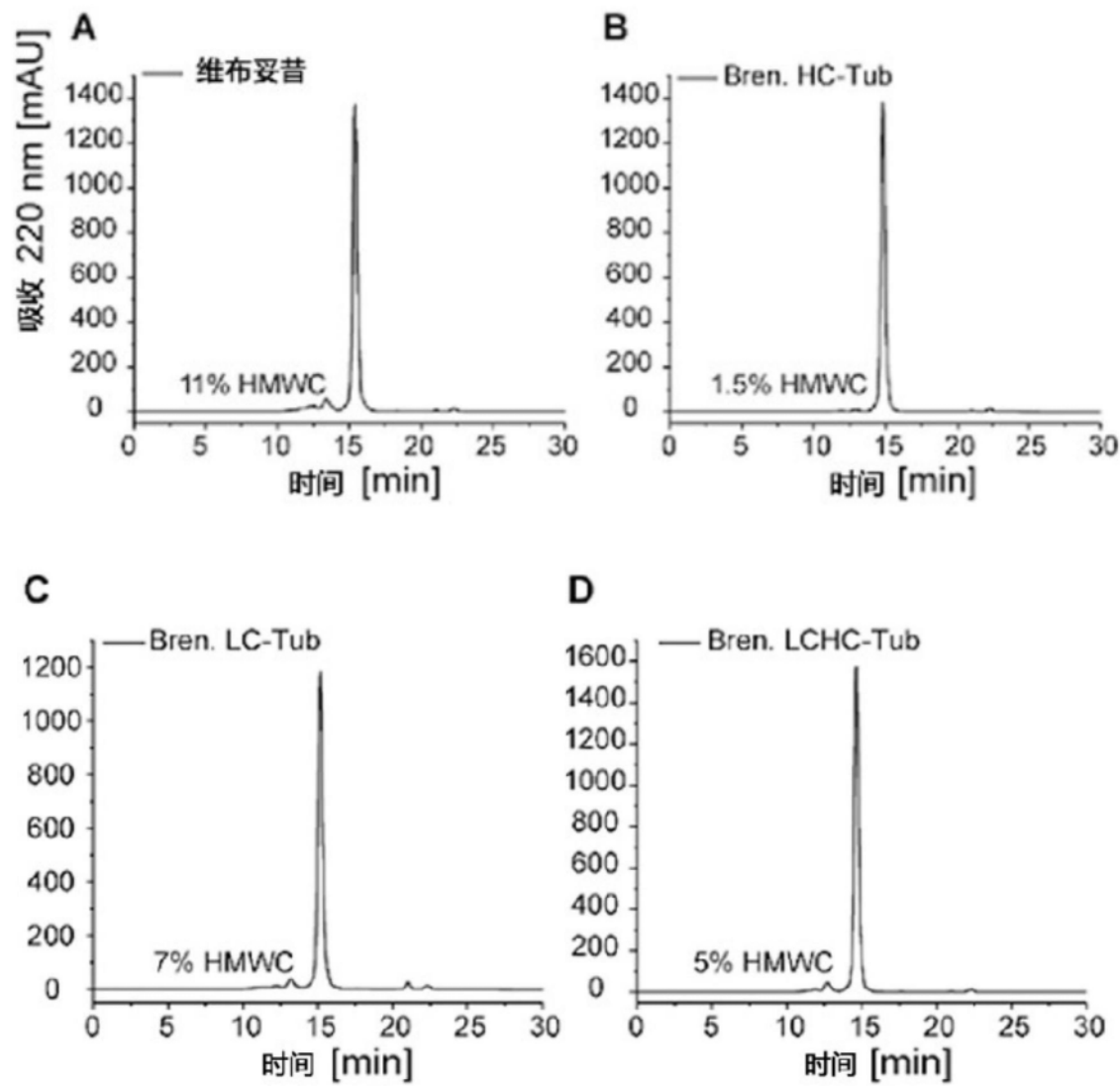


图1

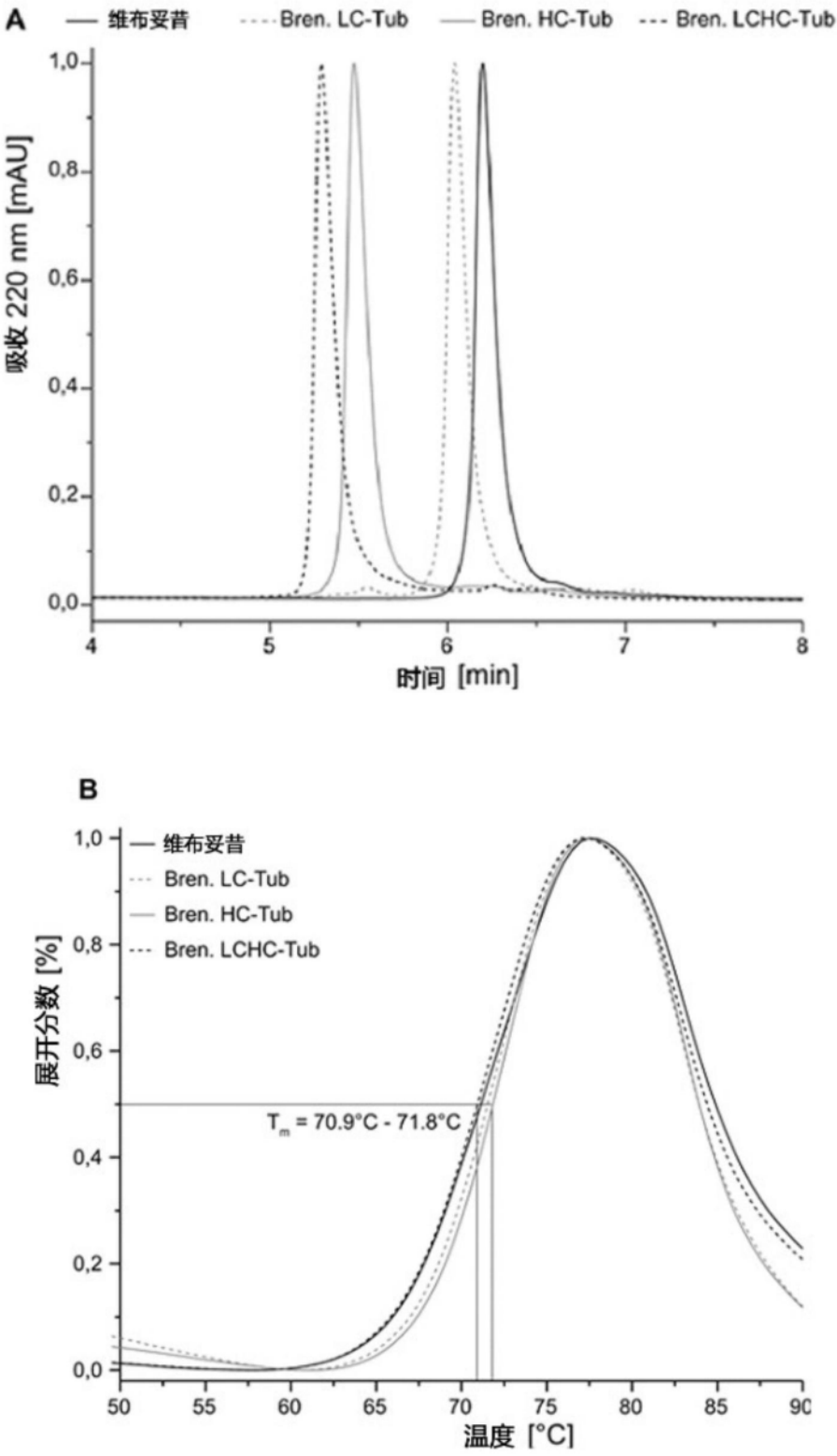


图2

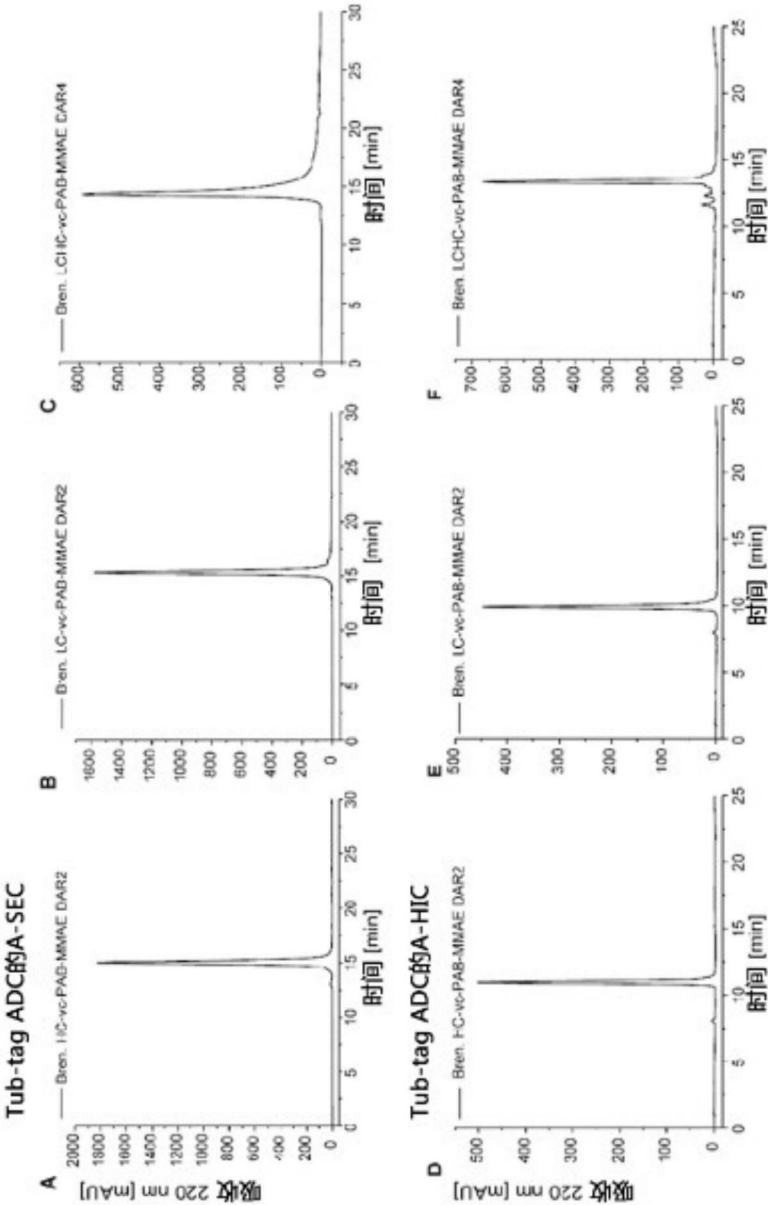


图3

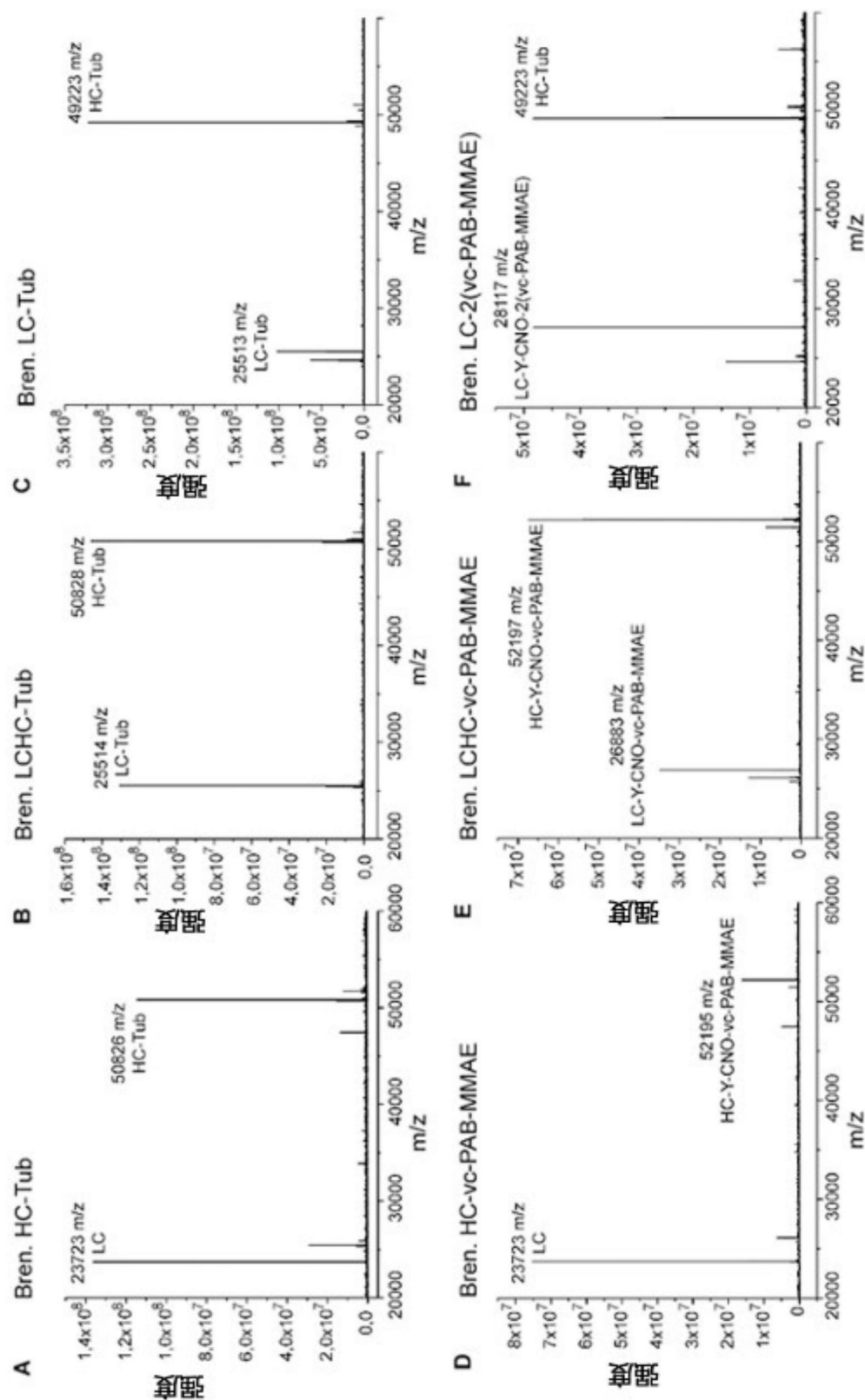


图4

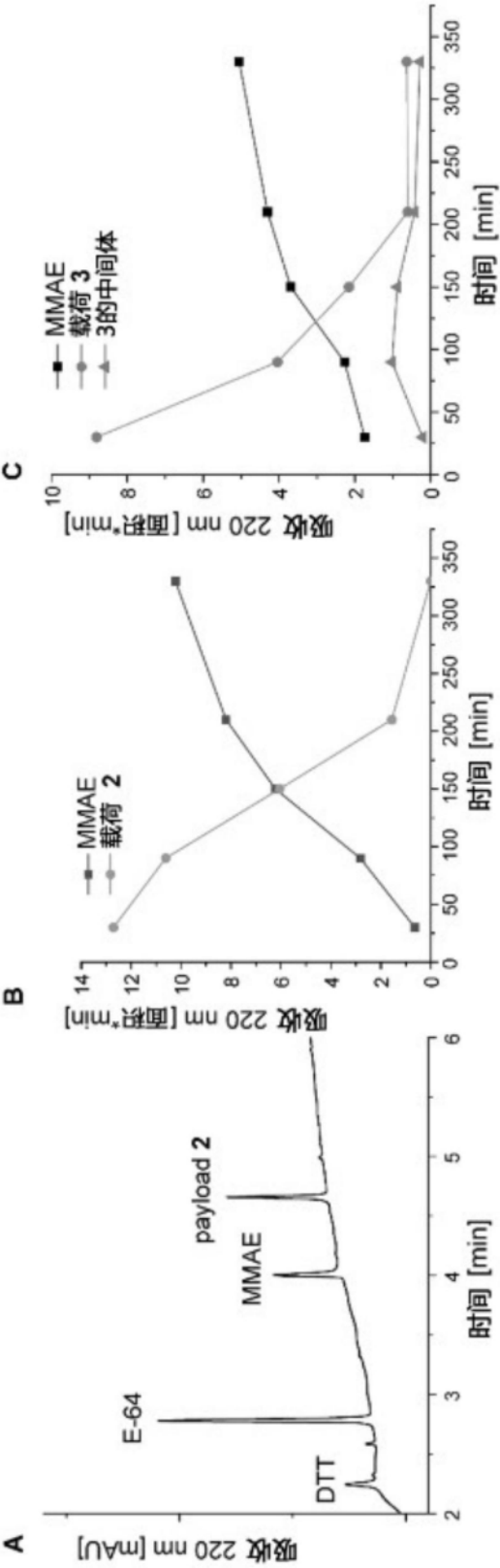


图5

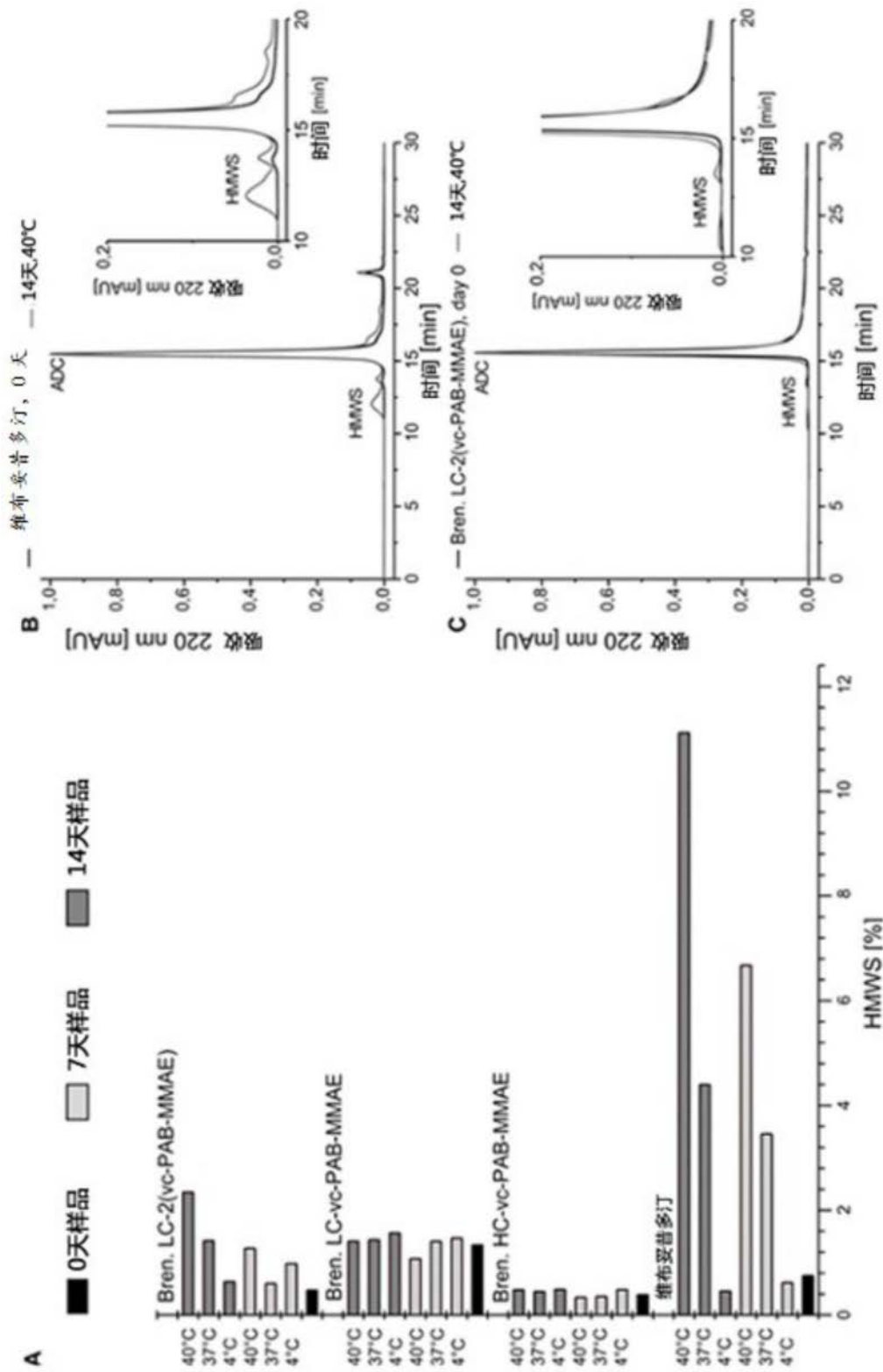


图6

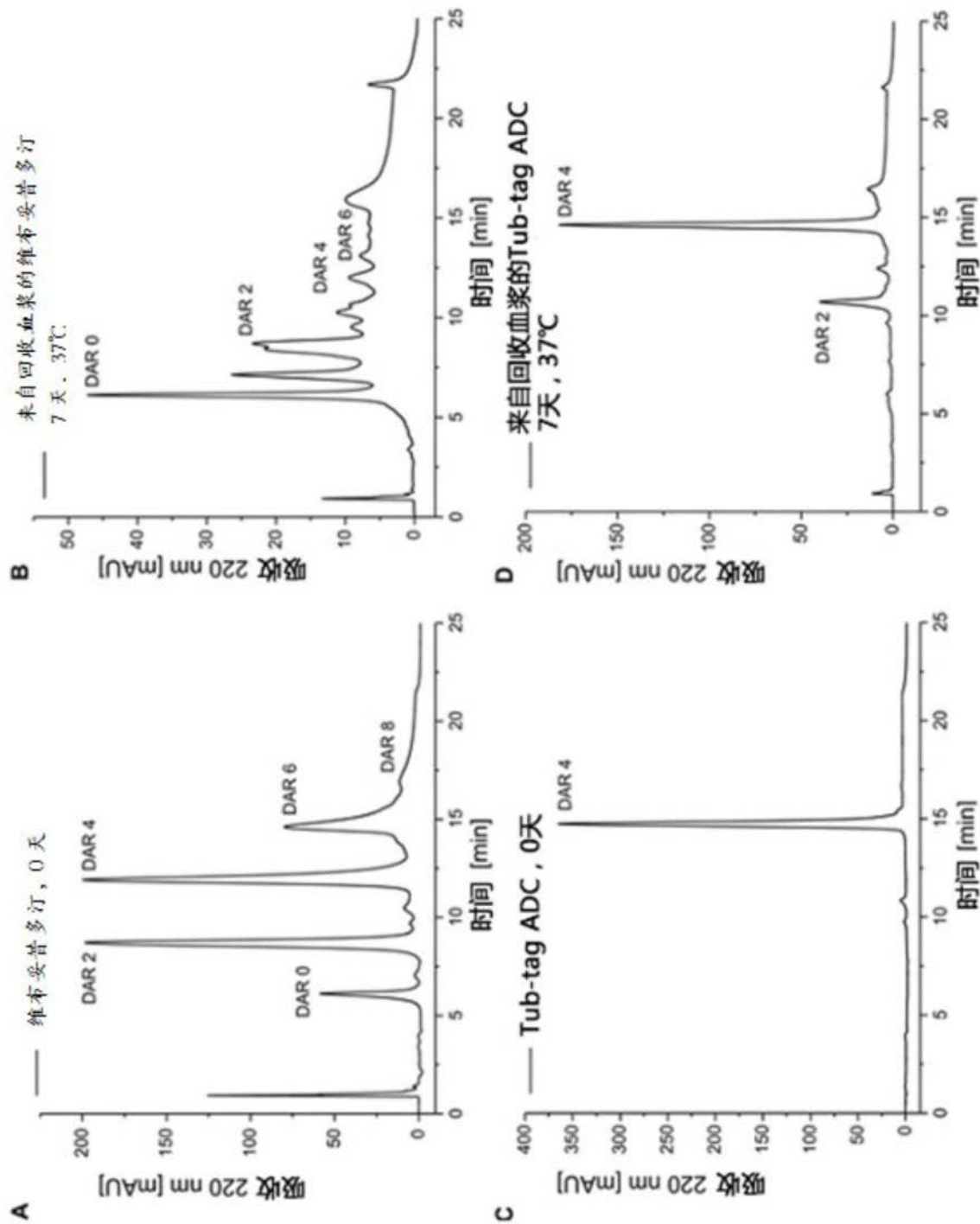


图7

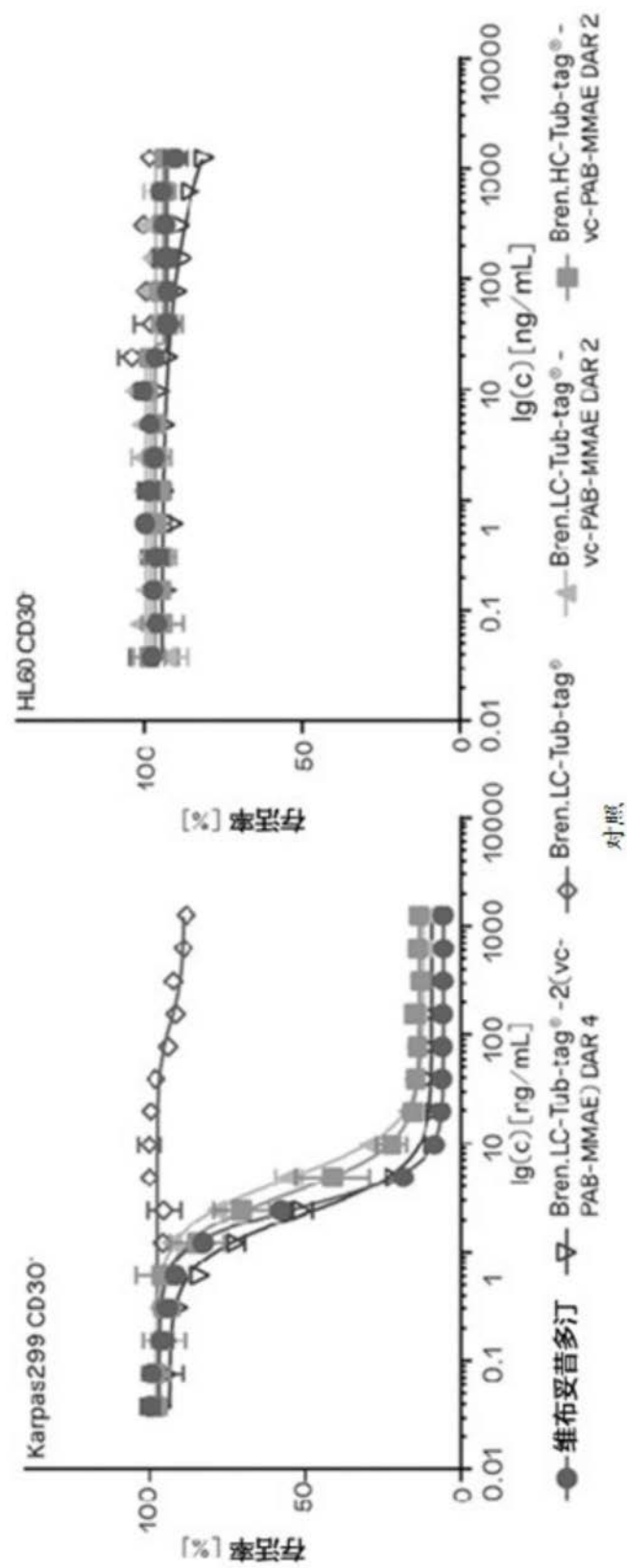


图8

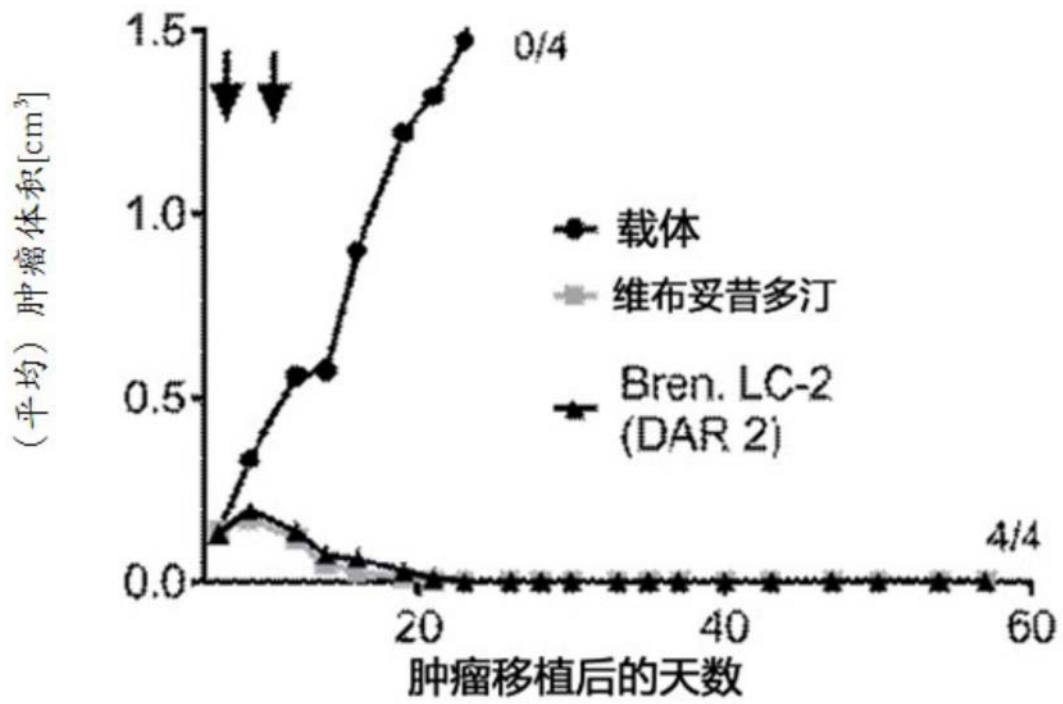


图9

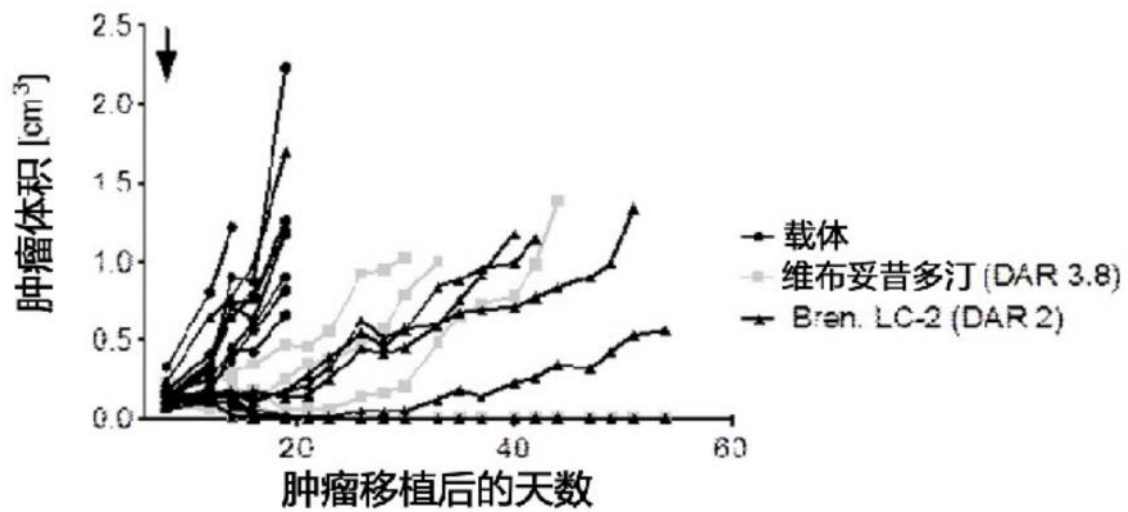


图10

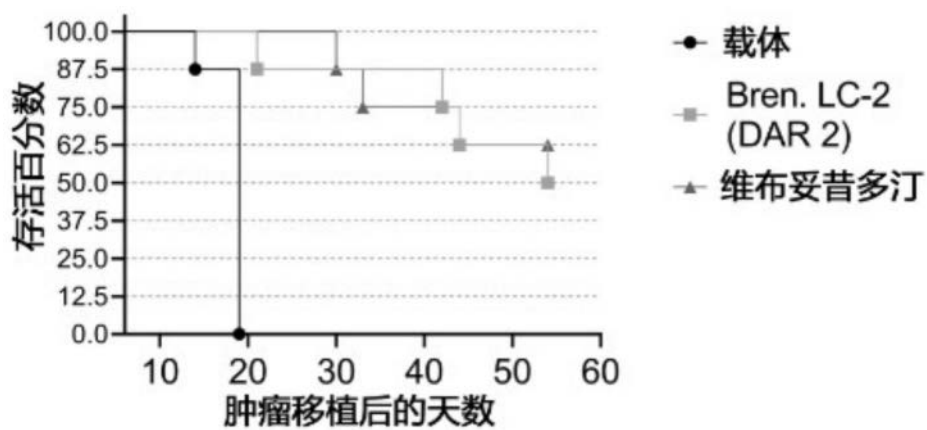


图10(续)

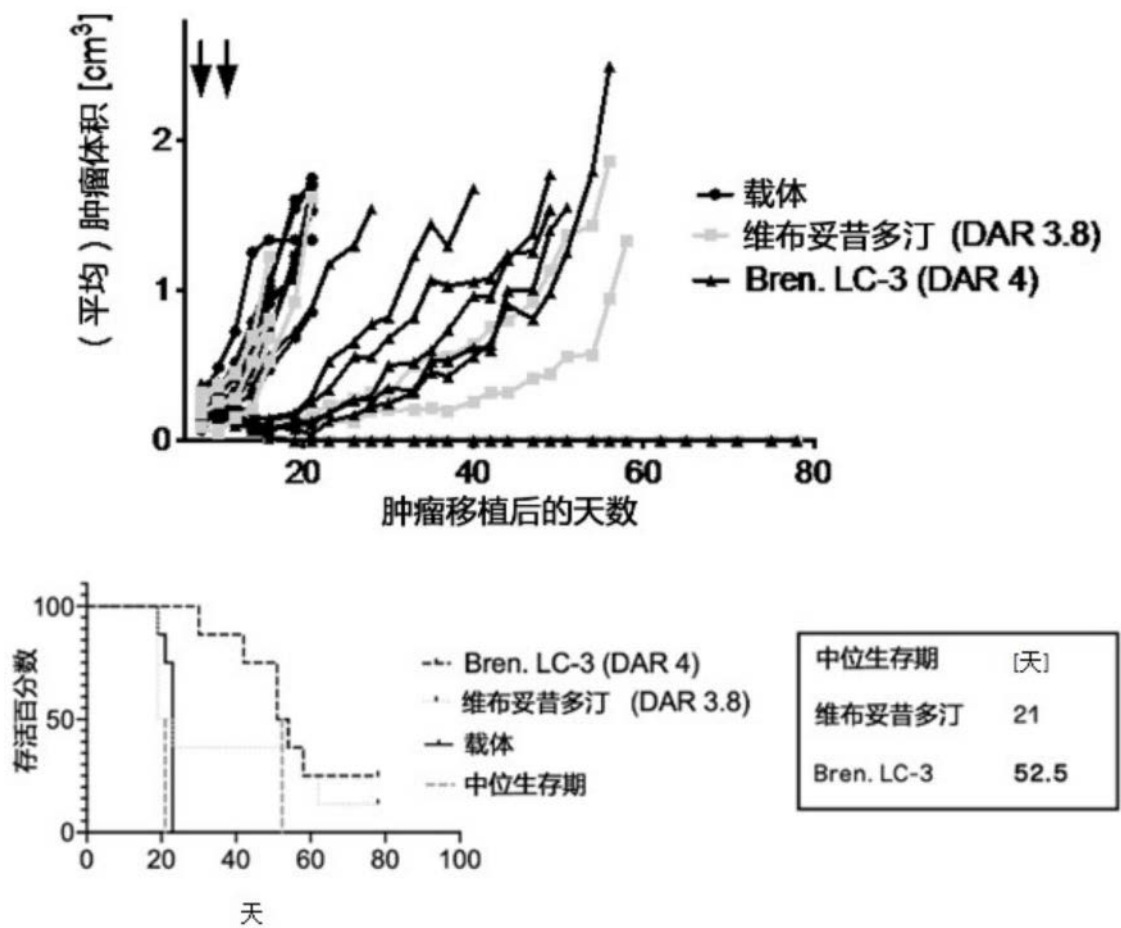


图11

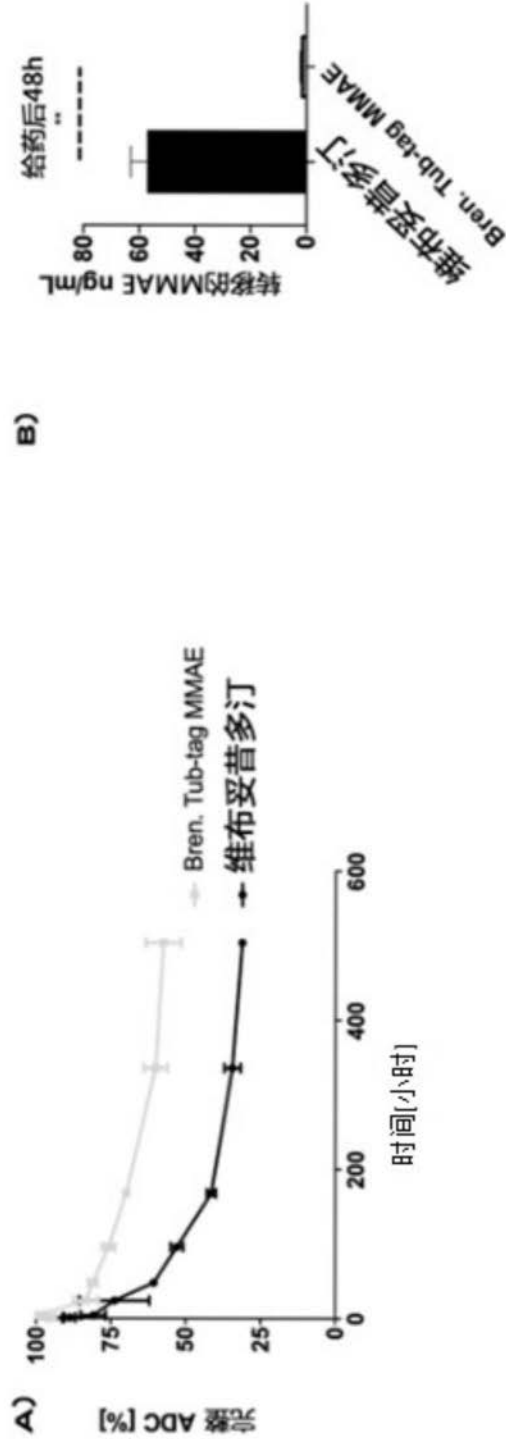


图12

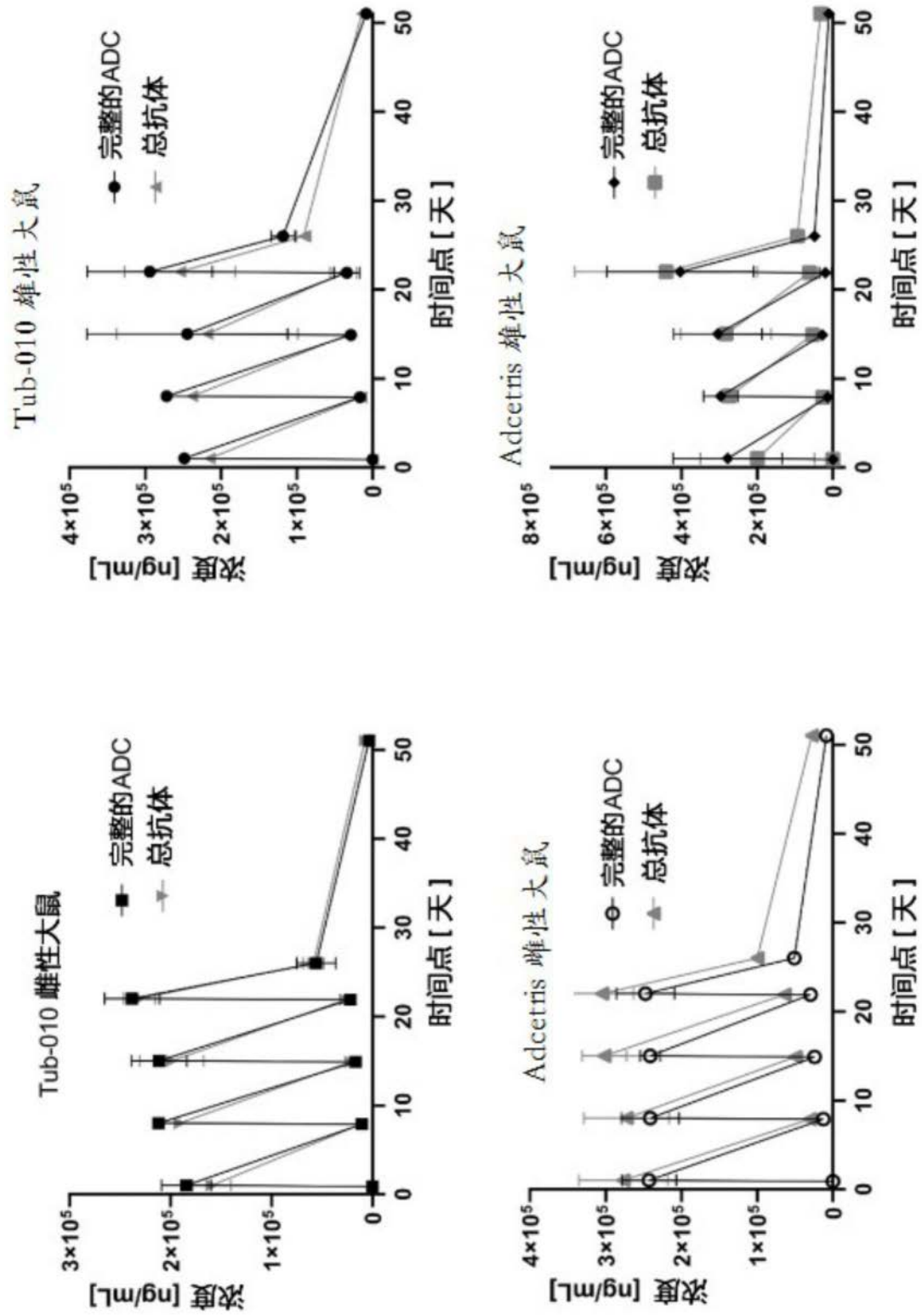


图13

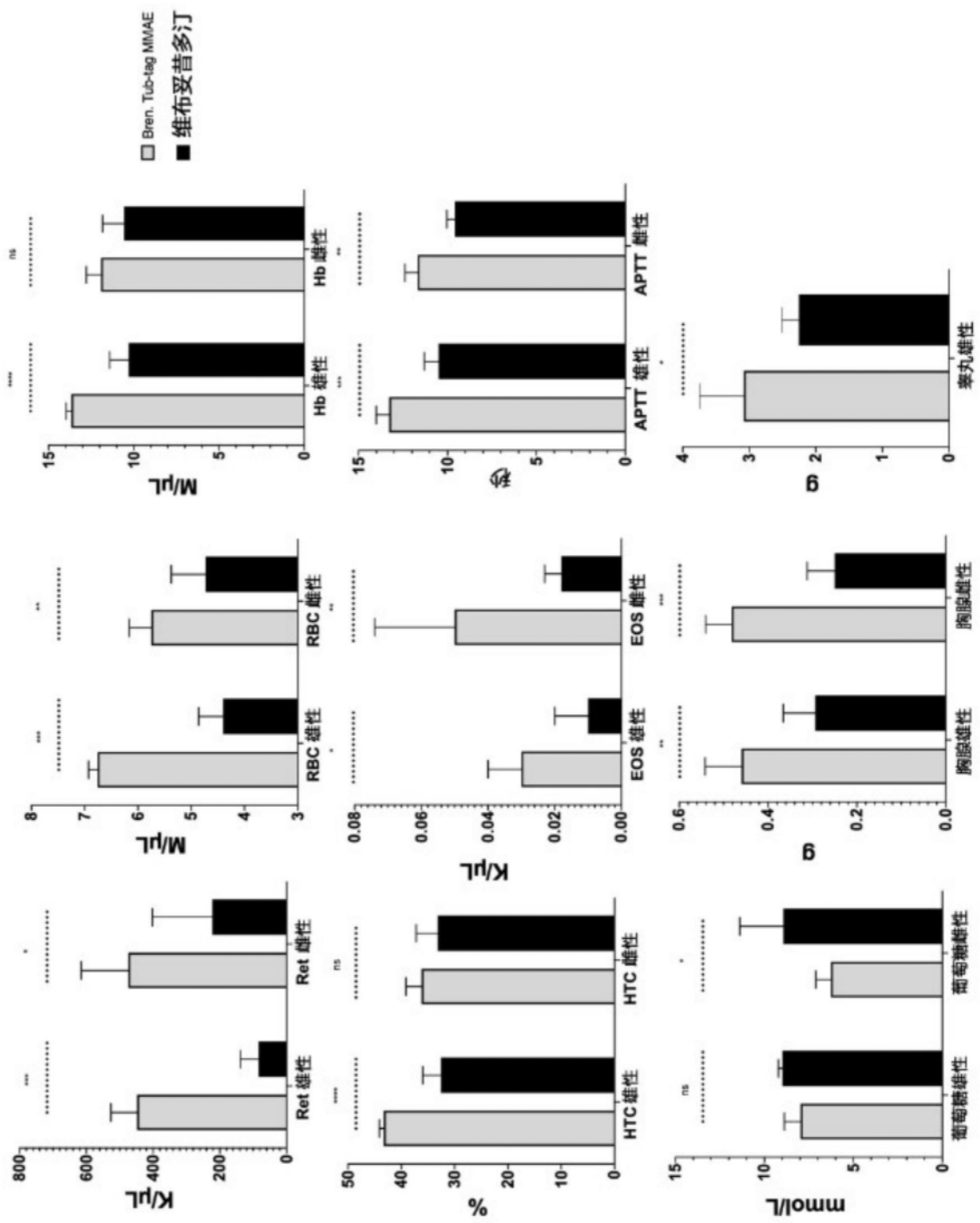


图14

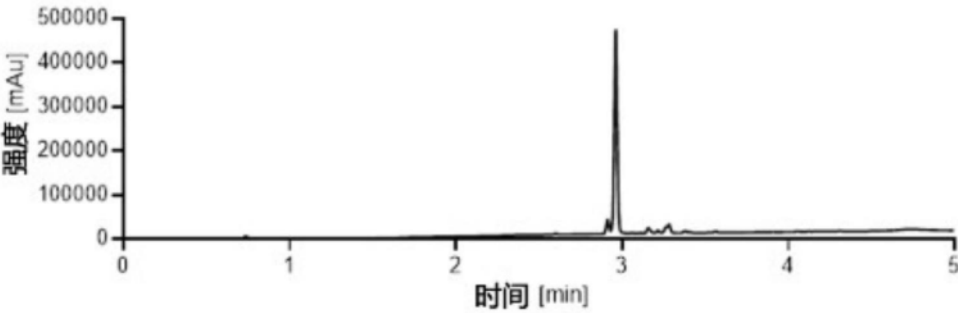


图15

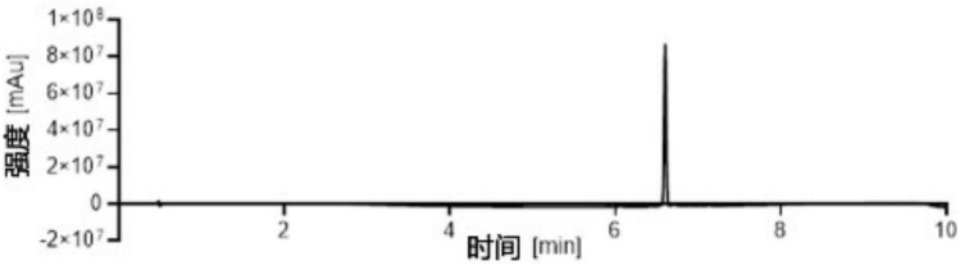


图16

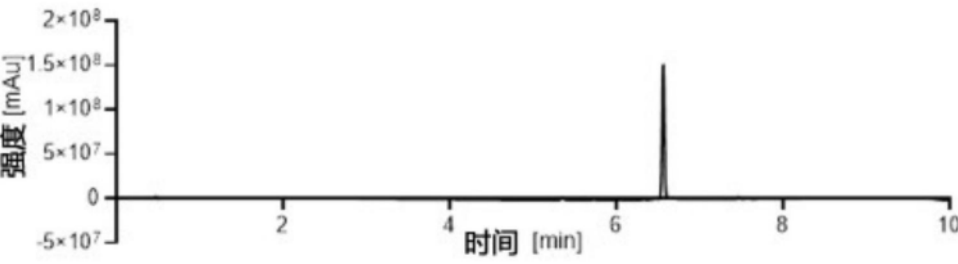


图17

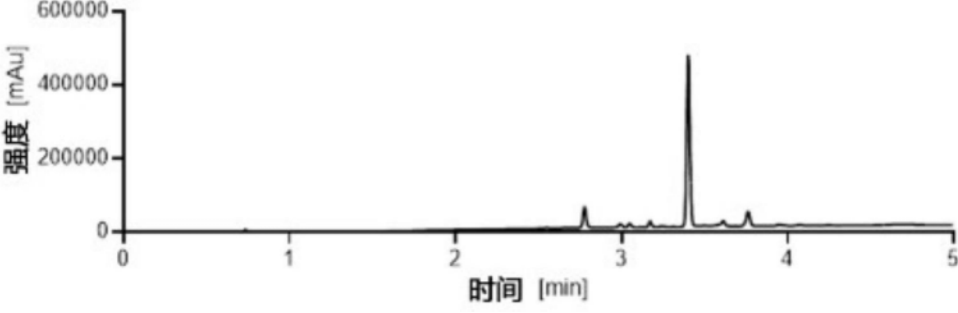


图18

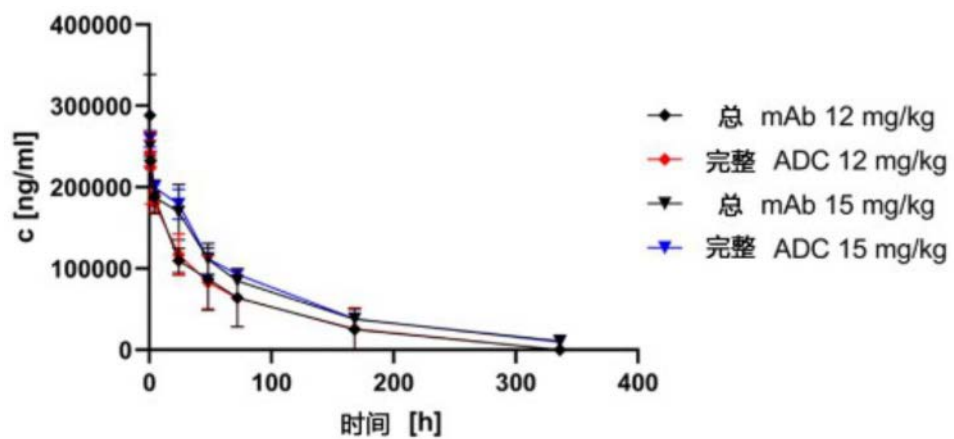


图19

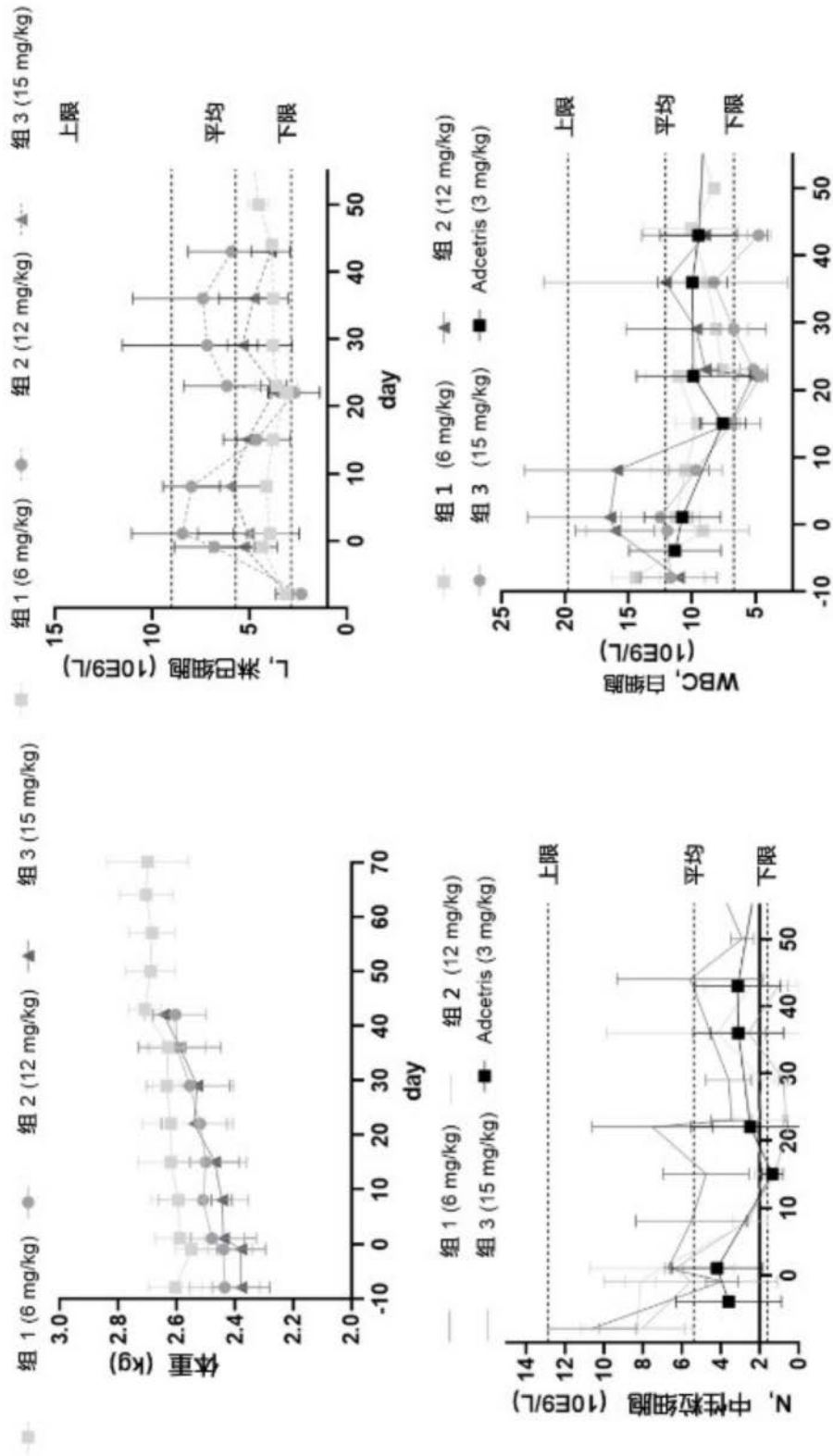


图20

轻链

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD FDGDSYMNWY QQKPGQPPKV
LIYAASNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQQSNEDPW
TFGGGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLISKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

重链

QIQLQQSGPE VVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYITWVKQK PGQGLEWIGW
IYPGSGNTKY NEKFKGKATL TVDTSSSTAF MQLSSLTSED TAVYFCANYG
NYWFAYWGQG TQVTVSAAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
NVNHKPSNTK VDKKVEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPG (K)

图21



图22

