



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116813690 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 29

(21) 申请号 202310731029.6

A61K 47/68 (2017.01)

(22) 申请日 2017.11.22

A61K 47/65 (2017.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/5517 (2006.01)

62/425,761 2016.11.23 US

A61P 35/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

C07K 5/065 (2006.01)

201780084278.3 2017.11.22

C07D 519/00 (2006.01)

(71) 申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·A·希尔德布兰德

B·M·哈钦斯

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 黄海波

(51) Int. Cl.

C07K 5/062 (2006.01)

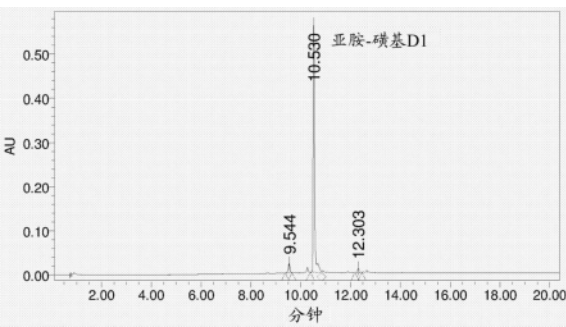
权利要求书31页 说明书82页 附图3页

(54) 发明名称

苯并二氮草衍生物的选择性磺化

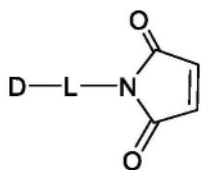
(57) 摘要

本申请涉及苯并二氮草衍生物的选择性磺化。本发明涉及制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的新颖方法,其中所述细胞毒性剂为带有马来酰亚胺基团的含亚胺细胞毒性剂。在一些实施方案中,所述细胞结合剂(CBA)通过工程化Cys诸如重链CH3结构域中的工程化Cys、在对应于抗体CBA上的EU/OU编号442位(或C442)的位置处共价连接至所述细胞毒性剂。本发明还提供通过本发明的所述方法制备的缀合物、实用于使用本发明的所述缀合物在哺乳动物中抑制异常细胞生长或治疗增生性病症的组合物和方法。

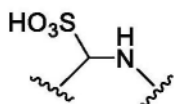


1. 一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法,其包括以下步骤:

(a) 使由下式表示的含亚胺细胞毒性剂或其药学上可接受的盐中的亚胺部分:



与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在pH 1.9至5.0的水溶液中反应以形成包含由下式表示的修饰的亚胺部分的修饰的细胞毒性剂:



或其药学上可接受的盐;以及

(b) 使所述修饰的细胞毒性剂与细胞结合剂反应以形成所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,

其中D为含亚胺苯并二氮草化合物;并且L为接头。

2. 如权利要求1所述的方法,其中D为含亚胺吡啶并苯并二氮草。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH2.9至4.0下进行。

4. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH2.9至3.7下进行。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH3.1至3.5下进行。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH3.2至3.4下进行。

7. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH3.3下进行。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在缓冲溶液的存在下进行。

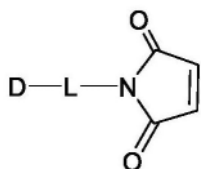
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述缓冲溶液为柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液。

10. 如权利要求8所述的方法,其中所述缓冲溶液为琥珀酸盐缓冲液。

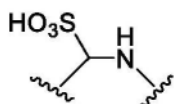
11. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在不存在缓冲溶液的情况下进行。

12. 一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法,其包括以下步骤:

(a) 使由下式表示的含亚胺细胞毒性剂或其药学上可接受的盐中的亚胺部分:



与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在不存在缓冲液的情况下在水溶液中反应以形成包含由下式表示的修饰的亚胺部分的修饰的细胞毒性剂:



或其药学上可接受的盐;以及

(b) 使所述修饰的细胞毒性剂与细胞结合剂反应以形成所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,

其中D为含亚胺苯并二氮草化合物;并且L为接头。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中使0.5至5当量所述亚硫酸氢盐或0.25至2.5当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

14. 如权利要求13所述的方法,其中使0.8至2.0当量所述亚硫酸氢盐或0.4至1.0当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

15. 如权利要求13所述的方法,其中使1.1至1.6当量所述亚硫酸氢盐或0.55至0.8当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

16. 如权利要求13所述的方法,其中使1.4当量所述亚硫酸氢盐或0.7当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

17. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH2.9至3.7下进行,并且使1.0至1.8当量所述亚硫酸氢盐或0.5至0.9当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

18. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH3.1至3.5下进行,并且使1.1至1.6当量所述亚硫酸氢盐或0.55至0.8当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

19. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH3.3下进行,并且使1.4当量所述亚硫酸氢盐或0.7当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在有机溶剂和水的混合物中进行。

21. 如权利要求20所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在二甲基乙酰胺(DMA)和水的混合物中进行。

22. 如权利要求20所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在DMA和水的混合物中进行,其中DMA与水的体积比为1:1。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应进行1分钟至48小时。

24. 如权利要求23所述的方法,其中步骤(a)的所述反应进行1小时至10小时。

25. 如权利要求24所述的方法,其中步骤(a)的所述反应进行1小时至4小时。

26. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中,使所述含亚胺细胞毒性剂与亚硫酸氢钠反应。

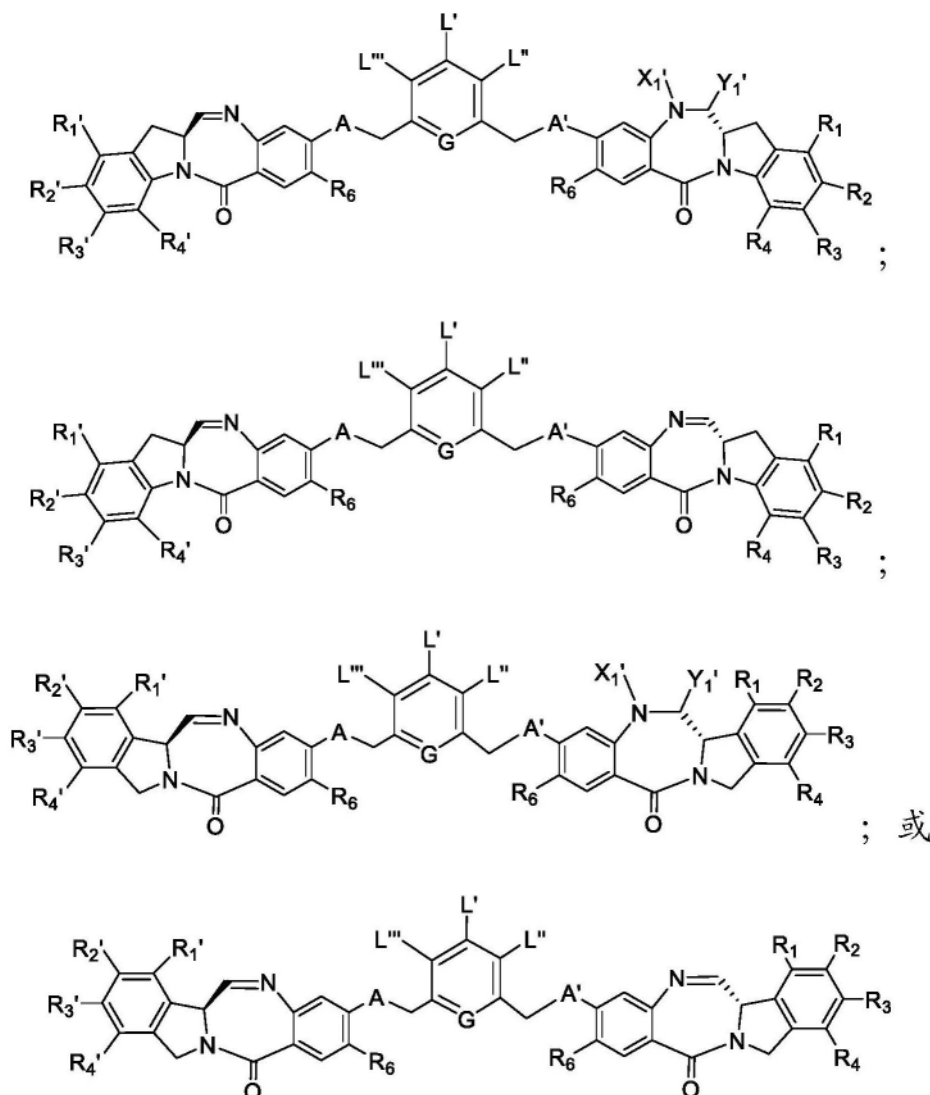
27. 如权利要求1-25中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中,使所述含亚胺细胞毒性剂与偏亚硫酸氢钠反应。

28. 如权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞毒性剂在步骤(b)中与所述细胞结合剂反应之前为未纯化的。

29. 如权利要求1-27中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞毒性剂在步骤(b)中与所述细胞结合剂反应之前为纯化的。

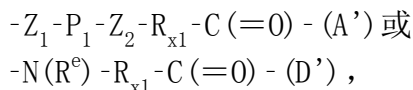
30. 如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中步骤(b)的所述反应在pH 4至9下进行。

31. 如权利要求30所述的方法,其中步骤(b)的所述反应在pH 5至8.5下进行。
32. 如权利要求30所述的方法,其中步骤(b)的所述反应在pH 5.5至6.5下进行。
33. 如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中所述缀合物通过切向流过滤来纯化以产生纯化的缀合物。
34. 如权利要求33所述的方法,其中所述纯化的缀合物在包含亚硫酸氢盐的配制缓冲液中配制。
35. 如权利要求34所述的方法,其中所述配制缓冲液包含10至200 μ M的亚硫酸氢钠。
36. 如权利要求33所述的方法,其中所述配制缓冲液包含40至80 μ M的亚硫酸氢钠。
37. 如权利要求33所述的方法,其中所述配制缓冲液包含50 μ M的亚硫酸氢钠。
38. 如权利要求34-37中任一项所述的方法,其中所述配制缓冲液为pH 4至5。
39. 如权利要求38所述的方法,其中所述配制缓冲液为pH 4.2。
40. 如权利要求1-39中任一项所述的方法,其中D为含亚胺吡啶并苯并二氮~~草~~化合物。
41. 如权利要求1-40中任一项所述的方法,其中D由下式表示:



或为其药学上可接受的盐,其中:

L'、L''和L'''中的一者由下式表示：



并且另两者各自独立地选自-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$,卤素,胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-NR'COR''$, $-SR$, $-SOR'$, $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$,氰基,叠氮基, $-COR'$, $-OCOR'$,和 $-OCONR'R''$;

Z_1 和 Z_2 中的一者为 $-C(=O)-$,并且另一者为 $-NR_5-$;

P_1 为氨基酸残基或含有2至20之间个氨基酸残基的肽;

R_{x1} 为具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

R^e 为-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$,其中 R^k 为-H,具有1至6个碳原子的直链、支链、环状烷基,其任选地带有仲氨基(例如, $-NHR^{101}$)或叔氨基($-NR^{101}R^{102}$)基团,或5或6元含氮杂环,其中 R^{101} 和 R^{102} 各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

R 在每次出现时独立地选自由以下组成的群组:-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,或含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

R' 和 R'' 各自独立地选自-H, $-OH$, $-OR$, $-NHR$, $-NR_2$, $-COR$,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$,和具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

R^c 为-H或具有1至4个碳原子的任选取代的直链或支链烷基;

n 为整数1至24;

X_1' 选自-H,胺保护基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,和含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

Y_1' 选自-H,氧代基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,具有1至6个杂原子的任选取代的3至18元杂环;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 和 R_4' 各自独立地选自由以下组成的群组:-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$,卤素,胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-NCO$, $-NR'COR''$, $-SR$, $-SOR'$, $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$,氰基,叠氮基, $-COR'$, $-OCOR'$,和 $-OCONR'R''$;

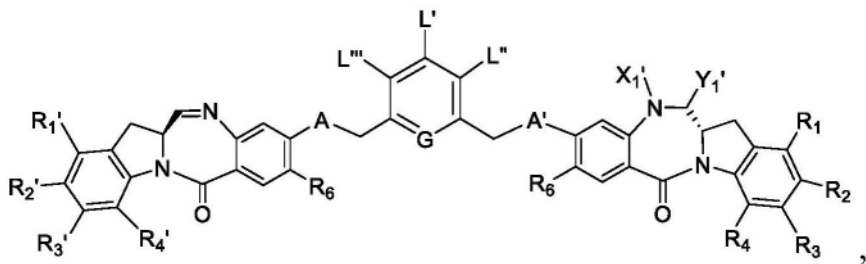
R_6 为-H、-R、-OR、-SR、 $-NR'R''$ 、 $-NO_2$ 或卤素;

G为-CH-或-N-;

A和A'相同或不同,并且独立地选自-O-、氧代($-C(=O)-$)、 $-CRR'O-$ 、 $-CRR'-$ 、 $-S-$ 、 $-CRR'S-$ 、 $-NR_5$ 和 $-CRR'N(R_5)-$;并且

R_5 在每次出现时独立地为-H或具有1至10个碳原子的任选取代的直链或支链烷基。

42. 如权利要求41所述的方法,其中D由下式表示:



或为其药学上可接受的盐。

43. 如权利要求41或42所述的方法, 其中L'、L"和L"'中的一者由式(A')或(D')表示, 并且另外两者为: -H, 具有1至6个碳原子的直链或支链烷基, 卤素, -OH, (C₁-C₆) 烷氧基, 或-NO₂。

44. 如权利要求43所述的方法,其中L'由式(A')表示;并且L"和L"'均为-H。

45. 如权利要求43所述的方法, L'由式(D')表示; 并且L"和L"'均为-H。

46. 如权利要求41-45中任一项所述的方法, 其中 R_{x1} 为具有1至6个碳原子的直链、支链或环状烷基, 其任选地被卤素、-OH、-SO₃H、(C₁-C₃) 烷基、(C₁-C₃) 烷氧基、卤代(C₁-C₃) 烷基或带电取代基或可离子化基团Q取代。

47. 如权利要求43-46中任一项所述的方法,其中L'由下式表示:

$$-\text{NR}_5-\text{P}_1-\text{C}(=\text{O})-(\text{CR}_a\text{R}_b)_s-\text{C}(=\text{O})-(\text{B1}')$$
$$-\text{NR}_5-\text{P}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{Cy}-(\text{CR}_2\text{R}_3)_{n-1}-\text{C}(=\text{O})-(\text{B}2'');$$
$$-\text{C}(=\text{O})-\text{P}_1-\text{NR}_5-(\text{CR}_a\text{R}_b)_s-\text{C}(=\text{O})-(\text{C1}') \text{ 或}$$
$$-C(=O)-P_1-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{s1}, -C(=O)-(C2'),$$

其中：

R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地为-H、 (C_1-C_3) 烷基或带电取代基或可离子化基团Q;

s为整数1至6;

s1'为0或整数1至6;并且

C_y为具有5或6个环碳原子的环状烷基,其任选地被卤素、-OH、(C₁-C₃) 烷基、(C₁-C₃) 烷氧基或卤代(C₁-C₃) 烷基取代。

48. 如权利要求47所述的方法, 其中 R_a 和 R_b 均为H; 式(B2')和(C2')中的 C_y 为环己烷; 并且 R_5 为H或Me。

49. 如权利要求47或48所述的方法,其中s1'为0或1。

50. 如权利要求41-49中任一项所述申的方法,其中所述带电取代基或可离子化基团Q为i) $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OPo}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{OPo}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$ 或 $-\text{Z}'-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$ 或其药学上可接受的盐;或ii) $-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$ 或 $-\text{Z}'-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$; Z' 为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基; R_{14} 至 R_{16} 各自独立地为任选取代的烷基;并且 X^- 为药学上可接受的阴离子。

51. 如权利要求50所述的方法,其中Q为-SO₃H或其药学上可接受的盐。

52. 如权利要求41-51中任一项所述的方法,其中P₁为含有2至10个氨基酸残基的肽。

53. 如权利要求52所述的方法, 其中P₁为含有2至5个氨基酸残基的肽。

54. 如权利要求53所述的方法, 其中P₁为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-

Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹- 甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹- 硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe 和 Gln-Ala。

55. 如权利要求5所述的方法, 其中P₁为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

56. 如权利要求41-55中任一项所述的方法, 其中X₁' 选自由以下组成的群组: -H, -OH, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 和苯基; 并且Y₁' 选自由以下组成的群组: -H, 氧代基, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基。

57. 如权利要求56所述的方法, 其中X₁' 为-H、-OH、(C₁-C₃) 烷基、卤代(C₁-C₃) 烷基或苯基; 并且Y₁' 为-H、氧代基、(C₁-C₃) 烷基或卤代(C₁-C₃) 烷基。

58. 如权利要求56所述的方法, 其中X₁' 为-H、-OH或-Me; 并且Y₁' 为-H或氧代。

59. 如权利要求56所述的方法, 其中X₁' 为-H; 并且Y₁' 为-H。

60. 如权利要求41-59中任一项所述的方法, 其中A和A' 相同或不同, 并且选自-O- 和-S-。

61. 如权利要求60所述的方法, 其中A和A' 为-O-。

62. 如权利要求41-61中任一项所述的方法, 其中R₆为-OMe。

63. 如权利要求41-62中任一项所述的方法, 其中R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃' 和R₄' 独立地为-H、卤素、-NO₂、-OH、(C₁-C₃) 烷基、卤代(C₁-C₃) 烷基或(C₁-C₃) 烷氧基。

64. 如权利要求63所述的方法, 其中R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃' 和R₄' 全部为-H。

65. 如权利要求41-64中任一项所述的方法, 其中R、R'、R'' 和R₅各自独立地为-H或(C₁-C₃) 烷基。

66. 如权利要求41-55中任一项所述的方法, 其中:

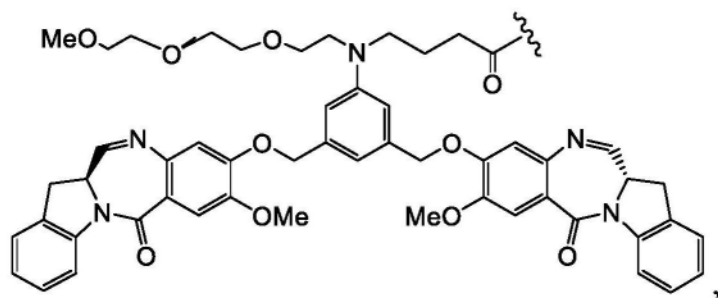
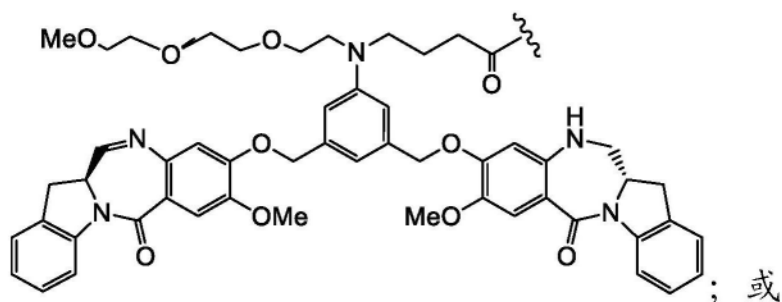
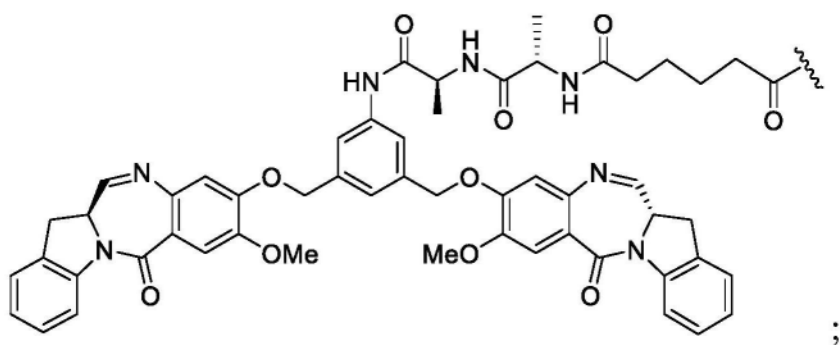
R₁、R₂、R₃、R₄、R₁'、R₂'、R₃' 和R₄' 全部为-H;

R₆为-OMe;

X₁' 和Y₁' 均为-H; 并且

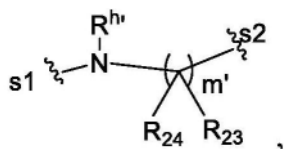
A和A' 为-O-。

67. 如权利要求41所述的方法, 其中D由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐。

68. 如权利要求1-67中任一项所述的方法,其中-L-由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐,其中:

s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

R_{23} 和 R_{24} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;

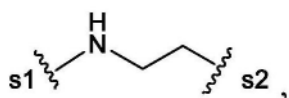
m' 为0与10之间的整数;并且

R^h 为H或任选取代的烷基。

69. 如权利要求68所述的方法,其中 R_{23} 和 R_{24} 均为H;并且 m' 为1与6之间的整数。

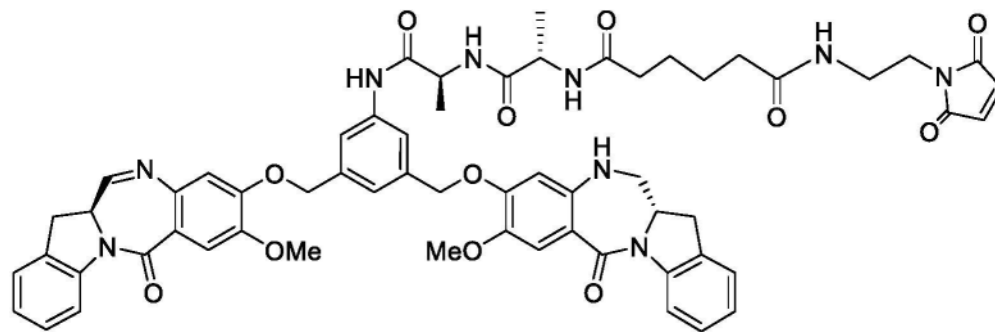
70. 如权利要求68或69所述的方法,其中 R^h 为H。

71. 如权利要求68所述的方法,其中L由以下结构式表示:

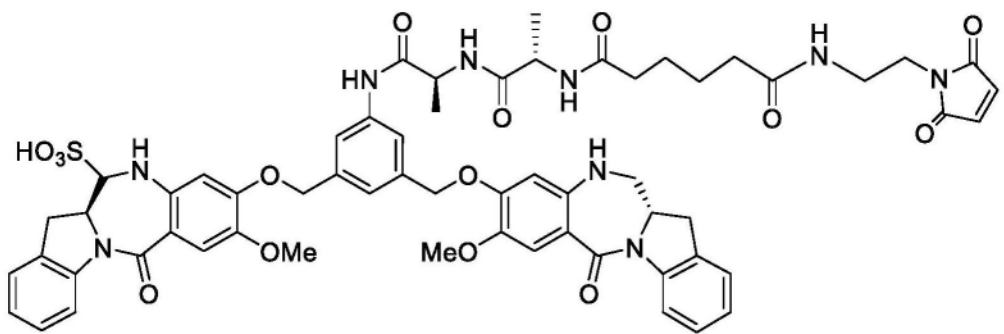


或为其药学上可接受的盐。

72. 如权利要求1-40中任一项所述的方法,其中所述含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

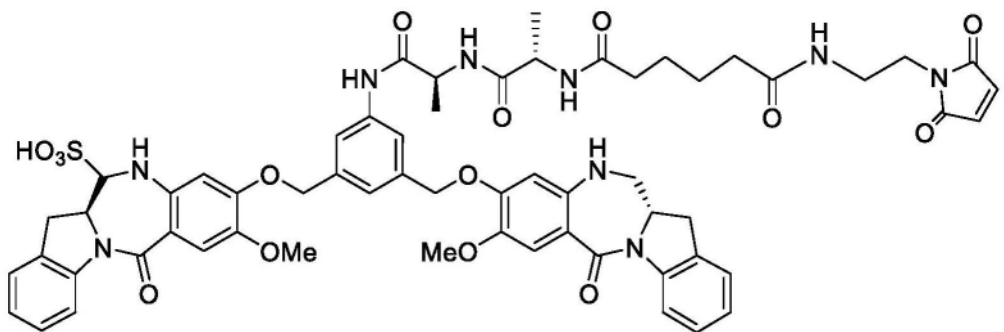


或为其药学上可接受的盐,并且所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:



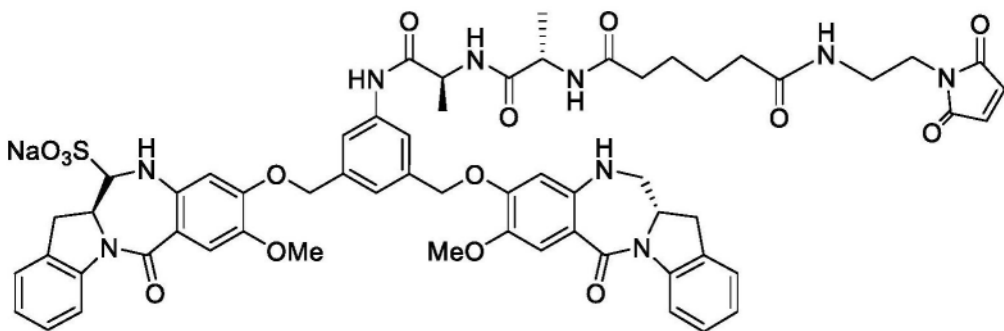
或为其药学上可接受的盐。

73. 如权利要求72所述的方法,其中所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:

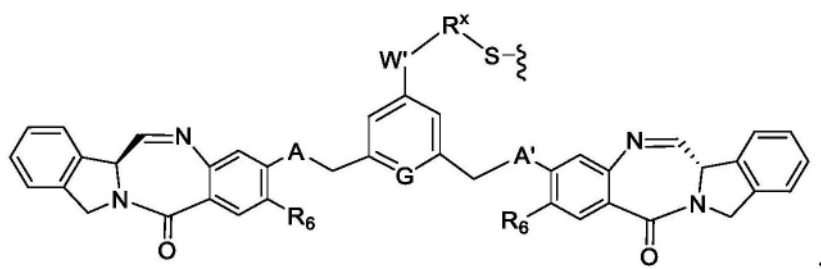
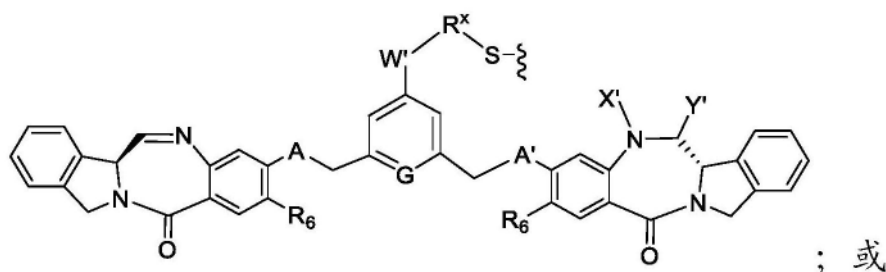
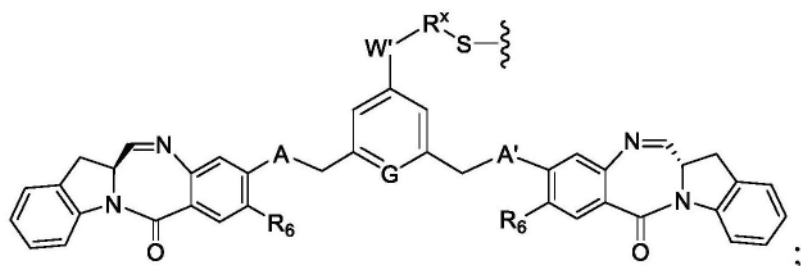
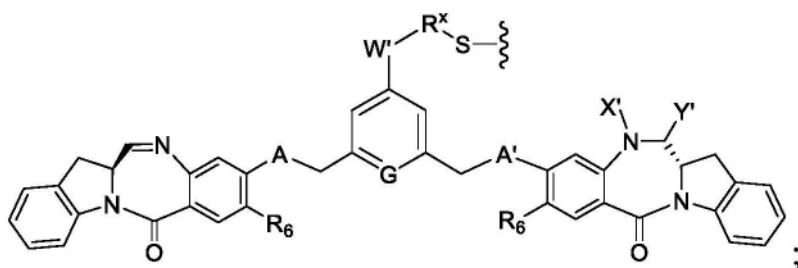


或为其钠盐或钾盐。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:



75. 如权利要求1-40中任一项所述的方法,其中D由下式表示:



或为其药学上可接受的盐,其中:

X' 选自由以下组成的群组: -H, -OH, 具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 苯基和胺保护基;

Y' 选自由以下组成的群组: -H、氧代基、具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

A和A' 选自 -O- 和 -S-;

W' 不存在, 或选自 -O-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S- 或 -CH₂-S-、-CH₂NR^e-;

R^x 不存在, 或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基;

R^e 为 -H, 具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或 -(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, 其中R^k 为 -H, 具有1至6个碳原子的直链、支链、环状烷基, 其任选地带有仲氨基(例如, -NHR¹⁰¹)或叔氨基(-NR¹⁰¹R¹⁰²)基团, 或5或6元含氮杂环, 其中R¹⁰¹和R¹⁰²各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

n为整数1至24;

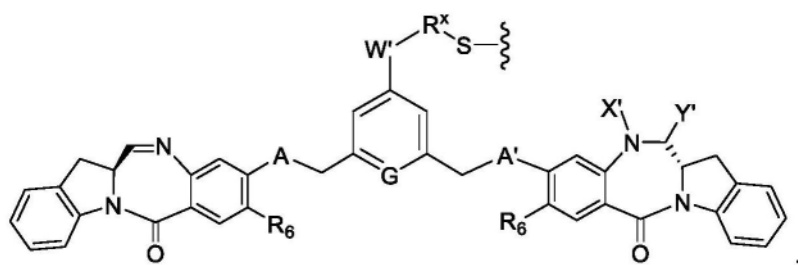
G选自-CH-或-N-;

R_6 为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂或卤素;并且

R为-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c,其中n为整数1至24,并且R^c为具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;

R'和R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NRR^{g'}、-COR,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环,PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c,并且R^{g'}为-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c.

76. 如权利要求75所述的方法,其中D由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐。

77. 如权利要求75或76所述的方法,其中:

X'和Y'均为-H;

A和A'均为-O-;

R_6 为-OMe;

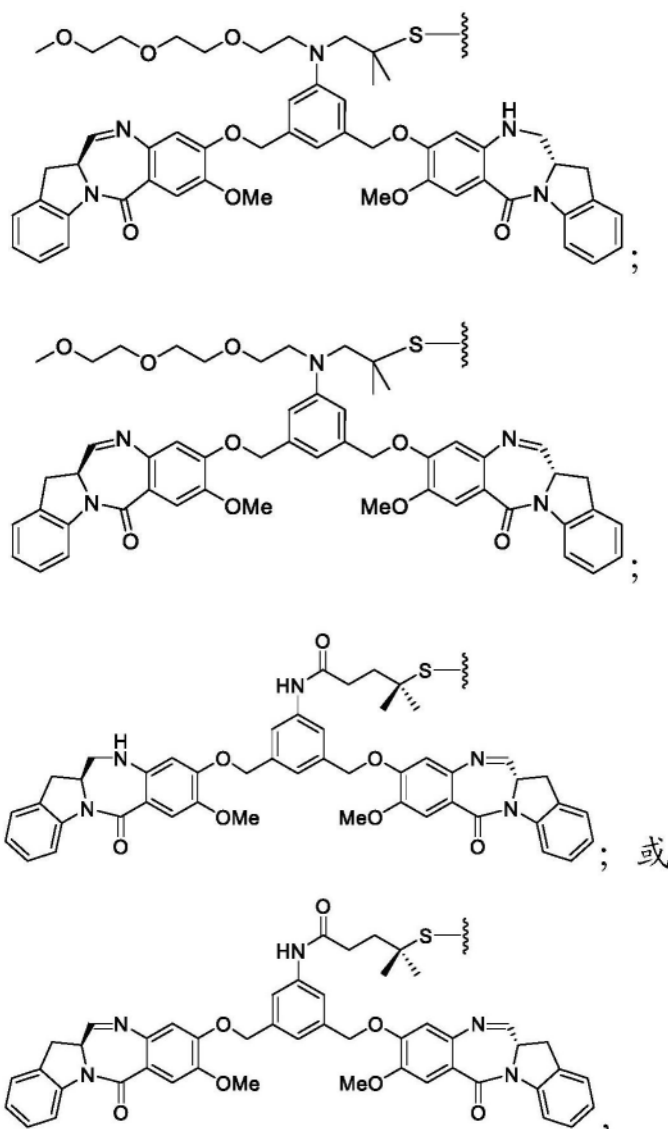
W'为-N(R^e)-或-N(R^e)-C(=O)-;

R^e为-H,具有1至4个碳原子的直链或支链烷基,或-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k,其中R^k为-H,具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;

n为整数2至6;并且

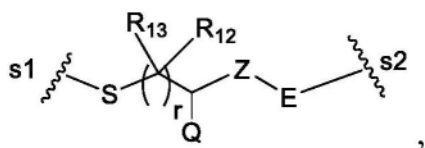
R^x为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基。

78. 如权利要求75所述的方法,其中D由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐。

79. 如权利要求75-78中任一项所述的方法,其中L由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐,其中:

$s1$ 为共价连接至D的位点,并且 $s2$ 为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

E为 $-(CR_{10}R_{11})_q-$ 、环烷基或环烷基烷基;

Z为不存在、 $-SO_2NR_9-$ 、 $-NR_9SO_2-$ 、 $-C(=O)-NR_9-$ 、 $-NR_9-C(=O)-$ 、

$-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NR_9-(CH_2CH_2O)_p-$ 、 $-NR_9-C(=O)-(CH_2CH_2O)_p-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_p-C(=O)NR_9-$ 或 $-(OCH_2CH_2)_p-NR_9-C(=O)-$;

p 为整数1至24;

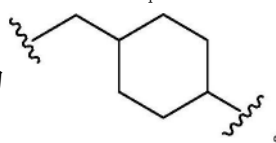
Q 为H、带电取代基或可离子化基团;

R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;并且,

q和r在每次出现时独立地为0与10之间的整数。

80. 如权利要求79所述的方法, 其中E为 $-(CR_{10}R_{11})_q^-$ 。

81. 如权利要求79所述的方法, 其中E为



82. 如权利要求79-81中任一项所述的方法, 其中Z为 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$ 。

83. 如权利要求82所述的方法, 其中 R_9 为H。

84. 如权利要求79-83中任一项所述的方法, 其中Q为:

i) H;

ii) $-SO_3H$ 、 $-Z'-SO_3H$ 、 $-OPO_3H_2$ 、 $-Z'-OPO_3H_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-Z'-PO_3H_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-Z'-CO_2H$ 、 $-NR_{11}R_{12}$ 或 $-Z'-NR_{14}R_{15}$ 或其药学上可接受的盐; 或,

iii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 或 $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$;

Z'为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基;

R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 各自独立地为任选取代的烷基; 并且,

X为药学上可接受的阴离子。

85. 如权利要求84所述的方法, 其中Q为H或 $-SO_3H$ 或其药学上可接受的盐。

86. 如权利要求78-85中任一项所述的方法, 其中 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 全部为H; 并且q和r各自独立地为1与6之间的整数。

87. 如权利要求79所述的方法, 其中:

R_{12} 和 R_{13} 在每次出现时各自独立地为H或 (C_1-C_3) 烷基;

Q为H或 $-SO_3H$ 或其药学上可接受的盐;

Z为 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$;

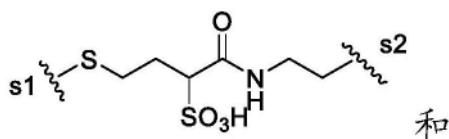
R_9 为H或 (C_1-C_3) 烷基;

E为 $-(CR_{10}R_{11})_q^-$;

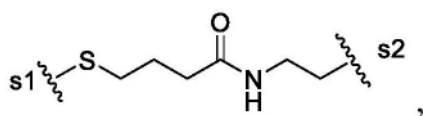
R_{10} 和 R_{11} 在每次出现时独立地为H或 (C_1-C_3) 烷基; 且

q和r各为整数1至5。

88. 如权利要求79所述的方法, 其中L由以下结构式中的任一者表示:

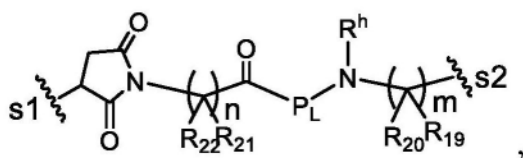


和



或为其药学上可接受的盐。

89. 如权利要求75-79中任一项所述的方法, 其中L由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐,其中:

s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 在每次出现时独立为H或任选取代的烷基;

m和n各自独立地为0与10之间的整数;

R^h 为H或任选取代的烷基;

P_L 为任选取代的亚烷基、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ (其中氧原子连接至与P连接的 $-(C=O)-$ 基团)、氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;并且

j为整数1至24。

90.如权利要求89所述的方法,其中 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自为H;并且m和n各自独立地为1与6之间的整数。

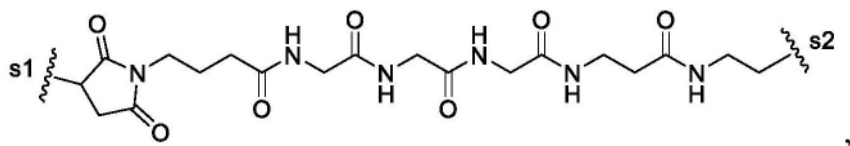
91.如权利要求89或90所述的方法,其中 P_L 为氨基酸残基或含有2至10个氨基酸残基的肽。

92.如权利要求91所述的方法,其中 P_L 为含有2至5个氨基酸残基的肽。

93.如权利要求92所述的方法,其中 P_L 选自自由以下组成的群组:Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Cit-Val、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala和 β -Ala-Gly-Gly-Gly。

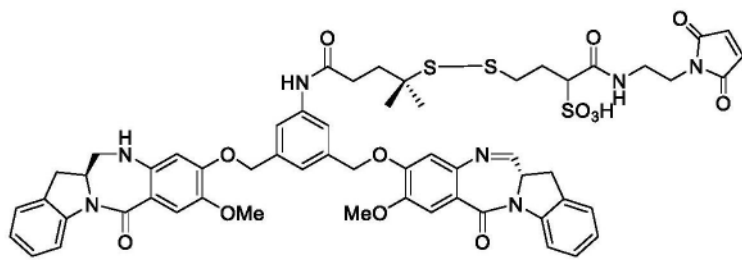
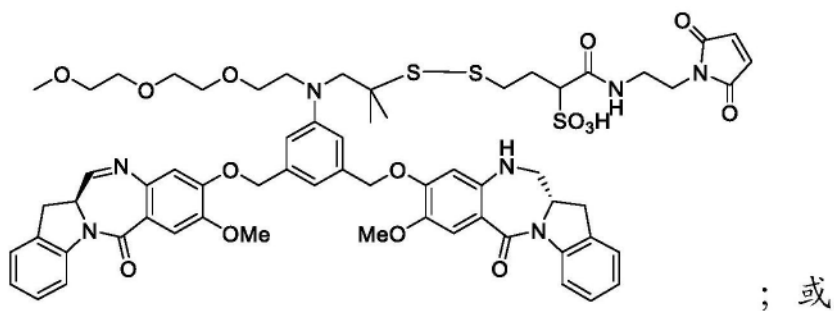
94.如权利要求93所述的方法,其中 P_L 为Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala或 β -Ala-Gly-Gly-Gly。

95.如权利要求89所述的方法,其中L由以下结构式表示:

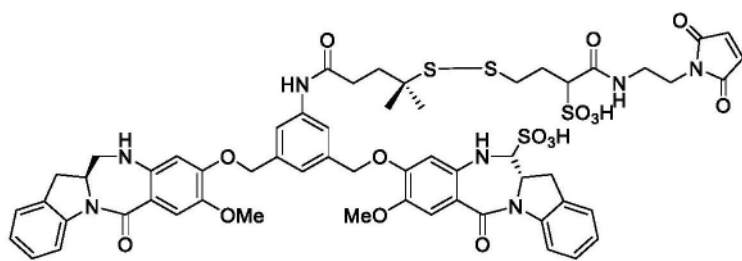
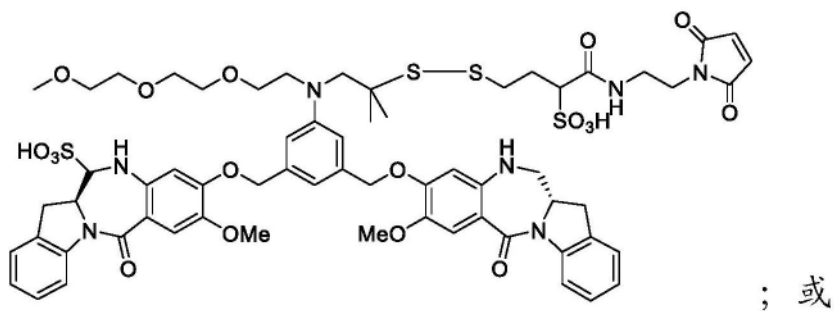


或为其药学上可接受的盐。

96.如权利要求1-40中任一项所述的方法,其中所述含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

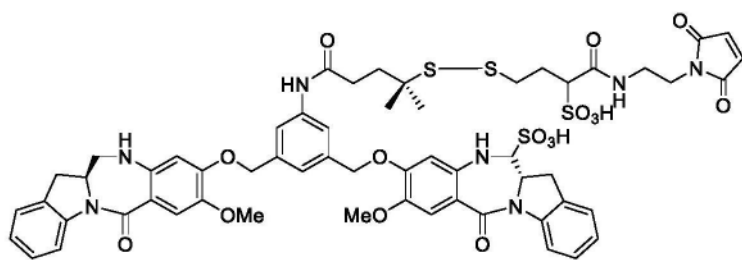
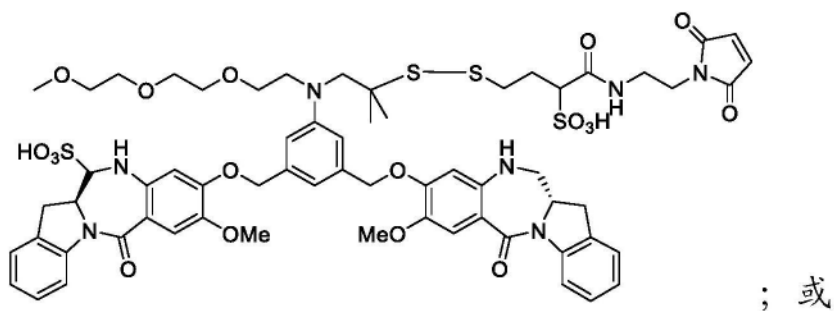


或为其药学上可接受的盐,并且所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:



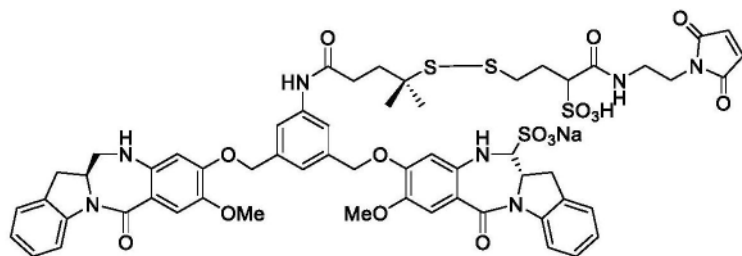
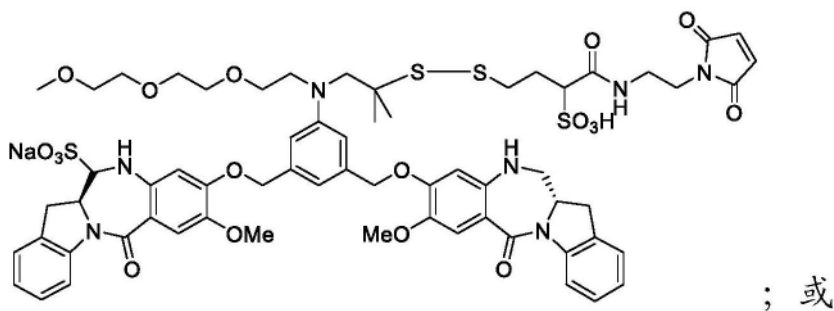
或为其药学上可接受的盐。

97. 如权利要求96所述的方法,其中所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:



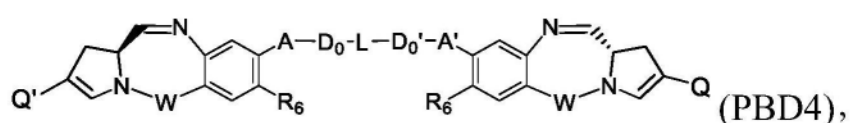
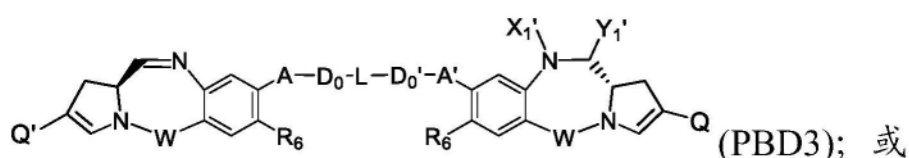
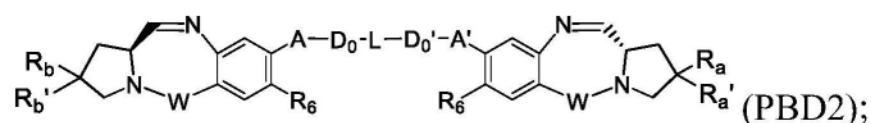
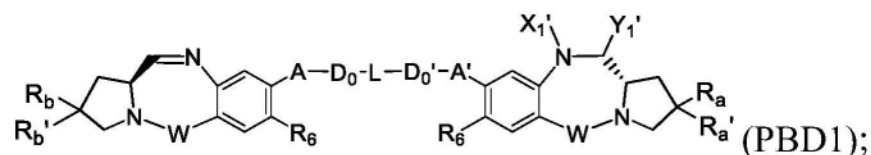
或为其钠盐或钾盐。

98. 如权利要求97所述的方法，其中所述修饰的细胞毒性剂由下式表示：



99. 如权利要求1-39中任一项所述的方法，其中D为含亚胺吡啶并苯并二氮草 (PBD) 化合物。

100. 如权利要求99所述的方法，其中D由下式表示：



或为其药学上可接受的盐,其中:

W选自C=O、C=S、CH₂、BH、SO和SO₂;

X₁'选自-H,胺保护基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH₂CH₂O)_n-R^c,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,和含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

Y₁'选自-H,氧代基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,具有1至6个杂原子的任选取代的3至18元杂环;

R₆为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂或卤素;

A和A'相同或不同,并且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR₅和-CRR'N(R₅)-,

R在每次出现时独立地选自由以下组成的群组:-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH₂CH₂O)_n-R^c,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,或含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

R'和R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR₂、-COR,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH₂CH₂O)_n-R^c,和具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

R^c为-H,或取代或未取代的具有1至4个碳原子的直链或支链烷基,或键合至反应性基团的连接基团;

n为整数1至24;

R₅在每次出现时独立地为-H或具有1至10个碳原子的任选取代的直链或支链烷基;

D₀和D₀'相同或不同,并且独立地不存在,或选自由以下组成的群组:具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,氨基酸,带有2至6个氨基酸的肽,和聚

乙二醇单元 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$;

L为不存在,接头,聚乙二醇单元 $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基或烯基,任选取代的苯基,具有1至6个独立地选自O、S、N和P的任选取代的3至18元杂环或5至18元杂芳环;

R_a 、 R_a' 、 R_b 和 R_b' ,相同或不同,并且独立地选自由以下组成的群组: -H,卤化物或具有1至10个碳原子的任选取代的支链、直链或环状烷基;或 R_a 和 R_a' 和/或 R_b 和 R_b' 在一起分别形成含有双键的基团 $=B$ 和 $=B'$;

$=B$ 和 $=B'$ 相同或不同,并且独立地选自任选取代的支链或直链烯基或羰基;

Q为 Q_1 -Ar- Q_2 ;

Q'为 Q_1' -Ar'- Q_2' ;

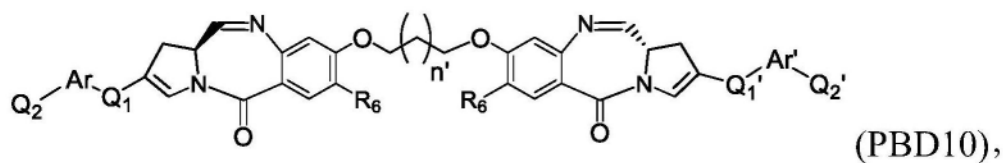
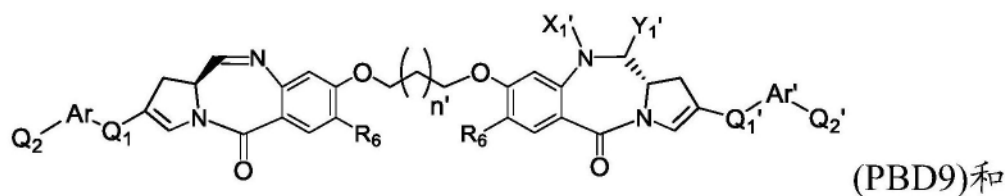
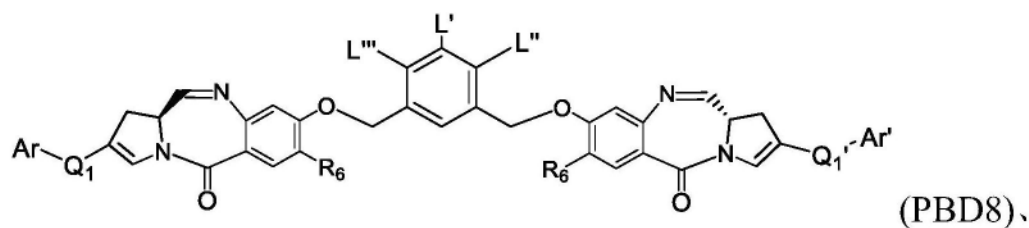
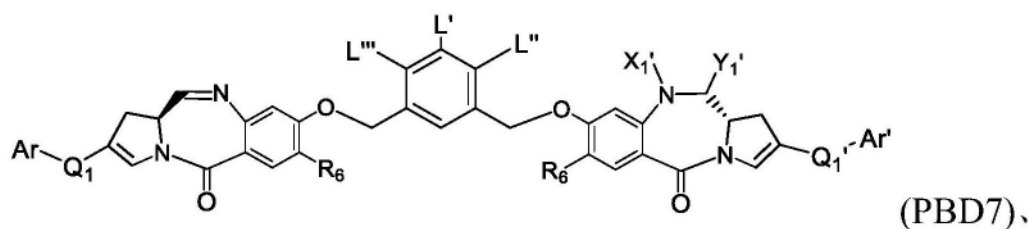
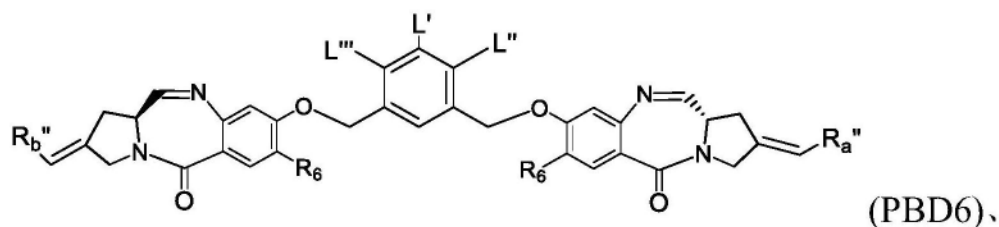
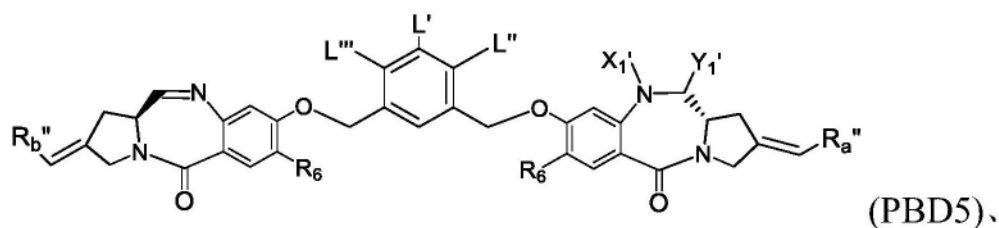
Q_1 和 Q_1' 各自独立地为不存在,1至6个碳原子的直链、支链或环状烷基或-CH=CH单元;

Ar和Ar'各自独立地为不存在或表示芳基;

Q_2 和 Q_2' 各自独立地选自-H,接头,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元- R^c '-(OCH_2CH_2) $_n$ - R^c ,或选自以下的取代基:卤素、胍[-NH(C=NH)NH₂]、-R、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NCO、-NR'COR''、NR'(C=O)OR''-SR、由-SOR'表示的亚砷、由SO₂R'表示的砷、磺酸盐-SO₃M、硫酸盐-OSO₃M、由SO₂NR'R''表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、-COR'、-OCOR'或-CONR'R'';并且

R^c '为不存在或选自具有1至5个碳原子的直链或支链烷基、烯基或炔基。

101.如权利要求100所述的方法,其中D选自以下中的一者:



或其药学上可接受的盐,其中:

式(PBD5)、(PBD6)、(PBD7)或(PBD8)中L'、L''和L'''中的一者由下式表示:

-Z₁-P₁-Z₂-R_{x1}-C(=O)-(A')或

-N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-(D'),

并且另两者各自独立地选自H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH₂CH₂O)_n-R^c,卤素,胍[-NH(C=NH)NH₂],-OR,-NR'R'',-NO₂,-NR'COR'',-SR,-SOR',-SO₂R',-SO₃H,-OSO₃H,-SO₂NR'R'',氰基,叠氮基,-COR',-OCOR',和-OCONR'R'';

式(PBD9)或(PBD10)中 Q_2 和 Q_2' 中的一者由下式表示:

$-Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-(A')$;

$-N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-(D')$;或

$-Z_1-P_1-Z_2-(E')$,

并且另一者选自-H、-R、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NR'(C=O)OR''、-SR或-NO₂;

Z_1 和 Z_2 中的一者为-C(=O)-,并且另一者为-NR₅-;

P_1 为氨基酸残基或含有2至20之间个氨基酸残基的肽;

R_{x1} 为具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

R^e 为-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k,其中R^k为-H,具有1至6个碳原子的直链、支链、环状烷基,其任选地带有仲氨基(例如,-NHR¹⁰¹)或叔氨基(-NR¹⁰¹R¹⁰²)基团,或5或6元含氮杂环,其中R¹⁰¹和R¹⁰²各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

R^c 为-H或具有1至4个碳原子的任选取代的直链或支链烷基;

R_5 在每次出现时独立地为-H或具有1至10个碳原子的任选取代的直链或支链烷基;

R_a'' 和 R_b'' 相同或不同,并且选自-H和-Me;并且

n' 选自0、1、2和3。

102.如权利要求101所述的方法,其中式(PBD5)、(PBD6)、(PBD7)或(PBD8)中 L' 、 L'' 和 L''' 中的一者由式(A')或(D')表示,并且另两者为-H、具有1至6个碳原子的直链或支链烷基、卤素、-OH、(C₁-C₆)烷氧基或-NO₂;或式(PBD9)或(PBD10)中 Q_2 和 Q_2' 中的一者由式(A')、(D')或(E');并且另一者为-H、具有1至6个碳原子的直链或支链烷基、卤素、-OH、(C₁-C₆)烷氧基或-NO₂。

103.如权利要求102所述的方法,其中:

L'' 和 L''' 均为-H;并且式(PBD5)、(PBD6)、(PBD7)或(PBD8)中 L' 由下式表示:

$-NR_5-P_1-C(=O)-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(B1')$;

$-NR_5-P_1-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(B2')$;

$-C(=O)-P_1-NR_5-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(C1')$;或

$-C(=O)-P_1-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(C2')$,

式(PBD9)或(PBD10)中 Q_2 和 Q_2' 中的一者由下式表示:

$-NR_5-P_1-C(=O)-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(B1')$;

$-NR_5-P_1-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(B2')$;

$-C(=O)-P_1-NR_5-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(C1')$;

$-C(=O)-P_1-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(C2')$;

$-NR_5-P_1-C(=O)-(E1')$;或

$-C(=O)-P_1-NR_5-(E2')$,

其中:

R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地为-H、(C₁-C₃)烷基或带电取代基或可离子化基团Q;

s 为整数1至6;

$s1'$ 为0或整数1至6;并且

Cy为具有5或6个环碳原子的环状烷基,其任选地被卤素、-OH、(C₁-C₃)烷基、(C₁-C₃)烷氧

基或卤代(C₁-C₃)烷基取代。

104. 如权利要求103所述的方法, 其中R_a和R_b均为H; 式(B2')和(C2')中的Cy为环己烷; R₅为H或Me; 并且s1'为0或1。

105. 如权利要求101-104中任一项所述的方法, 其中Q为-SO₃H或其药学上可接受的盐。

106. 如权利要求101-105中任一项所述的方法, 其中P₁为含有2至5个氨基酸残基的肽。

107. 如权利要求106所述的方法, 其中P₁为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe和Gln-Ala。

108. 如权利要求107所述的方法, 其中P₁为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

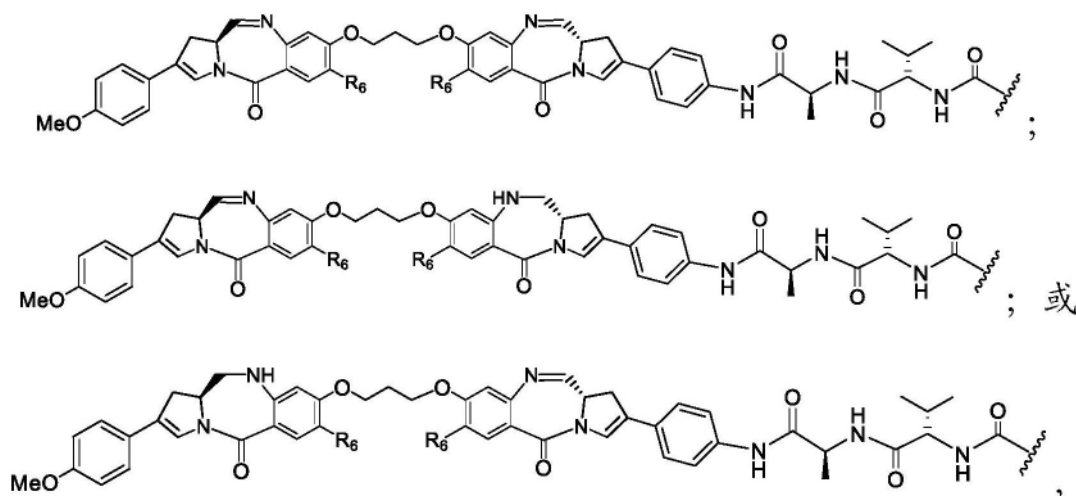
109. 如权利要求100-108中任一项所述的方法, 其中:

R₆为-OMe;

X₁'和Y₁'均为-H; 并且

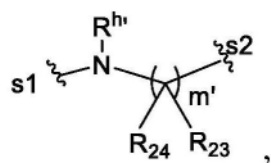
A和A'为-O-。

110. 如权利要求100所述的方法, 其中D由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐。

111. 如权利要求100-110中任一项所述的方法, 其中-L-由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐, 其中:

s1为共价连接至D的位点; s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

R_{23} 和 R_{24} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基；

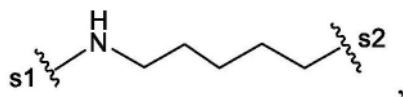
m' 为0与10之间的整数；并且

R^h 为H或任选取代的烷基。

112. 如权利要求111所述的方法，其中 R_{23} 和 R_{24} 均为H；并且 m' 为1与6之间的整数。

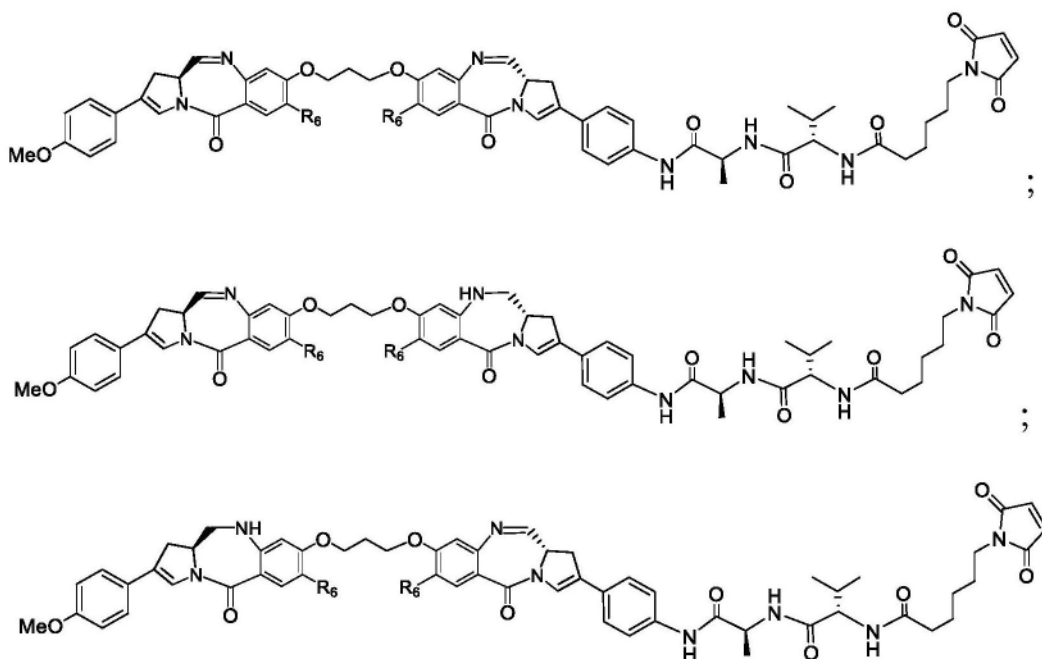
113. 如权利要求111或112所述的方法，其中 R^h 为H。

114. 如权利要求113所述的方法，其中L由以下结构式表示：



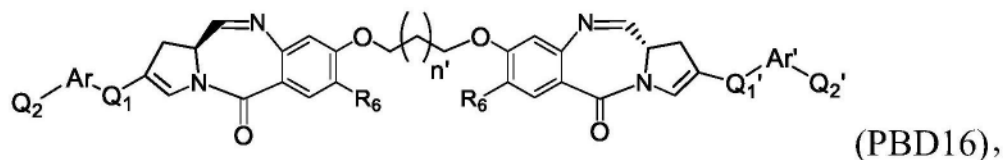
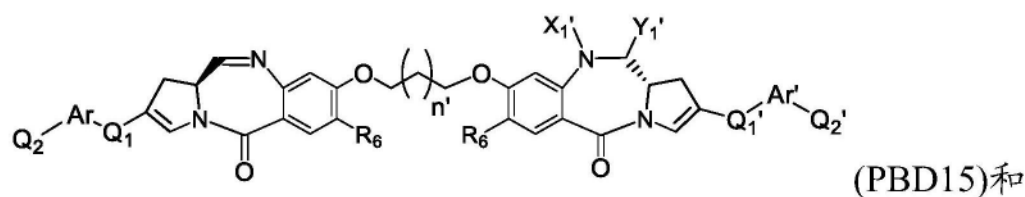
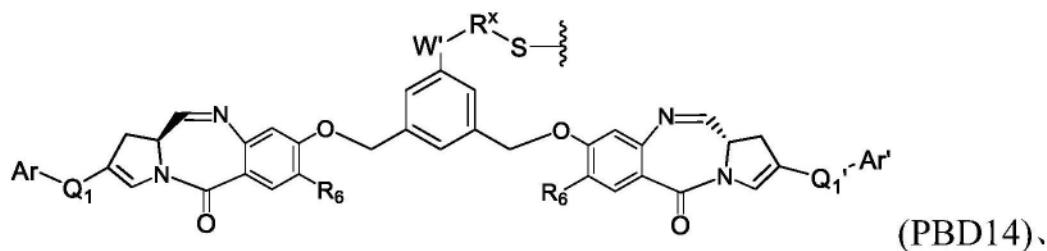
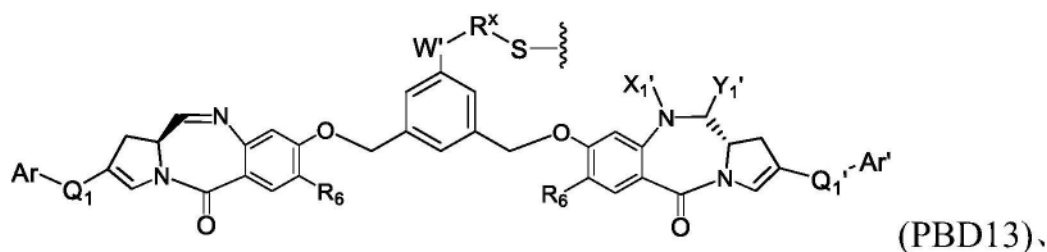
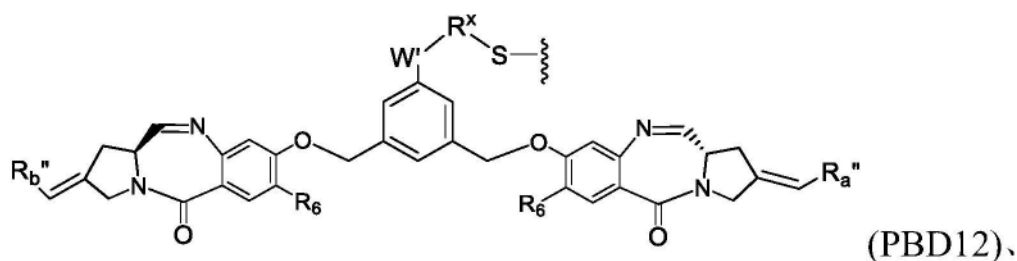
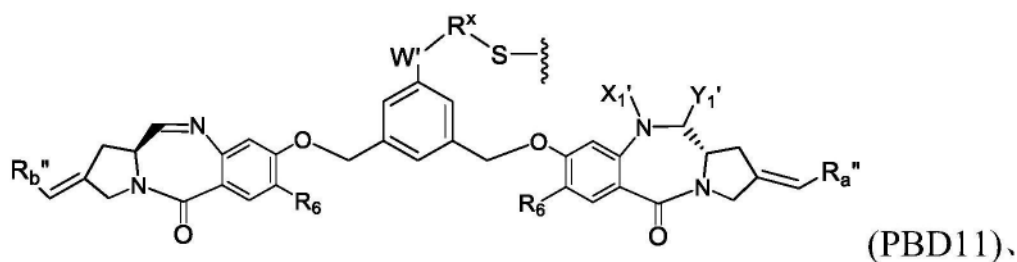
或为其药学上可接受的盐。

115. 如权利要求100-114中任一项所述的方法，其中所述含亚胺细胞毒性剂由下式表示：



或为其药学上可接受的盐。

116. 如权利要求100所述的方法，其中D由下式表示：



或为其药学上可接受的盐,其中:

X_1' 选自由以下组成的群组: -H, -OH, 具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 苯基, 和胺保护基;

Y_1' 选自由以下组成的群组: -H、氧代基、具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

式 (PBD15) 或 (PBD16) 中 Q_2 和 Q_2' 中的一者为 $-W'-R^x-S-$; 并且另一者选自 -H, 具有1至10

个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$, 卤素,胍 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$, $-\text{OR}$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NR}'\text{COR}''$, $-\text{SR}$, $-\text{SOR}'$, $-\text{SO}_2\text{R}'$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$,氰基,叠氮基, $-\text{COR}'$, $-\text{OCOR}'$ 和 $-\text{OCONR}'\text{R}''$;

W' 不存在,或选自 -O-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-或-CH₂-S-、-CH₂NR^e-;

R^x不存在,或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基;

R^e为-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k,其中R^k为-H,具有1至6个碳原子的直链、支链、环状烷基,其任选地带带有仲氨基(例如,-NHR¹⁰¹)或叔氨基(-NR¹⁰¹R¹⁰²)基团,或5或6元含氮杂环,其中R¹⁰¹和R¹⁰²各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

n为整数1至24:

R₆为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂或卤素;并且

R为-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c,其中n为整数1至24,并且R^c为具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;

R'和R"各自独立地选自-H,-OH,-OR,-NRR^g,-COR,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环,PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c,并且R^g为-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c。

117. 如权利要求116所述的方法,其中

X_1' 和 Y_1' 均为 $-H$;

R₆为-OMe;

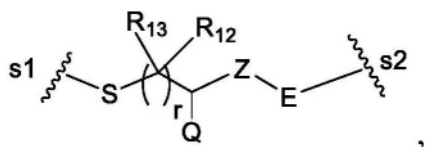
W' 为 $-N(R^e)$ - 或 $-N(R^e) - C (=0) -$;

R^e为-H,具有1至4个碳原子的直链或支链烷基,或-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k,其中R^k为-H,具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;

n 为整数2至6;并且

R^x为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基。

118. 如权利要求116或117所述的方法,其中L由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐,其中:

s1为共价连接至D的位点,并且s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

E为 $-(CR_{10}R_{11})_n$ 、环烷基或环烷基烷基；

Z为不存在、 $-\text{SO}_2\text{NR}_9-$ 、 $-\text{NR}_9\text{SO}_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-$ 、 $-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-$ 、

$$\begin{aligned} & -\text{C}(=\text{O})-\text{O}-, -\text{O}-\text{C}(=\text{O})-, -\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_9-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p-, -\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_p-, \\ & (\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_9\text{-或-}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NR}_9-\text{C}(=\text{O})-; \end{aligned}$$

p为整数1至24:

Q为H、帶电取代基或可离子化基团；

R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基；并且， q 和 r 在每次出现时独立地为0与10之间的整数。

119. 如权利要求118所述的方法，其中E为 $-(CR_{10}R_{11})_q^-$ 。

120. 如权利要求118或119所述的方法，其中Z为 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$ 。

121. 如权利要求120所述的方法，其中 R_9 为-H。

122. 如权利要求118-121中任一项所述的方法，其中Q为H或 $-SO_3H$ 或其药学上可接受的盐。

123. 如权利要求118-122中任一项所述的方法，其中 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 全部为H；并且 q 和 r 各自独立地为1与6之间的整数。

124. 如权利要求118所述的方法，其中：

R_{12} 和 R_{13} 在每次出现时各自独立地为H或 (C_1-C_3) 烷基；

Q为H或 $-SO_3H$ 或其药学上可接受的盐；

Z为 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$ ；

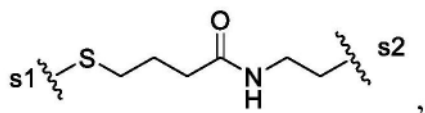
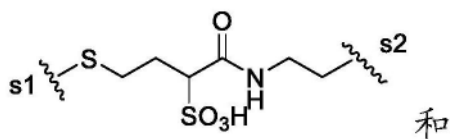
R_9 为H或 (C_1-C_3) 烷基；

E为 $-(CR_{10}R_{11})_q^-$ ；

R_{10} 和 R_{11} 在每次出现时独立地为H或 (C_1-C_3) 烷基；并且

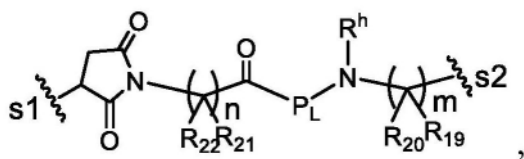
q 和 r 各为整数1至5。

125. 如权利要求118所述的方法，其中L由以下结构式中的任一者表示：



或为其药学上可接受的盐。

126. 如权利要求116或117所述的方法，其中L由以下结构式表示：



或为其药学上可接受的盐，其中：

s_1 为共价连接至D的位点； s_2 为共价连接至马来酰亚胺基团的位点；

R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基；

m 和 n 各自独立地为0与10之间的整数；

R^h 为H或任选取代的烷基；

P_L 为任选取代的亚烷基、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ （其中氧原子连接至与P连接的 $-C(=O)-$ 基团）、氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽；并且

j 为整数1至24。

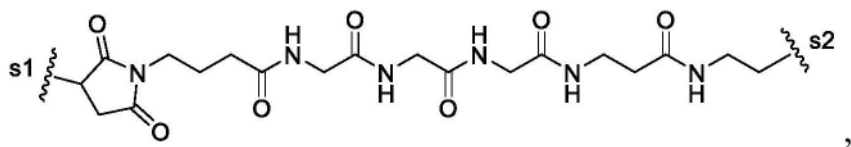
127. 如权利要求126所述的方法，其中 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自为H；并且 m 和 n 各自独立地为

1与6之间的整数。

128. 如权利要求126或127所述的方法, 其中 P_L 为含有2至5个氨基酸残基的肽。

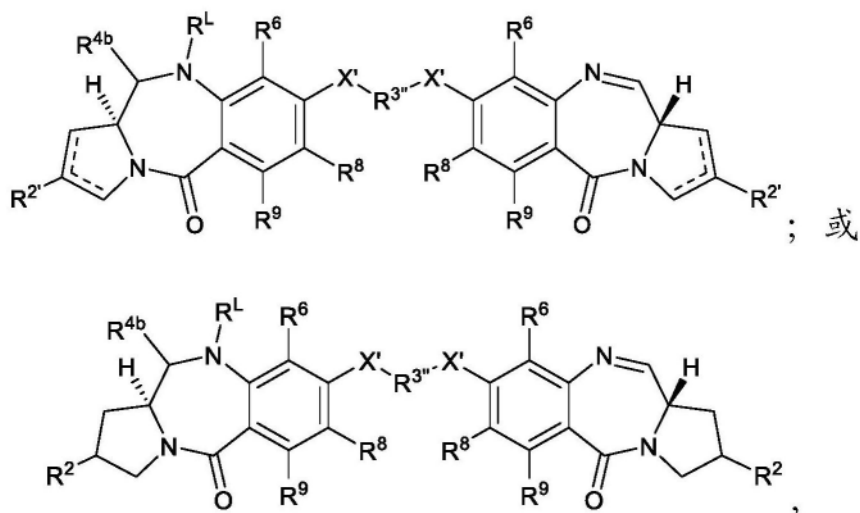
129. 如权利要求128所述的方法, 其中 P_L 选自由以下组成的群组: Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Cit-Val、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala和 β -Ala-Gly-Gly-Gly。

130. 如权利要求第126所述的方法, 其中L由以下结构式表示:



或为其药学上可接受的盐。

131. 如权利要求1-39中任一项所述的方法, 其中所述含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



或为其药学上可接受的盐, 其中:

点线指示任选地存在双键;

$R^{3''}$ 为 C_{3-12} 亚烷基,

每个 X' 在每次出现时独立地为-O-、-S-或-N(H)-,

每个 R^2 独立地选自-H、-OH、-CN、-R^{1'}、-OR^{1'}、-O-SO₂-R^{1'}、-CO₂R^{1'}、-COR^{1'}或卤代, 或两个 R^2 在一起为=O、=CH₂、=CH-R^a或=C(R^a)₂;

每个 $R^{2'}$ 独立地选自-H、OH、-CN、-R^{1'}、-OR^{1'}、-O-SO₂-R^{1'}、-CO₂R^{1'}、-COR^{1'}或卤代;

R^{4b} 选自以下的离去基团: -OR^{6'}、-OCOR^{4'}、-OCOOR^{4'}、-OCONR^{4'}R^{5'}、-NR^{4'}R^{5'}、-NR^{4'}COR^{5'}、-NR^{4'}NR^{4'}R^{5'}、任选取代的5员或6元含氮杂环(例如, 哌啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉)、

由 $-NR^{4'}$ ($C=NH$) $NR^{4'}$ $R^{5'}$ 表示的胍、氨基酸或由 $-NR^{6'}$ COP' 表示的肽, 其中 P' 为氨基酸或含有 2 至 20 之间个氨基酸单元的肽、 $-SR^{6'}$ 、 $-SOR^{4'}$ 、 $-SO_2M$ 、 $-SO_3M$ 、 $-OSO_3M$ 、卤素、氰基和叠氮基;

R^L 为带有可与细胞结合剂 (CBA) 形成共价键的马来酰亚胺部分的接头;

R^6 和 R^9 独立地选自 $-H$ 、 $-R^{1'}$ 、 $-OH$ 、 $-OR^{1'}$ 、 $-SH$ 、 $-SR^{1'}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^{1'}$ 、 $-NR^{1'}R^{3'}$ 、 $-NO_2$ 、 Me_3Sn 和卤代; 并且,

$R^{1'}$ 和 $R^{3'}$ 各自独立地选自任选取代的 C_{1-12} 烷基、 C_{3-20} 杂环基或 C_{5-20} 芳基, 并且任选地关于基团 $-NR^{1'}R^{3'}$ 、 $R^{1'}$ 和 $R^{3'}$ 与其所连接的氮原子一起形成任选取代的 4、5、6 或 7 元杂环; 或 R^6 至 R^9 的任一对相邻基团在一起形成基团 $-O-(CH_2)_p-O-$, 其中 p 为 1 或 2;

$R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 各自独立地选自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OR^{6'}$ 、 $-NHR^{6'}$ 、 $-NR^{6'}_2$ 、 $-COR^{6'}$, 具有 1 至 10 个碳原子的任选取代的直链、支链或环烷基、烯基或炔基, 聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^b$ 或具有 1 至 6 个独立地选自 O、S、N 或 P 的杂原子的任选取代的 3-18 元杂环;

$R^{6'}$ 在每次出现时独立地选自由以下组成的群组: $-H$, 具有 1 至 10 个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^b$, 具有 6 至 18 个碳原子的任选取代的芳基, 含有一个或多个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选取代的 5 至 18 元杂芳环, 和含有 1 至 6 个独立地选自 O、S、N 或 P 的杂原子的任选取代的 3 至 18 元杂环;

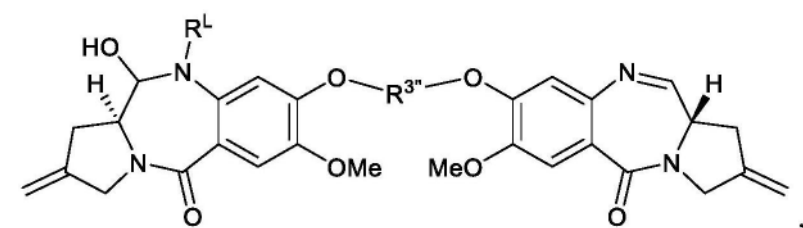
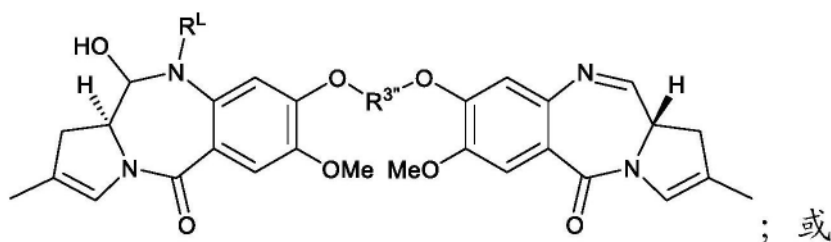
R^a 独立地选自 $-R^{1'}$ 、 $-CO_2R^{1'}$ 、 $-COR^{1'}$ 、 $-CHO$ 、 $-CO_2H$ 或卤代;

R^b 为 $-H$ 或具有 1 至 4 个碳原子的取代或未取代的直链或支链烷基;

M 为 H 或药理学上可接受的阳离子; 并且

n 为整数 1 至 24。

132. 如权利要求 131 所述的方法, 其中所述含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



或为其药理学上可接受的盐, 其中 $R^{3''}$ 为 C_{3-5} 亚烷基。

133. 如权利要求 131 或 132 所述的方法, R^L 为 $A-L^1-L^2-O-C(=O)^*$, 其中 L^1 为可裂解接头, A

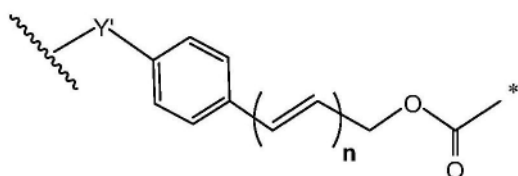
为带有能够将 L^1 连接至所述细胞结合剂的马来酰亚胺的连接基团, L^2 为共价键或与 $-OC(=O)-$ 一起形成自消耗接头。

134. 如权利要求 133 所述的方法, 其中 L^1 为含有 2 至 5 个氨基酸残基的肽。

135. 如权利要求 134 所述的方法, 其中 L^1 选自由以下组成的群组: Phe-Lys、Val-Ala、

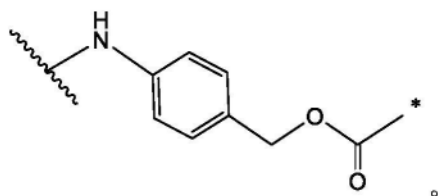
Val-Lys、Ala-Lys、Val-Cit、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Arg、Trp-Cit、Lys-Lys、Phe-Ala、Phe-N9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N9-硝基-Arg、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Gly-Gly-Gly、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2) 和 Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)。

136. 如权利要求131-135中任一项所述的方法, 其中 $-C(=O)O-$ 和 L^2 在一起形成以下基团:

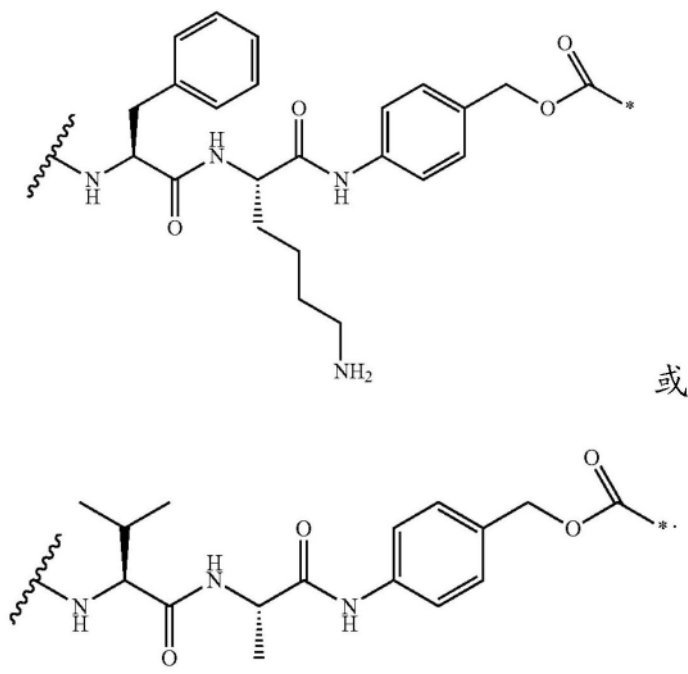


其中星号指示与N10位的连接点, 波形线指示与所述接头 L^1 的连接点, Y' 为 $NH-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)NH-$ 或 $-C(=O)O-$, 并且 n 为0至3。

137. 如权利要求136所述的方法, 其中 $-C(=O)O-$ 和 L^2 在一起形成以下基团:

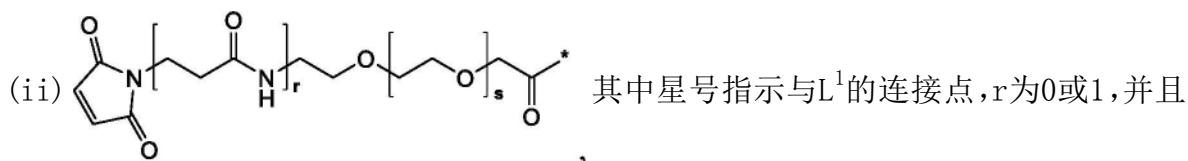
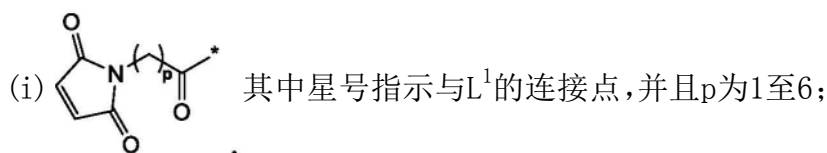


138. 如权利要求136所述的方法, 其中 L^1 和 L^2 与 $-OC(=O)-$ 一起组成选自以下的基团:



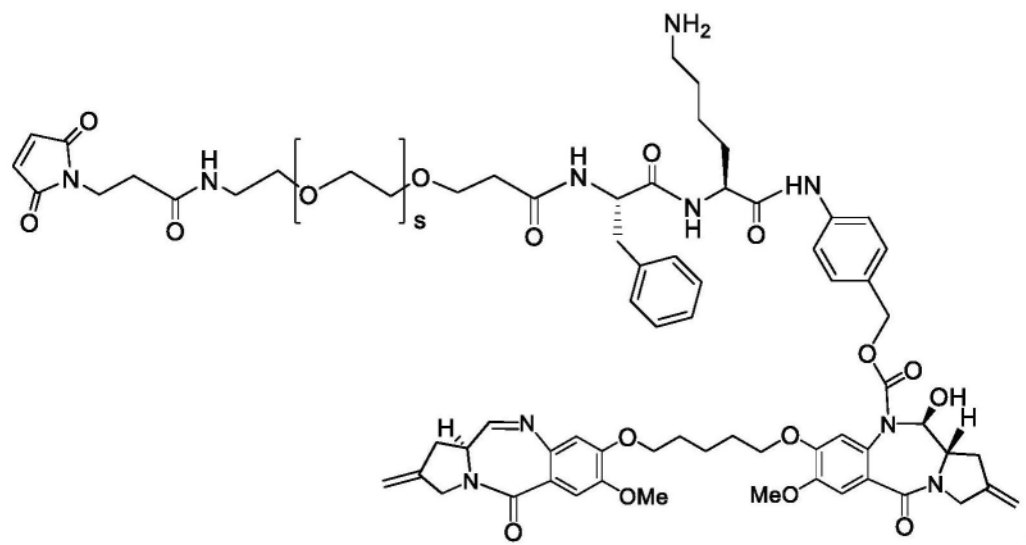
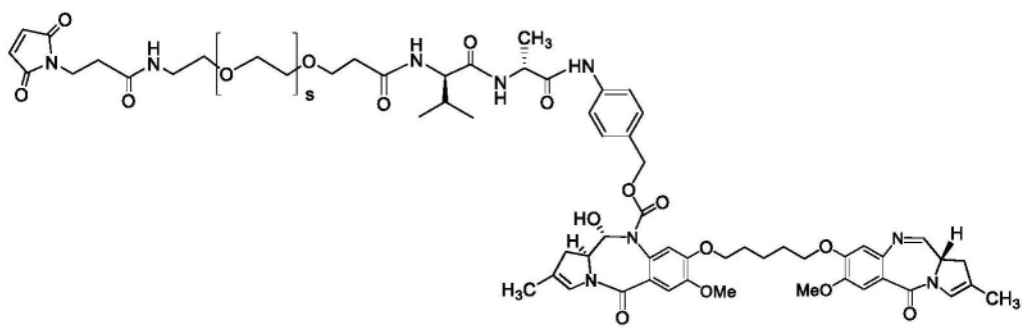
其中星号指示与N10位的连接点, 并且波形线指示与所述接头 L^1 的其余位置的连接点或与A的连接点。

139. 如权利要求131-138中任一项所述的方法, 其中A由以下中的一者表示:



140. 如权利要求139所述的方法,其中p为4至6;r为1;并且s为1至10。

141. 如权利要求131所述的方法,其中所述含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



或为其药学上可接受的盐,其中s为2至8。

142. 如权利要求141所述的方法,其中s为7。

143. 如权利要求1-142中任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂为抗体或其抗体片段。

144. 如权利要求1-142中任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂为具有工程化半胱氨酸残基的抗体。

145. 如权利要求144所述的方法,其中所述工程化半胱氨酸残基在抗体重链中的一者或两者的EU/OU编号442位处。

146. 如权利要求145所述的方法,其中所述工程化半胱氨酸残基在所述重链中的两者

上。

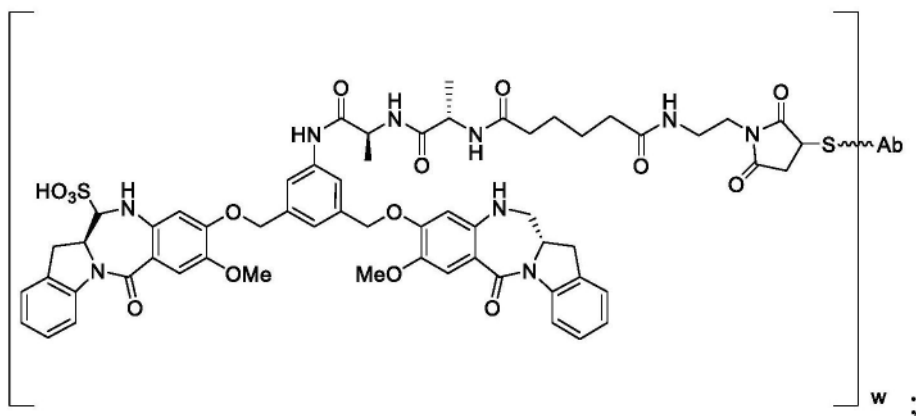
147. 如权利要求145所述的方法,其中所述工程化半胱氨酸残基在所述重链中的一者上。

148. 如权利要求143-147中任一项所述的方法,其中所述抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、表面重塑抗体或人类抗体。

149. 如权利要求148所述的方法,其中所述抗体为抗CD123抗体。

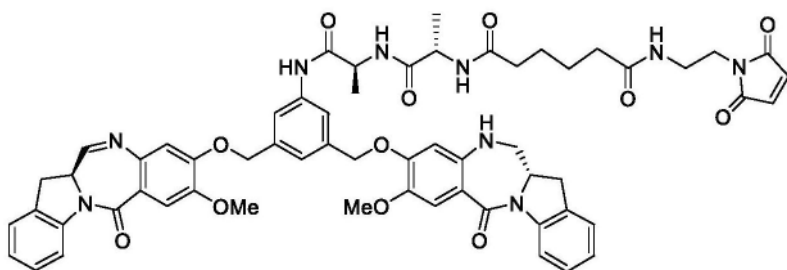
150. 如权利要求149所述的方法,其中所述抗CD123抗体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的免疫球蛋白重链区和具有氨基酸序列SEQ ID NO:26的免疫球蛋白轻链区。

151. 如权利要求1-39中任一项所述的方法,其中所述方法用于制备由下式表示的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物:

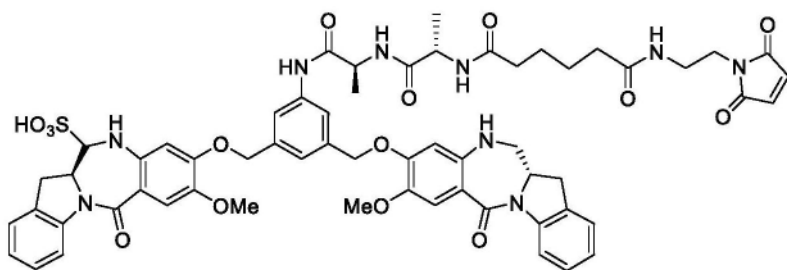


或其药学上可接受的盐,并且所述方法包括以下步骤:

(a) 使由下式表示的含亚胺细胞毒性剂或其药学上可接受的盐中的亚胺部分:



与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在pH 3.1至3.5的水溶液中反应以形成由下式表示的修饰的细胞毒性剂:



或其药学上可接受的盐;以及

(b) 使所述修饰的细胞毒性剂或其药学上可接受的盐与所述细胞结合剂Ab反应以形成所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,其中:

Ab为抗CD123抗体,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的免疫球蛋白重链区和具有

氨基酸序列SEQ ID NO:26的免疫球蛋白轻链区;并且

w为1或2。

152.如权利要求151所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH3.2至3.4下进行。

153.如权利要求151所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH3.3下进行。

154.如权利要求151-153中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在缓冲溶液的存在下进行。

155.如权利要求154所述的方法,其中所述缓冲溶液为柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液或磷酸盐缓冲液。

156.如权利要求155所述的方法,其中所述缓冲液为琥珀酸盐缓冲液。

157.如权利要求151-156中任一项所述的方法,其中使1.1至1.6当量所述亚硫酸氢盐或0.55至0.8当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

158.如权利要求157所述的方法,其中使1.3至1.5当量所述亚硫酸氢盐或0.65至0.75当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

159.如权利要求157所述的方法,其中使1.4当量所述亚硫酸氢盐或0.7当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

160.如权利要求151-159中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在pH 3.2至3.4下进行,并且使1.3至1.5当量所述亚硫酸氢钠与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

161.如权利要求151-160中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在二甲基乙酰胺(DMA)和水的混合物中进行。

162.如权利要求151-161中任一项所述的方法,其中步骤(a)的所述反应在室温下进行。

163.如权利要求151-162中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞毒性剂在步骤(b)中与所述细胞结合剂反应之前为未纯化的。

164.如权利要求151-163中任一项所述的方法,其中步骤(b)的所述反应在pH 5.5至6.5下进行。

165.如权利要求151-164中任一项所述的方法,其中所述缀合物通过切向流过滤来纯化以产生纯化的缀合物。

166.如权利要求165所述的方法,其中所述纯化的缀合物在包含40至80 μ M亚硫酸氢钠、pH 4至5的配制缓冲液中配制。

167.如权利要求166所述的方法,其中所述配制缓冲液包含50 μ M亚硫酸氢钠,pH 4.2。

苯并二氮草衍生物的选择性磺化

[0001] 本申请是申请日为2017年11月22日、申请号为201780084278.3、名称为“苯并二氮草衍生物的选择性磺化”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2016年11月23日提交的美国临时申请号62/425,761的提交日的权益,所述案的全部内容,包括所有附图、式、说明书、权利要求和序列表,均以引用方式并入本文。

背景技术

[0004] 抗体-细胞毒性剂缀合物(或“抗体-药物缀合物(ADC)”)和细胞结合剂-药物缀合物是新兴的跨一定范围的癌症具有功效的一类强大的抗肿瘤剂。细胞结合剂-药物缀合物(诸如ADC)通常由三种不同要素构成:细胞结合剂(例如,抗体);接头;和细胞毒性部分。细胞毒性药物部分可共价连接至抗体上的赖氨酸,得到缀合物,所述缀合物为带有不同数目的在抗体分子的不同位置处连接的药物的ADC的异质混合物。替代地,细胞毒性药物部分可通过硫醇反应性基团诸如马来酰亚胺基团共价连接至抗体上的半胱氨酸硫醇基团以形成位点特异性ADC。抗体与细胞毒性剂之间的缀合反应时常在水或水溶液中进行,其中使细胞毒性剂增溶需要少量有机溶剂。

[0005] 苯并二氮草化合物,包括三环苯并二氮草(诸如吡咯并苯并二氮草(PBD))和四环苯并二氮草(诸如吲哚啉并苯并二氮草),已用作与抗体键联以生成ADC的细胞毒性剂,其已示出有前景的抗肿瘤活性。此等苯并二氮草化合物含有亚胺键,其可结合至DNA的小沟并干扰DNA功能,导致细胞死亡。苯并二氮草化合物通常在水中具有非常低的溶解度。为了在与抗体的缀合反应中使苯并二氮草化合物增溶,需要相对大量的有机溶剂,其可使抗体不稳定。

[0006] 因此,需要开发用于制备细胞结合剂和含亚胺苯并二氮草药物的缀合物的新方法。

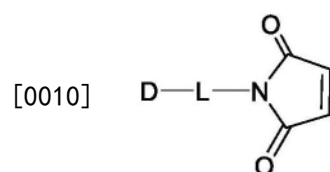
发明内容

[0007] 为了改良水溶性,可将含亚胺苯并二氮草化合物在与抗体进行缀合反应以形成抗体-苯并二氮草缀合物之前用亚胺反应性试剂(诸如亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐)处理。亚氨基团的磺化可增加苯并二氮草化合物的水溶性,导致与CBA(诸如抗体)的缀合反应的条件改良。然而,亲核试剂与 α,β -不饱和羰基之间的亲核加成为合成有机化学中熟知的。亚硫酸氢盐向马来酰亚胺的活化烯烃的亲核加成为此反应的一个此类实例。因此,当含亚胺苯并二氮草化合物带有马来酰亚胺时,与抗体共价键联的反应性基团马来酰亚胺部分和亚胺部分均与亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐反应以形成磺化马来酰亚胺和/或磺化亚胺。意外地发现,使带有马来酰亚胺基团的含亚胺吲哚啉并苯并二氮草化合物在低pH下与亚硫酸氢盐

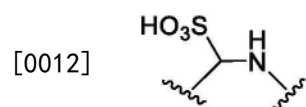
或偏亚硫酸氢盐反应可选择性地且有效地影响亚氨基团的磺化而无马来酰亚胺基团的显著磺化,从而增加吲哚啉并苯并二氮^草化合物与抗体之间的缀合反应的反应产率。此外,磺化吲哚啉并苯并二氮^草化合物具有增加的在水中的溶解度,并且因此,与抗体的缀合反应中需要显著较少量的有机溶剂(例如,DMA)。缀合反应中大量有机溶剂的存在可使抗体不稳定。

[0008] 本发明提供一种用于制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的新颖方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物包含带有马来酰亚胺基团的含亚胺细胞毒性剂,所述马来酰亚胺基团共价连接至细胞结合剂(CBA)。在一些实施方案中,本发明提供一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法,其包含以下步骤:

[0009] (a)使由下式表示的含亚胺细胞毒性剂或其药学上可接受的盐中的亚胺部分:



[0011] 与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在pH 1.9至5.0的水溶液中反应以形成包含由下式表示的修饰的亚胺部分的修饰的细胞毒性剂:



[0013] 或其药学上可接受的盐;以及

[0014] (b)使所述修饰的细胞毒性剂与细胞结合剂反应以形成所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,

[0015] 其中D为含亚胺细胞毒性化合物;并且L为接头。

[0016] 在一些实施方案中,D为含亚胺三环或四环苯并二氮^草化合物。

[0017] 在一些实施方案中,D为含亚胺三环苯并二氮^草化合物。

[0018] 在一些实施方案中,D为含亚胺四环苯并二氮^草化合物。

[0019] 如本文所用,含亚胺三环苯并二氮^草化合物是指具有稠合至苯并二氮^草核心的二氮^草部分的单环的化合物。单环可含有一个或多个额外杂原子诸如氧、硫或氮以及取代基诸如单环或多环。示例性三环苯并二氮^草化合物包括但不限于吡咯并苯并二氮^草(PBD),诸如W02010/043880、W02011/130616、W02009/016516、W0 2013/177481和W0 2012/112708中所述的那些。

[0020] 如本文所用,含亚胺四环苯并二氮^草化合物是指具有稠合至苯并二氮^草核心的二氮^草部分的双环的化合物。所述双环为任选地含有一个或多个额外杂原子诸如氧、硫或氮的稠合双环。示例性四环苯并二氮^草化合物包括但不限于吲哚啉并苯并二氮^草(IGN),诸如W0/2010/091150和W0 2012/128868中所述的那些。

[0021] 在一些实施方案中,D为吲哚啉并苯并二氮^草。

[0022] 在一些实施方案中,D为吡咯并苯并二氮^草(PBD)。

[0023] 本发明还提供通过本文所述的方法制备的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物和修饰的细胞毒性剂。

[0024] 应理解,除非明确否决或不适当,否则本文所述的任何实施方案,包括仅在本发明的一个方面下但不是其他方面所述的实施方案,并且包括仅出现于实施例中的实施方案,可与任何一个或多个其他实施方案组合。

附图说明

[0025] 图1示出含亚胺细胞毒性剂D1与亚硫酸氢钠的反应混合物在pH3.3下的UPLC色谱图。

[0026] 图2示出含亚胺细胞毒性剂D1与亚硫酸氢钠的反应混合物在pH4.75下的UPLC色谱图。

[0027] 图3示出含PBD亚胺细胞毒性剂塔立林(talirine)与亚硫酸氢钠的反应混合物的UPLC色谱图。

[0028] 图4A和图4B示出含亚胺细胞毒性剂D5与2.0(图4A)或2.5(图4B)当量亚硫酸氢钠的反应混合物的UPLC色谱图。

具体实施方式

[0029] 现将详细参照本发明某些实施方案,所述实施方案的实例以所附结构和式予以说明。尽管本发明将结合列举的实施方案进行描述,但应理解,其不意图将本发明局限于那些实施方案。相反,本发明意图旨在涵盖可包括在由权利要求所界定的本发明范畴内的所有替代物、修改和等同物。本领域的技术人员将认识到与本文所述的那些类似或等同的许多方法和材料,其可用于实践本发明。

[0030] 应理解,除非明确否决或不适当,否则本文所述的任一实施方案,包括在本发明不同方面和说明书不同部分(包括仅在实施例中所述的实施方案)下所述的那些,可与本发明的一个或多个其他实施方案组合。实施方案的组合不限于经由多个独立权利要求要求的那些具体组合。

[0031] 定义

[0032] 如本文所用的“烷基”或“直链或支链烷基”是指饱和直链或支链单价烃基。在优选实施方案中,直链或支链烷基具有三十个或更少碳原子(例如,直链烷基为 C_1-C_{30} 并且支链烷基为 C_3-C_{30}),并且更优选地二十个或更少碳原子。甚至更优选的是,直链或支链烷基具有十个或更少碳原子(即,直链烷基为 C_1-C_{10} 并且支链烷基为 C_3-C_{10})。在其他实施方案中,直链或支链烷基具有六个或更少碳原子(即,直链烷基为 C_1-C_6 或支链烷基为 C_3-C_6)。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基等等。此外,本说明书、实施例和权利要求通篇所使用的术语“烷基”意图旨在包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”,取代的烷基是指具有置换烃主链的一个或多个碳上的氢的取代基的烷基部分。如本文所用, (C_x-C_{xx}) 烷基或 C_{x-xx} 烷基意指具有x-xx个碳原子的直链或

支链烷基。

[0033] “烯基”或“直链或支链烯基”是指具有两个至二十个碳原子和至少一个不饱和位点(即,碳-碳双键)的直链或支链单价烃基,其中烯基包括具有“顺式”和“反式”取向或者“E”和“Z”取向的基团。实例包括但不限于乙烯基(ethylenyl或vinyl, $-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)等等。优选的是,烯基具有两个至十个碳原子。更优选的是,烷基具有两个至四个碳原子。

[0034] “炔基”或“直链或支链炔基”是指具有两个至二十个碳原子和至少一个不饱和位点(即,碳-碳三键)的直链或支链单价烃基。实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基等等。优选的是,炔基具有两个至十个碳原子。更优选的是,炔基具有两个至四个碳原子。

[0035] 术语“环状烷基”和“环烷基”可互换使用。如本文所用,所述术语是指饱和碳环的基团。在优选实施方案中,环烷基在其环结构中具有3至10个碳原子,并且更优选的是在环结构中具有5至7个碳原子。在一些实施方案中,两个环可具有共同的两个或更多个原子,例如,所述环为“稠环”。合适的环烷基包括但不限于环庚基、环己基、环戊基、环丁基和环丙基。在一些实施方案中,环烷基为单环基团。在一些实施方案中,环烷基为双环基团。在一些实施方案中,环烷基为三环基团。

[0036] 术语“环烷基烷基”是指上文所述的被环烷基取代的烷基。

[0037] 术语“环状烯基”是指在环结构中具有至少一个双键的碳环基团。

[0038] 术语“环状炔基”是指在环结构中具有至少一个三键的碳环基团。

[0039] 如本文所用的术语“芳基”包括取代或未取代的单环芳族基团,其中每个环原子为碳。优选的是,所述环为5至7元环,更优选地为6元环。芳基包括但不限于苯基、苯酚、苯胺等等。术语“芳基”还包括具有其中两个或更多个原子为两个邻接环(例如,所述环为“稠环”)所共有的两个或更多个环的“多环基”、“多环(polycycle)”和“多环(polycyclic)”系统,其中所述环中的至少一者为芳族,例如,其他环可为环烷基、环烯基、环炔基或芳族环。在一些优选实施方案中,多环具有2-3个环。在某些优选实施方案中,多环系统具有其中两个环为芳族的两个环。所述多环中的每个环可为取代或未取代的。在某些实施方案中,所述多环中的每个环在环中含有3至10个碳原子,优选地5至7个碳原子。例如,芳基包括但不限于苯基(苯)、甲苯基、蒽基、茚基、茛基、萘基、萘基和萘基、以及苯并稠合碳环部分诸如5,6,7,8-四氢萘基等等。在一些实施方案中,芳基为单环芳族基团。在一些实施方案中,芳基为二环芳族基团。在一些实施方案中,芳基为三环芳族基团。

[0040] 如本文所用的术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基”和“杂环(heterocyclic ring)”是指3至18元环、优选地3至10元环、更优选地3至7元环的取代或未取代的非芳族环结构,其环结构包括至少一个杂原子、优选地一至四个杂原子、更优选地一个或两个杂原子。在某些实施方案中,所述环结构可具有两个环。在一些实施方案中,两个环可具有共同的两个或更多个原子,例如,所述环为“稠环”。杂环基包括例如吡啶、吡嗪、吡咯烷、吗啉、内酯、内酰胺等等。杂环描述于Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocycle Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968), 尤其第1、3、4、6、7和9章; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 出版), 尤其第13、14、16、19和28卷; 和 J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566。杂环的实例包括但

不限于四氢呋喃、二氢呋喃、四氢噻吩(tetrahydrothiene)、四氢吡喃、二氢吡喃、四氢硫吡喃、硫吗啉、噻噁烷、高哌嗪、氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、高哌啶、哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、氧杂环庚烷、硫杂环庚烷、氮氧草、二氮草、硫氮草、2-吡咯啉、3-吡咯啉、吲哚啉、2H-吡喃、4H-吡喃、二噁烷、1,3-二氧戊环、吡唑啉、二噻烷、二硫戊环、二氢吡喃、二氢噻吩、二氢呋喃、吡唑烷基咪唑啉、咪唑烷、3-氮杂双环[3.1.0]己烷、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷和氮杂双环[2.2.2]己烷。螺环部分也包括在此定义的范畴内。环原子被氧代(=O)部分取代的杂环基团的实例为嘧啶酮和1,1-二氧化-硫吗啉。

[0041] 如本文所用的术语“杂芳基”是指环结构包括至少一个杂原子(例如,O、N或S)、优选地一个至四个或一个至三个杂原子、更优选地一个或两个杂原子的取代或未取代的芳族单环结构,优选地为5至7元环、更优选地为5至6元环。当两个或更多个杂原子存在于杂芳环中时,其可相同或不同。术语“杂芳基”还包括具有其中两个或更多个环原子为两个邻接环(例如,所述环为“稠环”)所共有的两个或更多个环的“多环基”、“多环”和“多环”系统,其中所述环中的至少一者为杂芳族,例如,其他环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳族和/或杂环。在一些优选实施方案中,多环杂芳基具有2-3个环。在某些实施方案中,优选多环杂芳基具有其中两个环为芳族的两个环。在某些实施方案中,所述多环中的每个环在环中含有3至10个原子,优选地在环中具有5至7个原子。例如,杂芳基包括但不限于吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、喹啉、嘧啶、吲哚、喹啉、吲哚、吲唑、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并呋喃、苯并噻吩、噌啉、酞嗪、喹唑啉、呋唑、吩噻嗪、喹啉、嘌呤等等。在一些实施方案中,杂芳基为单环芳族基团。在一些实施方案中,杂芳基为二环芳族基团。在一些实施方案中,杂芳基为三环芳族基团。

[0042] 可能时,杂环或杂芳基可为碳(碳连接)或氮(氮连接)连接的。例如且不限于,碳键合的杂环或杂芳基键合在吡啶的2、3、4、5或6位;哒嗪的3、4、5或6位;嘧啶的2、4、5或6位;吡嗪的2、3、5或6位;呋喃、四氢呋喃、硫呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的2、3、4或5位;噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位;异噁唑、吡唑或异噻唑的3、4或5位;氮杂环丙烷的2或3位;氮杂环丁烷的2、3或4位;喹啉的2、3、4、5、6、7或8位;或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。

[0043] 例如且不限于,氮键合的杂环或杂芳基键合在氮杂环丙烷、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啉、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲哚的1位;异吲哚或异吲哚啉的2位;吗啉的4位;和呋唑或0-呋啉的9位。

[0044] 杂芳基或杂环基中存在的杂原子包括氧化形式诸如NO、SO和SO₂。

[0045] 术语“卤代”或“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。

[0046] 如本文所用,术语“卤代烷基”是指被一个或多个如本文定义的卤代取代的如本文定义的烷基。卤代烷基可为单卤代烷基、二卤代烷基或多卤代烷基。单卤代烷基可具有一个氟、氯、溴或碘取代基。二卤代烷基或多卤代烷基可被两个或更多个相同卤原子或不同卤代基的组合取代。卤代烷基的实例包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、五氟乙基、七氟丙基、二氟氯甲基、二氯氟甲基、二氟乙基、二氟丙基、二氯乙基和二氯丙基。

[0047] 本文所用的“烷氧基”是指烷基-O-,其中烷基在上文中加以定义。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等等。

[0048] 上文所述的烷基、卤代烷基、烷氧基、烯基、炔基、环状烷基、环状烯基、环状炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基可任选地被一个或多个(例如,2、3、4、5、6或更多个)取代基取代。

[0049] 除非明确陈述为“未取代”,否则对本文化学部分的参考理解为还包括取代变体。例如,对“烷基”或部分的参考隐含包括取代和未取代变体。化学部分上取代基的实例包括但不限于卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫羰基(诸如硫酯、硫乙酸酯或硫甲酸酯)、烷氧基、烷基硫基、酰氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳基或杂芳基部分。

[0050] “任选的”或“任选地”意指随后描述的情况可能发生或可能不发生,使得本申请包括情况发生的情形和情况不发生的情形。例如,短语“任选取代的”意指非氢取代基可能或可不存在于给定原子上,并且因此,本申请包括其中存在非氢取代基的结构和其中不存在非氢取代基的结构。

[0051] 术语“取代的”是指部分具有置换一个或多个碳、氮、氧或硫原子上氢的取代基。应了解“取代”或“被...取代”包括隐含限制条件,即此取代符合取代的原子和取代基的允许价态,并且取代产生稳定化合物,例如不自发经受诸如通过重排、环化、消除等所进行的转化的稳定化合物。如本文所用,术语“取代的”旨在包括有机化合物的所有可允许取代基。在一广泛方面中,可允许的取代基包括有机化合物的非环和环状、支链和非支链、碳环和杂环、芳族和非芳族取代基。对于适当有机化合物,可允许取代基可为一种或多种取代基且可为相同或不同。出于本发明的目的,诸如氮的杂原子可具有氢取代基和/或本文所述的有机化合物的满足杂原子价态的任何可允许取代基。取代基可包括本文所述的任何取代基,例如,卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫羰基(诸如硫酯、硫乙酸酯或硫甲酸酯)、烷氧基、烷基硫基、酰氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、氨基、酰氨基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基或其芳族或杂芳族部分。为了说明,单氟烷基为被一个氟取代基取代的烷基,并且二氟烷基为被两个氟取代基取代的烷基。应认识到,如果在取代基上存在多于一个取代,那么每个非氢取代基可相同或不同(除非另外说明)。

[0052] 如果取代基的碳描述为任选地被取代基清单中的一者或多者取代,那么所述碳上的一个或多个氢(在存在的氢原子数情况下)可单独和/或一起被独立选择的任选取代基置换。如果取代基的氮描述为任选地被取代基清单中的一者或多者取代,那么所述氮上的一个或多个氢(在存在的氢原子数情况下)可各自被独立选择的任选取代基置换。一个示例性取代基可描述为-NR'R",其中R'和R"连同其所连接的氮原子一起可形成杂环。由R'和R"连同其所连接的氮原子一起形成的杂环可为部分或完全饱和的。在一些实施方案中,杂环由3至7个原子组成。在其他实施方案中,杂环选自由以下组成的群组:吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、异噁唑基、吡啶基和噻唑基。

[0053] 本说明书可互换使用术语“取代基”和“基团(radical/group)”。

[0054] 如果一组取代基统一描述为任选地被取代基清单中的一者或多者取代,那么所述组可包括:(1)不可取代的取代基、(2)未被任选取代基取代的可取代的取代基和/或(3)被一个或多个任选取代基取代的可取代的取代基。

[0055] 如果取代基描述为任选地至多特定数量的非氢取代基取代,那么所述取代基可为(1)未取代的;或(2)被至多所述特定数量的非氢取代基或被取代基上至多最大数量的可取代位置取代,以数量较少者为准。因此,例如,如果取代基描述为任选地被至多3个非氢取代基取代的杂芳基,那么具有少于3个可取代位置的任何杂芳基将任选地被至多仅所述杂芳基所具有的可取代位置的数量的非氢取代基取代。在非限制性实例中,此类取代基可选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,芳基,杂芳基,杂环基,卤素,胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR^{100}$, $NR^{101}R^{102}$, $-NO_2$, $-NR^{101}COR^{102}$, $-SR^{100}$, 由 $-SOR^{101}$ 表示的亚砷,由 $-SO_2R^{101}$ 表示的砷,磺酸酯 $-SO_3M$, 硫酸酯 $-OSO_3M$, 由 $-SO_2NR^{101}R^{102}$ 表示的磺酰胺,氰基,叠氮基, $-COR^{101}$, $-OCOR^{101}$, $-OCONR^{101}R^{102}$, 和聚乙二醇单元 $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$, 其中M为H或阳离子(诸如 Na^+ 或 K^+); R^{101} 、 R^{102} 和 R^{103} 各自独立地选自H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $(-OCH_2CH_2)_nR^{104}$ (其中n为整数1至24),具有6至10个碳原子的芳基,具有3至10个碳原子的杂环,和具有5至10个碳原子的杂芳基;并且 R^{104} 为H或具有1至4个碳原子的直链或支链烷基,其中由 R^{100} 、 R^{101} 、 R^{102} 、 R^{103} 和 R^{104} 表示的基团中的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和杂环已任选地被一个或多个(例如,2、3、4、5、6或更多个)独立地选自卤素、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 和具有1至4个碳原子的直链或支链烷基的取代基取代。优选的是,上文所述的任选取代的烷基、烯基、炔基、环状烷基、环状烯基、环状炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基的取代基包括卤素、 $-CN$ 、 $-NR^{102}R^{103}$ 、 $-CF_3$ 、 $-OR^{101}$ 、芳基、杂芳基、杂环基、 $-SR^{101}$ 、 $-SOR^{101}$ 、 $-SO_2R^{101}$ 和 $-SO_3M$ 。

[0056] 基团中的碳原子数在本文中通过前缀“ C_{x-xx} ”或“ C_x-C_{xx} ”指定,其中x和xx为整数。例如,“ C_{1-4} 烷基”或“C1-C4烷基”为具有1至4个碳原子的烷基。

[0057] 术语“化合物”或“细胞毒性化合物”、“细胞毒性二聚体”和“细胞毒性二聚体化合物”可互换使用。其旨在包括结构或式或其任何衍生物已经公开于本发明中或结构或式或其任何衍生物以引用方式并入的化合物。所述术语还包括本发明中公开的所有式的化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂合物、代谢物、盐(例如,药学上可接受的盐)以及前药和前药盐。所述术语还包括前述任一者的任何溶剂合物、水合物和多晶型物。在本申请中所述的本发明某些方面中“立体异构体”、“几何异构体”、“互变异构体”、“溶剂合物”、“代谢物”、“盐”、“前药”、“前药盐”、“缀合物”、“缀合物盐”、“溶剂合物”、“水合物”或“多晶型物”的具体陈述不应解释为旨在在使用术语“化合物”而未陈述这些其他形式的本发明其他方面中省略这些形式。

[0058] 如本文使用的术语“缀合物”是指连接至细胞结合剂的本文所述化合物或其衍生物。

[0059] 如本文所用,术语“可连接至细胞结合剂”是指本文所述的化合物或其衍生物包含至少一个合适于将这些化合物或其衍生物键合至细胞结合剂的连接基团或其前体。

[0060] 术语给定基团的“前体”是指可通过任何脱保护、化学修饰或偶联反应产生所述基团的任何基团。

[0061] 术语“手性”是指分子具有与镜像搭配物不可重叠的性质,而术语“非手性”是指分子可重叠于其镜像搭配物上。

[0062] 术语“立体异构体”是指具有相同化学构造和连接性但原子的取向不同,无法通过围绕单键的旋转而相互转化的化合物。

[0063] “非对映异构体”是指具有两个或更多个手性中心并且分子不互为镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同物理性质,例如熔点、沸点、光谱性质和反应性。非对映异构体的混合物可在诸如结晶、电泳和色谱的高分辨率分析程序下分离。

[0064] “对映异构体”是指化合物的两个彼此为不可重叠镜像的立体异构体。

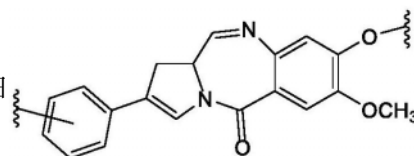
[0065] 本文使用的立体化学定义和惯例通常遵循S.P.Parker编, McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 和 Eliel, E. 和 Wilen, S., “Stereochemistry of Organic Compound,” John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994。本发明化合物可含有不对称或手性中心, 并且因此以不同立体异构形式存在。旨在本发明化合物的所有立体异构形式, 包括但不限于非对映异构体、对映异构体和阻转异构体, 以及其混合物(诸如外消旋混合物), 均形成本发明的一部分。许多有机化合物以光学活性形式存在, 即, 其能够使平面偏振光的平面旋转。在描述光学活性化合物时, 前缀D和L或R和S用于表示分子围绕其一个或多个手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于表示化合物旋转平面偏振光的符号, 其中(-)或l意指所述化合物为左旋的。前缀为(+)或d的化合物为右旋的。对于给定化学结构, 这些立体异构体相同, 除了其彼此为镜像。特定立体异构体还可称为对映异构体, 并且此类异构体的混合物常称为对映异构混合物。对映异构体的50:50混合物称为外消旋混合物或外消旋物, 其可在化学反应或过程中不存在立体选择或立体特异性时存在。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”是指两种对映异构物质的缺乏光学活性的等摩尔混合物。

[0066] 术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指具有不同能量的结构异构体, 能垒其可通过低能垒相互转化。例如, 质子互变异构体(还称为质子转移互变异构体)包括通过质子迁移发生的相互转化, 诸如酮基-烯醇和亚胺-烯胺异构化。价互变异构体包括通过一些键合电子的重排发生的相互转化。

[0067] 如本文使用, “苯并二氮⁷”化合物为具有苯并二氮⁷核心结构的化合物。苯并二氮⁷核心可为取代或未取代的和/或与一个或多个环结构稠合。其还包括具有两个通过接头连接的苯并二氮⁷核心的化合物。作为苯并二氮⁷核心的部分的亚胺官能团(-C=N-)可被还原。

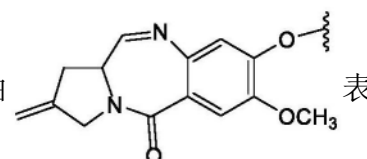
[0068] 如本文所用, “吡咯并苯并二氮⁷”(PBD)化合物为具有吡咯并苯并二氮⁷核心结构的化合物。吡咯并苯并二氮⁷可为取代或未取代的。其还包括具有两个通过接头连接的吡咯并苯并二氮⁷核心的化合物。作为吡咯并苯并二氮⁷核心的部分的亚胺官能团(-C=N-)可被还原。

[0069] 在某些实施方案中, 吡咯并苯并二氮⁷化合物包含由



表示的核心结构, 其被可任选地取代。

[0070] 在某些实施方案中, 吡咯并苯并二氮⁷化合物包含由

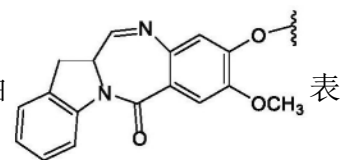


表

示的核心结构,其可被任选地取代。

[0071] 如本文所用,“吲哚啉并苯并二氮^草”(IGN)化合物为具有吲哚啉并苯并二氮^草核心结构的化合物。吲哚啉并苯并二氮^草可为取代或未取代的。其还包括具有两个通过接头连接的吲哚啉并苯并二氮^草核心的化合物。作为吲哚啉并苯并二氮^草核心的部分的亚胺官能团($-C=N-$)可被还原。

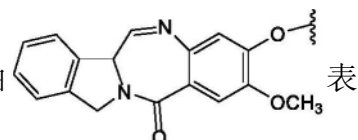
[0072] 在某些实施方案中,吲哚啉并苯并二氮^草化合物包含由



表

示的核心结构,其可被任选地取代。

[0073] 在一些实施方案中,吲哚啉并苯并二氮^草化合物包含由



表

示的核心结构,其可被进一步取代。

[0074] 如本文使用的短语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的有机或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐(gentisinate)、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、蔗糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐“甲磺酸盐”、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、扑酸盐(即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘酸盐))、碱金属(例如,钠和钾)盐、碱土金属(例如,镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及包括另一分子,诸如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。所述抗衡离子可为使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外,药学上可接受的盐的结构中可具有多于一种带电原子。多个带电原子为药学上可接受的盐的一部分的情况可具有多个抗衡离子。因此,药学上可接受的盐可具有一种或多种带电原子和/或一种或多种抗衡离子。

[0075] 如果本发明化合物为碱,那么所需药学上可接受的盐可通过本领域中可用的任何合适方法制备,例如用诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等等的无机酸或用诸如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖苷酸(pyranosidyl acid)(诸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸)、 α 羟基酸(诸如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(诸如天冬氨酸或谷氨酸)、芳族酸(诸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(诸如对甲苯磺酸或乙磺酸)等等的有机酸处理游离碱。

[0076] 如果本发明的化合物为酸,那么所需药学上可接受的盐可通过任何合适的方法制备,例如用诸如胺(伯胺、仲胺或叔胺)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等等的无机或有机碱处理游离酸。合适的盐的说明性实例包括但不限于衍生自氨基酸(诸如甘氨酸和精氨酸)、氨、伯胺、仲胺和叔胺和环状胺(诸如哌啶、吗啉和哌嗪)的有机盐,以及衍生自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

[0077] 如本文所用,术语“溶剂合物”意指还包括通过非共价分子间力键合的化学计量或

非化学计量的量的溶剂(诸如水、异丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸以及乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇等等)的化合物。化合物的溶剂合物或水合物易于通过将至少一摩尔当量羟基溶剂(诸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)添加至化合物以得到亚胺部分的溶剂化或水合作用来制备。

[0078] 短语“药学上可接受的”指示物质或组合物必须与构成制剂的其他成分和/或用其治疗的哺乳动物在化学上和/或毒理学上相容。

[0079] 术语“保护基”或“保护部分”是指常用于在化合物、其衍生物或其缀合物上的其他官能团反应时阻断或保护特定官能团的取代基。例如，“胺保护基”或“氨基保护部分”为连接至氨基、阻断或保护化合物中的氨基官能团的取代基。此类基团为本领域中熟知的(参见例如P.Wuts和T.Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第7章, J.Wiley&Sons, NJ)并且例证为氨基甲酸酯, 诸如氨基甲酸甲酯和氨基甲酸乙酯、Fmoc、取代的氨基甲酸乙酯、通过1,6- β -消除反应(还称“自消耗(self immolative)”)裂解的氨基甲酸酯; 脲; 酰胺; 肽; 烷基和芳基衍生物。合适的氨基保护基包括乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧羰基(BOC)、苄氧羰基(CBZ)和9-芴基亚甲基氧羰基(Fmoc)。有关保护基和其应用的一般描述, 参见P.G.M.Wuts和T.W.Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley&Sons, New York, 2007。

[0080] 术语“离去基团”是指一组在取代或置换期间离去的带电或不带电部分。此类离去基团为本领域中熟知的, 并且包括但不限于卤素、酯、烷氧基、羟基、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯、腈、叠氮化物、氨基甲酸酯、二硫化物、硫酯、硫醚和重氮化合物。

[0081] 术语“双官能交联剂”、“双官能接头”或“交联剂”是指具有两个反应性基团的修饰剂; 所述两个反应性基团中的一者能够与细胞结合剂反应, 而另一者与细胞毒性化合物反应, 以将两个部分连接在一起。此类双官能交联剂为本领域中熟知的(参见例如Isalm和Dent, *Bioconjugation*第5章, 第218-363页, Groves Dictionaries公司, New York, 1999中)。例如, 能够经由硫醚键键联的双官能交联剂包括用以引入马来酰亚胺基的N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-甲酸酯(SMCC)或用以引入碘代乙酰基的N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)。将马来酰亚胺基或碘代乙酰基引入细胞结合剂上的其他双官能交联剂为本领域中熟知的(参见美国专利申请2008/0050310、20050169933, 可从Pierce Biotechnology公司P.O.Box 117, Rockland, IL 61105, USA获得)并且包括但不限于双-马来酰亚胺基聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)₂、BM(PEO)₃、N-(β -马来酰亚胺基丙氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、 γ -马来酰亚胺基丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺基己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、5-马来酰亚胺基戊酸NHS、HBVS、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸酯)(其为SMCC(LC-SMCC)的“长链”类似物)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酰肼或盐酸盐(MPBH)、N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰基)丙酸酯(SBAP)、N-琥珀酰亚胺基碘代乙酸酯(SIA)、 κ -马来酰亚胺基十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、N-琥珀酰亚胺基4-(对马来酰亚胺基苯基)-丁酸酯(SMPB)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰胺)己酸酯(SMPH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺基乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺基丁烷(BMB)、1,4双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺基己烷(BMH)、双-马来酰亚胺基乙烷(BMOE)、磺基

琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、磺基琥珀酰亚胺基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-SIAB)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ϵ -马来酰亚胺基己酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ -马来酰亚胺基十一烷酰基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)和磺基琥珀酰亚胺基4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸酯(磺基-SMPB)。

[0082] 异双官能交联剂为具有两个不同反应性基团的双官能交联剂。还可使用含有胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS基团)和羰基反应性肼基的异双官能交联剂将本文所述细胞毒性化合物与细胞结合剂(例如,抗体)连接。所述可商购获得的异双官能交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基6-肼基烟酰胺丙酮脒(SANH)、琥珀酰亚胺基4-肼基对邻苯二甲酸酯盐酸盐(SHTH)和琥珀酰亚胺基肼烟酸酯盐酸盐(SHNH)。带有酸不稳定键联的缀合物还可使用带有肼的本发明苯并二氮~~草~~衍生物制备。可使用的双官能交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯甲酸酯(SFB)和琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯氧基乙酸酯(SFPA)。

[0083] 能够经由二硫键将细胞结合剂与细胞毒性化合物键联的双官能交联剂为本领域中已知的并且包括用以引入二硫吡啶基的N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基丁酸酯(磺基-SPDB)。可用以引入二硫基团的其他双官能交联剂为本领域中已知的并且公开于:美国专利6,913,748;6,716,821和US专利公布20090274713和20100129314,所有所述专利均以引用方式并入本文。替代地,还可使用交联剂诸如2-亚氨基硫杂环戊烷、高半胱氨酸硫内酯或S-乙酰基琥珀酸酐引入硫醇基。

[0084] 如本文所定义,“接头”、“连接部分”或“连接基团”是指将两个基团(诸如细胞结合剂和细胞毒性化合物)连接在一起的部分。通常,接头在连接其所连接的两个基团的条件下实质上呈惰性。双官能交联剂可包含两个反应性基团,在接头部分每一端各一个,使得一个反应性基团可首先与细胞毒性化合物反应以提供带有接头部分和第二反应性基团的化合物,所述化合物然后可与细胞结合剂反应。替代地,双官能交联剂的一端可首先与细胞结合剂反应以提供带有接头部分和第二反应性基团的细胞结合剂,所述细胞结合剂然后可与细胞毒性化合物反应。连接部分可含有允许细胞毒性部分在特定位点释放的化学键。合适的化学键为本领域中熟知的并且包括二硫键、硫醚键、酸不稳定键、光不稳定键、肽酶不稳定键和酯酶不稳定键(参见例如美国专利5,208,020;5,475,092;6,441,163;6,716,821;6,913,748;7,276,497;7,276,499;7,368,565;7,388,026和7,414,073)。优选为二硫键、硫醚键和肽酶不稳定键。可用于本发明中的其他接头包括不可裂解的接头,诸如美国公开号20050169933中详细描述的那样;或带电接头或亲水性接头,并且描述于US 2009/0274713、US 2010/0129314和WO 2009/134976,每一专利均以引用的方式清楚地并入本文中,每一专利均案以引用的方式清楚地并入本文中。

[0085] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸由 $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}, \text{R}^{\text{aa'}})\text{-C}(=\text{O})\text{OH}$ 表示,其中 R^{aa} 和 $\text{R}^{\text{aa'}}$ 各自独立地为H,具有1至10个碳原子的任取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,芳基,杂芳基或杂环基,或者 R^{aa} 和N末端氮原子可一起形成杂环(例如,如在脯氨酸中)。术语“氨基酸残基”是指当一个氢原子

从氨基酸的胺和/或羧基端移除时得到的对应残基,诸如-NH-C(R^{aa},R^{aa})-C(=O)O⁻。

[0086] 术语“肽”是指肽(酰胺)键连接的氨基酸单体的短链。在一些实施方案中,肽含有2至20个氨基酸残基。在其他实施方案中,肽含有2至10个氨基酸残基。在又其他实施方案中,肽含有2至5个氨基酸残基。如本文所用,当肽为细胞毒性剂或本文所述的由具体氨基酸序列表示的接头的一部分时,所述肽可在两个方向上连接至所述细胞毒性剂或所述接头的其余部分。例如,二肽X₁-X₂包括X₁-X₂和X₂-X₁。类似地,三肽X₁-X₂-X₃包括X₁-X₂-X₃和X₃-X₂-X₁,并且四肽X₁-X₂-X₃-X₄包括X₁-X₂-X₃-X₄和X₄-X₃-X₂-X₁。X₁、X₂、X₃和X₄表示氨基酸残基。

[0087] 术语“阳离子”是指带正电的离子。阳离子可为一价(例如,Na⁺、K⁺等)、二价(例如,Ca²⁺、Mg²⁺等)或多价(例如,Al³⁺等)。优选的是,阳离子为一价。

[0088] 术语“半胱氨酸工程化抗体”包括具有至少一个通常不存在于抗体轻链或重链的给定残基的半胱氨酸(Cys)的抗体。此类Cys(其还可称为“工程化Cys”)可例如通过标准重组技术(例如,通过用Cys的编码序列置换标靶残基处非Cys残基的编码序列)来引入。在某些实施方案中,本发明的Cys工程化抗体在重链中具有工程化Cys。在某些实施方案中,工程化Cys在重链的CH3结构域中或附近。在某些实施方案中,工程化Cys在重链的残基442处(EU/OU编号)。

[0089] 如本文所用,本文所述的所有抗体氨基酸残基为根据EU索引,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH出版号91-3242,1991进行编号(EU/OU编号,全部内容以引用方式并入)。共同的同种型称为G1、G2、G4等。

[0090] C442残基可通过C442残基的游离硫醇基团,诸如通过与细胞毒性药物的硫醇反应性试剂(例如,马来酰亚胺基),与细胞毒性药物/剂缀合。

[0091] 如本文所用,“水溶液”是指其中溶剂为水或水和一种或多种有机溶剂的混合物的溶液。

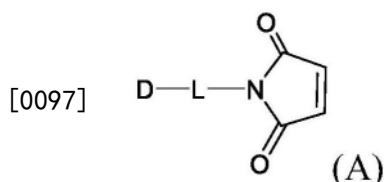
[0092] 如本文所用,术语“治疗(treating或treatment)”包括以改良或稳定受试者的病状的方式逆转、减轻或遏止病状的症状、临床征象和根本病理学。如本文所用,并且如本领域中所理解,“治疗”为一种用于获得有益或所需结果包括临床结果的方法。有益或所需临床结果可包括但不限于可检测或不可检测地减轻、改善或减缓与病状(例如,癌症)相关的一个或多个症状或病状,降低疾病程度,使疾病状态稳定(即,不恶化),延迟或延缓疾病进展,改善或缓解疾病状态,以及缓和(部分或完全)。“治疗”还可意指与在不接受治疗情况下预期的存活相比使存活延长。本文描述示例性有益临床结果。

[0093] 本发明的方法

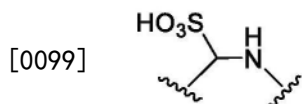
[0094] 本发明提供用于制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的新颖方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物包含带有马来酰亚胺基团的含亚胺细胞毒性剂,所述马来酰亚胺基团共价连接至细胞结合剂(CBA)。

[0095] 在一些实施方案中,本发明的用于制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法包括以下步骤:

[0096] (a)使由下式表示的含亚胺细胞毒性剂或其药学上可接受的盐中的亚胺部分:



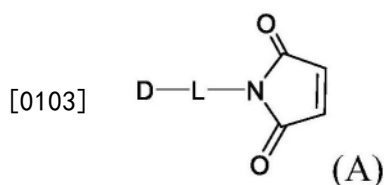
[0098] 与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在pH 1.9至5.0的水溶液中反应以形成包含由下式表示的修饰的亚胺部分的修饰的细胞毒性剂:



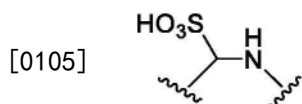
[0100] 或其药学上可接受的盐;以及

[0101] (b) 使所述修饰的细胞毒性剂与细胞结合剂反应以形成所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物。在一些实施方案中,所述亚硫酸氢盐为亚硫酸氢钠或亚硫酸氢钾。更具体来说,所述亚硫酸氢盐为亚硫酸氢钠。在又其他实施方案中,所述偏亚硫酸氢盐为偏亚硫酸氢钠或偏亚硫酸氢钾。更具体来说,所述偏亚硫酸氢盐为偏亚硫酸氢钠。

[0102] 本发明还提供一种制备修饰的细胞毒性剂的方法,其包括将由下式表示的含亚胺细胞毒性剂的亚胺部分:



[0104] 与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在pH 1.9至5.0的水溶液中反应以形成包含由下式表示的修饰的亚胺部分的修饰的细胞毒性剂:



[0106] 或其药学上可接受的盐的步骤。在一些实施方案中,所述反应可在下文第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七方面中所述的反应条件下进行。

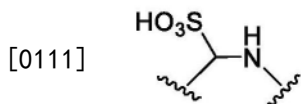
[0107] 在第一方面中,对于上文所述的本发明方法,步骤(a)的反应在pH 1.9至5.0下进行。更具体来说,pH为2.5至4.9、1.9至4.8、2.0至4.8、2.5至4.5、2.9至4.5、2.9至4.0、2.9至3.7、3.1至3.5或3.2至3.4。在另一具体实施方案中,步骤(a)的反应在pH 1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0下进行。在又另一具体实施方案中,步骤(a)的反应为在pH3.3下进行。

[0108] 如本文所用,具体pH值意指具体值±0.05。

[0109] 在一些实施方案中,步骤(a)的反应在缓冲溶液的存在下进行。本领域中已知的任何合适的缓冲溶液可用于本发明方法中。合适的缓冲溶液包括例如但不限于柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、含甘氨酸缓冲液(例如,甘氨酸-盐酸缓冲液)、邻苯二甲酸盐缓冲液(例如,包含邻苯二甲酸氢钠或邻苯二甲酸氢钾的缓冲溶液)及其组合。在一些实施方案中,缓冲溶液为琥珀酸盐缓冲液。在一些实施方案中,缓冲溶液

为磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液为柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液为包含柠檬酸和 Na_2HPO_4 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液。在其他实施方案中,缓冲液为包含柠檬酸和 K_2HPO_4 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中,上文所述的缓冲溶液的浓度可在10至250mM、10至200mM、10至150mM、10至100mM、25至100mM、25至75mM、10至50mM或20至50mM的范围内。

[0110] 在第二方面中,反应步骤(a)在不存在缓冲溶液(例如,第一方面中所述的缓冲液)的情况下进行。在一些实施方案中,本发明方法包括以下步骤:(a)使由式(A)表示的含亚胺细胞毒性剂或其药学上可接受的盐中的亚胺部分与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在水溶液中反应以形成包含由下式表示的修饰的亚胺部分的修饰的细胞毒性剂:



[0112] 或其药学上可接受的盐,其中所述水溶液不包含缓冲液;以及

[0113] (b)使所述修饰的细胞毒性剂与细胞结合剂反应以形成所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物。在一些实施方案中,步骤(a)的反应在有机溶剂和水的混合物中进行。更具体来说,步骤(a)的反应在二甲基乙酰胺(DMA)和水的混合物中进行。在一些实施方案中,DMA和水的混合物包含按体积计小于60%的DMA。甚至更具体来说,DMA和水的体积比为1:1。

[0114] 在第三方面中,对于上文所述或第一或第二方面中的方法,对于步骤(a)的反应中每1当量含亚胺细胞毒性剂使用0.5至5.0当量所述亚硫酸氢盐或0.25或2.5当量所述偏亚硫酸氢盐。在一些实施方案中,对于每1当量含亚胺细胞毒性剂使用0.5至4.5、0.5至4.0、0.5至3.5、0.5至4.0、0.5至3.5、0.5至3.0、0.5至2.5、0.8至2.0、0.9至1.8、1.0至1.7、1.1至1.6或1.2至1.5当量所述亚硫酸氢盐,或0.25至2.25、0.25至2.0、0.25至1.75、0.25至2.0、0.25至1.75、0.25至1.5、0.25至1.25、0.4至1.0、0.45至0.9、0.5至0.85、0.55至0.8或0.6至0.75当量所述偏亚硫酸氢盐。在其他实施方案中,对于每1当量含亚胺细胞毒性剂使用0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、4.0、4.5或5.0当量所述亚硫酸氢盐,或0.25、0.3、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.0、1.05、1.1、1.15、1.2、1.25、1.3、1.35、1.4、1.45、1.5、1.55、1.6、1.65、1.7、1.75、2.0、2.25或2.5当量所述偏亚硫酸氢盐。在又其他实施方案中,对于每1当量含亚胺细胞毒性剂使用1.4当量所述亚硫酸氢盐或0.7当量所述偏亚硫酸氢盐。在其他实施方案中,对于每1当量含亚胺细胞毒性剂使用1.2当量所述亚硫酸氢盐或0.6当量所述偏亚硫酸氢盐。

[0115] 如本文所用,具体当量意指具体值 ± 0.05 。

[0116] 在第四方面中,对于本发明方法,步骤(a)的反应在pH 2.9至3.7下进行,并且使1.0至1.8当量所述亚硫酸氢盐或0.5至0.9当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量含亚胺细胞毒性剂反应。在一些实施方案中,步骤(a)的反应在pH 3.1至3.5下进行,并且使1.1至1.6当量所述亚硫酸氢盐或0.55至0.8当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量含亚胺细胞毒性剂反应。在其他实施方案中,步骤(a)的反应在pH 3.2至3.4下进行,并且使1.3至1.5当量所述亚硫酸氢盐或0.65至0.75当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量含亚胺细胞毒性剂反应。在其他实施方案中,步骤(a)的反应在pH 3.3下进行,并且使1.4当量所述亚硫酸氢盐或0.7当量所述偏亚硫酸

氢盐与1当量含亚胺细胞毒性剂反应。在又其他实施方案中,在其他实施方案中,步骤(a)的反应在pH 3.3下进行,并且使1.4当量亚硫酸氢钠与1当量含亚胺细胞毒性剂反应。

[0117] 在第五方面中,对于本文所述或第一、第二、第三或第四方面中的本发明方法,步骤(a)的反应在有机溶剂和水的混合物中进行。可使用任何合适的有机溶剂。示例性有机溶剂包括但不限于醇(例如,甲醇、乙醇、丙醇等)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)、乙腈、丙酮、二氯甲烷等。在一些实施方案中,有机溶剂可与水混溶。在其他实施方案中,有机溶剂不可与水混溶,即,步骤(a)的反应在双相溶液中进行。在一些实施方案中,有机溶剂为二甲基乙酰胺(DMA)。按水和有机溶剂的总体积计,有机溶剂(例如,DMA)可以1%-99%、1-95%、10-80%、20-70%、30-70%、1-60%、5-60%、10-60%、20-60%、30-60%、40-60%、45-55%、10-50%或20-40%的量存在。在一些实施方案中,步骤(a)的反应在DMA和水的混合物中进行,其中DMA与水的体积比为1:1。

[0118] 在第六方面中,对于本文所述或第一、第二、第三、第四或第五方面中的本发明方法,步骤(a)的反应可在任何合适的温度下进行。在一些实施方案中,所述反应在0℃至50℃、10℃至50℃、10℃至40℃或10℃至30℃的温度下进行。在其他实施方案中,所述反应在15℃至30℃、20℃至30℃、15℃至25℃、16℃至24℃、17℃至23℃、18℃至22℃或19℃至21℃的温度下进行。在又其他实施方案中,所述反应可在15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃或25℃下进行。在一些实施方案中,所述反应可在0℃至15℃、0℃至10℃、1℃至10℃、5℃至15℃或5℃至10℃下进行。

[0119] 在第七方面中,对于本文所述或第一、第二、第三、第四、第五或第六方面中的本发明方法,步骤(a)的反应进行1分钟至48小时、5分钟至36小时、10分钟至24小时、30分钟至24小时、30分钟至20小时、1小时至20小时、1小时至15小时、1小时至10小时、2小时至10小时、3小时至9小时、3小时至8小时、4小时至6小时或1小时至4小时。在一些实施方案中,使所述反应进行4至6小时。在其他实施方案中,使所述反应进行10分钟、15分钟、20分钟、30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时等。在其他实施方案中,使所述反应进行4小时。在又其他实施方案中,使所述反应进行2小时。

[0120] 在第八方面中,对于本文所述或第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七方面中的本发明方法,步骤(b)的反应在pH 4至9下进行。在一些实施方案中,步骤(b)的反应在pH 4.5至8.5、5至8.5、5至8、5至7.5、5至7、5至6.5或5.5至6.5下进行。在其他实施方案中,步骤(b)的反应在pH 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0下进行。

[0121] 在一些实施方案中,对于本文所述或第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八方面中的本发明方法,步骤(b)的反应在包含水和有机溶剂的混合物的水溶液中进行。可使用上文所述的任何合适的有机溶剂。更具体来说,有机溶剂为DMA。在一些实施方案中,水溶液包含按体积计小于50%、小于40%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于3%、小于2%或小于1%有机溶剂(例如DMA)。

[0122] 在一些实施方案中,对于本文所述或第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八方面中的本发明方法,修饰的细胞毒性剂在步骤(b)中与细胞结合剂反应之前为未纯化的。替代地,修饰的细胞毒性剂在步骤(b)中与细胞结合剂反应之前为纯化的。本文所述的

任何合适的方法可用于纯化修饰的细胞毒性剂。在某些实施方案中,本发明提供通过本发明方法制备的经过分离的修饰的细胞毒性剂。经过分离的修饰的细胞毒性剂可在与细胞结合剂反应之前储存一段时间。优选的是,经过分离的修饰的细胞毒性剂在以下条件下储存,所述条件将防止修饰的细胞毒性剂分解,例如,呈经纯化的固体或呈冷冻的溶液,或保持在低温(例如,低于10℃或低于5℃)。

[0123] 在一些实施方案中,对于本文所述或上文所述的任一实施方案中的本发明方法,对步骤(b)的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物进行纯化步骤。就此而言,细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物可使用切向流过滤(TFF)、非吸附色谱、吸附色谱、吸附过滤、选择性沉淀或任何其他合适的纯化过程以及其组合来与混合物的其他组分分离(purified)。

[0124] 在本发明的一些实施方案中,将细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物使用单个纯化步骤(例如,TFF)进行纯化。优选的是,将缀合物使用单个纯化步骤(例如,TFF)进行纯化并交换至适当制剂中。在本发明的其他实施方案中,将细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物使用两个顺序的纯化步骤进行纯化。例如,缀合物可首先通过选择性沉淀、吸附过滤、吸附色谱或非吸附色谱纯化,接着用TFF进行纯化。本领域的普通技术人员将理解,细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的纯化实现包含化学偶联至细胞毒性剂的细胞结合剂的稳定缀合物的分离。

[0125] 任何合适的TFF系统可用于纯化,包括Pellicon型系统(Millipore,Billerica,Mass.)、Sartocon Cassette系统(Sartorius AG,Edgewood,N.Y.)和Centrasette型系统(Pall公司,East Hills,N.Y.)。

[0126] 任何合适的吸附色谱树脂可用于纯化。优选吸附色谱树脂包括羟基磷灰石色谱、疏水性电荷诱导色谱(HCIC)、疏水性相互作用色谱(HIC)、离子交换色谱、混合模式离子交换色谱、固定金属亲和色谱(IMAC)、染料配体色谱、亲和色谱、逆相色谱以及其组合。合适的羟基磷灰石树脂的实例包括陶瓷羟基磷灰石(CHT I型和II型,Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)、HA Ultrogel羟基磷灰石(Pall公司,East Hills,N.Y.)和陶瓷氟磷灰石(CFT I型和II型,Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的HCIC树脂的实例为MEP Hypercel树脂(Pall公司,East Hills,N.Y.)。合适的HIC树脂的实例包括丁基-琼脂糖、己基-琼脂糖、苯基-琼脂糖和辛基-琼脂糖树脂(所有均来自GE Healthcare,Piscataway,N.J.)以及Macro-prep甲基和Macro-Prep叔丁基树脂(Biorad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的离子交换树脂的实例包括SP-琼脂糖、CM-琼脂糖和Q-琼脂糖树脂(所有均来自GE Healthcare,Piscataway,N.J.)和Unosphere S树脂(Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的混合模式离子交换剂的实例包括Bakerbond ABx树脂(JT Baker,Phillipsburg N.J.)。合适的IMAC树脂的实例包括Chelating琼脂糖树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)和Profinity IMAC树脂(Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的染料配体树脂的实例包括蓝色琼脂糖树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)和Affi-gel蓝色树脂(Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的亲核树脂的实例包括蛋白质A琼脂糖树脂(例如,MabSelect,GE Healthcare,Piscataway,N.J.),其中细胞结合剂为抗体;和凝集素亲和树脂,例如Lentil凝集素琼脂糖树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.),其中细胞结合剂带有适当凝集素结合位点。替代地,可使用特异于细胞结合剂的抗体。此一抗体可固定至例如琼脂糖4快速流动树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)。合适的逆相树脂的实例包括C4、C8和C18树脂(Grace

Vydac, Hesperia, Calif.)。

[0127] 任何合适的非吸附色谱树脂可用于纯化。合适的非吸附色谱树脂的实例包括但不限于SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™树脂(例如,S-200和S-300)、SUPERDEX™树脂(例如,SUPERDEX™ 75和SUPERDEX™ 200)、**BIO-GEL**®树脂(例如,P-6、P-10、P-30、P-60和P-100)和本领域的普通技术人员已知的其他树脂。

[0128] 在一些实施方案中,纯化的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物为配制成合适的配制缓冲液。在一些实施方案中,配制缓冲液包含亚硫酸氢盐,诸如亚硫酸氢钠或亚硫酸氢钾。更具体来说,配制缓冲液包含亚硫酸氢钠。在一些实施方案中,配制缓冲液包含5至200μM、10至200μM、10至150μM、20至100μM、30至90μM、40至80μM、50至70μM、40至60μM、45至55μM或55至65μM所述亚硫酸氢盐(例如,亚硫酸氢钠)。在其他实施方案中,配制缓冲液包含20、30、40、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、70、80、90或100μM所述亚硫酸氢盐(例如,亚硫酸氢钠)。

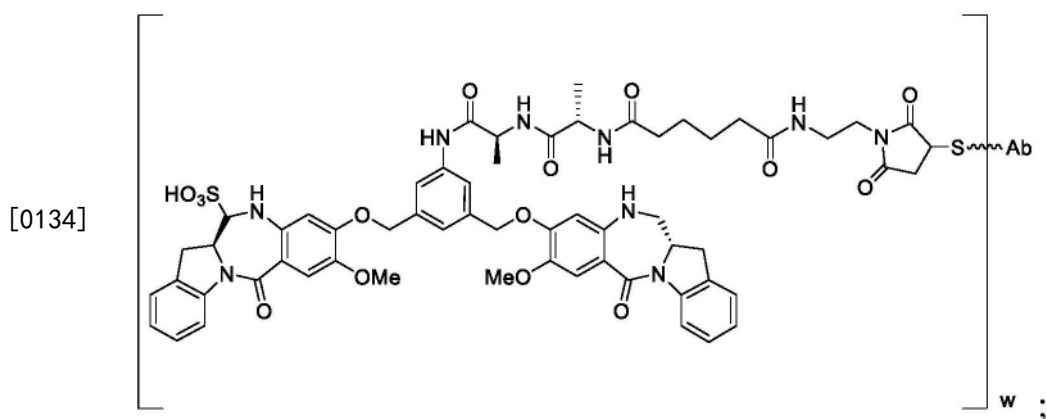
[0129] 在其他实施方案中,配制缓冲液还包含海藻糖。可使用任何合适量的海藻糖。在一些实施方案中,配制缓冲液还包含按重量计2至15%、5至10%、6至10%或7至9%或6至8%海藻糖。

[0130] 在另一实施方案中,配制缓冲液具有pH 4至6、4至5或4至4.5。在其他实施方案中,配制缓冲液的pH为4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0。

[0131] 在又其他实施方案中,配制缓冲液包含在pH 4.2下的10mM琥珀酸钠、50μM亚硫酸氢钠、8%海藻糖二水合物和0.01%聚山梨醇酯20。

[0132] 在一些实施方案中,对于本文所述的本发明方法,步骤(a)的反应不导致马来酰亚胺基团的实质磺化。在一些实施方案中,少于50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%马来酰亚胺基团为磺化的。马来酰亚胺磺化的百分比等于马来酰亚胺-磺化细胞毒性剂(仅在马来酰亚胺上具有磺化的细胞毒性剂)和二磺化细胞毒性剂(在马来酰亚胺和亚胺部分上具有磺化的细胞毒性剂)的总量除以含亚胺细胞毒性剂在其与所述亚硫酸氢盐或所述偏亚硫酸氢盐反应之前的起始量。

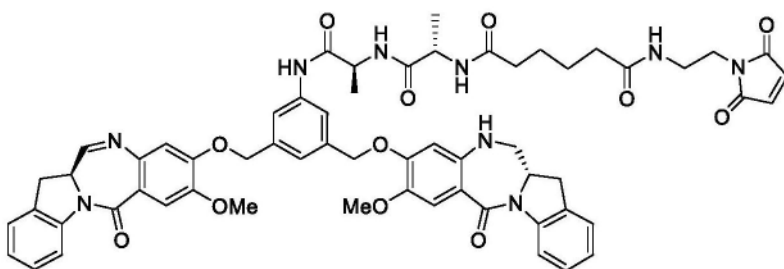
[0133] 在第九方面中,本发明提供一种制备由下式表示的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物或其药学上可接受的盐的方法:



[0135] 其包括以下步骤:

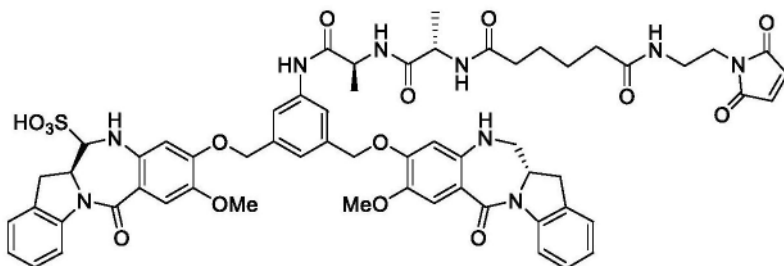
[0136] (a)使由下式表示的含亚胺细胞毒性剂或其药学上可接受的盐中亚胺部分:

[0137]



[0138] 与二氧化硫、亚硫酸氢盐或偏亚硫酸氢盐在pH 3.1至3.5的水溶液中反应以形成由下式表示的修饰的细胞毒性剂:

[0139]



[0140] 或其药学上可接受的盐;以及

[0141] (b)使所述修饰的细胞毒性剂或其药学上可接受的盐与细胞结合剂Ab反应以形成所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物,其中:

[0142] Ab为抗CD123抗体,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的免疫球蛋白重链和具有氨基酸序列SEQ ID NO:26的免疫球蛋白轻链;并且

[0143] w为1或2。

[0144] 在一些实施方案中,第九方面的方法在第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八方面和其中所述的任何实施方案中所述的反应条件下进行。

[0145] 在第十方面中,第九方面的方法中步骤(a)的反应在pH 3.2至3.4下进行。更具体来说,pH为3.3。

[0146] 在一些实施方案中,步骤(a)的反应在缓冲溶液的存在下进行。示例性缓冲溶液包括但不限于柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液或磷酸盐缓冲液。更具体来说,缓冲液为琥珀酸盐缓冲液。

[0147] 在第十一方面中,对于第九方面的方法中步骤(a)的反应,使1.1至1.6当量所述亚硫酸氢盐或0.55至0.8当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量含亚胺细胞毒性剂反应。其余反应条件为如上文在第十方面或其中所述的任何实施方案中所述。在一些实施方案中,使1.3至1.5当量所述亚硫酸氢盐或0.65至0.75当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。更具体来说,使1.4当量所述亚硫酸氢盐或0.7当量所述偏亚硫酸氢盐与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。

[0148] 在第十二方面中,第九方面的方法中步骤(a)的反应在pH 3.2至3.4下进行,并且使1.3至1.5当量所述亚硫酸氢钠与1当量所述含亚胺细胞毒性剂反应。在一些实施方案中,所述反应在pH 3.3下进行,并且使1.4当量亚硫酸氢钠与1当量含亚胺细胞毒性剂反应。

[0149] 在一些实施方案中,第九、第十、第十一或第十二方面的方法中步骤(a)的反应在合适的溶剂或溶剂混合物中进行。在一些实施方案中,步骤(a)的反应在包含水和有机溶剂的水溶液中进行。可使用上文所述的任何合适的有机溶剂。更具体来说,有机溶剂为DMA。在

一些实施方案中,水溶液包含按体积计小于50%、小于40%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于3%、小于2%或小于1%有机溶剂(例如DMA)。

[0150] 在一些实施方案中,步骤(a)的反应在合适的温度下(例如,在室温或在15至25℃下进行足够的一段时间,诸如1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、15小时、20小时、24小时、48小时等。

[0151] 在一些实施方案中,从步骤(a)的反应获得的修饰的细胞毒性剂在步骤(b)中与细胞结合剂反应之前为未纯化的。

[0152] 在一些实施方案中,从步骤(a)的反应获得的修饰的细胞毒性剂在步骤(b)中与细胞结合剂反应之前为纯化的。可使用本文所述的任何合适的纯化方法。

[0153] 在第十三方面中,第九方面的方法中步骤(b)的反应在pH 5.5至6.5下进行,并且其余反应条件为如第九、第十、第十一或第十二方面中所述。在一些实施方案中,pH为5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5。在一些实施方案中,pH为6.0。

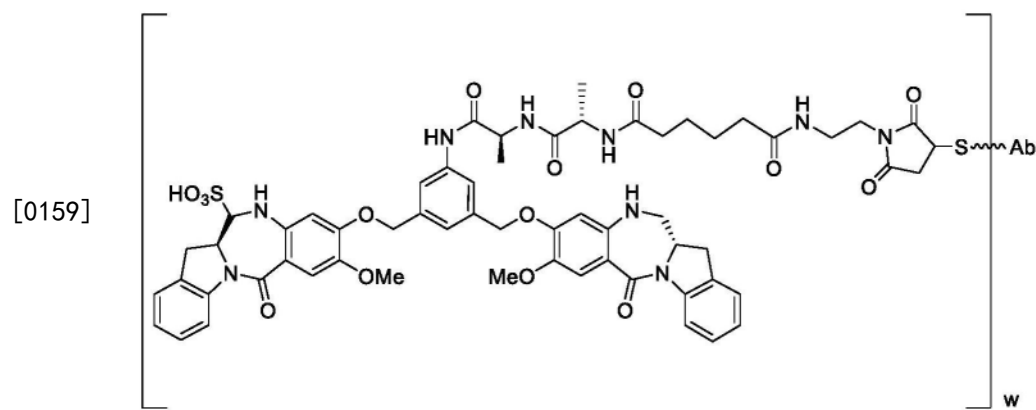
[0154] 在一些实施方案中,通过第九、第十、第十一、第十二或第十三方面的方法制备的缀合物通过本文所述的合适方法进行纯化。在一个实施方案中,所述缀合物通过切向过滤来纯化以产生纯化的缀合物。

[0155] 在一些实施方案中,将纯化的缀合物在包含40至80μM亚硫酸氢钠、pH 4至5的配制缓冲液中配制。在一些实施方案中,配制缓冲液包含50μM亚硫酸氢钠,pH 4.2。在一些实施方案中,配制缓冲液包含10mM琥珀酸钠、50μM亚硫酸氢钠、8%海藻糖二水合物和0.01%聚山梨醇酯20,pH 4.2。

[0156] 在一些实施方案中,对于本文(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八方面和其中所述的任何实施方案)所述的本发明的方法,细胞结合剂不为抗CD123抗体。

[0157] 在一些实施方案中,对于本文(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八方面和其中所述的任何实施方案)所述的本发明的方法,细胞结合剂不为包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的免疫球蛋白重链和具有氨基酸序列SEQ ID NO:26的免疫球蛋白轻链的抗CD123抗体。

[0158] 在一些实施方案中,通过本文(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八方面和其中所述的任何实施方案)所述的本发明的方法制备的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物不为由以下结构表示的缀合物:

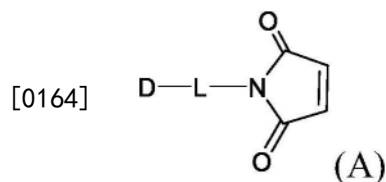


[0160] 或其药学上可接受的盐,其中Ab为抗CD123抗体,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:25的免疫球蛋白重链和具有氨基酸序列SEQ ID NO:26的免疫球蛋白轻链;并且

[0161] w为1或2。

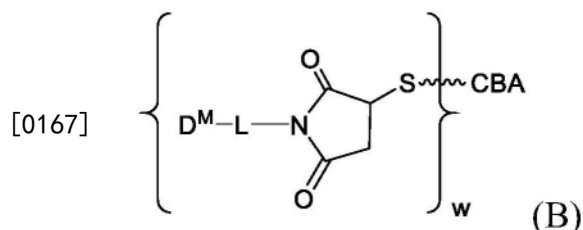
[0162] 本发明的含亚胺细胞毒性剂和缀合物

[0163] 在一些实施方案中,对于本文所述的本发明方法,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

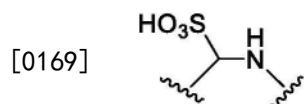


[0165] 或为其药学上可接受的盐,并且

[0166] 细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物由下式表示:



[0168] 其中D^M为包含由下式表示的修饰的亚胺部分的修饰的细胞毒性剂:



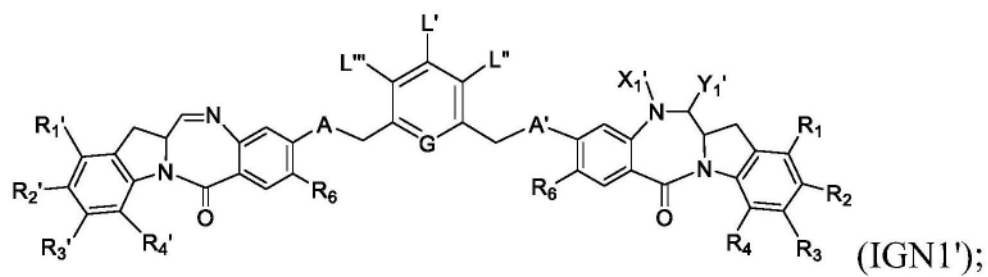
[0170] 或其药学上可接受的盐;L为接头; **CBA**  **S**—表示经由硫醇基团连接至细胞毒性剂的细胞结合剂;并且w为整数1至10。

[0171] 在一些实施方案中,CBA为抗体并且所述抗体经由一个或多个半胱氨酸硫醇基团连接至细胞毒性剂。在一些实施方案中,游离硫醇基团在抗体重链CH3区中的工程化Cys残基上,在所述重链的EU/OU编号442位(或简称C442)处。更具体来说,在442位处的半胱氨酸残基被重组地引入至抗体中。

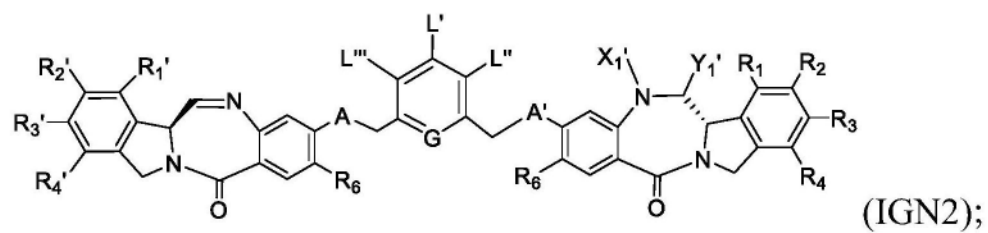
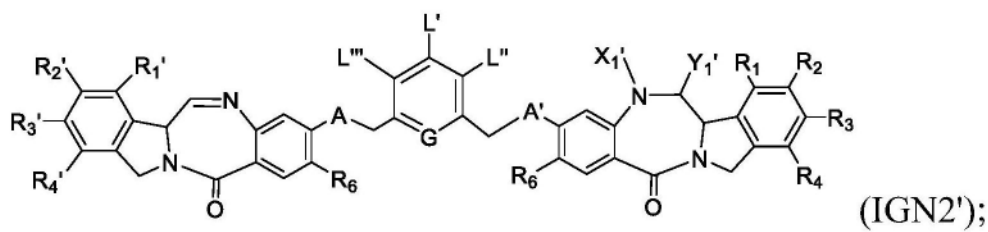
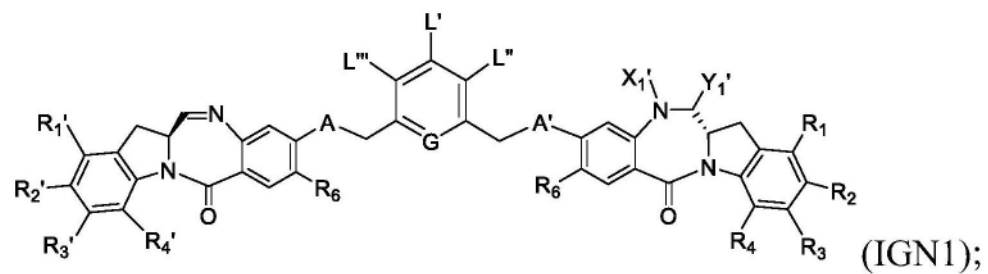
[0172] 在其他实施方案中,w为1或2。更具体来说,w为2。

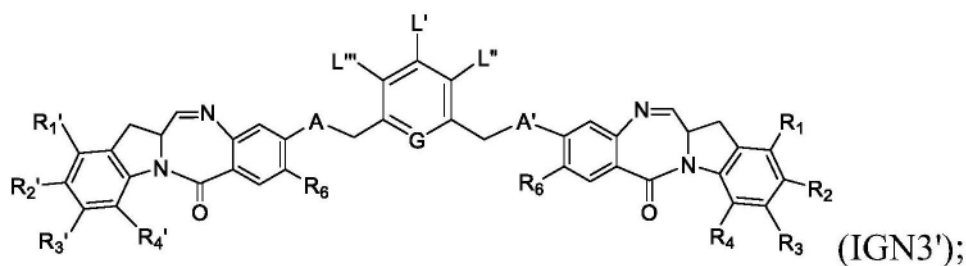
[0173] 下文描述本文所述的本发明的方法(例如,上文所述的第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八方面和其中所述的实施方案的方法)的某些实施方案和具体实施方案。

[0174] 在第一具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,D由以下结构式表示:

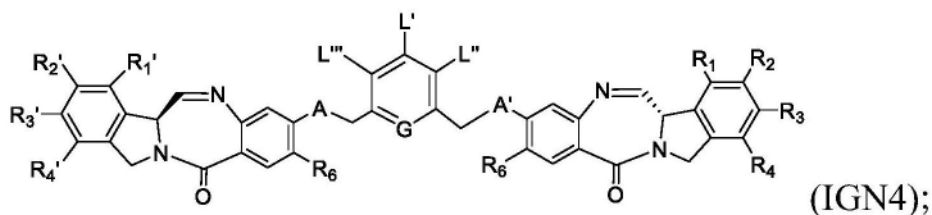
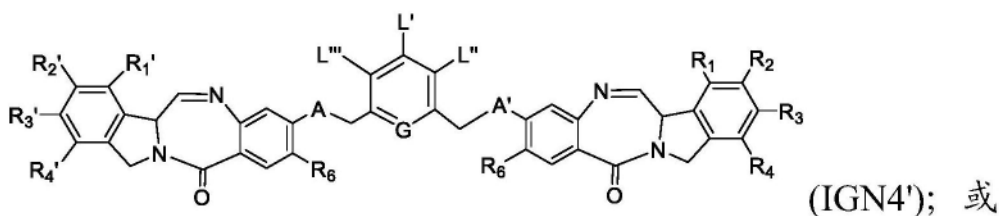
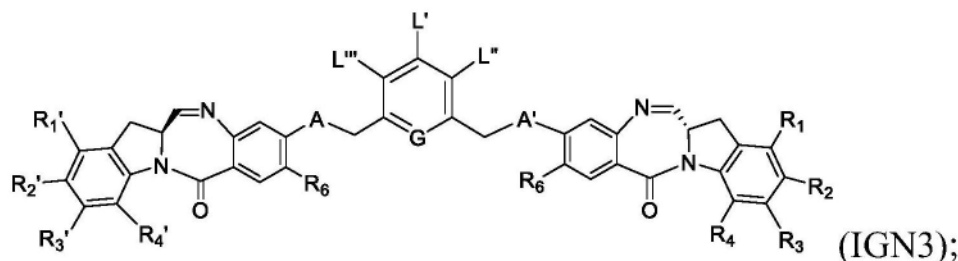


[0175]





[0176]



[0177] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0178] L' 、 L'' 和 L''' 中的一者由下式表示:[0179] $-Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-(A')$; 或[0180] $-N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-(D')$,

[0181] 并且另两者各自独立地选自 $-H$, 具有 1 至 10 个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 卤素, 胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-NR'COR''$, $-SR$, $-SOR'$, $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, 氰基, 叠氮基, $-COR'$, $-OCOR'$, 和 $-OCONR'R''$;

[0182] Z_1 和 Z_2 中的一者为 $-C(=O)-$, 并且另一者为 $-NR_5-$;[0183] P_1 为氨基酸残基或含有 2 至 20 之间个氨基酸残基的肽;[0184] R_{x1} 为具有 1 至 10 个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

[0185] R^e 为 $-H$, 具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, 其中 R^k 为 $-H$, 具有 1 至 6 个碳原子的直链、支链、环状烷基, 其任选地带有仲氨基 (例如, $-NHR^{101}$) 或叔氨基 ($-NR^{101}R^{102}$) 基团, 或 5 或 6 元含氮杂环, 诸如哌啶或吗啉, 其中 R^{101} 和 R^{102} 各自独立地为具有 1 至 10 个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

[0186] R 在每次出现时独立地选自由以下组成的群组: $-H$, 具有 1 至 10 个碳原子的任选取

代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,或含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0187] R' 和 R'' 各自独立地选自-H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$,和具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0188] R^c 为-H或具有1至4个碳原子的任选取代的直链或支链烷基;

[0189] n 为整数1至24;

[0190] X_1' 为选自-H,胺保护基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,和含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0191] Y_1' 为选自-H,氧代基(即, Y_1' 连同其所连接的碳原子一起形成 $-\text{C}(=\text{O})$ -基团),具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,具有1至6个杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0192] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 和 R_4' 各自独立地选自由以下组成的群组:-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元- $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$,卤素,胍 $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$, -OR, -NR'R'', -NO₂, -NCO, -NR'COR'', -SR, -SOR', -SO₂R', -SO₃H, -OSO₃H, -SO₂NR'R'', 氰基,叠氮基, -COR', -OCOR', 和-CONR'R'';

[0193] R_6 为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂或卤素;

[0194] G为-CH-或-N-;

[0195] A和A'相同或不同,并且独立地选自-O-、氧代($-\text{C}(=\text{O})-$)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR₅和-CRR'N(R₅)-;并且

[0196] R_5 在每次出现时独立地为-H或具有1至10个碳原子的任选取代的直链或支链烷基。

[0197] 在更具体实施方案中,D由式(IGN1')或(IGN1)表示。

[0198] 在另一更具体实施方案中,对于式(IGN1')-(IGN4')和(IGN1)-(IGN4),L'、L''和L'''中的一者由式(A')或(D')表示,并且另外两者为:-H,具有1至6个碳原子的直链或支链烷基,卤素,-OH,(C₁-C₆)烷氧基,或-NO₂。

[0199] 在另一更具体实施方案中,对于式(IGN1')-(IGN4')和(IGN1)-(IGN4),L'由式(A')表示;并且L''和L'''均为-H。

[0200] 在另一更具体实施方案中,对于式(IGN1')-(IGN4')和(IGN1)-(IGN4),L'由式(D')表示;并且L''和L'''均为-H。

[0201] 在另一更具体实施方案中,对于式(IGN1')-(IGN4')和(IGN1)-(IGN4), R_{x1} 为具有1至6个碳原子的直链、支链或环状烷基,其任选地被卤素、-OH、-SO₃H、(C₁-C₃)烷基、(C₁-C₃)烷氧基、卤代(C₁-C₃)烷基或带电取代基或可离子化基团Q取代。

[0202] 在第二具体方面中,对于式(IGN1')-(IGN4')和(IGN1)-(IGN4),L'由下式表示:

[0203] $-\text{NR}_5-\text{P}_1-\text{C}(=\text{O})-(\text{CR}_a\text{R}_b)_s-\text{C}(=\text{O})-(\text{B1}')$;

[0204] $-\text{NR}_5-\text{P}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{Cy}-(\text{CR}_a\text{R}_b)_{s1}, -\text{C}(=\text{O})-(\text{B}2')$;

[0205] $-\text{C}(=\text{O})-\text{P}_1-\text{NR}_5-(\text{CR}_a\text{R}_b)_s-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}1')$;或

[0206] $-\text{C}(=\text{O})-\text{P}_1-\text{NR}_5-\text{Cy}-(\text{CR}_a\text{R}_b)_{s1}, -\text{C}(=\text{O})-(\text{C}2')$

[0207] 其中:

[0208] R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地为 $-\text{H}$ 、 (C_1-C_3) 烷基或带电取代基或可离子化基团Q;

[0209] s 为整数1至6;

[0210] $s1'$ 为0或整数1至6;并且

[0211] Cy为具有5或6个环碳原子的环状烷基,其任选地被卤素、 $-\text{OH}$ 、 (C_1-C_3) 烷基、 (C_1-C_3) 烷氧基或卤代 (C_1-C_3) 烷基取代;

[0212] 并且其余变量为如上文在第一具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

[0213] 在更具体实施方案中, R_a 和 R_b 均为H;式 $(\text{B}2')$ 和 $(\text{C}2')$ 中的Cy为环己烷;并且 R_5 为H或Me。甚至更具体来说, $s1'$ 为0或1。

[0214] 在第三具体方面中,对于式 $(\text{IGN}1')-(\text{IGN}4')$ 和 $(\text{IGN}1)-(\text{IGN}4)$, P_1 为含有2至10个氨基酸残基的肽;并且其余变量为如第一或第二具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

[0215] 在具体实施方案中, P_1 为含有2至5个氨基酸残基的肽。

[0216] 在另一具体实施方案中, P_1 为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe和Gln-Ala。甚至更具体来说,P为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[0217] 在第四具体方面中,对于式 $(\text{IGN}1')-(\text{IGN}4')$ 和 $(\text{IGN}1)-(\text{IGN}4)$, X_1' 选自由以下组成的群组: $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,和苯基; Y_1' 选自由以下组成的群组: $-\text{H}$,氧代基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;并且其余变量为如上文在第一、第二或第三具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说, X_1' 为 $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 (C_1-C_3) 烷基、卤代 (C_1-C_3) 烷基或苯基;并且 Y_1' 为 $-\text{H}$ 、氧代、 (C_1-C_3) 烷基或卤代 (C_1-C_3) 烷基。在另一更具体实施方案中, X_1' 为 $-\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 或 $-\text{Me}$;并且 Y_1' 为 $-\text{H}$ 或氧代。甚至更具体来说, X_1' 为 $-\text{H}$;并且 Y_1' 为 $-\text{H}$ 。

[0218] 在第五具体方面中,对于式 $(\text{IGN}1')-(\text{IGN}4')$ 和 $(\text{IGN}1)-(\text{IGN}4)$,A和A'相同或不同,并且为 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}_5-$ 或氧代 $-\text{C}(=\text{O})-$;并且其余变量为如上文在第一、第二、第三或第四具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说,A和A'相同或不同,并且为 $-\text{O}-$ 或 $-\text{S}-$ 。甚至更具体来说,A和A'为 $-\text{O}-$ 。

[0219] 在第六具体方面中,对于式 $(\text{IGN}1')-(\text{IGN}4')$ 和 $(\text{IGN}1)-(\text{IGN}4)$, R_6 为 $-\text{OR}$,其中R为

具有1至6个碳原子的烷基；并且其余变量为如上文在第一、第二、第三、第四或第五具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说， R_6 为-OMe。

[0220] 在第七具体方面中，对于式 (IGN1) - (IGN4)， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 和 R_4' 各自独立地为-H、卤素、-NO₂、-OH、(C₁-C₃) 烷基、卤代 (C₁-C₃) 烷基或 (C₁-C₃) 烷氧基；并且其余变量为如上文在第一、第二、第三、第四、第五或第六具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 和 R_4' 全部为-H。

[0221] 在第八具体方面中，对于式 (IGN1') - (IGN4') 和 (IGN1) - (IGN4)， R 、 R' 、 R'' 和 R_5 各自独立地为-H或 (C₁-C₃) 烷基；并且其余变量为如上文在第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

[0222] 在第九具体方面中，对于式 (IGN1') - (IGN4') 和 (IGN1) - (IGN4)：

[0223] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_1' 、 R_2' 、 R_3' 和 R_4' 全部为-H；

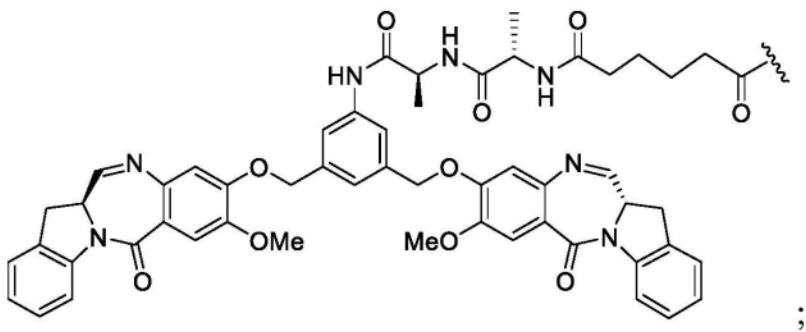
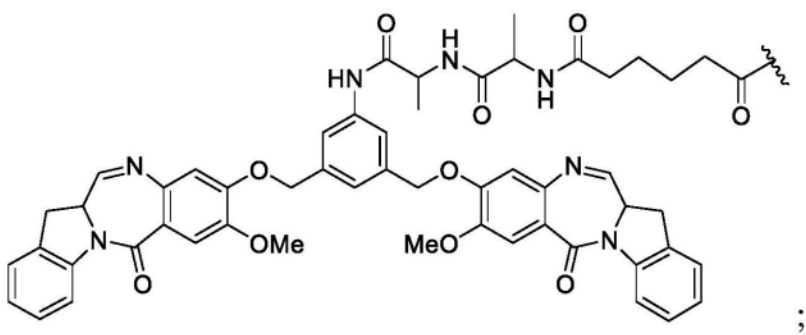
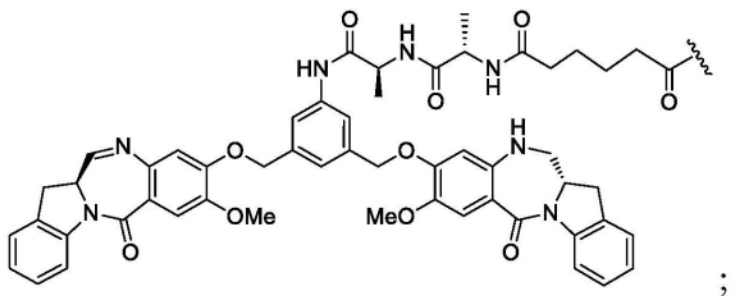
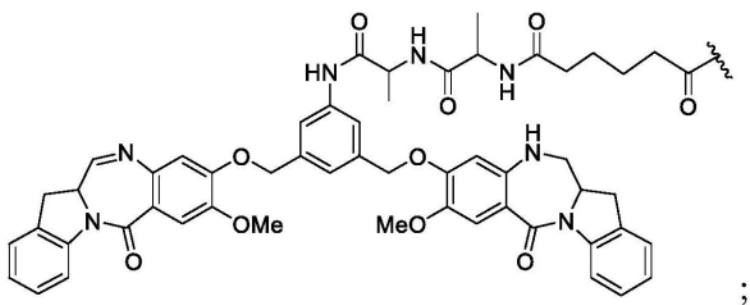
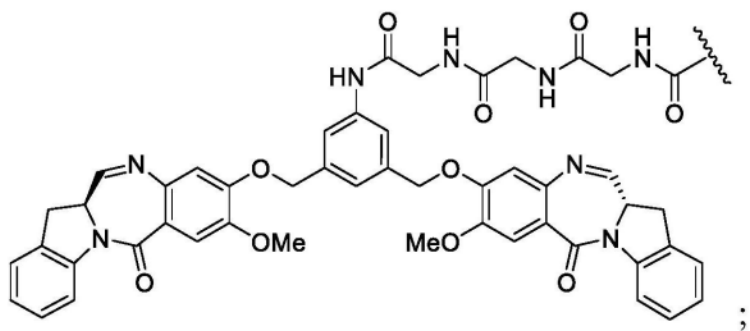
[0224] R_6 为-OMe；

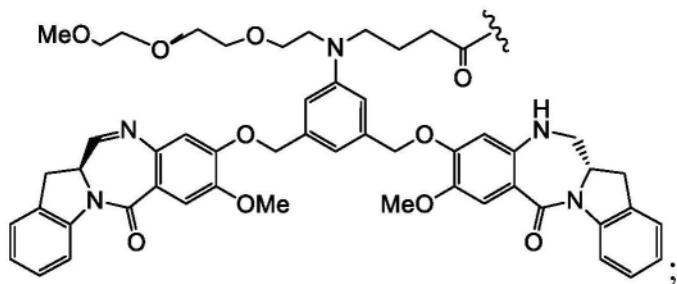
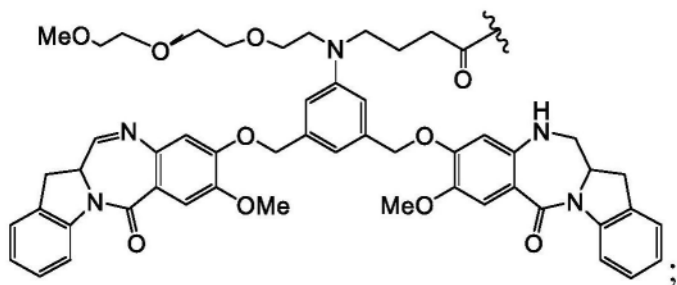
[0225] X_1' 和 Y_1' 均为-H；并且

[0226] A和A'为-O-；

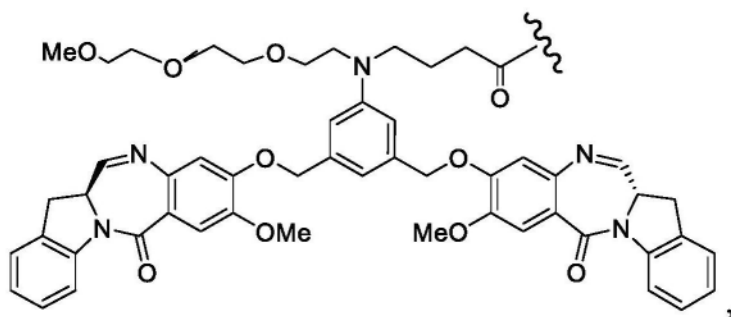
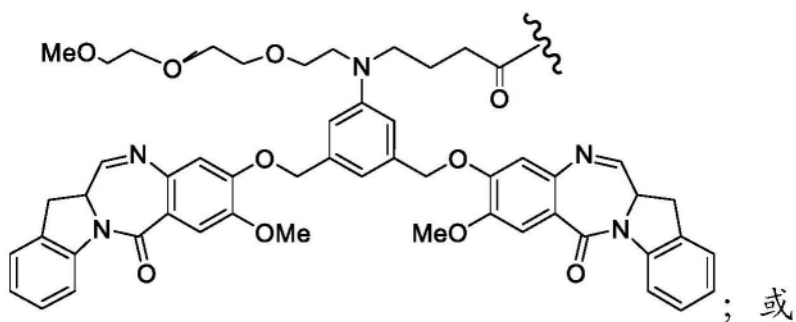
[0227] 并且其余变量为如上文在第一、第二或第三具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说， R 、 R' 、 R'' 和 R_5 各自独立地为-H或 (C₁-C₃) 烷基。甚至更具体来说， R 、 R' 、 R'' 和 R_5 全部为-H。

[0228] 在第十具体方面中，对于式 (A) 的含亚胺细胞毒性剂或式 (B) 的缀合物，D由以下结构式表示：



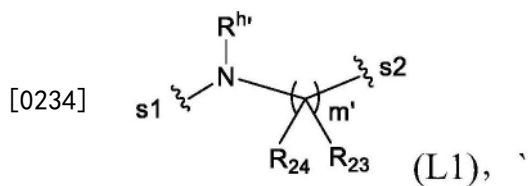


[0231]



[0232] 或为其药学上可接受的盐；并且其余变量为针对上文所述的式 (A) 或 (B) 加以描述。

[0233] 在第十一具体方面中,对于式 (A) 的含亚胺细胞毒性剂或式 (B) 的缀合物,-L-由以下结构式表示:



[0235] 其中:

[0236] s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

[0237] R_{23} 和 R_{24} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基；

[0238] m' 为0与10之间的整数；并且

[0239] $R^{h'}$ 为H或任选取代的烷基；

[0240] 并且其余变量为如上文针对式(A)或式(B)，或在第一至第十具体方面，或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

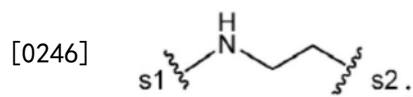
[0241] 在具体实施方案中， m' 为整数1至6。甚至更具体来说， m' 为整数1至3。

[0242] 在另一具体实施方案中， R_{23} 和 R_{24} 在每次出现时独立地为H或(C₁-C₃)烷基。甚至更具体来说， R_{23} 和 R_{24} 均为H。

[0243] 在另一具体实施方案中， $R^{h'}$ 为H或(C₁-C₃)烷基。更具体来说， $R^{h'}$ 为H。

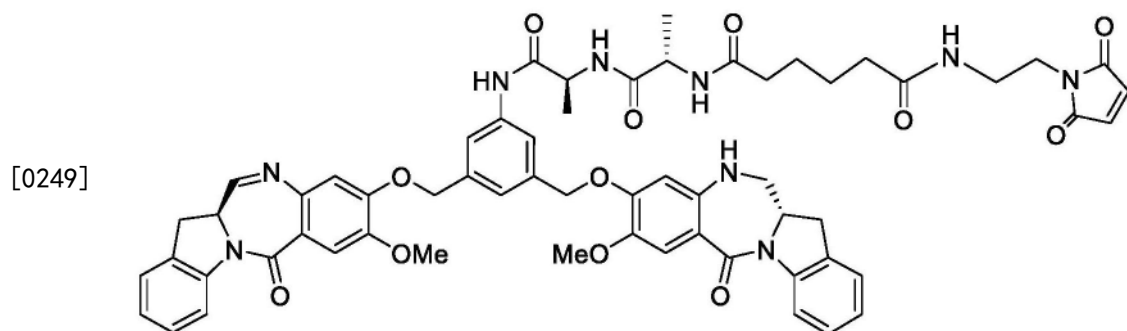
[0244] 在另一具体实施方案中， R_{23} 和 R_{24} 均为H； m' 为整数1至6。甚至更具体来说， m' 为整数1至3。

[0245] 在第十二具体方面中，对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物，-L-由以下结构式表示：

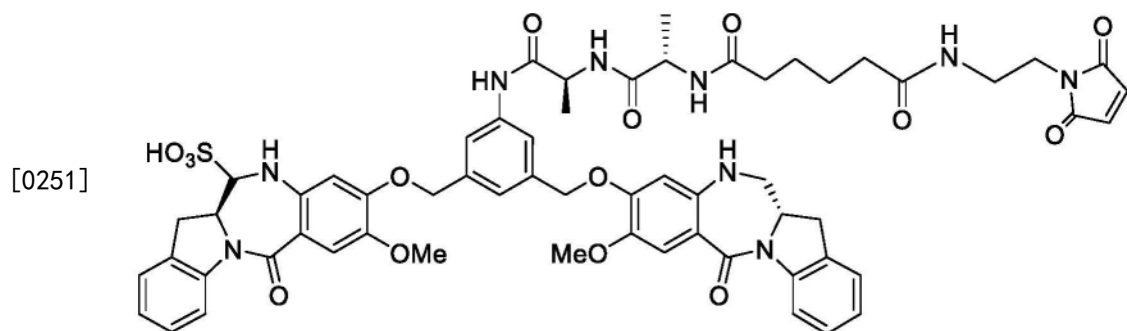


[0247] 其中s1为共价连接至D的位点；s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点；并且其余变量为如上文针对式(A)或式(B)，或在第一至第十方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

[0248] 在第十三具体方面中，含亚胺细胞毒性剂由下式表示：

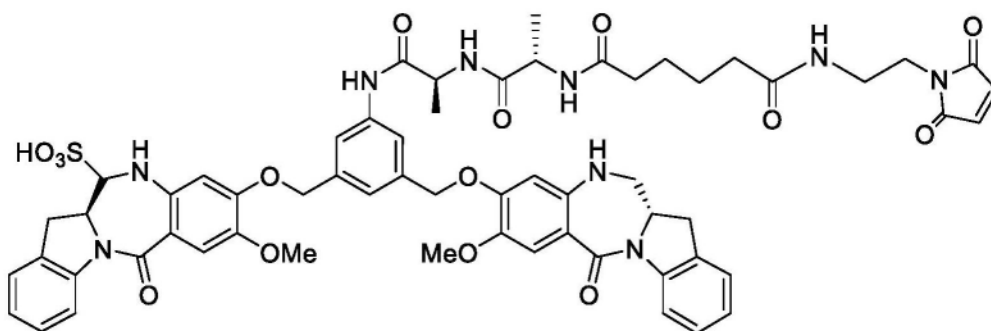


[0250] 或为其药学上可接受的盐，并且所述修饰的细胞毒性剂由下式表示：



[0252] 或为其药学上可接受的盐。更具体来说，修饰的细胞毒性剂由下式表示：

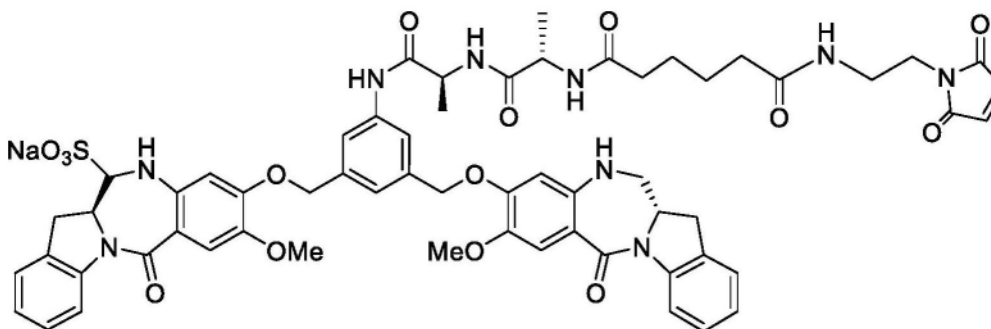
[0253]



[0254]

或其钠盐或钾盐。甚至更具体来说,修饰的细胞毒性剂由下式表示:

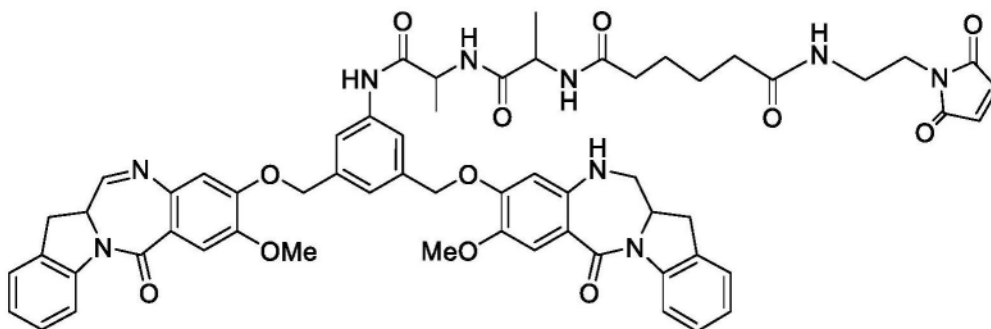
[0255]



[0256]

在一些实施方案中,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

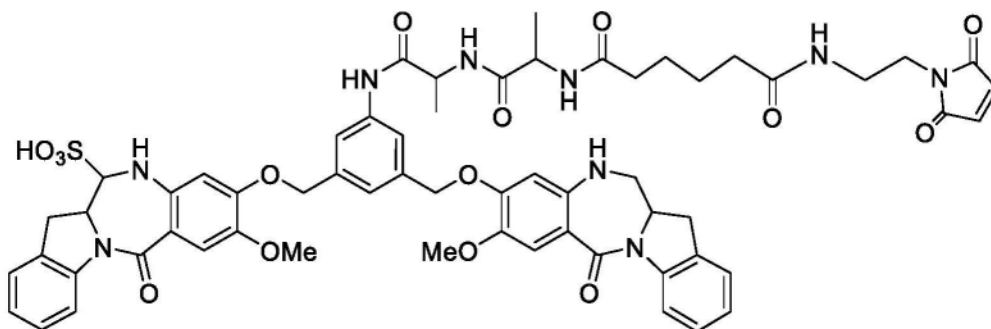
[0257]



[0258]

或为其药学上可接受的盐,并且所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:

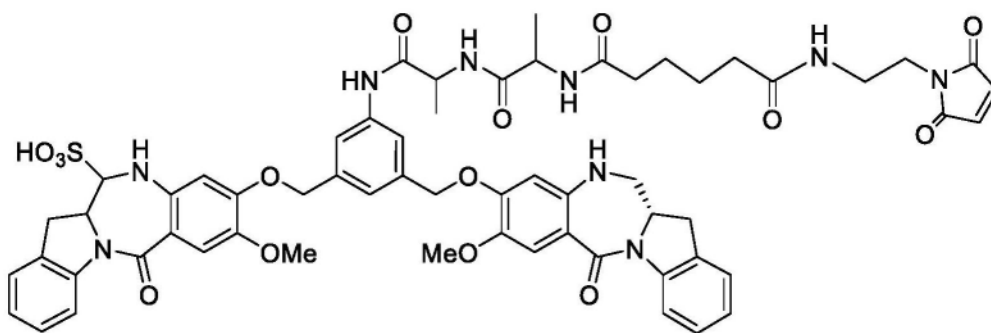
[0259]



[0260]

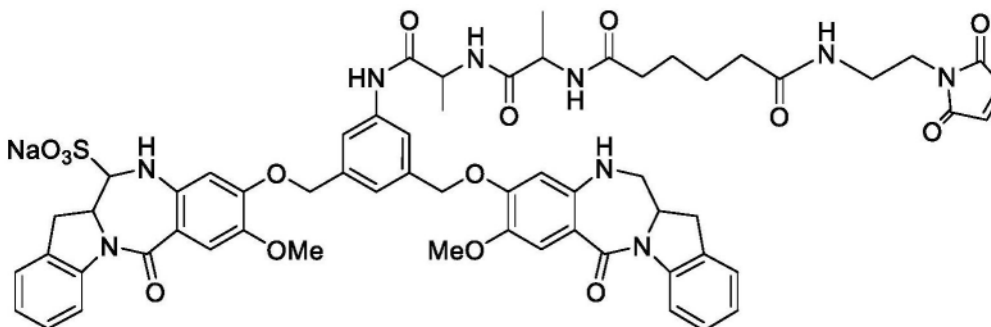
或为其药学上可接受的盐。更具体来说,修饰的细胞毒性剂由下式表示:

[0261]



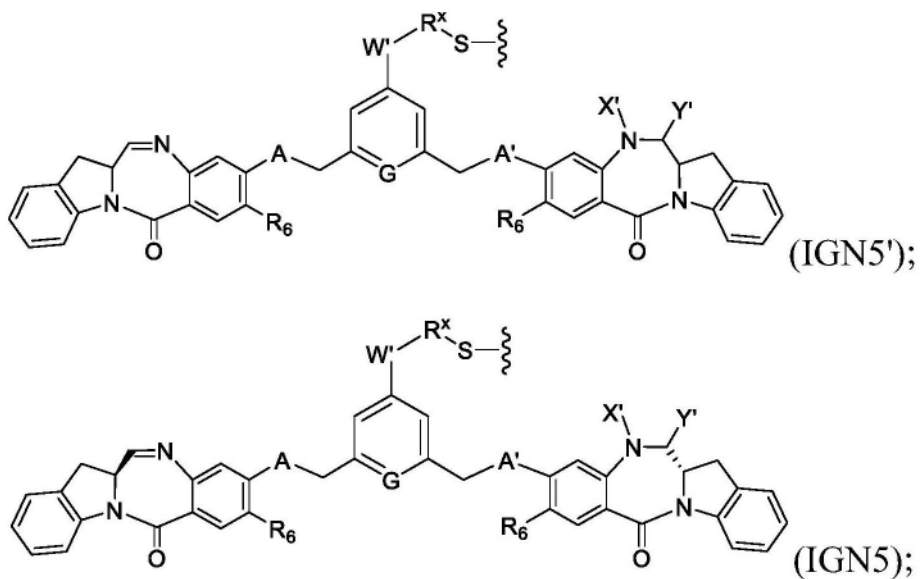
[0262] 或其钠盐或钾盐。甚至更具体来说,修饰的细胞毒性剂由下式表示:

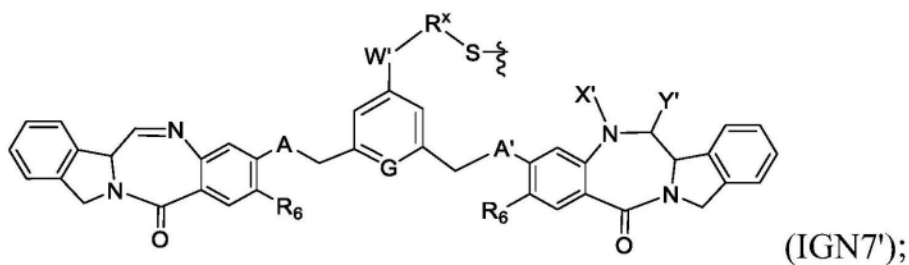
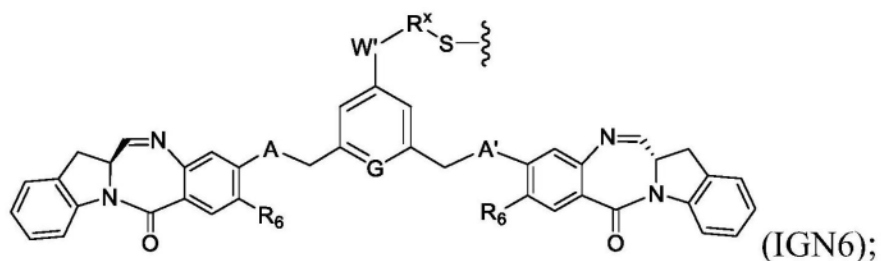
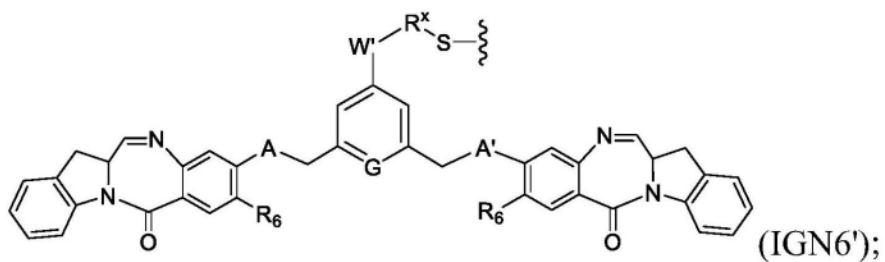
[0263]



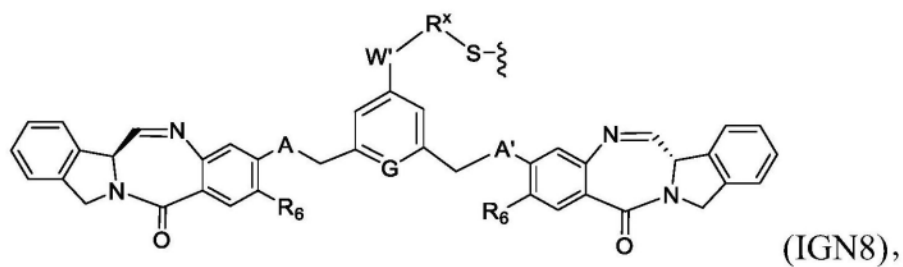
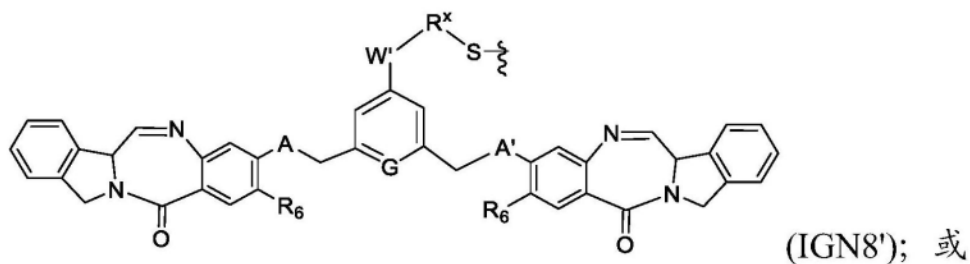
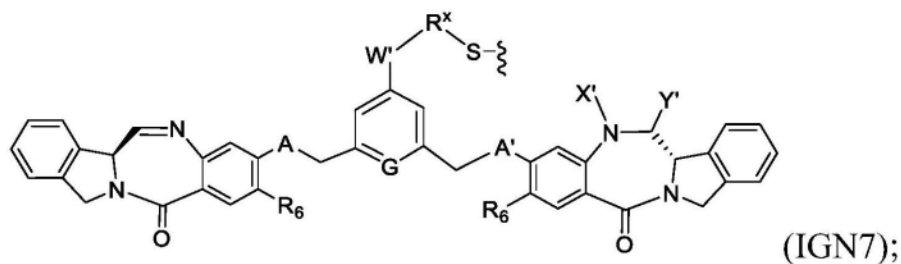
[0264] 在第十四具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,D由以下结构式表示:

[0265]





[0266]



[0267] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0268] X' 选自由以下组成的群组: -H, -OH, 具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、

支链或环状烷基、烯基或炔基, 苯基, 和胺保护基;

[0269] Y' 选自由以下组成的群组: -H、氧代基、具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

[0270] A和A' 选自-O-和-S-;

[0271] W' 不存在, 或选自-O-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-或-CH₂-S-、-CH₂NR^e-;

[0272] R^x不存在, 或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基;

[0273] R^e为-H, 具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, 其中R^k为-H, 具有1至6个碳原子的直链、支链、环状烷基, 其任选地带有仲氨基(例如, -NHR¹⁰¹)或叔氨基(-NR¹⁰¹R¹⁰²)基团, 或5或6元含氮杂环, 其中R¹⁰¹和R¹⁰²各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

[0274] n为整数1至24;

[0275] G选自-CH-或-N-;

[0276] R₆为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂或卤素; 并且

[0277] R为-H, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c, 其中n为整数1至24, 并且R^c为具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;

[0278] R'和R''各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NRR^g、-COR, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 具有6至18个碳原子的任选取代的芳基, 具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环, PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c, 并且R^g为-H, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或PEG基团-(CH₂CH₂O)_n-R^c。

[0279] 在更具体实施方案中, D由上文式(IGN5')或(IGN5)表示, 或为其药学上可接受的盐。

[0280] 在另一具体实施方案中, 对于式(IGN5')-(IGN8')和(IGN5)-(IGN8):

[0281] X'和Y'均为-H;

[0282] A和A'均为-O-;

[0283] R₆为-OMe;

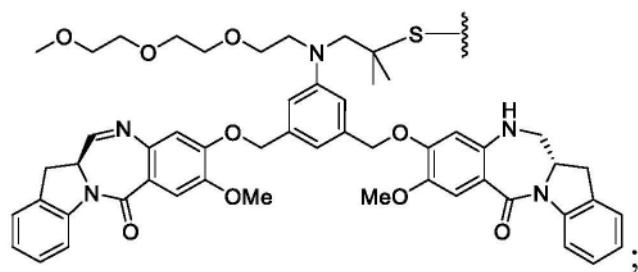
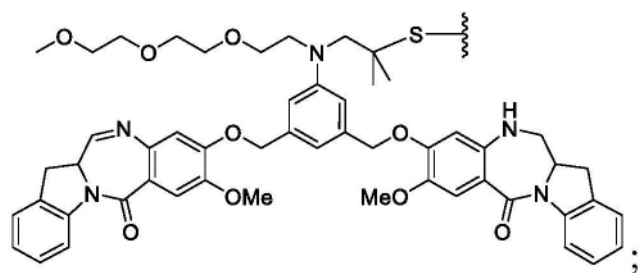
[0284] W'为-N(R^e)-或-N(R^e)-C(=O)-;

[0285] R^e为-H, 具有1至4个碳原子的直链或支链烷基, 或-(CH₂-CH₂-O)_n-R^k, 其中R^k为-H, 具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;

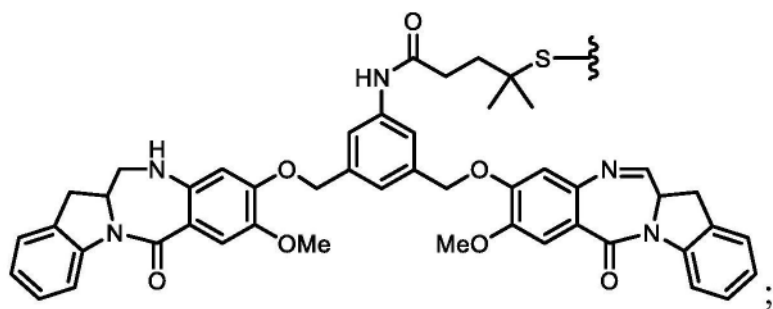
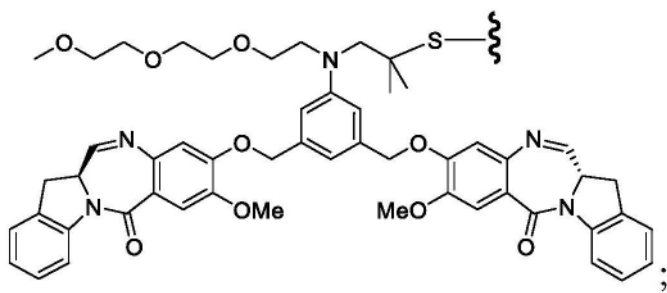
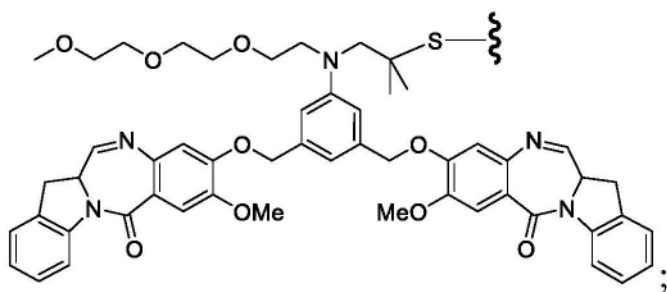
[0286] n为整数2至6; 并且

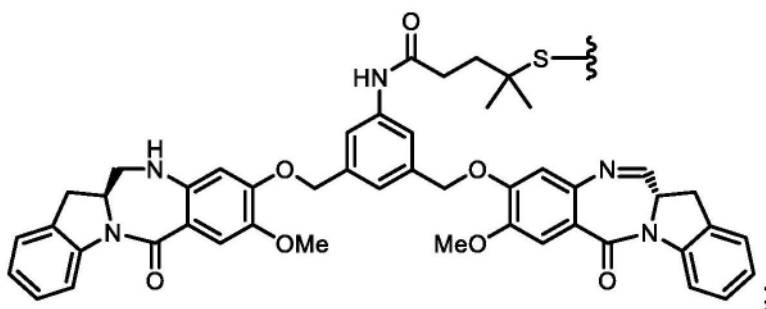
[0287] R^x为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基。

[0288] 在第十五具体方面中, 对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物, D由以下结构式表示:

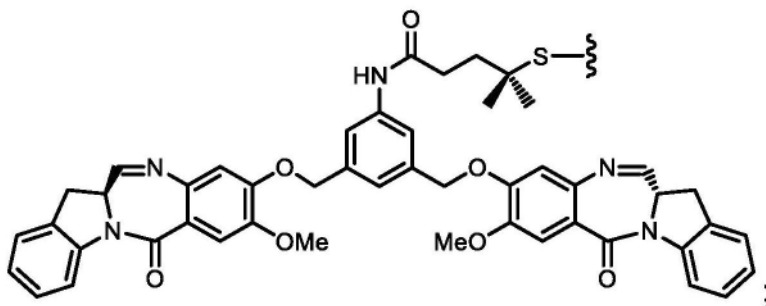
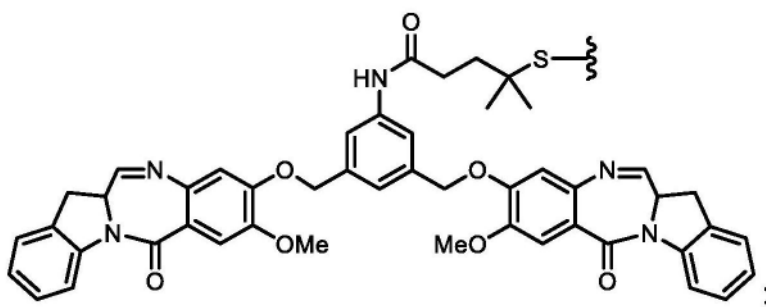


[0289]



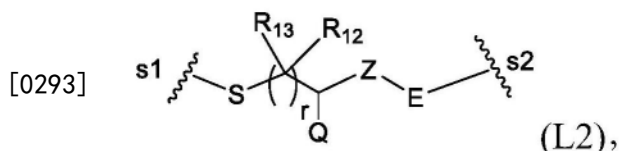


[0290]



[0291] 或为其药学上可接受的盐,其中其余变量如上文针对式(A)或(B)所述。

[0292] 在第十六具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,-L-由以下结构式表示:



[0294] 其中:

[0295] s1为共价连接至D的位点,并且s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

[0296] E为 $-(CR_{10}R_{11})_q-$ 、环烷基或环烷基烷基;

[0297] Z为不存在、 $-SO_2NR_9-$ 、 $-NR_9SO_2-$ 、 $-C(=O)-NR_9-$ 、 $-NR_9-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NR_9-(CH_2CH_2O)_p-$ 、 $-NR_9-C(=O)-(CH_2CH_2O)_p-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_p-C(=O)NR_9-$ 或 $-(OCH_2CH_2)_p-NR_9-C(=O)-$;

[0298] p为整数1至24;

[0299] Q为H、带电取代基或可离子化基团;

[0300] R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;并且,

[0301] q和r在每次出现时独立地为0与10之间的整数;并且其余变量为如上文针对式(A)或式(B),或在第十四或第十五具体方面,或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所

述。

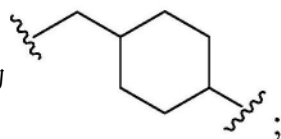
[0302] 在更具体实施方案中,q和r独立地为整数1至6,更具体来说,1至3。

[0303] 在另一更具体实施方案中, R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 在每次出现时独立地为H或 C_{1-3} 烷基。更具体来说, R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 全部为H。

[0304] 在另一更具体实施方案中,p为整数2至14。更具体来说,p为整数2至8、2至6或2至4。

[0305] 在更具体实施方案中,E为 $-(CR_{10}R_{11})_q^-$;并且式(L2)中的其余变量为如上文在第十六具体方面中所述。

[0306] 在另一更具体实施方案中,E为



并且式(L2)中的其余变量为如

上文在第十六具体方面中所述。

[0307] 在又另一具体实施方案中,Z为 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$;并且式(L2)中的其余变量为如上文在第十六具体方面或上文所述的任何具体或更具体实施方案中所述。甚至更具体来说, R_9 为H或Me。替代地, R_9 为H。

[0308] 在又另一更具体实施方案中,Q为i) H; ii) $-SO_3H$ 、 $-Z'-SO_3H$ 、 $-OPO_3H_2$ 、 $-Z'-OPO_3H_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-Z'-PO_3H_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-Z'-CO_2H$ 、 $-NR_{14}R_{15}$ 或 $-Z'-NR_{14}R_{15}$,或其药学上可接受的盐;或,iii) $-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$ 或 $-Z'-N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$; Z' 为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基; R_{14} 至 R_{16} 各自独立地为任选取代的烷基;并且 X^- 为药学上可接受的阴离子;并且式(L2)中的其余变量为如上文在第十六具体实施方案或上文所述的任何更具体实施方案中所述。在一些实施方案中, Z' 为任选取代的亚烷基。在又其他实施方案中, Z' 为 C_{1-3} 亚烷基(例如, $-CH_2-$);并且 R_{14} 至 R_{16} 各自独立地为 C_{1-4} 烷基。

[0309] 在又另一更具体实施方案中,Q为H或 $-SO_3H$ 或药学上可接受的阳离子(例如,钠盐或钾盐);并且式(L2)中的其余变量为如上文在第十六具体方面或上文所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

[0310] 在另一更具体实施方案中,对于式(L2):

[0311] R_{12} 和 R_{13} 在每次出现时各自独立地为H或 (C_1-C_3) 烷基;

[0312] Q为H或 $-SO_3H$ 或其药学上可接受的盐;

[0313] Z为 $-C(=O)-NR_9-$ 或 $-NR_9-C(=O)-$;

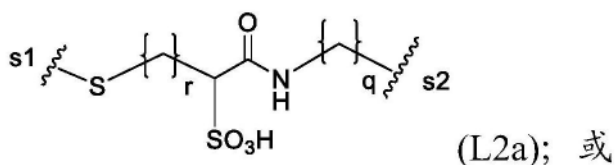
[0314] R_9 为H或 (C_1-C_3) 烷基;

[0315] E为 $-(CR_{10}R_{11})_q^-$;

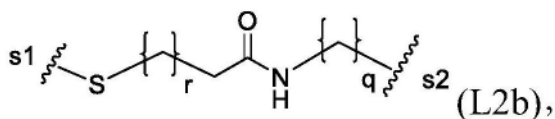
[0316] R_{10} 和 R_{11} 在每次出现时独立地为H或 (C_1-C_3) 烷基;并且

[0317] q和r各自为整数1至5。

[0318] 在第十七具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,-L-由以下结构式中任一者表示:

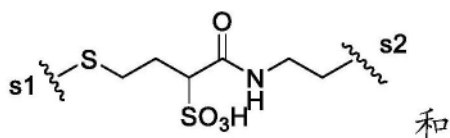


[0319]

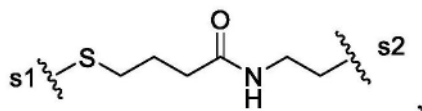


[0320] 或为其药学上可接受的盐(例如,钠盐或钾盐),其中s1为共价连接至D的位点,并且s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;q和r各自独立地为整数1至6;并且其余变量为如上文针对式(A)或式(B),或在第十四或第十五具体方面,或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说,q和r各自独立地为整数1至3。

[0321] 在第十八具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,-L-由以下结构式中任一者表示:

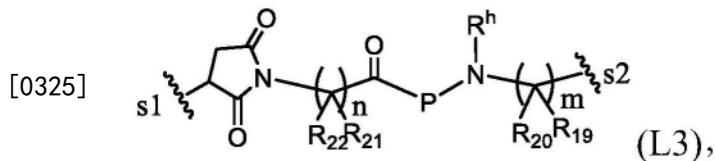


[0322]



[0323] 或为其药学上可接受的盐(例如,钠盐或钾盐),其中s1为共价连接至D的位点,并且s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;并且其余变量为如上文针对式(A)或式(B),或在第十四或第十五具体方面,或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

[0324] 在第十九具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,-L-由以下结构式表示:



[0326] 其中:

[0327] s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

[0328] R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;

[0329] m和n各自独立地为0与10之间的整数;

[0330] R^h 为H或任选取代的烷基;

[0331] P_L 为任选取代的亚烷基、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ (其中氧原子连接至与P连接的 $-(C=O)-$ 基团)、氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;并且

[0332] j为整数1至24;并且其余变量为如上文针对式(A)或式(B),或第十四或第十五具体方面,或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。

[0333] 在第二十具体方面中,对于式(L3), R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自为H或 (C_1-C_3) 烷基;m和n

各自独立地为1与6之间的整数;并且其余变量为上文在第十九具体实施方案或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说, R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 全部为H。甚至更具体来说, R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 全部为H;并且m和n各自独立地为1与3之间的整数。

[0334] 在第二十一具体方面中,对于式(L3), P_L 为氨基酸残基或含有2至10个氨基酸残基的肽;并且其余变量为如上文在第十九或二十具体方面或其中所述的任何具体或更具体实施方案中所述。更具体来说, P_L 为含有2至5个氨基酸残基的肽。

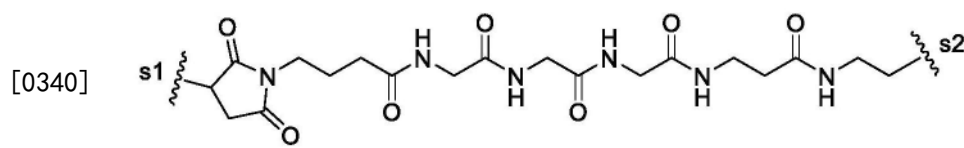
[0335] 在一些实施方案中,每个氨基酸残基为独立地选自以下的氨基酸的残基:天然存在的氨基酸、合成氨基酸、氨基酸类似物和以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸模拟物。

[0336] 在其他实施方案中,每个氨基酸残基为独立地选自由以下组成的群组的氨基酸的残基:组氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、精氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、赖氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、苯基丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丝氨酸、酪氨酸、N-甲基-组氨酸、N-甲基-丙氨酸、N-甲基-异亮氨酸、N-甲基-精氨酸、N-甲基-亮氨酸、N-甲基-天冬酰胺、N-甲基-赖氨酸、N-甲基-天冬氨酸、N-甲基-甲硫氨酸、N-甲基-半胱氨酸、N-甲基-苯基丙氨酸、N-甲基-谷氨酸、N-甲基-苏氨酸、N-甲基-谷氨酰胺、N-甲基-色氨酸、N-甲基-甘氨酸、N-甲基-缬氨酸、N-甲基-脯氨酸、N-甲基-丝氨酸、N-甲基-酪氨酸、羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸盐、硒半胱氨酸、O-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷、瓜氨酸、鸟氨酸、半胱氨酸磺酸、半胱氨酸亚磺酸、3-氨基丙氨酸、3-二甲基氨基丙氨酸、2-氨基-4-(二甲基氨基)丁酸、2,4-二氨基丁酸、2-氨基-6-(二甲基氨基)己酸、2-氨基-5-(二甲基氨基)戊酸和 β -丙氨酸,其各自独立地呈L或D异构体。更具体来说,每个氨基酸残基为独立地选择的甘氨酸或丙氨酸的残基。

[0337] 在其他实施方案中, P_L 为可通过蛋白酶裂解的肽。更具体来说, P_L 为可通过肿瘤组织中表达的蛋白酶裂解的肽。替代地, P_L 为可通过溶酶体蛋白酶裂解的肽。

[0338] 在又其他实施方案中, P_L 为选自由以下组成的群组:Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N⁹-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N⁹-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala和 β -Ala-Gly-Gly-Gly。更具体来说, P_L 为Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala或 β -Ala-Gly-Gly-Gly。

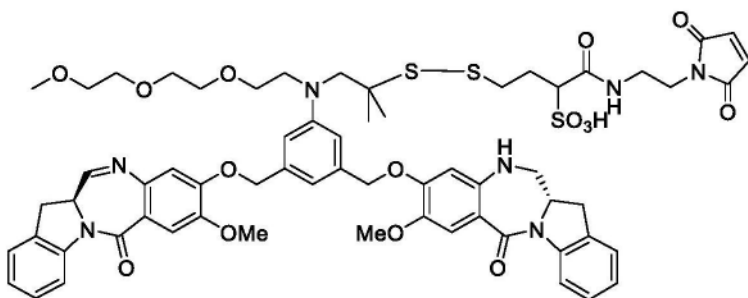
[0339] 在第二十二具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,-L-由以下结构式表示:



[0341] 或为其药学上可接受的盐,其中s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至马来酰

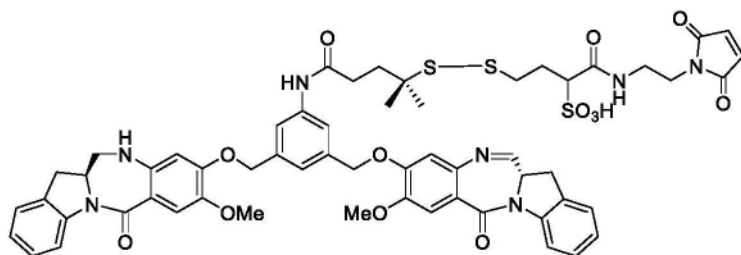
亚氨基团的位点;并且其余变量如上文针对式(A)或式(B),或在第十四或第十五具体方面中所述。

[0342] 在第二十三具体方面中,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

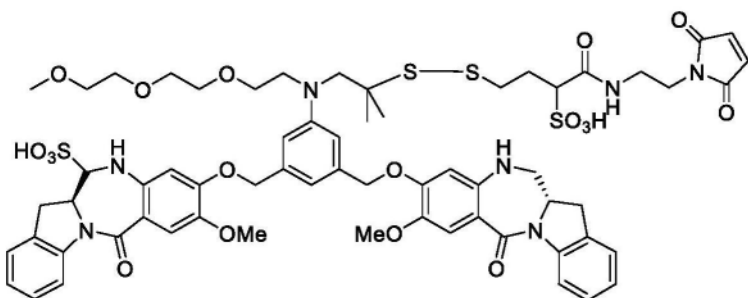


[0343]

；或

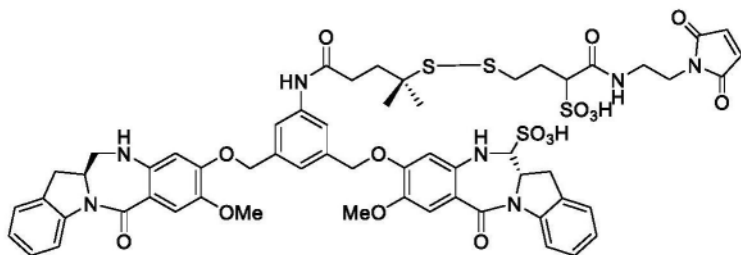


[0344] 或为其药学上可接受的盐,并且所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:



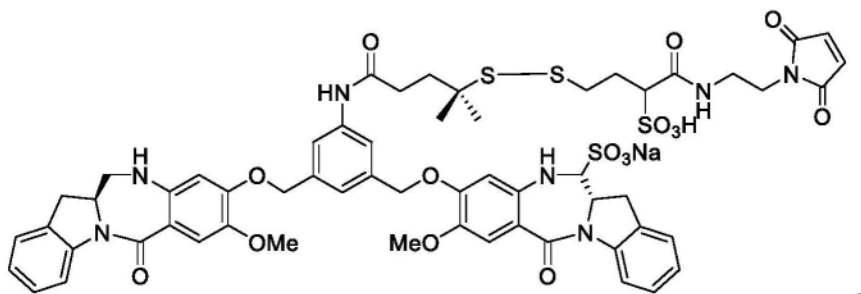
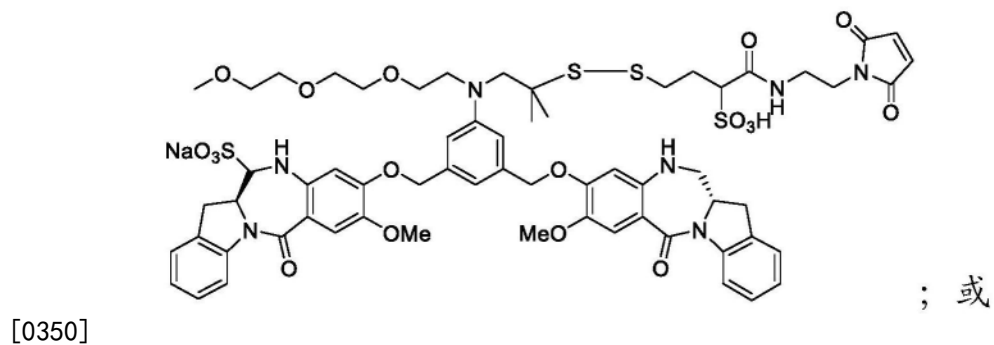
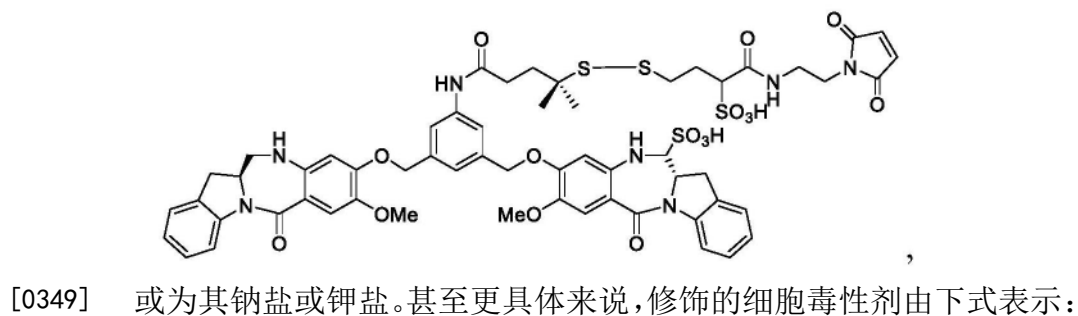
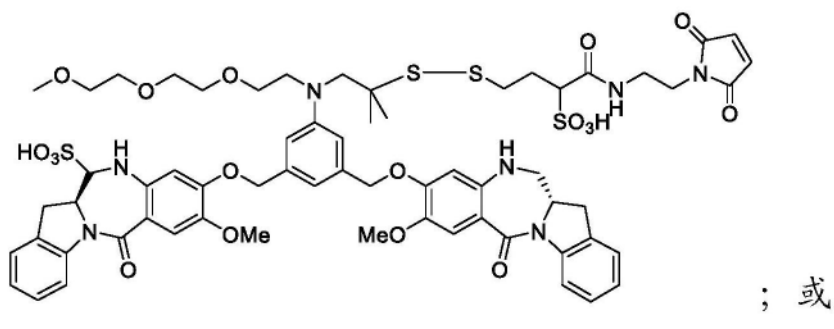
[0345]

；或

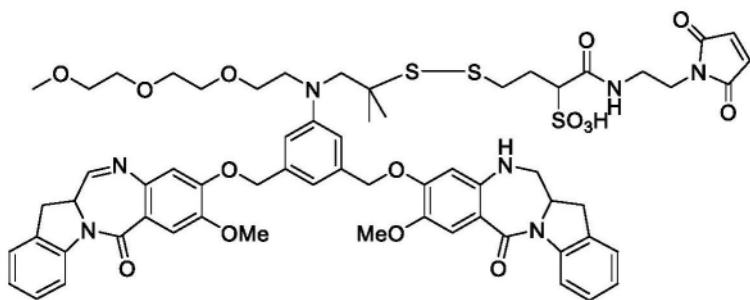


[0346] 或为其药学上可接受的盐。

[0347] 在更具体实施方案中,修饰的细胞毒性剂由下式表示:

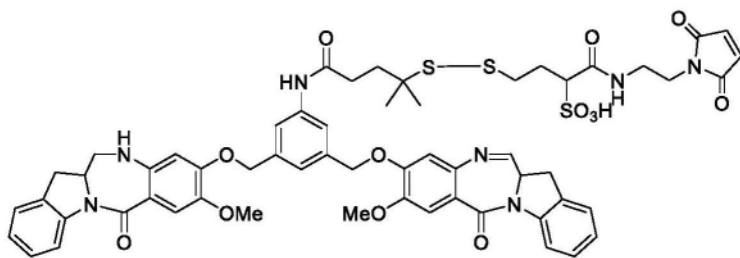


在一些实施方案中,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



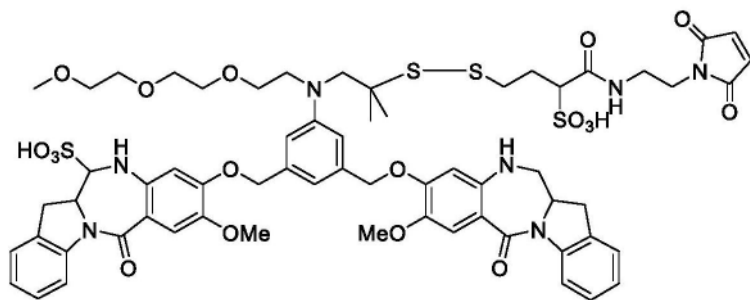
[0352]

; 或



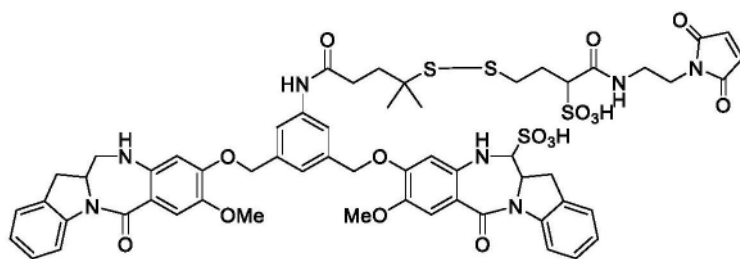
[0353]

或为其药学上可接受的盐,并且所述修饰的细胞毒性剂由下式表示:



[0354]

; 或



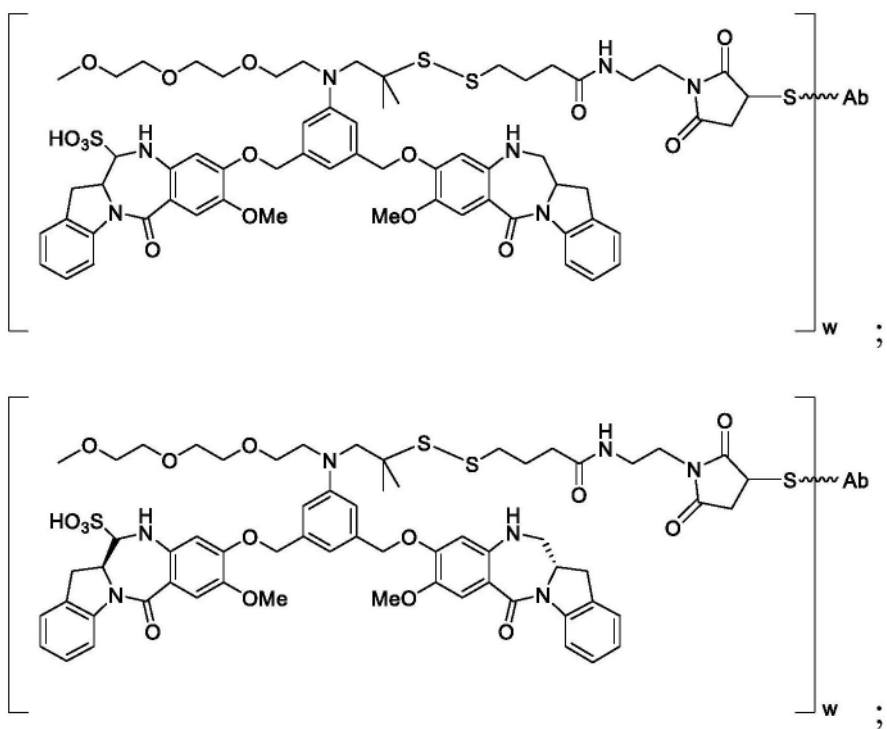
[0355]

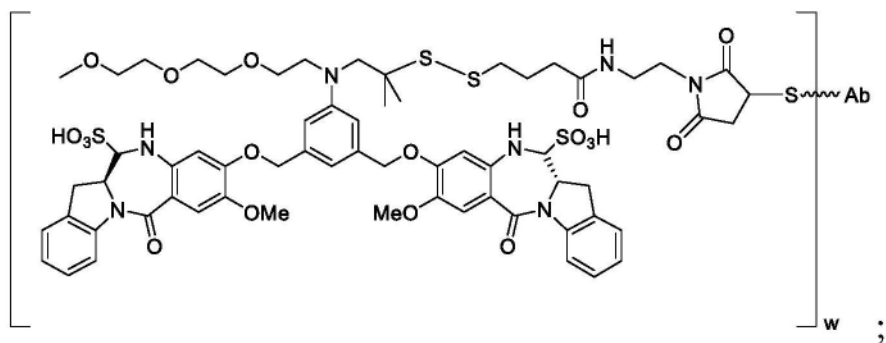
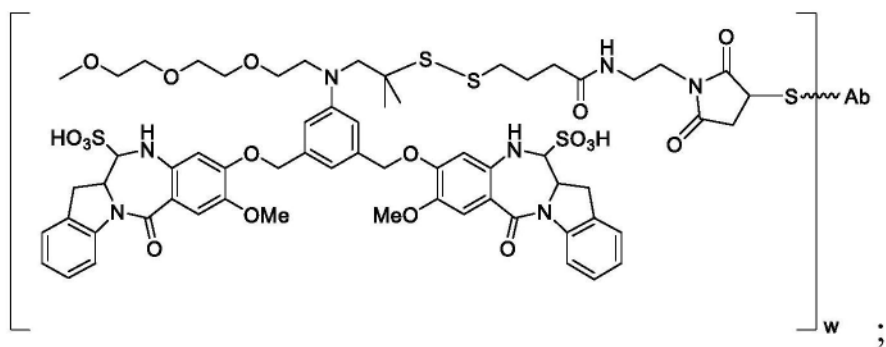
或为其药学上可接受的盐。

[0356]

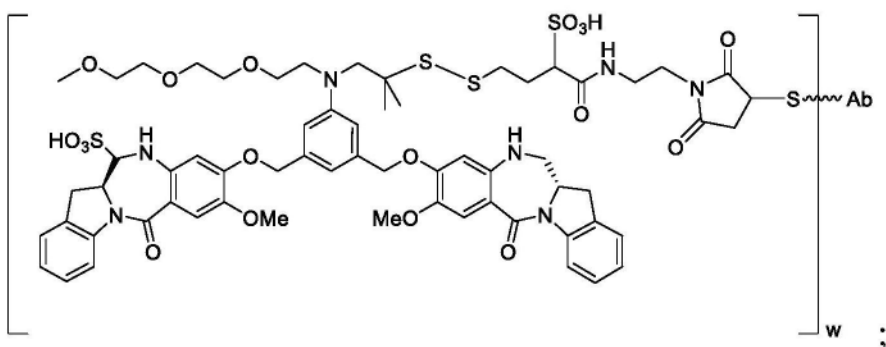
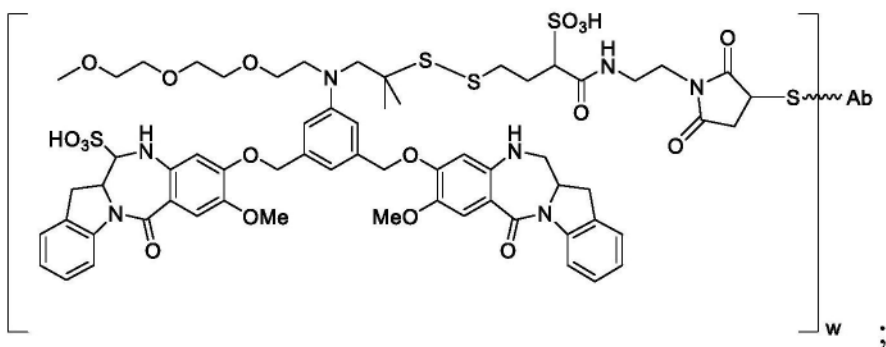
在第二十四具体方面中,可通过本发明方法制备的缀合物由以下结构式表示:

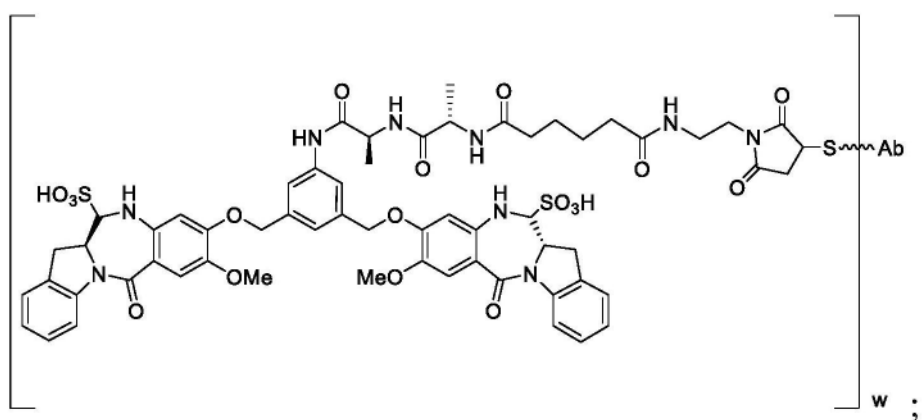
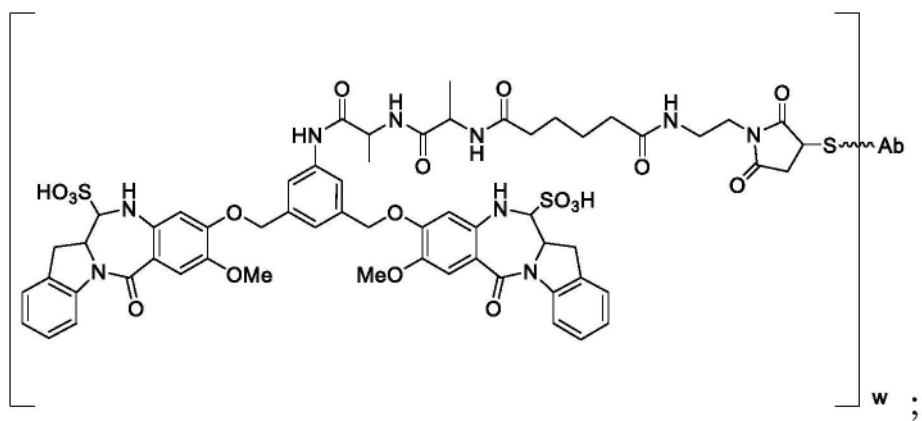
[0357]



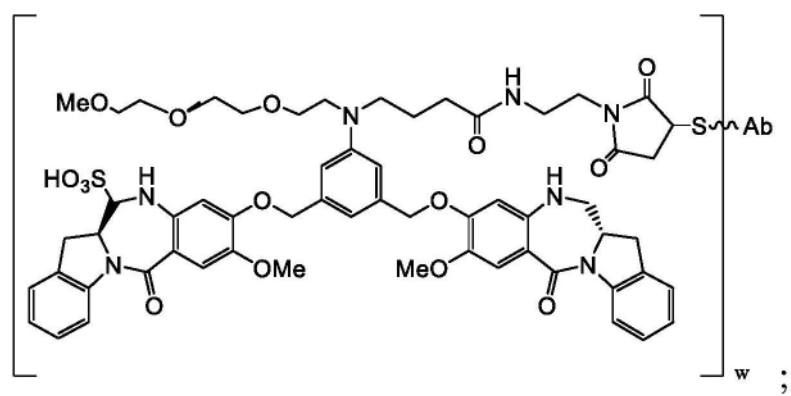
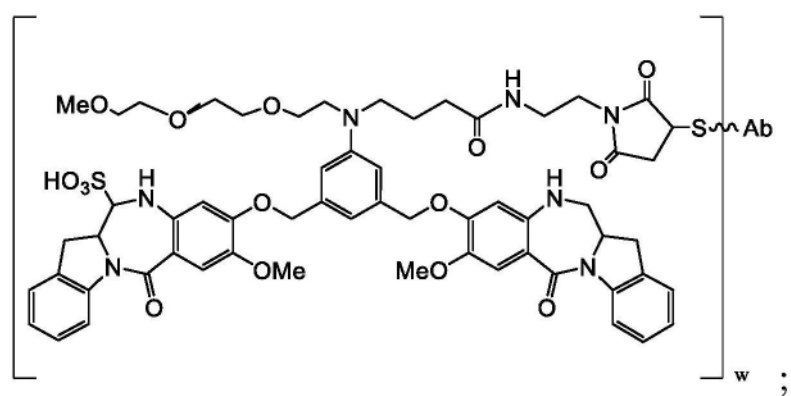


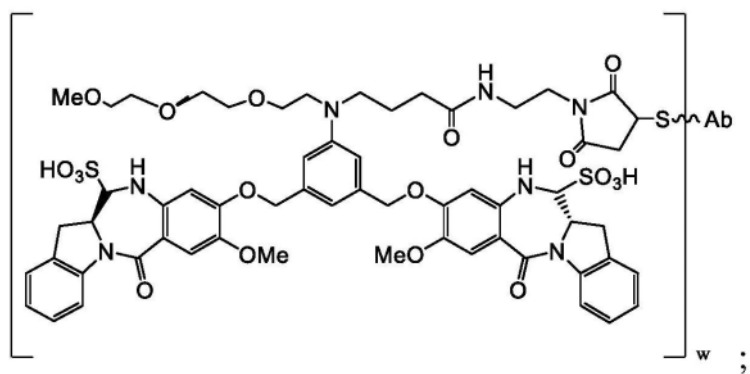
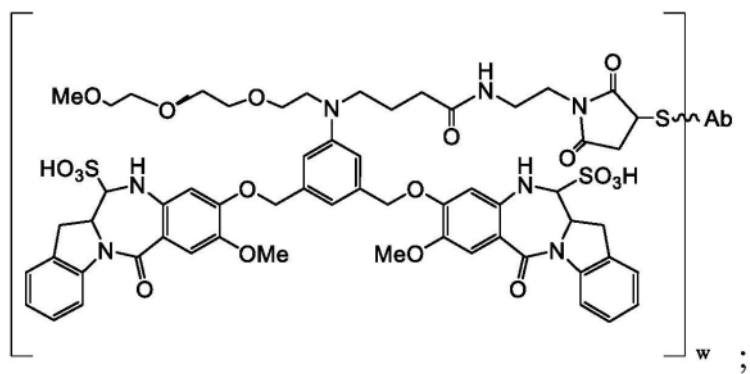
[0358]



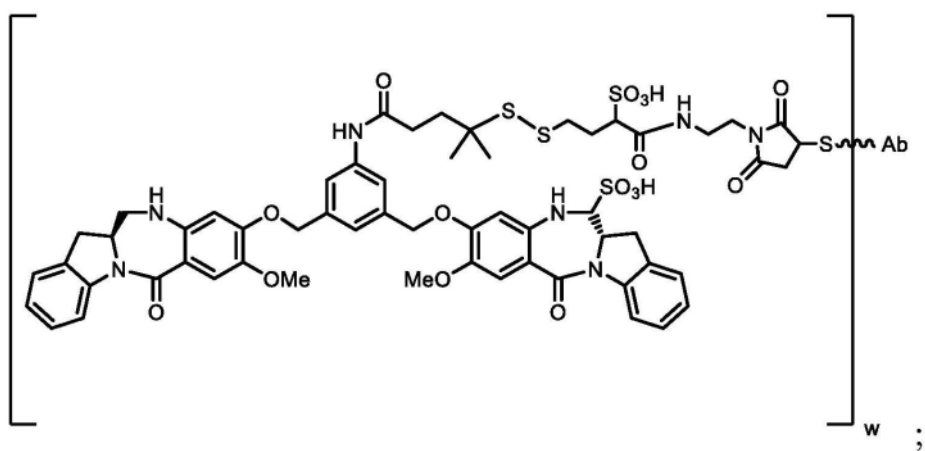
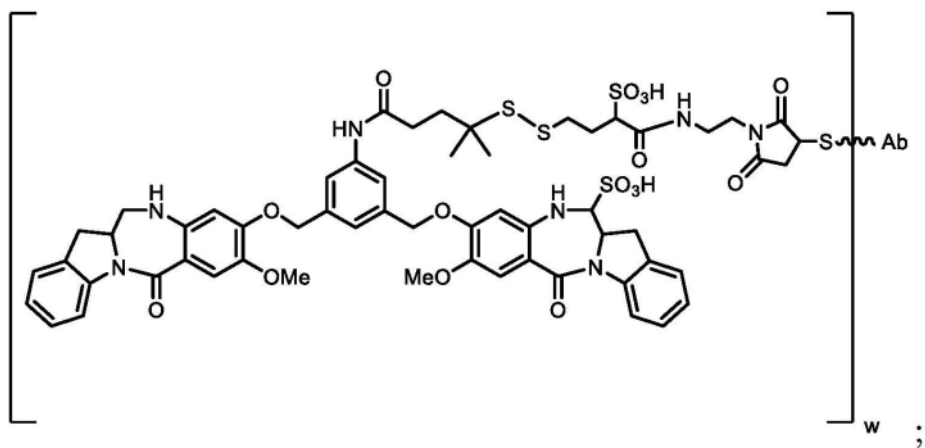


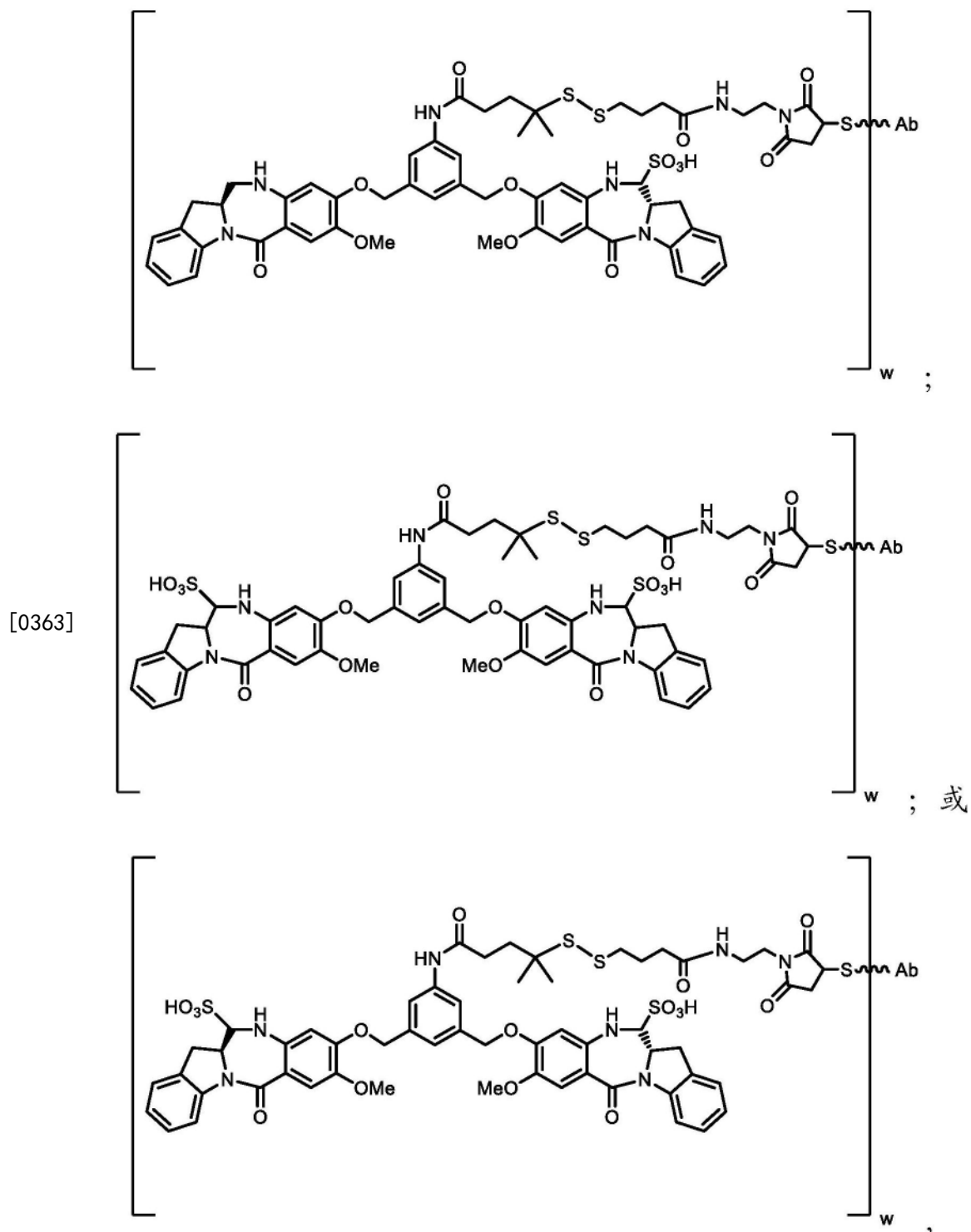
[0360]





[0361]

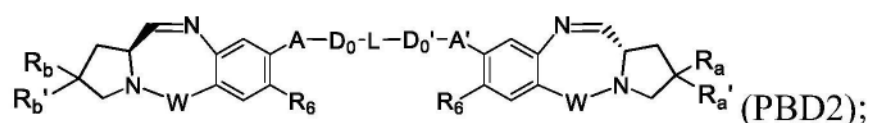
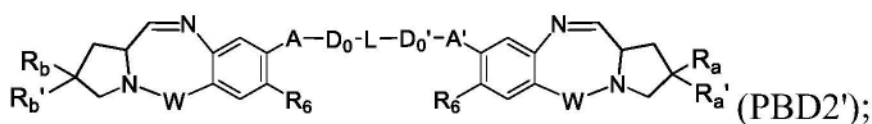
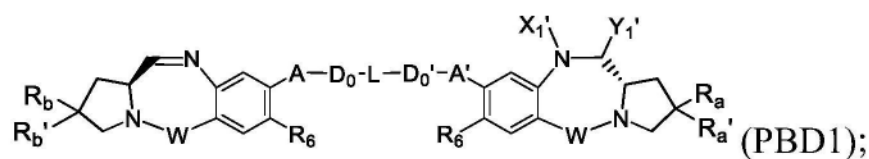
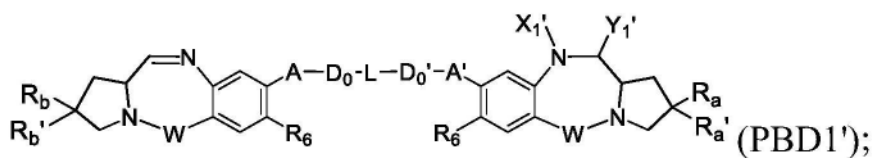




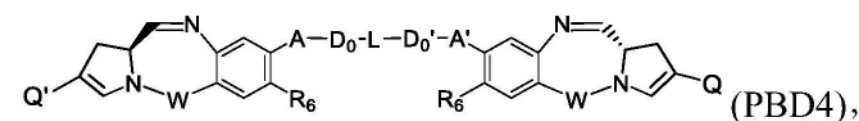
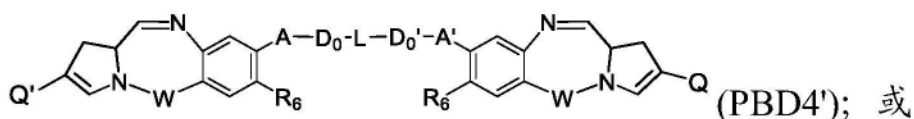
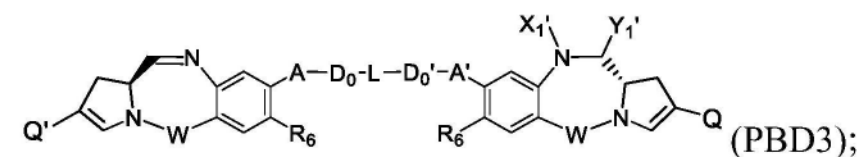
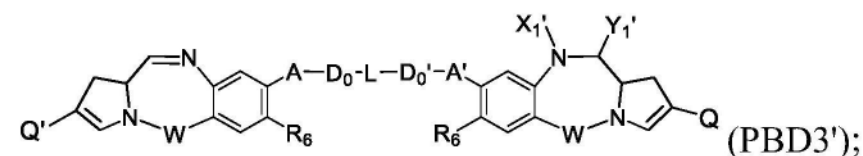
[0364] 或为其药学上可接受的盐(例如,钠盐或钾盐)。

[0365] 在一个方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,D为含亚胺PBD化合物。

[0366] 在第二十五具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,D由下式表示:



[0367]



[0368] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0369] W选自C=O、C=S、CH₂、BH、SO和SO₂;

[0370] X₁'选自-H,胺保护基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH₂CH₂O)_n-R^c,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,和含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0371] Y₁'选自-H,氧代基,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,具有1至6个杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0372] R₆'为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、-NO₂或卤素;

[0373] A和A'相同或不同,并且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR₅和-CRR'N(R₅)-,

[0374] R在每次出现时独立地选自由以下组成的群组:-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH₂CH₂O)_n-R^c,具有6至18个碳原子的任选取代的芳基,含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环,或含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0375] R'和R''各自独立地选自-H, -OH, -OR, -NHR, -NR₂, -COR,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-(CH₂CH₂O)_n-R^c,和具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环;

[0376] R^c为-H,或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链烷基,或键合至反应性基团的连接基团;

[0377] n为整数1至24;

[0378] R₅在每次出现时独立地为-H或具有1至10个碳原子的任选取代的直链或支链烷基;

[0379] D₀和D₀'相同或不同,并且独立地不存在,或选自由以下组成的群组:具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,氨基酸,带有2至6个氨基酸的肽,和聚乙二醇单元(-OCH₂CH₂)_n-;

[0380] L为不存在,接头,聚乙二醇单元(-OCH₂CH₂)_n-,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基或烯基,任选取代的苯基,具有1至6个独立地选自O、S、N和P的任选取代的3至18元杂环或5至18元杂芳环;

[0381] R_a、R_a'、R_b和R_b'相同或不同,并且独立地选自由以下组成的群组:-H,卤化物或具有1至10个碳原子的任选取代的支链、直链或环状烷基;或R_a和R_a'和/或R_b和R_b'在一起分别形成含有双键的基团=B和=B';

[0382] =B和=B'相同或不同,并且独立地选自任选取代的支链或直链烯基或羰基;

[0383] Q为Q₁-Ar-Q₂;

[0384] Q'为Q₁'-Ar'-Q₂';

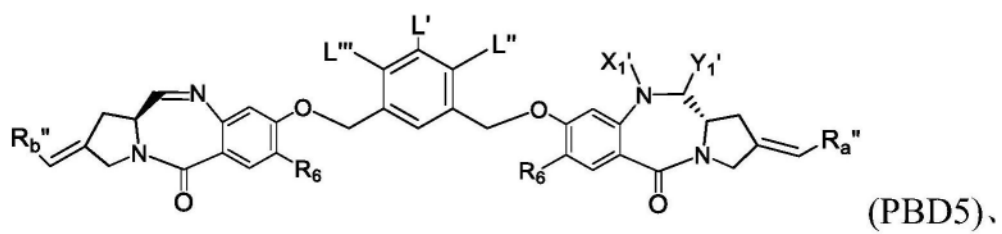
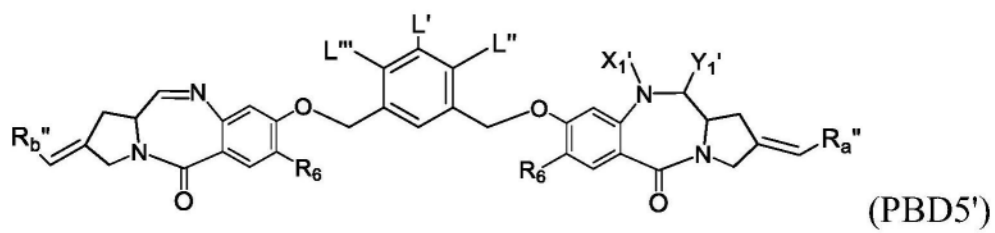
[0385] Q₁和Q₁'各自独立地为不存在,1至6个碳原子的直链、支链或环状烷基或-CH=CH单元;

[0386] Ar和Ar'各自独立地为不存在或表示芳基;

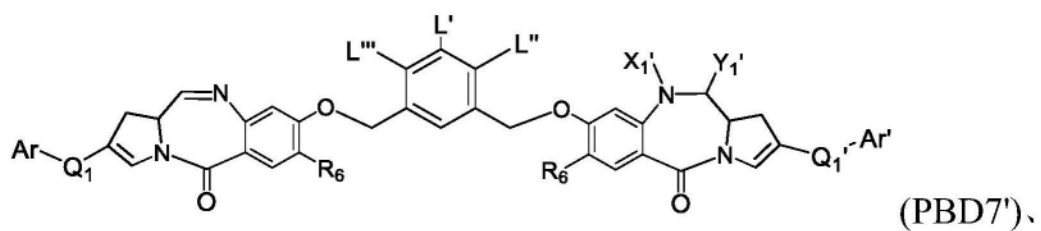
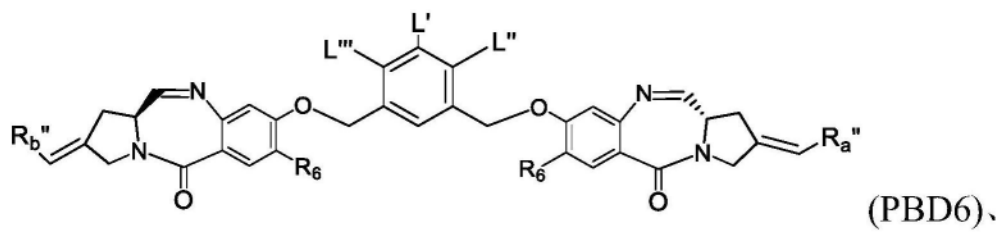
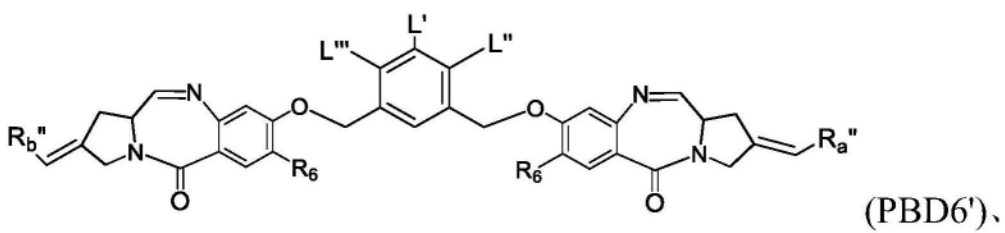
[0387] Q₂和Q₂'各独立地选自H,接头,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-R^c'-(OCH₂CH₂)_n-R^c,或选自以下的取代基:卤素、胍[-NH(C=NH)NH₂]、-R、-OR、-NR'R''、-NO₂、-NCO、-NR'COR''、NR'(C=O)OR''-SR、由-SOR'表示的亚砷、由-SO₂R'表示的砷、磺酸盐-SO₃M、硫酸盐-OSO₃M、由SO₂NR'R''表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、-COR'、-OCOR'或-OCONR'R'';并且

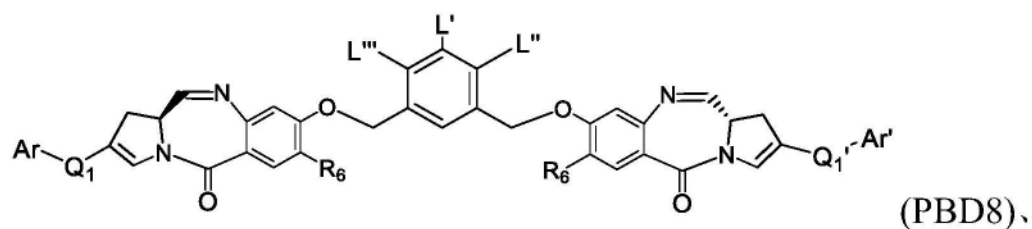
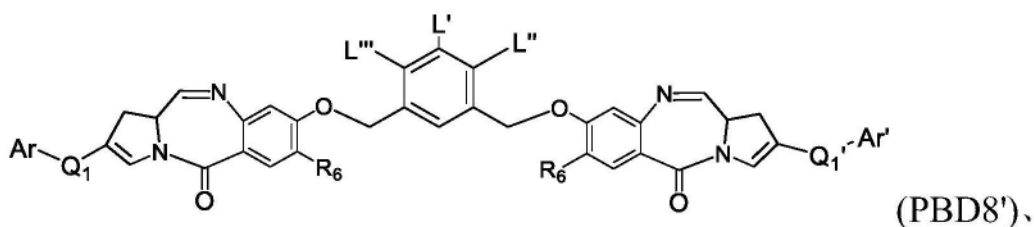
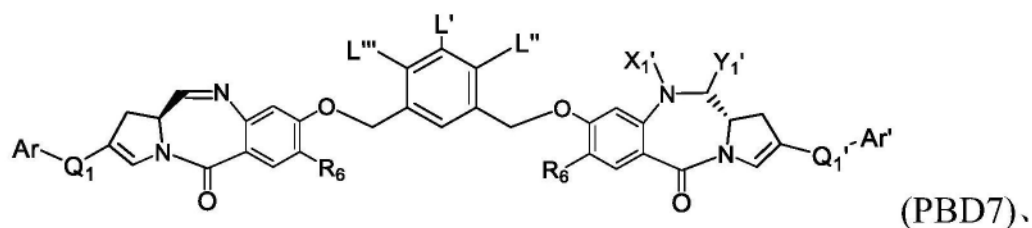
[0388] R^c'为不存在或选自具有1至5个碳原子的直链或支链烷基、烯基或炔基。

[0389] 在第二十六具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,D为自以下中的一者:

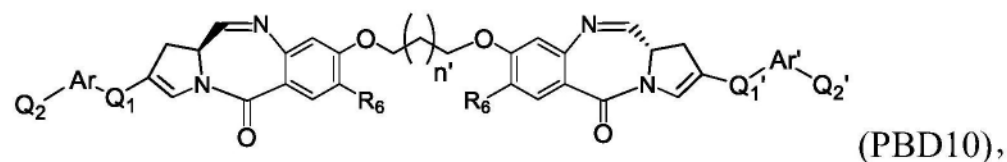
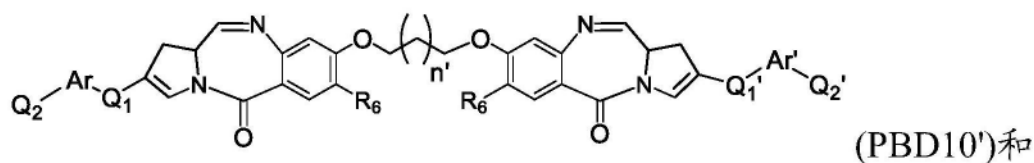
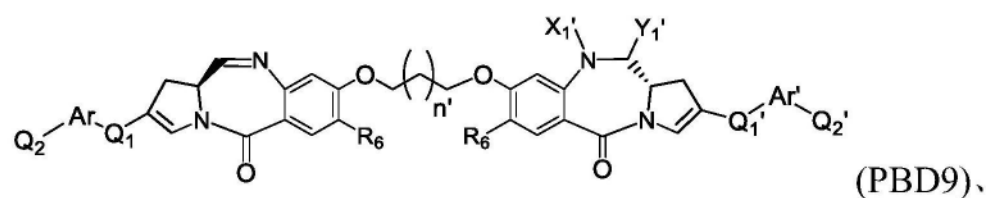
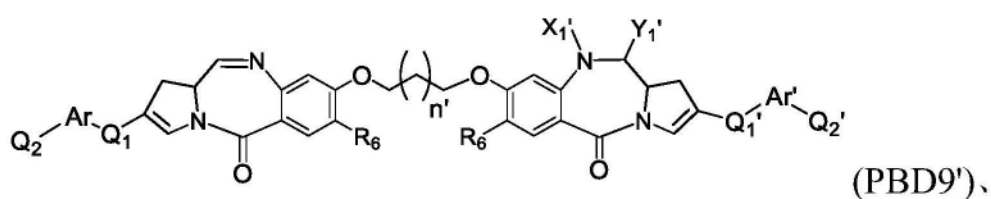


[0390]





[0391]



[0392] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0393] 式(PBD5')、(PBD6')、(PBD7')、(PBD8')、(PBD5)、(PBD6)、(PBD7)或(PBD8)中L'、L''和L'''中的一者由下式表示:

[0394] $-Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-(A')$;或[0395] $-N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-(D')$,

[0396] 并且另两者各自独立地选自-H,具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$,卤素,胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR$, $-NR'$, R'' , $-NO_2$, $-NR'COR''$, $-SR$, $-SOR'$, $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$,氰基,叠氮基, $-COR'$, $-OCOR'$,和 $-OCONR'R''$;

[0397] 式(PBD9')、(PBD10')、(PBD9)或(PBD10)中 Q_2 和 Q_2' 中的一者由下式表示:

[0398] $-Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-(A')$;

[0399] $-N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-(D')$;或

[0400] $-Z_1-P_1-Z_2-(E')$,

[0401] 并且另一者选自-H、-R、-OR、-NR'R''、 $-NO_2$ 、 $-NR'(C=O)OR''$ 、-SR或 $-NO_2$;

[0402] Z_1 和 Z_2 中的一者为 $-C(=O)-$,并且另一者为 $-NR_5-$;

[0403] P_1 为氨基酸残基或含有2至20之间个氨基酸残基的肽;

[0404] R_{x1} 为具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

[0405] R^e 为-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基,或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$,其中 R^k 为-H,具有1至6个碳原子的直链、支链、环状烷基,其任选地带有仲氨基(例如, $-NHR^{101}$)或叔氨基($-NR^{101}R^{102}$)基团,或5或6元含氮杂环,其中 R^{101} 和 R^{102} 各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;

[0406] R^e 为-H或具有1至4个碳原子的任选取代的直链或支链烷基;

[0407] R_5 在每次出现时独立地为-H或具有1至10个碳原子的任选取代的直链或支链烷基。

[0408] R_a 和 R_b 相同或不同,并且选自-H和-Me;并且

[0409] n' 选自0、1、2和3;并且其余变量如第二十五具体方面中所述。

[0410] 在第二十七具体方面中,式(PBD5')、(PBD6')、(PBD7')、(PBD8')、(PBD5)、(PBD6)、(PBD7)或(PBD8)中 L' 、 L'' 和 L''' 中的一者由式(A')或(D')表示,并且另两者为-H、具有1至6个碳原子的直链或支链烷基、卤素、-OH、 (C_1-C_6) 烷氧基或 $-NO_2$;或式(PBD9')、(PBD10')、(PBD9)或(PBD10)中 Q_2 和 Q_2' 中的一者由式(A')、(D')或(E')表示;并且另一者为-H、具有1至6个碳原子的直链或支链烷基、卤素、-OH、 (C_1-C_6) 烷氧基或 $-NO_2$;并且其余变量如第二十六具体方面中所述。

[0411] 在第二十八具体方面中, L'' 和 L''' 均为-H;并且式(PBD5')、(PBD6')、(PBD7')、(PBD8')、(PBD5)、(PBD6)、(PBD7)或(PBD8)中 L' 由下式表示:

[0412] $-NR_5-P_1-C(=O)-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(B1')$;

[0413] $-NR_5-P_1-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(B2')$;

[0414] $-C(=O)-P_1-NR_5-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(C1')$;或

[0415] $-C(=O)-P_1-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(C2')$,

[0416] 式(PBD9')、(PBD10')、(PBD9)或(PBD10)中 Q_2 和 Q_2' 中的一者由下式表示:

[0417] $-NR_5-P_1-C(=O)-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(B1')$;

[0418] $-NR_5-P_1-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(B2')$;

[0419] $-C(=O)-P_1-NR_5-(CR_aR_b)_s-C(=O)-(C1')$;

[0420] $-C(=O)-P_1-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{s1}-C(=O)-(C2')$;

[0421] $-NR_5-P_1-C(=O)-(E1')$;或

[0422] $-C(=O)-P_1-NR_5-(E2')$,

[0423] 其中:

[0424] R_a 和 R_b 在每次出现时各自独立地为-H、 (C_1-C_3) 烷基或带电取代基或可离子化基团Q;

[0425] s 为整数1至6;

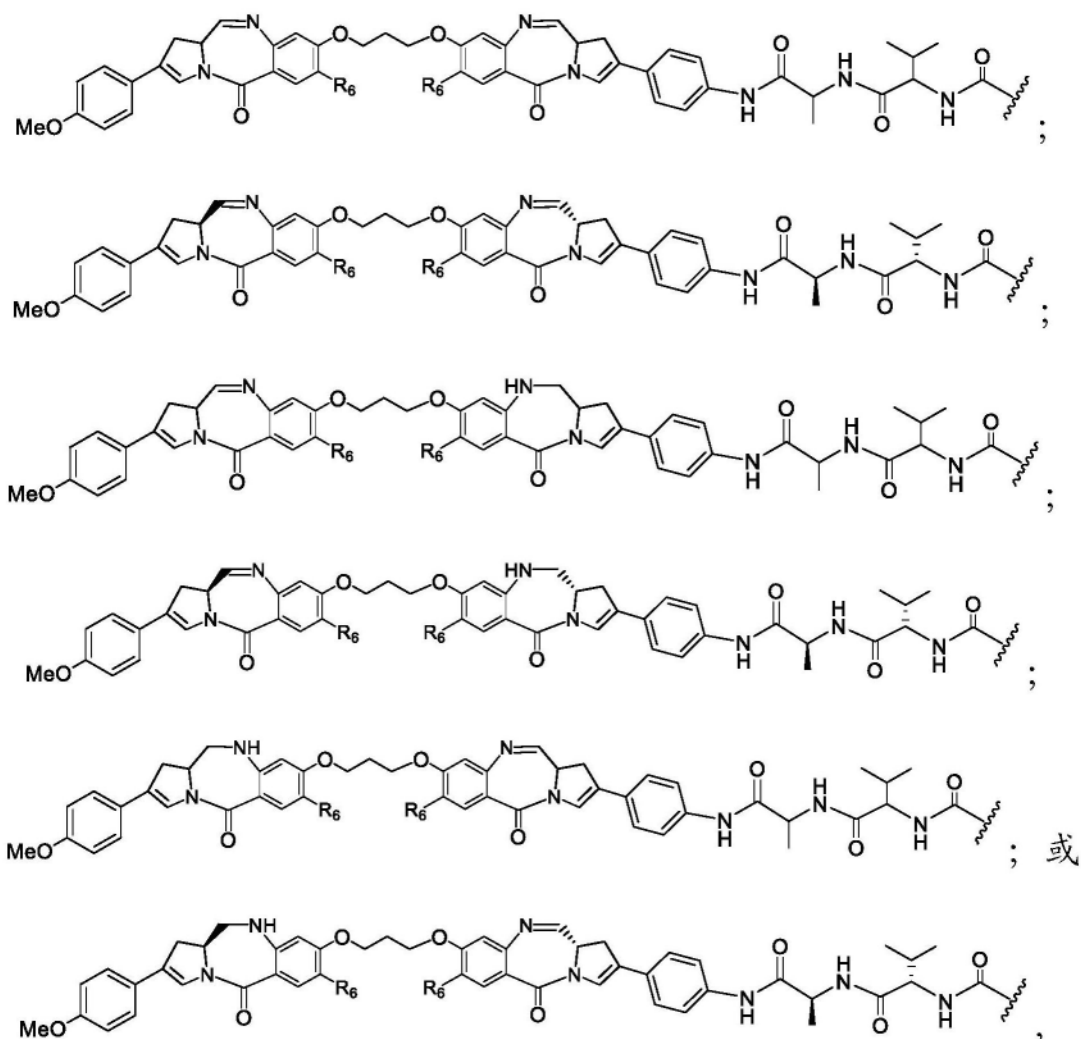
[0426] $s1'$ 为0或整数1至6;并且

[0427] Cy为具有5或6个环碳原子的环状烷基,其任选地被卤素、-OH、 (C_1-C_3) 烷基、 (C_1-C_3) 烷氧基或卤代 (C_1-C_3) 烷基取代;并且其余变量如第二十七具体方面中所述。在一些实施方案中, R_a 和 R_b 均为H;式(B2')和(C2')中Cy为环己烷; R_5 为H或Me;并且 $s1'$ 为0或1。

[0428] 在第二十九具体方面中, P_1 为含有2至10个氨基酸残基的肽;并且其余变量如第二十八具体方面中所述。在一些实施方案中, P_1 为含有2至5个氨基酸残基的肽。在一些实施方案中, P_1 为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe和Gln-Ala。在一些实施方案中, P_1 为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

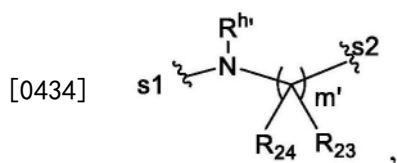
[0429] 在第三十具体方面中,对于第二十五、第二十六、第二十七、第二十八或第二十九具体方面中任一项和其中所述的实施方案中所述的方法, R_6 为-OMe; X_1' 和 Y_1' 均为-H;并且A和A'为-O-。

[0430] 在第三十一具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,D由以下结构式表示:



[0432] 或为其药学上可接受的盐。

[0433] 在第三十二具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,-L-由以下结构式表示:



[0435] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0436] s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

[0437] R_{23} 和 R_{24} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;

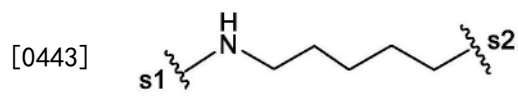
[0438] m' 为0与10之间的整数;并且

[0439] R^h 为H或任选取代的烷基;并且其余变量为上文第二十五、第二十六、第二十七、第二十八、第二十九、第三十、第三十一或第三十二具体方面中所述。

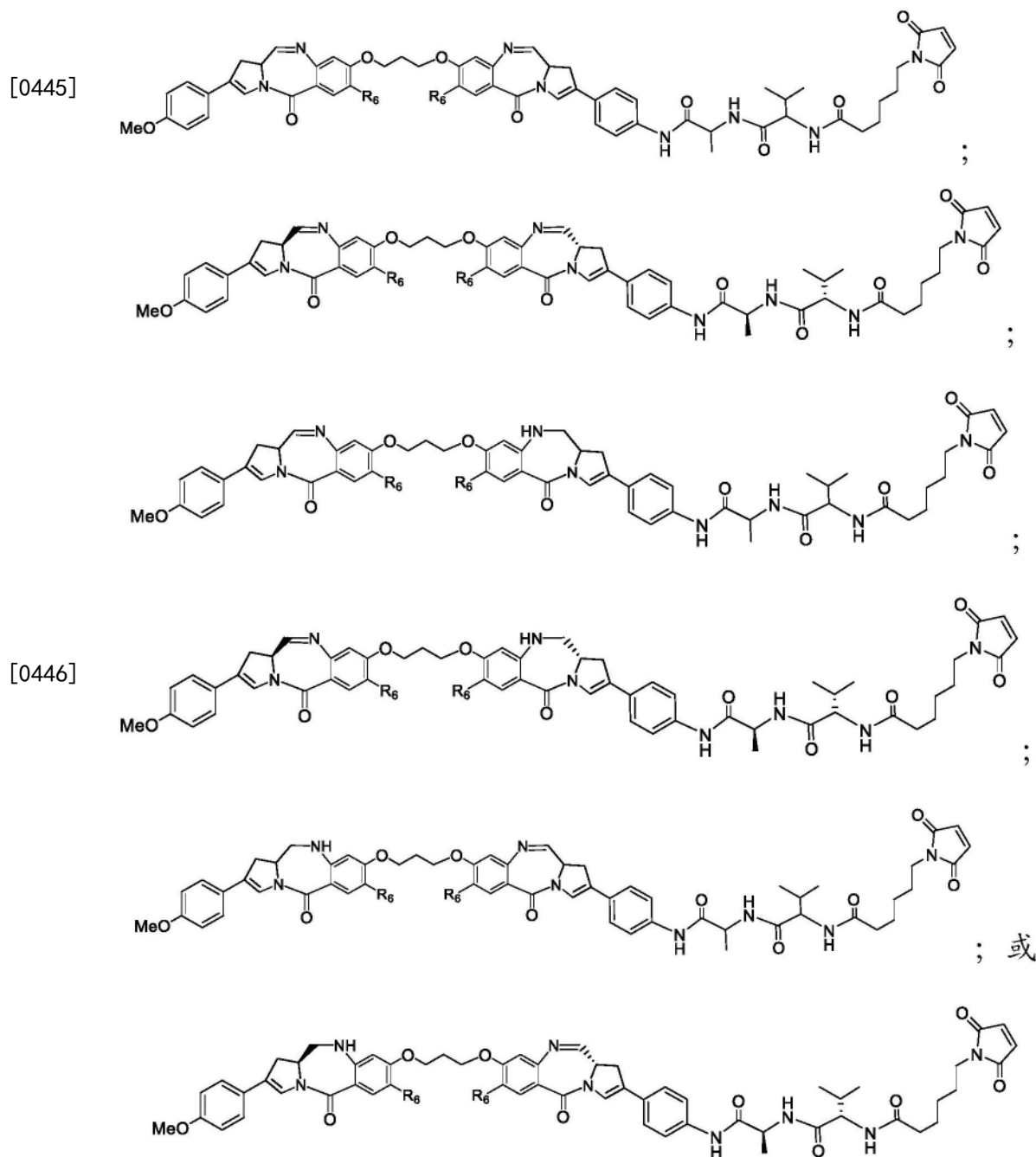
[0440] 在一些实施方案中, R_{23} 和 R_{24} 均为H;并且 m' 为1与6之间的整数。

[0441] 在一些实施方案中, R^h 为H。

[0442] 在一些实施方案中,L由以下结构式表示:

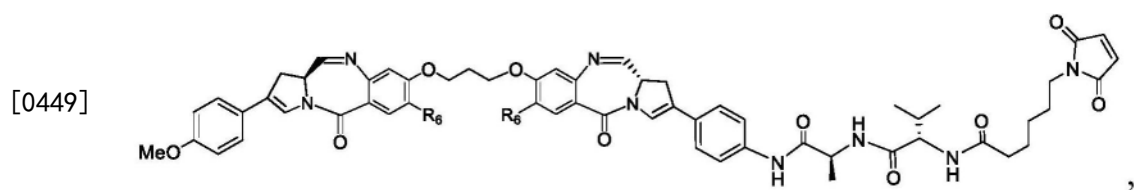


[0444] 在第三十四具体方面中,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



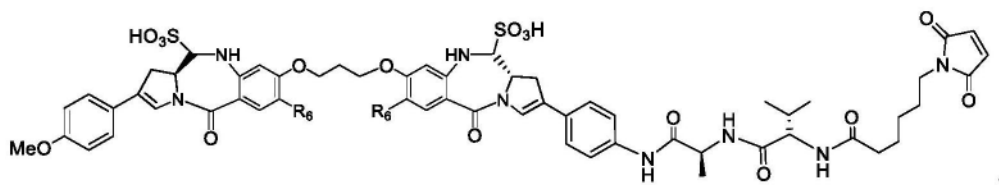
[0447] 或为其药学上可接受的盐。

[0448] 在一些实施方案中,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



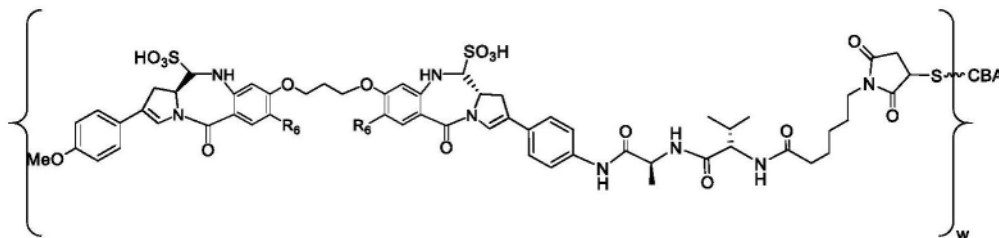
[0450] 或为其药学上可接受的盐;所述修饰的含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

[0451]



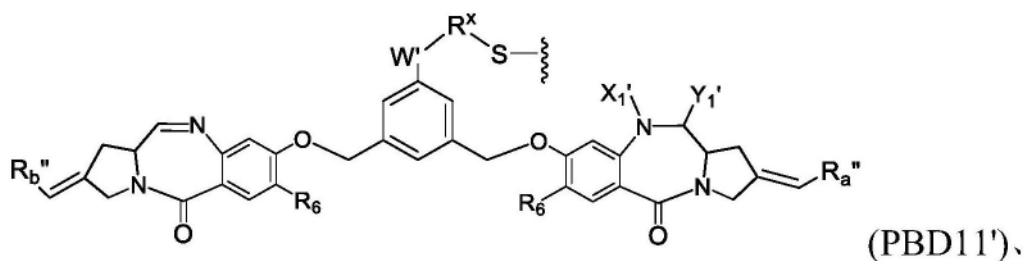
[0452] 或为其药学上可接受的盐;并且所述缀合物由下式表示:

[0453]

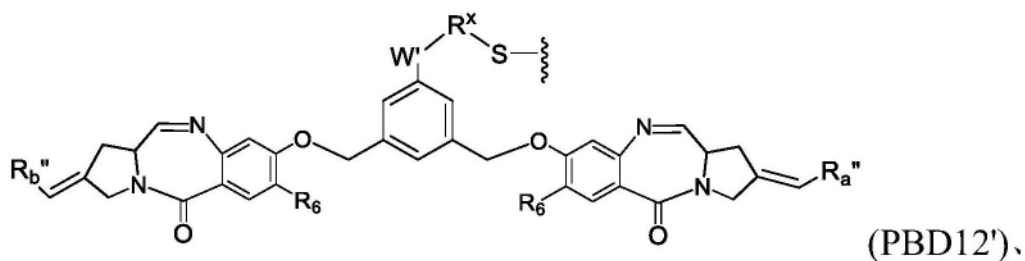
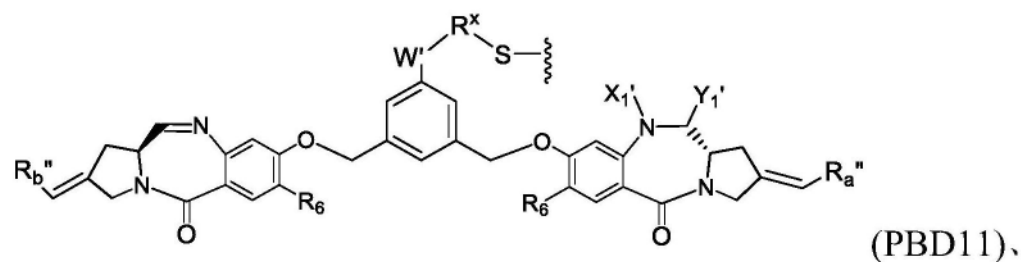


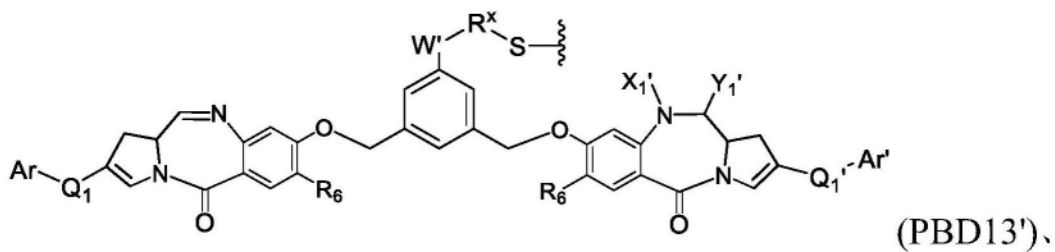
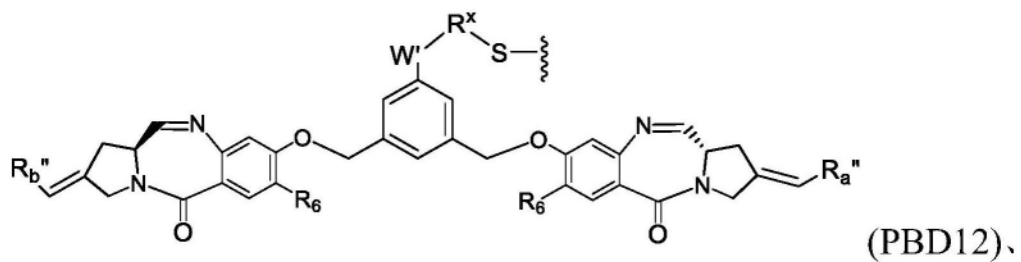
[0454] 或为其药学上可接受的盐。

[0455] 在第三十五具体方面中,对于式 (A) 的含亚胺细胞毒性剂或式 (B) 的缀合物,D由下式表示:

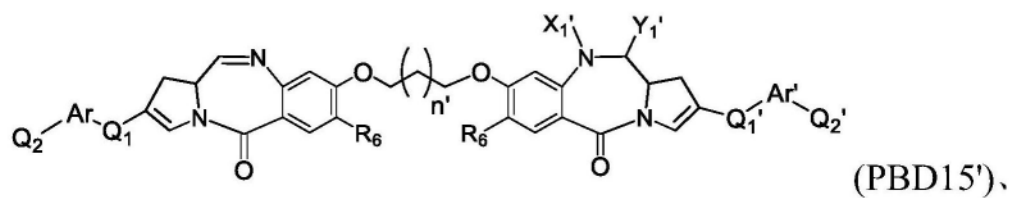
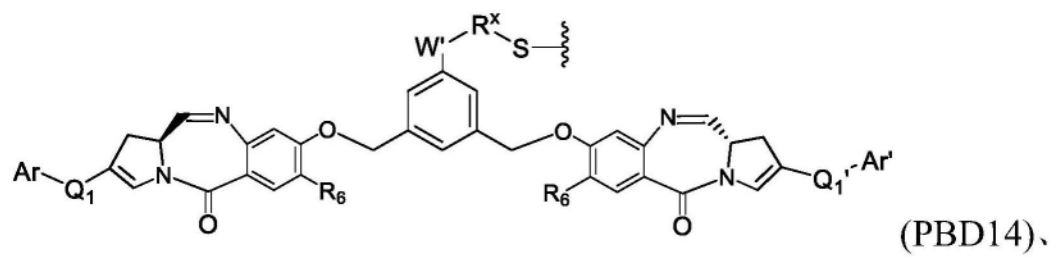
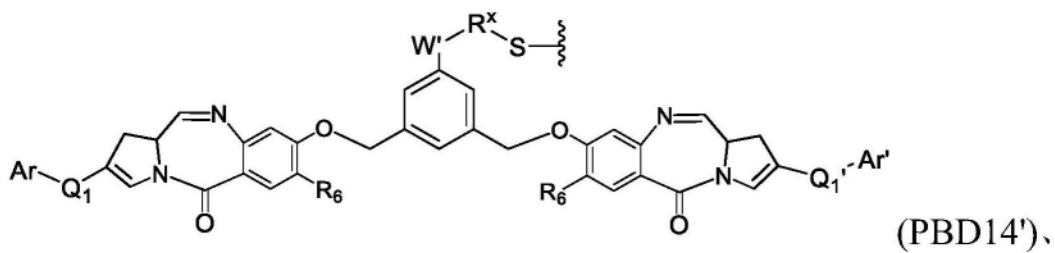
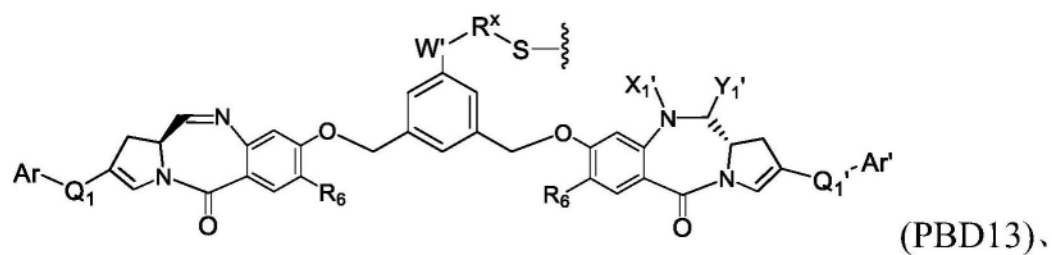


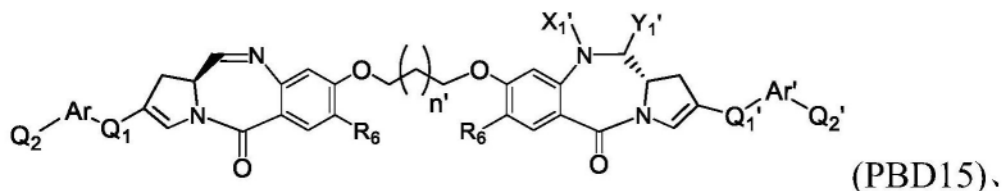
[0456]



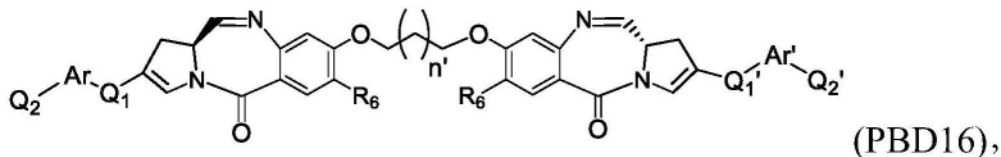
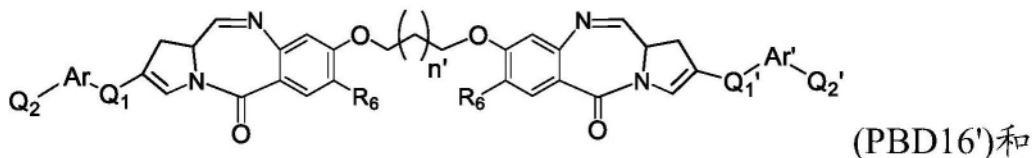


[0457]





[0458]



[0459] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0460] X_1' 选自由以下组成的群组: -H, -OH, 具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 苯基, 和胺保护基;[0461] Y_1' 选自由以下组成的群: -H、氧代、具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;[0462] 式(PBD15)或(PBD16)中 Q_2 和 Q_2' 中的一者为 $-W'-R^x-S-$; 并且另一者选自-H, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 卤素, 胍 $[-NH(C=NH)NH_2]$, $-OR$, $-NR'R''$, $-NO_2$, $-NR'COR''$, $-SR$, $-SOR'$, $-SO_2R'$, $-SO_3H$, $-OSO_3H$, $-SO_2NR'R''$, 氰基, 叠氮基, $-COR'$, $-OCOR'$ 和 $-OCONR'R''$;[0463] W' 不存在, 或选自 $-O-$ 、 $-N(R^e)-$ 、 $-N(R^e)-C(=O)-$ 、 $-N(C(=O)R^e)-$ 、 $-S-$ 或 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2NR^e-$;[0464] R^x 不存在, 或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基;[0465] R^e 为-H, 具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或 $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$, 其中 R^k 为-H, 具有1至6个碳原子的直链、支链、环状烷基, 其任选地带有仲氨基(例如, $-NHR^{101}$)或叔氨基($-NR^{101}R^{102}$)基团, 或5或6元含氮杂环, 其中 R^{101} 和 R^{102} 各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基;[0466] n 为整数1至24;[0467] R_6 为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R''、 $-NO_2$ 或卤素; 并且[0468] R 为-H, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或PEG基团 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 其中 n 为整数1至24, 并且 R^c 为具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;[0469] R' 和 R'' 各自独立地选自-H, -OH, -OR, $-NRR^g$, $-COR$, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 具有6至18个碳原子的任选取代的芳基, 具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的任选取代的3至18元杂环, PEG基团 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$, 并且 R^g 为-H, 具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基, 或PEG基团 $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$.

[0470] 在第三十六具体方面中,对于式(PBD11')、(PBD12')、(PBD13')、(PBD14')、(PBD15')、(PBD16')、(PBD11)、(PBD12)、(PBD13)、(PBD14)、(PBD15)或(PBD16), X_1' 和 Y_1' 均为-H;

[0471] R_6 为-OMe;

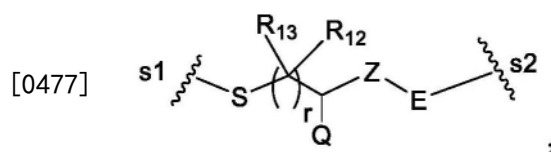
[0472] W' 为-N(R^e)-或-N(R^e)-C(=O)-;

[0473] R^e 为-H,具有1至4个碳原子的直链或支链烷基,或-(CH₂-CH₂-O)_n- R^k ,其中 R^k 为-H,具有1至4个碳原子的直链或支链烷基;

[0474] n为整数2至6;并且

[0475] R^x 为具有1至6个碳原子的直链或支链烷基;并且其余变量如第三十五具体方面中所述。

[0476] 在第三十七具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,L由以下结构式表示:



[0478] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0479] s1为共价连接至D的位点,并且s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

[0480] E为-(CR₁₀R₁₁)_q-、环烷基或环烷基烷基;

[0481] Z为不存在、-SO₂NR₉-、-NR₉SO₂-、-C(=O)-NR₉-、-NR₉-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-NR₉-(CH₂CH₂O)_p-、-NR₉-C(=O)-(CH₂CH₂O)_p-、-(OCH₂CH₂)_p-C(=O)NR₉-或-(OCH₂CH₂)_p-NR₉-C(=O)-;

[0482] p为整数1至24;

[0483] Q为H、带电取代基或可离子化基团;

[0484] R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;并且,

[0485] q和r在每次出现时独立地为0与10之间的整数;并且其余变量如第三十五或第三十六具体方面中所述。

[0486] 在一些实施方案中,E为-(CR₁₀R₁₁)_q-。在一些实施方案中,Z为-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-。在一些实施方案中,R₉为-H。在一些实施方案中,R₉、R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃全部为H;并且q和r各自独立地为1与6之间的整数。

[0487] 在一些实施方案中,对于第三十七具体方面中所述的-L-:

[0488] R₁₂和R₁₃在每次出现时各自独立地为H或(C₁-C₃)烷基;

[0489] Q为H或-SO₃H或其药学上可接受的盐

[0490] Z为-C(=O)-NR₉-或-NR₉-C(=O)-;

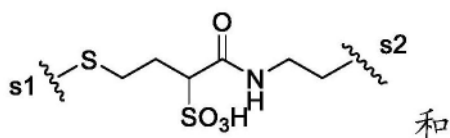
[0491] R₉为H或(C₁-C₃)烷基;

[0492] E为-(CR₁₀R₁₁)_q-。

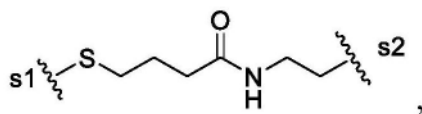
[0493] R₁₀和R₁₁在每次出现时独立地为H或(C₁-C₃)烷基;并且

[0494] q和r各自为整数1至5。

[0495] 在第三十八具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,L由以下结构式中的任一者表示:

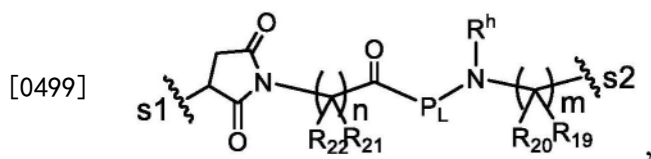


[0496]



[0497] 或为其药学上可接受的盐,并且其余变量如第三十五或第三十六具体方面中所述。

[0498] 在第三十九具体方面中,对于式(A)的含亚胺细胞毒性剂或式(B)的缀合物,L由以下结构式表示:



[0499]

[0500] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0501] s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至马来酰亚胺基团的位点;

[0502] R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;

[0503] m和n各自独立地为0与10之间的整数;

[0504] R^h 为H或任选取代的烷基;

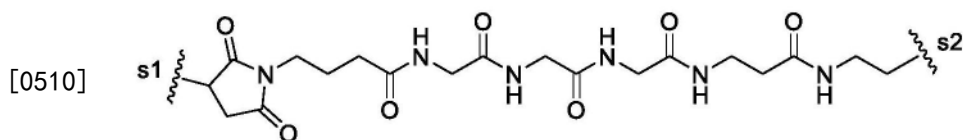
[0505] P_L 为任选取代的亚烷基、 $-(CH_2-CH_2-O)_j-$ (其中氧原子连接至与P连接的 $-(C=O)-$ 基团)、氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽;并且

[0506] j为整数1至24;并且其余变量如第三十五或第三十六具体方面中所述。

[0507] 在一些实施方案中, R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 和 R_{22} 各自为H;并且m和n各自独立地为1与6之间的整数。

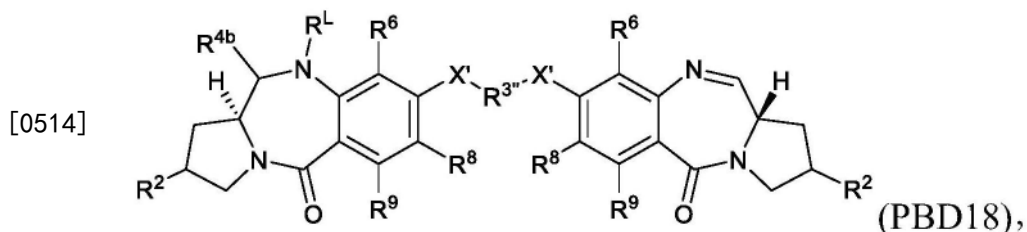
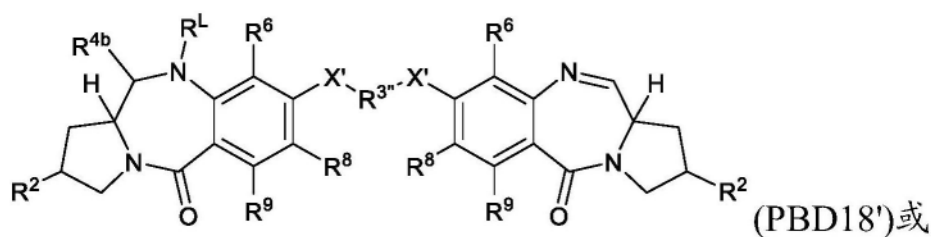
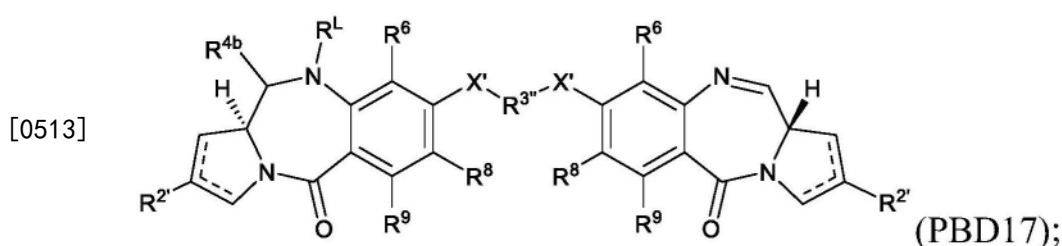
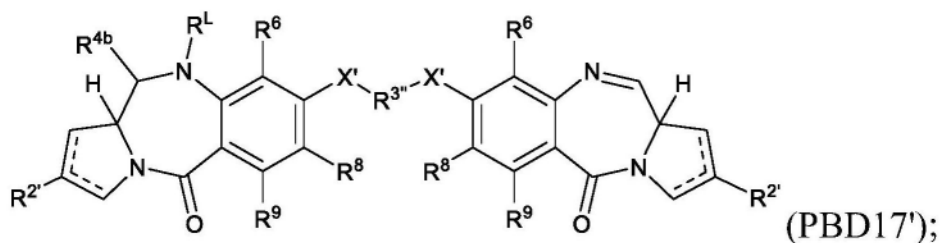
[0508] 在一些实施方案中, P_L 为含有2至10个氨基酸残基的肽。更具体来说, P_L 为含有2至5个氨基酸残基的肽。甚至更具体来说, P_L 选自由以下组成的群组:Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Cit-Val、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe- N^9 -甲苯磺酰基-Arg、Phe- N^9 -硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Met-Ala、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala和 β -Ala-Gly-Gly-Gly。

[0509] 在一些实施方案中,L由以下结构式表示:



[0511] 或为其药学上可接受的盐。

[0512] 在第四十具体实施方案中,对于本文所述的方法,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



[0515] 或为其药学上可接受的盐,其中:

[0516] 点线指示任选地存在双键;

[0517] $R^{3''}$ 为 C_{3-12} 亚烷基,

[0518] 每个 X' 在每次出现时独立地地为 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-N(H)-$,

[0519] 每个 R^2 独立地选自 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-R^1$ 、 $-OR^1$ 、 $-O-SO_2-R^1$ 、 $-CO_2R^1$ 、 $-COR^1$ 或卤代,或两个 R^2 在一起为 $=O$ 、 $=CH_2$ 、 $=CH-R^a$ 或 $=C(R^a)_2$;

[0520] 每个 R^2 独立地选自 $-H$ 、 OH 、 $-CN$ 、 $-R^1$ 、 $-OR^1$ 、 $-O-SO_2-R^1$ 、 $-CO_2R^1$ 、 $-COR^1$ 或卤代;

[0521] R^{4b} 为选自以下的离去基团: $-OR^6$ 、 $-OCOR^4$ 、 $-OCOOR^4$ 、 $-OCONR^4R^5$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-NR^4COR^5$ 、 $-NR^4NR^4R^5$ 、任选取代的5员或6元含氮杂环(例如,吡啶、四氢吡咯、吡唑、吗啉)、由 $-NR^4$ 、 $(C=NH)NR^4R^5$ 表示的胍、氨基酸或由 $-NR^6$ 、 COP' 表示的肽,其中 P' 为氨基酸或含有2至20之间个氨基酸单元的肽、 $-SR^6$ 、 $-SOR^4$ 、 $-SO_2M$ 、 $-SO_3M$ 、 $-OSO_3M$ 、卤素、氰基和叠氮

基；

[0522] R^L 为带有可与细胞结合剂(CBA)形成共价键的马来酰亚胺部分的接头；

[0523] R^6 和 R^9 独立地选自-H、 $-R^{1'}$ 、-OH、 $-OR^{1'}$ 、-SH、 $-SR^{1'}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHR^{1'}$ 、 $-NR^{1'}R^{3'}$ 、 $-NO_2$ 、 Me_3Sn 和卤代；并且，

[0524] $R^{1'}$ 和 $R^{3'}$ 各自独立地选自任选取代的 C_{1-12} 烷基、 C_{3-20} 杂环基或 C_{5-20} 芳基，并且任选地关于基团 $-NR^{1'}R^{3'}$ 、 $R^{1'}$ 和 $R^{3'}$ 与其所连接的氮原子一起形成任选取代的4、5、6或7元杂环；或 R^6 至 R^9 的任一对相邻基团在一起形成基团 $-O-(CH_2)_p-O-$ ，其中p为1或2；

[0525] R^4 和 R^5 各自独立地选自-H、-OH、 $-OR^{6'}$ 、 $-NHR^{6'}$ 、 $-NR^{6'}_2$ 、 $-COR^{6'}$ ，具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^b$ 或具有1至6个独立地选自O、S、N或P的杂原子的任选取代的3-18元杂环；

[0526] $R^{6'}$ 在每次出现时独立地选自由以下组成的群组：-H，具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元 $-(CH_2CH_2O)_n-R^b$ ，具有6至18个碳原子的任选取代的芳基，含有一个或多个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的任选取代的5至18元杂芳环，和含有1至6个独立地选自O、S、N或P的杂原子的任选取代的3至18元杂环；

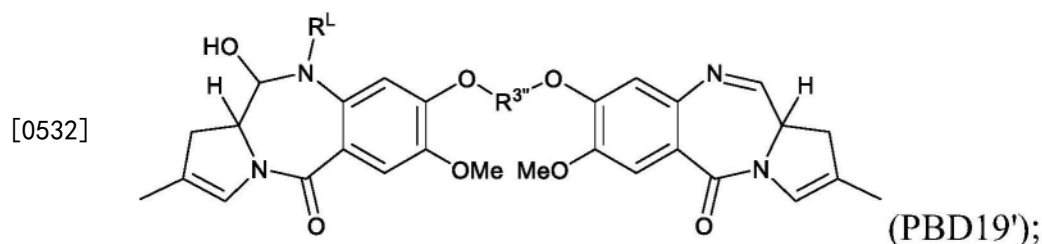
[0527] R^a 独立地选自 $-R^{1'}$ 、 $-CO_2R^{1'}$ 、 $-COR^{1'}$ 、-CHO、 $-CO_2H$ 或卤代；

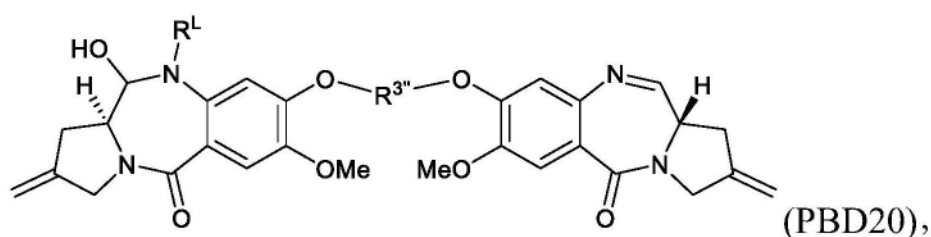
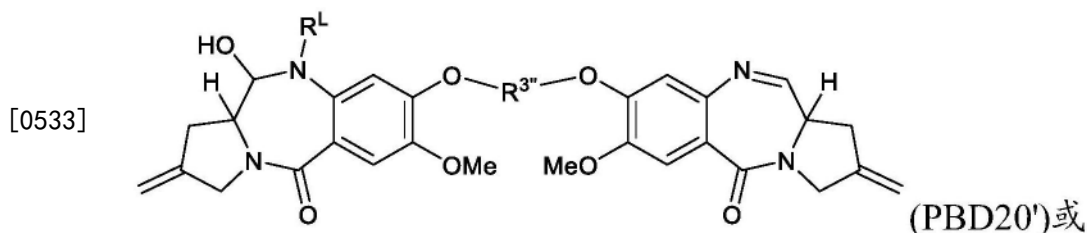
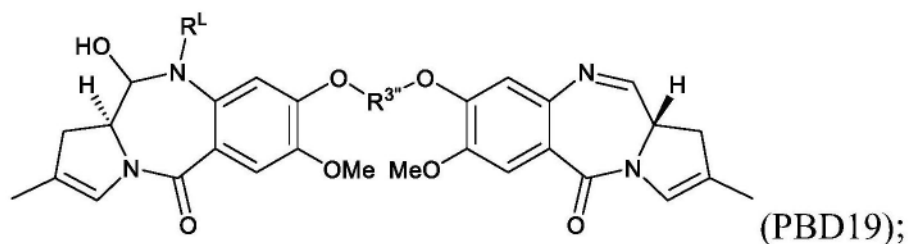
[0528] R^b 为-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链烷基；

[0529] M为H或药学上可接受的阳离子；并且

[0530] n为整数1至24。

[0531] 在第四十一具体方面中，对于本文所述的方法，含亚胺细胞毒性剂由下式表示：





[0534] 或为其药学上可接受的盐,其中 $R^{3''}$ 为 C_{3-5} 亚烷基;并且其余变量如上文第四十具体方面中所述。

[0535] 在第四十二具体方面中,对于式(PBD17')、(PBD18')、(PBD19')、(PBD20')、

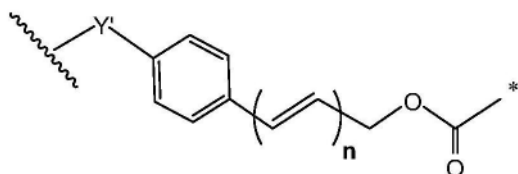
(PBD17)、(PBD18)、(PBD19)或(PBD20), R^L 为 $A-L^1-L^2-O-C(=O)-*$, 其中 L^1 为可裂解接头,A为

带有能够将 L^1 连接至所述细胞结合剂的马来酰亚胺的连接基团, L^2 为共价键或与 $-OC(=O)-$ 一起形成自消耗接头;并且其余变量如上文第四十或第四十一具体方面中所述。

[0536] 在第四十三具体方面中,对于第四十二具体方面中所述的 R^L , L^1 为含有2至10个氨基酸残基的肽;并且其余变量为如上文第四十二具体方面中所述。更具体来说, L^1 为含有2至5个氨基酸残基的肽。甚至更具体来说, L^1 选自由以下组成的群组:Phe-Lys、Val-Ala、Val-Lys、Ala-Lys、Val-Cit、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Arg、Trp-Cit、Lys-Lys、Phe-Ala、Phe-N9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N9-硝基-Arg、Val-Arg、Arg-Val、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Gly-Gly-Gly、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:1)、 β -Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:2) 和 Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:3)。

[0537] 在第四十四具体方面中,对于第四十二具体方面中所述的 R^L , $-C(=O)O-$ 和 L^2 一起形成以下基团:

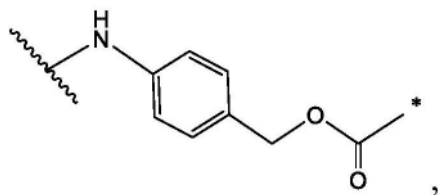
[0538]



[0539] 其中星号指示与N10位的连接点,波形线指示与所述接头 L^1 的连接点, Y' 为 $NH-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)NH-$ 或 $-C(=O)O-$,并且 n 为0至3;并且其余变量如第四十二或第四十三具体方面中所述。

[0540] 在第四十五具体方面中,对于第四十二具体方面中所述的 R^L , $-C(=O)O-$ 和 L^2 一起形成以下基团:

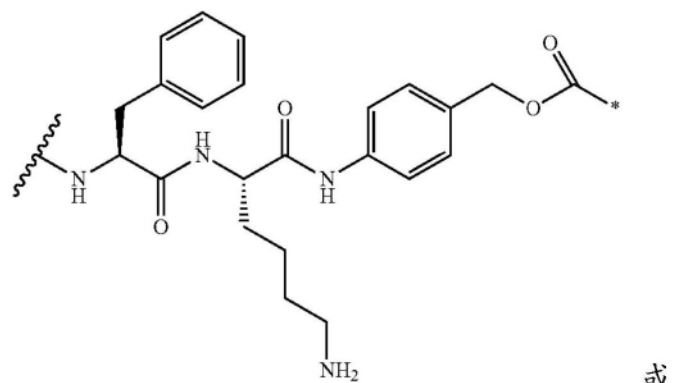
[0541]



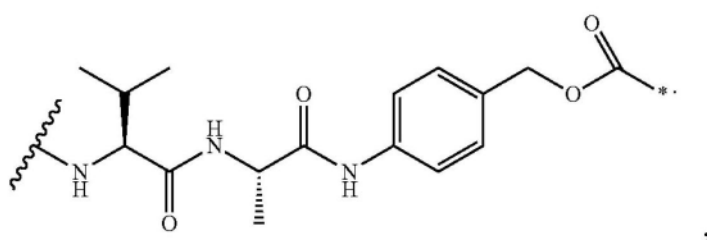
[0542] 并且其余变量如第四十二或第四十三具体方面中所述。

[0543] 在第四十六具体方面中,对于第四十二具体方面中所述的 R^L , L^1 和 L^2 与 $-OC(=O)-$ 一起组成选自以下的基团:

[0544]



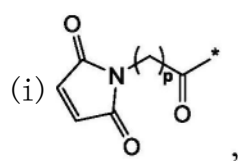
或



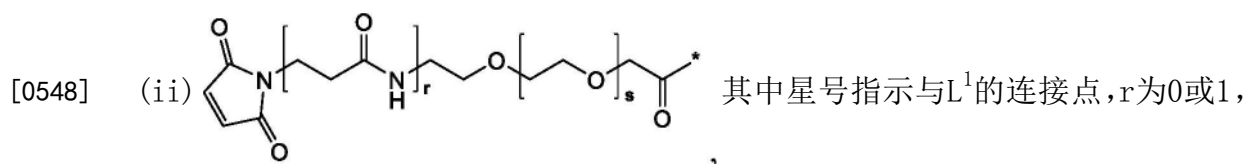
[0545] 其中星号指示与N10位的连接点,并且波形线指示与所述接头 L^1 的其余位的连接点或与A的连接点。

[0546] 在第四十七具体方面中,对于第四十二具体方面中所述的 R^L ,A由以下中的一者表示:

[0547]



其中星号指示与 L^1 的连接点,并且 p 为1至6;或

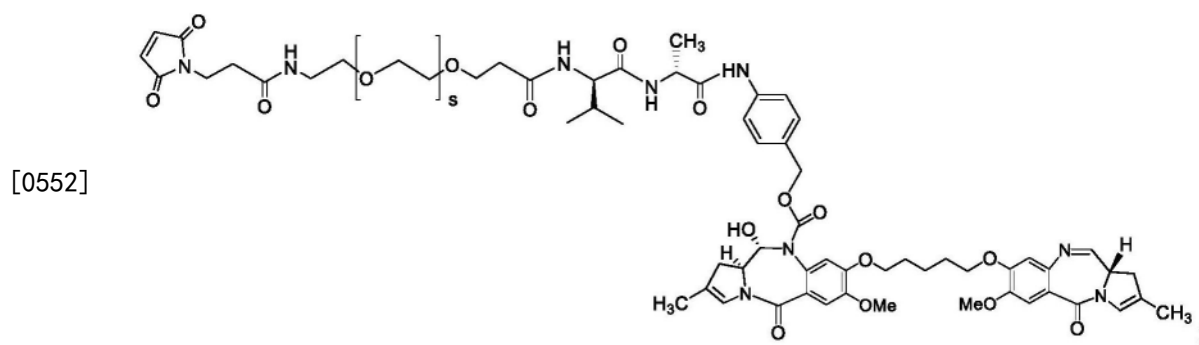


并且s为0至30;

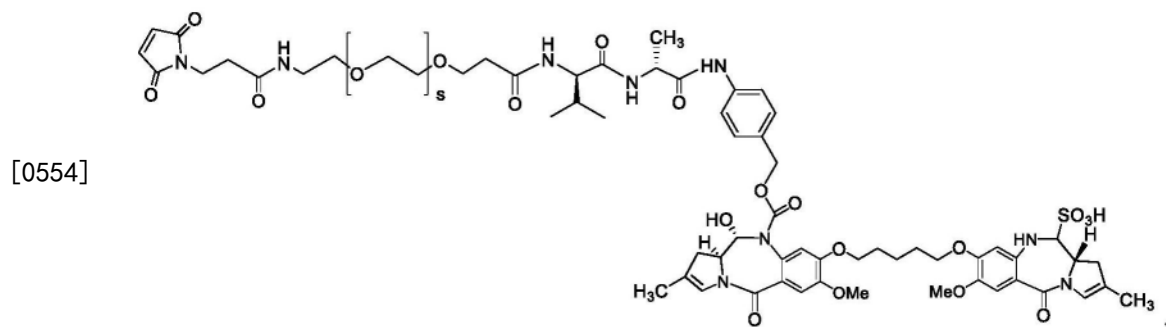
[0549] 并且其余变量为如第四十二、第四十三、第四十四、第四十五或第四十六具体方面中所述。

[0550] 在一些实施方案中, p为4至6; r为1; 并且s为1至10。

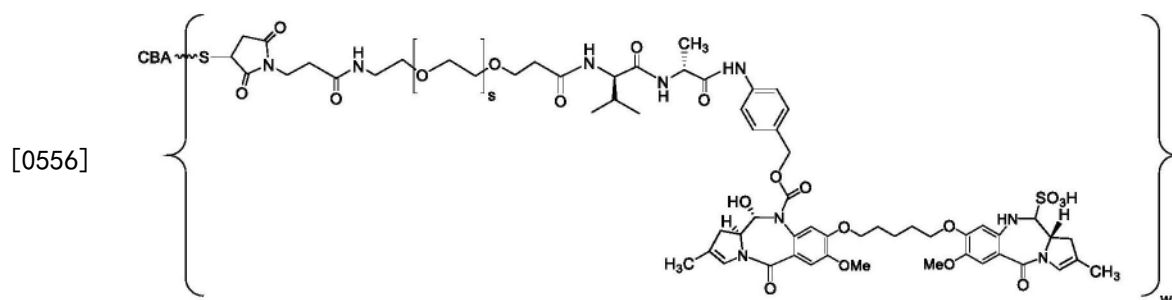
[0551] 在第四十八具体方面中, 对于本发明中所述的方法, 含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



[0553] 或为其药学上可接受的盐; 所述修饰的含亚胺细胞毒性剂由下式表示:



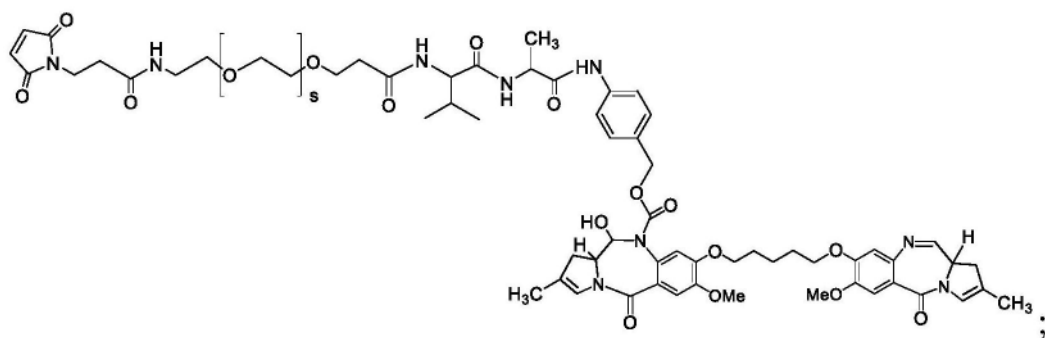
[0555] 或为其药学上可接受的盐, 并且所述缀合物由下式表示:



[0557] 其中s为2至8; w为1或2; 并且CBA为本文所述的细胞结合剂。在一些实施方案中, s为7。

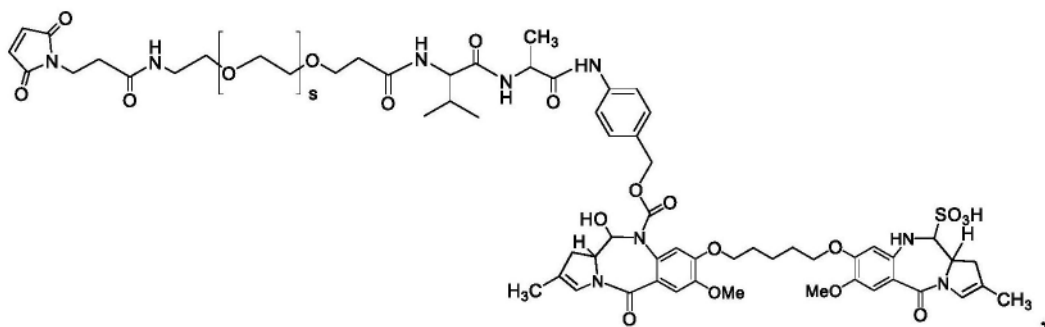
[0558] 在一些实施方案中, 对于本发明中所述的方法, 含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

[0559]



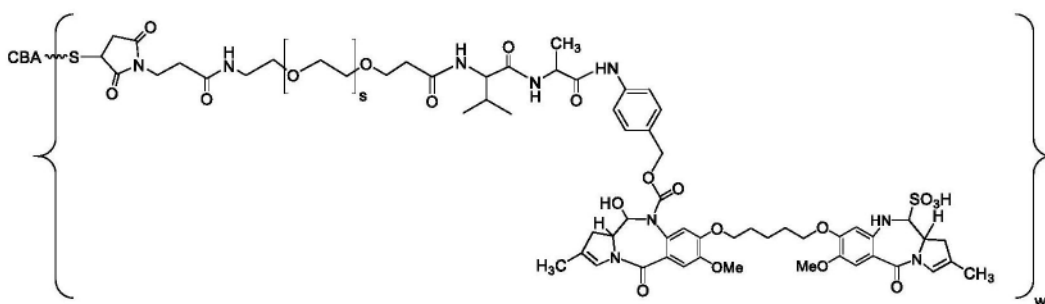
[0560] 或为其药学上可接受的盐;所述修饰的含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

[0561]



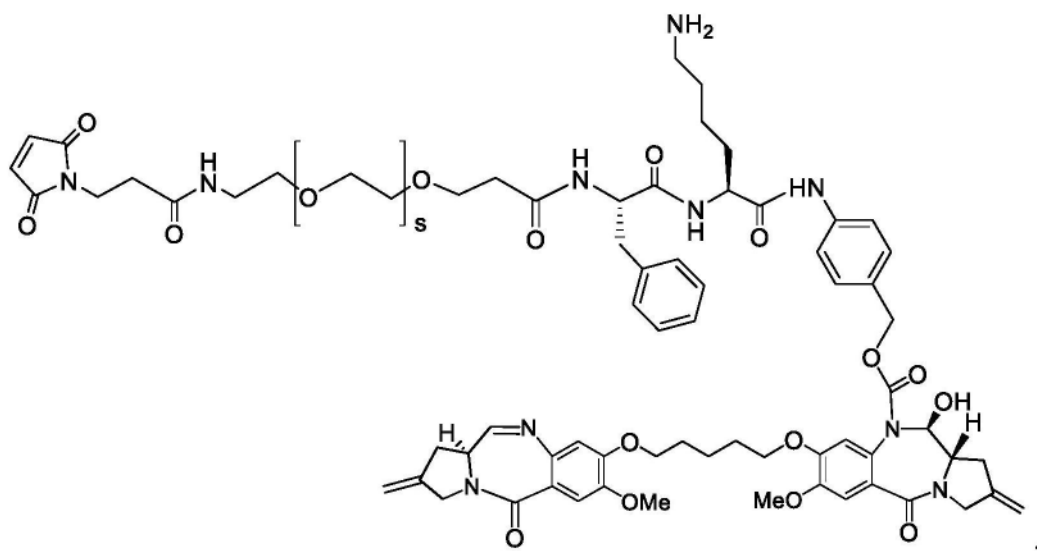
[0562] 或为其药学上可接受的盐,并且所述缀合物由下式表示:

[0563]

[0564] 其中 s 为2至8; w 为1或2;并且CBA为本文所述的细胞结合剂。在一些实施方案中, s 为7。

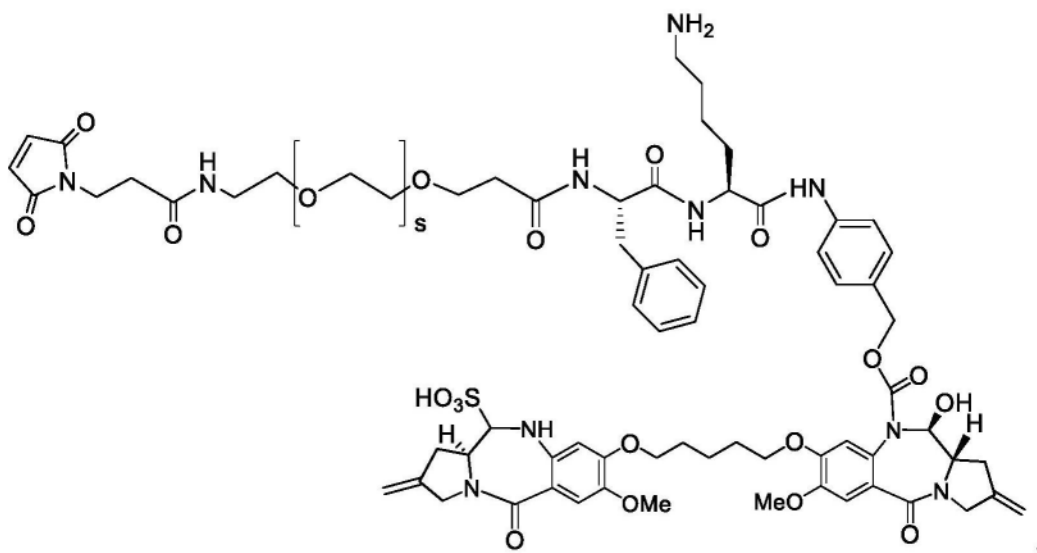
[0565] 在第四十九具体方面中,对于本发明中所述的方法,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

[0566]



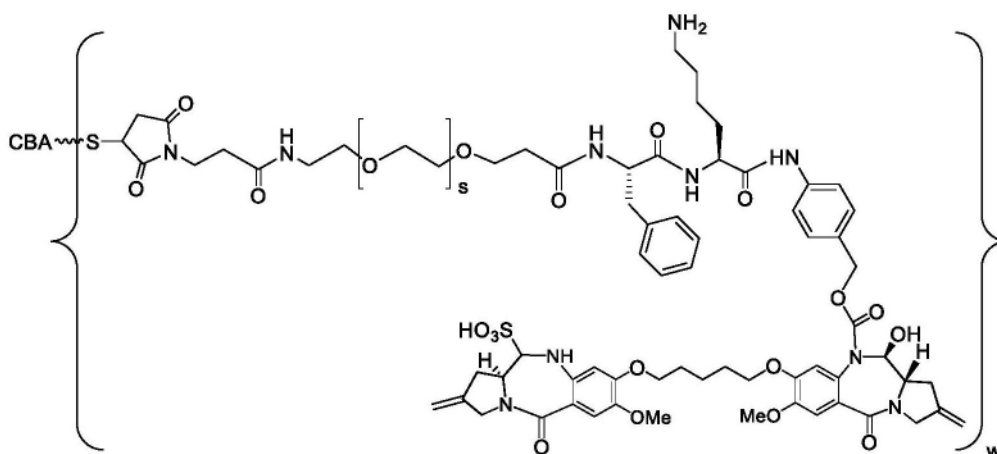
[0567] 或为其药学上可接受的盐;所述修饰的含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

[0568]



[0569] 或为其药学上可接受的盐,并且所述缀合物由下式表示:

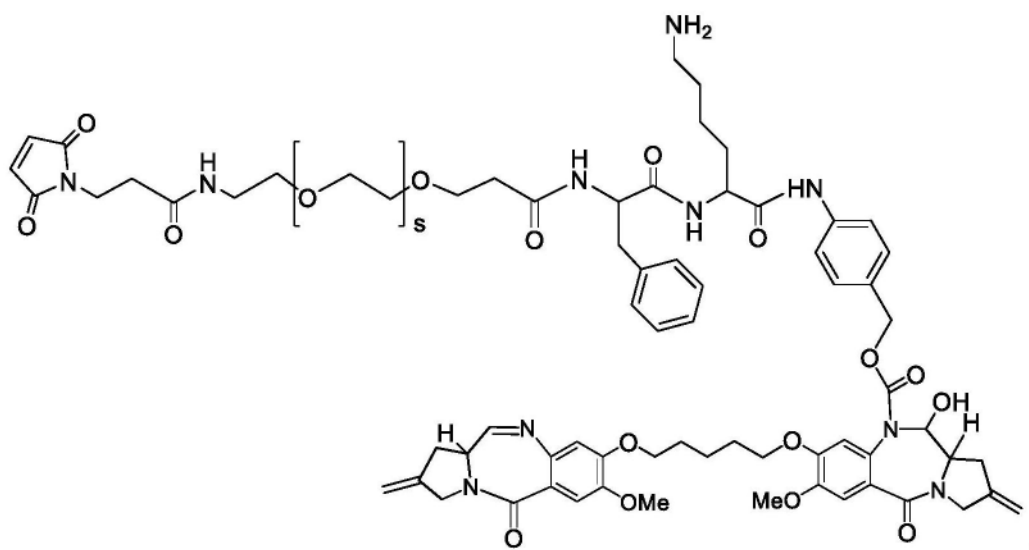
[0570]



[0571] 或为其药学上可接受的盐,其中s为2至8;w为1或2;并且CBA为本文所述的细胞结合剂。在一些实施方案中,s为7。

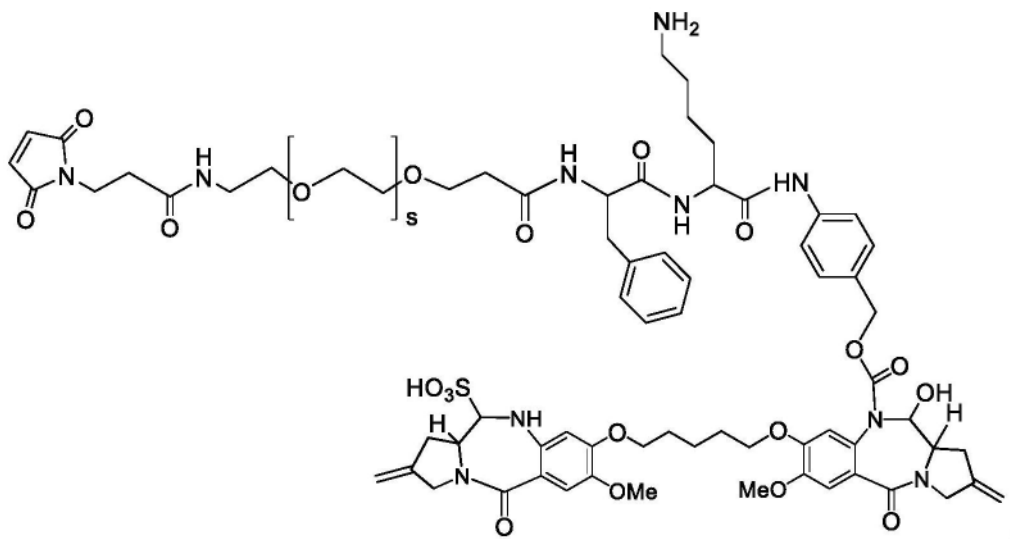
[0572] 在一些实施方案中,对于本发明中所述的方法,含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

[0573]



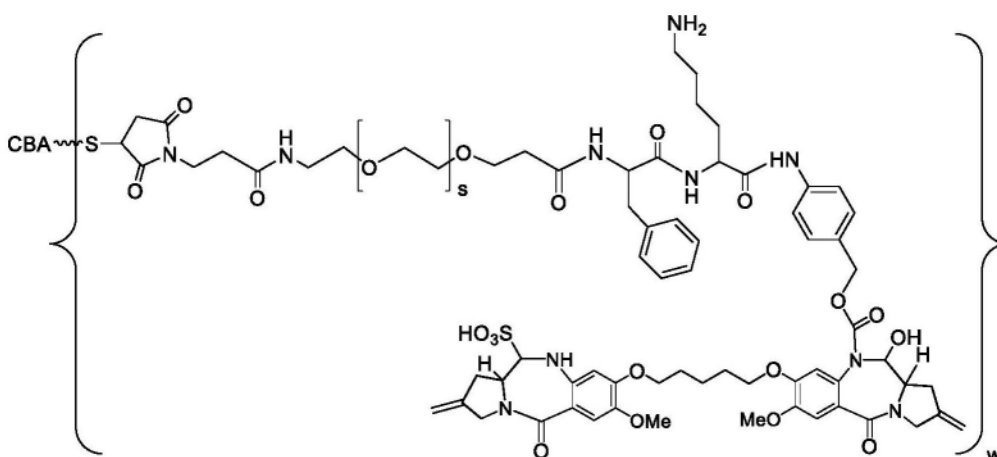
[0574] 或为其药学上可接受的盐;所述修饰的含亚胺细胞毒性剂由下式表示:

[0575]



[0576] 或为其药学上可接受的盐,并且所述缀合物由下式表示:

[0577]



[0578] 或为其药学上可接受的盐,其中s为2至8;w为1或2;并且CBA为本文所述的细胞结合剂。在一些实施方案中,s为7。

[0579] 在一些实施方案中,上文任何实施方案中所述的带电取代基或可离子化基团Q为

i) $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{OPO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{Z}'-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{Z}'-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$ 或 $-\text{Z}'-\text{NR}_{11}\text{R}_{12}$ 或其药学上可接受的盐;或ii) $-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$ 或 $-\text{Z}'-\text{N}^+\text{R}_{14}\text{R}_{15}\text{R}_{16}\text{X}^-$; Z' 为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基; R_{14} 至 R_{16} 各自独立地为任选取代的烷基;并且 X^- 为药学上可接受的阴离子。更具体来说, Q 为 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或其药学上可接受的盐。甚至更具体来说, Q 为 $-\text{SO}_3\text{Na}$ 。

[0580] 细胞结合剂

[0581] 在一些实施方案中,可用于本发明方法的细胞结合剂为具有工程化半胱氨酸残基(例如,在重链的EU/OU编号442位)的抗体。工程化Cys残基可定位于抗体的一条或两条重链上、抗体的一条或两条轻链上或其抗原结合部分或其组合。在一些实施方案中,Cys残基定位于抗体重链的EU/OU编号442位。在一些实施方案中,抗体为如本文所述的半胱氨酸工程化抗体。

[0582] 在一些实施方案中,本发明抗体为单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、表面重塑抗体或人类抗体。

[0583] 在其他实施方案中,细胞结合剂为抗体、单链抗体、特异性结合至靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、特异性结合至靶细胞的单克隆抗体片段(或“抗原结合部分”)、嵌合抗体、特异性结合至靶细胞的嵌合抗体片段(或“抗原结合部分”)、结构域抗体(例如,sdAb)或特异性结合至靶细胞的结构域抗体。

[0584] 在又其他实施方案中,细胞结合剂为人源化抗体、人源化单链抗体或人源化抗体片段(或“抗原结合部分”)。在具体实施方案中,人源化抗体为huMy9-6或另一相关抗体,其描述于美国专利号7,342,110和7,557,189中。在另一具体实施方案中,人源化抗体为美国专利号8,557,966中所述的抗叶酸受体抗体。在又其他实施方案中,人源化抗体为2016年6月28日申请的标题为“ANTI-CD123 ANTIBODIES AND CONJUGATES AND DERIVATIVES THEREOF”的美国申请号15/195,401中所述的抗CD123抗体。所有所述申请的教导均以全文引用的方式并入本文中。

[0585] 在一些实施方案中,细胞结合剂为表面重塑抗体、表面重塑单链抗体、表面重塑抗体片段(或“抗原结合部分”)或双特异性抗体。

[0586] 本发明的又另一方面提供一种重组抗体,其包含重链、轻链或其抗原结合部分的成熟加工序列,其衍生自本文所述的标的重组抗体重链(HC)、轻链(LC)或其抗原结合部分中的任一者。

[0587] 例如,重组抗体可为或可包含scFv-Fc、Fcab、mAb2、小模块免疫药物(SMIP)、Genmab/unibody或duobody、微型抗体、IgG Δ CH2、DVD-Ig、probody、内抗体(intrabody)或多特异性抗体。

[0588] **DUOBODY®**为双特异性修饰的IgG1抗体异二聚物IgG1铰链区,其通常包括(i)合适铰链区,其含有CPPC序列并且不容许体内Fab臂交换;和(ii)类IgG4 CH3结构域,其被修饰成含有F405L和K409R残基,从而使其容许体内Fab臂交换。(参见例如,W02008119353和W02011131746)。

[0589] 在一些实施方案中,重组抗体可包含重链、轻链或其抗原结合部分的成熟加工序列的一、二、三或四者,其各自衍生自本文所述的标的重组抗体重链(HC)、轻链(LC)或其抗原结合部分中的任一者。

[0590] 在其他实施方案中,重组抗体可为包含第一重链多肽和第二重链多肽的异二聚抗体,其中第一重链多肽的Fc区和第二重链多肽的Fc区在一界面处相接,并且第二重链多肽的Fc区的界面包含隆凸,其可定位于第一重链多肽的Fc区的界面中的空腔中。在某些实施方案中,提高双特异性抗体中重链的异性配对的孔中结技术可基于例如Genentech/Roche的CrossMab技术,例如,通过调换CH1和 κ 恒定区以进一步减少或消除轻链错配而进一步改良。

[0591] 替代地,在开发全双特异性抗体中,类似结果还可使用LC异二聚体来达成,诸如充分补充多种其他生物方法的Zymeworks AZYMETRIC™异二聚IgG1轻链平台技术,包括共同轻链、结构域抗体和单链格式。

[0592] 在一些实施方案中,第二重链多肽的Fc区与模板/原始多肽不同以编码隆凸,或第一重链多肽的Fc区与模板/原始多肽不同以编码空腔,或两者。

[0593] 在其他实施方案中,隆凸和空腔各自包含天然存在的氨基酸残基。

[0594] 在其他实施方案中,包含隆凸的第二重链多肽的Fc区为通过用侧链体积大于原始残基的输入残基置换模板/原始多肽的界面的原始残基来产生。

[0595] 在又其他实施方案中,包含隆凸的第二重链多肽的Fc区为通过包含以下步骤的方法来产生,在所述步骤中,将编码所述多肽的界面的原始残基的核酸用编码侧链体积大于原始残基的输入残基的核酸置换。

[0596] 在一些实施方案中,抗体包括双特异性、多特异性和单特异性抗体变体,其包括抗原结合区和重链恒定结构域,其中重链恒定结构域被修饰成在EU/OU编号的442位处包括Cys。

[0597] 在其他实施方案中,抗体可结合至靶细胞上的配体,诸如细胞表面配体,包括细胞表面受体。

[0598] 具体示例性抗原或配体可包括肾素;生长激素(例如,人类生长激素和牛生长激素);生长激素释放因子;副甲状腺激素;促甲状腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促滤泡激素;降钙素;黄体激素;升糖素;凝血因子(例如,因子vmc、因子IX、组织因子和温韦伯氏因子(von Willebrands factor));抗凝血因子(例如,蛋白质C);心房利钠因子;肺表面活性物质;纤维蛋白溶酶原活化剂(例如,尿激酶、人尿或组织型纤维蛋白溶酶原活化剂);铃蟾素;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ;脑啡肽酶;RANTES(即,调控活化正常T细胞表达和分泌因子);人类巨噬细胞炎性蛋白-1- α ;血清白蛋白(人类血清白蛋白);苗勒管抑制物(Muellerian-inhibiting substance);松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺素相关肽;微生物蛋白(β -内酰胺酶);DNase;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(例如,CTLA-4);抑制素;活化素;血管内皮生长因子;激素或生长因子受体;蛋白质A或D;类风湿因子;神经营养因子(例如,骨源性神经营养因子、神经营养素-3、神经营养素-4、神经营养素-5或神经营养素-6)、神经生长因子(例如,NGF- β);血小板源性生长因子;纤维母细胞生长因子(例如,aFGF和bFGF);纤维母细胞生长因子受体2;表皮生长因子;转化生长因子(例如,TGF- α 、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4和TGF- β 5);类胰岛素生长因子-I和类胰岛素生长因子-II;des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I);类胰岛素生长因子结合蛋白;黑素转铁蛋白(me lanotransferrin);EpCAM;GD3;FLT3;PSMA;PSCA;MUC1;MUC16;STEAP;CEA;TENB2;EphA受体;EphB受体;叶酸受体;FOLR1;间皮素;

槲皮素; $\alpha_v\beta_6$;整合素;VEGF;VEGFR;EGFR;转铁蛋白受体;IRTA1;IRTA2;IRTA3;IRTA4;IRTA5;CD蛋白(例如,CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80、CD81、CD103、CD105、CD123、CD134、CD137、CD138和CD152);一或多种肿瘤相关抗原或细胞表面受体(参见美国公开号2008/0171040或美国公开号2008/0305044,其以全文引用的方式并入);红血球生成素;骨生成诱导因子;免疫毒素;骨形态生成蛋白;干扰素(例如,干扰素- α 、干扰素- β 和干扰素- γ);集落刺激因子(例如,M-CSF、GM-CSF和G-CSF);白介素(例如,IL-1至IL-10);超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原(例如,HIV包膜的一部分);运输蛋白;归巢受体;地址素(addressin);调控蛋白;整合素(例如,CD11a、CD11b、CD11c、CD 18、ICAM、VLA-4和VCAM);肿瘤相关抗原(例如,HER2、HER3和HER4受体);内皮蛋白(endoglin);c-Met;c-kit;1GF1R;PSGR;NGEP;PSMA;PSCA;TMEFF2;LGR5;B7H4;和上文所列多肽中任一者的片段。

[0599] 在一些实施方案中,细胞结合剂为抗叶酸受体抗体。更具体来说,抗叶酸受体抗体为特异性结合人类叶酸受体1的人源化抗体,其中所述抗体包含:(a)重链CDR1,其包含GYFMN(SEQ ID NO:4);重链CDR2,其包含RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃(SEQ ID NO:5);和重链CDR3,其包含YDGSRAMDY(SEQ ID NO:6);以及(b)轻链CDR1,其包含KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:7);轻链CDR2,其包含RASNLEA(SEQ ID NO:8);和轻链CDR3,其包含QQSREYPYT(SEQ ID NO:9);其中Xaa₁选自K、Q、H和R;Xaa₂选自Q、H、N和R;并且Xaa₃选自G、E、T、S、A和V。优选的是,重链CDR2序列包含RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:10)。

[0600] 在其他实施方案中,抗叶酸受体抗体为特异性结合人类叶酸受体1的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有以下氨基酸序列的重链:QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNVWKQSP GQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQKGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:11)。

[0601] 在其他实施方案中,抗叶酸受体抗体为特异性结合人类叶酸受体1的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有以下氨基酸序列的轻链:DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQK PGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:12);或DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIIISCKASQSVSFAGTSLMH WYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:13)。

[0602] 在其他实施方案中,抗叶酸受体抗体为特异性结合至人类叶酸受体1的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的重链和具有氨基酸序列SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的轻链。优选的是,所述抗体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:11的重链和具有氨基酸序列SEQ ID NO:13的轻链(huMov19)。

[0603] 在其他实施方案中,抗叶酸受体抗体为人源化抗体或其抗原结合片段,其包含工程化Cys残基(例如,C442)和与以下序列具有至少约90%、95%、99%或100%同一性的重链可变结构域:QVQLVQSGAE VVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPY DGDTFYNQK FQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR YDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:14),和与以下序列具有至少约90%、95%、99%或100%同一性的轻链可变结构域:DI VLTQSPLSLAVSL GQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHQKPGQQ PRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATY YCQ QSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:15);或DIVLTQSPLSL AVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTS LMHWYHQQKPGQQPRLLIYRAS NLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTF GGGTKLEIKR (SEQ ID NO:16)。

[0604] 在具体实施方案中,人源化抗体为huMy9-6或另一相关抗体,其描述于美国专利号7,342,110和7,557,189中。在另一具体实施方案中,人源化抗体为美国专利号8,577,966中所述的抗叶酸受体抗体(例如,huMov19)。在某些实施方案中,人源化抗体为美国专利号8,765,917中所述的抗CD37抗体(例如,抗CD37-3)。在某些实施方案中,人源化抗体为美国专利号8,790,649中所述的抗EGFR抗体。在其他实施方案中,抗体为抗EGFR抗体。在一些实施方案中,抗EGFR抗体为非拮抗剂抗体,其包括例如W02012058592中所述的抗体,所述案以引用的方式并入本文。在其他实施方案中,抗EGFR抗体为非功能性抗体,例如,人源化ML66。更具体来说,抗EGFR抗体为huML66。

[0605] 在一些实施方案中,所述抗体为抗CD123抗体,诸如2016年6月28日申请的标题为“ANTI-CD123 ANTIBODIES AND CONJUGATES AND DERIVATIVES THEREOF”的美国申请号15/195,401(其全部内容包括所有序列和图式均并入本文)中所述的人源化huCD123抗体。在具体实施方案中,抗CD123抗体或其抗原结合片段包含:a)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个顺序互补决定区(CDR)CDR1、CDR2和CDR3,其中,CDR1具有序列SSIMH (SEQ ID NO:17),CDR2具有序列YIKPYNDGTKYNEKFKG (SEQ ID NO:18),并且,CDR3具有序列EGGNDYYDTMDY (SEQ ID NO:19);以及b)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个顺序互补决定区(CDR)CDR1、CDR2和CDR3,其中,CDR1具有序列RASQDINSYLS (SEQ ID NO:20),CDR2具有序列RVNRLVD (SEQ ID NO:21),并且,CDR3具有序列LQYDAFPYT (SEQ ID NO:22)。

[0606] 在另一具体实施方案中,抗CD123抗体或其抗原结合片段包含工程化Cys残基(例如,C442);与以下序列具有至少约90%、95%、99%或100%同一性的免疫球蛋白重链可变结构域:QXQLVQSGAEV KKPASVSKVSKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYND GTKYNEKFKGR ATLTSRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREG GNDYYDTMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:23);和与以下序列具有至少约90%、95%、99%或100%同一性的免疫球蛋白轻链可变区:DIQMTQSPSS LSASVGDRTTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKA PKTLIYRVNRLVDGVPDRFSGSGSGNDYTLTISLQPEDFAT YYCL QYDAFPYTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:24)。在某些实施方案中,Xaa (SEQ ID NO:23的N末端的第二残基)为Phe。在其他实施方案中,Xaa为Val。

[0607] 在某些实施方案中,抗CD123抗体或其抗原结合片段可包含:具有以下氨基酸序列的免疫球蛋白重链区:QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTSSIMHWVRQAPGQGLEWIGYIKPYNDG TKYNEKFKGRATLTSRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGGNDYYDTMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALTHNYHTQKSLLSPG (SEQ ID NO:25) ;

[0608] 和具有以下氨基酸序列的免疫球蛋白轻链区:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWVQKPKGKAPKTLIYRVNRLVDGVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDAFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:26) 。

[0609] 组合物和使用方法

[0610] 本发明还包括通过本发明的任何方法制备的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物、包含通过本发明的任何方法制备的细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物和载剂(药学上可接受的载剂)的组合物(例如,药物组合物)。本发明缀合物和组合物可用于在哺乳动物(例如,人类)中抑制异常细胞生长或治疗增生性病症。本发明包括一种在哺乳动物(例如,人类)中抑制异常细胞生长或治疗增生性病症的方法,其包括单独或与第二治疗剂组合向所述哺乳动物施用治疗有效量通过上文所述的本发明方法制备的缀合物或其组合物。

[0611] 在一些实施方案中,增生性病症为癌症。癌症可包括血癌或实体肿瘤。更具体来说,癌症为白血病(例如,急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)诸如急性B淋巴母细胞白血病(B-ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴球性白血病(CLL))或淋巴瘤、黑色素瘤、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、卵巢癌、子宫内膜癌、腹膜癌、胰腺癌、乳癌、前列腺癌和子宫颈癌。

[0612] 本发明还提供治疗方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的上述任一缀合物。

[0613] 类似地,本发明提供一种用于在所选择的细胞群中诱导细胞死亡的方法,其包括将靶细胞或含有靶细胞的组织与有效量包含上文所述的任一缀合物的细胞毒性剂接触。靶细胞为细胞结合剂可结合的细胞。

[0614] 需要时,其他活性剂,诸如其他抗肿瘤剂,可与所述缀合物一起施用。

[0615] 合适的药学上可接受的载剂、稀释剂和赋形剂为熟知的并且可由本领域的普通技术人员依据临床状况许可确定。合适的载剂、稀释剂和/或赋形剂的实例包括:(1)杜贝卡氏磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's phosphate buffered saline),pH为约7.4,含有或不含约1mg/mL至25mg/mL人类血清白蛋白;(2)0.9%盐水(0.9%w/v NaCl);和(3)5%(w/v)右旋糖;并且还可含有抗氧化剂诸如色胺和稳定剂诸如Tween 20。

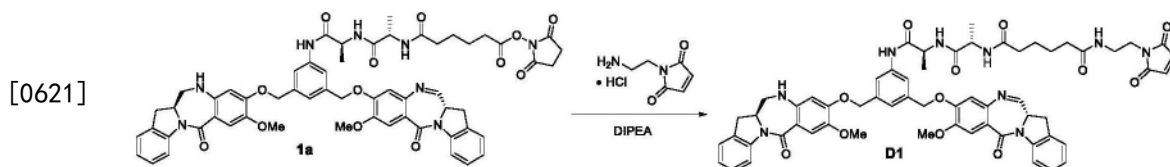
[0616] 实施例

[0617] 实施例1.含亚胺细胞毒性剂的制备

[0618] 以下溶剂、试剂、保护基、部分和其他指定可通过其括号中的缩写来提及:

Me	甲基	Et	乙基	Pr	丙基
i-Pr	异丙基	Bu	丁基	t-Bu	叔丁基
Ph	苯基	Ac	乙酰基	AcOH/HOAc	乙酸
Ala	丙氨酸	aq	水性	ACN/CH₃CN	乙腈
DI 水	去离子水	DCM/CH₂Cl₂	二氯甲烷	Boc/BOC	叔丁氧基羰基
g	克	DMA	N,N-二甲基乙酰胺	DIEA 或 DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
h	小时	DMF	N,N-二甲基甲酰胺	EDC	1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺
min	分钟	EtOAc	乙酸乙酯	ESI 或 ES	电喷射离子化
mg	毫克	LC	液相色谱	HPLC	高效液相色谱
mL	毫升	mmol	毫摩尔	LCMS	液相色谱质谱
µg	微克	µmol	微摩尔	MS	质谱
µL	微升	MeOH	甲醇	NHS	N-羟基琥珀酰胺
sat 或 sat'd	饱和	RT 或 rt	室温(周围, 约 25°C)	NMR	核磁共振光谱法
THF	四氢呋喃	TEA	三乙胺 (Et ₃ N)	RPHPLC 或 RP-HPLC	逆相高效液相色谱

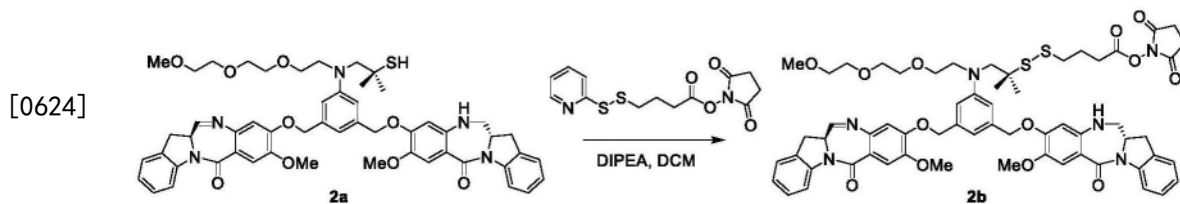
[0620] A. 合成N1-(2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-N6-((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)己二酰胺, 化合物D1



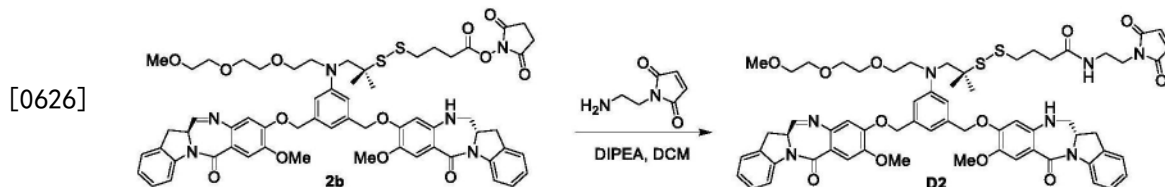
[0622] 在室温下将NHS酯1a (8.2mg, 7.6 μ mol) (根据US-2016/0082114中所述的程序制备, 所述案以引用的方式并入本文) 和1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐 (2.2mg, 0.011mmol) 溶解于无水二氯甲烷 (305 μ L) 中。添加DIPEA (2.66 μ L, 0.015mmol), 并且将反应搅拌3.5小时。将反应混合物浓缩, 并且通过RPHPLC (C18管柱, CH₃CN/H₂O, 梯度, 35%至55%) 纯化。将所需产物流份冷冻并且冻干以得到呈固体白色粉末的马来酰亚胺, 化合物D1 (5.3mg, 58%产率)。LCMS=5.11min (8min方法)。MS (m/z): 1100.6 (M+1)⁺。

[0623] B. 合成N-(2-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-11-(3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-13,13-二甲基-2,5,8-三噁-14,15-二噻-11-氮杂十九烷-

19-酰胺, 化合物D2

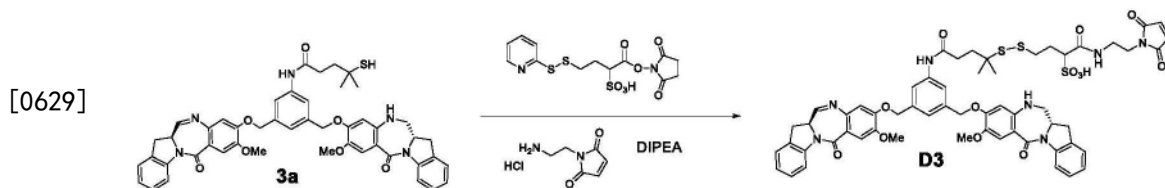


[0625] 向游离硫醇2a (40mg, 0.042mmol) 和NHS 4-(2-吡啶基二硫) 丁烷 (35mg, 80% 纯, 0.085mmol) 的无水二氯甲烷 (0.5mL) 溶液中添加无水二异丙基乙胺 (0.015mL, 0.085mmol) 并在室温下搅拌16小时。将反应混合物用饱和氯化铵淬灭并用二氯甲烷稀释。将获得的混合物在分液漏斗中分离。将有机层用盐水洗涤, 经由无水硫酸钠干燥, 过滤, 并且在减压下汽提。将残余物通过半制备型逆相HPLC (C18管柱, CH₃CN/H₂O) 纯化。将含有纯产物的流份组合, 冷冻, 并且冻干以得到所需NHS酯2b (29.7mg, 60% 产率)。LCMS=9.1min (15min方法)。MS (m/z): 1157.3 (M+1)⁺。



[0627] 向NHS酯2b (12.3mg, 0.011mmol) 和N-(2-氨基乙基) 马来酰亚胺盐酸盐 (2.0mg, 0.011mmol) 的无水二氯甲烷 (0.3mL) 溶液中添加DIPEA (0.0022mL, 0.013mmol)。将混合物在室温下搅拌3小时, 然后将其在减压下汽提。将残余物通过半制备型逆相HPLC (C18管柱, CH₃CN/H₂O) 纯化。将含有纯产物的流份组合, 冷冻, 并且冻干以得到所需马来酰亚胺, 化合物D2 (10mg, 80% 产率)。LCMS=8.3min (15min方法)。MS (m/z): 1181.8 (M+1)⁺。

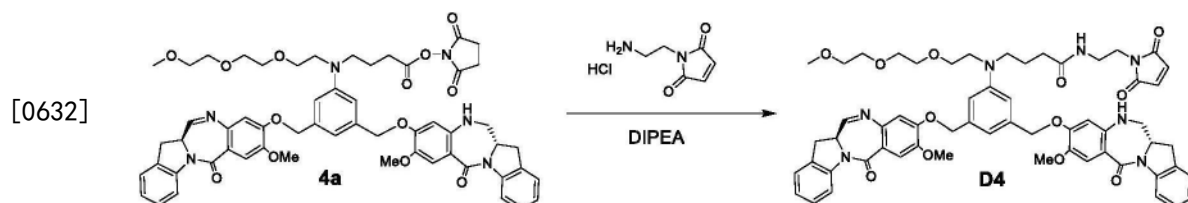
[0628] C. 合成1-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)氨基)-4-((5-((3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)氨基)-2-甲基-5-氧代戊-2-基)二磺酰基)-1-氧代丁-2-磺酸, 化合物D3



[0630] 在氮气、室温下向游离硫醇3a (88mg, 0.105mmol) 和1-((2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基)-1-氧代-4-(吡啶-2-基二磺酰基)丁-2-磺酸 (64.0mg, 0.158mmol) 在无水二氯甲烷 (2.10mL) 中的悬浮液中添加DIPEA (55.0μL, 0.315mmol)。将混合物搅拌16小时, 然后添加1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐 (55.6mg, 0.315mmol)、无水二氯甲烷 (1.0mL) 和DIPEA (0.055mL, 0.315mmol)。在室温下再将混合物搅拌5小时, 之后将反应真空浓缩。将所得残余物通过RP-HPLC (C18, CH₃CN/H₂O) 纯化。将含有所需产物的流份冷冻并冻干以得到呈白色固体的马来酰亚胺, 化合物D3 (20mg, 16% 产率)。LCMS=4.92min (8min方法)。MS (m/z):

1158.6(M+1)⁺。

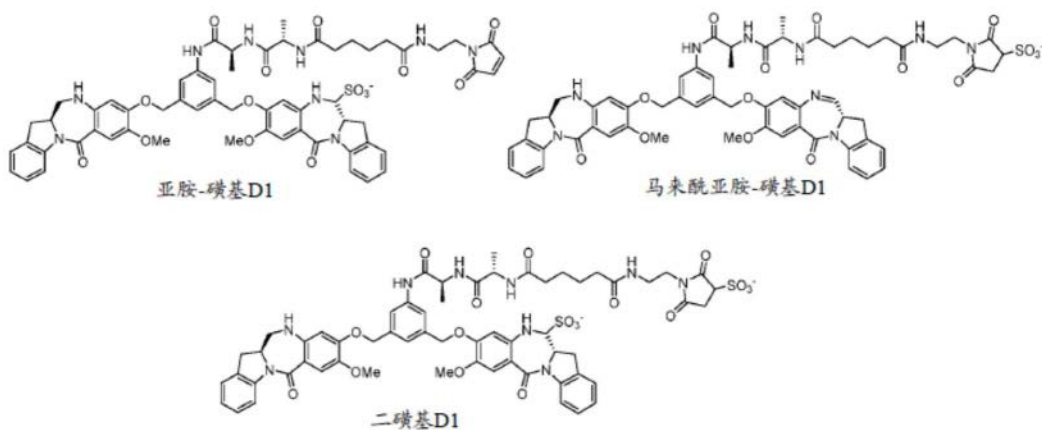
[0631] D.合成N-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)-11-(3-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-11,12,12a,13-四氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)-5-(((S)-8-甲氧基-6-氧代-12a,13-二氢-6H-苯并[5,6][1,4]二氮~~草~~并[1,2-a]吡啉-9-基)氧基)甲基)苯基)-2,5,8-三噁-11-氮杂十五烷-15-酰胺,化合物D4



[0633] 在氮气下向NHS酯4a (5mg, 4.82μmol) 和1-(2-氨基乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮盐酸盐(1.7mg, 9.64μmol)的无水二氯甲烷(200μL)溶液中添加DIPEA(1.512μL, 8.68μmol)。在室温下将混合物搅拌4小时,然后真空浓缩。将所得残余物通过RP-HPLC(C18, CH₃CN/H₂O)纯化。将含有所需产物的流份冷冻并冻干以得到马来酰亚胺,化合物D4 (3.5mg, 68%产率)。LCMS = 4.61min(15min方法)。MS(m/z): 1062.8(M+1)⁺。

[0634] 实施例2. 带有马来酰亚胺基团的含亚胺细胞毒性剂的选择性磺化

[0635] 向50mM琥珀酸钠pH 3.3 (116.5mL) 和DMA (98.5mL) 的混合物中添加溶解于21.4mL DMA中的D1 (263.6mg)。随后,将3.4mL含有1v/v% DMA的100mM亚硫酸氢钠的水溶液(1.4当量)引入至反应中。使均质混合物在25℃下反应2h,此时通过UPLC-MS分析反应的完整性。所述反应混合物合适用于在不进一步纯化的情况下缀合。如图1中所示,反应混合物的UPLC-MS分析示出92.5%亚胺-磺基D1、1.9%未反应D1、0.8%马来酰亚胺-磺基D1和4.8%二磺基D1。亚胺-磺基D1 (C₆₀H₆₂N₉O₁₅S⁻) 的ESI-MS负离子模式[M-H]⁻计算值: 1180.41; 实验值: 1180.03。



[0636]

[0637] 实施例3. 亚硫酸氢钠对选择性磺化的影响

[0638] 如表1中指出,以下列顺序向所需体积的50mM琥珀酸钠pH 3.3缓冲液中添加以下试剂:DMA (38.8μL)、所需体积的含有1v/v% DMA的20或40mM水性亚硫酸氢钠储备液和8.9mM D1的DMA溶液 (11.2μL)。使含有50体积% DMA的所得反应混合物在25℃下反应20h。通过UPLC-MS分析反应产物。观察的二磺基D1、马来酰亚胺-磺基D1、亚胺-磺基D1和未磺化D1产物的相对丰度示出于表1中。

[0639] 表1

反应	琥珀酸钠缓冲液(uL)	亚硫酸氢钠储备液			D1 反应产物(%)					
		总当量	储备液浓度(mM)	添加的体积(uL)	二磺基	马来酰亚胺-磺基	亚胺-磺基	未磺化	剩余的总反应性马来酰亚胺	
[0640]	1	46	0.8	20	4	0.6	1.4	35.9	62.1	98.0
	2	45	1.0	20	5	1.1	1.4	53.4	44.2	97.6
	3	44	1.2	20	6	2.0	1.2	69.6	27.2	96.8
	4	43	1.4	20	7	2.6	1.1	79.1	17.2	96.3
	5	42	1.6	20	8	5.0	1.1	85.7	8.2	93.9
	6	41	1.8	20	9	8.3	1.2	84.6	5.9	90.5
	7	45	2.0	40	5	8.7	0.8	88.2	2.3	90.5
	8	44	2.4	40	6	13.0	0.9	83.9	2.2	86.1
	9	43	2.8	40	7	16.4	1.1	79.8	2.7	82.5
	10	42	3.2	40	8	19.8	1.5	75.8	2.9	78.7
	11	41	3.6	40	9	22.9	1.8	71.9	3.4	75.3

[0641] 实施例4. pH对磺化的影响

[0642] 如表2中详述,以下列顺序向44.0uL具有所指示的pH的50mM琥珀酸钠缓冲液中添加以下试剂:20mM含有1%v/v DMA的水性亚硫酸氢钠储备液(6.0uL)、DMA(38.8uL)和8.9mM D1的DMA溶液(11.2uL)。使含有50体积%DMA的所得反应混合物在25℃下反应4h。通过UPLC-MS分析反应产物。观察的二磺基、马来酰亚胺-磺基、亚胺-磺基和未磺化D1产物的相对丰度示出于表2中。

[0643] 表2.

反应	琥珀酸钠缓冲液 pH	亚硫酸氢钠(总当量)	DGN549-C 反应产物(%)					
			二磺基	马来酰亚胺-磺基	亚胺-磺基	未磺化	剩余的总反应性马来酰亚胺	
[0644]	1	2.9	1.2	0.7	1.0	68.5	29.8	98.3
	2	3.1	1.2	0.8	1.3	65.0	33.0	97.9
	3	3.3	1.2	1.1	1.7	66.9	30.3	97.1
	4	3.4	1.2	1.3	1.4	66.5	30.7	97.3
	5	3.7	1.2	2.3	2.7	65.6	29.4	94.9

[0645] 实施例5. 具有或不具有缓冲液的选择性磺化

[0646] 如表3中详述,向21.6uL DMA中添加22.0uL水或具有所指示的pH的50mM琥珀酸钠缓冲液、含有1v/v%DMA的20mM水性亚硫酸氢钠储备液(3.0uL)和14.5mM D1的DMA溶液(3.4uL)。使含有50体积%DMA的所得反应混合物在25℃下反应6h。通过UPLC-MS分析反应产物。观察的二磺基、马来酰亚胺-磺基、亚胺-磺基和未磺化D1产物的相对丰度示出于表3中。

[0647] 表3.

[0648]	反 应	琥珀酸钠 缓冲液 pH	亚硫酸氢 钠(总当 量)	D1 反应产物(%)				
				二 磺 基	马来酰 亚胺-磺 基	亚胺- 磺基	未磺 化	剩余的总反 应性马来酰 亚胺
	1	3.5	1.2	0.8	0.5	86.9	11.8	98.7
	2	4.0	1.2	4.8	2.9	70.0	22.8	92.8
	3	仅水	1.2	2.8	1.8	75.8	19.6	95.4

[0649] 类似地,如表4中详述,向47.6uL DMA中添加55.6uL水或pH4.75 50mM琥珀酸钠缓冲液、含有1v/v%DMA的20mM水性亚硫酸氢钠储备液(6.9uL)和8.4mM D1的DMA溶液(14.9uL)。使含有50体积%DMA的所得反应混合物在25℃下反应24h。通过UPLC-MS分析反应产物(参见图2)。观察的二磺基、马来酰亚胺-磺基、亚胺-磺基和未磺化DGN549-C产物的相对丰度指示于表4中。

[0650] 表4.

[0651]	反 应	琥珀酸钠 缓冲液 pH	亚硫酸氢 钠(总当 量)	D1 反应产物(%)				
				二 磺 基	马来酰 亚胺-磺 基	亚胺- 磺基	未磺 化	剩余的总反 应性马来酰 亚胺
	1	4.75	1.1	9.8	40.7	13.4	36.1	49.5
	3	仅水	1.1	1.5	0.9	73.8	23.8	97.6

[0652] 在另一实验中,如表5中详述,向24.6uL DMA中添加指示体积的水、指示体积的20mM水性亚硫酸氢钠储备液。这些溶液的pH指示于表5中。向这些混合物中添加11.2mM D1的DMA溶液(5.4uL)。使含有50体积%DMA的所得反应混合物在25℃下反应1至2h。通过UPLC-MS分析反应产物。观察的二磺基、马来酰亚胺-磺基、亚胺-磺基和未磺化D1产物的相对丰度指示于表5中。

[0653] 表5

[0654]	反 应	水 (uL)	亚硫酸氢钠储备液			观 察 的 反 应 pH	DGN549-C 反应产物(%)				
			总 当 量	储 备 液 浓 度 (mM)	添 加 的 体 积 (uL)		二 磺 基	马来 酰亚 胺- 磺基	亚胺- 磺基	未磺 化	剩余的 总反应 性马来 酰亚胺
	1	21.0	3.0	20	9.0	4.2	6.9	-	90.9	2.2	93.1
	2	15.0	5.0	20	15.0	4.2	20.5	-	78.0	1.5	79.5

[0655] “-”意指未通过UPLC观察到。

[0656] 实施例6. 抗体-细胞毒性剂缀合物的制备

[0657] 随后将根据实施例2制备的磺化反应混合物(240mL, 3.5当量)引入至50mM磷酸钠 pH 6.0溶液,所述溶液含有10g具有还原的C442工程化半胱氨酸残基的抗CD123抗体。在2mg/mL抗体和15v/v%DMA的最终浓度下,使缀合反应在25℃下进行18h。反应产物的SEC分析得到DAR(药物与抗体比率)为1.9并且%HMW(高分子量物质的百分比)为4.4%对比3.7%(在缀合之前)的ADC。

[0658] 还根据上文所述的类似程序制备具有两种具有还原的C442工程化半胱氨酸残基

的其他人源化单克隆抗体的缀合物。

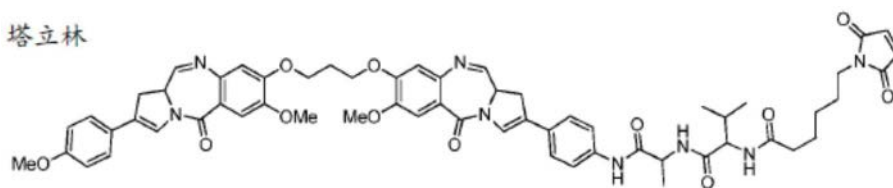
[0659] 实施例7. 带有马来酰亚胺基团的含亚胺PBD二聚物的选择性碘化

[0660] 以下列顺序向21.2μL 50mM琥珀酸钠pH 3.3缓冲剂中添加:20μL DMA、3.8μL 20mM亚硫酸氢钠水性储备液和5.0μL 10.0mM塔立林的DMA溶液。就塔立林而言,此对应于1.5当量亚硫酸氢盐。使含有50体积%DMA的所得反应混合物在25℃下反应4h。通过UPLC-MS分析反应产物。观察到的亚胺二磺基、总亚胺单磺基、未碘化和总马来酰亚胺-磺基产物的相对丰度为如表6中所指示进行确定。ESI-MS:塔立林的计算值($C_{60}H_{65}N_8O_{12}^+$) $[M+H]^+$ 1089.4716, 实验值1089.4716;亚胺单磺基塔立林的计算值($C_{60}H_{65}N_8O_{15}S^-$) $[M-H]^-$ 1169.4296, 实验值1169.4345;亚胺二磺基塔立林的计算值($C_{60}H_{67}N_8O_{18}S_2^-$) $[M-H]^-$ 1251.4020, 实验值1251.4053。最终反应混合物的代表性色谱图(在330nm下的吸光度)示出于图3中。识别的反应产物的结构为

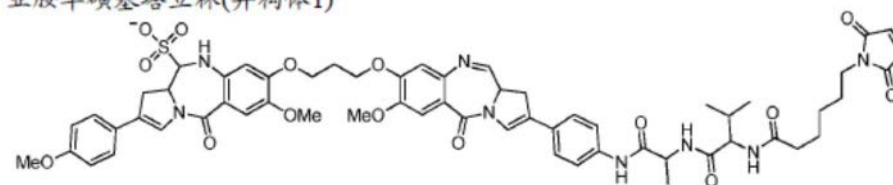
[0661] 表6.

反应	琥珀酸钠缓冲液(uL)	亚硫酸氢钠储备液			塔立林反应产物(%)				
		总当量(相对于有效载荷(payload))	储备液浓度(mM)	添加的体积(uL)	亚胺二磺基	总亚胺单磺基	总马来酰亚胺-磺基物种	未碘化	剩余的总反应性马来酰亚胺
塔立林	21.2	1.5	20	3.8	57.3	39.0	<1	3.7	>99.0

塔立林

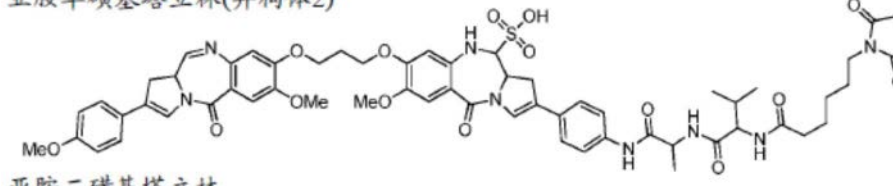


亚胺单磺基塔立林(异构体1)

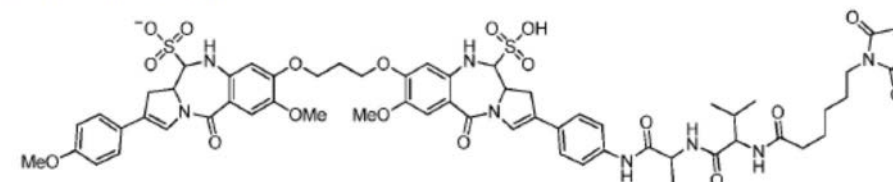


[0663]

亚胺单磺基塔立林(异构体2)



亚胺二磺基塔立林



[0664] 实施例8. 带有马来酰亚胺基团的含亚胺IGN二聚体的选择性碘化

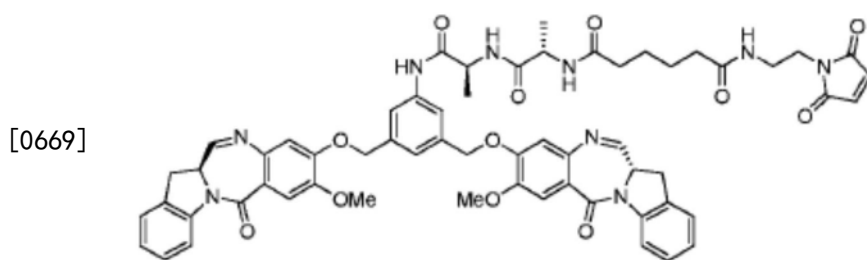
[0665] 如表7中指出,以下列顺序向所需体积的50mM琥珀酸钠pH 3.3缓冲液中添加:DMA (21.2μL)、所需体积20mM亚硫酸氢钠水性储备液和13.2mM D5的DMA溶液(3.8μL)。使含有50

体积%DMA的所得反应混合物在25℃下反应4h。通过UPLC-MS分析反应产物。观察到的亚胺二磺基、亚胺单磺基、未磺化和总马来酰亚胺-磺化产物的相对丰度为如表7中所指示进行确定。ESI-MS:D5的计算值($C_{60}H_{60}N_9O_{12}^+$) $[M+H]^+$ 1098.4356, 实验值1098.4351; 亚胺单磺化D5的计算值($C_{60}H_{60}N_9O_{15}S^-$) $[M-H]^-$ 1178.3935, 实验值1178.4006; 亚胺二磺化D5的计算值($C_{60}H_{62}N_9O_{18}S_2^-$) $[M-H]^-$ 1260.3660, 实验值1260.3704; 亚胺二磺化马来酰亚胺磺化D5的计算值($C_{60}H_{64}N_9O_{21}S_3^-$) $[M-2H]^{2-}$ $z=2$ 2670.6653, 实验值670.6693。以2.0和2.5当量亚硫酸氢盐的最终反应混合物的代表性色谱图(在330nm下的吸光度)示出于图4A和4B中。识别的反应产物的结构示出如下。

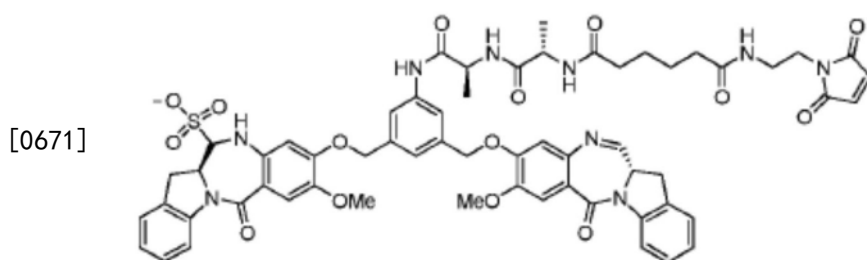
[0666] 表7

反应	琥珀酸钠缓冲液(uL)	亚硫酸氢钠储备液			IGN148-mal 反应产物(%)				
		总当量 (相对于有效载荷)	储备液 浓度 (mM)	添加的 体积 (uL)	亚胺二 磺基	亚胺单 磺基	总马来 酰亚胺- 磺基物 种	未磺化	剩余的 总反应 性马来 酰亚胺
1	21.2	1.5	20	3.8	41.9	46.9	1.4	9.7	98.6
2	20.0	2.0	20	5.0	76.0	20.3	1.9	1.8	98.1
3	18.7	2.5	20	6.3	83.3	6.7	10.0	-	90.0

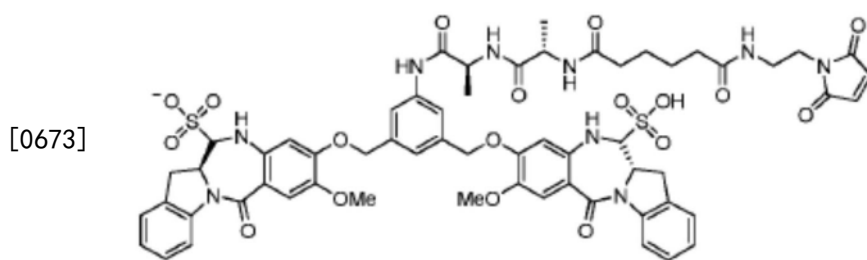
[0668] D5



[0670] 亚胺单磺基D5

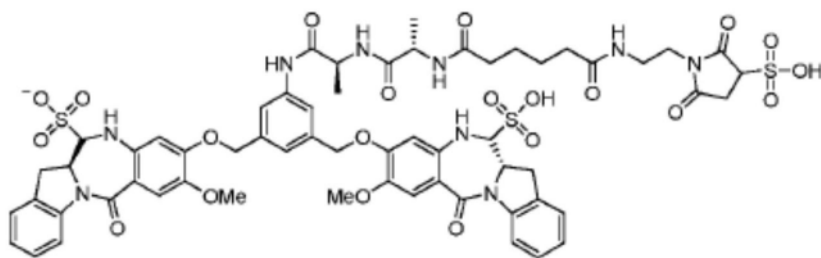


[0672] 亚胺二磺基D5



[0674] 亚胺二磺基马来酰亚胺D5

[0675]



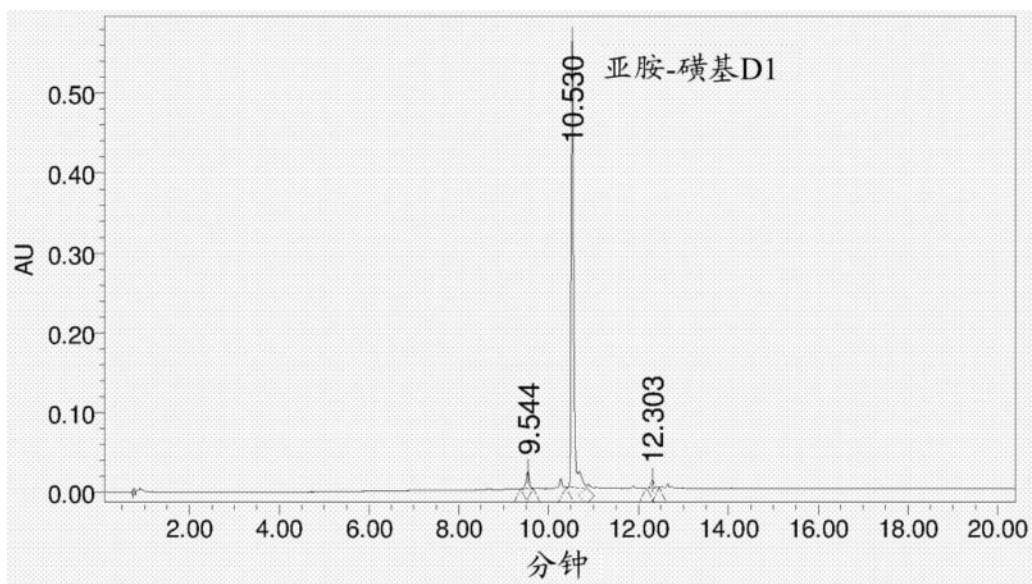


图1

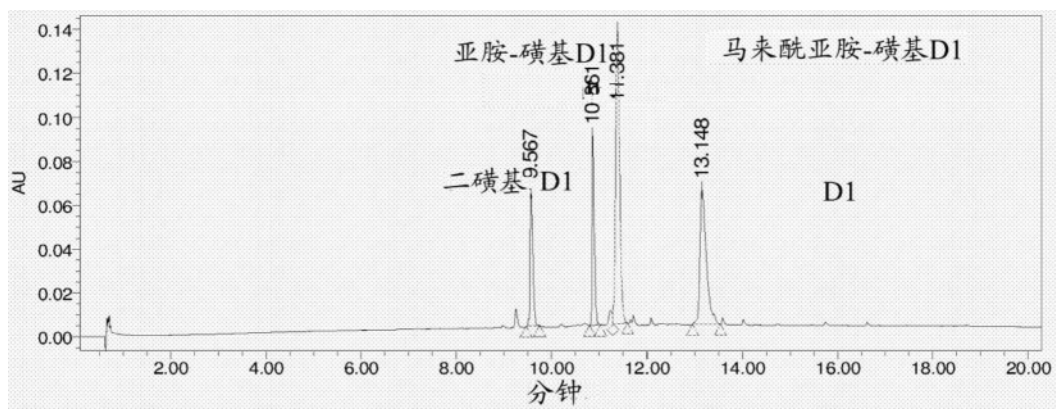


图2

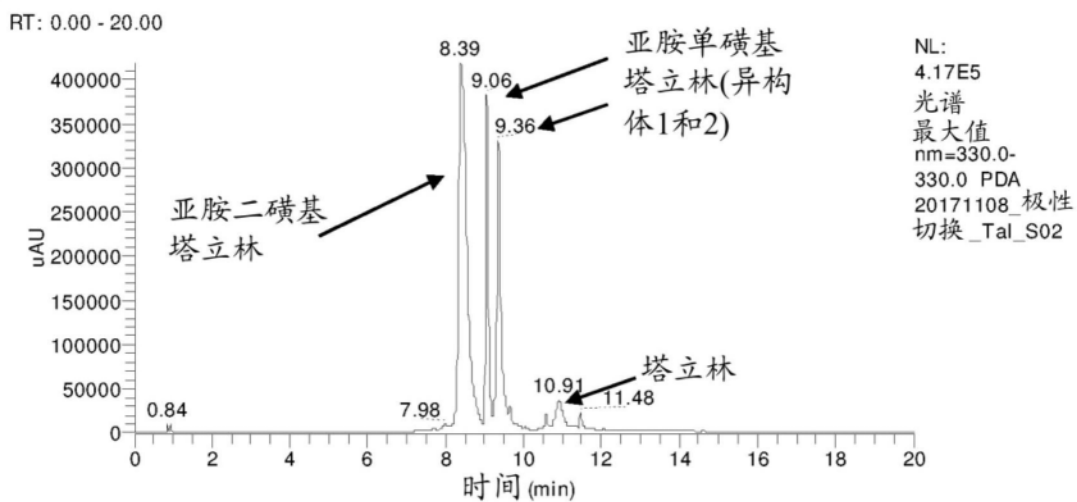


图3

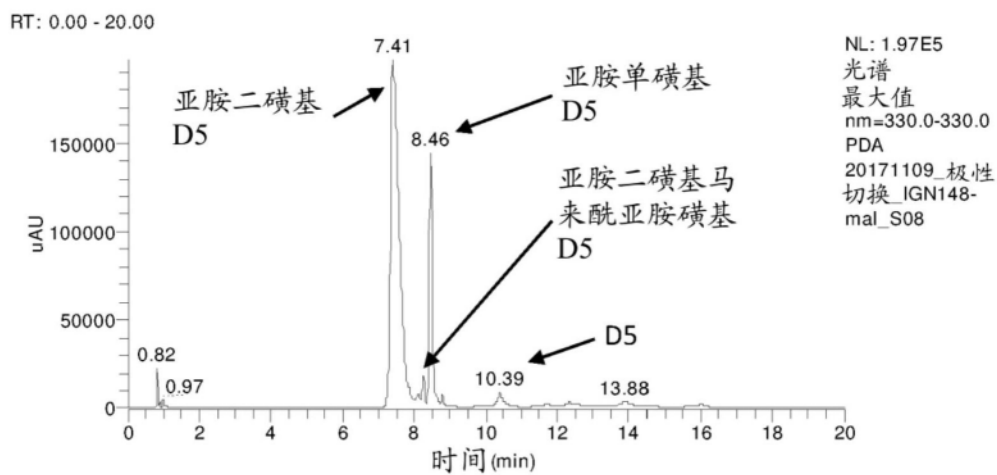


图4A

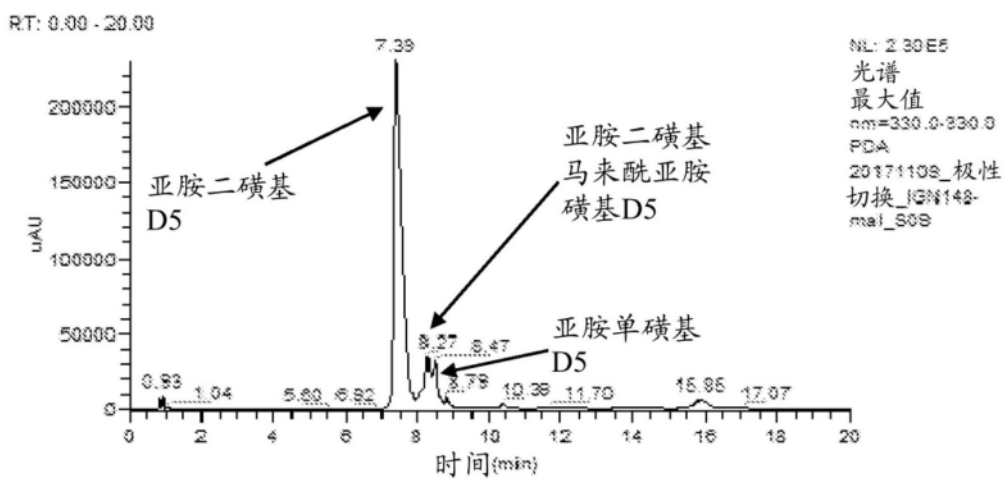


图4B