



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118829449 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202380016808.6

(22) 申请日 2023.01.10

(30) 优先权数据

63/298,786 2022.01.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/010514 2023.01.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/137026 EN 2023.07.20

(71) 申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 A·韩

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 凌翠 郑霞

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 491/22 (2006.01)

权利要求书22页 说明书134页 附图2页

(54) 发明名称

与蛋白中的谷氨酰胺残基缀合的喜树碱类似物及其用途

(57) 摘要

本文描述了蛋白-药物缀合物及其组合物,该蛋白-药物缀合物及其组合物可用于例如治疗部分例如喜树碱类似物和/或衍生物的靶向特异性递送。在某些实施方案中,提供了用于利用转谷氨酰胺酶和1,3-环加成技术的组合产生蛋白-药物构建体(例如抗体-药物缀合物)的特异性且有效方法。提供了喜树碱类似物、抗体-药物缀合物和包括谷氨酰胺酰基修饰的抗体和喜树碱类似物有效载荷的组合物。

1. 一种化合物, 具有根据式 (A) 的结构:

BA- (L1-B-L2-P)_n (A), 其中:

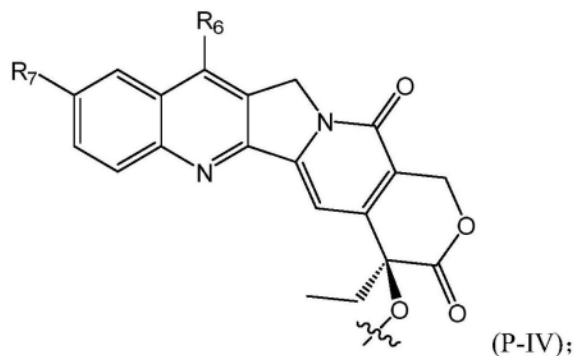
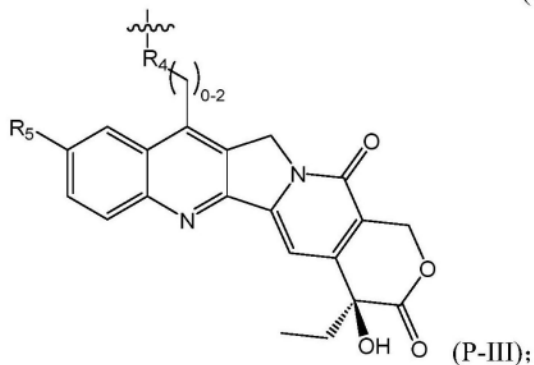
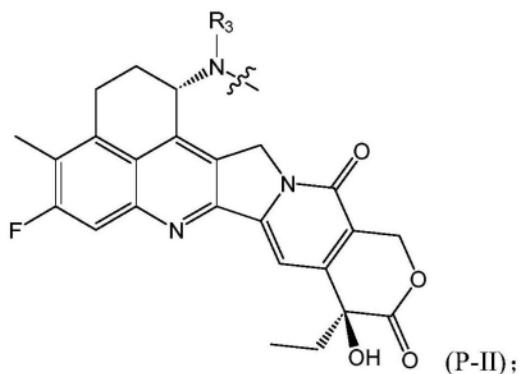
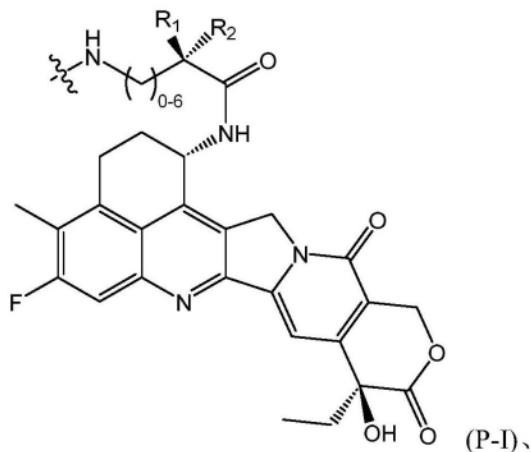
BA是抗体或其抗原结合片段;

L1是第一接头;

B是包括三唑的部分;

L2是第二接头;

P选自由P-I至P-IV组成的组:



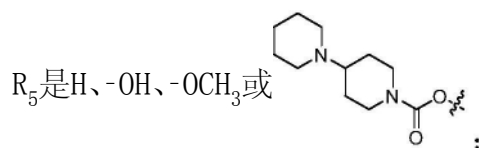
R₁是氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基和-(CH₂)_v-SO₂CH₃, 其中v是从0至12的整数;

R₂是氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基和-(CH₂)_v-SO₂CH₃, 其中v是从0至12的整数;

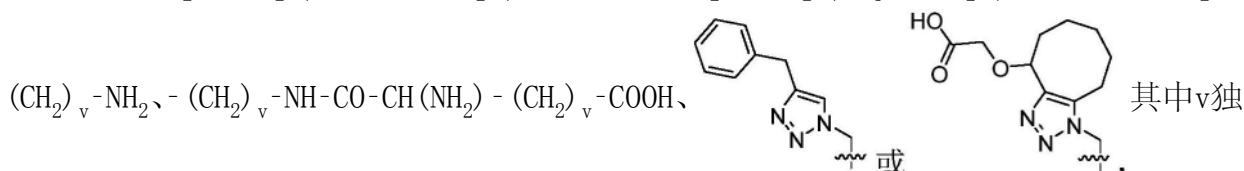
R₃是氢、-C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-SO₂CH₃和-CO-(CH₂)_v-O-COCH₃, 其中v是从0至12的整数;

R₄是-NH-、-N(-C₁₋₆烷基)、-N(-C₁₋₆烷基)(-SO₂CH₃)、-N(-C₁₋₆烷基)(-(CH₂)_v-OH)、-N(-C₁₋₆烷基)(CO-CH₂-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-(CH₂)_v-O-CH₂-NH-CO-CH₂-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-COOH)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-

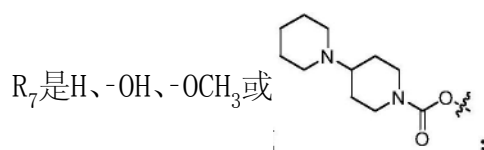
CH(NH₂)-(CH₂)_v-苯基)或 其中v是从0至12的整数;



R_6 是氢、-C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-CH₂-苯基、-(CH₂)_v-NMe-CH₂-苯基-OMe、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-CCH₃、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-



立地是从0至12的整数；



n是从1至12的整数。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其中所述第一接头L1连接至所述BA的谷氨酰胺残基的侧链。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的化合物，其中所述BA是抗体或其抗原结合片段。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的化合物，其中所述BA包括一个或更多个谷氨酰胺残基。

5. 根据权利要求2-4中任一项所述的化合物，其中所述谷氨酰胺残基天然存在于所述BA中，或通过一个或更多个氨基酸的位点特异性修饰引入至所述BA中。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的化合物，其中所述BA是抗HER2抗体、抗STEAP2抗体、抗MET抗体、抗EGFRVIII抗体、抗MUC16抗体、抗PRLR抗体、抗PSMA抗体、抗FGFR2抗体、抗FOLR1抗体、抗HER2/HER2双特异性抗体、抗MET/MET双特异性抗体或其抗原结合片段。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的化合物，其中所述BA是抗HER2抗体。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的化合物，其中所述BA靶向选自以下组成的组的癌症：乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肝癌和脑癌。

9. 根据权利要求2-8中任一项所述的化合物，其中所述谷氨酰胺残基天然存在于所述BA的CH₂结构域或CH₃结构域中。

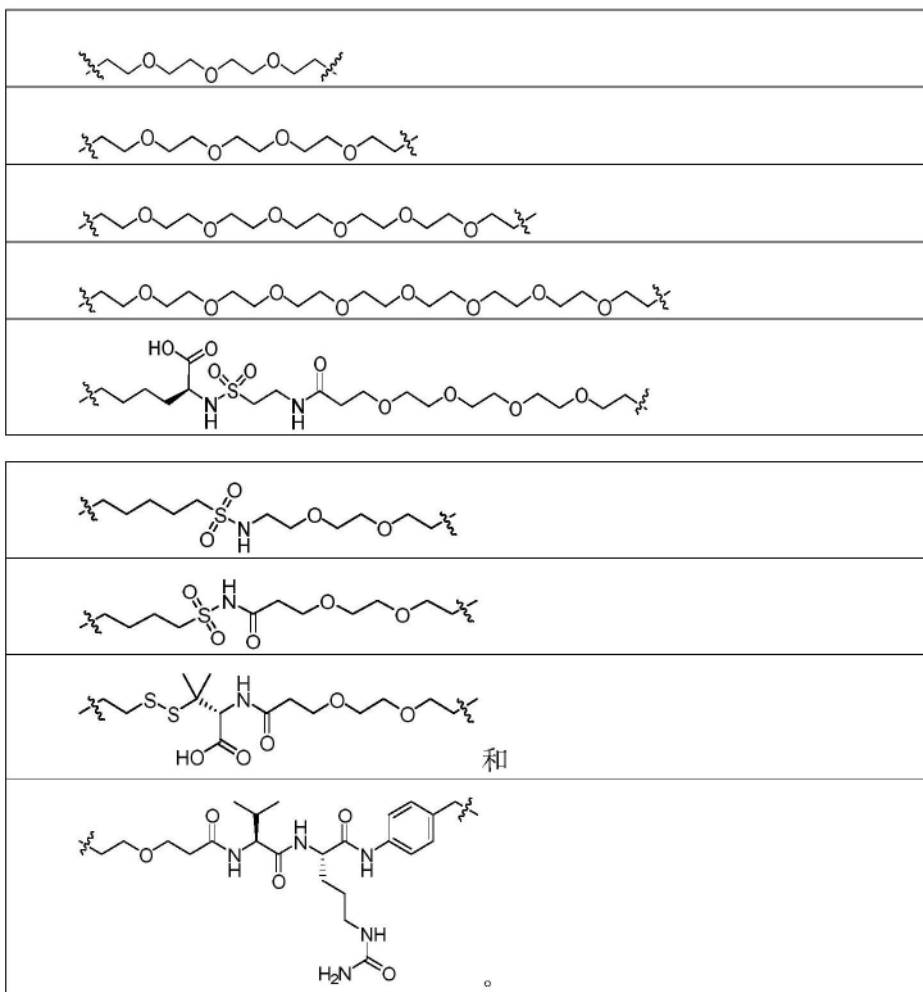
10. 根据权利要求2-9中任一项所述的化合物，其中所述谷氨酰胺残基通过修饰一个或更多个氨基酸而引入至所述BA中。

11. 根据权利要求2-10中任一项所述的化合物，其中所述谷氨酰胺残基是Q295或N297Q。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的化合物，其中L1包括C₁₋₆烷基、苯基、芳烷基-NH-、-C(O)-、-(CH₂)_u-NH-C(O)-、-(CH₂)_u-C(O)-NH-、-(CH₂-CH₂-O)_v-、-(CH₂)_u-(O-CH₂-CH₂)_v-C(O)-NH-、包括2个至4个氨基酸的肽单元或其组合，其中的每一种能够任选地被-S-、-S(O₂)-、-C(O)-、-C(O₂)-和-CO₂H中的一个或更多个取代，其中下标u和v独立地是从1至8的整

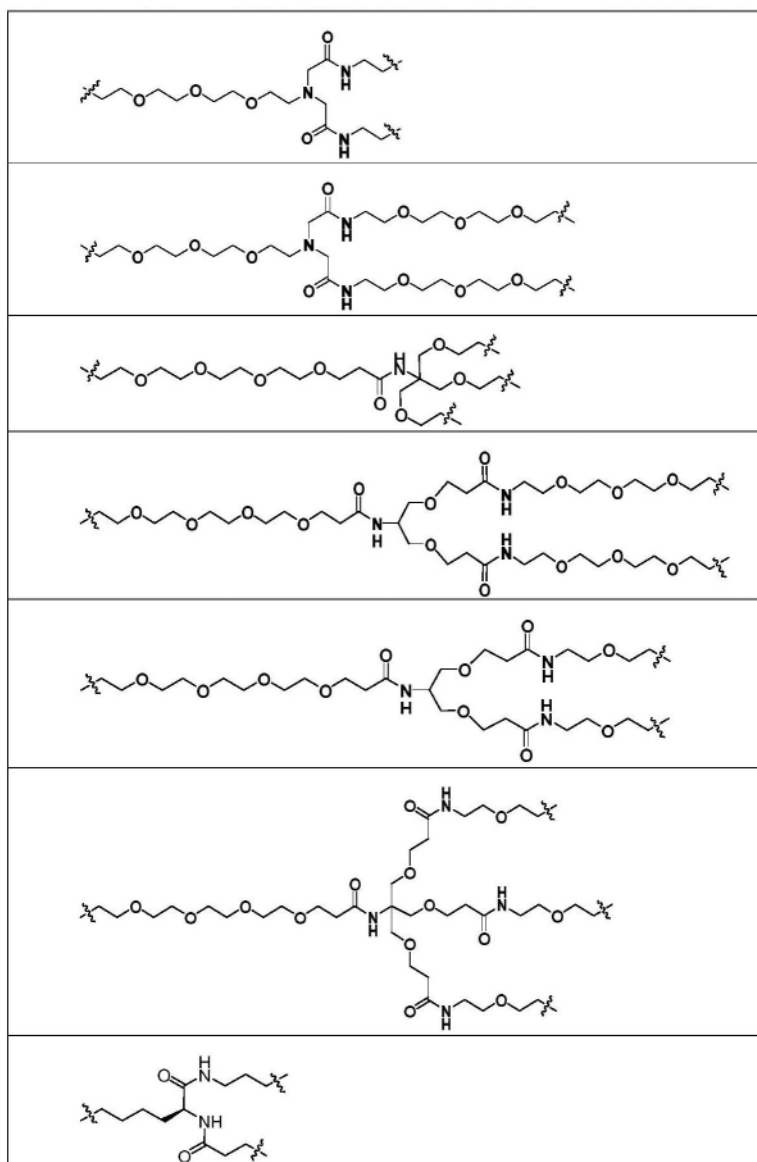
数。

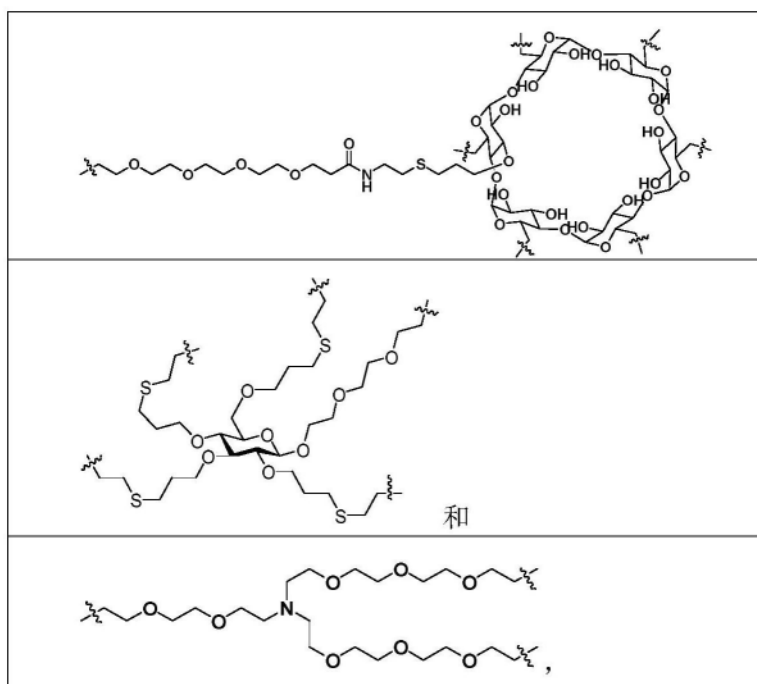
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的化合物, 其中L1选自由以下组成的组:



14. 根据权利要求1-13中任一项所述的化合物, 其中L1是 。

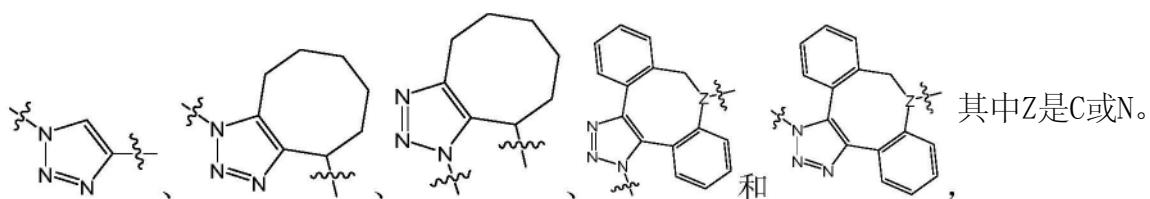
15. 根据权利要求1-12中任一项所述的化合物, 其中L1选自由以下组成的组:



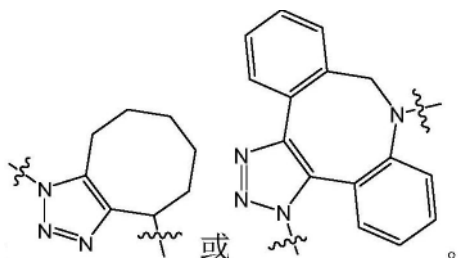


或其药学上可接受的盐。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的化合物, 其中B选自由以下组成的组:



17. 根据权利要求1-16中任一项所述的化合物, 其中B是



18. 根据权利要求1-17中任一项所述的化合物, 其中L2具有根据式(L2)的结构:

-SP1-AA-SP2- (L2),

其中:

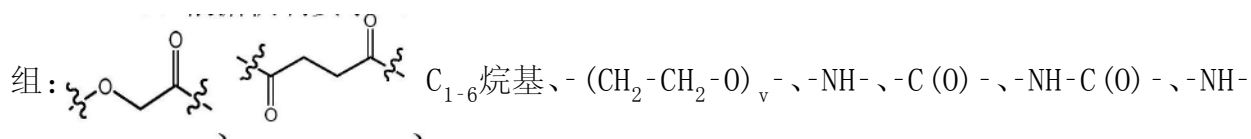
SP1不存在或者是第一间隔物单元;

AA不存在或者是包括2个至4个氨基酸的肽单元;

SP2不存在或者是与所述P共价附接的第二间隔物单元,

条件是SP1、AA和SP2中的至少一个并非不存在。

19. 根据权利要求18中任一项所述的化合物, 其中SP1不存在或者选自由以下组成的

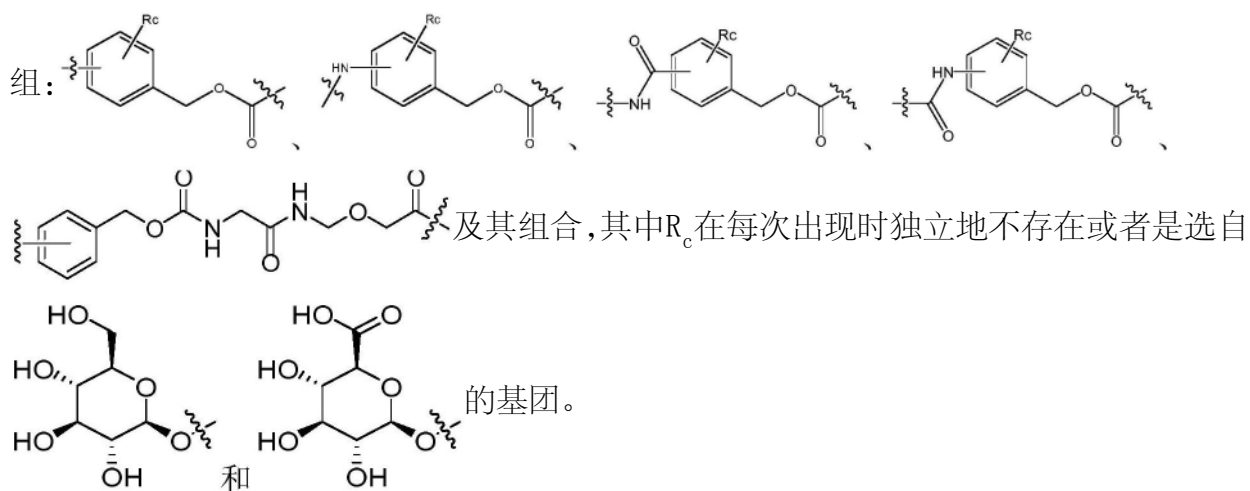


$(\text{CH}_2)_u$ -、-NH- $(\text{CH}_2)_u$ -C(O)-、-NH- $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_v$ -、-NH- $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_v$ -C(O)-、-NH- $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_v$ - $(\text{CH}_2)_u$ -、-NH- $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_v$ - $(\text{CH}_2)_u$ -C(O)-、- $(\text{CH}_2)_u$ -NH-C(O)-、-NH- $(\text{CH}_2)_u$ -NH-C(O)-、-NH- $(\text{CH}_2)_u$ -C(O)-NH- 及其组合；其中下标u和v独立地是从1至8的整数。

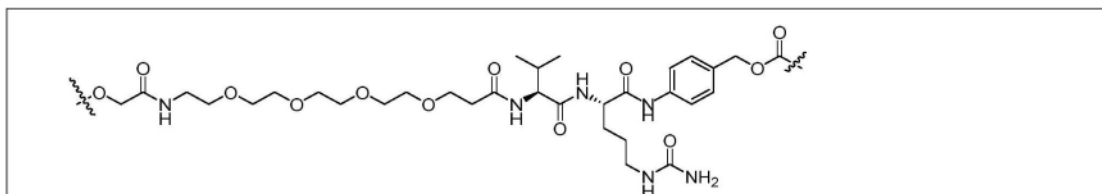
20. 根据权利要求18或19中任一项所述的化合物，其中AA是包括2个至4个氨基酸的肽单元，所述氨基酸选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、谷氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸和瓜氨酸及其组合。

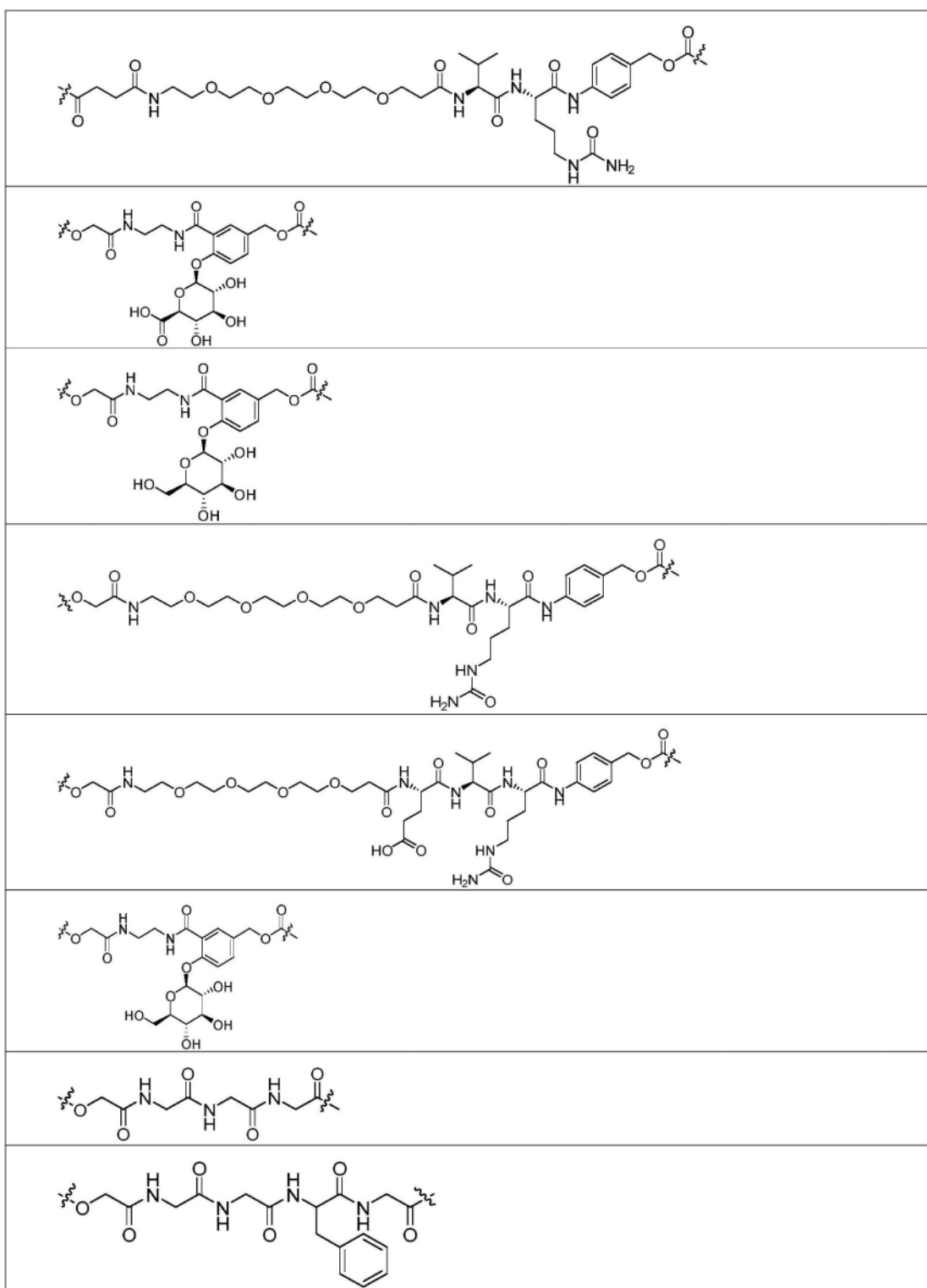
21. 根据权利要求18-20中任一项所述的化合物，其中AA是缬氨酸-瓜氨酸、谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸、甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸或甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸。

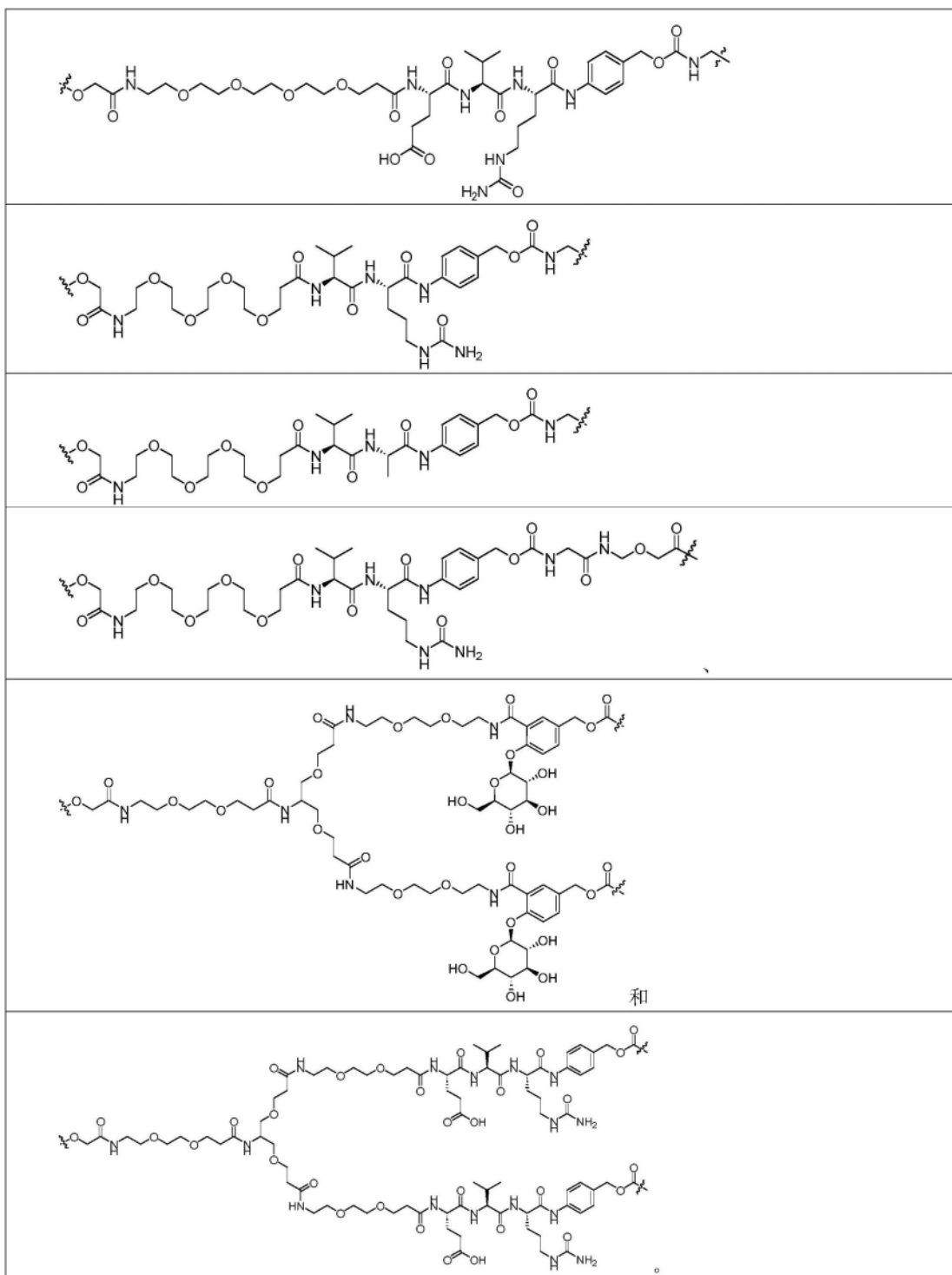
22. 根据权利要求18-21中任一项所述的化合物，其中SP2不存在或选自由以下组成的



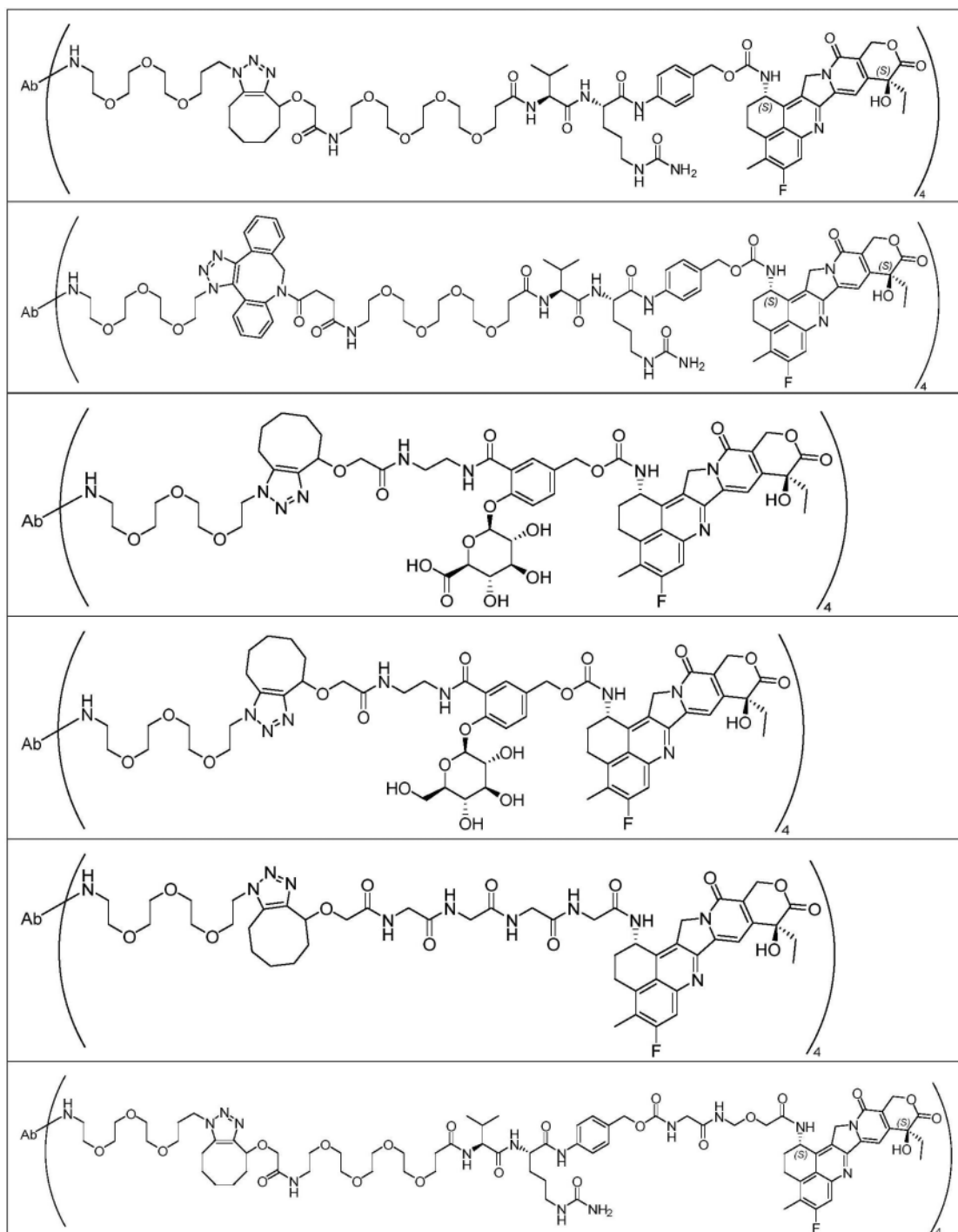
23. 根据权利要求1-22中任一项所述的化合物，其中L2选自由以下组成的组：

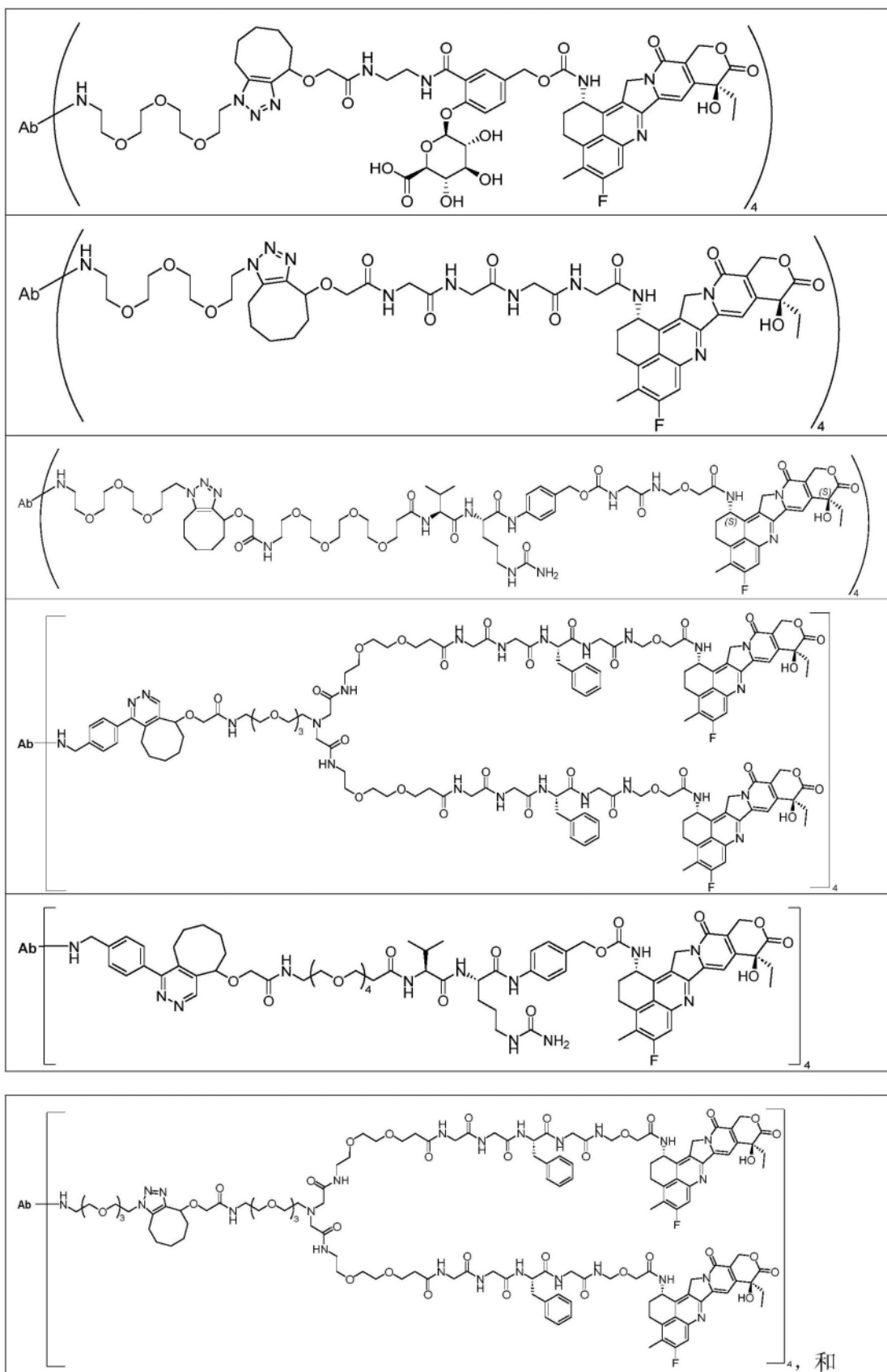






24. 根据权利要求1-23中任一项所述的化合物,其中n是4。
25. 根据权利要求1-24中任一项所述的化合物,其中n是2。
26. 根据权利要求1-25中任一项所述的化合物,其中n是8。
27. 根据权利要求1-26中任一项所述的化合物,其中所述化合物具有选自由以下组成的组的结构:





或其药学上可接受的盐。

28. 一种化合物, 所述化合物是根据式 (A1k-L2-P) 的化合物:

A1k-SP1-AA-SP2-P (A1k-L2-P), 其中:

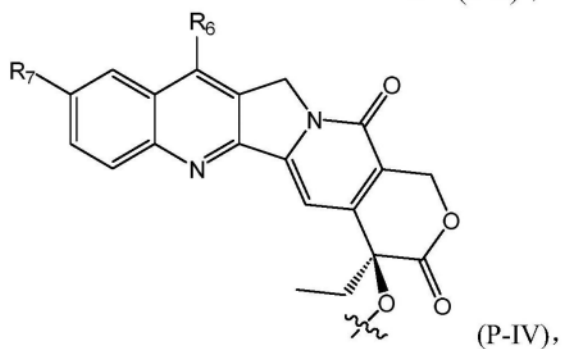
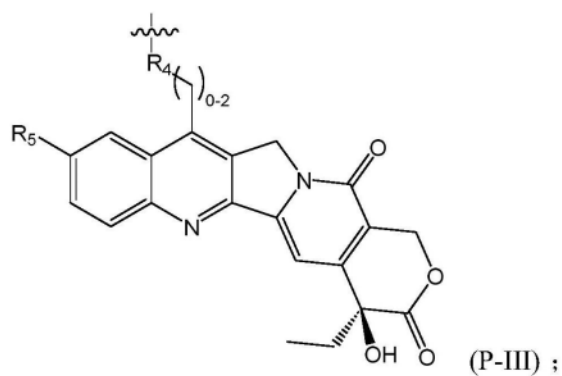
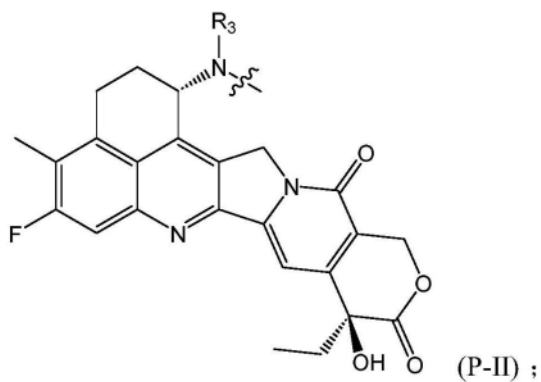
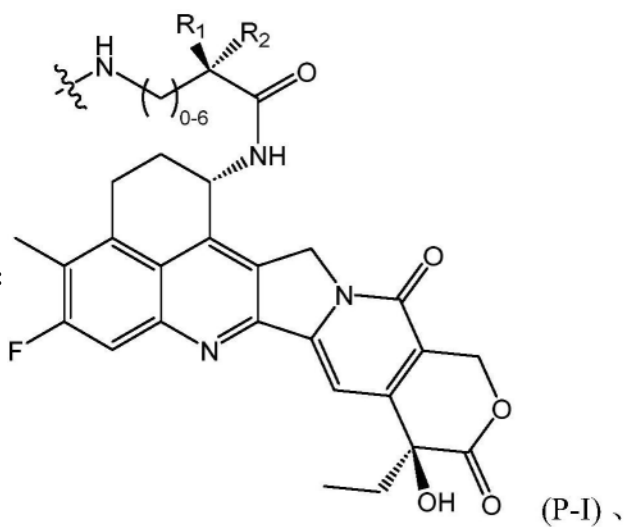
A1k是包括炔烃的部分；

SP1不存在或者是第一间隔物单元；

AA不存在或者是包括2个至4个氨基酸的肽单元；

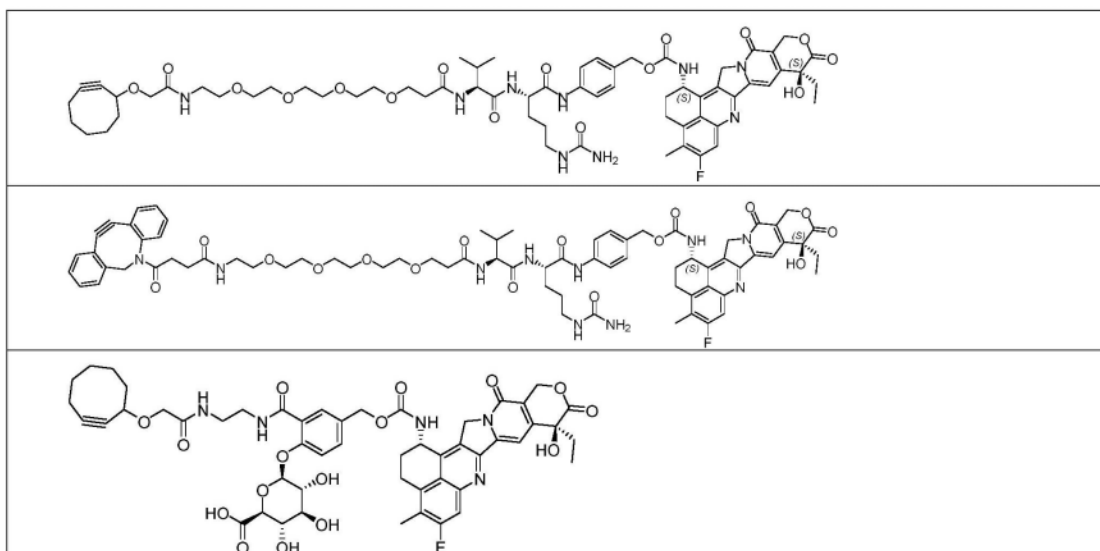
SP2不存在或者是第二间隔物单元；并且

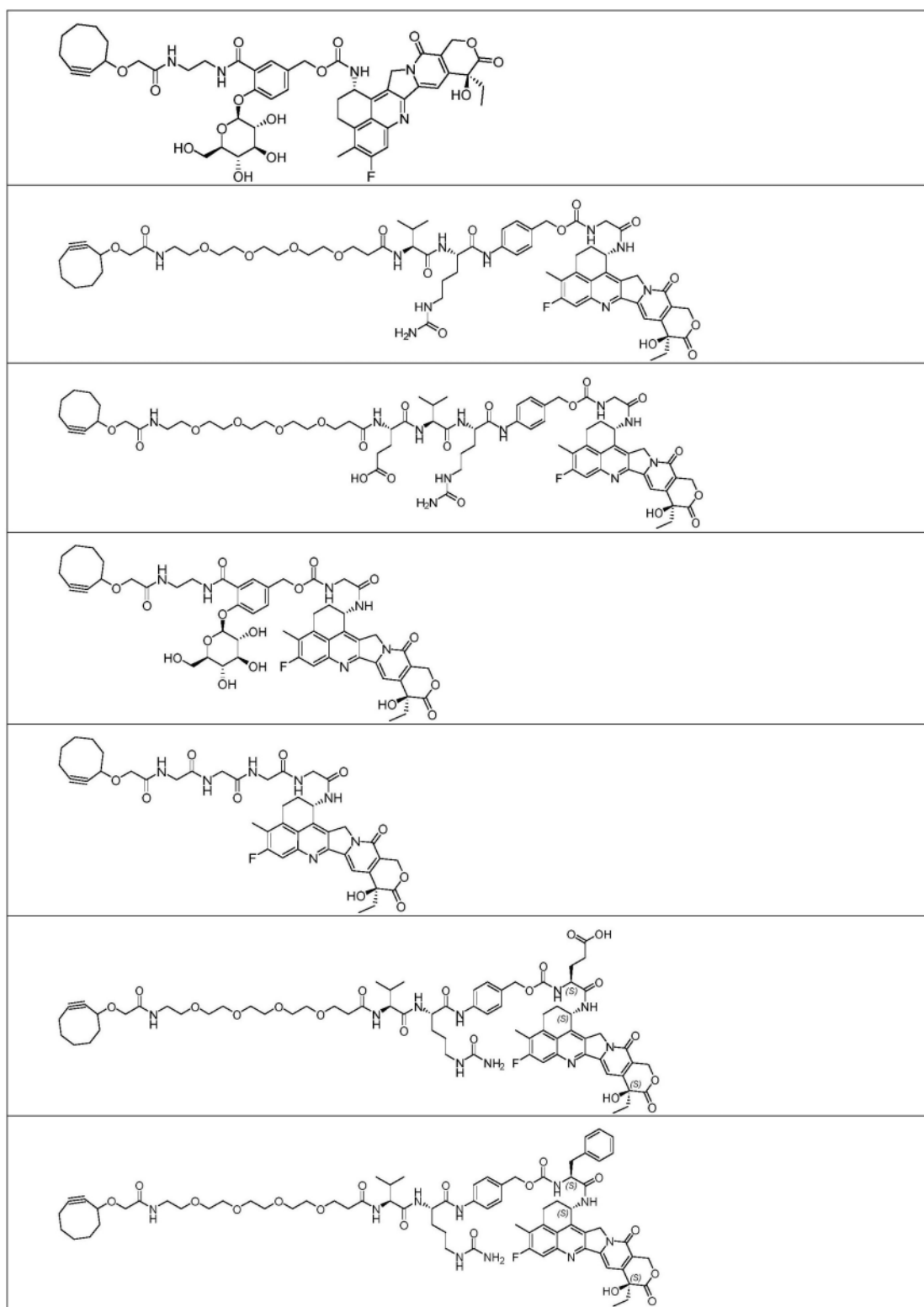
P选自由P-I至P-IV组成的组：

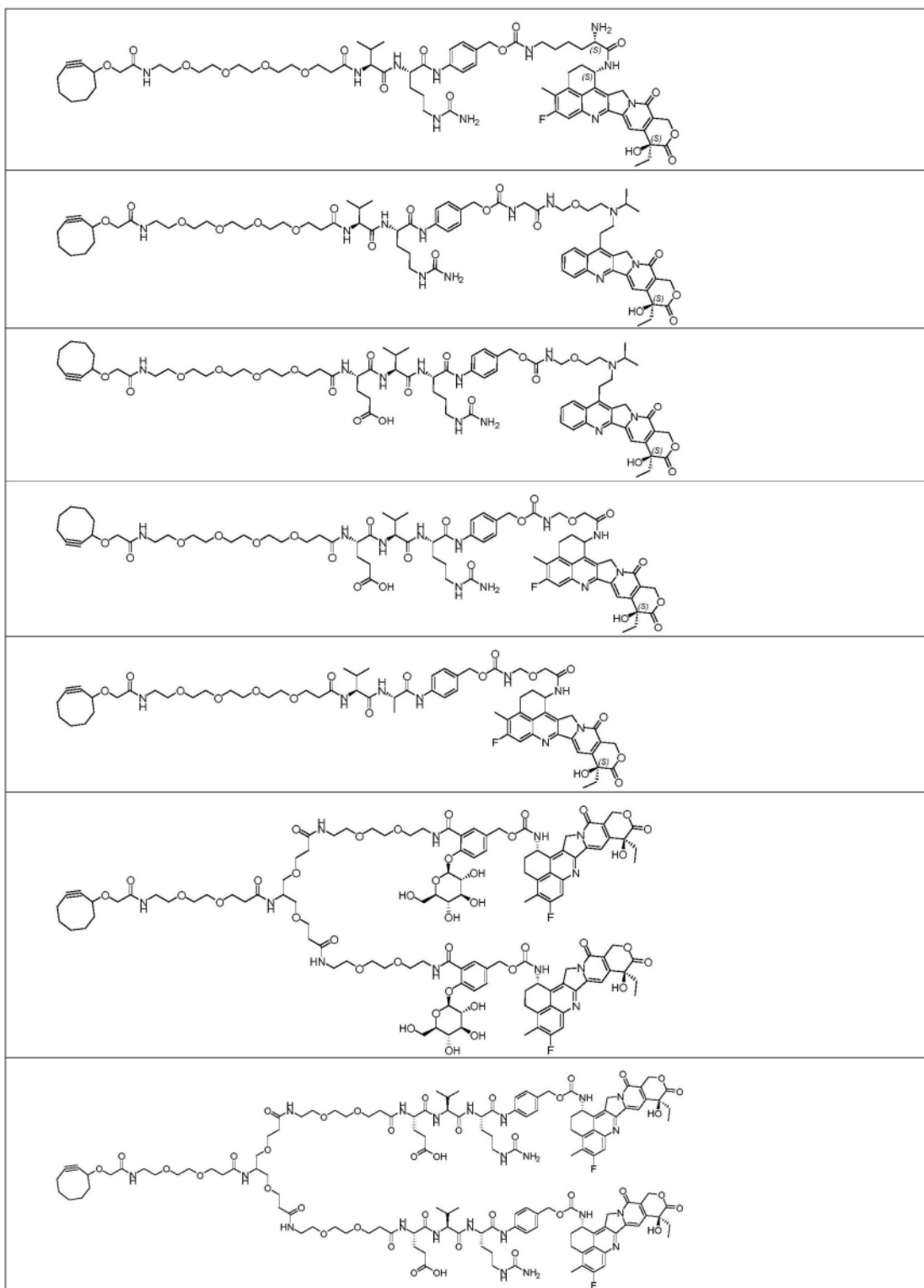


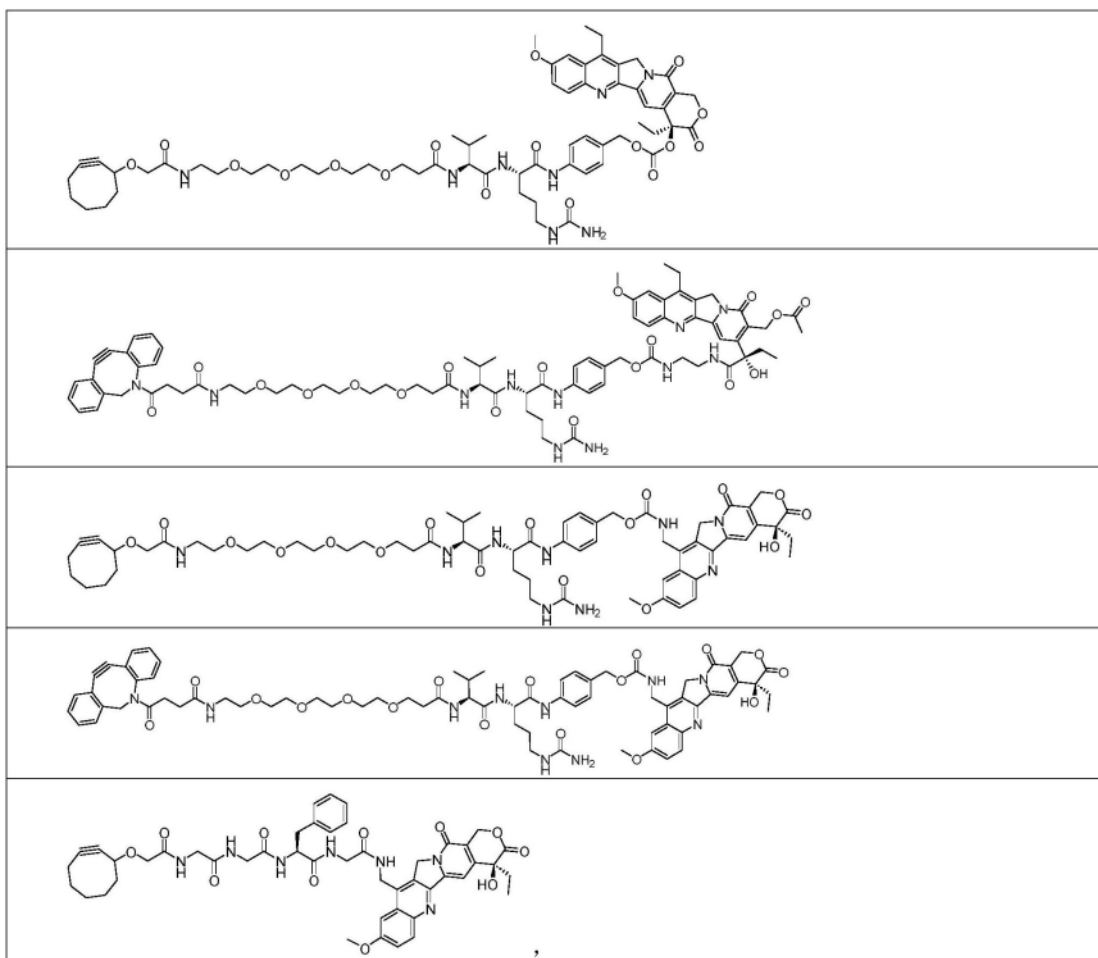
或其药学上可接受的盐。

29. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述根据式(A1k-L2-P)的化合物选自由以下组成的组：









或其药学上可接受的盐。

30.一种组合物,包括根据权利要求1-29中任一项所述的化合物的群体,具有约0.5至约12.0的药物-抗体比(DAR)。

31.根据权利要求30所述的组合物,具有约1.0至约2.5的DAR。

32.根据权利要求31所述的组合物,具有约2的DAR。

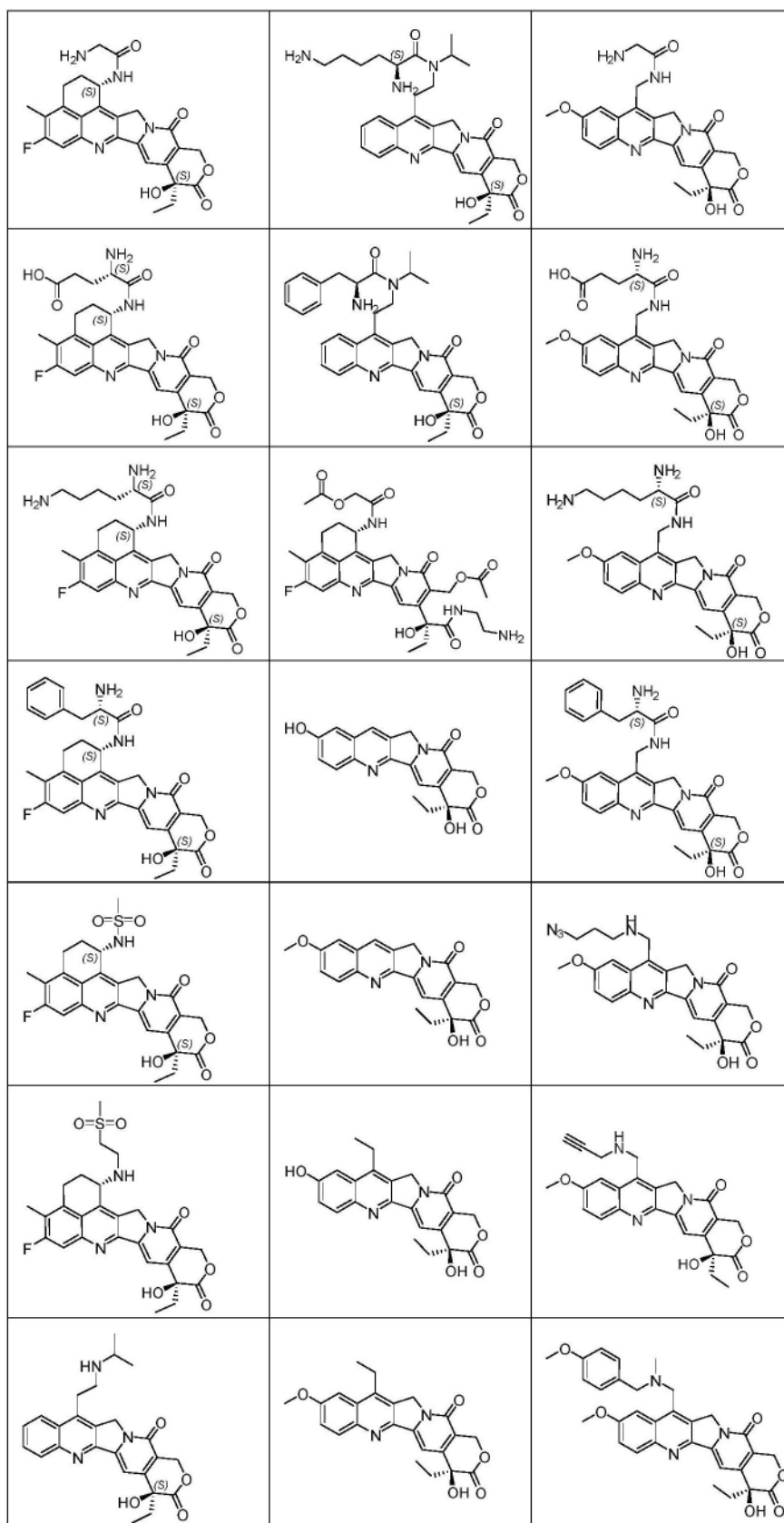
33.根据权利要求32所述的组合物,具有约3.0至约4.5的DAR。

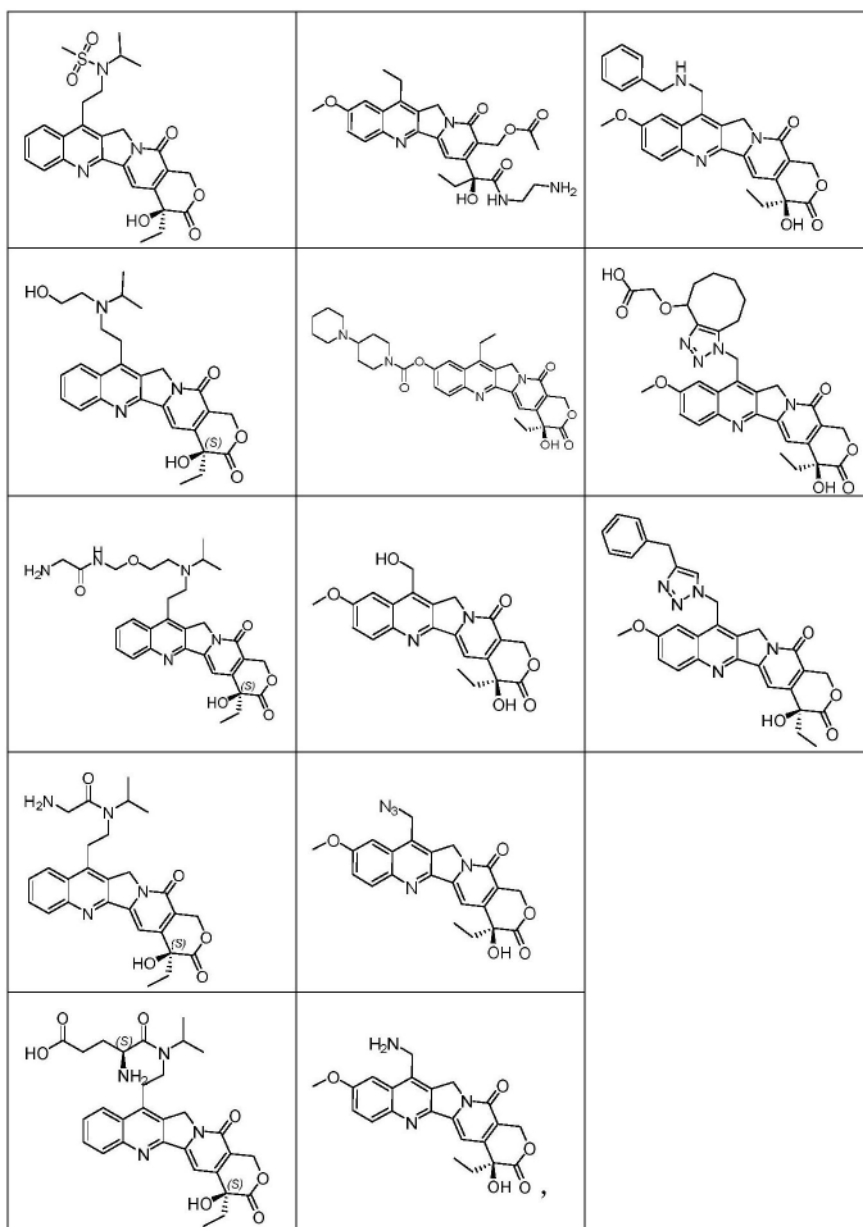
34.根据权利要求33所述的组合物,具有约4的DAR。

35.根据权利要求34所述的组合物,具有约6.5至约8.5的DAR。

36.根据权利要求35所述的组合物,具有约8的DAR。

37.一种化合物,具有选自由以下组成的组的结构:





或其药学上可接受的盐。

38. 一种药物组合物, 包括根据权利要求1-29和37中任一项所述的化合物, 以及稀释剂、载体和/或赋形剂。

39. 一种治疗肿瘤和/或癌症的方法, 包括使所述肿瘤和/或癌症与根据权利要求37所述的化合物接触。

40. 一种治疗有相应需要的受试者的状况的方法, 包括向所述受试者施用治疗有效量的根据权利要求1-29和37中任一项所述的化合物或根据权利要求30-36中任一项所述的组合物。

41. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述状况是癌症。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肝癌或脑癌。

43. 根据权利要求39或41所述的方法, 其中所述状况是HER2+乳腺癌。

44. 一种将化合物选择性地递送到细胞中的方法, 其中所述化合物是根据权利要求1-

29和37中任一项所述的化合物。

45. 一种用化合物选择性地靶向细胞表面上的抗原的方法, 其中所述化合物是根据权利要求1-29和37中任一项所述的化合物。

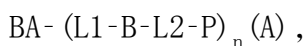
46. 根据权利要求44或45所述的方法, 其中所述细胞是哺乳动物细胞。

47. 根据权利要求44-46中任一项所述的方法, 其中所述细胞是人类细胞。

48. 根据权利要求44-47中任一项所述的方法, 其中所述细胞是癌细胞。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述癌细胞选自由以下组成的组: 乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、肺癌细胞、肝癌细胞或脑癌细胞。

50. 一种产生具有根据式 (A) 的结构的化合物的方法:



其中:

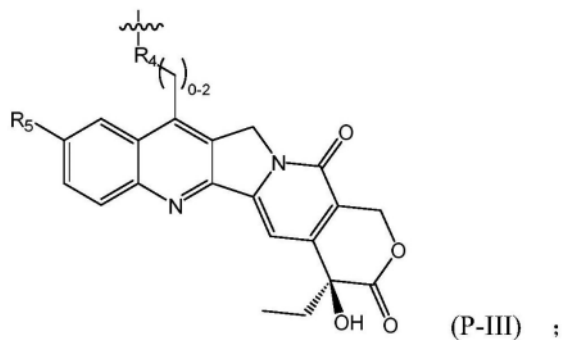
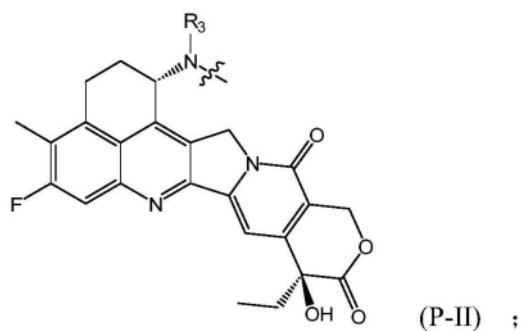
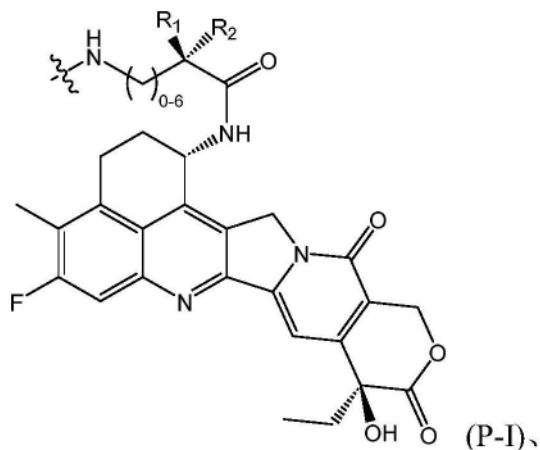
BA是抗体或其抗原结合片段;

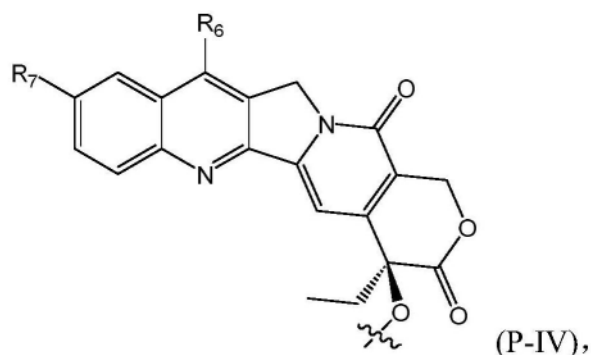
L1是与所述BA的谷氨酰胺残基的侧链共价结合的第一接头;

B是包括三唑的部分;

L2是与所述P共价结合的第二接头;

P是选自由P-I至P-IV组成的组的抗肿瘤剂:





R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

R_2 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

R_3 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$ 和 $-CO-(CH_2)_v-O-COCH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

R_4 是 $-NH-$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-SO_2CH_3)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-(CH_2)_v-OH)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-(CH_2)_v-O-CH_2-NH-CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-CO-$

$CH(NH_2)-(CH_2)_v$ -苯基)或

其中 v 是从0至12的整数;

R_5 是H、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 或

R_6 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CH_2$ -苯基、 $-(CH_2)_v-NMe-CH_2$ -苯基-OMe、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-CCH$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-$

$(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH$ 、

或

其中 v 独

立地是从0至12的整数;

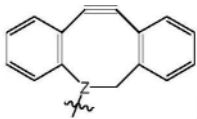
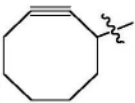
R_7 是H、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 或

其中所述方法包括以下步骤:

- 在存在转谷氨酰胺酶的情况下,使包括至少一个谷氨酰胺残基的BA与化合物L1-B'接触,
- 使步骤a)的产物与一个或更多个当量的化合物B"-L2-P接触,其中所述基团B"能够

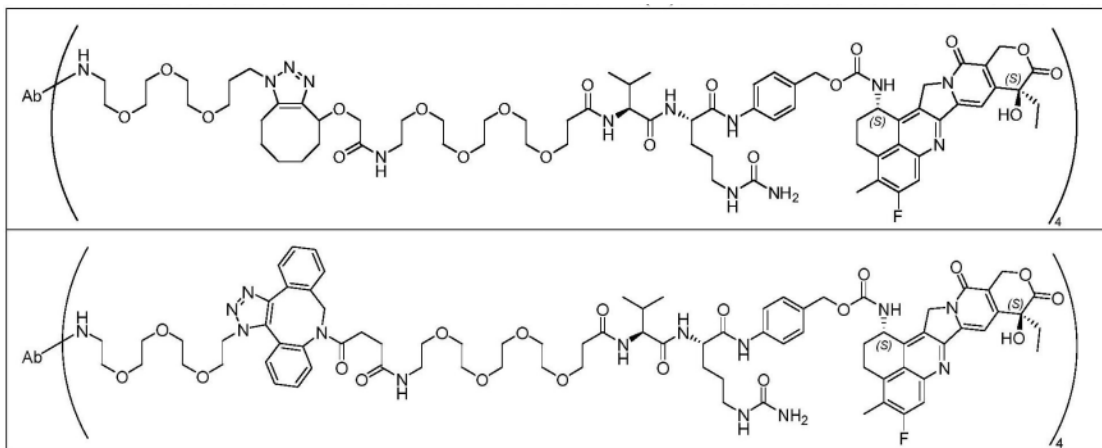
与所述基团B'共价附接,

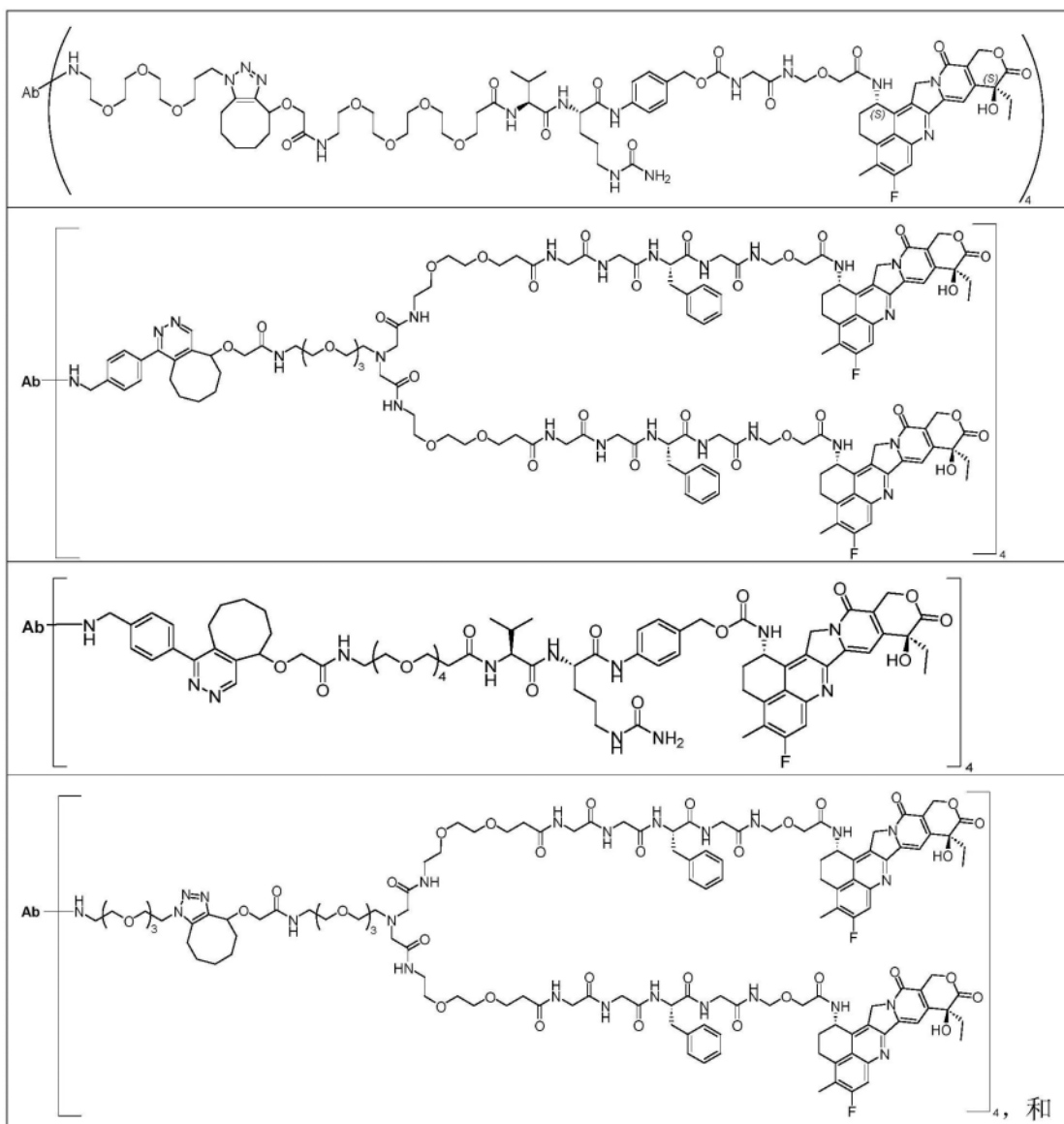
其中所述基团B'和B''中的一个选自 $-N_3$ 和 $-\text{C}_6\text{H}_4-$;并且所述基团B'和B''中的另一个

选自 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、和, 其中Z是C或N;以及

c) 分离所产生的式(A)的化合物。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述式(A)的化合物具有选自以下组成的组的结构:





或其药学上可接受的盐。

与蛋白中的谷氨酰胺残基缀合的喜树碱类似物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年1月12日提交的美国临时申请第63/298,786号的优先权。该申请的全部内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 本公开内容的领域

[0004] 本公开内容涉及蛋白-药物缀合物(例如,抗体-药物缀合物)、药物组合物及用其治疗疾病的方法。还提供了用于利用转谷氨酰胺酶和1,3-环加成技术的组合产生蛋白-药物缀合物的方法。更具体地,本公开内容涉及包括依喜替康(exatecan)前体和依喜替康的蛋白-药物缀合物(例如,抗体-药物缀合物)。

[0005] 公开内容的背景

[0006] 增生性疾病以异常细胞不受控制的生长和扩散为特征。如果扩散得不到控制,它可能导致死亡。异常增殖,例如,癌症是由外部因素(例如烟草、化学物质、辐射和感染性生物体)和内部因素(遗传突变、免疫系统状况、代谢发生的突变)两者引起的。这些致病因素可能一起或依次作用,启动或促进异常增殖。癌症通过手术、放射、化学疗法、激素和免疫疗法来治疗。然而,对更有效的抗增殖药物存在需求。

[0007] 理想的抗增殖疗法将使高度细胞毒性剂靶向递送至肿瘤细胞成为可能,并且将不影响正常细胞。由于药物对非癌细胞的作用引起的毒副作用,常规化学疗法治疗是有缺陷的。已经尝试了各种靶向药物递送的方法,包括使用肿瘤靶向探针(诸如抗体或生长因子)与阻止蛋白合成和细胞的毒素诸如假单胞菌或白喉毒素的缀合物。然而,副作用包括由于缀合物的非人类组分引起的免疫系统反应。此外,由于通过肾过滤从循环中消除、以及示意性降解、被网状内皮系统(RES)摄取以及在非靶向器官和组织中累积,药物缀合物的半衰期受到限制。

[0008] 另一种方法使用被动药物载体,诸如聚合物、脂质体和聚合物胶束,以利用肿瘤组织血管内皮的高渗透性。由于增强的渗透性和保持机制,聚合物药物和大分子在实体瘤内累积。然而,使用这样的靶向递送的障碍包括外来颗粒从血液中快速清除,以及获得具有用于结合肿瘤细胞所需的特异性和选择性的高度标准化、药学上可接受的药物递送系统的技术障碍。

[0009] 蛋白缀合物,诸如抗体缀合物,利用结合剂的选择性结合将有效载荷递送至受试者组织内的靶。有效载荷可以是能够对靶处采取行动的治疗部分。

[0010] 数种将接头和有效载荷与抗体缀合的技术是可行的。许多缀合物是通过与抗体中的半胱氨酸或赖氨酸残基的非选择性共价连接来制备的。这种非选择性技术可以导致在不同的位点具有缀合物并且每个抗体具有不同数目缀合物的产物的异质混合物。因此,本领域对提供位点选择性抗体缀合的方法和技术存在需求。

[0011] 本领域对用于在单一疗法和组合疗法中使用的另外的安全且有效的抗肿瘤靶向剂(其可以与多种抗原结合以提供疾病诸如癌症的增强治疗)存在需求。在某些实施方案中,本公开内容满足需求并且提供其他优点。

[0012] 呈现前述讨论仅仅是为了提供对本领域所面临的问题性质的更好的理解,并且不

应该以任何方式被解释为对现有技术的承认,也不应该将本文中任何参考文献的引用解释为对这样的参考文献构成本申请的“现有技术”的承认。

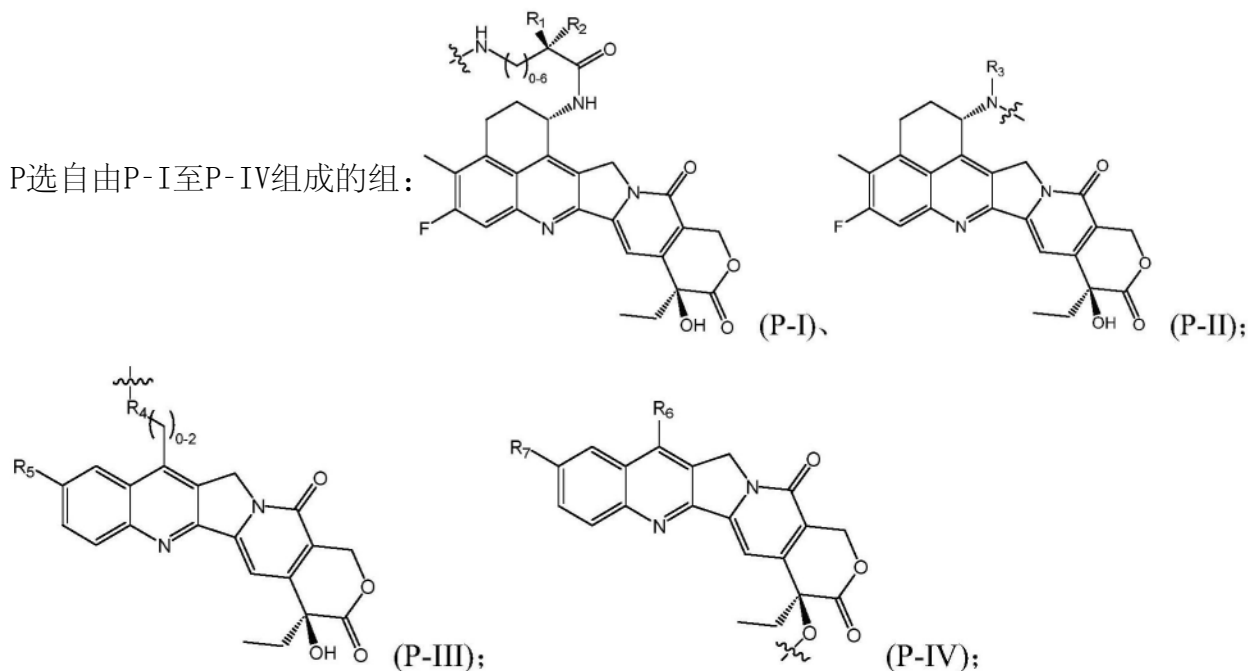
[0013] 公开内容的概述

[0014] 下文描述本公开内容的多种非限制性方面和实施方案。

[0015] 在一个方面,本公开内容提供了具有根据式(A)的结构的化合物:

[0016] BA- (L1-B-L2-P)_n (A), 其中:

[0017] BA是抗体或其抗原结合片段;L1是第一接头;B是包括三唑的部分;L2是第二接头;

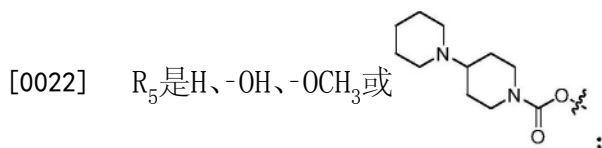
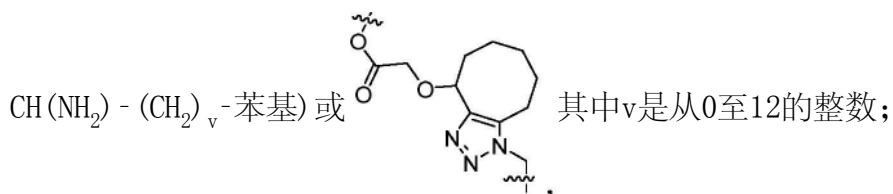


[0018] R₁是氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基和-(CH₂)_v-SO₂CH₃,其中v是从0至12的整数;

[0019] R₂是氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基和-(CH₂)_v-SO₂CH₃,其中v是从0至12的整数;

[0020] R₃是氢、-C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-SO₂CH₃和-CO-(CH₂)_v-O-COCH₃,其中v是从0至12的整数;

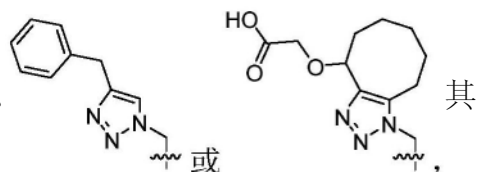
[0021] R₄是-NH-、-N(-C₁₋₆烷基)、-N(-C₁₋₆烷基)(-SO₂CH₃)、-N(-C₁₋₆烷基)(-(CH₂)_v-OH)、-N(-C₁₋₆烷基)(CO-CH₂-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-(CH₂)_v-O-CH₂-NH-CO-CH₂-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-COOH)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-



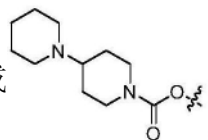
[0023] R₆是氢、-C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-

NH-CH₂-苯基、-(CH₂)_v-NMe-CH₂-苯基-OMe、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-CCH₃、
 (CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-CO-CH

(NH₂)-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-COOH、



中v独立地是从0至12的整数；

[0024] R₇是H、-OH、-OCH₃或  并且n是从1至12的整数。

[0025] 在一种实施方案中,第一接头L1连接至BA的谷氨酰胺残基的侧链。

[0026] 在一种实施方案中,BA是抗体或其抗原结合片段。

[0027] 在一种实施方案中,BA是抗体或其抗原结合片段。

[0028] 在一种实施方案中,BA包括一个或更多个谷氨酰胺残基。

[0029] 在一种实施方案中,谷氨酰胺残基天然存在于所述BA中,或通过一个或更多个氨基酸的位点特异性修饰引入至所述BA中。

[0030] 在一个实施方案中,BA是抗HER2抗体、抗STEAP2抗体、抗MET抗体、抗EGFRVIII抗体、抗MUC16抗体、抗PRLR抗体、抗PSMA抗体、抗FGFR2抗体、抗FOLR1抗体、抗HER2/HER2双特异性抗体、抗MET/MET双特异性抗体或其抗原结合片段。

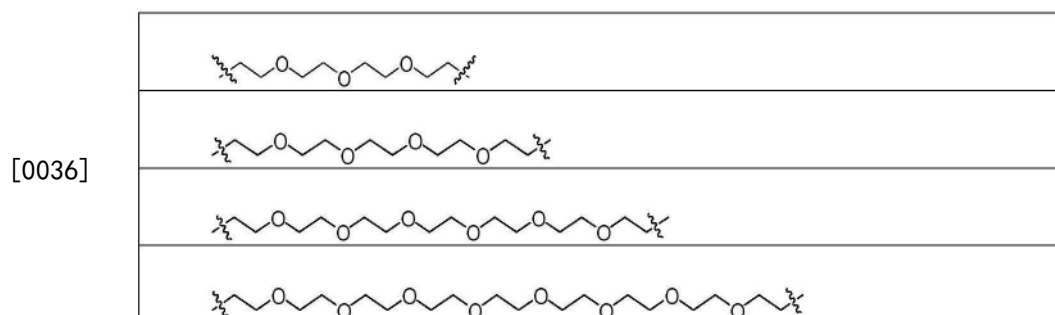
[0031] 在一种实施方案中,BA是抗HER2抗体。

[0032] 在一种实施方案中,BA靶向选自以下组成的组的癌症:乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肝癌和脑癌。

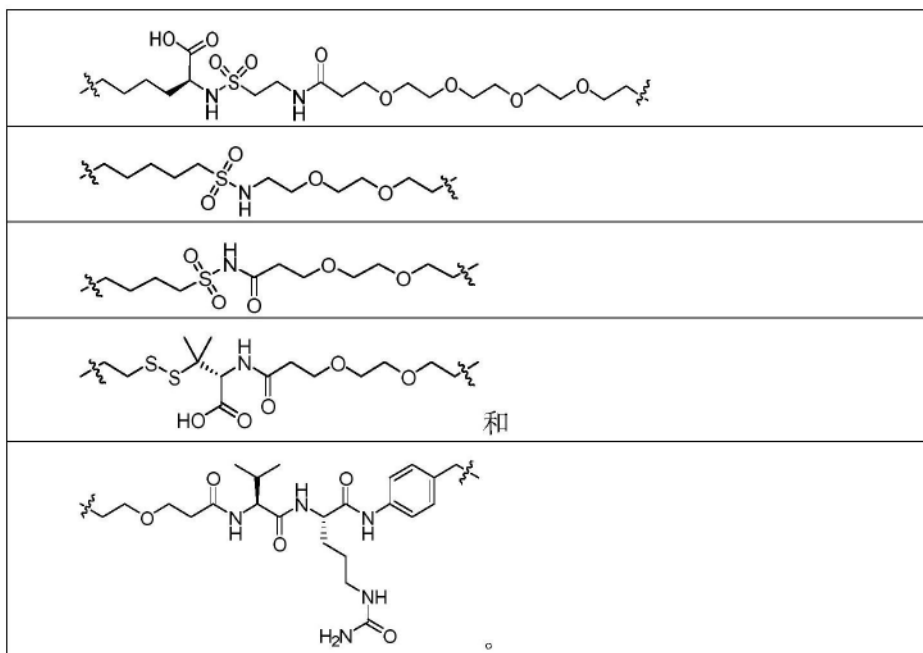
[0033] 在一种实施方案中,谷氨酰胺残基(有时表示为Q)天然存在于BA的CH₂结构域或CH₃结构域中。在一种实施方案中,谷氨酰胺残基通过位点特异性修饰一个或更多个氨基酸引入至BA中。在一种实施方案中,谷氨酰胺残基是Q295或N297Q。

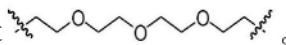
[0034] 在一种实施方案中,L1包括C₁₋₆烷基、苯基、芳烷基-NH-、-C(O)-、-(CH₂)_u-NH-C(O)-、-(CH₂)_u-C(O)-NH-、-(CH₂-CH₂-O)_v-、-(CH₂)_u-(O-CH₂-CH₂)_v-C(O)-NH-、包括2个至4个氨基酸的肽单元或其组合,其中的每一种能够任选地被-S-、-S(O₂)-、-C(O)-、-C(O₂)-和-CO₂H中的一个或更多个取代,其中下标u和v独立地是从1至8的整数。

[0035] 在一种实施方案中,L1选自以下组成的组:

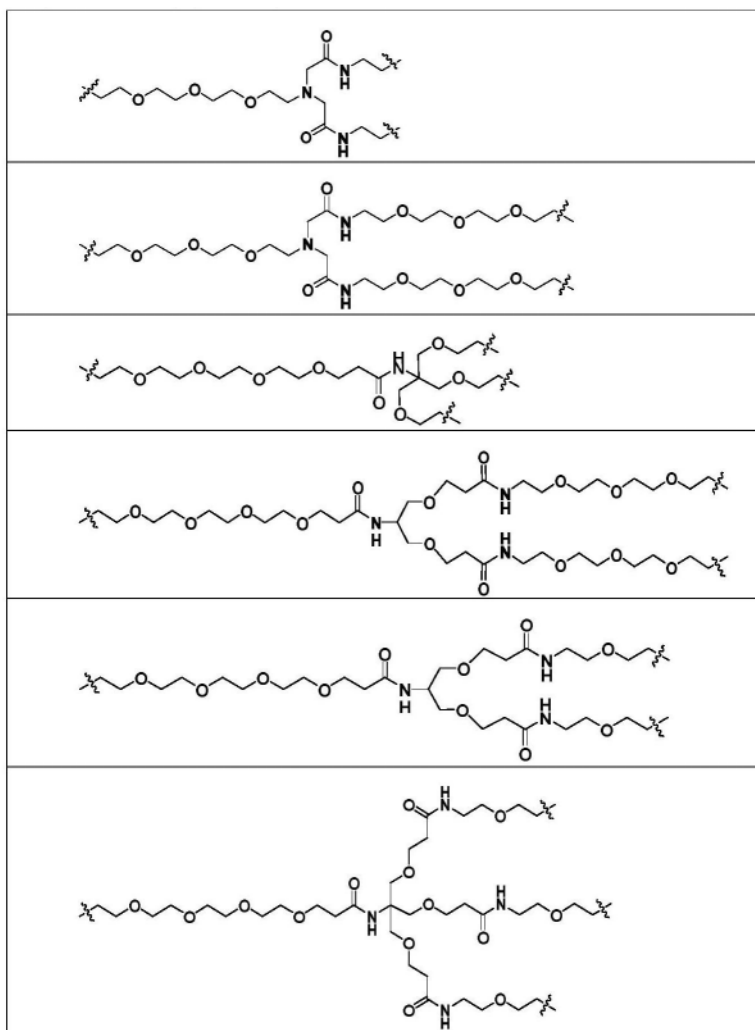


[0037]

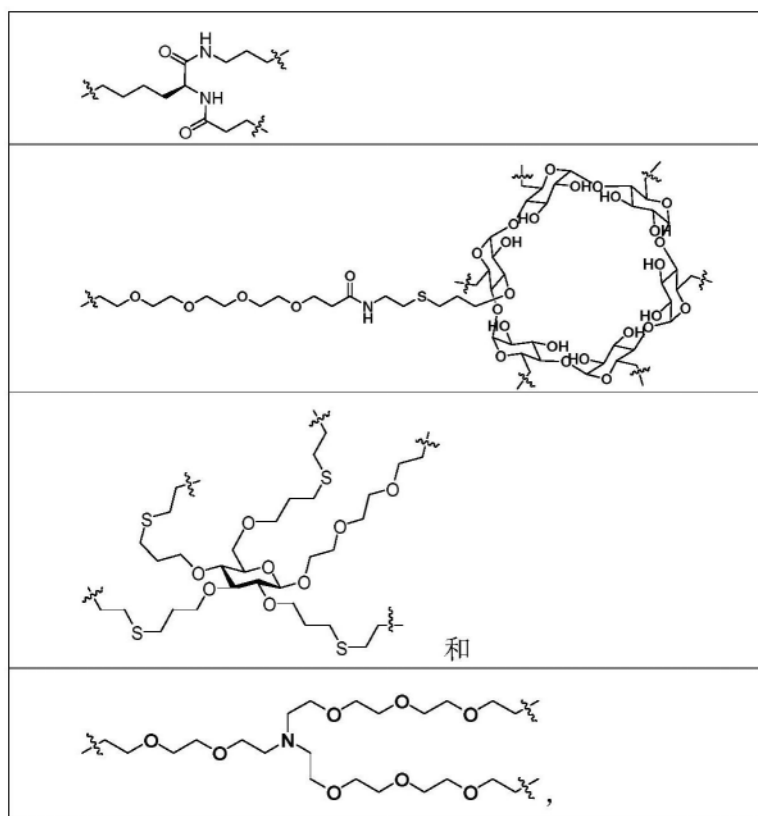


[0038] 在一种实施方案中,L1是 。在一种实施方案中,L1选自由以下组成的组:

[0039]



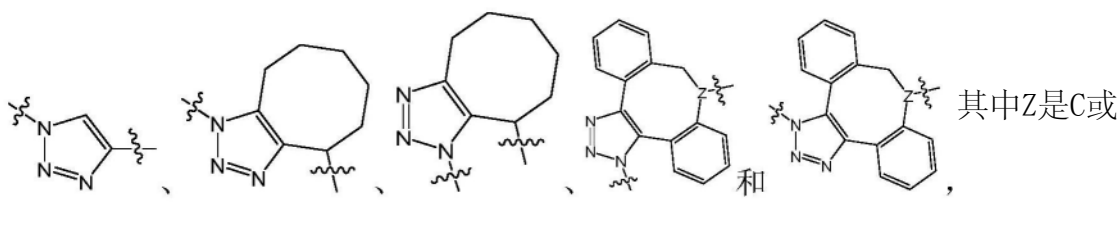
[0040]



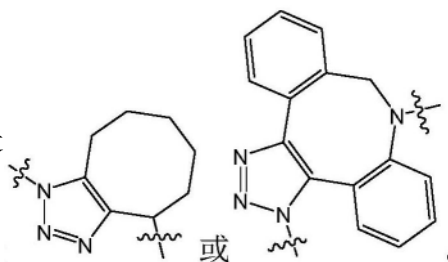
[0041] 或其药学上可接受的盐。

[0042] 在一种实施方案中,B选自由以下组成的组:

[0043]



[0044] 在一种实施方案中,B是

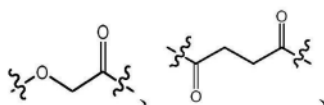


[0045] 在一种实施方案中,L2具有根据式 (L2) 的结构:

[0046] -SP1-AA-SP2- (L2) ,

[0047] 其中SP1不存在或者是第一间隔物单元;AA不存在或者是包括2个至4个氨基酸的肽单元;SP2不存在或者是与P共价附接的第二间隔物单元,条件是SP1、AA和SP2中的至少一个并非不存在。

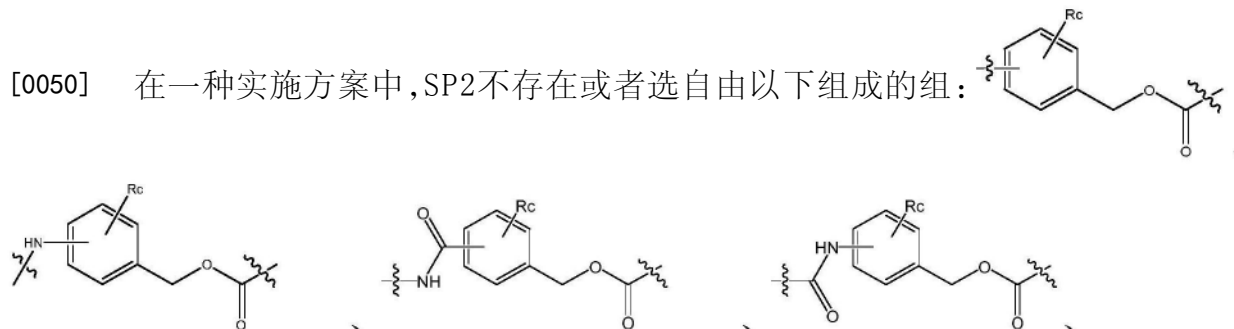
[0048] 在一种实施方案中,SP1不存在或者选自由以下组成的组:



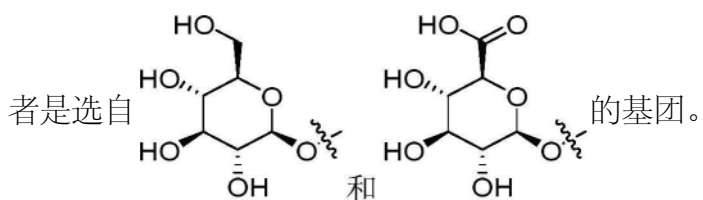
C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2-CH_2-O)_v-$ 、 $-NH-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_u-$ 、 $-NH-(CH_2)_u-C(O)-$ 、 $-NH-$

$(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-(\text{CH}_2)_u-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 及其组合；其中下标 u 和 v 独立地是从1至8的整数。

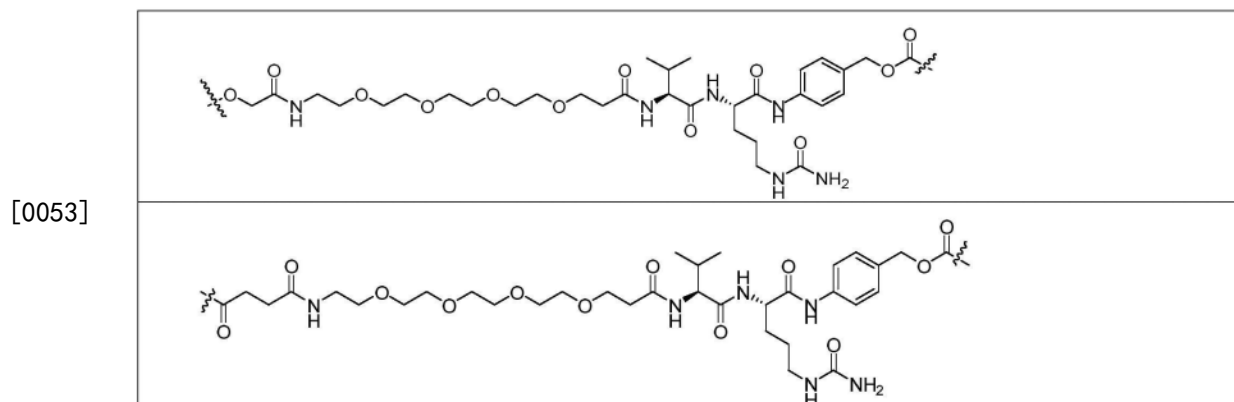
[0049] 在一种实施方案中,AA是包括2个至4个氨基酸的肽单元,所述氨基酸选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、谷氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸和瓜氨酸及其组合。在一种实施方案中,AA是缬氨酸-瓜氨酸、谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸或甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸。



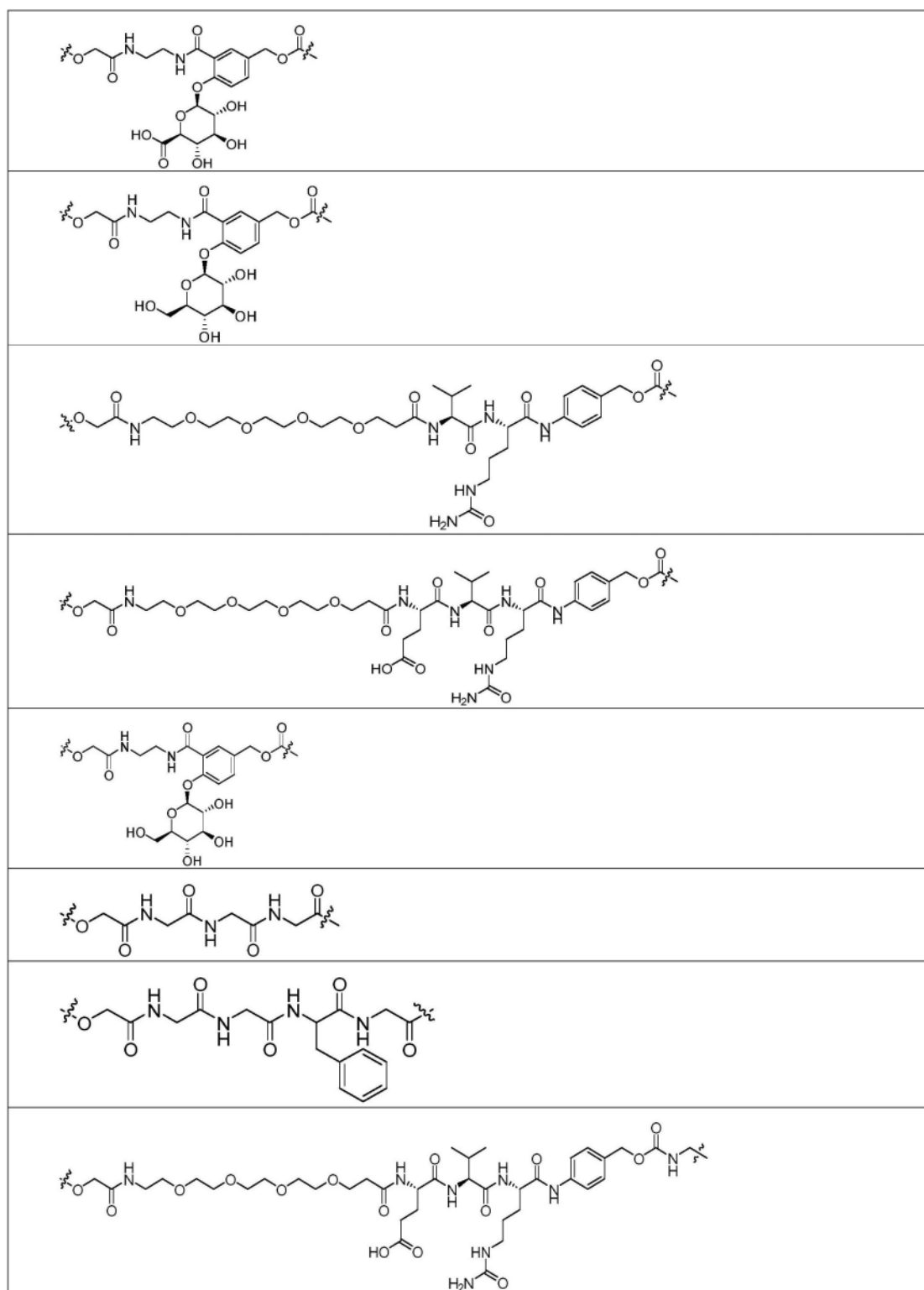
[0051] 及其组合,其中 R_c 在每次出现时独立地不存在或者是选自



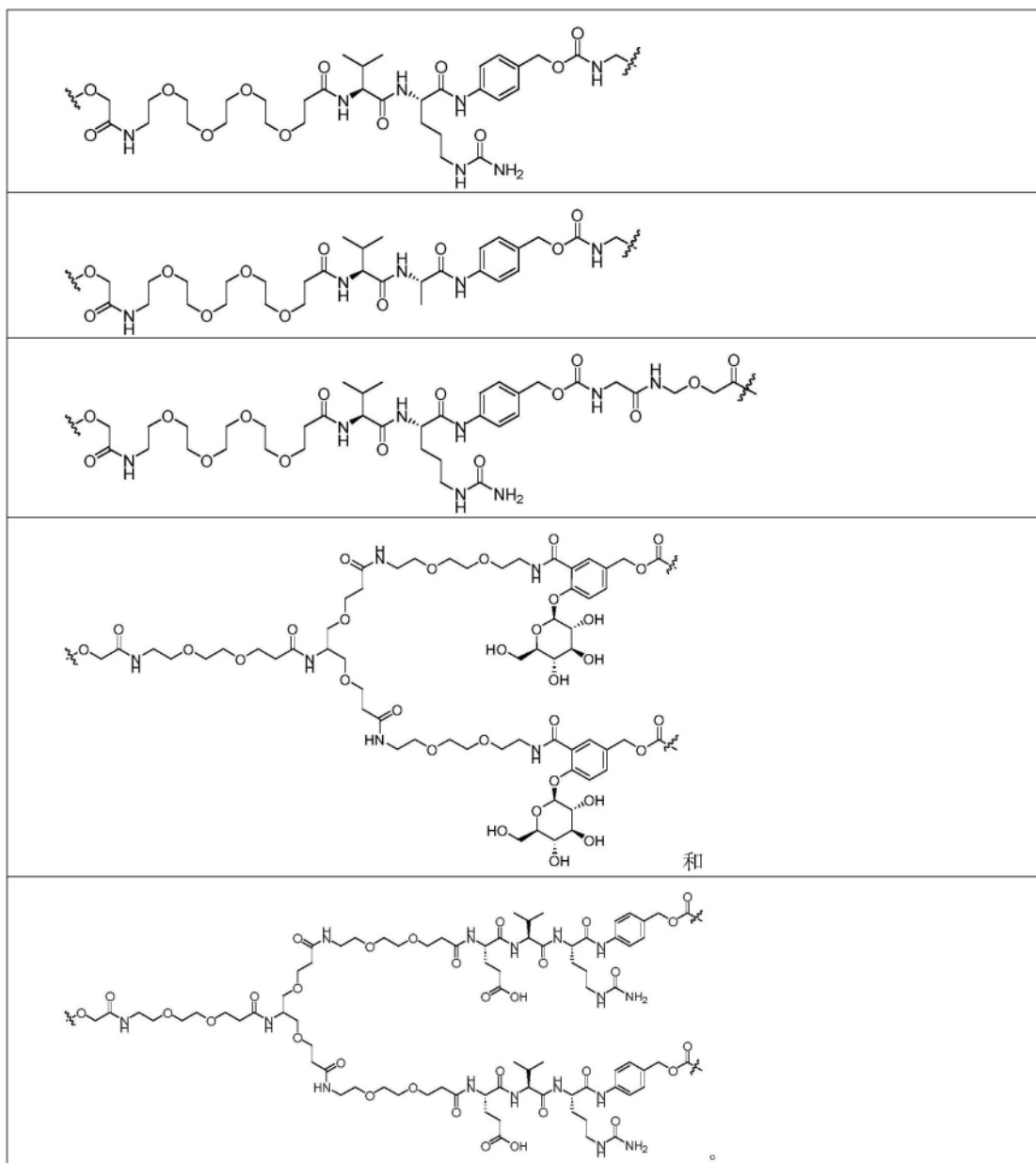
[0052] 在一种实施方案中,L2选自由以下组成的组:



[0054]

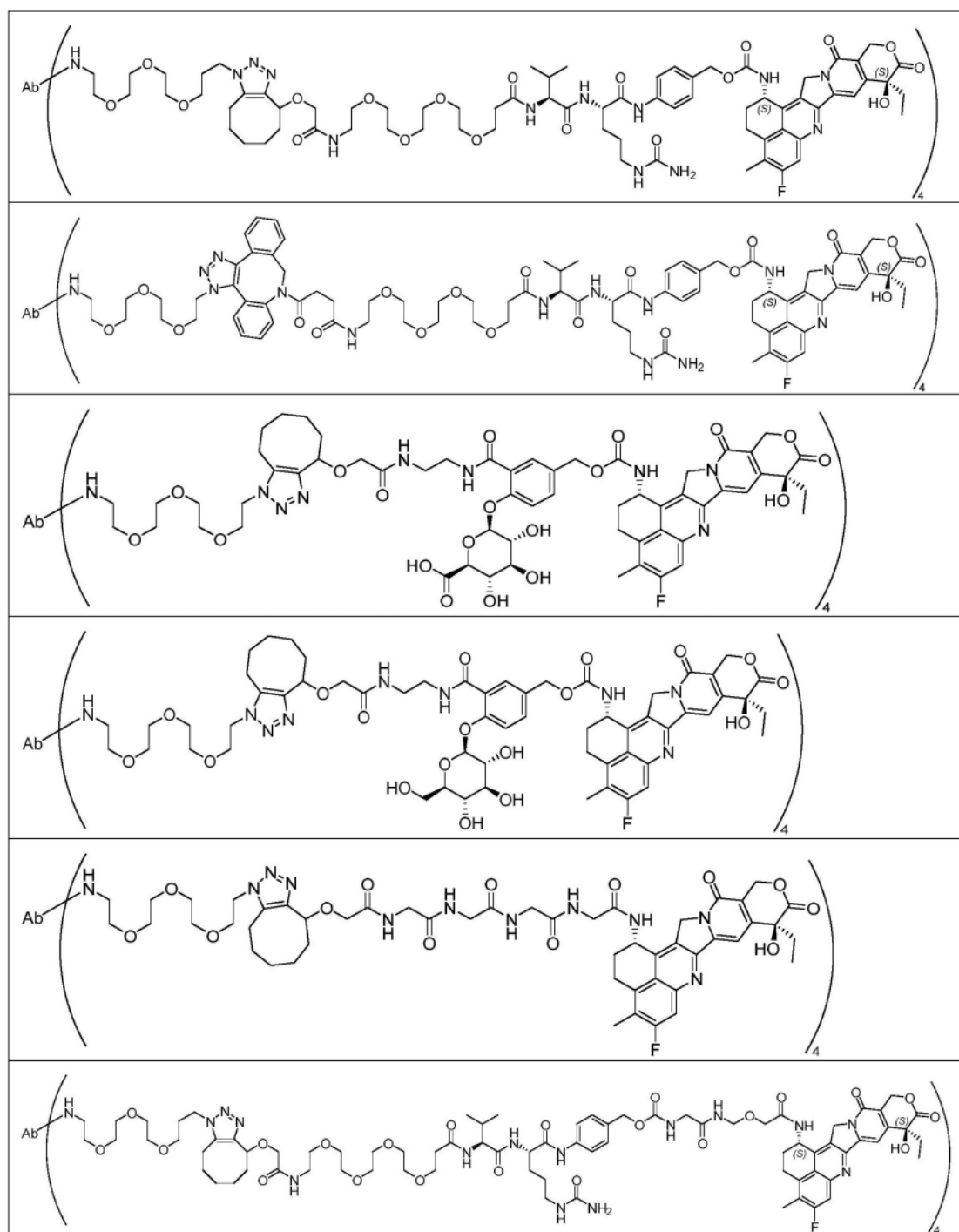


[0055]

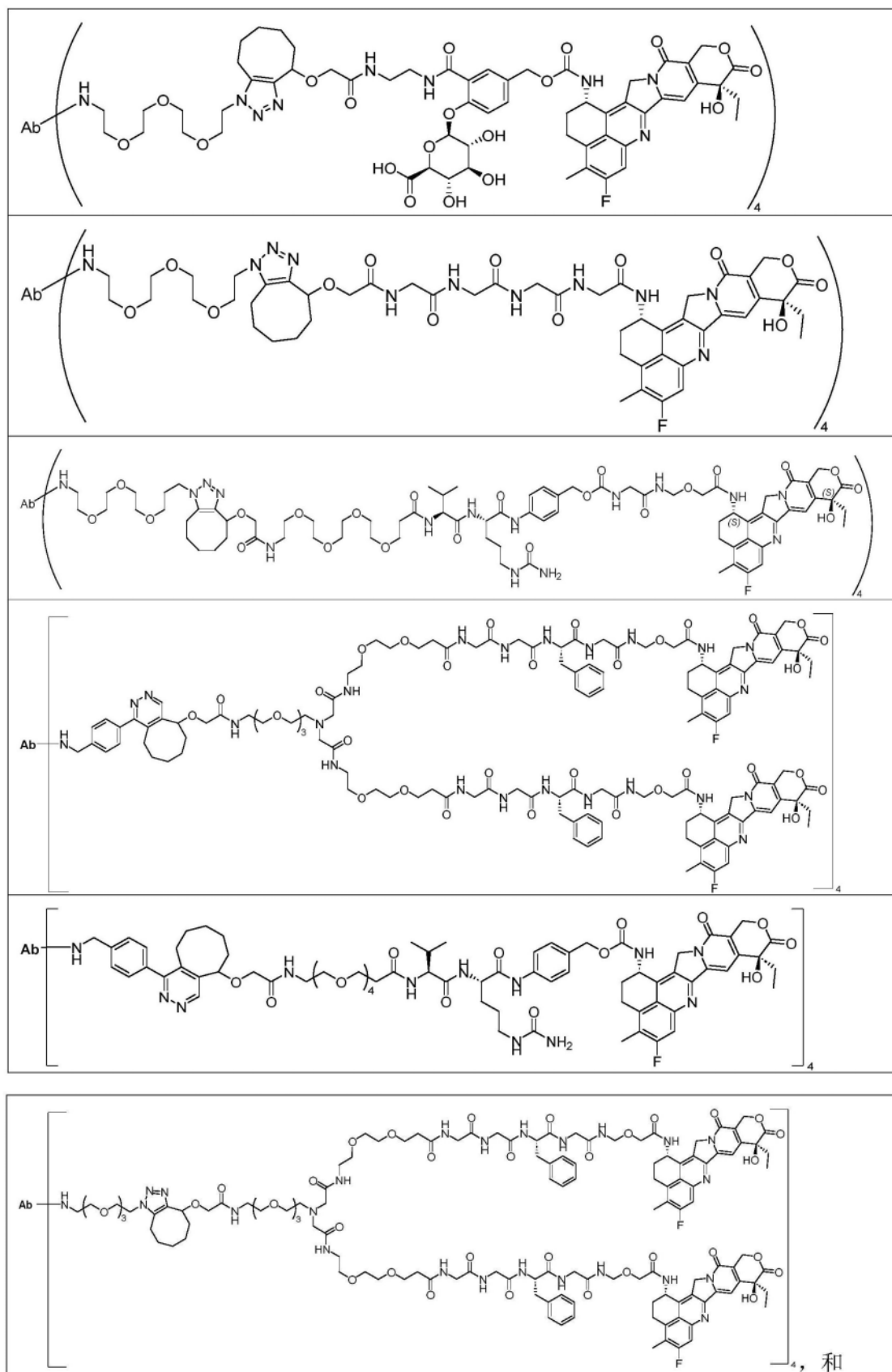


[0056] 在一种实施方案中,n是4。在一种实施方案中,n是2。在一种实施方案中,n是8。在一种实施方案中,化合物具有选自由以下组成的组的结构:

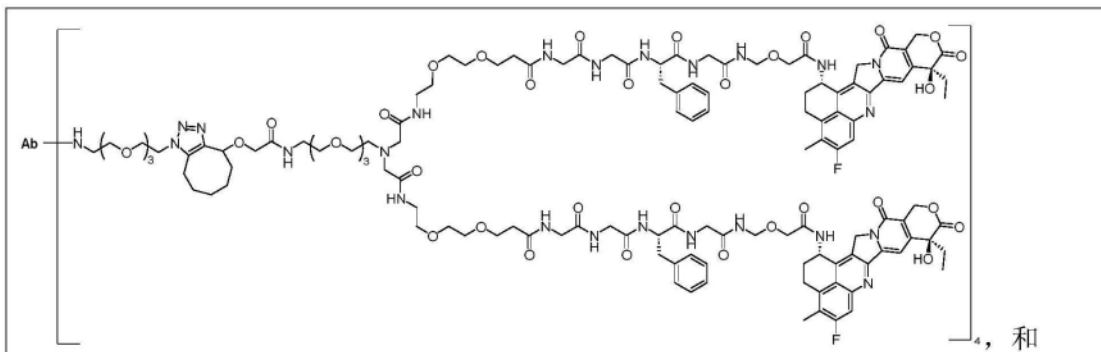
[0057]



[0058]



[0059]



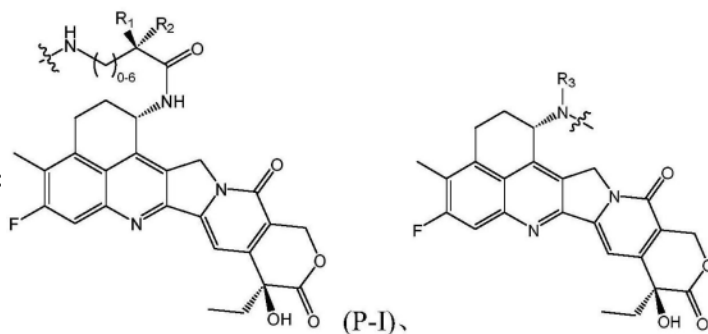
[0060] 或其药学上可接受的盐。

[0061] 在另一个方面,本公开内容呈现了根据式 (A1k-L2-P) 的化合物:

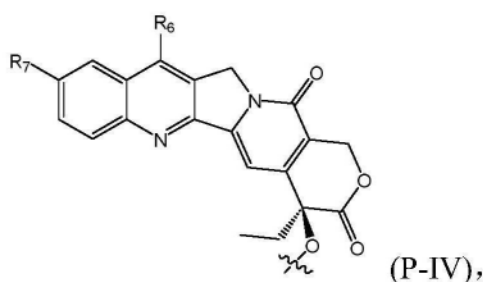
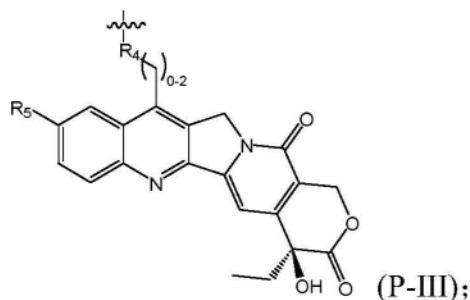
[0062] A1k-SP1-AA-SP2-P(A1k-L2-P),

[0063] 其中A1k是包括炔炔的部分;SP1不存在或者是第一间隔物单元;AA不存在或者是包括2个至4个氨基酸的肽单元;SP2不存在或者是第二间隔物单元;

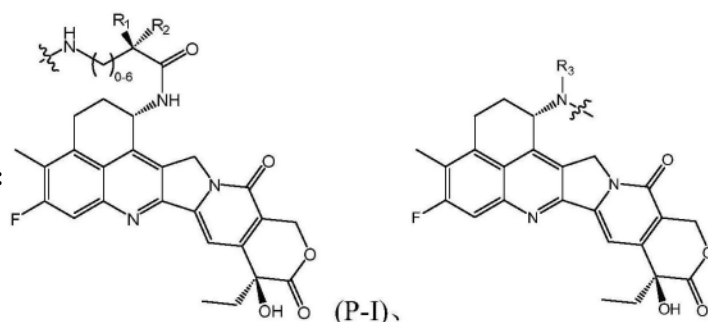
[0064] P选自由P-I至P-IV组成的组:



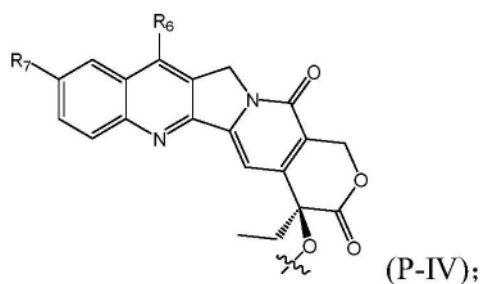
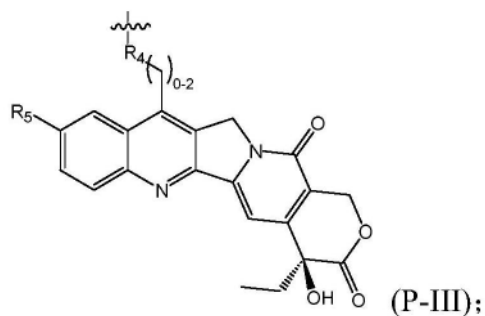
(P-II);



[0065] P选自由P-I至P-IV组成的组:



(P-II);



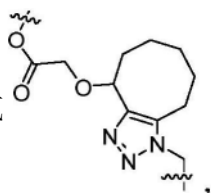
[0066] R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中v是从0至12的整数;

[0067] R_2 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中v是从0至12的整数;

[0068] R_3 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$ 和 $-CO-(CH_2)_v-O-COCH_3$,其中v是从0至12的整数;

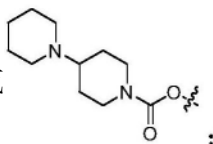
[0069] R_4 是 $-NH-$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)-SO_2CH_3$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)-(CH_2)_v-OH$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)-CO-CH_2-NH_2$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)-(CH_2)_v-O-CH_2-NH-CO-CH_2-NH_2$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)-CO-$

CH(NH₂) - (CH₂)_v - 苯基) 或



其中v是从0至12的整数；

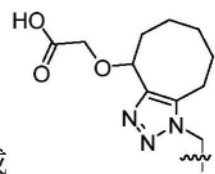
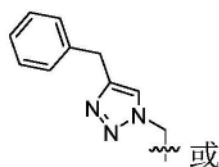
[0070] R₅是H、-OH、-OCH₃或



；

[0071] R₆是氢、-C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-CH₂-苯基、-(CH₂)_v-NMe-CH₂-苯基-OMe、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-CCH₃、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-CO-CH

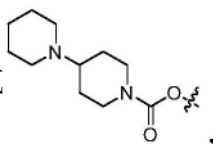
(NH₂) - (CH₂)_v - NH₂、-(CH₂)_v - NH - CO - CH(NH₂) - (CH₂)_v - COOH、



其

中v独立地是从0至12的整数；

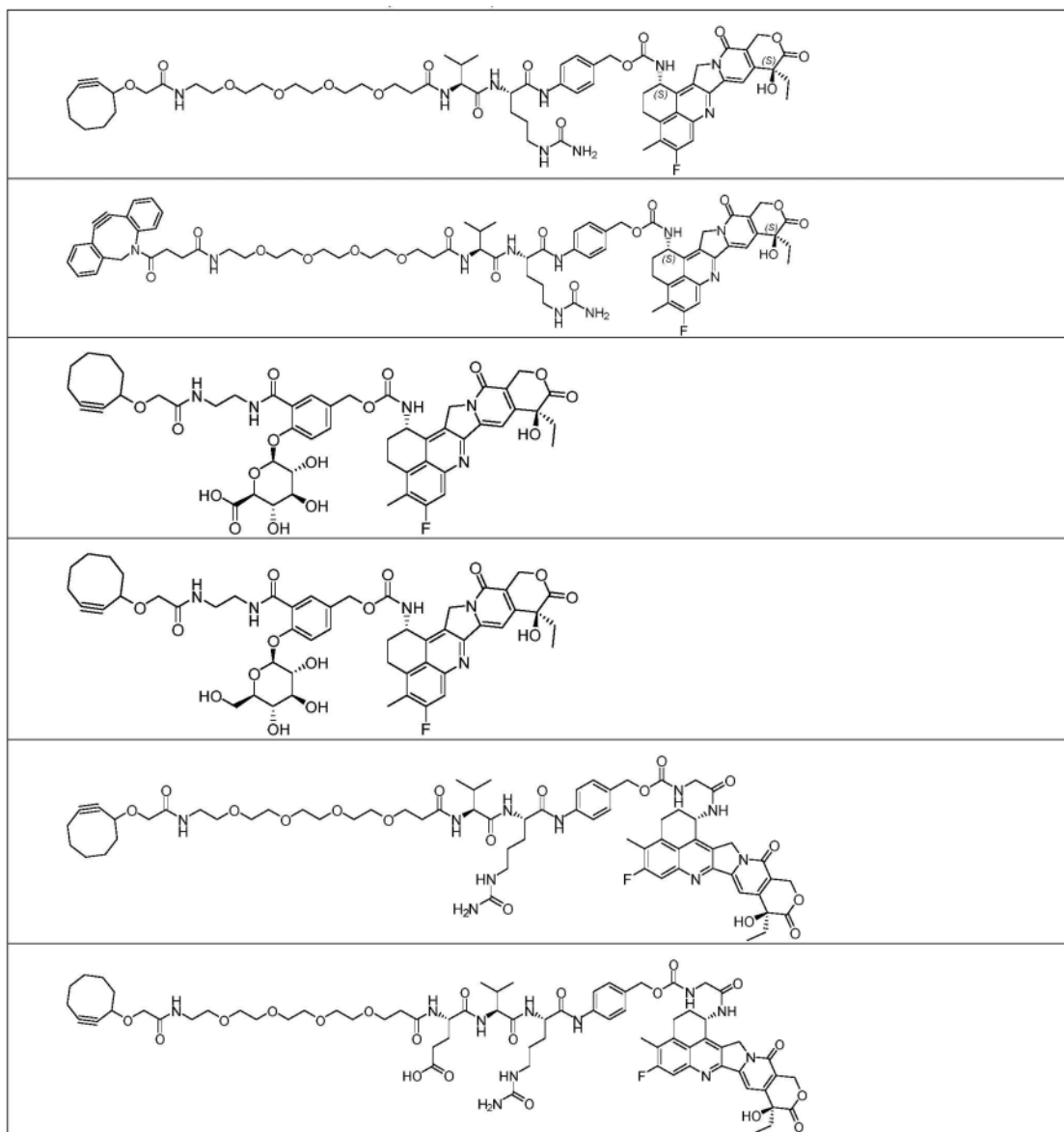
[0072] R₇是H、-OH、-OCH₃或



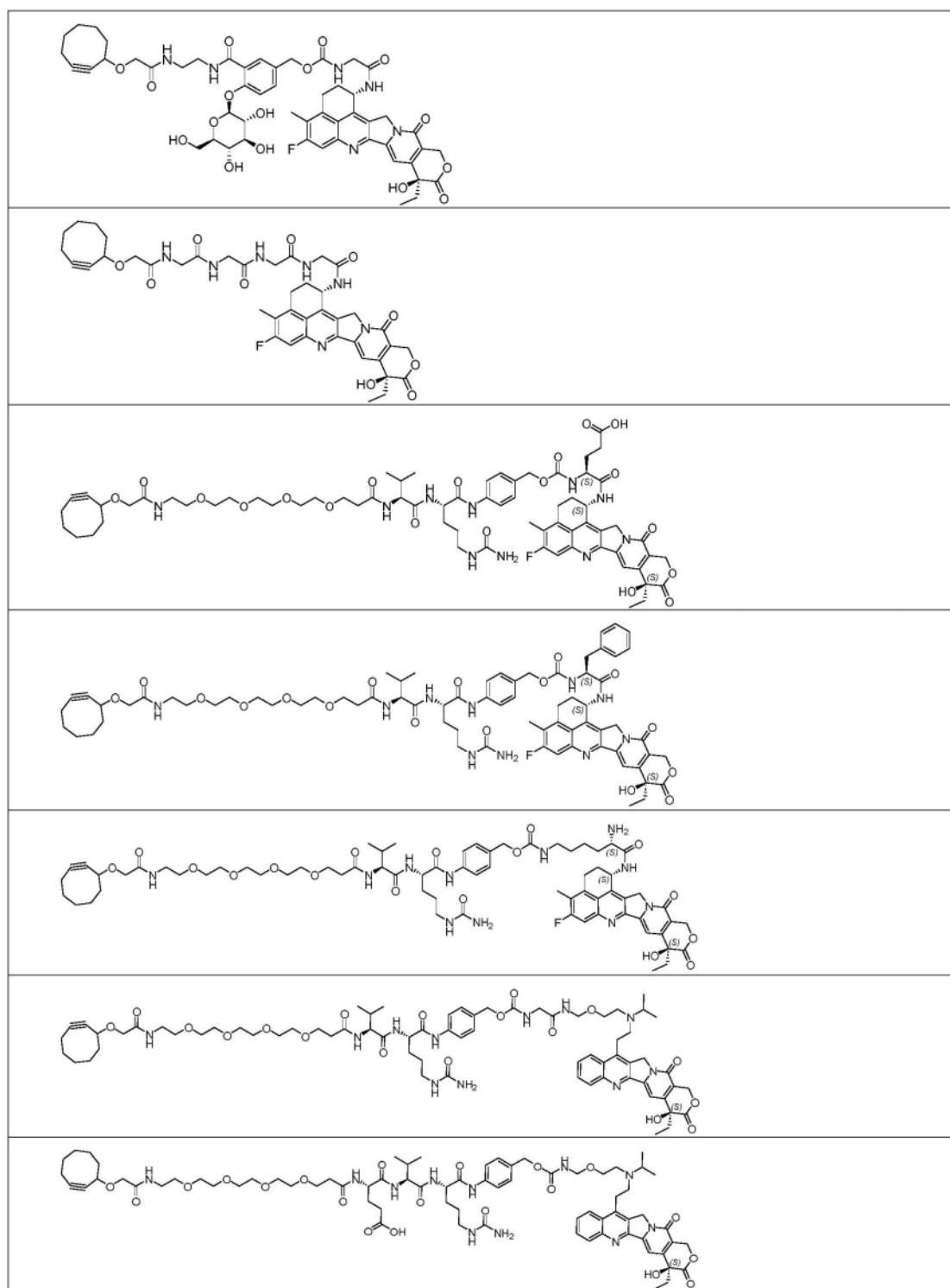
或其药学上可接受的盐。

[0073] 在一种实施方案中,根据式(A1k-L2-P)的化合物选自由以下组成的组:

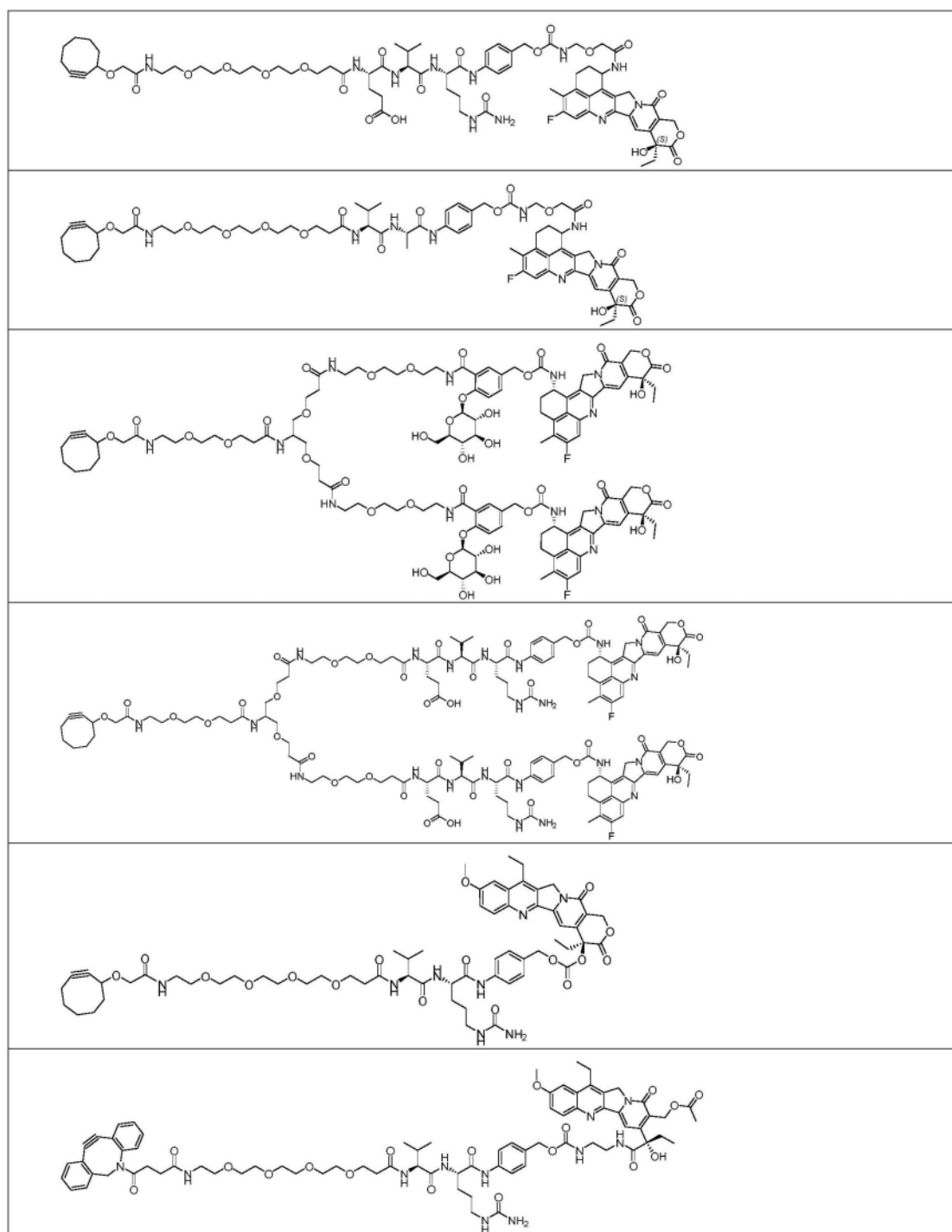
[0074]



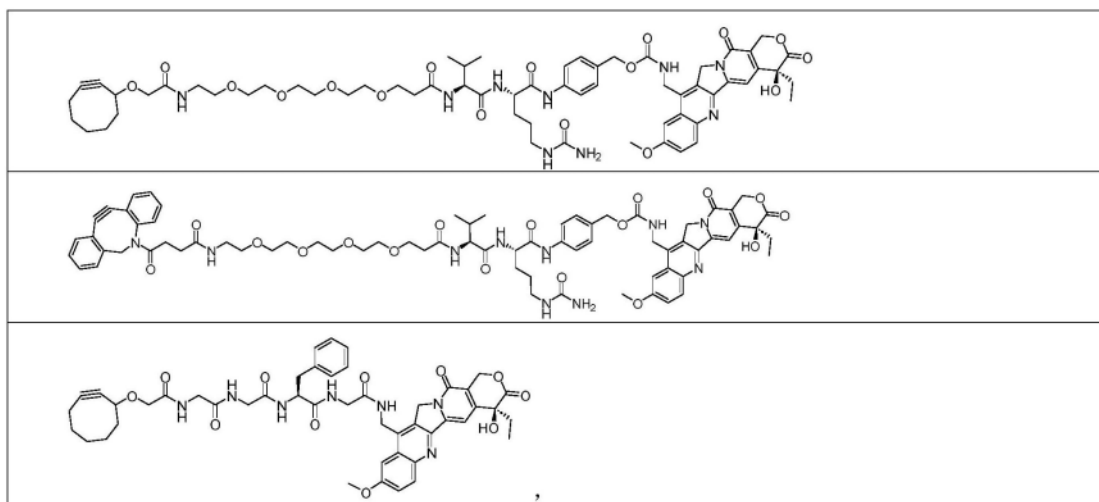
[0075]



[0076]



[0077]



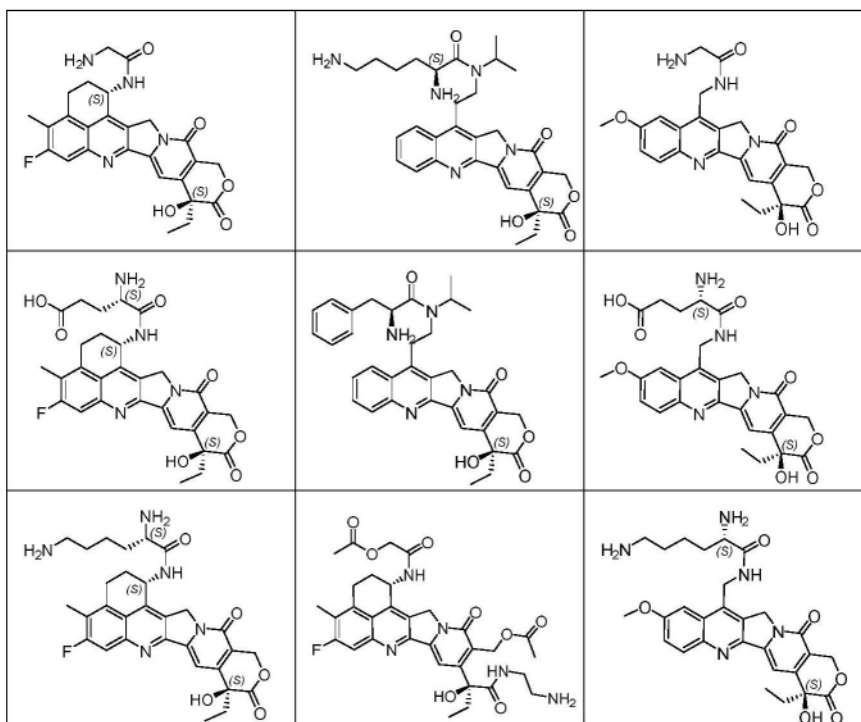
[0078] 或其药学上可接受的盐。

[0079] 在又另一个方面,本公开内容提供了一种组合物,包括根据以上实施方案中任一项所述的化合物的群体,具有约0.5至约12.0的药物-抗体比(drug-antibody ratio,DAR)。

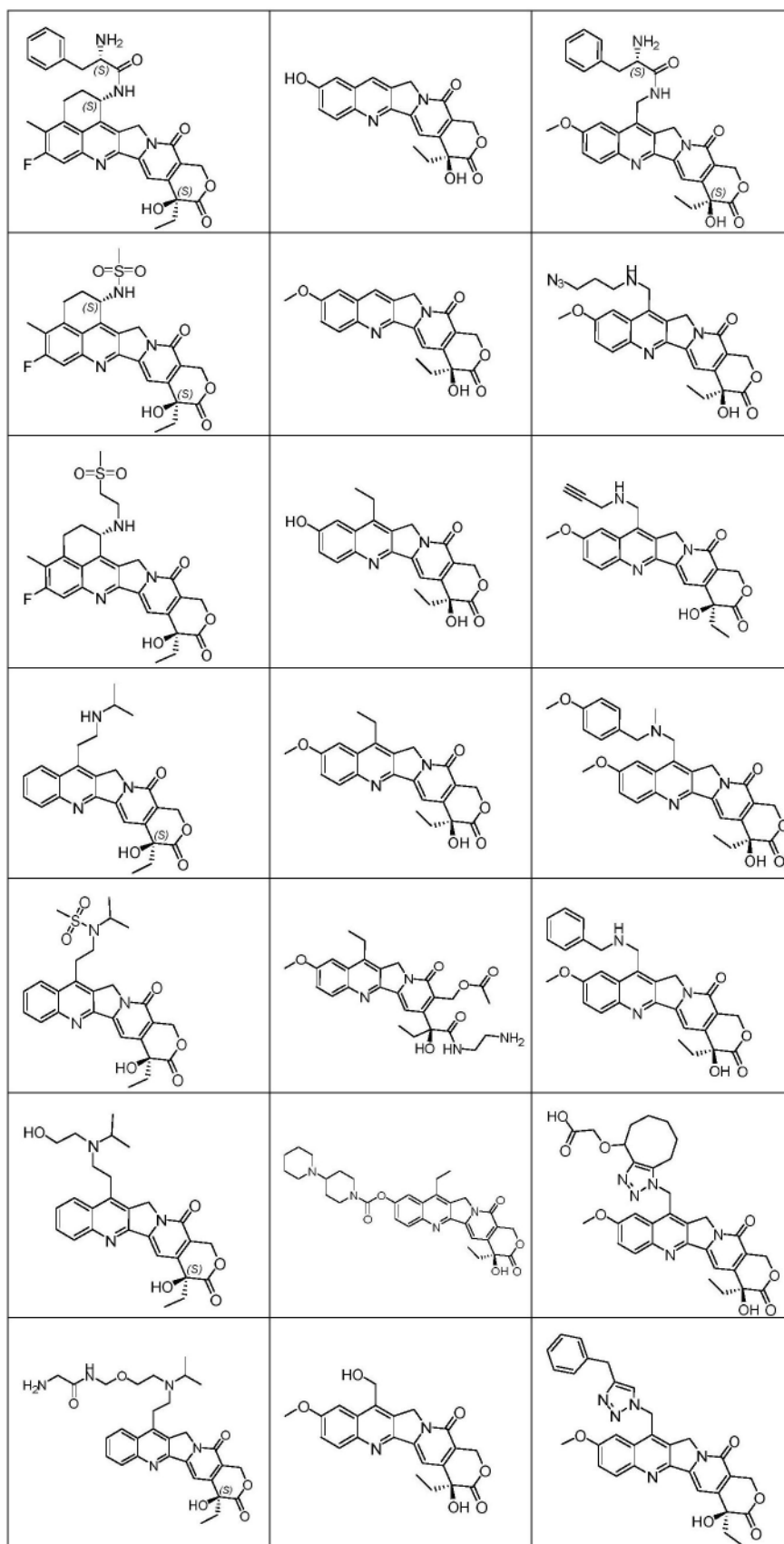
[0080] 在一种实施方案中,化合物的群体具有约1.0至约2.5的DAR。在一种实施方案中,化合物的群体具有约2的DAR。在一种实施方案中,化合物的群体具有约3.0至约4.5的DAR。在一种实施方案中,化合物的群体具有约4的DAR。在一种实施方案中,化合物的群体具有约6.5至约8.5的DAR。在一种实施方案中,化合物的群体具有约8的DAR。

[0081] 在又另一个方面,本公开内容提供了具有选自由以下组成的组的结构的化合物:

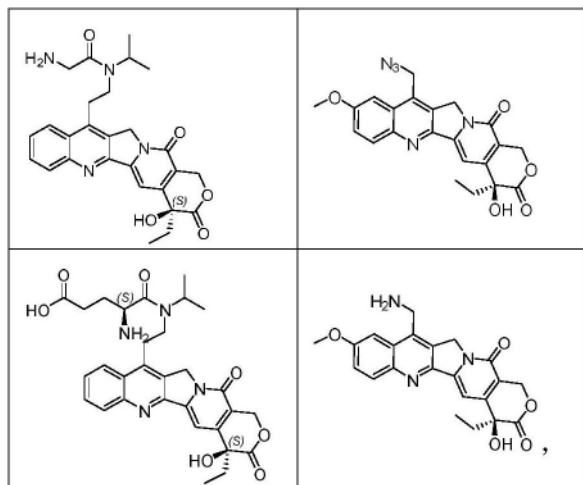
[0082]



[0083]



[0084]



[0085] 或其药学上可接受的盐。

[0086] 在另一个方面,本公开内容提供一种药物组合物,包括根据以上实施方案中任一项所述的化合物以及稀释剂、载体和/或赋形剂。

[0087] 在另一个方面,本公开内容提供了一种治疗肿瘤和/或癌症的方法,包括使肿瘤和/或癌症与根据以上实施方案中任一项所述的化合物接触。

[0088] 在另一个方面,本公开内容提供了一种治疗有相应需要的受试者的状况的方法,包括向受试者施用治疗有效量的根据以上实施方案中任一项所述的化合物或根据以上实施方案中任一项所述的组合物。

[0089] 在一种实施方案中,状况是癌症。在一种实施方案中,癌症选自由以下组成的组:乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肝癌或脑癌。在一种实施方案中,状况是HER2+乳腺癌。

[0090] 在另一个方面,本公开内容提供了一种将化合物选择性地递送到细胞中的方法,其中化合物是根据以上实施方案中任一项所述的化合物。

[0091] 在另一个方面,本公开内容提供了一种用化合物选择性地靶向细胞表面上的抗原的方法,其中化合物是根据以上实施方案中任一项所述的化合物。

[0092] 在一种实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一种实施方案中,细胞是人类细胞。在一种实施方案中,细胞是癌细胞。

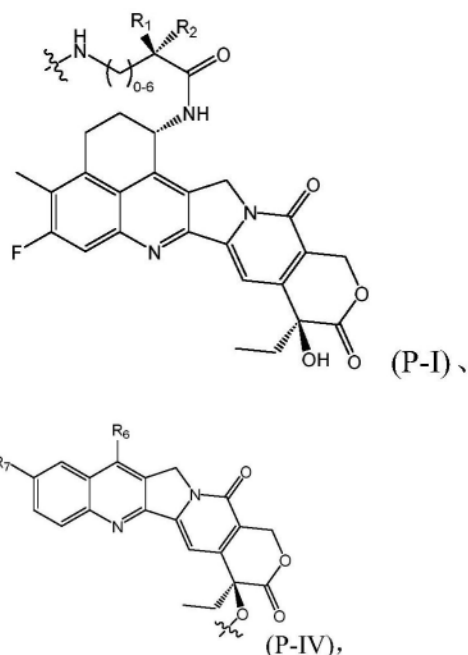
[0093] 在一种实施方案中,癌细胞选自由以下组成的组:乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、肺癌细胞、肝癌细胞或脑癌细胞。

[0094] 在另一个方面,本公开内容提供了一种产生具有根据式(A)的结构的化合物的方法:

[0095] $BA-(L1-B-L2-P)_n(A)$,

[0096] 其中BA是抗体或其抗原结合片段;L1是与BA的谷氨酰胺残基的侧链共价结合的第一接头;B是包括三唑的部分;L2是与P共价结合的第二接头,其中

[0097] P是选自由P-I至P-IV组成的组的抗肿瘤剂:



[0098] R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

[0099] R_2 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

[0100] R_3 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$ 和 $-CO-(CH_2)_v-O-COCH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

[0101] R_4 是 $-NH-$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-SO_2CH_3)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-(CH_2)_v-OH)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-(CH_2)_v-O-CH_2-NH-CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2)$ 、 $-N(C_{1-6}烷基)(-CO-$

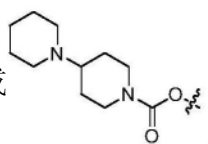
$CH(NH_2)-(CH_2)_v$ -苯基)或 其中 v 是从0至12的整数;

[0102] R_5 是H、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 或 ;

[0103] R_6 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CH_2$ -苯基、 $-(CH_2)_v-NMe-CH_2$ -苯基-OMe、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-CCH$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH$

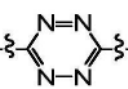
$(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH$ 、 或 其

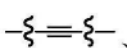
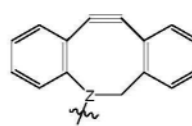
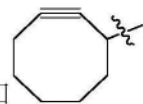
中 v 独立地是从0至12的整数;

[0104] R_7 是 H、-OH、-OCH₃ 或  , 其中所述方法包括以下步骤:

[0105] a) 在存在转谷氨酰胺酶的情况下, 使包括至少一个谷氨酰胺残基的 BA 与化合物 L1-B' 接触,

[0106] b) 使步骤 a) 的产物与一个或更多个当量的化合物 B''-L2-P 接触, 其中所述基团 B'' 能够与所述基团 B' 共价附接,

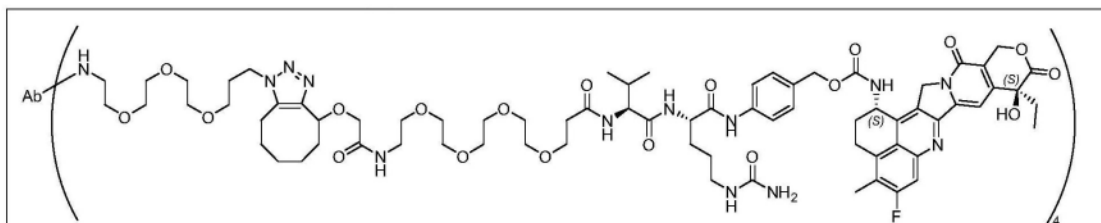
[0107] 其中所述基团 B' 和 B'' 中的一个选自 -N₃ 和  , 并且所述基团 B' 和 B'' 中的另

一个选自 、 和  , 其中 Z 是 C 或 N; 以及

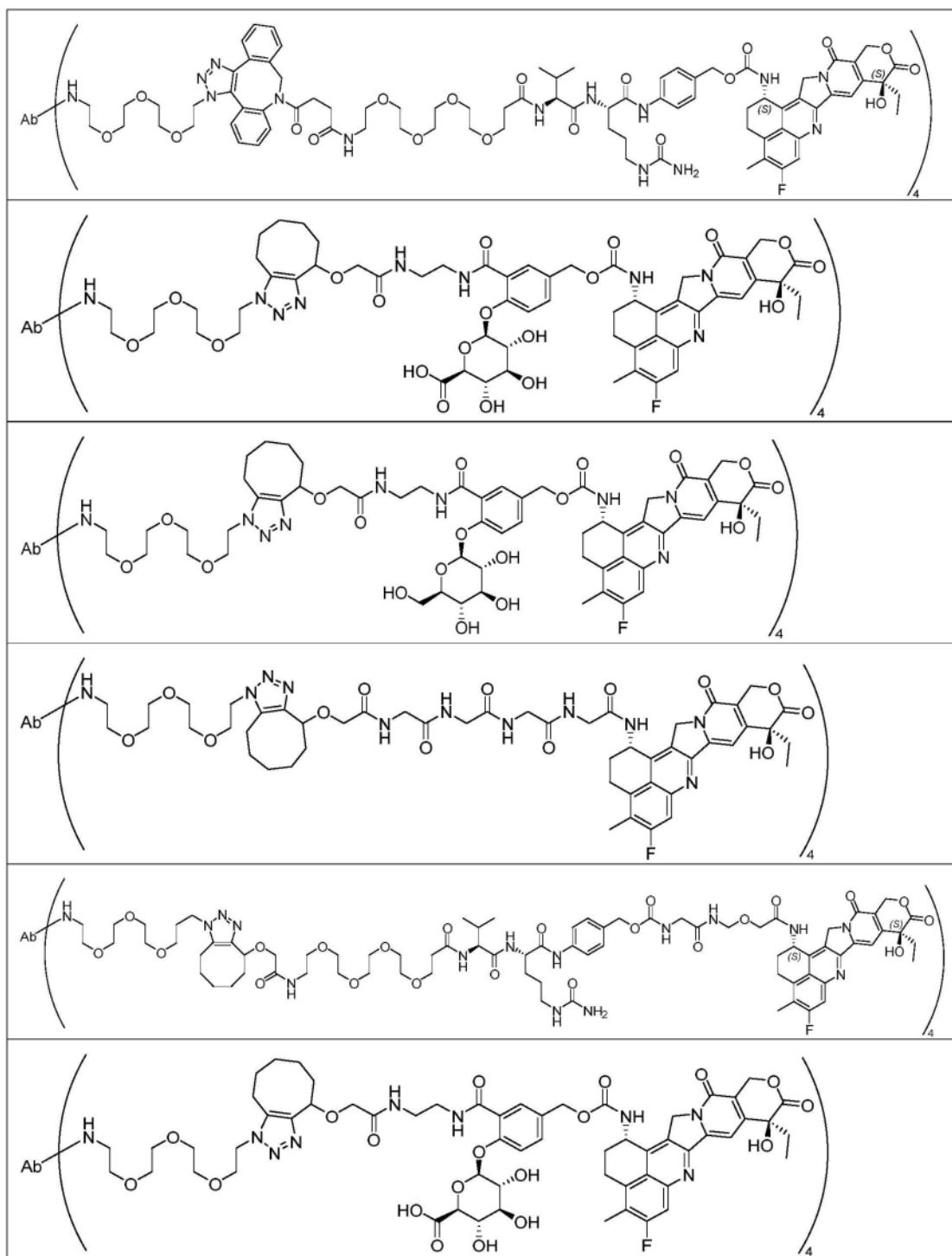
[0108] c) 分离所产生的式 (A) 的化合物。

[0109] 在一种实施方案中, 式 (A) 的化合物具有选自由以下组成的组的结构:

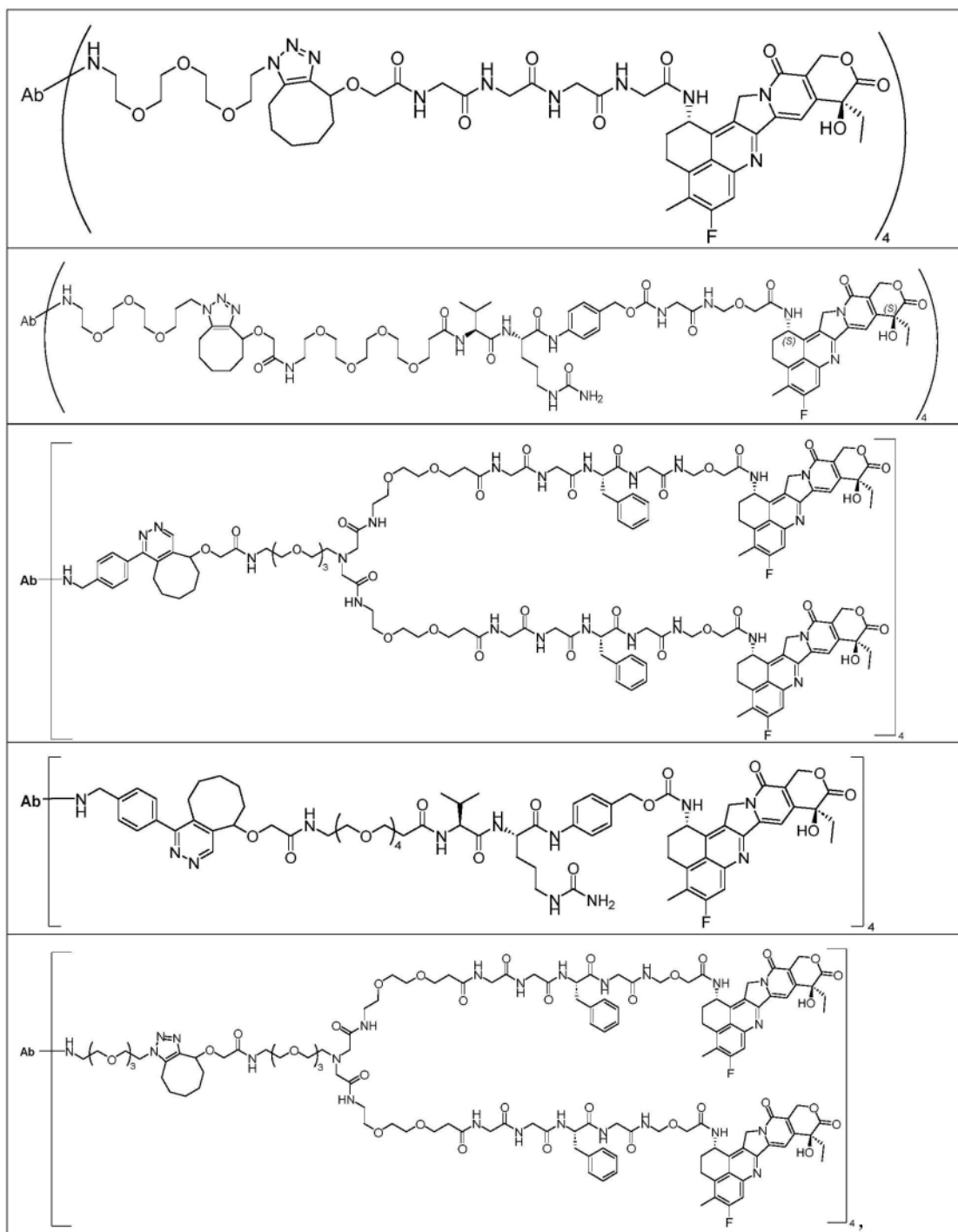
[0110]



[0111]



[0112]



[0113] 或其药学上可接受的盐。

[0114] 在阅读本公开内容的以下详细描述 (包括所附权利要求) 之后,本公开内容的这些和其他方面对于本领域技术人员来说将变得明显。

[0115] 附图简述

[0116] 本专利或申请文件包含至少一幅以彩色制作的图。具有彩色附图的本专利或专利申请公布的副本将在依请求和支付必要费用后由主管局提供。

[0117] 图1是根据本公开内容的实施方案的ADC的两步位点特异性生成的示意图。

[0118] 图2是游离依喜替康、对照ADC曲妥珠单抗德鲁替康 (deruxitecan) (DS8201a) 和根据本公开内容的两种ADC在SK-BR-3细胞中的EC₅₀值和杀伤最大值%的图。

[0119] 图3是游离依喜替康和根据本公开内容的五种ADC在SK-BR-3细胞中的EC₅₀值和杀伤最大值%的图。

[0120] 详述

[0121] 本文公开了本公开内容的详细实施方案;然而,应当理解,所公开的实施方案仅仅是可以以各种形式体现的本公开内容的说明。此外,结合本公开内容的各种实施方案给出的每个实例旨在是说明性的,而不是限制性的。因此,本文公开的特定结构和功能细节不应被解释为限制性的,而仅仅是作为教导本领域技术人员以不同方式采用本公开内容的代表性基础。

[0122] 定义

[0123] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与由本公开内容所属的领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0124] 除非上下文另外清楚地指明,否则如本说明书和所附的权利要求书中使用的单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述/该(the)”包括复数指示物。因此,例如,提及“一种方法”包括本文描述的和/或对于本领域技术人员而言在阅读本公开内容后将变得明显的一种或更多种方法,和/或类型的步骤。

[0125] 术语状态、紊乱或状况的“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”包括:(1)防止、延迟或降低在可能罹患或易患状态、紊乱或状况但尚未经历或表现出状态、紊乱或状况的临床或亚临床症状的受试者中发展状态、紊乱或状况的至少一种临床或亚临床症状的发病率和/或出现的可能性;或者(2)抑制状态、紊乱或状况,即,阻止、降低或延迟疾病或其复发或其至少一种临床或亚临床症状的发展;或者(3)缓解疾病,即,引起状态、紊乱或状况或其临床或亚临床症状的至少一种的消退。对待治疗的受试者的益处为在统计学上显著的或至少对患者或对医师为可感知的。在一些实施方案中,治疗包括以间接影响疾病的这样的方式消融细胞的方法。在某些实施方案中,治疗包括在疗法前耗尽免疫细胞作为造血调节方案。

[0126] 如本文使用的“受试者”或“患者”或“个体”或“动物”是指人类、兽医学动物(例如,猫、犬、牛、马、绵羊、猪等)和疾病的实验动物模型(例如,小鼠、大鼠)。在优选的实施方案中,受试者是人类。

[0127] 如本文使用的,适用于剂量或量的术语“有效”指在向有相应需要的受试者施用后足以产生期望活性的化合物或药物组合物的量。注意,在施用活性成分的组合时,组合物的有效量可以包括或不包括每一种成分单独施用时将有效的量。所需的确切量将根据受试者的物种、年龄和一般状况、被治疗状况的严重程度、采用的一种特定药物或更多种特定药物、施用的模式等因受试者而异。

[0128] 如结合本公开内容的组合物使用的短语“药学上可接受的盐”是指适于向患者施用的任何盐。合适的盐包括但不限于在Berge等人,“Pharmaceutical Salts”, J.Pharm.Sci., 1977, 66:1中公开的那些,该文献通过引用并入本文。盐的实例包括但不限于酸来源的盐、碱来源的盐、有机盐、无机盐、胺盐和碱金属盐或碱土金属盐,包括但不限于钙盐、镁盐、钾盐、钠盐,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等的盐。在一些实例中,本文描述的有效载荷(例如,本文描述的利福霉素类似物)包括叔胺,其中叔胺中的氮原子是有效载荷通过其与接头或接头-间隔物

键合的原子。在这样的情况下,与有效载荷的叔胺键合在接头-有效载荷分子中产生季胺。季胺上的正电荷可以被反荷离子(例如氯、溴、碘或任何其他合适地带电荷的部分,诸如本文描述的那些)平衡。

[0129] 范围在本文可以表示为从“约”或“大约”一个特定值,和/或至“约”或“大约”另一个特定值。在表示这样的范围时,另一种实施方案包括从一个特定值和/或至另一个特定值。

[0130] “包括/包含(comprising)”或“包括/包含(containing)”或“包括/包含(including)”意指,至少被指名的化合物、要素、颗粒或方法步骤存在于组合物或物品或方法中,但不排除其他化合物、材料、颗粒或方法步骤的存在,即使其他这样的化合物、材料、颗粒或方法步骤具有与被指名的相同的功能。

[0131] 本公开内容的化合物包括本文一般描述的化合物,并且通过本文公开的类别、亚类和种类进一步说明。如本文使用的,除非另外指示,否则以下定义应适用。为了本公开内容的目的,化学元素根据元素周期表,CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics,第75版来标识。另外地,有机化学的一般原理在以下中描述:“Organic Chemistry”,Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999,和“March's Advanced Organic Chemistry”,第5版,编著:Smith,M.B.和March,J.,John Wiley&Sons,New York:2001,所述文献的全部内容通过引用特此并入。

[0132] 如本文使用的,术语“烷基(alkyl)”被赋予其在本领域中的普通含义,并且可以包括饱和脂肪族基团,包括直链烷基基团、支链烷基基团、环烷基(脂环)基团、烷基取代的环烷基基团和环烷基取代的烷基基团。在某些实施方案中,直链烷基或支链烷基在其主链中具有约1个-20个碳原子(例如,直链为 C_1-C_{20} ,支链为 C_2-C_{20}),并且可选择地,约1个-10个碳原子或约1个至6个碳原子。在一些实施方案中,环烷基环在其环结构中具有约3-10个碳原子,其中这样的环是单环或双环的,并且可选地在环结构中具有约5个、6个或7个碳。在一些实施方案中,烷基基团可以是低级烷基基团,其中低级烷基基团包括1-4个碳原子(例如 C_1-C_4 对于直链低级烷基)。

[0133] 如本文使用的,术语“烯基”是指具有一个或更多个双键的如本文定义的烷基基团。

[0134] 如本文使用的,术语“炔基”是指具有一个或更多个三键的如本文定义的烷基基团。

[0135] 术语“杂原子”意指氧、硫、氮、磷或硅(包括氮、硫、磷或硅的任何氧化形式;任何碱性氮的季铵化形式;或杂环的可取代氮)中的一种或更多种。

[0136] 术语“卤素”意指F、Cl、Br或I;术语“卤化物”是指卤素基团或取代基,即-F、-Cl、-Br或-I。

[0137] 本公开内容的术语“加合物”(例如“基团B'的加合物”)涵盖包括加成反应(例如基团B'的加成反应)的产物的任何部分,与产生该部分所采取的合成步骤无关。

[0138] 术语“共价附接”意指共价键的形成,即涉及两个原子之间共有一个或更多个电子对的化学键。共价键合可以包括不同的相互作用,包括但不限于 σ 键合、 π -键合、金属对金属键合、抓桥相互作用(agostic interactions)、弯曲键和三中心双电子键。在第一基团被称为与第二基团“能够共价附接”时,这意味着第一基团能够例如通过使用催化剂或在特定的

反应条件下与第二基团直接或间接形成共价键。能够彼此共价附接的基团的非限制性实例可以包括例如胺和羧酸(形成酰胺键)、二烯和亲二烯体(经由Diels-Alder反应)以及叠氮化物和炔烃(经由1,3-环加成反应形成三唑)。

[0139] 如本文描述的,本公开内容的化合物可以包括“任选地取代的”部分。通常,术语“取代的”,无论前面是否有术语“任选地”,都意味着指定部分的一个或多个氢被合适的取代基取代。除非另外指示,否则“任选地取代的”基团可以在该基团的每个可取代位置处具有合适的取代基,并且在任何给定结构中的多于一个位置可以被选自特定组的多于一个取代基取代时,该取代基可以在每个位置处相同或不同。本公开内容所设想的取代基组合优选地是那些导致形成稳定或化学上可行的化合物的组合。如本文使用的术语“稳定的”是指在经历允许它们的产生、检测以及在某些实施方案中允许它们的回收、纯化和用于本文公开的一个或多个目的使用的条件时,基本上没有改变的化合物。

[0140] 除非另外说明,否则本文描绘的结构也意指包括结构的所有异构体(例如,对映异构体、非对映异构体和几何(或构象))形式;例如,每个不对称中心的R和S构型,(Z)和(E)双键异构体,以及(Z)和(E)构象异构体。因此,本发明化合物的单个立体化学异构体以及对映异构体、非对映异构体和几何(或构象)混合物在本公开内容的范围内。

[0141] 除非另外说明,否则本公开内容的化合物的所有互变异构形式都在本公开内容的范围内。

[0142] 另外地,除非另外说明,否则本文描绘的结构还意指包括仅在一个或多个同位素富集的原子的存在方面不同的化合物。例如,除了用氘或氚替代氢,或用 ^{11}C -或 ^{13}C -或 ^{14}C -富集的碳替代碳之外具有本发明结构的化合物在本公开内容的范围内。

[0143] 还应当理解,提及一个或多个方法步骤并不排除存在另外的方法步骤或明确标识的那些步骤之间的中间方法步骤。相似地,还应当理解,提及装置或系统中的一个或多个组件并不排除存在另外的组件或明确标识的那些组件之间的中间组件。

[0144] 除非另外说明,本公开内容的化合物及其盐的所有结晶形式也在本公开内容的范围内。本公开内容的化合物可以以多种无定形和结晶形式分离,包括但不限于无水、水合、非溶剂化或溶剂化的形式。示例性水合物包括半水合物、一水合物、二水合物等。在一些实施方案中,本公开内容的化合物是无水和非溶剂化的。“无水”意味着该化合物的结晶形式在晶格(crystal lattice)结构中基本上不含结合水,即该化合物不形成结晶水合物。

[0145] 如本文使用的,“结晶形式”意指是指结晶物质的某种晶格(lattice)构型。同一物质的不同结晶形式通常具有不同的结晶晶格(例如,晶胞),这导致每种结晶形式特征性的不同的物理特性。在一些情况下,不同的晶格构型具有不同的水或溶剂含量。不同的结晶晶格可以通过固态表征方法诸如X射线粉末衍射(PXRD)来鉴定。其他表征方法,诸如差示扫描量热法(DSC)、热重分析(TGA)、动态蒸汽吸附(DVS)、固态NMR等,进一步帮助鉴定结晶形式以及帮助确定稳定性和溶剂/水含量。

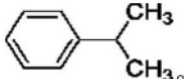
[0146] 物质的结晶形式包括溶剂化(例如,水合)和非溶剂化(例如,无水)形式两者。水合形式是在结晶晶格中包括水的结晶形式。水合形式可以是化学计量的水合物,其中水以一定的水/分子比存在于晶格中,诸如半水合物、一水合物、二水合物等。水合形式也可以是非化学计量的,其中水含量是可变的并且取决于外部条件,诸如湿度。

[0147] 在一些实施方案中,本公开内容的化合物是基本上分离的。“基本上分离”意味着

特定化合物与杂质至少部分地分离。例如,在一些实施方案中,本公开内容的化合物包括少于约50%、少于约40%、少于约30%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、少于约5%、少于约2.5%、少于约1%或少于约0.5%的杂质。杂质通常包括不是基本上分离的化合物的任何东西,包括例如其他结晶形式和其他物质。

[0148] 某些基团、部分、取代基和原子用波浪线描绘。波浪线可以与一个键或更多个键相交或对一个键或更多个键加帽。波浪线指示基团、部分、取代基或原子通过其键合的原子。

例如,被描绘为  的丙基基团取代的苯基基团

[0149] 具有以下结构: .

[0150] 表述“HER2”或“人类表皮生长因子受体2”是指人类表皮生长因子受体家族的成员。该蛋白也称为NEU;NGL;HER2;TKR1;CD340;HER-2;MLN 19;HER-2/neu。HER2可以指以NCBI登录号NP_004439.2示出的氨基酸序列。已经显示该癌基因的扩增或过表达在某些侵袭性类型乳腺癌的发展和进展中起重要作用。近年来,该蛋白已经成为大约30%乳腺癌患者的重要生物标志物和治疗靶。除非明确指定为来自非人类物种,否则本文对蛋白、多肽和蛋白片段的所有提及意图是指相应蛋白、多肽或蛋白片段的人类形式。因此,除非指定为来自非人类物种,例如“小鼠HER2”、“猴HER2”等,否则表述“HER2”意指人类HER2。

[0151] 短语“结合HER2的抗体”或“抗HER2抗体”包括特异性识别HER2的抗体及其抗原结合片段。

[0152] 短语“抗HER2/HER2”抗体(例如“抗HER2/HER2双特异性抗体”)包括特异性识别两种不同HER2表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,双特异性抗体及其抗原结合片段包括特异性结合人类HER2的第一表位的第一抗原结合结构域(D1)和特异性结合人类HER2的第二表位的第二抗原结合结构域(D2)。

[0153] 如本文中使用的表述“STEAP2”是指前列腺2(prostate 2)的六次跨膜上皮抗原。STEAP2是在前列腺上皮细胞中高度表达的完整的六次跨膜蛋白,并且是前列腺癌的细胞表面标志物,例如发现STEAP2在LNCaP前列腺细胞系上以显著水平表达(Porkka,等人Lab Invest 2002,82:1573-1582)。STEAP2(UniProtKB/Swiss-Prot:Q8NFT2.3)是由位于人类的染色体区域7q21处的STEAP2基因编码的490个氨基酸的蛋白。

[0154] 如本文使用的,“结合STEAP2的抗体”或“抗STEAP2抗体”包括特异性识别STEAP2的抗体及其抗原结合片段。

[0155] 短语“结合MET的抗体”或“抗MET抗体”包括特异性识别MET的抗体及其抗原结合片段。如本文中使用的表述“MET”、“c-Met”等是指人类跨膜受体酪氨酸激酶。

[0156] 短语“抗MET/MET”抗体(例如“抗MET/MET双特异性抗体”)包括特异性识别两种不同MET表位的抗体及其抗原结合片段。在一些实施方案中,双特异性抗体及其抗原结合片段包括特异性结合人类MET的第一表位的第一抗原结合结构域(D1)和特异性结合人类MET的第二表位的第二抗原结合结构域(D2)。

[0157] 本公开内容中使用的所有氨基酸缩写是如37C.F.R. §1.822(B)(J)中示出的被美国专利商标局(the United States Patent and Trademark Office)接受的那些。

[0158] 术语“蛋白”意指具有经由酰胺键共价连接的多于20个氨基酸的任何氨基酸聚合物。如本文使用的,“蛋白”包括生物治疗蛋白、研究或疗法中使用的重组蛋白、trap蛋白和其他Fc融合蛋白、嵌合蛋白、抗体、单克隆抗体、人类抗体、双特异性抗体、抗体片段、纳米抗体、重组抗体嵌合体、scFv融合蛋白、细胞因子、趋化因子、肽激素等。蛋白可以使用基于重组细胞的产生系统来产生,诸如昆虫杆状病毒(baculovirus)系统、酵母系统(例如毕赤酵母属物种(*Pichia* sp.))、哺乳动物系统(例如CHO细胞和CHO衍生物如CHO-K1细胞)。

[0159] 除非明确指定为来自非人类物种,否则本文对蛋白、多肽和蛋白片段的所有提及意图是指相应蛋白、多肽或蛋白片段的人类形式。因此,除非指定为来自非人类物种,例如“小鼠STEAP2”、“猴STEAP2”等,否则表述“STEAP2”意指人类STEAP2。

[0160] 抗体的氨基酸序列可以使用任何已知的编号方案进行编号,包括由以下描述的那些:Kabat等人, (“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,1997, *J.Mol.Biol.*, 273:927-948 (“Chothia”编号方案);MacCallum等人,1996, *J.Mol.Biol.* 262:732-745 (“Contact”编号方案);Lefranc等人, *Dev.Comp.Immunol.*, 2003, 27:55-77 (“IMGT”编号方案);以及Honegge和Pluckthun, *J.Mol.Biol.*, 2001, 309:657-70 (“Aho”编号方案)。除非另外指定,否则本文使用的编号方案是Kabat编号方案。然而,编号方案的选择并不意图暗示序列中不存在的差异,并且本领域技术人员可以通过检查一种或更多种抗体的氨基酸序列容易地确认序列位置。除非另外说明,否则在提及抗体重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号方案”(例如,如Kabat等人的报道,同上)。

[0161] 术语“谷氨酰胺酰基修饰的抗体”是指本公开内容的具有从谷氨酰胺侧链至伯胺化合物的至少一个共价连接的抗体。在特定实施方案中,伯胺化合物通过谷氨酰胺侧链上的酰胺连接来连接。在某些实施方案中,谷氨酰胺是内源谷氨酰胺。在其他实施方案中,谷氨酰胺是通过多肽工程化(例如,经由多肽上的氨基酸缺失、插入、取代或突变)而具有反应性的内源谷氨酰胺。在另外的实施方案中,谷氨酰胺是用含酰基供者谷氨酰胺的标签(例如,含谷氨酰胺的肽标签、Q-标签或TGase识别标签)工程化的多肽。

[0162] 术语“TGase识别标签”是指包括接受者谷氨酰胺残基的氨基酸序列,并且该接受者谷氨酰胺残基在掺入(例如,附加至)多肽序列时,在合适的条件下,被TGase识别,并且通过氨基酸序列内的氨基酸侧链与反应配偶体之间的反应导致TGase的交联。识别标签可以是不天然存在于包括TGase识别标签的多肽中的肽序列。在一些实施方案中,TGase识别标签包括至少一个Gln。在一些实施方案中,TGase识别标签包括氨基酸序列XXQX (SEQ ID NO: 1935),其中X是任何氨基酸(例如,常规氨基酸Leu、Ala、Gly、Ser、Val、Phe、Tyr、His、Arg、Asn、Glu、Asp、Cys、Gln、Ile、Met、Pro、Thr、Lys或Trp或非常规氨基酸)。在一些实施方案中,含酰基供者谷氨酰胺标签包括选自以下组成的组的氨基酸序列:LLQGG (SEQ ID NO: 1936)、LLQG (SEQ ID NO:1937)、LSLSQG (SEQ ID NO:1938)、gGGLLQGG (SEQ ID NO:1939)、gLLQG (SEQ ID NO:1940)、LLQgSPLAQSHGG (SEQ ID NO:1941)、gLLQGGG (SEQ ID NO:1942)、gLLQGG (SEQ ID NO:1943)、gLLQ (SEQ ID NO:1944)、LLQLLQGA (SEQ ID NO:1945)、LLQGA (SEQ ID NO:1946)、LLQYQGA (SEQ ID NO:1947)、LLQSG (SEQ ID NO:1948)、LLQYQG (SEQ ID NO:1949)、LLQLLQG (SEQ ID NO:1950)、SLLQG (SEQ ID NO:1951)、LLQLQ (SEQ ID NO:1952)、LLQLLQ (SEQ ID NO:1953)和LLQGR (SEQ ID NO:1954)。参见例如W02012059882,该文献全部内容并入本文。

[0163] 如本文使用的,术语“抗体”意指包括与特定抗原特异性结合或相互作用的至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包括包含通过二硫键相互连接的四条多肽链即两条重(H)链和两条轻(L)链的免疫球蛋白分子及其多聚体(例如,IgM)。每条重链包括重链可变区(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包括三个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包括轻链可变区(本文缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域(CL1)。VH区和VL区可以还细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,所述高变区间插着称为框架区(FR)的更保守区域。每个VH和VL包括3个CDR和4个FR,按以下顺序从氨基末端向羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在不同的实施方案中,抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人类种系序列相同,或者可以是天然或人工修饰的。氨基酸共有序列可以基于两个或更多个CDR的并列(side-by-side)分析来定义。

[0164] 如本文使用的术语“抗体”也包括完整抗体分子的抗原结合片段。如本文中使用的术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原形成复合物的任何天然存在的、酶促可获得的、合成的或遗传工程化的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可以使用任何合适的标准技术从例如完整抗体分子中获得,所述标准技术诸如蛋白水解消化或重组基因工程技术,包括操作和表达编码抗体可变结构域和任选地恒定结构域的DNA。这样的DNA是已知的和/或容易从例如,商业来源、DNA文库(包括,例如,噬菌体抗体文库)可得,或者可以合成。可以对DNA进行测序并且如下进行操作:化学或通过使用分子生物学技术,例如,将一个或更多个可变结构域和/或恒定结构域排列成合适的构型,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0165] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;和(vii) 由模拟抗体的高变区(例如,分离的互补决定区(CDR)诸如CDR3肽)或受约束的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成的最小识别单元。其他工程化分子,诸如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR接枝抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(nanobody)(例如,单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(small modular immunopharmaceuticals, SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也被涵盖在如本文使用的表述“抗原结合片段”中。

[0166] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何尺寸或氨基酸组成,并且通常将包含与一个或更多个框架序列相邻或符合读框(in frame)的至少一个CDR。在具有与VL结构域相关的VH结构域的抗原结合片段中,VH结构域和VL结构域可以以任何合适的排列相对于彼此定位。例如,可变区可以是二聚体,并且包含VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。

[0167] 可选地,抗体的抗原结合片段可以包含单体VH或VL结构域。

[0168] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可以包含被共价连接至至少一个恒定结构域的至少一个可变结构域。可以存在于本说明书抗体的抗原结合片段中的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括:(i) VH-CH1;(ii) VH-CH2;(iii) VH-CH3;(iv) VH-CH1-CH2;(v) VH-CH1-CH2-CH3;(vi) VH-CH2-CH3;(vii) VH-CL;(viii) VL-CH1;(ix) VL-CH2;(x) VL-CH3;(xi) VL-CH1-CH2;(xii) VL-CH1-CH2-CH3;(xiii) VL-CH2-CH3;和(xiv) VL-CL。在可变结构域和恒定结构域的任何构型(包括本文列出的任何示例性构型)中,可变结构域和

恒定结构域可以彼此直接连接,或者可以通过完整或部分铰链区或接头区连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,这些氨基酸导致单个多肽分子中相邻可变结构域和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。

[0169] 此外,本说明书抗体的抗原结合片段可以包括以彼此和/或与一个或更多个单体VH结构域或VL结构域(例如,通过一个或更多个二硫键)非共价缔合的本文列出的可变结构域和恒定结构域构型中的任一种的同二聚体或异二聚体(或其他多聚体)。

[0170] 如与完整抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性的或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常将包括至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够与单独的抗原或与同一抗原上的不同表位特异性结合。任何多特异性抗体形式,包括本文公开的示例性双特异性抗体形式,都可以使用本领域可得的常规技术适于在本说明书抗体的抗原结合片段的上下文中使用。

[0171] 本说明书的抗体可以通过补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)发挥作用。“补体依赖性细胞毒性”(CDC)是指在存在补体的情况下,本说明书的抗体对表达抗原的细胞的裂解。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”(ADCC)是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体,并且从而导致靶细胞的裂解。CDC和ADCC可以使用本领域熟知且可得的测定来测量。(参见例如美国专利第5,500,362号和第5,821,337号以及Clynes等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 95:652-656)。抗体的恒定区在抗体固定补体并介导细胞依赖性细胞毒性的能力中是重要的。因此,抗体的同种型可以基于是否期望抗体介导细胞毒性来选择。

[0172] 在某些实施方案中,本说明书的抗体,例如抗HER2抗体或抗HER2/HER2双特异性抗体或抗MET抗体或抗MET/MET双特异性抗体或抗STEAP2抗体是人类抗体。如本文使用的,术语“人类抗体”意在包括具有来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本说明书的人类抗体可以包括不被人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),所述氨基酸残基例如在CDR中并且特别是在CDR3中。然而,如本文使用的术语“人类抗体”不意在包括其中来源于另一个哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经被接枝到人类框架序列上的抗体。

[0173] 在一些实施方案中,抗体可以是重组人类抗体。如本文中使用的术语“重组人类抗体”意图包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,诸如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(下文进一步描述)、从重组的组合人类抗体文库分离的抗体(下文进一步描述)、从对于人类免疫球蛋白基因而言是转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor等人(1992)Nucl.Acids Res.20:6287-6295)或通过包括将人类免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人类抗体具有来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,这样的重组人类抗体经历体外诱变(或,当使用人类Ig序列的转基因动物时,则经历体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的VH区和VL区的氨基酸序列是这样的序列,所述序列尽管来源于人类种系VH序列和VL序列并且与人类种系VH和VL序列相关,但可以不天然地存在于体内人类抗体种系库(human antibody germline repertoire)中。

[0174] 人类抗体可以以两种与铰链异质性相关的形式存在。在一种形式中,免疫球蛋白分子包括大约150kDa-160kDa的稳定的四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在第二种形式中,二聚体不经由链间二硫键连接,并且形成包括共价偶联的轻链和重链的约75kDa-80kDa的分子(半抗体)。即使在亲和纯化之后,这些形式也极难分离。第二种形式在多种完整IgG同种型中出现的频率是由于但不限于与抗体铰链区同种型相关的结构差异。人类IgG4铰链的铰链区中的单个氨基酸取代可以将第二种形式的出现(Angal等人(1993)Molecular Immunology 30:105)显著降低至通常使用人类IgG1铰链观察到的水平。本说明书涵盖在铰链区、CH2区或CH3区具有一个或更多个突变的抗体,该突变例如在产生中可能是期望的,以改进期望抗体形式的产量。

[0175] 本说明书的抗体可以是分离的或纯化的抗体。如本文使用的“分离的抗体”或“纯化的抗体”意指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。出于本说明书的目的,例如,已经从生物体的至少一种组分或者从抗体天然存在或天然产生的组织或细胞中分离或取出的抗体是“分离的抗体”。例如,已经从反应或反应序列的至少一种组分中纯化的抗体是“纯化的抗体”或由纯化抗体产生。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经经历至少一个纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施方案,分离的抗体或纯化的抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0176] 与抗体来源的对应种系序列相比,本文公开的抗体可以包括重链和轻链可变结构域的框架和/或CDR区中的一个或更多个氨基酸取代、插入和/或缺失。这样的突变可以通过将本文公开的氨基酸序列与从例如公共抗体序列数据库可得的种系序列进行比较容易地确定。本说明书包括来源于本文公开的任何氨基酸序列的抗体及其抗原结合片段,其中一个或更多个框架和/或CDR区内的一个或更多个氨基酸被突变为抗体来源于的种系序列的一个或更多个对应残基、或另一个人种系序列的一个或更多个对应残基、或一个或更多个对应种系残基的保守氨基酸取代(这样的序列变化在本文统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员从本文公开的重链和轻链可变区序列开始,可以容易产生包括一个或更多个个体种系突变或其组合的许多抗体及抗原结合片段。在某些实施方案中,VH结构域和/或VL结构域内的所有框架和/或CDR残基突变回在抗体来源于的原始种系序列中存在的残基。在其他实施方案中,仅某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或FR4的后8个氨基酸内存在的突变残基,或仅在CDR1、CDR2或CDR3内存在的突变残基。在其他实施方案中,一个或更多个框架和/或一个或更多个CDR残基被突变为不同种系序列(即,不同于抗体原始来源于的种系序列的种系序列)的一个或更多个对应残基。

[0177] 此外,本说明书的抗体可以包含框架和/或CDR区内两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些单独残基被突变为特定种系序列的对应残基,而不同于原始种系序列的某些其他残基被维持或突变为不同种系序列的对应残基。在获得后,可以容易地测试包含一个或更多个种系突变的抗体和抗原结合片段的一种或更多种期望的特性,诸如改进的结合特异性、增加的结合亲和力、改进或增强的拮抗或激动生物学特性(可以根据具体情况而定)、降低的免疫原性、抗体-药物缀合物的改进的药物与抗体比(DAR)等。以这种一般方式获得的抗体和抗原结合片段被包括在本说明书中。

[0178] 术语“非糖基化抗体”是指不包括可能干扰转谷氨酰胺反应的糖基化序列的抗体,例如在一个或更多个重链上的N297处不具有糖基团的抗体。在特定实施方案中,抗体重链

具有N297突变。换言之,根据Kabat等人公开的EU编号系统,抗体被突变为在位置297处不再具有天冬酰胺残基。在特定实施方案中,抗体重链具有N297Q或N297D突变。这样的抗体可以通过定点诱变以使糖基化序列去除或失效,或者通过定点诱变以在除了任何干扰糖基化位点或任何其他干扰结构之外的位点插入谷氨酰胺残基来制备。这样的抗体也可以从天然或人工来源分离。非糖基化抗体还包括包含T299或S298P或其他突变或导致缺乏糖基化的突变组合的抗体。

[0179] 术语“去糖基化抗体”是指其中糖基基团被去除以促进转谷氨酰胺酶介导的缀合的抗体。糖包括但不限于N-连接寡糖。在一些实施方案中,在残基N297处进行去糖基化。在一些实施方案中,糖基团的去除是酶促(包括但不限于经由PNGase)完成的。

[0180] 术语“表位”是指与抗体分子的可变区中称为互补位(paratope)的特定抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单个抗原可以具有多于一个表位。因此,不同的抗体可以与抗原上的不同区域结合,并且可以具有不同的生物效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链不同区段的空间并列的氨基酸产生。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况下,表位可以包括抗原上的糖类、磷酸基团或磺酰基团的部分。

[0181] 如本文使用的术语“缀合蛋白”或“缀合抗体”是指与一个或多个化学部分共价连接的蛋白或抗体。化学部分可以包括本公开内容的胺化合物。适于与本公开内容一起使用的接头(L)和有效载荷(D)在本文详细地描述。在特定实施方案中,包括治疗部分的缀合抗体是抗体-药物缀合物(ADC),也称为抗体-有效载荷缀合物或抗体-接头-有效载荷缀合物。

[0182] 术语“药物与抗体比”或(DAR)是与本公开内容的结合剂缀合的治疗部分(例如药物)的平均数。

[0183] 在一些实施方案中,术语“接头抗体比”或(LAR)也表示为小写字母1,是与本公开内容的结合剂缀合的反应性伯胺化合物的平均数。这样的结合剂,例如抗体,可以与包括例如合适的叠氮化物或炔烃的伯胺化合物缀合。用叠氮化物或炔烃官能化的所得结合剂随后可以经由1,3-环加成反应与包括对应叠氮化物或炔烃的治疗部分反应。

[0184] 短语“药学上可接受量”是指在治疗、降低、减轻或调节有相应需要的受试者中的至少一种健康问题的影响或症状方面有效或足够的量。例如,抗体或抗体-药物缀合物的药学上可接受量是使用本文提供的抗体或抗体-药物缀合物调节生物靶的有效的量。合适的药学上可接受量包括但不限于约0.001%多达至约10%,以及介于两者之间的任何量,诸如约0.01%、约0.02%、约0.03%、约0.04%、约0.05%、约0.06%、约0.07%、约0.08%、约0.09%、约0.1%、约0.2%、约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%或约10%的本文提供的抗体或抗体-药物-缀合物。

[0185] 短语“反应pH”是指已经添加所有反应组分或反应物之后反应的pH。

[0186] 在提及核酸或其片段时,术语“基本上同一性”或“基本上相同”指示,在与另一核酸(或其互补链)的适当核苷酸插入或缺失进行最佳比对时,如下文讨论的,如通过任何熟知的序列同一性算法,诸如FASTA、BLAST或gap测量的,在至少约95%,并且更优选地至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基中存在核苷酸序列同一性。在某些情况下,与参考核

酸分子具有基本上同一性的核酸分子可以编码与由参考核酸分子编码的多肽具有相同或基本上相似氨基酸序列的多肽。

[0187] 在应用于多肽时,术语“基本上相似性”或“基本上相似”意指在诸如通过程序gAP或BESTFIT使用默认空位权重最佳比对时,两个肽序列共有至少95%的序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被侧链(R基团)具有相似化学特性(例如电荷或疏水性)的另一个氨基酸残基取代的氨基酸取代。通常,保守氨基酸取代基本上不会改变蛋白的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以向上调整序列同一性百分比或相似性程度,以校正取代的保守性质。用于做出该调整的方法是本领域技术人员熟知的。参见例如,Pearson(1994)Methods Mol.Biol.24:307-331。侧链具有相似化学特性的氨基酸组的实例包括(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,和(7)含硫侧链是半胱氨酸和甲硫氨酸。在一些实施方案中,保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0188] 可选地,保守替代是在Gonnet等人(1992)Science 256:1443-1445中公开的PAM250对数可能性矩阵中具有正值的任何改变。“中度保守”替代是PAM250对数可能性矩阵中具有非负值的任何改变。

[0189] 多肽的序列相似性,也称为序列同一性,通常使用序列分析软件来测量。蛋白分析软件使用分配至各种取代、缺失和其他修饰(包括保守氨基酸取代)的相似性量度来匹配相似的序列。例如,gCG软件包含程序诸如gap和Bestfit,这些程序可以以默认参数使用,以确定密切相关的多肽诸如来自不同生物体物种的同源多肽之间或者野生型蛋白与其突变体之间的序列同源性或序列同一性。参见例如,gCG 6.1版。多肽序列也可以使用FASTA(gCG 6.1版中的程序)使用默认或推荐的参数进行比较。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询序列与搜索序列之间最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000)同上)。在将本说明书序列与包含来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,另一种特定算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,特别是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402。

[0190] 蛋白-药物缀合物化合物

[0191] 根据前述目的和其他目的,本公开内容提供了蛋白-药物缀合物化合物,例如抗体-药物缀合物化合物,及其前体和中间体、药物组合物和用于治疗有这样的治疗需要的受试者的某些疾病的方法。根据本公开内容,本文提供的蛋白-药物缀合物化合物包括如本文描述的与连接至治疗部分(例如依喜替康或依喜替康前体部分)的伯胺化合物缀合的谷氨酰胺酰基修饰的结合剂。

[0192] 在一个方面,本公开内容提供了包括根据本公开内容的结合剂(例如抗体或其片段)的化合物,该结合剂具有经由第一接头、包括三唑的单元和第二接头与一种或更多种化合物(例如依喜替康或依喜替康前体)缀合的一个或更多个谷氨酰胺残基。说明性非限制性

实例包括本文描述的式(A)。在根据本公开内容的蛋白-药物缀合物的特定实施方案中,其中结合剂是抗体(例如,单克隆抗体),任选地使用术语“抗体药物缀合物”或ADC。

[0193] 在一个方面,本公开内容提供了具有根据式(A)的结构的化合物:

[0194] $BA-(L1-B-L2-P)_n$ (A), 其中:

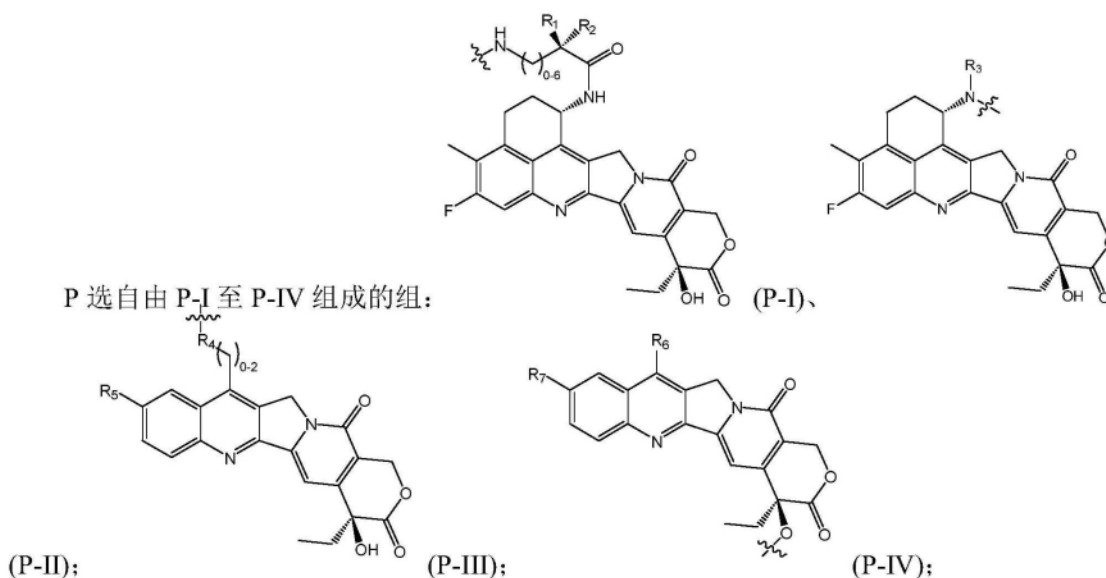
[0195] BA是抗体或其抗原结合片段;

[0196] L1是第一接头;

[0197] B是包括三唑的部分;

[0198] L2是第二接头;

[0199] P 选自由 P-I 至 P-IV 组成的组:



[0200] R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$, 其中 v 是从 0 至 12 的整数;

[0201] R_2 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$, 其中 v 是从 0 至 12 的整数;

[0202] R_3 是氢、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$ 和 $-CO-(CH_2)_v-O-COCH_3$, 其中 v 是从 0 至 12 的整数;

[0203] R_4 是 $-NH-$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})-SO_2CH_3$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})-(CH_2)_v-OH$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})-CO-CH_2-NH_2$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})-(CH_2)_v-O-CH_2-NH-CO-CH_2-NH_2$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-N(-C_{1-6} \text{ 烷基})-CO-$

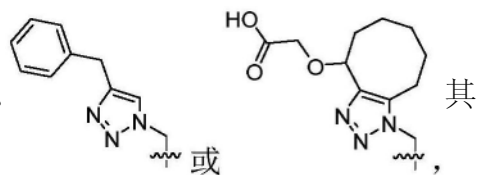
$CH(NH_2)-(CH_2)_v$ -苯基) 或 其中 v 是从 0 至 12 的整数;

[0204] R_5 是 H、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 或 ;

[0205] R_6 是氢、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CH_2$ -苯基、 $-(CH_2)_v-NMe-CH_2$ -苯基-OMe、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-CCH$;

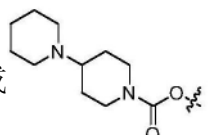
$(\text{CH}_2)_v\text{-NH-CO-CH}(\text{NH}_2)\text{-(CH}_2)_v\text{-苯基-}$ 、 $(\text{CH}_2)_v\text{-NH-CO-CH}(\text{NH}_2)\text{-(CH}_2)_v\text{-N}_3\text{-}$ 、 $(\text{CH}_2)_v\text{-NH-CO-CH}$

$(\text{NH}_2)\text{-(CH}_2)_v\text{-NH}_2\text{-}$ 、 $(\text{CH}_2)_v\text{-NH-CO-CH}(\text{NH}_2)\text{-(CH}_2)_v\text{-COOH}$ 、

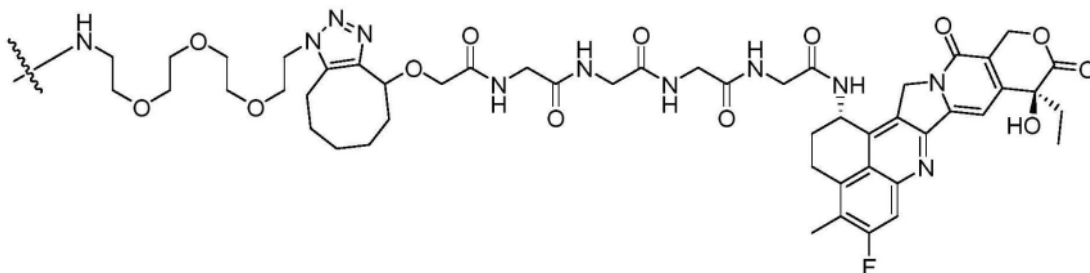


其

中 v 独立地是从0至12的整数；

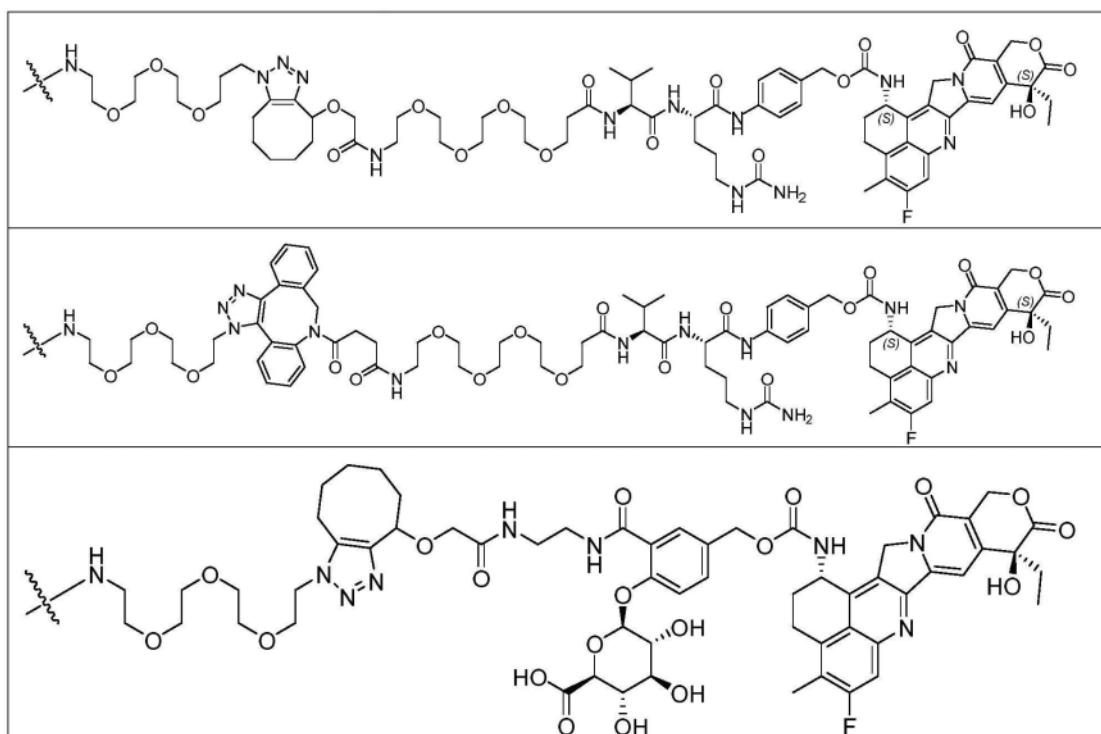
[0206] R_7 是H、-OH、-OCH₃或 , n 是从1至12的整数。

[0207] 在一种实施方案中,式(A)的化合物的-L1-B-L2-P具有以下结构:



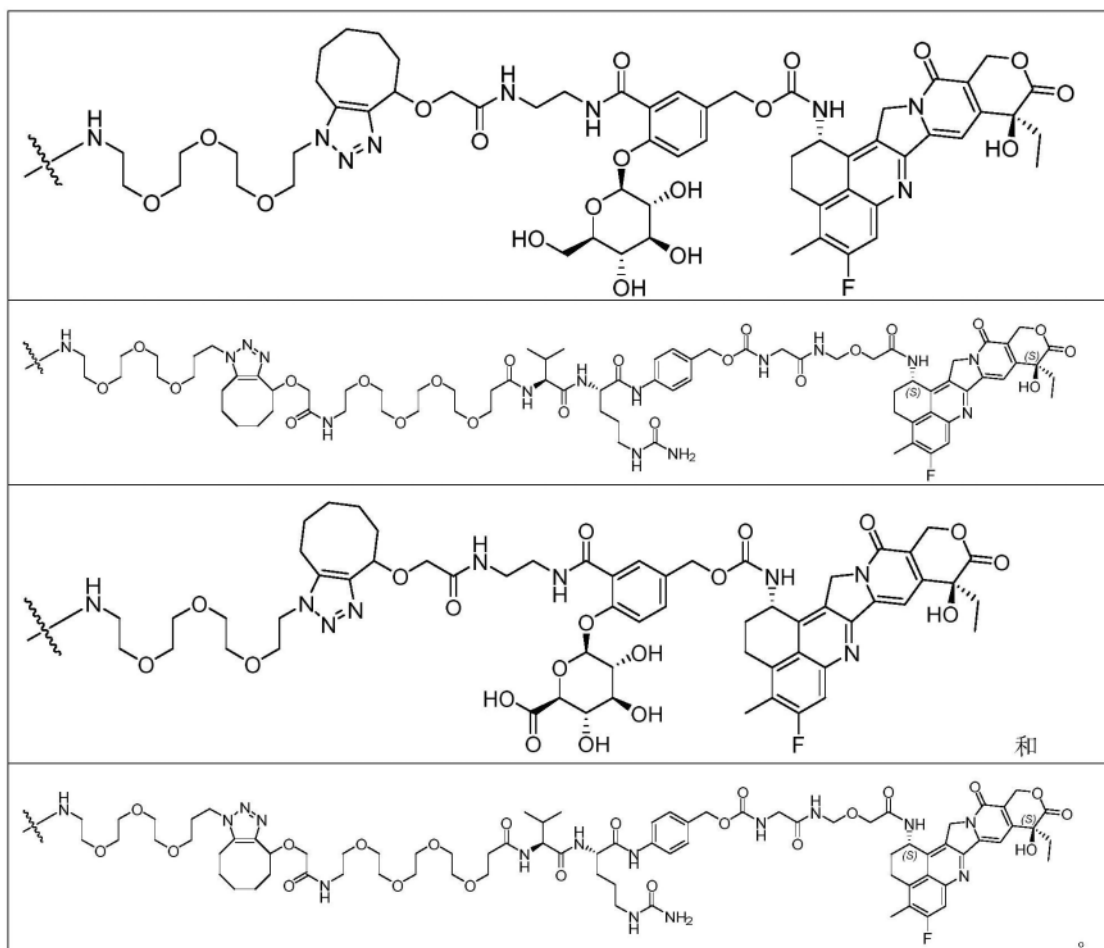
[0208]

[0209] 在一种实施方案中,式(A)的化合物的-L1-B-L2-P具有以下结构:



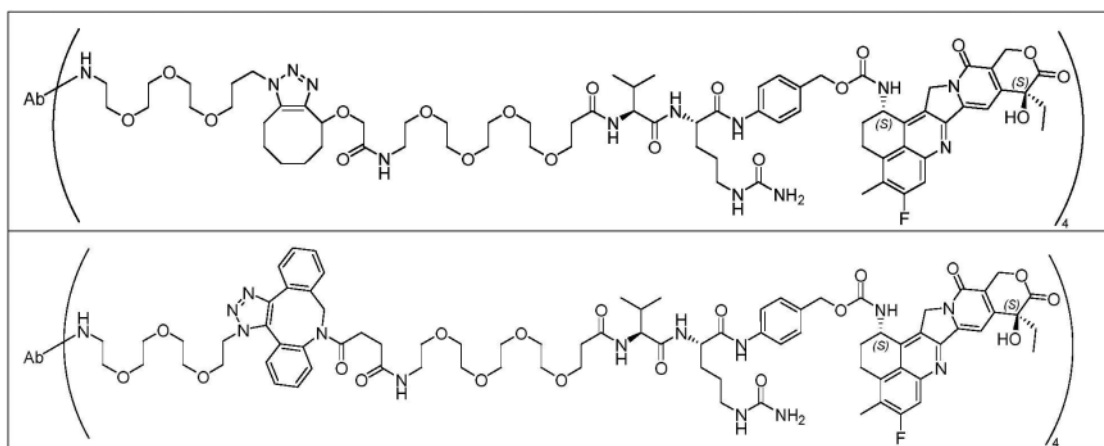
[0210]

[0211]

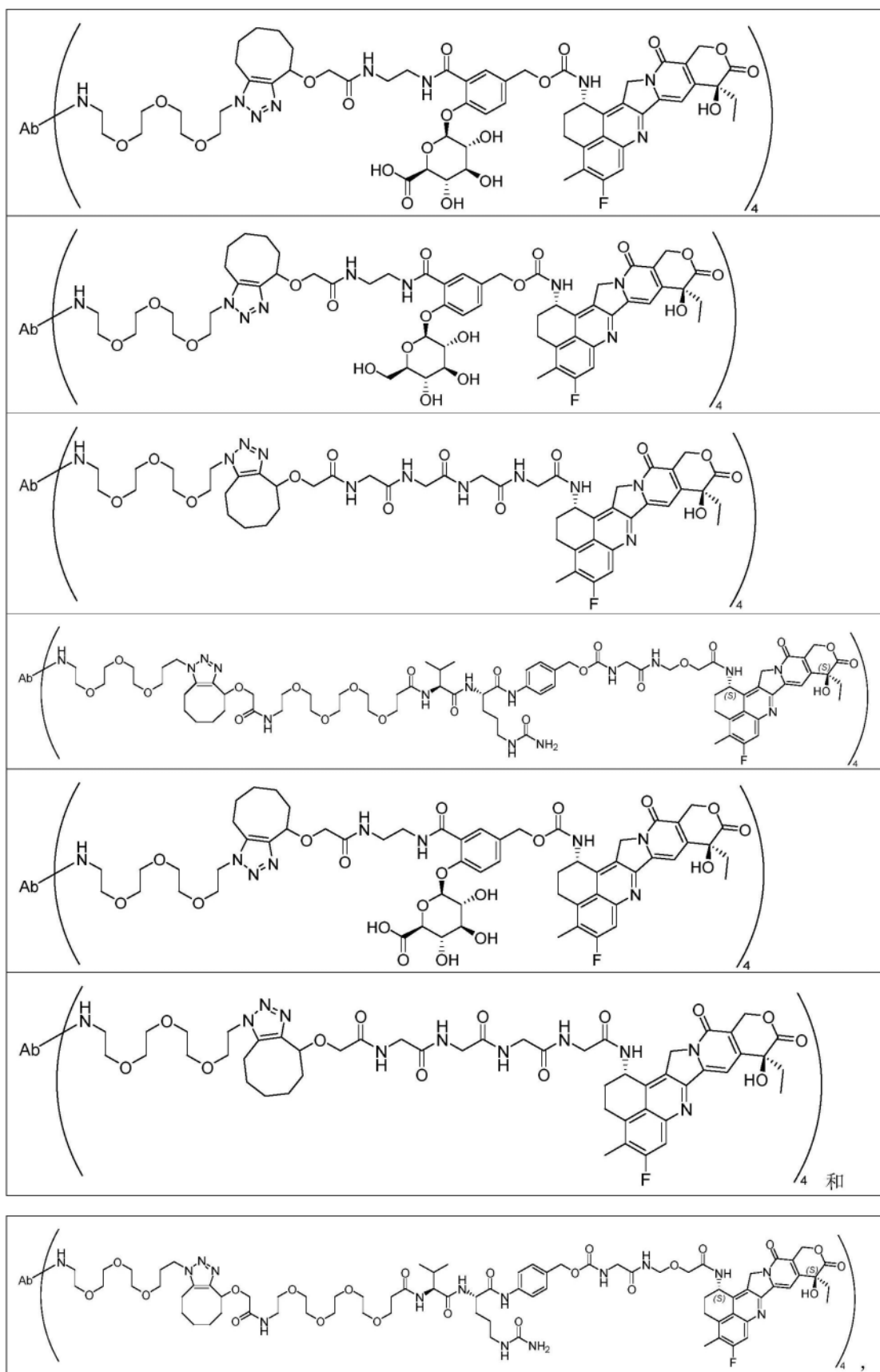


[0212] 在一种实施方案中,本公开内容的化合物具有选自由以下组成的组的结构:

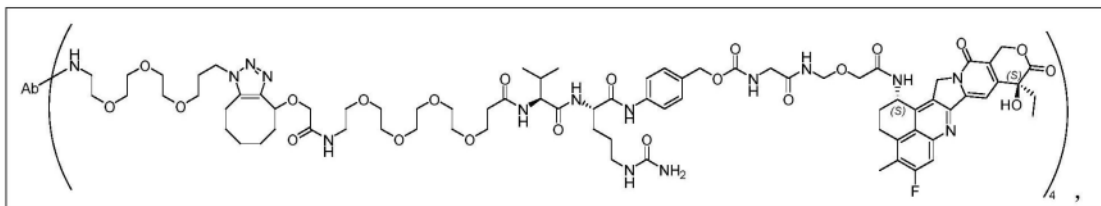
[0213]



[0214]



[0215]



[0216] 或其药学上可接受的盐。

[0217] 接头L1

[0218] 在某些实施方案中,接头L1与结合剂BA的谷氨酰胺残基的胺共价附接。

[0219] 在某些实施方案中,接头L1包括烷基(例如, C_{1-20} 烷基或 C_{1-12} 烷基或 C_{1-6} 烷基)、苯基、芳烷基-NH-、-C(O)-、-(CH₂)_u-NH-C(O)-、-(CH₂)_u-C(O)-NH-、-(CH₂-CH₂-O)_v-、-(CH₂)_u-(O-CH₂-CH₂)_v-C(O)-NH-、包括2个至4个氨基酸的肽单元或其组合,其中的每一种能够任选地被-S-、-S(O₂)-、-C(O)-、-C(O₂)-或-CO₂H中的一个或多个取代,其中下标u和v独立地是从1至8的整数。

[0220] 在某些实施方案中,游离(未缀合的)接头L1包括用于经由转谷氨酰胺反应与谷氨酰胺残基附接的伯胺。

[0221] 在一种实施方案中,接头L1包括一个或多个聚乙二醇(PEG)单元。在一种实施方案中,L1包括2个、或3个、或4个、或5个、或6个、或7个、或8个、或9个或10个PEG单元。

[0222] 在一种实施方案中,接头L1包括二硫(-S-S-)键。

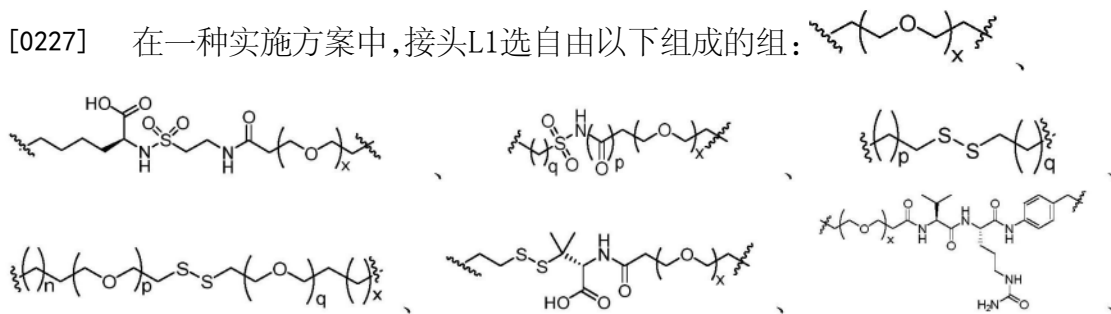
[0223] 在一种实施方案中,接头L1包括-S(O₂)-部分。

[0224] 在一种实施方案中,接头L1上的一个或多个碳被-CO₂H取代。

[0225] 在一种实施方案中,接头L1包括包含2个至4个氨基酸的肽单元,或包含2个氨基酸的肽单元、包含3个氨基酸的肽单元或包含4个氨基酸的肽单元。

[0226] 在一种实施方案中,接头L1包括包含2个氨基酸的肽单元,所述氨基酸选自丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、谷氨酸和瓜氨酸及其组合。在一种特定实施方案中,接头L1包括缬氨酸-瓜氨酸单元。

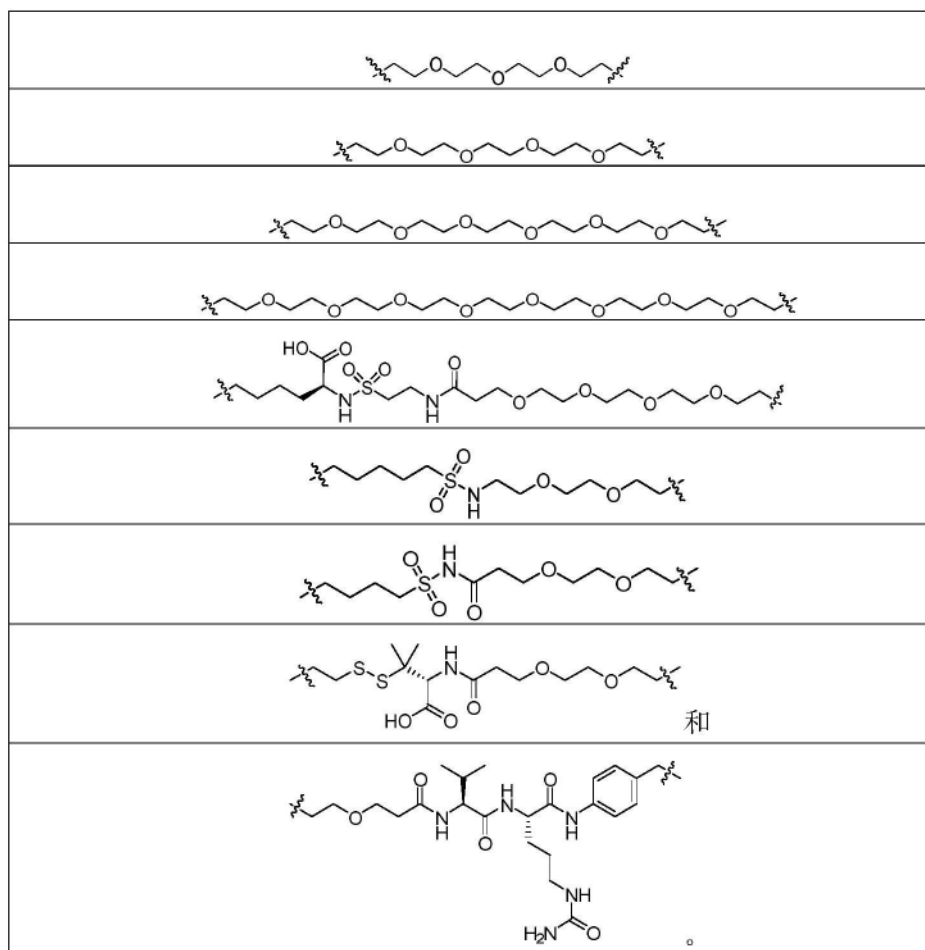
[0227] 在一种实施方案中,接头L1选自由以下组成的组:



[0228] 其中R_A是包括炔烃、叠氮化物、四嗪、反式环辛烯、马来酰亚胺、胺、酮、醛、羧酸、酯、硫醇、磺酸、甲苯磺酸酯、卤化物、硅烷、氰基基团、糖类基团、生物素基团、脂质残基的基团,并且其中下标x、n、p和q独立地是从0至12的整数,以及其组合。

[0229] 在一种实施方案中,接头L1选自由以下组成的组:

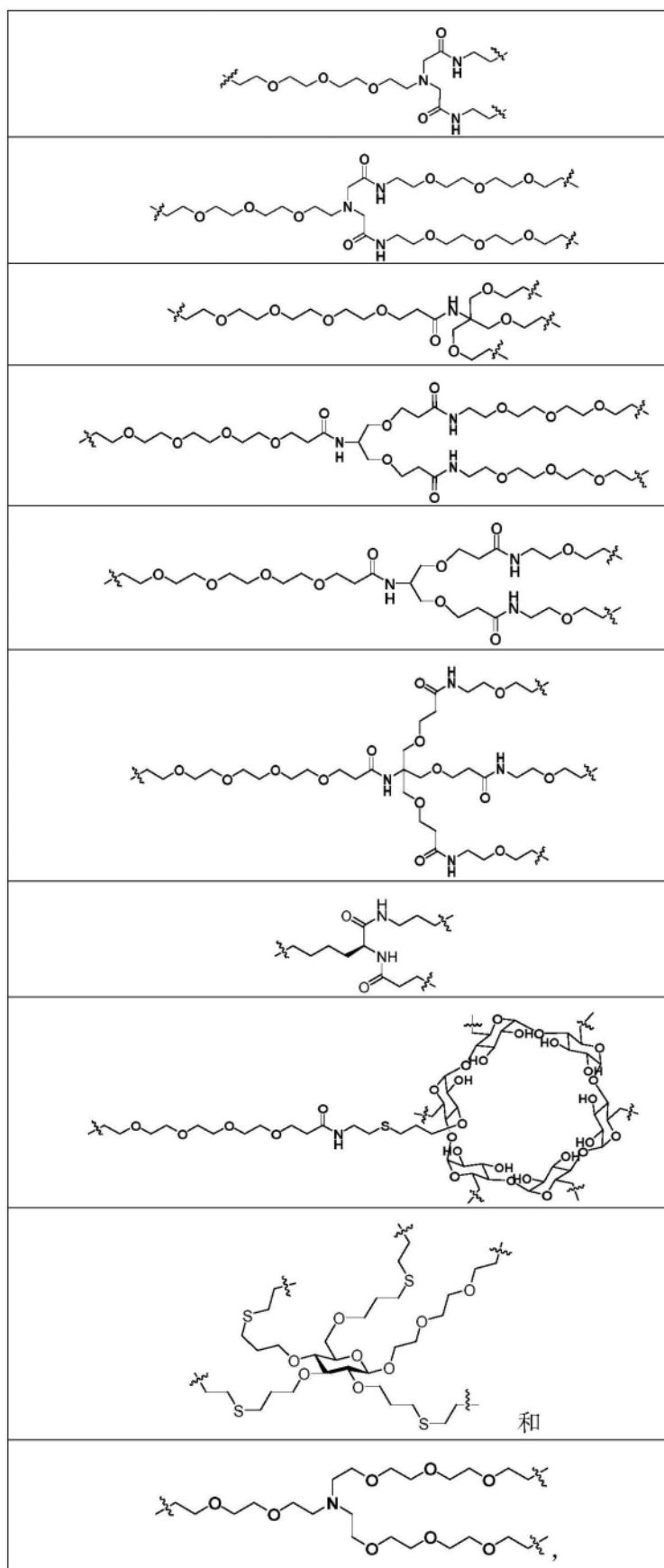
[0230]



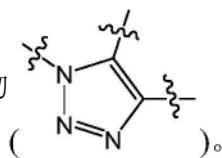
[0231] 在一种实施方案中,L1是。

[0232] 在另一种实施方案中,L1选自由以下组成的组:

[0233]

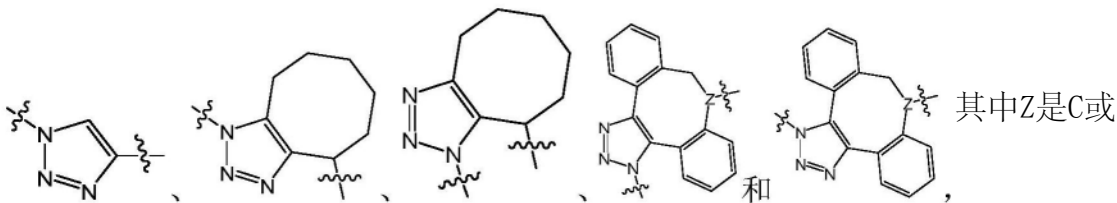


[0236] 在一个方面,B是包括三唑的化合物



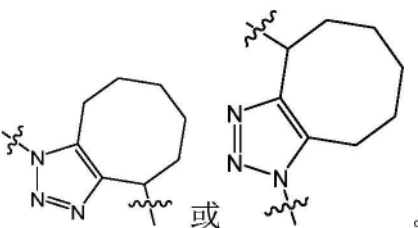
[0237] 在一种实施方案中,B选自由以下组成的组:

[0238]

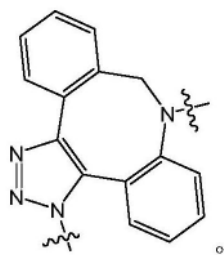


N。

[0239] 在一种实施方案中,B是



在另一种实施方案中,B是



[0240] 接头L2

[0241] 在本公开内容的某些方面,接头L2具有根据式(L2)的结构:

[0242] $-SP1-AA-SP2-$ (L2),

[0243] 其中:

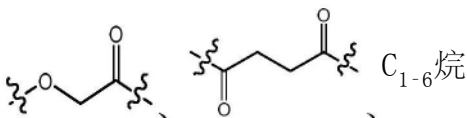
[0244] SP1不存在或者是第一间隔物单元;

[0245] AA不存在或者是包括2个至4个氨基酸的肽单元;

[0246] SP2不存在或者是与P共价附接的第二间隔物单元,条件是SP1、AA和SP2中的至少一个并非不存在。

[0247] 在一种实施方案中,SP1不存在。

[0248] 在一种实施方案中,SP1选自由以下组成的组:



基、 $-(CH_2-CH_2-O)_v-$ 、 $-NH-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-NH-C(O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_u-$ 、 $-NH-(CH_2)_u-C(O)-$ 、 $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-$ 、 $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-C(O)-$ 、 $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-$ 、 $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-C(O)-$ 、 $-(CH_2)_u-NH-C(O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_u-NH-C(O)-$ 、 $-NH-(CH_2)_u-C(O)-NH-$ 及其组合;其中下标u和v独立地是从1至8的整数。

[0249] 在一种实施方案中,AA不存在。

[0250] 在一种实施方案中,AA是包括2个至4个氨基酸的肽单元,所述氨基酸选自丙氨酸、

甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、谷氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸和瓜氨酸及其组合。

[0251] 在一种实施方案中,AA是缬氨酸-瓜氨酸、谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸或甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸。

[0252] 在一种实施方案中,AA是缬氨酸-瓜氨酸。

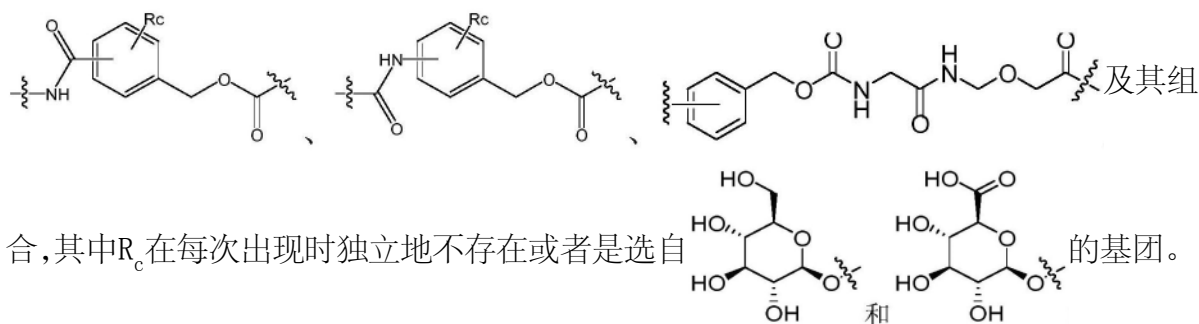
[0253] 在一种实施方案中,AA是谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸。

[0254] 在一种实施方案中,AA是甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸。

[0255] 在一种实施方案中,AA是甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸

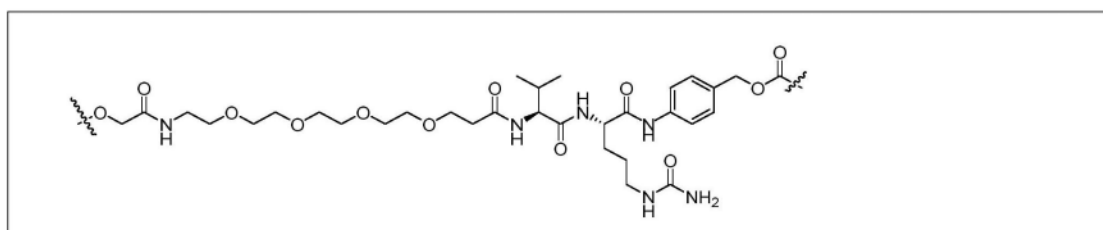
[0256] 在一种实施方案中,SP2不存在。

[0257] 在一种实施方案中,SP2选自由以下组成的组:

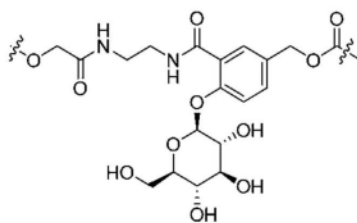
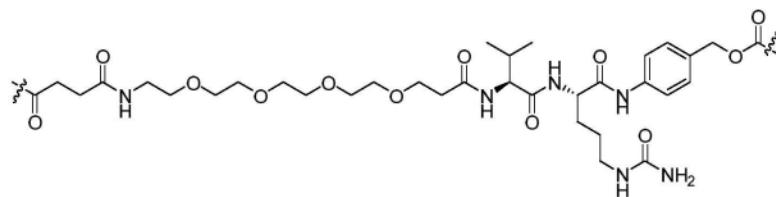


[0258] 在某些实施方案中,L2选自由以下组成的组:

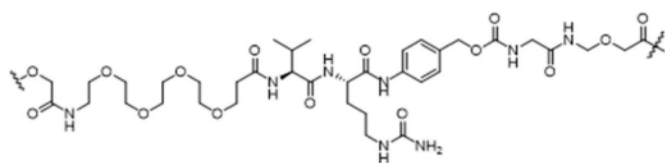
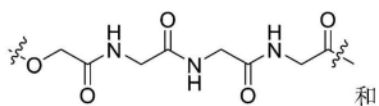
[0259]



[0260]



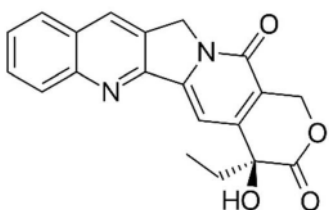
[0261]



[0262] 有效载荷

[0263] 在某些实施方案中,本公开内容的有效载荷是喜树碱类似物和/或衍生物。

[0264]



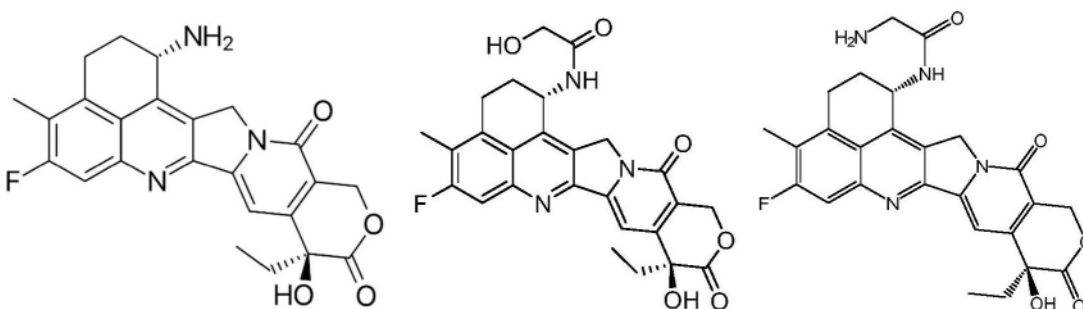
喜树碱

[0265] 以上示出的喜树碱(CPT)是拓扑异构酶毒物。它是1966年由M.E.Wall和M.C.Wani在系统筛选天然产物中的抗癌药物时发现的。它是从喜树(*Camptotheca acuminata*, Happy tree) (一种原产于中国的树,在中国传统医学中用作癌症治疗)树皮和茎中分离出来的。喜树碱在初步临床试验中显示出显著的抗癌活性。然而,它具有低溶解度,因此合成和药物化学家已经开发了喜树碱及各种衍生物的许多合成,以增加该化学品的益处,具有良好的结果。现今,四种喜树碱类似物已被批准并用于癌症化学疗法:拓扑替康、伊立替康、贝洛替康和德鲁替康(deruxtecan, Dxd)。

[0266] 曲妥珠单抗德鲁替康(T-Dxd,又名DS8201a)是一种抗体-药物缀合物,包括人类表皮生长因子受体2(HER2)导向的抗体曲妥珠单抗和拓扑异构酶I抑制剂缀合物德鲁替康(Dxd,依喜替康(exatecan)的衍生物)。于2019年12月在美国被批准使用。

[0267] 如下文示出的,依喜替康是喜树碱类似物。

[0268]

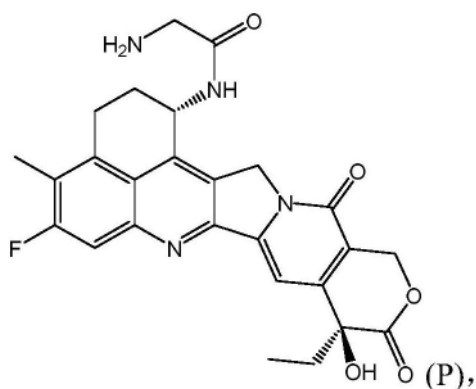


依喜替康(左)、德鲁替康(Dxd)(中)和依喜替康前体(右)

[0269] 在一种实施方案中,本公开内容的有效载荷是依喜替康。

[0270] 在某些实施方案中,本公开内容的有效载荷是具有结构P2的化合物(依喜替康前体):

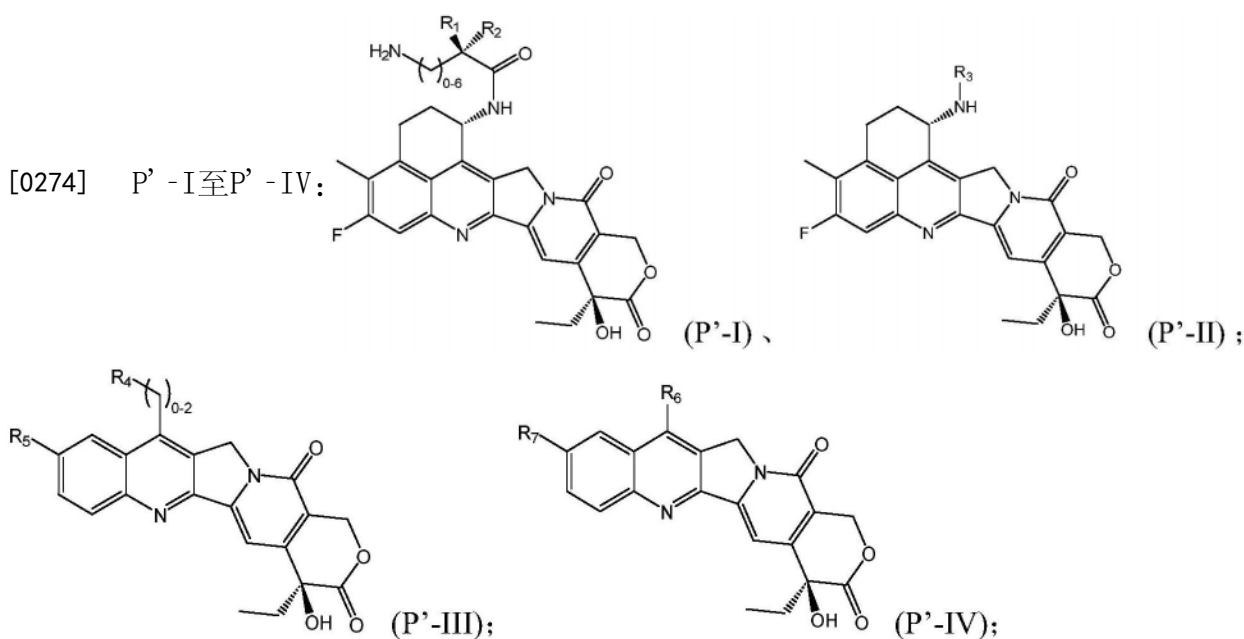
[0271]



[0272] 或其药学上可接受的盐。

[0273] 在某些实施方案中,本公开内容提供了具有选自由P' -I至P' -IV组成的组的结构的有效载荷:

[0274] P' -I至P' -IV:



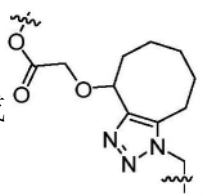
[0275] 或其药学上可接受的盐,其中:

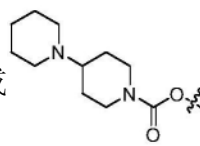
[0276] R₁是氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基和-(CH₂)_v-SO₂CH₃,其中v是从0至12的整数;

[0277] R₂是氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基和-(CH₂)_v-SO₂CH₃,其中v是从0至12的整数;

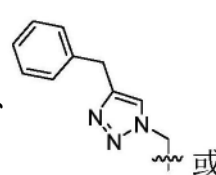
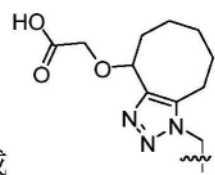
[0278] R₃是氢、-C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-C(O)OH、-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-SO₂CH₃和-CO-(CH₂)_v-O-COCH₃,其中v是从0至12的整数;

[0279] R₄是-NH-、-N(-C₁₋₆烷基)、-N(-C₁₋₆烷基)(-SO₂CH₃)、-N(-C₁₋₆烷基)(-(CH₂)_v-OH)、-N(-C₁₋₆烷基)(CO-CH₂-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-(CH₂)_v-O-CH₂-NH-CO-CH₂-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-COOH)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-NH₂)、-N(-C₁₋₆烷基)(-CO-

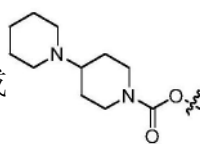
CH(NH₂) - (CH₂)_v - 苯基) 或  其中v是从0至12的整数；

[0280] R₅是H、-OH、-OCH₃或  ;

[0281] R₆是氢、-C₁₋₆烷基、-(CH₂)_v-OH、-(CH₂)_v-NH₂、-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-CH₂-苯基、-(CH₂)_v-NMe-CH₂-苯基-OMe、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-(CH₂)_v-CCH₃、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-苯基、-(CH₂)_v-NH-CO-CH(NH₂)-(CH₂)_v-N₃、-(CH₂)_v-NH-CO-CH

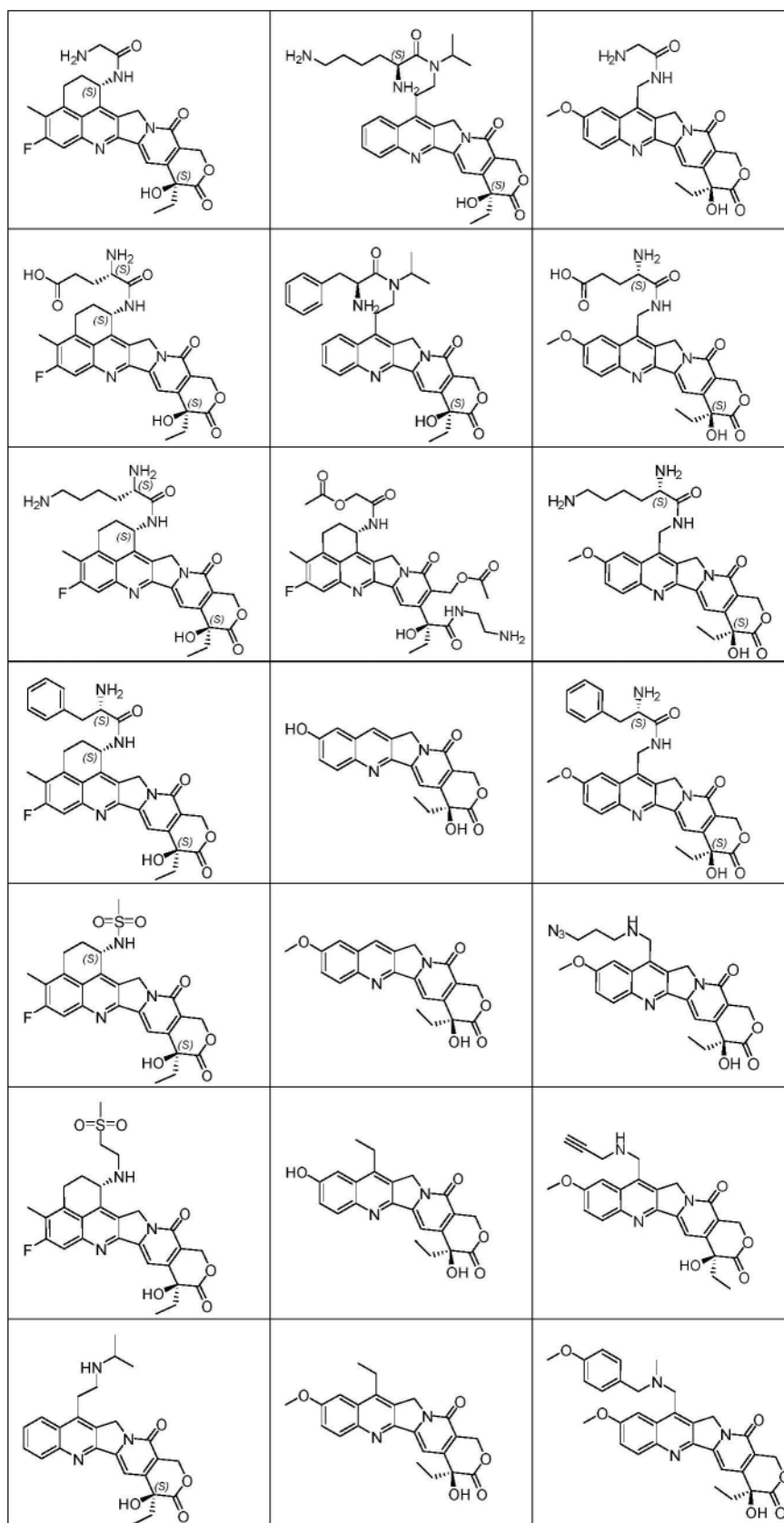
(NH₂) - (CH₂)_v - NH₂、-(CH₂)_v - NH - CO - CH(NH₂) - (CH₂)_v - COOH、 或  其

中v独立地是从0至12的整数,并且

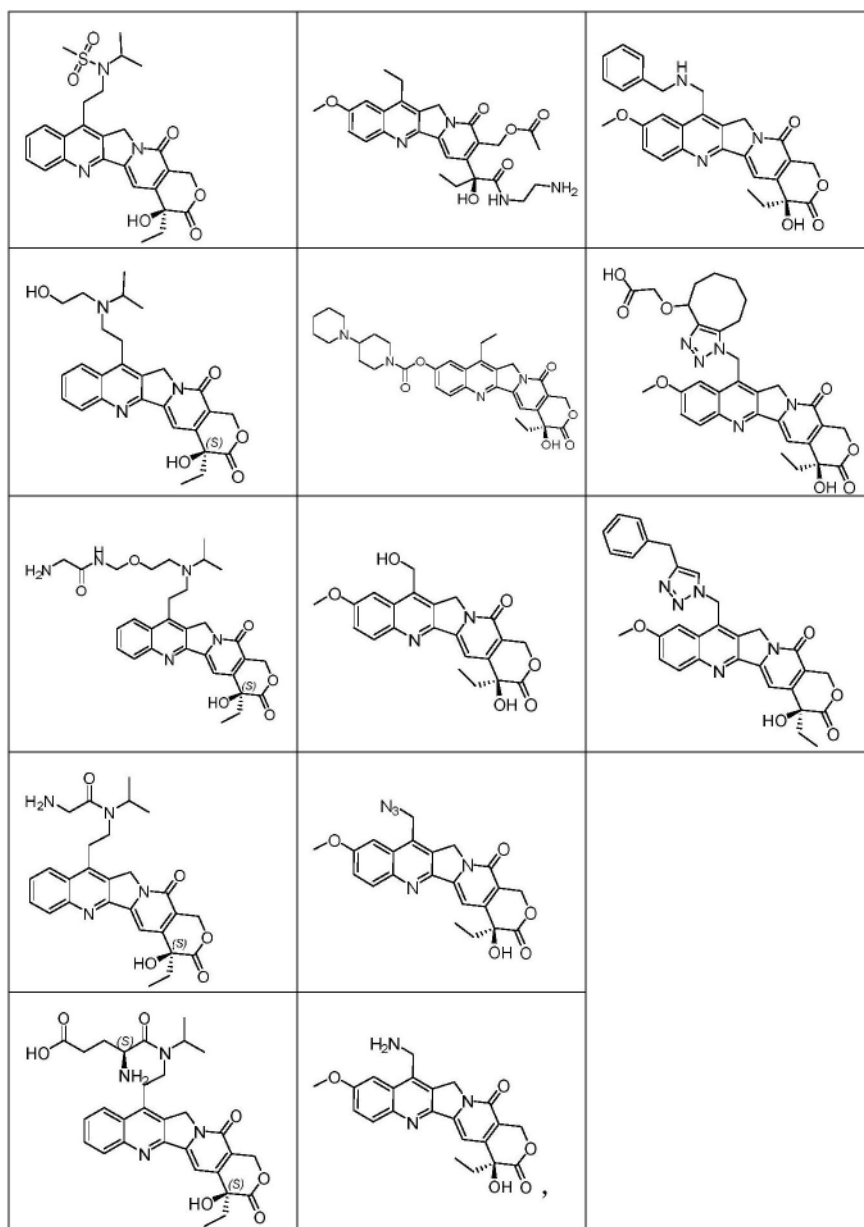
[0282] R₇是H、-OH、-OCH₃或  或其药学上可接受的盐。

[0283] 在某些实施方案中,本公开内容的有效载荷是具有选自由以下组成的组的结构的化合物:

[0284]



[0285]



[0286] 或其药学上可接受的盐。

[0287] 本公开内容还涉及一种药物组合物,包括治疗有效量的如以上描述的化合物或其药学上可接受的盐和一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0288] 接头-有效载荷 (L2-P)

[0289] 在另一个方面,本公开内容提供了根据式 (A1k-L2-P) 的化合物:

[0290] A1k-SP1-AA-SP2-P (A1k-L2-P)

[0291] 其中:

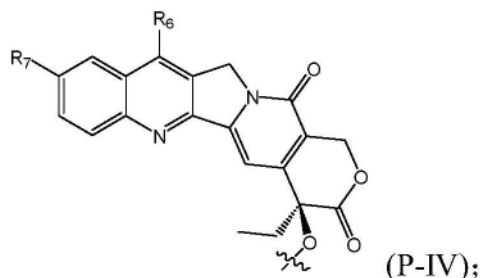
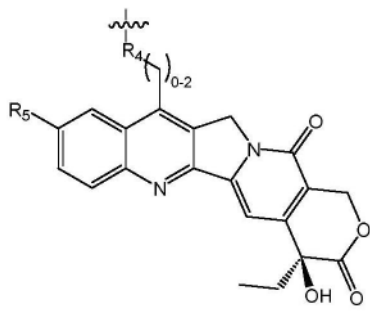
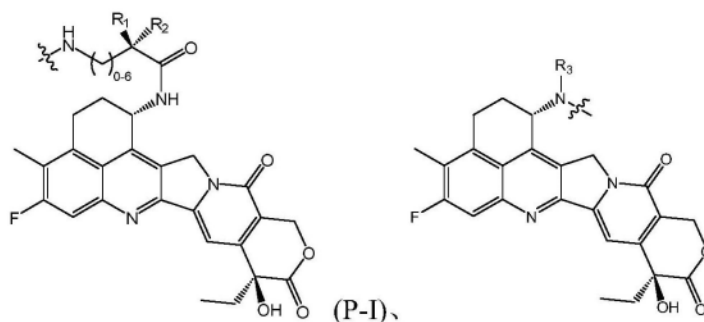
[0292] A1k是包括炔烃的部分;

[0293] SP1不存在或者是第一间隔物单元;

[0294] AA不存在或者是包括2个至4个氨基酸的肽单元;

[0295] SP2不存在或者是第二间隔物单元;

[0296] P选自自由P-I至P-IV组成的组:



[0297] R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

[0298] R_2 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

[0299] R_3 是氢、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$ 和 $-CO-(CH_2)_v-O-COCH_3$,其中 v 是从0至12的整数;

[0300] R_4 是 $-NH-$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)(-SO_2CH_3)$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)(-(CH_2)_v-OH)$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)(CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)(-(CH_2)_v-O-CH_2-NH-CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)(-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH)$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)(-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2)$ 、 $-N(-C_{1-6}烷基)(-CO-$

$CH(NH_2)-(CH_2)_v$ -苯基)或 其中 v 是从0至12的整数;

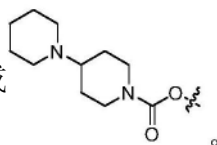
[0301] R_5 是H、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 或 ;

[0302] R_6 是氢、 $-C_{1-6}$ 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CH_2$ -苯基、 $-(CH_2)_v-NMe-CH_2$ -苯基-OMe、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-CCH$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH$

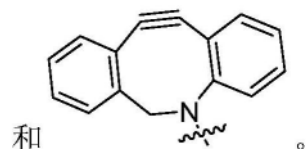
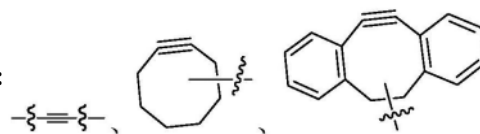
$(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH$ 、 或 ,

其中 v 独立地是从0至12的整数;并且

[0303] R_7 是 H、-OH、-OCH₃ 或



[0304] 在某些实施方案中, A1k 选自由以下组成的组:



[0305] 在一些实施方案中, SP1 不存在。

[0306] 在一些实施方案中, AA 不存在。

[0307] 在一些实施方案中, SP2 不存在。

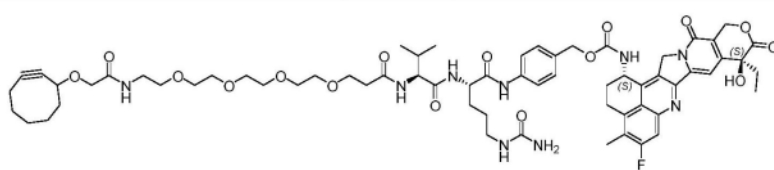
[0308] 在一些实施方案中, SP1 存在并且是如以上描述的部分。

[0309] 在一些实施方案中, AA 存在并且是如以上描述的部分。

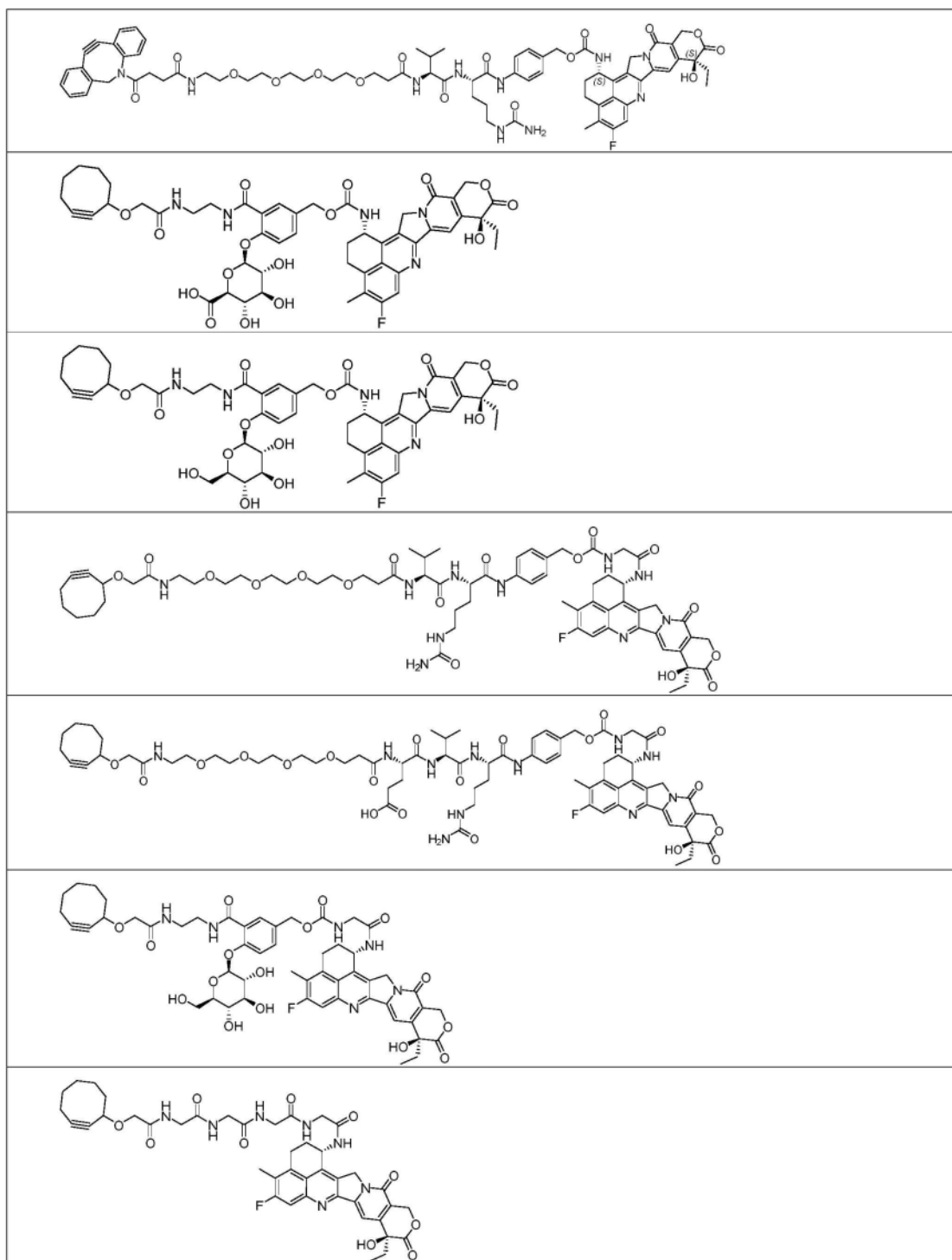
[0310] 在一些实施方案中, SP2 存在并且是如以上描述的部分。

[0311] 在某些实施方案中, 根据式 (A1k-L2-P) 的化合物选自由以下组成的组:

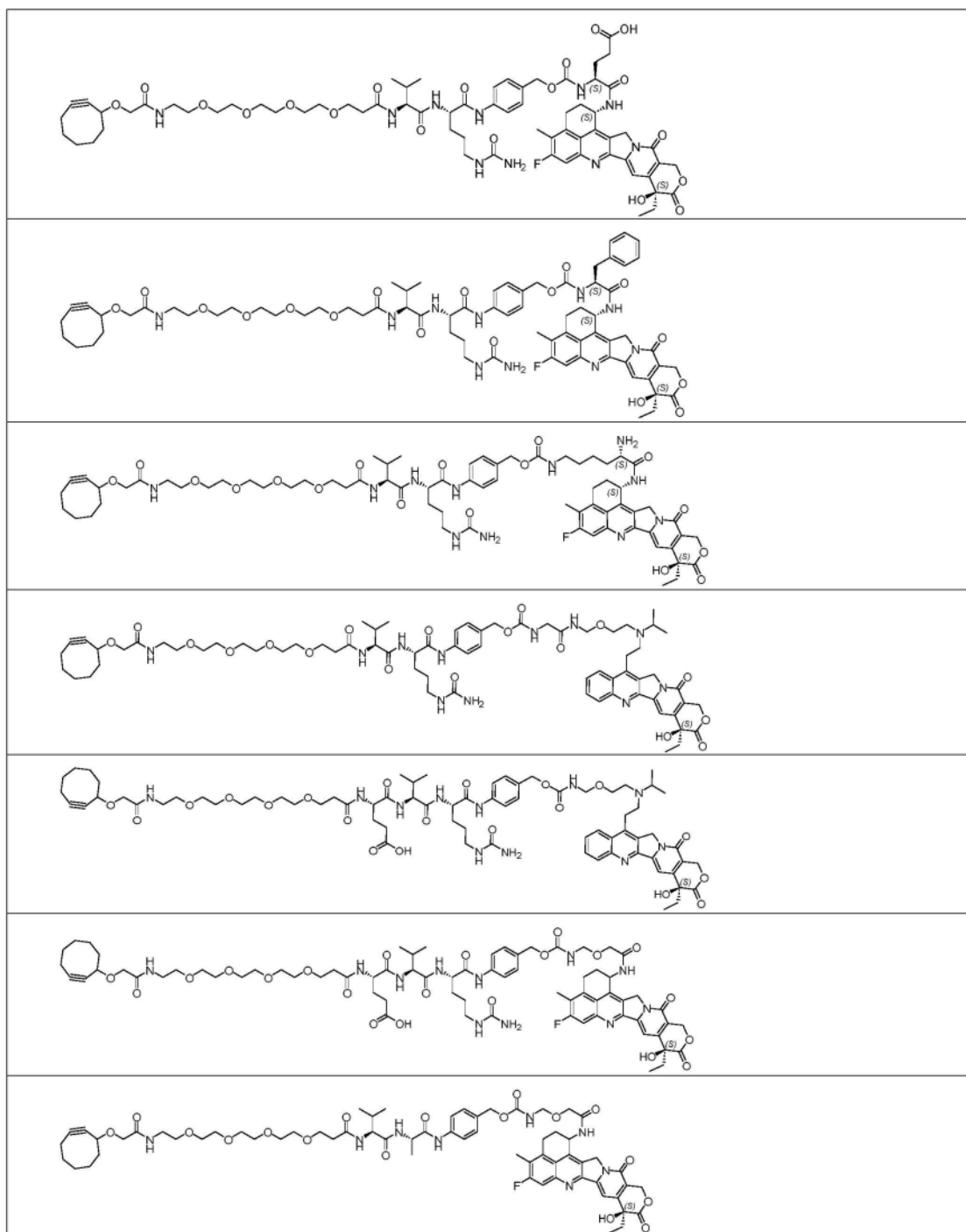
[0312]



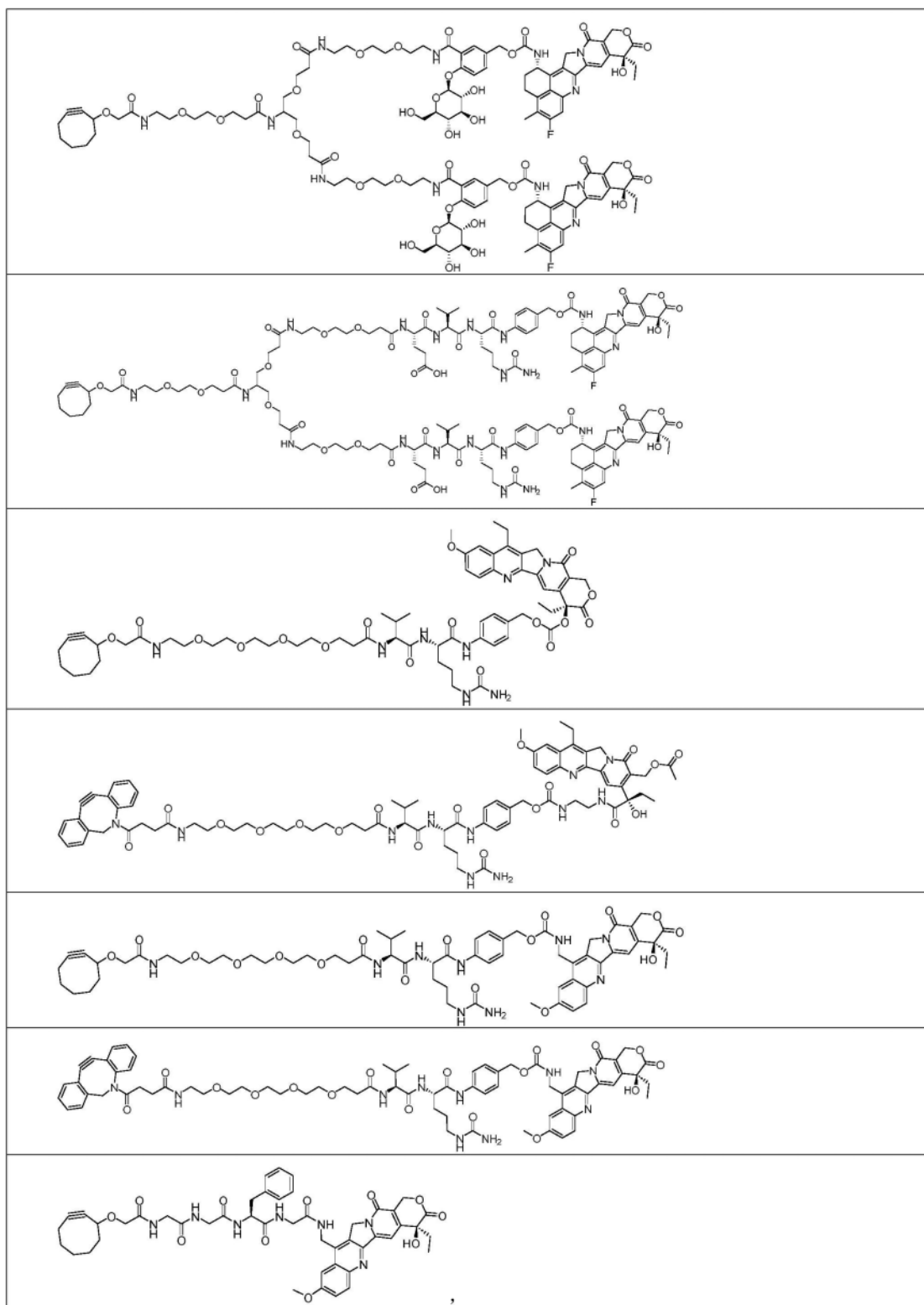
[0313]



[0314]



[0315]



[0316] 或其药学上可接受的盐。

[0317] 结合剂

[0318] 在一种实施方案中,本文描述的蛋白-药物缀合物实施方案的有效性取决于结合剂结合其结合配偶体的选择性。在本公开内容的一种实施方案中,结合剂是能够以某种特异性与给定结合配偶体结合的任何分子。在一种实施方案中,结合剂在哺乳动物体内,在那里相互作用可以产生治疗用途。在替代实施方案中,结合剂在体外,在那里相互作用可以产

生诊断用途。在一些方面,结合剂能够与细胞或细胞群体结合。

[0319] 本公开内容的合适结合剂包括与结合配偶体结合的蛋白,其中结合剂包括一个或更多个谷氨酰胺残基。合适的结合剂包括但不限于抗体、淋巴因子、激素、生长因子、病毒受体、白细胞介素或任何其他细胞结合或肽结合分子或物质。

[0320] 在一种实施方案中,结合剂是抗体。在某些实施方案中,抗体选自单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段(Fab、Fab' 和F(ab)2、微抗体、双抗体、三抗体等)。本文中的抗体可以使用美国专利第6,596,541号和美国公布第2012/0096572号中描述的方法进行人源化,这两个专利通过引用以其整体并入本文。在本公开内容的蛋白-药物缀合物化合物的某些实施方案中,BA是人源化单克隆抗体。例如,BA可以是结合HER2、MET或STEAP2的单克隆抗体。在本公开内容的蛋白-药物缀合物化合物的某些实施方案中,BA是双特异性抗体,例如抗HER2/HER2双特异性抗体或抗MET/MET双特异性抗体。

[0321] 在本公开内容中,抗体可以是被认为适于本领域从业者的任何抗体。在一些实施方案中,抗体在至少一个多肽链序列中包括至少一个谷氨酰胺残基。在某些实施方案中,抗体包括一个或更多个gln295残基。在某些实施方案中,抗体包括两个重链多肽,该两个重链多肽各自具有一个gln295残基。在另外的实施方案中,抗体在除了重链295之外的位点处包括一个或更多个谷氨酰胺残基。这样的抗体可以从天然来源分离或被工程化为包括一个或更多个谷氨酰胺残基。将谷氨酰胺残基工程化为抗体多肽链的技术在本领域从业人员的技术内。在某些实施方案中,抗体是非糖基化的。

[0322] 抗体可以是本领域技术人员已知的任何形式。在某些实施方案中,抗体包括轻链。在某些实施方案中,轻链是 κ 轻链。在某些实施方案中,轻链是 λ 轻链。

[0323] 在某些实施方案中,抗体包括重链。在一些方面,重链是IgA。在一些方面,重链是IgD。在一些方面,重链是IgE。在一些方面,重链是IgG。在一些方面,重链是IgM。在一些方面,重链是IgG1。在一些方面,重链是IgG2。在一些方面,重链是IgG3。在一些方面,重链是IgG4。在一些方面,重链是IgA1。在一些方面,重链是IgA2。

[0324] 在一些实施方案中,抗体是抗体片段。在一些方面,抗体片段是Fv片段。在一些方面,抗体片段是Fab片段。在一些方面,抗体片段是F(ab')2片段。在一些方面,抗体片段是Fab' 片段。在一些方面,抗体片段是scFv(sFv)片段。在一些方面,抗体片段是scFv-Fc片段。

[0325] 在一种实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是多克隆抗体。

[0326] 在一些实施方案中,抗体是嵌合抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,抗体是人类抗体。

[0327] 抗体可以对被认为适于本领域技术人员的任何抗原具有结合特异性。在某些实施方案中,抗原是跨膜分子(例如受体)或生长因子。示例性抗原包括但不限于分子,诸如,肾素;生长激素,包括人类生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α 1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体化激素;胰高血糖素;凝血因子,诸如因子vmc、因子IX、组织因子(TF)和血管性血友病因子;抗凝血因子诸如蛋白C;心房利钠因子;肺表面活性物质;纤溶酶原激活物,诸如尿激酶或人类尿液或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;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(调节激活正常T细胞表达和分泌);人类巨噬细胞炎性蛋白(MLP-I- α);血清白蛋白,诸如人类血清白蛋白;缪勒抑制物质(Muellerian-

inhibiting substance); 松弛素A链; 松弛素B链; 松弛素原; 小鼠促性腺激素相关肽; 微生物蛋白, 诸如 β 内酰胺酶; DNA酶; 19E; 细胞毒性T淋巴细胞相关抗原 (CTLA), 诸如CTLA-4; 抑制素; 激活素; 血管内皮生长因子 (VEGF); 激素或生长因子受体; 蛋白A或蛋白D; 类风湿因子; 神经营养因子, 诸如骨源性神经营养因子 (BDNF)、神经营养因子3、神经营养因子4、神经营养因子5或神经营养因子6 (NT-3、NT-4、NT-5或NT-6), 或神经生长因子, 诸如NGF- β ; 血小板源性生长因子 (PDGF); 成纤维细胞生长因子诸如aFGF和bFGF; 成纤维细胞生长因子受体2 (FGFR2)、表皮生长因子 (EGF); 转化生长因子 (TGF), 诸如TGF- α 和TGF- β , 包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5; 胰岛素样生长因子-1和胰岛素样生长因子-2 (IGF-1和IGF-2); des (I-3)-IGF-1 (脑IGF-1)、胰岛素样生长因子结合蛋白、EpCAM、gD3、FLT3、PSMA、PSCA、MUC1、MUC16、STEAP、STEAP2、CEA、TENB2、EphA受体、EphB受体、叶酸受体、FOLRI、间皮素、cripto、 α v β 6、整联蛋白、VEGF、VEGFR、EGFR、转铁蛋白受体、1RTAI、1RTA2、1RTA3、1RTA4、1RTA5; CD蛋白, 诸如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、CD134、CD137、CD138、CD152、或在美国公布第2008/0171040号或美国公布第2008/0305044号中公开的并且通过引用以其整体并入的与一种或更多种肿瘤相关抗原或细胞表面受体结合的抗体; 促红细胞生成素; 骨诱导因子; 免疫毒素; 骨形态发生蛋白 (BMP); 干扰素, 诸如干扰素- α 、干扰素- β 和干扰素- γ ; 集落刺激因子 (CSF), 例如M-CSF、gM-CSF和g-CSF; 白细胞介素 (IL), 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, 诸如例如HIV包膜的一部分; 转运蛋白; 归巢受体; 地址素 (addressins); 调控蛋白; 整联蛋白, 诸如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM; 肿瘤相关抗原诸如AFP、ALK、B7H4、BAGE蛋白、 β -联蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9 (碳酸酐酶IX)、胱天蛋白酶-8、CD20、CD40、CD123、CDK4、CEA、CLEC12A、c-kit、cMET、CTLA4、细胞周期蛋白-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRVIII、内皮素、Epcam、EphA2、ErbB2/HER2、ErbB3/HER3、ErbB4/HER4、ETV6-AML、Fra-1、FOLR1、gAGE蛋白 (例如, gAGE-1、gAGE-2)、gD2、gD3、globoH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3、gM3、gp100、HER2、HLA/B-raf、HLA/EBNA1、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGE蛋白 (例如MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6和MAGE-12)、MART-1、间皮素、mL-IAP、Muc1、Muc16 (CA-125)、MET、MUM1、NA17、NGEP、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ES01、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PDGFR- α 、PDGFR- β 、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PLAC1、PRLR、PRAME、PSCA、PSGR、PSMA (FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、STn、存活蛋白、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和尿蛋白-3, 以及本文列出的任何多肽的片段。

[0328] 示例性抗原还包括但不限于BCMA、SLAMF7、B7H4、gPNMB、UPK3A和LGR5。示例性抗原还包括但不限于MUC16、PSMA、STEAP2和HER2。

[0329] 在一些实施方案中, 抗原还包括但不限于血液学靶, 例如, CD22、CD30、CD33、CD79a和CD79b。

[0330] 本文的一些实施方案是对治疗或诊断用途特异性的靶。在一种实施方案中, 制备结合剂以与定义为肿瘤抗原的抗原相互作用并结合, 所述抗原包括对一种类型的肿瘤特异的抗原或在特定类型的肿瘤上共有、过表达或修饰的抗原。实例包括: 肺癌的 α -肌动蛋白-4、黑素瘤的ARTC1、慢性髓性白血病的BCR-ABL融合蛋白、黑素瘤的B-RAF、CLPP或Cdc27、鳞

状细胞癌的CASP-8和肾细胞癌的hsp70-2以及以下共有的肿瘤特异性抗原,例如:BAGE-1、gAGE、gnTV、KK-LC-1、MAGE-A2、NA88-A、TRP2-INT2。在一些实施方案中,抗原是PRLR或HER2。在一些实施方案中,抗体结合STEAP2、MUC16、EGFR、EGFRVIII、FGR2或PRLR。

[0331] 在一些实施方案中,抗原包括HER2。在一些实施方案中,抗原包括STEAP2。在一些实施方案中,抗原包括MET。在一些实施方案中,抗原包括EGFRVIII。在一些实施方案中,抗原包括MUC16。在一些实施方案中,抗原包括PRLR。在一些实施方案中,抗原包括PSMA。在一些实施方案中,抗原包括FGFR2。

[0332] 在一些实施方案中,BA是抗HER2抗体、抗STEAP2抗体、抗MET抗体、抗EGFRVIII抗体、抗MUC16抗体、抗PRLR抗体、抗PSMA抗体或抗FGFR2抗体、抗HER2/HER2双特异性抗体、抗MET/MET双特异性抗体或抗FOLR1抗体或其抗原结合片段。

[0333] 在一些实施方案中,BA靶向选自自由以下组成的组的癌症:乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肝癌或脑癌。

[0334] 适于蛋白-药物缀合物的抗HER2抗体

[0335] 在一些实施方案中,抗体是抗HER2抗体。在一些实施方案中,抗体是曲妥珠单抗、帕妥珠单抗(2C4)或马吉妥昔单抗(margetuximab, MGAH22)。在一些实施方案中,抗体为曲妥珠单抗。根据某些实施方案,根据本公开内容的蛋白-药物缀合物,例如ADC,包括抗HER2抗体。在一些实施方案中,抗HER2抗体可以包括WO 2019/212965 A1中描述的那些。

[0336] 在一些实施方案中,抗体是抗HER2/HER2双特异性抗体,其包括特异性结合人类HER2的第一表位的第一抗原结合结构域(D1)和特异性结合人类HER2的第二表位的第二抗原结合结构域(D2)。

[0337] 在某些实施方案中,抗HER2/HER2双特异性抗体的D1结构域和D2结构域彼此是非竞争性的。D1与D2之间对HER2结合的非竞争意味着D1和D2来源于的各自的单特异性抗原结合蛋白对人类HER2结合不彼此竞争。示例性抗原结合蛋白竞争测定是本领域已知的。

[0338] 在某些实施方案中,D1和D2与HER2上的不同(例如,非重叠或部分地重叠)表位结合。

[0339] 在一个非限制性实施方案中,本公开内容提供了包括双特异性抗原结合分子的蛋白-药物缀合物,该双特异性抗原结合分子包括:

[0340] 第一抗原结合结构域(D1);和

[0341] 第二抗原结合结构域(D2);

[0342] 其中D1特异性结合人类HER2的第一表位;并且

[0343] 其中D2特异性结合人类HER2的第二表位。

[0344] 抗HER2/HER2双特异性抗体可以使用两种单独的单特异性抗HER2抗体的抗原结合结构域来构建。例如,单克隆单特异性抗HER2抗体的集合可以使用本领域已知的标准方法产生。因此产生的单独抗体可以成对地彼此测试与HER2蛋白的交叉竞争。如果两种不同的抗HER2抗体能够同时与HER2结合(即,不彼此竞争),那么根据本公开内容,来自第一抗HER2抗体的抗原结合结构域和来自第二、非竞争性抗HER2抗体的抗原结合结构域可以被工程化为单个抗HER2/HER2双特异性抗体。

[0345] 根据本公开内容,双特异性抗原结合分子可以是单个多功能多肽,或者它可以是彼此共价或非共价缔合的两个或更多个多肽的多聚体复合物。如本公开内容将明显的,具

有同时结合HER2分子的两个单独的、不相同的表位的能力的任何抗原结合构建体被认为是双特异性抗原结合分子。本文描述的任何双特异性抗原结合分子或其变体可以使用如本领域普通技术人员已知的标准分子生物学技术(例如重组DNA和蛋白表达技术)来构建。

[0346] 在另一个方面,本公开内容提供了一种药物组合物,包括特异性结合HER2的重组人类抗体或其片段和药学上可接受的载体。在一种非限制性实施方案中,抗体可以结合HER2蛋白上的两个单独的表位,即抗体是HER2/HER2双特异性抗体。在一个相关方面,本公开内容特征在于一种组合物,该组合物是抗HER2/HER2抗体和第二治疗剂的组合。在一种实施方案中,第二治疗剂是有效地与抗HER2/HER2抗体组合的任何剂。涉及本公开内容的抗HER2/HER2双特异性抗体的另外的组合疗法和共制剂在本文别处公开。

[0347] 在另一个方面,本公开内容提供了用于使用本公开内容的抗HER2/HER2双特异性抗体靶向/杀伤表达HER2的肿瘤细胞的治疗方法,其中该治疗方法包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的包括本公开内容的抗HER2/HER2抗体的药物组合物。在一些情况下,抗HER2/HER2抗体(或其抗原结合片段)可以用于治疗乳腺癌,或者可以通过包括但不限于修饰Fc结构域以增加ADCC(参见例如Shield等人(2002) JBC 277:26733)、放射免疫疗法、抗体-药物缀合物的方法或用于增加肿瘤消融效率的其他方法来修饰以更具细胞毒性。

[0348] 本公开内容还包括本公开内容的抗HER2抗体在制造用于治疗与表达HER2的细胞相关或由其引起的疾病或紊乱(例如,癌症)的药物中的用途。在一个方面,本公开内容涉及一种用于在医学中使用的包括如本文公开的抗HER2抗体或抗原结合片段或HER2/HER2双特异性抗体的化合物。在一个方面,本公开内容涉及一种用于在医学中使用的包括如本文公开的抗体-药物缀合物(ADC)的化合物。

[0349] 在又一个方面,本公开内容提供了用于诊断应用诸如例如成像试剂的双特异性抗HER2/HER2抗体。

[0350] 抗体缀合

[0351] 用于与抗体或抗原结合片段的残基缀合的技术和接头是本领域已知的。可以在本方面的上下文中使用示例性氨基酸,包括,例如,赖氨酸(参见例如,US 5,208,020;US 2010/0129314;Hollander等人,Bioconjugate Chem.,2008,19:358-361;WO 2005/089808;US 5,714,586;US 2013/0101546;和US 2012/0585592)、半胱氨酸(参见例如,US 2007/0258987;WO 2013/055993;WO 2013/055990;WO 2013/053873;WO 2013/053872;WO 2011/130598;US 2013/0101546;和US 7,750,116)、硒代半胱氨酸(参见例如,WO 2008/122039;以及Hofer等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,2008,105:12451-12456)、甲酰甘氨酸(参见例如,Carrico等人,Nat.Chem.Biol.,2007,3:321-322;Agarwal等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,2013,110:46-51,以及Rabuka等人,Nat.Protocols,2012,10:1052-1067)、非天然氨基酸(参见例如,WO 2013/068874和WO 2012/166559)、以及酸性氨基酸(参见例如,WO 2012/05982)。赖氨酸缀合也可以通过NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)进行。通过在硫醇之间形成碳桥,接头也可以与半胱氨酸残基(包括裂解的链间二硫键的半胱氨酸残基)缀合(参见例如,US 9,951,141和US 9,950,076)。接头也可以经由与糖类(参见例如,US2008/0305497、WO 2014/065661和Ryan等人,Food&Agriculture Immunol.,2001,13:127-130)和二硫接头(参见例如,WO 2013/085925、WO 2010/010324、WO 2011/018611和Shaunak等人,Nat.Chem.Biol.,2006,2:312-313)附接而与抗原结合蛋白结合。位点特异性缀合技术也可

以用于与抗体或抗原结合蛋白的特定残基直接缀合(参见例如,Schumacher等人,J Clin Immunol (2016) 36 (增刊1):100)。在下文更详细讨论的特定实施方案中,位点特异性缀合技术包括经由转谷氨酰胺酶的谷氨酰胺缀合(参见例如,Schibbli,Angew Chemie Inter编著 2010, 49, 9995)。

[0352] 通过赖氨酸和/或半胱氨酸,例如经由马来酰亚胺或酰胺缀合连接的根据本公开内容的有效载荷被包括在本公开内容的范围内。

[0353] 在一些实施方案中,本公开内容的蛋白-药物缀合物根据两步方法产生,其中步骤1是基于赖氨酸的接头的缀合,例如与NHS-酯接头缀合,并且步骤2是有效载荷缀合反应(例如,1,3-环加成反应)。

[0354] 在一些实施方案中,本公开内容的蛋白-药物缀合物根据两步方法产生,其中步骤1是基于半胱氨酸的接头的缀合,例如与马来酰亚胺接头缀合,并且步骤2是有效载荷缀合反应(例如,1,3-环加成反应)。

[0355] 在一些实施方案中,本公开内容的蛋白-药物缀合物根据两步方法产生,其中步骤1是转谷氨酰胺酶介导的位点特异性缀合,并且步骤2是有效载荷缀合反应(例如,1,3-环加成反应)。

[0356] 图1描绘了使用两步缀合方法生成的根据本公开内容的位点特异性ADC的结构:步骤1:将去糖基化或N297Q突变的抗体与胺-PEG3-叠氮基接头(Al-N₃)经由MTG介导的缀合与Ab-Q295/7位点位点特异性缀合以生成叠氮基官能化的抗体(Ab(Al)₄);并且步骤2:将接头-有效载荷(L₂P#)经由炔烃与Ab(Al)₄的[3+2]环加成附接至抗体。具有接头-有效载荷的所有ADC缀合在抗体的Q295/297位点上。

[0357] 步骤1:转谷氨酰胺酶介导的位点特异性缀合

[0358] 在一些实施方案中,蛋白(例如抗体)可以根据已知方法被修饰以提供谷氨酰胺酰基修饰的蛋白。用于缀合抗体和伯胺化合物的技术是本领域已知的。本文采用位点特异性缀合技术,经由谷氨酰胺转胺酶使用谷氨酰胺缀合来指导与谷氨酰胺的缀合(参见例如,Schibbli,Angew Chemie Inter编著2010, 49, 9995)。

[0359] 本公开内容的包括伯胺的化合物(例如,接头L1)可以经由基于转谷氨酰胺酶的化学-酶促缀合(参见例如,Dennler等人,Protein Conjugate Chem. 2014, 25, 569-578,以及WO 2017/147542)与结合剂(例如,蛋白,例如,抗体)的一个或更多个谷氨酰胺残基缀合。例如,在存在转谷氨酰胺酶的情况下,抗体的一个或更多个谷氨酰胺残基可以与伯胺接头化合物偶联。简言之,在一些实施方案中,具有谷氨酰胺残基(例如,gln295,即Q295残基)的结合剂在存在酶转谷氨酰胺酶的情况下,用以上描述含伯胺的接头L1处理。在某些实施方案中,结合剂是非糖基化的。在某些实施方案中,结合剂是去糖基化的。

[0360] 在某些实施方案中,结合剂(例如,蛋白,例如,抗体)在至少一个多肽链序列中包括至少一个谷氨酰胺残基。在某些实施方案中,结合剂包括两个重链多肽,该两个重链多肽各自具有一个gln295残基。在另外的实施方案中,结合剂在除了重链295之外的位点处包括一个或更多个谷氨酰胺残基。

[0361] 在一些实施方案中,结合剂诸如抗体可以通过定点诱变制备,以在某个位点处插入谷氨酰胺残基,而不会导致抗体功能或结合失效。例如,本文包括如本文描述的携带一个或更多个Asn297Gln(N297Q)突变的抗体。在某些实施方案中,结合剂包括两个重链多肽,该

两个重链多肽各自具有一个gln295和一个gln297残基。

[0362] 在一些实施方案中,具有gln295残基和/或N297Q突变的抗体在其可变区中包含一个或更多个另外的天然存在的谷氨酰胺残基,其可以被转谷氨酰胺酶接近,并且因此能够与接头或接头-有效载荷缀合。示例性天然存在的谷氨酰胺残基可以存在于,例如,轻链的Q55处。在这样的情况下,经由转谷氨酰胺酶缀合的结合剂例如抗体可以具有高于预期的LAR值(例如,高于4的LAR)。任何这样的抗体都可以从天然或人工来源分离。

[0363] 在本公开内容的某些实施方案中,接头-抗体比或LAR是每个抗体1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个接头L1分子。在一些实施方案中,LAR是从1至8。在一些实施方案中,LAR是从1至6。在某些实施方案中,LAR是从2至4。在一些情况下,LAR是从2至3。在某些情况下,LAR是从0.5至3.5。在一些实施方案中,LAR是约1、或约1.5、或约2、或约2.5、或约3、或约3.5。在一些实施方案中,LAR是2。在一些实施方案中,LAR是4。

[0364] 步骤2:有效载荷缀合反应

[0365] 在某些实施方案中,根据本公开内容的接头L1包括至少一个能够在转谷氨酰胺化之后进一步反应的反应性基团B'。在这些实施方案中,谷氨酰胺酰基修饰的蛋白(例如,抗体)能够与反应性有效载荷化合物或反应性接头-有效载荷化合物(例如,如本文公开的L2-P)进一步反应,以形成蛋白-有效载荷缀合物。更具体地,反应性接头-有效载荷化合物L2-P可以包括能够与接头L1的反应性基团B'反应的反应性基团B''。在某些实施方案中,根据本公开内容的反应性基团B'包括能够进行1,3-环加成反应的部分。在某些实施方案中,反应性基团B'是叠氮化物。在某些实施方案中,反应性基团B''包括炔烃(例如,末端炔烃或内部应变炔烃)。在本公开内容的某些实施方案中,反应性基团B'与结合剂和转谷氨酰胺反应条件相容。

[0366] 在本公开内容的某些实施方案中,接头L1分子包括一个反应性基团B'。在本公开内容的某些实施方案中,接头L1分子包括多于一个反应性基团B'。

[0367] 在某些实施方案中,反应性接头-有效载荷L2-P包括一个有效载荷分子($n=1$)。在某些其他实施方案中,反应性接头-有效载荷L2-P包括两个或更多个有效载荷分子($n \geq 2$)。在某些实施方案中,反应性接头-有效载荷L2-P包括1个至12个有效载荷分子、或1个至10个有效载荷分子、或1个至8个有效载荷分子、或1个至6个有效载荷分子、或1个至4个有效载荷分子、或1个至2个有效载荷分子。

[0368] 在某些实施方案中,反应性接头-有效载荷L2-P包括一个有效载荷分子。在这样的L2-P与BA-L1-B' (例如,其中B'是叠氮化物,BA-L1-N₃)反应时,DAR将约等于BA-L1-B'的LAR。例如,如果包括一个有效载荷分子的L2-P与具有4的LAR的BA-L1-B'反应(例如,经由Q295和N297Q转谷氨酰胺化),所得蛋白-药物缀合物将具有4的DAR。

[0369] 在某些实施方案中,反应性接头-有效载荷L2-P包括2个有效载荷分子。在这样的L2-P与BA-L1-B'反应时,DAR将是BA-L1-B'LAR的约2倍。例如,如果包括2个有效载荷分子的L2-P与具有4的LAR的BA-L1-B'反应(例如,经由Q295和N297Q转谷氨酰胺化),所得蛋白-药物缀合物将具有8的DAR。

[0370] 在本公开内容的某些实施方案中,药物-抗体比或DAR(例如,缩写为小写字母n)是每个抗体约1个至约30个、或约1个至约24个、或约1个至约20个、或约1个至约16个、或约1个至约12个、或约1个至约10个、或约1个至约8个、或约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个或8个

有效载荷分子。在一些实施方案中,DAR是从1至30。在一些实施方案中,DAR是从1至24。在一些实施方案中,DAR是从1至16。在一些实施方案中,DAR是1至8。在一些实施方案中,DAR是从1至6。在某些实施方案中,DAR是从2至4。在一些情况下,DAR是从2至3。在某些情况下,DAR是从0.5至3.5。在一些实施方案中,DAR是4。

[0371] 在一个方面,本公开内容提供了一种产生具有根据式(A)的结构化合物的方法:

[0372] $BA-(L1-B-L2-P)_n$ (A)

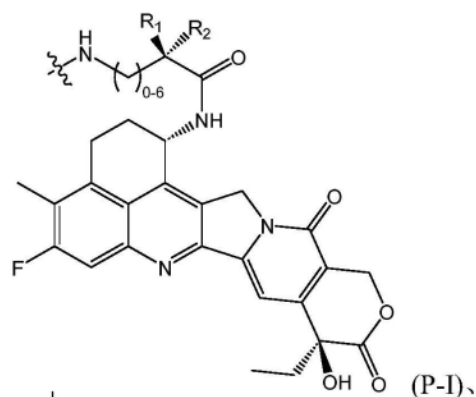
[0373] 其中:

[0374] BA是抗体或其抗原结合片段;

[0375] L1是与所述BA的谷氨酰胺残基的侧链共价结合的第一接头;

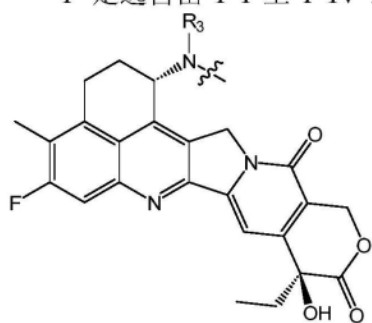
[0376] B是包括三唑的部分;

[0377] L2是与所述P共价结合的第二接头;

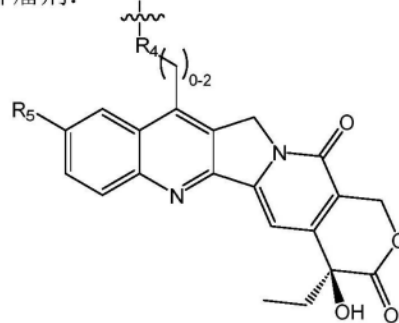


P 是选自由 P-I 至 P-IV 组成的组的抗肿瘤剂:

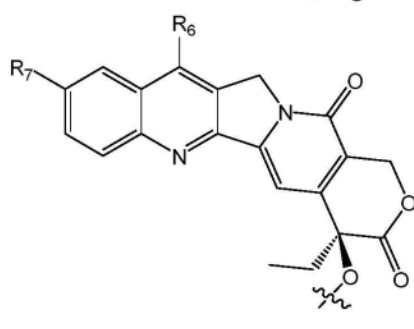
[0378]



(P-II) ;



(P-III) ;



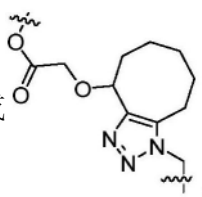
(P-IV),

[0379] R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中v是从0至12的整数;

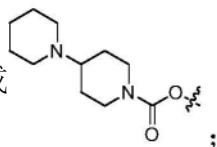
[0380] R_2 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基和 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$,其中v是从0至12的整数;

[0381] R_3 是氢、 C_{1-6} 烷基、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-C(=O)OH$ 、 $-(CH_2)_v$ -苯基、 $-(CH_2)_v-SO_2CH_3$ 和 $-CO-(CH_2)_v-O-COCH_3$,其中v是从0至12的整数;

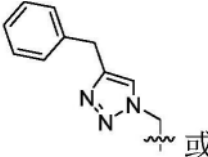
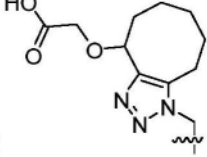
[0382] R_4 是 $-NH-$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})(-SO_2CH_3)$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})(-(CH_2)_v-OH)$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})(CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})(-(CH_2)_v-O-CH_2-NH-CO-CH_2-NH_2)$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})(-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH)$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})(-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2)$ 、 $-N(-C_{1-6}\text{烷基})(-CO-$

$CH(NH_2)-(CH_2)_v\text{-苯基})$ 或  其中v是从0至12的整数；

[0383] R_5 是H、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 或

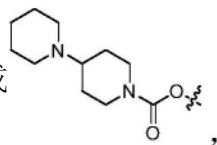


[0384] R_6 是氢、 $-C_{1-6}\text{烷基}$ 、 $-(CH_2)_v-OH$ 、 $-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v\text{-苯基}$ 、 $-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CH_2\text{-苯基}$ 、 $-(CH_2)_v-NMe-CH_2\text{-苯基}-OMe$ 、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-(CH_2)_v-CCH$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v\text{-苯基}$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-N_3$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH$

$(NH_2)-(CH_2)_v-NH_2$ 、 $-(CH_2)_v-NH-CO-CH(NH_2)-(CH_2)_v-COOH$ 、 或 

其中v独立地是从0至12的整数；

[0385] R_7 是H、 $-OH$ 、 $-OCH_3$ 或

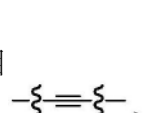
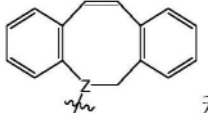
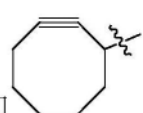


[0386] 其中所述方法包括以下步骤：

[0387] a) 在存在转谷氨酰胺酶的情况下，使包括至少一个谷氨酰胺残基的BA与化合物L1-B'接触，

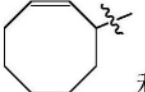
[0388] b) 使步骤a)的产物与一个或更多个当量的化合物B"-L2-P接触，其中所述基团B'能够与所述基团B'共价附接，

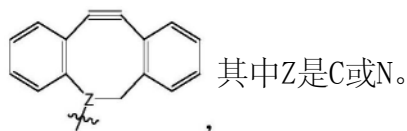
[0389] 其中所述基团B'和B"中的一个选自 $-N_3$ 和 $-\text{N}=\text{N}-\text{N}=\text{N}-$ 并且所述基团B'和B"中的另

一个选自 、 和 ，其中Z是C或N；以及

[0390] c) 分离所产生的式(A)的化合物。

[0391] 在一种实施方案中，基团B'是叠氮化物 $(-N_3)$ 。

[0392] 在一种实施方案中，基团B"包括炔烃。在一种实施方案中，基团B"选自  和



[0393] 在一种实施方案中,谷氨酰胺残基Gln天然存在于BA的CH₂结构域或CH₃结构域中。在另一种实施方案中,谷氨酰胺残基Gln通过修饰一个或更多个氨基酸而引入至BA中。在一种实施方案中,Gln是Q295或N297Q。

[0394] 在一种实施方案中,转谷氨酰胺酶是微生物转谷氨酰胺酶(MTG)。在一种实施方案中,转谷氨酰胺酶是细菌转谷氨酰胺酶(BTG)。

[0395] 治疗制剂和施用

[0396] 本公开内容提供了包括本公开内容的蛋白-药物缀合物的药物组合物。

[0397] 在一个方面,本公开内容提供了包括根据本公开内容的蛋白-药物缀合物群体的组合物,所述蛋白-药物缀合物群体具有约0.5至约30.0的药物-抗体比(DAR)。

[0398] 在一种实施方案中,组合物具有约1.0至约2.5的DAR。

[0399] 在一种实施方案中,组合物具有约2的DAR。

[0400] 在一种实施方案中,组合物具有约3.0至约4.5的DAR。

[0401] 在一种实施方案中,组合物具有约4的DAR。

[0402] 在一种实施方案中,组合物具有约6.5至约8.5的DAR。

[0403] 在一种实施方案中,组合物具有约8的DAR。

[0404] 在一种实施方案中,组合物具有约10至约14的DAR。

[0405] 在一种实施方案中,组合物具有约12的DAR。

[0406] 在一种实施方案中,组合物具有约14至约18的DAR。

[0407] 在一种实施方案中,组合物具有约16的DAR。

[0408] 在一种实施方案中,组合物具有约20至约24.5的DAR。

[0409] 在一种实施方案中,组合物具有约24的DAR。

[0410] 本公开内容的组合物用合适的载体、赋形剂和提供改进的转移、递送、耐受性等的其他试剂配制。许多适当的制剂可见于所有药物化学家已知的配方集中:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括例如粉末、糊剂、软膏、胶冻剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)的囊泡(诸如LIPOFECTINTM, Life Technologies, Carlsbad, CA)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、乳液 carbowax(多种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含carbowax的半固体混合物。还参见Powell等人"Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0411] 向患者施用的蛋白-药物缀合物的剂量可以根据患者的年龄和大小、靶疾病、状况、施用途径等而变化。合适的剂量通常根据体重或体表面积来计算。在本公开内容的蛋白-药物缀合物用于成人患者中的治疗目的时,通常以约0.01mg/kg至约20mg/kg体重、更优选地约0.02mg/kg至约7mg/kg、约0.03mg/kg至约5mg/kg或约0.05mg/kg至约3mg/kg体重的单剂量静脉内施用本公开内容的蛋白-药物缀合物可以是有利的。根据状况的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。用于施用蛋白-药物缀合物的有效剂量和时间表可以凭经验确定;例如,可以通过定期评价监测患者进展,并相应调整剂量。此外,可以使用本领域熟

知的方法进行剂量的物种间缩放(例如,Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)。

[0412] 多种递送系统是已知的,并且可以用于施用本公开内容的药物组合物,例如,包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达突变体病毒的重组细胞、受体介导的内吞中(参见例如,Wu等人,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432)。引入方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。组合物可以通过任何方便的途径,例如通过输注或快速浓注、通过经由粘膜上皮或粘膜皮层衬里(诸如口腔黏膜、直肠和肠粘膜等)吸收被施用,并且可以与其他生物活性剂一起被施用。施用可以是全身性的或局部的。

[0413] 本公开内容的药物组合物可以通过标准针头和注射器皮下或静脉内递送。此外,关于皮下递送,笔递送装置容易在递送本公开内容的药物组合物方面具有应用。这样的笔递送装置可以是可重复使用的或一次性使用的。可重复使用的笔递送装置通常利用包含药物组合物的可更换药筒。在药筒内的全部药物组合物已经被施用并且药筒是空的后,空的药筒可以容易地被弃去并被包含药物组合物的新药筒替代。然后,笔递送装置可以重复使用。在一次性使用的笔递送装置中,不存在可更换的药筒。而是,一次性使用的笔递送装置预先填充(comes prefilled)有保持在装置内的储器(reservoir)中的药物组合物。在储器中的药物组合物被清空后,整个装置就被弃去。

[0414] 许多可重复使用的笔和自动注射器递送装置在皮下递送本公开内容的药物组合物方面具有应用。实例包括,但不限于,仅举几个例子,AUTOPEN™(Owen Mumford,Inc.,Woodstock,UK)、DISETRONIC™笔(Disetronic Medical Systems,Bergdorf,Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25™笔、HUMALOG™笔、HUMALIN 70/30™笔(Eli Lilly and Co.,Indianapolis,IN)、NOVOPEN™I、II和III(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk,Copenhagen,Denmark)、BD™笔(Becton Dickinson,Franklin Lakes,NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™和OPTICLIK™(Sanofi-Aventis, Frankfurt,Germany)。在本公开内容的药物组合物的皮下递送方面具有应用的一次性使用的笔递送装置的实例,包括但不限于,仅举几个例子,SOLOSTAR™笔(Sanofi-Aventis)、FLEXPEN™(Novo Nordisk)和KWIKPEN™(Eli Lilly)、SURECLICK™自动注射器(Amgen,Thousand Oaks,CA)、PENLET™(Haselmeier,Stuttgart,Germany)、EPIPEN(Dey,L.P.)和 HUMIRA™笔(Abbott Labs,Abbott Park IL)。

[0415] 在某些情况下,药物组合物可以在控制释放系统中递送。在一种实施方案中,可以使用泵(参见,Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一种实施方案中,可以使用聚合物材料;参见,Medical Applications of Controlled Release,Langer和Wise(编著),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在又另一种实施方案中,控制释放系统可以置于组合物的靶附近,因此仅要求全身剂量的一部分(参见例如,Goodson,1984,in Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页)。Langer,1990,Science 249:1527-1533的综述中讨论了其他控制释放系统。

[0416] 可注射制品可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。这些可注射制品可以通过公众已知的方法制备。例如,可注射制品可以通过,例如,将以上描述的抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在无菌水性介质或常规用于注射的油性介质中来制备。作为注射用水性介质,存在,例如,生理盐水、包含葡萄糖和其他辅助剂的等渗溶液等,其可以与适当的增溶剂组合使用,所述增溶剂诸如醇(例如,乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二

醇)、非离子表面活性剂[例如,聚山梨醇酯80、HCO-50(氢化蓖麻油的聚氧乙烯(50mol)加合物)]等。作为油性介质,采用了,例如芝麻油、大豆油等,其可以与增溶剂诸如苯甲酸苄酯、苄醇等组合使用。这样制备的注射剂优选地填充在合适的安瓿中。

[0417] 有利地,以上描述的用于口服或肠胃外使用的药物组合物以适于符合活性成分剂量的单位剂量制备为剂型。单位剂量的这样的剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊、注射剂(安瓿)、栓剂等。在单位剂量中,被包含的前述抗体的量通常是每剂型约5mg至约500mg;特别是在注射形式中,优选的是前述抗体以约5mg至约100mg被包含并且对于其他剂型以约10mg至约250mg被包含。

[0418] 蛋白-药物缀合物、接头-有效载荷和有效载荷的治疗用途

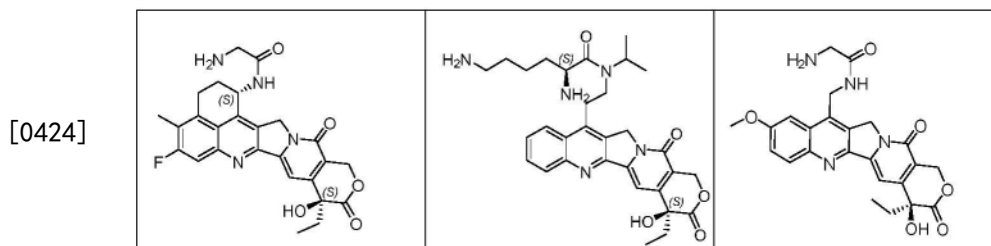
[0419] 在另一个方面,本文公开的蛋白-药物缀合物例如ADC尤其可用于治疗、预防和/或改善需要这样治疗的疾病、紊乱或状况。

[0420] 在一种实施方案中,本发明提供了一种治疗有相应需要的受试者的状况的方法,包括向受试者施用治疗有效量的根据本公开内容的化合物(例如,抗体-药物缀合物、接头-有效载荷和/或有效载荷),或包括根据本公开内容的任何化合物的组合物。

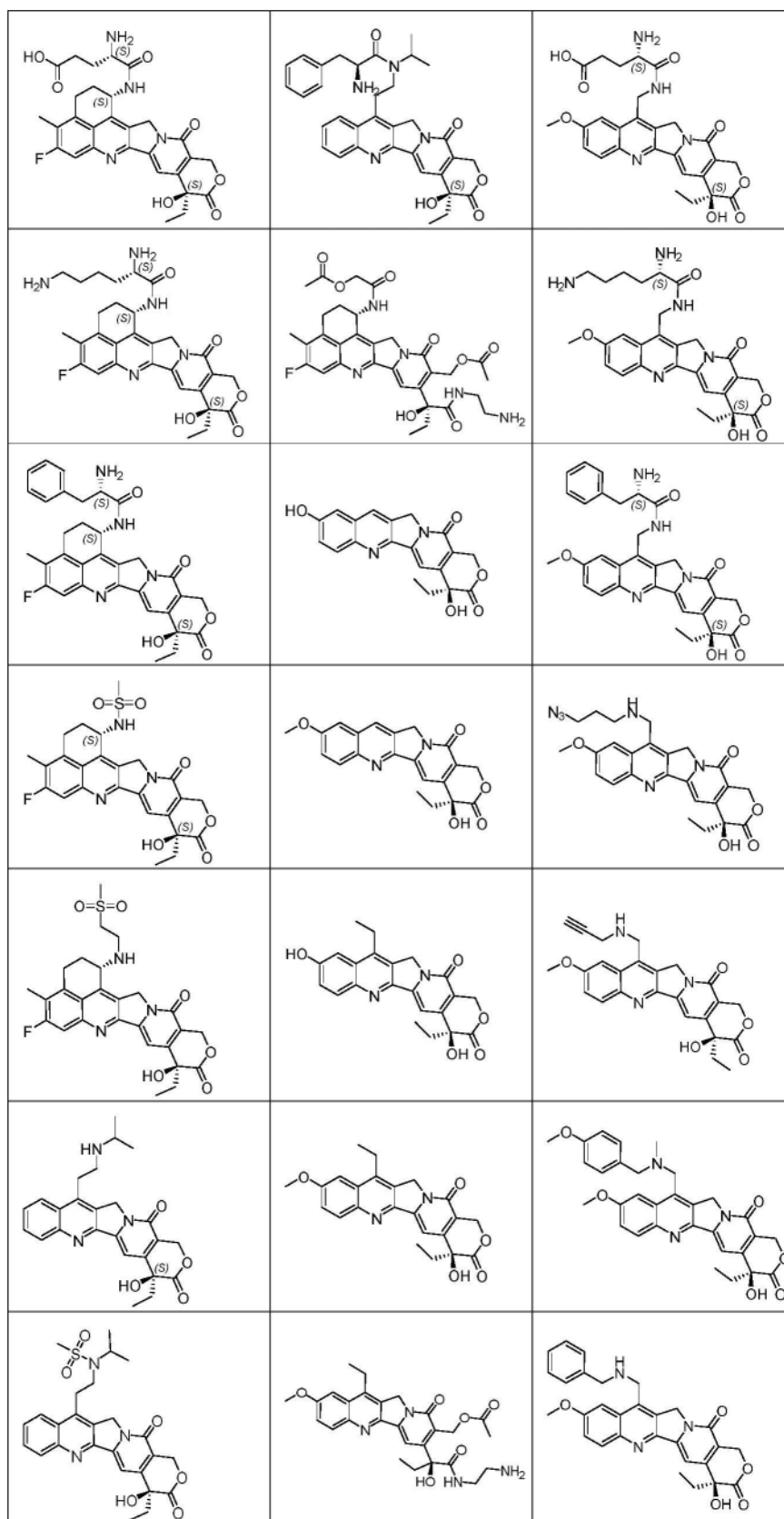
[0421] 在一种实施方案中,本文公开的蛋白-药物缀合物,例如ADC,可用于治疗癌症。在一种实施方案中,本文公开的蛋白-药物缀合物,例如ADC,可用于治疗选自以下组成的组的癌症:乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、肝癌或脑癌。在一种实施方案中,本文公开的蛋白-药物缀合物,例如ADC,可用于治疗HER2+乳腺癌。在一种实施方案中,本文公开的蛋白-药物缀合物,例如ADC,可用于治疗前列腺癌。

[0422] 在一个方面,本公开内容提供了一种将化合物选择性地递送到细胞中的方法。在一种实施方案中,将化合物选择性地递送到细胞中的方法包括将化合物与靶向抗体连接。在一种实施方案中,化合物是如以上描述的有效载荷。在一种实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一种实施方案中,细胞是人类细胞。在一种实施方案中,细胞是癌细胞。在一种实施方案中,癌细胞选自以下组成的组:乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、肺癌细胞、肝癌细胞或脑癌细胞。

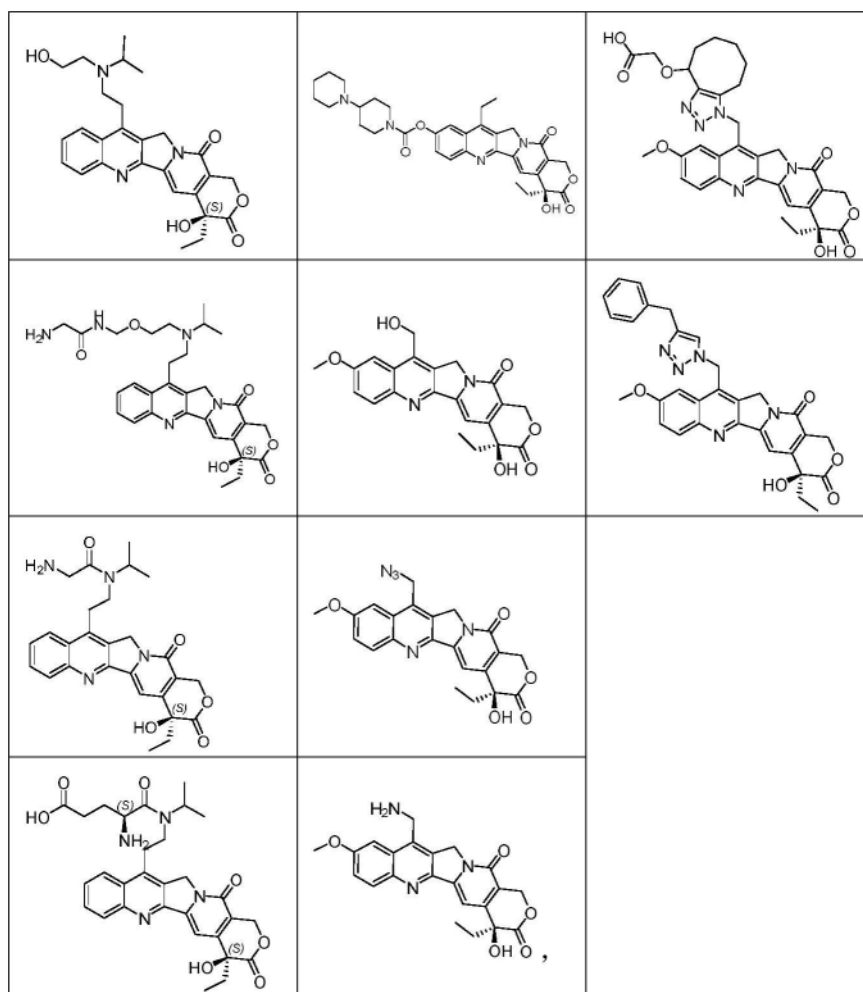
[0423] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种将具有选自以下组成的组的结构的化合物选择性递送到细胞中的方法:



[0425]



[0426]

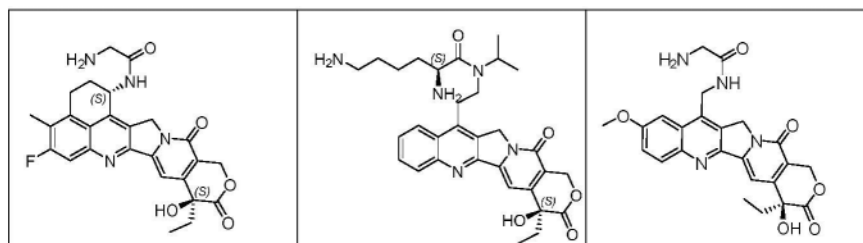


[0427] 或其药学上可接受的盐。

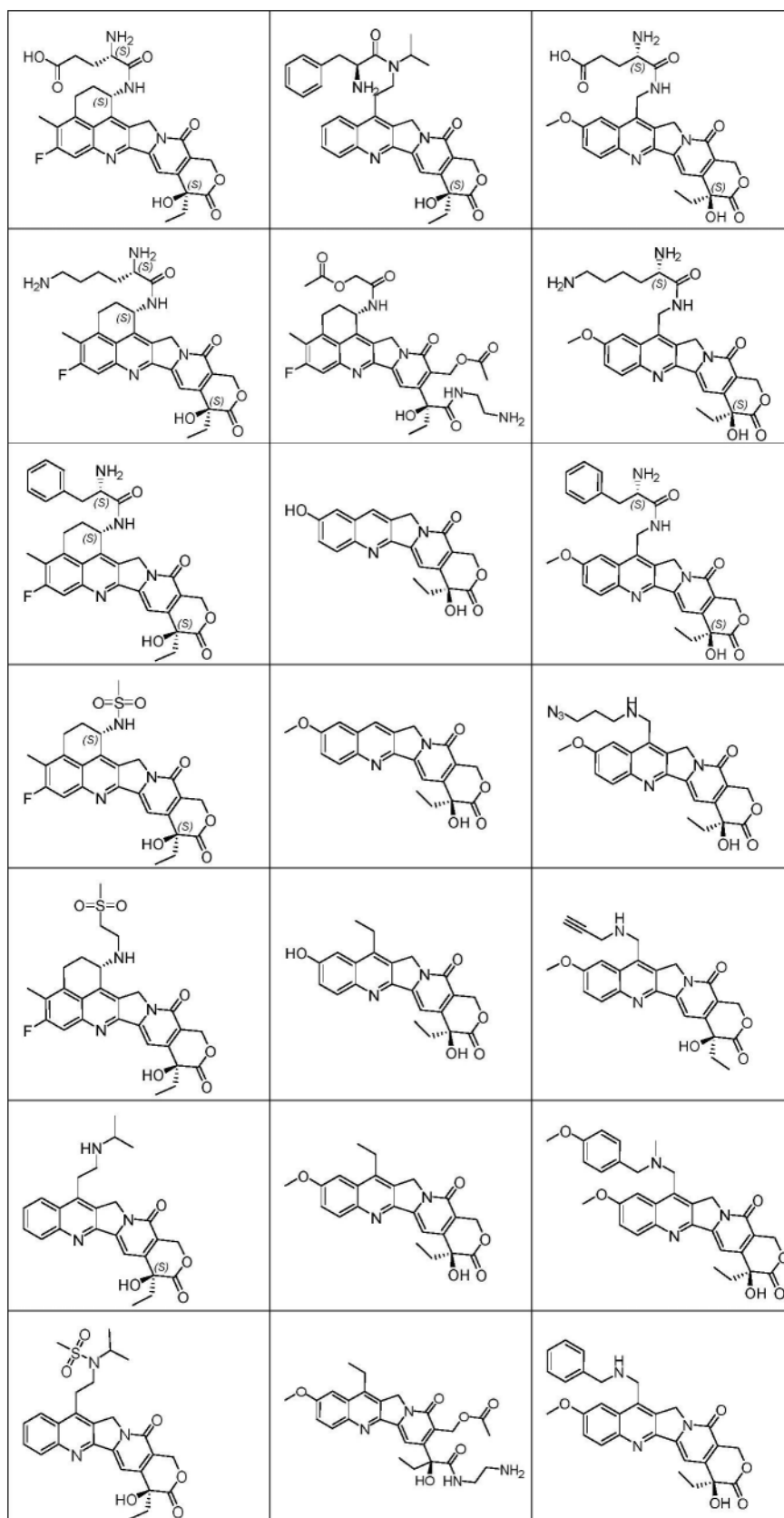
[0428] 在一个方面,本公开内容提供了一种用化合物选择性地靶向细胞表面上的抗原的方法。在一种实施方案中,用化合物选择性地靶向细胞表面上的抗原的方法包括将化合物与靶向抗体连接。在一种实施方案中,化合物是如以上描述的有效载荷。在一种实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在一种实施方案中,细胞是人类细胞。在一种实施方案中,细胞是癌细胞。在一种实施方案中,癌细胞选自由以下组成的组:乳腺癌细胞、卵巢癌细胞、前列腺癌细胞、肺癌细胞、肝癌细胞或脑癌细胞。

[0429] 某些实施方案中,本公开内容提供了一种用具有选自由以下组成的组的结构的化合物选择性地靶向细胞表面上的抗原的方法:

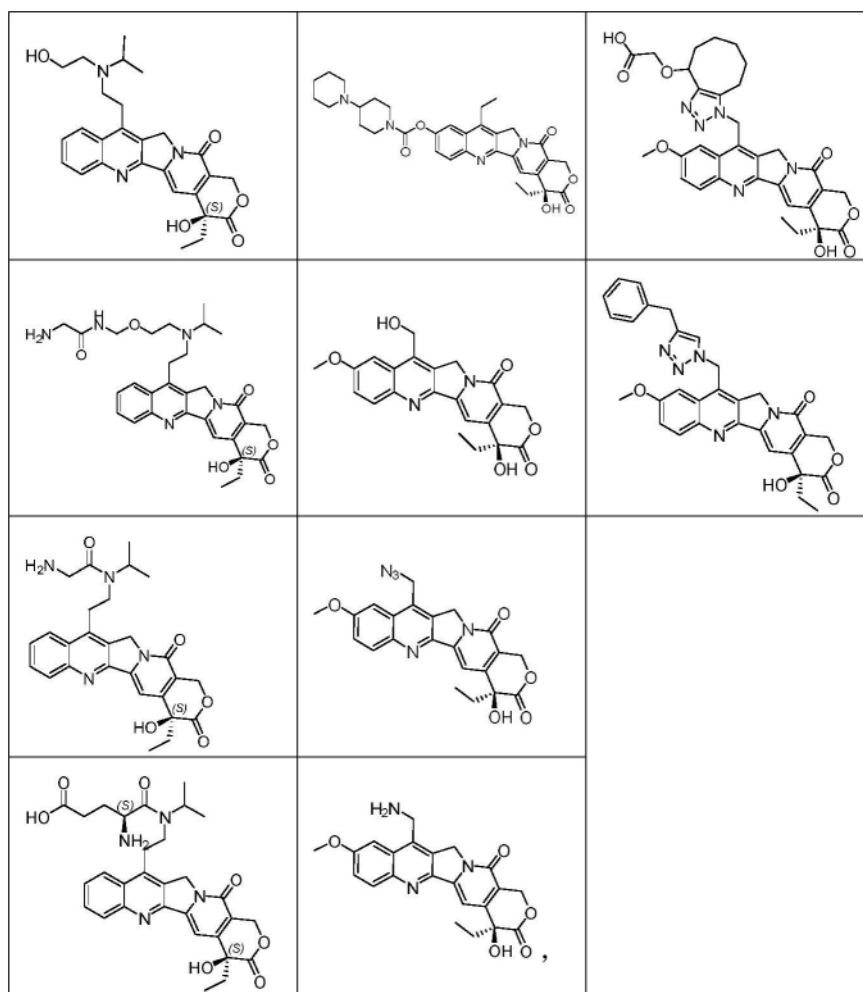
[0430]



[0431]



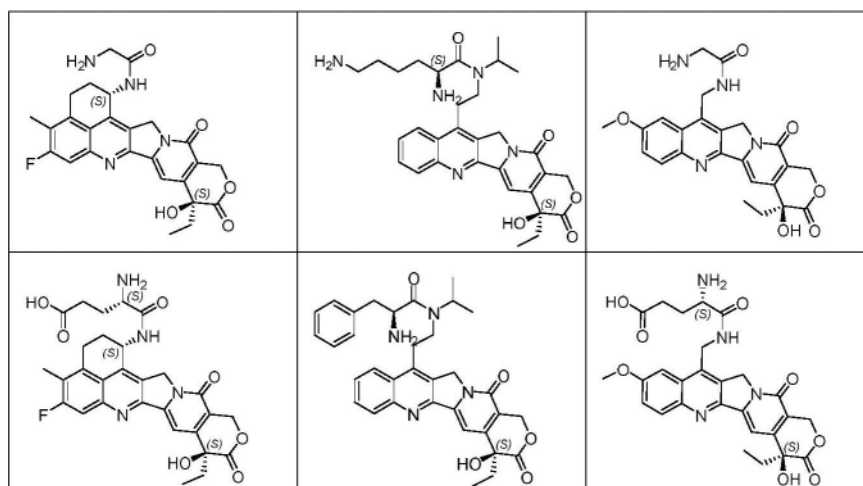
[0432]



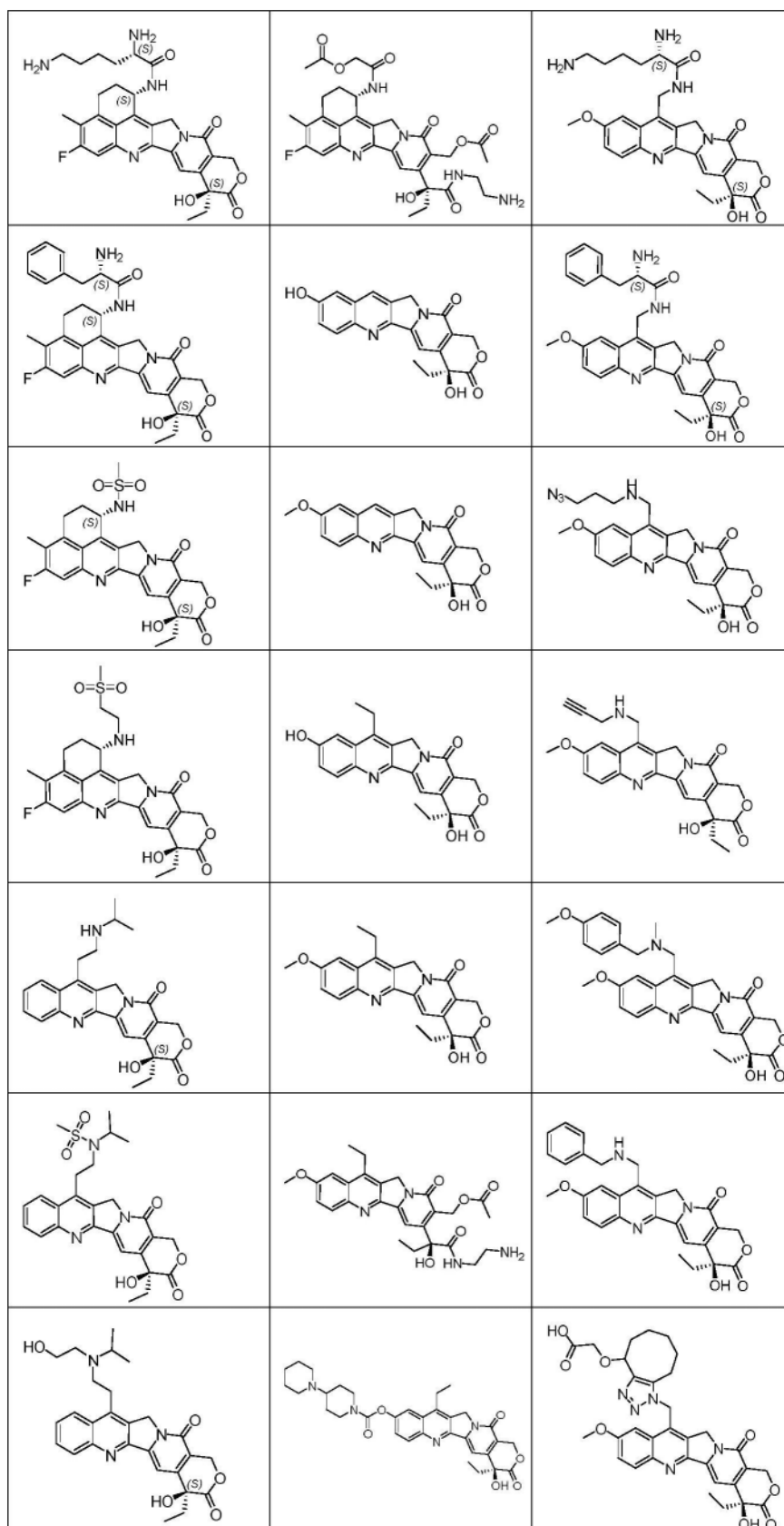
[0433] 或其药学上可接受的盐。

[0434] 在某些实施方案中,本公开内容提供了一种治疗肿瘤和/或癌症的方法,包括使肿瘤和/或癌症与具有选自以下组成的组的结构的化合物接触:

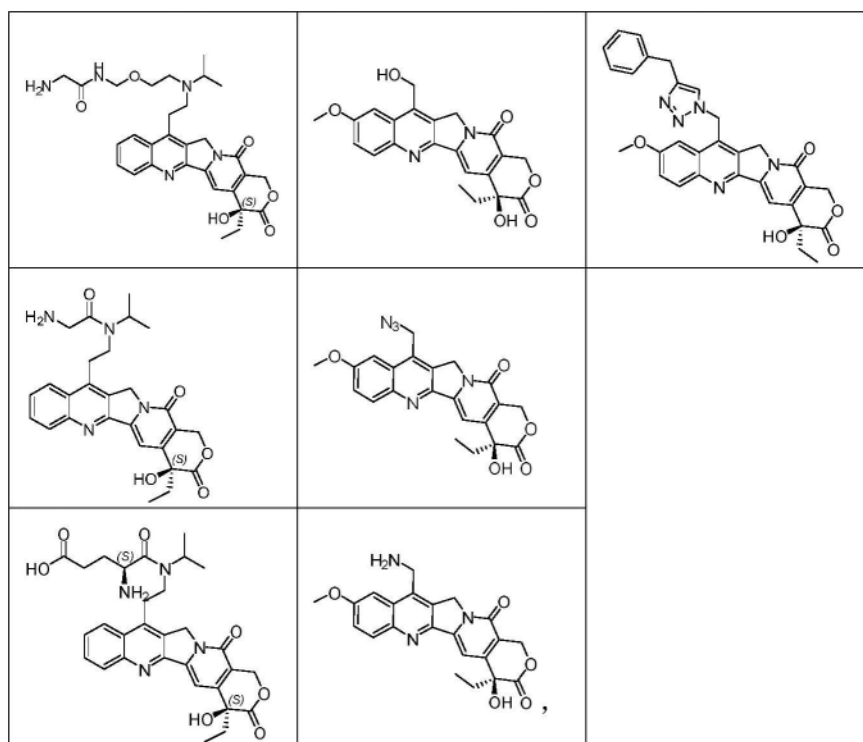
[0435]



[0436]



[0437]



[0438] 或其药学上可接受的盐。

[0439] 抗HER2抗体-药物缀合物

[0440] 在某些实施方案中,本文公开的蛋白-药物缀合物,例如ADC,尤其可用于治疗、预防和/或改善与HER2表达或活性相关或由HER2表达或活性介导的任何疾病或紊乱,或者可通过结合HER2而不与修饰的LDL竞争或者和/或促进HER2受体内化和/或减少细胞表面受体数目来治疗的任何疾病或紊乱。

[0441] 本公开内容的蛋白-药物缀合物(和包括其的治疗组合物)尤其可用于治疗其中刺激、激活和/或靶向免疫应答将是有益的任何疾病或紊乱。特别地,本公开内容的包括单特异性抗HER2抗体和双特异性抗HER2/HER2抗体两者的抗HER2蛋白-药物缀合物,可以用于治疗、预防和/或改善与HER2表达或活性或HER2+细胞增殖相关或由其介导的任何疾病或紊乱。实现本公开内容的治疗方法的作用机制包括在存在效应细胞的情况下例如通过CDC、凋亡、ADCC、吞噬或通过上述机制中的两种或更多种的组合杀伤表达HER2的细胞。可以使用本公开内容的蛋白-药物缀合物抑制或杀伤的表达HER2的细胞包括例如乳腺肿瘤细胞。

[0442] 在一种实施方案中,本公开内容的蛋白-药物缀合物(以及包括其的治疗组合物和剂型)包括双特异性抗原结合分子,该双特异性抗原结合分子包括:

[0443] 第一抗原结合结构域(D1);和

[0444] 第二抗原结合结构域(D2);

[0445] 其中D1特异性结合人类HER2的第一表位;并且

[0446] 其中D2特异性结合人类HER2的第二表位。

[0447] 在以上的一种实施方案中,D1和D2不彼此竞争与人类HER2的结合。

[0448] 本公开内容的蛋白-药物缀合物可以用于治疗例如在前列腺、膀胱、子宫颈、肺、结肠、肾、乳腺、胰腺、胃、子宫和/或卵巢中出现的原发性和/或转移性肿瘤。在某些实施方案中,本公开内容的蛋白-药物缀合物用于治疗以下癌症的一种或更多种:前列腺癌、膀胱癌、

宫颈癌、肺癌、结肠癌、肾癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、子宫癌和卵巢癌。根据本公开内容的某些实施方案,抗HER2抗体或抗HER2/HER2双特异性抗体可用于治疗罹患为IHC2+或更多的乳腺癌细胞的患者。根据本公开内容的其他相关实施方案,提供了包括向罹患为IHC2+或更多的乳腺癌细胞的患者施用如本文公开的抗HER2抗体或抗HER2/HER2抗体的方法。本领域已知的分析/诊断方法,诸如肿瘤扫描等,可以用于确定患者是否携带去势抵抗性肿瘤。

[0449] 在某些实施方案中,本公开内容还包括用于治疗受试者中剩余癌症的方法。术语“剩余癌症”意指在用抗癌疗法治疗后的受试者中一个或更多个癌细胞的存在或持续存在。

[0450] 本公开内容的蛋白-药物缀合物(和包括其的治疗组合物)尤其可用于治疗其中刺激、激活和/或靶向免疫应答将是有益的任何疾病或紊乱。特别地,本公开内容的包括抗HER2抗体或抗HER2/HER2抗体的蛋白-药物缀合物,可以用于治疗、预防和/或改善与HER2表达或活性或HER2+细胞增殖相关或由HER2表达或活性或HER2+细胞增殖介导的任何疾病或紊乱。实现本公开内容的治疗方法的作用机制包括在存在效应细胞的情况下例如通过CDC、凋亡、ADCC、吞噬或通过这一些机制中的两种或更多种的组合杀伤表达HER2的细胞。可以使用本公开内容的蛋白-药物缀合物抑制或杀伤的表达HER2的细胞包括例如乳腺肿瘤细胞。

[0451] 根据某些方面,本公开内容提供了用于治疗与HER2表达相关的疾病或紊乱(例如,乳腺癌)的方法,包括在受试者已被确定患有乳腺癌(例如,IHC2+乳腺癌)之后,向该受试者施用本文别处描述的抗HER2蛋白-药物缀合物或抗HER2/HER2双特异性蛋白-药物缀合物的一种或更多种。例如,本公开内容包括用于治疗乳腺癌的方法,包括在受试者接受激素疗法(例如,抗雄激素疗法)之后1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周或4周、2个月、4个月、6个月、8个月、1年或更长时间向患者施用包括抗HER2抗体或抗原结合分子或抗HER2/HER2双特异性抗体或抗原结合分子的蛋白-药物缀合物。

[0452] 在某些实施方案中,本公开内容还包括本公开内容的抗HER2抗体在制造用于治疗与表达HER2的细胞相关或由其引起的疾病或紊乱(例如癌症)的药物中的用途。在一个方面,本公开内容涉及一种用于在医学中使用的包括如本文公开的抗HER2抗体或抗原结合片段或抗HER2/HER2双特异性抗体或抗原结合片段的蛋白-药物缀合物。在一个方面,本公开内容涉及一种用于在医学中使用的包括如本文公开的抗体-药物缀合物(ADC)的化合物。

[0453] 组合疗法和制剂

[0454] 本公开内容提供了包括组合施用药物组合物与一种或更多种另外的治疗剂的方法,该药物组合物包括本文描述的示例性蛋白-药物缀合物(例如,抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和有效载荷的任何一种。可以与本公开内容的蛋白-药物缀合物(例如,抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和有效载荷组合或者与其组合施用的示例性另外的治疗剂包括,例如,HER2拮抗剂(例如,抗HER2抗体[例如,曲妥珠单抗]或HER2的小分子抑制剂或抗HER2抗体-药物缀合物或抗HER2/HER2双特异性抗体或抗HER2/HER2双特异性抗体-药物缀合物)、EGFR拮抗剂(例如,抗EGFR抗体[例如,西妥昔单抗或帕尼单抗]或EGFR的小分子抑制剂[例如,吉非替尼或埃罗替尼])、另一个EGFR家族成员诸如HER2/ErbB2、ErbB3或ErbB4的拮抗剂(例如,抗ErbB2、抗ErbB3或抗ErbB4抗体或ErbB2、ErbB3或ErbB4活性的小分子抑制剂)、EGFRvIII的拮抗剂(例如,特异性结合EGFRvIII的抗体)、cMET拮抗剂(例如,抗cMET抗体)、IGF1R拮抗剂(例如,抗IGF1R抗体)、B-raf抑制剂(例如,维罗非尼、索拉非尼、gDC-0879、PLX-4720)、PDGFR- α 抑制剂(例如,抗PDGFR- α 抗体)、PDGFR- β 抑制剂(例如,抗PDGFR- β

抗体)、VEGF拮抗剂(例如,VEGF-Trap,参见例如,US 7,087,411(在本文也称为“VEGF抑制融合蛋白”)、抗VEGF抗体(例如,贝伐单抗)、VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如,舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)、DLL4拮抗剂(例如,US2009/0142354中公开的抗DLL4抗体)、Ang2拮抗剂(例如,US2011/0027286中公开的抗Ang2抗体,诸如H1H685P)、FOLH1 (PSMA) 拮抗剂、PRLR拮抗剂(例如,抗PRLR抗体)、STEAP1或STEAP2拮抗剂(例如,抗STEAP1抗体或抗STEAP2抗体)、TMPRSS2拮抗剂(例如,抗TMPRSS2抗体)、MSLN拮抗剂(例如,抗MSLN抗体)、CA9拮抗剂(例如,抗CA9抗体)、uroplakin拮抗剂(例如,抗uroplakin抗体)等。

[0455] 可以有益地与本公开内容的蛋白-药物缀合物(例如,抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和有效载荷组合施用的其他剂包括细胞因子抑制剂,包括小分子细胞因子抑制剂和与细胞因子诸如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18或与其各自受体结合的抗体。本公开内容的药物组合物(例如,包括抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2蛋白-药物缀合物(例如,本文公开的抗体-药物缀合物)的药物组合物也可以作为治疗方案的一部分施用,该治疗方案包括选自以下的一种或更多种治疗组合:”ICE”:异环磷酰胺(例如,Ifex®)、卡铂(例如,Paraplatin®)、依托泊苷(例如,Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16);”DHAP”:地塞米松(例如,Decadron®)、阿糖胞苷(cytarabine)(例如,Cytosar-U®、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、ara-C)、顺铂(例如,Platinol®-AQ);和”ESHAP”:依托泊苷(例如,Etopophos®、Toposar®、VePesid®、VP-16)、甲泼尼龙(例如,Medrol®)、高剂量阿糖胞苷、顺铂(例如,Platinol®-AQ)。

[0456] 本公开内容还包括治疗组合,包括本文提及的蛋白-药物缀合物(例如抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和有效载荷的任何一种以及以下的抑制剂:HER2、VEGF、Ang2、DLL4、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR- α 、PDGFR- β 、FOLH1 (PSMA)、PRLR、STEAP1、STEAP2、TMPRSS2、MSLN、CA9、uroplakin中的一种或更多种或前述细胞因子中的任何一种,其中抑制剂是适配体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段(例如,Fab片段;F(ab')₂片段;Fd片段;Fv片段;scFv;dAb片段;或其他工程化分子,诸如双抗体、三抗体、四抗体、微抗体和最小识别单元)。本公开内容的抗原结合分子也可以与抗病毒药物、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇和/或NSAID组合施用和/或共配制。本公开内容的抗原结合分子也可以作为治疗方案的一部分施用,该治疗方案也包括放射治疗和/或常规化学疗法。

[0457] 一种或更多种另外的治疗活性组分可以在施用本公开内容的抗原结合分子之前立即、同时或之后不久施用;(为了本公开内容的目的,这样的施用方案被认为是抗原结合分子与另外治疗活性组分“组合”的施用)。

[0458] 本公开内容包括药物组合物,其中本公开内容的蛋白-药物缀合物(例如,抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷与本文别处描述的一种或更多种另外的治疗活性组分的一种或更多种共配制。

[0459] 施用方案

[0460] 根据本公开内容的某些实施方案,可以在确定的时间过程中向受试者施用多剂量的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗

STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷。根据本公开内容的这一方面的方法包括向受试者顺序施用多剂量的本公开内容的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷。如本文使用的,“顺序施用”意味着在不同的时间点,例如在由预定间隔(例如,小时、天、周或月)分隔的不同天数,向受试者施用每个剂量的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷。本公开内容包括了方法,该方法包括向患者顺序施用单个初始剂量的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷,随后是一个或更多个第二剂量的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷,以及任选地随后是一个或更多个第三剂量的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷。

[0461] 术语“初始剂量”、“第二剂量”和“第三剂量”是指本公开内容的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷施用的时间顺序。因此,“初始剂量”是在治疗方案开始时施用的剂量(也称为“基线剂量”);“第二剂量”是在初始剂量之后施用的剂量;并且“第三剂量”是在第二剂量之后施用的剂量。初始剂量、第二剂量和第三剂量都可以包含相同量的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2或抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷,但通常可以在施用频率方面彼此不同。然而,在某些实施方案中,在治疗过程期间,初始剂量、第二剂量和/或第三剂量中包含的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷的量彼此不同(例如,酌情上调或下调)。在某些实施方案中,在治疗开始时以“负荷剂量”施用两个或更多个(例如2个、3个、4个或5个)剂量,随后是以不太频繁基础施用的随后剂量(例如,“维持剂量”)。

[0462] 在本公开内容的一种示例性实施方案中,每个第二剂量和/或第三剂量在紧接前一剂量之后1周至26周(例如,1、1¹/₂、2、2¹/₂、3、3¹/₂、4、4¹/₂、5、5¹/₂、6、6¹/₂、7、7¹/₂、8、8¹/₂、9、9¹/₂、10、10¹/₂、11、11¹/₂、12、12¹/₂、13、13¹/₂、14、14¹/₂、15、15¹/₂、16、16¹/₂、17、17¹/₂、18、18¹/₂、19、19¹/₂、20、20¹/₂、21、21¹/₂、22、22¹/₂、23、23¹/₂、24、24¹/₂、25、25¹/₂、26、26¹/₂或更多)施用。如本文中使用的短语“紧接前一剂量”意指在多次施用的序列中,在顺序中在施用下一个剂量之前向患者施用的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷的剂量,没有中间剂量。

[0463] 根据本公开内容的这一方面的方法可以包括向患者施用任何数目的第二剂量和/或第三剂量的蛋白-药物缀合物(例如,抗HER2、抗HER2/HER2双特异性、抗MET、抗MET/MET双特异性或抗STEAP2抗体-药物缀合物)、接头-有效载荷和/或有效载荷。例如,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第二剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个)第二剂量。同样,在某些实施方案中,仅向患者施用单个第三剂量。在其他实施方案中,向患者施用两个或更多个(例如,2个、3个、4个、5个、6

个、7个、8个或更多个)第三剂量。

[0464] 在涉及多个第二剂量的实施方案中,每个第二剂量可以以与其他第二剂量相同的频率施用。例如,每个第二剂量可以在紧接前一剂量之后1周至2周向患者施用。相似地,在涉及多个第三剂量的实施方案中,每个第三剂量可以以与其他第三剂量相同的频率施用。例如,每个第三剂量可以在紧接前一剂量之后2周至4周向患者施用。可选地,向患者施用第二剂量和/或第三剂量的频率可以在治疗方案的过程中改变。在临床检查后,医生也可以根据个体患者的需要在治疗过程期间调整施用频率。

实施例

[0465] 以下实施例示出了本说明书的具体方面。这些实施例不应被解释为限制性的,因为这些实施例仅仅提供了对实施方案及其各个方面的具体理解和实践。

[0466] 缩写

[0467]	ADC	抗体-药物缀合物
	非糖基化抗体	抗体不具有任何聚糖
	aq.	水性
	Boc	N-叔丁氧羰基
	BupH	除非另外说明, 否则为 Thermo Scientific 产品号 28372, 包含 100 mM 磷酸钠和 150 mM 氯化钠、不含钾, 将 pH 从 7.2 调整至 7.6-7.8 MQ。
	COT	环辛醇
	Da	道尔顿
	DAR	药物与抗体比
	DCM	二氯甲烷
	DIBAC	二苯并[b,f]氮杂卓, 11,12-二脱氢-5,6-二氢-

[0468]

DIBAC-Suc	二苯并[b,f]氮杂卓-5(6H)-丁酸, 11,12-二脱氢
DIBACT	3H-苯并[c]-1,2,3-三唑并[4,5-e][1]苯并氮杂卓, 8,9-二氢-
DIPEA	二异丙基乙胺
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
EC	酶学委员会
ELSD	蒸发光散射检测器
Equiv.	当量
ESI	电喷雾电离
g	克
GUL-叠氮化物	((S)-5-(4-叠氮丁酰胺基)-1-羧基戊基)氨基甲酰基-L-谷氨酸
HATU	2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯
HC	免疫球蛋白重链
HEK	人类胚胎肾(细胞)
HOBt	1-羟基苯并三唑
HPLC	高效液相色谱
hr 或 hrs	小时
LC	免疫球蛋白轻链
LC	液相色谱
MALDI	基质辅助的激光解吸/电离
mg	毫克
min	分钟
mL	毫升
mmh	myc-myc-六组氨酸标签
μL	微升
mM	毫摩尔/升
μM	微摩尔/升
MS	质谱
MSD	质量选择性检测器
MW	分子量
NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
nM	纳摩尔/升
NMR	核磁共振
PAB	对氨基苯甲氧基(羧基)
PBS	10 mM 磷酸钠缓冲液和 150 mM 氯化钠
PBSg	10 mM 磷酸盐、150 mM 氯化钠、5%甘油
PEG	聚乙二醇
ppm	百万分率(化学位移)
PPTS	吡啶鎓对甲苯磺酸盐
RP	反相
RT	室温
Sat.	饱和的

[0469]

SDS-PAGE	十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
SEC	尺寸排阻色谱
Suc	琥珀酸
TCEP	三(2-羧乙基)膦盐酸盐
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
TG	转谷氨酰胺酶
THF	四氢呋喃
TOF	飞行时间
UPLC	超高效液相色谱法
UV	紫外线
VC	缬氨酸-瓜氨酸

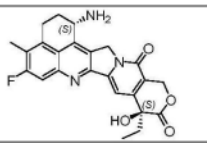
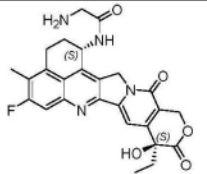
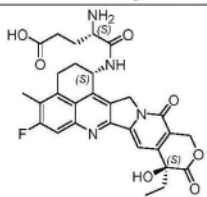
[0470] 甲磺酸依喜替康(P1)、贝洛替康盐酸盐(P8)、10-羟基喜树碱(P14)、SN38(P16)和伊立替康(P19)从MCE或Bide Pharm商购获得;化合物7A-1从TCI商购获得;化合物7-2从Accela商购获得。接头5-1如W02018089373和W02020146541中描述合成;接头6-1如W02020146541中描述合成。

[0471] 实施例1:依喜替康前体(ProEXT)的合成(方案1)

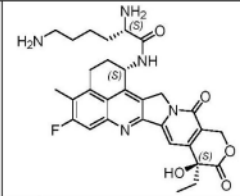
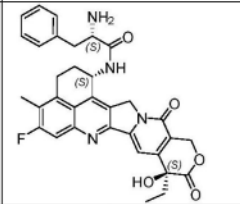
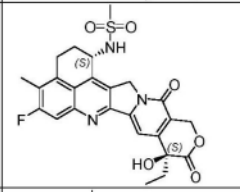
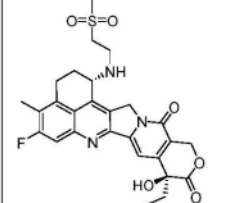
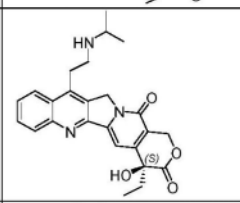
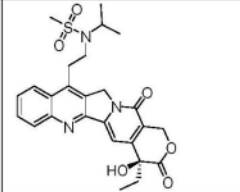
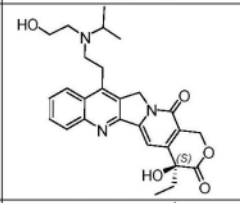
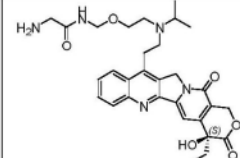
[0472] 根据本公开内容的有效载荷及其特性列于下文表1中。

[0473] 表1.有效载荷列表

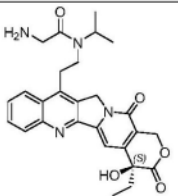
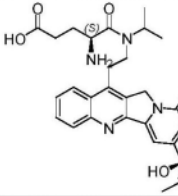
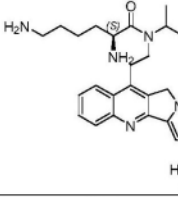
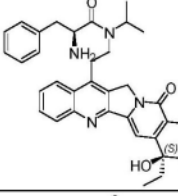
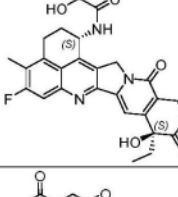
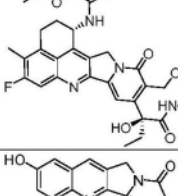
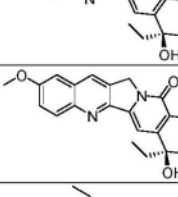
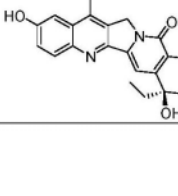
[0474]

P#	代码	结构	cLogP	MF	MW	纯度 (%)	准 确 质量 (M+H) ⁺
P1	依喜替康 (甲磺酸盐)		1.45	C ₂₄ H ₂₂ FN ₃ O ₄ ·CH ₃ O ₃ S	435.5+96.1	97	435.16
P2	依喜替康前体(GlyEXT)		0.44	C ₂₆ H ₂₅ FN ₄ O ₅	492.5	99	492.18
P3	(GluEXT)		-1.61	C ₂₉ H ₂₉ FN ₄ O ₇	564.6	98	565.2

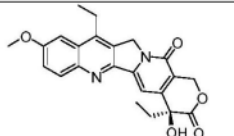
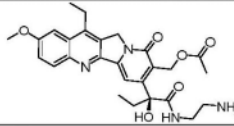
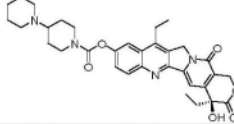
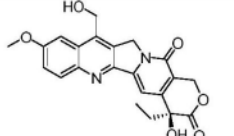
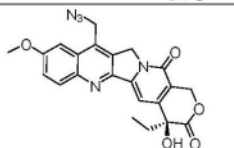
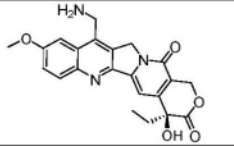
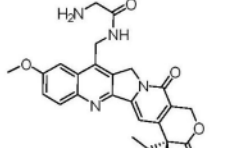
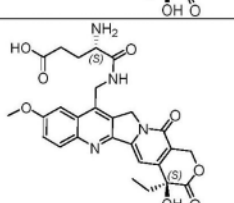
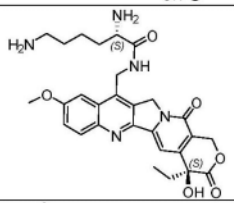
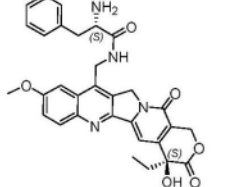
[0475]

P4	(LysEXT)		0.73	$C_{30}H_{34}FN_5O_5$	563.6	99	564.2
P5	(PheEXT)		2.67	$C_{33}H_{31}FN_4O_5$	582.6	99	583.3
P6	(MsEXT)		0.86	$C_{25}H_{24}FN_3O_6$ S	513.5	99	514.1
P7	(MsEthEXT)		0.66	$C_{27}H_{28}FN_3O_6$ S	541.6	99	541.9
P8	(贝洛替康盐 酸盐)		1.69	$C_{25}H_{27}N_3O_4$ HCl	433.5+36.5	99	434.2
P9	(MsBLT)		0.95	$C_{26}H_{29}N_3O_6$ S	511.6	97	512.3
P10	(HOEthBLT)		1.53	$C_{27}H_{31}N_3O_5$	477.6	99	478.2
P11	(ProBLT)		0.38	$C_{30}H_{37}N_5O_6$	563.7	99	564.3

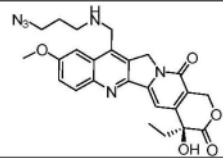
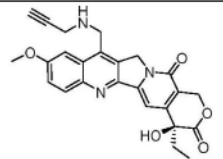
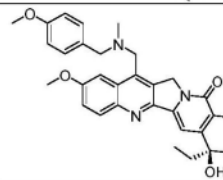
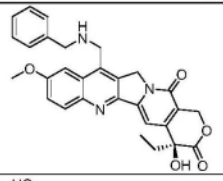
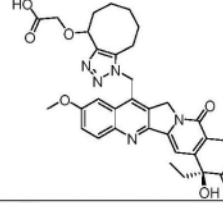
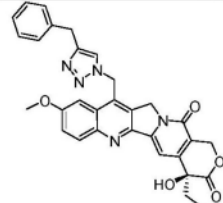
[0476]

P31			0.53	$C_{27}H_{30}N_4O_5$	490.6	>90	491.1
P32			-1.52	$C_{30}H_{34}N_4O_7$	562.6	>90	563.2
P33			0.80	$C_{31}H_{39}N_5O_5$	561.7	>90	562.3
P34			2.75	$C_{34}H_{36}N_4O_5$	580.7	>90	581.3
P12	Dxd		0.55	$C_{26}H_{24}FN_3O_6$	493.5	>95	494.3
P13			0.61	$C_{32}H_{36}FN_5O_8$	637.7	>99	638.3 [M+H]
P14			0.92	$C_{20}H_{16}N_2O_5$	364.4	99	365.1
P15			1.06	$C_{21}H_{18}N_2O_5$	378.4	95	379.1
P16	SN38		1.87	$C_{22}H_{20}N_2O_5$	392.4	98	393.1

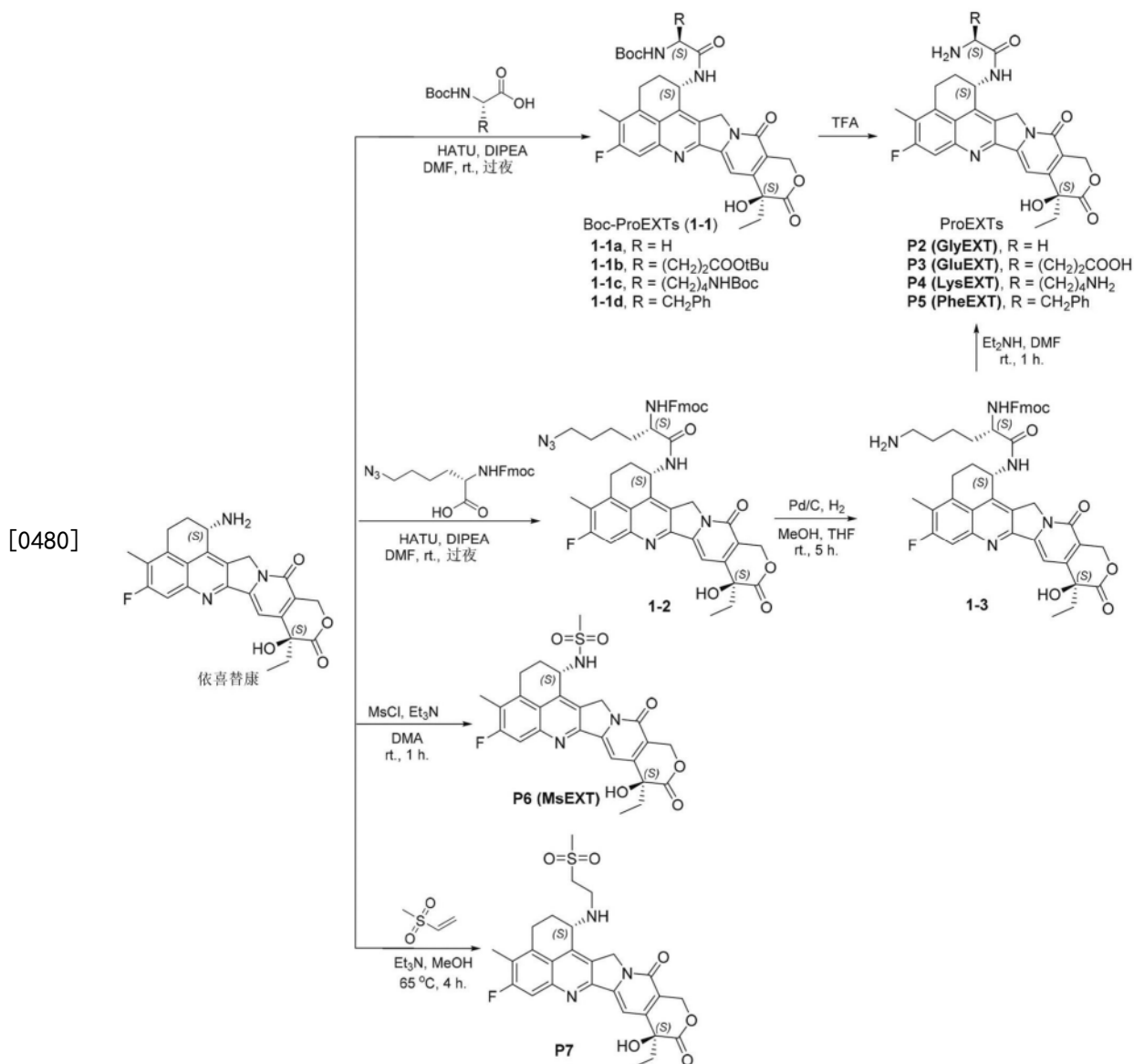
[0477]

P17			2.02	$C_{23}H_{22}N_2O_5$	406.4	94	407.1
P18			0.42	$C_{27}H_{32}N_4O_6$	508.6	99	449.2(M-OA c)
P19	伊立替康		2.78	$C_{33}H_{38}N_4O_6$	586.7	97	587.2
P20			0.30	$C_{22}H_{20}N_2O_6$	408.4	90	409.1
P21			1.12	$C_{22}H_{19}N_5O_5$	433.4	95	434.1
P22			0.19	$C_{22}H_{21}N_3O_5$	407.4	99	408.3
P41			-0.92	$C_{24}H_{24}N_4O_6$	464.5	96	465.2
P42			-2.97	$C_{27}H_{28}N_4O_8$	536.5	95	537.2
P43			-0.62	$C_{28}H_{33}N_5O_6$	535.6	95	536.3
P44			1.31	$C_{31}H_{30}N_4O_6$	554.6	98	555.2

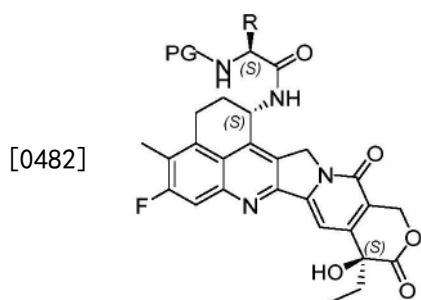
[0478]

P23		0.81	$C_{25}H_{26}N_6O_5$	490.5	99	491.2
P24		0.85	$C_{25}H_{23}N_3O_5$	445.5	99	446.3
P25		2.57	$C_{31}H_{31}N_3O_6$	541.6	98	542.2
P26		2.35	$C_{29}H_{27}N_3O_5$	497.6	99	498.2
P27		1.44	$C_{32}H_{33}N_5O_8$	615.6	99	616.3
P28		2.80	$C_{31}H_{27}N_5O_5$	549.6	96	550.1

[0479] 方案1.有效载荷(依喜替康衍生物)的合成



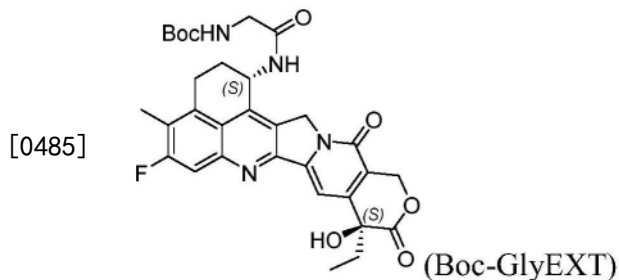
[0481] 实施例1A:用于合成被保护的ProEXT (1-1)的一般程序A



[0483] 向被保护的氨基酸 (1.0当量) 在DMF (50mM) 中的溶液中依次添加甲磺酸依喜替康 (1.0当量)、HATU (1.5当量) 和DIPEA (2.0当量), 并且将反应混合物在室温搅拌过夜, 这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 直接纯化, 以给出作为浅黄色固体的化合物1-1。

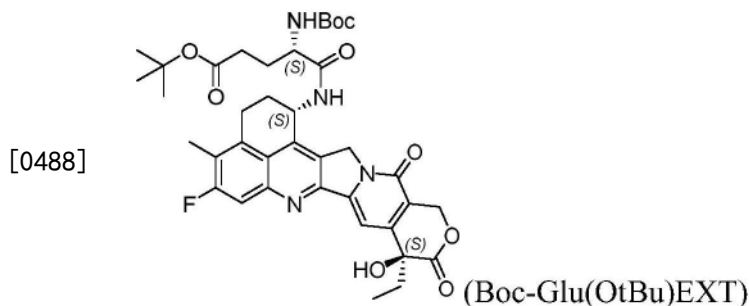
[0484] 实施例1A-1:叔-丁基N-([[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧代-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,

14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲基)氨基甲酸酯(Boc-GlyEXT,1-1a)



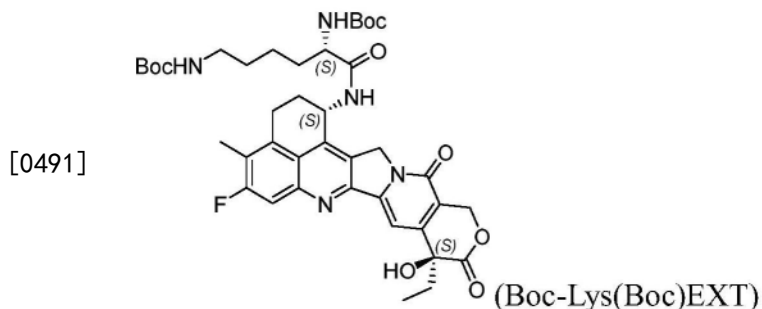
[0486] 遵循一般程序A,从Boc-Gly-OH(18mg,0.10mmol)开始,获得作为浅黄色固体的Boc-GlyEXT(1-1a)(45mg,75%收率)。ESI m/z :593.3(M+H)⁺。

[0487] 实施例1A-2:叔-丁基(4S)-4-{[(叔-丁氧基)羰基]氨基}-4-{[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}丁酸酯(Boc-Glu(OtBu)EXT,1-1b)



[0489] 遵循一般程序A,从N-Boc-Glu(OtBu)-OH(CAS:13726-84-6,50mg,0.16mmol)开始,获得作为黄色固体的Boc-Glu(OtBu)EXT(1-1b)(91mg,77%收率)。ESI m/z :721.3(M+H)⁺。

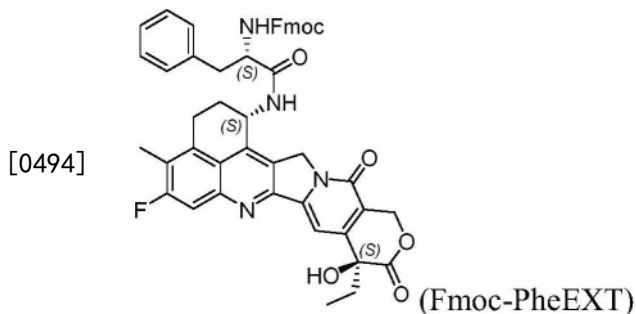
[0490] 实施例1A-3:叔-丁基N-[(1S)-5-{[(叔-丁氧基)羰基]氨基}-1-{[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}苯基]氨基甲酸酯(Boc-Lys(Boc)EXT,1-1c)



[0492] 遵循一般程序A,从Boc-Lys(Boc)-OH(CAS:2483-46-7,0.12g,0.35mmol)开始,获得作为灰色固体的Boc-Lys(Boc)EXT(1-1c)(0.17g,64%收率)。ESI m/z :764.2(M+H)⁺; 664.3(M-Boc+H)⁺。

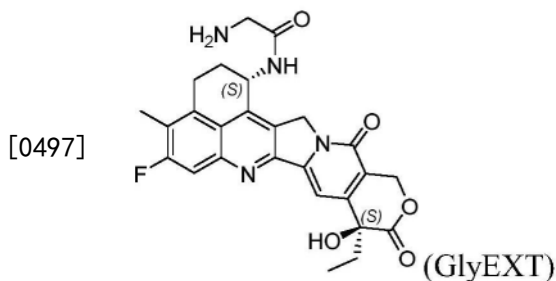
[0493] 实施例1A-4:(9H-芴-9-基)甲基N-[(1S)-1-{[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}-2-苯基乙基]氨基甲酸酯

(Fmoc-PheEXT, 1-1d)



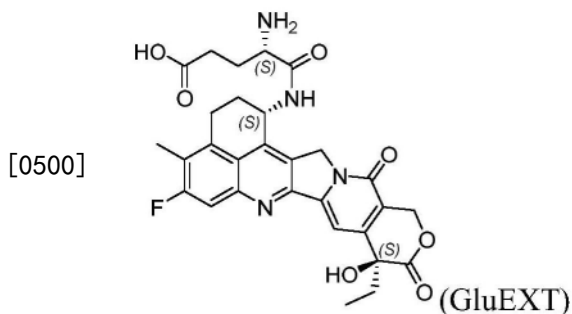
[0495] 遵循一般程序A,从N-Fmoc-Phe-OH(CAS:35661-40-6,50mg,0.13mmol)开始,获得作为黄色固体的N-Fmoc-PheEXT(1-1d)(73mg,70%收率)。ESI m/z :805.2(M+H)⁺。

[0496] 实施例1A-5:2-氨基-N-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]乙酰胺(GlyEXT,P2)



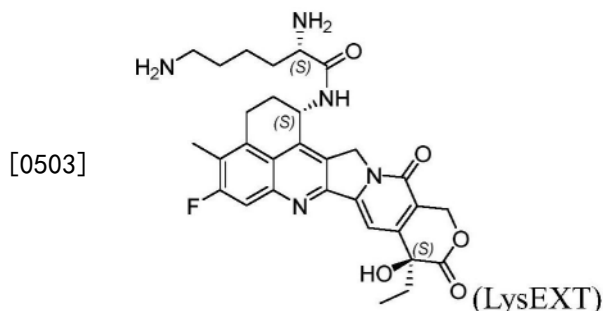
[0498] 向Boc-GlyEXT(1-1a)(45mg,75μmol)在DCM(3mL)的溶液中添加TFA(1mL),并且将混合物在室温搅拌2小时,这通过LCMS监测。将所得混合物在真空中浓缩,并且剩余物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.3%)中的5%-95%乙腈)纯化,以给出作为白色固体的GlyEXT(P2)(35mg,90%收率)。ESI m/z :493.2(M+H)⁺。

[0499] 实施例1A-6:(4S)-4-氨基-4-{[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}丁酸(GluEXT,P3)



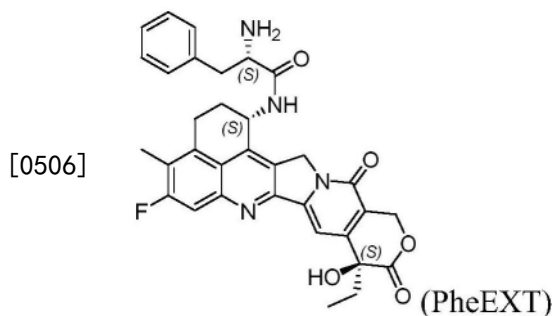
[0501] 遵循与P2相似的程序(除了从1-1b(60mg,83μmol)替代1-1a开始之外),获得作为黄色固体的P3(34mg,60%收率,TFA盐)。ESI m/z :565.2(M+H)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 9.00(d,J=8.0Hz,1H),8.34-8.13(m,2H),7.86-7.83(m,1H),7.33(s,1H),6.55(s,1H),5.62-5.57(m,1H),5.43-5.38(m,3H),5.07-5.02(m,1H),3.78(t,J=6.0Hz,1H),3.22-3.12(m,2H),2.43(s,3H),2.33-2.15(m,4H),1.98-1.79(m,4H),0.88(t,J=7.2Hz,3H)ppm。¹⁹F NMR(376MHz,DMSO_{d6}) δ-73.5,-110.9ppm。

[0502] 实施例1A-7: (2S)-2,6-二氨基-N-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]己酰胺 (LysEXT, P4)



[0504] 遵循与P2相似的程序 (除了从1-1c (50mg, 65 μ mol) 替代1-1a开始之外), 获得作为黄色固体的P4 (34mg, 66% 收率, TFA盐)。ESI m/z : 564.2 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 9.09-9.06 (m, 1H), 8.27 (s, 3H), 7.85-7.83 (m, 1H), 7.67 (s, 2H), 7.35 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.58-5.52 (m, 1H), 5.48-5.43 (m, 2H), 5.38-5.33 (m, 1H), 5.13-5.08 (m, 1H), 3.78 (s, 1H), 3.24-3.15 (m, 2H), 2.76 (s, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.30-2.14 (m, 2H), 1.90-1.84 (m, 2H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.55-1.46 (m, 2H), 1.39-1.28 (m, 2H), 0.89 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.6, -110.9ppm。

[0505] 实施例1A-8: (2S)-2-氨基-N-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]-3-苯基丙酰胺 (PheEXT, P5)



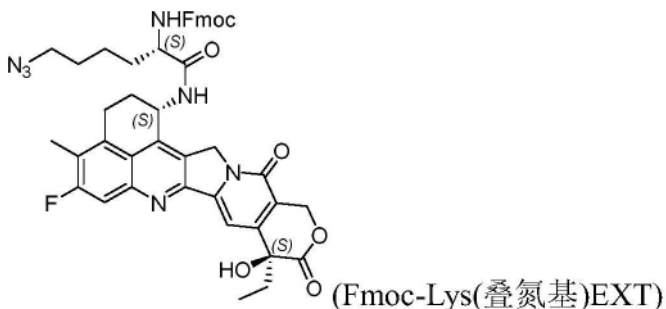
[0507] 向化合物1-1d (50mg, 62 μ mol) 在DMF (1mL) 中的溶液中添加二乙胺 (0.1mL), 并且将反应混合物在室温搅拌30分钟, 这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.01%) 中的5%-95% 乙腈) 纯化两次, 以给出作为浅黄色固体的P5 (14mg, 39% 收率)。ESI m/z : 583.3 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.85 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.31 (s, 3H), 7.86-7.83 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.91 (t, J=7.6Hz, 2H), 6.85 (t, J=7.2Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.59-5.52 (m, 1H), 5.47-5.41 (m, 2H), 5.25-5.20 (m, 1H), 4.62-4.58 (m, 1H), 4.05 (s, 1H), 3.27-3.10 (m, 2H), 3.05-2.95 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.33-2.10 (m, 2H), 1.98-1.85 (m, 2H), 0.93-0.89 (m, 3H) ppm。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.5, -111.0ppm。

[0508] 实施例1B: LysEXT (P4) 的替代合成

[0509] 实施例1B-1: (9H-茛-9-基) 甲基N-[(1S)-5-叠氮基-1-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基] 苯基] 氨基甲

酸酯 (Fmoc-Lys (叠氮基) EXT, 1-2)

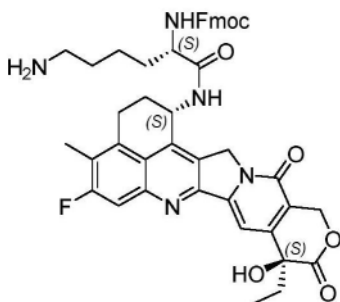
[0510]



[0511] 遵循一般程序A, 从Fmoc-L-叠氮基赖氨酸 (CAS:159610-89-6, 41mg, 0.10mmol) 开始, 获得作为浅黄色固体的Fmoc-Lys (叠氮基) EXT (1-2) (40mg, 92% 收率)。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.56 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.89-7.86 (m, 2H), 7.80 (d, J=11.0Hz, 1H), 7.75-7.54 (m, 3H), 7.44-7.35 (m, 2H), 7.35-7.20 (m, 3H), 6.52 (br s, 1H), 5.55-5.51 (m, 1H), 5.39 (d, J=16.2Hz, 1H), 5.33-5.22 (m, 2H), 5.09 (d, J=19.0Hz, 1H), 4.32-4.13 (m, 3H), 4.10-3.95 (m, 1H), 3.34-3.24 (m, 2H), 3.16-3.12 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.23-2.09 (m, 2H), 1.89-1.77 (m, 2H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.49-1.42 (m, 2H), 1.40-1.22 (m, 2H), 0.87 (t, J=7.3Hz, 3H) ppm。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.9, -111.2 ppm。

[0512] 实施例1B-2: (9H-茱-9-基) 甲基N-[(1S)-5-氨基-1-{[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5, 9-二氧化-8-氧杂-4, 15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2, 14}.0^{4, 13}.0^{6, 11}.0^{20, 24}]-二十四碳-1, 6(11), 12, 14, 16, 18, 20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基} 苯基]氨基甲酸酯 (1-3)

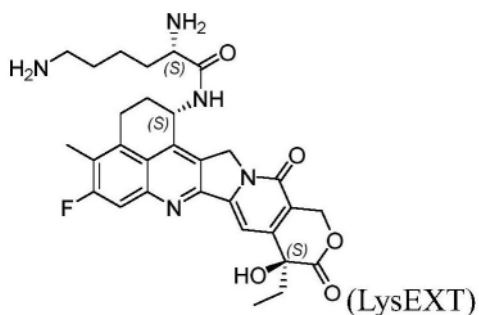
[0513]



[0514] 在氮气保护下向化合物1-2 (80mg, 86μmol) 在甲醇 (15mL) 和THF (5mL) 中的黄色溶液中添加钯碳 (50mg, 10% Pd)。将混合物在氢气气氛下在室温搅拌5小时, 这通过LCMS监测。将所得混合物过滤通过硅藻土并且将滤液浓缩。剩余物通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.01%) 中的5%-95% 乙腈) 纯化, 以给出作为浅黄色固体的化合物1-3 (70mg, 粗制)。ESI m/z 393.5 (M/2+H)⁺。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.5, -111.1 ppm。

[0515] 实施例1B-3: (2S)-2, 6-二氨基-N-[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5, 9-二氧化-8-氧杂-4, 15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2, 14}.0^{4, 13}.0^{6, 11}.0^{20, 24}]-二十四碳-1, 6(11), 12, 14, 16, 18, 20(24)-庚烯-23-基]己酰胺 (LysEXT, P4)

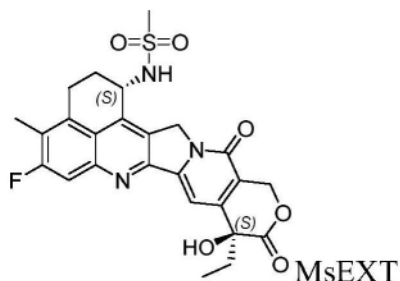
[0516]



[0517] 向化合物1-3 (10mg, 粗制, 以上获得) 在DMF (1mL) 中的溶液中添加二乙胺 (0.2mL), 并且将反应混合物在室温搅拌1小时, 这通过LCMS监测。所得溶液通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.01%) 中的5% -95% 乙腈) 直接分离, 以给出作为浅黄色固体的P4 (5mg, 从1-2的41% 收率, TFA盐)。ESI m/z : 564.2 (M+H)⁺。

[0518] 实施例1C: N-[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧代-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]甲磺酰胺 (MsEXT, P6) 的合成

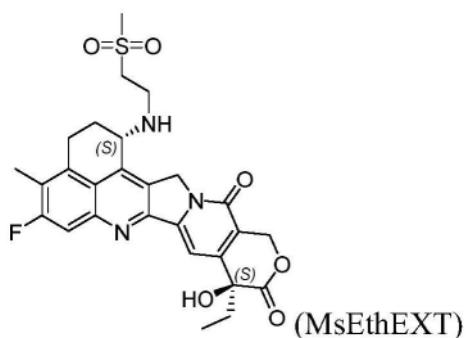
[0519]



[0520] 在0℃, 向甲磺酸依喜替康 (30mg, 56μmol) 在无水DMA (1mL) 中的溶液中依次添加三乙胺 (17mg, 0.17mmol) 和甲磺酰氯 (7.1mg, 62μmol), 并且将反应混合物在室温搅拌1小时, 这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.1%) 中的0-70% 乙腈) 直接分离, 以给出作为黄色固体的P6 (4.0mg, 11% 收率)。ESI m/z 514.0 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 7.81 (d, J=1.6Hz, 1H), 7.79 (d, J=4.8Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.43-5.42 (m, 3H), 5.13-5.18 (m, 1H), 3.18 (br, 4H), 2.39 (s, 3H), 2.30-2.26 (m, 2H), 1.93-1.83 (m, 3H), 1.16 (t, J=7.2Hz, 1H), 0.88 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。¹⁹F NMR (377MHz, DMSO_{d6}) δ -73.44, -111.30ppm。

[0521] 实施例1D: (10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-23-[(2-甲磺酰基乙基)氨基]-19-甲基-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-5,9-二酮 (MsEthEXT, P7) 的合成

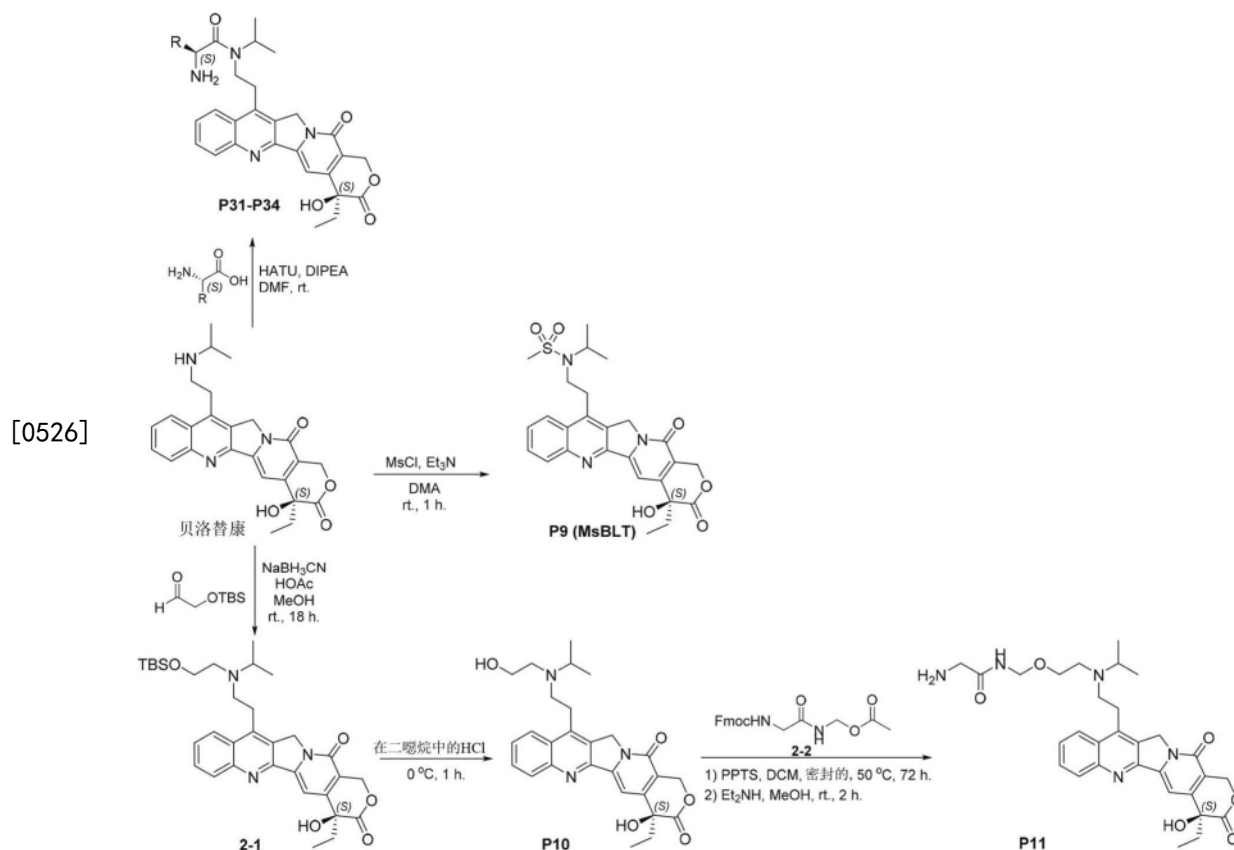
[0522]



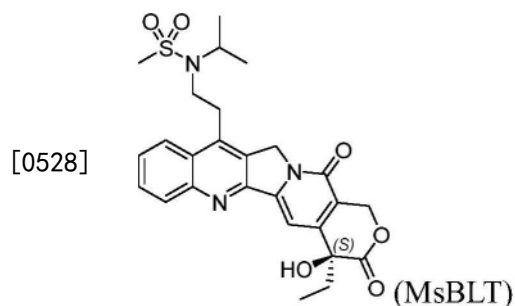
[0523] 向甲磺酸依喜替康(10mg, 19 μ mol)在甲醇(2mL)中的溶液中添加(甲磺酰基)乙烷(5.0mg, 46 μ mol)和三乙胺(10mg, 92 μ mol),并且将反应混合物在65 $^{\circ}$ C搅拌4小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.1%)中的5%-95%乙腈)直接分离,以给出作为白色固体的P7(5.0mg, 40%收率, TFA盐)。ESI m/z 542.5 (M+H) $^{+}$ 。 ^{1} H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 7.84 (d, J=11.2Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 5.54-5.36 (m, 5H), 5.00 (s, 1H), 3.55-3.40 (m, 5H), 3.20-3.10 (m, 5H), 2.65-2.60 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 1.89-1.85 (m, 2H), 0.88-0.84 (m, 3H) ppm。

[0524] 实施例2:有效载荷P9-P11和P31-P34的合成(方案2)

[0525] 方案2.有效载荷(贝洛替康衍生物)的合成



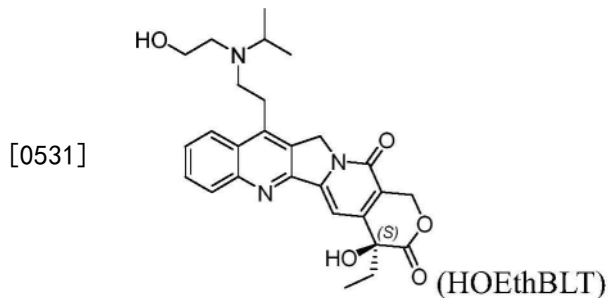
[0527] 实施例2A:N-{2-[(19S)-19-乙基-19-羟基-14,18-二氧代-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]乙基}-N-(丙-2-基)甲磺酰胺(MsBLT,P9)的合成



[0529] 在0 $^{\circ}$ C,向贝洛替康(30mg, 64 μ mol)在无水DMA(1mL)中的溶液中依次添加三乙胺(19mg, 0.19mmol)和甲磺酰氯(8.0mg, 70 μ mol),并且将反应混合物在室温搅拌1小时,这通

过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.1%)中的0-70%乙腈)直接分离,以给出作为黄色固体的P9(6.0mg,18%收率)。ESI m/z 512.3 (M+H)⁺。¹H NMR(400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.32(d, J=8.4Hz, 1H), 8.20(d, J=8.4Hz, 1H), 7.89(t, J=7.6Hz, 1H), 7.79(t, J=7.6Hz, 1H), 7.35(s, 1H), 6.54(s, 1H), 5.48-5.40(m, 4H), 4.02-3.95(m, 1H), 3.55-3.46(m, 2H), 3.40(s, 2H), 3.00(s, 3H), 1.93-1.83(m, 2H), 1.15(d, J=4.0Hz, 6H), 0.88(t, J=7.6Hz, 3H) ppm。

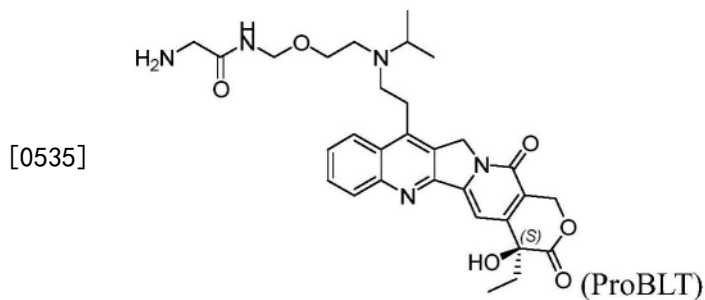
[0530] 实施例2B: (19S)-19-乙基-19-羟基-10-{2-[(2-羟基乙基)(丙-2-基)氨基]乙基}-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-14,18-二酮(HOEtBLT,P10)的合成



[0532] 在室温,向贝洛替康(60mg,0.12mmol)在甲醇的溶液中添加0-TBS-羟基乙醛(24mg,0.14mmol)和乙酸(0.01mL,cat.),并且将混合物在室温搅拌30分钟,然后添加氰基硼氢化钠(16mg,0.24mmol)。将反应混合物在室温搅拌18小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-35%乙腈)直接分离,以给出作为黄色固体的化合物2-1(43mg,51%收率,ESI m/z 592.4 (M+H)⁺)。

[0533] 在0℃,将以上获得的化合物2-1(30g,42 μ mol)溶解在盐酸在二噁烷(4N,2mL)中的溶液中,并且将混合物在0℃搅拌1小时,这通过LCMS监测。在0℃,将所得混合物用饱和碳酸氢钠水溶液中和至pH 6-7并且在真空中浓缩以去除二噁烷。剩余混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.1%)中的0-20%乙腈)分离,以给出作为黄色固体的P10(20mg,67%收率)。ESI m/z 478.3 (M+H)⁺。¹H NMR(400MHz, DMSO_{d6}) δ 9.64(s, 1H), 8.42(d, J=8.7Hz, 1H), 8.23(d, J=8.5Hz, 1H), 7.91(t, J=8.3Hz, 1H), 7.81(t, J=8.0Hz, 1H), 7.37(s, 1H), 6.57(s, 1H), 6.58(s, 1H), 5.54-5.39(m, 4H), 3.90-3.79(m, 4H), 3.77-3.71(m, 2H), 2.48-2.41(m, 2H), 1.93-1.84(m, 2H), 1.34-1.24(m, 8H), 0.88(t, J=7.3Hz, 3H) ppm。

[0534] 实施例2C: 2-氨基-N-{[2-({2-[(19S)-19-乙基-19-羟基-14,18-二氧代-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]乙基}(丙-2-基)氨基)乙氧基]甲基}乙酰胺(ProBLT,P11)的合成

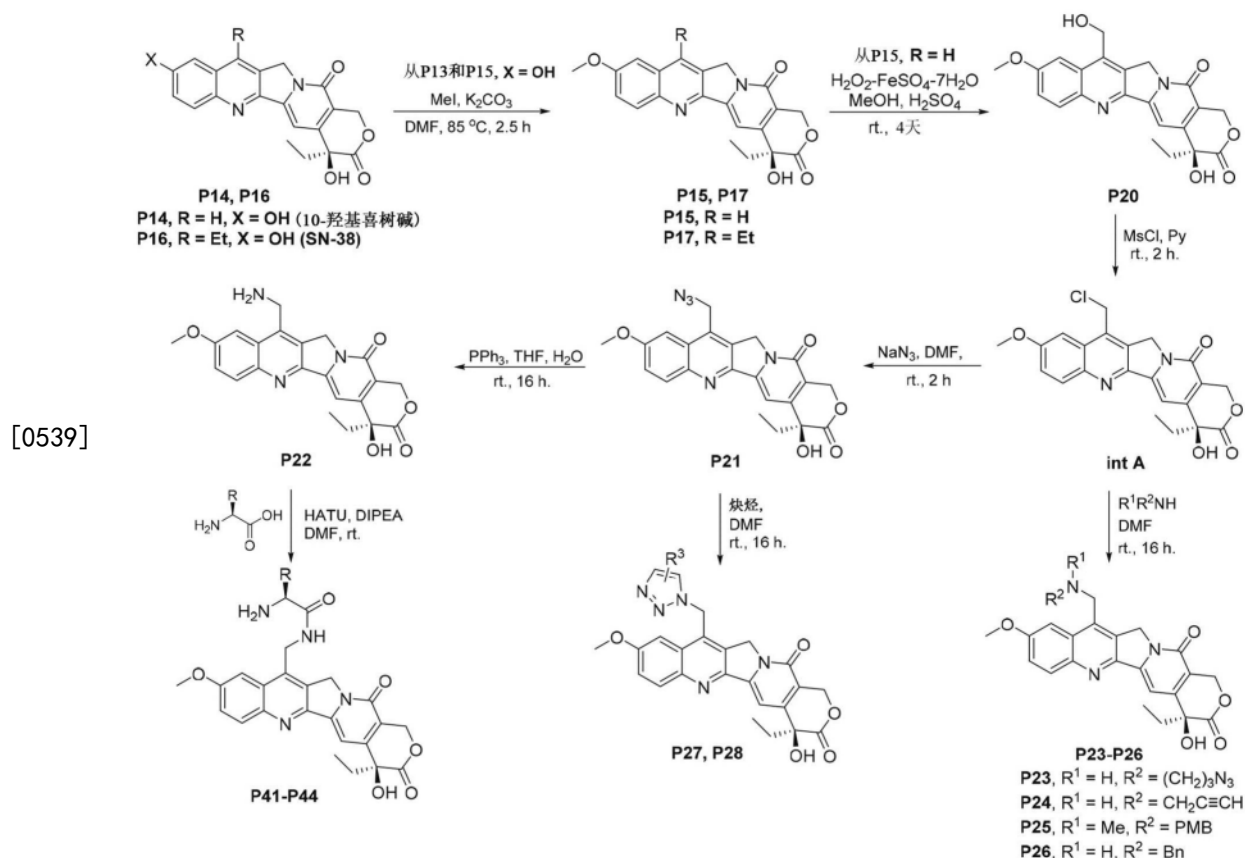


[0536] 在50℃,向在封闭的管中的P10(83mg,0.14mmol)在DCM(20mL)的溶液中添加化合

物2-2 (CAS:1599440-06-8, 57mg, 0.14mmol) 和对甲苯磺酸吡啶鎓 (PPTS) (7.0mg, 28 μ mol), 并且将反应混合物在50℃搅拌72小时。在冷却之后, 在真空中去除挥发物, 并且剩余物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 分离, 以给出浅黄色固体 (50mg, ESI m/z 393.6 (M/2+H)⁺), 将其溶于甲醇 (2mL) 中。向溶液中添加二乙胺 (0.2mL), 并且将反应混合物在室温搅拌3小时, 直到根据LCMS完全去除Fmoc。将所得混合物在真空中浓缩, 并且剩余物通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.01%) 中的5%-95%乙腈) 纯化, 以给出作为浅黄色固体的P11 (26mg, 从P10的27%收率)。ESI m/z 564.3 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 9.99 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 8.95-8.81 (m, 1H), 8.37 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.23 (d, J=8.2Hz, 1H), 8.12 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.90 (dd, J=18.3, 8.1Hz, 2H), 7.82 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.60 (t, J=9.3Hz, 3H), 7.51 (t, J=6.0Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.25 (d, J=8.1Hz, 2H), 6.57 (s, 1H), 5.99 (t, J=5.3Hz, 1H), 5.55-5.35 (m, 6H), 4.91 (s, 2H), 4.71 (s, 2H), 4.44-4.33 (m, 1H), 4.30-4.19 (m, 2H), 3.90-3.72 (m, 6H), 3.65-3.56 (m, 5H), 3.53-3.30 (m, 16H), 3.26-3.22 (m, 2H), 3.03-2.93 (m, 2H), 2.36 (d, J=7.2Hz, 1H), 2.29-2.01 (m, 4H), 2.00-1.80 (m, 6H), 1.80-1.53 (m, 7H), 1.46-1.34 (m, 3H), 1.32-1.24 (m, 6H), 0.90-0.82 (m, 9H) ppm。

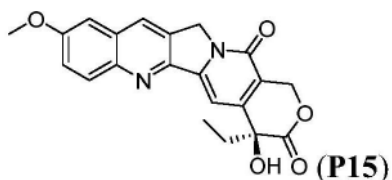
[0537] 实施例3: 有效载荷P14-P17、P20-P28和P41-P44的合成 (方案3)

[0538] 方案3.10-羟基喜树碱类似物的合成



[0540] 实施例3A: (19S)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-14,18-二酮(P15)的合成

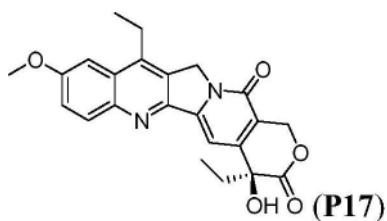
[0541]



[0542] 将10-羟基喜树碱P14 (0.73g, 2.0mmol) 和碳酸钾 (0.55g, 4.0mmol) 的混合物悬浮在DMF (5mL) 中并且加热至85℃, 直到棕色反应混合物变澄清。然后将溶液冷却至室温, 并且向溶液中一次性添加甲基碘 (0.73g, 2.0mmol)。将溶液在氮气球下在85℃搅拌另外2.5h, 直到反应完成, 这通过LCMS监测。沉淀出淡黄色固体。冷却至室温之后, 将反应混合物用水 (100mL) 稀释, 过滤以收集浅黄色沉淀物, 将其真空中干燥以提供作为浅黄色固体的化合物P15 (0.50g, 67% 收率)。ESI m/z : 379.1 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.52 (s, 1H), 8.04 (d, J=10Hz, 1H), 7.49-7.46 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 1.90-1.82 (m, 2H), 0.88 (t, J=7.6Hz, 3H) ppm。参考文献CN1587265 (确认了P15的身份) 通过引用以其整体并入。

[0543] 实施例3B: (19S)-10,19-二乙基-19-羟基-7-甲氧基-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环 [11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰] 二十一碳-1 (21), 2,4,6,8,10,15 (20)-庚烯-14,18-二酮 (P17) 的合成

[0544]



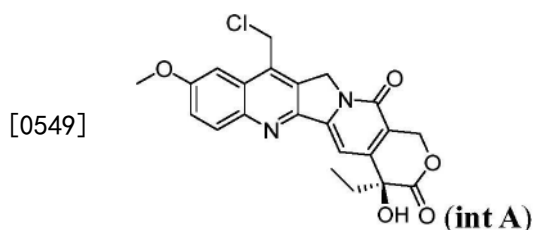
[0545] 遵循与化合物P15相似的程序 (除了使用7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38, 实施例2) 替代10-羟基喜树碱之外), 获得作为淡黄色固体的化合物P17 (0.52g, 84% 收率, 游离碱), 并且其包含内酯开环产物。将20mg游离碱通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.3%) 中的5%-95% 乙腈) 进一步纯化, 以给出作为淡黄色固体的实施例5 (15mg, TFA盐)。ESI m/z : 407.1 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.08 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.53-7.49 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.30 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.20 (q, J=7.2Hz, 2H), 1.93-1.81 (m, 2H), 1.33 (t, J=7.6Hz, 3H), 0.88 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。(未观察到TFA的质子)。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73ppm。参考文献W02005044821 (确认了P17的身份) 通过引用以其整体并入。

[0546] 实施例3C: (19S)-19-乙基-19-羟基-10-(羟基甲基)-7-甲氧基-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环 [11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰] 二十一碳-1 (21), 2,4,6,8,10,15 (20)-庚烯-14,18-二酮 (P20) 的合成

[0547] 向化合物P15 (0.30g, 0.79mmol) 在甲醇 (10mL) 和水 (10mL) 的共溶剂中的冷却的 (0℃冰水浴) 悬浮液中添加96% 硫酸 ((5.3mL, 95mmol) (逐滴) 和绿矾 (0.27g, 0.95mmol)。悬浮液变澄清并且冷却至-10℃。向所得溶液中逐滴添加30% 过氧化氢 (1mL, 9.5mmol)。将反应混合物在室温搅拌4天, 这通过LCMS监测。将混合物用水稀释, 并且沉淀出浅黄色固体。在通过过滤收集并且干燥之后, 获得作为淡黄色固体的化合物P20 (0.29g, 90% 收率), 其是足够纯的而无进一步纯化。ESI m/z : 409.1 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.07 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.50 (dd, J=9.2, 2.0Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.38 (s, 2H), 5.37

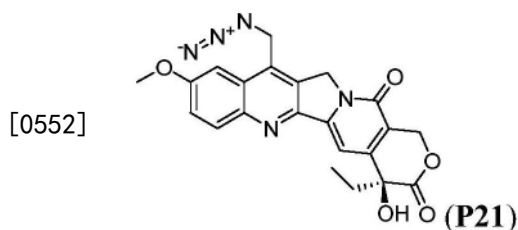
(s, 2H), 5.23 (br s, 2H), 3.96 (s, 3H), 1.89-1.83 (m, 2H), 0.89 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

[0548] 实施例3D: (19S)-10-(氯甲基)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-14,18-二酮(int A)的合成



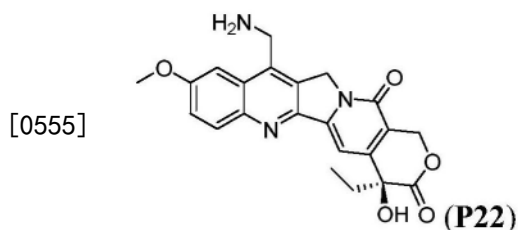
[0550] 在室温,向搅拌的化合物P20(0.12g,0.29mmol)在无水吡啶(3mL)中的溶液中的悬浮液中添加甲磺酰氯(67mg,0.59mmol)。然后将悬浮液在室温搅拌2小时,直到P20被完全消耗,这通过LCMS监测。反应混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.01%)中的0-50%乙腈)直接纯化,以给出作为黄色固体的氯化物(52mg,粗制),将其用于下一步。ESI m/z: 427.1 (M+H)⁺。

[0551] 实施例3E: (19S)-10-(叠氮基甲基)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-14,18-二酮(P21)的合成



[0553] 在室温,向搅拌的int A(52mg,粗制,以上获得)在DMF(1.3mL)中的黄色溶液中添加叠氮化钠(30mg,0.47mmol)。将反应混合物在室温搅拌2小时,直到反应物变澄清。LCMS显示此时氯化物被消耗。反应混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.01%)中的0-100%甲醇)直接纯化,以给出作为淡黄色固体的化合物P21(25mg,从P20的26%收率)。ESI m/z: 434.1 (M+H)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ8.13(d,J=9.2Hz,1H),7.58(d,J=2.4Hz,1H),7.57(dd,J=9.2,2.8Hz,1H),7.29(s,1H),6.54(s,1H),5.42(s,2H),5.40(s,2H),5.27(s,2H),4.00(s,3H),1.91-1.83(m,2H),0.88(t,J=7.6Hz,3H) ppm。

[0554] 实施例3F: (19S)-10-(氨基甲基)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-14,18-二酮(P22)的合成



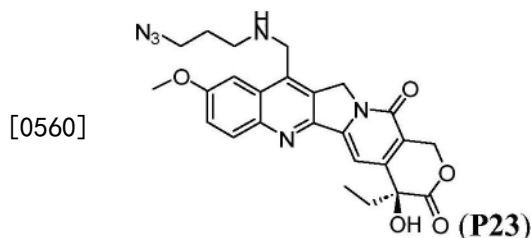
[0556] 向化合物P21(20mg,46μmol)在THF(4mL)和水(1mL)的共溶剂中的溶液中添加三苯

基磷 (36mg, 0.14mmol)。将澄清溶液在氮气气球下在室温搅拌过夜,直到根据LCMS完成还原。将反应溶液在真空中浓缩,并且剩余物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.01%)中的0-100%甲醇)纯化,以给出作为淡黄色固体的化合物P22(7mg, 37%收率, TFA盐)。ESI m/z : 408.2 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.44 (s, 3H), 8.16 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.68 (d, J=2.4Hz, 1H), 7.61 (dd, J=9.2, 2.4Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 4.05 (s, 3H), 1.92-1.84 (m, 2H), 0.88 (t, J=7.6Hz, 3H) ppm。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.62ppm。

[0557] 实施例3G:用于有效载荷P23-26的合成的一般程序B

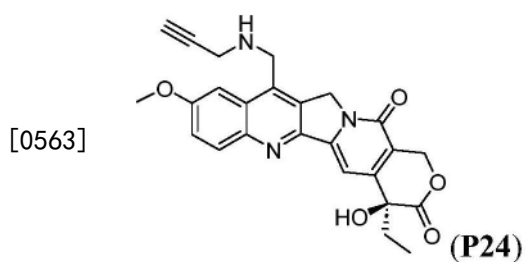
[0558] 向int A(1当量)在无水DMF(10mM)中的溶液中添加对应的胺(2.0当量),并且将反应混合物在室温搅拌2小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.01%)中的0-100%乙腈)直接分离,以给出作为白色固体的有效载荷P23-P26。

[0559] 实施例3G-1: (S)-11-(((3-叠氮基丙基)氨基)甲基)-4-乙基-4-羟基-9-甲氧基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(P23)的合成



[0561] 遵循一般程序B,获得作为白色固体的有效载荷P23(4.0mg, 17%收率)。ESI m/z : 491.2 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.07 (d, J=8.8Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.52-7.48 (m, 2H), 5.50 (d, J=16.4Hz, 1H), 5.38 (s, 2H), 5.30 (d, J=16.4Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.43 (t, J=6.0Hz, 2H), 2.96-2.91 (m, 2H), 1.94-1.84 (m, 5H), 1.21-1.18 (m, 4H), 0.91 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

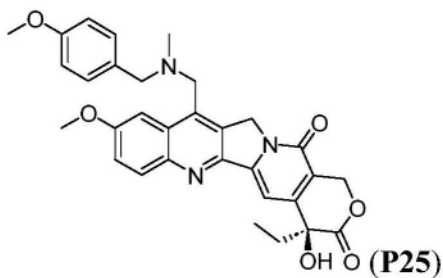
[0562] 实施例3G-2: (S)-4-乙基-4-羟基-9-甲氧基-11-((丙-2-炔-1-基氨基)甲基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(P24)的合成



[0564] 遵循一般程序B,获得作为白色固体的有效载荷P24(1.3mg, 6%收率)。ESI m/z : 446.3 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.13-8.08 (m, 1H), 7.67 (d, J=2.8Hz, 1H), 7.54-7.51 (m, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.42-5.40 (m, 4H), 4.36 (br s, 1H), 3.97 (s, 3H), 2.00-1.97 (m, 1H), 1.90-1.83 (m, 2H), 1.29-1.18 (m, 4H), 0.88 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

[0565] 实施例3G-3: (S)-4-乙基-4-羟基-9-甲氧基-11-(((4-甲氧基苄基)(甲基)氨基)甲基)-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(P25)的合成

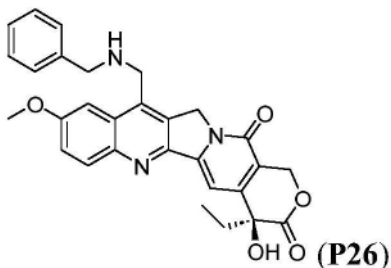
[0566]



[0567] 遵循一般程序B,获得作为白色固体的有效载荷P25 (8.0mg, 31%收率)。ESI m/z : 542.2 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 7.96 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.41-7.33 (m, 3H), 7.10 (br s, 1H), 6.92-6.89 (m, 2H), 5.48 (d, J=16.0Hz, 1H), 5.28 (d, J=16.0Hz, 1H), 5.22 (br, 4H), 4.01-3.97 (m, 1H), 3.77-3.71 (m, 6H), 2.59-2.43 (m, 3H), 1.89-1.83 (m, 2H), 1.21-1.18 (m, 1H), 0.90 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

[0568] 实施例3G-4: (S)-11-((苄基氨基)甲基)-4-乙基-4-羟基-9-甲氧基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮 (P26) 的合成

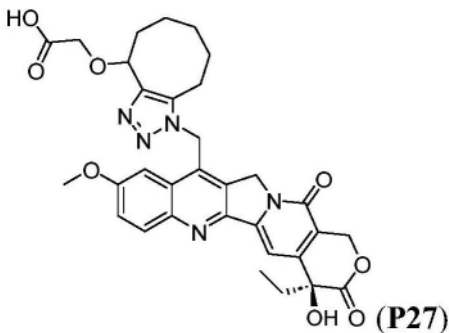
[0569]



[0570] 遵循一般程序B,获得作为白色固体的有效载荷P26 (2.0mg, 8.5%收率)。ESI m/z : 498.2 (M+H)⁺。

[0571] 实施例3G-5: 2-((1-(((S)-4-乙基-4-羟基-9-甲氧基-3,14-二氧代-3,4,12,14-四氢-1H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-11-基)甲基)-4,5,6,7,8,9-六氢-1H-环辛辛[d][1,2,3]三唑-4-基)氧基)乙酸 (P27) 的合成

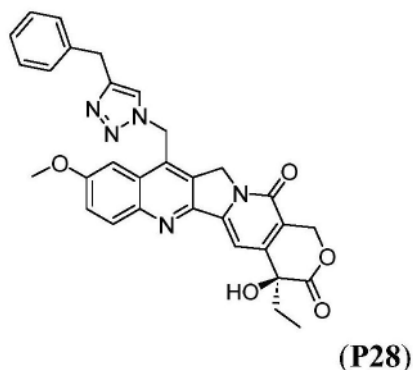
[0572]



[0573] 向P21 (15mg, 35 μ mol) 在甲醇 (3.0mL) 中的溶液中添加COT (13mg, 0.071 μ mol), 并且将反应混合物在室温搅拌20小时。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 纯化,以给出作为白色固体的P27 (5.5mg, 26%收率)。ESI m/z : 616.3 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.43 (brs, 3H), 8.13 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.56-7.51 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 6.58 (br s, 1H), 6.26 (s, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.16-4.98 (m, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.73-3.62 (m, 4H), 2.94-2.71 (m, 3H), 1.89-1.80 (m, 4H), 1.45-1.23 (m, 6H), 1.00 (brs, 1H), 0.87 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

[0574] 实施例3G-6: (S)-11-((4-苄基-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲基)-4-乙基-4-羟基-9-甲氧基-1,12-二氢-14H-吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-3,14(4H)-二酮(P28)的合成

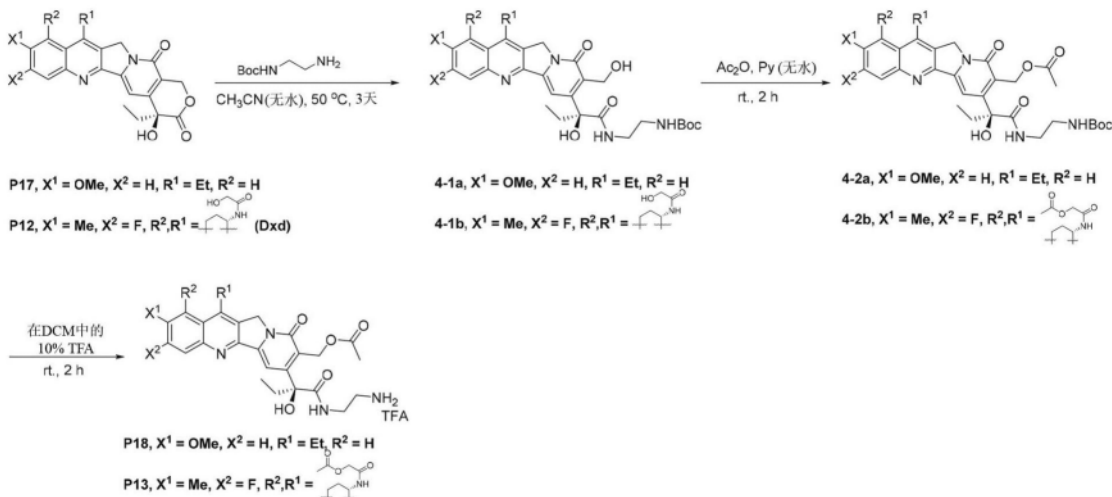
[0575]



[0576] 向P21 (10mg, 23 μ mol) 在THF (3mL) 中的溶液中添加苄基乙炔 (2.7mg, 23 μ mol)、抗坏血酸钠 (9.1mg, 46 μ mol) 和硫酸铜(II) 水溶液 (在1mL水中的2mg), 并且将反应混合物在黑暗中在室温搅拌20小时。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100% 乙腈) 直接分离, 以给出作为白色固体的P28 (4.3mg, 34% 收率)。ESI m/z : 550.1 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.51 (br s, 1H), 8.07 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.48-7.42 (m, 2H), 7.23-7.14 (m, 5H), 6.22 (s, 2H), 5.57 (d, J=16.0Hz, 1H), 5.37 (d, J=16.0Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 1.97-1.94 (m, 2H), 1.30-1.26 (m, 2H), 0.99 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

[0577] 实施例4: 有效载荷P13和P18的合成 (方案4)

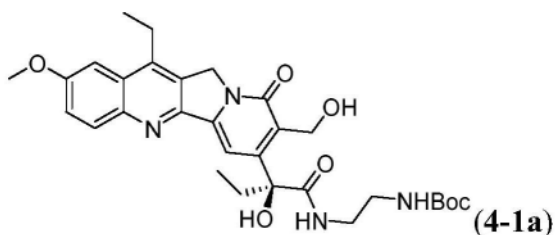
[0578] 方案4. 内酯开环类似物的合成



[0579]

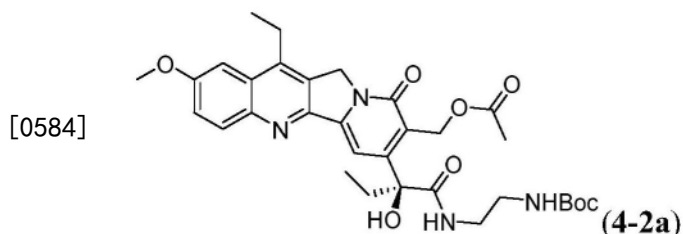
[0580] 实施例4A: 叔-丁基N-{2-[(2S)-2-[12-乙基-8-(羟基甲基)-2-甲氧基-9-氧代-9-H,11H-吡啶并[1,2-b]喹啉-7-基]-2-羟基丁酰胺基]乙基}氨基甲酸酯(4-1a)的合成

[0581]



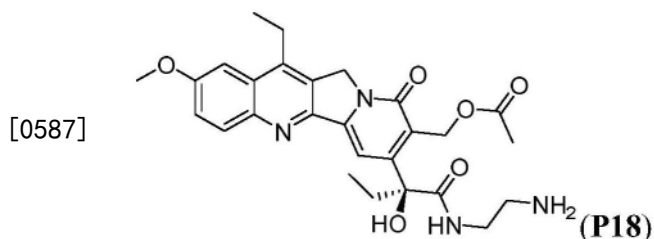
[0582] 将化合物P17 (0.12g, 0.30mmol) 和1-Boc-乙二胺 (0.20g, 1.2mmol) 在无水乙腈 (10mL) 中的悬浮液在50℃搅拌3天, 直到悬浮液变黄且澄清。溶液通过反相快速色谱 (在水中的0-80%乙腈) 直接纯化, 以给出作为淡黄色固体的化合物4-1a (0.12g, 71% 收率)。ESI m/z : 549.3 ($M-H_2O+H$)⁺。

[0583] 实施例4B: {7-[(1S)-1-[(2-{[(叔-丁氧基)羰基]氨基}乙基)氨基甲酰基]-1-羟基丙基]-12-乙基-2-甲氧基-9-氧代-9-H, 11H-吡啶并[1,2-b]喹啉-8-基}乙酸甲酯 (4-2a) 的合成



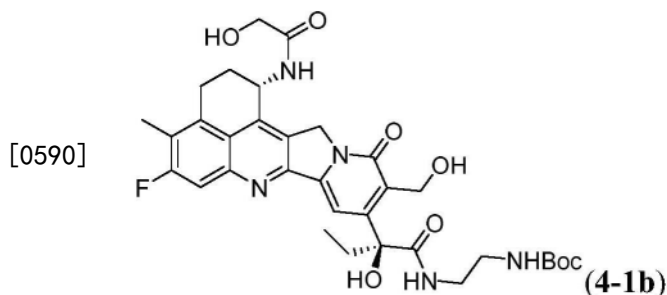
[0585] 向化合物4-1a (0.12g, 0.21mmol) 在无水吡啶 (2mL) 中的溶液中的黄色溶液中添加乙酸酐 (0.43g, 4.2mmol), 并且将反应混合物在室温搅拌2小时, 这通过LCMS监测。反应混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 直接纯化, 以给出作为黄色固体的化合物4-2a (55mg, 42% 收率)。ESI m/z 549.3 ($M-OAc$)⁺。

[0586] 实施例4C: {7-[(1S)-1-[(2-氨基乙基)氨基甲酰基]-1-羟基丙基]-12-乙基-2-甲氧基-9-氧代-9-H, 11H-吡啶并[1,2-b]喹啉-8-基}乙酸甲酯 (P18) 的合成



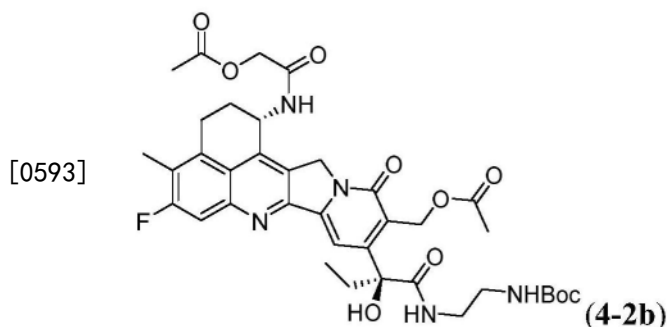
[0588] 向搅拌的化合物4-2a (6.1mg, 10 μ mol) 在DCM (1.8mL) 的黄色溶液中添加TFA (0.2mL), 并且将反应混合物在室温搅拌2小时, 直到根据LCMS完全去除Boc。然后所得溶液通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-80%乙腈) 直接纯化, 以给出作为黄色固体的化合物P18 (3.3mg, 65% 收率, TFA盐)。ESI m/z : 449.2 ($M-OAc$)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.31 (t, J=5.6Hz, 1H), 8.09 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.82 (br s, 3H), 7.53 (d, J=2.8Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.37 (d, J=10.8Hz, 1H), 5.29 (d, J=10.8Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.43-3.39 (m, 1H), 3.28-3.17 (m, 3H), 2.85 (br s, 2H), 2.22-2.11 (m, 2H), 1.99 (s, 3H), 1.33 (t, J=7.2Hz, 3H), 0.88 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

[0589] 实施例4D: 叔-丁基N-{2-[(2S)-2-[(19S)-14-氟-19-(2-羟基乙酰胺基)-6-(羟基甲基)-15-甲基-5-氧代-4,11-二氮杂戊环[10.7.1.0²,¹⁰.0⁴,⁹.0¹⁶,²⁰]二十-1,6,8,10,12,14,16(20)-庚烯-7-基]-2-羟基丁酰胺基]乙基}氨基甲酸酯 (4-1b) 的合成



[0591] 遵循与化合物4-1a相似的程序(除了用化合物DXd(P12)取代化合物P17之外),获得作为淡黄色固体的化合物4-1b(0.16g,84%收率)。ESI m/z :636.3(M-OH)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 8.45(d,J=9.2Hz,1H),8.14(t,J=5.6Hz,1H),7.81(d,J=11.2Hz,1H),7.42(s,1H),6.80(t,J=5.6Hz,1H),6.48(s,1H),5.64-5.58(m,1H),5.20(d,J=18.8Hz,1H),5.12(d,J=18.8Hz,1H),4.82(d,J=12.0Hz,1H),4.66(d,J=11.6Hz,1H),3.97(s,2H),3.20-3.10(m,4H),3.03-2.98(m,2H),2.39(s,3H),2.21-2.12(m,4H),1.43-1.38(m,9H),0.87(t,J=7.2Hz,3H)ppm。参考文献Chemical&Pharmaceutical Bulletin,1994,2518-2525(确认了4-1b的身份)通过引用以其整体并入。

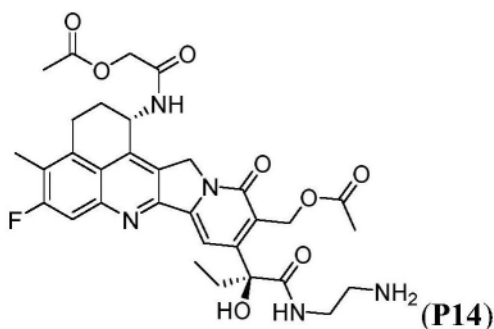
[0592] 实施例4E: {[(19S)-6-[(乙酰氧基) 甲基]-7-[(1S)-1-[(2-{ [(叔-丁氧基) 羰基] 氨基} 乙基) 氨基甲酰基]-1-羟基丙基]-14-氟-15-甲基-5-氧代-4,11-二氮杂戊环[10.7.1.0^{2,10}.0^{4,9}.0^{16,20}]二十碳-1,6,8,10,12,14,16(20)-庚烯-19-基]氨基甲酰基}乙酸甲酯(4-2b)的合成



[0594] 遵循与化合物4-2a相似的程序(除了用化合物4-1b取代化合物4-1a之外),获得作为淡黄色固体的化合物4-2b(50mg,73%收率,TFA盐)。ESI m/z :678.3(M-OAc)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 8.68(d,J=8.8Hz,1H),8.05-8.03(m,1H),7.83(d,J=10.8Hz,1H),7.45(s,1H),6.78(d,J=4.4Hz,1H),6.21(br s,1H),5.59-5.58(m,1H),5.37(d,J=11.2Hz,1H),5.30(d,J=10.8Hz,1H),5.25-5.13(m,2H),4.52(d,J=2.0Hz,2H),3.20-3.17(m,3H),3.06-2.99(m,3H),2.41(s,3H),2.22-2.10(m,4H),2.09(s,3H),1.98(s,3H),1.38-1.35(m,9H),0.87(t,J=7.2Hz,3H)ppm。¹⁹F NMR(376MHz,DMSO_{d6}) δ -74(TFA),-111(Ar-F)ppm。

[0595] 实施例4F: {[(19S)-6-[(乙酰氧基) 甲基]-7-[(1S)-1-[(2-氨基乙基) 氨基甲酰基]-1-羟基丙基]-14-氟-15-甲基-5-氧代-4,11-二氮杂戊环[10.7.1.0^{2,10}.0^{4,9}.0^{16,20}]二十碳-1,6,8,10,12,14,16(20)-庚烯-19-基]氨基甲酰基}乙酸甲酯(P14)的合成

[0596]



[0597] 遵循与化合物P18相似的程序(除了用化合物4-2b取代化合物4-2a之外),获得作为白色固体的化合物(26mg,60%收率,TFA盐)。ESI m/z :638.3 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.69(d, J=8.4Hz, 1H), 8.32(t, J=6.0Hz, 1H), 7.83(d, J=10.8Hz, 1H), 7.72(br s, 3H), 7.48(s, 1H), 6.34(s, 1H), 5.61-5.58(m, 1H), 5.37-5.14(m, 4H), 4.55(d, J=14.8Hz, 1H), 4.50(d, J=14.8Hz, 1H), 3.41-3.35(m, 1H), 3.26-3.23(m, 1H), 3.22-3.18(m, 2H), 2.84-2.83(br s, 2H), 2.42(s, 3H), 2.21-2.12(m, 4H), 2.08(s, 3H), 1.99(s, 3H), 0.88(t, J=7.2Hz, 3H) ppm。

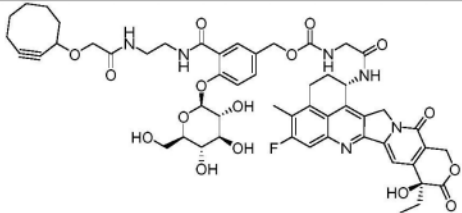
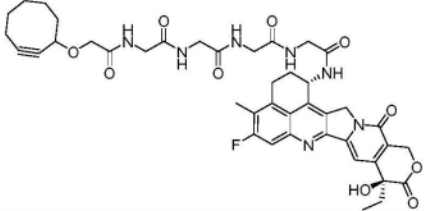
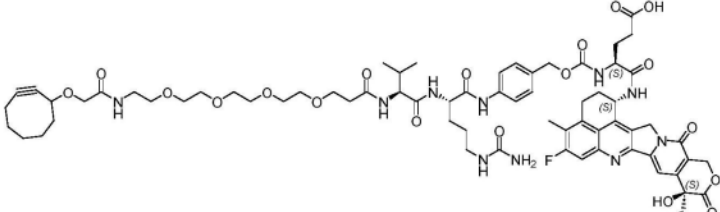
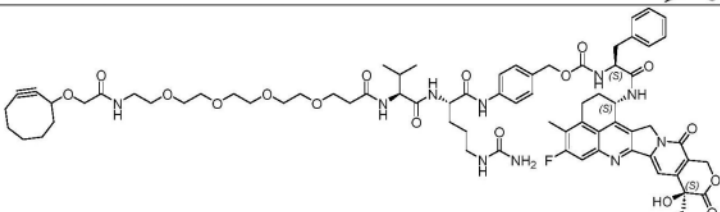
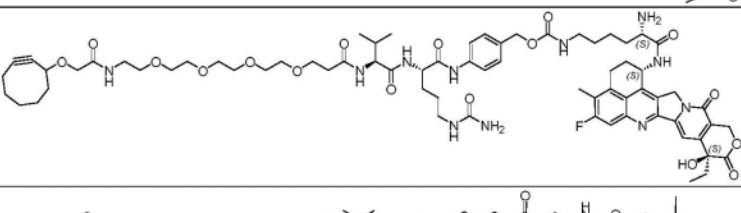
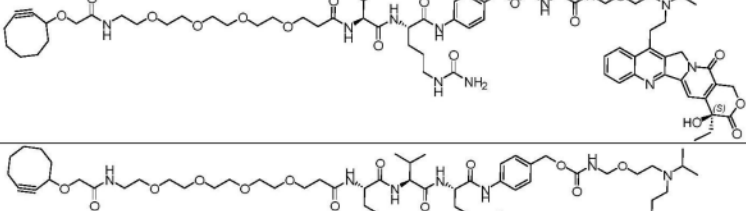
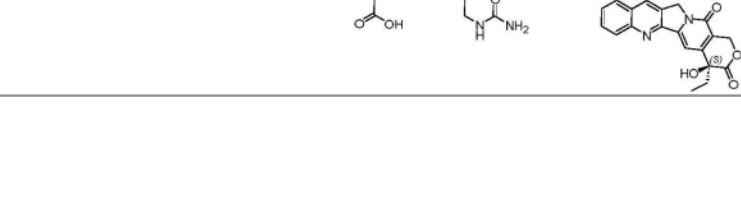
[0598] 下文表2提供了本公开内容的示例性接头-有效载荷(LP)的列表。下文表3提供了示例性LP的化学特性。下文表4提供了示例性有效载荷和接头-有效载荷的HCT-15数据。

[0599] 表2.接头-依喜替康与接头-ProExt的列表

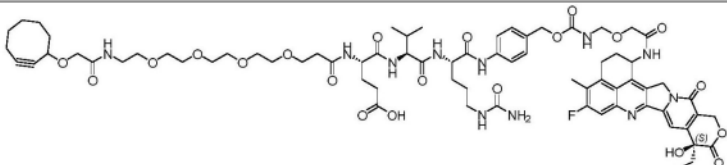
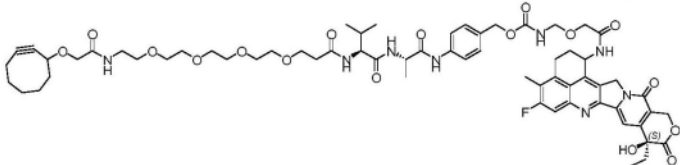
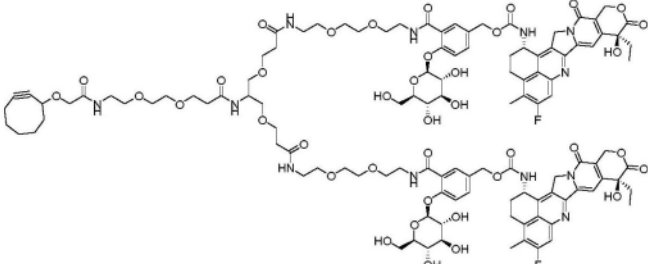
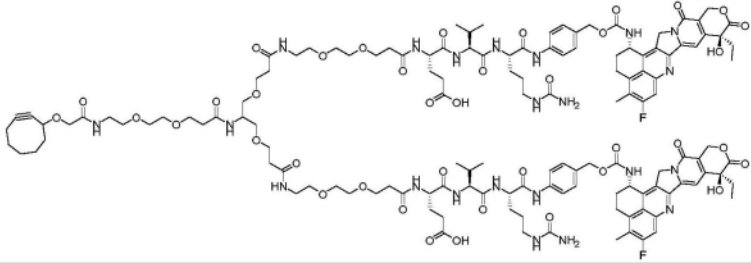
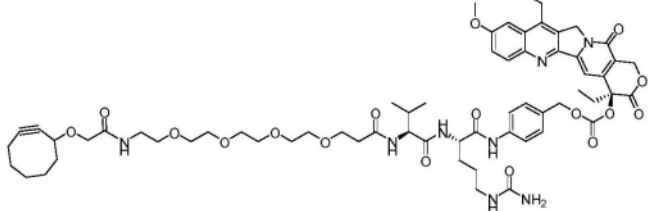
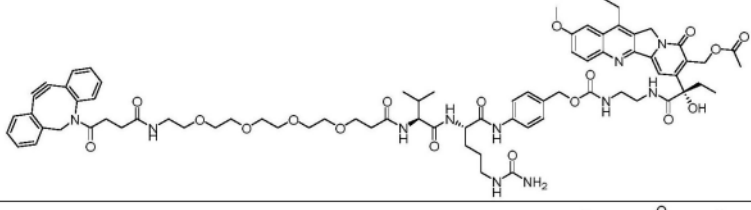
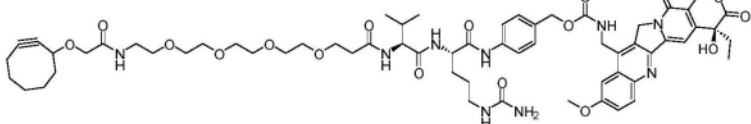
[0600]

#	接头名称	结构
LP1	COT-PEG4-vc PAB-依喜替康	
LP2	DIBAC-PEG4-vc PAB-依喜替康	
LP3	COT-EDA-(G LCA)PAB-依 喜替康	
LP4	COT-EDA-(G LC)PAB-依喜 替康	
LP5	COT-PEG4-vc PAB- ProEXT	
LP6	COT-PEG4-Ev cPAB- ProEXT	

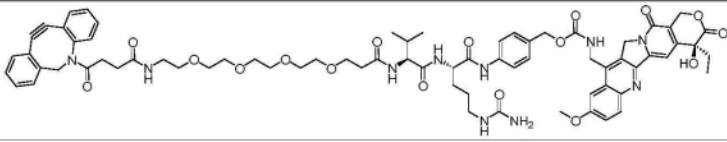
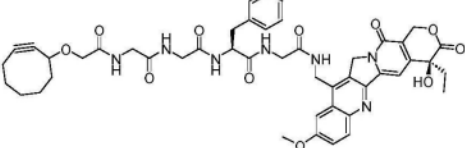
[0601]

LP7	COT-EDA-(G LC)PAB- ProEXT	
LP8	COT-GGGG- ProEXT	
LP9	COT-PEG4-vc PAB-GluEXT	
LP10	COT-PEG4-vc PAB-PheEXT	
LP11	COT-PEG4-vc PAB- ^ε LysEXT	
LP12	COT-PEG4-vc PAB-ProBLT	
LP13	COT-PEG4-Ev cPAB-NHCH2- -HOEthBLT	

[0602]

LP14	COT-PEG4-Ev cPAB-NHCH2 -DXd	
LP15	COT-PEG4-V APAB-NHCH 2-DXd	
LP16	COT-BL-[PEG 2-(GLC)PAB- EXT]2	
LP17	COT-BL-[PEG 2-EvcPAB-EX T]2	
LP18	COT-PEG4-vc PAB-P16	
LP19	COT-PEG4-vc PAB-P17	
LP20	COT-PEG4-vc PAB-P21	

[0603]

LP21	DIBAC-PEG4- vcPAB-P21	
LP22	COT-GGFG-P 21	

[0604] 表3.接头-有效载荷的化学特性

[0605]

	接头名称	cLogP	MF	MW	质量 ESI m/z	
	LP1	COT-PEG4-vcPAB-依喜替康	2.87	C ₆₄ H ₈₂ FN ₉ O ₁₆	1252.41	626.8 (M/2+H)
	LP2	DIBAC-PEG4-vcPAB-依喜替康	3.61	C ₇₃ H ₈₃ FN ₁₀ O ₁₆ (内酯)	1375.52	697.3 (M/2+H)
				C ₇₃ H ₈₅ FN ₁₀ O ₁₇ (酸)	1393.53	688.3 (M/2+H)
	LP3	COT-EDA-(GLCA)PAB-依喜替康	1.41	C ₅₁ H ₅₄ FN ₅ O ₁₆	1012.00	1012.5 (M+H)
	LP4	COT-EDA-(GLC)PAB-依喜替康	1.49	C ₅₁ H ₅₆ FN ₅ O ₁₅	998.01	998.5 (M+H)
	LP5	COT-PEG4-vcPAB- ProEXT	1.76	C ₆₆ H ₈₅ FN ₁₀ O ₁₇	1309.46	655.5 (M/2+H)
	LP6	COT-PEG4-EvcPAB-ProEXT	0.76	C ₇₁ H ₉₂ FN ₁₁ O ₂₀	1438.57	720.0 (M/2+H)
	LP7	COT-EDA-(GLC)PAB-ProEXT	0.38	C ₅₃ H ₅₉ FN ₆ O ₁₆	1055.08	
	LP8	COT-GGGG-ProEXT	-0.80	C ₄₂ H ₄₆ FN ₇ O ₁₀	827.85	828.5 (M+H)
	LP9	COT-PEG4-vcPAB-GluEXT	1.85	C ₆₉ H ₈₉ FN ₁₀ O ₁₉	1381.52	691.3
	LP10	COT-PEG4-vcPAB-PheEXT	3.99	C ₇₃ H ₉₁ FN ₁₀ O ₁₇	1399.58	700.6
	LP11	COT-PEG4-vcPAB- ⁵ LysEXT	2.20	C ₇₀ H ₉₄ FN ₁₁ O ₁₇	1380.58	691.2
	LP12	COT-PEG4-vcPAB-ProBLT	1.71	C ₇₀ H ₉₇ N ₁₁ O ₁₈	1380.61	690.8
	LP13	COT-PEG4-EvcPAB-NHCH2-HOEthBLT	-0.81	C ₇₃ H ₁₀₁ N ₁₁ O ₂₀	1452.67	727.3
	LP14	COT-PEG4-EvcPAB-NHCH2-DXd	0.83	C ₇₂ H ₉₄ FN ₁₁ O ₂₁	1468.60	734.3
	LP15	COT-PEG4-VAPAB-NHCH2-DXd	2.92	C ₆₄ H ₈₁ FN ₈ O ₁₇	1253.39	627.5
	LP16	COT-BL-[PEG2-(GLC)PAB-EXT]2	-1.39	C ₁₁₆ H ₁₄₂ F ₂ N ₁₂ O ₃₉	2366.45	789.2 (M/3+H)
	LP17	COT-BL-[PEG2-EvcPAB-EXT]2	1.74	C ₁₃₆ H ₁₇₆ F ₂ N ₂₂ O ₃₉	2781.02	927.7 (M/3+H)
	LP18	COT-PEG4-vcPAB-P17	3.97	C ₆₃ H ₈₂ N ₈ O ₁₇	1223.39	612.3
	LP19	COT-PEG4-vcPAB-P18	2.48	C ₇₆ H ₉₃ N ₁₁ O ₁₈	1448.64	612.3 ((M-OAc)/2+H)
	LP20	COT-PEG4-vcPAB-P22	1.51	C ₆₂ H ₈₁ N ₉ O ₁₇	1224.38	613.0
	LP21	DIBAC-PEG4-vcPAB-P22	2.25	C ₇₁ H ₈₂ N ₁₀ O ₁₇	1347.49	682.7 (酸)
						674.3 (内酯)
	LP22	COT-GGFG-P22	0.07	C ₄₇ H ₅₁ N ₇ O ₁	889.95	890.3 (M+H)

[0606] 表4.有效载荷和接头-有效载荷的HCT-15数据

有效载荷				接头-有效载荷		
#	名称	HCT-15 EC ₅₀ (nM)	HCT-15 + 维拉帕米 EC ₅₀ (nM)	#	接头名称	HCT-15
						5

[0608]

						EC₅₀ (nM)
P1	EXT	1.22	1.13	LP1	COT-PEG4-vcPAB-EXT	288.92
				LP2	DIBAC-PEG4-vcPAB-EXT	144.93
				LP3	COT-EDA-(GLCA)PAB-EXT	456.83
				LP4	COT-EDA-(GLC)PAB-EXT	362.97
				LP16	COT-BL-[PEG2-(GLC)PAB-EXT] T]2	140.24
				LP17	COT-BL-[PEG2-EvcPAB-EXT] 2	(无 amt)
P2	GlyEXT	61.91	14.34	LP5	COT-PEG4-vcPAB-GlyEXT	>1000
				LP6	COT-PEG4-EvcPAB-GlyEXT	(无 amt)
				LP7	COT-EDA-(GLC)PAB-GlyEXT	(无 amt)
				LP8	COT-GGGG-EXT	836.54
P3	GluEXT	610.21	596.04	LP9	COT-PEG4-vcPAB-GluEXT	722.36
P5	PheEXT	48.25	4.20	LP10	COT-PEG4-vcPAB-PheEXT	851.96
P4	LysEXT	447.03	580.96	LP11	COT-PEG4-vcPAB- ^E LysEXT	208.38
P6	MsEXT	7.45	3.16			
P7	MsEthEXT	5.58	1.69			
P8	BLT	20.04	3.09			
P9	MsBLT	8.89	3.03			
P10	HOEthBLT	8.60	4.38	LP13	COT-PEG4-EvcPAB-NHCH2-H OEtBLT	
P11	ProBLT			LP12	COT-PEG4-vcPAB-ProBLT	

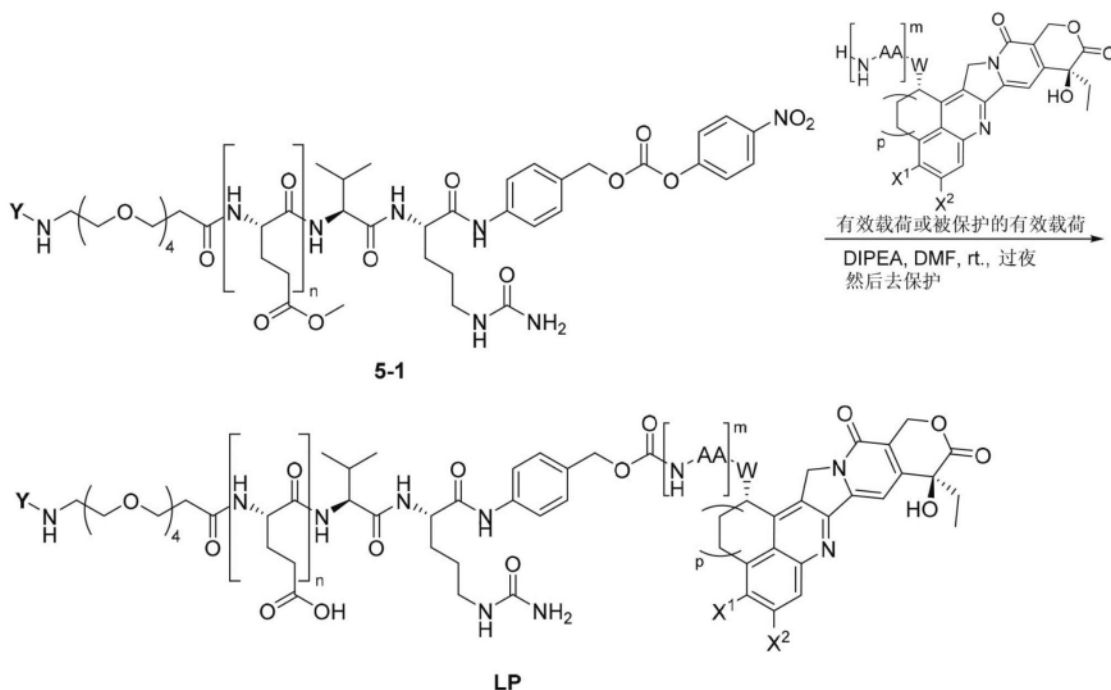
[0609]

P12	DXd	7.99	4.18	LP14	COT-PEG4-EvcPAB-NHCH2-D Xd	
				LP15	COT-PEG4-VAPAB-NHCH2-D Xd	96.93
P13		133.91				
P14		11.58	6.79			
P15		6.99	4.47			
P16	SN38	6.11	4.77			
P17		1.59	1.44	LP18	COT-PEG4-vcPAB-P16	
P18		32.45	32.79	LP19	COT-PEG4-vcPAB-P17	
P19	伊立替康	NA	NA			
P20		3.69	2.40			
P21						
P22		31.94	40.45	LP20	COT-PEG4-vcPAB-P21	
				LP21	DIBAC-PEG4-vcPAB-P21	
				LP22	COT-GGFG-P21	
P23		36.74				
P24		13.54				
P25		46.79				
P26		51.87				
P27		78.81				
P28		34.19				

[0610] 实施例5:vcPAB接头-有效载荷的合成(方案5A和5B)

[0611] 方案5A.从有效载荷的B环合成vcPAB-氨基甲酸酯接头

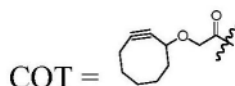
[0612]



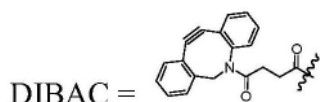
[0613]

P#	LP#	Y	n	W	m	AA	p	X1	X2
P1 (EXT)	LP1	COT	0	NH	0	/	1	Me	F
P1	LP2	DIBAC	0	NH	0	/	1	Me	F
P2	LP5	COT	0	NH	1	-CH ₂ CO-	1	Me	F
P2	LP6	COT	1	NH	1	-CH ₂ CO-	1	Me	F
P3	LP9	COT	0	NH	1	-CH(CH ₂ CH ₂ COOH)-CO	1	Me	F
P5	LP10	COT	0	NH	1	-CH(Bn)CO-	1	Me	F
P4	LP11	COT	0	NH	1	-(CH ₂) ₄ CH(NH ₂)CO-	1	Me	F
P11	LP12	COT	0	CH ₂ N ^{(i)Pr} (CH ₂) ₂ OCH ₂ NH	1	-CH ₂ CO-	1	H	H
P21	LP20	COT	0	NH	0	/	0	OMe	H
P21	LP21	DIBAC	0	NH	0	/	0	OMe	H

[0614]



[0615]

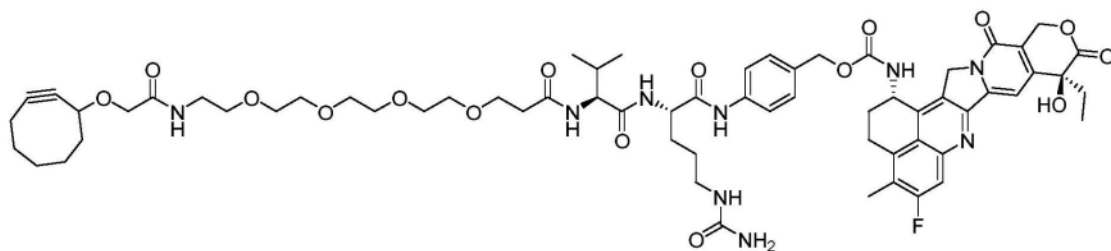


[0616] 实施例5A:一般程序C

[0617] 向包含胺基团的有效载荷或被保护的有效载荷 (1.0当量) 在无水DMF (2mM) 中的溶液中添加化合物5-1 (1当量) 和DIPEA (3当量), 并且将反应混合物在室温搅拌16小时, 这通过LCMS监测。所得溶液通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-70%乙腈) 直接纯化, 以给出作为固体的对应的接头-有效载荷 (23%-81%收率, TFA盐)。

[0618] 实施例5A-1: {4-[(2S) -5-(氨基甲酰基氨基) -2-[(2S) -2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基) 乙酰胺基] -3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基} -3-甲基丁酰胺基] 戊酰胺基] 苯基} 甲基N-[(10S,23S) -10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧代-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}] 二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基] 氨基甲酸酯 (LP1) 的合成

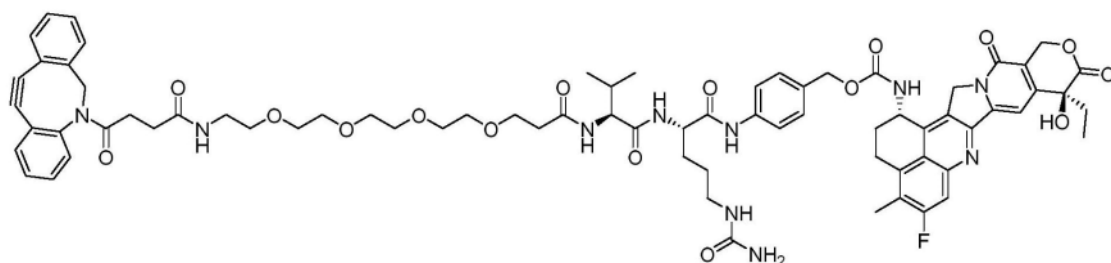
[0619]



[0620] 遵循一般程序C,用5-1a从依喜替康开始,在通过制备型HPLC(在碳酸氢铵水溶液(10mM)中的0-100%乙腈)纯化之后获得作为白色固体的接头-有效载荷LP1(36mg,81%收率,TFA盐),用TFA水溶液(0.1M)处理至pH 4.0,在真空中浓缩并冻干。ESI m/z :626.8($M/2+H$)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 10.00(s,1H),8.13(d,J=6.8Hz,1H),8.07(d,J=9.2Hz,1H),7.88(d,J=8.4Hz,1H),7.78(d,J=10.8Hz,1H),7.61(d,J=8.4Hz,3H),7.36(d,J=8.4Hz,2H),7.32(s,1H),6.54(s,1H),6.00(s,1H),5.45(s,3H),5.29(s,3H),5.08(s,2H),4.41-4.35(m,1H),4.29-4.21(m,2H),3.87(d,J=14.4Hz,1H),3.75(d,J=14.4Hz,1H),3.62-3.57(m,2H),3.50-3.48(m,14H),3.27-3.23(m,3H),3.15-2.90(m,4H),2.38-2.33(m,4H),2.24-2.07(m,5H),1.96-1.67(m,9H),1.59-1.53(m,3H),1.46-1.33(m,3H),0.89-0.82(m,9H)ppm。(未观察到TFA的质子)。¹⁹F NMR(376MHz,DMSO_{d6}) δ -74(TFA),-111(Ar-F)ppm。

[0621] 实施例5A-2:{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12),4(9),5,7,13,15-己烯-10-炔-2-基]-4-氧代丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酸酯(LP2)的合成

[0622]



[0623] 遵循一般程序C,用5-1b从依喜替康开始,在通过反相快速色谱(在碳酸氢铵水溶液(10mM)中的0-100%甲醇)纯化之后获得作为白色固体的接头-有效载荷LP2(具有内酯开环产物,10mg,26%收率)。

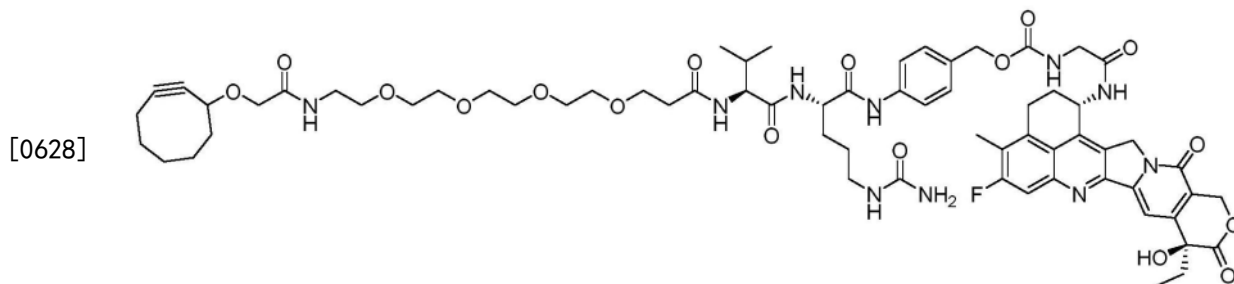
[0624] 内酯:HPLC纯度:67%,保留时间:8.16min,ESI m/z :459.4($M/3+H$)⁺,688.3($M/2+H$)⁺;

[0625] 开环产物:HPLC纯度:33%,保留时间:6.98min,ESI m/z :465.2($M/3+H$)⁺,697.3($M/2+H$)⁺。

[0626] ¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 9.99(s,1H),8.18-8.11(m,1H),8.06(d,J=8.8Hz,1H),7.94-7.86(m,1H),7.79-7.75(m,2H),7.68(d,J=1.6Hz,1H),7.67-7.56(m,3H),7.51-7.42(m,3H),7.38-7.28(m,6H),6.53(s,0.6H),6.05-6.00(m,0.4H),5.99-5.96(m,0.6H),5.45-5.41(m,3H),5.29-5.28(m,2H),5.26-5.21(m,1H),5.08(s,2H),5.02(d,J=14.0Hz,1H),4.75-4.70(m,0.4H),4.41-4.36(m,1H),4.25-4.21(m,1H),3.61-3.57(m,3H),3.47-3.42

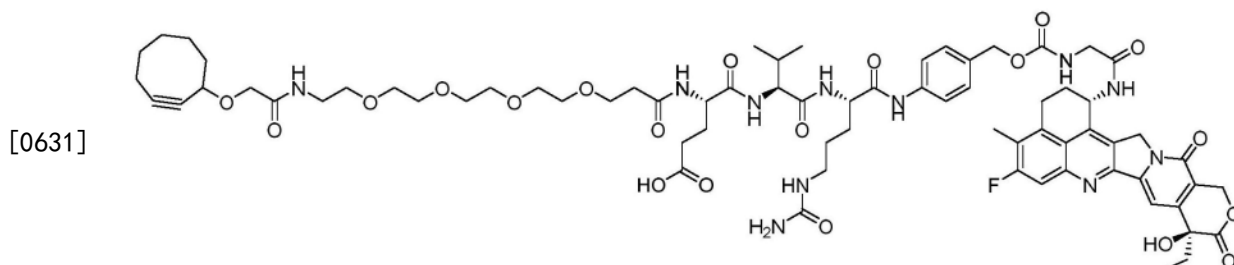
(m, 13H), 3.24-3.22 (m, 2H), 3.21-3.19 (m, 1H), 3.14-3.05 (m, 3H), 3.03-3.00 (m, 1H), 2.97-2.91 (m, 1H), 2.61-2.55 (m, 1H), 2.48-2.44 (m, 1H), 2.41-2.35 (m, 4H), 2.27-2.09 (m, 4H), 2.03-1.95 (m, 2H), 1.90-1.83 (m, 1H), 1.80-1.72 (m, 2H), 1.65-1.54 (m, 1H), 1.47-1.23 (m, 2H), 1.04 (t, J=6.8Hz, 0.4H), 0.90-0.81 (m, 9H) ppm。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ-111ppm。

[0627] 实施例5A-3: {4-[(2S)-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基}-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲基N-({[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲基)氨基甲酸酯(LP5)的合成



[0629] 遵循一般程序C,用5-1a从P2开始,在通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.1%)中的5%-95%乙腈)纯化之后获得作为白色固体的接头-有效载荷LP5(22mg,32%收率)。ESI m/z:655.5 (M/2+H)⁺,1309.6 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ9.99 (s, 1H), 8.50 (d, J=8.5Hz, 1H), 8.13 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.88 (d, J=8.5Hz, 1H), 7.81 (d, J=10.9Hz, 1H), 7.59-7.57 (m, 3H), 7.34-7.25 (m, 3H), 6.53 (s, 1H), 5.99-5.95 (m, 1H), 5.60-5.54 (m, 1H), 5.42 (s, 4H), 5.31-5.17 (m, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.41-4.34 (m, 1H), 4.27-4.21 (m, 2H), 3.88-3.73 (m, 2H), 3.68-3.58 (m, 4H), 3.56-3.44 (m, 14H), 3.43-3.40 (m, 2H), 3.25-3.23 (m, 2H), 3.19-3.15 (m, 1H), 3.03-2.92 (m, 2H), 2.40-2.38 (m, 4H), 2.23-2.04 (m, 5H), 1.96-1.67 (m, 9H), 1.62-1.52 (m, 3H), 1.45-1.34 (m, 3H), 0.87-0.81 (m, 9H) ppm。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ-111ppm。

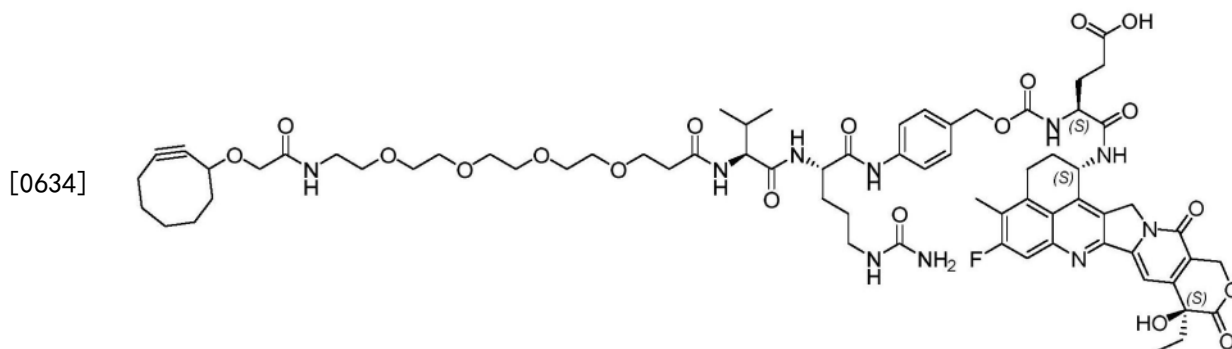
[0630] 实施例5A-4: (4S)-4-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-{4-({[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲基)氨基甲酰基]氧基}甲基]苯基]氨基甲酰基}丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-4-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基}丁酸(LP6)的合成



[0632] 遵循一般程序C,用2-1c从P2开始,在通过反相快速色谱法(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-70%乙腈)纯化之后获得作为白色固体的接头-有效载荷甲基化-LP6(15mg,45%收率,ESI m/z:727.0 (M/2+H)⁺)。向获得的甲基化-LP6(10mg,6.9μmol)在THF(2mL)中的溶

液中添加氢氧化锂水溶液(0.5mg, 20mM, 1mL), 并且将反应混合物在室温搅拌1小时, 这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.05%)中的10%-95%乙腈)直接纯化, 以给出作为白色固体的LP6(3.0g, 30%收率)。ESI m/z : 720.0 ($M/2+H$)⁺。¹H NMR(400MHz, DMSO_{d6}) δ 10.03(s, 1H), 8.51(d, J=8.8Hz, 1H), 8.18(d, J=7.6Hz, 1H), 8.08(d, J=8.0Hz, 1H), 7.81(d, J=11.2Hz, 1H), 7.74(d, J=7.6Hz, 1H), 7.63-7.56(m, 3H), 7.44(t, J=6.0Hz, 1H), 7.31(s, 1H), 7.27(d, J=8.8Hz, 2H), 6.54(s, 1H), 6.01-5.96(m, 1H), 5.60-5.55(m, 1H), 5.43(m, 4H), 5.32-5.16(m, 2H), 4.93(s, 2H), 4.39-4.31(m, 2H), 4.29-4.25(m, 1H), 4.22-4.17(m, 1H), 3.90-3.84(m, 1H), 3.78-3.73(m, 1H), 3.67-3.62(m, 1H), 3.60-3.55(m, 2H), 3.51-3.46(m, 13H), 3.44-3.40(m, 3H), 3.27-3.23(m, 3H), 3.06-3.00(m, 2H), 2.97-2.90(m, 2H), 2.43-2.39(m, 4H), 2.36-2.30(m, 2H), 2.26-2.20(m, 3H), 2.18-2.15(m, 1H), 2.08(s, 1H), 1.95-1.84(m, 5H), 1.76-1.69(m, 3H), 1.60-1.55(m, 2H), 1.43-1.35(m, 3H), 0.87-0.80(m, 11H) ppm。(未揭示COOH的质子)。

[0633] 实施例5A-5: (4S)-4-[(4-[(2S)-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基]甲氧基]羰基]氨基]-4-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基]丁酸(LP9)的合成

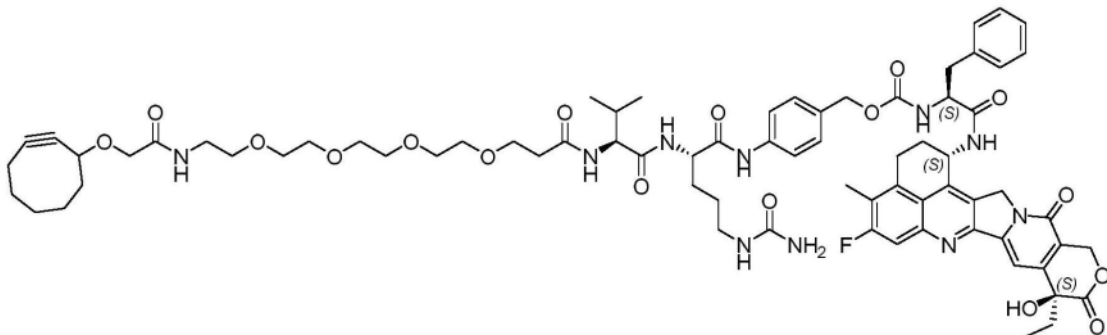


[0635] 遵循一般程序C, 用5-1a从P3开始, 在通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)纯化之后获得作为浅黄色固体的接头-有效载荷LP9(22mg, 38%收率)。ESI m/z : 691.3 ($M/2+H$)⁺。¹H NMR(400MHz, DMSO_{d6}) δ 10.00(s, 1H), 8.55(d, J=8.5Hz, 1H), 8.13(d, J=7.1Hz, 1H), 7.88(d, J=8.8Hz, 1H), 7.82(d, J=10.9Hz, 1H), 7.69-7.53(m, 3H), 7.44(d, J=7.6Hz, 1H), 7.31(s, 1H), 7.23(d, J=8.5Hz, 2H), 5.99(s, 1H), 5.52(s, 1H), 5.42(s, 2H), 5.33(d, J=18.7Hz, 1H), 5.08(d, J=18.7Hz, 1H), 4.97-4.87(m, 2H), 4.43-4.35(m, 1H), 4.30-4.19(m, 4H), 4.02-3.95(m, 1H), 3.87(d, J=14.7Hz, 1H), 3.75(d, J=14.8Hz, 1H), 3.61-3.57(m, 2H), 3.54-3.48(m, 14H), 3.26-3.21(m, 2H), 3.17(s, 2H), 3.05-2.94(m, 2H), 2.46(d, J=7.0Hz, 1H), 2.41-2.36(m, 4H), 2.29-2.02(m, 7H), 2.01-1.81(m, 11H), 1.64-1.52(m, 3H), 1.51-1.30(m, 3H), 0.97-0.68(m, 9H) ppm。

[0636] 实施例5A-6: {4-[(2S)-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基]甲基N-[(1S)-1-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20

(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}-2-苯基乙基)氨基甲酸酯(LP10)的合成

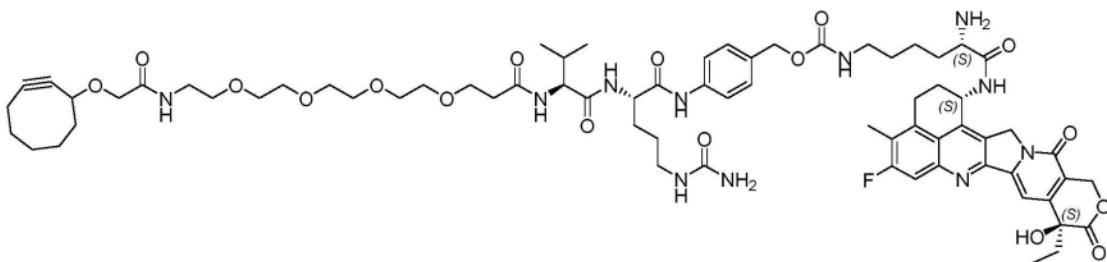
[0637]



[0638] 遵循一般程序C,用5-1a从P5开始,在通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)纯化之后获得作为黄色固体的接头-有效载荷LP10(55mg,51%收率)。ESI m/z :700.3(M/2+H)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 9.99(s,1H),8.65(d,J=8.5Hz,1H),8.13(d,J=7.5Hz,1H),7.88(d,J=8.6Hz,1H),7.82(d,J=11.0Hz,1H),7.68-7.49(m,4H),7.31(s,1H),7.26-7.13(m,4H),7.06(t,J=7.4Hz,2H),7.00-6.94(m,1H),6.00(s,1H),5.58-5.51(m,1H),5.43(s,2H),5.23(d,J=19.0Hz,1H),4.89(t,J=9.2Hz,2H),4.42-4.21(m,4H),3.85(d,J=14.8Hz,1H),3.75(d,J=14.8Hz,1H),3.67-3.58(m,14H),3.43-3.40(m,2H),3.27-3.17(m,4H),3.09-2.89(m,4H),2.85-2.78(m,1H),2.46(d,J=7.0Hz,1H),2.43-2.36(m,4H),2.26-2.03(m,6H),1.99-1.81(m,6H),1.80-1.66(m,4H),1.66-1.30(m,7H),0.93-0.78(m,9H)ppm.

[0639] 实施例5A-7:{4-[(2S)-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲基N-[(5S)-5-氨基-5-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧代-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}苯基)氨基甲酸酯(LP11)的合成

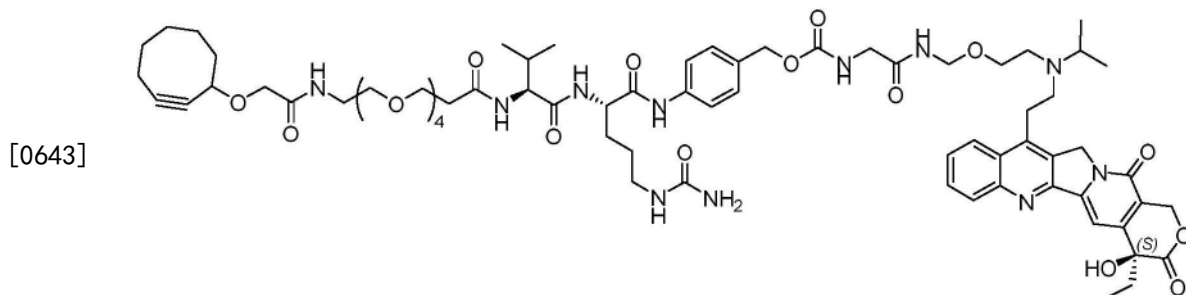
[0640]



[0641] 遵循一般程序C,用5-1a从1-3开始,在通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)纯化之后获得作为浅黄色固体的接头-有效载荷Fmoc-LP11(38mg(>95%纯度)和60mg(>75%纯度),ESI m/z :802.2(M+H)⁺。向Fmoc-LP11(38mg,>95%纯度,21 μ mol)在无水DMF(1mL)中的溶液中添加二乙胺(0.1mL),并且将反应混合物在室温搅拌2小时,直到Fmoc完全去除,这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在甲酸水溶液(0.1%)中的5%-95%乙腈)直接分离,以给出作为白色固体的LP11(14mg,从1-3的11%收率)。ESI m/z :691.2(M/2+H)⁺。¹H NMR(400MHz,DMSO_{d6}) δ 10.00(s,1H),8.46(s,1H),8.29(s,1H),8.14(d,J=7.3Hz,1H),7.89(d,J=8.8Hz,1H),7.81(d,J=10.9Hz,1H),7.64-7.54(m,3H),7.31(s,1H),7.25(d,J=8.5Hz,2H),7.17(s,1H),6.54(s,1H),6.01(s,1H),5.53(s,1H),5.42(m,4H),5.28-5.16(m,2H),4.89(s,2H),4.37(m,1H),4.24(m,2H),3.81(m,3H),

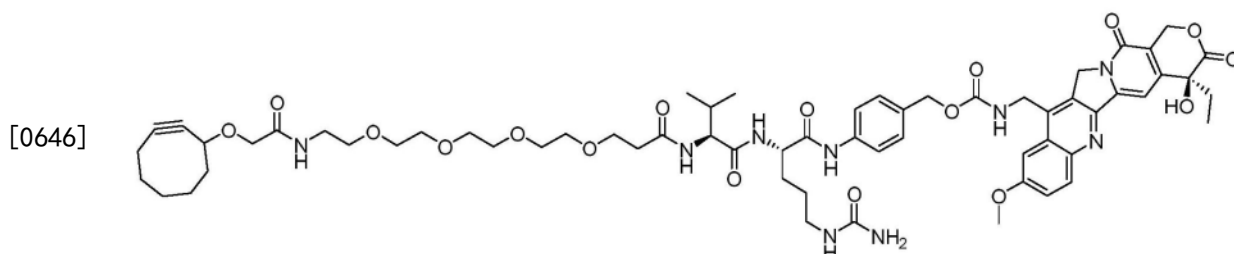
3.59 (m, 4H), 3.53-3.47 (m, 12H), 3.45-3.40 (m, 2H), 3.24 (m, 2H), 3.17 (m, 2H), 3.02-2.89 (m, 3H), 2.43-2.32 (m, 5H), 2.26-2.15 (m, 3H), 2.13-2.02 (m, 3H), 1.99-1.90 (m, 2H), 1.88-1.79 (m, 3H), 1.79-1.66 (m, 3H), 1.64-1.52 (m, 4H), 1.48-1.33 (m, 7H), 0.91-0.78 (m, 9H) ppm. ^{19}F NMR (376MHz, DMSO_{d_6}) δ -111.2 ppm.

[0642] 实施例5A-8: {4-[(2S)-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基}-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲基N-[(2-[(2-[(19S)-19-乙基-19-羟基-14,18-二氧代-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]乙基)(丙-2-基)氨基)乙氧基]甲基}氨基甲酰基]甲基}氨基甲酸酯(LP12)



[0644] 遵循一般程序C,用5-1a从P11开始,在通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)纯化之后获得作为白色固体的接头-有效载荷LP12(10mg,40%收率)。ESI m/z :690.8 ($\text{M}/2+\text{H}$)⁺. ^1H NMR (400MHz, DMSO_{d_6}) δ 9.99 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 8.95-8.81 (m, 1H), 8.37 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 8.23 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 8.12 (d, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 8.00-7.85 (m, 2H), 7.82 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.70-7.48 (m, 4H), 7.37 (s, 1H), 7.25 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 6.57 (br s, 1H), 5.99 (br t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H), 5.55-5.35 (m, 6H), 4.91 (br s, 2H), 4.71 (br s, 2H), 4.44-4.33 (m, 1H), 4.30-4.19 (m, 2H), 3.90-3.72 (m, 6H), 3.65-3.56 (m, 5H), 3.53-3.45 (m, 16H), 3.26-3.22 (m, 2H), 3.03-2.93 (m, 2H), 2.40-2.32 (m, 1H), 2.29-2.01 (m, 4H), 2.00-1.80 (m, 6H), 1.80-1.53 (m, 7H), 1.46-1.34 (m, 3H), 1.32-1.24 (m, 6H), 0.90-0.82 (m, 9H) ppm.

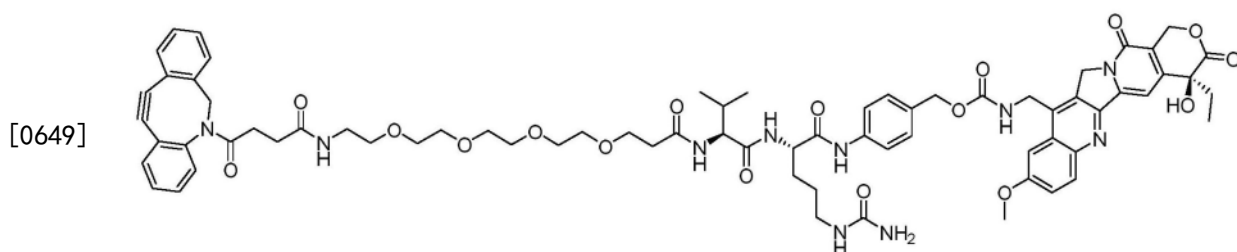
[0645] 实施例5A-9: {4-[(2S)-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基}-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲基N-[(19S)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-14,18-二氧代-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]甲基}氨基甲酸酯(LP20)



[0647] 遵循一般程序C,用5-1a从P21开始,在通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)纯化之后获得作为浅黄色固体的接头-有效载荷LP20(16mg,57%收率,TFA盐)。ESI m/z :613.0 ($\text{M}/2+\text{H}$)⁺. ^1H NMR (400MHz, DMSO_{d_6}) δ 9.97 (s, 1H), 8.17 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 8.10 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.87 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.61-7.56 (m, 3H), 7.53

(dd, $J=8.8, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.29(s, 2H), 7.27(br s, 1H), 6.51(s, 1H), 5.97(t, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 5.48(s, 2H), 5.44(s, 2H), 5.41(s, 2H), 4.97(s, 2H), 4.79(d, $J=6.0\text{Hz}$, 2H), 4.41-4.34(m, 1H), 4.28-4.20(m, 2H), 3.96(s, 3H), 3.87(d, $J=14.8\text{Hz}$, 1H), 3.75(d, $J=14.8\text{Hz}$, 1H), 3.62-3.58(m, 2H), 3.50-3.48(m, 12H), 3.46-3.42(m, 2H), 3.26-3.20(m, 2H), 3.03-2.91(m, 2H), 2.47-2.33(m, 1H), 2.21-2.03(m, 4H), 1.98-1.68(m, 8H), 1.61-1.46(m, 3H), 1.42-1.31(m, 3H), 0.91-0.82(m, 9H) ppm。(未观察到TFA的质子)。 ^{19}F NMR (376MHz, DMSO_{d_6}) δ -74ppm。

[0648] 实施例5A-10: {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六碳-1(12), 4(9), 5, 7, 13, 15-己烯-10-炔-2-基]-4-氧代丁酰胺基)-3, 6, 9, 12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-[(19S)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-14, 18-二氧化-17-氧杂-3, 13-二氮杂戊环[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,11}.020, 24]二十一碳-1(21), 2, 4, 6, 8, 10, 15(20)-庚烯-10-基]甲基}氨基甲酸酯(LP21)的合成



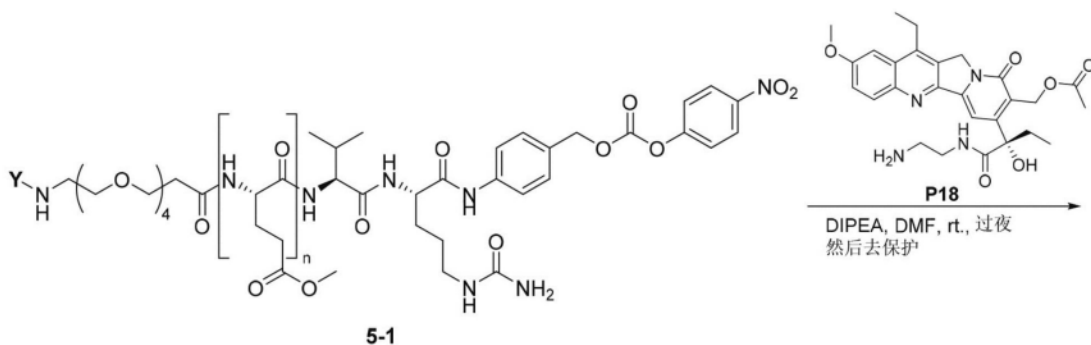
[0650] 遵循一般程序C, 用5-1b从P21开始, 在通过反相快速色谱(在碳酸氢铵水溶液(10mM)中的0-100%甲醇)纯化之后获得作为淡黄色固体的接头-有效载荷LP21(10mg, 38%收率)。

[0651] 内酯:HPLC纯度:77%, 保留时间:7.67min, ESI m/z :449.9 ($M/3+H$)⁺, 674.3 ($M/2+H$)⁺;

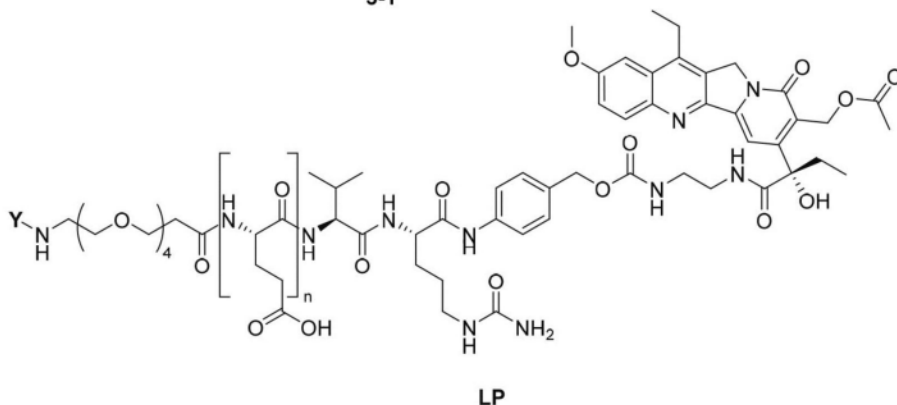
[0652] 开环产物:HPLC纯度:23%, 保留时间:6.57min, ESI m/z :455.9 ($M/3+H$)⁺, 683.4 ($M/2+H$)⁺。

[0653] ^1H NMR (400MHz, DMSO_{d_6}) δ 9.98(s, 1H), 8.18(t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 8.13-8.09(m, 2H), 7.87(d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.77(d, $J=5.6\text{Hz}$, 1H), 7.69-7.65(m, 2H), 7.63-7.60(m, 1H), 7.57(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.54-7.44(m, 4H), 7.39-7.34(m, 2H), 7.32-7.27(m, 4H), 6.51(s, 1H), 5.99-5.96(m, 1H), 5.48(br s, 2H), 5.44(s, 2H), 5.41(s, 2H), 5.02(d, $J=13.6\text{Hz}$, 1H), 4.97(s, 2H), 4.79(d, $J=6.0\text{Hz}$, 2H), 4.40-4.35(m, 1H), 4.25-4.21(m, 1H), 3.96(s, 3H), 3.62-3.57(m, 3H), 3.48-3.42(m, 12H), 3.30-3.28(m, 2H), 3.09-3.07(m, 2H), 3.03-2.99(m, 1H), 2.97-2.91(m, 1H), 2.60-2.55(m, 1H), 2.46-2.44(m, 1H), 2.41-2.37(m, 1H), 2.28-2.19(m, 1H), 2.03-1.93(m, 2H), 1.89-1.83(m, 2H), 1.80-1.65(m, 2H), 1.61-1.53(m, 1H), 1.48-1.31(m, 2H), 0.90-0.81(m, 9H) ppm。

[0654] 方案5B. 从有效载荷的E环合成vcPAB-氨基甲酸酯接头



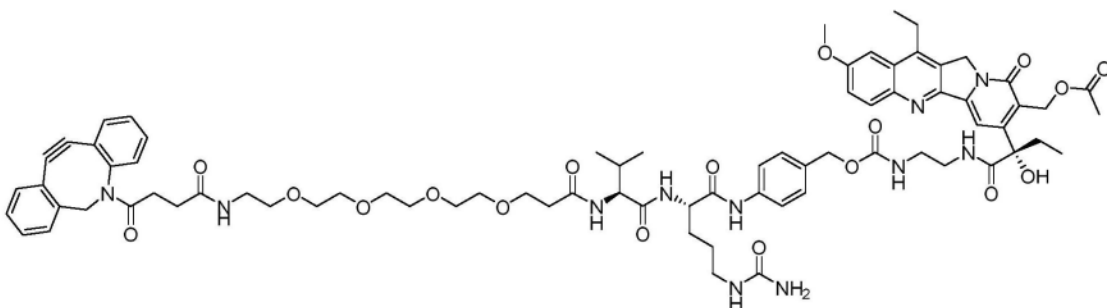
[0655]



P#	LP#	Y	n
P18	LP19	DIBAC	0

[0656] 实施例5B: {7-[(1S) -1-[(2- [({4-[(2S) -2-[(2S) -2-[1-(4-{2-氮杂三环[10.4.0.0^{4,9}]十六-1(12),4(9),5,7,13,15-己烯-10-炔-2-基)-4-氧代丁酰胺基)-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基)甲氧基)羰基]氨基]乙基)氨基甲酰基]-1-羟基丙基]-12-乙基-2-甲氧基-9-氧代-9-H,11H-吲哚并[1,2-b]喹啉-8-基)乙酸甲酯(LP19)的合成

[0657]

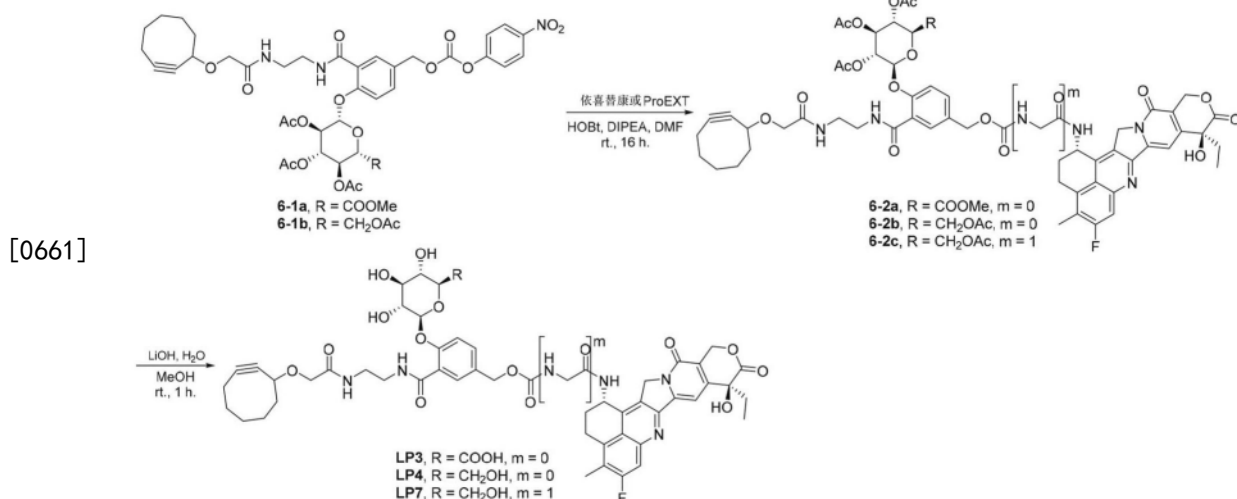


[0658] 遵循一般程序C,用5-1b从P18开始,在通过反相快速色谱法(在水溶液中的0-80%乙腈)纯化之后获得作为白色固体的接头-有效载荷LP19(19mg,82%收率)。ESI m/z :695.0 ((M-OAc)/2+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.98 (s, 1H), 8.12-8.09 (m, 2H), 8.06-8.03 (m, 1H), 7.87 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.77 (t, J=6.0Hz, 1H), 7.69 (dd, J=8.4 and 2.0Hz, 1H), 7.62 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.57 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.53-7.44 (m, 5H), 7.41-7.39 (m, 1H), 7.38-7.28 (m, 3H), 7.24 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.20-7.18 (m, 1H), 6.18 (s, 1H), 5.98 (t, J=6.0Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.37 (d, J=10.8Hz, 1H), 5.30 (d, J=10.8Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 5.03 (d, J=14.0Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.23 (q, J=6.8Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.62-

3.57 (m, 3H), 3.48-3.42 (m, 12H), 3.30-3.28 (m, 1H), 3.22-3.17 (m, 3H), 3.10-3.07 (m, 5H), 3.04-2.93 (m, 2H), 2.68-2.55 (m, 1H), 2.46-2.33 (m, 2H), 2.26-2.11 (m, 4H), 2.10-1.96 (m, 5H), 1.78-1.63 (m, 2H), 1.60-1.53 (m, 1H), 1.47-1.35 (m, 2H), 1.32 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 0.88-0.81 (m, 9H) ppm。

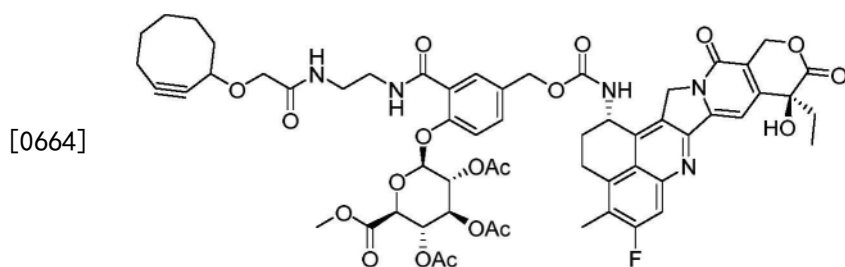
[0659] 实施例6:糖-PAB接头-有效载荷LP3、LP4和LP7的合成(方案6)

[0660] 方案6.糖-PAB接头-依喜替康LP3、LP4和LP7的合成



[0662] 实施例6A:LP3

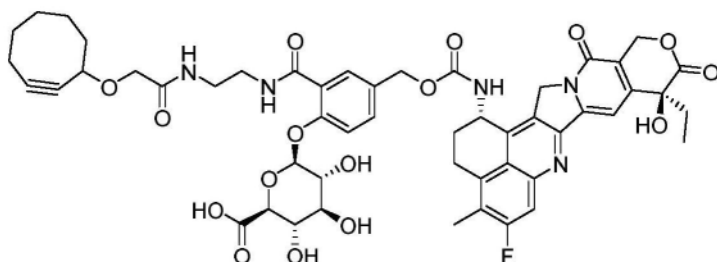
[0663] 实施例6A-1:甲基(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-[2-({2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙基}氨基甲酰基)-4-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基]氧基]甲基]苯氧基]噁烷-2-甲酸酯(6-2a)的合成



[0665] 向化合物6-1a(26mg, 30 μmol)在DMF(1.0mL)中的溶液中添加甲磺酸依喜替康(16mg, 30 μmol)、HOBt(4.0mg, 30 μmol)和DIPEA(7.7mg, 60 μmol)。将反应混合物在室温搅拌16小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液(0.01%)中的0-100%乙腈)直接纯化,以给出作为黄色固体的化合物6-2a(18mg, 52%收率)。ESI m/z : 1152.5(M+H)⁺。

[0666] 实施例6A-2:(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-({2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙基}氨基甲酰基)-4-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基]氧基]甲基]苯氧基]-3,4,5-三羟基噁烷-2-羧酸(LP3)的合成

[0667]

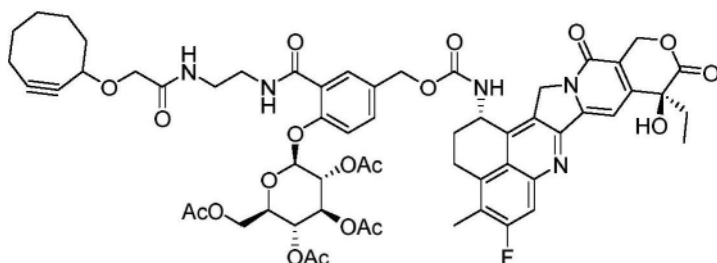


[0668] 向化合物6-2a (22mg, 19 μ mol) 在甲醇 (2mL) 中的混合物中添加氢氧化锂一水合物 (7.2mg, 0.17mmol) 和水 (2mL)。将反应混合物在25℃搅拌1小时, 这通过LCMS监测。将所得混合物用盐酸水溶液 (1N) 酸化至pH 3-4, 并且然后通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.1%) 中的5%-95%乙腈) 纯化, 以给出作为白色固体的LP3 (6.0mg, 28% 收率, TFA盐)。ESI m/z : 1012.5 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.56 (s, 1H), 8.09 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.98-7.92 (m, 1H), 7.79-7.76 (m, 2H), 7.54-7.52 (m, 1H), 7.34 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.52 (br s, 1H), 5.66 (br s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.28 (s, 3H), 5.15-5.06 (m, 3H), 4.89 (s, 1H), 4.25 (s, 1H), 3.88-3.71 (m, 2H), 3.25-3.05 (m, 9H), 2.38-2.33 (m, 4H), 2.23-2.01 (m, 6H), 1.98-1.79 (m, 4H), 1.74-1.65 (m, 2H), 1.65-1.46 (m, 2H), 1.28 (m, 1H), 0.88 (t, J=7.2Hz, 3H) ppm。(未揭示酸的质子。)

[0669] 实施例6B:LP4

[0670] 实施例6B-1: [(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-[2-({2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙基}氨基甲酰基)-4-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基]氧基]甲基]苯氧基]噁烷-2-基]乙酸甲酯 (6-2a) 的合成

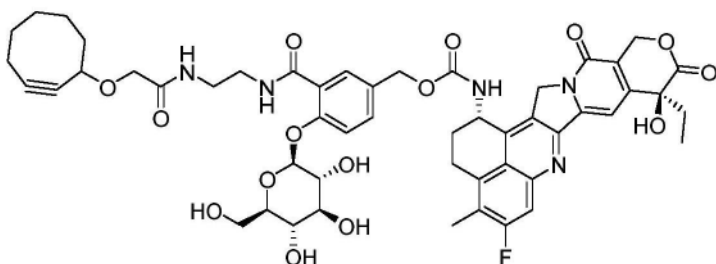
[0671]



[0672] 向化合物6-1b (55mg, 63 μ mol) 在DMF (3.0mL) 中的溶液中添加甲磺酸依喜替康 (34mg, 63 μ mol)、HOBt (8.5mg, 63 μ mol) 和DIPEA (16mg, 0.13mmol), 并且将反应混合物在室温搅拌16小时, 这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.1%) 中的0-100%乙腈) 直接纯化, 以给出作为黄色固体的化合物6-2b (34mg, 46% 收率)。ESI m/z : 1166.5 (M+H)⁺。

[0673] 实施例6B-2: [3-({2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙基}氨基甲酰基)-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)噁烷-2-基]氧基]苯基]甲基N-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酸酯 (LP4) 的合成

[0674]

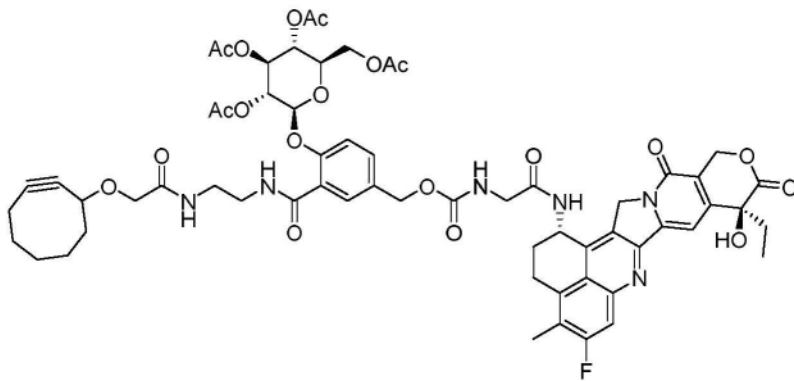


[0675] 向化合物6-2b (15mg, 13 μ mol) 在甲醇 (2mL) 中的混合物中添加氢氧化锂一水合物 (4.9mg, 0.12mmol) 和水 (2mL)。将反应混合物在15℃搅拌1小时, 这通过LCMS监测。将所得混合物用盐酸水溶液 (1N) 酸化至pH 3-4, 并且然后通过制备型HPLC (在甲酸水溶液 (0.1%) 中的5%-95%乙腈) 纯化, 以给出作为黄色固体的LP4 (4.0mg, 31%收率)。ESI m/z : 998.2 ($M+H$)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 8.49-8.43 (m, 4H), 8.10 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.83-7.72 (m, 3H), 7.54 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.78 (br s, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.33-5.28 (m, 4H), 5.16-5.08 (m, 3H), 4.91 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.68 (br s, 1H), 4.28-4.23 (m, 1H), 3.88-3.72 (m, 4H), 3.20-2.94 (m, 3H), 2.38-2.33 (m, 4H), 2.17-1.97 (m, 8H), 1.96-1.68 (m, 6H), 1.56-1.38 (m, 3H), 0.88 (t, $J=7.6$ Hz, 3H) ppm。

[0676] 实施例3C:LP7

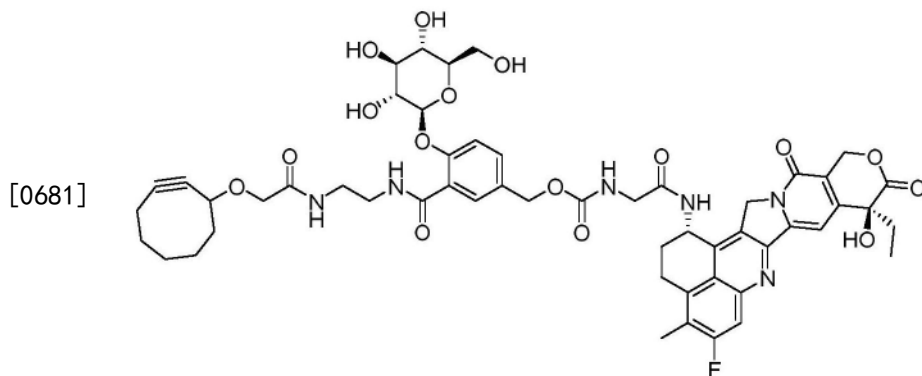
[0677] 实施例3C-1: [(2R, 3R, 4S, 5R, 6S) -3, 4, 5-三(乙酰氧基)-6-[2-({2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙基}氨基甲酰基)-4-({[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5, 9-二氧化-8-氧杂-4, 15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2, 14}.0^{4, 13}.0^{6, 11}.0^{20, 24}]二十四碳-1, 6(11), 12, 14, 16, 18, 20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲基)氨基甲酰基]氧基}甲基)苯氧基]噁烷-2-基]乙酸甲酯 (6-2c) 的合成

[0678]



[0679] 向化合物6-1b (31mg, 36 μ mol) 在DMF (1.0mL) 中的溶液中添加P2 (17mg, 36 μ mol)、HOBt (5.0mg, 36 μ mol) 和DIPEA (9.2mg, 71 μ mol), 并且将反应混合物在室温搅拌2小时, 这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 纯化, 以给出作为黄色固体的化合物6-2c (43mg, 88%收率)。ESI m/z : 1223.5 ($M+H$)⁺, 1245.5 ($M+Na$)⁺。

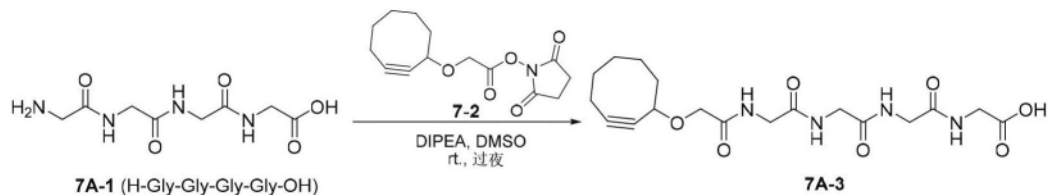
[0680] 实施例3C-2: [3-({2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙基}氨基甲酰基)-4-[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -3, 4, 5-三羟基-6-(羟基甲基)噁烷-2-基]氧基}苯基]甲基N-({[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5, 9-二氧化-8-氧杂-4, 15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2, 14}.0^{4, 13}.0^{6, 11}.0^{20, 24}]二十四碳-1, 6(11), 12, 14, 16, 18, 20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲基)氨基甲酸酯 (LP7) 的合成



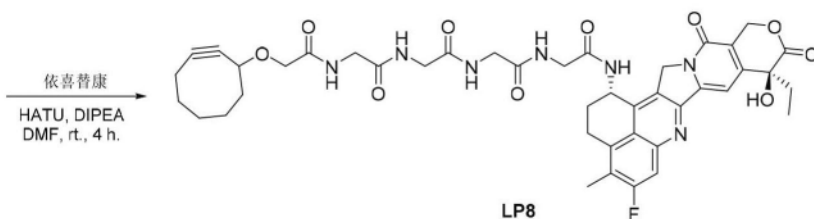
[0682] 向化合物6-2c (43mg, 35 μ mol) 在甲醇 (2mL) 中的混合物中添加氢氧化锂水溶液 (0.16mM, 2mL), 并且将反应混合物在15 $^{\circ}$ C搅拌2小时, 这通过LCMS监测。将所得混合物通过盐酸水溶液 (1N) 酸化至pH 3-4, 并且然后通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.1%) 中的5% - 95% 乙腈) 纯化, 以给出作为白色固体的LP7 (9.8mg, 57% 收率)。ESI m/z : 1055.5 (M+H) $^{+}$ 。

[0683] 实施例7: 肽接头-有效载荷LP8的合成 (方案7A和7B)

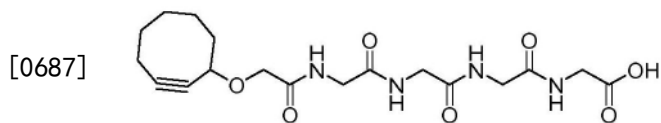
[0684] 方案7A. 肽接头-有效载荷的合成A



[0685]



[0686] 实施例7A: 2-[2-(2-{2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙酰胺基}乙酰胺基)乙酰胺基]乙酸 (7A-3) 的合成

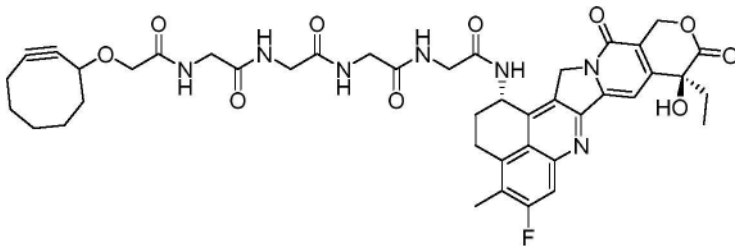


[0688] 向化合物7-2 (0.10g, 0.37mmol) 在DMSO (2mL) 中的溶液中添加肽7A-1 (H-Gly-Gly-Gly-Gly-OH, 90mg, 0.37mmol) 和DIPEA (94mg, 0.73mmol), 并且将反应混合物在室温搅拌过夜。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的5% - 95% 乙腈) 直接纯化, 以给出作为白色固体的化合物7A-3 (40mg, 15% 收率)。ESI m/z : 411.2 (M+H) $^{+}$ 。 ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6) δ 8.23-8.07 (m, 3H), 7.83 (t, J =5.7Hz, 1H), 4.33 (d, J =6.4Hz, 1H), 3.93 (d, J =14.9Hz, 1H), 3.77 (m, 9H), 2.25-2.04 (m, 3H), 1.98-1.84 (m, 2H), 1.82-1.71 (m, 2H), 1.59 (s, 2H), 1.40 (m, 1H) ppm。(未观察到TFA的质子)。

[0689] 实施例7B: 2-(2-{2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙酰胺基}乙酰胺基)-N-({[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5, 9-二氧化-8-氧杂-4, 15-二氮杂己环[14.7.1.0 ^{2} , 14.0 ^{4} , 13.0 ^{6} , 11.0 $^{20, 24}$]二十四碳-1, 6(11), 12, 14, 16, 18, 20(24)-庚烯-23-

基]氨基甲酰基}甲基)乙酰胺(LP8)的合成

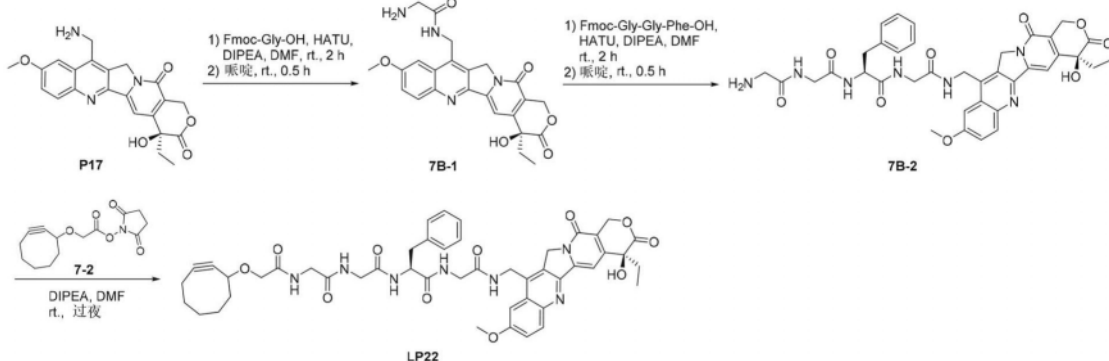
[0690]



[0691] 向化合物7A-3 (9.0mg, 29 μ mol) 在无水DMF (3mL) 中的溶液中添加HATU (17mg, 44 μ mol) 和DIPEA (12mg, 88 μ mol), 并且将混合物在室温搅拌10分钟, 然后添加依喜替康 (13mg, 29 μ mol)。将反应混合物在室温搅拌4小时, 直到依喜替康根据LCMS被完全消耗。所得混合物通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 直接纯化, 以给出作为白色固体的接头-有效载荷LP8 (11mg, 39% 收率, TFA盐)。ESI m/z : 828.5 (M+H)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.40 (d, J=8.5Hz, 1H), 8.18-8.09 (m, 3H), 7.84-7.77 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 5.62-5.52 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.23 (d, J=3.7Hz, 2H), 4.31 (t, J=5.6Hz, 1H), 3.92 (d, J=14.7Hz, 1H), 3.82-3.63 (m, 9H), 3.18-3.16 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.23-2.09 (m, 5H), 1.93-1.75 (m, 6H), 1.60-1.53 (m, 2H), 1.24 (s, 2H), 0.87 (t, J=7.3Hz, 3H) ppm。

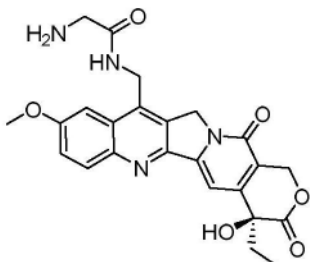
[0692] 方案7B. 肽接头-有效载荷的合成B

[0693]



[0694] 实施例7C: 2-氨基-N- {[(19S)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-14,18-二氧代-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1 (21), 2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]甲基}乙酰胺 (7B-1) 的合成

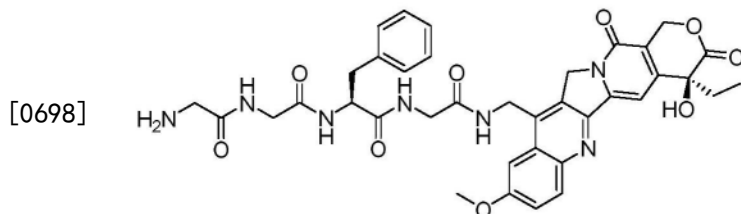
[0695]



[0696] 向Fmoc-Gly-OH (37mg, 0.13mmol) 在DMF (5.0mL) 中的溶液中添加DIPEA (0.04mL, 0.25mmol)、HATU (56mg, 0.15mmol), 并且将反应混合物在室温搅拌15分钟, 然后添加有效载荷P17 (50mg, 0.12mmol)。然后将混合物在室温搅拌过夜, 直到P17被完全消耗, 这通过LCMS监测。然后向混合物中添加哌啶 (0.3mL), 并且将所得混合物在室温搅拌半小时, 直到根据LCMS完全去除Fmoc。混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 直

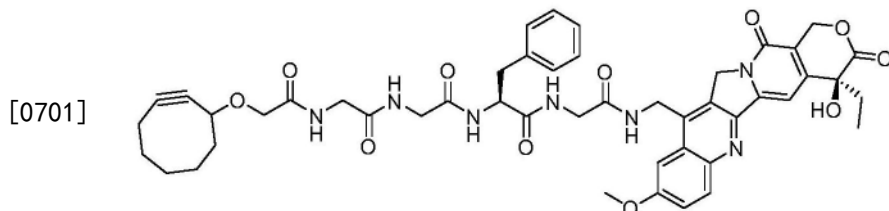
接纯化,以给出作为黄色固体的7B-1 (35mg, 61 %收率, TFA盐)。ESI m/z : 465.2 (M+H)⁺。

[0697] 实施例7D: (2S)-2-[2-(2-氨基乙酰胺基)乙酰胺基]-N-[(19S)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-14,18-二氧化-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]甲基}氨基甲酰基)甲基]-3-苯基丙酰胺(7B-2)的合成



[0699] 向肽Fmoc-Gly-Gly-Phe-OH (32mg, 65 μ mol) 在DMF (6mL) 中的溶液中添加DIPEA (0.02mL, 0.13mmol) 和HATU (29mg, 77 μ mol), 并且将反应混合物在室温搅拌15分钟, 然后添加化合物7B-1 (30mg, 65 μ mol)。将混合物在室温搅拌过夜, 这通过LCMS监测。然后向反应混合物中添加哌啶 (0.3mL), 并且将反应混合物在室温搅拌半小时, 直到根据LCMS完全去除Fmoc。反应混合物通过反相快速色谱(在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 直接纯化, 以给出作为黄色固体的粗制7B-2 (35mg, TFA盐, 粗制(在LCMS中68%纯度)), 其被用于下一步骤而无进一步纯化。ESI m/z : 363.8 (M/2+H)⁺。

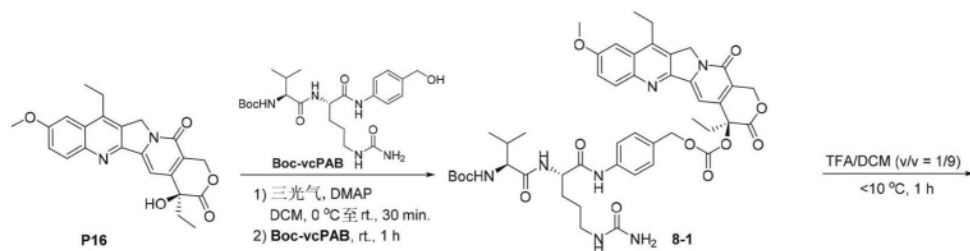
[0700] 实施例7E: (2S)-2-(2-{2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙酰胺基}乙酰胺基)-N-[(19S)-19-乙基-19-羟基-7-甲氧基-14,18-二氧化-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]甲基}氨基甲酰基)甲基]-3-苯基丙酰胺(LP22)的合成



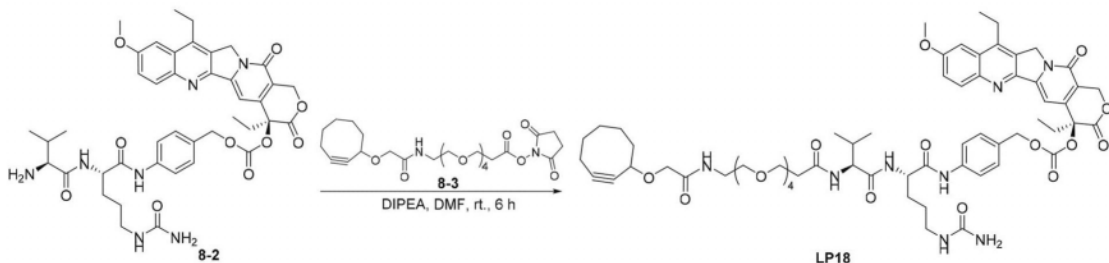
[0702] 向以上获得的化合物7B-2 (粗制, 35mg) 在DMF (3mL) 中的溶液中添加DIPEA (0.03mL, 0.20mmol) 和化合物7-2 (14mg, 49 μ mol), 并且将反应混合物在室温搅拌1.5小时, 这通过LCMS监测。然后所得混合物通过制备型HPLC(在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 直接纯化, 以给出作为灰白色固体的接头-有效载荷LP22 (2.0mg, 5%收率)。ESI m/z : 890.3 (M+H)⁺。

[0703] 实施例8. vcPAB-碳酸酯接头-有效载荷LP18的合成(方案8)

[0704] 方案8. 从有效载荷的E环合成vcPAB-碳酸酯接头

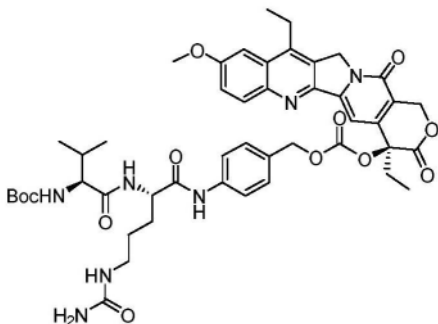


[0705]



[0706] 实施例8A: {4-[(2S) -2-[(2S) -2-[(叔-丁氧基)羰基]氨基]-3-甲基丁酰氨基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基 (19S) -10,19-二乙基-7-甲氧基-14,18-二氧代-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1 (21),2,4,6,8,10,15 (20) -庚烯-19-基碳酸酯 (8-1) 的合成

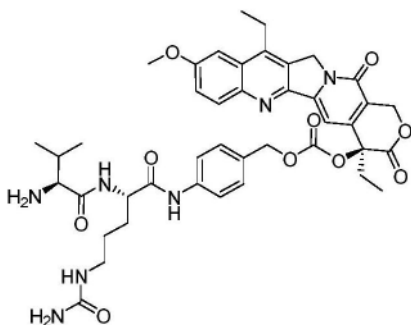
[0707]



[0708] 将化合物P16 (0.12g, 0.30mmol) 和DMAP (0.11g, 0.90mmol) 在无水DCM (18mL) 中的悬浮液在冰水中冷却。在10分钟内向悬浮液中逐滴添加三光气 (45mg, 0.15mmol) 在无水DCM (2mL) 中的溶液。添加后, 黄色悬浮液变澄清。将反应溶液在室温搅拌20分钟后直到形成氯甲酸酯中间体, 这通过TLC监测 (将反应溶液的等分试样用无水甲醇猝灭, 并且然后通过用 MeOH/DCM, v/v=1/15 进行 TLC eluting 与起始P16 比较迁移率。氯甲酸酯中间体的碳酸甲酯具有 R_f 0.75, P16 具有 R_f 0.5)。然后向反应混合物中添加 Boc-vcPAB (0.14g, 0.30mmol), 并且将混合物在室温搅拌20分钟, 这通过LCMS监测。将所得溶液在真空中低于30°C 浓缩, 并且剩余物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-65% 乙腈) 纯化, 以给出作为白色固体的化合物8-1 (0.15g, 56% 收率)。ESI m/z : 812 (M-Boc+H)⁺, 406.7 (片段, M_{P16} +H)⁺。

[0709] 实施例8B: {4-[(2S) -2-[(2S) -2-氨基-3-甲基丁酰胺基]-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基 (19S) -10,19-二乙基-7-甲氧基-14,18-二氧代-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1 (21),2,4,6,8,10,15 (20) -庚烯-19-基碳酸酯 (8-2) 的合成

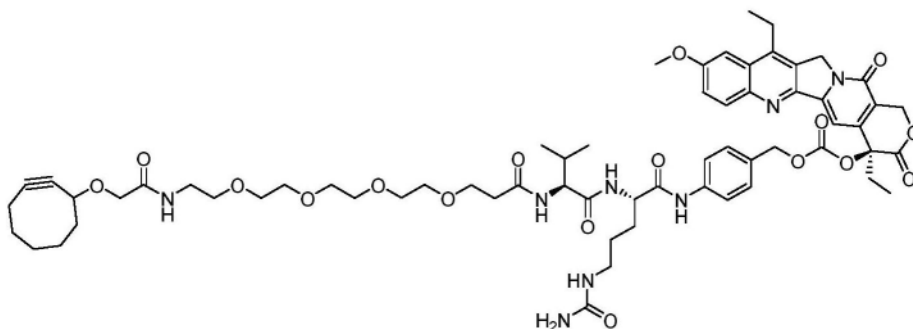
[0710]



[0711] 向冷却的 ($<10^{\circ}\text{C}$) 的 8-1 (90mg, $98\mu\text{mol}$) 在 DCM (9mL) 中的混合物中添加 TFA (1mL), 并且将所得澄清的黄色溶液在低于 10°C 的温度搅拌 1 小时, 直到根据 LCMS 去除 Boc。然后将反应溶液用饱和碳酸氢钠水溶液至 pH 6.0 进行猝灭, 然后在真空中去除挥发物。剩余物水溶液混合物通过反相快速色谱 (在 TFA 水溶液 (0.01%) 中的 0-70% 乙腈) 纯化, 以给出作为黄色固体的化合物 8-2 (58mg, 73% 收率)。ESI m/z : 812.3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

[0712] 实施例 8C: {4-[(2S)-5-(氨基甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰氨基}-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲基(19S)-10,19-二乙基-7-甲氧基-14,18-二氧化-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0^{2,11}.0^{4,9}.0^{15,20}]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-19-基碳酸酯(LP18)的合成

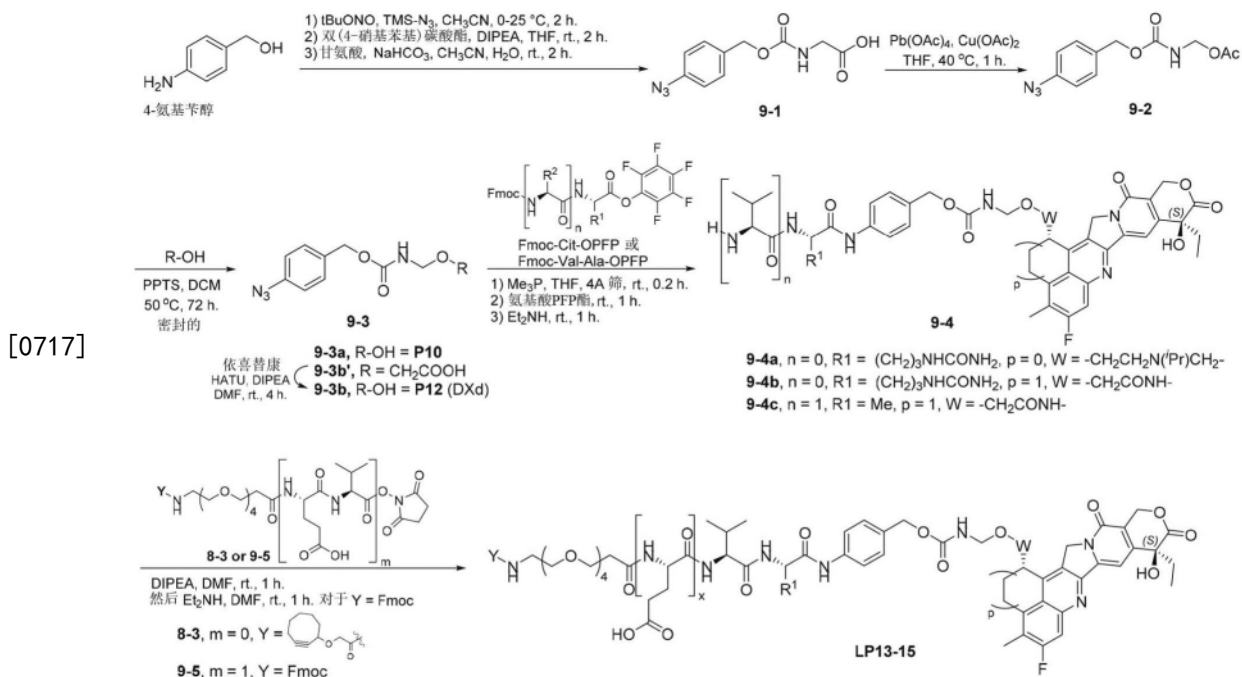
[0713]



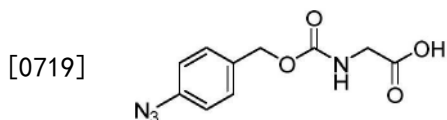
[0714] 向化合物 8-2 (20mg, $25\mu\text{mol}$) 在无水 DMF (2mL) 中的黄色溶液中添加 DIPEA (9.5mL, $74\mu\text{mol}$) 和 8-3 (13mg, $25\mu\text{mol}$), 并且将反应溶液在室温搅拌 6 小时, 直到起始物质 8-2 几乎被消耗, 这通过 LCMS 监测。所得混合物通过反相快速色谱 (在 TFA 水溶液 (0.01%) 中的 0-70% 乙腈) 直接纯化, 以给出作为淡黄色固体的接头-有效载荷 LP18 (18mg, 60% 收率)。ESI m/z : 612.5 ($\text{M}/2+\text{H}$)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 10.03 (s, 1H), 8.14 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 8.11 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.89 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.60 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 3H), 7.56-7.51 (m, 2H), 7.30 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.97 (s, 1H), 6.00 (br s, 1H), 5.52 (s, 2H), 5.34 (d, $J=3.2\text{Hz}$, 2H), 5.09 (q, $J=12\text{Hz}$, 2H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.29-4.22 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.87 (d, $J=14.8\text{Hz}$, 1H), 3.75 (d, $J=14.8\text{Hz}$, 1H), 3.62-3.57 (m, 2H), 3.50-3.48 (m, 16H), 3.27-3.19 (m, 4H), 3.04-2.91 (m, 2H), 2.46-2.33 (m, 2H), 2.25-2.06 (m, 5H), 2.03-1.66 (m, 6H), 1.61-1.56 (m, 3H), 1.45-1.36 (m, 3H), 1.32 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H), 0.92-0.81 (m, 9H) ppm。(未观察到 TFA 的质子)。¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73ppm。

[0715] 实施例 9. 接头-有效载荷 LP13、LP14 和 LP15 的合成 (方案 9)

[0716] 方案 9. 接头-贝洛替康 LP13 和接头-DXd LP14 和 LP15 的合成

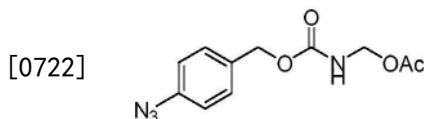


[0717] 实施例9A-1:2- ([(4-叠氮基苯基) 甲氧基] 羰基) 氨基) 乙酸 (9-1) 的合成



[0720] 在 0°C ,向4-氨基苯甲醇(10g,81mmol)和叠氮基(三甲基)硅烷(11g,97mmol,13mL)在乙腈(600mL)中的溶液中逐滴添加亚硝酸叔丁酯(13g,0.12mol,15mL)。将混合物在室温搅拌2小时,然后添加碳酸双(4-硝基苯基)酯(32g,0.11mol)和DIPEA(21g,0.16mol,28mL)在THF(300mL)中的溶液,并且将混合物在室温搅拌12小时,这通过TLC(在石油醚中的25%乙酸乙酯)监测。在真空中去除挥发物并且将剩余物溶解在乙腈(500mL)中。向溶液中逐滴添加甘氨酸(15g,0.20mol)和碳酸氢钠水溶液(0.8M,250mL,0.2mol),并且将混合物在室温搅拌16小时,这通过TLC(在石油醚中的25%乙酸乙酯)监测。所得混合物用乙酸乙酯(150mL $\times$ 6)洗涤。并且水性溶液用浓HCl酸化至pH 2-3,并且然后用乙酸乙酯(150mL $\times$ 3)提取。合并的有机溶液经无水硫酸钠干燥并且在真空中浓缩,以给出作为棕色固体的9-1(13g,61%收率),其被用于下一步骤而无进一步纯化。 ^1H NMR(400MHz, MeOD-d_4) δ 7.46-7.34(m, 2H), 7.12-6.97(m, 2H), 5.08(s, 2H), 3.83(s, 2H) ppm。

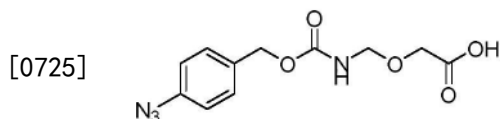
[0721] 实施例9A-2: ([(4-叠氮基苯基) 甲氧基] 羰基) 氨基) 乙酸甲酯 (9-2)



[0723] 向化合物9-1(13g,51mmol)在THF(150mL)中的溶液中添加乙酸铅(45g,0.10mol)和二乙酸铜(0.93g,5.1mmol),并且将反应混合物在 40°C 搅拌1小时,这通过TLC(在石油醚中的25%乙酸乙酯)监测。将反应用水(200mL)猝灭并且用乙酸乙酯(200mL $\times$ 2)提取。合并的有机溶液用盐水(150mL $\times$ 2)洗涤,经无水硫酸钠干燥,并且在真空中浓缩。剩余物通过硅胶快速色谱(在石油醚中的0-25%乙酸乙酯)纯化,以给出作为黄色油状物的化合物9-2(7.8g,55%收率)。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.36(br d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 7.03(d, $J=8.4\text{Hz}$,

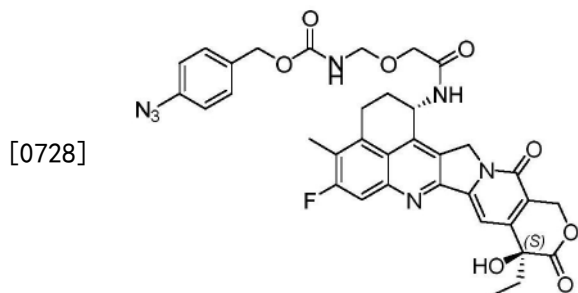
2H), 5.93 (br s, 1H), 5.21 (br d, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 5.11 (s, 2H), 2.07 (s, 3H) ppm。

[0724] 实施例9A-3:2-[(4-叠氮基苯基)甲氧基]羰基}氨基)甲氧基]乙酸(9-3b')的合成



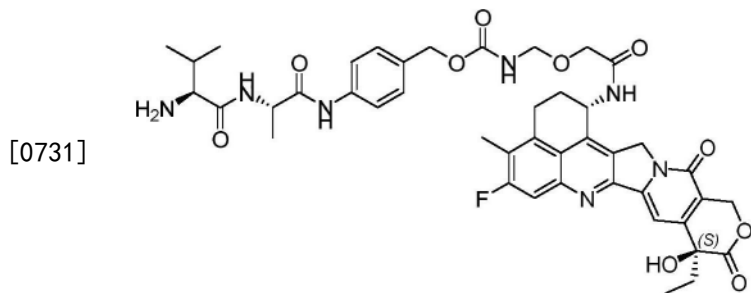
[0726] 向9-2(0.20g, 0.76mmol)在DCM(3mL)中的溶液中添加PPTS(38mg, 0.15mmol)和羟基乙酸(0.17g, 2.3mmol),并且将反应混合物在密封管中在50℃搅拌16小时,这通过LCMS监测。将所得混合物冷却并且在真空中去除挥发物。剩余物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的0-100%乙腈)纯化,以给出作为黄色固体的化合物9-3b'(0.10g, 47%收率)。ESI m/z : 303 ($M+Na$)⁺。

[0727] 实施例9A-4: (4-叠氮基苯基)甲基N-[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲氧基)甲基]氨基甲酸酯(9-3b)的合成



[0729] 向化合物9-3b'(50mg, 0.13mmol)和DIPEA(49mg, 0.38mmol)在无水DMF(1.5mL)中的黄色溶液中添加HATU(59mg, 0.15mmol),并且将混合物在室温搅拌半小时,然后添加依喜替康(60mg, 0.11mmol)。将反应混合物在室温搅拌2小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)直接分离,以给出作为淡黄色固体的化合物9-3b(58mg, 65%收率)。ESI m/z : 698 ($M+H$)⁺。

[0730] 实施例9A-5: {4-[(2S)-2-[(2S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基]丙酰胺基]苯基}甲基N-[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲氧基)甲基]氨基甲酸酯(9-4c)的合成



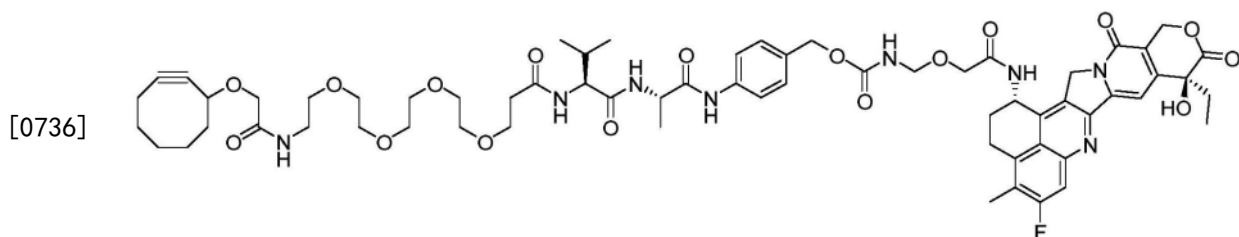
[0732] 向装有搅拌棒和THF(3mL)的25mL小瓶中添加9-3b(42mg, 52μmol)、4A分子筛(0.50g)和然后三甲基膦(0.16mL, 0.16mmol)。将反应混合物搅拌5分钟,然后添加Fmoc-

Val-Ala-OPFP (33mg, 57 μ mol)。将反应混合物在氮气保护下在室温搅拌半小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)直接分离,以给出作为浅黄色固体的Fmoc-9-4c (53mg, TFA盐),将其溶解在无水DMF(1mL)中。向溶液中添加二乙胺(0.1mL)。将反应混合物在室温搅拌1小时,直到根据LCMS完全去除Fmoc。所得溶液通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)直接分离,以给出作为浅黄色固体的化合物9-4c (28mg, 57%收率, TFA盐)。ESI m/z : 422 ($M/2+H$)⁺。

[0733] 对于Fmoc-9-4c的NMR: ¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 10.03 (s, 1H), 8.48-8.29 (m, 1H), 8.26-8.11 (m, 1H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.79-7.72 (m, 3H), 7.70-7.52 (m, 2H), 7.44-7.41 (m, 3H), 7.34-7.25 (m, 3H), 7.20-7.17 (m, 2H), 6.54 (d, J=9.0Hz, 1H), 5.59 (s, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.21 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.54 (d, J=6.5Hz, 2H), 4.41-4.32 (m, 1H), 4.35-4.17 (m, 3H), 4.00 (s, 1H), 3.98-3.83 (m, 1H), 3.15 (s, 2H), 2.38 (s, 3H), 2.18-2.11 (m, 3H), 2.09-1.95 (m, 2H), 1.93-1.71 (m, 2H), 1.30-1.14 (m, 6H), 0.89-0.77 (m, 9H) ppm。 ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.45, -111.33 ppm。

[0734] 对于9-4c的NMR: ¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 10.20 (br, 1H), 8.84-8.67 (m, 1H), 8.46 (br s, 1H), 8.21 (br s, 2H), 8.06 (s, 2H), 7.80 (d, J=10.5Hz, 1H), 7.65-7.50 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 7.23 (t, J=8.2Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.22 (s, 1H), 4.88 (d, J=5.8Hz, 2H), 4.60-4.45 (m, 3H), 4.00 (s, 1H), 3.61 (br s, 1H), 3.17 (br s, 1H), 2.93-2.90 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.33-2.06 (m, 2H), 1.93-1.76 (m, 2H), 1.34 (t, J=7.4Hz, 3H), 1.16 (t, J=7.3Hz, 3H), 0.97-0.93 (m, 6H), 0.85 (t, J=7.4Hz, 3H) ppm。 ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO_{d6}) δ -73.44, -111.33 ppm。

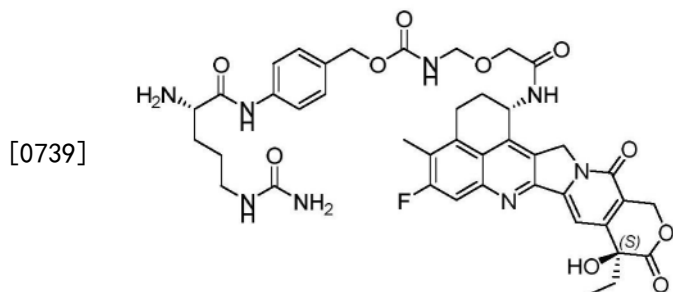
[0735] 实施例9A-6: {4-[(2S)-2-[(2S)-2-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基}-3-甲基丁酰胺基]丙酰胺基]苯基}甲基N-[(10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲氧基)甲基]氨基甲酸酯(LP15)的合成



[0737] 向化合物8-3 (14mg, 27 μ mol) 在无水DMF (1.5mL) 中的黄色溶液中添加DIPEA (14mg, 0.11mmol) 和化合物9-4c (23mg, 24 μ mol), 并且将反应混合物在室温搅拌1小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在甲酸水溶液(0.1%)中的5%-95%乙腈)直接分离,以给出作为白色固体的接头-有效载荷LP15 (9.0mg, 26%收率)。ESI m/z : 1253 ($M+H$)⁺。 ¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 9.96 (s, 1H), 8.45 (m, 1H), 8.21 (m, 1H), 7.89 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.79 (d, J=10.9Hz, 1H), 7.66-7.52 (m, 3H), 7.30 (s, 1H), 7.25-7.19 (m, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.54 (d, J=6.7Hz, 2H), 4.45-4.30 (m, 1H), 4.29-4.08 (m, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.87 (d, J=14.8Hz, 1H), 3.75 (d, J=14.7Hz, 1H), 3.58 (d, J=6.2Hz, 2H), 3.51-3.45 (m, 12H), 3.44-3.40 (m, 2H), 3.29-3.21 (m, 2H), 3.16 (br s, 2H),

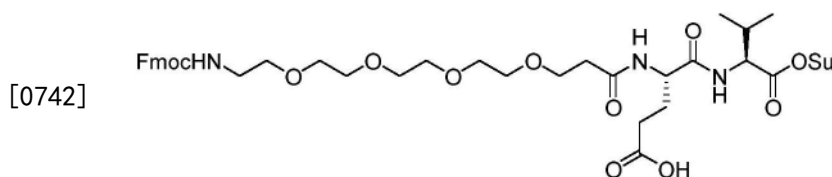
2.45-2.36 (m, 5H), 2.24-2.02 (m, 5H), 2.02-1.70 (m, 7H), 1.61-1.52 (m, 2H), 1.44-1.22 (m, 5H), 0.92-0.77 (m, 9H) ppm. ^{19}F NMR (376MHz, DMSO-d_6) δ -111.33ppm。

[0738] 实施例9B-1: {4-[(2S)-2-氨基-5-(氨基甲酰基氨基)戊酰胺基]苯基}甲基N-[(((10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基)氨基甲酰基}甲氧基]甲基]氨基甲酸酯(9-4b)的合成



[0740] 遵循与9-4c相似程序(除了使用Fmoc-Cit-OPFP替代Fmoc-Val-Ala-OPFP之外),获得作为浅黄色固体的化合物9-4b(41mg, 50%收率)。ESI m/z : 829 (M+H)。

[0741] 实施例9B-2: (4S)-4-[((2S)-1-[(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)氧基]-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酰基]-4-[1-[((9H-茚-9-基)甲氧基]羰基]氨基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基]丁酸(9-5)的合成



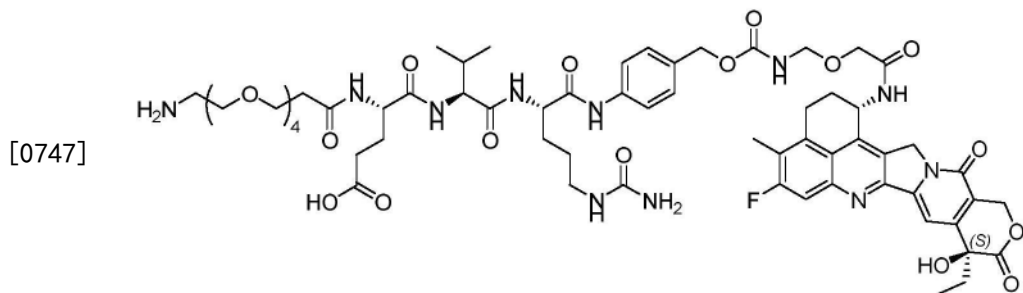
[0743] 向H-Glu(O^tBu)-Val-OH(29g, 56mmol)在DMF(200mL)中的溶液添加Fmoc-PEG₄-OSu(31g, 53mmol)在DCM(200mL)中的溶液和DIPEA(7.2g, 56mmol, 9.7mL),并且将反应混合物在室温搅拌2小时,这通过LCMS监测。然后在真空中去除挥发物。剩余物用水(100mL)稀释,用MTBE(80mL $\times$ 3)洗涤并且用柠檬酸酸化至pH 5。混合物用乙酸乙酯(120mL $\times$ 2)提取,并且合并的有机溶液用盐水(60mL $\times$ 2)洗涤,经无水硫酸钠干燥,并且在真空中浓缩,以给出作为黄色油状物的Fmoc-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-OH(33g)。ESI m/z : 772 (M+H)⁺。

[0744] 向HOSu(7.9g, 68mmol)在DMF(150mL)和DCM(150mL)中的溶液中添加DIC(6.5g, 51mmol)和以上获得的Fmoc-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-OH(33g)。将反应混合物在室温搅拌12小时,这通过TLC和LCMS监测。将反应混合物过滤,并且滤液在真空中浓缩。剩余物用水(200mL)稀释并且用乙酸乙酯(150mL $\times$ 3)提取。合并的有机溶液用盐水(150mL $\times$ 3)洗涤,经无水硫酸钠干燥并且在真空中浓缩,以给出作为黄色油状物的Fmoc-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-OSu(14g)。ESI m/z 870 (M+H)⁺。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.76(d, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 7.64-7.58(m, 2H), 7.42-7.37(m, 2H), 7.34-7.28(m, 2H), 4.86-4.76(m, 1H), 4.56-4.34(m, 3H), 4.28-4.18(m, 1H), 3.76-3.73(m, 3H), 3.66-3.56(m, 13H), 3.39(br d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 2.81(br s, 6H), 2.50-2.46(m, 2H), 2.40-2.32(m, 2H), 2.14-2.04(m, 1H), 1.97-1.81(m, 4H), 1.44(s, 9H), 1.05(s, 3H), 1.04(s, 3H) ppm。

[0745] 向Fmoc-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-OSu(0.14g, 0.16mmol, 以上获得的)在DCM(0.5mL)中

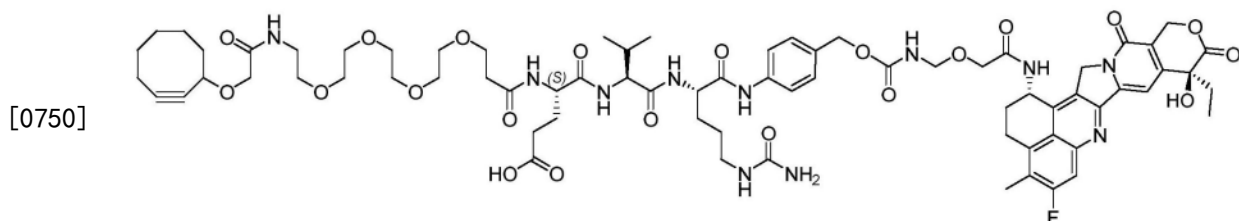
的溶液中添加TFA(0.72g, 0.47mL, 6.3mmol), 并且将反应混合物在室温搅拌1小时, 这通过LCMS监测。在真空中去除挥发物, 并且将剩余物在MTBE (10mL×2) 中研磨。通过离心机收集灰白色沉淀物, 以给出作为灰白色固体的化合物9-5 (Fmoc-PEG4-Glu-Ala-OSu) (0.13g, 从H-Glu(O^tBu)-Val-OH的22%收率)。ESI m/z: 813 (M+H)⁺。

[0746] 实施例9B-3: (4S)-4-[(1-氨基-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基)-4-{[(1S)-1-[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-({4-[([{ [(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲氧基)甲基]氨基甲酰基}氧基)甲基]苯基]氨基甲酰基)丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}丁酸(9-6b)的合成



[0748] 遵循与LP15相似程序(除了使用化合物9-5替代中间体8-3和9-4b替代9-4c之外), 获得作为浅黄色固体的Fmoc-9-6b(26mg), 将其溶解在DMF(2mL)中。向溶液中添加二乙胺(0.2mL), 并且将反应混合物在室温搅拌1小时, 直到根据LCMS完全去除Fmoc。混合物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)直接分离, 以给出作为白色固体的9-6b(13mg, 20%收率)。ESI m/z: 653 (M+H)⁺。

[0749] 实施例9B-4: (4S)-4-{[(1S)-1-[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-({4-[([{ [(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}甲氧基)甲基]氨基甲酰基}氧基)甲基]苯基]氨基甲酰基)丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-4-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基}丁酸(LP14)的合成

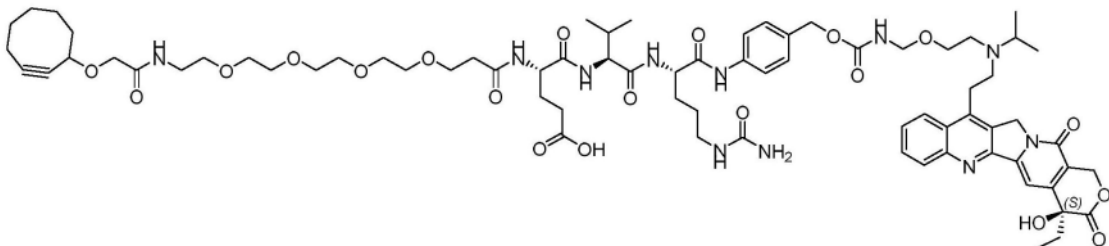


[0751] 向化合物7-2(3.3mg, 34μmol)在无水DMF(1mL)中的黄色溶液中添加DIPEA(2.6mg, 20μmol)和化合物9-6b(13mg, 10μmol), 并且将反应混合物在室温搅拌1小时, 这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在甲酸水溶液(0.1%)中的5%-95%乙腈)直接分离, 以给出作为白色固体的接头-有效载荷LP14(4.5mg, 31%收率)。ESI m/z: 735 (M/2+H)⁺。

[0752] 实施例9C-1: (4S)-4-{[(1S)-1-[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-[(4-[([{ [2-[(19S)-19-乙基-19-羟基-14,18-二氧化-17-氧杂-3,13-二氮杂戊环[11.8.0.0²,¹¹.0⁴,⁹.0¹⁵,²⁰]二十一碳-1(21),2,4,6,8,10,15(20)-庚烯-10-基]乙基} (丙-2-基)氨基)乙

氧基]甲基}氨基甲酰基)氧基]甲基}苯基)氨基甲酰基]丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-4-{1-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]-3,6,9,12-四氧杂十五烷-15-酰胺基}丁酸(LP13)的合成

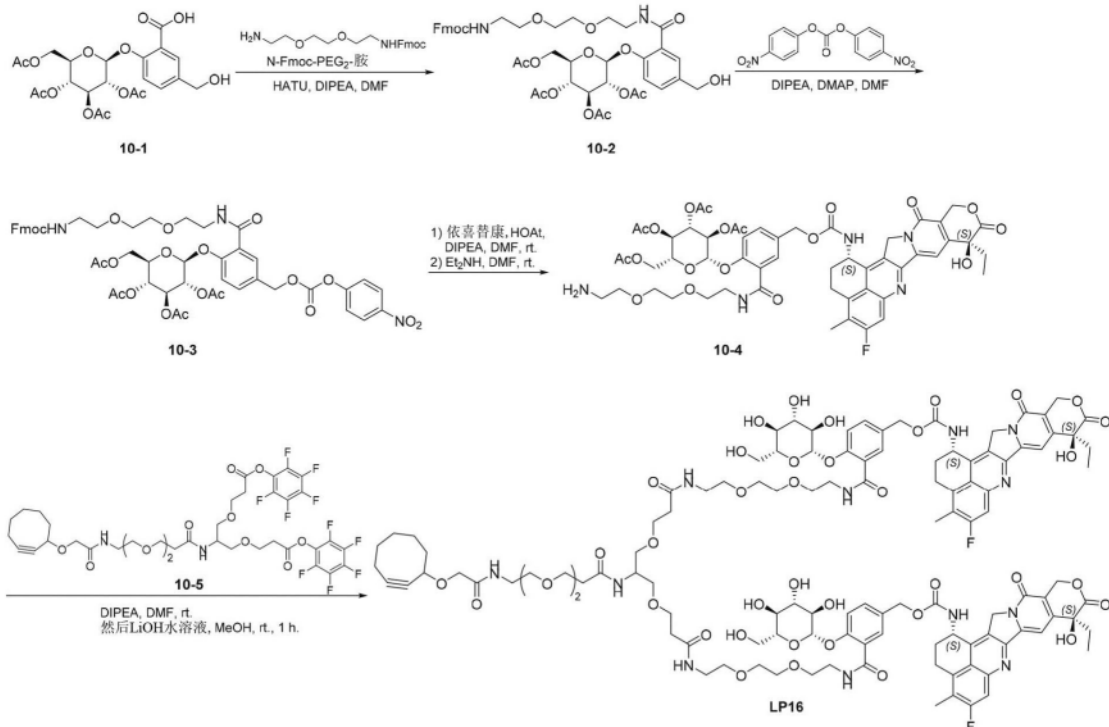
[0753]



[0754] 遵循与LP14相似程序(除了使用P10替代羟基乙酸),获得作为灰白色固体的接头-有效载荷LP13(8mg,4步从P10的1%收率)。ESI m/z :727.3(M/2+H)⁺。

[0755] 实施例10.支化糖-PAB接头-有效载荷的合成(方案10)

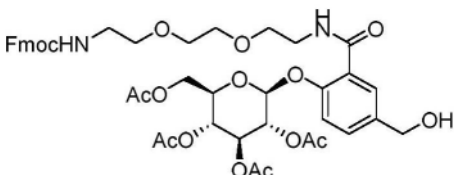
[0756] 方案10.支化糖-PAB接头-有效载荷LP16的合成



[0757]

[0758] 实施例10A: [(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-{2-[(2-{2-[2-({[(9H-芴-9-基)甲氧基]羰基}氨基)乙氧基]乙氧基}乙基)氨基甲酰基]-4-(羟基甲基)苯氧基}噁烷-2-基]乙酸甲酯(10-2)的合成

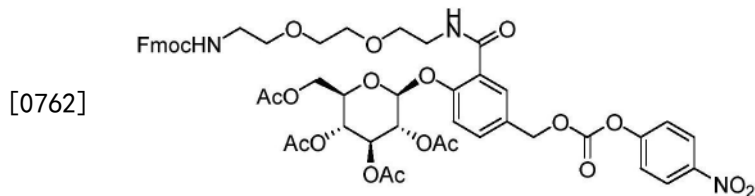
[0759]



[0760] 向化合物10-1(0.10g,0.2mmol)在DMF(5mL)中的溶液中添加N-Fmoc-PEG₂-胺(74mg,0.2mmol)和DIPEA(52mg,0.4mmol),并且将反应混合物在室温搅拌10分钟,然后向反应中添加HATU。将混合物在室温搅拌4小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC

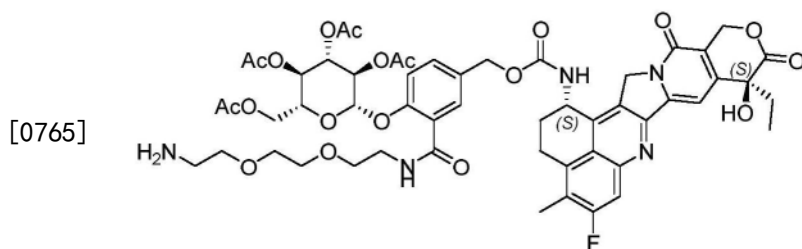
(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)纯化,以给出作为白色固体的化合物10-2(0.14g,81%收率)。ESI m/z :851.3(M+H)⁺。

[0761] 实施例10B:[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-{2-[2-{2-[(9H-芴-9-基)甲氧基]羰基}氨基]乙氧基}乙氧基]乙基)氨基甲酰基]-4-[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基]甲基]苯氧基]噁烷-2-基]乙酸甲酯(10-3)的合成



[0763] 向10-2(0.14g,0.16mmol)和碳酸双(4-硝基苯基)酯(0.25g,0.82mmol)在DMF(5mL)中的溶液中添加DIPEA(0.11g,0.82mmol)和DMAP(20mg,0.16mmol),并且将反应混合物在室温搅拌4小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)分离,以给出作为白色固体的化合物10-3(0.13g,75%收率)。ESI m/z :1017.2(M+H)⁺。

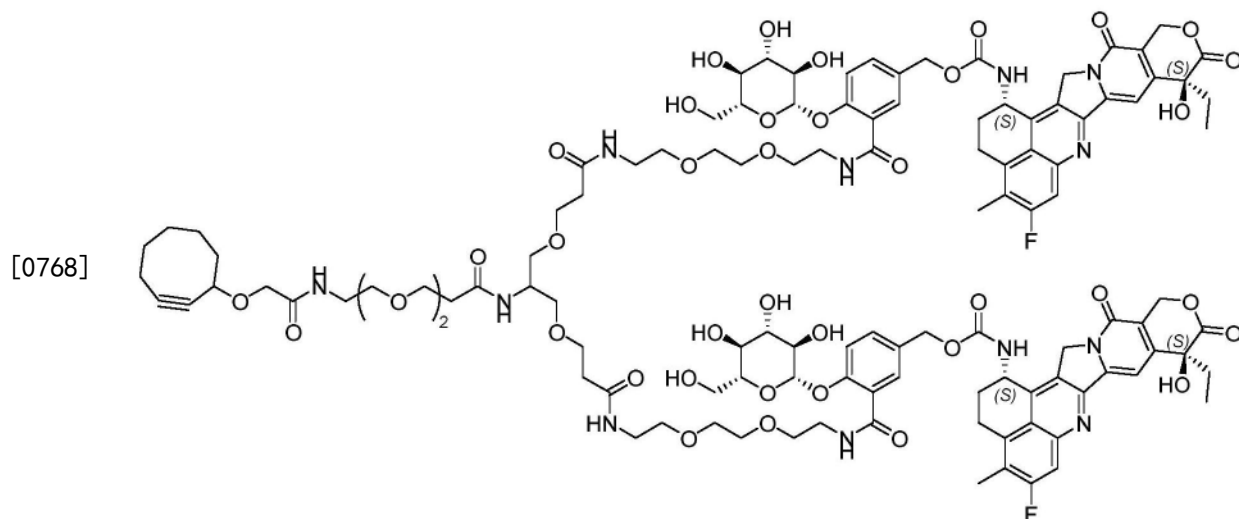
[0764] 实施例10C:[(2R,3R,4S,5R,6S)-3,4,5-三(乙酰氧基)-6-[2-({2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]乙基}氨基甲酰基)-4-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基]氧基]甲基]苯氧基]噁烷-2-基]乙酸甲酯(10-4)的合成



[0766] 向10-3(0.10g,98μmol)在DMF(5mL)中的溶液中添加依喜替康(43mg,98μmol)、HOAt(7mg,49μmol)和DIPEA(26mg,0.20mmol),并且将反应混合物在室温搅拌4小时,这通过LCMS监测。所得混合物通过制备型HPLC(在TFA水溶液(0.01%)中的5%-95%乙腈)纯化,以给出作为白色固体的化合物Fmoc-10-4(0.11g,86%收率,ESI m/z :1318.3(M+H)⁺),将其溶解在DMF(5mL)中。向溶液中添加DIPEA(13mg,0.17mmol),并且将反应混合物在室温搅拌1小时。所得混合物作为白色固体通过反相快速色谱分离(85mg,78%收率)。ESI m/z :1091.3(M+H)⁺。

[0767] 实施例10D:{3-[2-{2-[2-(3-{2-[3-(2-{2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙氧基}乙氧基)丙酰胺基]-3-{2-[2-{2-[(5-[(10S,23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基]氧基]甲基]-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)噁烷-2-基]氧基]苯基]甲酰胺基]乙氧基]乙氧基]乙基)氨基甲酰基]乙氧基]丙氧基]丙酰胺基]乙氧基]乙氧基]乙基)氨基甲酰基]-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)噁烷-2-基]氧基]苯基]甲基N-[(10S,

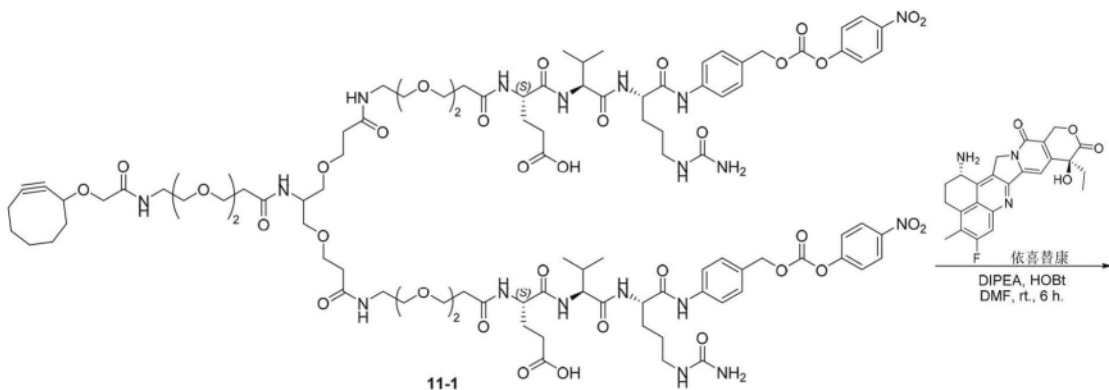
23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酸酯(LP16)的合成



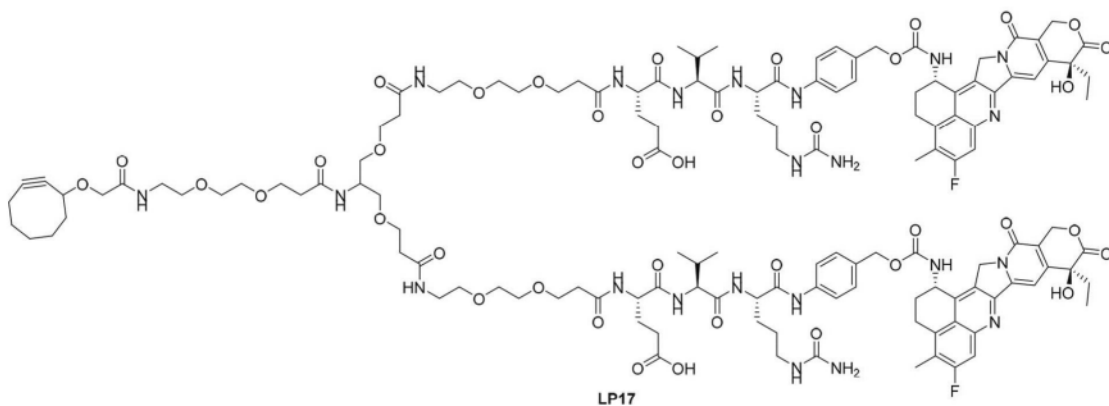
[0769] 向搅拌的10-4 (85mg, 78 μ mol) 和10-5 (35mg, 39 μ mol) 在DMF (5mL) 中的混合物中添加DIPEA (20mg, 0.16mmol), 并且将混合物在室温搅拌1小时, 这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 纯化, 以给出白色固体, 将其溶解在甲醇 (5mL) 中。向溶液中添加氢氧化锂水溶液 (36mM, 5mL)。将反应混合物在室温搅拌2小时, 这通过LCMS监测。所得混合物通过反相快速色谱 (在TFA水溶液 (0.01%) 中的5%-100%乙腈) 直接分离, 以给出作为白色固体的LP16 (30mg, 33%收率)。ESI m/z : 789.2 ($M/3+H$)⁺。

[0770] 实施例11. 支化vcPAB接头-有效载荷的合成 (方案11)

[0771] 方案11. 支化-vcPAB接头-有效载荷LP17的合成

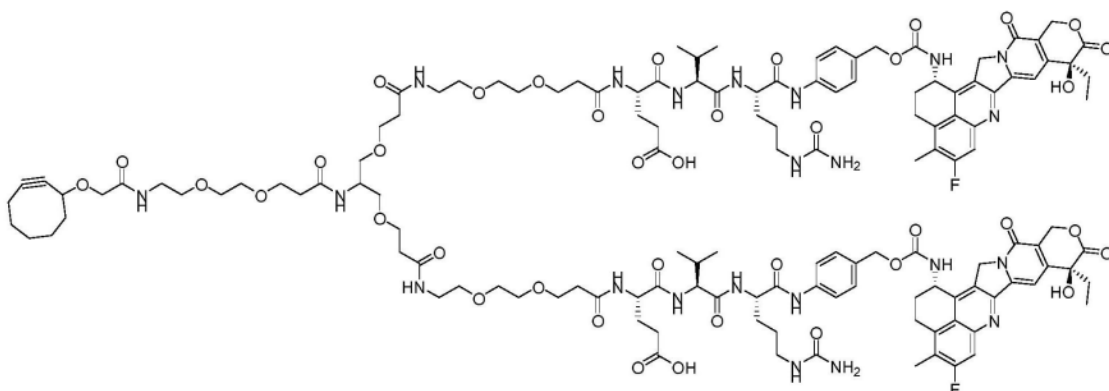


[0772]



[0773] 实施例11A: (4S)-4- {[(1S)-1- {[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-({4-[({ (10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}氧基)甲基]苯基}氨基甲酰基)丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-4- (3-{2-[2-(3-{3-[2-({2-[2-(2- {[(1S)-1- {[(1S)-1- {[(1S)-4-(氨基甲酰基氨基)-1-({4-[({ (10S, 23S)-10-乙基-18-氟-10-羟基-19-甲基-5,9-二氧化-8-氧杂-4,15-二氮杂己环[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]二十四碳-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-庚烯-23-基]氨基甲酰基}氧基)甲基]苯基}氨基甲酰基)丁基]氨基甲酰基)-2-甲基丙基]氨基甲酰基}-3-羧基丙基]氨基甲酰基}乙氧基)乙氧基)乙基}氨基甲酰基)乙氧基)-2-[3-(2-{2-[2-(环辛-2-炔-1-基氧基)乙酰胺基]乙氧基}乙氧基)丙酰胺基]丙氧基)丙酰胺基)乙氧基]乙氧基)丙酰胺基)丁酸 (LP17) 的合成

[0774]



[0775] 向11-1 (50mg, 23μmol) 在DMF (1.5mL) 中的黄色溶液中添加依喜替康 (12mg, 23μ

mol)、HOBt (3.1mg, 23 μ mol) 和DIPEA (8.9mg, 69 μ mol), 并且将反应混合物在室温搅拌6小时。所得混合物通过制备型HPLC (在TFA水溶液 (0.01%) 中的0-100%乙腈) 纯化, 以给出作为白色固体的LP17 (14mg, 22% 收率)。ESI m/z : 928 ($M/3+H$)⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO_{d6}) δ 10.06 (s, 2H), 8.28 (br s, 2H), 8.14 (d, J=7.2Hz, 2H), 8.06 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.95 (t, J=5.2Hz, 2H), 7.84-7.74 (m, 5H), 7.64-7.57 (m, 5H), 7.35 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.30 (s, 2H), 6.52 (s, 2H), 6.22-6.09 (m, 2H), 5.56-5.47 (m, 4H), 5.44 (s, 4H), 5.33-5.21 (m, 6H), 5.07 (s, 4H), 4.42-4.23 (m, 6H), 4.22-4.15 (m, 2H), 3.96-3.90 (m, 1H), 3.88-3.84 (m, 1H), 3.80-3.75 (m, 1H), 3.62-3.53 (m, 11H), 3.47 (br s, 14H), 3.41-3.38 (m, 6H), 3.26-3.15 (m, 10H), 3.13-3.07 (m, 2H), 3.03-2.91 (m, 4H), 2.40 (br s, 6H), 2.35-2.29 (m, 9H), 2.23-2.10 (m, 10H), 2.03-1.95 (m, 2H), 1.93-1.80 (m, 8H), 1.76-1.55 (m, 11H), 1.48-1.33 (m, 6H), 1.07-0.99 (m, 1H), 0.90-0.80 (m, 18H) ppm。

[0776] 实施例12. 用于制备位点特异性缀合物的一般程序

[0777] 该实施例显示了根据本公开内容的实施方案的通常是有效载荷与抗体或其抗原结合片段的位点特异性缀合的方法。该方法包括图1中示出的两步方法。第一步是微生物转谷氨酰胺酶 (MTG) 介导的胺接头叠氮化物诸如叠氮化物-PEG₃-胺 (AL, 氨基-PEG4-叠氮基) 与抗体的附接, 其中使用过量的胺试剂 (AL) 以避免抗体链的潜在交联。第二步将炔烃连接的有效载荷接头有效载荷 (LP) 与N₃-加标签的缀合物 (Ab-AL₄) 经由应变 (strain) 促进的叠氮化物-炔烃环加成 (SPAAC) 附接。向抗体中添加的LP分子的数目取决于缀合位点的数目和AL内叠氮化物官能团 (n=1) 的数目。对于分别具有酶促去糖基化或具有N297D Fc突变并且然后用AL接头叠氮化物官能化的WT Fc结构域的抗体, 预期的DAR=2乘以n乘以m, 其中n是AL上叠氮化物官能团的数目, 并且m是LP有效载荷的数目。对于具有N297Q Fc突变然后用AL接头叠氮基官能化的抗体, 预期的DAR=4。所有亲本抗体 (Ab), 含2个、4个或8个叠氮基基团 (Ab- (N₃)_n) 的叠氮基官能化抗体、作为具体实例生成的最终ADC和对应的接头-有效载荷 (LP), 以及其ADC的ES-MS结果和DAR值总结在表4和表5中。

[0778] 表4. 位点特异性ADC的列表

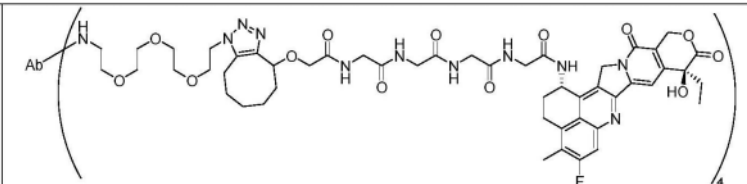
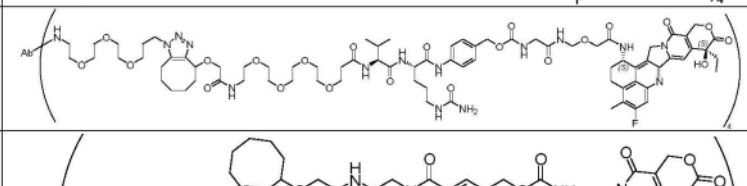
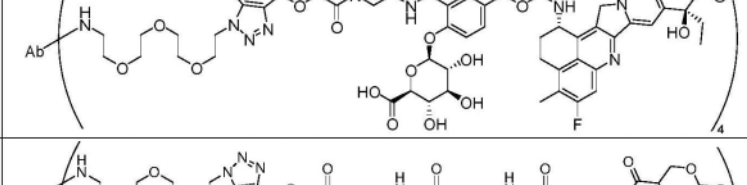
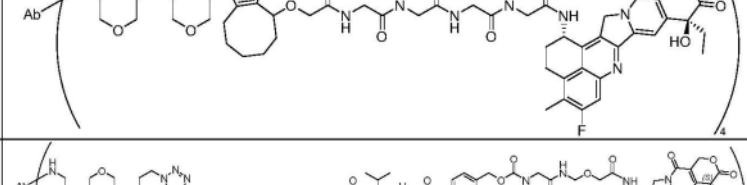
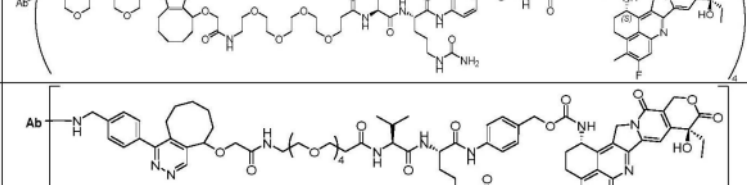
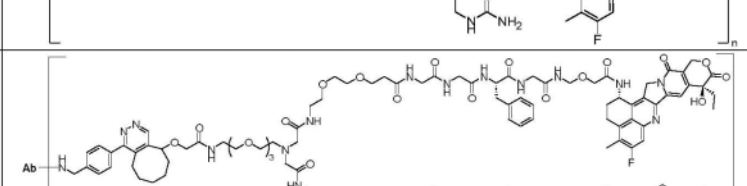
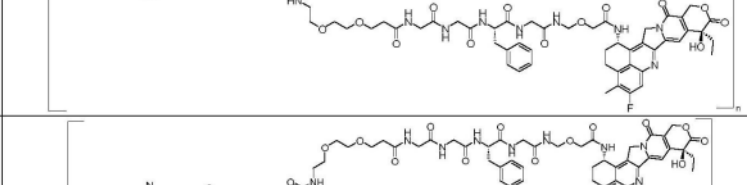
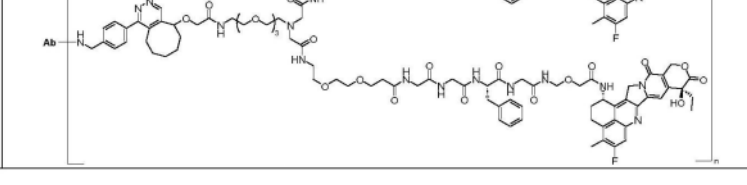
抗体描述	缀合位点	修饰		通过 ESI-MS 的 DAR
		AL、BL、LP #	MW (g/mol)	
抗 HER2 (去糖基化)		无	NA	NA
抗 HER2	Q295、Q297	[AL] ₄	218.3	4
抗 HER2	Q295、Q297	[AL-LP1] ₄	1469.7	4
抗 HER2	Q295、Q297	[AL-LP2] ₄	1593.8	4
抗 HER2	Q295、Q297	[AL-LP3] ₄	1230.3	4
抗 HER2	Q295、Q297	[AL-LP4] ₄	1216.3	4
抗 HER2	Q295、Q297	[AL-LP8] ₄	1046.2	4
抗 HER2	Q295、Q297	[AL-LP9] ₄	1614.8	4
同种型对照		无	NA	NA
同种型对照	Q295、Q297	[AL] ₄	218.3	4
同种型对照	Q295、Q297	[AL-LP3] ₄	1230.3	4
同种型对照	Q295、Q297	[AL-LP8] ₄	1046.2	4
同种型对照	Q295、Q297	[AL-LP9] ₄	1614.8	4

[0780] 表5. 位点特异性ADC的结构和DAR值

[0781]

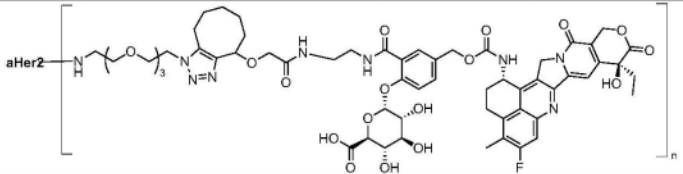
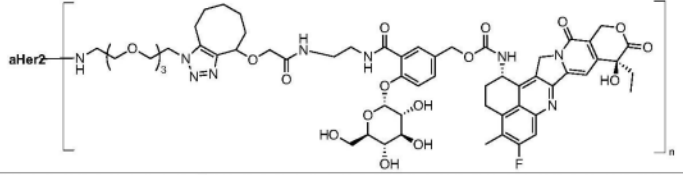
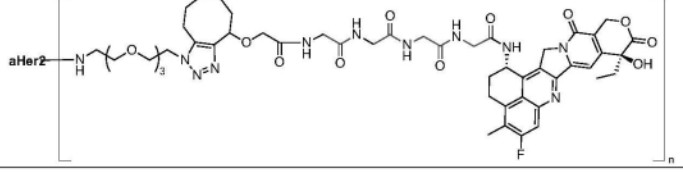
抗体	ADC	ADC 结构	DAR
抗 HER2	Ab[AL-LP1] ₄		3.58
抗 HER2	Ab[AL-LP2] ₄		4
抗 HER2	Ab[AL-LP3] ₄		4
抗 HER2	Ab[AL-LP4] ₄		4

[0782]

抗 HER2	Ab[AL-LP8] ₄		4
抗 HER2	Ab[AL-LP9] ₄		4
同种 型对照	Ab[AL-LP3] ₄		4
同种 型对照	Ab[AL-LP8] ₄		4
同种 型对照	Ab[AL-LP9] ₄		4
抗 HER2	Ab[AL2-LP1] ₄		
抗 HER2	Ab[AL2-LP17] _n		
同种 型对照	Ab[AL2-LP17] _n		

[0783] 含N297Q或N297D突变的非糖基化人类抗体IgG (IgG1、IgG4等) 用于ADC缀合。经由两步法进行两种方法 (I&II) (图1), 并且具有MS-DAR值的缀合结果总结在ADC列表中 (表7)。

[0784] 表7.ADC列表

[0786]	aHer2-AD C	4.00	
	aHer2-AD C	4.00	
	aHer2-AD C	4.00	

[0787] 步骤1:手柄官能化胺与抗体的位点特异性缀合生成每个抗体含2个、4个或8个手柄的药物缀合物。

[0788] 将BupH缓冲液 (pH 7.4) 中含N297Q突变或N297D突变的非糖基化人类抗体IgG与 ≥ 100 摩尔当量的非支化手柄胺 (AL) 或支化手柄-胺 (BL) 混合。将所得溶液与转谷氨酰胺酶 (25U/mL; 每mg抗体1U mTG, Zedira, Darmstadt, Germany; 或10U/mL; 每mg抗体5.5U MTG, Modernist Pantry-ACTIVATI包含来自Ajinomoto, Japan的麦芽糖糊精) 混合导致在0.5-20mg/mL的最终抗体浓度。将反应混合物在25°C-37°C孵育24小时, 同时温和地摇动, 同时通过ESI-MS监测。在完成, 过量的胺和mTG通过尺寸排阻色谱 (SEC) 或蛋白A柱色谱去除。将缀合物通过UV-Vis、SEC和ESI-MS进行表征。

[0789] 步骤2:手柄官能化抗体与表2中接头-有效载荷之间的点击反应以生成位点特异性ADC。

[0790] 将在PBS (pH 7.4) 中的手柄基官能化抗体 (Ab- (AL)_n 或 Ab- (BL)_n, 1-20mg/mL) 与溶解在有机溶剂诸如DMSO或DMA (10mg/mL) 中以使反应混合物包含5%-15%的有机溶剂 (v/v) 的 ≥ 2 -10摩尔当量的接头-有效载荷 (LP) 在25°C-37°C孵育1-48小时同时温和地摇动。反应通过ESI-MS监测。在完成, 过量量的LP和有机溶剂通过用BupH (pH 7.4) 脱盐柱去除并且蛋白聚集体 (如果有的话) 通过尺寸排阻色谱 (SEC) 去除。将纯化的缀合物Ab- (AL-LP)_n ADC 或 Ab- (BL-LP)₄ ADC浓缩, 无菌过滤, 并且通过UV-Vis、SEC和ESI-MS进行表征。缀合物单体纯度根据SEC $>95\%$ 。

[0791] 使用我们的内部曲妥珠单抗缀合T-DXd; T-DXd和同种型Ab-DXd ADC两者与Daiichi的马来酰亚胺四肽GGFG-接头DXd缀合, 使用常规程序完成抗体链间半胱氨酸与马来酰亚胺接头有效载荷的缀合。

[0792] 使用来自Cytiva的ÄKTA 仪器, 使用16/600 Superdex® 200柱, 用DPBS洗脱, 以1.5mL/min的流量在pH 7.4通过SEC纯化所有ADC。通过ESI-MS测量ADC的DAR值。从Ab-[AL]₄观察到4 $\times$ LP的质量增加, 与4DAR ADC相关。从Ab-[BL]₄观察到7至8 $\times$ LP另外的质量增加, 指示7至8DAR ADC。

[0793] 实施例13. 详细缀合程序

[0794] 来自方法I的代表性4DAR ADC示例如下 (图1)。将包含N297Q突变的非糖基化抗

Her2人类IgG抗体与>200摩尔当量的叠氮基-dPEG3-胺(手柄,MW 708.41g/mol)混合。将所得溶液与微生物转谷氨酰胺酶(10U/mL;每mg抗体5,5U mTG,Modernist Pantry-ACTIVA TI 包含来自Ajinomoto,Japan的麦芽糖糊精)混合导致在5mg/mL的最终抗体浓度。将反应混合物在37℃孵育24小时,同时温和地摇动,同时通过ESI-MS监测。在完成后,过量的胺和mTG通过尺寸排阻色谱(SEC)去除。将缀合物通过UV-Vis、SEC和ESI-MS进行表征。与mAb相比,叠氮基接头附接的抗体导致808Da质量增加,指示4个手柄与具有4个叠氮基手柄的抗体(Ab-(手柄)₄)缀合。将在PBS(pH 7.4)中的位点特异性抗体叠氮基缀合物(2.1mg/mL)与在2mM的DMSO中的7摩尔当量的接头-有效载荷(接头-有效载荷)混合以使反应混合物包含5%有机溶剂(v/v),并且将溶液在32℃放置36小时,同时温和地摇动。反应通过ESI-MS监测。在完成后,过量量的接头-有效载荷和蛋白聚集体通过尺寸排阻色谱(SEC)去除。将纯化的缀合物浓缩、无菌过滤,并且通过UV-Vis、SEC和ESI-MS表征。缀合物单体纯度根据SEC为99.8%。与药物附接的抗体导致对应于DAR4缀合物的质量增加。缀合物单体纯度根据SEC>99%。

[0795] 表8.ADC体外活性

[0796]

有效载荷	接头-有效载荷	ADC		
	接头名称	ADC#	DAR	SKBR3 EC ₅₀ (nM)
依喜替康	/	/	/	0.516
ProDXd	COT-PEG ₃ -BR2-(PEG ₂ -GGFG-NHCH ₂ -DXd) ₂		6.2	0.22
ProDXd	COT-PEG ₃ -BR2-(PEG ₂ -GGFG-NHCH ₂ -DXd) ₂	aHER2-ADC	7.6	0.237
		同种型对照-ADC	7.0	>100
依喜替康	COT-PEG4-vcPAB-依喜替康	aHER2-ADC	3.58	2.365

[0797]

康				
依喜替康	DIBAC-PEG4-vcPAB-依喜替康	aHER2-ADC	4.00	1.920
依喜替康	COT-EDA-(GLCA)PAB-依喜替康	aHER2-ADC	4.00	1.465
依喜替康	COT-EDA-(GLC)PAB-依喜替康	aHER2-ADC	4.00	4.117
依喜替康	COT-GGGG-依喜替康	aHER2-ADC	4.00	0.170

[0798] 实施例6:SKBR3细胞系的体外细胞杀伤活性

[0799] 为了测试本公开内容的抗Her2药物缀合物(ADC)(参见表5)杀伤人类细胞系的能力,体外进行细胞毒性测定。使用CellTiter-Glo 2.0测定试剂盒(Promega,Cat#G9243)评价ADC、同种型对照ADC和参考游离有效载荷的体外细胞毒性,其中使用ATP存在的数量确定培养物中活细胞的数目。

[0800] 为了测定,将SK-BR-3细胞以1000个细胞/孔接种在聚-D-赖氨酸包被的白色96孔BioCoat板(Corning#356693)中的完全生长培养基中,并且在37℃在5%CO₂中生长过夜。在稀释培养基(Optimem+0.1%BSA)中制备抗Her2 ADC或同种型对照ADC的三倍系列稀释液,并且以范围为100nM至0.015nM的最终浓度添加至细胞中(根据DAR(药物抗体比)校正浓度,并且根据有效的有效载荷浓度给药)。在100%DMSO中制备游离有效载荷的三倍系列稀释液,转移至新鲜稀释培养基中,并且然后以0.2%的最终恒定DMSO浓度和范围为100nM至0.015nM的最终有效载荷浓度添加至细胞中。每个稀释系列中的最后一个孔(未处理的孔)

用作空白对照,仅包含培养基(ADC)或培养基加0.2%DMSO(有效载荷),并且绘制为3倍系列稀释的延续。6天后,向每个孔中添加100μL CellTiter Glo 2.0,将板在轨道振荡器上混合2分钟,并且将板在室温孵育10分钟。在Envision光度计(PerkinElmer)上测量相对光单位(RLU),并且将细胞存活力表示为未处理(100%活)细胞的百分比。IC₅₀值使用10点剂量响应曲线(GraphPad Prism)上的四参数逻辑方程确定。还遵循如下方式确定每种测试项目的最大杀伤百分比:100-最小存活力百分比。运行了一个实验并且图2和图3示出了结果并且报道了每个测试项目的EC₅₀值和最大杀伤百分比。

[0801] 表9.SKBR3中的ADC体外细胞杀伤结果

有效载荷	接头-有效载荷		ADC		
	CP#	LP#	描述	DAR	SKBR3 EC ₅₀ (nM)
依喜替康			/	/	0.516
[0803]	依喜替康	LP1	COT-PEG4-vcPAB-依喜替康	抗 HER2-AL-LP1	3.58
	依喜替康	LP2	DIBAC-PEG4-vcPAB-依喜替康	抗 HER2-AL-LP2	4
	依喜替康	LP3	COT-EDA-(GLCA)PAB-依喜替康	抗 HER2-AL-LP3	4
				对照-AL-LP3	4
	依喜替康	LP4	COT-EDA-(GLC)PAB-依喜替康	抗 HER2-AL-LP4	4
	依喜替康	LP8	COT-GGGG-ProEXT	抗 HER2-AL-LP8	4
				对照-AL-LP8	4
	ProDXD	LP9	COT-PEG4-vcPAB-ProDXD	抗 HER2-AL-LP9	4
				对照-AL-LP10	4
	DXD	LP10	Mc-GGFG-NHCH2-Dxd	DS8201a	8

[0804] 如以上表9中示出的,经由谷氨酰胺缀合的抗Her2 ADC以范围为0.17nM至4.1nM的IC₅₀值和范围>60%至95%的最大%杀伤值杀伤高表达Her2的SK-BR-3细胞。曲妥珠单抗德鲁替康(T-DXD经由半胱氨酸缀合)杀伤的SK-BR-3细胞在测定中用作阳性对照,并且具有372pM的EC₅₀值和90.9%的最大%杀伤值。未缀合的抗Her2抗体在所有测试系中是弱细胞毒性的(结果未在图中示出)。从ADC释放的游离依喜替康有效载荷以范围为516pM的EC₅₀值和接近95%的最大%杀伤值杀伤细胞。***

[0805] 由于可以对以上描述的主题进行各种改变,而不偏离本公开内容的范围和精神,因此意图将以上描述中包含的或在所附权利要求中定义的所有主题解释为本公开内容的描述性和说明性的。本公开内容的许多修改和变化鉴于以上教导是可能的。因此,本描述意图涵盖落入所附权利要求范围内的所有这样的替代、修改和变化。

[0806] 本文引用的所有专利、申请、出版物、测试方法、文献和其他材料通过引用以其整体特此并入,就像物理上存在于本说明书中一样。

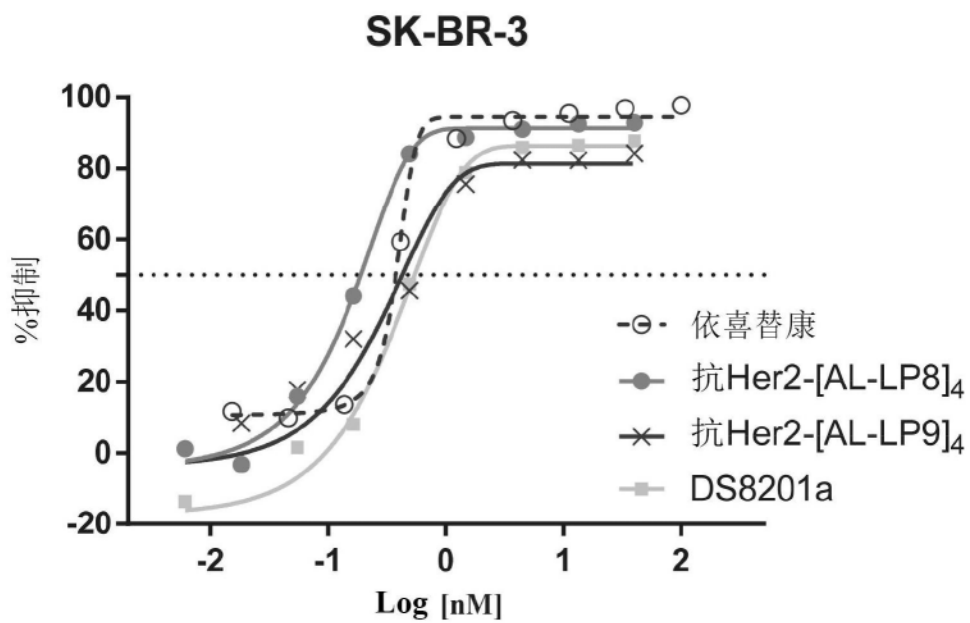


图2

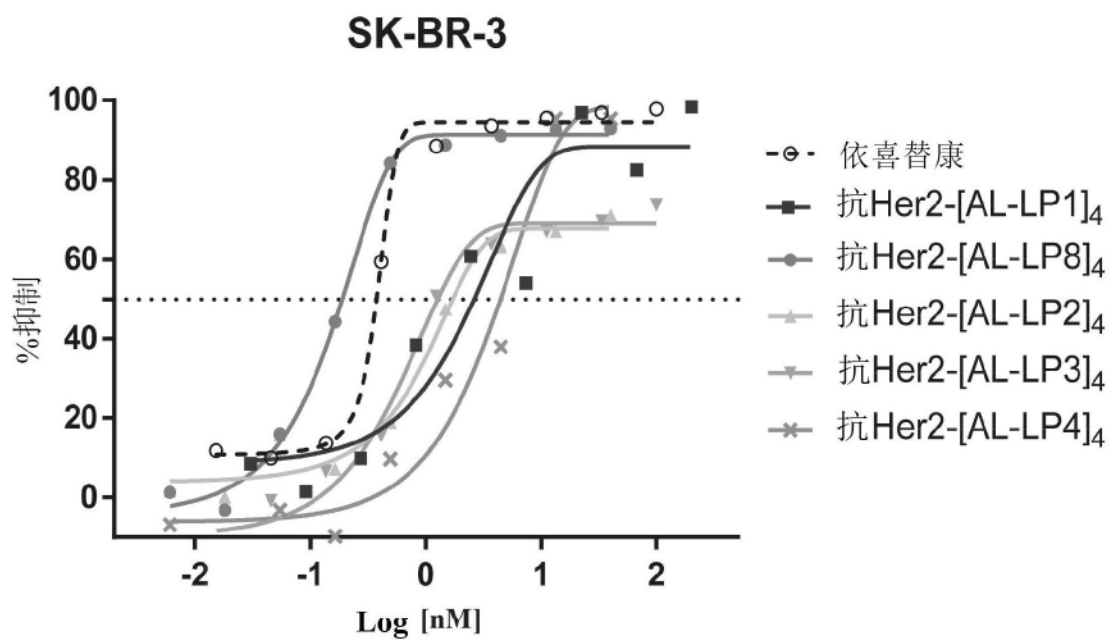


图3