



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105530942 B

(45)授权公告日 2019.10.11

(21)申请号 201480047607.3

(22)申请日 2014.08.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105530942 A

(43)申请公布日 2016.04.27

(30)优先权数据
61/869,954 2013.08.26 US
61/934,313 2014.01.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.02.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/052757 2014.08.26

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/031396 EN 2015.03.05

(73)专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 托马斯·尼托利
纳雷什库玛·F·贾因
托马斯·帕特里克·马尔科坦

(74)专利代理机构 北京市磐华律师事务所
11336

代理人 董巍 谢枸

(51)Int.Cl.
A61K 31/5365(2006.01)
C07D 413/14(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 102596922 A,2012.07.18,全文.
WO 2010126551 A1,2010.11.04,全文.
Robert Y. Zhao 等.Synthesis and
Evaluation of Hydrophilic Linkers for
Antibody Maytansinoid Conjugates.《Journal
of medicinal chemistry》.2011,第54卷第
3606-3623页.

审查员 焦士勇

权利要求书12页 说明书27页 附图13页

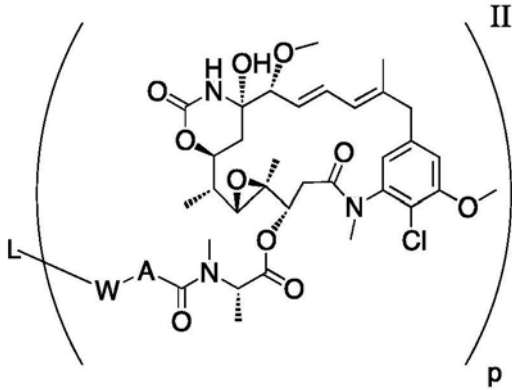
(54)发明名称

一种包含大环内酯类非对映体的药物组合物、其制备方法和用途

(57)摘要

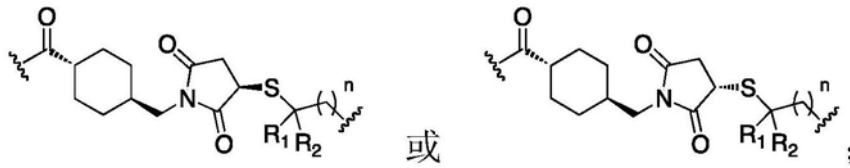
本发明涉及一种组合物包含大环内酯类非对映异构体,与含有其相应的非对映异构体混合物的组合物相比,其在抑制细胞增殖方面,表现出改进的治疗效果。本发明进一步提供了一种通过大环内酯类非对映异构体形成的药物-配体偶联物。本发明还提供了一种新的大环内酯类非对映异构体的制备方法和其治疗用途。

1. 一种组合物,其包含多个式(II)所示配体-药物偶联物:



其中,

A是:



W为NR₃;

L是抗体或其抗原结合片段;

R₁、R₂和R₃各自是H;

n是1;

p是1至10的任一整数;

且其中,所述组合物中的配体-药物偶联物的非对映异构体过量大于50%;其中所述非对映异构体在与式II的硫原子相连的手性碳原子,具有不同的立体化学构型。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中,所述抗体或其抗原结合片段是特异性地与肿瘤相关抗原结合,且进一步地,其中所述肿瘤相关抗原选自由AFP、ALK、BAGE蛋白、 β -链蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CD-20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、周期素B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGE蛋白、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc16或CA-125、MUM1、NA17、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、PSMA、FOLH1、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、存活素、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、和尿路上皮特异蛋白-3组成的组。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中,所述GAGE蛋白选自由GAGE-1和GAGE-2组成的组。

4. 根据权利要求2所述的组合物,其中,所述MAGE蛋白选自由MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6和MAGE-12组成的组。

5. 根据权利要求2所述的组合物,其中,所述肿瘤相关抗原选自由EGFRvIII、Her2和

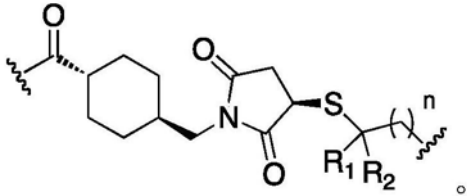
Muc16组成的组。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中,所述配体-药物偶联物的非对映异构体过量大于95%。

7. 使用权利要求1-6任一所述组合物来制备用于治疗选自卵巢癌、乳腺癌、胶质瘤和胃癌的癌症的药物的用途。

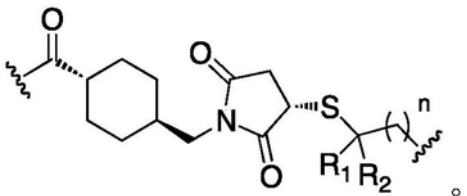
8. 根据权利要求1-6任一所述的组合物,其中,

A是:



9. 根据权利要求1-6任一所述的组合物,其中,

A是:



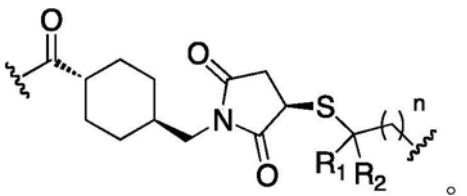
10. 一种使用权利要求1-6任一所述组合物来制备用于治疗与肿瘤相关抗原相关的疾病或病症的药物的用途,其中,所述肿瘤相关抗原选自EGFRvIII、ErbB2/Her2、Muc16、PRLR、PSMA、Steap-1和Steap-2组成的组;所述组合物包含治疗有效量的配体-药物偶联物。

11. 一种药物组合物,包含根据权利要求1-6任一所述的组合物及药学上可接受的赋形剂。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中,所述式II的配体-药物偶联物的非对映异构体过量大于95%;其中所述非对映异构体在与式II的硫原子相连的手性碳原子,具有不同的立体化学构型。

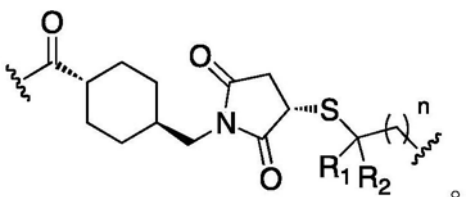
13. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中,

A是:

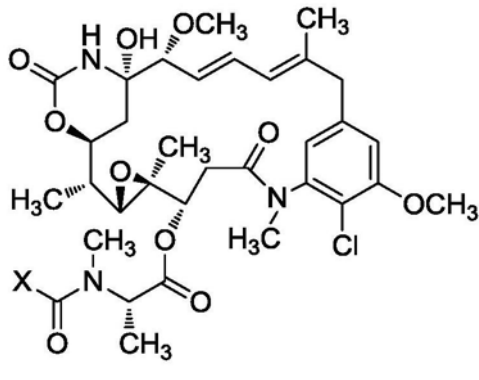


14. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中,

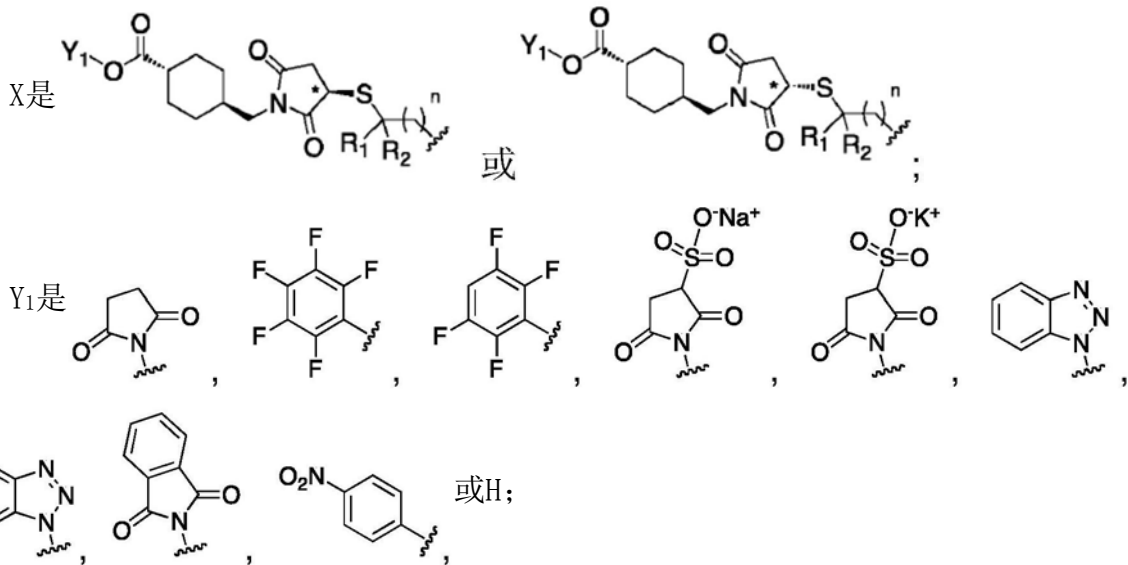
A是:



15. 一种组合物,其包含式I所示的化合物:



其中,



R₁和R₂各自独立地选自H或烷基;和

n是0或1至50的任一整数;

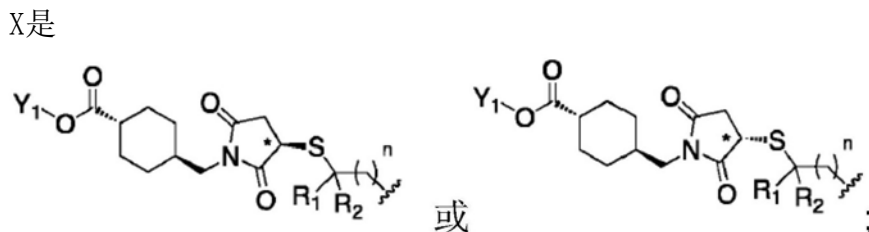
其中所述式I的化合物的非对映异构体过量大于50%;其中所述非对映异构体在式I的式X中以*表示的手性碳原子,具有不同的立体化学构型,其中所述手性碳原子是与硫原子相连的碳原子;其中烷基选自甲基,乙基,1-丙基,2-丙基,正丁基,异丁基,仲丁基,叔丁基,戊基,新戊基,己基和异己基。

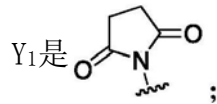
16. 根据权利要求15所述的组合物,其中,Y₁是

17. 根据权利要求15所述的组合物,其中,R₁和R₂为H。

18. 根据权利要求15所述的组合物,其中,n是1至10的任一整数。

19. 根据权利要求15所述的组合物,其中,

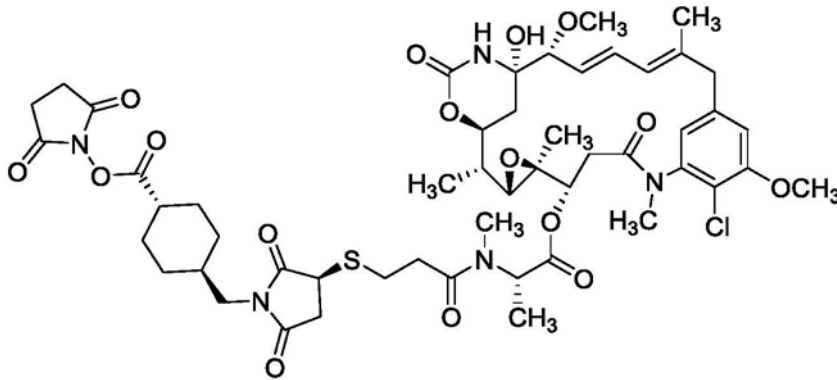




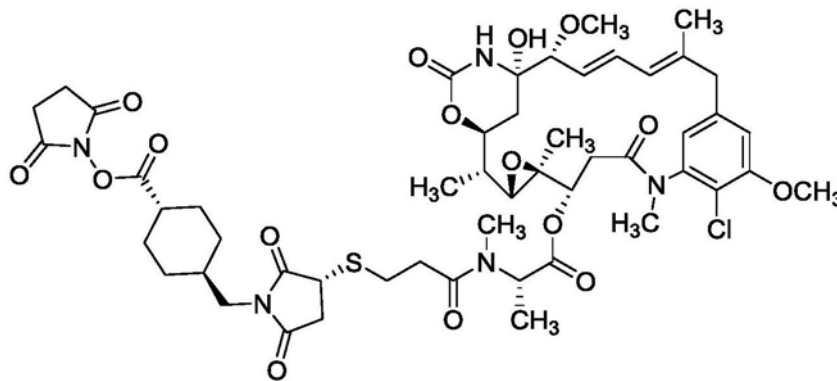
R₁和R₂是H; 和

n是1。

20. 根据权利要求19所述的组合物, 其中, 所述式I的化合物是:



21. 根据权利要求19所述的组合物, 其中, 所述式I的化合物是:

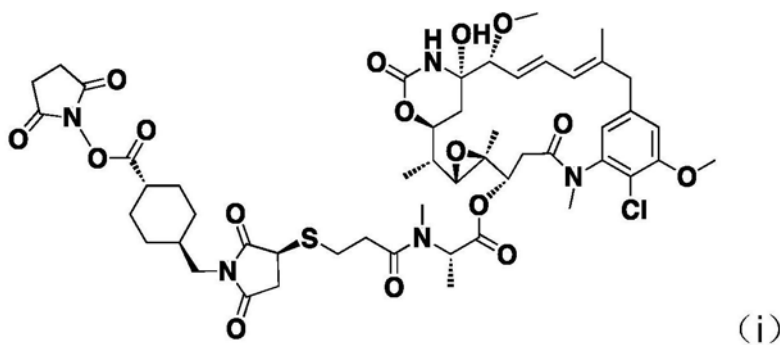


22. 根据权利要求15-21任一所述的组合物, 其中所述非对映异构体过量至少95%; 且其中所述非对映异构体在式I的式X中以*表示的手性碳原子, 具有不同的立体化学构型, 其中所述手性碳原子是与硫原子相连的碳原子。

23. 根据权利要求22所述的组合物, 其中, 所述式I的化合物的特征在于其¹H-NMR波谱未受其它非对映异构体所产生噪音的影响。

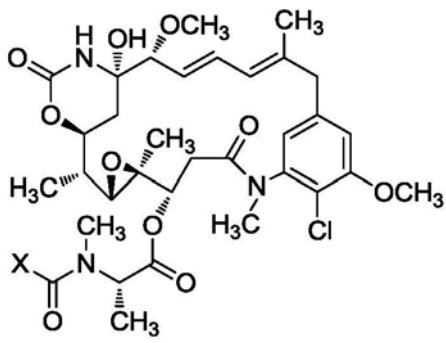
24. 一种抗体-药物偶联物, 所述抗体-药物偶联物是由如权利要求23所述的化合物与抗体或其抗原结合片段相结合形成。

25. 一种式(i)所示的化合物:



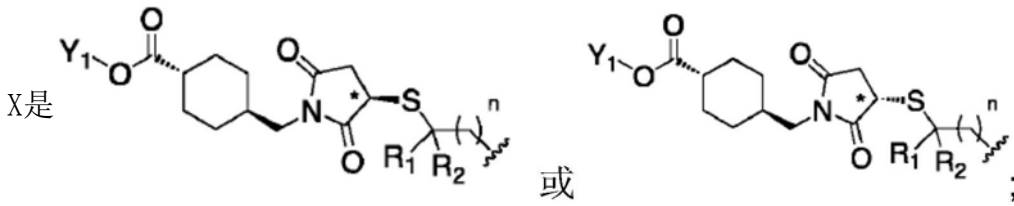
其中,所述的化合物为立体异构体纯。

26.一种制备式I所示化合物的方法:

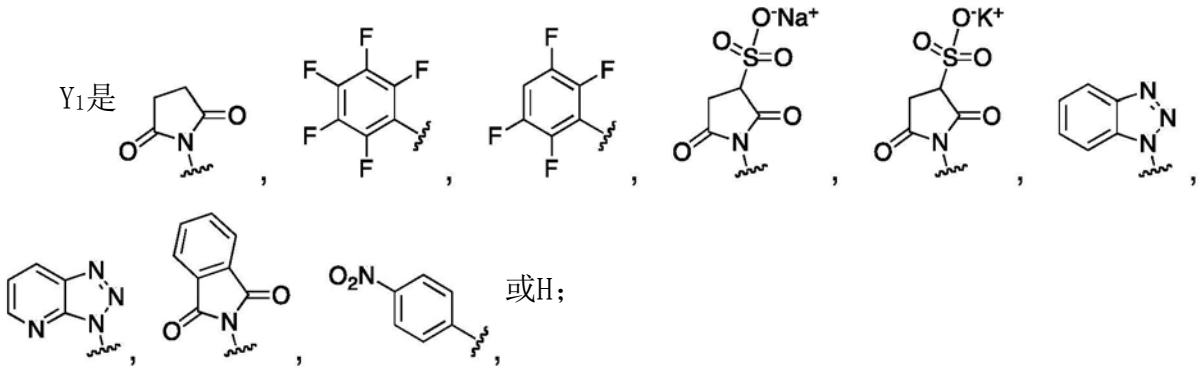


I

其中,



Y1是



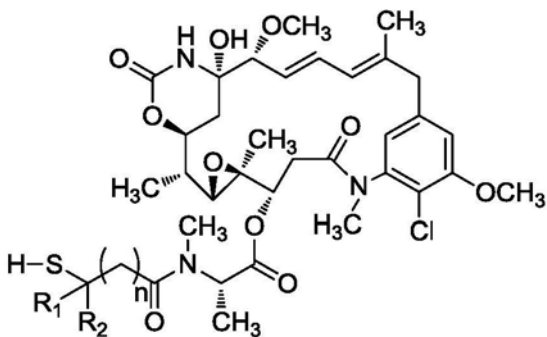
R1和R2各自独立地选自H或烷基;和

n独立地是0或1至50的任一整数;

所述方法包含如下步骤:

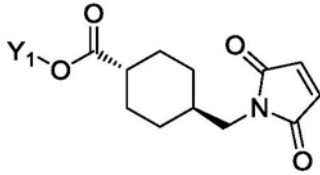
(a) 混合下述成分 (i) - (iv) :

(i) 具有式III的化合物:



III;

(ii) 具有式IV的化合物:



IV

(iii) 硅胶;和

(iv) 含有机溶剂和水的稀释剂;

(b) 分离得到所述式I的化合物,其中所述式I的化合物的非对映异构体过量大于50%;其中所述非对映异构体在式I的式X中以*表示的手性碳原子,具有不同的立体化学构型,其中所述手性碳原子是与硫原子相连的碳原子。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述有机溶剂包含极性非质子溶剂。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中,所述极性非质子溶剂包含乙腈。

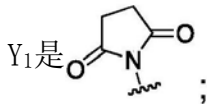
29. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述有机溶剂和所述水的体积比例为1:1至10:1。

30. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述有机溶剂和所述水的体积比例为1:1至4:1。

31. 根据权利要求26所述的方法,其中,所述式III的化合物和所述式IV的化合物的摩尔比为1:1至1:3。

32. 根据权利要求26所述的方法,其中n是1;和R₁和R₂各自独立地为H。

33. 根据权利要求26所述的方法,其中,



R₁和R₂是H;且

n是1。

34. 根据权利要求26-33任一所述的方法,其中混合是在氩气下进行。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中成分(i)-(iv)被搅拌。

36. 根据权利要求26-33任一所述的方法,其中混合是在室温下进行。

37. 根据权利要求26-33任一所述的方法,其中,所述成分(i)-(iv)被混合约18小时。

38. 根据权利要求26-33任一所述的方法,其中,所述式IV的化合物和所述式III的化合物的摩尔比为3:1至1:1。

39. 根据权利要求26-33任一所述的方法,其中,步骤(b)的分离所述式I的化合物是通过以硅藻土过滤完成。

40. 根据权利要求26-33任一所述的方法,进一步包括通过柱色谱在硅胶上纯化式I的化合物。

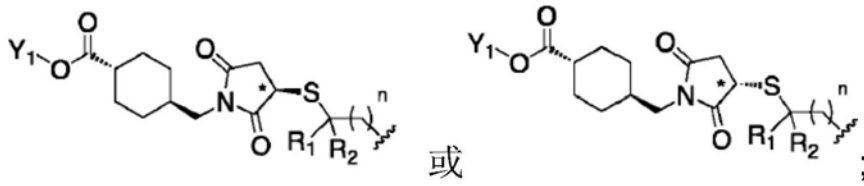
41. 根据权利要求40所述的方法,进一步包括干燥式I的化合物。

42. 根据权利要求26-33任一所述的方法,进一步包括将所述式I的化合物与抗体或其抗原结合片段相结合形成抗体-药物偶联物。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述式I的化合物是通过S、O或NR₃与所述抗体或

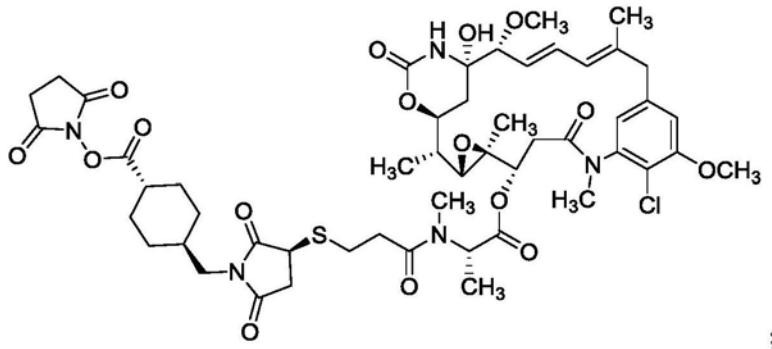
其抗原结合片段相连接,其中R₃是H或烷基。

44. 根据权利要求26-33任一所述的方法,其中,
X是



而Y₁是 ; R₁和R₂为H; 和n是1。

45. 根据权利要求26-33任一所述的方法,其中,所述式I的化合物是:



而Y₁是 ; R₁和R₂为H; 和n是1。

46. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述抗体或其抗原结合片段是特异性地与肿瘤相关抗原结合,且进一步地,其中所述肿瘤相关抗原选自由AFP、ALK、BAGE蛋白、β-链蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CD-20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、周期素B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGE蛋白、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc16或CA-125、MUM1、NA17、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、PSMA、FOLH1、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、存活素、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、和尿路上皮特异蛋白-3组成的组。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中,所述GAGE蛋白选自由GAGE-1和GAGE-2组成的组。

48. 根据权利要求46所述的方法,其中,所述MAGE蛋白选自由MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6和MAGE-12组成的组。

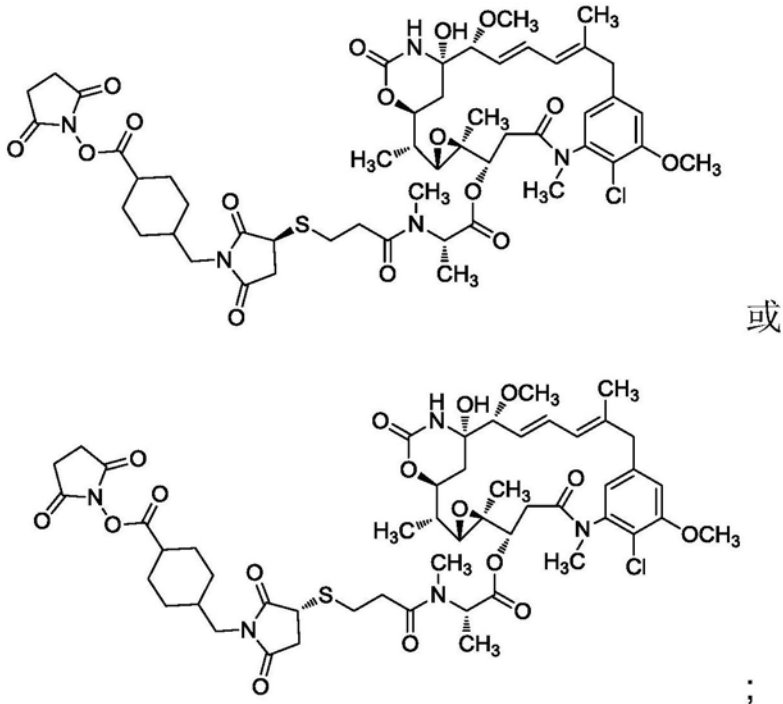
49. 根据权利要求46所述的方法,其中,所述肿瘤相关抗原选自由EGFRvIII、Her2和Muc16组成的组。

50. 一种制备权利要求1-6之一所述的式II所示的配体-药物偶联物的方法,其中,式II

所示的配体-药物偶联物的非对映异构体过量大于50%；其中所述非对映异构体在与式II的硫原子相连的手性碳原子，具有不同的立体化学构型；

所述方法包括：

(a) 使抗体或其抗原结合片段与式I所示的化合物反应，其中所述式I的化合物是：



其中所述式I的化合物的非对映异构体过量大于50%；其中所述非对映异构体在与式I的硫原子相连的手性碳原子，具有不同的立体化学构型；和

(b) 纯化所述式II所示的配体-药物偶联物。

51. 根据权利要求50所述的方法，其中，L是特异性地与肿瘤相关抗原结合的抗体或其抗原结合片段，且进一步地，其中所述肿瘤相关抗原选自AFP、ALK、BAGE蛋白、 β -链蛋白、brc-ab1、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8、CD-20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、周期素B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGE蛋白、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc16或CA-125、MUM1、NA17、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、PSMA、FOLH1、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、存活素、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、和尿路上皮特异蛋白-3组成的组。

52. 根据权利要求51所述的方法，其中，所述GAGE蛋白选自GAGE-1和GAGE-2组成的组。

53. 根据权利要求51所述的方法，其中，所述MAGE蛋白选自MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-6和MAGE-12组成的组。

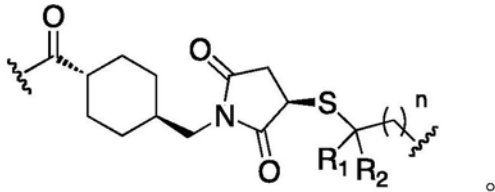
54. 根据权利要求51所述的方法，其中，所述肿瘤相关抗原选自EGFRvIII、Her2和Muc16组成的组。

55. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述式II所示的配体-药物偶联物的非对映异构体过量大于95%;其中所述非对映异构体在与式II的硫原子相连的手性碳原子,具有不同的立体化学构型。

56. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述式I的化合物的非对映异构体过量大于95%;其中所述非对映异构体在与式I的硫原子相连的手性碳原子,具有不同的立体化学构型。

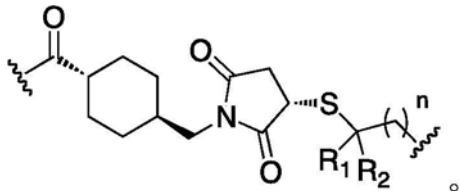
57. 根据权利要求50所述的方法,其中,

A是:

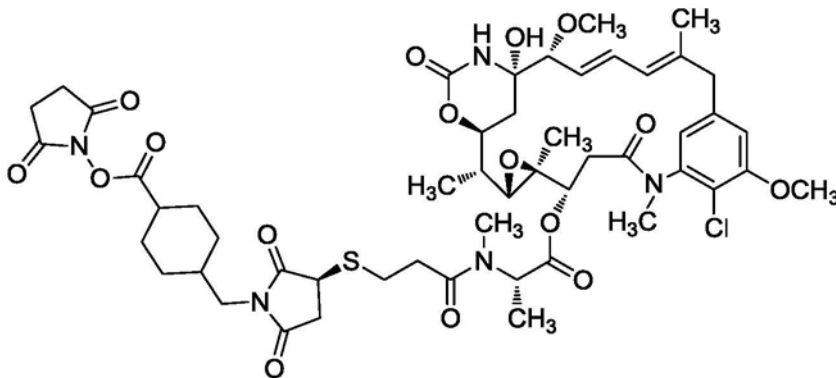


58. 根据权利要求50所述的方法,其中,

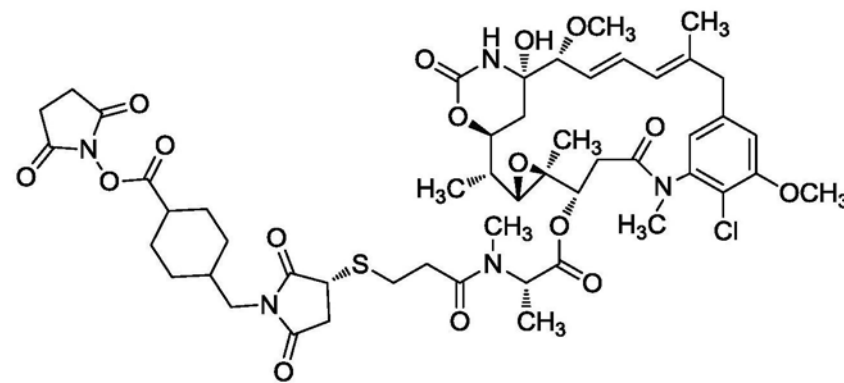
A是:



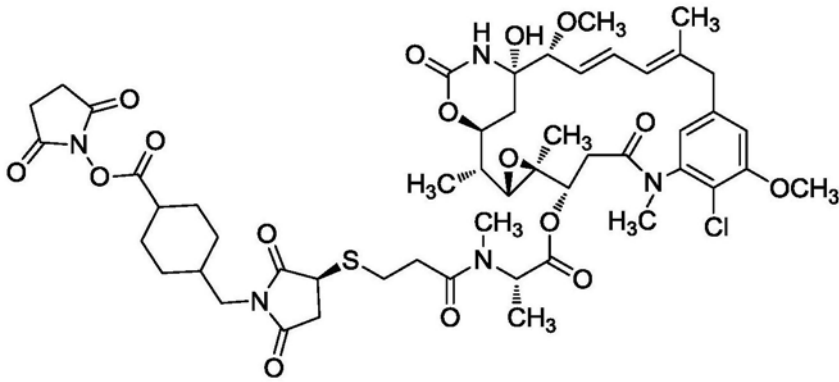
59. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述式I的化合物是:



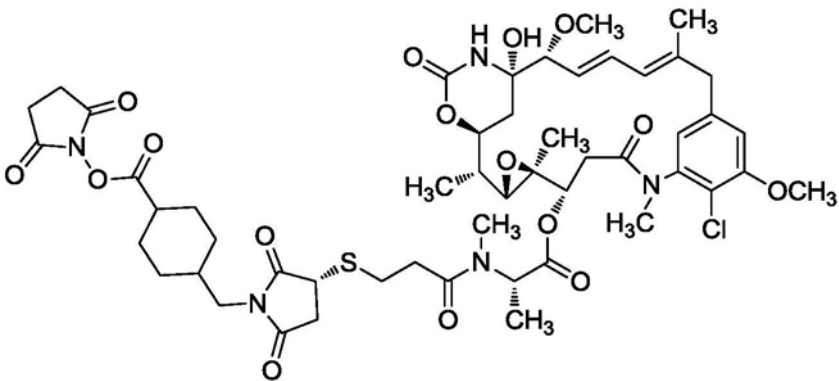
或



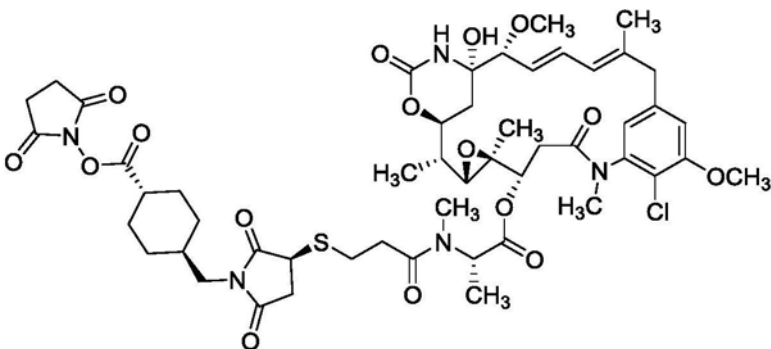
60. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述式I的化合物是:



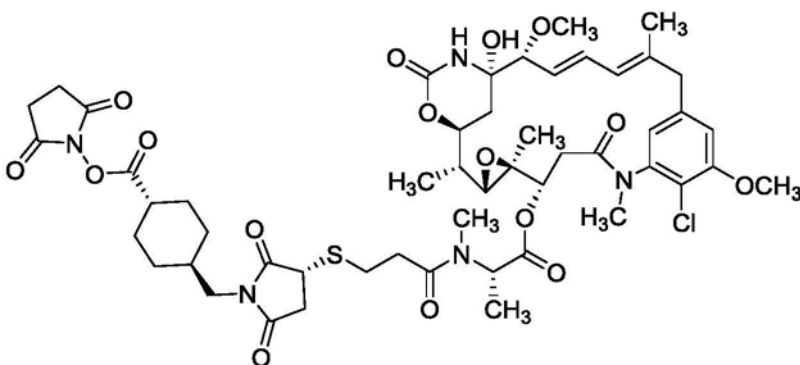
61. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述式I的化合物是:



62. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述式I的化合物是:



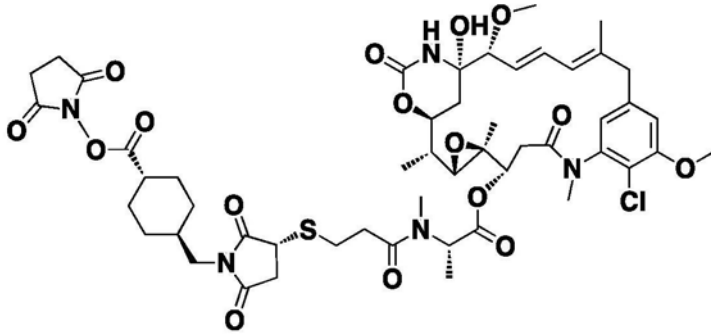
63. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述式I的化合物是:



64. 一种式I化合物,所述式I化合物根据权利要求29-44任一所述的方法制备。

65. 一种具有权利要求1-6之一中所述的式II所示的配体-药物偶联物,所述式II所示的配体-药物偶联物是根据权利要求45-63任一所述的方法制备。

66. 一种式 (ii) 所示的化合物:

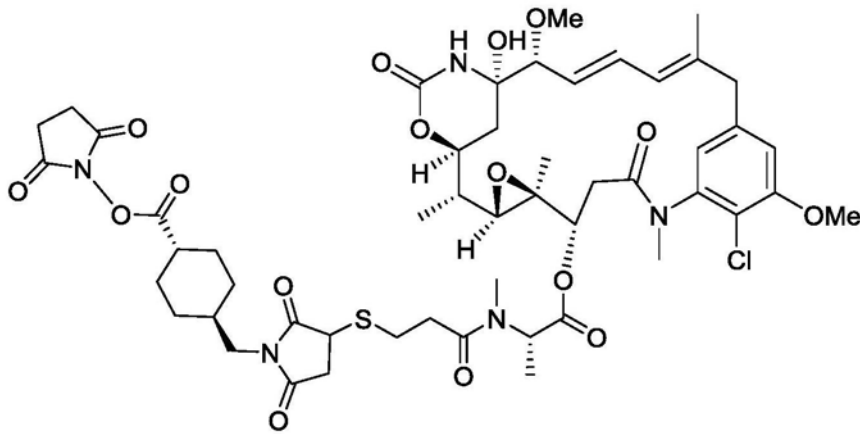


(ii)

其中,所述的化合物为立体异构体纯。

67. 一种抗体-药物偶联物,其中所述抗体-药物偶联物是通过将权利要求66的化合物和抗体或其抗原结合片段相结合而形成。

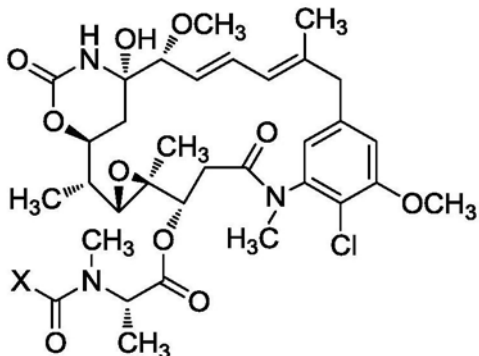
68. 含有式 I 化合物的组合物:



(I)

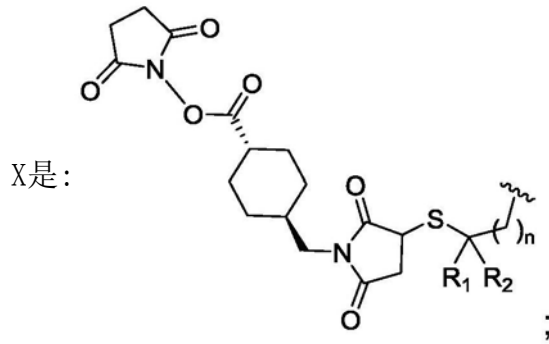
其中式 I 化合物的特征在于¹H NMR如图1所示。

69. 式 I 化合物的非对映异构体,其特征在于¹H NMR如图1所示:



I

其中:



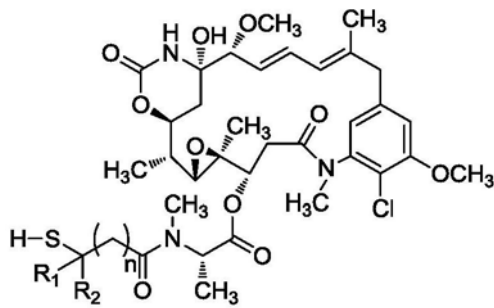
R_1 和 R_2 是H;且

n 是1。

70. 一种化合物,其特征在于如图1所示的 ^1H NMR,通过包括以下步骤的方法制备:

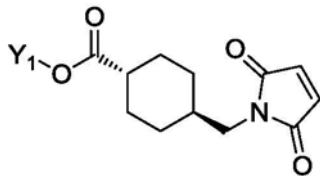
(a) 接触:

(i) 式III的化合物:



III;

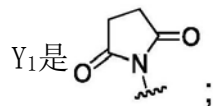
(ii) 式IV的化合物:



IV

(iii) 硅胶;以及

(iv) 包含有机溶剂和水的稀释剂;



R_1 和 R_2 是H;且

n 是1;

并且

(b) 分离如图1所示的 ^1H NMR所表征的化合物。

71. 通过使权利要求70的步骤 (b) 的化合物与抗体或其抗原结合片段接触而制备的抗体药物缀合物。

一种包含大环内酯类非对映体的药物组合物、其制备方法和用途

[0001] 增殖性疾病表现为非正常细胞不受控制地生长和蔓延。若所述这些细胞蔓延是不受控的,可能将导致死亡。增殖性疾病,如癌症,可以通过手术、放射疗法、化学疗法、激素疗法、和/或免疫疗法来治疗。大量此种治疗方法,尤其是化学疗法,是基于使用抗增殖药物来阻止非正常细胞的蔓延。抗增殖药物,简单地基于所述细胞是否复制,典型地不加选择地尽其所能来杀死细胞,影响正常和非正常细胞。不管怎样,大多抗增殖药物需要一个相对高浓度作用于非正常细胞增殖位点来起效。因此,提供有效的抗增殖药物作用于非正常细胞生长位点,同样会引起正常细胞全身性死亡,或引起所述非正常细胞周边正常细胞的死亡。

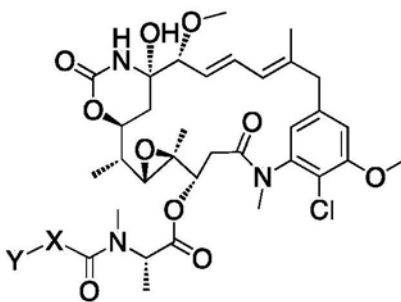
[0002] 已尝试各种靶向给药方法,包括利用偶联物和毒素的肿瘤靶点探针(如抗体或生长因子),所述毒素有假单胞菌或白喉毒素。偶联物用于治疗癌症,通过靶向抗增殖药物从而作用于非正常细胞群体。近来,偶联物包括毒素美登素已被应用于癌症治疗。美登素作为一种抗增殖药物,表现出很强的活性,但化合物毒性亦被证明会影响正常细胞。因此需要开发以偶联物为基础的美登素,可以有效用于癌症治疗。急需更加积极有效的、且低剂量的基于偶联物的美登素,用于抑制或杀死非正常细胞群体,同时减少破坏正常细胞的风险。

[0003] 很多抗增殖化合物表现为不对称结构,如美登素生物碱家族的大环内酯类,或其存在的其它消旋混合物形式,或分离的构型为“R”和“S”,或(+)和(-)之对映异构体,具有立体中心的结构,和多种非对映体。本发明提供一种美登素生物碱非对映异构体,与其各自非对映体混合物相比,能更加有效抑制细胞生长。因此,本发明所述非对映体可用于制备提高治疗效果的药用产品,并用于具体疾病或病症的治疗,尤其是癌症。

[0004] 本发明公开了一种包含多个式(I)所示药物分子的组合物:

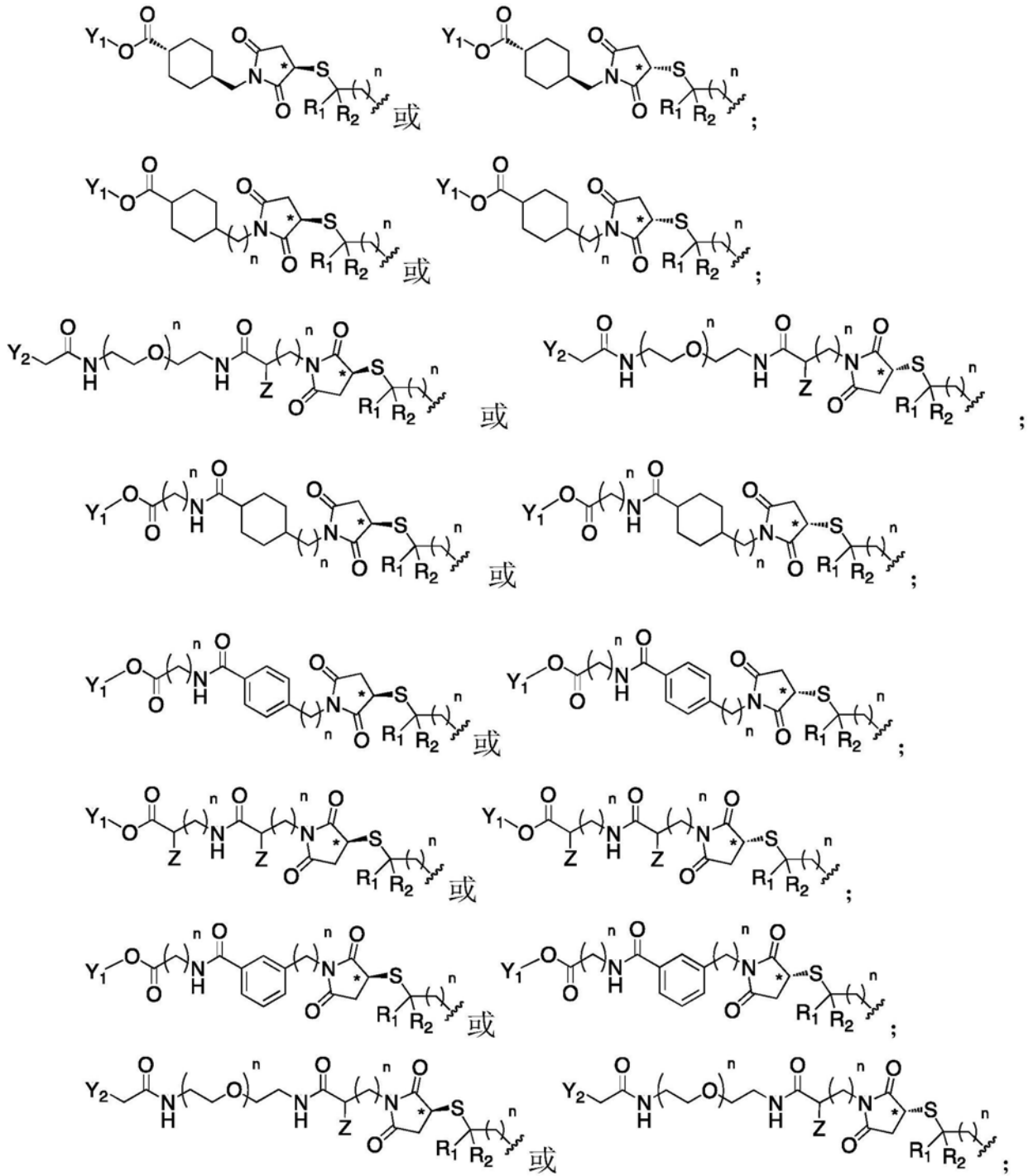
I

[0005]

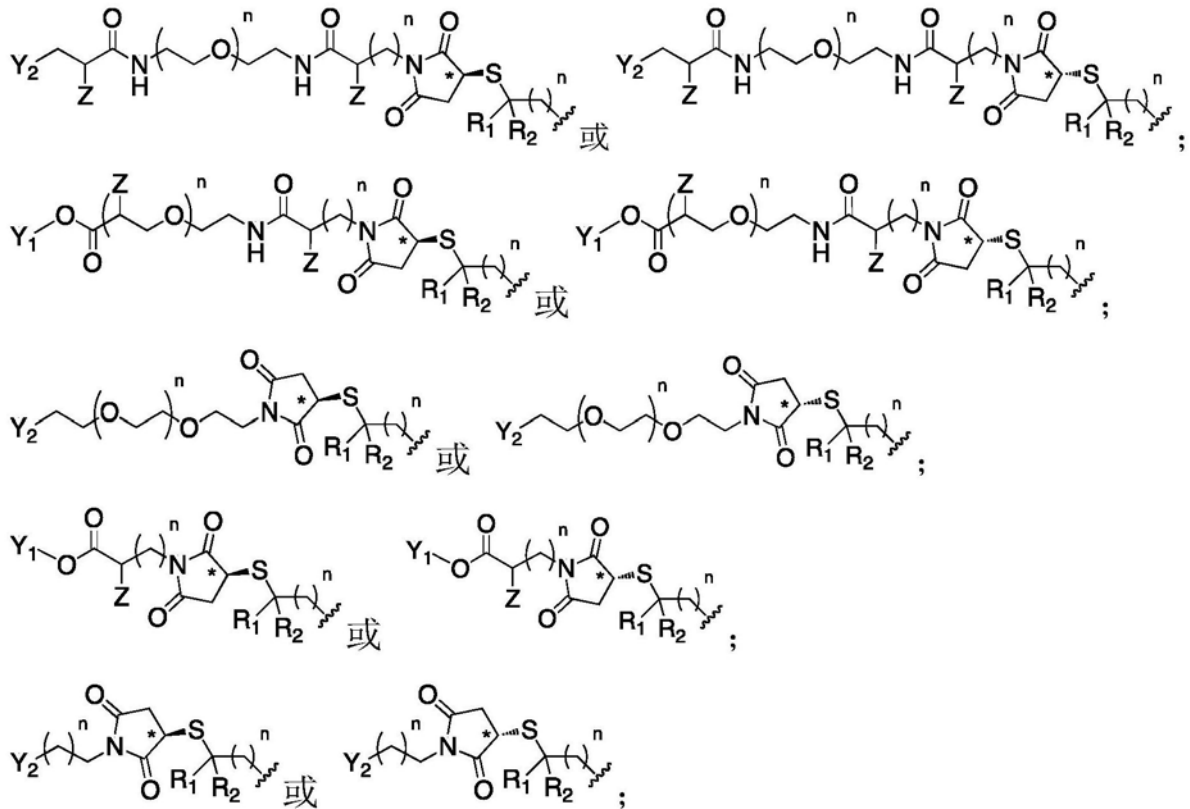


[0006] 其中,X是:

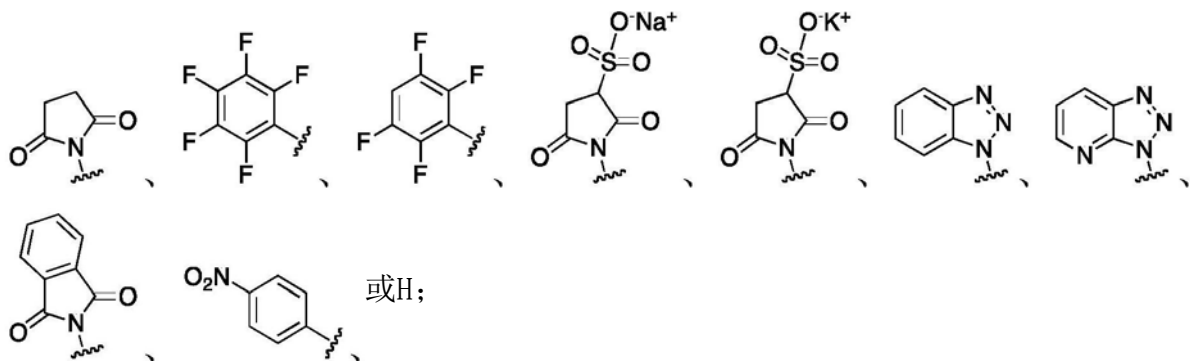
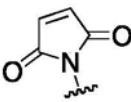
[0007]



[0008]

[0009] Y代表 Y_1 或 Y_2 ,其中 Y_1 是:

[0010]

[0011] Y_2 是 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 或  ;[0012] Z 是H或 SO_3H ;[0013] R_1 和 R_2 各自独立地选自H或烷基;[0014] 各 n 独立地为0或为1至50的任一整数;

[0015] 其中,所述组合物中药物分子包含至少两个非对映异构体的混合物,所述两个非对映异构体为第一非对映体和第二非对映体,所述第一非对映体和第二非对映体是相同的,除非所述第一和第二非对映体在X所代表子结构式中同一个手性碳原子具有不同的立体化学构型,并以(*)体现,其中所述手性碳原子是与硫原子相连的碳原子,所述第一和第二非对映体的非对映异构体过量大于50%。

[0016] 在其中一个实施例,本发明所述包含多个式I所示药物分子的组合物,其中,n是1, R_1 和 R_2 各自独立地为氢。

[0017] 在另一实施例,本发明所述包含多个式I所示药物分子的组合物,其药物分子非对映异构体过量约为60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0018] 在其中一些实施例,本发明所述包含式I所示药物分子的组合物,其药物分子非对映异构体过量约为90%至100%,或约为95%至100%,或约为98%至100%。

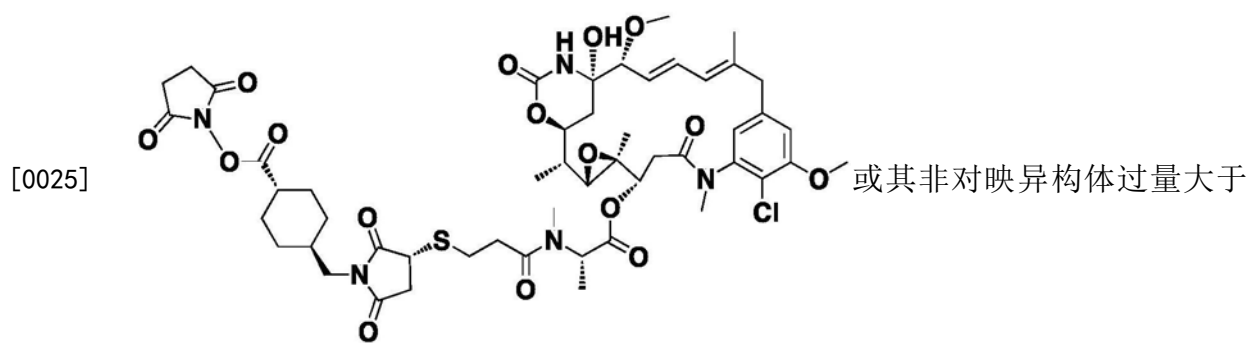
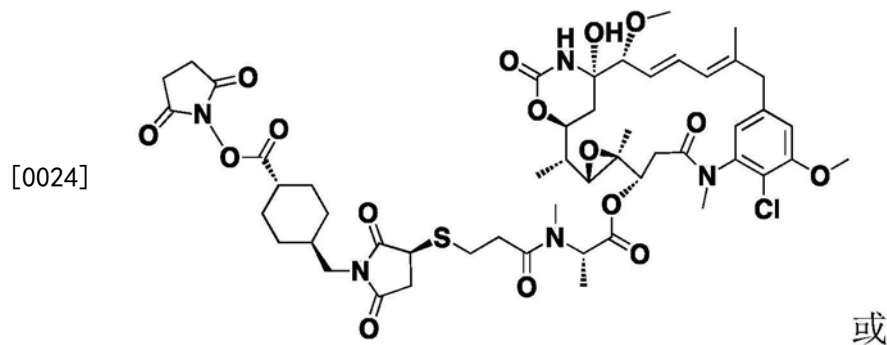
[0019] 在另一实施例,本发明所述包含多个式I所示药物分子的组合物,其中,至少两个非对映异构体中的一个由图1所示的 ^1H NMR波谱进行表征。

[0020] 本发明所使用术语“约”,当应用于相关特指列举数值时,表示所述数值可以有不超过1%的变化,例如本发明所表述的“约100”,包括99和101以及他们之间的所有数值(如99.1、99.2、99.3、99.4等等)。

[0021] 在另一实施例,本发明所述包含多个式I所示药物分子的组合物,其中,所述组合物包含非对映异构体过量大于50%的药物分子抗增殖活性优于包含非对映异构体过量未大于50%的药物分子抗增殖活性。

[0022] 进一步,本发明所述包含多个式I所示药物分子的组合物,其进一步包含治疗有效量的第二种或附加治疗剂,如化学治疗剂,抗炎药物,抗生素等等。

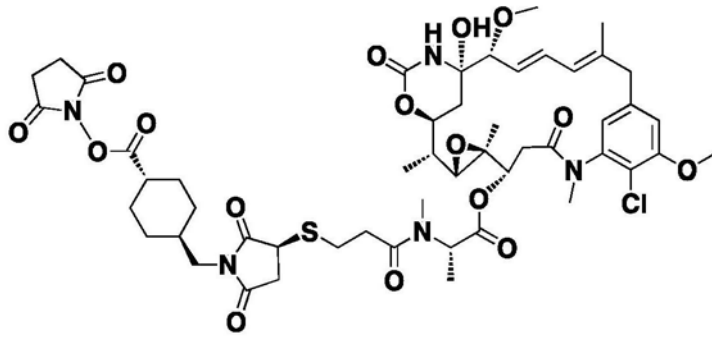
[0023] 在其中一个实施例,本发明所述组合物包含多个如下式I所示的药物分子:



50%。

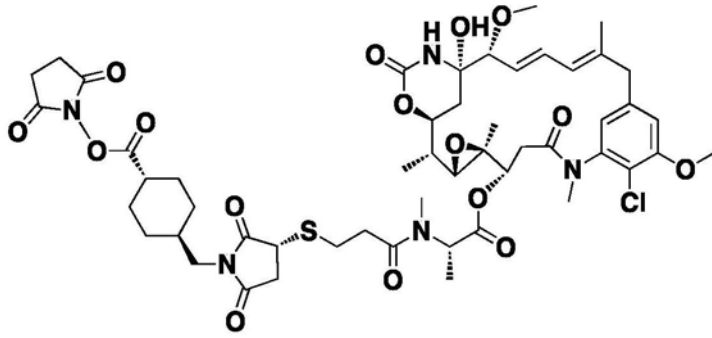
[0026] 在其中一个实施例,至少两个非对映异构体中的一个为式(i)所示的化合物:

[0027]



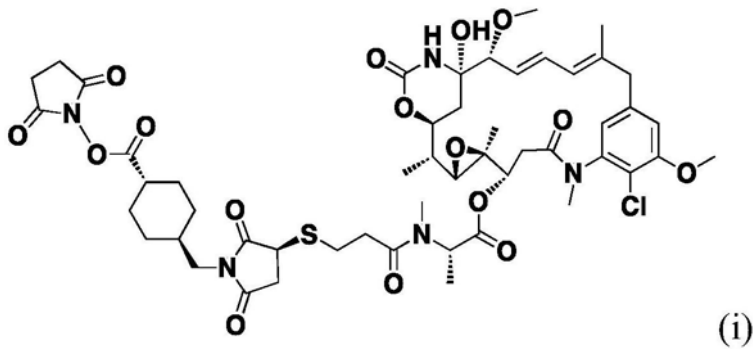
[0028] 在另一实施例,至少两个非对映异构体中的一个为式(ii)所示的化合物:

[0029]

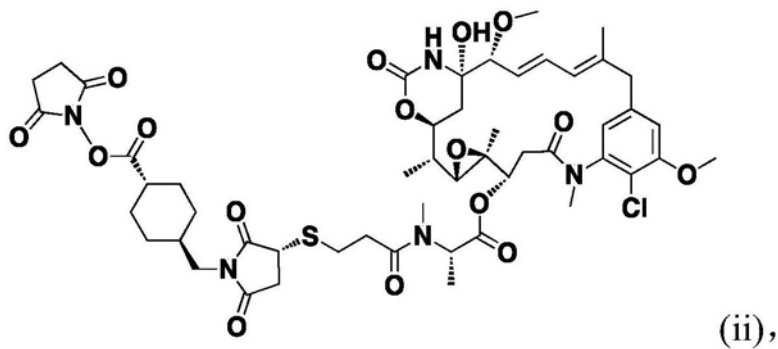


[0030] 本发明还提供式(i)或(ii)所示的化合物,

[0031]

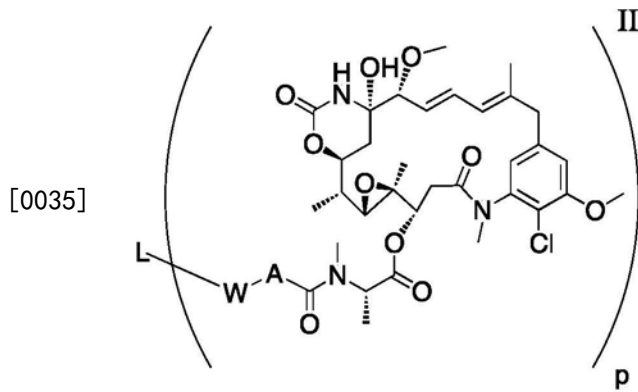


[0032]

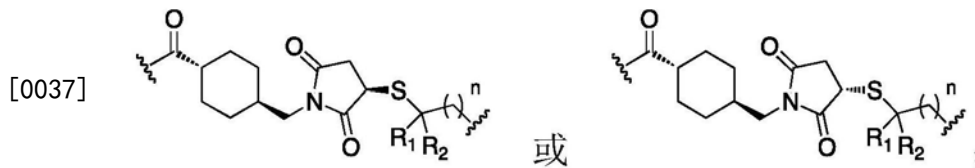


[0033] 其中,所述化合物为立体异构体纯。

[0034] 本发明还提供包含多个式(II)所示配体-药物偶联物的组合物:



[0036] 其中,A是:



[0038] W选自S、O或NR₃;

[0039] L是一种配体;其中,所述L能与单个细胞或细胞群体结合;

[0040] R₁、R₂和R₃各自独立地选自H或烷基;

[0041] n是0或1至10的任一整数;

[0042] p是1至10的任一整数;和

[0043] 其中,所述组合物中配体-药物偶联物的非对映异构体过量大于50%。

[0044] 在其中一个实施例,本发明所述包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其中,n是1,R₁和R₂各自独立地为氢。

[0045] 在其中一个实施例,本发明所述包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其配体-药物偶联物非对映异构体过量约为60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。在其中一些实施例,本发明所述包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其配体-药物偶联物非对映异构体过量约为90%至100%,或约为95%至100%,或约为98%至100%。

[0046] 在另一实施例,本发明所述包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其中,所述组合物包含非对映异构体过量大于50%的配体-药物偶联物抗增殖活性优于包含非对映异构体过量未大于50%的配体-药物偶联物抗增殖活性。

[0047] 在其中一个实施例,本发明所述包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其中,所述配体是一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段可以与肿瘤相关抗原结合。关于式II中,n可以是1,R₁和R₂可以各自独立地为氢。

[0048] 在其中一些实施例,本发明所述包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其中,所述配体是一种与肿瘤相关抗原结合的抗体或其抗原结合片段,本发明所述组合物中配体-药物偶联物,其非对映异构体过量大于约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0049] 在一些实施例,本发明提供了包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其中,所述抗体或其抗原结合片段特异性地与肿瘤相关抗原结合,并且进一步,其中所述肿瘤相关抗原选自由AFP、ALK、BAGE蛋白、β-链蛋白、bcr-abl、BRCA1、BORIS、CA9、碳酸酐酶IX、半

胱天冬酶-8、CD20、CD40、CDK4、CEA、CLEC12A、cMET、CTLA4、周期素B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE蛋白(如GAGE-1、-2)、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IGF1R、LGR5、LMP2、MAGE蛋白(如MAGE-1、-2、-3、-4、-6和-12)、MART-1、间皮素、ML-IAP、Muc1、Muc16(CA-125)、MUM1、NA17、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PDGFR- α 、PDGFR- β 、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA(FOLH1)、RAGE蛋白、Ras、RGS5、Rho、SART-1、SART-3、Steap-1、Steap-2、存活素、TAG-72、TGF- β 、TMPRSS2、Tn、TNFRSF17、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、和尿路上皮特异蛋白-3组成的组。

[0050] 在其中一些实施例,所述抗体或抗原结合片段具有从上述抗体改变而来的氨基酸序列,但保持能与所述肿瘤相关抗原结合的能力。当与母序列进行比较时,此种改变的抗体和抗体片段可以包含一个或多个氨基酸附加部分、删除部分或替换部分,但表现的生物活性基本与所述抗体相当。

[0051] 两个偶联物被认为是生物等效的,如果,譬如它们为等效药物或可相互替代药物,当在相似实验条件、且给予相同的摩尔剂量下,要么单一剂量,要么多剂量,其吸收率和吸收程度未呈现显著差异。一些偶联物将被认为是等效药物或可相互替代药物,如果它们在吸收程度上相当而非吸收率,则也可认为是生物等效的,因为此种差异在吸收率方面是潜在的,并在标记中体现,对于成就有效的体内药物浓度并非必要的,如长期用药,所述药物产品研究在医学上被认为是无关紧要的。

[0052] 在其中一个实施例,两个偶联物是生物等效的,如果它们在安全性、纯度和效能方面没有临床意义上的差异。

[0053] 在其中一个实施例,两个偶联物是生物等效的,如果患者可以在参照产品和生物制品之间切换给药一次或多次,其与继续治疗但未进行切换给药患者相比,未表现预期增加的副反应风险,包括免疫原性临床意义改变,或效力减弱。

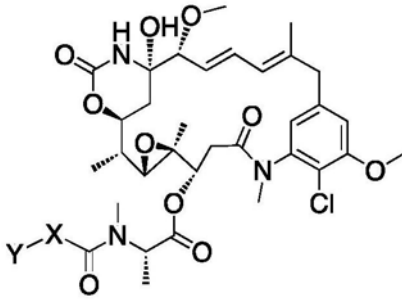
[0054] 在其中一个实施例,两个偶联物是生物等效的,如果它们均通过共性机理或作用机制作用于病症或病症治疗,某种程度上,所述机理或机制是已知的。

[0055] 生物等效性可以通过体内或体外测试方法来证明。生物等效性测试方法包括,如(a)一种人或其他哺乳类动物体内试验,根据时间,通过在血液、血浆、血清或其他生物流体中检测偶联物或其代谢产物浓度;(b)一种体外试验已被关联并可合理预测人体内生物利用度数据;(c)一种人或其他哺乳类动物体内试验,根据时间来检测偶联物(或其靶子)适当的急性药理作用;和(d)在良好控制的临床试验中,建立偶联物的安全性、有效性、或生物利用度、或生物等效性评价体系。

[0056] 本发明还提供一种新的制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法:

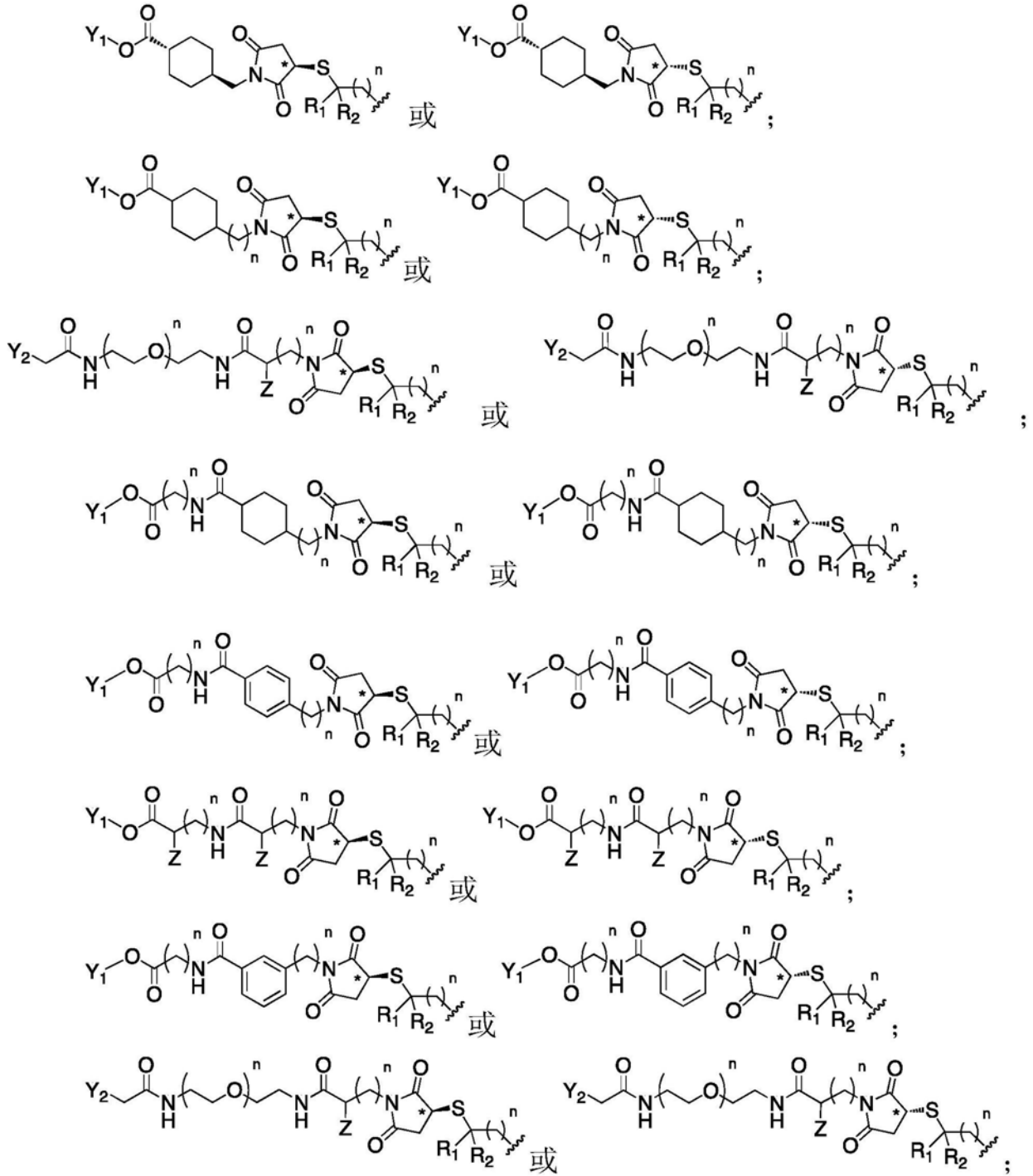
I

[0057]

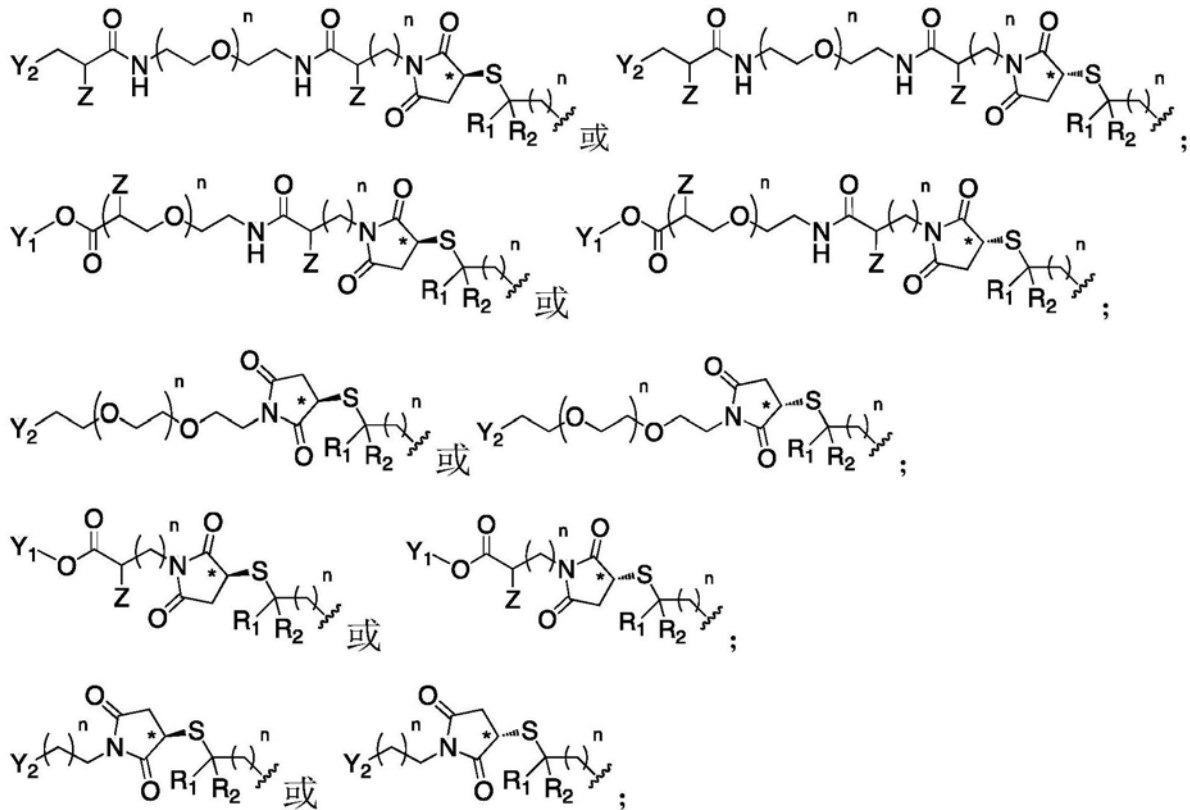


[0058] 其中,X是:

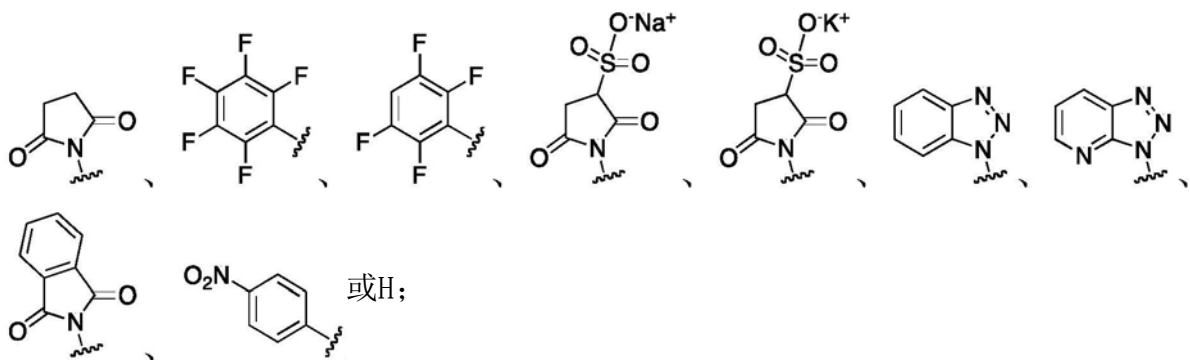
[0059]



[0060]

[0061] Y 代表 Y_1 或 Y_2 ,其中[0062] Y_1 是:

[0063]

[0064] Y_2 是 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、或 ;[0065] R_1 和 R_2 各自独立地选自H或烷基;[0066] 各 n 是0或1至50的任一整数;和

[0067] 其中,所述组合物中药物分子包含至少两个非对映异构体的混合物,所述两个非对映异构体为第一非对映体和第二非对映体,所述第一非对映体和第二非对映体是相同的,除非所述第一和第二非对映体在X所代表子结构式中同一个手性碳原子具有不同的立体化学构型,并以(*)体现,其中所述手性碳原子是与硫原子相连的碳原子,所述第一和第二非对映体的非对映异构体过量大于50%,

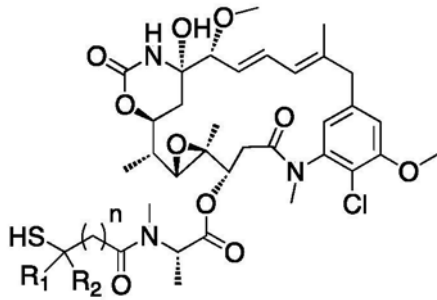
[0068] 所述方法包括:

[0069] (a) 提供一种混合物包含

[0070] (i) 式III所示的起始物料:

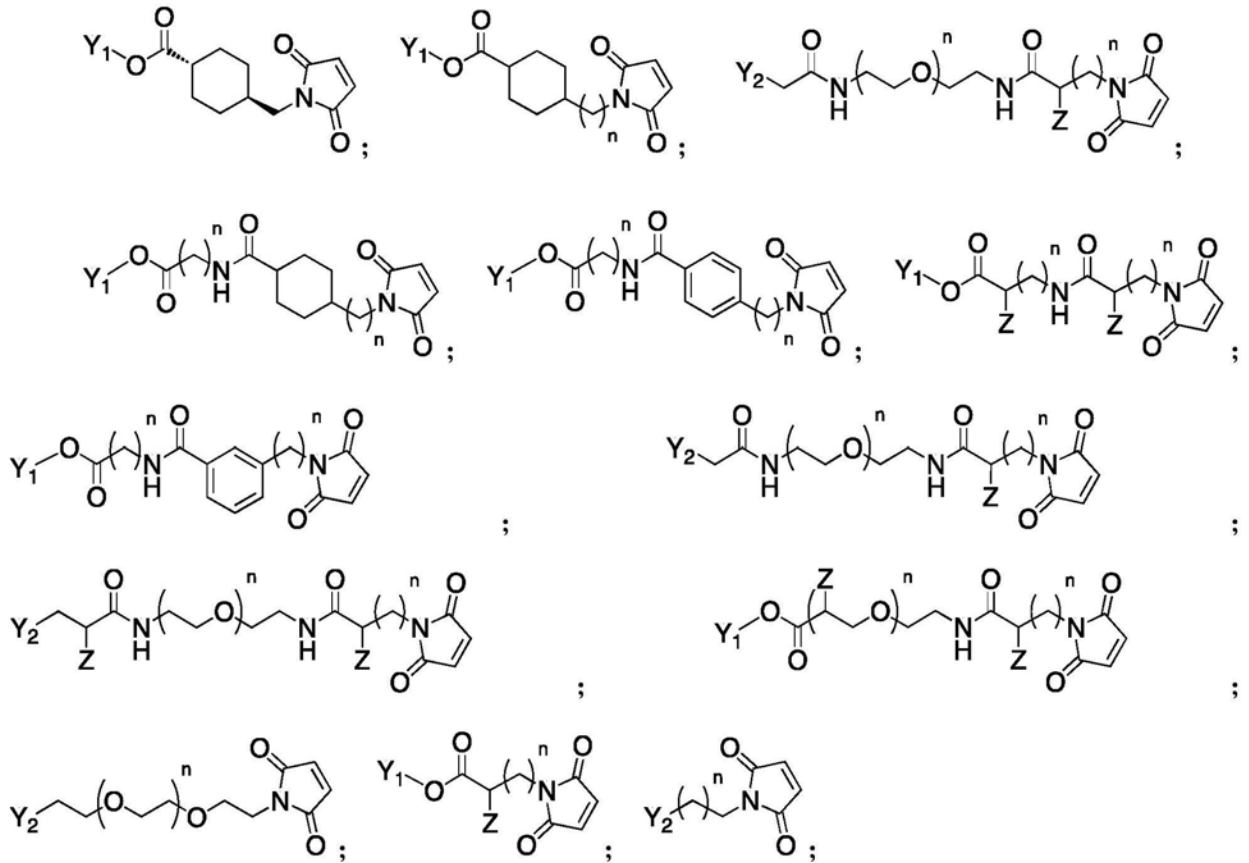
III

[0071]



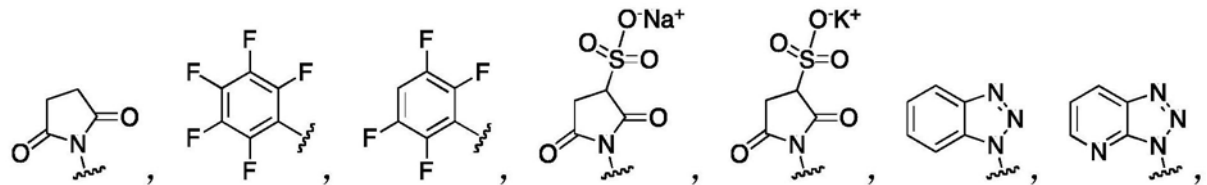
[0072] (ii) 式IV所示的其中之一化合物:

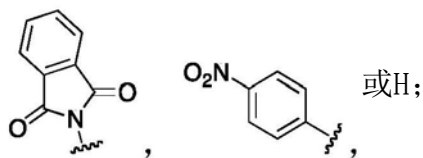
[0073]

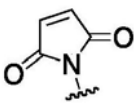


[0074] Y₁是:

[0075]





[0076] Y_2 是-Cl、-Br、-I、或  ;

[0077] Z是H或SO₃H;

[0078] R₁和R₂各自独立地选自H或烷基;和

[0079] 各n是0或1至50的任一整数;

[0080] (iii) 一种有机溶剂,

[0081] (iv) 水,和

[0082] (v) 一种固体底物;

[0083] (b) 使步骤(a)中所述混合物进行反应,直至一些起始物料转化为式I所示化合物;
和

[0084] (c) 从步骤(b)所得混合物中分离得到式I所示化合物的粗品。

[0085] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,所述方法进一步包括步骤(d),其中步骤(d)包括纯化上述步骤(c)所得式I所示化合物。

[0086] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,所述固体底物选自由硅胶、寅式盐、氧化铝、沸石、和压碎分子筛组成的组。其他固体底物也可以使用只要所述固体底物允许式III所示大环内酯类化合物适当定位,从而允许式IV所示马来酰胺立体选择地附加。

[0087] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,n是1,R₁和R₂各自独立地为氢。

[0088] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,所述有机溶剂包含一种极性非质子溶剂,如DMF、DMA、HMPT、NMP、乙腈、二氧六环、丙酮、DMSO、THF、乙酸乙酯、乙酸甲酯、二氯甲烷、碳酸丙烯酯、或其混合物。

[0089] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,所述极性非质子溶剂包括乙腈。

[0090] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,所述有机溶剂和所述水的比例约为1:1至4:1或约为1:1至10:1。

[0091] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,式III所示起始物料和式IV所示化合物的摩尔比约为1:1至1:3。

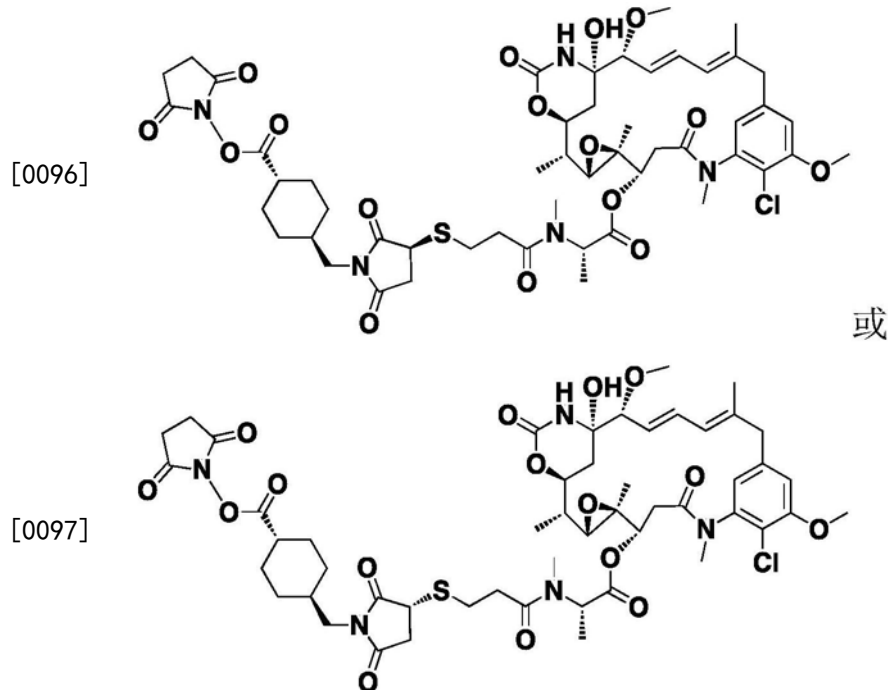
[0092] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,进一步包含式I所示化合物与一种抗体或其抗原结合片段相结合形成抗体-药物偶联物。

[0093] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,式I所示化合物是通过S、O或NR₃与所述抗体或其抗原结合片段相连接。

[0094] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其中,所述组合物中式I所示药物分子,其非对映异构体过量约为60%、70%、80%、90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。

[0095] 在其中一些实施例,本发明所述制备包含多个式I所示药物分子的组合物的方法,其药物分子具有如下结构:



[0098] 其非对映异构体过量大于50%。尽管本发明组合物典型的制备方法已在制备实施例中陈述,但其他可预期的方法也属于本发明范围,如色谱分离消旋混合物或非对映体混合物(如HPLC在正相、反相或手性固定相使用非质子溶剂混合物进行分离等等)。

[0099] 本发明还涉及一种组合物,包含治疗有效量的式I所示药物分子或式II所示配体-药物偶联物,其还进一步包含药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

[0100] 在其中一个实施例,本发明所述包含多个式II所示配体-药物偶联物的组合物,其还进一步包含治疗有效量的第二种化学治疗剂。

[0101] 在其中一些实施例,本发明所述包含式(I)和/或式(II)所示化合物的组合物,可以与一种或多种附加化合物或治疗剂联用。联合给药和组合治疗并不限于同时给药、分开或一起给药,也包括顺序给药。

[0102] 联合给药包括单个药物剂量剂型给药,所述药物剂量剂型包含一种含有一个或多个式(I)和/或式(II)所示化合物和一个或多个其他治疗剂的组合物;也包括一种含有一个或多个式(I)和/或式(II)所示化合物和一个或多个其他治疗剂,以其自己分开的药物剂量剂型形式的组合物给药。例如,一种组合物包含式(I)和/或式(II)所示化合物,和一种细胞毒类药物,一种化学治疗剂,或一种生长抑制剂,可以一起以单个剂量组合物如组合剂型对患者进行给药,或每一种药物/治疗剂可以以分开的剂量剂型对患者进行给药。其中分开的剂量剂型应用,含有一个或多个式(I)和/或式(II)所示化合物和一个或多个附加治疗剂的组合物可以同时或分开进行交错给药,如顺序给药。

[0103] 本发明所述附加治疗剂包括但不限于,细胞因子抑制剂(如白介素-1(IL-1)抑制剂,诸如利洛纳塞或阿那白滞素,小分子IL-1拮抗剂,或抗IL-1的抗体);IL-18抑制剂(诸如小分子IL-18拮抗剂或抗IL-18的抗体);IL-4抑制剂(诸如小分子IL-4拮抗剂,抗IL-4的抗

体或抗IL-4受体的抗体);IL-6抑制剂(诸如小分子IL-6拮抗剂,抗IL-6的抗体或抗IL-6受体的抗体);阿司匹林;NSAIDs;甾体(如强的松、甲氨蝶呤等);低剂量环孢霉素A;肿瘤坏死因子(TNF)或TNF受体抑制剂(如小分子TNF或TNFR拮抗剂或抗-TNF或TNFR的抗体);尿酸合成抑制剂(如别嘌醇);尿酸排泄促进剂(如丙磺舒、磺吡酮、苯溴马隆等);其他炎性抑制剂(如半胱天冬酶-1抑制剂、p38抑制剂、IKK1/2抑制剂、CTLA-4Ig抑制剂等)和/或糖皮质激素。所述附加治疗剂可以先于、同时或后于一个或多个式(I)和/或式(II)所示化合物进行给药(基于本发明目的,此种给药方案被认为是一个或多个式(I)和/或式(II)所示化合物与一种治疗剂联合给药。

[0104] 本发明所使用术语“细胞毒类药物”是指一种物质可以抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏。该术语适用于包括放射性同位素(如 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 和 Re^{186}),化学治疗剂,和毒素类诸如细菌性、真菌性、植物或动物来源的酶促活性毒素、或其碎片。

[0105] 术语“化学治疗剂”是指一种化学化合物用于治疗癌症。化学治疗剂的实例包括烷基化药物如噻替派和环磷酰胺(CYTOXAN®);烷基磺酸盐类如白消安、英丙舒凡和噻消安;氮杂环丙烷如苯佐替派、卡波醌、美妥替派、和乌瑞替派;乙亚胺类和和甲基三聚氰胺类包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺;氮芥类如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲类如卡氮芥、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素类如阿克那霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素、卡里奇霉素、carabycin、洋红霉素、嗜癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素类、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物类如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物如环胞苷、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、氟脲己胺、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素类如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素类如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充物如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;阿莫司汀;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;秋水仙胺;地吡醌;鸟氨酸;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;硝氨丙吡啶;喷司他丁;苯来美特;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙酰肼;甲苄肼;PSK®;雷佐生;西佐喃;锳螺胺;菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌血生;gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷类如紫杉醇(TAXOL®,百时美施贵宝肿瘤科,普林斯顿,N.J.)和多西他赛(TAXOTERE®,安万特,法国)苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫代鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物如顺铂和卡铂;长春花碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;去甲长春碱;米托蒽醌;替尼泊苷;柔红霉素;氨蝶呤;卡培他滨;伊班磷酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸;esperamicins;卡培他滨;和上述所述各药物药学上可接受的盐、酸或其衍生物。该术语亦包含抗激素药物,通过调节或抑

制激素对肿瘤的作用来起效,包括如三苯氧胺、雷洛昔芬、芳香酶抑制剂4(5)-咪唑类、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY 117018、奥那司酮、和托瑞米芬(法乐通);和抗雄激素类药物如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林、和戈舍瑞林;和上述各药物药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0106] 本发明所述“生长抑制剂”是指化合物或组合物在体内或体外可抑制细胞生长,尤其是肿瘤细胞。所述生长抑制剂的实例包括阻止细胞周期进程的药物(在某个位点除了S相),所述药物包括G1阻止和M-相阻止。经典M-相阻滞剂包括长春花属(长春新碱和长春花碱),TAXOL®,和拓扑异构酶II抑制剂如阿霉素、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷、和博来霉素。所述药物可阻止G1,同时也外溢阻止S-相,例如,DNA烷基化药物诸如三苯氧胺、强的松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、和阿糖胞苷。

[0107] 本发明还提供一种药物组合物,所述组合物包含一种治疗有效量的活性成分和药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的”是指获美国联邦政府或州政府法规机构批准,或美国药典、或一般公认药典收录用于哺乳类动物、尤其是人类治疗。术语“载体”是指稀释剂、辅剂、赋形剂、或媒介物与治疗剂一起给药。所述药用载体可以是无菌的液体,如水和油,包括石油、动物油、植物油或人造油,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、粉笔、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。所述组合物,若有必要,也可以包含少量润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。所述组合物可以表现为溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释剂型等。所述组合物可以与传统粘合剂和载体如甘油三酯制成栓剂。口服剂型可以包括标准载体如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药用载体实例已由E.W.Martin在“Remington's Pharmaceutical Sciences”中有详细描述。

[0108] 在其中一个实施例,所述组合物可以参照作为药物组合物并适用于人类静脉给药的常规方法配制得到。必要时,所述组合物也可以包括增溶剂和局部麻醉剂,如使用利多卡因来减轻注射部位疼痛。所述组合物可以通过灌注给药,其可以避免使用含有无菌药用级水或盐的灌注瓶。所述组合物也可以注射给药,装有一安瓿无菌水用于注射,盐亦可提供以便在给药前各成分可以混合均匀。

[0109] 本发明所述活性成分可以制成中性或盐的形式。药学上可接受的盐包括盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等与游离氨基基团所形成的盐,和钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等与游离羧基基团所形成的盐。

[0110] 本发明所述活性成分的用量,可以有效治疗相关医学病症,并可以通过基于本发明所述标准临床技术来确定。另外,体外试验也可用来帮助确定最佳剂量范围。应用于制剂的准确剂量同样取决于给药途径和病症严重程度,可根据职业医生的判断和每一患者情况来决定。无论怎样,静脉给药的合适剂量范围一般约为0.5至20毫克活性化合物每公斤体重。经鼻给药的合适剂量范围一般约为0.01pg/kg体重至1mg/kg体重。有效剂量可以通过体外动物模型检测系统的剂量反应曲线来外推得到。

[0111] 在其中一个实施例,本发明提供一种治疗个体医学紊乱方法,所述个体正在遭受医学紊乱病症,包含给予所述个体含有有效量的式(I)和/或式(II)所示化合物的组合物,进一步包含对所述个体顺序或连续施以附加疗法,或给予至少一种附加治疗剂。

[0112] 在另一实施例,本发明涉及一种对所述方法敏感的治疗疾病方法,所述方法包含对需要不经肠道进行给药的患者,施以含有式 (I) 和/或式 (II) 所示化合物的治疗有效剂量的组合物。

[0113] 本发明进一步包括使用本发明任一组合,用于制备药品来治疗、减轻、和/或改善医学疾病或病症的用途,所述组合物含有式 (I)、式 (II)、式 (i)、式 (ii) 所示化合物或其组合,和/或它们的药物制剂。

[0114] 本发明进一步包括使用本发明任一组合,用于制备药品来治疗、减轻、和/或改善肿瘤的用途,所述组合物含有式 (I)、式 (II)、式 (i)、式 (ii) 所示化合物或其组合,和/或它们的药物制剂。

[0115] 本发明所列举实例主要与抗增殖性疾病相关,如癌症,本发明所述组合物可预期地用于治疗选自自身免疫性疾病和其它免疫性疾病和功能障碍、炎性疾病、传染性疾病、神经退行性疾病、骨疾病、和心血管疾病的医学疾病、病症。并且,任何疾病、病症均可通过靶向给药给予毒物质作用于细胞、细胞种型、组织和/或器官来获益,且均属于本发明范围。

[0116] 最后,本发明所列举实例可以包括含有式 (I) 和式 (2) 所代表化合物的混合物的组合物。

[0117] 与本发明下述所列举实例相关的文献应被考虑为本发明原则性的解释和说明。并且,许多修饰和改变对本领域技术人员而言是显而易见的,因此其不能限制本发明仅为本发明所公开的结构或方法。据此,所有合适修饰物和等同物均落入本发明和本发明权利要求书所公开的范围。


[0118] 本发明说明书及权利要求书所使用术语“包含”或“包括”,适用于指定已陈述的特征、整数、组份或步骤的具体存在形式,但并不排除其他一个或多个附加的特征、整数、组份或步骤。

[0119] 本发明所列举任一实施例中使用的一般术语可以参见下述定义;但其陈述的含义并不能理解为限制所述术语定义的范围。

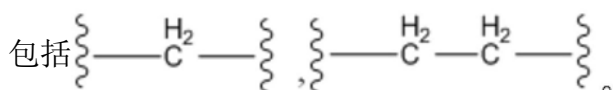
[0120] 本发明所使用术语“偶联物”是指具有配体、连接体和生物活性分子的化合物。例证性实例包括式 (II) 所示化合物。

[0121] 本发明所使用术语“间隔区”是指化学构建模块的连接体在空间上将配体和生物活性分子分离,并允许连接体在细胞内分解代谢。

[0122] 本发明所使用术语“大环类酯”是指具有大环内酯环的任何生物活性分子。

[0123] 符号  表示连接点。

[0124] 本发明所使用术语“烷基”是指具有直链、支链或其组合的碳氢化合物原子团。烷基原子团可以是一价、二价或环原子团。一价烷基原子团的实例包括甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、新戊基、己基、异己基等。二价烷基原子团实例



[0125] 环烷基原子团实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。典型烷基原子团具有1至10个碳原子,1至9个碳原子,1至8个碳原子,1至7个碳原子,1至6个碳原子,1至5个碳原子,1至4个碳原子,1至3个碳原子,1至2个碳原子或1个碳原子。典型的环烷基是3至7原子组成的单环原子团。

[0126] 本发明所使用术语“药学上可接受的盐”是指本发明所述偶联物和化合物的有机盐和无机盐,如式(I)和式(II)所示化合物。所述药学上可接受盐包括硫酸盐、柠檬酸盐、硝酸盐、磷酸盐、抗坏血酸盐、氢溴酸盐、葡糖酸盐、苯甲酸盐、草酸盐、泛酸盐等等。应知本发明所述药学上可接受的盐,其结构可以包括一个或多个带电原子,和一个或多个反荷离子。将本发明偶联物和化合物制备成药学上可接受的盐是本领域公知常识。

[0127] 本发明所使用术语“配体”是指任何分子或化合物特定或选择性地与第二种分子或化合物作用和/或结合。在其中一些实施例,所述配体是抗体或其抗原结合片段。在另一些实施例,所述本发明所使用合适配体包括,如寡核苷酸适配子,特定与所述抗原相作用的多肽类(如肽体),受体分子,和抗原结合骨架(如DARPs、HEAT重复蛋白、ARM重复蛋白、肽重复序列结构蛋白、和其它基于天然存在重复蛋白骨架等[see, e.g., Boersma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857, and references cited therein])。

[0128] 抗体以完整的免疫球蛋白或以各种肽酶消化产生的良好片段存在,例如当二硫键在铰链区,胃蛋白酶消化抗体从而产生 $F(ab)'_2$, Fab二聚体,其为通过二硫键与 V_H-C_H 连接的轻链。所述 $F(ab)'_2$ 可以通过在温和条件下使在铰链区的二硫键断裂来减少,从而将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化为Fab'单体。所述Fab'单体基本为带有部分铰链区的Fab。各种抗体片段亦包含在术语完整抗体消化的定义中,本领域技术人员知悉所述片段可以通过化学或DNA重组方法学重新合成得到。因此,本发明所使用术语抗体,也包括抗体片段,所述抗体片段可通过修饰完整抗体或采用DNA重组方法学重新合成得到(如单链Fv(scFv)单变量(Dabs)),或从一些被认证使用陈列图书馆如噬菌体E.coli或酵母陈列图书馆处获得(参见McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554)。

[0129] 所述抗体的制备方法是本领域公知的(参见Kohler&Milstein(1975) *Nature* 256:495-497; Harlow&Lane (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y.)。所述抗体是从生物体、但非人体中分离得到,生物体如小鼠、大鼠、兔子、牛,可以通过嵌合化或人源化尽量与人体保持相似。

[0130] 本发明所使用术语“人源抗体”包括具有源自人免疫球蛋白序列多变的和恒定区域的抗体。本发明所述人mAbs可以包括未通过人免疫球蛋白序列进行编码的氨基酸残基(如突变通过体外随机或特定位点突变发生,或体内的体细胞突变产生的),如在CDRs和特定的CDR3中。而本发明所使用术语“人源抗体”不包括已被嫁接至人FR序列上的mAbs,其中的CDR序列,源自另一哺乳类动物种群的生殖细胞株。

[0131] 本发明所使用术语“治疗有效量”是指所用量在治疗中可产生理想效果。准确用量将取决于治疗目的,并且本领域技术人员可通过公知技术来确定(参见Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*)。

[0132] 本发明所使用术语“外消旋体”是指一对对映异构体的等摩尔分数混合物。术语外消旋体也可指一种外消旋混合物。

[0133] 本发明所使用术语“对映异构体”是指化合物彼此之间不可重叠,并互成镜像关系。对映异构体可以(R)或(S)构型存在。

[0134] 术语“立体选择合成”是指通过化学反应可形成单一立体异构体或从两个或多个可能的立体异构体中得到对映异构体富集的异构体混合物。

[0135] 术语“非对映异构体过量”是指在一种组合物中,想要得到的单个非对映异构体的摩尔分数,与剩下非对映异构体摩尔分数相比,两者之间的差异。非对映异构体过量计算方式如下:

[0136] (单一非对映异构体的量) - (其他非对映异构体的量) / 1 例如,一种组合物含有 90% 的 1 和 10% 的 2、3、4 或其混合物,则非对映异构体过量为 80% $[(90-10)/1]$ 。一种组合物含有 95% 的 1 和 5% 的 2、3、4 或其混合物,则非对映异构体过量为 90% $[(95-5)/1]$ 。一种组合物含有 99% 的 1 和 1% 的 2、3、4、或其混合物,则非对映异构体过量为 98% $[(99-1)/1]$ 。任一 1、2、3 或 4 的非对映异构体过量可通过上述近似方法计算得到。

[0137] 本发明所使用术语“立体异构体纯”是指一种化合物,其中所指立体异构体相较于该化合物的其它立体异构体,某种程度上存在更多,例如化合物存在非对映异构体过量。在其中一些实施例,本发明所述立体异构体纯化化合物,其中之一的立体异构体含有重量 80% 或更多、85% 或更多、90% 或更多、95% 更多、或 97% 或更多。

[0138] 根据本发明所列举各种实例的偶联物,可以通过本领域任何已知的方法制备得到。用于制备偶联物的例证性方法参见下述具体实施例。

[0139] 在其中一个实施例,所述偶联物可以通过 i) 配体与式 (I) 所示药物分子反应得到式 (II) 所示偶联物,和 ii) 纯化所述偶联物。

[0140] 在另一实施例,所述偶联物是通过配体、连接体和生物活性分子一锅反应制备得到。一旦参照本发明制备方法得到的偶联物,均可进一步纯化。

[0141] 在其中一个实施例,本发明所述包含式 (I) 所示药物分子的组合物和/或包含式 (II) 所示偶联物的组合物,可以通过体外它们抑制各种肿瘤细胞株增殖试验来评价其功效。例如,包含式 (I) 所示药物分子的组合物和/或包含式 (II) 所示偶联物的组合物可以应用已知方法,对体外镀癌细胞试验中预定的天数和存活细胞数进行测定。

[0142] 上述说明书内容、实例和数据提供了一个完整的本发明组合物制备和用途的描述。在未偏离本发明精神和范围的前提下,本发明所述实例均可制备实现,本发明权利要求内容附于下文中。

[0143] 本发明及实施例引用所有文献,包括专利文献、已公开的专利申请和参考文献,均清楚地合并、共用参考。

[0144] 下面描述内容和实施例用于例证本发明内容。本领域技术人员应认识到,此处所提供的实施例仅以实例来例证本发明内容,但绝不应限制本发明范围。

[0145] 此处公开实例是通过下述非限制性实施例来更详细地阐明本发明内容。

[0146] 附图简要说明

[0147] 图 1 表示美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧基琥珀酸酯 (5) 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。所述 $^1\text{H-NMR}$ 谱图与以非对映异构体过量至少为 95% 的单一非对映体存在时保持一致,因其波谱未受其它非对映体所产生噪音的影响。(用于比较目的的非对映体混合物中实施例 2 所呈现的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图)。

[0148] 图 2 表示美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧基琥珀酸酯的非对映体混合物 (6) 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。

[0149] 图 3 表示在 SKBR3 细胞中,单一非对映体化合物偶联 HER2-5 (体外和体内组) 的 IC₅₀ 值 0.3nM,与非对映体混合物偶联 HER2-6 的 IC₅₀ 值 0.9nM 之间的对比。

[0150] 图4表示在BT474细胞中,单一非对映体化合物偶联HER2-5(体外)的IC₅₀值4.6nM和偶联HER2-5(体内)组的IC₅₀值4.0nM,与非对映体混合物偶联HER2-6的IC₅₀值11.6nM之间的对比。

[0151] 图5表示在NCI-N87细胞中,单一非对映体化合物偶联HER2-5(体外)的IC₅₀值0.6nM和偶联HER2-5(体内)组的IC₅₀值0.4nM,与非对映体混合物偶联HER2-6的IC₅₀值1.0nM之间的对比。

[0152] 图6表示在HEK293/hEGFRvIII细胞中,单一非对映体化合物偶联EGFRvIII-5的IC₅₀值为0.4nM,而非对映体混合物偶联EGFRvIII-6的IC₅₀值为0.5nM。

[0153] 图7表示在MMT/hEGFRvIII细胞中,单一非对映体化合物偶联EGFRvIII-5的IC₅₀值为0.5nM,而非对映体混合物偶联EGFRvIII-6的IC₅₀值几乎高于20倍,为9.8nM。

[0154] 图8表示在U251/hEGFRvIII细胞中,单一非对映体化合物偶联EGFRvIII-5的IC₅₀值为2.4nM,而非对映体混合物偶联EGFRvIII-6的IC₅₀值为3.3nM。

[0155] 图9表示在人卵巢癌细胞-3细胞中,单一非对映体化合物偶联MUC16-5的IC₅₀值为6.3nM,而非对映体混合物偶联MUC16-6的IC₅₀值为16.0nM。

[0156] 图10表示在PC3/MUC16长细胞中,单一非对映体化合物偶联MUC16-5的IC₅₀值为0.34nM,而非对映体混合物偶联MUC16-6的IC₅₀值为0.80nM。

[0157] 图11表示按剂量给予小鼠HER2-5和对照试剂,其肿瘤生长曲线。小鼠接受PBS媒介(■),300ug/kg DM1-SMe(●)和15mg/kg同种型对照mAb(▼)。小鼠同样也接受HER2mAb(▲),HER2-5(△)和剂量为1mg/kg(A)的同种型对照-5(▽),5mg/kg(B)和15mg/kg(C)。小鼠接受3每周一次剂量的偶联物和对照药物,并以黑色箭头标出(↑.组别N=8,Mean±SE.)。

[0158] 图12表示按剂量给予小鼠HER2-5和对照试剂,在PBS媒介控制组,第79天肿瘤移植后,其肿瘤体积的改变。个体肿瘤大小在每一剂量组体现。小鼠接受PBS媒介(■),300ug/kg DM1-SMe(●)和15mg/kg(▼)同种型对照mAb。小鼠同样接受HER2mAb(▲),HER2-5(△)和剂量为1mg/kg(A)的同种型对照-5(▽),5mg/kg(B)和15mg/kg(C)。组别N=8,Mean±SD。

[0159] 图13表示按剂量给予HER2-5和对照试剂,其动物体重变化百分比。小鼠接受PBS媒介(■),300ug/kg DM1-SMe(●)和15mg/kg(▼)同种型对照mAb。小鼠同样接受HER2mAb(▲),HER2-5(△)和剂量为1mg/kg(A)的同种型对照-5(▽),5mg/kg(B)和15mg/kg(C)。小鼠接受3周且每周一次剂量的偶联物和对照药物,并以黑色箭头标出(↑.组别N=8,Mean±SE.)。

实施例

[0160] 具体实施例

[0161] 质子NMR波普(对于那些无法使用UV检测的化合物)为Varian Inova300MHz仪器,而质谱则集中为Agilent 1100系列LC/MSD电喷雾电离源和四极离子阱的分析仪器。本发明所有偶联物均采用Bruker ultraFleXtreme MALDI-TOF-TOF质谱进行分析。除非另有说明,本发明所有起始物料和溶剂均为商业采购获得,且未进行纯化。

[0162] 实施例1

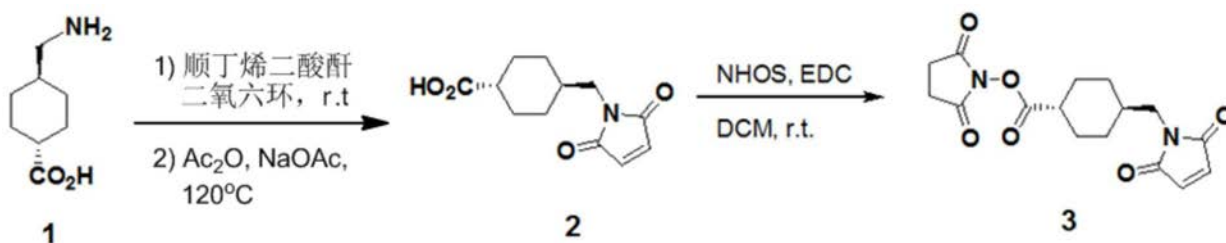
[0163] 马来酰亚胺基甲基-4-反式-环己基羧基-琥珀酸酯 (3): 马来酰亚胺基-4-反式-环己烷羧酸 (2) 的合成: 标题化合物可采用Marnett等人描述的各种修饰方法 (J. Med. Chem., 1996, 39, 1692-1670), 通过两步反应 (步骤A和步骤B) 制备得到。

[0164] 步骤A: 将反式-4-氨基甲基环己烷羧酸 (7.00g, 44.5mmol) 溶于1,4-二氧六环 (70mL), 后加入顺丁烯二酸酐 (4.89g, 49.9mmol), 并室温下搅拌反应48h。所得反应物减压蒸馏得到白色固体, 无需进一步纯化, 可直接用于下一步反应。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ 9.11 (m, 1H), 6.44 (d, 1H, J=13Hz), 6.24 (d, 1H, J=13Hz), 3.05 (t, 2H, J=6Hz), 2.13 (tt, 1H, J=12Hz, 4Hz), 1.90 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.44 (m, 1H), 1.28 (m, 2H), 0.96 (m, 2H)。

[0165] 步骤B: 步骤A所得马来酰胺酸 (36.8g, 144mmol) 和醋酸钠 (13.6g, 165mmol) 一起溶于乙酸酐 (368mL), 密封于玻璃反应器中, 加热至120°C反应3小时。冷却后的反应混合物 (黑色浆状物) 加入水 (3L), 搅拌反应, 并用二氯甲烷萃取。有机相用Na₂SO₄干燥, 玻璃漏斗过滤, 所得澄清滤液减压蒸馏和干燥, 得到目标化合物为黄色固体 (7.00g, 20%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 6.73 (s, 2H), 3.40 (d, 2H, J=7Hz), 2.28 (m, 1H), 2.06 (m, 2H), 1.75 (m, 3H), 1.42 (m, 2H), 1.03 (m, 2H)。

[0166] 马来酰亚胺基甲基-4-反式-环己基羧基-琥珀酸酯 (3): 步骤B所得化合物 (10.0g, 42.1mmol) 在Ar气氛下溶于二氯甲烷 (50mL), 后加入N-羟基琥珀酰亚胺 (7.27g, 63.2mmol) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDAC, 12.4g, 64.5mmol), 在室温下反应过夜。所得棕色溶液用二氯甲烷稀释, 并用水洗和盐洗, Na₂SO₄干燥, 玻璃漏斗过滤, 所得滤液减压浓缩并干燥。后得到产物溶于热的乙酸乙酯, 并加入活性炭 (1.5g) 处理, 冷却过滤。所得滤液。所得晶型产物过滤, 并用冷的乙酸乙酯洗涤, 抽滤干燥, 得到标题化合物为黄褐色固体 (5.52g, 39%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 6.72 (s, 2H), 3.42 (m, 2H), 2.85 (br s, 4H), 2.56 (tt, 1H, J=12Hz, 4Hz), 2.18 (m, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.70 (m, 1H), 1.56 (m, 2H), 1.09 (m, 2H)。

[0167]



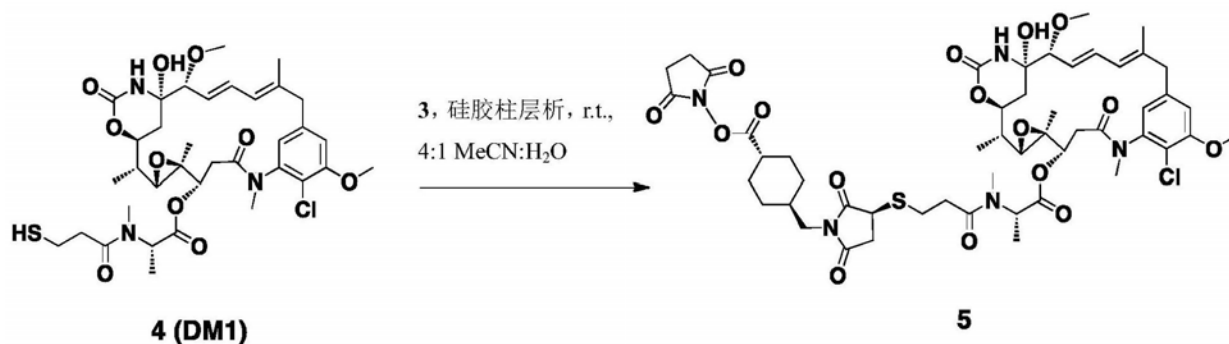
[0168] 实施例2

[0169] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰胺-3-硫醇 (4): 标题化合物公知名称为DM1, 其各种修饰制备方法参见Whitesides et al. (J. Org. Chem., 1991, 56, 2648-2650)。将美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-(3-甲基二磺酰基)丙酰胺 (DM1-SMe, 2.42g, 3.09mmol, prepared in a manner similar to Ho and Carrozzella, U.S. Pat. Appl. 2007/0037972A1) 溶于乙腈 (30mL), 加入三(2-羧乙基)磷化氢盐酸盐 (8.23g, 28.7mmol) 与水 (30mL) 的溶液, 加入饱和NaHCO₃溶液 (5mL) 调节pH值至3, 反应烧瓶通Ar气净化, 在室温下并采用橡胶隔片 (排放气泡) 搅拌反应。2小时后, 向反应物中加入饱和食盐水 (ca. 100mL), 冲Ar气5分钟 (赶走游离的甲硫醇), 分层。水相用乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取两次, 加入NaCl使其饱和, 再次使用EtOAc萃取至少两次。合并有机相用Na₂SO₄干燥, 过滤, 所得滤液减压浓缩并干燥, 得到标题化合物为白色固体 (2.24g, 98%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ 6.76 (d, 1H, J=1.5Hz), 6.63 (d, 1H, J

=11Hz), 6.59 (d, 1H, J=1.5Hz), 6.35 (m, 2H), 5.59 (dd, 1H, J=15Hz, 9Hz), 5.36 (q, 1H, J=6.5Hz), 4.68 (dd, 1H, J=12Hz, 3Hz), 4.21 (t, 1H, J=10Hz), 3.92 (s, 3H), 3.60 (d, 1H, J=13Hz), 3.42 (d, 1H, J=9Hz), 3.29 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 3.05 (d, 1H, J=13Hz), 2.95 (d, 1H, J=10Hz), 2.77 (s, 3H), 2.75-2.47 (m, 6H), 2.11 (dd, 1H, J=14Hz, 3Hz), 1.58 (s, 3H), 1.47 (d, 1H, J=14Hz), 1.40 (m, 1H), 1.22 (m, 6H), 0.73 (s, 3H)。MS (ESI, pos.): 计算 $C_{35}H_{48}ClN_3O_{10}S$, 737.3; 发现有738.3 (M+H), 720.3 (M-H₂O+H)。

[0170] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧基琥珀酸酯 (5): 下述合成方法为新的非公知的方法。将前述步骤所得产物 (4, 2.23g, 3.02mmol) 和马来酰亚胺基甲基-4-反式-环己基羧基-琥珀酸酯 (3, 1.50g, 4.49mmol) 溶于4:1乙腈/水 (75mL), 并用良好硅胶制备TLC板处理并刮板 (11.2g), 烧瓶冲Ar气净化, 所得混合物于室温并在橡胶隔片存在下搅拌反应18小时后, 加入过量的化合物3 (0.77g, 2.3mmol) 和乙腈 (MeCN, 10mL), 继续搅拌反应6小时。所得混合物硅藻土过滤, 得到固体用MeCN和乙酸乙酯 (EtOAc) 洗涤, 滤液减压浓缩得到金黄色固体, 并进一步采用填充有120g硅胶管的闪光柱色谱分离纯化 (50-100% 1:1EtOAc/MeCN和二氯甲烷, 分离33min, 75mL/min)。减压蒸馏并干燥纯的色谱层析所得溶液, 得到标题化合物为奶油色固体 (2.09g)。浓缩色谱层析不纯溶液, 并使用80g硅胶柱再次纯化, 得到另一批奶油色固体 (0.22g), 总共得到标题化合物2.31g (71%)。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ6.85 (d, 1H, J=4Hz), 6.72 (m, 1H), 6.65 (d, 1H, J=4Hz), 6.44 (dd, 1H, J=15Hz, 11Hz), 6.25 (s, 1H), 5.67 (dd, 1H, J=16Hz, 9Hz), 5.41 (m, 1H), 4.79 (d, 1H, J=11Hz), 4.30 (t, 1H, J=11Hz), 3.72 (m, 2H), 3.51 (d, 1H, J=9Hz), 3.37 (m, 4H), 3.27 (m, 1H), 3.23 (s, 3H), 3.16-2.99 (m, 4H), 2.85 (m, 7H), 2.62 (m, 3H), 2.39 (ddd, 1H, J=19Hz, 12Hz, 4Hz), 2.18 (br m, 2H), 1.77 (br m, 3H), 1.66 (s, 3H), 1.60-1.47 (m, 4H), 1.31 (m, 6H), 1.05 (m, 2H), 0.82 (s, 3H)。MS (ESI, pos.): 计算 $C_{51}H_{66}ClN_5O_{16}S$, 1071.4; 发现1072.4 (M+H), 1054.9 (M-H₂O+H); $[\alpha]^{20}_{589nm} = -52.4$ (c=0.00301, MeOH)。参见图1所示单一非对映体的¹H-NMR。

[0171]



[0172] 实施例3

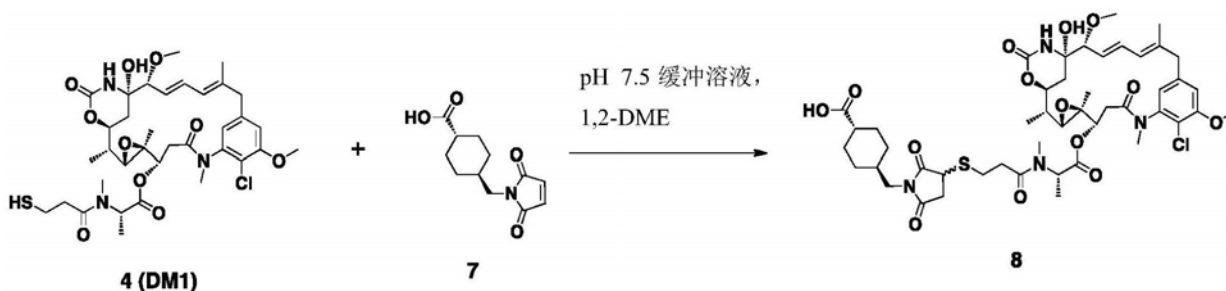
[0173] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧基琥珀酸酯的非对映体混合物 (6): 化合物5立体异构体混合物可以参照下述文献制备得到: US专利申请20100129314, 实施例XI。¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ6.85-6.6 (m), 6.4 (m), 6.1 (m), 5.8-5.4 (m), 5.2 (m), 4.92-4.79 (m), 4.4-4.1 (m), 4.03 (s), 3.82 (m), 3.8-2.2 (m), 2.1 (m), 2.07 (s), 2.0-0.8 (m)。MS (ESI, pos.): 计算 $C_{51}H_{66}ClN_5O_{16}S$, 1071.4; 发现1072.4

(M+H)。参见图2所示非对映体混合物的¹H-NMR。

[0174] 实施例4

[0175] 美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧酸的外消旋体 (8) : 向反式-1,4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸7 (167mg, 0.701mmol) 的1,2-二甲氧基乙烷 (8mL) 溶液中加入化合物4 (340mg, 0.461mmol) 的1,2-二甲氧基乙烷 (15mL) 溶液。所得混合物用pH值为7.5的缓冲体系处理, 并缓慢滴加饱和NaHCO₃溶液来维持pH值不变。反应混合物在氩气氛及室温下搅拌过夜, 后减压浓缩。所得粗产物通过反相色谱分析法纯化, 即色谱分析采用C18柱, 20-40微米柱 (100g), 乙腈 (0.1% AcOH) 和水 (0.1% AcOH) 梯度洗脱 (10-95%, 25分钟), 冻干得到化合物8为白色固体 (330mg, 0.338mmol, 收率73%)。MS m/z: 977.2 [MH⁺], 957.2 [M-18], 999.2 [M+Na]; 纯度: >98% (LC/MS)。

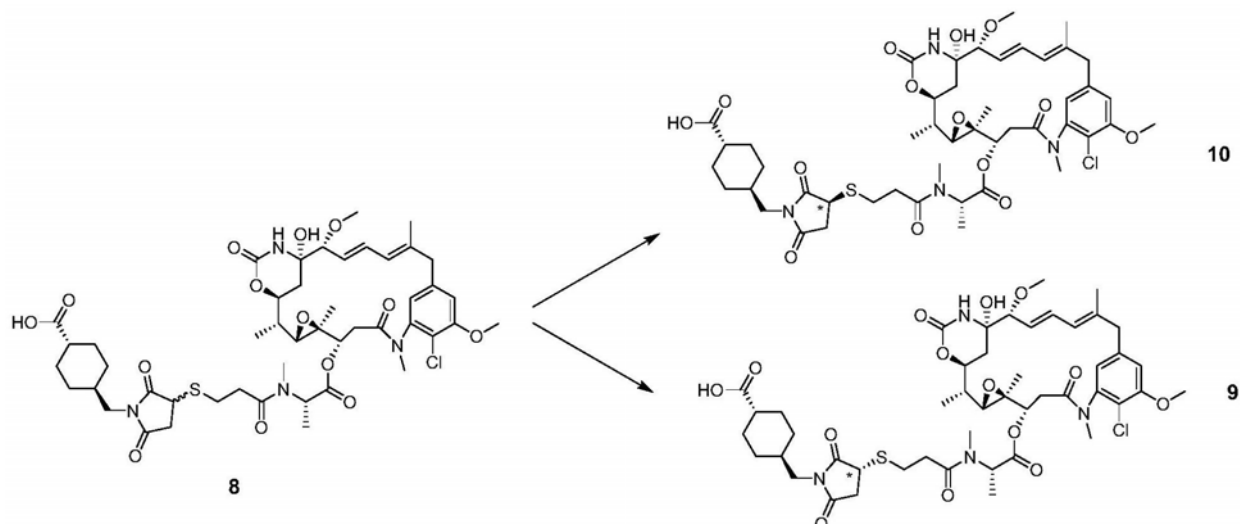
[0176]



[0177] 实施例5

[0178] 手性分离化合物8为单一非对映体 (R*)-美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧酸 (9) 和 (S*)-美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧酸 (10) (S*和R*代表未知的单一立体异构体手性结构) : 将化合物8的非对映体混合物 (20mg) 溶于0.5ml乙腈, 并使用手性拆分柱进行分离 (Chiralcel 10J, Solvent system, 6:1:1 Hexanes:IPA:Ethanol) 得到3.5mg更先分离的化合物10, MS m/z: 977.2 [MH⁺], 957.2 [M-18], 999.2 [M+Na]; 纯度: >95% (LC/MS), RT=32分钟, 和得到4.6mg后分离的化合物9, MS m/z: 977.2 [MH⁺], 957.2 [M-18], 999.2 [M+Na]; 纯度: >95% (LC/MS), R_f=48分钟。

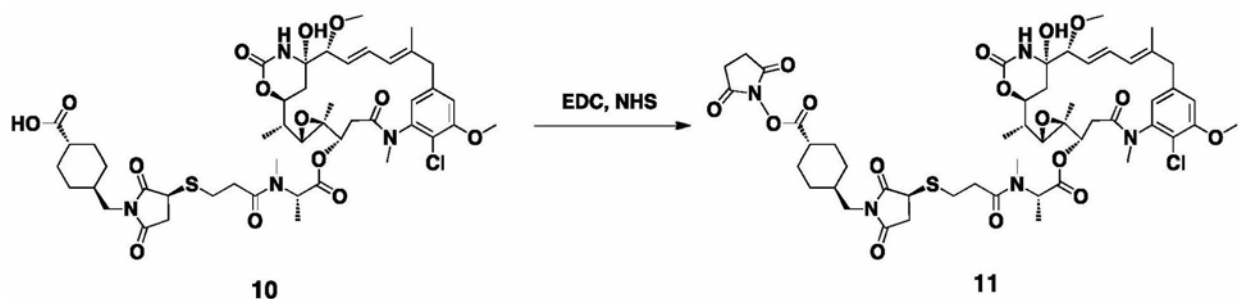
[0179]



[0180] 实施例6

[0181] (S*)-美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧基琥珀酸酯 (11) 的合成: 将化合物10 (2.5mg, 0.0026mmol) 溶于二氯甲烷 (1mL), 然后加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 6.0mg, 0.052mmol) 和1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI, 13mg, 0.065mmol)。所得反应混合物于室温并在橡胶隔片存在下搅拌反应过夜, 后水洗之后盐洗, 并用无水硫酸钠干燥, 过滤。所得溶液减压浓缩得到粗品, 并通过反相色谱分析法纯化, 即色谱分析采用C18柱, 20-40微米柱 (30g), 乙腈 (0.1% AcOH) 和水 (0.1% AcOH) 梯度洗脱 (10-95%, 18分钟), 冻干得到化合物11。MS m/z : 1073.2 [MH⁺], 1054.4 [M-18]; 纯度: 95% (LC/MS)。

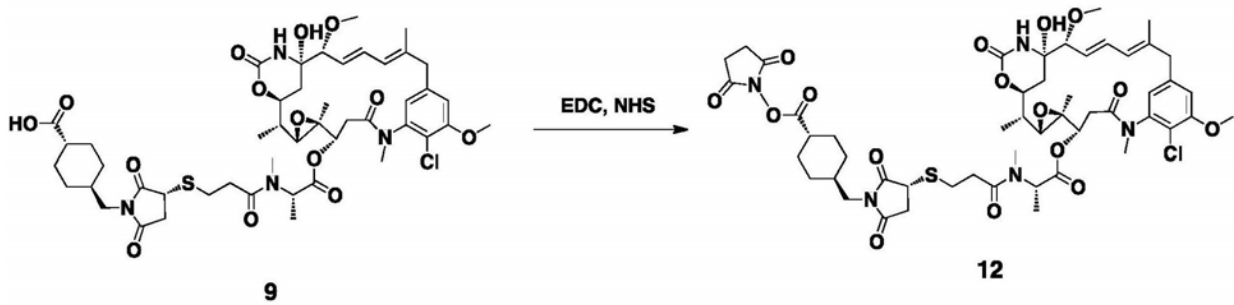
[0182]



[0183] 实施例7

[0184] (R*)-美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-丙酰亚胺基-3-硫-3-琥珀酰亚胺基-N-甲基环己基-4-反式-羧基琥珀酸酯 (12) : 将化合物9 (3mg, 0.003mmol) 溶于二氯甲烷 (1mL) 中, 然后加入N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 3.0mg, 0.026mmol) 和1-[3-(二甲氨基)丙基]-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI, 7mg, 0.036mmol)。所得反应混合物于室温并在橡胶隔片存在下搅拌反应过夜, 后水洗之后盐洗, 并用无水硫酸钠干燥, 过滤。所得溶液减压浓缩得到粗品, 并通过反相色谱分析法纯化, 即色谱分析采用C18柱, 20-40微米柱 (15g), 乙腈 (0.1% AcOH) 和水 (0.1% AcOH) 梯度洗脱 (10-95%, 18分钟), 冻干得到化合物12。MS m/z : 1073.2 [MH⁺], 1054.4 [M-18]; 纯度: 95% (LC/MS)。

[0185]



[0186] 实施例8

[0187] 偶联物的制备和表征。

[0188] 两种不同美登素连接体的组合物可参照前述实施例(化合物5和化合物6)制备得到,并可与各种抗肿瘤抗原单克隆抗体偶联。化合物5包含主要的DM1连接体细胞毒化合物的单一非对映体,其中化合物6包含各种DM1连接体非对映体的混合物。本发明实施例所使用抗体是源自人Ab4D5-8具有可变区域的抗HER2抗体,参见Carter et al,PNAS 199289 4285,和具有可变区域的抗EGFRvIII抗体,克隆自131参见W02013075048A1,和具有可变区域的抗MUC16抗体,克隆自3A5参见W02007001851。

[0189] 本发明所述抗体在细胞CHO中表达,并通过蛋白A进行纯化。一种未结合的同种型对照抗体来源于与肿瘤无关的传染性疾病抗原,并可应用于本发明实施例。

[0190] 所述抗体(10mg/ml)置于50mMHEPES、150mMNaCl、pH 8.0、和10% (v/v) DMA中,与超过6倍量的化合物5或化合物6于室温下偶联反应1小时。所得偶联物通过排阻色谱进行纯化,并无菌过滤。蛋白和有效负荷浓度的偶联物是通过UV光谱分析和MALDI-TOF质谱分析来表征确定。排阻色谱HPLC确定所有偶联物,应用时均为>95%含量相较于单体,和RP-HPLC确定有<0.5%未偶联的连接体有效负荷存在。表1为基于蛋白的产率。所有偶联物抗体均通过UV光谱分析连接体有效负荷值,参见文献Hamblett et al,Cancer Res 200410 7063,和质量差异,并将原始和偶联后进行比较。其总结结果参见表1。

[0191] 表1

[0192]

化合物	252 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)	280 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)
5	26790	5700
6*	26790	5700

抗体	252 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)	280 nm (cm ⁻¹ M ⁻¹)
HER2	81847	215388
EGFRvIII	79579	209420
MUC16	88671	248380
同种型对照	81718	233480

抗体偶联物	有效负荷: 抗体 (UV)	有效负荷: 抗体 (MS)	产率 %
HER2-5 (体内)	2.7	2.7	66
HER2-5 (体外)	3.1	2.4	75
HER2-6 (体外)	2.9	2.4	70
EGFRvIII-5	2.8	2.3	56

[0193]

EGFRvIII-6	2.9	2.2	56
MUC16-5	2.4	2.0	76
MUC16-6	2.3	2.1	96
同种型对照-5	3.3	3.3	67

[0194] *消光系数应用来自化合物5

[0195] 实施例9

[0196] 体外细胞毒性试验。

[0197] 细胞播种于PDL-包衣的96孔板中,以10,000 (SK-BR-3和NCI-N87)、15,000 (BT-474)、3000 (人卵巢癌细胞-3和PC3/Muc16)、2000 (HEK293/hEGFRvIII)、1500 (U251/hEGFRvIII) 或400 (MMT/hEGFRvIII) 细胞每孔,于完整的生长培养基中生长过夜。对于细胞存活率曲线,连续稀释的抗体-药物偶联物或游离的有效负荷,以终浓度范围为1 μ M至1pM加入至细胞中,孵化3天。每一浓度均重复操作并以各自的标准偏差进行记录。细胞与CCK8 (Dojindo) 一起孵化最后的1-3小时,且在450nm (OD₄₅₀) 下,用Flexstation 3 (分子仪器) 测定吸光度。所有孔板中细胞减去在OD₄₅₀水平背景下,洋地黄皂苷 (40nM) 处理的细胞,存活率表示其相对于未经处理的空白对照的百分比。其IC₅₀值通过四参数逻辑斯谛方程的10点响应曲线 (GraphPad Prism) 来确定。所有曲线和IC₅₀值均通过基于MALDI-TOF实验得到的有效负荷等同物来校正。

[0198] 在SKBR3细胞中 (乳腺癌细胞株),天然表达的HER2在607倍上述同种型对照结合中,单一非对映体化合物偶联HER2-5 (体外和体内组) 的IC₅₀值为0.3nM,与非对映体混合物

偶联HER2-6的IC₅₀值0.9nM之间的对比(表2,图3)。少数体外组偶联首先且仅用于细胞增殖试验,而大量体内组将后偶联并同时用于体外和体内试验。裸HER2抗体具有很低的抗增殖活性。

[0199] 在BT474细胞中(乳腺癌细胞株),天然表达的HER2在426倍上述同种型对照结合中,单一非对映体化合物偶联HER2-5(体外)的IC₅₀值为4.6nM,而偶联HER2-5(体内)组的IC₅₀值为4.0nM,与非对映体混合物偶联HER2-6的IC₅₀值11.6nM之间的对比(表2,图4)。裸HER2抗体具有很低的抗增殖活性。

[0200] 在NCI-N87细胞中(乳腺癌细胞株),天然表达的HER2在869倍上述同种型对照结合中,单一非对映体化合物偶联HER2-5(体外)的IC₅₀值为0.6nM,而偶联HER2-5(体内)组的IC₅₀值为0.4nM,与非对映体混合物偶联HER2-6的IC₅₀值1.0nM之间的对比(表2,图5)。裸HER2抗体具有很低的抗增殖活性。

[0201] 在HEK293/hEGFRvIII细胞中,表达的hEGFRvIII在360倍上述同种型对照结合中,两种偶联物(单一非对映体或非对映体混合)的IC₅₀值均为0.4nM(表3,图6)。裸EGFRvIII抗体具有很低的抗增殖活性。

[0202] 在MMT/hEGFRvIII细胞中,表达的hEGFRvIII在280倍上述同种型对照结合中,单一非对映体化合物偶联EGFRvIII-5的IC₅₀值为0.5nM,而非对映体混合物偶联EGFRvIII-6的IC₅₀值为9.8nM(表2,图7)。裸EGFRvIII抗体具有很低的抗增殖活性。

[0203] 在U251/hEGFRvIII细胞中,表达的hEGFRvIII在165倍上述同种型对照结合中,单一非对映体化合物偶联EGFRvIII-5的IC₅₀值为2.4nM,而非对映体混合物偶联EGFRvIII-6的IC₅₀值为3.3nM(表3,图8)。裸EGFRvIII抗体具有很低的抗增殖活性。

[0204] 在人卵巢癌细胞-3细胞中(卵巢癌细胞株),天然表达的MUC16在373倍上述同种型对照结合中,单一非对映体化合物偶联MUC16-5的IC₅₀值为6.3nM,而非对映体混合物偶联MUC16-6的IC₅₀值为16.0nM(表4,图9)。裸Muc16抗体具有很低的抗增殖活性。

[0205] 在PC3/MUC16细胞中,表达的MUC16在105倍上述同种型对照结合中,单一非对映体化合物偶联MUC16-5的IC₅₀值为0.34nM,而非对映体混合物偶联MUC16-6的IC₅₀值为0.8nM(表4,图10)。裸Muc16抗体具有很低的抗增殖活性。

[0206] 在图3、4和5中所示美登素-3-N-甲基-L-丙氨酸-(3-甲基二磺酰基)丙酰胺DM1-SMe,制备方法参见Ho和Carrozzella,U.S.Pat.Appl.2007/0037972A1)可供选择地代表这些试验中的有效负荷。化合物4因其太活泼而不被用于体外和体内试验从而给出不可靠的结果。

[0207] 体外试验结果如下表2-4所示。所述实施例表明包含本发明单一非对映体药物的抗肿瘤抗体-药物偶联物,相较相应的包含非对映体混合物的抗体-药物偶联物,大多情况下,体现出更好的体外杀肿瘤细胞效能。根据靶向研究,单一非对映体抗体-药物偶联物具有2至3倍功效于相应的非对映体混合物抗体-药物偶联物,当然取决于所述细胞株试验。

[0208] 表2

[0209]

抗体偶联物	SKBR3 IC50 (nM)	BT474 IC50 (nM)	N87 IC50 (nM)
HER2-5 (体内)	0.3	4.0	0.4
HER2-5 (体外)	0.3	4.6	0.6
HER2-6 (体外)	0.9	11.6	1.0

[0210] 表3

[0211]

抗体偶联物	HEK293/hEGFRvIII IC50 (nM)	MMT/hEGFRvIII IC50 (nM)	U251/hEGFRvIII IC50 (nM)
EGFRvIII-5	0.4	0.5	2.4
EGFRvIII-6	0.5	9.8	3.3

[0212] 表4

抗体偶联物	人卵巢癌细胞-3 IC50 (nM)	PC3/MUC16 IC50 (nM)
MUC16-5	6.3	0.34
MUC16-6	16.0	0.80

[0214] 实施例10

[0215] 体内研究。

[0216] 抗HER2单一非对映体偶联物(“HER2-5”)体内活性的测定研究,通过小鼠HER2+胃癌细胞肿瘤异种移植模型来完成,其效果先前已被Barok等人报道过(Barok M et al, Can Letters 2011)。具体地,将 5×10^6 NCI-N87细胞(ATCC CRL-5822)皮下植入CB-17SCID小鼠(Taconic)右下翼。一旦肿瘤达到平均体积 150mm^3 ,小鼠将被随机分入8组,并按剂量给予HER2-5或对照试剂。对照试剂包括PBS媒介、游离的DM1-SMe、同种型对照、同种型对照-5或HER2。在整个研究过程中,小鼠接受每周一次剂量共三周,其肿瘤体积和体重均每周两次进行监测。偶联物按剂量1、5和15mg/kg进行给药,所述剂量均在前述Lewis-Phillips等人体内研究中(Lewis-Phillips G et al., Can Res 2008)被证明是有效的。

[0217] 在现有N87肿瘤模型中,HER2-5表现出明显的抗肿瘤效力,当按剂量5和15mg/kg进行给药时,导致最初肿瘤体积明显减小,而当更高剂量给药时,一些肿瘤会消除(图11和12)。相对于同样给予对照药物1mg/kg剂量水平,其可明显延迟肿瘤生长。在整个研究过程中,使用所述剂量进行给药,未观测到副反应发生,且当小鼠接受HER2-5时表现出其体重有强健增加(图13)。

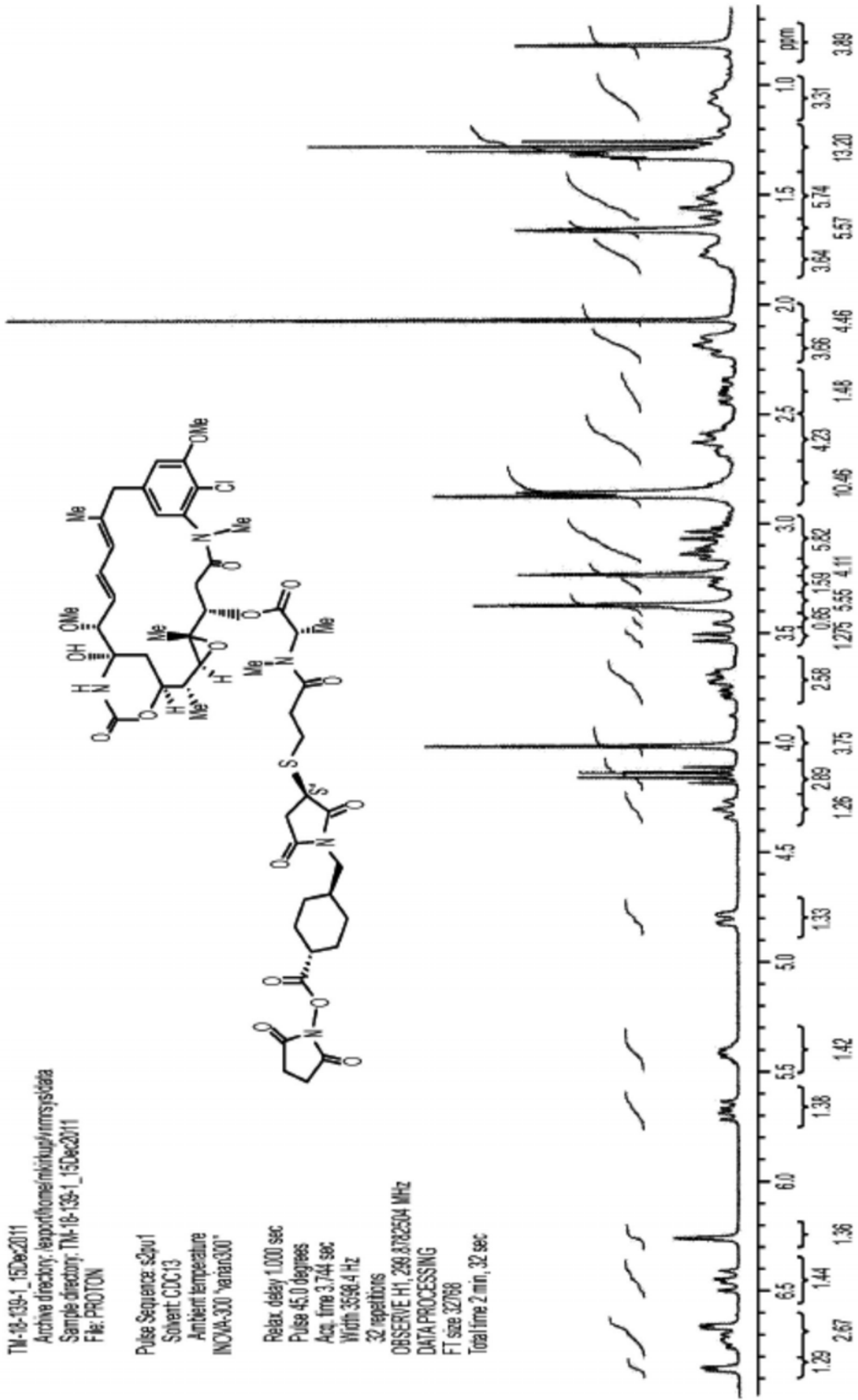


图1

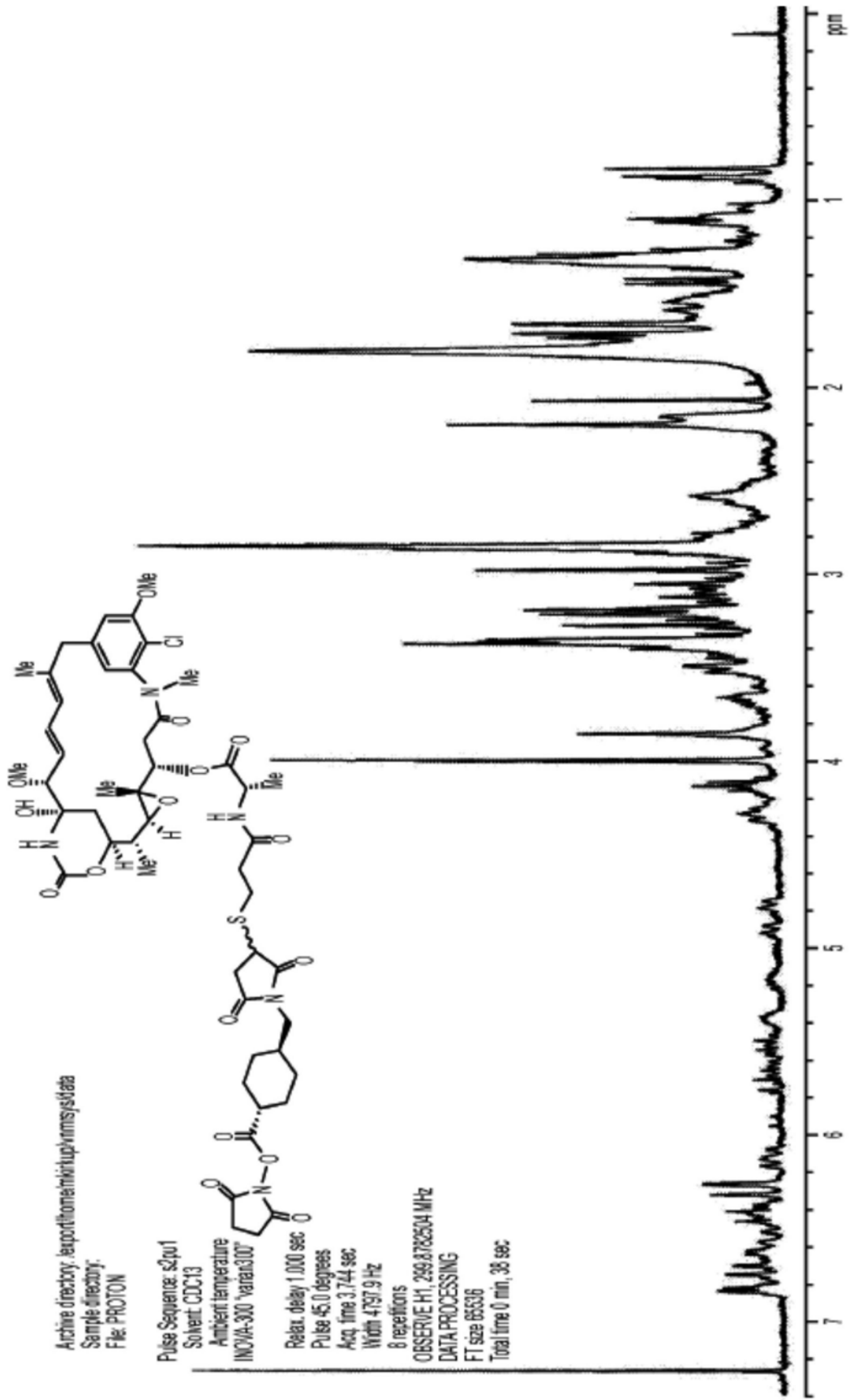


图2

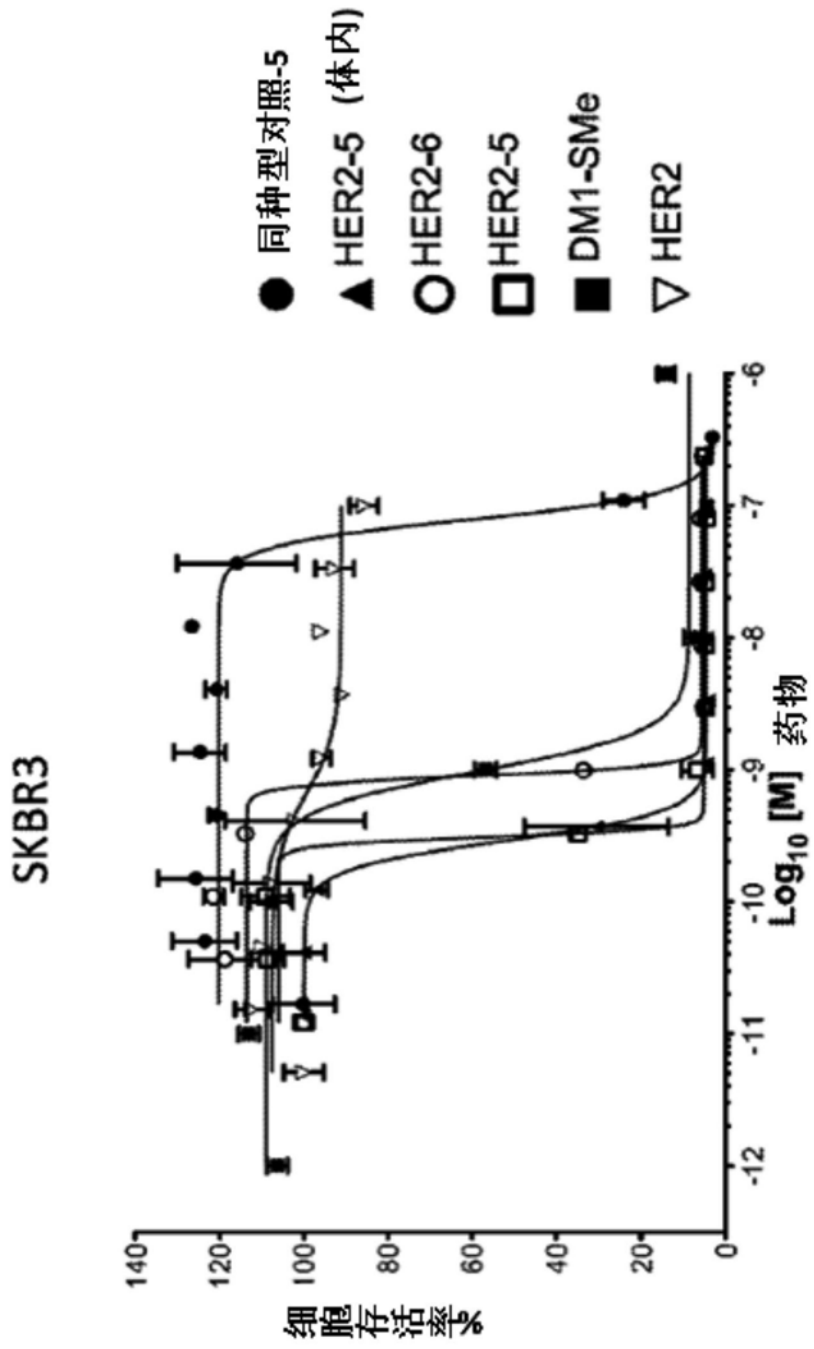


图3

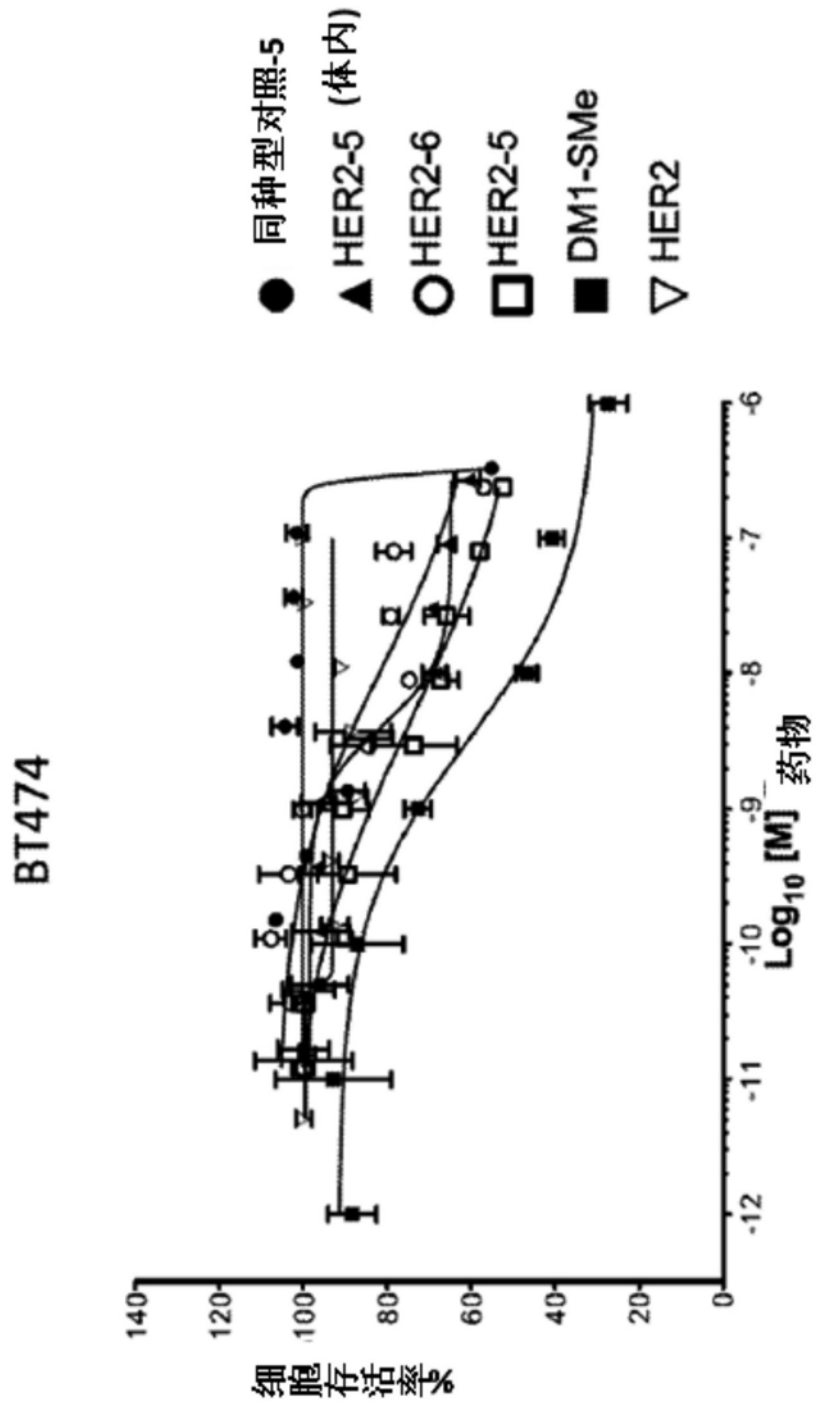


图4

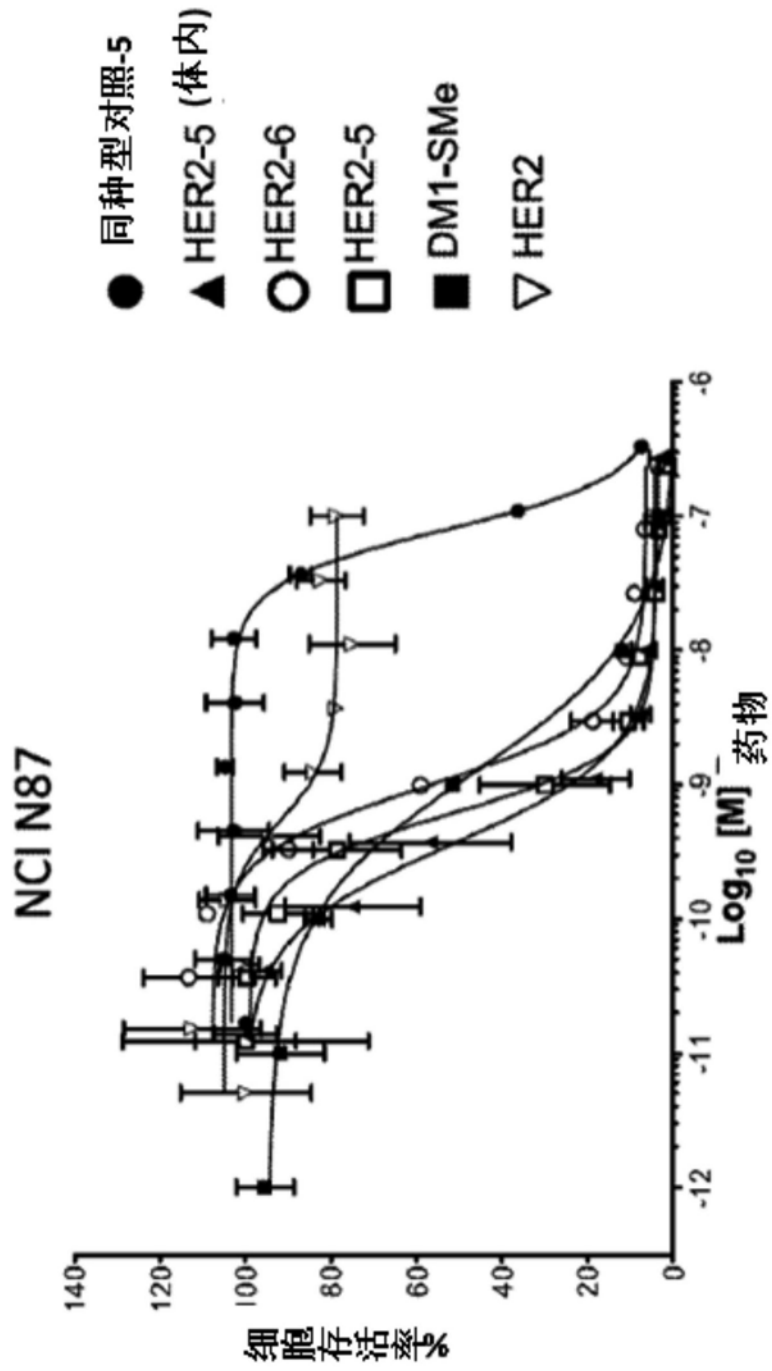


图5

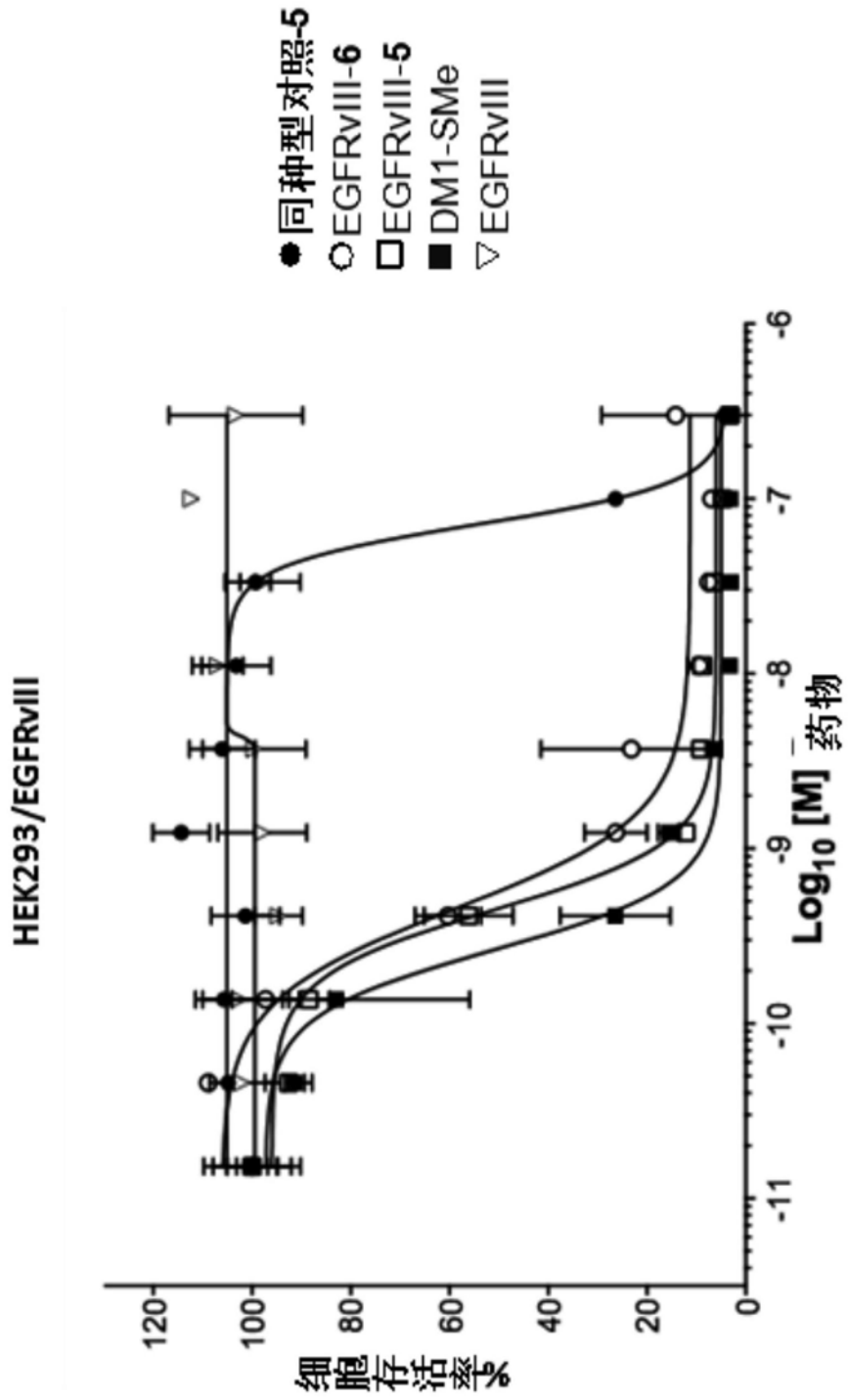


图6

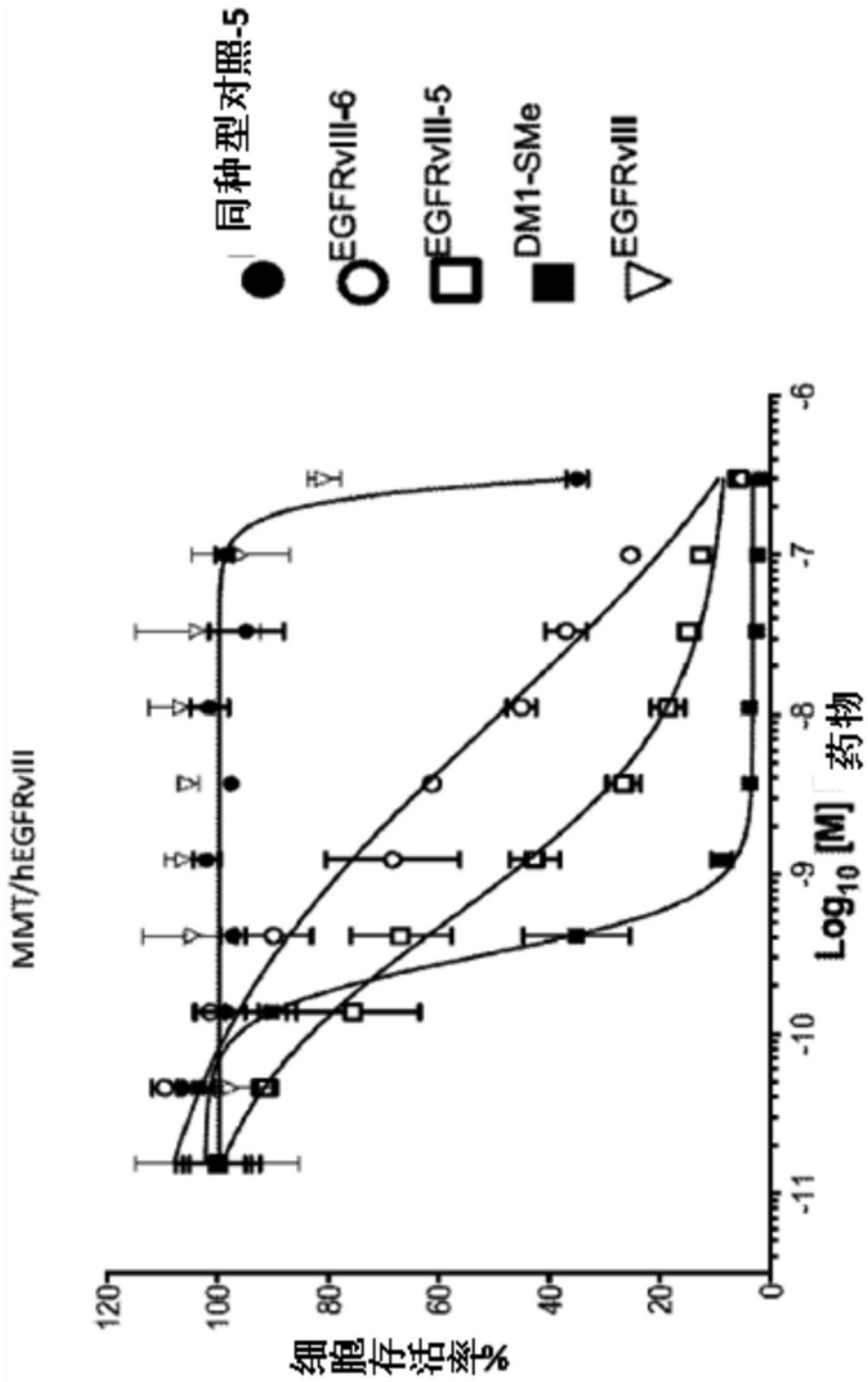


图7

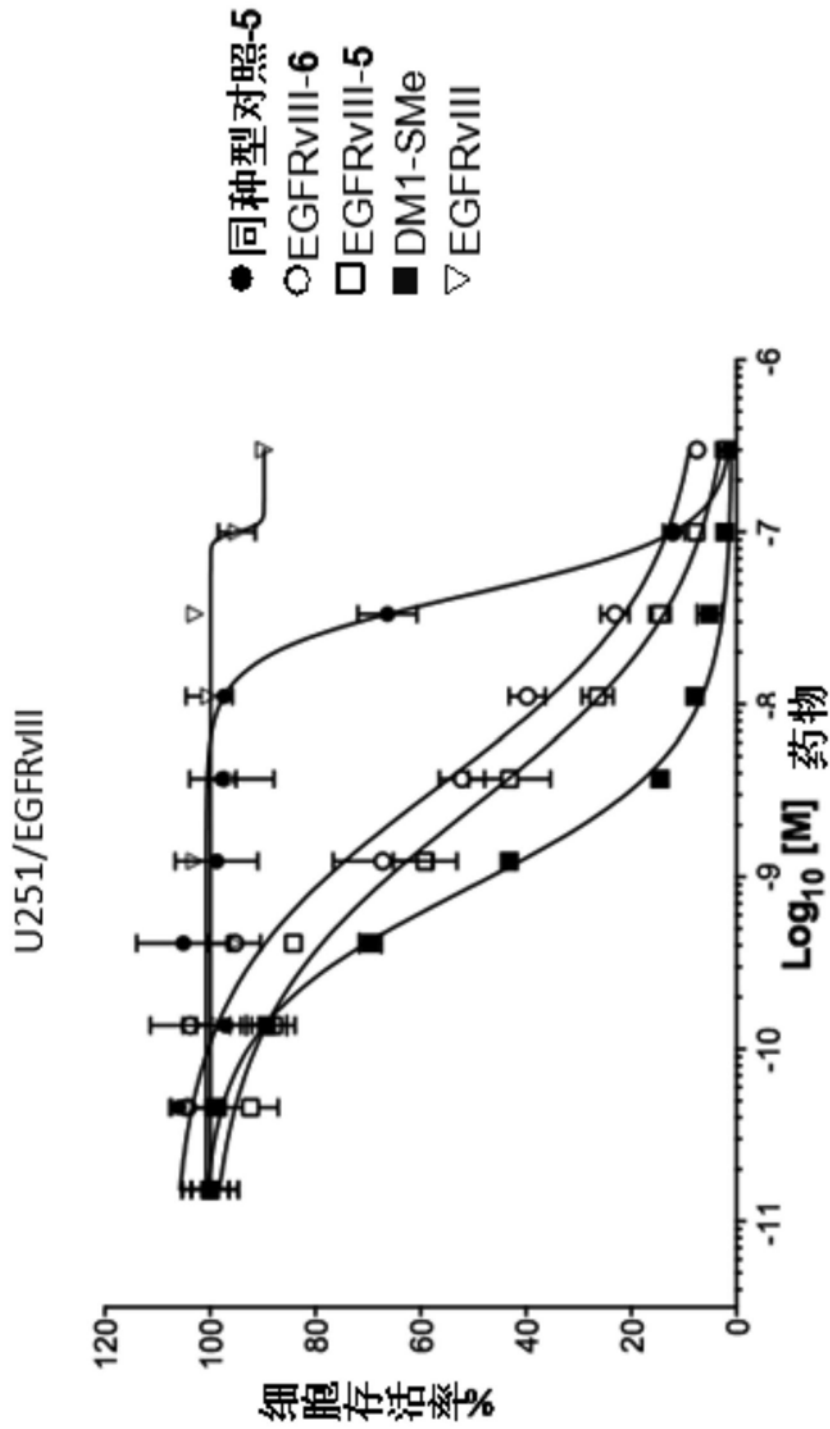


图8

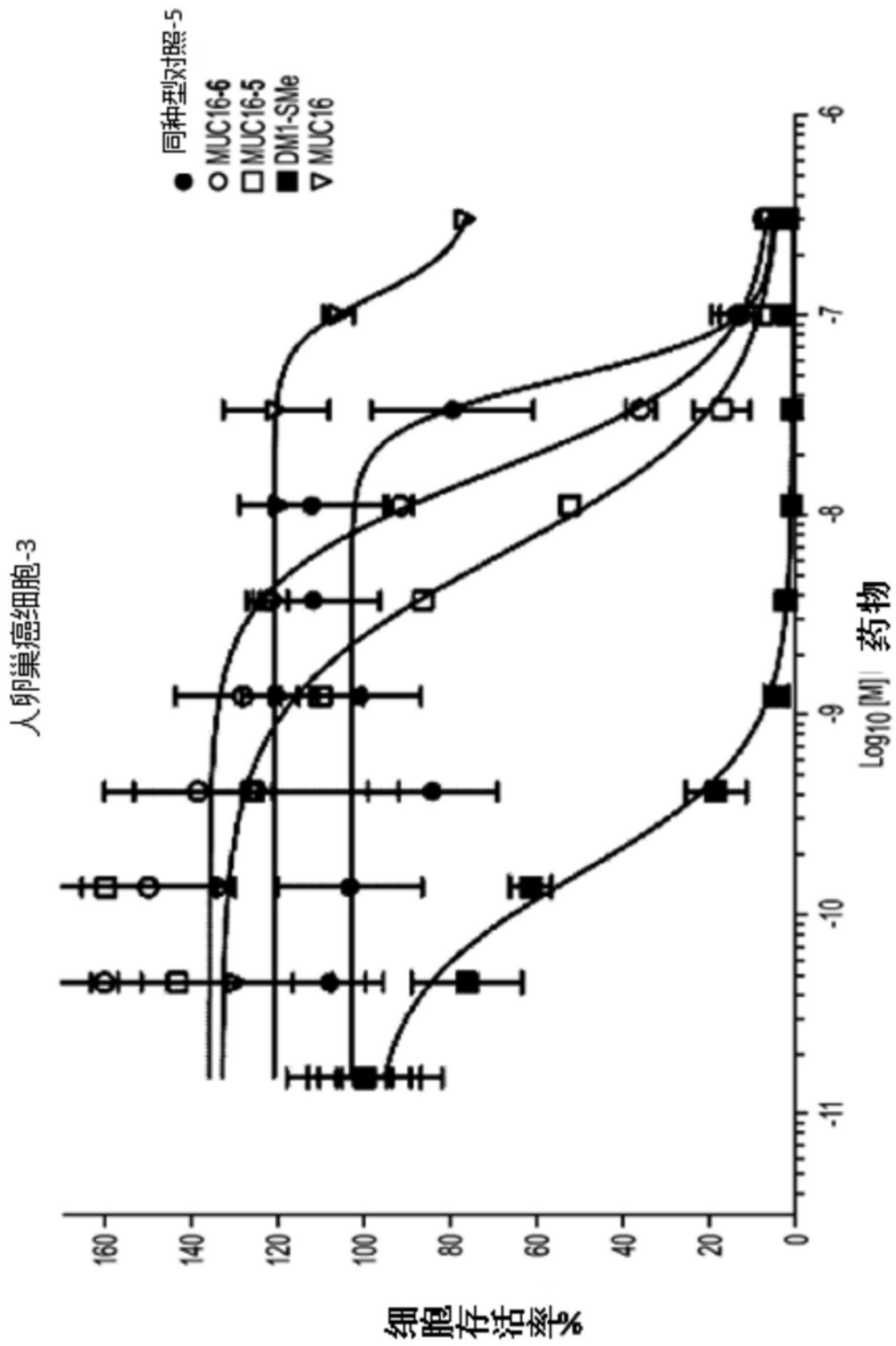


图9

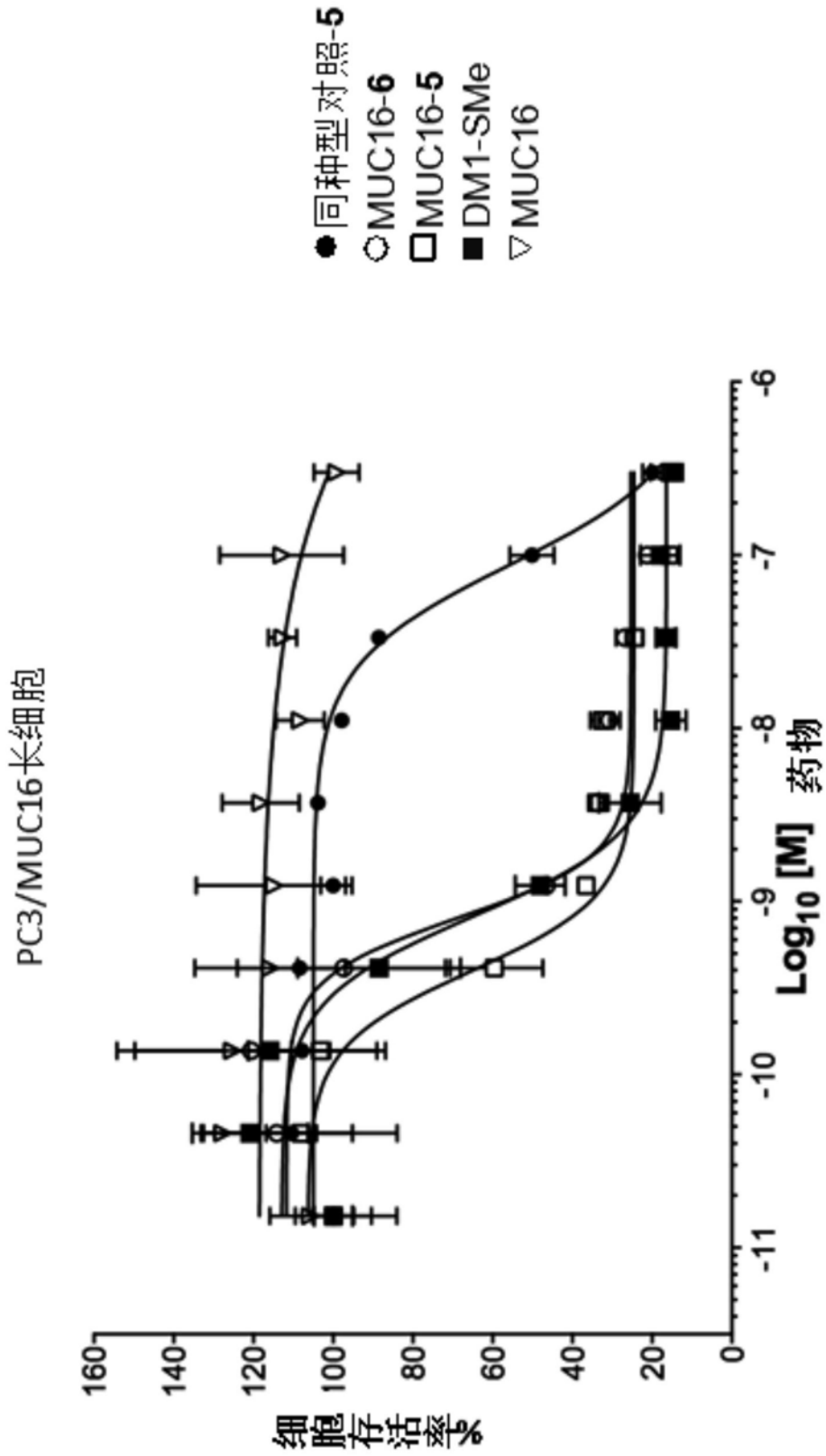


图10

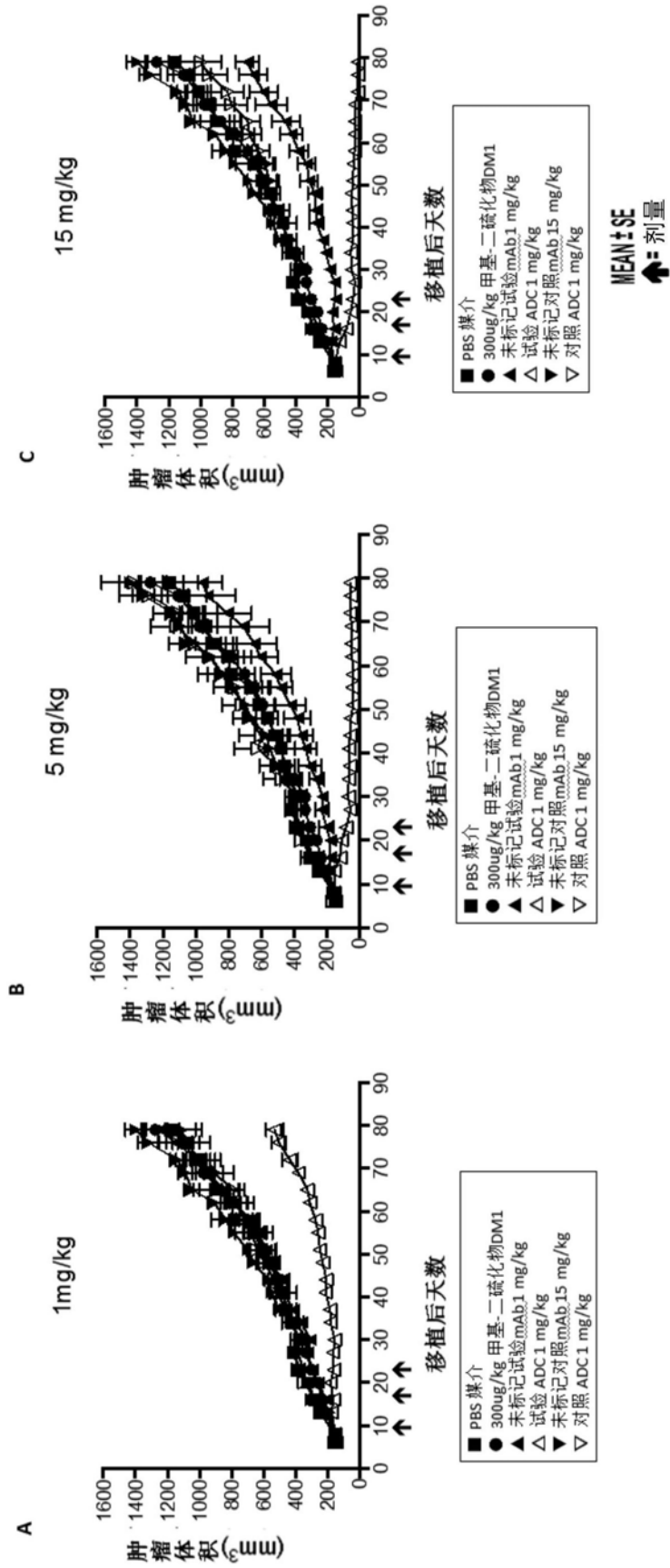


图11

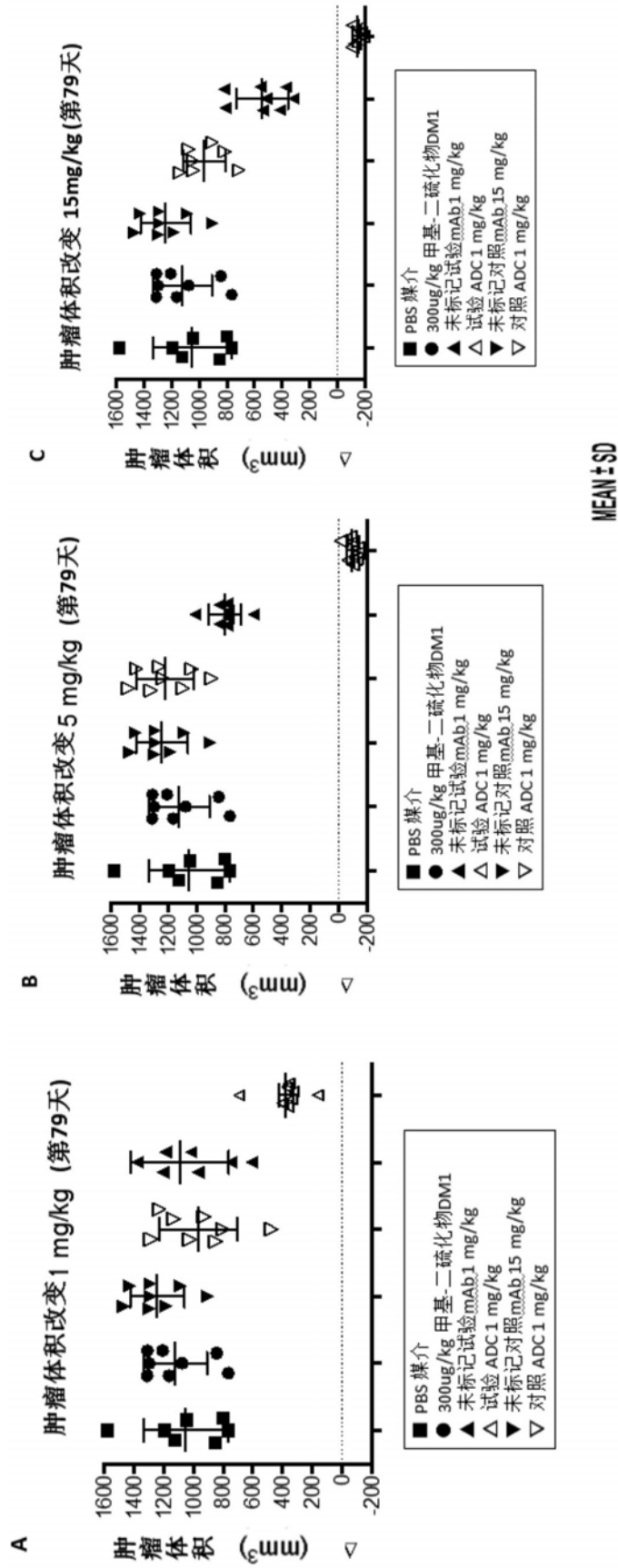


图12

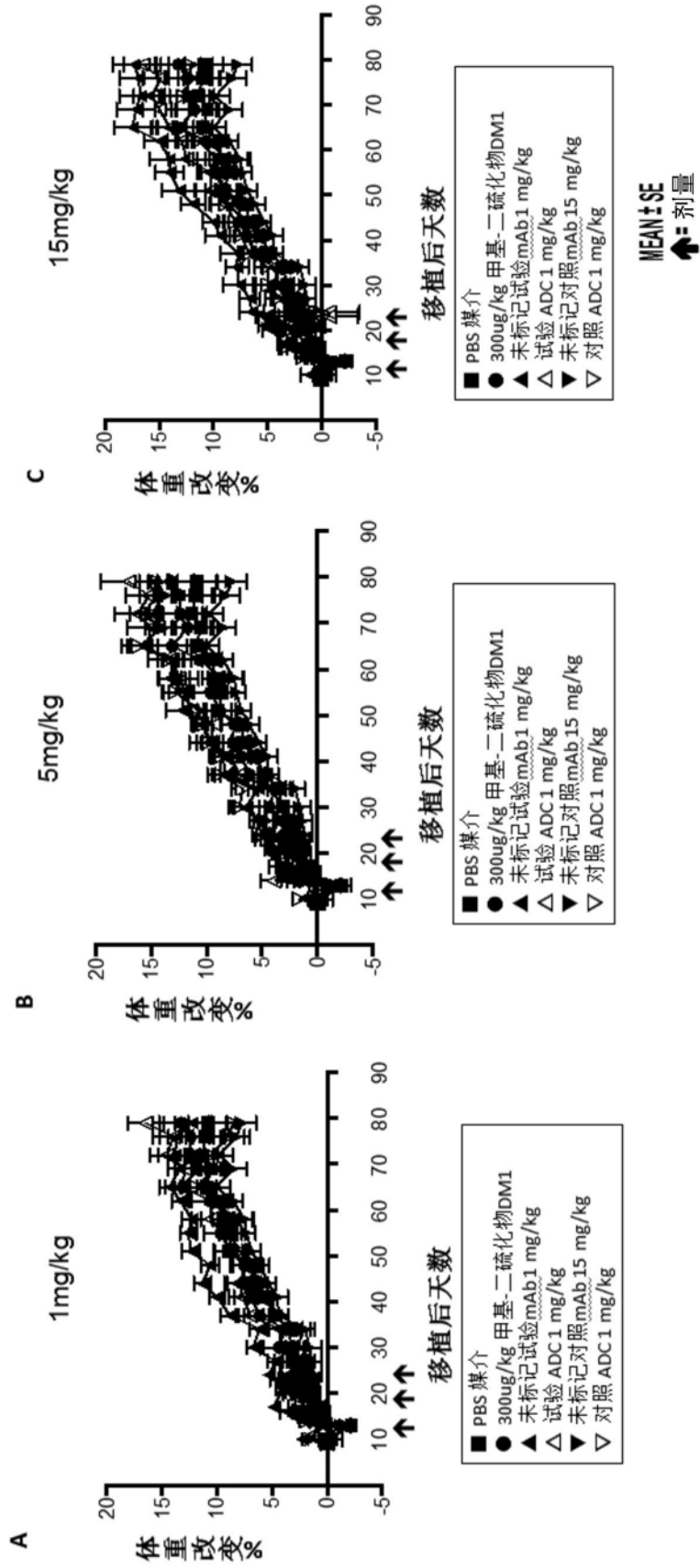


图13