



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106573074 B

(45) 授权公告日 2022.04.12

(21) 申请号 201580029530.1

(22) 申请日 2015.06.01

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106573074 A

(43) 申请公布日 2017.04.19

(30) 优先权数据

62/006816 2014.06.02 US

62/139052 2015.03.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.12.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/033618 2015.06.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/187596 EN 2015.12.10

(73) 专利权人 里珍纳龙药品有限公司

地址 美国纽约州.塔里敦.旧锯木厂河路
777号

(72) 发明人 T.尼托里 A.昆兹

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 林毅斌 罗文峰

(51) Int.CI.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2014064424 A1, 2014.05.01

WO 2014064424 A1, 2014.05.01

审查员 崔义文

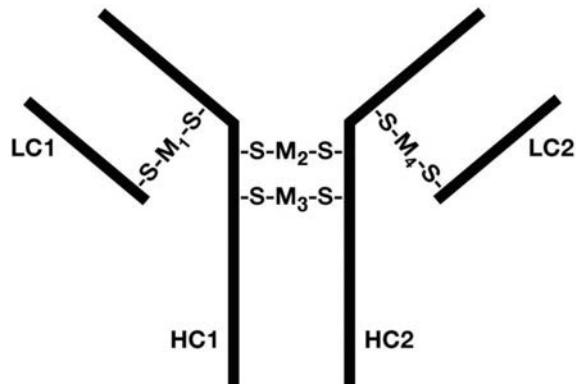
权利要求书13页 说明书59页 附图8页

(54) 发明名称

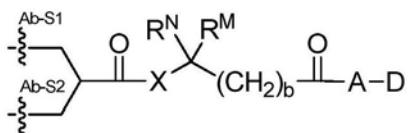
生物活性分子偶联物、试剂和制备方法及其治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及包含生物活性分子的偶联物，所述生物活性分子通过连接体与多聚体抗原-结合化合物或多聚体免疫球蛋白进行连接。本发明进一步提供了制备所述偶联物和所述连接体的试剂和方法。本发明还提供了包含所述偶联物的组合物，使用所述偶联物或所述组合物改变异常细胞生长的方法和治疗方法。



1. 抗体-药物偶联物，其包括抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段与式(A)的至少一个部分进行偶联：



(A)

其中：

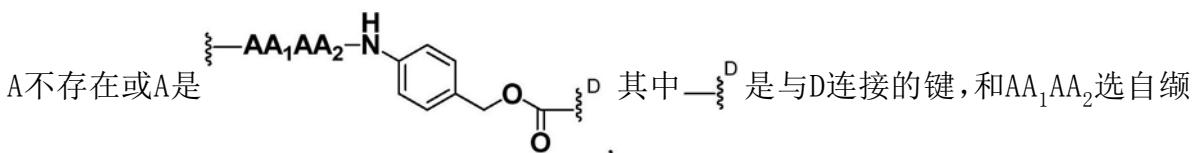
Ab-S1是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸硫原子连接；

Ab-S2是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸硫原子连接；

X是 $-\text{N}(\text{R}^{\text{A}})-$ 或 $-0-$ ；

其中 R^{A} 是氢或 C_{1-6} 烷基；

R^{N} 和 R^{M} 各自独立地为氢或 C_{1-6} 烷基；



A不存在或A是 氨酸-瓜氨酸、瓜氨酸-缬氨酸、赖氨酸-苯丙氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-缬氨酸、苏氨酸-天冬酰胺、丝氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-丝氨酸、苯丙氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-苯丙氨酸、亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-亮氨酸、异亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-异亮氨酸、甘氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-甘氨酸、谷氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-谷氨酸、瓜氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-瓜氨酸、丙氨酸-天冬酰胺、和天冬酰胺-丙氨酸；

D是生物活性分子，其中所述生物活性分子是美登素类化合物或阿里他汀，和

b是从2至8的整数；和

其中所述抗体片段选自：Fab片段、F(ab')2片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)分子、dAb片段、和由氨基酸残基组成的最小识别单位，其模拟抗体的超突变区，或限制性FR3-CDR3-FR4肽。

2. 根据权利要求1所述的偶联物，其中所述抗体或其抗原结合片段与式(A)的至少一个部分偶联，其中Ab-S1是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第一重链的半胱氨酸硫原子连接；和AB-S2是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第二重链的半胱氨酸硫原子连接。

3. 根据权利要求1所述的偶联物，其中所述偶联物包括：

(i) 式(A)的两个部分，其中Ab-S1是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第一重链的半胱氨酸硫原子连接；和AB-S2是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第二重链的半胱氨酸硫原子连接；和

(ii) 式(A)的两个部分，其中Ab-S1是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的轻链的半胱氨酸硫原子连接；和AB-S2是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的重链的半胱氨酸硫原子连接。

4. 根据权利要求1所述的偶联物，其中所述偶联物包括抗-PRLR抗体。

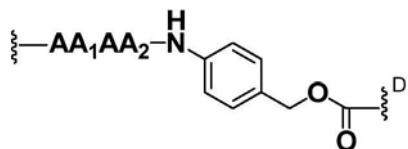
5. 根据权利要求1所述的偶联物，其中X是 $-\text{NH}-$ 。

6. 根据权利要求1所述的偶联物,其中X是-O-。

7. 根据权利要求1所述的偶联物,其中X是-NH-或-O-,和R^N和R^M均是氢。

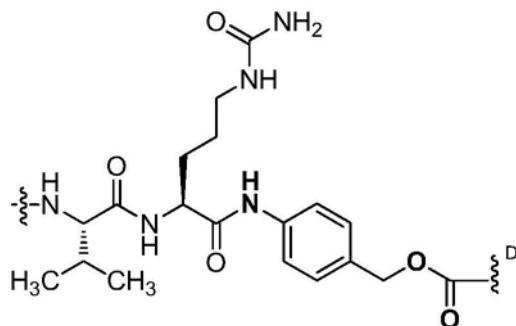
8. 根据权利要求7所述的偶联物,其中b是4。

9. 根据权利要求1所述的偶联物,其中A是:



其中—^D是与D连接的键。

10. 根据权利要求9所述的偶联物,其中A是:



其中—^D是与D连接的键。

11. 根据权利要求1所述的偶联物,其中A不存在。

12. 根据权利要求1所述的偶联物,其中AA₁AA₂是缬氨酸-瓜氨酸。

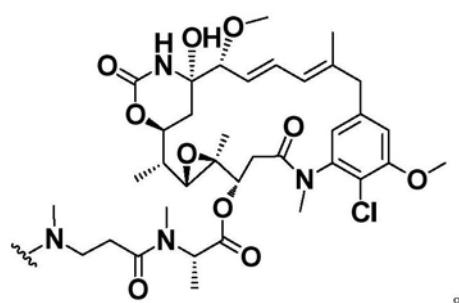
13. 根据权利要求1所述的偶联物,其中D是阿里他汀(auristatin)。

14. 根据权利要求1所述的偶联物,其中D是MMAE、MMAD、或MMAF。

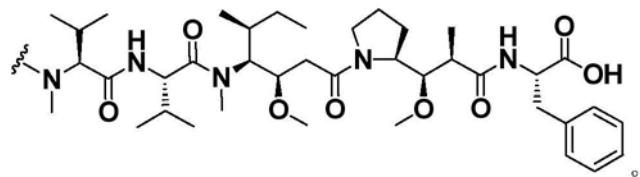
15. 根据权利要求1所述的偶联物,其中D是美登素类化合物。

16. 根据权利要求1所述的偶联物,其中D是DM1或DM4。

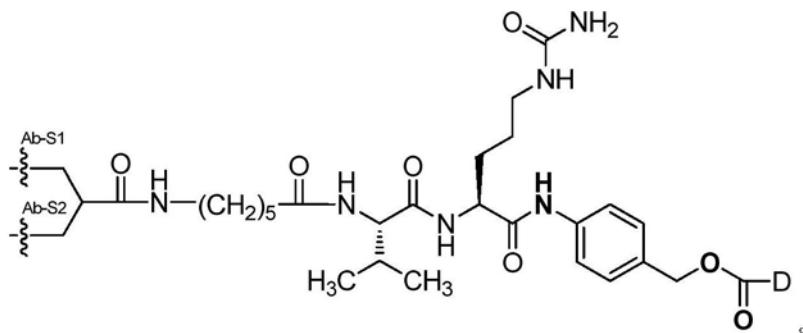
17. 根据权利要求1所述的偶联物,其中D是:



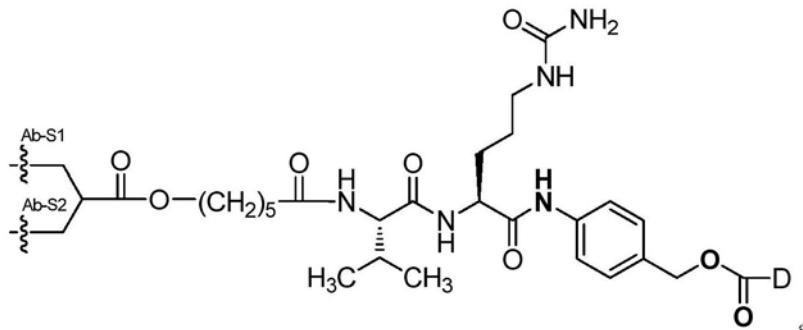
18. 根据权利要求1所述的偶联物,其中D是:



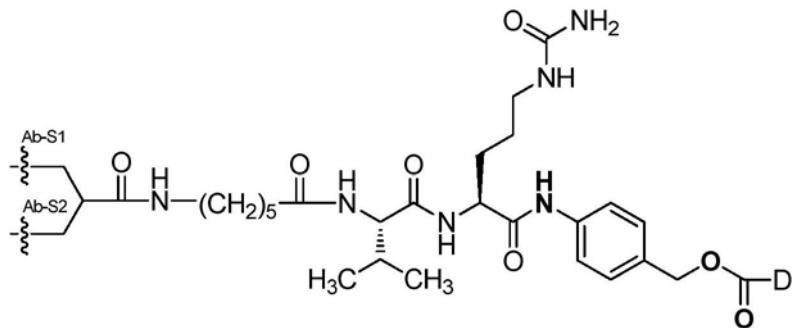
19. 根据权利要求1所述的偶联物,其中式(A)的所述部分是:



20. 根据权利要求1所述的偶联物,其中式(A)的所述部分是:

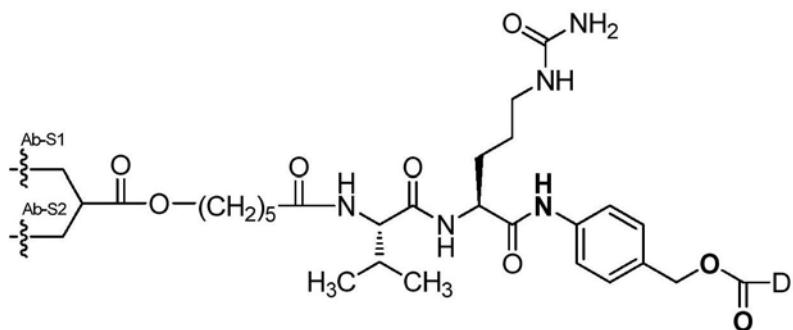


21. 根据权利要求1所述的偶联物,其中式(A)的所述部分是:



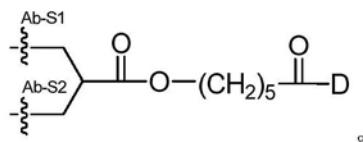
其中D是美登素类化合物。

22. 根据权利要求1所述的偶联物,其中式(A)的所述部分是:

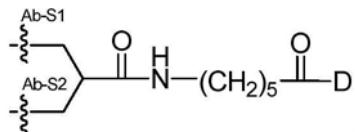


其中D是美登素类化合物。

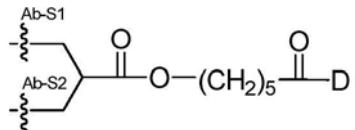
23. 根据权利要求1所述的偶联物,其中式(A)的所述部分是:



24. 根据权利要求1所述的偶联物,其中式(A)的所述部分是:

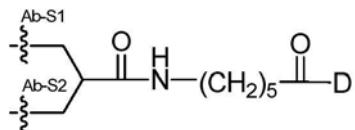


25. 根据权利要求1所述的偶联物, 其中式(A)的所述部分是:



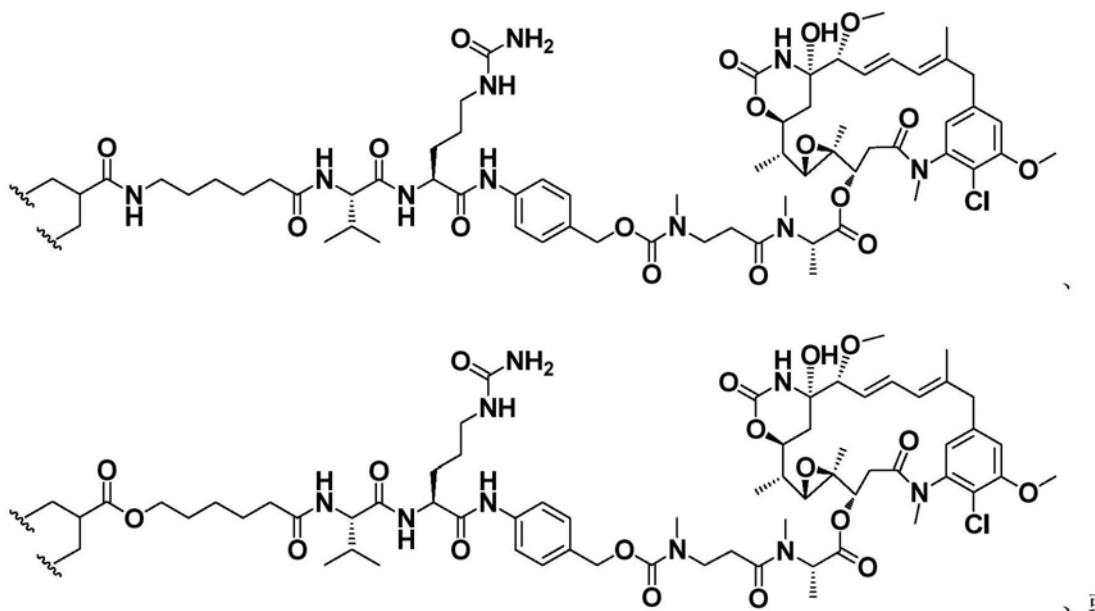
其中D是阿里他汀(auristatin)。

26. 根据权利要求1所述的偶联物, 其中式(A)的所述部分是:

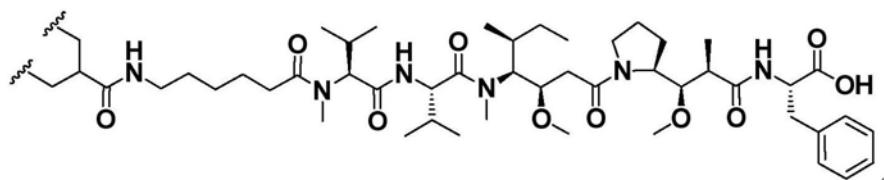


其中D是阿里他汀(auristatin)。

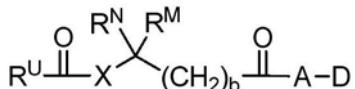
27. 根据权利要求1所述的偶联物, 其中式(A)的所述部分是:



26



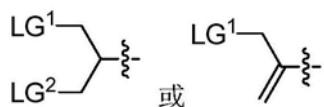
28. 式(L1)所示的化合物



(L1)

其中:

R^U 是



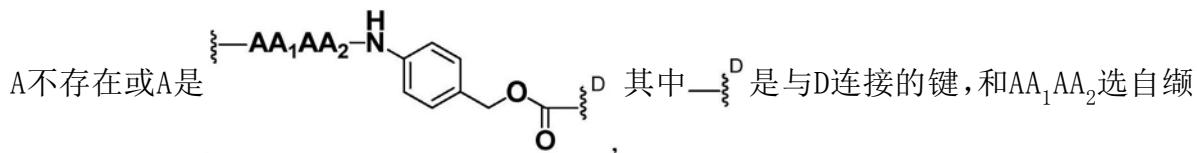
或

其中 LG^1 和 LG^2 在每一种情况独立地为离去基团；

X 是 $-N(R^A)$ - 或 $-O-$ ；

其中 R^A 是氢或 C_{1-6} 烷基；

R^N 和 R^M 各自独立地为氢或 C_{1-6} 烷基；



D 是生物活性分子，其中所述生物活性分子是美登素类化合物或阿里他汀；和 b 是从 2 至 8 的整数。

29. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中所述离去基团是卤化物。

30. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中 X 是 $-NH-$ 。

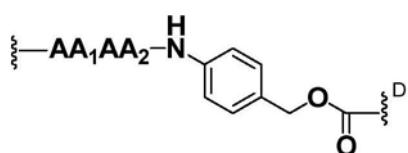
31. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中 X 是 $-O-$ 。

32. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中 R^N 和 R^M 均是氢。

33. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中 b 是从 3-6 的整数。

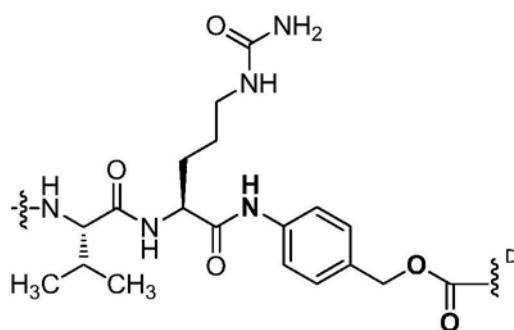
34. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中 R^N 和 R^M 均是氢，和 b 是 4。

35. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中 A 是：



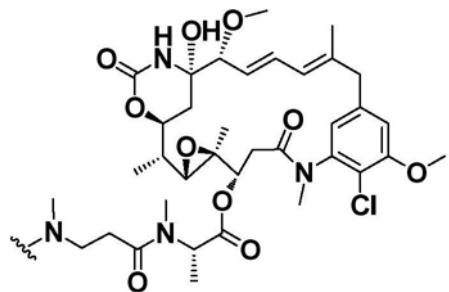
其中 ---^D 是与 D 连接的键。

36. 根据权利要求 28 所述的化合物，其中 A 是：

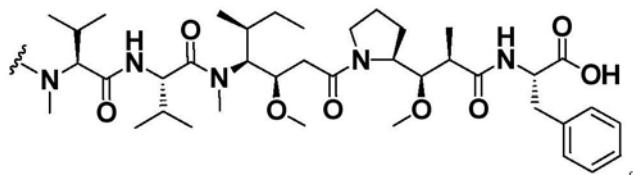


其中— $\ddot{\cdot}$ ^D是与D连接的键。

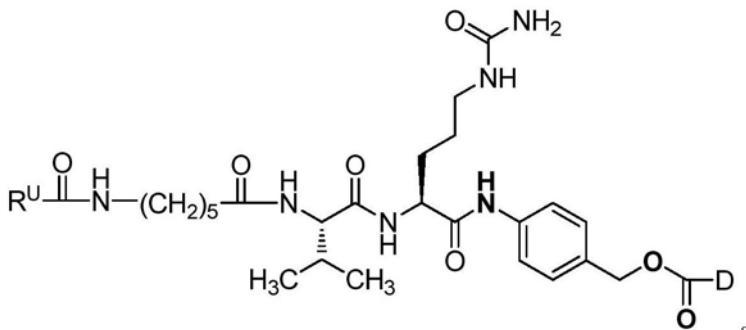
37. 根据权利要求28所述的化合物,其中A不存在。
38. 根据权利要求28所述的化合物,其中AA₁AA₂是缬氨酸-瓜氨酸。
39. 根据权利要求28所述的化合物,其中D是阿里他汀(auristatin)。
40. 根据权利要求28所述的化合物,其中D是MMAE、MMAD、或MMAF。
41. 根据权利要求28所述的化合物,其中D是美登素类化合物。
42. 根据权利要求28所述的化合物,其中D是:



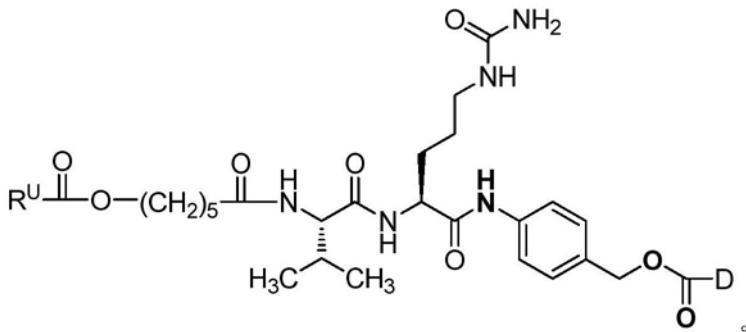
43. 根据权利要求28所述的化合物,其中D是:



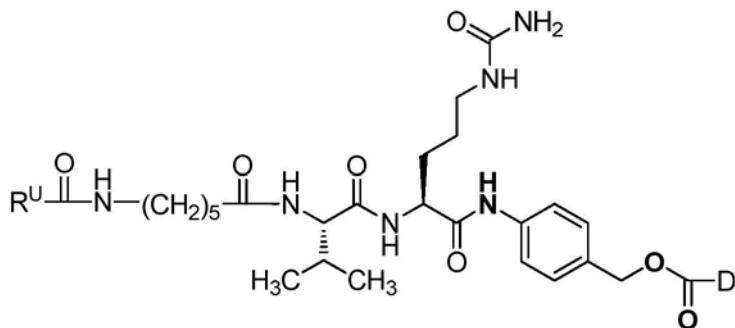
44. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:



45. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:

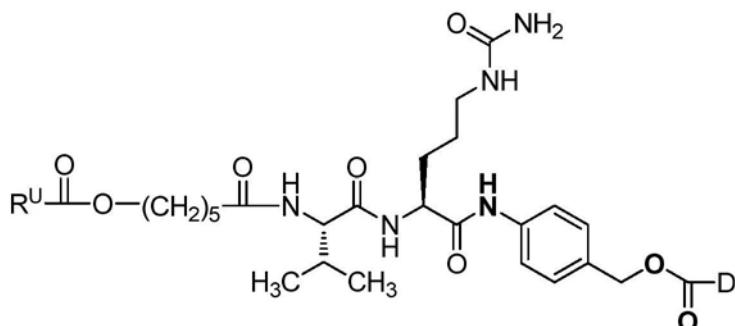


46. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:



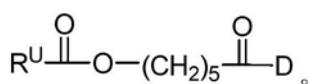
其中D是美登素类化合物。

47. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:

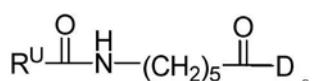


其中D是美登素类化合物。

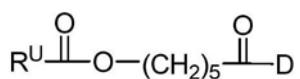
48. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:



49. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:

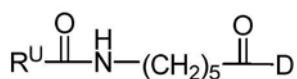


50. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:



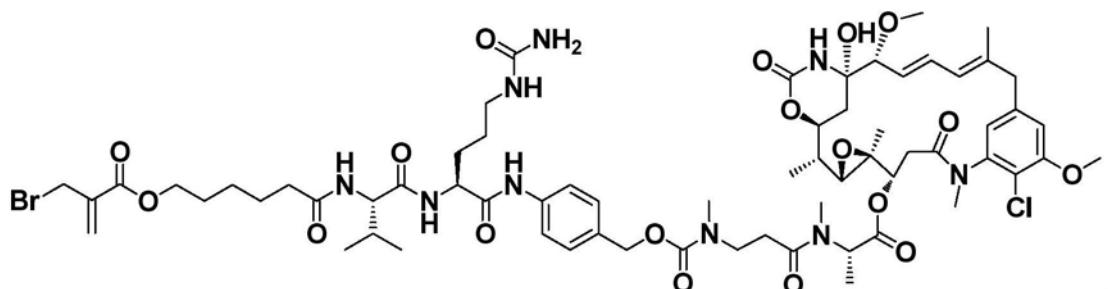
其中D是阿里他汀(auristatin)。

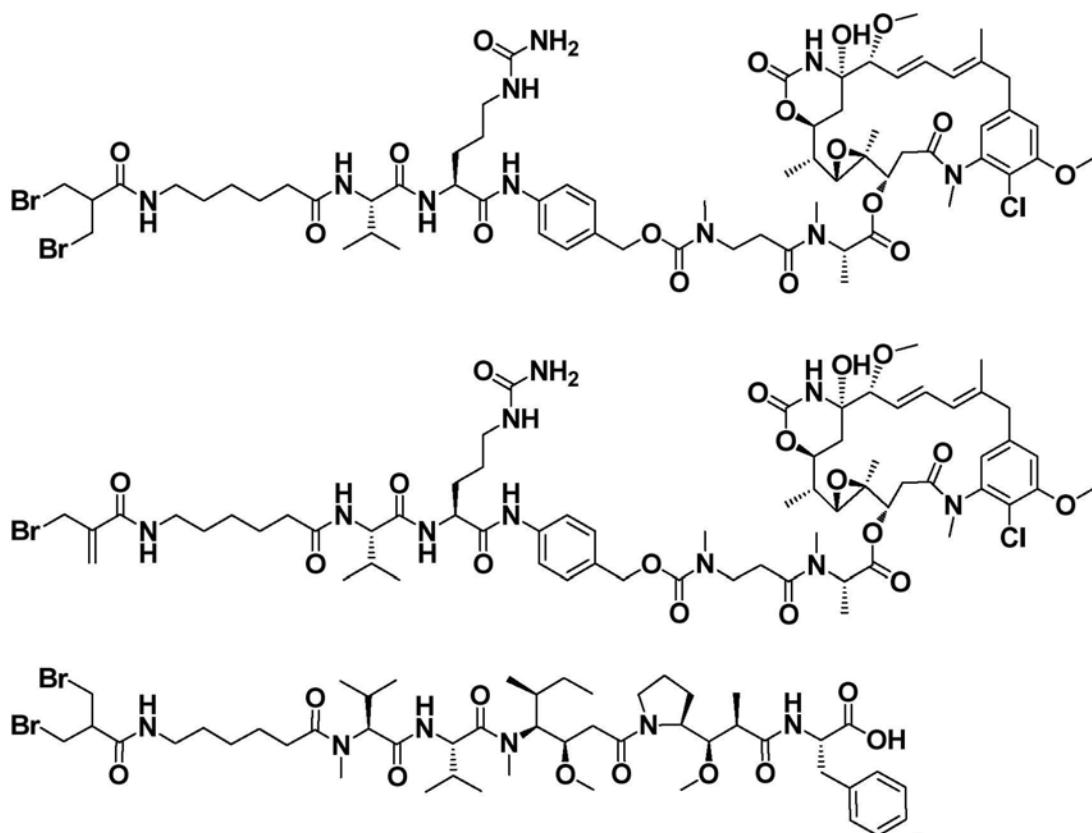
51. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:



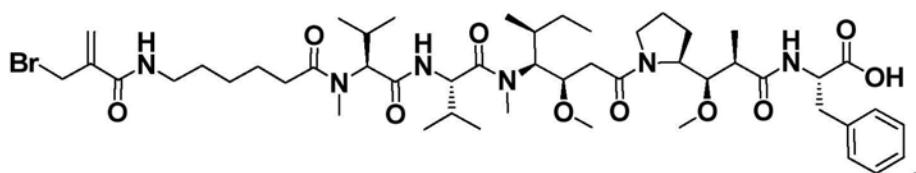
其中D是阿里他汀(auristatin)。

52. 根据权利要求28所述的化合物,其中所述化合物是:





或



53. 一种药物组合物，其含有：

治疗有效量的权利要求1-27中任一项的偶联物或其药学上可接受的盐，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

54. 权利要求1-27中任一项的偶联物或权利要求53的药物组合物在制备用于减少、延缓或阻止异常细胞生长的药物中的用途。

55. 权利要求1-27中任一项的偶联物或权利要求53的药物组合物在制备用于杀死细胞的药物中的用途。

56. 根据权利要求55的用途，其中所述细胞是肿瘤细胞。

57. 权利要求1-27中任一项的偶联物或权利要求53的药物组合物在制备用于对患有医疗疾病的个体进行治疗所述医疗疾病的药物中的用途。

58. 根据权利要求57的用途，其中所述个体是哺乳类动物。

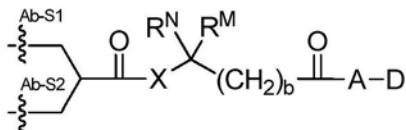
59. 根据权利要求57或56的用途，用于顺序或连续给予附加治疗。

60. 根据权利要求59的用途，其中所述附加治疗是放射疗法、化学疗法或其组合。

61. 权利要求1-27中任一项的偶联物在制备治疗癌症的药物中的用途。

62. 一种制备抗体-药物偶联物的方法，所述抗体-药物偶联物包括抗体、或其抗原结合

片段，其中所述抗体或其抗原结合片段与式(A)的至少一个部分进行偶联：



(A)

其中：

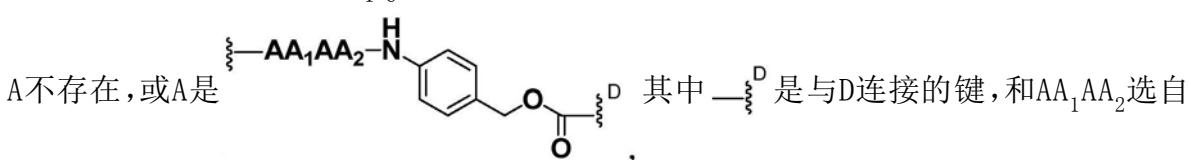
Ab-S1是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸硫原子连接；

Ab-S2是键，所述键与所述抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸硫原子连接；

X是-N(R^A)-或-O-；

其中R^A是氢或C₁₋₆烷基；

R^N和R^M各自独立地为氢或C₁₋₆烷基；



缬氨酸-瓜氨酸、瓜氨酸-缬氨酸、赖氨酸-苯丙氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸-缬氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-缬氨酸、苏氨酸-天冬酰胺、丝氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-丝氨酸、苯丙氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-苯丙氨酸、亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-亮氨酸、异亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-异亮氨酸、甘氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-甘氨酸、谷氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-谷氨酸、瓜氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-瓜氨酸、丙氨酸-天冬酰胺、和天冬酰胺-丙氨酸；

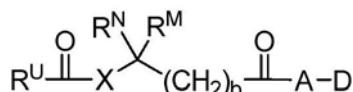
D是生物活性分子，其中所述生物活性分子是美登素类化合物或阿里他汀；和

b是从2至8的整数，

所述方法包括步骤

(a) 还原一个或多个存在于所述抗体或其抗原结合片段中的半胱氨酸残基之间的二硫键，从而形成两个巯基基团；

(b) 将所述抗体或其抗原结合片段与试剂偶联，所述试剂与源自步骤(a)的所述巯基基团形成共价键，其中所述试剂是式(L1)所示的化合物：



(L1)

其中

R^U是

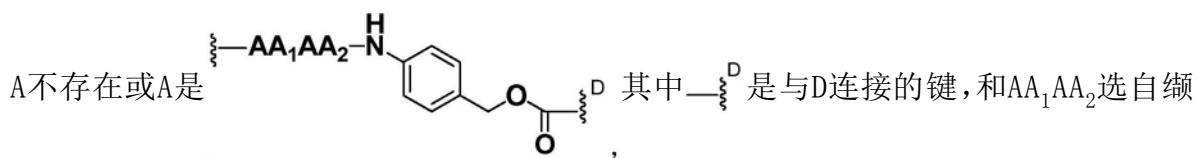


其中LG¹和LG²在每一种情况独立地为离去基团；

X是-N(R^A)-或-O-；

其中R^A是氢或C₁₋₆烷基；

R^N 和 R^M 各自独立地为氢或C₁₋₆烷基；



D是生物活性分子，其中所述生物活性分子是美登素类化合物或阿里他汀；和

b是从2至8的整数；和

其中所述抗体片段选自：Fab片段、F(ab')2片段、Fd片段、Fv片段、单链Fv(scFv)分子、dAb片段、和由氨基酸残基组成的最小识别单位，其模拟抗体的超突变区，或限制性FR3-CDR3-FR4肽。

63. 根据权利要求62的方法，所述方法进一步包括：通过色谱法、透析法、超过滤法、和/或正切流动过滤法纯化步骤(b)中所得的产品。

64. 根据权利要求62所述的方法，其中所述离去基团是卤素。

65. 根据权利要求62所述的方法，其中X是-NH-。

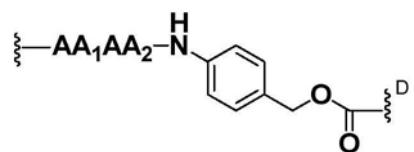
66. 根据权利要求62所述的方法，其中X是-O-。

67. 根据权利要求62所述的方法，其中R^N和R^M均为氢。

68. 根据权利要求62所述的方法，其中b是从3-6的整数。

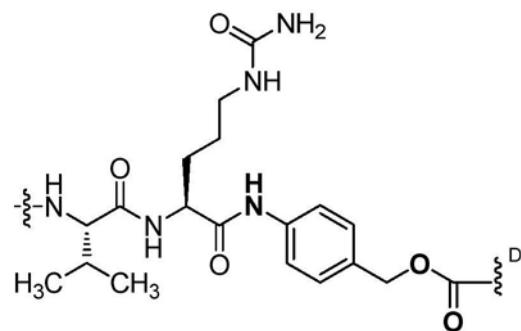
69. 根据权利要求62所述的方法，其中R^N和R^M均为氢；且b是4。

70. 根据权利要求62所述的方法，其中A是：



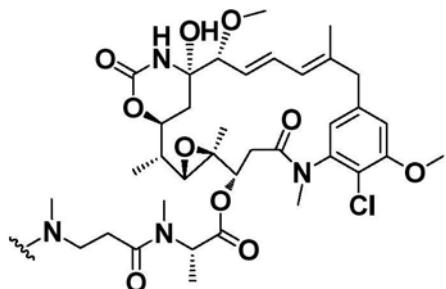
其中—^D是与D连接的键。

71. 根据权利要求62所述的方法，其中A是：

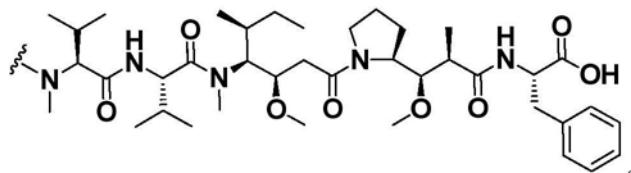


其中—^D是与D连接的键。

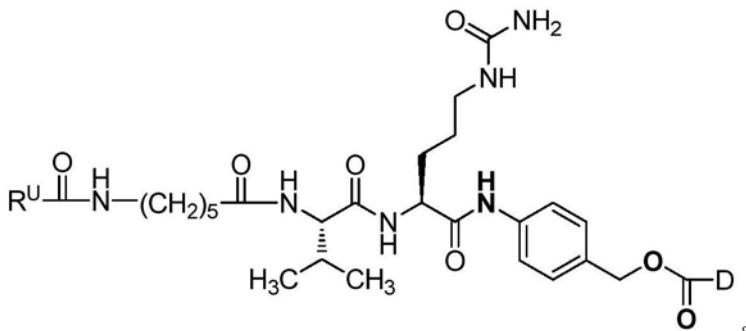
72. 根据权利要求62所述的方法,其中A不存在。
73. 根据权利要求62所述的方法,其中AA₁AA₂是缬氨酸-瓜氨酸。
74. 根据权利要求62所述的方法,其中D是阿里他汀(auristatin)。
75. 根据权利要求62所述的方法,其中D是MMAE、MMAD、或MMAF。
76. 根据权利要求62所述的方法,其中D是美登素类化合物。
77. 根据权利要求62所述的方法,其中D是



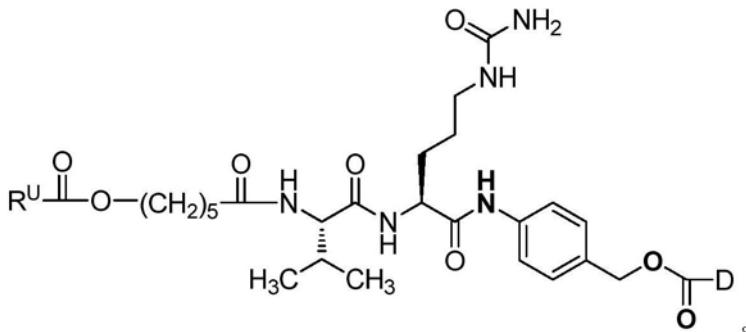
78. 根据权利要求62所述的方法,其中D是



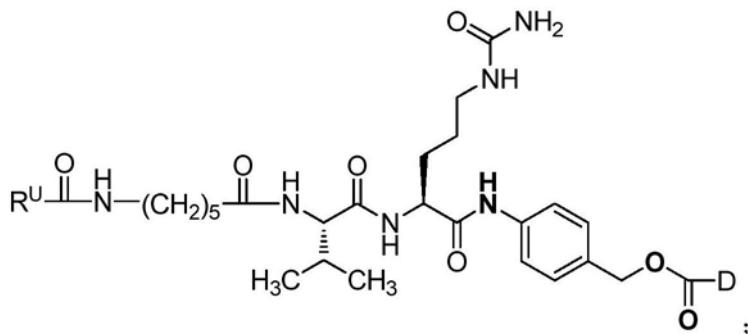
79. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:



80. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:

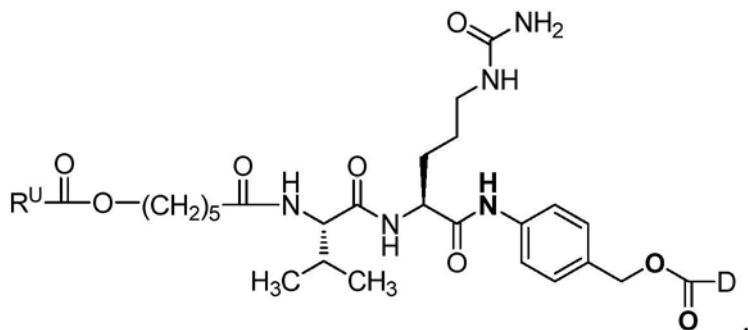


81. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:



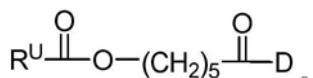
其中D是美登素类化合物。

82. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:

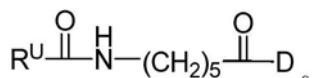


其中D是美登素类化合物。

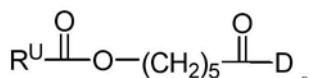
83. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:



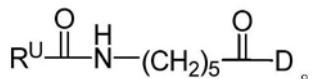
84. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:



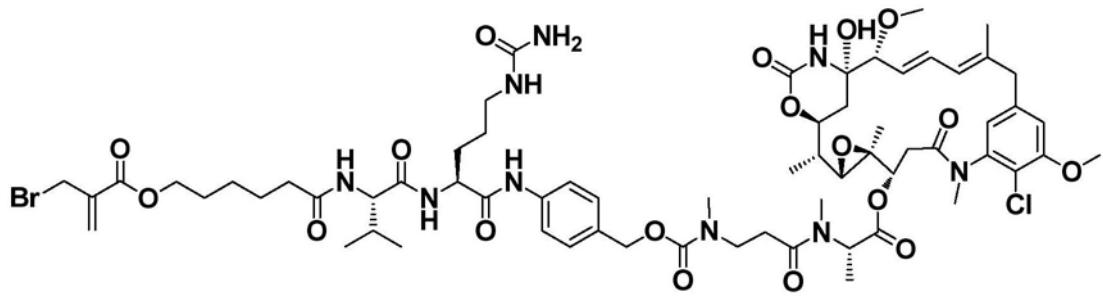
85. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:

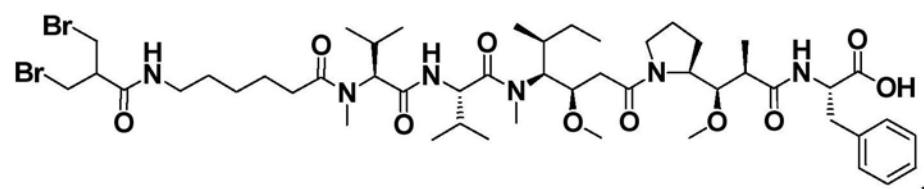
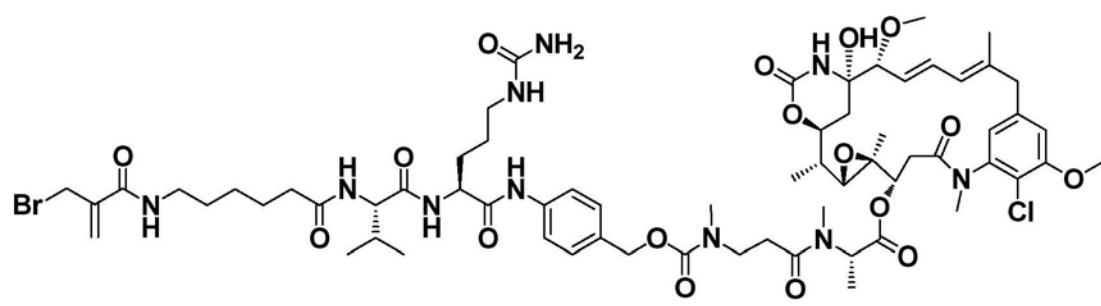
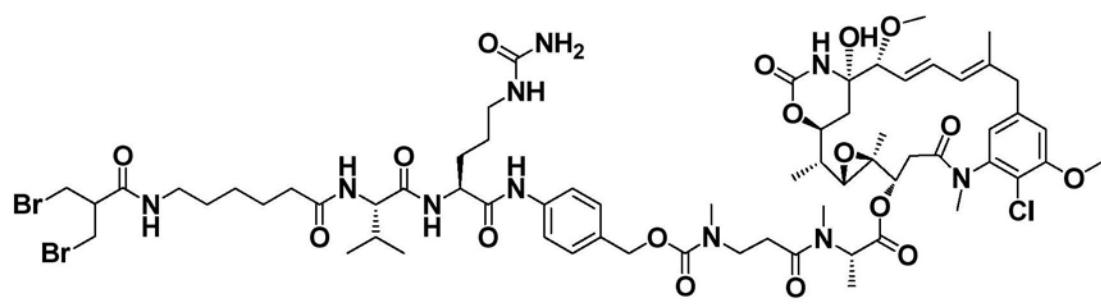


86. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:

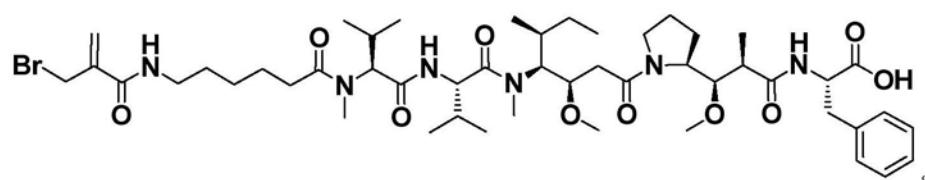


87. 根据权利要求62所述的方法,其中通式(L1)所示化合物是:





或



生物活性分子偶联物、试剂和制备方法及其治疗用途

技术领域

[0001] 本发明涉及包含生物活性分子的偶联物，所述生物活性分子通过连接体(linker)化合物与多聚体抗原-结合化合物进行连接。本发明还提供了使所述生物活性分子与所述多聚体抗原-结合化合物进行偶联的试剂和方法。

背景技术

[0002] 抗体药物偶联物(ADC)是通过化学连接体使抗体与细胞毒类药物进行偶联的药物。ADC利用抗体靶向结合的特异性将细胞毒类药物递送给异常细胞。常规的ADC技术是通过连接体，使药物与所述抗体中特定的氨基酸残基发生化学反应进行连接。例如，所述连接体可连接所述抗体的重链和/或轻链上的一个或多个半胱氨酸残基的所述巯基基团。然而，半胱氨酸残基偶联中常见的问题是，这一过程需要打断一个或多个链间二硫键，所述二硫键通常用于保持所述抗体分子的结构和功能。半胱氨酸-偶联的ADCs能降低稳定性，如此可能阻碍所述ADC的结合和治疗特性。因此，需要一种技术，其既可对抗体上的半胱氨酸残基进行偶联，又不会对所述抗体的亲合力造成显著影响，例如，在所述偶联过程中，重新连接断裂的链间二硫键的半胱氨酸残基的偶联方法。

发明摘要

[0003] 本发明提供了可使生物活性化合物例如细胞毒类药物，与多聚体抗原-结合化合物例如抗体上的半胱氨酸残基进行连接的化学连接体，及其偶联物、含有其偶联物的药物组合物、制备方法、和包括给予相应药物的治疗疾病的方法。

[0004] 附图简要说明

[0005] 图1表示多聚体免疫球蛋白偶联物。

[0006] 图2表示在还原或非还原条件下IgG1抗体-溴甲基丙烯酸酯(1)偶联物的SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)图。

[0007] 图3表示在还原或非还原条件下IgG1抗体偶联典型小分子偶联物1、2、6、和9的SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)图。

[0008] 图4表示在还原和非还原条件下抗-PRLR抗体偶联典型连接体有效负载H1H6765P-26、H1H6765P-28和H1H6765P-29的SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)图。

[0009] 图5表示偶联物H1H6765P-28的ESI MS(电喷雾电离质谱)光谱图。

[0010] 图6表示偶联物H1H6765P-26的ESI MS光谱图。

[0011] 图7表示偶联物H1H6765P-26在HEK293、HEK293/hPRLR、和T47D中的选择性扩散能力。

[0012] 图8表示偶联物H1H6765P-28和H1H6765P-29在HEK293、HEK293/hPRLR、和T47D中的选择性扩散能力。

[0013] 详细说明

[0014] 在下述描述中对某些实施方案/实施例做出的引用被认为仅是对公开内容原理的

说明。此外,由于大量的修饰和变化对本领域技术人员而言将是显而易见的,因此其并不旨在将公开内容限制在本发明所描述的精确构造和过程。相应地,所有适当的修饰及其等同物可以落入本发明公开的范围内,并由下述权利要求进行限定。

[0015] I. 定义

[0016] 用于本说明书和以下权利要求中的术语“包括”、“含有”、“包含”和“具有”目的在于说明特征、整数、组分、或步骤的存在,但不排除所述一个或多个附加特征、整数、组分、或其步骤的存在或附加说明。

[0017] 用于本发明中任何实施例的一般术语具有如下定义;然而,所述含义不应受限于对术语本身意思范围的解读。

[0018] 符号 \curvearrowright 表示附着点或连接点。

[0019] 本发明使用的术语“偶联物”是指化合物,其含有多聚体抗原-结合化合物或多聚体免疫球蛋白,连接体和生物活性分子。示例性的例子包括具有通式(I)和图(1)的化合物。

[0020] 本发明使用的术语“间隔单元”是指连接体的化学结构单元,其用于从生物活性分子的空间上分离多聚体抗原-结合化合物或多聚体免疫球蛋白,以及用于允许在细胞内连接体分解代谢。“间隔单元”可表示为Z₁和Z₂。

[0021] 本发明使用的术语“烷基”是指具有通式C_nH_{2n+1}的烃基。烷基实例包括,但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基等等。进一步地烷基基团实例包括,但不限于,含有从1到10个碳原子,1到9个碳原子,1到8个碳原子,1到7个碳原子,1到6个碳原子,1到5个碳原子,1到4个碳原子,1到3个碳原子,1到2个碳原子或1个碳原子。

[0022] 本发明使用的术语“芳基”是指一价或多环芳香烃基。芳基基团实例包括,但不限于,具有6至18个碳原子。典型的芳香基团进一步包括,但不限于苯基、取代的苯基、萘基、蒽基、茚基、四氢萘基等等。

[0023] 本发明使用的术语“烯基”是指含有至少一个不饱和的位点的两个或多个碳原子的脂肪族类的直链或支链的一价烃基。烯基实例包括但不限于乙撑、乙烯基、烯丙基等等。

[0024] 本发明使用的术语“炔基”是指含有至少一个三键的一价脂肪族类烃基。炔基实例包括但不限于,具有二至二十个碳原子(和包含至少一个三键)。炔基实例也包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、己炔基等等。

[0025] 本发明使用的术语“环烷基”是指一价饱和碳环基。环烷基基团实例包括含有3至7个碳原子。典型的环烷基包括但不限于环丙基、环戊基和环己基。

[0026] 本发明使用的术语“杂芳基”是指在芳香环中含有至少一个杂原子的一价芳香基。杂芳基基团包括但不限于稠环系统(至少须有一个芳香环),其包含高达5至18个原子,其中包括一个或多个独立选自N、S或O的杂原子。进一步地,所述杂芳基基团包括但不限于吡啶基、三唑基、呋喃基、吡嗪基、噻吩基、异恶唑基、吗啉基、呋吖基、苯并噻唑基、喹唑啉基、和呋喃并吡啶基。

[0027] 本发明使用的术语“杂环”是指饱和的或部分饱和的碳环基,包括但不限于含有3至18个碳原子,其中至少一个环上有一个选自N、O、P和S的杂原子。例如,杂环可以是单环或双环。杂环基团实例包括但不限于吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢吡喃基、硫杂氧杂环己烷基(thioxanyl)、2H-吡喃基、二噁烷基、二噁烷基、哌啶基等等。

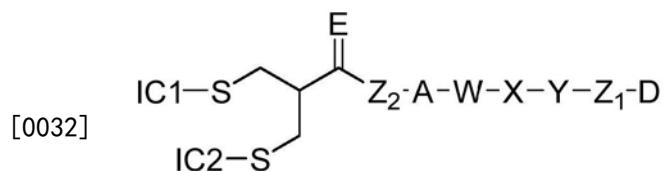
[0028] 本发明使用的术语“药学上可接受的盐”是指本发明所述的偶联化合物的有机和

无机盐，例如，通式(I)、图片(1)、和通式(III)所示的化合物。所述盐是药学上可接受的且包括硫酸盐、柠檬酸盐、硝酸盐、磷酸盐、抗坏血酸盐、氯化物、溴化物、葡萄糖酸盐、苯甲酸盐、草酸盐、泛酸盐等等。要注意的是本发明中药学上可接受的盐在其结构中可能包括具有一个以上带电原子和一个或多个反荷离子。本发明将偶联化合物制备为药学上可接受的盐是本领域技术人员所熟知的。

[0029] 本发明使用的术语“治疗有效量”是指施用后产生预期效果的量。准确的用量视治疗目的而定，并将由本领域技术人员使用已知技术来确定（参见，例如Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*）。

[0030] II. 多聚体抗原-结合化合物偶联物

[0031] 本发明提供了包括式(I)的多聚体抗原-结合化合物偶联物：



(I)

[0033] 其中：

[0034] IC1是第一免疫球蛋白链，和

[0035] IC2是第二免疫球蛋白链；

[0036] 进一步其中IC1和/或IC2独立或一起包括至少一个抗原-结合域；

[0037] Z₁和Z₂各自独立地不存在或各自独立地为间隔单元；

[0038] E是O、S、NR₄⁻或CR₅R₆；

[0039] D是生物活性分子；

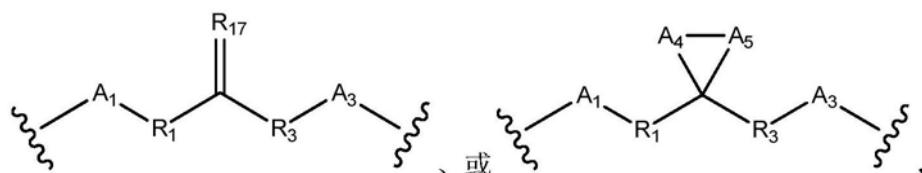
[0040] A不存在、或A是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽；

[0041] W不存在、或W是-O-、-S-、-CR₅R₆⁻、或-NR₄⁻；

[0042] X不存在、或X是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基，

[0043] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的；和

[0044] Y不存在、或Y是



[0045] 其中：

[0046] A₁、A₃、R₁和R₃各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆⁻、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO₂-、-NR₄⁻、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)-O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、或-O-C(=O)-NR₄⁻，

[0047] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基是任选取代的；

- [0048] A_4 和 A_5 各自独立地为 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_{18}-$ 、或 $-CR_5R_6-$ ；
- [0049] R_{17} 是 O 、 S 、 NR_{18} 、或 CR_5R_6 ；
- [0050] R_{18} 是H、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、或酰基，
- [0051] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；
- [0052] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_8 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；
- [0053] p_1 、 p_2 和 p_3 各自独立地为0、或从1到100的整数；和
- [0054] x 是0、1或2。

[0055] 在一些实施例，多聚体免疫球蛋白或抗体-结合化合物是在生理条件下具有与给定的偶联配体特异性结合能力的任何分子。在某些方面，所述多聚体免疫球蛋白或抗原-结合化合物能偶联一个细胞或细胞群。

[0056] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)表示的抗原-结合化合物-偶联物，其中，IC1是其抗体或抗原-结合部分的第一重链；和IC2是其所述抗体或抗原-结合部分的第二重链。在一些子实施例，其中IC1和IC2是抗体重链，一个或多个IC1和/或IC2可以单独地与其抗体轻链或抗原-结合部分相关联或连接(例如：形成完整的四聚抗体结构)。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)表示的抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物在还原条件下是基本上稳定的。在进一步实施例，本发明提供的通式(I)所示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中D为细胞毒类药物。

[0057] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)所示的抗原-结合化合物-偶联物，其中IC1是其抗体或抗原-结合部分的重链；IC2是所述抗体或其抗原-结合部分的轻链。在一些子实施例，其中IC1是抗体重链和IC2是抗体轻链，所述IC1/IC2结构可以与其他抗体重链/轻链对相关联或连接(例如：形成完整的四聚抗体结构)。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)所示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物在还原条件下是基本上稳定的。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)所示的抗原-结合化合物-偶联物，其中D为细胞毒类药物(cytotoxic agent)。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)所示的抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0058] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)所示的抗原-结合化合物-偶联物，其中在还原条件下和/或在一种或多种还原剂存在下，所述抗原-结合化合物-偶联物是基本上稳定的。此处公开的还原剂，包括可断裂或破坏二硫键的任何试剂。适当的还原剂例子包括二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇(BME)、2-巯基乙胺(MEA)、甲基硫醇钠、2-巯基乙烷磺酸钠、半胱氨酸、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、及其衍生物。还原条件包括，使用一种或多种还原剂和/或高温条件下进行孵化或处理。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)所示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中D为细胞毒类药物。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)所示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0059] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)所示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中D为细胞毒类药物(也是指本发明所述的“生物活性分子”)。本发明使用的细胞毒类药物包括，损害细胞生长、发育、或繁殖的任何试剂。本发明使用的细胞毒类药物的实例包括，例

如:1-(2-氯乙烷)-1,2-二甲基磺酰基酰肼、1,8-二羟基-二环[7.3.1]十三烷基-4,9-二烯-2,6-二炔-13-酮、1-去氢睾酮、5-氟脲嘧啶、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、9-氨基喜树碱、放线菌素D、鹅膏蕈碱(amanitins)、氨基蝶呤、蛇形菌素(anguidine)、蒽环类抗生素(anthracycline)、安曲霉素(AMC)、阿里他汀类(auristatins)、博来霉素(bleomycin)、白消安、丁酸、卡利奇霉素类(calicheamicins)、喜树碱(camptothecin)、洋红霉素类(carminomycins)、卡氮芥(carmustine)、西马多丁类(cemadotins)、顺氯氨铂(cisplatin)、秋水仙碱(colchicine)、考布他汀类(combretastatins)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、阿糖腺苷(cytarabine)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、更生霉素(dactinomycin)、道诺霉素(daunorubicin)、氨烯咪胺(decarbazine)、二乙酸基戊烷基阿霉素(diacetoxypentyl doxorubicin)、二溴甘露醇、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracidone)、双萨拉唑类(disorazoles)、多拉司他汀(dolastatin)、亚德里亚霉素(doxorubicin)、倍癌霉素(duocarmycin)、棘霉素类(echinomycins)、软珊瑚醇类(eleutherobins)、吐根碱(emetine)、埃博霉素类(epothilones)、埃斯培拉霉素(esperamicin)、雌二醇氮芥(estramustines)、溴化乙锭(ethidium bromide)、依托泊苷(etoposide)、氟二氧嘧啶(fluorouracils)、格尔德霉素(geldanamycins)、短杆菌肽D(gramicidin D)、糖皮质激素(glucocorticoids)、依立替康(irinotecans)、来普霉素(leptomycins)、长春罗新(1eurosines)、利多卡因(lidocaine)、洛莫司汀(CCNU)、美登素类(maytansinoids)、盐酸氮芥(mechlorethamine)、美法仑(melphalan)、巯基嘌呤(mercaptopurines)、氨甲喋呤(methopterins)、氨甲叶酸(methotrexate)、光神霉素(mithramycin)、丝裂霉素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、N8-乙酰基-亚精胺(N8-acetyl spermidine)、足叶草毒素(podophyllotoxins)、普鲁卡因(procaine)、普萘洛尔(propranolol)、蝶啶(pteridines)、嘌呤霉素(puromycin)、吡咯并苯并二氮杂类化合物(pyrrrolobenzodiazepines)(PBDs)、根霉素(rhizoxins)、链脲佐菌素(streptozotocin)、他利霉素(tallysomicins)、紫杉醇(taxol)、替尼泊昔(tenoposide)、盐酸丁卡因(tetracaine)、苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、托马霉素(tomaymycins)、拓扑替康(topotecans)、微管蛋白细胞溶素(tubulysin)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、长春瑞滨(vinorelbines)、司普力西欧他汀(spliceostatin)、鹅膏素(amanatin)、或卡奇霉素(calicheamicin)及以上所述的衍生物。根据某些实施例,所示细胞毒类药物是美登素类化合物,如DM1或DM4,托马霉素类衍生物,或多拉司他汀类衍生物。本领域已知的其他细胞毒类药物考虑包含在本发明范围内,其包括,例如,蛋白质毒素如蓖麻毒素(ricin)、艰难梭菌毒素(C. difficile toxin)、假单细胞菌外毒素(pseudomonas exotoxin)、蓖麻毒素(ricin)、白喉毒素(diphtheria toxin)、肉毒杆菌毒素(botulinum toxin)、异株泻根毒蛋白(bryodin)、皂草毒蛋白(saporin)、美洲商陆毒素(pokeweed toxins)(即,商陆毒素(phytolaccatoxin)、和商陆皂甙元(phytolaccigenin)),及其他如Sapra et al., Pharmacol.& Therapeutics, 2013, 138:452-469所述的那些细胞毒类药物。

[0060] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)所示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中所述抗原-结合化合物-偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0061] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)所示的抗原-结合化合物-偶联物,其中,Z₂

表示如下结构通式：

[0062] $-Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}-$,

[0063] 其中：

[0064] Z_{2A} 、 Z_{2B} 、 Z_{2C} 和 Z_{2D} 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-\text{CR}_5\text{R}_6-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_x-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_x-\text{CH}_x-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_x-\text{CH}_x-\text{CH}_x-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{O}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{NR}_4-$ 、 $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$ 、或 $-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$ ，

[0065] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_8

[0066] 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；和 Z_1 表示如下结构通式：

[0067] $-Z_{1A}-Z_{1B}-Z_{1C}-Z_{1D}-$,

[0068] 其中：

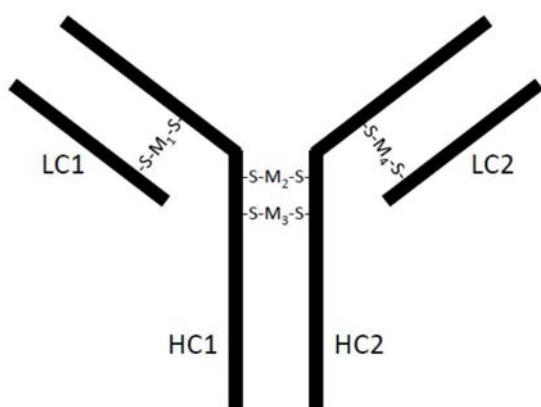
[0069] Z_{1A} 、 Z_{1B} 、 Z_{1C} 和 Z_{1D} 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-\text{CR}_5\text{R}_6-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_x-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_x-\text{CH}_x-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_x-\text{CH}_x-\text{CH}_x-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-$ 、 $-\text{S}-\text{C}(=\text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{O}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{NR}_4-$ 、 $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_8)-$ 、 $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 、 $-\text{N}(\text{R}_4)-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}_4)-$ 、 $-\text{O}-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$ 、或 $-\text{C}(=\text{S})-\text{N}(\text{R}_4)-$ ，

[0070] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_8

[0071] 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；

[0072] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和x是0、1或2。

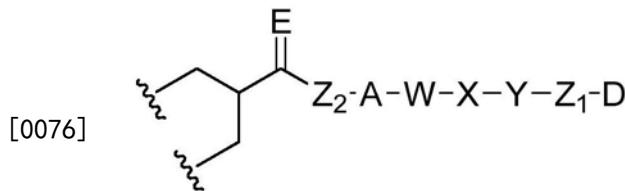
[0073] 本发明还提供了一种多聚体免疫球蛋白偶联物，其具有如图(1)所示的结构：



图(1)

[0075] 其中一个或多个 M_1 、 M_2 、 M_3 、和/或 M_4 各自独立地不存在（即，所述相邻的S原子通过

二硫键直接与另一原子连接)、或各自独立地具有如式(II)所示的结构



式 (II)

[0077] 其中

[0078] LC1是第一抗体轻链，

[0079] LC2是第二抗体轻链，

[0080] HC1是第一抗体重链，和

[0081] HC2是第二抗体重链；

[0082] 其中LC1、LC2、HC1和/或HC2包括至少一个抗原-结合域；

[0083] E是O、S、NR₄⁻、或CR₅R₆⁻；

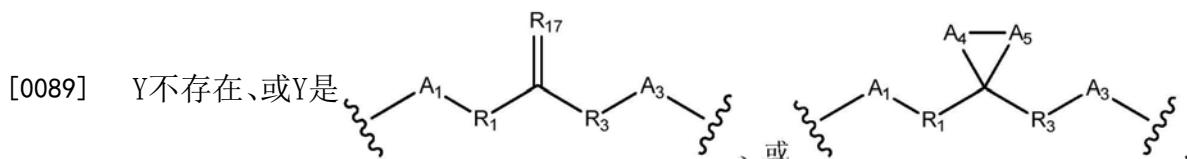
[0084] D是生物活性分子；

[0085] A不存在、或A是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽；

[0086] W不存在、或W是-O-、-S-、-CR₅R₆⁻、或-NR₄⁻；

[0087] X不存在、或X是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基，

[0088] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的；和



[0090] 其中A₁、A₃、R₁和R₃各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆⁻、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-(CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄⁻、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、或-O-C(=O)-NR₄⁻，

[0091] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；

[0092] A₄和A₅各自独立地为-O-、-S-、-NR₁₈⁻、或-CR₅R₆⁻；

[0093] R₁₇是O、S、NR₁₈⁻、或CR₅R₆⁻；

[0094] R₁₈是H、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基，

[0095] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；

[0096] R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0097] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0098] x是0、1或2。

[0099] 在一些实施例，本发明提供多聚体免疫球蛋白偶联物，其具有如图(1)所示的结

构,其中Z₂表示如下结构通式:

[0100] - Z_{2A} - Z_{2B} - Z_{2C} - Z_{2D} - ,

[0101] 其中：

[0102] Z_{2A} 、 Z_{2B} 、 Z_{2C} 和 Z_{2D} 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-CR_5R_6-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$ 、 $-(O-(CH_2)_{p2}-)_{p3}-$ 、 $-(CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-C(=S)-NH-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-S-C(=S)-S-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR_4-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-O-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-O-C(=S)-N(R_4)-$ 、或 $-C(=S)-N(R_4)-$ ，

[0103] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和R₄、R₅、R₆和R₈

[0104] 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；和Z₁表示如下结构通式：

[0105] -Z_{1A}-Z_{1B}-Z_{1C}-Z_{1D}- ,

[0106] 其中：

[0107] Z_{1A}, Z_{1B}, Z_{1C} 和 Z_{1D} 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-CR_5R_6-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$ 、 $-(O-(CH_2)_{p2}-)_{p3}-$ 、 $-(O-(CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-C(=S)-NH-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-S-C(=S)-S-$ 、 $-S-O-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR_4-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$ 、 $N(R_4)-C(=O)-O-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-$ 、 $C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-O-C(=S)-N(R_4)-$ 、 $-N(R_4)-C(=S)-$ ，或 $-C(=S)-N(R_4)-$ ，

[0108] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和R₄、R₅、R₆和R₇。

[0109] 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；

[0110] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0111] x是0, 1, 或2。

[0112] 在一些实施例，本发明提供了多聚体免疫球蛋白偶联物，其具有如图(1)所示的结构，其中所述偶联物在还原条件下是基本上稳定的。在进一步实施例，本发明提供了多聚体免疫球蛋白偶联物，其具有如图(1)所示的结构，其中所述偶联物特异性结合癌症相关的抗原。

[0113] 在一些实施例，本发明提供了多聚体免疫球蛋白偶联物，其具有如图(1)所示的结构，其中所述偶联物特异性结合癌症相关的抗原。

[0114] A. 抗体和多聚体抗原-结合化合物

[0115] 在一些实施例，本发明使用的的多聚免疫球蛋白或抗原-结合化合物，包括抗体。本发明使用的术语“抗体”，是指任何抗原-结合分子或包括最少一种互补决定区(CDR)的分子复合物，其特异性地结合或作用于特定抗原。术语“抗体”包括免疫球蛋白分子，其包括四条多肽链、通过二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)、及其多聚体(例如IgM)。每

条重链包括重链可变区(此处缩写为HCVR或V_H)和重链恒定区。所述重链恒定区包括三个域,C_H1、C_H2和C_H3。每条轻链包括轻链变异区(本发明缩写为LCVR或V_L)和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个域(C_L1)。所述V_H和V_L区可进一步细分为高变区,其被称为互补决定区(CDRs),所述V_H和V_L区可进一步散布在更保守的区中,其被称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成,从氨基-末端到羧基-末端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本发明公开的不同实施例,抗体的所述FR可能与人类生殖系序列一致,或可能经自然或人工改性。氨基酸共有序列可能被界定为基于两个或更多CDR的对比分析。

[0116] 本发明使用的术语“抗体”,也包括整条的抗体分子的抗原-结合片段。术语抗体的“抗原-结合部分”,抗体的“抗原-结合片段”,等,本发明使用的,包括任何天然存在、酶转化、合成、或基因工程多肽或糖蛋白特异性结合抗原形成复合物。抗体的抗原-结合片段可以从整条抗体分子中获得,例如,使用任何合适的标准技术如蛋白酶解或重组基因工程技术,所述重组基因工程技术涉及DNA编码抗体可变区和任选地恒定区的操纵和表达。这些DNA是已知的,和/或很容易从,例如,商业采购、DNA库(包括,例如,噬菌体-抗体库)得到,或能合成。所述DNA可以测序,化学加工,使用分子生物技术,例如,将一个或多个可变和/或恒定区排序到合适的序列中,或引入密码子,创建半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0117] 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)由氨基酸残基组成的最小识别单位,其模拟抗体的超突变区(例如,分离的互补决定区(CDR)诸如CDR3肽),或限制性FR3-CDR3-FR4肽。其他工程分子,诸如结构域-特异性抗体,单结构域抗体,结构域-删除抗体(domain-deleted antibodies),嵌合抗体,CDR-移植抗体,双抗体,三抗体,四抗体,微抗体,纳米抗体(例如单价纳米抗体,双价纳米抗体等),小模块化免疫药物(SMIPs),和鲨鱼可变IgNAR结构域,也包含在本发明使用的“抗原-结合片段”表达中。

[0118] 抗体的抗原-结合片段通常包含至少一个可变区。所述可变区可以是任何尺寸或氨基酸组合物,且通常包含至少一个CDR,其与一个或多个框架序列毗邻或位于框架中。在抗原-结合片段中含有与V_L域相关的V_H域,所述V_H和V_L域在任何适当的排列中彼此位于相对的位置。例如,所述变异区可以是二聚化且包含V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。或者,抗体的所述抗原-结合片段可包含单体的V_H或V_L结构域。

[0119] 在一些实施例,抗体的抗原-结合片段可包括至少一个可变区,通过共价键,与至少一个恒定区连接。非限制性的,可变和恒定区的实例结构在本发明公开的抗体的抗原-结合片段中可找到,其包括:(i)V_H-C_H1;(ii)V_H-C_H2;(iii)V_H-C_H3;(iv)V_H-C_H1-C_H2;(v)V_H-C_H1-C_H2-C_H3;(vi)V_H-C_H2-C_H3;(vii)V_H-C_L;(viii)V_L-C_H1;(ix)V_L-C_H2;(x)V_L-C_H3;(xi)V_L-C_H1-C_H2;(xii)V_L-C_H1-C_H2-C_H3;(xiii)V_L-C_H2-C_H3;和(xiv)V_L-C_L。在可变和恒定区的任何构型中,包括上面所列任何示例性的结构,所述可变和恒定区要么相互直接连接彼此,要么通过整条或部分铰链或连接区进行连接。所述铰链区可由至少2个(例如5、10、15、20、40、60或更多)氨基酸组成,其在单个多肽分子中的相邻可变和/或恒定区之间形成柔性的或半柔性的链接。更多地,本发明公开的抗体的抗原-结合片段可包括以上所述任何所述可变和恒定区结构的同源二聚体或异质二聚体(或其他多聚体),所述同源二聚体或异质二聚体(或其他多聚体)以非共价键方式彼此和/或与一个或多个单体V_H或V_L域相连接(例如:通过二硫键)。

[0120] 就整条抗体分子而言,抗原-结合片段可以是单特异性的或多特异性的(如双特异

性的)。抗体的多特异性的抗原-结合片段通常包含至少两个不同的可变区，其中每个可变区能够特异地结合单独的抗原或同一抗原上的不同抗原表位。任何多特异性抗体样式可能适合用于本发明公开的抗体的抗原-结合片段情况下，其用本领域常规技术获得。

[0121] 本发明公开的某些实施例，本发明公开的所述抗体是人源抗体。本发明使用的术语“人源抗体”，旨在包含具有可变和恒定区的抗体，其取自于人类生殖细胞的免疫球蛋白序列。本发明公开的所述人源抗体可包含不通过人类生殖细胞的免疫球蛋白序列进行编码的氨基酸残基(例如，通过在体外的随机或位点-特异性的突变或通过在体内体细胞突变而引起的变异)，例如在CDR中且尤其是CDR3中。然而，本发明使用的术语“人源抗体”，不旨在包括通过移植在人类的框架序列上的抗体，其取自其他哺乳动物物种的生殖细胞的CDR序列，例如老鼠。

[0122] 在一些实施例，本发明公开的抗体可以是重组人源抗体。术语“重组人源抗体”，本发明使用的，旨在包括所有人源抗体，其通过重组方法制备、表征、创造或分离得来的，例如使用重组表达载体转录到宿主细胞(如下所述)表达的抗体，从重组中分离的抗体，组合的人源抗体库(如下所述)，从人体免疫球蛋白基因转基因的动物(如老鼠)中分离的抗体(参见例如，Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)或通过其他方式制备、表征、创造或分离得来的抗体，所述其他方式涉及将人类生殖细胞的免疫球蛋白序列拼接到其他DNA序列。此种重组人源抗体含源自于人类生殖细胞的免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。在一些实施例，然而，此种重组人源抗体受到体外诱变(或，当用于人体Ig序列的动物转基因时，则体内细胞发生诱变)，因此所述重组抗体的所述V_H和V_L域的氨基酸序列是序列，即源自于人类生殖细胞和与人类生殖细胞相关的V_H和V_L序列，其在人体内的人源抗体生殖细胞库中是不可能自然存在的。

[0123] 在一些实施例，其中本发明使用的所述多聚体免疫球蛋白或抗原-结合化合物是抗体或其抗原-结合片段，所述抗体或抗原-结合片段与一个或多个抗原结合配体结合。所述抗原-结合配体可以是多肽，例如跨膜分子(如受体)或生长因子。抗原实例包括，但不限于，分子如肾素；生长激素，包括人生长激素和牛生长激素；生长激素释放因子；甲状旁腺素；促甲状腺激素；脂蛋白；α1-抗胰蛋白酶；胰岛素A-链；胰岛素B-链；胰岛素原；促卵泡激素；抑钙素；促黄体激素；胰高血糖素；凝血因子如vmc因子、IX因子、组织因子(TF)、和血管性血友病因子；抗凝血因子如蛋白C；心钠素；肺表面活性剂；纤溶酶原激活剂，如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原激活物(t-PA)；蛙皮素；凝血酶；造血生长因子；肿瘤坏死因子-α和β；脑啡肽酶；RANTES(调节活化正常T细胞表达和分泌)；人类巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1-α)；血清白蛋白，如人血清白蛋白；抑制苗勒管物质；耻骨松弛激素A-链；耻骨松弛激素B-链；松弛素；老鼠性腺促素相关肽；微生物蛋白，如β内酰胺酶、脱氧核糖核酸酶；19E；细胞毒T-淋巴细胞相关抗原(CTLA)，如CTLA-4；抑制素；激活素；血管内皮细胞生长因子(VEGF)；激素或生长因子受体；蛋白A或D；类风湿因子；神经营养因子如骨胳神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、-4、-5、或-6(NT-3、NT4、NT-5、或NT-6)，或神经生长因子如NGF-β；血小板源生长因子(PDGF)；纤维母细胞生长因子如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)如TGF-α和TGF-β，包括TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4、或TGF-β5；胰岛素样生长因子-1和-II(IGF-1和IGF-II)；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, CEA, TENB2，

EphA受体,EphB受体,叶酸受体,FOLRI,间皮素,畸胎瘤衍化生长因子单克隆抗体(cripto), $\alpha\beta6$,整合素,VEGF,VEGFR,EGFR,转铁蛋白受体,1RTAI,1RTA2,1RTA3,1RTA4,1RTA5;CD蛋白如CD2,CD3,CD4,CD5,CD6,CD8,CDII,CDI4,CDI9,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,CDI52,或与一种或多种肿瘤相关抗原或细胞表面受体相结合的抗体,其公开在US公开专利号2008/0171040或US公开专利号2008/0305044中,并其整体通过引用并入本发明;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形态生成蛋白(BMP);干扰素,如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSFs),如:M-CSF、GM-CSF、和G-CSF;白细胞介素(ILs),如IL-1至IL-10;表面膜蛋白;T-细胞受体;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;禀呈素(addressins);调控蛋白;整合素,诸如CD11a,CD11b,CD11c,CDI8,ICAM,VLA-4和VCAM;肿瘤相关的抗原如AFP,ALK,B7H4,BAGE蛋白, β -连环蛋白,brc-abl,BRCA1,BORIS,CA9(碳酸酐酶IX),半胱天冬酶-8,CD20,CD40,CD123,CDK4,CEA,CLEC12A,c-kit,cMET,CTLA4,细胞周期素-B1,CYP1B1,EGFR,EGFRvIII,内皮糖蛋白,Epcam,EphA2,ErbB2/Her2,ErbB3/Her3,ErbB4/Her4,ETV6-AML,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/EBNA1,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,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,Stear-1,Stear-2,STn,生存素,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,和上述所列任意多肽的片段。

[0124] 在一些实施例,所述抗体是抗-PRLR抗体,例如U.S.专利公开号2015/0056222A1所公开的那些抗体。

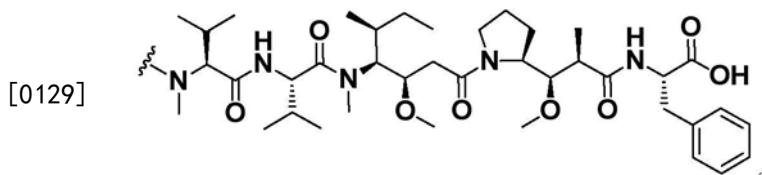
[0125] 本发明实施例所述的治疗用途是靶向特异性的。一些实施例,制备多聚体免疫球蛋白或抗原-结合化合物使其与抗原相互作用和结合,所述抗原界定为肿瘤抗原,其包括特异于肿瘤类的抗原或在特定类型的肿瘤上共享、过表达或修饰的抗原。示例性的例子包括肺癌的 α -辅肌动蛋白-4,黑色素瘤的ARTC1,慢性骨髓白血病的BCR-ABL融合蛋白,B-RAF,黑色素瘤的CLPP或Cdc27,鳞状细胞癌的CASP-8,和肾细胞癌hsp70-2以及如下共享的肿瘤特异性抗原,例如:BAGE-1,GAGE,GnTV,KK-LC-1,MAGE-A2,NA88-A,TRP2-INT2。

[0126] B.生物活性分子

[0127] 本发明所述生物活性分子(也涉及此处所述如“药物”,“毒素”,“细胞毒类药物”,“化疗药物”诸如此类)包括任何分子,当针对特定细胞、细胞类别、或组织时,所述分子对哺乳动物具有治疗用途。在典型的实施例,所述分子可有效地递送至所述哺乳动物体内的靶标,以及尤其是可有效地递送至细胞,并进入细胞内(如,内吞作用),同释放进入所述血管或淋巴系统的分子相比。

[0128] 一方面,生物活性分子是引起抑制,减缓,减少,和/或防止细胞生长的化合物。生物活性分子也可以通过坏死或凋亡致使细胞死亡。在本发明描述的用于偶联化合物中示例性的生物活性分子包括美登素类化合物,(如DM1,DM4,或其衍生物,等),阿里他汀类(如

MMAE, MMAD, MMAF, 等), 倍癌霉素(如MGBA), 多拉司他汀, 类毒素, 及其他化疗有效药物。一些实施例, 生物活性分子(I)具有如下结构:



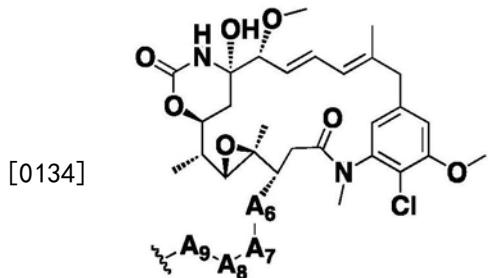
[0130] 生物活性分子的其他具体实例, 并可用于本发明的, 包括, 例如, 1-去氢睾酮、2-吡咯啉多柔比星、5-氟尿嘧啶、6-巯嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、鹅膏素(amanatin)、放线菌素D、蒽环霉素(如PNU-159682)、氨茴霉素(AMC)、博来霉素、白消安、卡利奇霉素、卡莫司汀顺铂、秋水仙碱、氨基吗啉基阿霉素(cyanomorpholino-doxorubicin)、环磷酰胺、阿糖胞苷、细胞松弛素B、放线菌素、道诺霉素、氨烯咪胺、二溴甘露醇、二羟基炭疽二酮、阿霉素、依米丁、表阿霉素、溴化乙锭、依托泊苷、短杆菌肽D、糖皮质激素、利多卡因、洛莫司汀(CCNU)、氮芥、美法仑、氨甲蝶呤、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、吗啉基-阿霉素、普鲁卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、吡咯并苯并二氮杂类化合物、西伯利亚霉素、链脲霉素、紫杉醇、替尼泊苷、丁卡因、苯丁酸氮芥、单端孢霉烯族毒素类、微管蛋白细胞溶素(tubulysin)、长春新碱、及其立体异构体、电子等排体、及类似物或上述任一的衍生物。

[0131] 在一些实施例, 所述生物活性分子为美登素类化合物或美登素类化合物类似物。本发明使用的示例性美登素类化合物在Widdison et al., J.Med.Chem., 2006, 49, 4392-4408中有描述, 并通过所有目的引入全文参考。在一些实施例中, 所述生物活性分子指在WO 2014/145090A1中所述的美登素类化合物。

[0132] 本发明使用的细胞毒类药物实例也包括, 但不限于, 1-(2-氯乙烷)-1,2-二甲基磺酰基酰肼、1,8-二羟基-二环[7.3.1]十三烷基-4,9-二烯-2,6-二炔-13-酮、1-去氢睾酮、5-氟脲嘧啶、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、9-氨基喜树碱、放线菌素D、鹅膏素、氨基蝶呤、蛇形菌素、蒽环霉素、安曲霉素(AMC)、阿里他汀类、博来霉素、白消安、酪酸、卡利奇霉素、喜树碱、洋红霉素、卡氯芥、西马多丁、顺氯氨铂、秋水仙碱、考布他汀、环磷酰胺、阿糖腺苷、松胞菌素B、放线菌素、道诺霉素、鸨烯咪胺、二乙酸基戊烷基阿霉素、二溴甘露醇、二羟基蒽二酮、双萨拉唑、多拉司他汀、亚德里亚霉素、倍癌霉素、棘霉素、软珊瑚醇、吐根碱、埃博霉素、拉霉素、雌二醇氮芥、溴化乙锭、依托泊苷、氟二氧嘧啶、格尔德霉素、短杆菌肽D、糖皮质激素、依立替康、来普霉素、长春罗新、利多卡因、洛莫司汀(CCNU)、美登素类化合物、二氯甲基二乙胺、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、氨甲叶酸、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、N8-乙酰基-亚精胺、足叶草霉素、普鲁卡因、普萘洛尔、蝶啶、嘌呤霉素、吡咯并苯并二氮杂类化合物(PBDs)、根霉素、链脲佐菌素、他利霉素、紫杉醇、替尼泊苷、丁卡因、苯丁酸氮芥、托马霉素、拓扑替康、微管蛋白细胞溶素、长春碱、长春新碱、长春花碱、长春地辛、长春瑞滨、司普力西欧他汀(spliceostatin)、鹅膏素、卡奇霉素及任意上述的衍生物。根据实施例, 所述细胞毒类药物是美登素类化合物, 诸如DM1或DM4, 托马霉素衍生物, 多拉司他汀衍生物。本领域已知的其他细胞毒类药物都包含在本发明公开的范围内, 包括例如蛋白质毒素如蓖麻毒素(ricin)、艰难梭菌毒素(C. difficile toxin)、假单细胞菌外毒素(pseudomonas exotoxin)、蓖麻毒素(ricin)、白喉毒素(diphtheria toxin)、肉毒杆菌毒素(botulinum toxin)、异株泻根毒蛋白(bryodin)、皂草毒蛋白(saporin)、美洲商陆毒素(pokeweed

toxins) (即,商陆毒素(phytolaccatoxin)、和商陆皂甙元(phytolaccigenin)),及其他如 Sapra et al., Pharmacol.&Therapeutics, 2013, 138: 452-469所述的那些毒类化合物。

[0133] 在一些实施例,本发明公开涉及偶联物,例如,通式(I)、通式(II)或通式(III)所示的化合物,其中所述生物活性分子(D)是细胞毒生物活性大环内酯类化合物。进一步实施例,本发明提供了作为生物活性大环内酯类化合物通式(I) (a) 表示的美登素类化合物:



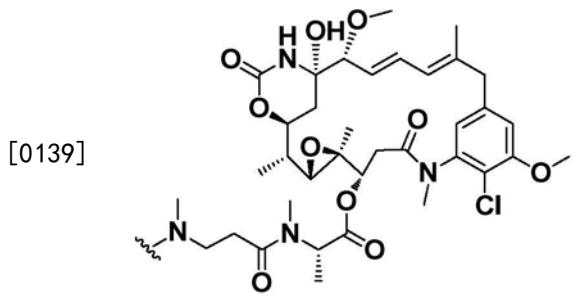
(I)(a),

[0135] 其中A₆、A₇、A₈、A₉各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、N-烷基氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-NR₄-,进一步其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的;和R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的:烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和杂环基;

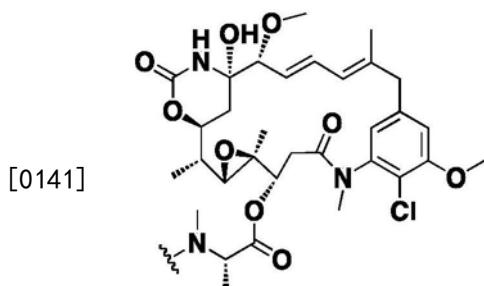
[0136] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数;和

[0137] x是0、1或2。

[0138] 在一些实施例,所述生物活性分子(D)具有如下结构式:



[0140] 在进一步实施例,所述美登素类化合物表示如下结构通式(II) (a) :

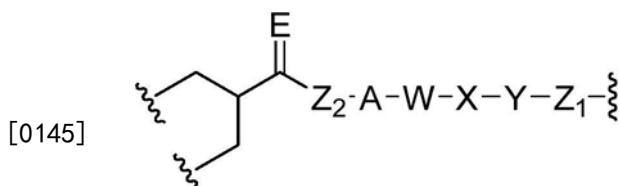


(II)(a)。

[0142] C. 连接体

[0143] 本发明提供了连接体将生物活性化合物(如细胞毒类药物)与多聚体抗原-结合化合物(如抗体)的巯基基团(如半胱氨酸残基)进行共价连接。在某些方面中,所述连接体将两个巯基基团通过3-碳桥连接起来。这种连接体可使抗体二硫键的半胱氨酸残基重新链接,所述半胱氨酸残基是在偶联过程中裂开的。

[0144] 在一些实施例,本发明提供了通式(IV)所示的连接体:



(IV)

[0146] 其中:

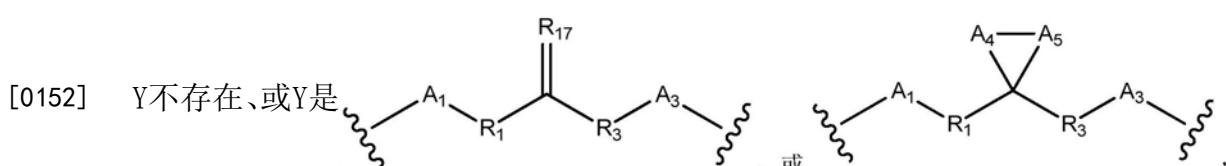
[0147] Z_1 和 Z_2 各自独立地不存在或各自独立地为间隔单元;

[0148] A 不存在、或 A 是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽;

[0149] W 不存在、或 W 是 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-CR_5R_6-$ 、或 $-NR_4-$;

[0150] X 不存在、或 X 是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基,

[0151] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的;



[0153] 其中 A_1 、 A_3 、 R_1 和 R_3 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-CR_5R_6-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-(CH_2)_{p2}-$ 、 $-(CH_2)_{p2}-O-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-C(=S)-NH-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-S-C(=S)-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR_4-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)O-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$ 、or $-O-C(=O)-NR_4-$,

[0154] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基是任选取代的;

[0155] A_4 和 A_5 各自独立地为 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR_{18}-$ 、或 $-CR_5R_6-$;

[0156] R_{17} 是 O 、 S 、 NR_{18} 、或 CR_5R_6 ;

[0157] R_{18} 是H、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、或酰基，

[0158] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；

[0159] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_8 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0160] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0161] x是0、1或2。

[0162] 在进一步实施例，本发明提供了通式(IV)所示的连接体，其中Z₂表示如下结构通式：

$$[0163] -Z_{2A} -Z_{2B} -Z_{2C} -Z_{2D} - ,$$

[0164] 其中：

[0165] Z_{2A}, Z_{2B}, Z_{2C} 和 Z_{2D} 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-CR_5R_6-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $(CH_x)_{p1}-$ 、 $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$ 、 $-O-(CH_2)_{p2}-$ 、 $-(CH_2)_{p2}-O-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-C(=S)-NH-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-S-C(=S)-S-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR_4-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-N(R_8)-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)O-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-O-C(=S)-N(R_4)-$ 、 $-N(R_4)-C(=S)-$ ，或 $-C(=S)-N(R_4)-$ ，

[0166] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和R₄、R₅、R₆和R₇。

[0167] 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；和其中Z₁表示如下结构通式：

$$[0168] - Z_{1A} - Z_{1B} - Z_{1C} - Z_{1D} - ,$$

[0169] 其中：

[0170] Z₁, Z₂

肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-CR_5R_6-$ 、 $-O-$ 、 $-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-O-$ 、 $-O-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$ 、 $-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$ 、 $-(O-(CH_2)_{p2}-)_{p3}-$ 、 $-(CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$ 、 $-C(=S)-$ 、 $-C(=S)-S-$ 、 $-C(=S)-NH-$ 、 $-S-C(=S)-$ 、 $-S-C(=S)-S-$ 、 $-S-$ 、 $-SO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR_4-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-N(R_8)-C(=O)-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)O-$ 、 $-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-$ 、 $-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$ 、 $-O-C(=O)-N(R_4)-$ 、 $-O-C(=S)-N(R_4)-$ 、或 $-C(=S)-N(R_4)-$ ，其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_8 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；

[0171] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

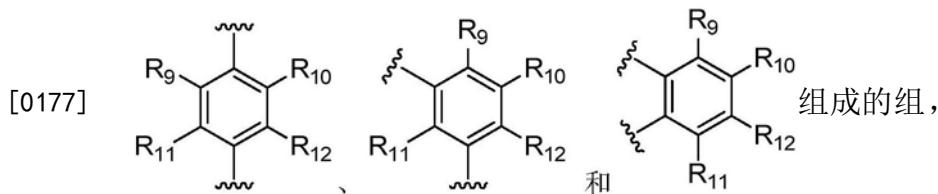
[0172] x是0、1或2。

[0173] 在一些实施例，所述美登素类化合物提供所述连接体的一个部分。

[0174] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)、通式(II)、通式(III)、或通式(IV)所示的化合物，其中A为氨基酸，其选自由丙氨酸、天冬氨酸、谷氨基酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、蛋氨酸、天冬酰胺酸、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、和瓜氨酸组成的组。

[0175] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)、通式(II)、通式(III)、或通式(IV)所示的化合物,其中A为肽,其选自由缬氨酸-瓜氨酸、瓜氨酸-缬氨酸、赖氨酸-苯丙氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-缬氨酸、苏氨酸-天冬酰胺、丝氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-丝氨酸、苯丙氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-苯丙氨酸、亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-亮氨酸、异亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-异亮氨酸、甘氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-甘氨酸、谷氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-谷氨酸、瓜氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-瓜氨酸、丙氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-丙氨酸组成的组。

[0176] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)、通式(II)、通式(III)、或通式(IV)所示的化合物,其中X是芳基,其选自由

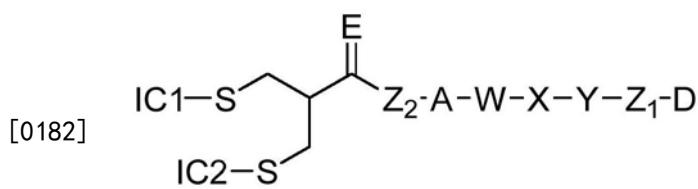


[0178] 其中R₉、R₁₀、R₁₁、和R₁₂各自独立地为H、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、卤素、NR₁₃R₁₄、硝基、氰基、-OH、-O-C(=O)-R₁₅、-C(=O)-R₁₅、-C(=O)-O-R₁₅、-C(=O)-NR₁₃R₁₄;和进一步其中,烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的;和R₁₃和R₁₄各自独立地为H或任选取代的烷基;和R₁₅是任选取代的烷基。

[0179] 在一方面,所述连接体用于共价连接具有治疗剂和标记物的配体。在另一方面,所述连接体改善连接基团的化学稳定性和/或系统稳定性。在另外一方面,所述连接体减少所述连接基团的体内毒性。另一方面,所述连接体改善所述连接基团的药代动力学,药效学,和/或生物利用度。一方面,所述连接体是可裂解的连接体,即,所述连接体可裂解和释放生物活性分子,所述生物活性分子在靶标细胞或细胞群站点或附近以药理学有效形式裂解或释放。另一方面,所述连接体是非裂解的,但是所述抗体-药物偶联物能以药理学有效形式降解并释放其连接基团。

[0180] D.示例性偶联物

[0181] 在一方面,本发明提供了具有式(I)所示的多聚体抗原-结合化合物-偶联物:



(I)

[0183] 其中:

[0184] IC1是第一免疫球蛋白链,和IC2是第二免疫球蛋白链;进一步其中IC1和/或IC2包括至少一个抗原-结合域;

[0185] Z₁和Z₂各自独立地不存在或各自独立地为间隔单元;

[0186] E是O、S、NR₄或CR₅R₆;

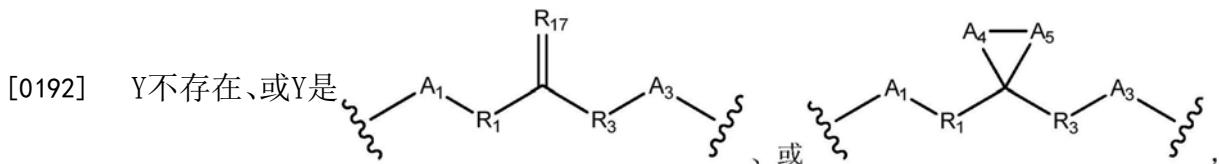
[0187] D是生物活性分子;

[0188] A不存在、或A是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽;

[0189] W不存在、或W是-0-、-S-、-CR₅R₆-、或-NR₄-；

[0190] X不存在、或X是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基，

[0191] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的；和



[0193] 其中A₁、A₃、R₁和R₃各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-0-、-C(=O)-、-0-C(=O)-、-C(=O)-0-、-0-C(=O)-0-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-0-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-0-、-(0-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-0-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、或-O-C(=O)-NR₄-，

[0194] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；

[0195] A₄和A₅各自独立地为-0-、-S-、-NR₁₈-、-CR₅R₆-；

[0196] R₁₇是O、S、NR₁₈、或CR₅R₆；

[0197] R₁₈是H、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、或酰基，

[0198] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；

[0199] R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0200] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0201] x是0、1或2。

[0202] 在一些实施例，本发明提供了式(I)所示的多聚体抗原-结合化合物-偶联物，其中IC1是其抗体或抗原-结合部分的第一重链；和IC2是其所述抗体或抗原-结合部分的第二重链。在某些子实施例，其中IC1和IC2是抗体重链，一个或多个IC1和/或IC2可独立地与抗体轻链或其抗原结合片段相关联或相连(例如，形成完整的四聚抗体结构)。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物在还原条件下是基本上稳定的。在进一步实施例，本发明提供了所述通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中D是细胞毒类药物。

[0203] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中IC1是其抗体或抗原-结合部分的重链；和所述IC2是其所述抗体或抗原-结合部分的轻链。在某些子实施例，其中IC1是抗体重链和IC2是抗体轻链，所述IC1/IC2结构可与另一个抗体重链/轻链对相联系或连接(例如，形成完整的四聚抗体结构)。在进一步实施例，本发明提供了所述通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物在还原条件下是基本上稳定的。本发明使用的表达“基本上稳定”，当用于本发明的抗体或其他多聚体免疫球蛋白时，意思是连接两独立肽链的所述重-加入的二硫键能在还原条件下保持所述抗体或免疫球蛋白基本上完整，如在SDS-PAGE凝胶还原环境下，或在血清(例如人血清，猴血清，牛血清，老鼠血清等)中温度为37℃，或温度90℃以上等。在进一步实

施例,本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中D为细胞毒类药物。在进一步实施例,本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中所述抗原-结合化合物-偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0204] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中所述抗原-结合化合物-偶联物在还原条件下是基本上稳定的。在进一步实施例,本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中D是细胞毒类药物。在进一步实施例,本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中所述抗原-结合化合物-偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0205] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中D为细胞毒类药物,包括,例如,本发明中其他地方所列举的任何细胞毒类药物。

[0206] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物,其中所述抗原-结合化合物-偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0207] 在一些实施例,-C(=E)-中的所述碳不与芳基基团直接连接。一些实施例,-C(=E)-中的所述碳不与苯基基团直接连接。

[0208] 在一些实施例,本发明提供了通式(I)表示的抗原-结合化合物-偶联物,其中Z₂表示如下结构通式:

[0209] -Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}-,

[0210] 其中:

[0211] Z_{2A}、Z_{2B}、Z_{2C}和Z_{2D}各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)-O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=S)-N(R₄)-、或-C(=S)-N(R₄)-，

[0212] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的,和R₄、R₅、R₆和R₈

[0213] 各自独立地为H、或取代或非取代的:烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基;

[0214] 和Z₁表示如下结构通式:

[0215] -Z_{1A}-Z_{1B}-Z_{1C}-Z_{1D}-,

[0216] 其中:

[0217] Z_{1A}、Z_{1B}、Z_{1C}和Z_{1D}各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)-O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=S)-N(R₄)-、或-C(=S)-N(R₄)-，

[0218] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的,和R₄、R₅、R₆

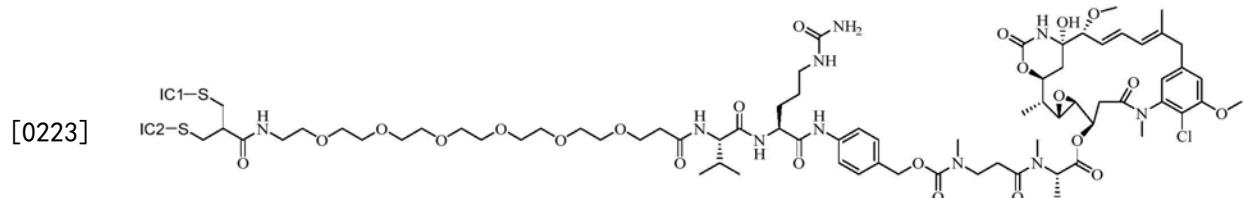
和R₈

[0219] 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0220] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0221] x是0、1或2。

[0222] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)的化合物表示如下结构通式(I)(b)：

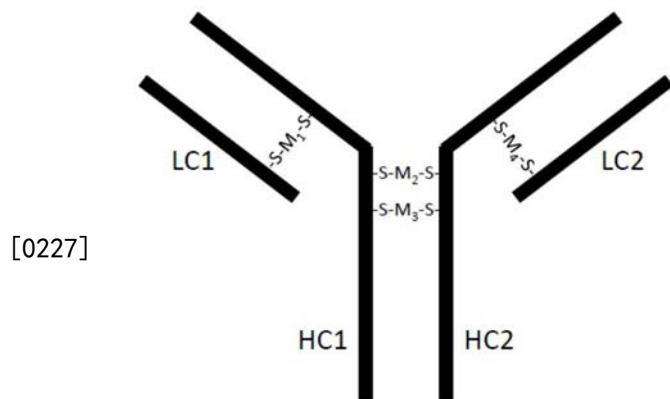


(I)(b)。

[0224] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)(b)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中IC1是其抗体或抗原-结合部分的第一重链；和IC2是其所述抗体或抗原-结合部分的第二重链。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)(b)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物在还原条件下是基本上稳定的。

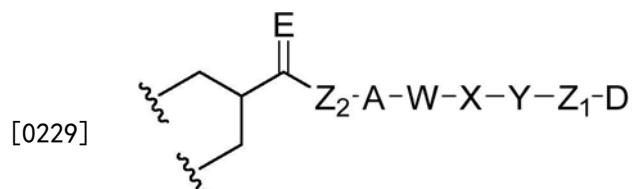
[0225] 在一些实施例，本发明提供了通式(I)(b)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中IC1是其抗体或抗原-结合部分的重链；和所述IC2是其所述抗体或抗原-结合部分的轻链。在进一步实施例，本发明提供了通式(I)(b)表示的所述抗原-结合化合物-偶联物，其中所述抗原-结合化合物-偶联物在还原条件下是基本上稳定的。

[0226] 一方面，本发明还提供了多聚体免疫球蛋白偶联物，其具有如图(1)所示的结构：



图(1)

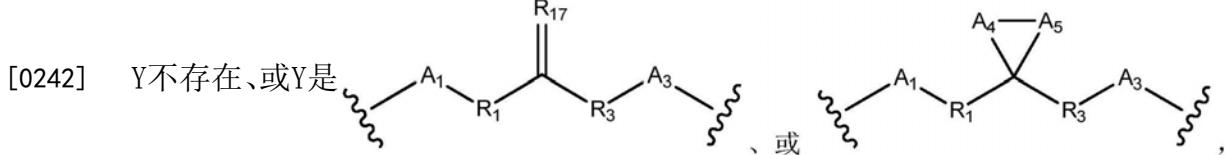
[0228] 其中一个或多个M₁、M₂、M₃、和/或M₄各自独立地不存在(即，所述相邻S原子通过二硫键直接与另一原子连接)，或含有通式(II)所示的结构



式(II)

[0230] 其中

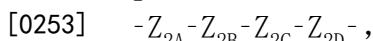
- [0231] LC1是第一抗体轻链；
- [0232] LC2是第二抗体轻链；
- [0233] HC1是第一抗体重链；和
- [0234] HC2是第二抗体重链；
- [0235] 其中LC1、LC2、HC1和/或HC2包括至少一个抗原-结合域；和
- [0236] E是O、S、NR₄、或CR₅R₆；
- [0237] D是生物活性分子；
- [0238] A不存在、或A是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽；
- [0239] W不存在、或W是-O-、-S-、-CR₅R₆-、或-NR₄-；
- [0240] X不存在、或X是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基，
- [0241] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的；和



- [0243] 其中A₁、A₃、R₁和R₃各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-NR₄-，

- [0244] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；
- [0245] A₄和A₅各自独立地为-O-、-S-、-NR₁₈-、或-CR₅R₆-；
- [0246] R₁₇是O、S、NR₁₈、或CR₅R₆；
- [0247] R₁₈是H、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、或酰基，
- [0248] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；
- [0249] R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基/或杂环基；
- [0250] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和
- [0251] x是0、1或2。

[0252] 在一些实施例，本发明提供了具有如图(1)所示的结构的多聚体免疫球蛋白偶联物，其中Z₂表示如下结构通式：



[0254] 其中：

- [0255] Z_{2A}、Z_{2B}、Z_{2C}和Z_{2D}各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-

NH-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S0-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-N(R₄)-、或-C(=S)-N(R₄)-，

[0256] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的, 和R₄、R₅、R₆和R₈

[0257] 各自独立地为H、或取代或非取代的: 烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基; 和Z₁表示如下结构通式:

[0258] -Z_{1A}-Z_{1B}-Z_{1C}-Z_{1D}-，

[0259] 其中:

[0260] Z_{1A}、Z_{1B}、Z_{1C}和Z_{1D}各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-N(R₄)-、-O-C(=S)-N(R₄)-、或-C(=S)-N(R₄)-，

[0261] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基是任选取代的, 和R₄、R₅、R₆和R₈各

[0262] 自独立地为H、或取代或非取代的: 烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基;

[0263] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数; 和

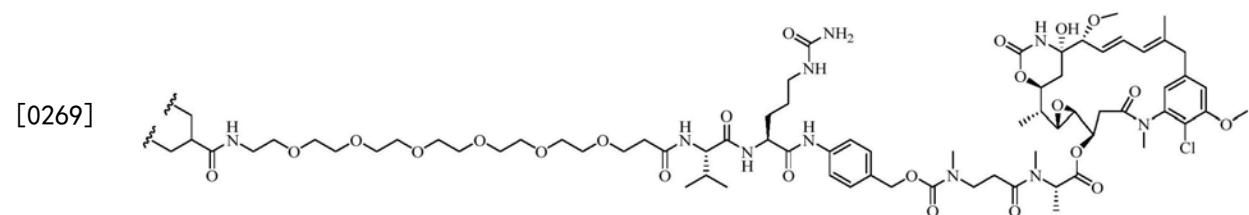
[0264] x是0、1或2。

[0265] 在一些实施例, 本发明提供了具有如图(1)所示的结构的多聚体免疫球蛋白偶联物, 其中所述偶联物在还原条件下是基本上稳定的。在进一步实施例, 本发明提供了具有如图(1)所示的结构的多聚体免疫球蛋白偶联物, 其中所述多聚体免疫球蛋白偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0266] 在一些实施例, 在一些实施例, 本发明提供了具有如图(1)所示的结构的多聚体

[0267] 免疫球蛋白偶联物, 其中所述多聚体免疫球蛋白偶联物特异性结合肿瘤相关的抗原。

[0268] 在一些实施例, 通式(II)表示如下所示结构(II)(b):



[0270] (II)(b)。

[0271] 本发明提供了如下通式的化合物:

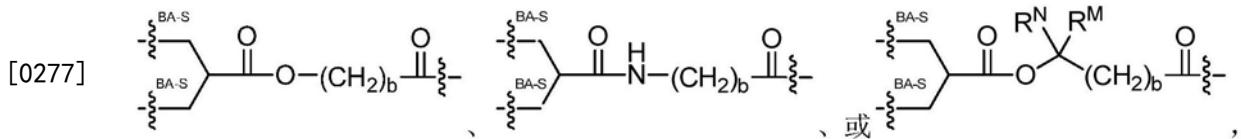
[0272] IG(SP^A-A-W-X-Y-Z₁-D)_x

[0273] 其中:

[0274] IG是抗原-结合免疫球蛋白;

[0275] x是从1到4的整数；

[0276] SP^A是：



[0278] 其中：

[0279] R^N是氢原子或烷基；

[0280] R^M是烷基；

[0281] 通过

表示的两个键，其连接所述免疫球蛋白的半胱氨酸，和b是从2至8的整数；

[0282] 和A、W、X、Y、Z₁、和D具有如本发明所述的定义。

[0283] 在一些实施例，所述化合物具有如下结构：

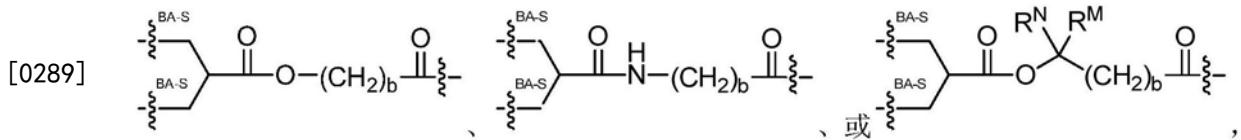
[0284] IG (SP^A-A-D)_x

[0285] 其中

[0286] IG是抗原-结合免疫球蛋白；

[0287] x是从1至4的整数；

[0288] SP^A是：



[0290] 其中：

[0291] R^N是氢原子或烷基；

[0292] R^M是烷基；

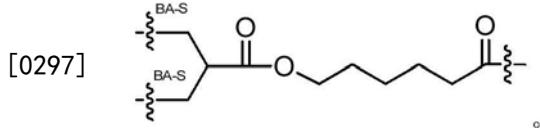
[0293] 通过

表示的两个键，其连接所述免疫球蛋白的半胱氨酸，和b是从2至8的整数；和

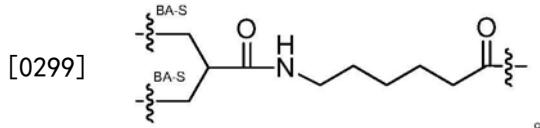
[0294] A具有如本发明所述的定义。

[0295] 在一些实施例，A是二肽。

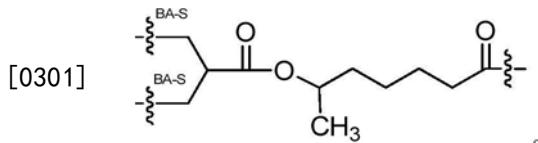
[0296] 在一些实施例，SP^A是：



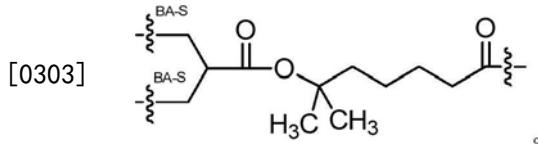
[0298] 在一些实施例，SP^A是：



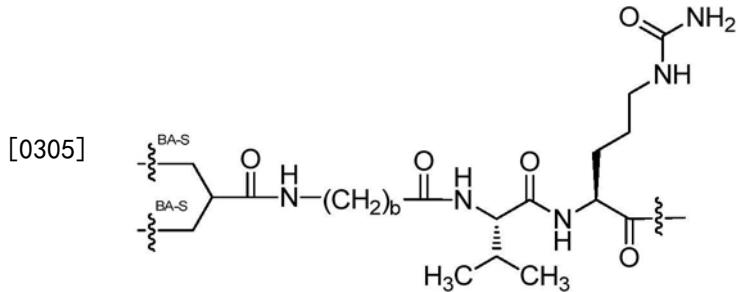
[0300] 在一些实施例，SP^A是：



[0302] 在一些实施例,SP^A是



[0304] 在一些实施例,SP^A-A-是:

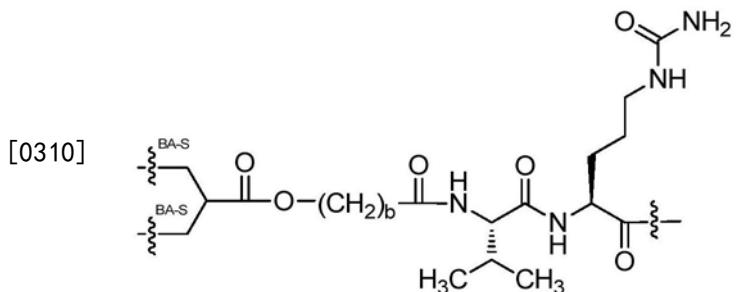


[0306] 其中:

[0307] 通过表示的两个键,其与所述免疫球蛋白的半胱氨酸连接,和

[0308] b是从2至8的整数。

[0309] 在一些实施例,SP^A-A-是:

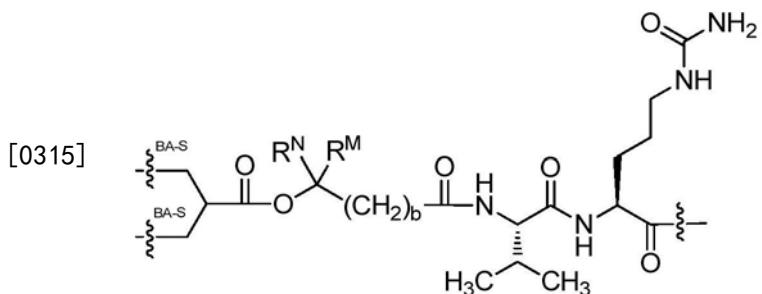


[0311] 其中

[0312] 通过表示的两个键,其与所述免疫球蛋白的半胱氨酸连接,和

[0313] b是从2至8的整数。

[0314] 在一些实施例,SP^A-A-是



[0316] 其中:

[0317] R^N是氢原子或烷基；

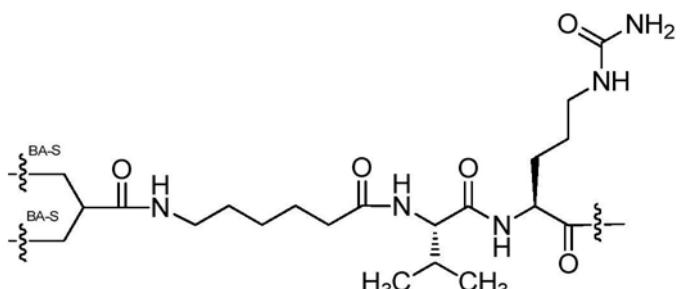
[0318] R^M是烷基；

[0319] 通过- $\xrightarrow{\text{BA-S}}$ -表示的两个键，其与所述免疫球蛋白的半胱氨酸连接，和

[0320] b是从2至8的整数。

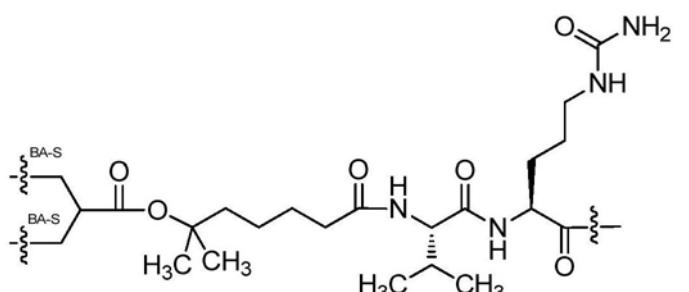
[0321] 在一些实施例，SP^A-A-是：

[0322]



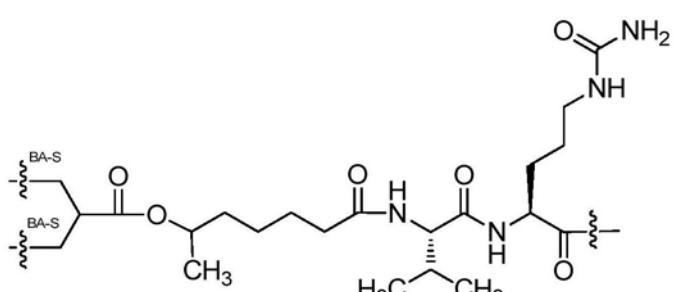
[0323] 在一些实施例，SP^A-A-是：

[0324]



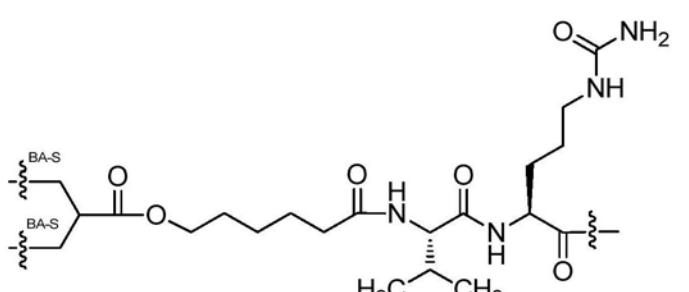
[0325] 在一些实施例，SP^A-A-是：

[0326]

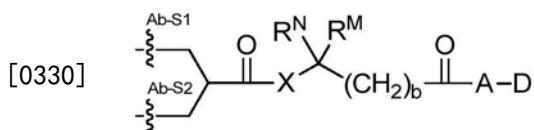


[0327] 在一些实施例，SPA-A-是：

[0328]



[0329] 本发明还提供了抗体-药物偶联物，其包括抗体、或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段与式(A)的至少一个部分进行偶联：



[0331] (A)

[0332] 其中：

[0333] Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸硫原子连接;

[0334] Ab-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的半胱氨酸硫原子连接;

[0335] X是-N(R^A)-或-O-;

[0336] 其中R^A是氢原子或烷基;

[0337] R^N和R^M各自独立地为氢原子或烷基;

[0338] A不存在,即键,或A是包括肽的间隔单元,

[0339] 其中所述肽包括2-20个氨基酸;

[0340] D是生物活性分子;和

[0341] b是从2至8的整数。

[0342] 在一些实施例,所述抗体或其抗原结合片段包括式(A)的至少一个部分,其中Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第一重链的半胱氨酸硫原子连接;和AB-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第二重链的半胱氨酸硫原子连接。

[0343] 在一些实施例,所述抗体或其抗原结合片段包括式(A)的至少一个部分,其中Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的轻链的半胱氨酸硫原子连接;和AB-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的重链的半胱氨酸硫原子连接。

[0344] 在一些实施例,所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0345] (i) 式(A)的至少一个部分,其中Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第一重链的半胱氨酸硫原子连接;和AB-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第二重链的半胱氨酸硫原子连接;和

[0346] (ii) 式(A)的至少一个部分,其中Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的轻链的半胱氨酸硫原子连接;和AB-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的重链的半胱氨酸硫原子连接。

[0347] 在一些实施例,所述抗体或其抗原结合片段包括式(A)的两个部分,其中Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第一重链的半胱氨酸硫原子连接;和AB-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第二重链的半胱氨酸硫原子连接。

[0348] 在一些实施例,所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0349] (i) 式(A)的两个部分,其中Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第一重链的半胱氨酸硫原子连接;和AB-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的第二重链的半胱氨酸硫原子连接;和

[0350] (ii) 式(A)的两个部分,其中Ab-S1是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的轻链的半胱氨酸硫原子连接;和AB-S2是键,所述键与所述抗体或其抗原结合片段的重链的半胱氨酸硫原子连接。

[0351] 在一些实施例,所述抗体药物偶联物包括抗体。

[0352] 在一些实施例,所述抗体是抗-PRLR抗体。

[0353] 在一些实施例，X是- $N(R^A)$ -。在某些实施例， R^A 是氢原子。

[0354] 在一些实施例，X是-O-。

[0355] 在一些实施例， R^N 和 R^M 均是氢原子。在一些实施例， R^N 是氢原子和 R^M 是烷基。在一些实施例， R^N 和 R^M 均是烷基。

[0356] 在一些实施例，X是-O-，和 R^N 和 R^M 均是氢原子。在一些实施例，X是-O-， R^N 是氢原子，和 R^M 是烷基。在一些实施例，X是-O-，和 R^N 和 R^M 均是烷基。在一些实施例，X是-O-， R^N 是氢原子，和 R^M 是甲基。在一些实施例，X是-O-，和 R^N 和 R^M 均是甲基。

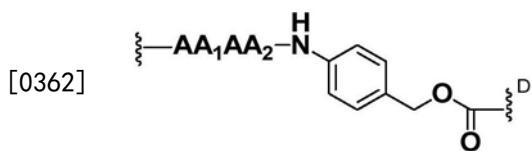
[0357] 在一些实施例，b是3-6的整数。在一些实施例，b是4。在一些实施例， R^N 和 R^M 均是氢和b是4。

[0358] 在一些实施例，X是-O-，和 R^N 和 R^M 均是氢原子，和b是4。在一些实施例，X是-O-， R^N 和 R^M 均是烷基，和b是4。在一些实施例，X是-O-， R^N 和 R^M 均是甲基，和b是4。在一些实施例，X是-O-， R^N 是烷基， R^M 是氢原子，和b是4。

[0359] 在一些实施例，X是- $N(H)$ -， R^N 和 R^M 均是氢原子，和b是4。

[0360] 在一些实施例， R^A 、 R^N 和 R^M 各自独立地为氢或 C_{1-6} 烷基。

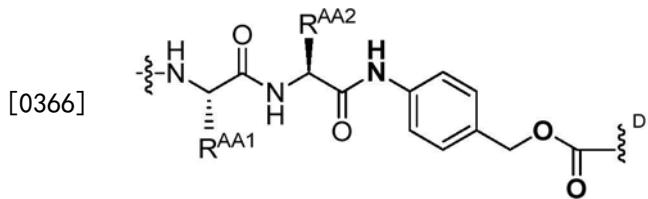
[0361] 在一些实施例，A是包括二肽的间隔单元。在一些实施例，所述二肽是缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施例，A是：



[0363] 其中— ξ^D 是与D连接的键，和AA₁和AA₂各自独立地为氨基酸。

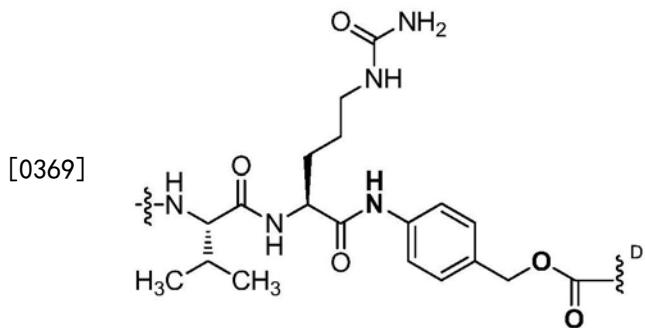
[0364] 在一些实施例，AA₁-AA₂是缬氨酸-瓜氨酸、瓜氨酸-缬氨酸、赖氨酸-苯丙氨酸、苯丙氨酸-赖氨酸、缬氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-缬氨酸、苏氨酸-天冬酰胺、丝氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-丝氨酸、苯丙氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-苯丙氨酸、亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-亮氨酸、异亮氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-异亮氨酸、甘氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-甘氨酸、谷氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-谷氨酸、瓜氨酸-天冬酰胺、天冬酰胺-瓜氨酸、丙氨酸-天冬酰胺、或天冬酰胺-丙氨酸。

[0365] 在一些实施例，A是：



[0367] 其中— ξ^D 是与D连接的键，和R^{AA1}和R^{AA2}各自独立地为氨基酸侧链。本发明使用的，“氨基酸侧链”是指结合 α -氨基酸中 α -碳的单价非氢取代基，其包括天然的和非天然氨基酸。示例性氨基酸侧链包括，但不限于，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸，酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺，天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、瓜氨酸的所述 α -碳取代基。

[0368] 在一些实施例，A是：



[0370] 其中 ---^D 是与D连接的键。

[0371] 在一些实施例,A不存在。

[0372] 在一些实施例,D是阿里他汀或美登素类化合物。

[0373] 在一些实施例,D是阿里他汀,其中所述是阿里他汀是MMAE、MMAD、或MMAF。

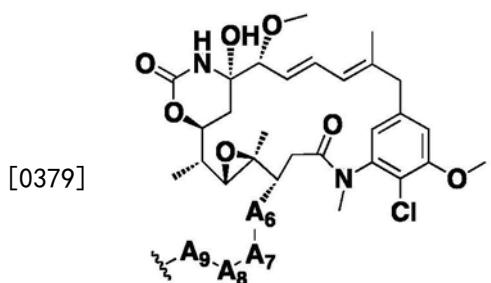
[0374] 在一些实施例,D是MMAF。

[0375] 在一些实施例,D是美登素类化合物。

[0376] 在一些实施例,A是包括2-20个氨基酸的肽的间隔单元,和D是美登素类化合物。

[0377] 在一些实施例,A不存在,和D是阿里他汀。

[0378] 在一些实施例,A是通式(I)(a)表示的生物活性的大环内酯类化合物:



(I)(a),

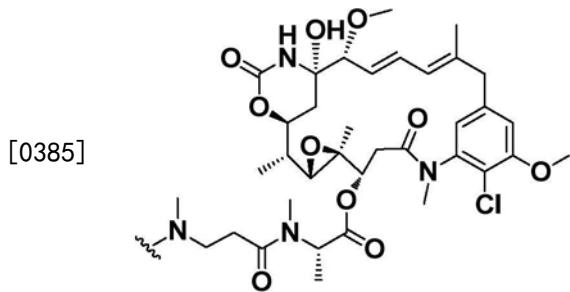
[0380] 其中A₆、A₇、A₈、A₉各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、N-烷基氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-NR₄-，进一步其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；和R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和杂环基；

[0381] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

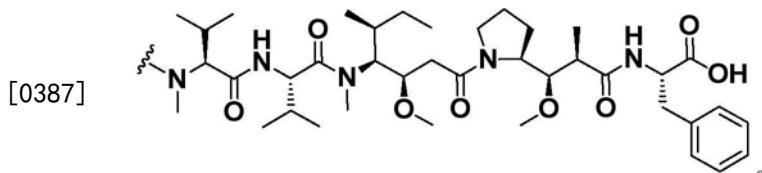
[0382] x是0、1或2。

[0383] 在一些实施例,D是DM1或DM4。

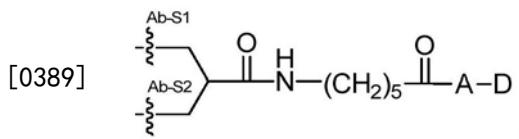
[0384] 在一些实施例,D是：



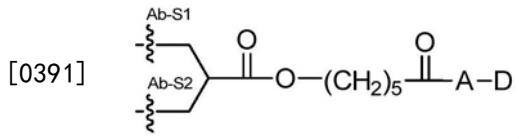
[0386] 在一些实施例,D是:



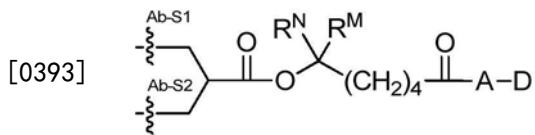
[0388] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:



[0390] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:

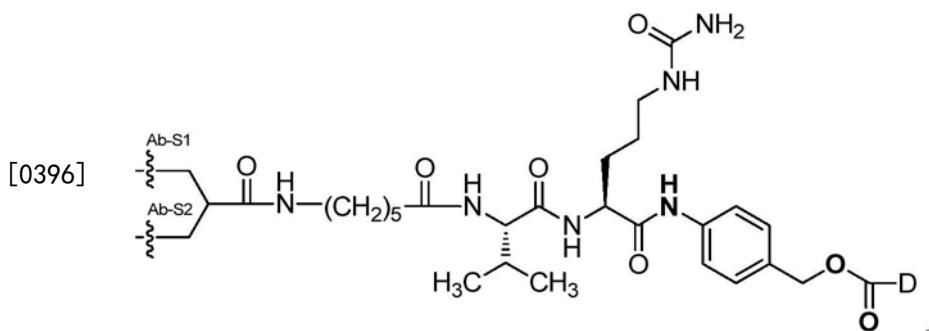


[0392] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:

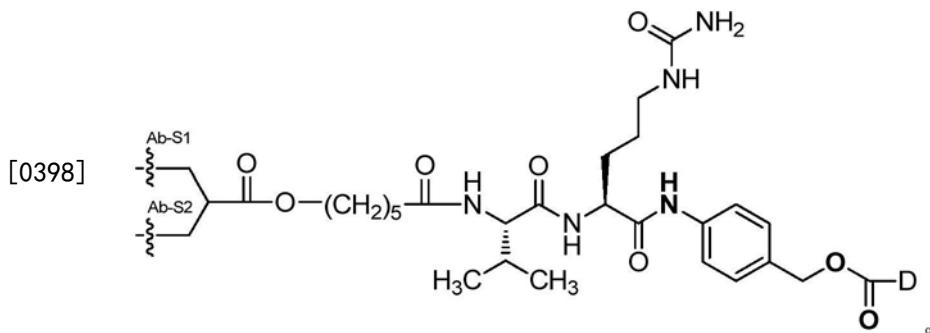


[0394] 其中RN和RM独立地为氢或C₁₋₆烷基。

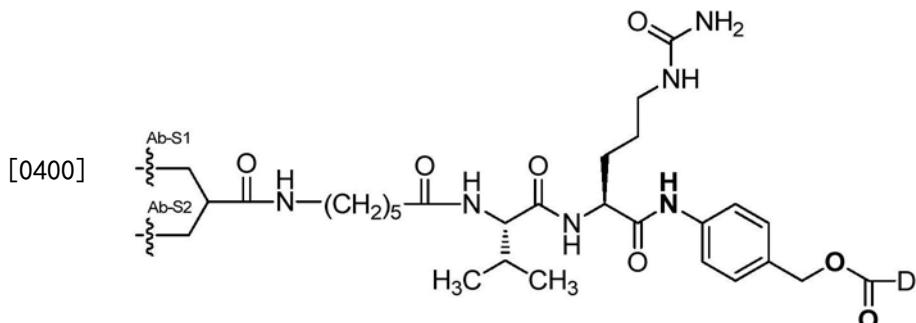
[0395] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:



[0397] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:

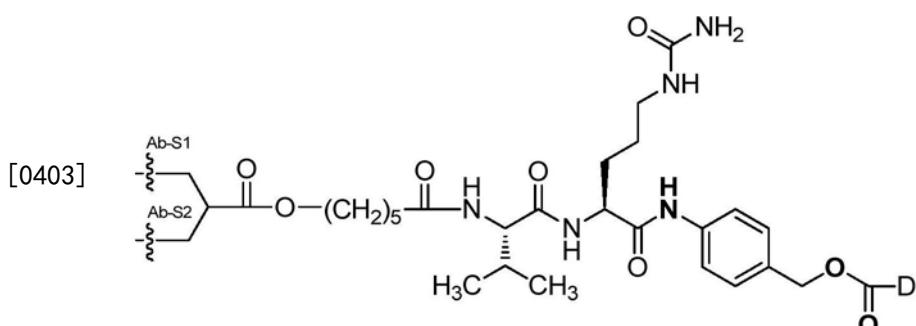


[0399] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:



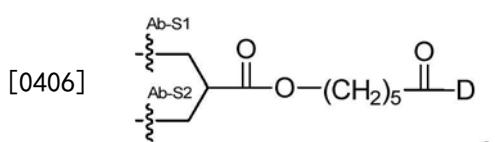
[0401] 其中D是美登素类化合物。

[0402] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:

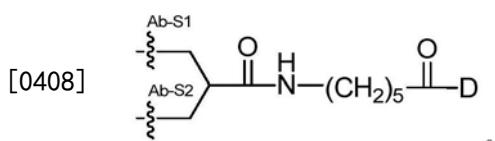


[0404] 其中D是美登素类化合物。

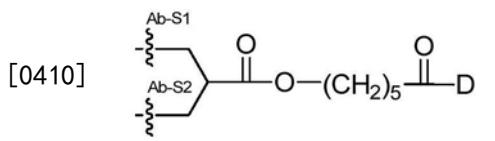
[0405] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:



[0407] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:

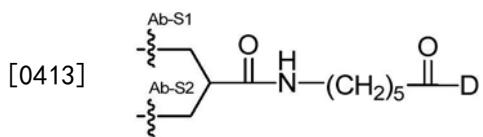


[0409] 在一些实施例,式(A)的所述一个部分是:



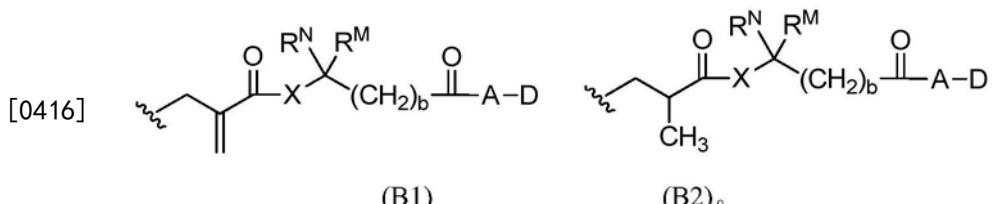
[0411] 其中D是阿里他汀(auristatin)。

[0412] 在一些实施例，式(A)的所述一个部分是：

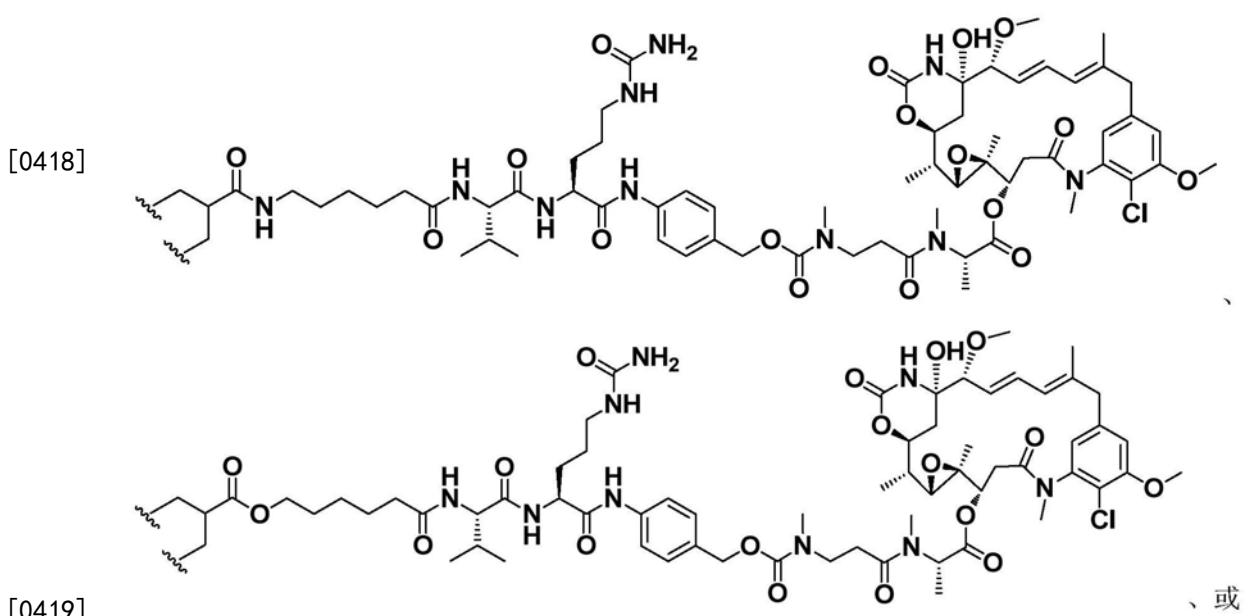


[0414] 其中D是阿里他汀(auristatin)。

[0415] 在一些实施例，所述抗体或其抗原结合片段进一步包括通式(B1)或(B2)的一个部分：



[0417] 在一些实施例，式(A)的所述一个部分是：



[0420] III. 合成偶联物的方法

[0421] A. 偶联方法

[0422] 本发明提供了具有图(1)所示结构的多聚体免疫球蛋白蛋白偶联物的制备方法：

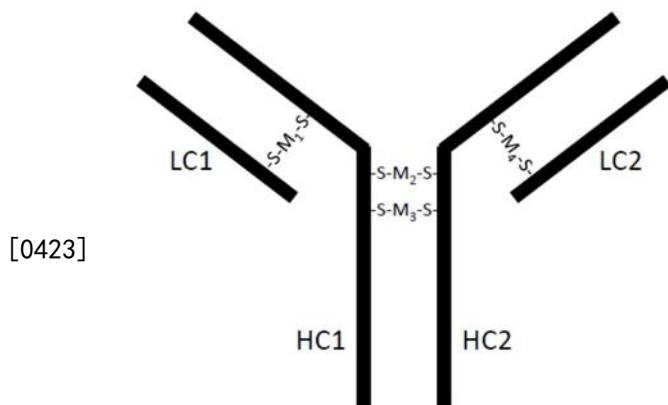
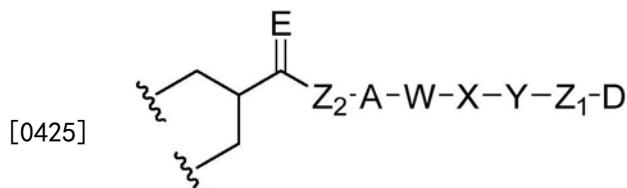


图 (1),

[0424] 其中一个或多个M₁、M₂、M₃、和/或M₄各自独立地不存在(即,所述相邻S原子通过二硫键直接连接另一个),或含有通式(II)所示的结构



式 (II)

[0426] 其中

[0427] LC1是第一抗体轻链;

[0428] LC2是第二抗体轻链;

[0429] HC1是第一抗体重链;和

[0430] HC2是第二抗体重链;

[0431] 其中LC1、LC2、HC1和/或HC2包括至少一个抗原-结合域;和

[0432] E是O、S、NR₄、或CR₅R₆;

[0433] D是生物活性分子;

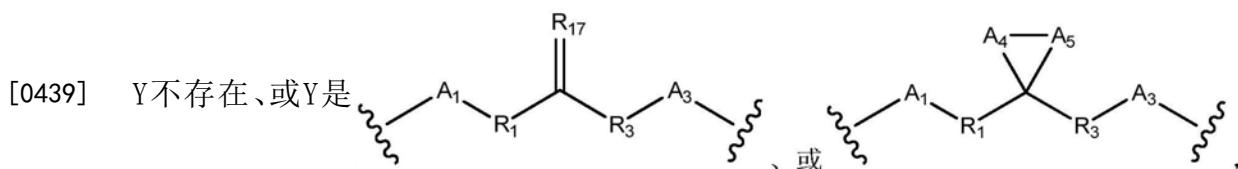
[0434] Z₁和Z₂各自独立地不存在或各自独立地为间隔单元;

[0435] A不存在、或A是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽;

[0436] W不存在、或W是-O-、-S-、-CR₅R₆-、或-NR₄-;

[0437] X不存在、或X是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基,

[0438] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的;



其中A₁、A₃、R₁和R₃各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2}-)、-((CH₂)_{p2}-O-)、-C(=S)、-C(=S)-S-、-S-C(=S)、-C(=S)-

S⁻-NH⁻、-S-C(=S)-S⁻、-S⁻、-SO⁻、-SO₂⁻、-NR₄⁻、-N(R₄)⁻-C(=O)-N(R₈)⁻、-N(R₄)⁻-C(=O)O⁻、-N(R₄)⁻-C(=O)⁻、-C(=O)-N(R₄)⁻、-C(=O)-N(R₄)⁻-C(=O)⁻、或-O-C(=O)-NR₄⁻，

[0440] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；

[0441] A₄和A₅各自独立地为-O⁻、-S⁻、-NR₁₈⁻、或-CR₅R₆⁻；

[0442] R₁₇是O、S、NR₁₈、或CR₅R₆；

[0443] R₁₈是H、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基，

[0444] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；

[0445] R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；

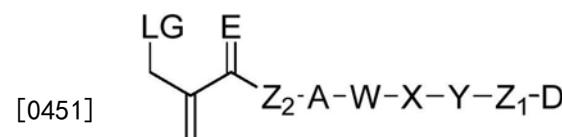
[0446] p₁、p₂和p₃各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0447] x是0、1或2；

[0448] 所述方法包括步骤

[0449] (a) 还原一个或多个存在于多聚体免疫球蛋白中的半胱氨酸残基之间的二硫键，从而形成两个巯基基团；和

[0450] (b) 偶联试剂，所述试剂与源自步骤(a)的所述巯基基团形成共价键，其中所述试剂是式(III)所示的结构：



式 (III)

[0452] 进一步地，其中，

[0453] LG是离去基团；

[0454] E是O、S、NR₄、或CR₅R₆；

[0455] Z₁和Z₂各自独立地不存在或各自独立地为间隔单元；

[0456] D不存在或D是生物活性分子；

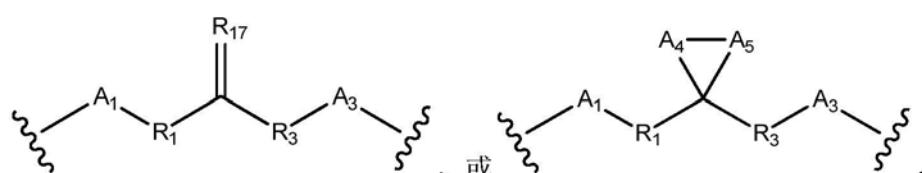
[0457] A不存在、或A是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽；

[0458] W不存在、或W是-O⁻、-S⁻、-CR₅R₆⁻、或-NR₄⁻；

[0459] X不存在、或X是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基，

[0460] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的；和

[0461] Y不存在、或Y是



[0462] 其中A₁、A₃、R₁和R₃各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆⁻、-O⁻、-C(=O)⁻、-O-C(=O)⁻、-C(=O)-O⁻、-(CH_x)_{p1}⁻、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}⁻、-(CH_x)_{p1}⁻-C(=O)、-(CH_x)_{p1}⁻-C(=O)-O⁻、-(O-(CH₂)_{p2})_{p3}⁻、-(O-(CH₂)_{p2}-O-)_{p3}⁻、-C(=S)⁻、-C(=S)-S⁻、-S-C

$(=S) - - C(=S) - NH - - S - C(=S) - S - - S - - SO_2 - - NR_4 - - N(R_4)C(=O) - N(R_8) - - N(R_4) - C(=O)O - - N(R_4) - C(=O) - - C(=O) - N(R_4) - - C(=O) - N(R_4) - C(=O) -$ 或 $-OC(=O) - NR_4 -$,

[0463] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；

[0464] A_4 和 A_5 各自独立地为 $-O -$ 、 $-S -$ 、 $-NR_{18} -$ 、或 $-CR_5R_6 -$ ；

[0465] R_{17} 是 O 、 S 、 NR_{18} 、或 CR_5R_6 ；

[0466] R_{18} 是 H 、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、或酰基，

[0467] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；

[0468] R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_8 各自独立地为 H 、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；

[0469] $p1$ 、 $p2$ 和 $p3$ 各自独立地为 0 、或从 1 到 100 的整数；和

[0470] x 是 0 、 1 或 2 。

[0471] 在一些实施例，所述多聚体免疫球蛋白偶联物的制备方法进一步包括通过色谱法、透析法、超过滤法、和/或正切流动过滤法纯化步骤 (b) 中所得的产品。

[0472] 在一些实施例，本发明提供了多聚体免疫球蛋白偶联物的制备方法，其中 Z_2 表示如下结构通式：

[0473] $-Z_{2A} - Z_{2B} - Z_{2C} - Z_{2D} -$ ，

[0474] 其中：

[0475] Z_{2A} 、 Z_{2B} 、 Z_{2C} 和 Z_{2D} 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有 2 ~ 20 个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-CR_5R_6 -$ 、 $-O -$ 、 $-C(=O) -$ 、 $-O - C(=O) -$ 、 $-C(=O) - O -$ 、 $-O - C(=O) - (CH_x)_{p1} -$ 、 $-C(=O) - O - (CH_x)_{p1} -$ 、 $- (CH_x)_{p1} - C(=O) -$ 、 $- (CH_x)_{p1} - C(=O) - O -$ 、 $- (O - (CH_2)_{p2} -)_{p3} -$ 、 $- ((CH_2)_{p2} - O -)_{p3} -$ 、 $-C(=S) -$ 、 $-C(=S) - S -$ 、 $-C(=S) - NH -$ 、 $-S - C(=S) -$ 、 $-S - C(=S) - S -$ 、 $-SO_2 -$ 、 $-NR_4 -$ 、 $-N(R_4) - C(=O) - N(R_8) -$ 、 $-N(R_4) - C(=O) O -$ 、 $-N(R_4) - C(=O) - N(R_4) - C(=O) -$ 、 $-O - C(=O) - N(R_4) -$ 、 $-O - C(=S) - N(R_4) -$ 、或 $-C(=S) - N(R_4) -$ ，

[0476] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_8

[0477] 各自独立地为 H 、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0478] Z_1 表示如下结构通式：

[0479] $-Z_{1A} - Z_{1B} - Z_{1C} - Z_{1D} -$ ，

[0480] 其中：

[0481] Z_{1A} 、 Z_{1B} 、 Z_{1C} 和 Z_{1D} 各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有 2 ~ 20 个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、 $-CR_5R_6 -$ 、 $-O -$ 、 $-C(=O) -$ 、 $-O - C(=O) -$ 、 $-C(=O) - O -$ 、 $-O - C(=O) - (CH_x)_{p1} -$ 、 $-C(=O) - O - (CH_x)_{p1} -$ 、 $- (CH_x)_{p1} - C(=O) -$ 、 $- (CH_x)_{p1} - C(=O) - O -$ 、 $- (O - (CH_2)_{p2} -)_{p3} -$ 、 $- ((CH_2)_{p2} - O -)_{p3} -$ 、 $-C(=S) -$ 、 $-C(=S) - S -$ 、 $-C(=S) - NH -$ 、 $-S - C(=S) -$ 、 $-S - C(=S) - S -$ 、 $-SO_2 -$ 、 $-NR_4 -$ 、 $-N(R_4) - C(=O) - N(R_8) -$ 、 $-N(R_4) - C(=O) O -$ 、 $-N(R_4) - C(=O) - N(R_4) - C(=O) -$ 、 $-O - C(=S) - N(R_4) -$ 、或 $-C(=S) - N(R_4) -$ ，

[0482] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和 R_4 、 R_5 、 R_6

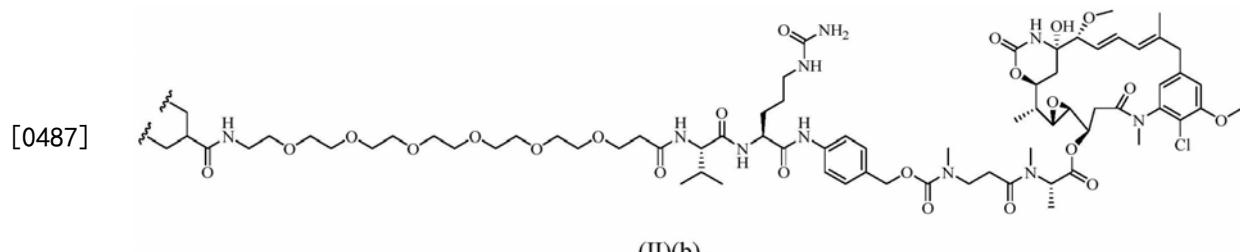
和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0483] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

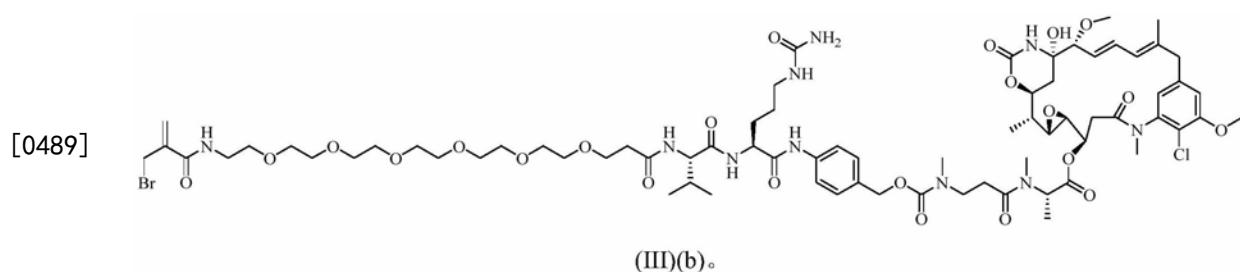
[0484] x是0、1或2。

[0485] 在进一步实施例，本发明提供了多聚体免疫球蛋白偶联物的制备方法，其中结构通式(III)表示的试剂中的所述离去基团是卤素、对甲苯磺酰基、甲磺酰基、OAc、OMe、三氟甲磺酸根、硝酸根、硫醇基、磷酸根、羧酸根、或苯氧化物。在进一步实施例，所述离去基团是溴。

[0486] 在一些实施例，本发明提供了多聚体免疫球蛋白偶联物的制备方法，其中通式(II)表示如下结构(II)(b)：

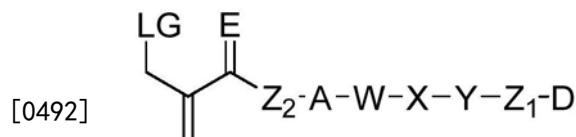


[0488] 在进一步实施例，本发明提供了多聚体免疫球蛋白偶联物的制备方法，其中通式(III)表示如下结构(III)(b)：



[0490] B. 连接体-有效负载试剂

[0491] 本发明也涉及如下结构通式(III)表示的试剂：



(III)

[0493] 其中，

[0494] LG是离去基团；

[0495] E是O、S、NR₄⁻、或CR₅R₆⁻；

[0496] Z₁和Z₂各自独立地不存在或各自独立地为间隔单元；

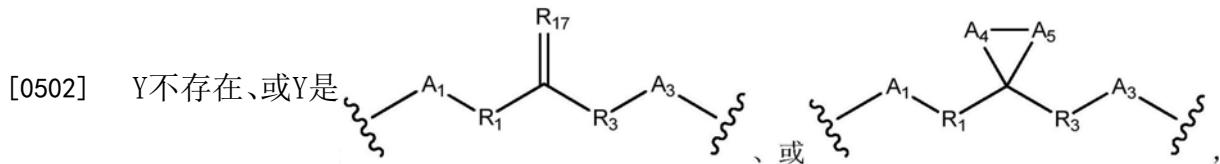
[0497] D不存在或D是生物活性分子；

[0498] A不存在、或A是天然或非天然的氨基酸、或包括2-20个氨基酸的肽；

[0499] W不存在、或W是-O-、-S-、-CR₅R₆-、或-NR₄-；

[0500] X不存在、或X是芳基、杂芳基、环烷基、杂环基，

[0501] 其中芳基、杂芳基、环烷基、和杂环基是任选取代的；和



[0503] 其中A₁、A₃、R₁和R₃各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(0-CH₂)_{p2}-)、-((CH₂)_{p2}-O-)、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、或-O-C(=O)-NR₄-，

[0504] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；

[0505] A₄和A₅各自独立地为-O-、-S-、-NR₁₈-、或-CR₅R₆-；

[0506] R₁₇是O、S、NR₁₈、或CR₅R₆；

[0507] R₁₈是H、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、或酰基，

[0508] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、和酰基是任选取代的；R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或杂环基；

[0509] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0510] x是0、1或2。

[0511] 在一些实施例，本发明提供了通式 (III) 表示的试剂，其中Z₂表示如下结构通式：

[0512] -Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}-，

[0513] 其中

[0514] Z_{2A}、Z_{2B}、Z_{2C}和Z_{2D}各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(0-CH₂)_{p2}-)、-((CH₂)_{p2}-O-)、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-N(R₄)-、或-C(=S)-N(R₄)-，

[0515] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0516] 和Z₁表示如下结构通式：

[0517] -Z_{1A}-Z_{1B}-Z_{1C}-Z_{1D}-，

[0518] 其中：

[0519] Z_{1A}、Z_{1B}、Z_{1C}和Z_{1D}各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(0-CH₂)_{p2}-)、-((CH₂)_{p2}-O-)、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-

(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-N(R₄)-、-O-C(=S)-N(R₄)-，或-C(=S)-N(R₄)-，

[0520] 其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的，和R₄、R₅、R₆和R₈

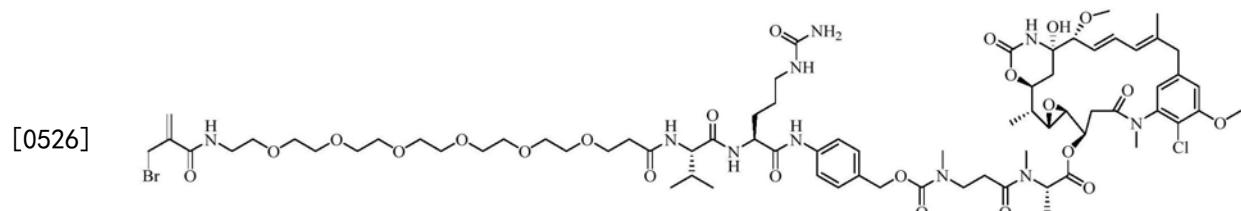
[0521] 各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、或杂环基；

[0522] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

[0523] x是0、1或2。

[0524] 在进一步实施例，本发明提供了通式(III)表示的试剂，其中所述离去基团为卤素、对甲苯磺酰基、甲磺酰基、OAc、OMe、三氟甲磺酸根、硝酸根、硫醇基、磷酸根、羧酸根、苯氧化物。在进一步实施例，本发明提供了通式(III)表示的试剂，其中所述离去基团是溴。

[0525] 在一些实施例，本发明提供了通式(III)的试剂表示为如下结构通式(III)(b)：



(III)(b)。

[0527] 在另外的实施例，所述化合物具有通式(aa)或(bb)：

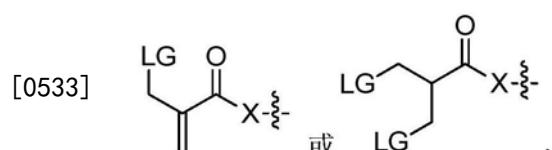
[0528] M-Z₂-A-W-X-Y-Z₁-D

[0529] (aa)

[0530] M-A-D

[0531] (bb)

[0532] 其中M是：



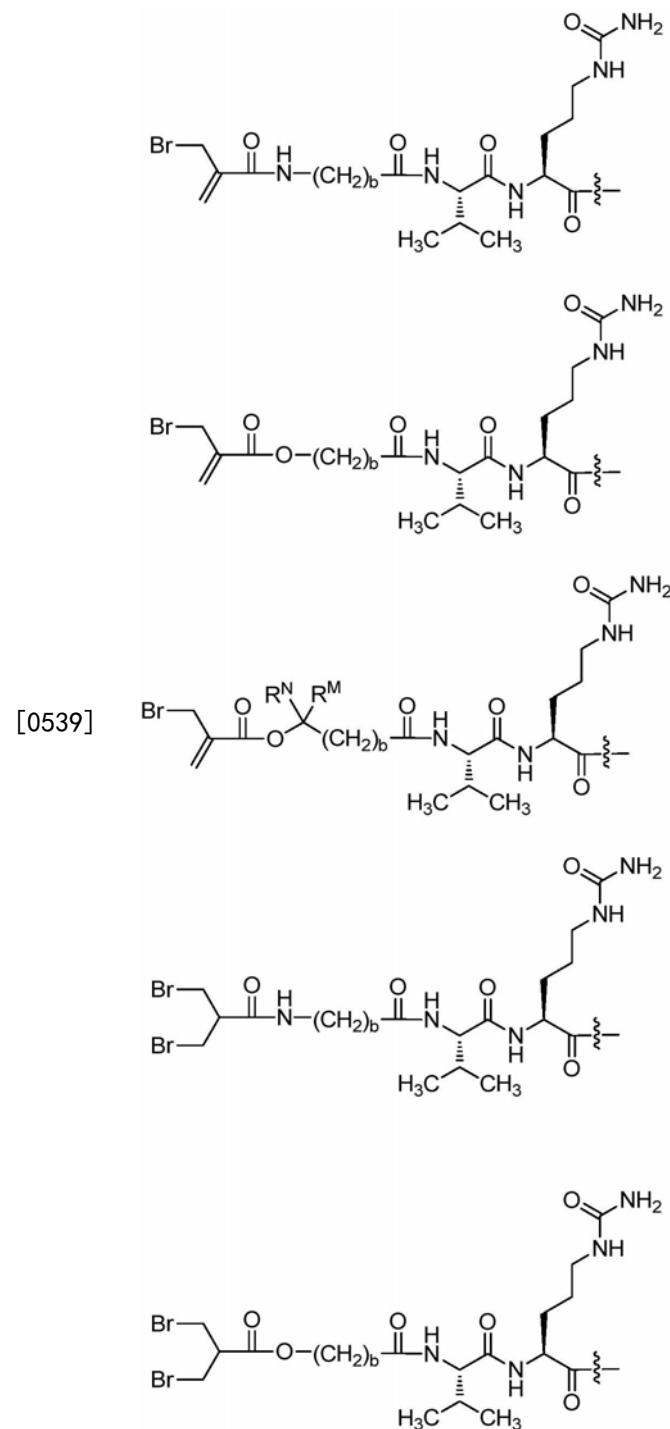
[0534] 其中X是-O-或-NH-，和LG是离去基团，例如Br；

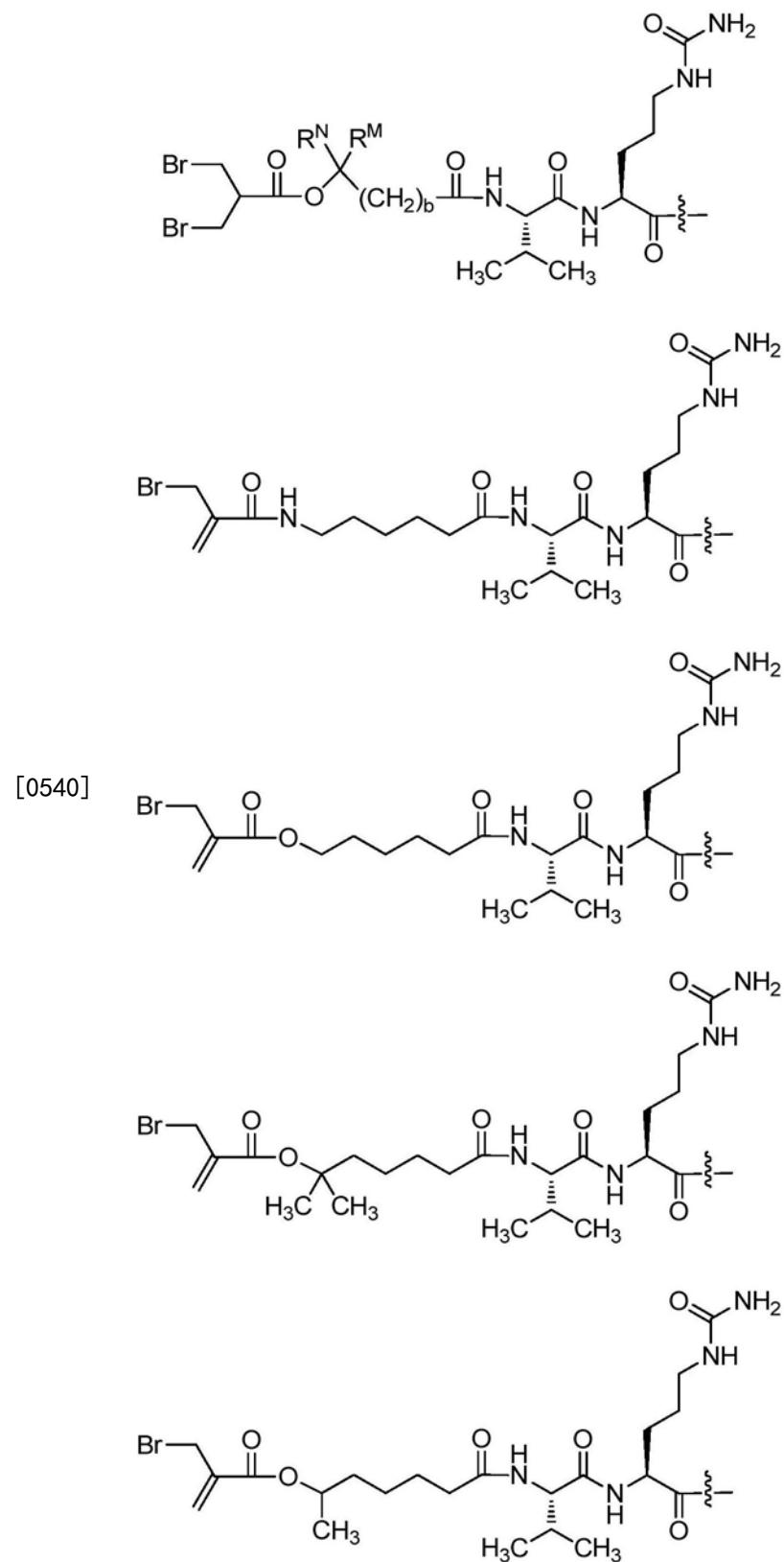
[0535] 和Z₂、A、W、X、Y、Z₁、和D具有如本发明所述的定义。

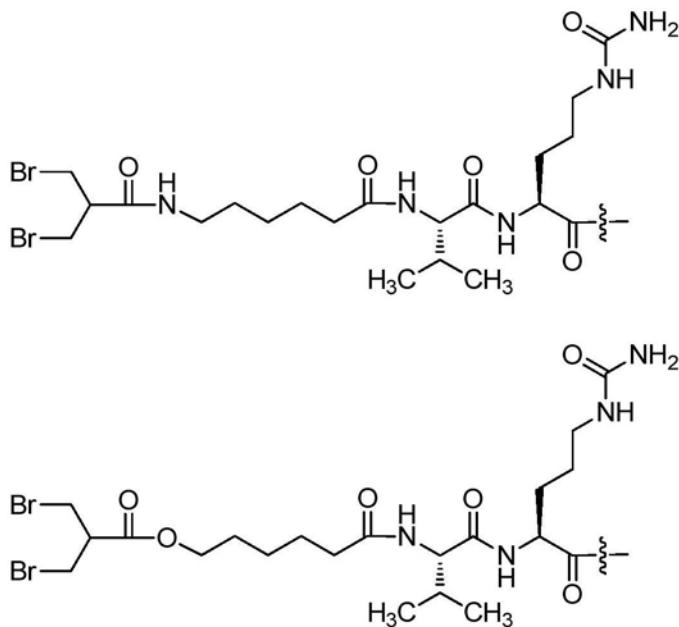
[0536] 在一些实施例，所述

[0537] (i) 通式(aa)的M-Z₂-A-或

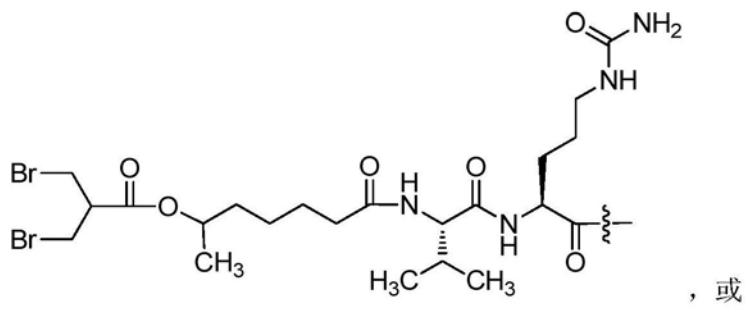
[0538] (ii) 通式(bb)的M-A-是：



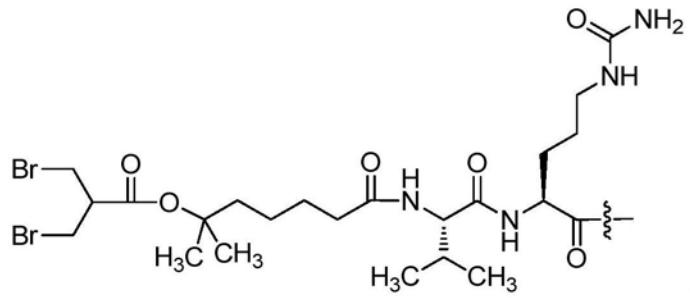




[0541]



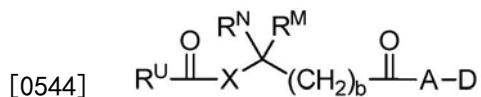
，或



；

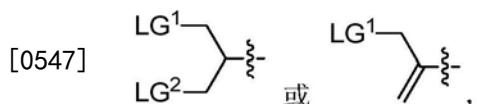
[0542] 其中b是从2至8的整数，R^N是氢原子或烷基，和R^M是烷基。

[0543] 本发明还提供了通式(L1)所示的连接体-有效负载化合物：

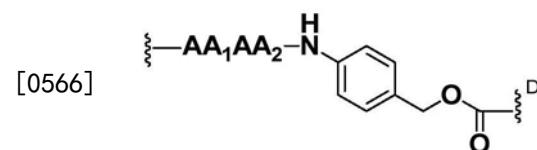


(L1)

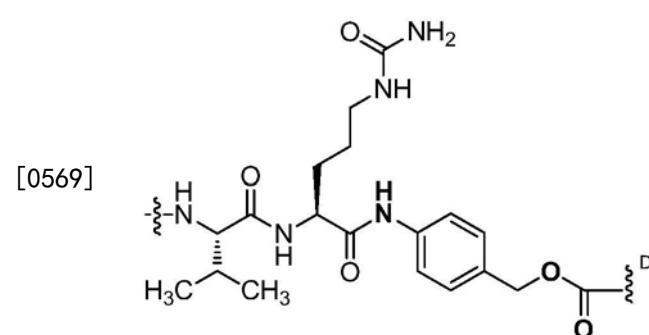
[0545] 其中

[0546] R^U是[0548] 其中LG¹和LG²在每一种情况独立地为离去基团；

- [0549] X是 $-N(R^A)-$ 或 $-O-$ ；
- [0550] 其中 R^A 是氢原子或烷基；
- [0551] R^N 和 R^M 各自独立地为氢原子或烷基；
- [0552] A不存在，即为键，或A是包括肽的间隔单元，
- [0553] 其中，所述肽包括2-20个氨基酸；
- [0554] D是生物活性分子；和
- [0555] b是从2至8的整数。
- [0556] 在一些实施例，所述离去基团是卤素、对甲苯磺酰基、甲磺酰基、 OAc 、 OMe 、三氟甲磺酸根、硝酸根、硫醇基、磷酸根、羧酸根、或苯氧化物。
- [0557] 在一些实施例，所述离去基团是 $-Br$ 。
- [0558] 在一些实施例，X是 $-N(R^A)-$ 。在某些实施例， R^A 是氢原子。
- [0559] 在一些实施例，X是 $-O-$ 。
- [0560] 在一些实施例， R^N 和 R^M 均为氢原子。在一些实施例， R^N 是氢原子和 R^M 是烷基。在一些实施例， R^N 和 R^M 均为烷基。
- [0561] 在一些实施例，X是 $-O-$ ，和 R^N 和 R^M 均为氢原子。在一些实施例，X是 $-O-$ ， R^N 是氢原子，和 R^M 是烷基。在一些实施例，X是 $-O-$ ，和 R^N 和 R^M 均为烷基。在一些实施例，X是 $-O-$ ， R^N 是氢原子，和 R^M 是甲基。在一些实施例，X是 $-O-$ ，和 R^N 和 R^M 均为甲基。
- [0562] 在一些实施例，b是从3-6的整数。在一些实施例，b是4。在一些实施例， R^N 和 R^M 均为氢原子和b是4。
- [0563] 在一些实施例，X是 $-O-$ ，和 R^N 和 R^M 均为氢原子，和b是4。在一些实施例，X是 $-O-$ ，和 R^N 和 R^M 均为烷基，和b是4。在一些实施例，X是 $-O-$ ，和 R^N 和 R^M 均为甲基，和b是4。在一些实施例，X是 $-O-$ ， R^N 是烷基， R^M 是氢原子，和b是4。
- [0564] 在一些实施例，X是 $-N(H)-$ ， R^N 和 R^M 均为氢原子，和b是4。
- [0565] 在一些实施例，A是包括二肽的间隔单元。在一些实施例，所述二肽是缬氨酸-瓜氨酸。在一些实施例，A是：



- [0567] 其中 ---^D 是与D连接的键。
- [0568] 在一些实施例，A是：



[0570] 其中—^D是与D连接的键。

[0571] 在一些实施例,A不存在。

[0572] 在一些实施例,D是阿里他汀(auristatin)或美登素类化合物。

[0573] 在一些实施例,D是阿里他汀,其中所述是阿里他汀是MMAE、MMAD、或MMAF。

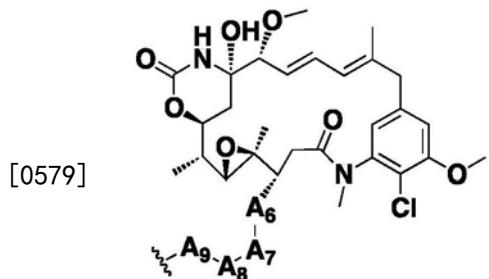
[0574] 在一些实施例,D是MMAF。

[0575] 在一些实施例,D是美登素类化合物。

[0576] 在一些实施例,A是包括2-20个氨基酸的肽的间隔单元,和D是美登素类化合物。

[0577] 在一些实施例,A不存在,和D是阿里他汀。

[0578] 在一些实施例,A是通式(I)(a)表示的具有生物活性的大环内酯类化合物:



(I)(a),

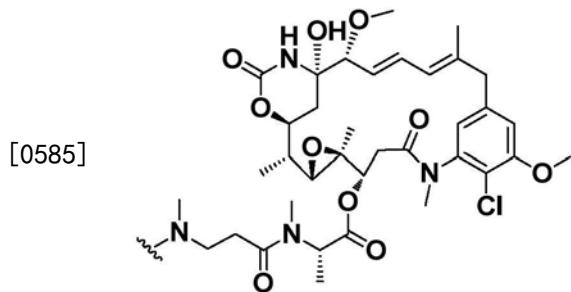
[0580] 其中A₆、A₇、A₈、A₉各自独立地不存在、或各自独立地为氨基酸、N-烷基氨基酸、具有2-20个氨基酸的肽、烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、-CR₅R₆-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(CH_x)_{p1}-、-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-、-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-、-(O-(CH₂)_{p2})_{p3}-、-((CH₂)_{p2}-O-)_{p3}-、-C(=S)-、-C(=S)-NH-、-C(=S)-S-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S-、-SO-、-SO₂-、-NR₄-、-N(R₄)-C(=O)-N(R₈)-、-N(R₄)-C(=O)O-、-N(R₄)-C(=O)-、-C(=O)-N(R₄)-、-C(=O)-N(R₄)-C(=O)-、-O-C(=O)-NR₄-，进一步其中烷基、炔基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是任选取代的；和R₄、R₅、R₆和R₈各自独立地为H、或取代或非取代的：烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、和杂环基；

[0581] p1、p2和p3各自独立地为0、或从1到100的整数；和

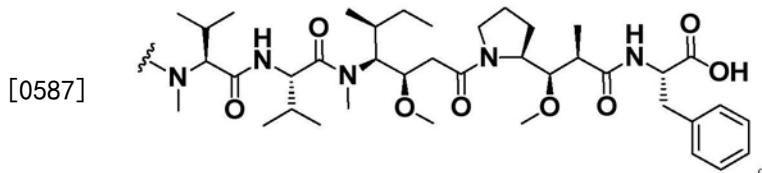
[0582] x是0、1或2。

[0583] 在一些实施例,D是DM1或DM4。

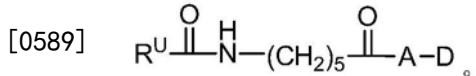
[0584] 在一些实施例,D是



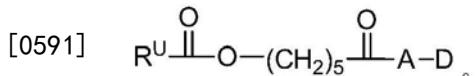
[0586] 在一些实施例,D是



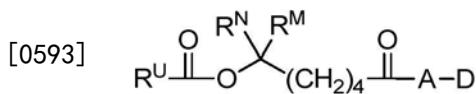
[0588] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:



[0590] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:

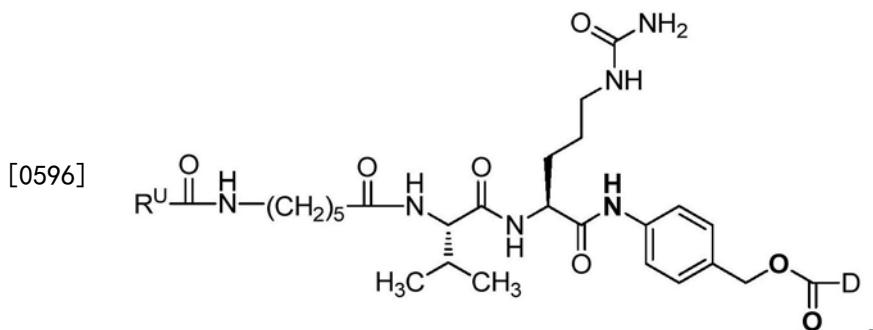


[0592] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:

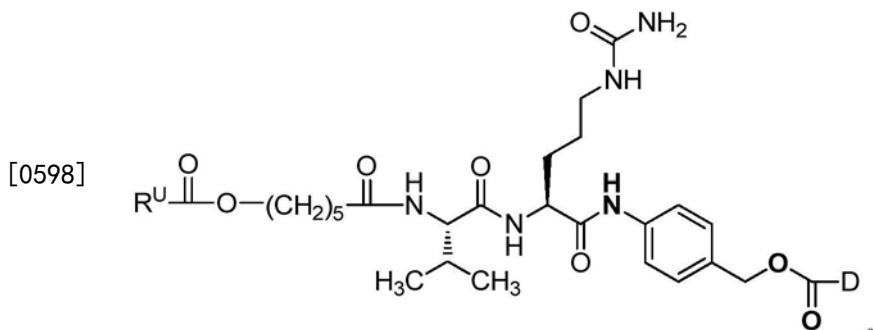


[0594] 其中R^N和R^M独立地为氢或C₁₋₆烷基。

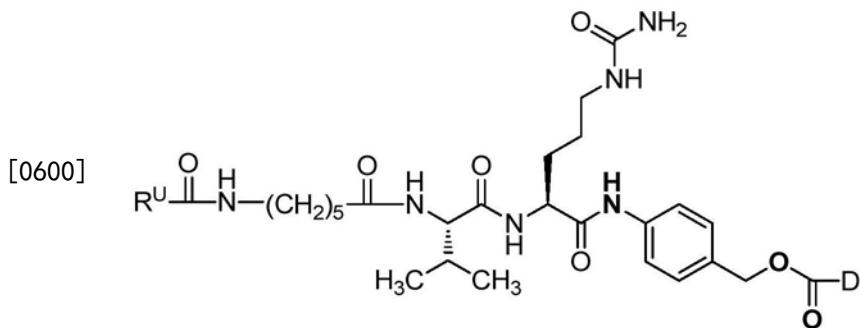
[0595] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:



[0597] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:

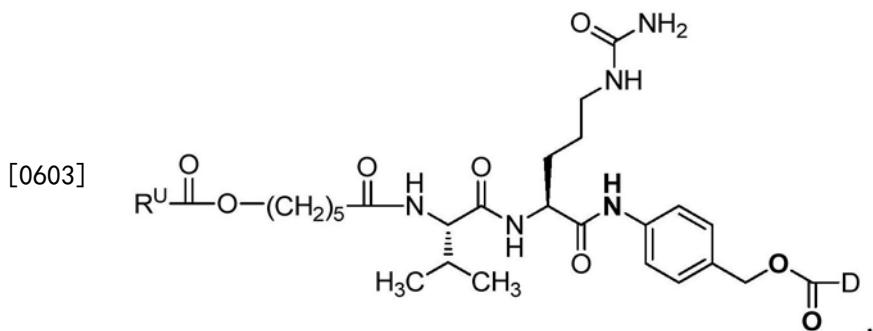


[0599] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:



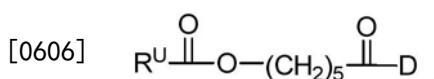
[0601] 其中D是美登素类化合物。

[0602] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:

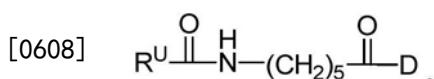


[0604] 其中D是美登素类化合物。

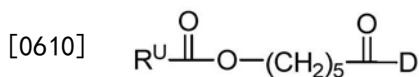
[0605] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:



[0607] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:

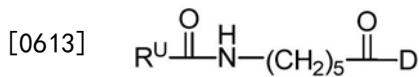


[0609] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:



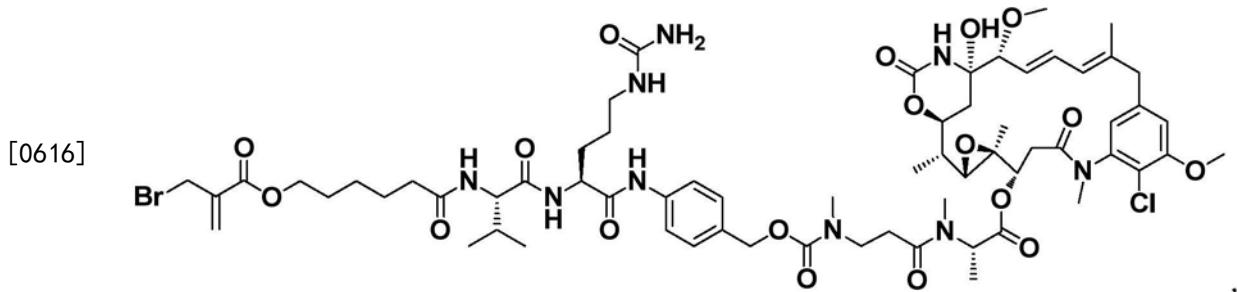
[0611] 其中D是阿里他汀(auristatin)。

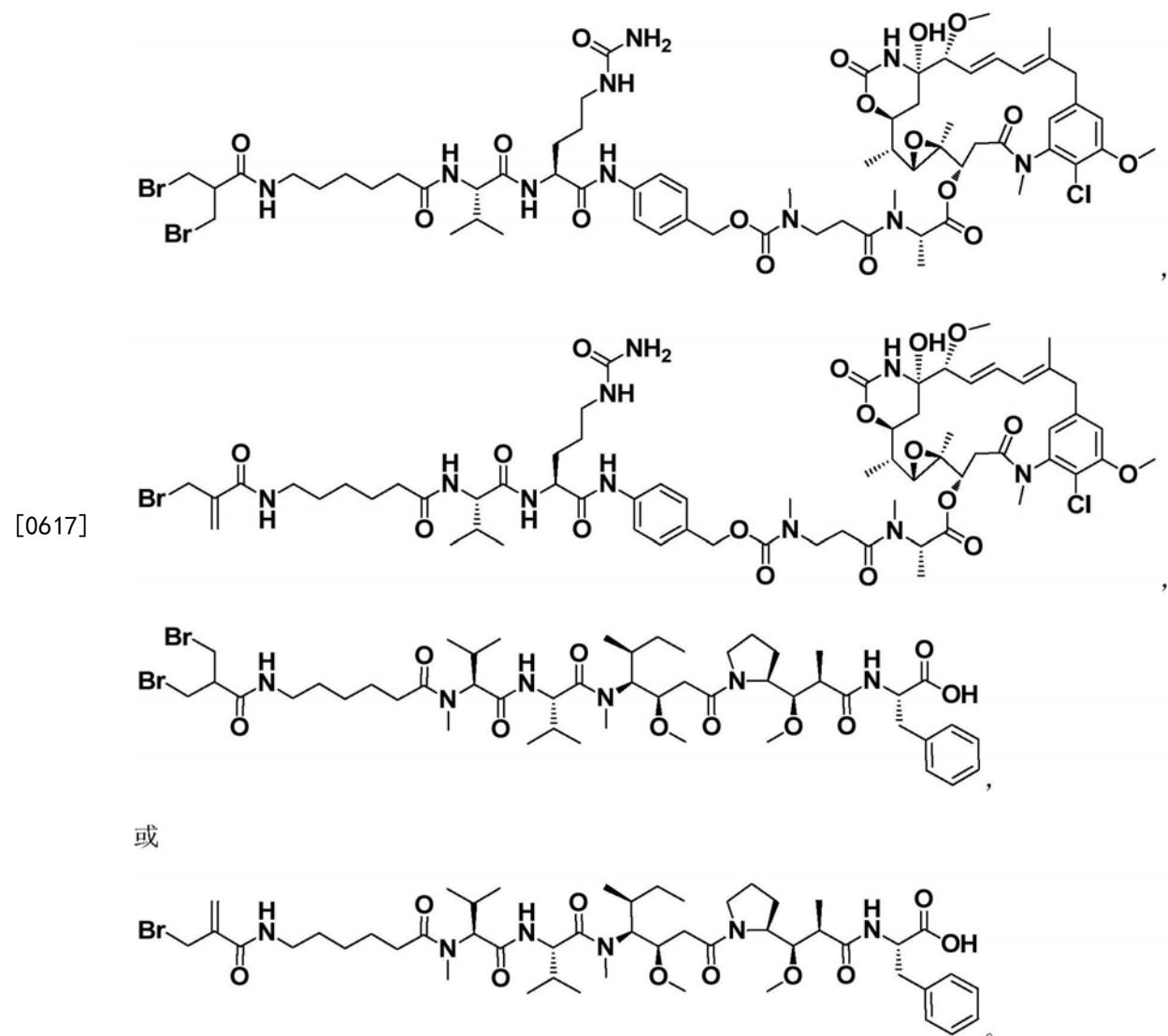
[0612] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:



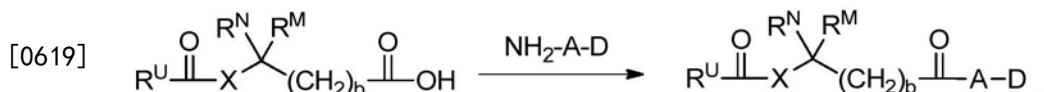
[0614] 其中D是阿里他汀(auristatin)。

[0615] 在一些实施例,通式(L1)所示化合物是:

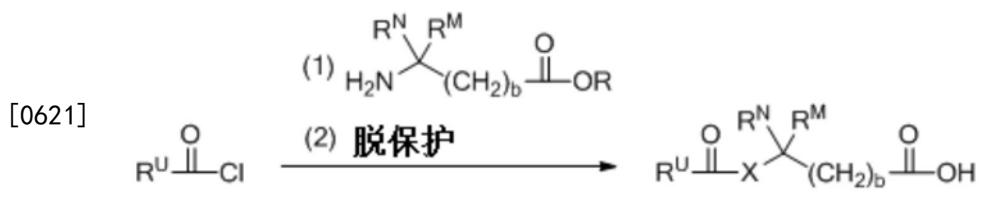




[0618] 连接体有效负载可以通过羧酸偶联条件合成,例如,如下所述:



[0620] 所述羧酸可通过酸性卤化物合成得到,例如,如下所述:



[0622] IV. 药物组合物及使用方法

[0623] 本发明所包括的药物组合物的实例,包含本发明所述的偶联物,例如,通式(I)、图(1)、或通式(III)所示的化合物及其混合物。在某些方面,所述化合物进一步是通式(I)(b)、通式(II)(b)、或通式(III)(b)所示的化合物。

[0624] 组合物可进一步包括一个或多个药学上可接受的载体、稀释剂、和/或赋形剂的药物组合物。在某些方面,所述药物组合物是本发明所述的偶联物的药学上可接受的盐,例

如,通式(I)、图(1)、或通式(III)所示的化合物及其混合物。

[0625] 合适的药学上可接受的载体、稀释剂和赋形剂是在本领域所熟知的,可由本领域技术人员根据临床需要来确定。合适的载体、稀释剂和赋形剂实例包括:维持适当的组合物pH值的缓冲剂(例如柠檬酸缓冲剂、琥珀酸盐缓冲剂、醋酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、乳酸盐缓冲剂、草酸盐缓冲剂等)、载体蛋白(如,人血清白蛋白)、生理盐水、多元醇(如,海藻糖、蔗糖、木糖醇、山梨醇等)、表面活性剂(如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、多聚草酸盐(polyoxolate)等)、抗菌剂、和抗氧化剂。

[0626] 若有需要,本发明所述药物组合物可包括第二个或者更多治疗试剂(如,所述通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示佐剂)。所述第二治疗剂可以包括与通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物相同的组分,或可以单独服用的通式(I)、图(1)、或通式(III)所示的化合物(按用药时间,或用药方式和用药位置)。

[0627] 生物活性分子领域的技术人员清楚每种如通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物,对所述化合物可在确保所得产物仍旧保留与起始化合物相似的特异性和/或活性的方式进行修饰。在这种情况下,所述生物活性分子(D),如,通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物,包括任意和所有生物活性分子的类似物和衍生物。

[0628] 一方面,本发明提供了所述药物组合物,其含有治疗有效量的,例如,通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物,或其药学上可接受的盐,和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0629] 另一方面,本发明提供了药物组合物,其含有治疗有效量的化合物,例如,通式(I)(b)、通式(II)(b)、和/或通式(III)(b)所示的化合物,或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0630] 如上所述,例如,通式(I)、和/或图(1)所示的偶联物化合物,可与各种功能基团反应,所述多聚体免疫球蛋白或所述多聚体抗原-结合化合物与连接体结合,使生物活性分子形成共价偶联物。所述多聚体免疫球蛋白或所述多聚体抗原-结合化合物特异性的以所述偶联化合物为靶标结合配体,配体通常是多肽或其它类似抗原。在一些实施例,所述偶联物旨在包含具有结合配体的多聚体免疫球蛋白或所述多聚体抗原-结合化合物,所述结合配体发现于细胞异常生长的细胞或增殖性障碍的细胞。在一些实施例,例如,通式(I)、和/或图(1)所示的偶联物化合物旨在使每个化合物的连接体限制所述偶联物在细胞内进行分解代谢。因此,通过本发明所述偶联实施例进行的生物活性分子递送允许递送通常毒性太大而无法进行常规给药的生物活性分子。本发明所述实施例允许这些高选择性和特异性的偶联物递送至细胞异常生长的细胞或增殖性障碍的细胞(例如,相对于细胞外的分解代谢,从而释放生物活性物质进入血液或淋巴系统)。

[0631] 正如本领域技术人员所预想的,本发明所述的共价偶联化合物也可用于递送任何类型的有用的生物活性分子及可以选择性地靶向任何类型细胞群,例如,所述偶联物可用于将抗-增殖药物传递给异常生长细胞或将抗病毒药物传递给感染病毒的细胞,只要所选择的多聚体免疫球蛋白或多聚体抗原-结合化合物识别出特定细胞的结合配体。

[0632] 同样地,本发明提供了本发明所述偶联化合物实施例的使用方法。

[0633] 本发明所述药物组合物用于抑制、减缓和/或预防异常细胞生长或在治疗哺乳动物各种增殖性紊乱或疾病。在典型的实施例,所述哺乳动物是指人(本发明实施例描述与人

相关)。其他的哺乳动物,包括患有可检测的增殖性疾病的任何哺乳动物,包括灵长类、犬科、猫科、马科、山羊、绵羊、牛、骆驼等动物。另外,据悉,所述药物组合物的所述偶联化合物旨在以本发明所述的所述异常细胞增殖的细胞或治疗各种增殖性紊乱或疾病状态为选择性目标。

[0634] 同样地,本发明实施例包括抑制异常细胞生长的方法或治疗人体增殖性疾病,其包括给予所述人体治疗有效量的本发明所述的药物组合物。

[0635] 本发明所述药物组合物的治疗有效量的给药方式在不同给药途径都有效,例如:静脉、腹腔、皮下、肌内、局部、真皮内、鼻腔、或支气管内给药。本发明所述药物组合物也可直接给药到异常细胞生长位点(直接或间接与所述异常生长细胞接触),其通过,例如,基因传递(例如,基因传递此处所述药物组合物到达肺部肿瘤或脑部肿瘤)。本发明所述药物组合物的给药剂量量由本领域主治的卫生保健专业人员或本领域其他专业人员基于特定的临床表现来决定。如医药领域所常见的,每个人的剂量,即,病人,由许多因素决定,包括患者大小、患者的体表面积、患者年龄和总体健康状况、患者性别,给药时间和途径,和第二治疗剂的存在。在某些情况下,本发明所述偶联物,例如,通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物可在 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重每剂量之间的用量(注意其中连续输液应视为一种给药途径,可考虑至少 $1\text{pg}/\text{kg}$ 体重每分钟)。药物组合物可用药一次或多次每天和在几天、几周、几月、或几年内用药。

[0636] 增殖性紊乱或疾病的治疗方法,例如肿瘤,包括降低肿瘤大小、导致肿瘤坏死或凋亡、杀死肿瘤、停止肿瘤增生、和/或阻止肿瘤侵入或转移的方法。

[0637] 疾病的实例,其可根据抑制异常细胞增生或治疗增殖性疾病的方法得到治疗,包括:任何类型的恶性肿瘤,例如肺癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、淋巴癌、血癌等;自身免疫性疾病,例如红斑性狼疮、类风湿性关节炎、多发性硬化症;病毒性感染,例如,CMV感染、HIV感染、AIDS、肝炎、HPV感染;疼痛;精神障碍;和炎性疾病。

[0638] 如上所述,本发明所述药物组合物也用于预防或治疗哺乳动物的病毒感染,疼痛,炎症,自身免疫疾病,等类似疾病。

[0639] 一方面,本发明提供了减少、延缓或阻止异常细胞生长的方法,所述方法包括使所述异常细胞与以足够延缓、减少或阻止异常细胞生长的量的本发明所述的偶联物,如通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物,接触,和其中所述异常细胞生长是被延缓、被减少或被阻止的。

[0640] 一方面,本发明提供了杀死细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与以足够杀死所述细胞的量的本发明所述的偶联物,如通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物,接触,和其中所述细胞是被杀死的。

[0641] 在一些实施例,本发明提供了杀死细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与以足够杀死所述细胞的量的本发明所述的偶联物,如通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物,接触,和其中所述细胞是被杀死的,和进一步其中所述细胞是肿瘤细胞。

[0642] 一方面,本发明提供了对患有所述医疗疾病的个体进行医疗疾病治疗的方法,包括对所述个体施用有效量的包含本发明所述偶联物的组合物。所述偶联物,如通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物。

[0643] 在一些实施例,本发明提供了对患有所述医疗疾病的个体进行医疗疾病治疗的方

法,包括对所述个体施用有效量的包含本发明所述偶联物的组合物;所述偶联物,如通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物;和进一步地包括顺序或连续给予附加治疗。

[0644] 在一些实施例,本发明提供的方法,其中所述附加治疗是放射疗法、化学疗法、外科手术、或其组合。

[0645] 在一些实施例,本发明提供了对患有所述医疗疾病的个体进行医疗疾病治疗方法,包括对所述个体施用有效量的包含本发明所述偶联物的组合物;所述偶联物,如通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物;和进一步地包括顺序或连续给予附加治疗和给予至少一种附加治疗剂。

[0646] 一方面,所述医疗疾病治疗选自肿瘤,癌症,传染性疾病,神经变性疾病,骨疾,和心血管疾病。

[0647] 最后,本发明实施例可包括本发明所述偶联物的混合物,例如,通式(I)、图(1)、和/或通式(III)所示的化合物。

[0648] 既然本发明已经详细展示和描述了许多有关实施例,在不脱离本发明精神和范围内,本领域技术人员明白,可通过形式和细节上的改变,制备本发明公开的各种实施例,同时本发明公开的各种实施例不应被认为是对所述权利要求范围的限制。

[0649] V. 实施例

具体实施方式

[0650] 如下实施例仅作为说明性目的,并不用于限制本发明的范围。

[0651] 核磁共振氢谱来自于Varian Inova 300MHz or 500MHz仪器,然而质谱来自于两台Agilent电喷雾离子化LC-MS中的一台,一台带有离子阱分析器1100系列LC/MS,一台带有单四极分析器1200系列LC/MSD。偶联物的质谱在实施例详述。所有原始材料来自于商业采购,未经纯化,而溶剂来自于商业采购和在需要时通过本领域常规方法进行干燥。如下为实施例所用缩写词列表,括号中为化学全称:Boc (N-叔丁氧羰基)、DCM (二氯甲烷)、DIEA (N,N-二异丙基乙基胺)、DMF (N,N-二甲基甲酰胺)、EtOAc (乙酸乙酯)、HATU (1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶3-氧化六氟磷酸酯)、HCl (盐酸)、HOAc (冰醋酸)、HOAT (1-羟基-7-氮杂苯并三氮唑)、HPLC (高效液相色谱法)、LCMS (串联HPLC和质谱)、MeCN (乙腈)、MeMgI (碘化甲基镁)、MMAF (单甲基阿里他汀F)、NaHCO₃ (碳酸氢钠)、Na₂SO₄ (无水硫酸钠)、NH₄Cl (氯化铵)、t-BuOK (叔丁基氧钾)、TFA (三氟乙酸)、THF (四氢呋喃)。

[0652] 实施例1:

[0653] 本发明实施例阐明了所述抗体偶联分子的实用性,通过与本发明所述的连接体化合物桥接(如再连接)所述抗体的一个或多个二硫键。特别地,概念验证连接体分子(即,2-(溴-甲基)丙烯酸酯(1) [Sigma Aldrich]))),代表性地如本发明所述连接体-药物分子,与所述抗体上的半胱氨酸残基进行偶联,和所产生的偶联分子通过SDS-PAGE在还原条件下评估其稳定性。

[0654] 偶联物的制备及表征

[0655] 简单来说,测试Fc异形IgG1单克隆抗体(“mAb1” 10mg/ml),在50mM HEPES、150mM NaCl、pH 7.5条件下与1mM二硫苏糖醇(0.006mg每mg抗体)在37°C下还原30分钟。经凝胶过滤后(G-25,醋酸钠pH 4.5),2-溴甲基丙烯酸甲酯(1,1.2eq/二硫化物)在DMSO(10mg/ml)溶

液中加入到已还原的抗体，使用1M HEPES (pH 7.4) 将混合物调到pH 7.0，反应4h。立即烷基化，所述抗体使用0.5mM的脱氢抗坏血酸(dhAA) 氧化4h。使用体积排阻色谱对所述偶联物进行纯化。蛋白质浓度由UV光谱仪进行分析检测。HPLC排阻色谱测得所有偶联物是>95%单体。使用还原和非还原SDS-PAGE (图2) 对偶联物进行检测分析。

[0656] 图2中通道1显示分子量标识 (KDaltons)。图2中通道2是未反应的Ab1 (未偶联、未还原)。图2中通道3是与dhAA (已偶联、氧化、未还原的) 反应的mAb1-1偶联物。通道3中最小带在75KDa附近对应于“半抗体”分子重-轻链(表示图2中“HL”)。图2中通道4、通道5为空白。图2中通道6是还原条件下的mAb1，其显示为分开的重链和轻链带。图2中通道7是在还原条件下与dhAA反应的mAb1-1偶联物。通道8、9、10、11、和12为空白。如图2所示，通道7，所述mAb1-1偶联物在还原条件下是基本上完整的，这表明溴甲基丙烯酸酯化合物形成的所述二硫键用来稳定所述抗体和阻止在还原条件下免疫球蛋白重链和轻链解离。

[0657] 暂无任何理论可参考，还原和非还原SDS-PAGE检测所得实验结果表明：mAb1上的半胱氨酸残基之间的二硫键还原生成了游离巯基后，mAb1通过与化合物1发生还原反应形成稳定的偶联物。进一步地，化合物1通过共价键与mAb1上两个游离的巯基结合。因此，mAb1-1偶联物在还原条件下保持其结构未变。

[0658] 因此，概念验证实验显示本发明公开的连接体-药物化合物，其类似于本实施例所使用的化合物1的测试化合物，可通过半胱氨酸残基将多个药物、毒素剂及其他分子偶联至抗体上，同时保持所生成的抗体-药物偶联物结构的完整性。

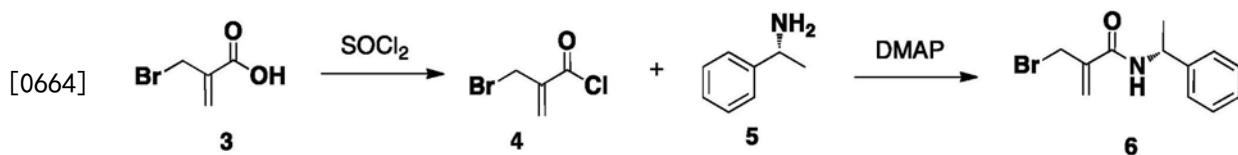
[0659] 实施例2：

[0660] 其他概念验证连接体分子(即，3-溴-2-(溴甲基)丙酸甲酯(2) [Sigma Aldrich])，本发明公开的连接体-药物分子代表物，其与抗体半胱氨酸残基上已还原的IgG1抗体相偶联，及所得偶联分子经还原条件和非还原条件下SDS-PAGE测试评估，如实施例1中所述(氨基丁三醇/甘氨酸4-12%，考马斯(Coomassie)染色)。

[0661] 2-溴甲基-N-(1-苯基-乙基)-丙烯酰胺(6)

[0662] 在50mL带有磁力搅拌、热电偶和氮气冷凝器接口的三颈圆底烧瓶中，将2-溴甲基-丙烯酸(2.0g；12.12mmol)溶于氯化亚砜(2.6mL；4.3g；36.36mmol)，所得棕色透明溶液在90-92℃下回流3小时，然后真空浓缩得到2.01克(90.5%产率)相应的酰基氯化合物4。

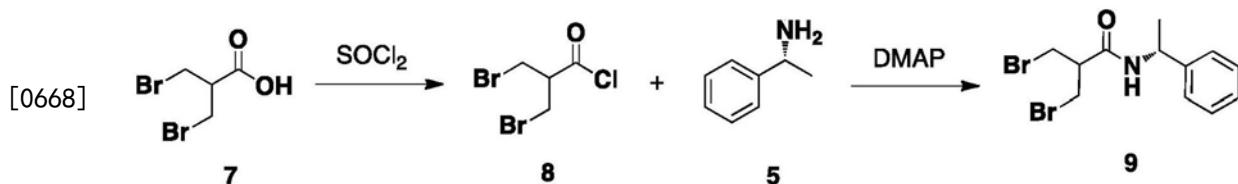
[0663] 在另一个50mL带有磁力搅拌、加料漏斗、热电偶、冷凝器和氮气接口的三颈圆底烧瓶中，加入R-1-苯基-乙胺(275mg；2.27mmol)、催化量DMAP(28mg；0.23mmol, 0.1eq)和DCM(10mL)。该溶液在冰浴下冷却至0℃。将2-溴甲基-丙烯酰氯4(500mg；2.73mmol, 1.2eq)也溶解于DCM(10mL)中，冷却至0℃，然后通过加料漏斗缓慢加到反应混合物中。该反应液在冰浴中搅拌，然后缓慢升温至室温，过夜。向反应液中加入乙酸乙酯进行稀释，并使用Na₂SO₄洗，过滤，真空浓缩至干，粗产品使用少量DCM溶解，硅胶纯化(0-100% EtOAc己烷溶液)。合并纯化后溶液(通过LC)，浓缩至干，得到白色固体目标化合物(0.12g, 20%)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) : 7.39-7.25 (m, 5H), 6.27 (br s, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 5.24-5.13 (m, 1H), 4.33-4.31 (app.d, 2H), 1.56-1.54 (d, 3H)。



[0665] 3-溴-2-溴甲基-N-(1-苯基-乙基)-丙酰胺(9)

[0666] 在带有磁力搅拌、热电偶、冷凝器和氮气接口的25mL三颈圆底烧瓶中,将3-溴-2-溴甲基-丙酸(1.0g;4.07mmol)溶于氯化亚砜(0.9mL;1.45g;12.2mmol)中。所得透明的棕色溶液在90-92℃回流3小时,然后真空浓缩,得到0.89克(83%产率)相应酰基氯化物。¹H-NMR(300MHz,CDCl₃):3.85-3.75(m,4H),3.60(pentet,1H,J=9Hz)。

[0667] 在另一个50mL带有磁力搅拌、加料漏斗、热电偶和氮气接口的三颈圆底烧瓶中,加入R-1-苯基-乙胺(149mg;1.23mmol)、催化量DMAP(18mg;0.15mmol,0.1eq)和DCM(10mL)。反应混合物在冰浴冷却至0℃。将3溴-2-溴甲基-丙酰氯8(390mg;1.48mmol,1.2eq)溶解于DCM(10mL)中,冷却至0℃,然后通过加料漏斗缓慢加到反应混合物中。该反应混合物在冰浴中搅拌,缓慢升温至室温,过夜。向该反应混合物中加乙酸乙酯稀释,并使用Na₂SO₄洗,过滤,真空浓缩至干,粗产品使用少量DCM溶解,硅胶纯化(0-100%EtOAc己烷溶液)。合并纯化后溶液(通过LC),浓缩至干得到白色固体目标化合物(0.13g,24%)。¹H-NMR(300MHz,CDCl₃):7.36-7.25(m,5H),6.03-6.01(d,1H),5.22-5.13(m,1H),3.65-3.45(m,4H),2.92-2.82(m,1H),1.55-1.53(d,3H)。



[0669] 偶联物的制备和表征

[0670] 简单来说,测试Fc异形IgG1单克隆抗体(“mAb1”10mg/ml),在50mM HEPES、150mM NaCl、pH 7.5中,与1mM二硫苏糖醇(0.006mg每mg抗体)在37℃还原30分钟。经凝胶过滤后(G-25,醋酸钠pH 4.5),重聚试剂1、2、6、或9(1.2eq/二硫化物)在DMSO(10mg/ml)溶液中加入到已还原的抗体中,使用1M HEPES(pH 7.4)将混合物调到pH 7.0,反应4h。立即烷基化,所述抗体使用0.5mM的脱氢抗坏血酸(dhAA)氧化4h。使用体积排阻色谱对所述偶联物进行纯化。蛋白质浓度由UV光谱仪进行分析检测。HPLC体积排阻色谱测得所有偶联物是>95%单体。图3包含偶联物的还原和非还原SDS-PAGE凝胶(氨基丁三醇/甘氨酸4-12%,考马斯(Coomassie)染色)。

[0671] 图3中通道1显示分子量标识(KDa)。图3中通道2是完整的Ab1(未偶联、未还原)。通道3和通道4分别是mAb1-6和mAb1-9偶联物。通道3和4中主带在75KDa附近对应于“半抗体”分子重-轻链(表示图3中“HL”)。图3中通道5和6分别为mAb1-2和mAb1-1偶联物。主带在150KDa附近的偶联物均对应为完整的抗体。通道7为空白。图3中通道8是还原条件下的mAb1,其显示为分开的重链和轻链带。通道9和10分别是还原条件下的mAb1-6和mAb1-9。在这些通道中,3条带对应为轻链(25KDa)、重链(50KDa)、及重-轻链或“半抗体”分子。图3中通道11和12分别为还原条件下的mAb1-2和mAb1-1偶联物。主要的带在150KDa附近的偶联物均对应为完整的抗体。如图3所示,通道11和12,对应的mAb1-2和mAb1-1在还原条件下保持基

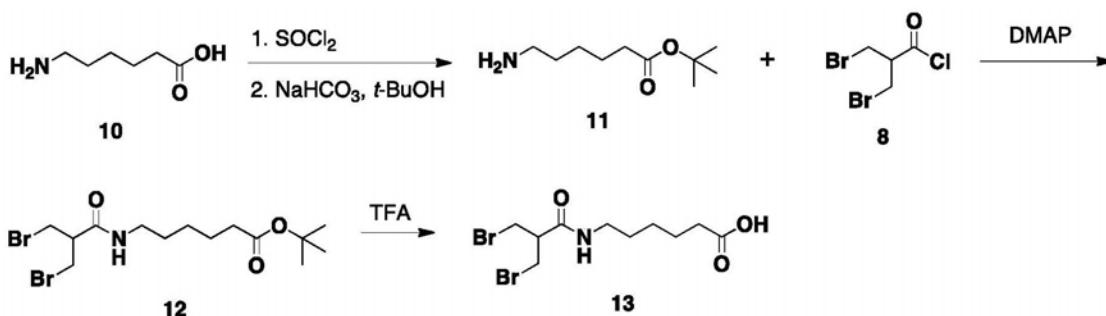
本上完整,表明在还原条件下,所述二硫键化合物形成的二硫键用来稳定所述抗体和阻止在还原条件下免疫球蛋白重链和轻链解离。

[0672] 暂无任何理论可参考,还原和非还原SDS-PAGE检测所得实验结果表明:mAb1上的半胱氨酸残基之间的二硫键还原得到游离巯基后,mAb1通过与二硫键化合物反应形成了稳定的偶联物。进一步地,mAb1上的两个游离巯基形成的连接是共轭键。因此,mAb1-6和mAb1-9偶联物在还原条件下保持它们的大多数结构未变,而在mAb1-2和mAb1-1偶联物中,几乎所有的IgG结构保持完整。

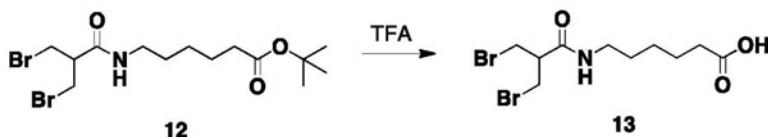
[0673] 因此,附加的概念验证实验显示本发明公开的连接体-药物化合物,其类似于本实施例化合物1、2、6、和9,可通过半胱氨酸残基将多个药物、毒素剂及其他分子偶联至抗体上,同时保持所生成的抗体-药物偶联物结构的完整性。

[0674] 实施例3:

[0675] 连接体合成



[0676]



[0677] (3-溴-2-溴甲基-丙酰氨基)-己酸(13)

[0678] 步骤1:制备6-氨基-己酸叔丁酯(11)

[0679] 向50mL带有磁力搅拌和氮气接口的圆底烧瓶,加入6-氨基己酸(2.0g;15mmol)和氯化亚砜(5.0mL;69mmol;4.5eq)。该反应液保持温度不超过30℃条件下,搅拌2小时,真空浓缩至干。向所得黄褐色半固态浆液加入碳酸氢钠(2.6g;30mmol;2.0eq) t-BuOH(5.0mL;87mmol;5.7eq)溶液,然后该浆液在室温下搅拌2小时。在40℃下真空蒸发丁醇。使用乙酸乙酯稀释所得白色浓稠浆液,再用4份1N NaOH、3份H₂O、1份盐水进行洗。所得有机物用Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,得到无色油状物目标化合物2.2g (77%产率)。MS (ESI, pos.) :计算值C₁₀H₂₁NO₂, 187.3; 实测值188.4 (M+H)⁺, ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) : 2.68-2.64 (m, 2H), 2.21-2.16 (m, 2H), 1.62-1.52 (m, 2H), 1.48-1.38 (m, 9H), 1.36-1.20 (m, 2H), 1.09 (m, 2H)。

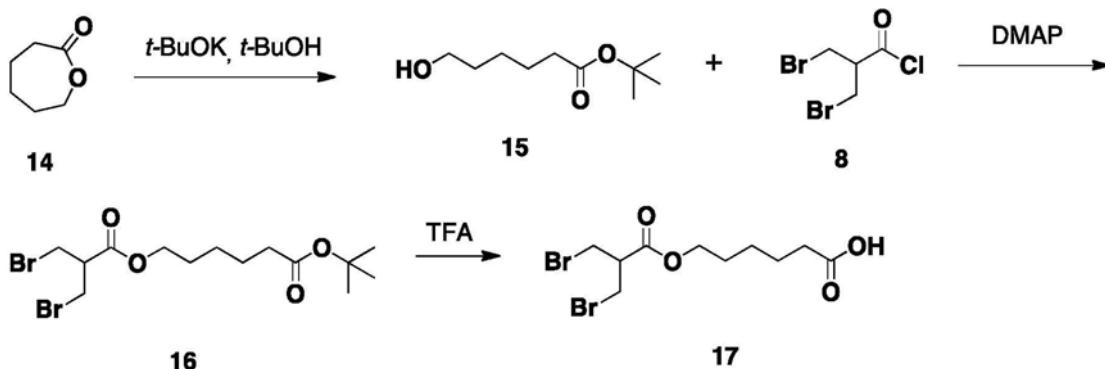
[0680] 步骤2:制备6-(3-溴-2-溴甲基-丙酰氨基)-己酸叔丁酯(12)

[0681] 向50mL带有磁力搅拌和氮气接口的圆底烧瓶,加入6-氨基己酸叔丁酯11 (0.50g; 2.7mmol) 和二甲氨基吡啶(0.03g; 0.27mmol; 0.10eq) 的DCM(5.0mL) 溶液。该反应液在冰浴冷却至0℃。将3-溴-2-溴甲基-丙酰氯8 (0.90g; 3.4mmol; 1.2eq) 溶解于DCM(5mL) 中,然后缓慢加入0℃的反应混合物中。搅拌,缓慢升温至室温,过夜。用乙酸乙酯稀释反应混合物,用水、5%NaHCO₃和盐水洗涤有机混合物。所得有机物用Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,硅胶柱纯化,用0-100%乙酸乙酯己烷溶液洗脱,得到黄色透明油状物目标化合物0.49g (42%产率)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) : 5.92 (brs, 1H), 3.64-3.58 (m, 2H), 3.54-3.48 (m, 2H), 3.36-3.29 (m, 2H), 2.89-2.83 (m, 1H), 2.24-

[0682] 2.20 (m, 2H), 1.65-1.51 (m, 4H), 1.44-1.35 (m, 11H)。

[0683] 步骤3:制备6- (3-溴-2-溴甲基-丙酰氨基) -己酸(13)

[0684] 向50ml带有磁力搅拌和氮气接口的圆底烧瓶,加入6- (3-溴-2-溴甲基-丙酰氨基) -己酸叔丁酯12 (0.26g; 0.62mmol) 和三氟乙酸 (0.70mL; 9.3mmol; 15eq) 的DCM (10mL) 溶液。该反应液在室温搅拌,过夜,浓缩至干,用乙腈和水(各1.0mL)溶解,冷冻和冻干,得到固体化合物0.22g (100%)。MS (ESI, pos.) :计算值C₁₀H₁₇Br₂N0₃, 359.0, 实测值358.0, 360.0, 362.0 (M+H), 380.0, 382.0, 384.0 (M+Na), 356.0, 358.0, 360.0 (M-H)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) :11.97 (s, 1H), 8.20-8.16 (m, 1H), 3.58-3.56 (d, 4H), 3.11-3.04 (m, 2H), 3.02-2.97 (m, 1H), 2.21-2.16 (m, 2H), 1.54-1.37 (m, 4H), 1.33-1.29 (m, 2H)。



[0685]

[0686] 6- (3-溴-2-溴甲基-丙酰氧基) -己酸(17)

[0687] 步骤1:制备6-羟基-己酸叔丁酯(15)

[0688] 向250ml带有磁力搅拌、热电偶、冷凝器、和氮气接口的圆底烧瓶加入6-己内酯14 (3.7g; 32mmol) 和t-BuOH (100mL) 的DCM溶液,再加入t-BuOK (3.9g; 35mmol; 1.1eq)。搅拌该溶液,加热回流3小时。该溶液用甲苯稀释,用水和浓盐水洗,用Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,得到黄色透明油状物4.8g (80%产率)。¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) :3.65-3.62 (m, 2H), 2.32-2.29 (m, 1H), 2.23-2.20 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 4H), 1.43 (s, 9H), 1.41-1.35 (m, 2H)。

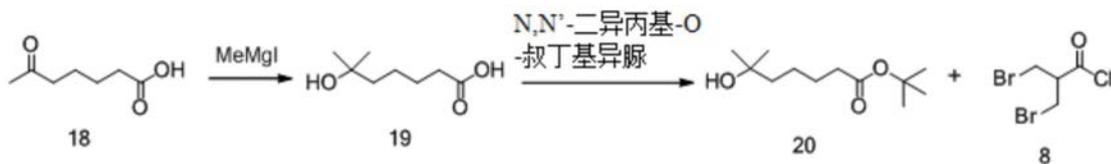
[0689] 步骤2:制备6- (3-溴-2-溴甲基-丙酰氧基) -己酸叔丁酯(16)

[0690] 向50ml带有磁力搅拌和氮气接口的圆底烧瓶,加入6-羟基-己酸叔丁酯15 (0.50g; 2.7mmol) 和二甲氨基吡啶 (0.03g; 0.27mmol; 0.10eq) 的DCM (5.0mL) 溶液。该反应溶液在冰浴冷却至0℃。将3-溴-2-溴甲基-丙酰氯8 (0.90g; 3.4mmol; 1.3eq) 溶解于DCM (5.0mL) 中,0℃下,缓慢将其加入到反应溶液中。混合物搅拌,缓慢升温至室温,过夜。用乙酸乙酯稀释反应所得混合物,用水、5%NaHCO₃和浓盐水洗涤有机混合物。所得有机物用Na₂SO₄干燥,过滤,浓缩,和在硅胶柱上纯化,用0-100%乙酸乙酯己烷溶液洗脱,得到黄色透明油状物0.75g (78%产率)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) :4.21-4.15 (m, 2H), 3.80-3.68 (m, 4H), 3.21-3.15 (m, 1H), 2.40-2.31 (m, 2H), 1.71-1.59 (m, 4H), 1.42-1.37 (m, 11H)。

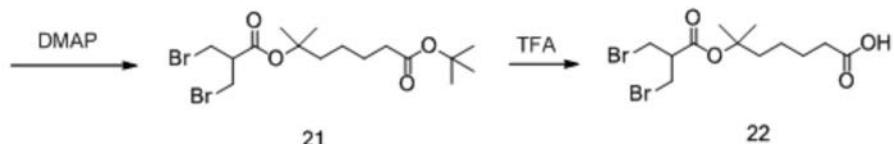
[0691] 步骤3:制备6- (3-溴-2-溴甲基-丙酰氧基) -己酸(17)

[0692] 向50ml带有磁力搅拌和氮气接口的圆底烧瓶,加入6- (3-溴-2-溴甲基-丙酰氨基) -己酸叔丁酯16 (0.70g; 1.7mmol) 和三氟乙酸 (1.3mL; 17mmol; 10eq) DCM (10mL) 溶液。该反应液在室温下搅拌过夜,浓缩和在硅胶柱上纯化,用0-100%乙酸乙酯己烷溶液洗脱,得到无色透明油状物0.34g (56%产率)。MS (ESI, pos.) :计算值C₁₀H₁₆Br₂O₄, 360.0; 实测值380.8, 382.8, 384.8 (M+Na), 276.0, 278.0 (M-H)。¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) :4.21-4.16 (m, 2H), 3.80-3.67 (m, 4H), 3.22-3.16 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 2H), 1.75-1.63 (m, 4H), 1.50-1.39 (m,

2H)。



[0693]



[0694] 6-((3-溴-2-(溴甲基)丙酰基)氧基)-6-甲基庚酸(22)

[0695] 步骤1:制备6-羟基-6-甲基-庚酸(19)

[0696] 向250mL带有磁力搅拌、加料漏斗、冷凝器、热电偶和氮气接口的三口圆底烧瓶，加入5-乙酰戊酸18 (1.0g; 6.9mmol) 和无水THF (50mL)。搅拌溶液，在干冰/丙酮浴中冷却至-78 °C。通过加料漏斗，向该溶液缓慢加入1.4M MeMgI的THF/甲苯 (29mL; 40mmol; 5.8eq) 溶液，加料时间超过15分钟。-78°C搅拌该溶液反应2小时，然后缓慢升温至-10°C，加入饱和NH₄Cl溶液去除过量的Grignard试剂。将两相溶液升温至室温，加入乙酸乙酯稀释，弃去有机层。合并水相，用1M HCl酸化，用乙酸乙酯萃取 (3x 50mL)，合并有机相，用盐水洗，Na₂SO₄干燥，过滤，浓缩，得到无色透明油状物0.63g (57%产率)。¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) : 2.39-2.36 (m, 2H), 1.68-1.62 (m, 2H), 1.51-1.47 (m, 2H), 1.45-1.40 (m, 2H), 1.21 (s, 6H)。

[0697] 步骤2:制备6-羟基-6-甲基-庚酸叔丁酯(20)

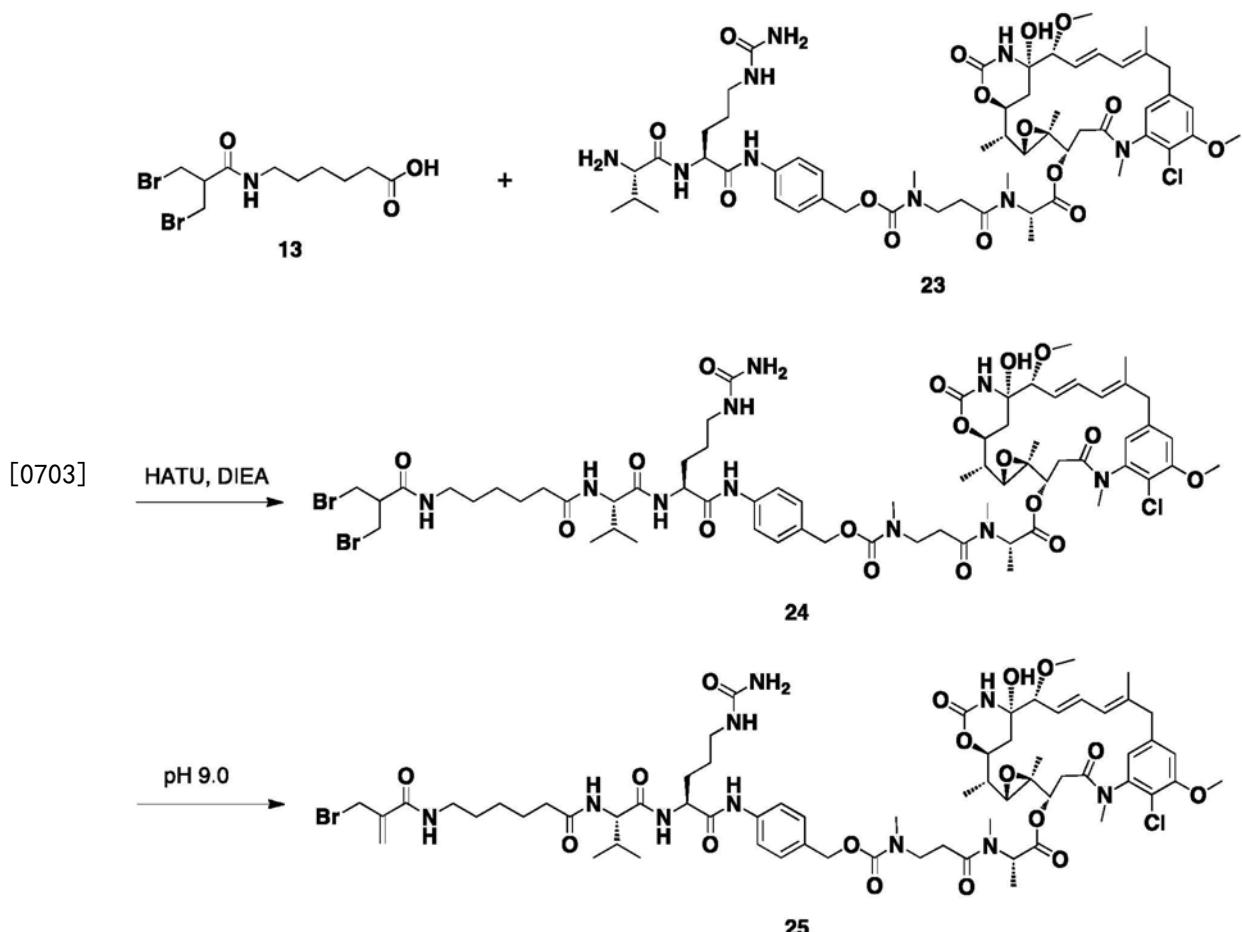
[0698] 向100mL带有磁力搅拌、加料漏斗、冷凝器、热电偶和氮气接口的三口圆底烧瓶，加入6-羟基-6-甲基-庚酸19 (0.68g; 4.2mmol) 和DCM (30mL)。反应液在室温下搅拌，同时通过加料漏斗逐滴加入N,N'-二异丙基-O-叔丁基异脲 (2.6g; 13mmol)。该反应搅拌过夜，然后升温至40°C，反应3h。移除溶剂，粗产品过硅胶柱，用0-50%乙酸乙酯己烷液洗脱纯化，然后真空蒸发得到无色澄清油状物目标化合物 (0.28g, 30%产率)。¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) : 2.25-2.21 (t, 2H), 1.63-1.57 (q, 2H), 1.49-1.46 (m, 2H), 1.44 (m, 9H), 1.41-1.36 (m, 2H), 1.21 (s, 6H)。

[0699] 步骤3-4:制备化合物21和22

[0700] 化合物20与化合物8在DMAP催化下发生酰基化反应，生成化合物21，和三氟乙酸移除叔丁基保护基团的三氟乙酸将提供所需阻碍功能的酸连接体22，所述连接体22可与有效负载和连接体有效负载进行偶联。

[0701] 实施例4:

[0702] 美登素类化合物连接体有效负载



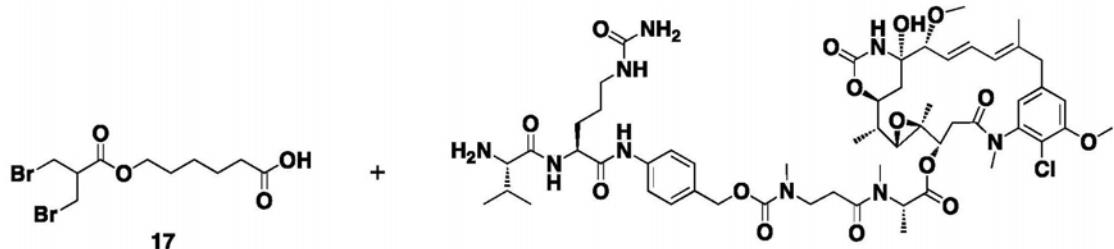
[0704] 根据W02014145090所述的方法制得白色固体化合物23 (0.074g, 63%)。MS (ESI, pos.) : 计算值 $C_{55}H_{78}ClN_9O_{15}$, 1139.5; 实测值1141.4 ($M+H$)。

[0705] 6-(3-溴-2-溴甲基-丙氨基)-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸-p-氨基-苄基氨基甲酰基-N-甲基-β-丙氨酸-N-甲基-L-丙氨酸-美登素-3-酯(24)

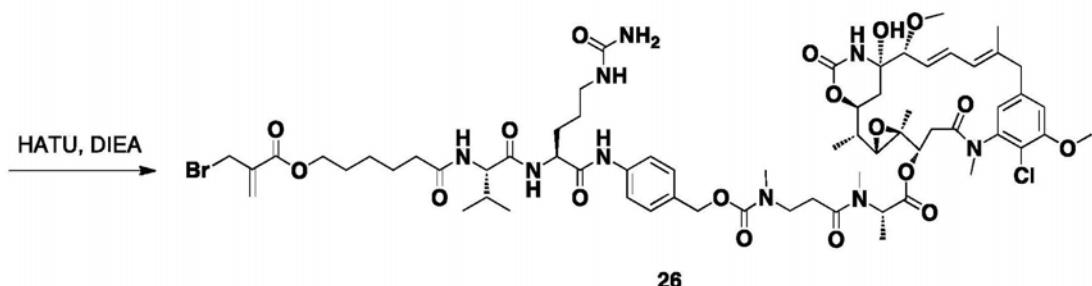
[0706] 在干燥的圆底烧瓶中加入称量的化合物23 (0.016g, 0.013mmol)、化合物13 (0.016g, 0.045mmol) 和HATU (0.024g, 0.063mmol), 用DMF (3.0mL) 溶解上述化合物, 通过注射器注入DIEA (0.010mL, 0.057mmol)。用氩气冲洗烧瓶, 橡皮隔片封口, 在室温下搅拌反应22小时。向烧瓶中加水稀释, 通过ISCO CombiFlash系统用100g C18Aq RediSep黄金柱纯化 (20-80%乙腈水溶液和0.05%HOAc, 超过15mins, 流速50mL/min), 和将最干净部分冷冻, 冻干得到白色固体目标化合物 (0.015g, 75%)。MS (ESI, pos.) : 计算值 $C_{65}H_{93}Br_2ClN_{10}O_{17}$, 1480.5/1481.5 (最丰富的同位素); 实测值1481.5/1483.6 ($M+H$)。

[0707] 2-(溴甲基)-丙烯酰胺基-6-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸-p-氨基苄基氨基甲酰基-N-甲基-β-丙氨酸-N-甲基-L-丙氨酸-美登素-3-酯(25)

[0708] 化合物24 (0.021g, 0.014mmol) 溶于MeCN (4.0mL), 用pH 9.00缓冲液 (4.0mL, Fisher Chemical#SB114-500) 处理, 烧瓶用氩气吹洗, 用橡胶隔片封口, 室温下搅拌反应20小时。反应液在干冰中冷冻, 冻干成固体, 再用1:1乙腈/水溶解, 通过ISCO CombiFlash系统用50g C18Aq RediSep黄金柱 (20-80%MeCN水溶液, 和0.05%HOAc, 超过12mins, 40mL/min) 纯化, 和将最干净部分冷冻, 冻干得到白色固体目标化合物 (0.013g, 65%)。MS (ESI, pos.) : 计算值 $C_{65}H_{92}BrClN_{10}O_{17}$, 1400.6 (最丰富的同位素); 实测值1401.5 ($M+H$)。



[0709]

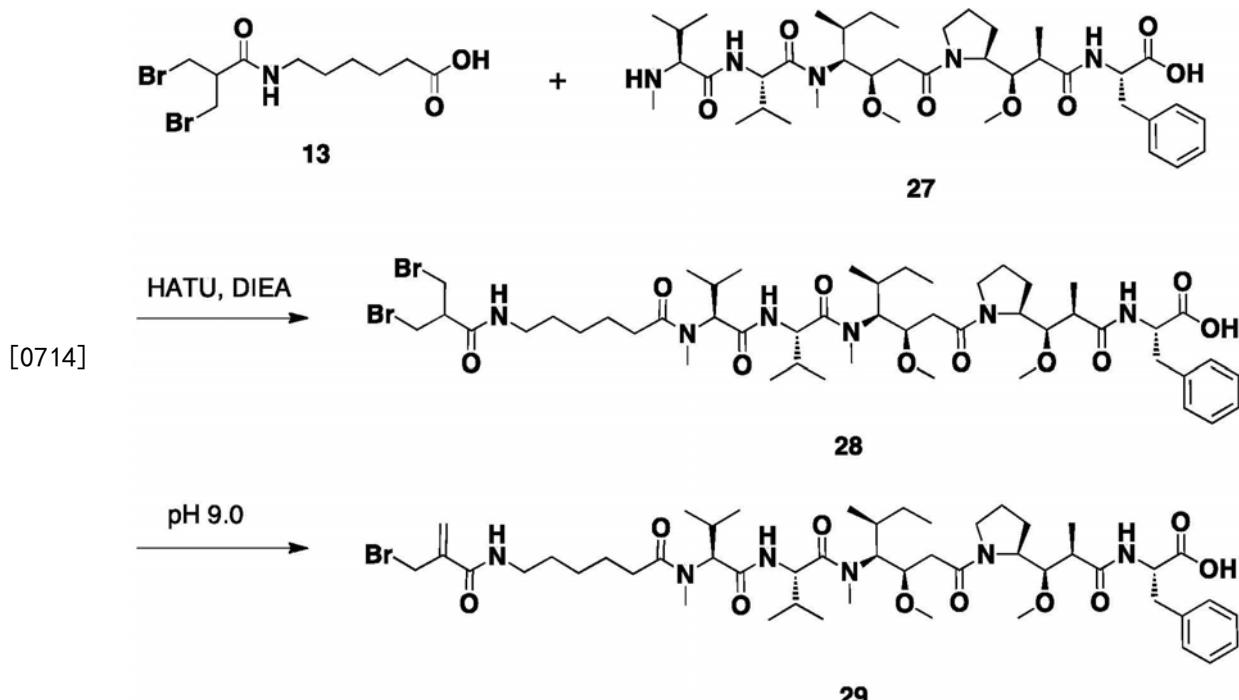


[0710] 2-(溴甲基)-丙烯酰基-6-己酰胺基-L-缬氨酸-L-瓜氨酸--p-氨基苄基氨基甲酰基-N-甲基-β-丙氨酸-N-甲基-L-丙氨酸-美登素-3-酯(26)

[0711] 称量化合物17 (0.022g, 0.061mmol)、化合物23 (0.024g, 0.020mmol)、和HATU (0.038g, 0.10mmol) 并加入干燥圆底烧瓶中, 用DMF (3.0mL) 溶解, 通过注射器将DIEA (0.02mL, 0.12mmol) 注入烧瓶。用氩气吹净烧瓶, 橡皮隔片封口, 室温下搅拌反应24小时。反应液真空浓缩, 得到油状物, 用1:1乙腈/水溶解, 加入一滴10%HOAc溶液处理, 通过ISCO CombiFlash系统用50g C18Aq RediSep黄金柱 (20-80%乙腈/水, 和0.05%HOAc, 超过12mins, 流速40mL/min) 纯化, 和将最干净部分冷冻, 冻干得到白色固体 (0.012g, 43%) , 即为目标化合物。MS (ESI, pos.) : 计算值C₆₅H₉₁BrClN₉O₁₈, 1401.5 (最丰富的同位素); 测量值1402.6 (M+H)。

[0712] 实施例5:

[0713] 阿里他汀连接体有效负载



[0715] 6- (3-溴-2-溴甲基-丙酰胺基) -己酰氨基-单甲基阿里他汀F (28)

[0716] 称量化合物13 (0.040g, 0.11mmol) 和HATU (0.033g, 0.087mmol) 并加入干燥圆底烧瓶中, 用DMF (2.0mL) 进行溶解, 通过注射器加入DIEA (0.030mL, 0.17mmol) 处理。用氩气吹净烧瓶, 橡皮隔片封口, 室温下搅拌反应0.5小时。然后加入单甲基阿里他汀F 27 (0.034g, 0.046mmol) 的DMF (1.0mL) 溶液, 用氩气再次吹净烧瓶, 再封口, 再次搅拌反应18小时。该反应液加水 (3mL) 稀释, 通过ISCO CombiFlash系统用50g C18Aq RediSep黄金柱 (20-80% 乙腈/水, 和0.05% HOAc, 超过17mins, 流速为50mL/min) 纯化。合并通过LCMS流出的包含产品的部分, 用干冰/丙酮浴冷冻, 和冻干得到白色固体目标化合物 (0.024g, 44%) 。MS (ESI, pos.) : 计算值 $C_{49}H_{80}Br_2N_6O_{10}$, 1072.4 (最丰富的同位素); 实测值1073.5 ($M+H$)。

[0717] 2- (溴甲基) -丙烯酰胺基-6-己酰氨基-单甲基阿里他汀F (29)

[0718] 将化合物28 (0.013g, 0.012mmol) 溶于MeCN (2.0mL), 使用pH 9.00缓冲剂 (2.0mL, Fisher Chemical#SB114-500) 进行处理, 用氩气吹净烧瓶, 用橡皮隔片进行封口, 室温条件下搅拌反应40小时。反应显示只有56%通过LCMS转化为产品, 所以加入饱和 $NaHCO_3$ 溶液, 将pH调至高达8.5, 室温条件下再次搅拌反应7小时。反应液加入10% HOAc (1.0mL) 溶液酸化, 通过ISCO CombiFlash系统用50g C18Aq RediSep黄金柱 (20-80% 乙腈/水, 和0.05% HOAc, 超过12分钟, 流速30mL/min) 纯化。冷冻得到的最纯净的部分和冻干得到白色固体目标化合物 (0.005g, 42%) 。MS (ESI, pos.) : 计算值 $C_{55}H_{78}ClN_9O_{15}$, 990.5/992.5 (最丰富的同位素); 实测值991.5/993.5 ($M+H$)。

[0719] 偶联物的制备及表征

[0720] 来自US20150056222 (W02015026907) 的抗-PRLR单克隆抗体、H1H6765P、和非靶向单克隆抗体均为Fc异形 IgG1 (10mg/ml) 在50mM HEPES、150mM NaCl、pH 7.5中与1mM二硫苏糖醇 (0.006mg每mg抗体) 在37°C还原30分钟。经凝胶过滤后 (G-25, 醋酸钠pH 4.5), 在DMSO (10mg/ml) 溶液中化合物26、28、或29 (1.2eq/二硫化物) 中的一种加入到已还原的抗体中, 使用1M HEPES (pH 7.4) 将混合物调到pH 7.0, 反应4h。接着立即烷基化, 所述抗体使用

0.5mM的脱氢抗坏血酸(dhAA)氧化4h或允许空气氧化。使用体积排阻色谱对所述偶联物进行纯化。蛋白质浓度由UV光谱仪进行分析检测。体积排阻HPLC色谱测得所有偶联物是>95%单体。对于美登素类偶联物26的药物与抗体比(DAR)使用消光系数进行确定 $280\text{nm}=8115\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 和 $252\text{nm}=49407\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$,其所得DAR为2。所述阿里他汀类偶联物的DAR不能确定。偶联物通过还原和非还原SDS-PAGE和图4包含的凝胶进行分析(氨基丁三醇/甘氨酸4-12%,考马斯(Coomassie)染色)。

[0721] 图4中通道1显示分子量标记物(KDa)。图4中通道2包含完整的H1H6765P抗体(未偶联、未还原)。通道3和通道4中分别是偶联物H1H6765P-28和H1H6765P-29。三个主带是在通道3和4中在75、125、和150KDa周围对应重-轻链“半抗体”重-重-轻链抗体,以及完整的抗体偶联物。图4中通道5是H1H6765P-26具有的唯一主带,在75和50KDa周围,分别对应重-轻链“半抗体”和完整抗体偶联物。通道6和7为空白。图4中通道8包括还原条件下的H1H6765P,其显示为分开的重链和轻链带。通道9和10分别是还原条件下的H1H6765P-28和H1H6765P-29偶联物。这些通道中,3个主带在25、50、和75KDa周围,分别对应轻链、重链、和重-轻链“半抗体”偶联物。图4中通道11包含在还原条件下的偶联物H1H6765P-26。在这个通道中,所述带出现在75、125、和150KDa周围对应重-轻链“半抗体”重-重-轻链,和完整的抗体偶联物。如图4所示,通道9-10偶联物在还原条件下部分保持完整。在通道11中,H1H6765P-26保持基本上完整,这表明在还原条件下,所述二硫键聚合连接体有效负载形成的二硫键用来稳定所述抗体和阻止免疫球蛋白重链和轻链解离。

[0722] 偶联物质谱分析

[0723] 偶联物H1H6765P-28和H1H6765P-26由赛默Q-Exactive(四极杆)电喷雾质谱进行分析检测,该质谱配备岛津HPLC,HPLC配有高性能LC-20AD泵、SIL-20AC HT自动进样器、和SPD-20AUV检测器。

[0724] 使用MilliQ水将每种偶联物稀释至1mg/mL。PNGase F(P0704L,新英格兰内切酶)稀释为75 000U/mL。吸取5uL稀释后的PNGase F,加入到50uL各样品中,和所述样品37°C下保持恒温,摇摆(500RPM),过夜。取5uL样品加入到LC-MS系统中测试。

[0725] 色谱分离由LC梯度完成,由流动相A(0.1%甲酸水溶液)和流动相B(0.1%甲酸乙腈溶液)组成的梯度参数如表1所示,流速设定为0.4ml/min。分析过程中Waters BEH C18色谱柱(50X2.1mm 1.7um粒径)恒温60°C。3-14分钟流出的试样直接进入MS和其他排入废液池中。

[0726] 表1:LC梯度

分钟	0.01	3	13.9	14	16	17	24
%B	10	10	90	95	95	10	10

[0728] 质谱参数设定

[0729] 赛默Q-Exactive质谱配备HESI离子源用于从LC检测洗脱液。其他参数如表2所示。

[0730] 表2:完整质谱分析Q-Exactive参数

参数	扫描范围	分辨率	自动增益控制	最大离子注射时间	源内 CID
数值	700-4000 Da	17,500	5e6	200 ms	80.0 eV
参数	喷雾电压	辅助气	尾气	毛细管温度	
数值	4400 V	10	8	250 °C	

[0732] 使用赛默蛋白反卷积软件对所收集的质谱进行反卷积分析。手动ReSpect™选为实验类型。噪声抑制设定为置信度95%，和质量偏差为25ppm。

[0733] 图5包含H1H6765-28的去糖偶联物质谱。所述质谱峰与通过二硫键聚合提供的连接体有效负载28或氧化物的完整的、重-重-轻、或“半抗体”一致。其中28在所述巯基之间得到的共价键的程度，体现为离散质量增加与反应连接体-有效负载(993Da, -1溴类或913Da, -2溴类)对应。质谱总结如表3所示。

表 3			
质谱峰 (图 5)	质量数 (Da)	同种基团相邻峰的质量数差异 (Da)	匹配片段*
P1	74276.797		HL
P2	75188.813	912.0	HL+1 drug
P3	122479.523		HHL
P4	123390.578	911.1	HHL+1 drug
P5	124303.344	912.8	HHL+2 drugs
P6	144906.469		HHLL
P7	145819.813	913.3	HHLL+1 drug
P8	146731.172	911.4	HHLL+2 drugs
P9	147643.922	912.8	HHLL+3 drugs

*备注: H 代表 mAb 重链; L 代表 mAb 轻链; HL 代表半 mAb; HHL 是指两条重链连接一条轻链; HHLL 是指整条 mAb。来自添加一种药物的质量增加为 913 Da。

[0736] 图6包含H1H6765-26的去糖基偶联物质谱。所述质谱峰与通过二硫键聚合提供的连接体有效负载26或氧化物的完整或“半抗体”一致。其中26在所述巯基之间得到的共价键的程度，体现为离散质量增加与反应连接体-有效负载(1323Da)。质谱总结如表4所示。

表 4			
质谱峰 (图 6)	质量数 (Da)	同种基团相邻峰的质量数差异 (Da)	匹配片段*
P1	72652.508		HL
P2	73974.609	1122.2	HL+1 drug
P3	75181.383	1206.8	HL+2 drugs
P4	76416.953	1235.6	HL+3 drugs
P5	145105.625		HHLL
P6	146425.141	1319.5	HHLL+1 drug
P7	147749.703	1324.6	HHLL +2 drug
P8	149077.906	1328.2	HHLL+ 3 drug
P9	150483.453	1405.5	HHLL +4 drug

*备注：H 代表 mAb 重链；L 代表 mAb 轻链；HL 代表半 mAb；HHL 是指两条重链连接一条轻链；HHLL 是指整个 mAb。由于每个品种的特异性，来自添加一种药物的质量增加可能与名义上的 1322.9 Da 不同。

[0738] 实施例6

[0739] 体外细胞毒性试验

[0740] 本实施例,对各抗体-药物偶联物体外杀死表达抗原肿瘤细胞的能力进行评估。

[0741] 细胞种植在细胞培养板三角面96孔板上,每孔放置1000 (HEK293和HEK293/PRLR) 或6000个细胞 (T47D),在完整生长培养基中细胞培养过夜。将系列稀释的偶联物和游离代表性有效负载以100nM到5pM的最终浓度添加到细胞中,培养孵化三天,以测试细胞活力曲线。将细胞与CCK8 (Dojindo) 一起培养孵化1 - 3小时,使用孔板检测仪Victor X4 (PerkinElmer),在吸光度为450nm (OD450),测试细胞活化能力。从所有孔中扣除源自洋地黄皂苷(40nM) 处理细胞的背景OD450水平 (CCK8),活化能力表示为未处理的对照组的百分比。IC50值由10-点响应曲线(GraphPad Prism) 上的四参数逻辑方程测得。美登素类化合物偶联物曲线和IC50值,可由基于UV DAR值的有效负载等价物进行修正。对于阿里他汀偶联物(MMAF),由于通过UV或质谱,不能获得好的估算值,IC50值指定DAR为1(即,等同于抗体浓度)。

[0742] 图7中,在任何细胞株检测中,美登素类化合物有效负载(WO2014145090中化合物7) 正如预期的那样,在任何检测的细胞系中,不能活跃至高达100nM。同型对照组织蛋白酶B裂解偶联物、同型对照-26,是同样不活跃的。然而,靶标组织蛋白酶B裂解的H1H6765P-26偶联物在基因工程细胞株HEK293/hPRLR中的活跃度IC50为~4nM,在基因工程细胞株T47D中的活跃度IC50为0.52nM.H1H6765P-26在自然细胞株HEK293(非靶向表达) 中的不活跃度高达100nM,正如预期的那样。在所述这些检测中,未偶联的H1H6765P缺乏活性。

[0743] 在图8中,在任何用于检测的细胞株中,化合物27 (MMAF) 有效负载不活跃度高达100nM,正如预期的那样。对照非裂解偶联物,同型对照-28或同型对照-29,均相似的不活跃。然而,靶标非裂解偶联物,H1H6765P-28或H1H6765P-29,在基因工程细胞株HEK293/

hPRLR中,活跃至IC50值分别为~0.04和~0.03nM,和在基因工程细胞株T47D中,活跃至IC50值分别为0.03和0.03nM。在自然细胞株HEK293(非靶向表达)中,H1H6765P-28或对照-29活跃度均高达100nM,正如预期的那样。在所述这些检测中,未偶联的H1H6765P缺乏活性。

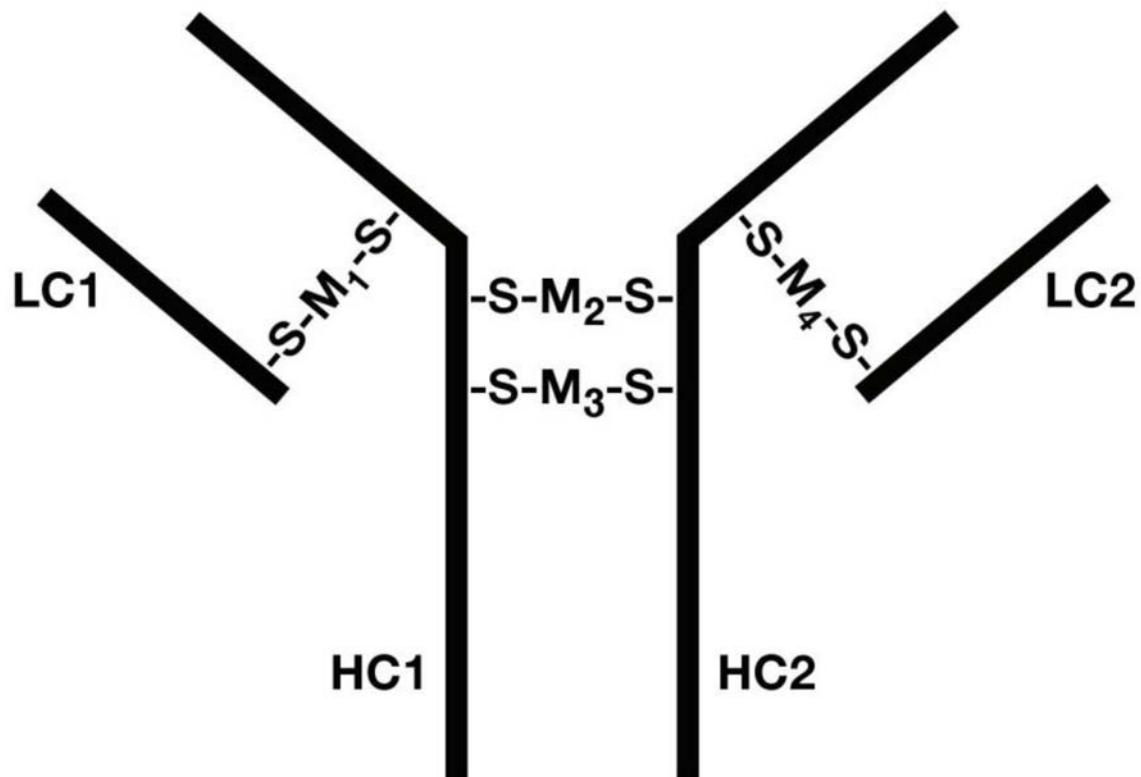
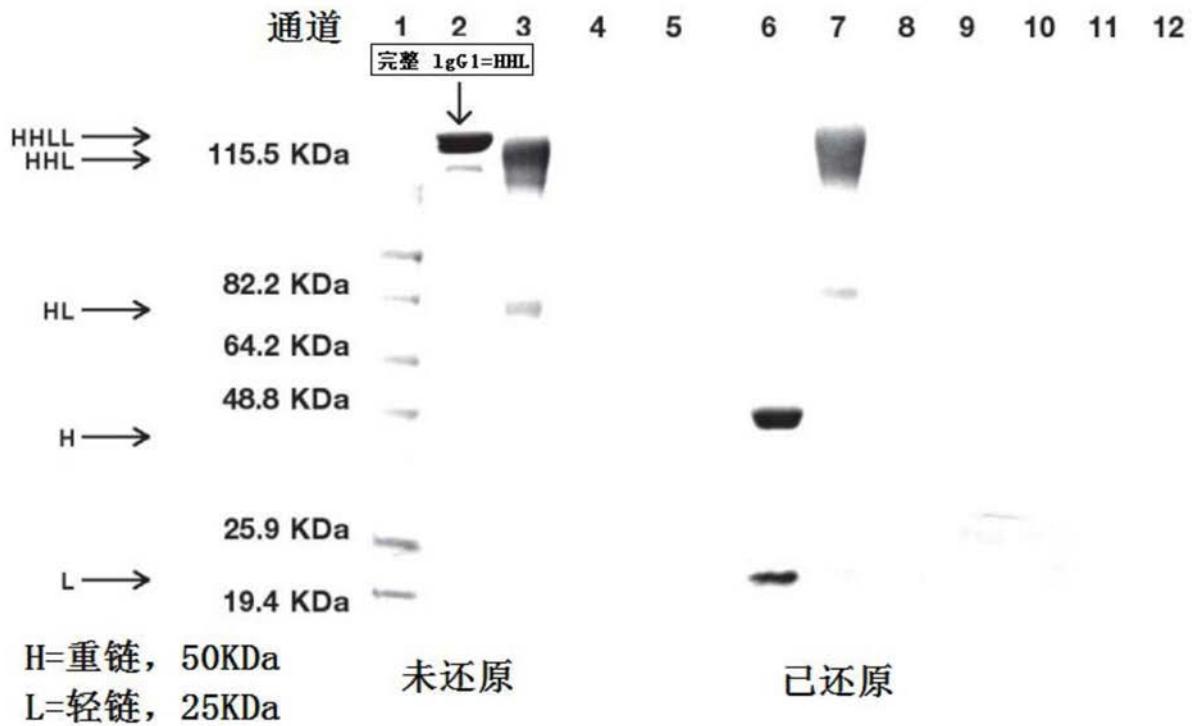
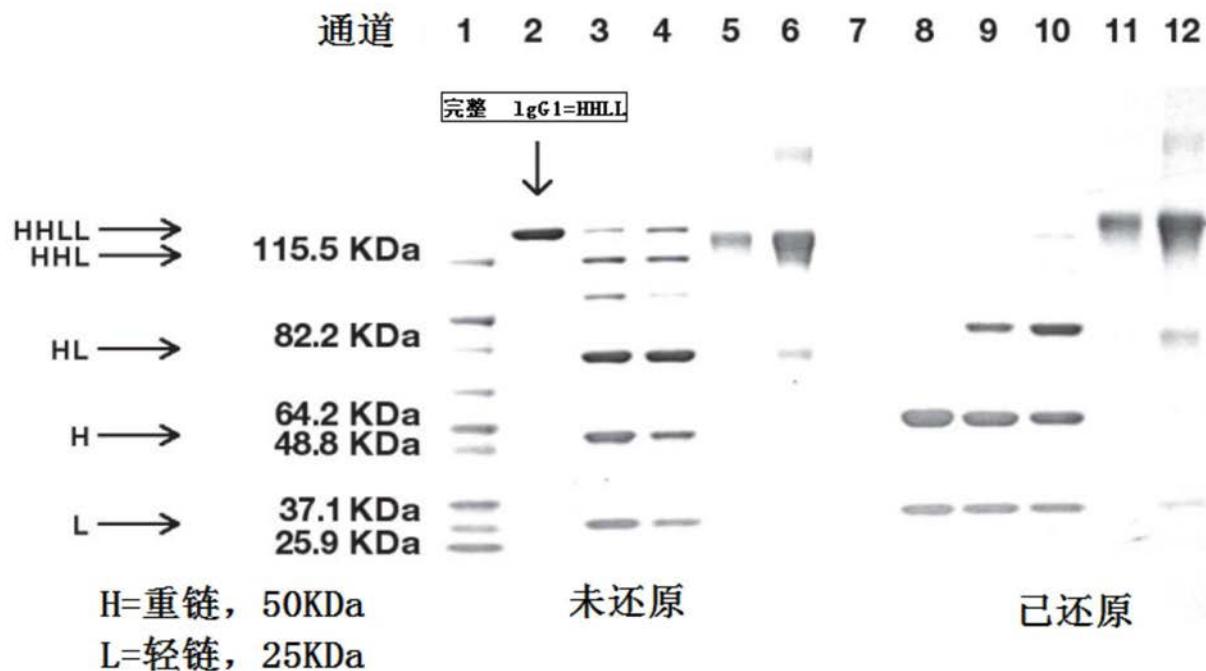


图1



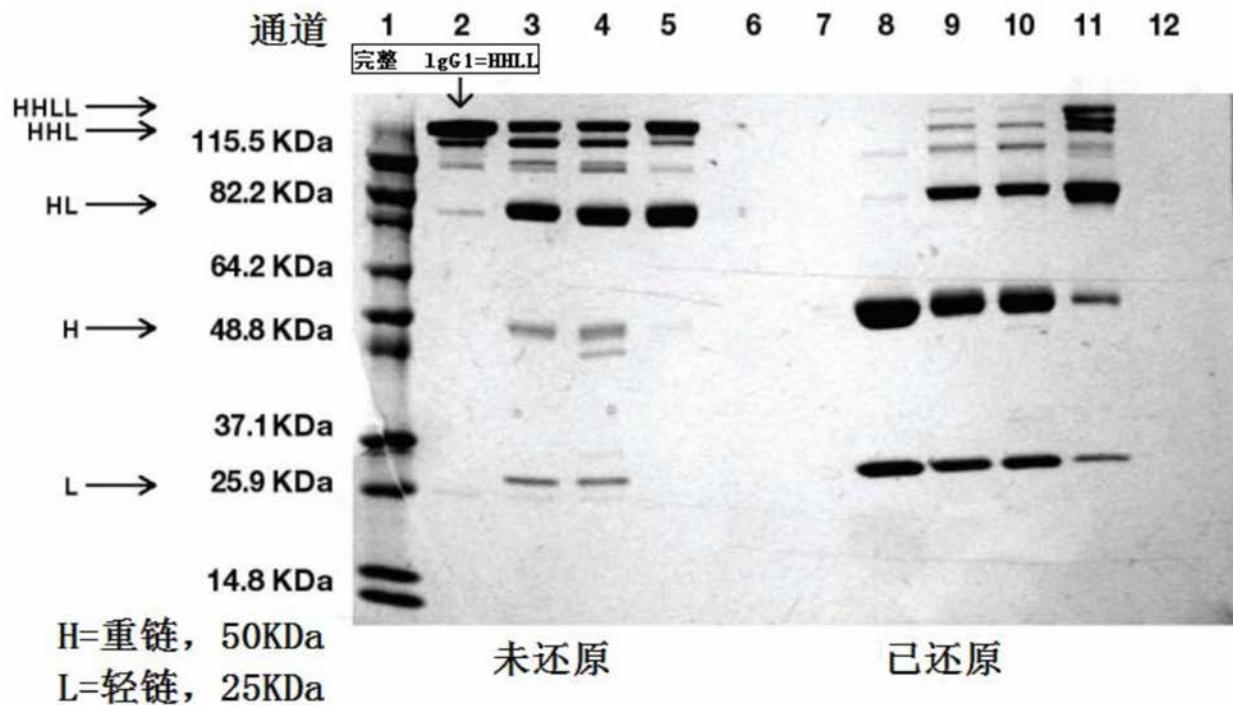
通道	样品名称
1	Mol. Wt. 标记 (Kdaltons)
2	IgG1 抗体
3	IgG1 抗体-溴甲基丙烯酸酯 (1)+dhAA
4	空白
5	空白
6	IgG1 抗体 (已还原)
7	IgG1 抗体-溴甲基丙烯酸酯 (1)+dhAA (已还原)
8	空白
9	空白
10	空白
11	空白
12	空白

图2



通道	样品名称
1	MW 标记 (kDa)
2	完整 IgG1 抗体
3	化合物 6
4	化合物 9
5	化合物 2
6	化合物 1
7	空白
8	已还原的 IgG1 抗体
9	化合物 6
10	化合物 9
11	化合物 2
12	化合物 1

冬3



通道	样品名称
1	Mol. Wt. 标记 (Kdaltons)
2	未修饰抗体
3	化合物 28
4	化合物 29
5	化合物 26
6	空白
7	空白
8	未修饰抗体
9	化合物 28
10	化合物 29
11	化合物 26
12	空白

图4

H1H6765-28 去糖基未还原

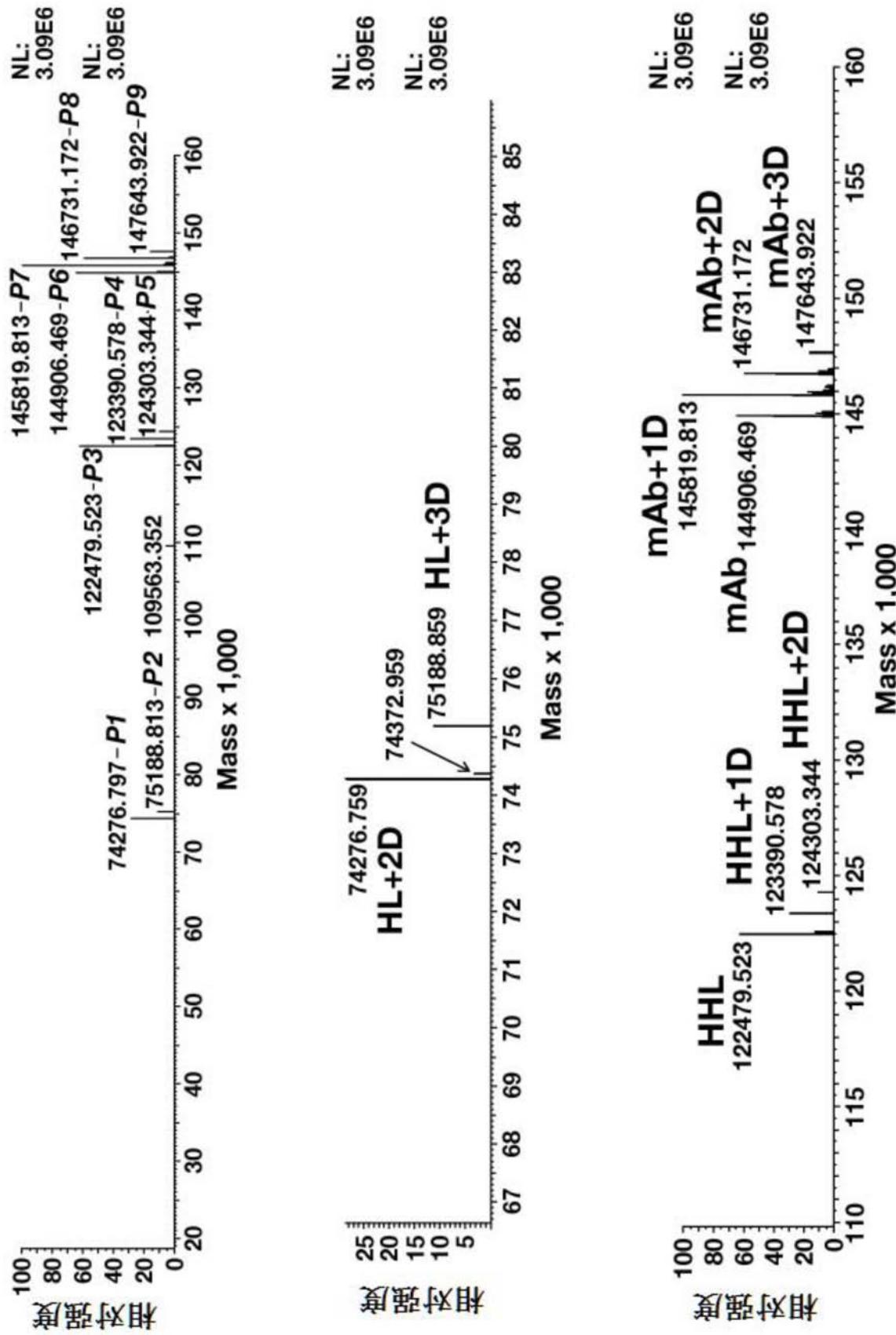


图5

H1H6765-26 去糖基未还原

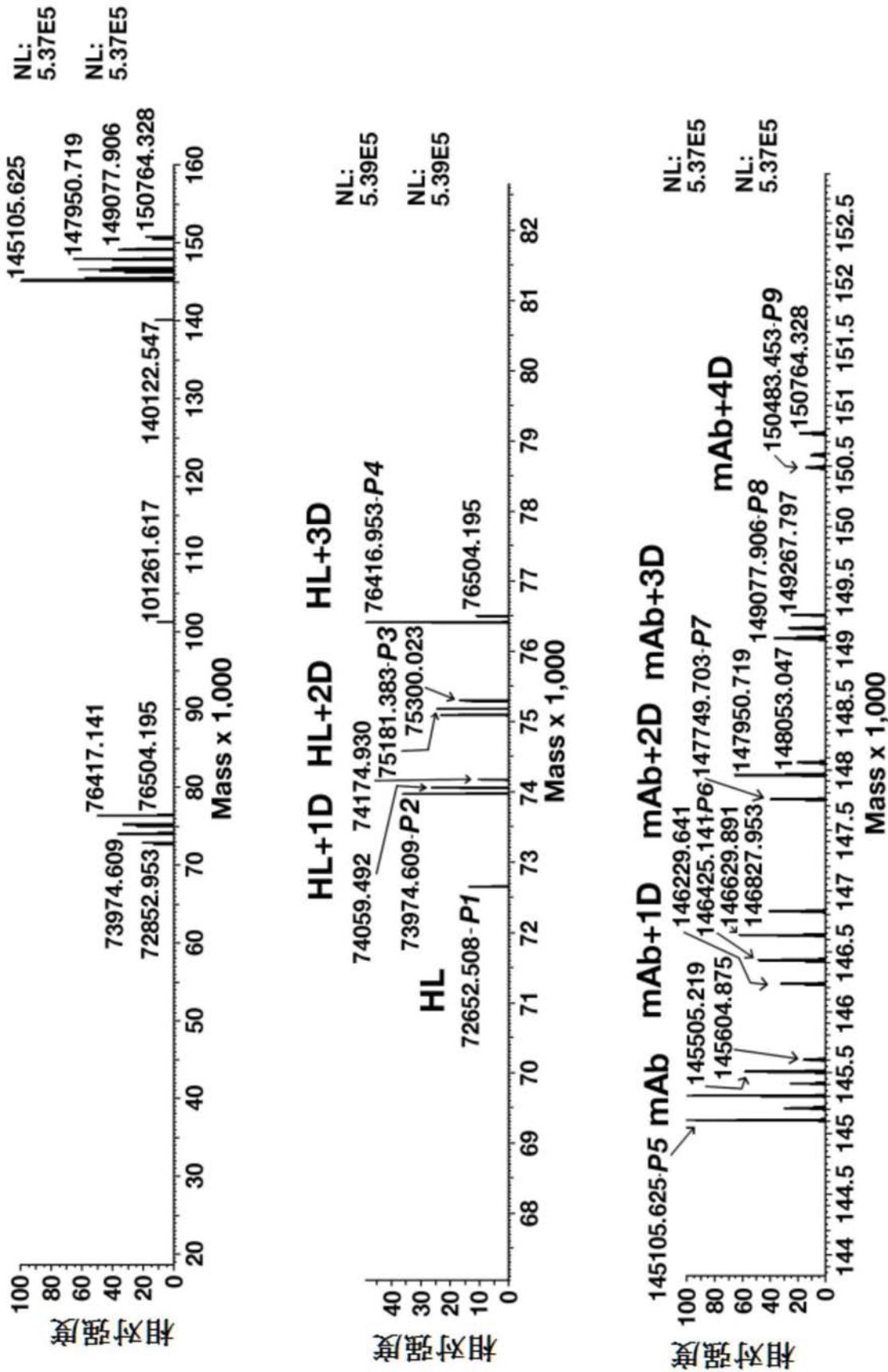


图6

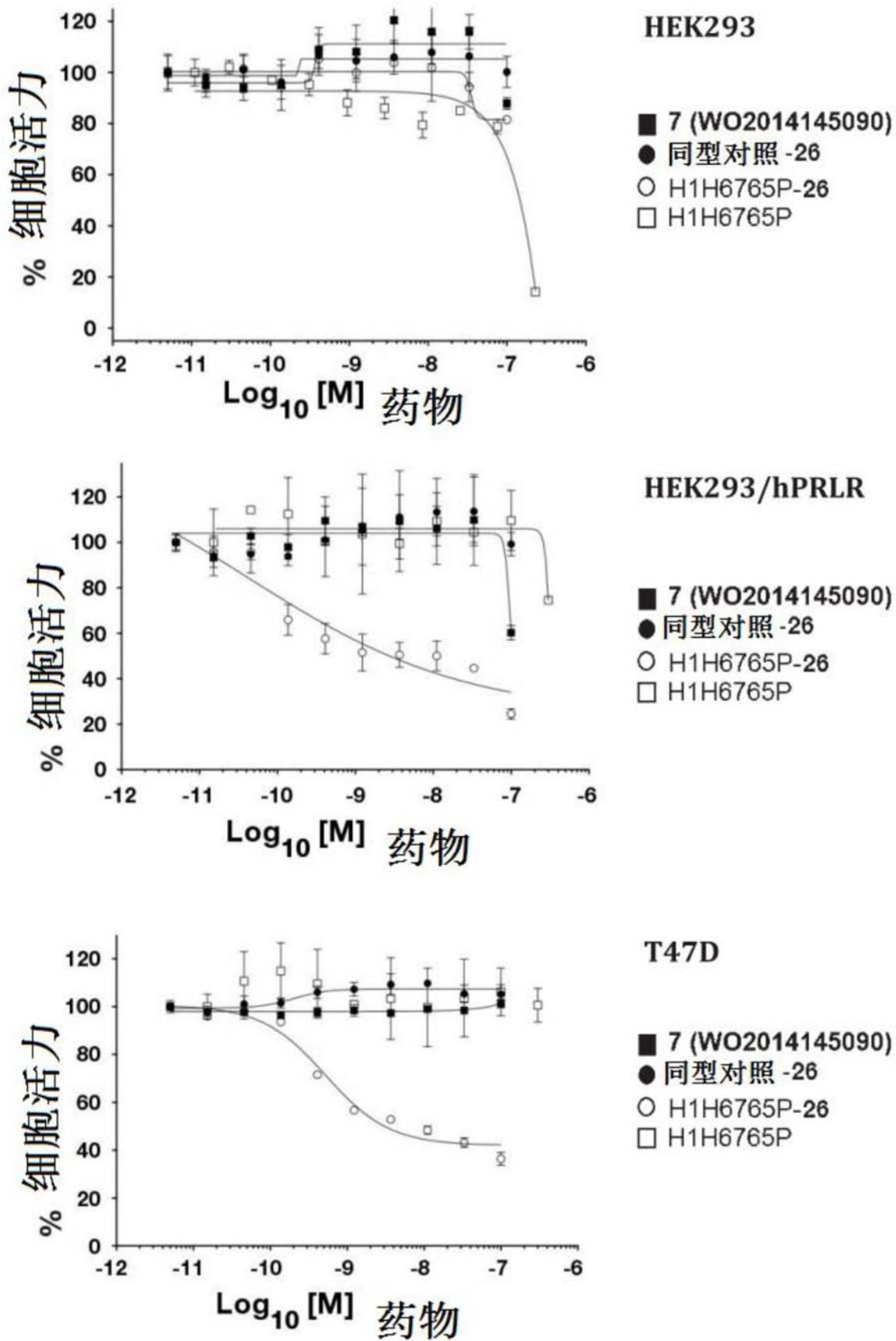


图7

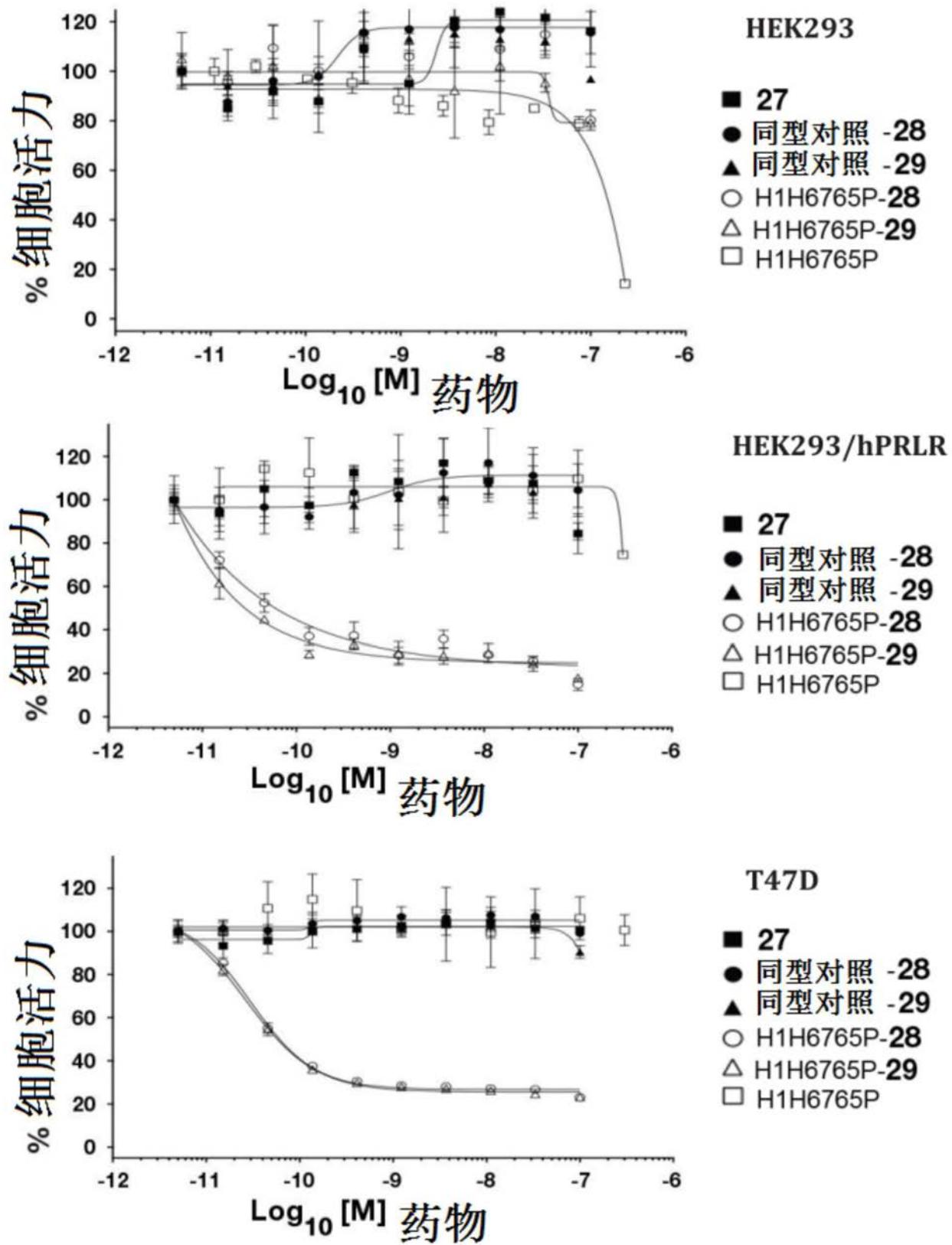


图8