



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104984360 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 21

(21) 申请号 201510338095. 2

A61K 31/704(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 06. 02

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/183, 774 2009. 06. 03 US

(62) 分案原申请数据

201080024325. 3 2010. 06. 02

(71) 申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 B·A·克洛格 R·辛

R·V·J·查理

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 47/48(2006. 01)

A61K 31/537(2006. 01)

A61K 31/337(2006. 01)

权利要求书1页 说明书29页 附图25页

(54) 发明名称

辄合方法

(57) 摘要

本发明描述了使细胞结合剂例如抗体与效应基团(例如,细胞毒性剂)或报道基团(例如,放射性标记)辄合的方法,由此报道基团或效应基团首先与双官能连接体反应,然后混合物无需纯化而用于与细胞结合剂的辄合反应。本发明描述的方法有利于制备细胞结合剂例如抗体与效应基团或报道基团的稳定连接的辄合物。该辄合方法以高产率提供了高纯度和均一性的辄合物,该辄合物没有链间交联和失活的连接体残基。

1. 一种在溶液中制备纯化的轭合物的方法,其中所述轭合物包括与细胞结合剂连接的效应分子或报道分子,所述方法包括以下步骤:(a)使所述效应分子或报道分子与双官能连接体试剂接触以共价连接所述连接体与所述效应分子或报道分子并由此制备包含具有与之连接的连接体的所述效应分子或报道分子的未纯化的第一混合物,(b)通过所述未纯化的第一混合物与细胞结合剂反应而使所述细胞结合剂与具有与之连接的连接体的所述效应分子或报道分子轭合以制备第二混合物,和(c)使所述第二混合物经受正切流动过滤、透析、凝胶过滤、吸附色谱、选择性沉淀或其组合以由此制备纯化的轭合物。

2. 权利要求1所述的方法,其中步骤(b)在pH约4至约9的溶液中进行。

3. 权利要求1所述的方法,其中步骤(b)的第二混合物基本上不含由于分子内或分子间反应而形成的不期望的交联的、水解的物类。

4. 权利要求1所述的方法,其中所述效应分子是细胞毒性剂。

5. 权利要求4所述的方法,其中所述细胞毒性剂是美登木素生物碱、紫杉烷、CC1065或其类似物。

6. 权利要求4所述的方法,其中所述细胞毒性剂是美登木素生物碱。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述美登木素生物碱包含硫醇基。

8. 权利要求6所述的方法,其中所述美登木素生物碱是DM1。

9. 权利要求6所述的方法,其中所述美登木素生物碱是DM4。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述细胞结合剂是干扰素、白介素2(IL-2)、白介素3(IL-3)、白介素4(IL-4)、白介素6(IL-6)、胰岛素、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、MCSF、GM-CSF、运铁蛋白或抗体。

轭合方法

[0001] 本申请是申请日为2010年06月02日和发明名称为“轭合方法”的201080024325.3号发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2009年6月3日提交的美国临时申请号61/183,774的优先权,其完整公开内容在此明确通过引用并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及使效应基团(例如,细胞毒性剂)或报道基团(例如,放射性标记)与细胞结合剂例如抗体或其片段通过双官能连接体轭合的新方法。更具体地,本发明涉及使效应基团(例如,美登木素生物碱)或报道基团(例如,放射性标记)与细胞结合剂(例如抗体或其片段)通过双官能连接体轭合的新方法,使得该过程消除了导致由于分子内或分子间反应而生成的不期望的水解物类或不期望的交联物类生成的步骤。

[0004] 发明背景

[0005] 细胞结合剂例如抗体与效应基团例如小细胞毒性剂或细胞毒性蛋白的轭合物在开发抗癌治疗剂方面引起浓厚兴趣(Richart, A. D. 和 Tolcher, A. W., 2007, Nature Clinical Practice, 4, 245-25)。这些轭合物由于针对肿瘤细胞的细胞表面上表达的抗原所选择的抗体的高特异性而是肿瘤特异性的。当特异性结合至肿瘤细胞时,抗体-细胞毒性剂轭合物被内化入靶癌细胞并在其中降解,由此释放抑制必要细胞功能例如微管动力学或DNA复制的活性细胞毒性剂,导致癌细胞的杀伤。已经采用各种连接体连接抗体与细胞毒性剂,目的是增强内化时细胞内物质的递送和轭合物的加工,同时保持轭合物在血浆中期望的稳定性。这些连接体包括被设计具有不同程度的空间位阻而影响其分子内硫醇还原动力学的二硫化物连接体、可裂解的肽连接体例如缬氨酸-瓜氨酸连接、和不可裂解连接体例如硫醚连接(Widdison, W. 等, J. Med. Chem., 2006, 49, 4392-4408; Erickson, H. 等, Cancer Res., 2006, 66, 4426-4433)。

[0006] 细胞结合剂例如抗体与标记或报道基因的轭合物用于癌症患者的肿瘤成像应用、诊断各种疾病的免疫测定应用、使用放射性核素-配体轭合物的癌症疗法、和纯化生物活性剂例如蛋白、肽和寡核苷酸的亲和色谱应用。与细胞结合剂轭合的标记或报道基因包括荧光团和亲和标记例如生物素。

[0007] 经由不可还原的连接(例如硫醚连接)连接的细胞结合剂例如抗体(Ab)与效应基团(例如,细胞毒性剂)或报道基团(例如,放射性标记)的常规轭合方法采用两个不同的抗体反应步骤,并必须使用纯化步骤。在第一反应步骤中,抗体与带有两个不同反应性基团(例如,X和Y)的异双官能连接体反应。例如,在一种方法中,抗体的反应性残基(例如赖氨酸氨基残基)与异二双官能试剂的X反应性基团(例如N-羟基琥珀酰亚胺酯)的反应导致在抗体的一个或多个反应性残基(例如赖氨酸氨基残基)处加入具有Y反应性基团的连接体。最初修饰的抗体产物必须在可以发生下一步骤之前从过量连接体或水解连接体试剂纯化。在第二反应步骤中,含有Y反应性基团(例如马来酰亚胺或卤代乙酰胺)的连接体修饰的抗体与含有反应性基团例如硫醇的效应物例如效应基团(C)(例如,细胞毒

性剂)反应生成抗体-效应物轭合物,其在额外纯化步骤中再次纯化(参见例如,美国专利 5,208,020、5,416,064 或 5,024,834)。因此,在以上方法中,需要至少两个纯化步骤。

[0008] 包括两个反应和纯化步骤以轭合抗体与效应基团或报道基团的另一种方法利用抗体中的硫醇残基(通过用硫醇生成试剂例如 2-亚胺基硫烷修饰抗体或者通过诱变加入非天然半胱氨酸残基或者通过还原天然二硫键而产生)与含有 Y 反应性基团(例如马来酰亚胺或卤代乙酰胺)的同双官能连接体 Y-L-Y 反应。

[0009] 在抗体或肽中加入反应性基团 Y 例如马来酰亚胺(或卤代乙酰胺)的主要缺点是反应性马来酰亚胺(或卤代乙酰胺)基团与抗体或肽中天然组氨酸、赖氨酸、酪氨酸或半胱氨酸残基经历分子内或分子间反应(Papini, A. 等, Int. J. Pept. Protein Res., 1992, 39, 348-355; Ueda, T. 等, Biochemistry, 1985, 24, 6316-6322),以及 Y 马来酰亚胺基团的水性失活。在与效应基团或报道基团 C 的第二反应之前,抗体中加入的马来酰亚胺(或卤代乙酰胺)基团 Y 与抗体中天然组氨酸、赖氨酸或半胱氨酸残基的不期望的分子内或分子间反应以及 Y 马来酰亚胺基团的水性失活产生交联蛋白或不均一轭合物并降低与效应基团或报道基团 C 的第二反应的效率。不均一轭合物产物—由于最初加入的基团 Y(例如马来酰亚胺基团)与抗体或肽中天然基团(例如组氨酸、赖氨酸、酪氨酸或半胱氨酸)的不期望反应或水性失活产生的无活性马来酰亚胺残基而产生的交联蛋白或肽—可能具有比期望的均一轭合产物差的活性和稳定性。

[0010] 之前已经描述了通过二硫键轭合抗体与含硫醇细胞毒性剂的方法(参见例如,美国专利 5,208,020、5,416,064、6,441,163,美国专利公开号 2007/0048314 A1)。这些方法包括抗体与异双官能试剂的最初反应,随后与含硫醇细胞毒性剂的第二反应。已经在美国专利 6,441,163 B1 中描述了可选方法,其中细胞毒性剂的二硫化物连接的反应性酯首先被纯化,然后与抗体反应,但是该方法在抗体反应步骤之前包括从含硫醇基细胞毒性剂开始的额外的反应和纯化步骤。

[0011] 目前制备细胞结合剂轭合物的方法的其他缺点是需要两个纯化步骤,这两个纯化步骤降低了总产率,并且还使该方法对于放大生产而言变得繁琐和不经济。

[0012] 鉴于以上所述,本领域需要开发制备细胞结合剂-药物轭合物组合物的改良方法,所述细胞结合剂-药物轭合物组合物具有很高纯度并且其制备不需要繁琐步骤并减少了用户的时间和成本。本发明提供了这种方法。本发明的这些和其他优点以及其他发明特征将根据本文提供的发明描述而变得明显。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明描述了用于制备式 C-L-CBA 的不可还原的硫醚连接的轭合物的轭合方法,其中 C 代表效应分子或报道分子(例如,细胞毒性剂或放射性标记),L 是连接体,CBA 是细胞结合剂(例如,抗体或其片段),通过利用含硫醇细胞毒性剂(例如,美登木素生物碱)与异或同双官能试剂(例如,可裂解或不可裂解的连接体)的直接反应,随后混合未纯化的反应混合物与细胞结合剂(例如,抗体或其片段),由此通过更有效、高产率且容易放大的工艺产生不可还原的硫醚连接的轭合物。另一个重要的优点是这种轭合方法产生无链间蛋白交联或失活残基(例如,马来酰亚胺或卤代乙酰胺残基)的硫醚连接的不可还原的轭合物。本说明书公开的新方法可用于制备由上式表示的任何轭合物。

[0015] 具体地,本发明涉及以下各项:

[0016] 1. 一种在溶液中制备纯化的轭合物的方法,其中所述轭合物包括与细胞结合剂连接的效应分子或报道分子,所述方法包括以下步骤:(a)使所述效应分子或报道分子与双官能连接体试剂接触以共价连接所述连接体与所述效应分子或报道分子并由此制备包含具有与之连接的连接体的所述效应分子或报道分子的未纯化的第一混合物,(b)通过所述未纯化的第一混合物与细胞结合剂反应而使所述细胞结合剂与具有与之连接的连接体的所述效应分子或报道分子轭合以制备第二混合物,和(c)使所述第二混合物经受正切流动过滤、透析、凝胶过滤、吸附色谱、选择性沉淀或其组合以由此制备纯化的轭合物。

[0017] 2. 如第1项所述的方法,其中步骤(b)在pH约4至约9的溶液中进行。

[0018] 3. 如第1项所述的方法,其中步骤(b)的第二混合物基本上不含由于分子内或分子间反应而生成的不期望的交联的、水解的物类。

[0019] 4. 如第1项所述的方法,其中所述效应分子是细胞毒性剂。

[0020] 5. 如第4项所述的方法,其中所述细胞毒性剂是美登木素生物碱、紫杉烷、CC1065或其类似物。

[0021] 6. 如第4项所述的方法,其中所述细胞毒性剂是美登木素生物碱。

[0022] 7. 如第6项所述的方法,其中所述美登木素生物碱包含硫醇基。

[0023] 8. 如第6项所述的方法,其中所述美登木素生物碱是DM1。

[0024] 9. 如第6项所述的方法,其中所述美登木素生物碱是DM4。

[0025] 10. 如第1项所述的方法,其中所述细胞结合剂是干扰素、白介素2(IL-2)、白介素3(IL-3)、白介素4(IL-4)、白介素6(IL-6)、胰岛素、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、MCSF、GM-CSF、运铁蛋白或抗体。

[0026] 11. 如第10项所述的方法,其中所述细胞结合剂是抗体。

[0027] 12. 如第11项所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0028] 13. 如第11项所述的方法,其中所述抗体是人或人源化单克隆抗体。

[0029] 14. 如第10项所述的方法,其中所述抗体是MY9、抗B4、EpCAM、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD11、CD19、CD20、CD22、CD26、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、CD79、CD105、CD138、EphA受体、EphB受体、EGFR、EGFRvIII、HER2、HER3、间皮素、cripto、 $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ 、 $\alpha v \beta 6$ 整联蛋白或C242。

[0030] 15. 如第13项所述的方法,其中所述人或人源化抗体是My9-6、B4、C242、N901、DS6、EphA2受体、CD38、IGF-IR、CNT0 95、B-B4、曲司珠单抗、帕妥珠单抗、比伐珠单抗、西罗珠单抗或利妥昔单抗。

[0031] 16. 如第1项所述的方法,其中所述连接体是可裂解或不可裂解的连接体。

[0032] 17. 如第1项所述的方法,其中所述报道分子是放射性同位素。

[0033] 附图简述

[0034] 图1显示了抗体与美登木素生物碱DM1(或DM4)和马来酰亚胺-PEG_n-NHS连接体的反应混合物的轭合。

[0035] 图2显示使用本发明描述的方法制备的Ab-(PEG₄-Ma1)-DM4轭合物与使用传统两步方法制备的轭合物的还原SDS-PAGE。每个样品泳道含有10 μ g蛋白;凝胶用考马斯蓝染色。泳道1和2含有分子量标志物。泳道3含有通过传统两步方法制备的具有6.1 DM4/Ab的轭合物。泳道4含有通过本发明描述的方法制备并且含有6.2 DM4/Ab的轭合物。

[0036] 图 3 显示了使用本发明描述的方法制备的 Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 轭合物与使用传统两步方法制备的轭合物的蛋白 LabChip 电泳。A. Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 轭合物在还原条件下的蛋白 LabChip 电泳 (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent Protein 230 试剂盒)。泳道 1:分子量标记物;泳道 2:使用本发明描述的方法合成的 Ab-PEG₄-Mal-DM4, 6.2 D/Ab;泳道 3:使用两步轭合方法合成的 Ab-PEG₄-Mal-DM4, 6.1 D/Ab;泳道 4:未轭合的 Ab(每条泳道 0.24 微克总蛋白)。较高标记物、系统峰和较低标记物条带代表从试剂盒添加的外部标记物。B. 来自蛋白 LabChip 电泳的蛋白条带的定量。

[0037] 图 4 显示了使用本发明描述的方法制备的 Ab-(PEG₄-Mal)-DM4 轭合物与使用传统两步方法制备的轭合物的 MS。A. 通过传统两步方法制备的具有 6.1 DM4/Ab 的轭合物的 MS。由于轭合物的明显不均一性,MS 峰不能良好分辨。B. 通过本发明描述的方法制备并含有 6.1 DM4/Ab 的轭合物的 MS。由于轭合物的均一性,MS 峰被良好分辨。

[0038] 图 5 显示了具有 6.7 DM1/抗体的抗 CanAg 抗体-PEG₄-Mal-DM1 轭合物(使用本发明描述的方法制备)对表达 CanAg 抗原的 COLO205 细胞的结合与未修饰抗体对表达 CanAg 抗原的 COLO205 细胞的结合。结合使用荧光单位测量。

[0039] 图 6 显示了具有 6.7 DM1/抗体的抗 CanAg 抗体-PEG₄-Mal-DM1 轭合物(使用本发明描述的方法制备)对表达 CanAg 抗原的 COLO205 细胞的体外细胞毒性。轭合物被添加至 COLO205 细胞,在与轭合物连续孵育 5 天之后,使用 WST-8 测定法测量细胞存活。使用过量未轭合的抗 CanAg 抗体阻断轭合物对靶癌细胞的结合和细胞毒性来进行对照试验以说明轭合物的特异性。

[0040] 图 7 显示抗体与 DM1(或 DM4)和马来酰亚胺-磺基-NHS 连接体的反应混合物的轭合。

[0041] 图 8 显示使用本发明描述的方法制备的 Ab-(磺基-Mal)-DM1 轭合物与使用传统两步方法制备的轭合物的还原 SDS-PAGE。每个样品泳道含有 10 μg 蛋白;凝胶用考马斯蓝染色。泳道 1 含有分子量标志物。泳道 3 和 5 含有通过本发明描述的方法制备并分别含有 3.6/Ab 和 6.2DM4/Ab 的轭合物。泳道 2 和 4 含有通过传统两步方法制备并分别含有 4.0/Ab 和 5.7DM1/Ab 的轭合物。

[0042] 图 9 显示了使用本发明描述的方法制备的 Ab-(磺基-Mal)-DM1 轭合物与使用传统两步方法制备的轭合物的蛋白 LabChip 电泳。A. Ab-(磺基-Mal)-DM1 轭合物在还原条件下的蛋白 LabChip 电泳 (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent Protein 230 试剂盒)。泳道 1:分子量标记物;泳道 2:未轭合的 Ab;泳道 3:使用两步轭合方法合成的 Ab-磺基-Mal-DM1, 5.7 D/Ab;泳道 4:使用本发明描述的方法合成的 Ab-磺基-Mal-DM1, 5.6 D/Ab;每孔 0.22 微克总蛋白。较高标记物、系统峰和较低标记物条带代表从试剂盒添加的外部标记物(每孔 0.24 微克总蛋白)。B. 来自蛋白 LabChip 电泳的蛋白条带的定量。

[0043] 图 10 显示了通过本发明描述的方法制备的抗体-(磺基-Mal)-DM1 轭合物与通过传统两步轭合方法制备的轭合物的 LC-MS 比较。A. 使用本发明描述的方法制备的具有 3.6 DM1/Ab 的轭合物的 MS 显示具有 1-6 DM1 分离轭合物峰的均一轭合物。B. 通过传统两步轭合方法制备的具有 4.0 DM1/Ab 的轭合物的 MS 显示对应于轭合物以及具有水解或交联连接体的轭合物(例如具有 2 DM1 的轭合物,加一个 L、两个 L 和三个 3L)的峰,表明不均一的产物。

[0044] 图 11 显示了具有 5.6 DM1/ 抗体的抗 CanAg 抗体 - 磺基 -Ma1-DM1 轭合物 (使用本发明描述的方法制备) 对表达 CanAg 抗原的 COLO205 细胞的结合与未修饰抗体对表达 CanAg 抗原的 COLO205 细胞的结合。结合以荧光单位测量。

[0045] 图 12 显示了具有 5.6 DM4/ 抗体的抗 CanAg 抗体 - 磺基 -Ma1-DM1 轭合物 (使用本发明描述的方法制备) 对表达 CanAg 抗原的 COLO205 细胞的体外细胞毒性。轭合物被添加至 COLO205 细胞, 在与轭合物连续孵育 5 天之后, 使用 WST-8 测定法测量细胞存活。使用过量未轭合的抗 CanAg 抗体阻断轭合物对靶癌细胞的结合和细胞毒性来进行对照试验以说明轭合物的特异性。

[0046] 图 13 显示抗体与 DM1 (或 DM4) 和磺基 -NHS SMCC 连接体的反应混合物的轭合。

[0047] 图 14 显示使用本发明描述的方法制备的 Ab-(SMCC)-DM1 轭合物与使用传统两步方法制备的轭合物的还原 SDS-PAGE。每个样品泳道含有 10 μ g 总蛋白; 凝胶用考马斯蓝染色。泳道 1 含有分子量标志物, 泳道 2 含有未轭合的 Ab, 泳道 3 含有通过传统两步方法制备的具有 3.1 DM1/Ab 的轭合物, 泳道 4 含有通过本发明描述的方法制备的具有 3.1 DM1/Ab 的轭合物。

[0048] 图 15 显示了使用本发明描述的方法制备的 Ab-(SMCC)-DM1 轭合物与使用传统两步方法制备的轭合物的蛋白 LabChip 电泳。A. Ab-SMCC-DM1 轭合物在还原条件下的蛋白 LabChip 电泳 (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent Protein 230 试剂盒)。泳道 1: 分子量标记物; 泳道 2: 使用本专利描述的方法合成的 Ab-SMCC-DM1, 3.1 D/Ab; 泳道 3: 未轭合的 Ab; 泳道 4: 使用两步轭合方法合成的 Ab-SMCC-DM1, 3.1 D/Ab; (每个泳道含有 0.24 微克总蛋白)。较高标记物、系统峰和较低标记物条带代表从试剂盒添加的外部标记物。B. 来自蛋白 LabChip 电泳的蛋白条带的定量。

[0049] 图 16 显示了通过本发明描述的方法制备的抗体 -(SMCC)-DM1 轭合物与通过传统两步轭合方法制备的轭合物的 LC-MS 比较。A. 通过连续两步方法制备的具有 3.1 DM1/Ab 的轭合物的 MS。由于水解和交联的连接体片段的存在, 每个主要轭合物峰具有伴随的侧峰。B. 通过本发明描述的方法制备的具有 3.1 DM1/Ab 的轭合物的 MS。由于轭合物的均一性, MS 峰被良好分辨。

[0050] 图 17 显示了所提出的通过传统两步方法轭合期间链间交联和马来酰亚胺失活的机制。

[0051] 图 18 显示使用本发明描述的方法制备的 Ab-(磺基 -Ma1)-DM4 轭合物的非还原 SDS-PAGE 以及在抗体轭合反应之前使用 4- 马来酰亚胺丁酸猝灭游离 DM4 硫醇 (在初始 DM4+NHS- 磺基 -Ma1 异双官能试剂偶联反应之后)。每个样品含有 10 μ g 蛋白; 凝胶用考马斯蓝染色。泳道 1 和 5 含有分子量标志物。泳道 2 含有单独的 Ab。泳道 3 含有通过本发明描述的方法制备的轭合物, 未添加 4- 马来酰亚胺丁酸。泳道 4 含有通过本发明描述的方法制备的轭合物, 在初始 DM4+NHS- 磺基 -Ma1 异双官能试剂之后 (在抗体轭合步骤之前) 添加 4- 马来酰亚胺丁酸。

[0052] 图 19 显示了使用 DM1 (或 DM4) 和 SPDB 连接体的反应混合物制备二硫化物连接的抗体轭合物。

[0053] 图 20 显示通过抗体与 DM1 (或 DM4) 和 SPDB 和 NHS-PEG4-Ma1 连接体两者的未纯化反应混合物轭合而制备具有二硫化物和不可裂解的 PEG4-Ma1 连接体的抗体 - 美登木素

生物碱钶合物。

[0054] 图 21 显示具有二硫化物和不可裂解的 PEG4-Ma1 连接体的抗体 - 美登木素生物碱钶合物 (通过抗体与 DM1 或 DM4 与 SPDB 和 NHS-PEG4-Ma1 连接体两者的未纯化反应混合物钶合而制备) 的 MS。

[0055] 图 22 显示抗体与 DM1 (或 DM4) 和 SMCC 连接体的反应混合物的钶合。

[0056] 图 23 显示通过本发明描述的方法使用 SMCC 制备的抗体 - SMCC-DM1 钶合物的 MS, 所述钶合物含有平均 3.1 DM1/ 抗体。

[0057] 图 24 显示使用 DM1 (或 DM4) 和 SSNPB 连接体的反应混合物制备二硫化物连接的抗体钶合物。

[0058] 图 25 显示抗体与 DM1 (或 DM4) 和具有脂肪族线性碳链的异双官能连接体的反应混合物的钶合。

[0059] 发明详述

[0060] 现在详细参考本发明的某些实施方案,其实例以所附结构和式描述。虽然结合所列举的实施方案描述了本发明,但要理解,它们不是要将本发明限制于那些实施方案。相反,本发明预期涵盖权利要求书限定的本发明范围内可能包括的所有替代、修改和等同物。本领域技术人员将知道可用于实施本发明的与本文描述的那些类似或等同的许多方法和材料。

[0061] 本发明描述了使含硫醇的效应基团 (例如,细胞毒性剂) 或报道基团 (例如,放射性标记) 与细胞结合剂 (例如,抗体) 钶合的新方法,其中含硫醇的效应物或报道分子首先与双官能连接体试剂在有机、水性或有机 / 水性混合溶剂中反应,随后未纯化的反应混合物与细胞结合剂在有机、水性或有机 / 水性混合溶剂中反应。

[0062] 图例缩写

[0063] 以下方案和实施例的描述中使用的缩写是:

[0064] C = 效应基团或报道基团 (例如,细胞毒性剂或放射性标记)

[0065] L = 连接体 (例如,可裂解或不可裂解的连接体)

[0066] X = 胺反应性基团 (例如, N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (NHS 酯)、磺基 -NHS 酯、对硝基苯酚酯、四氟磺酸苯基酯、1- 羟基 -2- 硝基 - 苯 -4- 磺酸酯)

[0067] Y = 马来酰亚胺或卤代乙酰胺 (碘乙酰胺、溴乙酰胺)

[0068] Yb 是反应性混合二硫基 (例如,2- 吡啶基二硫基、4- 吡啶基二硫基、2- 硝基 - 吡啶基二硫基、5- 硝基 - 吡啶基二硫基、2- 羧基 -5- 硝基 - 吡啶基二硫基)

[0069] X' = 酰胺键

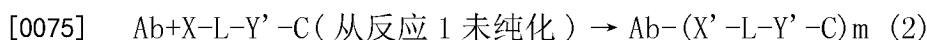
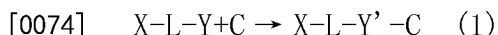
[0070] Y' = 硫醚 (R-S-R') 或硒醚 (R-Se-R') 键

[0071] Yb' = 二硫 (R-S-S-R') 键

[0072] 在本发明的一个实施方案中,描述了用于制备细胞结合剂与效应分子或报道分子的硫醚连接的钶合物的方法,该方法包括以下步骤:a) 使式 X-L-Y 的异双官能连接体与含硫醚的效应分子或报道分子 C (例如,美登木素生物碱或放射性核素) 在水性溶剂、有机溶剂或有机 / 水性混合反应混合物中接触,产生式 X-L-Y'-C 的中间产物;b) 使反应混合物无需纯化与细胞结合剂例如抗体 (Ab) 混合产生式 Ab-(X'-L-Y'-C)_n 的钶合物,其中 L 是具有 1-10 个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状烷基、烯基或炔基、简单或取代的芳基单

元（取代基选自烷基、烷氧基、卤素、硝基、氟代、羧基、磺酸酯、磷酸酯、氨基、羰基、哌啶基）或含有聚乙二醇的单元（优选 1-500 个 PEG 间隔物、更优选 1-24 个 PEG 间隔物或更优选 2-8 个 PEG 间隔物）；X 和 Y 是胺或硫醇反应性基团例如 N- 羟基琥珀酰亚胺酯和马来酰亚胺或卤代乙酰胺；Ab 是抗体；m 是 1-20 的整数；X' 是与抗体反应时修饰的 X 位点（例如，酰胺键）；Y' 是与例如效应基团或报道基团的细胞毒性剂或放射性标记反应时修饰的 Y 位点（例如，硫醚键）；和 c）通过正切流动过滤、透析或色谱（例如，凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用色谱）或其组合纯化轭合物。优选地，Y 是选自马来酰亚胺或卤代乙酰胺的硫醇反应性基团。优选地，L 是具有 1-6 个碳或 2-8 个 PEG 间隔物的直链或支链烷基。优选地，C 是选自美登木素生物碱、CC-1065 类似物、紫杉烷、DNA 结合剂的细胞毒性剂，并且更优选地，它是美登木素生物碱。

[0073] 式 1 和 2 中表示的反应工序：



[0076] 不涉及中间产物 $X-L-Y'-C$ 的任何纯化，并且因此提供了将之与抗体直接混合（未纯化的中间产物被添加至抗体，或者抗体被添加至未纯化的中间产物）的优势，从而使该方法有利于轭合，因为这不需要繁琐的纯化步骤。重要的是，与通过传统两步反应和纯化工序制备的轭合物中发现的链间蛋白交联和失活马来酰亚胺残基不同，该方法产生没有链间蛋白交联或失活马来酰亚胺残基的均一轭合物。

[0077] 反应 1 可以高浓度的异双官能连接体、 $X-L-Y$ 和效应基团或报道基团 C 在水性溶剂、有机溶剂或有机 / 水性反应混合物中进行，导致比通过传统两步反应和纯化工序制备的轭合物的水性溶液中较低浓度时更快的反应速率。

[0078] 反应 1 中产生的中间产物 $X-L-Y'-C$ 可以未纯化的低温冷冻状态在适当低 pH（例如， $pH \sim 4-6$ ）的水性溶剂、有机溶剂或混合的有机 / 水性混合物中或者以冻干状态保存延长的时段，并且可以在后来与抗体溶液混合以在约 4-9 的较高 pH 值下进行最终的轭合反应，由此增加该反应工序的方便性。中间产物可以在与细胞结合剂混合之前按需要使用有机溶剂或水性缓冲液或有机溶剂与水性缓冲液的混合物稀释。在本文结合数值使用的术语“约”应该被理解为指所有此类数值，包括来自其的所有数值和小的变化。中间产物 $X-L-Y'-C$ 与抗体的反应可以在以下 pH 值下进行：约 4 至约 pH9、优选约 5 至 8.7 的 pH 范围、更优选约 6.5 至约 8.5 的 pH 范围、例如 pH 6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4 和 8.5、其中的 pH 范围或其小变化。用于抗体与中间产物 $X-L-Y'-C$ 在约 6.5 至约 8.5 的优选 pH 范围下反应的缓冲液是 pK_a 值在该 pH 范围附近的缓冲液，例如磷酸盐缓冲液和 HEPES 缓冲液。这些优选的缓冲液不应该具有伯氨基或仲氨基或者可以与连接体 X（例如 N- 羟基琥珀酰亚胺酯）反应的其他反应性基团。

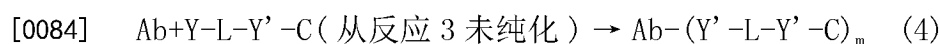
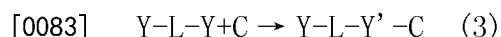
[0079] 在第一反应中使用比异双官能连接体 $X-L-Y$ 化学计量或略微过量的 C 以保证在向抗体添加未纯化混合物之前所有 Y 基团（例如马来酰亚胺）被反应。可以进行用猝灭试剂（例如 4- 马来酰亚胺丁酸、3- 马来酰亚胺丙酸或 N- 乙基马来酰亚胺或碘乙酰胺或碘乙酰胺丙酸）的任选额外处理以保证任何未反应的 C 在与抗体混合之前被猝灭以最小化硫醇 - 二硫化物与天然抗体二巯基的任何不希望的交换反应。在用极性带电硫醇猝灭试剂（例如 4- 马来酰亚胺丁酸或 3- 马来酰亚胺丙酸）猝灭时，过量的未反应的 C 被转化成极性

带电加合物,其可以容易地与共价连接的轭合物分离。任选地,最终反应混合物在纯化之前与亲核物质例如含氨基的亲核物质(例如,赖氨酸、牛磺酸、羟胺)反应以猝灭任何未反应的连接体(X-L-Y'-C)。

[0080] 用于抗体与美登木素生物碱(DMx)和异双官能连接体的未纯化的初始反应混合物反应的可选方法包括将DMx和异双官能连接体的初始反应混合物与抗体在低pH(pH~5)下混合(在DMx-连接体反应结束时),随后添加缓冲剂或碱以增加pH至约6.5-8.5以进行轭合反应。

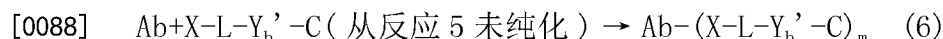
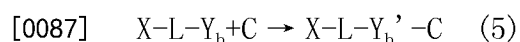
[0081] 该新方法用于制备抗体与细胞毒性美登木素生物碱药物的轭合物。基于还原SDS-PAGE、蛋白LabChip电泳和质谱对轭合物的鉴定,使用在反应工序1-2中列出的该方法制备的抗体-美登木素生物碱轭合物出乎意料地在均一性方面远优于通过传统两步反应和纯化工序制备的轭合物。包括反应工序1-2的本发明描述的轭合方法不需要任何中间纯化步骤,并因此显著比传统两步方法更方便。

[0082] 在本发明的第二个实施方案中,描述了用于制备细胞结合剂与效应分子或报道分子的硫醚连接轭合物的方法,该方法包括以下步骤:a)使式Y-L-Y'的同双官能连接体与含硫醇或胺的效应基团或报道基团C(例如细胞毒性剂)在水性溶剂、有机溶剂或有机/水性混合反应混合物中接触以产生Y-L-Y'-C,b)反应混合物无需纯化与例如抗体在水性溶液或水性/有机混合物中混合产生式Ab-(X'-L-Y'-C)_m的轭合物,其中L如上文定义;Y是硫醇或胺反应性基团例如马来酰亚胺或卤代乙酰胺,或N-羟基亚磺酰亚胺或磺基N-羟基亚磺酰亚胺;Ab是抗体;m是1至20的整数;Y'是与抗体反应时修饰的Y位点(例如,硫醚键或酰胺键)或与细胞毒性剂或效应基团或报道基团反应时修饰的Y位点(例如,硫醚键或酰胺键),和c)通过正切流动过滤、透析或色谱(例如,凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用色谱)或其组合纯化轭合物。式3和4中表示的反应工序:



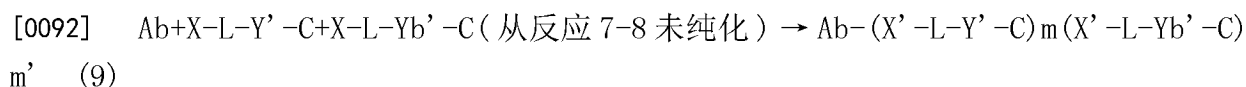
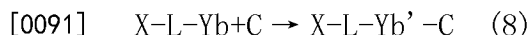
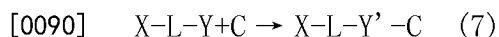
[0085] 不涉及中间产物Y-L-Y'-C的任何纯化,并因此是有利的轭合方法。

[0086] 在第三个实施方案中,描述了用于制备细胞结合剂与效应分子或报道分子的二硫化物连接的轭合物的方法,该方法包括以下步骤:a)使式X-L-Y_b的异双官能连接体与效应基团或报道基团C(例如细胞毒性剂)在水性溶剂、有机溶剂或有机/水性混合反应混合物中接触以产生中间产物X-L-Y_b'-C;b)使反应混合物无需纯化与抗体在水性溶液或水性/有机混合物中混合产生式Ab-(X'-L-Y_b'-C)_m的轭合物,其中L如上文定义;Y_b是反应性二硫化物例如吡啶基二硫化物或硝基吡啶基二硫化物;X是胺反应性基团例如N-羟基琥珀酰亚胺酯或磺基N-羟基琥珀酰亚胺酯;Ab是抗体;m是1至20的整数;X'是与抗体反应时修饰的X位点(例如酰胺键);Y_b是与细胞毒性剂或效应基团或报道基团反应时修饰的Y_b位点(二硫化物);和c)通过正切流动过滤、透析或色谱(例如,凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用色谱)或其组合纯化轭合物。反应工序以式5和6表示:



[0089] 在第四个实施方案中,描述了通过两个类型的连接体—不可裂解的(硫醚键)和可裂解的(二硫键)—制备抗体与效应基团或报道基团轭合物的方法,该方法包括以下步

骤 :a) 使 X-L-Y 和 X-L-Yb 连接体与细胞毒性剂 C 接触以产生式 X-L-Y'-C 和 X-L-Yb'-C 的中间化合物, b) 如反应式 7-9 所示使反应混合物无需纯化与抗体顺序或同时混合 :



[0093] 以提供轭合物 $Ab-(X'-L-Y'-C)_m(X'-L-Yb'-C)_{m'}$, 其中 X、L、Y'、C、Yb' 和 m 的定义如上文给出, 并且 m' 是 1 至 20 的整数 ; 和 c) 通过正切流动过滤、透析或色谱 (例如, 凝胶过滤、离子交换色谱、疏水相互作用色谱) 或其组合纯化轭合物。这两个连接体效应中间体 (X-L-Y'-C 和 X-L-Yb'-C) 无需纯化以不同顺序 (首先 X-L-Y'-C、然后 X-L-Yb'-C, 或者首先 X-L-Yb'-C、然后 X-L-Y'-C, 或者同时) 和不同比例与抗体混合。

[0094] 反应 1、3、5 和 7-8 可以高浓度双官能连接体 (X-L-Y、X-L-Yb 或 Y-L-Y) 和效应基团或报道基团 C 在水性溶剂、有机溶剂或有机 / 水性反应混合物中进行, 导致比通过传统两步反应和纯化工序制备的轭合物的水性溶液中较低浓度时更快的反应速率, 其中试剂溶解度是限制性的。

[0095] 在反应 1、3、5 和 7-8 中产生的中间产物 X-L-Y'-C 或 Y-L-Y'-C 或 X-L-Yb'-C 可以未纯化的低温冷冻状态在适当低 pH 的水性溶剂、有机溶剂或混合的有机 / 水性混合物中或者以冻干状态保存延长的时段, 并且可以在后来与抗体溶液混合以进行最终的轭合反应, 由此增加该反应工序的方便性。

[0096] 在第一反应中使用比异双官能连接体 X-L-Y 或 Y-L-Y 或 X-L-Yb 化学计量或略微过量的 C 以保证在向抗体添加未纯化混合物之前所有 Y 基团 (例如马来酰亚胺) 被反应。可以进行用猝灭试剂 (例如 4- 马来酰亚胺丁酸或 3- 马来酰亚胺丙酸或 N- 乙基马来酰亚胺或碘乙酰胺或碘乙酸) 的任选额外处理以保证任何未反应的基团 (例如硫醇) 在添加至抗体之前被猝灭以最小化硫醇 - 二硫化物与天然抗体二硫基的任何不希望的交换反应。在 C 与双官能连接体初始反应之后, 用带电极性硫醇猝灭试剂猝灭过量的 C, 使过量 C 转化成高极性的水溶性加合物, 其容易通过凝胶过滤、透析或 TFF 与共价连接的轭合物分离。最终轭合产物不含有任何非共价连接的 C。任选地, 最终反应混合物 2、4、6 和 9 在纯化之前用亲核物质例如含氨基的亲核物质 (例如, 赖氨酸、牛磺酸、羟胺) 处理以猝灭任何未反应的连接体 (X-L-Y'-C、Y-L-Y'-C 或 X-L-Yb'-C)。

[0097] 抗体与 DMx 和双官能连接体的未纯化初始反应混合物的反应的可选方法包括将 DMx 和异双官能连接体的初始反应混合物与抗体在低 pH (pH ~ 5) 下混合 (在 DMx- 连接体反应结束时), 随后添加缓冲剂或碱以增加 pH 至约 6.5-8.5 以进行轭合反应。

[0098] 通过将衍生自两种或多种不同效应物的两种或多种连接体 - 效应物中间体无需纯化地顺序或同时添加至抗体, 超过一种类型效应物的多个拷贝可以与抗体轭合。

[0099] 效应基团

[0100] 术语效应基团或效应分子可互换使用并且本文使用的术语 "效应基团" 或 "效应分子" 意思是包括细胞毒性剂。在某些方面, 可能希望效应基团或效应分子通过各种长度的间隔臂连接以降低潜在位阻。超过一种效应子的多个拷贝可以通过向抗体顺序或同时添加未纯化的衍生自两个或多个不同效应子的两个或多个连接体 - 效应物中间体而轭合至

抗体。

[0101] 可用于本发明的细胞毒性剂包括化疗剂或化疗剂的结构类似物。“化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括烷化剂,例如硫化三环氮丙基磷和环磷酰胺 (CYTOXAN™);磺酸烷基酯例如白消安、英丙舒凡和噻消安;氮丙啶例如 benzodopa、卡波醌、meturedopa 和 uredopa;氮丙啶和甲基三聚氰胺,包括六甲基蜜胺、三亚乙基蜜胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三甲基三聚氰胺;己酸配质(特别是 bullatacin 和 bullatacinone);喜树碱(包括合成的类似托泊替康);苔藓抑素;callystatin;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);cryptophycin(特别是 cryptophycin 1 和 cryptophycin 8);多拉司他汀;倍癌霉素(包括合成类似物 KW-2189 和 CBI-TMI);软珊瑚醇;pancratistatin;匍枝珊瑚醇;海绵抑制素;氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、cholophosphamide、雌氮芥、异环磷酰胺、双氯乙基甲胺、盐酸甲氧氮芥、苯丙氨酸氮芥、新氮芥、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、氯乙环磷酰胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如亚硝基脲氮芥、氯脲菌素、福替目丁、环己亚硝脲、嘧啶亚硝脲、雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔抗生素(例如,加利车霉素,特别是加利车霉素 γ 1 和加利车霉素 θ I, 参见例如 Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994);dynemicin, 包括 dynemicin A;埃斯波霉素;以及新制癌菌素生色团及相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团 chromomophores)、aclacinomysins、放线菌素、authramycin、重氮丝氨酸、博莱霉素、放线菌素 C、carabycin、洋红霉素、嗜癌霉素;色霉素、放线菌素 D、道诺红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、阿霉素(包括吗啉代-阿霉素、氰基吗啉代-阿霉素、2-吡咯啉代-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、去甲氧基柔红霉素、麻西罗霉素、nitomycins、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、派来霉素、potfiromycin、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链唑霉素、杀结核菌素、乌苯美司、新制癌菌素、佐柔比星;抗代谢物,例如氨甲喋呤和 5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、氨甲喋呤、蝶酰三谷氨酸、曲美沙特;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;pyrimidine 类似物,例如盐酸环胞苷、氮杂胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、5-氟脱氧尿苷、5-FU;雄激素,例如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、表硫雄醇、环戊缩环硫雄烷、睾内酯;抗肾上腺,例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;乙酰葡萄糖酸内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;bestrabucil;比山群;edatraxate;defofamine;地美可辛;地吡醌;elfomithine;醋酸羟吡唑;环氧聚微管素;环氧甘醚;环氧甘醚;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登木素生物碱,例如美登素和安丝菌素;丙米腈;米托蒽醌;单派潘生丁;二胺硝吡啶;喷司他丁;蛋氨酸氮芥;吡喃阿霉素;鬼臼酸;2-乙基酰肼;甲基苄肼;PSK®;丙亚胺;根霉素;西佐喃;诸螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯乙胺;单端孢霉烯族毒素(特别是 T-2 毒素、verracurin A、杆孢菌素 A 和 anguidine);氨基甲酸乙酯;长春花碱酰胺;氮烯唑胺;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;溴丙哌嗪;gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;硫化三环氮丙基磷;紫杉烷,例如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ.)和多烯紫杉醇(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲喋呤;铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春花碱;铂;表鬼臼毒

素 (VP-16) ; 异环磷酰胺 ; 丝裂霉素 C ; 米托蒽醌 ; 长春新碱 ; 长春瑞滨 ; 诺维本 ; 诺消灵 ; 表鬼臼毒噻吩糖苷 ; 道诺霉素 ; 氨喋呤 ; 希罗达 ; 伊班膦酸盐 ; CPT-11 ; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000 ; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO) ; 视黄酸 ; 卡培他滨 ; 和以上任何的药学可接受的盐、酸或衍生物。该定义还包括作用为调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂, 例如抗雌激素, 包括例如三苯氧胺、雷洛昔芬、芳香酶抑制性 4(5)-咪唑、4-羟基三苯氧胺、曲沃昔芬、keoxifene、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (Fareston) ; 和抗雄激素, 例如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、leuprolide 和戈舍瑞林 ; siRNA 和以上任何的药学可接受的盐、酸或衍生物。可用于本发明的其他化疗剂公开于美国公开号 20080171040 或美国公开号 20080305044, 并通过引用整体并入。

[0102] 在一个优选实施方案中, 化学治疗性细胞毒性剂基本上是小分子细胞毒性剂。“小分子药物”在本文广泛用于指可以具有例如 100 至 1500、更适合 120 至 1200、优选 200 至 1000 的分子量且通常具有小于约 1000 的分子量的有机化合物、无机化合物或有机金属化合物。本发明的小分子细胞毒性剂包括具有小于约 1000 分子量的寡肽和其他生物分子。小分子细胞毒性剂在本领域被良好表征, 例如在 W005058367A2、欧洲专利申请号 85901495 和 8590319 中, 以及在美国专利号 4, 956, 303 及其他中, 其通过引用整体并入。

[0103] 优选的小分子细胞毒性剂是允许连接至细胞结合剂的那些。本发明包括已知的细胞毒性剂以及可以变成已知的那些。特别优选的小分子细胞毒性剂包括细胞毒性剂。

[0104] 细胞毒性剂可以是导致细胞死亡或诱导细胞死亡或以某种方式降低细胞存活的任何化合物, 其中每种细胞毒性剂包括硫醇部分。

[0105] 优选的细胞毒性剂是美登木素生物碱化合物、紫杉烷化合物、CC-1065 化合物、道诺红霉素化合物和阿霉素化合物、吡咯并苯并二氮卓二聚体、加利车霉素、auristatin 及其类似物和衍生物, 其中的一些在下文描述。

[0106] 不一定是小分子的其他细胞毒性剂例如 siRNA 也包括在本发明范围内。例如, siRNA 可以通过常用于修饰寡核苷酸的方法连接至本发明的交联剂 (参见例如美国专利公开 20050107325 和 20070213292)。因此, 以其 3' 或 5' - 亚磷酰胺形式的 siRNA 与带有羟基官能团的交联剂的一端反应而在 siRNA 和交联剂之间产生酯键。类似地, siRNA 亚磷酰胺与带有末端氨基的交联剂反应导致交联剂与 siRNA 通过胺连接。siRNA 详细描述于美国专利公开号 : 20070275465、20070213292、20070185050、20070161595、20070054279、20060287260、20060035254、20060008822、20050288244、20050176667, 其在此通过引用整体并入。

[0107] 美登木素生物碱

[0108] 可用于本发明的美登木素生物碱是本领域公知的, 并且可以根据已知方法从天然来源分离或根据已知方法合成制备。

[0109] 适合的美登木素生物碱的实例包括美登醇和美登醇类似物。适合的美登醇类似物的实例包括具有修饰的芳族环的那些和具有其他位置修饰的那些。

[0110] 具有修饰的芳族环的适合的美登醇类似物的具体实例包括 :

[0111] (1) C-19- 脱氯 (美国专利号 4, 256, 746) (通过 LAH 还原美登木素 P2 来制备) ;

[0112] (2) C-20- 羟基 (或 C-20- 脱甲基) +/ - C-19- 脱氯 (美国专利号 4, 361, 650 和 4, 307, 016) (通过使用链霉菌或放线菌脱甲基或者使用 LAH 脱氯来制备) ; 和

[0113] (3) C-20- 脱甲氧基、C-20- 酰氧基 (-OCOR)、+/ - 脱氯 (美国专利号 4, 294, 757)

(通过使用酰基氯酰化来制备)。

[0114] 具有其他位置修饰的适合的美登醇类似物的具体实例包括：

[0115] (1) C-9-SH (美国专利号 4, 424, 219) (通过美登醇与 H₂S 或 P₂S₅ 反应来制备)；

[0116] (2) C-14-烷氧基甲基 (脱甲氧基 /CH₂OR) (美国专利号 4, 331, 598)；

[0117] (3) C-14-羟基甲基或酰氧基甲基 (CH₂OH 或 CH₂OAc) (美国专利号 4, 450, 254) (从诺卡菌制备)；

[0118] (4) C-15-羟基 / 酰氧基 (美国专利号 4, 364, 866) (通过链霉菌转化美登醇来制备)；

[0119] (5) C-15-甲氧基 (美国专利号 4, 313, 946 和 4, 315, 929) (从滑桃树分离)；

[0120] (6) C-18-N-脱甲基 (美国专利号 4, 362, 663 和 4, 322, 348) (通过链霉菌对美登醇脱甲基来制备)；和

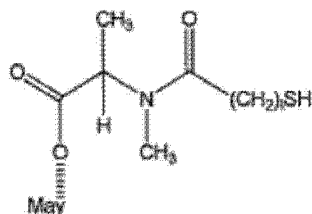
[0121] (7) 4, 5-脱氧 (美国专利号 4, 371, 533) (通过三氯化钛 /LAH 还原美登醇来制备)。

[0122] 用于本发明的含硫醇美登木素生物碱的合成完全公开于美国专利号 5, 208, 020、5, 416, 064 和美国专利申请号 20040235840。

[0123] 预期在 C-3 位置、C-14 位置、C-15 位置或 C-20 位置具有硫醇部分的美登木素生物碱都是有用的。C-3 位置是优选的, 并且美登醇的 C-3 位置是特别优选的。N-甲基-丙氨酸-含 C-3 硫醇部分的美登木素生物碱和 N-甲基-半胱氨酸-含 C-3 硫醇部分的美登木素生物碱和每一种的类似物也是优选的。

[0124] 用于本发明的 N-甲基-丙氨酸-含 C-3 硫醇部分的美登木素生物碱衍生物的具体实例由式 M1、M2、M3、M6 和 M7 表示。

[0125]

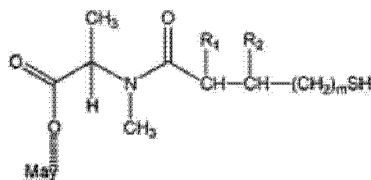


M1

[0126] 其中：

[0127] 1 是 1 至 10 的整数；且 May 是美登木素生物碱。

[0128]



M2

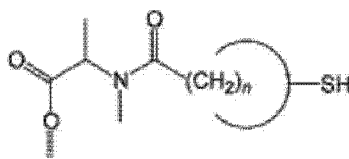
[0129] 其中：

[0130] R₁ 和 R₂ 是 H、CH₃ 或 CH₂CH₃, 并且可以相同或不同；

[0131] m 是 0、1、2 或 3；且

[0132] May 是美登木素生物碱。

[0133]



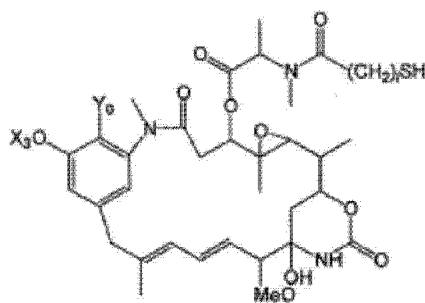
M3

[0134] 其中：

[0135] n 是 3 至 8 的整数；并且

[0136] May 是美登木素生物碱。

[0137]



M6

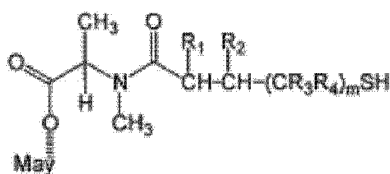
[0138] 其中：

[0139] 1 是 1、2 或 3；

[0140] Y₀ 是 Cl 或 H；且

[0141] X₃ 是 H 或 CH₃。

[0142]



[0143]

M7

[0144] 其中：

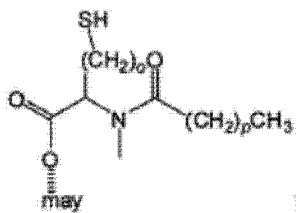
[0145] R₁、R₂、R₃、R₄ 是 H、CH₃ 或 CH₂CH₃，并且可以相同或不同；

[0146] m 是 0、1、2 或 3；并且

[0147] May 是美登木素生物碱。

[0148] 用于本发明的 N-甲基-半胱氨酸-含 C-3 硫醇部分的美登木素生物碱衍生物的具体实例由式 M4 和 M5 表示。

[0149]



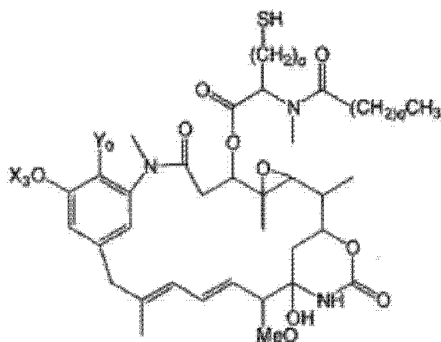
M4

[0150] 其中：

[0151] o 是 1、2 或 3；

[0152] p 是 0 至 10 的整数；并且 May 是美登木素生物碱。

[0153]



M5

[0154] 其中：

[0155] o 是 1、2 或 3；

[0156] q 是 0 至 10 的整数；

[0157] Y₀ 是 Cl 或 H；并且

[0158] X₃ 是 H 或 CH₃。

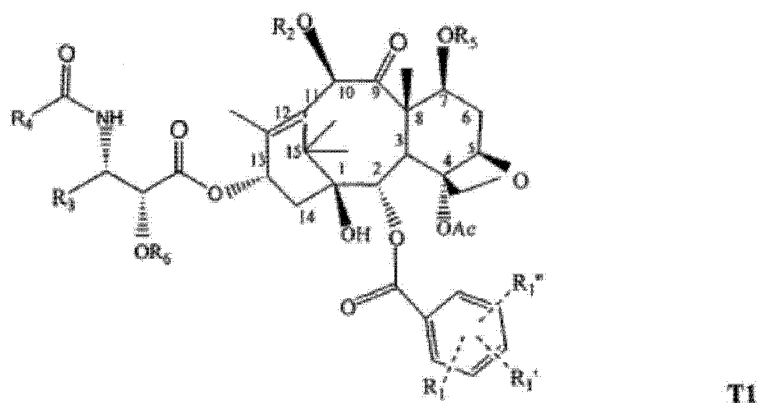
[0159] 优选的美登木素生物碱是公开于美国专利号 5, 208, 020 ; 5, 416, 064 ; 6, 333. 410 ; 6, 441, 163 ; 6, 716, 821 ; RE39, 151 和 7, 276, 497 的那些。

[0160] 紫杉烷

[0161] 根据本发明的细胞毒性剂也可以是紫杉烷。

[0162] 可用于本发明的紫杉烷已经被修饰为含有硫醇部分。用于本发明的一些紫杉烷具有以下所示的式 T1：

[0163]



[0164] 优选的紫杉烷是公开于美国专利号 6,340,701;6,372,738;6,436,931;6,596,757;6,706,708;7,008,942;7,217,819 和 7,276,499 中的那些。

[0165] CC-1065 类似物

[0166] 根据本发明的细胞毒性剂也可以是 CC-1065 类似物。

[0167] 根据本发明,CC-1065 类似物含有 A 亚基和 B 或 B-C 亚基。优选的 CC-1065 类似物是公开于美国专利号 5,475,092;5,595,499;5,846,545;6,534,660;6,586,618;6,756,397 和 7,049,316 的那些。

[0168] 道诺红霉素 / 阿霉素类似物

[0169] 根据本发明的细胞毒性剂也可以是道诺红霉素类似物或阿霉素类似物。

[0170] 本发明的道诺红霉素和阿霉素类似物可以被修饰为含有硫醇部分。具有硫醇部分的本发明的修饰的阿霉素 / 道诺红霉素类似物描述于 WO 01/38318。修饰的阿霉素 / 道诺红霉素可以根据已知方法合成 (参见例如,美国专利号 5,146,064)。

[0171] Auristatin 包括 auristatin E、auristatin EB(AEB)、auristatin EFP(AEFP)、单甲基 auristatin E(MMAE) 并且描述于美国专利号 5,635,483, Int. J. Oncol. 15:367-72(1999);Molecular Cancer Therapeutics, 第 3 卷,第 8 期, pp. 921-932(2004);美国专利申请号 11/134826,美国专利公开号 20060074008,2006022925。

[0172] 根据本发明的细胞毒性剂包括本领域已知的吡咯并苯并二氮卓二聚体 (美国专利号 7,049,311;7,067,511;6,951,853;7,189,710;6,884,799;6,660,856)。

[0173] 类似物和衍生物

[0174] 细胞毒性剂领域技术人员容易理解,本文描述的细胞毒性剂的每一种可以如下方式修饰:得到的化合物依然保留起始化合物的特异性和 / 或活性。技术人员还理解,这些化合物的许多可以替代本文描述的细胞毒性剂来使用。因此,本发明的细胞毒性剂包括本文描述的化合物的类似物和衍生物。

[0175] 报道基团

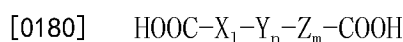
[0176] 术语报道基团或报道分子可互换使用并且本文使用的术语“报道基团”或“报道分子”指为诊断或治疗目的通过试剂的特异性亲和部分递送给特定物质或细胞的物质;实例有放射性同位素、顺磁造影剂和抗癌剂。各种标记或报道基团用于癌症患者的肿瘤成像应用,诊断各种疾病的免疫测定应用,使用放射性核素-配体复合物的癌症疗法,和用于纯化生物活性剂例如蛋白、肽和寡核苷酸的亲和色谱应用。与细胞结合剂复合的标记或报道基团包括荧光团和亲和标记例如生物素。这种报道基团可参考美国公开号 2007/0092940。

包括例如生物素或荧光素的报道基团还可以连接至 PEG 轭合物部分。许多适合的报道基团是本领域已知的,例如美国专利号 4,152,411 和 Hirschfeld 美国专利号 4,166,105、美国专利号 5,223,242、美国专利号 5,501,952、美国公开 20090136940,并且通过引用整体并入。

[0177] 连接体

[0178] 轭合物可通过体外方法制备。为了连接药物与细胞结合剂,使用了连接基团。适合的连接基团是本领域公知的并且包括不可裂解或可裂解的连接体。不可裂解的连接体是能够以稳定共价方式连接细胞毒性剂与细胞结合剂的任何化学部分。不可裂解的连接体基本上耐受酸诱导的裂解、光诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、酯酶诱导的裂解和二硫键裂解。不可裂解的连接体的实例包括具有用于与药物、报道基团或细胞结合剂反应的 N-琥珀酰亚胺酯、N-硫代琥珀酰亚胺酯部分、基于马来酰亚胺基-或卤代乙酰基部分的连接体。包含基于马来酰亚胺基-部分的交联试剂包括 N-琥珀酰亚胺基 4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷羧酸酯 (SMCC)、SMCC 的“长链”类似物 (LC-SMCC) N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺己酸酯)、 κ -马来酰亚胺基十一烷酸 N-琥珀酰亚胺酯 (KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸 N-琥珀酰亚胺酯 (GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺基癸酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EMCS)、m-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)、N-(α -马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯 (AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯 (SMPH)、N-琥珀酰亚胺基 4-(p-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酯 (SMPB) 和 N-(p-马来酰亚胺基苯基)异氰酸酯 (PMPI)。包含基于卤代乙酰基部分的交联试剂包括 N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘代乙酸酯 (SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯 (SBA) 和 N-琥珀酰亚胺基 3-(溴乙酰氨基)丙酸酯 (SBAP)。

[0179] 形成不可裂解连接体的缺少硫原子的其他交联试剂也可用于本发明。这种连接体可衍生自基于二羧酸的部分。适合的基于二羧酸的部分包括但不限于以下所示通式的 α, ω -二羧酸:



[0181] 其中 X 是具有 2 至 20 个碳原子的直链或支链烷基、烯基或炔基, Y 是具有 3 至 10 个碳原子的环烷基或环烯基, Z 是具有 6 至 10 个碳原子的取代或未取代的芳族基团或者其中杂原子选自 N、O 或 S 的取代或未取代的杂环基,并且其中 1、m 和 n 各自为 0 或 1,条件是 1、m 和 n 不同时为 0。

[0182] 本文公开的不可裂解连接体的许多详细描述于美国专利公开号 20050169933。

[0183] 可裂解的连接体是在温和条件下可裂解的连接体,所述温和条件即其中细胞毒性剂活性不受影响的条件。许多已知的连接体属于该类别并且在下文描述。

[0184] 酸不稳定连接体是在酸性 pH 下可裂解的连接体。例如,某些细胞内区室例如内体和溶酶体具有酸性 pH (pH 4-5) 并且提供适合裂解酸不稳定连接体的条件。

[0185] 光不稳定连接体用于体表和许多光可及的体腔内。而且,红外光可穿透组织。

[0186] 一些连接体可被肽酶裂解。仅某些肽容易在细胞内或细胞外裂解,参见例如 Trouet 等, 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982), Umemoto 等 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989) 和 lysosomal-hydrolase cleavable valine-citrulline linkage (溶酶体水解酶可裂解的缬氨酸-瓜氨酸连接) (美国专利 6,214,345 B1)。而且肽由 α -氨基酸和肽键构成,肽键在化学上是一个氨基酸的羧酸与另一氨基酸的 α -氨基之间的酰胺键。认

为其他酰胺键例如羧酸和赖氨酸的 ϵ 氨基之间的键不是肽键并且是不可裂解的。

[0187] 一些连接体可被酯酶裂解。同样,仅某些酯可被细胞内或细胞外存在的酯酶裂解。酯是羧酸与醇缩合而成的。简单的酯是用简单的醇例如脂肪醇和小的环状和小芳族醇产生的。例如,本发明人发现没有在美登素的 C-3 处裂解酯的酯酶,因为酯的醇组分美登醇是非常大且复杂的。

[0188] 优选的可裂解连接体分子包括例如 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯 (SPDP) (参见例如, Carlsson 等, Biochem. J, 173:723-737(1978))、N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯 (SPDB) (参见例如美国专利 4,563,304)、N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯 (SPP) (参见例如, CAS 登记号 341498-08-6) 和其他反应性交联剂,例如描述于美国专利 6,913,748 中的那些,其在此通过引用并入。

[0189] 可用于本发明的其他连接体包括带电连接体或亲水连接体,分别描述于美国专利申请号 12/433,604 和 12/433,668,其在此通过引用并入。

[0190] 细胞结合剂

[0191] 本发明使用的细胞结合剂是蛋白(例如,免疫球蛋白和非免疫球蛋白),其与癌细胞上的靶抗原特异性结合。这些细胞结合剂包括:

[0192] - 抗体,包括:

[0193] - 表面处理抗体 (resurfaced antibody) (美国专利号 5,639,641);

[0194] - 人源化或完全人抗体(人源化或完全人抗体选自但不限于 huMy9-6、huB4、huC242、huN901、DS6、CD38、IGF-IR、CNT0 95、B-B4、曲司珠单抗、比伐珠单抗、西罗珠单抗和利妥昔单抗(参见例如,美国专利号 5,639,641、5,665,357 和 7,342,110、国际专利申请 WO 02/16,401、美国公开号 20060045877、美国公开号 20060127407、美国公开号 20050118183、Pedersen 等, (1994) J. Mol. Biol. 235,959-973、Roguska 等, (1994) Proceedings of the National Academy of Sciences, 第 91 卷,969-973、Colomer 等, Cancer Invest., 19:49-56(2001)、Heider 等, Eur. J. Cancer, 31A:2385-2391(1995)、Welt 等, J. Clin. Oncol., 12:1193-1203(1994) 和 Maloney 等, Blood, 90:2188-2195(1997)); 和

[0195] - 抗体片段,例如 sFv、Fab、Fab' 和 F(ab')₂, 其优先结合靶细胞 (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902(1983); Spring 等, J. Immunol. 113:470-478(1974); Nisonoff 等, Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244(1960));

[0196] 其他细胞结合剂包括其他细胞结合蛋白和多肽,示例如下但不限于此:

[0197] - 锚蛋白重复蛋白 (DARPin; Zahnd 等, J. Biol. Chem., 281,46,35167-35175, (2006); Binz, H. K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) Nature Biotechnology, 23, 1257-1268) 或锚蛋白样重复蛋白或合成肽,描述于例如美国公开号 20070238667; 美国专利号 7,101,675; WO/2007/147213; WO/2007/062466);

[0198] - 干扰素(例如 α 、 β 、 γ);

[0199] - 淋巴因子例如 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6;

[0200] - 激素,例如胰岛素、TRH(促甲状腺激素释放激素)、MSH(黑素细胞刺激激素)、类固醇激素例如雄激素和雌激素; 和

[0201] - 生长因子和集落刺激因子,例如 EGF、TGF- α 、IGF-1、G-CSF、M-CSF 和 GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158(1984))。

[0202] 当细胞结合剂是抗体时,它结合多肽抗原并且可以是跨膜分子(例如受体)或配体例如生长因子。示例性抗原包括分子例如肾素;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;甲状旁腺激素;促甲状旁腺激素;脂蛋白; α -1-抗胰蛋白酶;胰岛素A-链;胰岛素B-链;胰岛素原;促卵泡激素;降血钙素;促黄体生成激素;胰高血糖素;凝血因子,例如vnc因子、IX因子、组织因子(TF)和von Willebrands因子;抗凝血因子,例如蛋白C;心房利钠因子;肺表面活性剂;纤溶酶原活化因子,例如尿激酶或人尿或组织型纤溶酶原活化因子(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子- α 和- β ;脑啡肽酶;RANTES(调节激活正常T细胞表达和分泌因子);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- α);血清白蛋白,例如人血清白蛋白;Muellerian抑制物质;耻骨松弛激素A-链;耻骨松弛激素B-链;耻骨松弛激素原;小鼠促性腺激素相关肽;微生物蛋白,例如 β -内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),例如CTLA-4;抑制素;活化素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经元营养因子,例如骨源性神经元营养因子(BDNF)、神经营养蛋白-3、-4、-5或-6(NT-3、NT4、NT-5或NT-6),或神经生长因子,例如NGF- β ;血小板衍生的生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子,例如aFGF和bFGF;表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF),例如TGF- α 和TGF- β ,包括TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4或TGF- β 5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II);des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白;CD蛋白,例如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20和CD40;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素;骨形成蛋白(BMP);干扰素,例如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),例如,M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白介素(IL),例如,IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原,例如,HIV包膜的一部分;转运蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;整联蛋白,例如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM、异二聚体人整联蛋白受体的 α -v亚基;肿瘤相关抗原,例如HER2、HER3或HER4受体;和上列多肽的任何一片段的片段。

[0203] 本发明涵盖的抗体的优选抗原包括CD蛋白,例如CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD34和CD46;ErbB受体家族成员,例如EGF受体、HER2、HER3或HER4受体;细胞粘附分子,例如LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、VCAM、 α 4/ β 7整联蛋白和 α v/ β 3整联蛋白,包括其 α 或 β 亚基(例如,抗CD11a、抗CD18或抗CD11b抗体);生长因子,例如VEGF;组织因子(TF);TGF- β ; α 干扰素(α -IFN);白介素,例如IL-8;IgE;血型抗原Apo2、死亡受体;flk2/flt3受体;肥胖(OB)受体;mp1受体;CTLA-4;蛋白C等。这里最优选的靶是IGF-IR、CanAg、EGF-R、EphA2、MUC1、MUC16、VEGF、TF、CD19、CD20、CD22、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、CD138、CA6、Her2/neu、CRIPTO(在大部分人乳腺癌细胞中以升高的水平产生的蛋白)、 α v/ β 3整联蛋白、 α v/ β 5整联蛋白、TGF- β 、CD11a、CD18、Apo2和C24。

[0204] 单克隆抗体技术允许产生单克隆抗体形式的特异性细胞结合剂。本领域特别公知的是通过用感兴趣的抗原例如完整靶细胞、从靶细胞分离的抗原、完整病毒、减毒的完整病毒和病毒蛋白例如病毒外壳蛋白免疫接种小鼠、大鼠、仓鼠或任何其他哺乳动物来产生单克隆抗体的技术。还可以使用致敏的人细胞。产生单克隆抗体的另一方法是使用sFv(单链可变区)、特别是人sFv的噬菌体文库(参见例如,Griffiths等,美国专利号5,885,793;McCafferty等,WO 92/01047;Liming等,WO 99/06587.)。

[0205] 适合的细胞结合剂的选择是根据待靶向的特定细胞群的选择问题,但一般而言,

如果适当的一种是可获得的,则优先结合靶细胞的单克隆抗体及其片段是优选的。

[0206] 例如,单克隆抗体 My9 是对急性髓细胞样白血病 (AML) 细胞上存在的 CD33 抗原特异性的鼠 IgG_{2a} 抗体 (Roy 等 Blood 77 :2404-2412(1991)) 并且可用于治疗 AML 患者。类似地,单克隆抗体抗 B4 是鼠 IgG₁,其结合 B 细胞上的 CD 19 抗原 (Nadler 等, J. Immunol. 131 : 244-250(1983)) 并且当靶细胞是表达该抗原的 B 细胞或患病细胞例如非霍奇金淋巴瘤或慢性成淋巴细胞白血病时可以被使用。类似地,抗体 N901 是结合小细胞肺癌细胞和神经内分泌来源的其他肿瘤细胞上存在的 CD56 的鼠单克隆 IgG₁ 抗体 (Roy 等 J Nat. Cancer Inst. 88 :1136-1145(1996))、结合 CanAg 抗原的 huC242 抗体、结合 HER2/neu 的曲司珠单抗、和结合 EGF 受体的抗 EGF 受体抗体。

[0207] 纯化方法

[0208] 本发明轭合物,即最终产物,被纯化以除去任何未反应或未轭合的效应分子或报道分子或未反应的连接体或未轭合的水解的连接体。纯化方法可以是正切流动过滤(还称为交叉流过滤的 TFF、超滤或渗滤)、凝胶过滤、吸附色谱、选择性沉淀或其组合。吸附色谱方法包括离子交换色谱、羟基磷灰石色谱、疏水反应色谱 (HIC)、疏水电荷诱导色谱 (HCIC)、混合型离子交换色谱、固定化金属亲和色谱 (IMAC)、染料配体色谱、亲和色谱和反相色谱。例如,式 2 中描述的轭合物 Ab-(X'-L-Y'-C)_m 从未反应的 C 或未反应的 / 水解的连接体 X-L-Y 或 X-L-Y'-C 纯化。类似地,式 4、6 和 9 中描述的轭合物被纯化。这种纯化方法是本领域技术人员已知的,并且可以参见例如美国公开号 2007/0048314。

[0209] 轭合物中不期望的水解的连接体或蛋白交联

[0210] 利用蛋白与具有反应性马来酰亚胺或卤代乙酰胺残基的异双官能连接体的初始反应的传统轭合方法具有两个主要缺点:(i) 由于在与效应分子或报道分子反应之前抗体中加入的连接体的水性失活,轭合产物可能由水解的连接体组成;和(ii) 由于马来酰亚胺(或卤代乙酰胺)基团与蛋白或肽中的天然组氨酸、赖氨酸、酪氨酸或半胱氨酸残基反应,轭合物的链间或链内交联(A. Papini 等, Int. J. Pept. Protein Res., 1992, 39, 348-355; T. Ueda 等, Biochemistry, 1985, 24, 6316-6322)。抗体中的这种链间交联将导致重链和轻链之间或两条重链之间各种不可还原的共价连接,这在还原 SDS-PAGE 分析中是明显的,因为存在比预期重链和轻链条带更高分子量的条带。抗体中这种链间或链内交联也可以通过 MS 显示,因为存在不同于抗体加连接的报道基团或效应基团的预期质量峰的异常质量峰。不同于传统轭合方法,本申请中描述的方法导致具有高均一性而无明显链间交联或水解连接体的轭合物。

[0211] 本文和以下实施例中引用的所有参考文献明确通过引用整体并入。

实施例

[0212] 仅示例性的以下实施例不是要限制本发明。

[0213] 实施例 1. 对比传统两步方法,通过本方法使用异双官能连接体马来酰亚胺-PEG_n-NHS 轭合抗体与细胞毒性剂 DM1/DM4(图 1)。

[0214] 在 N,N'-二甲基乙酰胺(DMA)中制备浓度为 30-60mM 的 DM1[N^{2'}-脱乙酰基-N^{2'}-(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素]或 DM4[N^{2'}-脱乙酰基-N^{2'}-(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素](DMx) 硫醇和马来酰亚胺-PEG_n-NHS 双官能连接体的储液。连接

体与 DMx 硫醇在含有至多 50% v/v 200mM 琥珀酸盐缓冲液, 2mM EDTA, pH 5.0 的 DMA 中混合在一起而得到 1.6 : 1 的 DMx : 连接体摩尔比和等于 15mM 的 DMx 终浓度。混合后, 使反应混合物静置 1-4h, 然后小份反应混合物被稀释 10 倍并在 302-320nm 下测量吸光度以确定任何剩余的未反应的马来酰亚胺的存在, 使用马来酰亚胺的消光系数 (ϵ), $302\text{nm} = 620\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 和 $\epsilon\ 320\text{nm} \sim 450\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。(后来对小份冷冻的反应混合物进行额外的反相 HPLC 分析并在 302nm 和 252nm 监测吸光度以证实反应混合物添加至抗体时, 连接体马来酰亚胺完全消失和期望的连接体-DMx 试剂的形成)。当通过 UV 确定不再存在马来酰亚胺时, 将小份反应混合物无需纯化而添加至抗体的磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 溶液中, 最终轭合条件为 4mg/ml Ab, 90% 磷酸盐缓冲液 / 10% DMA, pH 7.5。允许轭合反应在室温下进行 2h。使用在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液中平衡的 G25 凝胶过滤柱或使用正切流动过滤 (TFF), 使 Ab-DMx 轭合物从过量小分子 DMx 和连接体反应物纯化。轭合物在 pH 7.5 缓冲液中 4℃ 下进一步保持 2 天, 以允许非共价连接或通过不稳定键连接至抗体的任何 DMx 物类解离。然后将轭合物透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸 / 甘氨酸缓冲液, 然后经 0.22 μm 滤器过滤以最终储存。通过测定轭合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量最终轭合物中每个 Ab 分子的 DMx 数目 (平均)。

[0215] 使用几种不同的反应条件用于 DMx 硫醇与异双官能马来酰亚胺-PEG₄-NHS 试剂的初始反应: 50% DMA/50% 水性 200mM 琥珀酸盐缓冲液 pH 5.0, 2mM EDTA (v/v); 或 60% DMA/40% 200mM 琥珀酸盐缓冲液 pH 5.0, 2mM EDTA (v/v); 或 100% DMA, 每摩尔 DM4 硫醇 1.5 摩尔当量的有机碱 (例如, N, N'-二异丙基乙胺、DIPEA 或 4-甲基吗啉)。

[0216] 在一系列实验中, DMx 与马来酰亚胺-PEG₄-NHS 连接体 (购自 Pierce Endogen) 的摩尔当量为 1.2-2.4, 并且反应时间是 30min。对纯化轭合物测量的 DMx/Ab 数目被测量为增加当量的 DMx/抗体的函数。1.2-2.0 当量 DM1/连接体的条件产生具有相似 DMx/Ab 载量的轭合物, 表明 DMx 硫醇在连接体的 NHS 酯侧不期望的反应不是重要问题。最终轭合物中存在的交联的量也通过还原 SDS PAGE 分析, 显示交联污染物的存在随着增加的 DM1/连接体比率而显著降低。

[0217] 在最初 DMx 和异双官能连接体反应完成之后 (在反应混合物添加至抗体之前) 引入使用马来酰亚胺或卤代乙酰胺试剂 (例如马来酰亚胺丁酸或马来酰亚胺丙酸或 N-乙基马来酰亚胺或碘乙酰胺或碘乙酸) 的一个任选猝灭步骤, 以猝灭过量 DMx 硫醇基, 以防止 DMx 硫醇与抗体的任何不期望的反应。

[0218] 抗体与未纯化的 DMx 和异双官能连接体的初始反应混合物反应的可选方法包括在低 pH (pH $\sim$ 5) 下混合 DMx 和异双官能连接体的初始反应混合物与抗体 (在 DMx-连接体反应完成时), 随后添加缓冲液或碱以增加 pH 至 6.5-8.5 以进行轭合反应。

[0219] 抗体-PEG₄-Mal-DM1 或 DM4 轭合物通过传统两步轭合方法制备, 与本发明描述的轭合方法相比较。在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液 (50mM 磷酸钾、50mM 氯化钠、2mM EDTA, pH 7.5) 和 5% DMA 中浓度为 8mg/ml 的人源化抗体用过量异双官能马来酰亚胺-PEG₄-NHS 连接体试剂 (购自 Pierce Endogen) 修饰。25℃ 下 2h 后, 修饰的抗体通过 G25 色谱凝胶纯化以除去过量的未反应的未加入的连接体。通过在 280nm 下 UV 吸光度测定纯化的 Ab 的回收。在修饰的 Ab 中连接的马来酰亚胺基团的数目使用小份修饰的抗体测定, 通过添加已知量的硫醇 (例如 2-巯基乙醇), 所述硫醇以超过马来酰亚胺的量添加以与修饰抗体中的马来酰亚

胺残基反应并然后通过 Ellman 测定法使用 DTNB 试剂分析剩余硫醇（硫醇 TNB 在 412nm 的消光系数 = $14150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Riddles, P. W. 等, *Methods Enzymol.*, 1983, 91, 49-60; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351)。修饰 Ab 与 DM1 或 DM4 硫醇的轭合以反应混合物中 Ab 浓度为 2.5mg/ml 下进行, 所述反应混合物由 95% 磷酸盐缓冲液 pH 7.5 (50mM 磷酸钾, 50mM 氯化钠, 2mM EDTA, pH 7.5) 和 5% DMA 组成。Ab 上每摩尔连接的马来酰亚胺添加 1.7 摩尔当量的过量 DM1 或 DM4 硫醇。在 25°C 反应过夜之后, 轭合物使用 0.22 μm 滤器无菌过滤并通过在磷酸盐缓冲液 pH 7.5 (50mM 磷酸钾, 50mM 氯化钠, 2mM EDTA, pH 7.5) 中平衡的 G25 柱从过量未反应的 DM1 或 DM4 凝胶纯化。纯化的轭合物在磷酸盐缓冲液 pH 7.5 (50mM 磷酸钾, 50mM 氯化钠, 2mM EDTA, pH 7.5) 中 4°C 保持 2 天以允许非共价连接或通过不稳定键连接至抗体的任何 DM1 或 DM4 物类解离。随后在组氨酸 / 甘氨酸缓冲液 pH 5.5 (130mM 甘氨酸 / 10mM 组氨酸, pH 5.5) 中将轭合物透析 2 天, 并使用 0.22 μm 滤器无菌过滤。通过测定轭合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DM1/DM4 和 Ab 的已知消光系数来测量最终轭合物中每个 Ab 分子的 DM1 或 DM4 分子数目。

[0220] 使用具有 4-12% Bis Tris Gel 的 NuPage 电泳系统 (Invitrogen) 对轭合物和抗体样品进行还原 SDS PAGE。热变性和还原样品以 10 μg /泳道加载。使用本发明描述的方法制备的轭合物的还原 SDS-PAGE 仅显示作为主要条带的预期的重链和轻链条带 (分别是 50kDa 和 25kDa) (图 2)。相反, 通过传统两步轭合方法制备的轭合物显示分子量为 75、100、125 和 150kDa 的不期望的交联条带, 推测分别对应于链间交联物类 HL、H₂、H₂L 和 H₂L₂ (图 2)。

[0221] 通过本发明描述的方法制备的抗体-PEG₄-Mal-DM4 轭合物的蛋白 LabChip 电泳分析 (在还原条件下) 显示百分比为 58% 和 30% (总蛋白) 的预期重链和轻链条带, 分别类似于未轭合抗体的 65% 和 30% (图 3)。相反, 使用传统两步轭合方法制备的轭合物显示分别仅 16% 和 8% 的重链和轻链条带, 并且范围 94-169kDa 的较高分子量的主要条带推测是由于链间交联。基于定量蛋白 LabChip 分析, 通过本申请描述的方法制备的轭合物高度优于使用传统两步方法制备的轭合物 (图 3)。

[0222] 通过本发明描述的方法制备的轭合物的 MS 分析显示有关每个抗体分子带有增加数目的美登木素生物碱分子的分离的 DMx- 抗体轭合物峰 (图 4)。相反, 使用传统两步方法制备获得的轭合物的 MS 几乎未分辨, 表明轭合物制品的不均一性, 推测是由于交联或失活的马来酰亚胺连接体。因此, 基于 MS, 使用本发明描述的方法制备的轭合物优于通过传统两步方法合成的轭合物。

[0223] 通过本发明描述的方法制备的抗 CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 轭合物的结合通过流式细胞术测量, 使用表达抗原的 COLO205 细胞, 并且发现类似于未轭合抗体的结合, 表明轭合对抗体结合没有不利影响 (图 5)。通过本发明描述的方法制备的抗 CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 轭合物的细胞毒性活性使用表达 CanAg 抗原的 COLO205 结肠癌细胞在体外测量 (图 6)。表达抗原的癌细胞以大约 1000 细胞 / 孔涂布于 96 孔板的含有胎牛血清的细胞培养基并暴露于各种浓度的 Ab-DMx 轭合物。暴露于轭合物 5 天后, 保留在每个孔中的活细胞使用 WST-8 测定法 (Dojindo Molecular Technologies) 测量。如图 6 所示, 使用该方法制备的抗 CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 轭合物在低浓度下对表达 CanAg 抗原的 COLO205 结肠癌细胞高度有效。通过本发明描述的方法制备的抗 CanAg Ab-PEG₄-Mal-DM1 轭合物的细胞毒性特异

性针对 COLO205 细胞,因为这可以通过添加过量的未耦合抗体来阻遏。

[0224] 实施例 2. 对比传统连续两步方法,通过本方法使用马来酰亚胺-磺基-NHS 连接体耦合抗体与 DM1/DM4(图 7)。

[0225] 在 N,N'-二甲基乙酰胺(DMA)中制备浓度为 30-60mM 的 DMx 硫醇和马来酰亚胺-磺基-NHS 异双官能连接体的储液。连接体与 DMx 硫醇在含有 40% v/v 200mM 琥珀酸盐缓冲液,2mM EDTA, pH 5.0 的 DMA 中混合在一起而得到 1.6 的 DMx:连接体比率和等于 15mM 的 DMx 终浓度。混合后,使反应静置 1-4h,然后小份反应混合物被稀释 10 倍并在 302-320nm 下测量吸光度以评估反应完成和马来酰亚胺的存在。(后来对小份冷冻的反应混合物进行额外的反相 HPLC 分析并在 302nm 和 252nm 监测吸光度以证实在反应混合物添加至抗体时,连接体马来酰亚胺完全消失和期望的连接体-DMx 试剂的形成)。当通过 UV 确定不再存在马来酰亚胺时,将小份反应混合物添加至抗体在磷酸盐缓冲液(pH 7.5)中的混合物,最终耦合条件为 4mg/ml Ab,90%磷酸盐缓冲液/10% DMA,pH 7.5。允许耦合反应在室温下进行 2h。使用在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液中平衡的 G25 凝胶过滤柱或通过正切流动过滤,使 Ab-DMx 耦合物从过量未反应的 DMx 和未耦合的连接体产品纯化。耦合物在 pH 7.5 缓冲液中 4℃下保持 2 天,以允许非共价连接或通过不稳定键连接至抗体的任何 DMx 物类解离。然后将耦合物透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸/甘氨酸缓冲液,然后经 0.22 μm 滤器过滤以最终储存。通过测定耦合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量最终耦合物中每个 Ab 分子的 DMx 分子数目(平均)。

[0226] 为了比较,使用常规两步耦合方法制备 Ab-磺基-Mal-DMx 耦合物。在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液/5% DMA 缓冲液中浓度为 8mg/ml 的抗体(Ab)用过量异双官能马来酰亚胺磺基-NHS 连接体修饰。允许反应在 20℃下进行 2h,然后修饰的 Ab 使用 G25 色谱与过量的未反应连接体纯化分离。通过在 280nm 下 UV 吸光度测定纯化的 Ab 的回收。在修饰的 Ab 中连接的马来酰亚胺基团的数目使用小份修饰的抗体测定,通过添加已知量的硫醇(例如 2-巯基乙醇),所述硫醇以超过马来酰亚胺的量添加以与修饰抗体中的马来酰亚胺残基反应并然后通过 Ellman 测定法使用 DTNB 试剂分析剩余硫醇(硫醇 TNB 在 412nm 的消光系数 = $14150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Riddles, P.W. 等, *Methods Enzymol.*, 1983, 91, 49-60; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351)。修饰的 Ab 与 DMx 的耦合以 95% pH 7.5 磷酸盐缓冲液/5% DMA(v/v) 中抗体浓度为 2.5mg/ml 下进行,抗体中每摩尔连接的马来酰亚胺添加 1.7 摩尔当量的 DMx 硫醇。反应在 18℃进行 8-24h,耦合物通过使用 G25 尺寸排阻色谱与过量未反应的 DMx 分离。纯化后,耦合物在 pH 7.5 缓冲液中 4℃保持 2 天以允许非共价连接或通过不稳定键连接至抗体的任何 DMx 物类解离。然后耦合物被透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸/甘氨酸缓冲液,然后通过 0.22 μm 滤器过滤以最终储存。通过测定耦合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量最终耦合物中每个 Ab 分子的 DMx 分子数目。

[0227] 使用具有 4-12% Bis Tris Gel 和 NuPAGE MOPS SDS 电泳缓冲液的 NuPage 电泳系统(Invitrogen),使用耦合物和抗体样品(10 μg/泳道)进行还原 SDS PAGE(图 8)。凝胶上分子量为 75、125 和 150kDa 的条带指示链间交联物类(分别是 HL、H₂L 和 H₂L₂)。Ab-磺基-Mal-DM1 耦合物与 ~4 DM1/Ab(分别为通过本方法的泳道 3 和通过传统两步耦合方法的泳道 2)和 ~6 DM1/Ab(分别为通过本方法的泳道 5 和通过传统两步耦合方法的泳道 4)

的比较清楚显示,通过本发明描述的方法制备的轭合物(泳道 3 和 5)与通过传统两步方法制备的轭合物(泳道 2 和 4)相比具有小得多比例的高分子量交联物类。

[0228] 通过本发明描述的方法制备的抗体-磺基-Mal-DM1 轭合物的蛋白 LabChip 电泳分析(在还原条件下)显示百分比为 70%和 28%(总蛋白)的重链和轻链主要条带,分别类似于未轭合抗体的 70%和 30%(图 9)。相反,使用传统两步方法制备的轭合物显示分别仅 53%和 23%的重链和轻链条带,并且范围 99-152 kDa 的较高分子量的主要条带推测是由于链间交联。基于定量蛋白 LabChip 分析,通过本申请描述的方法制备的轭合物在缺少链间交联方面高度优于使用传统两步方法制备的轭合物(图 9)。

[0229] 通过尺寸排阻 LC/MS 分析比较通过本发明描述的方法和通过传统两步方法制备的具有相似药物载荷的 Ab-磺基-mal-DM1 轭合物(图 10)。通过本发明描述的方法制备的轭合物显示仅含有质量等于 Ab-(连接体-DMx)_n的预期峰分布的预期 MS 谱。在使用传统两步方法制备的轭合物的情况下,谱中主要峰除了预期的 Ab-(连接体-DMx)_n部分,都含有一个或多个水解或交联的连接体片段。传统两步反应顺序中链间交联或马来酰亚胺水性失活的推测机制示于图 17,由此通过抗体与异双官能连接体的初始反应而加入的马来酰亚胺(或卤代乙酰胺)残基可以与分子内(或分子间)组氨酸、赖氨酸、酪氨酸或半胱氨酸残基反应,导致链间交联,或者初始加入的马来酰亚胺(或卤代乙酰胺)残基可以被失活(例如通过水解马来酰亚胺环裂解或通过水性添加至马来酰亚胺)并因此对于与含硫醇的效应基团或报道基团的快速反应不可用。因此,LC-MS 分析清楚显示,本发明描述的方法有利于产生均一轭合物,具有很少或没有与抗体连接的水解或交联的连接体片段。

[0230] 通过本发明描述的方法制备的抗 CanAg Ab-磺基-Mal-DM1(每个抗体分子负载 5.6 个美登木素生物碱(平均))的结合使用表达抗原的 COLO205 细胞通过流式细胞术来测量,并且发现类似于未轭合抗体的结合,表明轭合不影响抗体与靶抗原的结合(图 11)。通过本发明描述的方法制备的抗 CanAg Ab-磺基-Mal-DM1 轭合物的细胞毒性活性使用表达 CanAg 抗原的 COLO205 结肠癌细胞在体外测量(图 12)。表达抗原的癌细胞以大约 1000 细胞/孔涂布于 96 孔板的含有胎牛血清的细胞培养基并暴露于各种浓度的 Ab-DMx 轭合物。暴露于轭合物 5 天后,保留的活细胞使用 WST-8 测定法(Dojindo Molecular Technologies)测量。如图 12 所示,使用该方法制备的抗 CanAg Ab-磺基-Mal-DM1 轭合物在低浓度下对表达 CanAg 抗原的 COLO205 结肠癌细胞高度有效。该轭合物的细胞毒性是特异性的,因为这可以用过量未轭合的抗体的竞争来阻遏。

[0231] 使用本发明描述方法轭合的可选方法包括在初始 DMx 和异双官能连接体反应完成之后(在反应混合物添加至抗体之前)使用马来酰亚胺或卤代乙酰胺试剂(例如 4-马来酰亚胺丁酸或 3-马来酰亚胺丙酸或 N-乙基马来酰亚胺或碘乙酰胺或碘乙酸)的猝灭步骤以猝灭过量 DMx 硫醇基,以防止 DMx 硫醇与抗体的任何不期望的反应。在具体实施例中,在初始 DMx 和异双官能连接体反应完成之后(在反应混合物添加至抗体之前),添加 4-马来酰亚胺丁酸以猝灭过量 DMx 硫醇基,以防止轭合反应期间 DMx 硫醇与抗体的任何不期望的反应。向含有过量 DM4(3mM)的 DM4 和磺基-Mal-NHS 异双官能试剂的反应混合物,在预期的 DM4 硫醇偶联至异双官能试剂的马来酰亚胺基团完成时,在室温下向反应混合物添加两倍摩尔过量的 4-马来酰亚胺丁酸(6mM)持续 20 分钟以猝灭从最初偶联反应剩余的 DM4。无需纯化反应混合物,小份与抗体的磷酸盐缓冲液(pH 7.5)的溶液混合,最终轭合

条件为 4mg/ml Ab, 90% 水性磷酸盐缓冲液 / 10% DMA, pH 7.5。允许耦合反应在室温下进行 2h。使用在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液中平衡的 G25 凝胶过滤柱使抗体-DM4 耦合物从过量的小分子 DM4 和连接体反应物纯化。耦合物在 pH 7.5 缓冲液中 4℃ 下进一步保持 2 天, 以允许非共价连接或通过不稳定键连接至抗体的任何 DMx 物类解离。然后将耦合物透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸 / 甘氨酸缓冲液, 并经 0.22 μm 滤器过滤以最终储存。通过测定耦合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量最终耦合物中每个 Ab 分子的 DM4 分子平均数目。使用具有 4-12% Bis Tris Gel 的 NuPage 电泳系统 (Invitrogen), 通过非还原 SDS PAGE 分析耦合物样品。热变性样品以 10 μg/泳道加载。使用本发明描述的方法制备的耦合物 (未猝灭) 的非还原 SDS-PAGE 显示轻链条带 (~25kDa) 和半抗体条带 (重链-轻链; ~75kDa) 的证据 (图 18)。另一方面, 使用本发明描述的方法制备的、用 4-马来酰亚胺丁酸处理 (以加帽过量 DMx 硫醇) 的耦合物具有显著更低量的这些不期望的条带 (以相当于未修饰的抗体样品的水平)。通过硫醇猝灭剂例如 4-马来酰亚胺丁酸猝灭初始 DMx 和异双官能反应混合物 (在与抗体耦合之前) 的另一优点在于在抗体耦合反应期间没有 "游离的" DMx (DM1 或 DM4) 物类, 并且因此纯化后的最终耦合物不含有 "游离的" 或未耦合的 DMx 物类。DMx 与 4-马来酰亚胺丁酸 (或其他极性硫醇猝灭试剂) 的加合物比 DMx 更溶于水, 并且因此可以更容易与共价连接的抗体-DMx 耦合物分离。

[0232] 实施例 3. 使用磺基-NHS-SMCC 连接体耦合抗体与美登木素生物碱 (DM1/DM4) (图 13)

[0233] 在 DMA 中制备浓度为 30-60mM 的 DM1 或 DM4 硫醇 (DMx) 和具有磺基-NHS 基团的磺基-SMCC 异双官能连接体 (购自 Pierce Endogen; 图 13) 的储液。连接体与 DM1 或 DMx 硫醇在含有 40% v/v 200mM 水性琥珀酸盐缓冲液, 2mM EDTA, pH 5.0 的 DMA 中混合在一起而得到 1.6:1 的 DM1 或 DM4 (DMx): 连接体比率和 6mM 的 DMx 终浓度。混合后, 使反应在室温静置 1-4h, 然后小份反应混合物被稀释 10 倍以在 302-320nm 下测量吸光度以评估是否所有的马来酰亚胺已经反应。(后来对小份冷冻的反应混合物进行额外的反相 HPLC 分析并在 302nm 和 252nm 监测以证实在反应混合物添加至抗体时, 连接体马来酰亚胺完全消失和期望的磺基-NHS-连接体-Mal-DMx 试剂的形成)。当通过 UV 确定不再存在马来酰亚胺时, 将小份反应添加至抗体在磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中的水溶液, 最终耦合条件为 4mg/ml Ab, 90% 磷酸盐缓冲液 (水性) / 10% DMA (v/v), pH 7.5。允许耦合反应在室温下进行 2h。使用在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液 (水性) 中平衡的 G25 凝胶过滤柱, 使 Ab-DMx 耦合物从过量未反应的试剂和过量 DMx 纯化。耦合物在 pH 7.5 缓冲液中 4℃ 下保持 2 天, 以允许非共价连接或通过不稳定键连接至 Ab 的任何 DMx 物类解离。然后将耦合物透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸 / 甘氨酸缓冲液, 然后经 0.22 μm 滤器过滤以最终储存。通过测定耦合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量最终耦合物中每个 Ab 分子的 DMx 分子数目。

[0234] 为了比较, 使用常规两步耦合方法制备 Ab-SMCC-DMx 耦合物。在 95% pH 6.5 磷酸盐缓冲液 / 5% DMA 缓冲液中浓度为 8mg/ml 的抗体 (Ab) 用过量的具有磺基-NHS 基团的磺基-SMCC 连接体 (购自 Pierce Endogen) 修饰。允许反应在 25℃ 下进行 2h, 然后修饰的 Ab 使用 G25 色谱与过量的未反应连接体纯化分离。通过在 280nm 下 UV 吸光度测定纯化的

Ab 的回收。在修饰的 Ab 中连接的马来酰亚胺基团的数目使用小份修饰的抗体测定,通过添加已知量的硫醇(例如 2- 巯基乙醇),所述硫醇以超过马来酰亚胺的量添加以与修饰抗体中的马来酰亚胺残基反应并然后通过 Ellman 测定法使用 DTNB 试剂分析剩余硫醇(硫醇 TNB 在 412nm 的消光系数 = $14150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Riddles, P. W. 等, *Methods Enzymol.*, 1983, 91, 49-60; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351)。修饰的 Ab 与 DM1 或 DM4 的轭合以在 95% pH6.5 磷酸盐缓冲液 /5% DMA(v/v) 中抗体浓度为 2.5mg/ml 下进行, Ab 中每摩尔连接的马来酰亚胺添加 1.7 摩尔当量的 DM1 或 DM4 硫醇。反应在 18℃ 进行 8-24h, 轭合物通过 G25 色谱与过量未反应的 DM1 (或 DM4) 分离。纯化后, 轭合物在 pH 6.5 缓冲液中 4℃ 保持 2 天以允许任何弱连接的 DM1/DM4 物质水解。然后轭合物被透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸 / 甘氨酸缓冲液, 然后通过 0.22 μm 滤器过滤以最终储存。通过测定轭合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DM1/DM4 和抗体的已知消光系数来测量最终轭合物中每个 Ab 分子的 DM1/DM4 分子数目。

[0235] 使用具有 4-12% Bis Tris Mini Gel 和 NuPAGE MOPS SDS 电泳缓冲液的 NuPage 电泳系统 (Invitrogen) 对轭合物和抗体样品 (10 μg / 泳道) 进行还原 SDS PAGE (图 14)。凝胶上分子量为 75、125 和 150kDa 的条带指示链间交联物类 (分别是 HL、H₂L 和 H₂L₂)。Ab-SMCC-DM1 轭合物与 3.1 D/Ab (分别为通过本方法的泳道 4 和通过传统两步方法的泳道 3) 的比较清楚显示, 通过本发明描述的方法制备的轭合物 (泳道 4) 与通过传统两步方法制备的轭合物 (泳道 3) 相比具有少得多的高分子量交联物类。

[0236] 通过本发明描述的方法制备的抗体-SMCC-DM1 轭合物的蛋白 LabChip 电泳分析 (在还原条件下) 显示百分比为 67% 和 30% (总蛋白) 的重链和轻链主要条带, 分别类似于未轭合抗体的 68% 和 30% (图 15)。相反, 使用传统两步方法制备的轭合物显示分别仅 54% 和 24% 的重链和轻链条带, 并且范围 96-148kDa 的较高分子量的主要条带推测是由于链间交联。基于定量蛋白 LabChip 分析, 通过本申请描述的方法制备的轭合物在缺少链间交联方面高度优于使用传统两步方法制备的轭合物 (图 15)。

[0237] 通过尺寸排阻 LC/MS 分析比较通过本发明描述的方法和通过传统两步方法制备的具有相似药物载荷的 Ab-SMCC-DM1 轭合物 (图 16)。通过本发明描述的方法制备的轭合物显示仅含有质量等于 Ab-(连接体-DMx)_n 的预期峰分布的预期 MS 谱。在使用传统两步方法制备的轭合物的情况下, 谱显示异质物类混合物, 包括预期的 Ab-(连接体-DMx)_n 物类和含有失活的马来酰亚胺和交联连接体片段的其他物类。传统两步反应顺序中链间交联或马来酰亚胺失活的推测机制示于图 17, 由此通过抗体与异双官能连接体的初始反应而加入的马来酰亚胺 (或卤代乙酰胺残基) 可以与分子内 (或分子间) 组氨酸、赖氨酸、酪氨酸或半胱氨酸残基反应, 导致链间交联, 或者初始加入的马来酰亚胺 (或卤代乙酰胺) 残基可以在与含硫醇的 DM1 或 DM4 (DMx) 物质反应步骤之前通过水解或水合马来酰亚胺残基而失活。因此, LC-MS 分析清楚显示, 本发明描述的方法有利于产生均一轭合物, 具有很少或没有与抗体连接的失活的马来酰亚胺或交联的连接体片段。

[0238] 实施例 4. 通过本方法使用可裂解的二硫化物连接体轭合抗体与 DM1/DM4 (DMx) (图 19)。

[0239] 在 DMA 中制备浓度为 30-60mM 的 DM1 或 DM4 硫醇 (DMx) 和异双官能连接体 4-(2-吡啶基二巯基) 丁酸-N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (SPDB) 的储液。连接体与 DMx 硫醇在含有多达

40% v/v 200mM 水性琥珀酸盐缓冲液, 2mM EDTA, pH 5.0 的 DMA 中混合在一起而得到 1.6 : 1 的 DM1 或 DM4 (DMx) : 连接体比率和 8mM 的 DMx 终浓度。混合后, 使反应在室温静置 1h, 然后小份反应添加至抗体在磷酸缓冲液 (pH 7.5) 中的水溶液, 最终耦联条件为 4mg/ml Ab, 90% 磷酸盐缓冲液 (水性) / 10% DMA, pH 7.5。允许耦联反应在室温下进行 2h。使用在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液 (水性) 中平衡的 G25 凝胶过滤柱, 使 Ab-DMx 耦合物从过量未反应的试剂和过量 DMx 纯化。耦合物在 pH7.5 缓冲液中 4℃ 下保持 2 天, 以允许非共价连接或通过不稳定键连接至 Ab 的任何 DMx 物类解离。然后将耦合物透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸 / 甘氨酸缓冲液, 然后经 0.22 μ m 滤器过滤以最终储存。通过测定耦合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量最终耦合物中每个 Ab 分子的 DMx 分子数目。

[0240] 实施例 5. 通过本方法使用二硫化物连接体和不可裂解连接体制备抗体 -DM1/DM4 (Ab-DMx) 耦合物 (图 20)。

[0241] 在 N, N-二甲基乙酰胺 (DMA) 中制备浓度为 30-80mM 的 DM1 或 DM4 硫醇 (DMx) 和 NHS-PEG_n-马来酰亚胺异双官能连接体的储液。NHS-PEG₄-马来酰亚胺连接体和 DMx 硫醇在含有 40% v/v 200mM 琥珀酸盐缓冲液, 2mM EDTA, pH 5.0 的 DMA 中混合在一起而得到 1.6 : 1 的 DMx : 连接体摩尔比和等于 8.0mM 的 DMx 终浓度。使反应混合物在室温继续反应 2h。在单独的平行反应中, SPDB 连接体和 DMx 硫醇混合在一起并以相似方式反应至用于 NHS-PEG₄-马来酰亚胺反应的条件持续 1h 的反应时间。在反应完成之后不纯化, 合并等体积的 PEG₄-Mal-DM4 混合物和 SPDB-DM4 混合物。将未纯化的小份合并的反应混合物添加至抗体在磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中的溶液, 最终耦联条件为 4mg/ml Ab, 90% 磷酸盐缓冲液 (水性) / 10% DMA (v/v), pH 7.5。允许耦联反应在室温下进行 2h。使用在 pH 7.5 磷酸盐缓冲液 (水性) 中平衡的 G25 凝胶过滤柱, 使 Ab-DMx 耦合物从过量未反应的试剂和过量 DMx 纯化。耦合物在 pH 7.5 缓冲液中 4℃ 下保持 2 天, 以允许非共价连接或通过不稳定键连接至 Ab 的 DMx 物类解离。然后将耦合物透析过夜进入 pH 5.5 组氨酸 / 甘氨酸缓冲液, 然后经 0.22 μ m 滤器过滤以最终储存。通过测定耦合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量最终耦合物中每个 Ab 分子的 DMx 分子数目。

[0242] 通过比较 DTT (二硫苏糖醇) 处理耦合物以还原二硫键之前和之后的 DMx / 抗体 (D/A) 比率, 对通过本发明描述的方法制备的 Ab-(混合的 SPDB 和 PEG₄-Mal 连接体)-DMx 耦合物测试以测定 Ab 中可裂解与不可裂解连接体的加入百分比。为了维持 DTT 还原期间的 pH 为 7.5, 耦合物首先被透析进入 250mM HEPES 缓冲液 pH 7.5。然后通过 37℃ 下与 25mM DTT 反应 20min 来还原耦合物。在 DTT 反应之后, 使用在 250mM HEPES 缓冲液 pH 7.5 中平衡的 G25 凝胶过滤柱从反应混合物分离释放的 DMx 和 DTT。通过测定耦合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DMx 和抗体的已知消光系数来测量纯化产物中每个 Ab 分子的 DMx 分子平均数目。DTT 处理的耦合物的 D/A 与非 DTT 处理的耦合物的 D/A 之间的比率用于计算通过不可裂解键连接至 Ab 的 DMx 的百分比。两个其他样品 Ab-SPDB-DM4 和 Ab-PEG₄-Mal-DM4 耦合物用 DTT 处理, 分别作为阳性对照和阴性对照。通过比较 DTT 处理之前和之后的 D/A 比率, 对照不可裂解的 Ab-PEG₄-Mal-DM4 耦合物显示, 发现几乎所有结合的连接体如预期是不可裂解的 (93%)。通过本发明描述的方法制备的含有不可裂解的连接体和二硫化物连接体的 Ab-(混合的 SPDB 和 PEG₄Mal 连接体)-DMx 耦合物相对于完全

由可裂解连接体组成的 Ab-SPDB-DMx 轭合物的 DMx 损失量具有少 41% 的通过 DTT 处理裂解的 DMx。这说明,通过本发明描述的方法制备的 Ab-(混合的 SPDB 和 PEG₄-Ma1)-DMx 轭合物由大约 40% 不可裂解的连接体和 60% 可裂解的连接体构成。通过改变不可裂解的连接体试剂和可裂解的连接体试剂的初始比率,抗体与美登木素生物碱或其他效应物的轭合物可以用不同比率的不可裂解的连接体和可裂解的连接体制备。图 21 显示了上述脱糖基轭合物的质谱,其包括具有通过二硫化物连接体 (SPDB) 和不可裂解的连接体 (PEG) 二者连接的每个抗体分子平均 3.5 个美登木素生物碱分子的抗体。MS 显示带有可裂解和不可裂解连接体的单独轭合物物类 (图 21)。例如,称为 D2-PEG-SPDB 的轭合物峰带有一个二硫化物连接的美登木素生物碱分子和一个不可裂解的硫醚连接的美登木素生物碱分子;称为 D3-PEG-2SPDB 的轭合物峰带有两个二硫化物连接的美登木素生物碱分子和一个不可裂解的硫醚连接的美登木素生物碱分子;称为 D3-2PEG-SPDB 的轭合物峰带有一个二硫化物连接的美登木素生物碱分子和两个不可裂解的硫醚连接的美登木素生物碱分子。

[0243] 实施例 6. 使用 SMCC 连接体轭合抗体与美登木素生物碱 (图 22)。

[0244] 在 DMA 中制备浓度为 30–60mM 的 DM1 硫醇和 SMCC 异双官能连接体 (Pierce) 的储液。连接体和 DM1 硫醇在含有多达 50% v/v 200mM 水性琥珀酸盐缓冲液, 2mM EDTA, pH 5.0 的 DMA 中混合在一起而得到 1.4:1 摩尔当量的 DM1:连接体比率和等于 1 至 6mM 的 DM1 终浓度。混合后,使反应在室温静置 4h,然后小份反应混合物被稀释 10 倍以在 302–320nm 下测量吸光度以评估是否所有的马来酰亚胺已经与硫醇反应。当通过 UV 确定不再存在马来酰亚胺时,将小份反应添加至抗体在磷酸盐缓冲液 (pH 7.5–8.5) 中的水溶液,最终轭合条件为 2.5mg/ml Ab, 70–80% 磷酸盐缓冲液 (水性)/30–20% DMA (v/v)。允许轭合反应在室温下进行 3h。使用在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (水性) 中平衡的 G25 凝胶过滤柱,使 Ab-DM1 轭合物从过量未反应或水解的试剂和过量 DM1 纯化。然后将轭合物透析过夜进入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (水性) 并然后经 0.22 μm 滤器过滤以最终储存。通过测定轭合物在 252 和 280nm 下的吸光度并使用在这两个波长下 DM1 和抗体的已知消光系数来测量最终轭合物中每个 Ab 分子的 DM1 分子数目。类似地,可以制备抗体与 DM4 硫醇和 SMCC 的轭合物。使用 SMCC 连接体的抗体与 DM1 或 DM4 的这些轭合物含有硫醚不可裂解的连接体。

[0245] 通过本发明描述的方法制备的 Ab-SMCC-DM1 轭合物通过脱糖基化轭合物的 MS 分析来鉴定 (图 23)。通过本发明描述的方法制备的轭合物显示含有质量等于 Ab-(连接体-DM1)_n 的预期峰分布的预期 MS 谱。

[0246] 实施例 7. 使用含有异双官能二硫化物的连接体 (SSNPB, SPP) 轭合抗体与美登木素生物碱。

[0247] 通过类似于针对实施例 4 中 SPDB 连接体描述的方法类似的方法,含有异双官能连接体 SSNPB (N- 硫代琥珀酰亚胺基 -4-(5- 硝基 -2- 吡啶基二硫基) 丁酸酯) 和 SPP (N- 琥珀酰亚胺基 -3-(2- 吡啶基二硫基) 丙酸酯) 的二硫化物可用于制备二硫化物连接的抗体-美登木素生物碱轭合物。使用 SPDB (图 19) 制备的二硫化物连接的轭合物的结构与用 SSNPB (图 24) 制备的轭合物的结构相同。使用 SPDB 制备的二硫化物连接的轭合物的 MS 显示质量值对应于连接至抗体的美登木素生物碱分子的不同数目的离散峰。

[0248] 实施例 8. 抗体与含有具有线性烷基碳链的不可裂解的连接体的美登木素生物碱的轭合。

[0249] 类似于实施例 6 中针对 SMCC 连接体描述的方法,使用美登木素生物碱和具有线性烷基碳链的异双官能连接体的反应混合物制备含有具有线性烷基碳链的不可裂解连接体的轭合物。例如,如图 26 所示,人源化抗体与 DM1 的轭合物使用 BMPS(N-[β -马来酰亚胺基丙氧基琥珀酰亚胺酯)或 GMBS((N-[γ -马来酰亚胺基丁氧基]琥珀酰亚胺酯)连接体制备。在 60% DMA/40% (v/v) 200mM 琥珀酸盐缓冲液, pH5 中含有 BMPS 或 GMBS(8mM) 和 DM1 硫醇(10.4mM)的初始反应混合物显示当在 15 分钟检测时马来酰亚胺部分完全反应(基于在 302-320nm 下马来酰亚胺吸光度的衰退)。以 30 分钟间隔分两部分将反应混合物添加至 80% EPPS 水性缓冲液, pH 8.1 中 2.5mg/ml 的人源化抗体溶液,该溶液含有 20% DMA(v/v),总连接体以与抗体 8 摩尔当量添加。轭合物混合物在 4h 后凝胶过滤并经受 2 轮透析。DM1/抗体比率为 3.8 和 5.1 的轭合物以 71-75% 回收和高单体% (96.2-97.6%) 制备。用 GMBS 或 BMPS 制备的这些轭合物通过 HISEP HPLC 分析显示没有未轭合的游离药物。如图 25 所示,含有具有线性烷基链的不可裂解连接体的类似轭合物可以使用 AMAS(N-[β -马来酰亚胺基乙酰氧基]琥珀酰亚胺酯)或 EMCS(N-[β -马来酰亚胺基己酰氧基]琥珀酰亚胺酯)或磺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS,磺基-EMCS)制备。表 1 显示了通过本发明描述方法制备的选定轭合物的单体%,通过尺寸排阻色谱分析全部显示高单体%。为了比较,还显示了通过传统两步轭合方法(通过抗体与异双官能连接体初始反应,随后与美登素类硫醇反应)制备的轭合物的单体%。

[0250] 表 1. 通过本申请描述的方法与通过传统两步轭合方法制备的选定轭合物的单体%。

[0251]

轭合物	D/A	轭合方法	%单体
Ab-PEG ₄ -Mal-DM1	6.6	本发明	99.0
Ab-PEG ₄ -Mal-DM1	6.8	两步	98.0
Ab-磺基-Mal-DM1	3.6	本发明	99.0
Ab-磺基-Mal-DM1	4.0	两步	96.7
Ab-SMCC-DM1	4.0	本发明	98.6
Ab-SMCC-DM1	3.8	两步	97.0
Ab-PEG ₄ -Mal-DM4	6.2	本发明	96.9

Ab-PEG ₄ -Mal-DM4	6.1	两步	84.5
Ab-SPDB-DM4	4.1	本发明	99.4
Ab-SPDB-DM4	3.9	两步,一罐	95.7

抗体DM1 (或DM4) 和马来酰亚胺-PEG_n-NHS连接体的
反应混合物的耦合

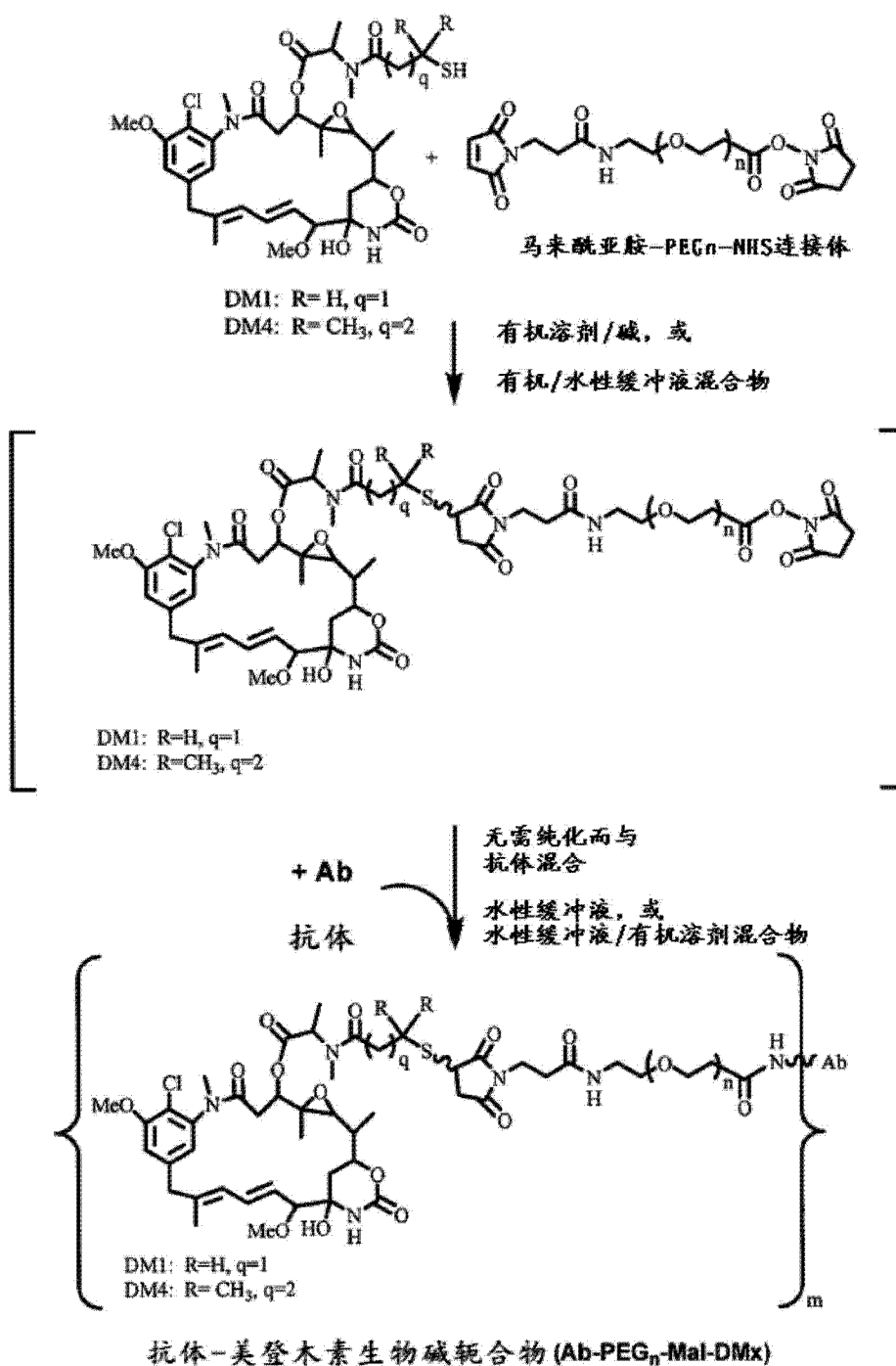


图 1

使用本发明描述的方法制备的Ab-(PEG4-Ma1)-DM4
轭合物与使用传统2步方法制备的轭合物的
还原SDS-PAGE。

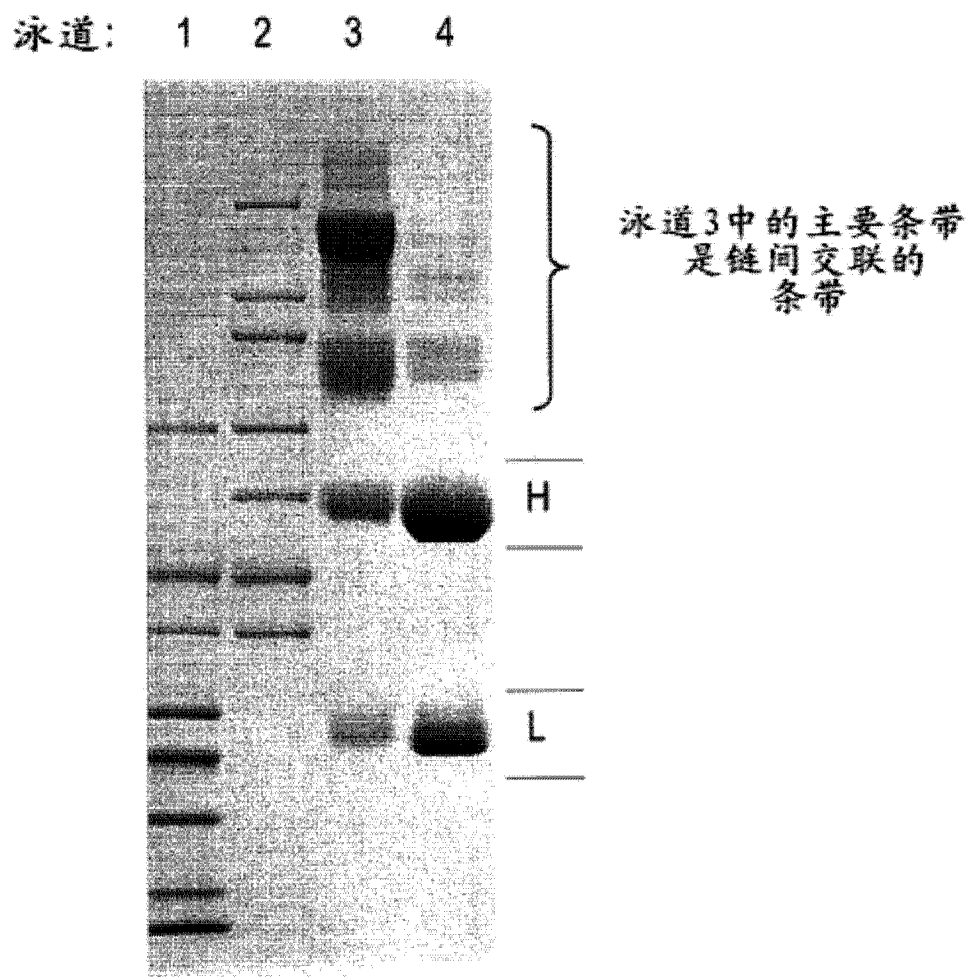


图 2

使用本发明描述的方法制备的抗体-(PEG4-Mal)-DM4
 轍合物与使用传统2步方法制备的轍合物的
 Protein LabChip电泳。

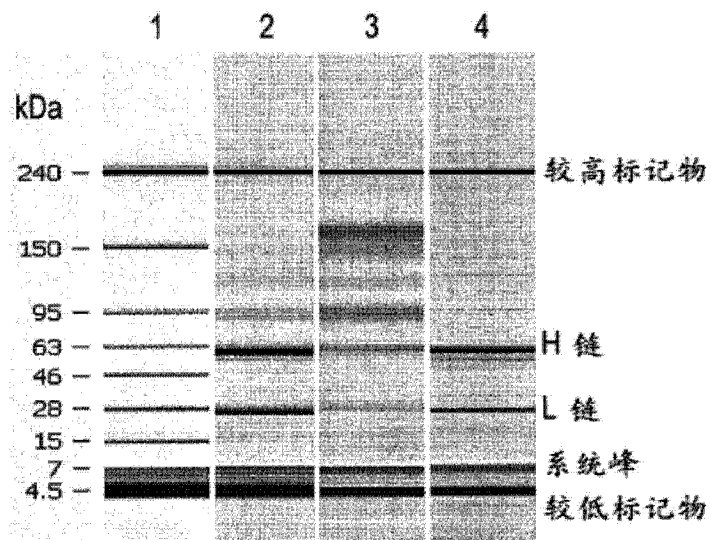


图 3A

		加载的总蛋白质质量%		
条带 MW (kDa)		未轍合的 Ab	Ab-PEG4-Mal-DM4 本发明方法	Ab-PEG4-Mal-DM4 2步方法
L 链	17	1	2	1
	27	30	30	8
	56	4	2	-
H 链	61	65	58	16
	94	-	6	26
	122	-	2	7
	147	-	-	12
	169	-	-	31

图 3B

使用本发明描述的方法制备的抗体-(PEG4-Ma1)-DM4
轆合物与使用传统2步方法制备的
轆合物的MS(去糖基化的轆合物样品
通过MS分析)。

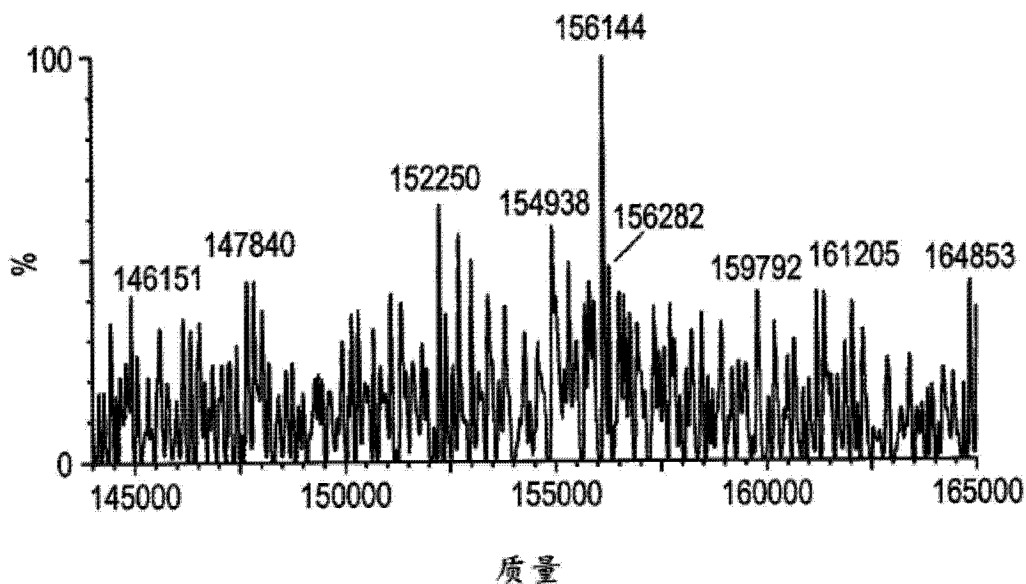


图 4A

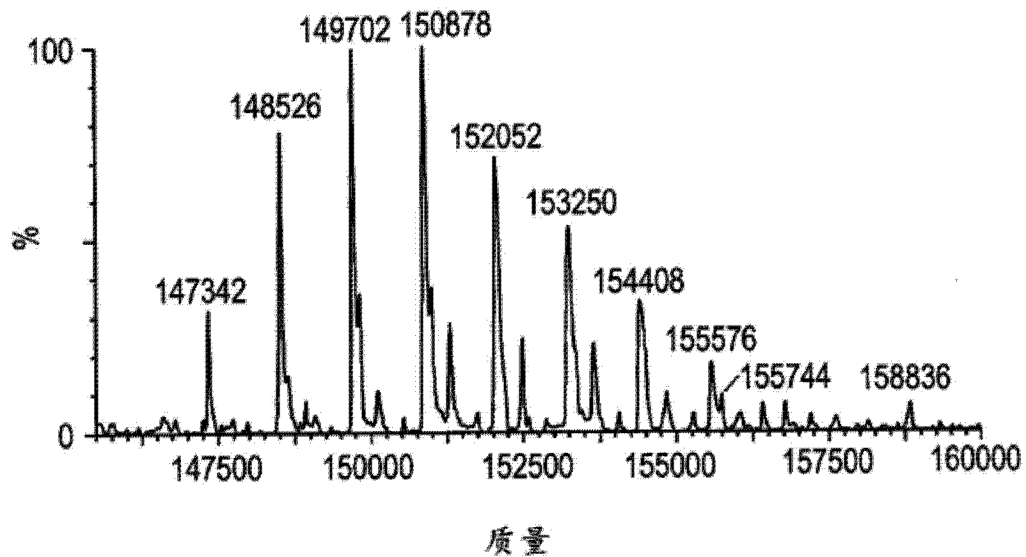


图 4B

具有 6.7 DM1/抗体的抗CanAg抗体-PEG4-Mal-DM1
轭合物(使用本发明描述的方法制备)对表达
CanAg抗原的COL0205细胞的结合与未修饰抗体
对表达CanAg抗原的COL0205细胞的结合

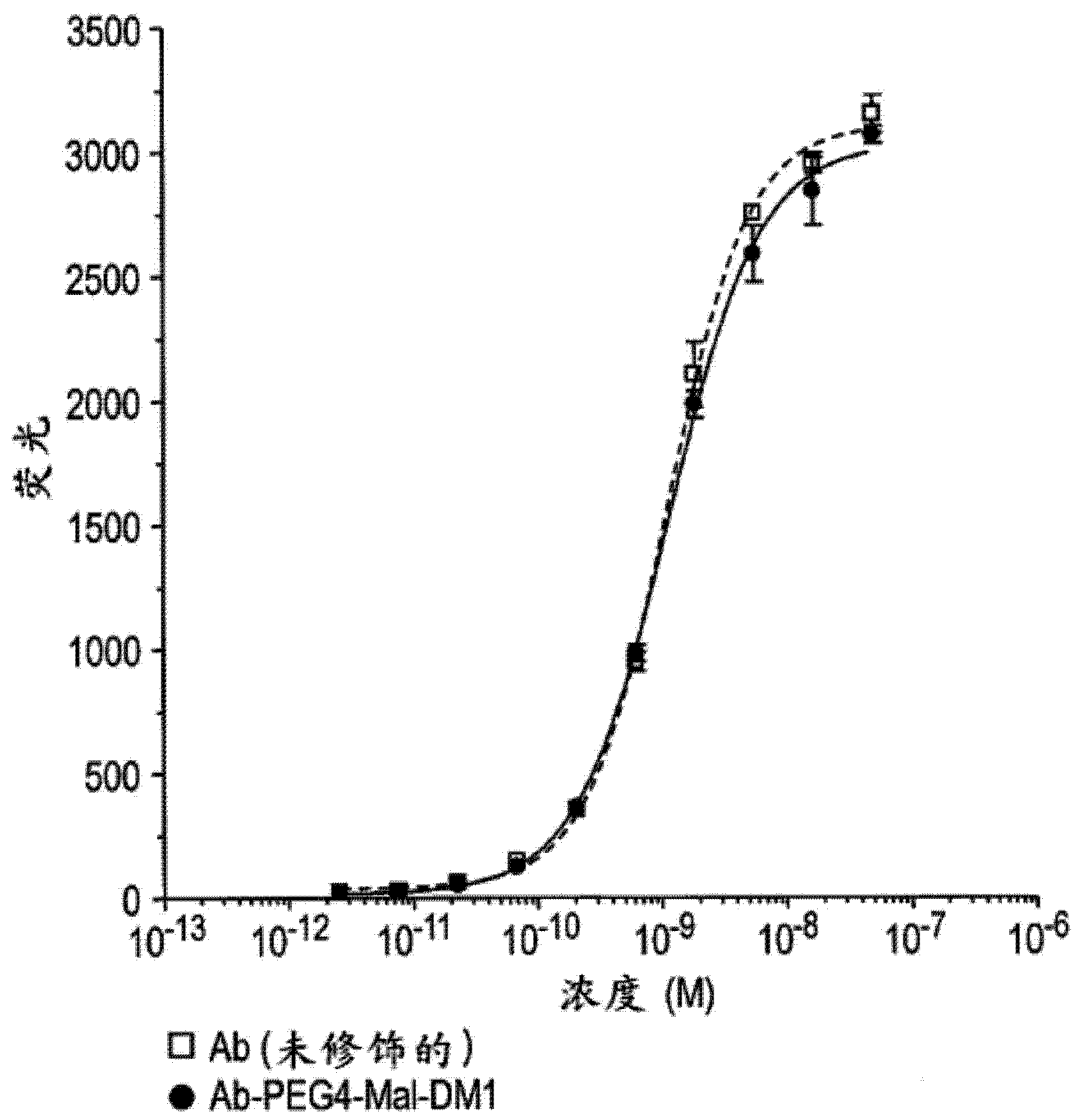


图 5

具有6.7 DM1/抗体的抗CanAg 抗体-PEG4-Mal-DM1
轭合物(使用本发明描述的方法制备)对表达CanAg
抗原的COL0205细胞的体外细胞毒性。

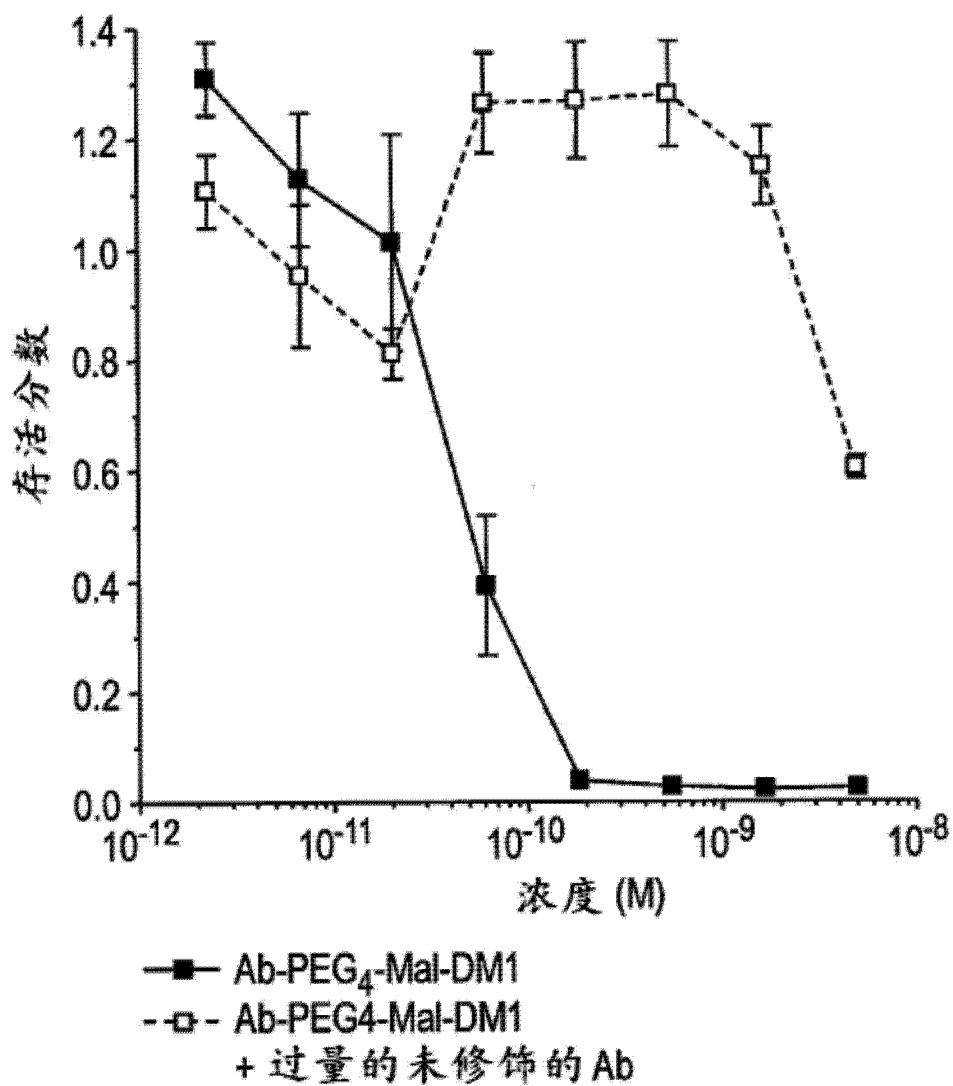


图 6

抗体与DM1 (或DM4) 和马来酰亚胺-磺基-NHS连接体的反应混合物的耦合。

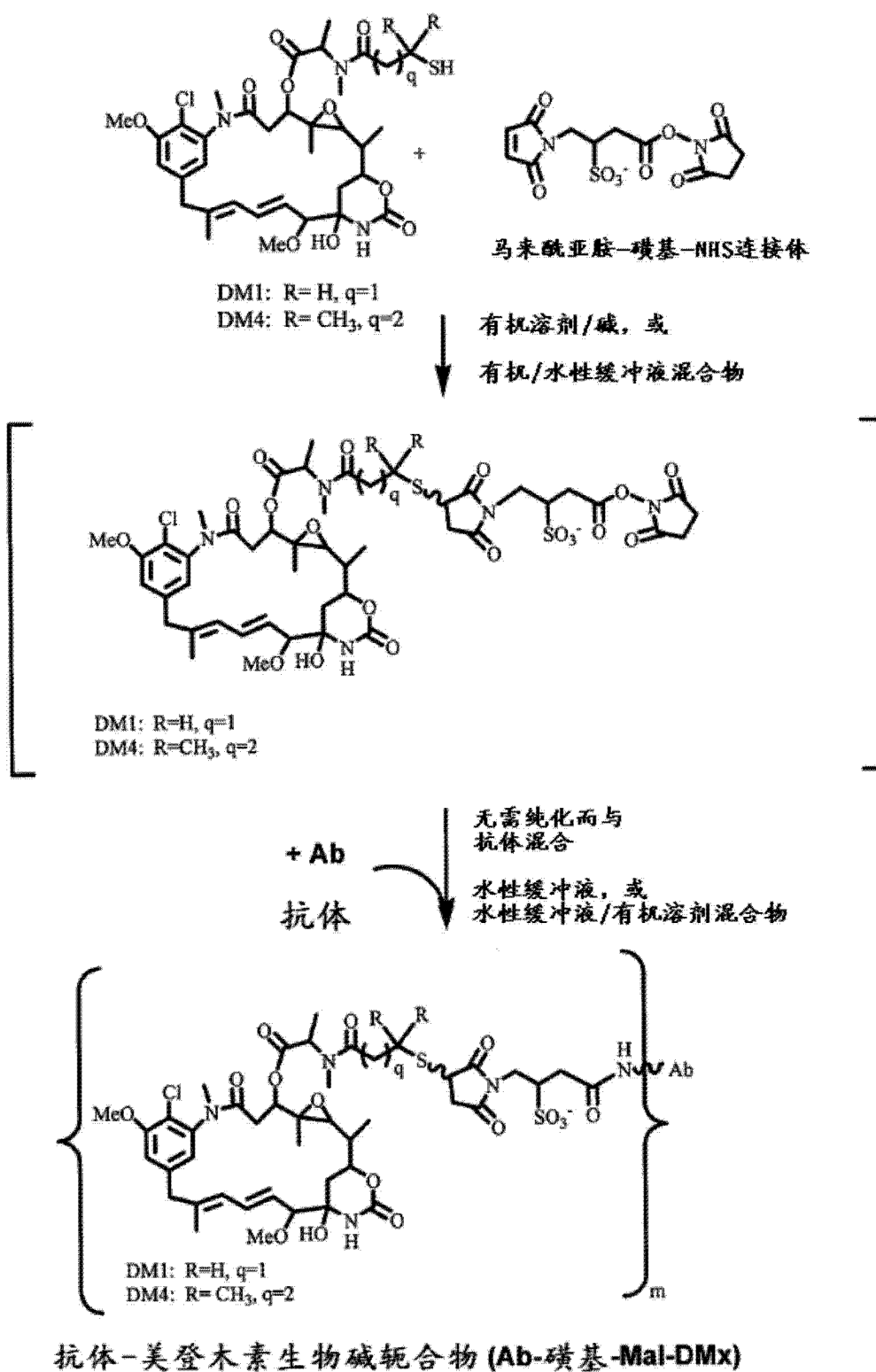


图 7

使用本发明描述的方法制备的
Ab-(磺基-Mal)-DM1轭合物与使用
传统2步方法制备的轭合物的还原
SDS-PAGE。

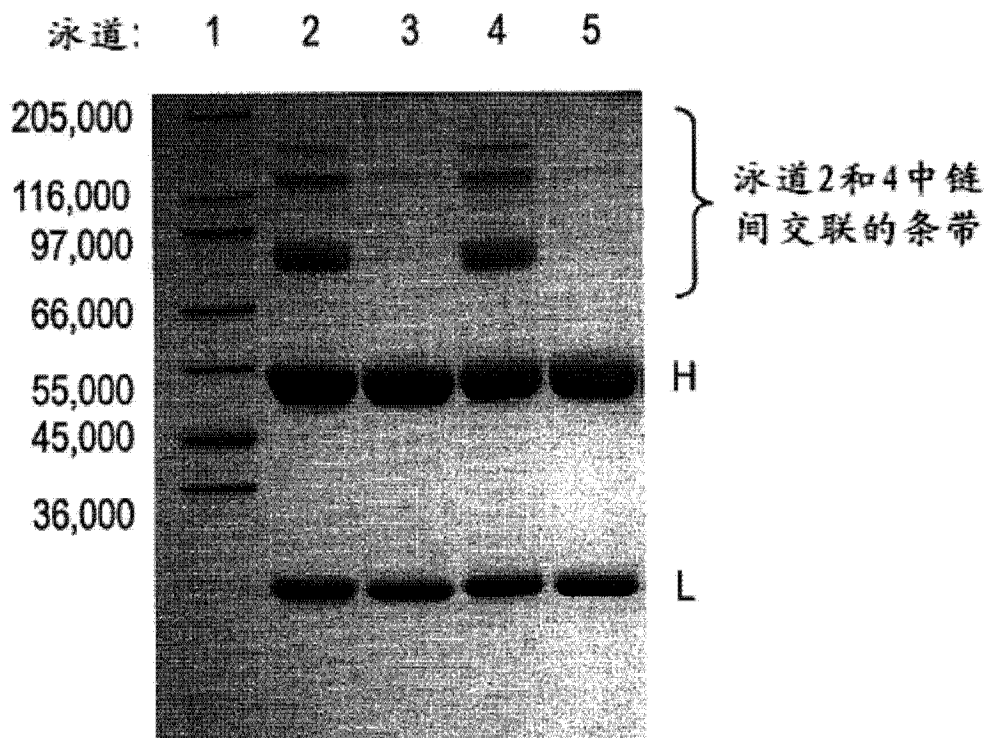


图 8

使用本发明描述的方法制备的抗体-(磺基-Mal)-DM1
 轍合物与使用传统2步方法制备的
 轍合物的Protein LabChip电泳。

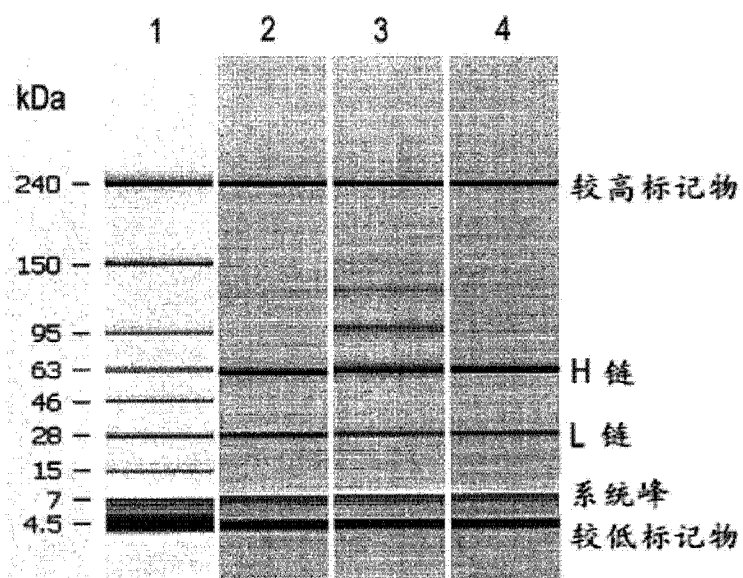


图 9A

		加载的总蛋白质质量%		
条带MW (kDa)		未轍合的 Ab	Ab-磺基-Mal-DM1 2步方法	Ab-磺基-Mal-DM1 本发明方法
L 链	18	-	-	1
	29	30	23	28
H 链	62	70	53	70
	99	-	15	1
	130	1	7	1
	152	-	3	-

图 9B

通过本发明描述的方法制备的
Ab-(3-磺基-Ma1)-DM1 轭合物 (3.6 D/Ab)。

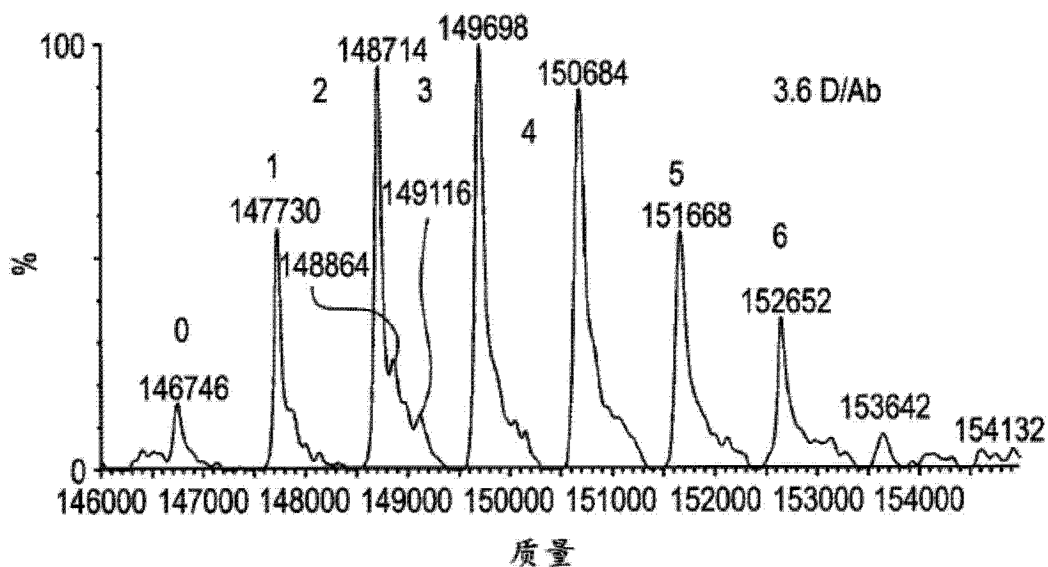


图 10A

通过传统2步轭合方法制备的Ab-(3-磺基
-Ma1)-DM1 轭合物 (4.0 D/Ab)。

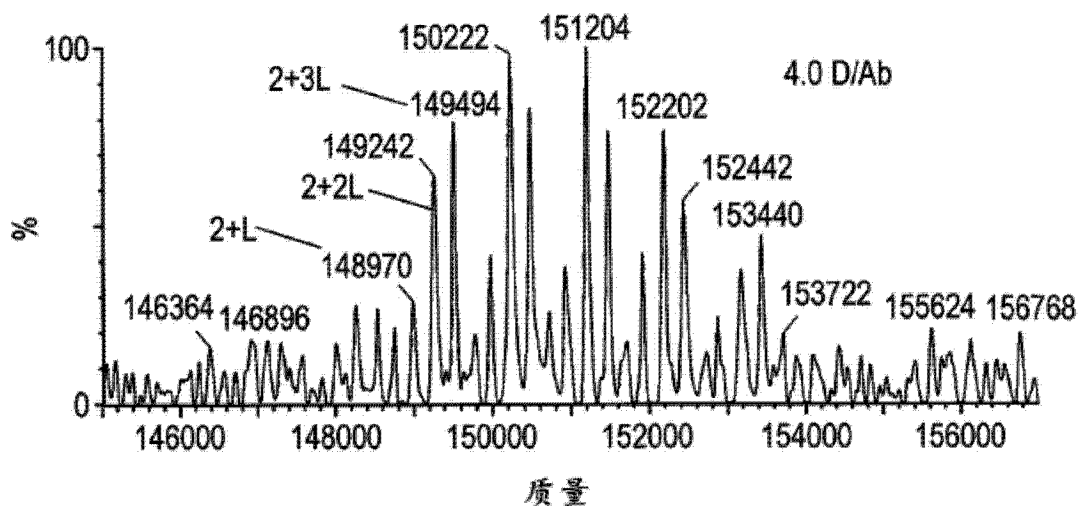


图 10B

具有 5.6 DM1/抗体的抗CanAg 抗体-磺基-Mal-DM1 轭合物
(使用本发明描述的方法制备)对表达CanAg抗原的、
COL0205细胞的结合与未修饰抗体对表达CanAg
抗原的COL0205细胞的结合。

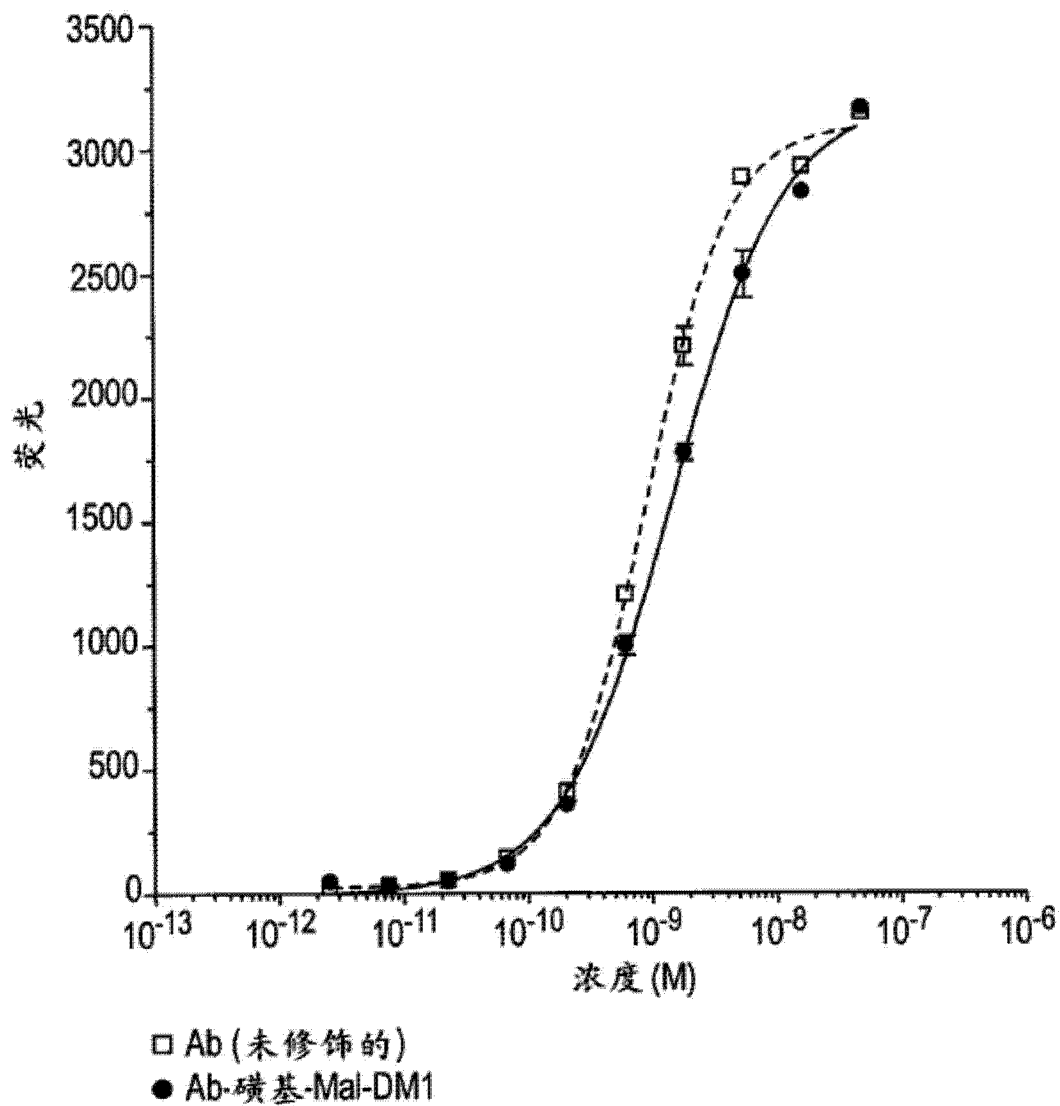


图 11

具有 5.6 DM1/抗体的抗CanAg 抗体-磺基-Mal-DM1 轭合物
(使用本发明描述的方法制备)对表达CanAg抗原的
COL0205细胞的体外细胞毒性。

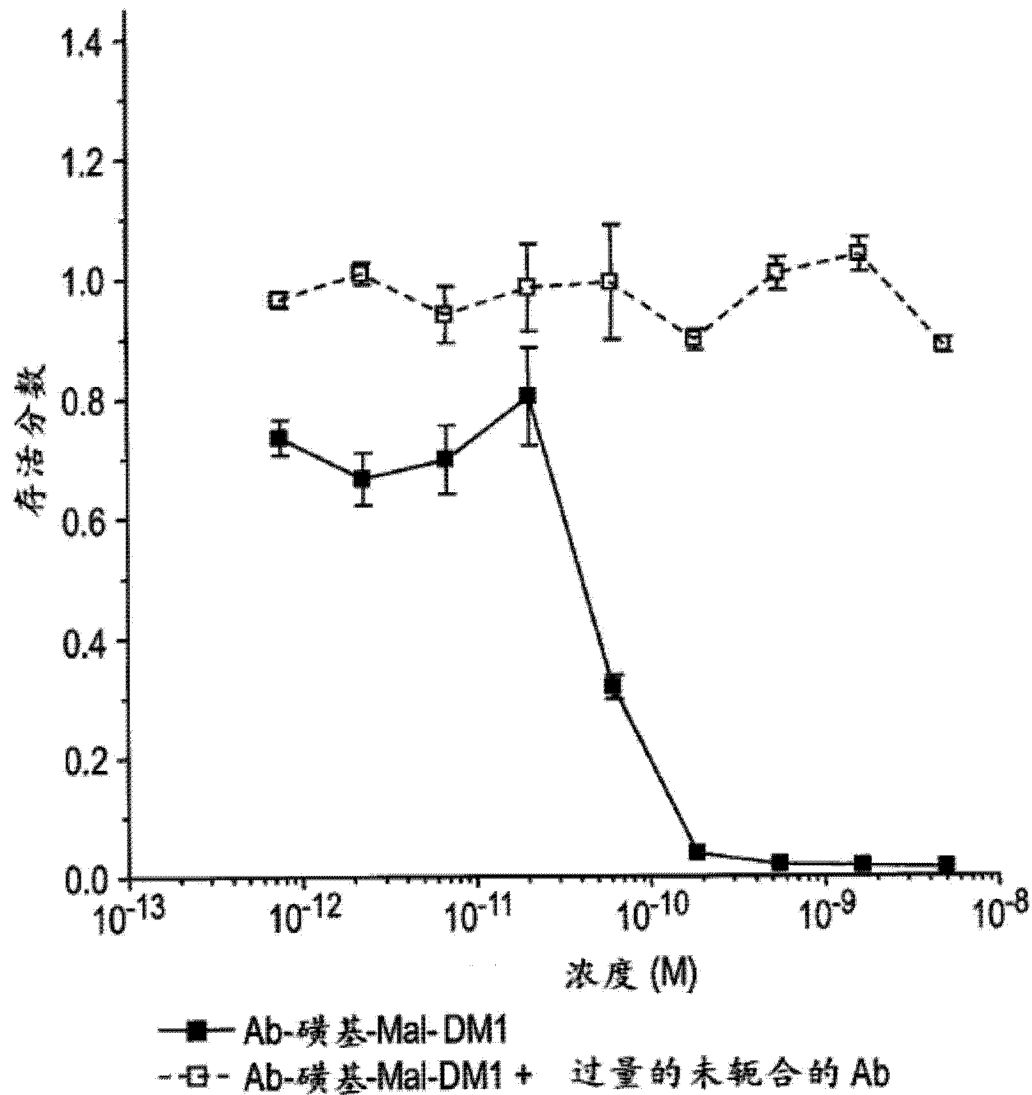


图 12

抗体与DM1 (或DM4) 和磺基-NHS SMCC连接体的
反应混合物的耦合

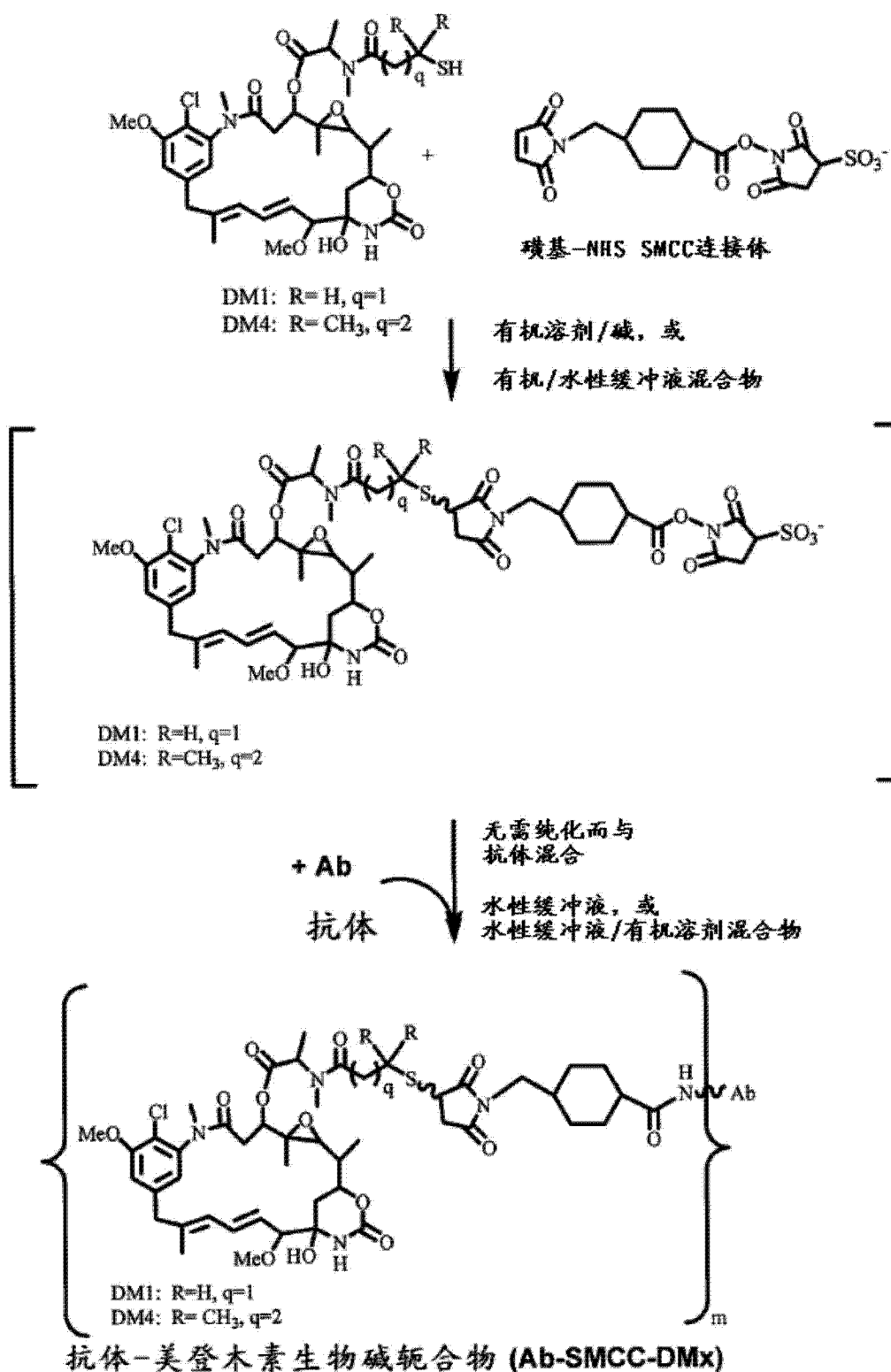


图 13

使用本发明描述的方法制备的Ab-(SMCC)-DM1
轭合物与使用传统2步方法制备的轭合物的
还原SDS-PAGE。

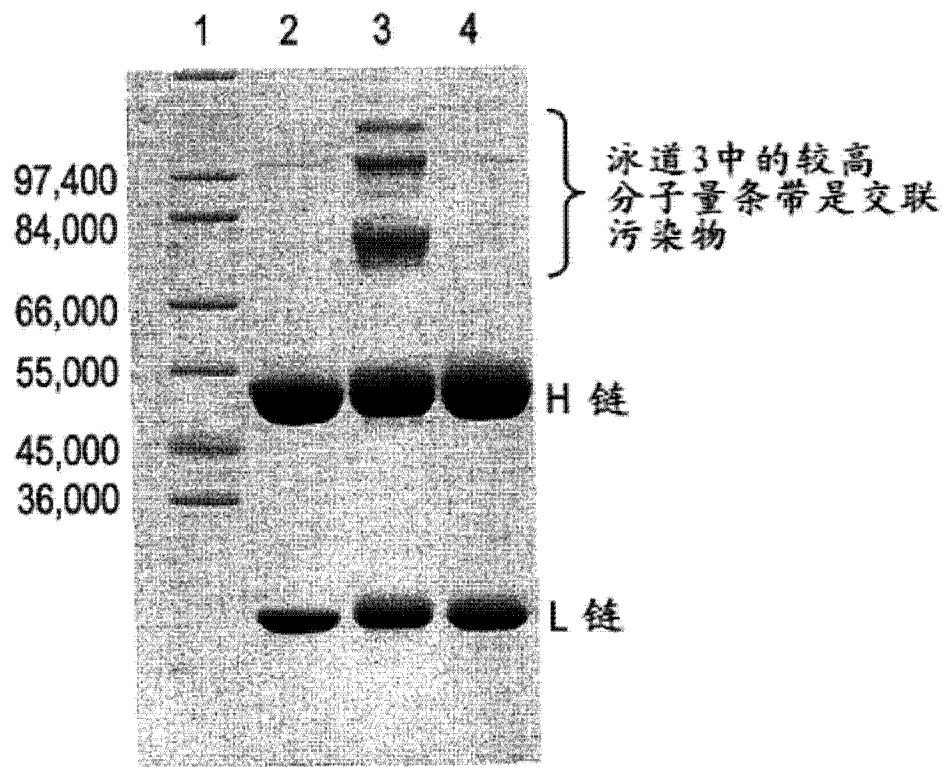


图 14

使用本发明描述的方法制备的抗体-(SMCC)-DM1 羧合物
与使用传统2步方法制备的羧合物的
Protein LabChip电泳。

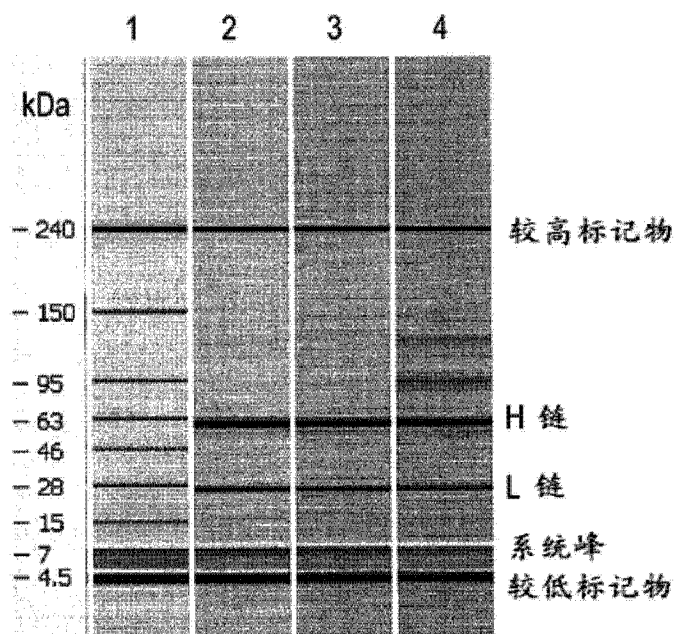


图 15A

		加载的总蛋白质质量%		
条带MW (kDa)		Ab-SMCC-DM1 本发明方法	未羧合的 Ab	Ab-SMCC-DM1 2-步方法
L 链	27	30	30	24
	56	2	2	2
H 链	61	67	68	54
	96	1	-	12
	129	1	-	6
	148	-	-	2

图 15B

通过传统2步耦合方法
制备的Ab SMCC DM1, 3.1D/Ab。

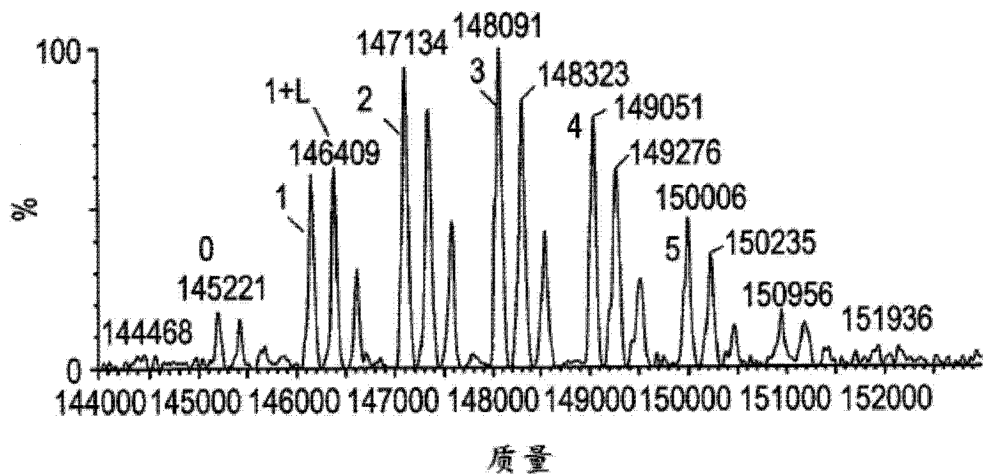


图 16A

通过本发明描述的方法制备的
Ab SMCC-DM1, 3.1D/Ab。

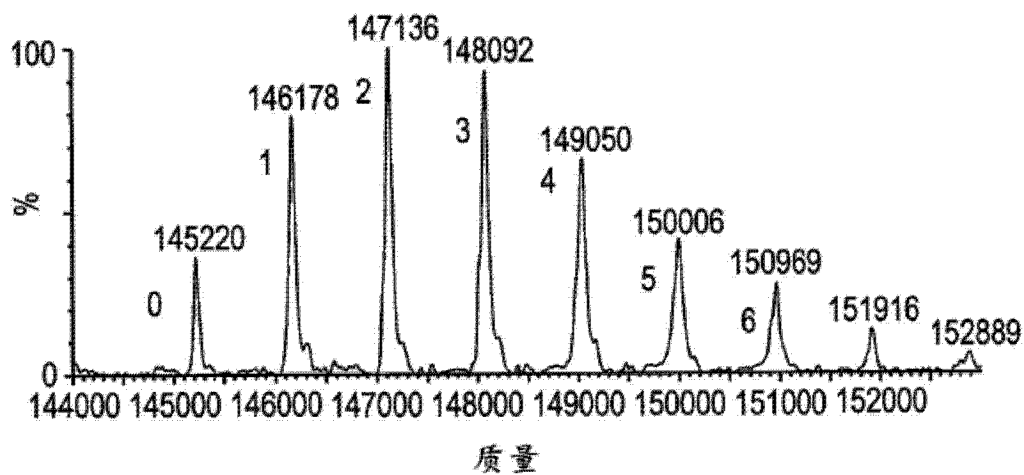


图 16B

所提出的通过传统2步方法
 耦合期间链间交联和马来酰亚胺失活
 的机制。

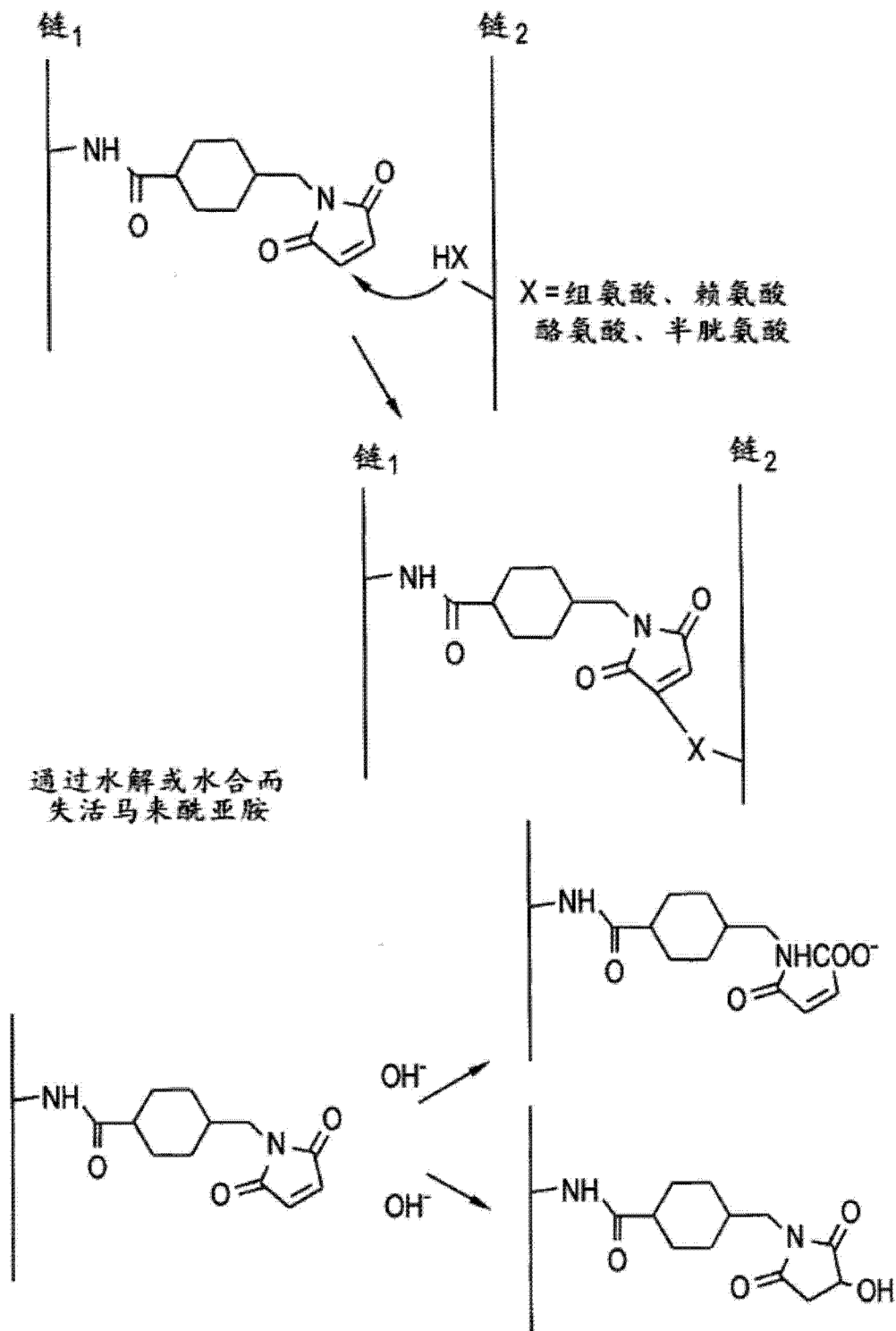


图 17

使用本发明描述的方法制备的Ab-(磺基-Mal)-DM4轭合物的非还原SDS-PAGE以及在抗体轭合反应之前使用4-马来酰亚胺丁酸猝灭游离DM4硫醇(在初始DM4+ NHS-磺基-Mal异双官能试剂偶联反应之后)。

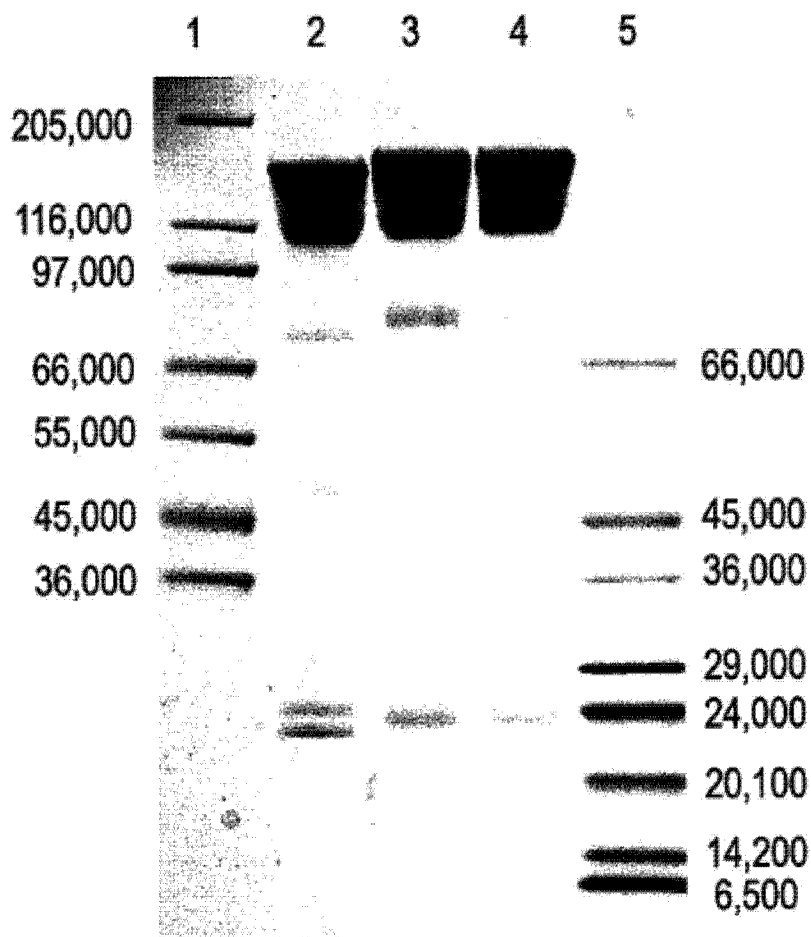


图 18

使用DM1 (或DM4) 和SPDB连接体的反应混合物制备
二硫化物连接的抗体-美登木素生物碱衍生物

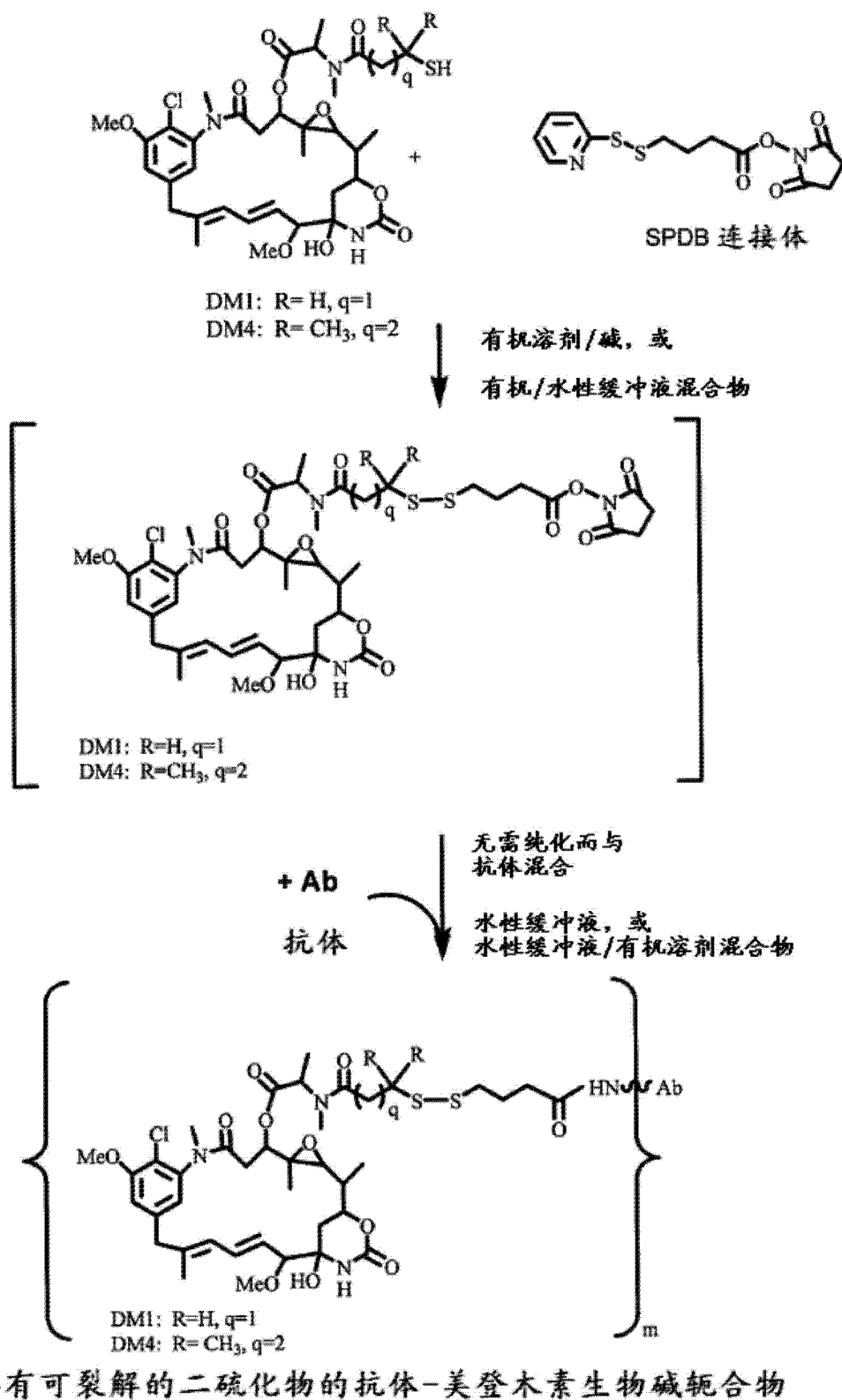


图 19

通过抗体与DM1 (或DM4) 与SPDB和NHS-PEG_n-Mal
连接体两者的未纯化反应混合物耦合而制备
具有二硫化物和不可裂解的PEG_n-Mal连接体的
抗体-美登木素生物碱衍生物

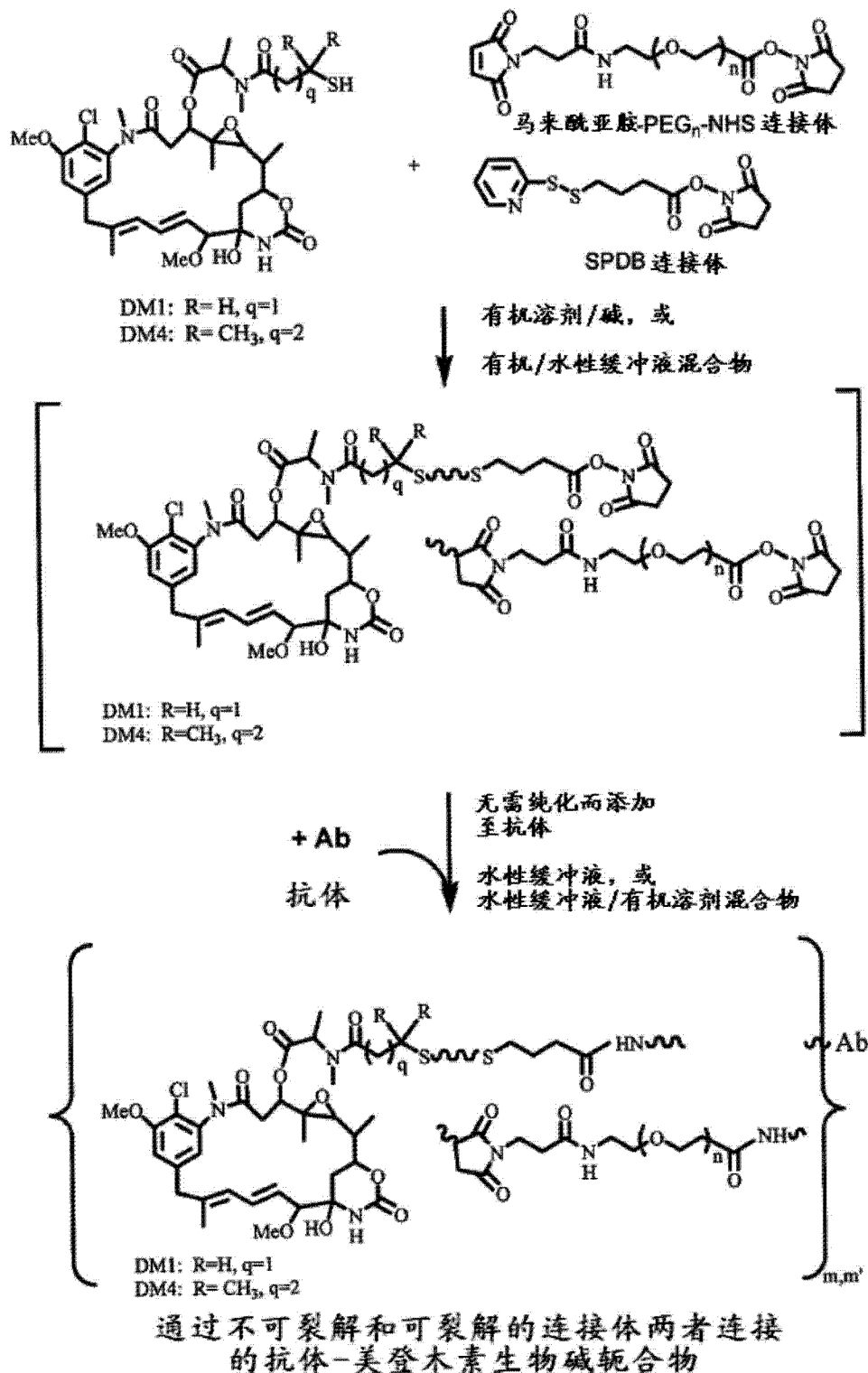
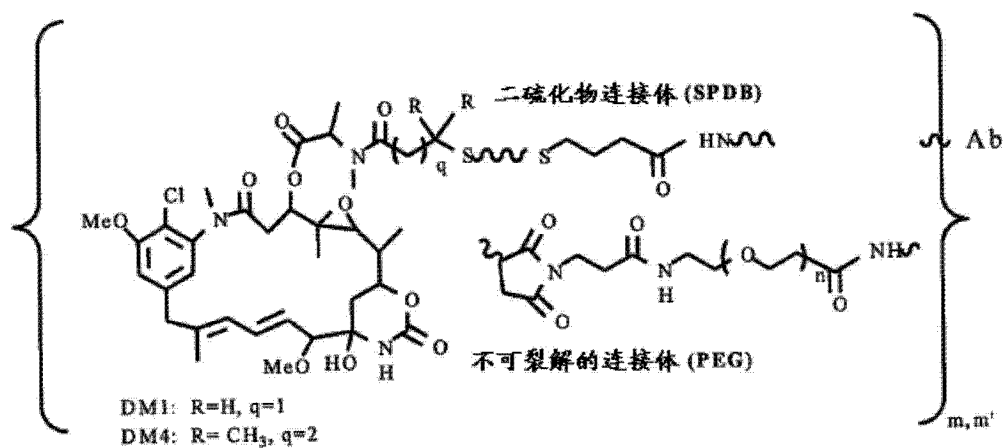


图 20

具有二硫化物和不可裂解的PEG4-Mal连接体的抗体-美登木素生物碱衍合物(通过抗体与DM1(或DM4)与SPDB和NHS-PEG_n-Mal连接体两者的未纯化反应混合物耦合而制备)的MS。该衍合物具有每个抗体分子3.5个美登木素生物碱分子的平均载量。



通过不可裂解和可裂解连接体两者连接的
抗体-美登木素生物碱衍合物

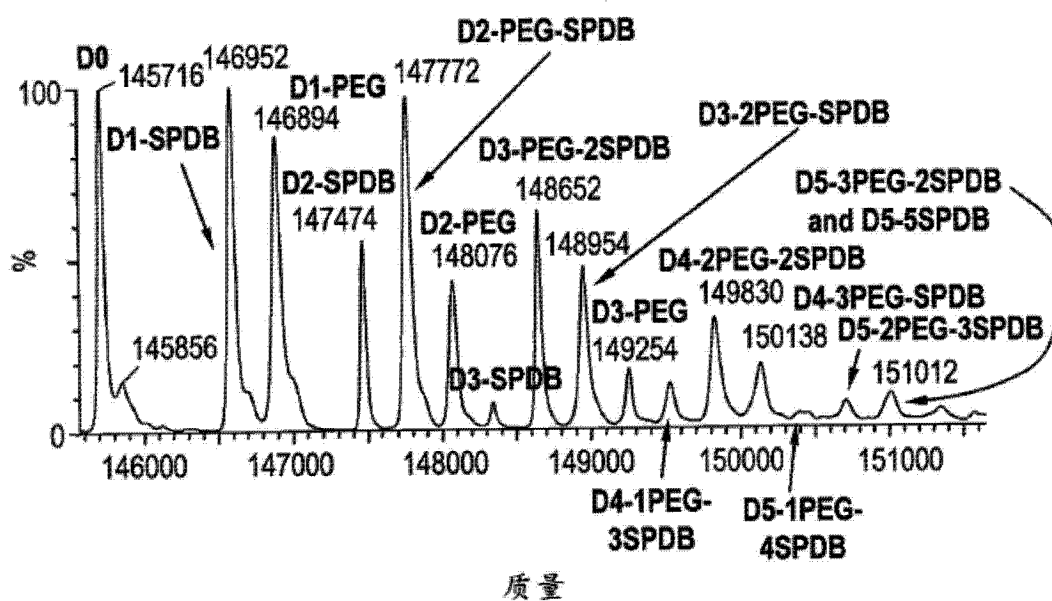


图 21

抗体与DM1 (或DM4) 和SMCC连接体的反应
混合物的耦合

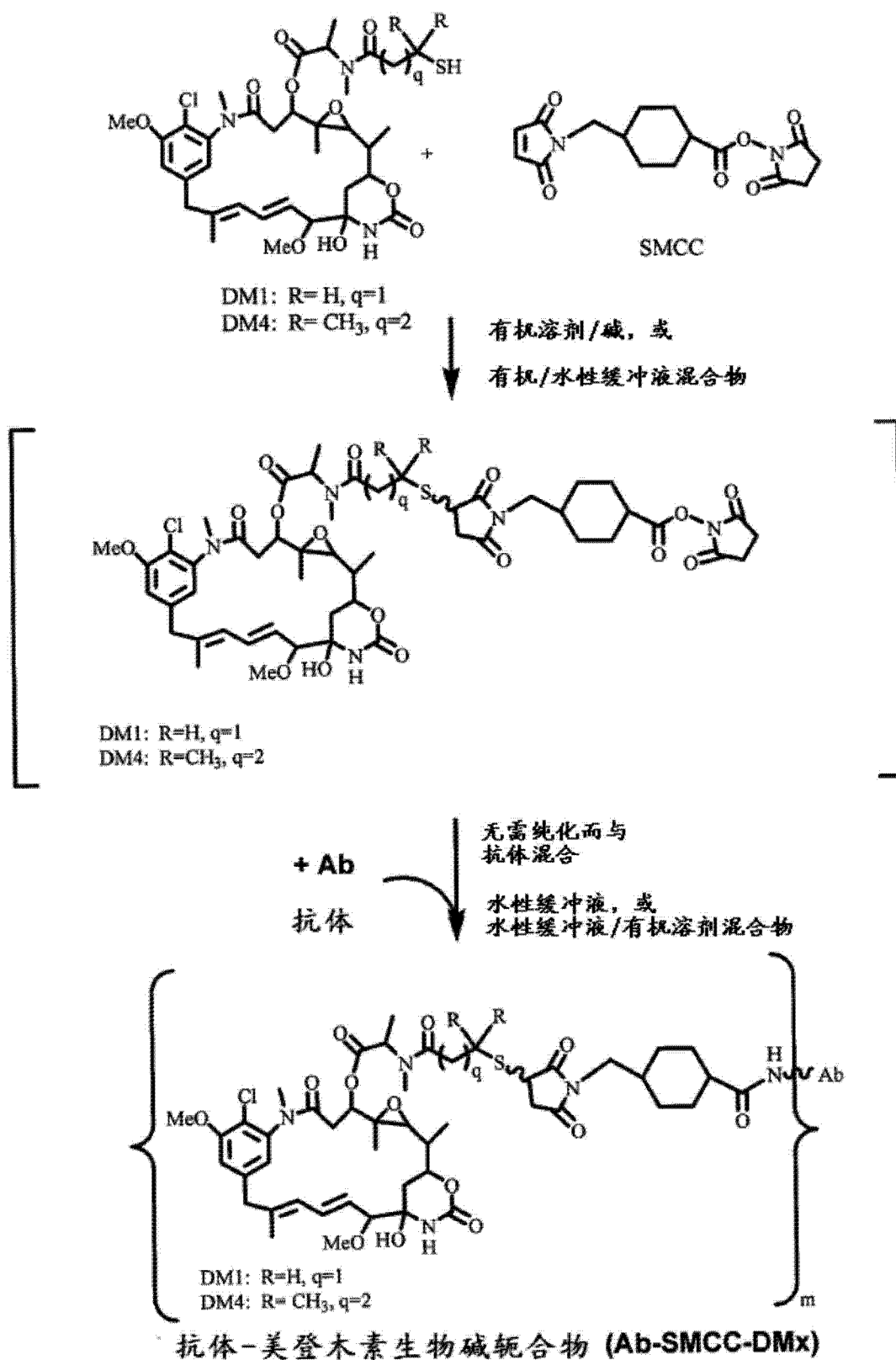


图 22

通过本发明描述的方法使用SMCC制备的抗体-SMCC-DM1轭合物的MS，所述轭合物含有平均3.1 DM1/抗体。

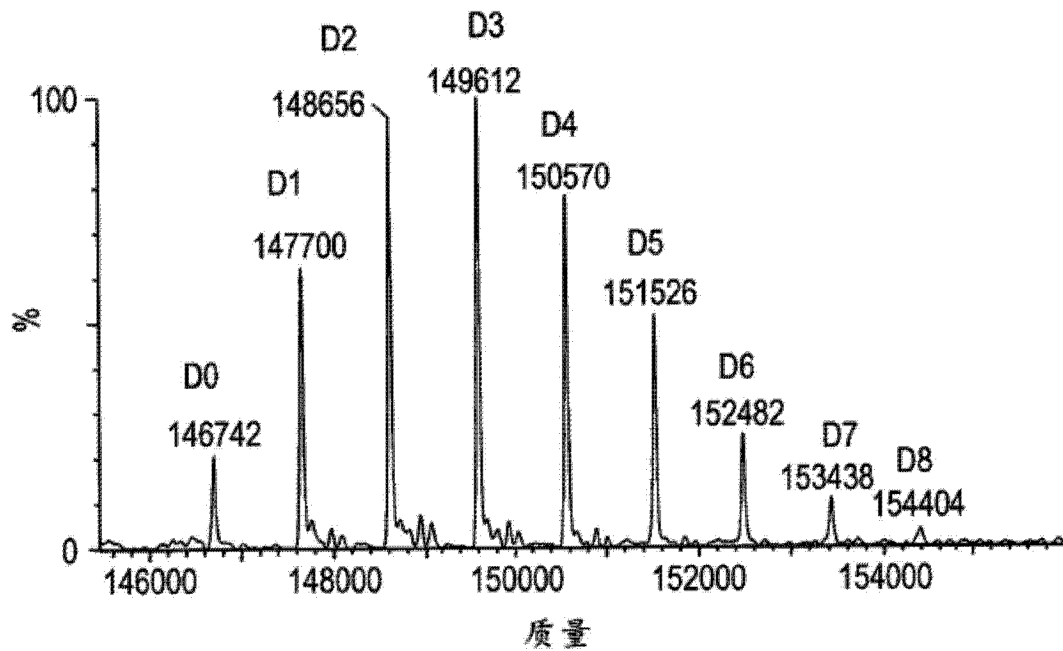


图 23

使用DM1 (或DM4) 和SSNPB连接体的反应混合物
制备二硫化物连接的抗体-美登木素生物碱衍生物

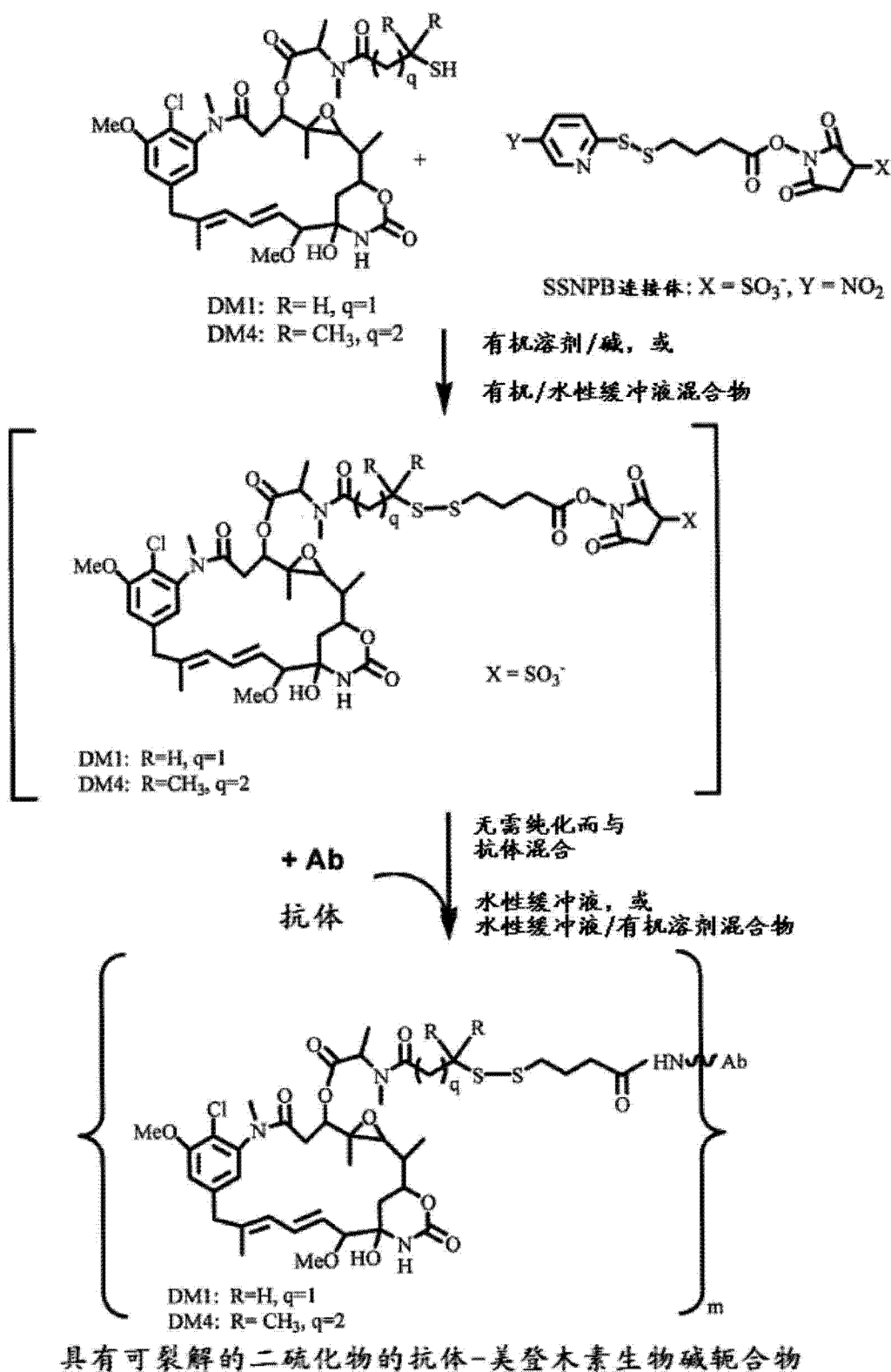


图 24

抗体与DM1 (或DM4) 和具有脂肪族线性碳链
的异双官能连接体的反应混合物的轭合

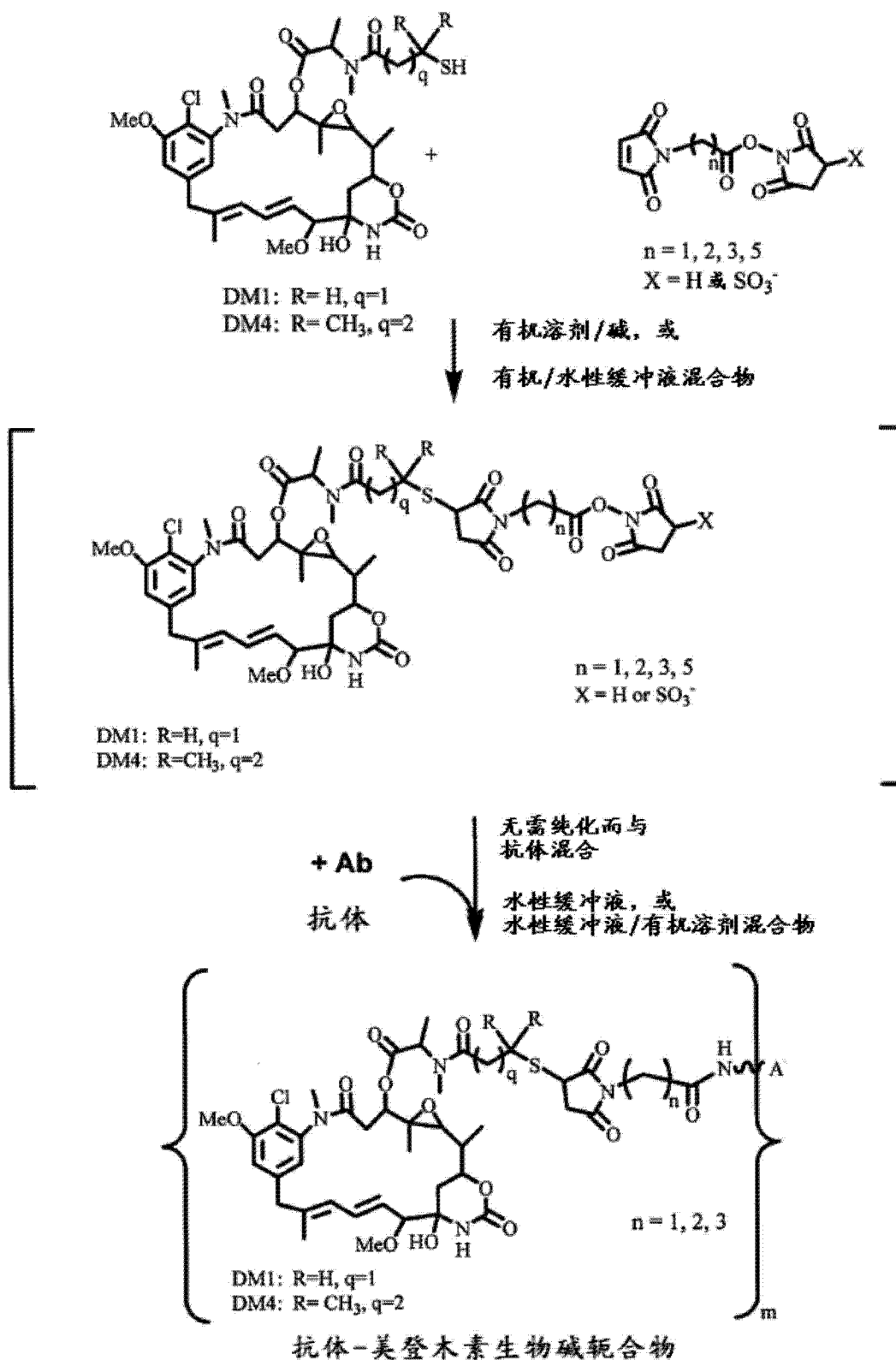


图 25

Abstract

This invention describes a method of conjugating a cell binding agent such as an antibody with an effector group (e.g., a cytotoxic agent) or a reporter group (e.g., a radionuclide), whereby the reporter or effector group is first reacted with a bifunctional linker and the mixture is then used without purification for the conjugation reaction with the cell binding agent. The method described in this invention is advantageous for preparation of stably-linked conjugates of cell binding agents, such as antibodies with effector or reporter groups. This conjugation method provides in high yields conjugates of high purity and homogeneity that are without inter-chain cross-linking and inactivated linker residues.