



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89108469.X

[51] Int.CI⁵

C07K 15/12

[43] 公开日 1990年5月30日

[22]申请日 89.11.10

[30]优先权

[32]88.11.10 [33]US [31]269,815

[71]申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

[72]发明人 罗素·拉维恩·巴顿

[74]专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 汪 洋 杨九昌

C07K 15/28

C07H 15/252 C07H 15/26

C07D519/00 C07C 69/38

说明书页数: 51 附图页数:

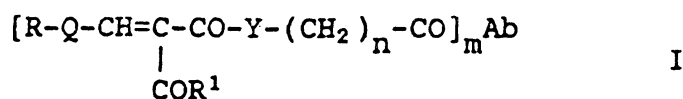
[54]发明名称 抗体-药物结合物

[57]摘要

使用由丙二酸酯构成的连接子制备了药物与抗体或其抗原识别片段的结合物,其中抗体或其片段通过羰基连接到丙二酸酯的一个羧基上的酯或酰胺基上,而药物则通过亚甲基连接到丙二酸酯的2位碳原子上。

权 利 要 求 书

1. 一种具有下式的药物结合物



其中

Ab 是一种抗体或其识别抗原的片段，它可识别与需要传递药物的细胞相结合的抗原；

Q 是 -NH-，-O-，或 -S-；

R-Q- 是药物残基，它具有可参与反应的氨基、羟基或硫醇基团；

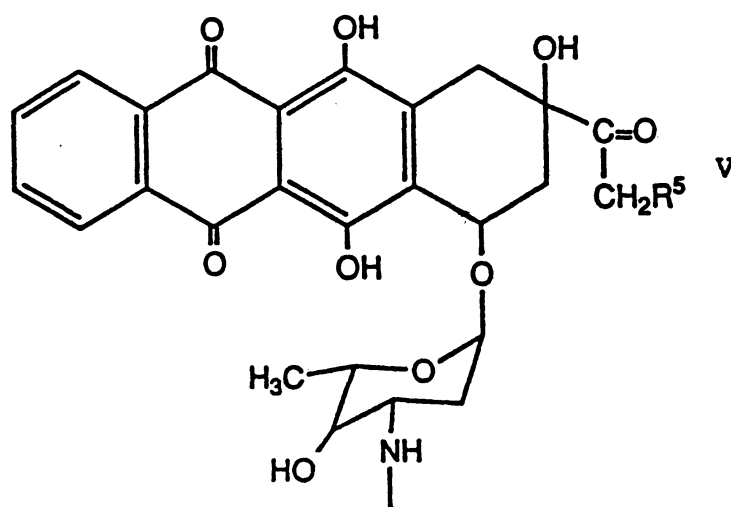
R¹ 是羧酸保护基；

Y 是 -O-，-NH-，-NCH₃- 或 -NC₂H₅-；

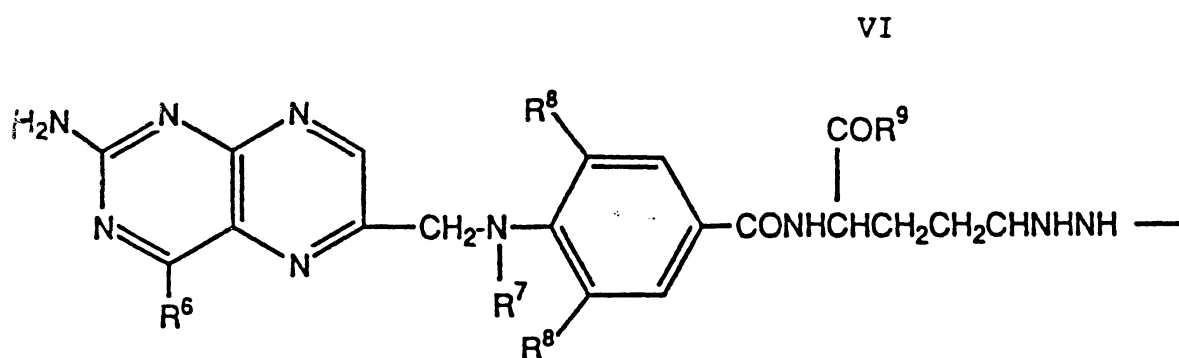
n 是从 1 至大约 8 的整数；

m 是从 1 至大约 10 的整数。

2. 权利要求 1 的结合物，其中，药物是具有下式之一的细胞毒性药物



其中 R^5 是氢或羟基；

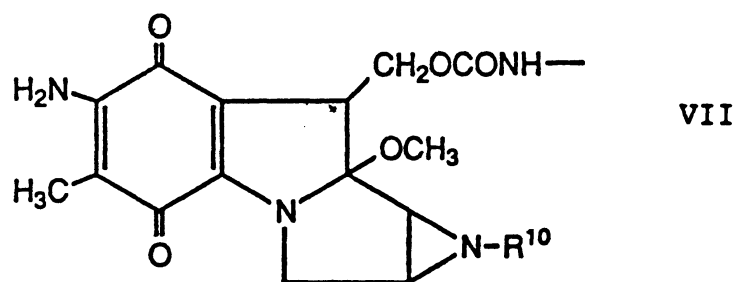


其中 R^6 是氨基或羟基；

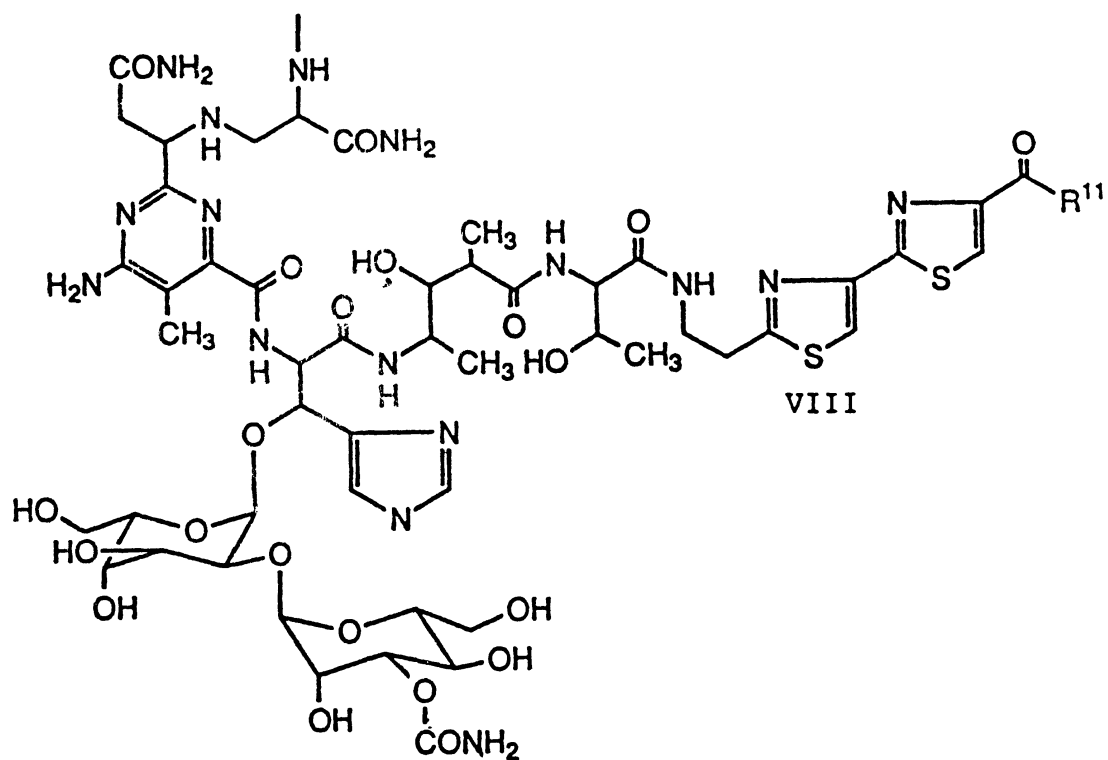
R^7 是氢或甲基；

R^8 是氢、氟、氯、溴或碘；

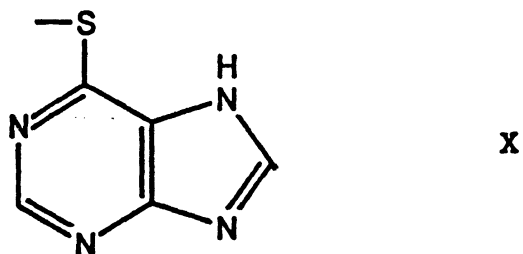
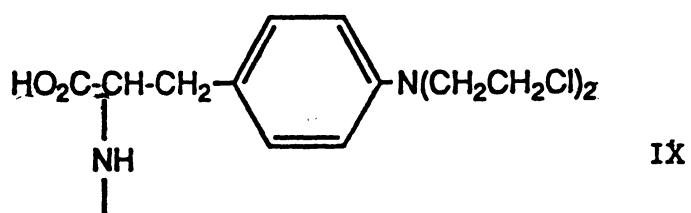
R^9 是羟基或一种构成羧酸盐的半分子；

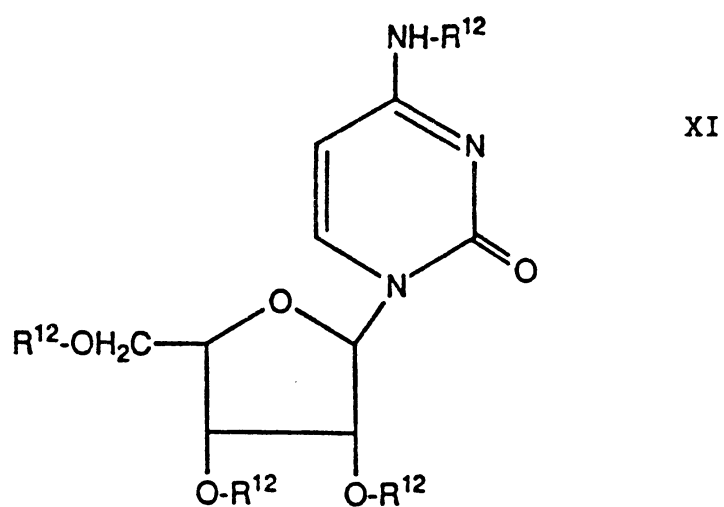


其中 R^{10} 是氢或甲基；

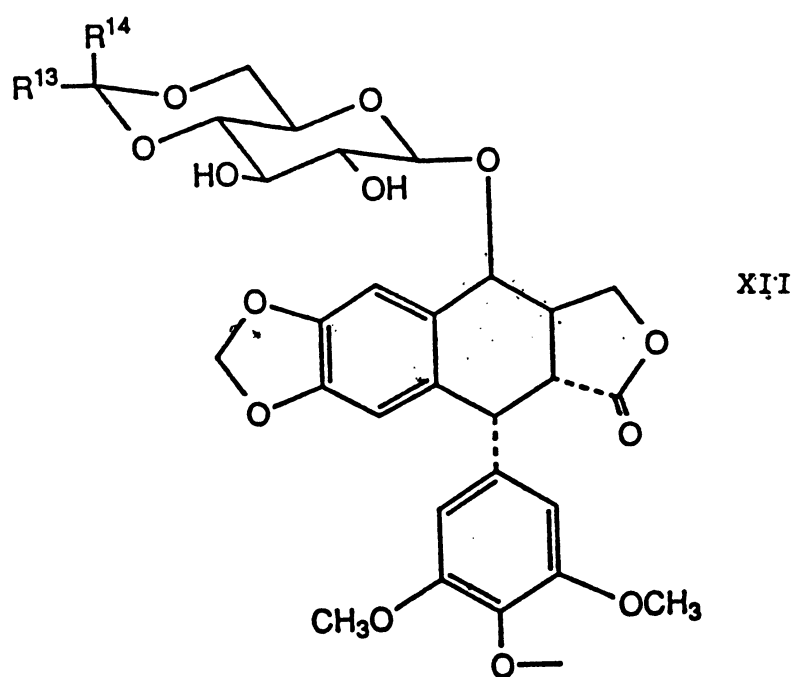


其中R¹¹是氨基、C₁-C₃烷基氨基、二(C₁-C₃烷基)-氨基或C₄-C₆聚亚甲基氨基；





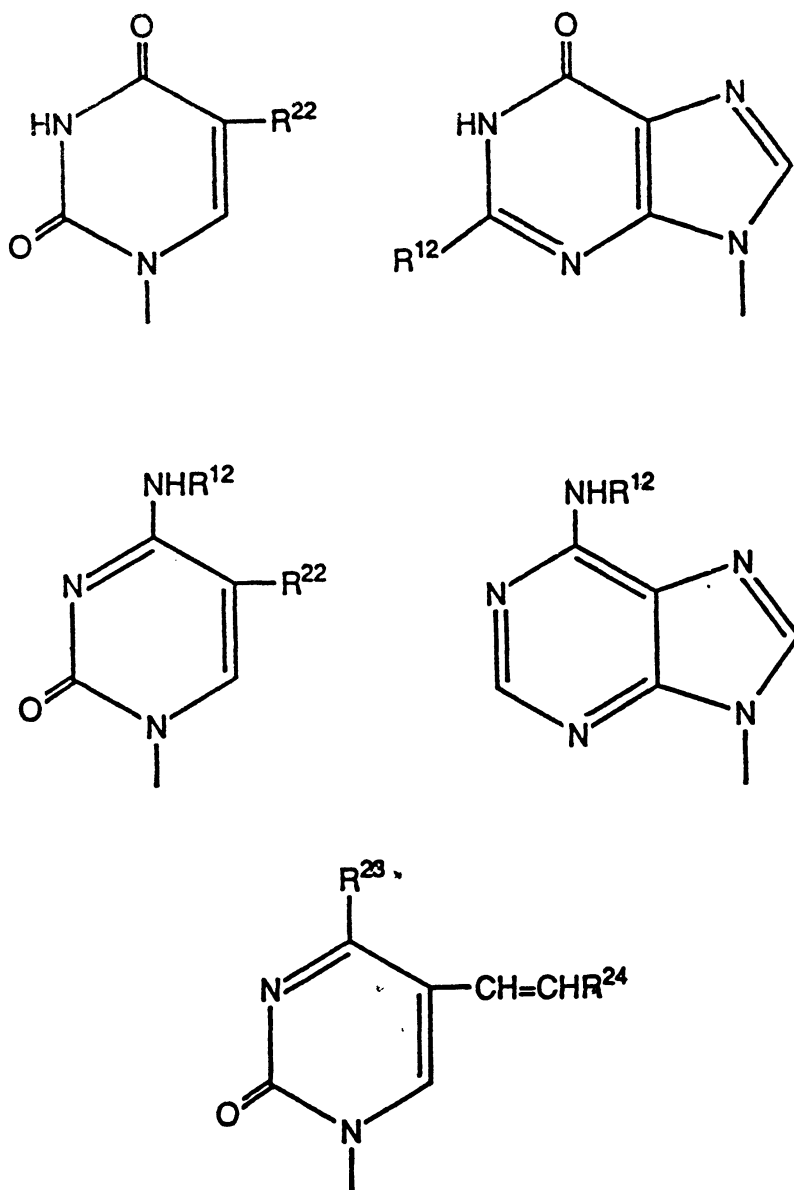
其中， R^{12} 半分子中的一个为一个键，其它的则为氢；



其中 R^{13} 是氢或甲基；

R^{14} 是甲基或噻吩基；

其中， R^{21} 是下式之一的碱基



其中， R^{22} 是氢、甲基、溴、氟、氯或碘；

R^{23} 是 $-OR^{12}$ 或 $-NHR^{12}$ ；

R^{24} 是氢、溴、氯或碘。

3. 权利要求 1 或 2 的结合物，其中的抗体是单克隆抗体。

4. 权利要求1-3中任何一项的结合物, 其中的 m 为大约3至大约8。

5. 权利要求1-4中任何一项的结合物, 其中的 n 为1至大约6。

6. 权利要求5的结合物, 其中的 n 为1至大约3。

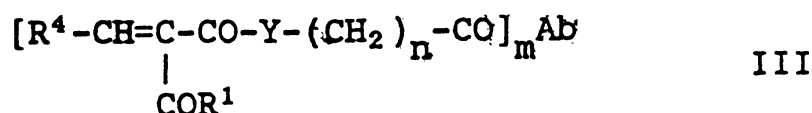
7. 前述权利要求中任何一项的结合物, 其中的药物为式V、式VI或式XIII的药物。

8. 一种药物组合物, 它含有非肠道施用的基质及权利要求1-7中任何一项的结合物。

9. 权利要求1-7中任一项的结合物作为药物使用。

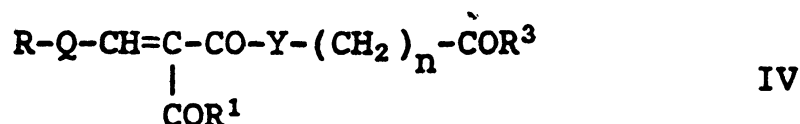
10. 一种制备如权利要求1-7中任何一项所要求的式I的药物结合物的方法, 包括

(A)使具有下式的修饰抗体



其中 R^1 、Y、 n 、 m 和Ab都如权利要求1所定义, R^4 是 C_1 - C_4 烷氧基, 与式为 $R-QH$ 的药物反应, 其中Q和 $R-Q-$ 都如权利要求1所定义; 或

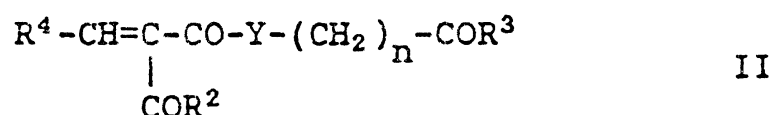
(B)使具有下式的衍生药物



其中Q、 $R-Q-$ 、 R^1 、Y和 n 都如权利要求1所定义, R^3 是羟基、羧酸保护基团或构成羧酸盐的半分子, 与如权利要求1所定义的式子

为Ab 的抗体或抗体片段反应。

1 1。一种具有下式的丙二酸酯



其中n和Y如权利要求1所定义；

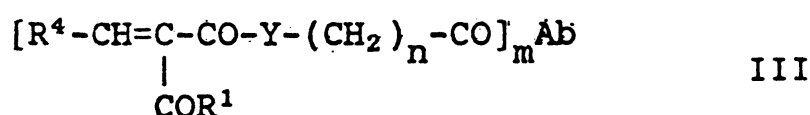
R² 是羟基、一个羧酸保护基团或构成羧酸盐的半分子；

R³ 是羟基、一个羧酸保护基团、一个羧酸活化基团或一个构成羧酸盐的半分子；

R⁴ 是C₁-C₄ 烷氧基。

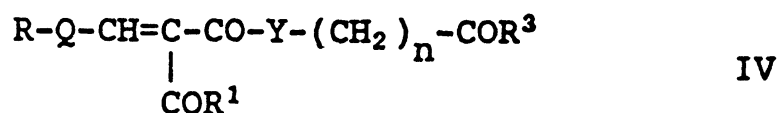
1 2。权利要求11 的丙二酸酯，其中的R² 是一个羧酸保护基团，R³ 是一个羧酸保护基团或羧酸活化基团，n是从1至大约6。

1 3。一种具有下式的修饰抗体或抗体片段



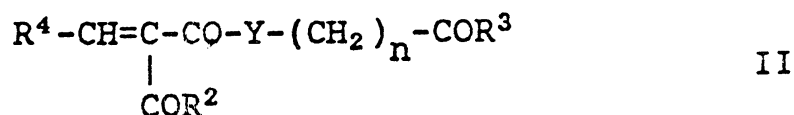
其中R¹、Y、n、m和Ab 如权利要求1所定义，R⁴ 是C₁-C₄ 烷氧基。

1 4。一种具有下式的衍生药物



其中Q、R-Q-、R¹、Y和n都如权利要求1所定义，R³ 是羟基、一个羧酸保护基团、一个羧酸活化基团或一个构成羧酸盐的半分子。

15. 一种制备如权利要求13所定义的式Ⅲ的修饰抗体或抗体片段的方法，包括使具有下式的丙二酸酯与如权利要求1定义的式子为A_b的抗体或抗体片段反应，



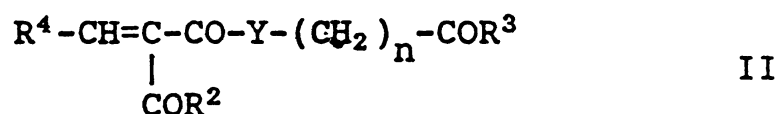
其中Y和n如权利要求1所定义；

R² 是一个羧酸保护基团；

R³ 是羟基、一个羧酸活化基团或一个构成羧酸盐的半分子；

R⁴ 是C₁-C₄烷氧基；

16. 一种制备如权利要求14定义的式IV的衍生药物的方法，包括使具有下式的丙二酸酯



其中R² 是一个羧酸保护基团；R⁴、Y、n和R³ 如权利要求12所定义，与式子为R-QH的药物反应，其中的Q和R-Q-如权利要求1所定义。

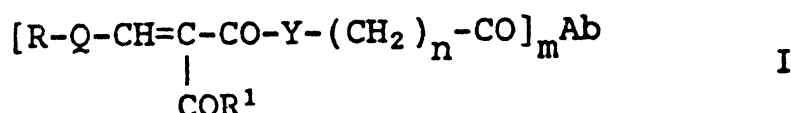
抗 体 - 药 物 结 合 物

本发明属于有机化学、药物化学和免疫学领域，本发明提供了抗体与药物的结合物。该结合物可用于药物的定靶施用，即抗体将药物传递至需要此药物的组织或细胞。抗体与药物的结合通过双价连接子完成，该连接子在一个键合点与抗体结合，而在另一点与药物结合。本发明还提供了制备结合物的中间产物。

药物化学提供了日益增多的特异性高效药物以治疗和预防疾病。但直至最近，还没有一种方法可将药物传递至身体中需要它的特定部位。因此，虽然通常能够使用具有所需特异效应的药物来治疗病人，并且对身体没有其他副作用，但仍然必须按全身剂量给药。而另一方面，如果有可能将药物传递至需要治疗的器官、组织甚或细胞，则通常能够施用极少的总剂量，因为药物将浓缩于需要它的地方。这对于病人的安全性和药物的经济使用来说都具有明显的优越性。

近年来，免疫学领域一直在尝试通过使药物与抗体结合而达到定靶治疗的目的，而这种抗体是针对于与药物需要位点相结合的特异抗原的，目前，关于这种抗体药物结合物的专利和科学文献已为数不少了。但直至最近，还没有一种抗体药物结合物获准用于治疗目的。

本发明提供了一种具有下式的生理上可接受的药物结合物



其中

Ab 是抗体或其识别抗原的片段，它识别与需要传递药物的细胞相结合的抗原；

Q 是 $-\text{NH}-$ ， $-\text{O}-$ 或 $-\text{S}-$ ；

R-Q- 是药物残基，它具有可参与反应的氨基、羟基或巯基；

R¹ 是羧酸保护基团；

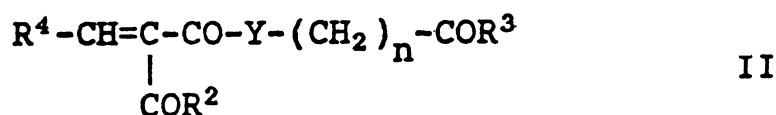
Y 是 $-\text{O}-$ ， $-\text{NH}-$ ， $-\text{NCH}_3-$ 或 $-\text{NC}_2\text{H}_5-$ ；

n 是 1 至大约 8 的整数；

m 是 1 至大约 10 的整数。

本发明还提供了含有本发明结合物及非肠道施用基质的药物组合物，并提供了治疗方法，该方法包括对需要该药物治疗的病人非肠道施用本发明的结合物。

本发明还提供了具有下式的中间产物丙二酸酯



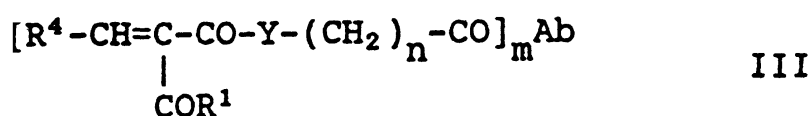
其中

R² 是羟基、羧酸保护基团或构成羧酸盐的半分子；

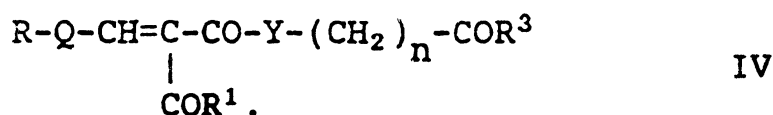
R³ 是羟基、羧酸保护基团、羧酸活化基团或构成羧酸盐的半分子；

R⁴ 是 C₁-C₄ 烷氧基。

本发明进一步提供了具有下式的修饰抗体或抗体片段



本发明还提供了具有下式的衍生药物



本发明进一步提供了制备上述式 I 的药物结合物的方法，包括

(A) 使上述式 III 的修饰抗体与式子为 R-QH 的药物反应，其中 Q 和 R-Q- 如上面所定义；或

(B) 使上述式 IV 的衍生药物与上述式子为 Ab 的抗体或抗体片段反应。

在本说明书中，所有温度都是指摄氏温度。除非特别指出，所有百分比、浓度等都是重量单位。药物结合物中的所有浓度和剂量都是指结合物中所含药物的浓度或数量。

在上述通式中，术语 C₁-C₄ 烷氧基是指甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基和各种异构体的丁氧基，包括 n- 丁氧基和 t- 丁氧基。

在本申请文件中，化合物一般都将称为丙二酸酯。但是，其中 Y 是氨基的那些化合物应当称为丙酰胺酸酯，在特别提到这种化合物时将使用这一术语。

术语羧酸保护基团是指能用于在其他位点进行反应时保护羧酸的有机基团。这种基团在合成化学中使用得极为广泛，尤其是在肽化学领域，保护基团是有机化学家众所周知的。关于这方面特别方便的教科书是 Greene 所著的《有机合成中的保护基团》(John Wiley and Sons, New York, 1981)。Greene 在第 5 章中讨论了羧酸保护基团。本发明中最优选的保护基团是低级烷氧基，尤其是乙氧

基。根据 Greene 的著作，进一步优选的方便的酸保护基团包括例如甲氧基甲氧基、四氢吡喃氧基、四氢呋喃氧基、苄氧基甲氧基、苯甲酰甲氧基和取代的苯甲酰甲氧基、2,2,2-三氯乙氧基和其他的卤代乙氧基、三甲基甲硅烷乙氧基、甲硫乙氧基、甲苯磺酰乙氧基、t-丁氧基、环戊氧基、苄氧基、二苯基和三苯基甲氧基等，以及酰胺形成基团如氨基、乙氨基、二甲氨基、吡咯烷子基、吗啉代、哌啶子基、二乙氨基乙氨基、吗啉代乙氨基、苄甲氨基乙氨基等。

术语羧酸活化基团包括合成有机化学中用以提高羧酸反应活性的基团。这种基团合成化学家经常使用，包括例如苯磺酰氧基、甲烷磺酰氧基、甲苯磺酰氧基、苯二甲酰亚氨基氧基、琥珀酰亚胺氧基、氯、苯并三唑氧基、溴、迭氮基等。本发明中优选的活化基团是N-琥珀酰亚胺氧基、苯二甲酰亚氨基氧基和苯并三唑氧基。

术语构成羧酸盐的半分子是指通常意义上的化学半分子，它通过氧原子连接后构成羧酸的盐类。例如，最好使用这样的盐形成半分子，如碱金属、胺基和季铵基团。更具体说，更为优选的半分子是钠、钾、锂、C₁-C₄ 烷基氨基、二烷基氨基和三烷基氨基以及其中的氮原子被四个氢、C₁-C₄ 烷基、苯基或苄基取代的季铵基团。作为进一步的例子，可以方便地选来用作半分子的季铵基团有铵、四甲基铵、二乙基二甲基铵、二乙基二丁基铵、苄基三甲基铵、t-丁基三甲基铵、苯基三乙基铵、二乙基二丙基铵、s-丁基三甲基铵、异丁基三乙基铵等。进一步，胺类例如甲胺、丁基胺、三乙基胺、二丙基胺、二乙醇胺等也可方便地用于盐的形成。

本发明的药物结合物由抗体、某些化学类型的药物和连接抗体与药物的有机化学基团组成。本发明还提供了用于制备所述结合物的中

间产物丙二酸酯，以及通过抗体或抗体片段与活化形式的丙二酸酯中间产物反应而产生的修饰抗体。下面，将首先分别讨论抗体和药物，然后说明丙二酸酯中间产物及其合成。最后给出合成实例及结合物的生物学性能。

抗 体

应当认识到，本发明的药物结合物的功能是由药物的生物学效能和抗体的抗原选择性决定的。所选择的抗体应当识别与将要传递特殊药物的细胞相结合的抗原。例如，如果药物是抗肿瘤的，则所选择的抗体应当识别与肿瘤细胞相结合的抗原。如果药物是抗细菌的，例如一种头孢菌素，则应当选择识别细菌抗原的抗体。根据所用药物的特性，在一给定条件下可优先选择被细胞内化的抗体，或可以优先使用通过识别表面抗原而保留在细胞表面的抗体。

抗体的来源对于本发明并不是重要的。它可以从免疫球蛋白的任何一类或亚类中选择，包括 IgG、IgA、IgM、IgE 和 IgD。同样，来源的种也不是重要的，只要抗体能定靶于药物可发挥作用的细胞就行。

在现有技术中，药物结合物中使用最多的是单克隆抗体，本发明也优先使用它们。但并不排除多克隆抗体。一种更新的抗体是嵌合抗体，它是由实验室重组技术制备的，该技术能够表达修饰过的 DNA 分子，这种分子可编码任何所需抗体的抗原结合区，并且还可编码任何其他所需氨基酸顺序。因此，本发明可以得到并使用这样的嵌合抗体，其中一部分来自一个种，另一部分来自另一个种。

抗体的来源和特性并不是重要的，只要它能定靶于待治疗的细胞并对病人无毒性就行。普通技术人员很容易用候选抗体制备结合物并

对其作出评价。为方便起见，下面将讨论评价抗体和结合物的方法。首先，抗体应当由足够稳定的杂交瘤产生，以制备足够数量的抗体。抗体本身应当能经受纯化过程，尤其应当有足够的水溶性，以能够用需要的浓度 进行化学操作。

首先评价用候选抗体制备的结合物的抗原结合能力。游离抗体的结合能力可能会有可以接受的适度下降。然后，测定结合物针对抗原阳性细胞的体外效能，例如抗癌药物的细胞毒性。在同样的检测中，有效结合物的效能可能比游离药物的稍低，这是因为它能够将药物高浓度地集中于细胞。然后，根据 Johanson 和 Laguzza 的方法 (Cancer Res. 47:3118-22, 1987)，利用裸鼠人肿瘤异体移植模型评价通过了前两种测试的结合物。在裸鼠中测试候选结合物时，应当与游离药物、游离药物与游离抗体的混合物、与非定靶免疫球蛋白的结合物作比较，候选结合物应当比它们有更好的效能或安全性。在异体移植模型中应当进行剂量范围的研究。

再对异体移植模型中有效的结合物进行动物测试，已知所用动物能表达与人体相似形式的抗原。如果结合物在这种测试中与抗原有显著的结合作用，并且如果它在由上述异体移植模型预测有治疗效应的剂量下基本上没有毒性，则此候选结合物可被认为是具有治疗潜力的。

应当理解，正确选择的抗体片段与完整抗体具有相同的效应。因此在实施本发明时，识别与待治疗细胞相结合抗原的抗体片段，尤其是 $F(ab)_2$ 片段，可与完整抗体一样使用。

式 I 中并未给出连接基团与抗体反应并附着于抗体的严格的机理，因为这一点并不十分清楚。如下所示，该反应也许是酰化作用，抗体分子上有若干可进行酰化作用的位点。通常认为，抗体的酰化作用发

生于赖氨酸残基的游离氨基上。然而，酰化作用也能开始于羟基、苯酚基、咪唑环及其他基团。

式 I 指出，有 1 至大约 10 个连接子-药物半分子附着于抗体的每个分子。当然，每个抗体分子上的这种半分子数目是平均数，因为，在一批给定的结合物所含的分子中，药物-连接子与抗体的比例必定落在一个范围中。如果使每个抗体分子上附着若干药物分子，则当然能使价格昂贵的抗体得到最大效率的使用。但是，附着过多的药物-连接子半分子，通常会使抗体识别和结合其抗原的能力受到不利影响，因此必须找到一个合适的 m 值。一般说来，优选的 m 值为大约 4 至大约 10；另一优选值为大约 3 至大约 8。

有大量的抗体可为免疫学家用于本发明中，在每一期的有关杂志中，都正在公开进一步有用的抗体。不可能也没必要穷举能够用于本发明的抗体。普通的免疫学家和化学家完全能够从下述来源选择抗体，例如美国典型培养物收集中心目录 (Rockville, Maryland, U.S.A.) 和 Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents (Linscott's Directory 出版, 40 Glen Drive, Mill Valley, California, U.S.A. 94941)。因此，本领域的普通技术人员很容易选择针对几乎任何决定基的抗体，例如肿瘤、细菌、真菌、病毒、寄生虫、支原体，或组织相容性抗原，以及病原体表面抗原、毒素、酶、变应原和与生理重要细胞相关的其他类型的抗原。

本发明最优选的用途是将细胞毒性药物传递给癌细胞，尤其包括鳞状癌细胞、腺瘤细胞、小细胞癌细胞、glyoma 细胞、黑素瘤细胞、肾细胞癌细胞、移行细胞癌细胞、肉瘤细胞、支持肿瘤维管结构

的细胞、淋巴类肿瘤细胞如白血病和淋巴瘤。可以得到定靶于所有这些细胞的合适抗体，在Linscott 中可找到其来源。另外，通过常规方法生产这种抗体的必需杂交瘤可得自ATCC和其他的细胞系收集中心。

目前已知的若干抗体尤其适用于本发明的抗肿瘤方面。例如，一个优选的特异抗体是L₁/1C2，由ATCC杂交瘤HB9682产生。

另一种有用的抗体是KS1/4，它是首先由Varki 等人公开的(Cancer Research 44:681-86, 1984)。含有单克隆抗体KS1/4不同区域编码顺序的若干质粒现在已经保藏，并可从北方地区研究实验室(Northern Regional Research Laboratory Peoria, IL, USA)得到。普通技术人员能够使用这些质粒通过重组技术生产嵌合抗体，该抗体与以高密度存在于腺癌细胞上的表面抗原结合。1989年4月18日提交的欧洲专利申请89303814.1详细讨论了这种抗体的构建方法。下述质粒涉及KS1/4。

质粒pGKC2310，轻链、与轻链结合的信号肽及5'和3'非转译区的编码顺序，分离自大肠杆菌K12MM294/pGKC2310(NRRL B-18356)。

质粒pG2A52，重链的编码顺序、与重链结合的信号肽及5'和3'非转译区的编码顺序；分离自大肠杆菌K12 MM294/pG2A52(NRRL B-18357)。

质粒CHK02-6，轻链可变区的编码顺序、与轻链结合的信号肽的编码顺序、以及人IgG轻链恒定区的编码顺序；分离自大肠杆菌K12 DH5/CHK02-6(NRRL B-18358)。

质粒CHK02-18，衍生的轻链可变区的编码顺序、与轻链结合的

信号肽的编码顺序以及人IgG轻链恒定区的编码顺序；分离自大肠杆菌 K12 DH5/CHKC2-18(NRRL B-18359)。

质粒 CH2A 5, 重链可变区的编码顺序、与重链结合的信号肽的编码顺序及人IgG1的重链恒定区的编码顺序；分离自大肠杆菌 K12 MM294/CH2A 5(NRRL B-18360)。

质粒 CH2A 5IG2, 重链可变区的编码顺序、与重链结合的信号肽的编码顺序以及人IgG2的重链恒定区的编码顺序；分离自大肠杆菌 K12 DH5/CH2A 5IG2(NRRL B-18361)。

质粒 CH2A 5IG3, 重链可变区的编码顺序、与重链结合的信号肽的编码顺序以及人IgG3的重链恒定区的编码顺序；分离自大肠杆菌 K12 DH5/CH2A 5IG3(NRRL B-18362)。

质粒 CH2A 5IG4, 重链可变区的编码顺序、与重链结合的信号肽的编码顺序以及人IgG4的重链恒定区的编码顺序；分离自大肠杆菌 K12 DH5/CH2A IG4(NRRL B-18363)。

由ATCC杂交瘤 HB21产生的抗体 5E9C11识别转铁蛋白受体, 后者可由许多肿瘤表达。可由国立癌症研究所得到的称为 B72.3 的抗体识别由乳腺和结肠癌表达的抗原。

OKT3和OKT4是两种具有针对非肿瘤抗原反应活性的有用抗体, 它们分别与外围T细胞和人体T辅助细胞结合。它们分别由保藏于ATCC的杂交瘤 CRL8001和CRL8002产生。

下面列出了可用于不同治疗目的的抗体的其他来源。可用于免疫调节和肿瘤治疗的抗人淋巴细胞和单核细胞抗体, 由ATCC培养物 HB2、HB22、HB44、HB78和HB136产生。可用于肿瘤治疗的抗转铁蛋白受体抗体, 由ATCC培养物 HB84产生。ATCC培养物 HB8059

产生针对结直肠癌单唾液酰神经节苷脂的抗体；培养物 HB8136 产生针对成熟的人 T 细胞表面抗原的抗体，它可用于免疫调节和 T 细胞白血病的治疗。

更进一步，ATCC 杂交瘤 HB9620 将产生一种方便的抗癌胚抗原的抗体 CEM231.6.7。

免疫学家或本领域的普通技术人员，借助于本领域的公知出版物和上述指导性实例和描述，可以方便地选择一种抗体，以将任何合适的药物定靶传递至需用该药物治疗的任何细胞。

药 物

应当理解，本发明的实质是通过上述丙二酸酯连接子连接药物和抗体的方法，而药物和抗体都不限制本发明。因此，本发明的丙二酸酯连接子可有利地用于任何治疗或预防目的的药物，而只受到这样的限制，即药物必须具有与丙二酸酯连接的化学功能团，以及抗体必须定靶于该药物能发挥有益作用的细胞。本发明提供的亚甲基连接机理需要药物具有可参与反应的氨基、羟基或硫醇功能团。进一步，药物必须具有这样的特性，即可参与反应的功能团与连接子的反应不会破坏药物的活性。

因此，本发明的连接子可用于几乎所有种类的药物连接，例如包括抗菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗癌药物、抗支原体药物等。这样构建的药物结合物能有效地实现相应药物的效力，并具有更优越的效能，因为抗体能够将药物传递给特别需要此药物的细胞。

美国专利 4,671,958 提供了可进行药物连接的药物和其他化合物的信息，该专利中有关药物的公开被作为本发明的参考文献。

如前所述，药物通过其氨基、羟基或硫醇基团反应。这些术语是

以其扩展意义使用的；也就是说，术语“氨基”包括作为羧基酰胺、酰肼、氨基甲酸酯等的一部分的氨基，以及简单地附着于碳氢化合物结构上的氨基。一个氨基上可以有第三个小的取代基，只要该基团不产生阻止与丙二酸酯反应的空间障碍就行。这种基团可以是例如直链烷基等。

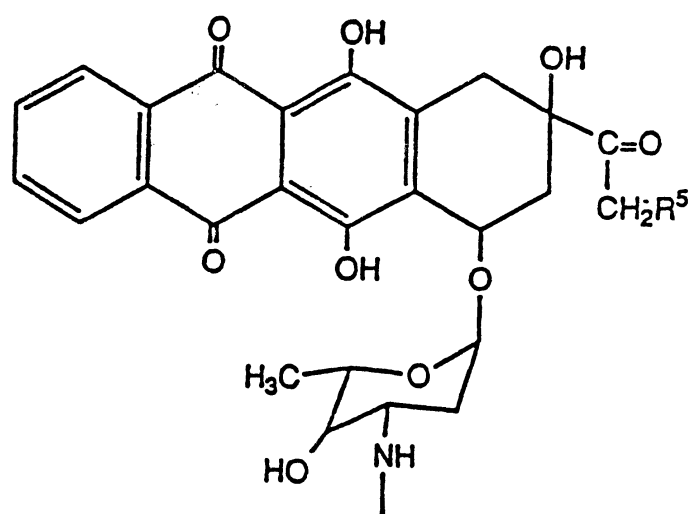
同样，羟基或硫醇基可以是羧酸或硫代酸的一部分。

虽然本发明包括使用任何化学类型以及任何治疗或预防效能的药物，但优选使用具有可参与反应的氨基的药物。更优选使用氨基是酰肼或酰肼半分子一部分的药物。

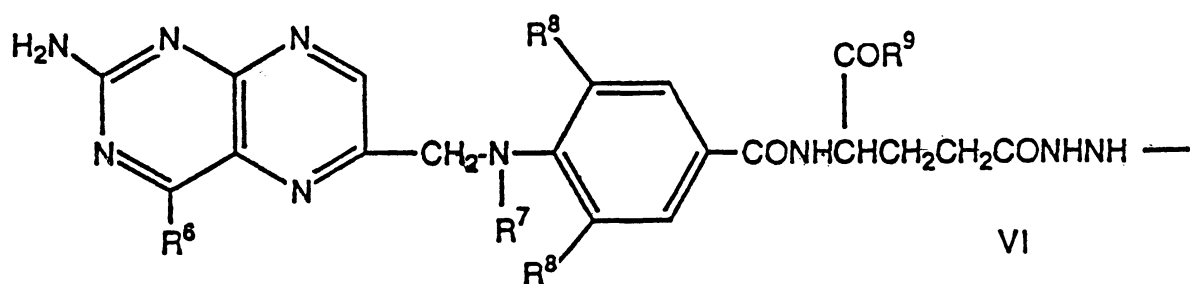
用于本发明的最有效的药物是细胞毒性药物，尤其是那些用于治疗癌症的药物。一般说来，这种药物包括烷基化剂、抗增殖剂、微管蛋白结合剂等。优选的细胞毒性药物包括例如柔毛霉素类药物、长春花碱药物、丝裂霉素、博莱霉素、细胞毒性核苷、蝶啶类药物、及鬼臼毒素等。而这些药物中特别有用的药物包括例如阿霉素、柔毛霉素、氨基蝶啶、氨甲蝶呤、甲蝶呤、二氯氨甲蝶呤、丝裂霉素O、甲基丝裂霉素、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、阿糖胞苷、鬼臼毒素、鬼臼乙叉甙、苯丙氨酸氮芥、长春花碱、长春新碱、长春西定、长春花碱酰胺、长春素等。应当理解，为了使反应更为方便地进行，普通专业人员可对优选的和一般的化合物作一些适当的化学修饰。

还应当理解，优选的结合物是由优选的药物制备的。

本发明中作为药物使用的一组更为高度优选的细胞毒性药物包括具有下列式子的药物。



其中 R^5 是氢或羟基；

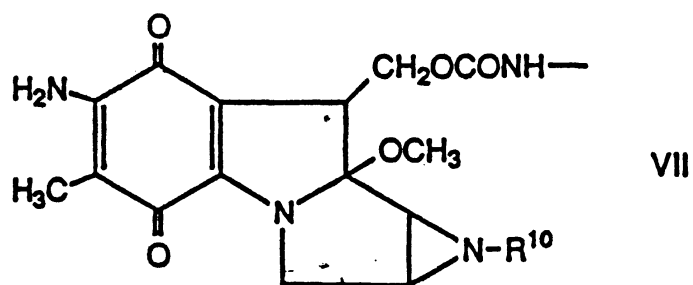


其中 R^6 是氨基或羟基；

R^7 是氢或甲基；

R^8 是氢、氟、氯、溴或碘；

R^9 是羟基或构成羧酸盐的半分子；

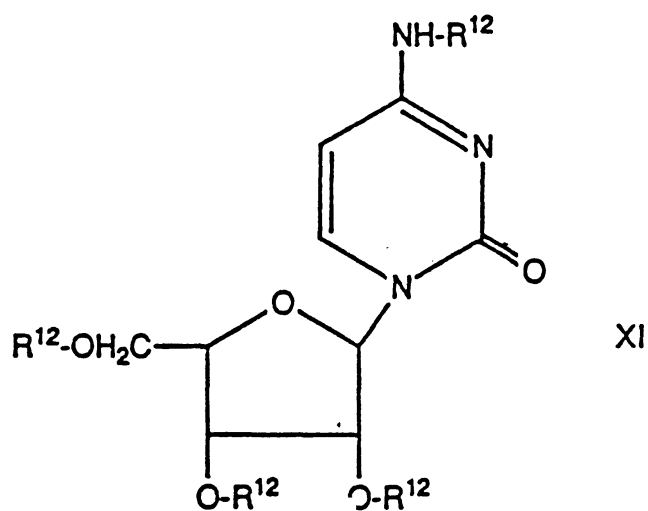
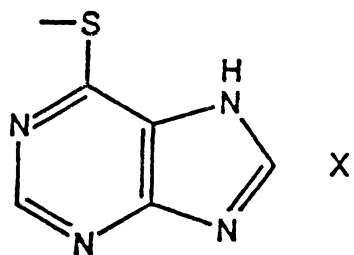


其中R¹⁰是氢或甲基；

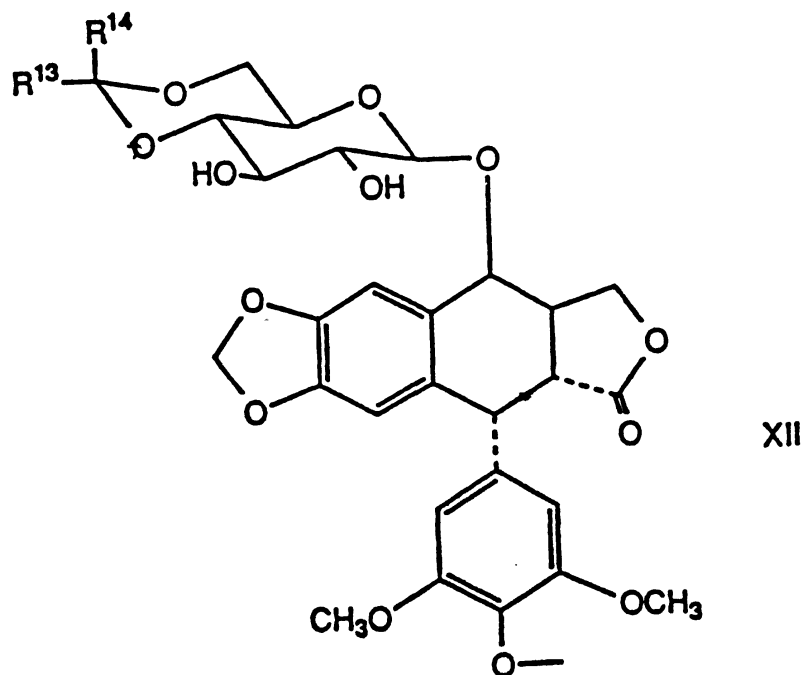


其中R^{II}是氨基、C₁-C₃烷基氨基、二(C₁-C₃烷基)-氨基或C₄-C₆众亚甲基氨基；



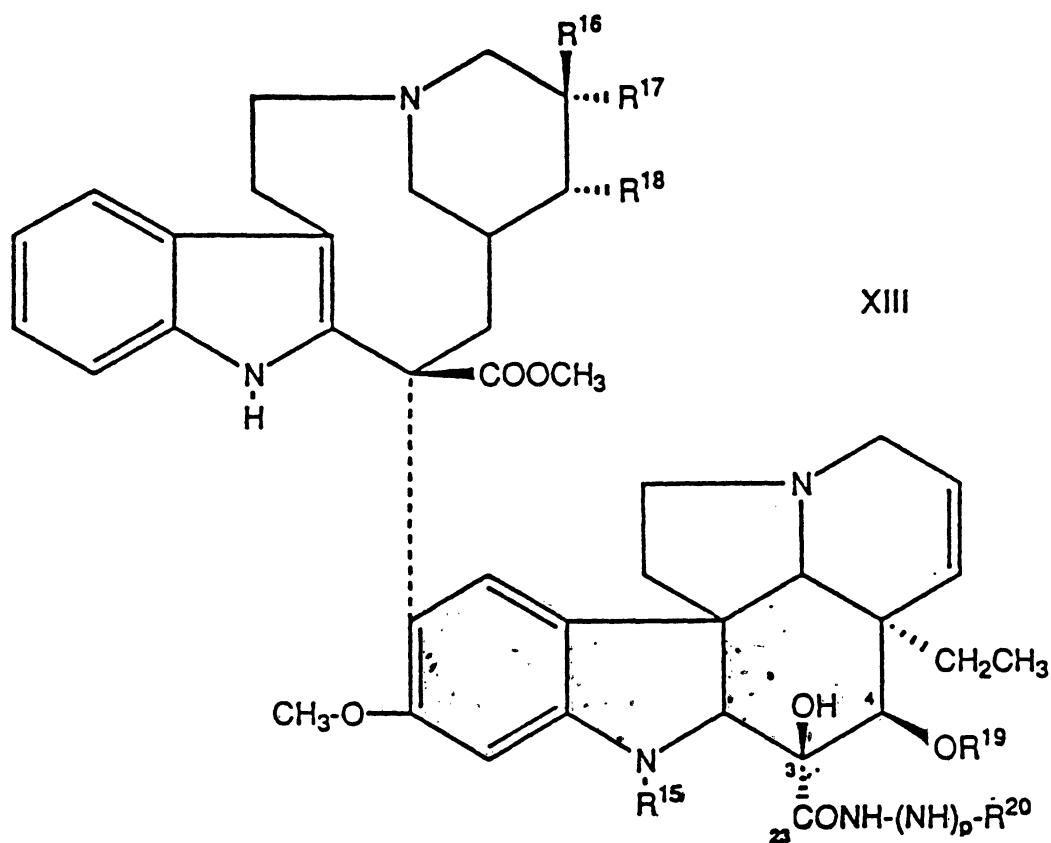


其中，一个 R^{12} 是一个键，而其他的则是氢；



其中 R^{13} 是氢或甲基；

R^{14} 是甲基或噻嗯基；

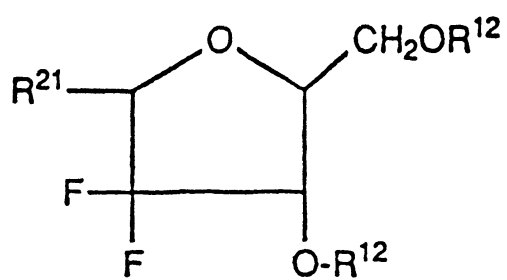


其中 R^{15} 是 H 、 CH_2 或 CHO ； R^{17} 和 R^{18} 单独看待时， R^{18} 是 H ， R^{16} 和 R^{17} 之一是乙基，另一个则是 H 或 OH ；当 R^{17} 、 R^{18} 与它们与之结合的碳原子一起看待时，它们构成一个环氧乙烷环，此时 R^{16} 是乙基； R^{19} 是氢、 $(C_1-C_3 \text{ 烷基})-CO$ 或氯取代的 $(C_1-C_3 \text{ 烷基})-CO$ ；

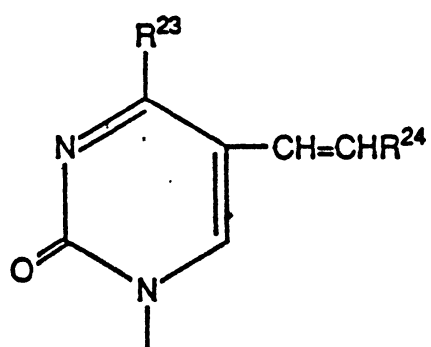
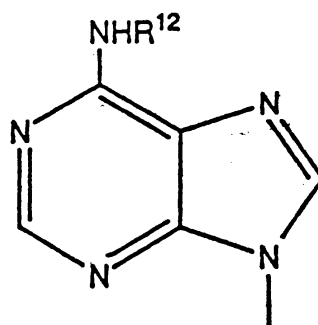
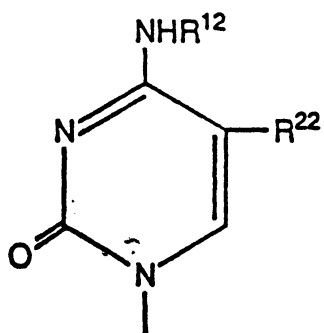
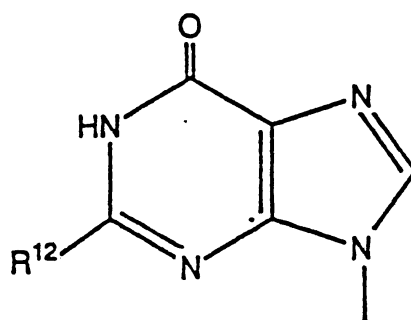
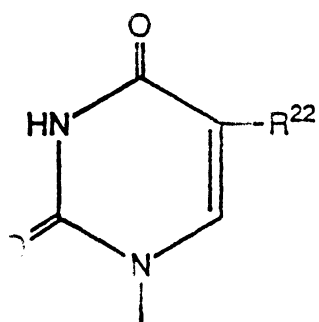
p 是 0 或 1 ；

R^{20} 是一个键或 $(C_1-C_4 \text{ 烷基})-X$ ；

X 是 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$ ；



其中 R^{24} 是一个如下式的碱基



其中R²²是氢、甲基、溴、氟、氯或碘；

R²³是-OR¹²或-NHR¹²；

R²⁴是氢、溴、氯或碘。

在以上的优选结构式中，式V的化合物代表柔毛霉素（或亚德里亚霉素）组的化合物，式VI代表氨甲蝶呤组的化合物；式VII代表丝裂霉素；式VIII代表博莱霉素；式IX代表苯丙氨酸氨芥；式X代表6-巯基嘌呤；式XI代表阿糖胞苷；式XII代表鬼臼毒素；式XIII代表长春花碱药物；式XIV代表二氟核苷。

在这些优选的药物中，最优选的是长春花碱药物和柔毛霉素类的药物；另一类优选的药物包括长春花碱药物、柔毛霉素类和氨甲蝶呤类。

另一类优选药物包括6-巯基嘌呤、二氟核苷和阿糖胞苷。还有一类优选药物包括二氟核苷、长春花碱药物和柔毛霉素药物。

优选药物中的另一优选组包括通过氨基连接的那些药物。

用于本发明中的长春花碱药物是本领域内已知的，尤其可参阅Cullinan等人 and Trouet等人的各种专利和出版物。关于本发明中所用长春花碱药物的合成，尤其可以参见Cullinan的4,203,898号美国专利。

最优选的药物是上述式XIII的长春花碱化合物。应当理解，结构式所包括的化合物是具有若干不同普通名或俗名的药物或其衍生物。因此，为了简化长春花碱药物的复杂命名，它们在本申请文件中将作为长春花碱的衍生物命名。应当理解，长春花碱即是上式的化合物，其中，R¹⁵是甲基，R¹⁶是乙基，R¹⁷是羟基，R¹⁸是氢，R¹⁹是乙酰基，而C₂处的羰基是甲酯的形式，而不是上面所示的羧基酯

胺。

下表给出了一些本发明中所用的长春花碱药物。

表 I

$\underline{R^{15}}$	$\underline{R^{16}}$	$\underline{R^{17}}$	$\underline{R^{18}}$	$\underline{R^{19}}$	$\underline{P}$	$\underline{R^{20}}$
H	H	C ₂ H ₅	H	H	0	--
CH ₃	C ₂ H ₅	OH	H	H	0	(CH ₂) ₂ O-
CHO	C ₂ H ₅	H	H	COCH ₃	1	--
CHO	OH	C ₂ H ₅	H	COC ₂ H ₅	1	(CH ₂) ₃ S-
CH ₃	C ₂ H ₅	环氧乙烷		COCH(CH ₃) ₂	1	(CH ₂) ₄ NH-
H	C ₂ H ₅	H	H	COCH ₂ Cl	0	(CH ₂) ₂ NH-
CH ₃	C ₂ H ₅	环氧乙烷		COCHClCH ₂ Cl	1	CH ₂ CH ₂ (CH ₃)CH ₂ O-
H	C ₂ H ₅	环氧乙烷		COCCl ₃	1	C(CH ₃) ₂ CH ₂ O-
CHO	OH	C ₂ H ₅	H	CO(CH ₂) ₂ CHCl ₂	0	C(CH ₃)CH ₂ CH ₂ NH-
CH ₃	H	C ₂ H ₅	H	H	0	(CH ₂) ₂ S-
CH ₃	C ₂ H ₅	OH	H	H	1	CH(CH ₃)CH ₂ NH-

美国专利 4,692,434 记载的二氟核苷提供了若干能够通过氨基或羟基与连接基团反应的位置。一种尤其优选的式 XIV 的药物是 2'-脱氧-2', 2'-二氟胞苷, 它也可以命名为 1-(2-氧代-4-氨基-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2, 2-二氟核糖。应当理解, 该化合物可以在 5'-羟基、3-羟基或碱基上的氨基处反应以形成结合物。

由于二氟核苷在本领域中相对来说比较新, 为了确保理解给出下面一组二氟核苷。

1-(5-甲基-2, 4-二氧-1H, 3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2, 2-二氟核糖

1-(2, 4-二氧-1H, 3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2, 2-二氟核糖

1-(5-溴-2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟核糖

1-(5-氯-2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟核糖

1-(5-碘-2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟核糖

1-(4-氨基-5-氯-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟核糖

1-(4-氨基-5-溴-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟核糖

1-(4-氨基-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,2-二氟
核糖

1-(4-氨基-5-甲基-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟核糖

1-[5-(2-溴乙烯基)-4-羟基-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟核糖

1-[4-氨基-5-(2-溴乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟核糖

1-[4-氨基-5-(2-碘乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟核糖

1-[5-(2-氯乙烯基)-4-羟基-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟核糖

1-[4-羟基-5-(2-碘乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟核糖

1-[4-氨基-5-(2-氯乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟核糖

1-(2-氨基-6-氧-1H,9H-嘌呤-9-基)-2-脱氧-2,2-
二氟核糖

1-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2-脱氧-2,2-二氟核糖

1-(5-氟-2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,2-
二氟核糖

1-(2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,2-二氟
木糖

1-(5-溴-2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟木糖

1-(5-氯-2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟木糖

1-(5-碘-2,4-二氧-1H,3H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟木糖

1-(4-氨基-5-氟-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟核糖

1-(4-氨基-5-氯-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟木糖

1-(4-氨基-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,2-二氟
木糖

1-(4-氨基-5-氟-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,
2-二氟木糖

1-(4-氨基-5-甲基-2-氧-1H-嘧啶-1-基)-2-脱氧-2,

2-二氟木糖

1-[5-(2-溴乙烯基)-4-羟基-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟木糖

1-[4-氨基-5-(2-溴乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟木糖

1-[4-氨基-5-(2-碘乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟木糖

1-[5-(2-氯乙烯基)-4-羟基-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟木糖

1-[4-羟基-5-(2-碘乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟木糖

1-[4-氨基-5-(2-氯乙烯基)-2-氧-1H-嘧啶-1-基]-
2-脱氧-2,2-二氟木糖

1-(2-氨基-6-氧-1H,3H-嘌呤-9-基)-2-脱氧-2,2-
二氟木糖

1-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2-脱氧-2,2-二氟木糖。

由下列限制所描述的化合物是尤其优选的长春花碱药物。下面的
各种不同限定能够结合起来，以形成进一步更加限制的优选类别。

A. R¹⁵ 是甲基；

B. R¹⁵ 是氢或甲酰基；

C. R¹⁶ 是乙基；

D. R¹⁸ 是氢；

E. R¹⁶ 和 R¹⁷ 之一是乙基，另一者是氢或羟基；

F. R¹⁷ 是羟基；

- G. R^{19} 是氢；
- H. R^{19} 是乙酰基；
- I. R^{19} 是 C_1-C_3 烷基-CO；
- J. p 是 1；
- K. R^{20} 是一个键；
- L. R^{20} 是 $(C_2-C_4 \text{ 烷基})-X$ ；
- M. p 是 0；
- N. X 是 $-NH-$ ；
- O. X 是 $-O-$ 或 $-S-$ ；
- P. R^{20} 是乙氧基，乙基硫或乙氨基；
- Q. R^{20} 是一个键；
- R. R^{20} 是 $(C_2-C_4 \text{ 烷基})-NH-$ 。

中间产物

本发明的中间产物丙二酸酯是与抗体和药物反应所产生的中间产物。因此，中间产物丙二酸酯是使抗体与药物结合的连接子的前体；因此，优选的中间产物丙二酸酯将其结构赋予优选的结合物。

此中间产物是丙二酸的衍生物，根据已知方法或者普通的有机化学专业人员很容易想象的方法制备。但为了保证使读者理解，下面根据不同的基团给出了一组化合物。

表 II

$\underline{n}$	$\underline{R^2}$	$\underline{Y}$	$\underline{R^3}$	$\underline{R^4}$
1	OH	O	N-	OCH ₃
4	ONa	O	N-	OC ₂ H ₅
6	OLi	NH	N-	OCH(CH ₃) ₂
2	OK	NCH ₃	N-	O(CH ₂) ₃ CH ₃
3	OCH ₂ CH ₃	O	OCH ₂ CH=CH ₂	OC ₂ H ₅
7	OCH(C ₆ H ₅) ₂	O	OCH ₂ CH=CHC ₆ H ₅	OCH ₃
1	OCH ₂ C ₆ H ₄ OCH ₃	O	ONHCH ₃	OCH(CH ₃) ₂
8	OH	NH	ON(C ₃ H ₇) ₂	O(CH ₂) ₂ CH ₃
6	OCH ₂ CCl ₃	NH	OH	O(CH ₂) ₃ CH ₃
5	OC(CH ₃) ₃	NC ₂ H ₅	OCH ₂ CCl ₃	OCH ₃
7	OSi(CH ₃) ₃	NC ₂ H ₅	OC(CH ₃) ₃	OCH ₃
3	ON(C ₂ H ₅) ₃	O	ON(CH ₃) ₃	OC ₂ H ₅
4	ON(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	O	ON[(CH ₂) ₃ CH ₃] ₄	OC ₂ H ₅
6	OCH ₂ OCH ₃	NH	ON(CH ₃) ₃	OC ₂ H ₅
2	OCH ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	NH	ON(C ₂ H ₅) ₃	OCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
1	OCH ₂ COC ₆ H ₅	O	ON(C ₂ H ₅) ₃ CH ₂ C ₆ H ₅	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂
8	OCH ₂ COC ₆ H ₄ Br	NH	ONa	OCH ₃
6	OCH ₂ CH=CH ₂	O	OLi	OC ₂ H ₅
5	OCH ₂ CH=CHC ₆ H ₅	O	OK	OCH ₂ (CH ₃) ₂
3	ONHCH ₃	NCH ₃	OSi(CH ₃) ₃	OC ₂ H ₅
4	ON(C ₃ H ₇) ₂	NC ₂ H ₅	ON(C ₂ H ₅) ₃	OCH ₃
2	ON(CH ₃) ₃	O	ON(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	OCH(CH ₃) ₂
3	ON[(CH ₂) ₃ CH ₃] ₄	O	OCH ₂ OCH ₃	OC ₂ H ₅
1	ON(CH ₃) ₃	NH	OCH ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	OC ₂ H ₅
4	ON(C ₂ H ₅) ₃	O	OCH ₂ COC ₆ H ₅	OC ₂ H ₅
2	OH	O	OCH ₂ COC ₆ H ₄ Br	OC ₂ H ₅
7	ON(C ₂ H ₅) ₂	NH	ON(C ₂ H ₅) ₃ CH ₂ C ₆ H ₅	OCH ₃
3	OCH ₂ CH ₂ Si(CH ₃) ₃	NC ₂ H ₅	OCH ₂ CH ₃	OCH ₃

表 2 (续)

$\underline{n}$	$\underline{R^2}$	$\underline{Y}$	$\underline{R^3}$	$\underline{R^4}$
6	OH	O	$\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$	OC_2H_5
1	NH_2	O	OH	OC_2H_5
3	NHCH_3	NH	OK	OCH_3
2	$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	NH	ONHCH_3	OC_2H_5
1	$\text{N}(\text{CH}_3)(\text{C}_3\text{H}_7)$	NCH_3	$\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$	OC_3H_7
1	$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	NC_2H_5	OC_2H_5	OC_2H_5
2	$\text{N}(\text{CH}_2)_4$	NH	$\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	OCH_3
2	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	O	OLi	OC_2H_5
3	$\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2)_5$	O	ONHCH_3	OCH_3
2	$\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)$	O	$\text{ON}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	OC_2H_5

下面是优选的中间产物丙二酸酯的不同亚组。应当理解，优选的亚组可以结合起来以形成进一步限制的优选组。

- A. R^4 是 C_2-C_3 烷氧基；
- B. R^4 是乙氧基；
- C. R^2 是羟基或形成盐的半分子；
- D. R^2 是一个保护基团；
- E. R^2 是一个通过氧原子连接的保护基团；
- F. R^2 是一个通过氮原子连接的保护基团；
- G. R^2 是一个烷氧基；
- H. R^2 是一个氨基或烷基氨基；
- I. R^3 是一个活化基团；
- J. R^3 是一个保护基团；
- K. R^3 是羟基或形成盐的半分子；
- L. R^3 是 N-琥珀酰亚胺氧基、N-苯二甲酰亚胺氧基或 N-苯并三唑氧基；
- M. n 从 1 至大约 3；
- N. n 从 1 至大约 6；
- O. n 从大约 3 至大约 8；
- P. n 从大约 5 至大约 8；
- Q. Y 是 $-O-$ ；
- R. Y 是 $-NH-$ ；
- S. Y 是 $-NCH_3-$ 或 $-NC_2H_5-$ 。

修饰抗体

修饰抗体是制备给合物的中间产物，它由除药物外的全体结合物

构成。它们是通过中间产物丙二酸酯与抗体反应而制备的，所用方法将在本文 下面的合成部分中描述。

优选的修饰抗体是由优选的各组丙二酸酯中间产物与优选抗体反应而制备的。为了便于理解，下面将给出一组典型的修饰抗体。由于很难对这些复杂分子命名，因此这些化合物不是用其化学名称，而是通过其组成的变化加以鉴别。此处提及的抗体是免疫学领域公知的。

〔表Ⅲ见27页〕

衍生药物

本发明的衍生药物是中间产物，通过使药物与中间产物丙二酸酯反应而形成，它用来通过与抗体反应而形成结合物。在上面的衍生药物的定义式中， R 、 R^1 、 R^2 、 Y 和 n 的广泛定义和优选意义与上面讨论的一样，但应当清楚地理解，通过选择不同的所需可变基团，尤其是优选的中间产物丙二酸酯，能够制备任何所需的或优选的衍生药物。衍生药物按下面合成部分讨论的方法制备。

合 成

有机化学家们将会理解，在本合成的许多步骤中，必须保护起始化合物和中间产物上的各种反应基团，当所需的反应在其他反应基团上进行时。而反应结束以后，则一般需要去除这些保护基团。这种保护和去保护作用在有机化学中完全是常规方法，本申请文件中无须对此多加说明。但应注意，在上述Greene的关于保护基团的教科书中，详细说明了所有常规的反应基团的保护基，包括羟基、硫醇基、氨基等，并概述了安置和去除这些保护基的方法。

中间产物丙二酸酯的合成

根据一般常识和普通文献，一个普通的有机化学工作者就能够制

表 III

$\underline{n}$	$\underline{m}$	$\underline{R^4}$	$\underline{R^1}$	$\underline{Ab}$	$\underline{Y}$
1	3	OCH_3	OC_2H_5	L/1C2, F(ab') ₂	NH
3	5	OC_2H_5	OCH_2OCH_3	KS1/4	NH
7	7	OC_2H_5	OCH_2SCH_3	5E9C11	NCH ₃
2	6	$OCH(CH_3)_2$	$OCH_2OCH_2C_6H_5$	B72.3	NC ₂ H ₅
4	4	$O(CH_2)_3CH_3$	$OCH(CH_3)COC_6H_5$	OKT4	O
4	2	OC_2H_5	OCH_2CCl_3	YOL1-34	O
6	1	OCH_3	$OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$	B1011	NH
8	8	$OCH(CH_3)C_2H_5$	$OCH_2CH_2SO_2C_6H_4CH_3$	8.14.49	O
5	9	$OCH_2CH(CH_3)_2$	$OC(CH_3)_3$	B1018	O
1	6	OC_2H_5	O 环己基	GS-1.A	O
2	10	OCH_3	$OCH(CH_3)_2$	KP9.2	NH
4	5	$O(CH_2)_2CH_3$	$OCH_2CH=CHC_6H_5$	p97	NCH ₃
3	4	$OCH(CH_3)_2$	OC_6H_5	TFS-2	NC ₂ H ₅
6	3	OCH_3	$OC(C_6H_5)_3$	D83.21	NH
7	4	OC_2H_5	$OCH_2C_6H_4OCH_3$	A6H	O
5	6	$O(CH_2)_3CH_3$	$OSi(CH_3)_3$	B6.2	O
8	3	OC_2H_5	OCH_3	14.95.55	O
2	8	OCH_3	OC_2H_5	791T/48	O
4	5	OC_2H_5	$N(CH_3)_2$	B1018	NCH ₃
2	6	OCH_3	$NH(CH_2)_2N(CH_3)_2$	KS1/4	NH
1	4	OC_2H_5	$N(CH_2)_4$	L/1C2	NH
2	4	OC_2H_5	$N(C_2H_4)_2$	5E9C11	O
3	5	OC_2H_5			

备任一种中间产物丙二酸酯。但优选的制备方法是以丙二酸衍生物为起始，其中在一个羧基上有一个羧酸保护基， R^2 。另一个羧基可以相同或不同的方式取代。在不同的情况下，非 R^2 基必须比 R^2 基更易去除。使起始化合物与卤代链烷酸酯或氨基链烷酸酯反应，其烷基链的长度提供了几个亚甲基。卤代链烷酸酯用来制备Y是氧的中间产物，以产生一个酯键连接。这时卤素原子（或其他易去除基团）位于链的端部。氨基链烷酸酯中的氨基位于链的端部，它用来制备Y是氨基的中间产物。链烷酸酯的酯部分是一个酸保护基， R^3 。

该反应如下进行：去除起始化合物和非 R^2 基，然后使这样形成的羧酸基与链烷酸酯反应。通过初始还原已成功地进行了此反应，例如，在环己二烯的存在下使用加氢催化剂。另外，可在合适的催化剂（例如贵重金属催化剂）存在下使用加氢作用。

也可以通过用强碱分解非 R^3 酯而进行反应，尤其是使用在含水溶剂（如含水丙酮）中的氢氧化锂。羧酸根形成以后，加入卤代链烷酸酯，则中间产物丙二酸酯迅速形成，尤其是在一种酸清除剂的存在下。然而，如果用氨基链烷酸酯进行反应，则应当通过加入一种上述的活化基团而使羧酸根活化，然后进行反应以形成丙二酸酯。

上述反应形成中间产物丙二酸酯，在 R^3 上有一个酸保护基，但缺失 $R^4-CH=$ 部分。该基团（即烷氧亚甲基）通过使第一个中间产物与适当的烷基原甲酸酯在路易斯酸（例如氯化锌）存在下反应而插入。该反应在较高的温度下进行，范围为 $100-200^\circ$ ，反应在几小时内完成。

在上述反应中，以及在下述的其他方法中，无须使用大为过量的起始化合物。就象有机化学中的一般情况那样，最好使用适度过量的

相对廉价的反应剂，以确保更为昂贵的反应剂被完全消耗。在与抗体本身反应时这一原则尤为重要，因为抗体一般都相当昂贵并难于制备和纯化。但一般说来，过量反应剂的选择应考虑到使该方法最为经济，既要考虑到成分的费用还要考虑设备的生产能力，不应仅仅为了促使反应的发生而使用过量的反应剂。

与药物的反应

使中间产物丙二酸酯与药物在这样的条件下反应，该条件能使烷氧基 R^4 切除，而使剩余的亚甲基与药物的活性氨基、羟基或硫醇基反应。一般说来，反应在温和条件下进行，从 0° 左右到 50°C 左右，在不与任一种反应剂反应的有机溶剂或这种有机溶剂的含水混合物中进行，并且通常存在有温和碱例如碱金属碳酸氢盐、碳酸盐和氢氧化物。反应一般是定量的，不需要大为过量的反应剂。但产物的分离可能需要在高压下层析或其他复杂方法，因为非常小心地纯化衍生药物通常是重要的。由于衍生药物要与抗体反应才能构成结合物，因此伴随衍生药物的任何活性杂质都将消耗抗体的反应位点，从而浪费耗资昂贵而制备的抗体。

在药物具有多重反应位点的情况下，例如具有多羟基的核苷，通常必须阻断药物上不想使用的反应基团。这种阻断通过讨论过的保护基进行，这对于有机化学家来说并没有特殊的困难。

羧酸保护基 R^3 可在与药物反应之前或之后从中间产物丙二酸酯上除去。如果必须在药物上使用保护基，则完全能够在除去 R^3 保护基的同样条件下除去这些基团，从而以双倍的效率利用了去保护步骤。

修饰抗体的合成

使抗体与活性形式的中间产物丙二酸酯反应，即中间产物丙二酸

酯的 R^3 基团是上面说明过的羧酸活化基团。活化基团是通过使用常规的酯化剂如碳化二亚胺而连在羧酸 (R^3 是氢) 上的, 尤其是二环己基碳化二亚胺。这种反应是在通过适当的方法 (根据所用的保护基) 除去酸保护基 R^3 后进行的。与活化基团的反应是在惰性有机溶剂中进行的, 例如二噁烷、四氢呋喃、氯化碳氢化合物等, 并可在 $0-50^\circ$ 的适度温度下进行。

在选择使中间产物丙二酸酯与抗体反应的条件时, 主要应考虑维持抗体的稳定性。反应必须在含水基质中进行, 其组成不应伤害抗体。一种尤其合适的含水基质是硼酸缓冲液, 其中, 硼酸盐离子的浓度在 $0.1-0.5M$ 的范围内。另一种可进行反应的合适的含水基质是生理缓冲盐水。反应基质的 pH 应是微碱性, 在大约 $7-9$ 的范围内。虽然反应基质应是水溶液, 但少量有机溶剂的存在没有坏处, 也许还非常有益。例如, 最好是将中间产物丙二酸酯溶于少量有机溶剂例如二甲基甲酰胺、乙腈、四氢呋喃、二噁烷或乙二醇醚中, 并将有机溶液加至在基质水溶液中的抗体溶液中。

一般说来, 必须以相对较低的浓度进行反应, 因为抗体的溶解度一般都较低。例如, 抗体浓度一般在大约 $5-25 \text{ mg/毫升}$ 基质水溶液。

如上所述, 每摩尔抗体结合有大约 1 至 10 摩尔的连接子和药物。为了达到这一结合比例, 通常需要使用过量的连接子中间产物。抗体与活性酯在酰化条件下的反应活性略有不同, 但一般说来, 在该方法中, 每摩尔抗体使用大约 5 至 15 摩尔左右的连接子中间产物。

使酰化反应在大约 0° 至 40° 左右的温度下进行几分钟至几小时。显而易见, 较高的温度可能伤害抗体, 因此最好在低温下进行反

应，尤其是该反应本身很迅速。

制备好了具有连接基团的衍生抗体后，则如下面的实例所示，通过常规方法层析反应混合物，以从未反应的连接子中间产物中分离出衍生抗体。

结合物的合成

制备好修饰药物后，作为结合物制备的最后一步，使之与抗体反应，上述涉及与抗体反应时应注意的地方在这儿是完全适用的。选择抗体用量和衍生药物用量之间的比例时遵循同样的原则。一般说来，反应条件的选择必须考虑抗体的稳定性，因为药物可望忍受任何抗体能忍受的条件。

衍生药物必须转化为活性形式，即R³处是羧酸活化基团，转化反应在如上所述的修饰抗体合成条件下进行。

另一方面，制备好修饰抗体后，最后一步是使之与药物反应，必须小心确保抗体的稳定性。

因此，优选的方法是制备衍生药物，然后作为最终步骤使之与抗体反应。修饰抗体与药物的反应必须在较低温度下进行，例如从0°至40°左右，在抗体能够接受的基质中进行。例如，尤其合适的反应基质是硼酸缓冲液，尤其是pH为大约7至9的0.1-0.5M硼酸钠缓冲液。但反应也可以在硼酸缓冲液、微酸性磷酸缓冲液、生理盐水等中进行。反应基质中有少量有机溶剂没有害处，如上所述，只要该溶剂没有损伤抗体的倾向就行。

最后，常规地通过层析法分离和纯化药物结合物。有可能从层析基质中洗脱出适用于病人所需浓度的结合物。但在通常情况下，结合物是以其溶解度允许的最高浓度通过层析而纯化的，可用任何适宜的

溶剂洗脱，但最优选使用生理盐水。通常使洗脱液冷冻干燥，以提供稳定的干燥形式的结合物，它能够安全地贮存和销售，并且最终能与无菌水重新配制以进行施用。

下述的制备和实例进一步说明了本发明各种中间产物和结合物的合成。

制备 1 苄氧基羰基甲基乙基丙二酸酯

在装有搅拌器的圆底烧杯中加入 400ml 丙酮和 50g 二乙基丙二酸酯。形成溶液后，加入 200ml 水，然后加入 156ml 2N 氢氧化锂溶液。混合物于室温下搅拌 30 分钟，然后在真空下浓缩成固体。在其中加入 350ml 二甲基亚砜，搅拌混合物，同时加入 71.5g 苄基 2- 溴乙酸酯。然后使混合物于室温下搅拌 3 小时，再用 1000ml 乙酸乙酯和盐水萃取，萃取液用盐水洗涤 2 次。萃取液在硫酸钠上干燥，过滤后在真空下浓缩过夜，产生 76.4g 粘液，使之在 0.1mm 汞柱下蒸馏，产生 18.8g 基本上纯化形式的所需中间产物。

制备 2 苄氧基羰基甲基乙基丙二酸酯

在装有搅拌器的烧杯中加入 60ml 无水乙醇，使 5g 氢化催化剂钨碳悬浮于其中，加入 25g 苄基乙基丙二酸酯和 16ml 1,4- 环己二烯。混合物搅拌 1.5 小时，然后过滤，滤液在真空下浓缩成浆液。在残渣中加入 60ml 二甲基甲酰胺和 15.6ml 三乙基胺，然后加入 17.7ml 苄基 2- 溴乙酸酯。混合物于室温下搅拌 1 小时，然后用 600ml 乙酸乙酯和盐水萃取，萃取液用饱和的碳酸氢钠溶液、用盐水、用 10% 柠檬酸溶液、用盐水并再用饱和的碳酸氢钠和盐水洗涤。洗涤过的萃取液在硫酸镁上干燥，过滤后在真空下浓缩，得到 28.2g 纯化的所需中间产物，它在薄层层析上只有一个物质点，用 1:1 的乙酸

乙酯；己烷洗脱， $R_f=0.55$ 。质谱结果为 $m/e=280$ 。

制备3 苄氧基羧甲基

乙基2-乙氧基亚甲基丙二酸酯

在装有搅拌器的烧杯中加入11.1ml 乙酸酐，使10g制备1的产物溶于其中，加入7.8ml 三乙基原甲酸酯。混合物在140-50°下加热6.5小时，然后真空下除去挥发物质。残渣溶于11.1ml乙酸酐和7.8ml 三乙基原甲酸酯中，加入50mg氯化锌。然后，混合物于140-150°下加热回流16小时，然后冷却，用600ml乙酸乙酯和盐水萃取，用2份盐水洗涤。洗涤过的萃取液在硫酸镁上干燥，过滤和浓缩，残渣溶于最少量的乙酸乙酯中，将此溶液与己烷搅拌。使此溶液通过充满硅胶的漏斗，用1升含10%乙酸乙酯的己烷洗脱，然后再用1升含20%乙酸乙酯的己烷洗脱。所需产物在另外2升含20%乙酸乙酯的己烷中得到，使之在真空下浓缩，得到4.9g无色浆液，它基本上是纯化的所需产物。

分析计算：C, 60.71, H, 5.99;

测得：C, 60.98; H, 6.03;

制备4 羧甲基乙

基2-乙氧基亚甲基丙二酸酯

在装有搅拌器的烧杯中加入15ml无水乙醇，使1g氢化催化剂钨碳悬浮于其中，加入4.9g在10ml乙醇中的制备3产物的溶液，然后加入2.8ml 1,4-环己二烯。将混合物搅拌5分钟，然后加热至45°，在这一点开始放热。然后除掉加热，混合物搅拌45分钟，在此时达到室温。然后使混合物过滤，在真空下浓缩后得到3.6g黄色液体，它通过质谱鉴别即是所需的中间产物。 $m/e=246$ 。

制备 5 羧甲基乙基 2-

亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物

此制备的产物是加成物，其中，阿霉素通过道诺胺环 (daunosamine ring) 的氨基与中间产物丙二酸酯的亚甲基连接。

在圆底烧杯中加入 134mg 阿霉素盐酸和 8.5ml 二甲基甲酰胺，加入 1ml 水以溶解药物。加入 264mg 制备 4 的产物（在 0.5ml 二甲基甲酰胺的溶液中），混合物搅拌 10 分钟。然后加入含有 115mg 碳酸氢钠的 1.25ml 水溶液，混合物于室温下搅拌 2 小时。在真空下除去挥发物质，残渣溶于最少量的 0.1M 乙酸钠缓冲液 (pH 5.4) 中。溶液加到 C18 (J.T.Baker, Phillipsburg, N.J.) 快速层析柱 (1.75×6 cm) 中，柱子用含有增量甲醇的乙酸缓冲液洗脱。在含有 50% 以上甲醇的组分中得到所需产物，合并含有产物的组分并在真空下浓缩。残渣溶于几毫升水中，加到同样的柱上，用 40ml 水洗脱，然后用 80ml 50% 含水甲醇，再用 20ml 甲醇洗脱。所需产物在 50% 甲醇洗脱的组分中，使之合并后在真空下浓缩。残渣溶于最少量的甲醇中，加入 5 倍体积的苯，使溶液冷冻干燥过夜，得到 146mg 橙色固体，FAB 质谱结果为 $m/e = 744$ 。通过高效液相层析表明该产物是纯化形式的，该层析法使用 C18 径向柱，在 5ml/分的流速和含有 3% 乙酸铵的 70% 含水甲醇下洗脱产物。

制备 6 乙基 N-琥珀酰亚胺氧基

羧甲基乙基 2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物

在装有干燥管和搅拌器的圆底烧杯中加入 17.6mg 制备 5 的产物，溶于 1.5ml 无水二甲基甲酰胺中。溶液冷却至 -5° ，加入在 0.1ml 无水二甲基甲酰胺中的 5.2 μ l N-甲基吗啉，混合物于 -5° 搅

拌5分钟，然后加入0.1ml 无水二甲基甲酰胺中的6.14ml异丁基氯甲酸酯，混合物在恒定温度下搅拌30分钟以上。然后加入在0.1ml 无水二甲基甲酰胺中的5.45mg N-羟基琥珀酰亚胺，混合物搅拌20小时，同时使之加热至室温。然后在真空下浓缩成红色残渣，将其溶于最少体积的二氯甲烷中，加到用二氯甲烷平衡的硅胶柱上(0.75×4cm)。柱子用50ml二氯甲烷洗脱，然后用在二氯甲烷中的10%异丙醇洗脱。第二洗脱液在真空下浓缩，残渣溶于最少体积的异丙醇中，在其中加入少量苯。使溶液：冻干燥，得到15.9mg 所需产物， $m/e = 742$ 。在300MHz仪器上通过在 $CDCl_3$ 中的核磁共振谱(NMR)分析证实其身份，该分析在2.8ppm处显示出N-羟基琥珀酰亚胺的信号。

实例1 抗体007B与羰基甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

抗体007B由一杂交瘤产生，该杂交瘤是由产生抗体KS1/4的杂交瘤衍生的亚克隆，它在本说明书的上述抗体部分已讨论过。在3ml的装有搅拌器的管瓶中，加入508 μ l的0.34M 硼酸钠缓冲液(pH8.6)，其中抗体的含量为19.7mg/ml。将0.56mg溶于56.4 μ l无水二甲基甲酰胺中的制备6的产物在室温下加至抗体溶液中，搅拌2小时。然后使混合物在室温下离心，弃掉红色沉淀，上清液加至用生理磷酸缓冲液平衡的1.75×25cm SephadexG-25 M柱中(Pharmacia, Inc., Piscataway, N.J.)。柱子用同样的缓冲液洗脱，收集洗脱柱子的第一个峰。该组分通过Millex-GV(Millipore, Bedford, MA)0.22 μ 滤器过滤，于4°下贮存3天。然后以同样方式再次过滤，用紫外光谱进行测定，显示出

抗体浓度为 1.54 mg/ml ，表明回收到 7.6 mg 结合物。结合比例为每摩尔抗体 2.2 摩尔药物。

实例 1A 抗体 007B 与羰甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

按照实例 1 的方法，用 7.5 mg 抗体和 1.0 mg 制备 6 的产物开始。回收的结合物为 4.94 mg ，结合比例为每摩尔抗体 3.1 摩尔药物，形式为 1.10 mg/ml 浓度的溶液。

实例 2 抗体 HB21 与羰甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

抗体 HB21 是由杂交瘤 ATCC HB21 产生。在 3 ml 装有搅拌器的管瓶中，加入在 0.875 ml 上述实例 1 提及的硼酸缓冲液中的 17.5 mg 抗体 HB21，在其中加入溶于 $97.2\text{ }\mu\text{l}$ 无水二甲基甲酰胺中的 1.3 mg 制备 6 的产物。搅拌反应液，如实例 1 分离结合物，得到浓度为 2.57 mg/ml 的 14.9 mg 结合物，结合比例为 3.8 。

实例 2A 抗体 HB21 与羰基甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

按照实例 2 的方法，用 12 mg 抗体和 1.30 mg 制备 6 的产物开始。过滤后的产物溶液通过真空透析而浓缩，得到含有 3.25 mg 结合物的 0.82 ml 溶液，结合比例为每摩尔抗体 4.5 摩尔药物。

实例 2B 抗体 HB21 与羰基甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

按照实例 2A 的方法，用 12 mg 抗体和 2.60 mg 制备 6 的产物开始。产物为含有 1.37 mg 结合物的 0.72 ml 溶液，结合比例为每摩尔抗体 5.6 摩尔药物。

实例 3 抗体 L4KS 与羧基甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

如 Starling 等人 (J. Cell. Biochem. Supp. 11B: 1982, 1987) 所述, 抗体 L4KS 透析至 0.34M 硼酸钠缓冲液 (pH 8.6) 中, 产生在 0.875 ml 缓冲液中的 17.5 mg 抗体溶液。在其中加入在 97.2 μ l 无水二甲基甲酰胺中的 1.3 mg 制备 6 的产物。如实例 1 进行反应和分离产物, 得到浓度为 2 mg/ml 的 11.6 mg 结合物。结合比例为每摩尔抗体 2.6 摩尔药物。

实例 3A 抗体 L4KS 与羧基甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

重复实例 3 的方法, 用 10 mg 抗体和 0.59 mg 制备 6 的产物开始。产物溶液通过真空透析而浓缩, 得到 1.16 ml 含有 4.03 mg 结合物的溶液, 结合比例为 2.9。

制备 7 L/1C2 抗体的生产

从美国典型培养物收集中心以 HB9682 的保藏号得到 L/1C2 杂交瘤的冷冻小瓶。使小瓶在 37°C 水浴中旋转而融化其内容物, 收集存活细胞。细胞悬浮液用平衡盐溶液 (Grand Island Biological Company (GIBCO), 3175 Staley Road, Grand Island, New York 14072) 以 1:2 稀释, 使悬浮液通过血清垫层离心, 从冷冻基质中分离出细胞。吸出上清, 沉淀中的细胞在 5% 二氧化碳和 37°C 下, 悬浮于在 T75 组织培养瓶中的培养基中 (Ventrex HL-1 Ventrex Laboratories, Portland, ME), 该培养基补充有 10% 小牛血清, 2 mM L-谷氨酰胺 (GIBCO) 和 50 μ g/ml 庆大霉素硫酸盐 (GIBCO)。从几乎汇合的培养物中收

集上清,通过离心去除残留的细胞。使无细胞的上清通过蛋白A Sepharose柱(Pharmacia)而从中纯化抗体。抗体与柱子结合,而培养基被0.01M 磷酸钠(pH8.0)洗掉。然后用0.1M磷酸钠缓冲液(pH3.5)从柱中洗脱抗体。洗脱的抗体立即用pH7.4的1M Trizma缓冲液(Sigma, St. Louis, MO)中和,在含有0.01M 磷酸钠(pH7.4)和0.15M 氯化钠的真空透析仪(Bio-Molecular Dynamics, Beaverton, OR)中透析和浓缩。使抗体制剂通过0.2 μ m孔经过滤而消毒,贮存在4℃备用。

实例4 抗体L/1C2与羰基甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

使在0.94ml 0.34M 硼酸钠缓冲液中的10.1mg抗体L/1C2与在54.7 μ l无水二甲基甲酰胺中的0.85mg制备6的产物合并。反应混合物在室温下搅拌1.5小时,然后如实例1分离产物,产生的溶液在大约5升生理磷酸缓冲液于4°真空透析大约16小时,得到9.16mg结合物,浓度为5.33mg/ml。结合比例为每摩尔抗体1.7摩尔药物。

实例4A 抗体L/1C2与羰基甲基乙基

2- 亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

重复实例4的方法,省掉透析步骤,用24mg抗体和1.75mg制备6的产物开始。回收到在2.69ml溶液中的8.56mg结合物,结合比例为2.8。

制备8 苄氧基

羰基戊基乙基丙二酸酯

在装有搅拌器的圆底烧杯中加入200ml 丙酮、100ml 水和

25.3g 二乙基丙二酸酯。在5分钟内，向溶液中加入78.2ml 2N 氢氧化锂溶液。在室温下搅拌75分钟后，除去挥发物质，残渣悬浮于35ml 无水二甲基甲酰胺中。向其中加入38.3g 苄基6-溴己酸酯，混合物于65° 搅拌20小时。然后使混合物冷却至室温，用1000ml 乙酸乙酯和盐水萃取。萃取液用盐水洗涤2次，然后在真空下浓缩。液体残渣倒在硅胶上，用500ml 庚烷洗涤，用1升含10%乙酸乙酯的庚烷洗脱。然后，用1升含15%乙酸乙酯的己烷洗脱所需产物，通过真空浓缩得到22g 产物。 $m/e = 336$ 。

制备9 苄氧基羧

基戊基乙基2-亚甲基丙二酸酯

在装有冷凝器和搅拌器的烧杯中加入15g 制备8的产物，再加入8.4ml 三乙基原甲酸酯和8.6ml 乙酸酐。然后加入48mg 氯化锌，混合物于125° 搅拌16小时，然后于150-160° 搅拌3.5小时。然后冷却，萃取至600ml 乙酸乙酯和盐水中。萃取液用盐水洗涤2次，在真空下浓缩。液体残渣用500ml 庚烷洗涤，用1500ml 在庚烷中的15%乙酸乙酯，再用500ml 在庚烷中的20%乙酸乙酯洗涤。然后，通过用500ml 在庚烷中的40%乙酸乙酯洗脱而分离所需产物，数量为2.78g。 $m/e = 392$ 。

制备10 5-羧

基戊基乙基2-亚甲基丙二酸酯

在装有搅拌器的小瓶中，加入在2ml 无水乙醇中的0.49g 10% 钨碳催化剂、1g 制备9的产物和1ml 1,4-环己二烯。盖上小瓶，在60° 搅拌5分钟，然后冷却至室温，搅拌30分钟以上。然后过滤，使溶液在真空下浓缩。液体残渣溶于最少体积的乙酸乙酯中，与庚烷

混合，然后通过硅胶层析纯化，首先用250ml含10%乙酸乙酯的庚烷洗涤，然后用250ml含30%乙酸乙酯的庚烷洗涤。500ml含50%乙酸乙酯的庚烷洗脱掉0.56g所需产物， $m/e = 303$ 。

制备11 5-羧基戊基乙基

2-亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物

以与上述制备5的产物相同的方法，使此处的中间产物丙二酸酯与阿霉素分子共价结合。

以与上述制备5的同样方式进行反应，用142mg阿霉素盐酸、159mg制备10的产物和75.5mg碳酸氢钠开始。按制备5所述分离产物，用60ml 70%甲醇的乙酸缓冲液从柱中洗脱产物。该产物如制备5所述进一步纯化，得到95mg红色固体产物， $m/e = 403, 398$ 。

制备12 乙基N-琥

珀酰亚胺氧基羧基戊基 2-

亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物

基本上如制备6所示，在N-甲基吗啉和异丁基氯甲酸酯的存在下，使12.5mg制备11的产物与3.6mg N-羟基琥珀酰亚胺反应，得到9.7mg所需产物， $m/e = 896$ 。

实例5 抗体007B与羧基戊基乙基

2-亚甲基丙二酸酯的阿霉素加成物的结合物

进行两种结合反应。在每一种结合反应中，抗体007B都是0.862μl在0.34M硼酸钠缓冲液(pH8.6)中的溶液，其中抗体的含量为17.4mg/ml。

1. 加入溶于95.8μl无水二甲基甲酰胺中的1.17mg制备12

的产物。

2. 加入溶于 $95.8\mu\text{l}$ 无水二甲基甲酰胺中的 1.79mg 同样的中间产物。

两种反应都在室温下进行1.5小时，然后在 $1.75\times 25\text{cm}$ Sephadex G-25M 柱上层析。收集每一种中的含有产物的组分，通过Millex-GV 0.22μ 滤器过滤，在 4°C 下贮存16小时。再次使产物过滤，通过紫外分光光度法测定。

1. 回收到浓度为 $1.75\text{mg}/\text{ml}$ 的 11.1mg 结合物。结合比例为每摩尔抗体3.8摩尔药物。

2. 回收到浓度为 $1.33\text{mg}/\text{ml}$ 的 6.7mg 产物，结合比例为4.5摩尔药物/摩尔抗体。

制备13 羧基戊基乙基

2-(4-脱乙酰基-23-脱甲氧

基长春花碱-23-胍撑)-亚甲基丙二酸酯

60.2mg 4-脱乙酰基-23-脱甲氧基长春花碱-23-胍硫酸盐溶于 1ml 无水二甲基甲酰胺中，向其中加入 48.6mg 溶于 0.5ml 无水二甲基甲酰胺中的制备10.产物。混合物于室温下搅拌16小时，然后在真空下除去挥发物质。残渣溶于最少量的甲醇中，加水使其产生15%的含水甲醇溶液。溶液加在用10%甲醇水溶液平衡的C18快速层析柱($1.5\times 60\text{cm}$)中。柱子用浓度逐渐增高的含水甲醇洗脱，发现产物在含有60%甲醇和100%甲醇的组分中洗脱出。合并含有产物的组分并在真空下浓缩，残渣溶于最少量的甲醇中。加入大量的苯(100ml)，使溶液冷冻干燥后得到 46mg 所需中间产物， $m/e = 952$ 。

制备14 乙基N-琥珀酰亚胺

氧基羰基戊基2-(4-脱乙酰基-23-

脱甲氧基长春花碱-23-胍撑)亚甲基丙二酸酯

36.9mg 制备13的产物溶于2ml无水二甲基甲酰胺中,在10.8 μ l N-甲基吗啉和8.5 μ l 异丁基氯甲酸酯的存在下及在-20 $^{\circ}$ 下,使之与在无水二甲基甲酰胺中的7.56mg N-羟基琥珀酰亚胺反应5分钟,混合物缓慢加热至室温,然后加热至40 $^{\circ}$ 30分钟。然后冷却至室温并搅拌16小时,在真空下除去挥发物质。残渣溶于二氯甲烷中,并加到0.75 $\times$ 6cm 硅胶柱上。柱子用20ml二氯甲烷洗脱,然后用30ml 1:1的乙酸乙酯:二氯甲烷洗脱掉产物。洗脱液在真空下浓缩后得到28.3mg所需产物,通过NMR进行鉴别,呈现出2.88ppm处的N-羟基琥珀酰亚胺信号。

实例6 抗体L4KS与羰基戊基

乙基2-(4-脱乙酰基-23-脱甲氧基长

春花碱-23-胍撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

进行两种结合反应。在每一种结合反应中,抗体L4KS都是625 μ l 含有16mg/ml的0.34M 硼酸钠缓冲液(pH0.6)。

1. 在抗体溶液中加入0.75mg溶于51 μ l无水二甲基甲酰胺中的制备14的产物。

2. 加入1.2mg溶于51 μ l无水二甲基甲酰胺中的同样的中间产物。

两种反应混合物都在室温下搅动1.5小时,然后离心分离出白色沉淀。上清都用1.75 $\times$ 25cm Sephadex G-25M 柱层析,该柱用生理磷酸缓冲液平衡并用同样的缓冲液洗脱。收集每个柱中含有产

物的组分,通过Millex-GV 0.22 μ 滤器过滤,在4℃下贮存17天。然后以同样方式再次过滤,通过紫外分光光度法测定。

1. 回收到浓度为1.26mg/ml的6.3mg结合物,结合比例为2.5摩尔/摩尔。

2. 产物为0.68mg/ml浓度的4.5mg结合物,结合比例为3.6摩尔/摩尔。

实例 6A 抗体L4KS 与羰基戊基

乙基2-(4-脱乙酰基-23-脱甲氧基长

春花碱-23-肼撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

重复实例6的方法,用595mg抗体和57.9mg制备14的产物开始。通过真空透析浓缩产物溶液,浓缩液再次无菌过滤,得到17.8ml含有125mg结合物的溶液,结合比例为2.8摩尔/摩尔。

实例 7 抗体007B 与羰基戊基

乙基2-(4-脱乙酰基-23-脱甲氧基长

春花碱-23-肼撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

进行3种结合反应。在每一种结合反应中,都是以0.5ml 0.34M 硼酸钠缓冲液(pH8.6)的形式提供10mg抗体007B。

1. 加入0.89mg在41 μ l无水二甲基甲酰胺中的制备14的中间产物。

2. 加入1.20mg在41 μ l无水二甲基甲酰胺中的同样的中间产物。

3. 加入1.49mg在41 μ l无水二甲基甲酰胺中的同样的中间产物。

三种反应都在室温下搅拌1.5小时,然后离心,上清如实例6所

述进行层析。收集含有产物的组分，通过紫外分光光度法测定。

1. 回收到浓度为 $1.35\text{mg}/\text{ml}$ 的结合物 5.95mg ，结合比例为 3.0 摩尔/摩尔。

2. 回收到浓度为 $0.76\text{mg}/\text{ml}$ 的结合物 3.76mg ，结合比例为 3.6 摩尔/摩尔。

3. 回收到浓度为 $0.34\text{mg}/\text{ml}$ 的结合物 1.54mg ，结合比例为 6.1 摩尔/摩尔。

实例 7A 抗体 007B 与羰基戊基

乙基 2-(4- 脱乙酰基-23-脱甲氧基长

春花碱-23-肼撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

重复实例 7 的方法，用 396mg 抗体和 35.6mg 制备 14 的产物开始。使产物真空透析和消毒过滤后得到含有 307mg 结合物的 39.4ml 溶液，结合比例为 2.6 摩尔/摩尔。

实例 8 抗体 9.2.27 与羰基戊

基乙基 2-(4- 脱乙酰基-23-脱甲氧基长

长春花碱-23-肼撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

抗体 9.2.27 可参见 Bumol 和 Reisfeld (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1245, 1982)。与该抗体进行 3 种结合反应，在每一种反应中，都是以 0.36ml 0.34M 硼酸钠缓冲液 (pH 8.6) 形式的 10mg 抗体开始。

1. 加入 0.6mg 溶于 $41\mu\text{l}$ 无水二甲基甲酰胺中的制备 14 的中间产物。

2. 加入 0.89mg 溶于 $41\mu\text{l}$ 无水二甲基甲酰胺中的同样的中间产物。

3. 加入1.2mg 溶于41 μ l无水二甲基甲酰胺中的同样的中间产物。

搅拌反应混合物，离心并如实例7所述层析，通过紫外分光光度法测定产物。

1. 回收浓度为0.95mg/ml的结合物5.2mg，结合比例为3.4摩尔/摩尔。

2. 回收浓度为0.32mg/ml的结合物1.5mg，结合比例为6.1摩尔/摩尔。

3. 回收浓度为0.16mg/ml的结合物0.6mg，结合比例为7.3摩尔/摩尔。

实例9 抗体L₁102 与羰基戊

基乙基2-(4-脱乙酰基-23-脱甲氧基

长春花碱-23-胍撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

将2.9ml 含有43mg 抗体L₁102 的0.34M 硼酸钠缓冲液 (pH8.6) 与含有10.7mg/ml 制备14 中间产物的238 μ l 无水二甲基甲酰胺溶液合并。如上述实例7进行反应，分离并测定产物。回收浓度为0.69mg/ml的结合物9.35mg，结合比例为2.6摩尔/摩尔。

制备15 乙基N-

(2-苄氧基羰基乙基)丙二酸酯

在100ml 烧杯中加入2g 5% 的钨碳氢化催化剂、10g苄基乙基丙二酸酯和8.6ml 1,4-环己二烯。在室温下搅拌混合物，在大约40 分钟后反应开始放热。继续搅拌，直到反应混合物再次冷却至室温，然后使混合物过滤，在真空下从滤液中除去溶剂。得到的浆液

残渣溶于最少量的乙酸乙酯中，倒入150ml 的硅胶漏斗中。用400 ml 含20%乙酸乙酯的己烷洗涤硅胶，然后用400 ml 乙酸乙酯洗涤所需的中间产物。洗脱液在真空下浓缩，得到5.48g 作为粘液的中间产物。

上述中间产物溶于100ml 无水二甲基甲酰胺中，加入并溶解4.77g N- 羟基琥珀酰亚胺。然后，分步加入8.56g 二环己基碳化二亚胺，反应混合物开始放热。然后在室温下搅拌过夜，过滤。加入8.95g 苄基3- 氨基丙酸酐并溶于滤液中，然后加入4.56ml N- 甲基吗啉。混合物在室温下搅拌1.5小时，然后用乙酸乙酯和盐水萃取混合物。有机层用10%的含水柠檬酸、盐水、饱和的含水碳酸钠洗涤，再用盐水洗涤后干燥，过滤并在真空下浓缩。浆液残渣溶于乙酸乙酯中，加入己烷直至溶液呈现混浊。然后倒入硅胶中，用含10%、20% 和30%乙酸乙酯的乙烷各200ml 洗涤硅胶。然后，用600ml 的含40%乙酸乙酯己烷洗脱所需产物。使产物溶液在真空下浓缩，得到5.05g 浅黄色粘液状的所需产物。用质谱进行鉴定，显示出重293的分子离子。元素分析如下。

理论, C, 61.42; H, 6.57; N, 4.78;

测定, C, 61.21; H, 6.31; N, 4.76。

制备 16 乙基N-(2- 苄氧

基羰基乙基)-2- 乙氧基亚甲基丙二酸酯

5.05g 制备15 的产物溶于10.7ml乙酸酐中，加入7.45ml 三乙基原甲酸酯。然后在混合物中加入80mg 氯化锌，在140-150°回流下搅拌混合物16小时。然后冷却至室温，在真空下除去挥发物质。用己烷乙酯和盐水萃取残渣，有机层用盐水洗涤后干燥，过滤并在真

空下浓缩。残渣溶于最少量的乙酸乙酯中，通过加入己烷使溶液呈现混浊。然后倒在硅胶中，用乙酸乙酯含量逐渐升高的己烷洗脱硅胶。用30%和50%乙酸乙酯得到含有产物的组分，收集后在真空下浓缩，得到3.4g所需产物，质谱中的分子离子重为349。

制备17 乙基N-(2-羧
基乙基)-2-乙氧基亚甲基丙二酸酯

1.64g 制备16的产物加至10ml乙醇和0.5g 5% 钨碳氢化催化剂中。加入0.89ml 1,4-环己二烯，使混合物加热回流，冷却后在室温下搅拌1小时。然后再加热，冷却并搅拌1小时以上。然后使混合物过滤，滤液在真空下浓缩。残渣用乙酸乙酯研制，通过过滤收集固体，用乙醚洗涤后得到0.61g所需产物，质谱分析显示260、244、214和171的分子离子。

制备18 乙基N-(2-羧基乙基)
-2-(4-脱乙酰基-23-脱甲氧基长
春花碱-23-胍撑)亚甲基丙二酸酯

将67mg制备17的产物加至含有196mg 4-脱乙酰基-23-脱甲氧基长春花碱-23-胍硫酸盐的1ml无水二甲基甲酰胺溶液中。混合物在室温下搅拌过夜，在真空下除去溶剂。残渣溶于含有20%甲醇的0.5M KH_2PO_4 缓冲液(pH 7)中，并加到 C_{18} 反相硅胶柱上。用甲醇浓度逐步上升的同样缓冲液洗脱柱子，合并含有产物的组分，在真空下浓缩。然后使残渣溶于几毫升水中，溶液加到同一类型柱上，用甲醇含量逐步上升的水洗脱。合并含有产物的组分，在真空下浓缩后得到197mg所需的中间产物。

制备 19 乙基N-(2- 琥珀酰亚
胺氧基羰基乙基)-2-(4-脱乙酰基-23-脱
甲氧基长春花碱-23-肼撑) 亚甲基丙二酸酯

159mg 制备 18 的产物溶于2ml无水二甲基甲酰胺中，向其中加入20.5mg N-羟基琥珀酰亚胺，33.4mg二环己基碳化二亚胺和30.8mg对甲苯磺酸水合物。混合物在室温下搅拌24小时，在真空下除去溶剂。残渣溶于二氯甲烷中，并加到用二氯甲烷平衡的硅胶柱上。柱子用1:1的异丙醇：二氯甲烷洗脱，合并含有产物的组分，在真空下浓缩后得到45.2mg所需的中间产物。

实例 10 抗体 007B 与乙基N-(2-
羰基乙基)-2-(4-脱乙酰基-23-脱甲

氧基长春花碱-23-肼撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

进行3种结合反应，基本上采用实例6的方法，在每一种反应中都都用15mg在1.03M硼酸缓冲液中的抗体开始。在3种反应中使用下列数量的制备19的产物。

1. 0.86mg

2. 1.08mg

3. 1.30mg

3种反应混合物都在室温下搅拌1小时，进行离心和层析，使产物溶液灭菌过滤后得到下列产物。

	1	2	3
结合物	14.9mg	14.9mg	13.6mg
体积	6.2ml	6.5ml	7.2ml
结合比例	3.3	4.1	4.9

实例 11 抗体 007B 与乙基 N-(2-
羰基乙基)-2-(4-脱乙酰基-23-脱甲氧基
长春花碱-23-肼撑)-亚甲基丙二酸酯的结合物

基本上根据实例 6 进行结合反应，用 200mg 抗体 007B(14.6 mg/ml 的溶液) 和 18mg 制备 19 的产物开始。使产物灭菌过滤，真空透析后得到 163mg 形式为 12.0mg/ μ l 溶液的结合物，结合比例为 4.3。

实例 12 抗体 007B 的 F(ab)₂ 片段与乙
基 N-(2-羰基乙基)-2-(4-脱乙酰基-23-脱
甲氧基长春花碱-23-肼撑) 亚甲基丙二酸酯的结合物

600mg 抗体 007B 的 F(ab)₂ 片段溶于 30ml 0.34M 的硼酸缓冲液 (pH8.6) 中。在其中滴加含有 51mg 制备 19 中间产物的 3.75ml 无水二甲基甲酰胺，混合物在室温下搅拌 30 分钟。然后离心，上清在 Phenyl Sepharose CL-4B (Pharmacia) 柱上层析，先用 0.1M pH6.2 磷酸缓冲液，然后用 40% 含水乙腈洗脱。通过在生理缓冲盐水中透析浓缩含有产物的组分，得到 214 mg 所需的结合物，结合比例为 2.9 摩尔/摩尔。

测试 I 体外测试

在离体系统中测试本发明的代表性结合物，以证实结合物的活性。在这些测试中，通过测定结合物对来自人癌细胞的组织培养物的细胞毒性，以确定细胞毒性药物结合物的效力。所用细胞为 UCLA/P3 细胞系（一种人肺腺癌）和 T222 细胞系（一种人鳞状癌）。下表以结合物中的药物含量为基础，以 50% 的抑制浓度给出了结合物的活性。

实例	UCLA/P3	T222
2A	$0.1\mu\text{g}/\text{ml}$	$>10\mu\text{g}/\text{ml}$
2B	>10	>10
3A	>10	>10
4	>10	
4A	>10	3.3
6A	<0.0001	
11	0.26	

测试Ⅱ 小鼠中的UCLA/P3

体内测试实例 6A 的结合物，在 Charles River 雌性裸鼠中测定它对于 UCLA/P3 肺腺癌的异体移植物的活性。测试开始时，在每只小鼠中皮下移植 10^7 UCLA / P3 肿瘤细胞。在移植后的第 2、5 和 8 天，对每只小鼠注射结合物，或对未处理对照注射生理缓冲盐水。结合物的剂量范围为 $0.09\text{mg}/\text{kg}$ 至 $3\text{mg}/\text{kg}$ ，以药物量为基础。在移植后的第 15、21 和 28 天，测定由移植诱导的肿瘤的大小。每个处理组由 5 只小鼠组成，而未处理对照组由 10 只小鼠组成。

在第 28 天， $0.38\text{mg}/\text{kg}$ 或大于此剂量的处理均对肿瘤产生 100% 的抑制。 $0.19\text{mg}/\text{kg}$ 的处理对肿瘤生长产生大约 60% 抑制， $0.09\text{mg}/\text{kg}$ 的处理对肿瘤生长产生大约 25% 的抑制。

测试Ⅲ 小鼠中的UCLA/P3肿瘤

基本上根据测试Ⅱ所述，测试实例 7A 的结合物针对小鼠中由 UCLA/P3 细胞移植而诱导的肿瘤的活性。在此测定中，在移植后的第 16、19、22 和 25 天，以 0.25 、 0.5 、 1 和 $2\text{mg}/\text{kg}$ （以药物量为基础）的剂量施用结合物。并在同一天测量肿瘤的大小。

发现 $0.25\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量对肿瘤稍有抑制，在移植后第 50 天，给予该剂量的小鼠的肿瘤平均重约 7500mg 。而此时对照小鼠的肿瘤平均重约 8000mg 。而其他剂量基本上能抑制肿瘤生长。

在移植后第 70 天，接受 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 剂量的小鼠的肿瘤平均重约 4000mg ；接受 $1\text{mg}/\text{kg}$ 剂量的小鼠的肿瘤平均重约 2000mg ；而接受 $2\text{mg}/\text{kg}$ 剂量的小鼠的肿瘤平均重仅约 500mg 。

组合物及使用方法

本发明的结合物可用于治疗方法中，这是本发明的重要方面。因此，本发明还包括用于治疗方法中的非肠道施用的药物组合物。这种组合物由药物化学领域中的常规方法制备。本发明的组合物能够以可接受的溶解度溶于生理上可接受的液体（例如生理盐水和其他能够安全地进行非肠道施用的水溶液）。

非肠道施用的产品通常配制并分散于固体中，优选冷冻干燥的固体，在使用前临时再构成。这种制剂是本发明的有用组合物。药物化学家非常熟悉其制备；一般说来，它们含有无机盐混合物，以提供等渗性，以及分散剂如乳糖，以使干燥制剂在再构成时迅速溶解。在使用时，用高度纯化的水以已知浓度再配制这种制剂。

用结合物和含有结合物的组合物治疗需用结合物中的药物治疗的病人。治疗的特殊目的和给药的剂量范围，根据药物的种类及待治疗病人的状况确定。从标准的医学文献中，可找到药物的特殊效应及其适当的剂量范围的指南。