



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104662000 B

(45)授权公告日 2018.08.17

(21)申请号 201380025775.8

(22)申请日 2013.05.14

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104662000 A

(43)申请公布日 2015.05.27

(30)优先权数据

61/647,300 2012.05.15 US

61/648,532 2012.05.17 US

61/648,406 2012.05.17 US

61/652,512 2012.05.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.11.17

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/041027 2013.05.14

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/173392 EN 2013.11.21

(73)专利权人 索伦托医疗有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 苗振伟 洪予丰 朱同

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇

(51)Int.Cl.

C07D 207/16(2006.01)

C07D 401/12(2006.01)

A61K 31/401(2006.01)

A61K 47/06(2006.01)

(56)对比文件

CN 101087611 A, 2007.12.12, 权利要求36-57, 说明书附图图17, 图19.

Laurent Ducry et al..Antibody-Drug  
Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to  
Monoclonal Antibodies.《Bioconjugate  
Chem.》.2012,第21卷5-13.

审查员 姜雪

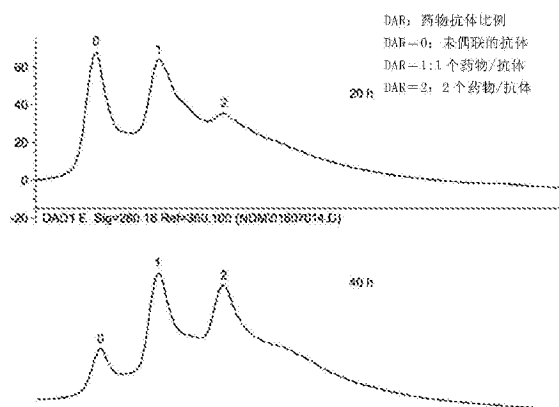
权利要求书9页 说明书69页 附图16页

(54)发明名称

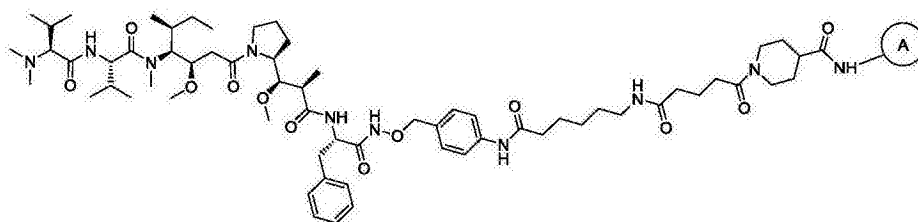
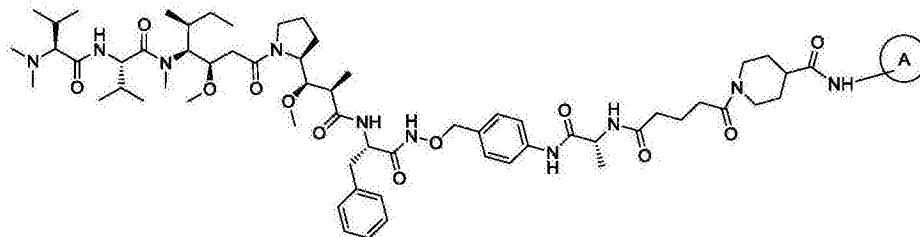
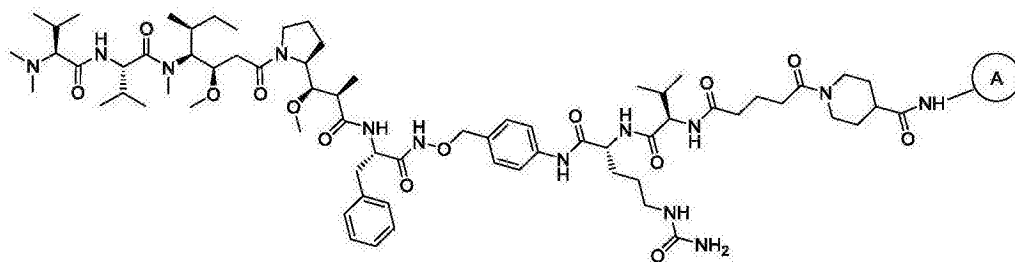
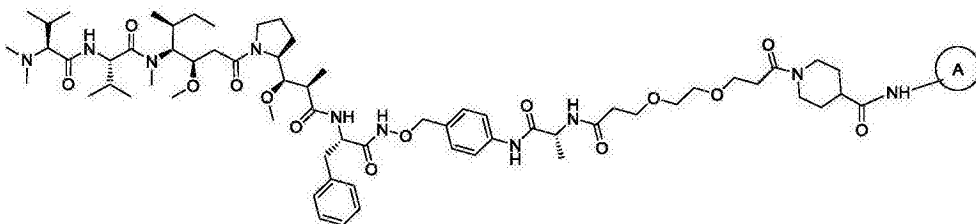
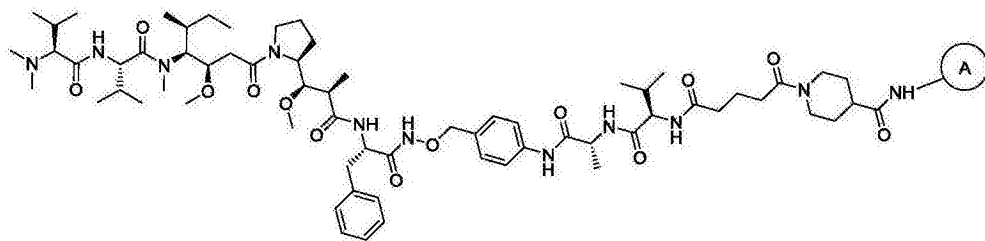
药物偶联物及其偶联方法和用途

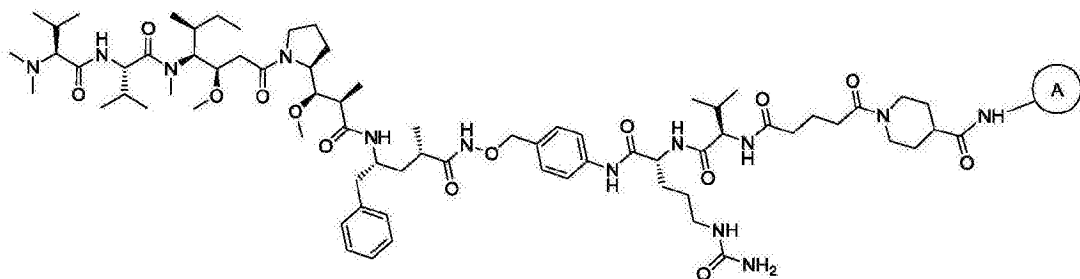
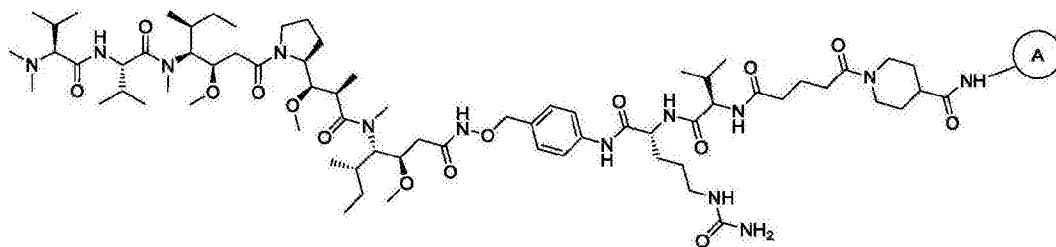
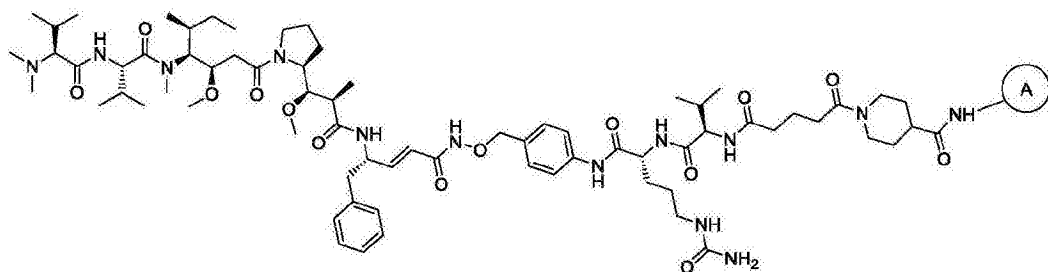
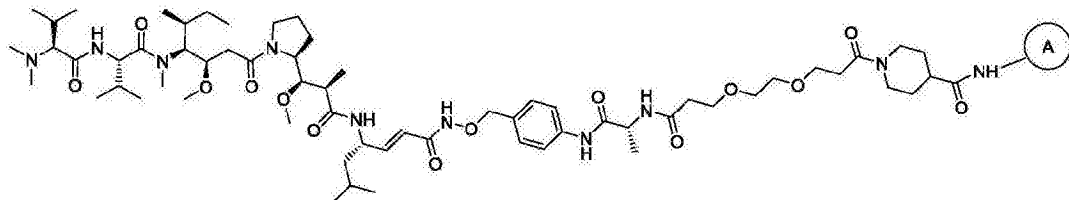
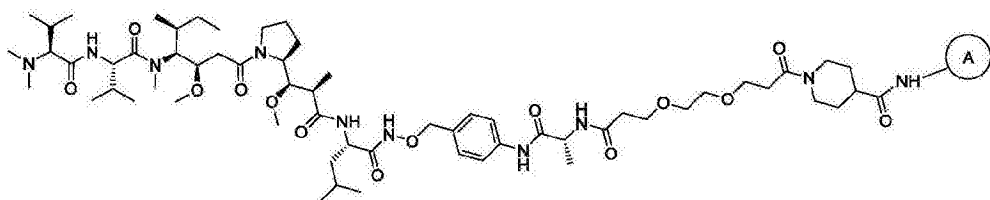
(57)摘要

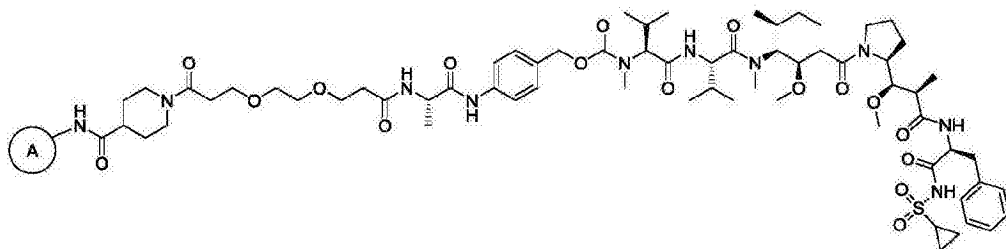
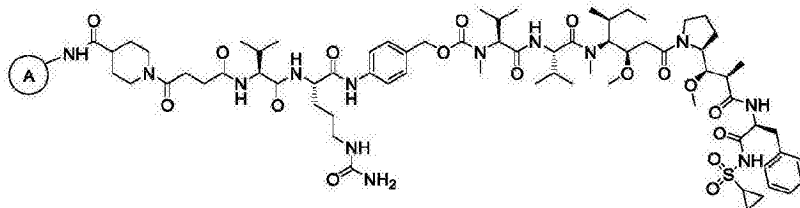
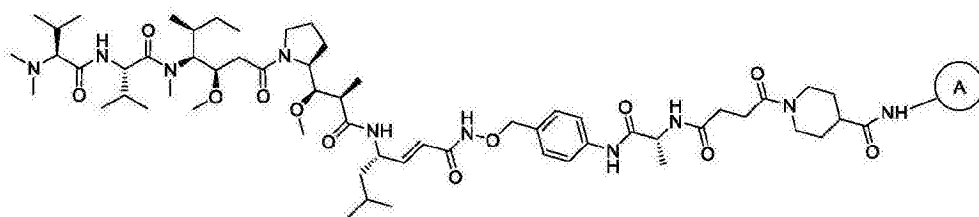
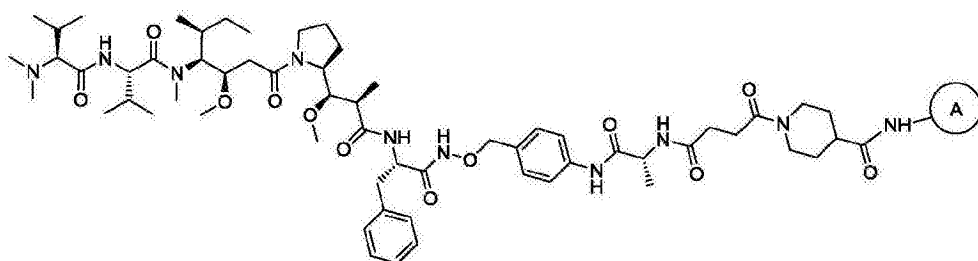
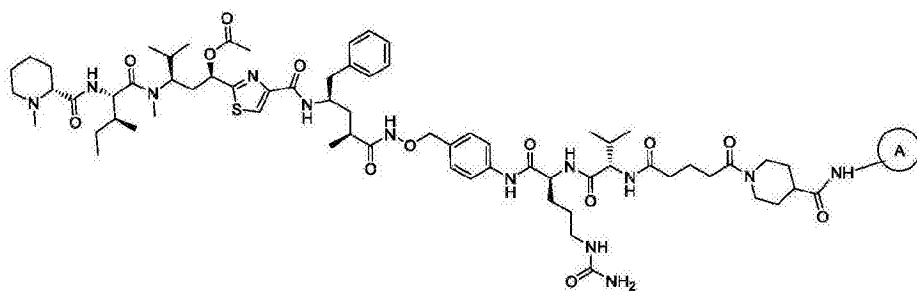
一方面,本发明提供一种活性剂-偶联物,制备该活性剂-偶联物的方法及其用途。

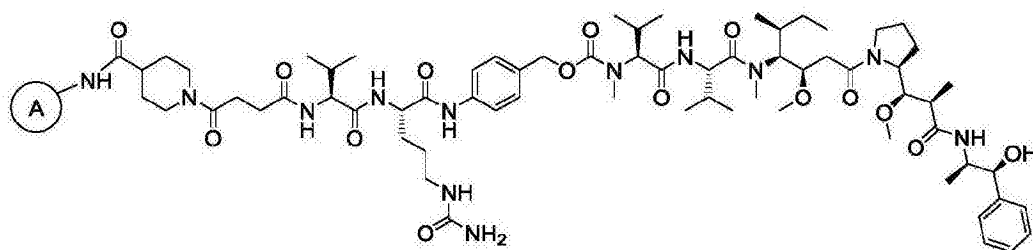
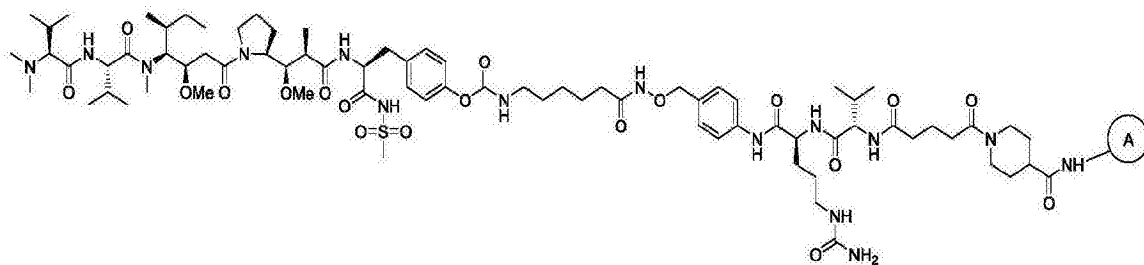
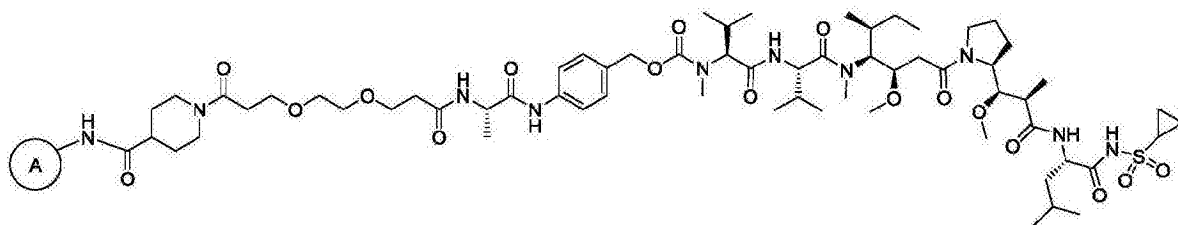
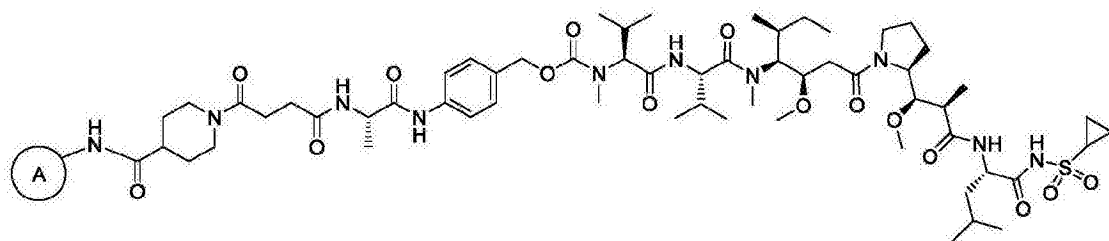
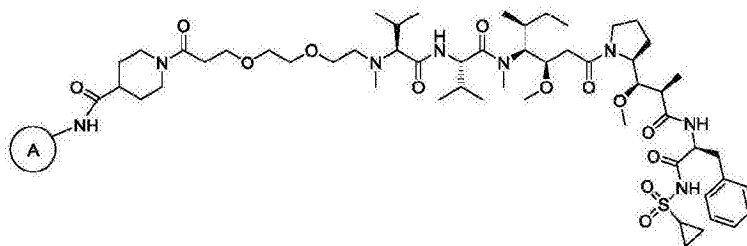


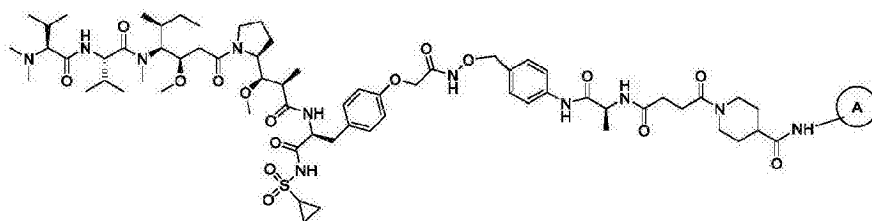
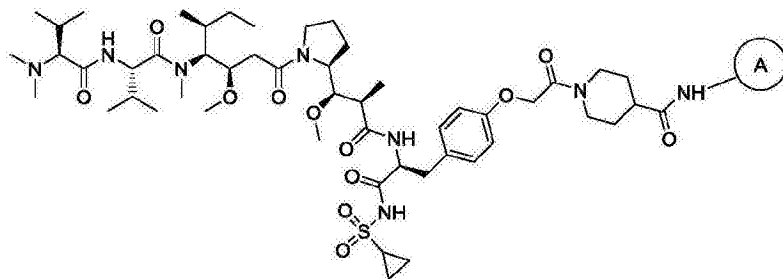
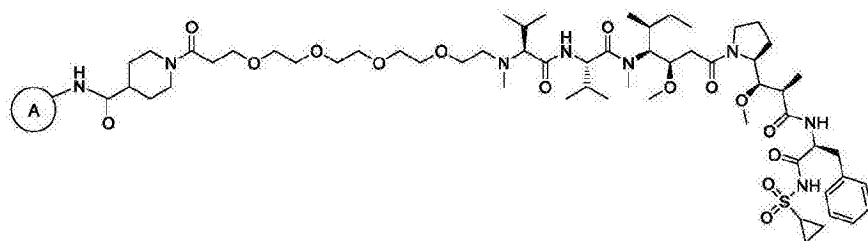
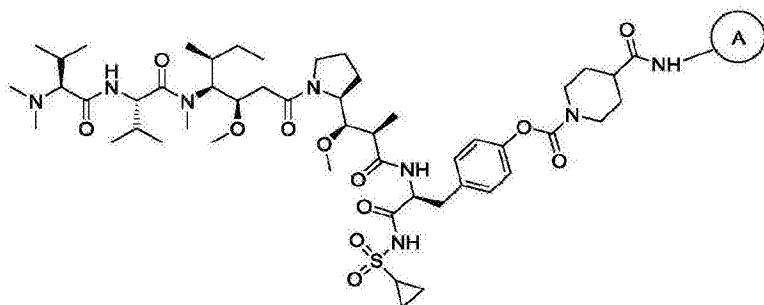
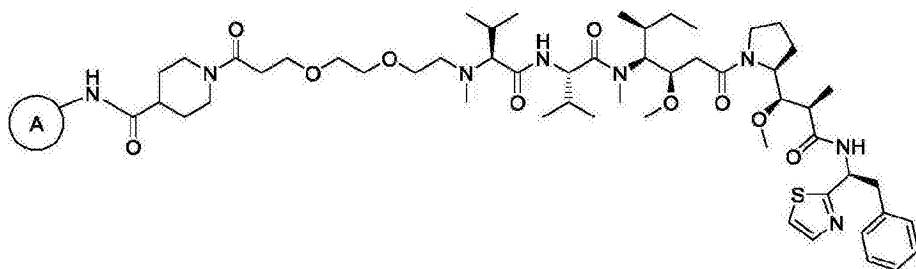
1. 一种活性剂-偶联物,其选自如下组:

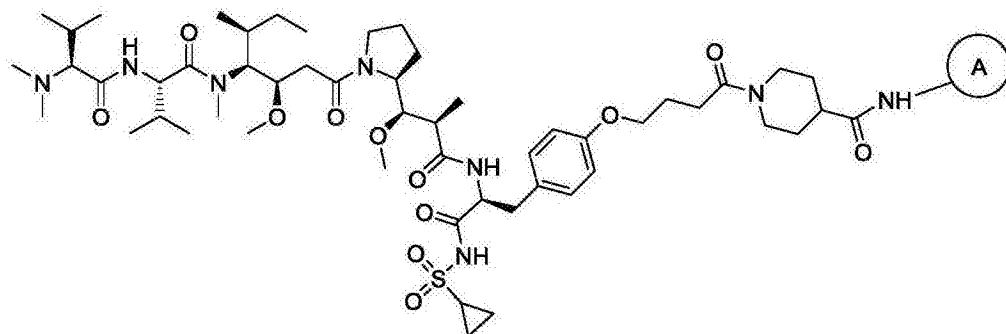
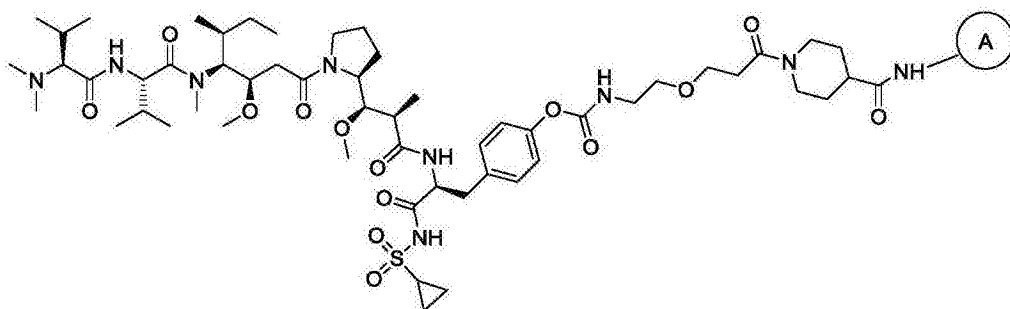
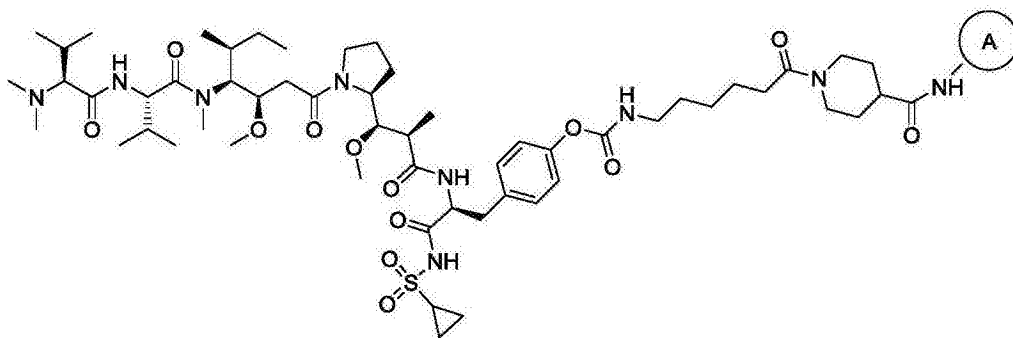
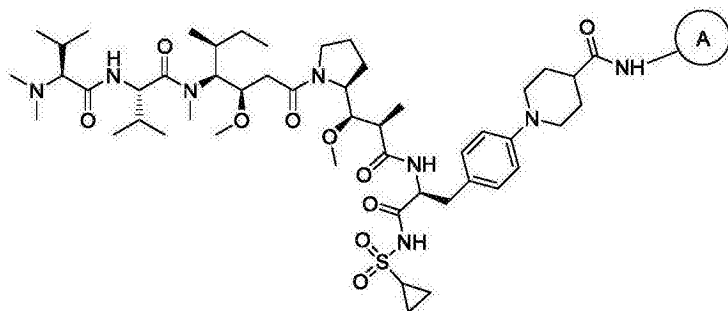


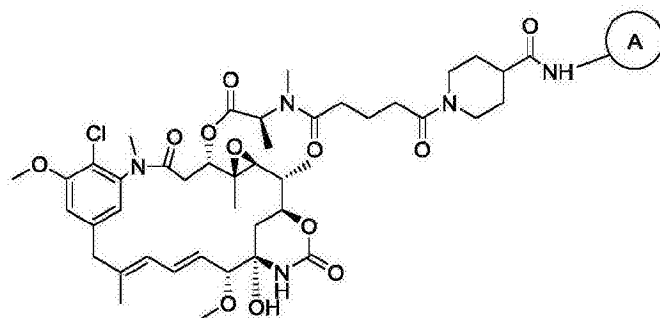
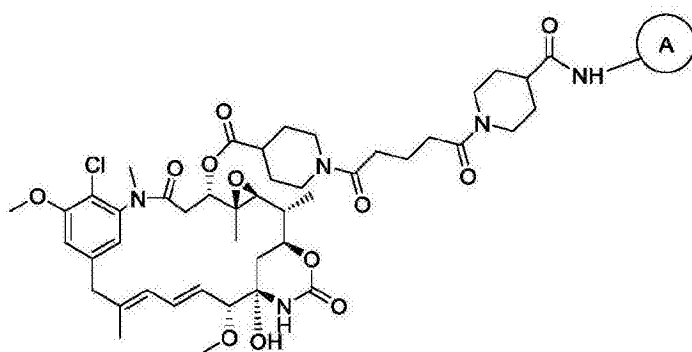
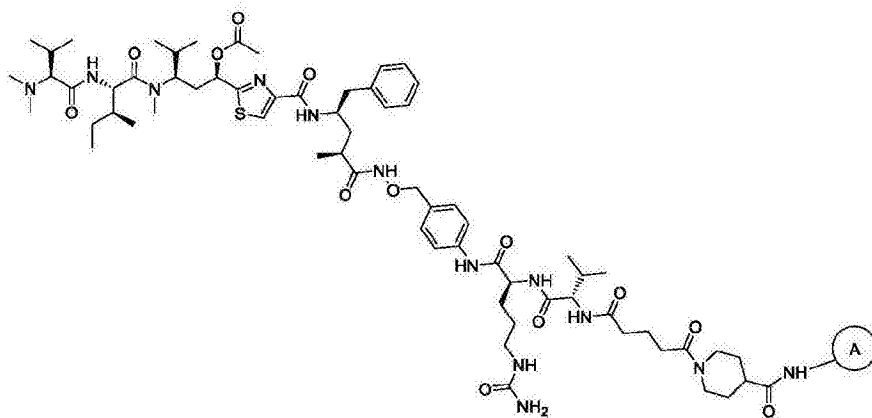
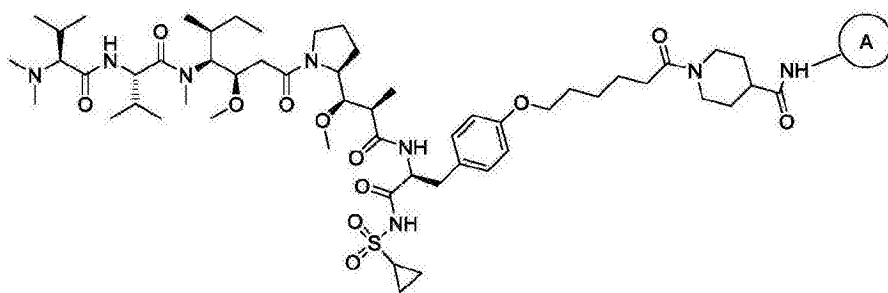


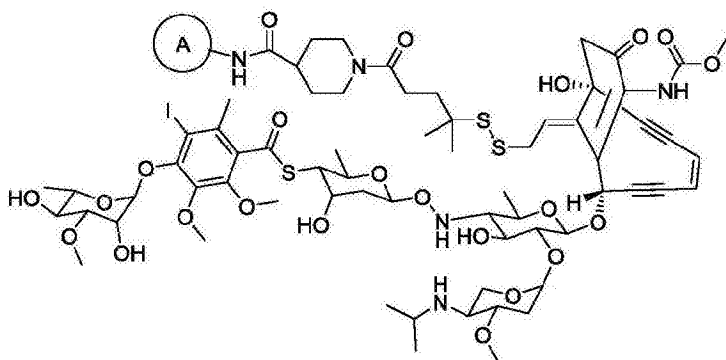
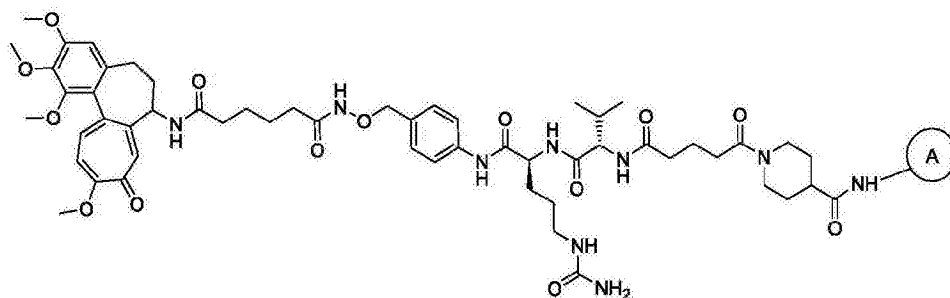
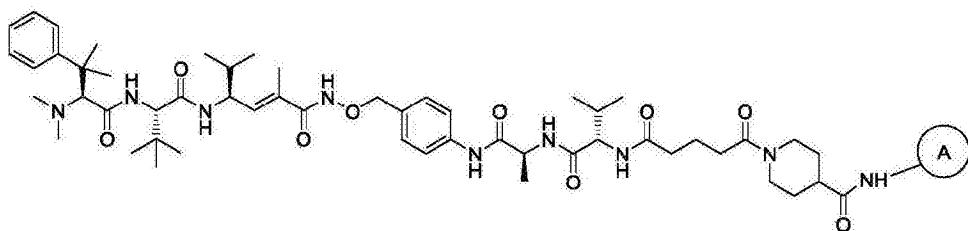
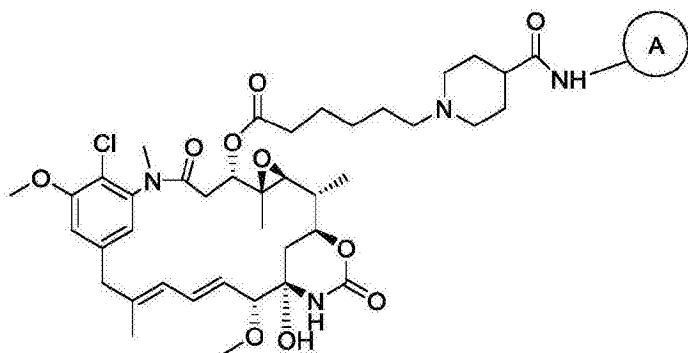


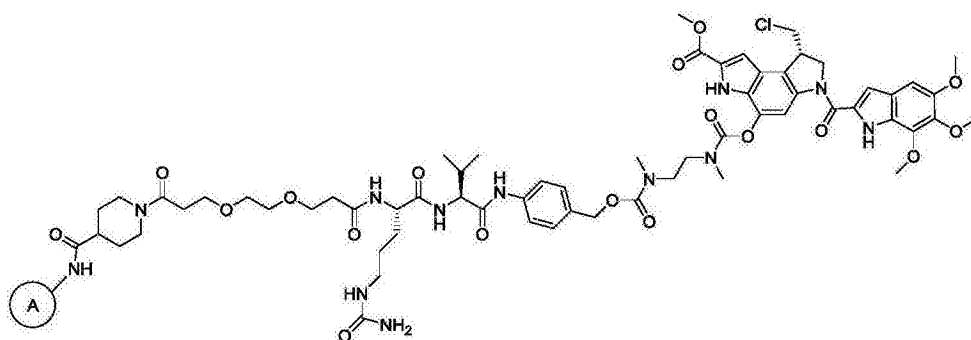
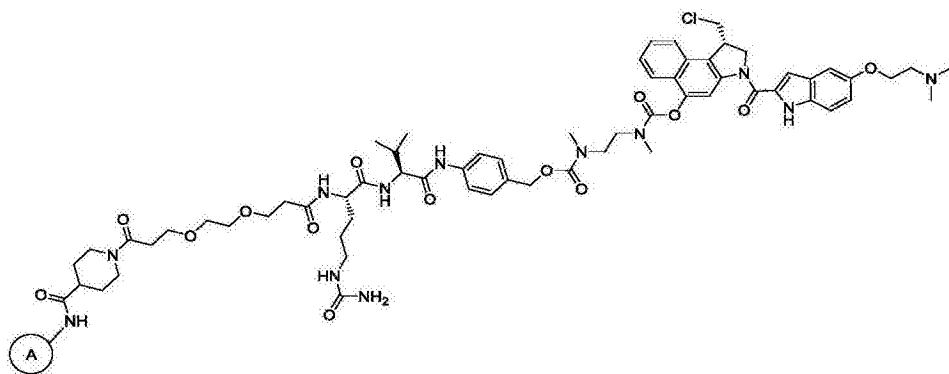




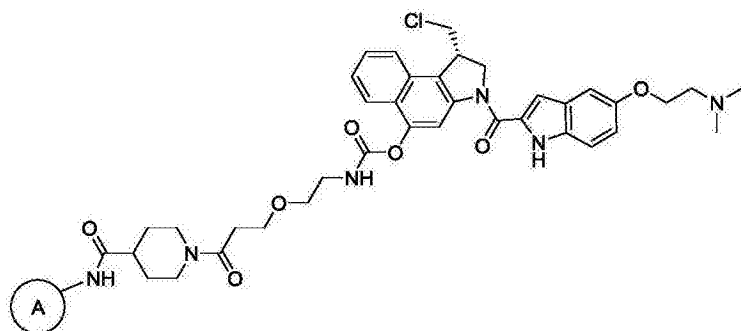








和

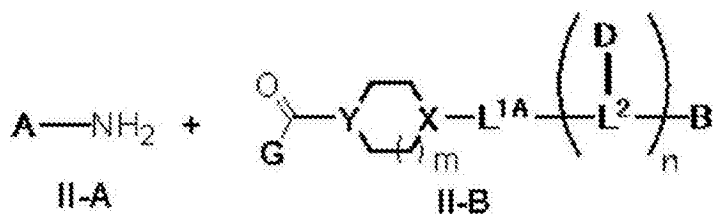


;

其中所述的A为抗体或抗体片段。

2.一种化学合成方法,包括:

式II-A所示的化合物与式II-B所示的化合物反应,得到权利要求1所述的活性剂一偶联物,



其中,G选自下组:-F、-Cl、-Br、-I、-N<sub>3</sub>、-OR、SR、-ONRR、RC(=O)O-、和RSO<sub>2</sub>-O-;R是任选取代的烷基、任选取代的芳基、或取代的杂环;A为抗体或抗体片段;X为N;Y为CH;m=1。

## 药物偶联物及其偶联方法和用途

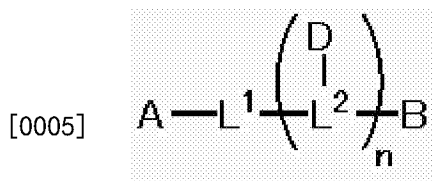
### 背景技术

[0001] 近年来已经发现,抗体(或抗体片段,如单链可变片段)可以与有效负载药物相连形成称为抗体-药物偶联物,即ADC的免疫偶联物。抗体引导ADC结合到靶细胞。通常,ADC随后被细胞内化,释放药物,治疗细胞。由于靶向作用,其副作用可能比系统给予该药物的副作用低。

[0002] 概要

[0003] 多个实施方式提供了活性剂-偶联物和制备活性剂-偶联物的方法及其用途。

[0004] 多个实施方式提供了具有式I所示结构的活性剂-偶联物:



(I)

[0006] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0007] A为靶向部分;

[0008] B为辅助部分,可任选的包括第二靶向部分,或B为空;

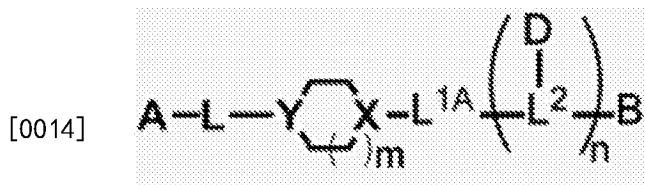
[0009] L¹包括至少含有一个N(氮)原子的基团;

[0010] 每个D是独立选择的,其中每个D包括活性剂;

[0011] 每个L²独立地为连接物,其中至少一个L²与L¹相连;以及

[0012] n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中,L¹包括-C(=O)-。

[0013] 多个实施方式提供了具有式Ia所示结构的活性剂-偶联物:



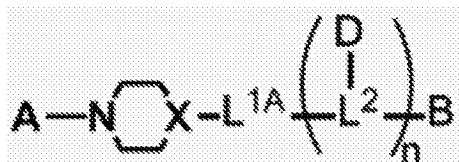
(Ia)

[0015] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0016] A为靶向部分;B为辅助部分,可任选的包括第二靶向部分,或B为空;每个D是独立选择的,其中每个D包括活性剂;每个L²独立地为连接物;n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;X为N(氮)或CH;Y为N(氮),或CH;m为0,1,或2;L为连接物,或为空;以及L¹A为连接物,或为空。

[0017] 多个实施方式提供了具有式Iaa所示结构的活性剂-偶联物:

[0018]



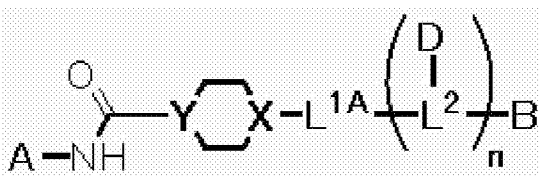
(Iaa)

[0019] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0020] A为靶向部分;B为辅助部分,可任选的包括第二靶向部分,或B为空;每个D是独立选择的,其中每个D包括活性剂;每个 $L^2$ 独立地为连接物;n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;X为N(氮)或CH;以及 $L^{1A}$ 为连接物,或为空。

[0021] 多个实施方式提供了活性剂-偶联物,具有式Iab所示的结构:

[0022]



(Iaa)

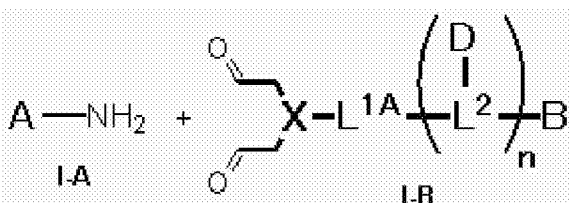
[0023] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0024] A为靶向部分;B为辅助部分,可任选的包括第二靶向部分,或B为空;每个D是独立选择的,其中每个D包括活性剂;每个 $L^2$ 独立地为连接物;n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;X为N(氮)或CH;以及 $L^{1A}$ 为连接物,或为空。

[0025] 多个实施方式提供了一种化学合成方法,包括:

[0026] 式I-A所示的胺与式I-B所示的二醛反应提供式Iaa所示的活性剂-偶联物。

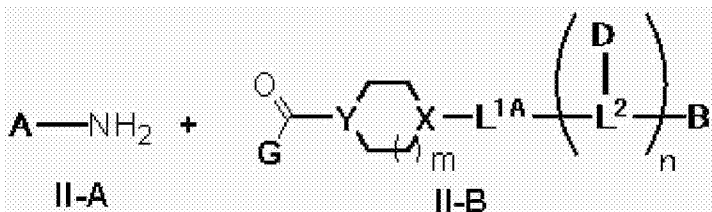
[0027]



[0028] 多个实施方式提供了一种化学合成方法,包括:

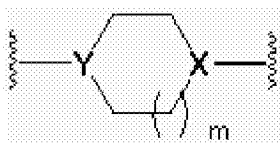
[0029] 式II-A所示的化合物与式II-B所示的化合物反应提供式Iab所示的活性剂-偶联物。

[0030]

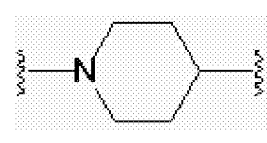


[0031]

在多个实施方式中,



可以是:





括-NH-C(=O)-、-NH-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-O-。在多个实施方式中, L可以是-NH-C(=O)-、-NH-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-O-。在多个实施方式中, L可以为空。在多个实施方式中, L包括-C(=O)-、-NH-C(=O)-、-C(=O)-O-、-NH-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-O-。在多个实施方式中, L可以是-C(=O)-、-NH-C(=O)-、-C(=O)-O-、-NH-C(=O)-NH-或-NH-C(=O)-O-。在多个实施方式中, L可以是-C(=O)-。

[0032] 在多个实施方式中,  $L^{1A}$ 包括 $-(CH_2)_n-$ , 其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中,  $L^{1A}$ 包括 $-(CH_2CH_2O)_n-$ , 其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中,  $L^{1A}$ 包括Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、Ala-PAB、或PAB。在多个实施方式中,  $L^{1A}$ 包括肽、寡糖、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、Ala-PAB、PAB、或其组合。

[0033] 在多个实施方式中, 组分A含有单克隆抗体(mAb)。在多个实施方式中, 组分A含有抗体片段, 替代物, 或变体。在多个实施方式中, 组分A含有蛋白质配体。在多个实施方式中, 组分A含有蛋白质支架。在多个实施方式中, 组分A含有肽。在多个实施方式中, 组分A含有小分子配体。在多个实施方式中, 组分A含有至少一个修饰的正丁基L- $\alpha$ -氨基酸残基。

[0034] 在多个实施方式中,  $L^2$ 包括不可切割的单元。在多个实施方式中, 不可切割的单元包括 $-(CH_2)_n-$ , 其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中,  $L^2$ 包括可切割的单元。在多个实施方式中, 可切割的单元包括肽。在多个实施方式中,  $L^2$ 包括至少一个组分, 选自下组: 肽、寡糖、 $-(CH_2)_n-$ 、O(氧)、S(硫)、-NH-、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、Val、Cit、PAB、Phe、Lys、D-Val、Leu、Lys、Gly、Ala、Asn等。在多个实施方式中,  $L^2$ 包括 $-(CH_2)_n-$ , 其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中,  $L^2$ 包括 $-(CH_2CH_2O)_n-$ , 其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中,  $L^2$ 含有至少一个Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、Ala-PAB、或PAB。在多个实施方式中,  $L^2$ 含有肽寡糖、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB、Ala-PAB、PAB、或其组合。

[0035] 多个实施方式提供了一种组合物, 包括本文公开和描述的活性剂-偶联物, 在多个实施方式中, >70%的组合物仅不超过两种活性组分组成。在多个实施方式中, >60%的组合物由不超过两种活性组分组成。在多个实施方式中, >50%的组合物由不超过两种活性组分组成。多个实施方式提供一种组合物, 包括本文公开和描述的活性剂-偶联物。在多个实施方式中, >70%的组合物仅由两种活性组分组成。在多个实施方式中, >60%的组合物仅由两种活性组分组成。在多个实施方式中, >50%的组合物仅由两种活性组分组成。

## 附图说明

[0036] 图1显示传统的曲妥珠单抗-伊美坦辛(trastuzumab-emtansine)两步法偶联反应

的产品HIC-HPLC色谱图。

[0037] 图2显示传统的曲妥珠单抗-伊美坦辛一步法偶联反应的产品HIC-HPLC色谱图。

[0038] 图3显示用传统的NHS方法,曲妥珠单抗和化合物34反应的产品HIC-HPLC色谱图。

[0039] 图4显示用选择性偶联的方法,曲妥珠单抗和化合物34反应的产品HIC-HPLC色谱图。

[0040] 图5显示用选择性偶联的方法,曲妥珠单抗和化合物67反应的产品HIC-HPLC色谱图。

[0041] 图6显示用选择性偶联的方法,曲妥珠单抗和化合物62反应的产品HIC-HPLC色谱图,药物/抗体比为1:4。

[0042] 图7显示用选择性偶联的方法,曲妥珠单抗和化合物62反应的产品HIC-HPLC色谱图,药物/抗体比为1:6。

[0043] 图8显示用选择性偶联的方法,曲妥珠单抗和化合物62反应的产品HIC-HPLC色谱图,药物/抗体比为1:7.5。

[0044] 图9显示用选择性偶联的方法,曲妥珠单抗和化合物49反应的产品HIC-HPLC色谱图。

[0045] 图10显示用选择性偶联的方法,曲妥珠单抗和化合物73反应的产品HIC-HPLC色谱图。

[0046] 图11显示用非选择性连接物,曲妥珠单抗和化合物60反应的产品HIC-HPLC色谱图;以及用优化的连接物,曲妥珠单抗和化合物60反应的产品HIC-HPLC色谱图。

[0047] 图12显示SK-BR-3细胞针对抗体-药物偶联物曲妥珠单抗-化合物55的活力。

[0048] 图13显示SK-BR-3,HCC1954,MCF7,和MDA-MB-468细胞针对抗体-药物偶联物曲妥珠单抗-化合物61的活力。

[0049] 图14显示SK-BR-3,HCC1954,MCF7,和MDA-MB-468细胞针对抗体-药物偶联物曲妥珠单抗-化合物67的活力。

[0050] 图15显示SK-BR-3,HCC1954,MCF7,和MDA-MB-468细胞针对抗体-药物偶联物曲妥珠单抗-化合物62的活力。

[0051] 图16显示SK-BR-3,HCC1954,MCF7,和MDA-MB-468细胞针对抗体-药物偶联物曲妥珠单抗-化合物55的活力。

[0052] 详述

[0053] 多个实施方式提供了活性剂-偶联物。在多个实施方式中,所述的活性剂-偶联物为药物-偶联物。在多个实施方式中,所述的药物-偶联物包括靶向分子。在多个实施方式中,所述的靶向分子包括单克隆抗体(mAB)。在多个实施方式中,所述的药物-偶联物含有间隔物或多功能连接物。在多个实施方式中,所述的间隔物通过含有N(氮)原子的基团连接到mAB。在多个实施方式中,所述的多功能连接物通过含有N(氮)原子的基团连接到mAB。在多个实施方式中,间隔物或多功能连接物可以任选地与辅助部分相连。在多个实施方式中,所述辅助部分可以是第二靶向分子,如mAB和肽。在多个实施方式中,辅助部分可以是亲水聚合物,如聚乙二醇(PEG)等。在多个实施方式中,间隔物或多功能连接物可以包括含有N(氮)原子的基团。在多个实施方式中,间隔物或多功能连接物可以包括含有N(氮)原子的环状基团。

[0054] 用有效负荷衍生化多肽的偶联方法可以通过与赖氨酸侧链形成酰胺键来完成。由于存在大量的反应性相似的赖氨酸侧链胺,该偶联策略能够产生非常复杂的异质混合物。本发明所提供的组合物和方法通过赖氨酸偶联,其中,在多个实施方式中,赖氨酸选择性的提高能够产生异质性较低的混合物。

[0055] 定义

[0056] 如本文所用,常见的有机缩写定义如下:

|        |            |                                        |
|--------|------------|----------------------------------------|
| [0057] | Ac         | 乙酰基                                    |
| [0058] | aq.        | 水的                                     |
| [0059] | BOC or Boc | 叔丁氧羰基                                  |
| [0060] | BrOP       | 溴三(二甲基氨基)六氟磷酸磷                         |
| [0061] | Bu         | 正丁基                                    |
| [0062] | °C         | 温度摄氏度                                  |
| [0063] | DCM        | 二氯甲烷                                   |
| [0064] | DEPC       | 二乙基氰基磷酸酯                               |
| [0065] | DIC        | 二异丙基碳二亚胺                               |
| [0066] | DIEA       | 二异丙基乙胺                                 |
| [0067] | DMF        | N,N'-二甲基甲酰胺                            |
| [0068] | EDC        | 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺                 |
| [0069] | Et         | 乙基                                     |
| [0070] | EtOAc      | 乙酸乙酯                                   |
| [0071] | Eq         | 当量                                     |
| [0072] | Fmoc       | 9-芴基甲氧基羰基                              |
| [0073] | g          | 克                                      |
| [0074] | h          | 小时                                     |
| [0075] | HATU       | 2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐 |
| [0076] | HOAt       | 1-羟基-7-氮杂苯并三唑                          |
| [0077] | HOBT       | N-羟基苯并三唑                               |
| [0078] | HOSu       | N-羟基琥珀酰亚胺                              |
| [0079] | HPLC       | 高效液相色谱法                                |
| [0080] | LC/MS      | 液相色谱-质谱                                |
| [0081] | Me         | 甲基                                     |
| [0082] | MeOH       | 甲醇                                     |
| [0083] | MeCN       | 乙腈                                     |
| [0084] | mL         | 毫升                                     |
| [0085] | MS         | 质谱分析法                                  |
| [0086] | RP-HPLC    | 反相HPLC                                 |
| [0087] | rt         | 室温                                     |
| [0088] | t-Bu       | 叔丁基                                    |
| [0089] | TEA        | 三乙胺                                    |

|        |         |       |
|--------|---------|-------|
| [0090] | Tert, t | 叔的    |
| [0091] | TFA     | 三氟乙酸  |
| [0092] | THF     | 四氢呋喃  |
| [0093] | THP     | 四氢吡喃  |
| [0094] | TLC     | 薄层分析法 |
| [0095] | μL      | 微升    |

[0096] 术语“药学上可接受的盐”指保留某化合物的生物有效性和性质的盐,它们对于用于药物中在生物学或其它方面不适不符合需要的。在许多情况下,本文所公开的化合物能够借助氨基和/或羧基或类似基团的存在形成酸和/或碱盐。药学上可接受的酸加成盐可由无机酸和有机酸组成。可以衍生形成盐的无机酸包括,例如,盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。可以衍生形成盐的有机酸包括,例如,醋酸、丙酸、羟基乙酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、反丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。药学上可接受的碱加成盐可由无机碱和有机碱组成。可以衍生形成盐的无机碱包括,比如,钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝等;特别优选的是铵,钾,钠,钙和镁盐。可以衍生形成盐的有机碱包括,例如,伯,仲和叔胺,取代的胺,包括天然存在的取代胺,环胺,碱性离子交换树脂等,具体地例如异丙胺,三甲胺,二乙胺,三乙胺,三丙胺和乙醇胺。许多这类盐是本领域已知的,如W087/05297, Johnston等人描述的,出版于1987年9月11日(通过引用将其整体并入本文)。

[0097] 如本文所用,“C<sub>a</sub>至C<sub>b</sub>”或“C<sub>a-b</sub>”,其中“a”和“b”是整数,是指在指定基团中碳原子的数目。也就是说,该组可以包含从“a”到“b”的(包括端点的)碳原子数。因此,例如,“C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基”或“C<sub>1-4</sub>烷基”指的是具有1至4个碳原子的所有烷基,即,CH<sub>3</sub>-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-和(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-。

[0098] 如本文所用的术语“卤素”或“卤”,是指该元素周期表第7列中的放射性稳定的原子中的任何一个,例如,氟、氯、溴、碘、氟和氯是首选。

[0099] 如本文所用,“烷基”指的是完全饱和的(即,不包含双键或三键)的直链或支链烃链。该烷基可具有1~20个碳原子(无论何时在本文中出现,数值范围如“1至20”是指在给定范围内的每个整数;例如,“1至20个碳原子”是指该烷基可由1个碳原子,2个碳原子,3个碳原子等,至多并包括20个碳原子,尽管本定义也涵盖没有指定数值范围的术语“烷基”的情况)。该烷基也可以是具有1-9个碳原子的中等大小的烷基。该烷基也可以是具有1至4个碳原子的低级烷基。烷基可以是指定为“C<sub>1-4</sub>烷基”或类似的名称。仅举例来说,“C<sub>1-4</sub>烷基”表示,烷基链中有一至四个碳原子,即,烷基链选自甲基,乙基,丙基,异丙基,正丁基,异丁基,仲丁基,和叔丁基。典型的烷基包括但不限于甲基,乙基,丙基,异丙基,丁基,异丁基,叔丁基,戊基,己基,等等。

[0100] 如本文所用,“烷氧基”指的是式-OR,其中R是如上定义的烷基,例如“C<sub>1-9</sub>烷氧基”,包括但不限于甲氧基,乙氧基,正丙氧基,1-甲基乙氧基(异丙氧基),正丁氧基,异丁氧基,仲丁氧基和叔丁氧基,等。

[0101] 如本文所用,“烷硫基”是指式-SR,其中R是如上所定义的烷基,例如“C<sub>1-9</sub>烷硫基”等,包括但不限于甲硫基,乙硫基,正丙硫基,1-甲基乙硫基(异丙硫基),正丁硫基,异丁硫基,仲丁硫基,叔丁硫基等。

[0102] 如本文所用,“烯基”是指含有一个或多个双键的直链或支链烃链。烯基可具有2至20个碳原子,尽管本定义也涵盖没有指定数值范围的术语“烯基”的情况。烯基也可以是具有2-9个碳原子的中等大小的烯基。烯基也可以是具有2-4个碳原子的低级烯基。烯基可以是指定为“C<sub>2-4</sub>烯基”或类似的名称。仅举例来说,“C<sub>2-4</sub>链烯基”表示在烯基链中有2-4个碳原子,即,烯基链选自下组:乙烯基,丙烯-1-基,丙烯-2-基,丙烯-3-基,丁烯-1-基,丁烯-2-基,丁烯-3-基,丁烯-4-基,1-甲基-丙烯-1-基,2-甲基-丙烯-1-基,1-乙基-乙烯-1-基,2-甲基-丙烯-3-基,丁-1,3-二烯基,丁-1,2-二烯基和丁-1,2-二烯-4-基。典型的烯基包括,但不以任何方式限于,乙烯基,丙烯基,丁烯基,戊烯基和己烯基,等等。

[0103] 如本文所用,“炔基”是指含有一个或多个三键的直链或支链烃链。炔基可具有2至20个碳原子,尽管本定义也涵盖了没有指定数值范围的“炔基”的情况。炔基也可以是具有2-9个碳原子的中等大小的炔基。炔基也可以是具有2-4个碳原子的低级炔基。炔基可被指定为“C<sub>2-4</sub>炔基”或类似的名称。仅举例来说,“C<sub>2-4</sub>炔基”是指在炔基链中有2-4个碳原子,即,所述炔基链选自乙炔基,丙炔-1-基,丙炔-2-基,丁炔-1-基,丁炔-3-基,丁炔-4-基和2-丁炔基。典型的炔基包括,但不以任何方式限定于乙炔基,丙炔基,丁炔基,戊炔基和己炔基,等等。

[0104] 术语“芳族”是指具有共轭 $\pi$ 电子体系的环或环体系,包括碳环芳族(例如,苯基)和杂环芳基(例如,吡啶)。该术语包括单环或稠环多环(即,共用毗邻原子对的环)基团,只要整个环系统是芳族的。

[0105] 如本文所用,“芳氧基”和“芳硫基”是指RO-和RS-,其中R是如上所定义的芳基,如“C<sub>6-10</sub>芳氧基”或“C<sub>6-10</sub>芳硫基”等,包括但不限于苯氧基。

[0106] “芳烷基”或“芳基烷基”是指作为取代基的芳基通过亚烷基连接,如“C<sub>7-14</sub>芳烷基”等,包括但不限于苄基,2-苄乙基,3-苄丙基,和萘基。在某些情况下,亚烷基是低级亚烷基(例如,一个C<sub>1-4</sub>亚烷基)。

[0107] 如本文所用,“杂芳基”是指芳环或环系统(即,共享两个毗邻原子的两个或更多个稠合的环),包含一个或多个杂原子,即,碳以外的元素,包括但不限于,氮,氧和硫,在环主链上。当所述杂芳基是一环系统时,系统中的每个环是芳族的。所述杂芳基可以具有5-18个环成员(即,构成环骨架的原子,包括碳原子和杂原子的数目),尽管本定义也涵盖未指定数值范围的术语“杂芳基”的情况。在一些实施例中,所述杂芳基具有5至10个环成员,或5至7个环成员。杂芳基可以是被指定为“5-7元杂芳基”,“5-10元杂芳基”或类似的指定。杂芳基环的实例包括,但不限于,呋喃基,噻吩基,呋喃基,吡咯基,噁唑基,噻唑基,咪唑基,吡唑基,异噁唑基,异噻唑基,三唑基,噻二唑基,吡啶基,哒嗪基,嘧啶基,吡嗪基,三嗪基,喹啉基,异喹啉基,苯并咪唑基,苯并噁唑基,苯并噻唑基,吲哚基,异吲哚基,和苯并噻吩基。

[0108] “杂芳烷基”或“杂芳基烷基”是杂芳基作为取代基通过亚烷基连接的。实例包括但不限于:2-噻吩基甲基,3-噻吩基甲基,呋喃基甲基,噻吩基乙基,吡咯基烷基,吡啶基烷基,异噁唑基烷基,和咪唑基烷基。在某些情况下,该亚烷基是低级亚烷基(例如,C<sub>1-4</sub>亚烷基)。

[0109] 如本文所用,“碳环基”是指在环系统中的骨架中只有碳原子的非芳族环状环或环体系。当所述碳环是环体系时,两个或更多个环可以是以稠合,桥接或螺接的方式连接在一起。碳环基可具有任何的饱和度,只要环系统中至少一个环不是芳族的。因此,碳环基包括环烷基,环烯基,和环炔基。碳环基可以具有3-20个碳原子,尽管本定义也涵盖未指定数值

范围的术语“碳环基”的情况。所述碳环基也可以是具有3至10个碳原子的中等大小的碳环基。碳环基也可以是具有3-6个碳原子的碳环基。该碳环基可以是指定为“C<sub>3-6</sub>碳环”或类似的名称。碳环基环的实例包括,但不限于,环丙基,环丁基,环戊基,环己基,环己烯基,2,3-二氢茚,双环[2.2.2]辛烷基,金刚烷基和螺[4.4]壬基。

[0110] “(碳环基)烷基”是碳环基团作为取代基通过亚烷基相连接的,如“C<sub>4-10</sub>(碳环基)烷基”等,包括但不限于,环丙基甲基,环丁基甲基,环丙基乙基,环丙基丁基,环丁基乙基,环丙基异丙基,环戊基甲基,环戊基乙基,环己基甲基,环己基乙基,环庚基甲基,等。在某些情况下,该亚烷基是低级亚烷基。

[0111] 如本文所用,“环烷基”是指完全饱和的碳环基环或环系统。实例包括环丙基,环丁基,环戊基和环己基。

[0112] 如本文所用,“环烯基”是指具有至少一个双键的碳环基环或环系统,其中在该环系统中没有环是芳族的。一个实例是环己烯基。

[0113] 如本文所用,“杂环基”是指在环骨架中含有至少一个杂原子的非芳族环状环或环体系。杂环基可以是以稠合,桥接或螺接的方式连接在一起。杂环基可具有任何的饱和度,只要该环系统中至少一个环是非芳族的。所述杂原子可以存在于环体系中的非芳族或芳族环中。所述杂环基可具有3至20个环成员(即,构成环骨架的原子,包括碳原子和杂原子的数目),尽管本定义也涵盖未指定数值范围的术语“杂环基”的情况。杂环基团也可以是具有3至10个环成员的中等大小的杂环基。所述杂环基团也可以是具有3至6个环成员的杂环。所述杂环基可以是指定为“3-6元杂环基”或类似的名称。在优选的6元单环杂环基中,所述杂原子选自以下的一个至多三个的O,N或S,且在优选的5元单环杂环基中,所述杂原子选自O,N,或S中的一个或两个杂原子。杂环基环的实例包括,但不限于,氮杂环庚烷基,吡啶基,咪唑基,噻唑基,噻吩基,二氧戊环基,咪唑啉基,咪唑烷基,吗啉基,环氧乙烷基,氧杂环庚烷基,硫杂环庚烷基,哌啶基,哌嗪基,二氧代哌嗪基,吡咯烷基,吡咯烷酮基,吡咯烷酮基(pyrrolidionyl),4-哌啶酮基,吡唑啉基,吡唑烷基,1,3-二氧杂环己烯基,1,3-二氧杂环己烷基,1,4-二氧杂环己烯基,1,4-二氧杂环己烷基,1,3-氧硫杂环己烷基(oxathianyl),1,4-氧硫杂环己烯基(oxathiinyl),1,4-氧硫杂环己烷基,2H-1,2-噁嗪基,三氧杂环己烷基(trioxanyl),六氢-1,3,5-三嗪基,1,3-二氧杂环戊烯基,1,3-二氧戊环基,1,3-二硫杂环戊二烯基,1,3-二硫戊环基,异噁唑啉基,异噁唑烷基,噁唑啉基,噁唑烷基,噁唑烷酮基,噻唑啉基,噻唑烷基,1,3-氧硫杂环戊烷基(oxathiolanyl),二氢吡啶基,异二氢吡啶基,四氢呋喃基,四氢吡喃基,四氢噻吩基,四氢噻喃基,四氢-1,4-噻嗪基,噻吗啉基,二氢苯并呋喃基,苯并咪唑烷基和四氢喹啉。

[0114] “(杂环基)烷基”是指杂环基团作为取代基通过亚烷基连接。实例包括,但不限于,咪唑啉基甲基和吡啶基乙基。

[0115] 如本文所用,“酰基”是指-C(=O)R,其中R为氢,C<sub>1-6</sub>烷基,C<sub>2-6</sub>烯基,C<sub>2-6</sub>炔基,C<sub>3-7</sub>碳环基,C<sub>6-10</sub>芳基,5-10元杂芳基,和5-10元杂环基,如本文所定义。非限制性实例包括甲酰基,乙酰基,丙酰基,苯甲酰基,和丙烯酰基。

[0116] “O-羧基”是指“-OC(=O)R”,其中R选自氢,C<sub>1-6</sub>烷基,C<sub>2-6</sub>烯基,C<sub>2-6</sub>炔基,C<sub>3-7</sub>碳环基,C<sub>6-10</sub>芳基,5-10元杂芳基和5-10元杂环基,如本文所定义。

[0117] “C-羧基”指的是“-C(=O)OR”基团,其中R选自氢,C<sub>1-6</sub>烷基,C<sub>2-6</sub>烯基,C<sub>2-6</sub>炔基,C<sub>3-7</sub>

碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。非限制性实例包括羧基(即, -C(=O)OH)。

[0118] “氰基”基团指的是“-CN”基团。

[0119] “氰酸根”基团是指“-OCN”基团。

[0120] “异氰酸根”基团是指“-NCO”基团。

[0121] “硫氰酸根”基团是指“-SCN”基团。

[0122] “异硫氰酸根”基团是指“-NCS”基团。

[0123] “亚磺酰基”基团是指“-S(=O)R”, 其中R选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0124] “磺酰基”基团是指“-SO<sub>2</sub>R”, 其中R选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0125] “S-磺酰氨基”基团是指“-SO<sub>2</sub>NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0126] “N-磺酰氨基”基团是指“-N(R<sub>A</sub>)SO<sub>2</sub>R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0127] “O-氨基甲酰”基团是指“-OC(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0128] “N-氨基甲酰”基团是指“-N(R<sub>A</sub>)C(=O)OR<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0129] “O-硫代氨基甲酰”基团是指“-OC(=S)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0130] “脲”基团是指“-N(R<sub>A</sub>)C(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0131] “N-硫代氨基甲酰”基团是指“-N(R<sub>A</sub>)C(=S)OR<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0132] “C-酰氨基”基团是指“-C(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0133] “N-酰氨基”基团是指“-N(R<sub>A</sub>)C(=O)R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。

[0134] “氨基”基团是指“-NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>”, 其中R<sub>A</sub>和R<sub>B</sub>各自独立地选自氢, C<sub>1-6</sub>烷基, C<sub>2-6</sub>烯基, C<sub>2-6</sub>炔基, C<sub>3-7</sub>碳环基, C<sub>6-10</sub>芳基, 5-10元杂芳基和5-10元杂环基, 如本文所定义。非限制性实例包括游离氨基(即, -NH<sub>2</sub>)。

[0135] “氨基烷基”基团是指通过亚烷基连接的氨基。

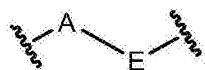
[0136] “烷氧基烷基”基团是指通过亚烷基连接的烷氧基, 如“C<sub>2-8</sub>烷氧基烷基”等。

[0137] 如本文所用, 取代基由未取代的母体基团衍生而来, 其中的一个或多个氢原子交

换为另一原子或基团。除非另有说明,当一个基团被认为是“取代的”,这意味着所述基团被一个或多个独立选自下组的取代基所取代: $C_1-C_6$ 烷基, $C_2-C_6$ 烯基, $C_2-C_6$ 炔基, $C_3-C_7$ 碳环基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代), $C_3-C_7$ 碳环基- $C_1-C_6$ -烷基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代),5-10元杂环基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代),5-10元杂环基- $C_1-C_6$ -烷基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代),芳基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代),芳基( $C_1-C_6$ )烷基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代),5-10元杂芳基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代),5-10元杂芳基( $C_1-C_6$ )烷基(任选被卤素, $C_1-C_6$ 烷基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 卤代烷基,和 $C_1-C_6$ 卤代烷氧基取代),卤素,氰基,羟基, $C_1-C_6$ 烷氧基, $C_1-C_6$ 烷氧基( $C_1-C_6$ )烷基(即,醚),芳氧基,巯基(巯基),卤代( $C_1-C_6$ )烷基(例如, $-CF_3$ ),卤代( $C_1-C_6$ )烷氧基(例如, $-OCF_3$ ), $C_1-C_6$ 烷硫基,芳硫基,氨基,氨基( $C_1-C_6$ )烷基,硝基,0-氨基甲酰基,N-氨基甲酰基,0-硫代氨基甲酰基,N-硫代氨基甲酰基,C-酰氨基,N-酰氨基,S-磺酰氨基,N-磺酰氨基,C-羧基,0-羧基,酰基,氰酸根,异氰酸根,硫氰酸根,异硫氰酸根,亚磺酰基,磺酰基,和氧代(=O)。无论何时基团被描述为“任选取代的”,该基团可以被上述的取代基取代。

[0138] 应当理解的是,某些基团的命名规则可以包括单基或双基,这取决于上下文。例如,如果一取代基需要两个连接点与分子的其余部分相连,这可以理解为该取代基是双基。例如,需要两个连接点的鉴定为烷基的取代基包括双基,如 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 等。其它的基团命名规则清楚地表明该基团是双基,如“亚烷基”或“亚烯基”。

[0139] 只要取代基被描述为双基(即,具有两个点与分子的其余部分连接),应当理解的是,该取代基可以任何方向构型进行连接,除非另有说明。因此,例如,描述为-AE-或



的取代基包括取代基的取向使得A连接于该分子的最左边,以及取代基的取向使得A连接在该分子的最右边。

[0140] 本文所用的“对象”,是指人类或非人类的哺乳动物,例如,狗,猫,小鼠,大鼠,牛,绵羊,猪,山羊,非人类灵长类或鸟,如鸡,以及任何其他脊椎动物或无脊椎动物。

[0141] 化合物

[0142] 本领域技术人员将认识到,本文描述的一些结构可以是化合物的共振式或互变异构体,其可通过其他化学结构清楚表示,即使在动力学上;本领域技术人员认识到,这类结构可以仅代表其中一小部分化合物。此类化合物应视作落在本文描述的结构范围内,尽管本文没有对共振式或互变异构体化合物进行表述。

[0143] 同位素可以存在于描述的化合物中。本文专门或泛泛描述的化合物中存在每个化学元素可以包括上述元素任何的同位素形式。例如,在本文专门或泛泛描述的化合物中的氢原子可以被明确公开或理解为存在于该化合物中,并且每个氢原子是任何形式的氢原子同位素,包括(但不限于)氢-1(氕)和氢-2(氘)。因此,本文提及的化合物包括所有潜在的同位素形式,上下文明确规定的除外。

[0144] 所用的偶联方法、间隔物以及连接物

[0145] 多个实施方式提供了一种通过间隔子或多功能连接物偶联靶分子的方法。在多个

实施方式中,所述间隔物或多功能连接物可以包括含有N(氮)原子的基团。在多个实施方式中,所述方法包括一步法或连续偶联的方法。在多个实施方式中,所述药物-偶联物包括间隔物或多功能连接物。在多个实施方式中,间隔物或多功能连接物可以包括不可切割的或可切割的单元,如肽或二硫键。

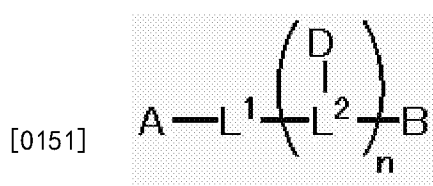
[0146] 实用和应用

[0147] 多个实施方式提供了治疗有此需要的患者的方法,包括将本文公开和描述的活性剂-偶联物施用于所述患者。在多个实施方式中,患者可能患有癌症、免疫疾病、感染性疾病或代谢性疾病,例如糖尿病。

[0148] 多个实施方式提供了一种诊断或成像的方法,包括将本文公开及描述的活性剂-偶联物给予个体。

[0149] 特定结构

[0150] 多个实施方式提供了具有式I所示结构的活性剂-偶联物



(I)

[0152] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0153] A可以是靶向部分;

[0154] B为辅助部分,可任选的包括一个第二靶向部分,水溶性聚合物或B为空;

[0155] L<sup>1</sup>包括含有N(氮)原子的基团;

[0156] 每个D是独立选择的,其中每个D包括活性剂;

[0157] 每个L<sup>2</sup>独立地为连接物,其中至少一个L<sup>2</sup>与L<sup>1</sup>相连;以及

[0158] n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0159] 在多个实施方式中,A可以是单克隆抗体(mAB),更具体地,A可以是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0160] 在多个实施方式中,A可以是抗体片段、替代物、或变体。

[0161] 在多个实施方式中,A可以是蛋白质配体。

[0162] 在多个实施方式中,A可以是蛋白质支架。

[0163] 在多个实施方式中,A可以是肽。

[0164] 在多个实施方式中,A可以是小分子配体。

[0165] 在多个实施方式中,B可以是亲水聚合物。在多个实施方式中,所述亲水聚合物可以是聚乙二醇(PEG)等。在多个实施方式中,B可以是生物可降解聚合物。在多个实施方式中,生物可降解聚合物可以是非结构化的蛋白多聚氨基酸、多肽多糖及其组合。

[0166] 在多个实施方式中,B可以是单克隆抗体(mAB)。

[0167] 在多个实施方式中,B可以是抗体片段、替代物、或变体。

[0168] 在多个实施方式中,B可以是蛋白质配体。

[0169] 在多个实施方式中,B可以是蛋白质支架。

- [0170] 在多个实施方式中,B可以是肽。
- [0171] 在多个实施方式中,B可以是RNA或DNA。
- [0172] 在多个实施方式中,B可以是RNA或DNA片段。
- [0173] 在多个实施方式中,B可以是小分子配体。
- [0174] 在多个实施方式中,B可以是生物活性化合物。
- [0175] 在多个实施方式中,D可以是药物。
- [0176] 在多个实施方式中,D可以是化疗药物。
- [0177] 在多个实施方式中,D可以是天然产品。
- [0178] 在多个实施方式中,D可以是免疫调节剂。
- [0179] 在多个实施方式中,D可以是微管蛋白结合剂。
- [0180] 在多个实施方式中,D可以是DNA烷化剂。
- [0181] 在多个实施方式中,D可以是RNA聚合酶抑制剂。
- [0182] 在多个实施方式中,D可以是DNA拓扑异构酶抑制剂。
- [0183] 在多个实施方式中,D可以是抗后生剂(anti-epigenetic agent)。
- [0184] 在多个实施方式中,D可以是蛋白质合成抑制剂。
- [0185] 在多个实施方式中,D可以是抗代谢剂。
- [0186] 在多个实施方式中,D可以是酶抑制剂。
- [0187] 在多个实施方式中,D可以是肽。
- [0188] 在多个实施方式中,D可以是肽拟似物。
- [0189] 在多个实施方式中,D可以是siRNA。
- [0190] 在多个实施方式中,D可以是反义DNA。
- [0191] 在多个实施方式中,D可以是DNA插入剂。
- [0192] 在多个实施方式中, $L^2$ 可以包括间隔物或多功能连接物。在多个实施方式中, $L^2$ 可以包括间隔物或多功能连接物。在多个实施方式中, $L^2$ 可以包括多功能连接物。在多个实施方式中,每一个 $L^2$ 可以是连接物,其中连接物可以是在生物学条件下可切割的或不可切割的。在多个实施方式中,所述连接物可以是酶可切割的。在多个实施方式中, $L^2$ 可以包括连接物。
- [0193] 在多个实施方式中, $L^1$ 包括环状基团,其含有至少一个N(氮)原子。在多个实施方式中, $L^1$ 包括环状基团,其含有至少两个N(氮)原子。在多个实施方式中, $L^1$ 包括环状基团,其含有至少一个N(氮)原子和一间隔物。在多个实施方式中, $L^1$ 包括环状基团,其含有至少两个N(氮)原子和一间隔物。在多个实施方式中,间隔物借助酰胺键与mAB相连。在多个实施方式中,间隔物通过酰胺键与mAB相连。
- [0194] 在多个实施方式中,A含有至少一个修饰的正丁基L- $\alpha$ -氨基酸。在多个实施方式中,至少一个修饰的L-赖氨酸残基来自于偶联前的肽的L-赖氨酸残基。在多个实施方式中, $L^1$ 的至少一个氮来自于偶联前的肽的至少一个修饰的正丁基L- $\alpha$ -氨基酸。在多个实施方式中,A和 $L^1$ 一起含有至少一个修饰的L-赖氨酸残基。在多个实施方式中,偶联前的肽的L-赖氨酸残基侧链的末端N为 $L^1$ 的至少一个N(氮)原子。在多个实施方式中,A含有偶联前的肽的L-赖氨酸残基侧链的 $-(CH_2)_4-$ ,其提供了 $L^1$ 至少一个N(氮)原子。在多个实施方式中,A含有修饰的正丁基 $\alpha$ -氨基酸残基。

[0195] 在多个实施方式中,连接物为可以是肽。

[0196] 在多个实施方式中,连接物可以包括寡糖。例如,连接物可以包括壳聚糖。在多个实施方式中, $L^2$ 可以包括连接物和 $-(CH_2)_n-$ ,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中, $L^2$ 可以包括连接物和 $-(CH_2CH_2O)_n-$ ,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0197] 在多个实施方式中,连接物可以包括 $-(CH_2)_n-$ ,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0198] 在多个实施方式中,连接物可以包括 $-(CH_2CH_2O)_n-$ ,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0199] 在多个实施方式中,连接物可以包括Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys (Ac) -PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys (Ac) -PAB、Ala-PAB、PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB等。

[0200] 在多个实施方式中,连接物可以包括肽、寡糖、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys (Ac) -PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys (Ac) -PAB、Ala-PAB、PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB等的任何组合。

[0201] 在多个实施方式中,间隔物可以包括肽。

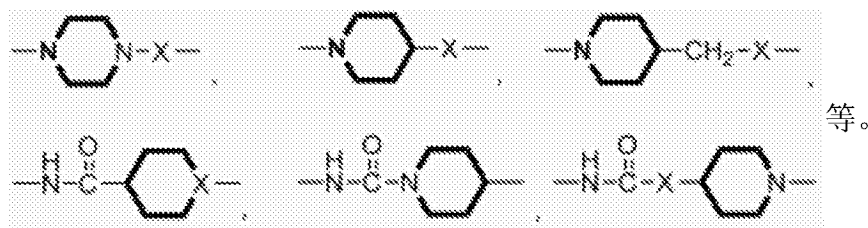
[0202] 在多个实施方式中,间隔物可以包括寡糖。例如,间隔物可以包括壳聚糖。

[0203] 在多个实施方式中,间隔物可以包括 $-(CH_2)_n-$ ,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在多个实施方式中, $L^1$ 可以包括含有4-碳桥和 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 的组分,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

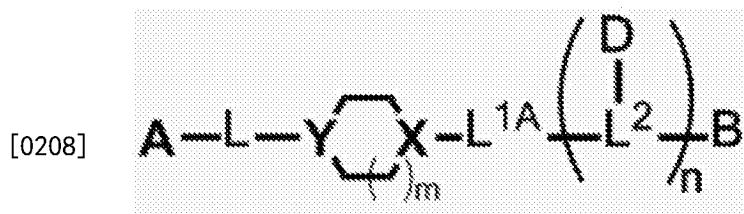
[0204] 在多个实施方式中,间隔物可以包括Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys (Ac) -PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys (Ac) -PAB、Ala-Ala-Asn-PAB、Ala-PAB、PAB等。

[0205] 在多个实施方式中,间隔物可以是肽、寡糖、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys (Ac) -PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys (Ac) -PAB、Ala-PAB、PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB等的任何组合。

[0206] 在多个实施方式中, $L^1$ 可以包括但不限于:



[0207] 在多个实施方式中,具有式I结构的药剂-偶联物具有式Ia结构:

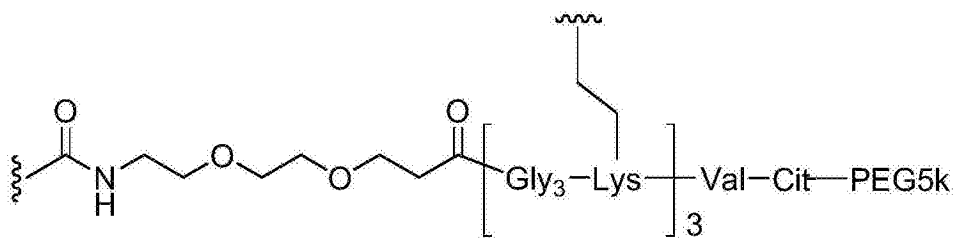
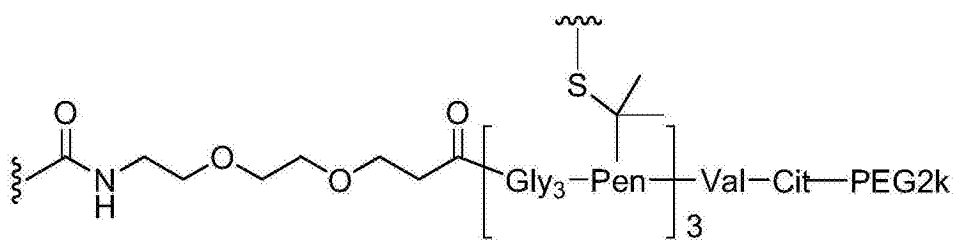
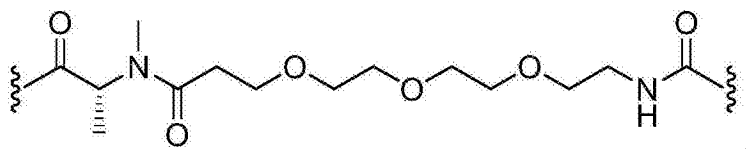


(Ia)

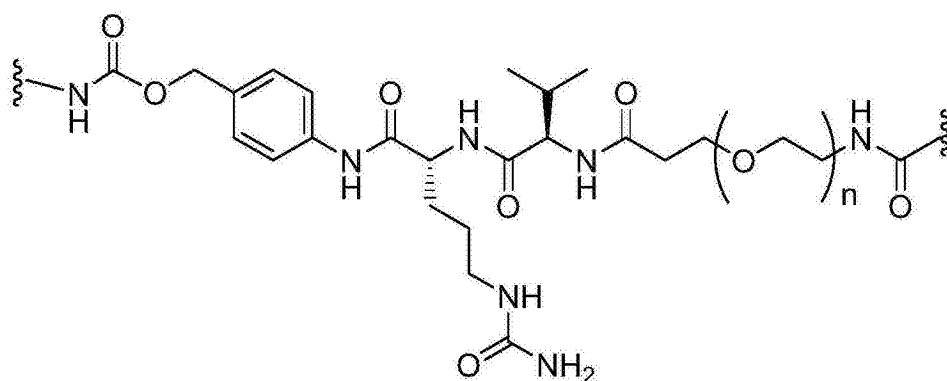
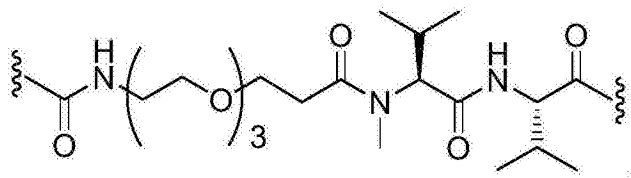
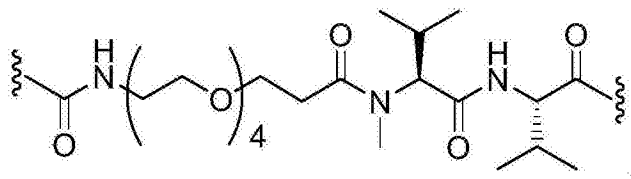
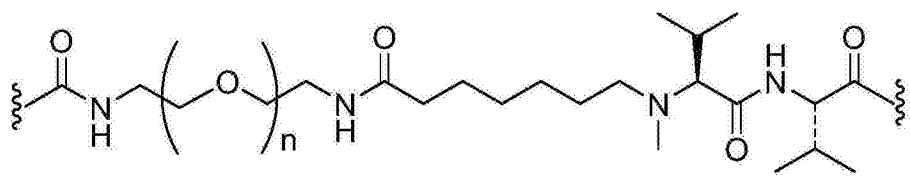
[0209] 或其药学上可接受的盐,

[0210] 其中X为N(氮)、CH-或CH-C(=O)-。Y为N(氮)、CH-或CH-CH<sub>2</sub>-。m可以是0,1,或2;以及 $L^{1A}$ 可以是连接物,或为空;L是但不限于: $-NH-C(=O)-$ 、 $-NH-C(=O)-NH-$ 或 $-NH-C(=O)-$

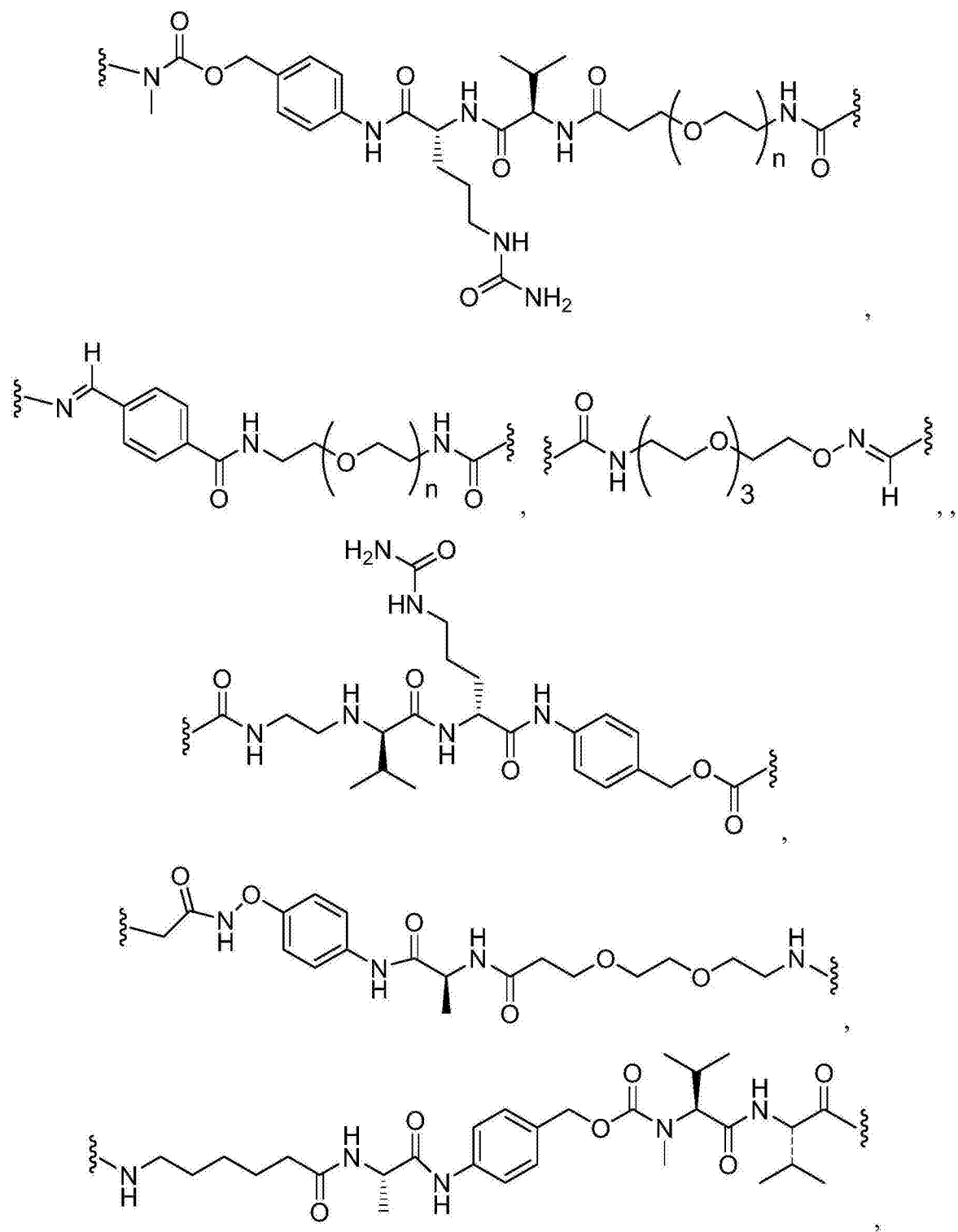




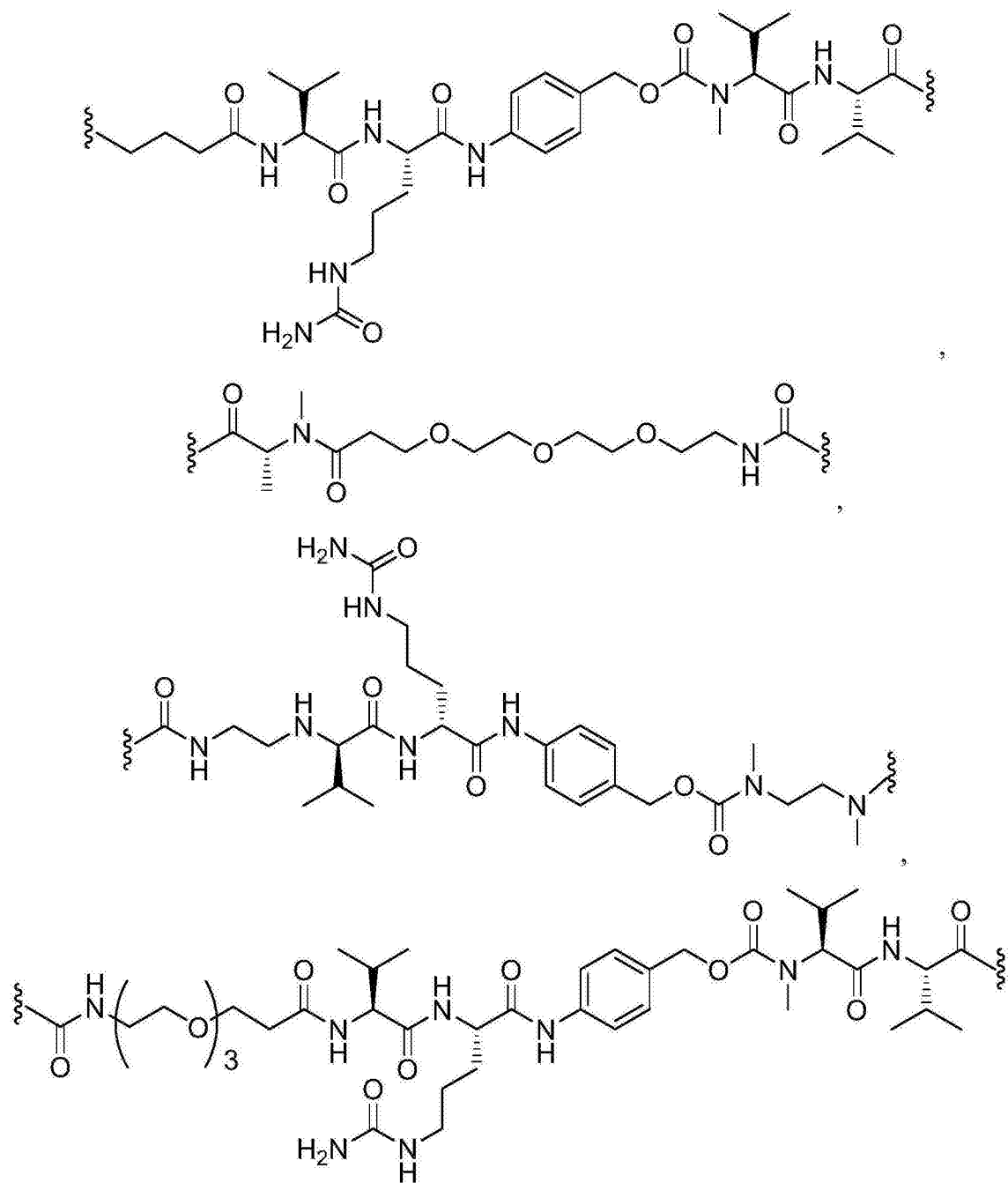
[0213]



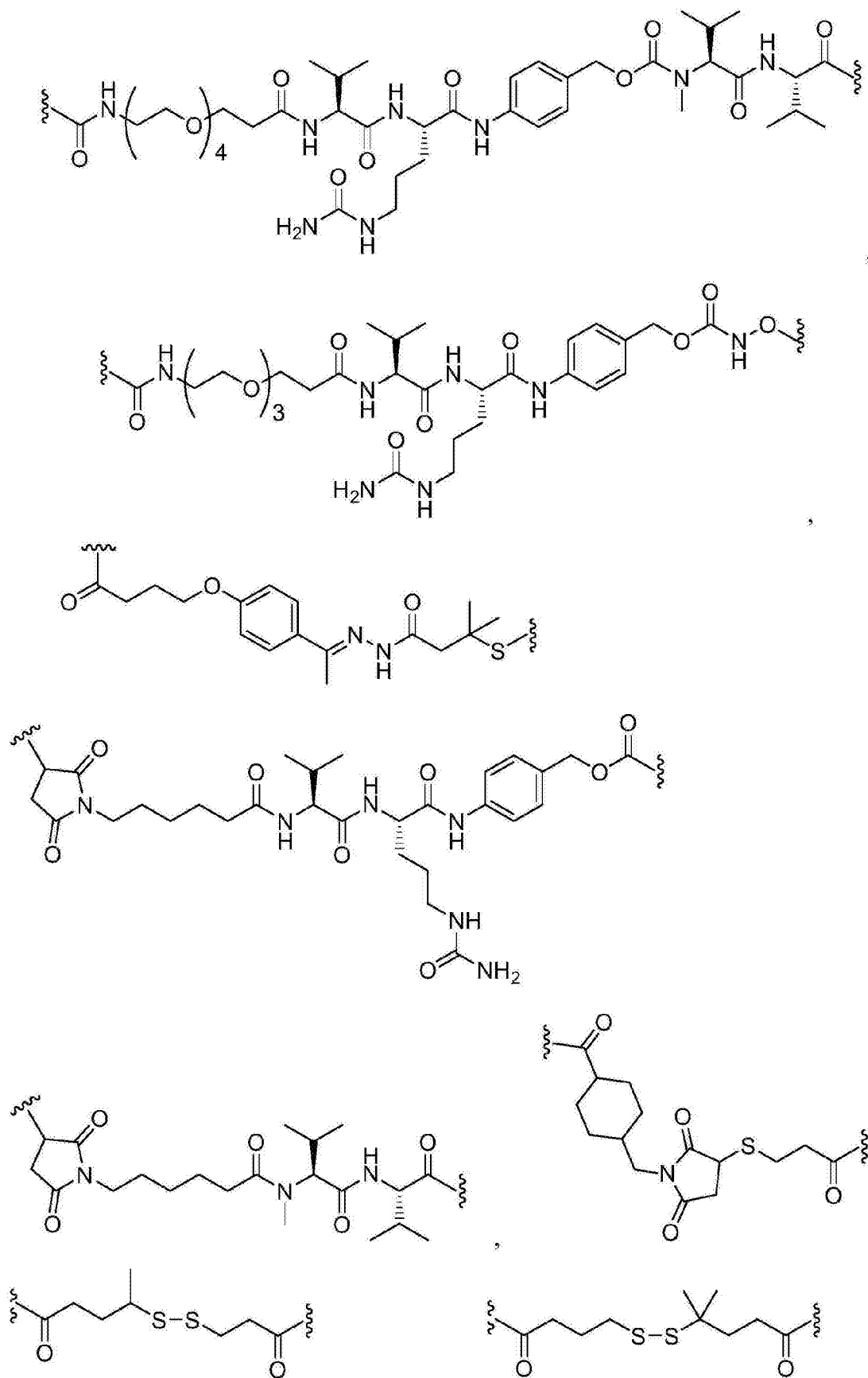
[0214]



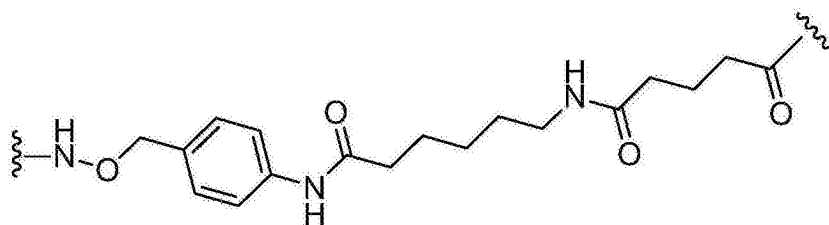
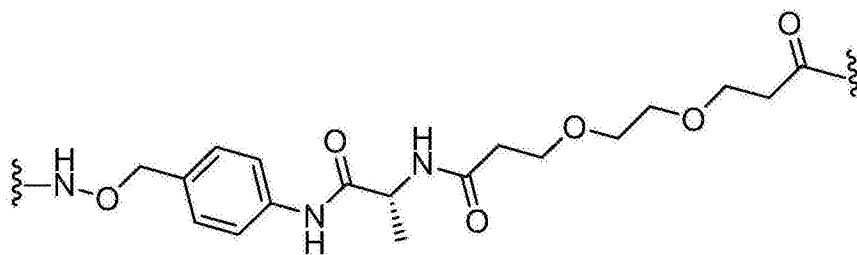
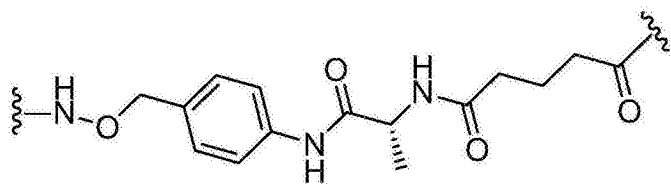
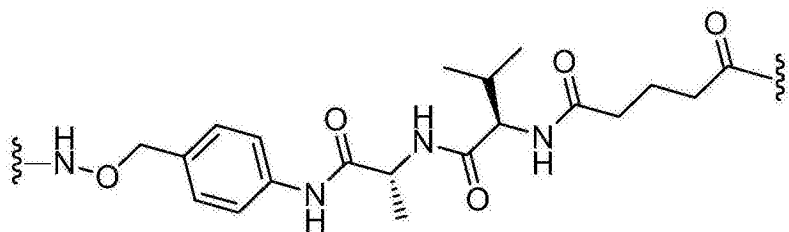
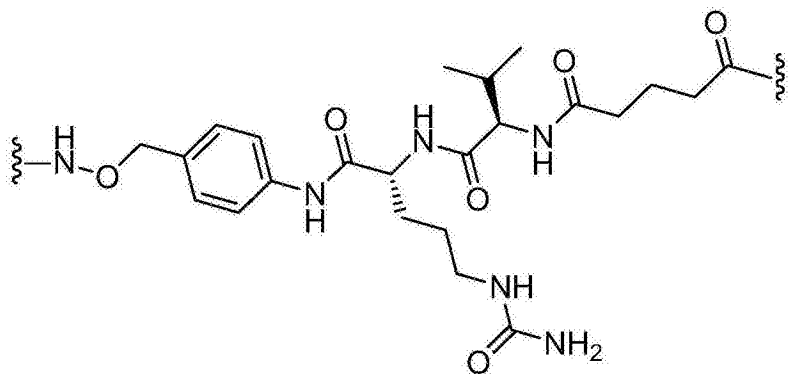
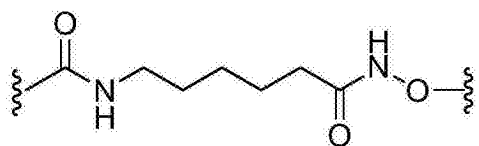
[0215]



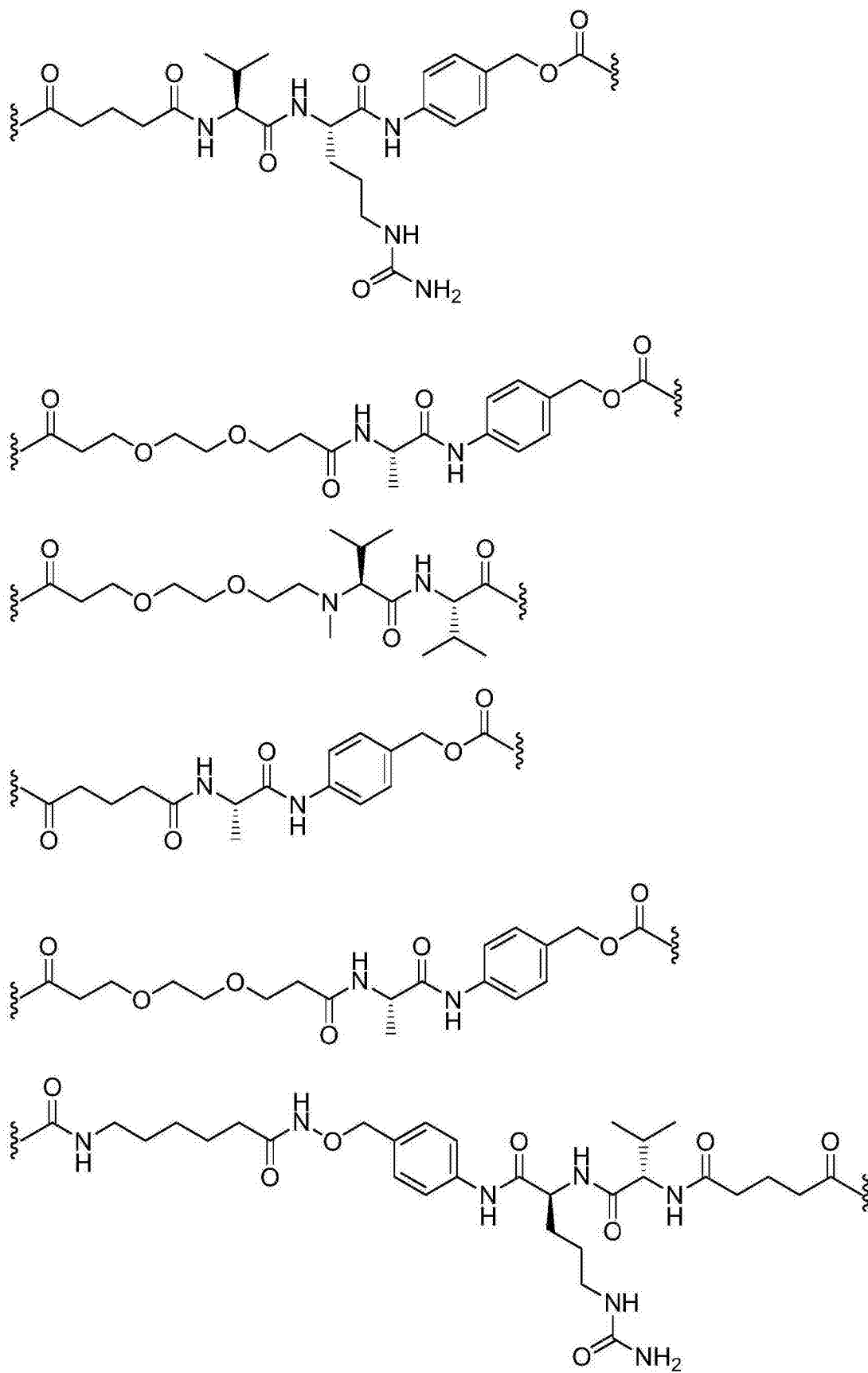
[0216]



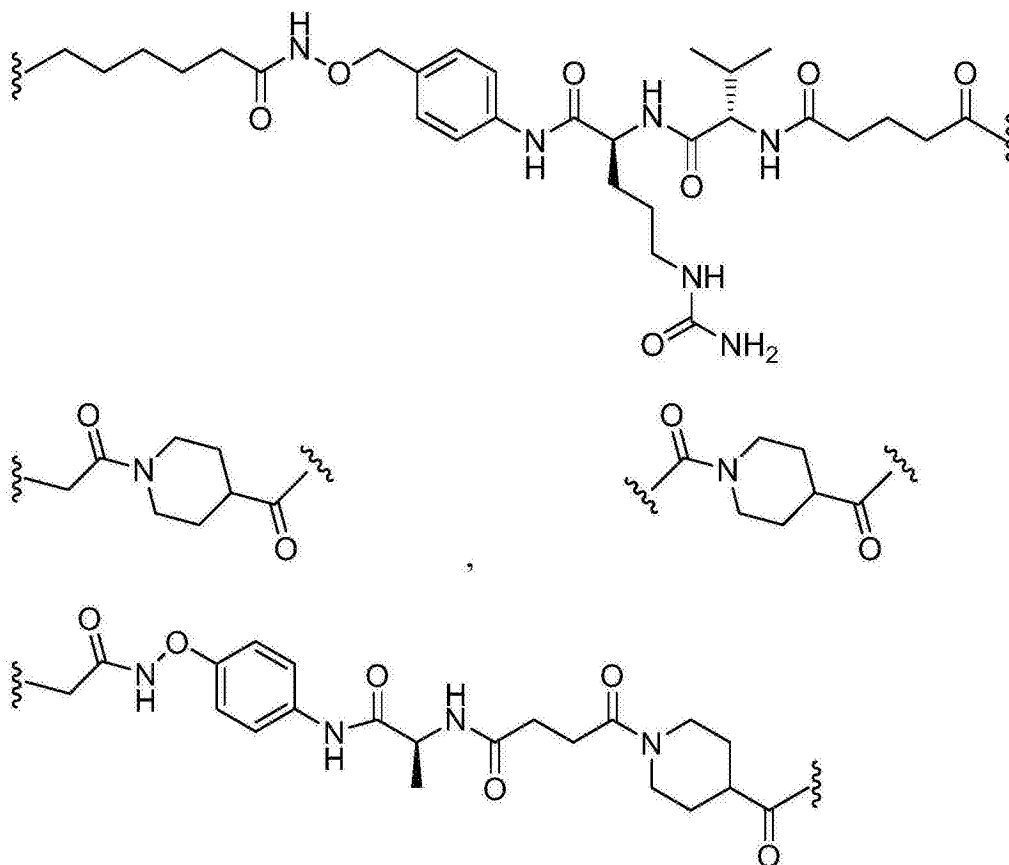
[0217]



[0218]



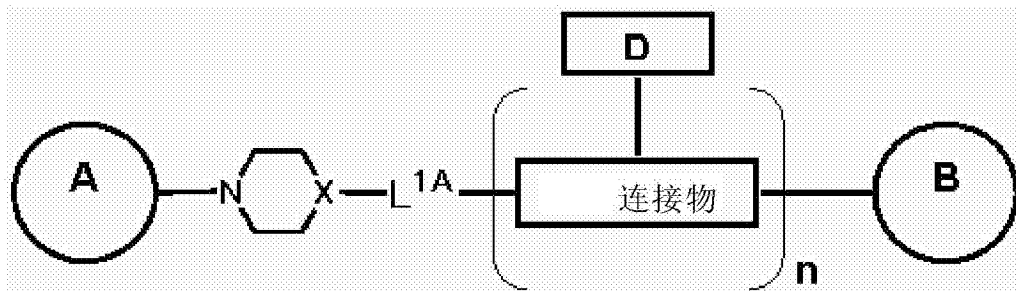
[0219]



或

[0220] 在多个实施方式中,式I结构的药剂-偶联物具有下述结构:

[0221]



[0222] 或其药学上可接受的盐,

[0223] 其中连接物包括至少一个组分,选自下组:肽、寡糖、 $-(CH_2)-$ 、O(氧)、S(硫)、 $-NH-$ 、 $-(CH_2CH_2O)-$ 、Val、Cit、PAB、Phe、Lys、D-Val、Leu、Lys、Gly、Ala、Asn等。

[0224] 在多个实施方式中,连接物可以包括 $-(CH_2)_n-$ ,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0225] 在多个实施方式中,连接物可以包括 $-(CH_2CH_2O)_n-$ ,其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

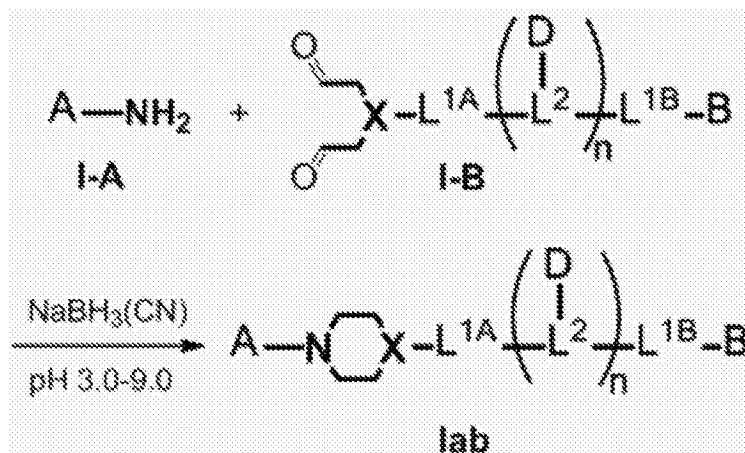
[0226] 在多个实施方式中,连接物可以包Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、Ala-PAB、PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB等。

[0227] 在多个实施方式中,连接物可以包括肽、寡糖、 $-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Val-Lys(Ac)-PAB、Phe-Lys-PAB、Phe-Lys(Ac)-PAB、Ala-PAB、PAB、D-Val-Leu-Lys、Gly-Gly-Arg、Ala-Ala-Asn-PAB等的任何组合。

## [0228] 偶联方法的描述

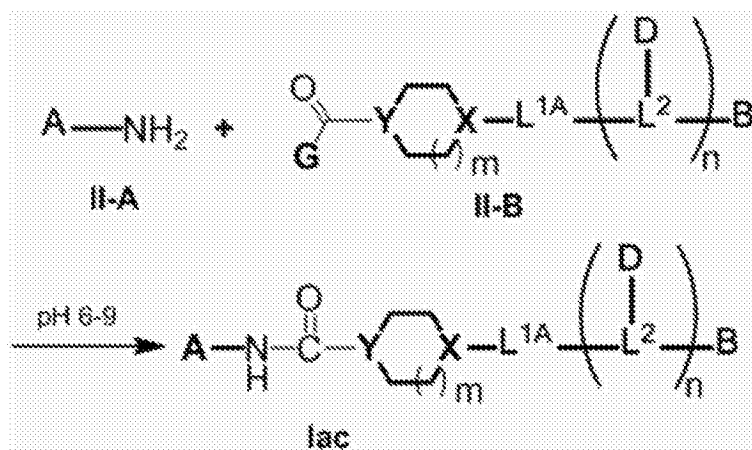
[0229] 通用方法A: 多个实施方式提供了一种化学合成方法, 包括: 式I-A的胺与式I-B的二醛反应, 得到式(Iab)的活性剂-偶联物。

[0230]

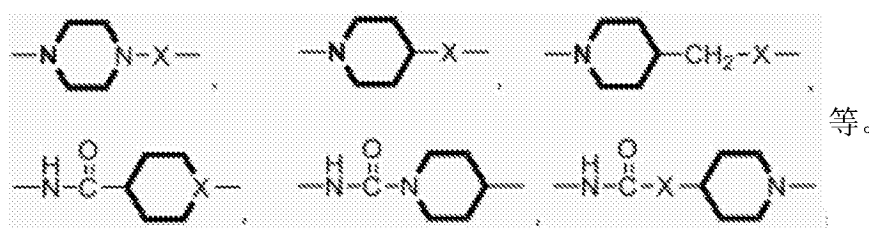


[0231] 通用方法B: 多个实施方式提供了一种化学合成方法, 包括: 式II-A的胺与式II-B活化的羧酸组分反应, 得到式(Ia")的活性剂-偶联物。

[0232]



[0233] 选择性地与氨基反应, 形成六元环, 例子包括但不限于:



[0234] 在多个实施方式中, 药剂-偶联物可以包括一个或多个组分, 选自下组: 氨基酸、氨基酸残基、氨基酸类似物、和修饰的氨基酸。

[0235] 如本文所用, 术语“靶向部分”指与生物部分或其片段相结合或相连的结构。

[0236] 在多个实施方式中, 靶向部分可以是单克隆抗体 (mAB)。在多个实施方式中, 靶向部分可以是抗体片段、替代物、或变体。在多个实施方式中, 靶向部分可以是蛋白质配体。在多个实施方式中, 靶向部分可以是蛋白质支架。在多个实施方式中, 靶向部分可以是肽。在多个实施方式中, 靶向部分可以是RNA或DNA。在多个实施方式中, 靶向部分可以是RNA或DNA片段。在多个实施方式中, 靶向部分可以是小分子配体。

[0237] 在多个实施方式中,靶向部分可以是抗体片段,在Janthur等有描述,“药物偶联物,如抗体药物偶联物(ADCs)、免疫毒素和免疫脂质体挑战每日临床实践(Drug Conjugates Such as Antibody Drug Conjugates(ADCs),Immunotoxins and Immunoliposomes Challenge Daily Clinical Practice),”Int.J.Mol.Sci.2012,13,16020-16045中,其中披露的部分通过引用整体并入本文。在多个实施方式中,靶向部分可以是抗体片段,描述在Trail,PA,“抗体药物偶联物用于治疗癌症(Antibody Drug Conjugates as Cancer Therapeutics)”Antibodies 2013,2,113-129,其中披露的部分通过引用整体并入本文。

[0238] 在多个实施方式中,靶向部分可以是HuM195-Ac-225、HuM195-Bi-213、安雅拉(Anyara)(他那莫单抗(naptumomab estafenatox);ABR-217620)、AS1409、泽娃灵(Zevalin)(替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan))、BIIB015、BT-062、纽迪(Neuradiab)、CDX-1307、CR011-vcMMAE、曲妥珠单抗-DM1(R3502)、贝沙(Bexxar)(托西莫单抗)、IMGN242、IMGN388、IMGN901、<sup>131</sup>I-拉妥珠单抗(labetuzumab)、IMMU-102(<sup>90</sup>Y-依帕珠单抗)、IMMU-107(<sup>90</sup>Y-昔妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan))、MDX-1203、CAT-8015、EMD 273063(hu14.18-IL2)、图妥珠单抗(Tucotuzumab celmoleukin)(EMD 273066;huKS-IL2)、<sup>188</sup>Re-PTI-6D2、蔻塔(Cotara)、L19-IL2、特鲁金(Teleukin)(F16-IL2)、特那德(Tenarad)(F16-<sup>131</sup>I)、L19-<sup>131</sup>I、L19-TNF、PSMA-ADC、DI-Leu16-IL2、SAR3419、SGN-35、或CMC544。在多个实施方式中,靶向部分可以包括以下的抗体部分,由以下的抗体部分组成,或基本上由以下的抗体部分组成:HuM195-Ac-225、HuM195-Bi-213、安雅拉(Anyara)(他那莫单抗(naptumomab estafenatox);ABR-217620)、AS1409、泽娃灵(Zevalin)(替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan))、BIIB015、BT-062、纽迪(Neuradiab)、CDX-1307、CR011-vcMMAE、曲妥珠单抗-DM1(R3502)、贝沙(Bexxar)(托西莫单抗)、IMGN242、IMGN388、IMGN901、<sup>131</sup>I-拉妥珠单抗(labetuzumab)、IMMU-102(<sup>90</sup>Y-依帕珠单抗)、IMMU-107(<sup>90</sup>Y-昔妥珠单抗(clivatuzumab tetraxetan))、MDX-1203、CAT-8015、EMD 273063(hu14.18-IL2)、图妥珠单抗(Tucotuzumab celmoleukin)(EMD 273066;huKS-IL2)、<sup>188</sup>Re-PTI-6D2、蔻塔(Cotara)、L19-IL2、特鲁金(Teleukin)(F16-IL2)、特那德(Tenarad)(F16-<sup>131</sup>I)、L19-<sup>131</sup>I、L19-TNF、PSMA-ADC、DI-Leu16-IL2、SAR3419、SGN-35、或CMC544。

[0239] 在多个实施方式中,靶向部分可以是本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)、曲妥珠单抗(Trastuzumab emtansine)、奥英妥珠单抗(Inotuzumab ozogamicin)、洛妥珠单抗(Lorvotuzumab mertansine)、格巴妥莫单抗(Glembatumumab vedotin)、SAR3419、莫妥莫单抗(Moxetumomab pasudotox)、莫妥莫单抗(Moxetumomab pasudotox)、AGS-16M8F、AGS-16M8F、BIIB-015、BT-062、IMGN-388、或IMGN-388。

[0240] 在多个实施方式中,靶向部分可以包括以下的抗体部分,由以下的抗体部分组成,或基本上由以下的抗体部分组成:本妥昔单抗(Brentuximab vedotin)、曲妥珠单抗(Trastuzumab emtansine)、奥英妥珠单抗(Inotuzumab ozogamicin)、洛妥珠单抗(Lorvotuzumab mertansine)、格巴妥莫单抗(Glembatumumab vedotin)、SAR3419、莫妥莫单抗(Moxetumomab pasudotox)、莫妥莫单抗(Moxetumomab pasudotox)、AGS-16M8F、AGS-16M8F、BIIB-015、BT-062、IMGN-388、或IMGN-388。

[0241] 在多个实施方式中,靶向部分可以包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:本

妥昔单抗 (Brentuximab)、奥英妥珠单抗 (Inotuzumab)、吉妥珠单抗 (Gemtuzumab)、米妥珠单抗 (Milatuzumab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、格巴妥莫单抗 (Glembatumomab)、洛妥珠单抗 (Lorvotuzumab)、或拉妥珠单抗 (Labestuzumab)。

[0242] 如本文所用,术语“肽”指包含一个或多个组分结构,每个组分可以独立选自下组:氨基酸、氨基酸残基、氨基酸类似物、以及修饰的氨基酸。组分之间通常通过酰胺键相连。

[0243] 如本文所用,术语“氨基酸”包括天然氨基酸、含有能够形成酰胺键的N和羧酸的分子、通式 $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ 的分子或带有母体氨基酸的肽内的残基,其中“R”是许多不同的侧链之一。“R”可以是天然氨基酸中发现的取代基。“R”也可以指不是天然氨基酸的取代基。

[0244] 如本文所用,术语“氨基酸残基”指与另一个氨基酸相连时,失去水分子后保留的氨基酸部分。

[0245] 如本文所用,术语“氨基酸类似物”指氨基酸母体化合物的结构衍生物,它们因为一个元件而彼此不同。

[0246] 如本文所用,术语“修饰的氨基酸”指带有“R”取代基,与20个遗传编码的氨基酸之一不相对应的氨基酸。

[0247] 如本文所用,遗传编码的L-对映体氨基酸的简称是常规的,具体如下:D-氨基酸用小写字母表示,比如,D-脯氨酸=p,等。

[0248] 表1

[0249]

| 氨基酸  | 单字母符号 | 常用简称 |
|------|-------|------|
| 丙氨酸  | A     | Ala  |
| 精氨酸  | R     | Arg  |
| 天冬酰胺 | N     | Asn  |
| 天冬氨酸 | D     | Asp  |
| 半胱氨酸 | C     | Cys  |
| 谷氨酰胺 | Q     | Gln  |

[0250]

| 氨基酸  | 单字母符号 | 常用简称 |
|------|-------|------|
| 谷氨酸  | E     | Glu  |
| 甘氨酸  | G     | Gly  |
| 组氨酸  | H     | His  |
| 异亮氨酸 | I     | Ile  |
| 亮氨酸  | L     | Leu  |
| 赖氨酸  | K     | Lys  |
| 苯丙氨酸 | F     | Phe  |
| 脯氨酸  | P     | Pro  |
| 丝氨酸  | S     | Ser  |
| 苏氨酸  | T     | Thr  |
| 色氨酸  | W     | Trp  |
| 酪氨酸  | Y     | Tyr  |
| 缬氨酸  | V     | Val  |

[0251] 活性剂-偶联物中的某些氨基酸残基可以被其他氨基酸残基取代,并且不会显著不利影响肽的活性,在多数情况下,甚至会提高肽的活性。因而,优选实施方式还包括活性剂-偶联物的改变和突变形式,其中该结构中至少一个指定的氨基酸残基被另一个氨基酸残基或其衍生物和/或类似物取代。应注意,在优选的实施方式中,氨基酸取代物是保守的,即,取代的氨基酸残基与被取代的氨基酸残基具有相似的理化性质。

[0252] 为了确定保守性氨基酸取代,可以方便的将氨基酸分为主要的两类:亲水性氨基酸和疏水性氨基酸—主要取决于氨基酸侧链的理化特性。这两类可以进一步被分为亚类,这样可以更明确的定义氨基酸侧链的特性。例如,亲水性氨基酸类可以进一步被分为酸性氨基酸、碱性氨基酸和极性氨基酸。疏水性氨基酸可以进一步被分为非极性氨基酸和芳香族氨基酸。对各类氨基酸的定义如下:

[0253] 术语“亲水性氨基酸”指根据标准化的共同疏水性量表(normalized consensus hydrophobicity scale),表现出疏水性<0的氨基酸(Eisenberg等.,1984,J.Mol.Biol.179:125-142)。遗传编码的亲水性氨基酸包括Thr(T)、Ser(S)、His(H)、Glu(E)、Asn(N)、Gln(Q)、Asp(D)、Lys(K)和Arg(R)。

[0254] 术语“疏水性氨基酸”指根据标准化的共同疏水性量表,表现出疏水性>0的氨基酸(Eisenberg,1984,J.Mol.Biol.179:125-142)。遗传编码的疏水性氨基酸包括Pro(P)、Ile(I)、Phe(F)、Val(V)、Leu(L)、Trp(W)、Met(M)、Ala(A)、Gly(G)和Tyr(Y)。

[0255] 术语“酸性氨基酸”指含有pK值小于7的侧链的亲水性氨基酸。酸性氨基酸通常由于缺失氢离子,而在生理pH下其侧链带负电。遗传编码的酸性氨基酸包括Glu(E)和Asp(D)。

[0256] 术语“碱性氨基酸”指含有pK值大于7的侧链的亲水性氨基酸。碱性氨基酸通常由

于与水合氢离子结合,在生理pH下其侧链带正电。遗传编码的碱性氨基酸包括His (H)、Arg (R) 和Lys (K)。

[0257] 术语“极性氨基酸”指这样一种亲水性氨基酸,在生理pH下,其侧链不带电,但是至少含有一个键,其中的两个原子共用的电子对离其中一个原子更近。遗传编码的极性氨基酸包括Asn (N)、Gln (Q)、Ser (S) 和Thr (T)。

[0258] 术语“非极性氨基酸”指这样一种疏水性氨基酸,在生理pH下,其侧链不带电,并且含有多根键,其中两个原子共用的电子对通常离两个原子等距(即侧链是非极性的)。遗传编码的非极性氨基酸包括Leu (L)、Val (V)、Ile (I)、Met (M)、Gly (G) 和Ala (A)。

[0259] 术语“芳香族氨基酸”指一种疏水性氨基酸,其侧链至少含有一个芳香族环或杂芳族环。在多个实施方式中,芳香族环或杂芳族环可以含有一个或多个取代基,比如-OH、-SH、-CN、-F、-Cl、-Br、-I、-NO<sub>2</sub>、-NO、-NH<sub>2</sub>、-NHR、-NRR、-C(O)R、-C(O)OH、-C(O)OR、-C(O)NH<sub>2</sub>、-C(O)NHR、-C(O)NRR等,其中每个R可以独立是(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基、取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烯基、取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烯基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)炔基、取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)炔基、(C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>)芳基、取代的(C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>)芳基、(C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>)烷芳基、取代的(C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>)烷芳基、5-20元杂芳基、取代的5-20元杂芳基、6-26元烷杂芳基或取代的6-26元烷杂芳基。遗传编码的芳香族氨基酸包括Phe (F)、Tyr (Y) 和Trp (W)。

[0260] 术语“脂肪族氨基酸”指带有脂肪族烃侧链的疏水性氨基酸。遗传编码的脂肪族氨基酸包括Ala (A)、Val (V)、Leu (L) 和Ile (I)。

[0261] 氨基酸残基Cys (C) 与众不同,因为它能够与其他的Cys (C) 或含有磺酰基的氨基酸形成二硫键。Cys (C) 残基(以及其他带有一SH侧链的氨基酸)可以以还原的游离-SH形式或氧化二硫键形式存在于肽中的能力影响Cys (C) 残基是赋予肽的净亲水性还是净疏水性特征。根据标准化的共同疏水性量表,Cys (C) 表现出0.29的疏水性(Eisenberg, 1984, 萨普拉),但应理解,对于优选的实施方式,Cys (C) 被分到极性亲水性氨基酸类,虽然通常的分类定义如上所述。

[0262] 本领域技术人员应了解,上述分类定义并不相互排斥。因而,带有表现出两种或更多种理化性质侧链的氨基酸可以被收入多个类别中。例如,被极性取代基进一步取代的侧链具有芳香族部分的氨基酸,如Tyr (T),可以既表现出芳香族疏水性,又表现出极性或亲水性,因此既可以归到芳香族类又可以归到极性类。对本领域技术人员来说,对氨基酸进行适当的分类是显而易见的,尤其本文里已经将其详细公开。

[0263] 虽然已经根据遗传编码的氨基酸示例了上述定义类别,氨基酸取代无需限于,在某些实施方式中优选不限于遗传编码的氨基酸。在多个实施方式中,活性剂-偶联物可以含有遗传非编码氨基酸。因此,除了天然的遗传编码氨基酸,活性剂-偶联物中的氨基酸残基可以被天然的非编码氨基酸以及合成氨基酸取代。

[0264] 为活性剂-偶联物提供有用取代的某些常见的氨基酸包括(但不限于):β-丙氨酸(β-Ala)和其他的ω-氨基酸如3-氨基丙酸、2,3-二氨基丙酸(Dpr)、4-氨基丁酸等等;α-氨基异丁酸(Aib);ε-氨基己酸(Ahx);δ-氨基戊酸(Ava);N-甲基甘氨酸或肌氨酸(MeGly);鸟氨酸(Orn);瓜氨酸(Cit);叔丁丙氨酸(t-BuA);叔丁甘氨酸(t-BuG);N-甲基异亮氨酸(MeIle);苯基甘氨酸(Phg);环己基丙氨酸(Cha);正亮氨酸(Nle);萘基丙氨酸(Nal);4-苯基苯丙氨酸,4-氯苯丙氨酸(Phe(4-Cl));2-氟苯丙氨酸(Phe(2-F));3-氟苯丙氨酸(Phe(3-F));4-氟苯丙氨酸(Phe(4-F));青霉胺(Pen);1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸(Tic);β-2-噻

吩丙氨酸(Thi);甲硫氨酸亚砷(MSO);高精氨酸(hArg);N-乙酰赖氨酸(AcLys);2,4-二氨基丁酸(Dbu);2,3-二氨基丁酸(Dab);p-氨基苯丙氨酸(Phe(pNH<sub>2</sub>));N-甲基缬氨酸(MeVal);高半胱氨酸(hCys),高苯丙氨酸(hPhe)和高丝氨酸(hSer);羟脯氨酸(Hyp),高脯氨酸(hPro),N-甲基化的氨基酸和肽(N-取代的甘氨酸)。

[0265] 其他在本文中沒有特別提到的氨基酸殘基可以基於它們自身的理化性質,根據本文的定義進行分類。

[0266] 根據上述定義分類的遺傳編碼和常用的非編碼氨基酸類別總結在下表2中。應理解,表2僅作描述目的,並無意作為用於取代本文所述活性劑-偶聯物的氨基酸殘基和衍生物的窮盡清單。

[0267] 表2 常用的氨基酸分類

[0268]

| 分類         | 遺傳編碼                | 非遺傳編碼                                                                    |
|------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <u>疏水性</u> |                     |                                                                          |
| 芳香族        | F, Y, W             | Phg, Nal, Thi, Tic, Phe (4-Cl), Phe (2-F),<br>Phe (3-F), Phe (4-F), hPhe |
| 非極性        | L, V, I, M, G, A, P | t-BuA, t-BuG, Melle, Nle, MeVal, Cha, McGly, Aib                         |
| 脂肪族        | A, V, L, I          | b-Ala, Dpr, Aib, Ahx, McGly, t-BuA, t-BuG, Melle,<br>Cha, Nle, MeVal     |
| <u>親水性</u> |                     |                                                                          |
| 酸性         | D, E                |                                                                          |
| 鹼性         | H, K, R             | Dpr, Orn, hArg, Phe(p-NH <sub>2</sub> ), Dbu, Dab                        |
| 極性         | C, Q, N, S, T       | Cit, AcLys, MSO, bAla, hSer                                              |
| 螺旋斷裂       | P, G                | D-Pro 以及其他 D-氨基酸 (在 L-肽中)                                                |

[0269] 其他在本文中沒有特別提到的氨基酸殘基可以基於它們自身的理化性質,根據本文的定義進行分類。

[0270] 雖然在大多數情況下,活性劑-偶聯物的氨基酸會被L-對映體氨基酸取代,但取代不限於L-對映體氨基酸。在多個實施方式中,肽可以由至少一個D-對映體氨基酸組成。含有此種D-氨基酸的肽認為在口腔、腸道或血漿中比僅由L-氨基酸組成的肽對於降解更加穩定。

[0271] 在多個實施方式中,本文提供的組合物和方法能夠增強靶向賴氨酸側鏈氨基的選擇性。在多個實施例中,>80%的含有本文公開和描述的活性劑-偶聯物的組合物由不超過兩種活性組分組成。在多個實施例中,>70%的含有本文公開和描述的活性劑-偶聯物的組合物由兩種活性組分組成。在多個實施例中,>60%的含有本文公開和描述的活性劑-偶聯物的組合物由不超過兩種活性組分組成。在多個實施例中,>50%的含有本文公開和描述的

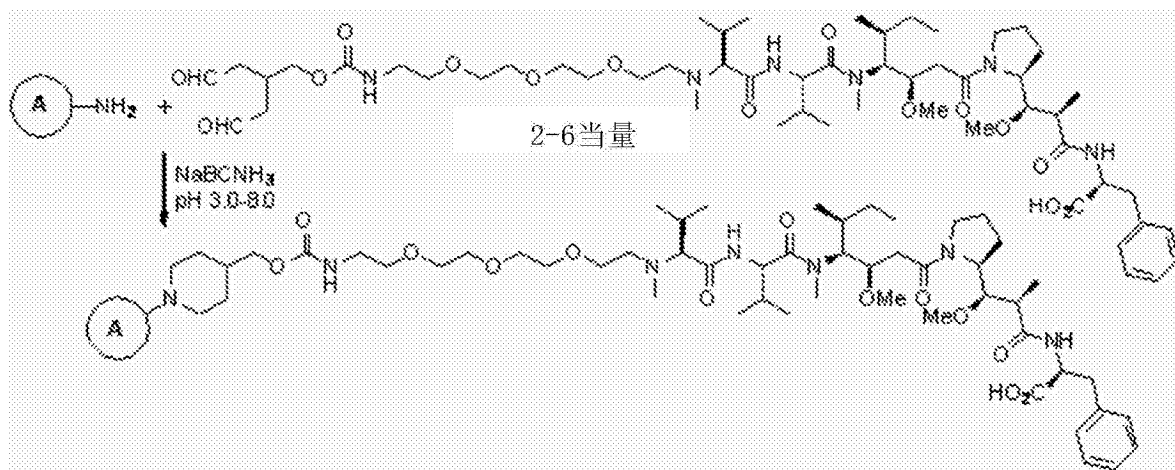
活性剂-偶联物的组合物由不超过两种活性组分组成。在多个实施例中,>40%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物组合物由不超过两种活性组分组成。在多个实施例中,>30%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物的组合物由不超过两种活性组分组成。在多个实施例中,>80%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物的组合物仅由两种活性组分组成。在多个实施例中,>70%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物的组合物仅由两种活性组分组成。在多个实施例中,>60%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物的组合物仅由两种活性组分组成。在多个实施例中,>50%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物的组合物仅由两种活性组分组成。在多个实施例中,>40%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物的组合物仅由两种活性组分组成。在多个实施例中,>30%的含有本文公开和描述的活性剂-偶联物的组合物仅由两种活性组分组成。

[0272] 一步法偶联-二醛还原胺化

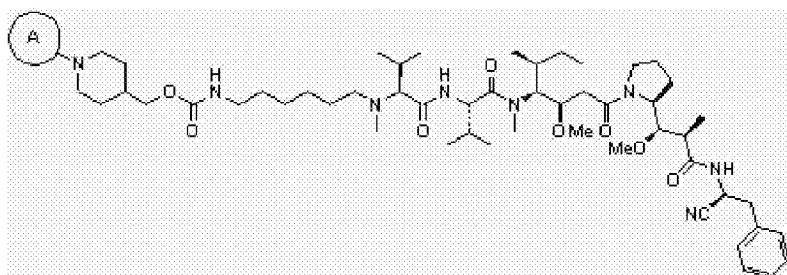
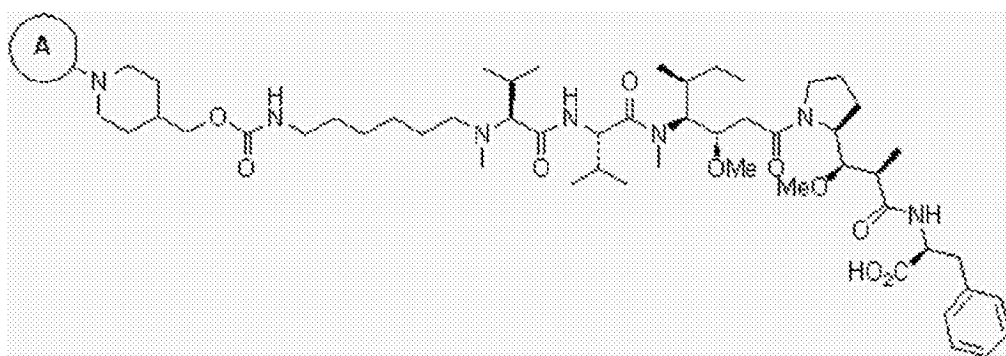
[0273] 通用偶联方法I:

[0274] 向pH 3.0-8.0的缓冲液配制的靶分子A溶液(0.5-50mg/mL)内加入2-6当量的二醛组分和2-50当量的 $\text{NaBCNH}_3$ 。反应在0-40°C进行0.5-50h,并轻微搅拌或摇动,用HIC-HPLC检测。得到的粗的ADC产物使用目前工艺水平进行必要的下游步骤:脱盐、更改缓冲液/更改缓冲液配方以及任选的纯化。最终得到的ADC产物用HIC-HPLC、SEC、RP-HPLC,以及任选的LC-MS进行表征。用UV吸收和/或MS光谱法计算平均DAR。

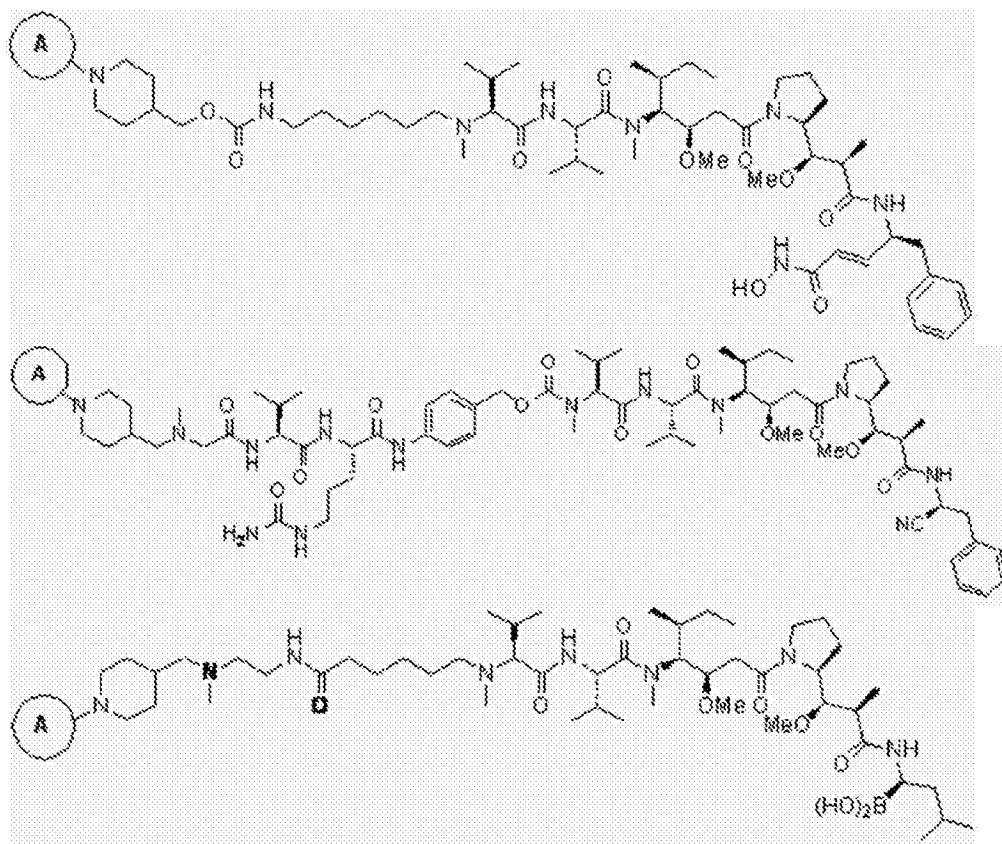
[0275]



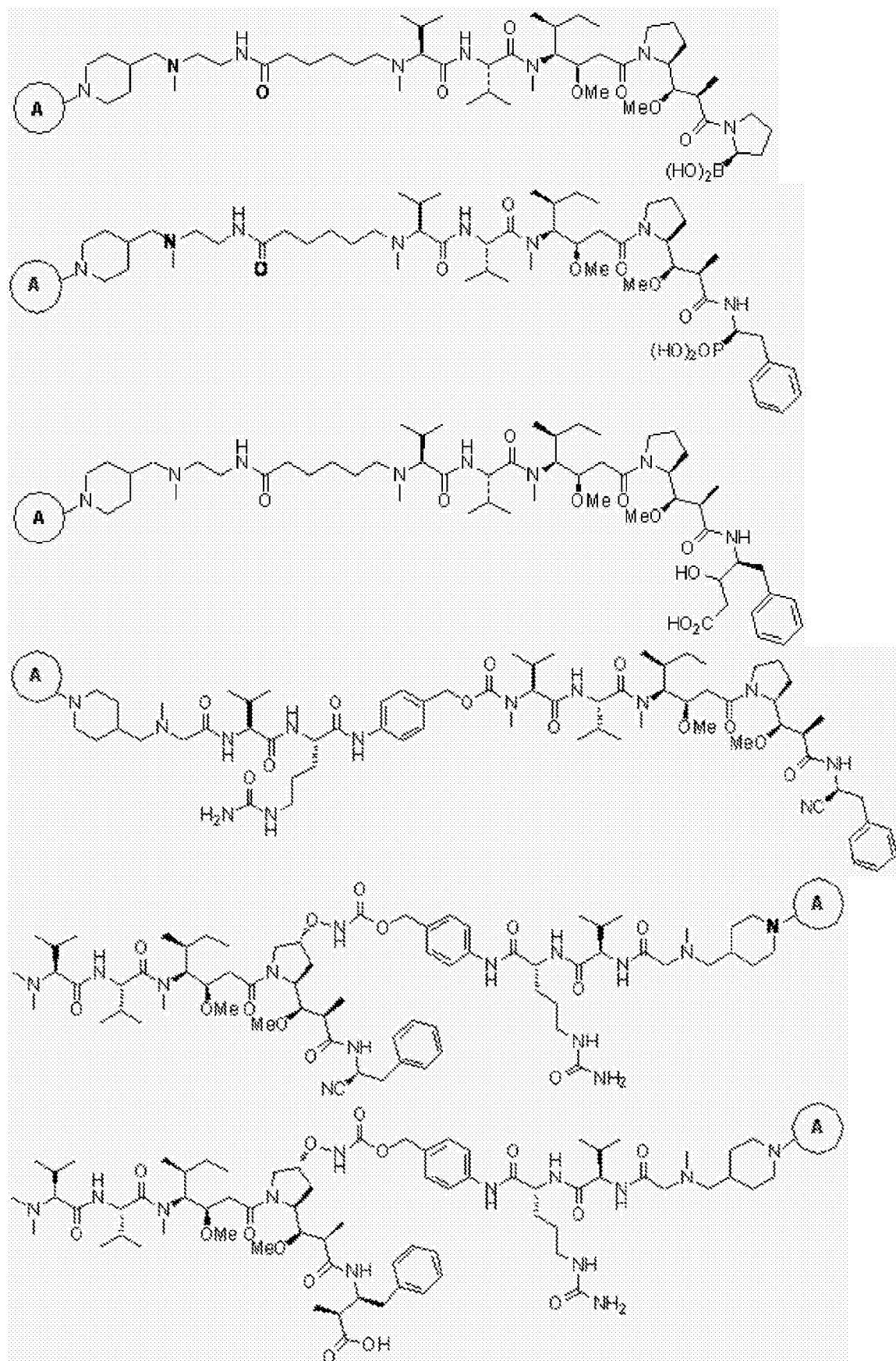
[0276] 可以用通用方案I制备的例子包括(但不限于)下列一般化合物:



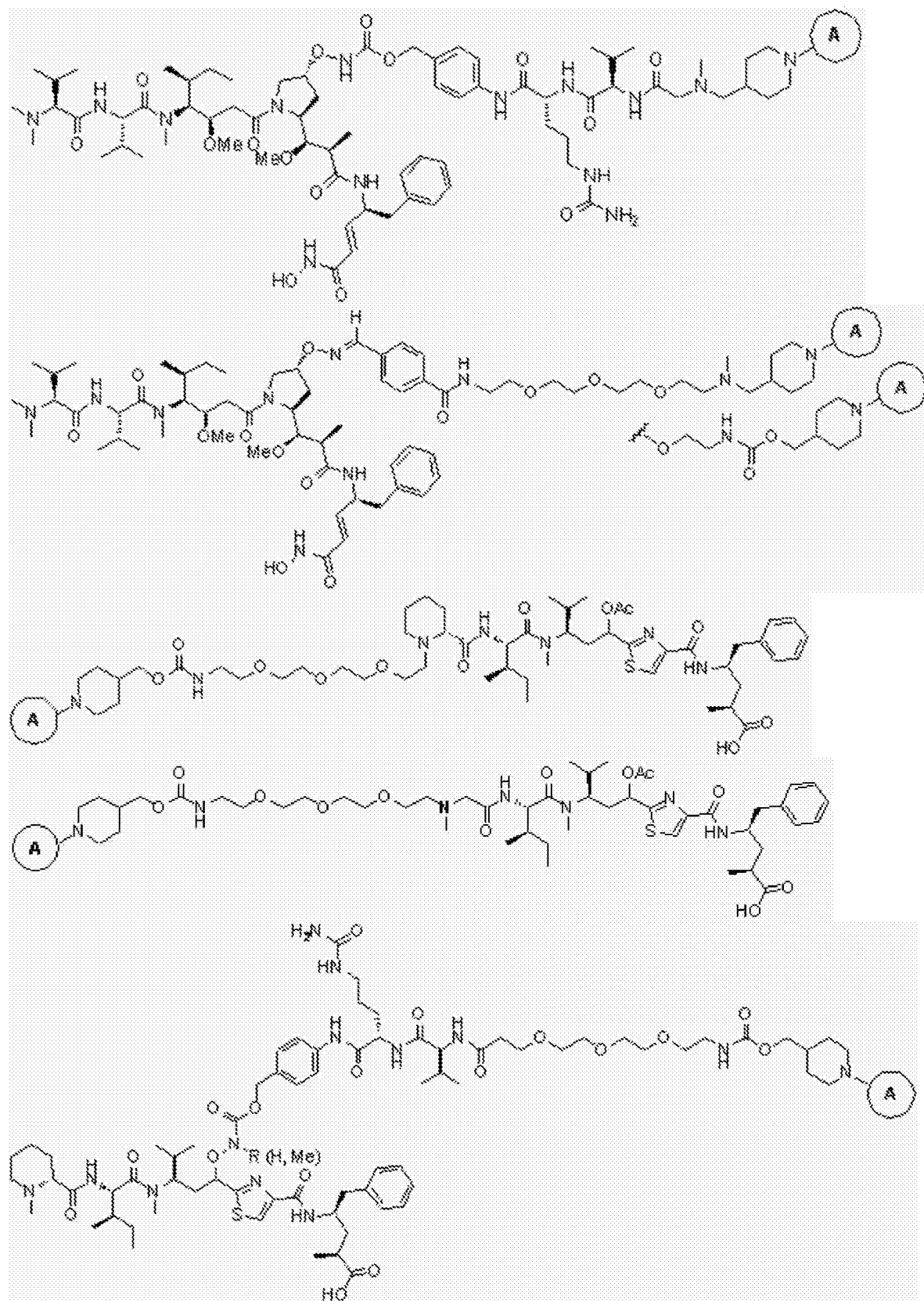
[0277]



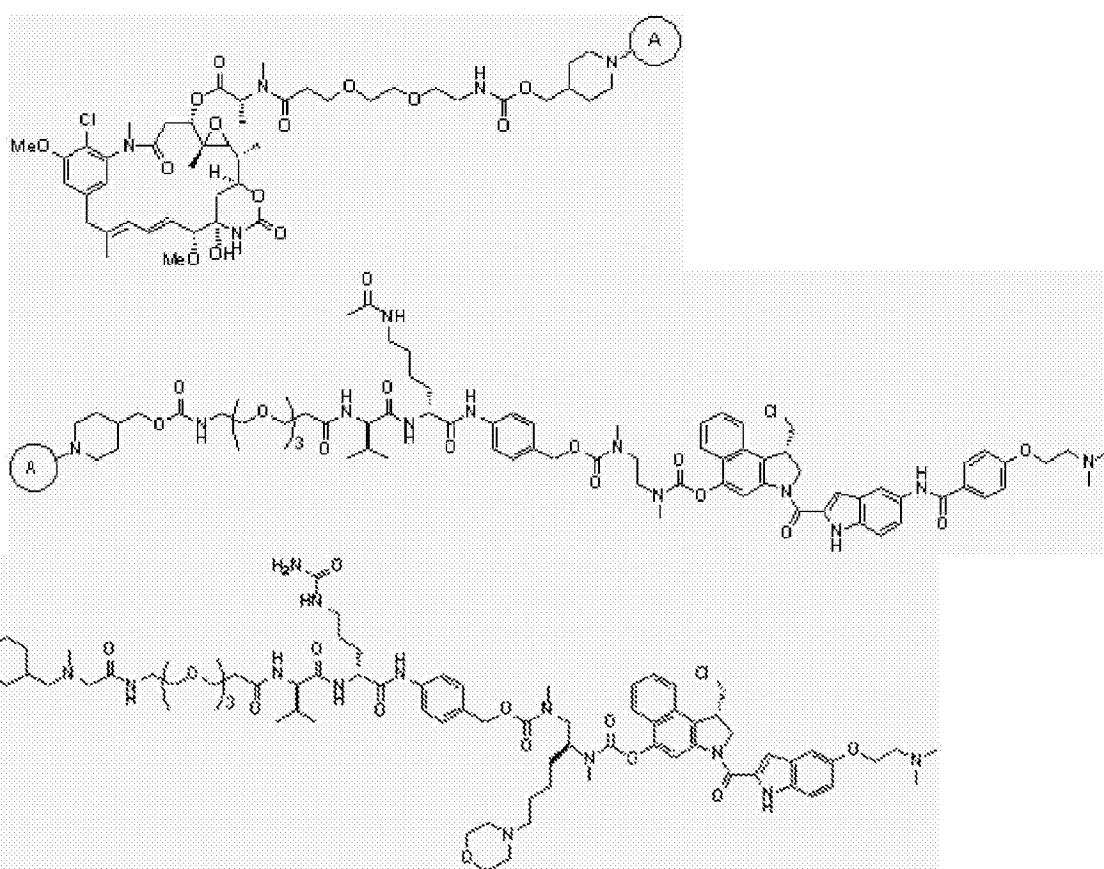
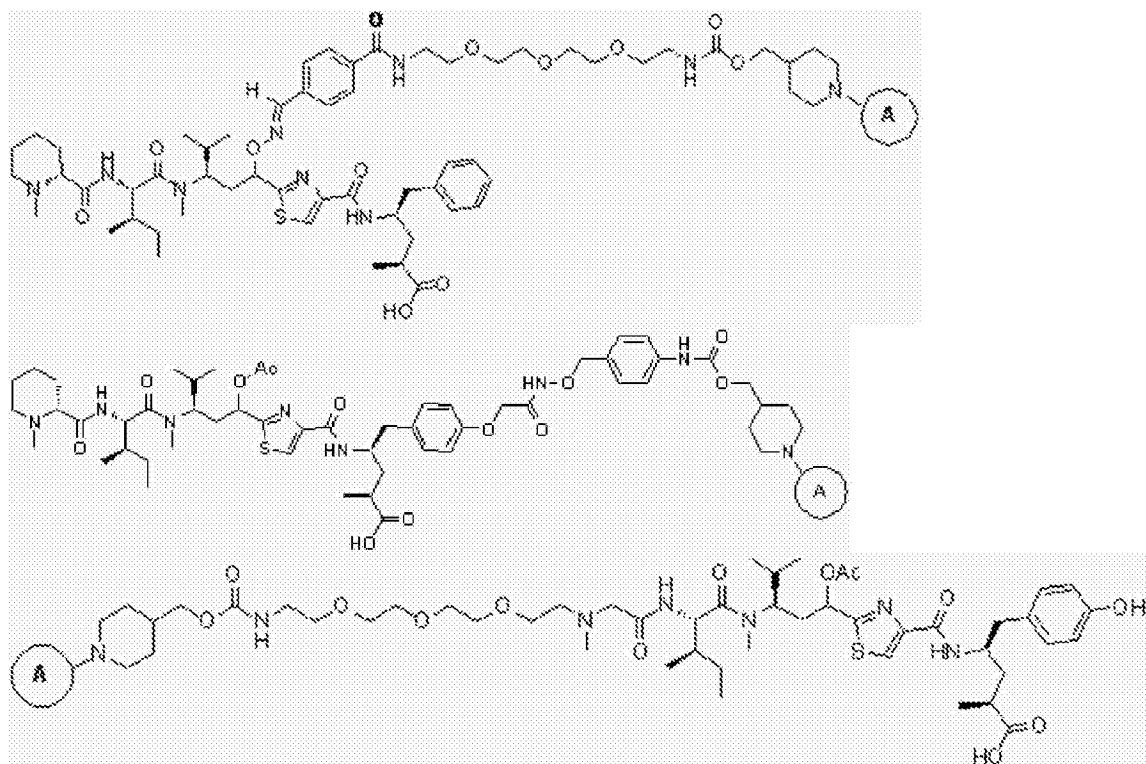
[0278]



[0279]

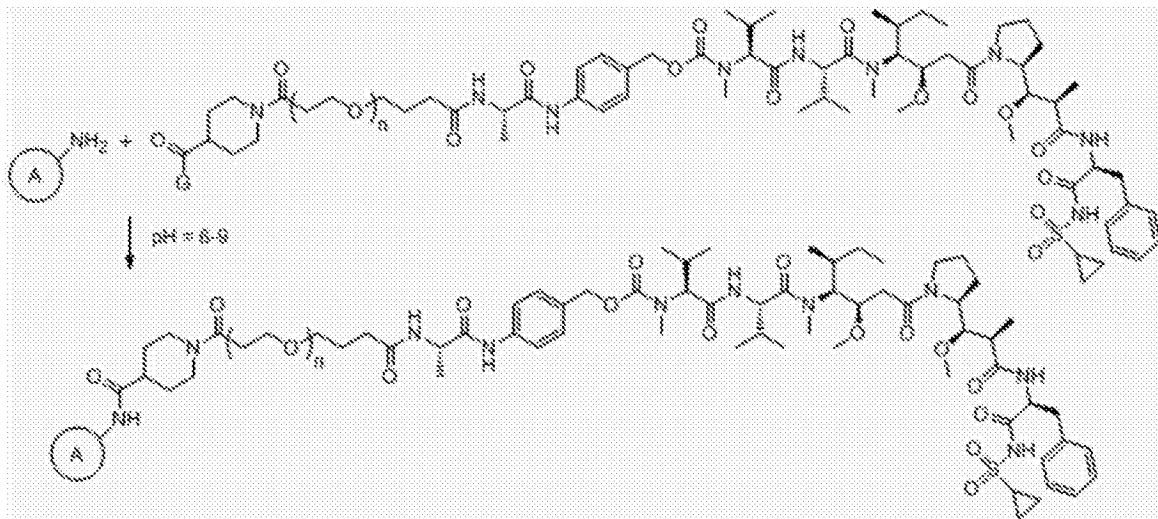


[0280]

[0281] 通用偶联方法II:

[0282] 向配制在缓冲液 (pH6.0-9.0, 含有0-30%有机溶剂) 中的靶分子A溶液 (0.5-50mg/mL) 内以分批或连续流动的方式加入0.1-10当量的活化羧酸成分。反应在0-40℃进行0.5-50h, 并轻微搅拌或摇动, 用HIC-HPLC检测。得到的粗的ADC产物使用目前工艺水平进行必要的下游步骤: 脱盐、更改缓冲液/更改缓冲液配方以及任选的纯化。最终得到的ADC产物用HIC-HPLC、SEC、RP-HPLC, 以及任选的LC-MS进行表征。用UV吸收和/或MS光谱法计算平均DAR。

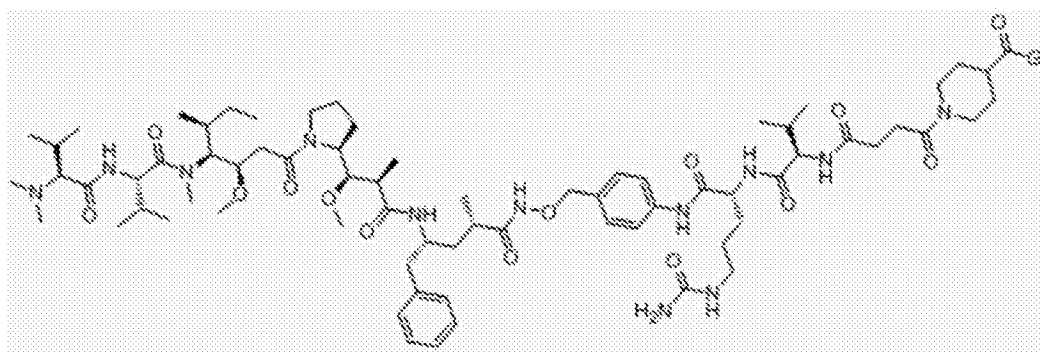
[0283]

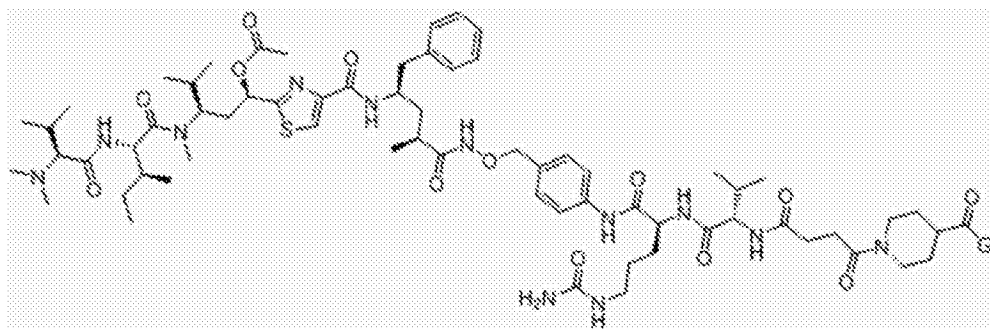
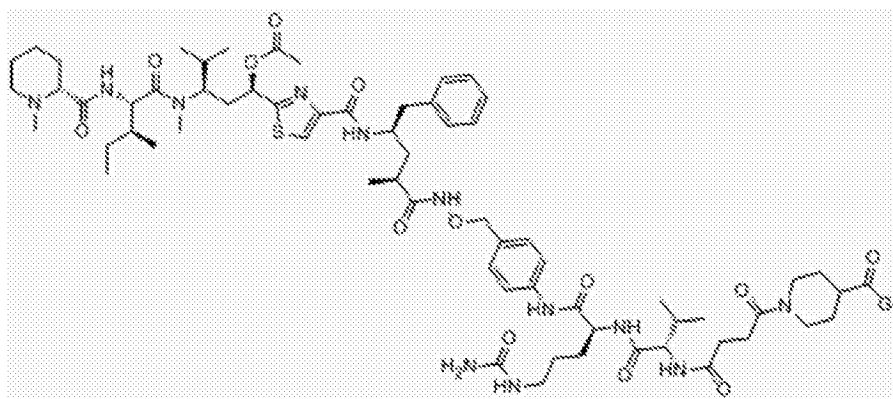


[0284] 通用偶联方法II [0160] 中的多个活化羧酸成分带有离去基团G, 选自下组: -F、-Cl、-Br、-I、-N<sub>3</sub>、-OR (R=取代烷基、取代芳基、杂环、取代杂环)、SR (R=烷基、芳基、取代芳基)、-ON (R<sup>1</sup>) R<sup>2</sup>、RC(=O)O-、以及RSO<sub>2</sub>-O-。

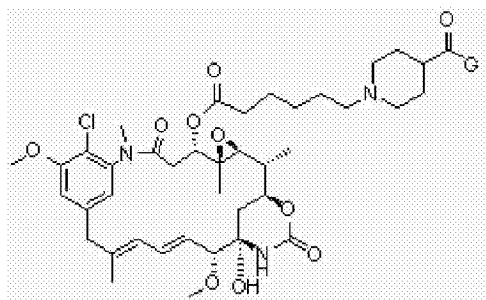
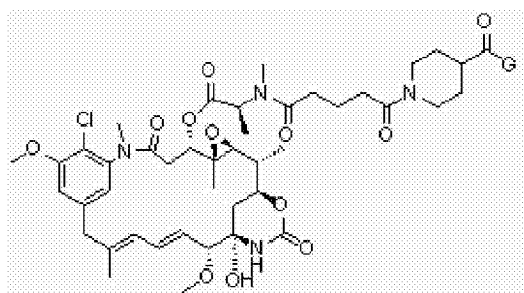
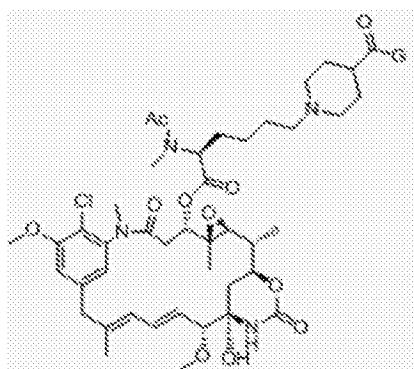
[0285] 多个活化羧酸成分选自, 但不限于下组, 以提供根据通用方法II得到的式I活性剂-偶联物。

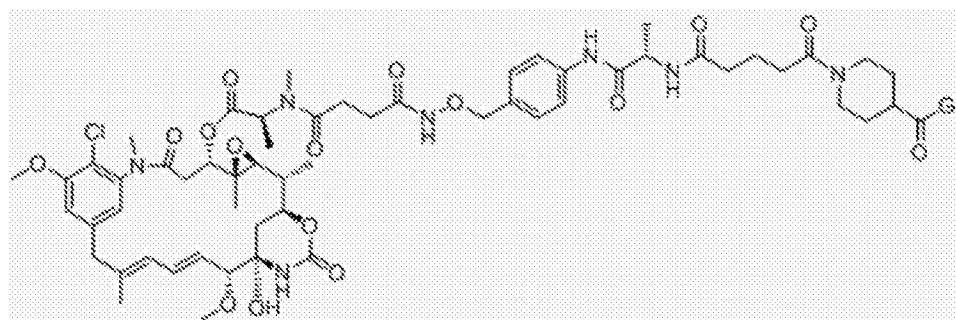
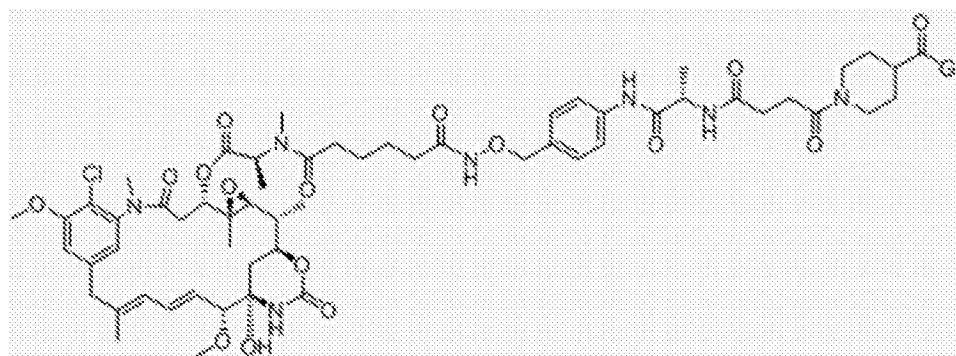
[0286]



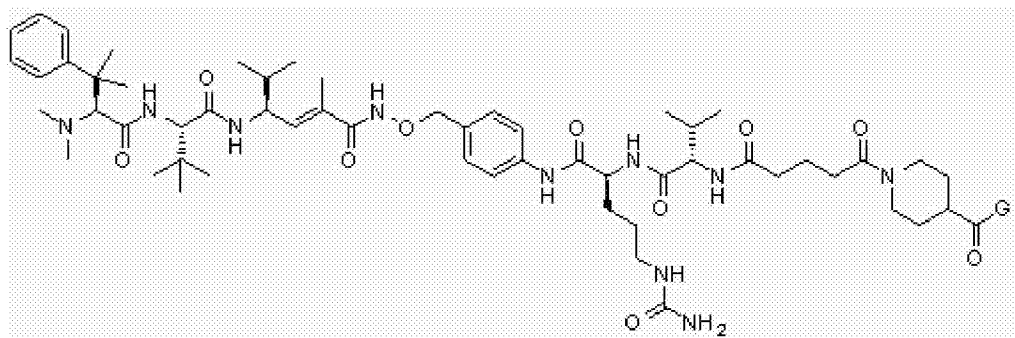
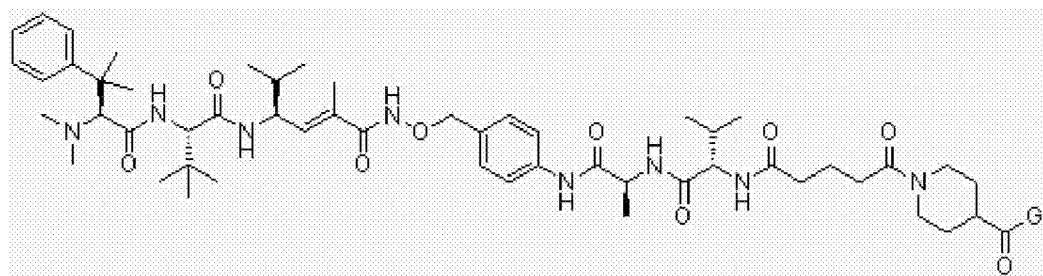
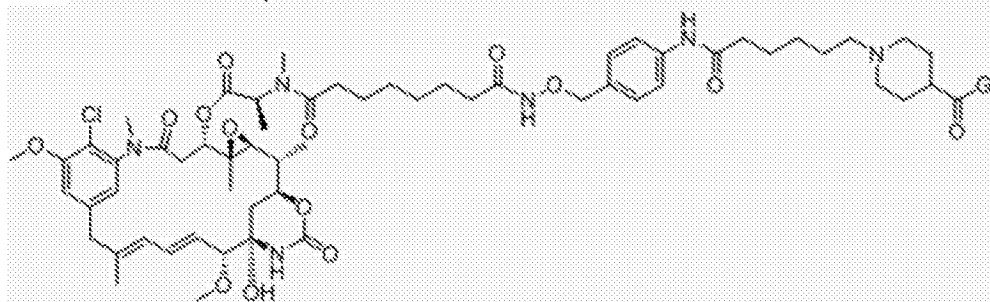


[0287]

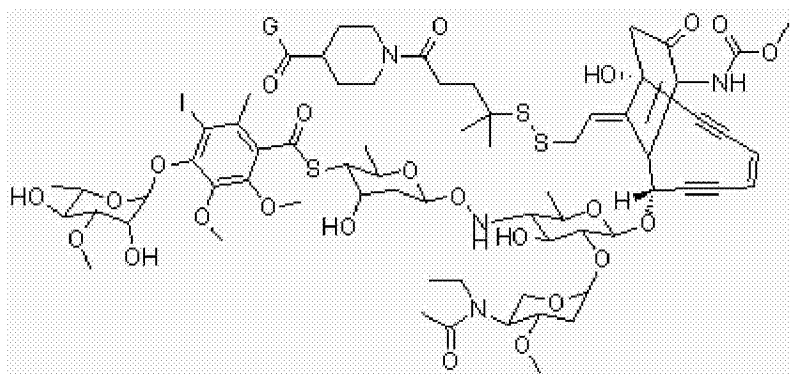
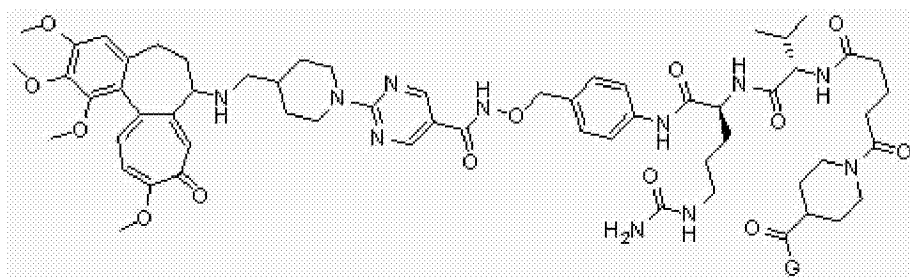
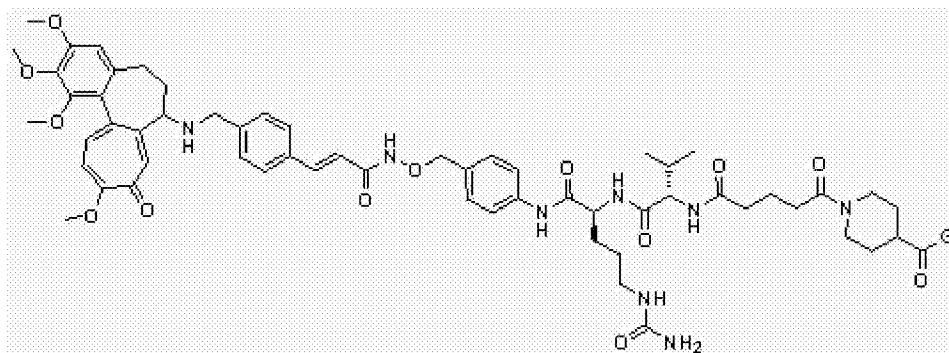
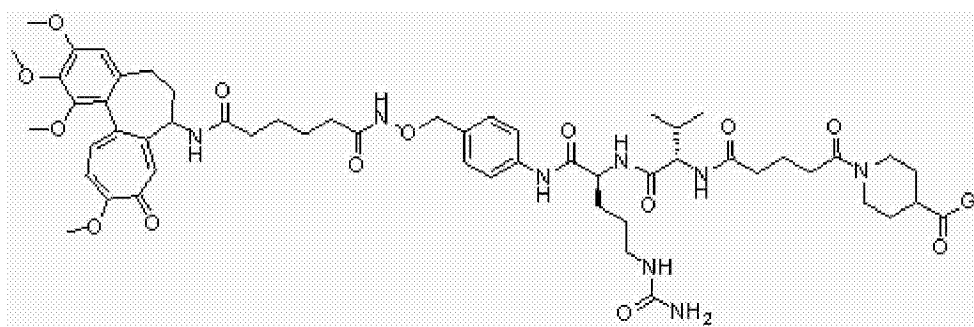
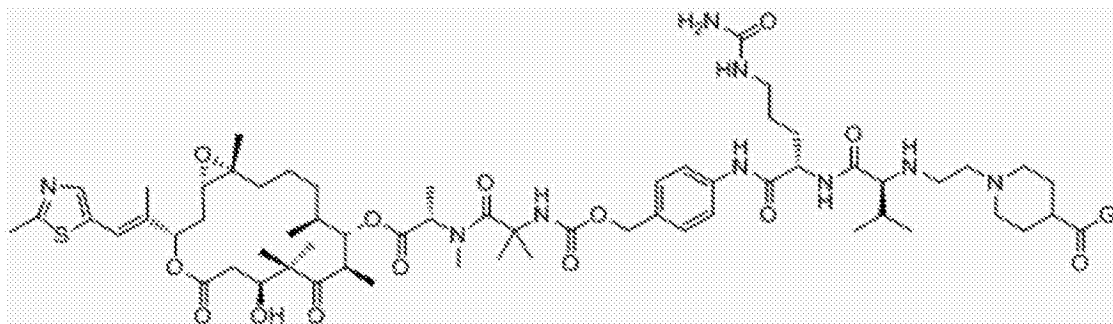


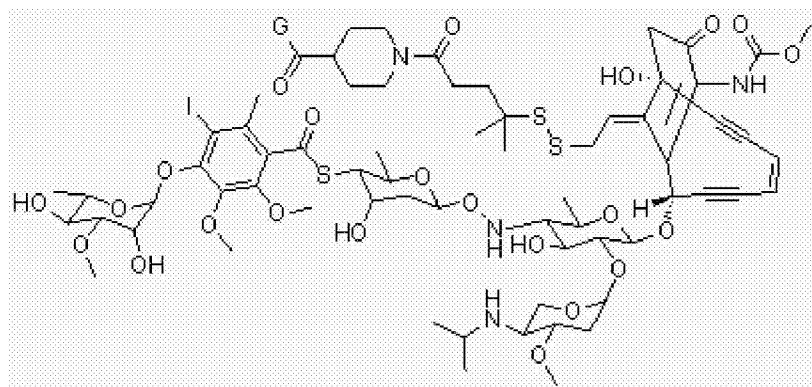


[0288]

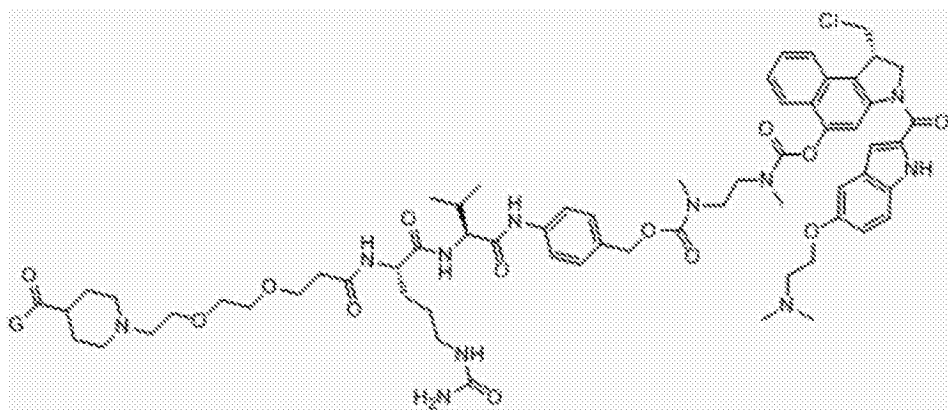


[0289]

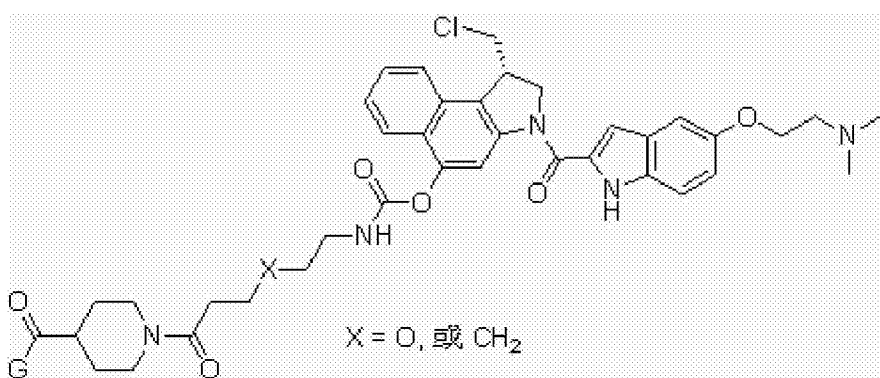




[0290]



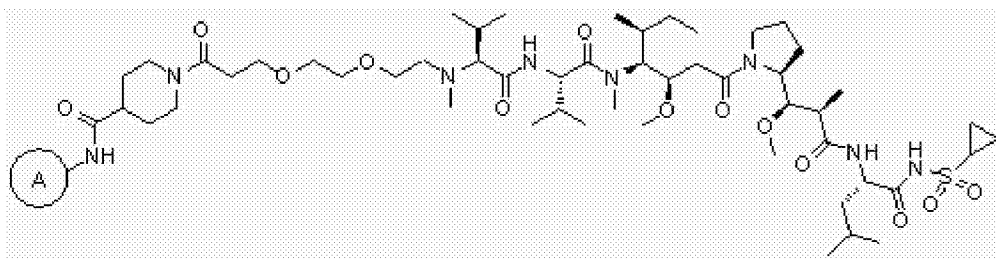
, 或



。

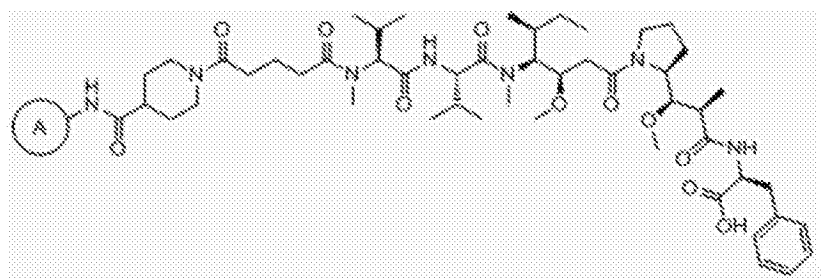
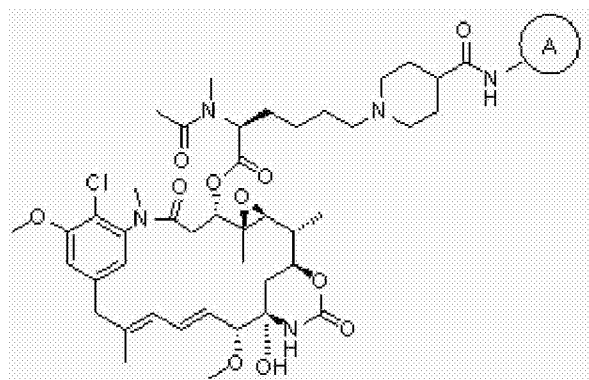
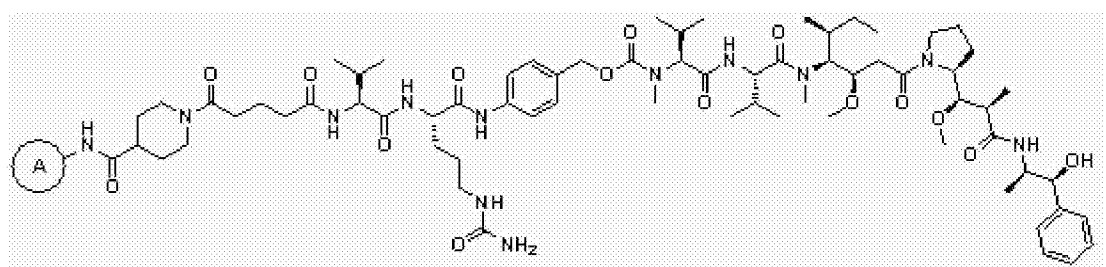
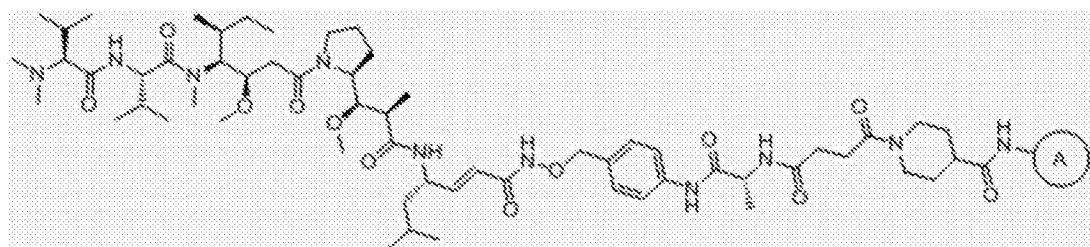
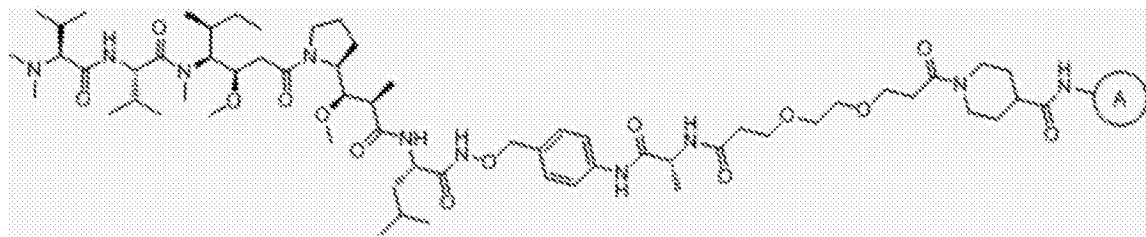
[0291] 在多个实施方式中,根据通用方法II得到的式I活性剂-偶联物含有(但不限于)下述结构:

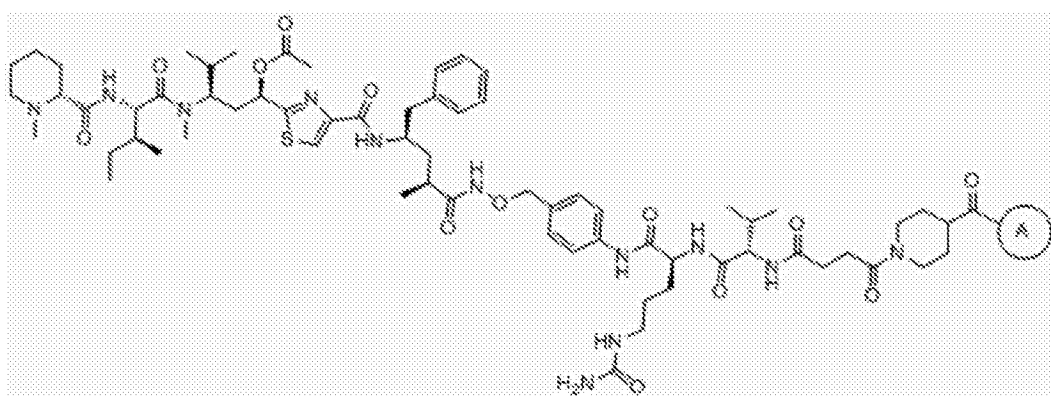
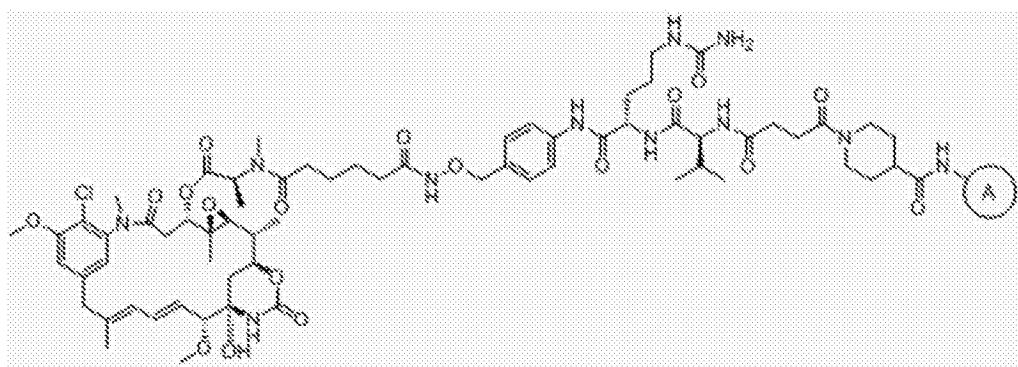
[0292]



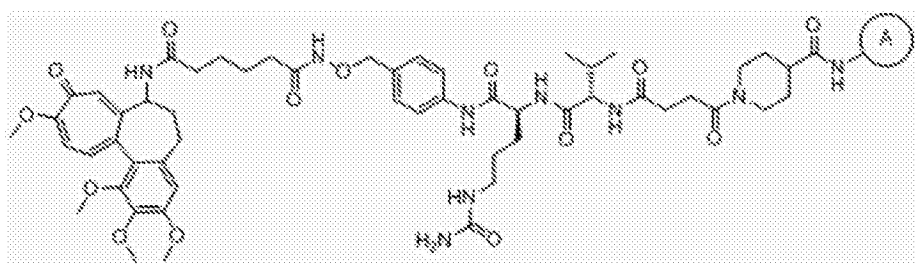
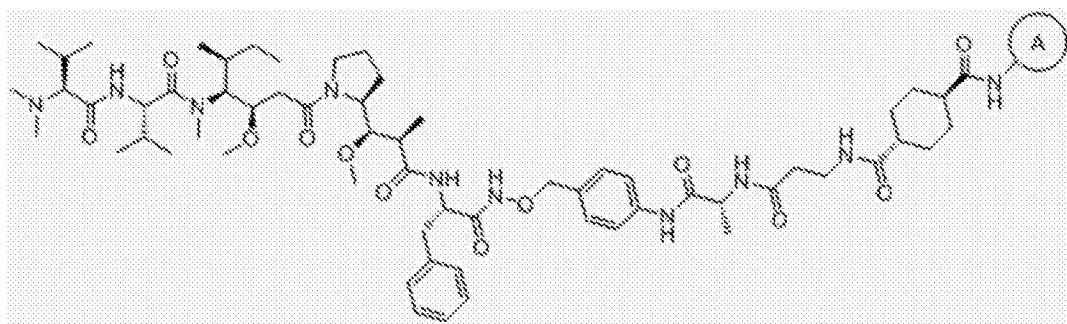
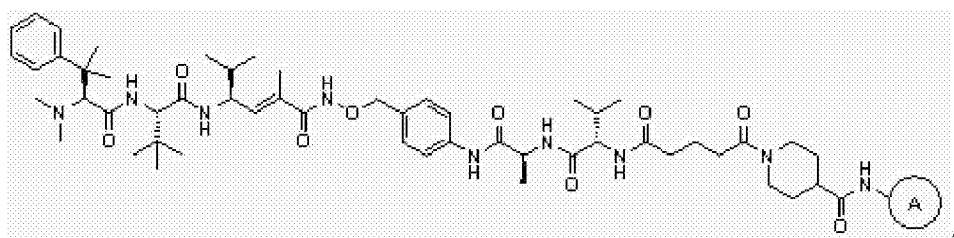
等。

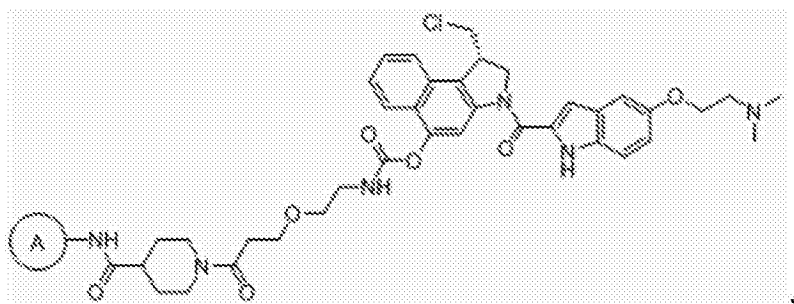
[0293]



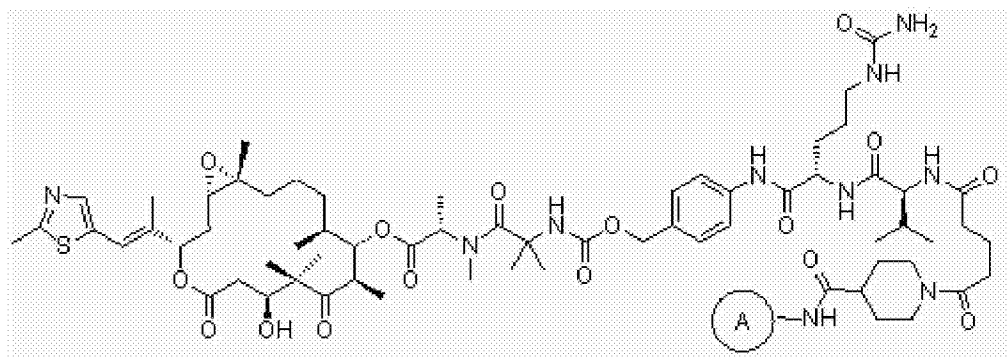
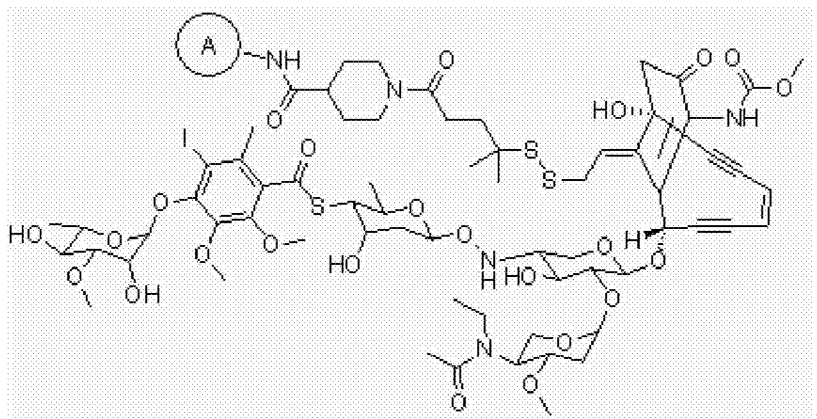


[0294]

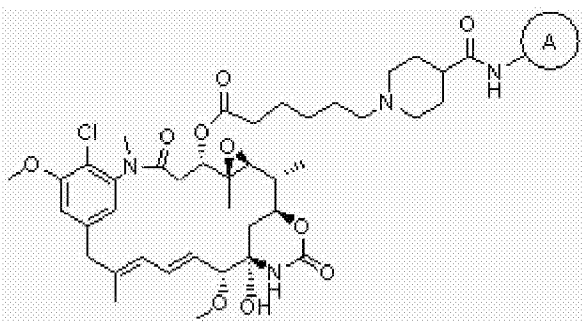




[0295]



[0296]



或,等等。

[0297] 实验

[0298] 通用合成方法

[0299] 通用方法A—HATU介导的酰胺键生成

[0300] 向无水DMF的酸(1.1当量相对于胺)中加入HATU(1当量相对于酸)和DIEA(2当量相对于酸),在室温下搅拌所得混合物1分钟。然后将混合物加入到在DMF中的胺溶液,室温下搅拌反应混合物,直到反应完成为止(用LC/MS检测)。在减压下去除溶剂,任选用反相HPLC纯化残留物,得到最终的纯品。

[0301] 通用方法B—DIC/HOAt介导的酰胺键生成

[0302] 向无水DMF的羧酸(1.1当量),胺和HOAt(1.1当量)的搅拌的溶液中加入DIC(1.1当量),在室温下搅拌反应混合物。反应结束后(用LC/MS检测),在减压下去除溶剂,任选用反相HPLC纯化残留物,得到最终的纯品。

[0303] 通用方法C—使用HCl/二氧六环去除酸敏感的保护性基团(Boc,THP,t-Bu)

[0304] 含有酸敏感的保护性基团的化合物溶解在4NHCl/二氧六环中,在室温下搅拌混合物2h。在减压下浓缩溶液,用冷的乙醚洗涤残留物2次。如果需要,用反相HPLC进行纯化。

[0305] 通用方法D—去除Fmoc基团

[0306] 含有Fmoc的化合物溶解在DMF的2-5%的哌啶中。室温下搅拌混合物1h。在减压下去除溶液。如果需要,用反相HPLC进行纯化。

[0307] 通用方法E—还原烷基化

[0308] 胺溶解在DMF中,加入乙醛(5当量),之后再加入氰基硼氢化钠(5当量)。加入HOAc调节反应混合物的pH至4-5。室温下搅拌混合物,直到反应结束为止(1-4h,用HPLC检测)。如果需要,用反相HPLC进行纯化。

[0309] 通用方法F—皂化反应—从酯类去除Me/Et

[0310] 向搅拌中的酯的甲醇溶液内加入1M LiOH水溶液,直到混合物的pH约为13-14,在室温下搅拌反应混合物,直到反应结束为止(~16h,用HPLC监测)。加入柠檬酸(~10%,水溶液)中和反应,在减压下去除溶剂。任选用反相HPLC纯化粗产品或直接用于下一步。

[0311] 通用方法G—用二(对硝基苯基)碳酸酯激活羟基/酚基团

[0312] 向搅拌的醇/酚的THF/DMF(2/1)溶液中加入二(对硝基苯基)碳酸酯(3-5当量),之后再加入DIEA(2-4当量),室温下搅拌反应混合物,直到大部分的原料被耗尽为止。用LC/MS监测反应进程。任选用快速柱色谱法或沉淀法纯化粗产品,并洗涤。

[0313] 通用方法H—胺和环酐(戊二酐或琥珀酐)的反应

[0314] 含有胺的化合物溶解在DMF中。加入戊二酐(3当量),之后再加入DIEA(4当量)。室温下搅拌混合物,直到大部分的原料被耗尽为止。用LC/MS监测反应进程。用反相HPLC纯化粗产品,得到纯的羧酸。

[0315] 通用方法I—用对硝基苯基碳酸酯(如FmocVC-PAB-PNP)形成氨基甲酸酯

[0316] 含有胺的化合物溶解在DMF中,加入烷基/芳基对硝基苯基碳酸酯(1.5当量),之后再加入DIEA(2当量)和HOBt(cat.,5%)。室温下搅拌反应混合物,直到大部分的胺被耗尽为止。用LC/MS监测反应进程。任选用反相HPLC纯化粗产品,得到纯的氨基甲酸酯。

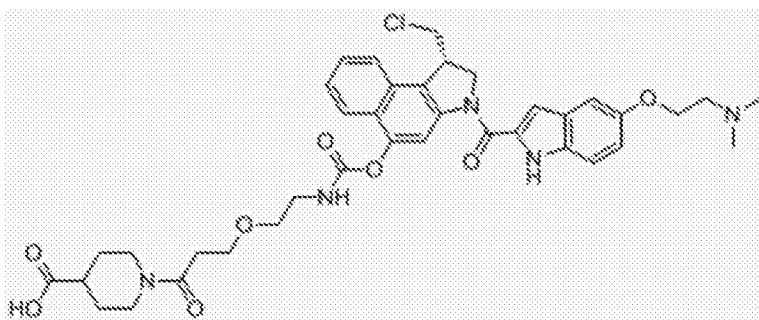
[0317] 通用方法J—从酸形成活化的酯(如NHS)

[0318] 酸溶解在DCM中,如有需要,将DMF加入以促进溶解。加入N-羟基琥珀酰亚胺(1.5当量),之后再加入EDC.HCl(1.5当量)。室温下搅拌反应混合物1h,直到大部分的酸被耗尽为止。用反相HPLC监测反应进程。用DCM稀释混合物,依次用柠檬酸(水溶液,10%)和盐水进行洗涤。干燥有机层,浓缩至干。任选用反相HPLC或硅胶柱色谱法纯化粗产品。

[0319] 形成活性剂偶联物的基本方案

[0320] 偶联方法A 通过活化的环状羧酸偶联赖氨酸残基

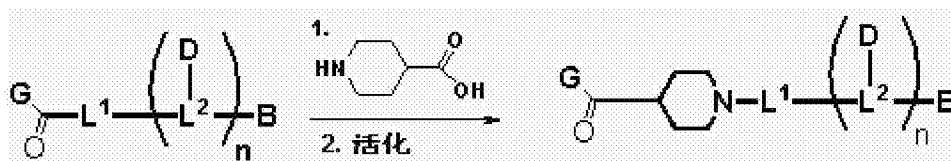
[0321]



[0322] 如果环状羧酸不能直接获得,也可以从线性羧酸衍生物中很容易的获得环状羧酸部分。

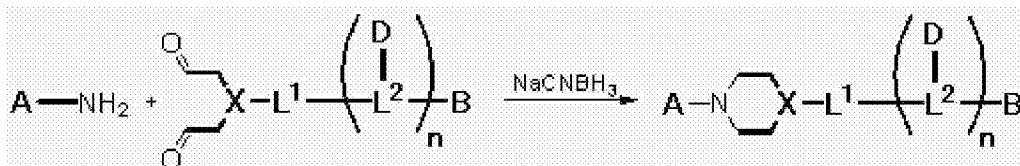
[0323] 比如:

[0324]



[0325] 偶联方法B 通过活化的环状羧酸偶联赖氨酸残基

[0326]



[0327] 实验描述

[0328] 步骤1 合成药物-连接物构建物 (-L2-D)

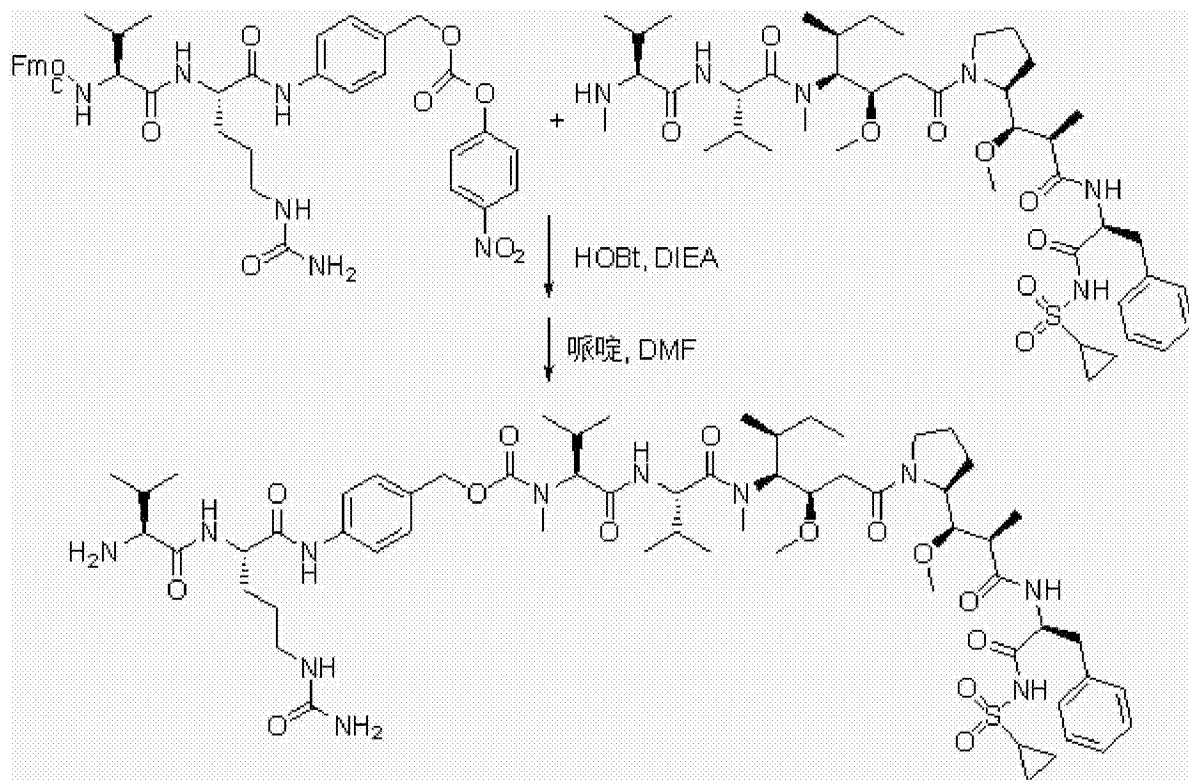
[0329] 合成药物-连接物构建物的方法,包括但不限于:

[0330] 方法1-1:连接物和药物通过氨基甲酸酯键相连。使用下述通用方法:

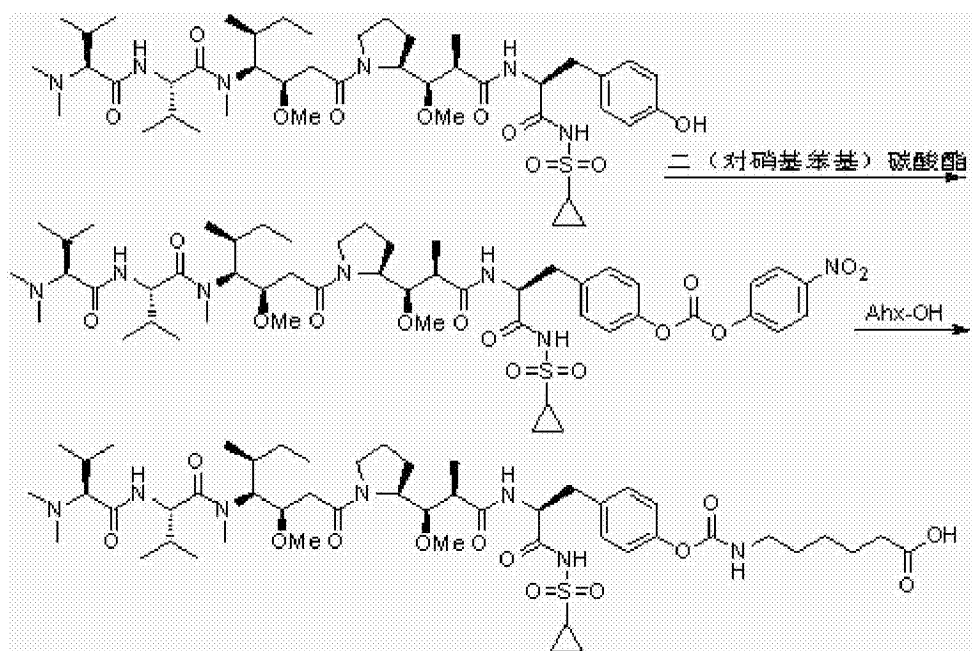
[0331] 通用方法G和I用于激活和形成氨基甲酸酯

[0332] 通用方法C,D和F去除保护性基团,用于进一步衍生化。

[0333]



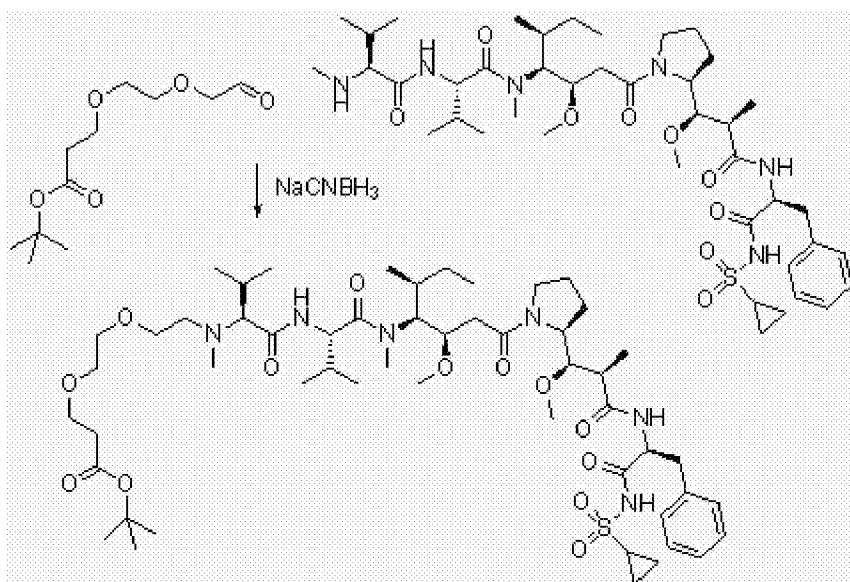
[0334]



[0335]

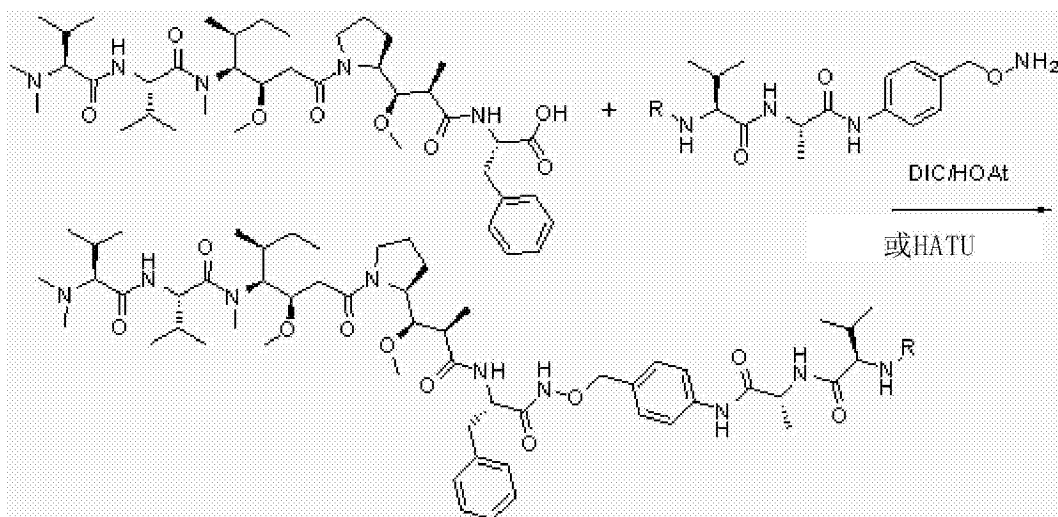
方法1-2:连接物和药物通过还原烷基化反应相连(通用方法E)

[0336]



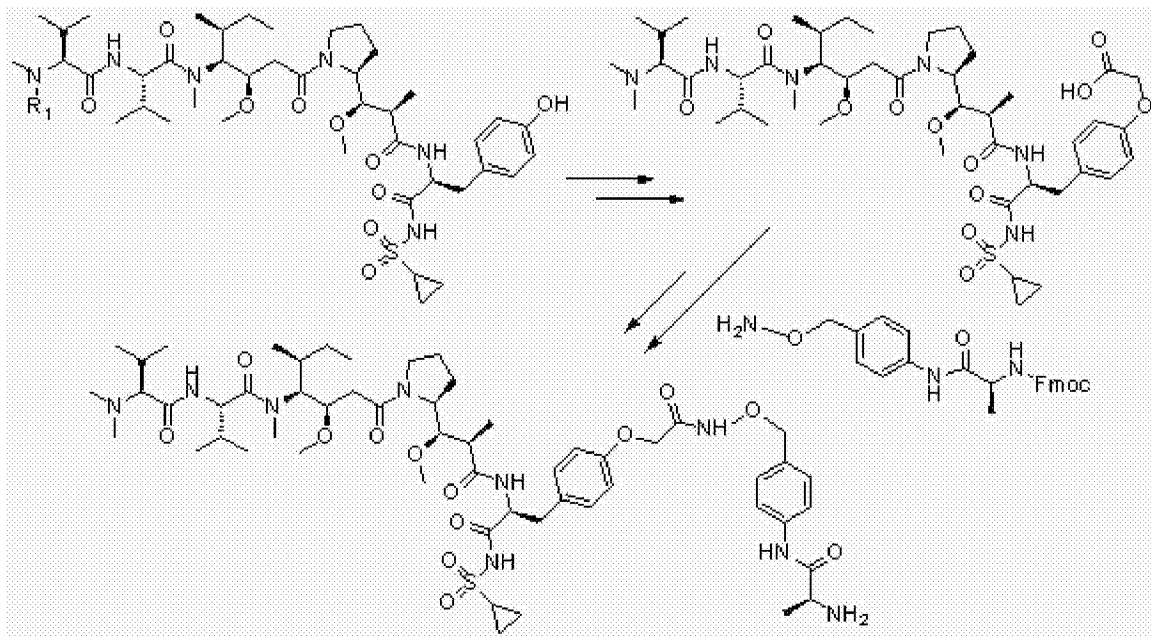
[0337] 方法1-3: 含有羧酸部分的活性分子通过形成异羟肟酸酯 (hydroxamate) 与烷氧基氨基连接物相连 (通用方法A或B), 之后去除保护性基团。

[0338]

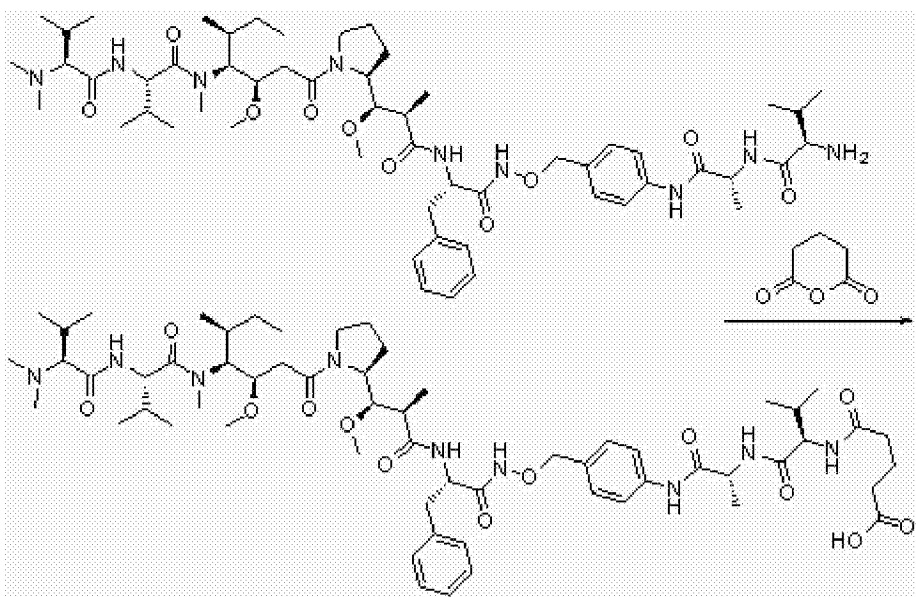


[0339] 上述方法对异羟肟酸 (hydroxamic acid) 活性分子氧肟酸仍然适用, 因为在酶解条件下, 该构建物会释放异羟肟酸。反应需要从它相应的羧酸开始。

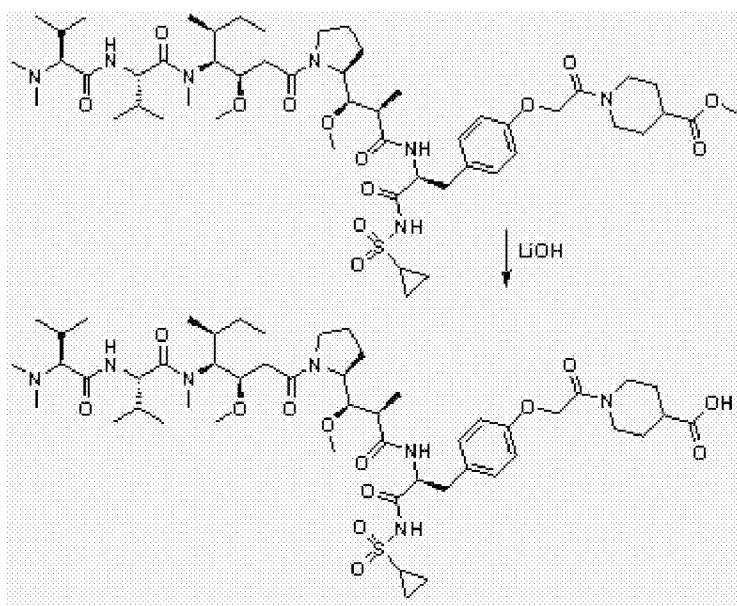
[0340]

[0341] 步骤2 引入官能团到L1-(L2-D)[0342] 引入适于偶联反应的官能团的方法,包括但不限于:[0343] 方法2-1 带有游离氨基的化合物与环酐反应,引入羧酸(通用方法H)。

[0344]

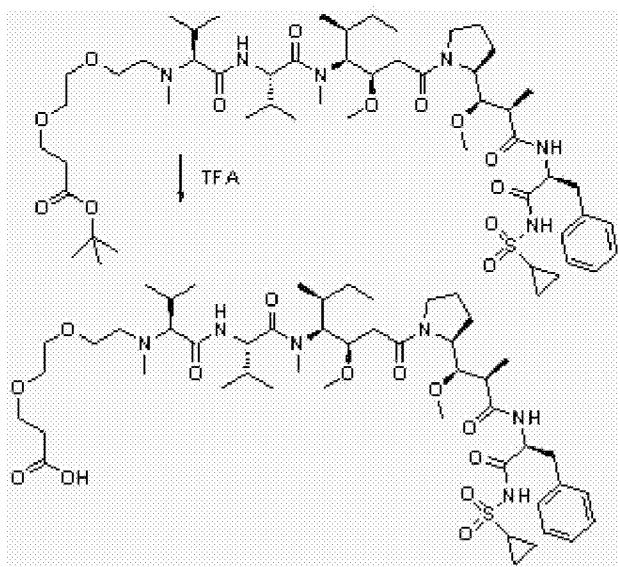
[0345] 方法2-2 带有游离氨基的化合物与二酸反应,引入羧酸(通用方法B)。





[0348]

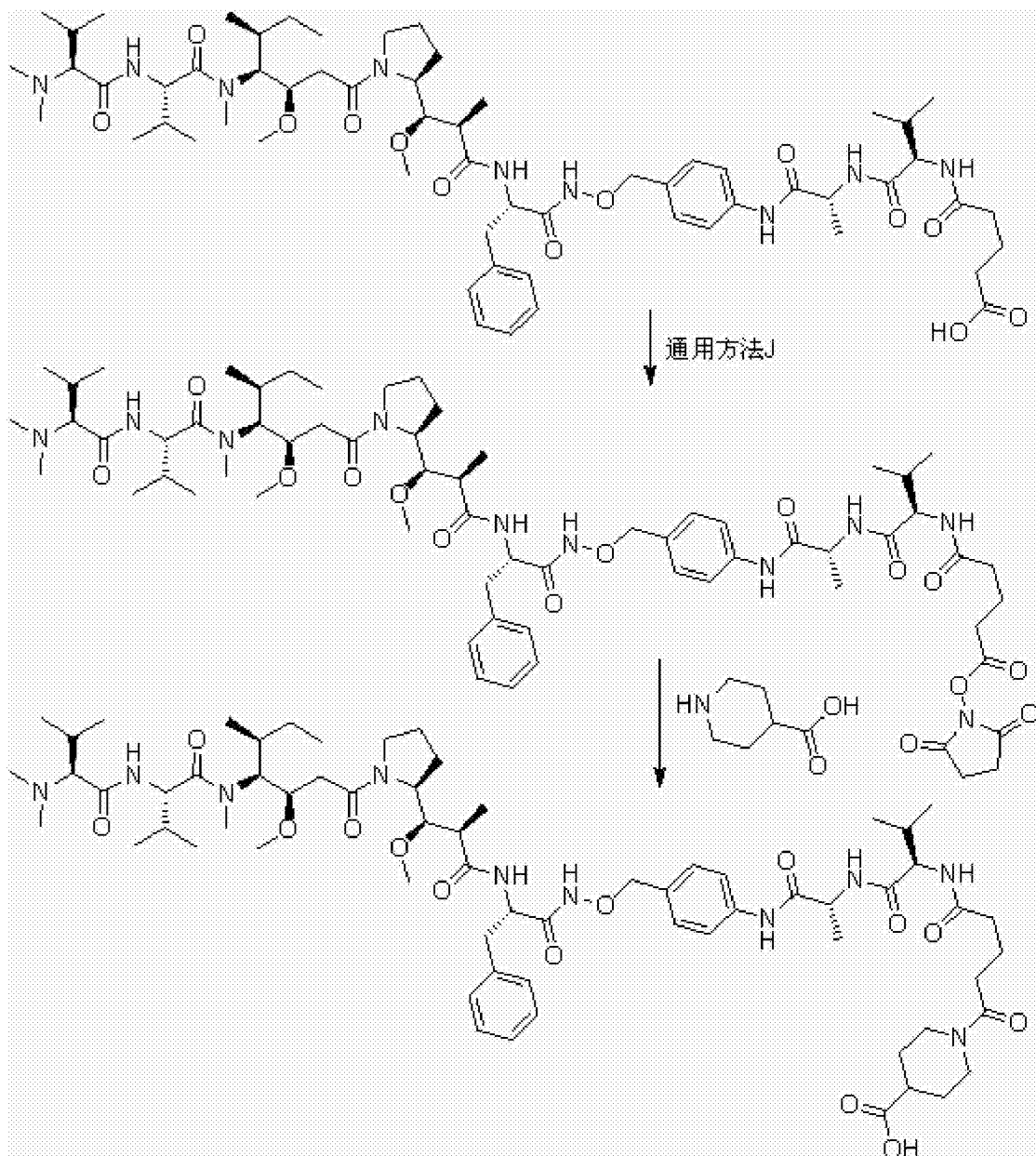
或



[0349]

方法2-4 用线性羧酸作为原料,引入环状羧酸部分

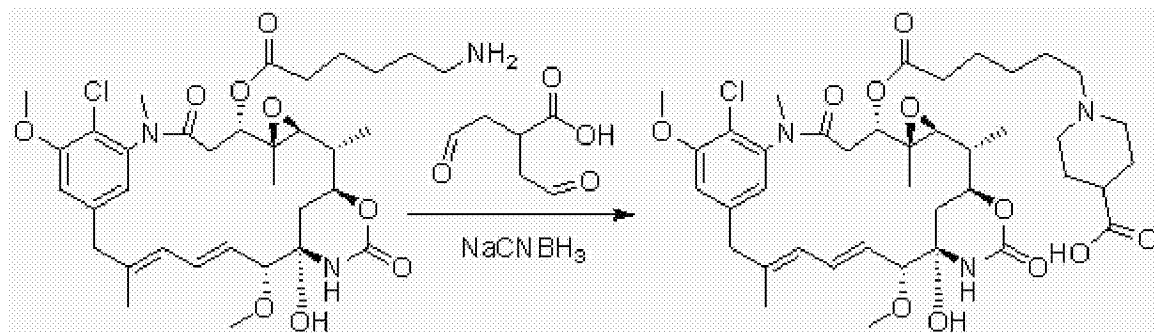
[0350]



[0351] NHS酯 (20mg) 溶解在乙腈/水 (6/4, v/v) 中, 加入饱和碳酸氢钠水溶液 (0.3mL) 配制的哌啶4-羧酸 (12mg) 溶液。室温下搅拌混合物2h, 用反相HPLC直接纯化, 得到预期产品, 冻干后为白色固体 (18mg)。MS实测1261.5 (M+H)<sup>+</sup>

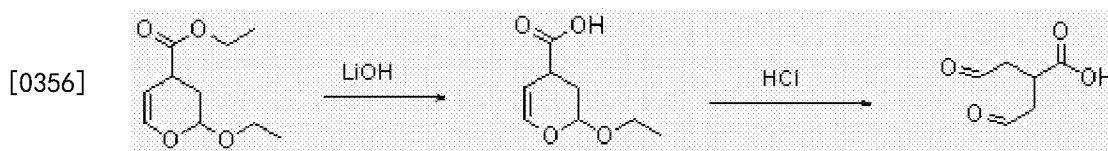
[0352] 方法2-5 用带有羧酸部分的二醛还原烷基化伯胺 (通用方法E)

[0353]



[0354] 胺(NH<sub>2</sub>-Ahx-美登醇) (20mg) 溶解在乙腈(2mL) 中, 加入1mL的NaOAc缓冲液(100mM, pH=4.0)。加入二醛(0.5M的水溶液, 0.2mL), 之后再加入NaCNBH<sub>3</sub> (10mg)。室温下搅拌反应混合物30min, 用反相HPLC直接进行纯化, 得到所需的酸(16mg), 冻干后为白色固体。MS实测: 790.5 (M+H)<sup>+</sup>。

[0355] 根据如下方案合成二醛羧酸:

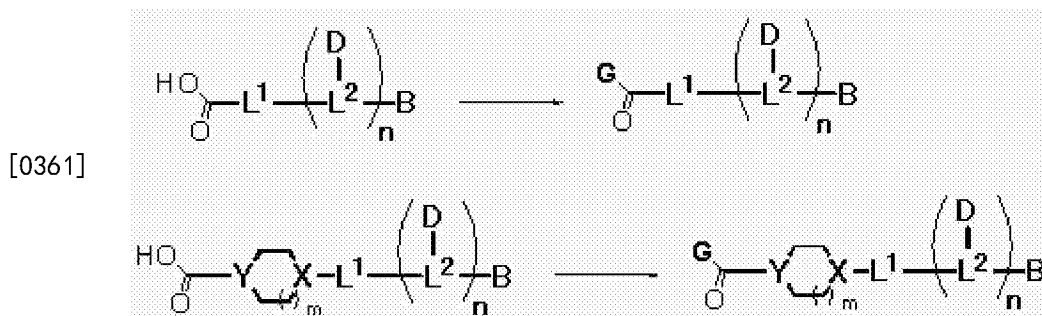


[0357] 根据文献所述的步骤(化学通讯, (1) 25-26, 1998) 合成该酯、2H-吡喃-4-羧酸、2-乙氧基-3,4-二氢-乙酯, 用通用方法F对其进行皂化反应, 再用1N的盐酸水溶液进行室温处理1h。二醛水溶液不经进一步纯化直接使用。

[0358] 步骤3 在偶联前引入最后的官能团

[0359] 在偶联反应之前引入最后反应基团的方法, 包括但不限于:

[0360] 方法3-1 活化羧酸至其相应的活化形式



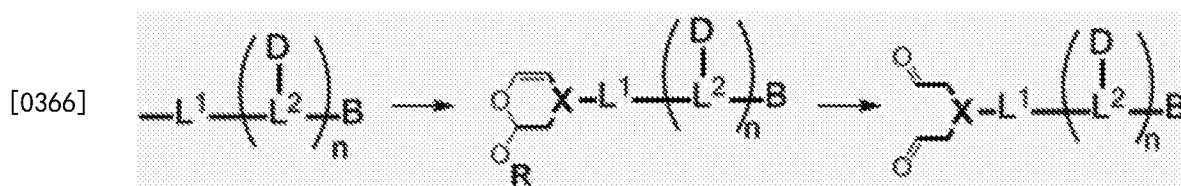
[0362] G是离去基团, 选自-F, -Cl, -Br, -I, -N<sub>3</sub>, -OR (R为烷基, 芳基, 杂芳基, 取代的芳基, 取代的杂芳基), SR (R为取代的烷基, 取代的芳基杂芳基, 取代的芳基, 取代的杂芳基), -ON (R<sup>1</sup> R<sup>2</sup>, (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>分别独立选自-(C=O)-R, R=H, 烷基, 芳基, 杂芳基, 取代的芳基, 取代的杂芳基或R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>连接成一个环状结构或R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=(=C-R), RC(=O)O-和RSO<sub>2</sub>-O- (R为烷基, 芳基, 杂芳基, 取代的芳基, 取代的杂芳基))。

[0363] 可以用多种方法活化羧酸, 得到其活化形式。比如, 可以用下述方法活化羧酸: A) Tetrahedron 61 (2005) 10827-10852; B) Beckwith, A.L.J. 刊于“酰胺化学”(The Chemistry of Amides); Zabicky, J., 编.: 酰胺的合成 (Synthesis of Amides); Interscience: 伦敦, 1970; 第105-109页; C) 有机合成试剂手册: 激活剂和保护性基团 (Handbook of Reagents

for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups); Pearson, A.J., Roush, W.R., 编.; Wiley: 纽约, 1999; 页码 370-373; D) Lloyd-Williams, P., Albericio, F., 和 Giralt, E. (1997). 肽类和蛋白质合成的化学方法 (Chemical approaches to the synthesis of peptide and proteins) (Series 编. C.W. Rees). CRC 出版社, 纽约; E) 肽化学: 实用性教科书 (Peptide chemistry: A practical textbook): By M Bodansky. Springer-Verlag, 海德堡. 1988; 和 F) 肽合成实践 (The practice of peptide synthesis), 第二版., M. Bodansky 和 A. Bodansky, Springer-Verlag, 纽约, 通过引用的形式将上述包含在本文中。

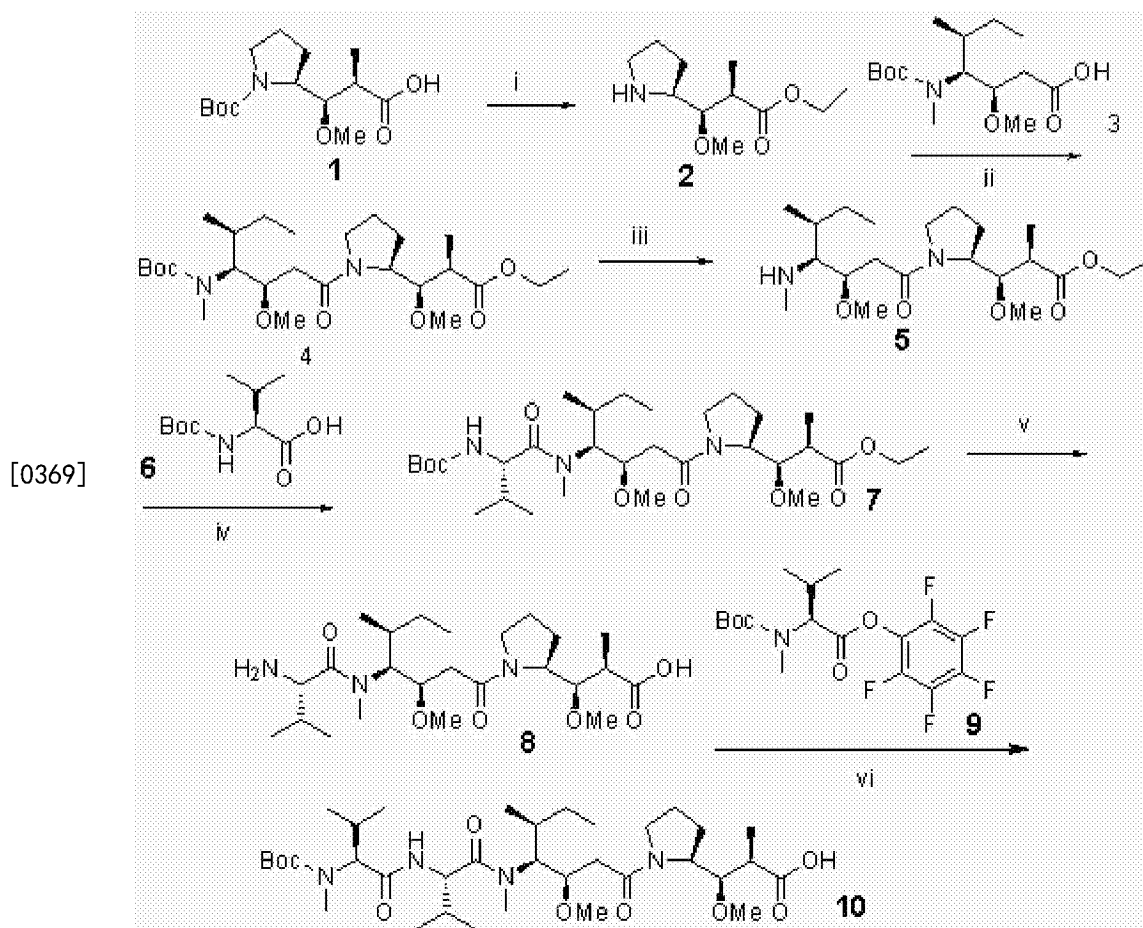
[0364] 方法 3-2 引入二醛部分进行偶联反应

[0365] 用酸性水溶液处理乙氧基吡喃衍生物, 得到所需的二醛。



[0367] 实施例 I 合成化合物 10

[0368] 方案 I



[0370] 方案 I 试剂和条件: I. SOCl<sub>2</sub>, EtOH; II. DEPC, TFA, DCM; III. TFA, DCM; IV. BROP, DCM, DIEA; V. TFA, DCM; IV. DIEA, DCM, HOBT.

[0371] 在 0℃, 向化合物 1 (23.4g, 81.53mmol) 的干燥乙醇 (200mL) 溶液中加入氯化亚砷

(100mL)。搅拌混合物过夜,真空蒸发去除溶剂。残留物不需进一步纯化,立即被用于下一步。在0℃,向化合物2 (81.53mmol) 和化合物3 (50g, 163.1mmol) 的无水DMF (150mL) 溶液中加入DEPC (15.9g, 97.8mmol), TEA (41g, 0.408mol)。0℃搅拌混合物2h。然后室温搅拌混合物过夜。真空蒸发去除溶剂。用乙酸乙酯-甲苯 (2:1, 900mL) 稀释残留物,用1M硫酸氢钾,水,饱和碳酸氢钠和盐水洗涤。干燥有机层,浓缩得到残留物,用柱(己烷:乙酸乙酯:DCM=5:1:1) 纯化,得到38g的化合物4。

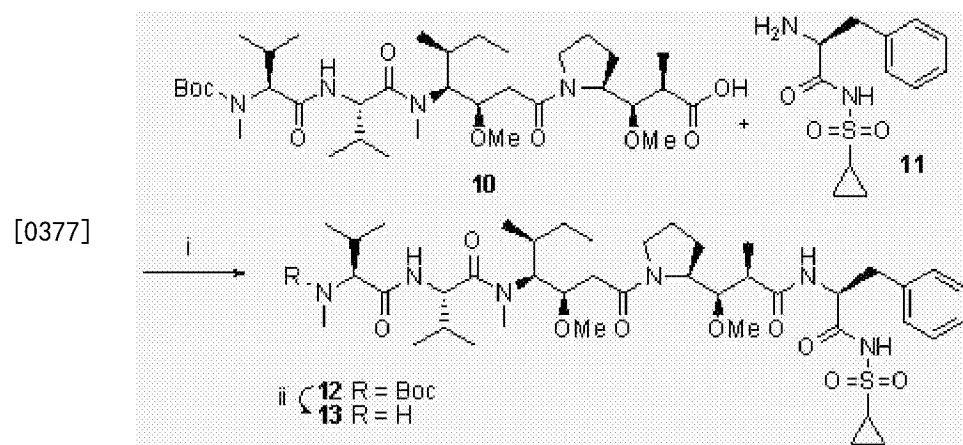
[0372] 在0℃,向Boc-Val-OH (30.6g, 0.142mol), 化合物5 (来自25g的化合物4) 的DCM (400mL) 溶液中加入BrOP (28g, 70.87mmol), DIEA (30g, 0.236mol)。将混合物避光,在0℃搅拌0.5h。然后在室温搅拌48h。真空蒸发去除溶剂。用乙酸乙酯-甲苯 (3:1, 900mL) 稀释残留物,用1M硫酸氢钾,水,饱和碳酸氢钠和盐水洗涤。干燥有机层,浓缩得到残留物,用硅胶柱(己烷:乙酸乙酯:DCM=3:1:1) 纯化,得到22g的化合物7。

[0373] 在10℃以下,向化合物7 (40g, 66.7mmol) 的THF (600mL) 溶液中加入氢氧化锂 (14g, 0.33mol) 与水 (300mL) 的混合物。25℃搅拌混合物5d。蒸发去除THF。用乙醚 (200mL×3) 洗涤水层。在0℃,用1N盐酸酸化水层至pH为2,用乙酸乙酯萃取混合物,用水和盐水洗涤有机层。干燥有机层,浓缩得到残留物,用制备型HPLC纯化,得到14g的化合物8。

[0374] 向化合物8 (3g) 的DCM (100mL) 溶液中加入化合物9 (3g, 根据通用方法J使用EDC和五氟苯酚从Boc-N-Me-Val-OH制备)。加入DIEA (2.6mL), 再加入HOBT (cat. 100mg), 室温下搅拌反应混合物16h。在减压下去除溶剂,硅胶柱纯化残留物,得到化合物10,为白色粉末 (3.1g)。MS  $m/z$  计算的 $C_{35}H_{64}N_4O_9$  684.5, 实测707.6 ( $[M+Na]^+$ )。

[0375] 实施例II-1 合成化合物13

[0376] 方案II-1



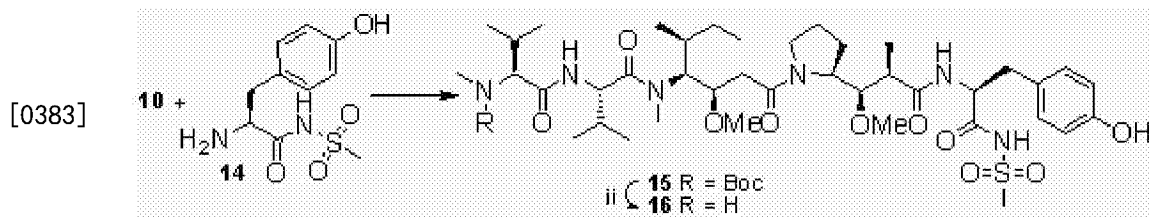
[0378] 方案II-1 试剂和条件:i. DIC/HOAt, DMF, rt, 16h; ii. HCl/二氧六环

[0379] 根据之前报道的步骤 (ARKIVOC 2004 (xii) 14-22, 或 WO 2007146695) 使用Boc保护的氨基酸和环丙基/甲基磺酰胺合成氨基酸磺酰胺类衍生物11,之后去除Boc (通用方法C)。

[0380] 如下所示,用上述通用方法合成化合物13: DIC/HOAt在Boc-N-Me-Val-Val-Dip-OH (化合物1) 和胺11之间介导酰胺键形成 (通用方法B),之后去除Boc (通用方法C)。用反相HPLC纯化最终的化合物,得到化合物13,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{42}H_{70}N_6O_9S$  834.5, 实测835.6 ( $[M+H]^+$ )。

[0381] 实施例II-2 合成化合物16

## [0382] 方案II-2



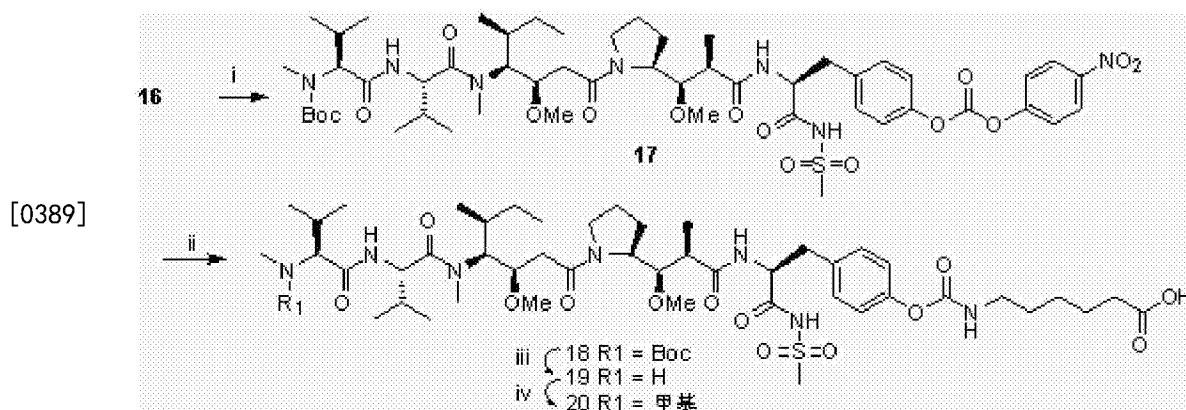
[0384] 方案II-2 试剂和条件:i.DIC/HOAt,DMF,rt,16h;ii.HCl/二氧六环

[0385] 根据之前报道的步骤(ARKIVOC 2004(xii) 14-22,或WO 2007146695)使用Boc保护的氨基酸和环丙基/甲基磺酰胺合成氨基酸磺酰胺类衍生物14,之后去除Boc(通用方法C)。

[0386] 如下所示,用上述通用方法合成化合物16:DIC/HOAt在Boc-N-Me-Val-Val-Dil-Dap-OH(化合物10)和胺14之间介导酰胺键形成(通用方法B),之后去除Boc(通用方法C)。用反相HPLC纯化最终的化合物,得到化合物16,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{41}H_{70}N_6O_{10}S$  838.5,实测839.6 ( $[M+H]^+$ )。

[0387] 实施例II-3 合成化合物20

## [0388] 方案IIC



[0390] 方案IIC 试剂和条件:i.二(硝基苯基)碳酸盐,DIEA,THF/DMF,r.t.;ii.6-氨基己酸, $NaHCO_3$ (水溶液);iii.HCl/二氧六环(4N);iv. $HCHO$ , $NaCNBH_3$ ,DMF, $HOAc$ ;

[0391] 用3当量的二(对硝基苯基)碳酸酯处理酚16(1mmol),形成活化的碳酸酯17(通用方法G)。粗产品不需进一步纯化直接使用。6-氨基己酸(5当量)溶解在饱和的碳酸氢钠水溶液(5mL)中,所得到的溶液被加入。室温下搅拌反应混合物16h。加入柠檬酸酸化反应(pH为4-5),然后用乙酸乙酯(150mL)稀释。干燥有机层(用 $Na_2SO_4$ ),浓缩得到粗产品18,然后进行下述步骤:去除Boc(通用方法C),用甲醛还原烷基化。用反相HPLC纯化终产品,得到化合物20,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{48}H_{81}N_7O_{13}S$  995.6,实测996.4 ( $[M+H]^+$ )。

[0392] 实施例III 合成烷氧基胺连接物24,25,26和27

[0393]

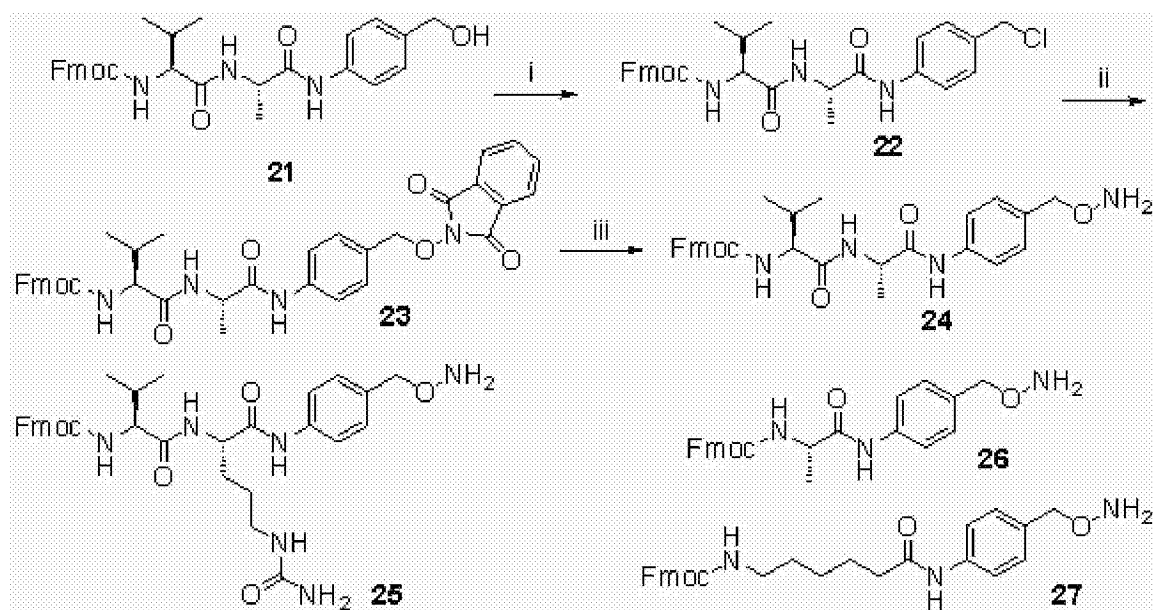
| ID | 结构 |
|----|----|
| 24 |    |
| 25 |    |

[0394]

|    |  |
|----|--|
| 26 |  |
| 27 |  |

[0395] 方案III

[0396]



[0397] 方案III 试剂和条件:i.SOCl<sub>2</sub>,THF,1h;ii.N-羟基邻苯二甲酰亚胺,NaHCO<sub>3</sub>,DMF,rt,48h;iii.NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O,HOAc,DMF.

[0398] 实施例III-1合成化合物24

[0399] 向搅拌的Fmoc-VA-PAB (21) (Bioconjugate Chem.,2002,13,855-859) (9g,15mmol) 的THF (200mL) 溶液中逐滴加入亚硫酸氯 (18mmol)。添加完成后,室温下搅拌反应混合物1h.TLC分析 (乙酸乙酯/己烷,1/1,v/v) 显示反应完成。减压下去除溶剂,用己烷 (100mL) 洗涤残留物,得到化合物22,为浅黄色固体 (8.8g)。

[0400] 化合物22 (6.2g,10mmol) 溶解在无水DMF (100mL) 中。加入N-羟基-邻苯二甲酰亚胺 (3.2g,20mmol),之后加入固体NaHCO<sub>3</sub> (3.4g,40mmol)。室温下搅拌反应混合物48h.TLC分析显示大部分的化合物61被耗尽。之后反应用乙酸乙酯 (500mL) 进行稀释,依次用饱和的NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (3×200mL) 和盐水 (200mL) 洗涤。干燥有机层,浓缩得到化合物23,为黄褐色固体,不需进一步纯化直接使用。

[0401] 上步得到的粗的化合物23溶解在DMF (100mL) 中。加入HOAc (6mL),之后加入水合肼 (5mL)。室温搅拌反应混合物1h.LC/MS显示反应完成。反应混合物之后被倒入装有1L水的烧杯中,并搅拌。通过过滤收集沉淀的固体,用水洗涤2次,得到化合物24,为白色固体 (纯度>85%,可以直接使用)。反相HPLC纯化后得到纯的化合物63。MS m/z计算的C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>530.3,实测531.4 ([M+H]<sup>+</sup>)。

[0402] 实施例III-2 合成化合物25

[0403] 对于化合物25的合成,用上述方法,以化合物Fmoc-VC-PAB (Bioconjugate Chem,2002,13,855-859) 作为起始化合物合成化合物25。MS m/z计算的C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>616.3,实测617.5 ([M+H]<sup>+</sup>)。

[0404] 实施例III-3 合成化合物26

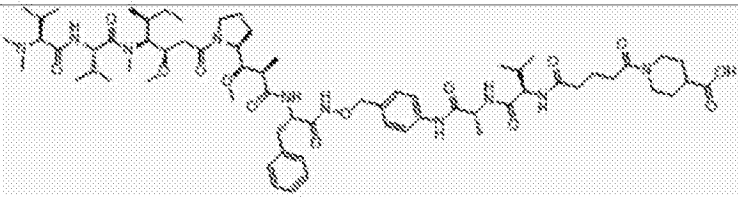
[0405] 对于化合物26的合成,用上述方法,以化合物Fmoc-A-PAB (根据已报道的步骤合成:Bioconjugate Chem,2002,13,855-859) 作为起始化合物合成化合物26。MS m/z计算的C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>431.2,实测432.6 ([M+H]<sup>+</sup>)。

[0406] 实施例III-4 合成化合物27

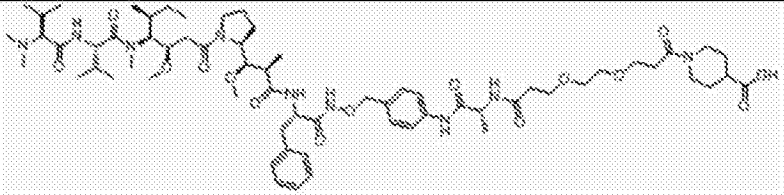
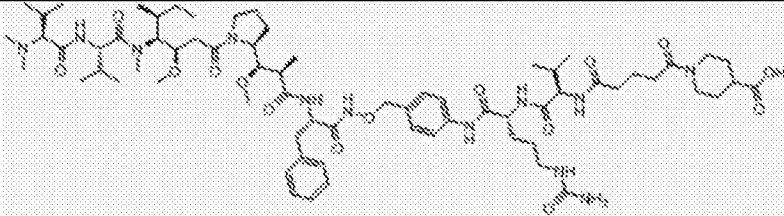
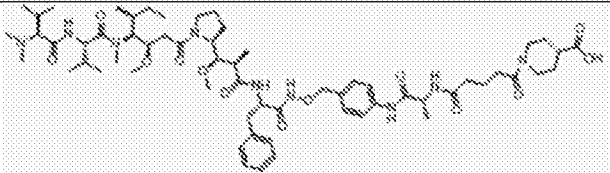
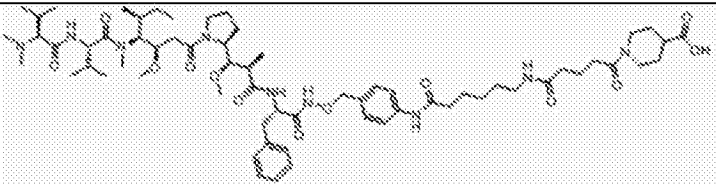
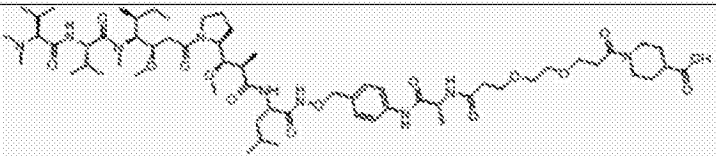
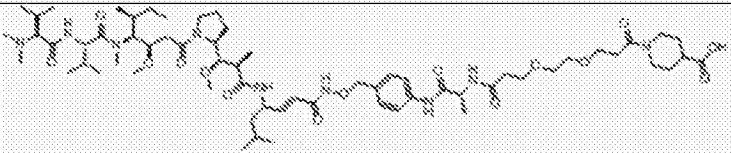
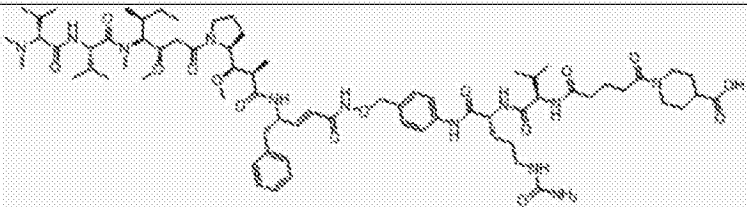
[0407] 对于化合物27的合成,用上述的方法,以化合物Fmoc-Ahx-PAB作为起始化合物合成化合物27。MS m/z计算的C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>473.2,实测474.3 ([M+H]<sup>+</sup>)。

[0408] 实施例IV 合成-L<sup>1</sup>-(L<sup>2</sup>-D)-

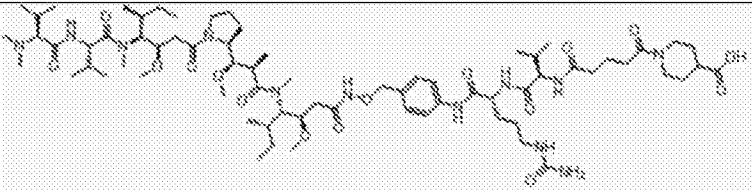
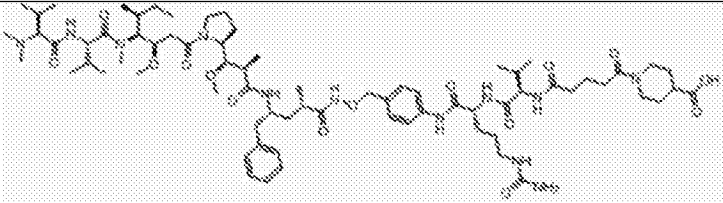
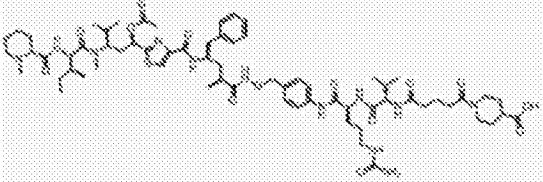
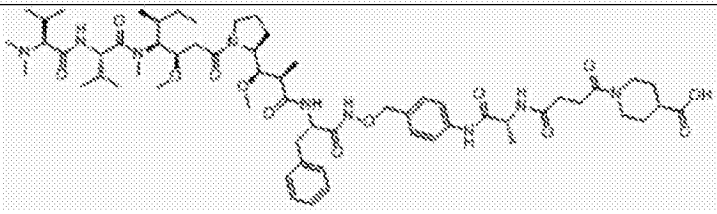
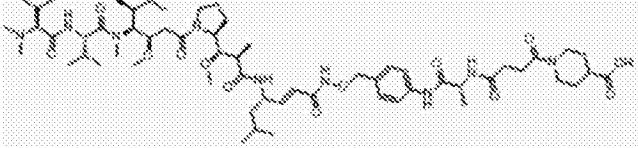
[0409]

| ID | -L <sup>1</sup> -(L <sup>2</sup> -D)的结构                                              | MS 实测<br>(M+H) <sup>+</sup> |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 32 |  | 1261.5                      |

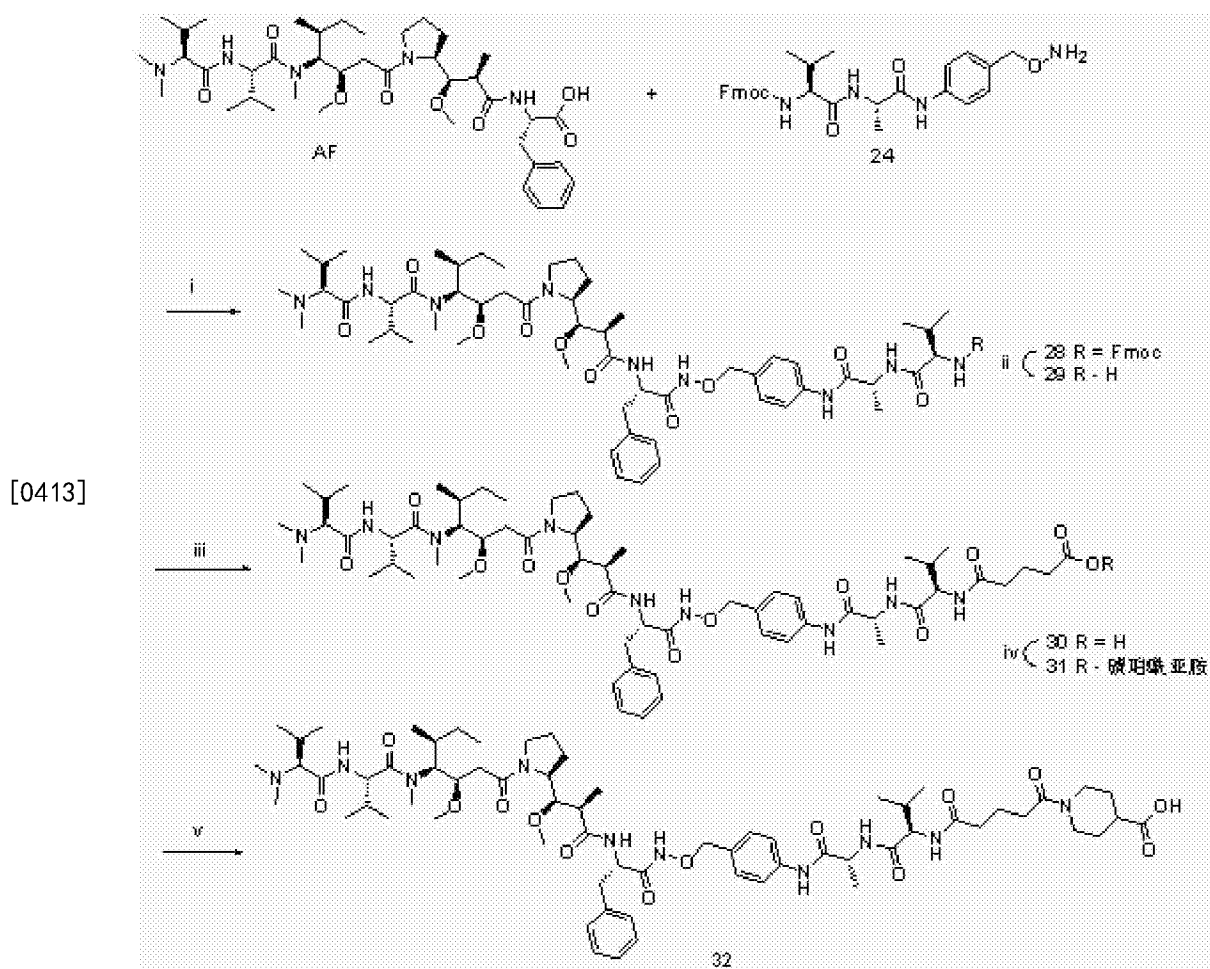
[0410]

|    |                                                                                      |        |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 34 |    | 1236.4 |
| 35 |    | 1348.0 |
| 36 |    | 1162.6 |
| 37 |   | 1204.5 |
| 38 |  | 1202.4 |
| 39 |  | 1228.2 |
| 40 |  | 1374.0 |

[0411]

|    |                                                                                      |        |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 41 |    | 1385.6 |
| 42 |    | 1389.4 |
| 43 |     | 1329.7 |
| 44 |   | 1148.5 |
| 45 |  | 1140.4 |

[0412] 方案IV



[0414] 方案IV 试剂和条件:i.DIC,HOAt,DMF,r.t.;ii.哌啶,DMF;iii.戊二酐,DIEA,DMF,rt;iv.EDC,HOSu,DCM,DMF,r.t.iv.哌啶-4-羧酸,NaHCO<sub>3</sub>,MeCN/水。

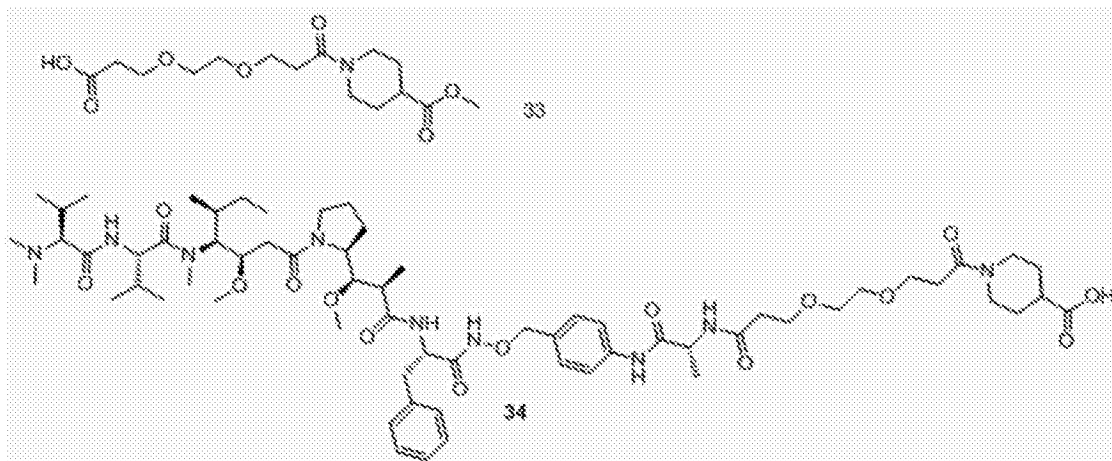
[0415] 实施例IV-1 合成化合物32

[0416] 使用上述的通用方法合成化合物32,具体如下:DIC/HOAt在奥瑞他汀(Auristatin)F和化合物24之间介导酰胺键形成(通用方法B),之后去除Fmoc(通用方法D),与戊二酐反应(通用方法H),将酸变为相应的NHS酯(通用方法J)。

[0417] NHS酯(20mg)溶解在乙腈/水(6/4,v/v)中,加入配制在饱和碳酸氢钠水溶液(0.3mL)的哌啶-4-羧酸(12mg)溶液。室温下搅拌混合物2h,用反相HPLC直接纯化,得到所需的产品,冻干后为白色固体(18mg)。MS实测1261.5(M+H)<sup>+</sup>。

[0418] 实施例IV-2 合成化合物34

[0419]



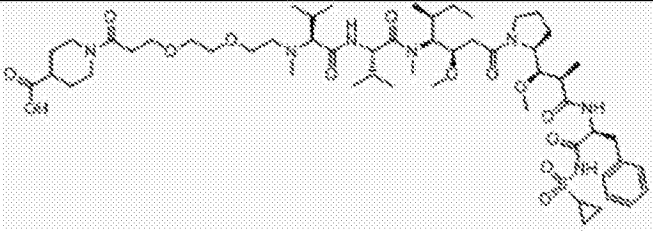
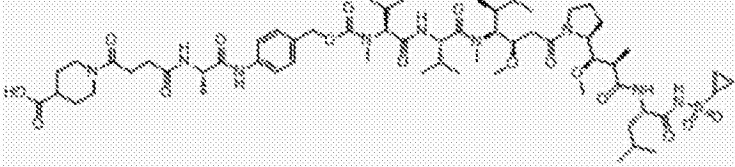
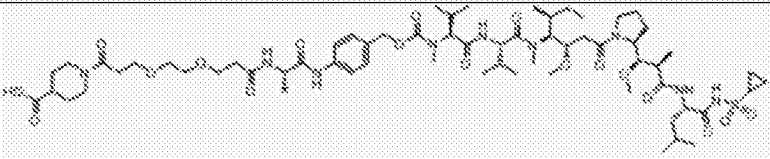
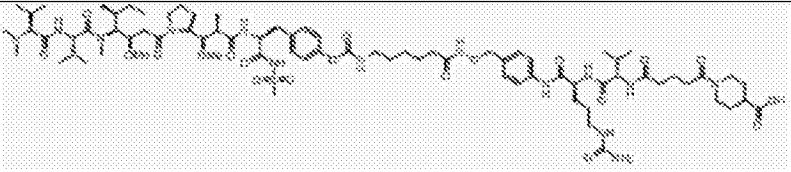
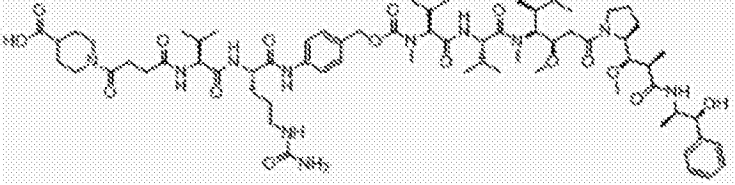
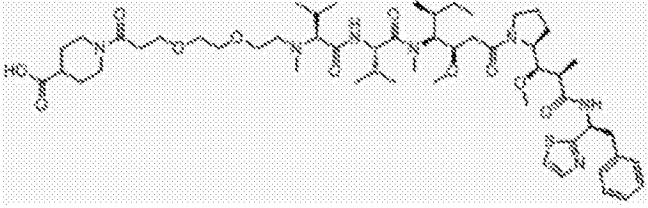
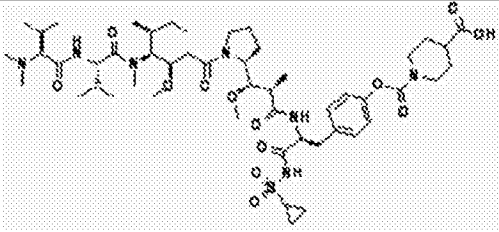
[0420] 使用上述的通用方法合成化合物34,具体如下:DIC/HOAt在化合物二甲基奥瑞他汀F和化合物26之间介导酰胺键形成(通用方法B),之后去除Fmoc(通用方法D),使用HATU与酸33形成酰胺(通用方法A),再进行皂化反应去除甲酯(通用方法F)。用反相HPLC纯化最终的化合物,得到化合物34,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{64}H_{101}N_9O_{15}$  1235.7,实测1236.4 ( $[M+H]^+$ )。

[0421] 实施例V 合成 $-L^1-(L^2-D)-$

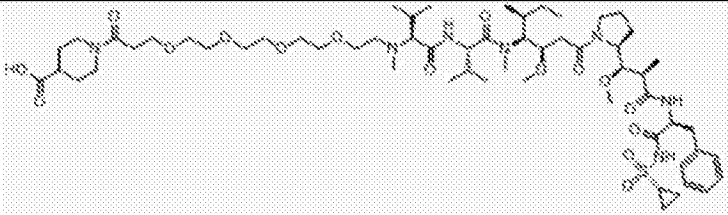
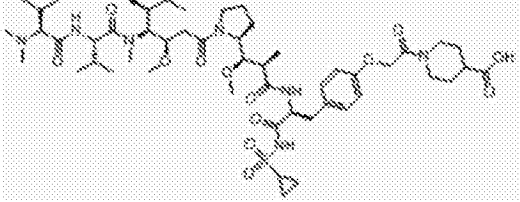
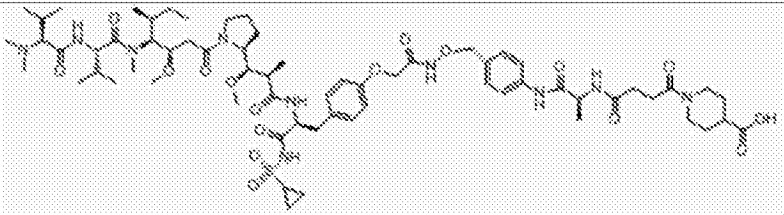
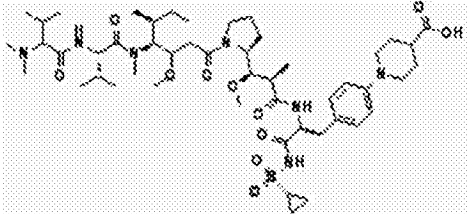
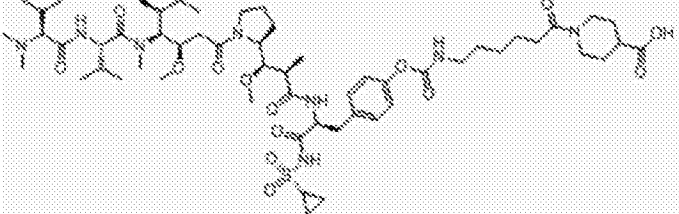
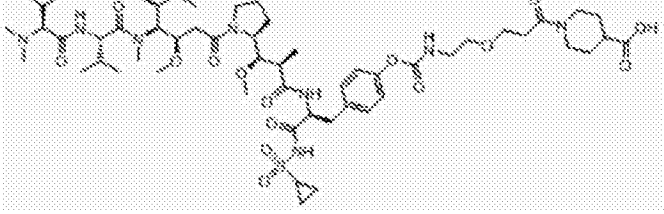
[0422]

| ID | $-L^1-(L^2-D)$ 的结构 | MS 实测<br>$(M+H)^+$ |
|----|--------------------|--------------------|
| 48 |                    | 1451.7             |
| 62 |                    | 1354.7             |

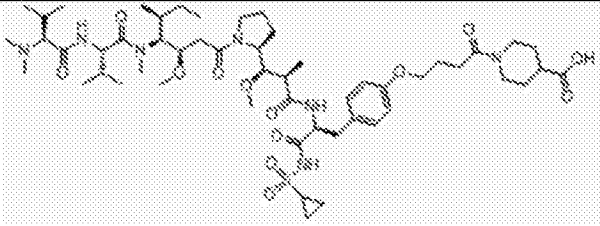
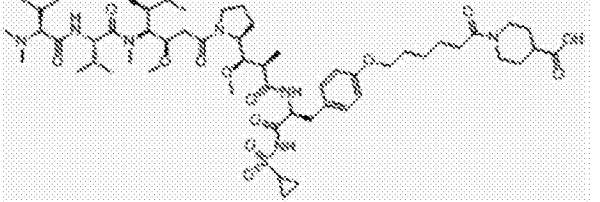
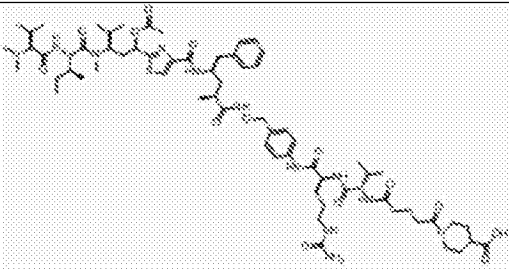
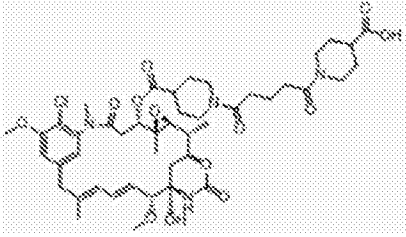
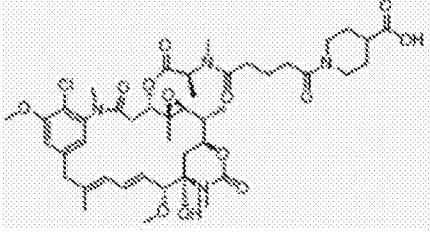
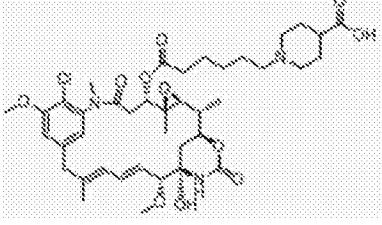
[0423]

|    |                                                                                      |        |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 49 |    | 1106.4 |
| 63 |    | 1232.5 |
| 64 |    | 1320.4 |
| 65 |   | 1598.1 |
| 66 |  | 1334.8 |
| 67 |  | 1042.5 |
| 55 |   | 1020.8 |

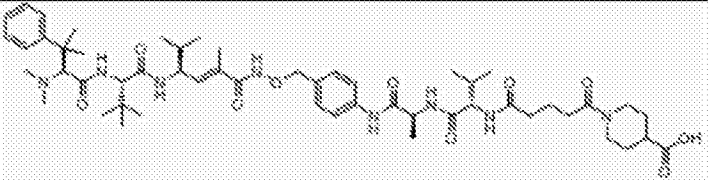
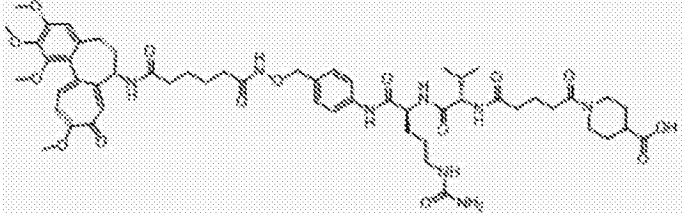
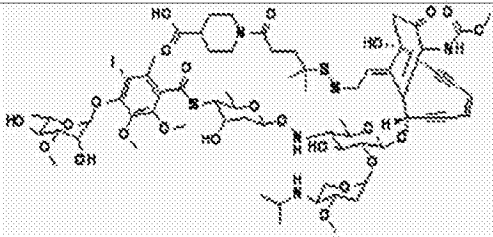
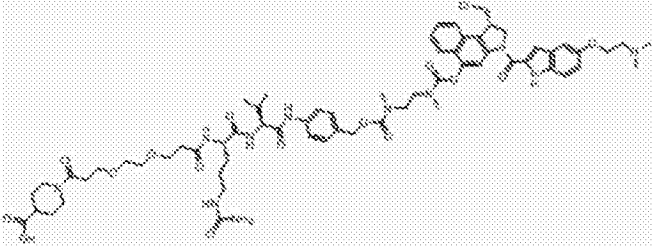
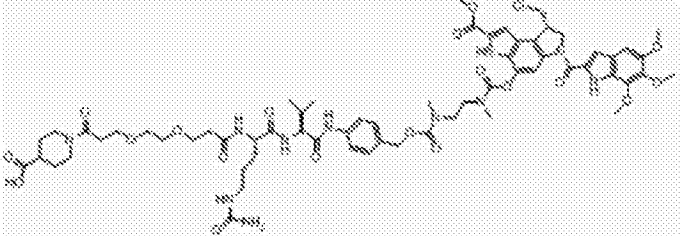
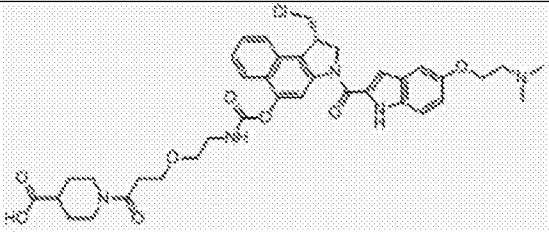
[0424]

|    |                                                                                      |        |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 68 |    | 1194.7 |
| 60 |     | 1034.7 |
| 61 |    | 1325.9 |
| 69 |    |        |
| 70 |  | 1133.5 |
| 71 |  | 1135.6 |

[0425]

|    |                                                                                     |        |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 72 |    | 1062.9 |
| 73 |    | 1090.2 |
| 74 |    | 1331.6 |
| 75 |  | 901.4  |
| 76 |  | 875.5  |
| 77 |  | 790.5  |

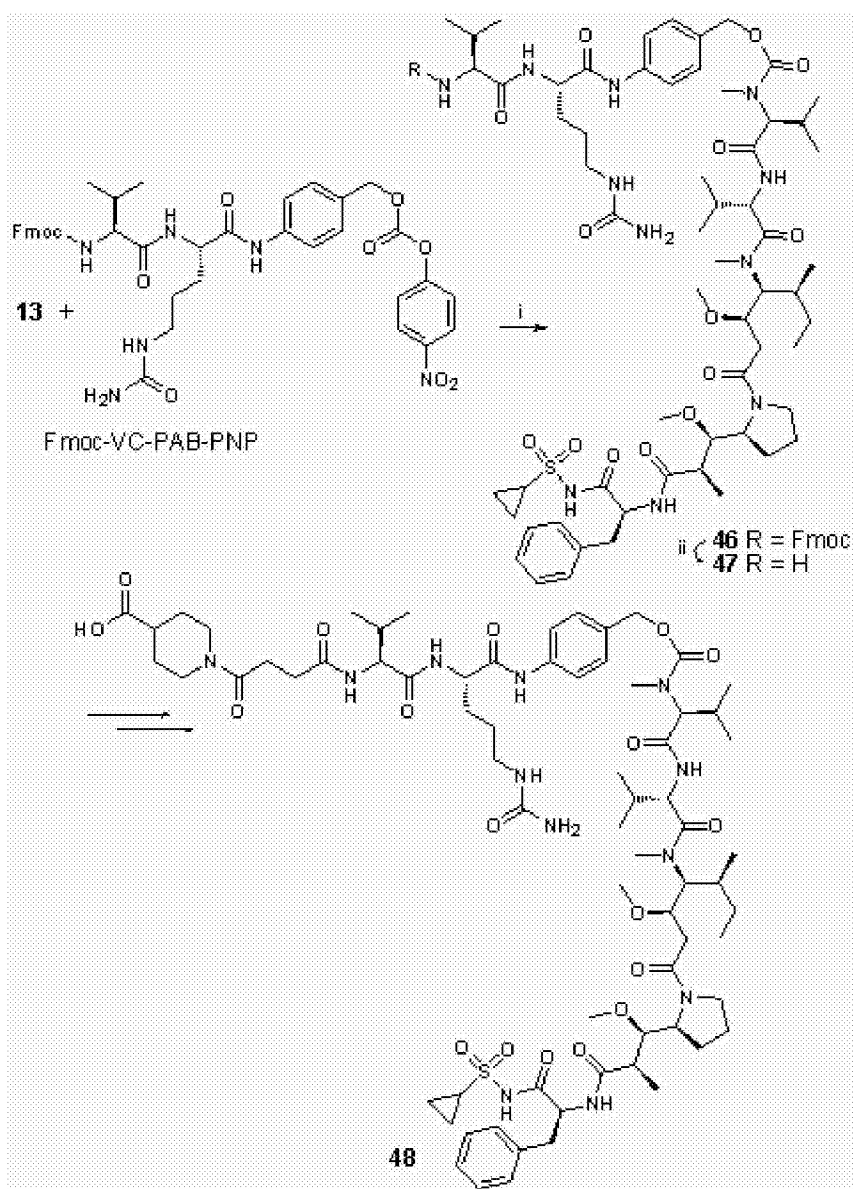
[0426]

|    |                                                                                      |        |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 78 |    | 989.7  |
| 79 |    | 1087.2 |
| 80 |     | 1561.5 |
| 81 |   | 1282.4 |
| 82 |  | 1332.6 |
| 87 |   | 734.3  |

[0427] 实施例V-1 合成化合物48

[0428] 方案IX

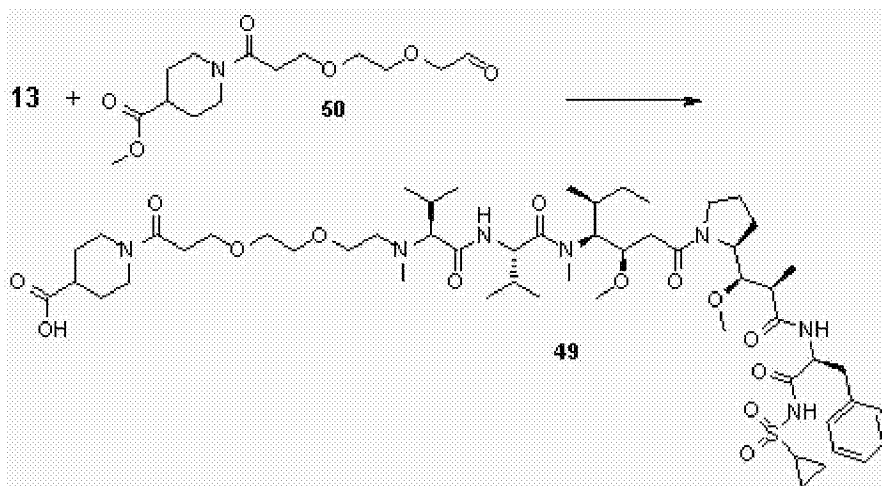
[0429]



[0430] 方案IX 试剂和条件:i.DIEA,HOBt (5%),DMF,rt,48h;ii.哌啶,DMF.

[0431] 使用上述的通用方法合成化合物48,具体如下:在化合物13和Fmoc-VC-PAB-PNP之间形成氨基甲酸酯(通用方法I),之后去除Fmoc(通用方法D),得到中间化合物47,使用合成化合物34的相同步骤将中间化合物47转变成最终化合物。用反相HPLC纯化最终化合物,得到化合物48,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{71}H_{110}N_{12}O_{18}S$  1450.8,实测1451.7 ( $[M+H]^+$ )。

[0432]



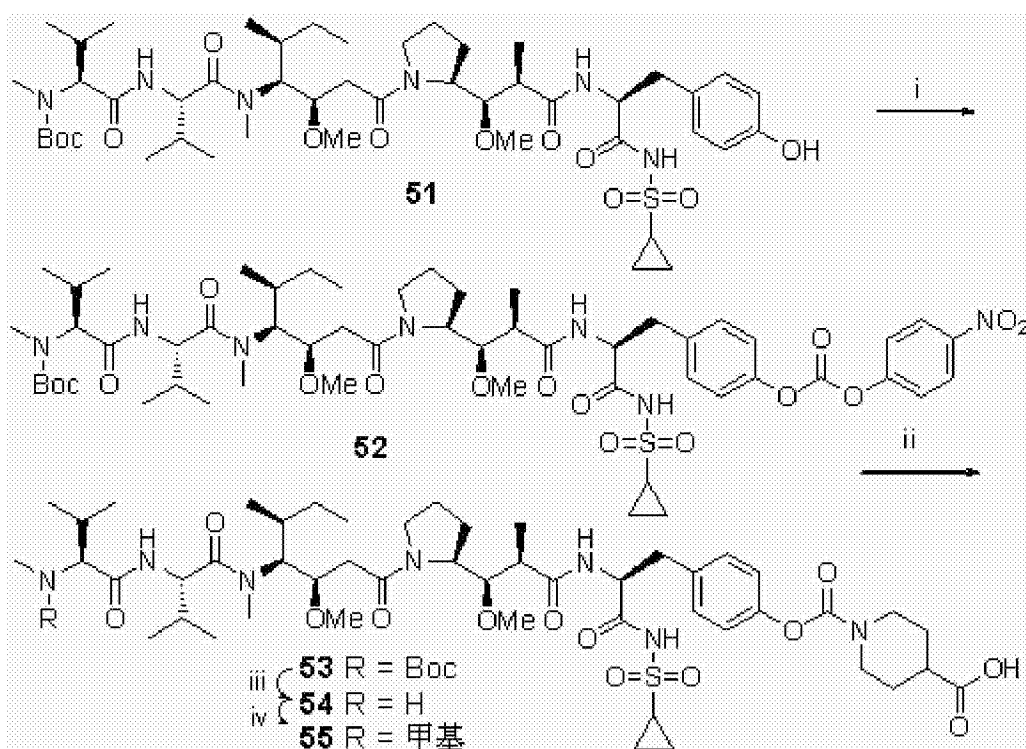
[0433] 实施例V-2 合成化合物49

[0434] 使用上述的通用方法合成化合物49,具体如下:在还原烷基化条件下进行化合物13和醛50的反应(通用方法E),之后去除甲酯(通用方法F)。用反相HPLC纯化最终化合物,得到化合物49,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{55}H_{91}N_7O_{14}S$  1105.6,实测1106.4 ( $[M+H]^+$ )。

[0435] 实施例V-3 合成化合物55

[0436] 方案V-3

[0437]



[0438] 方案V-3 试剂和条件:i.二(硝基苯基)碳酸酯,DIEA,THF/DMF,r.t.;ii.哌啶4-羧酸, $NaHCO_3$ (水溶液);iii.HCl/二氧六环(4N);iv. $HCHO$ , $NaCNBH_3$ ,DMF, $HOAc$ 。

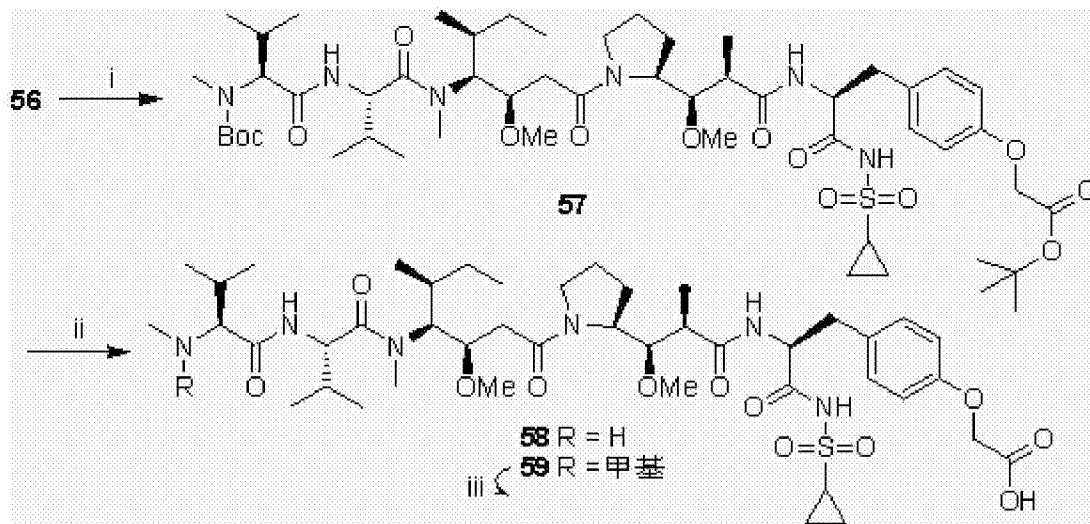
[0439] 用3当量的二(对硝基苯基)碳酸酯处理酚51(1mmol),形成活化的碳酸酯52(通用方法G)。粗产品不经进一步纯化直接使用。哌啶4-羧酸(5当量)溶解在饱和的 $NaHCO_3$ 水溶液(5mL),所得到的溶液被加入。室温下搅拌反应混合物8h。加入柠檬酸(水溶液,10%),酸化反应(pH为4-5),之后用EtOAc(150mL)稀释。干燥有机层(用 $Na_2SO_4$ ),浓缩得到粗产品53,然

后经历下述步骤:去除Boc(通用方法C),用HCHO进行还原烷基化(通用方法E)。用反相HPLC纯化最终的化合物,得到化合物55,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{50}H_{81}N_7O_{13}S$  1019.6,实测1020.8 ( $[M+H]^+$ )。

[0440] 实施例V-4 合成化合物60

[0441] 方案V-4

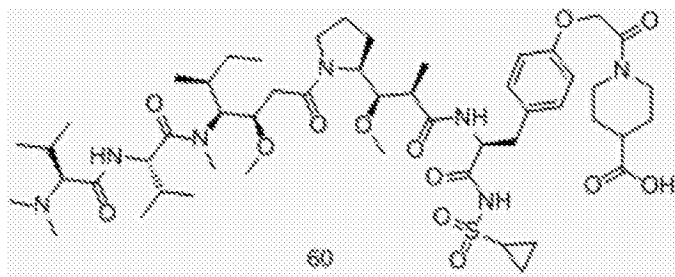
[0442]



[0443] 方案V-4 试剂和条件:i.溴乙酸叔丁酯, $K_2CO_3$ ,DMF,rt,2h;ii.HCl/二氧六环(4N);iii.HCHO, $NaCNBH_3$ ,HOAc,DMF

[0444] 向搅拌的化合物59 (0.2mmol,190mg)的无水DMF (5mL)溶液中加入溴乙酸叔丁酯 (0.3mmol),之后加入固体碳酸钾 (55mg,0.4mmol)。室温下搅拌反应混合物2h。LC/MS证实反应结束。用EtOAc (100mL) 稀释混合物,用10%的柠檬酸水溶液和盐水洗涤。干燥有机层,浓缩至干,得到粗的化合物57,随后经历下述步骤:去除Boc和t-Bu(通用方法C),用HCHO还原烷基化(通用方法E)。用反相HPLC纯化最终的化合物,得到化合物59,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{45}H_{74}N_6O_{12}S$ ,922.5实测923.7 ( $[M+H]^+$ )。

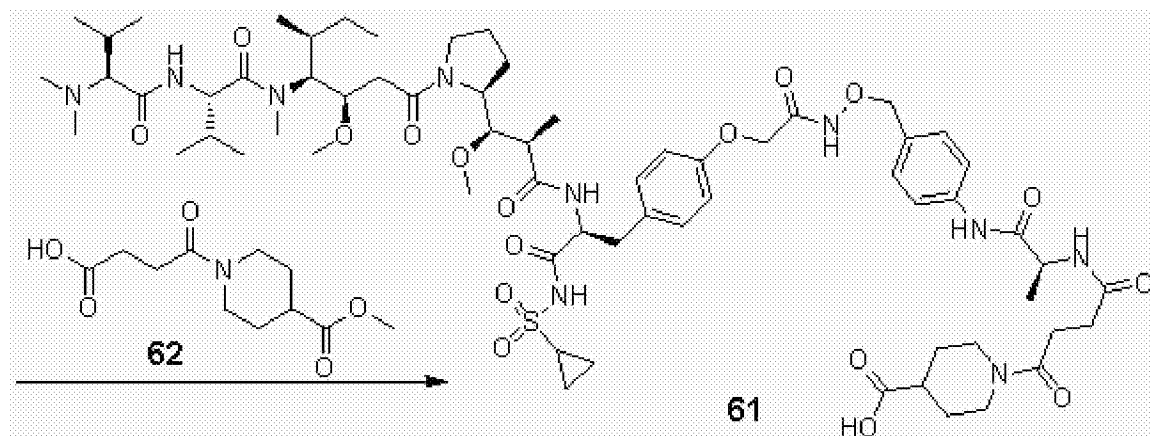
[0445]



[0446] 使用上述的通用方法合成化合物60,具体如下:HATU在化合物59和哌啶甲酸甲酯之间介导酰胺键形成(通用方法A),之后进行皂化反应去除酯中的甲基(通用方法F)。用反相HPLC纯化最终的化合物,得到化合物60,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$  计算的 $C_{51}H_{83}N_7O_{13}S$  1033.6,实测1034.7 ( $[M+H]^+$ )。

[0447] 实施例V-5 合成化合物61

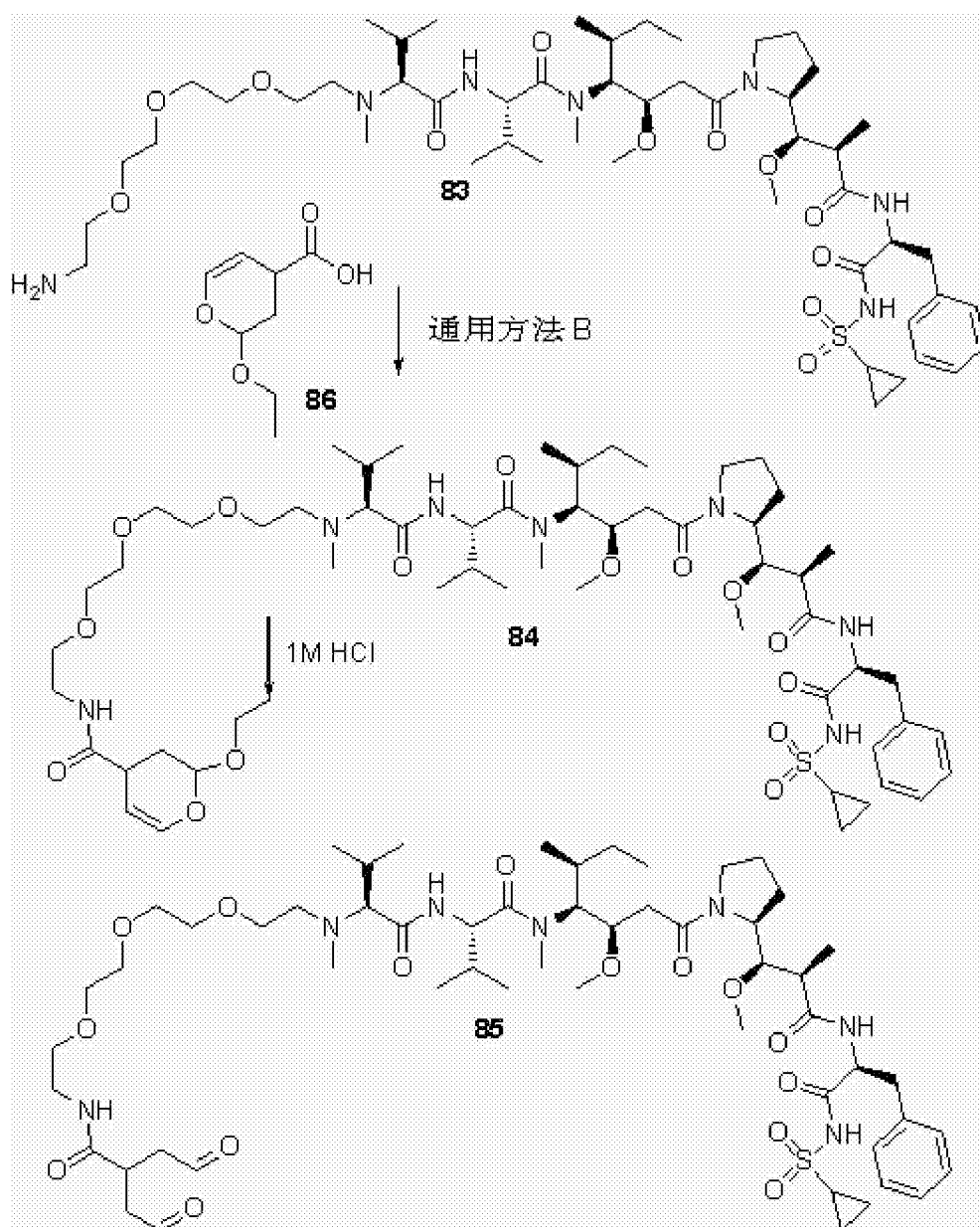
[0448]



[0449] 使用上述的通用方法合成化合物61,具体如下:DIC/HOA在化合物59和化合物26之间介导酰胺键形成(通用方法B),之后去除Fmoc(通用方法D)。HATU介导了与酸62的酰胺化反应(通用方法A),进行皂化反应去除酯中的甲基(通用方法F)。用反相HPLC纯化最终的化合物,得到化合物61,冻干后为白色粉末。MS  $m/z$ 计算的 $C_{65}H_{100}N_{10}O_{17}S$  1324.7,实测1325.9 ( $[M+H]^+$ )。

[0450] 实施例VI 在偶联之前引入最后的官能团

[0451]



[0452] 使用上述的通用方法合成化合物85,具体如下:DIC/HOA在化合物83和化合物86之间介导酰胺键形成(通用方法B)。用反相HPLC纯化中间体84,得到的纯品用乙腈/水(6/4,v/v)配制的1N HCl水溶液(20当量)进行处理1h。粗的产品不经进一步纯化直接使用。MS实测:1136.6 (M+H)<sup>+</sup>。

[0453] 抗体-药物偶联

[0454] 通用偶联方法II:

[0455] 向配制在缓冲液(pH6.0-9.0,含有0-30%有机溶剂)中的靶分子A溶液(0.5-50mg/mL)内以分批或连续流动的方式加入0.1-10当量的活化羧酸成分。反应在0-40℃进行0.5-50h,并轻微搅拌或摇动,用HIC-HPLC检测。得到的粗的ADC产物使用目前工艺水平进行必要的下游步骤:脱盐、更改缓冲液/更改缓冲液配方以及任选的纯化。最终得到的ADC产物用HIC-HPLC、SEC、RP-HPLC,以及任选的LC-MS进行表征。用UV吸收和/或MS光谱法计算平均DAR。

[0456] 在美国专利号8,435,528及其引用的文献提供的条件下,用传统的两步法偶联曲

妥珠单抗和伊美坦辛。

[0457] 用HIC-HPLC分析两步偶联反应得到的产物曲妥珠单抗-伊美坦辛,具体条件如下:HPLC柱:日本东曹色谱柱(Tosoh TSKgel Butyl-NPR),4.6mm×3.5cm,2.5mm;缓冲液A:20mM磷酸钠,1.5M硫酸铵,pH7.0;缓冲液B:20mM磷酸钠,25%v/v异丙醇,pH7.0;流速:1ml/min;梯度:10%-80%的缓冲液B,10min;100%缓冲液B,4min;样品20μl。

[0458] 图1显示了两步法偶联反应的产物曲妥珠单抗-伊美坦辛的HIC-HPLC色谱图,其中DAR表示基于UV<sub>252</sub>和UV<sub>280</sub>,每个抗体偶联的药物数量。未偶联的抗体数量(DAR=0)约为1%。

[0459] 在美国专利号8,435,528及其引用的文献提供的条件下,用传统的一步法偶联曲妥珠单抗和伊美坦辛。用HIC-HPLC分析一步偶联反应得到的产物曲妥珠单抗-伊美坦辛,如图2所示。未偶联的抗体数量(DAR=0)约为1%。

[0460] 在美国专利号8,435,528及其引用的文献提供的条件下,用传统的NHS法偶联曲妥珠单抗和化合物34。用HIC-HPLC分析NHS偶联反应得到的产物曲妥珠单抗-化合物34,如图3所示。

[0461] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物34。分别在反应20h和反应40h后取出样品。用HIC-HPLC分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物34,如图4所示。每个抗体偶联的药物数量(DAR)主要为0,1,2,如图4所示。

[0462] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物67。用HIC-HPLC分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物67,如图5所示。

[0463] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物62,其中偶联反应中化合物62与曲妥珠单抗的比例是1:4。用HIC-HPLC分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物62,如图6所示。每个抗体偶联的药物数量(DAR)对应的DAR0,1,2分别是0(4%),1(29%)和2(45%),如图6所示。

[0464] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物62,其中偶联反应中化合物62与曲妥珠单抗的比例是1:6。用HIC-HPLC分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物62,如图7所示。每个抗体偶联的药物数量(DAR)对应的DAR0,1,2分别是0(3%),1(26%)和2(47%),如图7所示。

[0465] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物62,其中偶联反应中化合物62与曲妥珠单抗的比例是1:7.5。用HIC-HPLC分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物62,如图8所示。每个抗体偶联的药物数量(DAR)对应的DAR0,1,2分别是0(1%),1(18%)和2(46%),如图8所示。

[0466] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物49。用HIC-HPLC分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物49,如图9所示。每个抗体偶联的药物数量(DAR)对应的DAR0,1,2分别是0(11%),1(26%)和2(45%),如图9所示。

[0467] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物73。用HIC-HPLC分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物73,如图10所示。每个抗体偶联的药物数量(DAR)对应的DAR0,1,2在图10有所描述。

[0468] 用传统的NHS法偶联曲妥珠单抗和化合物60。用HIC-HPLC分析曲妥珠单抗-化合物60偶联非选择性连接物得到的产物,如图11所示。从图11可以看出,当使用非选择性连接

物时,观察不到主要的ADC峰。

[0469] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物60。用HIC-HPLC分析曲妥珠单抗-化合物60偶联优化的连接物得到的产物,如图11所示。从图11可以看出,当使用优化的连接物时,能够观察到2个主要的ADC峰。

#### [0470] 体外细胞毒性实验

[0471] 分析抗体药物偶联物的细胞毒性。使用下列细胞系:SK-BR-3人乳腺癌 (HER2三阳性),HCC1954人导管癌 (HER2三阳性),MCF7人乳腺癌 (HER2正常),以及MDA-MB-468人乳腺癌 (HER2阴性)。上述细胞可从ATCC获得。细胞SK-BR-3生长在加有10%胎牛血清的McCoy's 5A培养基内(沉井实验室,北洛根,犹他州-Caisson Labs,North Logan,UT)。细胞HCC1954生长在加有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基内(沉井实验室,北洛根,犹他州)。细胞MCF7和MDA-MB-468生长在加有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基内(沉井实验室,北洛根,犹他州)。细胞SK-BR-3,细胞MCF7和MDA-MB-468以约7500个细胞/孔接种在96孔板中;细胞HCC1954以约20000个细胞/孔接种在96孔板中。化合物或抗体-药物偶联物在同一天加入,一式两份。37℃孵育72h,然后加入CellTiter-Glo (Promega,麦迪逊,威斯康星州),用生产商手册描述的方法确定细胞活力。细胞活力百分比用如下方法确定:

[0472]  $\% \text{细胞活力} = \text{重复的平均发光值 (处理孔)} / \text{未处理孔的平均发光值}$

[0473] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物55。分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物55对细胞SK-BR-3的细胞毒性,如图12所示。

[0474] 根据通用偶联方法II,用选择性偶联的方法偶联曲妥珠单抗和化合物61。分析选择性偶联反应的产物曲妥珠单抗-化合物61对细胞SK-BR-3,HCC1954,MCF7,MDA-MB-468的细胞毒性,如图13所示。

[0475] 分析上述图5描述的曲妥珠单抗和化合物67选择性偶联的产物对细胞SK-BR-3,HCC1954,MCF7,MDA-MB-468的细胞毒性,如图14所示。

[0476] 分析上述图6描述的曲妥珠单抗和化合物62选择性偶联的产物对细胞SK-BR-3,HCC1954,MCF7,MDA-MB-468的细胞毒性,如图15所示。

[0477] 分析上述图12描述的曲妥珠单抗和化合物55选择性偶联的产物对细胞SK-BR-3,HCC1954,MCF7,MDA-MB-468的细胞毒性,如图16所示。

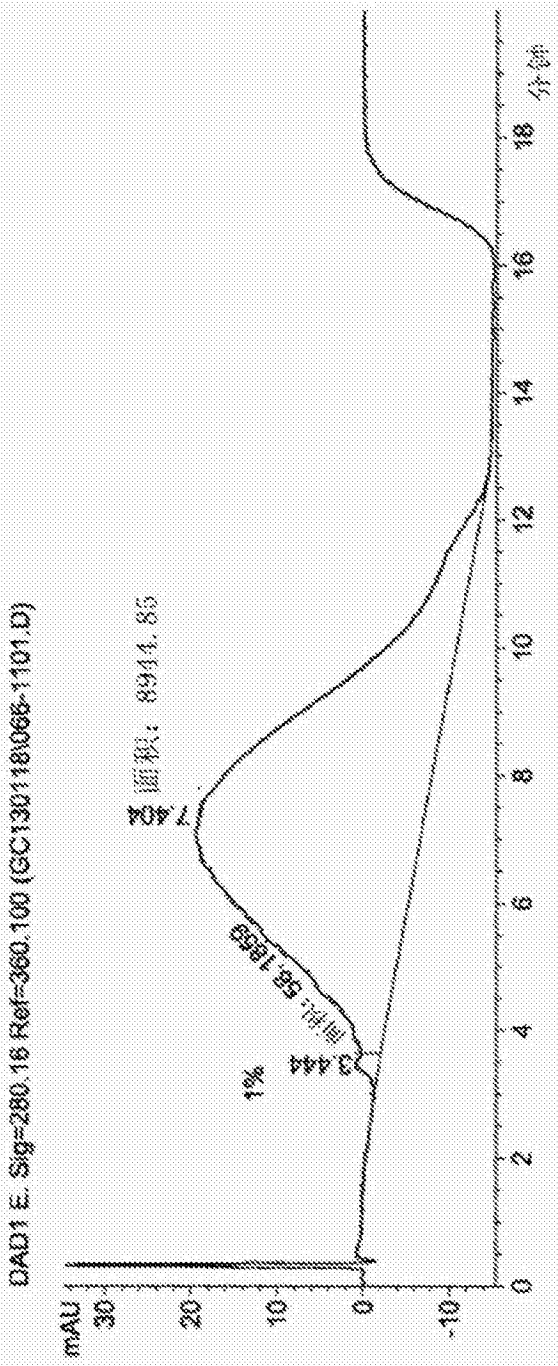


图1

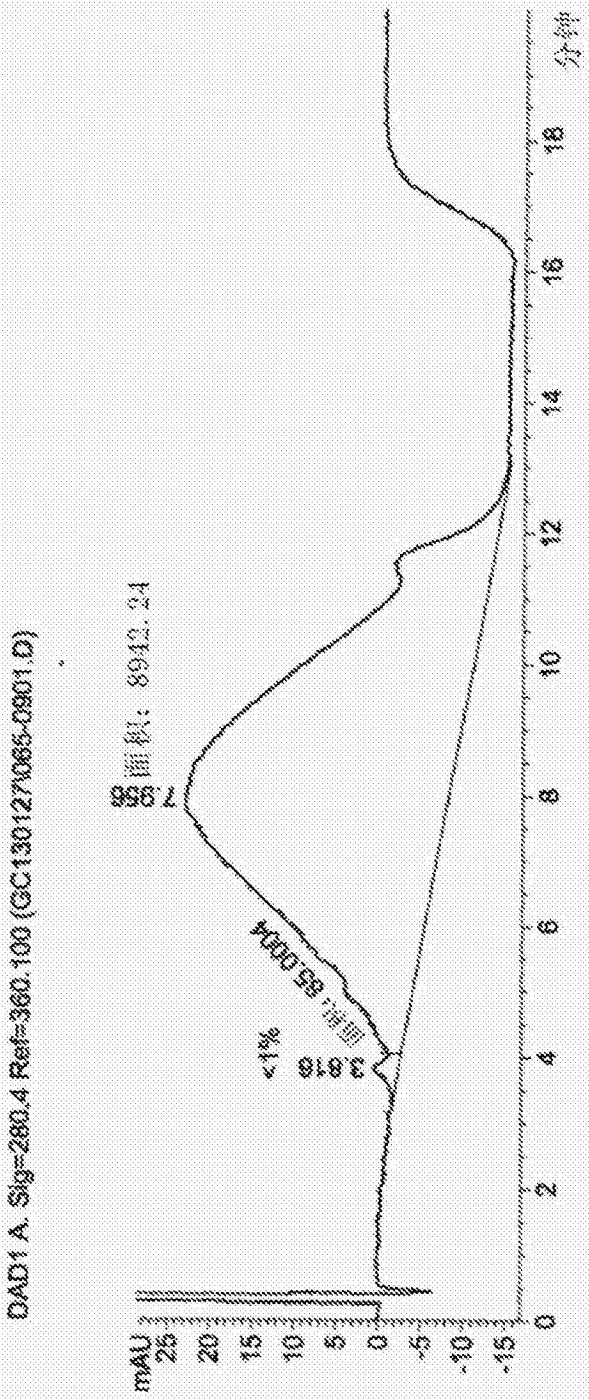


图2

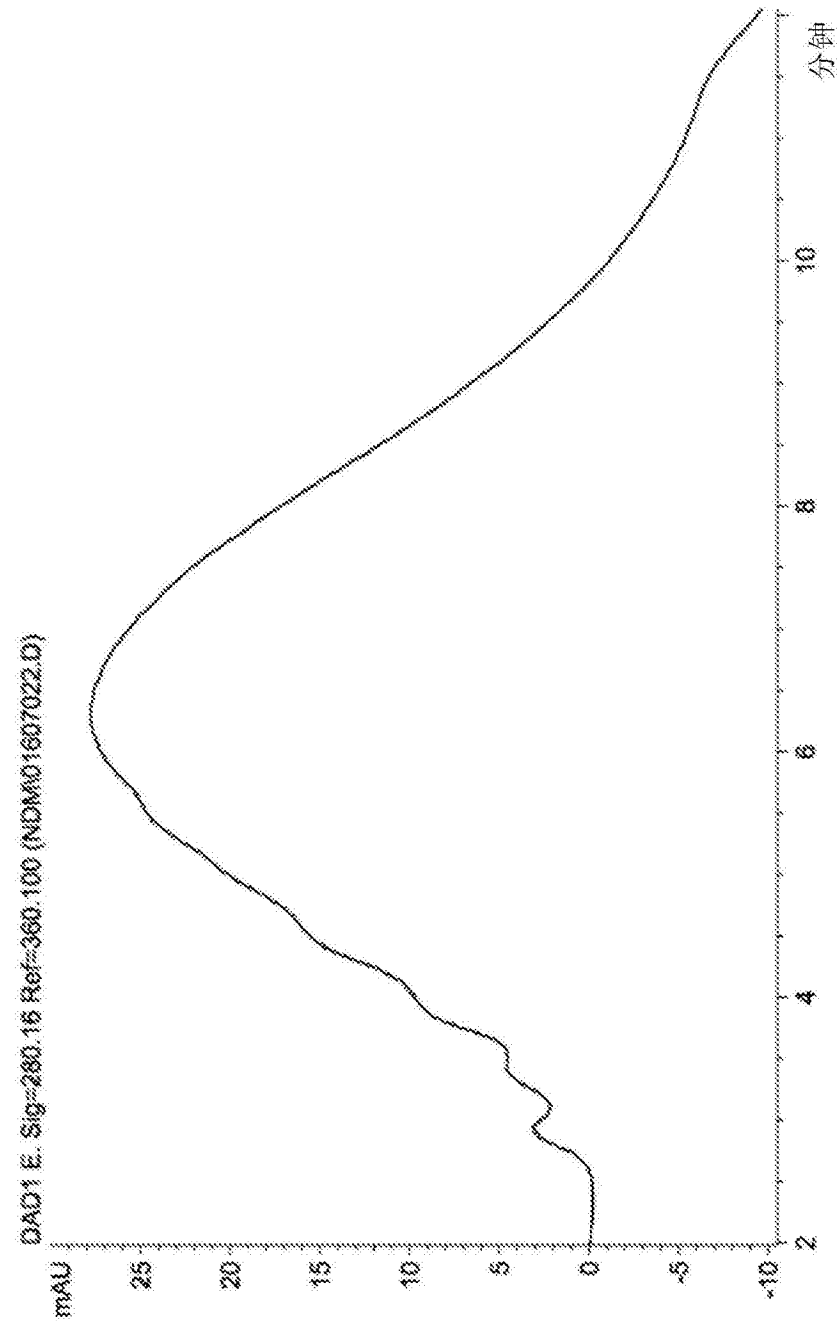


图3

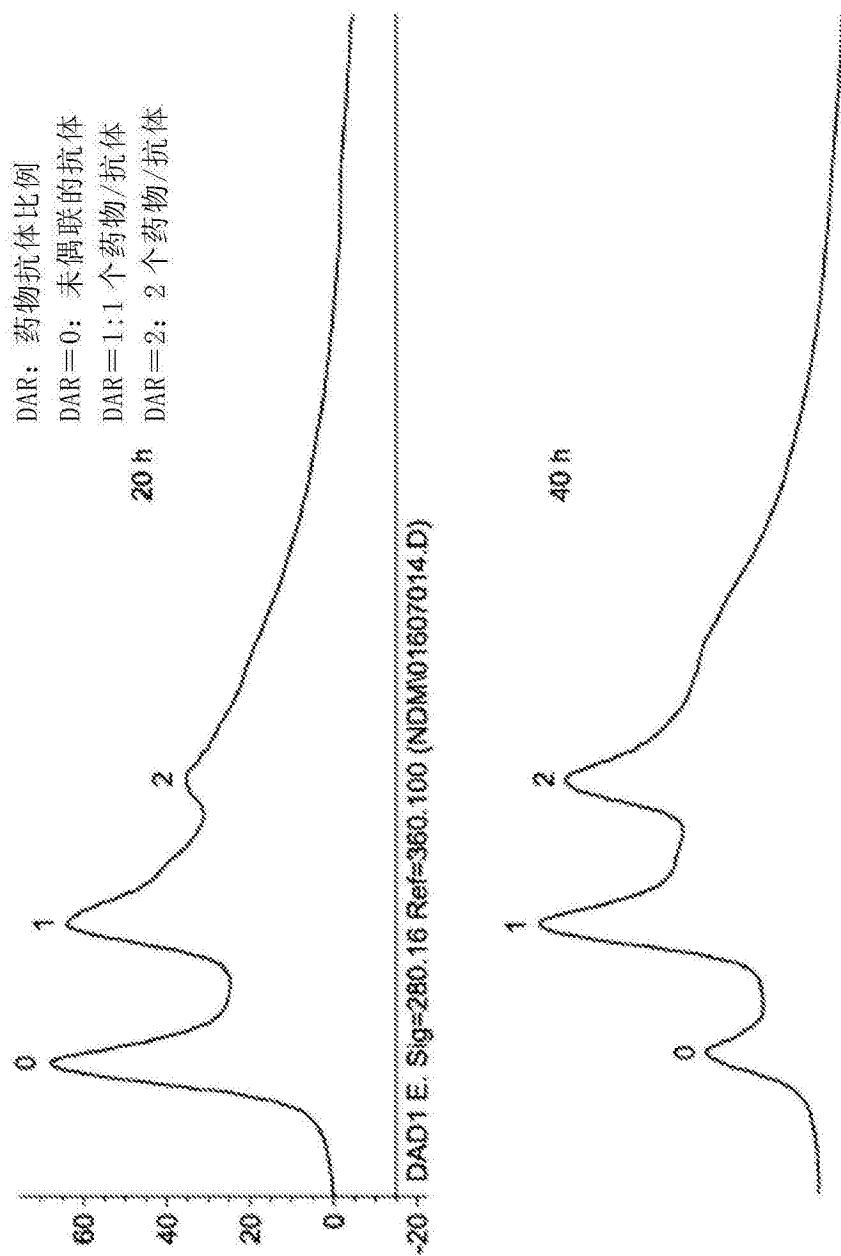


图4

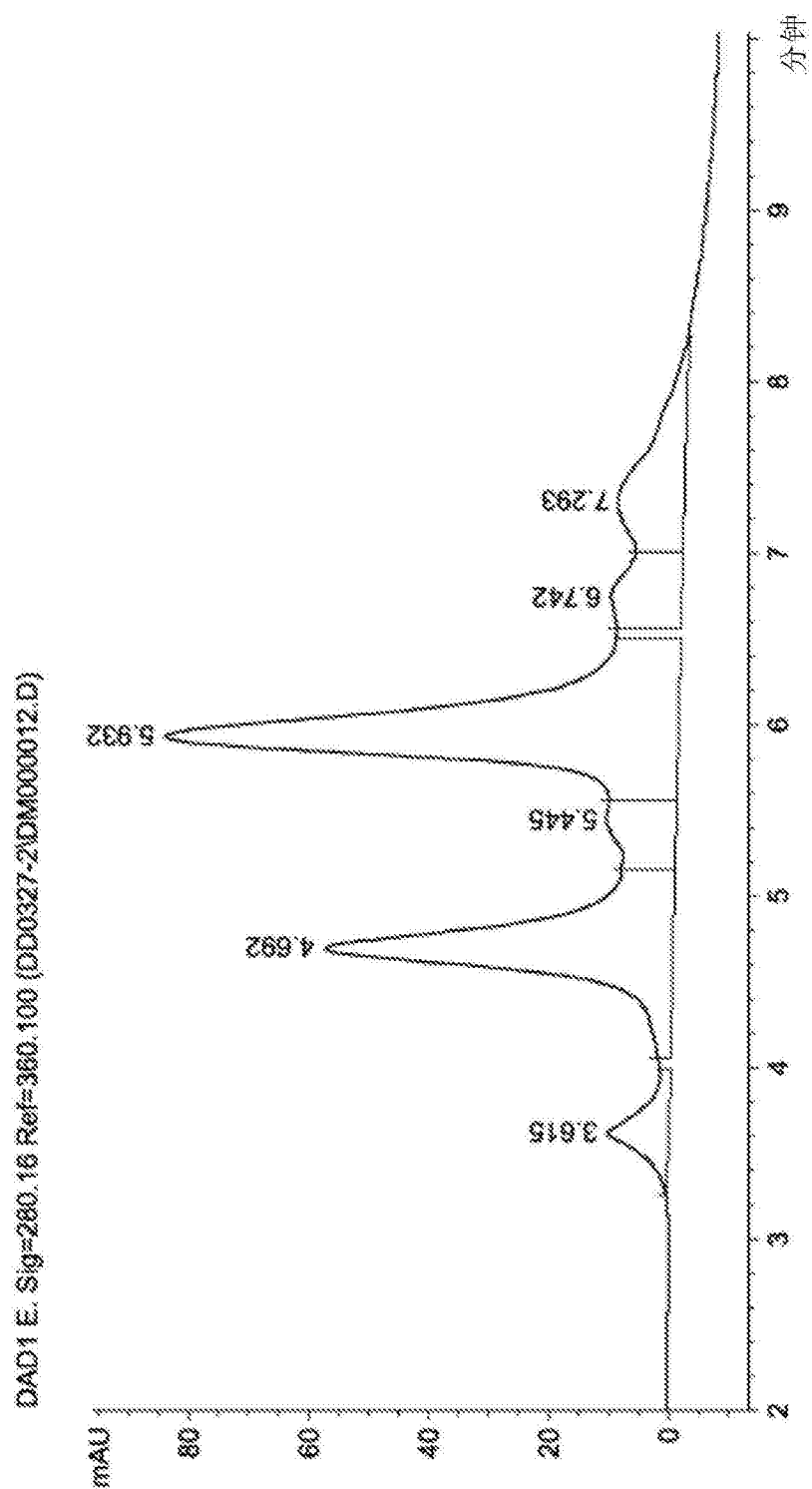


图5

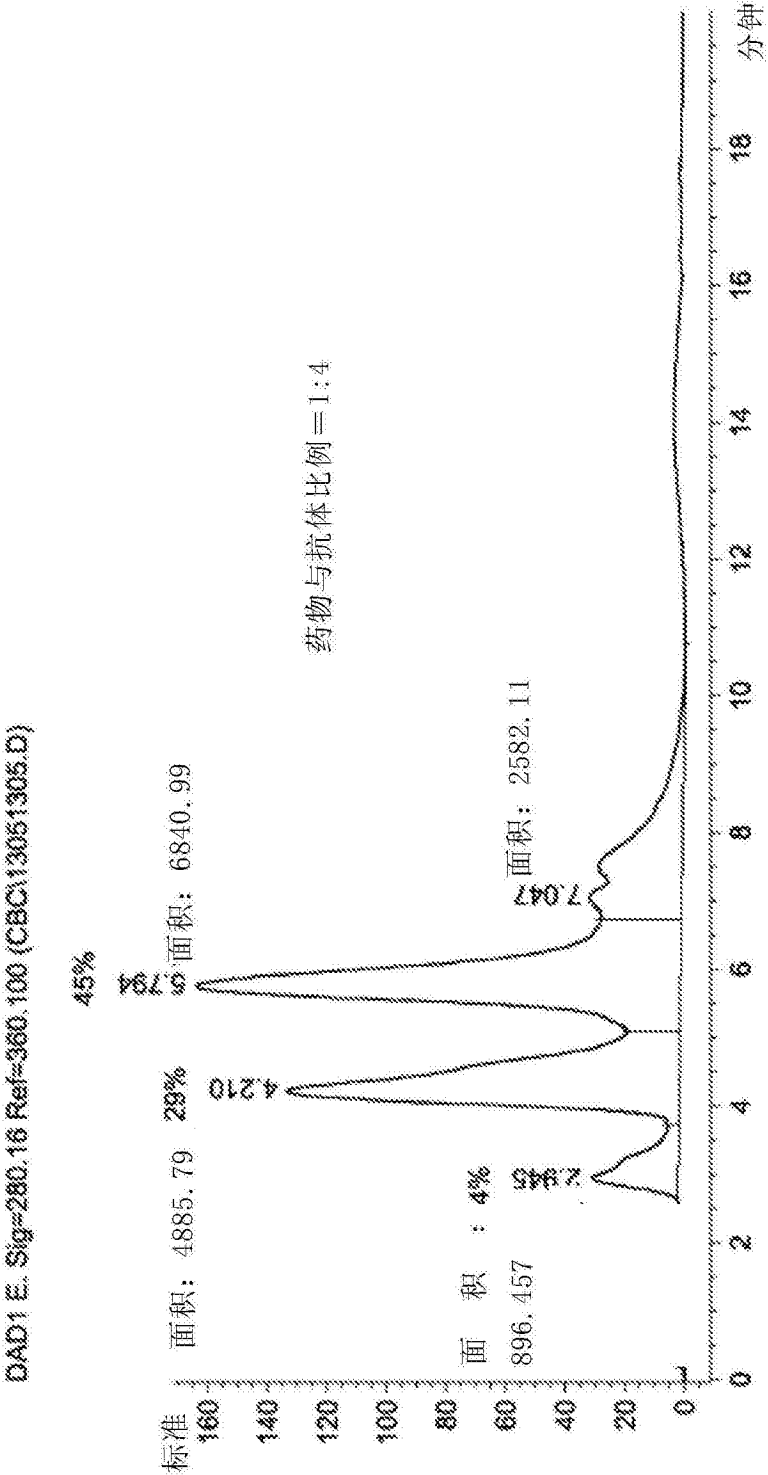


图6

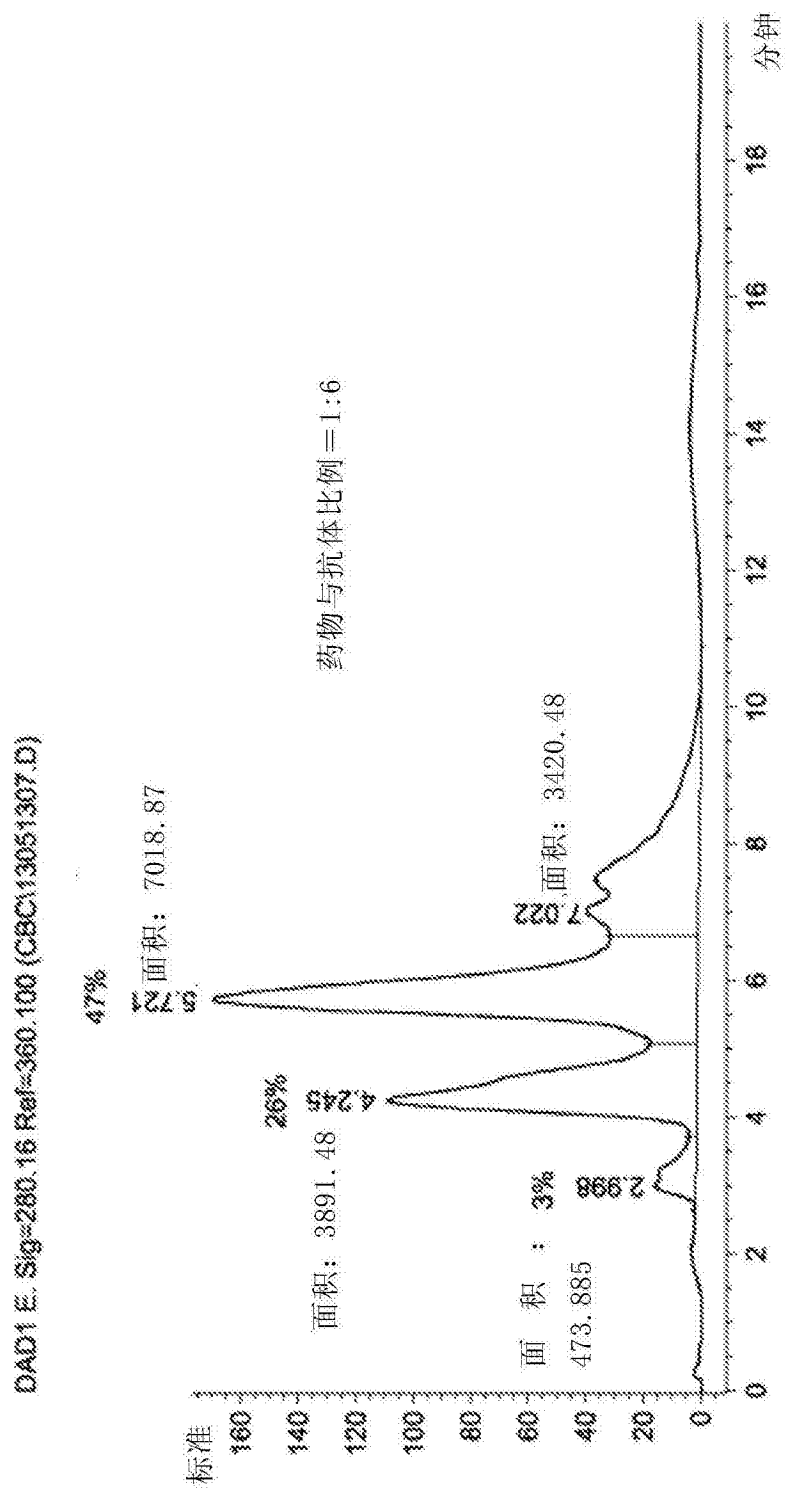


图7

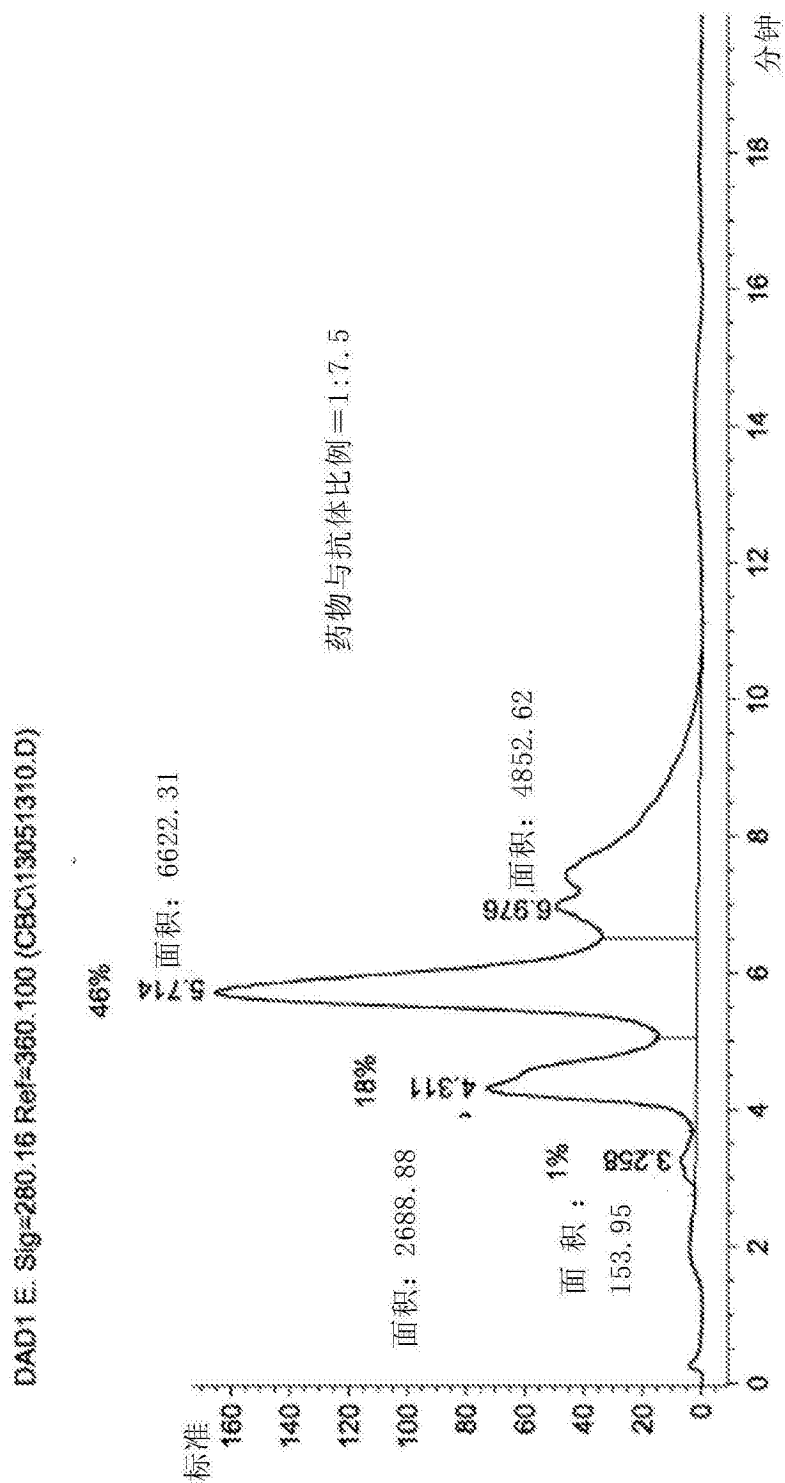


图8

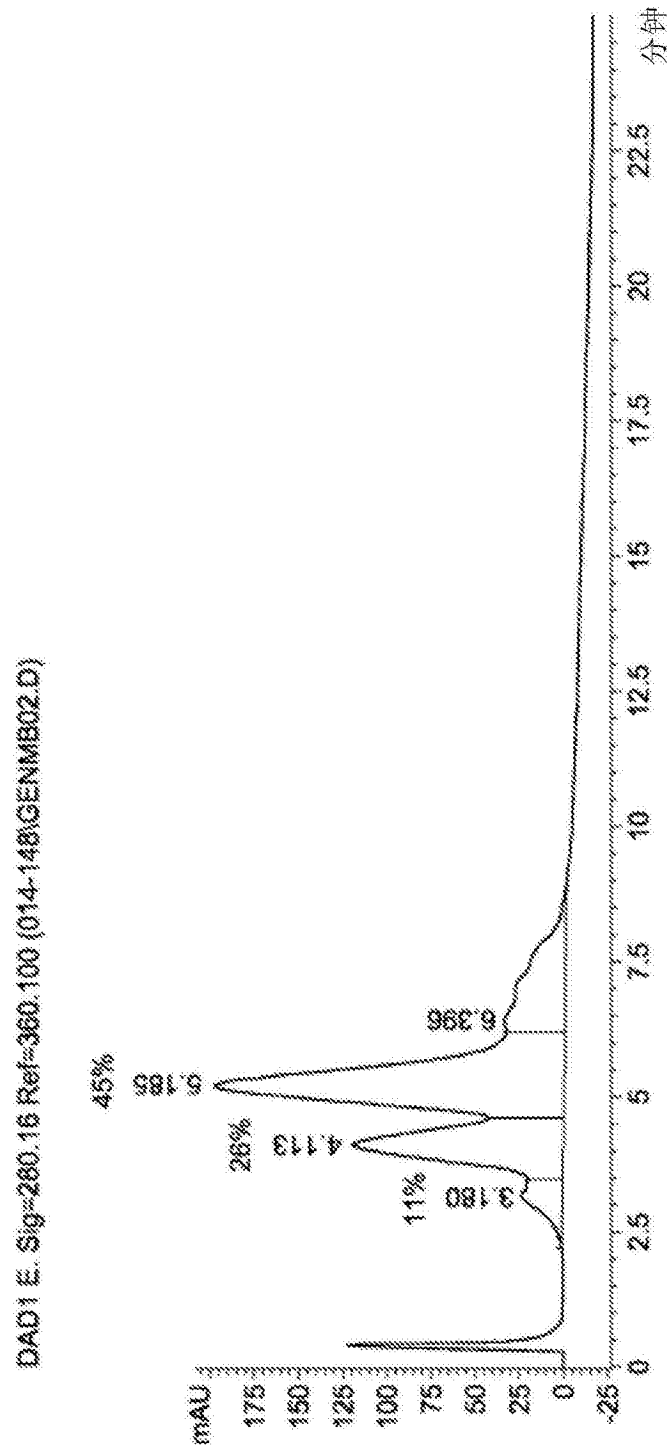


图9

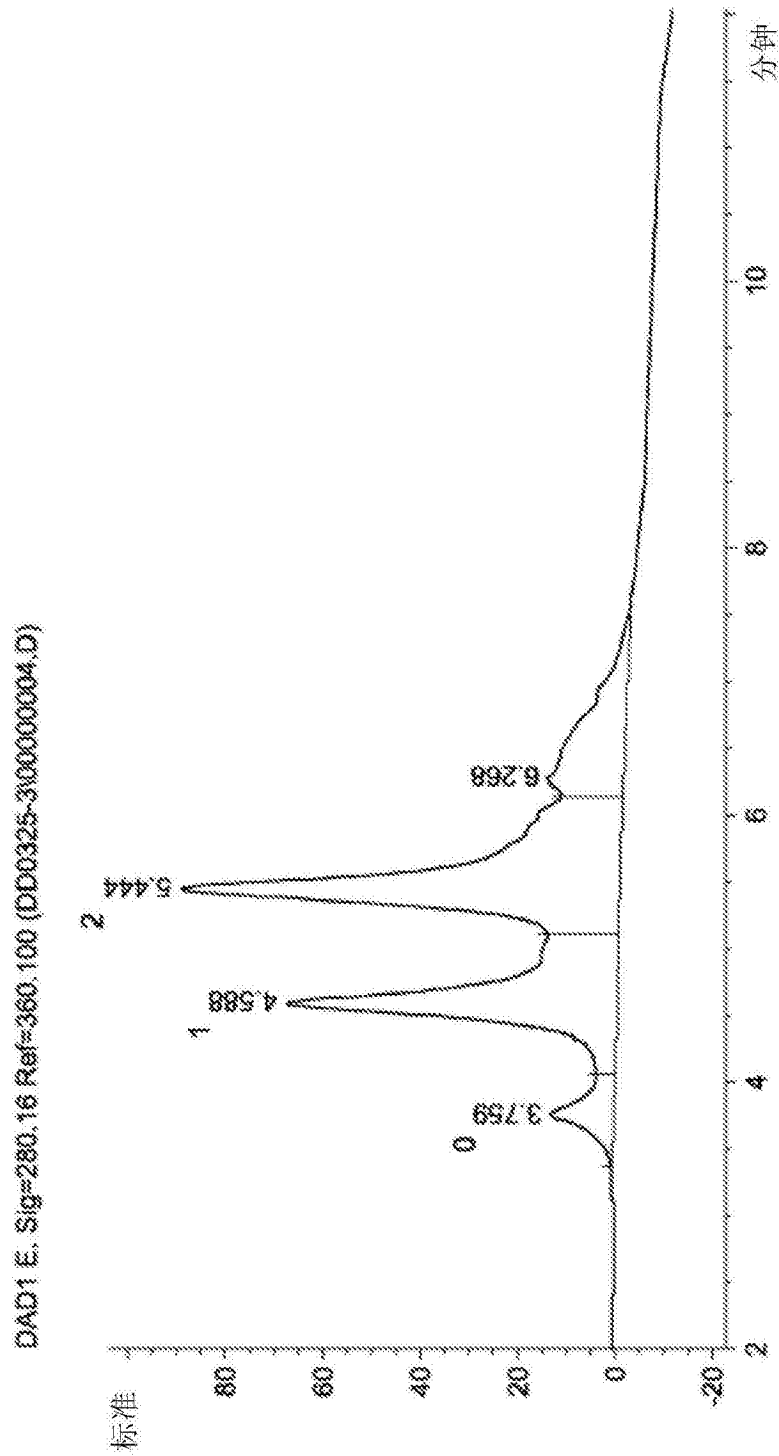


图10

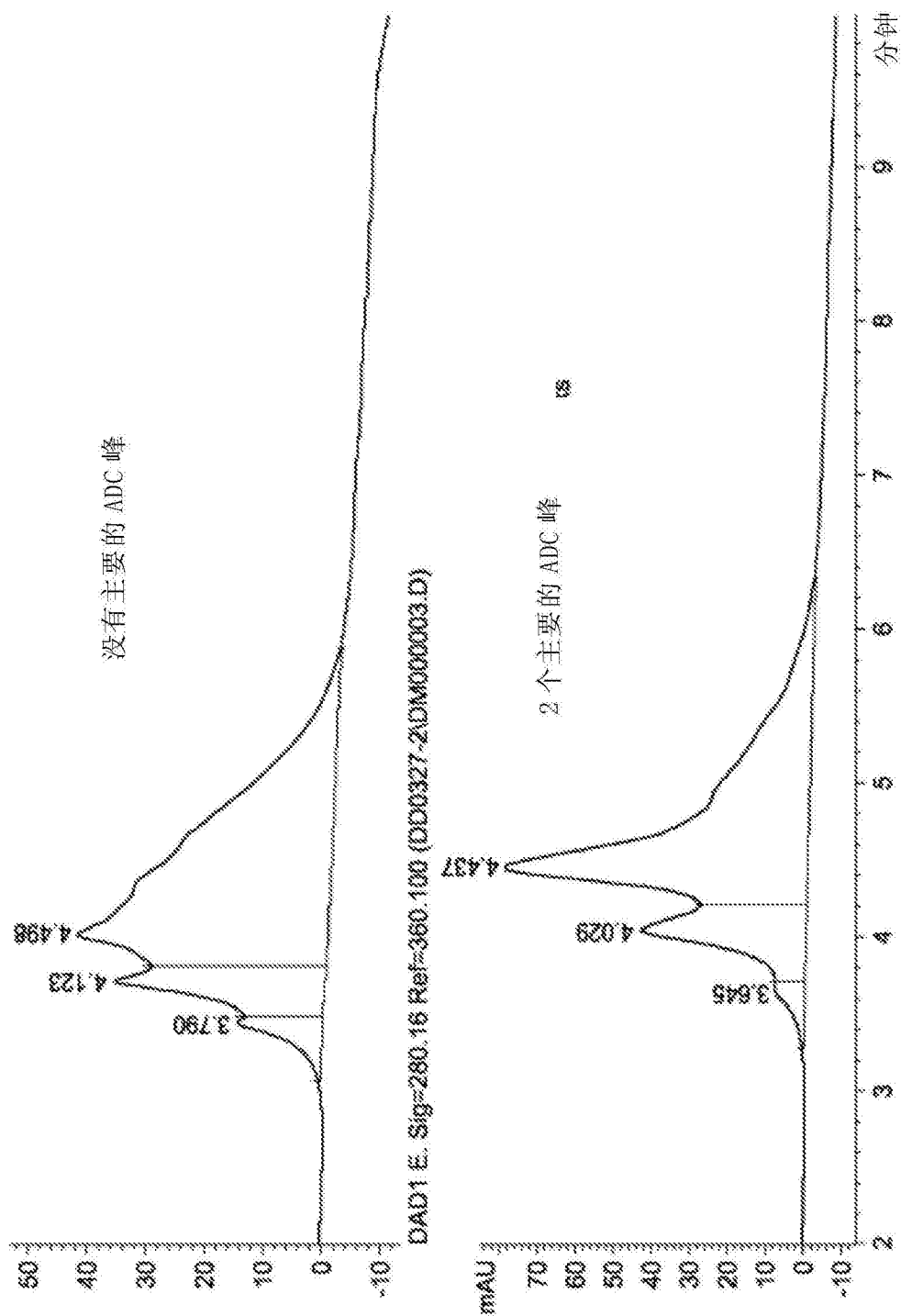


图11

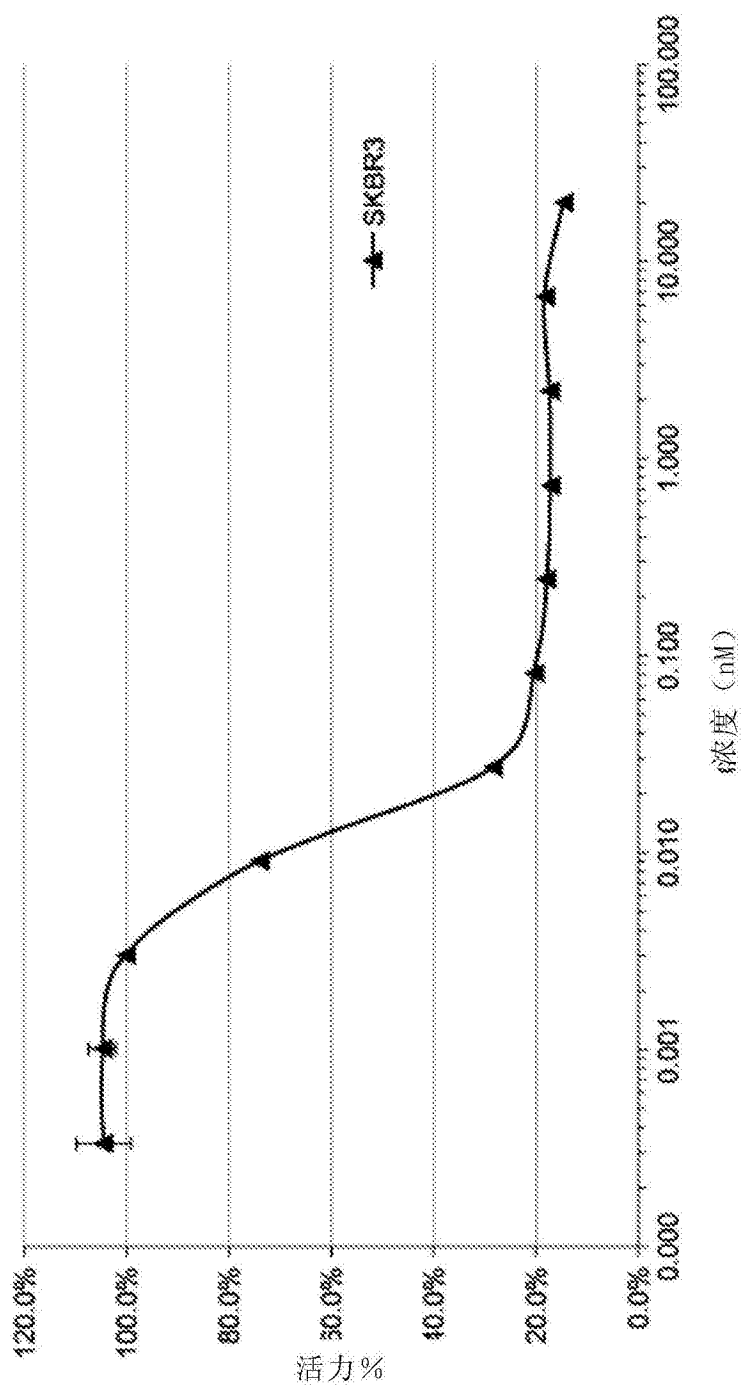


图12

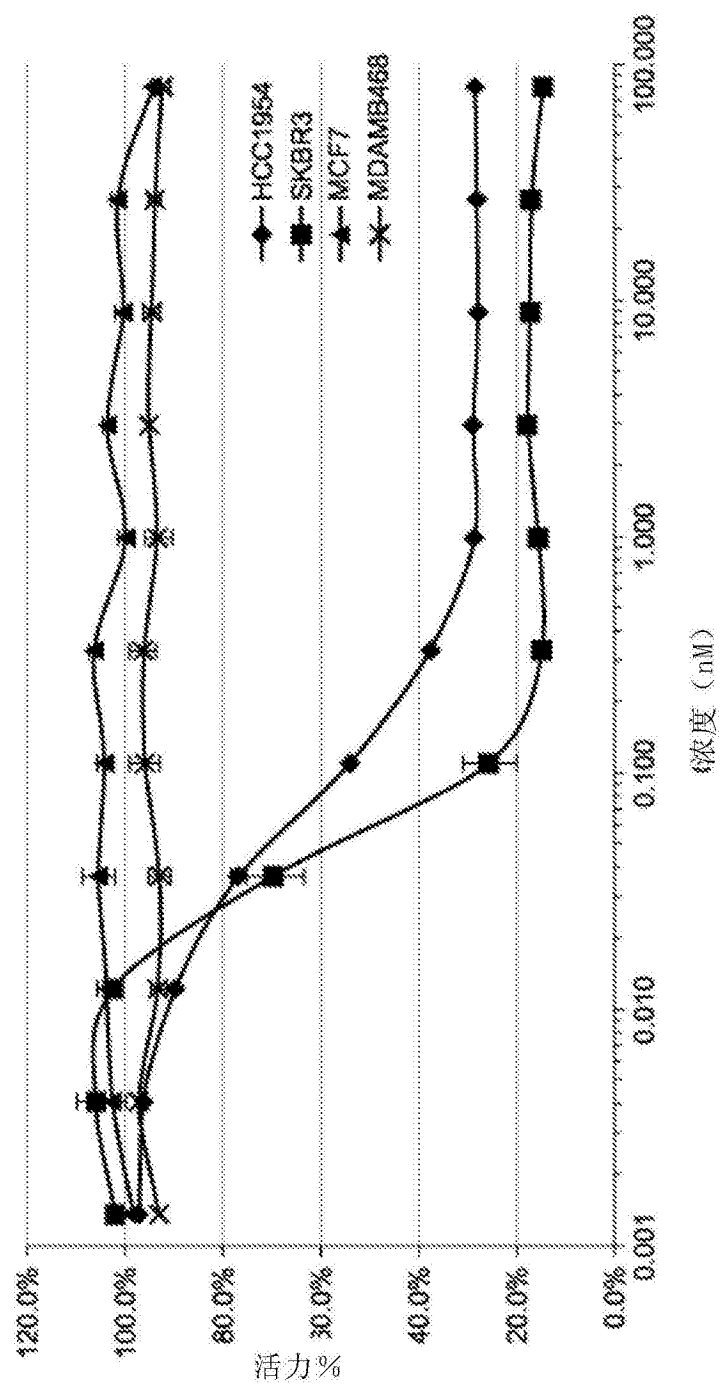


图13

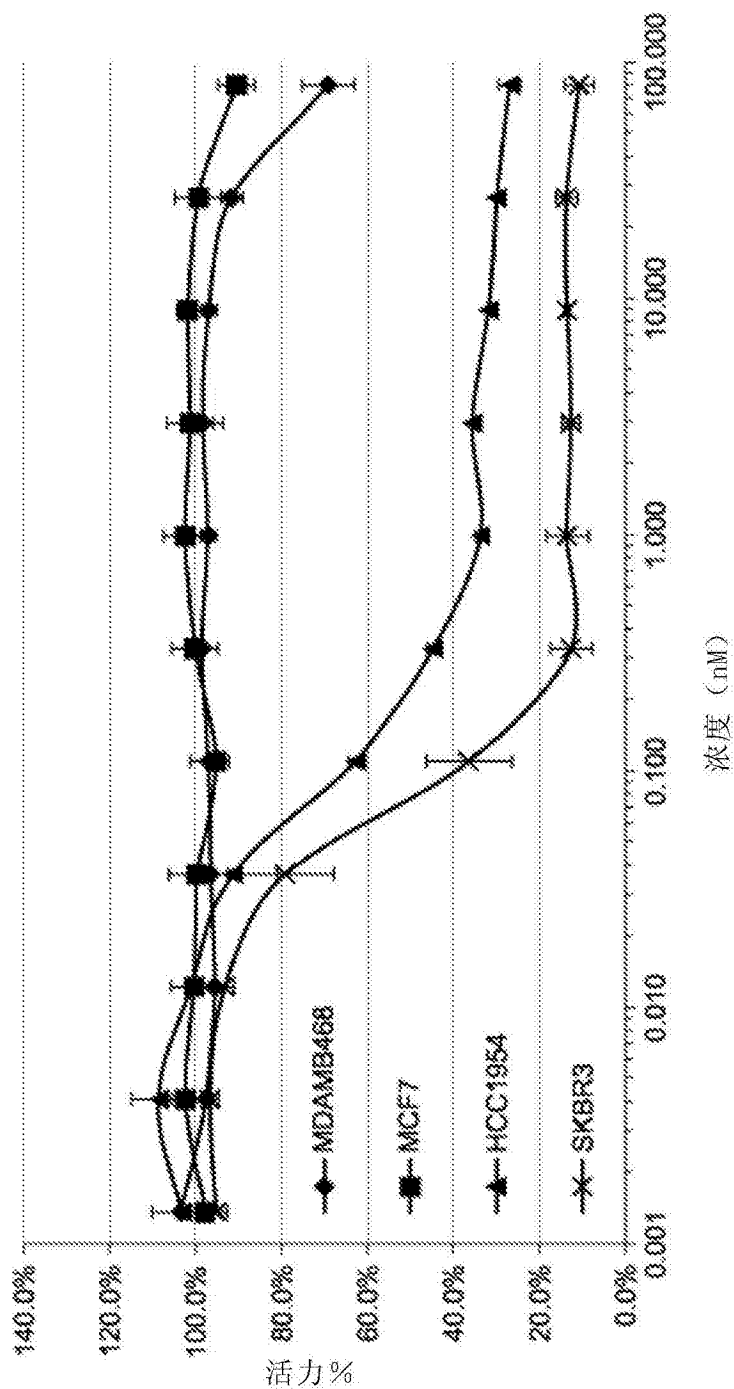


图14

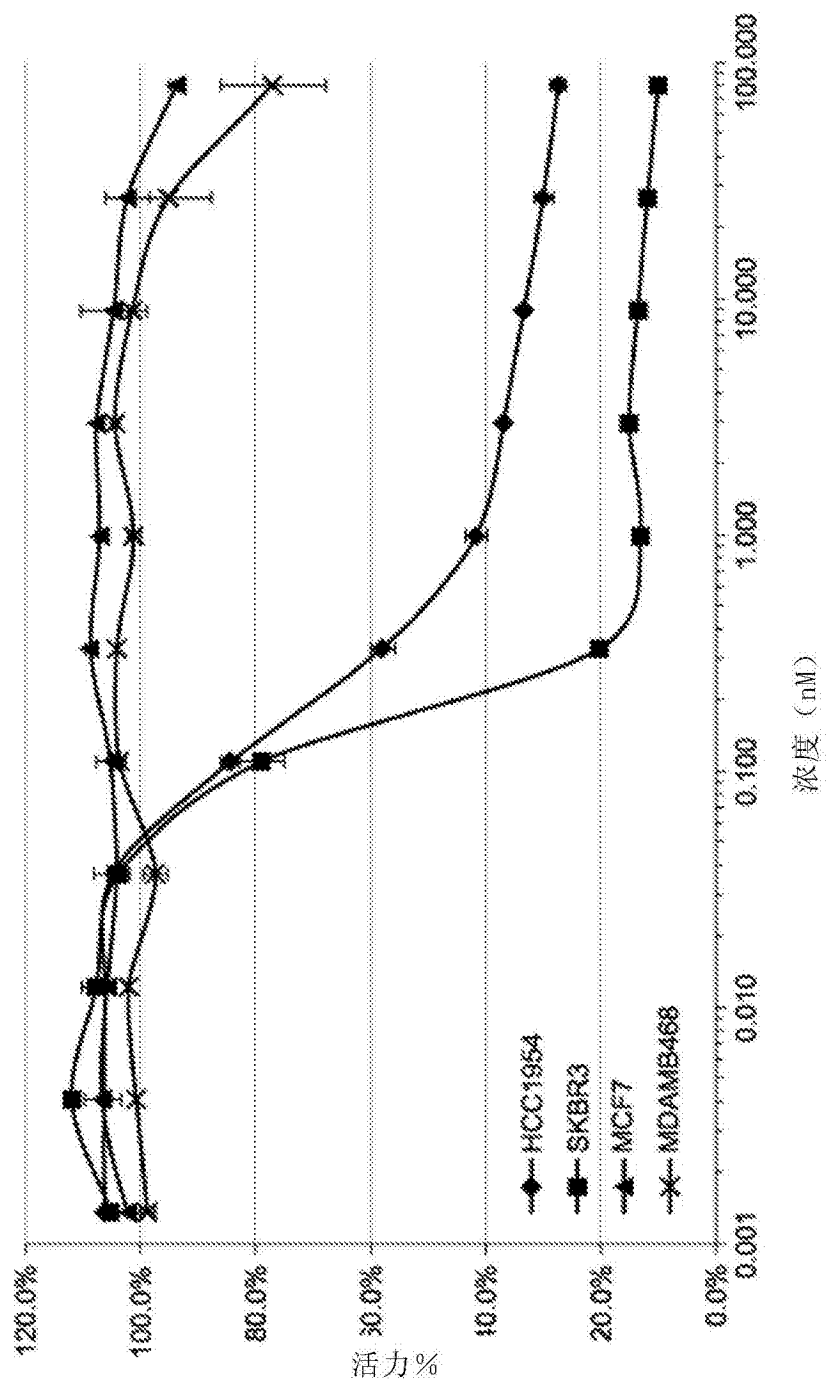


图15

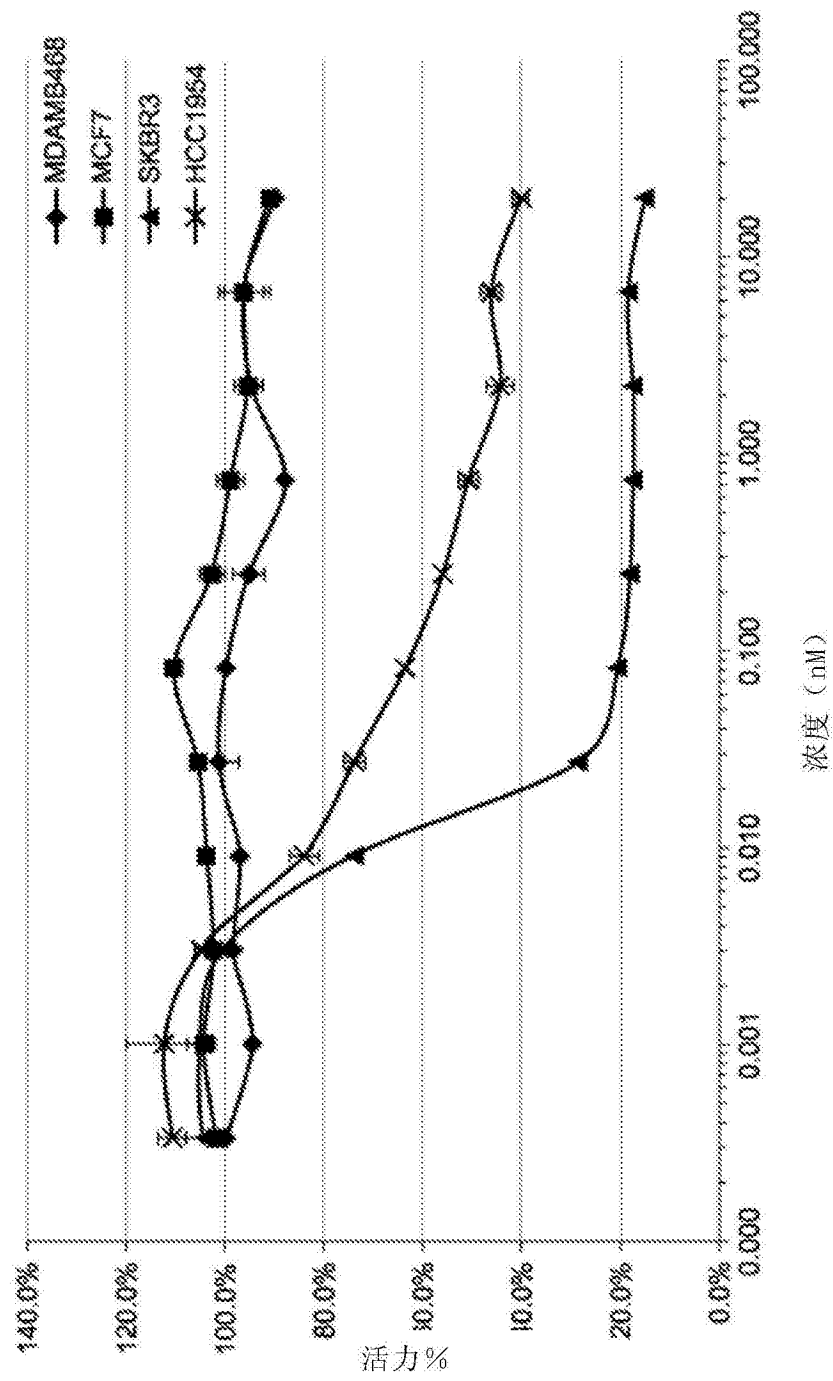


图16