



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103648530 B

(45)授权公告日 2017.02.08

(21)申请号 201280031480.7

(22)申请日 2012.05.08

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103648530 A

(43)申请公布日 2014.03.19

(30)优先权数据

61/483,698 2011.05.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.12.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/001065 2012.05.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/153193 EN 2012.11.15

(73)专利权人 乐高化学生物科学股份有限公司

地址 韩国大田广域市

(72)发明人 金容珠 朴泰奎 于成昊 李香淑

金永云 赵宗云 郑斗烷 金善英

权贤珍 吴奎万 郑允瑞 朴允熙

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 张晶 王莹

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61K 47/64(2017.01)

A61K 31/70(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

US 2009/0081210 A1, 2009.03.26, 摘要, 说明书第[0005]、[0050]、[0255]–[0256]段.

US 2010/0063114 A1, 2010.03.11, 摘要, 说明书第[0003]、[0029]–[0030]、[0066]–[0067]、[0082]、[0084]段.

US 6011175 A, 2000.01.04, 摘要, 说明书第1栏第15–31行、第2栏第12–16行、第21栏第52行–第22栏第11行.

审查员 曲凯

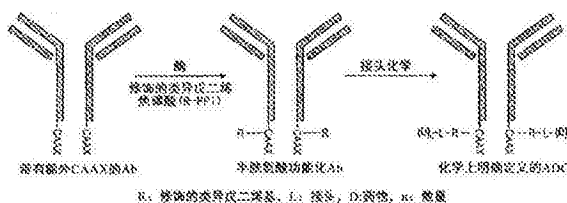
权利要求书3页 说明书50页 附图23页

(54)发明名称

蛋白质-活性剂缀合物及其制备方法

(57)摘要

本发明提供了具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质-活性剂缀合物。本发明还提供了包含缀合物的组合物,以及用于制备缀合物和组合物的方法。本发明进一步提供了使用缀合物将活性剂递送至靶细胞的方法,以及使用缀合物对需要治疗的个体(例如需要活性剂的个体)进行治疗的方法。



1. 单克隆抗体-活性剂缀合物, 包含单克隆抗体和活性剂,

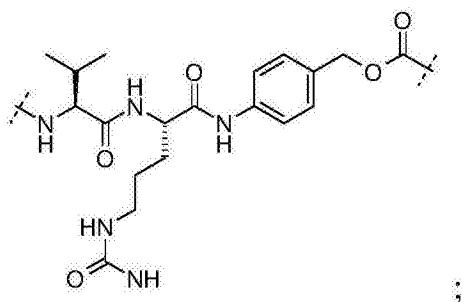
其中所述单克隆抗体的至少一条轻链和/或至少一条重链直接或间接通过间隔区连接氨基酸基序, 所述间隔区包括至少一个氨基酸;

其中所述氨基酸基序是CAAX, 其中C代表半胱氨酸, A代表脂肪族氨基酸, X代表决定所述类异戊二烯转移酶的底物特异性的氨基酸, 所述氨基酸基序在所述单克隆抗体的羧基末端;

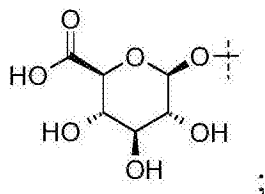
其中至少一个氨基酸基序连接至少一个能被类异戊二烯转移酶识别的类异戊二烯;

其中所述类异戊二烯通过至少一个可裂解的接头与所述活性剂连接, 其中所述可裂解的接头包含能被组织蛋白酶B裂解的肽或被 β -葡糖醛酸糖苷酶裂解的葡糖苷酸;

其中所述可被组织蛋白酶B裂解的肽为:



其中所述可被 β -葡糖醛酸糖苷酶裂解的葡糖苷酸是:



其中所述活性剂是毒素。

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体-活性剂缀合物, 其中所述间隔区为G₇。

3. 如权利要求1所述的单克隆抗体-活性剂缀合物, 其中CAAX中的X是蛋氨酸M。

4. 如权利要求1所述的单克隆抗体-活性剂缀合物, 其中所述类异戊二烯转移酶是FTase或GGTase。

5. 如权利要求1所述的单克隆抗体-活性剂缀合物, 其中所述缀合物选自由赫赛汀-LC-G₇CVIM-BG-MMAF、赫赛汀-LC-G₇CVIM-VC-MMAF-OMe和赫赛汀-LC-G₇CVIM-BG-MMAE组成的群组。

6. 制备单克隆抗体-活性剂缀合物的方法, 所述方法包括:

(a) 表达具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的单克隆抗体; 其中所述单克隆抗体的至少一条轻链和/或至少一条重链直接或间接通过间隔区连接氨基酸基序, 所述间隔区包括至少一个氨基酸;

其中所述氨基酸基序是CAAX, 其中C代表半胱氨酸, A代表脂肪族氨基酸, X代表决定所述类异戊二烯转移酶的底物特异性的氨基酸, 所述氨基酸基序在所述单克隆抗体的羧基末端;

(b) 使用所述类异戊二烯转移酶使所述表达的单克隆抗体与至少一个具有第一官能团FG1的类异戊二烯进行酶促异戊烯化反应, 由此产生功能化单克隆抗体; 其中所述功能化单

克隆抗体通过类异戊二烯与FG1连接；

其中所述FG1选自由乙炔、叠氮化物、醛、羟胺、肼、酮、硝基苯并呋喃(NBD)、丹酰、荧光素、生物素、和若丹明(Rhodamin)组成的群组；

(c) 将第二官能团FG2与活性剂连接，由此产生功能化活性剂；其中所述FG2选自由乙炔、羟胺、叠氮化物、醛、肼、酮和胺组成的群组；

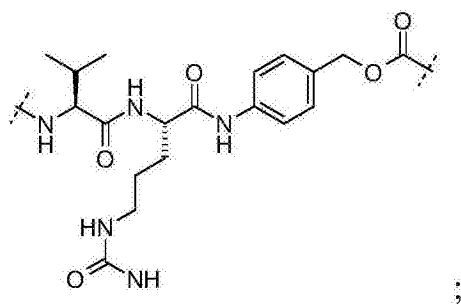
以及

(d) 使所述功能化单克隆抗体的FG1与所述功能化活性剂的FG2反应，由此产生所述单克隆抗体-活性剂缀合物；

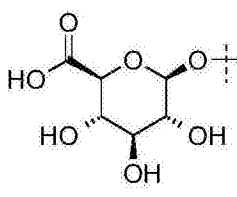
其中FG2与所述活性剂通过至少一个可裂解的接头连接，其中所述可裂解的接头包含能被组织蛋白酶B裂解的肽或被 β -葡糖醛酸糖苷酶裂解的葡糖苷酸；

其中所述活性剂是毒素；

其中所述可被组织蛋白酶B裂解的肽为：



其中所述可被 β -葡糖醛酸糖苷酶裂解的葡糖苷酸是：



其中FG1与FG2反应，FG2选自能与FG1连接的基团，从而产生所述的

单克隆抗体-活性剂缀合物。

7. 如权利要求6所述的方法，其中所述间隔区为G₇。

8. 如权利要求6所述的方法，其中CAAX中的X是蛋氨酸M。

9. 如权利要求6所述的方法，其中所述氨基酸基序是CAAX，并且其中所述方法进一步包括在步骤(b)后将AAX从所述氨基酸基序中移除。

10. 如权利要求6所述的方法，其中所述功能化单克隆抗体与所述功能化活性剂之间的反应是点击化学反应或腙和/或肟形成反应。

11. 如权利要求10所述的方法，其中所述FG1是叠氮基，所述FG2是乙炔基，或者其中所述FG1是乙炔基，所述FG2是叠氮基。

12. 如权利要求10所述的方法，其中，所述FG1是醛基或酮基，且所述FG2是肼或羟胺，或者其中所述FG1是肼或羟胺，且所述FG2是醛或酮。

13. 制备单克隆抗体-活性剂缀合物的方法，所述方法包括：

(a) 表达具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的单克隆抗体；其中所述单克隆抗体的至少一条轻链和/或至少一条重链直接或间接通过间隔区连接氨基酸基序，所述间隔区包括至少一个氨基酸；

其中所述氨基酸基序是CAAX,其中C代表半胱氨酸,A代表脂肪族氨基酸,X代表决定所述类异戊二烯转移酶的底物特异性的氨基酸,所述氨基酸基序在所述单克隆抗体的羧基末端;

(b) 用类异戊二烯转移酶将具有官能基团FG1的至少一个类异戊二烯与活性剂连接;

其中所述FG1选自由乙炔、叠氮化物、醛、羟胺、肼、酮、硝基苯并呋喃(NBD)、丹酰、荧光素、生物素、和若丹明(Rhodamin)组成的群组;以及

(c) 使用所述类异戊二烯转移酶使所述表达的单克隆抗体与和所述类异戊二烯连接的所述活性剂进行酶促异戊烯化反应;

其中所述活性剂是毒素。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述间隔区为G₇。

15. 如权利要求13所述的方法,其中CAAX中的X是蛋氨酸M。

16. 组合物,其包含权利要求1所述的单克隆抗体-活性剂缀合物。

17. 如权利要求16所述的组合物,其中所述组合物是所述单克隆抗体-活性剂缀合物的均质混合物。

蛋白质-活性剂缀合物及其制备方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年5月8日提交的美国临时申请61/483,698的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种蛋白质-活性剂缀合物(conjugate)。蛋白质(例如,寡肽、多肽、抗体等)对于所需靶标具有底物特异性,活性剂(例如,药物、毒素、配体、检测探针等)具有特定的功能或活性。本发明还涉及制备该缀合物的方法。本发明进一步涉及使用缀合物将活性剂递送至个体的靶细胞的方法,以及治疗需要活性剂的个体(例如患有癌症的个体)的方法。

背景技术

[0004] 已提出了通过靶向递送抗癌药物抑制癌细胞生长的方法。例如,已证明靶向递送抗体-药物缀合物可以杀死特定的癌细胞。由于抗体(或抗体片段)与癌细胞特异性地结合,药物被递送至目标癌细胞。药物的靶向递送确保药物作用于目标癌细胞,而不是正常的宿主细胞,因此,使正常细胞损坏所带来的副作用最小化。

[0005] 抗体缀合物可用于递送化学和/或生物分子。示例性化学和/或生物分子包括常规用于化学疗法的药物、细菌蛋白毒素(例如白喉毒素)、植物蛋白毒素(例如蓖麻毒蛋白)、小分子毒素(例如auristatin、格尔德霉素(geldanamycin)、美登素(maytansinoid)、刺孢霉素(calicheamycin)、道诺霉素(daunomycin)、氨甲喋呤(methotrexate)、长春地辛(vindesine)、tubulysin)、亲和配体、检测探针(例如,荧光探针,放射性探针)等(包括它们的组合)。

[0006] 迄今为止,已提出的抗体-药物缀合物是通过使药物部分与抗体的多个赖氨酸基团相连接而制备。或者,抗体-药物缀合物通过以下方式制备:还原抗体的所有或部分链间二硫键或还原所有链间二硫键,再进行部分氧化,由此产生游离的半胱氨酸巯基,然后将自由的半胱氨酸巯基与药物部分相连接。

[0007] 然而,现有的制备方法存在一些问题。例如,总体制备过程是复杂的,因为通过现有制备方法制备的抗体-药物缀合物不是均一的(均质的)。当通过使药物部分与赖氨酸基团相连接来制备抗体-药物缀合物时,由于抗体内存在很多赖氨酸基团(例如每个抗体内100个赖氨酸基团),导致获得了各种类型和形式的抗体-药物缀合物。同样,当通过使巯基与药物部分相连接来制备抗体-药物缀合物时,由于巯基与马来酰亚胺基(maleimide groups)的连接,导致获得了非对映异构体的混合物。例如,如果缀合n种药物,会获得 2^n 种立体异构体的混合物。因此,当药物分配数是0-8时(例如链间二硫键被还原的情况),会获得 $\sum_{n=0}^{n=8} 2^n$ 种立体异构体的混合物。另外,将i种药物缀合至q个位点,会获得 $\sum_{i=0}^q C_i^q$ 种不同化合物的混合物。

[0008] 此外,当通过将赖氨酸基团与药物部分相连接来制备抗体-药物缀合物时,赖氨酸基团会失电荷,由此导致抗体失去其独特的抗原特异性。同样,通过还原二硫键制备抗体-药物缀合物时,抗体的三级或四级结构可能无法保持,从而使抗体失活或变成非特异性抗体。通过利用巯基-马来酰亚胺连接制备抗体-药物缀合物时,药物会通过例如可逆反应从缀合物上(非特异性地)裂解。

[0009] 为克服与现有制备方法有关的问题,提出了一种替代方法,其中抗体特定位置的氨基酸基团被替换为半胱氨酸基团。尽管该方法在毒性、活性和安全性方面表现出比现有制备方法更好的结果,但该方法仍涉及巯基-马来酰亚胺连接,并因此存在与巯基-马来酰亚胺连接相关的非对映异构体和不稳定性的问题。提出了另一种替代方法,其中将硒代半胱氨酸基团(selenocysteine groups)连接于抗体的羧基端上。

[0010] 除使用半胱氨酸取代基来控制缀合位点外,Ambrx Technology (<http://www.ambrx.com>) 已致力于将非天然氨基酸并入抗体中,以提供可用于接头化学(linker chemistry)的官能团。Ambrx的表达系统含有用非天然氨基酸来氨酰化原始tRNA的tRNA合成酶,从而在每当遇到琥珀终止(amber stop)时插入非天然氨基酸。

[0011] Redwood生物科学技术(<http://www.redwoodbioscience.com>)使用基因编码的醛标签(aldehyde tags),并且旨在开发出通过酶(即甲酰甘氨酸生成酶)翻译后识别和修饰的特定序列,以产生所谓的醛的化学处理。在抗体的特定位置引入CxPxR序列提供了一种产生适于药物缀合的反应性醛的手段。

[0012] 然而,鉴于现有技术中有关于制备抗体-药物缀合物的上述问题,新的抗体-药物缀合物和制备抗体-药物缀合物的新方法是十分必要的。

[0013] 在该背景技术部分中公开的以上信息仅用于强化对本发明背景的理解,因此它可能包含并不构成对本领域普通技术人员已知的现有技术的信息。

发明内容

[0014] 如前所述,本发明的特征总体而言是蛋白质-活性剂缀合物和制备蛋白质-活性剂缀合物的方法。本发明的特征还在于将蛋白质-活性剂缀合物递送至个体的靶细胞的方法,以及治疗需要活性剂的个体的方法。本发明的蛋白质-活性剂缀合物可均质地制备,并有利地用于疾病的靶向治疗。

[0015] 在一些方面,本发明提供了蛋白质-活性剂缀合物。在实施方案中,该蛋白质具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序。在实施方案中,活性剂在氨基酸基序处与蛋白质共价连接。

[0016] 在实施方案中,该蛋白质在蛋白质羧基末端具有缺失。在相关实施方案中,将该修饰连接到氨基酸基序上。

[0017] 在实施方案中,该蛋白质在蛋白质的羧基末端具有寡肽或多肽添加。在相关实施方案中,将该修饰连接到氨基酸基序上。

[0018] 在实施方案中,该蛋白质在蛋白质羧基末端具有缺失,并且在蛋白质的羧基末端具有寡肽或多肽添加。在相关实施方案中,将该修饰连接到氨基酸基序上。

[0019] 在实施方案中,蛋白质是抗原多肽的片段或抗体。在相关实施方案中,蛋白质是单克隆抗体。在相关实施方案中,单克隆抗体的至少一条轻链和/或至少一条重链包含具有氨

氨基酸基序的氨基酸区。

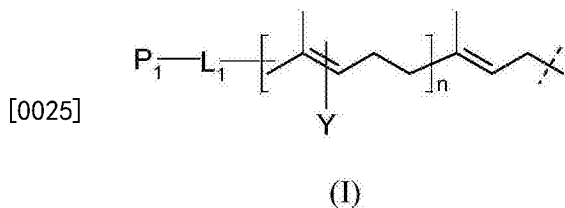
[0020] 在任意上述方面或实施方案中,类异戊二烯转移酶是FTase或GGTase。

[0021] 在任意上述方面或实施方案中,活性剂是药物、毒素、亲和配体、检测探针或其组合。

[0022] 在任意上述方面或实施方案中,氨基酸基序是CAAX、XXCC、XCXC或CXX,其中C代表半胱氨酸,A代表脂肪族氨基酸,X代表决定类异戊二烯转移酶的底物特异性的氨基酸。

[0023] 在任意上述方面或实施方案中,氨基酸基序通过至少一个接头与活性剂共价连接。在相关实施方案中,接头是能被类异戊二烯转移酶识别的异戊二烯衍生物。

[0024] 在相关实施方案中,接头由以下分子式 (I) 表示:



[0026] 其中,

[0027] P_1 和 Y 独立地是包含第一官能团(FG1)的基团,FG1选自乙炔、叠氮化物、醛基、羟胺、肼、酮、硝基苯并呋喃(NBD)、丹酰、荧光素、生物素、和若丹明(Rhodamin)。

[0028] L_1 是 $(CH_2)_r X_q (CH_2)_p$,

[0029] X 是氧、硫、 $-NR_1-$ 、 $-C(O)NR_1-$ 、 $-NR_1C(O)-$ 、 $-NR_1SO_2-$ 、 $-SO_2NR_1-$ 、 $-(CH=CH)-$ 或乙炔,

[0030] R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基芳基或 C_{1-6} 烷基杂芳基,

[0031] r 和 p 独立地是0至6中的整数,

[0032] q 是0至1中的整数,以及

[0033] n 是1至4中的整数。

[0034] 在实施方案中,活性剂连接至包含能与FG1反应的第二官能团(FG2)的基团。在相关实施方案中,FG2是乙炔、羟胺、叠氮化物、醛、肼、酮或胺。在进一步相关的实施方案中,活性剂通过 $-(CH_2)_r X_q (CH_2)_p-$ 或 $-[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_w CH_2CH_2Z]-$ 与含有FG2的基团连接,其中,

[0035] X 是氧、硫、 $-NR_1-$ 、 $-C(O)NR_1-$ 、 $-NR_1C(O)-$ 、 $-NR_1SO_2-$ 或 $-SO_2NR_1-$,

[0036] Z 是氧、硫或 NR_1 ,

[0037] R_1 是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基芳基或 C_{1-6} 烷基杂芳基,

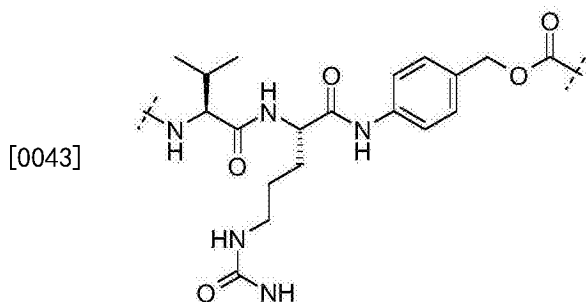
[0038] r 和 p 独立地是0至6中的整数,

[0039] q 是0至1中的整数,以及

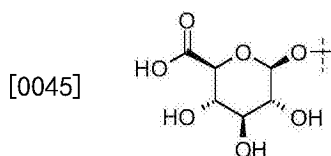
[0040] m 是0至6中的整数。

[0041] 在更进一步相关的实施方案中, $-(CH_2)_r X_q (CH_2)_p-$ 或 $-[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_w CH_2CH_2Z]-$ 连接于(i) 可被组织蛋白酶B裂解的(多个)肽或(ii) 可被 β -葡糖醛酸糖苷酶裂解的葡糖苷酸。

[0042] 在实施方案中,可被组织蛋白酶B裂解的肽是:



[0044] 在实施方案中,可被 β -葡糖醛酸糖苷酶裂解的葡糖苷酸是:



[0046] 在一些方面,本发明提供了制备本文所述的任意蛋白质-活性剂缀合物的方法。在实施方案中,该方法包括表达具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质。在实施方案中,该方法包括利用类异戊二烯转移酶使表达的蛋白质与至少一个具有第一官能团(FG1)的等同底物(isosubstrate)进行酶促反应,由此产生功能化蛋白质。在实施方案中,该方法包括将第二官能团(FG2)连接至活性剂,由此产生功能化活性剂。在实施方案中,该方法包括使功能化蛋白质与功能化活性剂反应,由此产生蛋白质-活性剂缀合物。

[0047] 在相关实施方案中,氨基酸基序在蛋白质的羧基末端。

[0048] 在相关实施方案中,氨基酸基序是CAAX、XXCC、XCXC或CXX,其中C代表半胱氨酸,A代表脂肪族氨基酸,X代表决定类异戊二烯转移酶的底物特异性的氨基酸。

[0049] 在相关实施方案中,氨基酸基序是CAAX,并且其中,该方法还包括在步骤(b)后将AAX从氨基酸基序中移除。

[0050] 在相关实施方案中,FG2通过至少一个接头连接至活性剂。

[0051] 在相关实施方案中,功能化蛋白质与功能化活性剂之间的反应是点击化学反应或产生肟和/或肟的反应。在实施方案中,FG1是叠氮基,并且FG2是乙炔基。在实施方案中,FG1是乙炔基,并且FG2是叠氮基。在实施方案中,FG1是醛基或酮基,并且FG2是肼或羟胺。在实施方案中,FG1是肼或羟胺,并且FG2是醛或酮。

[0052] 在一些方面,本发明提供了制备本文所述的任意蛋白质-活性剂缀合物的方法,该方法包括表达具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质。在实施方案中,该方法包括将类异戊二烯转移酶的同底物连接到活性剂上。在实施方案中,该方法包括利用类异戊二烯转移酶使表达的蛋白质与连接至等同底物的活性剂进行酶促反应。

[0053] 在相关实施方案中,氨基酸基序在蛋白质的羧基末端。

[0054] 在相关实施方案中,氨基酸基序是CAAX、XXCC、XCXC或CXX,其中C代表半胱氨酸,A代表脂肪族氨基酸,X代表决定类异戊二烯转移酶的底物特异性的氨基酸。

[0055] 在相关实施方案中,等同底物通过至少一个接头连接至活性剂。

[0056] 在一些方面,本发明提供了包含本文所述的任意蛋白质-活性剂缀合物的组合物。在实施方案中,该组合物是蛋白质-活性剂缀合物的均质混合物。在实施方案中,蛋白质是抗原多肽的片段或抗体。

[0057] 在一些方面,本发明提供了将活性剂递送至个体的靶细胞的方法。在实施方案中,

该方法包括施用至少一种本文所述的蛋白质-活性剂缀合物或组合物。在实施方案中,靶细胞是癌细胞。

[0058] 在一些方面,本发明提供了对需要治疗(即需要活性剂)的个体进行治疗的方法。在实施方案中,该方法包括施用至少一种本文所述的蛋白质-活性剂缀合物或组合物。在实施方案中,个体患有癌症。在实施方案中,个体被病原体感染。病原体可以是病毒、细菌、真菌,或寄生虫。

[0059] 在上述的蛋白质-活性剂缀合物、组合物和方法中,在一些实施方案里,活性剂可以是免疫调节化合物、抗癌剂、抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂或抗寄生虫剂。

[0060] 通过并入并形成说明书一部分的附图和同时用于以举例的方式解释本发明的原理的以下详细说明,本发明的以上和其他方面、特征以及优势将会更具体地显现和更详细地阐述。

附图说明

[0061] 图1示出了通过在赫赛汀(Herceptin)重链的C-末端中插入GCVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-HC-GCVIM)的氨基酸序列。

[0062] 图2示出了通过在赫赛汀轻链的C-末端中插入GCVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-LC-GCVIM)的氨基酸序列。

[0063] 图3示出了通过在赫赛汀重链的C-末端中插入G₅CVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-HC-G₅CVIM)的氨基酸序列。

[0064] 图4示出了通过在赫赛汀轻链的C-末端中插入G₅CVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-LC-G₅CVIM)的氨基酸序列。

[0065] 图5示出了通过在赫赛汀重链的C-末端中插入G₇CVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-HC-G₇CVIM)的氨基酸序列。

[0066] 图6示出了通过在赫赛汀轻链的C-末端中插入G₇CVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-LC-G₇CVIM)的氨基酸序列。

[0067] 图7示出了通过在赫赛汀重链的C-末端中插入G₁₀CVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-HC-G₁₀CVIM)的氨基酸序列。

[0068] 图8示出了通过在赫赛汀轻链的C-末端中插入G₁₀CVIM制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-LC-G₁₀CVIM)的氨基酸序列。

[0069] 图9示出了通过在赫赛汀重链的C-末端中插入G₁₀CVLL制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-HC-G₁₀CVLL)的氨基酸序列。

[0070] 图10示出了通过在赫赛汀轻链的C-末端中插入G₁₀CVLL制备的修饰的赫赛汀抗体(赫赛汀-LC-G₁₀CVLL)的氨基酸序列。

[0071] 图11示出了通过在抗cMET抗体重链的C-末端插入G₇CVIM制备的修饰的抗cMET抗体(抗cMET-HC-G₇CVIM)、通过在抗cMET抗体轻链的C-末端插入G₇CVIM制备的修饰的抗cMET抗体(抗cMET-LC-G₇CVIM)、通过在抗cMET抗体重链的C-末端插入G₁₀CVIM制备的修饰的抗cMET抗体(抗cMET-HC-G₁₀CVIM)和通过在抗cMET抗体轻链的C-末端插入G₁₀CVIM制备的修饰的抗cMET抗体(抗cMET-LC-G₁₀CVIM)的SDS-PAGE凝胶分析。

[0072] 图12示出了使用FTase和NBD-GPP对赫赛汀-HC-G_nCVIM进行异戊烯化的SDS-PAGE

凝胶分析。

[0073] 图13示出了使用FTase和NBD-GPP对赫塞汀-LC-G_nCVIM进行异戊烯化的SDS-PAGE凝胶分析。

[0074] 图14示出了使用FTase和NBD-GPP对cMET-HC-G_nCVIM进行异戊烯化的SDS-PAGE凝胶分析。

[0075] 图15示出了使用FTase和NBD-GPP对cMET-LC-G_nCVIM进行异戊烯化的SDS-PAGE凝胶分析。

[0076] 图16示出了使用FTase/NBD-GPP或GGTase I/NBD-FPP对赫塞汀-HC-G₁₀CVLL和赫塞汀-LC-G₁₀CVLL进行异戊烯化的SDS-PAGE凝胶分析。

[0077] 图17示出了异戊烯化的赫塞汀-LC-G₇CVIM的LC/MS分析结果。

[0078] 图18示出了异戊烯化赫塞汀-LC-G₁₀CVIM的LC/MS分析结果。

[0079] 图19示出了LCB14-0104 (赫塞汀-LC-G₇CVIM-NC-MMAF-Ome) 的LC/MS和去卷积质谱(deconvoluted mass spectra)的分析结果。

[0080] 图20示出了赫塞汀-LC-G₇CVIM、异戊烯化的赫塞汀-LC-G₇CVIM和LCB14-0101 (赫塞汀-LC-G₇CVIM-BG-MMAF) 的HIC-HPLC色谱图。

[0081] 图21示出了用乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-468和SK-BR-3对LCB14-0101 (赫塞汀-LC-G₇CVIM-BG-MMAF) 进行抗增殖试验的结果。

[0082] 图22示出了用乳腺癌细胞系MCF-7和SK-BR-3对LCB14-0102 (赫塞汀-LC-G₇CVIM-VC-MMAF-OMe) 进行抗增殖试验的结果。

[0083] 图23示出了用乳腺癌细胞系MCF-7和SK-BR-3对LCB14-0103 (赫塞汀-LC-G₇CVIM-BG-MMAE) 进行抗增殖试验的结果。

[0084] 图24示出了蛋白质(C-末端CVIM)的翻译后修饰过程。

[0085] 图25示出了活性药物(除不可裂解的接头)的释放机制。

[0086] 图26示出了抗体-药物缀合物LCB14-0101、LCB14-0102、LCB14-0103和LCB14-0104的化学结构。

[0087] 图27是描述利用类异戊二烯转移酶以及其等同底物(其中CAAX基序的半胱氨酸被烷基化)制备蛋白质-活性剂缀合物的方法的示意图。

具体实施方案

[0088] 现在详细参考本发明的实施方案,其实例在随后的附图中示出,其中相同的附图标记由始至终表示相同的元素。下面通过参照附图对实施方案进行描述,以解释本发明。

[0089] 定义

[0090] “药剂(agent)”或“活性剂(active agent)”代表任意小分子化合物、抗体、核酸分子,或多肽,或其片段。实例包括但不限于药物、毒素、亲和配体、检测探针或其组合。

[0091] “类似物”代表不相同但具有相似的功能或结构特征的分子。例如,多肽类似物保留了相应的天然存在的多肽的生物活性,同时具有某些生化修饰,相对于天然存在的多肽,所述修饰增强了类似物的功能。这种生化修饰能够增强类似物的蛋白酶抗性、膜渗透性或半衰期,而不必改变例如配体结合。类似物可包括非天然氨基酸。

[0092] 在本发明中,“包含(comprise)”、“包含(comprising)”、“含有(containing)”和

“具有(having)”等具有美国专利法赋予它们的含义,并且可以表示“包括(includes)”、“包括(including)”等;“主要由……组成(consisting essentially of)”或“主要由……组成(consisting essentially)”同样具有美国专利法赋予它们的含义,并且该术语是开放式的,允许存在比所叙述内容多的内容,只要所叙述的内容的基本或新特性没有被比所叙述内容多的内容的存在所改变,但应排除现有技术的实施方案。

[0093] “接触细胞”在本文中应理解为将制剂提供给细胞,例如提供给在培养的、离体的或动物中的待处理细胞,从而使制剂能与细胞(例如待处理细胞)反应,潜在地被细胞摄取,并对细胞产生作用。可将制剂(例如佐剂)直接递送至细胞(例如通过将制剂加入培养基或注入目的细胞或组织的方式),或通过局部或静脉给药递送至机体,以经由血管、淋巴或其他方式递送至细胞。本领域普通技术人员应很容易理解,将本发明的蛋白质-活性剂缀合物施用于个体涉及使蛋白质-活性剂缀合物与个体的细胞接触。

[0094] “疾病”代表损坏或干扰细胞、组织或器官正常功能的任何疾病状况或病症。

[0095] 术语“有效量”、“治疗有效量”、“有效剂量”或“治疗有效剂量”指制剂产生既定的药理学、治疗或预防结果的量。例如,药理学有效量的结果是在个体或者在群体内发病频率上,阻止或延缓疾病的发作。提供有效剂量可能需要多于一个剂量。应理解的是,一个群体的有效剂量在所有群体可能是或不是足够的。因此,与制剂或免疫原性组合物的给药相关,当以临床上适合的方式给药对群体至少统计学上显著的部分引起有益效果时,例如预防疾病发作、改善症状、治愈、减少病征或症状、延长寿命、改善生命质量或者被熟悉治疗特定类型的疾病或疾病状况的医生普遍认为是积极的效果,制剂或免疫原性组合物“有效对抗”疾病或疾病状况。

[0096] “增强”代表至少10%、25%、50%、75%、100%或它们之间的任何数值的正向变化。

[0097] “片段”代表多肽或核酸分子的部分。该部分优选地含有参考核酸分子或多肽全长的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。片段可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90或100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个核苷酸或氨基酸。

[0098] “杂交”代表互补核苷酸碱基之间的氢键结合,其可以是Watson-Crick、Hoogsteen或反Hoogsteen氢键结合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是通过形成氢键来配对的互补核苷酸碱基。

[0099] “获得”在本文中应理解为生产、购买、合成、分离、纯化或以其他方式得到。

[0100] 短语“药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂”是领域内公知的,并包括适用于将本发明的化合物施用于哺乳动物的药学上可接受的材料、组合物或载体。如本文所用,术语“药学上可接受的”代表由联邦或州政府的监管机构所认可的,或者在美国药典、欧洲药典或其他普遍公认的药典所列出的用于哺乳动物、例如人类的。

[0101] “减少”代表至少10%、25%、50%、75%、100%或它们之间的任何数值的负向变化。

[0102] “参考”表示标准或对照条件。

[0103] 本文使用的“样品”是指从它的环境(例如来自动物的血液或组织、细胞,或来自组织培养的条件培养基)中分离出的生物材料。在实施方案中,样品疑似含有或已知含有分析物,例如目的蛋白(例如抗体、细胞因子等)。样品也可以是组织或体液的部分纯化的部分。参考样品可以是来自不具有疾病或疾病状况流(disease or condition fluid)的供体,或者来自具有疾病或疾病状况的个体、或未经治疗的个体(例如未接受疫苗的个体)内的正常

组织的“正常”样品。参考样品还可以在用待测试制剂或干预治疗法接触细胞或个体之前的“零时间点”采集。

[0104] “特异性结合”表示对靶标(例如多肽、细胞等)的识别与结合,但其实质上并不识别和结合样品(例如生物样品)中的其他分子。

[0105] 本文使用的“个体”是指活生物体。在实施方案中,活生物体是动物。在实施方案中,个体是哺乳动物。在实施方案中,个体是家养哺乳动物或包括非人灵长类的灵长类动物。个体的实例包括但不限于人类、猴子、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、猪、山羊、绵羊和鸟。个体也可以称为患者。

[0106] “患有或疑似患有”特定疾病、疾病状况或综合征的个体具有足够数量的危险因子,或呈现出具有足够数量或组合的疾病、疾病状况或综合征的病症或症状,从而使得感应个体(competent individual)能诊断或怀疑所述个体患有疾病、疾病状况或综合征。确认个体患有或疑似患有疾病或疾病状况的方法是在本领域技术人员的能力范围内。患有或疑似患有特定疾病、疾病状况或综合征的个体不一定是两个不同的群组。本领域普通技术人员还应容易地理解到,需要活性剂的个体还可以是患有或疑似患有特定疾病、疾病状况或综合征的个体。

[0107] 如本文所用,术语“治疗”(treat, treating, treatment)等是指减轻或改善病症和/或与其相关的症状(例如癌症或与癌症相关症状)。应当认识到,虽然不排除,但治疗病症或疾病状况并不要求病症、疾病状况或与其相关的症状完全消除。

[0108] 本文提供的范围应理解为,是该范围内所有值的简写。例如,1-50的范围应理解为来自包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50的群组的任何数、数的组合或子区间。

[0109] 除非特别声明或从背景中明显看出,本文使用的术语“或”应理解为包括。

[0110] 除非特别声明或从背景中明显看出,本文使用的术语“一个/种(a)”、“一个/种(an)”应理解为单数或复数。

[0111] 除非特别声明或从背景中明显看出,本文使用的术语“约”应理解为背景技术中正常公差范围内,例如平均值的2个标准偏差内。约可理解为在表述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%以内。除非背景中另有明确阐述,本文提供的所有数值均可以被术语约修饰。

[0112] 本文变量的任何定义中,述及所列举的化学基团的清单均包括作为所列举的基团的任何单个基团或组合的变量的定义。在本文中述及变量或方面的实施方案包括作为单个实施方案或与任何其他实施方案组合或作为其一部分的该实施方案。

[0113] 本文提供的任何组合物或方法可以与本文提供的任何其它组合物和方法中的一个或多个组合。

[0114] 1. 制备蛋白质-活性剂缀合物的方法

[0115] 基于本文所公开的,制备本发明的蛋白质-活性剂缀合物的方法及其变型对于本领域普通技术人员来说显而易见。以下提供了示例性方法,它是以举例的方式提供的,并不非意图限制本发明。

[0116] 实施方案1

[0117] 根据本发明的一个实施方案,制备蛋白质-活性剂缀合物的方法包括:(a)表达具有能被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白;(b)利用类异戊二烯转移酶使表达的蛋白质与至少一个具有第一官能团(FG1)的等同底物进行酶促反应,由此产生功能化蛋白质;(c)将第二官能团(FG2)连接至活性剂,由此产生功能化活性剂;以及(d)使功能化蛋白质与功能化活性剂反应,由此产生蛋白质-活性剂缀合物。

[0118] 本文使用的术语“蛋白质”应理解为两个或更多个通过共价键(例如肽键)连接的独立选择的天然或非天然氨基酸。肽可包括2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个通过肽键连接的天然或非天然氨基酸。这里所述的多肽包括全长蛋白质(例如完全加工的蛋白质)和较短的氨基酸序列(例如天然存在的蛋白的片段或合成的多肽片段)。

[0119] 蛋白质指含有至少一个C-末端和至少一个N-末端的寡肽或多肽。在本文中该术语用于包括完整的寡肽或多肽、其修饰型、其片段,以及其类似物。例如,该术语可以指寡肽或多肽,或者通过将其连接至可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸序列来修饰的寡肽或多肽。本文使用的术语“片段”指由寡肽或多肽组成的氨基酸序列的部分。在本文中该术语用于包括氨基酸序列的具有寡肽或多肽的底物特异性的部分。术语“类似物”指相对参考寡肽或多肽具有至少70%或75%、至少80%或85%、至少90%、91%、92%、93%、94%或95%或至少96%、97%、98%或99%的序列同一性的寡肽或多肽。

[0120] 本文使用的术语“蛋白质”还包括抗原多肽的片段的抗体,或其类似物,或其衍生物。术语“抗体”表示免疫球蛋白分子,其通过免疫球蛋白分子可变区内的至少一个抗原识别位点来识别和特异地结合靶标,例如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质,或前述的组合。如本文所用,术语“抗体”包含完整的多克隆、完整的单克隆抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体,例如由至少两个完整抗体产生的双特异性抗体的多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人类抗体,包括抗体的抗原决定部分的融合蛋白,以及包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要抗体表现出期望的生物活性。抗体可以是任意的五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同种型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),其基于它们的分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、 μ 的重链恒定区的同一性。不同类别的免疫球蛋白具有不同和已知的亚单元结构和三维构造。

[0121] 术语“抗体片段”指完整抗体的一部分,以及完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd和Fv片段、线性抗体、单链抗体,以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0122] “单克隆抗体”指与高特异性识别并单一抗原决定簇或表位有关的均质抗体群。这与多克隆抗体相反,多克隆抗体通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体。术语“单克隆抗体”包含完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白,以及包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”指以多种方式制得的这些抗体,包括但不限于以下方式:杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0123] 术语“人源化抗体”指非人(例如鼠科)抗体形式,其是包含最小限度的非人(例如鼠科)序列的特定免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段。通常,人源化抗体是人类免疫

球蛋白,其中互补决定区(CDR)的残基被具有期望的特异性、亲和性和性能的非人类物种(例如老鼠、鼠、兔子、仓鼠)的CDR的残基替代(Jones et al.,1986,Nature,321:522-525; Riechmann et al.,1988,Nature,332:323-327;Verhoeyen et al.,1988,Science,239:1534-1536)。在某些情况下,用具有期望的特异性、亲和性和性能的非人类物种的抗体中的相应的残基取代人类免疫球蛋白Fv构架区(FR)的残基。可在Fv构架区内和/或取代的非人类残基内通过取代附加残基来进一步修饰人源化抗体,以改善和优化抗体的特异性、亲和性和/或性能。一般而言,人源化抗体将包括基本所有的至少一个,并且通常两个或三个可变结构域,其包含对应于非人类免疫球蛋白的所有或几乎所有的CDR区,然而所有或几乎所有的FR区是来自人类免疫球蛋白共有序列的FR区。人源化抗体还可以包含至少部分的免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc),通常是人类免疫球蛋白的恒定区或结构域。美国专利5,225,539描述了产生人源化抗体的方法的实例。

[0124] 术语“人类抗体”指人类产生的抗体或具有对应于人类利用任何本领域已知的技术产生的抗体的氨基酸序列的抗体。人类抗体的这种限定包括完整或全长抗体、其片段,和/或包含至少一个人类重和/或轻链多肽抗体,例如包含鼠类轻链和人类重链多肽的抗体。

[0125] 术语“嵌合抗体”指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两个或更多物种的抗体。通常,轻链与重链的可变区对应于来源于哺乳动物(例如老鼠、鼠、兔子等)的一个物种的具有期望特异性、亲和性和性能的抗体的可变区,而恒定区与来自另一物种(通常为人类)的抗体序列是同源的,以避免在该物种内引发免疫应答。

[0126] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文中可互换使用,并且指的是抗原的能够被特定抗体特异性识别和结合的部分。当抗原是多肽时,表位既可以由相邻氨基酸形成,也可以由不相邻氨基酸通过蛋白质的三级折叠交错而形成。蛋白质变性后,由相邻氨基酸形成的表位通常可被保留,而通过三级折叠形成的表位在蛋白质变性后通常会丢失。在唯一的空间构象内,表位通常包括至少3个、至少5个或至少8-10个氨基酸。

[0127] 抗体“特异性结合”表位或抗原分子表示,相比包括不相关的蛋白质的替代物质,抗体更频繁地、更快速地、持续时间更长地、更亲和地(或以上的组合)与表位或抗原分子反应或结合。在某些实施方案中,“特异性结合”表示,例如抗体以约0.1mM或以下的 K_D ,而更一般为小于约1 μ M结合至蛋白质。在某些实施方案中,“特异性结合”代表抗体有时以至少约0.1 μ M或以下,而其他时候以至少约0.01 μ M或以下的 K_D 结合蛋白质。由于不同物种的同源蛋白质之间的序列同一性,特异性结合可包括识别多于一个物种的特定蛋白的抗体。应理解的是,与第一靶标特异性结合的抗体或结合部分可以或不可特异性结合第二靶标。照此,“特异性结合”不必需要(尽管它可以包括)排他性结合,即:与单一靶标的结合。通常,但不是必要地,提到结合就表示特异性结合。

[0128] 抗体,包括其片段/衍生物和单克隆糖体,可利用本领域已知的方法获得。(参见 McCafferty et al.,Nature348:552-554(1990);Clackson et al.,Nature352:624-628; Marks et al.,J.Mol.Biol.222:581-597(1991);Marks et al.,Bio/Technology10:779-783(1992);Waterhouse et al.,Nucleic.Acids Res.21:2265-2266(1993);Morimoto et al.,Journal of Biochemical and Biophysical Methods24:107-117(1992);Brennan et al.,Science229:81(1985);Carter et al.,Bio/Technology10:163-167(1992);Kohler

et al., Nature 256:495 (1975); U.S. Pat. No. 4,816,567; Kilpatrick et al., Hybridoma 16(4):381-389 (1997); Wring et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 19(5):695-707 (1999); Bynum et al., Hybridoma 18(5):407-411 (1999); Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992), U.S. Pat. Nos. 5514548, 5545806, 5569825, 5591669, 5545807; W097/17852, 以上所有文献通过引用并入本文。)

[0129] 抗体的非限制性实例包括但不限于莫罗单抗-CD3 (Muromonab-CD3) 阿昔单抗 (Abciximab)、利妥昔单抗 (Rituximab)、赛尼哌 (Daclizumab)、帕利珠单抗 (Palivizumab)、英夫利昔单抗 (Infliximab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、依那西普 (Etanercept)、巴利昔单抗 (Basiliximab)、吉妥单抗 (Gemtuzumab ozogamicin)、阿仑单抗 (Alemtuzumab)、替伊莫单抗 (Ibritumomab tiuxetan)、阿达木单抗 (Adalimumab)、阿法赛特 (Alefcept)、奥马珠单抗 (Omalizumab)、依法珠单抗 (Efalizumab)、Tositumomab-I131、西妥昔单抗 (Cetuximab)、贝伐单抗 (Bevacizumab)、那他珠单抗 (Natalizumab)、兰尼单抗 (Ranibizumab)、帕尼单抗 (Panitumumab)、Ecolizumab、利纳西普 (Rilonacept)、塞妥珠单抗 (Certolizumab pegol)、罗米司亭 (Romiplostim)、AMG-531、CNT0-148、CNT0-1275、ABT-874、LEA-29Y、贝利木单抗 (Belimumab)、TACI-Ig、第二代抗CD20、ACZ-885、托珠单抗 (Tocilizumab, Atlizumab)、美泊利单抗 (Mepolizumab) 帕妥珠单抗 (Pertuzumab)、Humax CD20、CP-675,206 (Ticilimumab)、MDX-010、IDEC-114、Inotuzumab ozogamycin、HUMAX表皮生长因子受体 (HuMax EGFR)、阿柏西普 (Aflibercept)、VEGF Trap-Eye、HUMAX-CD4、Ala-Ala-ChChAglyCD3; TRX4、卡妥索单抗 (Catumaxomab)、IGN101、MT-201、Pregovomab、CH-14.18、WX-G250、AMG-162、AAB-001、Motavizumab; MEDI-524、efumgumab、**Aurograb®**、瑞西巴库 (Raxibacumab)、第三代抗-CD20、LY2469298、维妥珠单抗 (Veltuzumab)。

[0130] 在一些实施方案中,当蛋白质是单克隆抗体时,单克隆抗体的至少一条轻链、单克隆抗体的至少一条重链或两者,可包含具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的氨基酸区。

[0131] 在实施方案中,修饰轻链或重链的C-末端。并且,可糖基化Fc区的CH2区。

[0132] 在一些实施方案中,可将蛋白质(其片段、类似物或衍生物)的C-末端连接至可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序。在其他实施方案中,可修饰C-末端。该修饰可以是(i)蛋白质羧基端中的缺失,(ii)蛋白质的羧基端中寡肽或多肽的添加,或(iii)蛋白质羧基端中的缺失和蛋白质的羧基端中寡肽或多肽的添加。在相关实施方案中,可将该修饰连接到氨基酸基序上。

[0133] 本文使用的术语“类异戊二烯转移酶”指一种酶,其能够识别蛋白质的C-末端处或附近的某些氨基酸基序,并通过在携带某些氨基酸基序的蛋白质中加入(多个)类异戊二烯单元在某些氨基酸基序的(多个)半胱氨酸残基的(多个)巯基位置处进行选择性的烷基化。

[0134] 类异戊二烯转移酶的实例包括法尼基转移酶(farnesyltransferase, FTase)和香叶基香叶基转移酶(geranylgeranyltransferase, GGTase),其分别涉及将法尼基或香叶基

香叶基部分转移到靶蛋白的C-末端的(多个)半胱氨酸。GGTase可以分为GGTase I和GGTase II。FTase和GGTase I可识别CAAX基序,GGTase II可识别XXCC、XCXC或CXX基序,其中C代表半胱氨酸,A代表脂肪族氨基酸,X代表决定类异戊二烯转移酶的底物特异性的氨基酸(Nature Rev.Cancer2005,5(5),pp.405-12;Nature Chemical Biology,2010,17,pp.498-506;Lane KT,Bees LS,Structural Biology of Protein of Farnesyltransferase and Geranylgeranyltransferase Type I,Journal of Lipid Research,47,pp.681-699(2006);Patrick J.Kasey,Miguel C.Seabra;Protein Prenyltransferases,The Journal of Biological Chemistry,Vol.271,No.10,Issue of March8,pp.5289-5292(1996),这些参考文献的内容通过引用并入本文)。

[0135] 在本发明中,可以使用各种来源的类异戊二烯转移酶,例如来自人类、动物、植物、细菌、病毒等。在一些实施方案中,可以使用天然存在的类异戊二烯转移酶。在一些其他的实施方案中,可以使用天然或人工修饰的类异戊二烯转移酶。例如,具有至少一个天然改变(包括后翻译修饰)的氨基酸序列的类异戊二烯转移酶、天然或人为截短形式的天然存在的类异戊二烯转移酶、被(His)-tag、GST、GFP、MBP、CBP、Iospeptag、BCCP、Myc-标签、钙调蛋白-标签、FLAG-标签、HA-标签、麦芽糖结合蛋白-标签、Nus-标签、谷胱甘肽-S-转移酶-标签、绿色荧光蛋白标记、硫氧还蛋白标签、S-标签、Softag1、Softag3、Strep-标签、SBP-标签、Ty标签等中的至少一个修饰的类异戊二烯转移酶。

[0136] 类异戊二烯转移酶可识别等同底物和底物。等同底物指在底物中具有修饰的底物类似物。在蛋白质的C-末端,类异戊二烯转移酶使某些氨基酸基序(例如CAAX基序)烷基化(Benjamin P.Duckworth et al,ChemBioChem2007,8,98;Uyen T.T.Nguyen et al,ChemBioChem2007,8,408;Guillermo R.Labadie et al,J.Org.Chem.2007,72(24),9291;James W.Wollack et al,ChemBioChem2009,10,2934,其内容通过引用并入本文)。可利用类异戊二烯转移酶和等同底物通过在C-末端的(多个)半胱氨酸上烷基化来产生功能化蛋白质。

[0137] 例如,利用类异戊二烯转移酶可以使C-末端的CAAX基序的半胱氨酸残基与等同底物反应。在某些情况下,然后可通过蛋白酶除去AAX。然后可通过酶将获得的半胱氨酸的羧基端甲基化。(Iran M.Bell,J.Med.Chem.2004,47(8),1869,其通过引用并入本文。)

[0138] 在一些蛋白质的情况中,由于翻译后修饰可能会通过形成二硫键发生半胱氨酸化和谷胱甘肽化。然而,当这种烷基化是通过类异戊二烯转移酶而发生,可还原这种二硫键。

[0139] 本发明的蛋白质可利用本领域熟知的任何分子生物学或细胞生物学方法制备。例如,可使用瞬时转染方法。可利用标准PCR技术将编码某些可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的基因序列插入已知的质粒载体中,从而表达出在其C-末端具有某些氨基酸基序的蛋白质(其片段或类似物)。照此,可以表达具有至少一个可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质。然后可利用类异戊二烯转移酶使表达的蛋白质与类异戊二烯转移酶的等同底物进行酶促反应,以产生功能化蛋白质。等同底物含有官能团。

[0140] 一旦具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质得到表达,利用类异戊二烯转移酶和至少一个具有第一官能团(FG1)的等同底物使它进行酶促反应,由此产生功能化蛋白质。

[0141] 本文使用的术语“官能团”指能导致以下反应的基团,例如1,3-偶极环加成反应、

杂Diels反应(hetero-diels reactions)、亲核取代反应(诸如环氧化物、氮丙啶、环硫酸酯和aziridium的杂环亲电开环反应)、非羧醛型羰基反应(例如肟醚、脒、硫脒、芳香杂环、脞和胺的形成)、碳碳多键加成反应、氧化反应(例如,环氧化、氮杂环丙化反应、硫酰卤化加成),以及点击化学。该官能团可包括但不限于荧光标签、三唑、马来酰亚胺和放射性同位素(Angew.Chem.Int.Ed.2001,40,2004-2021;Drug Discovery Today,2003,8(24),1128-1137;Chem.Rev.2008,108,2952-3015,其内容通过引用并入本文)。在实施方案中,该官能团可以是乙炔基和叠氮基。

[0142] 可通过至少一个接头将该官能团连接在蛋白质或活性剂上。在一些实施方案中,接头是线性接头。在其他一些实施方案中,接头是枝状接头。当接头是枝状接头时,可将活性剂连接到所有分枝上。每个分枝可具有相同或不同的活性剂。在一些实施方案中,接头可以是可裂解的。在一些其他的实施方案中,它可以是不可裂解的。

[0143] 在一些实施方案中,可通过将第二官能团(FG2)连接至活性剂来制备功能化活性剂。示例性活性剂包括但不限于药物、毒素、亲和配体、检测探针或其组合。

[0144] 示例性药物包括但不限于厄洛替尼(Erlotinib)(TARCEVA;Genentech/OSI Pharm.(基因泰克公司/OSI制药))、硼替佐米(Bortezomib)(VELCADE;Millennium Pharm.(千年制药公司))、氟维司群(Fulvestrant)(FASLODEX;AstraZeneca(阿斯特拉捷利康公司))、苹果酸舒尼替尼(Sutent)(SU112488;Pfizer辉瑞公司)、来曲唑(Letrozole)(FEMARA;Novartis(诺华公司))、甲磺酸伊马替尼(Imatinib mesylate)(GLEEVEC;Novartis(诺华公司))、PTK787/ZK222584(Novartis(诺华公司))、奥沙利铂(Oxaliplatin)(Eloxatin;Sanofi(赛诺菲公司))、5-FU(5-氟尿嘧啶)、亚叶酸(Leucovorin)、雷帕霉素(Rapamycin)(西罗莫斯,RAPAMUNE;Wyeth(惠氏公司))、拉帕替尼泊(Lapatinib)(TYKERB;GSK572016;Glaxo SmithKline(葛兰素史克公司))、洛那法尼(Lonafarnib)(SCH66336)、索拉非尼(Sorafenib)(BAY43-9006;Bayer Labs(拜尔实验室))、吉非替尼片(Gefitinib)(IRESSA;AstraZeneca(阿斯特拉捷利康公司))、AG1478、AG1571(SU5271;Sugen)、烷化剂如塞替派(thiotepa)和**CYTOXAN®**环磷酰胺;磺酸烷基酯如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines)如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺类(ethylenimine)和甲基蜜胺类(methylamelamine)包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰胺类(尤其是布拉它辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物托泊替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatin);多烯酮类化合物(callystatin);CC-1065(包括其合成类似物阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin));隐藻素类(cryptophycin)(具体地cryptophycin1和cryptophycin8);多拉司他汀(dolastatin);念珠藻环肽(包括合成类似物、KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);sarcodictyin;海绵素(Spongistatin);氮芥如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑

(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆留醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofوسفamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝基脲类(nitrosureas)如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lmustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类如烯二炔类抗生素(例如加里刹霉素(calicheamicin),尤其是加里刹霉素 γ II和加里刹霉素 ω II(例如参见Angew, Chem Intl ed Engl., 33:183-186(1994)),以及达内霉素(dynemicin)包括达内霉素A;二磷酸盐如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素(esperamicin)及新制癌菌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、carabycin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®**多柔比星(doxorubicin)(包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、脂质体多柔比星(liposomal doxorubicin)和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycins)如丝裂霉素C(mitomycinC)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olvomycins)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)和佐柔比星(zorubicin);抗代谢物如5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫代鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(fluxuridine);雄性激素(androgens)如卡普睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)和睾内酯(testolactone);抗肾上腺物如氨鲁米特(aminogluthetimide)、米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane);叶酸补充物如亚叶酸(frolinic acid);醋葡内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);氨苯吡啶(amsacrine);百垂布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依洛尼塞(elfornithine);醋酸羟吡唑啉(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);美登木素生物碱类(maytansinoids),如美登素(maytansine)和美登醇(maytansinol);安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰胺;丙卡巴肼

(procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西索菲兰 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecene) (尤其是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素 (roridin) A和蛇形菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) ('Ara-C'); 环磷酰胺; 噻替哌 (thiotepa); 类紫杉醇 (taxoid), 例如 **TAXOL®** 紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、**ABRAXANE™** 紫杉醇的不含克列莫佛 (Cremophor)、清蛋白改造纳米颗粒剂型 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) 和 **TAXOTERE®** 多西他塞 (doxetaxel) (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine); 6-巯鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨嘌呤; 铂类似物如顺铂和卡铂; 长春碱 (vinblastine); 铂; 依托泊苷 (etoposide); 异磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); **NAVELBINE®** 长春瑞宾 (vinorelbine); 诺安托 (novantrone); 替尼泊甙 (teniposide); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤; 希罗达 (xeloda); 伊拜膦酸盐 (ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DFMO); 类维生素A酸, 诸如视黄酸; 卡培他滨 (capecitabine); 以及上述物质的药学上可接受的盐、溶剂化物、酸或其衍生物。

[0145] 其他药物包括但不限于 (i) 起着调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂如抗雌激素剂和选择性雌激素受体调节剂 (SERMs), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬; (ii) 抑制芳香化酶的芳香化酶抑制剂, 芳香化酶调节肾上腺中雌激素的产生, 例如4(5)-咪唑、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** (醋酸甲地孕酮)、**AROMASIN®** 依西美坦、**FEMARA®** 来曲唑和 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑; (iii) 抗雄激素剂如氟他胺 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、亮内瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊烧核苷胞嘧啶类似物); (iv) 芳香化酶抑制剂; (v) 蛋白激酶抑制剂; (vi) 脂质激酶抑制剂; (vii) 反义寡核苷酸, 特别是抑制与异常细胞增殖有关的信号途径中的基因表达的那些, 例如PKC- α 、Raf和H-Ras; (viii) 核酶, 例如VEGF抑制剂 (例如ANGIOZYME核酶和HER2表达抑制剂); (ix) 疫苗, 如基因治疗疫苗、**ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN** 疫苗和 **VAXID** 疫苗; **PROLEUKIN®** r1L-2; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶1抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; (x) 抗血管生成剂, 如贝伐单抗 (bevacizumab) (**AVASTIN**, Genentech (基因公司)); 以及 (xi) 上述物质的药学上可接受的盐、溶剂化物、酸或其衍生物。

[0146] 在一些实施方案中, 细胞因子可用作药物。细胞因子是小的细胞信号蛋白分子, 其是由众多细胞分泌的、并广泛用于细胞间通讯的信号分子。它们包括单核因子、淋巴因子、

传统的多肽激素等。细胞因子的实例包括但不限于生长激素,如人生长激素,N-甲二磺酰人生长激素,和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;前胰岛素;松驰素;前松驰素;糖蛋白激素如卵泡刺激素(FSH),甲状腺刺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝细胞生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳激素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;缪氏抑制物质(mullerian-inhibiting substance);小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮细胞生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF)如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子;干扰素如干扰素- α , - β , 和- γ ;集落刺激因子(CSFs)如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(ILs)如IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12;肿瘤坏死因子如TNF- α 或TNF- β ;和其它多肽因子包括LIF和kit配体(KL)。本文中术语细胞因子还包括天然蛋白或来自重组细胞培养物的蛋白以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0147] 术语“毒素”指活细胞或生物体中产生的毒性物质。毒素可以是小分子、肽或蛋白质,其能够在接触机体组织或被其吸收后与诸如酶或细胞受体的生物大分子发生反应来引发疾病。毒素包括植物毒素和动物毒素。动物毒素的实例包括但不限于白喉抗毒素、肉毒毒素、破伤风抗毒素、痢疾毒素、河豚毒素、短裸甲藻毒素、雪卡毒素。植物毒素的实例包括但不限于蓖麻毒素和苹果链格孢毒素(AM-toxin)。

[0148] 小分子毒素的实例包括但不限于auristatin、格尔德霉素(Kerr et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8 (6): 781-784)、美登木素生物碱(EP1391213, ACR2008, 41, 98-107)、刺孢霉素(US2009105461, Cancer Res. 1993, 53, 3336-3342)、道诺霉素、阿霉素、甲氨蝶呤、长春地辛、SG2285(Cancer Res. 2010, 70 (17), 6849-6858)、尾海兔素、尾海兔素类似物的auristatin(US563548603)、cryptophycin、喜树碱、根霉素衍生物、CC-1065类似物或衍生物、duocarmycin、烯二炔类抗生素、埃斯培拉霉素、埃博霉素和类毒素。毒素可通过微管蛋白结合、DNA结合、拓扑异构酶抑制等显示出细胞毒性和细胞生长抑制活性。

[0149] 术语“配体”指可与靶标生物分子形成络合物的分子。配体的实例是连接至靶蛋白的预设位置并传输信号的分子。配体可以是底物、抑制剂、刺激剂、神经传递素或放射性同位素。

[0150] “可检测部分”或“标记物”是指可以通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的成分。例如,有用的标记包括 ^{32}P 、 ^{35}S 、荧光染料、电子密度试剂、酶(例如,通常用在ELISA中)、生物素-链霉亲和素(biotin-streptavidin)、dioxigenin、半抗原和蛋白质(抗血清或单克隆抗体对其有用)或是具有与靶标互补的序列的核酸分子。可检测部分经常会产生可检测的信号,例如放射性信号、显色信号或荧光信号,它们可用来对样品中结合的可检测部分进行定量。信号的定量通过闪烁计数、显微测密术、流式细胞术、ELISA,或通过完整或随后的消化肽(可测定一个或更多肽)的质谱来直接分析获得。本领域技术人员熟悉用于标记目的化合物的技术和用于检测它们的手段。这些技术和方法在本领域中是常规的技术和方法。

[0151] 本文使用的术语“探针”指材料,所述材料可以(i)提供可检测信号,(ii)能够与第一探针或第二探针相互作用以改变由第一或第二探针提供的可检测信号,例如荧光共振能量转移(FRET),(iii)稳定与抗原或配体的相互作用,或增强结合亲和性;(iv)通过如电荷、

疏水性等物理参数影响电泳迁移率或细胞入侵活性,或(v)控制配体亲和性、抗原-抗体结合或离子络合物的形成。

[0152] 功能化蛋白质和功能化活性剂一旦产生,它们相互反应,由此产生蛋白质-活性剂缀合物。在实施方案中,功能化蛋白质和功能化活性剂之间的反应可以是点击化学反应或通过肟和/或肟的形成。在实施方案中,FG1是叠氮基,FG2是乙炔基,反之亦可。在其他实施方案中,FG1可以是醛基或酮基,FG2是肟或羟胺,反之亦可。

[0153] 点击化学反应是在温和条件下进行,以便容易地处理蛋白质。点击化学反应表现出非常高的反应特异性。因此,即使蛋白质具有其他官能团(例如,侧链残基或在C-末端或N-末端),这些官能团不会被点击化学反应所影响。例如,可以发生蛋白质的乙炔基和叠氮基之间的点击化学反应,而蛋白质的其他官能团却不受点击化学反应的影响。此外,点击化学反应可以特异性地发生,而不会受所涉及的配体的种类的影响。在一些情况下,可以选择配体,以改善整体的反应效率。例如,叠氮化物-乙炔点击化学可高产率产生三唑(Rhannon K. Iha et al, Chem. Rev. 2009, 109, 5620; Morten Meldal and Christian Wenzel Tornøe, Chem. Rev., 2008, 108, 2952; Hartmuth C. Kolb et al, Angew. Chemie Int. Ed. Engl., 2001, 40, 2004, 以上所有文献通过引用并入本文。)

[0154] 叠氮基和乙炔基是不存在于天然存在的蛋白质的氨基酸序列中的官能团。如果利用这些官能团来发生缀合反应,那么不会有侧链残基和N-末端或C-末端受到点击化学反应的影响。因此,可产生活性剂缀合在(多个)目标位置的蛋白质-活性剂缀合物。

[0155] 当蛋白质是抗体时,所有或部分的抗体可在被类异戊二烯转移酶烷基化期间被还原成单链。由于点击化学反应中使用的氧化剂,可将单链氧化形成H₂L₂-形抗体。

[0156] 由于抗体有4个链(2H+2L),烷基化可在每个抗体的1-4位置进行。由于可将多个活性剂连接于接头,因此活性剂的数量可多于4。

[0157] 在某些实施方案中,当可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序是CAAX时,所述方法还可包括去除AAX。在其他实施方案中,所述方法还可包括去除AAX后,在C-末端加入甲基(Journal of Lipid Research, 2006, 47, 681-699, 其通过引用并入本文。)

[0158] 实施方案2

[0159] 根据另一实施方案,制备蛋白质-活性剂缀合物的方法包括:(a)表达具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质;(b)将类异戊二烯转移酶的等同底物连接至活性剂;(c)利用类异戊二烯转移酶使表达的蛋白质与连接至等同底物的活性剂进行酶促反应。

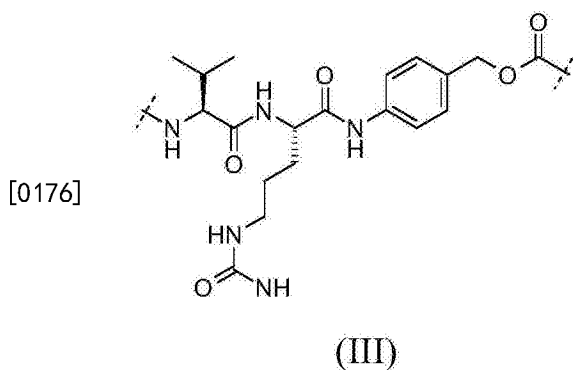
[0160] 在该实施例中,一旦具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质得以表达,蛋白质就会与连接至类异戊二烯转移酶的等同底物的活性剂反应。在这种情况下,会产生硫醇基-马来酰亚胺的缀合。然而,即使产生硫醇基-马来酰亚胺的缀合,根据本发明,活性剂也会缀合在靶标位置处。因此,避免了现有技术中相关的产生非均质混合物的问题。

[0161] 2. 蛋白质-活性剂缀合物

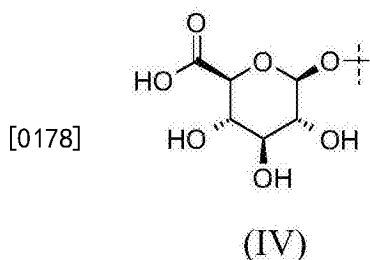
[0162] 在另一方面,本发明提供了一种蛋白质-活性剂缀合物,包含具有可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序的蛋白质,其中活性剂在氨基酸基序处共价连接至蛋白质。

[0163] 本领域技术人员很容易能够选择出选择性结合目的靶标(例如个体内的靶细胞)的蛋白质。示例性蛋白质包括但不限于特异性结合目的靶标的抗体或抗原片段。

[0164] CAAX蛋白质 (CAAX抗体)



[0177] 在某些实施方案中,可被 β -葡糖醛酸糖苷酶裂解的葡糖苷酸可由下式(IV)来表示:



[0179] 3. 组合物

[0180] 在另一方面,本发明提供了包含本文所述蛋白质-活性剂缀合物的组合物。在实施方案中,组合物用于将活性剂递送至个体的靶细胞。在实施方案中,组合物用于对需要治疗(即需要活性剂)的个体进行治疗。

[0181] 这种组合物的制备对本领域技术人员来说是已知的,并且可将这种组合物在体内递送至个体。

[0182] 在一些方面,将组合物制备成可注射形式,如液体溶液或悬浮液。也可以制备成适用于注射的固体形式,如乳剂,或在脂质体内胶囊化的多肽。蛋白质-活性剂缀合物可与药学上可接受的载体组合,其包括不引发产生对接受载体的个体有害的抗体的任何载体。适用的载体通常包括缓慢代谢的大型大分子,例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合氨基酸、氨基酸共聚物、脂质集群体等。这些载体对本领域技术人员来说是熟知的。

[0183] 本发明的组合物还可以含有稀释液,例如水、盐水、甘油、乙醇。也可存在辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、pH缓冲物质等。可将蛋白质以中性或盐的形式配制到疫苗中。组合物可通过注射以肠胃外施用;该注射可以是皮下注射或肌肉注射。其他剂型适用于其他形式的给药,例如栓剂或口服。口服组合物可以作为溶液、悬浮液、片剂、药丸、胶囊或缓释剂施用。

[0184] 组合物以与剂量制剂相配的方式施用。组合物包含治疗有效量的蛋白质-活性剂缀合物。治疗有效量意味着有效用于治疗或预防疾病或病症的单次剂量或多个剂量安排中施用的成分。施用的剂量将根据待治疗的个体、个体的健康和身体状况、期望保护的程度和其他相关因素而变化。所需活性成分的精确量将取决于从业者的判断。

[0185] 4、蛋白质-活性剂缀合物和组合物的使用方法

[0186] 在进一步的方面,本发明提供了将活性剂递送至个体的靶细胞的方法,该方法包括施用该蛋白质-活性剂缀合物或组合物。在更进一步的方面,本发明提供了对需要治疗的

个体(即需要活性剂的个体)进行治疗的方法,该方法包括对个体施用有效量的蛋白质-活性剂缀合物或包括该缀合物的组合物。

[0187] 在实施方案中,可将蛋白质-活性剂缀合物(例如,抗体-药物缀合物)或包含该缀合物的组合物以治疗有效量施用于患有癌症或肿瘤的患者,以治疗癌症或肿瘤。

[0188] 在实施方案中,可将蛋白质-活性剂缀合物(例如,抗体-药物缀合物)或包含该缀合物的组合物以有效量施用于患者,以治疗或预防病原体(病毒、细菌、真菌、寄生虫等)感染。这种方法包括在预防或治疗疾病或病症的情况下,将治疗量或预防量的足以治疗疾病或病症或其症状量的缀合物施用于哺乳动物的步骤。

[0189] 在一些实施方案中,蛋白质-活性剂缀合物或组合物可通过药学上可接受的盐或其溶剂化物的形式施用。在一些实施方案中,它可以与药学上可接受的载体、药学上可接受赋形剂,和/或药学上可接受的添加剂一起施用。药学有效量和药学上可接受的盐或溶剂化物、赋形剂和添加剂可使用标准方法来确定(Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药理学), Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition, 1990)。

[0190] 针对癌症或肿瘤的术语“治疗有效量”表示能够降低癌细胞数量、减小癌细胞尺寸、阻止癌细胞侵入外围系统或减少这种侵入、阻止细胞扩散至其他系统或减少这种扩散、阻止细胞生成和/或改善至少一个与癌症相关的症状的量。在癌症的治疗中,药物的效力可由肿瘤进展时间(TTP)和/或反应率(RR)来评价。

[0191] 针对病原体感染的术语“治疗有效量”表示能够预防、治疗或减轻感染相关症状的量。

[0192] 本文使用的术语“药学上可接受的盐”包括有机盐和无机盐。其实例包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、单宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐(即1,1'-亚甲基双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))。药学上可接受的盐可包括另一种分子(例如乙酸盐离子、琥珀酸盐离子或其它反荷离子等)。它也可包括至少一个带电荷的原子。它也可包括至少一个反荷离子。

[0193] 可用于本发明的化合物的药学上可接受的溶剂化物的示例性溶剂包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0194] 实施例

[0195] 下列实例用于说明本发明,但并不用于限制本发明。

[0196] 实施例1: Ab(M)-CAAX的制备

[0197] 1-1. 赫赛汀-CAAX的构建、表达和纯化

[0198] 修饰的赫赛汀抗体是由pNATABH::赫赛汀HC质粒或pNATABL::赫赛汀LC质粒通过使用标准重组DNA技术和PCR克隆方案产生的。重组质粒通过瞬时转染在HEK293E细胞系中表达。用蛋白质A柱层析分离和纯化抗体。

[0199] 赫赛汀-HC-GCVIM和赫赛汀-LC-GCVIM的构建

[0200] 使用标准PCR克隆方案产生修饰的赫赛汀抗体。一般而言,赫赛汀-HC-GCVIM和赫赛汀-LC-GCVIM质粒的构建是通过将编码CAAX基序(例如GCVIM、G₅CVIM、G₇CVIM、G₁₀CVIM或

G₁₀CVLL)的DNA序列插入在pNATABH::赫赛汀HC或pNATABH::赫赛汀LC质粒中编码的重链或轻链的C-末端来进行。

[0201] 例如, SacII识别序列存在于人类IgG1-Fc区的C-末端的氨基酸172处。因此, 将正向引物设计为结合Fc区的SacII位点。将待插入的DNA序列(例如15-mer编码GCVIM5-mer序列)添加至对Fc-C-末端具有特异性的反向引物。正向引物和反向引物用于扩增PCR产物, 获得的产物使用PCR纯化试剂盒来纯化。由于反向引物含有XhoI位点, 因此用SacII和XhoI消化PCR产物。同样, pNATABH::赫赛汀HC质粒用SacII和XhoI消化。消化的主链通过凝胶纯化试剂盒纯化并与消化的PCR产物连接。通过适当地调整载体和插入物的比例来进行连接, 并且将连接产物转入用于筛选的感受态细菌细胞(competent bacterial cell)中。赫赛汀-HC-GCVIM和赫赛汀-LC-GCVIM质粒由测序的克隆制备。

[0202] 图1-10中示出了来自获得的质粒的氨基酸序列。以下的1-4和1-7部分提供了每个构建体的详细说明。

[0203] 赫赛汀-HC-GCVIM和赫赛汀-LC-GCVIM的表达和纯化

[0204] 在150mm的板(#430599, Corning USA)上将HEK293E细胞培养于DMEM/10%FBS培养基中, 直到达到70~80%的汇合。使13μg DNA和26μg PEI(#23966, Polysciences, USA)以1:2的比例混合, 在室温下孵育约20分钟, 然后添加到HEK193E细胞。16-20小时后, 用无血清培养基(无FBS DMEM(#SH30243.01, Hyclone Thermo., USA))替换培养基, 每2或3天收集上清液。

[0205] 用0.22μm的过滤器(top-filter, #PR02890, Millipore, USA)过滤上清液, 然后与包覆在5mL柱中的500μl蛋白A珠(#17-1279-03, GEhealthcare, Sweden)结合。在4℃下, 利用蠕动泵以0.9mL/min的速率进行隔夜结合。用100mL或更多的PBS(#70011, Gibco, USA)洗涤柱子。用0.1M甘氨酸-盐酸(#G7126, Sigma, USA)将结合的蛋白洗提成6份, 并用1M Tris(#T-1503, Sigma, USA)(pH9.0)中和。对蛋白质定量。收集含蛋白质的2份或3份, 并用超滤器(Amicon Ultra filter unit, #UFC805024, Millipore, USA)进行浓缩。用1x PBS(#70011, Gibco, USA)更换10次缓冲液。用蛋白质印迹(Western blot)确定蛋白质产物为赫赛汀HC-GCVIM或赫赛汀-LC-GCVIM。为确定含赫赛汀的蛋白质带, 使用了免疫纯(ImmunoPure)过氧化酶缀合的山羊抗人类IgG Fc(#31413, Pierce, USA)。纯化后, 从1L的细胞培养基中获得1-2mg的赫赛汀-HC-GCVIM或赫赛汀-LC-GCVIM。

[0206] 还使用安捷伦(Agilent)生物分析仪对赫赛汀-HC-GCVIM和赫赛汀-LC-GCVIM进行分析。简而言之, 使用安捷伦蛋白试剂盒(Agilent Protein230Kit, 5067-1515 Agilent Technologies, USA)对8μl纯化蛋白样品(约1mg/ml)进行分析。将蛋白样品分成两份(每份4μl)。每份样品中加入2μl非还原性缓冲液或还原性缓冲液。样品在95-100℃下加热5分钟, 再用冰冷却至4℃。旋转沉降后, 在样品和序列梯(ladder)中加入84μl去离子水, 并进行振荡。随后, 根据用户手册装载样品并用试剂盒进行分析。

[0207] 1-2. 抗cMET-CAAX的构建、表达和纯化

[0208] 修饰的抗cMET-CAAX抗体也通过上述方法制备。例如, 使用标准重组DNA技术和PCR克隆方案用pPMC-C1A5质粒产生修饰的抗cMET-CAAX抗体。通过瞬时感染在HEK293T细胞系中表达重组的质粒。通过蛋白质A柱层析分离和纯化抗体。

[0209] 1-3. 赫赛汀-HC-G_nCVIM

[0210] 制备赫赛汀-HC-GCVIM、赫赛汀-HC-G₅CVIM、赫赛汀-HC-G₇CVIM和赫赛汀-HC-G₁₀CVIM抗体。这些抗体在其重链(图1、3、5和7)的C-末端分别具有5-mer (GCVIM)、9-mer (G₅CVIM)、11-mer (G₇CVIM) 或14-mer (G₁₀CVIM) 序列。

[0211] 1-4. 赫赛汀-LC-G_nCVIM

[0212] 制备赫赛汀-LC-GCVIM、赫赛汀-LC-G₅CVIM、赫赛汀-LC-G₇CVIM和赫赛汀-LC-G₁₀CVIM抗体。这些抗体在其轻链(图2、4、6和8)的C-末端分别具有5-mer (GCVIM)、9-mer (G₅CVIM)、11-mer (G₇CVIM) 或14-mer (G₁₀CVIM) 序列。

[0213] 1-5. 赫赛汀-HC-G₁₀CVLL

[0214] 制备赫赛汀-HC-G₁₀CVLL抗体。抗体在其重链(图9)的C-末端具有14-mer (G₁₀CVLL) 序列。

[0215] 1-6. 赫赛汀-LC-G₁₀CVLL

[0216] 制备赫赛汀-LC-G₁₀CVLL抗体。抗体在其轻链(图10)的C-末端具有14-mer (G₁₀CVLL) 序列。

[0217] 1-7. 抗cMET-HC-G_nCVIM

[0218] 制备抗cMET-HC-G₇CVIM和抗cMET-HC-G₁₀CVIM抗体。这些抗体在其重链(未示出)的C-末端分别具有11-mer (G₇CVIM) 或14-mer (G₁₀CVIM) 序列。图11示出了对抗cMET-HC-G₇CVIM和抗cMET-HC-G₁₀CVIM抗体的SDS-PAGE凝胶分析。

[0219] 1-8. 抗cMET-LC-G_nCVIM

[0220] 制备抗cMET-LC-G₇CVIM和抗cMET-LC-G₁₀CVIM抗体。这些抗体在其轻链(未示出)的C-末端分别具有11-mer (G₇CVIM) 或14-mer (G₁₀CVIM) 序列。图11示出了对抗cMET-LC-G₇CVIM和抗cMET-LC-G₁₀CVIM抗体的SDS-PAGE凝胶分析。

[0221] 实施例2: AB (M) -CAAX的功能化

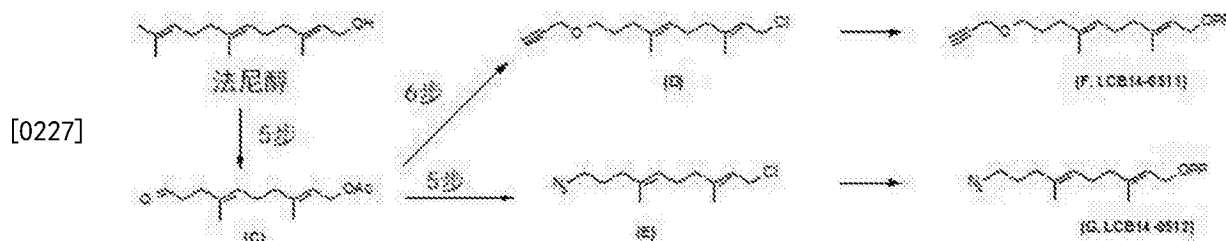
[0222] 2-1. 香叶基炔二磷酸(B, LCB14-0501)



[0224] 通过与ChembioChem207, 8, 98-105中描述的方法类似的方法, 以香叶醇作为起始原料经6步制备上述化合物, 该文献的内容通过引用并入本文。

[0225] (B) ¹H NMR (600MHz, D₂O) δ5.38 (t, J=7.8Hz, 1H), 5.30 (t, J=7.8Hz, 1H), 4.31 (brs, 2H), 3.96 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 2.70 (bs, 1H), 2.07 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.56 (s, 3H), 1.48 (s, 3H)

[0226] 2-2. 癸二烯炔丙基醚二磷酸酯(Decadienyl propargyl ether diphosphate) (F, LCB14-0511) 和癸二烯叠氮二磷酸酯(decadienyl azide diphosphate) (G, LCB14-0512)



[0228] 由法尼醇(farnesol)经5步制备乙酰氧基癸二烯醛(C)。从化合物(C)分别经6步和

5步制备化合物(D)和(E)。用与上面2-1部分中描述的方法类似的方法,由化合物(D)和(E)制备上述化合物(F)和(G)。化合物(C)、(D)和(E)通过与JOC2007,72(24),9291-9297中描述的方法类似的方法制备,该文献的内容通过引用并入本文。

[0229] (F): ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 5.44 (t, J=6Hz, 1H), 5.22 (t, J=6Hz, 1H), 4.46 (t, J=8.4Hz, 2H), 4.16 (t, J=2.4Hz, 2H), 3.55 (m, 2H), 2.85 (m, 1H), 2.15 (m, 2H), 2.09 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.03 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.70~1.65 (m, 5H), 1.60 (s, 3H)

[0230] (G): ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 5.43 (t, J=6.6Hz, 1H), 5.23 (t, J=6.6Hz, 1H), 4.40 (t, J=6Hz, 2H), 3.26 (t, J=6.0Hz, 2H), 2.15 (m, 2H), 2.10~2.04 (m, 4H), 1.70~1.65 (m, 5H), 1.60 (s, 3H)

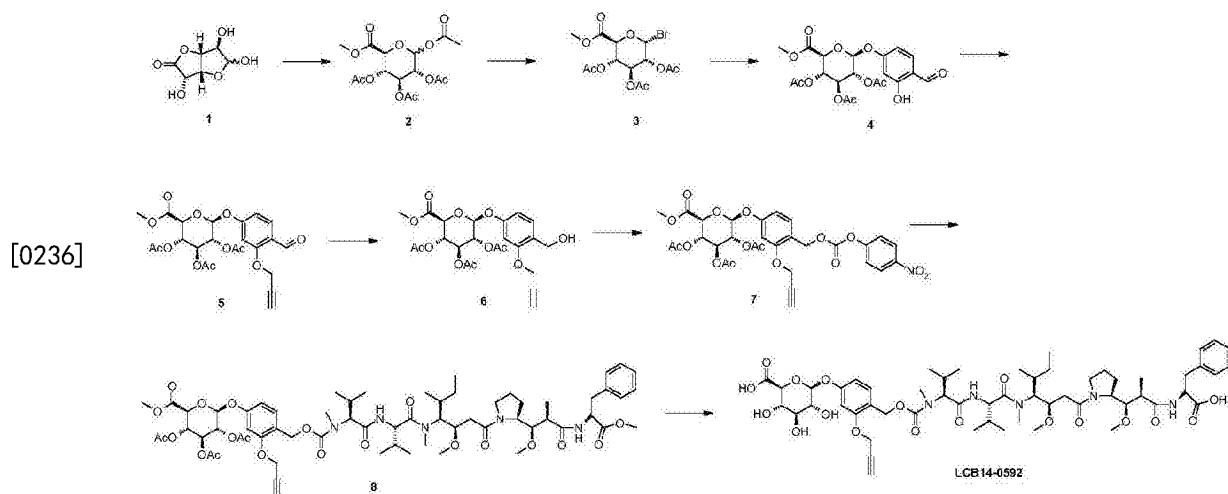
[0231] 2-3.NBD-GPP

[0232] 用与JACS2006,128,2822-2835中描述的方法类似的方法制备三铵[3,7-二甲基-8-(7-硝基-苯并[1,2,5]噁二唑-4-基氨基)-辛-2,6-二烯-1]焦磷酸酯(Tris-ammonium[3,7-dimethyl-8-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ylamino)-octa-2,6-diene-1]pyrophosphate, NBD-GPP), 该文献的内容通过引用并入本文。



[0234] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 8.51 (d, J=9Hz, 1H), 6.37 (d, J=9Hz, 1H), 5.50 (t, J=6.6Hz, 1H), 5.42 (t, J=6.6Hz, 1H), 4.43 (t, J=6.6Hz, 2H), 4.08 (s, 2H), 2.22 (m, 2H), 2.10 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.69 (s, 6H)

[0235] 2-4. 葡萄糖苷酸接头-MMAF (LCB14-0592)



[0237] 化合物2

[0238] 在氮气环境下向D-葡萄糖醛酸-6,3-内酯(19g,107.88mmol)的甲醇(250mL)溶液缓慢加入NaOH(100mg)的甲醇(100mL)溶液。将获得的混合物搅拌2小时。加入NaOH(200mg)的甲醇(15mL)溶液。将获得物搅拌3小时。在减压条件下除去甲醇。在10℃或更低的温度下,依次加入吡啶(50mL)和无水醋酸(Ac_2O , 54mL)。获得的混合物在室温下搅拌4小时。反应完全后,在减压条件下浓缩获得的混合物,经过柱层析后获得固体化合物2(20g, 50%)。

[0239] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.77 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 5.31 (t, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 5.24 (t, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.17 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.04 (m, 9H)

[0240] 化合物3

[0241] 在0℃下将化合物2 (5g, 13.28mmol) 加入33% HBr 的 AcOH (20mL) 溶液中。室温下将获得的混合物搅拌2小时。反应完全后, 用甲苯 (50mL) 稀释获得的混合物。在减压条件下浓缩获得的混合物。加入乙酸乙酯 (100mL) 和饱和 NaHCO_3 溶液 (100mL), 以萃取有机层。用无水硫酸钠干燥所得有机层, 得到化合物3 (5.27g, 100%)。

[0242] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 6.64 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 5.61 (t, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 5.24 (t, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 4.85 (m, 1H), 4.58 (d, $J=10.2\text{Hz}$, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)

[0243] 化合物4

[0244] 用分子筛 (5g) 和 Ag_2O (9.33g, 40.28mmol) 依次处理化合物3 (4g, 10.07mmol) 和二羟基苯甲醛 (1.67g, 12.084mmol) 溶于乙腈 (30mL) 的溶液。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后, 过滤掉固体, 并在减压条件下浓缩滤液。残余物经过柱层析后, 获得化合物4 (2g, 43.5%)。

[0245] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 11.38 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 7.48 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.61 (dd, $J=8.4, 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.53 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 5.36~5.25 (m, 4H), 4.23 (m, 1H), 3.73 (s, 1H), 2.06 (s, 9H)

[0246] 化合物5

[0247] 用碳酸钾 (760mg, 5.50mmol) 和80%炔丙基溴的甲苯 (735 μL , 6.60mmol) 溶液对化合物4 (1g, 2.20mmol) 的丙酮 (10mL) 溶液进行处理。获得的混合物在45℃下搅拌12小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩。残余物经过柱层析后, 得到化合物5 (930mg, 87%)。

[0248] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 10.33 (s, 1H), 7.83 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), 6.75 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.67 (dd, $J=9, 1.8\text{Hz}$, 1H), 5.39~5.34 (m, 2H), 5.31~5.26 (m, 2H), 4.79 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 4.23 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.59 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)

[0249] 化合物6

[0250] 用硅胶 (5g) 和 NaBH_4 (178mg, 4.79mmol) 依次处理化合物5 (930mg, 1.88mmol) 的异丙醇 (2mL) 和氯仿 (10mL) 溶液。将获得的混合物搅拌3小时。反应完全后, 过滤掉硅胶。用二氯甲烷 (100mL) 和蒸馏水 (100mL) 萃取反应混合物, 用无水硫酸钠干燥后, 在真空中浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物6 (610mg, 65%)。

[0251] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.23 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.72 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.61 (dd, $J=8.4, 2.4\text{Hz}$, 1H), 5.35~5.32 (m, 2H), 5.27 (m, 1H), 5.13 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 4.72 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 4.63 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H)

[0252] 化合物7

[0253] 用二(4-硝基苯)碳酸酯 (308mg, 1.00mmol) 和二异丙基乙胺 (DIPEA, 132 μL , 0.75mmol) 处理化合物6 (250mg, 0.50mmol) 在二氯甲烷 (0.5mL) 中的溶液。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后, 在减压条件下浓缩反应混合物。残余物经过柱层析后, 获得化合物7 (310mg, 94%)。

[0254] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.26 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7.37 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7.34 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.77 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.64 (dd, 7.8, 2.4Hz, 1H), 5.37~5.33 (m, 2H), 5.30~5.27 (m, 3H), 5.17 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 4.74 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 4.18 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.54 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H)

[0255] 化合物8

[0256] 向化合物7 (150mg, 0.227mmol)、MMAF-OMe (169.6mg, 0.227mmol) 和无水1-羟基苯并三唑 (HOBT, 6.2mg, 0.0454mmol) 于二甲基甲酰胺 (3mL) 的溶液中加入吡啶 (0.8mL) 和二异丙基乙胺 (40 μL , 0.227mmol)。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物8 (146mg, 50%)。

[0257] EI-MS m/z : 1067 (M^+)

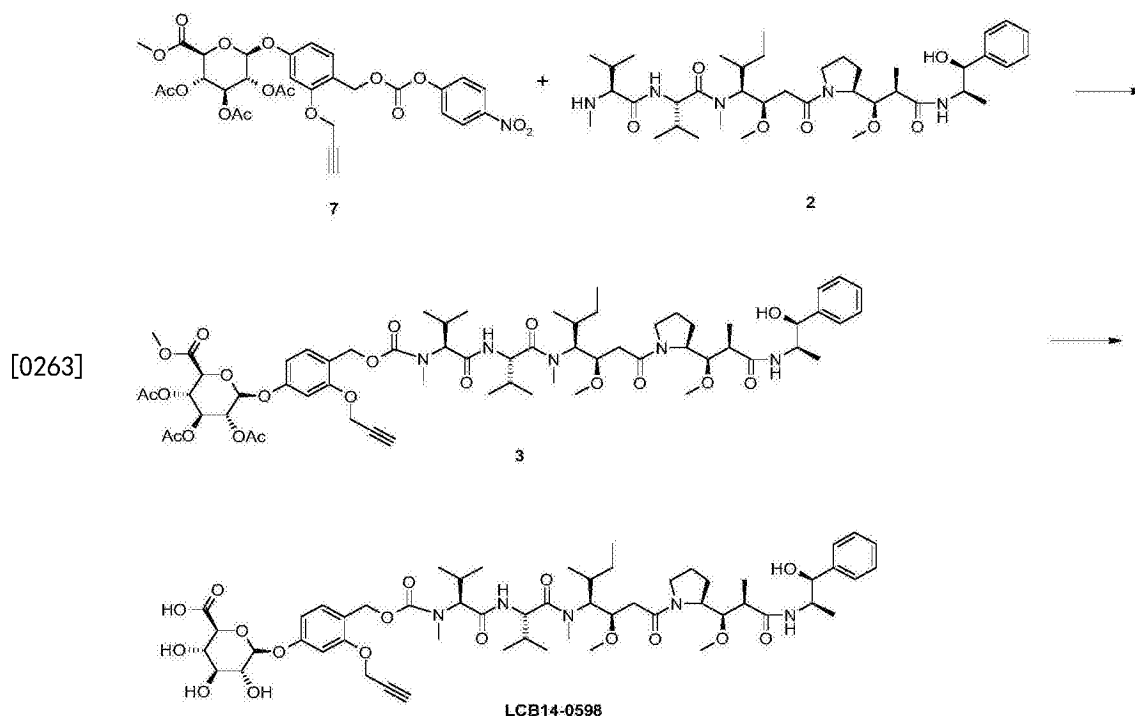
[0258] 根据US61/483,698、ChemPharmBull, 1995, 43 (10), 1706-1718、US7423116、US7498298和W02002/088172中所述的方法制备MMAF-OMe, 以上文献的全部内容通过引用并入本文。

[0259] LCB14-0592

[0260] 在0 $^\circ\text{C}$ 下用 LiBH_4 (28.2mg, 0.670mmol) 在蒸馏水 (1mL) 中的溶液处理化合物8 (85mg, 0.067mmol) 的甲醇 (2mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后, 在减压条件下除去甲醇。将残余物溶解于蒸馏水 (50mL) 中并用醋酸酸化至pH=3。反应混合物用二氯甲烷 (3x50mL) 萃取3次。在减压条件下浓缩合并的有机层而得到固体, 用乙醚 (50mL) 洗涤该固体, 得到化合物LCB14-0592 (62mg, 83%)。

[0261] EI-MS m/z : 1112 (M^+)

[0262] 2-5. 葡萄糖苷酸接头-MMAE (LCB14-0598)



[0264] 化合物3

[0265] 用吡啶 (0.8mL) 和二异丙基乙胺 (40 μL , 0.227mmol) 处理实例2-4的化合物7

(150mg, 0.227mmol)、MMAE (163mg, 0.227mmol; ChemPharmBull, 1995, 43 (10), 1706-1718, US7423116, W02002/088172) 和无水1-羟基苯并三唑 (HOBt, 6.2mg, 0.0454mmol) 在二甲基甲酰胺 (3mL) 中的溶液。获得的混合物在室温下搅拌24小时。反应完全后, 用乙酸乙酯 (100mL)、0.5N HCl (10mL) 和蒸馏水 (100mL) 稀释获得的混合物。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物3 (30mg, 10%)。

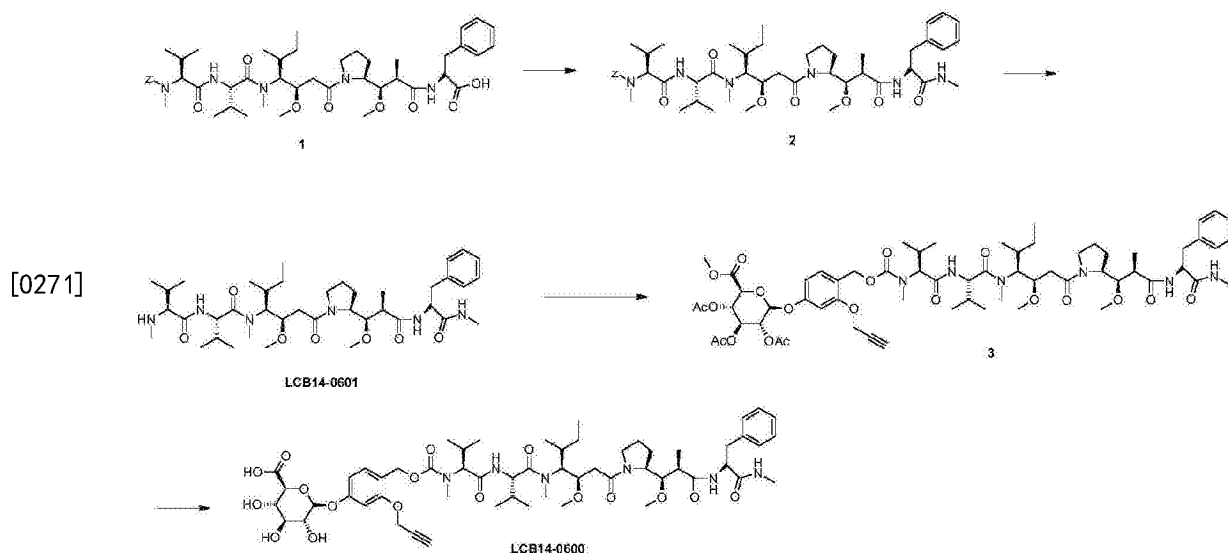
[0266] EI-MS m/z : 1238 (M^+)

[0267] LCB14-0598

[0268] 在0℃下用LiOH (10mg, 0.24mmol) 的蒸馏水 (0.5mL) 溶液处理化合物3 (30mg, 0.024mmol) 的甲醇 (3mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后, 在减压条件下除去有机溶剂。用蒸馏水 (50mL) 稀释获得的产物, 并用0.5N HCl酸化为pH=3。用二氯甲烷 (50mL) 萃取, 然后在减压条件下浓缩得到化合物LCB14-0598 (21mg, 79%)。

[0269] EI-MS m/z : 1098 (M^+)

[0270] 2-6. 葡萄糖苷酸接头-MMAF-甲酰胺 (LCB14-0600)



[0272] 化合物2

[0273] 用甲胺盐酸盐 (130mg, 1.932mmol)、氰代磷酸二乙酯 (DEPC, 144mg, 0.966mmol) 和三乙胺 (270μL, 1.932mmol) 处理化合物1 (Z-MMAF, 558mg, 0.644mmol, ChemPharmBull, 1995, 43 (10), 1706-1718) 溶于二甲基甲酰胺 (5mL) 的溶液。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物2 (490mg, 86%)。

[0274] EI-MS m/z : 879 (M^+)

[0275] LCB14-0601 (MMAF-甲酰胺)

[0276] 将化合物2 (470mg, 0.53mM) 溶解在叔丁醇 (tBuOH, 8mL) 和蒸馏水 (0.8mL) 中。在0℃下, 加入10%Pd/C (50mg)。将获得的混合物在H₂气中搅拌2小时。反应完全后, 用塞力特硅藻土过滤掉Pd/C。将获得的过滤后的溶液在减压条件下浓缩而得到化合物LCB14-0601 (340mg, 85%)。

[0277] EI-MS m/z : 745 (M^+)

[0278] 化合物3

[0279] 用吡啶 (0.8mL) 和二异丙基乙胺 (DIPEA, 35 μ L, 0.20mmol) 处理实例2-4的化合物7 (133mg, 0.20mmol)、LCB14-601 (150mg, 0.20mmol) 和无水1-羟基苯并三唑 (HOBt 5.44mg, 0.04mmol) 溶于二甲胺 (3mL) 的溶液。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (100mL) 和0.5N HCl溶液 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物3 (123mg, 48%)。

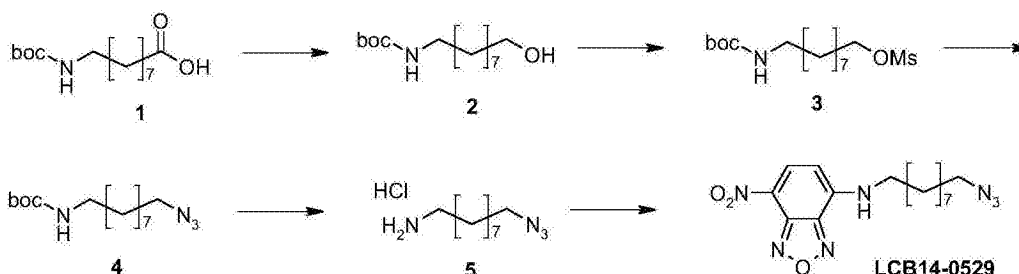
[0280] EI-MS m/z : 1265 (M^+)

[0281] LCB14-0600 (葡糖苷酸接头-MMAF-甲酰胺)

[0282] 在0℃下用LiOH (20mg, 0.47mmol) 溶于蒸馏水 (0.5mL) 的溶液处理化合物3 (60mg, 0.047mmol) 的甲醇 (3mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌2小时。反应完全后, 在减压条件下除去有机溶剂。用蒸馏水 (50mL) 稀释残余物, 并用0.5N HCl酸化为pH=3。用二氯甲烷 (50mL) 萃取, 然后在减压条件下浓缩而得到化合物LCB14-0600 (25mg, 47%)。

[0283] EI-MS m/z : 1125 (M^+)

[0284] 2-7. 叠氮化物-接头-NBD: LCB14-0529



[0286] 化合物2

[0287] 在-15℃下于氮气环境中用氯甲酸异丁酯 (1.8mL, 13.94mmol) 缓慢处理化合物1 (4g, 12.67mmol) 和N-甲基吗啉 (1.6mL, 14.57mmol) 溶于四氢呋喃 (30mL) 的溶液。获得的混合物在同样温度下搅拌30分钟。在-78℃和高效搅拌下, 将获得的混合物缓慢过滤并加入到硼氢化钠 (959mg, 25.34mmol) 的四氢呋喃/甲醇 (36mL/12mL) 溶液中。将反应物缓慢温热至室温, 同时搅拌2小时。反应完全后, 加入乙酸 (4mL) 并搅拌15分钟。加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 得到化合物2 (3.69g, 96.5%)。

[0288] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.50 (s, 1H), 3.64 (q, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.56 (m, 2H), 1.44 (m, 11H), 1.29 (m, 10H)

[0289] 化合物3

[0290] 在0℃下于氮气环境中用甲基磺酸酐 (363mg, 2.07mmol) 缓慢处理化合物2 (450mg, 1.73mmol) 和N-甲基吗啉 (381 μ L, 3.46mmol) 溶于四氢呋喃 (5mL) 的溶液。将获得的混合物缓慢温热至室温, 同时搅拌1小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得呈白色固体的化合物3 (520mg, 89%)。

[0291] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.50 (s, 1H), 4.22 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 3.11 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 1.74 (m, 2H), 1.44-1.36 (m, 13H), 1.29 (m, 8H)

[0292] 化合物4

[0293] 在氮气环境中用叠氮化钠 (120mg, 1.85mmol) 处理化合物3 (520mg, 1.54mmol) 溶于

二甲基甲酰胺 (5mL) 的溶液, 并将获得的混合物在70℃下搅拌3小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩, 得到液态的化合物4 (430mg, 98%)。

[0294] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.49 (s, 1H), 3.26 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 3.09–3.12 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.44 (m, 11H), 1.33 (m, 10H)。

[0295] 化合物5

[0296] 在0℃和氮气环境下用4M-HCl的1,4-二氧己环溶液处理化合物4 (430mg, 1.51mmol) 的二氯甲烷 (6mL) 溶液。将获得的混合物搅拌3小时, 并在减压条件下浓缩, 得到化合物5 (330mg, 99%)。

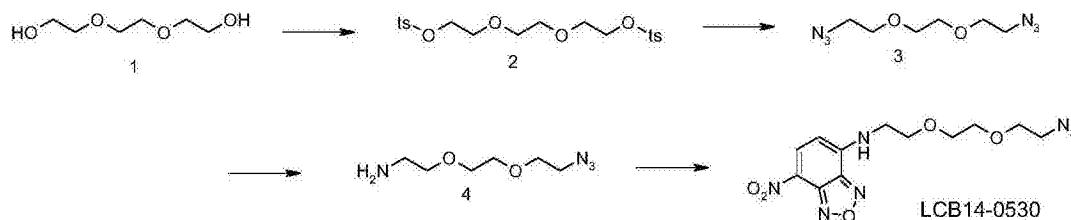
[0297] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.29 (s, 2H), 3.26 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 2.98 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.31–1.39 (m, 10H)

[0298] LCB14-0529

[0299] 用4-氯代-7-硝基苯并呋喃 (442mg, 2.20mmol) 处理化合物5 (326mg, 1.47mmol) 溶于乙腈和25mmol碳酸氢钠的混合溶剂 (10mL) 的溶液。获得的混合物在室温下搅拌3小时。加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 得到化合物LCB14-0529 (250mg, 49%)。

[0300] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.48 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.16 (d, 8.4Hz, 1H), 3.47 (q, 6.6Hz, 2H), 3.24 (t, 6.9Hz, 2H), 1.79 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.42–1.48 (m, 2H), 1.20–1.37 (m, 8H)

[0301] 2-8. 叠氮化物-接头-NBD: LCB14-0530



[0302]

[0303] 化合物2

[0304] 在0℃和氮气环境下用对甲苯磺酰氯 (13.96g, 73.24mmol) 和氢氧化钾 (8.96g, 159.79mmol) 处理三(乙烯基)乙二醇 (5g, 33.29mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液。获得的混合物在0℃下搅拌3小时。加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得呈白色固体的化合物2 (13.2g, 86.5%)。

[0305] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.79 (m, 4H), 7.35 (m, 4H), 4.14 (m, 4H), 3.65 (m, 4H), 3.53 (s, 4H), 2.44 (s, 6H)

[0306] 化合物3

[0307] 在氮气环境下用叠氮化钠 (1.6g, 24.52mmol) 处理化合物2 (4.5g, 9.81mmol) 的二甲基甲酰胺 (20mL) 溶液。获得的混合物在65℃下搅拌10小时。加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 得到化合物3 (1.96g, 99%)。

[0308] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 3.68–3.66 (m, 8H), 3.37 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 4H)

[0309] 化合物4

[0310] 将三苯基膦 (655mg, 2.49mmol) 的乙醚 (3.5mL) 溶液在5分钟内缓慢加入化合物3 (500mg, 2.49mmol) 溶于6.6mL乙醚、四氢呋喃和1N HCl的混合溶剂 (V:V:V=3:0.6:3) 中。获得的混合物在室温下搅拌5小时。获得的混合物用乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL) 稀释, 并用1N NaOH溶液中和。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物4 (370mg, 85%)。

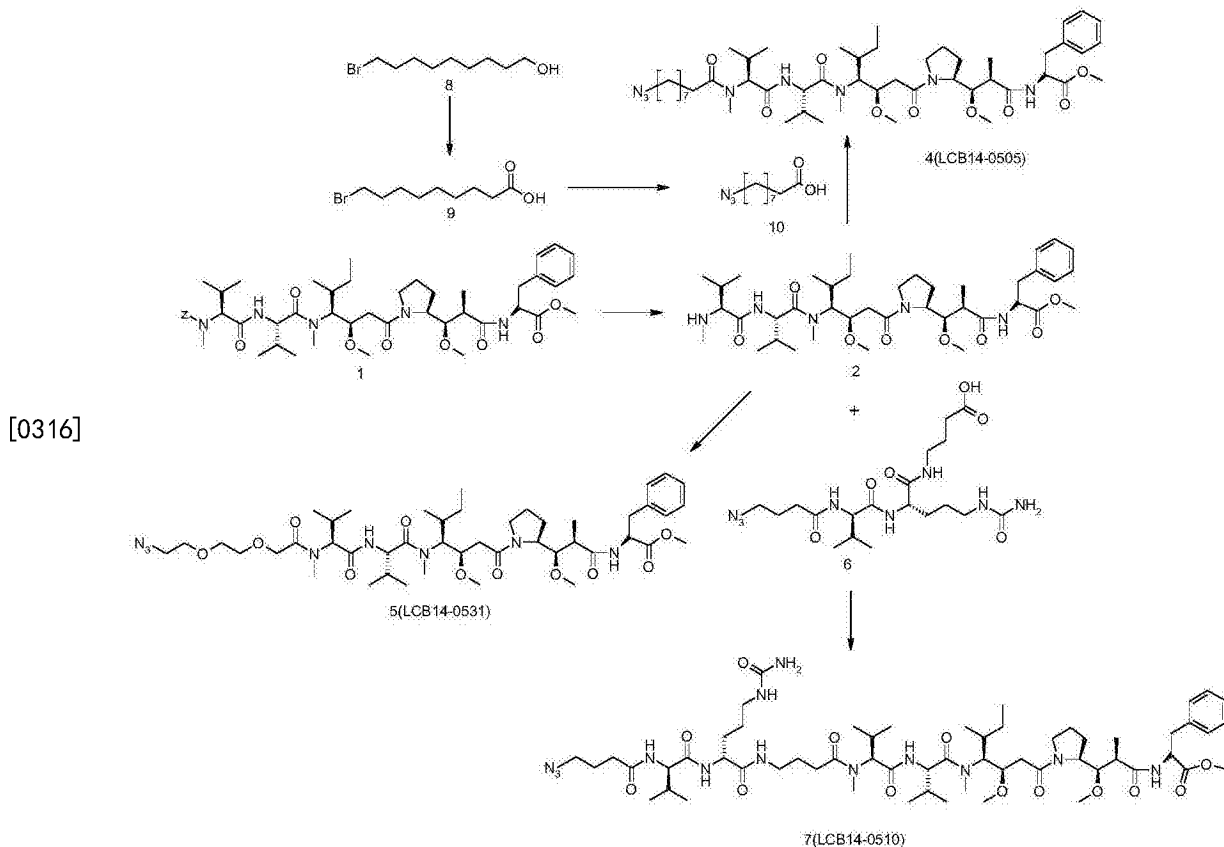
[0311] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 3.69–3.63 (m, 6H), 3.52 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 2H), 3.40 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 2.87 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 2H)

[0312] LCB14-0530

[0313] 依次用三乙胺 (320 μL , 2.28mmol) 和4-氯代-7-硝基苯并呋喃 (442mg, 2.20mmol) 的四氢呋喃 (1mL) 溶液处理化合物4 (200mg, 1.14mmol) 的四氢呋喃 (4mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌1小时。加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物LCB14-0530 (305mg, 78.8%)。

[0314] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.47 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.17 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 3.86 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.66–3.73 (m, 8H), 3.41 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H)

[0315] 2-9. 叠氮化物-接头-药物: LCB14-0505、-0531和-0510



[0317] 化合物2

[0318] 参考ChemPharmBull, 1995, 43 (10), 1706–1718中描述的方法制备化合物1, 该文献的全部容通过引用并入本文。将化合物1 (0.50g, 0.57mmol) 在叔丁醇 (6mL) 和水 (0.6mL) 中的溶液与Pd/C (6mg, 0.06mmol) 在氮气环境下搅拌4小时。反应物的溶液通过塞力特硅藻土的板来过滤, 滤液在减压条件下浓缩, 得到呈白色固体的化合物2 (0.42g)。

[0319] EI-MS m/z : 747 (M^+)

[0320] 化合物9

[0321] 在0℃下将三氧化铬(VI) (CrO_3 , 7g, 0.07mol) 溶于蒸馏水(10mL) 中。向该溶液中依次加入18M- H_2SO_4 (6.1mL, 0.11mol) 和蒸馏水(20mL)。将获得的混合物搅拌5分钟(=琼斯试剂)。在-5℃下用琼斯试剂(18mL) 缓慢处理9-溴代-1-壬醇(5g, 22.4mmol) 的丙酮(250mL) 溶液。室温下将获得的混合物搅拌3小时后, 过滤掉绿色固体, 并浓缩滤液。残余物用乙醚(100mL) 和水(50mL) 进行萃取。用无水 Na_2SO_4 干燥有机萃取液, 过滤, 并在真空下浓缩。残余物经过快速柱层析后, 获得化合物9(4.95g, 93%)。

[0322] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 3.40 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.35 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.41 (m, 2H), 1.32 (m, 6H)

[0323] 化合物10

[0324] 用叠氮化钠(1.64g, 25.29mmol) 处理化合物9(4g, 16.86mmol) 的N,N-二甲基甲酰胺(15mL) 溶液。在搅拌下将获得的混合物加热至80℃并持续6小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯(100mL) 和蒸馏水(100mL)。分离所得有机层, 用无水 Na_2SO_4 进行干燥, 过滤, 并在真空下浓缩。残余物经过快速柱层析后, 获得化合物10(3.3g, 98%)。

[0325] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 3.26 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.35 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 1.64~1.57 (m, 4H), 1.35~1.32 (m, 8H)

[0326] LCB14-0505

[0327] 在0℃下, 用DIPEA(0.06mL, 0.32mmol) 和PyBOP(0.15g, 0.28mmol) 处理化合物2(0.16g, 0.21mmol) 和9-叠氨基-壬酸(10)(47mg, 0.24mmol) 溶于二氯甲烷(3mL) 的溶液。将获得的混合物搅拌3小时。获得的混合物用二氯甲烷(100mL) 和水(20mL) 进行萃取。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后, 获得呈白色固体的化合物LCB14-0505(0.12g, 59%)。

[0328] EI-MS m/z : 928 (M^+)

[0329] LCB14-0531

[0330] 用与上述方法类似的方法制备化合物LCB14-0531(65%)。

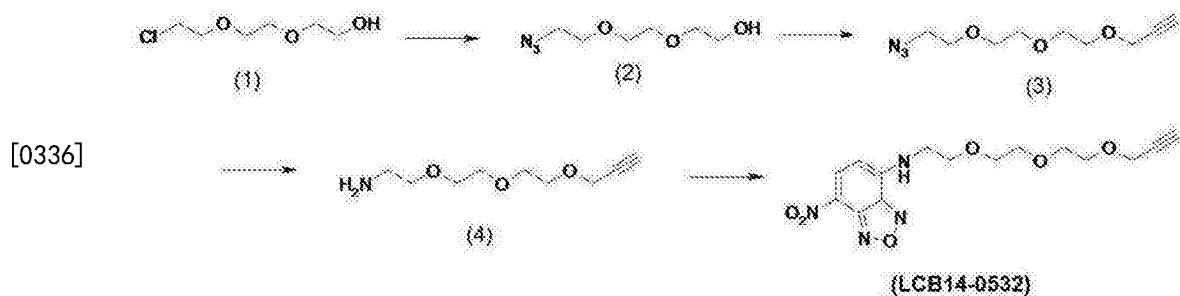
[0331] EI-MS m/z : 917 (M^+)

[0332] LCB14-0510

[0333] 使用BioconjugateChem. 2002, 13, 855-869和US2005238649中描述的方法制备化合物6, 这些参考文献的内容通过引用并入本文。在0℃下用DIPEA(0.04mL, 0.2mmol) 和PyBOP(0.09g, 0.17mmol) 处理化合物6(69mg, 0.15mmol) 和化合物2(100mg, 0.13mmol) 溶于DMF(2mL) 的溶液。将获得的混合物搅拌3小时。用乙酸乙酯(100mL) 和水(30mL) 萃取有机层, 在减压条件下对其进行浓缩。残余物与二氯甲烷和甲醇一起经过柱层析后, 获得呈褐色固体的化合物LCB14-0510(94mg, 64%)。

[0334] EI-MS m/z : 1199 (M^+)

[0335] 2-10. 乙炔-接头-NBD: LCB14-0532



[0337] 化合物2

[0338] 在氮气环境下用叠氮化钠 (578mg, 8.89mmol) 处理化合物1 (1g, 5.93mmol) 溶于 10mL 二甲基甲酰胺的溶液。获得的混合物在 80℃ 下搅拌 3 小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩, 得到化合物2 (1.03g, 99%)。

[0339] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 3.75 (m, 2H), 3.69 (m, 6H), 3.62 (m, 2H), 3.41 (t, $J=3.5\text{Hz}$, 2H), 2.30 (m, 1H)

[0340] 化合物3

[0341] 在 0℃ 下向氢化钠 (55% 于矿物油中, 250mg, 5.7mmol) 在四氢呋喃 (10mL) 中的悬浮液加入化合物2 (500mg, 2.85mmol) 的四氢呋喃 (5mL) 溶液。将获得的混合物搅拌 1 小时。然后将获得的混合物温热至室温, 并搅拌 2 小时。加入溴丙炔 (80% 甲苯溶液, 800 μ l, 7.12mmol), 获得的混合物在室温下搅拌 12 小时。加入氯化铵溶液 (20mL) 和乙醚 (30mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩, 得到化合物3 (530mg, 86.6%)。

[0342] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.21 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 3.66–3.72 (m, 10H), 3.39 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 2H), 2.43 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H)

[0343] 化合物4

[0344] 用三苯基膦 (461mg, 1.75mmol) 的四氢呋喃 (1mL) 溶液在五分钟内缓慢处理化合物 3 (250mg, 1.17mmol) 溶于 3mL 的四氢呋喃和蒸馏水的混合溶液 (V:V=2:1) 的溶液。在室温下搅拌获得的混合物。反应完全后, 加入乙醚 (30mL) 和蒸馏水 (30mL)。用 1N HCl 酸化获得的混合物, 并分离掉有机层。用二氯甲烷 (50mL) 稀释含水层并用 1N NaOH 溶液中和。分离所得有机层, 用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩, 得到亮黄色的化合物4 (200mg, 91.3%)。

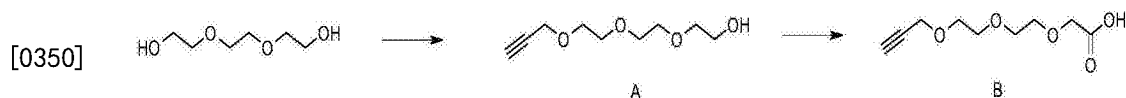
[0345] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 4.18 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 3.59–3.69 (m, 8H), 3.48 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 2H), 2.84 (s, 2H), 2.40 (m, 1H)

[0346] LCB14-0532

[0347] 用三乙胺 (290 μ L, 2.08mmol) 处理化合物4 (195mg, 1.04mmol) 的四氢呋喃 (4mL) 溶液。加入 4-氯代-7-硝基苯并呋喃 (270mg, 1.35mmol) 的四氢呋喃 (1mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌 1 小时。加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压条件下浓缩, 得到化合物 LCB14-0532 (280mg, 77%)。

[0348] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.50 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.19 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 4.19 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 3.89 (t, $J=5.1\text{Hz}$, 2H), 3.68–3.75 (m, 10H), 2.41 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H)

[0349] 2-11. 乙炔基-接头-MMAF-OMe (LCB14-0536)



[0351] 化合物A

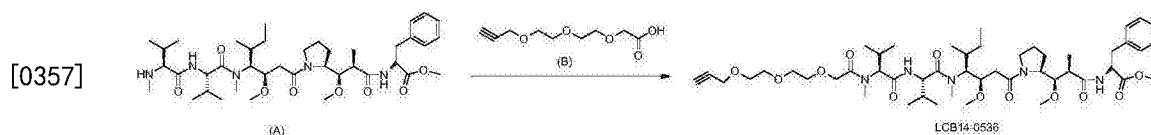
[0352] 在0℃和氮气环境下向NaH(55%于矿物油中,390mg,16.25mmol)的四氢呋喃(10mL)悬浮液中缓慢加入三甘醇(4g,26.63mmol)的四氢呋喃(20mL)溶液。缓慢加入80%溴丙炔的甲苯溶液(1.97g,13.31mmol)。获得的混合物在同样温度下搅拌2小时。反应完全后,加入二氯甲烷(100mL)和水(100mL)。浓缩所得有机层,残余物经柱层析后,得到液态的化合物(A)(1g,43%)。

[0353] ^1H NMR(600MHz, CDCl_3) δ 4.21–4.20 (m, 2H), 3.74–3.66 (m, 10H), 3.62–3.61 (m, 2H), 2.43 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H)

[0354] 化合物B

[0355] 在-5℃和氮气环境下向化合物A(1g,5.31mmol)的丙酮溶液中缓慢加入5.3mL的琼斯试剂。将获得的混合物温热至室温,同时搅拌3h。反应完全后,加入乙酸乙酯(100mL)和水(100mL)。浓缩所得有机层,得到呈黄色液体的化合物(B)(886mg,82%)。

[0356] ^1H NMR(600MHz, CDCl_3) δ 4.21 (d, $J=2.4$, 2H), 4.18–4.17 (m, 2H), 3.78–3.77 (m, 2H), 3.74–3.70 (m, 6H), 2.44 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H)

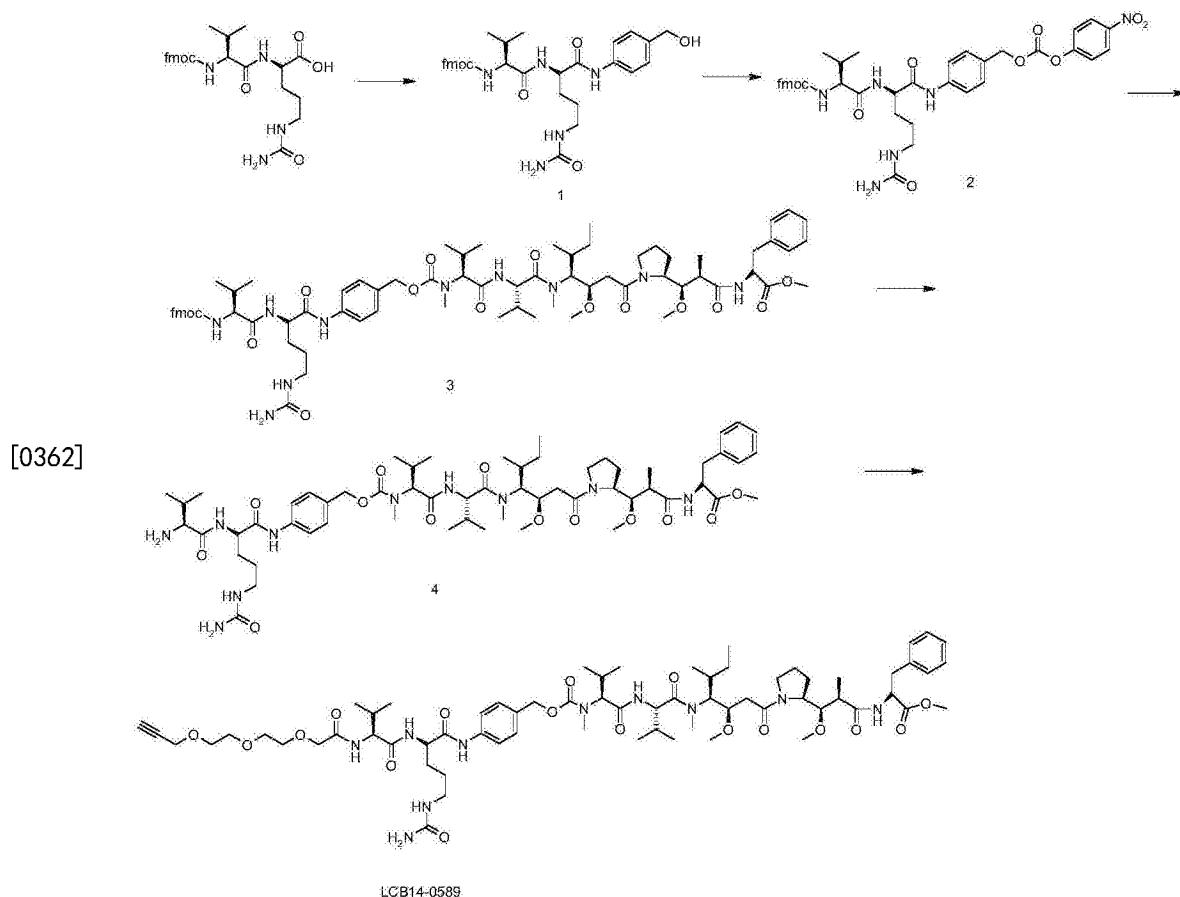


[0358] LCB14-0536

[0359] 在室温下向化合物(A)(MMAF-OMe,100mg,0.13mmol)的乙腈(2mL)溶液中加入化合物(B)(27mg,0.13mmol)、PyBOP(104mg,0.19mmol)和DIPEA(0.03mL,0.19mmol)。将获得的混合物搅拌12小时。反应完全后,加入乙酸乙酯(50mL)和水(20mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与二氯甲烷和甲醇一起经过柱层析后,获得呈黄色固体的化合物LCB14-0536(82mg,68%)。

[0360] EI-MS m/z :930 (M^+)

[0361] 2-12.乙炔-接头(肽序列)-MMAF-OMe(LCB14-0589)



[0363] 化合物1 (Fmoc-Val-Cit-PAB)

[0364] 根据W02007/008603中描述的方法制备Fmoc-Val-Cit-OH,该文献的全部内容通过引用并入本文。在氮气环境下向Fmoc-Val-Cit-OH (4.89g, 9.85mmol) 溶于二氯甲烷 (50mL) 和甲醇 (20mL) 的溶液中加入对氨基苯甲醇 (2.43g, 19.70mmol) 和1-乙氧羰基-2-乙氧基-1, 2-二氢喹啉 (1.98g, 19.7mmol)。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后,将溶剂浓缩。用乙醚洗涤获得的固体若干次,得到呈黄色固体的化合物1 (4.12g, 70%)。

[0365] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 10.00 (s, 1H), 8.12 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.89 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 7.75-7.72 (m, 2H), 7.55 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 7.44-7.41 (m, 2H), 7.33-7.31 (m, 2H), 7.23 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.02 (bs, 1H), 5.41-5.38 (m, 2H), 5.09 (bs, 1H), 4.42 (bs, 2H), 4.30-4.28 (m, 1H), 4.24-4.23 (m, 2H), 3.94-3.91 (m, 1H), 3.02-2.99 (m, 1H), 2.94-2.93 (m, 1H), 2.00-1.99 (m, 1H), 1.7 (bs, 1H), 1.60 (bs, 1H), 1.43 (bs, 1H), 1.36 (bs, 1H), 0.88-0.84 (m, 6H)

[0366] 化合物2 (Fmoc-Val-Cit-PABC-PNA)

[0367] 在氮气环境下,依次用二(4-硝基苯)碳酸酯 (2.02g, 6.64mmol) 和二异丙基乙胺 (0.647mL, 4.98mmol) 处理化合物1 (2g, 3.32mmol) 的DMF (8mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后,加入乙醚以固化。用乙醚和水洗涤得到的固体若干次,得到呈黄色固体的化合物2 (1.52g, 60%)。

[0368] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 10.19 (s, 1H), 8.31 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 2H), 8.15 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.89 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 7.75-7.72 (m, 2H), 7.66 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.57 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 2H), 7.43-7.39 (m, 4H), 7.32 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 6.05-6.04 (m, 1H), 5.42 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.42 (m, 1H), 4.30-4.28 (m, 1H), 4.25-4.23 (m, 2H), 3.94-3.91 (m, 1H), 3.01-3.00 (m, 1H), 2.96-

2.94 (m, 1H), 2.00–1.99 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 0.89–0.83 (m, 6H)。

[0369] EI-MS m/z : 767 (M^+)

[0370] 化合物3 (Fmoc-Val-Cit-MMAF-OMe)

[0371] 用HOBt (7.1mg, 0.052mmol)、吡啶 (1mL) 和DIPEA (0.045mL, 0.261mmol) 处理化合物2 (200mg, 0.261mmol) 和MMAF-OMe (194mg, 0.261mmol) 溶于DMF (2mL) 的溶液。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后, 用乙酸乙酯 (30mL)、水 (30mL) 和盐溶液 (30mL) 萃取有机层。浓缩有机层, 再经柱层析后, 获得呈黄色固体的化合物3 (153mg, 42%)。

[0372] EI-MS m/z : 1375 (M^+)

[0373] 化合物4 (Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

[0374] 在室温下, 向化合物3 (153mg, 0.112mmol) 的四氢呋喃 (5mL) 溶液中加入哌啶 (0.2mL)。获得的混合物在同样温度下搅拌2小时。反应完全后, 用醚和己烷进行重结晶, 得到呈淡黄色固体的化合物4 (85mg, 66%)。

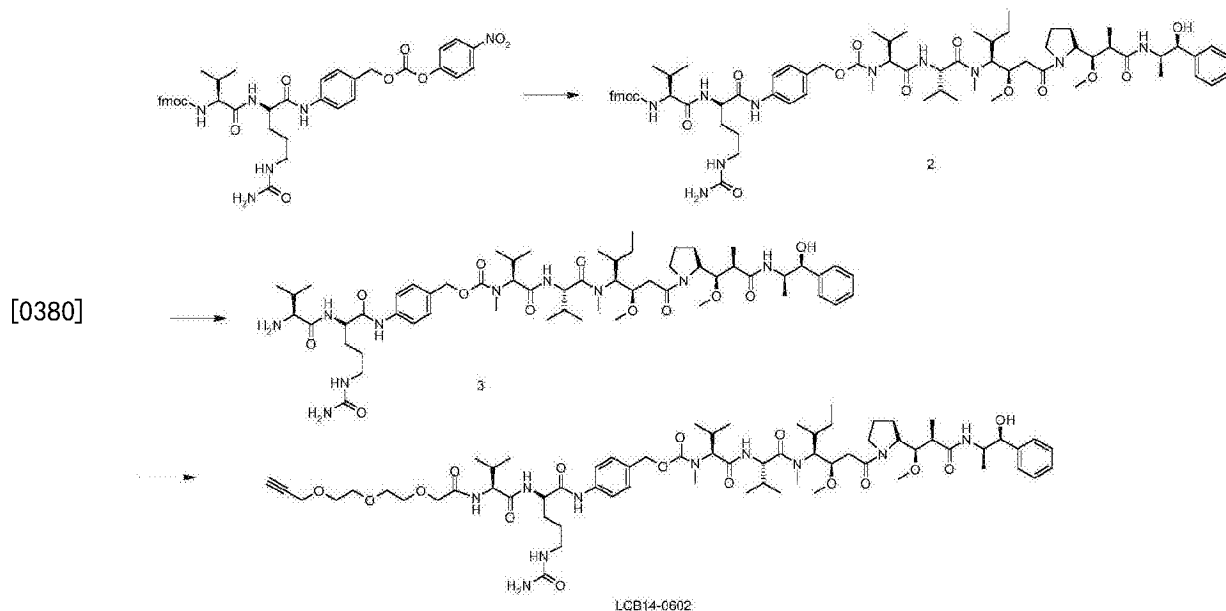
[0375] EI-MS m/z : 1152 (M^+)

[0376] LCB14-0589 (乙炔接头-Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

[0377] 向化合物4 (85mg, 0.074mmol) 和实施例2-11的化合物B (18mg, 0.088mmol) 溶于DMF (2mL) 的溶液中加入DIPEA (0.03mL, 0.148mmol) 和PyBOP (58mg, 0.111mmol)。获得的混合物在室温下搅拌5小时。反应完全后, 用乙酸乙酯 (20mL) 和水 (20mL) 进行萃取。获得的粗产物经柱层析后, 获得呈白色固体的化合物LCB14-0589 (35.4mg, 36%)。

[0378] EI-MS m/z : 1336 (M^+)

[0379] 2-13. 乙炔-接头-Val-Cit-PABC-MMAE (LCB14-0602)



[0381] 化合物2 (Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAE)

[0382] 向Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP (200mg, 0.261mmol) 和MMAE (187mg, 0.261mmol) 溶于DMF (2mL) 的溶液中加入HOBt (7.1mg, 0.052mmol)、吡啶 (1mL) 和DIPEA (0.045mL, 0.261mmol)。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后, 用乙酸乙酯 (30mL)、水 (30mL) 和盐溶液 (30mL) 萃取有机层。浓缩有机层, 并经柱层析后, 获得呈黄色固体的化合物

2 (50mg, 14.3%)。

[0383] EI-MS m/z : 1346 (M^+)

[0384] 化合物3 (Val-Cit-PABC-MMAE)

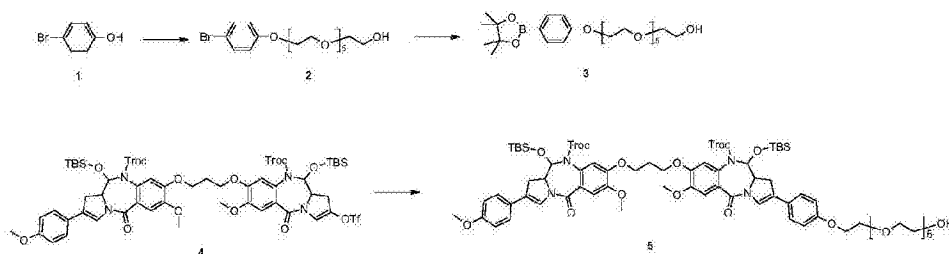
[0385] 在室温下向化合物2 (50mg, 0.037mmol) 的四氢呋喃 (5mL) 溶液中加入哌啶 (0.1mL)。获得的混合物在同样温度下搅拌2小时。反应完全后, 用醚和己烷进行重结晶, 得到呈淡黄色固体的化合物3 (37mg, 89%)。

[0386] EI-MS m/z : 1124 (M^+)

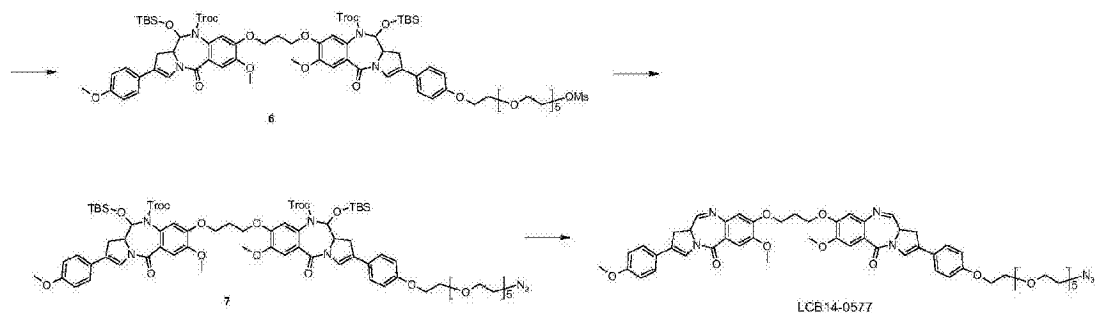
[0387] LCB14-0602 (乙炔接头-Val-Cit-PABC-MMAE)

[0388] 在室温下向化合物3 (35mg, 0.031mmol) 和实施例2-11的化合物B (7.6mg, 0.037mmol) 溶于DMF (2mL) 的溶液中加入DIPEA (0.011mL, 0.062mmol) 和PyBOP (24mg, 0.47mmol)。将获得的混合物搅拌5小时。反应完全后, 用乙酸乙酯 (20mL) 和水 (20mL) 进行萃取。获得的粗产物经柱层析后, 获得呈白色固体的化合物LCB14-0602 (28.5mg, 70%)。

[0389] EI-MS m/z : 1308 (M^+)



[0390]



[0391] 2-14. 叠氮化物接头-PBD (吡咯苯并二氮杂卓) 二聚体 (LCB14-0577)

[0392] 化合物2

[0393] 在氮气环境下, 向化合物1 (1.22g, 7.08mmol)、三苯基膦 (TPP, 2.23g, 8.50mmol) 和六甘醇 (2g, 7.08mmol) 溶于四氢呋喃 (10mL) 的溶液中加入二异丙基偶氮二碳酸盐 (DIAD, 1.67mL, 8.50mmol)。将获得的混合物搅拌1小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 得到化合物2 (1.4g, 45%)。

[0394] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.80 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 4.09 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.84 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.72 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 4H), 3.68~3.65 (m, 14H), 3.60 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 2.85 (bs, 1H)

[0395] 化合物3

[0396] 向化合物2 (300mg, 0.68mmol) 的1,4-二氧己环 (5mL) 溶液中依次加入乙酸钾 (200mg, 2.04mmol)、 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (28mg, 0.034mmol) 和双(频那醇合)二硼 (174mg,

0.68mmol)。获得的混合物在70℃下搅拌12小时。反应完全后,加入乙酸乙酯(50mL)和蒸馏水(50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥,并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后,获得化合物3(300mg,90%)。

[0397] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.73 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.90 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 4.15 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.86 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.73~3.72 (m, 4H), 3.68~3.64 (m, 14H), 3.60 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 1.33 (s, 12H)

[0398] 化合物4

[0399] 根据W02006/111759A1、W02010/043880A1和W02010/010347A1中描述的方法制备化合物4,这些参考文献的全部内容通过引用并入本文。

[0400] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (s, 1H), 7.29 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7.27 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.89 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 6.77 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 5.91 (m, 2H), 5.23 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 5.21 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.17~4.13 (m, 4H), 3.96~3.91 (m, 8H), 3.82 (s, 3H), 3.33 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.44 (m, 2H), 0.90 (2s, 18H), 0.27 (2s, 12H)

[0401] 化合物5

[0402] 依次将化合物4 (83mg, 0.059mmol)、碳酸钠 (10mg, 0.089mmol) 和Pd (TPP)₄ (3.4mg, 0.003mmol) 溶解于乙醇/甲苯/蒸馏水 (0.3mL/0.3mL/0.3mL) 的混合溶剂中。加入化合物3 (31.6mg, 0.065mmol) 的甲苯 (3mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌1小时。反应完全后,加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥,并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后,得到化合物5 (79mg, 74%)。

[0403] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (m, 2H), 7.31~7.27 (m, 6H), 6.92~6.89 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 5.23 (d, $J=12.6\text{Hz}$, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.16~4.13 (m, 6H), 3.97~3.94 (m, 8H), 3.87 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.74~3.64 (m, 18H), 3.61 (m, 2H), 3.34 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0404] 化合物6

[0405] 在0℃下,向化合物5 (250mg, 0.155mmol) 的四氢呋喃 (3mL) 溶液中加入4-甲基吗啉 (34.2 μ L, 0.310mmol) 和甲磺酸酐 (Ms_2O , 32.5mg, 0.186mmol)。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后,加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥,并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后,获得化合物6 (220mg, 84%)。

[0406] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.33 (m, 2H), 7.28~7.23 (m, 6H), 6.89~6.86 (m, 4H), 6.76 (s, 2H), 5.88 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 5.21 (d, $J=12.6\text{Hz}$, 2H), 4.35 (m, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.13~4.11 (m, 6H), 3.92 (s, 6H), 3.84 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.74~3.60 (m, 20H), 3.31 (m, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.80 (m, 2H), 2.43 (m, 2H), 0.88 (s, 18H), 0.23 (2s, 12H)

[0407] 化合物7

[0408] 向化合物6 (100mg, 0.059mmol) 的二甲基甲酰胺 (2mL) 溶液中加入叠氮化钠 (NaN_3 , 4.6mg, 0.071mmol)。获得的混合物在55℃下搅拌4小时。反应完全后,加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥,并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后,获得化合物7 (85mg, 88%)。

[0409] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.33 (bs, 2H), 7.28~7.24 (m, 6H), 6.89~6.87 (m, 4H), 6.76 (s, 2H), 5.88 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 5.21 (d, $J=12.6\text{Hz}$, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.13~4.11 (m, 6H),

3.92 (m, 8H), 3.84 (t, J=4.8Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.67~3.64 (m, 16H), 3.36 (t, J=4.8Hz, 2H), 3.31 (m, 2H), 2.80 (m, 2H), 2.43 (m, 2H), 0.88 (s, 18H), 0.23 (2s, 12H)

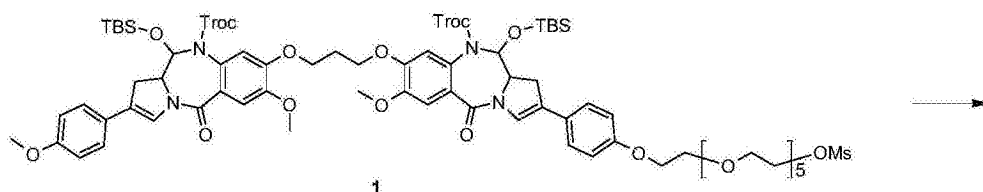
[0410] LCB14-0577

[0411] 向化合物7 (80mg, 0.049mmol) 的四氢呋喃 (1.5mL) 溶液中加入1N-醋酸铵 (1mL) 和10%镉/铅合金 (120mg)。获得的混合物在室温下搅拌4小时。反应完全后, 加入二氯甲烷 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物LCB14-0577 (9mg, 18%)。

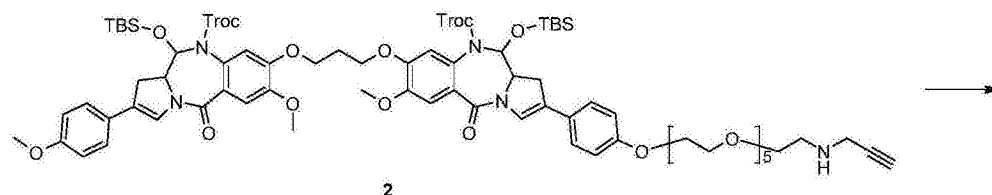
[0412] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.86 (d, J=4.2Hz, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.31~7.23 (m, 6H), 6.89~6.80 (m, 6H), 4.34~4.22 (m, 6H), 4.11 (m, 2H), 3.92 (m, 6H), 3.84~3.77 (m, 5H), 3.71 (m, 2H), 3.67~3.63 (m, 18H), 3.36 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.44~2.40 (m, 2H)

[0413] EI-MS m/z : 1017 (M^+)

[0414] 2-15. 乙炔-接头-PBD二聚体 (LCB14-0578)



[0415]



LCB14-0578

[0416] 化合物2

[0417] 向实施例2-14的化合物6 (95mg, 0.056mmol) 的乙腈 (1mL) 溶液中加入碳酸钠 (18mg, 0.168mmol) 溶于炔丙基胺 (18 μL , 0.28mmol) 和蒸馏水 (500 μL) 的溶液。获得的混合物在40 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌12小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物2 (45mg, 48%)。

[0418] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (m, 2H), 7.30~7.27 (m, 6H), 6.91~6.89 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 5.91 (d, J=9Hz, 2H), 5.23 (d, J=11.4Hz, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.16~4.11 (m, 6H), 3.94 (s, 6H), 3.87 (t, J=4.8Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.73 (m, 2H), 3.69~3.60 (m, 18H), 3.45 (d, J=2.4Hz, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.87 (t, J=4.8Hz, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.22 (t, J=4.4Hz, 1H), 0.90 (s, 18H), 0.24 (2s, 12H)

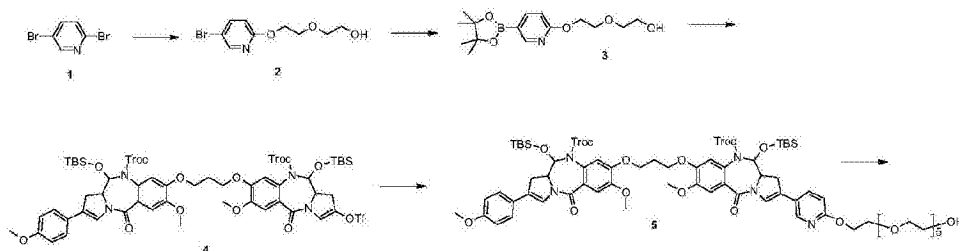
[0419] LCB14-0578

[0420] 向化合物2 (40mg, 0.024mmol) 的四氢呋喃 (750μL) 溶液中加入1N-乙酸铵 (0.5mL) 和10%镉/铅合金 (70mg)。获得的混合物在室温下搅拌4小时。反应完全后, 加入二氯甲烷 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物LCB14-0578 (13mg, 52%)。

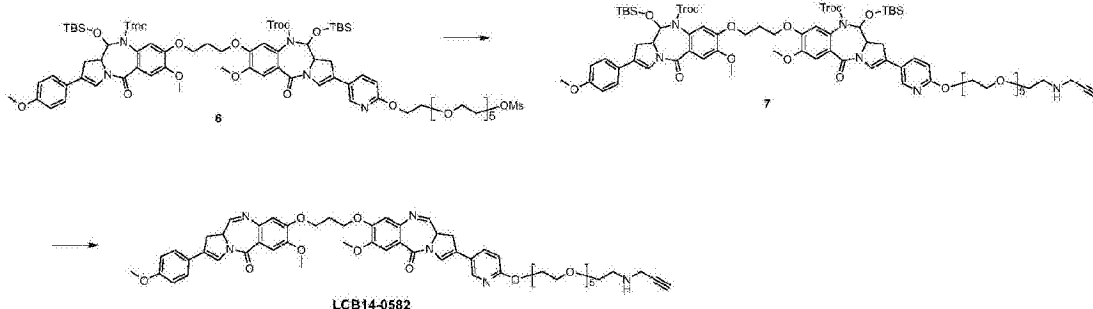
[0421] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.88 (d, $J=4.2\text{Hz}$, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.33~7.28 (m, 6H), 6.91~6.86 (m, 6H), 4.38~4.20 (m, 6H), 4.13 (m, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.88~3.80 (m, 5H), 3.73 (m, 2H), 3.69~3.61 (m, 16H), 3.46 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.30 (m, 2H), 2.88 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 2.43 (m, 2H), 2.23 (t, $J=4.4\text{Hz}$, 1H)

[0422] EI-MS m/z : 1028 (M^+)

[0423] 2-16.乙炔-接头-PBD二聚体(吡啶型)(LCB14-0582)



[0424]



[0425] 化合物2

[0426] 在氮气环境下向NaH(55%于矿物油中,184mg,4.22mmol)的四氢呋喃(5mL)悬浮液中加入六甘醇(2.4g,8.44mmol)的四氢呋喃(3mL)。获得的混合物在0℃下搅拌10分钟。缓慢加入通过将化合物1(1g,4.22mmol)溶解于二甲基甲酰胺(0.5mL)而制备的混合溶液。获得的混合物在室温下搅拌1小时,再在70℃下搅拌12小时。将获得的混合物冷却至0℃,加入蒸馏水(2mL)。反应完全后,加入乙酸乙酯(100mL)和蒸馏水(100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥,并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后,得到化合物2(1.5g,81%)。

[0427] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.13 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 7.61 (dd, $J=8.4, 2.4\text{Hz}$, 1H), 6.67 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), 4.41 (m, 2H), 3.81 (m, 2H), 3.70~3.61 (m, 18H), 3.58 (m, 2H), 2.71 (bs, 1H)

[0428] 化合物3

[0429] 依次用乙酸钾(336mg, 3.42mmol)、PdCl₂(dppf) (46.5mg, 0.057mmol) 和双(频那醇合)二硼(318mg, 1.25mmol) 处理化合物2 (500mg, 1.14mmol) 的二甲基甲酰胺(5mL) 的溶液。获得的混合物在70℃下搅拌12小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯(100mL) 和蒸馏水(50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物3 (250mg, 45%)。

[0430] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.50 (s, 1H), 7.90 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.74 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 4.50 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.84 (m, 2H), 3.74~3.70 (m, 20H), 1.33 (s, 12H)

[0431] 化合物5

[0432] 依次将化合物4 (245mg, 0.175mmol)、碳酸钠 (28mg, 0.262mmol) 和 $\text{Pd}(\text{TPP})_4$ (10mg, 0.009mmol) 溶解于乙醇/甲苯/蒸馏水 (1.5mL/1.5mL/1.5mL) 的混合溶液中。加入化合物3 (94mg, 0.192mmol) 的甲苯 (1.5mL) 溶液。获得的混合物在室温下搅拌12小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 得到化合物5 (100mg, 35.5%)。

[0433] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.02 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.29 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7.27 (m, 2H), 6.89 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 6.80 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 5.23 (dd, $J=11.4, 4.2\text{Hz}$, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.17~4.12 (m, 2H), 3.4 (m, 8H), 3.86 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.82 (m, 4H), 3.74~3.65 (m, 18H), 3.61 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 0.90 (s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0434] 化合物6

[0435] 在 0°C 下, 向化合物5 (180mg, 0.11mM) 的四氢呋喃 (3mL) 溶液中加入4-甲基吗啉 (NMM, 61.5 μL , 0.55mM) 和甲磺酸酐 (Ms_2O , 22mg, 0.121mM)。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL) 以萃取有机层。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物6 (80mg, 43%)。

[0436] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.03 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 7.66 (dd, $J=7.8, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7.27 (m, 2H), 6.89 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 6.80 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 5.22 (dd, $J=12, 4.2\text{Hz}$, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.38 (m, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.15 (m, 3H), 3.99~3.93 (m, 7H), 3.86 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.76 (m, 2H), 3.71 (m, 2H), 3.69~3.63 (m, 16H), 3.34 (m, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.83 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 0.90 (2s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0437] 化合物7

[0438] 向化合物6 (80mg, 0.047mmol) 的乙腈 (4mL) 溶液中加入碳酸钠 (20mg, 0.141mmol) 溶于炔丙基胺 (30 μL , 0.47mmol) 和蒸馏水 (500 μL) 的溶液。获得的混合物在 50°C 下搅拌12小时。反应完成后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物7 (25mg, 32%)。

[0439] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.03 (d, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 7.66 (dd, $J=8.4, 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.28 (m, 2H), 6.89 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 6.79 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H), 6.78 (s, 2H), 5.90 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 5.22 (dd, $J=12, 4.2\text{Hz}$, 2H), 4.47 (m, 2H), 4.30 (m, 2H), 4.17~4.14 (m, 3H), 3.98~3.93 (m, 7H), 3.86 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (m, 2H), 3.69~3.60 (m, 18H), 3.45 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 3.34 (m, 2H), 2.87 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.45 (m, 2H), 2.22 (m, 1H), 0.90 (2s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0440] LCB14-0582

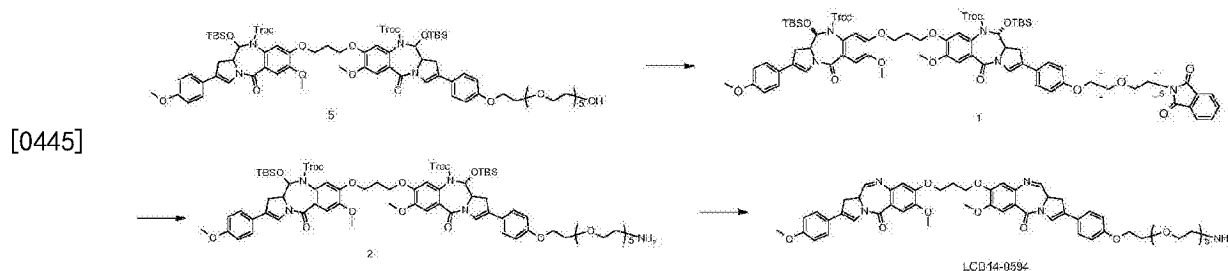
[0441] 向化合物7 (25mg, 0.015mmol) 的四氢呋喃 (750 μL) 溶液中加入1N-醋酸铵 (0.5mL) 和10%镉/铅合金 (50mg)。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完成后, 加入二甲基氯甲烷 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经

过柱层析后,获得化合物LCB14-0582 (6mg, 38.4%)。

[0442] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.00 (m, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.60 (m, 1H), 7.41~7.28 (m, 6H), 6.90~6.71 (m, 5H), 4.46 (m, 2H), 4.35~4.24 (m, 4H), 3.95~3.79 (m, 11H), 3.70 (m, 2H), 3.68~3.61 (m, 18H), 3.47 (m, 2H), 3.38 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.89 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.23 (bs, 1H)

[0443] EI-MS m/z : 1029 (M^+)

[0444] 2-17. 氨基-Peg5-PBD二聚体 (LCB14-0594)



[0446] 化合物1

[0447] 向实施例2-14的化合物5 (456mg, 0.284mmol) 的四氢呋喃溶液中加入三苯基膦 (108mg, 0.411mmol) 和苯邻二甲酰亚胺 (50mg, 0.341mmol)。在0℃下缓慢加入DIAD (0.058mL, 0.340mmol)。获得的混合物在室温下搅拌2小时。反应完全后,用二氯甲烷 (40mL) 和水 (40mL) 进行萃取。残余物经过柱层析后,获得呈黄色固体的化合物1 (492mg, 定量的)。

[0448] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.84~7.82 (m, 2H), 7.70~7.69 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.29~7.25 (m, 6H), 6.90 (d, $J=7.2$, 4H), 6.78 (s, 2H), 5.92 (d, $J=9.0$, 2H), 5.21 (d, $J=12.6$, 2H), 4.28 (m, 2H), 4.19~4.10 (m, 4H), 3.93 (m, 6H), 3.89~3.87 (m, 2H), 3.86~3.84 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.74~3.71 (m, 4H), 3.67~3.66 (m, 2H), 3.63~3.62 (m, 6H), 3.59~3.58 (m, 6H), 3.33 (m, 2H), 2.85~2.82 (m, 2H), 2.42 (m, 2H), 0.91 (s, 18H), 0.27 (2s, 12H)

[0449] 化合物2

[0450] 向化合物1 (492mg, 0.283mmol) 的乙醇 (2mL) 和四氢呋喃 (2mL) 溶液中加入水合联氨 (0.07mL, 1.417mmol)。获得的混合物在60℃下搅拌5小时。反应完全后,加入2mL乙酸乙酯。将固体过滤掉。浓缩滤液,再经柱层析后,获得呈黄色固体的化合物2 (380mg, 83%)。

[0451] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (bs, 2H), 7.29~7.26 (m, 6H), 6.92~6.88 (m, 4H), 6.79 (bs, 2H), 5.92 (d, $J=8.4$, 2H), 5.21 (d, $J=12$, 2H), 4.29~4.28 (m, 2H), 4.19~4.17 (m, 6H), 3.93~3.90 (m, 6H), 3.89~3.87 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.75~3.73 (m, 2H), 3.69~3.63 (m, 12H), 3.35~3.31 (m, 2H), 2.96 (bs, 2H), 2.85 (d, $J=16.8$, 2H), 2.43 (m, 2H), 0.91 (s, 18H), 0.27 (2s, 12H)。

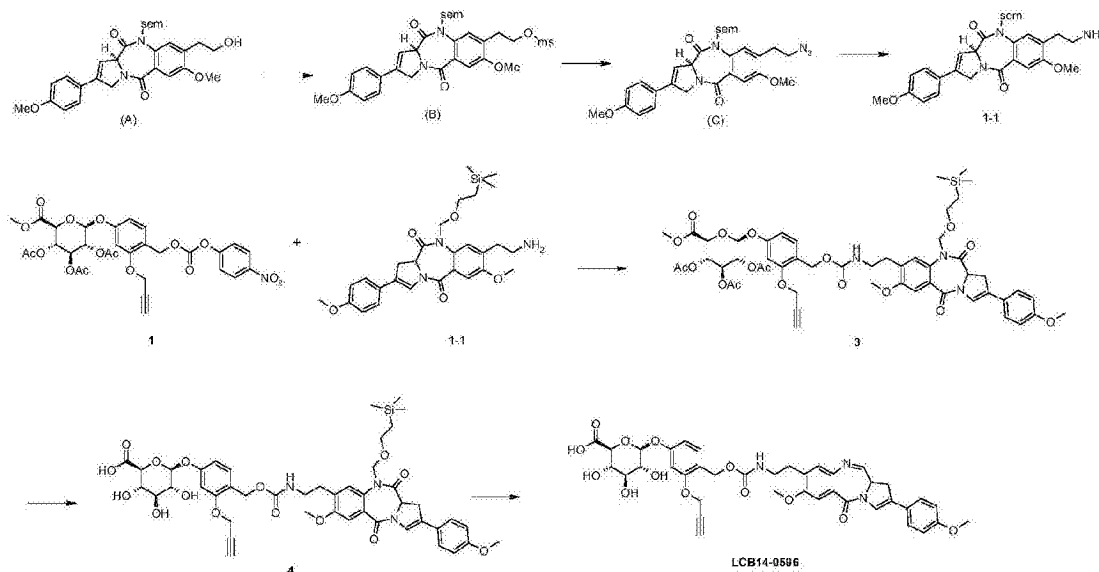
[0452] EI-MS m/z : 1606 (M^+)

[0453] LCB14-0594

[0454] 在室温下向化合物2 (25mg, 0.015mmol) 的四氢呋喃 (1mL) 溶液中加入1N乙酸铵 (0.4mL) 和10%镉/铅合金 (40mg)。获得的混合物在同样温度下搅拌12小时。反应完全后,用二氯甲烷过滤获得的混合物。浓缩过滤的溶液,再经柱层析后,获得呈黄色固体的LCB14-0594 (4mg, 26%)。

[0455] EI-MS m/z : 990 (M^+)

[0456] 2-18. 葡糖苷酸-接头-PBD单体 (LCB14-0596)



[0458] 化合物 (B)

[0459] 在室温下,向化合物 (A) (300mg, 0.57mmol) 的四氢呋喃 (5mL) 溶液中加入N-甲基吗啉 (0.16mL, 1.43mmol) 和甲磺酸酐 (120mg, 0.69mmol)。将获得的混合物搅拌4小时。加入乙酸乙酯 (100mL) 和水 (50mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后,获得化合物 (B) (330mg, 96%)。

[0460] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ : 7.53 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.39–7.37 (m, 2H), 7.33 (t, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.90–6.89 (m, 2H), 5.47 (d, $J=10.2\text{Hz}$, 1H), 4.81 (d, $J=10.2\text{Hz}$, 1H), 4.62 (dd, $J=7.2, 3.0\text{Hz}$, 1H), 4.49–4.41 (m, 2H), 3.97–3.93 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.76–3.72 (m, 1H), 3.68–3.64 (m, 1H), 3.17–3.10 (m, 3H), 2.96 (s, 3H), 0.98 (t, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 0.02 (s, 9H)。

[0461] EI-MS m/z : 603 (M^+)

[0462] 化合物 (C)

[0463] 在室温下,向化合物 (B) (330mg, 0.55mmol) 的DMF (3mL) 溶液中加入叠氮化钠 (43mg, 0.66mmol)。获得的混合物在60℃下搅拌3小时。加入乙酸乙酯 (100mL) 和水 (50mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后,获得呈黄色固体的化合物 (C) (307mg, 99%)。

[0464] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ : 7.54 (s, 1H), 7.38–7.37 (m, 3H), 7.34 (t, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.90–6.88 (m, 2H), 5.49 (d, $J=10.2\text{Hz}$, 1H), 4.76 (d, $J=10.2\text{Hz}$, 1H), 4.63 (dd, $J=7.2, 3.0\text{Hz}$, 1H), 3.96–3.93 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.79–3.75 (m, 1H), 3.69–3.65 (m, 1H), 3.52–3.50 (m, 2H), 3.16–3.12 (m, 1H), 3.03–2.99 (m, 1H), 2.96–2.91 (m, 1H), 0.99 (t, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 0.02 (s, 9H)。

[0465] EI-MS m/z : 550 (M^+)

[0466] 化合物 (1-1)

[0467] 在室温下,向化合物 (C) (500mg, 0.91mmol) 的四氢呋喃 (2mL) 溶液中加入三苯基膦 (285mg, 1.09mmol)。获得的混合物在40℃下搅拌13小时。加入乙酸乙酯 (200mL) 和水 (100mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后,获

得呈黄色固体的化合物(1-1) (435mg, 93%)。

[0468] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ : 7.50 (s, 1H), 7.38–7.36 (m, 3H), 7.33 (t, $J=1.8\text{Hz}$, 1H), 6.90–6.88 (m, 2H), 5.47 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 4.81 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 4.67 (dd, $J=7.2, 3.0\text{Hz}$, 1H), 3.95–3.92 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.76–3.72 (m, 1H), 3.68–3.64 (m, 1H), 3.15–3.10 (m, 2H), 3.06–2.96 (m, 2H), 2.94–2.88 (m, 1H), 2.86–2.80 (m, 1H), 0.98 (t, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 0.02 (s, 9H)。

[0469] EI-MS m/z : 524 (M^+)

[0470] 化合物3

[0471] 向实施例2-4的化合物7 (126mg, 0.190mmol) 和化合物(1-1) (100mg, 0.190mmol) 的二甲基甲酰胺(3mL) 溶液中加入三乙胺 (TEA, 80 μL , 0.57mmol)。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物3 (178mg, 89%)。

[0472] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 7.46 (s, 1H), 7.37 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 6.87 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.71 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.60 (m, 1H), 5.44 (d, $J=10.4\text{Hz}$, 1H), 5.34 (m, 2H), 5.27 (m, 1H), 5.16 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.82~4.77 (m, 2H), 4.68 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 2H), 4.60 (m, 1H), 4.19 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.72~3.61 (m, 5H), 3.45 (m, 2H), 3.11 (m, 1H), 2.93~2.84 (m, 2H), 2.51 (bs, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 0.97 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 0.01 (s, 9H)

[0473] 化合物4

[0474] 在0℃下, 向化合物3 (100mg, 0.094mmol) 的甲醇 (5mL) 溶液中加入氢氧化锂 (40mg, 1.880mmol) 溶于蒸馏水 (2mL) 的溶液。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完全后, 在减压下除去甲醇。用蒸馏水 (50mL) 稀释残余物, 并用醋酸缓慢地酸化为pH=3。用二氯甲烷 (3x50mL) 进行3次萃取。在减压条件下浓缩获得的产物, 得到固体化合物。用二乙醚 (50mL) 洗涤该固体化合物, 得到化合物4 (86.5mg, 100%)。

[0475] ^1H NMR (600MHz, CD_3OD) δ : 7.43 (s, 1H), 7.41 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 7.30 (d, $J=10.2\text{Hz}$, 2H), 7.14 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 6.90 (d, $J=9\text{Hz}$, 2H), 6.86 (m, 1H), 6.66 (m, 1H), 5.22 (m, 2H), 4.98~4.94 (m, 3H), 4.71~4.67 (m, 3H), 3.96 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.75 (m, 1H), 3.59~3.47 (m, 5H), 3.36 (m, 2H), 3.25 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 2.90 (bs, 1H), 2.85 (m, 2H), 0.83 (m, 2H), 0.01 (s, 9H)

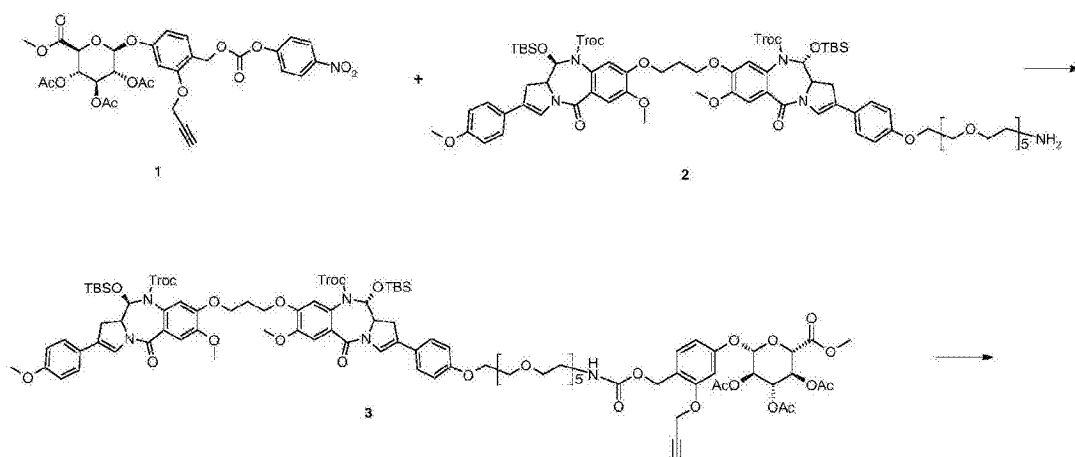
[0476] EI-MS m/z : 904 (M^+)

[0477] LCB14-0596

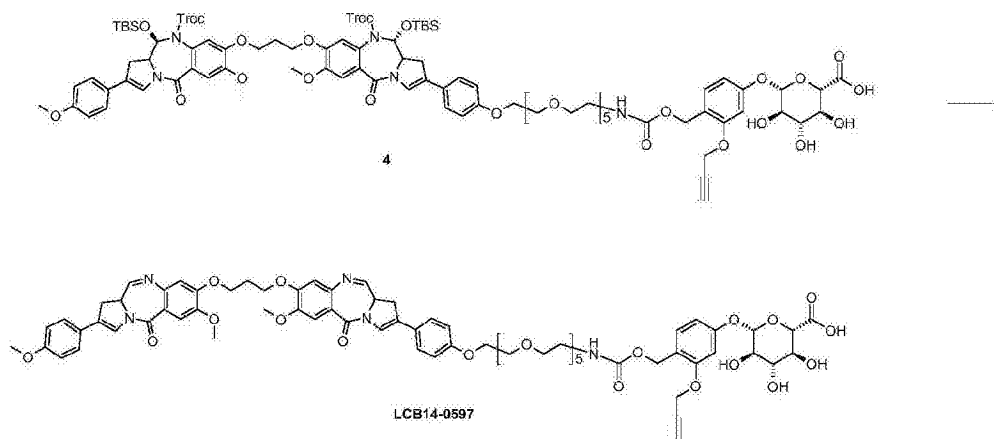
[0478] 在0℃下, 向化合物4 (86.5mg, 0.094mmol) 溶于四氢呋喃 (1mL) 和乙醇 (1mL) 的溶液中加入硼氢化锂2M-四氢呋喃溶液 (940 μL , 1.88mmol)。获得的混合物在室温下搅拌12小时。加入另外的硼氢化锂2M-四氢呋喃溶液 (1.41mL, 2.82mmol)。将获得的混合物搅拌5小时, 再冷却至0℃。通过加入1%蚁酸溶液 (33mL) 使反应淬灭。将获得的混合物搅拌3小时。反应完全后, 用蒸馏水 (50mL) 以及乙酸乙酯 (20mL) 和甲醇 (10mL) 的混合溶液进行萃取。用氯仿/甲醇/蚁酸 (V:V:V=9:1:0.05) 使残余物经过柱层析后, 获得化合物LCB14-0596 (50mg, 69%)。

[0479] EI-MS m/z : 756 (M^+)

[0480] 2-19. 葡萄糖苷酸接头-PBD二聚体 (LCB14-0597)



[0481]



[0482] 化合物3

[0483] 向实施例2-4的化合物7 (150mg, 0.220mmol) 和实施例2-17的化合物2 (365mg, 0.220mmol) 的二甲基甲酰胺 (3mL) 溶液中加入三乙胺 (95 μ L, 0.66mmol)。获得的混合物在室温下搅拌2小时。反应完全后, 加入乙酸乙酯 (100mL) 和蒸馏水 (100mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物3 (310mg, 64%)。

[0484] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (m, 2H), 7.30~7.25 (m, 7H), 6.90 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 6.73 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.60 (dd, 8.4, 1.8Hz, 1H), 5.90 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 5.36~5.32 (m, 2H), 5.27 (m, 2H), 5.22 (m, 2H), 5.13 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.69 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.17~4.13 (m, 6H), 3.94 (m, 8H), 3.85 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.67~3.59 (m, 14H), 3.54 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 3.39~3.31 (m, 4H), 2.82 (m, 2H), 2.52 (t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 2.44 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 0.91 (s, 18H), 0.26 (2s, 12H)

[0485] 化合物4

[0486] 在0 $^\circ\text{C}$ 下, 向化合物3 (100mg, 0.047mmol) 溶于甲醇 (3mL) 和四氢呋喃 (1.5mL) 的溶液中加入氢氧化锂 (20mg, 0.47mmol) 溶于蒸馏水 (1.5mL) 的溶液。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完成后, 在减压条件下除去有机溶剂。用蒸馏水 (50mL) 稀释残余物, 并用0.5N HCl溶液缓慢地酸化至pH=3。用二氯甲烷 (3x50mL) 进行3次萃取。在减压条件下浓缩萃取液, 得到化合物4 (93.4mg, 100%)。

[0487] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.35 (m, 2H), 7.30~7.24 (m, 7H), 4.89 (m, 4H), 6.78 (m,

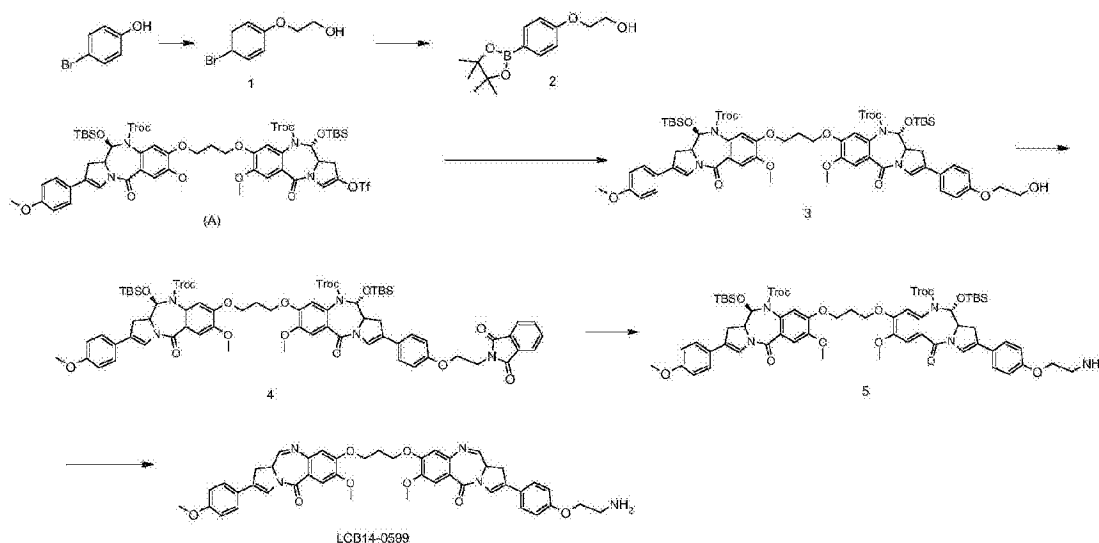
3H), 6.64 (m, 1H), 5.91 (m, 2H), 5.65 (m, 1H), 5.21 (m, 2H), 5.07 (m, 2H), 4.89 (m, 1H), 4.67 (m, 2H), 4.28 (m, 2H), 4.18~4.12 (m, 6H), 3.93 (m, 8H), 3.85~3.82 (m, 5H), 3.72 (m, 2H), 3.65~3.54 (m, 20H), 3.34~3.32 (m, 4H), 2.82 (m, 2H), 2.56 (m, 1H), 2.44 (m, 2H), 0.90 (2s, 18H), 0.25 (2s, 12H)

[0488] LCB14-0597

[0489] 向化合物4 (90mg, 0.045mmol) 的四氢呋喃 (1.5mL) 溶液中加入1N-醋酸铵 (1.2mL) 和10%镉/铅合金 (120mg)。获得的混合物在室温下搅拌3小时。反应完成后, 加入乙酸乙酯 (50mL) 和蒸馏水 (50mL)。所得有机层用无水硫酸钠进行干燥, 并在减压下浓缩。残余物经过柱层析后, 获得化合物LCB14-0597 (16.4mg, 26%)。

[0490] EI-MS m/z : 1371 (M^+)

[0491] 2-20. 氨基-Peg1-PBD二聚体 (LCB14-0599)



[0493] 化合物1

[0494] 在室温下, 向4-溴苯酚 (4.0g, 23.1mmol) 的乙醇 (18mL) 溶液中加入氢氧化钠 (1.0g, 25.40mmol) 和2-溴乙醇 (1.7mL, 23.10mmol)。加入乙酸乙酯 (500mL) 和水 (200mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后, 获得液态的化合物1 (4.3g, 86%)。

[0495] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ : 7.39~7.36 (m, 2H), 6.81~6.78 (m, 2H), 4.05~4.03 (m, 2H), 3.95 (t, $J=4.2\text{Hz}$, 2H), 2.18 (bs, 1H)。

[0496] 化合物2

[0497] 在室温下, 向化合物1 (0.3g, 1.38mmol) 的1,4-二氧己环 (10mL) 溶液中加入双(频那醇合)二硼 (0.35g, 1.38mmol)、乙酸钾 (0.41g, 4.14mmol) 和 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (56mg, 0.07mmol)。获得的混合物在70℃下搅拌12小时, 然后在减压条件下浓缩。用乙酸乙酯进行过滤。在减压条件下浓缩过滤的溶液。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后, 获得化合物2 (0.36g, 97%)。

[0498] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ : 7.76~7.75 (m, 2H), 6.92~6.91 (m, 2H), 4.11 (t, $J=4.2\text{Hz}$, 2H), 3.97~3.96 (m, 2H), 1.99 (bs, 1H), 1.33 (s, 12H)。

[0499] 化合物3

[0500] 根据W02006/111759、W02010/043880和W02010/010347中描述的方法制备化合物(A) (85mg, 0.11mmol), 这些参考文献的全部内容通过引用并入本文, 并向化合物2 (35mg, 0.13mmol) 的甲苯 (2mL) 溶液中加入碳酸钠 (17mg, 0.16mmol)、蒸馏水 (1mL) 和乙醇 (1mL)。将获得的混合物搅拌5分钟后, 加入Pd (TPP)₃ (22mg, 0.02mmol)。将获得的混合物搅拌2小时。加入乙酸乙酯 (10mL) 和水 (10mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后, 获得呈黄色固体的化合物3 (79mg, 53%)。

[0501] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 7.36–7.35 (m, 2H), 7.32–7.25 (m, 6H), 6.92–6.89 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 5.92 (d, J=9.0Hz, 2H), 5.22 (d, J=12.0Hz, 2H), 4.30–4.28 (m, 2H), 4.17–4.10 (m, 6H), 3.98–3.94 (m, 4H), 3.94 (s, 6H), 3.83 (s, 3H), 3.37–3.32 (m, 2H), 2.85–2.82 (m, 2H), 2.46–2.44 (m, 2H), 1.98 (bs, 1H), 0.91 (s, 18H), 0.26 (2s, 12H)。

[0502] EI-MS m/z: 1387 (M⁺)

[0503] 化合物4

[0504] 在室温下, 向化合物3 (77mg, 0.06mmol) 的四氢呋喃 (2mL) 溶液中依次加入三苯基膦 (18mg, 0.07mmol)、苯邻二甲酰亚胺 (10mg, 0.07mmol) 和DIAD (13μl, 0.07mmol)。将获得的混合物搅拌12小时。加入乙酸乙酯 (10mL) 和水 (10mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后, 获得呈黄色固体的化合物4 (72mg, 87%)。

[0505] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 7.88–7.86 (m, 2H), 7.77–7.75 (m, 2H), 7.39–7.36 (m, 2H), 7.30–7.24 (m, 6H), 6.90–6.86 (m, 4H), 6.78 (d, J=1.8Hz, 2H), 5.92–5.88 (m, 2H), 5.24–5.22 (m, 2H), 4.28–4.24 (m, 4H), 4.17–4.11 (m, 6H), 3.98–3.90 (m, 8H), 3.83 (s, 3H), 3.36–3.29 (m, 2H), 2.85–2.78 (m, 2H), 2.47–2.43 (m, 2H), 0.91 (d, J=1.8Hz, 18H), 0.27–0.24 (m, 12H)。

[0506] EI-MS m/z: 1516 (M⁺)

[0507] 化合物5

[0508] 在室温下, 用水合联氨 (12μl, 0.23mmol) 处理化合物4 (70mg, 0.05mmol) 的乙醇 (2mL) 溶液。获得的混合物在60℃下搅拌5小时。用乙酸乙酯 (10mL) 将固体过滤掉。在减压条件下浓缩滤液。残余物与二氯甲烷和甲醇一起经过柱色谱层析后, 获得化合物5 (64mg, 63%)。

[0509] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ: 7.36–7.35 (m, 2H), 7.32–7.25 (m, 6H), 6.92–6.89 (m, 4H), 6.78 (s, 2H), 5.92 (d, J=9.0Hz, 2H), 5.22 (d, J=12.0Hz, 2H), 4.30–4.28 (m, 2H), 4.17–4.10 (m, 6H), 3.98–3.94 (m, 4H), 3.94 (s, 6H), 3.83 (s, 3H), 3.37–3.32 (m, 2H), 2.85–2.82 (m, 2H), 2.46–2.44 (m, 2H), 1.98 (bs, 1H), 0.91 (s, 18H), 0.26 (2s, 12H)。

[0510] EI-MS m/z: 1386 (M⁺)

[0511] LCB14-0599

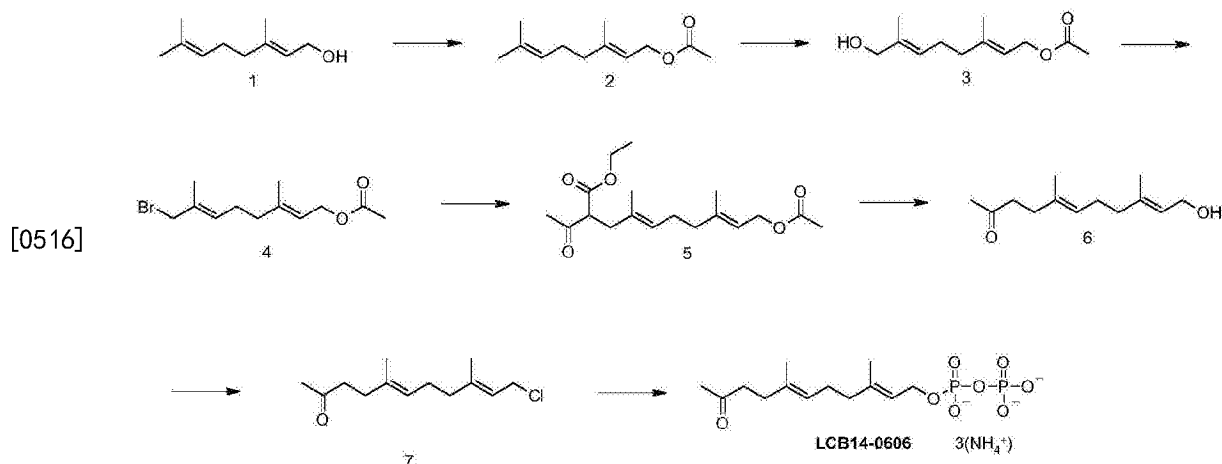
[0512] 在室温下, 向化合物5 (30mg, 0.02mmol) 的四氢呋喃 (2mL) 溶液中加入1N醋酸铵溶液 (0.6mL) 和镉/铅合金 (60mg)。将获得的混合物搅拌4小时。用乙酸乙酯 (10mL) 将固体过滤掉。在减压条件下浓缩滤液。残余物与二氯甲烷和甲醇一起经过柱层析后, 获得呈黄色固体的化合物LCB14-0599 (9.0mg, 60%)。

[0513] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃, CD3OD_1drop) δ: 7.54–7.49 (m, 3H), 7.35–7.30 (m, 5H), 7.26 (s, 1H), 6.93–6.86 (m, 5H), 6.51 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 4.67–4.59 (m, 2H), 4.28–4.09 (m, 6H), 3.85 (s, 9H), 3.31–3.27 (m, 1H), 3.07–3.03 (m, 2H), 2.92–2.89 (m, 1H), 2.39–2.30 (m, 2H),

2.05-2.03 (m, 2H) .

[0514] EI-MS m/z : 770 (M^+)

[0515] 2-21. 修饰的含羰基的GPP衍生物 (LCB14-0606)



[0517] 化合物2

[0518] 在室温下,向化合物1 (3g, 19.45mmol) 的吡啶溶液中加入乙酸酐 (7.9mL, 77.8mmol)。将获得的混合物搅拌2小时。加入石油醚 (100mL) 和0.1NHCl (100mL)。在减压条件下浓缩所得有机层,得到液态的化合物2 (3.81g, 100%)。

[0519] 1H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ 5.35-5.33 (m, 1H), 5.08-4.58 (m, 1H), 4.59 (d, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.11-2.03 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.60 (s, 3H)

[0520] 化合物3

[0521] 在室温下向化合物2 (3.81g, 19.41mmol) 的二氯甲烷 (30mL) 溶液中依次加入二氧化硒 (65mg, 0.58mmol) 和70%叔丁基过氧化氢。将获得的混合物搅拌20小时。反应完成后,加入二氯甲烷 (100mL) 和水 (100mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后,获得液态的化合物3 (1.8g, 43%)。

[0522] 1H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ 5.38-5.30 (m, 2H), 4.59 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.00-3.99 (d, $J=6$ Hz, 2H), 2.18-2.15 (m, 2H), 2.10-2.06 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 1.66 (s, 3H)

[0523] 化合物4

[0524] 在0℃下,向化合物3 (1.8g, 8.48mmol) 的二氯甲烷 (18mL) 溶液中加入三苯基膦 (3.33g, 12.72mmol) 和四溴化碳 (3.37g, 10.18mmol)。获得的混合物在0℃下搅拌4小时。加入二氯甲烷 (100mL) 和水 (100mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸乙酯和己烷一起经过柱层析后,获得液态的化合物4 (2.33g, 100%)。

[0525] 1H NMR (600MHz, $CDCl_3$) δ 5.57-5.55 (m, 1H), 5.35-5.32 (m, 2H), 4.59 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 2.18-2.15 (m, 2H), 2.10-2.07 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.70 (s, 3H)

[0526] 化合物5

[0527] 在0℃下,向氢化钠 (348mg, 8.71mmol) 的四氢呋喃 (35mL) 溶液中逐滴加入乙酰乙酸乙酯 (1.85mL, 14.52mmol) 的四氢呋喃 (5mL) 溶液。获得的混合物在0℃下搅拌30分钟后,在0℃下缓慢加入溶于四氢呋喃 (5mL) 的化合物4 (2g, 7.26mmol)。获得的混合物在80℃下搅拌4小时。加入乙酸乙酯 (80mL) 和水 (80mL)。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物与乙酸

乙酯和己烷一起经过柱层析后,获得呈白色液体的化合物5 (1.56g, 66%)。

[0528] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.34–5.31 (m, 1H), 5.17–5.14 (m, 1H), 4.60–4.58 (m, 2H), 4.20–4.16 (m, 2H), 3.61 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.55–2.51 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.12–2.02 (m, 4H), 2.06 (s, 3H), 1.27 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)

[0529] 化合物6

[0530] 向化合物5 (1.56g, 4.81mmol) 的乙醇 (20mL) 溶液中加入氢氧化钾 (2.16g, 38.47mmol) 和乙醇 (20mL)。获得的混合物100℃下搅拌4小时,用乙醚 (100mL) 和0.1N HCl溶液 (50mL) 稀释,然后 Na_2CO_3 溶液中和。在减压条件下浓缩所得有机层。残余物经过柱层析后,获得化合物6 (819mg, 81%)。

[0531] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.39–5.37 (m, 1H), 5.09–5.07 (m, 1H), 4.15 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.53–2.51 (m, 2H), 2.27–2.24 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.12–2.09 (m, 2H), 2.04–2.01 (m, 2H), 1.66 (s, 3H), 1.60 (s, 3H)

[0532] 化合物7

[0533] 在氮气环境下,向N-氯代丁二酰亚胺 (210mg, 1.57mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液中加入二甲基硫醚 (126 μL , 1.71mmol)。获得的混合物在0℃下搅拌5分钟。在30℃下加入化合物6 (300mg, 1.43mmol) 溶于二氯甲烷 (5mL) 的溶液。获得的混合物在0℃下搅拌2小时。反应完成后,加入正戊烷 (100mL) 和水 (100mL)。减压条件下浓缩所得有机层,得到化合物7 (325mg, 99%)。

[0534] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 5.42 (m, 2H), 5.09 (m, 2H), 4.11 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 2.52 (m, 2H), 2.24 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.11 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 1.71 (s, 3H), 1.60 (s, 3H)。

[0535] LCB14-0606

[0536] 根据JACS, 2010, 132 (12), 4281中描述的方法类似的方法制备化合物LCB14-0606, 该文献全部内容通过引用并入本文。在室温下,向化合物7 (320mg, 1.40mmol) 溶于7mL的乙腈溶液中缓慢加入三(四丁基铵)氢焦磷酸盐 (2.25g, 2.80mmol) 的乙腈 (7mL) 溶液。将获得的混合物搅拌1小时。反应完成后,在减压条件并低于25℃下浓缩获得的混合物。用氨水:蒸馏水 (V:V=3:1) 和25mM碳酸氢铵:异丙醇 (V:V=50:1) 使残余物经过柱层析 (packed BioRad AG50W-X8resin (封装BioRad AG50W-X8树脂, 氢形式), hydrogen form, 15g) 后,获得化合物LCB14-0606 (585mg, 99%)。

[0537] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ 5.42 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 4.46 (t, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 2.66 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.25 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.60 (s, 3H)

[0538] 实施例3: Ab (M) -CAAX的异戊烯化

[0539] 3-1. 异戊烯化方法

[0540] 用NBD-GPP (三铵 [3, 7-二甲基-8-(7-硝基-苯并 [1, 2, 5] 二噁唑-4-基氨基)-辛-2, 6-二烯-1] 焦磷酸酯) 和FTase (#344146, Calbiochem, USA) 或NBD-FPP (#LI-013, Jena Bioscience, Germany) 和GGTase I (#345852, Calbiochem, USA) 进行Ab (M) -CAAX的异戊烯化。

[0541] 通过使用50mM含有5mM MgCl_2 、10 μM ZnCl_2 和5mM DTT的Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液, 使该异戊烯化反应在30℃下进行3小时。反应完成后,进行SDS-PAGE分析。用图像分析仪

(ChemiDoc XRS⁺, BioRad, USA) 识别 (多条) 荧光蛋白质带, 以证实异戊烯化反应的发生。

[0542] 3-2. 使用FTase和NBD-GPP对赫赛汀-HC-CAAX进行异戊烯化

[0543] 通过使用上述方法中的NBD-GPP和FTase, 对赫赛汀-HC-GCVIM、赫赛汀-HC-G₅CVIM (未示出)、赫赛汀-HC-G₇CVIM和赫赛汀-HC-G₁₀CVIM抗体进行异戊烯化。对与各个抗体的 (多条) 重链 (约50000道尔顿) 对应的 (多条) 蛋白质带进行荧光检测。该结果证实, 每个具有各种长度的间隔区的赫赛汀-HC-CAAX抗体都能被异戊烯化 (图12)。

[0544] 3-3. 使用FTase和NBD-GPP对赫赛汀-LC-CAAX进行异戊烯化

[0545] 通过使用上述方法中的NBD-GPP和FTase, 对赫赛汀-LC-GCVIM、赫赛汀-LC-G₅CVIM、赫赛汀-LC-G₇CVIM和赫赛汀-LC-G₁₀CVIM抗体进行异戊烯化。对与各个抗体的 (多条) 轻链 (约25000道尔顿) 对应的 (多条) 蛋白质带进行荧光检测。该结果证实, 每个具有各种长度的间隔区的赫赛汀-LC-CAAX抗体都能被异戊烯化 (图13)。

[0546] 3-4. 使用FTase和NBD-GPP对抗cMET-HC-CAAX进行异戊烯化

[0547] 通过使用上述方法中的NBD-GPP和FTase, 对抗cMET-HC-G₇CVIM和抗cMET-HC-G₁₀CVIM抗体进行异戊烯化。对与各个抗体的 (多条) 重链 (约50000道尔顿) 对应的 (多条) 蛋白质带进行荧光检测。该结果证实, 每个具有各种长度的间隔区的抗cMET-HC-CAAX抗体都能被异戊烯化 (图14)。

[0548] 3-5. 使用FTase和NBD-GPP对抗cMET-LC-CAAX进行异戊烯化

[0549] 通过使用上述方法中的NBD-GPP和FTase, 对抗cMET-LC-G₇CVIM和抗cMET-LC-G₁₀CVIM抗体进行异戊烯化。对与各个抗体的 (多条) 轻链 (约25000道尔顿) 对应的 (多条) 蛋白质带进行荧光检测。该结果证实, 每个具有各种长度的间隔区的抗cMET-LC-CAAX抗体都能被异戊烯化 (图15)。

[0550] 3-6. 使用GGTase I和NBD-FPP对赫赛汀-HC-CAAX进行异戊烯化

[0551] 通过使用上述方法中的NBD-FPP和GGTase I, 对赫赛汀-HC-G₁₀CVLL抗体进行异戊烯化。对与在C-末端通过G₁₀间隔区连接CAAX-基序的抗体的 (多条) 重链 (约50000道尔顿) 对应的蛋白质带进行荧光检测。该结果证实, 赫赛汀-HC-CAAX抗体能够被GGTase I异戊烯化 (图16)。

[0552] 3-7. 使用GGTase I和NBD-FPP对赫赛汀-LC-CAAX进行异戊烯化

[0553] 通过使用上述方法中的NBD-FPP和GGTase I, 对赫赛汀-LC-G₁₀CVLL抗体进行异戊烯化。对与在C-末端通过G₁₀间隔区连接CAAX-基序的抗体的 (多条) 轻链 (约25000道尔顿) 对应的蛋白质带进行荧光检测。该结果证实了赫赛汀-LC-CAAX抗体能够被GGTase I异戊烯化 (图16)。

[0554] 3-8. 使用FTase和等同底物对赫赛汀-LC-CAAX进行异戊烯化

[0555] 赫赛汀-LC-G₇CVIM

[0556] 通过使用上述方法中的LCB14-0512和FTase, 对赫赛汀-LC-G₇CVIM抗体进行异戊烯化。在未处理PNGase F时使异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM抗体在还原条件下进行LC/MS分析的情况中, 可预知重链和轻链的理论分子量分别为50597道尔顿和24480道尔顿。如图17所示, 测得的重链和轻链的实验分子量分别是50600道尔顿和24479道尔顿。理论分子量和实验分子量的差值在标准误差范围内。该结果证实了赫赛汀-LC-G₇CVIM抗体被FTase和等同底物 (LCB14-0512) 异戊烯化。

[0557] 赫赛汀-LC-G₁₀CVIM

[0558] 通过使用上述方法中的LCB14-0512和FTase,对赫赛汀-LC-G₁₀CVIM抗体进行异戊烯化。在未处理PNGase F时使异戊烯化的赫赛汀-LC-G₁₀CVIM抗体在还原条件下进行LC/MS分析的情况下,可预知重链和轻链的理论分子量分别为50596道尔顿和24651道尔顿。如图18所示,测得的重链和轻链的实验分子量分别是50601道尔顿和24651道尔顿。理论分子量和实验分子量的差值在标准误差范围内。该结果证实了赫赛汀-LC-G₁₀CVIM抗体被FTase和等同底物(LCB14-0512)异戊烯化。

[0559] 实施例4:使用点击化学法的药物的缀合

[0560] 4-1:异戊烯化的Ab(M)-CAAX的再次氧化

[0561] 进行透析过滤,以除去根据上述方法制备的异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM中的过量反应物。使用CuSO₄再次氧化该抗体。进行透析过滤,以除去CuSO₄。

[0562] 4-2.使用点击化学和接头-药物进行Ab(M)-CAAX的药物缀合

[0563] 进行10分钟的再次氧化和异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM与化合物LCB14-0536之间的点击化学反应。对获得的缀合物(LCB14-0104)(图26)进行LC/MS分析。在未处理PNGase F时使抗体在还原条件下进行LC/MS分析的情况下,可预知重链和轻链的理论分子量分别为49153道尔顿和25410道尔顿。如图19所示,测得的重链和轻链的实验分子量分别是49154道尔顿和25408道尔顿。理论分子量和实验分子量的差值在标准误差范围内。该结果证实,异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM抗体通过点击化学反应与药物形成缀合物。

[0564] 4-3.赫赛汀-LC-CAAX-药物缀合物的分析

[0565] 使缀合物LCB14-0101经受带有醚-5PW柱(7.5x75mm,10 μ m,Tosoh Bioscience, USA)的疏水作用色谱-高效液相色谱。含1.5M硫酸铵的50mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)用作缓冲液A,含20%异丙醇的50mM磷酸钾缓冲液(pH7.0)用作缓冲液B。90%A/10%B保持5分钟。在以后的30分钟内,用从90%A/10%B到10%A/90%B的线性梯度的缓冲液进行洗提。流速和温度分别设定为0.8mL/min和25℃。接着在254nm和280nm下进行检测。未修饰的赫赛汀-LC-G₇CVIM和异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM作为对照使用。未修饰的赫赛汀-LC-G₇CVIM、异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM和缀合物LCB14-0101的保持时间分别是9.6分钟、11.7分钟和12.4分钟(图20)。

[0566] 实施例5:ADC的抗增殖作用

[0567] 5-1.细胞系

[0568] 使用商业上可用的人乳房癌细胞系MCF-7(对正常呈HER2阴性)、MDA-MB-468(HER2阴性)和SK-BR-3(HER2阳性)。根据为商业上可用的细胞系提供的技术规格培养细胞系。

[0569] 5-2.测试样品

[0570] 使用商业上可用的赫赛汀抗体和赫赛汀-LC-G₇CVIM作为抗体。使用LCB14-0537(MMAF)、LCB14-0508(MMAF-OMe)和LCB14-0562(MMAE)作为药物。使用LCB14-0101、LCB14-0102和LCB14-0103(图26)作为蛋白质-活性剂缀合物。使用LCB14-0512异戊烯化赫赛汀-LC-G₇CVIM。使用LCB14-0592使异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM进行点击反应,以缀合 β -葡萄糖苷酸接头(BG)-MMAF,由此制备LCB14-0101。另外,使用LCB14-0589使异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM进行点击反应,以缀合Val-Cit接头(VC)-MMAF-OMe,由此制备LCB14-0102。进一步地,使用LCB14-0598使异戊烯化的赫赛汀-LC-G₇CVIM进行点击反应,以缀合 β -葡萄糖苷酸

接头(BG)-MMAE,由此制备LCB14-0103。

[0571] 5-3.测试方法

[0572] 测试了抗体、药物和缀合物针对癌细胞的抗增殖活性。将细胞接种于96孔组织培养板中,每个孔中有 1×10^4 个细胞。培养24小时后,加入各浓度的抗体、药物和缀合物。72小时后用SRB染料对活细胞数量计数。使用SpectraMax190 (Molecular Device, USA) 测量540nm的吸光度。

[0573] 5-4.测试结果

[0574] LCB14-0101 (赫赛汀-LC-G₇CVIM-BG-MMAF)

[0575] 赫赛汀-LC-G₇CVIM对MCF-7、MDA-MB-468和SK-BR-3的IC₅₀是10μg/mL或更高。LCB14-0101 (MMAF缀合物) 对MCF-7和MDA-MB-468的IC₅₀分别为8.09μg/mL和4.18μg/mL,其未表达或表达低水平的HER2,而它对SK-BR-3的IC₅₀为0.11μg/mL,其超表达HER2。除了其良好的抑制活性外,LCB14-0101的选择性是赫赛汀-LC-G₇CVIM的40-80倍。因此,可以证明LCB14-0101同时具有细胞毒性药物效力和抗HER2选择性(图21)。

[0576] LCB14-0102 (赫赛汀-LC-G₇CVIM-VC-MMAF-OM)

[0577] 赫赛汀-LC-G₇CVIM对MCF-7和SK-BR-3的IC₅₀是10μg/mL。LCB14-0102 (MMAF-OMe缀合物) 对MCF-7的IC₅₀为4.38μg/mL,而对SK-BR-3的IC₅₀为0.15μg/mL。除了其良好的抑制活性外,LCB14-0102的选择性是赫赛汀-LC-G₇CVIM的30倍。因此,可以证实LCB14-0102同时具有细胞毒性药物效力和抗HER2选择性(图22)。

[0578] LCB14-0103 (赫赛汀-LC-G₇CVIM-BG-MMAE)

[0579] LCB14-0103 (MMAE缀合物) 对MCF-7的IC₅₀为7.25μg/mL,而对SK-BR-3的IC₅₀为0.072μg/mL。除了其良好的抑制活性外,LCB14-0103的选择性是赫赛汀-LC-G₇CVIM的100倍。因此,可以证实LCB14-0103同时具有细胞毒性药物效力和抗HER2选择性(图23)。

[0580] 其他实施方案

[0581] 根据前面的描述可对本文中描述的发明做出变化与修改使它适应于各种用途与条件将是显而易见的。这样的实施例也在下面的权利要求书的范围内。

[0582] 本文的变量的任何定义中所列元素的叙述包括该变量作为任何所列元素的单独元素或组合(或亚组合)的定义。本文的实施方案的叙述包括作为任何单个实施方案或与其他任何实施方案或其部分组合的实施方案。

[0583] 本说明书中所提到的所有专利和出版物都通过引用的方式并入本文,如同每篇独立的专利和出版物被特别且单独指出通过引用的方式并入一样。

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGXGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFIYAMDYW	GQGTILVTVS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLSG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPISEKTI	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK	GCVM		

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCRASQDVN	TAVAWYQQR	GKAEKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGSRSGTD	FTLTISLQ	EDFATYYCQ	HYTTPPTFG	GTKVEIKRSV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNFF	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSILT
190	200	210			
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSPVTKSFN	RGEC		

图1

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNIAI	LMNSLRAED	TAVYYCSPWG	GDGFYAMDYN	GQGTIVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGFSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFFAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHNKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYCKKVSNA	LPAPIEKTIS	KANGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MNEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVIT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQK	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGSRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSSTLT
190	200	210			
LSKADYEKKH	VYACEVTHQG	LSSPVTKSEN	RGECGCVIM		

图2

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGTLVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTF	EVTCSVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVRNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSTI	AVEWESNGQP	ENNYKTTFPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQCNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK	GGGGGCVIN		

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPFS	LSASVGRVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQK	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGSRSGTD	FTLTSSSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSITL
190	200	210			
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

图3

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYINWVRQA	FGKGLEWVAE	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNIAI	LMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGTILVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSVVVT	VFSSSLGTQT	YICNVNHNKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCRAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTF	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVY	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFGSGRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAFSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLXSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT
190	200	210	220		
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGECSGGGGG	VIM	

图4

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFIAMDYW	GQGTLVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHNKPS	NTKVDKRVET	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFFPKP	KDTLMISRTF	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KARGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSTI	AVENESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450	460		
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK	GGGGGGGCVI	M	

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSAASVGDRV	ITCRASQDVN	TAVAWYQQK	GNAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGERSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIAPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT
190	200	210			
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

图5

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRNG	GDGFYANDYN	GQGTLVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSEKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHNKP	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCTVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLAHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFPYSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFTSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGR			

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVY	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKQ	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RPSSGRSGTD	FTLTSSLOP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	FREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSSTLT
190	200	210	220		
LSKADYEKKK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGECGGGGGG	GGVIM	

图6

重链

```

      10      20      30      40      50      60
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIRHWVROA FGKGLEWVAR IYPTNGYTRY

      70      80      90     100     110     120
ADSVKGRFTI SADTSKNIAI LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS

     130     140     150     160     170     180
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS

     190     200     210     220     230     240
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG

     250     260     270     280     290     300
PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN

     310     320     330     340     350     360
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKAK LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE

     370     380     390     400     410     420
LTKNQVSLTCL LVKGFPYSDI AVEWESNQCQ ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW

     430     440     450     460
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGGGGGG CVIM

```

轻链

```

      10      20      30      40      50      60
DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPK GRAPKLLIYS ASFLYSGVPS

      70      80      90     100     110     120
RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP

     130     140     150     160     170     180
SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSITLT

     190     200     210
LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

```

图7

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHNVROA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQCTLVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHPKS	NTKVDRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNQQP	ENNYKTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVIT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQK	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGSRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIPPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQMKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT
190	200	210	220		
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGECSGGGGG	GGGGCVLM	

图8

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFWIK	DTYIHWRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAD	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQSTLTVVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVF	LAPSSKSTISG	GTAALGCLVK	DYFPEFVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVFP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTF	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKFREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSTI	AVENESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450	460		
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK	GGGGGGGGGG	CVLL	

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGDRVY	ITCRASQDVN	TAVAWYQQK	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFSGSRSGTD	FTLTISSLQF	EDFATYYCQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVTFIFP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSILT
190	200	210			
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC		

图9

重链

10	20	30	40	50	60
EVQLVESGGG	LVQPFGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVROA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY
70	80	90	100	110	120
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAI	LQMNSLRAED	TAVYYCSRNG	GDGFYANDYW	GQGTLVTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VFSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGC
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPFKP	KDTLMISRTF	EVTQCVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVRNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEXTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSTI	AVEWESNGQP	ENNYKTTFPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

轻链

10	20	30	40	50	60
DIQMTQSPSS	LSASVGERVT	ITCRASQDWN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS
70	80	90	100	110	120
RFGSGRSGTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRSV	AAPSVFIFPF
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLINNFY	FREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT
190	200	210	220		
LSKADYEKKK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGECCGGGGG	GGGGCVLL	

图10

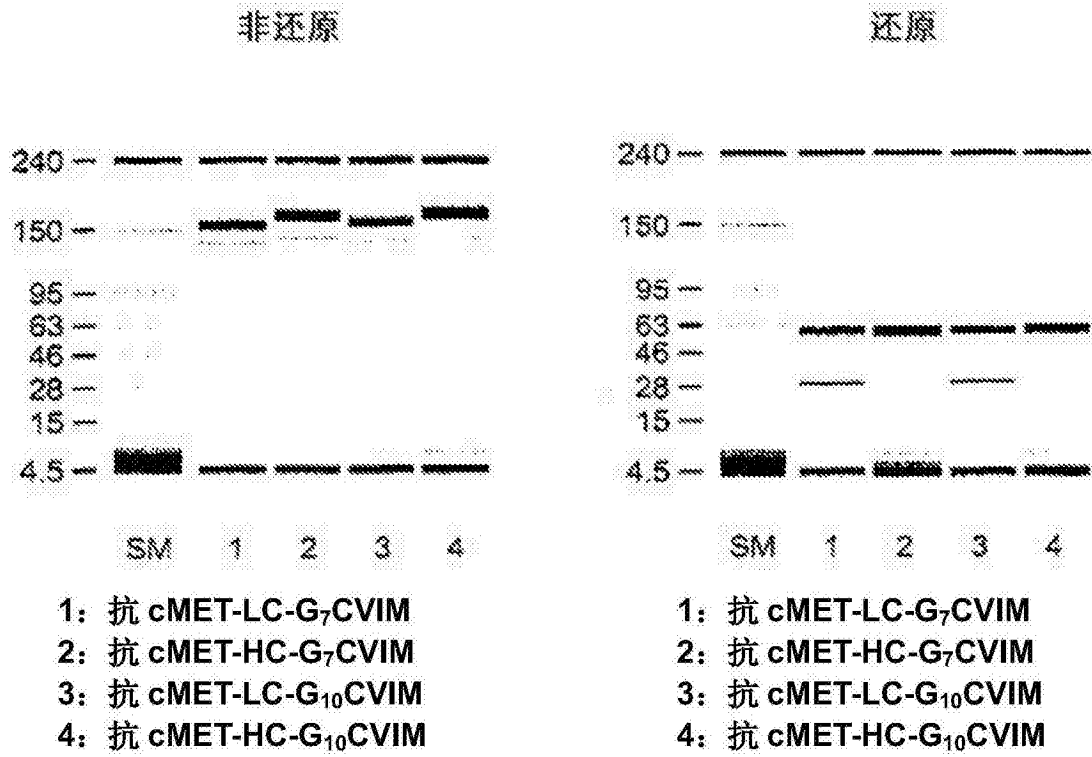


图11

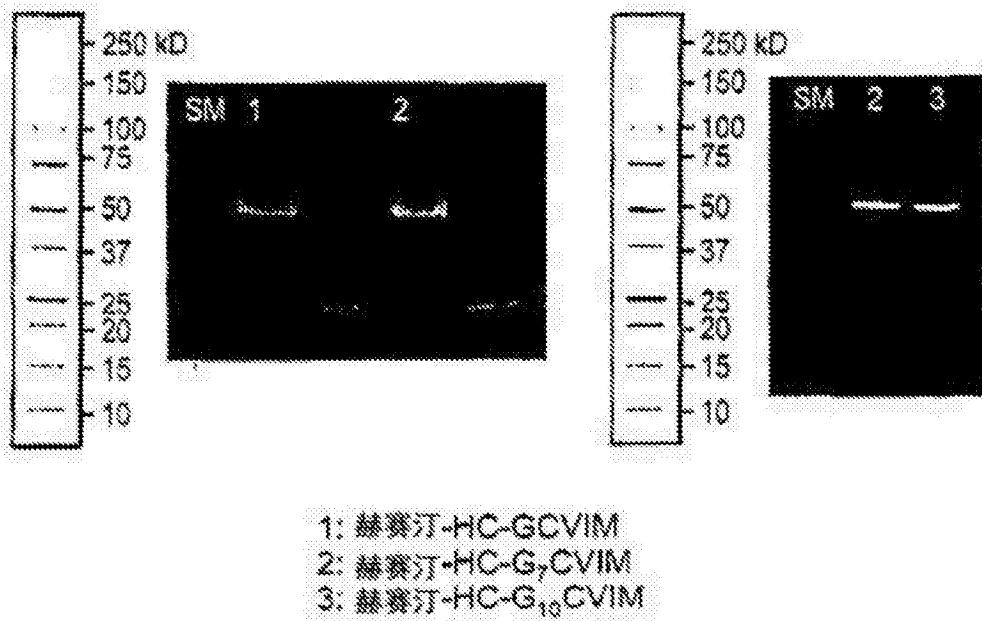


图12

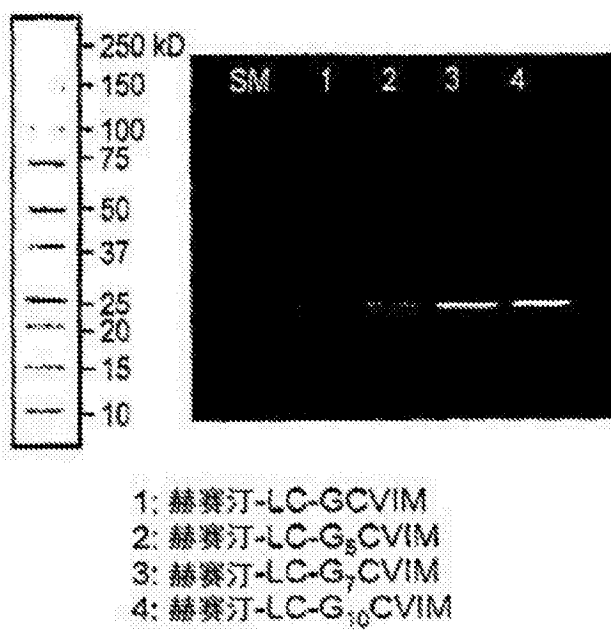


图13

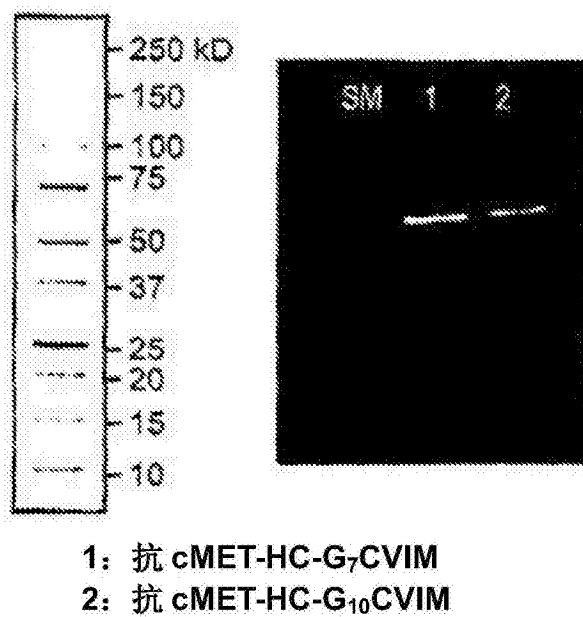


图14

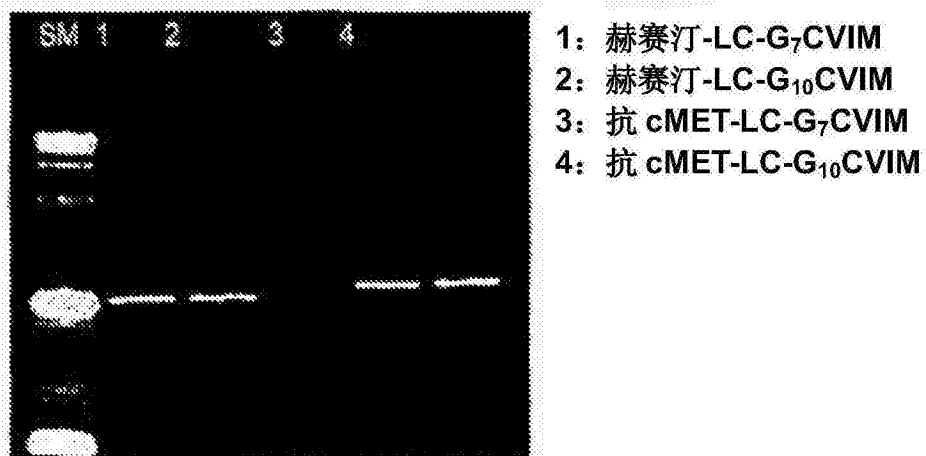


图15



图16

样品	理论质量 (道尔顿)			实验质量 (道尔顿)			δ 量 (道尔顿)
	HC	LC, 裸露的	LC, 异戊烯化	HC	LC, 裸露的	LC, 异戊烯化	
赫赛汀-LC-G-CVIM	49152*	24275	-	49156*	24274	-	
异戊烯化的赫赛汀-LC-G-CVIM	50397**	24275	24480	50600**	-	24479	205
*PNGase F 处理							
**PNGase F 未处理							

图17

样品	理论质量 (道尔顿)			质量 (道尔顿)			Δ 量 (道尔顿)
	HC	LC, 裸露的	LC, 异戊烯化	HC	LC, 裸露的	LC, 异戊烯化	
赫赛汀-LC-G7CVIM	49152*	24446	-	49156*	24445	-	
异戊烯化的赫赛汀-LC-G7CVIM	50596**	24446	24651	50601**	-	24651	206
*PNGase F 处理							
**PNGase F 未处理							

图18

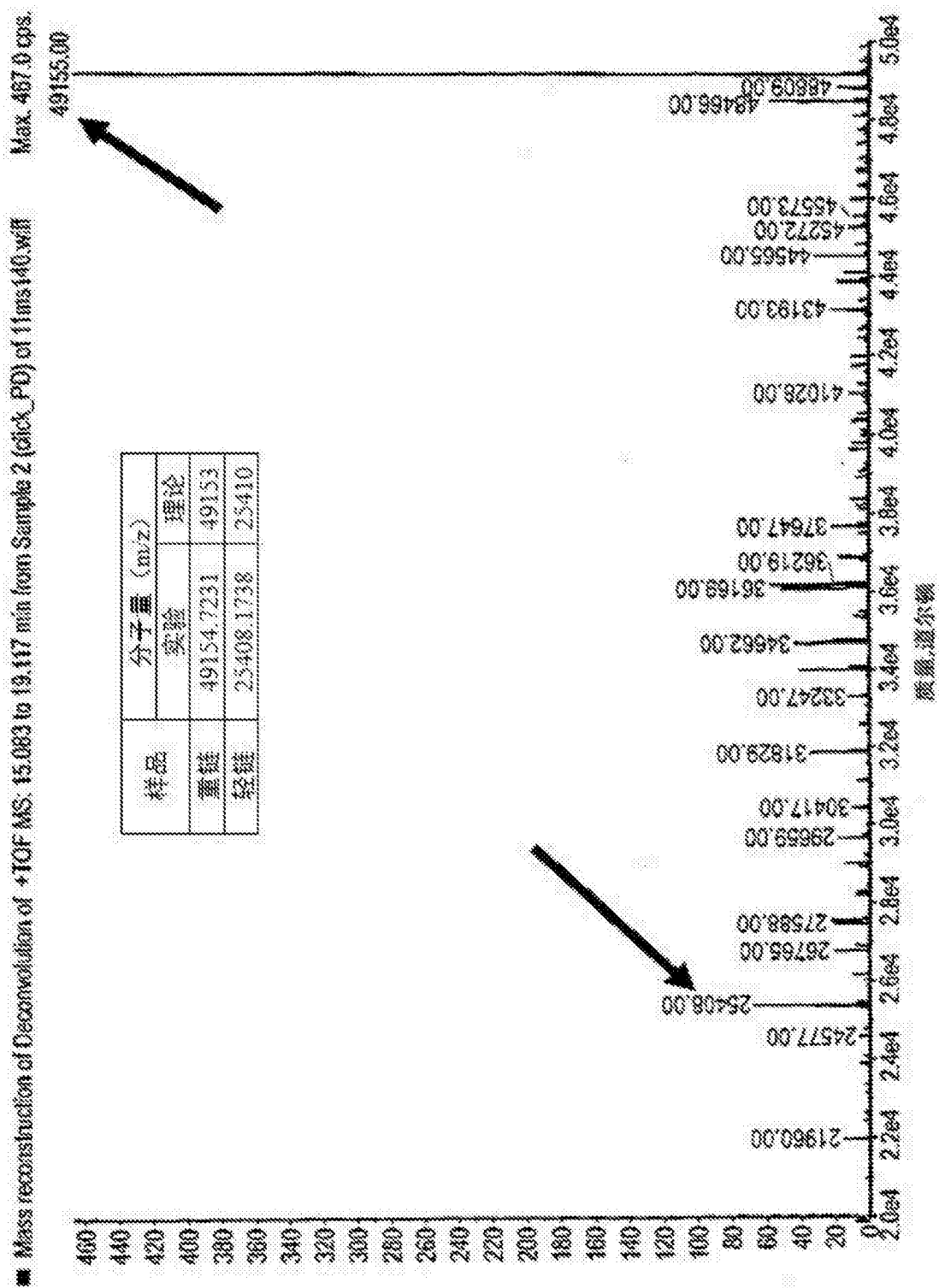


图19

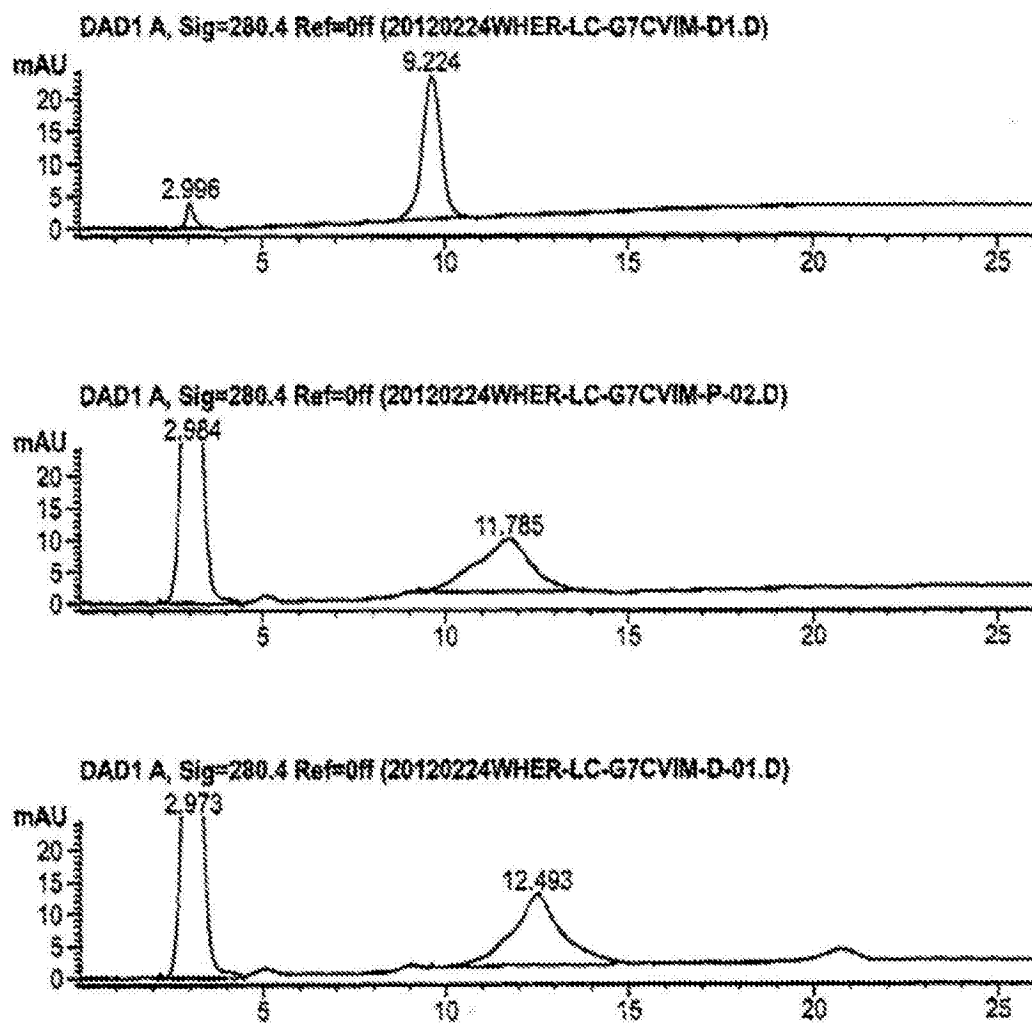


图20

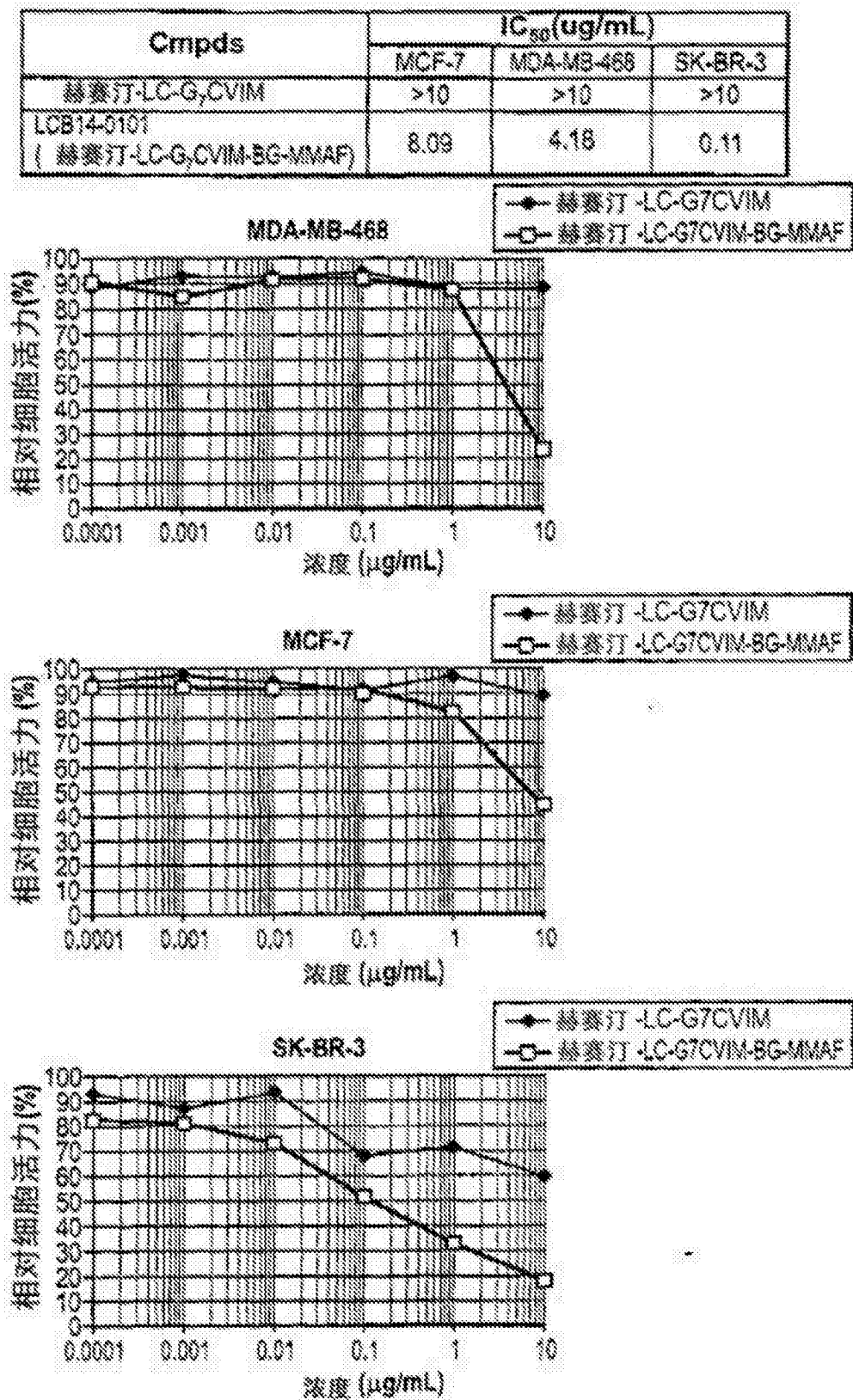


图21

Cmpds	IC ₅₀ (μ g/mL)	
	MCF-7	SK-BR-3
赫赛汀-LC-G ₇ CVIM	>10	>10
LCB14-0102 (赫赛汀-LC-G ₇ CVIM-VC-MMAF-Ome)	4.38	0.15

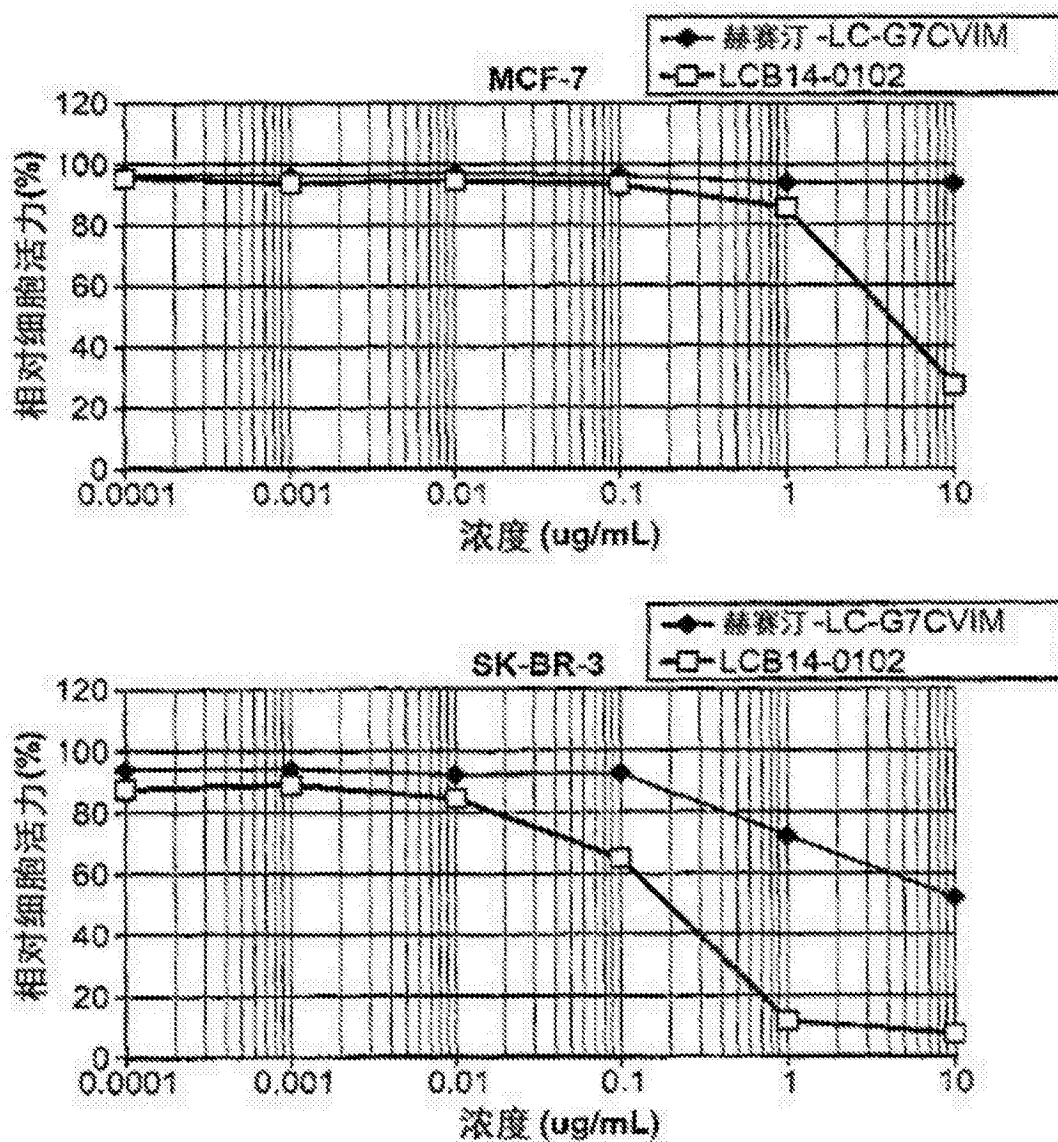


图22

ADC	IC ₅₀ (μ g/mL)	
	MCF-7	SK-BR-3
LCB14-0103 (赫赛汀-LC-G7CVIM-BG-MMAE)	7.25	0.072

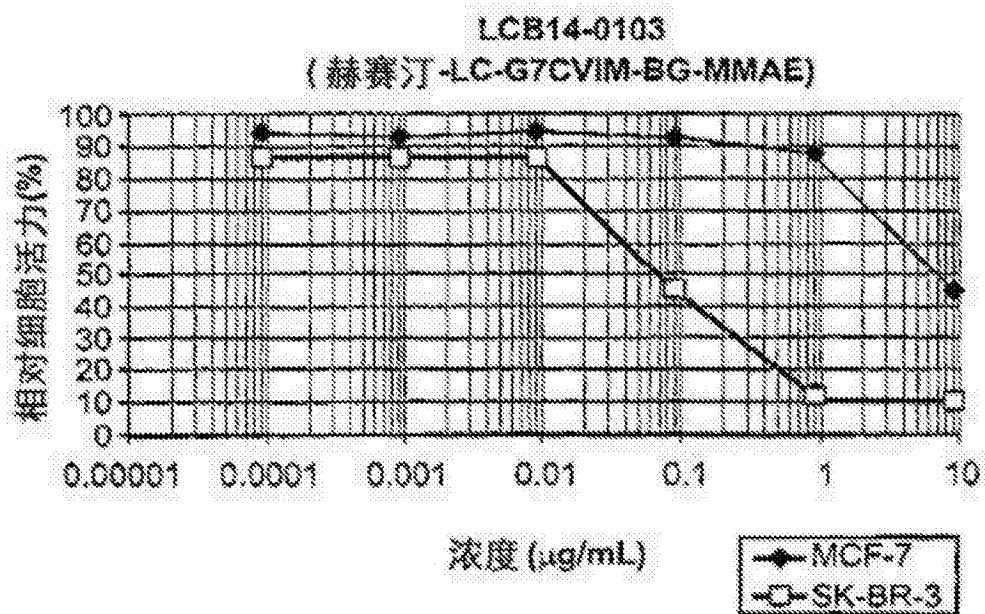


图23

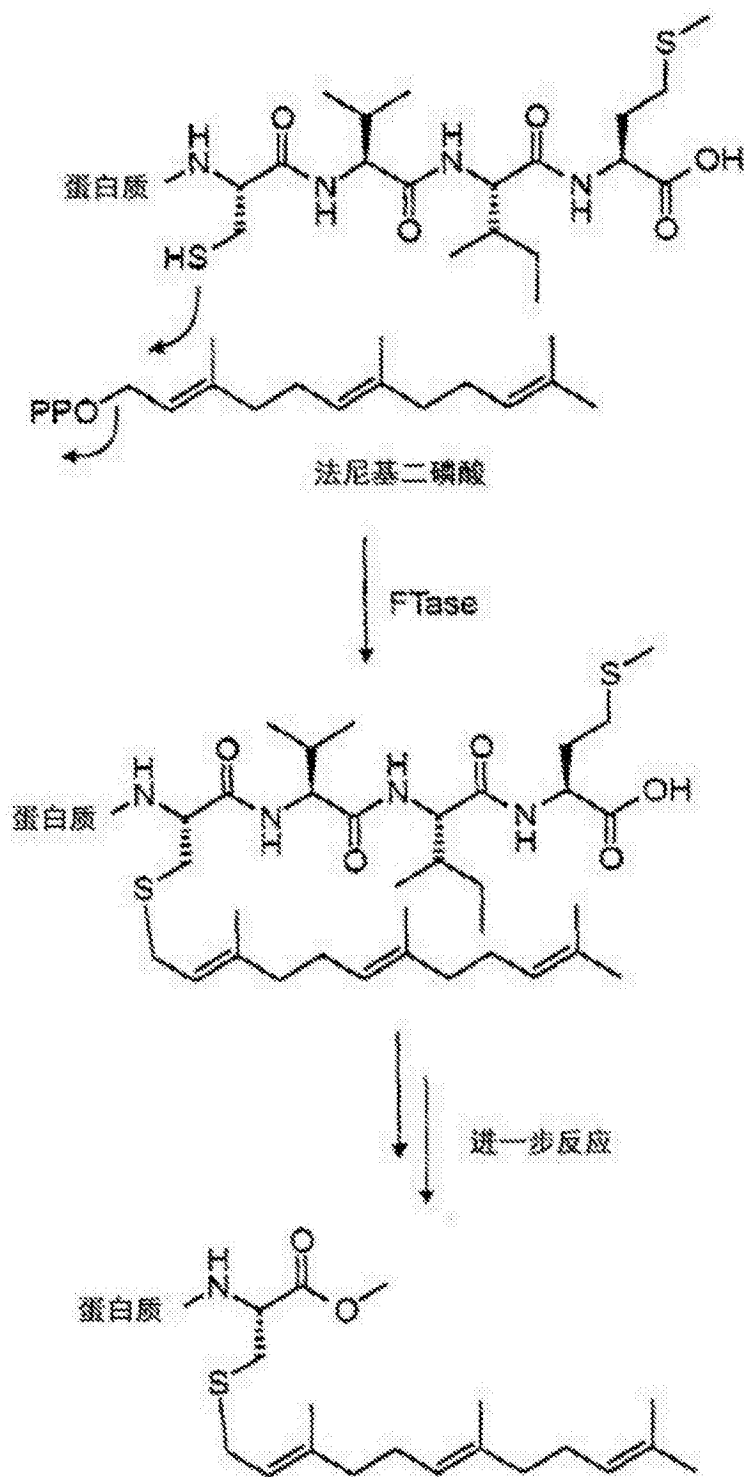


图24

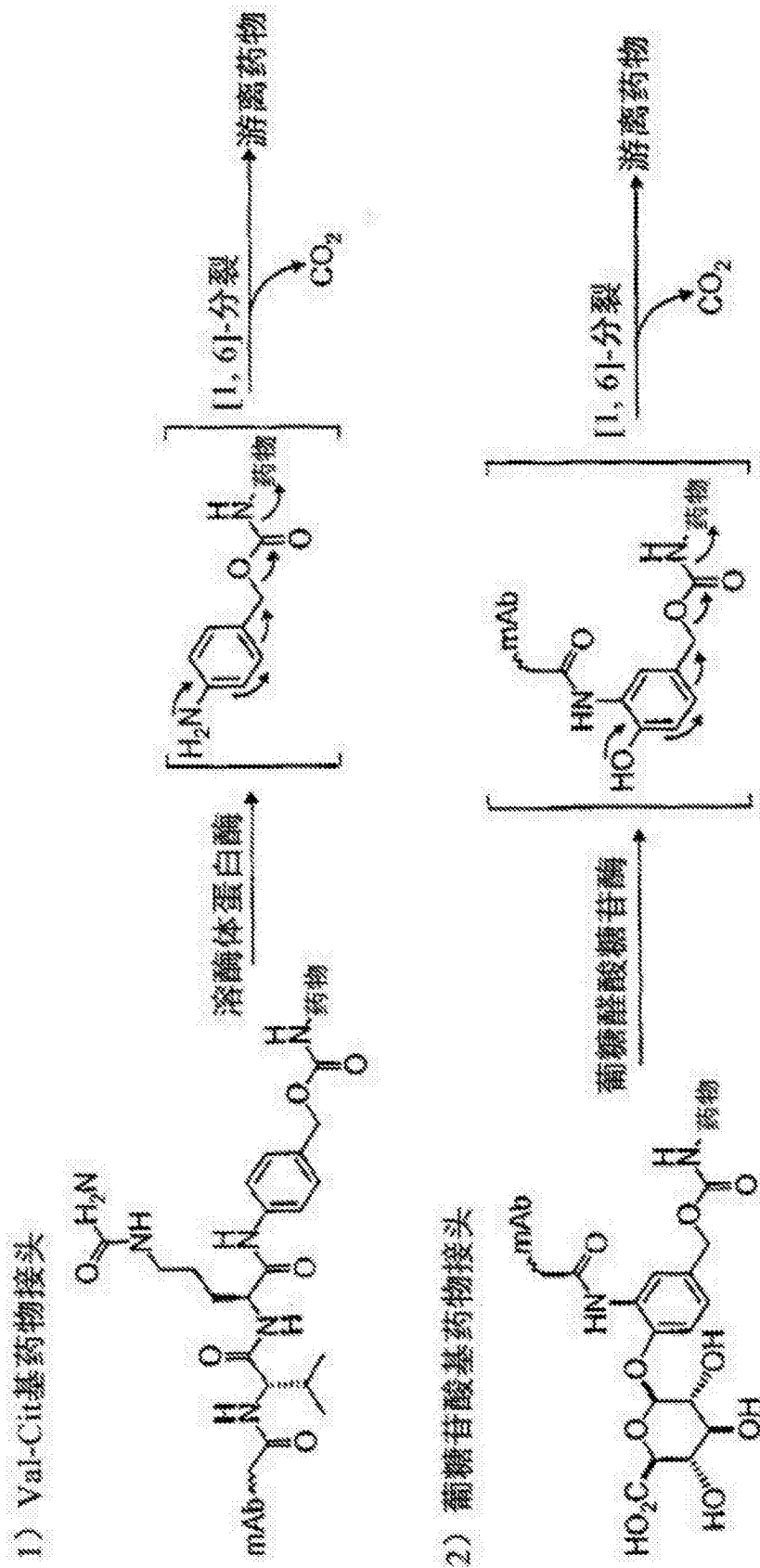


图25

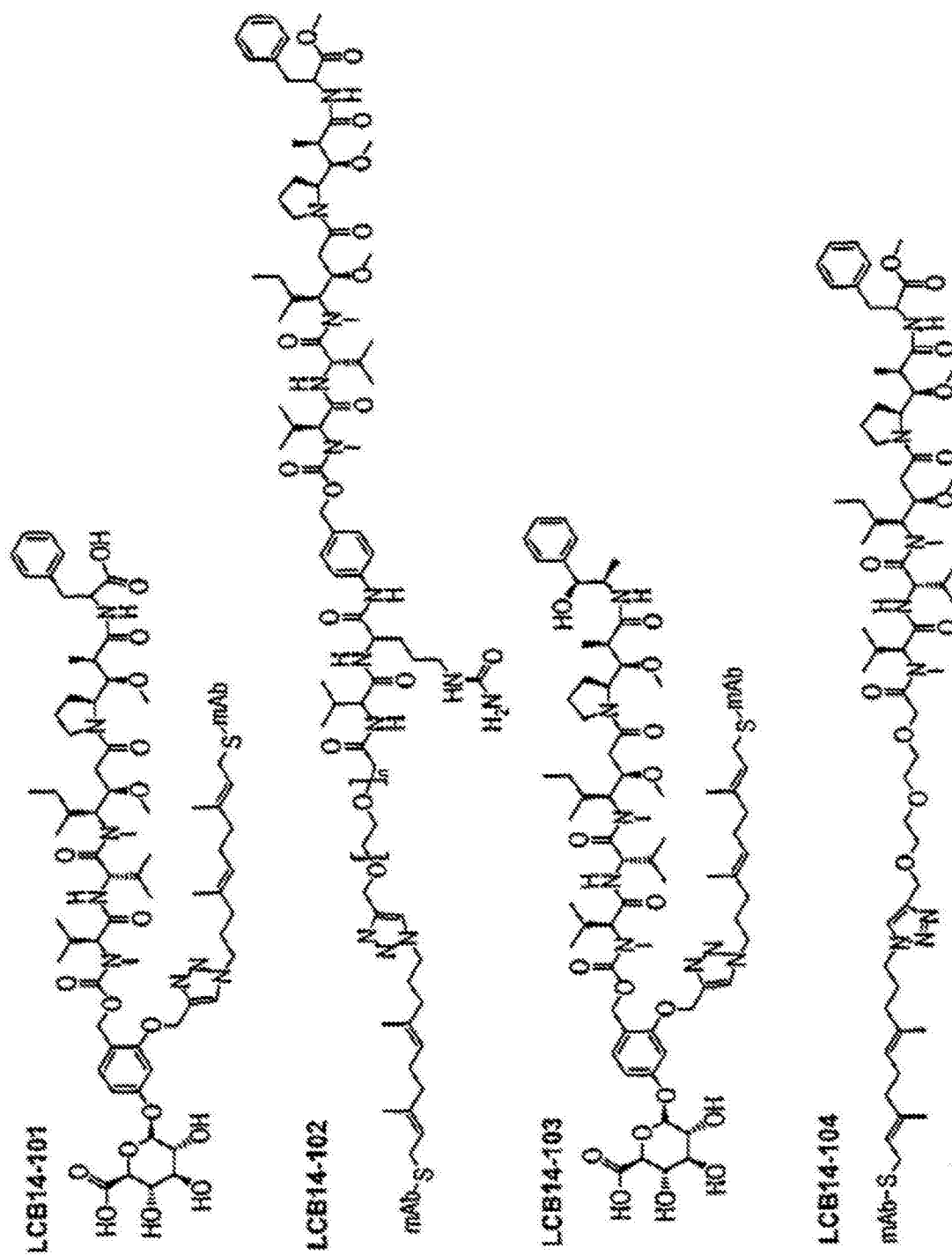


图26

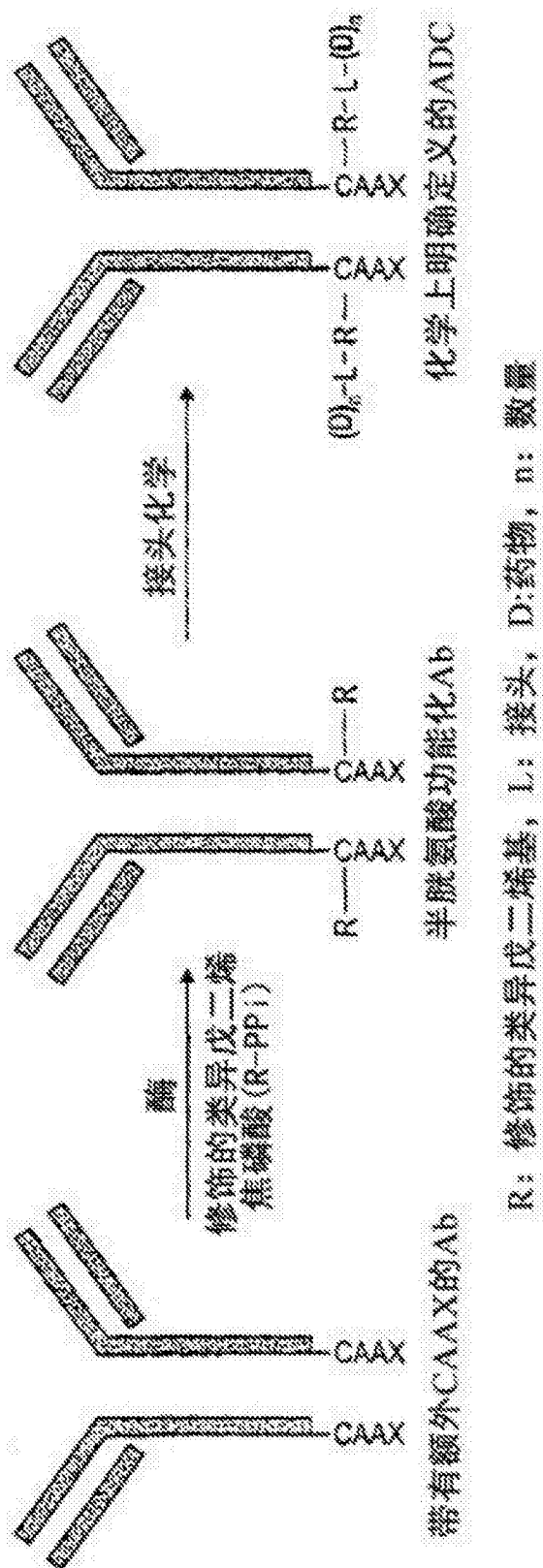


图27