(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113631194 A
(43)申请公布日 2021.11.09

(21)申请号 202080022987.0

(22)申请日 2020.03.20

(30)优先权数据
62/821,707 2019.03.21 US
62/856,942 2019.06.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/023897 2020.03.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/191306 EN 2020.09.24

(71)申请人 伊缪诺金公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 S·A·希尔德布兰德
D·F·米拉诺

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 黄海波

(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)

权利要求书35页 说明书101页 附图8页

(54)发明名称

制备细胞结合剂-药物缀合物的方法

(57)摘要

本发明提供制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA)。还提供通过本文所述的方法制备的缀合物以及其药物组合物和使用方法。

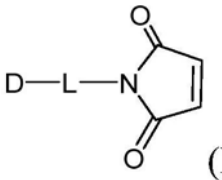
CN 113631194 A

1.一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

(a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

(b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中所述未配对半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化;和

(c)使所述CysCBA与式(I)化合物:



(I)

或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物,其中步骤(a)中的所述还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);并且步骤(b)中的所述CysCBA未纯化即用于步骤(c),其中:

D为细胞毒性剂;并且

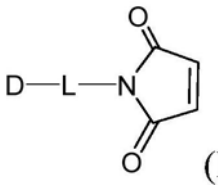
L为接头。

2.一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

(a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

(b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中所述未配对半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化;和

(c)使所述CysCBA与式(I)化合物:



(I)

或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物,

其中步骤(a)中的所述还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);步骤(b)中的所述CysCBA未纯化即用于步骤(c),并且选自步骤(a)至(c)的任一个或多个步骤是连续地执行,其中:

D为细胞毒性剂;并且

L为接头。

3.如权利要求2所述的方法,其中步骤(a)至(c)是连续地执行。

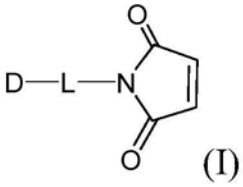
4.一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述细胞结合剂-细胞

毒性剂缀合物(ADC)包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

(a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

(b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中所述未配对半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化;和

(c)使所述CysCBA与式(I)化合物:



(I)

或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物;和

(d)去除未缀合的式(I)化合物;

其中步骤(a)中的所述还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);步骤(b)中的所述CysCBA未纯化即用于步骤(c),选自步骤(a)至(d)的任一个或多个步骤是连续地执行;并且其中:

D为细胞毒性剂;并且

L为接头。

5.如权利要求4所述的方法,其中步骤(a)至(d)是连续地执行。

6.如权利要求4或5所述的方法,其中所述方法还包括步骤(e)将所述缀合物交换至稳定缓冲液中。

7.如权利要求6所述的方法,其中步骤(e)是连续地执行。

8.如权利要求4-7中任一项所述的方法,其中使用单程切向流过滤(SPTFF)和/或逆流透滤来去除所述未缀合的式(I)化合物和/或将所述ADC交换至所述稳定缓冲液中。

9.如权利要求2-8中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中,当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物之后,所述cCysCBA和/或所述还原剂连续地添加至反应容器中。

10.如权利要求9所述的方法,其中所述cCysCBA和所述还原剂连续地添加至所述反应容器中,同时连续地抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

11.如权利要求10所述的方法,其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述还原剂和所述cCysCBA的组合流动速率相同。

12.如权利要求2-11中任一项所述的方法,其中在步骤(b)中,当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物之后,所述还原的细胞结合剂和所述选择性氧化剂连续地添加至反应容器中。

13.如权利要求12所述的方法,其中所述还原的细胞结合剂和所述选择性氧化剂连续地添加至所述反应容器中,同时连续地抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

14.如权利要求13所述的方法,其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述还原的细胞结合剂和所述选择性氧化剂的组合流动速率相同。

15.如权利要求2-14中任一项所述的方法,其中在步骤(c)中,当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物之后,所述CysCBA和所述式(I)化合物连续地添加至反应容器中。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述CysCBA和所述式(I)化合物连续地添加至反应容器中,连续地抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

17.如权利要求16所述的方法,其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述CysCBA和所述式(I)化合物的组合流动速率相同。

18.如权利要求9-17中任一项所述的方法,其中所述反应容器为连续搅拌槽反应器(CSTR)。

19.如权利要求10、11、13、14和16-18中任一项所述的方法,其中所述流式反应器为塞流反应器(PFR)。

20.如权利要求3-19中任一项所述的方法,其中使用单程切向流过滤(SPTFF)来去除所述未缀合的药物。

21.如权利要求3-19中任一项所述的方法,其中使用逆流透滤来去除所述未缀合的药物。

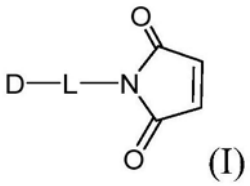
22.如权利要求6-21中任一项所述的方法,其中使用SPTFF和/或逆流透滤将所述ADC交换至所述稳定缓冲液中。

23.如权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述CysCBA是半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段并且所述方法包括以下步骤:

(a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个工程改造的半胱氨酸残基的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)或其抗原结合片段反应以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

(b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成所述CysAb,其中所述工程改造的半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化;和

(c)使所述CysAb与所述式(I)化合物:



(I)

或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC),其中步骤(a)中的所述还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b);并且步骤(b)中的所述CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c),其中:

D为细胞毒性剂;并且

L为接头。

24.如权利要求1或23所述的方法,其中所述步骤(a)、(b)和(c)是在同一反应容器中进行。

25.如权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)或其抗原结合片段中的一个或多个链间二硫键是在步骤(a)中被还原。

26.如权利要求25所述的方法,其中所述一个或多个链间二硫键是在步骤(b)中再形

成。

27.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述还原剂为三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)、三羟基丙基膦(THPP)、三(2-氰基乙基)膦、二硫苏糖醇(DTT)、二环己基膦基)苯磺酸、双(对磺酸根苯基)苯基膦、(二苯基膦基)苯磺酸、(二苯基膦基)苯甲酸、三氟甲磺酸2-(二苯基膦基)-N,N,N-三甲基苯甲基铵、(二苯基膦基)乙胺、2-(二异丙基膦基)乙胺或3-(二苯基膦基)丙胺(DPPA)。

28.如权利要求27所述的方法,其中所述还原剂为TCEP或DPPA。

29.如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述氧化剂为脱氢抗坏血酸(DHAA)、硫酸铜、氧气或空气。

30.如权利要求29所述的方法,其中所述氧化剂为DHAA。

31.如权利要求1-30中任一项所述的方法,其中步骤(a)的反应是在5.0与8.5之间的pH下进行。

32.如权利要求31所述的方法,其中步骤(a)的反应是在6.0与7.5之间的pH下进行。

33.如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中步骤(b)的反应是在5.0与8.5之间的pH下进行。

34.如权利要求33所述的方法,其中步骤(b)的反应是在6.0与7.5之间的pH下进行。

35.如权利要求1-34中任一项所述的方法,其中步骤(c)的反应是在5.0与8.5之间的pH下进行。

36.如权利要求35所述的方法,其中步骤(c)的反应是在6.0与7.5之间的pH下进行。

37.如权利要求1-34中任一项所述的方法,其中步骤(c)的反应是在5.5与6.5之间的pH下进行。

38.如权利要求37所述的方法,其中步骤(c)的反应是在pH 6.0下进行。

39.如权利要求1-38中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在步骤(c)中使所述CysCBA与所述细胞毒性剂反应之前调节步骤(b)之后的所述反应混合物的pH。

40.如权利要求1-38中任一项所述的方法,其中步骤(b)之后的所述反应混合物的pH未在步骤(c)中使所述CysCBA与所述细胞毒性剂反应之前进行调节。

41.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述还原剂为TCEP并且步骤(a)的反应是在6.0与8.0之间的pH下进行。

42.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述还原剂为TCEP并且步骤(a)的反应是在pH 7.5下进行。

43.如权利要求41或42所述的方法,其中所述氧化剂为DHAA并且步骤(b)的反应是在pH 7.5下进行。

44.如权利要求41-43中任一项所述的方法,其中步骤(b)之后的所述反应混合物的pH是在步骤(c)中使所述CysCBA与所述细胞毒性剂反应之前从pH 7.5调节至pH 6.0。

45.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述还原剂为DPPA并且步骤(a)的反应是在6.0与8.0之间的pH下进行。

46.如权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述还原剂为DPPA并且步骤(a)的反应是在pH 6.5下进行。

47.如权利要求45或46所述的方法,其中所述氧化剂为DHAA并且步骤(b)的反应是在pH

6.5下进行。

48.如权利要求1-47中任一项所述的方法，其中通过切向流过滤(TFF)、吸附色谱、非吸附色谱、吸附过滤、选择性沉淀或其组合来纯化所述缀合物。

49.如权利要求48所述的方法，其中通过切向流过滤来纯化所述缀合物。

50.如权利要求1-49中任一项所述的方法，其中相对于所述cCysCBA过量的所述还原剂用于步骤(a)中。

51.如权利要求50所述的方法，其中所述还原剂与其cCysCBA的摩尔比率是在1:1与50:1之间、2:1与30:1之间或5:1与25:1之间。

52.如权利要求51所述的方法，其中所述还原剂与其cCysCBA的摩尔比率是在15:1与20:1之间。

53.如权利要求1-52中任一项所述的方法，其中步骤(a)中的所述还原剂与步骤(b)中的所述氧化剂的摩尔比率是在2:1与1:2之间。

54.如权利要求53所述的方法，其中所述还原剂与所述氧化剂的摩尔比率是在1.2:1与1:1.5之间。

55.如权利要求53所述的方法，其中所述还原剂与所述氧化剂的摩尔比率是在1:1与1:1.5之间。

56.如权利要求55所述的方法，其中所述还原剂与所述氧化剂的摩尔比率为1:1。

57.如权利要求55所述的方法，其中所述还原剂与所述氧化剂的摩尔比率为1:1.5。

58.如权利要求1-57中任一项所述的方法，其中相对于其CysCBA过量的所述式(I)化合物用于步骤(c)中。

59.如权利要求58所述的方法，其中对于每一当量的CysCBA，使用2与5之间摩尔当量的所述式(I)化合物。

60.如权利要求23-59中任一项所述的方法，其中所述CysAb是在一个或多个位置处具有工程改造的半胱氨酸残基的抗体，所述一个或多个位置选自所述抗体的重链的EU/OU编号位置40、43、84、88、103、112、113、114、115、131、132、133、134、135、136、137、138、139、161、168、172、234、235、236、237、238、239、244、245、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、260、262、265、267、270、272、274、279、280、282、283、284、285、286、288、289、293、295、297、298、303、305、307、308、309、311、312、313、314、315、316、317、318、325、326、327、328、329、330、332、334、338、339、340、341、343、345、360、361、362、375、376、377、378、380、382、384、385、386、387、389、390、391、413、422、423、424、427、428、430、431、433、434、435、436、437、438、440、442、443和446。

61.如权利要求23-59中任一项所述的方法，其中所述CysAb为如下抗体，其在所述抗体的重链的EU/OU编号位置442处具有工程改造的半胱氨酸残基。

62.如权利要求61所述的方法，其中所述CysAb是在两条重链的EU/OU编号位置442处均具有工程改造的半胱氨酸残基的抗体。

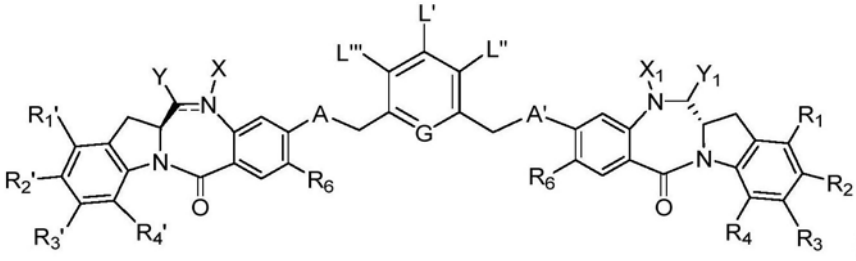
63.如权利要求1-62中任一项所述的方法，其中所述封端剂为半胱氨酸、高半胱氨酸、谷胱甘肽或其组合。

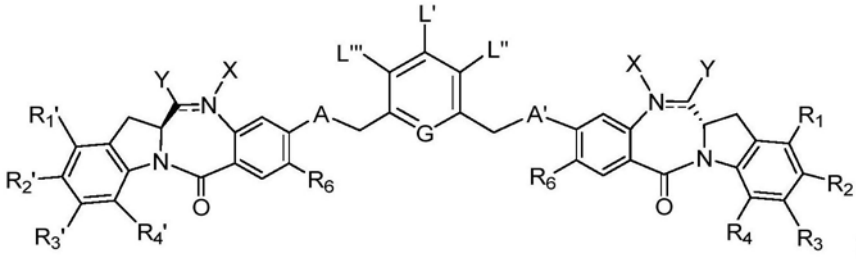
64.如权利要求1-63中任一项所述的方法，其中所述缀合物的大于95％、96％、97％、98％、99％或99.5％为单体。

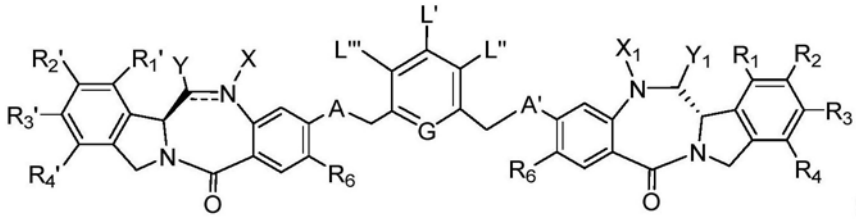
65.如权利要求1-64中任一项所述的方法，其中D为苯并二氮呯化合物。

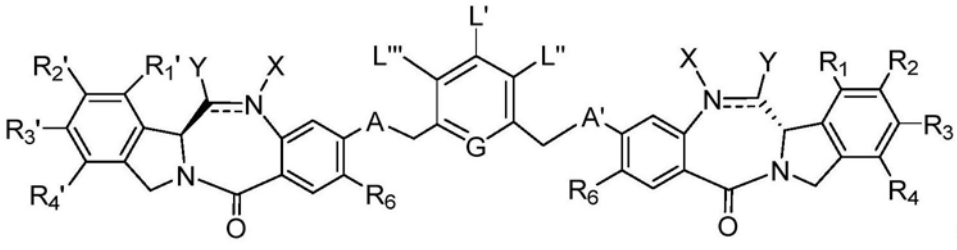
66.如权利要求1-64中任一项所述的方法，其中D为类美登素化合物。

67.如权利要求1-64中任一项所述的方法，其中D是由下式或其药学上可接受的盐表示：


(D-IA);


(D-IB);


(D-IC); 或


(D-ID);

其中：

N与C之间的双线═表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H或(C_1-C_4)烷基；并且当其为单键时，X为-H或胺保护部分，Y为-OH或-SO_3H或其药学上可接受的盐；

L'、L"和L"'之一是由下式表示：

-Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-(A')，或

-N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-(D')；

并且另两者各自独立地选自-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-(CH_2CH_2O)$_n$-R^c、卤素、胍盐[-NH(C=NH)NH_2]、-OR、-NR'R"、-NO_2、-NR'COR"、-SR、-SOR'、-SO_2R'、-SO_3H、-OSO_3H、-SO_2NR'R"、氰基、叠氮基、-COR'、-OCOR'和-OCONR'R"；

Z_1和Z_2之一为-C(=O)-，并且另一者为-NR_5-；

P_1为氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽；

R_{x1}为任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基；

R^e为-H、直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k为-H、具有1至6个碳原子、任选地携带仲氨基(例如-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)的直链、分支链环状烷基、或5元或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基；

R在每次出现时是独立地选自由-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n-R^c$、任选取代的具有6至18个碳原子的芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环或任选取代的含有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环组成的组；

R'和R"是各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR_2、-COR、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n-R^c$和任选取代的具有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环；

R^c为-H或任选取代的具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基；

n为整数1至24；

X_1是选自-H、胺保护基、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n-R^c$、任选取代的具有6至18个碳原子的芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环和任选取代的含有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环；

Y_1是选自-H、氧代基、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、任选取代的6元至18元芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环、任选取代的具有1至6个杂原子的3元至18元杂环；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'是各自独立地选自由-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n-R^c$、卤素、胍盐[-$NH(C=NH)NH_2$]、-OR、-NR'R"、-NO_2、-NCO、-NR'COR"、-SR、-SOR'、-SO_2R'、-SO_3^-H、-OSO_3H、-$SO_2NR'R"$、氰基、叠氮基、-COR'、-OCOR'和-OCONR'R"组成的组；

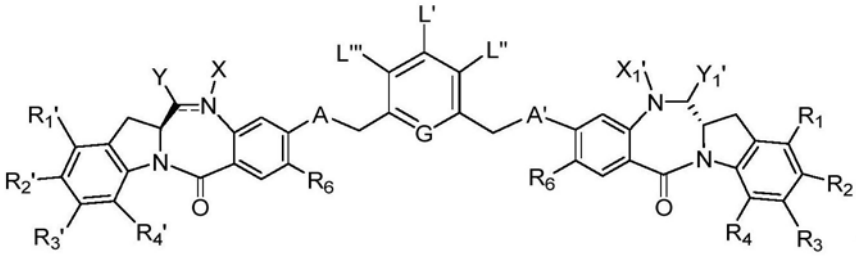
R_6为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素；

G为-CH-或-N-；

A和A'为相同或不同的，并且是独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR_5和-CRR'N(R_5)-；并且

R_5在每次出现时独立地为-H或任选取代的直链或分支链烷基。

68.如权利要求67所述的方法，其中D是由下式或其药学上可接受的盐表示：



(D-IA)。

69.如权利要求67或68所述的方法，其中X_1为-H、-OH、(C_1-C_3)烷基、卤基(C_1-C_3)烷基或苯基；并且Y_1'为-H、氧代基、(C_1-C_3)烷基或卤基(C_1-C_3)烷基。

70.如权利要求69所述的方法，其中X_1为-H、-OH或-Me；并且Y_1为-H或氧代。

71.如权利要求69所述的方法，其中X_1为-H；并且Y_1为-H。

72.如权利要求67-71中任一项所述的方法，其中A和A'为相同或不同的，并且是选自-O-和-S-。

73.如权利要求72所述的方法，其中A和A'为-O-。

74.如权利要求67-73中任一项所述的方法，其中R_6为-OMe。

75.如权利要求67-74中任一项所述的方法，其中R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'是独立地为-H、卤素、$-NO_2$、-OH、(C_1-C_3)烷基、卤基(C_1-C_3)烷基或(C_1-C_3)烷氧基。

76.如权利要求75所述的方法，其中R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'均为-H。

77.如权利要求67-76中任一项所述的方法，其中R、R'、R"和R_5各自独立地为-H或(C_1-C_3)烷基。

78.如权利要求67或68所述的方法，其中：

R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'均为-H；

R_6为-OMe；

X_1和Y_1均为-H；并且

A和A'为-O-。

79.如权利要求67-78中任一项所述的方法，其中L'、L"和L"'之一是由式(A')或(D')表示，并且其余为-H、具有1至6个碳原子的直链或分支链烷基、卤素、-OH、(C_1-C_6)烷氧基或$-NO_2$。

80.如权利要求79所述的方法，其中L'是由式(A')表示；并且L"和L"'均为-H。

81.如权利要求79所述的方法，L'是由式(D')表示；并且L"和L"'均为-H。

82.如权利要求67-81中任一项所述的方法，其中R_{x1}为具有1至6个碳原子的直链、分支链或环状烷基，其任选地经卤素、-OH、(C_1-C_3)烷基、(C_1-C_3)烷氧基、卤基(C_1-C_3)烷基或带电取代基或可电离基团Q取代。

83.如权利要求67-82中任一项所述的方法，其中L'是由下式表示：

$-NR_5-P_1-C(=O)-(CR_aR_b)_s-C(=O)-$ (B1')；

$-NR_5-P_1-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{s1'}-C(=O)-$ (B2')；

$-C(=O)-P_1-NR_5-(CR_aR_b)_s-C(=O)-$ (C1')，或

$-C(=O)-P_1-NR_5-Cy-(CR_aR_b)_{s1'}-C(=O)-$ (C2')

其中：

R_a和R_b在每次出现时各自独立地为-H、(C_1-C_3)烷基或带电取代基或可电离基团Q；

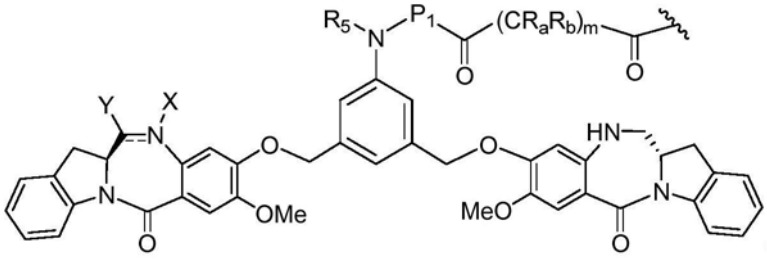
s为整数1至6；

s1'为0或整数1至6；并且

Cy是具有5或6个环碳原子的环状烷基，其任选地经卤素、-OH、(C_1-C_3)烷基、(C_1-C_3)烷氧基或卤基(C_1-C_3)烷基取代。

84.如权利要求83所述的方法，其中式(B2')和(C2')中的Cy为环己烷；并且s1'为0或1。

85.如权利要求83所述的方法，其中D是由下式或其药学上可接受的盐表示：



(D-IE)。

86.如权利要求83-85中任一项所述的方法，其中R_a和R_b均为H；并且R_5为H或Me。

87.如权利要求67-85中任一项所述的方法，其中所述带电取代基或可电离基团Q为i)-SO_3H、-Z'-SO_3H、-OPO_3H_2、-Z'-OPO_3H_2、-PO_3H_2、-Z'-PO_3H_2、-CO_2H、-Z'-CO_2H、-$NR_{11}R_{12}$或-Z'-$NR_{11}R_{12}$或其药学上可接受的盐；或者，ii)-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$或-Z'-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$；Z'为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基；R_{14}至R_{16}各自独立地为任选取代的烷基；并且X^-为药学上可接受的阴离子。

88.如权利要求87所述的方法，其中Q为-SO_3H或其药学上可接受的盐。

89.如权利要求67-88中任一项所述的方法，其中P_1是含有2至10个氨基酸残基的肽。

90.如权利要求89所述的方法，其中P_1是含有2至5个氨基酸残基的肽。

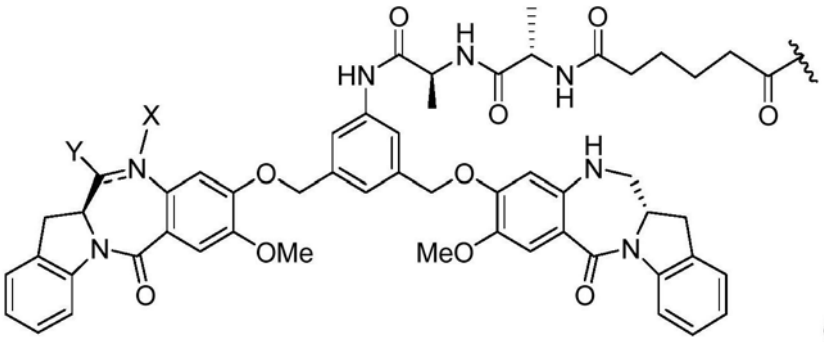
91.如权利要求89或90所述的方法，其中P_1是可通过蛋白酶裂解的肽。

92.如权利要求89所述的方法，其中P_1是可通过在肿瘤组织中表达的蛋白酶裂解的肽。

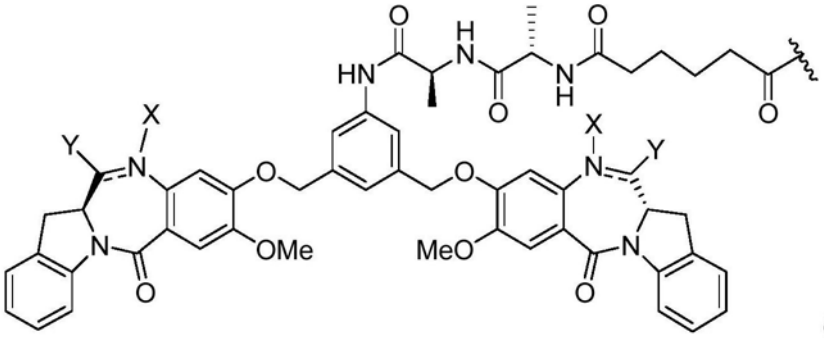
93.如权利要求67-88中任一项所述的方法，其中P_1为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N^9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:56)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ IDNO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:58)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe和Gln-Ala。

94.如权利要求93所述的方法，其中P_1为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

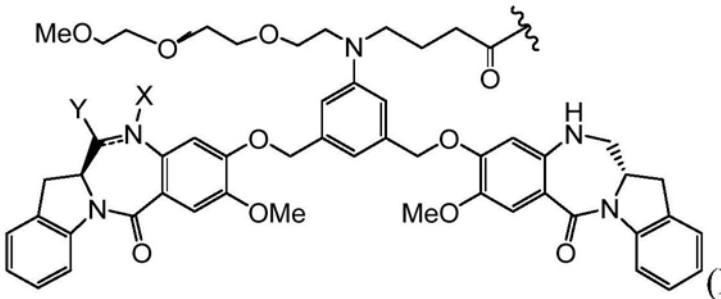
95.如权利要求67所述的方法，其中D是由以下结构式或其药学上可接受的盐表示：



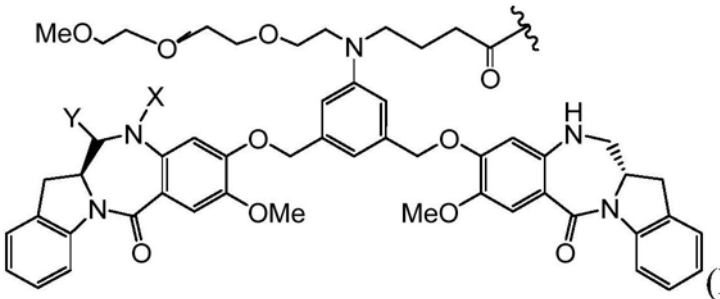
(D1);



(D2);



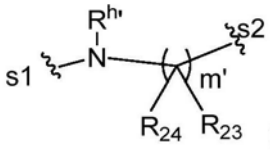
(D3); 或



(D4),

其中N与C之间的双线═表示单键或双键,其限制条件在于当其为双键时,X不存在并且Y为-H;并且当其为单键时,X为-H,Y为-SO_3H或其药学上可接受的盐。

96.如权利要求67-95中任一项所述的方法,其中-L-是由以下结构式或其药学上可接受的盐表示:



(L-I),

其中:

s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至顺丁烯二酰亚胺基的位点;

R_{23}和R_{24}在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;

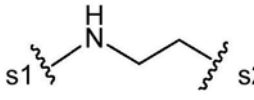
m'为0与10之间的整数;并且

$R^{h'}$为H或任选取代的烷基。

97.如权利要求96所述的方法,其中R_{23}和R_{24}均为H;并且m'为1与6之间的整数。

98.如权利要求96或97所述的方法,其中$R^{h'}$为H。

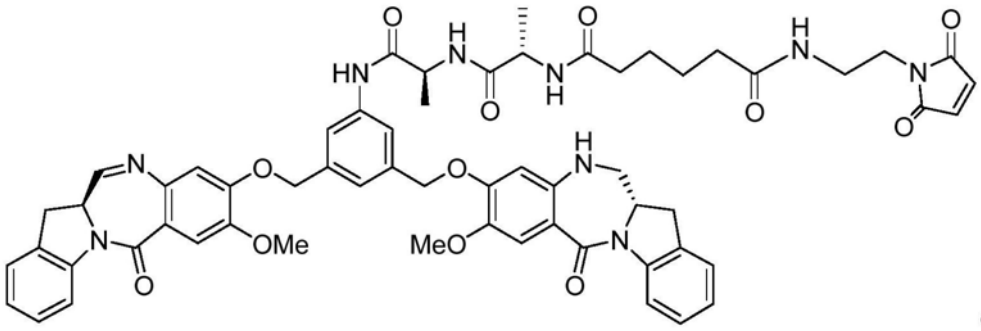
99.如权利要求96所述的方法,其中L是由以下结构式或其药学上可接受的盐表示:



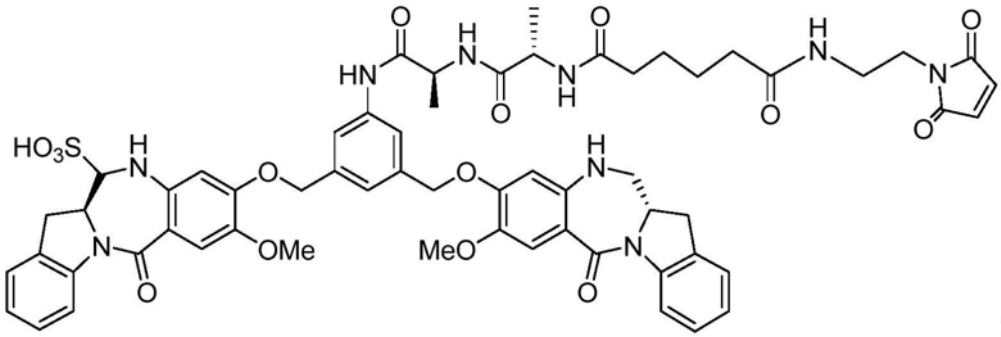
(L1)。

100.如权利要求67-99中任一项所述的方法，其中所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。

101.如权利要求1-64中任一项所述的方法，其中所述化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示：

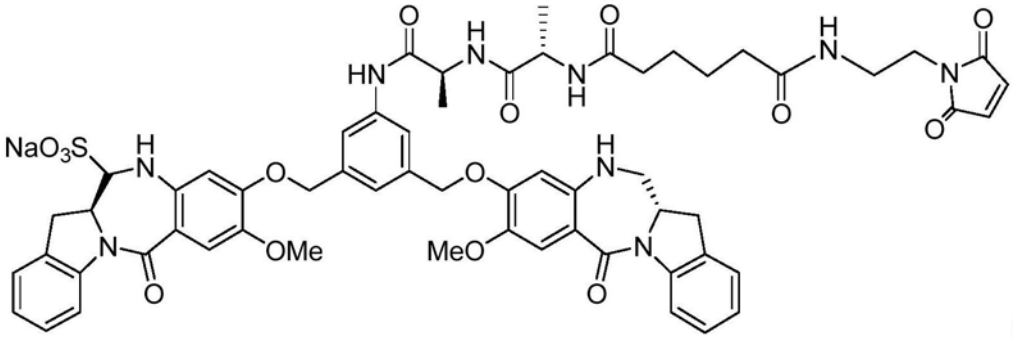


(I1)，或



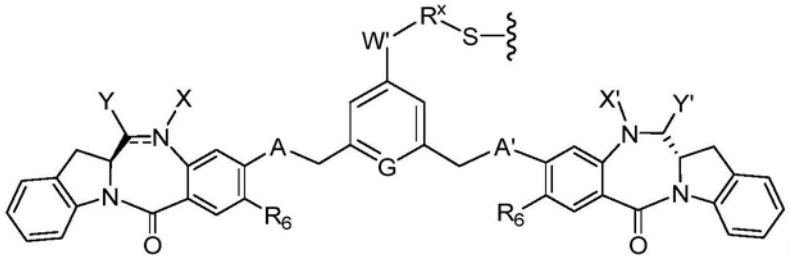
(I2)。

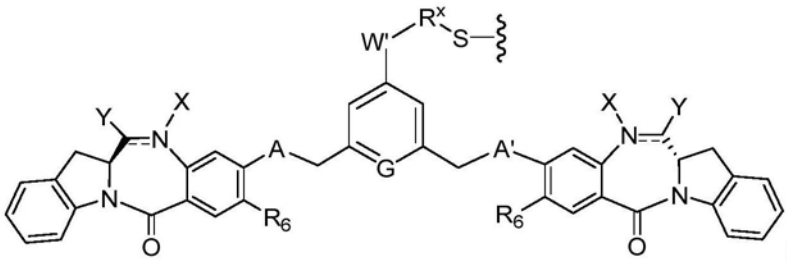
102.如权利要求101所述的方法，其中所述化合物是由下式表示：

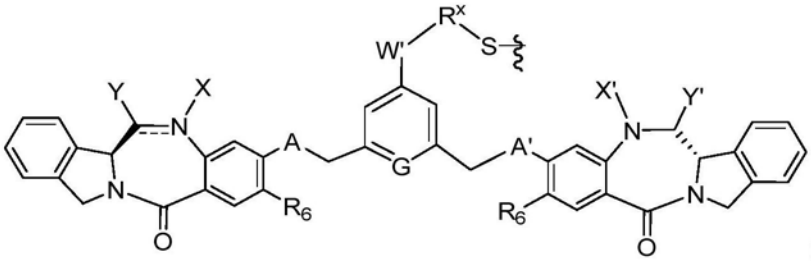


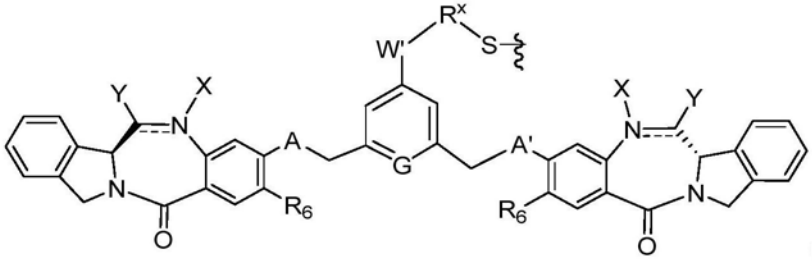
(I3)。

103.如权利要求1-64中任一项所述的方法，其中D是由下式或其药学上可接受的盐表示：


(D-IIA);


(D-IIB);


(D-IIC); 或


(D-IID),

其中：

N与C之间的双线═表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H或(C_1-C_4)烷基；并且当其为单键时，X为-H或胺保护部分，Y为-OH或-SO_3H或其药学上可接受的盐；

X'是选自由-H、-OH、取代或未取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、苯基和胺保护基组成的组；

Y'是选自由-H、氧代基、取代或未取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基组成的组；

A和A'是选自-O-和-S-；

W'不存在，或是选自-O-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-或-CH_2-S-、-CH_2NR^e-；

R^x不存在或是选自直链、分支链或环状烷基；

R^e为-H、直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k为-H、具有1至6个碳原子、任选地携带仲氨基(例如-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)的直链、分支链环状烷

基、或5元或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基；

n为整数1至24；

G是选自-CH-或-N-；

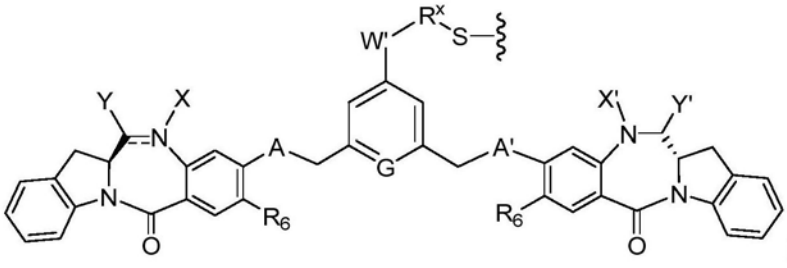
R_6为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、$-NO_2$或卤素；并且

R在每次出现时是独立地选自由-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$、任选取代的具有6至18个碳原子的芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环或任选取代的含有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环组成的组；

R'和R"是各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、$-NR_2$、-COR、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$和任选取代的具有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环；

R^c为-H或任选取代的具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基。

104.如权利要求103所述的方法，其中D是由以下结构式或其药学上可接受的盐表示：



(D-IIA)。

105.如权利要求103或104所述的方法，其中：

X'和Y'均为-H；

A和A'均为-O-；

R_6为-OMe；

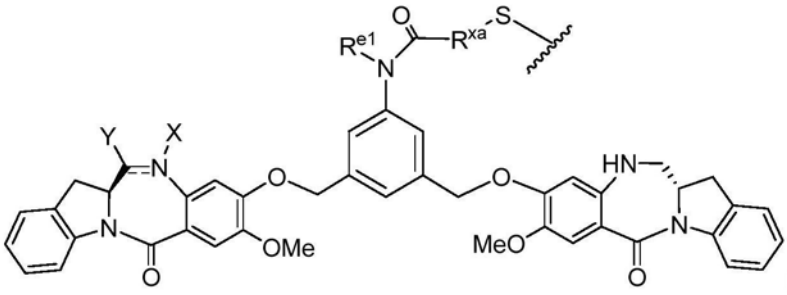
W'为$-N(R^e)-$或$-N(R^e)-C(=O)-$；

R^e为-H、具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k为-H、具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基；

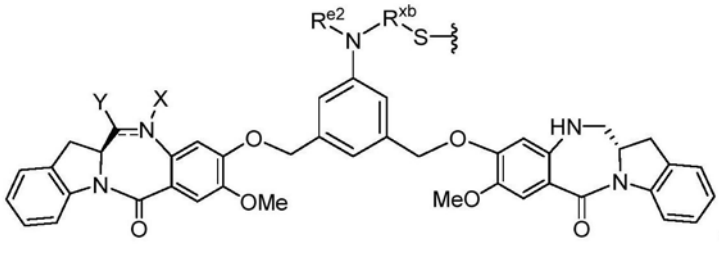
n为整数2至6；并且

R^x为具有1至6个碳原子的直链或分支链烷基。

106.如权利要求103所述的方法，其中D是由以下结构式或其药学上可接受的盐表示：



(D-IIE)，或



(D-IIF),

其中：

R^{e1}为H或(C_1-C_6)烷基；

R^{xa}为(C_1-C_6)烷基；

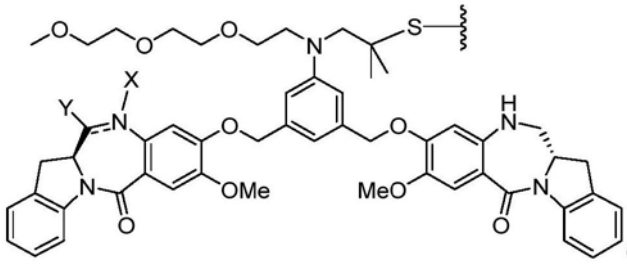
R^{e2}为$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$；

n为整数2至6；

R^k为-H或-Me；并且

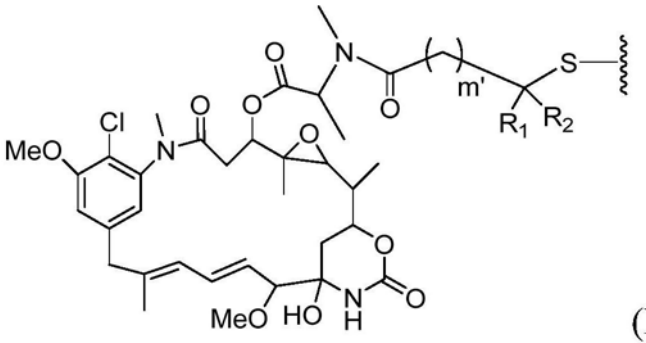
R^{xb}为(C_1-C_6)烷基。

107.如权利要求106所述的方法，其中D是由下式或其药学上可接受的盐表示：



(D5)。

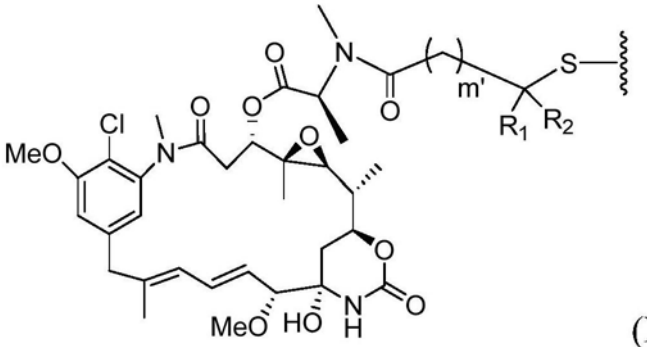
108.如权利要求1-64中任一项所述的方法，其中D是由下式表示：



(D-III),

其中m'为1或2；并且R_1和R_2各自独立地为-H或(C_1-C_3)烷基。

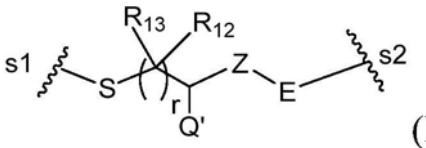
109.如权利要求108所述的方法，其中D是由下式表示：



(D-IIIA)。

110.如权利要求103-109中任一项所述的方法，其中L是由以下结构式或其药学上可接

受的盐表示：



(L-II),

其中：

s1为共价连接至D的位点，并且s2为共价连接至顺丁烯二酰亚胺基的位点；

E为-$(CR_{10}R_{11})_q$-、环烷基或环烷基烷基；

Z是不存在、-SO_2NR_9-、-NR_9SO_2-、-C(=O)-NR_9-、-NR_9-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-NR_9-$(CH_2CH_2O)_p$-、-NR_9-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_p$-、-$(OCH_2CH_2)_p$-C(=O)NR_9-或-$(OCH_2CH_2)_p$-NR_9-C(=O)-；

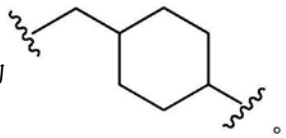
p为整数1至24；

Q为H、带电取代基或可电离基团；

R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基；并且，

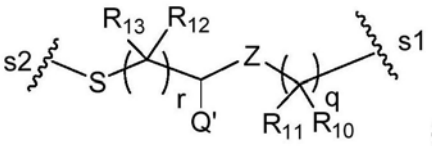
q和r在每次出现时独立地为0与10之间的整数。

111.如权利要求110所述的方法，其中E为-$(CR_{10}R_{11})_q$-。

112.如权利要求111所述的方法，其中E为  。

113.如权利要求110-112中任一项所述的方法，其中Z为-C(=O)-NR_9-或-NR_9-C(=O)-。

114.如权利要求110所述的方法，其中L是由以下结构式表示：



(L-IIA),

其中R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}在每次出现时独立地为-H或$(C_1$-$C_3)$烷基。

115.如权利要求110-114中任一项所述的方法，其中R_9为-H。

116.如权利要求110-115中任一项所述的方法，其中Q'为：

i)H；

ii)-SO_3H、-Z'-SO_3H、-OPO_3H_2、-Z'-OPO_3H_2、-PO_3H_2、-Z'-PO_3H_2、-CO_2H、-Z'-CO_2H、-$NR_{11}R_{12}$或-Z'-$NR_{14}R_{15}$或其药学上可接受的盐；或者，

iii)-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$或-Z'-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$；

Z'为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基；

R_{14}、R_{15}和R_{16}各自独立地为任选取代的烷基；并且，

X^-为药学上可接受的阴离子。

117.如权利要求116所述的方法，其中Q'为H或-SO_3H或其药学上可接受的盐。

118.如权利要求110-117中任一项所述的方法，其中R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}均为H；并且q和r各自独立地为1与6之间的整数。

119.如权利要求114所述的方法，其中：

R_{12}和R_{13}在每次出现时各自独立地为H或$(C_1$-$C_3)$烷基；

Q为H或-SO_3H或其药学上可接受的盐

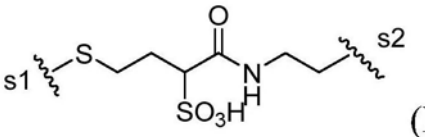
Z为-C(=O)-NR_9-或-NR_9-C(=O)-；

R_9为H或(C_1-C_3)烷基；

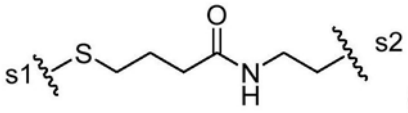
R_{10}和R_{11}在每次出现时独立地为H或(C_1-C_3)烷基；并且

q和r各自为整数1至5。

120.如权利要求119所述的方法，其中L是由以下结构式中的任一者或其药学上可接受的盐表示：

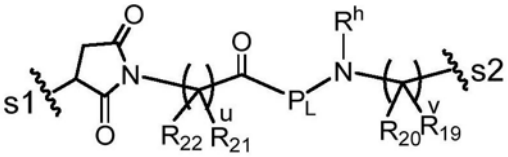


(L2)，和



(L3)。

121.如权利要求103-109中任一项所述的方法，其中L是由以下结构式或其药学上可接受的盐表示：



(L-III)，

其中：

s1为共价连接至D的位点；s2为共价连接至顺丁烯二酰亚胺基的位点；

R_{19}、R_{20}、R_{21}和R_{22}在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基；

u和v各自独立地为0与10之间的整数；

R^h为H或任选取代的烷基；

P_L为任选取代的亚烷基、-(CH_2-CH_2-O)$_j$-(其中氧原子连接至与P_L连接的-(C=O)-基团)、氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽；并且

j为整数1至24。

122.如权利要求121所述的方法，其中R_{19}、R_{20}、R_{21}和R_{22}各自为H；并且u和v各自独立地为1与6之间的整数。

123.如权利要求121或122所述的方法，其中P_L为氨基酸残基或含有2至10个氨基酸残基的肽。

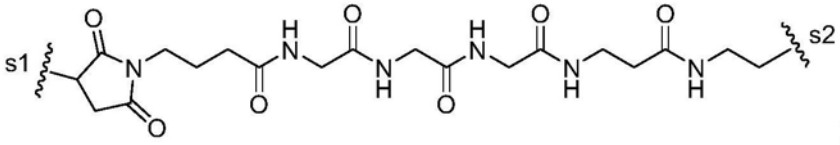
124.如权利要求123所述的方法，其中P_L是含有2至5个氨基酸残基的肽。

125.如权利要求110所述的方法，其中P_L是选自由以下组成的组：Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Cit-Val.Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N^9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:56)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:57)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-

Ala.、Ala-Met、Met-Ala、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala和β-Ala-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:58)。

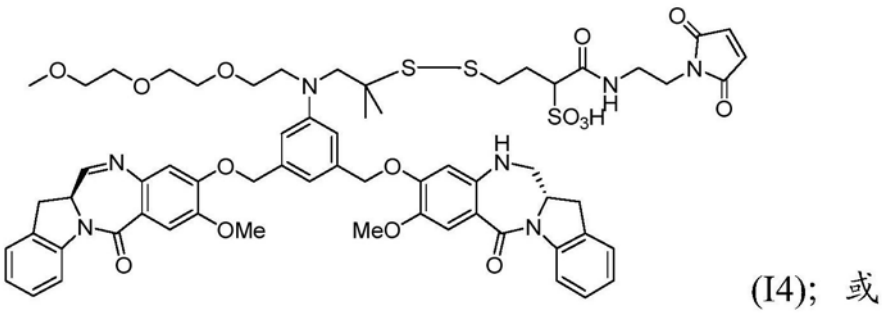
126.如权利要求125所述的方法,其中P_L为Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala或β-Ala-Gly-Gly-Gly。

127.如权利要求121所述的方法,其中L是由以下结构式或其药学上可接受的盐表示:

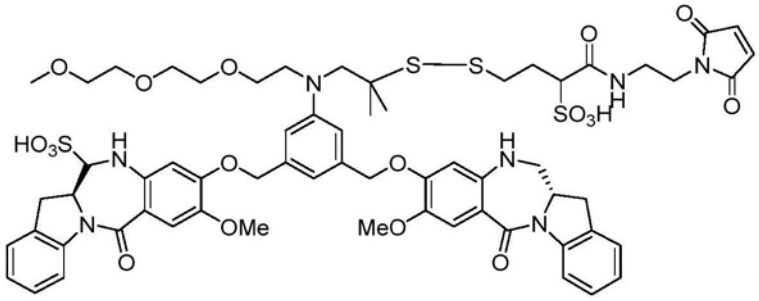


(L4)。

128.如权利要求1-64中任一项所述的方法,其中所述式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示:

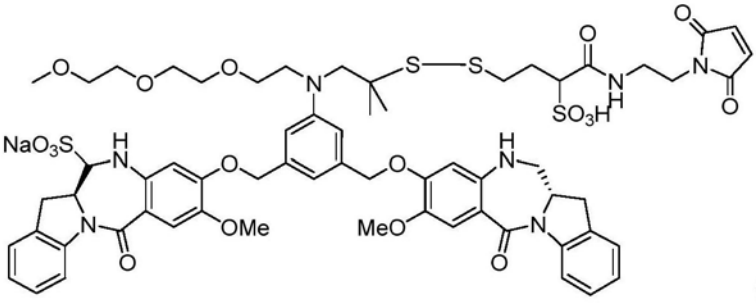


(I4); 或



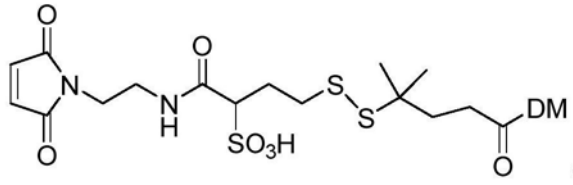
(I5)。

129.如权利要求128所述的方法,其中所述化合物是由下式表示:

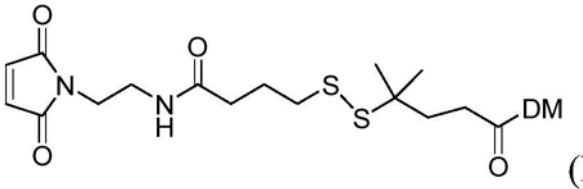


(I6)。

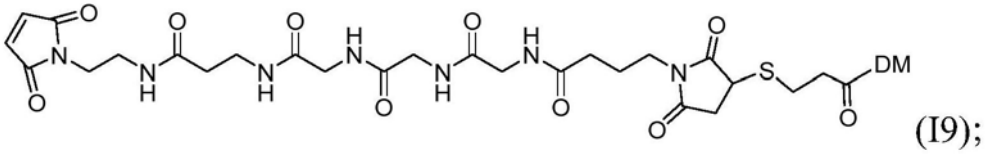
130.如权利要求1-64中任一项所述的方法,其中所述式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示:



(I7);

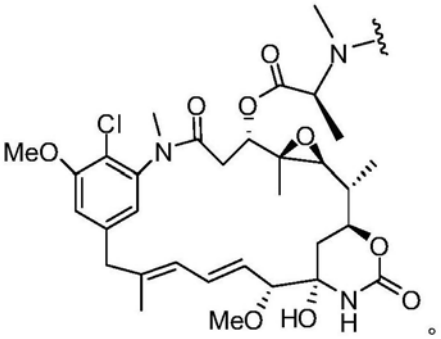


(I8); 或



(I9);

其中DM是由下式表示的药物部分：



131.如权利要求1-64中任一项所述的方法，其中所述式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐呈现：

L_2'-A-NH-$CR^{1A}R^{2A}$-S-$_L$1-D (I-a)，

其中：

L_2'是携带顺丁烯二酰亚胺部分的间隔基；

A为氨基酸或包含2至20个氨基酸的肽；

R^{1A}和R^{2A}各自独立地为H或C_{1-3}烷基；

L_1为间隔基；并且

D-L_1-SH为细胞毒性剂。

132.如权利要求131所述的方法，其中R^{1A}和R^{2A}中的至少为H。

133.如权利要求131所述的方法，其中R^{1A}和R^{2A}各自独立地为H或Me。

134.如权利要求131所述的方法，其中R^{1A}和R^{2A}之一为H；并且另一者为Me。

135.如权利要求133所述的方法，其中R^{1A}和R^{2A}均为H。

136.如权利要求131-135中任一项所述的方法，其中L_1为-L_1'-C(=O)-；并且L_1'为亚烷基或亚环烷基。

137.如权利要求136所述的方法，其中L_1'为C_{1-10}亚烷基。

138.如权利要求137所述的方法，其中L_1为-$CR^{3A}R^{4A}$-$(CH_2)_{1-8}$-C(=O)-；R^{3A}和R^{4A}各自独立地为H或Me。

139.如权利要求138所述的方法，其中L_1为-$CR^{3A}R^{4A}$-$(CH_2)_{3-5}$-C(=O)-。

140.如权利要求138或139所述的方法，其中R^{3A}和R^{4A}均为Me。

141.如权利要求139所述的方法，其中L_1为-$(CH_2)_{4-6}$-C(=O)-。

142.如权利要求131-141中任一项所述的方法，其中L_2'是由以下结构式表示：

J_{CB}'-R^A-V-W-R^B-V'-R^C-J_A-；

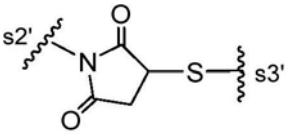
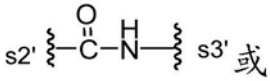
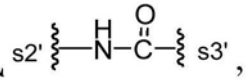
其中：

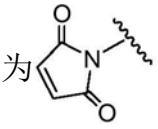
R^A为亚烷基、环烷基亚烷基或亚芳基；

R^B和R^C是各自独立地不存在、亚烷基、亚环烷基或亚芳基；

V和V'各自独立地为-$(O-CH_2-CH_2)_{p1}$-或-$(CH_2-CH_2-O)_{p1}$-；

p1为0或整数1至10；

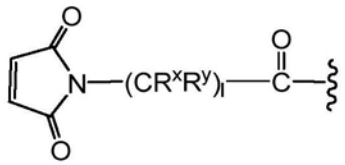
W是不存在、、或，其中s2'指示连接至V、R^A或J_{CB}'的位点并且s3'指示连接至R^B、V'、R^C或J_A的位点；

J_{CB}'为并且；

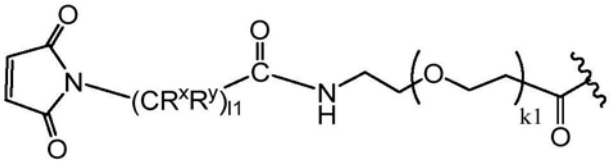
J_A为-C(=O)-。

143.如权利要求142所述的方法，其中p1为0并且R^C不存在。

144.如权利要求131-142中任一项所述的方法，其中L_2'是由以下结构式表示：



(L2a')；或



(L2b')，

其中：

R^x和R^y在每次出现时独立地为H、-OH、卤素、-O-(C_{1-4}烷基)、-SO_3H、-$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$或任选地经-OH、卤素、-SO_3H或$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$取代的C_{1-4}烷基，其中R_{40}、R_{41}和R_{42}各自独立地为H或C_{1-4}烷基；

l和l1各自独立地为整数1至10；

k1为整数1至12。

145.如权利要求144所述的方法，其中R^x和R^y均为H。

146.如权利要求144或145所述的方法，其中l和l1各自为整数整数2至6。

147.如权利要求131-146中任一项所述的方法，其中A是可通过蛋白酶裂解的肽。

148.如权利要求126所述的方法，其中A是可通过在肿瘤组织中表达的蛋白酶裂解的肽。

149.如权利要求131-146中任一项所述的方法，其中A是具有与-NH-CR^1R^2-S-L_1-D共价连接的氨基酸的肽，所述氨基酸选自由Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、硒代-Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val组成的组，各自独立地呈L或D异构体。

150.如权利要求131-149中任一项所述的方法，其中所述与-NH-CR^1R^2-S-L_1-D连接的氨基酸为L氨基酸。

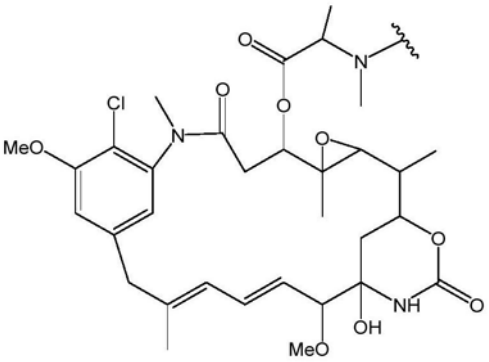
151.如权利要求147-150中任一项所述的方法，其中A是含有2至5个氨基酸残基的肽。

152.如权利要求131-147中任一项所述的方法，其中A是选自由Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N^9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:56)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:58)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro和D-Ala-tBu-Gly组成的组，其中各肽中的第一个氨基酸连接至L_2基团并且各肽中的最后一个氨基酸连接至-NH-CR^1R^2-S-L_1-D。

153.如权利要求152所述的方法，其中A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly。

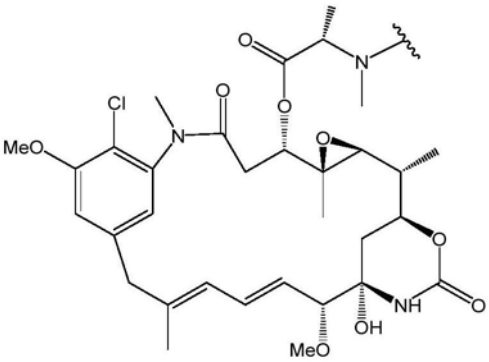
154.如权利要求131-153中任一项所述的方法，其中D为类美登素。

155.如权利要求154所述的方法，其中D是由下式表示：



。

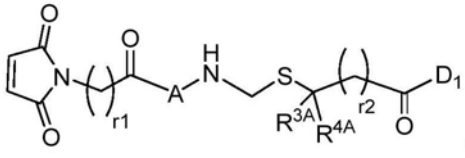
156.如权利要求155所述的方法，其中D是由下式表示：



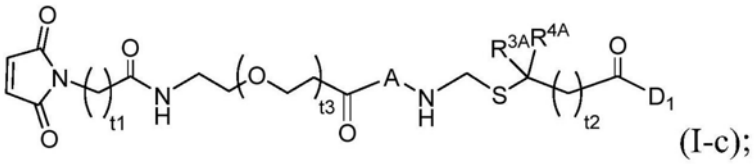
。

157.如权利要求131-154中任一项所述的方法，其中所述式(I)化合物是由下式或其药

学上可接受的盐表示：



(I-b)；或



(I-c)；

其中：

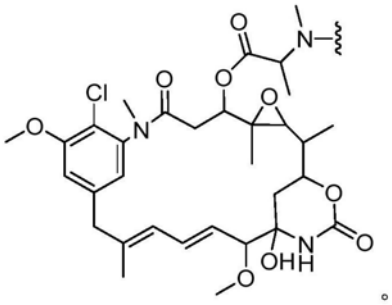
R^{3A}和R^{4A}各自独立地为H或Me；

r1和t1各自独立地为整数1至6；

r2和t2各自独立地为整数1至7；

t3为整数1至12；

D_1是由下式表示：

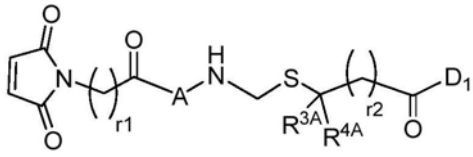


。

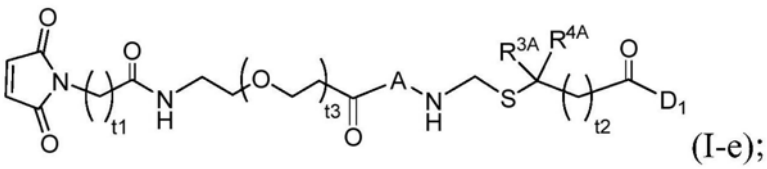
158.如权利要求157所述的方法，其中A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly。

159.如权利要求157或158所述的方法，其中r1为整数2至4；并且r2为整数3至5。

160.如权利要求159所述的方法，其中所述式(I)化合物是由下式表示：



(I-d)；或



(I-e)；

其中：

r1和t1各自为整数2至6；

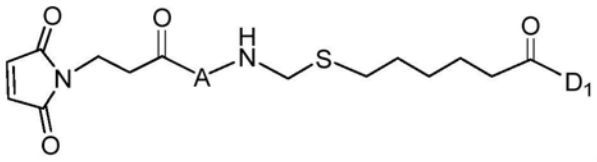
r2和t2各自为整数2至5；并且

t3为整数2至12。

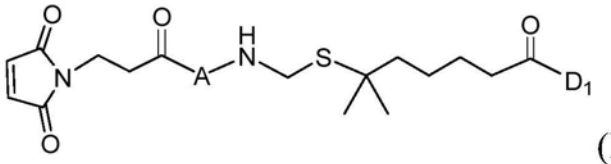
161.如权利要求157-160中任一项所述的化合物，其中R^{3A}和R^{4A}均为Me。

162.如权利要求157-160中任一项所述的化合物，其中R^{3A}和R^{4A}均为H。

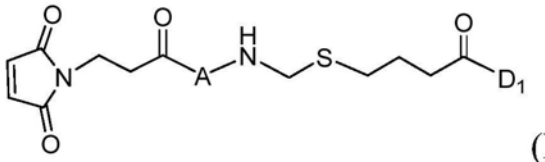
163.如权利要求157所述的化合物,其中所述化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示:



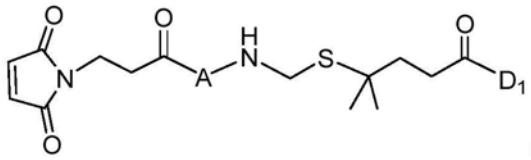
(I-f);



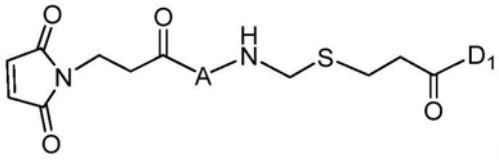
(I-g);



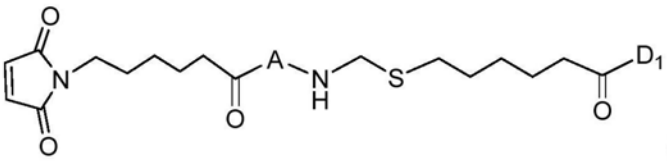
(I-h);



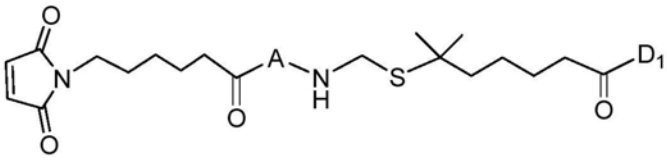
(I-i);



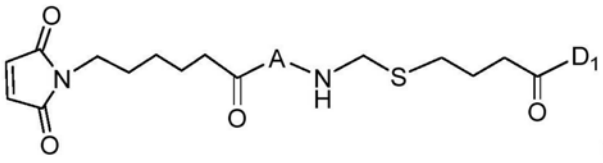
(I-j);



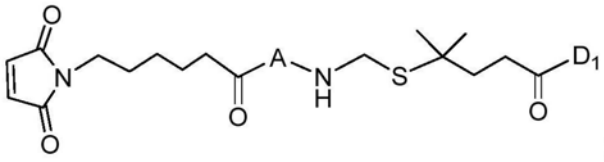
(I-k);



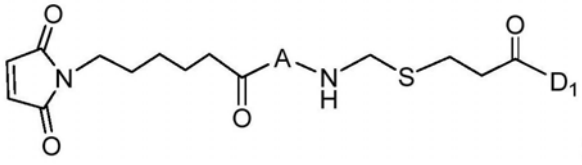
(I-l);



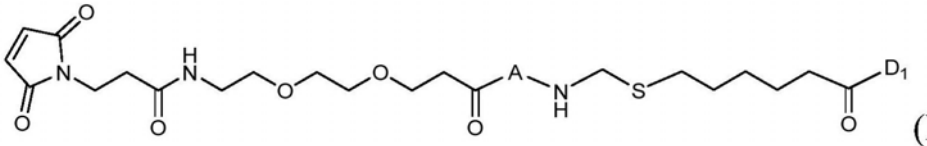
(I-m);



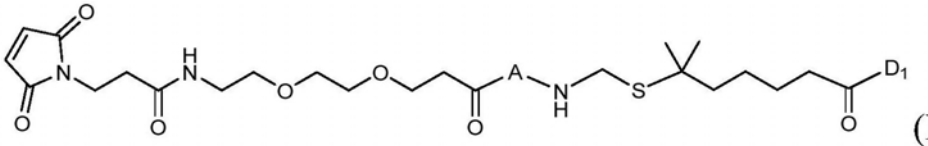
(I-n);



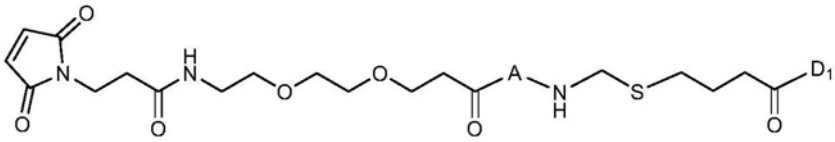
(I-o);



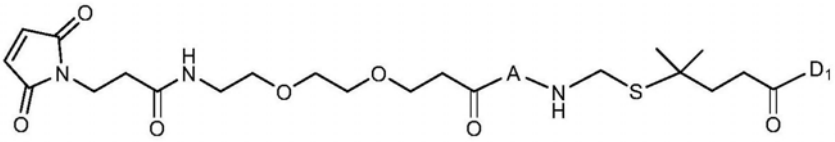
(I-p);



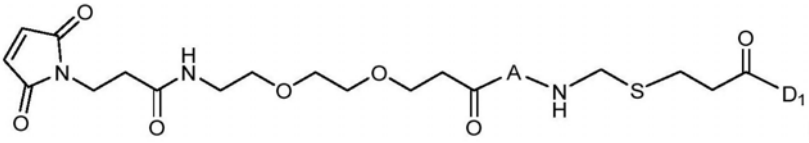
(I-q);



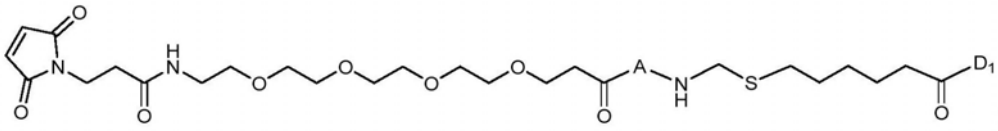
(I-r);



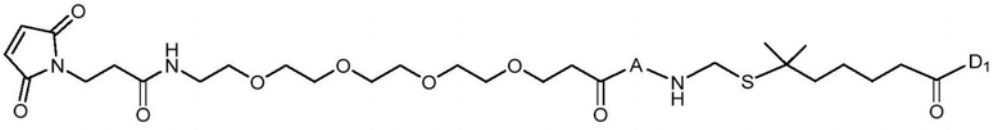
(I-s);



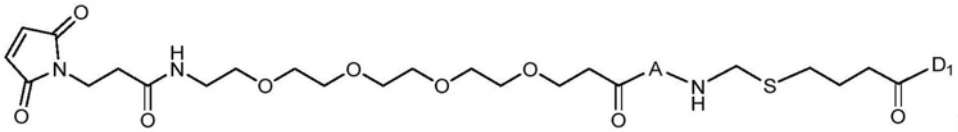
(I-t);



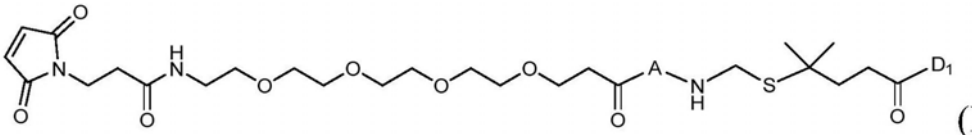
(I-u);



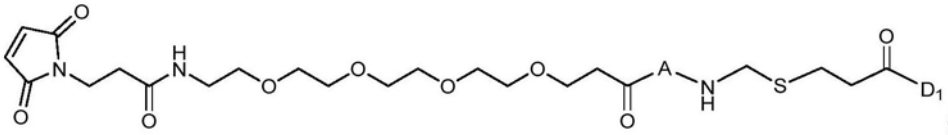
(I-v);



(I-w);



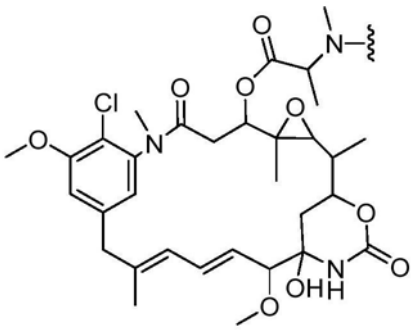
(I-x); 或


(I-y);

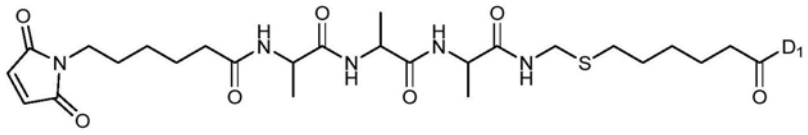
其中：

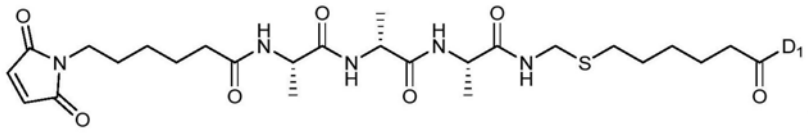
A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly；并且

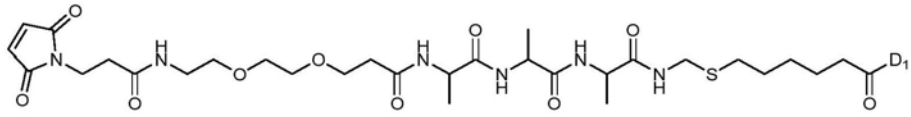
D_1是由下式表示：

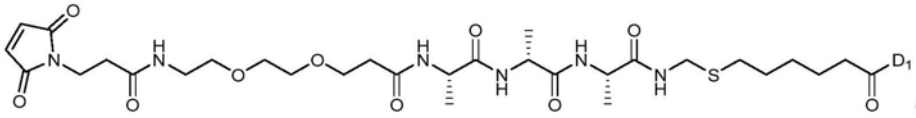

。

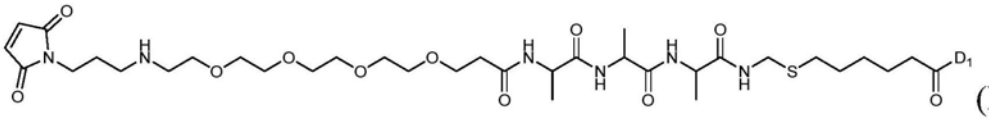
164.如权利要求163所述的方法，其中所述化合物是由下式表示：

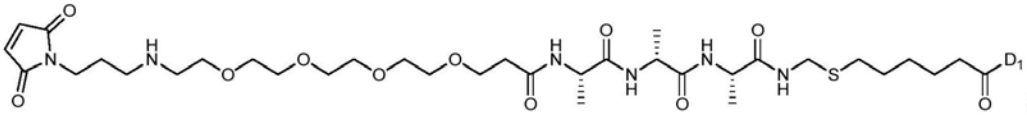

(I10);


(I11);

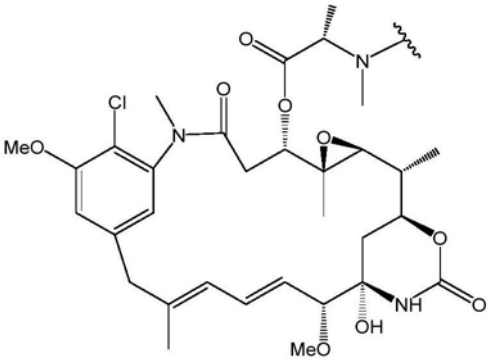

(I12);


(I13);

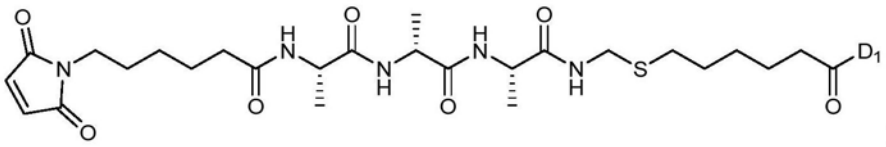

(I14); 或


(I15),

其中D_1是由下式表示：



165.如权利要求164所述的方法，其中所述式(I)化合物是由下式表示：



(I11)。

166.如权利要求23-165中任一项所述的方法，其中所述半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段为抗叶酸盐受体抗体或其抗原结合片段、抗EGFR抗体或其抗原结合片段、抗CD33抗体或其抗原结合片段、抗CD19抗体或其抗原结合片段、抗Muc1抗体或其抗原结合片段、抗CD37抗体或其抗原结合片段、抗cMet抗体或其抗原结合片段或抗EpCAM抗体或其抗原结合片段。

167.如权利要求23-165中任一项所述的方法，其中所述半胱氨酸工程改造的抗体或抗原结合片段为抗CD123抗体或其抗原结合片段。

168.如权利要求167所述的方法，其中所述抗CD123抗体或其抗原结合片段包含a)免疫球蛋白重链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3；和b)免疫球蛋白轻链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3。

169.如权利要求167所述的方法，其中所述抗CD123抗体或其抗原结合片段包含V_H序列SEQ ID NO:7和V_L序列SEQ ID NO:9。

170.如权利要求167所述的方法，其中所述抗CD123抗体包含：(a)具有以SEQ ID NO:8陈述的氨基酸序列的免疫球蛋白重链；和

b)具有以SEQ ID NO:10陈述的氨基酸序列的免疫球蛋白轻链。

171.如权利要求23-165中任一项所述的方法，其中所述半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段为抗ADAM9抗体或其抗原结合片段。

172.如权利要求171所述的方法，其中所述抗ADAM9抗体或其抗原结合片段是特异性地结合于人ADAM9和cyno ADAM9的人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段。

173.如权利要求172所述的方法，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段包含a)免疫球蛋白重链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:24陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:25陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:26陈述的氨基酸序列的CDR_H3；和b)免疫球蛋白轻链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:21陈述的氨基酸序列的CD_LR1、具有以SEQ ID NO:22陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:23陈述的氨基

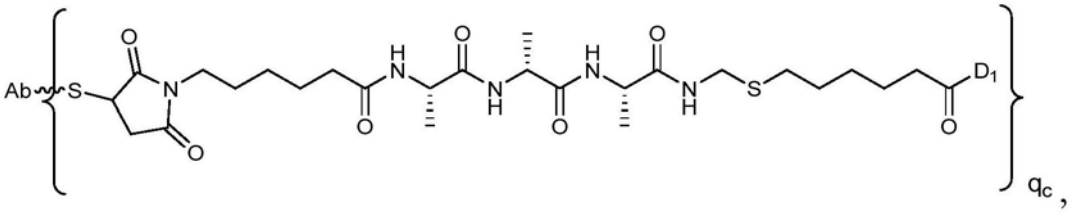
酸序列的CDR_L3。

174.如权利要求172或173所述的方法，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段包含重链可变域(V_H)序列SEQ ID NO:27和轻链可变域($V_{L)}$序列SEQ ID NO:28。

175.如权利要求174所述的方法，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段包含具有以SEQ ID NO:29陈述的氨基酸序列的重链；和具有以SEQ ID NO:30陈述的氨基酸序列的轻链。

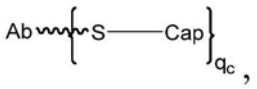
176.如权利要求171-175中任一项所述的方法，其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段是经过优化以具有对cyno ADAM9的结合亲和力的至少100倍增强并且如与嵌合或鼠科动物亲本抗体相比，保持对人ADAM9的高亲和力结合。

177.一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：



所述方法包括以下步骤：

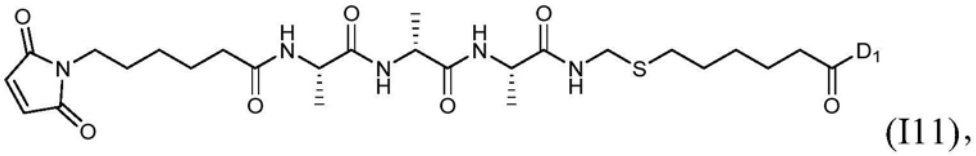
(a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：



以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

(b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中所述工程改造的半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化；和

(c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：



(I11),

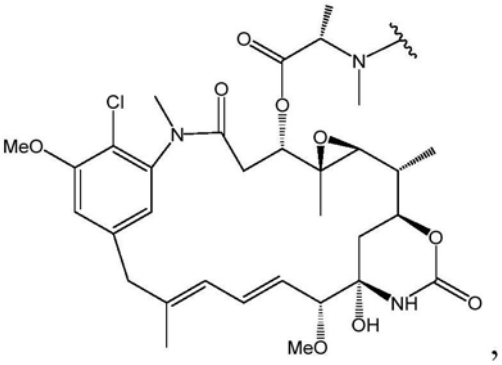
或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，其中步骤(a)中的所述还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的所述CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，

其中：

Ab～S—是经由位于所述工程改造的半胱氨酸残基上的所述硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段；并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23；

q_c为1或2；

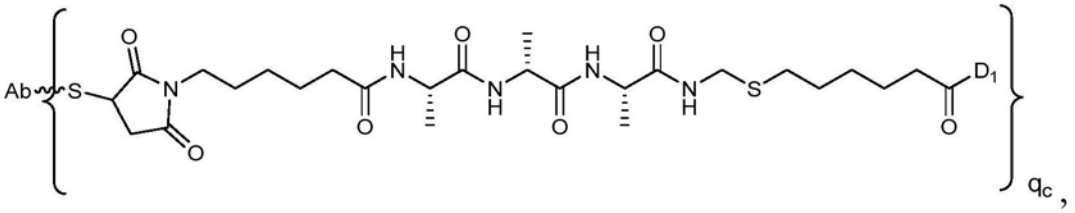
D_1是由下式表示：



并且

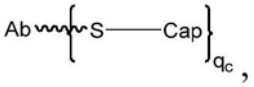
Cap为封端剂。

178.一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：



所述方法包括以下步骤：

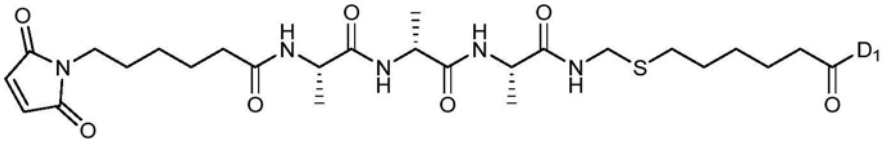
(a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：



以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

(b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中所述工程改造的半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化；和

(c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：



(I11),

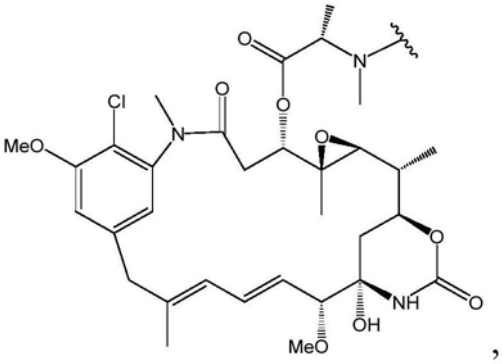
或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，其中步骤(a)中的所述还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的所述CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，步骤(a)至(c)是连续地执行，并且

其中：

Ab～S—是经由位于所述工程改造的半胱氨酸残基上的所述硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段；并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23；

q_c为1或2；

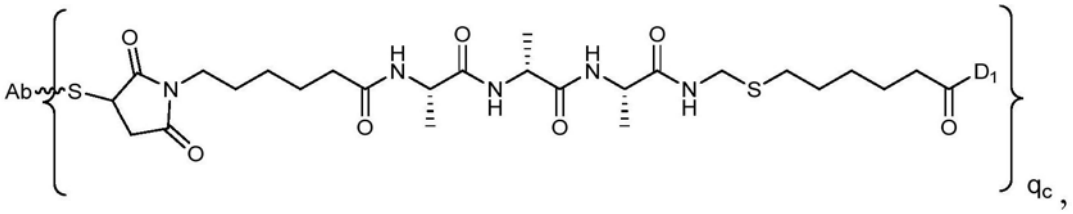
D_1是由下式表示：



，并且

Cap为封端剂。

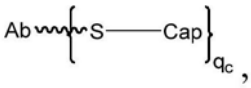
179.一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：



，

所述方法包括以下步骤：

(a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

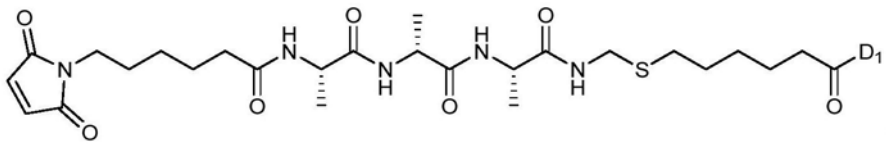


，

以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

(b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中所述工程改造的半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化；

(c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：



(I11)，

或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC；和

(d)去除未缀合的式(I11)化合物；

其中步骤(a)中的所述还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的所述CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，步骤(a)至(d)是连续地执行，并且

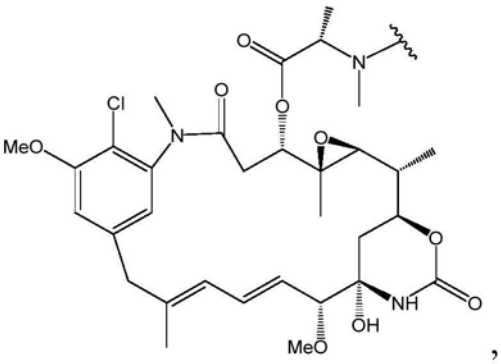
其中：

Ab～S——是经由位于所述工程改造的半胱氨酸残基上的所述硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段；并且其中所述CysAb或

其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23；

q_c为1或2；

D_1是由下式表示：



并且

，

Cap为封端剂。

180.如权利要求179所述的方法，其中所述方法还包括步骤(e)将所述缀合物交换至稳定缓冲液中。

181.如权利要求180所述的方法，其中步骤(e)是连续地执行。

182.如权利要求179-181中任一项所述的方法，其中使用单程切向流过滤(SPTFF)和/或逆流透滤来去除所述未缀合的式(I)化合物和/或将所述ADC交换至所述稳定缓冲液中。

183.如权利要求179-182中任一项所述的方法，其中在步骤(d)中使用逆流透滤来去除所述未缀合的式(I)化合物。

184.如权利要求178-183中任一项所述的方法，其中在步骤(a)中，所述cCysAb和所述还原剂连续地添加至所述反应容器中，同时连续地抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

185.如权利要求184所述的方法，其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述还原剂和所述cCysAb的组合流动速率相同。

186.如权利要求178-185中任一项所述的方法，其中在步骤(b)中，所述还原抗体和所述选择性氧化剂连续地添加至所述反应容器中，同时连续地抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

187.如权利要求186所述的方法，其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述还原抗体和所述选择性氧化剂的组合流动速率相同。

188.如权利要求178-187中任一项所述的方法，其中在步骤(c)中，所述CysAb和所述式(I11)化合物连续地添加至反应容器中并且连续地从所述反应容器抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

189.如权利要求188所述的方法，其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述CysAb和所述式(I11)化合物的组合流动速率相同。

190.如权利要求182-189中任一项所述的方法，其中所述反应容器为连续搅拌槽反应

器(CSTR)。

191.如权利要求182-190中任一项所述的方法,其中所述流式反应器为塞流反应器(PFR)。

192.如权利要求177-191中任一项所述的方法,其中所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有序列SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。

193.如权利要求177-191中任一项所述的方法,其中所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有序列SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的重链和轻链。

194.如权利要求177-193中任一项所述的方法,其中所述还原剂为DPPA。

195.如权利要求194所述的方法,其中在步骤(a)中,对于每一当量的cCysAb,使用10与20之间摩尔当量的DPPA。

196.如权利要求194所述的方法,其中在步骤(a)中,对于每一当量的cCysAb,使用15与17之间摩尔当量的DPPA。

197.如权利要求194所述的方法,其中在步骤(a)中,对于每一当量的cCysAb,使用16摩尔当量的DPPA。

198.如权利要求177-197中任一项所述的方法,其中步骤(a)中的反应是在6.0与7.0之间的pH或6.3与6.7之间的pH下进行。

199.如权利要求198所述的方法,其中步骤(a)中的反应是在pH 6.5下进行。

200.如权利要求177-199中任一项所述的方法,其中所述氧化剂为DHAA。

201.如权利要求200所述的方法,其中在步骤(b)中,对于每一当量的cCysAb,使用20与30之间摩尔当量的DHAA。

202.如权利要求200所述的方法,其中在步骤(b)中,对于每一当量的cCysAb,使用23与25之间摩尔当量的DHAA。

203.如权利要求200所述的方法,其中在步骤(b)中,对于每一当量的cCysAb,使用24摩尔当量的DHAA。

204.如权利要求177-203中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的反应是在6.0与7.0之间的pH或6.3与6.7之间的pH下进行。

205.如权利要求204所述的方法,其中步骤(b)中的反应是在pH 6.5下进行。

206.如权利要求177-205中任一项所述的方法,其中步骤(c)中的反应是在6.0与7.0之间的pH或6.3与6.7之间的pH下进行。

207.如权利要求206所述的方法,其中步骤(c)中的反应是在pH 6.5下进行。

208.如权利要求177-207中任一项所述的方法,其中在步骤(c)中,对于每一当量的CysAb,使用2至10之间摩尔当量的所述式(I11)化合物。

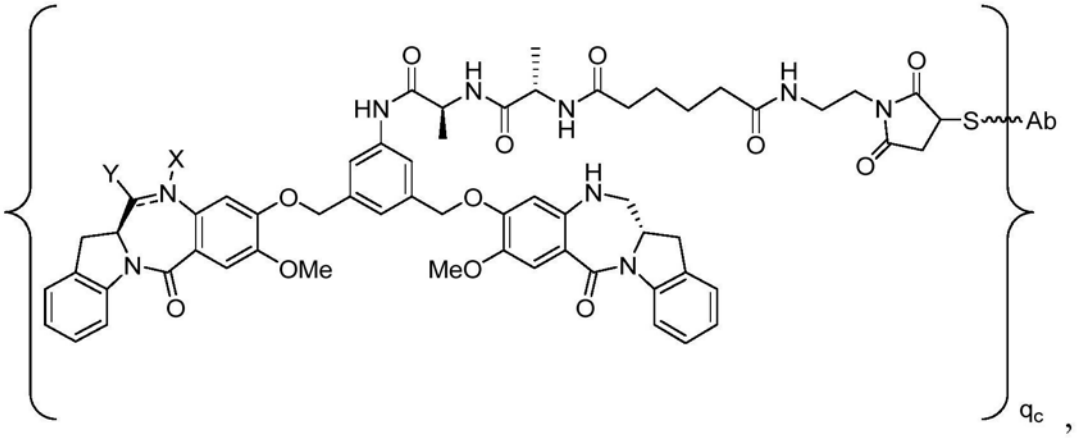
209.如权利要求208所述的方法,其中对于每一当量的CysAb,使用4.6摩尔当量的所述式(I11)化合物。

210.如权利要求177-209中任一项所述的方法,其中Cap为半胱氨酸、谷胱甘肽或其组合。

211.如权利要求177-210中任一项所述的方法,其中q_c为2。

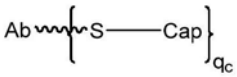
212.一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物

(ADC)由下式表示：



所述方法包括以下步骤：

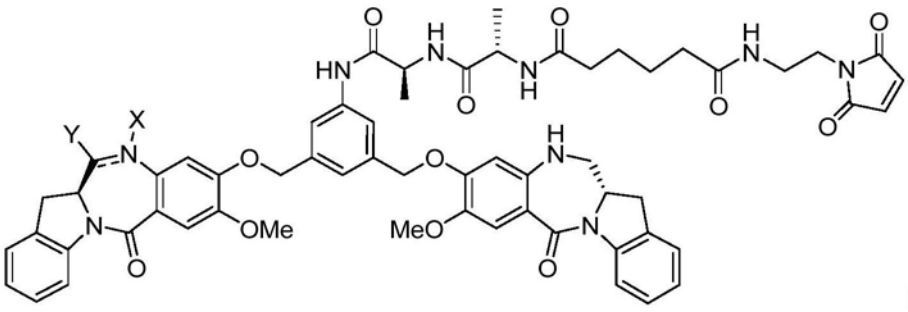
(a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：



以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

(b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中所述工程改造的半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化；和

(c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：



(I1a)，

或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，其中步骤(a)中的所述还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的所述CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，其中：

N与C之间的双线═表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H，并且当其为单键时，X为-H，并且Y为$-SO_3M$，并且M为H^+或阳离子；

Ab～S—是经由位于所述工程改造的半胱氨酸残基上的所述硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的所述半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段；其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段，其包含：

a)免疫球蛋白重链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3；和

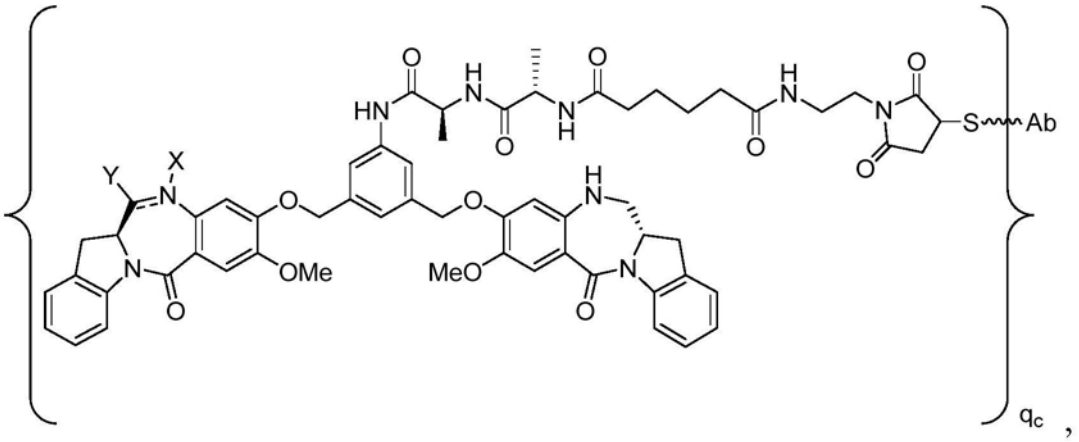
b)免疫球蛋白轻链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有

以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3;

q_c为1或2;并且

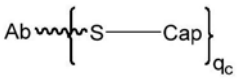
Cap为封端剂。

213.一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示:



所述方法包括以下步骤:

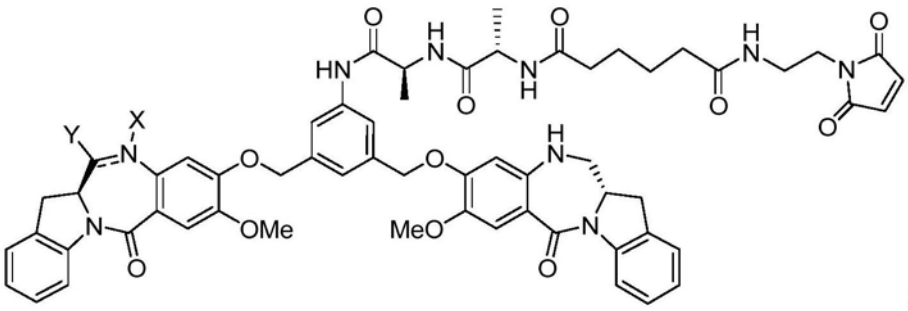
(a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应:



以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

(b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb,其中所述工程改造的半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化;和

(c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:



(I1a),

或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述ADC,其中步骤(a)中的所述还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b),并且步骤(b)的所述CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c);并且步骤(a)至(c)是连续地执行,

其中:

N与C之间的双线═表示单键或双键,其限制条件在于当其为双键时,X不存在并且Y为-H,并且当其为单键时,X为-H,并且Y为$-SO_3M$,并且M为H^+或阳离子;

Ab~S—是经由位于所述工程改造的半胱氨酸残基上的所述硫醇基共价连接至所述

细胞毒性剂的所述半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段;其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段,其包含:

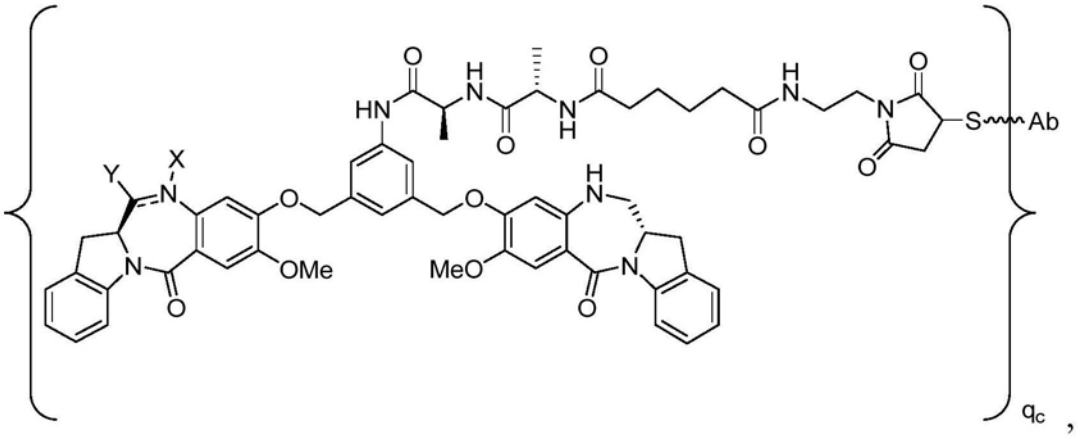
a)免疫球蛋白重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3;和

b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3;

q_c为1或2;并且

Cap为封端剂。

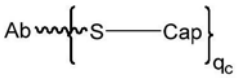
214.一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示:



,

所述方法包括以下步骤:

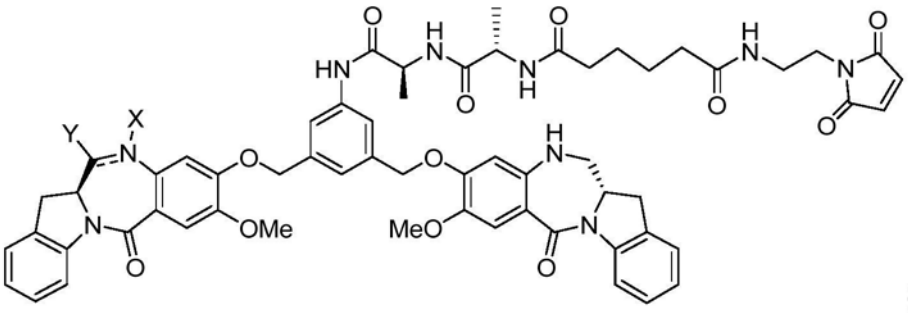
(a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应:



以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

(b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb,其中所述工程改造的半胱氨酸残基中的所述游离硫醇基未被氧化;和

(c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:



(I1a),

或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述ADC;和

(d)去除未缀合的式(I1a)化合物,其中步骤(a)中的所述还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b),并且步骤(b)的所述CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c);并且步骤(a)至(d)是连续地执行,

其中:

N与C之间的双线═表示单键或双键,其限制条件在于当其为双键时,X不存在并且Y为-H,并且当其为单键时,X为-H,并且Y为$-SO_3M$,并且M为H^+或阳离子;

Ab～S—是经由位于所述工程改造的半胱氨酸残基上的所述硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的所述半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段;其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段,其包含:

a)免疫球蛋白重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3;和

b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3;

q_c为1或2;并且

Cap为封端剂。

215.如权利要求214所述的方法,其中所述方法还包括步骤(e)将所述缀合物交换至稳定缓冲液中。

216.如权利要求215所述的方法,其中步骤(e)是连续地执行。

217.如权利要求214-216中任一项所述的方法,其中使用单程切向流过滤(SPTFF)和/或逆流透滤来去除所述未缀合的式(I)化合物和/或将所述ADC交换至所述稳定缓冲液中。

218.如权利要求214-216中任一项所述的方法,其中在步骤(d)中使用逆流透滤来去除所述未缀合的式(I)化合物。

219.如权利要求213-218中任一项所述的方法,其中在步骤(a)中,所述cCysAb和所述还原剂连续地添加至所述反应容器中,同时连续地抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

220.如权利要求219所述的方法,其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述还原剂和所述cCysAb的组合流动速率相同。

221.如权利要求213-220中任一项所述的方法,其中在步骤(b)中,所述还原抗体和所述选择性氧化剂连续地添加至所述反应容器中,同时连续地抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

222.如权利要求221所述的方法,其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述还原抗体和所述选择性氧化剂的组合流动速率相同。

223.如权利要求213-222中任一项所述的方法,其中在步骤(c)中,所述CysAb和所述式(I1a)化合物连续地添加至反应容器中并且连续地从所述反应容器抽出所述反应混合物并且经由流式反应器馈送。

224.如权利要求223所述的方法,其中从所述反应容器抽出所述反应混合物的体积流

动速率是与正在添加至所述反应容器中的所述CysAb和所述式(I1a)化合物的组合流动速率相同。

225.如权利要求219-224中任一项所述的方法,其中所述反应容器为连续搅拌槽反应器(CSTR)。

226.如权利要求219-225中任一项所述的方法,其中所述流式反应器为塞流反应器(PFR)。

227.如权利要求212-214中任一项所述的方法,其中所述抗CD123抗体或其抗原结合片段包含V_H序列SEQ ID NO:7和V_L序列SEQ ID NO:9。

228.如权利要求212-214中任一项所述的方法,其中所述抗CD123抗体包含:

a)具有以SEQ ID NO:8陈述的氨基酸序列的重链;和

b)具有以SEQ ID NO:10陈述的氨基酸序列的轻链。

229.如权利要求212-228中任一项所述的方法,其中所述还原剂为DPPA或TCEP。

230.如权利要求229所述的方法,其中所述还原剂为TCEP。

231.如权利要求212-230中任一项所述的方法,其中步骤(a)中的反应是在5.0与8.5之间、7.0与8.0之间或7.5与7.7之间的pH下进行。

232.如权利要求231所述的方法,其中步骤(a)的反应是在pH 7.5下进行。

233.如权利要求212-232中任一项所述的方法,其中所述氧化剂为DHAA。

234.如权利要求212-233中任一项所述的方法,其中步骤(b)中的反应是在5.0与8.5之间、7.0与8.0之间或7.5与7.7之间的pH下进行。

235.如权利要求233所述的方法,其中步骤(b)中的反应是在pH 7.5下进行。

236.如权利要求212-235中任一项所述的方法,其中步骤(c)的反应是在5.0与8.5之间、5.5与6.5之间或5.8与6.2之间的pH下进行。

237.如权利要求236所述的方法,其中步骤(c)的反应是在pH 6.0下进行。

238.如权利要求212-237中任一项所述的方法,其中所述还原剂为TCEP;步骤(a)中的反应是在pH 7.5下进行;所述氧化剂为DHAA;步骤(b)中的反应是在pH 7.5下进行;并且步骤(b)之后的所述反应混合物的pH是在步骤(c)中使所述CysAb与所述细胞毒性剂反应之前从pH 7.5调节至pH 6.0。

239.如权利要求212-238中任一项所述的方法,其中所述封端试剂为半胱氨酸、高半胱氨酸、谷胱甘肽或其组合。

制备细胞结合剂-药物缀合物的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2019年3月21日提交的美国临时申请号62/821,707和2019年6月4日提交的美国临时申请号62/856,942的优先权,所述美国临时申请中的每一者的内容均由此以引用的方式整体并入。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及制备细胞结合剂-药物缀合物的方法,所述细胞结合剂-药物缀合物包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂。

[0004] 发明背景

[0005] 细胞结合剂-药物缀合物(诸如抗体-药物缀合物(ADC))作为在多种癌症中具有功效的一类特效抗肿瘤剂出现。细胞结合剂-药物缀合物(诸如ADC)通常由三种不同要素构成:细胞结合剂(例如抗体);接头;和细胞毒性部分。所述细胞毒性药物部分可经由诸如顺丁烯二酰亚胺基的硫醇反应性基团共价连接至所述抗体上的半胱氨酸硫醇基,以形成位点特异性ADC。半胱氨酸工程改造的抗体可用于制备位点特异性ADC。然而,在抗体产生期间,工程改造的半胱氨酸通常由诸如半胱氨酸或谷胱甘肽的其他含硫醇部分封端,以形成二硫化物。在与细胞毒性剂缀合之前,所述二硫化物需要用还原剂处理以去除封端部分并且形成用于与所述细胞毒性剂反应的游离硫醇。所述处理还还原抗体链间二硫键,所述抗体链间二硫键需要通过不会再氧化工程改造的半胱氨酸上的游离硫醇基的选择性氧化步骤再形成。选择性氧化通过使用温和氧化剂以及去除还原剂和封端剂(诸如半胱氨酸和/或谷胱甘肽)来实现。所述还原和选择性氧化步骤在用半胱氨酸工程改造的抗体制备ADC的过程中引入复杂性,并且通常需要多个纯化步骤,使得所述过程变得麻烦并且对于ADC的大规模制造不太有效。

[0006] 因此,需要开发适用于大规模制造过程的用于制备工程改造的半胱氨酸抗体的ADC的新型有效方法。

发明内容

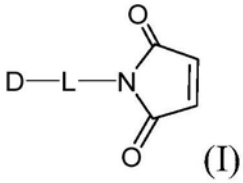
[0007] 本发明是基于如下令人满意的发现,即包含共价连接至细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体的ADC可通过在反应步骤之间无需纯化的一锅方法以高纯度和反应产率来制备。此外,比较数据显示当与通过在反应步骤之间需要纯化的多步骤方法制备的ADC相比时,所述一锅方法出乎意料地增加最终ADC产物的单体百分率(参见实施例5)。

[0008] 在某些实施方案中,本发明提供一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

[0009] (a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

[0010] (b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中未配对半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0011] (c)使所述CysCBA与式(I)化合物:

[0012] 

(I)

[0013] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物,其中步骤(a)中的还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);并且步骤(b)中的CysCBA未纯化即用于步骤(c),其中:

[0014] D为细胞毒性剂;并且

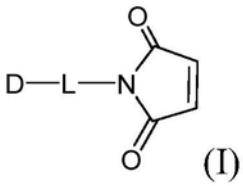
[0015] L为接头。

[0016] 在某些实施方案中,本发明提供一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

[0017] (a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

[0018] (b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中未配对半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0019] (c)使所述CysCBA与式(I)化合物:

[0020] 

(I)

[0021] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物,

[0022] 其中步骤(a)中的还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);步骤(b)中的CysCBA未纯化即用于步骤(c),并且选自步骤(a)至(c)的任一个或多个步骤是连续地执行,并且其中:

[0023] D为细胞毒性剂;并且

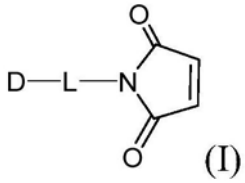
[0024] L为接头

[0025] 在某些实施方案中,本发明提供一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

[0026] (a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

[0027] (b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中未配对半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0028] (c)使所述CysCBA与式(I)化合物:

[0029] 

(I)

[0030] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物;和

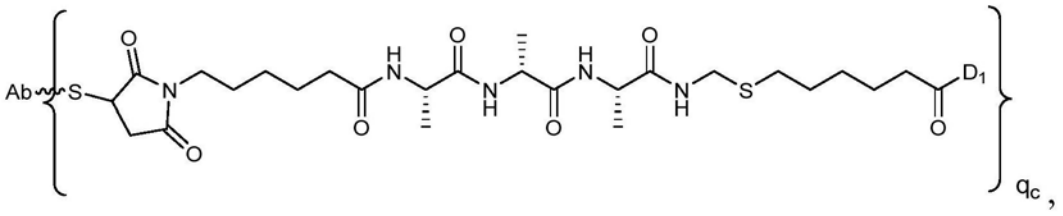
[0031] (d)去除未缀合的式(I)化合物;

[0032] 其中步骤(a)中的还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);步骤(b)中的CysCBA未纯化即用于步骤(c),并且选自步骤(a)至(d)的任一个或多个步骤是连续地执行;并且其中:

[0033] D为细胞毒性剂;并且

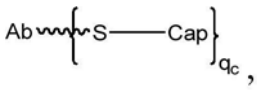
[0034] L为接头

[0035] 在某些实施方案中,本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示:

[0036] 

[0037] 所述方法包括以下步骤:

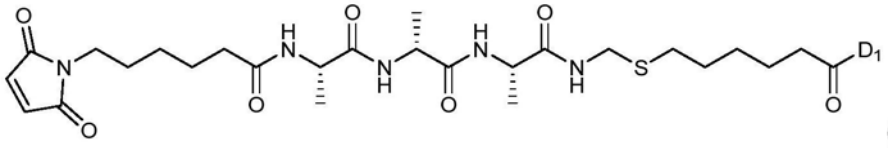
[0038] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应:

[0039] 

[0040] 以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

[0041] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb,其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0042] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:

[0043] 

(I11),

[0044] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述ADC,其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b),并且步骤(b)中的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c),

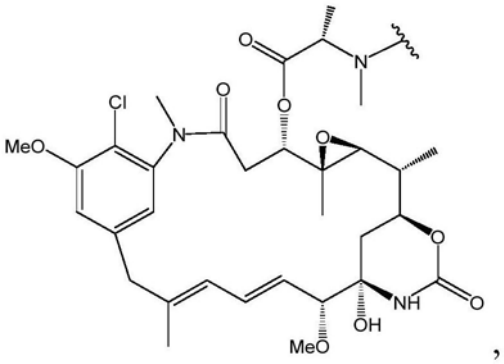
[0045] 其中:

[0046] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段;并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID

NO:21、22、23；

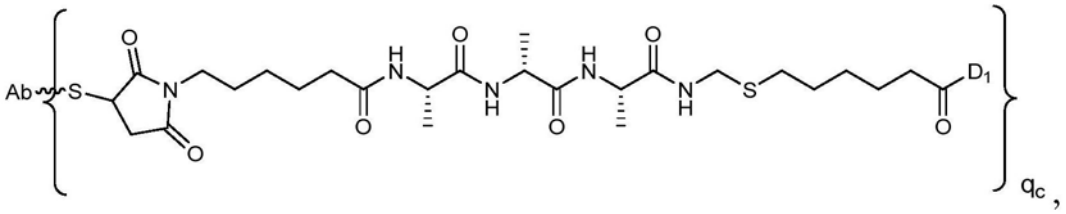
[0047] q_c为1或2；

[0048] D_1是由下式表示：

[0049]  并且

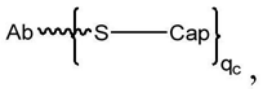
[0050] Cap为封端剂。

[0051] 在某些实施方案中，本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：

[0052] 

[0053] 所述方法包括以下步骤：

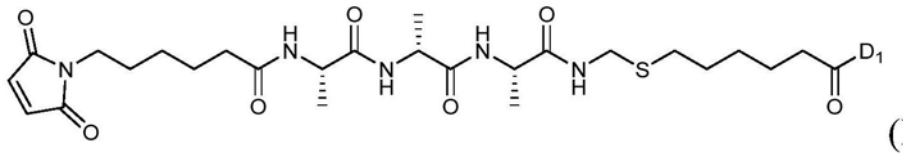
[0054] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

[0055] 

[0056] 以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

[0057] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化；和

[0058] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：

[0059]  (I11)，

[0060] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，并且步骤(a)至(c)是连续地执行，并且

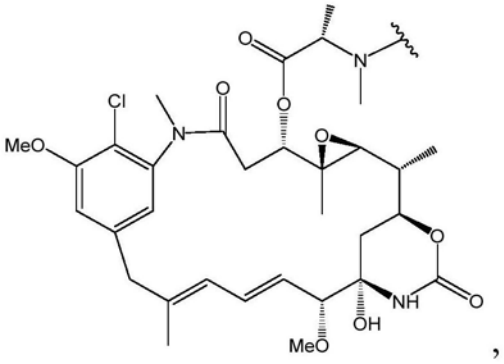
[0061] 其中：

[0062] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段；并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗

ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23；

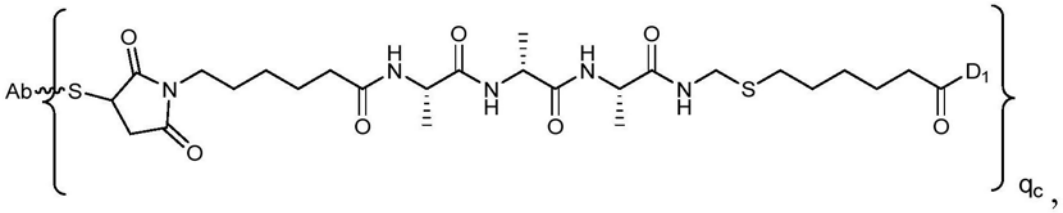
[0063] q_c为1或2；

[0064] D_1是由下式表示：

[0065]  并且

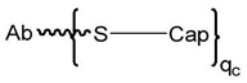
[0066] Cap为封端剂。

[0067] 在某些实施方案中，本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：

[0068] 

[0069] 所述方法包括以下步骤：

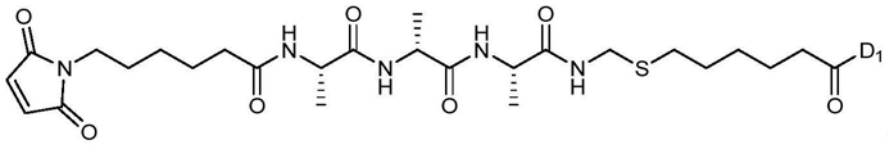
[0070] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

[0071] 

[0072] 以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

[0073] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化；

[0074] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：

[0075]  (I11)，

[0076] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC；和

[0077] (d)去除未缀合的式(I11)化合物；

[0078] 其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，并且步骤(a)至(d)是连续地执行，并且

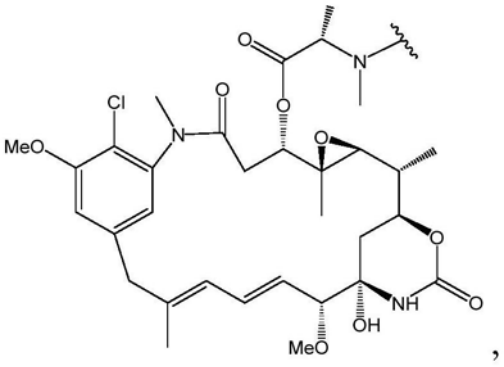
[0079] 其中：

[0080] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞

毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段;并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23;

[0081] q_c为1或2;

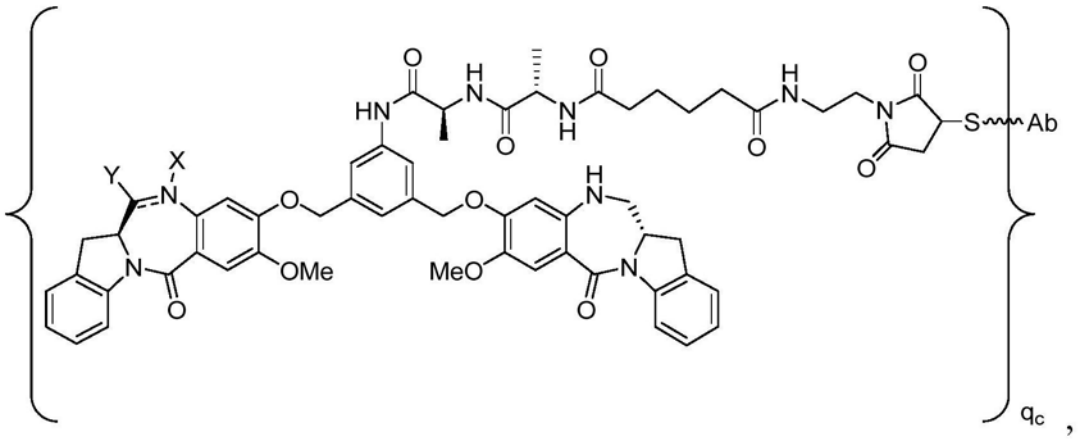
[0082] D_I是由下式表示:

[0083] 

并且

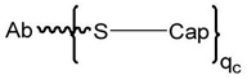
[0084] Cap为封端剂。

[0085] 在某些实施方案中,本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示:

[0086] 

[0087] 所述方法包括以下步骤:

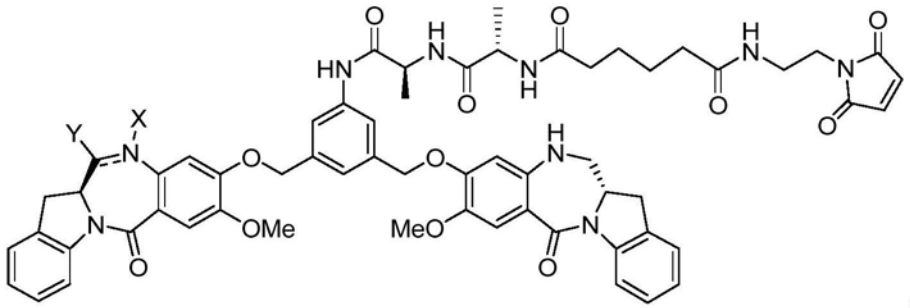
[0088] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应:

[0089] 

[0090] 以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

[0091] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb,其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0092] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:

[0093] 

[0094] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)中的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，其中：

[0095] N与C之间的双线==表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H，并且当其为单键时，X为-H，并且Y为-SO_3M，并且M为H^+或阳离子；

[0096] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段；其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段，其包含：

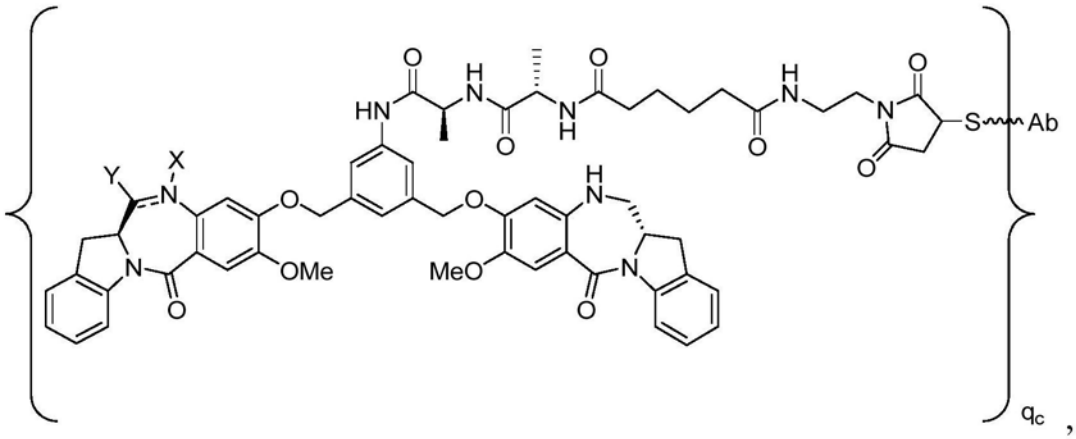
[0097] a)免疫球蛋白重链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3；和

[0098] b)免疫球蛋白轻链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3；

[0099] q_c为1或2；并且

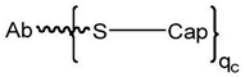
[0100] Cap为封端剂。

[0101] 在某些实施方案中，本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：

[0102] 

[0103] 所述方法包括以下步骤：

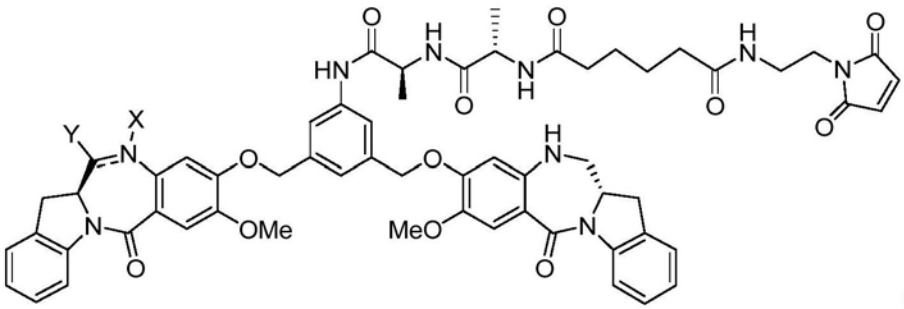
[0104] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

[0105] 

[0106] 以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

[0107] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb,其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0108] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:

[0109] 

(I1a),

[0110] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述ADC,其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b),并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c);并且步骤(a)至(c)是连续地执行,

[0111] 其中:

[0112] N与C之间的双线═表示单键或双键,其限制条件在于当其为双键时,X不存在并且Y为-H,并且当其为单键时,X为-H,并且Y为-SO_3M,并且M为H^+或阳离子;

[0113] Ab〰S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段;其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段,其包含:

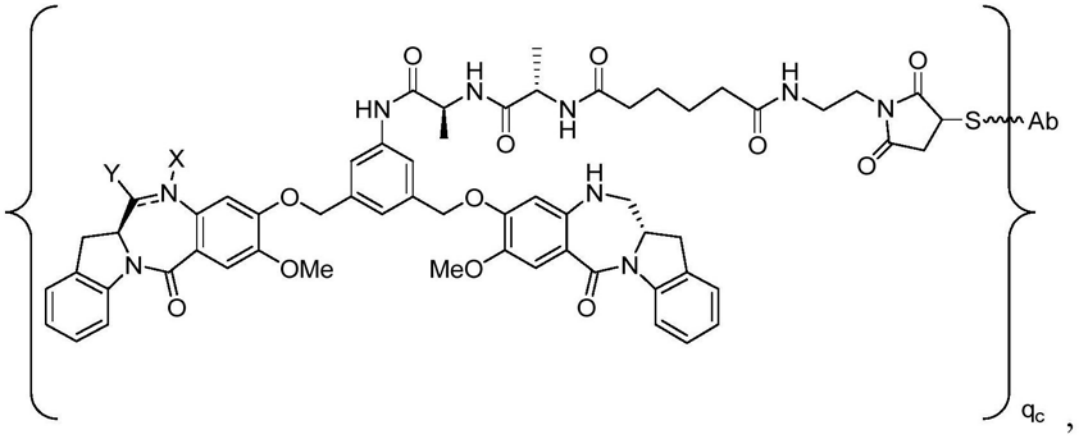
[0114] a)免疫球蛋白重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3;和

[0115] b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3;

[0116] q_c为1或2;并且

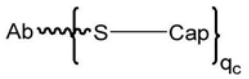
[0117] Cap为封端剂。

[0118] 在某些实施方案中,本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示:

[0119] 

[0120] 所述方法包括以下步骤：

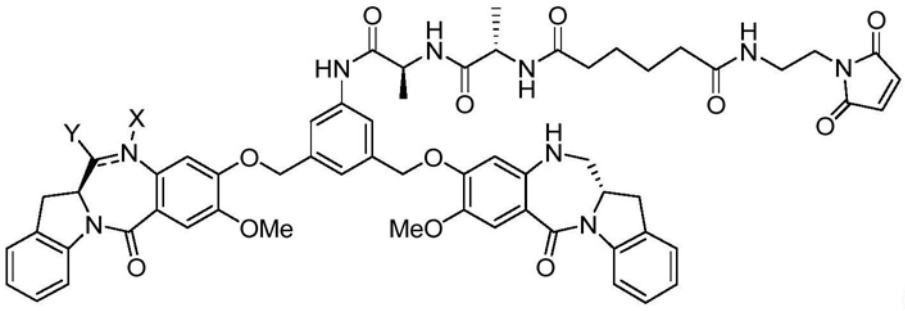
[0121] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

[0122] 

[0123] 以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

[0124] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化；和

[0125] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：

[0126] 

(I1a)，

[0127] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC；和

[0128] (d)去除未缀合的式(I1a)化合物，其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)；并且步骤(a)至(d)是连续地执行，

[0129] 其中：

[0130] N与C之间的双线═表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H，并且当其为单键时，X为-H，并且Y为-SO_3M，并且M为H^+或阳离子；

[0131] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段；其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段，其包含：

[0132] a)免疫球蛋白重链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3；和

[0133] b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3;

[0134] q_c为1或2;并且

[0135] Cap为封端剂。

[0136] 在某些实施方案中,本文所述的方法中的任一步骤均可在惰性气氛(例如N_2)下进行。在某些实施方案中,本文所述的方法是在惰性气氛(例如N_2)下进行。在某些实施方案中,本文所述的方法中的任一步骤均可在O_2存在下进行。在某些实施方案中,本文所述的方法是在O_2存在下进行。

[0137] 预期除非明确地否认或不适用,否则本文所述的任一实施方案,包括仅在本发明的一方面中描述(而未在其他方面中描述或未在其他方面中重复)的那些和仅在实施例中描述的那些,均可与本发明的任一个或多个其他实施方案组合。

附图说明

[0138] 图1示出所用的氧化剂DHAA和还原剂2-二苯基膦基乙胺的量对DAR的影响。

[0139] 图2示出针对TCEP还原的反应时间和温度对DAR的影响。

[0140] 图3示出针对TCEP还原的反应时间和温度对单体百分率的影响。

[0141] 图4示出用于还原反应的TCEP的量对DAR的影响。

[0142] 图5示出用于实施例5中描述的CD123靶向性抗体药物缀合物(ADC)的集成连续制造过程。Ab是指抗CD123单克隆抗体G4723A。

[0143] 图6示出用于实施例5中描述的CD123靶向性ADC的集成制造过程的逆流TFF纯化。

[0144] 图7示出在线过程自动化技术(PAT)的使用可如何用于增加控制和可检测性。

[0145] 图8示出可能用于在升高温度下脉冲化缀合反应的加热和冷却反应器的示意图。在脉冲反应器(标记为"PR")中,夹套温度升高,使得暂时地加热含于线圈内的反应组分以诱导短暂温度漂移。接着,在冷却反应器(标记为"CR")中,夹套温度保持在较冷温度下以使线圈内的反应组分从升高温度冷却下来。这可减少反应期间出现的聚集的量。停留时间反应器(RTR)维持在脉冲化完成之后所需的反应温度,并且其体积可基于所需反应时间。

具体实施方式

[0146] 1.定义

[0147] 为了促进理解本发明,下文定义多个术语和短语。

[0148] 如本文所用,术语"抗体药物缀合物"(ADC)和"免疫缀合物"是指连接至细胞结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)并且由以下通式定义的化合物或其衍生物:D-L-A,其中D=细胞毒性药物,L=接头,并且A=抗体或抗体片段。ADC也可以逆序由以下通式定义:A-L-D。ADC可包含每个抗体或其抗原结合片段多个药物和接头,例如$(D-L)_4$-A或A-$(L-D)_2$。术语"抗体药物缀合物"和"免疫缀合物"在本文中可互换使用。

[0149] 除非另外指示,否则如本文中可互换使用的术语"(人)IL-3Rα"、"白细胞介素-3受体α"或"CD123"是指任何原生(人)IL-3Rα或CD123。CD123蛋白是杂二聚细胞因子受体的白细胞介素3特异性亚单位(IL-3受体或IL-3R)。IL-3R包含配体特异性α亚单位,和由白细胞

介素3(IL3)、集落刺激因子2(CSF2/GM-CSF)和白细胞介素5(IL5)的受体共享的信号转导通用β亚单位(还称作CD131)。CD123/IL-3Rα与IL3的结合取决于所述β亚单位。所述β亚单位通过配体结合来活化,并且是IL3的生物活性所需的。

[0150] 关于CD123的所有这些上述术语均可指如本文所指示的蛋白质或核酸序列。术语"CD123/IL-3Rα"涵盖"全长"未加工CD123/IL-3Rα,以及由细胞内的加工产生的任何形式的CD123/IL-3Rα。所述术语还涵盖CD123/IL-3Rα蛋白或核酸的天然存在的变体,例如剪接变体、等位基因变体和同种型。本文所述的CD123/IL-3Rα多肽和多核苷酸可从多种来源,诸如从人类组织类型或从另一来源分离,或通过重组或合成方法制备。CD123/IL-3Rα序列的实例包括但不限于NCBI参考编号NP_002174和NM_002183(针对人CD123变体1的蛋白质和核酸序列),以及NP_001254642和NM_001267713(针对人CD123变体2的蛋白质和核酸序列)。

[0151] 术语"ADAM9"是指含有去整合素和金属蛋白酶域的蛋白9,其为ADAM分子家族的成员。其被合成为无活性形式,所述无活性形式经蛋白水解裂解以产生活性酶。上游处的加工对于酶原的活化来说尤为重要。ADAM9表达于纤维母细胞(Zigrino,P.等人(2011)"The Disintegrin-Like And Cysteine-Rich Domains Of ADAM-9Mediate Interactions Between Melanoma Cells And Fibroblasts,"J.Biol.Chem.286:6801-6807)、活化的血管平滑肌细胞(Sun,C.等人(2010)"ADAM15 Regulates Endothelial Permeability And Neutrophil Migration Via Src/ERK1/2Signalling,"Cardiovasc.Res.87:348-355)、单核球(Namba,K.等人(2001)"Involvement Of ADAM9 In Multinucleated Giant Cell Formation Of Blood Monocytes,"Cell.Immunol.213:104-113)和活化的巨噬细胞(Oksala,N.等人(2009)"ADAM-9,ADAM-15,And ADAM-17Are Upregulated In Macrophages In Advanced Human Atherosclerotic Plaques In Aorta And Carotid And Femoral Arteries-Tampere Vascular Study,"Ann.Med.41:279-290)中。代表性人ADAM9多肽为NCBI序列NP_003807。在ADAM9多肽的819个氨基酸残基中,残基1-28为信号序列,残基29-697为细胞外域,残基698-718为跨膜域,并且残基719-819为细胞内域。三个结构域位于细胞外域内:Reprolysin(M12B)家族锌金属蛋白酶域(在大约残基212-406处);去整合素域(在大约残基423-497处);和EGF样域(在大约残基644-697处)。已经鉴定多种翻译后修饰和同种型并且所述蛋白质在其到达质膜以产生成熟蛋白质之前在反式高尔基网中经蛋白水解裂解。前域的去除经由两个不同位点处的裂解而发生。加工最有可能在前域与催化域之间的边界处(Arg-205/Ala-206)通过诸如弗林蛋白酶的原蛋白转化酶而发生。另外的上游裂解原蛋白转化酶位点(Arg-56/Glu-57)在ADAM9的活化中具有重要作用。代表性食蟹猴ADAM9多肽为NCBI序列XM_005563126.2,包括可能28个氨基酸残基的信号序列。所述蛋白质的Reprolysin(M12B)家族锌金属蛋白酶域在大约残基212-406处);所述蛋白质的去整合素域在大约残基423-497处。

[0152] 术语"抗体"意指免疫球蛋白分子,其经由所述免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并且特异性地结合于靶,诸如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述各物的组合。如本文所用,术语"抗体"涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(诸如Fab、Fab'、$F(ab')_2$和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体(诸如双特异性抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他经修饰免疫球蛋白分子,只要所述抗体展现所需生物活性即

可。抗体基于其重链恒定域的属性(分别称作α、δ、ε、γ和μ)可为免疫球蛋白的五种主要类别中的任一者:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)。不同类别的免疫球蛋白具有不同并且众所周知的亚单位结构和三维配置。抗体可为裸的或缀合于其他分子,诸如毒素、放射性同位素等。

[0153] 在一些实施方案中,抗体为非天然存在的抗体。在一些实施方案中,抗体从天然组分纯化。在一些实施方案中,抗体是重组产生的。在一些实施方案中,抗体是通过杂交瘤产生的。

[0154] 术语"抗CD123抗体"、"抗IL-3Rα抗体"或"(特异性地)结合于CD123/IL-3Rα的抗体"是指能够以充足亲和力结合CD123/IL-3Rα的抗体,使得所述抗体可用作靶向CD123/IL-3Rα的诊断和/或治疗剂。除非另外规定,否则抗CD123/IL-3Rα抗体与无关、非CD123/IL-3Rα蛋白的结合程度小于所述抗体与CD123/IL-3Rα的结合的约10%,如例如通过放射性免疫分析(RIA)所测量。在某些实施方案中,结合于CD123/IL-3Rα的抗体具有≤0.5nM、≤0.3nM、≤0.1nM、≤0.05nM或≤0.01nM的解离常数(K_d)。在一个实施方案中,抗CD123/IL-3Rα抗体不结合通用β链CD131。在一个实施方案中,抗CD123/IL-3Rα抗体不结合CD123中由诸如7G3(小鼠IgG_{2a})、6H6(小鼠IgG_1)和9F5(小鼠IgG_1)的已知并且市售CD123抗体结合的相同表位(Sun等人,Blood 87(1):83-92,1996)。

[0155] 本文提供本发明的抗CD123/IL-3Rα抗体和其抗原结合片段的序列。

[0156] 术语"抗体片段"是指完整抗体的一部分并且是指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')$_2$和F_v片段、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。术语抗体的"抗原结合片段"包括抗体中保持特异性地结合于抗原的能力的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的某些片段执行。涵盖于术语抗体的"抗原结合片段"内的结合片段的实例包括(但不限于):(i)Fab片段,即由V_L、V_H、C_L和C_{H1}域组成的单价片段(例如,通过木瓜蛋白酶消化的抗体产生三个片段:两个抗原结合Fab片段和一个不结合抗原的Fc片段);(ii)F(ab')$_2$片段,即包含由铰链区处的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段(例如,通过胃蛋白酶消化的抗体产生两个片段:二价抗原结合F(ab')$_2$片段和不结合抗原的pFc'片段)和其相关F(ab')单价单元;(iii)F_d片段,其由V_H和C_{H1}域组成(即,重链中包括于Fab中的那一部分);(iv)由抗体单臂的V_L和V_H域组成的F_v片段,和相关二硫化物连接的F_v;(v)dAb(域抗体)或sdAb(单域抗体)片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989),其由V_H域组成;和(vi)分离的互补决定区(CDR)。

[0157] "单克隆抗体"是指牵涉于单一抗原决定子或表位的高度特异性识别和结合中的均质抗体群体。这与多克隆抗体形成对照,多克隆抗体通常包括针对不同抗原决定子的不同抗体。术语"单克隆抗体"涵盖完整和全长单克隆抗体,以及抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')$_2$、F_v)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他经修饰免疫球蛋白分子。此外,"单克隆抗体"是指以多种方式制得的此类抗体,所述方式包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0158] 术语"人源化抗体"是指非人(例如鼠科动物)抗体的形式,所述形式为特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其含有最小非人(例如鼠科动物)序列的片段。通常,人源化抗体是其中来自互补决定区(CDR)的残基由来自非人物种(例如小鼠、大鼠、兔、仓鼠)的CDR的残基置换的具有所需特异性、亲和力和能力的人免疫球蛋白(Jones等人,Nature 321:522-

525,1986;Riechmann等人,Nature 332:323-327,1988;Verhoeyen等人,Science 239:1534-1536,1988)。

[0159] 在一些情况下,人免疫球蛋白的F_v框架区(FR)残基经来自非人物种的具有所需特异性、亲和力和能力的抗体中的相应残基置换。所述人源化抗体可通过F_v框架区中和/或经置换非人残基内另外的残基的取代进一步经修饰以细化和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。一般说来,人源化抗体将包含大体上全部的至少一个并且通常两个或三个可变域,所述可变域含有全部或大体上全部的对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而全部或大体上全部FR区为人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体也可包含免疫球蛋白恒定区或域(F_c)(通常,人免疫球蛋白的恒定区或域)的至少一部分。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利5,225,539和5,639,641,Roguska等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(3):969-973,1994;和Roguska等人,Protein Eng.9(10):895-904,1996(均以引用的方式并入本文中)中。在一些实施方案中,"人源化抗体"为表面重塑抗体。在一些实施方案中,"人源化抗体"为CDR移植抗体。

[0160] 抗体的"可变区"是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区(单独或组合)。重链和轻链的可变区各自由四个通过三个互补决定区(CDR)(还称作高变区)连接的框架区(FR)组成。各链中的CDR通过FR紧密地保持在一起并且与来自另一链的CDR一起促进形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种用于测定CDR的技术:(1)基于交叉物种序列变异性的方法(即,Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda Md.);和(2)基于抗原-抗体复合物的结晶学研究的方法(Al-lazikani等人,J.Molec.Biol.273:927-948,1997)。此外,这两种方法的组合有时用于本领域中以测定CDR。

[0161] 当提及可变域中的残基(大约为轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,一般使用Kabat编号系统(例如Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0162] 如Kabat中的氨基酸位置编号是指在Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)(以引用的方式并入本文中)中用于抗体的汇编的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用这种编号系统,实际线性氨基酸序列可含有较少或另外的氨基酸,其对应于可变域的FR或CDR的缩短或插入其中。例如,重链可变域可包括在H2的残基52后面的单一氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82后面插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。残基的Kabat编号可针对给定抗体通过在所述抗体的序列的同源区处与"标准"Kabat编号序列比对来测定。而Chothia指出结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917,1987)。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDR-H1环的末端在H32与H34之间变化,视所述环的长度而定。这是因为Kabat编号方案将插入放置于H35A和H35B处—如果35A和35B均不存在,那么所述环在32处结束;如果仅35A存在,那么所述环在33处结束;如果35A和35B均存在,那么所述环在34处结束。AbM高变区表示在Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且通过Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。

[0163]

环	Kabat	AbM	Chiothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat 编号)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Chothia 编号)	H26-H32

[0164]

H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H9S-H102	H95-H102	H95-H102

[0165] 如Kabat或EU编号方案中的EU指数或EU指数是指基于Edelman等人,1969,Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85(以引用的方式并入本文中)的人IgG1Eu抗体的编号系统。

[0166] 术语“人抗体”意指由人类产生的抗体,或使用本领域中已知的任何技术制得的具有对应于由人类产生的抗体的氨基酸序列的抗体。在某些实施方案中,所述人抗体不具有非人序列。人抗体的这一定义包括完整或全长抗体,或其抗原结合片段。

[0167] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列是源于两种或更多种物种的抗体。通常,轻链和重链的可变区对应于源于一种哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特异性、亲和力和能力的抗体的可变区,而恒定区与源于另一物种(通常为人类)的抗体中的序列同源以避免或减少在那一物种(例如人类)中引发免疫反应的机会。在某些实施方案中,嵌合抗体可包括包含至少一种人重链和/或轻链多肽的抗体或其抗原结合片段,诸如包含鼠科动物轻链和人重链多肽的抗体。

[0168] 术语“表位”或“抗原决定子”在本文中可互换使用并且是指抗原中能够由特定抗体识别并且特异性地结合的那一部分。当抗原为多肽时,表位可由连续氨基酸和通过蛋白质的三重折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位在蛋白质变性时通常得到保持,而通过三重折叠形成的表位在蛋白质变性时通常丧失。表位通常包括呈独特空间构形的至少3个并且更通常地至少5个或8-10个氨基酸。

[0169] “结合亲和力”一般是指在分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合搭配物(例如抗原)之间的非共价相互作用的总计强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其搭配物Y的亲和力一般可由解离常数(K_d)或半最大有效浓度(EC_{50})表示。亲和力可通过本领域中已知的常见方法,包括本文所述的那些来测量。低亲和力抗体一般缓慢地结合抗原并且倾向于快速地解离,而高亲和力抗体一般更快结合抗原并且倾向于保持更久结合。本领域中已知多种测量结合亲和力的方法,其中任一者均可用于本发明的目的。本文描述特定说明性实施方案。

[0170] “特异性地结合”一般意指抗体经由其抗原结合域结合于表位,并且所述结合使得所述抗原结合域与所述表位之间需要一些互补性。根据这一定义,与抗体将结合于随机、无关表位相比,当抗体更容易地经由其抗原结合域结合于一表位时,据说所述抗体“特异性地结合”于那个表位。术语“特异性”在本文中用于限定特定抗体结合于特定表位时的相关亲

和力。例如，抗体“A”可被认为与抗体“B”相比对给定表位具有较高特异性，或据说与抗体“A”对相关表位“D”的特异性相比，抗体“A”可以较高特异性结合于表位“C”。

[0171] 如本文所用，术语“免疫缀合物”、“缀合物”或“ADC”是指连接至细胞结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)的化合物或其衍生物。

[0172] “接头”是能够以稳定、共价方式连接诸如本文所述的细胞毒性剂(例如吲哚啉并苯并二氮呯(IGN)化合物)的化合物(通常为药物)至诸如抗体或其片段的细胞结合剂的任何化学部分。接头在使所述化合物或所述抗体保持活性的条件下可易经受或大体上抵抗酸诱导性裂解、光诱导性裂解、肽酶诱导性裂解、酯酶诱导性裂解和二硫键裂解。合适接头为本领域中众所周知的并且包括例如二硫基、硫醚基、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团和酯酶不稳定基团。接头还包括带电接头，和如本文所述和本领域中已知的其亲水形式。

[0173] 术语“半胱氨酸工程改造的抗体”包括具有通常未存在于抗体轻链或重链的给定残基处的至少一个Cys的抗体。所述Cys也可称作“工程改造的Cys”，可使用任何常规分子生物学或重组DNA技术(例如，通过用Cys的编码序列置换在靶残基处的非Cys残基的编码序列)进行工程改造。例如，如果原始残基为具有编码序列5’-UCU-3’的Ser，那么所述编码序列可突变(例如，通过定点诱变)为5’-UGU-3’，其编码Cys。在某些实施方案中，本发明的Cys工程改造的抗体在重链中具有工程改造的Cys。在某些实施方案中，工程改造的Cys在重链的CH3域中或附近。

[0174] 术语“未配对半胱氨酸”是指位于细胞结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)上的半胱氨酸残基，其未涉及与所述细胞结合剂的另一个半胱氨酸残基形成二硫键。在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段的未配对半胱氨酸是未涉及形成链间或链内二硫键的半胱氨酸残基。在某些实施方案中，未配对半胱氨酸是工程改造的半胱氨酸残基。

[0175] 术语“封端剂”是指具有硫醇-SH基团的试剂，其可与CBA的未配对半胱氨酸形成二硫化物。在某些实施方案中，封端剂是用于CBA(例如抗体或其抗原结合片段)的产生或纯化的含硫醇试剂，诸如用于供产生抗体或其抗原结合片段用的培养基中的一种或多种含硫醇试剂。在某些实施方案中，封端剂为半胱氨酸、谷胱甘肽、高半胱氨酸或其组合。在某些实施方案中，封端剂是固定的含硫醇试剂或硫醇-亲和力树脂(例如硫丙基琼脂糖6B)。参见Guo，J.等人，Nat Protoc.2014年1月;9(1):64-75，以引用的方式并入本文中。

[0176] 如本文所用，术语“连续过程”是指如下过程，其中当反应继续进行时和在已形成至少一种反应产物之后，一种或多种反应试剂继续添加至反应中。当反应继续进行时，反应产物可继续从反应中取出。

[0177] 如本文所用，术语“流式反应器”是指用于连续反应化学的任何反应容器，通常为管状。流式反应器可由不锈钢、玻璃、聚合物等制成。

[0178] 如本文所用，术语“过滤器”是指允许流体中的物质分离的选择性屏障。分离是通过选择性传递(渗透)流体的一种或多种物质通过过滤器，同时阻止一种或多种其他物质的传递来实现。

[0179] 如本文所用，术语“进料流”是指馈送至过滤器或膜以在所述过滤器或膜中分离组分的流体。

[0180] 如本文所用，术语“滞留物”是指进料流中未传递通过过滤器的部分。

[0181] 如本文所用,术语“渗透物”是指进料流中传递通过过滤器的部分。

[0182] 如本文所用,术语“切向流过滤”(TFF)是指基于膜的过滤过程,其中进料流平行于膜面传递。进料流的一部分传递通过膜(渗透物),而剩余物(滞留物)再循环返回进料储器。TFF还称作交叉流过滤。用于执行TFF的系统是已知的并且包括例如Pellicon类型系统(Millipore,Billerica,MA)、Sartocon卡匣系统(Sartorius AG,Edgewood,NY)和Centrasette类型系统(Pall Corporation,East Hills,NY)。

[0183] 如本文所用,术语“单程切向流过滤”(SPTFF)是指切向流过滤过程,其中进料流仅在膜面上传递一次。用于执行SPTFF的系统是已知的并且包括例如Cadance类型系统(Pall Corporation,Westborough,MA)。用于执行SPTFF的系统和方法在例如美国专利第7,384,549号、美国专利第7,510,654号、美国专利第7,682,511号、美国专利第7,967,987号、美国专利第8,157,999号和美国专利第8,231,787号中公开,其中每一者均以引用的方式整体并入本文中。

[0184] 如本文所用,术语“连续透滤”是指如下透滤过程,其中通过使进料流与稀释剂混合并将其泵送通过膜,同时去除渗透物和滞留物而以连续方式实现溶质的选择性分离。当过滤进行时,产物未形成于容器中;相反,其在过滤过程期间连续地从所述系统中抽出。“逆流透滤”是指其中过程流(例如渗透物或滞留物)在透滤步骤中再循环的连续透滤过程。

[0185] 术语“在线监测”是指例如在产生或纯化过程期间,实时监测分析物。在线监测不同于不提供实时反馈的过程中取样或脱机分析。

[0186] 术语“在线过程自动化技术”是指用于在过程期间监测分析物的任何在线测量器件。

[0187] 如本文所用,术语“分析物”为广泛术语,并且其是指但不限于流体中可分析的物质或化学组分。分析物可包括天然存在的物质、人工物质、代谢物和/或反应产物。在一些实施方案中,用于本文所公开的方法中的测量的分析物为抗体或其抗原结合片段、药物、接头、结合于抗体或其抗原结合片段的接头、结合于药物的接头、抗体-药物缀合物(ADC)、药物:抗体比率(DAR)和/或杂质。

[0188] 如本文所用,术语“配制缓冲液”是指允许活性成分具有生物活性并且不含对将施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分的缓冲液。

[0189] 术语“癌症(cancer)”和“癌的(cancerous)”是指或描述哺乳动物的生理学疾患,其中细胞群体的特征在于不受调控的细胞生长。“肿瘤”和“赘瘤”是指由于过度细胞生长或增生而产生的一种或多种细胞,其为良性(非癌的)或恶性(癌的),包括癌前病变。

[0190] 癌症的实例包括肺癌(例如非小细胞肺癌)、结肠直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食管癌、乳腺癌、头颈部癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、骨髓癌、黑素瘤和淋巴癌。在某些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌、结肠直肠癌、胃癌或胰腺癌。在某些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌(鳞状细胞癌、非鳞状细胞癌、腺癌或大细胞未分化癌)、结肠直肠癌(腺癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠基质肿瘤、原发性结肠直肠淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鳞状细胞癌)或乳腺癌(例如三阴性乳腺癌(TNBC))。在某些实施方案中,癌症为淋巴瘤和白血病。在某些实施方案中,癌症的实例包括AML、CML、ALL(例如B-ALL)、CLL、骨髓发育不良综合征、母细胞性浆细胞样DC赘瘤(BPDCN)白血病、B细胞淋巴瘤,包括非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphomas,NHL)、前体B细胞淋巴母细胞性白血病/淋

巴瘤和成熟B细胞赘瘤，诸如B细胞慢性淋巴球性白血病(B-CLL)/小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴球性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)(包括低级、中间级和高级FL)、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤(MALT类型、淋巴结和脾类型)、毛细胞白血病(HCL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、移植后淋巴增生性病症、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)和霍奇金氏白血病(HL)。在某些实施方案中，所述癌症为BPDCN白血病。在某些实施方案中，所述癌症为ALL。在其他实施方案中，所述癌症为AML。

[0191] 术语“受试者”是指待作为特定治疗的接受者的任何动物(例如哺乳动物)，包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿动物等。通常，术语“受试者”和“患者”在本文中关于人受试者可互换使用。

[0192] 术语“药物组合物”是指呈允许活性成分的生物活性有效的形式，并且不含对将施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分的制剂。此类组合物可为无菌的。

[0193] 如本文所公开的免疫缀合物的“治疗有效量”是足以进行特定陈述的目的的量。“治疗有效量”可关于所陈述的目的凭经验并且以常规方式确定。

[0194] 如本文所用，“烷基”或“直链或分支链烷基”是指饱和直链或分支链单价烃基。在优选实施方案中，直链或分支链烷基具有三十个或三十个以下碳原子(例如，关于直链烷基为C_1-C_{30}并且关于分支链烷基为C_3-C_{30})，并且更优选二十个或二十个以下碳原子。甚至更优选地，直链或分支链烷基具有十个或十个以下碳原子(即，关于直链烷基为C_1-C_{10}并且关于分支链烷基为C_3-C_{10})。在其他实施方案中，直链或分支链烷基具有六个或六个以下碳原子(即，关于直链烷基为C_1-C_6并且关于分支链烷基为C_3-C_6)。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、-$CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基)、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基等。此外，如本说明书、实施例和权利要求书中所用的术语“烷基”意图包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”，其中后者是指具有置换烃骨架的一个或多个碳上的氢的取代基的烷基部分。如本文所用，(C_x-C_{xx})烷基或C_{x-xx}烷基意指具有x-xx个碳原子的直链或分支链烷基。

[0195] “烯基”或“直链或分支链烯基”是指具有两个至二十个碳原子并且具有至少一个不饱和位点(即，碳-碳双键)的直链或分支链单价烃基，其中烯基包括具有“顺式”和“反式”取向或替代地“E”和“Z”取向的基团。实例包括但不限于乙烯基(ethylenyl/vinyl，-CH=CH_2)、烯丙基(-CH_2CH=CH_2)等。优选地，烯基具有两个至十个碳原子。更优选地，烷基具有两个至四个碳原子。

[0196] “炔基”或“直链或分支链炔基”是指具有两个至二十个碳原子并且具有至少一个不饱和位点(即，碳-碳三键)的直链或分支链单价烃基。实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基等。优选地，炔基具有两个至十个碳原子。更优选地，炔基具有两个至四个碳原子。

[0197] 术语“环状烷基”和“环烷基”可互换使用。如本文所用，所述术语是指饱和碳环的

基团。在优选实施方案中，环烷基在其环结构中具有3至10个碳原子，并且更优选地在环结构中具有5至7个碳原子。在一些实施方案中，所述两个环可共同具有两个或更多个原子，例如所述环为“稠环”。合适环烷基包括但不限于环庚基、环己基、环戊基、环丁基和环丙基。在一些实施方案中，环烷基为单环基团。在一些实施方案中，环烷基为二环基团。在一些实施方案中，环烷基为三环基团。

[0198] 术语“环烷基烷基”是指经环烷基取代的上述烷基。

[0199] 术语“环状烯基”是指在环结构中具有至少一个双键的碳环基团。

[0200] 术语“环状炔基”是指在环结构中具有至少一个三键的碳环基团。

[0201] 如本文所用，术语“芳基”或“芳环”包括取代或未取代的单环芳族基团，其中所述环的每一个原子均为碳。优选地，所述环为5至7元环，更优选地6元环。芳基包括但不限于苯基、苯酚、苯胺等。术语“芳基”还包括“多环基”、“多环”和“多环状”环系统，其具有两个或更多个环，其中两个或更多个原子是两个邻接环所共有，例如所述环为“稠环”，其中所述环中的至少一者为芳族，例如其他环可为环烷基、环烯基、环炔基或芳环。在一些优选实施方案中，多环具有2-3个环。在某些优选实施方案中，多环系统具有两个环，其中所述环均为芳族。多环的每一个环均可经取代或未经取代。在某些实施方案中，多环的每一个环在环中含有3至10个碳原子，优选地5至7个。例如，芳基包括但不限于苯基、甲苯基、蒽基、芴基、茚基、奠基和萘基，以及苯并稠合碳环部分，诸如5,6,7,8-四氢萘基等。在一些实施方案中，芳基为单环芳族基团。在一些实施方案中，芳基为双环芳族基团。在一些实施方案中，芳基为三环芳族基团。

[0202] 如本文所用，术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基”和“杂环(heterocyclic ring)”是指3元至18元环、优选地3元至10元环、更优选地3元至7元环的取代或未取代的非芳环结构，其环结构包括至少一个杂原子，优选地一至四个杂原子，更优选地一或两个杂原子。在某些实施方案中，所述环结构可具有两个环。在一些实施方案中，所述两个环可共同具有两个或更多个原子，例如所述环为“稠环”。杂环基包括例如哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、内酯、内酰胺等。杂环描述于Paquette,Leo A.;“Principles of Modern Heterocyclic Chemistry”(W.A.Benjamin,New York,1968)，尤其第1、3、4、6、7和9章;“The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A series of Monographs”(JohnWiley&Sons,New York,1950年至今)，尤其第13、14、16、19和28卷;和J.Am.Chem.Soc.(1960)82:5566中。杂环的实例包括但不限于四氢呋喃、二氢呋喃、四氢噻吩、四氢吡喃、二氢吡喃、四氢噻喃、硫代吗啉、噻噁烷、高哌嗪、氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、高哌啶、哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、氧杂环庚烷、硫杂环庚烷、氧氮呼、二氮呼、硫氮呼、2-吡咯啉、3-吡咯啉、吲哚啉、2H-吡喃、4H-吡喃、二噁烷、1,3-二氧戊环、吡唑啉、二噻烷、二硫戊环、二氢吡喃、二氢噻吩、二氢呋喃、吡唑烷基咪唑啉、咪唑烷、3-氮杂双环[3.1.0]己烷、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷和氮杂双环[2.2.2]己烷。螺部分还包括于这一定义的范围内。其中环原子经氧代(=O)部分取代的杂环基团的实例为嘧啶酮和1,1-二氧代-硫代吗啉。

[0203] 如本文所用，术语“杂芳基(heteroaryl)”或“杂芳环(heteroaromatic ring)”是指取代或未取代的芳族单环结构，优选地6元至18元环，优选地5元至7元环，更优选地5元至6元环，其环结构包括至少一个杂原子(例如，O、N或S)，优选地一至四个或一至三个杂原子，更优选地一或两个杂原子。当两个或更多个杂原子存在于杂芳基环中时，其可为相同或不

同的。术语“杂芳基”还包括“多环基”、“多环”和“多环状”环系统，其具有两个或更多个环，其中两个或更多个环原子是两个邻接环所共有，例如所述环为“稠环”，其中所述环中的至少一者为杂芳族，例如其他环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳族和/或杂环基。在一些优选实施方案中，多环杂芳基具有2-3个环。在某些实施方案中，优选多环杂芳基具有两个环，其中所述环均为芳族。在某些实施方案中，多环的每一个环在环中含有3至10个原子，优选地在环中含有5至7个原子。例如，杂芳基包括但不限于吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、喹啉、嘧啶、吲嗪、吲哚、吲唑、苯并咪唑、苯并噻唑、苯并呋喃、苯并噻吩、噌啉、酞嗪、喹唑啉、咔唑、吩噁嗪、喹啉、嘌呤等。在一些实施方案中，杂芳基为单环芳族基团。在一些实施方案中，杂芳基为双环芳族基团。在一些实施方案中，杂芳基为三环芳族基团。

[0204] 在可能的情况下，杂环或杂芳基可为碳(碳连接)或氮(氮连接)附接的。举例来说并且非限制，碳键结的杂环或杂芳基键结于吡啶的2、3、4、5或6位、哒嗪的3、4、5或6位、嘧啶的2、4、5或6位、吡嗪的2、3、5或6位、呋喃、四氢呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的2、3、4或5位、噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位、异噁唑、吡唑或异噻唑的3、4或5位、氮丙啶的2或3位、氮杂环丁烷的2、3或4位、喹啉的2、3、4、5、6、7或8位或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。

[0205] 举例来说并且非限制，氮键结的杂环或杂芳基键结于氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲唑的1位、异吲哚或异吲哚啉的2位、吗啉的4位和咔唑或O-咔啉的9位。

[0206] 存在于杂芳基或杂环基中的杂原子包括氧化形式，诸如NO、SO和SO_2。

[0207] 在一些实施方案中，杂芳环为5至18元环。

[0208] 术语“卤基”或“卤素”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。在一些实施方案中，卤素为氟。在一些实施方案中，卤素为氯。在一些实施方案中，卤素为溴。在一些实施方案中，卤素为碘。如本文所用，术语“卤烷基”是指如本文所定义的烷基，其由如本文所定义的一个或多个卤基取代。卤烷基可为单卤烷基、二卤烷基或聚卤烷基。单卤烷基可具有一个氟、氯、溴或碘取代基。二卤烷基或聚卤烷基可经两个或更多个相同卤原子或不同卤基的组合取代。卤烷基的实例包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氯甲基、二氯甲基、三氯甲基、五氟乙基、七氟丙基、二氟氯甲基、二氯氟甲基、二氟乙基、二氟丙基、二氯乙基和二氯丙基。

[0209] 本文所用的“烷氧基”是指烷基-O-，其中烷基定义于上文中。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、2-丙氧基、丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。

[0210] 上文所述的烷基、卤烷基、烷氧基、烯基、炔基、环状烷基、环状烯基、环状炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基可任选地经一个或多个(例如，2、3、4、5、6个或更多个)取代基取代。

[0211] 除非特定地陈述为“未取代”，否则本文中对化学部分的提及应理解为还包括取代的变体。例如，对“烷基”基团或部分的提及暗含包括取代和未取代的变体。化学部分上的取代基的实例包括但不限于卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧羰基、甲酰基或酰基)、硫羰基(诸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、烷硫基、酰氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳基或杂芳基部分。

[0212] “任选的”或“任选地”意指随后描述的情形可以发生或可以不发生，使得所述申请包括其中所述情形发生的情况和其中所述情形不发生的情况。例如，短语“任选地经取代”意指非氢取代基可以或可以不存在于给定原子上，并且因此所述申请包括其中存在非氢取代基的结构和其中不存在非氢取代基的结构。

[0213] 术语“经取代”是指具有置换一个或多个碳、氮、氧或硫原子上的氢的取代基的部分。应理解，“取代”或“经取代”包括暗含限制条件，即所述取代与取代的原子和取代基的允许价态一致，并且所述取代产生稳定化合物，例如所述化合物不会自发地经历诸如通过重排、环化、消除等导致的转化。如本文所用，术语“经取代”预期包括有机化合物的所有可允许取代基。在一广泛方面，所述可允许取代基包括有机化合物的无环和环状、分支和未分支、碳环和杂环、芳族和非芳族取代基。所述可允许取代基可以是用于适当有机化合物的一者或多者并且相同或不同。出于本发明的目的，诸如氮的杂原子可具有氢取代基和/或本文所述的有机化合物的满足杂原子价态的任何可允许取代基。取代基可包括本文所述的任何取代基，例如卤素、羟基、羰基(诸如羧基、烷氧羰基、甲酰基或酰基)、硫羰基(诸如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、烷硫基、酰氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳族或杂芳族部分。为了说明，单氟烷基是经一个氟取代基取代的烷基，并且二氟烷基是经两个氟取代基取代的烷基。应认识到，如果取代基上存在超过一个取代，那么各非氢取代基可为一致或不同的(除非另外规定)。

[0214] 如果取代基的碳被描述为任选地经取代基清单中的一者或多者取代，那么所述碳上的一个或多个氢(就存在一些来说)可独立地和/或合起来经独立选择的任选的取代基置换。如果取代基的氮被描述为任选地经取代基清单中的一者或多者取代，那么所述氮上的一个或多个氢(就存在一些来说)可各自经独立选择的任选的取代基置换。一种示例性取代基可描绘为-NR’R”，其中R’和R”与其所附接的氮原子一起可形成杂环。由R’和R”与其所附接的氮原子一起形成的杂环可部分地或完全地饱和。在一些实施方案中，杂环由3至7个原子组成。在其他实施方案中，杂环是选自吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、异噁唑基、吡啶基和噻唑基。

[0215] 本说明书可互换地使用术语“取代基”、“基团(radical)”和“基团(group)”。

[0216] 如果取代基的基团共同地被描述为任选地由取代基清单中的一者或多者取代，那么所述基团可包括：(1)不可取代的取代基，(2)可取代的取代基，其未由任选的取代基取代，和/或(3)可取代的取代基，其由任选的取代基中的一者或多者取代。

[0217] 如果取代基被描述为任选地经多达特定数目的非氢取代基取代，那么那个取代基可(1)未经取代；或(2)由多达那个特定数目的非氢取代基或由多达所述取代基上的可取代位置的最大数目的非氢取代基(取较小者)取代。因此，举例来说，如果取代基被描述为任选地经多达3个非氢取代基取代的杂芳基，那么具有少于3个可取代位置的任何杂芳基均将任选地经多达仅与所述杂芳基具有的可取代位置同样多的非氢取代基取代。在非限制性实施例中，所述取代基可选自具有1至10个碳原子的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、芳基、杂芳基、杂环基、卤素、胍盐[-NH(C=NH)NH_2]、-OR^{100}、$NR^{101}R^{102}$、-NO_2、-$NR^{101}COR^{102}$、-SR^{100}、由-SOR^{101}表示的亚砜、由-SO_2R^{101}表示的砜、磺酸酯基-SO_3M、硫酸酯基-OSO_3M、由-$SO_2NR^{101}R^{102}$表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、-COR^{101}、-$OCOR^{101}$、-$OCONR^{101}R^{102}$和聚乙二醇单元(-

$OCH_2CH_2)_nR^{101}$，其中M为H或阳离子(诸如Na^+或K^+)；R^{101}、R^{102}和R^{103}各自独立地选自H、具有1至10个碳原子的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-R^{104}$(其中n为整数1至24)、具有6至10个碳原子的芳基、具有3至10个碳原子的杂环和具有5至10个碳原子的杂芳基；并且R^{104}为H或具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基，其中所述基团中由R^{100}、R^{101}、R^{102}、R^{103}和R^{104}表示的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和杂环基任选地经独立地选自卤素、-OH、-CN、$-NO_2$和具有1至4个碳原子的未取代的直链或分支链烷基的一个或多个(例如，2、3、4、5、6个或更多个)取代基取代。优选地，用于上文所述的任选取代的烷基、烯基、炔基、环状烷基、环状烯基、环状炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基的取代基包括卤素、-CN、$-NR^{102}R^{103}$、$-CF_3$、$-OR^{101}$、芳基、杂芳基、杂环基、$-SR^{101}$、$-SOR^{101}$、$-SO_2R^{101}$和$-SO_3M$。

[0218] 基团中的碳原子数目在本文中可由前缀“C_{x-xx}”或“C_x-C_{xx}”规定，其中x和xx为整数。例如，“C_{1-4}烷基”或“C1-C4烷基”是具有1至4个碳原子的烷基。

[0219] 术语“化合物”、“细胞毒性剂”或“细胞毒性化合物”可互换使用。其意图包括如下化合物，其结构或式或任何衍生物已公开于本发明中或其结构或式或任何衍生物已以引用的方式并入。所述术语还包括本发明中所公开的所有式的化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢物和盐(例如，药学上可接受的盐)。所述术语还包括前述任一者的任何溶剂化物、水合物和多晶型物。在本申请中描述的本发明的某些方面，特定陈述“立体异构体”、“几何异构体”、“互变异构体”、“溶剂化物”、“代谢物”、“盐”、“缀合物”、“缀合物盐”、“溶剂化物”、“水合物”或“多晶型物”不应解释为在其中使用术语“化合物”而未陈述这些其他形式的本发明的其他方面意图省略这些形式。

[0220] 术语“手性”是指具有镜像搭配物的不可重叠特性的分子，而术语“非手性”是指在其镜像搭配物上可重叠的分子。

[0221] 术语“立体异构体”是指如下化合物，其具有一致化学组成和连接性，但其原子在空间中的不同取向无法通过绕单键旋转而互变。

[0222] “非对映异构体”是指具有两个或更多个手性中心并且分子彼此不为镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理特性，例如熔点、沸点、光谱特性和反应性。非对映异构体的混合物可根据高分辨率分析程序，诸如结晶、电泳和色谱来分离。

[0223] “对映异构体”是指化合物的两种立体异构体，其彼此为不可重叠镜像。

[0224] 本文中使用的立体化学定义和惯例通常遵循S.P.Parker编，McGraw-Hill，Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;和Eliel，E.和Wilen,S.,Stereochemistry of Organic Compounds,John Wiley&Sons,Inc.,New York,1994。本发明化合物可含有非对称或手性中心，并且因此以不同立体异构体形式存在。预期本发明化合物的所有立体异构体形式形成本发明的一部分，包括但不限于非对映异构体、对映异构体和位阻异构体，以及其混合物，诸如外消旋混合物。多种有机化合物以光学活性形式存在，即，其具有使平面偏振光的平面旋转的能力。在描述光学活性化合物时，前缀D和L或R和S用于表示所述分子绕其手性中心的绝对配置。前缀d和I或(+)和(-)用于指示所述化合物使平面偏振光旋转的符号，其中(-)或l意指所述化合物为左旋的。前缀为(+)或d的化合物为右旋的。关于给定化学结构，这些立体异构体是一致的，只是其彼此为镜像。特定立体异构体也可称作对映异构体，并且所述异构体的混合物通常称作对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物是称作外消旋混合物或外消旋体，其可在化学反应或

过程中不具有立体选择或立体特异性的情况下存在。术语“外消旋混合物”和“外消旋体”是指两种对映异构体物质的等摩尔浓度混合物，其缺乏光学活性。

[0225] 术语“互变异构体”或“互变异构体形式”是指可经由低能屏障互变的具有不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体(还称作质子移变互变异构体)包括经由质子迁移实现的互变，诸如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。价互变异构体包括通过一些键结电子的重组实现的互变。

[0226] 如本文所用，短语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的有机或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟碱酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、鞣酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、丁二酸盐、顺丁烯二酸盐、龙胆酸盐、反丁烯二酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖质酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐“甲磺酸盐”、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、双羟萘酸盐(即，1,1’-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐))、碱金属(例如，钠和钾)盐、碱土金属(例如，镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及包括另一分子，诸如乙酸盐离子、丁二酸盐离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定化的任何有机或无机部分。此外，药学上可接受的盐可在其结构中具有超过一个带电原子。其中多个带电原子是药学上可接受的盐的一部分的情况可具有多个抗衡离子。因此，药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0227] 如果本发明化合物是碱，那么所需药学上可接受的盐可通过本领域中可获得的任何合适方法制备，例如用诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸等的无机酸，或用诸如乙酸、顺丁烯二酸、丁二酸、扁桃酸、反丁烯二酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖酸(诸如葡糖醛酸或半乳糖醛酸)、α羟基酸(诸如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(诸如天冬氨酸或谷氨酸)、芳香酸(诸如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(诸如对甲苯磺酸或乙烷磺酸)等的有机酸处理游离碱。

[0228] 如果本发明化合物是酸，那么所需药学上可接受的盐可通过任何合适方法制备，例如用诸如胺(伯、仲或叔)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等的无机或有机碱处理游离酸。合适盐的说明性实例包括但不限于源于诸如甘氨酸和精氨酸的氨基酸、氨水、伯、仲和叔胺和诸如哌啶、吗啉和哌嗪的环状胺的有机盐，和源于钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

[0229] 如本文所用，术语“溶剂化物”意指如下化合物，其还包括通过非共价分子间力结合的化学计量或非化学计量的量的溶剂，诸如水、异丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇等。化合物的溶剂化物或水合物容易通过向所述化合物中添加至少一摩尔当量的羟基溶剂(诸如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)以产生亚胺部分的溶剂化或水合来制备。

[0230] 短语“药学上可接受”指示所述物质或组合物必须可在化学上和/或在毒物学上与构成所述制剂的其他成分和/或用其治疗的哺乳动物相容。

[0231] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸或非天然存在的氨基酸。在一个实施方案中，氨基酸由NH_2-C($R^{aa'}$ R^{aa})-C(=O)OH表示，其中R^{aa}和$R^{aa'}$各自独立地为H、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、芳基、杂芳基或杂环基或R^{aa}和N端氮

原子可合起来形成杂环(例如,如在脯胺酸中)。术语“氨基酸残基”是指当一个氢原子从氨基酸的胺和/或羧基末端去除时的相应残基,诸如-NH-C($R^{aa'}$ R^{aa})-C(=O)-。

[0232] 术语“阳离子”是指具有正电荷的离子。阳离子可为单价(例如,Na^+、K^+、NH_4^+等)、二价(例如,Ca^{2+}、Mg^{2+}等)或多价(例如,Al^{3+}等)。优选地,阳离子为单价。

[0233] 术语“硫醇反应性基团”是指可与硫醇(-SH)基团反应以形成共价键的基团。示例性硫醇反应性基团包括但不限于顺丁烯二酰亚胺、卤基乙酰基、卤基乙酰胺、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺或乙烯基吡啶。在一个实施方案中,硫醇反应性基团为顺丁烯二酰亚胺。

[0234] 应理解,在本文中用语言“包含”描述实施方案的任何情况下,还提供根据“由.....组成”和/或“基本上由.....组成”描述的其他类似实施方案。

[0235] 如本文中诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”和“B”。同样,如诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”意图涵盖以下实施方案中的每一者:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

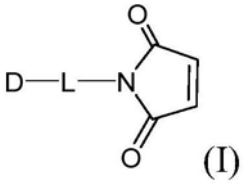
[0236] 2.制备免疫缀合物的方法

[0237] 在第一方面,本发明提供一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

[0238] (a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

[0239] (b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中未配对半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0240] (c)使所述CysCBA与式(I)化合物:

[0241] 

(I)

[0242] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物,其中步骤(a)中的还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);并且步骤(b)中的CysCBA未纯化即用于步骤(c),其中:

[0243] D为细胞毒性剂;并且

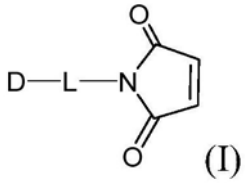
[0244] L为接头。

[0245] 在第二方面,本发明提供一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

[0246] (a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

[0247] (b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中未配对半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0248] (c)使所述CysCBA与式(I)化合物：

[0249] 

(I)

[0250] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述缀合物，

[0251] 其中步骤(a)中的还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b)；步骤(b)中的CysCBA未纯化即用于步骤(c)，并且选自步骤(a)至(c)的任一个或多个步骤是连续地执行，其中：

[0252] D为细胞毒性剂；并且

[0253] L为接头。

[0254] 在一些实施方案中，上文所述的第二方面的方法中的步骤(a)至(c)是连续地执行。

[0255] 在本文所提供的连续方法中，组分继续添加至正在进行中的过程中，并且产物可在所述过程中取出，而非在所述过程结束时整体取出。例如，在上文所述的连续方法的步骤(a)(还原步骤)中，当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物(即，还原的细胞结合剂)之后，还原剂和/或经封端细胞结合剂(cCysCBA)继续添加至还原反应中。在上文所述的连续方法的步骤(b)(氧化步骤)中，当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物(即，CysCBA)之后，还原的细胞结合剂和/或选择性氧化剂继续添加至氧化反应中。在上文所述的连续方法的步骤(c)(结合步骤)中，当所述反应继续进行时和在已形成至少一种缀合反应产物(ADC)之后，CysCBA和/或式(I)化合物继续添加至缀合反应中。同样，在下游连续浓缩、纯化和/或缓冲液交换过程中，当那些过程继续进行时，ADC、缓冲液和/或其他组分继续添加至浓缩纯化和/或缓冲液交换过程中，并且浓缩、纯化和经缓冲液交换的ADC可连续地从那些正在进行中的过程中取出。因此，整个ADC过程可以是连续的(参见例如图5和图6)。

[0256] 本发明人已证明，本文所述的制备ADC的方法可使用流式反应器连续地执行。当反应继续进行时和在已形成至少一种反应产物之后，流式反应器允许一种或多种试剂连续地添加至反应中。流式反应器在所述连续方法中的使用容许反应的控制和方法的多功能性(例如，快速温度改变/更严格温度控制、通过扩散介导的混合因此更均一并且无容器约束或套件限制)和方法的改进可扩展性(即，分批加工的常规按比例增加风险不适用并且时空产率得到优化(例如，通过运转本发明过程持续较长时间来执行假的按比例增加(增加输出)))。

[0257] 在某些实施方案中，塞流反应器(PFR)用于本发明的连续方法。

[0258] 在某些实施方案中，在一种或多种试剂添加至流式反应器中之前，反应容器(例如连续搅拌槽反应器(CSTR))用于反应物的连续添加。反应容器(例如CSTR)和流式反应器(例如塞流反应器)的连续使用具有如下优势，即减少总体积需求、改进反应物流之间的混合和增加风险缓解能力(包括较宽停留时间分布)。

[0259] 在某些实施方案中，关于本文所述的连续方法中的还原步骤(a)，当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物(即，还原的细胞结合剂)之后，还原剂和经封端细胞结合剂(cCysCBA)连续地添加(例如，针对还原剂使用进料泵并且针对cCysCBA使用独立进料泵)至反应容器(例如CSTR)中。反应混合物使用泵(例如蠕动泵)连续地从反应容器(例如CSTR)

中抽出并且经由流式反应器(例如PFR)馈送。在一些实施方案中,从反应容器(例如CSTR)中抽出材料的体积流动速率与将还原剂和cCysCBA添加至CSTR中的组合流动速率相同,即进入和离开反应容器(例如CSTR)的流动速率相同。

[0260] 同样,关于本文所述的连续方法中的选择性再氧化步骤(b),当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物(即,CysCBA)之后,还原的细胞结合剂和选择性氧化剂连续地添加(例如,针对还原的细胞结合剂使用进料泵并且针对选择性氧化剂使用独立进料泵)至反应容器(例如CSTR)中。反应混合物使用泵(例如蠕动泵)连续地从反应容器(例如CSTR)中抽出并且经由流式反应器(例如PFR)馈送。在一些实施方案中,从反应容器(例如CSTR)中抽出材料的体积流动速率与将还原的细胞结合剂和选择性氧化剂添加至CSTR中的组合流动速率相同,即进入和离开反应容器(例如CSTR)的流动速率相同。

[0261] 在一些实施方案中,关于本文所述的连续方法中的结合步骤(c),当所述反应继续进行时和在已形成至少一种产物(即,ADC)之后,CysCBA和式(I)化合物连续地添加(例如,针对CysCBA使用进料泵并且针对式(I)化合物使用独立进料泵)至反应容器(例如CSTR)中。反应混合物使用泵(例如蠕动泵)连续地从反应容器(例如CSTR)中抽出并且经由流式反应器(例如PFR)馈送。在一些实施方案中,从CSTR中抽出材料的体积流动速率与将CysCBA和式(I)化合物添加至反应容器(例如CSTR)中的组合流动速率相同,即进入和离开反应容器(例如CSTR)的流动速率相同。

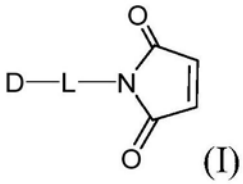
[0262] 在一些实施方案中,产生各反应的动力学数据并且规定各反应的所需靶转化。基于这些结果,各反应的CSTR和PFR体积是基于所用管的内径和实现各反应步骤的所需停留时间所需的体积流动速率来规定。

[0263] 在第三方面,本发明提供一种制备细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物(ADC)包含具有共价连接至细胞毒性剂的一个或多个未配对半胱氨酸残基的细胞结合剂(CysCBA),其中所述方法包括以下步骤:

[0264] (a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个未配对半胱氨酸残基的经封端细胞结合剂(cCysCBA)反应以形成还原的细胞结合剂,其中去除所述封端剂以在所述还原的细胞结合剂中形成游离硫醇(-SH)基;

[0265] (b)使所述还原的细胞结合剂与选择性氧化剂反应以形成所述CysCBA,其中未配对半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0266] (c)使所述CysCBA与式(I)化合物:

[0267] 

(I)

[0268] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述缀合物;

[0269] (d)去除未缀合的式(I)化合物;和任选地

[0270] (e)将所述缀合物交换至稳定缓冲液中;

[0271] 其中步骤(a)中的还原的细胞结合剂未纯化即用于步骤(b);步骤(b)中的CysCBA未纯化即用于步骤(c),选自步骤(a)至(e)的任一个或多个步骤是连续地执行,并且使用单程切向流过滤(SPTFF)和/或逆流透滤来去除未缀合的药物和/或将ADC交换至稳定缓冲液

中;并且其中:

[0272] D为细胞毒性剂;并且

[0273] L为接头。

[0274] 在一些实施方案中,关于第三方面中所述的连续方法,所述方法包括步骤(a)至(d)。在一些实施方案中,步骤(a)至(d)是连续地执行。在一些实施方案中,仅步骤(d)是连续地执行。

[0275] 在一些实施方案中,关于第三方面中所述的连续方法,所述方法包括步骤(a)至(e)。在一些实施方案中,步骤(a)至(e)是连续地执行。在一些实施方案中,仅步骤(d)和(e)是连续地执行。

[0276] 本发明人也已证明,连续ADC加工可使用单程切向流过滤(SPTFF)来实现,SPTFF可成功地分离未缀合的药物(即,式(I)化合物)与ADC)。ADC加工可涉及ADC的缀合(形成)(即,上文所述的步骤(c))、ADC浓缩、ADC纯化和/或ADC配制。尽管特别适用的是从ADC缀合至配制的整个过程是连续的,也有可能组合连续加工步骤与分批加工步骤。另外,有可能上游加工步骤(例如抗体的制备,即此处所述的方法中的步骤(a)和(b))是连续的并且连续地馈送至ADC缀合中。

[0277] 整体(常规)透滤涉及用第一缓冲液A(产物最初所处的缓冲液)起动切向流过滤(TFF)系统。产物接着添加至滞留物容器中,在滞留物容器中其与起动体积混合。用于滞留物容器的进料泵从滞留物经TFF膜泵送产物,在TFF膜中产物得到保持(并且返回滞留物)或被弃去。另一泵(透滤泵)将从所述容器馈送至含于独立容器中的缓冲液B(产物将交换进入的缓冲液)中,所述独立容器具有从所述容器至滞留物容器中的进料线。两个泵均开始并且滞留物容器中的产物开始经TFF膜传递。当缓冲液经由废物流去除时,滞留物中的体积通过添加缓冲液B(相等体积)至滞留物容器中加以维持。结果,产物缓慢地交换至缓冲液B中。

[0278] SPTFF使用将最初在缓冲液A中的产物交换至缓冲液B中的相关概念。然而,所述产物仅仅曾经完成经所述膜的单程,因此必须实现使所有适当体积的缓冲液B达成完全缓冲液交换。为此,SPTFF可经堆叠阶段添加缓冲液B。因此,产物仅传递通过所述膜一次:进入缓冲液A中并且离开缓冲液B中的模块。

[0279] 同样,可使用逆流透滤来实现连续ADC加工。逆流透滤涉及两次或更多次SPTFF(例如模块1、模块2等)。在一些实施方案中,逆流透滤涉及两个SPTFF模块,其中来自模块1的滞留物与透滤缓冲液的另外的进料组合并且接着直接地馈送至模块2中,并且来自模块2的渗透物进行再循环并且与模块1的进料组合。示例性逆流透滤在图6中示出。未纯化的粗ADC产物与透滤(DF)缓冲液流组合并且接着经由逆流TFF纯化单元的模块1进行馈送。来自模块1的渗透物经由废物流去除并且来自模块1的滞留物与DF缓冲液的另外的进料组合并且接着经由模块2进行馈送。纯化的ADC从模块2的滞留物中加以回收并且来自模块2的渗透物进行再循环并且与模块1的进料组合。

[0280] 因此,如与分批ADC加工相比,本文所提供的连续ADC加工方法(例如,使用SPTFF和/或逆流透滤)可减少加工时间,改进产率,和/或改进产物一致性。本文所提供的连续ADC加工方法(例如,使用SPTFF和/或逆流透滤)也可消除用于分批结合方法中的保留步骤。本文所提供的连续ADC加工方法(例如,使用SPTFF和/或逆流透滤)也可容许较小设备的使用。SPTFF也是有利的,因为对潜在地由剪切力引起的氧化敏感的抗体可更加适用于SPTFF。

[0281] SPTFF的使用可容许缀合反应中组分的连续添加和/或去除。因此，可使用SPTFF来制备用于ADC缀合和用于加工装配的ADC的试剂。SPTFF可使得能够进行连续ADC加工，使得针对特定ADC的全部(或子集)加工步骤(例如，产生、浓缩、纯化和/或配制)可同时发生。也可使用逆流透滤来制备用于ADC缀合和用于加工装配的ADC的试剂。

[0282] 根据本文所提供的方法，可使用SPTFF来浓缩ADC，纯化ADC，和/或配制ADC(例如，通过将ADC交换至配制缓冲液中)。可使用SPTFF将ADC从第一缓冲液转移至第二缓冲液。也可使用逆流透滤来浓缩ADC，纯化ADC，和/或配制ADC(例如，通过将ADC交换至配制缓冲液中)，并且也可使用逆流透滤将ADC从第一缓冲液转移至第二缓冲液。

[0283] 在本文所提供的一些方法中，SPTFF用于ADC产生、纯化和配制中，使得从ADC产生至配制的整个过程是连续的。在本文所提供的一些方法中，逆流透滤用于ADC产生、纯化和配制中，使得从ADC产生至配制的整个过程是连续的。

[0284] 在本文所提供的一些方法中，SPTFF与常规TFF组合使用，使得所述过程的一些部分是连续的，而其他部分分批执行。例如，抗体或其抗原结合片段可在缀合之前使用常规(分批)TFF进行缓冲液交换并且接着馈送至连续过程中，其中SPTFF是用于下游过程。逆流透滤可替代SPTFF或与SPTFF组合用于所述方法中。

[0285] 无论用于使缓冲液中的抗体进行缀合的过程是分批或以连续方式执行的，在缀合反应下游的ADC浓缩和纯化过程可使用SPTFF并且以连续方式执行，或可使用常规TFF并且以分批方式执行。同样，无论用于使缓冲液中的抗体进行缀合的过程是在分批或连续过程中执行的，并且无论ADC是使用分批或连续过程进行浓缩和纯化，ADC可使用SPTFF以连续方式或使用常规TFF以分批方式配制。逆流透滤可替代SPTFF或与SPTFF组合用于所述方法中。

[0286] 在一些实施方案中，ADC过程中的至少两个步骤是使用SPTFF执行的。例如，在一些实施方案中，使用SPTFF将抗体或其抗原结合片段转移至缀合缓冲液中并且在ADC形成之后，使用SPTFF浓缩并且纯化ADC，而使用SPTFF或TFF将ADC交换至配制缓冲液中。在一些实施方案中，使用SPTFF将抗体或其抗原结合片段转移至缀合缓冲液中并且使用SPTFF将纯化的ADC交换至配制缓冲液中，而在ADC形成之后，使用SPTFF或TFF浓缩并且纯化ADC。在一些实施方案中，使用SPTFF浓缩并且纯化ADC并且使用SPTFF将浓缩和纯化的ADC交换至配制缓冲液中，其中使用SPTFF或TFF将抗体或其抗原结合片段转移至缀合缓冲液中。

[0287] SPTFF可使用超滤膜，例如在浓缩ADC的方法中。SPTFF可使用透滤膜，例如在纯化ADC的方法中和/或在将ADC转移至缓冲液(例如配制缓冲液)中的方法中。

[0288] 在一些实施方案中，ADC过程中的至少两个步骤是使用SPTFF和/或逆流透滤执行的。例如，在一些实施方案中，使用SPTFF和/或逆流透滤将抗体或其抗原结合片段转移至缀合缓冲液中并且在ADC形成之后，使用SPTFF和/或逆流透滤浓缩并且纯化ADC，而使用SPTFF、逆流透滤和/或TFF将ADC交换至配制缓冲液中。在一些实施方案中，使用SPTFF和/或逆流透滤将抗体或其抗原结合片段转移至缀合缓冲液中并且使用SPTFF和/或逆流透滤将纯化的ADC交换至配制缓冲液中，而在ADC形成之后，使用SPTFF、逆流透滤和/或TFF浓缩并且纯化ADC。在一些实施方案中，使用SPTFF和/或逆流透滤浓缩并且纯化ADC并且使用SPTFF和/或逆流透滤将浓缩和纯化的ADC交换至配制缓冲液中，其中使用SPTFF、逆流透滤和/或TFF将抗体或其抗原结合片段转移至缀合缓冲液中。

[0289] 柱色谱也可以流通模式用于本文所提供的连续ADC加工方法中(例如，与SPTFF和/

或逆流透滤组合)。例如,缀合反应(例如连续缀合反应)可馈送至流通柱色谱中以从所述缀合反应去除未缀合的药物。经由流通柱色谱纯化的ADC可接着馈送至SPTFF过程中以缓冲液交换至配制缓冲液中。经由流通柱色谱纯化的ADC也可馈送至逆流透滤过程中以缓冲液交换至配制缓冲液中。

[0290] 在一些情况下,本文所提供的连续方法的反应参数可快速地发生改变或"脉冲化"。例如,在本文所述的连续方法中,温度可快速地变化,例如通过使用水浴、封装的反应器、加热器、热电源和/或使反应流经的线圈和/或管的剖面绝缘。另外,在连续流动缀合中,pH可快速地变化,例如通过添加酸或碱。因此,在某些情况下,使用脉冲化参数来执行连续反应。脉冲化参数的使用可例如缩短反应时间(即,增加反应速度)而不损害产物质量,通过快速地降低温度暂时地淬灭或停止反应,在引入另一扰乱(例如,添加另一化学试剂)之前稳定化溶液中的缀合物,而较长时间暴露于同一参数可急剧地降低产物质量或产物稳定性。

[0291] 在某些情况下,使所述连续反应暴露于变化的温度(例如,增加或降低)持续规定的时间增量,持续规定次数。例如,在一种情况下,温度增加至少2℃、至少3℃、至少4℃或至少5℃。因此,温度可增加或降低至少5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃或35℃。例如,温度可增加或降低5℃、10℃、15℃、20℃、25℃、30℃或35℃。温度也可增加或降低5℃-10℃、10℃-15℃、15℃-20℃、20℃-25℃、25℃-30℃或30℃-35℃。因此,例如,温度可增加(例如,从约20℃)至25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃或55℃的升高温度。温度也可增加(例如,从约25℃)至30℃、35℃、40℃、45℃、50℃或55℃的升高温度。在某些情况下,温度不超过55℃。在某些情况下,温度增加(例如,从20℃)至介于35℃-55℃范围内的升高温度或至介于40℃-50℃范围内的升高温度。在某些情况下,温度增加(例如,从20℃)至60℃、70℃、80℃、90℃或100℃的升高温度(例如持续短时间增量,诸如10秒)。在某些情况下,温度增加(例如,从20℃)至介于60℃-70℃范围内、介于70℃-80℃范围内、介于80℃-90℃范围内或介于90℃-100℃范围内的升高温度(例如持续短时间增量,诸如10秒)。在某些情况下,增加或降低温度至升高温度或降低温度所用的时间是不超过2分钟。在某些情况下,增加或降低温度至升高温度或降低温度所用的时间是不超过1分钟。

[0292] 在某些情况下,使所述连续反应暴露于变化的pH(例如,增加或降低)持续规定的时间增量,持续规定次数。例如,在一种情况下,pH增加或降低1、2、3、4或5。在一种情况下,pH增加1-2、2-3、3-4或4-5。因此,例如,pH可增加(例如,从4)至5、6、7、8或9。PH也可增加(例如,从5)至6、7、8或9。PH也可降低(例如,从9)至8、7、6、5或4。

[0293] 在某些情况下,脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或pH)存在30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、30分钟、1小时、1.5小时或2小时。脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或)也可存在例如30秒至1分钟、1分钟至2分钟、2分钟至3分钟、3分钟至4分钟、4分钟至5分钟、6分钟至7分钟、7分钟至8分钟、8分钟至9分钟或9分钟至10分钟。脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或)也可存在例如1至10分钟、1至15分钟、1至30分钟、1分钟至1小时、1分钟至1.5小时或1分钟至2小时。脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或)也可存在例如1至5分钟或5至10分钟、10至15分钟、15分钟至30分钟、30分钟至1小时、1小时至1.5小时或1.5小时至2小时。在某些情况下,脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或pH)不超过2小时、1小时、30分钟、20分钟或15分钟。

[0294] 在某些情况下,脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或pH)发生一次。在某些情况下,脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或)重复两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在某些情况下,脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或)发生一次至五次。在某些情况下,脉冲(例如,暴露于变化的温度和/或)发生两次至二十次,或五次至十次。

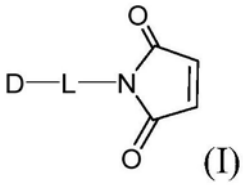
[0295] 连续方法(例如,使用SPTFF和/或逆流透滤)可与在线监测过程(论述于下文)一起或不一起使用。

[0296] 在第一实施方案中,第一、第二或第三方面或其中所述的任何实施方案中的CysCBA是半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段并且所述方法包括以下步骤:

[0297] (a)使还原剂与具有经封端剂封端的一个或多个工程改造的半胱氨酸残基的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)或其抗原结合片段反应以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

[0298] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成所述CysAb,其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0299] (c)使所述CysAb与式(I)化合物:

[0300] 

(I)

[0301] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC),其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b);并且步骤(b)中的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c),其中:

[0302] D为细胞毒性剂;并且

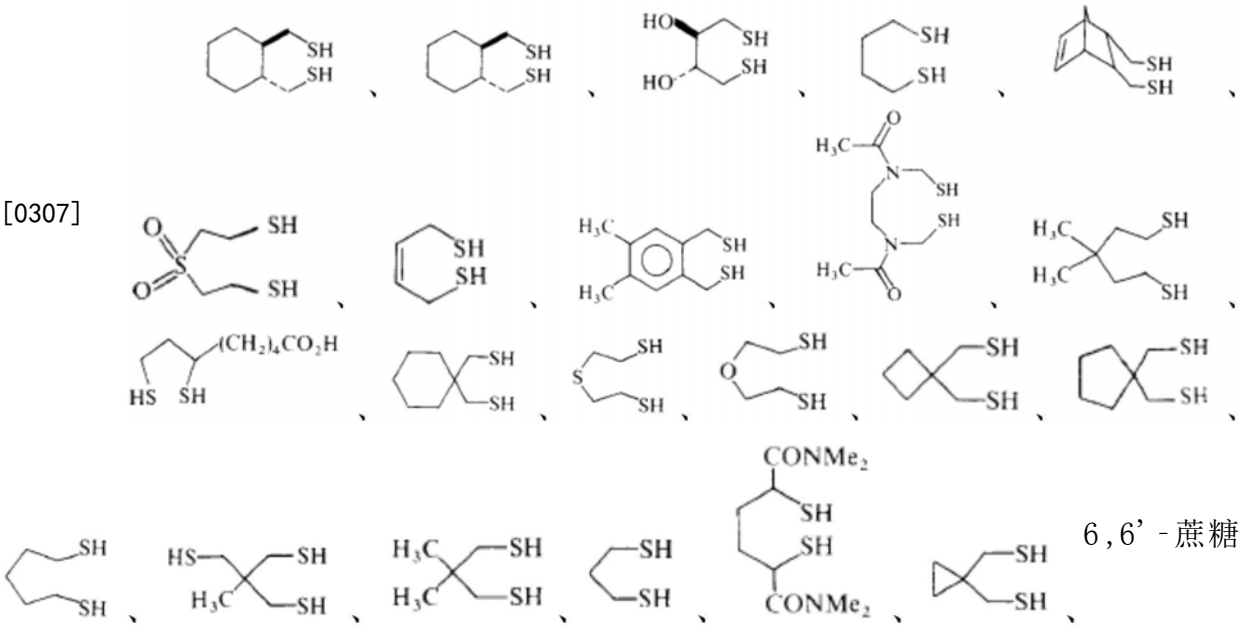
[0303] L为接头。

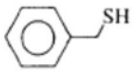
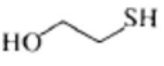
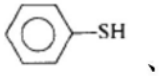
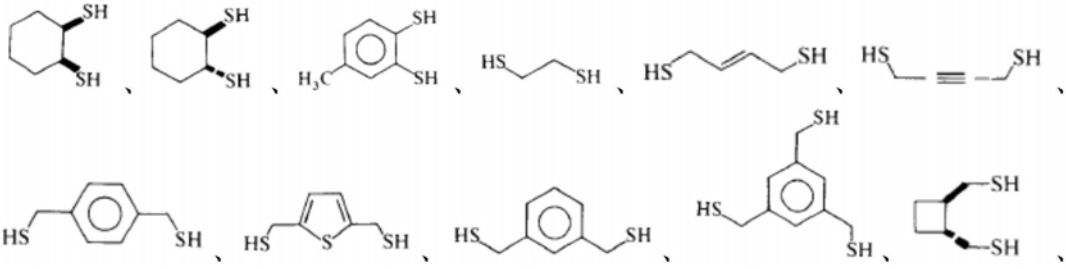
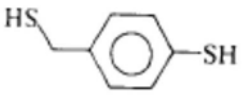
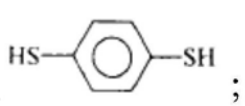
[0304] 在某些实施方案中,第一方面或第一实施方案的方法中的步骤(a)、(b)和(c)是在同一反应容器中进行。

[0305] 在某些实施方案中,关于第一实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)或其抗原结合片段中的一个或多个链间二硫键是在步骤(a)中经还原。在某些实施方案中,所述一个或多个链间二硫键是在步骤(b)中再形成。

[0306] 在某些实施方案中,关于第一、第二或第三方面或第一实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,任何合适还原剂均可用于步骤(a)的反应中。用还原剂处理cCysCBA(例如cCysAb或其抗原结合片段)可从未配对半胱氨酸残基去除封端剂以形成游离硫醇(-SH)基并且也可还原在细胞结合剂的两个半胱氨酸残基之间形成的二硫键,例如抗体或其抗原结合片段的链间和/或链内二硫键。示例性还原剂包括但不限于(i)基于膦的还原剂,诸如三(2-羧基乙基)膦盐酸盐(TCEP)、三羟基丙基膦(THPP)、三(2-氰基乙基)膦、二环己基膦基)苯磺酸、双(对磺酸根苯基)苯基膦、(二苯基膦基)苯磺酸、(二苯基膦基)苯甲酸、三氟甲磺酸2-(二苯基膦基)-N,N,N-三甲基苯甲基铵、(二苯基膦基)乙胺、2-(二异丙基膦基)乙

胺、3-(二苯基膦基)丙胺(DPPA)、3,3',3"-三苯基膦三间磺酸钠、3-(二苯基膦基)苯磺酸钠、4-(二苯基膦基)苯磺酸钠、双(对磺酸根苯基)苯基膦二水合物二钾盐、双(对磺酸根苯基)苯基膦二水合物二钾盐、丙酸3,3',3"-次膦基三-,1,1',1"-三甲酯(TmTCEP)、丙腈3,3'-(苯基亚膦基)双-苯胺(还称作N,N-双(氰基乙基)苯胺)、4-(二乙基膦基)-N,N-二甲基-三(3-甲氧基丙基)膦、2-(二苯基膦基)乙酸、(S)2-[2-(二苯基膦基)乙基]-吡啶、2-2-(二苯基膦基)-1-苯基乙胺、四氟硼酸2-(二苯基膦基)乙铵、3-(二苯基膦基)-丙酸、(乙酸,2-(二苯基膦基)-,乙酯)或4-(二苯基磷烷基)丁酸;(i)基于硫醇的还原剂,诸如二硫苏糖醇(DTT)、1,4-二硫赤藻糖醇(DTE)、1,4-丁二硫醇、L-1,4-二硫苏糖醇、(S)-2-氨基丁烷-1,4-二硫醇盐酸盐、(2S)-2-氨基丁烷-1,4-二硫醇(DTBA)、2-氨基乙烷硫醇(MEA)(或其盐酸盐),或以下任一者:

[0307] 

6,6'-蔗糖二硫化物、$HS(CH_2)_6SH$、、$CH_3(CH_2)_6SH$、、、、$HS(CH_2)_8SH$、、$HS(CH_2)_7SH$、或;(iii)固定的二硫化物还原剂,诸如固定的TCEP二硫化物还原凝胶或树脂、含有已固定有基于硫醇的还原剂的珠粒状树脂的固定的还原剂柱,或(iv)其他还原剂,诸如硒醇、胍-HCl或尿素。

[0308] 在某些实施方案中,还原剂是基于CBA(例如抗体或其抗原结合片段)的等电点(pI)加以选择。

[0309] 在某些实施方案中,第一方面、第二方面或第三方面或第一实施方案或其中所述

的任何实施方案的方法还包括测定CBA(例如抗体或其抗原结合片段)的pI和基于CBA的pI选择还原剂。CBA的pI可使用已知的任何合适方法来测定。

[0310] 在某些实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,任何合适氧化剂均可用于步骤(b)的反应中。所述氧化剂选择性地氧化并且再形成在CBA的两个半胱氨酸残基之间形成的二硫键,而不会再氧化未配对半胱氨酸残基的游离硫醇。在某些实施方案中,所述氧化剂选择性地再形成抗体或其抗原结合片段的链间和/或链内二硫键,而不会再氧化未配对半胱氨酸残基的游离硫醇。示例性氧化剂包括但不限于脱氢抗坏血酸(DHAA)、硫酸铜、氧气、空气或Cu(II)-(1,10-邻二氮杂菲)$_3$和碘溶液(参见Hamdan,F.F.等人,Biochemistry,2002,41(24),第7647-7658页,以引用的方式并入本文中)。

[0311] 在第二实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(a)中的还原剂为TCEP或DPPA。

[0312] 在第三实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一实施方案、第二实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,氧化剂为DHAA。

[0313] 在第四实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二或第三实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(a)的反应是在5.0与8.5之间的pH下进行。更具体说来,步骤(a)的反应是在6.0与7.5之间的pH下进行。

[0314] 在某些实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三或第四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(b)的反应是在5.0与8.5之间的pH下进行。更具体说来,步骤(b)的反应是在6.0与7.5之间的pH下进行。

[0315] 在某些实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三或第四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(c)的反应是在5.0与8.5之间的pH下进行。更具体说来,步骤(c)的反应是在6.0与7.5之间的pH下进行。甚至更具体说来,步骤(c)的反应是在5.5与6.5之间的pH下进行。在另一特定实施方案中,步骤(c)的反应是在pH 6.0下进行。在另一特定实施方案中,步骤(c)的反应是在pH 6.5下进行。

[0316] 在某些实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三或第四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,所述方法还包括在步骤(c)中使CysCBA与细胞毒性剂反应之前调节步骤(b)之后的反应混合物的pH。

[0317] 在某些实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三或第四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(b)之后的反应混合物的pH未在步骤(c)中使CysCBA与细胞毒性剂反应之前进行调节。

[0318] 在第五实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三或第四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(a)中的还原剂为TCEP并且步骤(a)的反应是在7.0与8.0之间、更具体说来7.3与7.7之间的pH下并且甚至更具体说来在pH 7.5下进行。

[0319] 在某些实施方案中,关于第五实施方案的方法,氧化剂为DHAA并且步骤(b)的反应是在7.0与8.0之间、更具体说来7.3与7.7之间的pH下并且甚至更具体说来在pH 7.5下进行。

[0320] 在某些实施方案中,关于第五实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤

(b)之后的反应混合物的pH是在步骤(c)中使CysCBA与细胞毒性剂反应之前从7.3与7.7之间的pH(例如pH 7.5)调节至5.8至6.2之间的pH(例如pH 6.0)。

[0321] 在第六实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三或第四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(a)中的还原剂为DPPA并且步骤(a)的反应是在6.0与7.0之间、更具体说来6.3与6.7之间的pH下、甚至更具体说来在pH 6.5下进行。

[0322] 在某些实施方案中,关于第六实施方案的方法,氧化剂为DHAA并且步骤(b)的反应是在6.0与7.0之间、更具体说来6.3与6.7之间的pH下、甚至更具体说来在pH 6.5下进行。

[0323] 在某些实施方案中,关于第六实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(b)之后的反应混合物的pH未在步骤(c)中使CysCBA与细胞毒性剂反应之前进行调节并且步骤(c)的反应是在6.0与7.0之间、更具体说来6.3与6.7之间的pH下、甚至更具体说来在pH 6.5下进行。

[0324] 在第七实施方案中,关于第一或第二方面或第一、第二、第三、第四、第五或第六实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,所述缀合物是通过切向流过滤(TFF)、吸附色谱、非吸附色谱、吸附过滤、选择性沉淀或其组合纯化。更具体说来,所述缀合物是通过TFF纯化。

[0325] 任何合适的TFF系统均可用于纯化,包括Pellicon类型系统(Millipore,Billerica,Mass.)、Sartocon卡匣系统(Sartorius AG,Edgewood,N.Y.)、TangenX卡匣(TangenX Technology Corporation,Shrewsbury,MA)和Centrasette类型系统(Pall Corp.,East Hills,N.Y.)

[0326] 任何合适的吸附色谱树脂均可用于纯化,其中所述树脂可保持细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物并且允许杂质的洗脱,或保持杂质并且允许细胞结合剂-细胞毒性剂缀合物的洗脱。优选的吸附色谱树脂包括羟磷灰石色谱、疏水性电荷诱导色谱(HCIC)、疏水性相互作用色谱(HIC)、离子交换色谱、混合模式离子交换色谱、固定金属亲和力色谱(IMAC)、染料配体色谱、亲和力色谱、逆相色谱和其组合。合适的羟磷灰石树脂的实例包括陶瓷羟磷灰石(CHT I型和II型,Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)、HA Ultrogel羟磷灰石(Pall Corp.,East Hills,N.Y.)和陶瓷氟磷灰石(CFT I型和II型,Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的HCIC树脂的实例为MEP Hypercel树脂(Pall Corp.,East Hills,N.Y.)。合适的HIC树脂的实例包括Butyl-Sepharose、Hexyl-Sepaharose、Phenyl-Sepharose和Octyl Sepharose树脂(均来自GE Healthcare,Piscataway,N.J.),以及Macro-prep Methyl和Macro-Prep t-Butyl树脂(Biorad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的离子交换树脂的实例包括SP-Sepharose、CM-Sepharose和Q-Sepharose树脂(均来自GE Healthcare,Piscataway,N.J.)和Unosphere S树脂(Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的混合模式离子交换剂的实例包括Bakerbond ABx树脂(JT Baker,Phillipsburg N.J.)合适的IMAC树脂的实例包括Chelating Sepharose树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)和Profinity IMAC树脂(Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的染料配体树脂的实例包括Blue Sepharose树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)和Affi-gel Blue树脂(Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的亲和力树脂的实例包括蛋白A琼脂糖树脂(例如MabSelect,GE

Healthcare,Piscataway,N.J.),其中细胞结合剂为抗体;和凝集素亲和力树脂,例如小扁豆凝集素琼脂糖树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.),其中细胞结合剂携带适当凝集素结合位点。或者,可使用对细胞结合剂具特异性的抗体。此类抗体可固定至例如Sepharose 4Fast Flow树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)。合适的逆相树脂的实例包括C4、C8和C18树脂(Grace Vydac,Hesperia,Calif.)。

[0327] 任何合适的非吸附色谱树脂均可用于纯化。合适的非吸附色谱树脂的实例包括但不限于SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™树脂(例如S-200和S-300)、SUPERDEX™树脂(例如SUPERDEX™ 75和SUPERDEX™ 200)、BIO-GEL®树脂(例如P-6、P-10、P-30、P-60和P-100),和本领域普通技术人员已知的其他树脂。

[0328] 在一些实施方案中,所述缀合物是通过单程切向流过滤(SPTFF)纯化。在一些实施方案中,所述缀合物是通过逆流透滤纯化。

[0329] 在一些实施方案中,使用SPTFF来去除未缀合的药物和/或将ADC交换至稳定缓冲液中。在一些实施方案中,使用流通柱色谱来去除未缀合的药物并且使用SPTFF将ADC交换至稳定缓冲液中。

[0330] 在一些实施方案中,使用逆流透滤来去除未缀合的药物和/或将ADC交换至稳定缓冲液中。在一些实施方案中,使用流通柱色谱来去除未缀合的药物并且使用逆流透滤将ADC交换至稳定缓冲液中。

[0331] 在一些实施方案中,SPTFF使用超滤膜。在一些实施方案中,SPTFF使用透滤膜。

[0332] 在一些实施方案中,所述方法改进ADC产生的一致性。在一些实施方案中,所述方法降低用于ADC产生的时间。

[0333] 在一些实施方案中,SPTFF改进ADC产生的一致性。在一些实施方案中,SPTFF降低用于ADC浓缩、纯化或转移的时间。在一些实施方案中,SPTFF降低所用缓冲液的量。

[0334] 在一些实施方案中,逆流透滤改进ADC产生的一致性。在一些实施方案中,逆流透滤降低用于ADC浓缩、纯化或转移的时间。在一些实施方案中,逆流透滤降低所用缓冲液的量。

[0335] 在某些实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,所述方法还包括在纯化所述缀合物之前调节步骤(c)之后的反应混合物的pH。在一些实施方案中,步骤(c)之后的反应混合物的pH被调节至4.0与6.0之间、4.0与5.5之间、4.0与5.0之间、4.5与5.0之间或4.6与4.8之间的pH。在一特定实施方案中,所述pH被调节至4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0。在另一特定实施方案中,所述pH被调节至4.7。

[0336] 在第八实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,相对于cCysCBA过量的还原剂用于步骤(a)中。更具体说来,还原剂与cCysCBA(例如抗体或其抗原结合片段)的摩尔比率是在1:1与50:1之间、2:1与30:1之间、5:1与25:1之间或10:1与25:1之间。甚至更具体说来,所述摩尔比率是在15:1与20:1之间。

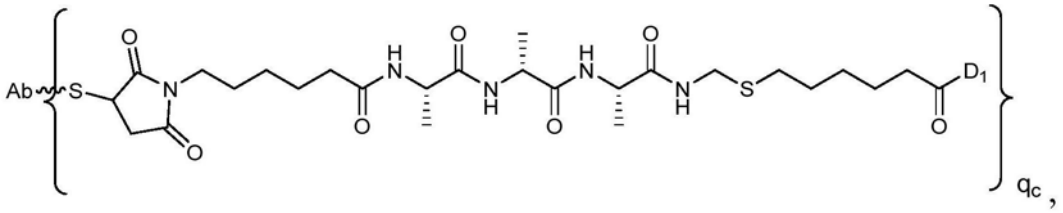
[0337] 在第九实施方案中,关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七或第八实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(a)中的还原剂与步骤(b)中的氧化剂的摩尔比率是在20:1与1:20之间、10:1与1:10之间、5:1与1:5之

间、2:1与1:2之间、1.2:1与1:1.5之间、1:1与1:20之间或1:1与1:10之间。更具体说来，还原剂与氧化剂的摩尔比率是在1:1与1:1.5之间。甚至更具体说来，还原剂与氧化剂的摩尔比率为1:1。或者，还原剂与氧化剂的摩尔比率为1:1.5。

[0338] 在第十实施方案中，关于第一方面、第二方面或第三方面或第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八或第九实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，相对于CysCBA(例如抗体或其抗原结合片段)或其抗原结合片段过量的式(I)化合物用于步骤(c)中。更具体说来，对于每一当量的CysCBA，使用1.1与20之间、1.5与20之间、2与20之间、2与10之间、2与5之间、3.5与5之间、4.2与5之间、4.3与4.9之间、4.4与4.8之间或4.5与4.7之间摩尔当量的式(I)化合物。在一特定实施方案中，对于每一当量的CysCBA，使用4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0摩尔当量的式(I)化合物。在另一特定实施方案中，对于每一当量的CysCBA，使用4.6摩尔当量的式(I)化合物。

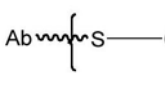
[0339] 在某些实施方案中，关于本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)，CysAb是在一个或多个位置处具有工程改造的半胱氨酸残基的抗体，所述一个或多个位置选自所述抗体的EU/OU编号位置40、43、84、88、103、112、113、114、115、118、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、161、168、172、179、187、209、234、235、236、237、238、239、244、245、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、260、262、265、267、270、272、274、279、280、282、283、284、285、286、288、289、293、295、297、298、303、305、307、308、309、311、312、313、314、315、316、317、318、325、326、327、328、329、330、332、334、338、339、340、341、343、345、360、361、362、371、373、375、376、377、378、380、382、384、385、386、387、389、390、391、413、422、423、424、427、428、430、431、433、434、435、436、437、438、440、442、443和446。在其他实施方案中，CysAb是在一个或多个位置处具有工程改造的半胱氨酸残基的抗体，所述一个或多个位置选自Kabat编号位置15、43、106、108、110、112、113、119、120、121、142、144、149、153、156、158、168、173、175、205和207。在某些实施方案中，CysAb是在描述于WO 2016/040856和美国专利号7,521,541中的一个或多个位置处具有工程改造的半胱氨酸残基的抗体，所述文献各自以引用的方式并入本文中。更具体说来，CysAb是如下抗体，其在所述抗体的重链的EU/OU编号位置442处具有工程改造的半胱氨酸残基。甚至更具体说来，CysAb是在两条重链的EU/OU编号位置442处均具有工程改造的半胱氨酸残基的抗体。

[0340] 在第十一实施方案中，本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：

[0341] 

[0342] 所述方法包括以下步骤：

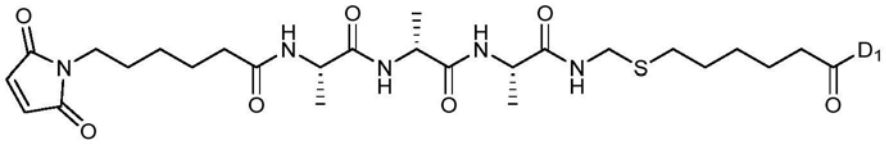
[0343] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

[0344] 

[0345] 以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

[0346] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化；和

[0347] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：

[0348] 

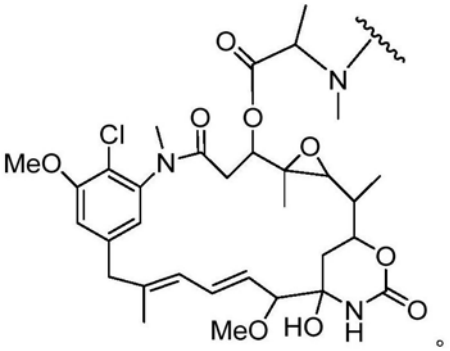
[0349] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，其中：

[0350] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段；并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23；

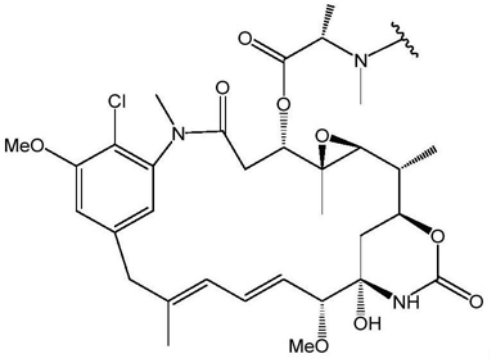
[0351] q_c为1或2；

[0352] Cap为封端剂；并且

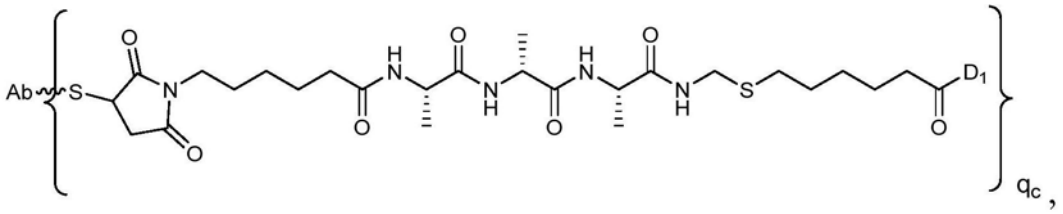
[0353] D_1是由下式表示：

[0354] 

[0355] 优选地，D_1是由下式表示：

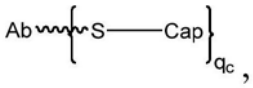
[0356] 

[0357] 在第十二实施方案中，本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：

[0358] 

[0359] 所述方法包括以下步骤：

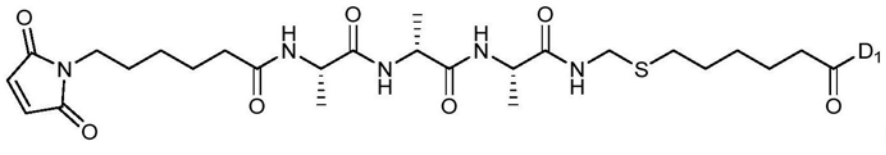
[0360] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

[0361] 

[0362] 以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

[0363] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化；和

[0364] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：

[0365] 

(I11)

[0366] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，

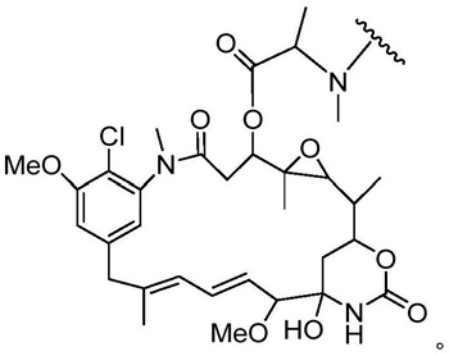
[0367] 其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，并且步骤(a)至(c)是连续地执行，并且其中：

[0368] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段；并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段，所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23；

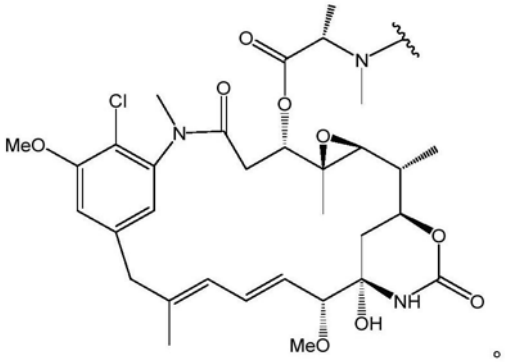
[0369] q_c为1或2；

[0370] Cap为封端剂；并且

[0371] D_1是由下式表示：

[0372] 

[0373] 优选地，D_1是由下式表示：

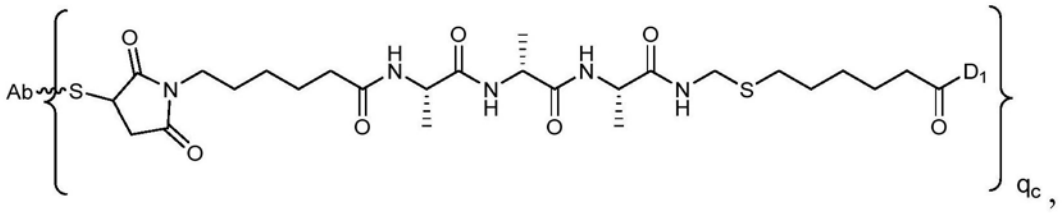
[0374] 

[0375] 在第十三实施方案中,如本文所述的第十一或第十二实施方案的方法还包括以下步骤:(d)去除未缀合的式(I11)化合物;和任选地(e)将ADC交换至稳定缓冲液中。

[0376] 在一些实施方案中,使用SPTFF来去除未缀合的药物和/或将ADC交换至稳定缓冲液中。在一些实施方案中,使用逆流透滤来去除未缀合的药物和/或将ADC交换至稳定缓冲液中。

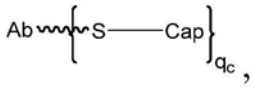
[0377] 在某些实施方案中,步骤(d)和(e)是连续地执行。

[0378] 在第十四实施方案中,本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示:

[0379] 

[0380] 所述方法包括以下步骤:

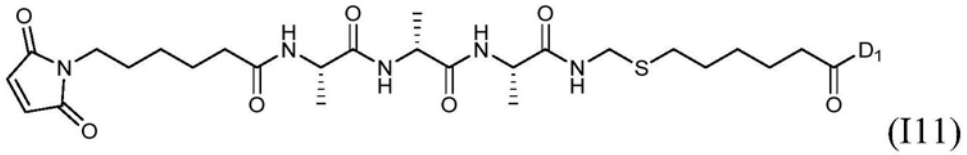
[0381] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应:

[0382] 

[0383] 以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂(Cap)以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

[0384] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb,其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0385] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:

[0386] 

[0387] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述ADC;和

[0388] (d)通过逆流透滤去除未缀合的式(I11)化合物;

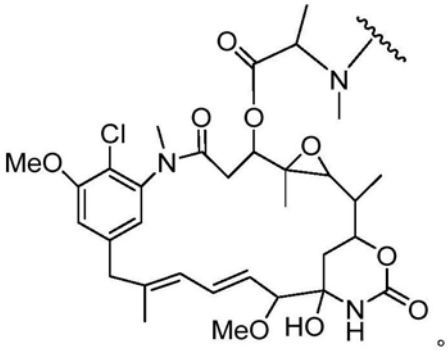
[0389] 其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b),并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c),并且步骤(a)至(d)是连续地执行,并且其中:

[0390] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体(CysAb)或其抗原结合片段;并且其中所述CysAb或其抗原结合片段是包含CDR_H1域、CDR_H2域和CDR_H3域以及CDR_L1域、CDR_L2域和CDR_L3域的人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段,所述域分别具有序列SEQ ID NO:24、25和26以及SEQ ID NO:21、22、23;

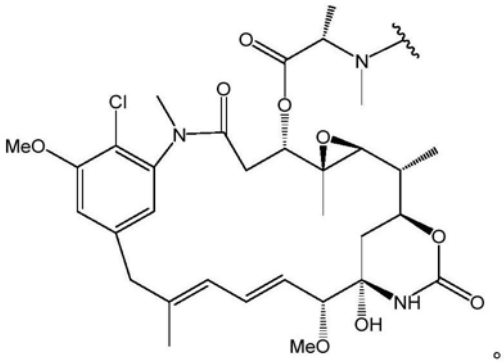
[0391] q_c为1或2;

[0392] Cap为封端剂;并且

[0393] D_I是由下式表示:

[0394] 

[0395] 优选地,D_I是由下式表示:

[0396] 

[0397] 在某些实施方案中,关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,所述人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段包含分别具有序列SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。

[0398] 在某些实施方案中,关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,所述人源化抗ADAM9抗体包含分别具有序列SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的重链和轻链。

[0399] 在某些实施方案中,关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,还原剂为DPPA。在某些实施方案中,在步骤(a)中,对于每一当量的cCysAb,使用10与20之间摩尔当量的DPPA。更具体说来,在步骤(a)中,对于每一当量的cCysAb,使用15与17之间摩尔当量的DPPA。甚至更具体说来,在步骤(a)中,对于每一当量的cCysAb,使用16摩尔当量的DPPA。

[0400] 在某些实施方案中,关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法,步骤(a)中的反应是在6.0与7.0之间的pH下或在6.3与6.7之间的pH下进行。更具体说来,步骤(a)中的反应是在pH 6.5下进行。

[0401] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，氧化剂为DHAA。在某些实施方案中，在步骤(b)中，对于每一当量的cCysAb，使用20与30之间摩尔当量的DHAA。更具体说来，在步骤(b)中，对于每一当量的cCysAb，使用23与25之间摩尔当量的DHAA。甚至更具体说来，在步骤(b)中，对于每一当量的cCysAb，使用23与25之间摩尔当量的DHAA。甚至更具体说来，在步骤(b)中，对于每一当量的cCysAb，使用24摩尔当量的DHAA。

[0402] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，步骤(b)中的反应是在6.0与7.0之间的pH下或在6.3与6.7之间的pH下进行。更具体说来，步骤(b)中的反应是在pH 6.5下进行。

[0403] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，步骤(c)中的反应是在6.0与7.0之间的pH下或在6.3与6.7之间的pH下进行。更具体说来，步骤(c)中的反应是在pH 6.5下进行。

[0404] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，相对于CysAb(例如抗体或其抗原结合片段)或其抗原结合片段过量的式(I11)化合物用于步骤(c)中。更具体说来，对于每一当量的CysAb，使用1.1与20之间、1.5与20之间、2与20之间、2与10之间、2与5之间、3.5与5之间、4.2与5之间、4.3与4.9之间、4.4与4.8之间或4.5与4.7之间摩尔当量的式(I11)化合物。在一特定实施方案中，对于每一当量的CysAb，使用4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0摩尔当量的式(I11)化合物。在另一特定实施方案中，对于每一当量的CysAb，使用4.6摩尔当量的式(I11)化合物。

[0405] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，在步骤(a)中，对于每一当量的cCysAb，使用15与17之间摩尔当量的DPPA；步骤(a)中的反应是在6.3与6.7之间的pH下进行；在步骤(b)中，对于每一当量的cCysAb，使用23与25之间摩尔当量的DHAA；步骤(b)中的反应是在6.3与6.7之间的pH下进行；并且步骤(c)中的反应是在6.3与6.7之间的pH下进行。

[0406] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，在步骤(a)中，对于每一当量的cCysAb，使用16摩尔当量的DPPA；步骤(a)中的反应是在pH 6.5下进行；在步骤(b)中，对于每一当量的cCysAb，使用24摩尔当量的DHAA；步骤(b)中的反应是在pH 6.5下进行；并且步骤(c)中的反应是在pH 6.5下进行。

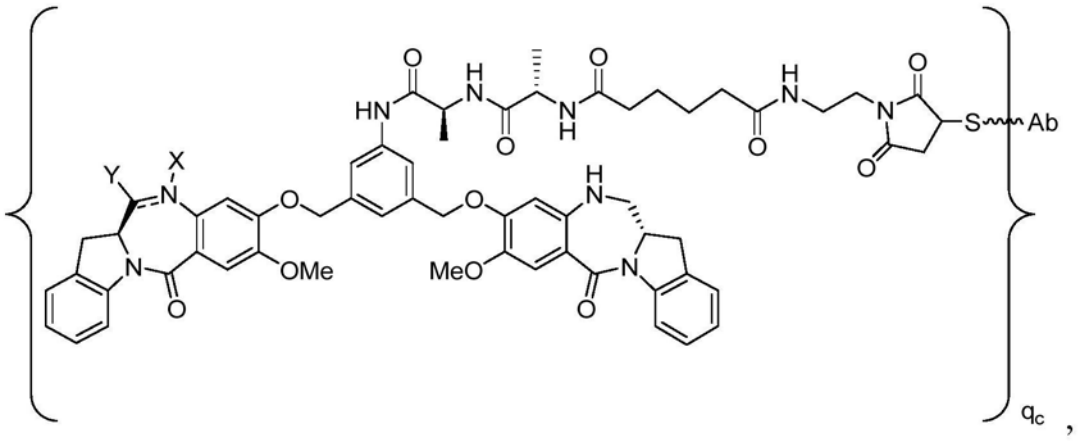
[0407] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，所述方法还包括在纯化所述缀合物之前(例如，在步骤(d)之前)调节步骤(c)之后的反应混合物的pH。在一些实施方案中，步骤(c)之后的反应混合物的pH被调节至4.0与6.0之间、4.0与5.5之间、4.0与5.0之间、4.5与5.0之间或4.6与4.8之间的pH。在一特定实施方案中，所述pH被调节至4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0。在另一特定实施方案中，所述pH被调节至4.7。

[0408] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，所述封端剂为半胱氨酸、谷胱甘肽或其组合。

[0409] 在某些实施方案中，关于第十一、第十二、第十三或第十四实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，q_c为2。

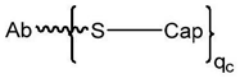
[0410] 在某些实施方案中，包含通过第十一实施方案或其中所述的任何实施方案的方法制备的免疫缀合物的组合物(例如药物组合物)具有介于1.0-2.5、1.5-2.5、1.8-2.2或1.9-2.1范围内的DAR值。在一些实施方案中，DAR为1.8、1.9、2.0或2.1。

[0411] 在第十五实施方案中，本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：

[0412] 

[0413] 所述方法包括以下步骤：

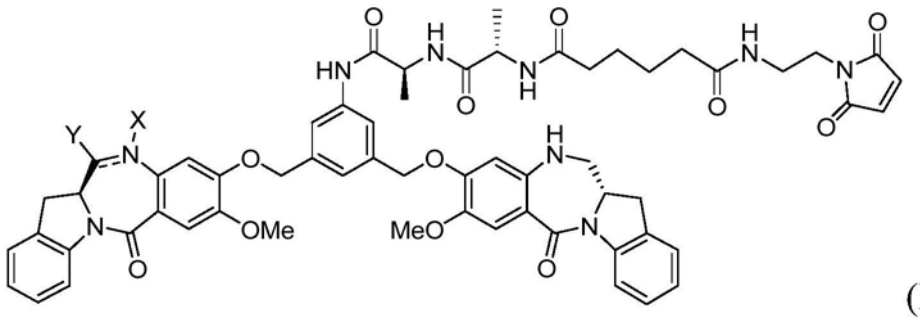
[0414] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

[0415] 

[0416] 以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

[0417] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化；和

[0418] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物：

[0419] 

(I1a)，

[0420] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成所述ADC，其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b)，并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c)，其中：

[0421] N与C之间的双线═表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H，并且当其为单键时，X为-H，并且Y为-SO_3M，并且M为H+或阳离子；

[0422] Ab～S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段；其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段，其包含：

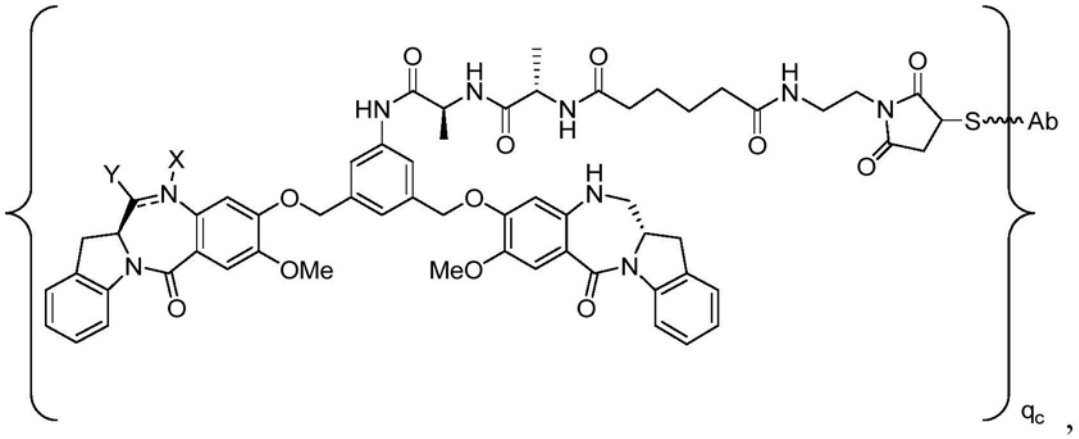
[0423] a)免疫球蛋白重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3;和

[0424] b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3;

[0425] q_c为1或2;并且

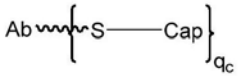
[0426] Cap为封端剂。

[0427] 在第十六实施方案中,本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法,所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示:

[0428] 

[0429] 所述方法包括以下步骤:

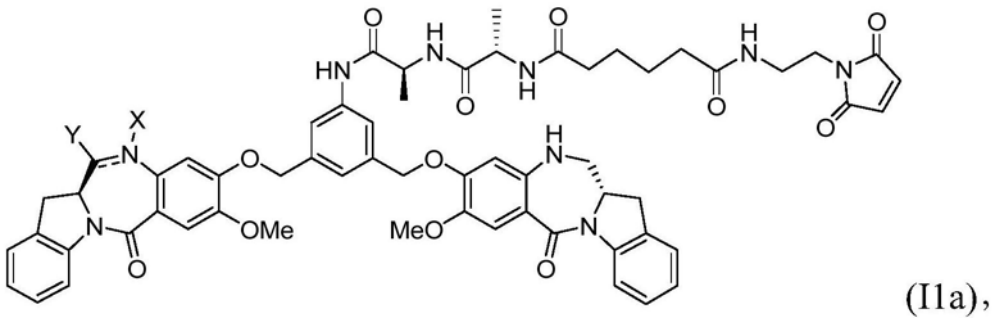
[0430] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应:

[0431] 

[0432] 以形成还原抗体或其抗原结合片段,其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基;

[0433] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb,其中工程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0434] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:

[0435] 

[0436] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述ADC,

[0437] 其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b),并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c),并且步骤(a)至(c)是连续地执行,其

中：

[0438] N与C之间的双线==表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H，并且当其为单键时，X为-H，并且Y为-SO_3M，并且M为H^+或阳离子；

[0439] Ab~S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段；其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段，其包含：

[0440] a)免疫球蛋白重链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3；和

[0441] b)免疫球蛋白轻链可变区，其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3；

[0442] q_c为1或2；并且

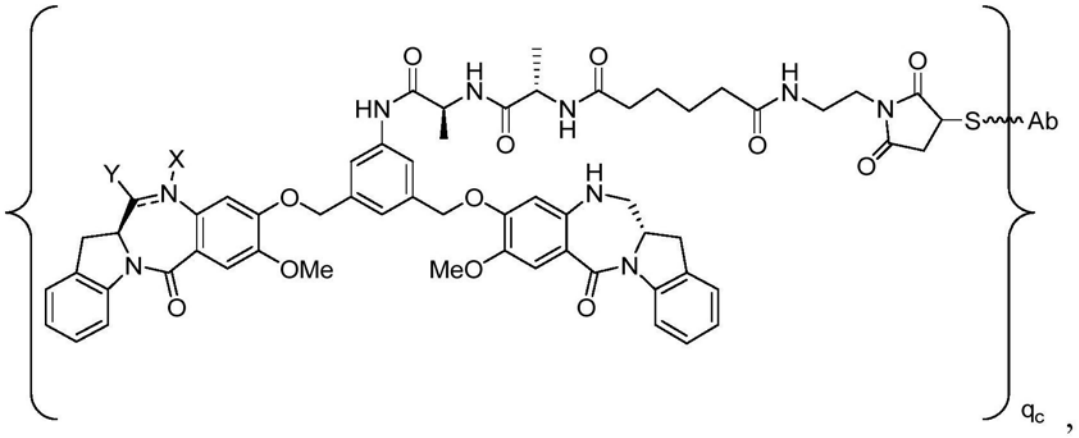
[0443] Cap为封端剂。

[0444] 在第十七实施方案中，如本文所述的第十五或第十六实施方案的方法还包括以下步骤：(d)去除未缀合的式(I1a)化合物；和任选地(e)将ADC交换至稳定缓冲液中。

[0445] 在一些实施方案中，使用SPTFF来去除未缀合的药物和/或将ADC交换至稳定缓冲液中。在一些实施方案中。在一些实施方案中，使用逆流透滤来去除未缀合的式(I1a)化合物；和/或将ADC交换至稳定缓冲液中。

[0446] 在某些实施方案中，步骤(d)和(e)是连续地执行。

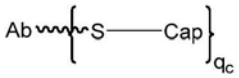
[0447] 在第十八实施方案中，本发明提供一种制备抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)的连续方法，所述抗体-细胞毒性剂缀合物(ADC)由下式表示：

[0448] 

，

[0449] 所述方法包括以下步骤：

[0450] (a)使还原剂与由下式表示的经封端的半胱氨酸工程改造的抗体(cCysAb)反应：

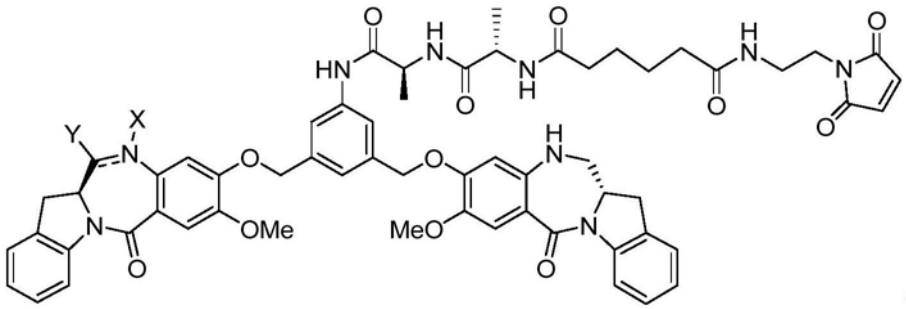
[0451] 

[0452] 以形成还原抗体或其抗原结合片段，其中去除所述封端剂以在所述还原抗体或其抗原结合片段中形成游离硫醇(-SH)基；

[0453] (b)使所述还原抗体或其抗原结合片段与选择性氧化剂反应以形成CysAb，其中工

程改造的半胱氨酸残基中的游离硫醇基未被氧化;和

[0454] (c)使所述CysAb与由下式表示的化合物:

[0455] 

(I1a),

[0456] 或其药学上可接受的盐反应,由此形成所述ADC;和

[0457] (d)通过逆流透滤去除未缀合的式(I1a)化合物;

[0458] 其中步骤(a)中的还原抗体或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(b),并且步骤(b)的CysAb或其抗原结合片段未纯化即用于步骤(c),并且步骤(a)至(d)是连续地执行,其中:

[0459] N与C之间的双线═表示单键或双键,其限制条件在于当其为双键时,X不存在并且Y为-H,并且当其为单键时,X为-H,并且Y为-SO_3M,并且M为H^+或阳离子;

[0460] Ab~S—是经由位于工程改造的半胱氨酸残基上的硫醇基共价连接至所述细胞毒性剂的半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段;其中所述半胱氨酸工程改造的抗体是抗CD123抗体或抗原结合片段,其包含:

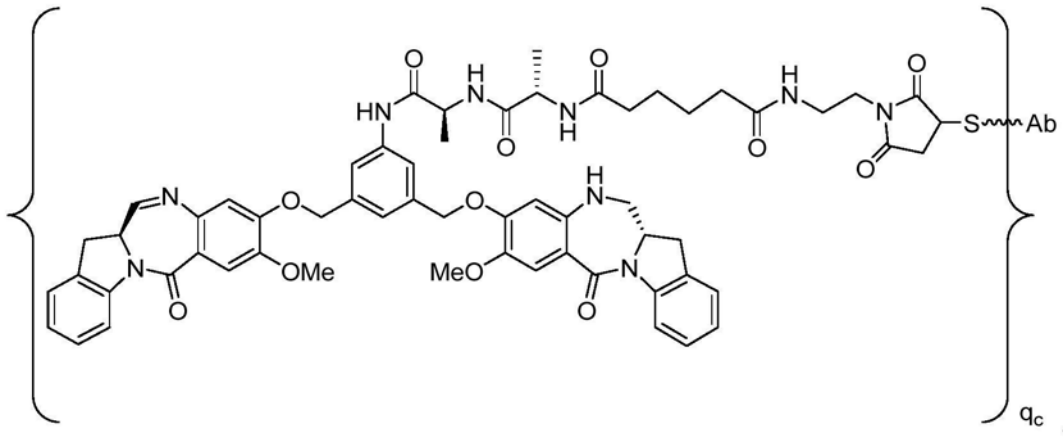
[0461] a)免疫球蛋白重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:4陈述的氨基酸序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:5陈述的氨基酸序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:6陈述的氨基酸序列的CDR_H3;和

[0462] b)免疫球蛋白轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:1陈述的氨基酸序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:2陈述的氨基酸序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:3陈述的氨基酸序列的CDR_L3;

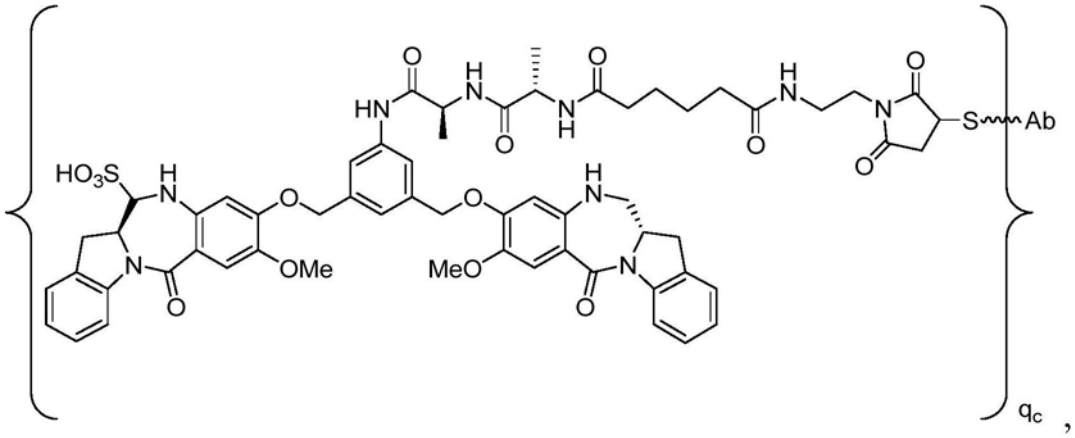
[0463] q_c为1或2;并且

[0464] Cap为封端剂。

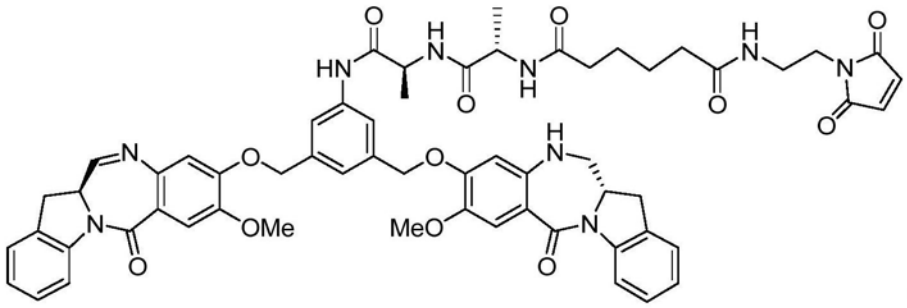
[0465] 在某些实施方案中,通过第十五、第十六、第十七和第十八实施方案制备的缀合物是由下式或其药学上可接受的盐表示:

[0466] 

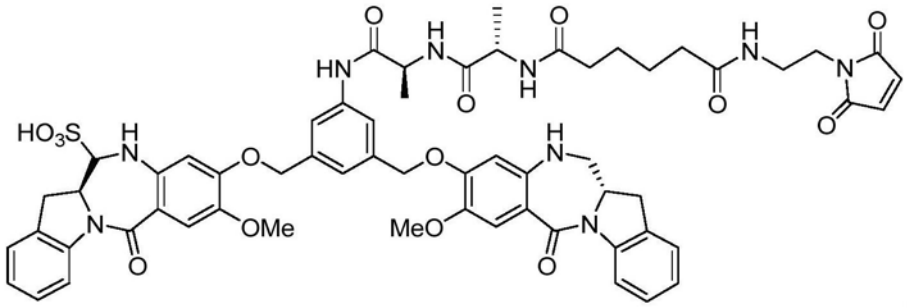
或

[0467] 

[0468] 并且所述化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示：



或

[0469] 

。

[0470] 在某些实施方案中，所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。在某些实施方案中，所述药学上可接受的盐为钠盐。

[0471] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，抗CD123抗体或其抗原结合片段包含V_H序列SEQ ID NO:7和V_L序列SEQ ID NO:9。

[0472] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，所述抗CD123抗体包含：

[0473] a)具有以SEQ ID NO:8陈述的氨基酸序列的重链；和

[0474] b)具有以SEQ ID NO:10陈述的氨基酸序列的轻链。

[0475] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，还原剂为DPPA或TCEP。在某些实施方案中，还原剂为TCEP。

[0476] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，步骤(a)中的反应是在5.0与8.5之间、7.0与8.0之间或7.3与7.7之间的pH下进行。更具体说来，步骤(a)的反应是在pH 7.5下进行。

[0477] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，氧化

剂为DHAA。

[0478] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，步骤(b)中的反应是在5.0与8.5之间、7.0与8.0之间或7.3与7.7之间的pH下进行。更具体说来，步骤(b)的反应是在pH 7.5下进行。

[0479] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，步骤(c)的反应是在5.0与8.5之间、5.5与6.5之间或5.8与6.2之间的pH下进行。更具体说来，步骤(c)的反应是在pH 6.0下进行。

[0480] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案或其中所述的任何实施方案的方法，相对于CysAb(例如抗体或其抗原结合片段)或其抗原结合片段过量的式(I1a)化合物用于步骤(c)中。更具体说来，对于每一当量的CysAb，使用1.1与20之间、1.5与20之间、2与20之间、2与10之间、2与5之间、3.5与5之间、4.2与5之间、4.3与4.9之间、4.4与4.8之间或4.5与4.7之间摩尔当量的式(I1a)化合物。在一特定实施方案中，对于每一当量的CysAb，使用4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0摩尔当量的式(I1a)化合物。在另一特定实施方案中，对于每一当量的CysAb，使用4.6摩尔当量的式(I11)化合物。

[0481] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，还原剂为TCEP；步骤(a)中的反应是在7.3与7.7之间的pH下进行；氧化剂为DHAA；步骤(b)中的反应是在7.3与7.7之间的pH下进行；并且步骤(b)之后的反应混合物的pH是在步骤(c)中使CysAb与细胞毒性剂反应之前从7.3与7.7之间的pH调节至5.8至6.2之间的pH。

[0482] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，还原剂为TCEP；步骤(a)中的反应是在pH 7.5下进行；氧化剂为DHAA；步骤(b)中的反应是在pH 7.5下进行；并且步骤(b)之后的反应混合物的pH是在步骤(c)中使CysAb与细胞毒性剂反应之前从pH 7.5调节至pH 6.0。

[0483] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，所述方法还包括在纯化所述缀合物之前(例如，在步骤(d)之前)调节步骤(c)之后的反应混合物的pH。在一些实施方案中，步骤(c)之后的反应混合物的pH被调节至4.0与6.0之间、4.0与5.5之间、4.0与5.0之间、4.5与5.0之间或4.6与4.8之间的pH。在一特定实施方案中，所述pH被调节至4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或5.0。在另一特定实施方案中，所述pH被调节至4.7。

[0484] 在某些实施方案中，关于第十五、第十六、第十七或第十八实施方案的方法，所述封端试剂为半胱氨酸、谷胱甘肽或其组合。

[0485] 在某些实施方案中，包含通过第十五、第十六或第十七实施方案或其中所述的任何实施方案的方法制备的免疫缀合物的组合物(例如药物组合物)具有介于1.0-2.5、1.5-2.5、1.8-2.2或1.9-2.1范围内的DAR值。在一些实施方案中，DAR为1.8、1.9、2.0或2.1。

[0486] 通过本发明方法制备的缀合物具有大体上高纯度和稳定性。在某些实施方案中，通过本发明方法制备的缀合物具有大于90％、95％、96％、97％、98％、99％或99.5％的单体百分率。在某些实施方案中，通过本发明方法制备的缀合物具有小于约10％、小于约5％(例如，小于或等于约4％、3％、2％、1％或0％)的高分子量物质。如本文所用，术语“高分子量物质”或“HMW”是指具有高分子量的含抗体或含缀合物物质。高分子量物质可以是通过所述抗体或缀合物或其组合的聚集形成的二聚体、三聚体、其他较高级寡聚物。高分子量物质可通

过SEC-HPLC鉴定并且测定其量。

[0487] 在某些实施方案中,所述缀合物的组合物中的细胞毒性剂与CysCBA的平均摩尔比率(即,DAR)为1.0-2.5、1.5-2.5、1.7-2.3、1.8-2.2或1.9-2.1。在另一实施方案中,通过本发明方法制备的缀合物的组合物的DAR为1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4或2.5。在一个实施方案中,DAR为2.0。DAR值可通过本领域中已知的任何方法来测定。在一个实施方案中,DAR值可通过UV/Vis光谱法使用在分别针对抗体和细胞毒性剂的波长下的吸光度值来测定。或者,DAR值可通过质谱法和/或HPLC来测定。

[0488] 在某些实施方案中,关于本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七或第十八实施方案或其中所述的任何实施方案的方法),步骤(a)、步骤(b)或步骤(c)的反应是在缓冲溶液中进行。任何合适的缓冲液均可用于本发明方法中。示例性缓冲液包括但不限于柠檬酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、丁二酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、MES((2-(N-吗啉基)乙烷磺酸))缓冲液、bis-tris甲烷(2-[双(2-羟基乙基)氨基]-2-(羟基甲基)丙烷-1,3-二醇)缓冲液、ADA(N-(2-乙酰胺基)亚氨基二乙酸)缓冲液、ACES(N-2-氨基乙烷磺酸)缓冲液、PIPES(哌嗪-N,N′-双(2-乙烷磺酸))、MOPSO(β-羟基-4-吗啉丙烷磺酸)缓冲液、bis-tris丙烷(1,3-双(三(羟基甲基)甲基氨基)丙烷)缓冲液、BES(N,N-双(2-羟基乙基)-2-氨基乙烷磺酸)、TES(N-[三(羟基甲基)甲基]-2-氨基乙烷磺酸)缓冲液、HEPES(4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-乙烷磺酸)缓冲液、DIPSO、(3-(N,N-双[2-羟基乙基]氨基)-2-羟基丙烷磺酸或N,N-双(2-羟基乙基)-3-氨基-2-羟基丙烷磺酸)、MOBS(4-(N-吗啉基)丁烷磺酸)缓冲液、TAPSO(3-[[1,3-二羟基-2-(羟基甲基)丙-2-基]氨基]-2-羟基丙烷-1-磺酸)缓冲液、trizma(Tris或2-氨基-2-(羟基甲基)-1,3-丙二醇)缓冲液、HEPPSO(N-(2-羟基乙基)哌嗪-N'-(2-羟基丙烷磺酸))缓冲液、POPSO(哌嗪-1,4-双-(2-羟基-丙烷-磺酸)脱水物)缓冲液、EPPS(4-(2-羟基乙基)哌嗪-1-丙烷磺酸)缓冲液、tricine(N-(2-羟基-1,1-双(羟基甲基)乙基)甘氨酸)缓冲液、gly-gly、bicine(2-(双(2-羟基乙基)氨基)乙酸)缓冲液、HEPBS(N-(2-羟基乙基)哌嗪-N′-(4-丁烷磺酸))缓冲液、TAPS(3-[[1,3-二羟基-2-(羟基甲基)丙-2-基]氨基]丙烷-1-磺酸)缓冲液、AMPD(2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇)缓冲液、TABS(N-三(羟基甲基)甲基-4-氨基丁烷磺酸)缓冲液、AMPSO(N-(1,1-二甲基-2-羟基乙基)-3-氨基-2-羟基丙烷磺酸)缓冲液或其组合。在某些实施方案中,缓冲液为磷酸盐缓冲液。

[0489] 在某些实施方案中,关于本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十、第十一、第十二、第十三、第十四、第十五、第十六、第十七或第十八实施方案或其中所述的任何实施方案的方法),步骤(a)、步骤(b)或步骤(c)的反应是在少量有机溶剂存在下进行。更具体说来,有机溶剂为二甲基乙酰胺(DMA)。有机溶剂(例如DMA)可以反应混合物的总体积计以1%-20%、1-15%、2-15%、5-15%或5-10%的量存在。

[0490] 在某些实施方案中,关于上文所述的本发明方法,使步骤(a)、步骤(b)或步骤(c)的反应继续进行至完成或实质性完成,例如持续2分钟至1周、1小时至48小时、1小时至36小时、1小时至24小时、1小时至12小时、1小时至8小时、5小时至15小时、5小时至10小时、1小时至5小时、30分钟至2小时或5分钟至30分钟的时期。在某些实施方案中,使步骤(a)的反应继续进行,持续1小时至12小时、1小时至8小时、2小时至8小时、3小时至7小时或4小时至6小时的时期。在一特定实施方案中,使步骤(a)的反应继续进行,持续5小时。在某些实施方案中,

使步骤(b)的反应继续进行,持续1小时至12小时、1小时至8小时、3小时至9小时、4小时至8小时或5小时至7小时的时期。在一特定实施方案中,使步骤(b)的反应继续进行,持续6小时。在某些实施方案中,使步骤(c)的反应继续进行,持续1小时至24小时、5小时至15小时、6小时至14小时、7小时至13小时、8小时至12小时或9小时至11小时的时期。在一特定实施方案中,使步骤(c)的反应继续进行,持续10小时。

[0491] 在某些实施方案中,关于上文所述的本发明方法,步骤(a)、步骤(b)或步骤(c)的反应可在任何合适温度下进行。在某些实施方案中,所述反应可在10℃至50℃、10℃至40℃或10℃至30℃的温度下进行。在某些实施方案中,所述反应可在15℃至30℃、20℃至30℃、15℃至25℃、16℃至24℃、17℃至23℃、18℃至22℃或19℃至21℃的温度下进行。在某些实施方案中,所述反应可在15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃或25℃下进行。

[0492] 在某些实施方案中,关于上文所述的本发明方法中的步骤(a)、步骤(b)或步骤(c)的反应,细胞结合剂(例如抗体)的浓度可介于1mg/mL至50mg/mL、1mg/mL至20mg/mL、1mg/mL至15mg/mL、1mg/mL至10mg/mL、1mg/mL至6mg/mL或2mg/mL至5mg/mL范围内。在某些实施方案中,细胞结合剂(例如抗体)的浓度系介于3mg/mL至5mg/mL范围内。

[0493] 在某些实施方案中,关于本文所述的方法,稳定缓冲液是用于ADC的配制缓冲液。

[0494] 3.在线过程自动化技术(在线PAT)

[0495] 本文提供用于本文所述的连续方法(例如,用于形成并且加工第一、第二或第三方面或其中所述的任何实施方案中所述的抗体药物缀合物(ADC)的方法)的在线过程自动化技术。所述技术提供直接测量,其可消除脱机分析并且降低由操作者处置材料。可使用在线监测来监测ADC(蛋白质)浓度以及游离药物的去除。这可允许基于从在线读数获得的数据,而非基于用于所述过程(例如,纯化过程)中的透滤体积的具体体积或数字来靶向最终ADC浓度。PAT实施容许增加控制和可检测性(例如,在产物质量受影响之前可使用稳态操作期间的改变来检测问题)并且多个PAT模块(例如,FlowVPE、UV传感器、pH计、电导率计、压力传感器或流量计)的使用可确保个别单元操作中的稳固过程性能。

[0496] 在线监测可例如用于在例如抗体还原和/或氧化反应和/或ADC缀合反应(例如,描述于第一、第二或第三方面或其中所述的任何实施方案中的方法中所述的反应)中监测来自任何泵的进料流中的流动速率。在线监测可例如用于监测添加至抗体还原和/或氧化反应和/或ADC缀合反应(例如,描述于第一、第二或第三方面或其中所述的任何实施方案中的方法中所述的反应)中的组分的浓度。所述监测可确保对所述反应的化学计量的适当控制。在线监测可监测例如抗体或其抗原结合片段、还原剂、氧化剂、细胞毒性剂或细胞毒性剂-接头化合物(例如由式(I)表示的化合物)和/或缀合缓冲液的流动速率或浓度。在线监测可监测抗体或其抗原结合片段浓缩至缀合反应缓冲液中的流动速率。

[0497] 在线监测也可例如用于测定何时停止缀合反应,例如通过停止添加缀合缓冲液,通过停止缀合缓冲液的循环,和/或开始冲洗或去除缀合缓冲液。在本文所提供的一些实施方案中,可使用未缀合的药物(例如式(I)化合物)的在线监测。未缀合的药物的测量可用于推断在缀合反应中实现的平均药物数目/抗体(DAR)。因此,当达到靶DAR时,可停止缀合反应。

[0498] 在线监测也可用于监测ADC的浓缩和/或纯化。浓缩和/或纯化可使用过滤(例如超

滤、透滤)。所述过滤可以是切向流过滤,包括SPTFF。所述过滤可以是逆流透滤。当用于监测过滤时,在线监测可用于测量滞留物或渗透物中的分析物。因此,例如,滞留物中的未缀合的药物或未缀合的药物-接头化合物的在线监测可用于分析ADC的纯化程度。未缀合的药物或未缀合的药物-接头化合物的水平可在缀合反应之后不久在滞留物中是高的,但在纯化之后在滞留物中是低的。滞留物或渗透物中的ADC的在线监测可用于分析浓缩和/或纯化过程期间的ADC损失。

[0499] 所述纯化也可使用色谱(例如流通柱色谱)。在色谱柱末端处的在线监测可例如测量ADC水平并且可用于测定柱何时超载或何时存在ADC突破。

[0500] 在线监测也可用于测量pH,其可例如用于测定缓冲液交换的完全性。

[0501] 示例性在线监测技术包括例如傅立叶变换红外(FTIR)流动池、高效液相色谱(HPLC)或超高效液相色谱(UPLC)的使用。

[0502] 在线监测技术可使用例如FlowVPE或UV传感器。在一些实施方案中,使用FlowVPE来执行在线监测。FlowVPE使用流动池来进行连续监测。

[0503] 切向流过滤(例如单程切向流过滤(SPTFF)的功效可使用FlowVPE、UV传感器、pH计、电导率计、压力传感器、流量计等进行在线监测。逆流透滤的功效也可使用FlowVPE、UV传感器、pH计、电导率计、压力传感器、流量计等进行在线监测。

[0504] 在线监测过程可与本发明的连续方法(论述于上文),例如使用单程切向流过滤和/或逆流透滤的连续缀合过程,或与分批缀合过程(其为本领域中已知的)组合使用

[0505] 4.细胞结合剂(CysCBA)

[0506] 本发明的免疫缀合物中的细胞结合剂可以是目前已知或变成已知的任何种类,包括肽和非肽。一般说来,这些细胞结合剂可以是抗体(诸如多克隆抗体和单克隆抗体,尤其单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素(诸如叶酸盐等,其可结合于其细胞表面受体,例如叶酸盐受体)、营养物转运分子(诸如转铁蛋白)或任何其他细胞结合分子或物质。

[0507] 在某些实施方案中,细胞结合剂为抗体、单链抗体、特异性地结合于靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体、特异性地结合于靶细胞的单克隆抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)、嵌合抗体、特异性地结合于靶细胞的嵌合抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)、域抗体(例如,sdAb)或特异性地结合于靶细胞的域抗体片段。

[0508] 在某些实施方案中,细胞结合剂为人源化抗体、人源化单链抗体或人源化抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)。

[0509] 在某些实施方案中,细胞结合剂为表面重塑抗体、表面重塑单链抗体或表面重塑抗体片段(或“抗原结合部分”或“抗原结合片段”)。

[0510] 在某些实施方案中,细胞结合剂为抗体或其抗原结合部分(包括抗体衍生物),CBA可结合于靶细胞上的配体,诸如细胞表面配体,包括细胞表面受体。

[0511] 在某些实施方案中,细胞结合剂是半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,半胱氨酸工程改造的抗体或其抗原结合片段是抗叶酸盐受体抗体或其抗原结合片段、抗EGFR抗体或其抗原结合片段、抗CD33抗体或其抗原结合片段、抗CD19抗体或其抗原结合片段、抗Muc1抗体或其抗原结合片段、抗CD37抗体其抗原结合片段、抗cMet抗体或其抗原结合片段或抗EpCAM抗体或其抗原结合片段。

[0512] 在某些实施方案中，细胞结合剂是如下抗体或其抗原结合片段，其：(a)结合人CD123/IL3-Rα抗原的氨基酸101-346内的表位，和(b)抑制抗原阳性TF-1细胞中的IL3依赖性增生(参见WO2017/004026，以引用的方式整体并入本文中)。

[0513] 在某些实施方案中，细胞结合剂是如WO2017/004026(其以引用的方式并入本文中)中所述的抗CD123抗体或其抗原结合片段。

[0514] 在某些实施方案中，抗CD123抗体或其抗原结合片段可包含：a)至少一个轻链可变区或其片段，其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3，其中CDR_L1具有氨基酸序列RASQDINSYLS(SEQ ID NO:1)，CDR_L2具有氨基酸序列RVNRLVD(SEQ ID NO:2)，并且CDR_L3具有氨基酸序列LQYDAFPYT(SEQ ID NO:3)；和b)至少一个重链可变区或其片段，其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3，其中CDR_H1具有氨基酸序列SSIMH(SEQ ID NO:4)，CDR_H2具有氨基酸序列YIKPYNDGTKYNEKFKG(SEQ ID NO:5)，并且CDR_H3具有氨基酸序列EGGNDYYDTMDY(SEQ ID NO:6)。

[0515] 在某些实施方案中，抗CD123抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H)，其具有氨基酸序列

[0516] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT**SSIMH**WVRQAPGQGLEWIG**YIKPYNDGTKYNEKFKG**RATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EGGNDYYDTMDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

[0517] 和轻链可变区(V_L)，其具有氨基酸序列

[0518] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINSYLS**WFQQKPGKAPKTLIY**RVNRLVD**GVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC**LQYDAFPYT**FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:9)。

[0519] 在某些实施方案中，抗CD123抗体具有重链全长序列

[0520] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT**SSIMH**WVRQAPGQGLEWIG**YIKPYNDGTKYNEKFKG**RATLTSDRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**EGGNDYYDTMDY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG (SEQ ID NO:8)

[0521] 和轻链全长序列

[0522] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDINSYLS**WFQQKPGKAPKTLIY**RVNRLVD**GVPSRFSGSGSGNDYTLTISSLQPEDFATYYC**LQYDAFPYT**FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)

[0523] 在某些实施方案中,细胞结合剂是如美国专利号7,342,110和7,557,189(其以引用的方式并入本文中)中所述的抗CD33抗体或其抗原结合片段。

[0524] 在某些实施方案中,抗CD33抗体或其抗原结合片段可包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,其中CDR_L1具有氨基酸序列KSSQSVFFSSSQKNYLA(SEQ ID NO:11),CDR_L2具有氨基酸序列WASTRES(SEQ ID NO:12),并且CDR_L3具有氨基酸序列HQYLSSRT(SEQ ID NO:13);和b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3,其中CDR_H1具有氨基酸序列SYYIH(SEQ ID NO:14),CDR_H2具有氨基酸序列VIYPGNDDISYNQKFQG(SEQ ID NO:15),并且CDR_H3具有氨基酸序列EVRLRYFDV(SEQ ID NO:16)。

[0525] 在某些实施方案中,抗CD33抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H),其具有氨基序列

[0526] QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGNDDISYNQKFQG**KATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:17)

[0527] 和轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

[0528] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WYQQIPGQSPRLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYLSSRT**FGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:19)。

[0529] 在某些实施方案中,抗CD33抗体具有重链全长序列

[0530] QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTPGQGLEWVG**VIYPGNDDISYNQKFQG**KATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLXLSPG (SEQ ID NO:18)

[0531] 和轻链全长序列

[0532] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WYQQIPG QSPRLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYC**HQYL SSRT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:20),其中SEQ ID NO:18中的X为S或C。在一个实施方案中,X为C。

[0533] 在某些实施方案中,所述抗CD33抗体为huMy9-6抗体。

[0534] 在某些实施方案中,细胞结合剂是如WO2018/119196和美国临时申请号62/690052和62/691342(其各自以引用的方式并入本文中)中所述的抗ADAM9抗体或其抗原结合片段。

[0535] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其抗原结合片段是特异性地结合于人ADAM9和cyno ADAM9的人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段。

[0536] 在某些实施方案中,人源化抗ADAM9抗体或其ADAM9结合片段是经优化以具有对cyno ADAM9的结合亲和力的至少100倍增强并且如与嵌合或鼠科动物亲本抗体相比,保持对人ADAM9的高亲和力结合。

[0537] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其抗原结合片段(例如,人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段)包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,其中CDR_L1具有氨基酸序列KASQSVDYSGDSYMN(SEQ ID NO:21),CDR_L2具有氨基酸序列AASDLES(SEQ ID NO:22),并且CDR_L3具有氨基酸序列QQSHEDPFT(SEQ ID NO:23);和b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3,其中CDR_H1具有氨基酸序列SYWMH(SEQ ID NO:24),CDR_H2具有氨基酸序列EIIPIFGHTNYNEKFKS(SEQ ID NO:25),并且CDR_H3具有氨基酸序列GGYYYYPRQGFLDY(SEQ ID NO:26)。

[0538] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体或其抗原结合片段(例如,人源化抗ADAM9抗体或其抗原结合片段)包含重链可变区(V_H),其具有氨基序列

EVQLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E IIPIFGHTNY NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG YYYY*PRQGFL* DY**WGQGTTVT VSS (SEQ ID NO:27)

[0539] 和轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC**KASQSVDYSGDSYMN**WYQQKPGQ

[0540] PPKLLIY**AASDLES** GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFATYYC**QQSHEDPFT**FGQGTKLEI K (SEQ ID NO:28)。

[0541] 在某些实施方案中,抗ADAM9抗体具有重链全长序列

[0542] EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS **SYWMH**WVRQA PGKGLEWVG**E IIPIFGHTNY NEKFKS**RFTI SLDNSKNTLY LQMGSLRAED TAVYYCAR**GG YYYYPRQGFL DY**WGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTL**Y**I**T** R**E**PEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP

[0543] SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSL**C**LS PG (SEQ ID NO:29)

[0544] 和轻链全长序列

[0545] DIVMTQSPDSLAVSLGERATISC**KASQSVDYSGDSYMN**WYQQKPGQ PPKLLIY**AASDLES**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYC**QQSHED PFT**FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:30)。

[0546] 在某些实施方案中,细胞结合剂是如美国临时申请号62/751,530(其以引用的方式并入本文中)中所述的抗EpCAM抗体或其抗原结合片段。

[0547] 在某些实施方案中,抗EpCAM抗体或其抗原结合片段可包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,其中CDR_L1具有氨基酸序列RSSRSLLHSDGFTYLY(SEQ ID NO:31),CDR_L2具有氨基酸序列QTSNLAS(SEQ ID NO:32),并且CDR_L3具有氨基酸序列AQNLELPNT(SEQ ID NO:33);和b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3,其中CDR_H1具有氨基酸序列NYYIH(SEQ ID NO:34),CDR_H2具有氨基酸序列WIYPGNVYIQYNEKFKG(SEQ ID NO:35),并且CDR_H3具有氨基酸序列DGPWFAY(SEQ ID NO:36)。

[0548] 在某些实施方案中,抗EpCAM抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H),其具有氨基序列

[0549] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**NYYIH**WVRQAPGQRLE YIG**WIYPGNVYIQYNEKFKG**RATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYY CAR**DGPWFAY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:37)

[0550] 和轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

[0551] DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSRSLLHSDGFTYLY**WFLQKPGQS

[0552] PQLLIY**QTSNLAS**GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**AQNLEL PNT**FGQGTKLEIK (SEQ ID N:38)。

[0553] 在某些实施方案中,抗EpCAM抗体具有重链全长序列

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**NYYIH**WVRQAPGQRLE
YIG**WIYPGNVYIQYNEKFKG**RATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYY
CAR**DGPWFAY**WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLXLSPG
(SEQ ID NO:39)

[0554] 和轻链全长序列

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISC**RSSRSLLHSDGFTYLY**WFLQKPGQS
PQLLIY**QTSNLAS**GVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC**AQNLEL**
PNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:40),其中SEQ ID NO:39中的X为S或C。在一个实施方案中,X为C。

[0555]

[0556] 在某些实施方案中,所述细胞结合剂为抗叶酸盐受体抗体。在某些实施方案中,细胞结合剂是如美国专利8,709,432、美国专利号8,557,966和WO2011106528(其均以引用的方式并入本文中)中所述的抗人叶酸盐受体1(FOLR1)抗体或其抗原结合片段。

[0557] 在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段可包含:a)至少一个轻链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_L1、CDR_L2和CDR_L3,其中CDR_L1具有氨基酸序列KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:41),CDR_L2具有氨基酸序列RASNLEA(SEQ ID NO:42),并且CDR_L3具有氨基酸序列QQSREYPYT(SEQ ID NO:43);和b)至少一个重链可变区或其片段,其分别包含三个连续互补决定区(CDR)CDR_H1、CDR_H2和CDR_H3,其中CDR_H1具有氨基酸序列GYFMN(SEQ ID NO:44)或GYTFTGYFMN(SEQ ID NO:47),CDR_H2具有氨基酸序列RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:45)或RIHPYDGDTF(SEQ ID NO:48),并且CDR_H3具有氨基酸序列YDGSRAMDY(SEQ ID NO:46)。在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段包含a)轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:41陈述的氨基序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:42陈述的氨基序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:43陈述的氨基序列的CDR_L3;和b)重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:44陈述的氨基序列的CDR_H1、具有以SEQ ID NO:45陈述的氨基序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:46陈述的氨基序列的CDR_H3。在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段包含a)轻链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:41陈述的氨基序列的CDR_L1、具有以SEQ ID NO:42陈述的氨基序列的CDR_L2和具有以SEQ ID NO:43陈述的氨基序列的CDR_L3;和b)重链可变区,其包含具有以SEQ ID NO:47陈述的氨基序列的CDR_H1、具有以

SEQ ID NO:48陈述的氨基序列的CDR_H2和具有以SEQ ID NO:46陈述的氨基序列的CDR_H3。

[0558] 在某些实施方案中,抗FOLR1抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H),其具有氨基序列

[0559] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKAS**GYTFTGYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQKFQG**KATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:49)

[0560] 和轻链可变区(V_L),其具有氨基酸序列

[0561] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:50),或

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQPRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREYPYT**FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:51)。

[0562] 在某些实施方案中,抗FOLR1抗体具有重链全长序列

[0563] QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKAS**GYTFTGYFMN**WVKQSPGQSLEWIG**RIHPYDGDTFYNQKFQG**KATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTR**YDGSRAMDY**WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLXLSPGY (SEQ ID NO:52)

[0564] 和轻链全长序列

[0565] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQ PRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC**QQSREY PYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:53)，或

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISC**KASQSVSFAGTSLMH**WYHQKPGQQ PRLLIY**RASNLEA**GVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC**QQSREY PYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:54)，其中SEQ ID NO:52中的X为C或S并且SEQ ID NO:52中的Y为K或不存在。在一个实施方案中，X为C。

[0566] 在某些实施方案中，所述抗FOLR1抗体为huMov19或M9346A抗体。

[0567] 在某些实施方案中，本文所述的抗体为鼠科动物、非人哺乳动物、嵌合、人源化或人抗体。例如，所述人源化抗体可以是CDR移植抗体或表面重塑抗体。在某些实施方案中，所述抗体为全长抗体。在某些实施方案中，其抗原结合片段为Fab、Fab'、$F(ab')_2$、F_d、单链Fv或scFv、二硫化物连接的F_v、V-NAR域、IgNar、内体、$IgG\Delta CH_2$、微抗体、$F(ab')_3$、四功能抗体、三功能抗体、双功能抗体、单域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb_2、$(scFv)_2$或scFv-Fc。

[0568] 在某些实施方案中，所述细胞结合剂为替代蛋白质骨架，诸如Centyrin(基于纤维连接蛋白III型(FN3)重复序列的共有序列的蛋白质骨架；参见美国专利公布2010/0255056、2010/0216708和2011/0274623，以引用的方式并入本文中)、锚蛋白重复蛋白(例如设计的锚蛋白重复蛋白，称作DARPin；参见美国专利公布号2004/0132028、2009/0082274、2011/0118146和2011/0224100，以引用的方式并入本文中，并且还参见C.Zahnd等人，Cancer Res.(2010)70:1595-1605；Zahnd等人，J.Biol.Chem.(2006)281(46):35167-35175；和Binz,H.K.,Amstutz,P.和Pluckthun,A.,Nature Biotechnology(2005)23:1257-1268，以引用的方式并入本文中)、锚蛋白样重复蛋白或合成肽(参见例如美国专利公布号2007/0238667；美国专利号7,101,675；WO 2007/147213；和WO2007/062466，以引用的方式并入本文中)、纤连蛋白(纤维连接蛋白域骨架蛋白；参见美国专利公布号2007/0082365；2008/0139791，以引用的方式并入本文中)、Avibody(包括双功能抗体、三功能抗体和四功能抗体；参见美国公布号2008/0152586和2012/0171115)、双重受体再靶向(DART)分子(P.A.Moore等人，Blood,2011;117(17):4542-4551；Veri MC等人，Arthritis Rheum,2010年3月30日;62(7):1933-43；Johnson S等人J Mol Biol,2010年4月9日;399(3):436-49)和细胞渗透超电荷蛋白(Methods in Enzymol.502,293-319(2012)。

[0569] 在某些实施方案中，所述细胞结合剂是可活化抗体或可活化抗原结合抗体片段(统称为AA)。在一些实施方案中，所述可活化抗体或可活化抗原结合抗体片段包含特异性地结合于靶细胞(或“靶”)上的配体的抗体或抗原结合抗体片段(例如，本文所述的抗体或抗原结合抗体片段)，所述靶细胞(或“靶”)偶合至遮蔽部分(MM)，使得MM的偶合减少所述抗体或抗原结合抗体片段结合所述靶的能力。在一些实施方案中，所述MM经由包括蛋白酶的

底物的序列进行偶合，所述蛋白酶例如在患病组织中具活性的蛋白酶和/或与所述靶共定位于受试者中的治疗位点处的蛋白酶。所述可活化抗体优选地在循环中稳定，在疗法和/或诊断的预期位点处但不在正常(例如，健康)组织或治疗和/或诊断未靶向的其他组织中活化，并且当活化时，展现至少可相当于相应、未修饰抗体的与靶的结合。在一些实施方案中，所述AA是描述于WO 2009/025846、WO 2010/081173、WO 2015/048329、WO 2015/116933和WO 2016/118629中的那些，所述文献各自以引用的方式整体并入。

[0570] 在一些实施方案中，所述可活化抗体或抗体片段包含：

[0571] (a)偶合至所述抗体或抗体片段(统称为“AB”)的可裂解部分(CM)，其中所述CM是充当蛋白酶的底物的多肽；和

[0572] (b)偶合至所述抗体或抗体片段的遮蔽部分(MM)，其中当所述可活化抗体处于未裂解状态时，所述MM抑制所述抗体或抗体片段与配体的结合，

[0573] 其中处于未裂解状态的可活化抗体从N端至C端具有如下结构安排：(MM)-(CM)-(AB)或(AB)-(CM)-(MM)。

[0574] 在一些实施方案中，所述遮蔽部分(或“遮蔽”)是如下氨基酸序列，其偶合或以其他方式附接于所述抗体并且定位于可活化抗体构建体内，使得所述遮蔽部分减少所述抗体特异性地结合所述靶的能力。合适的遮蔽部分使用多种已知技术中的任一者来鉴定。例如，肽遮蔽部分使用描述于WO 2009/025846中的方法来鉴定，所述文献的内容以引用的方式整体并入本文中。

[0575] 经MM修饰的AB针对靶的K_d可比未经MM修饰的AB或亲本AB针对靶的K_d大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍，或在5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍之间。相反，经MM修饰的AB针对靶的结合亲和力可比未经MM修饰的AB或亲本AB针对靶的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍，或在5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍之间。

[0576] MM针对AB的解离常数(K_d)一般大于AB针对靶的K_d。MM针对AB的K_d可比AB针对靶的K_d大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。相反，MM针对AB的结合亲和力一般低于AB针对靶的结合亲和力。MM针对AB的结合亲和力可比AB针对靶的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000或甚至10,000,000倍。

[0577] 如与未经MM修饰的AB与靶的特异性结合或亲本AB与靶的特异性结合相比，当AB经MM修饰并且在靶存在下时，AB与其靶的特异性结合可减少或受抑制。当如WO 2010/081173所述在体内或在靶位移体外免疫吸附剂分析中测量时，当与未经MM修饰的AB与靶的结合或

亲本AB与靶的结合相比时，AB在经MM修饰时结合靶的能力可减少至少50％、60％、70％、80％、90％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％和甚至100％，持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96小时，或5、10、15、30、45、60、90、120、150、180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或更久。

[0578] MM可抑制AB与靶的结合。MM可结合AB的抗原结合域并且抑制AB与其靶的结合。MM可在空间上抑制AB与靶的结合。MM可别位抑制AB与其靶的结合。在这些实施方案中，当如WO 2010/081173所述在体内或在靶位移体外免疫吸附剂分析中测量时，如与未经MM修饰的AB、亲本AB或未偶合至MM的AB与靶的结合相比，当AB经MM修饰或偶合至MM并且在靶存在下时，AB与靶不结合或大体上不结合，或存在AB与靶的仅.001％、.01％、.1％、1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％或50％结合，持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96小时，或5、10、15、30、45、60、90、120、150、180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或更久。

[0579] 当AB偶合至MM或由MM修饰时，所述MM可‘遮蔽’或减少或抑制AB与其靶的特异性结合。当AB偶合至MM或由MM修饰时，所述偶合或修饰可实现结构改变，所述结构改变减少或抑制AB特异性地结合其靶的能力。

[0580] 偶合至MM或经MM修饰的AB可由以下各式表示(依氨基(N)端区至羧基(C)端区的顺序)：

[0581] (MM)-(AB)

[0582] (AB)-(MM)

[0583] (MM)-L-(AB)

[0584] (AB)-L-(MM)

[0585] 其中MM为遮蔽部分，Ab为抗体或靶结合抗原片段，并且L为接头。在多个实施方案中，可需要将一个或多个接头(例如柔性接头)插入至所述组合物中以便提供柔性。

[0586] 在某些实施方案中，所述MM不是Ab的天然结合搭配物。在一些实施方案中，所述MM不含或大体上不含与Ab的任何天然结合搭配物的同源性。在一些实施方案中，所述MM与Ab的任何天然结合搭配物仅5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或80％相似。在一些实施方案中，所述MM与Ab的任何天然结合搭配物仅5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或80％同一。在一些实施方案中，所述MM与Ab的任何天然结合搭配物仅25％同一。在一些实施方案中，所述MM与Ab的任何天然结合搭配物仅50％同一。在一些实施方案中，所述MM与Ab的任何天然结合搭配物仅20％同一。在一些实施方案中，所述MM与Ab的任何天然结合搭配物仅10％同一。

[0587] 本文所提供的可活化抗体也可包括可裂解部分(CM)。所述AA展现与AB的靶的可活化/可转换结合。AA一般包括抗体或抗体片段(AB)，其通过遮蔽部分(MM)和可修饰或可裂解部分(CM)修饰或偶合至遮蔽部分(MM)和可修饰或可裂解部分(CM)。在一些实施方案中，所述CM含有充当所关注的蛋白酶的底物的氨基酸序列。在其他实施方案中，所述CM提供可通过还原裂解的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键。在其他实施方案中，所述CM提供可通过光解活化的光解底物。

[0588] 在一些实施方案中，所述可裂解部分(或“底物”)包括作为蛋白酶、通常细胞外蛋

白酶的底物的氨基酸序列。合适底物使用多种已知技术中的任一者来鉴定。例如,肽底物使用描述于美国专利号7,666,817和8,563,269;和WO2014/026136中的方法来鉴定,所述文献中每一者的内容均以引用的方式整体并入本文中。(还参见Boulware等人,Biotechnol Bioeng.106(3):339-346(2010))。任选地,所述CM包含能够形成二硫键的半胱氨酸-半胱氨酸对,所述二硫键可通过还原剂的作用裂解。所述CM是经定位使得当所述CM在靶存在下通过裂解剂裂解(例如,CM的蛋白酶底物通过蛋白酶裂解和/或半胱氨酸-半胱氨酸二硫键经由通过暴露于还原剂实现的还原受到破坏),从而引起裂解状态时,Ab结合所述靶,并且在未裂解状态中,在靶存在下,Ab与靶的结合受到MM抑制。应注意,CM的氨基酸序列可与MM重叠或包括于MM内,使得当所述可活化抗体呈未裂解构形时,CM的全部或一部分促进Ab的"遮蔽"。

[0589] 在一些实施方案中,CM可基于与所述可活化抗体的所需靶共定位于组织中的蛋白酶加以选择。已知其中共定位所关注的靶与蛋白酶的多种不同条件,其中所述蛋白酶的底物是本领域中已知的。例如,靶组织可以是癌组织,特别是实体肿瘤的癌组织。文献中已多次报告,具有已知底物的蛋白酶在多种癌症(例如实体肿瘤)中具有增加的水平。参见例如La Rocca等人,(2004)British J.of Cancer 90(7):1414-1421。

[0590] 示例性底物可包括但不限于可通过以下酶中的一者或多者裂解的底物:MMP-I、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、血纤维蛋白溶酶、PSA、PSMA、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-4、半胱天冬酶-5、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、半胱天冬酶-9、半胱天冬酶-10、半胱天冬酶-11、半胱天冬酶-12、半胱天冬酶-13、半胱天冬酶-14和TACE。

[0591] 在一些实施方案中,所述CM是多达15个氨基酸长的多肽。

[0592] 在一些实施方案中,所述CM是如下多肽,其包括作为至少一种基质金属蛋白酶(MMP)的底物的第一可裂解部分(CM1)和作为至少一种丝氨酸蛋白酶(SP)的底物的第二可裂解部分(CM2)。在一些实施方案中,CM1-CM2底物的CM1底物序列和CM2底物序列中的每一者均独立地为多达15个氨基酸长的多肽。

[0593] 在一些实施方案中,所述CM为豆荚蛋白、血纤维蛋白溶酶、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、组织蛋白酶、半胱天冬酶、人嗜中性球弹性蛋白酶、β-分泌酶、uPA或PSA的底物。

[0594] 经MM和CM修饰的Ab针对靶的K_d可比未经MM和CM修饰的Ab或亲本Ab针对靶的K_d大至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000,000、100-10,000,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍之间。相反,经MM和CM修饰的Ab针对靶的结合亲和力可比未经MM和CM修饰的Ab或亲本Ab针对靶的结合亲和力低至少5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000倍或更多倍,或在5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、10-10,000,000、100-1,000,000、100-10,000,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000,000、10,000-100,

000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、100,000-1,000,000或100,000-10,000,000倍之间。

[0595] 如与未经MM和CM修饰的Ab或亲本Ab与靶的特异性结合相比，当Ab经MM和CM修饰并且在靶存在下但不在修饰剂(例如酶、蛋白酶、还原剂、光)存在下时，Ab与其靶的特异性结合可减少或受抑制。当如WO201008117(以引用的方式整体并入本文中)所述在体内或在靶位移体外免疫吸附剂分析中测量时，当与亲本Ab与其靶的结合或未经MM和CM修饰的Ab与其靶的结合相比时，Ab在经MM和CM修饰时结合靶的能力可减少至少50％、60％、70％、80％、90％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％和甚至100％，持续至少2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96小时，或5、10、15、30、45、60、90、120、150、180天，或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月或更久。

[0596] 如本文所用，术语裂解状态是指在CM的蛋白酶修饰和/或CM的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键的还原和/或光活化之后AA的状态。如本文所用，术语未裂解状态是指在CM的蛋白酶裂解不存在下和/或在CM的半胱氨酸-半胱氨酸二硫键的还原不存在下和/或在光不存在下AA的状态。如上文所论述，术语AA在本文中用于指呈其未裂解(原生)状态以及呈其裂解状态的AA。普通技术人员应显而易见，在一些实施方案中，裂解的AA可归因于CM的蛋白酶裂解，导致至少MM的释放而缺乏MM(例如，其中MM未通过共价键(例如半胱氨酸残基之间的二硫键)接合于AA)。

[0597] 可活化或可转换意指AA当呈抑制、遮蔽或未裂解状态(即，第一构形)时展现第一水平的与靶的结合，并且在未抑制、未遮蔽和/或裂解状态(即，第二构形)下展现第二水平的与靶的结合，其中所述第二水平的靶结合大于所述第一水平的结合。一般说来，靶对AA的Ab的接近在能够裂解CM的裂解剂存在下大于此类裂解剂不存在下。因此，当AA是呈未裂解状态时，Ab受到抑制以免于靶结合并且可受到遮蔽以免于靶结合(即，第一构形使得Ab无法结合靶)，并且在裂解状态下，AB关于靶结合未受抑制或未受遮蔽。

[0598] 可以选择AA的CM和AB，使得AB表示用于所关注的靶的结合部分，并且CM表示与靶共定位于受试者中的治疗位点处的蛋白酶的底物。或者或另外，所述CM为半胱氨酸-半胱氨酸二硫键，其可由于这个二硫键的还原而裂解。AA含有蛋白酶可裂解CM或半胱氨酸-半胱氨酸二硫键中的至少一者，并且在一些实施方案中包括两个种类的CM。AA可替代地或还包括可通过光源活化的光不稳定底物。本文所公开的AA发现特定用途，其中例如与非治疗位点的组织中(例如健康组织中)相比，能够裂解CM中的位点的蛋白酶以相对较高水平存在于治疗位点的含靶组织(例如患病组织;例如用于治疗性治疗或诊断性治疗)中。本文所公开的AA还发现特定用途，其中例如与非治疗非诊断位点的组织中相比，能够还原CM中的位点的还原剂以相对较高水平存在于治疗或诊断位点的含靶组织中。本文所公开的AA还发现特定用途，其中例如能够光解CM中的位点的光源(例如，藉助于雷射)被引入至治疗或诊断位点的含靶组织。

[0599] 在一些实施方案中，AA可提供减少的毒性和/或不良副作用，如果Ab并未受到遮蔽或以其他方式受到抑制以免于结合其靶，那么所述毒性和/或不良副作用可能原本由非治疗位点处的Ab结合引起。在AA含有可通过促进二硫键的还原的还原剂裂解的CM的情况下，可以选择所述AA的AB以利用Ab的活化，其中所关注的靶存在于所需治疗位点处，所述治疗位点的特征在于升高的还原剂水平，使得所述环境具有高于例如非治疗位点的环境的还原

潜力。

[0600] 一般说来,AA可通过选择所关注的Ab并且构建AA的剩余部分来设计,使得当构形受约束时,MM提供Ab的遮蔽或Ab与其靶的结合的减少。结构设计准则应考虑提供这一功能特征。

[0601] 提供与未抑制构形相对,在受到抑制的构形中展现针对靶结合的所需动态范围的可转换表型的AA。动态范围一般是指(a)在第一条件集合下参数的最大检测水平与(b)在第二条件集合下那个参数的最小检测值的比率。例如,在AA的情况下,动态范围是指(a)在能够裂解AA的CM的蛋白酶存在下与AA结合的靶蛋白的最大检测水平与(b)在所述蛋白酶不存在下与AA结合的靶蛋白的最小检测水平的比率。AA的动态范围可计算为AA裂解剂(例如酶)治疗的平衡解离常数与所述AA裂解剂治疗的平衡解离常数的比率。AA的动态范围越大,AA的可转换表型越好。具有相对较高动态范围值(例如大于1)的AA展现更加需要的转换表型,使得与裂解剂不存在下相比,AA的靶蛋白结合在能够裂解AA的CM的裂解剂(例如酶)存在下以较大程度发生(例如,主要地发生)。

[0602] 可提供呈多种结构配置的AA。AA的示例性式提供于下文中。特定地预期,AB、MM和CM的N端至C端顺序可在AA内逆转。还特定地预期,CM和MM的氨基酸序列可重叠,例如使得CM含于MM内。

[0603] 例如,AA可由下式表示(依氨基(N)端区至羧基(C)端区的顺序:

[0604] (MM)-(CM)-(AB)

[0605] (AB)-(CM)-(MM),其中MM为遮蔽部分,CM为可裂解部分,并且AB为抗体或其片段。应注意,尽管MM和CM是指示为上式中的不同组分,在本文所公开的所有示例性实施方案(包括各式)中,预期MM和CM的氨基酸序列可能重叠,例如使得CM完全地或部分地含于MM内。另外,以上各式提供可定位于AA要素的N端或C端的另外的氨基酸序列。

[0606] 在某些实施方案中,可需要将一个或多个接头(例如柔性接头)插入至AA构建体中以便在MM-CM接头、CM-AB接头或两者中的一者或多者处提供柔性。例如,AB、MM和/或CM可未含充足数目的残基(例如Gly、Ser、Asp、Asn,尤其Gly和Ser,特别地Gly)来提供所需柔性。因而,所述AA构建体的可转换表型可受益于为了提供柔性接头而引入的一个或多个氨基酸。另外,如下文所述,在AA作为构形受约束的构建体来提供的情况下,可操作性地插入柔性接头以促进未裂解AA中的环状结构的形成和维持。

[0607] 例如,在某些实施方案中,AA包含以下各式之一(其中下式表示呈N端至C端方向或C端至N端方向的氨基酸序列):

[0608] (MM)-L_1-(CM)-(AB)

[0609] (MM)-(CM)-L_1-(AB)

[0610] (MM)-L_1-(CM)-L_2-(AB)

[0611] 环[L_1-(MM)-L_2-(CM)-L_3-(AB)]

[0612] 其中MM、CM和AB是如上文所定义;其中L_1、L_2和L_3各自独立地并且任选地存在或不存在,是包括至少1个柔性氨基酸(例如Gly)的相同或不同柔性接头;并且其中在环存在的情况下,AA归因于在AA中的一对半胱氨酸之间存在二硫键而呈环状结构的形式。另外,以上各式提供可定位于AA要素的N端或C端的另外的氨基酸序列。应理解,在式环[L_1-(MM)-L_2-(CM)-L_3-(AB)]中,负责二硫键的半胱氨酸可定位于AA中以容许一个或两个尾,由此当AA处

于二硫化物键结的结构(并且因此构形受约束的状态)中时产生套索或ω结构。所述尾的氨基酸序列可提供另外的AA特征,诸如结合于靶受体以促进AA的定位,增加AA的血清半衰期等。靶部分(例如,针对存在于靶组织中的细胞的受体的配体)和血清半衰期延长部分(例如结合血清蛋白的多肽,诸如免疫球蛋白(例如IgG)或血清白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA))。

[0613] 适用于本文所述的AA的接头一般是提供修饰的AB或所述AA的柔性以促进对AB与靶的结合的抑制的接头。所述接头一般称作柔性接头。合适接头可容易地进行选择并且可具有任何合适的不同长度,诸如1个氨基酸(例如GIy)至20个氨基酸、2个氨基酸至15个氨基酸、3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸或7个氨基酸至8个氨基酸,并且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0614] 示例性柔性接头包括甘氨酸聚合物$(G)_n$、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$和$(GGGS)_n$,其中n是至少为1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和本领域中已知的其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物相对地未结构化,并且因此可能够充当组分之间的中性系栓。甘氨酸接近甚至比丙氨酸显著更多的phi-psi空间,并且与具有较长侧链的残基相比更不受限制(参见Scheraga,Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例性柔性接头包括但不限于Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly、GIy-Ser-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly和其类似接头。普通技术人员应认识到,AA的设计可包括全部或部分地具柔性的接头,使得所述接头可包括柔性接头以及赋予较少柔性结构以提供所需AA结构的一个或多个部分。

[0615] 除了上文所述的要素以外,修饰的AB和AA也可含有另外的要素,诸如AA的氨基酸序列N端或C端。例如,AA可包括靶向部分以促进递送至所关注的细胞或组织。此外,可在骨架蛋白的情况下提供AA以促进细胞表面上AA的展示

[0616] 在一些实施方案中,所述可活化抗体还包括信号肽。在一些实施方案中,所述信号肽经由间隔基缀合于所述可活化抗体。在一些实施方案中,所述间隔基在信号肽不存在下缀合于所述可活化抗体。在一些实施方案中,所述间隔基直接地接合于所述可活化抗体的MM。在一些实施方案中,在从N端至C端具有间隔基-MM-CM-AB的结构安排中,所述间隔基直接地接合于所述可活化抗体的MM。

[0617] 合适间隔基和间隔基技术是本领域中已知的并且可常规地用于在所提供的可活化抗体的一些实施方案中并入间隔基。参见例如WO 2016/179285(例如在第52-53页),其内容以引用的方式整体并入本文中。

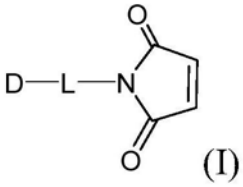
[0618] 在一些实施方案中,所述可活化抗体暴露于蛋白酶并且通过蛋白酶裂解,使得在活化或裂解状态中,所述可活化抗体包括如下轻链序列,所述序列在所述蛋白酶已裂解CM之后包括LP2和/或CM序列的至少一部分。

[0619] 所述CM由至少一种蛋白酶以约$0.001\text{-}1500\times10^4M^{-1}S^{-1}$或至少0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250或$1500\times10^4M^{-1}S^{-1}$的速率特异性地裂解。在一些实施方案中,所述CM以约$100,000M^{-1}S^{-1}$的速率特异性地裂解。在一些实施方案中,所述CM以约1×10^2至约$1\times10^6M^{-1}S^{-1}$(即,约1×10^2至约1×10^6 $M^{-1}S^{-1}$)的速率特异性地裂解。

[0620] 关于通过酶实现的特异性裂解，在所述酶与CM之间实现接触。当包含偶合至MM和CM的Ab(例如抗体或EpCAM结合抗体片段)的可活化抗体是在靶和充足酶活性存在下时，所述CM可裂解。充足酶活性可指所述酶与所述CM进行接触并且实现裂解的能力。可容易地设想，酶可处于所述CM附近，但由于其他细胞因子或所述酶的蛋白质修饰而无法裂解。

[0621] 5.细胞毒性剂(D)或细胞毒性剂-接头化合物(式(I)化合物

[0622] 在某些实施方案中，关于本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的步骤(c)，使CysCBA(例如CysAb或其抗原结合片段)与式(I)化合物：

[0623] 

(I)

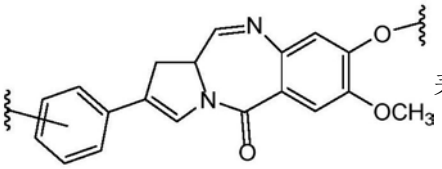
[0624] 或其药学上可接受的盐反应，由此形成缀合物，其中D为细胞毒性剂，并且L为接头。

[0625] 在某些实施方案中，D为苯并二氮呯化合物，诸如吡咯并苯并二氮呯(PBD)、噁唑烷并苯并二氮呯(OBD)或吲哚啉并苯并二氮呯(IGN)化合物。

[0626] 如本文所用，“苯并二氮呯”化合物是具有苯并二氮呯核心结构的化合物。所述苯并二氮呯核心可经取代或未经取代，和/或与一个或多个环结构稠合。其还包括具有通过接头连接的两个苯并二氮呯核心的化合物。作为苯并二氮呯核心的一部分的亚胺官能团(-C=N-)可被还原。

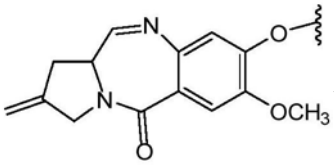
[0627] 如本文所用，“吡咯并苯并二氮呯”(PBD)化合物是具有吡咯并苯并二氮呯核心结构的化合物。吡咯并苯并二氮呯可经取代或未经取代。其还包括具有通过接头连接的两个吡咯并苯并二氮呯核心的化合物。作为吲哚啉并苯并二氮呯核心的一部分的亚胺官能团(-C=N-)可被还原。

[0628] 在某些实施方案中，所述吡咯并苯并二氮呯化合物包含由



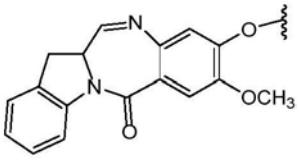
表示的核心结构，其可任选地经取代。

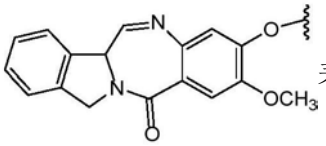
[0629] 在某些实施方案中，所述吡咯并苯并二氮呯化合物包含由



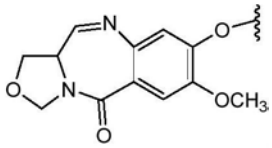
表示的核心结构，其可任选地经取代。

[0630] 如本文所用，“吲哚啉并苯并二氮呯”(IGN)化合物是具有吲哚啉并苯并二氮呯核心结构的化合物。吲哚啉并苯并二氮呯可经取代或未经取代。其还包括具有通过接头连接的两个吲哚啉并苯并二氮呯核心的化合物。作为吲哚啉并苯并二氮呯核心的一部分的亚胺官能团(-C=N-)可被还原。

[0631] 在某些实施方案中,所述吲哚啉并苯并二氮呼化合物包含由  表示的核心结构,其可任选地经取代。

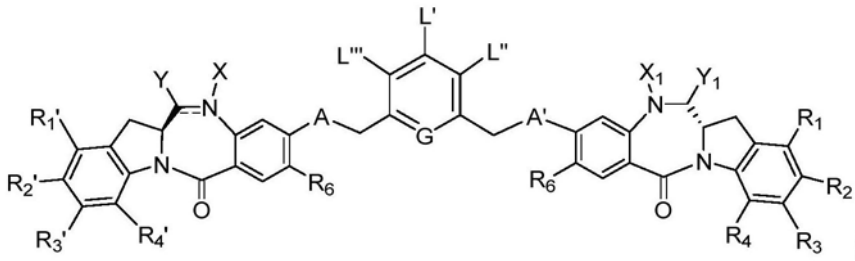
[0632] 在一些实施方案中,所述吲哚啉并苯并二氮呼化合物包含由  表示的核心结构,其可任选地经取代。

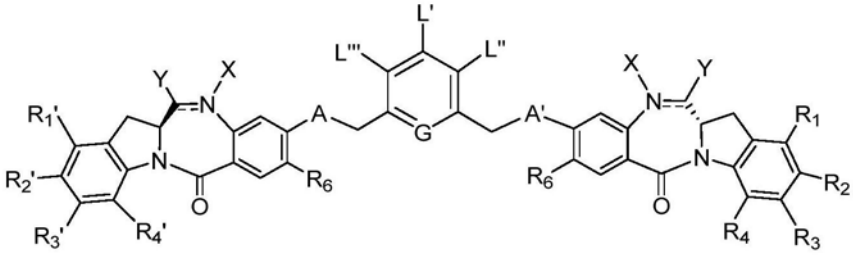
[0633] 如本文所用,“噁唑烷并苯并二氮呼”(OBD)化合物是具有噁唑烷并苯并二氮呼核心结构的化合物。噁唑烷并苯并二氮呼可经取代或未经取代。其还包括具有通过接头连接的两个噁唑烷并苯并二氮呼核心的化合物。作为噁唑烷并苯并二氮呼核心的一部分的亚胺官能团(-C=N-)可被还原。

[0634] 在一些实施方案中,所述噁唑烷并苯并二氮呼化合物包含由  表示的核心结构,其可任选地经取代。

[0635] 在某些实施方案中,D为类美登素化合物。

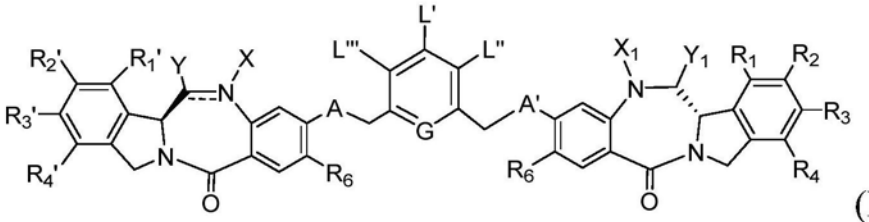
[0636] 在第一特定实施方案中,关于本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物,D是由下式或其药学上可接受的盐表示:

[0637]  (D-IA);

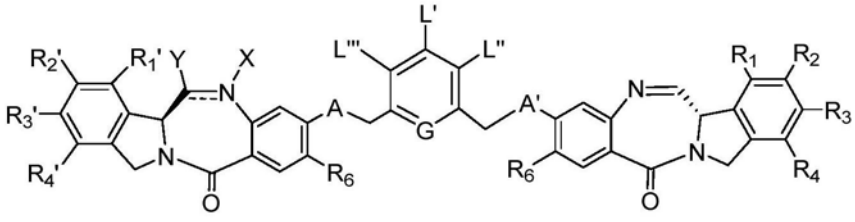


(D-IB);

[0638]



(D-IC); 或



(D-ID);

[0639] 其中：

[0640] N与C之间的双线==表示单键或双键，其限制条件在于当其为双键时，X不存在并且Y为-H或(C_1-C_4)烷基；并且当其为单键时，X为-H或胺保护部分，Y为-OH或-SO_3H或其药学上可接受的盐；

[0641] L'、L"和L"'之一是由下式表示：

[0642] -Z_1-P_1-Z_2-R_{x1}-C(=O)-(A')，或

[0643] -N(R^e)-R_{x1}-C(=O)-(D')；

[0644] 并且另两者各自独立地选自-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-(CH_2CH_2O)$_n$-R^c、卤素、胍盐[-NH(C=NH)NH_2]、-OR、-NR'R"、-NO_2、-NR'COR"、-SR、-SOR'、-SO_2R'、-SO_3H、-OSO_3H、-SO_2NR'R"、氰基、叠氮基、-COR'、-OCOR'和-OCONR'R"；

[0645] Z_1和Z_2之一为-C(=O)-，并且另一者为-NR_5-；

[0646] P_1为氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽；

[0647] R_{x1}为任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基；

[0648] R^e为-H、直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基或-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k为-H、具有1至6个碳原子、任选地携带仲氨基(例如-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)的直链、分支链环状烷基、或5元或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基；

[0649] R在每次出现时是独立地选自由-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-(CH_2CH_2O)$_n$-R^c、任选取代的具有6至18个碳原子的芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环或任选取代的含有独

立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环组成的组；

[0650] R'和R"是各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR_2、-COR、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c和任选取代的具有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环；

[0651] R^c为-H或任选取代的具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基；

[0652] n为整数1至24；

[0653] X_1是选自-H、胺保护基、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c、任选取代的具有6至18个碳原子的芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环和任选取代的含有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环；

[0654] Y_1是选自-H、氧代基、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、任选取代的6元至18元芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环、任选取代的具有1至6个杂原子的3元至18元杂环；

[0655] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'是各自独立地选自由-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c、卤素、胍盐[-NH(C=NH)NH_2]、-OR、-NR'R"、-NO_2、-NCO、-NR'COR"、-SR、-SOR'、-SO_2R'、-SO_3^-H、-OSO_3H、-$SO_2NR'R"$、氰基、叠氮基、-COR'、-OCOR'和-OCONR'R"组成的组；

[0656] R_6为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素；

[0657] G为-CH-或-N-；

[0658] A和A'为相同或不同的，并且是独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR_5和-CRR'N(R_5)-；并且

[0659] R_5在每次出现时独立地为-H或任选取代的直链或分支链烷基。

[0660] 在某些实施方案中，D是由式(D-IA)或其药学上可接受的盐表示。

[0661] 在某些实施方案中，关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)，X_1为-H、-OH、(C_1-C_3)烷基、卤基(C_1-C_3)烷基或苯基；Y_1'为-H、氧代基、(C_1-C_3)烷基或卤基(C_1-C_3)烷基，并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，X_1为-H、-OH或-Me；并且Y_1为-H或氧代。甚至更具体说来，X_1为-H；并且Y_1为-H。

[0662] 在某些实施方案中，关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)，A和A'为相同或不同的，并且是选自-O-和-S-，并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，A和A'为-O-。

[0663] 在某些实施方案中，关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)，R_6为-OMe，并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0664] 在某些实施方案中，关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)，R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'是独立地为-H、卤素、-NO_2、-OH、(C_1-C_3)烷基、卤基(C_1-C_3)烷基或(C_1-C_3)烷氧基，并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'均为-H。

[0665] 在某些实施方案中，关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)，R、R'、R"和R_5各自独立地为-H或(C_1-C_3)烷基，并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0666] 在某些实施方案中,关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID),G为-CH-。

[0667] 在某些实施方案中,D是由式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID)表示,其中:

[0668] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'均为-H;

[0669] R_6为-OMe;

[0670] X_1和Y_1均为-H;

[0671] A和A'为-O-;并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。在某些实施方案中,G为-CH-;并且剩余变量是如上文所述。

[0672] 在第二特定实施方案中,关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID),L'、L"和L"'之一是由式(A')或(D')表示,并且其余为-H、具有1至6个碳原子的直链或分支链烷基、卤素、-OH、(C_1-C_6)烷氧基或-NO_2,并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。在某些实施方案中,L'是由式(A')表示;并且L"和L"'均为-H。在其他实施方案中,L'是由式(D')表示;并且L"和L"'均为-H。

[0673] 在某些实施方案中,式(A')或(D')中的R_{x1}是具有1至6个碳原子的直链、分支链或环状烷基,其任选地经卤素、-OH、(C_1-C_3)烷基、(C_1-C_3)烷氧基、卤基(C_1-C_3)烷基或带电取代基或可电离基团Q取代;并且剩余变量是如第一或第二特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0674] 在第三特定实施方案中,关于第一或第二特定实施方案或其中所述的任何实施方案中所述的式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)或(D-ID),L'是由下式表示:

[0675] -NR_5-P_1-C(=O)-$(CR_aR_b)_s$-C(=O)-(B1');

[0676] -NR_5-P_1-C(=O)-Cy-$(CR_aR_b)_{s1'}$-C(=O)-(B2');

[0677] -C(=O)-P_1-NR_5-$(CR_aR_b)_s$-C(=O)-(C1'),或

[0678] -C(=O)-P_1-NR_5-Cy-$(CR_aR_b)_{s1'}$-C(=O)-(C2')

[0679] 其中:

[0680] R_a和R_b在每次出现时各自独立地为-H、(C_1-C_3)烷基或带电取代基或可电离基团Q;

[0681] s为整数1至6;

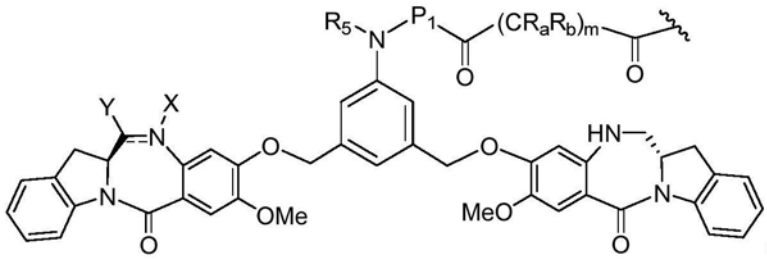
[0682] s1'为0或整数1至6;

[0683] Cy是具有5或6个环碳原子的环状烷基,其任选地经卤素、-OH、(C_1-C_3)烷基、(C_1-C_3)烷氧基或卤基(C_1-C_3)烷基取代;并且

[0684] 剩余变量是如第一或第二特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0685] 在某些实施方案中,式(B2')和(C2')中的Cy为环己烷;并且s1'为0或1。

[0686] 在第四特定实施方案中,关于式(I)化合物,D是由下式或其药学上可接受的盐表示:

[0687] 

(D-IE),

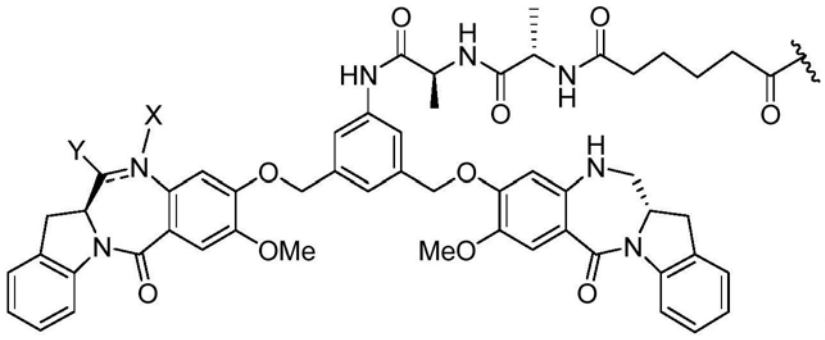
[0688] 并且剩余变量是如第三特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0689] 在第五特定实施方案中，关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)、(D-ID)或(D-IE)，R_a和R_b均为H；并且R_5为H或Me，并且剩余变量是如第三或第四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

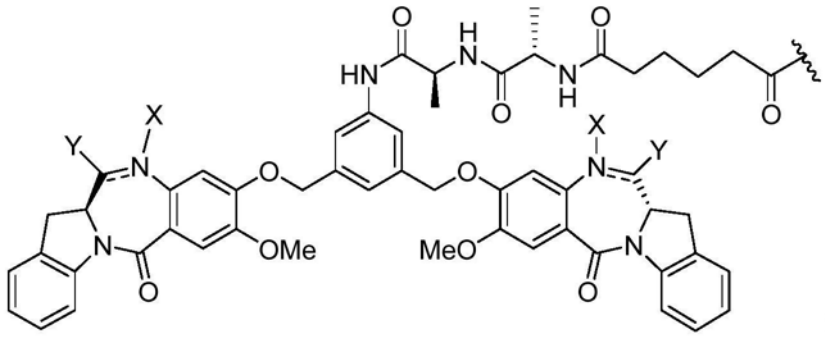
[0690] 在某些实施方案中，关于第一、第二、第三或第四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述的化合物，所述带电取代基或可电离基团Q为i)-SO_3H、-Z'-SO_3H、-OPO_3H_2、-Z'-OPO_3H_2、-PO_3H_2、-Z'-PO_3H_2、-CO_2H、-Z'-CO_2H、-$NR_{11}R_{12}$或-Z'-$NR_{11}R_{12}$或其药学上可接受的盐；或者，ii)-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$或-Z'-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$；Z'为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基；R_{14}至R_{16}各自独立地为任选取代的烷基；并且X^-为药学上可接受的阴离子。更具体说来，Q为-SO_3H或其药学上可接受的盐。

[0691] 在第六特定实施方案中，关于式(D-IA)、(D-IB)、(D-IC)、(D-ID)或(D-IE)，P_1为含有2至10个氨基酸残基的肽，并且剩余变量是如第一、第二、第三、第四或第五特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。在某些实施方案中，P_1是含有2至5个氨基酸残基的肽。在某些实施方案中，P_1是可通过蛋白酶裂解的肽。更具体说来，P_1是可通过在肿瘤组织中表达的蛋白酶裂解的肽。在某些实施方案中，P_1为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp、Cit、Phe-Ala、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N^9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:56)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:57)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:58)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe和Gln-Ala。更具体说来，P_1为Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala或D-Ala-D-Ala。

[0692] 在第七特定实施方案中，关于式(I)化合物，D是由以下结构式表示：

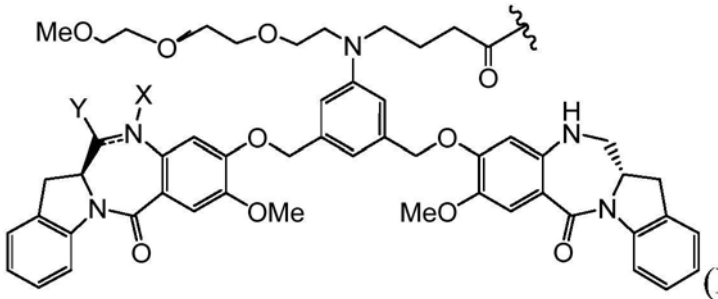
[0693] 

(D1);

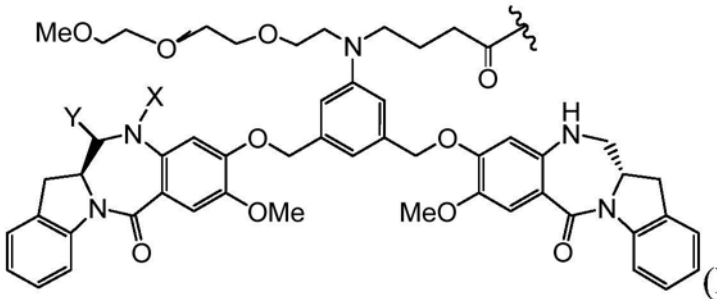


(D2);

[0694]



(D3); 或

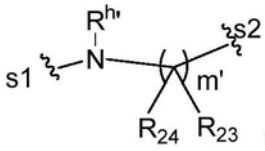


(D4),

[0695] 或其药学上可接受的盐,其中N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件在于当其为双键时,X不存在并且Y为-H;并且当其为单键时,X为-H,Y为-SO_3H或其药学上可接受的盐,并且剩余变量是如第一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0696] 在第八特定实施方案中,关于本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物,-L-是由以下结构式表示:

[0697]



(L-I),

[0698] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0699] s1为共价连接至D的位点;s2为共价连接至顺丁烯二酰亚胺基的位点;

[0700] R_{23}和R_{24}在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;

[0701] m'为0与10之间的整数;

[0702] $R^{h'}$为H或任选取代的烷基;

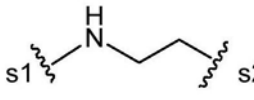
[0703] 并且剩余变量是如第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0704] 在某些实施方案中,R_{23}和R_{24}均为H;并且m'为1与6之间的整数,并且剩余变量是如

第八特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0705] 在某些实施方案中，$R^{h'}$ 为H，并且剩余变量是如第八特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

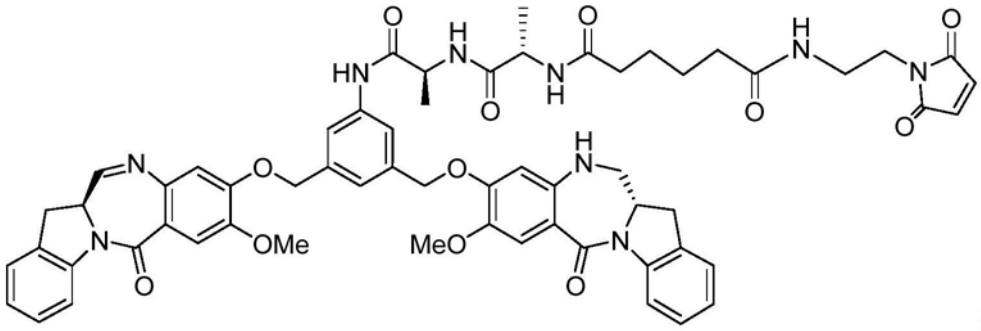
[0706] 在第九特定实施方案中，关于本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物，-L-是由以下结构式表示：

[0707] 

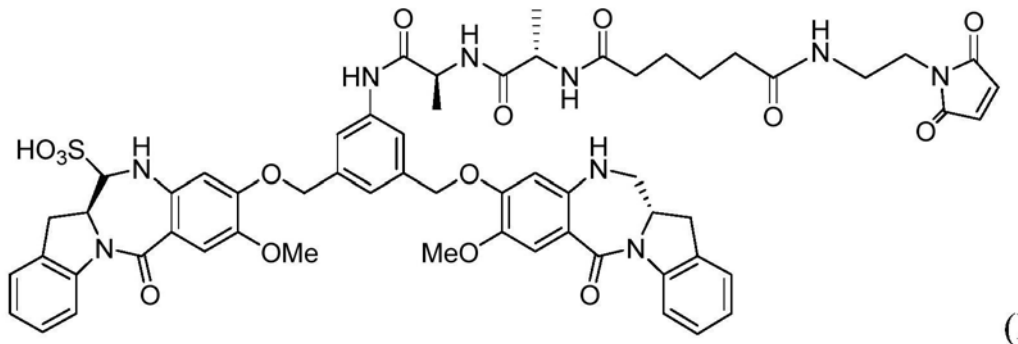
(L1)，

[0708] 或其药学上可接受的盐，并且剩余变量是如第一、第二、第三、第四、第五、第六或第七特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0709] 在第十特定实施方案中，本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示：

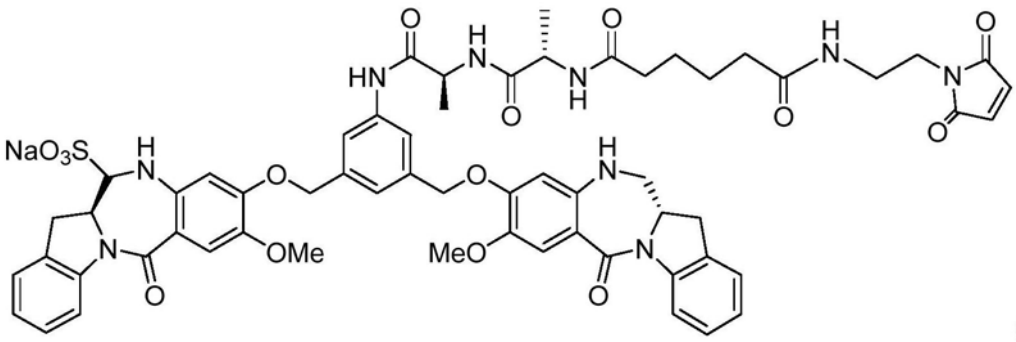
[0710] 

(I1)，或

[0711] 

(I2)。

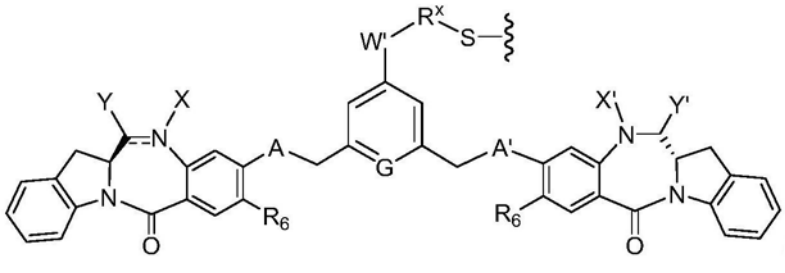
[0712] 在某些实施方案中，式(I)化合物是由下式表示：

[0713] 

(I3)。

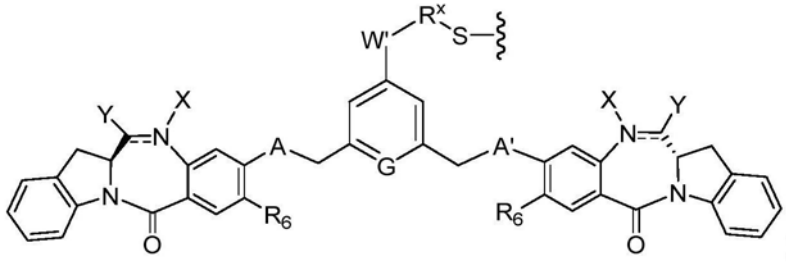
[0714] 在第十一特定实施方案中，关于本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)

化合物,D是由下式或其药学上可接受的盐表示:

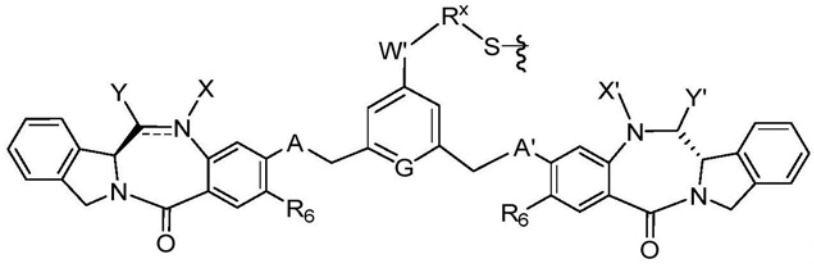


(D-IIA);

[0715]

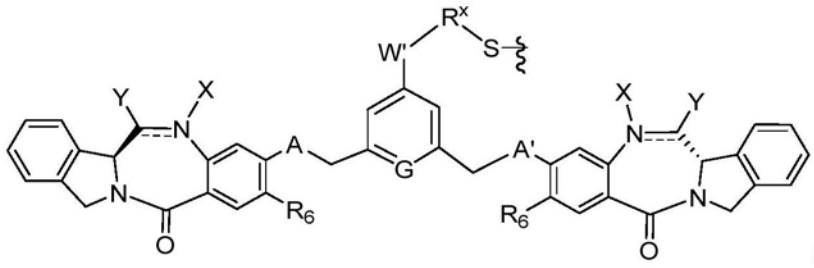


(D-IIB);



(D-IIC); 或

[0716]



(D-IID),

[0717] 其中:

[0718] N与C之间的双线==表示单键或双键,其限制条件在于当其为双键时,X不存在并且Y为-H或(C_1-C_4)烷基;并且当其为单键时,X为-H或胺保护部分,Y为-OH或-SO_3H或其药学上可接受的盐;

[0719] X'是选自由-H、-OH、取代或未取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、苯基和胺保护基组成的组;

[0720] Y'是选自由-H、氧代基、取代或未取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基组成的组;

[0721] A和A'是选自-O-和-S-;

[0722] W'不存在,或是选自-O-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-或-CH_2-S-、-CH_2NR^e-;

[0723] R^x不存在或是选自直链、分支链或环状烷基;

[0724] R^e为-H、直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$,其中R^k为-H、具

有1至6个碳原子、任选地携带仲氨基(例如-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)的直链、分支链环状烷基、或5元或6元含氮杂环,其中R^{101}和R^{102}各自独立地为直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基;

[0725] n为整数1至24;

[0726] G是选自-CH-或-N-;

[0727] R_6为-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素;并且

[0728] R在每次出现时是独立地选自由-H、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c、任选取代的具有6至18个碳原子的芳基、任选取代的含有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个杂原子的5元至18元杂芳基环或任选取代的含有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环组成的组;

[0729] R'和R"是各自独立地选自-H、-OH、-OR、-NHR、-NR_2、-COR、任选取代的直链、分支链或环状烷基、烯基或炔基、聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c和任选取代的具有独立地选自O、S、N和P的1至6个杂原子的3元至18元杂环;

[0730] R^c为-H或任选取代的具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基;并且L为接头。

[0731] 在某些实施方案中,D是由式(D-IIA)或其药学上可接受的盐表示。

[0732] 在某些实施方案中,D是由式(D-IIA)、(D-IIB)、(D-IIC)或(D-IID)表示,其中:

[0733] X'和Y'均为-H;

[0734] A和A'均为-O-;

[0735] R_6为-OMe;

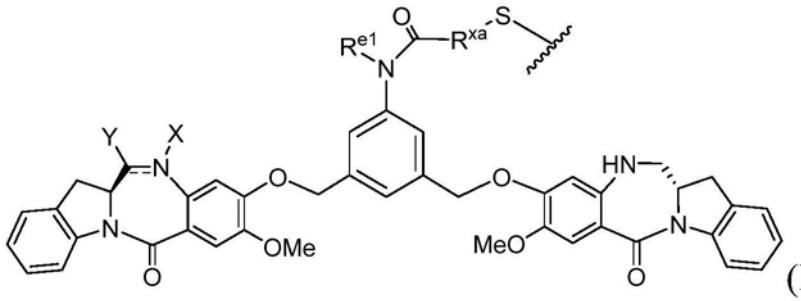
[0736] W'为-N(R^e)-或-N(R^e)-C(=O)-;

[0737] R^e为-H、具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基或-$(CH_2-CH_2-O)_n$-R^k,其中R^k为-H、具有1至4个碳原子的直链或分支链烷基;

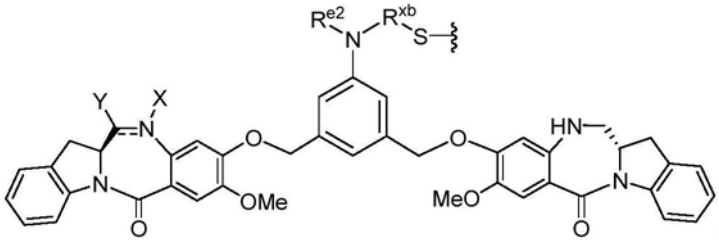
[0738] n为整数2至6;

[0739] R^x为具有1至6个碳原子的直链或分支链烷基;并且剩余变量是如第十一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0740] 在第十二特定实施方案中,关于式(I)化合物,D是由以下结构式表示:

[0741] 

(D-IIE),或



(D-IIF),

[0742] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0743] R^{e1}为H或(C_1-C_6)烷基;

[0744] R^{xa}为(C_1-C_6)烷基;

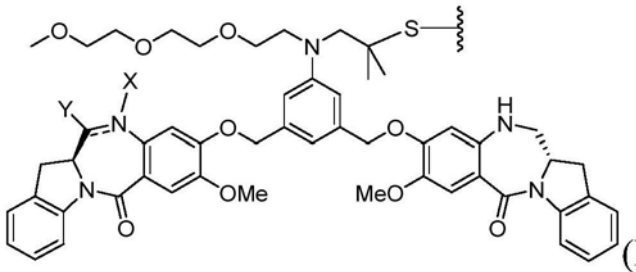
[0745] R^{e2}为-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k;

[0746] n为整数2至6;

[0747] R^k为-H或-Me;

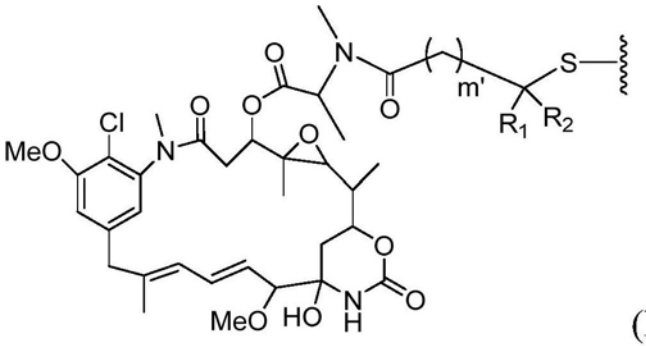
[0748] R^{xb}为(C_1-C_6)烷基;并且剩余变量是如第十一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0749] 在第十三特定实施方案中,关于式(I)化合物,D是由下式或其药学上可接受的盐表示:

[0750] 
(D5);

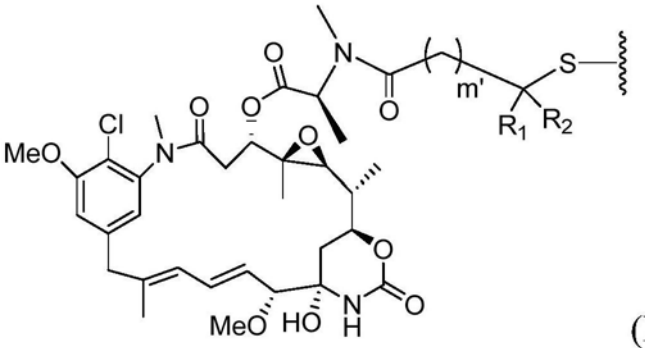
[0751] 并且剩余变量是如第十一特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0752] 在第十四特定实施方案中,关于本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物,D是由下式表示:

[0753] 
(D-III),

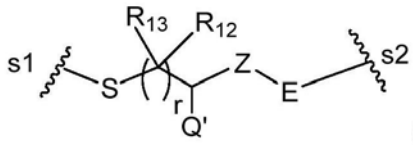
[0754] 其中m'为1或2;R_1和R_2各自独立地为-H或(C_1-C_3)烷基;并且L为接头。

[0755] 在某些实施方案中,D是由下式表示:

[0756] 
(D-IIIA)。

[0757] 在第十五特定实施方案中,关于本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第

五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物,L是由以下结构式表示:

[0758] 

(L-II),

[0759] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0760] s1为共价连接至D的位点,并且s2为共价连接至顺丁烯二酰亚胺基的位点;

[0761] E为-$(CR_{10}R_{11})_q$-、环烷基或环烷基烷基;

[0762] Z是不存在、-SO_2NR_9-、-NR_9SO_2-、-C(=O)-NR_9-、-NR_9-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-NR_9-$(CH_2CH_2O)_p$-、-NR_9-C(=O)-$(CH_2CH_2O)_p$-、-$(OCH_2CH_2)_p$-C(=O)NR_9-或-$(OCH_2CH_2)_p$-NR_9-C(=O)-;

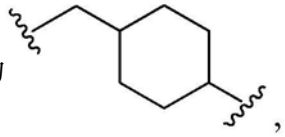
[0763] p为整数1至24;

[0764] Q为H、带电取代基或可电离基团;

[0765] R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基;

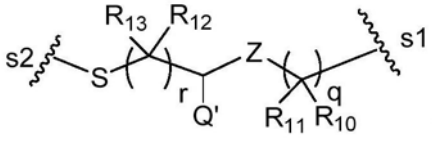
[0766] q和r在每次出现时独立地为0与10之间的整数;并且剩余变量是如第十一、第十二、第十三或第十四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0767] 在某些实施方案中,E为-$(CR_{10}R_{11})_q$-,并且剩余变量是如第十五特定实施方案所述。

[0768] 在某些实施方案中,E为  ,并且剩余变量是如第十五特定实施方案所述。

[0769] 在某些实施方案中,Z为-C(=O)-NR_9-或-NR_9-C(=O)-,并且剩余变量是如第十五特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0770] 在第十六特定实施方案中,关于式(I)化合物,L是由以下结构式表示:

[0771] 

(L-IIA),

[0772] 其中R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}在每次出现时独立地为-H或(C_1-C_3)烷基;并且剩余变量是如第十五特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0773] 在某些实施方案中,R_9为-H,并且剩余变量是如第十六特定实施方案所述。

[0774] 在某些实施方案中,Q'为:

[0775] i)H;

[0776] ii)-SO_3H、-Z'-SO_3H、-OPO_3H_2、-Z'-OPO_3H_2、-PO_3H_2、-Z'-PO_3H_2、-CO_2H、-Z'-CO_2H、-$NR_{11}R_{12}$或-Z'-$NR_{14}R_{15}$或其药学上可接受的盐;或者,

[0777] iii)-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$或-Z'-$N^+R_{14}R_{15}R_{16}X^-$;

[0778] Z'为任选取代的亚烷基、任选取代的亚环烷基或任选取代的亚苯基;

[0779] R_{14}、R_{15}和R_{16}各自独立地为任选取代的烷基;并且

[0780] X^-为药学上可接受的阴离子，并且剩余变量是如第十六特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0781] 在某些实施方案中，Q'为H或-SO_3H或其药学上可接受的盐，并且剩余变量是如第十六特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0782] 在某些实施方案中，R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{13}均为H；并且q和r各自独立地为1与6之间的整数，并且剩余变量是如第十六特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0783] 在某些实施方案中，L是由式(L-IIA)表示，其中：

[0784] R_{12}和R_{13}在每次出现时各自独立地为H或(C_1-C_3)烷基；

[0785] Q为H或-SO_3H或其药学上可接受的盐

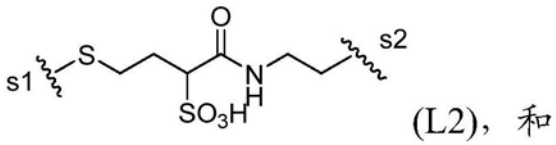
[0786] Z为-C(=O)-NR_9-或-NR_9-C(=O)-；

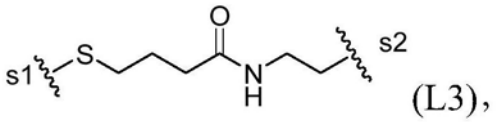
[0787] R_9为H或(C_1-C_3)烷基；

[0788] R_{10}和R_{11}在每次出现时独立地为H或(C_1-C_3)烷基；并且

[0789] q和r各自为整数1至5；并且剩余变量是如第十六特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

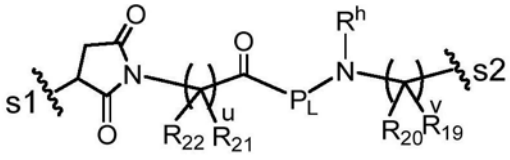
[0790] 在第十七特定实施方案中，关于式(I)化合物，L是由以下结构式中的任一者表示：

[0791] 
(L2)，和


(L3)，

[0792] 或其药学上可接受的盐，并且剩余变量是如第十一、第十二、第十三或第十四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0793] 在第十八特定实施方案中，关于式(I)化合物，L是由以下结构式表示：

[0794] 
(L-III)，

[0795] 或其药学上可接受的盐，其中：

[0796] s1为共价连接至D的位点；s2为共价连接至顺丁烯二酰亚胺基的位点；

[0797] R_{19}、R_{20}、R_{21}和R_{22}在每次出现时独立地为H或任选取代的烷基；

[0798] u和v各自独立地为0与10之间的整数；

[0799] R^h为H或任选取代的烷基；

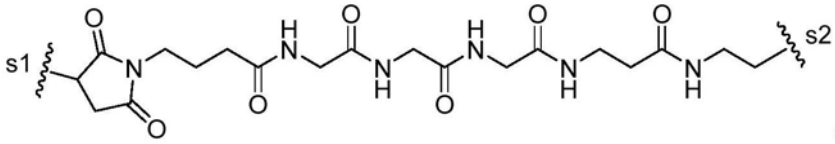
[0800] P_L为任选取代的亚烷基、-(CH_2-CH_2-O)$_j$-(其中氧原子连接至与P_L连接的-(C=O)-基团)、氨基酸残基或含有2至20个氨基酸残基的肽；并且

[0801] j为整数1至24；并且剩余变量是如第十一、第十二、第十三或第十四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0802] 在某些实施方案中，R_{19}、R_{20}、R_{21}和R_{22}各自为H；并且u和v各自独立地为1与6之间的整数；并且剩余变量是如上文第十八特定实施方案所述。

[0803] 在某些实施方案中，P_L为氨基酸残基或含有2至10个氨基酸残基的肽并且剩余变量是如上文第十八特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，P_L是含有2至5个氨基酸残基的肽。在另一更特定实施方案中，P_L是选自由以下组成的组：Ala-Val、Val-Ala、Val-Cit、Cit-Val.Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Ala、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N^9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:56)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:57)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala.、Ala-Met、Met-Ala、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Val-Cit、Ala-Val-Ala和β-Ala-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO:58)。甚至更具体说来，P_L为Gly-Gly-Gly、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Val-Ala或β-Ala-Gly-Gly-Gly。

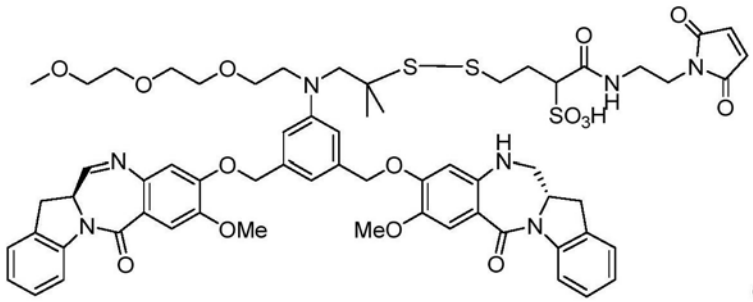
[0804] 在第十九特定实施方案中，关于式(I)化合物，L是由以下结构式表示：

[0805] 

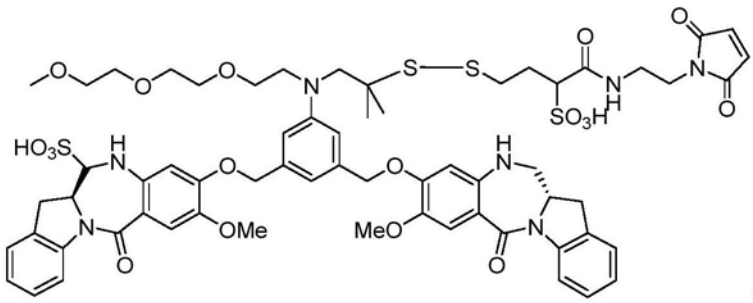
(L4)，

[0806] 或其药学上可接受的盐，并且剩余变量是如第十一、第十二、第十三或第十四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0807] 在第二十特定实施方案中，本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示：

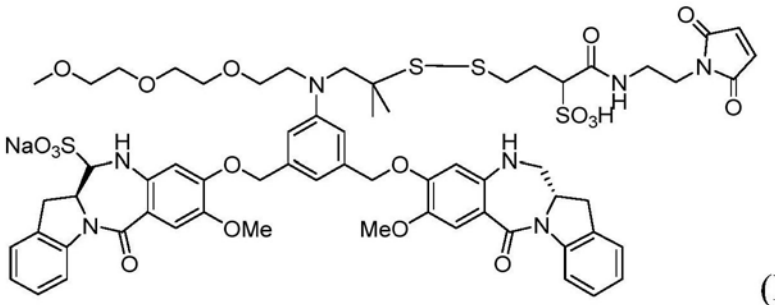
[0808] 

(I4)；或

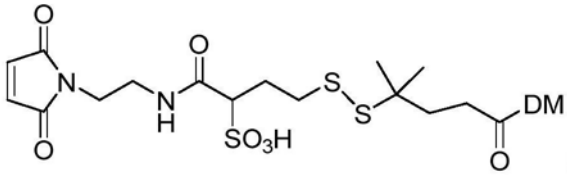
[0809] 

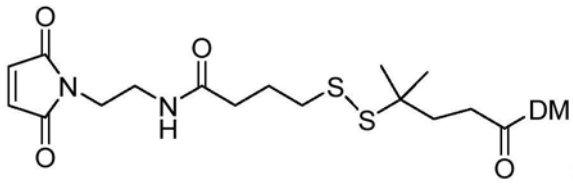
(I5)。

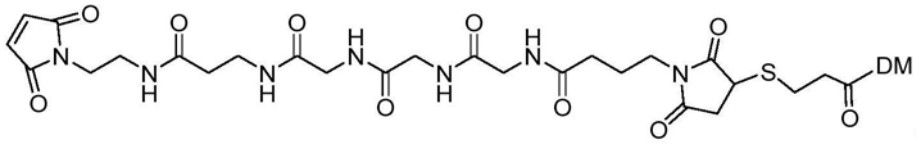
[0810] 在某些实施方案中，第二十特定实施方案中的式(I)化合物是由下式表示：

[0811] 
(I6)。

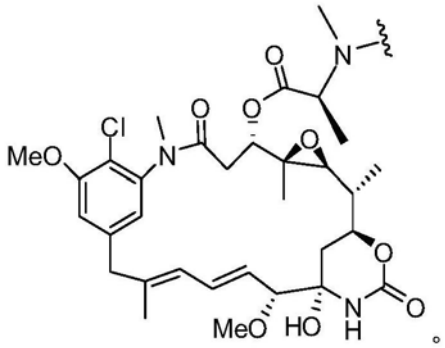
[0812] 在第二十一特定实施方案中，本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示：


(I7);

[0813] 
(I8); 或


(I9);

[0814] 其中DM是由下式表示的药物部分：

[0815] 
。

[0816] 在第二十二特定实施方案中，本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示：

[0817] L_2'-A-NH-$CR^{1A}R^{2A}$-S-L_1-D(I-a)，

[0818] 其中：

[0819] L_2'是携带顺丁烯二酰亚胺部分的间隔基；

[0820] A为氨基酸或包含2至20个氨基酸的肽；

[0821] R^{1A}和R^{2A}各自独立地为H或C_{1-3}烷基；

[0822] L_1为间隔基；并且

[0823] D-L_1-SH为细胞毒性剂。

[0824] 在某些实施方案中，R^{1A}和R^{2A}中的至少为H，并且剩余变量是如第二十二特定实施方案所述。

[0825] 在某些实施方案中，R^{1A}和R^{2A}各自独立地为H或Me，并且剩余变量是如第二十二特定实施方案所述。

[0826] 在某些实施方案中，R^{1A}和R^{2A}为H；并且另一者为Me，并且剩余变量是如第二十二特定实施方案所述。

[0827] 在某些实施方案中，R^{1A}和R^{2A}均为H，并且剩余变量是如第二十二特定实施方案所述。

[0828] 在某些实施方案中，L_1为-L_1'-C(=O)-；并且L_1'为亚烷基或亚环烷基，并且剩余变量是如第二十二特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，L_1'为C_{1-10}亚烷基。甚至更具体说来，L_1为-$CR^{3A}R^{4A}$-$(CH_2)_{1-8}$-C(=O)-；R^{3A}和R^{4A}各自独立地为H或Me。在另一更特定实施方案中，L_1为-$CR^{3A}R^{4A}$-$(CH_2)_{3-5}$-C(=O)-。在一甚至更特定实施方案中，R^{3A}和R^{4A}均为Me。

[0829] 在某些实施方案中，L_1为-$(CH_2)_{4-6}$-C(=O)-，并且剩余变量是如第二十二特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0830] 在第二十三特定实施方案中，关于式(I-a)，L_2'是由以下结构式表示：

[0831] J_{CB}'-R^A-V-W-R^B-V'-R^C-J_A-；

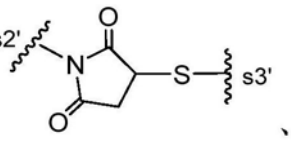
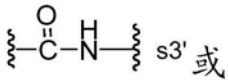
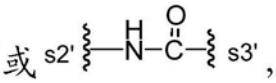
[0832] 其中：

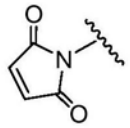
[0833] R^A为亚烷基、环烷基亚烷基或亚芳基；

[0834] R^B和R^C是各自独立地不存在、亚烷基、亚环烷基或亚芳基；

[0835] V和V'各自独立地为-(O-CH2-CH2)$_p$1-或-(CH2-CH2-O)$_p$1-；

[0836] p1为0或整数1至10；

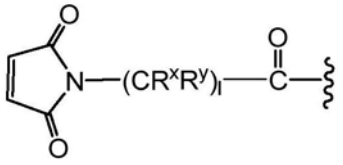
[0837] W是不存在、、或，其中s2'指示连接至V、R^A或J_{CB}'的位点并且s3'指示连接至R^B、V'、R^C或J_A的位点；

[0838] J_{CB}'为并且；

[0839] J_A为-C(=O)-；并且剩余变量是如第二十二特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

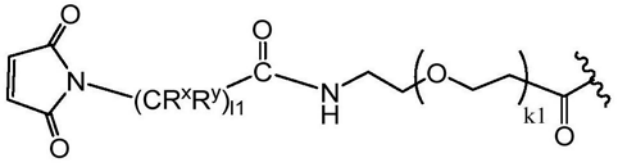
[0840] 在某些实施方案中，p1为0并且R^C不存在，并且剩余变量是如第二十三特定实施方案所述。

[0841] 在第二十四特定实施方案中，关于式(I-a)，L_2'是由以下结构式表示：



(L2a')；或

[0842]



(L2b')，

[0843] 其中：

[0844] R^x和R^y在每次出现时独立地为H、-OH、卤素、-O-(C_{1-4}烷基)、-SO_3H、-$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$或任选地经-OH、卤素、-SO_3H或$NR_{40}R_{41}R_{42}^+$取代的C_{1-4}烷基，其中R_{40}、R_{41}和R_{42}各自独立地为H或C_{1-4}烷基；

[0845] l和l1各自独立地为整数1至10；

[0846] k1为整数1至12；并且剩余变量是如第二十二特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

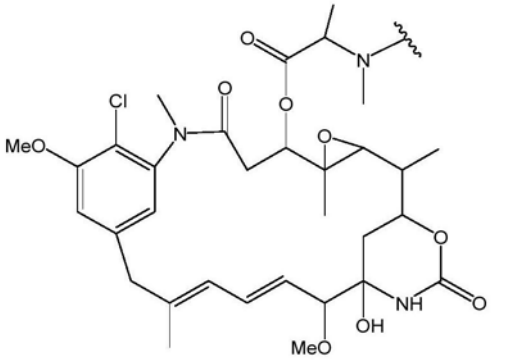
[0847] 在某些实施方案中，R^x和R^y均为H，并且剩余变量是如上文第二十四特定实施方案所述。

[0848] 在某些实施方案中，l和l1各自为整数2至6，并且剩余变量是如上文第二十四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

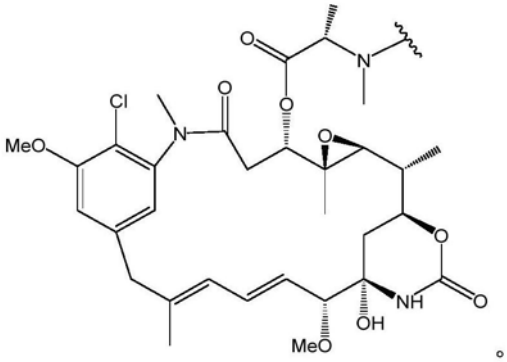
[0849] 在第二十五特定实施方案中，关于式(I-a)，A是可通过蛋白酶裂解的肽，并且剩余变量是如第二十二、第二十三或第二十四特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，A是可通过在肿瘤组织中表达的蛋白酶裂解的肽。在另一更特定实施方案中，A是具有与-NH-CR^1R^2-S-L_1-D共价连接的氨基酸的肽，所述氨基酸选自由Ala、Arg、Asn、Asp、Cit、Cys、硒代-Cys、Gln、Glu、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr和Val组成的组，各自独立地呈L或D异构体。更具体说来，与-NH-CR^1R^2-S-L_1-D连接的氨基酸为L氨基酸。

[0850] 在某些实施方案中，A是含有2至5个氨基酸残基的肽，并且剩余变量是如第二十五特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，A是选自由Gly-Gly-Gly、Ala-Val、Val-Ala、D-Val-Ala、Val-Cit、D-Val-Cit、Val-Lys、Phe-Lys、Lys-Lys、Ala-Lys、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Phe-Ala、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg、Phe-N^9-硝基-Arg、Phe-Phe-Lys、D-Phe-Phe-Lys、Gly-Phe-Lys、Leu-Ala-Leu、Ile-Ala-Leu、Val-Ala-Val、Ala-Ala-Ala、D-Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala-D-Ala、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:55)、β-Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:56)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:57)、Val-Arg、Arg-Arg、Val-D-Cit、Val-D-Lys、Val-D-Arg、D-Val-Cit、D-Val-Lys、D-Val-Arg、D-Val-D-Cit、D-Val-D-Lys、D-Val-D-Arg、D-Arg-D-Arg、Ala-Ala、Ala-D-Ala、D-Ala-Ala、D-Ala-D-Ala、Ala-Met、Gln-Val、Asn-Ala、Gln-Phe、Gln-Ala、D-Ala-Pro和D-Ala-tBu-Gly组成的组，其中各肽中的第一个氨基酸连接至L_2基团并且各肽中的最后一个氨基酸连接至-NH-CR^1R^2-S-L_1-D。甚至更具体说来，A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly。

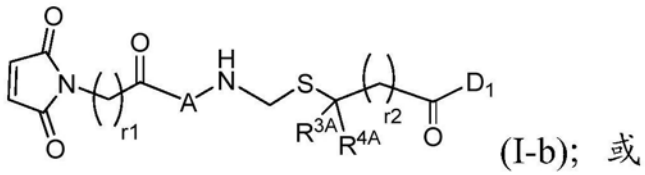
[0851] 在第二十六特定实施方案中，关于式(I-a)，D为类美登素并且剩余变量是如第二十二、第二十三、第二十四或第二十五特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。更具体说来，D是由下式表示：

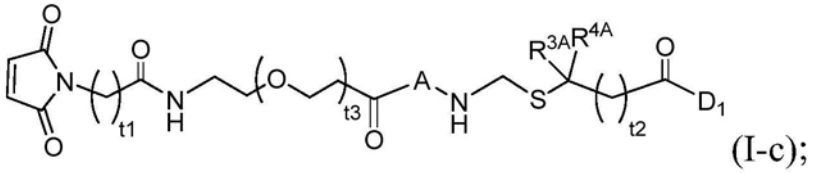
[0852] 。

[0853] 甚至更具体说来，D是由下式表示：

[0854] 。

[0855] 在第二十七特定实施方案中，本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示：


(I-b)；或

[0856] 
(I-c)；

[0857] 其中：

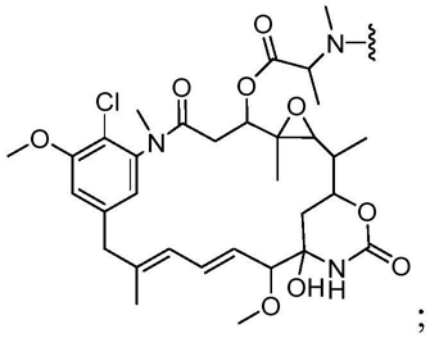
[0858] R^{3A}和R^{4A}各自独立地为H或Me；

[0859] r1和t1各自独立地为整数1至6；

[0860] r2和t2各自独立地为整数1至7；

[0861] t3为整数1至12；

[0862] D_1是由下式表示：

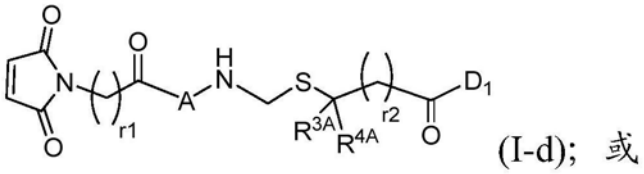
[0863] ;

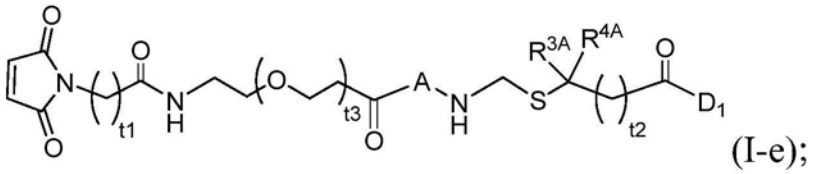
[0864] 并且剩余变量是如第二十五或第二十六特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0865] 在某些实施方案中,A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly,并且剩余变量是如第二十八特定实施方案所述。

[0866] 在某些实施方案中,r1为整数2至4;并且r2为整数3至5,并且剩余变量是如第二十七特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

[0867] 在第二十八特定实施方案中,本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式表示:

[0868] (I-d); 或

(I-e);

[0869] 其中:

[0870] r1和t1各自为整数2至6;

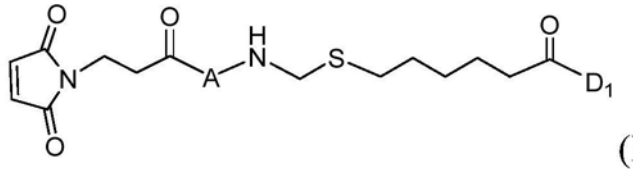
[0871] r2和t2各自为整数2至5;并且

[0872] t3为整数2至12;并且剩余变量是如第二十七特定实施方案或其中所述的任何实施方案所述。

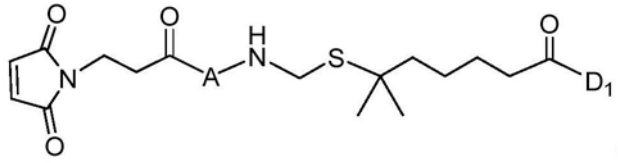
[0873] 在某些实施方案中,R^{3A}和R^{4A}均为Me,并且剩余变量是如第二十八特定实施方案所述。

[0874] 在某些实施方案中,R^{3A}和R^{4A}均为H,并且剩余变量是如第二十八特定实施方案所述。

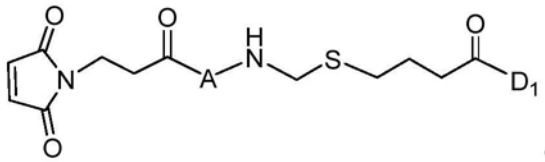
[0875] 在第二十九特定实施方案中,本文所述的方法(例如,第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式或其药学上可接受的盐表示:



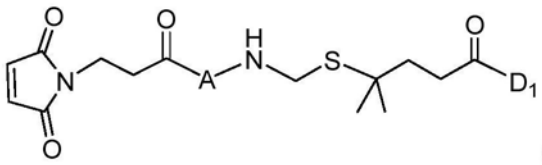
(I-f);



(I-g);

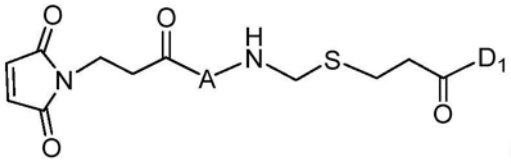


(I-h);

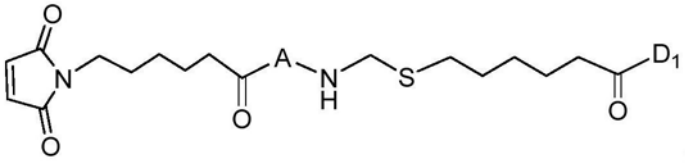


(I-i);

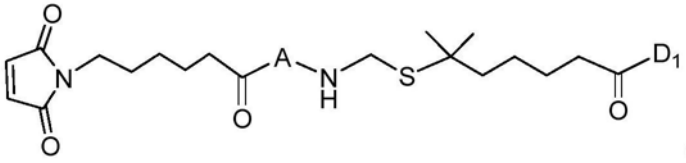
[0876]



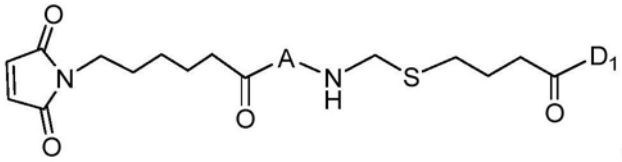
(I-j);



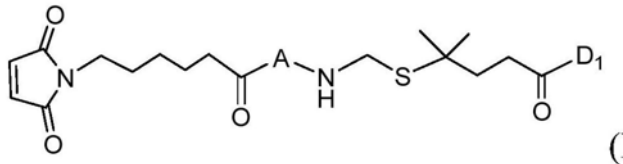
(I-k);



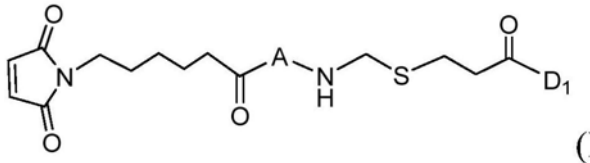
(I-l);



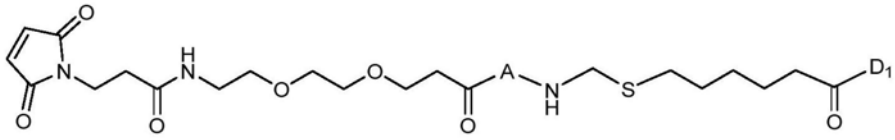
(I-m);



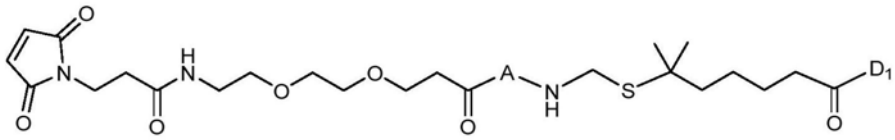
(I-n);



(I-o);

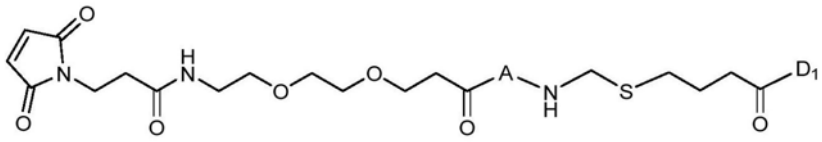


(I-p);

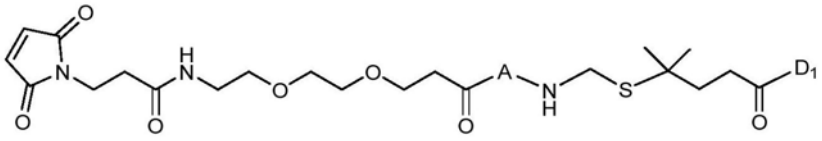


(I-q);

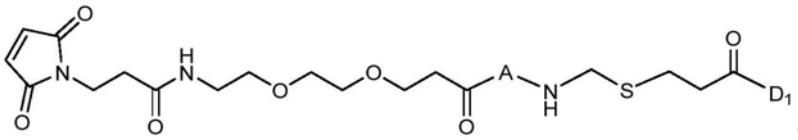
[0877]



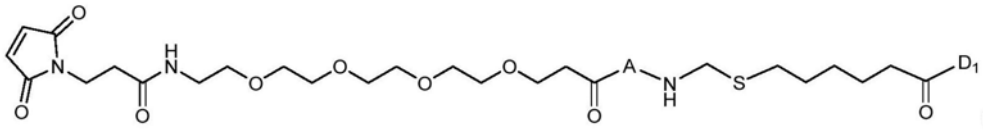
(I-r);



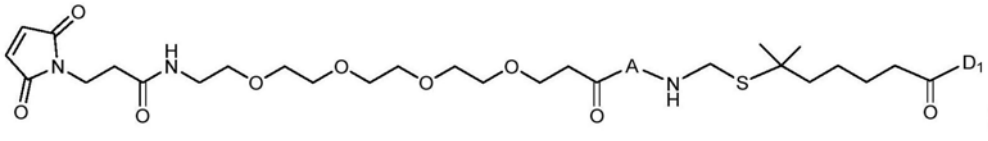
(I-s);



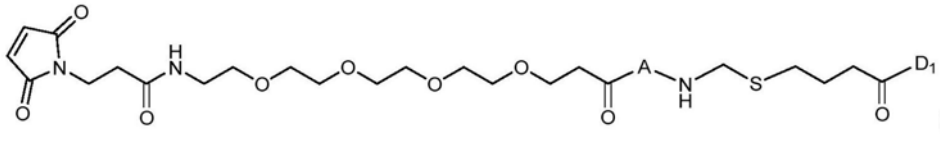
(I-t);



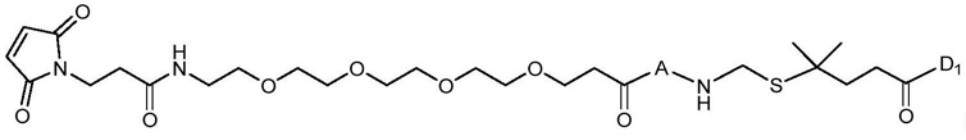
(I-u);



(I-v);

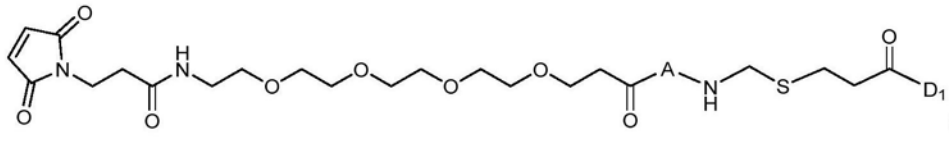


(I-w);



(I-x); 或

[0878]

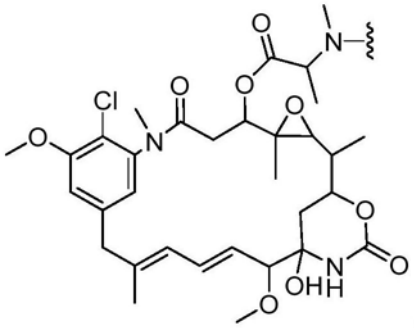


(I-y);

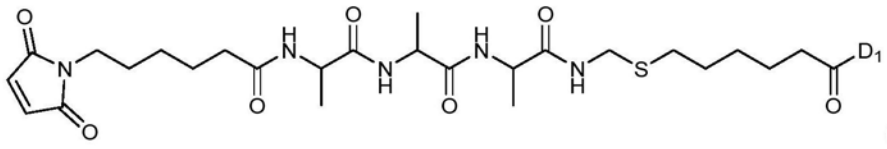
[0879] 其中：

[0880] A为Ala-Ala-Ala、Ala-D-Ala-Ala、Ala-Ala、D-Ala-Ala、Val-Ala、D-Val-Ala、D-Ala-Pro或D-Ala-tBu-Gly;并且

[0881] D_1是由下式表示：

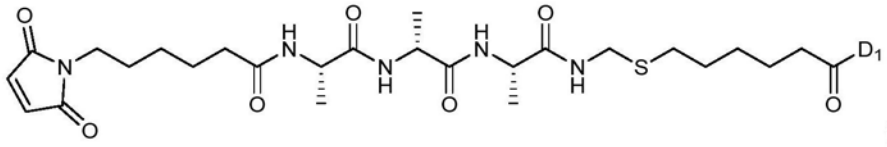
[0882] 

[0883] 在第三十特定实施方案中，本文所述的方法(例如，第一、第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十实施方案或其中所述的任何实施方案的方法)中的式(I)化合物是由下式表示：

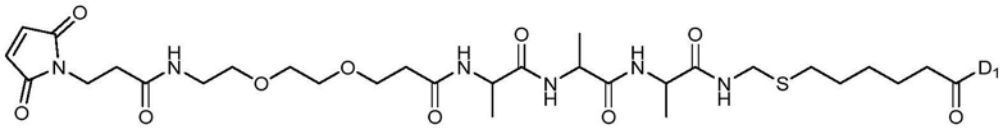


(I10);

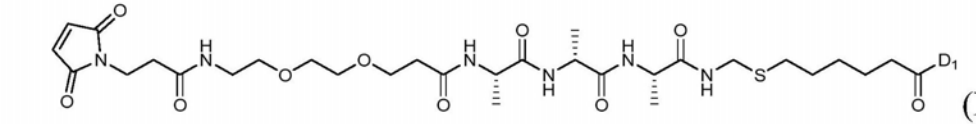
[0884]

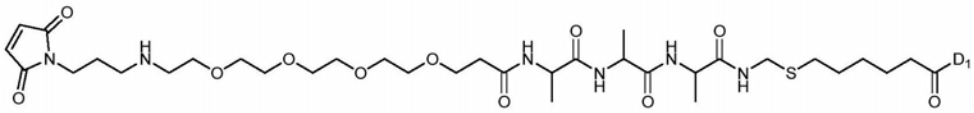


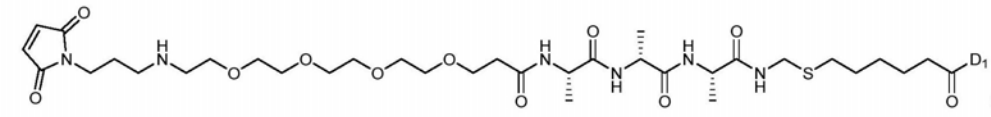
(I11);



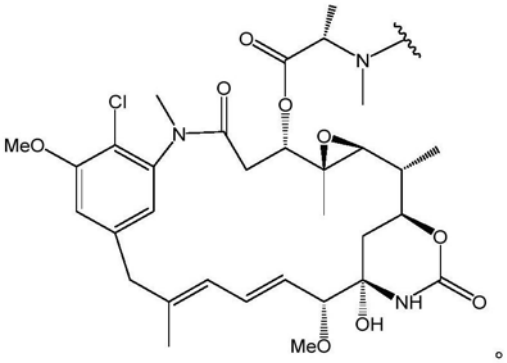
(I12);


(I13);

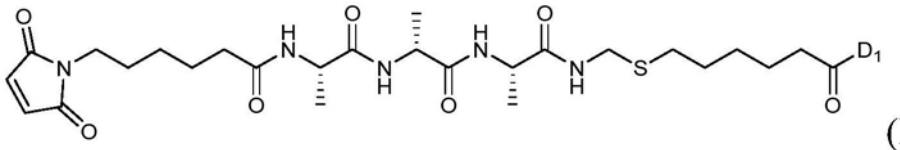
[0885] 
(I14); 或


(I15),

[0886] 其中D_1是由下式表示：

[0887] 
。

[0888] 在某些实施方案中，式(I)化合物是由式(I11)表示：

[0889] 
(I11)。

[0890] 式(I11)化合物还称作DM21-C或Mal-LDL-DM或MalC5-LDL-DM。

[0891] 在某些实施方案中，关于上文所述的式(I)化合物，所述药学上可接受的盐为钠盐或钾盐。在某些实施方案中，关于上文所述的式(I)化合物，所述药学上可接受的盐为钠盐。

[0892] 5.免疫缀合物、药物组合物和使用方法

[0893] 本发明还提供通过本发明方法制备的本文所述的缀合物。还提供包含本文所述的缀合物的药物组合物。

[0894] 本文所述的药物组合物可以多种方式施用以用于局部或全身性治疗。施用可以是表面(诸如至粘膜，包括阴道和直肠递送)，诸如经皮贴片、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂；肺(例如通过粉剂或气雾剂的吸入或吹入，包括通过喷雾器；气管内、鼻内、表皮和经皮)；口服；或肠胃外，包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内或肌肉内注射或输注；或颅内(例如鞘内或室内)施用。在一些特定实施方案中，所述施用为静脉内。本文所述的药物组合物也可在体外或离体使用。

[0895] 本发明包括一种抑制哺乳动物(例如人类)的异常细胞生长或治疗增生性病症的方法，其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的本发明的免疫缀合物或药物组合物。

[0896] 在某些实施方案中，哺乳动物的异常细胞生长或增生性病症为癌症，包括血液癌症、白血病或淋巴瘤。在某些实施方案中，所述增生性病症为淋巴器官的癌症，或血液恶性

肿瘤。

[0897] 例如,所述癌症可选自由以下组成的组:急性骨髓白血病(AML,包括CD33低AML、P-糖蛋白阳性AML、复发性AML或难治性AML)、慢性骨髓性白血病(CML)(包括CML的母细胞危象和与CML相关的Abelson致癌基因(Bcr-ABL易位))、骨髓发育不良综合征(MDS)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)(包括但不限于急性B淋巴母细胞性白血病或B细胞急性淋巴母细胞性白血病(B-ALL))、慢性淋巴球性白血病(CLL)(包括Richter氏综合征或Richter氏CLL转化)、毛细胞白血病(HCL)、急性早幼粒细胞性白血病(APL)、B细胞慢性淋巴增生性疾病(B-CLPD)、非典型慢性淋巴球性白血病(优选地具有经标记CD11c表达)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、母细胞性浆细胞样树突状细胞赘瘤(BPDCN)、非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括套细胞白血病(MCL)和小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、霍奇金氏淋巴瘤、全身性肥大细胞增生症和伯基特氏淋巴瘤。

[0898] 在某些实施方案中,所述癌症具有至少一种阴性预后因子,例如P-糖蛋白的过表达、EVI1的过表达、p53变化、DNMT3A突变、FLT3内部串联重复。

[0899] 在某些实施方案中,所述癌症可选自由肺癌(例如非小细胞肺癌)、结肠直肠癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺癌、食管癌、乳腺癌、头颈部癌、子宫癌、卵巢癌、肝癌、子宫颈癌、甲状腺癌、睾丸癌、骨髓癌、黑素瘤和淋巴癌组成的组。在某些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌、结肠直肠癌、胃癌、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌(TNBC))或胰腺癌。在其他实施方案中,本发明的免疫缀合物可用于治疗非小细胞肺癌(鳞状细胞癌、非鳞状细胞癌、腺癌或大细胞未分化癌)、结肠直肠癌(腺癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠基质肿瘤、原发性结肠直肠淋巴瘤、平滑肌肉瘤或鳞状细胞癌)或乳腺癌(例如三阴性乳腺癌(TNBC))

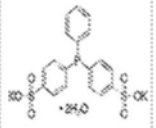
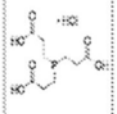
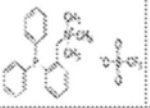
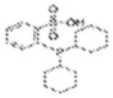
[0900] 实施例1.还原剂筛选和抗体预加工

[0901] 还原剂筛选

[0902] 多种还原剂针对还原含有位点特异性缀合位点的抗CD123抗体中的工程改造的半胱氨酸的能力进行筛选。关于所有反应,将抗体于20mM组氨酸(pH 6.0)中的50mg/mL储备溶液稀释至磷酸钾pH 6.0缓冲液中以实现50mM的最终磷酸钾浓度。所需体积的DMA和溶解于DMA中的适当膦储备液随后添加至反应溶液中以实现2.0mg/mL抗体浓度、10%(v/v)DMA和相对于所述抗体的指示数目的当量的膦(mol:mol)。随后使反应混合物在25℃下反应持续4h。在所述还原反应完成时,使用Alexa Fluor 488顺丁烯二酰亚胺于DMA中的10mM储备液将相对于所述抗体40(mol:mol)当量的Alexa Fluor 488-顺丁烯二酰亚胺引入至反应中。在25℃下孵育过夜之后,通过SEC色谱使用所述抗体在280nm下的已知消光系数和AF488-mal在280nm和493nm下的已知消光系数来测定标记的程度。结果在下表A中示出。

[0903] 表A

[0904]

膦当量	双（对磺酸根苯基）苯基膦二水合物 	2-（二苯基膦基）苯磺酸 	2-（二苯基膦基）苯甲酸 	TCEP 	2-（二苯基膦基乙胺 	三氟甲磺酸2-（二苯基膦基）-N，N，N-三甲基苯甲基铵 	2-（二环已基膦基）苯磺酸 
0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0 .5
2	0.835	0.78	2.08	2.41	1.97	0.514	0.69
3	0.845	0.74	2.605	3.36	2.14	0.48	0.86
5	0.88	N/A	4.5	3.94	2.62	0.51	0.63
10	1.02	0.65	7.1	7.24	5.16	0.633	0.05

[0905] 来自这些数据的结果指示膦2-(二苯基膦基)苯甲酸、TCEP和2-(二苯基膦基)乙胺能够还原所述抗体的二硫化物，从而使其可用于后续经AF488顺丁烯二酰亚胺标记。

[0906] 在一个独立实验中，两种特定膦针对其还原含有位点特异性缀合位点的抗CD123抗体中的工程改造的半胱氨酸的能力进行筛选。首先将所述抗体稀释至50mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0)中。向这一溶液中添加相对于所述抗体适当数目的当量(mol:mol)的所指示还原剂和DMA以实现5mg/mL的最终抗体浓度和5％(v/v)DMA。使这一混合物在25℃下反应持续4h。在这个步骤完成时，取出所述还原抗体的等分试样，用pH 6.0磷酸钾缓冲液稀释并且使其与20mol:mol当量的AF488-mal对抗体在2.5mg/mL抗体和10％(v/v)DMA下反应。在使所述混合物在25℃下反应持续18h之后，通过SEC在280nm和493nm下监测标记的程度。所述还原溶液的剩余部分也用维持50mM缓冲液浓度的pH 6.0磷酸钾缓冲液稀释。DMA和DHAA(作为DMA储备溶液)在1.5:1的DHAA:还原剂摩尔比率下接着添加至所述溶液中。所述再氧化反应混合物的最终组成为2.5mg/mL抗体，具有所指示数目的DHAA当量，和5％(v/v)DMA。在25℃下孵育这一溶液持续18h之后，建立缀合反应。所述反应混合物用维持50mM缓冲液浓度的pH 6.0磷酸钾稀释。向这一溶液中添加DMA和相对于所述抗体10摩尔当量的AF488-mal。所述缀合反应混合物的最终组成为2.0mg/mL抗体、10摩尔当量的AF488-mal和10％(v/v)DMA。使这一反应混合物在25℃下反应持续18h。在所述反应完成时，通过SEC色谱使用所述抗体在280nm下的已知消光系数和AF488-mal在280nm和493nm下的已知消光系数来测定用AF488-mal标记的程度。这项研究的结果在下表B中示出。

[0907] 表B

[0908]

	2-(二苯基膦基)乙胺		3-(二苯基膦基)丙胺	
当量数	还原DAR（20当量Alexa）	缀合后DAR(1.5倍DHAA;5当量Alexa)	还原DAR（20当量Alexa）	缀合后DAR(1.5倍DHAA;5当量Alexa)
5	3.25	0.93	6.82	1.62
10	5.96	1.49	9.38	2.26
16/15	7.17	1.88	9.49	2.39

[0909] 这些研究指示2-(二苯基膦基)乙胺和3-(二苯基膦基)丙胺均为能够还原所述抗体的原生链间二硫化物和工程改造的半胱氨酸二硫化物的有效还原剂。另外，在一锅反应

中使用过量DHAA进行再氧化时，可获得预期的DAR 2缀合物。

[0910] 在一个独立实验中，通过在pH 7.5下使用膦和非膦还原剂进行还原来测试所述过程。首先将抗CD123抗体稀释至50mM磷酸钾缓冲液(pH 7.5)中。向这一溶液中添加相对于所述抗体适当数目的当量(mol:mol)的所指示还原剂和DMA以实现5mg/mL的最终抗体浓度和5％(v/v)DMA。使这一混合物在25℃下反应持续4h。在这个步骤完成时，进一步用维持50mM缓冲液浓度的pH 7.5磷酸钾缓冲液稀释所述反应溶液。DMA和DHAA(作为DMA储备溶液)在1.5:1的DHAA:还原剂摩尔比率下接着添加至所述溶液中。所述再氧化反应混合物的最终组成为2.5mg/mL抗体、所指示数目的DHAA当量和5％(v/v)DMA。在25℃下孵育这一溶液持续18h之后，建立缀合反应。通过用维持50mM缓冲液浓度的pH 6.0磷酸钾稀释来降低反应混合物pH。向这一溶液中添加DMA和相对于所述抗体10摩尔当量的AF488-mal。所述缀合反应混合物的最终组成为2.0mg/mL抗体、10摩尔当量的AF488-mal和10％(v/v)DMA。使这一反应混合物在25℃下反应持续18h。在所述反应完成时，通过SEC色谱使用所述抗体在280nm下的已知消光系数和AF488-mal在280nm和493nm下的已知消光系数来测定用AF488-mal标记的程度。这项研究的结果在下表C中示出。

[0911] 表C

[0912]

反应	还原剂	DTT(相对于Ab的当量数)	DHAA(相对于DTT的当量数)	AF488-mal(相对于Ab的当量数)	AF488标记/Ab
1	DTT	5	1.5	10	1.3
2	DTT	10	1.5	10	1.6
3	DTT	20	1.5	10	1.4
4	TCEP	10	1.5	10	1.7
5	TCEP	15	1.5	10	1.8
6	TCEP	20	1.5	10	2.0
7	2-(二苯基膦基)乙胺	5	1.5	10	1.3
8	2-(二苯基膦基)乙胺	10	1.5	10	1.7
9	2-(二苯基膦基)乙胺	15	1.5	10	1.8
10	3-(二苯基膦基)丙胺	5	1.5	10	2.0
11	3-(二苯基膦基)丙胺	10	1.5	10	1.6
12	3-(二苯基膦基)丙胺	15	1.5	10	2.1

[0913] 氧化剂和还原剂浓度和对DAR的影响

[0914] 检测DHAA:2-二苯基膦基乙胺的比率对DAR的影响。首先将抗CD123抗体稀释至50mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0)中。向这一溶液中添加相对于所述抗体适当数目的当量(mol:mol)的2-(二苯基膦基)乙胺和DMA以实现5mg/mL的最终抗体浓度和5％(v/v)DMA。使这一混合物在25℃下反应持续4h。在这个步骤完成时，取出所述还原抗体的等分试样，用pH 6.0磷酸钾缓冲液稀释并且使其与20mol:mol当量的AF488-mal对抗体在2.5mg/mL抗体和10％(v/v)DMA下反应。在使所述混合物在25℃下反应持续18h之后，通过SEC在280nm和493nm下监测标记的程度。所述还原溶液的剩余部分也用维持50mM缓冲液浓度的pH 6.0磷酸钾缓冲液稀

释。DMA和DHAA(作为DMA储备溶液)在所指示的DHAA:还原剂摩尔比率下接着添加至所述溶液中。所述再氧化反应混合物的最终组成为2.5mg/mL抗体,具有所指示数目的DHAA当量,和5%(v/v)DMA。在25℃下孵育这一溶液持续18h之后,建立缀合反应。用维持50mM缓冲液浓度的pH 6.0磷酸钾稀释所述反应混合物。向这一溶液中添加DMA和相对于所述抗体10摩尔当量的AF488-mal。所述缀合反应混合物的最终组成为2.0mg/mL抗体、10摩尔当量的AF488-mal和10%(v/v)DMA。使这一反应混合物在25℃下反应持续18h。在所述反应完成时,通过SEC色谱使用所述抗体在280nm下的已知消光系数和AF488-mal在280nm和493nm下的已知消光系数来测定用AF488-mal标记的程度。这项研究的结果在下表D和图1中示出。

[0915] 表D

[0916]

2-二苯基膦基乙胺之当量	DAR(还原后;20当量AF488-Mal)
0	0.53
5	3.25
6	4.19
8	5.51
10	5.96
12	6.44
16	7.17

[0917] 这些数据指示使用2-(二苯基膦基)乙胺发生有效缀合。具体说来,当膦的当量增加时,观察到较高程度的AF-488标记。另外,在1.0-2.0mol:mol过量的DHAA:膦中,未观察到AF-488标记的显著差异,指示所述抗体的原生链间二硫键的完全再氧化。

[0918] 抗体浓度研究

[0919] 使用一锅缀合方法评估高抗体浓度对DAR的影响。首先将抗ADAM9抗体稀释至50mM磷酸钾缓冲液(pH 6.0)中。向这一溶液中添加相对于所述抗体25当量(mol:mol)的所指示的膦和DMA以实现10mg/mL的最终抗体浓度和5%(v/v)DMA。使这一混合物在25℃下反应持续4h。在这个步骤完成时,取出所述还原抗体的等分试样,用pH 6.0磷酸钾缓冲液稀释并且使其与25mol:mol当量的AF488-mal对抗体在4.0或7.5mg/mL抗体(分别针对低和高浓度反应)和10%(v/v)DMA下反应。在使所述混合物在25℃下反应持续4h之后,通过SEC在280nm和493nm下监测标记的程度。所述还原溶液的剩余部分也用维持50mM缓冲液浓度的pH 6.0磷酸钾缓冲液稀释。DMA和DHAA(作为DMA储备溶液)在1:1的DHAA:还原剂摩尔比率下接着添加至所述溶液中。所述再氧化反应混合物的最终组成为如所指示的4或7.5mg/mL抗体,相对于抗体具有25mol:mol当量DHAA,和7.5%(v/v)DMA。在25℃下孵育这一溶液持续18h之后,建立缀合反应。用维持50mM缓冲液浓度的pH 6.0磷酸钾稀释所述反应混合物。向这一溶液中添加DMA和相对于所述抗体5摩尔当量的AF488-mal。所述缀合反应混合物的最终组成为分别针对低和高浓度反应的3.5或7mg/mL抗体、5摩尔当量的AF488-mal和10%(v/v)DMA。使这

一反应混合物在25℃下反应持续18h。在所述反应完成时，通过SEC色谱使用所述抗体在280nm下的已知消光系数和AF488-mal在280nm和493nm下的已知消光系数来测定用AF488-mal标记的程度。这项研究的结果在下表E中示出。

[0920] 表E

[0921]

反应	膦	还原浓度 (mg/mL)	再氧化浓度 (mg/mL)	缀合浓度 (mg/mL)	还原反应之后的 AF488-mal 标记	最终缀合物的 AF488-mal 标记
1	TCEP	10	4	3.5	8.45	1.53
2	三(羟基丙基)膦	10	4	3.5	9.72	1.88
3	三(羟基丙基)膦	10	7.5	7	9.63	1.97
4	2-(二苯基膦基)乙胺	10	4	3.5	8.76	1.93
5	2-(二苯基膦基)乙胺	10	7.5	7	8.67	1.85
6	3-(二苯基膦基)丙胺	10	4	3.5	9.37	1.94
7	3-(二苯基膦基)丙胺	10	7.5	7	8.98	2.15
8	双(3-氨基丙基)苯基膦	10	4	3.5	9.51	1.91
9	双(3-氨基丙基)苯基膦	10	7.5	7	8.28	2.05

[0922] 在低或高浓度下用不同的膦进行还原、再氧化和缀合之后，所有反应均显示逼近2.0个标记/抗体的目标的AF488-mal标记。

[0923] 时间和温度对TCEP还原的影响

[0924] 使用一锅缀合方法检测时间和温度对TCEP还原的影响。在10mg/mL抗ADAM9抗体浓度下在具有5％DMA的pH 6.0 25mM丁二酸盐中执行还原反应。用25mol:mol当量的TCEP建立反应并且在25℃、30℃或35℃下执行2、4、6、8或20小时。在7mg/mL抗体浓度下在具有8％DMA的pH 6.025mM丁二酸盐中执行再氧化反应。用相对于TCEP 1.5倍过量的DHAA建立反应并且在25℃下执行16-20小时。再氧化的抗体直接用于建立具有AF488-mal有效载荷的缀合反应。在5mg/mL抗体浓度下在具有10％DMA的pH 6.0 25mM丁二酸盐中执行这些缀合反应。用5.0mol:mol当量的AF488-mal建立反应并且在25℃下执行16-20h。在各AF488-mal反应结束时，经由SEC分析样品的单体和AF488-mal标记的程度。通过使用所述抗体在280nm下的已知消光系数和AF488-mal在280nm和493nm下的已知消光系数来测定用AF488-mal标记的程度。这些反应的细节在表F和图2和图3中示出。

[0925] 表F

[0926]

样品	还原时间 (h)	还原温度 (C)	单体%	SEC DAR
1	2	25	96.30	1.53
2	4	25	97.44	1.86
3	6	25	97.74	1.92
4	8	25	98.20	2.05
5	20	25	97.13	2.28
6	2	30	97.32	1.75
7	4	30	98.17	2.01
8	6	30	98.41	2.13
9	8	30	98.46	2.19
10	20	30	93.36	2.34
11	2	35	97.79	1.97
12	4	35	98.45	2.18
13	6	35	94.81	2.24
14	8	35	93.51	2.29
15	20	35	85.99	2.42

[0927] 这项研究证明了TCEP还原反应时间和温度对最终缀合物标记程度具有影响，其中最短反应时间转化成用AF488-mal标记的较低程度。在升高温度下观察到对缀合物稳定性的另外的影响，其中发现所述缀合物的单体%随时间降低。

[0928] TCEP当量筛选

[0929] 使用一锅缀合方法和抗ADAM9抗体检测TCEP浓度对半胱氨酸还原的影响。在10mg/mL抗体浓度下在具有5%DMA的pH 6.0 25mM丁二酸盐中执行还原反应。用相对于所述抗体8、10、15、20或25当量的TCEP建立这些还原反应并且在25℃下执行8小时。在7mg/mL抗体浓度下在具有8%DMA的pH 6.0 25mM丁二酸盐中在相对于TCEP 1.5倍过量的DHAA存在下执行再氧化反应并且在25℃下执行16-20小时。再氧化的抗体反应混合物直接用于建立具有AF-488Mal标记的缀合反应。在5mg/mL抗体浓度下在具有10%DMA的pH 6.0 25mM丁二酸盐中执行这些缀合反应。用相对于所述抗体5摩尔当量的AF-488Mal建立反应并且在25℃下执行16-20h。在所述反应完成时，通过SEC色谱使用所述抗体在280nm下的已知消光系数和AF488-mal在280nm和493nm下的已知消光系数来测定用AF488-mal标记的程度。这项研究的结果在下表G和图4中示出。

[0930] 表G

[0931]

样品	TCEP当量	还原时间(h)	SEC DAR
1	8	8	1.62
2	10	8	1.73
3	15	8	1.91
4	20	8	1.95
5	25	8	2.03

[0932] 这些数据指示最终缀合物有效载荷负载取决于摩尔过量的膦。在pH 6.0下使用TCEP,需要15或更大当量的还原剂来实现大于1.9的标记程度。

[0933] 实施例2:使用TCEP和3-(二苯基膦基)丙胺(DPPA)的一锅缀合过程的比较

[0934] 设计这些实验以确认和比较以25mg Ab规模使用抗ADAM9抗体进行的pH 7.5TCEP还原和pH 6.0DPPA还原的功效。

[0935] 关于TCEP一锅过程,在12mg/mL抗体浓度下在具有5%DMA的pH 7.550mM KPi中执行还原反应。用相对于抗体27摩尔当量的TCEP建立所述反应并且在25℃下执行4小时。使用这一还原抗体来建立再氧化反应,所述再氧化反应在10mg/mL抗体浓度下在具有7.5%DMA的pH 7.5 50mM KPi中执行。用1:1摩尔比率的DHAA:TCEP建立所述再氧化反应并且在25℃下执行4小时。再氧化的抗体在缀合之前用1M乙酸调节pH至6.0。在8mg/mL抗体浓度下在具有15%DMA的pH 6.0 50mM KPi中执行缀合反应。用相对于抗体5.4摩尔当量的DM21-C建立所述缀合反应并且在25℃下执行8-12小时。

[0936] 关于DPPA一锅过程,在12mg/mL抗体浓度下在具有5%DMA的pH 6.025mM丁二酸盐中在相对于抗体16摩尔当量的DPPA存在下执行还原反应并且在25℃下执行4小时。使用这一还原抗体来建立再氧化反应,所述再氧化反应在10mg/mL抗体浓度下在具有7.5%DMA的pH 6.0 25mM丁二酸盐中执行。用1:1摩尔比率的DHAA:DPPA建立所述再氧化反应并且在25℃下执行13小时。在8mg/mL抗体浓度下在具有15%DMA的pH 6.0 25mM丁二酸盐中执行缀合反应。用相对于抗体5.4摩尔当量的DM21-C建立所述缀合反应并且在25℃下执行8-12小时。经由SEC分析粗缀合物的单体和DAR。使用TCEP和DPPA的一锅缀合过程的结果详述于表H中。

[0937] 表H

[0938]

样品	还原剂	还原pH	再氧化pH	缀合pH	膦当量	单体%	SEC DAR
1	TCEP	7.5	7.5	6	27.17	98.0	1.82
2	DPPA	6	6	6	16.30	97.7	1.98

[0939] 这一数据支持先前反应集合的发现,从而确认在pH 6.0DPPA还原下的缀合导致高于提供pH 7.5TCEP还原的缀合的DAR值。这两种还原条件下的单体水平可相当,其中pH 7.5TCEP还原产生高0.3%的单体水平。

[0940] 实施例3:针对使用TCEP作为还原剂的一锅过程的还原反应pH筛选

[0941] 设计这一实验以针对使用作为还原剂的TCEP、抗ADAM9抗体和DM21-C有效载荷的一锅过程筛选还原反应pH。

[0942] 用适当pH 200mM磷酸钾缓冲液稀释引入的抗ADAM9抗体溶液(含25mg/mL抗体的10mM乙酸钠,pH 5.0,9%蔗糖)以制备具有50mM的最终磷酸钾浓度的不同pH抗体储备溶液,所述储备溶液为pH 7.0、8.0和8.5。随后使用这些抗体溶液来建立相应pH还原反应。在10mg/mL抗体浓度下在pH 7.0、8.0或8.5的50mM磷酸钾和5%DMA中执行还原反应。用相对于抗体27摩尔当量的TCEP建立反应并且在25℃下执行4小时。还原抗体溶液使用1M乙酸调节pH至6.0并且接着未纯化即用于建立再氧化反应,所述再氧化反应在9mg/mL抗体浓度下在具有8%DMA的pH 6.0 50mM磷酸钾中执行。用相对于TCEP 1.5倍摩尔过量的DHAA建立反应并且在25℃下执行12-16小时。再氧化的抗体接着直接用于建立缀合反应,所述缀合反应在

8mg/mL抗体浓度下在含有15％DMA的pH 6.0 50mM磷酸钾中执行。用5.4当量的DM21-C建立反应并且在25℃下执行8小时。经由SEC分析粗缀合物的单体％和DAR。

[0943] 这一实验的结果在下表I中示出。具体说来，这些结果指示将还原反应pH从7.0增加至8.5不会显著地影响最终缀合物。

[0944] 表I

[0945]

反应	还原 pH	再氧化 pH	缀合 pH	单体%	SEC DAR
1	7.0	6.0	6.0	97.39	1.81
2	8.0	6.0	6.0	96.42	1.76
3	8.5	6.0	6.0	96.00	1.78

[0946] 实施例4:关于抗ADAM9药物缀合物的缀合的一锅缀合过程开发

[0947] 在pH 5.0下而无pH调节的一锅过程

[0948] 设计这一实验以确定在含有9％蔗糖的pH 5.0 10mM乙酸盐缓冲液中的25mg/mL抗ADAM9抗体是否适用于一锅过程中在pH 5.0下而无pH调节的直接缀合。

[0949] 在12mg/mL抗体浓度下在具有5％DMA的pH 5 10mM乙酸盐+9％蔗糖中执行还原反应。用相对于所述抗体所指示的摩尔过量的DPPA建立反应并且在25℃下执行10小时。还原抗体未纯化即用于建立再氧化反应，所述再氧化反应在10mg/mL下在含有7.5％DMA的pH 5.0 10mM乙酸盐+9％蔗糖中执行。用1:1摩尔比率的DHAA:DPPA膦建立反应并且在25℃下执行12小时。再氧化的抗体未纯化即用于建立使用DM21-C的缀合反应。在8mg/mL抗体浓度下在含有15％DMA的pH 5 10mM乙酸盐+9％蔗糖中执行这些缀合反应。用5.4当量的DM21-C建立反应并且在25℃下执行12h。在缀合反应结束时，经由SEC分析样品的单体％和DAR。

[0950] 这一实验的结果在下表J中示出。具体说来，这些结果指示DPPA可在一锅过程中在pH 5.0下用作还原剂以制备DAR 2缀合物。

[0951] 表J

[0952]

反应	还原剂	DPPA当量	单体%	SEC DAR
1	DPPA	11	98.12	2.11
2	DPPA	16	97.54	2.07
3	DPPA	22	97.05	2.17
4	DPPA	27	95.72	2.26

[0953] 针对使用DPPA的一锅过程的反应温度筛选

[0954] 设计这一实验以针对使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DM21-C有效载荷的一锅过程筛选反应温度。

[0955] 关于所有反应，将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠，pH 5.0，具有9％蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成50mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.1mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5％的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应在所指示的温度下继续进行4h。所述反应温度维持于所指示的值下，持续所述一锅过程的持续时间。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在3.7mg/mL的最终抗体浓度、相对于

DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7％的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。使再氧化反应继续进行8h，随后起始缀合反应。在用另外的50mM pH 6.5磷酸钾稀释之后，向再氧化的抗体溶液中添加相对于在2.8mg/mL浓度下的抗体5.4摩尔当量的DM21-C。在15％的最终DMA浓度下反应持续8h之后，经由SEC分析粗反应混合物的单体％和DAR。这些实验的结果在下表K中示出。基于这些数据，发现所述一锅过程中在18°与27℃之间的温度不会对DAR和单体％具有影响。

[0956] 表K

[0957]

反应	温度(C)	DAR(SEC)	单体％
1	27	1.97	98.46
2	25	1.96	98.47
3	23	1.98	98.46
4	21	2.00	98.45
5	22	2.04	98.52
6	20	2.01	98.44
7	18	2.02	98.56

[0958] 针对使用DPPA的一锅过程的pH筛选

[0959] 设计这一实验以在25℃下针对使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DM21-C有效载荷的一锅过程筛选反应pH。

[0960] 关于所有反应，将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠，pH 5.0，具有9％蔗糖)稀释至所指示的pH磷酸钾缓冲液中以生成50mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.1mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5％的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行4h。所述反应pH维持于所指示的值下，持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在3.7mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7％的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。适当pH的磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行8h，随后起始缀合反应。在用另外的50mM适当pH的磷酸钾缓冲液稀释之后，向再氧化的抗体溶液中添加相对于在2.8mg/mL浓度下的抗体5.4摩尔当量的DM21-C。在15％的最终DMA浓度下反应持续8h之后，经由SEC分析粗反应混合物的单体％和DAR。这些实验的结果在下表L中示出。

[0961] 表L

[0962]

反应	pH	DAR(SEC)	单体％
1	6.6	1.98	98.43
2	6.5	1.96	98.47
3	6.4	1.99	98.47
4	6.3	1.99	98.53

[0963] 针对使用DPPA的一锅过程的膦浓度筛选

[0964] 设计这一实验以在25℃下在使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DM21-C有效载荷的一锅过程中筛选膦的量。

[0965] 关于所有反应，将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠，pH 5.0，

具有9％蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成50mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.1mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体所指示数目的摩尔当量的DPPA膦添加至具有5％的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行4h,并且反应pH维持于6.5下,持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在3.7mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7％的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行8h,随后起始缀合反应。在用另外的50mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后,向再氧化的抗体溶液中添加相对于在2.8mg/mL浓度下的抗体5.4摩尔当量的DM21-C。在15％的最终DMA浓度下反应持续8h之后,经由SEC分析粗反应混合物的单体％和DAR。这些实验的结果在下表M中示出。

[0966] 表M

[0967]

反应	DPPA当量	DAR(SEC)	单体％
1	19	2.03	98.44
2	16	1.96	98.47
3	14	1.95	98.43

[0968] 针对使用DPPA的一锅过程的DHAA氧化剂浓度筛选

[0969] 设计这一实验以在25℃下在使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DM21-C有效载荷的一锅过程中筛选DHAA氧化剂的量。

[0970] 关于所有反应,将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠,pH 5.0,具有9％蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成50mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.1mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5％的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行4h,并且反应pH维持于6.5下,持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在3.7mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA所指示倍数的摩尔过量的DHAA氧化剂和7％的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行8h,随后起始缀合反应。在用另外的50mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后,向再氧化的抗体溶液中添加相对于在2.8mg/mL浓度下的抗体5.4摩尔当量的DM21-C。在15％的最终DMA浓度下反应持续8h之后,经由SEC分析粗反应混合物的单体％和DAR。这些实验的结果在下表N中示出。

[0971] 表N

[0972]

反应	DHAA 当量(相对于DPPA)	DAR (SEC)	单体%
1	1.7	1.96	98.43
2	1.5	1.96	98.47
3	1.4	1.98	98.43

[0973] 针对使用DPPA的一锅过程的有效载荷浓度筛选

[0974] 设计这一实验以在25℃下在使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体的一锅过程中筛选DM21-C有效载荷的所需量。

[0975] 关于所有反应,将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠,pH 5.0,具有9%蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成50mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.1mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5%的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行4h,并且反应pH维持于6.5下,持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在3.7mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7%的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行8h,随后起始缀合反应。在用另外的50mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后,向再氧化的抗体溶液中添加相对于在2.8mg/mL浓度下的抗体所指示摩尔当量的DM21-C。在15%的最终DMA浓度下反应持续8h之后,经由SEC分析粗反应混合物的单体%和DAR。这些实验的结果在下表O中示出。

[0976] 表O

[0977]

反应	DM21-C 当量 (相对于 Ab)	DAR (SEC)	单体%
1	5.4	1.96	98.47
2	5.2	1.94	98.48
3	5.0	1.93	98.50
4	4.8	1.96	98.45
5	4.6	1.93	98.46
6	4.3	1.93	98.44
7	4.1	1.92	98.40
8	3.9	2.00	98.52
9	3.7	2.01	98.47
10	3.5	2.01	98.44

[0978] 针对使用DPPA的一锅过程的缀合反应时间筛选

[0979] 设计这一实验以在25℃下在使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体的一锅过程中筛选所需缀合反应时间。

[0980] 关于这一反应,将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠,pH 5.0,具有9%蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成50mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这一抗体溶液来建立在4.1mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5%的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行4h,并且反应pH维持于6.5下,持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在3.7mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7%的最终DMA共溶剂浓度下执行这一再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行8h,随后起始缀合反应。在用另外的50mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后,向再氧化的抗体溶液中添加相对于在2.8mg/mL浓度下的抗体5.4摩尔当量的DM21-C。用于缀合反应的最终DMA浓度为15%。通过在25℃下在仪器样品室中保持1.5-10.5h的反应的重复SEC色谱反应来监测反应进展。收集

SEC单体%和缀合物DAR数据并且概述于下表P中。

[0981] 表P

[0982]

反应	缀合时间(h)	DAR(SEC)	单体%
1	1.5	1.86	98.58
2	2.5	1.90	98.56
3	3.5	1.93	98.50
4	4.5	1.91	98.52
5	5.5	1.93	98.51
6	6.5	1.95	98.54
7	7.5	1.97	98.53
8	8.5	1.96	98.50
9	9.5	1.95	98.47
10	10.5	1.94	98.46

[0983] 针对使用DPPA的一锅过程的有机共溶剂条件筛选

[0984] 设计这一实验以在25℃的恒定温度下在使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DHAA氧化剂的一锅过程的最终缀合步骤期间筛选有机共溶剂含量%。

[0985] 关于所有反应,将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠,pH 5.0,具有9%蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成50mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.1mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5%的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行4h,并且反应pH维持于6.5下,持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在3.7mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7%的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行8h,随后起始缀合反应。在用另外的50mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后,向再氧化的抗体溶液中添加相对于在2.8mg/mL浓度下的抗体5.4摩尔当量的DM21-C。在所指示的最终DMA浓度下反应持续8h之后,经由SEC分析粗反应混合物的单体%和DAR。这些实验的结果在下表Q中示出。

[0986] 表Q

[0987]

反应	缀合反应 DMA 含量 (%)	DAR (SEC)	单体%
1	16	1.97	98.44
2	15	1.96	98.47
3	13	1.98	98.48
4	12	1.97	98.47
5	11	1.97	98.47
6	10	1.96	98.46
7	9	1.96	98.46

[0988] 针对使用DPPA的一锅过程的还原反应时间筛选

[0989] 设计这一实验以在23℃的恒定温度下针对使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DHAA氧化剂的一锅过程的还原反应步骤筛选所需时间。

[0990] 关于所有反应，将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠，pH 5.0，具有9％蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成30mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.5mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5％的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行在1h与5h之间的所指示时间，并且反应pH维持于6.5下，持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在4.0mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7％的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行6h，随后起始缀合反应。在用另外的30mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后，向再氧化的抗体溶液中添加相对于在3.5mg/mL浓度下的抗体4.6摩尔当量的DM21-C。在10％的最终DMA浓度下反应持续13h之后，经由SEC分析粗反应混合物的单体％和DAR。这些实验的结果在下表R中示出。

[0991] 表R

[0992]

反应	还原时间(h)	DAR(SEC)	单体％
1	1	1.96	98.74
2	2	1.97	98.73
3	3	2.00	98.66
4	4	2.05	98.70
5	5	2.03	98.65

[0993] 针对使用DPPA的一锅过程的再氧化反应时间筛选

[0994] 设计这一实验以在23℃的恒定温度下针对使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DHAA氧化剂的一锅过程的再氧化反应步骤筛选所需时间。

[0995] 关于所有反应，将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠，pH 5.0，具有9％蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成30mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用这些抗体溶液来建立在4.5mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5％的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行4h，并且反应pH维持于6.5下，持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在4.0mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7％的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行在1h与7h之间的所指示时间，随后起始缀合反应。在用另外的30mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后，向再氧化的抗体溶液中添加相对于在3.5mg/mL浓度下的抗体4.6摩尔当量的DM21-C。在10％的最终DMA浓度下反应持续13h之后，经由SEC分析粗反应混合物的单体％和DAR。这些实验的结果在下表S中示出。

[0996] 表S

[0997]

反应	再氧化时间(h)	DAR(SEC)	单体％
1	1	2.02	98.69

2	2	2.05	97.88
3	3	2.03	98.65
4	4	2.01	98.08
5	5	1.97	98.09
6	6	1.98	98.61
7	7	1.96	98.65

[0998] 针对使用DPPA的一锅过程的按比例增加条件

[0999] 设计这一实验以在23℃的恒定温度下测试以1.2g抗体规模使用作为还原剂的DPPA、抗ADAM9抗体和DHAA氧化剂的一锅反应过程的性能。

[1000] 关于这一反应，将引入的抗ADAM9抗体(含约25mg/mL抗体的10mM乙酸钠，pH 5.0，具有9％蔗糖)稀释至pH 6.5磷酸钾缓冲液中以生成30mM的最终磷酸钾缓冲液浓度。随后使用所述抗体溶液来建立在4.5mg/mL抗体的最终抗体浓度下的还原反应。相对于所述抗体16摩尔当量的DPPA膦添加至具有5％的最终DMA共溶剂浓度的抗体溶液中。使还原反应继续进行5h，并且反应pH维持于6.5下，持续所述一锅过程的持续时间而无pH调节。还原抗体溶液接着未纯化即用于建立再氧化反应。在4.0mg/mL的最终抗体浓度、相对于DPPA 1.5倍摩尔过量的DHAA氧化剂和7％的最终DMA共溶剂浓度下执行再氧化反应。pH 6.5磷酸钾储备缓冲液用于反应的稀释以实现靶抗体浓度。使再氧化反应继续进行6h，随后起始缀合反应。在用另外的30mM pH 6.5磷酸钾缓冲液稀释之后，向再氧化的抗体溶液中添加相对于在3.5mg/mL浓度下的抗体4.6摩尔当量的DM21-C。在10％的最终DMA浓度下反应持续12h之后，纯化粗反应混合物并且进行配制。在反应完成时，首先用0.5/0.2um双层聚醚砜过滤器过滤均质反应混合物。在过滤之后，通过TFF纯化所述反应混合物，针对含有9w/v％蔗糖的10mM丁二酸钠pH 4.7缓冲液持续14个置换体积。在回收之后，用0.5/0.2um双层聚醚砜过滤器过滤经缓冲液交换的缀合物并且在具有9w/v％蔗糖和0.01％聚山梨醇酯-20的10mM丁二酸钠pH 4.7中以7mg/mL缀合物的最终浓度进行配制。在1.2g规模下所述过程的总体产率为93％。使用最终缀合物的SEC色谱测定单体％和DAR分别为98.71％和1.99。

[1001] 实施例5:使用DPPA的一锅缀合过程和使用TCEP的多步骤过程的比较

[1002] 关于在500mg抗体规模下的多步骤过程，在37℃下在50mM pH 7.6磷酸钾还原缓冲液中以10mg/mL抗ADAM9抗体和相对于所述抗体27(mol:mol)当量的TCEP执行还原，持续1h。在还原之后，执行TFF，其中针对50mM pH 7.6磷酸钾还原缓冲液透滤持续10个置换体积以去除残留膦、氧化膦和含小分子硫醇的封端分子。这一经纯化、还原的抗体未经进一步处理即用于准备选择性再氧化反应。在25℃下以7mg/mL的最终抗体浓度、相对于抗体15(mol:mol)当量的DHAA和1％(v/v)DMA执行再氧化，持续4h。在4℃下保留再氧化的反应溶液过夜之后，准备使用DM21-C的缀合反应，而未对再氧化的抗体溶液进行任何另外的加工。在25C下在具有相对于所述抗体4.4(mol:mol)当量的DM21-C有效载荷和10％(v/v)DMA的50mM pH7.6磷酸钾中以6mg/mL的最终抗体浓度执行缀合，持续18h。在缀合之后，通过TFF纯化粗反应混合物，其中针对含有9％(w/v)蔗糖的10mM丁二酸钠pH 5.0缓冲液透滤，持续12个置换体积。

[1003] 关于在500mg抗体规模下的一锅过程，在25℃下在25mM pH 6.0丁二酸钠缓冲液和5％(v/v)DMA中以12mg/mL抗ADAM9抗体和相对于所述抗体16(mol:mol)当量的3-(二苯基膦

基)丙胺(DPPA)执行还原,持续4h。粗还原抗体溶液接着未纯化即转入选择性再氧化反应中。在25℃下以10mg/mL抗体和相对于所述抗体16(mol:mol)当量的DHAA和7.5%(v/v)DMA进行再氧化,持续23h。所述粗再氧化的抗体溶液接着未纯化即转入缀合反应中。在25℃下在具有相对于所述抗体5.4(mol:mol)当量的DM21-C的25mM pH6.0丁二酸钠缓冲液中以8mg/mL的最终抗体浓度执行缀合,持续20h。在缀合之后,通过TFF纯化粗反应混合物,其中针对含有9%(w/v)蔗糖的10mM丁二酸钠pH 5.0缓冲液透滤,持续12个置换体积。

[1004] 通过最终缀合物的SEC色谱来测定两个反应的单体和DAR值。DAR值是使用所述抗体在280nm下的消光系数、所述抗体的252:280nm吸光度比率和在252nm下的有效载荷消光系数来计算。这项研究的结果在表T中给出。

[1005] 表T

[1006]

反应	单体%	SEC DAR
多步骤TCEP过程	86.2	1.7
一锅DPPA过程	98.2	1.9

[1007] 实施例6:连续一锅缀合过程

[1008] 端对端集成连续制造运转经过证明用于所述一锅过程。G4723A抗体用于所述研究。设计所述经过证明的以集成连续搅拌槽反应器(CSTR)和塞流反应器(PFR),作为概念验证用于按比例增加所述一锅连续过程。

[1009] 连续使用CSTR和PFR的优势是减少总体积需求、改进反应物流之间的混合并且增加风险缓解能力(包括较宽停留时间分布)。在各反应步骤中针对CSTR和PFR测定反应体积:还原、再氧化和缀合。产生各反应的动力学数据并且规定各反应的所需靶转化。基于这些结果,各反应的CSTR和PFR体积是基于所用管的内径和实现各反应步骤的所需停留时间所需的体积流动速率来规定。连续一锅缀合过程的反应示意图在图5中示出。

[1010] 首先,用30mM磷酸钾pH 6.5将以50mg/mL配制的所配制G4723A抗体稀释至4mg/mL的靶还原反应浓度。这一进料流通过蠕动泵馈送至还原CSTR中。平行地,在DMA中以8.77mM制备的DPPA储备溶液通过注射泵馈送至还原CSTR中。设置这两个进料流的体积流动速率,使得所述还原反应在16倍摩尔过量的DPPA:Ab下实现4.0mg/mL浓度。另外,所述还原反应中的DMA的体积浓度为5%(v/v)。

[1011] 使用蠕动泵以与进入还原反应CSTR中的组合流动速率(由Ab和DPPA进料流构成)相同的体积流动速率从还原反应CSTR抽出材料。进入和离开CSTR的流动速率是匹配的以使还原反应CSTR的液体水平和停留时间保持恒定用于稳态操作。馈送从还原反应CSTR抽取的材料通过还原PFR。用于PFR的管的长度是基于靶所需反应转化来确定。使用靶转化来设置停留时间并且测定通过PFR的总体积流动速率以针对PFR反应器设置固定长度。将所述还原PFR浸没于温度控制的水浴中以确保反应温度始终恒定。

[1012] 所述还原PFR以与通过蠕动泵从还原CSTR反应器抽出的材料相同的体积流动速率直接地馈送至再氧化CSTR中。使这一进料流与在DMA中制备的DHAA储备溶液混合,所述DHAA储备溶液也通过注射泵馈送至再氧化CSTR。所述DHAA储备溶液在DMA中以55mM制备并且馈送至反应器中,使得再氧化反应的最终反应参数为:3.9mg/mL抗体浓度、24倍摩尔过量的DHAA:Ab和6.5%DMA(v/v)。

[1013] 测定进入再氧化CSTR中的两个进料流的组合流动速率并且用于设置用于以相同

流动速率从再氧化CSTR取出材料的另外的蠕动泵的体积流动速率。与还原CSTR相似，选择进入和离开CSTR的匹配的流动速率，使得液体水平和停留时间在稳态操作期间是一致的。通过泵从再氧化CSTR取出的材料直接地馈送至再氧化PFR中。再氧化反应PFR设计方法与先前论述的还原PFR相同。基于动力学数据的所需反应转化设置反应停留时间。这一停留时间与通过再氧化反应的体积流动速率组合用于计算PFR设计准则。所述再氧化PFR也浸没(与还原PFR相似)于温度控制的水浴中。

[1014] 再氧化反应PFR的输出直接地馈送至缀合CSTR中。DM21-C储备溶液在DMA中以3.20mM制备并且通过注射泵添加至缀合CSTR中。所述两个入口流在CSTR中混合，使最终反应条件达到3.8mg/mL抗体浓度、4.6摩尔过量的DM21:Ab和10％DMA(v/v)。蠕动泵以再氧化反应和DM21-C储备溶液的组合体积流动速率取出缀合反应混合物。这一蠕动泵匹配所述流动速率以维持所述容器中的液体水平并且直接地馈送至缀合反应PFR中。所述缀合反应PFR基于动力学反应数据靶向反应转化。使用这一靶转化来定义停留时间。使用缀合的停留时间和体积流动速率来定义缀合PFR的条件。与还原和再氧化PFR两者相似，所述缀合反应PFR浸没于温度控制的水浴中。

[1015] 所述缀合反应PFR洗脱未纯化的缀合反应混合物。将这个流馈送至逆流TFF纯化单元中。引入的粗反应是在大约3.8mg/mL的浓度和10％DMA(v/v)下。透滤缓冲液(10mM丁二酸钠、9％(w/v)蔗糖，pH 4.7)的流与引入的未纯化的缀合反应混合物组合以稀释引入的进料流。这一进料流与来自如图6所示的模块2的渗透物流组合，从而进一步稀释进入模块1的缀合物的进料浓度。关于模块1和模块2，使用Pall Cadence在线浓缩器(ILC)膜。

[1016] 来自模块1的滞留物直接地馈送至模块2中。DF缓冲液的另外的进料在模块2的入口前面与来自模块1的滞留物组合。发送来自模块1的渗透物至供处置的废弃物。从模块2的滞留物回收纯化的缀合物。使来自模块2的渗透物再循环并且与如上文所述的模块1的进料组合(参见图6)。这一逆流设置有效地从粗反应混合物去除杂质并且将所述缀合物缓冲液交换至DF缓冲液中。为了在逆流TFF纯化期间确保有效载荷杂质的去除，通过游离药物方法表征TFF前和纯化的样品。结果显示所述两个单元中来自引入的未纯化进料流的杂质的高度有效去除(>99％)。最终纯化的缀合物关于连续运转和分批控制的结果在表S中示出。

[1017] 表S:集成DS制造运转的产物质量概述

[1018]

产物质量属性	连续缀合 (逆流 TFF)	分批控制 (NAP 纯化)
HMW (%，通过 SEC)	0.3	0.3
单体(%，通过 SEC)	99.7	99.7
游离药物去除(%)	99.89	N/A
纯化的游离药物(ug/mL)	<LOQ	N/A
DAR (通过 UV)	1.95	N/A
DAR (通过 SEC-MS)	1.9	N/A
粗反应 DAR (通过 SEC)	2.0	2.1
HL (%，通过 Gel Chip)	3	4
H2L2 (%，通过 Gel Chip)	81	82

[1019] 实施例7.在惰性气氛下的一锅缀合过程

[1020] 为了测试在N_2净化系统中执行整个一锅缀合过程的影响以更好地模拟GMP制造期间的预期条件。通过比较在N_2下和在正常空气气氛下的同一反应来测试还原和再氧化反应的性能。在4.5mg/mL抗体浓度下在具有5%DMA的pH 6.5 30mL磷酸钾中执行还原。用16当量的DPPA建立所述反应并且在23℃下执行5小时。在4.0mg/mL抗体浓度下在具有7%DMA的pH 6.530mM磷酸钾中执行再氧化。用24当量的DHAA建立所述反应并且在23℃下执行6小时。在3.5mg/mL抗体浓度下在具有10%DMA的pH 6.5 30mM磷酸钾中执行缀合。用4.6当量的DM21-C建立所述反应并且在23℃下执行12小时。在EasyMax系统中建立在175mg规模下的两个反应,其中内部温度控制至23.0℃并且以70rpm进行顶部混合。连续地用N_2净化一个反应的顶部空间,持续所述实验的持续时间。另外,关于这一反应,用N_2对水和30mM磷酸钾缓冲溶液鼓泡持续15-30分钟,接着将其添加至所述反应中。

[1021] 如表T所示,在氮气净化的系统中运转所述反应与使缀合反应容器向大气开放之间未存在显著差异。在氮气下的反应运转的所有分析数据(SEC单体、SEC DAR、HIC DAR、GelChip)均与使用相同原料的对照和先前按比例增加运转一致。

[1022] 表T.产物质量的概述

[1023]

	N2 反应 (粗物质)	空气反应 (粗物质)	先前按比例增加运转*
SEC DAR	2.04	2.01	2.04
HIC DAR	1.98	1.97	1.98
单体%	98.35	98.35	98.71
HMW%	1.47	1.54	1.22
LMW%	0.18	0.11	0.07
D0%	未发现	未发现	0.02
D1%	2.56	2.96	2.82
D2%	97.32	97.04	96.90
D4%	0.12	未发现	0.26
HL%	6.18	5.14	5.84
H2L2%	78.36	80.92	78.54
总体产率%	NA	NA	93.60

[1024] *先前按比例增加运转使用与此处所述的反应相同的Ab批次、

[1025] DPPA和有效载荷批次

[1026] ----------

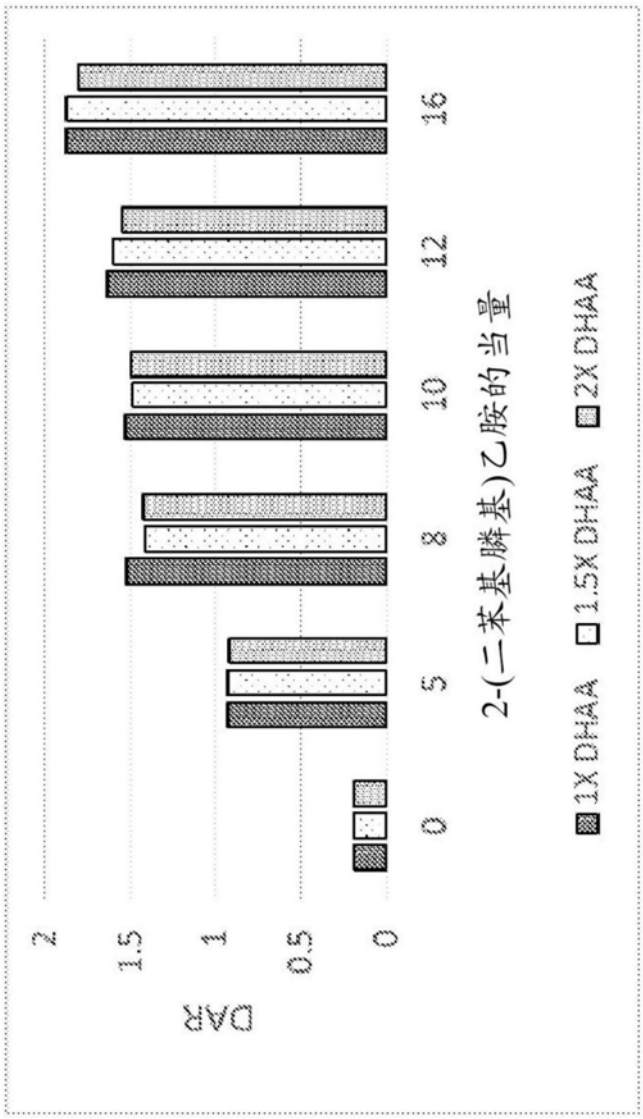


图1

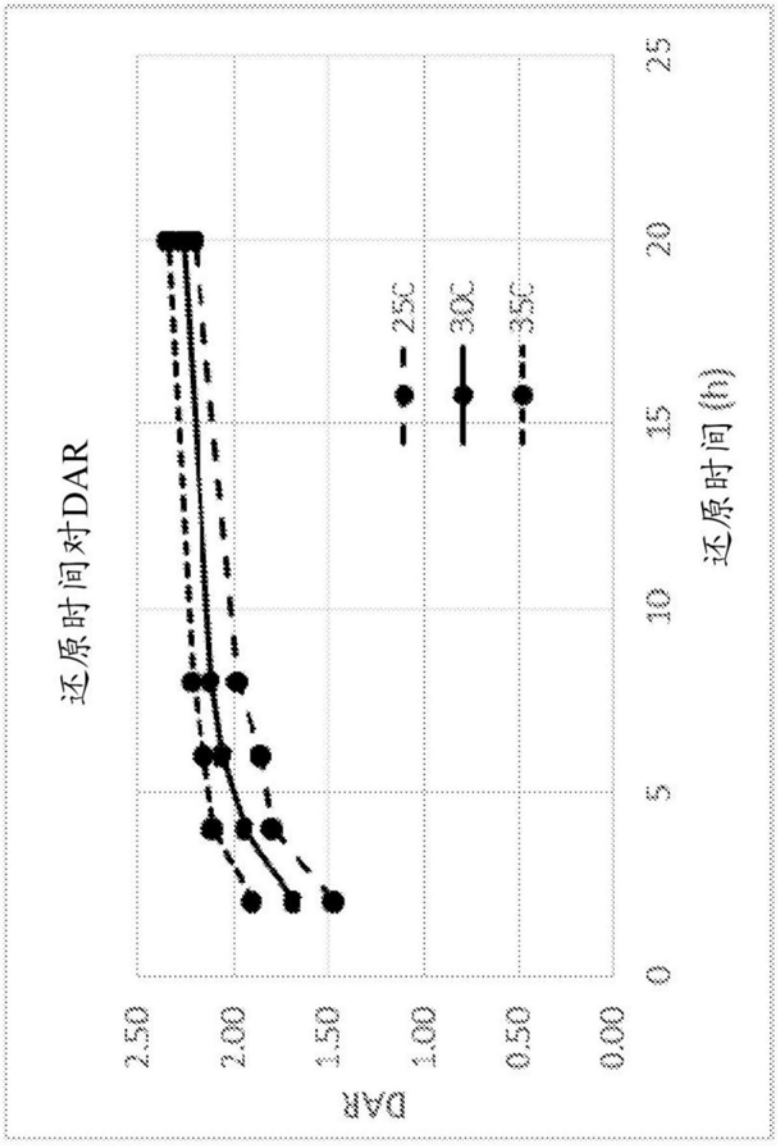

还原时间对DAR
DAR
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
5
10
15
20
25
还原时间(h)
25C
30C
35C

图2

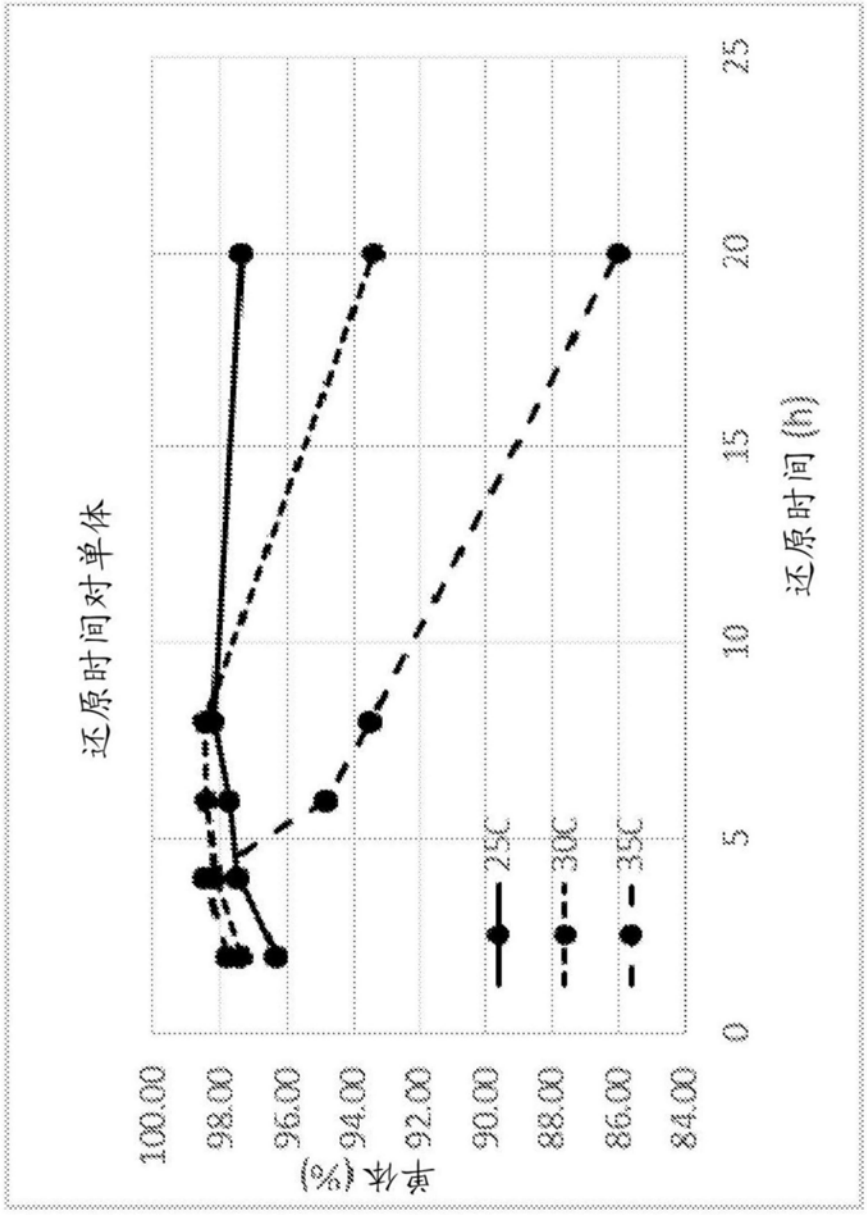

还原时间对单体
单体(%)
100.00
98.00
96.00
94.00
92.00
90.00
88.00
86.00
84.00
0
5
10
15
20
25
还原时间(h)
25C
30C
35C

图3

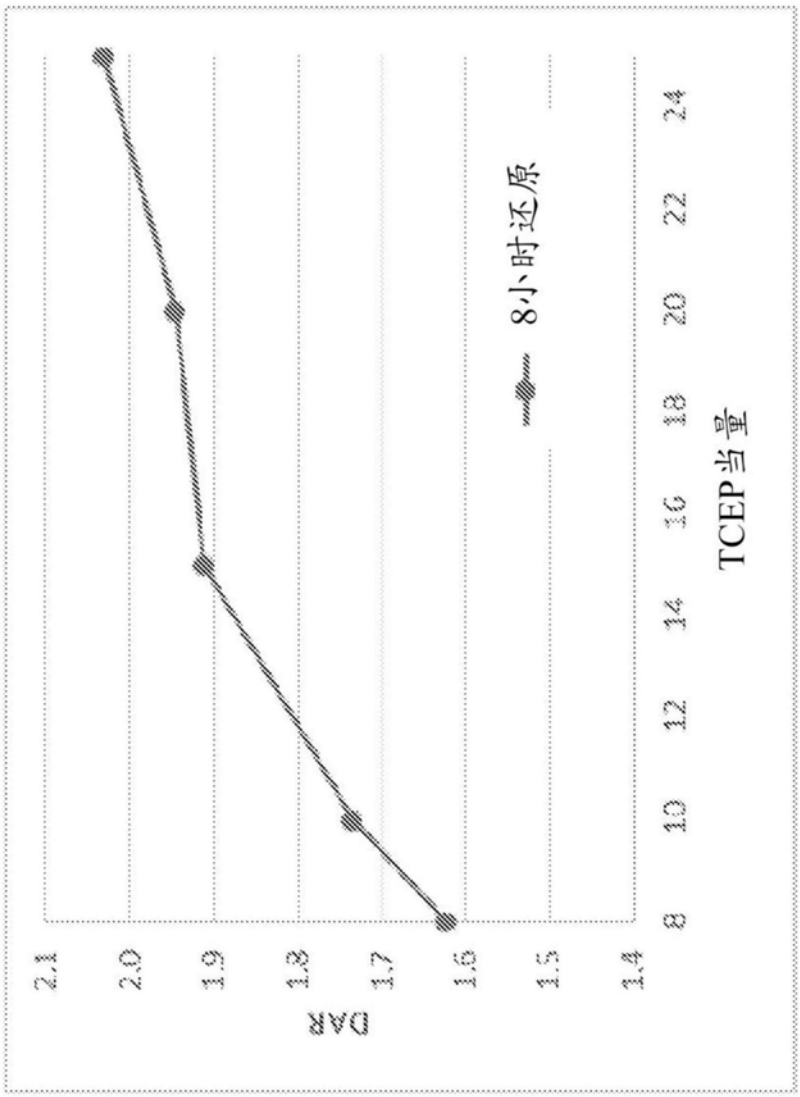


图4

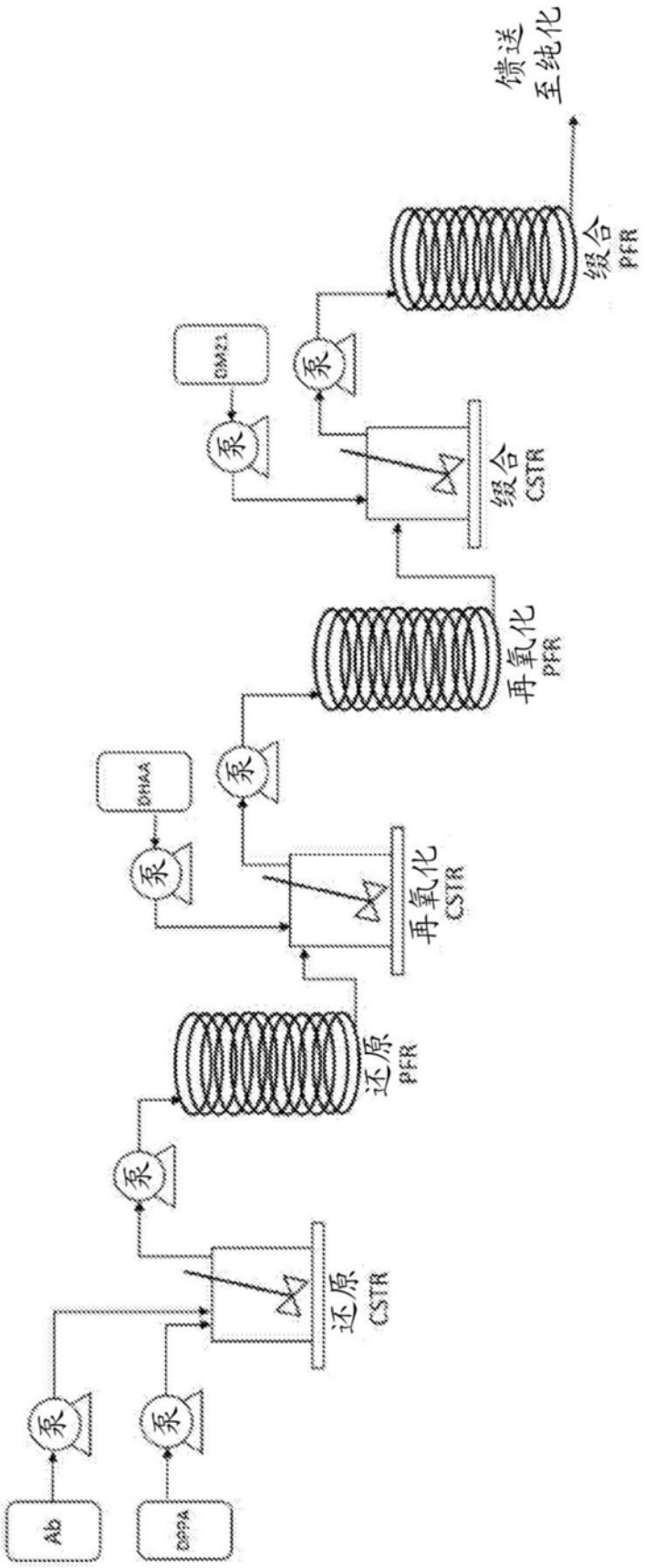

Ab
DSPPA
泵
泵
还原
CSTR
泵
还原
PFR
泵
BHAA
再氧化
CSTR
泵
再氧化
PFR
DMA21
泵
级合
CSTR
泵
级合
PFR
馈送
至纯化

图5

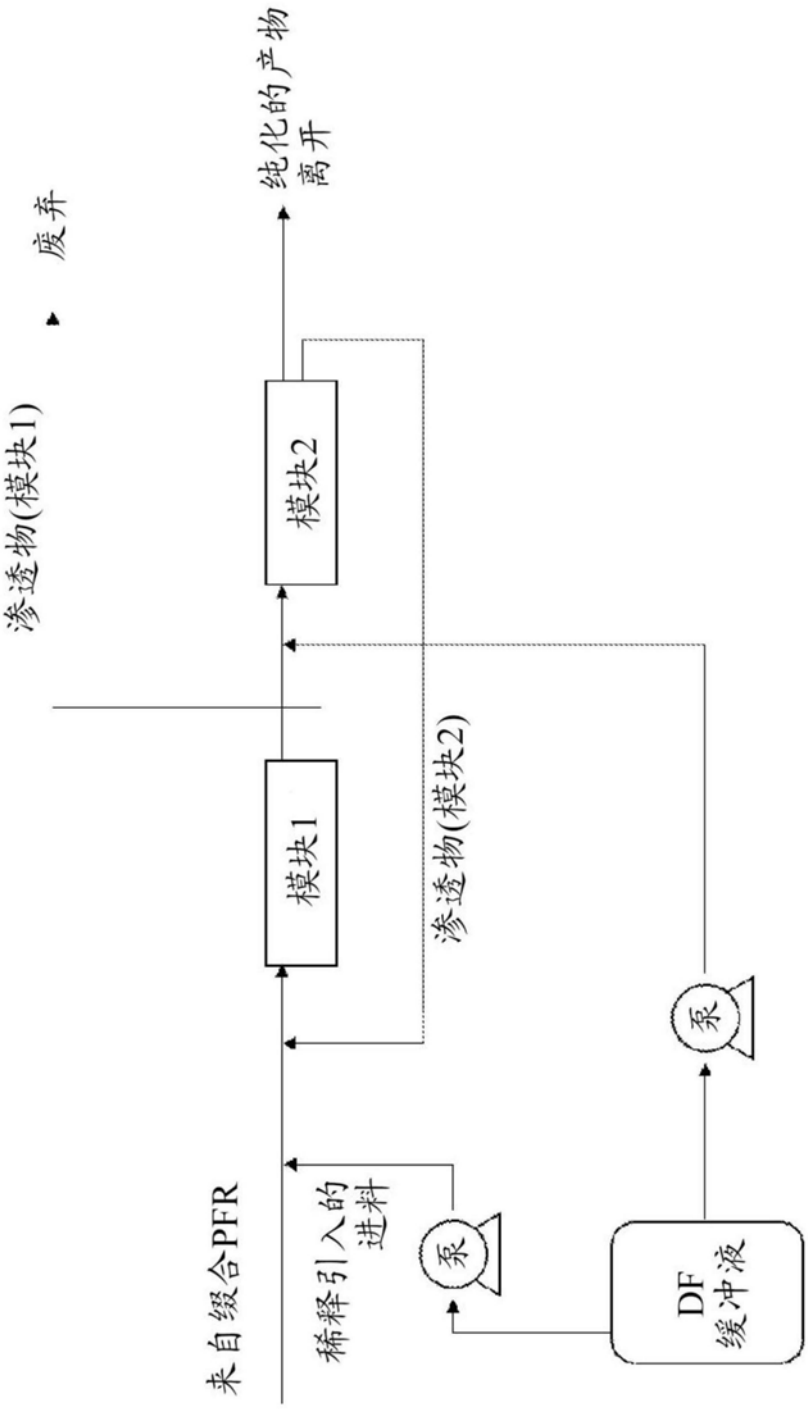


图6

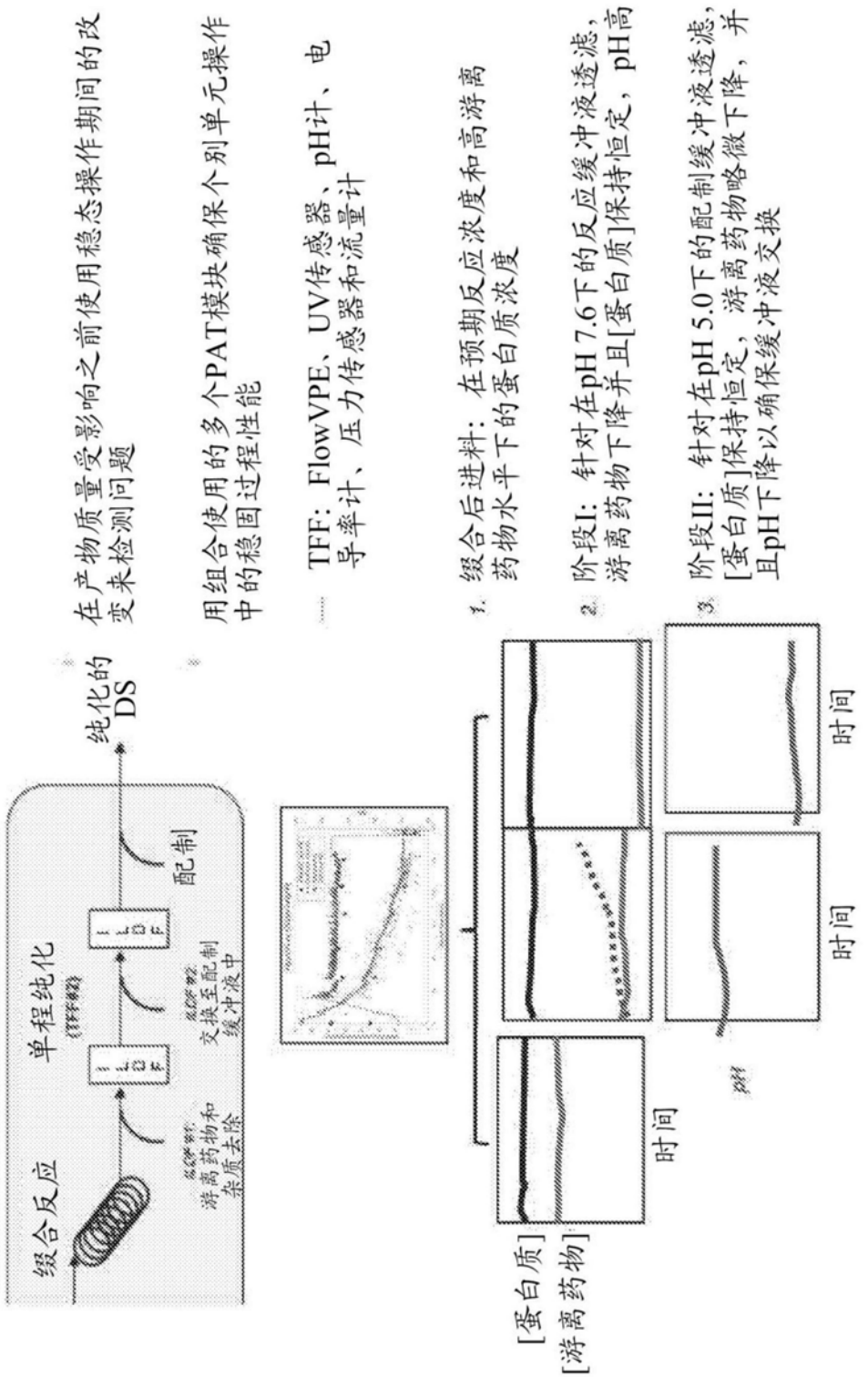

在产物质量受影响之前使用稳态操作期间的改变来检测问题
用组合使用的多个PAT模块确保个别单元操作中的稳固过程性能
TFF：FlowVPE、UV传感器、pH计、电导率计、压力传感器和流量计
1. 缀合后进料：在预期反应浓度和高游离药物水平下的蛋白质浓度
2. 阶段I：针对在pH 7.6下的反应缓冲液透滤，游离药物下降并且[蛋白质]保持恒定，pH高
3. 阶段II：针对在pH 5.0下的配制缓冲液透滤，[蛋白质]保持恒定，游离药物略微下降，并且pH下降以确保缓冲液交换
缀合反应
单程纯化
游离药物和杂质去除
交换至配制缓冲液中
配制
纯化的DS
[蛋白质]
[游离药物]
时间
时间
时间

图7

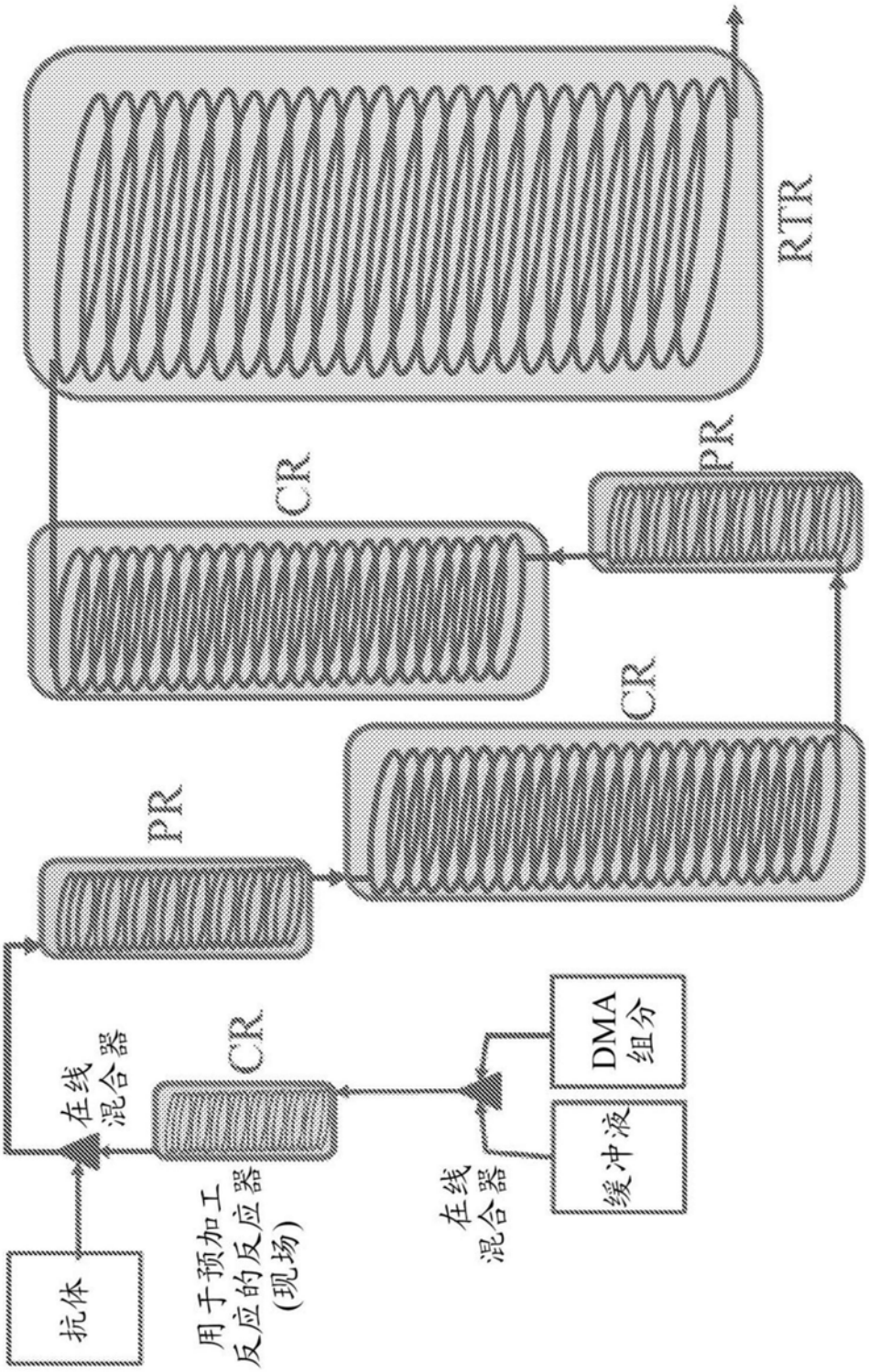


图8