



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I736047 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：108143994

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 15 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/50 (2017.01)* *C07K9/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)* *A61K39/395 (2006.01)*

(30)優先權：2013/10/15 美國 61/891,320

2014/02/19 美國 61/941,904

2014/03/04 美國 61/947,742

2014/04/04 美國 61/975,318

2014/10/14 世界智慧財產權組織 PCT/US2014/060477

(71)申請人：美商西雅圖遺傳學公司 (美國) SEATTLE GENETICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：萊恩 羅伯特 LYON, ROBERT (US)；布魯克 派翠克 BURKE, PATRICK (US)；

杭特 喬許瓦 HUNTER, JOSHUA (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

TW 201420118A US 2010/0158909A1

WO 2012/113847A1

審查人員：唐韶璞

申請專利範圍項數：31 項 圖式數：23 共 303 頁

(54)名稱

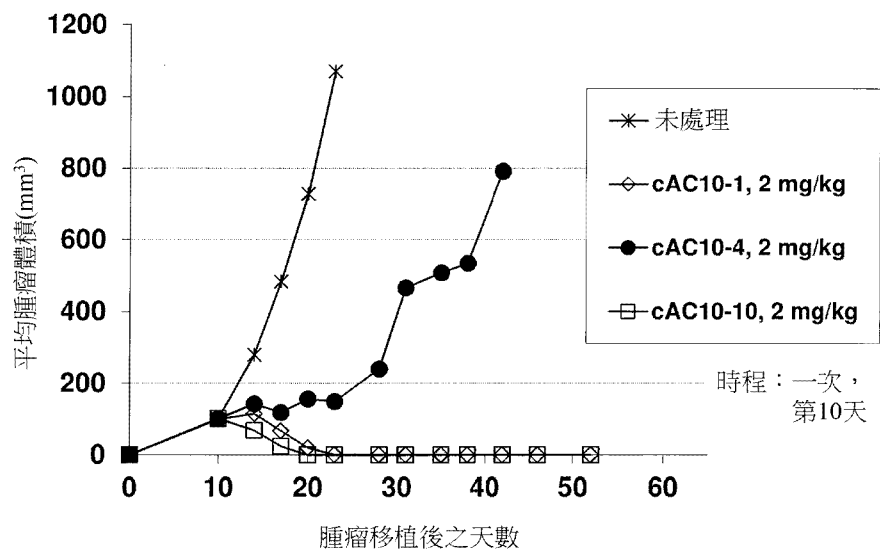
改良配體-藥物結合物之藥物動力學之聚乙二醇化藥物連接子

(57)摘要

本發明提供配體-藥物結合物，其包含與藥物單元平行取向之 PEG 單元。

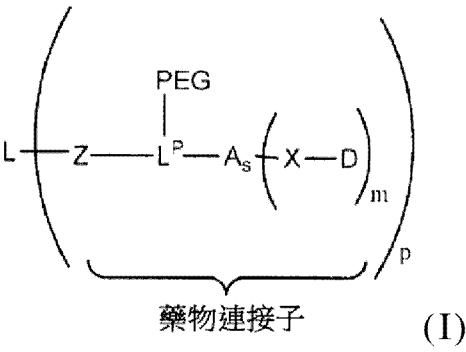
The present invention provides Ligand-Drug Conjugates comprising a PEG Unit in a parallel orientation to the Drug Unit.

指定代表圖：



【圖1】

特徵化學式：





I736047

【發明摘要】

【中文發明名稱】

改良配體-藥物結合物之藥物動力學之聚乙二醇化藥物連接子

【英文發明名稱】

PEGYLATED DRUG-LINKERS FOR IMPROVED LIGAND-DRUG
CONJUGATE PHARMACOKINETICS

【中文】

本發明提供配體-藥物結合物，其包含與藥物單元平行取向之PEG單元。

【英文】

The present invention provides Ligand-Drug Conjugates comprising a PEG Unit in a parallel orientation to the Drug Unit.

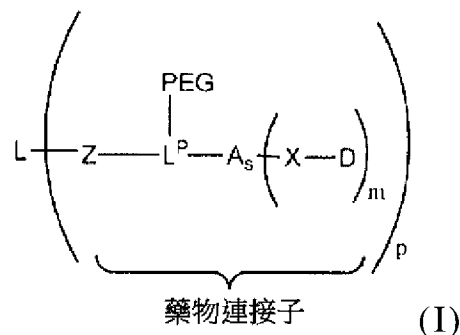
【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

改良配體-藥物結合物之藥物動力學之聚乙二醇化藥物連接子

【英文發明名稱】

PEGYLATED DRUG-LINKERS FOR IMPROVED LIGAND-DRUG
CONJUGATE PHARMACOKINETICS

【技術領域】

本發明提供配體-藥物結合物，其包含與藥物單元平行取向之PEG單元。

【先前技術】

大量的關注圍繞使用單株抗體(mAb)進行細胞毒性劑向癌細胞之靶向遞送。通常經由連接子使細胞毒性劑連接至抗體之抗體藥物結合物之設計考慮多種因素。此等因素包括用於結合細胞毒性劑之化學基團之特性及位置、藥劑釋放機制、使細胞毒性劑釋放之結構元件(若存在)及釋放之游離藥劑之結構改變(若存在)。另外，若細胞毒性劑在抗體內化之後釋放，則結構元件及藥劑釋放機制與結合物之細胞內移行一致。

儘管已評價許多不同藥物類別之經由抗體之遞送，但證明僅幾種藥物類別為有充分活性之抗體藥物結合物，同時具有適合毒性概況，以保證臨床研發。一種此類類別為奧瑞他汀(auristatins)，其與天然產物海兔毒素10 (dolastatin 10)相關。代表性奧瑞他汀包括MMAE(N-甲基纈胺酸-纈胺酸-多拉索因(dolaisoleuine)-多拉普因(dolaproine)-降麻黃鹼)及MMAF(N-甲基纈胺酸-纈胺酸-多拉索因-多拉普因-苯丙胺酸)。

MMAE為作為活性游離藥物之細胞毒性劑之實例，且當結合至單株抗體(mAb)時極有效且在內化至細胞中之後釋放。MMAE在MMAE之N端胺基酸處經由含有順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(mc-vc-)及自體分解型基團對胺基苯甲基-胺甲醯基(PABC)之基於組織蛋白酶B可裂解肽之連接子成功結合至mAb，產生以下結構之抗體藥物結合物： $\text{mAb}-(\text{mc-vc-PABC-MMAE})_p$ 。(在上式中，p係指每抗體之(mc-vc-PABC-MMAE)單元之數量。)在vc肽與自體分解型PABC基團之間的鍵裂解後，PABC基團本身自MMAE釋放，釋出游離MMAE。

另一奧瑞他汀MMAF為相對較小活性之游離藥物(與MMAE相比)，但當結合至抗體且內化至細胞中時又極為有效。MMAF已在MMAF之N端胺基酸處經由含有順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(mc-vc-)及自體分解型基團對胺基苯甲基-胺甲醯基(PABC)之基於組織蛋白酶B可裂解肽之連接子成功結合至單株抗體(mAb)，產生結構 $\text{mAb}-(\text{mc-vc-PABC-MMAF})_p$ 之抗體-藥物結合物，其中p係指每抗體(mc-vc-PABC-MMAF)單元之數量。在肽連接子裂解後，自體分解型PABC基團本身自MMAF釋放，釋出游離MMAF。

亦發現MMAF為含有藥物連接子順丁烯二醯亞胺基己醯基MMAF(mcMMAF)之活性非可裂解結合物。當此結合物單抗-(mcMMAF)_p內化至細胞中時，所釋放之活性物質為cys-mcMMAF。因為連接子為非可裂解的，所以抗體之順丁烯二醯亞胺基己醯基及半胱胺酸殘基仍保持連接至MMAF之N端。亦報導MMAF為C端胺基酸苯丙胺酸連接至肽-順丁烯二醯亞胺基己醯基連接子之活性C端結合物。當結合物(MMAF-肽-mc)_p-mAb內化至細胞中時，MMAF(苯丙胺酸)-肽鍵

裂解之後釋放出活性物質MMAF。

在動物模型中，此等MMAE及MMAF結合物展示藥物動力學特性之藥物負載依賴性降低。特定言之，連接至各抗體之藥物連接子單元之數量增加，結合物之PK降低。

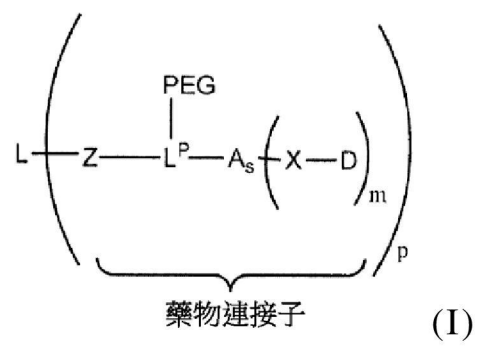
因此，結合物設計中之另一重要因素為每靶向劑可遞送之藥物之量(亦即連接至各靶向劑(例如抗體)之細胞毒性劑數量，稱為載藥量或藥物負載)。歷史上，假定較高載藥量優於較低載藥量(例如8單位負載量對4單位負載量)。基本原理為較高負載之結合物將向靶向細胞傳遞較多藥物(細胞毒性劑)。此基本原理藉由以下觀察結果支持：在活體外具有較高藥物負載之結合物針對細胞株更具活性。然而，某些後續研究顯示在動物模型中此假設並不確定。在小鼠模型中觀測到某些奧瑞他汀之載藥量為4或8單位之結合物具有類似活性。Hamblett等人，*Clinical Cancer Res.* 10:7063-70 (2004)。Hamblett等人進一步報導在動物模型中較高負載之ADC較快地自循環中清除。此較快清除率表明與較低負載之物質相比較高負載之物質之PK可靠性。Hamblett等人。另外，在小鼠中較高負載之結合物之MTD較低，且因此所報導之治療指數較窄。同上。相比而言，報導單株抗體中之工程改造位點處藥物負載為2單位之ADC與某些4單位負載之ADC相比具有相同或較佳PK及治療指數。舉例而言，參見Junutula等人，*Clinical Cancer Res.* 16:4769 (2010)。因此，近來趨勢為研發具有低藥物負載之ADC。

因此，需要使得藥物負載較高，但維持較低負載結合物之其他特徵(諸如有利PK特性)之抗體藥物結合物形式(及更一般而言其他結合物形式)。出人意料地，本發明解決了彼等需求。

【發明內容】

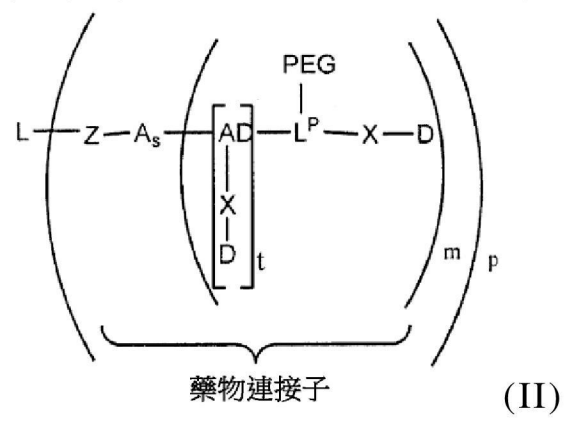
本發明尤其提供配體-藥物結合物(LDC)、其製備及使用之方法及其中間物。配體-藥物結合物在循環中穩定，一旦其藥物負荷在靶向細胞附近或靶向細胞內釋放又能夠造成靶向細胞之細胞死亡或抑制靶向細胞增殖。

在主要實施例中，本發明之LDC由以下式I之結構表示：



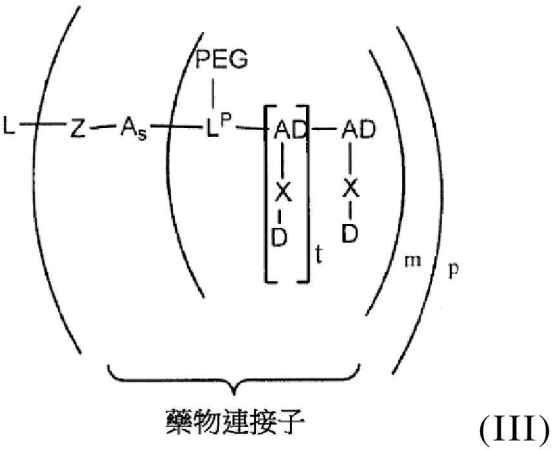
其中D為藥物單元，PEG為遮蔽藥物連接子之疏水性的聚乙二醇單元，L^p為使PEG單元對於X-D平行取向之平行連接體單元，當m大於1時A為分支單元，視情況包含次單元，或當m為1時A不存在，X為使各D自LDC釋放之可釋放組合單元，且Z為視情況存在之間隔子單元，L^p經由其結合至靶向配體L。

在其他主要實施例中，本發明之LDC由以下式II之結構表示：



其中AD為使得以與PEG單元平行取向再連接t所示量之X-D部分體之藥物連接單元，且L、L^p、Z、A、X、D、m、p及s係如式I所定義。

在其他主要實施例中，本發明之LDC由以下式III之結構表示：



其中AD、L、L^p、PEG、Z、A、X、D、m、p、s及t係如式II所定義。

【圖式簡單說明】

圖1. 以較高單次劑量(2 mg/kg)給藥非聚乙二醇化ADC(cAC10-[mc-PAB(gluc)MMAE]_p)(cAC10-1)、平行取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-10)及串聯取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-4)組合物(平均藥物負載為8單位藥物/Ab)之異種移植L540cy模型(霍奇金淋巴瘤(Hodgkin Lymphoma))之平均腫瘤體積對植入後之天數。

圖2. 對於以較高單次劑量(0.6 mg/kg)給藥非聚乙二醇化ADC(cAC10-1)、平行取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-10)及串聯取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-4)組合物(平均藥物負載為8單位藥物/Ab)之異種移植Karpas299模型(ALCL)之平均腫瘤體積對植入後天數。

圖3. 以較低單次劑量(0.5 mg/kg)給藥非聚乙二醇化ADC(cAC10-1)、平行取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-10)及串聯取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-4)組合物之異種移植L540cy模型(霍奇金淋巴瘤)之平均腫瘤體積對植入後天數。

圖4. 以較低單次劑量(0.15 mg/kg)給藥非聚乙二醇化

ADC(cAC10-1)、平行取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-10)及串聯取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-4)組合物(平均藥物負載為8單位藥物/Ab)之異種移植Karpas299模型(ALCL)之平均腫瘤體積對植入後天數。

圖5. 以0.2 mg/kg單次給藥非聚乙二醇化ADC (cAC10-[MDpr-PAB(gluc)-MMAE]_p)(cAC10-14)) 及 平行取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-16)組合物(平均藥物負載為8單位藥物/Ab，亦即p為8)之異種移植Karpas299模型(ALCL)之平均腫瘤體積對植入後天數。

圖6. 以1 mg/kg單次給藥非聚乙二醇化ADC (hBU12-[MDpr-PAB(gluc)-MMAE]_p)(hBU12-14)) 及 平行取向之聚乙二醇化ADC(hBU12-16)組合物(平均藥物負載為8單位藥物/Ab，亦即p為8)之異種移植拉莫斯模型(伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's Lymphoma))之平均腫瘤體積對植入後天數。

圖7. 大鼠在單次靜脈內3 mg/Kg劑量之非共軛cAC10抗體、其非聚乙二醇化ADC(cAC10-1)、平行取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-10)及串聯取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-4)組合物(平均藥物負載為8單位藥物/Ab)後之藥物動力學概況(總Ab濃度(以μg/mL計)對時間(以天計))。

圖8. 8單位藥物/Ab之具有非聚乙二醇化藥物連接子及平行取向之聚乙二醇化藥物連接子部分體之cAC10 ADC之尺寸排阻層析圖，其中藥物連接子部分體為MDpr-VC-PABA-MMAE，各種長度之PEG單元為：cAC10-A (非聚乙二醇化)、cAC10-B (PEG₁₂)、cAC10-C (PEG₂₄)、cAC10-D (PEG₃₆)、cAC10-E (PEG₁₂ + PEG₃₆)、cAC10-F (PEG₂₄ + PEG₃₆)及cAC10-G (PEG₃₆ + PEG₃₆)。

圖9. 大鼠在單次靜脈內3 mg/Kg劑量之8單位藥物/Ab之具有非聚乙二醇化藥物連接子(其中ADC結合物為c-AC10-MDpr-VC-PAB-MMAE (cAC10-A)及cAC10-mc-VC-PABA-MMAE (cAC10-K))及平行取向之聚乙二醇化藥物連接子部分體(其中ADC由結構cAC10-[MDpr (-X-D)-PEG₂₄]_p表示, 且-X-D為MDpr-VC-PAB-MMAE (cAC10-C)或mc-VC-PABA-MMAE (cAC10-L)且p為8)之cAC10 ADC後之藥物動力學概況(總Ab濃度(以μg/mL計)對時間(以天計)), 相比於具有使用正乙基胺基順丁烯二醯亞胺封端之PEG₂₄架構(亦即無連接藥物單元)之對照結合物cAC10-NAEM(cAC10-I)。

圖10. 大鼠單次靜脈內3 mg/Kg劑量之8單位藥物/Ab之具有非聚乙二醇化藥物連接子(其中ADC結合物為c-AC10-[MDpr-VC-PAB-MMAE]_p(cAC10-A))或平行取向之聚乙二醇化藥物連接子部分體(其中ADC由結構cAC10-[MDpr (-X-D)-PEG]_p表示, 且p為8, -X-D為MDpr-VC-PAB-MMAE且PEG為具有各種長度之PEG單元: PEG₁₂ (cAC10-B)、PEG₂₄ (cAC10-C)及PEG₃₆ (cAC10-D))的cAC10 ADC後之藥物動力學概況(總Ab濃度(以μg/mL計)對時間(以天計)), 相比於與具有如下使用正乙基胺基順丁烯二醯亞胺封端之PEG架構(亦即無連接藥物單元)之對應對照結合物: PEG₁₂ (cAC10-H)、PEG₂₄ (cAC10-I)及PEG₃₆ (cAC10-J)。

圖11. 相比於未處理動物, 一次靜脈內給藥2 mg/Kg非聚乙二醇化ADC: c-AC10-[MDpr-VC-PAB-MMAE]_p (cAC10-A)之L540cy異種移植模型中腫瘤體積(mm²)對腫瘤移植後之天數。

圖12. 相比於未處理動物, 一次靜脈內給藥2 mg/Kg平行取向之聚

乙二醇化ADC(cAC10-B)：cAC10-[MDpr (-X-D)-PEG₁₂]_p(其中p為8且-X-D為MDpr-VC-PAB-MMAE)之L540cy異種移植模型中腫瘤體積(mm²)對腫瘤移植後之天數。

圖13. 相比於未處理動物，一次靜脈內給藥2 mg/Kg平行取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-C)：cAC10-[MDpr (-X-D)-PEG₂₄]_p(其中p為8且-X-D為MDpr-VC-PAB-MMAE)之L540cy異種移植模型中腫瘤體積(mm²)對腫瘤移植後之天數。

圖14. 相比於未處理動物，在靶向抗原LIV-1之非聚乙二醇化ADC：hLIV22-[mc-VC-PAB-MMAE]_p或hLIV22-[MDpr (-X-D)-PEG₂₄]_p(其中p為8且-X-D為mc-VC-PAB-MMAE)之情況下異種移植乳癌模型中平均腫瘤體積(mm²)對腫瘤移植後天數。

圖15：相比於未處理動物，一次靜脈內給藥1或0.5 mg/Kg非聚乙二醇化ADC：cAC10-[mc-PAB(gluc)-MMAE]_p (cAC10-1)或其對應平行取向之聚乙二醇化ADC：cAC10-{mc-[PAB(gluc)-MMAE]-PEG₂₄}_p (cAC10-10)(其中p為4)之L540cy異種移植模型中平均腫瘤體積(mm²)對腫瘤移植後天數。

圖16：相比於未處理動物，一次靜脈內給藥0.3或0.15 mg/Kg非聚乙二醇化ADC：cAC10-[mc-PAB(gluc)-MMAE]_p (cAC10-1)或其對應平行取向之聚乙二醇化ADC：cAC10-{mc-[PAB(gluc)-MMAE]-PEG₂₄}_p (cAC10-10)(其中p為4)之Karpas299異種移植模型中平均腫瘤體積(mm²)對腫瘤移植後天數。

圖17：對於一組非霍奇金淋巴瘤細胞株，8單位藥物負載之具有PEG單元為各種長度之聚乙二醇化架構及由結構MDpr-L^p-

(PEG)_x(PAB(glu))表示之藥物連接子的hBU12 ADC之劑量反應曲線，其中L^P為作為平行連接體單元之離胺酸，其中x為0 (hBU12-14)(其中離胺酸之ε胺基處之PEG單元經乙醯基置換)，x為2 (hBU12-43)、4 (hBU12-42)、8 (hBU12-18)、12 (hBU12-17)、24 (hBU12-16)或為PEG₄-(PEG₄)₃之分支結構(hBU12-19)。

圖18. 單次靜脈內1 mg/Kg劑量之未結合非靶向抗體(h00)、其具有PEG單元為各種長度之聚乙二醇化架構由結構MDpr-L^P-(PEG)_x(PAB(glu))表示之連接子的結合物後之大鼠中藥物動力學概況(總Ab濃度(以μg/mL計)對時間(以天數計))，在該結構中L^P為作為平行連接體單元之離胺酸，其中x為0 (h00-14)(其中離胺酸之ε胺基處之PEG單元經乙醯基置換)，x為2 (h00-43)、4 (h00-42)、8 (h00-18)、12 (h00-17)或24 (h00-16)。

圖19：相比於未處理動物，單次劑量靜脈內投與為1或3 mg/Kg之具有PEG單元為各種長度之聚乙二醇化架構及由結構MDpr-L^P-(PEG)_x(PAB(gluc))表示之藥物連接子的hBU12 ADC後之CD19陽性RL 彌漫性大B細胞淋巴瘤模型中平均腫瘤體積(mm²)對腫瘤移植後天數，其中L^P為作為平行連接體單元之離胺酸，其中x為0 (hBU12-14)(其中離胺酸之ε胺基處之PEG單元經乙醯基置換)，x為2 (hBU12-43)、4 (hBU12-42)、8 (hBU12-18)、12 (hBU12-17)或24 (hBU12-16)。

圖20. 單次劑量投與1 mg/Kg非聚乙二醇化ADC(cAC10-[mc-PAB(gluc) MMAE]_p)(cAC10-1)、具有藥物連接子mc-L^P-(PAB(gluc)-MMAE)PEG₂₄ (cAC10-10)、MDpr-L^P-(PAB(gluc)-MMAE)PEG₂₄ (cAC10-16)之平行取向之聚乙二醇化ADC(其中平行連接體單元L^P為離

胺酸)或串聯取向之聚乙二醇化ADC(cAC10-4)後小鼠中CD30⁺L540cy霍奇金淋巴瘤之異種移植腫瘤中之藥物濃度(nM)，其中ADC之平均藥物負載為8單位。

圖21. 相比於未處理動物，單次靜脈內給藥50 mg/Kg具有PEG單元為各種長度之聚乙二醇化架構及由結構MDpr-L^P-(PEG)_x(PAB(gluc))表示之藥物連接子的非靶向對照聚乙二醇化藥物結合物之以隨時間推移之重量百分比變化所示之耐受性，其中L^P為作為平行連接體單元之離胺酸，其中x為0 (h00-43)(其中離胺酸之ε胺基處之PEG單元經乙醯基置換)，x為2 (h00-43)、4 (h00-42)、8 (h00-18)、12 (h00-17)或24 (h00-16)，其中ADC之平均藥物負載為8單位。

圖22. 具有PEG單元為各種長度之聚乙二醇化架構及由結構MDpr-L^P-(PEG)_x(PAB(gluc))表示之藥物連接子的非靶向對照聚乙二醇化藥物結合物之尺寸排外層析法(SEC)層析圖，其中L^P為作為平行連接體單元之離胺酸，其中x為8 (h00-18)、12 (h00-17)或24 (h00-16)。

圖23. 具有PEG單元為各種長度之聚乙二醇化架構及由結構MDpr-L^P-(PEG)_x(PAB(gluc))表示之藥物連接子的非靶向對照聚乙二醇化藥物結合物之符合二室模型之排除半衰期及分佈，其中L^P為作為平行連接體單元之離胺酸，其中x為8 (h00-18)、12 (h00-17)或24 (h00-16)。

【實施方式】

對相關申請案之交叉參考

本非臨時申請案根據35 USC§119(e)規定主張2013年10月15日申請之美國申請案第61/891,320號、2014年2月19日申請之第61/941,904號之優先權、2014年3月4日申請之第61/947,742號及2014年4月4日申請之第

61/975,318號，所有文獻以全文引用的方式併入本文中。

序列表

2014年10月9日創建之13 KB之命名為2700-00114PC-ST25.txt序列表以引用的方式併入本文中。

概述

本發明部分係基於以下出人意料之發現：配體-藥物結合物之聚乙二醇組分(PEG單元)之取向可對所得結合物藥物動力學具有深遠影響。特定言之，本發明人已發現與不具有PEG單元或PEG單元以與藥物單元串聯取向置放之結合物相比，配體-藥物結合物之PEG單元相對於藥物單元之平行置放可改良結合物之藥物動力學。本發明人已進一步發現，存在於PEG單元上重複聚乙二醇次單元之數量會影響所得結合物藥物動力學。藉由將結合物設計成具有平行置放且適當尺寸之PEG單元以遮蔽藥物及在一些情況下為連接子之組分之疏水性，可製備允許較高藥物負載，同時維持較低負載結合物之其他特徵(諸如有利PK特性)之配體-藥物結合物形式。進一步設計配體-藥物結合物以使得其釋放「游離」藥物。

定義

除非另外說明，否則如本文所用之以下術語及短語意欲具有以下含義。當本文中使用的商標名時，除非上下文中另外指明，否則商標名包括商標名產品之產品調配物、通用藥物及活性醫藥成分。

如本文所用之「平行連接體單元」係指使PEG單元以平行取向連接至藥物單元之分支連接子單元組分。如本文所用，短語「平行取向」、「平行置放」、「平行連接」及類似術語係指平行置放或平行取向

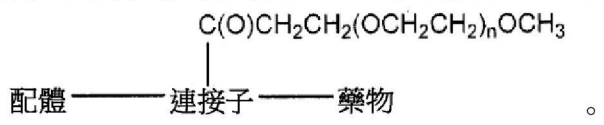
或平行連接之組分連接至平行連接單元(L^p)之組態以使得各者具有一個繫栓至 L^p 之末端及一個自由末端。通常， L^p 經由一或多個連接子單元組分連接藥物單元，其中一者(或僅一者)為可釋放組合單元，且連接PEG單元以使得藥物及PEG單元呈平行取向，以便藉由PEG單元遮蔽藥物單元之疏水性。在一些態樣中，藉由一或多個連接至 L^p 之藥物連接單元(AD)提供進一步分支，使得連接至AD之藥物單元與PEG單元因 L^p 而呈平行取向。僅遮蔽指定連接子-藥物部分體之疏水性所需之彼等PEG單元需要與其藥物單元平行取向，此情況不一定需要所有藥物及聚乙二醇單元連接至 L^p 之彼此平行取向。

術語「平行」本文中用以指示配體-藥物結合物(LDC)之兩種組分之自構成LDC之 L^p 分支，且並非用以指示兩種組分在空間上並行或在一定或其整個長度上在其之間具有相同距離。在平行取向之組分本身為分支且由此具有多個末端之情況下，其仍具有僅一個繫栓末端。

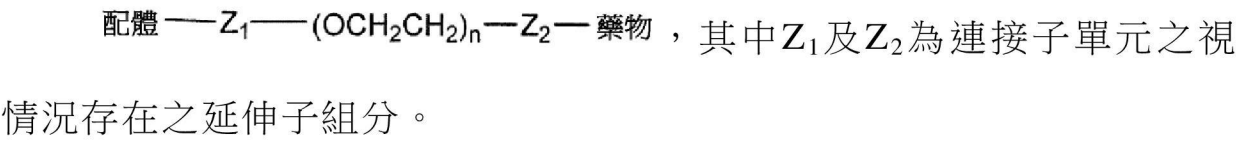
PEG單元相對於LDC之藥物單元平行取向之LDC係指包含具有一個連接至連接子單元(亦即平行連接體單元)之組分之末端及一或多個游離未繫栓末端之PEG單元之LDC。PEG單元之游離未繫栓末端可呈例如未反應官能基之形式，例如烷氧基、羧酸、伸烷基羧酸、醇或其他官能基。PEG單元關於藥物單元平行取向用以使配體單元與藥物單元之間的原子數減至最少，此係因為PEG單元之原子不會插入藥物單元與配體單元之間。在LDC中，連接子單元包含在目標位點能夠自LDC釋放生物活性藥物部分體之可釋放組合單元(例如經由細胞內裂解)。在一些情況下，所釋放之藥物部分體為已併入藥物單元中之母體藥物且由此不會仍保持連接至PEG單元或配體單元之降解產物。在其他情況

下，所釋放之生物活性藥物部分體為仍保留連接子單元之一部分(除PEG單元外)之母體藥物。

將稱為可釋放組合單元之具有釋放機制之連接子單元組分插入L^P與藥物單元之間。如同PEG單元一樣，藥物單元具有一個連接(但經由可釋放組合單元間接)至平行連接體單元之末端，及一或多個游離未繫栓末端(或在一些環狀藥物之情況下無游離末端)。具有相對於藥物單元平行(亦即分支)取向之PEG單元之LDC之例示性圖示如下：



短語「串聯取向」或「串聯置放」或「串聯連接」係指LDC中之組分之組態，其中連續取向之組分經連接以使得其具有兩個繫栓末端各末端連接至LDC之不同組分。具有相對於LDC之配體單元及藥物單元串聯取向之PEG單元之LDC係指包含一個末端繫栓至配體(通常經由連接子單元之組分間接)及另一末端繫栓至藥物單元(通常經由連接子單元之其他組分間接)之PEG單元之LDC。PEG單元之串聯置放會使配體單元與藥物單元之間的原子數增加，此係因為PEG單元之至少一些原子會插入藥物單元與配體單元之間。舉例而言，將一或多個表徵PEG單元之(OCH₂CH₂)次單元插入藥物單元與配體單元之間。具有相對於配體單元及藥物單元串聯取向之PEG單元之配體-結合物結合物之例示性圖示如下：



如本文所用，術語「抗體」以最廣泛意義使用，且特定言之涵蓋完整單株抗體、多株抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(例如雙特異

性抗體)及呈現所需生物活性之抗體片段，其限制條件為對於藥物連接子抗體片段具有所需數量之連接位點。抗體之天然形式為四聚體且由相同之兩對免疫球蛋白鏈組成，各對具有一個輕鏈及一個重鏈。在各對中，輕鏈可變區及重鏈可變區(VL及VH)一起主要致使結合至抗原。輕鏈及重鏈可變結構域由雜有三個亦稱為「互補決定區」或「CDR」之高變區之架構區組成。恆定區可藉由免疫系統識別且與免疫系統相互作用。(參見例如 Janeway 等人, 2001, *Immuno. Biology*, 第5版, Garland Publishing, New York)。抗體可具有任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類。抗體可衍生自任何適合物種。在一些態樣中，抗體源自人類或鼠類。舉例而言，抗體可為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

如本文所用，術語「單株抗體」係指自實質上均質之抗體群體獲得之抗體，亦即構成此群體之個別抗體除可少量存在之可能天然存在之突變外為相同的。單株抗體針對單一抗原位點具高度特異性。修飾語「單株」指示抗體係自一群大體上均質之抗體獲得的特徵，且並不應解釋為需要藉由任何特定方法來產生抗體。

「完整抗體」為按抗體類別之需要包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定域(C_L)及重鏈恆定域(C_H1、C_H2、C_H3及C_H4)之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，包含其抗原結合區或可變區。為用於本發明中，抗體片段必須具有需要數量之用於連接至藥物-連接子之位點。連接位點可為天然存在或非天然存在的。

「抗原」為與抗體特異性結合之實體。

術語「特異性結合(specific binding/specifically binds)」意謂抗體或抗體衍生物將以高度選擇性方式與其對應目標抗原結合，而不與許多其他抗原結合。通常，抗體或抗體衍生物以至少約 1×10^{-7} M且較佳 10^{-8} M至 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M之親和力結合且結合至除預定抗原或緊密相關抗原外之非特異性抗原(例如BSA、酪蛋白)之親和力至少兩倍之親和力結合至預定抗原。

術語「抑制(inhibit/inhibition of)」意謂降低可量測量或完全阻止。

術語「治療有效量」係指有效治療哺乳動物之疾病或病症的結合物量。在癌症之情況下，治療有效量之結合物可減少癌細胞數；減小腫瘤大小；抑制(亦即在一定程度上延緩，且較佳終止)癌細胞浸潤於周邊器官中；抑制(亦即在一定程度上延緩，且較佳終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上緩解一或多個與癌症相關之症狀。為達到藥物可抑制所存在之癌細胞生長及/或殺死所存在之癌細胞的程度，藥物可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。關於癌症療法，可例如藉由評定疾病進展(TTP)及/或測定反應率(RR)來量測功效。

除非上下文另外指明，否則術語「實質」或「實質上」係指混合物或樣品群體之大多數，亦即>50%，較佳群體之50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%以上。

術語「細胞內裂解(intracellularly cleaved/intracellular

cleavage)」係指在配體-藥物結合物(例如抗體藥物結合物(ADC)或其類似物)上之細胞內部代謝過程或反應，由此例如藉由可釋放組合單元之作用破壞藥物部分體(D)與配體單元(例如抗體(Ab))之間的共價連接，產生自細胞內部之LDC(包括其降解產物)解離之游離藥物。因此由解離產生之部分為細胞內代謝物。

術語「細胞毒活性」係指藥物或配體-藥物結合物或配體-藥物結合物之細胞內代謝物之殺死細胞效應。細胞毒活性可由IC₅₀值表現，其為使曝露於細胞毒性劑之一半細胞存活之每單位體積之濃度(莫耳或質量)。

術語「細胞生長抑制活性」係指細胞生長抑制劑或具有細胞生長抑制劑作為其藥物單元之配體-藥物結合物或其細胞內代謝物(其中代謝物為細胞生長抑制劑)除殺死細胞外之抗增殖效應。

如本文所用，術語「細胞毒性劑」係指具有細胞毒活性且導致細胞破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、⁶⁰C及Lu之放射性同位素)、化學治療劑及毒素(諸如源於細菌、真菌、植物或動物之小分子毒素或酶促活性毒素)，包括其合成類似物及衍生物。

如本文所用，術語「細胞生長抑制劑」係指具有細胞生長抑制活性，例如抑制細胞引起細胞生長或增殖或有助於細胞生長或增殖之功能的物質。細胞生長抑制劑包括抑制劑，諸如蛋白質抑制劑，例如酶抑制劑。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物中通常以不受調控細胞生長為特徵之生理病狀或病症。「腫瘤」包含一或多種癌細胞。

「自體免疫疾病」在本文中為由個體自身組織或蛋白質產生且針對個體自身組織或蛋白質之疾病或病症。

如本文所用，「患者」係指投與LDC之個體。「患者」之實例包括(但不限於)人類、大鼠、小鼠、天竺鼠、非人類靈長類動物、豬、山羊、牛、馬、狗、貓、鳥及家禽。通常，患者為大鼠、小鼠、狗、非人類靈長類動物或人類。在一些態樣中，患者為需要有效量之LDC的人類。

除非上下文另外指明，否則術語「治療(treat/treatment)」係指治療性治療及預防復發之預防性量度，其中目標為抑制或減緩(減輕)不當之生理變化或病症，諸如癌症之顯現或擴散。就本發明而言，有益或所需臨床結果包括(但不限於)症狀緩解、疾病程度減輕、疾病病況穩定(亦即不惡化)、疾病進程延緩或減緩、疾病病況改善或減輕及病徵緩解(部分或完全)，該等結果為可偵測或不可偵測的。「治療」亦可意謂若不接受治療則相比於預期存活期會延長存活期。需要治療之彼等患者包括已具有病狀或病症之彼等患者以及易於具有病狀或病症之彼等患者。

在癌症之情況下，術語「治療」包括以下中之任一者或所有：抑制腫瘤細胞、癌細胞或腫瘤之生長；抑制腫瘤細胞或癌細胞之複製；減輕總腫瘤負荷或降低癌細胞數；及改善與疾病有關之一或多種症狀。

在自體免疫疾病之情況下，術語「治療」包括以下中之任一者或所有：抑制與自體免疫疾病病況相關之細胞(包括(但不限於)產生自體免疫抗體之細胞)的複製、減輕自體免疫抗體負荷及改善自體免疫疾病

之一或多種症狀。

如本文所用，短語「醫藥學上可接受之鹽」係指醫藥學上可接受之化合物之有機或無機鹽(例如藥物、藥物連接子或配體-藥物結合物)。化合物可含有至少一個胺基且因此可使用該胺基形成酸加成鹽。例示性鹽包括(但不限於)硫酸鹽、三氟乙酸酯、檸檬酸鹽、乙酸鹽、乙二酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸性磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、柳酸鹽、酸性檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、丁二酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、葡萄糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(亦即1,1'-亞甲基-雙(2-羥基-3-萘甲酸鹽))。醫藥學上可接受之鹽可涉及包括另一分子，諸如乙酸根離子、丁二酸根離子或其他相對離子。相對離子可為使母體化合物上之電荷穩定之任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽可於其結構中具有一個以上帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽之一部分的情況可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

除非另外指明，否則術語「烷基」單獨或作為另一術語之一部分係指具有指定數量之碳原子之經取代或未經取代之直鏈或分支鏈飽和或不飽和烴(例如「-C₁-C₈烷基」或「-C₁-C₁₀」烷基分別係指具有1至8或1至10個碳原子之烷基)。當未指定碳原子數時，烷基具有1至8個碳原子。代表性直鏈「-C₁-C₈烷基」基團包括(但不限於)-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基及-正辛基；而分支鏈-

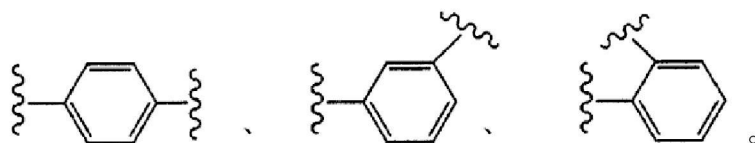
C₁-C₈烷基包括(但不限於)-異丙基、-第二丁基、-異丁基、-第三丁基、-異戊基及-2-甲基丁基；不飽和-C₂-C₈烷基包括(但不限於)-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-異丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、-1-己基、2-己基、-3-己基、-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基及-3-甲基-1-丁炔基。在一些態樣中，烷基未經取代。烷基可經一或多個基團取代。在其他態樣中，烷基將為飽和的。

除非另外指明，否則「伸烷基」單獨或作為另一術語之一部分係指具有規定數量之碳原子(通常為1至10個碳原子)且具有藉由自母體烷烴之同一或兩個不同碳原子移除兩個氫原子衍生之兩個單價基團中心的經取代或未經取代之飽和或不飽和分支鏈或直鏈或環烴基團。典型伸烷基包括(但不限於)：亞甲基(-CH₂-)、1,2-乙基(至CH₂CH₂-)、1,3-丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)及其類似基團。在較佳態樣中，伸烷基為分支鏈或直鏈烴(亦即其不為環烴)。在本文提供之任何實施例中，伸烷基可為飽和伸烷基。

除非另外指明，否則「芳基」單獨或作為另一術語之一部分意謂藉由自母體芳環系統之單個碳原子移除一個氫原子衍生之具有6至20個碳(較佳6至14個碳)原子之經取代或未經取代之單價碳環芳族烴基團。在例示性結構中一些芳基以「Ar」表示。典型芳基包括(但不限於)衍生自苯、經取代之苯、萘、蒽、聯苯及其類似基團的基團。例示性芳基為苯基。

除非另外指明，否則「伸芳基」單獨或作為另一術語之一部分為如上所定義之芳基，其中芳基氫原子中之一者經一鍵置換(亦即其為二

價的)且可如以下結構中所示呈鄰、間或對定位，其中苯基作為例示性基團：



在所選實施例中，例如當平行連接體單元、分支單元或藥物連接單元包含伸芳基時，伸芳基為上文所定義之芳基，其中一或兩個芳基氫原子經一鍵置換(亦即伸芳基可為二價或三價的)。

除非另外指明，否則「 C_3-C_8 雜環」單獨或作為另一術語之一部分係指具有3至8個碳原子(亦稱為環成員)及1至4個獨立地選自N、O、P或S之雜原子環成員且藉由自母體環系統之環原子移除一個氫原子衍生的單價經取代或未經取代之芳族或非芳族單環或雙環系統。可將雜環中之一或多個N、C或S原子氧化。包括雜原子之環可為芳族環或非芳族環。除非另外說明，否則雜環在產生穩定結構之任何雜原子或碳原子處與其側基連接。 C_3-C_8 雜環之代表性實例包括(但不限於)吡咯啉基、氮雜環丁烷基、哌啉基、嗎啉基、四氫呋喃基、四氫哌喃基、苯并呋喃基、苯并噻吩、吲哚基、苯并吡啶基、吡咯基、噻吩基(噻吩)、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、嘧啶基、吡啶基、吡嗪基、噻嗪基、異噻唑基及異噁唑基。

除非另外指明，否則「 C_3-C_8 雜環基」單獨或作為另一術語之一部分係指上文所定義之 C_3-C_8 雜環基團其中雜環基氫原子中之一者經一鍵置換(亦即其為二價的)。在所選實施例中，例如當平行連接體單元、分支單元或藥物連接單元包含雜環基時，雜環基為上文所定義之芳基，其中一或兩個雜環基氫原子經一鍵置換(亦即雜環基可為二價或三價

的)。

除非另外指明，否則「C₃-C₈碳環」單獨或作為另一術語之一部分為藉由自母體環系統之環原子移除一個氫原子而衍生之3員、4員、5員、6員、7員或8員單價經取代或未經取代之飽和或不飽和非芳族單環或雙環碳環。代表性-C₃-C₈碳環包括(但不限於)環丙基、環丁基、環戊基、環戊二烯基、環己基、環己烯基、1,3-環己二烯基、1,4-環己二烯基、環庚基、1,3-環庚二烯基、1,3,5-環庚三烯基、環辛基及環辛二烯基。

除非另外指明，否則「C₃-C₈碳環基」單獨或作為另一術語之一部分係指上文所定義之C₃-C₈碳環基，其中碳環基氫原子中之另一者經一鍵置換(亦即其為二價的)。在所選實施例中，例如當平行連接體單元、分支單元或藥物連接單元包含碳環基時，碳環基為上文所定義之碳環，其中一或兩個碳環基氫原子經一鍵置換(亦即碳環基可為二價或三價的)。

除非另外指明，否則術語「雜烷基」單獨或與另一術語組合除非另行說明，否則意謂完全飽和或含有1至3不飽和度且由規定數量之碳原子及1至10個、較佳1至3個選自由O、N、Si及S組成之群的雜原子組成之穩定直鏈或支鏈烴或其組合，且其中可視情況將氮及硫原子氧化且可視情況將氮雜原子四級鉸化。雜原子O、N及S可位於雜烷基之任何內部位置處或烷基與分子之其餘部分連接之位置處。雜原子Si可位於雜烷基之任何位置處，包括烷基與分子之其餘部分連接之位置。實例包括 -CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-NH-CH₂-CH₂-NH-

$\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_3$ 及 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 。至多兩個雜原子可為連續的，諸如 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 及 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。在較佳實施例中， C_1-C_4 雜烷基或伸雜烷基具有1至4個碳原子及1或2個雜原子且 C_1-C_3 雜烷基或伸雜烷基具有1至3個碳原子及1或2個雜原子。在一些態樣中，雜烷基伸雜烷基為飽和的。

除非另外指明，否則術語「伸雜烷基」單獨或作為另一取代基之一部分意謂如藉由 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 及 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 所例示之自雜烷基(如上文所論述)衍生之二價基團。對於伸雜烷基，雜原子亦可佔據任一或兩個鏈末端。此外，對於伸烷基及伸雜烷基鍵聯基團，未提示鍵聯基團之定向。在所選實施例中，例如當平行連接體單元、分支單元或藥物連接單元包含伸雜烷基時，伸雜烷基為上文所定義之芳基，其中一或兩個雜烷基氫原子經一鍵置換(亦即伸雜烷基可為二價或三價的)。

「經取代之烷基」及「經取代之芳基」分別意謂一或多個氫原子各自獨立地經取代基置換之烷基及芳基。典型取代基包括(但不限於) $-\text{X}$ 、 $-\text{R}$ 、 $-\text{O}^-$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{S}^-$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{NR}_3$ 、 $=\text{NR}$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCN}$ 、 $-\text{SCN}$ 、 $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{N}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NRC}(\text{=O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{=O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{=O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{S}(\text{=O})_2\text{R}$ 、 $-\text{OS}(\text{=O})_2\text{OR}$ 、 $-\text{S}(\text{=O})_2\text{NR}$ 、 $-\text{S}(\text{=O})\text{R}$ 、 $-\text{OP}(\text{=O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{P}(\text{=O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{AsO}_2\text{H}_2$ 、 $-\text{C}(\text{=O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{=O})\text{X}$ 、 $-\text{C}(\text{=S})\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{C}(\text{=S})\text{OR}$ 、 $\text{C}(\text{=O})\text{SR}$ 、 $\text{C}(\text{=S})\text{SR}$ 、 $\text{C}(\text{=O})\text{NR}_2$ 、 $\text{C}(\text{=S})\text{NR}_2$ 或 $\text{C}(\text{=NR})\text{NR}_2$ ，其中各 X 獨立地為鹵素： $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 或 $-\text{I}$ ；且各 R 獨立

地為-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₆-C₂₀芳基、-C₃-C₁₄雜環、保護基或前藥部分。典型取代基亦包括(=O)。如上所述之伸烷基、碳環、碳環基、伸芳基、雜烷基、伸雜烷基、雜環及雜環基亦可以類似方式取代。

如本文所使用，術語「游離藥物」係指不會直接或間接共價連接至PEG單元或配體單元之降解產物之生物活性藥物部分體。游離藥物可指藉由LDC中之可釋放組合單元提供之藥物，因為其在經由釋放機制自連接子單元裂解時立即存在，或可指後續細胞內轉化或代謝。在一些態樣中，游離藥物將具有式H-D或可作為帶電部分存在。游離藥物為可發揮所需生物效應之藥理學活性物質。在一些態樣中，藥理學活性物質可不為母體藥物且可包含連接子單元之組分，其不會經歷後續細胞內代謝。

配體-藥物結合化合物及相關中間物

本發明部分基於以下發現：具有不利PK特性之配體-藥物結合物(LDC)之PK特性可藉由如本文所述使PEG單元以對於其藥物單元平行取向置放來改良。在一些態樣中，甚至在較高藥物負載下，聚乙二醇化結合物之清除概況與未結合配體類似(亦即靶向劑，諸如抗體或相關抗原結合片段)。LDC包含配體單元(亦即靶向配體)、連接子單元及藥物單元。連接子單元在其連接至靶向配體之前或之後使藥物單元連接至配體單元且包含相對於藥物單元平行組態之PEG單元。平行組態由經由可釋放組合單元使藥物單元及PEG單元連接至平行連接體單元產生。連接子單元在連接至藥物單元時可稱為藥物連接子。LDC群體之平均藥物連接子負載較佳為每配體單元至少約6、約7或約8個藥物連接子。

PEG單元經設計賦予藥物連接子之疏水性組分最佳程度之疏水性遮蔽。出於彼原因，如本文中所教示併入PEG單元尤其適用於與未結合配體相比原本具有充分疏水性而不利地影響所得結合物之藥物動力學之藥物連接子。彼等較不良藥物動力學包括較大血漿清除率。因此，展示相對於未結合配體顯著較大血漿清除率及對應較低血漿暴露之配體藥物結合物將從本發明中受益。

配體-藥物結合物具有較為有利之藥物動力學特性，此係歸因於藥物單元及PEG單元之疏水性藥物連接子部分體內之平行取向，由此會減小或除去藥物單元及/或藥物連接子部分體之其他組分之疏水性對血漿清除率之不利影響(亦即遮蔽藥物連接子部分體之疏水性)。在平行連接體單元用以按適當分支組態連接藥物單元、PEG單元及配體以提供所需平行取向時，平行取向藉由平行連接體單元(L^P)實現。平行連接體單元可視為具有結合物組分之連接位點之架構，其可多重處理以具有多個與PEG單元平行取向之藥物單元以提供聚乙二醇化多重處理架構。在一些實施例中，疏水性藉由平行取向之PEG單元遮蔽之藥物連接子部分體中之疏水性組分為疏水性藥物單元。

藥物單元經由可釋放組合單元連接至平行連接體單元。可釋放組合單元使得在目標細胞處高效釋放藥物，足以誘導例如細胞毒性或細胞生長抑制性。通常，可釋放組合單元經設計以一旦結合物內化至目標細胞中即高效釋放游離藥物，但亦可經設計以在目標細胞內或附近釋放游離藥物。適用於裂解之識別位點為使得高效釋放LDC之藥物單元的彼等位點。通常，識別位點為肽裂解位點(諸如在基於肽之可釋放組合單元中)、糖裂解位點(諸如在基於糖於中可釋放組合單元中)或二

硫鍵裂解位點(諸如在基於二硫鍵物之可釋放組合單元中)。肽裂解位點之實例包括藉由細胞內蛋白酶(諸如溶酶體中所存在之彼等蛋白酶)識別之彼等位點。糖裂解位點之實例包括藉由糖苷酶(包括葡萄糖醛酸酶，諸如 β -葡萄糖醛酸酶)識別之彼等位點。

任何生物活性化合物(亦即藥物)均可用作本發明中之藥物單元。生物活性化合物可具有適合用於將其作為藥物單元併入LDC中之位點，或可經修飾以達到彼目的，同時當自LDC釋放可能保留或可能未保留連接子單元之一部分之經修飾藥物時實質上仍保留母體藥物之所需生物活性。較佳藥物單元使得釋放母體生物活性化合物。藥物單元可為奧瑞他汀或非奧瑞他汀藥物，其為疏水性藉由平行取向之藥物單元遮蔽之藥物連接子部分體之疏水性組分。在藥物單元、可釋放組合單元或藥物單元/可釋放組合單元組合實質上具疏水性由此不利地影響所得結合物之藥物動力學之實施例中，本發明之效應更為顯著。疏水性藥物之實例包括單甲基奧瑞他汀E及疏水性與單甲基奧瑞他汀E相當或大於其之藥物。疏水性可釋放組合單元之實例包括具有本文中特定例示之疏水性自體分解型組分之基於肽及基於糖之可釋放組合單元，以及疏水性與此類可釋放組合單元相當或大於其之可釋放組合單元。

疏水性可為使用SlogP來量測。SlogP定義為辛醇/水分配係數(包括隱式氫)之對數且可使用程式MOETM由化學計算組來計算(使用Wildman, S.A., Crippen, G.M.; Prediction of Physiochemical Parameters by Atomic Contributions; J. Chem. Inf. Comput. Sci. 39第5期 (1999) 868-873計算SlogP值)。當提及具有與參比藥物單元或可釋放組合單元相當之疏水性之藥物單元或可釋放組合單元時，SlogP值

在參比藥物單元或可釋放組合單元之SlogP值的20%內，較佳在10%內。

鑒於以上，在一組實施例中，本發明提供包含配體-藥物結合物群體之一種配體-藥物結合物組合物。配體-藥物結合物包含配體單元及多個連接至其之藥物連接子單元。較佳地，組合物中每配體平均約6至約14、約6至約12、約6至約10、約8至約14、約8至約12、約8至約10個藥物連接子單元。與配體之例示性連接經由硫醚鍵聯實現。配體上之例示性結合位點為由還原鏈間二硫基及/或引入配體中之含有巯基之基團(諸如所引入之半胱胺酸)獲得之巯基。連接可例如經由由鏈間二硫鍵及0至8個引入之半胱胺酸殘基獲得之巯基實現。

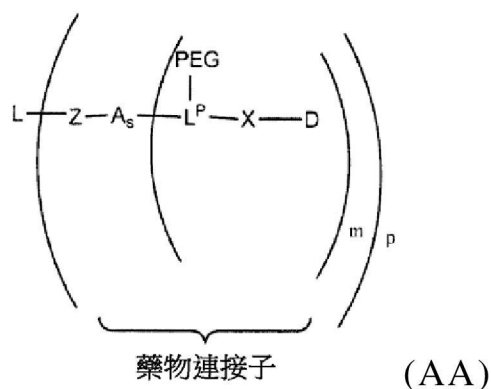
在一組相關實施例中，提供向患者投與配體-藥物結合物以治療疾病之方法。該疾病可為例如癌症或自體免疫疾病。配體-藥物結合物以治療有效量及治療有效時程投與。

實施例

下文描述本發明之許多實施例，之後為組成配體-藥物結合物及其中間物之組分之較詳細論述。如本文所述，任一關於配體-藥物結合物及其中間物之組分之所選實施例均可適用於本發明之各態樣及每一態樣，或其可指單個態樣。所選實施例可以任何組合組合於一起。

配體-藥物結合化合物

在一組實施例中，本文提供能夠釋放游離藥物之LDC化合物，其中LDC化合物由以下式AA表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L為配體單元；

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z為延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^P為平行連接體單元；

A為視情況存在之分支單元；

下標p為1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至約12)範圍內之整數；

下標m為1至4範圍內之整數；且較佳為1或2；及

下標s為0或1，其限制條件為當s為0時，m為1且當s為1時，m為2、3或4。

在另一組實施例中，式AA不表示個別LDC化合物，但表示LDC組合物(亦即包含個別LDC化合物群體之組合物)。在此類實施例中，p表示組合物中每配體藥物連接子之平均數量。在此類實施例中，p通常不為整數值且可在1至約14，較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)之範圍內。其他變數(例如L、Z、A、L^P、PEG、X、D、s及m)保持相同。

在另一組實施例中，LDC組合物包含LDC化合物群體、由式AA表示之個別LDC化合物，其中對於各個別LDC化合物， p 獨立地選自1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至約12)範圍內之整數且組合物中每配體藥物連接子之平均數量為1至約14、較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)。

在一些態樣中，使1至32或2至32(較佳6至32或8至32)個藥物單元連接至各配體單元。配體-藥物結合物群體每配體可具有平均1至32或約2至32(較佳約6至32或約8至32)個藥物單元。

由式AA表示之LDC化合物或LDC組合物之所選實施例包括彼等實施例，其中：

1) m 為1且 s 為0；

2) m 為2至4且 s 為1；

3) m 為2且 s 為1；

4) m 為1； s 為0；且對於LDC化合物 p 為6至14、8至14或8至12範圍內之整數，或對於LDC組合物 p 為6至約14、約8至約14或約8至約12範圍內之數量；

5) m 為2-4； s 為1；且對於LDC化合物 p 為6至14、8至14或8至12範圍內之整數，或對於LDC組合物 p 為6至約14、約8至約14或約8至約12範圍內之數量；

6) m 為2； s 為1；且對於LDC化合物 p 為6至14、8至14或8至12範圍內之整數，或對於LDC組合物 p 為6至約14、約8至約14或約8至約12範圍內之數量；

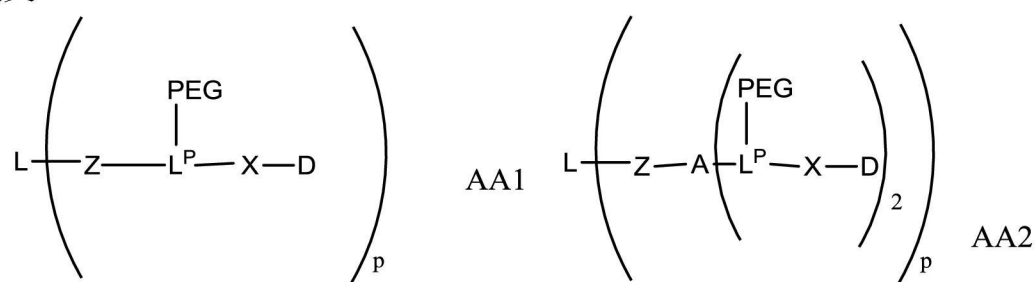
7) m 為2； s 為1；且 p 為8

8) m為1；s為0；且p為8

9) 此段落之1-8中所述實施例中之任一者，其中有1至32或約2至32(較佳約6至約32或約8至約32)個藥物單元連接至配體單元。

10) 此段落之1-9中所述實施例中之任一者，其中 L^P 為天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺。

由式AA表示之LDC化合物或LDC組合物之所選實施例具有以下式AA1及AA2：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L為配體單元；

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z為延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^P 為平行連接體單元；

A為所存在之分支單元；及

對於配體-藥物結合化合物，下標p為1至14範圍內之整數且較佳在2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至12)之範圍內，或對於配體-藥物結合物組合物，p為1至約14範圍內之數量，且較佳在約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)之範圍內。

在本文提供之p值存在之LDC化合物(包括以上彼等化合物)之任一所

選實施例中， p 可為1至14、2至14、2至10、4至12、6至14、6至12、8至12或8至10範圍內之整數。下標 p 可為1、或2、或3、或4、或5、或6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14。

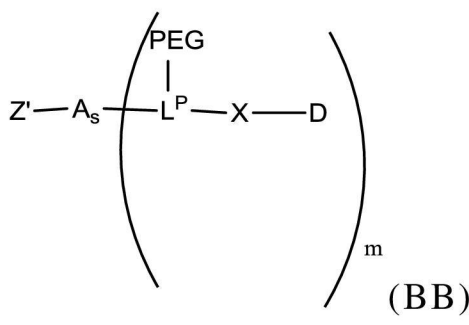
在本文提供之 p 值存在之LDC組合物(包括以上彼等組合物)之任一所選實施例中， p 在1至約14、約2至約14、約2至約10、約4至約12、約6至約14、約6至約12、約8至約12約8至約10之範圍內。下表 p 可為1或約1、或2或約2、或3或約3、或4或約4、或5或約5、或6或約6、或7或約7、或8或約8、或9或約9、或10或約10、或11或約11、或12或約12、或13或約13、或14或約14。

在另一組實施例中，本文提供能夠釋放游離藥物之配體-藥物結合物(LDC)，其中1至32個藥物單元(較佳2至32個藥物單元、6至32個藥物單元、8至32個藥物單元、6至14個藥物單元、約8至14個藥物單元、或約8至約12個藥物單元)經由連接子單元結合至LDC之靶向配體，其中藥物連接子部分體之各單元單元經由可裂解組分(亦即可釋放組合單元)連接至其連接子單元，該可裂解組分在接近配體(L)所靶向之位點處釋放游離藥物，且其中LDC進一步包含連接配體單元之平行連接體單元(L^p)及聚乙二醇(PEG)單元，其中PEG及連接子藥物部分體之藥物單元彼此以平行取向連接。聚乙二醇單元具有4至72(較佳6至72個重複- OCH_2CH_2 -單元，更佳6至36、或8至24)個重複單元。配體可為抗體單元，較佳為完整抗體單元。可裂解連接子可包含例如肽裂解位點、糖裂解位點或二硫鍵裂解位點。藥物可為奧瑞他汀或非奧瑞他汀。奧瑞他汀或非奧瑞他汀可具有與單甲基奧瑞他汀E相當或大於其之疏水性。奧瑞他汀可為單甲基奧瑞他汀E。在一些態樣中，ADC呈現改良之藥物

動力學特性，與缺乏PEG單元或含有PEG單元但以相對於抗體及藥物串聯取向置放之相同或實質上相同之ADC相比。在一些態樣中，ADC呈現與未結合時之抗體組分相同或實質上相同之藥物動力學特性。

藥物連接子化合物

在一些態樣中，當設計配體-藥物結合物時，需要在結合至配體單元之前合成完整藥物連接子。在此類實施例中，藥物連接子化合物充當中間化合物。如下提供例示性藥物連接子化合物，其結構由式BB表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z'為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^P為平行連接體單元；

A為視情況存在之分支單元；

下標m為1至4範圍內之整數；且較佳為1或2；

下標s為0或1，其限制條件為當s為0時，m為1且當s為1時，m為2至4。

式BB之所選實施例包括彼等實施例，其中：

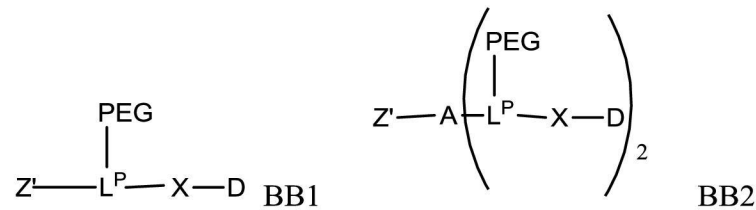
1) m為1且s為0；

2) m為2、3或4且s為1；

3) m為2且s為1；

4) 此段落之1-3中所述實施例中之任一者，其中 L^P 為天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺。

式BB之所選實施例包括下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z'為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^P 為平行連接體單元；及

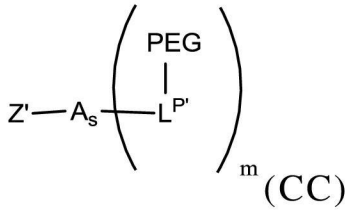
A為所存在之分支單元。

中間連接子化合物

在一些態樣中，當設計配體-藥物結合物時，可能需要在連接配體-藥物結合物之-X-D組分之前使連接子之組分與配體單元(例如抗體)結合。舉例而言，在使用含有巰基之取代基(例如半胱胺酸)連接-X-D組分之實施例中，可能需要在連接配體-藥物結合物之-X-D組分之前使連接子之組分與配體單元(例如抗體)結合。在一些此類實施例中，平行連接體單元能夠與可釋放組合單元形成共價鍵聯，但尚未與其連接。平行連接體單元可經保護基保護以易於合成。保護基可在即將連接至可

釋放組合單元之前移除。

如下提供例示性中間連接子化合物，其具有式CC：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

PEG為聚乙二醇單元；

Z'為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；

A為視情況存在之分支單元；

L^{P'}為能夠與藥物釋放單元形成共價連接之平行連接體單元；

下標m為1至4範圍內之整數；且較佳為1或2；及

下標s為0或1，其限制條件為當s為0時，m為1且當s為1時，m為2、3或4。

式CC之所選實施例包括下式。



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

PEG為聚乙二醇單元；

Z'為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；

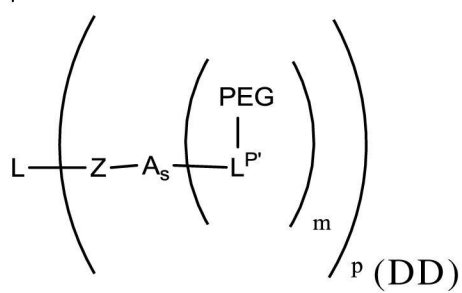
-X-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元；

A為分支單元；及

L^{P'}為能夠與-X-D形成共價連接之平行連接體單元。

在一些態樣中，中間連接子化合物將結合至配體單元以形成中間配

體-連接子化合物。中間配體-連接子化合物之例示性實施例由以下所示結構表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L 為配體單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z 為延伸子單元；

$L^{P'}$ 為能夠與-X-D形成共價連接之平行連接體單元；

A 為視情況存在之分支單元；

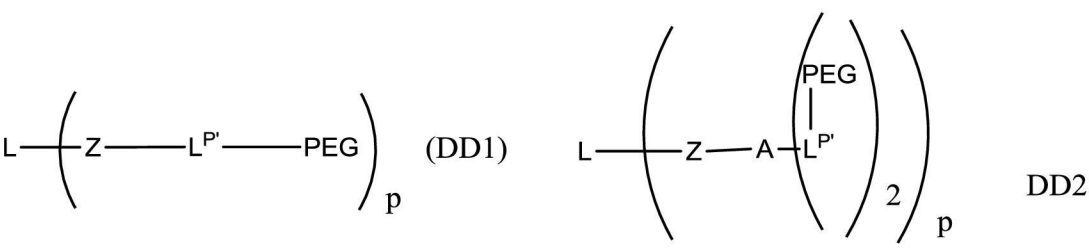
下標 p 為1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至12)範圍內之整數；

下標 m 為1至4範圍內之整數；較佳為1或2；及

下標 s 為0或1，其限制條件為當 s 為0時， m 為1且當 s 為1時， m 為2、3或4。

在另一組實施例中，式DD不表示個別中間配體-連接子化合物，但組合物包含個別中間配體連接子化合物之群體。在此類實施例中， p 表示組合物中每配體中間連接子之平均數量。在此類實施例中， p 通常不為整數值且可在1至約14，較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)之範圍內。其他變數(例如 L 、 Z 、 A 、 $L^{P'}$ 、PEG、 s 及 m)保持相同。

式DD之所選實施例包括下式。



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L為配體單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z-為延伸子單元；

-X-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元；

L^{P'}為能夠與-X-D形成共價連接之平行連接體單元；

A為分支單元；及

對於中間配體連接子化合物，下標p為1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至12)範圍內之整數，或對於中間配體-連接子組合物，下標p為1至約14、較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)範圍內之數量。

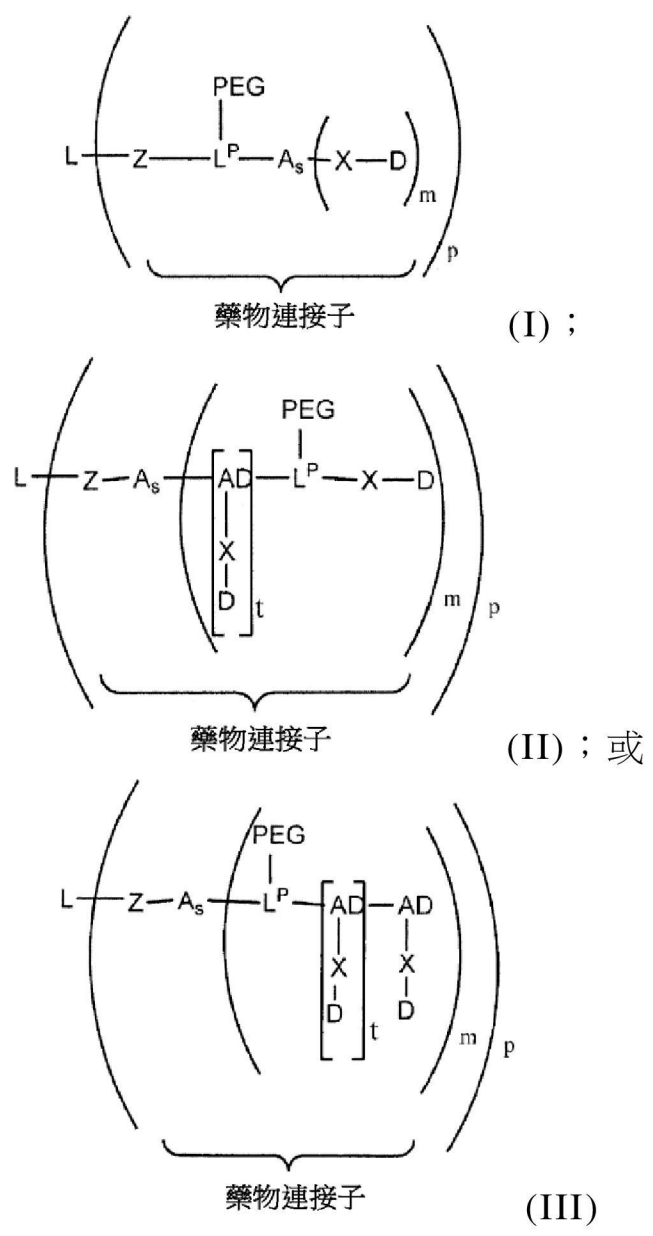
額外實施例

式AA之結合物及其中間物每PEG單元包含一個藥物單元，比率為1:1。然而，可能需要提供每PEG單元具有1單元藥物或每PEG單元具有2單元或大於2單元藥物之藥物結合物。相應地，本發明提供每PEG單元具有至少一單元藥物之配體-藥物結合物及其中間物。

熟習此項技術者將瞭解，只要存在配體-藥物結合物之核心組分(亦即配體單元、延伸子單元、平行連接體單元、PEG單元、可釋放組合單元及藥物單元)，即可使用本文提供之教示內容容易地實現包含額外藥物單元之配體-藥物結合物之合成。包含額外分支單元及/或藥物連

接單元使得每PEG單元連接多個單元之藥物。額外-X-D單元經由分支單元或藥物連接單元進行連接。

在一組實施例中，此類能夠釋放游離藥物之LDC化合物由式(I)、(II)或(III)表示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L為配體單元；

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z為延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^P 為平行連接體單元；

A為視情況存在之分支單元；

AD為藥物連接單元；

下標p為1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至12)範圍內之整數

下標t為0至8範圍內之整數，且較佳為0、1、2或3；

下標m為1至4範圍內之整數；且較佳為1或2；及

下標s為0或1，其限制條件為當s為0時，m為1且當s為1時，m為2、3或4。

在另一組實施例中，式I、II及III不表示個別LDC化合物，但表示LDC組合物(亦即包含個別LDC化合物群體之組合物)。在此類實施例中，p表示組合物中每配體藥物連接子之平均數量。在此類實施例中，p通常不為整數值且可在1至約14，較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)之範圍內。其他變數(例如L、Z、A、 L^P 、PEG、X、D、AD、s、m及t)保持相同。

在另一組實施例中，LDC組合物包含LDC化合物群體、由式I、II或II表示之個別LDC化合物，其中對於各個別LDC化合物，p獨立地選自1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至約12)範圍內之整數且組合物中每配體之藥物連接子之平均數量為1至約14，較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)。

在一些態樣中，使1至32或2至32(較佳6至32或8至32)個藥物單元連

接至各配體單元。配體-藥物結合物群體每配體可具有平均1至32或約2至32(較佳約6至32或約8至32)個藥物單元。

式I、II及III之所選實施例包括彼等實施例，其中：

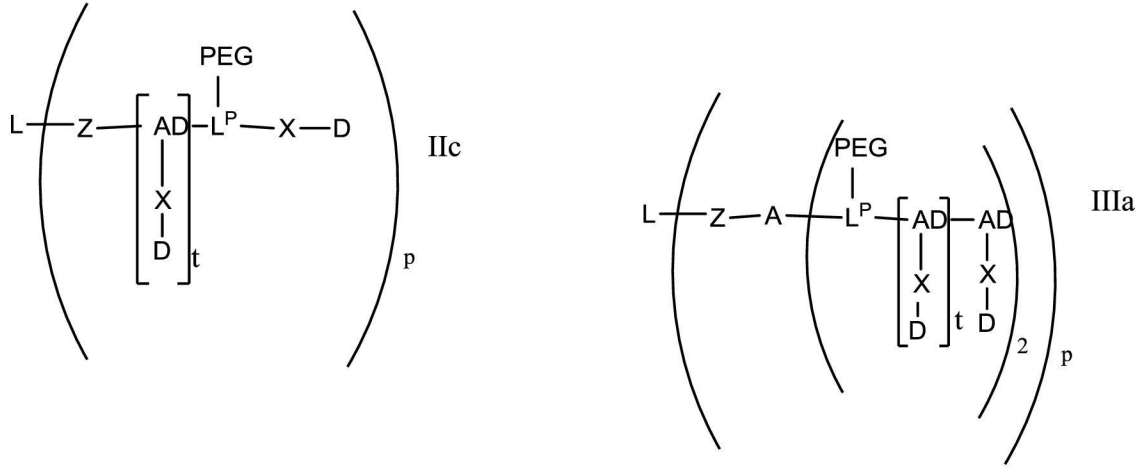
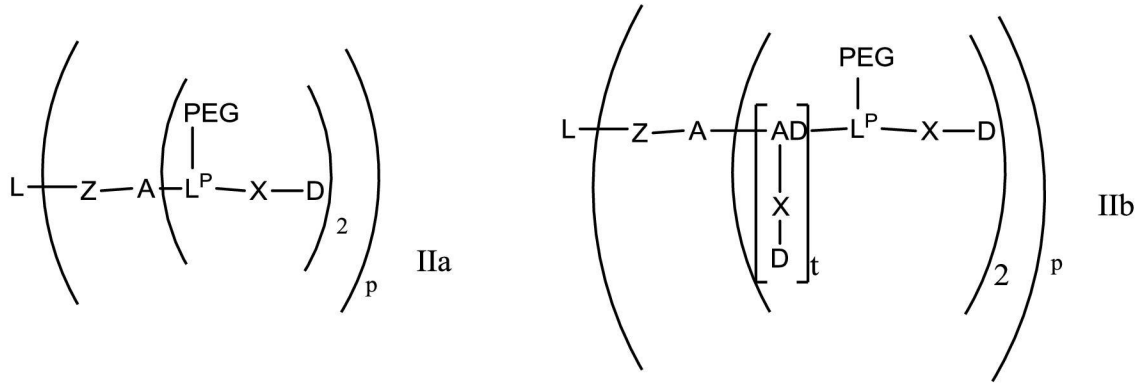
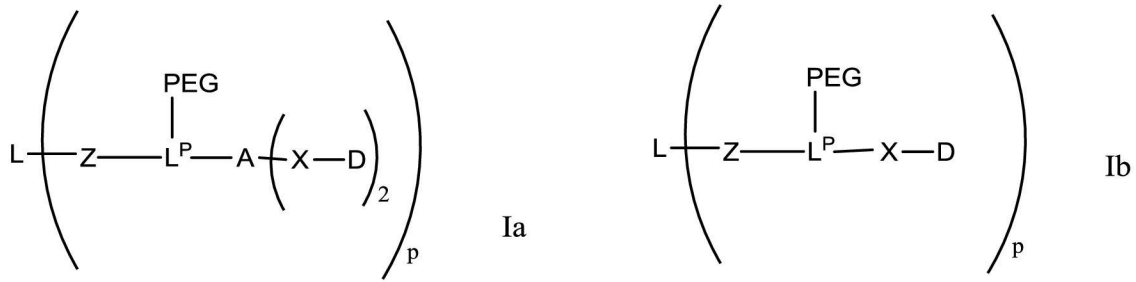
- 1) m 為1且 s 為0；
- 2) m 為2、3或4且 s 為1；
- 3) m 為2且 s 為1；
- 4) m 為1； s 為0；且對於配體-藥物結合化合物， p 為2至12、4至12、8至14或8至12範圍內之整數，或對於配體-藥物結合物組合物， p 為約2至約12、約4至約12、約8至約14或約8至約12範圍內之數量；
- 5) m 為2、3或4； s 為1；且對於配體-藥物結合化合物， p 為約2至約12、約4至約12、約8至約14或約8至約12範圍內之整數，或對於配體-藥物結合物組合物， p 為約2至約12、約4至約12、約8至約14或約8至約12範圍內之數量；
- 6) m 為2； s 為1；且對於配體-藥物結合化合物， p 為2至12、4至12、6至14、6至12、8至14或約8至約12範圍內之整數，或對於配體-藥物結合物組合物， p 為約2至約12、約4至約12、約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12範圍內之數量；
- 7) m 為2； s 為1；且 p 為8；
- 8) m 為1； s 為0；且 p 為8；
- 9) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為0；
- 10) 此段落之1-8中所述實施例中之任一者，其中 t 為1-8；
- 11) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為1；
- 12) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為2；

- 13) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為3；
- 14) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為4；
- 15) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為5；
- 16) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為6；
- 17) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為7；
- 18) 此段落之1-8中所述實施例之任一者，其中 t 為8；
- 19) 此段落之1-18中所述實施例中之任一者，其中有1至32或約2至32個藥物單元連接至配體單元；
- 20) 此段落之1-18中所述實施例中之任一者，其中有6至32或約8至32個藥物單元連接至配體單元；及
- 21) 此段落之1-20中所述實施例中之任一者，其中 L^P 為天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺。

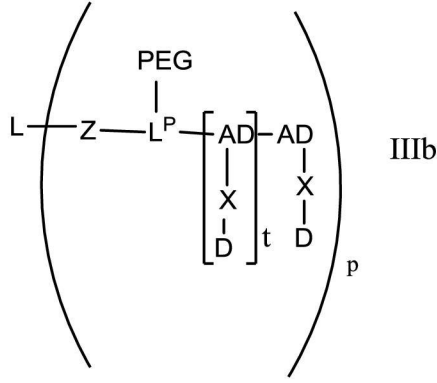
在本文提供之 p 值存在之LDC化合物(包括以上彼等化合物)之任一所選實施例中， p 可為1至14、2至14、2至10、4至12、6至14、6至12、8至12或8至10範圍內之整數。下標 p 可為1、或2、或3、或4、或5、或6、或7、或8、或9、或10、或11、或12、或13、或14。

在本文提供之 p 值存在之LDC化合物(包括以上彼等化合物)之任一所選實施例中， p 在1至約14、約2至約14、約2至約10、約4至約12、約6至約14、約6至約12、約8至約12或約8至約10之範圍內。下標 p 可為為1或約1、或2或約2、或3或約3、或4或約4、或5或約5、或6或約6、或7或約7、或8或約8、或9或約9、或10或約10、或11或約11、或12或約12、或13或約13、或14或約14。其他變數(例如 L 、 Z 、 A 、 L^P 、PEG、 X 、 D 、 AD 、 s 、 m 及 t)保持相同。

式I、II及III之所選實施例包括以下式Ia、Ib、IIa、IIb、IIc、IIIa及IIIb。



及



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：
L為配體單元；

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z為延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^p 為平行連接體單元；

A為視情況存在之分支單元；及

AD為藥物連接單元；

對於配體-藥物結合化合物，下標p為1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至12)範圍內之整數，或對於配體-藥物結合物組合物，下標p為1至約14、較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)範圍內之數量。

下標t為0至8範圍內之整數；且較佳為0、1、2或3。

式Ia、Ib、IIa、IIb、IIb、IIc、IIIa及IIIb之所選實施例包括具有彼等實施例，其中：

- 1) t為0；
- 2) t為1至8；
- 3) t為1；
- 4) t為2；
- 5) t為3；
- 6) t為4；
- 7) t為5；
- 8) t為7；
- 9) t為8；

10) 此段落之1-10中所述實施例中之任一者，其中有1至32、約2至32、6至32或約8至32個藥物單元連接至配體單元；及

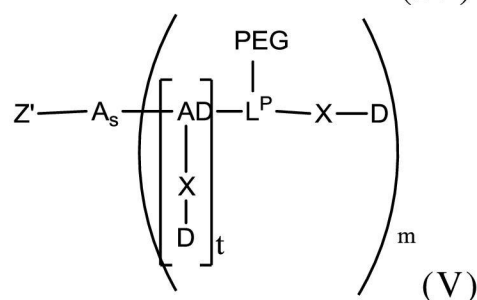
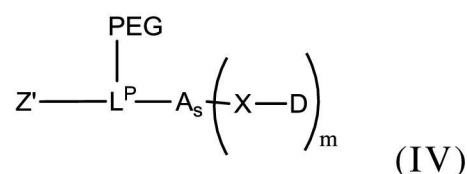
11) 此段落之1-11中所述實施例中之任一者，其中 L^P 為天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺。

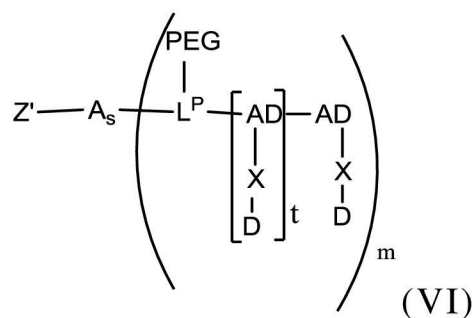
LDC組合物之式Ia、Ib、IIa、IIb、IIb、IIc、IIIa及IIIb之實施例包括彼等實施例，其中p為6至約12；約8至約12及約8至約10範圍之數量。對於彼等組合物，下標p可為6或約6、或7或約7、或8或約8、或9或約9、或10或約10、或11或約11、或12或約12、或13或約13、或14或約14。在任一此等實施例中，t可為0至8、1至8，或為0、1、2、3、4、5、6、7或8。

LDC化合物之式Ia、Ib、IIa、IIb、IIb、IIc、IIIa及IIIb之實施例包括具有以下特徵之彼等實施例，其中p為6至12；8至12及8至10範圍內之整數。下標p可為6、7、8、9、10、11、12、13或14。在任一此等實施例中，t可為0至8、1至8，或為0、1、2、3、4、5、6、7或8。

藥物連接子化合物

如下提供每PEG單元具有至少1單元藥物之例示性藥物連接子化合物，其具有式IV、V、VI：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z'為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^p為平行連接體單元；

A為視情況存在之分支；

AD為藥物連接單元；

下標t為0至8範圍內之整數；且較佳為0、1、2或3；

下標m為1至4範圍內之整數；且較佳為1或2；

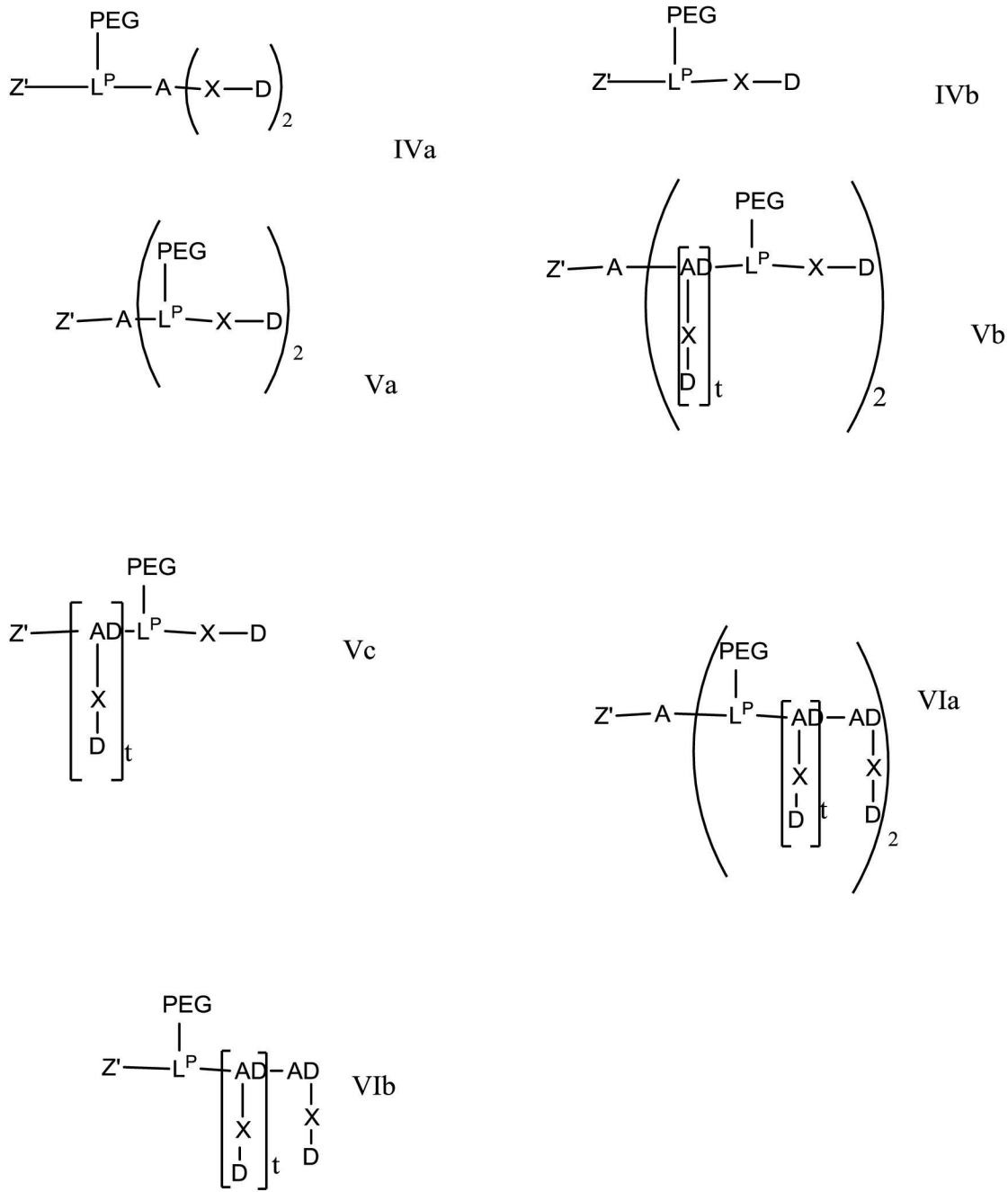
下標s為0或1，其限制條件為當s為0時，m為1且當s為1時，m為2、3或4。

式IV、V及VI之所選實施例包括彼等實施例，其中：

- 1) m為1且s為0；
- 2) m為2至4且s為1；
- 3) m為2且s為1；
- 4) 此段落之1-3中所示實施例之任一者，其中t為0
- 5) 此段落之1-3中所示實施例之任一者，其中t為1
- 6) 此段落之1-3中所示實施例之任一者，其中t為2；及

7) 此段落之1-6中所述實施例中之任一者，其中L^P為天然或非天然
胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺。

式IV、V及VI之所選實施例包括下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

D為藥物單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z'為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；

X為可釋放組合單元；

L^P 為平行連接體單元；

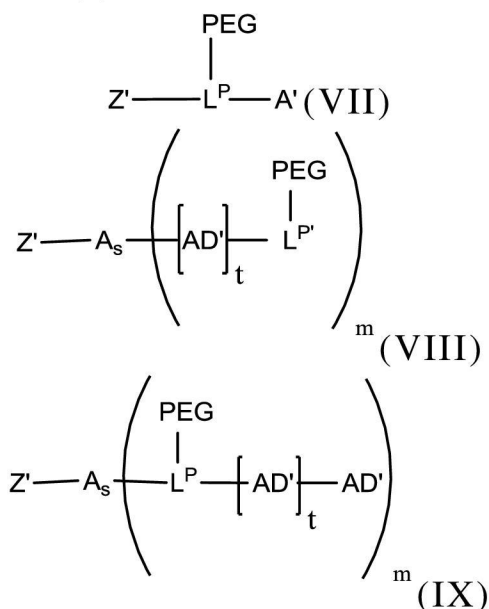
A為視情況存在之分支；

AD為藥物連接單元；及

下標t為0至8範圍內之整數；且較佳為0、1、2或3。

中間連接子化合物

每PEG單元包含至少一單元藥物之例示性中間物連接子化合物如下，其具有式VII、VIII或IX：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

PEG為聚乙二醇單元；

Z'為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；

A'為能夠與2至4個X-D單元、較佳2個X-D單元形成共價連接之分支單元；

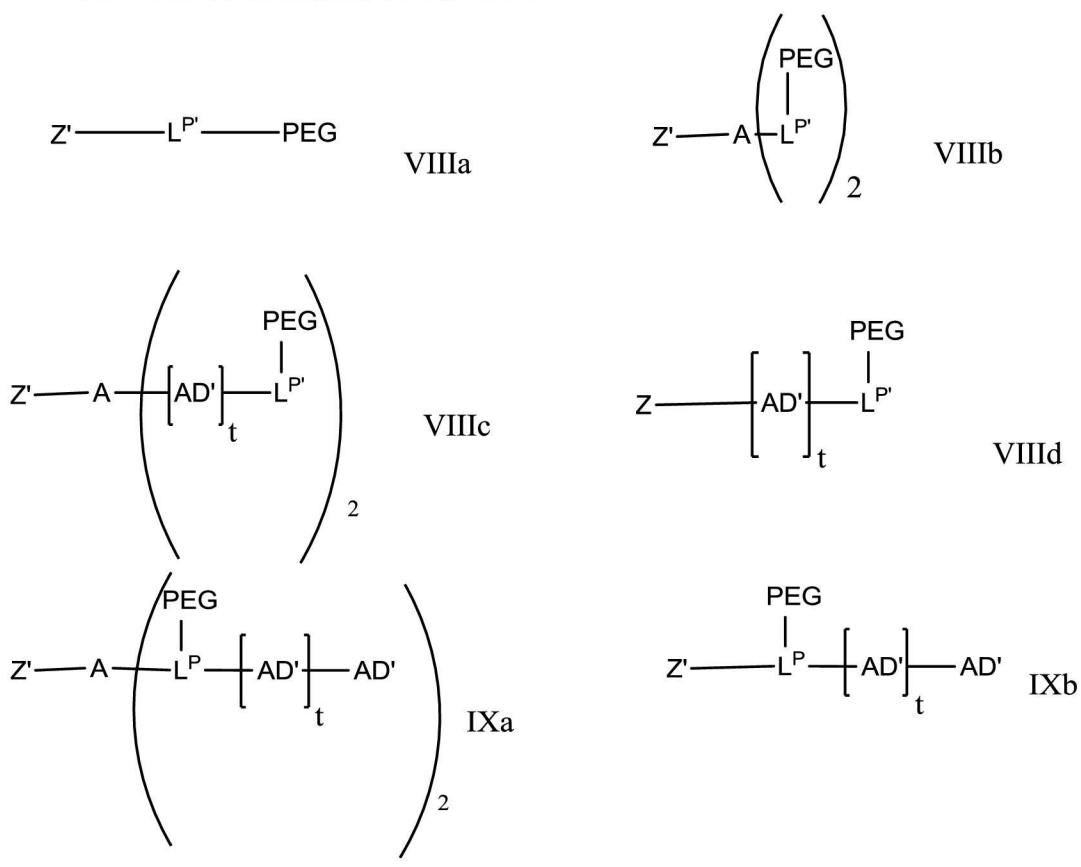
A為視情況存在之分支單元；

AD'為能夠與-X-D單元形成共價連接之藥物連接單元；

L^P 為平行連接體單元；

$L^{P'}$ 為能夠與-X-D形成共價連接之平行連接體單元；
下標 t 為0至8範圍內之整數；且較佳為0、1、2或3；
下標 m 為1至4範圍內之整數；且較佳為1或2；
下標 s 為0或1，其限制條件為當 s 為0時， m 為1且當 s 為1時， m 為2、3或4；及
其中-X-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元。

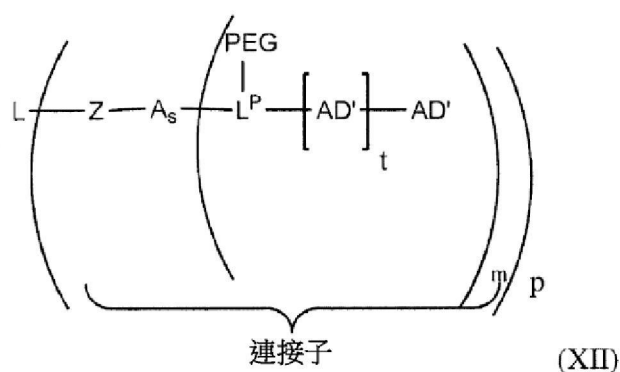
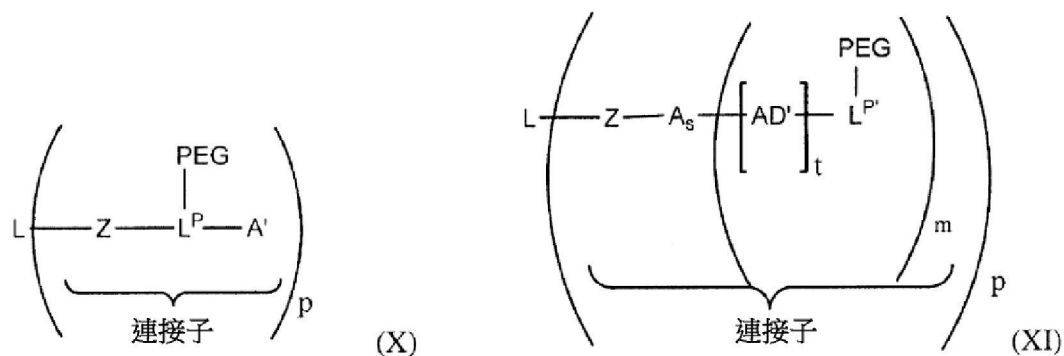
式VIII或IX之所選實施例包括以下：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：
PEG為聚乙二醇單元；
 Z' 為能夠與配體單元形成共價連接之延伸子單元；
 A 為分支單元；
 AD' 為能夠與-X-D單元形成共價連接之藥物連接單元；
 L^P 為平行連接體單元；

$L^{P'}$ 為能夠與-X-D形成共價連接之平行連接體單元；及
下標 t 為0至8範圍內之整數；且較佳為0、1、2或3；及
其中-X-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元。

中間連接子化合物及式 VII、VIII、XI、VIIIa、VIIIb、VIIIc、VIIIId、IXa及IXb、延伸子單元可結合至配體單元(例如抗體)以形成使1至14個連接子連接至各配體單元之中間配體-連接子化合物。例示性實施例如下所示，其中 p 為1至14且所有其他可變基團係如本文針對中間連接子化合物所述。例示性配體-連接子化合物及包含此等化合物之組合物(亦即配體-連接子組合物)如下，其具有由式X、XI、XII表示之結構：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L 為配體單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z -為延伸子單元；

-X-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元；

L^P 為平行連接體單元；

$L^{P'}$ 為能夠與-X-D形成共價連接之平行連接體單元；

A'為能夠與2至4個X-D單元、較佳2個X-D單元形成共價連接之分支單元；

A為視情況存在之分支單元；

AD'為能夠與X-D單元形成共價連接之藥物連接單元；

對於配體-連接子化合物，下標p為1至14、較佳2至12(較佳6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)範圍內之整數，或

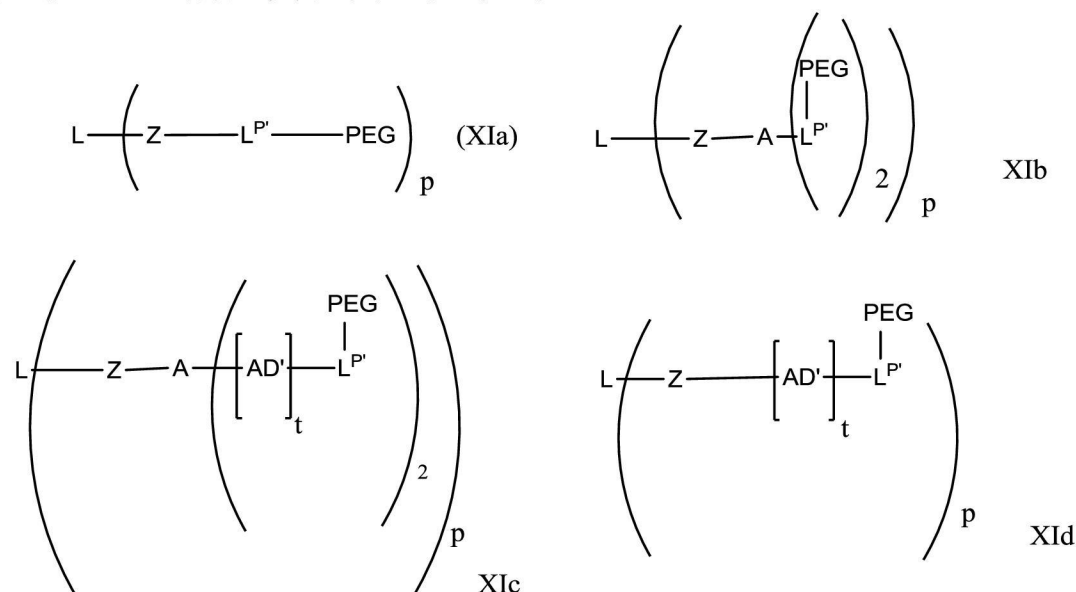
對於配體-連接子組合物，下標p為1至約14，較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)範圍內之數量；

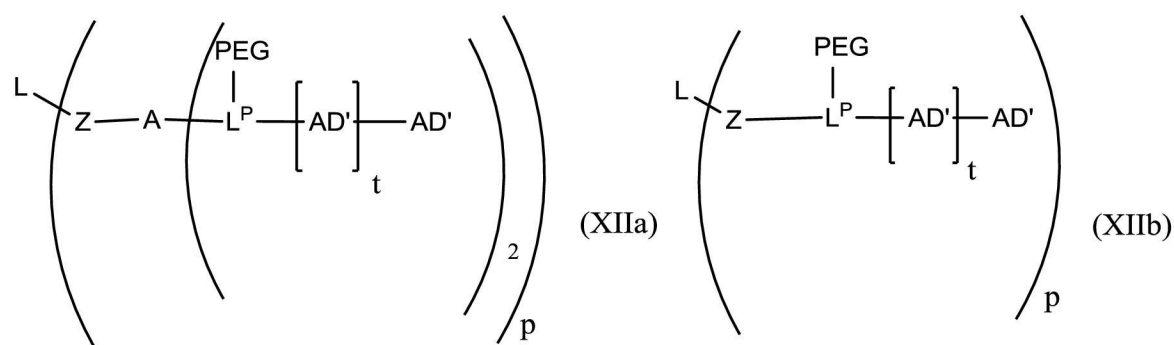
下標t為0至8；且較佳為0、1、2或3；

下標m為1至4範圍內之整數；且較佳為1或2；及

下標s為0或1，其限制條件為當s為0時，m為1且當s為1時，m為2、3或4。

式XI及XII之所選實施例包括下式





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

L為配體單元；

PEG為聚乙二醇單元；

Z-為延伸子單元；

L^P為平行連接體單元；

L^{P'}為能夠與-X-D形成共價連接之平行連接體單元；

A為分支單元；

AD'為能夠與X-D單元形成共價連接之藥物連接單元；

對於配體-連接子化合物，下標p為1至14、較佳2至12(較佳6至14、6至12、8至14或8至12)範圍內之整數，或

對於配體-連接子組合物，下標p為1至約14，較佳約2至約12(較佳約6至約14、約6至約12、約8至約14或約8至約12)範圍內之數量；及

下標t為0至8；及

其中-X-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元。

組分基團

對於本文所述之配體-藥物結合物及中間化合物重要的是使PEG單元以與其藥物單元平行取向置放以影響所得LDC之藥物動力學。PEG單元之置放藉由平行連接體單元實現。平行連接體單元用以使配體連接至聚乙二醇單元及藥物單元，使得PEG及藥物單元呈平行組態，其

將配體、PEG及藥物單元以分支組態排列。相應地，平行連接體單元可視為具有配體-藥物結合物及用於其製備之中間化合物之組分之連接位點的架構。

為充當平行連接體， L^P 單元經由連接子內之三個連接位點連接。其中之一者連接位點使 L^P 單元連接至PEG單元。第二連接位點使 L^P 單元連接至可釋放組合單元(在一些情況下經由分支單元A或藥物連接單元AD)。第三連接位點使 L^P 單元連接至延伸子單元(在一些情況下，經由藥物連接單元AD及/或分支單元A)。平行連接體單元為不同於PEG單元且經由PEG單元之PEG連接單元組分使其連接之單元。換言之，平行連接體單元並非PEG單元之次單元。

對於每PEG單元具有一單元以上藥物之配體-藥物結合物及其中間物，平行連接體單元與可釋放組合單元之連接可經由分支單元或藥物連接單元實現。平行連接體單元與延伸子單元之連接可經由藥物連接單元AD及/或視情況經由額外分支單元實現。在所有此等實施例中， L^P 單元可視為能夠將三個隔開之化學部分體共價鍵聯於一起的三官能化學部分。如將瞭解，對於所選中間化合物， L^P 單元由 $L^{P'}$ 表示且尚未經由藥物釋放單元連接至藥物，但具有用於與藥物連接(例如經由藥物釋放單元)之視情況經保護之官能基。亦如將瞭解，術語三官能用以指示三個連接位點且並非存在於 L^P 或 $L^{P'}$ 單元上之官能基之數量。

平行連接體單元可由一或多種(通常1至5、或1至4、或1至3、1或2種)天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺來製備。

應瞭解當提及如本發明之結合物或中間物中所存在之天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺(不論其是否為 L^P 單元之一部分或

本文所述結合物或中間物之其他組分)時，該等胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺將以殘基形式存在，在本文中亦稱為組合形式。舉例而言，在平行連接體單元為兩個胺基酸之實施例中，該兩個胺基酸以其間具有一肽鍵之殘基之形式存在。在平行連接體單元包含胺基醇之實施例中，該胺基醇將以殘基之形式存在，其中例如其胺基經由另一殘基/組分之含羰基官能基結合至平行連接體單元之另一殘基或結合物之另一組分，而其羥基以醚形式結合至或經由含羰基官能基鍵結至平行連接體單元之另一殘餘物或結合物組分另一組分。在平行連接體單元包含胺基醛之實施例中，該胺基醛將以殘基之形式存在，其中例如其胺基經由另一殘基/組分之含羰基官能基結合至平行連接體單元之另一殘基或結合物之另一組分，而其醛官能基在結合至平行連接體單元之另一殘基或結合物之另一組分之胺基時轉化成亞胺基官能基或經由後續還原提供氮-碳鍵。胺基醇或胺基醛可由天然或非天然胺基酸藉由將其羧酸官能基還原成醛或羥基官能基而衍生。

當平行連接體單元殘基為彼單元之分支殘基時，應瞭解彼殘基將具有結合平行連接體單元之另一殘基、-X-D部分體或連接子單元之PEG單元或其他組分之第三官能基。舉例而言，平行連接單元之胺基酸或其他含胺酸殘基可具有官能化側鏈或可經官能化側鏈取代以提供分支殘基所需之三個必需連接點。舉例而言，絲胺酸具有三個官能基，亦即酸、胺基及羥基官能基，且為達到其併入平行連接體單元之目的可視為經組合之胺基酸及胺基醇殘基。酪胺酸亦含有羥基，在此情況下處於其酚系側鏈中，且為達到其作為分支殘基併入平行連接體單元之目的亦可視為類似於絲胺酸。

在另一實例中，當平行連接體單元之分支殘基為半胱胺酸時，其胺基及羧酸基團將以先前針對胺基酸或含胺酸所述之方式以殘基形式存在，以提供用於分支殘基之三個必需連接點中之兩者，而其巯基在作為二硫鍵或以硫-碳鍵結合至-X-D部分體或連接子單元之PEG單元或其他組分時，例如當巯基官能基與連接子單元組分之含順丁烯二醯亞胺基團反應時將以殘基形式存在。在一些情況下，殘基巯基在結合至平行連接體單元之另一殘基或連接子單元之另一組分時呈其氧化形式(亦即-S(=O)-或-S(=O)₂-)。在又一實例中，離胺酸之 α 胺基及羧酸基團將以殘基形式存在以提供平行連接體單元之分支殘基所需之三個必需連接點中之兩者，而其呈其殘基形式之 ϵ 胺基提供第三連接點。組胺酸亦可視為具有兩個胺基之胺基酸，其中第二胺基為含咪唑側鏈之NH。

在另一實例中，當平行連接體單元之分支殘基時為天冬胺酸或麩胺酸，呈殘基形式之胺基酸之 α 胺基及C端羧酸基團提供平行連接體單元之分支殘基所需之三個必需連接點中之兩者，而呈其殘基形式之其 β 或 γ 羧酸基團提供第三連接點。在彼等情況下，當將天然存在之胺基酸描述為平行連接體單元之殘基，但並非天然含有官能化胺基酸側鏈，又必需為分支殘基時，應瞭解胺基酸結構在呈殘基形式以提供第三必需連接點時經修飾具有除其胺基及羧酸官能基外之額外官能基。舉例而言，具有脂族側鏈之胺基酸可在彼側鏈之碳處經羥基、胺基、醛、巯基、羧酸基團或其他官能基或經此等官能基中之任一者取代之其他部分(例如芳基或芳基烷基)取代以提供具有三個必需連接點之非天然胺基酸。如上針對胺基酸及殘基形式之所引入官能基所述，將此類非天然胺基酸併入平行連接體單元中。

類似地，當將胺基醛或胺基醇作為分支殘基併入平行連接單元中時，胺基醛或胺基醇將具有第三官能基以連同其胺基及醛官能基一起提供三個必需連接點。在彼等情況下，胺基醛或胺基醇在結構上可相當於具有官能化側鏈之天然胺基酸或具有引入如上所述天然胺基酸之側鏈中之官能基之非天然胺基酸，其中將天然或非天然胺基酸之羧酸還原成羥基或醛官能基。

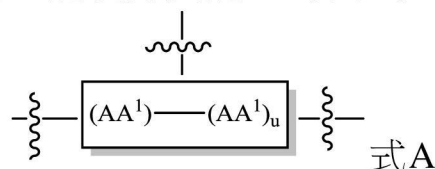
胺基酸可為 α 、 β 或 γ 胺基酸或其他含胺酸化合物，且若其含有結合天然或非天然胺基酸側鏈之對掌性碳則可呈其D或L異構體形式。當平行連接體單元由一個以上天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺組成時，該等胺基酸、胺基醇、胺基醛、多元胺或其組合經由共價鍵連接在一起以形成平行連接體單元。

視具體情況而定，該胺基酸、胺基醇或胺基醛可為非天然的且可經修飾以具有連接至結合物或中間化合物之組分之官能化側鏈(如上針對平行連接體單元之分支殘基所述)。例示性官能化胺基酸、胺基醇或胺基醛包括例如疊氮基或炔基官能化胺基酸、胺基醇或胺基醛(例如使用點擊化學修飾而具有連接用疊氮基或炔基之胺基酸、胺基醇或胺基醛)。在此項技術中已所熟知使胺基酸上存在之官能基，例如胺部分、羧酸部分及側鏈部分(例如胺基部分、羥基、另一羧酸、巯基、疊氮基或炔基)單獨活化及反應之方法。

平行連接體單元可包含一或多個(通常1至5、或1至4、或1至3、或1或2個)胺基酸，視情況經取代之 C_{1-20} 伸雜烷基(較佳視情況經取代之 C_{1-12} 伸雜烷基)、視情況經取代之 C_{3-8} 雜環基、視情況經取代之 C_{6-14} 伸芳基、視情況經取代 C_3 - C_8 碳環基或其組合。在一些態樣中，平行連接體單元包含

不超過2個或不超過1個視情況經取代之 C_{1-20} 伸雜烷基、視情況經取代之 C_{3-8} 雜環基、視情況經取代之 C_{6-14} 伸芳基或視情況經取代之 C_3-C_8 碳環基。視情況存在之取代基包括($=O$)、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NRC(=O)R$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)(OR)_2$ 、 $-P(=O)(OR)_2$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-AsO_2H_2$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CO_2-$ 、 $-C(=S)OR$ 、 $-C(=O)SR$ 、 $-C(=S)SR$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-C(=S)NR_2$ 或 $-C(=NR)NR_2$ ，其中各 X 獨立地為鹵素： $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 或 $-I$ ；且各 R 獨立地為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_6-C_{20}$ 芳基、 $-C_3-C_{14}$ 雜環、保護基或前藥部分。較佳視情況存在之取代基為($=O$)、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 及 $-NR_2$ 。

平行連接體單元可為直鏈或分支鏈且可由式A表示：



其中

AA^1 為獨立地選自以下之 L^P 之次單元：胺基酸、視情況經取代之 C_{1-20} 伸雜烷基(較佳為視情況經取代之 C_{1-12} 伸雜烷基)、視情況經取代之 C_{3-8} 雜環基、視情況經取代之 C_{6-14} 伸芳基或視情況經取代之 C_3-C_8 碳環基；且下標 u 獨立地選自0至4；且波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之共價連接位點。視情況經取代之伸雜烷基、雜環、伸芳基或碳環基將具有用於次單元之間及配體-藥物結合物或其中間物內連接之官能基。

在一些態樣中， AA^1 之至少一種情況為胺基酸。下標 u 可為0、1、2、3或4。在一些態樣中， AA^1 為胺基酸且 u 為0。在一些態樣中，平行連接體單元包含不超過2個視情況經取代之 C_{1-20} 伸雜烷基、視情況經取代之 C_{3-8} 雜環基、視情況經取代之 C_{6-14} 伸芳基或視情況經取代之 C_3-C_8 碳環基。在平行連接體單元具有式A之一些態樣中，平行連接體單元包含不超過1個視情況經取代之 C_{1-20} 伸雜烷基、視情況經取代之 C_{3-8} 雜環基、視情況經取代之 C_{6-14} 伸芳基或視情況經取代之 C_3-C_8 碳環基。

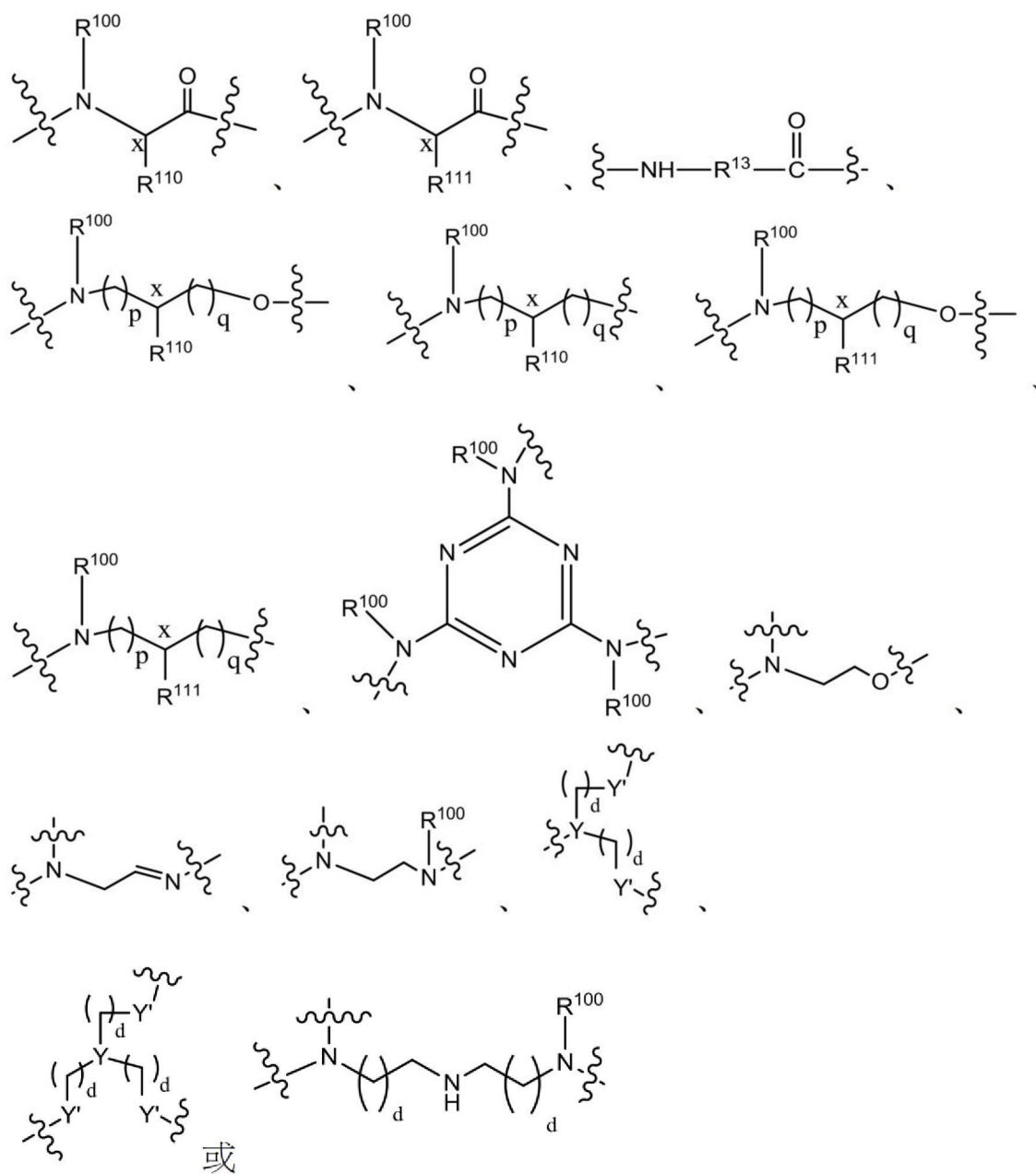
平行連接體單元或其胺基酸次單元可為天然或非天然之 α 、 β 或 γ 胺基酸。胺基酸可為D或L異構體。平行連接體單元內或與結合物(或連接子)之另一組分之連接可例如經由胺基、羧基或其他官能基實現。此項技術中已熟知使官能基單獨活化及反應之方法。

平行連接體單元或其胺基酸次單元可獨立地選自含巯基胺基酸之D或L異構體。含巯基胺基酸可為例如半胱胺酸、高半胱胺酸或青黴胺。

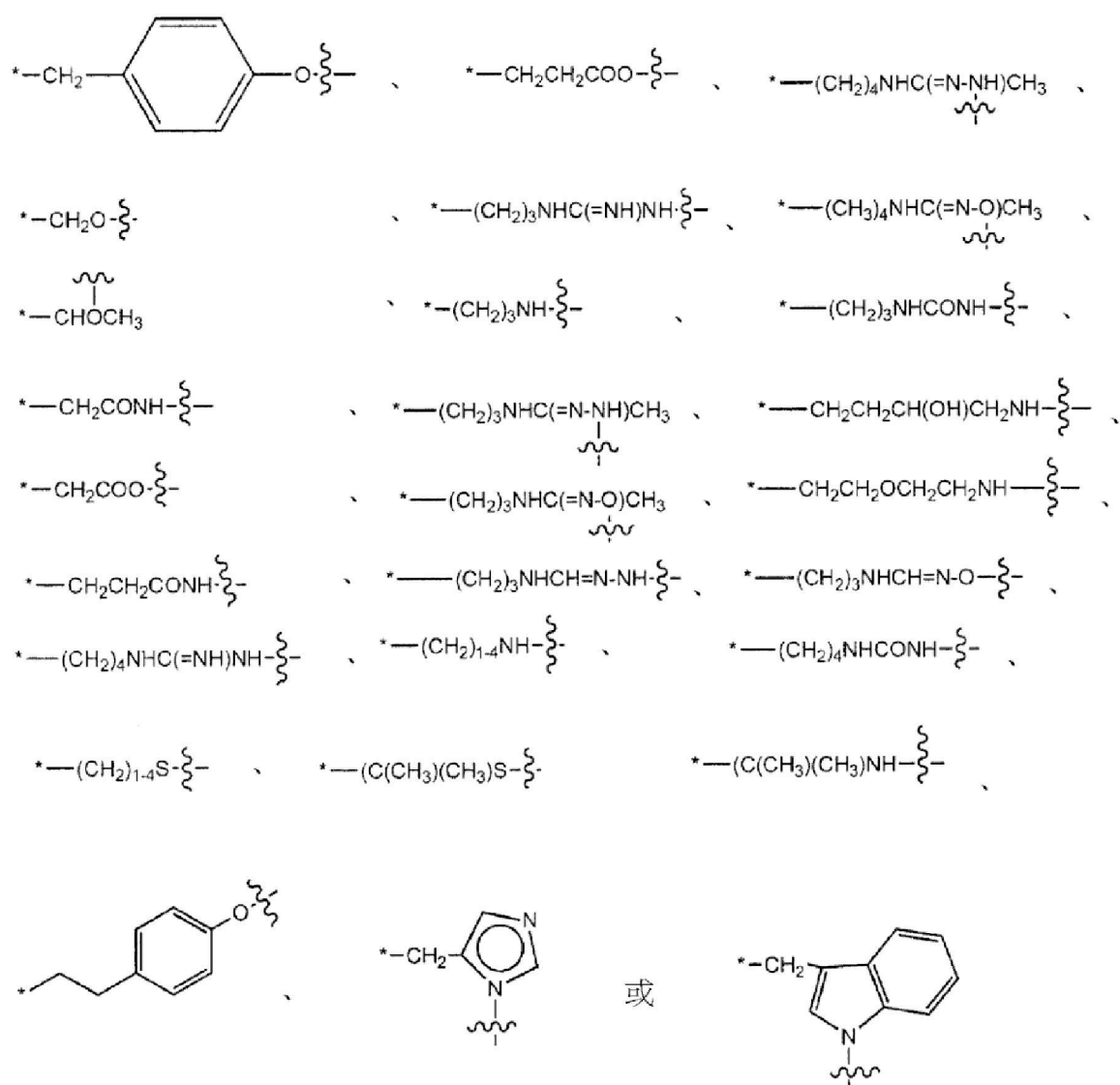
平行連接體單元或其胺基酸次單元可獨立地選自由以下胺基酸之L或D異構體組成之群：丙胺酸(包括 β -丙胺酸)、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、半胱胺酸、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、色胺酸、脯胺酸、鳥胺酸、青黴胺、B-丙胺酸、胺基炔酸、胺基烷二酸、雜環基-羧酸、瓜胺酸、他汀(statine)、二胺基烷酸及其衍生物。

較佳胺基酸包括半胱胺酸、高半胱胺酸、青黴胺、鳥胺酸、離胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、麩醯胺酸、丙胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、硒半胱胺酸、脯胺酸、甘胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸及丙胺酸。

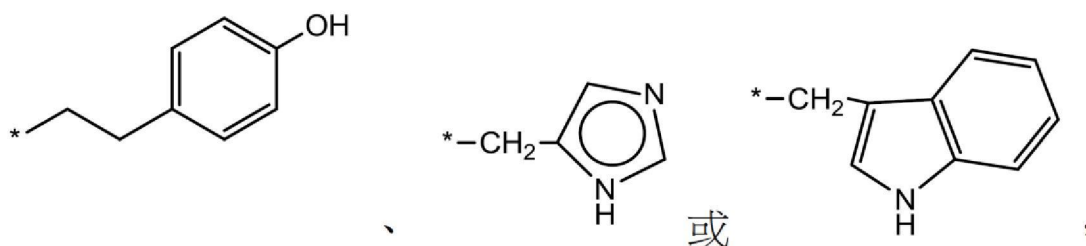
例示性 L^P 或其 AA^1 次單元包括：



其中 $\mathbf{R}^{110}$ 為



R¹¹¹ 獨立地選自氫、對羥基苄基、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-



其中星號指示與以x標記之碳連接；

R^{100} 獨立地選自氫或-C₁-C₃烷基(較佳為或CH₃)，

R^{13} 獨立地選自由以下組成之群：-C₁-C₆伸烷基-、-C₃-C₈碳環基-、-伸芳基-、-C₁-C₁₀伸雜烷基-、-C₃-C₈雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-及-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-(較佳為-CH₂-CH₂-)；

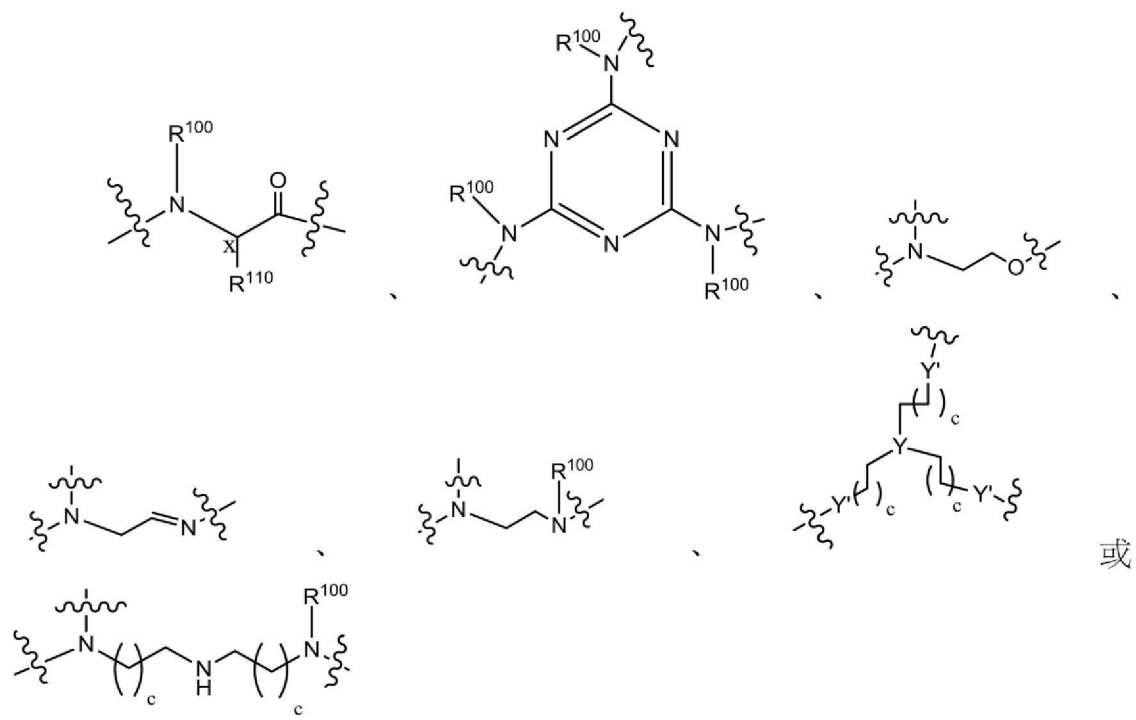
Y為 $-\overset{|}{\underset{|}{C}}(R^{100})-$ 或 $-\overset{|}{\underset{|}{N}}-$ ；

Y'為-C(=O)-、-O-、-S-、-NH-或-N(CH₃)-，及

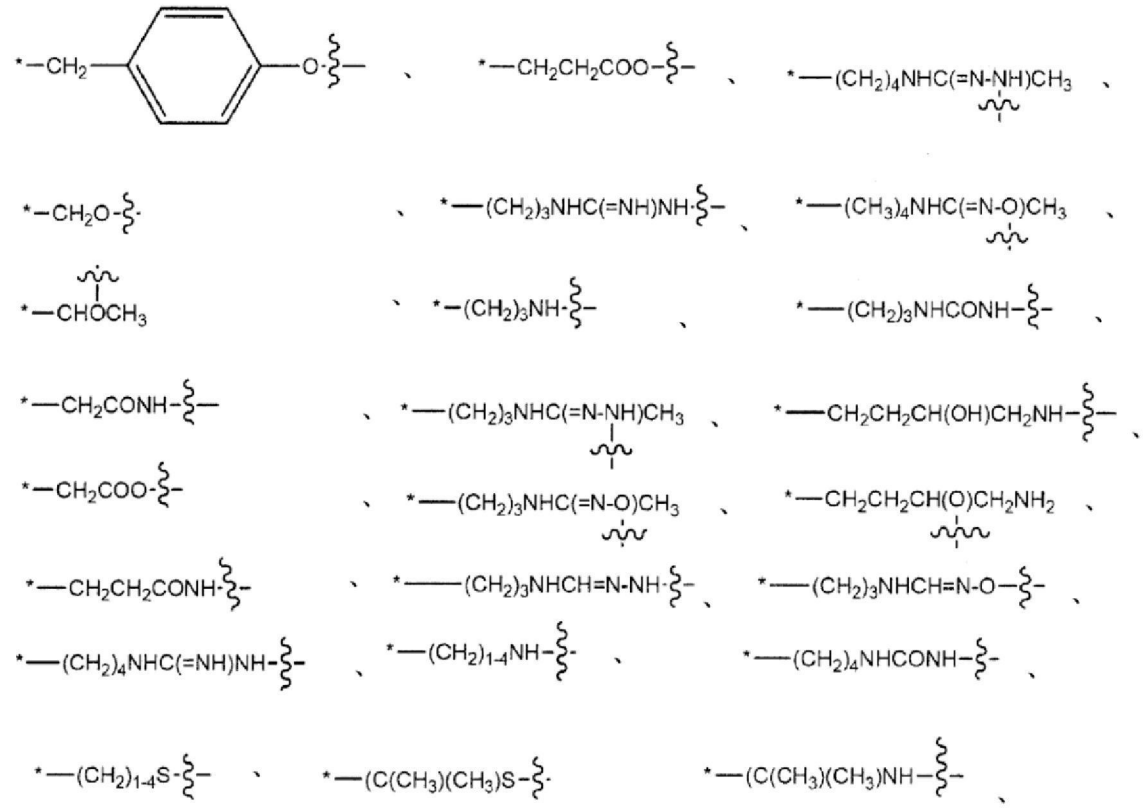
下標p、q及d為獨立地選自0至5之整數；且波浪線指示化合物、氫、OH或未經取代之C₁₋₃烷基內之共價連接，其限制條件為波浪線中之至少一者指示化合物內之共價連接。在一些態樣中，所有波浪線指示化合物內之共價連接(例如當L^P不包含任何次單元時)。

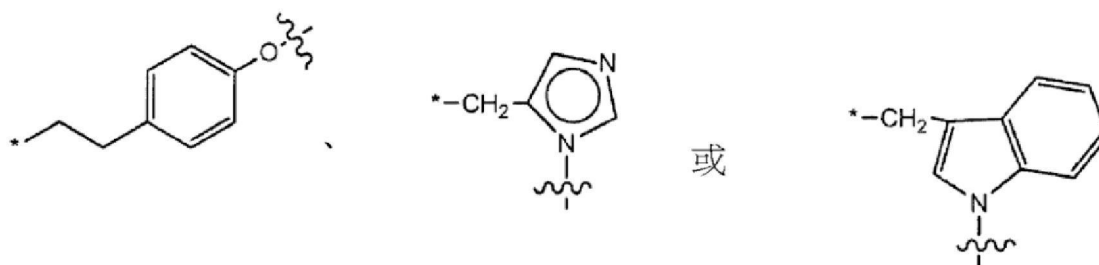
在一組實施例中，L^P為具有可獨立地與所示組分形成共價鍵聯之官能基之雜環(例如由三聚氯化氰形成之三唑雜環)。在另一組實施例中，L^P為具有如上所示連接官能基之烷烴。在其他實施例中，L^P可為氮原子。

在一些實施例中，-L^P-一經組合即具有下示式：



其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接位點(例如與 PEG、-X(直接或經由A或AD間接)及Z(直接或經由A或AD間接)連接)且其中 R^{110} 為





其中星號指示連接至以x標記之碳且波浪線指示三個連接位點中之一者；

R^{100} 獨立地選自氫或 $-C_1-C_3$ 烷基，較佳為氫或 CH_3 ，

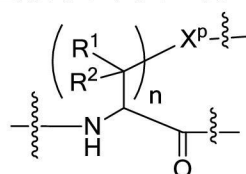
Y獨立地選自N或CH，

Y'獨立地選自NH、O或S，及

下標c為獨立地選自1至10之整數，且較佳為1、2或3。

在較佳實施例中， R^{110} 不為 $*-CH_2CH_2CH(O)CH_2NH_2$ 。

平行連接體單元或其胺基酸次單元可具有下式



其中下標n為1至4範圍內之整數；

X^p 係選自由以下組成之群： $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-S(=O)-$ 、 $-C(=O)-$ 或 $-C_2-C_8$ 雜環基-；及

R^1 及 R^2 獨立地選自由以下組成之群： $-H$ 、 $-C_{1-3}$ 烷基、-苯基或 $-C_2-C_5$ 雜環(較佳為H或 C_{1-3} 烷基)，其中波浪線指示化合物內之共價連接。

在一些實施例中， X^p 藉由天然或非天然胺基酸側鏈提供。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自離胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸、青黴胺、絲胺酸或蘇胺酸之D或L異構體。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自離胺酸、麩胺酸、天冬

胺酸、半胱胺酸或青黴胺之D或L異構體。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由以下胺基酸組成之群：精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、離胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、色胺酸、鳥胺酸、青黴胺、胺基炔酸、胺基烷二酸、雜環基-羧酸、瓜胺酸、他汀、二胺基烷酸及其衍生物。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由以下此等天然胺基酸之L異構體組成之群：精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、離胺酸、半胱胺酸、青黴胺、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸及色胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由以下此等天然胺基酸之D異構體組成之群：精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、半胱胺酸、青黴胺、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸及色胺酸。

各平行連接體單元或其胺基酸次單元可獨立地選自含巯基胺基酸之D或L異構體。含巯基胺基酸可為例如半胱胺酸、高半胱胺酸或青黴胺。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由以下胺基酸之L或D異構體組成之群：丙胺酸(包括 β -丙胺酸)、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、半胱胺酸、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、色胺酸、脯胺酸、鳥胺酸、青黴胺、B-丙胺酸、胺基炔酸、胺基烷二酸、雜環基-羧酸、瓜胺酸、他汀、二胺基烷酸及其衍生物。

較佳胺基酸包括半胱胺酸、高半胱胺酸、青黴胺、鳥胺酸、離胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、麩醯胺酸、丙胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、硒半

肱胺酸、脯胺酸、甘胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸及纈胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由丙胺酸衍生物組成之群，其限制條件為存在適當數量之官能單元。丙胺酸衍生物之說明性實例包括(但不限於)：脫氫丙胺酸、4-噻唑基丙胺酸、2-吡啶基丙胺酸、3-吡啶基丙胺酸、4-吡啶基丙胺酸、 β 至(1-萘基)-丙胺酸、 β -(2-萘基)-丙胺酸、 α -胺基丁酸、 β -氯-丙胺酸、 β -氰基-丙胺酸、 β -環戊基-丙胺酸、 β -環己基-丙胺酸、 β -碘-丙胺酸、 β -環戊烯基-丙胺酸、 β -第三丁基-丙胺酸、 β -環丙基-丙胺酸、 β -二苯基-丙胺酸、 β -氟-丙胺酸、哌嗪環經保護或未經保護之 β -哌嗪基-丙胺酸、 β -(2-喹啉基)-丙胺酸、 β -(1,2,4-三唑-1-基)-丙胺酸、 β -脲基-丙胺酸、H- β 至(3-苯并噻吩基)-Ala-OH及H- β -(2-噻吩基)-Ala-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由精胺酸及其精胺酸衍生物組成之群。精胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：精胺酸(Arg)、N-烷基-精胺酸、H-Arg(Me)-OH、H-Arg(NH₂)-OH、H-Arg(NO₂)-OH、H-Arg(Ac)₂-OH、H-Arg(Me)₂-OH (不對稱)、H-Arg(Me)₂-OH (對稱)、2-胺基-4-(2'-羥基胍基)-丁酸(N- ω -羥基-降-精胺酸)及高精胺酸。

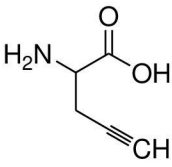
各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由天冬胺酸及其衍生物組成之群。天冬胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：天冬胺酸(Asp)、N-烷基-天冬胺酸及H-Asp(OtBu)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由天冬醯胺及其衍生物組成之群。天冬醯胺及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：天冬醯胺(Asn)、N-烷基-天冬醯胺及異天冬醯胺(H-Asp-NH₂)。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由半胱胺酸及其衍生物組成之群。半胱胺酸(Cys)及其衍生物(不含游離SH基團)之說明性實例包括(但不限於)：Cys (StBu)、H-Cys(Acm)-OH、H-Cys(Trt)-OH、H-Cys(StBu)-OH、H-Cys(Bzl)-OH、H-Cys(S-Et)-OH、H-Cys(SO₃H)-OH、H-Cys(胺基乙基)-OH、H-Cys(胺甲醯基)-OH、H-Cys(S-苯基)-OH、H-Cys(Boc)-OH及H-Cys(羥基乙基)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由組胺酸及其衍生物組成之群。組胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：組胺酸(His)、N-烷基-組胺酸、H-His(Boc)-OH、H-His(Bzl)-OH、H-His(1-Me)-OH、H-His(1-Tos)-OH、H-2,5-二碘-His-OH及H-His(3-Me)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由甘胺酸衍生物組成之群。甘胺酸衍生物之說明性實例包括(但不限於)：H-炔丙基甘胺酸

()、α-胺基甘胺酸(經保護或未經保護)、β-環丙基-甘胺酸、α-烯丙基甘胺酸及新戊基甘胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由麩胺酸及其衍生物組成之群。麩胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：麩胺酸(Glu)、N-烷基-麩胺酸、H-Glu(OtBu)-OH、H-γ-羥基-Glu-OH、H-γ-亞甲基-Glu-OH、H-γ-羧基-Glu(OtBu)₂-OH及焦麩胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由麩醯胺酸及其衍生物組成之群。麩醯胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：麩醯胺酸(Gln)、N-烷基-麩醯胺酸、異麩醯胺酸(H-Glu-NH₂)、H-Gln(Trt)-

OH及H-Gln(異丙基)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由苯丙胺酸(Phe)衍生物組成之群。苯丙胺酸衍生物之說明性實例包括(但不限於)：H-對胺基-Phe-OH、H-對胺基-Phe(Z)-OH、H-對溴-Phe-OH、HH-對羧基-Phe(OtBu)-OH、H-對羧基-Phe-OH、H-對氰基-Phe-OH、H-對氟-Phe-OH、H-3,4-二氯-Phe-OH、H-對碘-Phe-OH、H-對硝基-Phe-OH、氯-苯丙胺酸及 β -高苯丙胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由離胺酸及其衍生物組成之群。離胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：離胺酸(Lys)、N-烷基-離胺酸、H-Lys(Boc)-OH、H-Lys(Ac)-OH、H-Lys(甲醯基)-OH、H-Lys(Me)₂-OH、H-Lys(菸鹼醯基)-OH、H-Lys(Me)₃-OH、H-反-4,5-脫氫-Lys-OH、H-Lys(Alloc)-OH、H-H- δ -羥基-Lys-OH、H- δ -羥基-Lys(Boc)-OH、H-Lys(乙醯胺基)-OH及H-Lys(異丙基)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由白胺酸生物組成之群。白胺酸衍生物之說明性實例包括(但不限於)：4,5-脫氫白胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由甲硫胺酸衍生物組成之群。甲硫胺酸衍生物之說明性實例包括(但不限於)：甲硫胺酸(Met)、H-Met(=O)-OH及H-Met(=O)₂-OH，其中甲硫胺酸側鏈之硫原子呈氧化形式。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由絲胺酸及其衍生物組成之群。絲胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：絲胺酸(Ser)、N-烷基-絲胺酸、H-Ser(Ac)-OH、H-Ser(tBu)-OH、H-

Ser(Bzl)-OH、H-Ser(對氯-Bzl)-OH、H- β -(3,4-二羥基苯基)-Ser-OH、H- β -(2-噻吩基)-Ser-OH、異絲胺酸、N-烷基-異絲胺酸及3-苯基異絲胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由酪胺酸及其衍生物組成之群。酪胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：酪胺酸(Tyr)、N-烷基-酪胺酸、H-3,5-二硝基-Tyr-OH、H-3-胺基-Tyr-OH、H-3,5-二溴-Tyr-OH、H-3,5-二碘-Tyr-OH、H-Tyr(Me)-OH、H-Tyr(tBu)-OH、H-Tyr(Boc)-OH、H-Tyr(Bzl)-OH、H-Tyr(Et)-OH、H-3-碘-Tyr-OH及H-3-硝基-Tyr-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由蘇胺酸及其衍生物組成之群。蘇胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：蘇胺酸(Thr)、N-烷基-蘇胺酸、別蘇胺酸、H-Thr(Ac)-OH、H-Thr(tBu)-OH及H-Thr(Bzl)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由色胺酸及其衍生物組成之群。色胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：色胺酸(Trp)、N-烷基-色胺酸、H-5-Me-Trp-OH、H-5-羥基-Trp-OH、H-4-Me-Trp-OH、H- α -Me-Trp-OH、H-Trp(Boc)-OH、H-Trp(甲醯基)-OH及H-Trp(均三甲苯-2-磺醯基)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由及及其衍生物組成之群。脯胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：脯胺酸(Pro)、N-烷基-脯胺酸、高脯胺酸、硫代脯胺酸、羥脯胺酸(H-Hyp-OH)、H-Hyp(tBu)-OH、H-Hyp(Bzl)-OH、H-3,4-脫氫-Pro-OH、4-酮基-脯胺酸、 α -Me-Pro-OH及H-4-氟-Pro-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由鳥胺酸及其衍生物組成之群。鳥胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：鳥胺酸(Orn)、N-烷基-鳥胺酸、H-Orn(Boc)-OH、H-Orn(Z)-OH、H- α -二氟-Me-Orn-OH (埃弗羅(Eflornitine))及H-Orn(Alloc)-OH。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由青黴胺及其衍生物組成之群。青黴胺及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：青黴胺、H-青黴胺(Acm)-OH (H- β,β -二甲基cys(Acm)-OH)及N-烷基-青黴胺。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由 β -丙胺酸衍生物組成之群。 β -丙胺酸衍生物之說明性實例包括(但不限於)：脫氫丙胺酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由胺基烷酸衍生物組成之群。胺基烷酸衍生物之說明性實例包括(但不限於)：4-(新戊氧基磺醯基)-胺基丁酸、哌啶基乙酸、3-胺基丙酸及3-胺基-3-(3-吡啶基)-丙酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由胺基炔酸及其衍生物組成之群。胺基炔酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：N-烷基胺基炔酸、6-胺基-4-己炔酸、6-(Boc-胺基)-4-己炔酸。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由胺基烷二酸及其衍生物組成之群。胺基烷二酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：N-烷基胺基烷二酸、2-胺基己二酸、2-胺基庚二酸、2-胺基辛二酸(H-Asu-OH)。

各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由胺基-雜環基-烷酸及其衍生物組成之群。胺基-雜環基-烷酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：N-烷基胺基-雜環基-烷酸、4-胺基-1-甲基-1H-咪唑-2-甲

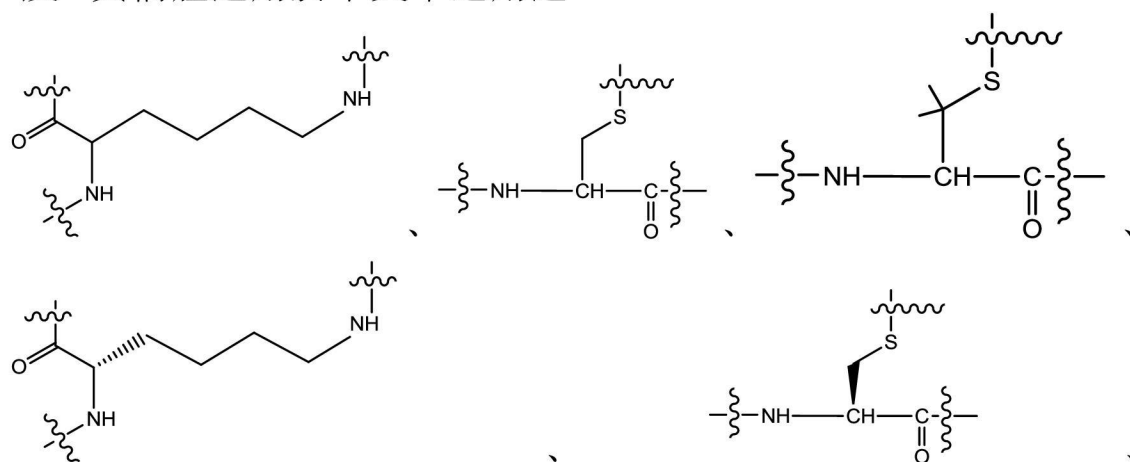
酸、4-胺基-1-甲基-1H-吡咯-2-甲酸、4-胺基-哌啶-4-甲酸(H-Pip-OH；經1-保護或未經保護)、3-胺基-3-(3-吡啶基)-丙酸。

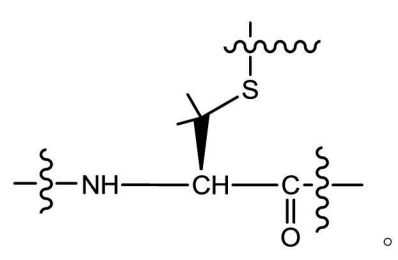
各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由瓜胺酸及其衍生物組成之群。瓜胺酸及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：瓜胺酸(cit)、N-烷基-瓜胺酸、硫代瓜胺酸、S-甲基-硫代瓜胺酸及高瓜胺酸。

他汀及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：他汀、N-烷基-他汀、環己基他汀及苯基他汀。

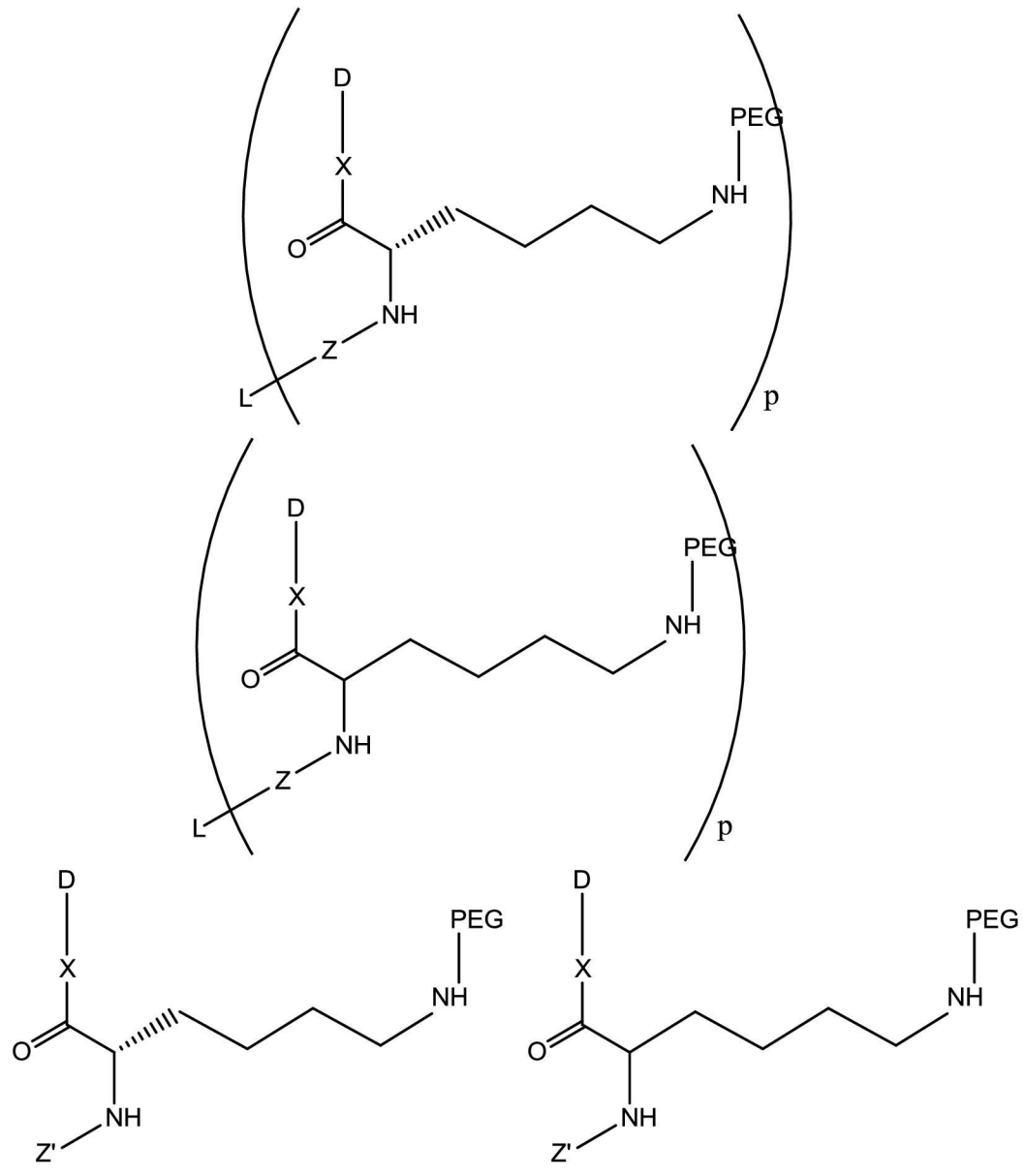
各平行連接體單元或其次單元可獨立地選自由二胺基烷酸及其衍生物組成之群。二胺基烷酸(Dab)及其衍生物之說明性實例包括(但不限於)：N-烷基-二胺-烷酸、N,N-二烷基胺基-烷酸、 α,γ -二胺基丁酸(H-Dab-OH)、H-Dab(Alloc)-OH、H-Dab(Boc)-OH、H-Dab(Z)-OH、 α,β -二胺基丙酸及其側鏈經保護之型式。

以下展示例示性 L^P 單元或其次單元離胺酸或半胱胺酸或青黴胺。波浪線指示與PEG、可釋放組合單元(直接或經由單元或藥物連接單元)及延伸子單元(直接或經由分支單元或藥物連接單元)之連接位點。胺基酸之L及D異構體適用於本文中之用途。



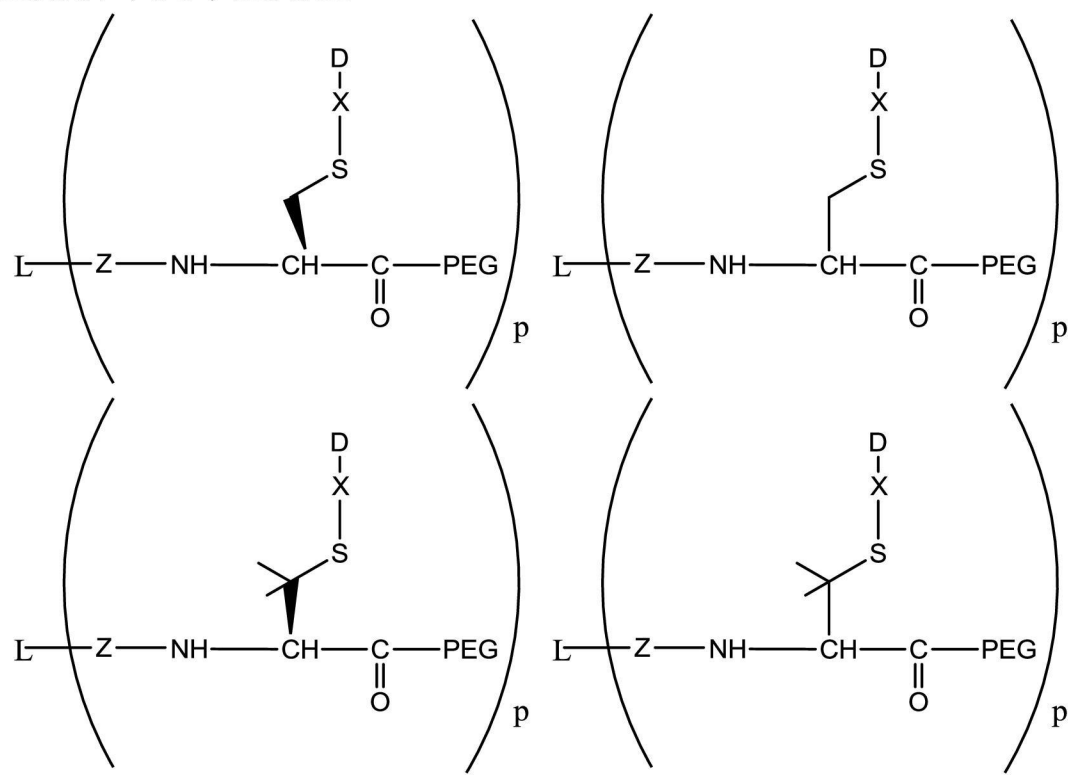


以下展示具有離胺酸作為 L^p 單元之例示性配體-藥物結合物或藥物連接子化合物，其中Z、L、X、D、PEG、Z'、p及PEG係如本文所述。胺基酸之L及D異構體適用於本文中之用途。

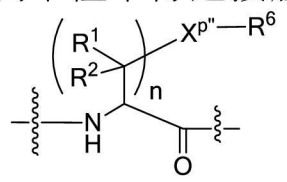


以下展示具有半胱胺酸或青黴胺作為 L^p 單元之例示性配體-藥物結合物，其中Z、L、X、D、Z'、PEG及p係如本文所述。胺基酸之L及D

異構體適用於本文中之用途。



應瞭解，對於某些本發明化合物(例如中間連接子化合物及配體-連接子化合物)，平行連接體單元能夠與-X-D形成共價連接，但尚未連接至-X-D，且平行連接體單元將不會完全組合至配體-藥物結合物中，且因而將包含與可釋放組合單元上所存在之基團具有反應性之官能基。具有連接用官能基之例示性平行連接體單元如下：



其中，

下標n為1至4，

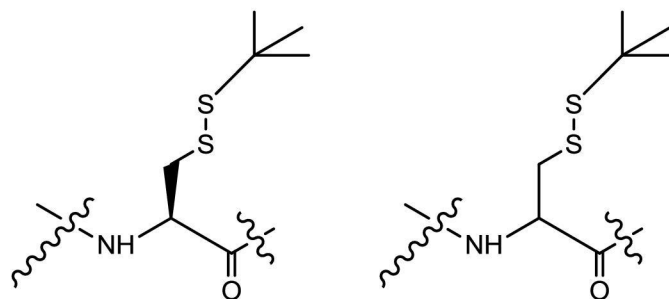
X^{p''}係選自由以下組成之群：-O-、-NR-、-S-、-C(=O)-及-S(=O)-；及

R¹及R²獨立地選自由以下組成之群：H、C₁₋₃烷基、苯基或C₂-C₅雜環；

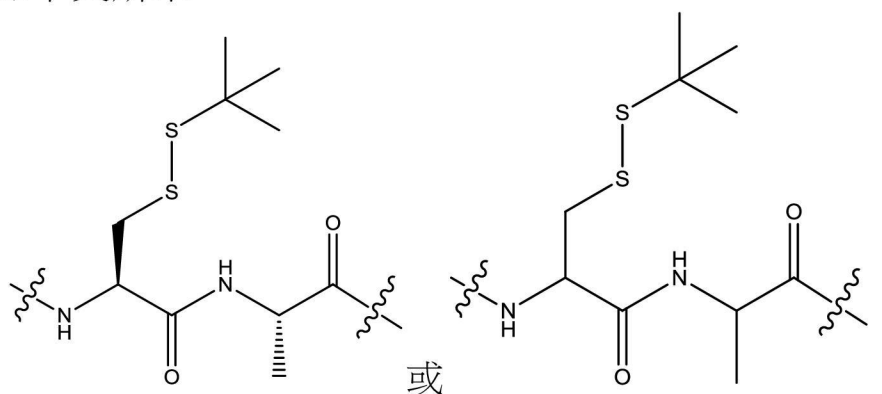
R⁶為保護基、H、-C₁₋₃烷基或-OH，

其中波浪線指示中間連接子化合物或配體-連接子化合物之其餘部分內之共價連接。

提供 $X^{p''}$ 尤其較佳反應性官能基為硫氫基以形成二硫鍵或硫醚鍵。官能基可經保護基保護。 L^P 可為含巯基基團(例如含有巯基胺基酸)，且因而 $L^{P'}$ 可經含巯基胺基酸保護，諸如如下文所示之經保護半胱胺酸。儘管以下表述中描繪半胱胺酸之 L 異構體，但半胱胺酸之 D 異構體亦為適合的。另外，第三丁基巯基保護基可經任何其他適合巯基保護基置換。巯基保護基包括第三丁基硫基、正丁基硫基、正丙基硫基、甲基硫基、苯基硫基、硫吡啶基、異丙基硫基、乙基硫基及半胱胺醯基。



$L^{P'}$ 可為包含含經保護巯基之胺基酸的二肽，此類經保護半胱胺酸-丙胺酸二肽如下文所示：



其中波浪線指示連接子中間化合物之其餘部分內之 $L^{P'}$ 之共價連接。

在較佳實施例中， L^P 單元經選擇以使向配體-藥物結合物之藥物-

連接子部分體中添加疏水性減到最小或不會促使其發生。

在本發明之較佳態樣中， L^P 單元之質量為不超過約500道爾頓、不超過約200道爾頓、約10至約500道爾頓、或約10至約200道爾頓。

在配體-藥物結合物之末端為配體單元、藥物單元及PEG單元。

配體單元：

在本發明之一些實施例中，存在配體單元。配體單元(L-)為與目標部分特異性結合之靶向劑。配體可特異性結合至細胞組分(細胞結合劑)或所關注之其他目標分子。配體單元用以使藥物單元靶向且存在於與配體單元相互作用之特定目標細胞群體中。配體包括(但不限於)蛋白質、多肽及肽。適合配體單元包括例如抗體(例如全長抗體及其抗原結合片段)、干擾素、淋巴因子、激素、生長因子及菌落刺激因子、維生素、養分運送分子(諸如(但不限於)運鐵蛋白)或任何其他細胞結合分子或物質。配體可為例如非抗體蛋白質靶向劑。或者，配體可為例如抗體。較佳配體為較大分子量蛋白質，例如分子量為至少約80 Kd之配體。

配體單元可與延伸子單元形成鍵。配體單元必須具有所需量之用於藥物連接子之連接位點，不論其天然存在或非天然存在(例如經工程改造)。舉例而言，為使下標p之值為6至14，配體單元必須能夠與6至14個配體單元形成鍵。連接位點可為天然存在之配體或經工程改造成配體。配體單元可經由配體之反應性或可活化性雜原子或含雜原子官能基與連接子單元之延伸子單元形成鍵。可存在於配體單元上之反應性或可活化性雜原子或含雜原子官能基包括硫(在一個實施例中，來自配體之硫氫基)、 $C=O$ 或(在一個實施例中，來自配體之羰基、羧基或羥

基)及氮(在一個實施例中，來自配體之一級或二級胺基)。彼等雜原子可存在於呈天然配體狀態之配體(例如天然存在之抗體)上，或可經由化學修飾或生物工程改造引入中配體。

在一個實施例中，配體單元具有硫氫基且配體單元經由硫氫基之硫原子結合至連接子單元。

在另一實施例中，配體具有離胺酸殘基，可與連接子單元之延伸子單元之活化酯(此類酯包括(但不限於)*N*-羥基丁二醯亞胺酯、五氟苯酯及對硝基苯酯)反應，且由此形成由配體單元之氮原子及連接子單元之C=O基團組成的醯胺鍵。

在又一態樣中，配體單元具有一或多個可經化學修飾以引入一或多個硫氫基之離胺酸殘基。配體單元經由硫氫基之硫原子結合至連接子單元。可用於修飾離胺酸之試劑包括(但不限於)*S*-乙醯基硫基乙酸*N*-丁二醯亞胺酯(SATA)及2-亞胺基硫雜環戊烷鹽酸鹽(特勞特試劑(Traut's Reagent))。

在另一實施例中，配體單元可具有一或多個可經化學修飾以具有一或多個硫氫基之碳水化合物基團。配體單元經由group's之硫原子結合至連接子單元之延伸子單元。

在又一實施例中，配體單元可具有一或多個可經氧化以提供醛(-CHO)基團之碳水化合物基團(參見例如Laguzza,等人, 1989, *J. Med. Chem.* 32(3):548-55)。對應醛可與延伸子單元上之反應性位點形成鍵。可與配體上之羰基反應之延伸子單元上之反應性位點包括(但不限於)肼及羥胺。關於用於藥物單元之連接或締合之蛋白質之修飾的其他協定描述於Coligan等人, *Current Protocols in Protein Science*, 第2卷,

John Wiley & Sons (2002) (以引用的方式併入本文中)中。

配體單元與延伸子單元上之反應性基團形式鍵。多種反應基均適用且將取決於配體單元之性質。反應性基團可為存在於延伸子單元上之順丁烯二醯亞胺(在連接至L之前)且L與延伸子單元之共價連接經由配體單元之硫氫基實現以形成經硫基取代之丁二醯亞胺。硫氫基可存在於呈配體之天然狀態之配位體(例如天然存在之殘基)上或可經由化學修飾引入配體中。

在另一實施例中，配體為抗體且藉由還原鏈間二硫鍵產生硫氫基。相應地，在一些實施例中，連接子單元與經還原鏈間二硫鍵之半胱胺酸殘基結合。

在又一實施例中，配體為抗體且硫氫基以化學方式，例如藉由引入半胱胺酸殘基而引入抗體中。相應地，在一些實施例中，延伸子單元與所引入之半胱胺酸殘基結合。

關於生物結合物已觀察到，藥物結合之位點可影響多個參數，包括結合容易性、藥物連接子穩定性、對所得生物結合物之生物物理學特性的影響及活體外細胞毒性。對於藥物連接子穩定性，藥物連接子與配體之結合位點可影響經結合藥物連接子進行消除反應之能力，且對於藥物連接子而言，影響由生物結合物之配體轉移至存在於生物結合物環境中之替代反應性巯基，諸如白蛋白、游離半胱胺酸或麩胱甘肽(當在血漿中時)中之反應性巯基的能力。此類位點包括例如鏈間二硫鍵以及所選半胱胺酸工程改造位點。本文所述之配體-藥物結合物可在除其他位點外之對消除反應不敏感之位點結合至巯基殘基(例如根據EU索引之位置239，如Kabat中所述)。

當結合物包含非免疫活性蛋白質、多肽或肽配體代替抗體時，適用之非免疫活性蛋白質、多肽、或肽配體包括(但不限於)運鐵蛋白、表皮生長因子(「EGF」)、鈴蟾素、胃泌素、胃泌素釋放肽、血小板衍生成長因子、IL-2、IL-6、轉型生長因子(「TGF」，諸如TGF- α 及TGF- β)、牛痘成長因子(「VGF」)、胰島素及胰島素樣生長因子I及II、生長抑素、凝集素及來自低密度脂蛋白之缺輔基蛋白。

尤其較佳配體為抗體，包括完整抗體。實際上，在本文所述之任何實施例中，配體單元可為抗體。適用多株抗體為衍生自經免疫動物之血清的抗體分子之異質群體。適用單株抗體為針對特定抗原決定子(例如癌細胞抗原、病毒抗原、微生物抗原、蛋白質、肽、碳水化合物、化學製品、核酸或其片段)之抗體的均質群體。針對所關注抗原之單株抗體(mAb)可藉由使用為由連續細胞株在培養中產生抗體分子而提供之此項技術中已知之任何技術來製備。

適用單株抗體包括(但不限於)人類單株抗體、人類化單株抗體或嵌合人類-小鼠(或其他物種)單株抗體。抗體包括全長抗體及其抗原結合片段。人類單株抗體可藉由此項技術中已知眾多技術中之任一者來製備(例如Teng等人, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7308-7312; Kozbor等人, 1983, *Immunology Today* 4:72-79; 及Olsson等人, 1982, *Meth. Enzymol.* 92:3-16)。

抗體可為與目標細胞(例如癌細胞抗原、病毒抗原或微生物抗原)免疫特異性結合之抗體或與腫瘤細胞或基質結合之其他抗體的功能活性片段、衍生物或類似物。就此而言，「功能活性」意謂片段、衍生物或類似物能夠免疫特異性結合至目標細胞。為確定結合抗原之CDR序

列，藉由此項技術中已知之任何結合分析方法(例如BIA核心分析)可將含有CDR序列之合成肽用於關於抗原之結合分析中(參見例如Kabat等人，1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md；Kabat E等人，1980, *J. Immunology* 125(3):961-969)。

其他適用抗體包括抗體片段，諸如(但不限於)F(ab')₂片段、Fab片段、Fv、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、scFv、scFv-FV或具有與抗體相同之特異性的任何其他分子。

另外，可使用標準重組DNA技術製備之包含人類與非人類部分之重組抗體(諸如嵌合及人類化單株抗體)為適用抗體。嵌合抗體為不同部分衍生自不同動物物種之分子，諸如具有衍生自鼠類單株之可變區及人類免疫球蛋白恆定區之彼等分子。(參見例如美國專利第4,816,567號；及美國專利第4,816,397號，其以全文引用的方式併入本文中。)人類化抗體為來自非人類物種之抗體分子，其具有一或多個來自非人類物種之互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子之架構區。(參見例如美國專利第5,585,089號，其以全文引用的方式併入本文中。)此類嵌合及人類化單株抗體可藉由此項技術中已知之重組DNA技術，例如使用以下所述之方法產生：國際公開案第WO 87/02671號；歐洲專利公開案第0 184 187號；歐洲專利公開案第0 171 496號；歐洲專利公開案第0 173 494號；國際公開案第WO 86/01533號；美國專利第4,816,567號；歐洲專利公開案第012 023號；Berter等人，1988, *Science* 240:1041-1043；Liu等人，1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443；Liu等人，1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526；Sun等人，

1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218 ; Nishimura等人, 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005 ; Wood等人, 1985, *Nature* 314:446-449 ; 及 Shaw 等人, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559 ; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207 ; Oi等人, 1986, *BioTechniques* 4:214 ; 美國專利第5,225,539號 ; Jones 等人, 1986, *Nature* 321:552-525 ; Verhoeyan 等人, 1988, *Science* 239:1534 ; 及 Beidler 等人, 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060 ; 各文獻以全文引用的方式併入本文中。

完全人類抗體為尤其需要的且可使用不能表現內源性免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因但可表現人類重鏈及輕鏈基因之轉基因小鼠產生。

抗體包括類似物及衍生物，其任一者經修飾，亦即藉由共價連接任何類型之分子修飾，只要此類共價連接允許抗體保持其抗原結合免疫特異性即可。舉例而言(但不以限制方式)，抗體之衍生物及類似物包括已例如藉由糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、用已知保護/阻斷基團衍生化、蛋白水解分裂、與細胞抗體單元或其他蛋白質鍵聯等而進一步修飾的彼等衍生物及類似物。眾多化學修飾中之任一者可藉由已知技術實施，該等技術包括(但不限於)特異性化學裂解、乙醯化、甲醯化、在衣黴素存在下之代謝合成等。另外，類似物或衍生物可含有一或多種非天然胺基酸。

抗體可在與Fc受體相互作用之胺基酸殘基中具有修飾(例如取代、缺失或添加)。特定言之，抗體可在識別為與抗Fc域與FcRn受體之間的相互作用有關之胺基酸殘基中具有修飾(參見例如國際公開案第WO 97/34631號，其以全文引用的方式併入本文中)。

抗體對癌細胞抗原之免疫特異性可以商業方式獲得或藉由熟習此

項技術者已知之任何方法(諸如化學合成或重組表現技術)產生。編碼對癌細胞抗原具免疫特異性之抗體的核苷酸序列可例如自 **GenBank** 資料庫或與其類似之資料庫、文獻出版物或藉由常規選殖及測序獲得。

在一特定實施例中，可所用已知用於治療癌症之抗體。抗體對癌細胞抗原之免疫特異性可以商業方式獲得或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(諸如重組表現技術)產生。編碼對癌細胞抗原具免疫特異性之抗體的核苷酸序列可例如自 **GenBank** 資料庫或與其類似之資料庫、文獻出版物或藉由常規選殖及測序獲得。

在另一特定實施例中，根據本發明之組合物及方法使用用於治療自體免疫疾病之抗體。對負責產生自體免疫抗體之細胞的抗原具免疫特異性之抗體可獲自任何組織(例如大學科學家或公司)或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(諸如化學合成或重組表現技術)產生。

在某些實施例中，適用抗體可結合至表現於活化淋巴細胞上之受體或受體複合物。受體或受體複合物可包含免疫球蛋白基因超家族成員、TNF受體超家族成員、整合素、細胞因子受體、趨化因子受體、主要組織相容蛋白、凝集素或補體控制蛋白。

在一些態樣中，抗體將特異性結合CD19、CD20、CD30、CD33、CD70、 α -v- β -6、Liv-1或路易斯Y(Lewis Y)抗原。

抗CD30抗體可為例如嵌合AC10抗體貝倫妥單抗(貝倫妥單抗)。抗CD30抗體可含有具有SEQ ID NO:1所示之胺基酸序列之重鏈可變區、具有SEQ ID NO:2所示之胺基酸序列之輕鏈可變區、具有SEQ ID NO:7所示之胺基酸序列之人類 γ I恆定區及具有SEQ ID NO:8所示之胺基酸序列之人類 κ 恆定區。

抗CD30抗體可為例如人類化AC10抗體。抗CD30抗體可含有具有SEQ ID NO:9所示胺基酸序列之重鏈可變區、具有SEQ ID NO:10所示胺基酸序列之輕鏈可變區。抗體可進一步包含具有SEQ ID NO:7所示胺基酸序列之人類 γ I恆定區(視情況在位置239處(根據EU索引)具有絲胺酸至半胱胺酸取代)及具有SEQ ID NO:8所示胺基酸序列之人類 κ 恆定區。

抗CD70抗體可為例如人類化抗體(參見例如US 2009/0148942)。在一個例示性實施例中，抗CD70抗體含有具有SEQ ID NO:3所示胺基酸序列之重鏈可變區及具有SEQ ID NO:4所示胺基酸序列之輕鏈可變區。

抗CD19抗體可為例如人類化抗體(參見例如US 2009/0136526，其以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)。在一個例示性實施例中，hBU12抗體含有具有SEQ ID NO:5所示胺基酸序列之重鏈可變區及具有SEQ ID NO:6所示胺基酸序列之輕鏈可變區。

抗體可為人類化抗CD33抗體(US 2013/0309223，其以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)、人類化抗Beta6抗體(參見例如WO 2013/123152，其以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)、人類化抗Liv-1抗體(參見例如US 2013/0259860，其以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)或人類化AC10抗體(參見例如US 8,257,706，其以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中)。

與配體之例示性連接經由硫醚鍵聯實現。硫醚鍵聯可經由鏈間二硫鍵、所引入之半胱胺酸殘基及其組合來實現。

藥物單元：

本發明之效應在藥物為實質上疏水性藥物之實施例中將更為顯著。相應地，本發明之藥物較佳為實質上疏水性的。

藥物單元(D)可為細胞毒性藥物、細胞生長抑制藥物或免疫抑制藥物，在本文中亦稱為細胞毒性劑、細胞生長抑制劑或免疫抑制劑。藥物單元具有可與可釋放組合單元(X)形成鍵之原子。在一些實施例中，藥物單元D具有可與可釋放組合單元(X)形成鍵之氮原子。在其他實施例中，藥物單元D具有可與可釋放組合單元(X)形成鍵之羧酸。在其他實施例中，藥物單元D具有可與可釋放組合單元X形成鍵之硫氫基。在其他實施例中，藥物單元D具有可與可釋放組合單元X形成鍵之羥基或酮或醇。

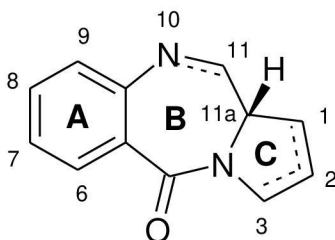
適用類別之細胞毒性劑或免疫抑制劑包括例如抗微管蛋白劑、DNA小溝結合劑、DNA複製抑制劑、烷基化劑、抗生素、抗葉酸劑、抗代謝物、化學治療敏化劑、拓撲異構酶抑制劑、長春花生物鹼或其類似物。適用類別之細胞毒性劑之實例尤其包括例如DNA小溝結合劑、DNA烷基化劑及微管蛋白抑制劑。例示性細胞毒性劑包括例如奧瑞他汀、喜樹鹼、倍癌黴素、依託泊苷、美登素及美登醇、紫杉烷、苯并二氮呋或含有苯并二氮呋之藥物(例如吡咯并[1,4]-苯并二氮呋(PBD)、吲哚啉并苯并二氮呋及噁唑啉并苯并二氮呋)及長春花生物鹼。所選含有苯并二氮呋之藥物描述於WO 2010/091150、WO 2012/112708、WO 2007/085930及WO 2011/023883中。

在某些實施例中，細胞毒性劑為美登素或類美登素(例如DM1、DM4)，另一組抗微管蛋白藥劑。(ImmunoGen, Inc.；亦參見Chari等人, 1992, Cancer Res. 52:127-131及美國專利第8,163,888號)。

在一些實施例中，藥物為苯并二氮呋(包括含有苯并二氮呋之藥物，例如吡咯并[1,4]苯并二氮呋(PBD)、吲哚啉并苯并二氮呋及噁唑啉

并苯并二氮呋)。

PBD具有通式結構：

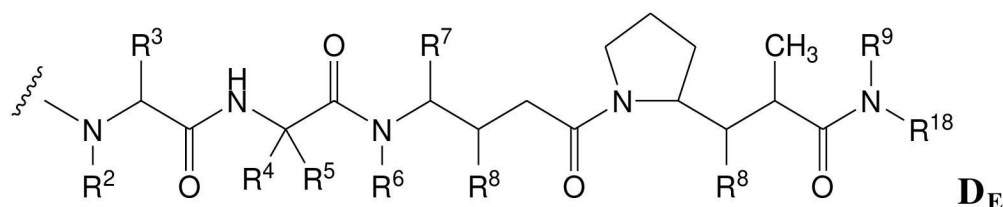


但取代基之數目、類型及位置；其芳族A環與吡咯并C環，及C環之飽和度可不同。在B環中，在N10-C11位置處存在亞胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺甲醚(NH-CH(OMe))，其為負責烷化DNA之親電子中心。所有已知天然產物在對掌性C11a位置處均具有(S)取向，當由C環朝向A環查看時該(S)取向為其提供右旋扭轉。此情況為其提供關於B形式DNA之小溝的等螺旋性之適當三維形狀，從而在結合位點處產生緊密貼合。PBD在小溝中形成加合物之能力使其能夠干擾DNA加工，因此其用作抗腫瘤劑。此等分子之生物活性可藉由例如使兩PBD單元經由其C8/C'-羥基官能基經由可撓伸烷基連接子連接在一起來增強。認為PBD二聚體形成序列選擇性DNA損傷，諸如認為主要負責其生物活性之倒序5'-Pu-GATC-Py-3'股間交叉連接。

藥物單元可為例如疏水性與單甲基奧瑞他汀E相當或大於其之奧瑞他汀或非奧瑞他汀藥物。在一些態樣中，藥物為疏水性與單甲基奧瑞他汀E相當或大於其之MMAE或奧瑞他汀。奧瑞他汀藥物可例如經由其N或C端共價連接至可釋放組合單元。MMAE之SlogP值為2.59。在一些態樣中，待用於本發明中之藥物之SlogP值為1.5或大於1.5、2.0或大於2.0、或2.5或大於2.5。在一些態樣中，待用於本發明中之藥物之SlogP值為(a)約1.5、約2、或2.5至約7，(b)約1.5、約2、或2.5至約6，

(c)約1.5、約2、或約2.5至約5，(d)約1.5、約2、或2.5至約4，或(e)約1.5、約2、或約2.5至約3。

藥物單元可具有以下式D_E，其中與可釋放組合單元之連接經由N端實現：



其中，在各位置獨立地：

R²係選自由H及C₁-C₈烷基組成之群；

R³係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R⁴係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R⁵選自由H及甲基組成之群；

或R⁴及R⁵共同形成碳環且具有式-(CR^aR^b)_n-，其中R^a及R^b獨立地選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基及C₃-C₈碳環且n係選自由以下組成之群：2、3、4、5及6；

R⁶係選自由H及C₁-C₈烷基組成之群；

R⁷係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

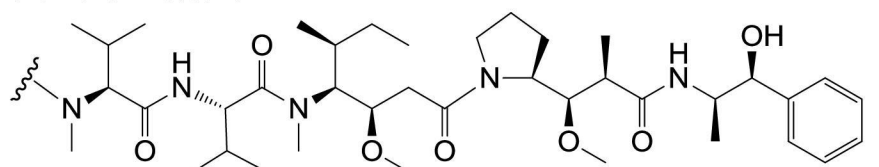
各R⁸係獨立地選自由以下組成之群：H、OH、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳

環及O-(C₁-C₈烷基)；

R⁹係選自由H及C₁至C₈烷基組成之群；

R¹⁸係選自由以下組成之群：-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-芳基、-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈雜環)及-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈碳環)。

以下展示經由N端結合之MMAE：



在一些實施例中，藥物單元為長春花化合物、喜樹鹼或蔥環黴素細胞毒性化合物。本文關於藥物連接子中間物描述X-D部分體中之彼等藥物單元(若存在)之實例。

存在多種可用於確定配位體-藥物結合物是否對細胞株施加細胞生長抑制或細胞毒性作用之不同分析。在一個用於確定配位體-藥物結合物是否對細胞株施加細胞生長抑制或細胞毒性作用之實例中，使用胸苷併入分析。舉例而言，細胞在每96孔板之孔5,000個細胞之密度下培養72小時時段，且在72小時時段之最後8小時期間，暴露於0.5 μ Ci ³H-胸苷，且在存在及不存在配體-藥物結合物之情況下量測培養物之細胞中之³H-胸苷併入。若培養物之細胞與在相同條件下培養但不與配位體-藥物結合物接觸之相同細胞株之細胞相比具有降低之³H-胸苷併入，則配位體-藥物結合物對細胞株具有細胞生長抑制或細胞毒性作用。

在另一實例中，對於確定配體-藥物結合物是否對細胞株施加細胞生長抑制或細胞毒性作用，藉由測定細胞中諸如中性紅、錐蟲藍或ALAMAR™藍之染料之攝入來量測細胞存活率(參見例如 Page等人, 1993, *Intl. J. of Oncology* 3:473-476)。在此類分析中，在含有染料之

培養基中培育細胞，洗滌細胞且以分光光度法量測剩餘染料，其反映細胞對染料之吸收。蛋白質結合染料磺醯若丹明B(SRB)亦可用以量測細胞毒性(Skehan等人, 1990, *J. Nat'l Cancer Inst.* 82:1107-12)。較佳配體-藥物結合物包括細胞株上之IC₅₀值(定義為產生50%細胞死亡之mAB濃度)小於1000 ng/ml、較佳小於500 ng/ml、更佳小於100 ng/ml、甚至最佳小於50或甚至小於10 ng/ml之彼等結合物。

使藥物與連接子連接之通用程序在此項技術中已知。參見例如美國專利第8,163,888號、第7,659,241號、第7,498,298號、美國公開案第US20110256157號及國際申請案第WO2011023883號及第WO2005112919號。

聚乙二醇單元(PEG)

多分散PEG、單分散PEG及離散PEG可用以製得本發明化合物。多分散PEG為各尺寸及分子量之異質混合物，而單分散PEG通常自異質混合物純化且因此提供單一鏈長及分子量。較佳PEG單元為離散PEG，即以逐步方式且不經由聚合方法合成之化合物。離散PEG提供具有規定及指定鏈長之單一分子。

本文提供之PEG單元包含一或多個聚乙二醇鏈。聚乙二醇鏈可例如以線性、分支或星型組態連接在一起。通常，在一個末端衍生PEG鏈中之至少一者以共價連接至平行連接體單元。與平行連接體單元之例示性連接藉助於非條件性可裂解鍵聯或經由條件性可裂解鍵聯實現。例示性連接經由醯胺鍵聯、醚鍵聯、酯鍵聯、胺鍵聯、肟鍵聯、二硫鍵聯、肽鍵聯或三唑鍵聯實現。在一些態樣中，與L^P之連接藉助於非條件性可裂解鍵聯實現。在一些態樣中，與L^P之連接並非經由酯

鍵聯、胺鍵聯、脲鍵聯或二硫鍵聯實現。在一些態樣中，與 L^P 之連接並非經由胺鍵聯實現。

條件性可裂解鍵聯係指在血漿中循環時對裂解實質上不敏感，但在細胞內或瘤內環境中對裂解敏感之鍵聯。至條件性可裂解鍵聯為在任何生物環境中對裂解實質上不敏感之鍵聯。胺之化學水解、二硫鍵之還原及肽鍵或糖苷鍵聯之酶促裂解為條件性可裂解鍵聯之實例。

PEG單元將在平行連接體單元處直接連接至配體-藥物結合物(或其中間物)。PEG單元之另一末端為游離且未繫栓的且可呈甲氧基、羧酸、醇或其他適合官能基之形式。甲氧基、羧酸、醇或其他適合官能基充當PEG單元之末端PEG次單元之封端。未繫栓意謂PEG單元將不會在未繫栓位點連接至藥物單元、配體單元或連接藥物單元及/或配體單元之鍵聯組分。對於PEG單元包含一個以上PEG鏈之彼等實施例，多個PEG鏈可為相同或不同化學部分(例如具有不同分子量或數量之次單元之PEG)。多個PEG鏈在單一連接位點連接至平行連接體單元。熟習此項技術者應瞭解，PEG單元除包含重複聚乙二醇次單元之外，亦可含有非PEG物質(例如以有助於多個PEG鏈彼此偶合或有助於與平行連接體單元偶合)。非PEG物質係指PEG單元中並非重複- CH_2CH_2O -次單元之一部分的之原子。在本文提供之實施例中，PEG單元可包含兩個經由非PEG元件彼此連接之單體PEG鏈。在本文提供之其他實施例中，PEG單元可包含兩個直鏈PEG鏈連接至與平行連接體單元連接之中心核心(亦即PEG單元本身為分支鏈)。

存在許多熟習此項技術者可獲得之PEG連接方法，[參見例如 Goodson等人 (1990) *Bio/Technology* 8:343 (在定點突變誘發之後將介

白素-2在其糖基化位點聚乙二醇化)；EP 0 401 384 (使PEG與G-CSF偶合)；Malik,等人, (1992) *Exp. Hematol.* **20**:1028-1035 (使用三氟乙磺醯氯將GM-CSF聚乙二醇化)；ACT公開案第WO 90/12874號 (使用半胱胺酸特異性mPEG衍生物將含有以重組方式引入之半胱胺酸殘基之紅血球生成素聚乙二醇化)；美國專利第5,757,078號(將EPO肽聚乙二醇化)；美國專利第5,672,662號(用丙酸或丁酸及其功能衍生物單取代聚(乙二醇)及相關聚合物以用於生物技術應用)；美國專利第6,077,939號(將肽之N端 α 碳聚乙二醇化)；Veronese等人, (1985) *Appl. Biochem. Bioechnol* **11**:141-142 (用PEG-硝基苯基碳酸酯(「PEG-NPC」)或PEG-三氯苯基碳酸酯將肽之N端 α 碳聚乙二醇化)；及Veronese (2001) *Biomaterials* **22**:405-417 (關於肽及蛋白質聚乙二醇化之綜述文章)]。

舉例而言，PEG可經由反應性基團共價結合至胺基酸殘基。反應性基團為可結合活化PEG分子之基團(例如游離胺基或羧基)。舉例而言，N端胺基酸殘基及離胺酸(K)殘基具有游離胺基；且C端胺基酸殘基具有游離羧基。硫氫基(例如如半胱胺酸殘基中所見)亦可用作連接PEG之反應性基團。另外，已描述了在多肽之C端特異性地引入活化基團(例如醯肼、醛及芳族胺基)之酶輔助方法(參見Schwarz等人 (1990) *Methods Enzymol.* **184**:160；Rose等人 (1991) *Bioconjugate Chem.* **2**:154；及Gaertner等人 (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:7224)。

在一些實施例中，PEG分子可使用具有不同反應性部分之甲氧基化PEG(「mPEG」)連接至胺基。此類反應性部分之非限制性實例包括丁二酸丁二醯亞胺酯(SS)、碳酸丁二醯亞胺酯(SC)、mPEG-醯亞胺酯、對硝基苯基碳酸酯(NPC)、丙酸丁二醯亞胺酯(SPA)及三聚氯化

氧。此類 mPEGs 之非限制性實例包括 mPEG-丁二酸丁二醯亞胺酯 (mPEG-SS)、mPEG₂-丁二酸丁二醯亞胺酯 (mPEG₂-SS)；mPEG-碳酸丁二醯亞胺酯 (mPEG-SC)、mPEG₂-碳酸丁二醯亞胺酯 (mPEG₂-SC)；mPEG-醯亞胺酯、mPEG-對硝基苯基碳酸酯 (mPEG-NPC)、mPEG-醯亞胺酯；mPEG₂-對硝基苯基碳酸酯 (mPEG₂-NPC)；mPEG-丙酸丁二醯亞胺酯 (mPEG-SPA)；mPEG₂-丙酸丁二醯亞胺酯 (mPEG₂-SPA)；mPEG-N-羥基-丁二醯亞胺 (mPEG 至 NHS)；mPEG₂-N-羥基-丁二醯亞胺 (mPEG₂-NHS)；mPEG 至三聚氯化氧；mPEG₂-三聚氯化氧；mPEG₂-離胺醇-NPC 及 mPEG₂-Lys-NHS。

一般而言，將組成 PEG 單元之 PEG 鏈中之至少一者官能化以使得其可連接至平行連接體單元。可例如經由胺、巰基、NHS 酯、順丁烯二醯亞胺、炔烴、疊氮基、羰基或其他官能基功能化。PEG 單元可進一步包含非 PEG 物質 (亦即不包含 -CH₂CH₂O- 之物質)，以有助於與平行連接體單元偶合或有助於使兩個或兩個以上 PEG 鏈偶合。

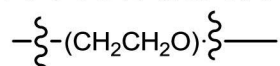
可使用多種聚乙二醇 (PEG) 物質，且可使用實質上任何適合之反應性 PEG 試劑。在一些實施例中，反應性 PEG 試劑將使得在連接至 L^P 時形成胺基甲酸酯或醯胺鍵。以下 PEG 試劑適用於各種實施例：mPEG₂-NHS、mPEG₂-ALD、多臂 PEG、mPEG(MAL)₂、mPEG₂(MAL)、mPEG-NH₂、mPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG-硫酯、mPEG-雙酯、mPEG-BTC、mPEG-ButyrALD、mPEG-ACET、雜官能性 PEG (NH₂-PEG-COOH、Boc-PEG-NHS、Fmoc-PEG-NHS、NHS-PEG-VS、NHS-PEG-MAL)、PEG 丙烯酸酯 (ACRL-PEG-NHS)、PEG-磷脂 (例如 mPEG-DSPE)、SUNBRITETM 系列之多臂 PEG (包括藉

由熟習此項技術者所選化學物質活化之基於丙三醇之PEG之GL系列)、任何經SUNBRITE活化之PEG(包括(但不限於)羧基-PEG、對-NP-PEG、三氟乙磺醯基-PEG、醛PEG、縮醛-PEG、胺基-PEG、巯基PEG、順丁烯二醯亞胺基-PEG、羥基-PEG-胺、胺基-PEG-COOK羥基-PEG-醛、羧酸酐型-PEG、官能化PEG-磷脂及如熟習此項技術者針對其特定應用及用法所選之其他類似及/或適合反應性PEG。

加成PEG單元對所得配體-藥物結合物之藥物動力學可具有兩種潛在影響。所需影響為降低清除率(及隨之而來的增加暴露)，其係由暴露之藥物連接子之疏水性元件誘導非特異性相互作用降低所引起。第二種影響為不當影響且為可由配體-藥物結合物之分子量增加引起之體積及分佈速率降低。PEG次單元之數量增加使結合物之流體動力學半徑增加，從而致使擴散率降低。擴散率降低可能會減小配體-藥物結合物穿透至腫瘤中之能力(Schmidt 及 Wittrup, *Mol Cancer Ther* 2009;8:2861-2871)。由於此等兩種競爭性藥物動力學效應，故需要使用大至足以降低LDC清除率由此增加血漿暴露但又不可以大至極大幅減小其擴散率之PEG，其可能會降低配體-藥物結合物到達預定目標細胞群體之能力。參見針對特定藥物連接子選擇最佳PEG尺寸之方法之實例(例如實例1、18及21)。

在一組實施例中，PEG單元包含至少6個次單元、至少7個次單元、至少8個次單元、至少9個次單元、至少10個次單元、至少11個次單元、至少12個次單元、至少13個次單元、至少14個次單元、至少15個次單元、至少16個次單元、至少17個次單元、至少18個次單元、至少19個次單元、至少20個次單元、至少21個次單元、至少22個次單

元、至少23個次單元或至少24個次單元。如本文所用，在提及PEG單元時次單元係指具有下式之聚乙二醇次單元：



。在一些此類實施例中，PEG單元包含不超過約72個次單元。

在一組實施例中，PEG單元包含一或多個直鏈PEG鏈，各PEG鏈具有至少2個次單元、至少3個次單元、至少4個次單元、至少5個次單元、至少6個次單元、至少7個次單元、至少8個次單元、至少9個次單元、至少10個次單元、至少11個次單元、至少12個次單元、至少13個次單元、至少14個次單元、至少15個次單元、至少16個次單元、至少17個次單元、至少18個次單元、至少19個次單元、至少20個次單元、至少21個次單元、至少22個次單元、至少23個次單元或至少24個次單元。在較佳實施例中，PEG單元包含總數至少6個次單元、至少8個次單元、至少10個次單元或至少12個次單元。在一些此類實施例中，PEG單元包含不超過總數約72個次單元、較佳不超過總數約36個次單元。

在另一組實施例中，PEG單元包含總數4至72、4至60、4至48、4至36或4至24個次單元、5至72、5至60、5至48、5至36或5至24個次單元、6至72、6至60、6至48、6至36或6至24個次單元、7至72、7至60、7至48、7至36或7至24個次單元、8至72、8至60、8至48、8至36或8至24個次單元、9至72、9至60、9至48、9至36或9至24個次單元、10至72、10至60、10至48、10至36或10至24個次單元、11至72、11至60、11至48、11至36或11至24個次單元、12至72、12至60、12至48、12至36或12至24個次單元、13至72、13至60、13至48、13至36或13至

24個次單元、14至72、14至60、14至48、14至36或14至24個次單元、15至72、15至60、15至48、15至36或15至24個次單元、16至72、16至60、16至48、16至36或16至24個次單元、17至72、17至60、17至48、17至36或17至24個次單元、18至72、18至60、18至48、18至36或18至24個次單元、19至72、19至60、19至48、19至36或19至24個次單元、20至72、20至60、20至48、20至36或20至24個次單元、21至72、21至60、21至48、21至36或21至24個次單元、22至72、22至60、22至48、22至36或22至24個次單元、23至72、23至60、23至48、23至36或23至24個次單元、或24至72、24至60、24至48、24至36或24個次單元。

在另一組實施例中，PEG單元包含一或多個直鏈PEG鏈，該一或多個直鏈PEG鏈具有總數4至72、4至60、4至48、4至36或4至24個次單元、5至72、5至60、5至48、5至36或5至24個次單元、6至72、6至60、6至48、6至36或6至24個次單元、7至72、7至60、7至48、7至36或7至24個次單元、8至72、8至60、8至48、8至36或8至24個次單元、9至72、9至60、9至48、9至36或9至24個次單元、10至72、10至60、10至48、10至36或10至24個次單元、11至72、11至60、11至48、11至36或11至24個次單元、12至72、12至60、12至48、12至36或12至24個次單元、13至72、13至60、13至48、13至36或13至24個次單元、14至72、14至60、14至48、14至36或14至24個次單元、15至72、15至60、15至48、15至36或15至24個次單元、16至72、16至60、16至48、16至36或16至24個次單元、17至72、17至60、17至48、17至36或17至24個次單元、18至72、18至60、18至48、18至36或18至24個次單元、19至72、19至60、19至48、19至36或19至24個次單元、20至72、20至60、

20至48、20至36或20至24個次單元、21至72、21至60、21至48、21至36或21至24個次單元、22至72、22至60、22至48、22至36或22至24個次單元、23至72、23至60、23至48、23至36或23至24個次單元、或24至72、24至60、24至48、24至36或24個次單元。

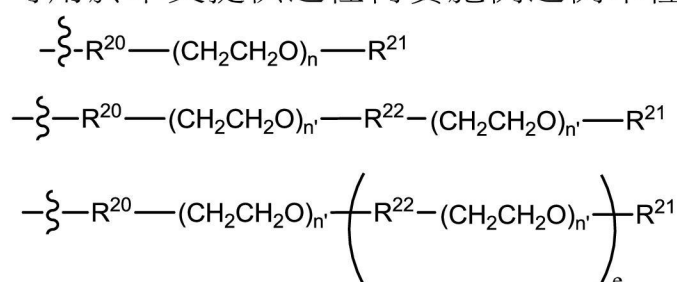
在另一組實施例中，PEG單元為衍生之單一直鏈PEG鏈，該鏈具有至少2個次單元、至少3個次單元、至少4個次單元、至少5個次單元、至少6個次單元、至少7個次單元、至少8個次單元、至少9個次單元、至少10個次單元、至少11個次單元、至少12個次單元、至少13個次單元、至少14個次單元、至少15個次單元、至少16個次單元、至少17個次單元、至少18個次單元、至少19個次單元、至少20個次單元、至少21個次單元、至少22個次單元、至少23個次單元或至少24個次單元。

在另一組實施例中，PEG單元為衍生之單一直鏈PEG鏈，該鏈具有6至72、6至60、6至48、6至36或6至24個次單元、7至72、7至60、7至48、7至36或7至24個次單元、8至72、8至60、8至48、8至36或8至24個次單元、9至72、9至60、9至48、9至36或9至24個次單元、10至72、10至60、10至48、10至36或10至24個次單元、11至72、11至60、11至48、11至36或11至24個次單元、12至72、12至60、12至48、12至36或12至24個次單元、13至72、13至60、13至48、13至36或13至24個次單元、14至72、14至60、14至48、14至36或14至24個次單元、15至72、15至60、15至48、15至36或15至24個次單元、16至72、16至60、16至48、16至36或16至24個次單元、17至72、17至60、17至48、17至36或17至24個次單元、18至72、18至60、18至48、18至36或18至24個

次單元、19至72、19至60、19至48、19至36或19至24個次單元、20至72、20至60、20至48、20至36或20至24個次單元、21至72、21至60、21至48、21至36或21至24個次單元、22至72、22至60、22至48、22至36或22至24個次單元、23至72、23至60、23至48、23至36或23至24個次單元、或24至72、24至60、24至48、24至36或24個次單元。

在另一組實施例中，PEG單元為衍生之單一直鏈PEG鏈，該鏈具有2至72、2至60、2至48、2至36或2至24個次單元、2至72、2至60、2至48、2至36或2至24個次單元、3至72、3至60、3至48、3至36或3至24個次單元、3至72、3至60、3至48、3至36或3至24個次單元、4至72、4至60、4至48、4至36或4至24個次單元、5至72、5至60、5至48、5至36或5至24個次單元。

可用於本文提供之任何實施例之例示性直鏈PEG單元如下：



其中線條線指示連接至平行連接體單元之位點，

R^{20} 為PEG連接單元，

R^{21} 為PEG封端單元；

R^{22} 為PEG偶合單元(亦即用於將多個PEG次單元鏈偶合於一起)

n 獨立地選自2至72(較佳4至72、更佳6至72、8至72、10至72、12至72或6至24)；

e 為2至5

各 n' 獨立地選自1至72。在較佳實施例中，在PEG單元中存在至少

6、較佳至少8、至少10或至少12個PEG次單元。在一些實施例中，在PEG單元中存在不超過72或36個PEG次單元。

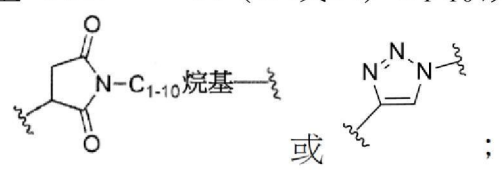
在較佳實施例中，n為8或約8、12或約12、24或約24。

PEG連接單元為PEG單元之一部分且用以使PEG單元連接至平行連接體單元。就此而言，平行連接體單元具有與PEG單元形成鍵之官能基。使PEG單元連接至平行連接體單元之官能基包括形成二硫鍵或硫醚鍵之硫氫基、形成脙鍵之醛、酮或肼基團、形成脲鍵之羥胺、形成肽鍵之羧基或胺基、形成酯鍵之羧基或羥基、形成磺醯胺鍵之磺酸、形成胺基甲酸酯鍵之醇、及形成磺醯胺鍵或胺基甲酸酯鍵或醯胺鍵之胺。相應地，PEG單元可例如經由二硫鍵、硫醚、脙、脲、肽、酯、磺醯胺、胺基甲酸酯或醯胺鍵連接至平行連接體單元。通常，PEG連接單元為當使PEG單元連接至平行連接體單元時發生之環加成、加成、加成/消除或取代反應之產物。

PEG偶合單元為PEG單元之一部分且為用以連接重複 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -次單元之兩個或兩個以上鏈之非PEG物質。在例示性實施例中，PEG偶合單元 R^{22} 為 $-\text{C}_{1-10}$ 烷基- $\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}_{1-10}$ 烷基- $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}_{2-10}$ 烷基- $\text{NH}-$ 、 $-\text{C}_{2-10}$ 烷基- $\text{O}-$ 、 $-\text{C}_{1-10}$ 烷基- $\text{S}-$ 或 $-\text{C}_{2-10}$ 烷基- $\text{NH}-$ 。

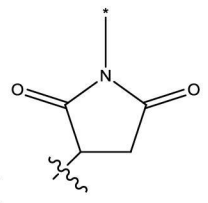
在例示性實施例中，PEG 連接單元R²⁰為-C(O)-、-O-、-S-、-S(O)-、-NH-、-C(O)O-、-C(O)C₁₋₁₀ 烷基、-C(O)C₁₋₁₀ 烷基-O-、-C(O)C₁₋₁₀ 烷基-CO₂-、-C(O)C₁₋₁₀ 烷基-NH-、-C(O)C₁₋₁₀ 烷基-S-、-C(O)C₁₋₁₀ 烷基-C(O)-NH-、-C(O)C₁₋₁₀ 烷基-NH-C(O)-、-C₁₋₁₀ 烷基、-C₁₋₁₀ 烷基-O-、-C₁₋₁₀ 烷基-CO₂-、-C₁₋₁₀ 烷基-NH-、-C₁₋₁₀ 烷基-S-、-C₁₋₁₀ 烷基-C(O)-NH-、-C₁₋₁₀ 烷基-NH-C(O)-、-CH₂CH₂SO₂-C₁₋₁₀ 烷基-、-

CH₂C(O)-C₁₋₁₀烷基-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-O-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-NH-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-CO₂-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-S-、



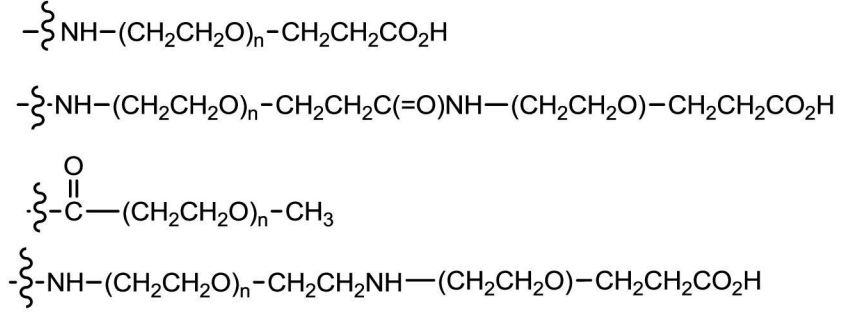
各R²¹獨立地為-C₁₋₁₀烷基、-C₂₋₁₀烷基-CO₂H、-C₂₋₁₀烷基-OH、-C₂₋₁₀烷基-NH₂、C₂₋₁₀烷基-NH(C₁₋₃烷基)或C₂₋₁₀烷基-N(C₁₋₃烷基)₂；及
各R²²獨立地-C₁₋₁₀烷基-C(O)-NH-、-C₁₋₁₀烷基-NH-C(O)-、-C₂₋₁₀烷基-NH-、-C₂₋₁₀烷基-O-、-C₁₋₁₀烷基-S-或-C₂₋₁₀烷基-NH-。

在一些實施例中，R²⁰為-NH-、-C(=O)-、三唑連接基團或-S-，或



順丁烯二醯亞胺基連接基團，諸如，其中波浪線指示連接至平行連接體單元之位點且星號指示PEG單元內之連接位點。在一些此類態樣中，R²¹為C₁₋₁₀烷基、-C₂₋₁₀烷基-CO₂H、-C₂₋₁₀烷基-OH或-C₂₋₁₀烷基-NH₂。

可用於本文提供之任何實施例之說明性直鏈PEG單元如下：



其中波浪線指示連接至平行連接體單元之位點，且各n獨立地選自4至72、6至72、8至72、10至72、12至72、6至24或8至24。在一些態樣中，n為約8、約12或約24。

如本文所述，PEG單元經選擇以使得改良所得配體-藥物結合物之

清除率但並不會顯著影響結合物穿透至腫瘤中之能力。在配體-藥物結合物之藥物單元及可釋放組合單元之疏水性與順丁烯二醯亞胺基葡萄糖醛酸苷MMAE藥物連接子相當之實施例中(如實例中所示)，使用之所選PEG單元較佳具有8個次單元至約24個次單元，更佳約12個次單元。在結合物之藥物單元及可釋放組合單元之疏水性大於順丁烯二醯亞胺基葡萄糖醛酸苷MMAE藥物連接子之實施例中，可選擇具有較多次單元之PEG單元。實例章節中所示之方法可用以鑑別用於特定藥物連接子之次單元之理想數量。

在本發明之較佳實施例中，PEG單元為約300道爾頓至約5千道爾頓；約300道爾頓至約4千道爾頓；約300道爾頓至約3千道爾頓；約300道爾頓至約2千道爾頓；或約300道爾頓至約1千道爾頓。在一些此類態樣中，PEG單元具有至少6個次單元或至少8、10或12個次單元。在一些此類態樣中，PEG單元具有至少6個次單元或至少8、10或12個次單元，但不超過72個次單元，較佳不超過36個次單元。

在本發明之較佳實施例中，除PEG單元之外，不存在其他存在於藥物連接子中之PEG次單元(亦即在本文提供之結合物及連接子之其他組分中之任一者中無PEG次單元)。在本發明之其他態樣中，除PEG單元之外，存在不超過8、不超過7、不超過6、不超過5、不超過4、不超過3、不超過2或不超過1個其他存在於藥物連接子中之聚乙二醇次單元(亦即在本文提供之結合物及連接子之其他組分中有不超過8、7、6、5、4、3、2或1個其他聚乙二醇次單元)。組分包括延伸子單元、平行連接體單元、藥物單元、分支單元及可釋放組合單元。

應瞭解，在提及PEG次單元時且視情形而定，次單元之數量可表

示平均數量，例如在提及配體-藥物結合物或中間化合物群體，且使用多分散PEG時。

延伸子單元：

延伸子單元(-Z-)用以使配體單元連接至平行連接體單元。就此而言，延伸子單元具有可與配體單元之官能基形成鍵之官能基。延伸子單元亦具有可與視情況存在之分支單元或平行連接體單元之官能基形成鍵之官能基。在每PEG單元具有藥物單元一個以上藥物單元之配體-藥物結合物及中間物中，延伸子單元具有可與配體單元之官能基形成鍵之官能基及可與分支單元、平行連接體單元或藥物連接單元形成鍵之官能基。可天然或經由化學操作存在於配體單元上之適用官能基包括(但不限於)硫氫基(-SH)、胺基、羥基、羧基、碳水化合物之變旋異構羥基及羧基。在一個態樣中，配體單元之官能基為硫氫基及胺基。延伸子單元可包含例如連接至配體單元之順丁烯二醯亞胺基團、醛、酮、羰基或鹵乙醯胺。

在一些態樣中，藥物連接子化合物或中間連接子化合物之延伸子單元具有與存在於配體單元(例如抗體)上之親核性基團具有反應性之親電子基團。配體上之適用親核性基團包括(但不限於)硫氫基、羥基及胺基基團。配體之親核性基團之雜原子對延伸子單元上之親電子基團具有反應性且與延伸子單元形成共價鍵。適用親電子基團包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺及鹵乙醯胺基團。對於作為配體之抗體，親電子基團提供適用於具有可進入親核性基團之彼等抗體之抗體連接之位點。

在另一實施例中，延伸子單元具有親核性基團對存在於配體單元(例如抗體)上之親電子基團具有反應性之反應性位點。配體上之適用親電子基團包括(但不限於)醛及酮及羰基基團。延伸子單元之親核性基團之雜原

子可與配體上之親電子基團反應且與抗體形成共價鍵。延伸子單元上之適用親核性基團包括(但不限於)醯肼、羥胺、胺基、肼、硫半卡巴肼、肼甲酸酯及芳基醯肼。對於作為配體之抗體，抗體上之親電子基團提供適用於連接至親核性延伸子單元之位點。

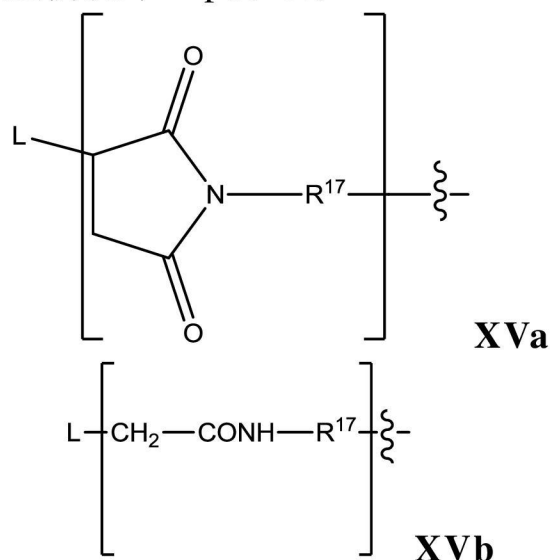
在一些態樣中，結合物可使用一段具有反應性位點之延伸子單元來製備，以結合至平行連接體單元且引入另一段具有配體單元之反應性位點之延伸子單元。在一個態樣中，延伸子單元具有親核性基團對存在於配體單元(例如抗體)上之親電子基團具有反應性之反應性位點。親電子基團提供適用於配體(例如抗體)連接之位點。抗體上之適用親核性基團包括(但不限於)硫氫基、羥基及胺基。抗體之親核性基團之雜原子對延伸子單元上之親電子基團具有反應性且與延伸子單元形成共價鍵。適用親電子基團包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺及鹵乙醯胺基團及NHS酯。

在另一實施例中，延伸子單元具有親核性基團對存在於配體單元上之親電子基團具有反應性之反應性位點。配體單元(例如抗體)上之親電子基團提供適用於連接至延伸子單元之位點。抗體上有用之親電子基團包括(但不限於)醛及酮羰基。延伸子單元之親核性基團之雜原子可與抗體上之親電子基團反應且與抗體形成共價鍵。延伸子單元上之適用親核性基團包括(但不限於)醯肼、肼、胺基、肼、硫半卡巴肼、肼甲酸酯及芳基醯肼。

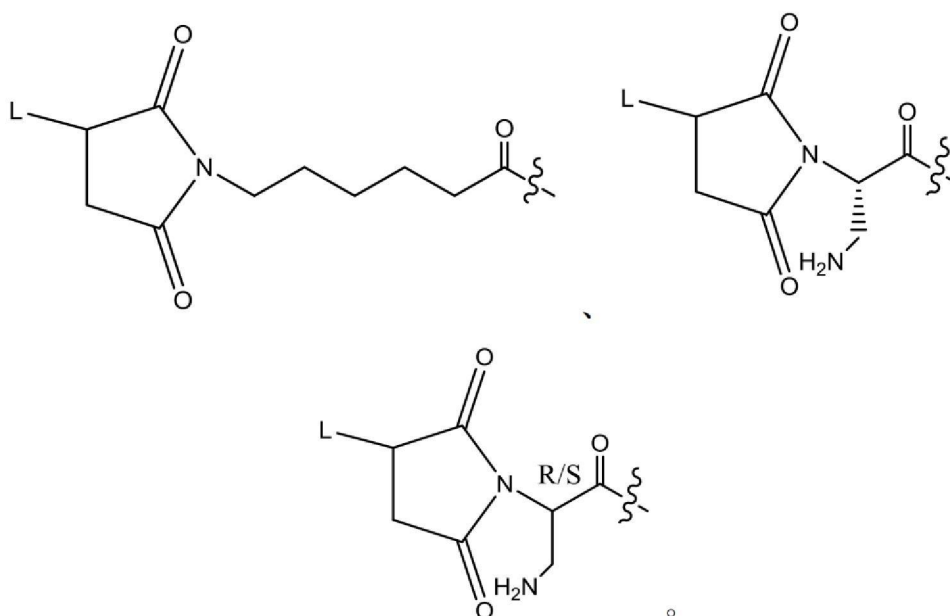
在一些實施例中，延伸子單元經由延伸子單元之順丁烯二醯亞胺基團與配體單元之硫原子形成鍵。硫原子可衍生自配體單元之硫氫基。此實施例之代表性延伸子單元包括式**XVa**及**XVb**之方括號內之彼等單元，其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接，且 R^{17} 為-C₁-C₁₀伸烷基-、C₁-C₁₀伸雜烷基-、-C₃-C₈碳環基-、-O-(C₁-C₈烷

基)-、-伸芳基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₃-C₈雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-、-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-C(=O)-、C₁-C₁₀伸雜烷基-C(=O)-、-C₃-C₈碳環基-C(=O)-、-O-(C₁-C₈烷基)-C(=O)-、-伸芳基-C(=O)-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-C(=O)-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-C(=O)-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-C(=O)-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-C(=O)-、-C₃-C₈雜環基-C(=O)-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-C(=O)-、-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-C(=O)-、-C₁-C₁₀伸烷基-NH-、C₁-C₁₀伸雜烷基-NH-、-C₃-C₈碳環基-NH-、-O-(C₁-C₈烷基)-NH-、-伸芳基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-NH-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-NH-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-NH-、-C₃-C₈雜環基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-NH-、-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-S-、C₁-C₁₀伸雜烷基-S-、-C₃-C₈碳環基-S-、-O-(C₁-C₈烷基)-S-、-伸芳基-S-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-S-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-S-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-S-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-S-、-C₃-C₈雜環基-S-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-S-或-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-S-。R¹⁷取代基中之任一者可經取代或未經取代。在一些態樣中，R¹⁷取代基未經取代。在一些態樣中，R¹⁷取代基視情況經取代。在一些態樣中，R¹⁷基團視情況經鹼性單元取代，例如-(CH₂)_xNH₂、-(CH₂)_xNHR^a及-(CH₂)_xNR^a₂，其中x為1-4之整數且各R^a係獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群，或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。應瞭解

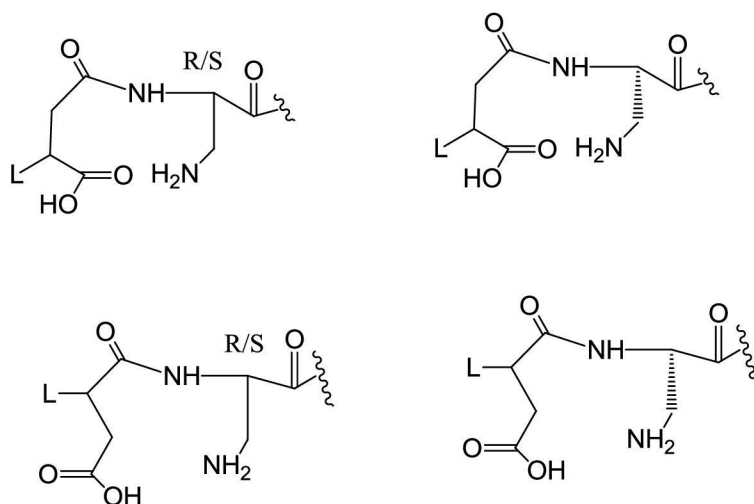
甚至在未明確指示之情況下， p 為1至14。



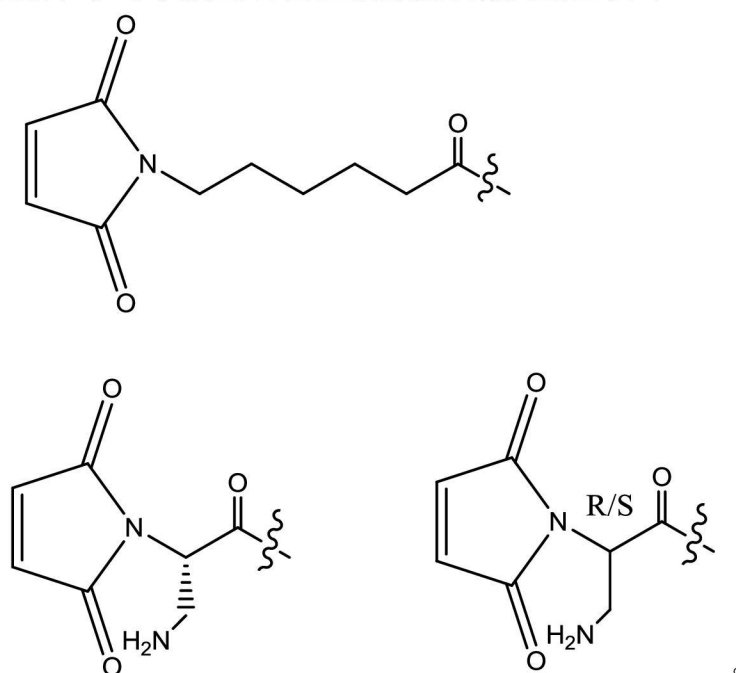
說明性延伸子單元為式 **XVa** 單元，其中 R^{17} 為 $-C_2-C_5$ 伸烷基- $C(=O)-$ ，其中伸烷基視情況經鹼性單元取代，例如 $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中 x 為1-4之整數且各 R^a 係獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群，或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啶基。例示性實施例如下：



應瞭解，經取代之丁二醯亞胺可以如下文所示之水解形式存在：

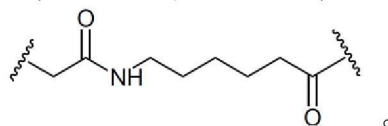


說明性延伸子單元在結合至配體之前包括以下：



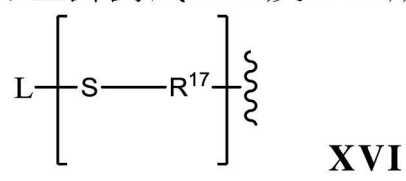
應瞭解，在合成期間延伸子單元之胺基可為經胺基保護基(例如酸不穩定保護基(例如BOC))適當保護。

另一說明性延伸子單元為式**XVb**之單元，其中 R^{17} 為 $-(CH_2)_5-$ ：

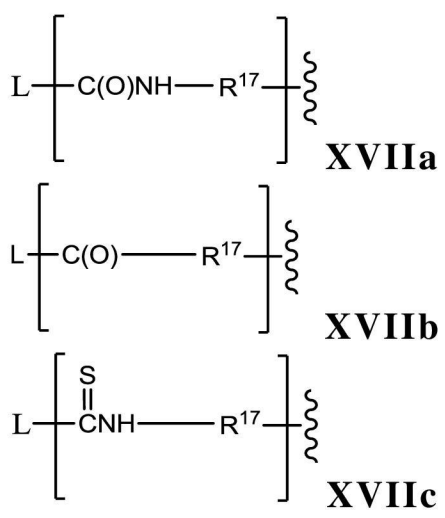


在另一實施例中，延伸子單元經由配體單元之硫原子與延伸子單元之硫原子之間的二硫鍵連接至配體單元。此實施例之代表性延伸子

單元描繪在式**XVI**之方括號內，其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接且R¹⁷如上針對式**XVa**及**XVb**所述。

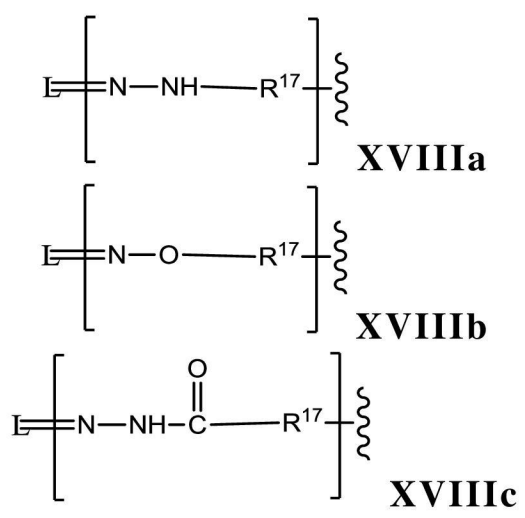


在又一實施例中，延伸子之反應性基團含有可與配體之一級或二級胺基形成鍵之反應性位點。此等反應性位點之實例包括(但不限於)活化酯，諸如丁二醯亞胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、酸氯化物、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性延伸子單元描繪在式**XVIIa**、**XVIIb**及**XVIIc**之方括號內，其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接且R¹⁷如上針對式**XVa**及**XVb**所述。

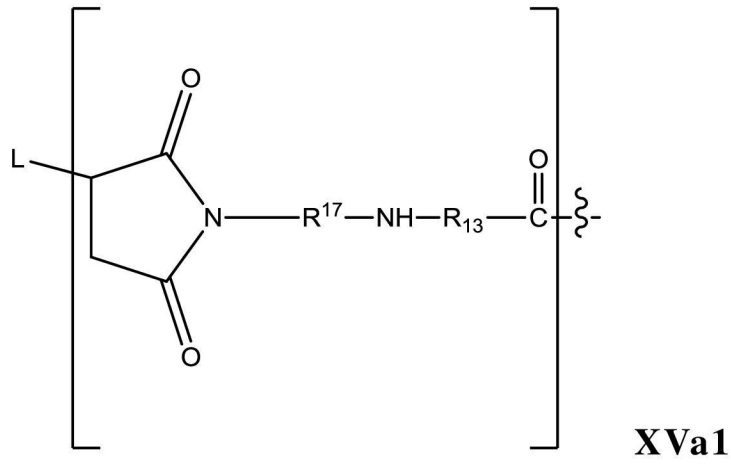


在又一實施例中，延伸子之反應性基團含有對可存在於配體上之經修飾碳水化合物(-CHO)基團具有反應性之反應性位點。舉例而言，碳水化合物可使用諸如過碘酸鈉之試劑適度氧化且氧化碳水化合物之所得(-CHO)單元可與含有官能基(諸如醯肼、肟、一級或二級胺、肼、硫半卡巴肼、肼甲酸酯及芳基醯肼)之延伸子縮合，諸如Kaneko, T.等人 (1991) Bioconjugate Chem. 2:133-41所述。此實施例之代表性延伸

子單元描繪在式**XVIIIa**、**XVIIIb**及**XVIIIc**之方括號內，其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接且R¹⁷如上針對式**XVa**及**XVb**所述。



在本發明之一些實施例中，需要使延伸子單元之長度延伸。相應地，延伸子單元可包含額外組分。舉例而言，延伸子單元可包括式**XVa1**之方括號內之彼等單元，



其中波浪線指示連接至配體-藥物結合物或其中間物之其餘部分；
R¹⁷如上所述，R¹⁷較佳為-C₂-C₅伸烷基-C(=O)-，其中伸烷基視情況經鹼性單元取代，例如-(CH₂)_xNH₂、-(CH₂)_xNHR^a及-(CH₂)_xNR^a₂，其中x為1-4之整數且各R^a係獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群，或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉

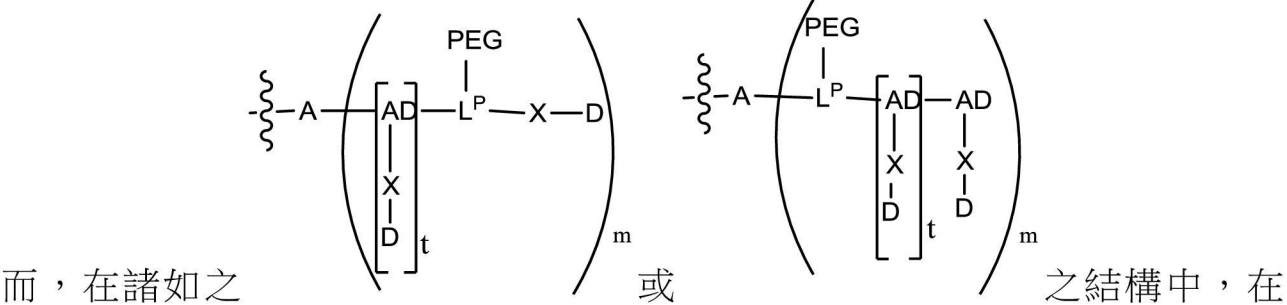
基或哌啶基；及

R¹³為-C₁-C₆伸烷基-、-C₃-C₈碳環基-、-伸芳基-、-C₁-C₁₀伸雜烷基-、-C₃-C₈雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-或-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-。在較佳實施例中，R¹³為-C₁-C₆伸烷基-。

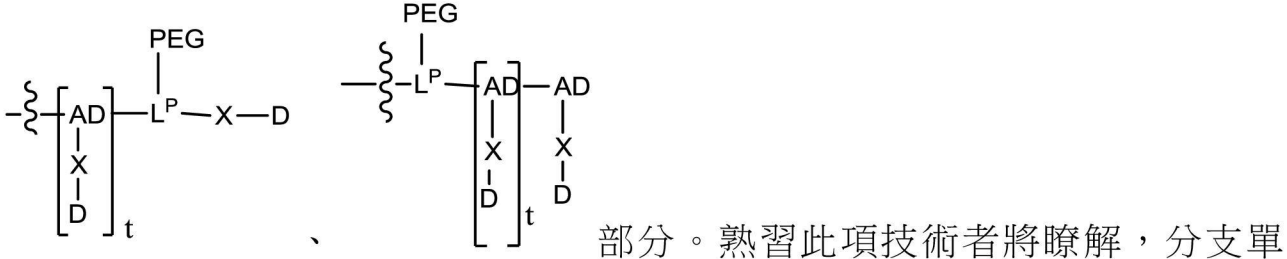
在本發明之較佳態樣中，延伸子單元之質量為不超過約1000道爾頓、不超過約500道爾頓、不超過約200道爾頓、約30、50或100道爾頓至約1000道爾頓、約30、50或100道爾頓至約500道爾頓、或約30、50或100道爾頓至約200道爾頓。

視情況存在之分支單元(A)

在需要將額外藥物加成至藥物連接子且最終加成至配體中之情況下，分支單元包括在配體-藥物結合物中。分支單元能夠與2至4個平行連接體單元、與2至4個藥物連接單元或與2至4個-X-D單元形成共價鍵。因

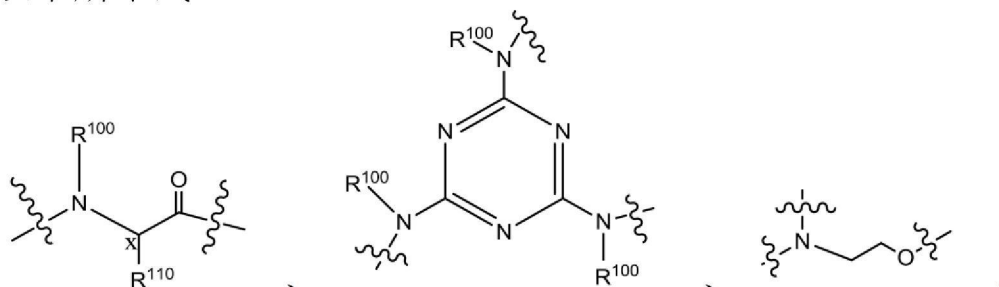


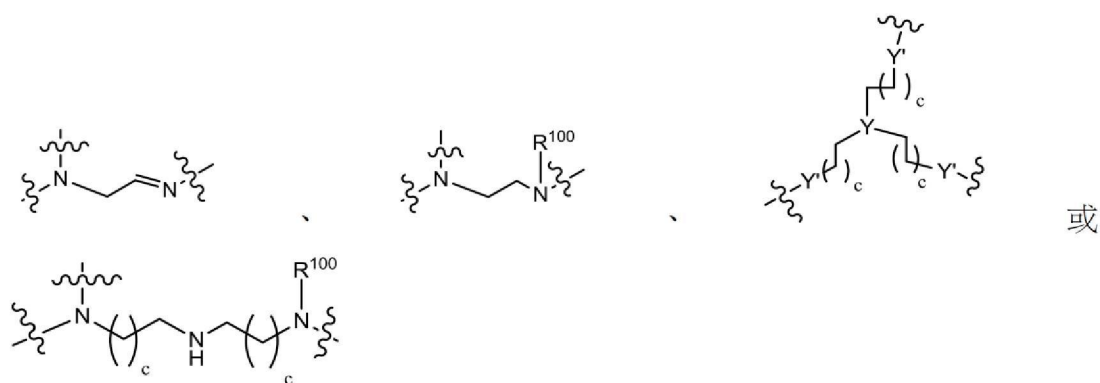
m 大於 1 之情況下，分支單元允許連接多個



元經設計以使得在連接子內分支。為充當分支單元，分支單元至少具有用於配體-藥物結合物或其中間物內之連接的第一、第二及第三連接位點。換言之，分支單元必須為至少三官能的。在 m 為3或4之實施例中，分支單元將具有4或5個用於配體-藥物結合物或其中間物內之共價連接的位點。在一些態樣中，分支單元為單一單元或具有兩個或兩個以上次單元(例如2至10，較佳2至5，例如2、3、4或5)以提供需要數量之連接位點，其中分支單元或其次單元為獨立選擇之天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺或其組合。若需要為了具有需要數量之連接，胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺中之至少一者將具有官能化側鏈，以為 L^P 單元及/或 Z 單元及/或 AD 單元及/或 $X-D$ 部分體提供連接位點。在一些態樣中，一或多種胺基酸、胺基醇或胺基醛將為非天然的且經修飾以具有一或多個用於連接位點之官能化側鏈。例示性官能化胺基酸、胺基醇或胺基醛包括例如疊氮基或炔基官能化胺基酸、胺基醇或胺基醛(例如使用點擊化學修飾而具有連接用疊氮基或炔基之胺基酸、胺基醇或胺基醛)。

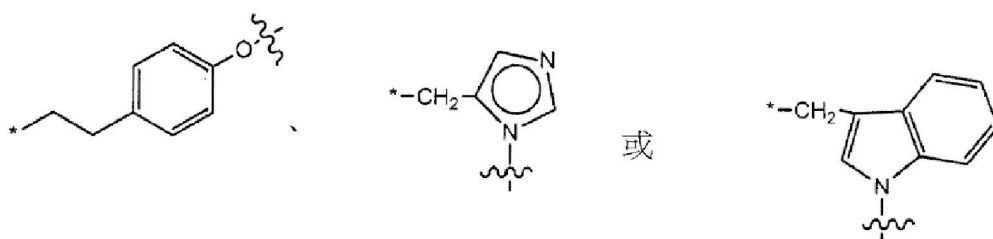
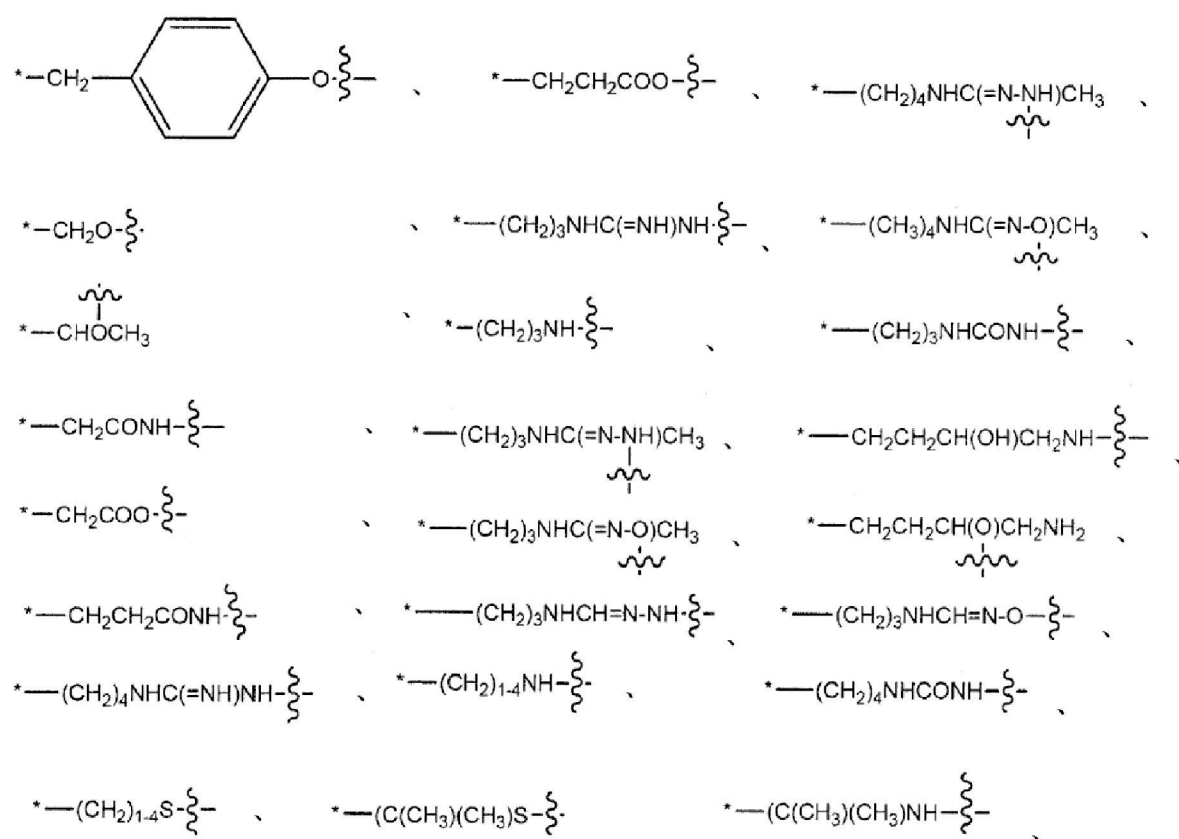
各胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺可為天然或非天然的。類似地，各胺基酸可為 D -或 L -異構體。在分支單元能夠連接兩個平行連接體單元之一些實施例中，兩個 $X-D$ 單元或兩個藥物連接單元、分支單元一經組合即具有以下所示式：





或

其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之三個連接位點中之兩個或三個，且其中 R^{110} 為



或

其中星號指示連接至以x標記之碳且波浪線指示分支單元之三個連接位點中之一者；

各 R^{100} 獨立地選自氫或 $-C_1-C_3$ 烷基，較佳為氫或 CH_3 ，

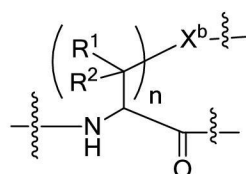
Y獨立地選自N或CH，

各Y'獨立地選自NH、O或S，

下標c獨立地為1至10、較佳1至3範圍內之整數。

在較佳實施例中， R^{110} 不為 $\begin{array}{c} * - CH_2CH_2CH(O)CH_2NH_2 \\ | \\ \sim \end{array}$ 。

在分支單元能夠連接至兩個平行連接體單元或兩個藥物連接單元之一些實施例中，配體-藥物結合物或其中間物中之各分支單元一經組合即獨立地具有以下所示式：



其中，下標n為1至4；

X^b 係選自由以下組成之群： $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=O)-$ 及 $-S(=O)-$ ；及

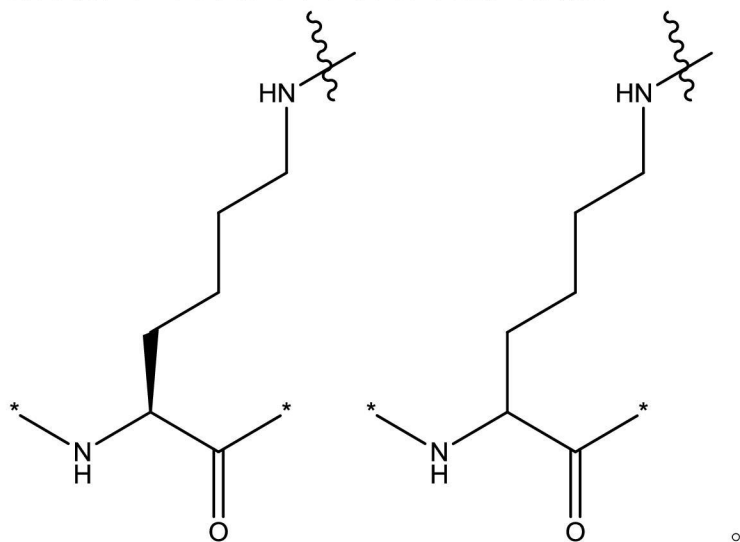
R^1 及 R^2 獨立地選自由以下組成之群： H 、 C_{1-3} 烷基、苯基及 C_2-C_5 雜環(較佳 H 或 C_{1-3} 烷基)，其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之分支單元之共價連接。

分支單元之胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺可視情況經如本文所述之視情況經取代之 C_{1-20} 伸雜烷基(較佳視情況經取代之 C_{1-12} 伸雜烷基)、視情況經取代之 C_{3-8} 雜環基、視情況經取代之 C_{6-14} 伸芳基或視情況經取代之 C_3-C_8 碳環基置換。視情況經取代之伸雜烷基、雜環、伸芳基或碳環基將具有用於配體-藥物結合物或其中間物內之連接的官能基。

視情況存在之取代基包括 $(=O)$ 、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-$

NO_2 、 $=\text{N}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NRC}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、
 SO_3H 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$ 、
 $\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{AsO}_2\text{H}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 、
 $-\text{C}(=\text{O})\text{X}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{OR}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}$ 、
 $\text{C}(=\text{S})\text{SR}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_2$ 或 $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}_2$ ，其中各X獨立地
 為鹵素： $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 或 $-\text{I}$ ；且各R獨立地為 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 烷基、 $-\text{C}_6\text{-C}_{20}$
 芳基、 $-\text{C}_3\text{-C}_{14}$ 雜環、保護基或前藥部分。較佳視情況存在之取代基為
 $(=\text{O})$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{R}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 及 $-\text{NR}_2$ 。

例示性分支單元為如下文所示之離胺酸，其中波浪線及星號指示配體-藥物結合物或其中間物內之共價鍵：



應瞭解，在某些本文提供中間化合物之式中，視情況存在之分支單元能夠與-X-D部分體形成2至4個共價連接，但尚未與其連接。在此類實施例中，分支單元將呈部分組合形式，且因而將包含兩個或兩個以上對存在於-X-D部分體之可釋放組合單元上之基團具有反應性之官能基。尤其較佳反應性官能基包括能夠形成二硫鍵或硫醚之硫氫基。

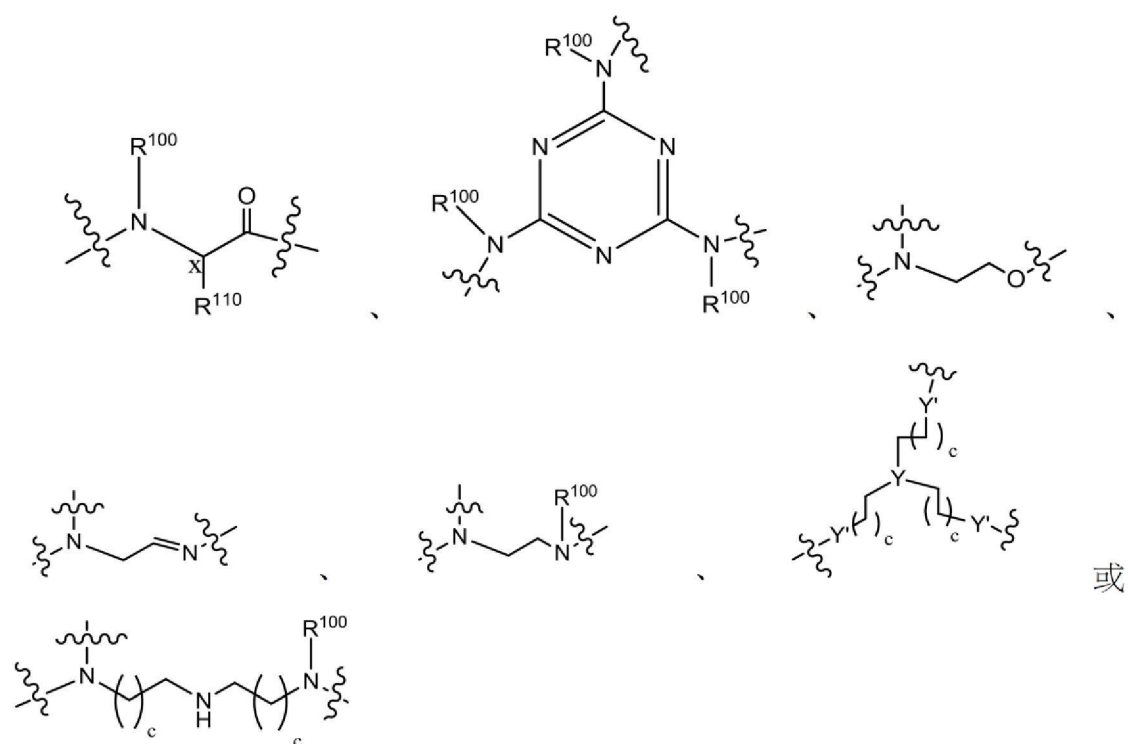
在本發明之較佳態樣中，分支單元之質量為不超過約1000道爾

頓、不超過約500道爾頓、不超過約200道爾頓、約10、50或100道爾頓至約1000道爾頓、約10、50或100道爾頓至約500道爾頓、或約10、50或100道爾頓至約200道爾頓。

藥物連接單元(AD)

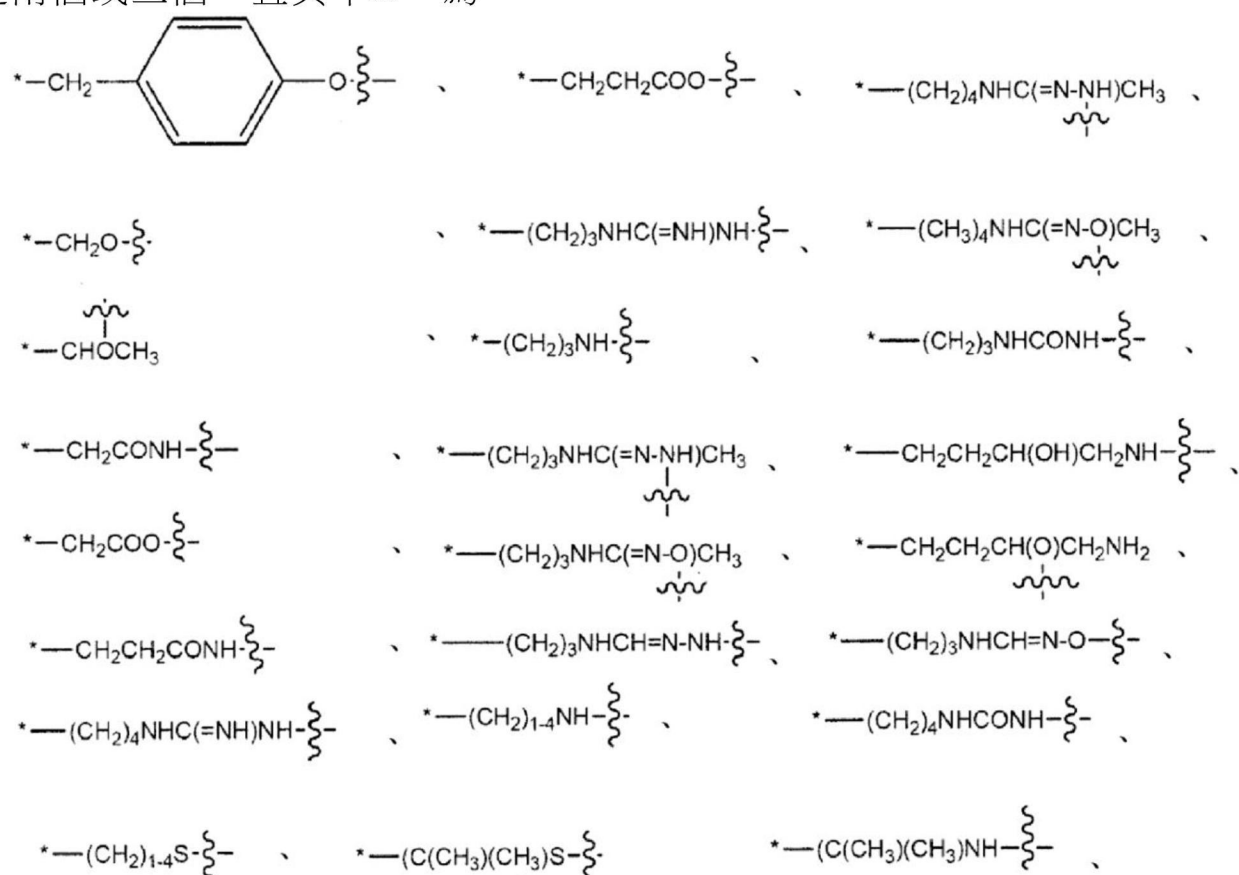
如同分支單元一樣，在需要加成額外-X-D部分體(亦即可釋放組合單元共價連接至藥物單元)至藥物連接子部分體中且最終加成至配體中之情況下，藥物連接單元包括在配體-藥物結合物中。藥物連接單元，視配體-藥物結合物或其中間物內之置放而定，將具有鍵聯至配體-藥物結合物或其中間物之組分之兩個連接位點或三個連接位點。熟習此項技術者將瞭解藥物連接單元可為用以連接藥物連接子部分體內之額外-X-D單元且最終連接至配體單元之任何基團。在一些實施例中，各藥物連接單元為單一單元或具有兩個或兩個以上次單元(例如2至10，較佳2至5，例如2、3、4或5)，其中連接單元或其次單元獨立地選自天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛、二胺或多元胺或其組合。若需要為了具有需要數量之連接，胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺中之至少一者將具有官能化側鏈，以為 L^P 單元及/或Z單元及/或AD單元及/或X-D部分體提供連接位點。胺基酸、胺基醇或胺基醛可為非天然的且可經修飾以具有一或多個用於連接可釋放組合單元之官能化側鏈。例示性官能化胺基酸、胺基醇或胺基醛包括例如疊氮基或炔基官能化胺基酸、胺基醇或胺基醛(例如使用點擊化學修飾而具有連接用疊氮基或炔基之胺基酸、胺基醇或胺基醛)。

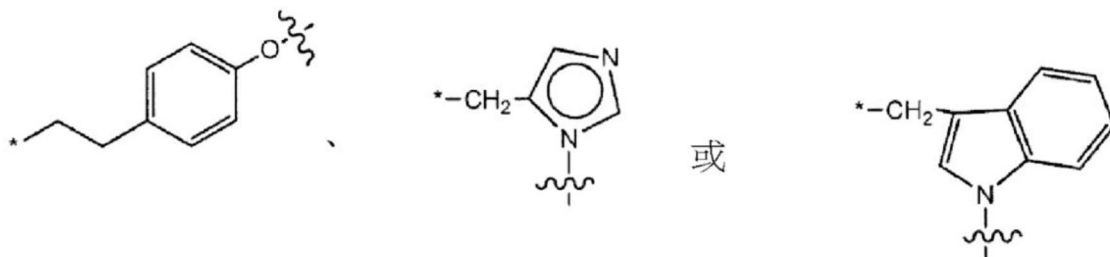
在AD單元具有三個連接位點之一些態樣中，呈組合形式之AD單元具有以下所示之式：



或

其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之三個AD連接位點中之兩個或三個，且其中 R^{110} 為





其中星號指示連接至以x標記之碳且波浪線指示三個連接位點中之一者；

R^{100} 獨立地選自氫或 $-C_1-C_3$ 烷基，較佳為氫或 CH_3 ，

Y獨立地選自N或CH，

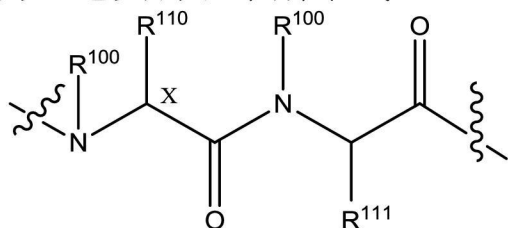
Y'獨立地選自NH、O或S，及

下標c獨立地選自1至10，較佳為1至3。

在較佳態樣中， R^{110} 不為 $^*CH_2CH_2CH(O)CH_2NH_2$ 。

在AD單元具有兩個連接位點(亦即末端AD單元)之實施例中，上文所示連接位點中之一者可例如經H、OH或未經取代之 C_{1-3} 烷基置換。

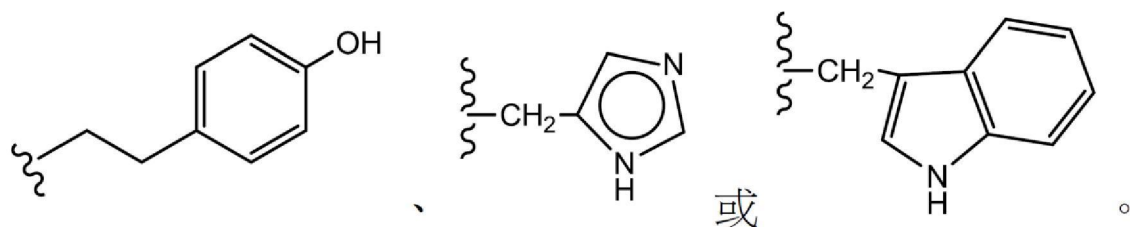
在AD單元具有三個連接位點之一些實施例中，呈組合形式之AD單元獨立地具有以下所示式：



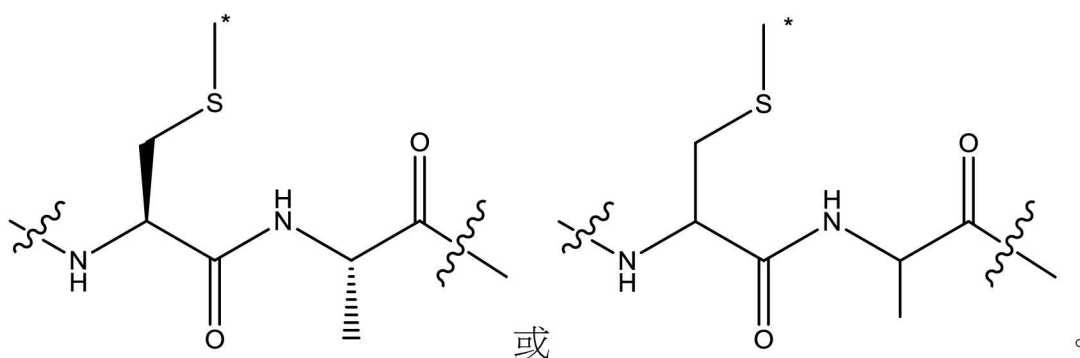
其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接位點，且其中x、 R^{100} 及 R^{110} 如先前緊接之上文所述，且其中

R^{111} 為對羥基苄基、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 $-CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NHCOCH_3$ 、 $-(CH_2)_3NHCHO$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、

$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、
 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶基甲基-、3-吡啶
 基甲基-、4-吡啶基甲基-、

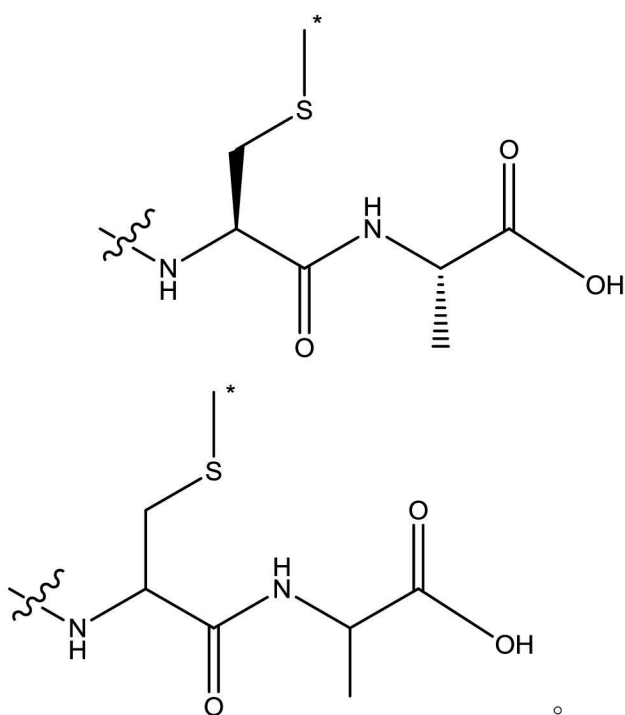


在AD單元具有三個連接位點之一些實施例中，AD單元包含兩個或兩個以上胺基酸。此類例示性胺基AD單元為如下文所示之半胱胺酸-丙胺酸，其中波浪線及星號指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接：



在一些實施例中，星號指示與可釋放組合單元共價連接。

在AD單元具有兩個連接位點之一些實施例中，AD單元包含兩個或兩個以上胺基酸。此類例示性胺基AD單元為如下文所示之半胱胺酸-丙胺酸，其中波浪線及星號指示配體-藥物結合物或其中間物內之連接：



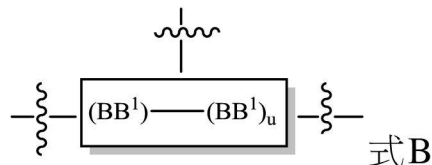
或

在一些實施例中，星號指示與可釋放組合單元共價連接。

AD單元之胺基酸、胺基醇、胺基醛或多元胺可視情況經如本文所述之視情況經取代之 C_{1-20} 伸雜烷基(較佳視情況經取代之 C_{1-12} 伸雜烷基)、視情況經取代之 C_{3-8} 雜環基、視情況經取代之 C_{6-14} 伸芳基或視情況經取代之 C_3-C_8 碳環基置換。視情況經取代之伸雜烷基、雜環、伸芳基或碳環基將具有用於配體-藥物結合物或其中間物內之連接的官能基。視情況存在之取代基包括($=O$)、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 CX_3 、 CN 、 OCN 、 SCN 、 $N=C=O$ 、 NCS 、 NO 、 NO_2 、 $=N_2$ 、 N_3 、 $NRC(=O)R$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 SO_3^- 、 SO_3H 、 $S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)(OR)_2$ 、 $-P(=O)(OR)_2$ 、 PO_3^- 、 PO_3H_2 、 AsO_2H_2 、 $C(=O)R$ 、 $C(=O)X$ 、 $C(=S)R$ 、 CO_2R 、 CO_2^- 、 $C(=S)OR$ 、 $C(=O)SR$ 、 $C(=S)SR$ 、 $C(=O)NR_2$ 、 $C(=S)NR_2$ 或 $C(=NR)NR_2$ ，其中各X獨立地為鹵素： $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 或 $-I$ ；且各R獨立地為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_6-C_{20}$ 芳基、 $-C_3-C_{14}$ 雜環、保護

基或前藥部分。較佳視情況存在之取代基為(=O)、X、R、OR、SR及NR₂。

藥物連接單元可為直鏈或分支鏈且可由式B表示：



其中

BB¹獨立地選自胺基酸、視情況經取代之C₁₋₂₀伸雜烷基(較佳視情況經取代之C₁₋₁₂伸雜烷基)、視情況經取代之C₃₋₈雜環基、視情況經取代之C₆₋₁₄伸芳基或視情況經取代之C_{3-C8}碳環基；

且下標u獨立地選自0至4；其中波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之共價連接位點。視情況取代之伸雜烷基、雜環、伸芳基或碳環基將具有用於BB次單元之間及配體-藥物結合物或其中間物內之連接的官能基。

在一些實施例中，BB¹之至少一種情況為限定胺基藥物連接單元之胺基酸。下標u可為0、1、2、3或4。在一些態樣中，BB¹為胺基酸且u為0。在一些實施例中，AD單元包含不超過2個視情況經取代之C₁₋₂₀伸雜烷基、視情況經取代之C₃₋₈雜環基、視情況經取代之C₆₋₁₄伸芳基或視情況經取代之C_{3-C8}碳環基。在一些實施例中，AD單元包含不超過1個視情況經取代之C₁₋₂₀伸雜烷基、視情況經取代之C₃₋₈雜環基、視情況經取代之C₆₋₁₄伸芳基或視情況經取代之C_{3-C8}碳環基。視情況經取代之伸雜烷基、雜環、伸芳基或碳環基將具有用於BB次單元之間及配體-藥物結合物或其中間物內之連接的官能基。

胺基藥物連接單元之胺基酸可為天然或非天然之α、β或γ胺基酸。

胺基酸可為D或L異構體。胺基藥物連接單元內或與結合物(或連接子)之另一組分之連接可例如經由胺基、羧基或其他官能基來實現。視情況經取代之伸雜烷基將具有用於配體-藥物結合物或其中間物內之連接的官能基。此項技術中已熟知使官能基單獨活化及反應之方法。

在本文提供之任何實施例中，藥物連接單元(包括胺基藥物連接單元)之胺基酸可獨立地選自含巯基胺基酸之D或L異構體。含巯基胺基酸可為例如下半胱胺酸、高半胱胺酸或青黴胺。

在另一實施例中，包含藥物連接單元(包括胺基藥物連接單元)之胺基酸可獨立地選自由以下組成之群：以下胺基酸之L或D異構體：丙胺酸(包括β-丙胺酸)、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、半胱胺酸、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、色胺酸、脯胺酸、鳥胺酸、青黴胺、B-丙胺酸、胺基炔酸、胺基烷二酸、雜環基-羧酸、瓜胺酸、他汀、二胺基烷酸及其衍生物。

較佳胺基酸包括半胱胺酸、高半胱胺酸、青黴胺、鳥胺酸、離胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、麩醯胺酸、丙胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、硒半胱胺酸、脯胺酸、甘胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、纈胺酸及丙胺酸。

應瞭解，在某些本文所述化合物之式中，諸如藥物連接單元能夠與-X-D形成共價連接但尚未連接至-X-D之彼等式，藥物連接單元將呈部分組合形式，且因而將包含與存在於可釋放組合單元上之基團具有反應性之官能基。尤其較佳反應性官能基包括形成二硫鍵或硫醚鍵之硫氫基。在一些態樣中，反應性硫原子將經保護基保護。用於結合化

學之巰基保護基在此項技術中已熟知，且包括例如烷基巰基(例如第三丁基巰基、乙巰基、2-丙巰基、2-吡啶巰基)保護基、芳族巰基保護基(例如2-吡啶巰基)及乙醯基保護基。

在本發明之較佳態樣中，藥物連接單元之質量為不超過約1000道爾頓、不超過約500道爾頓、不超過約200道爾頓、約10、50或100道爾頓至約1000道爾頓、約10、50或100道爾頓至約500道爾頓、或約10、50或100道爾頓至約200道爾頓。

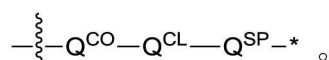
可釋放組合單元(X)

可釋放組合單元(-X-)使藥物單元連接至配體-藥物結合物之其餘部分。可釋放組合單元之主要功能為在配體靶向之位點釋放游離藥物。本著彼精神，可釋放組合單元能夠與藥物單元形成可裂解鍵聯或含有釋放藥物之可裂解鍵聯(例如在抗原介導之內化後)。在較佳實施例中，可釋放組合單元之釋放機制為酶促釋放機制或二硫鍵消除機制。酶促釋放機制之識別位點可為例如肽裂解位點或糖裂解位點(例如葡萄糖醛酸苷裂解位點)。

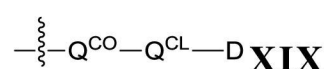
可釋放組合單元可包含1至3個組分、可裂解單元(Q^{CL})、視情況存在之間隔子單元(Q^{SP})及視情況存在之共價連接單元(Q^{CO})。間隔子單元(若存在)用以連接可裂解單元及藥物單元。相應地，在存在間隔子單元之實施例中，間隔子單元將直接連接至藥物單元且可裂解單元將經由間隔子單元連接至藥物單元。在不存在間隔子單元之實施例中，可裂解單元將直接連接至藥物單元。

相應地，可釋放組合單元可由下式表示，其中 Q^{CO} 為共價連接單元， Q^{SP} 為間隔子單元且 Q^{CL} 為可裂解單元。共價連接單元可存在或不

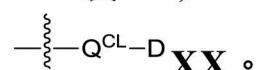
存在且間隔子單元可存在或不存在。星號指示共價連接至藥物單元之位點且波浪線指示配體-藥物結合物或其中間物內之共價連接(視情況可連接至 L^P 、A或AD)：



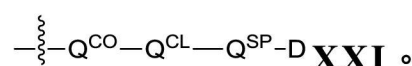
在不存在間隔子單元且存在共價連接單元之實施例中，-X-D可由式XIX表示，其中與共價連接單元相鄰之波浪線指示共價連接至連接子之其餘部分(視情況可連接至 L^P 、A或AD)。



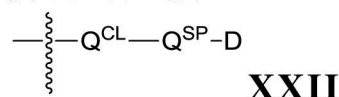
在不存在共價連接單元且不存在間隔子單元之實施例中，-X-D可由式XX表示，其中與可裂解單元相鄰之波浪線指示共價連接至連接子之其餘部分(視情況可連接至 L^P 、A或AD)：



在不存在間隔子單元且存在共價連接單元之實施例中，-X-D可由式XXI表示，其中與共價連接單元相鄰之波浪線指示共價連接至連接子之其餘部分(視情況可連接至 L^P 、A或AD)：



在存在間隔子單元且不存在共價連接單元之實施例中，-X-D可由式XXII表示，其中與可裂解單元或間隔子單元相鄰之波浪線指示共價連接至連接子之其餘部分(視情況可連接至 L^P 、A或AD)。



熟習此項技術者應瞭解以上關於-X-D之定義(式XIX-XXIV)中之任一者可用於本文提供之式及實施例中之任一者及其所選實施例中之任一者中。各X、d及各 Q^{CO} 、 Q^{CL} 或 Q^{SP} 單元可相同或不同。

在本發明之較佳態樣中，可釋放組合單元之質量為不超過約5000道爾頓、不超過約4000道爾頓、不超過約3000道爾頓、不超過約2000道爾頓、不超過約1000道爾頓、不超過約800道爾頓或不超過約500道爾頓。在一些態樣中，可釋放組合單元之質量為約100道爾頓、或約200道爾頓、或約300道爾頓至約5000道爾頓、約100道爾頓、或約200道爾頓、或約300道爾頓至約4000、約100道爾頓、或約200道爾頓、或約300道爾頓至約3000道爾頓、約100道爾頓、或約200道爾頓、或約300道爾頓至約2000道爾頓、約100道爾頓、或約200道爾頓、或約300道爾頓至約1000道爾頓、約100道爾頓、或約200道爾頓、或約300道爾頓至約800道爾頓、或約100道爾頓、或約200道爾頓、或約300道爾頓至約500道爾頓。

熟習此項技術者應瞭解，中間連接子或藥物連接子化合物之組分可以與缺乏配體單元之配體-藥物結合物相同之方式連接。

可裂解單元(Q^{CL})

可裂解單元為可釋放組合單元之僅有之必須存在之組分。在一些態樣中，可裂解單元與藥物單元形成可裂解鍵。在一些態樣中，可裂解單元與間隔子單元形成可裂解鍵。在一些態樣中，可裂解鍵在可裂解單元內，但允許釋放游離藥物(例如藉由裂解後之1,6-消除反應)。形成可裂解鍵之官能基可包括例如形成二硫鍵之硫氫基、形成腙鍵醛、酮或肼基團、形成肟鍵之羥胺基團、形成肽鍵之羧基或胺基、形成酯鍵之羧基或羥基基團及形成糖苷鍵之糖。

可裂解單元之性質可極大不同。舉例而言，可裂解連接子包括可經由二硫鍵交換裂解之含二硫鍵之連接子、可在酸性pH值下裂解之酸

不穩定連接子、及可藉由水解酶(例如肽酶、酯酶及葡萄糖醛酸酶)裂解之連接子。

可裂解單元之結構及序列可使得該單元藉由存在於目標位點處之酶的作用而裂解。在其他態樣中，可裂解單元可藉由其他機制裂解。可裂解單元可包含一或多個裂解位點。

在一些實施例中，可裂解單元將包含一個胺基酸或一或多個胺基酸序列。可裂解單元可包含例如單肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。

可裂解單元之各胺基酸可為天然或非天然的及/或D或L異構體，當然其限制條件為存在可裂解鍵。在一些實施例中，可裂解單元將僅包含天然胺基酸。在一些實施例中，可裂解單元將包含1至12個呈鄰近序列之胺基酸。

在一些實施例中，可裂解單元之各胺基酸係獨立地選自由以下組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、脯胺酸、色胺酸、纈胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、硒半胱胺酸、鳥胺酸、青黴胺、 β -丙胺酸、胺基烷酸、胺基炔酸、胺基烷二酸、胺基苯甲酸、胺基-雜環基-烷酸、雜環基-羧酸、瓜胺酸、他汀、二胺基烷酸及其衍生物。在一些實施例中，各胺基酸獨立地選自由以下組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、脯胺酸、色胺酸、纈胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸及硒半胱胺酸。在一些實施例中，各胺基酸係獨立地

選自由以下組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、脯胺酸、色胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，各胺基酸係選自蛋白型或非蛋白型胺基酸。

在另一實施例中，可裂解單元之各胺基酸係獨立地選自由以下L-(天然)胺基酸組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、色胺酸及纈胺酸。

在另一實施例中，可裂解單元之各胺基酸係獨立地選自由以下此等天然胺基酸之D-異構體組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、色胺酸及纈胺酸。

在一些實施例中，可裂解單元與藥物單元或間隔子單元之間的鍵可以酶促方式藉由一或多種酶裂解，該一或多種酶包括腫瘤相關蛋白酶以釋放藥物單元(-D)，在一個實施例中該藥物單元在釋放後經活體內質子化以提供藥物(D)。

適用可裂解單元在其由特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解之選擇性方面可經設計且最佳化。在一個實施例中，可裂解單元與藥物單元或間隔子單元之間的鍵聯(或鍵)為藉由組織蛋白酶B、C及D或纖維蛋白溶酶蛋白酶催化裂解之彼鍵聯(或鍵)。

在某些實施例中，可裂解單元可僅包含天然胺基酸。在其他實施例中，可裂解單元可僅包含非天然胺基酸。在一些實施例中，可裂解單元可包含與非天然胺基酸連接之天然胺基酸。在一些實施例中，可

裂解單元可包含與天然胺基酸之D-異構體連接之天然胺基酸。

例示性可裂解單元為二肽-Val-Cit-、-Phe-Lys-或-Val-Ala。

在一些實施例中，可裂解單元將包含肽且將包含1至12個胺基酸。

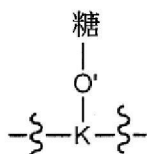
在一些此類實施例中，肽將與藥物單元直接結合且間隔子單元將不存在。在一些此類實施例中，肽將為二肽。

在一些實施例中，可裂解單元-CU-將由 $(-AM-)_{1-12}$ -或 $(-AM-AM-)_{1-6}$ 表示，其中AM在每次出現時獨立地選自天然或非天然胺基酸。在一個態樣中，AM在每次出現時獨立地選自天然胺基酸。熟習此項技術者將瞭解，胺基酸通常經由存在於胺基酸中之官能單元(例如其羧酸或胺基末端)連接至藥物單元或間隔子單元。

在其他態樣中，可裂解單元將包含糖裂解位點。在一些此類實施例中，Cleaveable單元包含經由氧糖苷鍵連接至自體分解型基團之糖部分體(Su)。在此類態樣中，自體分解型基團視為可裂解單元 Q^{CL} 之一部分。

「自體分解型基團」為三官能性化學部分，能夠將三個間隔之化學部分(亦即糖部分體(經由糖苷鍵)、藥物單元(直接或經由間隔子單元 Q^{SP} 間接)及 L^P 單元、A單元或AD單元(直接或經由共價連接單元 Q^{CO} 間接))共價鍵聯在一起。糖苷鍵將為可在目標位點裂解以起始使得藥物釋放之自體分解型反應次序之鍵。

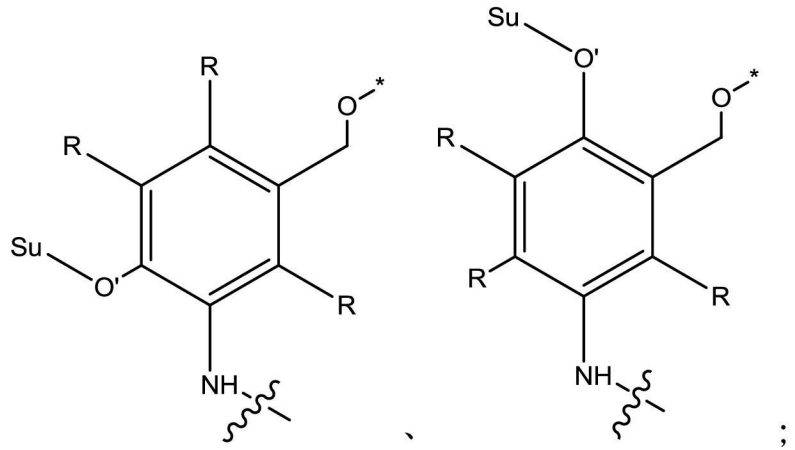
相應地，可裂解單元可包含下式之經由糖苷鍵(-O'-)連接至自體分解型基團(K)之糖部分體(Su)：



其中自體分解型基團K可視情況與藥物單元(直接或經由間隔子單

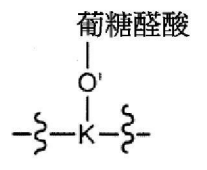
元間接)形成共價鍵且與L^P、AD或A(直接或經由共價連接單元間接)形成共價鍵。

可裂解單元可例如由下式表示：



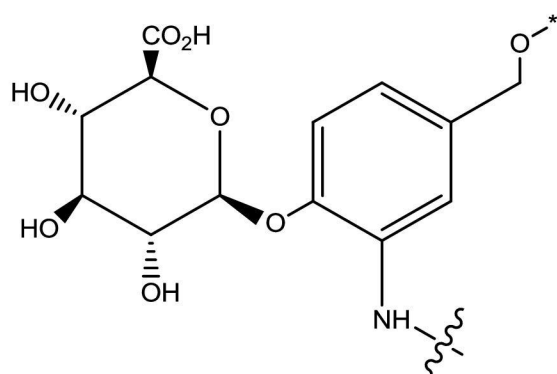
其中Su為糖部分體，-O'-表示氧糖苷鍵；各R獨立地為氫、鹵素、-CN或-NO₂；且其中波浪線指示連接至L^P、AD或A(直接或經由共價連接單元間接)且星號指示連接至藥物單元(直接或經由間隔子單元間接，間隔子單元(若存在)可為例如-C(=O)-)。

在一些此類實施例中，糖裂解位點藉由β-葡萄糖醛酸酶識別且可裂解單元包含葡萄糖醛酸苷單元。葡萄糖醛酸苷單元可包含下式之經由糖苷鍵(-O'-)連接至自體分解型基團(K)之葡萄糖醛酸：



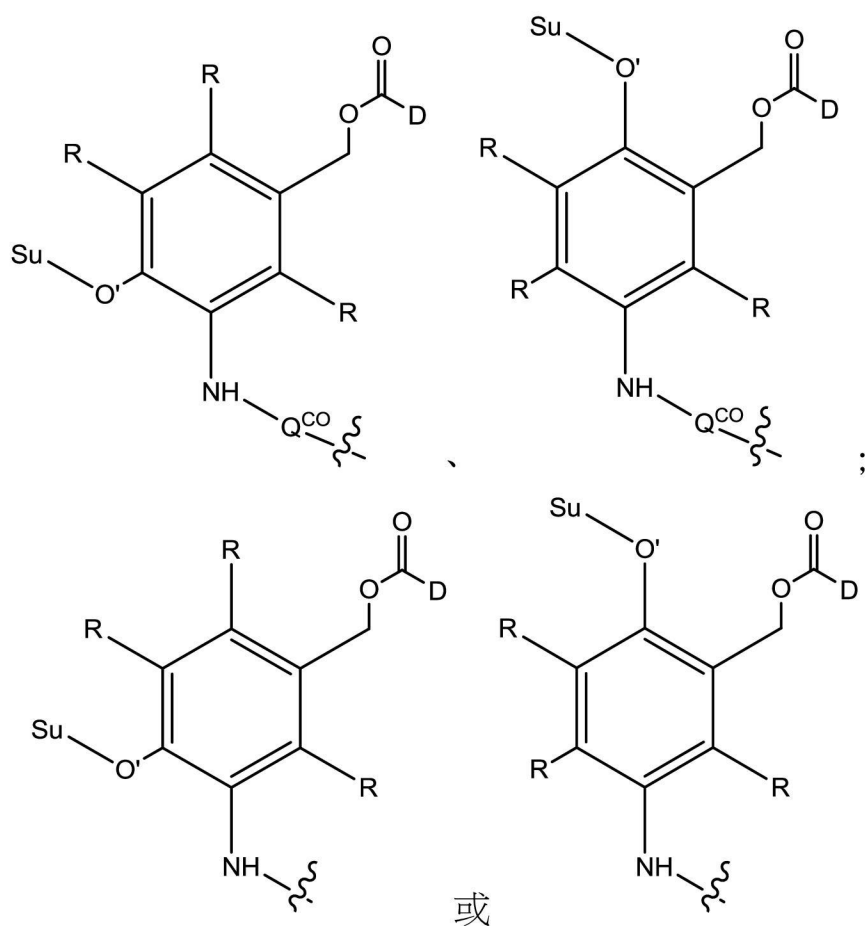
其中自體分解型基團K可視情況與藥物單元(直接或經由間隔子單元間接)形成共價鍵且與L^P、AD或A(直接或經由共價連接單元間接)形成共價鍵。

葡萄糖醛酸苷單元可例如由下式表示：



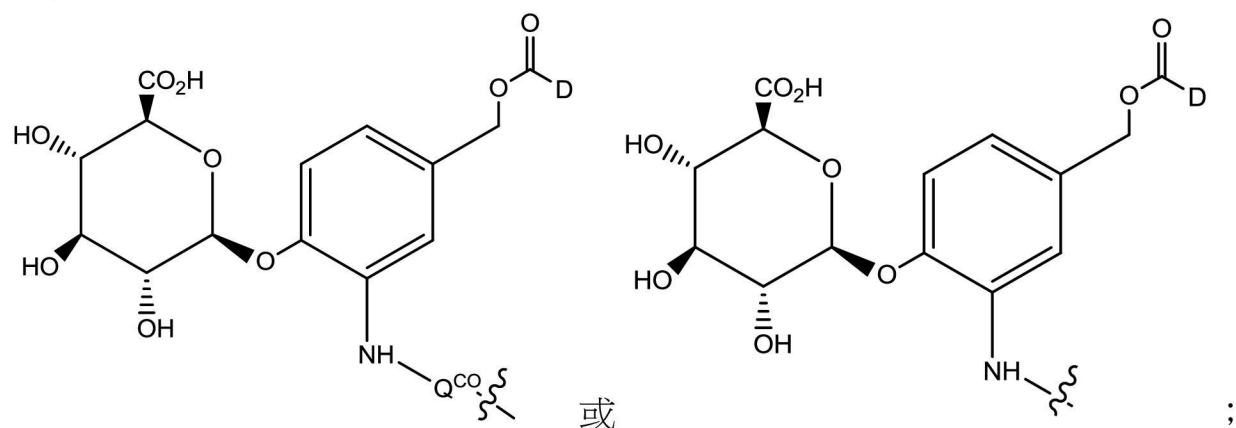
其中波浪線指示共價連接至 L^P 、AD或A(直接或經由共價連接單元間接)且星號指示共價連接至藥物單元(直接或經由間隔子單元間接)。

在一些實施例中，可裂解單元包含糖裂解位點， $-X-D$ 由下式表示：



其中Su為糖部分體， $-O'$ -表示氧糖苷鍵；各R獨立地為氫或鹵素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 或其他拉電子基團， Q^{CO} 為共價連接單元；其中波浪鍵指示共價連接至連接子單元之其餘部分(視情況可連接至 L^P 、A或AD)。

當可裂解單元包含葡萄糖醛酸苷單元時，-X-D可例如由下式表示：



其中波浪鍵指示共價連接至連接子單元之其餘部分(視情況可連接至 L^P 、A或AD)；且 Q^{CO} 為共價連接單元。

在一些其他實施例中，可裂解單元本身將包含能夠與間隔子單元或藥物單元之硫原子形成鍵之硫原子以形成二硫鍵或受阻二硫鍵。二硫鍵之兩個硫原子之間發生裂解。在一些此類實施例中，硫原子中之一者由藥物單元裂解，且其限制條件為不存在進一步釋放機制，另一硫原子仍連接至藥物單元且變為藥物單元之一部分。

多種二硫鍵連接子在此項技術中已知且可適合於用於本發明中，包括例如可使用以下物質形成之彼等二硫鍵連接子：SATA (N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫基乙酸酯)、SPDP (N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB (N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)、SMPT (N-丁二醯亞胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫基)甲苯)及SPP (N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯)。(參見例如Thorpe等人，1987，*Cancer Res.* 47:5924-5931；Wawrzynczak等人，*Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager* and

Therapy of Cancer (C. W. Vogel編, Oxford U. Press, 1987。亦參見美國專利第4,880,935號。)

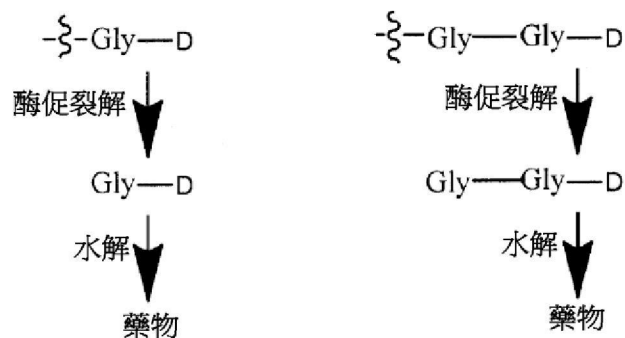
在一些實施例中，可裂解單元為pH敏感的且將包含例如可在溶酶體中水解之酸不穩定連接子(例如脙、半卡巴脙、硫半卡巴脙、順式-烏頭酸醯胺、原酸酯、縮醛或縮酮基團)。(參見例如美國專利第5,122,368號；第5,824,805號；第5,622,929號；Dubowchik及Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123；Neville等人, 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661。)此類連接子在中性pH值條件(諸如血液中之pH值條件)下相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0(近似溶酶體之pH值)下不穩定。

在一些實施例中，可裂解單元將直接連接至藥物單元且可裂解單元將經由可裂解肽或二硫鍵連接至藥物單元。

間隔子單元(Q^{SP})

間隔子單元(若存在)用以使藥物單元連接至可裂解單元。間隔子單元具有兩個通用類型：自體分解型及非自體分解型。非自體分解型單元為在裂解之後間隔子單元之一部分或所有仍結合至藥物單元之單元，且可進一步降解或自發分解以產生『游離藥物』或可變為藥物單元本身之一部分。非自體分解型單元之實例包括(但不限於)甘胺酸-甘胺酸單元及單一甘胺酸單元(皆描述於流程A中)(見下文)。當含有甘胺酸-甘胺酸單元或單一甘胺酸單元之配體-藥物結合物經由腫瘤細胞相關蛋白酶、癌症細胞相關蛋白酶或淋巴細胞相關蛋白酶進行酶促裂解時，甘胺酸-甘胺酸-藥物單元或甘胺酸-藥物單元由結合物裂解。在一個實施例中，單獨水解反應出現在目標細胞內，使甘胺酸-藥物單元鍵斷裂且釋出藥物。

流程A

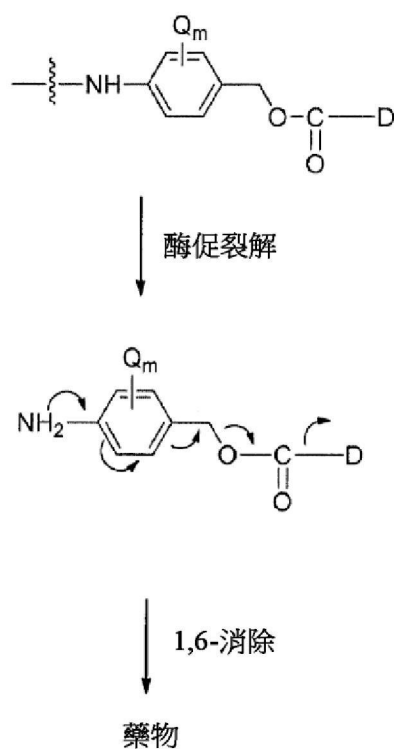


在一個實施例中，非自體分解型單元為-Gly-Gly-。在另一實施例中，非自體分解型單元為-Gly-。

在另一實施例中，間隔子單元包含對胺基苯甲醇(PAB)單元(參見流程B及C，見下文)，其中伸苯基部分經 Q_m 取代，其中Q為-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)或其他供電子基團或-鹵素、-硝基、-氰基或其他拉電子基團；且m為0-4範圍內之整數。

或者，含有自體分解型間隔子單元之結合物可釋放-D，而不需要各別水解步驟。在一些態樣中，延伸子單元包含經由PAB基團之胺基氮原子連接至肽可裂解單元且經由碳酸酯、胺基甲酸酯或醚基團直接連接至藥物單元之PAB基團。PAB基團及相鄰羰基組成間隔子單元。不受任何特定理論或機制束縛，流程B描繪經由胺基甲酸酯或碳酸酯基團直接連接至-D之PAB基團之可能藥物釋放機制，藉由Toki等人，2002, *J Org. Chem.* 67:1866-1872支持。

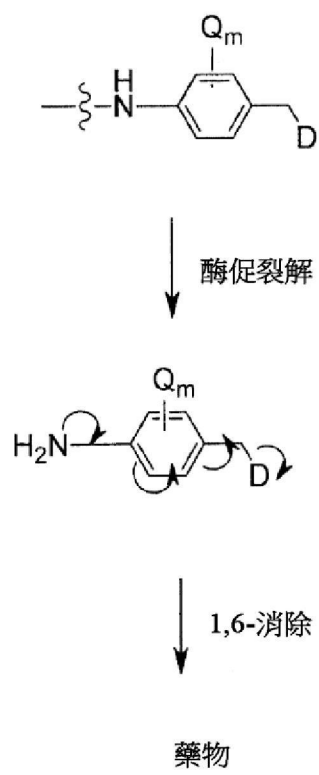
流程B



其中Q為-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為0-4範圍內之整數。

不受任何特定理論或機制束縛，流程C描述經由醚或胺鍵聯直接連接至-D之PAB基團之可能藥物釋放機制。

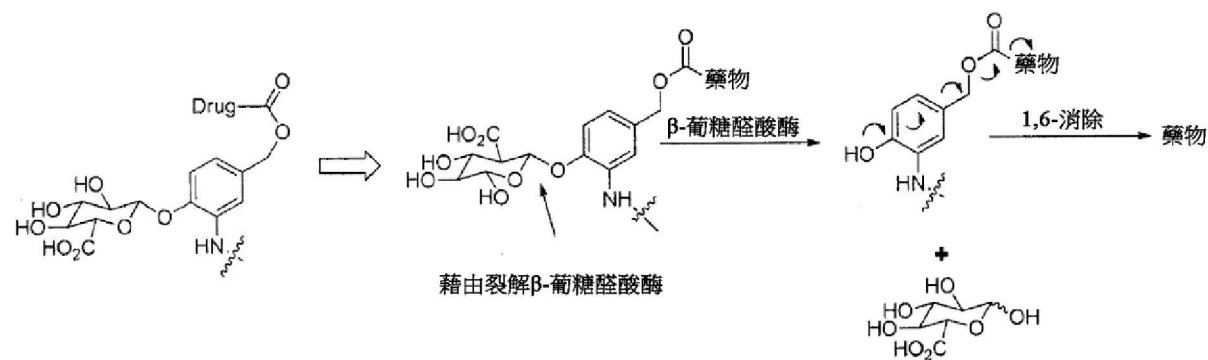
流程C



其中Q為-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為0-4範圍內之整數。

不受任何特定理論或機制束縛，流程D描述經由羰基直接連接至-D之葡萄糖醛酸苷單元之PAB基團之可能藥物釋放機制。

流程D



自體分解型單元之其他實例包括在電子上類似於PAB基團之包含芳族化合物之彼等單元，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(參見例如Hay等人，1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)及鄰或對胺基苯甲基乙醛。可使

用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔子，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(參見例如Rodrigues等人, 1995, *Chemistry Biology* 2:223)、經適當取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(參見例如Storm等人, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815)及2-胺基苯基丙酸醯胺(參見例如Amsberry等人, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867)。在甘胺酸之 α -位置經取代之含胺藥物之消除(參見例如Kingsbury等人, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447)亦為適用於例示性結合物之自體分解型間隔子之實例。

在本發明之較佳實施例中，間隔子單元包含1、2或3個自體分解型或非自體分解型基團。

在本發明之較佳實施例中，間隔子單元之質量為不超過約1000道爾頓、不超過約500道爾頓、不超過約400道爾頓、不超過約300道爾頓、或約10、50或100至約1000道爾頓、約10、50或100至約500道爾頓、約10、50或100道爾頓至約400道爾頓、約10、50或100道爾頓至約300道爾頓或約10、50或100道爾頓至約200道爾頓。

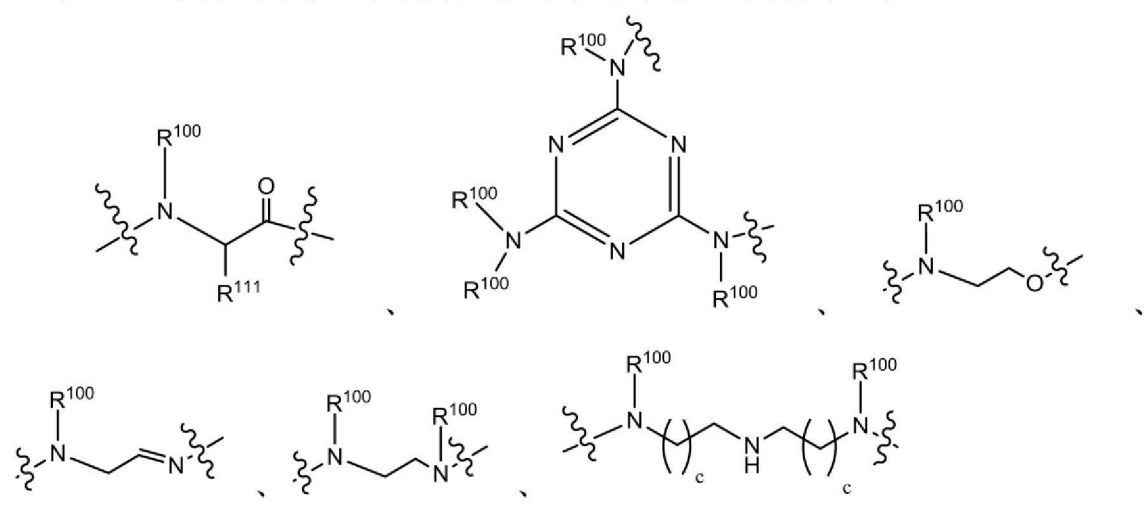
共價連接單元(Q^{c0})

共價連接單元(若存在)延伸可釋放連接子組合單元之架構以在 L^P 與藥物單元之間提供較大距離。就此而言，共價連接單元具有可在一個末端與視情況存在之分支單元A或 L^P 或藥物連接單元AD之官能基形成鍵之官能基及可在另一末端上與可裂解單元之官能基形成鍵之官能基。在一些態樣中，例示性鍵藉助於非條件性可裂解鍵聯實現。

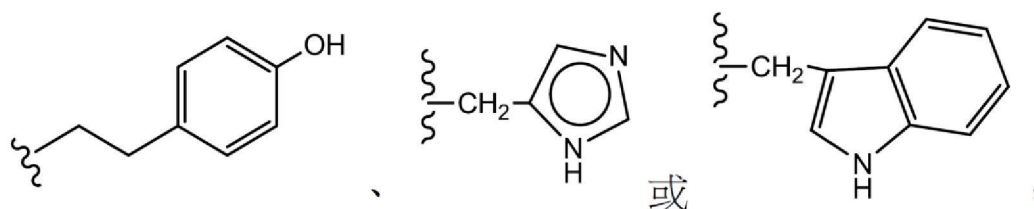
熟習此項技術者將瞭解共價連接單元可為用以使可裂解單元連接至分子之其餘部分之任何基團或部分。在一些態樣中，在組合之前共價連接單元將具有兩個能夠形成鍵且連接至配體-藥物結合物或其中間

物之組分之官能基。熟練醫師應瞭解共價連接單元在組合之前可具有兩個以上官能基；然而，就本發明而言，將僅經由兩個官能基連接至配體-藥物結合物或其中間物之組分。共價連接單元可具有一或多個(例如1-10，較佳1、2、3或4)天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛、二胺或天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或二胺。在一些態樣中，共價連接單元為天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或二胺。能夠充當共價連接單元之例示性胺基酸包括β-丙胺酸。

在一些實施例中，共價連接單元具有以下所示式：



其中R¹¹¹為對羥基苄基、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-

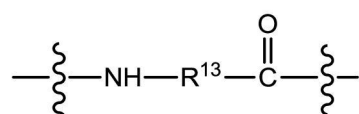


各 R^{100} 獨立地選自氫或 $-C_1-C_3$ 烷基，較佳為氫或 CH_3 ；

及

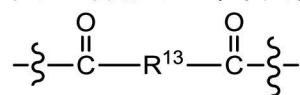
c 為獨立地選自1至10，較佳1至3之整數。

具有鍵聯至可裂解單元之羰基之代表性共價連接單元如下：



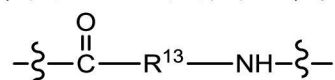
其中 R^{13} 為 $-C_1-C_6$ 伸烷基-、 $-C_3-C_8$ 碳環基-、-伸芳基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸雜烷基-、 $-C_3-C_8$ 雜環基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基- $(C_3-C_8$ 碳環基)-、 $-(C_3-C_8$ 碳環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基- $(C_3-C_8$ 雜環基)-或 $-(C_3-C_8$ 雜環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-。在較佳實施例中， R^{13} 為 $-C_1-C_6$ 伸烷基。

具有鍵聯至可裂解單元之羰基之代表性共價連接單元如下：



其中 R^{13} 為 $-C_1-C_6$ 伸烷基-、 $-C_3-C_8$ 碳環基-、-伸芳基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸雜烷基-、 $-C_3-C_8$ 雜環基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基- $(C_3-C_8$ 碳環基)-、 $-(C_3-C_8$ 碳環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基- $(C_3-C_8$ 雜環基)-或 $-(C_3-C_8$ 雜環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-。在較佳實施例中， R^{13} 為 $-C_1-C_6$ 伸烷基。

具有鍵聯至可裂解單元之NH基團之代表性共價連接單元如下：

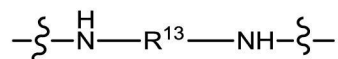


其中 R^{13} 為 $-C_1-C_6$ 伸烷基-、 $-C_3-C_8$ 碳環基-、-伸芳基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸雜

第 129 頁(發明說明書)

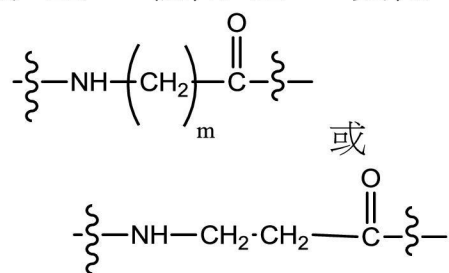
烷基-、-C₃-C₈雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-或-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-。在較佳實施例中，R¹³為-C₁-C₆伸烷基。

具有鍵聯至可裂解單元之NH基團之代表性共價連接單元如下：



其中R¹³為-C₁-C₆伸烷基-、-C₃-C₈碳環基-、-伸芳基-、-C₁-C₁₀伸雜烷基-、-C₃-C₈雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-或-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-。在較佳實施例中，R¹³為-C₁-C₆伸烷基。

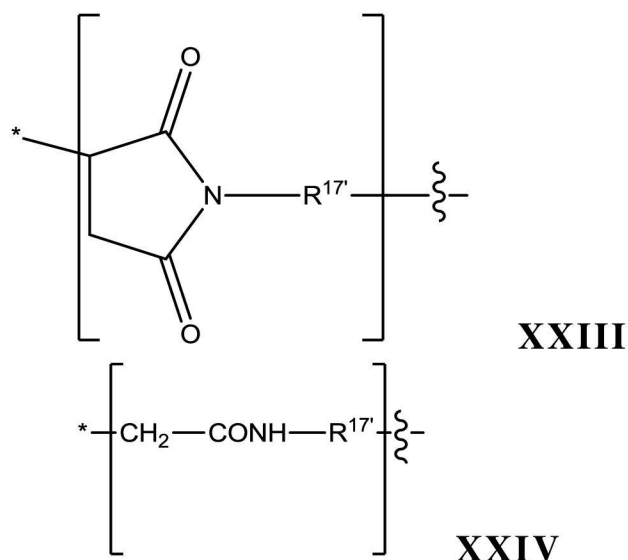
共價連接單元之所選實施例包括以下，其中與氮相鄰之波浪線指示共價連接至L^P(補足至AD或A)，且與羰基相鄰之波浪線指示共價連接至可裂解單元，且m為1至6、較佳2至6、更佳2至4範圍內之整數。



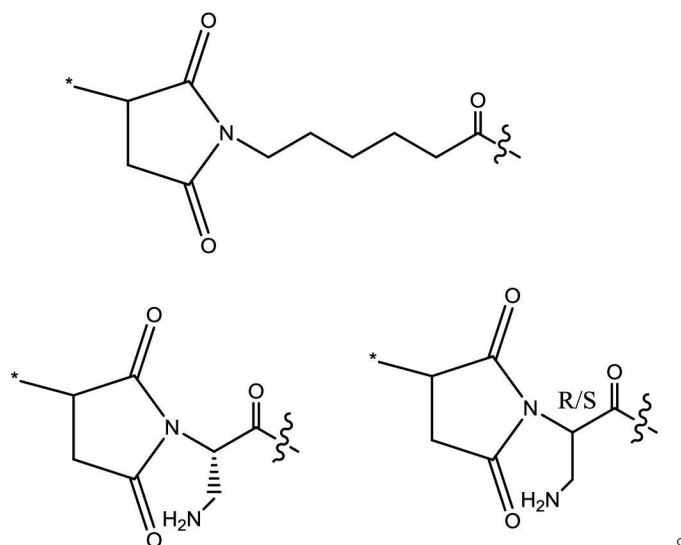
在一些態樣中，共價連接單元為視情況經取代之C₁₋₈伸雜烷基。

在一些態樣中，尤其共價連接單元與平行連接體單元、分支單元或藥物連接單元之硫原子形成鍵之彼等態樣中，該共價連接單元將經由共價連接單元之順丁烯二醯亞胺基團與硫原子形成鍵。此實施例之代表性共價連接單元包括XXIII及XXIV之方括號內之彼等單元，其中波浪線指示連接至如本文所定義之可裂解單元，且星號指示連接至平行連接體單元、分

支單元或藥物連接單元之硫原子，且 $R^{17'}$ 為- C_1-C_{10} 伸烷基-、 C_1-C_{10} 伸雜烷基-、- C_3-C_8 碳環基-、- $O-(C_1-C_8$ 烷基)-、-伸芳基-、- C_1-C_{10} 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- C_1-C_{10} 伸烷基-、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 碳環基)-、-(C_3-C_8 碳環基)- C_1-C_{10} 伸烷基-、- C_3-C_8 雜環基-、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 雜環基)-、-(C_3-C_8 雜環基)- C_1-C_{10} 伸烷基-、- C_1-C_{10} 伸烷基- $C(=O)-$ 、 C_1-C_{10} 伸雜烷基- $C(=O)-$ 、- C_3-C_8 碳環基- $C(=O)-$ 、- $O-(C_1-C_8$ 烷基)- $C(=O)-$ 、-伸芳基- $C(=O)-$ 、- C_1-C_{10} 伸烷基-伸芳基- $C(=O)-$ 、-伸芳基- C_1-C_{10} 伸烷基- $C(=O)-$ 、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 碳環基)- $C(=O)-$ 、-(C_3-C_8 碳環基)- C_1-C_{10} 伸烷基- $C(=O)-$ 、- C_3-C_8 雜環基- $C(=O)-$ 、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 雜環基)- $C(=O)-$ 、-(C_3-C_8 雜環基)- C_1-C_{10} 伸烷基- $C(=O)-$ 、- C_1-C_{10} 伸烷基-NH-、 C_1-C_{10} 伸雜烷基-NH-、- C_3-C_8 碳環基-NH-、- $O-(C_1-C_8$ 烷基)-NH-、-伸芳基-NH-、- C_1-C_{10} 伸烷基-伸芳基-NH-、-伸芳基- C_1-C_{10} 伸烷基-NH-、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 碳環基)-NH-、-(C_3-C_8 碳環基)- C_1-C_{10} 伸烷基-NH-、- C_3-C_8 雜環基-NH-、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 雜環基)-NH-、-(C_3-C_8 雜環基)- C_1-C_{10} 伸烷基-NH-、- C_1-C_{10} 伸烷基-S-、 C_1-C_{10} 伸雜烷基-S-、- C_3-C_8 碳環基-S-、- $O-(C_1-C_8$ 烷基)-S-、-伸芳基-S-、- C_1-C_{10} 伸烷基-伸芳基-S-、-伸芳基- C_1-C_{10} 伸烷基-S-、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 碳環基)-S-、-(C_3-C_8 碳環基)- C_1-C_{10} 伸烷基-S-、- C_3-C_8 雜環基-S-、- C_1-C_{10} 伸烷基-(C_3-C_8 雜環基)-S-或-(C_3-C_8 雜環基)- C_1-C_{10} 伸烷基-S-。 $R^{17'}$ 取代基可視情況經取代。在一些態樣中， $R^{17'}$ 取代基將為未經取代的。在一些態樣中， $R^{17'}$ 基團視情況經鹼性單元取代，例如 $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中x為1-4之整數且各 R^a 係獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群，或兩種 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。



說明性共價連接單元為式**XXIII**單元，其中 $R^{17'}$ 為 $-C_2-C_5$ 伸烷基- $C(=O)-$ ，其中伸烷基視情況經鹼性單元取代，例如 $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中 x 為1-4之整數且各 R^a 係獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群，或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。例示性實施例如下：



應瞭解，上文所描繪之經取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。

應瞭解，延伸子單元之胺基可經胺基保護基，例如酸不穩定保護基(例如BOC)來保護。

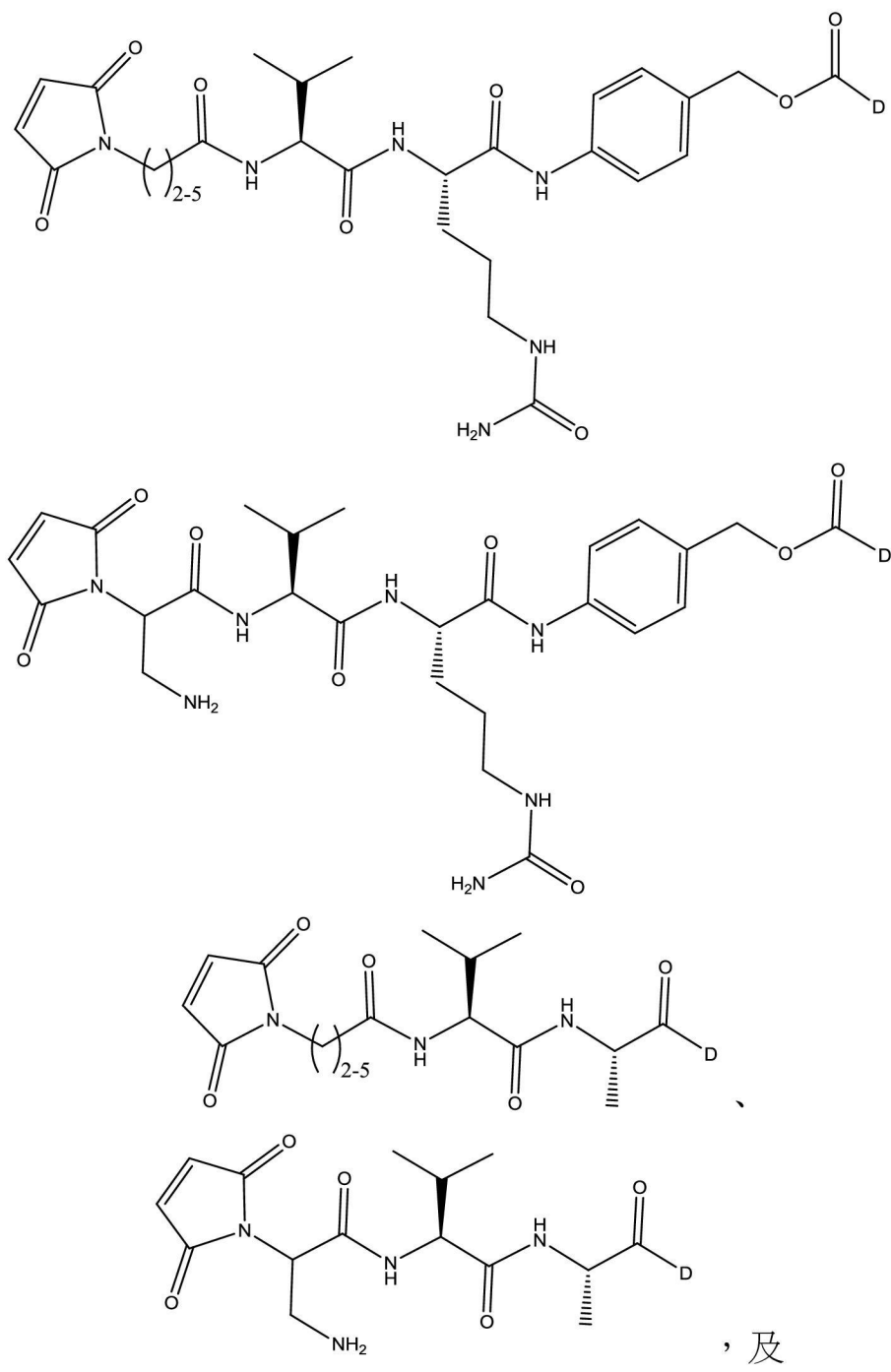
在本發明之較佳態樣中，共價連接單元之質量為不超過約1000道爾頓、不超過約500道爾頓、不超過約400道爾頓、不超過約300道爾頓、約10、50或100至約500道爾頓、約10、50或100至約500道爾頓、約10、50或100道爾頓至約400道爾頓、約10、50或100道爾頓至約300道爾頓或約10、50或100道爾頓至約200道爾頓。

聚乙二醇化結合架構

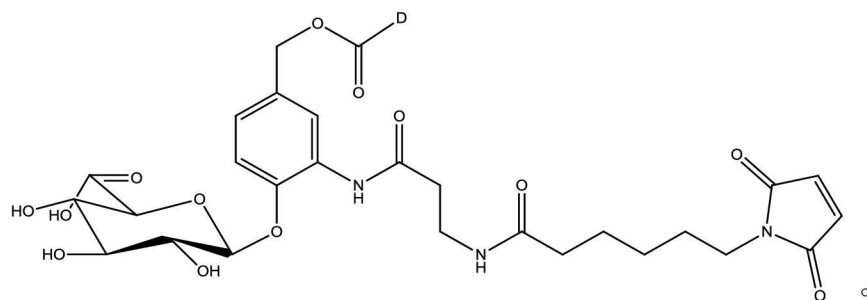
如熟習此項技術者所瞭解，選擇用於本發明之PEG單元之尺寸將視加成PEG單元之前藥物及其藥物連接子部分體之連接子組分之疏水性而定。式DD、X、XI或XII之中間化合物可充當聚乙二醇化結合架構，可用以篩檢產生具有改良之PK及/或最小凝集之ADC的藥物及PEG單元之組合。聚乙二醇化結合架構使能夠達到既定藥物連接子之PEG次單元之數量最佳化之平台。

聚乙二醇化結合架構經特定設計使得不同藥物及PEG部分平行結合以檢查PEG遮蔽疏水性之能力且改良大量習知藥物連接子之PK參數(亦即藥物連接子不含平行連接之本發明之PEG單元)。較佳選擇尺寸足以遮蔽藥物連接子之疏水性但不會過大以不利地影響配體-藥物結合物擴散至靶向位點或進入靶向細胞及釋放藥物之能力的PEG單元。

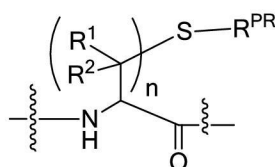
在尤其較佳實施例中，習知用於使PEG最佳化之藥物連接子為具有用於結合至抗體之巰基基團之反應性基團(例如含順丁烯二醯亞胺基之藥物連接子)及可藉由蛋白酶裂解之可釋放組合單元X之彼等藥物連接子。相應地，與結合架構一起使用之具有可藉由蛋白酶裂解之可釋放組合單元X之例示性X-D單元包括以下，其中D為如本文所述之任何藥物單元：



在其他尤其較佳實施例中，習知用於使PEG最佳化之藥物連接子為具有用於結合至抗體之巰基基團之反應性基團(例如含順丁烯二醯亞胺基之藥物連接子)及可藉由糖苷酶裂解之可釋放組合單元X之彼等藥物連接子。相應地，與結合架構一起使用之具有可藉由糖苷酶裂解之可釋放組合單元X之例示性X-D單元包括以下，其中D為如本文所述之任何藥物單元：



在用於使PEG最佳化之藥物連接子為具有用於結合至巯基接受基團(諸如順丁烯二醯亞胺部分)之反應性基團之彼等藥物連接子實施例中，結合架構將具有經保護含巯基殘基，該經保護含巯基殘基在脫除保護基時能夠共價連接至藥物連接子之巯基接受基團。經保護含巯基殘基可為平行連接體單元(或分支單元或藥物連接單元)之組分。例示性聚乙二醇化結合物架構具有式DD，其中L^{P'}單元包含具有下式之胺基酸：



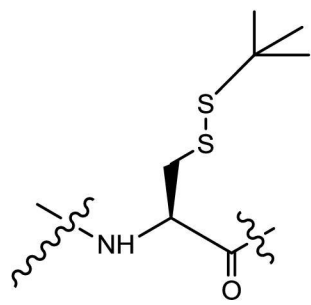
其中，

下標n為1至4範圍內之整數；

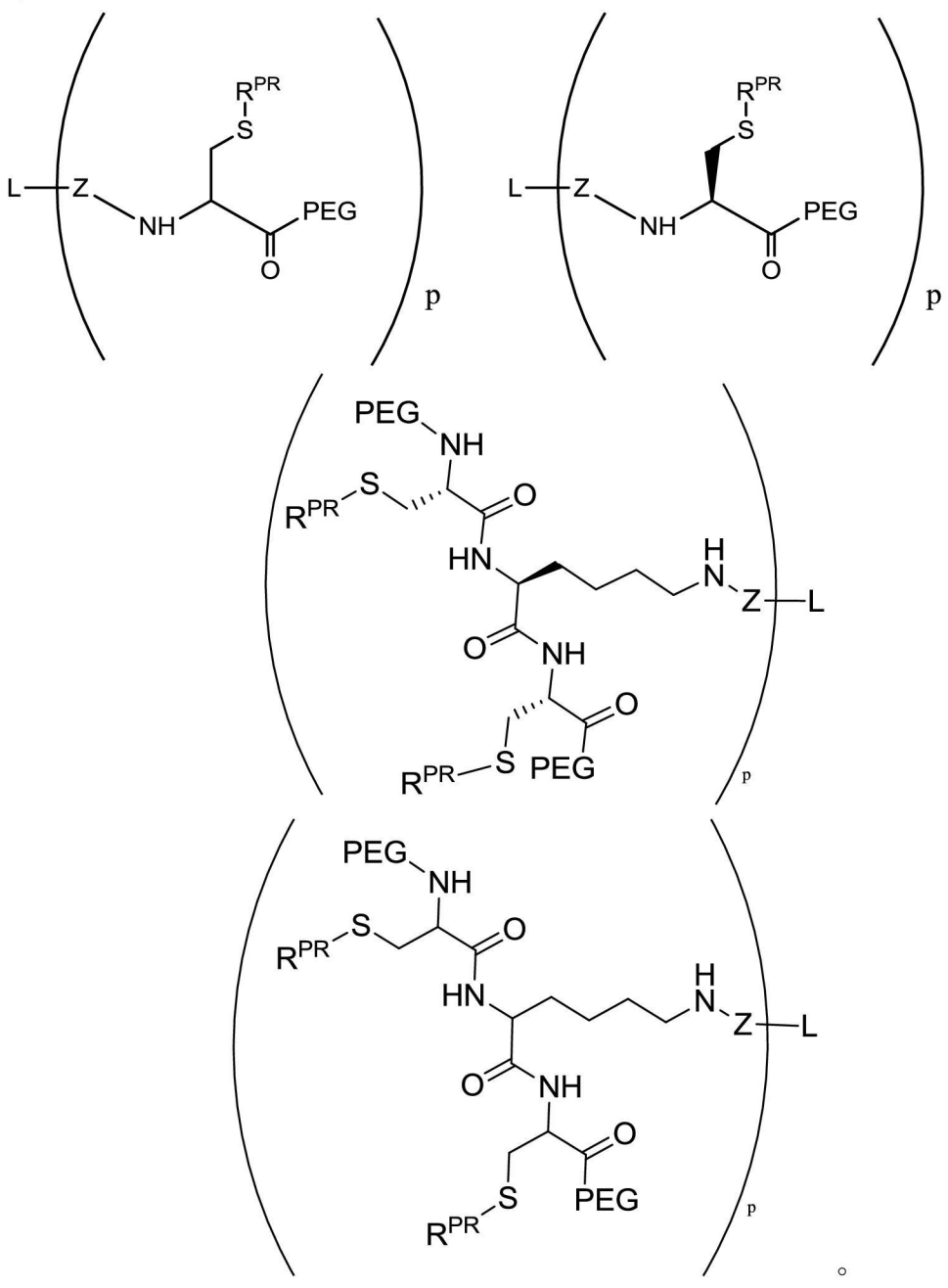
R¹及R²獨立地選自由以下組成之群：H、C₁₋₃烷基、苯基或C₂-C₅雜環(較佳氫、甲基、乙基或丙基)；及

R^{PR}為適合巯基保護基。

例示性聚乙二醇化結合物架構具有式DD，其中L^{P'}單元包含經保護半胱胺酸、高半胱胺酸或青黴胺。胺基酸之D或L異構體為適合的。用作L^{P'}單元之例示性胺基酸為如下文所示之半胱胺酸，其中第三丁基巯基為適合保護基。

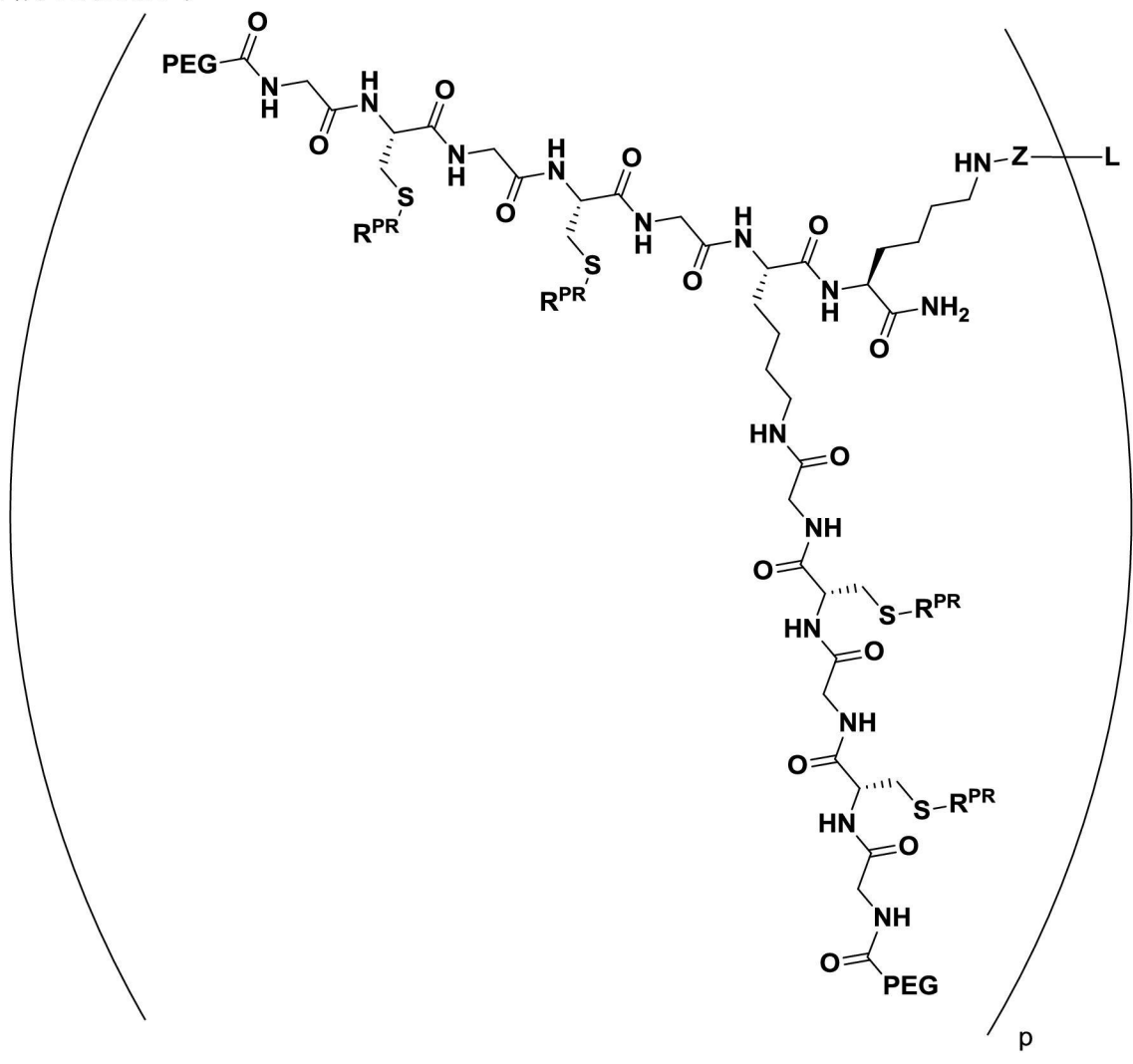


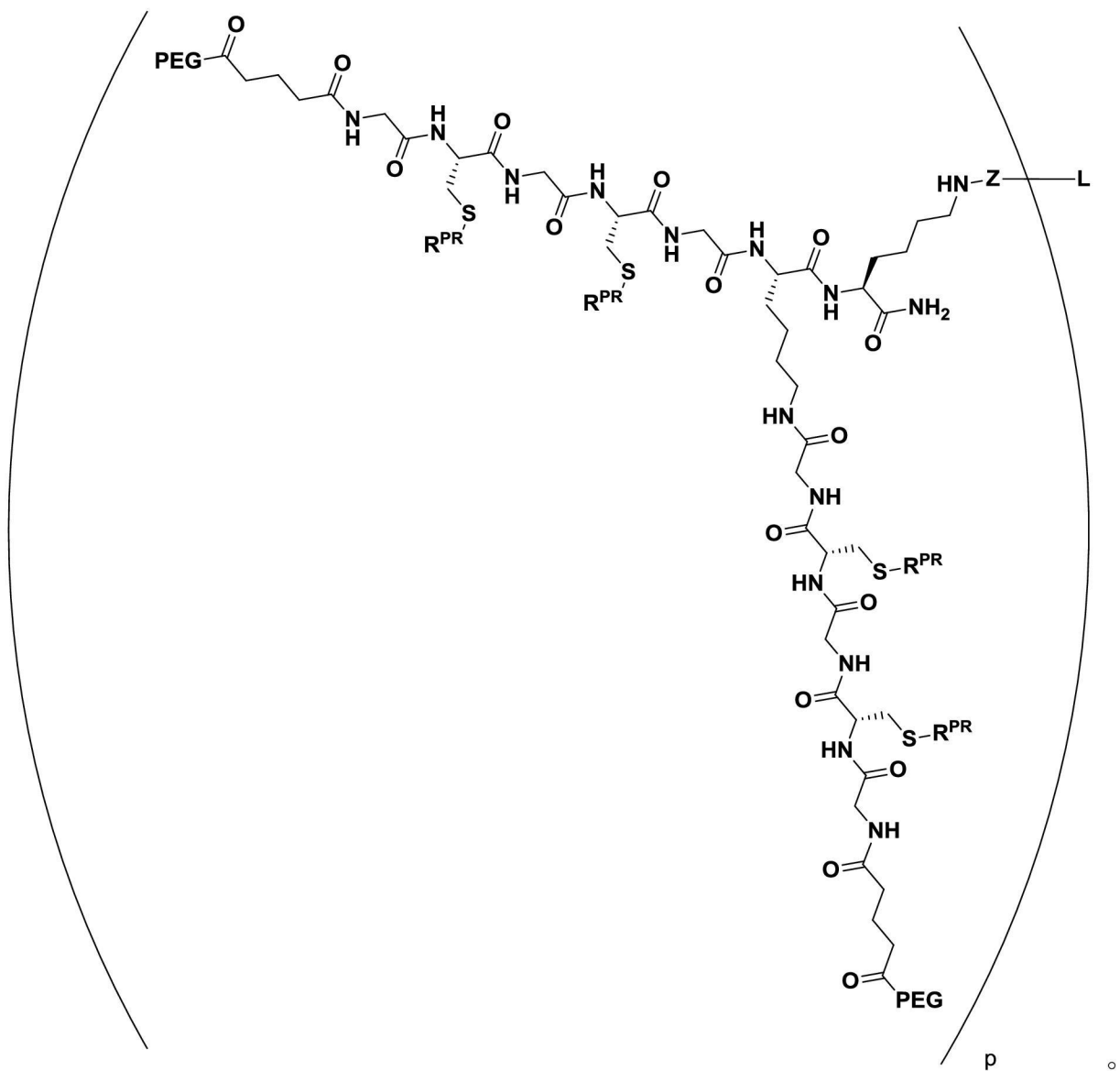
經適當保護之配體連接子中間化合物中之例示性聚乙二醇化結合架構包括以下：



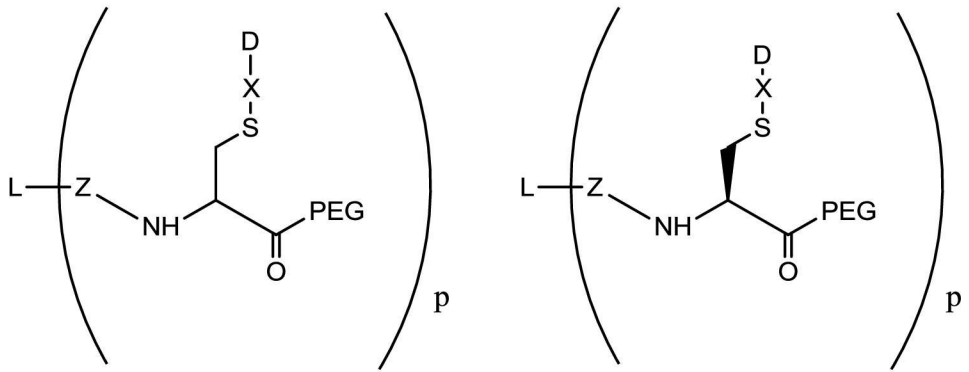
經適當保護之配體連接子中間化合物中之其他例示性聚乙二醇化結

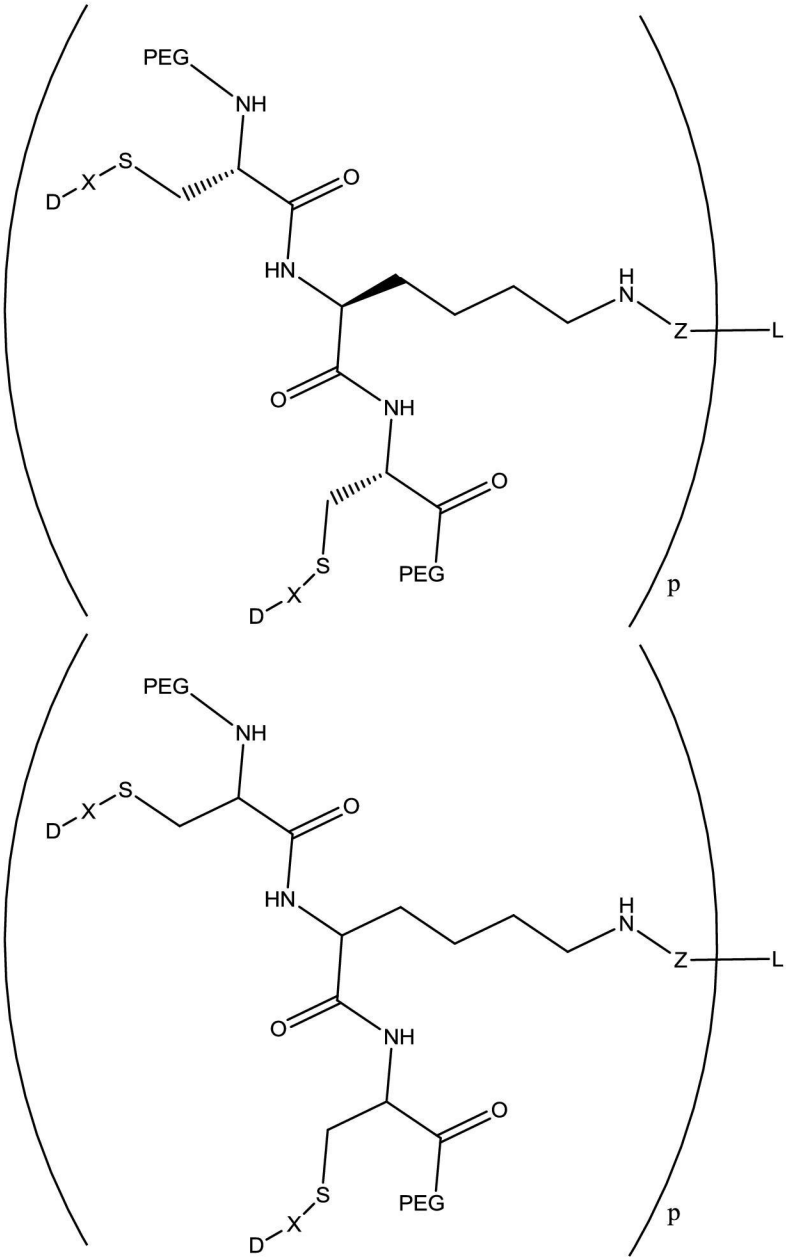
合架構包括以下：

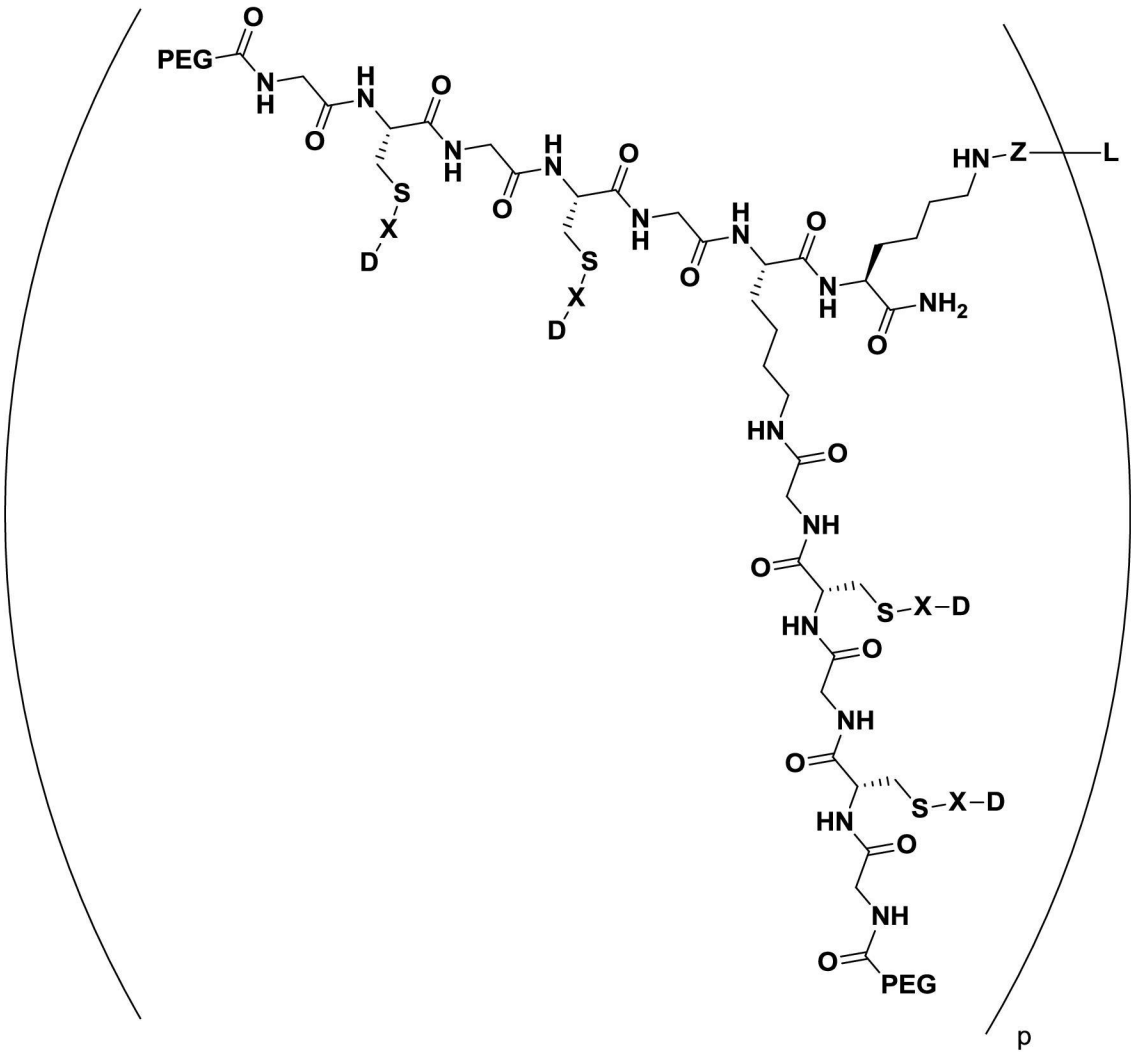


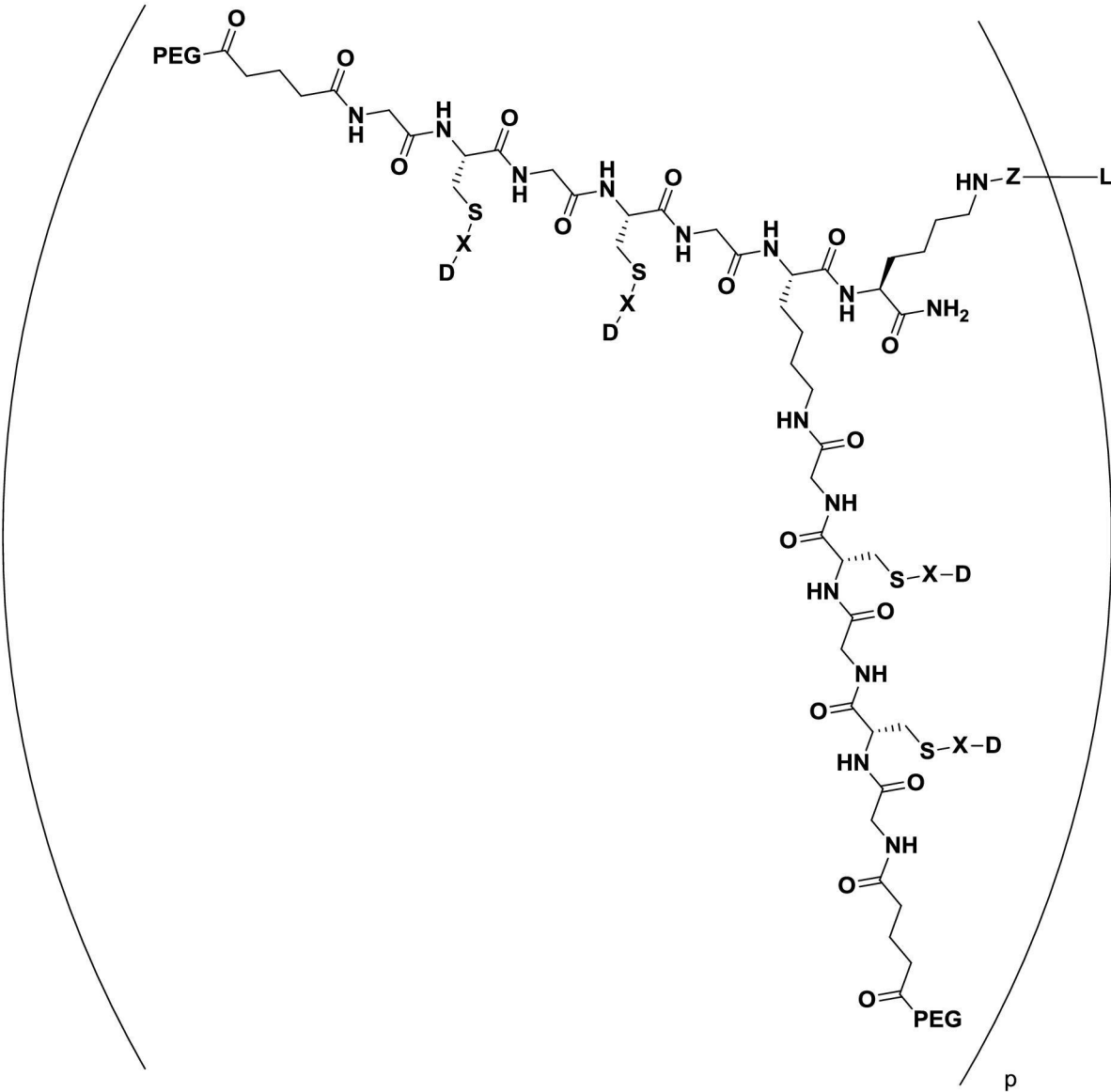


例示性聚乙二醇化結合架構在與藥物連接子結合之後提供如下配體-藥物結合物：

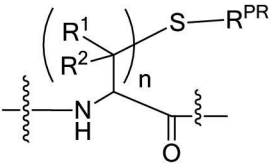








例示性中間物結合架構具有式(CC)，其中L^{P'}單元包含具有下式之胺基酸：



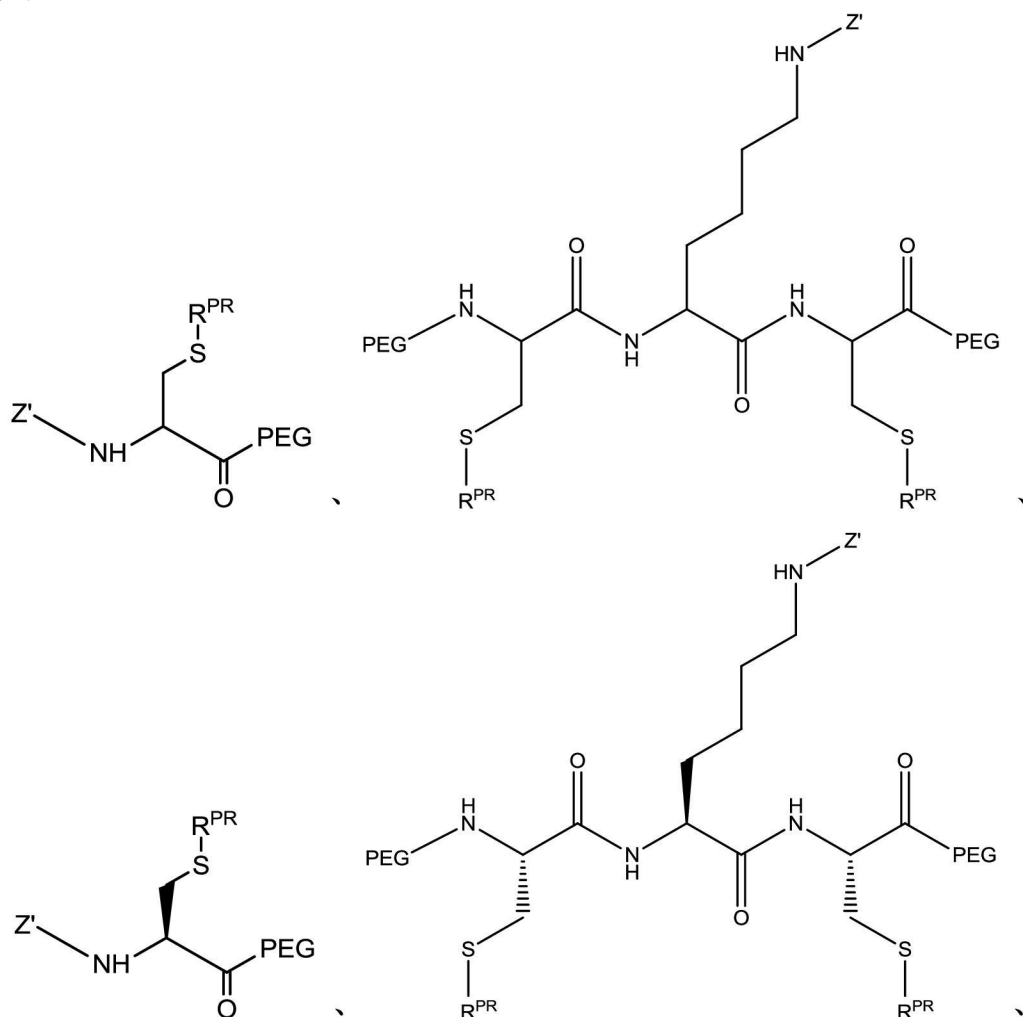
其中，

下標n為1至4範圍內之整數；

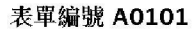
R¹及R²獨立地選自由以下組成之群：H、C₁₋₃烷基、苯基或C₂-C₅雜環(較佳氫、甲基、乙基或丙基)；及

R^{PR} 為適合巯基保護基。

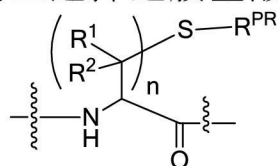
經適當保護之連接子中間化合物中之例示性中間聚乙二醇化結合物架構如下所示：







1082068542-0

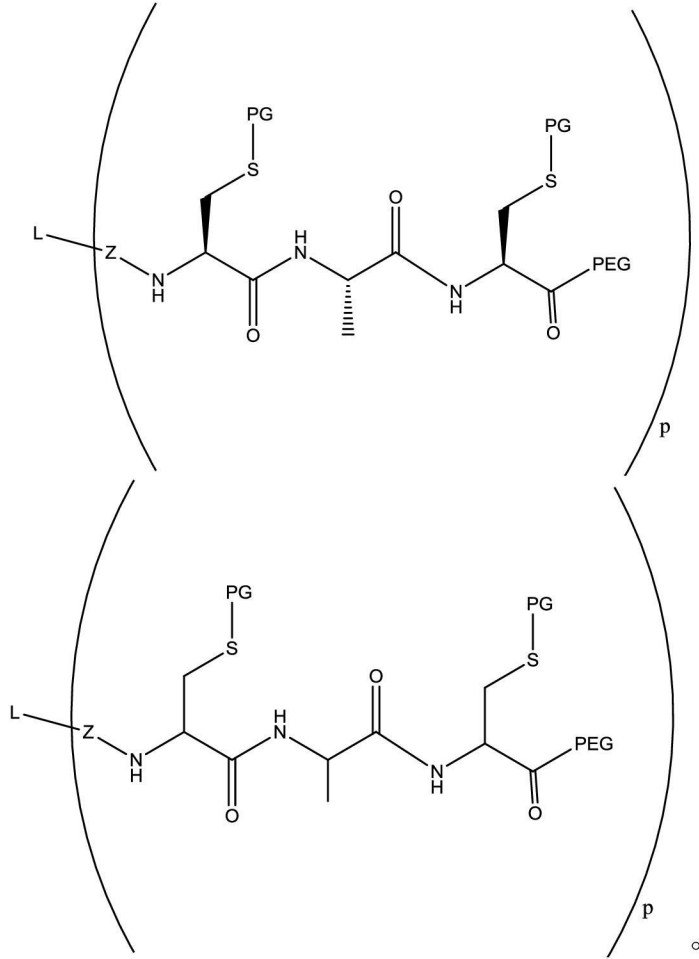


下標 n 為1至4範圍內之整數；

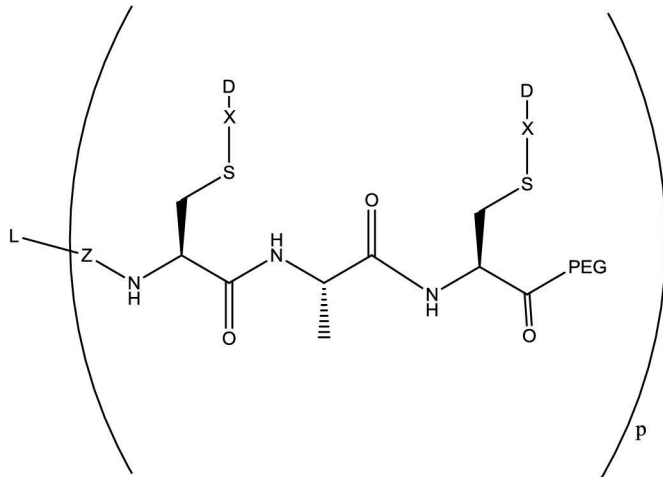
R^1 及 R^2 獨立地選自由以下組成之群：H、 C_{1-3} 烷基、苯基或 C_2-C_5 雜環(較佳氫、甲基、乙基或丙基)；及

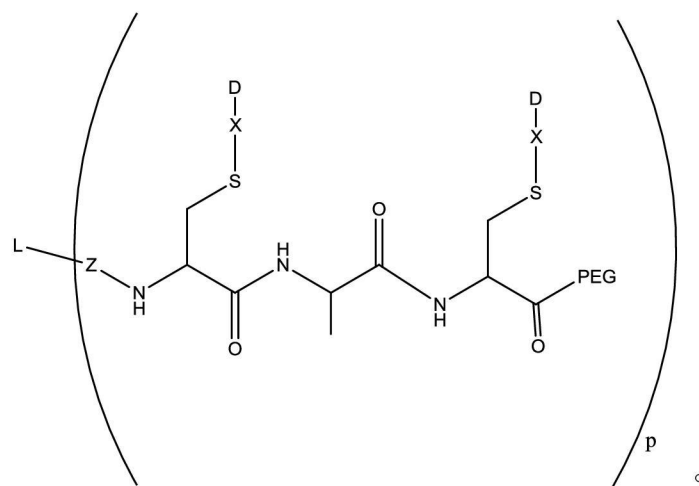
R^{PR} 為適合巯基保護基。

經適當保護之配體連接子中間化合物中之式XI之例示性聚乙二醇化結合物架構如下所示：



例示性聚乙二醇化結合架構在與藥物連接子結合之後提供式II之配體-藥物結合物：





對於聚乙二醇化結合架構及中間物，延伸子單元、**Z**或**Z'**、**PEG**、配體、保護基 R^{PR} 及下標 p 係如本文提供之任何實施例中所述。在例示性態樣中，延伸子單元為如本文所述之含順丁烯二醯亞胺基之延伸子單元。在例示性實施例中，**PEG**單元具有6至72、10至72、或12至72個次單元且延伸子單元為如本文及本文針對**XVa**提供之任何實施例中所述之含順丁烯二醯亞胺基之延伸子單元。

相應地，本發明提供選擇用於配體-藥物結合物之**PEG**單元之方法，該方法包含以下步驟：(i)提供具有式(DD)之結合架構，其中平行連接體單元包含經巰基保護之半胱胺酸，(ii)自經巰基保護之半胱胺酸移除保護基以形成具有游離巰基之脫除保護基之結合架構，(iii)在形成配體-藥物結合物之條件下使該脫除保護基之結合架構與具有與游離巰基共價連接之官能基之藥物連接子接觸。該等方法可進一步包含測試所得配體-藥物之**PK**參數(參見例如實例8或21)。亦提供藉由此類方法產生之配體藥物結合物。

亦提供選擇用於配體-藥物結合物之**PEG**單元之方法，該等方法包含以下步驟(i)提供具有式XI或XII之結合架構，其中平行連接體單元及藥物連接單元包含經巰基保護之半胱胺酸，(ii)自經巰基保護之半胱胺酸移除

保護基以形成具有游離巰基之脫除保護基之結合架構，(iii)在形成配體-藥物結合物之條件下使脫除保護基之結合架構與具有與游離巰基共價連接之官能基之藥物連接子接觸。該等方法可進一步包含測試所得配體-藥物之PK參數(參見例如實例21)。亦提供藉由此類方法產生之配體藥物結合物。

藥物負載

一般提及式I、II、III及AA之配體-藥物結合物，每配體之藥物連接子單元之數量由p表示。當提及此類結合物群體中之個別配體-藥物結合物時，p為表示每配體之藥物連接子分子之數量的整數。當時提及含有多個結合物之組合物(亦即LDC組合物)，p表示每配體之藥物連接子之平均數量且更通常為非整數量。在彼等情況下，在描述包含抗體-藥物結合物(ADC)之LDC組合物之實驗中，其中提及指定數量之藥物單元/抗體之載藥量(例如8單位負載量、16單位負載量或32單位負載量)，彼值係指平均藥物負載以及組合物中起主要作用之ADC之藥物負載，其視將與連接子藥物化合物，或在適當情況下與配體中間物反應，隨後引入-X-D之抗體上之反應性位點之數量而定。在配體-藥物結合物群體中，平均值可為每配體1至14個藥物連接子，平均值可為每配體約6至約14、約6至約12、約6至約10、約8至約14、約8至約12、或約8至約10個藥物連接子單元。與配體之例示性連接經由硫醚鍵聯實現。配體上之例示性結合位點為鏈間二硫鍵殘基及/或引入配體中之殘基(諸如引入之半胱胺酸)的巰基。當提及平均載藥量為約8、10、12、14、16或32之實施例時，值8、10、12、14、16或32通常亦指組合物中起主要作用配體藥物結合物之藥物負載。類似地，當提及平均值為每配體

約8至約14、約8至約12、或約8至約10個藥物連接子單元之實施例時，彼值通常亦指組合物中起主要作用之ADC的藥物連接子負載。

自結合反應製備中每配體單元之藥物連接子單元平均數量可藉由習知手段(諸如質譜法、ELISA分析、HIC及HPLC)表徵。亦可根據 p 確定配體-連接子-藥物結合物之定量分佈。在一些情況下，當 p 為來自具有其他藥物負載之配體-藥物結合物的某一值時，可藉由諸如逆相HPLC或電泳之手段來實現均質配體-藥物結合物之分離、純化及表徵。

組合物

本發明提供包含本文所述之配體-藥物結合物中之任一者的組合物。舉例而言，本發明提供包含式AA、I、II或III之配體-藥物結合物之組合物及其所選實施例中之任一者。變數係如本文任何實施例中所定義。

當式AA、I、II或III不表示個別LDC化合物而為LDC組合物(亦即包含配體藥物結合物群體之組合物)時，下標 p 表示組合物中每配體分子(例如抗體分子)藥物連接子分子之平均數量。類似地，當式DD、X、XI及XII不表示個別配體連接子中間化合物而為配體連接子中間物組合物(亦即包含配體連接子中間化合物群體之組合物)時，下標 p 表示組合物中每配體分子(例如抗體)連接子分子之平均數量。應瞭解，組合物可包含不同數量之藥物連接子連接至其上(例如1至14、2至12、4至12、6至12、8至12)以獲得平均 p 值之配體-藥物結合物之集合(或群體)。或者，組合物可包含相同或實質上相同數量之藥物連接子連接至其上(1至14)以獲得平均 p 值之配體-藥物結合物之集合(或群體)。在此情形下術

語集合或群體同義使用。在組合物內，可存在小百分比之未結合抗體，其亦反映為平均p值。對於包含本發明之配體-藥物結合物群體之組合物，平均值可為每配體1至14個藥物連接子，平均值可為每配體約6至約14、約6至約12、約6至約10、約8至約14、約8至約12、或約8至約10個藥物連接子單元。使用如本發明中所教示之PEG尤其適用於具有較高載藥量之配體-藥物結合物，例如平均藥物負載為每配體至少約6、更佳至少約8個藥物連接子，其中各藥物連接子具有一或多個-X-D部分體，較佳1、2或4個。相應地，本文提供之組合物之平均藥物連接子負載較佳將為組合物中每配體至少約8個藥物連接子分子，且較佳每配體單元約8、10、12或16至約32個藥物單元。

在一些態樣中，組合物為包含本文所述之配體-藥物結合物及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物。舉例而言，本發明提供包含式I、II或III之結合物之組合物及其所選實施例中之任一者。在一些態樣中，醫藥組合物將呈液體形式。在一些態樣中，其將為凍乾粉末。

組合物，包括醫藥組合物，可呈純化形式。如本文所用，「純化」意調在分離時分離物含有以分離物之重量計至少95重量%，且在另一態樣中至少98%之結合物。

藥物動力學

如先前所示，本發明人發現，藉由加成PEG單元可顯著改變某些配體-藥物結合物之藥物動力學概況。在某些情況下，將PEG依與配體單元及藥物單元平行取向置放時，會降低配體-藥物結合物之血漿清除率且增加血漿暴露，由此改良此等結合物之所需藥理學活性。出人意料地，將PEG單元依與配體單元及藥物單元串聯取向置放時，不會提

供相同之改良藥物動力學效應，且在某些情況下，相對於其非聚乙二醇化對應物，實際上增加清除率且降低相對暴露。直至本發明之前，對經由疏水性化合物之聚乙二醇化而減少疏水性之努力尚未考慮PEG單元之取向效應。

有許多方式可以量測配體-藥物結合物之藥物動力學參數。一種方法為測定配體-藥物結合物濃度，亦即在某一時間點，在指定體積之血漿或血清中之配體-藥物結合物之量。另一種方法為測定藥物清除率，亦即每單位時間清除配體-藥物結合物之血漿(或血清)之體積。第三種方法為測定曲線下面積(AUC)，亦即濃度-時間曲線之積分。濃度、清除率及AUC可藉由在向個體投與所關注藥劑之後，將沿縱座標(Y軸)之總抗體之血清(或血漿)濃度($\mu\text{g/ml}$)對沿橫座標(X軸)之時間(天數)繪圖來確定。舉例而言，在一種方法中，藥物動力學參數係藉由對小鼠注射一定劑量之(i)未結合配體、(ii)本發明之配體-藥物結合物及(iii)對照配體-藥物結合物，且在注射之後的多個時間點(例如1、2、3、7、14、21、28、35、42、49及56天)收集血液樣品並分離血清來量測。血清(或血漿)濃度可藉由此項技術中已知之方法來量測。舉例而言，可使用適當偵測機制，藉由夾心ELISA來量測總配體(例如抗體)之血清(或血漿)濃度。可使用適當軟體分析各動物之血清(或血漿)濃度數據在某些時間點所達到之濃度、藥物清除率及AUC之數值。在另一實施例中，可使用放射性標記之結合物產生藥物動力學數據。舉例而言，可對動物投與放射性標記之配體或配體-藥物結合物且藉由液體閃爍計數法量測血漿(或血清)濃度。在一些實施例中，所用動物模型將為大鼠模型。

在一些實施例中，本發明之配體-藥物結合物之藥物動力學概況與其未結合配體類似。相應地，本文提供清除率值在未結合配體之清除率值之約3倍以內或約2倍以內及/或AUC值為未結合配體之AUC值的至少25%或至少30%之配體-藥物結合物(例如參見表2)。

在一些實施例中，與對照結合物相比，本發明之配體-藥物結合物之藥物動力學概況改良。相應地，本文提供與對照結合物(亦即不具有與藥物連接子部分體平行取向之PEG單元)相比濃度值、清除率值及/或AUC值改良之配體-藥物結合物。術語改良之清除率值意謂配體-藥物結合物之清除率比對照結合物之清除率值佳至少2倍或至少3倍(例如與48.6或57.8毫升/天/公斤之值相比值為14.2毫升/天/公斤)。術語改良之AUC值意謂配體-藥物結合物之AUC值比對照結合物之AUC值佳至少2倍或至少3倍(例如與67或52天 $\times\mu\text{g/ml}$ 之值相比值為229.7天 $\times\mu\text{g/ml}$)。

對照結合物可為缺乏PEG單元之相同或實質上類似之結合物、缺乏以平行取向置放之PEG單元但含有以相對於配體單元及藥物單元串聯取向置放之PEG單元之相同或實質上類似之結合物。在一些實施例中，對照結合物為包含相同藥物單元且不具有PEG單元(亦即缺乏PEG單元之相同或實質上類似之結合物)或具有相對於配體單元及藥物單元以串聯取向置放之PEG單元(亦即具有不以平行取向置放之PEG單元之相同或實質上相同之結合物)之結合物。一般而言，配體-藥物結合物及對照結合物具有相同藥物負載(組合物中每配體單元之藥物之平均數量)。

如本文所用，短語「缺乏PEG單元之相同或實質上類似之結合物」一般係指包含相同或實質上相同之配體單元、藥物單元及連接子

單元(例如延伸子單元及可釋放組合單元)但缺乏平行連接體單元 L^P 及PEG單元之結合物。對於與本發明之配體-藥物結合物極其類似之缺乏PEG單元之對照結合物，對照結合物將包含相同配體單元、藥物單元、可釋放組合單元、延伸子單元及平行連接體單元(及AD或A單元(適當時))。然而，平行連接體單元將不會連接至PEG單元，但將由諸如乙醯基之官能基終止(參見例如實例中之化合物44)。

如本文所用，短語「缺乏以平行取向置放之PEG單元但含有相對於配體單元及藥物單元以串聯取向置放之PEG單元之相同或實質上相同之結合物」(亦即具有不以平行取向置放之PEG單元之相同或實質上相同之結合物)一般係指包含相同或實質上相同之配體單元、藥物單元及連接子單元(例如延伸子單元及可釋放組合單元)但缺乏平行連接體單元 L^P 及以平行組態連接至其上之PEG單元且包括與配體單元及藥物單元串聯取向之連接子中之PEG單元的結合物。

在此情形下，術語「實質上相同」意謂可存在一些較小變化但此類變化主要為易於結合物之多個組分之化學合成及連接。對於相比於PEG單元平行取向之本發明之結合物，不具有PEG或PEG單元以串聯取向對照結合物之實例，參見實例章節。

展示相對於未結合配體顯著較大血漿清除率及對應較低血漿暴露之配體-藥物結合物將從本發明受益，因為其可經如本文所述修飾以包括PEG單元。相對於未結合配體顯著較大之血漿清除率係指清除率值為未結合配體之血漿清除率值之2倍以上、3倍以上或4倍以上(參見例如表2)。相對於未結合配體較低之血漿暴露係指AUC值為未結合配體之30%或30%以下、25%或25%以下、或20%或20%以下(參見例如表

2)。

在一些實施例中，本文提供清除率值在未結合配體之清除率值之約3倍以內或約2倍以內及/或AUC值為未結合配體之AUC值的至少25%或至少30%之配體-藥物結合物(例如參見表2)。

在一些實施例中，待用作本發明中之藥物單元之藥物為當結合至配體作為缺乏PEG或包含串聯取向之PEG之配體藥物結合物時產生展示相對於未結合配體顯著較大血漿清除率及對應較低血漿暴露之配體-藥物結合物的藥物。相對於未結合配體顯著較大之血漿清除率係指清除率值為未結合配體之血漿清除率值之2倍以上、3倍以上或4倍以上(參見例如表2)。相對於未結合配體較低之血漿暴露係指AUC值為未結合配體之30%或30%以下、25%或25%以下、或20%或20%以下(參見例如表2)。

具有疏水性藥物單元或疏水性藥物連接子之配體-藥物結合物將從本發明中受益，因為其可如本文所述修飾以包括PEG單元且可看見藉由應用本發明而增強之其藥物動力學參數。

在較佳實施例中，配體為抗體。

凝集

本發明人亦已發現，可藉由將PEG單元以平行取向加成至疏水性藥物連接子部分體中顯著減小某些配體-藥物結合物之凝集。

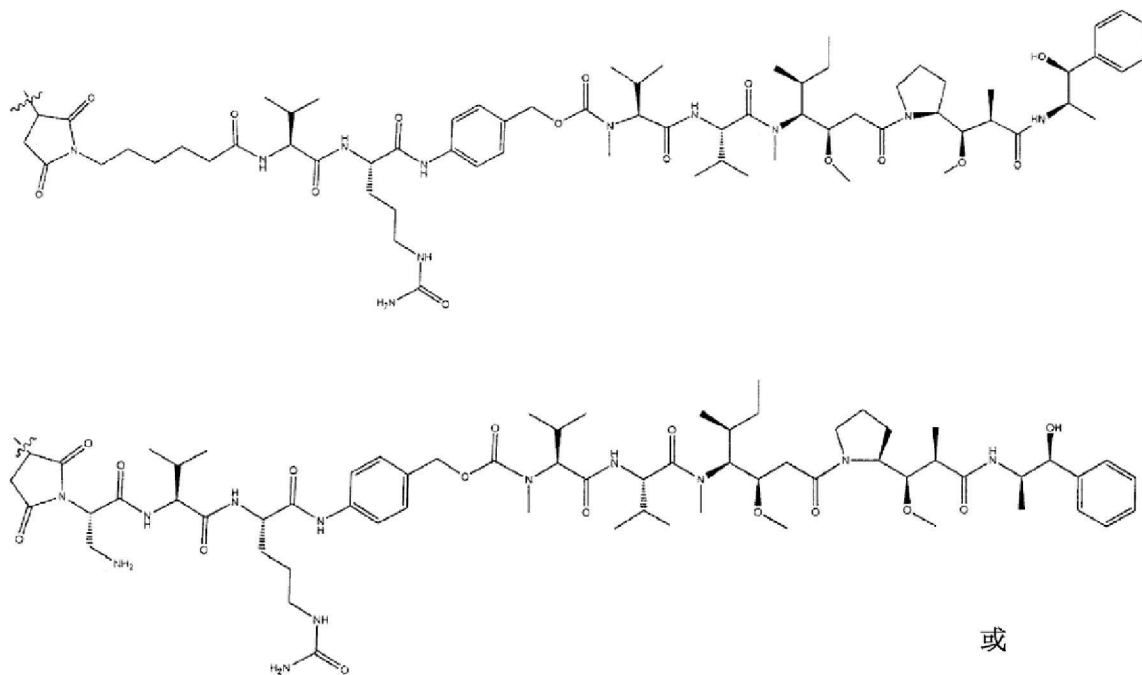
在一些實施例中，待用於本發明中之藥物為當結合至配體作為缺乏PEG或包含串聯取向之PEG且每配體具有平均4、8或16單位藥物之配體藥物結合物時產生如SEC所量測之凝集程度為4%或4%以上、5%或5%以上、或10%或10%以上之配體-藥物結合物的藥物。

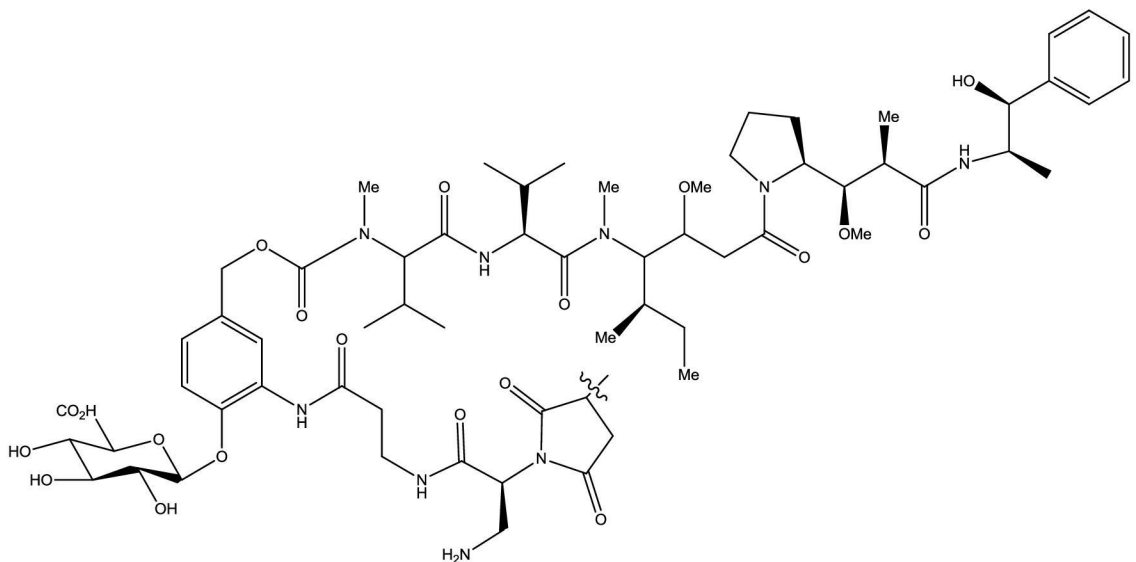
本發明提供平均每配體單元8單位藥物或每配體單元8單位以上藥物、每抗體10單位藥物或每抗體10單位以上藥物、每抗體12單位藥物或每抗體12單位以上藥物、每抗體16單位藥物或每抗體16單位以上藥物、或每抗體32單位藥物，凝集程度為約1%或約2%或約3%(例如式I或II，其中p為4或8，m為1，s為0且t為0；式II，其中p為8，m為2，s為1且t為0)之配體-藥物結合物群體。

在較佳態樣中，配體單元為抗體。

所選實施例

本發明之例示性-X-D單元包括以下，其中波浪線指示視情況可共價連接至L^P、A或AD單元：

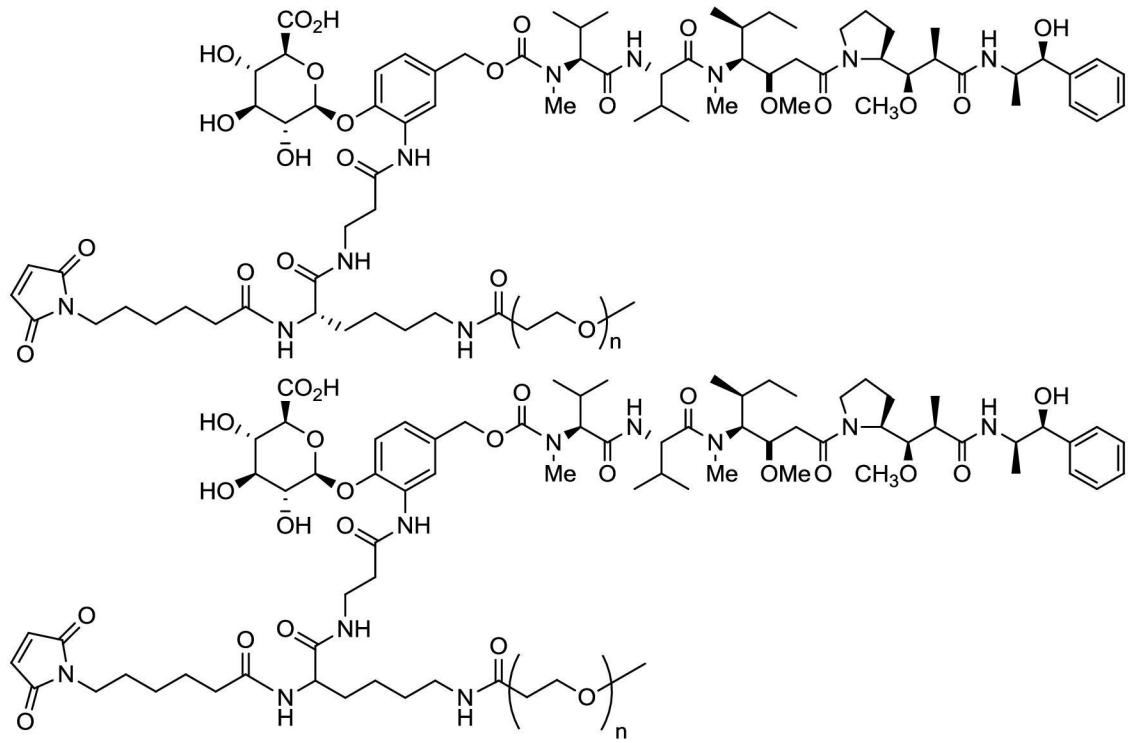


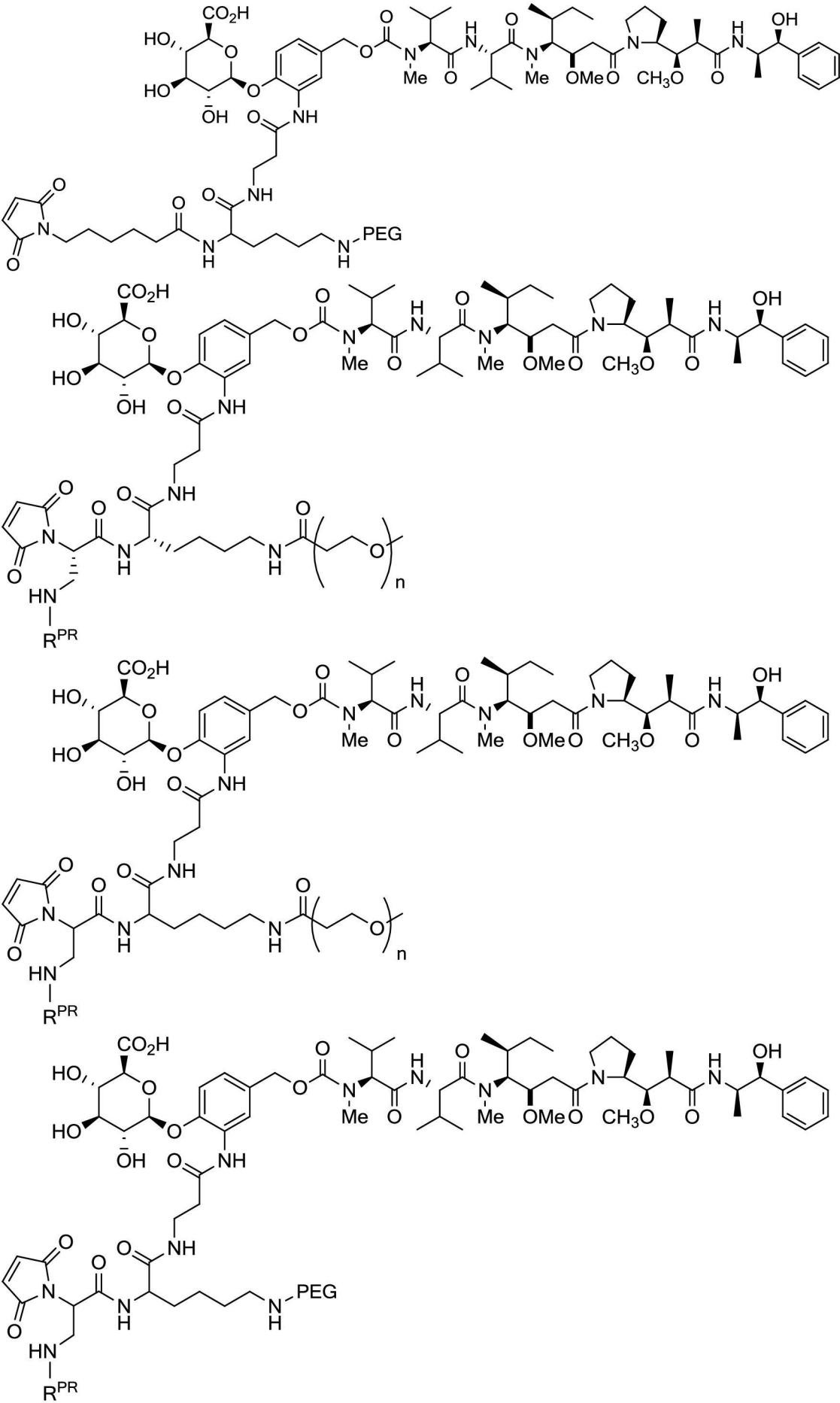


o

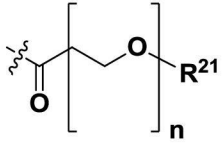
應瞭解，上文所描繪之經取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。

本發明之例示性藥物連接子化合物包括由以下結構表示之彼等化合物：

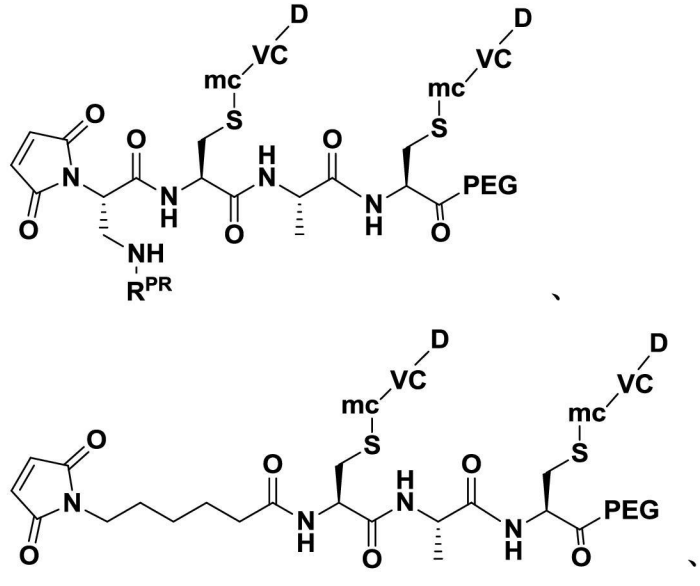


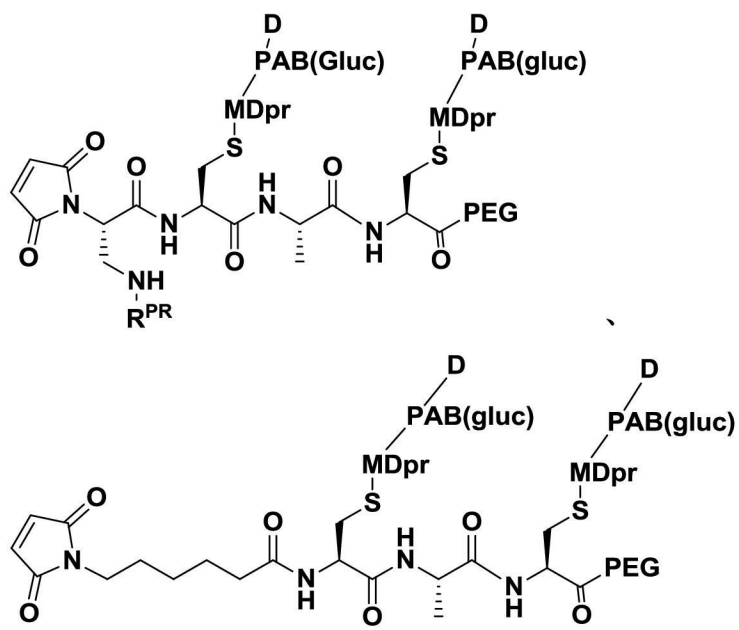


或其醫藥學上可接受之鹽，其中PEG單元如本文提供之任何實施例中所述且可為分散性或非分散性的，且n為6至72、8至72、10至72、12至72、12至38、12至36、6至24或最佳8至24或12至24範圍內之整數；R^{PR}為氫或保護基，例如酸不穩定保護基，例如BOC。在一些實施例中，n為8、10、12或24。對於使用分散性PEG單元前驅體製備之配體-藥物結合物群體(亦即LDC組合物)，前驅體較佳具有與具有約6至72、8至72、10至72、12至72、12至38、12至36、6至24、或最佳8至約24個次單元或約12至約38個次單元之PEG單元對應之峰值平均MW。若PEG為非分散性的，則LDC組合物之各LDC通常將具有含有相同數量之次單元(-OCH₂CH₂)(亦即相同之整數值n)的PEG單元。非分

散性PEG單元可例如具有結構 ，其中R²¹為PEG封端單元、較佳為-CH₃或-CH₂CH₂CO₂H，且n為8至12、8至24或12至38範圍內之整數。

提供2倍藥物負載之本發明之例示性藥物連接子化合物包括由以下結構表示之彼等化合物：



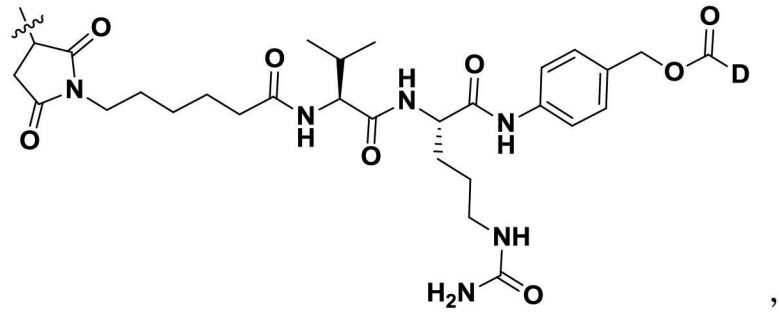


及彼等結構，其中mc-

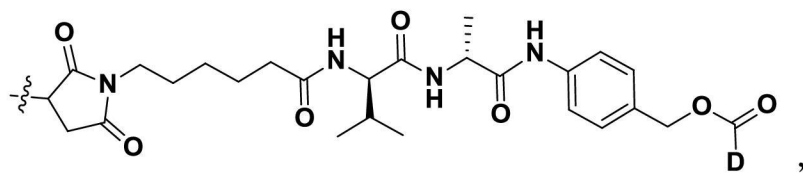
VC-PAB-D經mc-VA-PAB-D或mc-VA-D或任何其他X-D單元置換；

其中R^{PR}為氫或保護基，例如酸不穩定保護基，例如BOC；

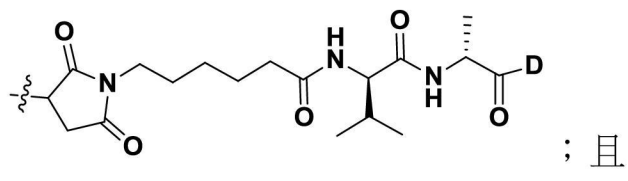
mc-VC-PAB-D具有結構



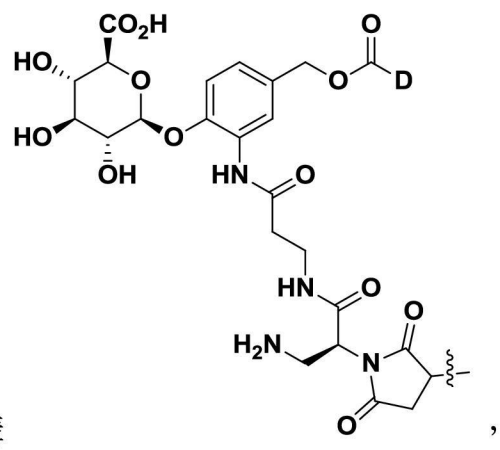
mc-VA-PAB-D具有結構



mc-VA-D具有結構



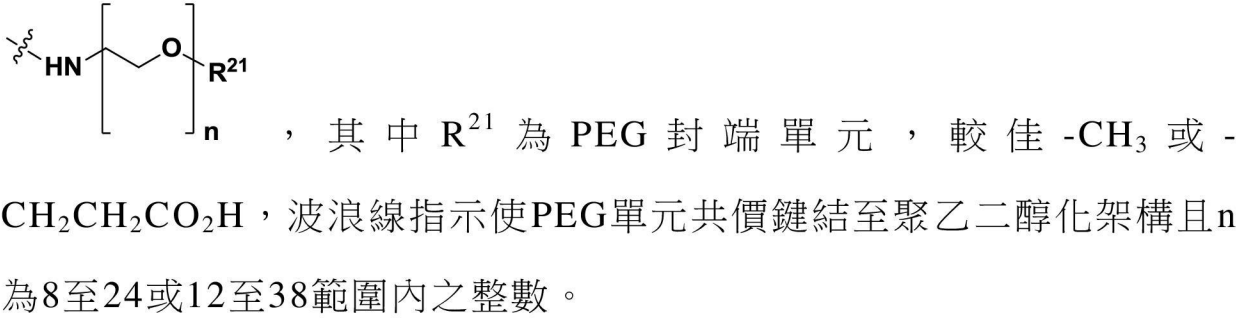
；且



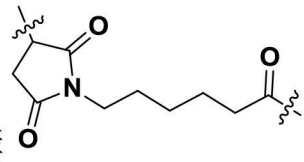
MDpr-PAB(gluc)-D具有結構

其中 mc-VC-PAB-D 、 mc-VA-PAB-D 、 mc-VA-D 及 MDpr-PAB(gluc)-D為結合至聚乙二醇化架構之例示性-X-D部分體，且其中波浪線指示將mc或MDpr之丁二醯亞胺環共價鍵結至聚乙二醇化架構之硫；

且PEG如本文提供之任何實施例中所述，且當描述使用分散性PEG單元前驅體製備之LDC群體時可為分散性的，其中分散性PEG單元前驅體較佳具有與具有n個，即約8至約24個次單元或約12至約38個次單元之PEG單元對應之峰值平均MW，或為非分散性的(如n為整數值之PEG單元所界定，其中LDC組合物之各LDC將具有含有相同整數值n之PEG單元)。在一些實施例中，非分散性PEG單元具有結構

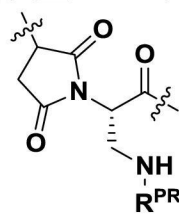


在一些實施例中，在存在mc部分之mc-VC-PAB-D、mc-VA-D及mc-VA-PAB-D中之任一者中，以上結構中之彼mc部分經MDpr部分置換，在該等結構中mc部分具有結構



，其中丁二醯亞胺

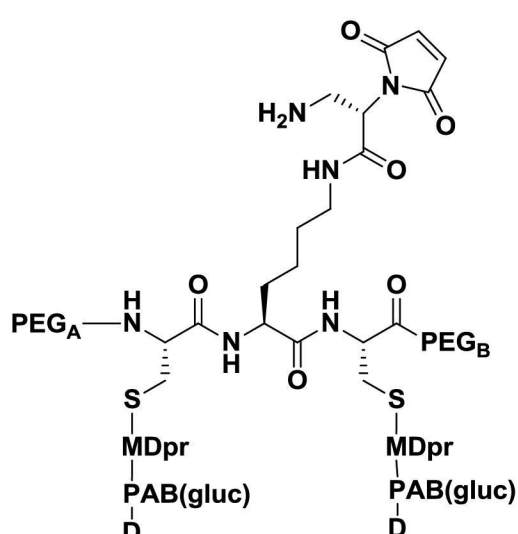
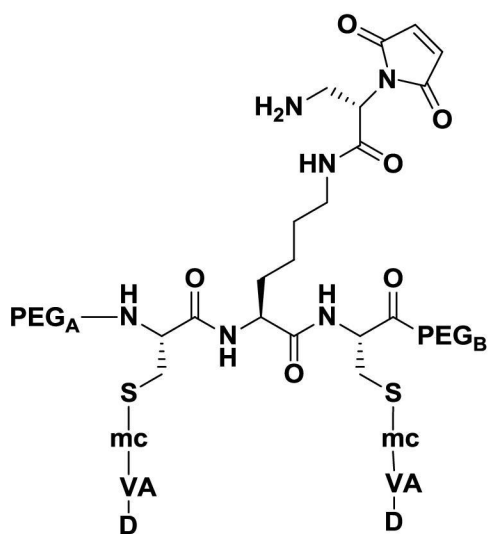
部分之波浪線指示共價鍵結至聚乙二醇化架構且羰基之波浪線指示共價鍵結至-X-D之其餘部分，該MDpr部分具有結構

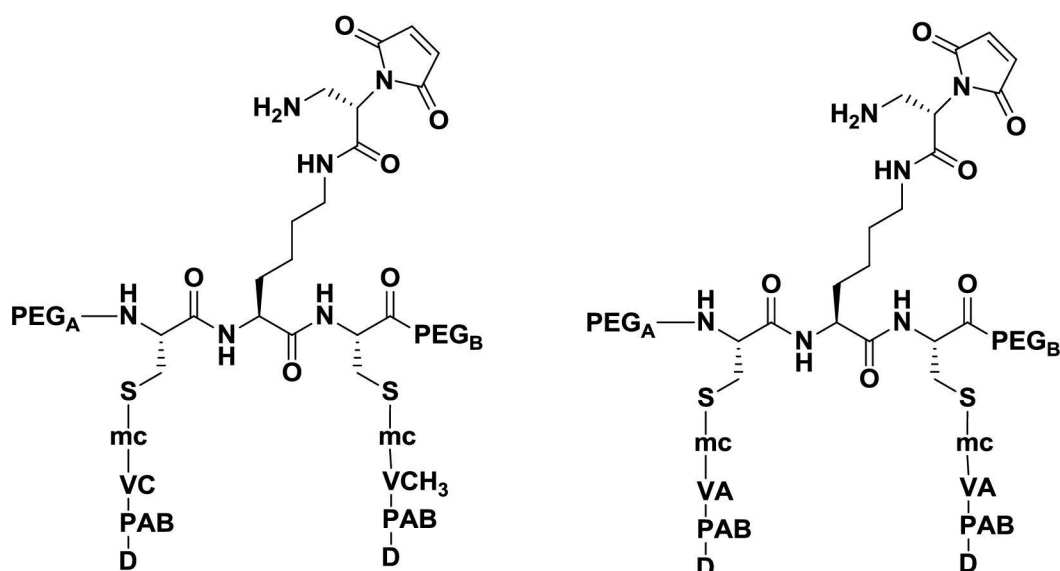


R^{PR} ，其中 R^{PR} 為氫或保護基，以提供作為進一步例示性-X-D部分體之MDpr-VC-PAB-D、MDpr-VA-D及MDpr-VA-PAB-D。

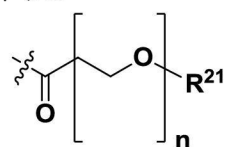
應瞭解，在含MDpr之-X-D部分體中之任一者中，MDpr中之經取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。包含mc之-X-D部分體亦可具有水解形式之其丁二醯亞胺環。

提供2倍藥物負載之本發明之其他例示性藥物連接子化合物包括以下：

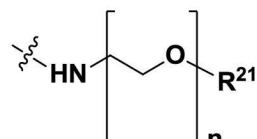




其中 mc-VA-D 、 mc-VC-PABA-D 、 mc-VA-PABA-D 及 MDpr-PAB(gluc)-D 為對於以上 2 倍藥物負載結構所述之例示性-X-D 部分體，且其中獨立選擇之 PEG_A 及 PEG_B 如本文提供之 PEG 單元之任何實施例中所述，且當提及使用分散性 PEG 單元前驅體製備之配體-藥物結合物群體(亦即 LDC 組合物)時可為分散性的，其中分散性 PEG 單元前驅體較佳具有與具有 n 個，即約 8 至約 24 個次單元或約 12 至約 38 個次單元之 PEG 單元對應之峰值平均 MW，或 PEG_A 為非分散性的(亦即具有個別量之 PEG 次單元之 PEG 單元由整數值所界定，使得 LDC 組合物之各 LDC 包含具有整數值 n 相同之 PEG 單元之 ADC)。在一些實施例中，PEG_A 為具有以下結構之非分散性 PEG 單元：



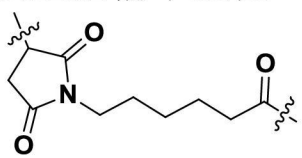
，及/或 PEG_R 為具有以下結構之非分散性PEG單元：



其中各 R^{21} 為獨立選擇之PEG封端單元，獨立選擇

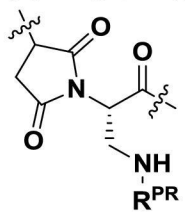
之各情況之n為8至24或12至38範圍內之整數。在較佳實施例中，一個R²¹為-CH₃且另一個為-CH₂CH₂CO₂H。

在一些實施例中，在存在mc部分之以上結構中之任一者中，mc部分經MDpr部分置換，該mc部分具有結構



，該MDpr部

分具有結構

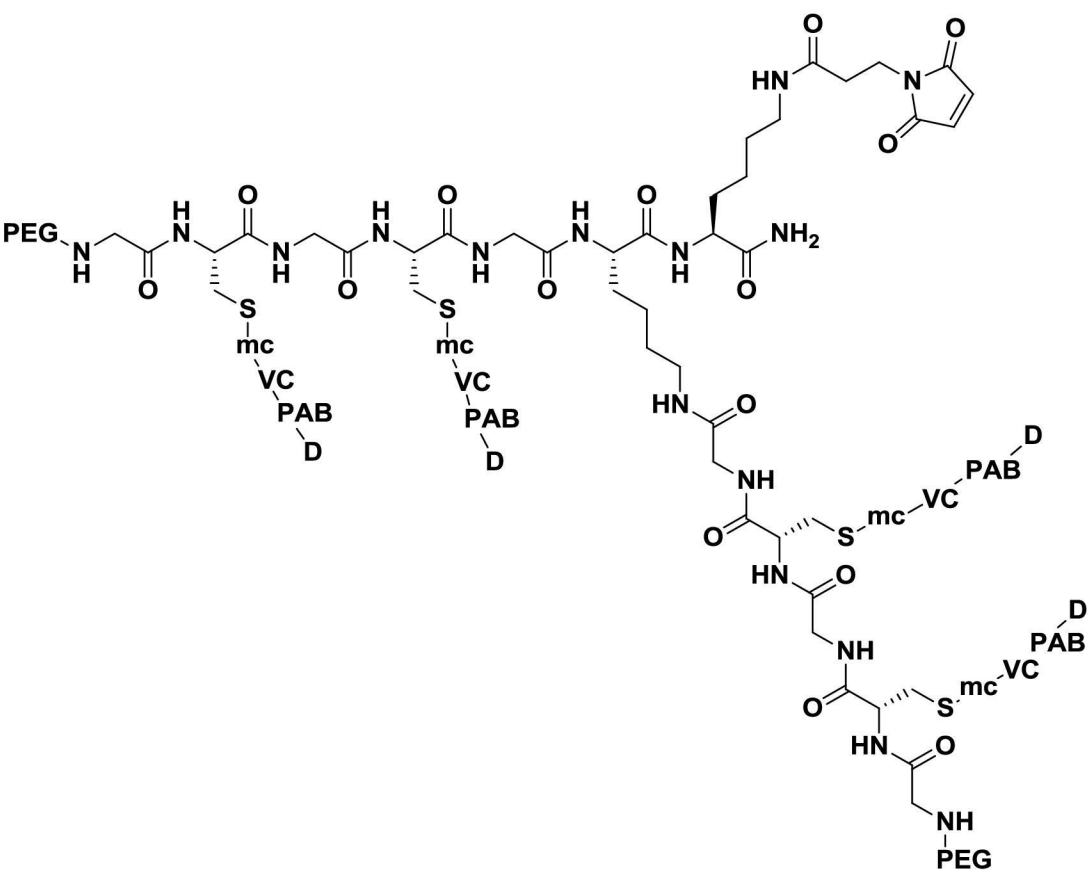


，其中R^{PR}為氫或保護基，以提供作為-X-D之MDpr-VC-PAB-D、MDpr-VA-D及MDpr-VA-PAB-D。

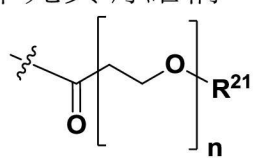
在其他實施例中，存在部分之上述結構中之MDpr部分經mc部分置換以提供作為-X-D之mc-PAB(gluc)D。

應瞭解，在含MDpr之-X-D部分體中之任一者中，MDpr中之經取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。包含mc之-X-D部分體亦可具有水解形式之其丁二醯亞胺環。

提供4倍藥物負載之本發明之例示性藥物連接子化合物包括以下



其中mc-VC-PAB-D如針對以上2倍藥物負載結構所述；且PEG如本文提供之任何實施例中所述，且當提及使用分散性PEG單元前驅體製備之配體-藥物結合物群體(亦即LDC組合物)時可為分散性的，其中分散性PEG單元前驅體較佳具有與具有n個，即約8至約24個次單元或約12至約38個次單元之PEG單元對應之峰值平均MW，或為非分散性的(亦即具有個別量之PEG次單元之PEG單元由整數值所界定，使得LDC組合物之各LDC包含具有整數值n相同之PEG單元之ADC)。在一些實施例中，非分散性PEG單元具有結構

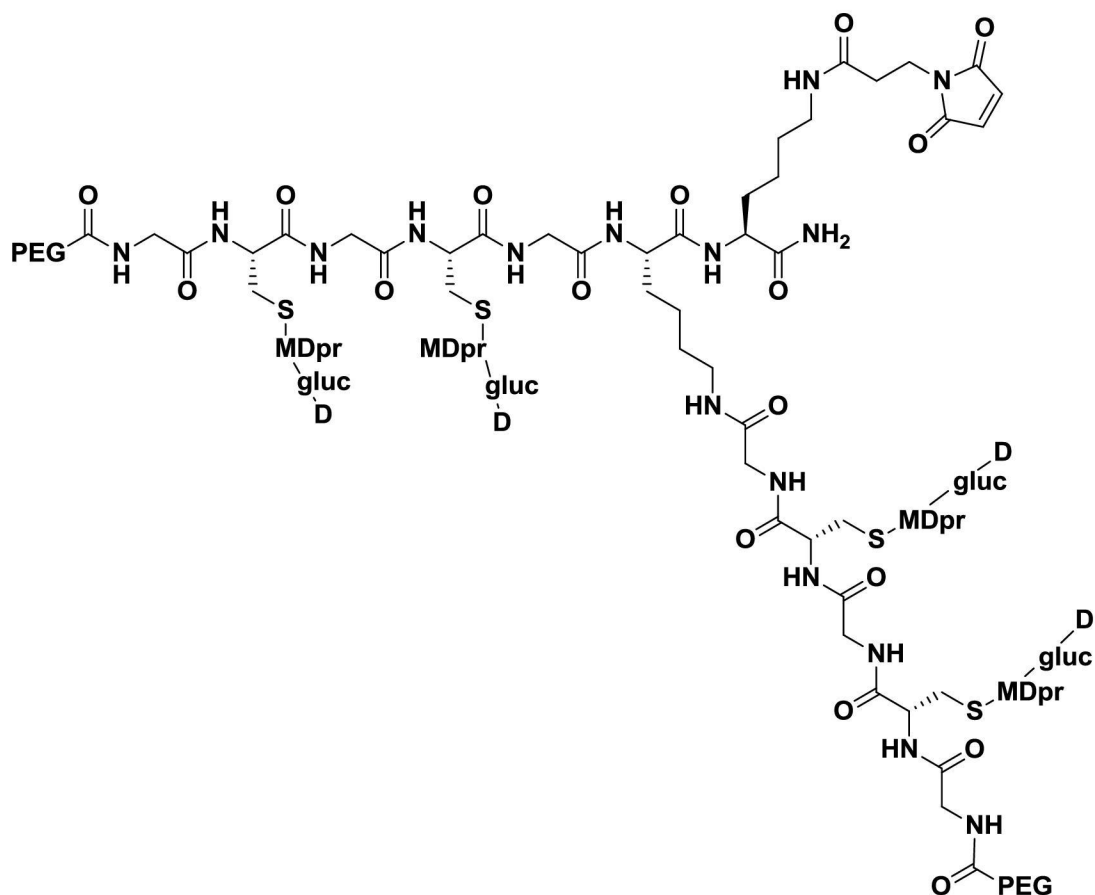


，其中R²¹為PEG封端單元，波浪線指示共價鍵結至聚乙二醇化架構且n為8至24或12至38範圍內之整數。R²¹較佳為-CH₃或-CH₂CH₂CO₂H。

在一些實施例中，作為-X-D部分體之mc-VC-PAB-D經包括MDpr-VC-PAB-D、mc-VA-PAB-D及MDpr-VA-PAB-D之本文所述之-X-D部分體中之任一者置換。

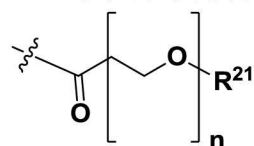
應瞭解，在含MDpr之-X-D部分體中之任一者中，MDpr中之經取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。包含mc之-X-D部分體亦可具有水解形式之其丁二醯亞胺環。

提供4倍藥物負載之本發明之其他例示性藥物連接子化合物包括以下：



其中MDpr-PAB(gluc)-D如針對以上2倍藥物負載結構所述；且PEG如本文提供之任何實施例中所述，且當提及使用分散性PEG單元前驅體製備之配體-藥物結合物群體(亦即LDC組合物)時可為分散性的，其中分散

性PEG單元前驅體較佳具有與具有n個，即約8至約24個次單元或約12至約38個次單元之PEG單元對應之峰值平均MW，或PEG_A為非分散性的(亦即具有個別量之PEG次單元之PEG單元由整數值所界定，使得LDC組合物之各LDC包含具有整數值n相同之PEG單元之ADC)。在一些實施例中，非分散性PEG單元具有結構

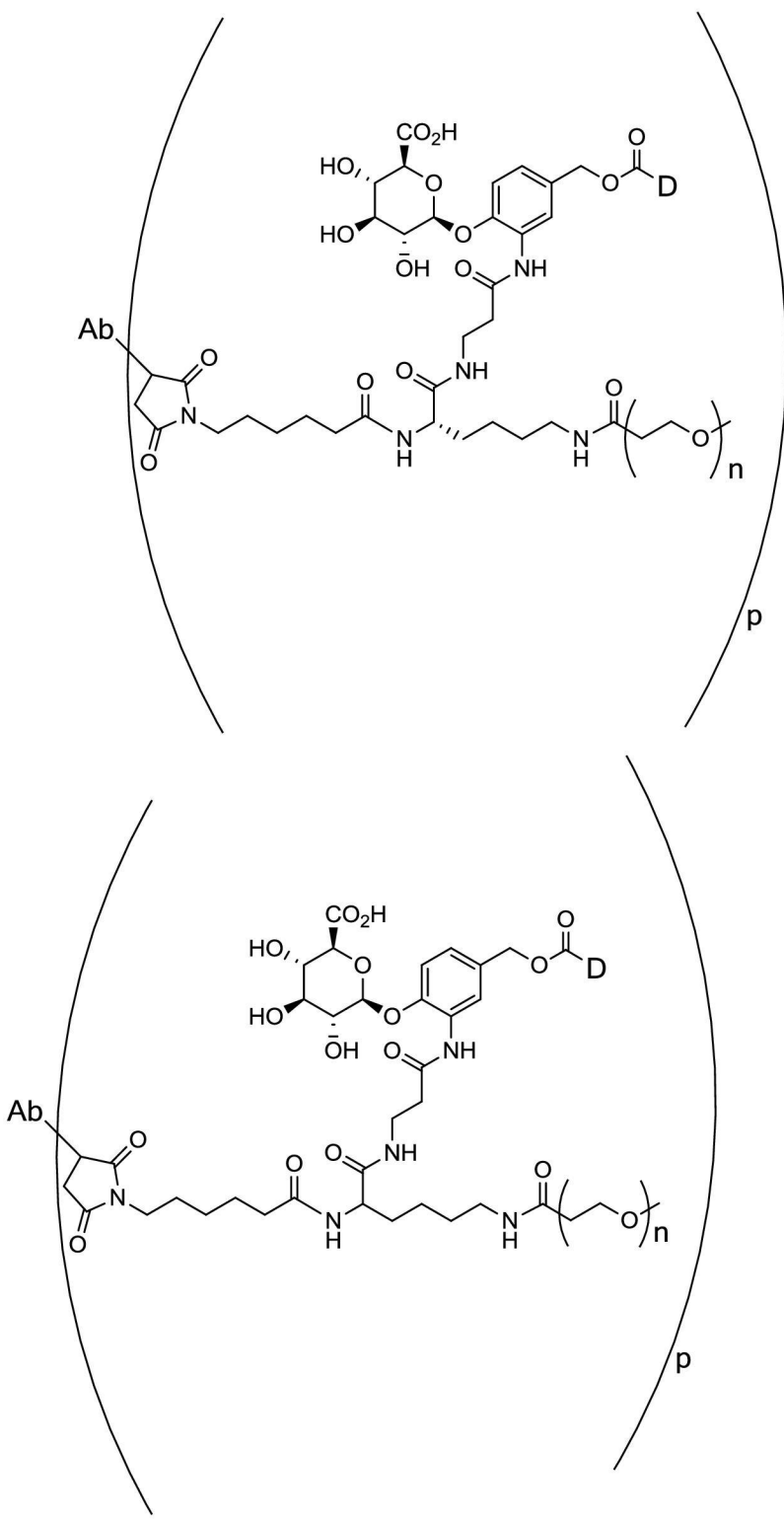


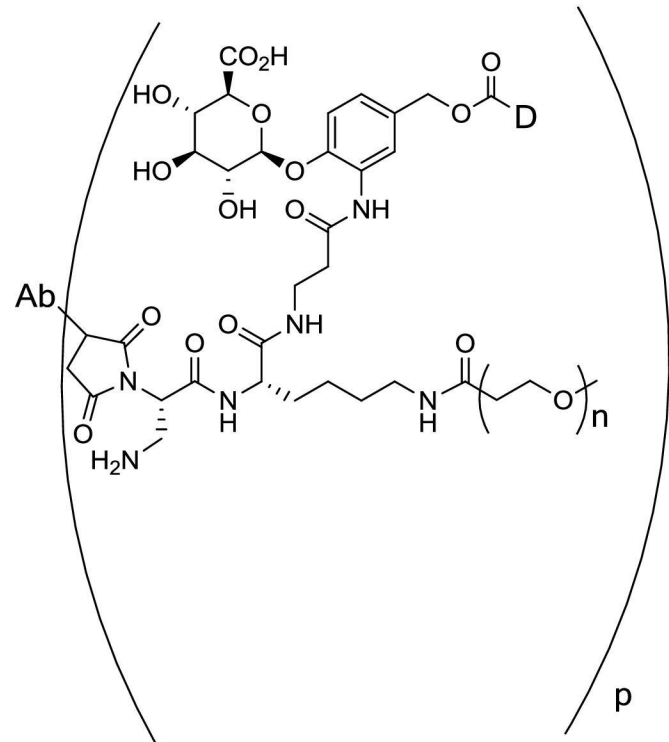
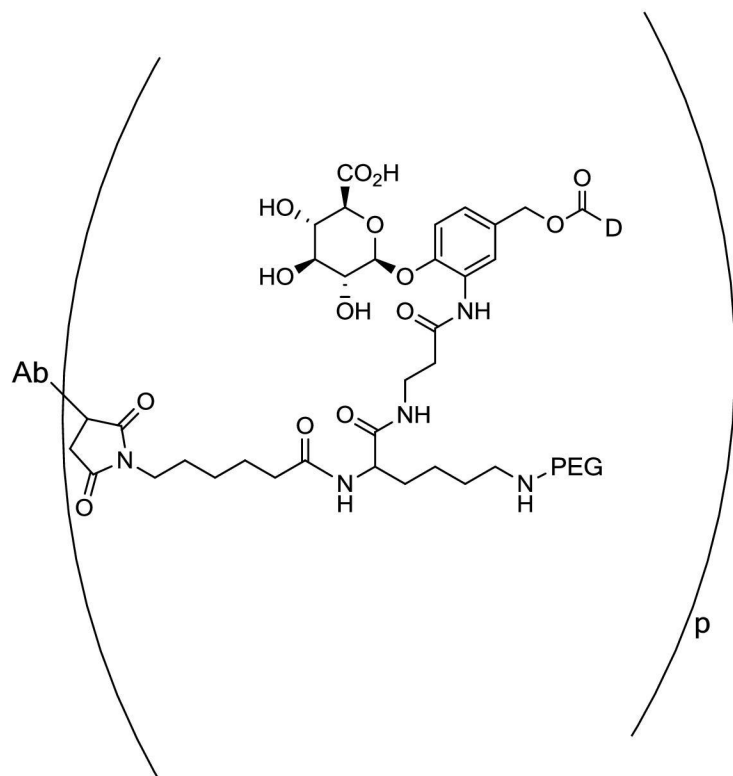
，其中R²¹為PEG封端單元，波浪線指示共價鍵結至聚乙二醇化架構且n為8至24或12至38範圍內之整數。R²¹較佳為-CH₃或-CH₂CH₂CO₂H。

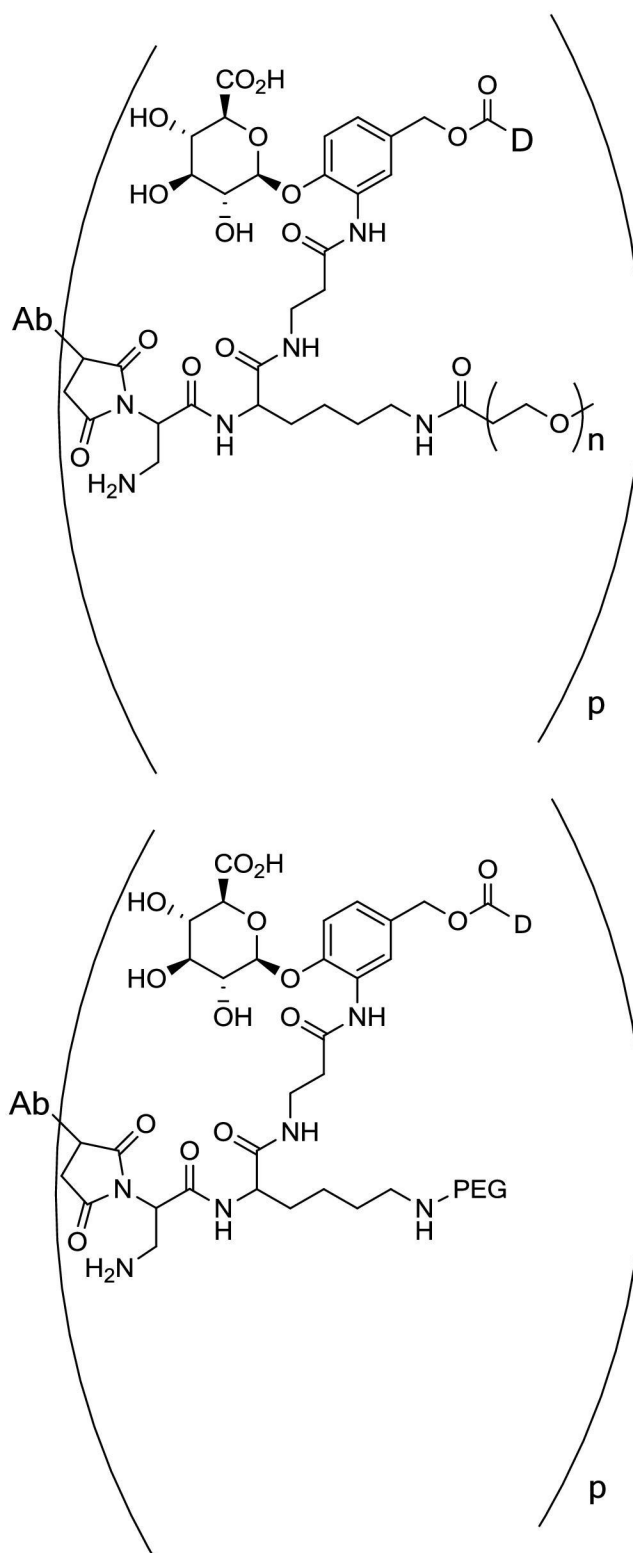
在一些實施例中，作為-X-D部分體之MDpr-PAB(gluc)-D經mc-PAB(gluc)-D置換。

應瞭解，在含MDpr之-X-D部分體中之任一者中，MDpr中之經取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。包含mc之-X-D部分體亦可具有水解形式之其丁二醯亞胺環。

本發明之例示性配體-藥物結合物包括由以下結構表示之彼等結合物：

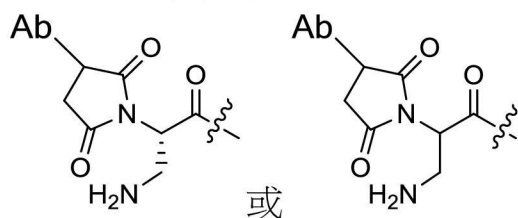






或其醫藥學上可接受之鹽，其中p為1至14、較佳2至12、6至12、8至12或8至10範圍內之整數，Ab為抗體，較佳單株抗體，D為藥物單元且n為6至72、8至72、10至72、12至72、12至36或38、6至24、或最佳8至24範圍內之整數。PEG如本文針對PEG單元提供之任何實施例中

所述。應瞭解，經Ab取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)，對於包含諸如以下部分之彼等抗體-藥物結合物尤其如此：

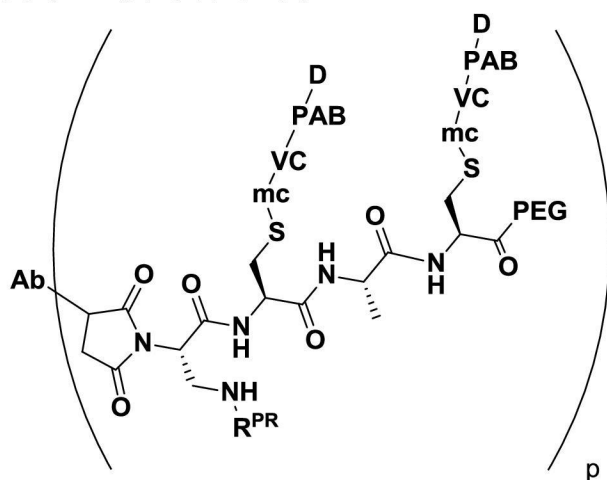


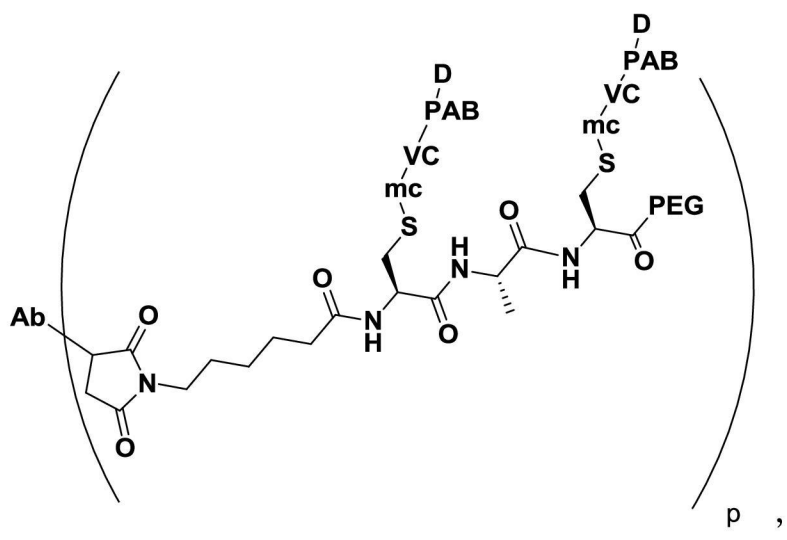
，其中波浪線指示共價結合至抗體-

藥物結合物之藥物配體部分之其餘部分。

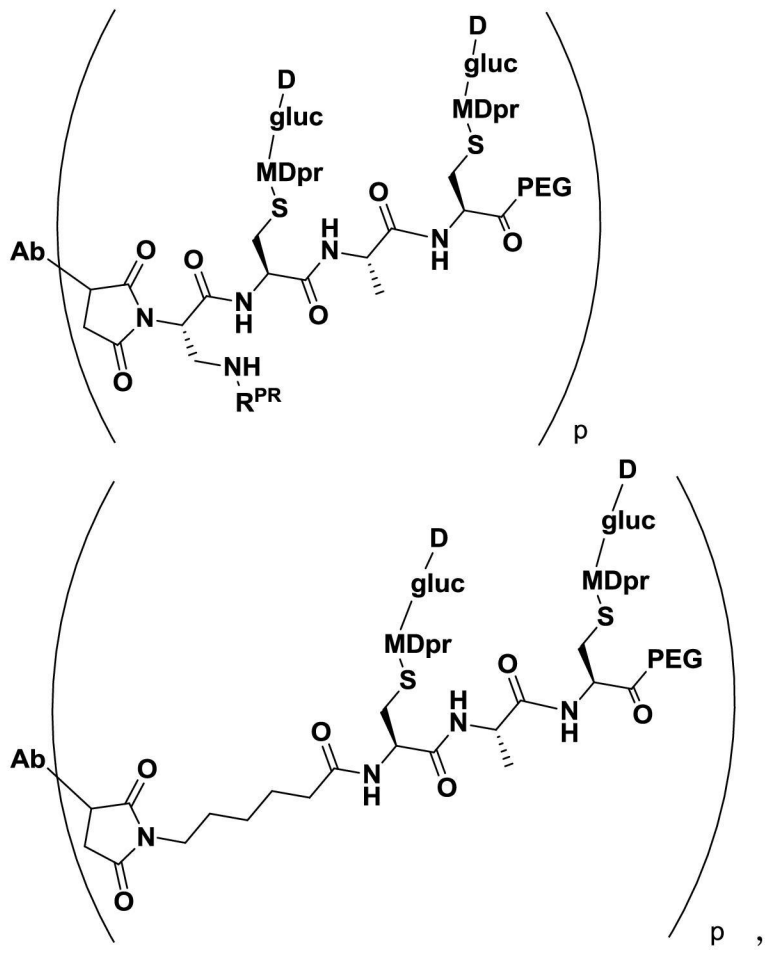
應瞭解，以上代表性結構亦可表示組合物，在此情況下， p 表示組合物中每配體藥物連接子之平均數量。在此類實施例中， p 通常不為整數值且可在1至14、較佳2至12、6至12、8至12或8至10之範圍內。

提供2倍藥物負載之本發明之例示性配體-藥物結合物包括由以下結構表示之彼等結合物：





及彼等結構，其中-X-D部分體mc-VC-PAB-D經包括mc-VA-PAB-D及MDpr-VA-PAB-D之本文所述之-X-D部分體中之任一者置換



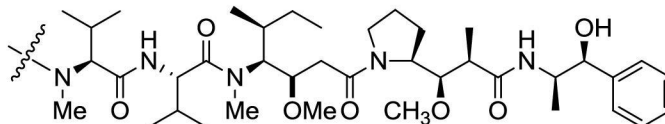
或其醫藥學上可接受之鹽，其中p為1至14、較佳2至12、6至12、8至12或8至10範圍內之整數，Ab為抗體，較佳單株抗體，D為藥物單元且n為6至72、8至72、10至72、12至72、12至36或38、6至24、或最

第 170 頁(發明說明書)

佳8至24範圍內之整數。PEG如本文針對PEG單元提供之任何實施例中所述。應瞭解，結合至Ab或S之經取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。

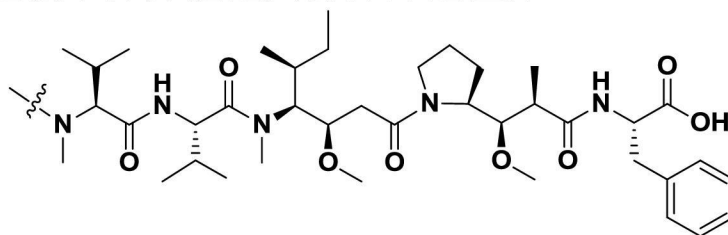
應瞭解，經Ab取代之MDpr部分體或-X-D部分體中之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個羰基-氮鍵加成水分子)。經Ab取代之mc部分體或-X-D部分體中之丁二醯亞胺亦可以水解形式存在。

在以上任何實施例中，藥物單元D可為如下MMAE，其中波浪線指示連接至藥物連接子部分體之其餘部分之位點。



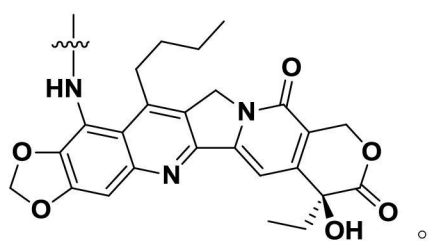
在一些較佳態樣中，包括D為MMAE之彼等態樣，p為6、7、8、9、10、11或12。在一些實施例中，包括D為MMAE之彼等實施例，抗體經由抗體之半胱胺酸殘基之硫原子結合至連接子。半胱胺酸殘基可為天然或非天然存在的。舉例而言，在一些態樣中，半胱胺酸將來自鏈間二硫鍵。在其他態樣中，半胱胺酸殘基將來自引入之半胱胺酸(例如在位置239處引入之半胱胺酸)。在一些態樣中，抗體將經由其鏈間二硫鍵及經由引入之半胱胺酸連接至藥物連接子。

在以上任何實施例中，藥物單元D可為如下MMAF，其中波浪線指示連接至藥物連接子部分體之其餘部分之位點。

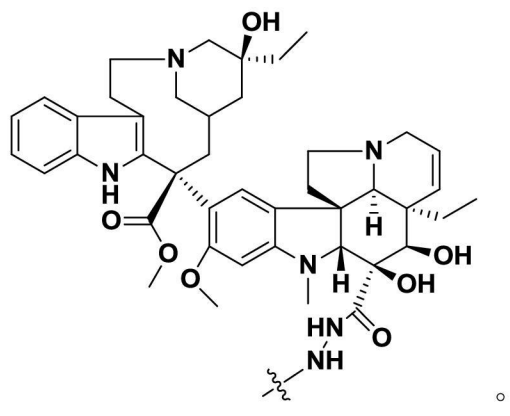


在以上任何實施例中，藥物單元D可為如下針對喜樹鹼本身所例

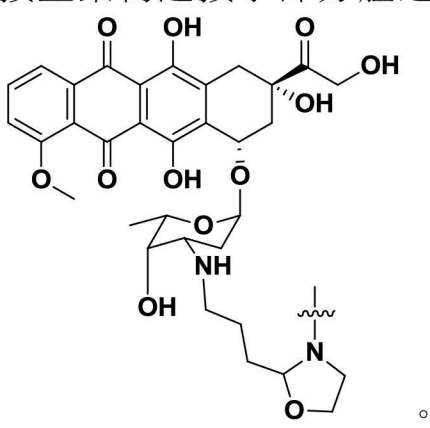
示之喜樹鹼化合物，其中波浪線指示連接至藥物連接子部分體之其餘部分之位點：



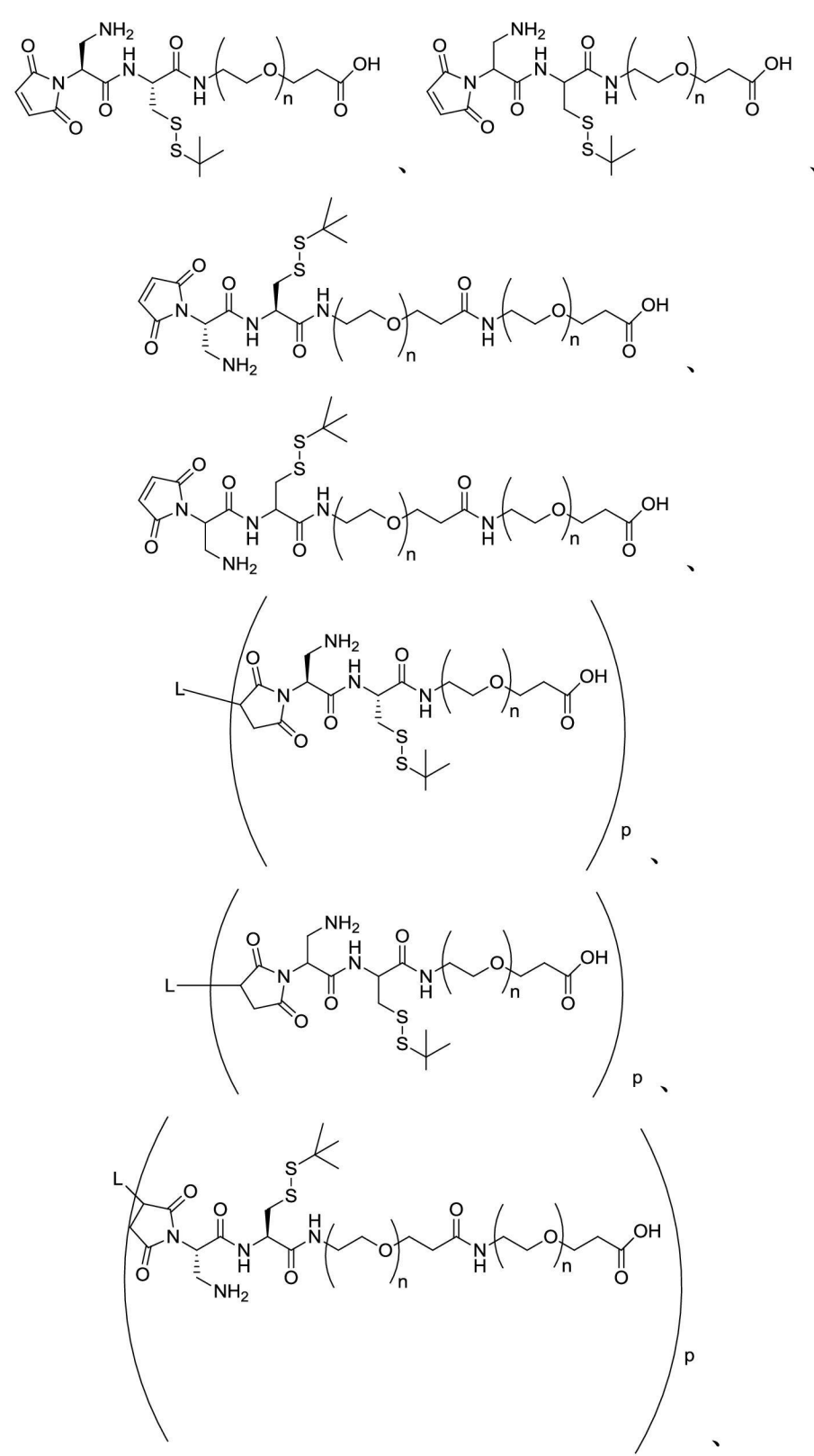
在以上任何實施例中，藥物單元D可為如下針對長春鹼鹽肼所例示之長春花化合物，其中波浪線指示連接至藥物連接子部分體之其餘部分之位點：

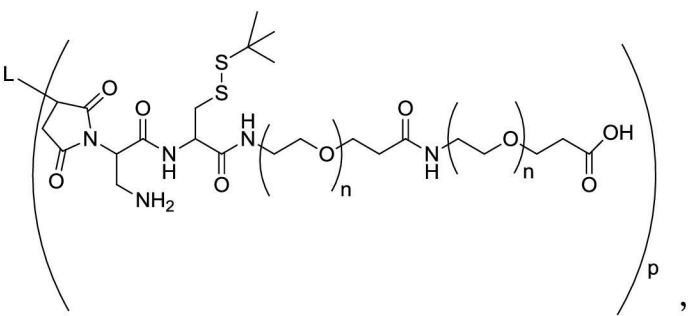


在以上任何實施例中，藥物單元D可為如下所例示之蔥環黴素化合物，其中波浪線指示連接至藥物連接子部分體之其餘部分之位點：



經巯基保護之連接子中間化合物及本發明之對應配體連接子化合物中之例示性聚乙二醇化架構包括以下：





或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

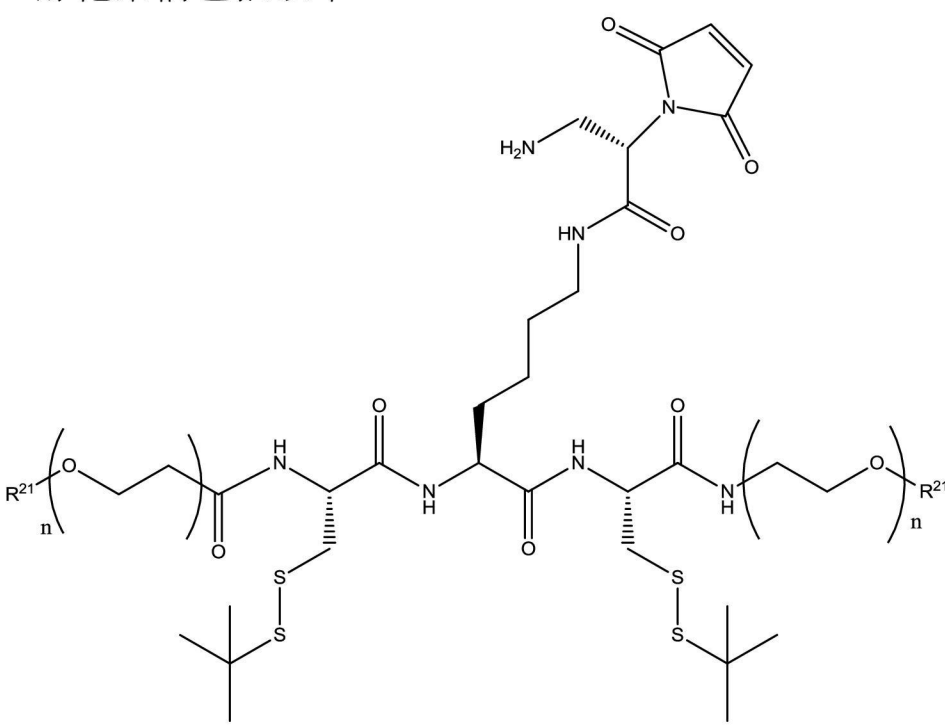
n為2至72，較佳為4至72、或8至72、或8至24；

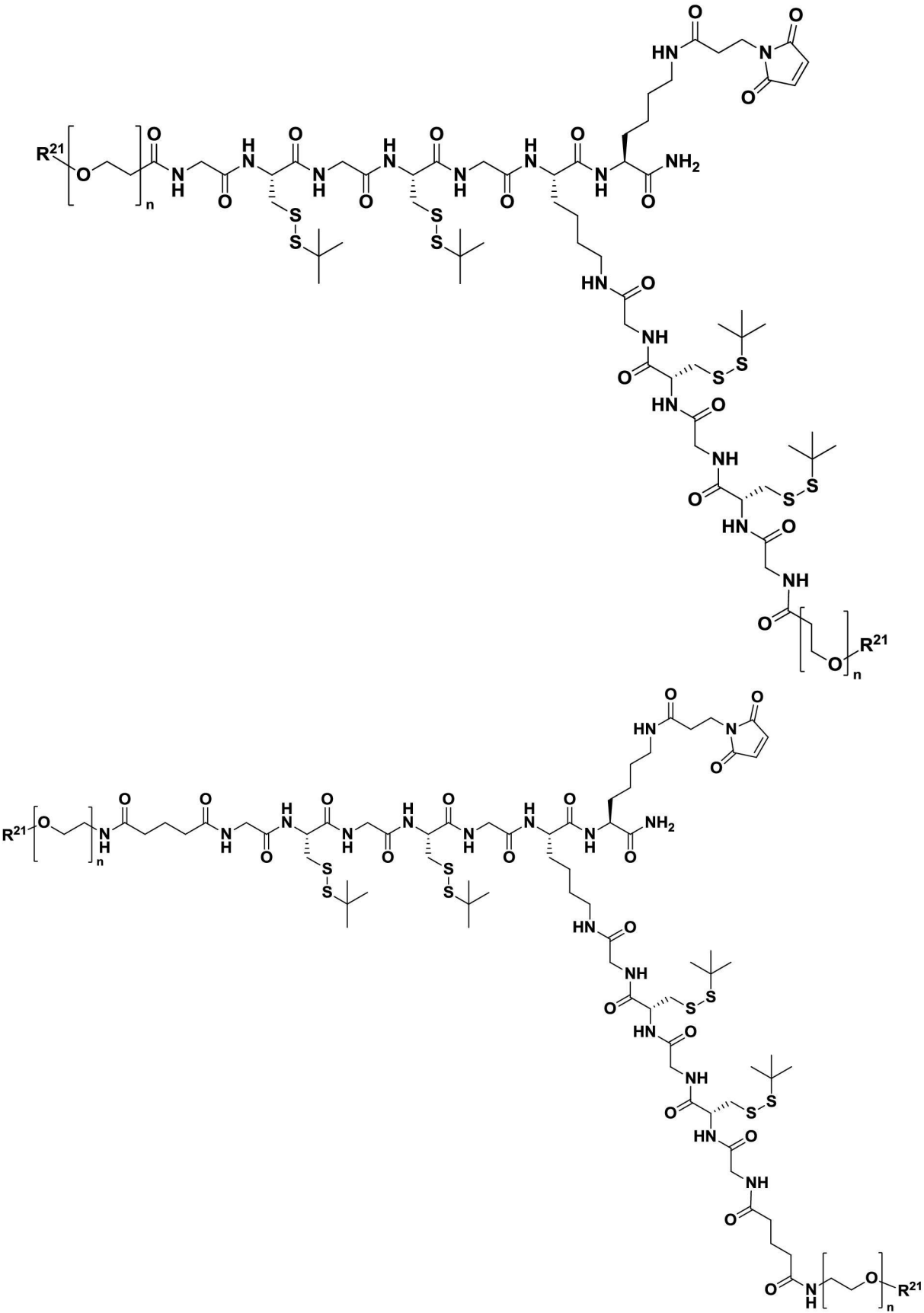
p為1至14，較佳約2至約12；及

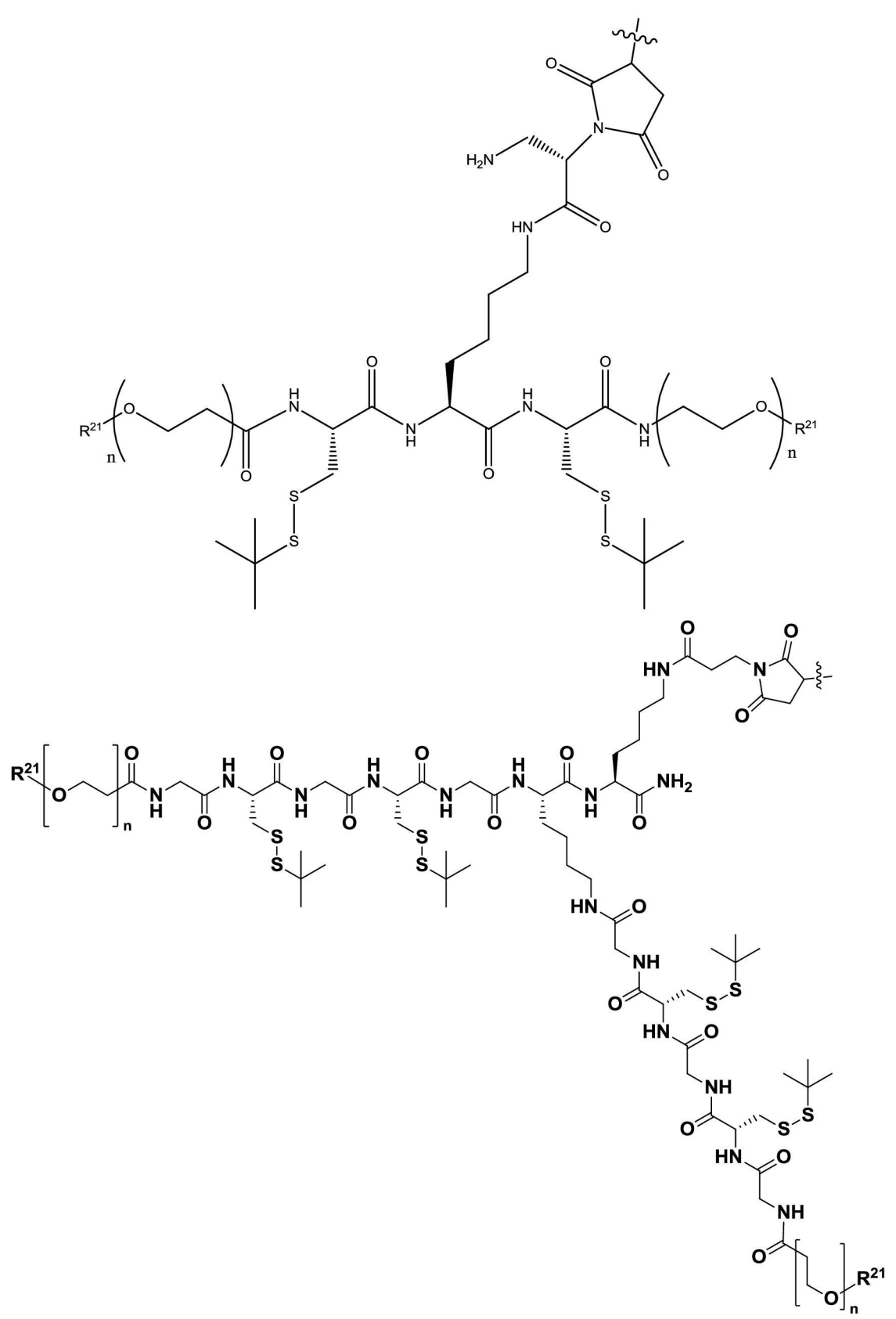
Ab為抗體，較佳單株抗體。

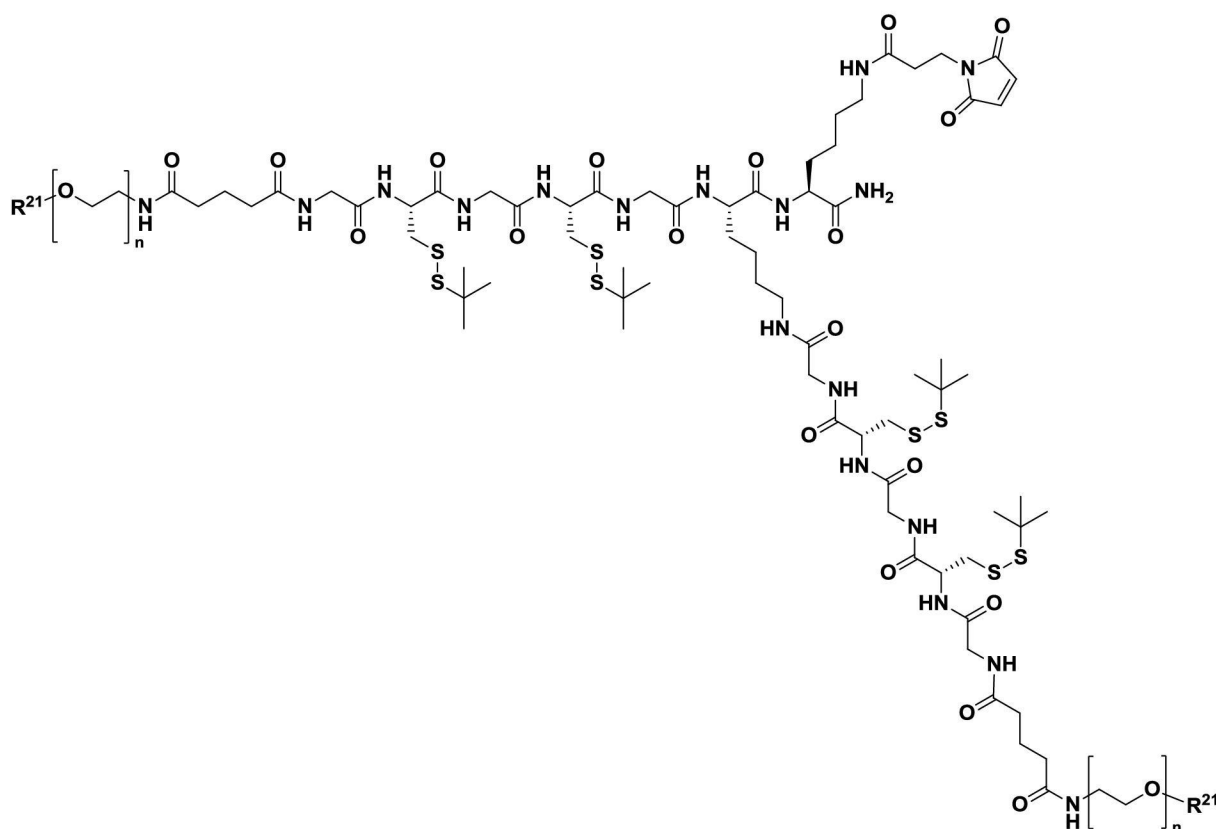
應瞭解，在上式中，經配體取代之丁二醯亞胺可以水解形式存在(亦即橫跨一個而非兩個丁二醯亞胺之C-N鍵加成水分子)。此外，在以上實施例中之任一者中，第三丁基巰基保護基可經任何其他適合巰基保護基置換。

作為連接子中間化合物及本發明之對應配體連接子化合物之例示性多重聚乙二醇化架構包括以下：









其中波浪線指示共價連接至配體單元， R^{21} 為獨立選擇之PEG封端基團，較佳甲基或3-丙酸，且 n 獨立地在2至72、較佳4至72、或8至72、或8至24之範圍內，更佳為24。巯基保護基可經另一適合巯基保護基置換。

在一些較佳具體實例中， p 為6、7、8、9、10、11或12。在一些實施例中，抗體經由抗體之半胱胺酸殘基之硫原子結合至連接子。半胱胺酸殘基可為天然或非天然存在的。舉例而言，在一些實施例中，半胱胺酸將來自鏈間二硫鍵。在其他實施例中，半胱胺酸殘基將來自引入之半胱胺酸(例如在位置239處引入之半胱胺酸)。在一些實施例中，抗體將經由其鏈間二硫鍵及經由引入之半胱胺酸連接至藥物連接子。

在本發明之一些態樣中，在配體-藥物結合物之配體單元與藥物單元之間存在不超過50、不超過45、不超過40、不超過35、不超過30或不超過25個插入原子。在本發明之一些態樣中，在配體-藥物結合物之

配體單元與可裂解單元之間存在不超過40、不超過35、不超過30或不超過25個插入原子。

在一些實施例中，與在PEG單元中存在原子相比，在配體-藥物結合物之配體與藥物單元之間存在較少插入原子。在一些實施例中，與在PEG單元中存在原子相比，在配體-藥物結合物之配體與可裂解單元之間存在較少插入原子。

在一些實施例中，與在PEG單元之末端與平行連接體單元之間存在插入原子相比，在配體-藥物結合物之配體與藥物單元之間存在較少插入原子。在一些實施例中，與在PEG單元之末端與平行連接體單元之間存在插入原子相比，在配體-藥物結合物之配體與可裂解單元之間存在較少插入原子。

在本發明之較佳實施例中，藥物較佳為奧瑞他汀(例如MMAE或疏水性與MMAE相當或大於其之奧瑞他汀)，可釋放組合單元包含可藉由 β -葡糖醛酸酶裂解之葡萄糖醛酸苷單元；且PEG單元包含至少6個、至少8個、至少10個、或至少12個次單元不超過72個次單元，較佳不超過36或24個次單元。在較佳態樣中，PEG單元將包含約8至約24個次單元，最佳約12個次單元。配體-藥物結合物或其中間物之另一組分可如本文提供之任何實施例中所述。

本發明之較佳組合物包含配體-藥物結合物之群體，其中配體單元為抗體(例如完整抗體)，藥物單元為奧瑞他汀或非奧瑞他汀(較佳為奧瑞他汀，例如MMAE或疏水性與MMAE相當或大於其之奧瑞他汀)，可釋放組合單元包含可藉由 β -葡糖醛酸酶裂解之葡萄糖醛酸苷單元；PEG單元包含至少6個、至少8個、至少10個或至少12個次單元，但不超過

72個次單元，較佳不超過36或24個次單元；且組合物中每抗體之藥物連接子部分體之平均數量為至少6個、或至少約8個。在較佳態樣中，PEG單元將包含約8至約24個次單元，最佳約12個次單元。配體-藥物結合物之另一組分可如本文提供之任何實施例中所述。

使用方法

治療癌症

配體-藥物結合物適用於抑制腫瘤細胞或癌細胞之增殖，從而在腫瘤或癌細胞中引起細胞凋亡，或用於治療患者之癌症。相應地，配體-藥物結合物可用於供治療癌症用之多種環境中。配體-藥物結合物可用以將藥物遞送至腫瘤細胞或癌細胞中。不受理論束縛，在一個實施例中，配體-藥物結合物之配體單元與癌細胞或腫瘤細胞相關抗原結合或締合，且配體-藥物結合物可在腫瘤細胞或癌細胞內部經由受體介導之內飲作用或其他內化機制溶解(內化)。抗原可連接至腫瘤細胞或癌細胞或可為與腫瘤細胞或癌細胞相關之細胞外基質蛋白質。一旦進入細胞內，經由可裂解機制，將藥物釋放於細胞內。在替代實施例中，藥物或藥物單元在腫瘤細胞或癌細胞外部自配體-藥物結合物裂解，且藥物或藥物單元隨後穿入細胞中。

在一個實施例中，配體單元結合至腫瘤細胞或癌細胞。

在另一實施例中，配體單元結合至位於腫瘤細胞或癌細胞表面上之腫瘤細胞或癌細胞抗原。

在另一實施例中，配體單元結合至作為與腫瘤細胞或癌細胞相關之細胞外基質蛋白質之腫瘤細胞或癌細胞抗原。

配體單元對特定腫瘤細胞或癌細胞之特異性對於測定最有效治療

之彼等腫瘤或癌症而言可為重要的。舉例而言，靶向存在於造血癌症中之癌細胞抗原之配體-藥物結合物可適用於治療血液科惡性疾病(例如抗CD30、抗CD70、抗CD19、抗CD33結合配體單元(例如抗體)可適用於治療血液科惡性疾病)。靶向存在於實體腫瘤上之癌細胞抗原之配體-藥物結合物可為適用於治療此類實體腫瘤。

可用配體-藥物結合物治療之癌症包括(但不限於)造血癌症，諸如淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin Lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤)及白血病及實體腫瘤。造血癌症之實例包括濾泡性淋巴瘤、多形性大細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、急性骨髓母細胞白血病、慢性骨髓細胞性白血病、慢性淋巴球性白血病、擴散型大B細胞淋巴瘤及多發性骨髓瘤。實體腫瘤之實例包括纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴內皮肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏腫瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、結腸直腸癌、腎臟癌、胰臟癌、骨癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、食道癌、胃癌、口腔癌、鼻癌、咽喉癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、囊腺癌、髓性癌、支氣管癌、腎細胞癌、肝癌、膽管癌、絨膜癌、精原細胞瘤、胚胎癌、威爾姆斯氏腫瘤(Wilms' tumor)、子宮頸癌、子宮癌、睪丸癌、小細胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、皮膚癌、黑素瘤、神經母細胞瘤及視網膜胚細胞瘤。

癌症之多儀器治療

包括(但不限於)腫瘤、癌轉移或以細胞生長不受控為特徵之其他疾病或病症的癌症可藉由投與配體-藥物結合物來治療或抑制。

在其他實施例中，提供用於治療癌症之方法，包括向有需要之患者投與有效量之配體-藥物結合物及化學治療劑。在一個實施例中，化學治療劑為已發現治療癌症不難之彼治療劑。在另一實施例中，化學治療劑為已發現治療癌症較難之彼治療劑。可向亦已經歷手術作為癌症之治療的患者投與配體-藥物結合物。

在一些實施例中，患者亦接受其他治療，諸如放射療法。在一特定實施例中，配體-藥物結合物與化學治療劑或放射療法同時投與。在另一特定實施例中，在投與配體-藥物結合物之前或之後投與化學治療劑或放射療法。

化學治療劑可經一系列階段投與。可投與任何一種化學治療劑或其組合，諸如護理化學治療劑之標準物。

另外，提供用配體-藥物結合物作為化學療法或放射療法之替代方法治療癌症之方法，其中化學療法或放射療法已證實或可證實對於所治療之個體而言毒性過大，例如產生不可接受或不堪忍受之副作用。所治療之患者可視情況經另一癌症療法治療，諸如手術、放射療法或化學療法，視發現何種療法可接受或可忍受而定。

治療自體免疫疾病

配體-藥物結合物適用於殺死產生自體免疫疾病之細胞或抑制其複製或適用於治療自體免疫疾病。相應地，配體-藥物結合物可用於供治療患者用之自體免疫疾病的多種環境中。配體-藥物結合物可用以將藥物遞送至目標細胞。不受理論束縛，在一個實施例中，配體-藥物結合

物與目標細胞表面上之抗原締合，且接著配體-藥物結合物經由受體介導之內飲作用在目標細胞內部溶解。一旦進入細胞內，連接子單元即發生裂解，從而釋放藥物或藥物單元。接著，所釋放之藥物在細胞溶質中自由遷移且誘導細胞毒性或細胞生長抑制活性。在一替代實施例中，藥物在目標細胞外部自配體-藥物結合物裂解且藥物或藥物單元隨後穿入細胞中。

在一個實施例中，配體單元結合至自體免疫抗原。在一個態樣中，抗原位於與自體免疫病狀有關之細胞的表面上。

在另一實施例中，配體單元結合至位於細胞表面上之自體免疫抗原。

在一個實施例中，配體單元結合至自體免疫疾病病況相關之活化淋巴細胞。

在另一實施例中，配體-藥物結合物殺死產生與特定自體免疫疾病相關之自體免疫抗體之細胞或抑制其增殖。

可用配體-藥物結合物治療之特定類型之自體免疫疾病包括(但不限於)Th2淋巴細胞相關病症(例如異位性皮炎、異位性哮喘、鼻結膜炎、過敏性鼻炎、歐門氏症候群(Omenn's syndrome)、全身性硬化症及移植物抗宿主疾病)；Th1淋巴細胞相關病症(例如類風濕性關節炎、多發性硬化、牛皮癬、休格連氏症候群(Sjorgren's syndrome)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷弗氏病(Grave's disease)、原發性膽汁性肝硬化、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)及肺結核)；活化B淋巴細胞相關病症(例如全身性紅斑狼瘡、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、類風濕性關節炎及I型糖尿病)。

自體免疫疾病之多物療法

亦揭示用於治療自體免疫疾病之方法，其包括向有需要之患者投與有效量之配體-藥物結合物及已知用於治療自體免疫疾病之另一治療劑。

組合物及投藥方法

本發明提供包含本文所述之配體-藥物結合物及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。配體-藥物結合物可呈使化合物向患者投與用於治療與配體單元所結合之抗原的表現相關之病症的任何形式。舉例而言，結合物可呈液體或固體形式。較佳投藥途徑為非經腸。非經腸投藥包括皮下注射、靜脈內、肌肉內、胸骨內注射或輸注技術。在一個態樣中，將組合物非經腸投與。在一個態樣中，靜脈內投與結合物。投藥可藉由任何適宜途徑實現，例如藉由輸注或快速注射。

醫藥組合物可經調配以便使得化合物在向患者投與組合物之後為生物可用的。組合物可呈一或多個劑量單位之形式，其中例如錠劑可為單一劑量單位。

用於製備醫藥組合物之材料在所用量下可為無毒的。對一般技術者而言，將顯而易見的是醫藥組合物中活性成分之最佳劑量將取決於多種因素。相關因素包括(但不限於)動物之類型(例如人類)、化合物之特定形式、投藥方式及所用組合物。

組合物可例如呈液體形式。液體可適用於藉由注射遞送。在用於藉由注射投藥之組合物中，亦可包括界面活性劑、防腐劑、濕潤劑、分散劑、懸浮劑、緩衝液、穩定劑及等張劑中之一或多者。

液體組合物(無論其為溶液、懸浮液或其他類似形式)亦可包括以

下中之一或多者：無菌稀釋劑，諸如注射用水、生理食鹽水溶液(較佳生理鹽水)、林格氏溶液(Ringer's solution)、等張氯化鈉、固定油(諸如合成甘油單酯或甘油二酯，其可充當溶劑或懸浮介質)、聚乙二醇、丙三醇、環糊精、丙二醇或其他溶劑；抗微生物劑，諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸；緩衝液，諸如胺基酸、乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；清潔劑，諸如非離子型界面活性劑、多元醇；及用於調節張力之藥劑，諸如氯化鈉或右旋糖。非經腸組合物可封閉於由玻璃、塑膠或其他材料製成之安瓿、拋棄式注射器或多劑量小瓶中。生理鹽水為示例性佐劑。可注射組合物較佳為無菌的。

有效治療特定病症或病狀之結合物之量將視病症或病狀之性質而定，且可藉由標準臨床技術來確定。另外，活體外或活體內分析可視情況用於幫助鑑別最佳劑量範圍。待用於組合物中之精確劑量亦將視投藥途徑及疾病或病症之嚴重性而定，且應根據醫師之判斷及各患者之情況來決定。

組合物包含有效量之化合物，使得將獲得適合劑量。通常，此量為以組合物之重量計至少約0.01%之化合物。

對於靜脈內投藥，組合物可包含每公斤動物體重約0.01至約100 mg配體-藥物結合物。在一個態樣中，組合物可包括每公斤動物體重約1至約100 mg之配體-藥物結合物。在另一態樣中，投與量將在每公斤體重約0.1至約25 mg化合物之範圍內。

一般而言，向患者投與之結合物之劑量通常為每公斤個體體重約0.01 mg至約100 mg。在一些實施例中，向患者投與之劑量在每公斤個

體體重約0.01 mg至15 mg之間。在一些實施例中，向患者投與之劑量在每個體體重約0.1 mg與約15 mg之間。在一些實施例中，向患者投與之劑量在每公斤個體體重約0.1 mg與20 mg之間。在一些實施例中，投與劑量在每公斤個體體重約0.1 mg至約5 mg或約0.1 mg至約10 mg之間。在一些實施例中，所投與之劑量在每公斤個體體重約1 mg至約15 mg之間。在一些實施例中，所投與之劑量在每公斤個體體重約1 mg至約10 mg之間。在一些實施例中，在治療週期所投與之劑量在每公斤個體體重約0.1至4 mg，甚至更佳0.1至3.2 mg，或甚至更佳0.1至2.7 mg之間。

術語「載劑」係指與化合物一起投與之稀釋劑、佐劑或賦形劑。此類醫藥載劑可為液體，諸如水及油，包括石油、動物、植物或合成來源之彼等油，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油。載劑可為生理食鹽水、阿拉伯膠、明膠、澱粉糊劑、滑石、角蛋白、膠態二氧化矽、尿素。另外，可使用助劑、穩定劑、增稠劑、潤滑劑及著色劑。在一個實施例中，當向患者投與時，化合物或組合物及醫藥學上可接受之載劑為無菌的。當靜脈內投與化合物時，水為示例性載劑。亦可使用生理食鹽水溶液及右旋糖水溶液及甘油溶液作為液體載劑，尤其用於可注射溶液。適合之醫藥載劑亦包括賦形劑，諸如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻穀、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石、氯化鈉、乾燥脫脂牛奶、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇。必要時，本發明組合物亦可含有少量潤濕劑或乳化劑或pH緩衝劑。

在一實施例中，根據常規程序將結合物調配成適合於向動物、尤

其人類靜脈內投與之醫藥組合物。通常，用於靜脈內投與之載劑或媒劑為無菌等張緩衝水溶液。必要時，組合物亦可包括溶解劑。用於靜脈內投與之組合物可視情況包含局部麻醉劑(諸如利多卡因(lignocaine))以減輕注射部位之疼痛。一般而言，該等成分係單獨提供或以單位劑型混合在一起，例如呈於指示活性劑量之氣密密封容器(諸如安瓿或藥囊)中之乾燥凍乾粉末或無水濃縮物形式。當藉由輸注投與結合物時，其可例如用含有無菌醫藥級水或生理食鹽水之輸注瓶來配藥。當藉由注射投與結合物時，可提供注射用無菌水或生理食鹽水之安瓿，使得該等成分可於投與前混合。

醫藥組合物一般經調配為無菌、實質上等張的，且完全符合美國食品藥物管理局之所有良好製造實務(GMP)法規。

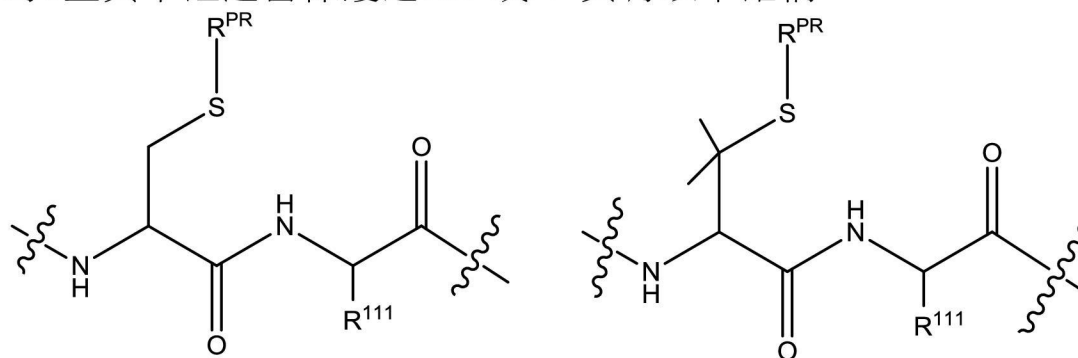
例示性方法

本文提供製備由如本文所述之式(IV)、(V)或(VI)之結構表示之藥物連接子化合物之方法，該方法包含步驟(a)：使由如本文所述之式VII、VIII或IX之結構表示之中間連接子化合物與量足以與 L^P 或 AD' 反應以便形成 L^P-X-D 或 $AD-X-D$ 部分體之 $X'-D$ 部分接觸，對於 L^P 及 AD' 之各情況，其中 $-X-D$ 為連接至藥物單元之可釋放組合單元；且 $X'-D$ 為連接至藥物單元之可釋放組合單元前驅體，其中 X' 能夠與 L^P 及/或 AD' 反應。

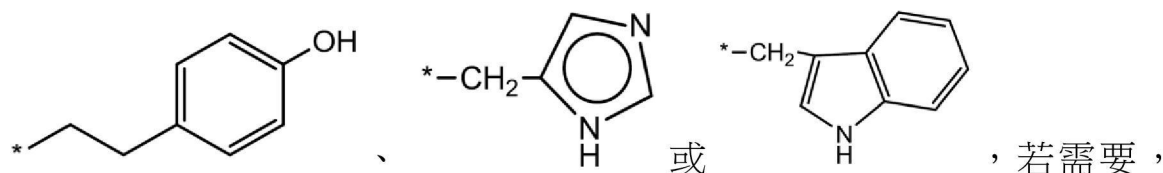
在一些態樣中，如此製備之藥物連接子將具有由如本文所述之式IVa、IVb、Va、Vb、Vc、VIa或VIb表示之結構，且用於步驟(a)中之中間連接子化合物具有由如本文所述之式VIIIa、VIIIb、VIIIc、VIIIId、IXa或IXb表示之結構。

該方法可進一步包含步驟(a')：使結構與式VIIIa、VIIIb、VIIIc、

VIIIId、IXa或IXb之對應之經適當保護之中間連接子化合物脫除保護基，其中t為0且其中經適當保護之AD'或L^{P'}具有以下結構：



其中R¹¹¹獨立地選自氫、對羥基苄基、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-

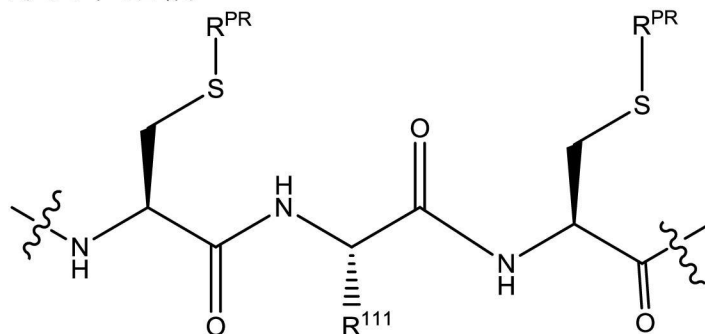


經適當保護，

其中R^{PR}為適合巯基保護基且波浪線指示中間連接子化合物內之適合之經保護AD'或L^{P'}部分之共價連接；

且在步驟(a)中使來自步驟(a')之所得脫除保護基之式VIIIa、VIIIb、VIIIc、VIIIId、IXa或IXb產物與X'-D部分接觸，其中X'包含能夠與AD'或L^{P'}之游離巯基反應以形成經硫基取代之丁二醯亞胺部分之順丁烯二醯亞胺部分。

或者，該方法可進一步包含步驟a'：使具有彼結構之式VIIIa、VIIIb、VIIIc、VIIIId、IXa或IXb之中間連接子化合物前驅體脫除保護基，其中t為1且AD'-AD'或AD'-L^{P'}經適當保護，其中經適當保護之AD'-AD'或AD'-L^{P'}具有以下結構：

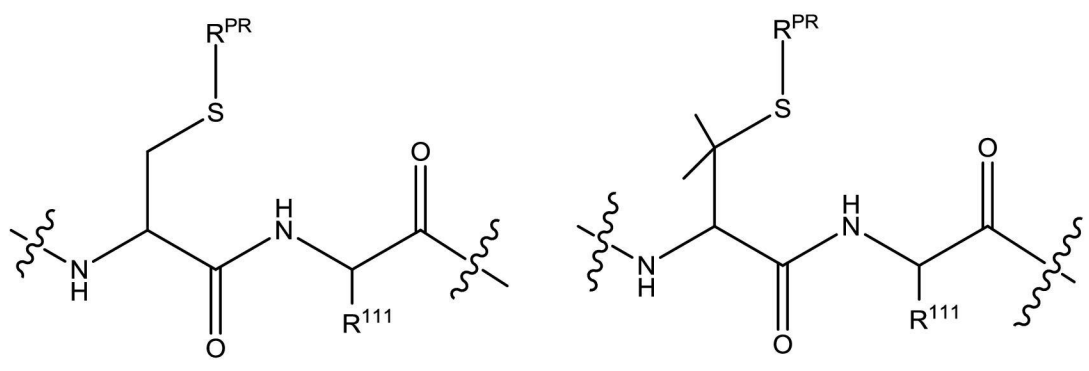


其中R¹¹¹為氫或甲基，且R^{PR}為會脫除之適合巯基保護基，且波浪線指示中間連接子化合物內之適合經保護AD'部分之共價連接；且在步驟(a)中使來自步驟(a')之所得脫除保護之式VIIIa、VIIIb、VIIIc、VIIIId、IXa或IXb產物與X'-D部分接觸，其中X'包含能夠與AD'-AD'或AD'-L^{P'}之游離巯基反應以形成經巯基取代之含丁二醯亞胺部分之含順丁烯二醯亞胺之部分。

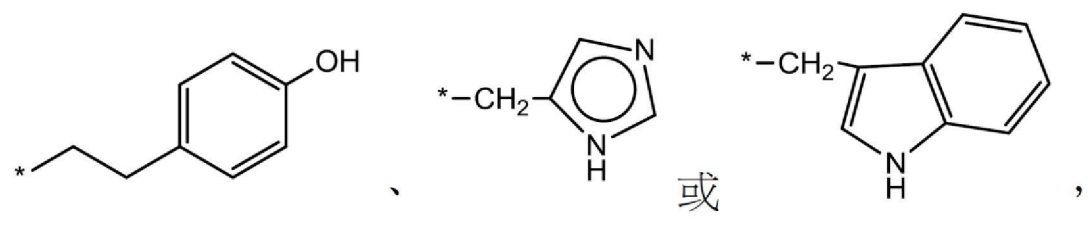
本文提供製備由如本文所述之式I、II或III之結構表示之配體-藥物結合物之方法，該方法包含步驟(a)：使由如本文所述之式X、XI或XII之結構表示之配體連接子化合物與量足以與L^{P'}或AD'反應以便形成L^{P'}-X-D或AD-X-D部分體之X'-D部分接觸，對於L^{P'}及AD'之各情況，其中-X-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元；且X'-D為連接至藥物單元之可釋放組合單元前驅體，其中X'能夠與L^{P'}及/或AD'反應。

如此製備之例示性配體-藥物結合物具有由如本文所述之式Ia、Ib、IIa、IIb、IIb、IIIa或IIIb表示之結構，且配體連接子化合物具有由如本文所述之式XIa、XIb、XIc、XIId、XIIa或XIIb表示之結構。

該方法可進一步包含步驟a'：使結構與如本文所述之式X、XI、XII、XIa、XIb、XIc、XId、XIIa或XIIb之對應之經適當保護之配體連接子化合物脫除保護基，其中t為0且其中經適當保護之AD'或L^p具有以下結構：



其中R¹¹¹獨立地選自氫、對羟基苄基、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-，若需要，經適當保護，

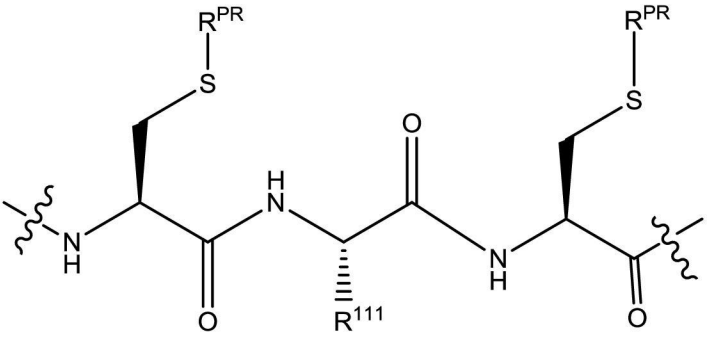


其中R^{PR}為適合巯基保護基且波浪線指示中間配體連接子化合物內之適合之經保護AD'或L^p部分之共價連接；

且在步驟(a)中使來自步驟(a')之所得脫除保護基之式X、XI、XII、XIa、XIb、XIc、XId、XIIa或XIIb產物與X'-D部分接觸，其中X'包含能夠與AD'或L^p之游離巯基反應以形成經巯基取代之丁二醯亞胺部分之順丁

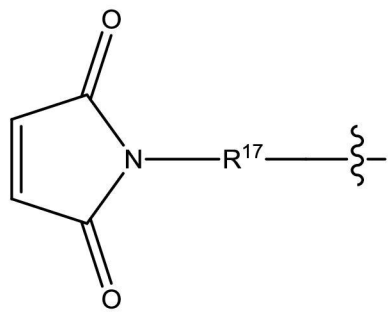
烯二醯亞胺部分。

或者，該方法可進一步包含步驟(a')：使結構與式XIa、XIb、XIc、XIId、XIIa或XIIb對應之配體連接子化合物脫除保護基，其中t為1且AD'-AD'或AD'-L^{P'}經適當保護，其中經適當保護之AD'-AD'或AD'-L^{P'}具有以下結構：

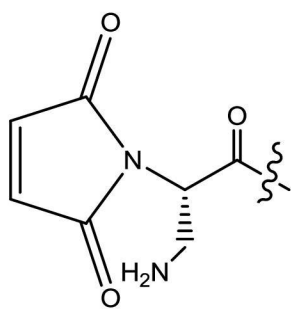


其中R¹¹¹為氫或甲基，且R^{PR}為會脫除之適合巯基保護基，且波浪線指示中間配體連接子化合物內之適合經保護AD'部分之共價連接；且在步驟(a)中使來自步驟(a')之所得脫除保護之式XIa、XIb、XIc、XIId、XIIa或XIIb產物與X'-D部分接觸，其中X'包含能夠與AD'-AD'或AD'-L^{P'}之游離巯基反應以形成經巯基取代之含丁二醯亞胺部分之含順丁烯二醯亞胺部分。

由步驟(a')產生之能夠與游離巯基反應於中例示性順丁烯二醯亞胺部分具有以下結構：



，其中R¹⁷為-(CH₂)₅C(=O)-，且波浪線指示X'-D部分內之連接或具有以下結構：



，其中波浪線指示X'-D部分內之連接且胺基視情況

經在使經R^{PR}保護巰基脫除保護基之條件下穩定之胺基保護基保護。

實例

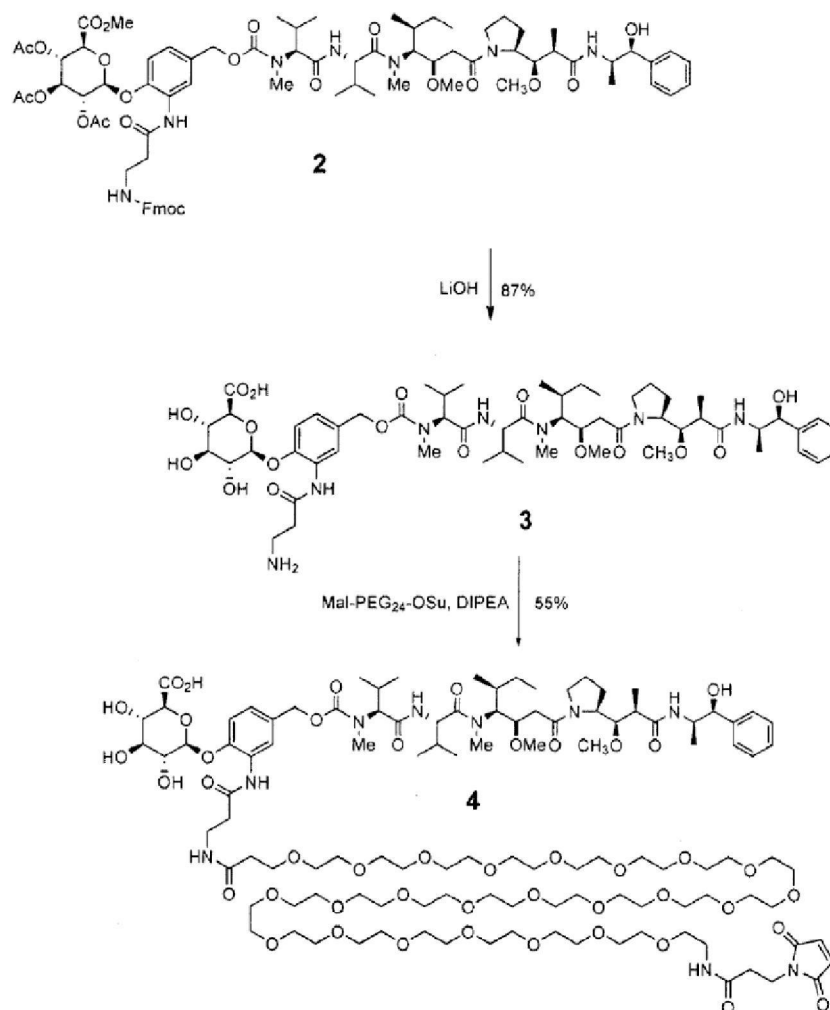
通用資訊. 所有市售之無水溶劑未經進一步純化即可使用。PEG試劑獲自Quanta BioDesign(Powell, OH)。在矽膠上60 F254鋁薄片(EMD Chemicals, Gibbstown, NJ)上進行分析型薄層層析。在Chromatotron裝置(Harris Research, Palo Alto, CA)上進行放射層析。在Biotage Isolera One急驟純化系統(Charlotte, NC)上進行管柱層析。在經組態具有Varian ProStar 330 PDA偵測器之Varian ProStar 210溶劑遞送系統上進行分析性HPLC。經C12 Phenomenex Synergi 2.0×150 mm, 4 μm, 80 Å逆相逆相溶離樣品。酸性移動相由皆含有0.05%三氟乙酸或0.1%甲酸(各化合物所示)之乙腈及水組成。用注射後1 min時5%至11 min時95%酸性乙腈，隨後等濃度95%乙腈至15 min(流動速率=1.0 mL/min)之線性梯度來溶離化合物。在兩個不同系統上進行LC-MS。LC-MS系統1由ZMD Micromass質譜儀接合至裝備有C12 Phenomenex Synergi 2.0×150 mm, 4 μm, 80 Å逆相管柱之HP Agilent 1100 HPLC儀器組成。酸性溶離劑由經10 min含5%至95%乙腈之0.1%甲酸水溶液，隨後等濃度95%乙腈維持5 min(流動速率=0.4 mL/min)之線性梯度組成。LC-MS系統2由Waters Xevo G2 Tof質譜儀接合至具有Waters 2996光電二極體陣列偵測器之Waters 2695分離模組組成；管柱、流動相、梯度及流動速率與LC-MS系統1相同。

經耦接至Waters Acquity H類UPLC系統之Waters Xevo GS-S QTOF獲得抗體-藥物結合物之LC-MS數據。樣品在80℃下經分析型逆相管柱(Agilent技術, PLRP-S, 300Å, 2.1 mm ID×50 mm, 8 μm)層析且用經12.5分鐘含25%至65%具有0.01% TFA之乙腈之0.05%TFA水溶液, 隨後等濃度65%具有0.01% TFA之乙腈維持1.5分鐘之線性梯度溶離, 流動速率為1 mL/min。在ESI+模式中使用500至4000 m/z之質量範圍獲得輕鏈及重鏈之質譜數據且使用MaxEnt1去卷積以測定所得結合物之質量。

在經組態具有Varian ProStar 330 PDA偵測器之Varian ProStar 210溶劑遞送系統上進行製備型HPLC。經C12 Phenomenex Synergi 10.0×250 mm, 4 μm, 80Å逆相管柱用含0.1%甲酸之水(溶劑A)及含0.1%甲酸之乙腈(溶劑B)溶離來純化產物。純化方法由以下溶劑A與溶劑B之梯度組成: 90:10維持0至5 min; 90:10至10:90維持5 min至80 min; 隨後等濃度10:90維持5 min。在254 nm下監測流動速率為4.6 mL/min。代替0.1%甲酸, 用含0.1%三氟乙酸之兩種流動相實施流程3及4中化合物之製備型HPLC。經Varian汞400 MHz光譜儀收集NMR光譜數據。偶合常數(J)以赫茲報導。

實例1：合成包含串聯取向之PEG單元之葡萄糖醛酸苷-MMAE藥物連接子

流程1.



(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-氨基丙鹽胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-呋喃-2-甲酸(3)：先前已描述了化合物2之合成(美國專利公開案2008/0241128)，其以引用的方式併入本文中。向含有葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物2 (40 mg, 26.8 μmol)之燒瓶中添加0.9 mL甲醇及0.9 mL四氫呋喃。接著在冰浴中冷卻溶液且逐滴添加單水合氫氧化鋰(6.8 mg, 161 μmol)於0.9 mL水中之溶液。接著在冰上攪拌反應物1.5 h，此時LC/MS展示完全轉化成產物。接著添加冰醋酸(9.2 μL, 161 μmol)且使反應物濃縮至乾燥。製備型HPLC得到呈油性殘餘物狀之完全

第 193 頁(發明說明書)

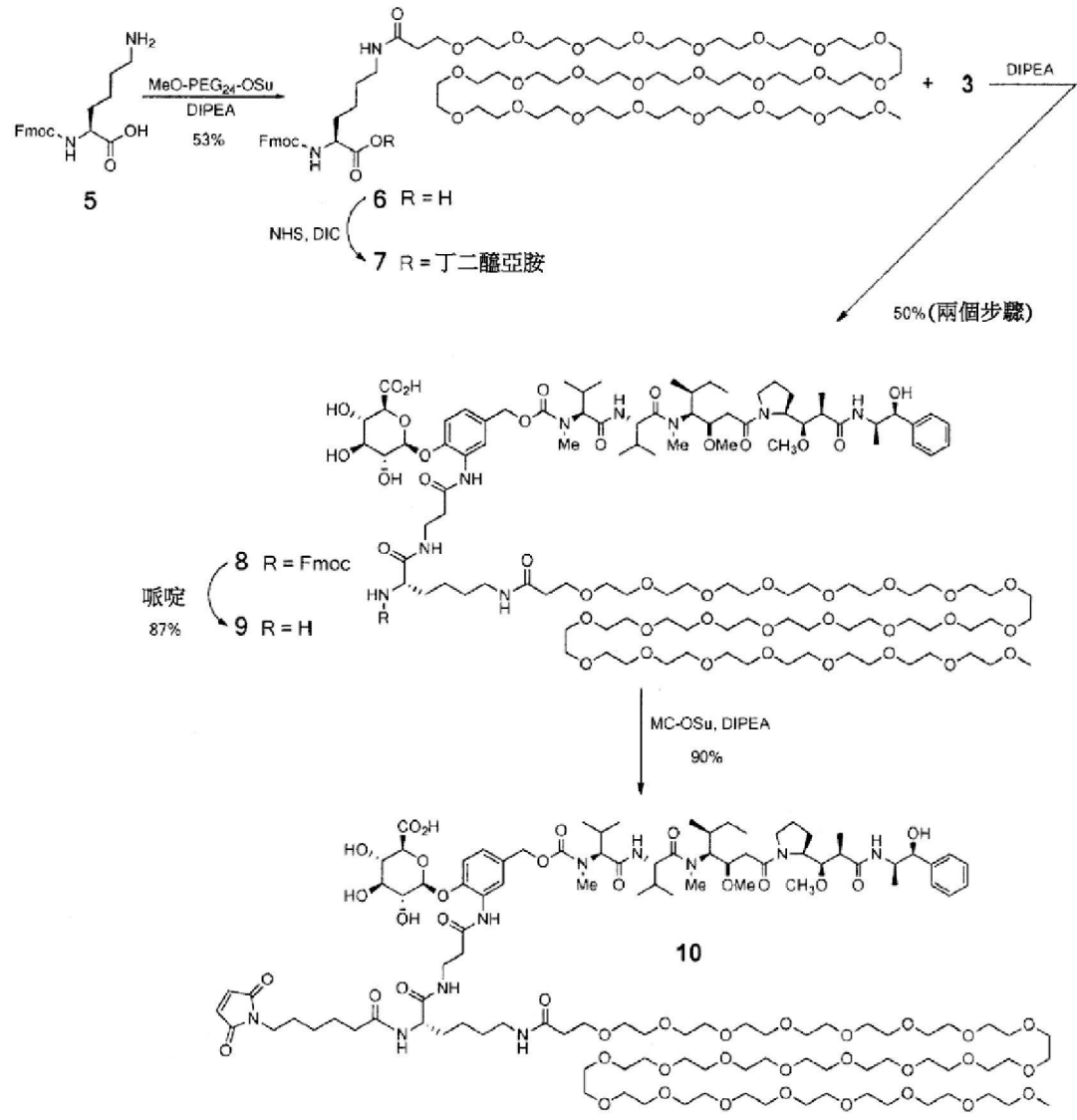
脫除保護基之葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子中間物**3** (26 mg, 87%)。分析型HPLC (0.1% 甲酸) : t_R 9.3 min。LC-MS系統1 : t_R 11.10 min, m/z (ES^+)實驗值1130.48 ($M+H$)⁺, m/z (ES^-)實驗值1128.63 ($M-H$)⁻。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)-2-(1-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基))-3,79-二側氧基-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76-二十四氧雜-4,80-二氮雜八十三烷醯胺基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-嘧啶-2-甲酸(4) : 向含有溶解於無水DMF (0.94 mL)中之脫除保護基之葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物**3** (26 mg, 23 μ mol)之燒瓶中添加順丁烯二醯亞胺基-PEG24-NHS酯(32 mg, 23 μ mol)於二甲基乙醯胺(200 mg/ml)中之溶液。添加二異丙基乙胺(20 μ L, 115 μ mol)且在環境溫度下在氮氣下攪拌反應物6 h, 此時LC/MS展示轉化成所需產物。藉由製備型HPLC純化反應物, 得到呈油性殘餘物狀之線性順丁烯二醯亞胺基-PEG24-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子**4** (31 mg, 55%)。¹H NMR (CD_3OD) δ (ppm) 0.92 (m, 16H), 1.15 (m, 6H), 1.42 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.91 (m, 4H), 2.20 (m, 3H), 2.48 (m, 6H), 2.66 (m, 3H), 2.96 (m, 4H), 3.10 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 3.31 (s, 8H), 3.38 (m, 5H), 3.44 (m, 2H), 3.57 (m, 6H), 3.62 (m, 79H), 3.77 (m, 5H), 3.87 (t, $J = 9.6$ Hz, 2H), 4.05 (m, 1H), 4.21 (m, 3H), 4.53 (m, 2H), 4.61 (m, 2H), 4.80 (m, 2H), 5.14 (m, 3H), 6.82 (s, 2H), 7.10 (m, 2H), 7.21 (m, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.74 (d, $J = 8.8$

Hz, 1H), 7.94 (m, 2H), 8.10 (m, 1H), 8.27 (m, 2H)。分析型HPLC (0.1% 甲酸) : t_R 9.9 min。LC-MS系統1 : t_R 11.94 min , m/z (ES^+) 實驗值 1205.34 ($M+2H$)²⁺。LC-MS系統2 : t_R 10.38 min , m/z (ES^+) 實驗值 2410.3225 ($M+H$)⁺。

實例2：合成包含平行取向之PEG單元之葡萄糖醛酸苷-MMAE藥物連接子

流程2.



(S)-80-((((9H- 第 -9- 基) 乙 氧 基) 羰 基) 胺 基)-74- 側 氧 基 -
2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-

二十四氧雜-75-氮雜八十一碳-81-烯酸(6)：向含有N α -Fmoc-離胺酸**5**(30 mg, 81.5 μ mol)之燒瓶中依序添加1.6 mL無水二氯甲烷、甲氧基-PEG24至OSu(100 mg, 81.5 μ mol)。接著添加DIPEA(71 μ L, 408 μ mol)且在室溫下在氮氣下攪拌反應物且隨後進行TLC及LC/MS。在2 h之後，LC/MS展示轉化成產物。用二氯甲烷稀釋反應溶液且直接裝載於1 mm chromatotron板上進行純化。用具有遞增量之甲醇(0%至15%)的二氯甲烷溶離該板，得到所需產物**6**(63 mg, 53%)。TLC：R_f = 0.17，含10% MeOH之CH₂Cl₂。¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 1.48 (m, 6H), 2.47 (m, 5H), 3.20 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.63 (m, 86H), 4.16 (m, 2H), 4.36 (m, 1H), 7.26 (m, 3H), 7.35 (m, 2H), 7.60 (m, 2H), 7.71 (m, 3H)。分析型HPLC (0.1%甲酸)：t_R 10.8 min。LC-MS系統1：t_R 11.95 min，*m/z* (ES⁺)實驗值1468.40 (M+H)⁺，*m/z* (ES⁻)實驗值1466.36 (M-H)⁻。

(S)-80-((((9H-第-9-基)乙氧基)羰基)胺基)-74-側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75-氮雜八十一碳-81-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯(7)：燒瓶中裝入N α -Fmoc-離胺酸(PEG24)-OH **6**(63 mg, 43 μ mol)及0.43 mL無水四氫呋喃。依序添加N-羥基丁二醯亞胺(5.5 mg, 47 μ mol)、二異丙基碳化二亞胺(7.3 μ L, 47 μ mol)。在氮氣下密封反應物並攪拌隔夜。在18 h之後，再添加N-羥基丁二醯亞胺(5.5 mg, 47 μ mol)及二異丙基碳化二亞胺(7.3 μ L, 47 μ mol)且再持續攪拌4小時，此時LC/MS展示完全轉化成產物。用二氯甲烷稀釋粗反應物且藉由徑向層析經1 mm板用具有遞增量之甲醇(0%至10%)的二氯甲烷溶離來純化，得到所需活化酯**7**(36 mg)。物質未經進一步表徵即向下一步推進。TLC：R_f = 0.43，含有10% MeOH之

CH₂Cl₂。分析型HPLC (0.1% 甲酸)：t_R 11.4 min。LC-MS系統2：t_R 11.01 min，*m/z* (ES⁺)實驗值1564.8379 (M+H)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80-(((9H-芴-9-基)乙氧基)羰基)胺基)-74,81-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82-二氮雜八十五烷鹽胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(8)：經脫除保護基之葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子中間物3(26 mg，23 μmol)溶解於無水二甲基甲醯胺(0.58 mL)中且添加至含有Nα至Fmoc-離胺酸(PEG)-OSu 7(36 mg，23 μmol)之燒瓶中。接著添加二異丙基乙胺(20 μL，115 μmol)，接著在室溫下在氮氣下攪拌反應物。在4.5 h之後，LC-MS展示轉化成產物。藉由製備型HPLC純化產物，得到呈油性殘餘物狀之Fmoc-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物8(30 mg，經兩個步驟50%)。分析型HPLC (0.1% 甲酸)：t_R 11.4 min。LC-MS系統1：t_R 12.31 min，*m/z* (ES⁺)實驗值1291.05 (M+2H)²⁺。LC-MS系統2：t_R 11.30 min，*m/z* (ES⁺)實驗值2580.2515 (M+H)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80- 胺 基 -74,81- 二 側 氧 基 -2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82-二氮雜八十五烷鹽胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異

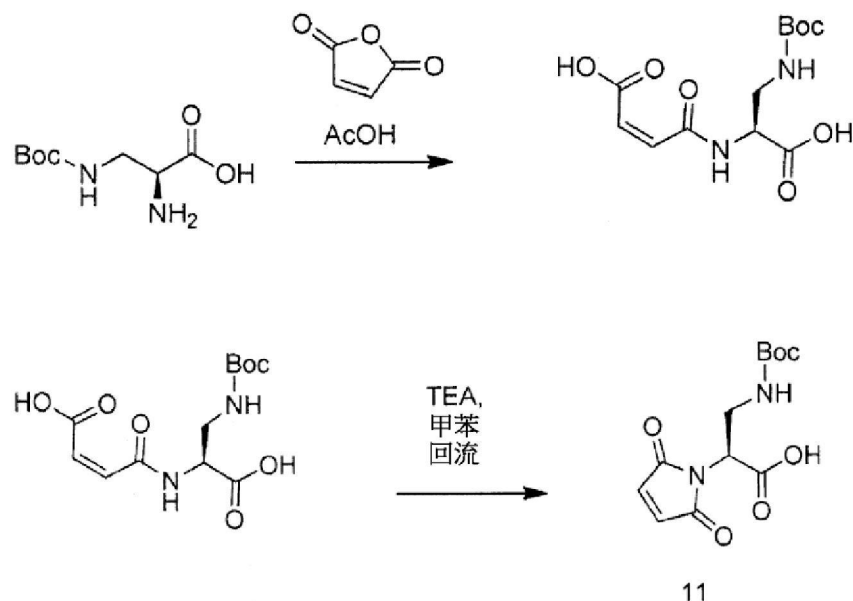
丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-嘓喃-2-甲酸(9)：將Fmoc-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物8(30 mg, 12 μ mol)溶解於0.46 mL無水二甲基甲醯胺中，隨後添加0.12 mL嘓啉。在氮氣下攪拌反應物3小時，接著濃縮至乾燥。藉由製備型HPLC純化產物，得到呈油性殘餘物狀之H-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物9(24 mg, 87%)。¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 0.92 (m, 14H), 1.14 (m, 6H), 1.42 (m, 5H), 1.79 (m, 8H), 2.22 (m, 3H), 2.42 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.47 (m, 2H), 2.65 (m, 2H), 2.76 (m, 2H), 2.95 (m, 3H), 3.10 (m, 3H), 3.31 (m, 8H), 3.35 (m, 6H), 3.54 (m, 5H), 3.63 (s, 70H), 3.72 (t, J = 6.0 Hz, 3H), 3.85 (m, 2H), 4.07 (m, 1H), 4.22 (m, 3H), 4.52 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 4.71 (m, 2H), 5.11 (m, 3H), 7.12 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.31 (m, 3H), 7.37 (m, 2H), 7.75 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.89 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.26 (m, 2H)。分析型HPLC (0.1%甲酸)： t_R 8.9 min。LC-MS系統1： t_R 11.18 min, m/z (ES⁺)實驗值1178.97 (M+2H)²⁺。LC-MS系統2： t_R 9.50 min, m/z (ES⁺)實驗值2358.2341 (M+H)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)-2-((S)-80-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-74,81-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82-二氮雜八十五烷醯胺基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-

哌喃-2-甲酸(10)：將順丁烯二醯亞胺基己酸NHS酯(4.2 mg, 14 μmol)溶解於0.6 mL無水二甲基甲醯胺中且轉移至含有H-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物**9**(24 mg, 10 μmol)之燒瓶中。接著添加二異丙基乙胺(10 μL , 58 μmol)，接著在室溫下在氮氣下攪拌反應物隔夜。藉由製備型HPLC直接純化反應混合物，得到呈油性殘餘物狀之MC-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子**10**(23 mg, 90%)。 ^1H NMR (CD_3OD) δ (ppm) 0.87 (m, 13H), 1.12 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.17 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.24 (m, 2H), 1.48 (m, 9H), 1.80 (m, 5H), 2.19 (m, 4H), 2.42 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.48 (m, 2H), 2.64 (m, 2H), 2.96 (m, 3H), 3.10 (s, 1H), 3.12 (m, 2H), 3.15 (s, 1H), 3.27 (s, 6H), 3.35 (m, 3H), 3.43 (m, 3H), 3.54 (m, 3H), 3.58 (m, 2H), 3.63 (m, 64H), 3.70 (m, 4H), 3.92 (m, 2H), 4.22 (m, 4H), 4.54 (m, 1H), 4.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H), 4.83 (m, 1H), 5.13 (m, 3H), 6.80 (s, 2H), 7.10 (m, 1H), 7.20 (m, 2H), 7.29 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.74 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.90 (m, 3H), 8.08 (s, 1H), 8.26 (m, 2H)。分析型HPLC (0.1% 甲酸)： t_R 10.6 min。LC-MS系統1： t_R 11.88 min, m/z (ES^+)實驗值1276.23 ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$ 。LC-MS系統2： t_R 10.54 min, m/z (ES^+)實驗值2551.2871 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

實例3：合成mDPR(順丁烯二醯亞胺基-二胺基丙酸)葡萄糖醛酸苷-MMAE藥物連接子

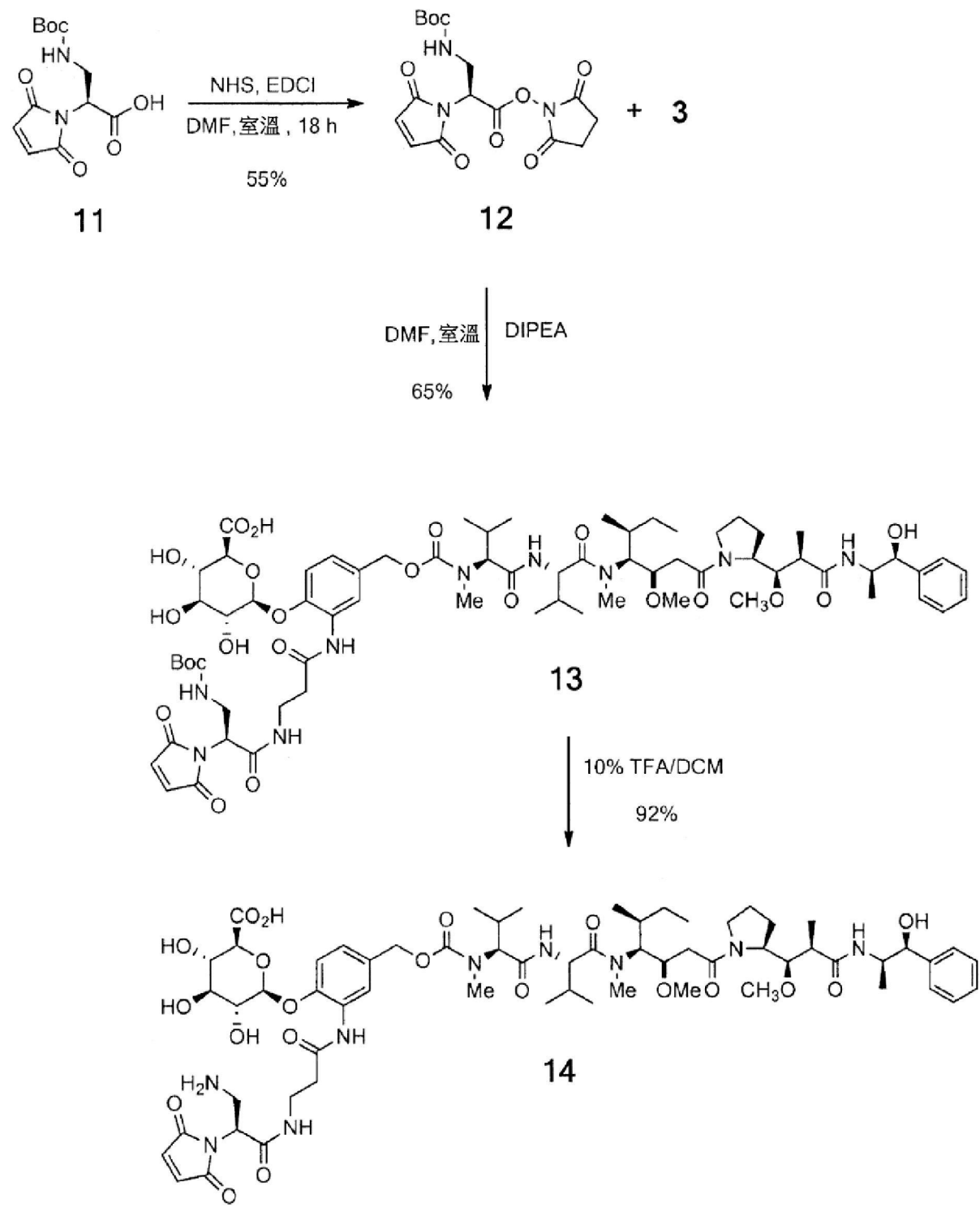
流程3a



在50 ml圓底燒瓶中，將H-DPR(boc)-OH及順丁烯二酸酐溶解於4體積乙酸中且在室溫下攪拌溶液3小時。經旋轉蒸發器使反應混合物濃縮成油狀物，且藉由添加約10 ml二氯甲烷使產物沈澱。藉由真空過濾收集沈澱，用二氯甲烷洗滌且在真空烘箱中乾燥隔夜。

使順丁烯二酰基-DPR(boc)-OH經分子篩懸浮於裝備有冷凝器之50 ml圓底燒瓶中之甲苯(3 mL)及三乙胺(224 μ L)中。添加DMA (約150 μ L)以輔助溶解。使溶液加熱至125°C且回流4小時，之後藉由LCMS展示反應完成。經旋轉蒸發器使反應混合物濃縮至乾燥，再溶解於DMSO中，且藉由製備型HPLC純化。分離呈白色固體狀之產物。

流程3b.



(S)-3-((第三丁氧羰基)胺基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-酯(12)：將(S)-N α -順丁烯二醯亞胺基-N β -Boc-二胺基丙酸11(流程3a)(400 mg，1.4 mmol)溶解於7 mL無水二甲基甲醯胺中。依序添加N-羥基丁二醯亞胺(178 mg，1.5 mmol)、1-乙基-3-

(3-)碳化二亞胺(298 mg, 1.5 mmol)。在室溫下在氮氣下攪拌反應物3小時。經由稀釋至120 mL水中實現水性處理；接著用60 mL乙酸乙酯萃取水層三次。接著用鹽水洗滌經合併之有機層，經硫酸鈉乾燥，且濃縮至乾燥。藉由急驟管柱層析、己烷:乙酸乙酯(50:50至0:100)混合物溶離純化產物，得到(S)-N_α-順丁烯二醯亞胺基-N_β-Boc-二胺基丙酸 NHS 酯[MDpr(Boc)-OSu] **12** (297 mg, 55%)。LC-MS系統1：t_R 12.23 min，m/z (ES⁺)實驗值282.0599 (M+H-Boc基團)⁺。LC-MS系統2：t_R 11.30 min，m/z (ES⁺)實驗值2580.2515 (M+H)⁺。

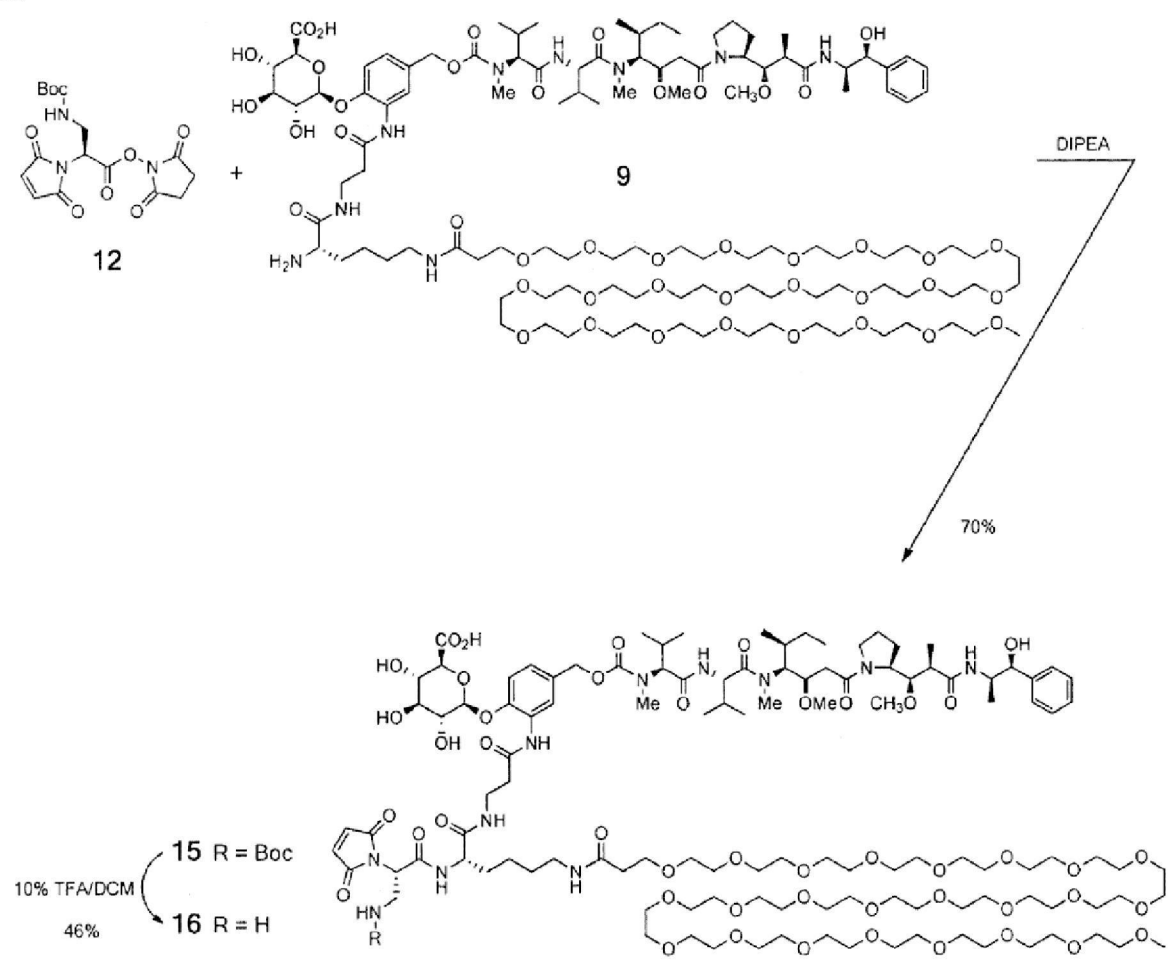
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-((S)-3-((第三丁氧羰基)胺基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)丙醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(**13**)：將MDpr(Boc)-OSu **12** (33 mg, 86 μmol)溶解於1.1 mL無水二甲基甲醯胺中且添加至含有脫除保護基之葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子中間物**3**(49 mg, 43 μmol)燒瓶中。接著添加二異丙基乙胺(37 μL, 220 μmol)，接著在室溫下在氮氣下攪拌反應物30 min。用37 μL冰醋酸淬滅反應物且藉由製備型HPLC純化，獲得MDpr(Boc)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物**13**(39 mg, 65%)。LC-MS系統2：t_R 11.09 min，m/z (ES⁺)實驗值1396.7321 (M+H)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-((S)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)丙醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲

氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(**14**)：在氮氣下在冰浴中使含有MDpr(Boc)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物**13**(18 mg, 13 μ mol)之燒瓶冷卻至0℃。逐滴添加10%三氟乙酸於二氯甲烷(1.3 mL)中之溶液。接著在0℃下攪拌反應物2 h，此時LC-MS展示完全脫除Boc保護基。接著使反應物濃縮成粗殘餘物且藉由製備型HPLC純化，得到MDpr-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子**14**(15 mg, 92%)。LC-MS系統2： t_R 9.13 min, m/z (ES⁺)實驗值1296.6697 (M+H)⁺。

實例4：合成包含平行取向之PEG單元之mDPR(順丁烯二醯亞胺基-二胺基丙酸)葡萄糖醛酸苷-MMAE藥物連接子

流程4.



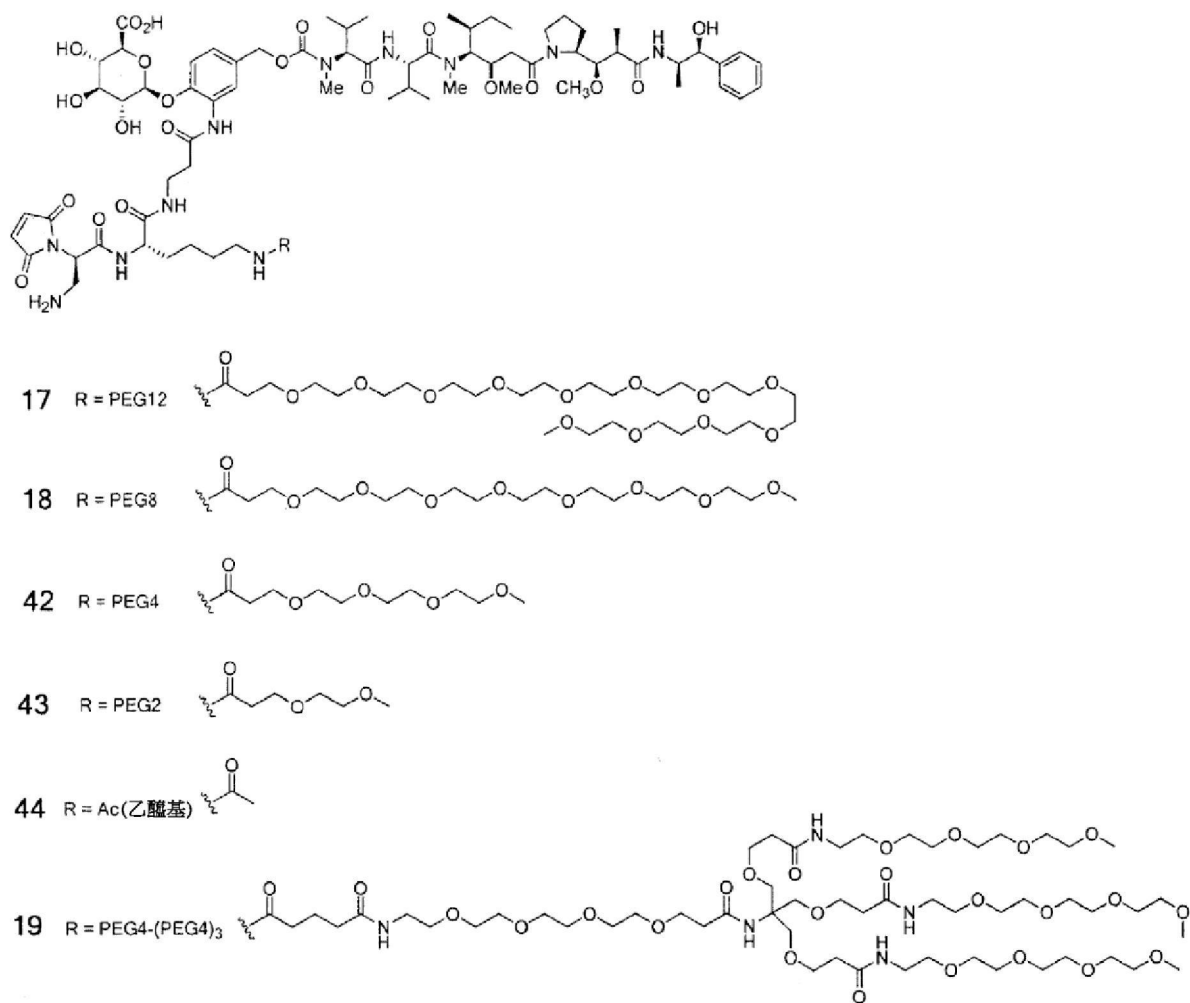
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80-((S)-3-((第三丁氧羰基)胺基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-74,81-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82-二氮雜八十五烷醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸 (15)：將 MDpr(Boc)-OSu 12(33mg，86 μmol)溶解於0.66 mL無水二甲基甲醯胺中且添加至含有H-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子中間物9(135 mg，57 μmol)之

燒瓶中。接著添加二異丙基乙胺(50 μ L, 290 μ mol)，接著在室溫下在氮氣下攪拌反應物2.5 h。用50 μ L冰醋酸淬滅反應物且藉由製備型HPLC純化，獲得MDpr(Boc)-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物**15**(86 mg, 58%)。LC-MS系統2： t_R 11.71 min， m/z (ES^+)實驗值2624.2004 ($M+H$)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-80-((S)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-74,81-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82-二氫雜八十五烷醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(**16**)：在氮氣下在冰浴中使含有MDpr(Boc)-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE中間物**15**(86 mg, 33 μ mol)之燒瓶冷卻至0℃。逐滴添加10%三氟乙酸於二氯甲烷(3.3 mL)中之溶液。接著在0℃下攪拌反應物2 h，此時LC-MS展示完全脫除Boc保護基。接著使反應物濃縮成粗殘餘物且藉由製備型HPLC純化，得到MDpr-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子**16**(38 mg, 46%)。LC-MS系統2： t_R 10.54 min， m/z (ES^+)實驗值2524.2256 ($M+H$)⁺。

實例5：合成包含平行取向之PEG12、PEG8或PEG4-(PEG4)₃單元之mDPR(順丁烯二醯亞胺基-二胺基丙酸)葡萄糖醛酸苷-MMAE藥物連接子

流程5.



(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((R)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-38,45-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十二氧雜-39,46-二氫雜四十九烷醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-嘓喃-2-甲酸(17)：以流程2及4中所述之與16相同之方式製備MDpr-Lys(PEG12)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子17。LC-MS系統2： t_R 9.88 min， m/z (ES⁺)實驗值1996.1001 (M+H)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-32-((R)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-26,33-二側氧基-2,5,8,11,14,17,20,23-八氧雜-27,34-二氮雜三十七烷醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(18)：以流程2及4中所述之與16相同之方式製備MDpr-Lys(PEG8)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子17。LC-MS系統2： t_R 10.50 min， m/z (ES^+)實驗值1818.8678 ($M+H$)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-48-((R)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-15,22,38,42,49-五側氧基-20,20-雙(15-側氧基-2,5,8,11,18-五氧雜-14-氮雜十九烷-19-基)-2,5,8,11,18,25,28,31,34-九氧雜-14,21,37,43,50-五氮雜五十三烷醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(19)：以流程2及4中所述之與16相同之方式製備MDpr-Lys(PEG4[PEG4]3)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子19。LC-MS系統2： t_R 9.92 min， m/z (ES^+)實驗值2674.3813 ($M+H$)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-20-((R)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-14,21-二側氧基-2,5,8,11-四氧雜-15,22-二氮雜五十烷醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-

((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(42)：以流程2及4中所述之與**16**相同之方式製備MDpr-Lys(PEG4)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子**42**。LC-MS系統2： t_R 10.18 min， m/z (ES^+)實驗值1642.8586 ($M+H$)⁺。

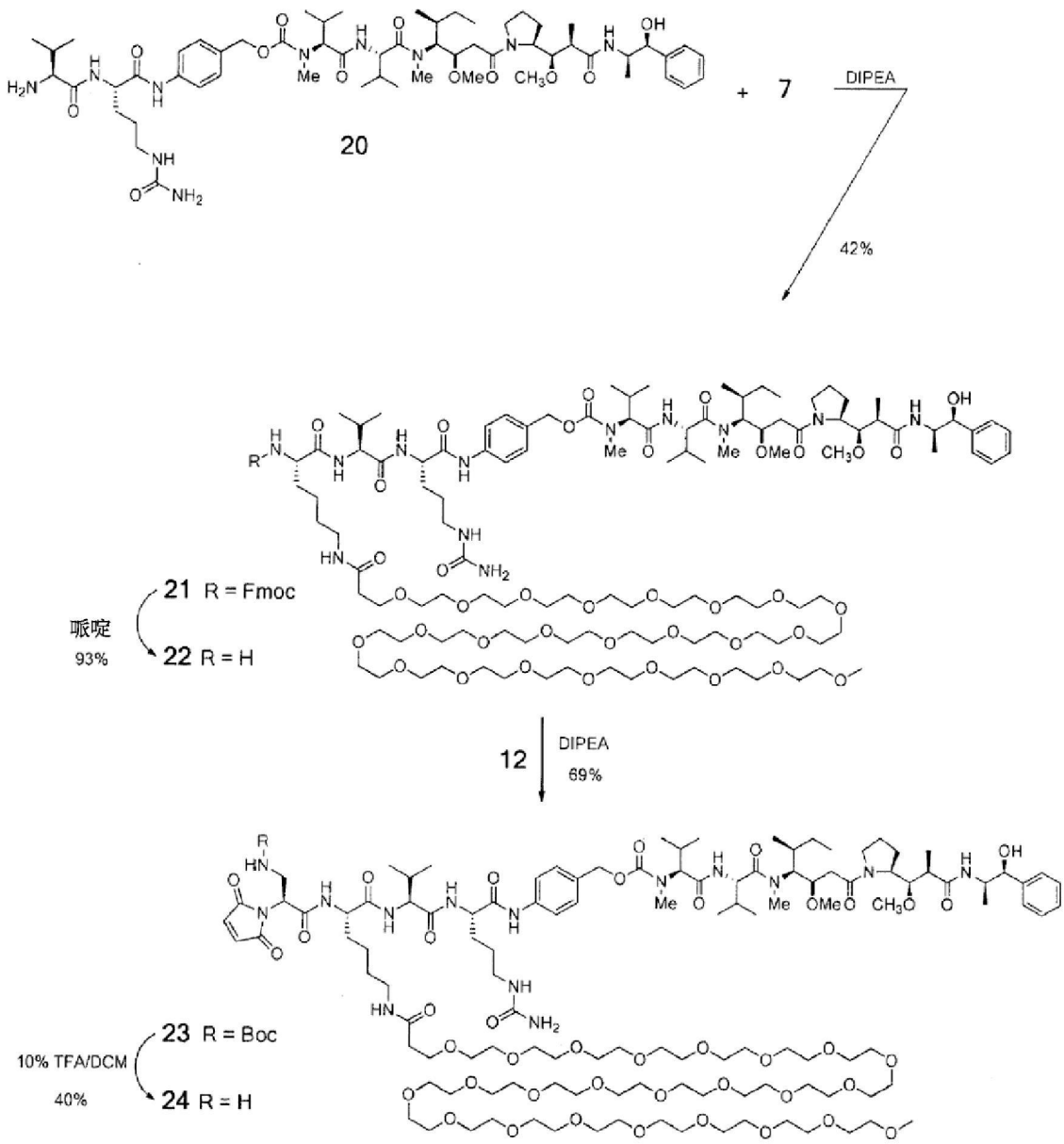
(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-14-((R)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-8,15-二側氧基-2,5-二氧雜-9,16-二氮雜十九烷醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(43)：以流程2及4中所述之與**16**相同之方式製備MDpr-Lys(PEG2)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子**43**。LC-MS系統2： t_R 10.10 min， m/z (ES^+)實驗值1554.8093 ($M+H$)⁺。

(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-((S)-6-乙醯胺基-2-((R)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)己醯胺基)丙醯胺基)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-第二丁基)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-2-側氧基乙基)-5,8-二異丙基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧基-2,13-二氧雜-4,7,10-三氮十四基)苯氧基)-3,4,5-三羥基四氫-2H-哌喃-2-甲酸(44)：以流程2及4中所述之與**16**相同之方式製備MDpr-Lys(Ac)-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子**44**。LC-MS系統2： t_R 10.38 min， m/z (ES^+)實驗值

1466.8109 (M+H)⁺。

實例6：合成包含平行取向之PEG單元之mDPR(順丁烯二醯亞胺基-二胺基丙酸)纈胺酸-瓜胺酸-MMAE藥物連接子

流程6.



4-((80S,83S,86S)-80-(((9H-第-9-基)乙氧基)羰基)胺基)-83-異丙基-74,81,84-三側氧基-86-(3-脲基丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82,85-三氮雜八十七烷醯胺基)苯甲基((S)-1-(((S)-1-

(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基)(甲基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)(甲基)胺基甲酸酯(**21**)：將ValCit-PAB-MMAE連接子(如美國專利第7,659,241號中所述合成)中間物**20**(16 mg, 14 μ mol)溶解於無水二甲基甲醯胺(0.28 mL)中且添加至含有N α -Fmoc-離胺酸(PEG)-OSu **7**(25 mg, 17 μ mol)之燒瓶中。D接著添加二異丙基乙胺(12 μ L, 70 μ mol)，接著在室溫下在氮氣下攪拌反應物。在6 h之後，LC-MS展示轉化成產物。藉由製備型HPLC純化產物，得到呈油性殘餘物狀之Fmoc-Lys(PEG24)-ValCit-PAB-MMAE中間物**21** (15 mg, 42%)。分析型HPLC (0.1% 甲酸)：LC-MS系統2： t_R 11.67 min, m/z (ES^+)實驗值2573.2493 ($M+H$) $^+$ 。

4-((80S,83S,86S)-80-胺基-83-異丙基-74,81,84-三側氧基-86-(3-脲基丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82,85-三氮雜八十七烷醯胺基)苯甲基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基)(甲基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)(甲基)胺基甲酸酯(**22**)：將Fmoc-Lys(PEG24)-ValCit-PAB-MMAE中間物**21**(15 mg, 6 μ mol)溶解於0.16 mL無水二甲基甲醯胺中，隨後添加0.04 mL哌啶。在氮氣下攪拌反應混合物1.5小時，接著濃縮至乾燥。藉由製備型HPLC純化產物，得到呈油性殘餘物狀之H-Lys(PEG24)-ValCit-PAB-MMAE中間物**22**(13 mg, 93%)。LC-MS系統2： t_R 9.72 min, m/z (ES^+)實驗值2351.1787 ($M+H$) $^+$ 。

4-((80S,83S,86S)-80-((S)-3-((第三丁氧羰基)胺基)-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-83-異丙基-74,81,84-三側氧基-86-(3-脲基丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82,85-三氮雜八十七烷醯胺基)苯甲基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基)(甲基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)(甲基)胺基甲酸酯(23)：將MDpr(Boc)-OSu **12**(4 mg, 11 μmol)溶解於0.12 mL無水二甲基甲醯胺中且添加至含有H-Lys(PEG24)-ValCit-PAB-MMAE連接子中間物**22**(13 mg, 5.5 μmol)之燒瓶中。接著添加二異丙基乙胺(5 μL, 28 μmol)，接著在室溫下在氮氣下攪拌反應物1 h。用5 μL冰醋酸淬滅反應物且藉由製備型HPLC純化，獲得MDpr(Boc)-Lys(PEG24)-ValCit-PAB-MMAE中間物**23** (10 mg, 69%)。LC-MS系統2： t_R 11.25 min, m/z (ES⁺)實驗值2617.3203 (M+H)⁺。

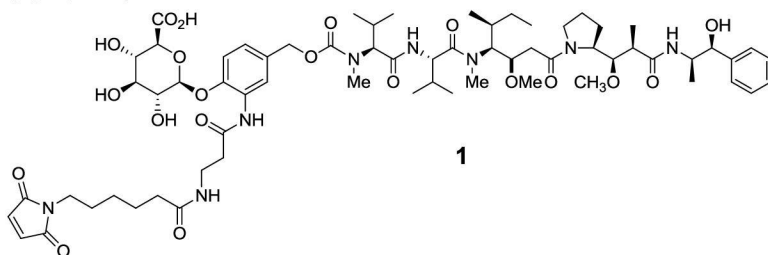
4-((80S,83S,86S)-80-((S)-3-胺基-2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)丙醯胺基)-83-異丙基-74,81,84-三側氧基-86-(3-脲基丙基)-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71-二十四氧雜-75,82,85-三氮雜八十七烷醯胺基)苯甲基((S)-1-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧基丙基)吡咯啉-1-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧基庚-4-基)(甲基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)(甲基)胺基甲酸酯(24)：在氮氣下在冰浴中使含有MDpr(Boc)-Lys(PEG24)-ValCit-PAB-MMAE中間物**23**(10 mg, 4 μmol)之燒瓶冷卻

至0℃。逐滴添加10%三氟乙酸於二氯甲烷(0.4 mL)中之溶液。接著在0℃下攪拌反應物3 h。接著使反應物濃縮成粗殘餘物且藉由製備型HPLC純化，得到 MDpr-Lys(PEG24)-ValCit-PAB-MMAE 連接子 **24**(4 mg，40%)。LC-MS 系統 2： t_R 9.81 min， m/z (ES^+) 實驗值 2517.2930 ($M+H$)⁺。

實例7：包含平行取向之PEG之ADC呈現與其非聚乙二醇化對應物類似或包含串聯取向之PEG之ADC類似之活體外活性

將培養為對數期生長之細胞接種於含有150 μ L補充有20%FBS之RPMI 1640的96孔板中維持24 h。用細胞培養基以4倍操作濃度製備ADC之連續稀釋液；將50 μ L各稀釋液添加至96孔板。在添加ADC之後，在37℃下用測試物品培育細胞4 d。在96 h之後，藉由Cell Titer Glo(Promega, Madison, WI)評定生長抑制且經板讀取器量測發光。在此處將一式三份測定之 IC_{50} 值定義為引起細胞生長相對於未處理對照減低50%之濃度。

化合物**1**、**4**及**10**以平均藥物負載為每抗體8單位藥物經由其鏈間巯基結合至美國專利第7,090,843號中所述之嵌合cAC10抗體。化合物4及10如上所述。化合物1如下：



針對CD30⁺及CD30⁻細胞株量測所得ADC之活體外細胞毒活性。PEG之加成抑或其組態均不會對活體外活性產生任何顯著影響；僅觀測到可忽略之ADC效能差異，且在兩個細胞株(L540cy及Karpas-299)中，活性基本上相同(表1)。

表1. 抗CD30 ADC之活體外細胞毒活性；值表示以ng/mL計之IC₅₀。

ADC	藥物/Ab	CD30+細胞株			CD30-
		Karpas 299	L540cy	L428	WSU-NHL
cAC10-1	8	2.5	4.4	9	無影響
cAC10-4	8	1.5	4.4	34	無影響
cAC10-10	8	1.7	6.6	13	無影響

實例8：包含平行取向之PEG之ADC呈現與包含串聯取向之PEG之ADC相比有利之藥物動力學

使用放射性標記之抗體或ADC進行抗體及ADC放射性標記藥物動力學(PK)實驗。使用以下程序對PK測試物品進行放射性標記。向抗體或ADC於補充有額外50 mM磷酸鉀(pH 8.0)及50 mM氯化鈉之PBS中之溶液中添加每毫克抗體或ADC 55 µCi丙酸N-丁二醯亞胺酯、[丙酸酯-2,3-³H]- (Moravek Biochemicals，目錄號：MT 919, 80 Ci/mmol, 1 mCi/mL, 9:1 己烷:乙酸乙酯溶液)。使所得混合物渦旋並在室溫下靜置2小時。在4,000 xg下離心混合物5分鐘且移除下面水層且分離至Amicon Ultra-15離心濾膜單元(Millipore, 目錄號：UFC903024, 30 kDa MWCO)中。藉由4輪稀釋及4,000 × g下之離心移除未結合放射物。所得產物經由無菌0.22 µm Ultrafree-MC離心濾膜單元(Millipore, 目錄號：UFC30GV0S)過濾且以分光光度法量測最終抗體或ADC濃度。藉由液體閃爍計數測定各產物之比活性(µCi/mg)。

藥物動力學實驗-在若干啮齒動物模型中檢測未結合抗體或ADC之藥物動力學特性。在各實驗中，經由尾部靜脈注射每公斤動物重量1-3 mg放射性標記之抗體或ADC。在重複動物中給藥各測試物品。在多個時間點經由隱靜脈或藉由心臟穿刺針對末端血將血液吸入K₂EDTA管中。藉由在10,000 × g下離心10分鐘來分離血漿。將來自各時間點之10-20 µL血漿樣品添加至4 mL Ecoscint-A液體閃爍混合液(National Diagnostics)中且藉

由液體閃爍計數量測總放射能。將所得每分鐘崩解值轉化成 μCi 且使用放射性標記之測試物品之比活性計算各時間點保留於血漿中之抗體或ADC之濃度。由所得血漿濃度數據測定藥物動力學參數(清除率及AUC)。用Phoenix WinNonlin 6.3版(Pharsight, Mountain View, CA)使用靜脈內單次劑量選項藉由非間隔分析計算估計藥物動力學參數。

化合物**1**、**4**及**10**經由其鏈間巯基以平均藥物負載為每抗體8單位藥物結合至美國專利第7,090,843號中所述之嵌合cAC10抗體，其以引用的方式併入本文中。正如預期，由非聚乙二醇化藥物連接子**1**之8個複本製備之ADC展示相對於未結合抗體極快之清除率及底暴露(圖7)。出人意料地，聚乙二醇化藥物連接子**4**利用串聯組態之PEG產生ADC，具有與非聚乙二醇化形式相比甚至較快清除率及較低暴露。鑒於根據此設計製備之ADC技術中之實例數，此結果並不出人意料。相比而言，由藥物連接子**10**利用平行組態之PEG製備之ADC產生具有與非聚乙二醇化形式相比相當慢清除率及較大暴露之ADC(參見圖7及表2)。

表2

配體-藥物結 合物	清除率(毫升/ 天/公斤)	AUC _{0-inf} (天 × μg/ml)
cAC10	8.6	604.1
cAC10-1	48.6	67.0
cAC10-4	57.8	52.0
cAC10-10	14.2	229.7

或者，可使用基於ELISA之總抗體(Tab)分析獲得藥物動力學量度。將100 μL 抗人類IgG κ 抗體(0.5 mg/mL，Antibody Solutions，Mountain View CA)於0.05M碳酸酯-碳酸氫鹽緩衝劑中之溶液(pH 9.6，Sigma Aldrich，St.Louis，MO)添加至塗佈有MaxiSorp™(Sigma Aldrich，St.Louis，MO)之96孔聚苯乙烯板之各孔中。在4°C下培育該板隔夜。在培

育之後，用含有0.05% Tween-20之PBS(PBS-T)洗滌該板3次。接著在室溫下用含有1%牛血清白蛋白之PBS-T阻斷孔至少1小時。在阻斷之後，用PBS-T洗滌該板3次。在大鼠或小鼠血漿中製備抗體或ADC標準物之濃縮儲備液(40倍濃度)以產生標準曲線。接著用PBS-T 1:40稀釋血漿樣品及標準物。將稀釋之樣品及標準物(100 μ L)添加至ELISA板之各孔中且在室溫下培育1小時。在培育之後，移除樣品且用PBS-T洗滌培養板3次。用PBS-T 1:30,000稀釋Fc γ 片段特異性之過氧化酶-親和純F(ab')₂片段山羊抗人類IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)之溶液且將100 μ L添加至各孔中。在室溫下培育該板1小時。在培育之後，移除樣品且用PBS-T洗滌培養板3次。將SureBlueTMB Microwell過氧化酶基質(KPL, Inc. Gaithersburg, MD)之溶液添加至各孔(100 μ L)中。在室溫下培育該板 11 至 12 分鐘且用 100 μ L 1N HCl 淬滅反應。經Molecular Devices Spectromax板讀取器在450 nm下讀取該板。

實例9：與包含串聯取向之PEG之ADC或缺乏PEG單元之ADC相比，包含平行取向之PEG之ADC具有改良之活體內活性

活體內異種移植模型-依照動物飼養和使用委員會(Animal Care and Use Committee)用國際實驗動物評估和認可委員會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)完全認可之設備進行所有實驗。在Karpas 299多形性大細胞淋巴瘤、L540cy霍奇金氏淋巴瘤、拉莫斯伯基特氏淋巴瘤及MCF-7乳癌之異種移植模型中進行功效實驗。在免疫功能不全小鼠中皮下植入細胞懸浮液或腫瘤片段。帶有MCF-7腫瘤之小鼠共同投與皮下植入17 β -雌二醇之緩慢釋放錠劑。當平均腫瘤體積達到約100 mm³時，將小鼠隨機分組成研究基團。腹膜內給藥

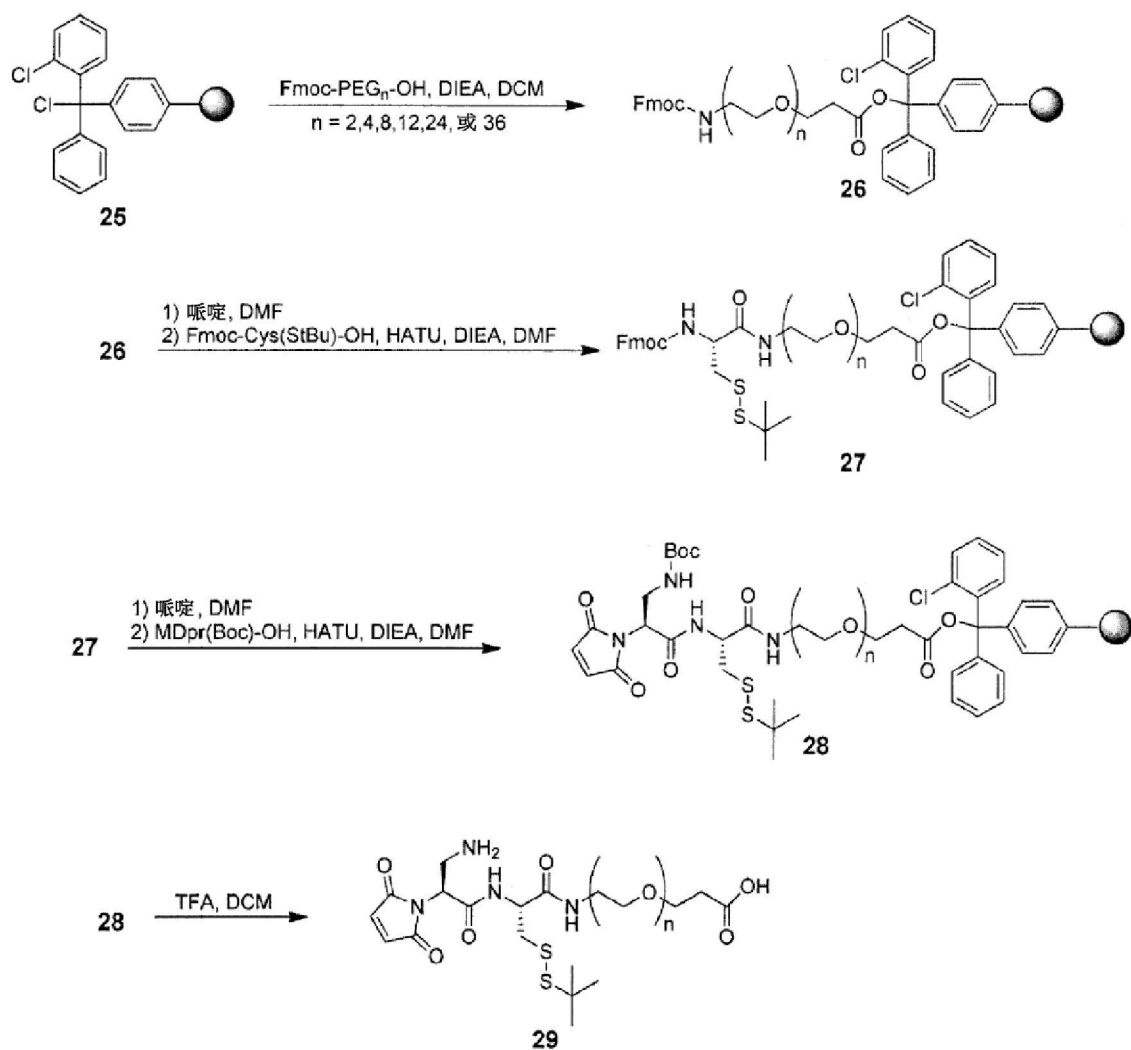
ADC或對照一次。使用式 $(L \times W^2)/2$ 測定隨時間而變之腫瘤體積。當腫瘤體積達到 1000 mm^3 時使動物安樂死。植入後約100天使展示持久消退之小鼠停止。

由L540cy模型(圖1)給藥2 mg/kg(單次劑量)之各ADC及對於Karpas-299模型(圖2)0.6 mg/kg(單次劑量)進行初始研究。腫瘤體積隨時間推移之曲線示於圖1及圖2中。所有藥物連接子以平均藥物負載為每抗體8單位藥物經由其鏈間巰基結合至美國專利第7,090,843號中所述之嵌合cAC10抗體，其以引用的方式併入本文中。在兩種模型中，由**1**(cAC10-mc-PAB(gluc)，非聚乙二醇化)及**10**(流程2中之聚乙二醇化設計)製備之ADC能治癒其劑量組中之所有動物(5/5)，而由**4**製備之ADC並不產生治癒，且經會適度延遲腫瘤生長。cAC10-**4**之活性降低與PK研究中觀測到之其暴露極大減小一致，圖7中所示。懷疑亦會在cAC10-**1**與cAC10-**10**之間觀測到以藥物動力學方式驅動之活性差異，但需要較低之劑量。相應地，對兩個模型以用於初始研究中之劑量之 $\frac{1}{2}$ 及 $\frac{1}{4}$ 劑量重複研究。對於L540cy，1 mg/kg劑量之cAC10-**10**產生完全治癒(6/6)，且cAC10-**1**僅2/6治癒(圖3)。在0.5 mg/kg下，任一基團均未觀測到治癒；然而，cAC10-**10**提供與cAC10-**1**相比較長之腫瘤生長延緩(圖3)。在兩種劑量下，根據其各別藥物動力學特性，cAC10-**10**之L540cy抗腫瘤活性大於cAC10-**1**。對於Karpas-299，0.3 mg/kg劑量之cAC10-**10**產生6/6治癒及5/6，且cAC10-**1**產生5/6治癒(圖4)。在0.15 mg/kg下，對於cAC10-**10**觀測到5/6治癒且對於cAC10-**1**僅2/6治癒(圖4)。因此，對於Karpas-299，在最低劑量之cAC10-**10**下觀測到較大抗腫瘤活性，高於此水準之兩種ADC顯示較高治癒率。

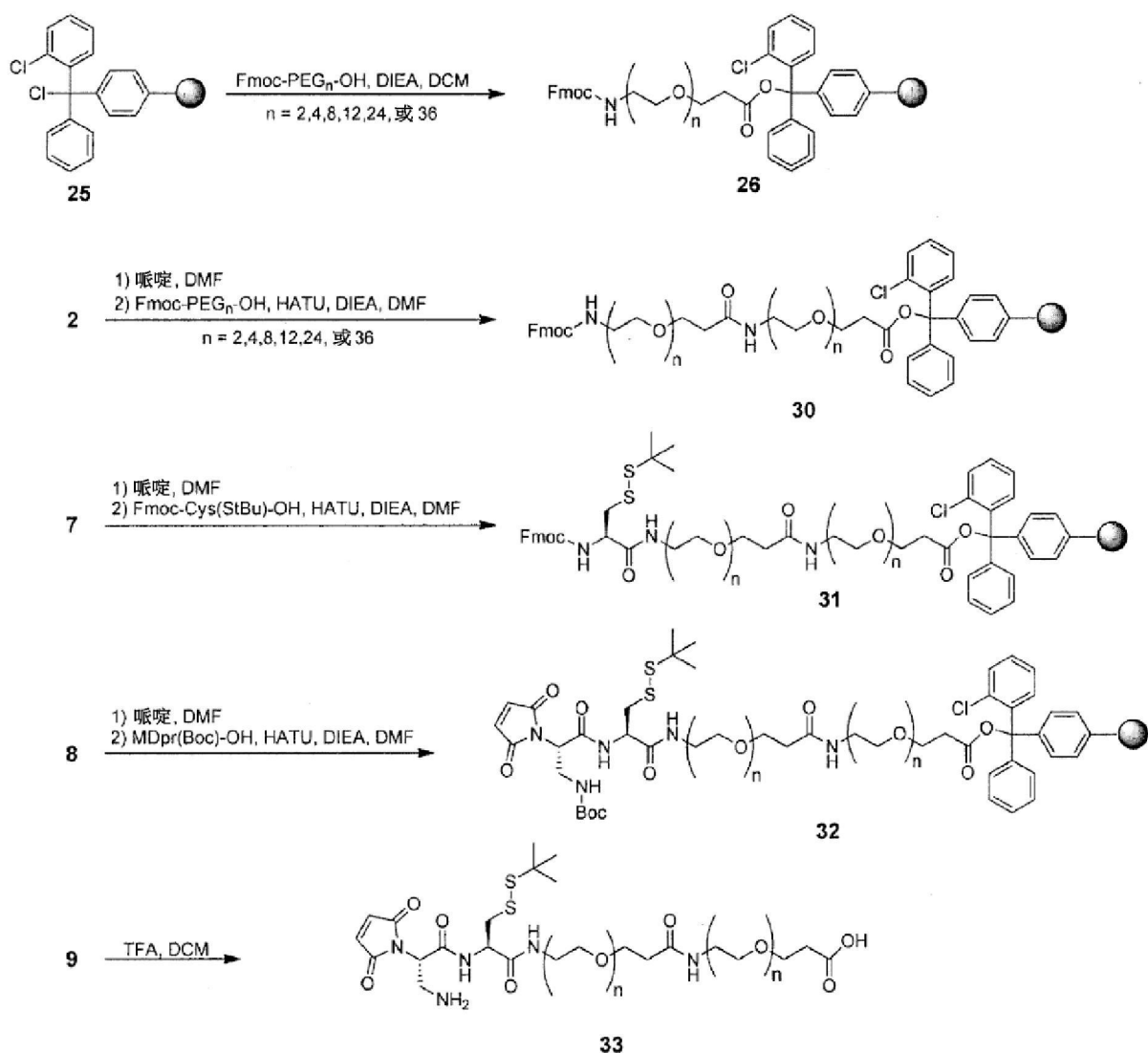
流程3及4分別描述非聚乙二醇化連接子**1**及聚乙二醇化連接子**10**之類似物之合成，併入N α -順丁烯二醯亞胺基-二胺基丙酸(MDpr)酸基作為結合點。在Karpas299 ALCL及拉莫斯伯基特氏淋巴瘤模型中評價兩個連接子。對於Karpas299，給藥0.2 mg/kg之**14**(非聚乙二醇化)及**16**(平行聚乙二醇化)之cAC10結合物一次且觀測到類似之腫瘤生長延緩(圖5)。相比而言，在拉莫斯模型中，在兩種不同劑量下，與hBU12-**14**相比hBU12-**16**發揮較大之抗腫瘤活性。在單次給藥2 mg/kg之後，與hBU12-**14**之0/5相比hBU12-**16**產生5/5治癒(圖6)。

實例 10：合成 mDPR-cys(StBu)-PEG₂₋₃₆-OH 結合架構及 mDPR-cys(StBu)-PEG₄₈₋₇₂-OH 結合架構

流程7：合成MDpr-Cys(StBu)-PEG₂₋₃₆-OH



流程8：合成MDpr-Cys(StBu)-PEG₄₈₋₇₂-OH



2-氯三苯甲基氯樹脂負載：裝備有多孔聚丙烯盤之聚丙烯注射器負載有2-氯三苯甲基氯樹脂。將Fmoc-PEG_n-OH (1當量)及DIEA (1當量)於無水DCM(每公克樹脂10 mL)中之溶液吸入注射器中。注射器用橡膠塞加蓋且攪拌5 min，此時再添加DIEA(1.5當量)。再振盪30 min之後，將MeOH(每公克樹脂至少0.8 mL)吸入注射器中以淬滅未反應樹脂。在振盪5 min之後，從注射器中吹出溶液且用DMF(6×5 mL)、DCM(6×5 mL)及乙醚(6×5 mL)洗滌樹脂。真空乾燥樹脂。

瑞克醯胺(Rink Amide)樹脂負載：向經Fmoc保護之PEG或胺基酸(4當量)於無水DMF(每公克樹脂10 mL)中之溶液中添加HATU(4當量)及DIEA(8當量)。攪拌溶液5 min且吸入裝備有負載有瑞克醯胺樹脂之多孔聚丙烯盤之聚丙烯注射器中。攪拌反應混合物最少2小時且藉由Kaiser測試確定反應完成程度。用DMF(6×5 mL)、DCM(6×5 mL)及乙醚(6×5 mL)洗滌樹脂且真空乾燥。

脫除Fmoc保護基：用DCM(每公克樹脂10 mL)使裝備有多孔聚丙烯盤之聚丙烯注射器中之Fmoc-PEG_n-2-氯三苯甲基樹脂膨脹30 min。吹出DCM且用DMF(6×5 mL)洗滌樹脂。在攪拌下用20%哌啶於DMF(3×2 min及1×60 min)中之溶液洗滌樹脂。藉由Kaiser測試確定反應完成程度且用DMF(6×5 mL)、DCM(6×5 mL)及乙醚(6×5 mL)洗滌所得脫除Fmoc保護基之樹脂且真空乾燥。

胺基酸偶合：向經Fmoc保護之PEG酸、胺基酸或MDpr(Boc)-OH(3當量)於無水DMF(每公克樹脂10 mL)中之溶液中添加HATU(3當量)及DIEA(6當量)。攪拌溶液5 min且吸入含有脫除Fmoc保護基之胺基酸2-氯三苯甲基-樹脂之聚丙烯注射器中。攪拌反應混合物最少2小時且藉由Kaiser測試確定反應完成程度。用DMF(6×5 mL)、DCM(6×5 mL)及乙醚(6×5 mL)洗滌樹脂且真空乾燥。

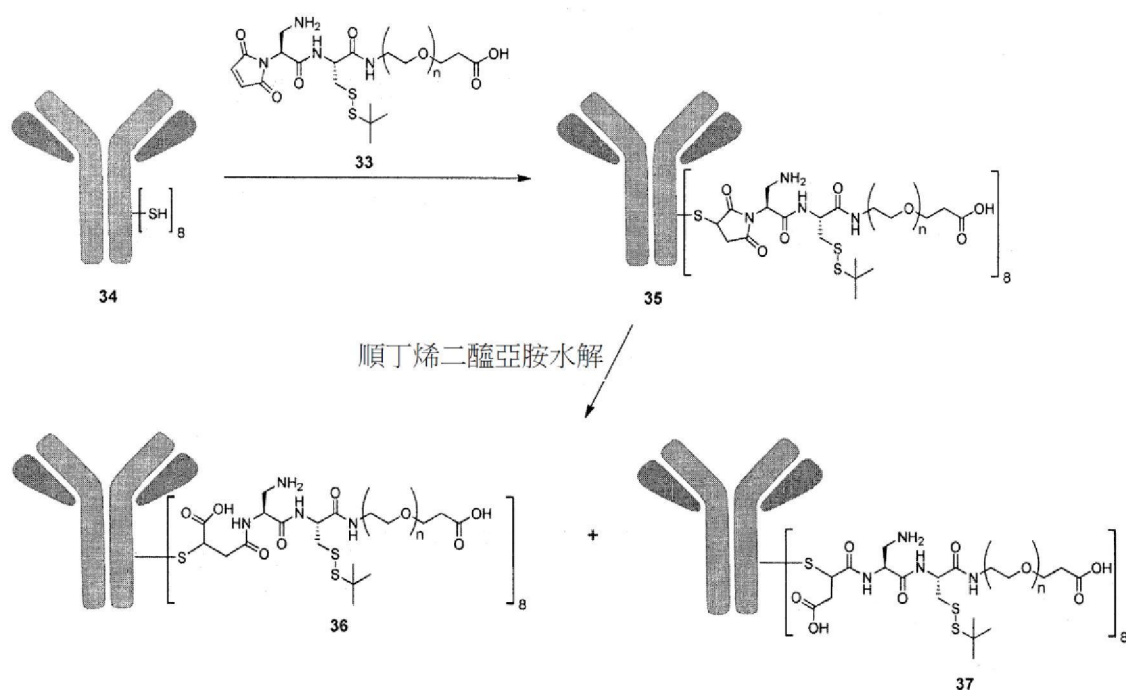
移除IvDde保護基：為移除IvDde保護基，在攪拌下用2%肼於DMF(2×30 min)中之溶液洗滌樹脂。藉由Kaiser測試確定反應完成程度且用DMF(6×5 mL)、DCM(6×5 mL)及乙醚(6×5 mL)洗滌所得脫除IvDde保護基之樹脂且真空乾燥。

肽-樹脂裂解：藉由用含TFA之DCM(對於2-氯三苯甲基樹脂，

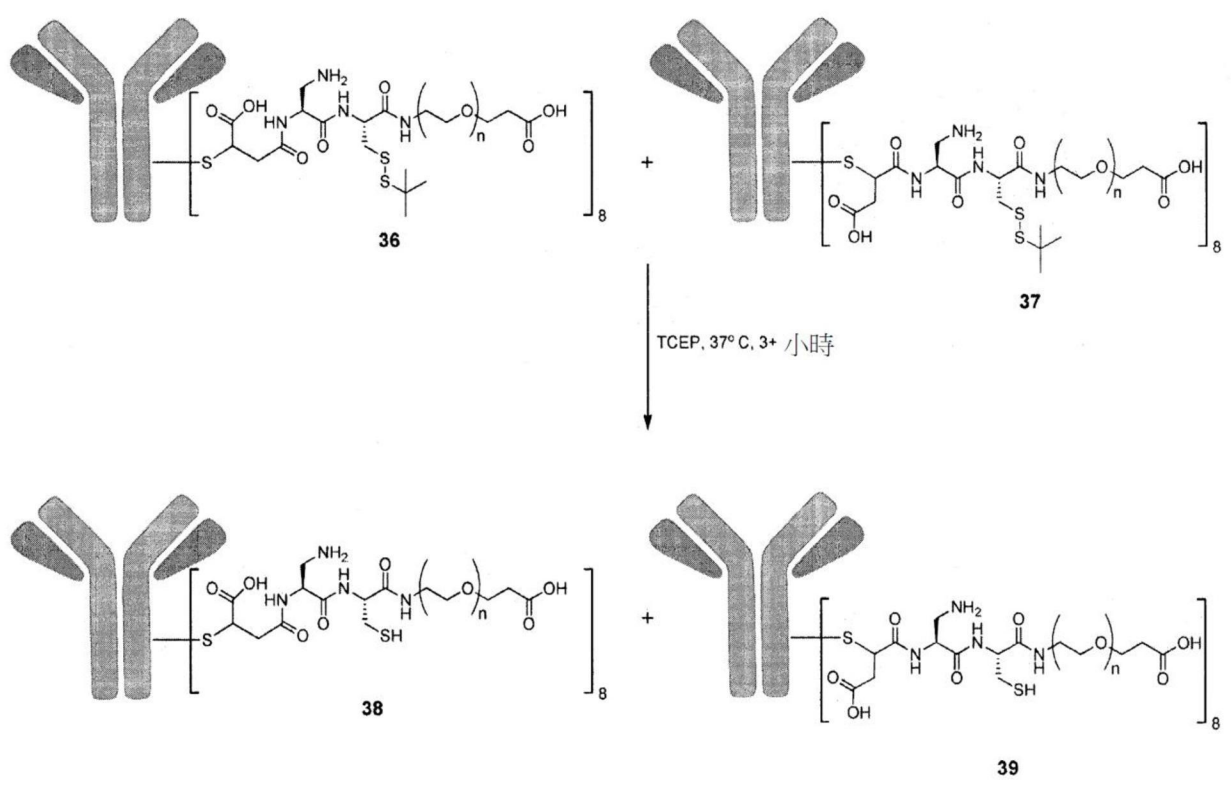
30%v/v，或對於瑞克鹽胺樹脂，95%v/v)處理15 min由樹脂裂解出最終肽。在裂解之後，使溶液靜置60 min以確保Boc保護基自MDpr殘基完全移除。在氮氣流下蒸發所得溶液且藉由LC-MS分析所得肽。肽以粗物質形式使用或藉由製備型逆相HPLC隨後LC-MS分析來純化。

實例11：聚乙二醇化結合架構結合至抗體及藥物連接子。

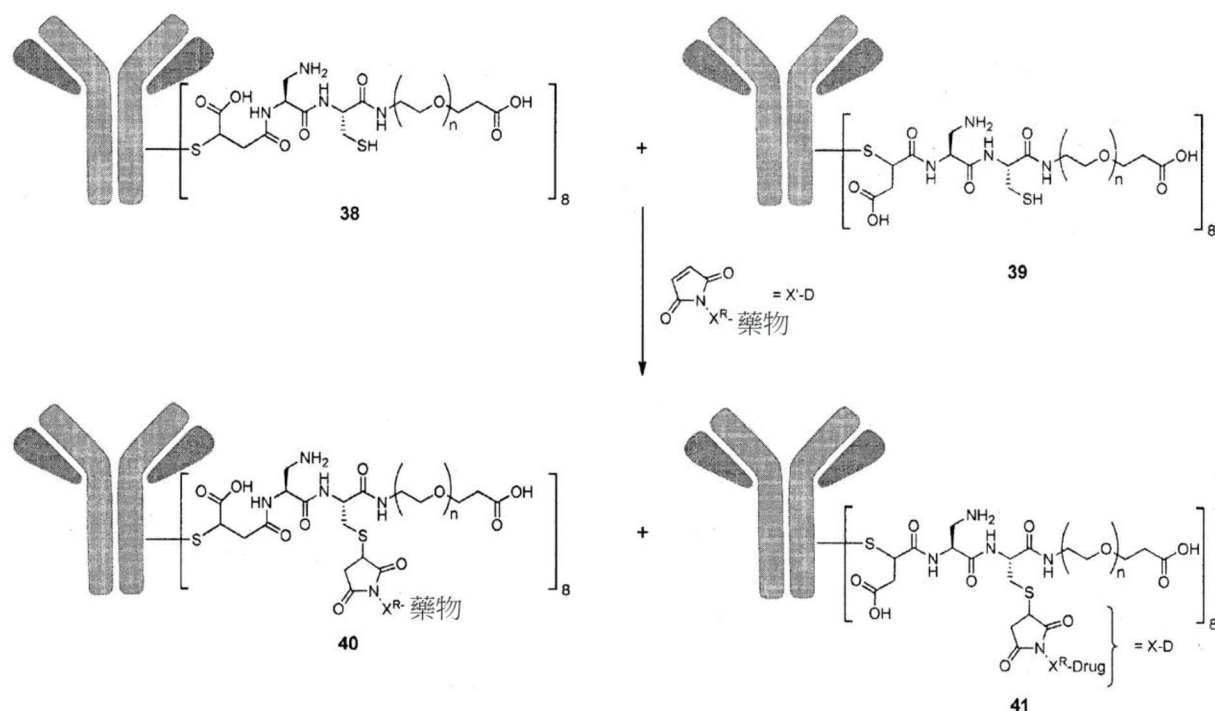
流程9：聚乙二醇化架構結合至完全還原之抗體鏈間二硫鍵



流程10：聚乙二醇化結合架構脫除保護基



流程11：藥物結合至聚乙二醇化架構



其中 X^R 為 X' -D部分體中之可釋放組合單元前驅體 X' 之其餘部分體或- X -D部分體中之可釋放組合單元 X 之其餘部分。

完全還原抗體鏈間二硫鍵：向濃度為約10 mg/mL之抗體於含有二伸乙三胺五乙酸之PBS(1 mM)中且用額外磷酸鉀(100 mM, pH 7.4)緩衝之溶液中添加12當量參(2-羧基乙基)-膦(TCEP)。使溶液渦旋且在37°C下培育1小時。藉由逆相層析確定鏈間二硫鍵完全還原。若還原不完全則再添加TCEP。在還原之後，經由30 kDa MWCO濾膜藉由3輪稀釋及4,000 × g下之離心將抗體溶液去鹽至含有2 mM EDTA之PBS中。所得完全還原之抗體(34)經由無菌0.22 μm離心濾膜過濾且立即使用或儲存於-80°C下。

結合含有順丁烯二醯亞胺之聚乙二醇化架構：向濃度為約10 mg/mL之完全還原抗體(34)於含有EDTA之PBS(2 mM)中且用額外磷酸鉀(100

mM, pH 7.4)緩衝之溶液中添加12莫耳當量來自5-20 mM DMSO儲備溶液之MDpr-PEG_n-OH。在室溫下靜置所得溶液30 min。藉由逆相層析確定完全結合。若結合不完全,則再添加PEG試劑。在結合之後,經由30 kDa MWCO濾膜藉由3輪稀釋及4,000 × g下之離心使抗體溶液去鹽至PBS中。所得聚乙二醇化抗體溶液(36及37)經由無菌0.22 μm離心濾膜過濾且立即使用或儲存於-80℃下。

自聚乙二醇化結合架構移除第三丁基巰基保護基：向濃度為約10 mg/mL之聚乙二醇化抗體(36及37)於含有二伸乙三胺五乙酸之PBS(1 mM)中且用額外磷酸鉀(100 mM, pH 7.4)緩衝之溶液中添加20至30當量TCEP。使溶液渦旋且在37℃下培育3小時。藉由逆相層析確定第三丁基巰基保護基完全移除。若還原不完全,則再添加TCEP且繼續在37℃下培育。在還原之後,經由30 kDa MWCO濾膜藉由3輪稀釋及4,000 × g下之離心將抗體溶液去鹽至含有2 mM EDTA之PBS中。經由無菌0.22 μm離心濾膜過濾所得脫除保護基之聚乙二醇化抗體溶液(38及39)且立即使用或儲存於-80℃下。

結合含有順丁烯二醯亞胺之藥物連接子：向濃度為約10 mg/mL之脫除保護基之聚乙二醇化抗體(38及39)於含有EDTA之PBS(2 mM)中且用額外磷酸鉀(100 mM, pH 7.4)緩衝之溶液中添加12莫耳當量來自5-20 mM DMSO儲備溶液之含有順丁烯二醯亞胺之藥物連接子。在室溫下靜置所得溶液30 min。藉由逆相層析確定完全結合。若結合不完全,則再添加藥物連接子。在結合之後,經由30 kDa MWCO濾膜藉由3輪稀釋及4,000 × g下之離心使抗體溶液去鹽至PBS中。所得聚乙二醇化抗體-藥物結合物溶液(40及41)經由無菌0.22 μm離心濾膜過濾,藉由尺寸排外層析法(SEC)

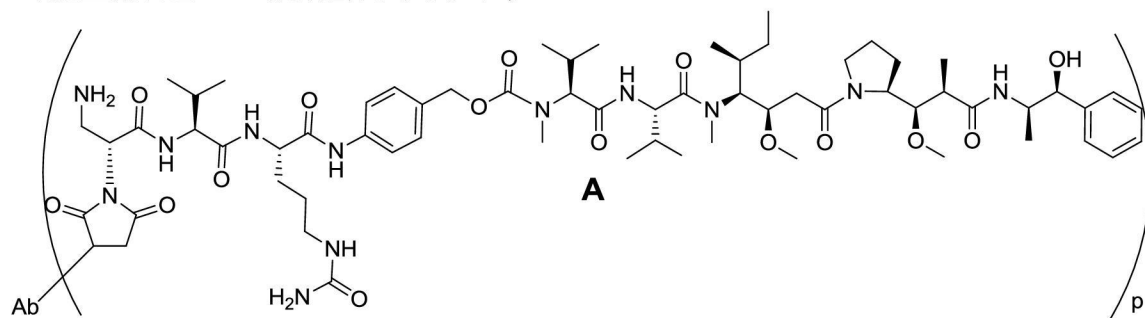
分析且儲存-80°C下。

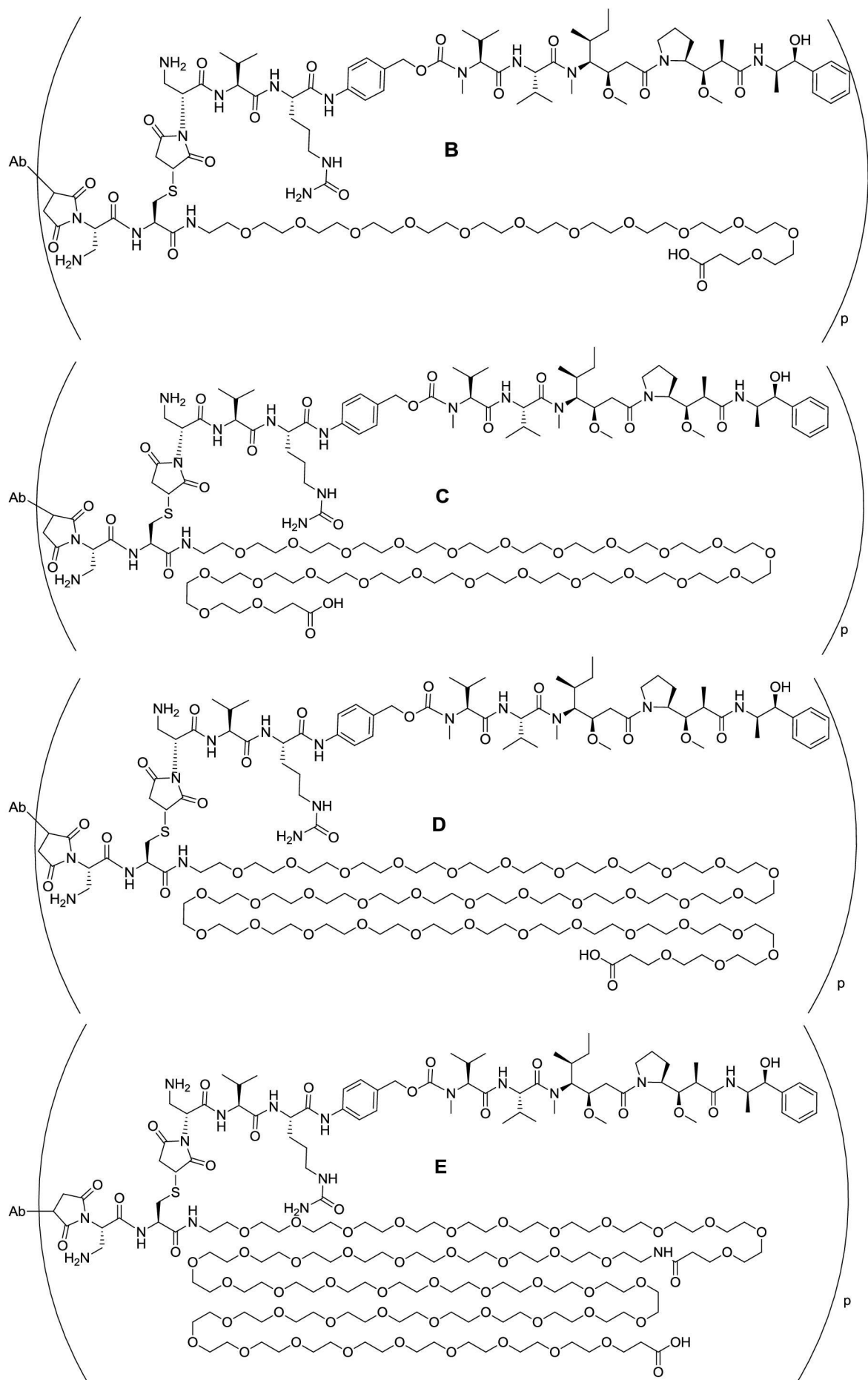
實例12：包含平行取向之PEG之ADC展示低凝集程度

結合物之SEC分析：用PBS將抗體、ADC或聚乙二醇化ADC樣品(50 μ g)稀釋成1 mg/mL且經分析型SEC管柱(TOSOH TSKgel G3000SW_{XL}, 7.8 mm ID×30 cm, 5 μ m)經Waters 2695 HPLC系統層析30 μ L注射劑。用92.5% 25mM磷酸鈉(pH 6.8)、350 mM NaCl及7.5%異丙醇以1 mL/min之流動速率等度溶離樣品。

為檢查PEG長度對ADC凝集之影響，在有或無使用不同尺寸之PEG單元組合之聚乙二醇化共軛架構之情況下，製備每抗體8單位藥物之cAC10-MDpr-vcMMAE ADC。SEC結果示於圖8中。在不包括聚乙二醇化結合架構(cAC10-A)之情況下，ADC凝集為10.4%。添加聚乙二醇化架構會產生凝集程度較低之ADC。隨著PEG長度增至PEG₃₆(cAC10-D)凝集降低，其中凝集峰值為總信號之2.0%。在cAC10-MDpr-vcMMAE之情況下，比PEG₃₆長之PEG單元(cAC10-D至cAC10-G)並不會進一步降低凝集。

SEC研究中包括之藥物連接子之結構：ADC經由鏈間巯基結合至抗體。經抗體取代之丁二醯亞胺可以其水解形成存在(亦即橫跨一個而非兩個丁二醯亞胺之C-N鍵加成水分子)。





實例13：包含平行取向之PEG之ADC呈現與其非聚乙二醇化對應物類似之活體外活性

由聚乙二醇化結合架構製備之ADC之活體外細胞毒性

在添加及不添加聚乙二醇化結合架構之情況下製備指向CD30之基於MDpr-vcMMAE之ADC。針對CD30陽性細胞株、Karpas 299及L540cy測試化合物A(非聚乙二醇化)、B(PEG₁₂)、C(PEG₂₄)及D(PEG₃₆)之結合物。包含PEG及PEG長度增加使活體外細胞毒性之差異可忽略(表3)。在此分析中用正以及胺基順丁烯二醯亞胺(NAEM)替代MDpr-vcMMAE(cAC10-H、cAC10-I及cAC10-J)製備之對照ADC(非聚乙二醇化及聚乙二醇化)展示無活性，表明聚乙二醇化架構並不會促進活體外細胞毒性。

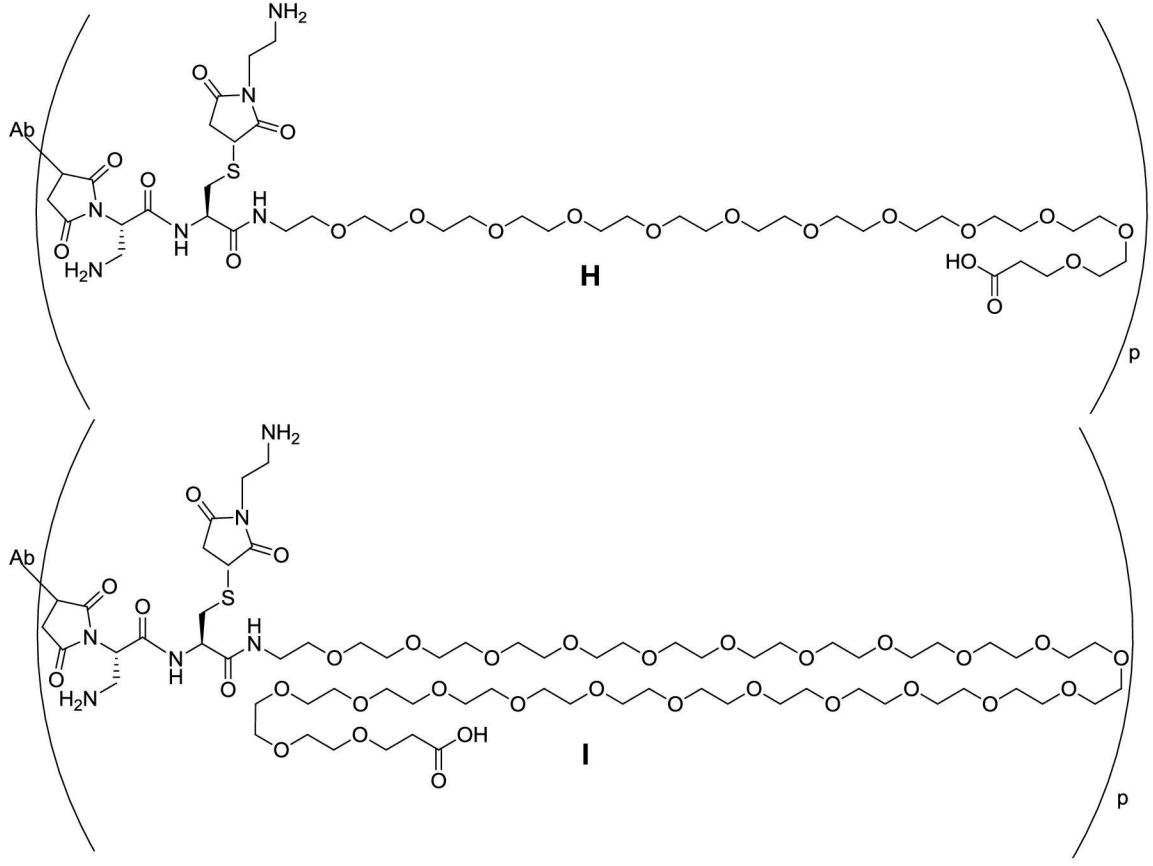
表3由聚乙二醇化結合架構製備之抗CD30 ADC之活體外細胞毒活性；值表示IC₅₀，以ng/mL計。

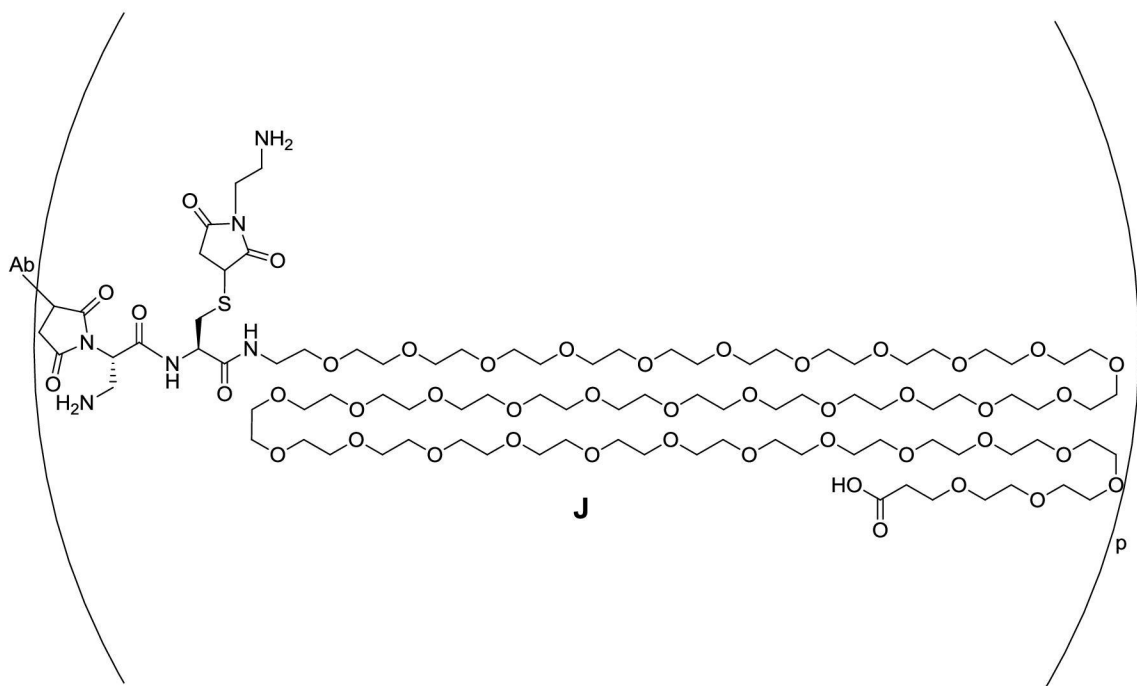
ADC	藥物/Ab	CD30+細胞株	
		Karpas 299	L540cy
cAC10-A	8	1.7	5.6
cAC10-B	8	2.2	5
cAC10-C	8	4.2	5.5
cAC10-D	8	4.3	4
cAC10-NAEM	8	無影響	無影響
cAC10-H	8	無影響	無影響
cAC10-I	8	無影響	無影響
cAC10-J	8	無影響	無影響

當與4單位藥物負載之非聚乙二醇化結合物cAC10-A相比時，針對Karpas 299及L540cy，8單位藥物負載之cAC10-A具有2至4倍活體外細胞毒性；然而，在活體內異種移植模型中，由於8單位負載之ADC之較快清除率，8單位負載之ADC的表現不會優於4單位負載之ADC(參見實例14)。

在異種移植模型中，相比於對應8單位負載之非聚乙二醇化ADC(cAC10-1)及8單位負載之具有串聯取向之PEG₂₄單元之ADC(cAC10-4)(其中後者由實例1之連接子藥物中間物製備)，由實例2之連接子藥物中間物製備且具有與藥物平行取向之PEG₂₄(藥物/Ab為8)單元之具有mc-PABA(gluc)-MMAE之-X-D的PEG 24 cAC10結合物cAC10-10亦具有較大活性(參見圖1及圖2)。

NAEM封端結合架構用作對照：ADC經由鏈間巰基結合至抗體。經抗體取代之丁二醯亞胺可以其水解形成存在(亦即橫跨一個而非兩個丁二醯亞胺之C-N鍵加成水分子)。

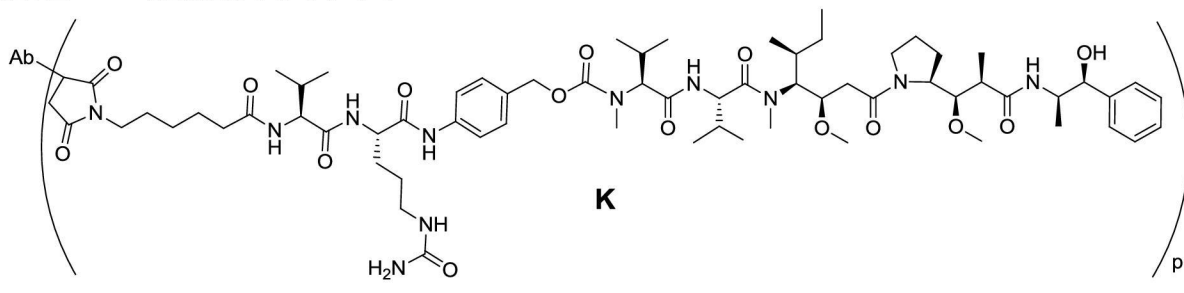


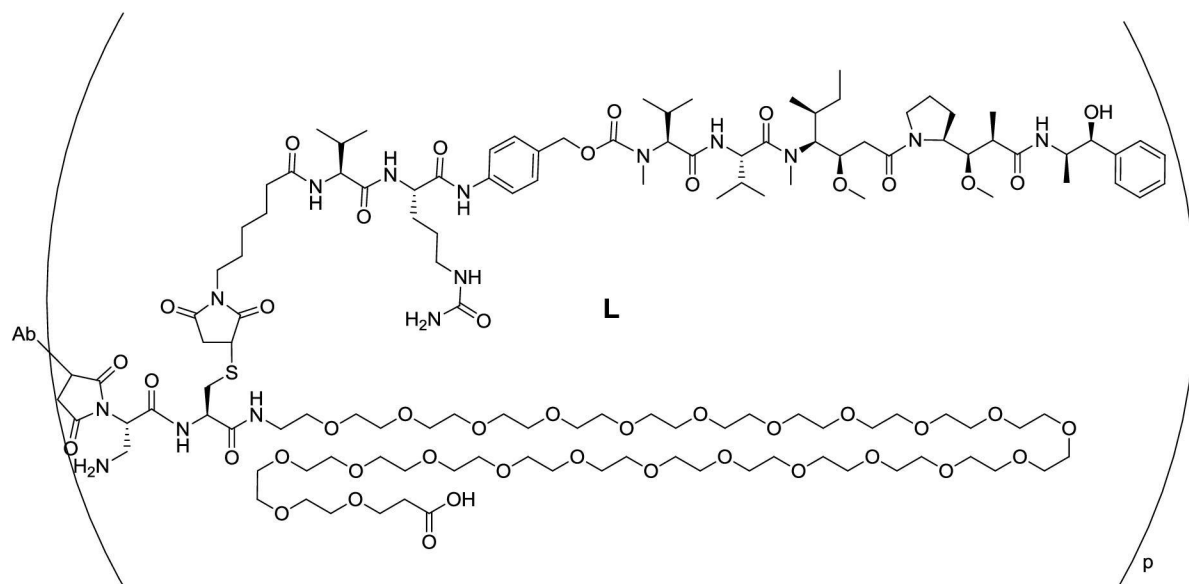


實例14：與不包含PEG之ADC相比包含平行取向之PEG之ADC會改良藥物動力學

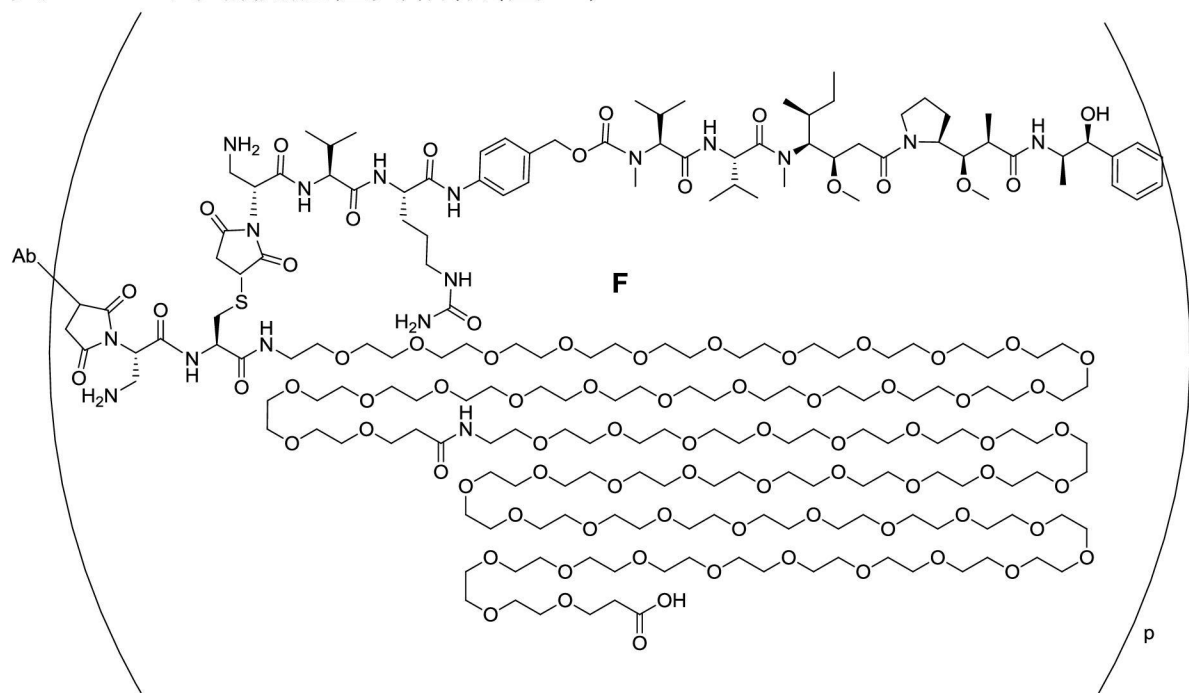
小鼠給藥3 mg/kg之單次靜脈內劑量之以8單位藥物/mAb負載之各ADC。正如預期，與由NAEM製備之對照結合物相比，由mc至vcMMAE(**K**)或MDpr-vcMMAE(**A**)製備之非聚乙二醇化ADC將更為快速地自循環中清除。對應聚乙二醇化ADC **C**及**L**展示改良之PK，亦即較慢清除率(圖9)。

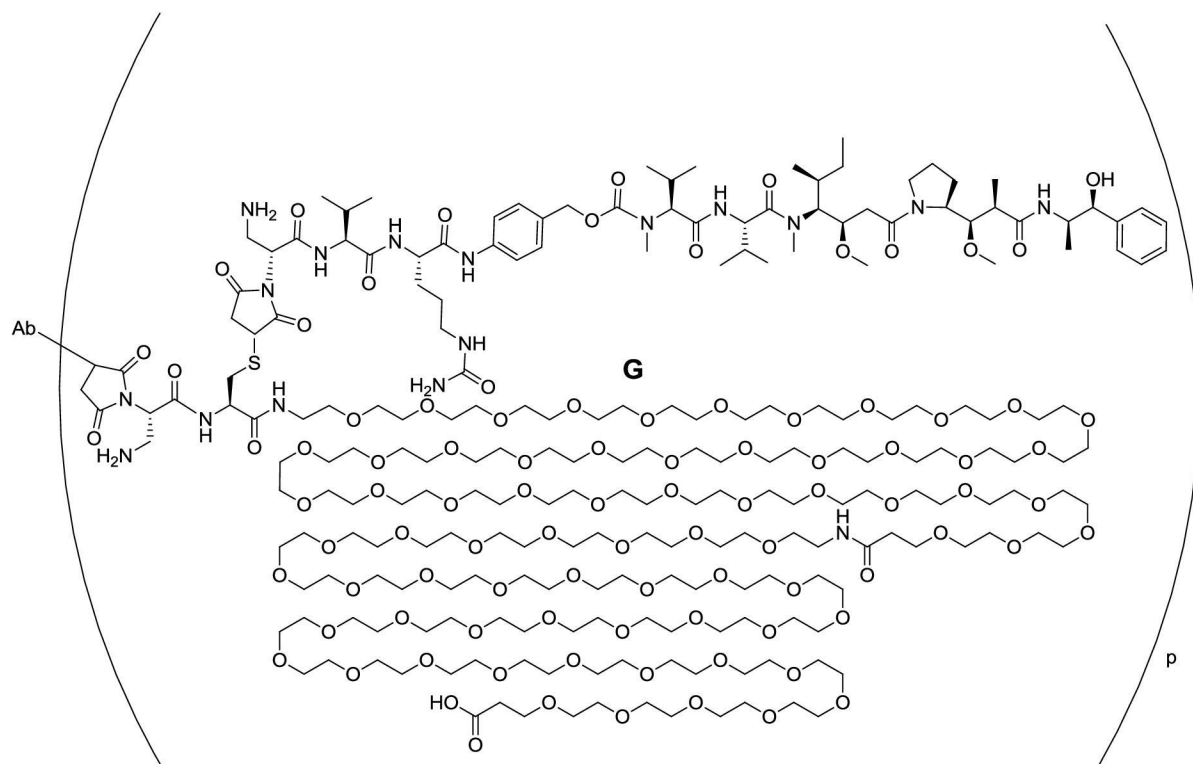
包括於小鼠中之額外化合物**PK** - ADC經由鏈間巯基結合至抗體。經抗體取代之丁二醯亞胺可以其水解形成存在(亦即橫跨一個而非兩個丁二醯亞胺之C-N鍵加成成水分子)。





在第二實驗中，小鼠給藥3 mg/kg之單次靜脈內劑量之以8單位藥物/mAb裝載之各ADC。如上(圖9)，由非聚乙二醇化MDpr-vcMMAE **A**製備之ADC展示自循環之清除率加速(圖10)。由聚乙二醇化結合架構**B**、**C**及**D**製備之三種ADC展示改良之清除率(圖10)。在此分析中，由不同PEG長度PEG₁₂(**B**)、PEG₂₄(**C**)及PEG₃₆(**D**)製備之ADC展示可忽略之彼此差異。如所預期，由NAEM封端聚乙二醇化架構(**H**、**I**及**J**)製備之對照結合物展示PK與NAEM封端抗體極其相似(圖10)。





實例15：與不包含PEG之ADC相比包含平行取向之PEG之ADC會改良藥物動力學

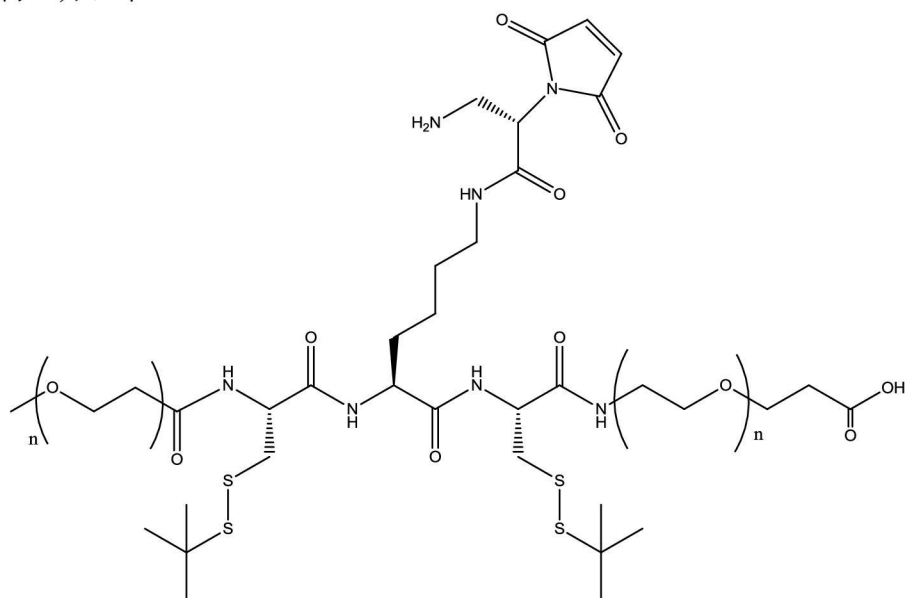
在L540cy異種移植模型中分析由**(B、C及D)**及在無**(A)**聚乙二醇化結合架構下製備之基於cAC10之ADC。動物給藥以2 mg/kg(單次劑量)各ADC且隨時間推移量測腫瘤體積。在研究之第25天未處理動物中之腫瘤體積達到1,000 mm³。由非聚乙二醇化藥物連接子**(A)**製備之ADC治癒5隻小鼠中之2隻，在未治癒動物中腫瘤體積達到1,000 mm³之平均時間為57.3天(圖11)。由與PEG₁₂**(B)**組合之聚乙二醇化結合架構製備之ADC展示與由**A**製備之ADC類似之活性(圖12)。在此情況下，5隻動物中之1隻治癒且在未治癒動物中腫瘤體積達到1,000 mm³所需之平均時間為68.5天。由含有PEG₂₄之架構**(C)**製備之ADC展示優於**A**之改良，治癒5隻小鼠中之4隻，其中剩餘之1隻的腫瘤在第53天達到1,000 mm³(圖13)。

在第二實驗中，靶向乳癌抗原LIV-1之基於hLIV22之ADC(hLIV22抗體描述於PCT公開案第WO 2012/078688號中，其以全文引用的方式併

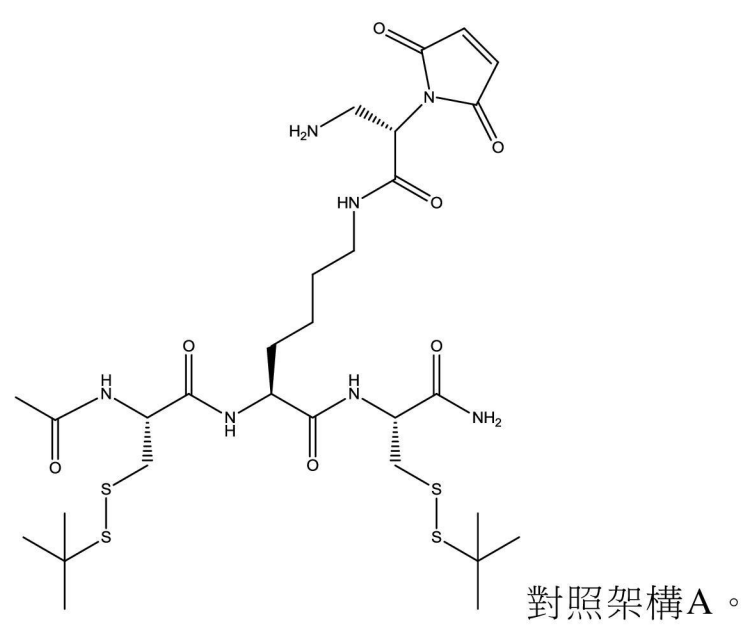
入本文中)由有(L)及無具有PEG₂₄之結合架構(K)之mc-vcMMAE來製備。動物給藥以3 mg/kg(單次劑量)之各ADC。在研究之未處理隊組中，腫瘤體積達到1,000 mm³之平均時間為39.2天。用hLIV22-K處理會使此時間延遲至57.6天且聚乙二醇化ADC hLIV22-L使此平均值進一步移動至71.4天(圖14)。

實例16：包含平行取向之PEG及每抗體16單位藥物之ADC展示與不包含PEG之ADC相比較少之凝集

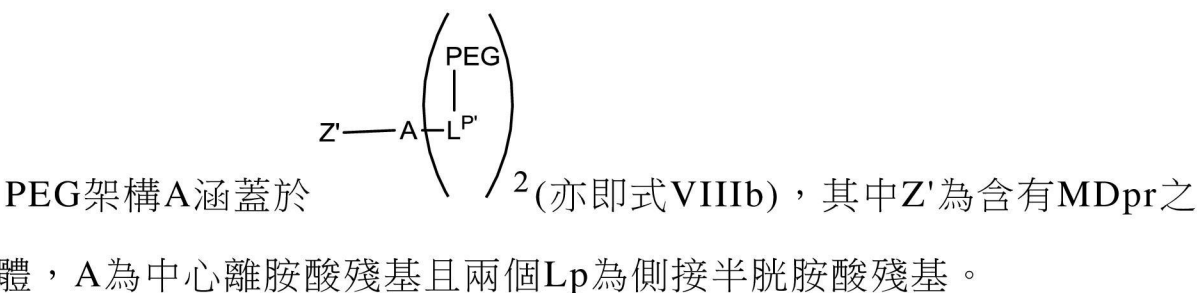
為檢查PEG對16單位負載之ADC之凝集的影響，使用MDpr-葡萄糖醛酸苷-喜樹鹼作為-X-D單元製備抗運鐵蛋白受體結合物。製備含有或不含PEG單元之呈標準8單位負載(每抗體8單位藥物)或16單位負載(每抗體16單位藥物)之ADC。經由鏈間二硫鍵結合。用於製備16單位載藥量之ADC的聚乙二醇化及對照非聚乙二醇化結合架構(分別為PEG架構A及對照架構A)如下：



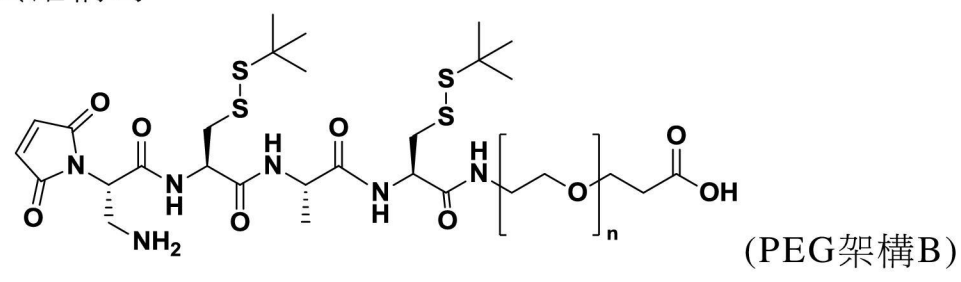
PEG 架構A



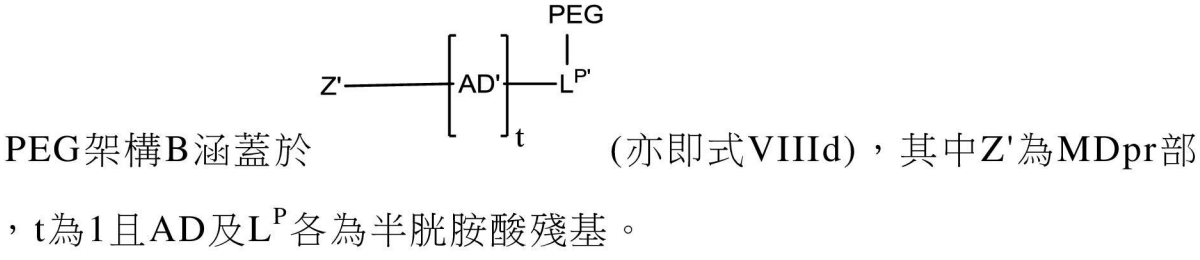
抗體藥物結合物由表示例示性配體中間化合物之PEG架構A(n=23)及如實例11中所述之對照架構A如下來製備：藉由(a)使架構與具有能夠結合加成至架構之順丁烯二醯亞胺單元中巯基之抗體接觸以形成經抗體取代之丁二醯亞胺部分體，(b)移除巯基保護基，及(c)使所得產物與-X-D部分體接觸，其中X為包含順丁烯二醯亞胺單元及可裂解單元之可釋放組合單元，其中X-D順丁烯二醯亞胺單元能夠在適合使X-D之順丁烯二醯亞胺單元轉化成額外經取代之丁二醯亞胺部分之條件下藉由結合加成與獲自步驟(b)之游離巯基反應，同時避免使衍生自架構及X-D部分體之丁二醯亞胺部分過早水解，及(d)對於自MDpr部分引入之作為順丁烯二醯亞胺單元之各丁二醯亞胺部分體，藉由橫跨一個而非兩個丁二醯亞胺之C-N鍵加成水分子使獲自步驟(c)之連接子藥物化合物之集體經取代之丁二醯亞胺水解。



為16單位藥物負載之結合物所提供之另一經適當保護之架構為PEG
架構B，其結構為



其中n為36。



不包含聚乙二醇化結合架構之情況下，16單位負載ADC之凝集程度
為22%。添加具有與藥物單元平行取向之PEG單元的聚乙二醇化架構會使
凝集程度降低至8單位負載之凝集程度，亦即2%凝集。

針對一組TfR⁺癌細胞株測試8單位負載及聚乙二醇化16單位負載之具
有MDpr-PABA(gluc)-喜樹鹼之-X-D的抗運鐵蛋白受體ADC(cOKT9)。在
大多數情況下，使藥物負載加倍會使ADC效能增加約2倍。在若干情況
下，ADC效能增加3-10倍或更高，即使藥物負載僅增加2倍。最值得注意的是，
16單位負載之結合物對結腸直腸細胞株HT-29(TfR複本數23K)及
黑素瘤細胞株SK-MEL-5(TfR複本數21K)具有活性，而8單位負載結合物
視為惰性的(IC₅₀>1 μM)。

**實例17：以每抗體4單位藥物負載之具有平行取向之PEG24的ADC呈現相
對於其非聚乙二醇化對應物活體內活性降低**

當ADC藥物負載降至每抗體4單位藥物時，發現帶有聚乙二醇化葡萄
糖醛酸苷-MMAE連接子10之結合物具有與暴露於帶有連接子1之非聚乙

二醇化結合物類似之PK。相應地，聚乙二醇化不會使活體內異種移植模型之活性增強。

抗CD30嵌合抗體cAC10與非聚乙二醇化連接子**1**或聚乙二醇化連接子**10**以每抗體4單位藥物之平均負載結合，且在L540cy霍奇金淋巴瘤及Karpas 299多形性大細胞淋巴瘤腫瘤模型中進行評價。對於L540cy(圖13)，向動物投與0.5及1 mg/kg之單次腹膜內劑量之ADC。在1 mg/kg之較高劑量下，聚乙二醇化(cAC10-**10**)及非聚乙二醇化(cAC10-**1**)為等效的，提供5/6小鼠之治癒。然而，在0.5 mg/kg之較低劑量下，非聚乙二醇化連接子(cAC10-**1**)提供較長平均腫瘤生長延緩及2/6小鼠治癒。然而，聚乙二醇化連接子(cAC10-**10**)有效性較差，並無小鼠被治癒。在Karpas299異種移植模型中獲得類似結果(圖16)。

此等研究結果表明在不存在結合物PK增強之情況下，24個PEG單元之聚乙二醇化導致活體內活性微小衰減。此情況了歸因於因聚乙二醇化時結合物尺寸增加而導致之酶促藥物釋放減弱或滲透性降低。

實例18： 負載有聚乙二醇化葡萄糖醛酸苷藥物連接子之ADC呈現與結合物PK特性一致之活體內活性

為測定葡萄糖醛酸苷及MMAE組合是否存在最佳PEG尺寸，製備一系列PEG_x連接子並在整個非聚乙二醇化、PEG2、PEG4、PEG8、PEG12、PEG24及分支鏈PEG4-(PEG4)₃上進行評估。分別表4及5之非聚乙二醇化ADC cAC10-**14**及hBU12-**14**之結構類似於聚乙二醇化ACD，但缺乏L^P單元，其在聚乙二醇化架構之情況下為離胺酸殘基。

初始活體外研究表明PEG尺寸對大多數所測試細胞株之活性之影響最小。抗CD30及抗CD19抗體，即分別cAC10及hBU12以8單位藥物/抗體

結合且針對一組淋巴瘤細胞株進行評估。如表4中所示，與PEG尺寸無關，CD30陽性L540cy及L428霍奇金淋巴瘤細胞株及Karpas 299多形性大細胞淋巴瘤對所有cAC10結合物均具有高敏感性。

表4.活體外細胞毒性-αCD30結合物(IC₅₀(以ng/mL計))

ADC ^a	PEGx	CD30+細胞株			CD30-
		Karpas 299	L540cy	L428	RL
cAC10-14	no PEG	0.3	3	85	>1000
cAC10-43	PEG2	0.3	2	10	>1000
cAC10-42	PEG4	0.4	3	16	>1000
cAC10-18	PEG8	0.3	2	18	>1000
cAC10-17	PEG12	0.3	2	19	>1000
cAC10-16	PEG24	0.4	3	8	>1000
cAC10-19	PEG4-(PEG4)3	0.1	1	8	>1000

^aADC以8單位藥物/Ab負載

如表5中所示，對於一組非霍奇金淋巴瘤細胞株，帶有PEGx-葡萄糖醛酸苷-MMAE連接子之hBU12(抗CD19)結合物之活性的可變性較大。PEG尺寸對拉莫斯伯基特氏淋巴瘤之ADC效能無影響。然而，結合物效能呈現隨彌漫性大B細胞淋巴瘤細胞株SU-DHL-4、WSU-DLCL-2及RL中之PEG尺寸而改變。如IC₅₀所量測，似乎PEG尺寸與活性之間並無相關性。然而，劑量反應曲線之更為仔細之檢查揭示尺寸與最大生長抑制之間明顯反相相關。此等數據展示於圖17中。

表5.活體外細胞毒性-αCD19結合物(IC₅₀(以ng/mL計))

ADC ^a	PEGx	CD19+細胞株				CD19-
		Ramos	SU-DHL-4	WSU-DLCL-2	RL	L540cy
hBU12-14	無PEG	2	22	5	61	>1000
hBU12-43	PEG2	2	>1000	12	229	>1000
hBU12-42	PEG4	3	>1000	5	>1000	>1000
hBU12-18	PEG8	2	16	211	>1000	>1000
hBU12-17	PEG12	2	>1000	129	>1000	>1000
hBU12-16	PEG24	4	>1000	3	>1000	>1000
hBU12-19	PEG4-(PEG4)3	2	>1000	247	>1000	>1000

^aADC以8單位藥物/Ab負載

如上所述評估整個PEGx系列上之結合物之藥物動力學特性。向大鼠

投與 1 mg/kg 之單次靜脈內劑量之以 8 單位藥物/Ab 負載之帶有 MDpr-PEG_x-葡萄糖醛酸苷-MMAE 連接子之包含非結合人類化 IgG(h00) 之結合物。在多個時間點採集血漿樣品且如上定量總循環抗體。如圖 16 中所示，抗體清除率展示與 PEG 尺寸直接相關。具有 PEG8、PEG12 及 PEG24 之聚乙二醇化結合物展示接近裸抗體之清除率特性；然而，較短之 PEG 及非聚乙二醇化對應物自循環清除較為快速。

活體內在異種移植模型中評估 PEG_x 連接子。在 CD19 陽性 RL 彌漫性大 B 細胞淋巴瘤模型及 CD30 陽性 L540cy 霍奇金淋巴瘤模型中進行研究。一旦平均腫瘤體積達到 100 mm³，以 1 及 3 mg/kg 腹膜內給藥整個無 PEG、有 PEG4、PEG8、PEG12 及 PEG24 之連接子上之抗 CD19(hBU12) 結合物一次；RL 模型之結果展示於圖 17 中。在 1 mg/kg 下，所有組僅適度腫瘤生長延緩且並未觀測到 PEG 尺寸與活性之間的顯著相關。在 3 mg/kg 之較高劑量下，不帶有 PEG 及帶有 PEG4 之結合物均實現腫瘤生長延緩，在約第 35 天腫瘤才長得過大。相比而言，連接子帶有 PEG8、PEG12 及 PEG24 之結合物在 3 mg/kg 下實現完全緩解，在 PEG24 組中 1/5 小鼠經歷腫瘤再生長。相對於 PEG4 及非聚乙二醇化對應物，較高劑量 PEG8、PEG12 及 PEG24 下活性增強型與圖 18 中之 PK 觀察結果一致。

實例 19：MMAE 之瘤內遞送與結合物之 PK 特性相關

向帶有約 200 mm³ 之 CD30 陽性 L540cy 霍奇金淋巴瘤腫瘤之小鼠投與 1 mg/kg 之單次劑量之以 8 單位藥物/Ab 負載 mc-葡萄糖醛酸苷-MMAE(連接子 1)、mc-Lys(PEG24)葡萄糖醛酸苷-MMAE(連接子 10)、順丁烯二醯亞胺基-PEG24-葡萄糖醛酸苷-MMAE(連接子 4) 或 MDpr-Lys(PEG24)-葡萄糖醛酸苷-MMAE(連接子 16) 之 cAC10 結合物。給藥後 3 天收集腫瘤且藉

由質譜評估瘤內濃度。如圖20中所示，與結合物PK一致，相對於非聚乙二醇化結合物(cAC10-1)，具有平行組態之PEG24(連接子10及16)之ADC向腫瘤遞送顯著較高之MMAE。此外，與其對應物(cAC10-10)相比，順丁烯二醯亞胺與葡萄糖醛酸苷之間含有串聯之PEG24作為延伸子之結合物(cAC10-4)遞送1/4 MMAE。最後，優於含有順丁烯二醯亞胺基己醯基之對應物(cAC10-10)，併入mDPR順丁烯二醯亞胺(cAC10-16)進一步增加MMAE之遞送。

實例20：以每抗體8單位藥物負載維持親本抗體PK之聚乙二醇化連接子之ADC相對於其較短PEG及非聚乙二醇化對應物活體內耐受較佳

在第0天向Balb/c小鼠(n=3)投與50 mg/kg之單次腹膜內劑量之結合物。每天觀測小鼠之外部發病病徵且量測體重；若動物之體重減少20%以上或發現其瀕死，則使其安樂死。在圖21中，將相對於第0天之體重變化根據時間繪圖。在將至少一隻動物處死時停止對各組進行繪圖。向小鼠投與無PEG(IgG-14及IgG-44)、有PEG2(IgG-43)及PEG4(IgG-42)之結合物展示顯著體重減輕或外部毒性病徵並在第5天與第7天之間實施安樂死。相比而言，接受帶有PEG8(IgG-18)、PEG12(IgG-17)及PEG24(IgG-16)之結合物之小鼠展示最小體重減輕且並無外部瀕死病徵。此等數據以及圖18中之PK概況表明PK暴露降低之結合物產生較大之急性毒性。

實例21：使PEG長度最長

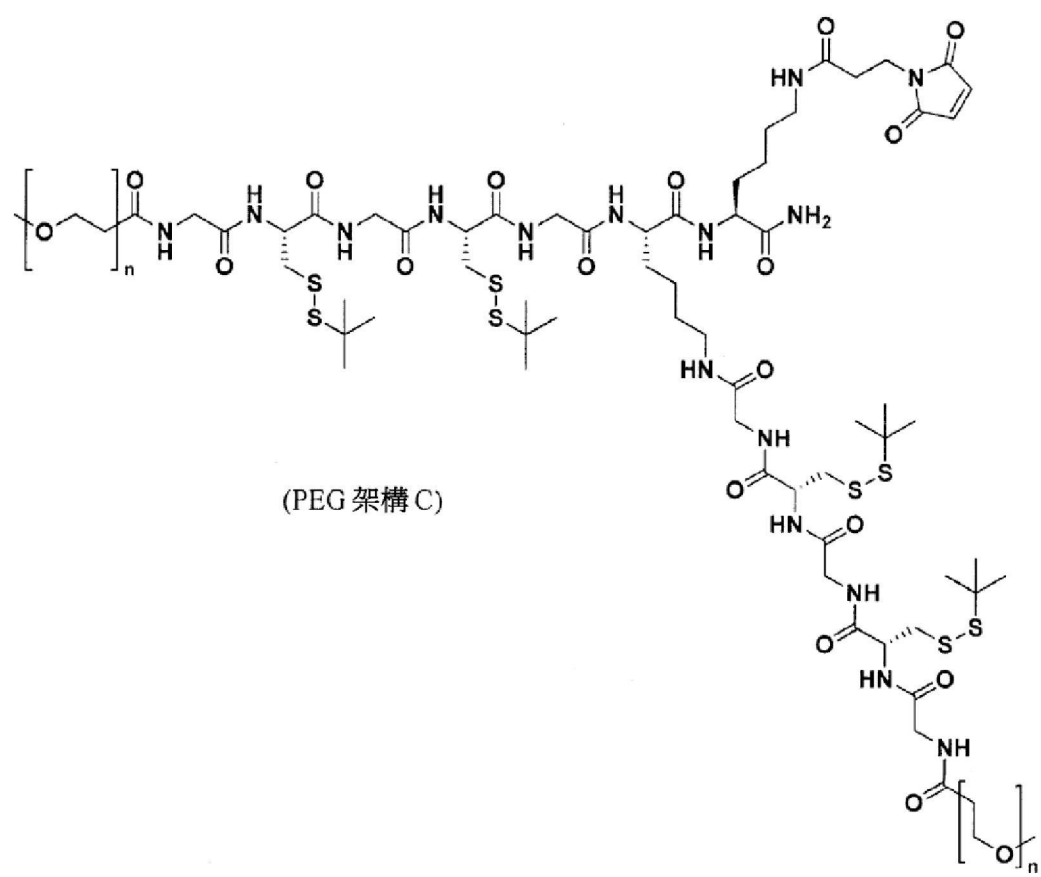
藥物連接子上PEG鏈之長度增加時，結合物之總尺寸及流體動力學半徑亦將增加。此情況示於圖22中，其展示由分別具有8、12及24個PEG單元之藥物連接子18、17及16製備之ADC之分析型尺寸排阻層析痕跡。根據第一原理，ADC之表觀尺寸增加時，可預期其在活體內系統中之擴

散率會降低。此情況可具有減小ADC可穿透至實體腫瘤中之速率或程度之不良作用。在血漿藥物動力學中藉由將數據與二室模型擬合亦可觀測到此擴散率降低，該數據包括分佈及消除階段之速率項。收集由藥物連接子18、17及16(分別具有8、12及24個PEG單元)製備之ADC之藥物動力學數據21天且擬合至二室模型，兩種方法(分佈及消除)之半衰期示於圖23中。

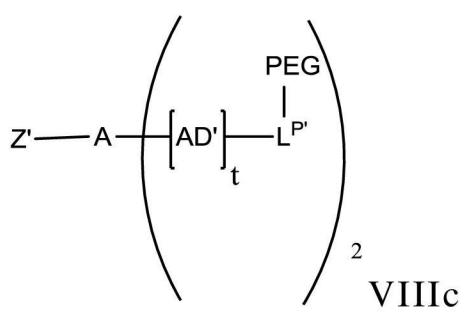
自此等數據中明顯的是，PEG鏈由8個增至12個單元致使血漿消除減緩($t_{1/2}$ 增加約2天)，但PEG由12個加倍至24個單元額外PK改良極小。相反，分佈 $t_{1/2}$ 以幾乎線性方式增至超過此範圍，因此PEG鏈由12個加倍至24個單元使分佈至組織室中之半數時間幾乎加倍。此等數據表明對於此藥物連接子12個PEG單元可為最佳長度，因為較大PEG具有減小分佈速率之作用而不會顯著影響消除速率。此實例展示可使用PK數據以選擇任何特定藥物連接子之最佳PEG尺寸的方式。

實例22：製備多重聚乙二醇化架構

流程12至14描繪使用提供4及8個藥物單元/抗體之聚乙二醇化架構所述之肽偶合方法合成多重聚乙二醇化架構A及B，其提供具有16個藥物單元/抗體之ADC的，及多重聚乙二醇化架構C，其結構緊隨之後。

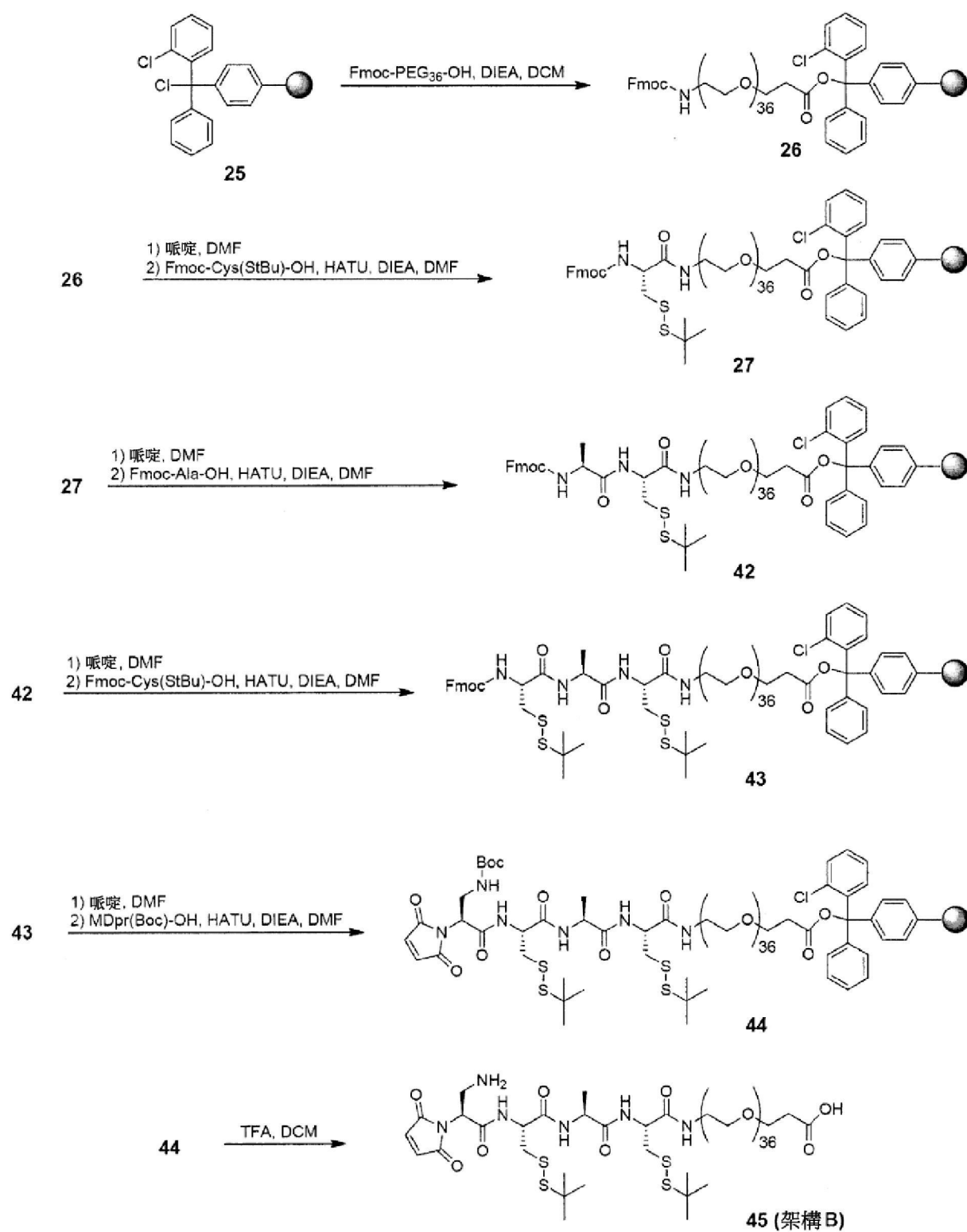


PEG 架構C涵蓋於結構



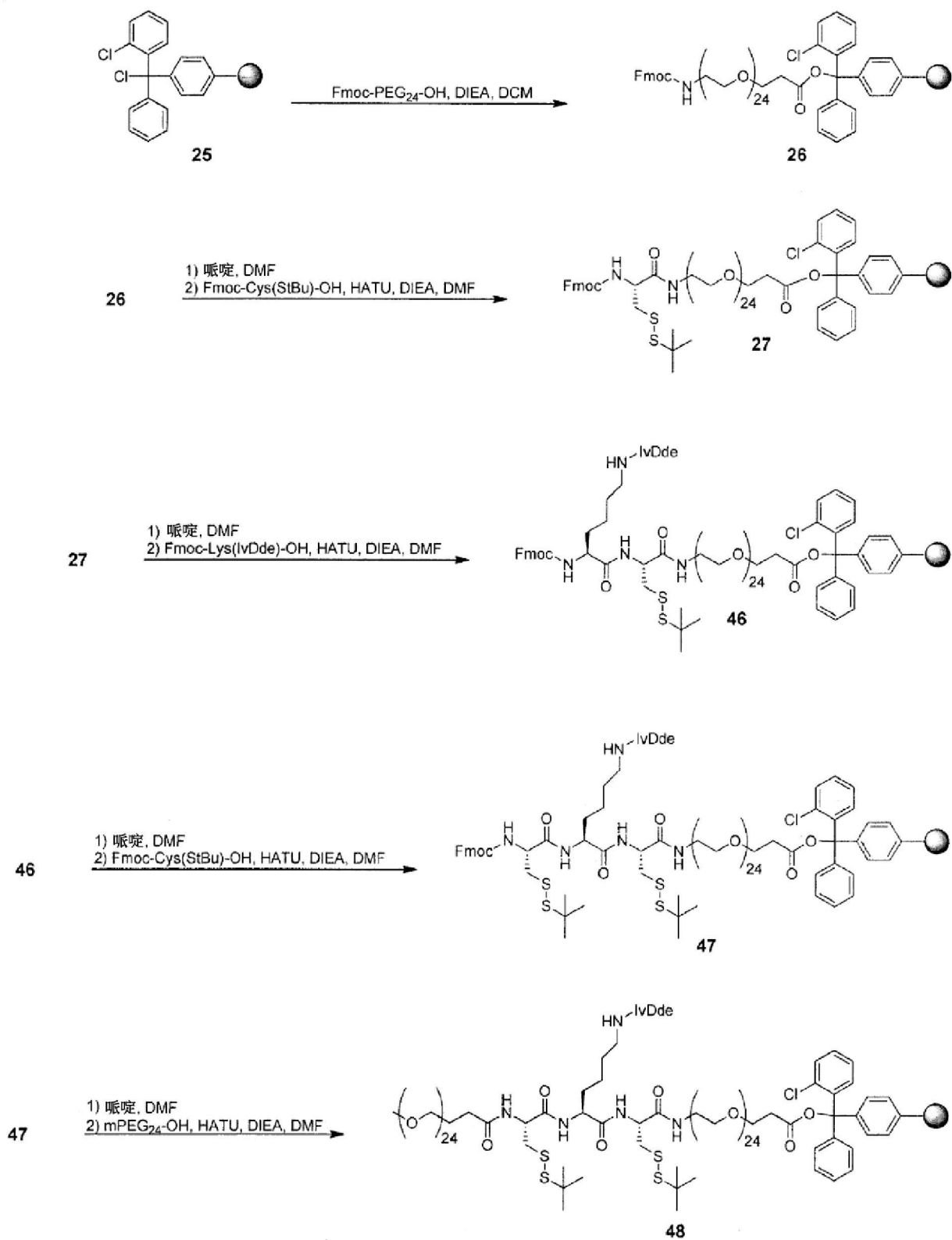
其中Z'為含順丁烯二醯亞胺之部分體，A為分支離胺酸-離胺酸殘基，t為1且各AD及各Lp為半胱胺酸殘基。

流程12.合成MDpr-Cys(StBu)-Ala-Cys(StBu)-PEG₃₆-OH (架構B)

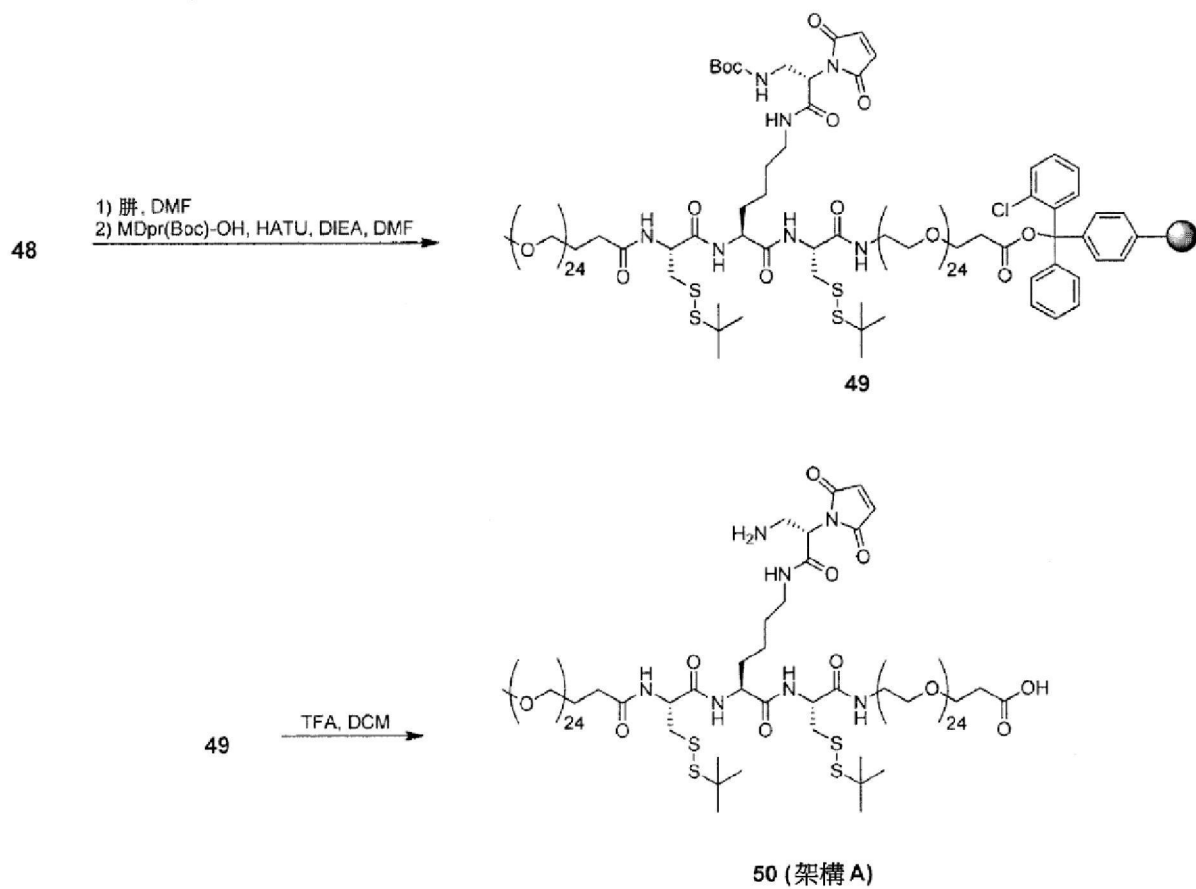


流程13：合成mPEG₂₄-Cys(StBu)-Lys(MDpr)-Cys(SBu)-PEG₂₄-OH (架構

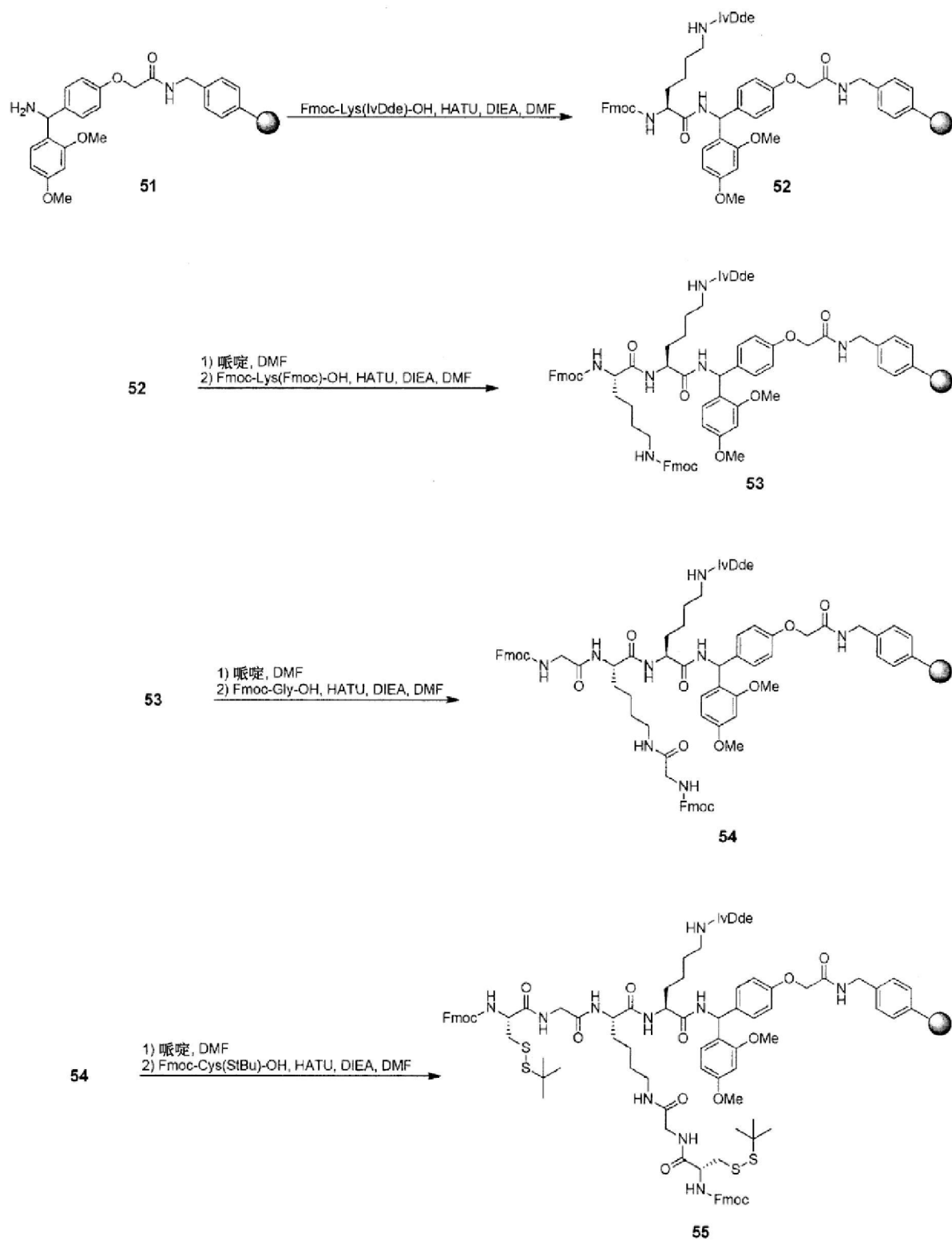
A)



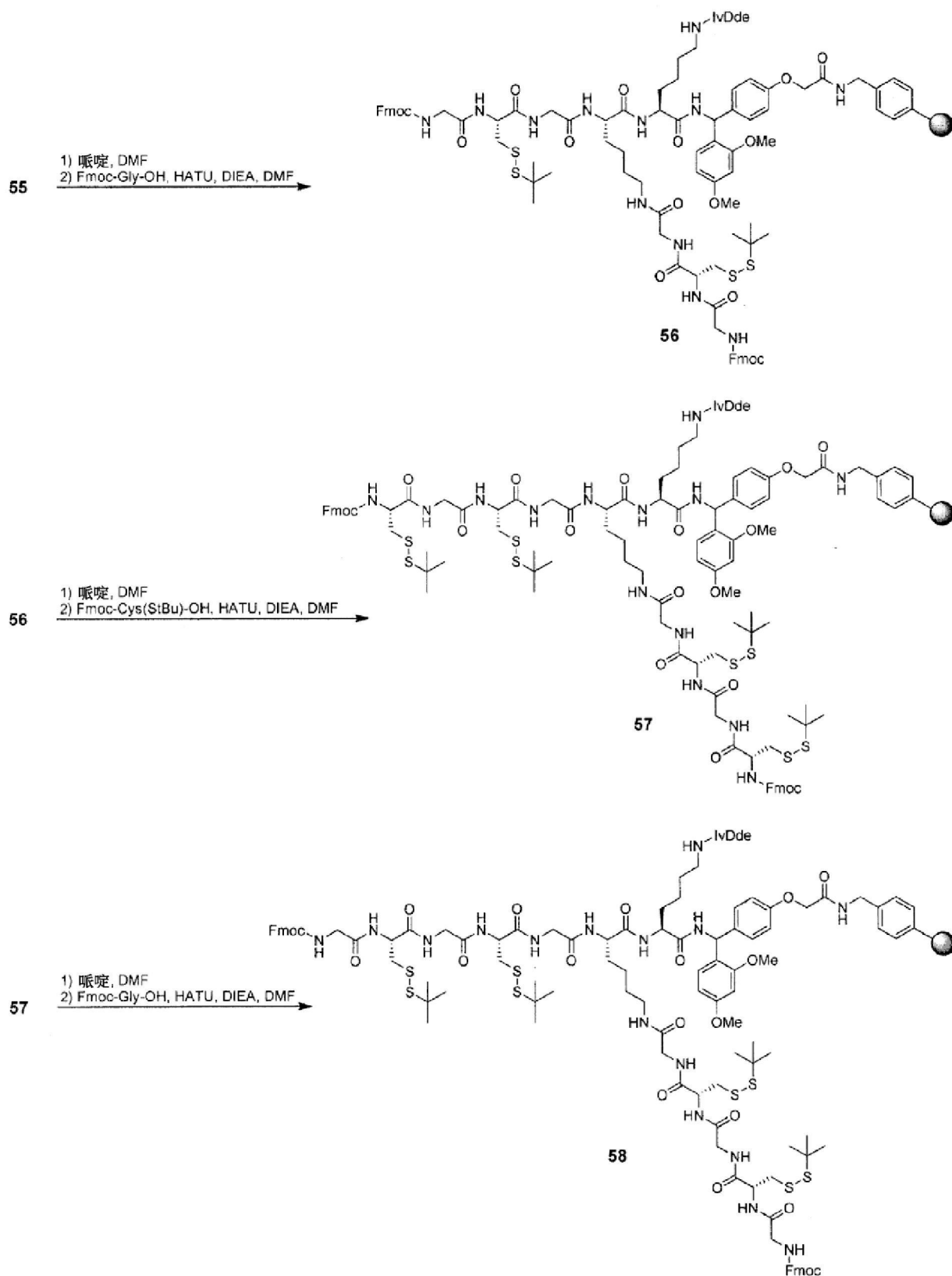
流程13 (對照)：合成mPEG₂₄-Cys(StBu)-Lys(MDpr)-Cys(SBu)-PEG₂₄-OH



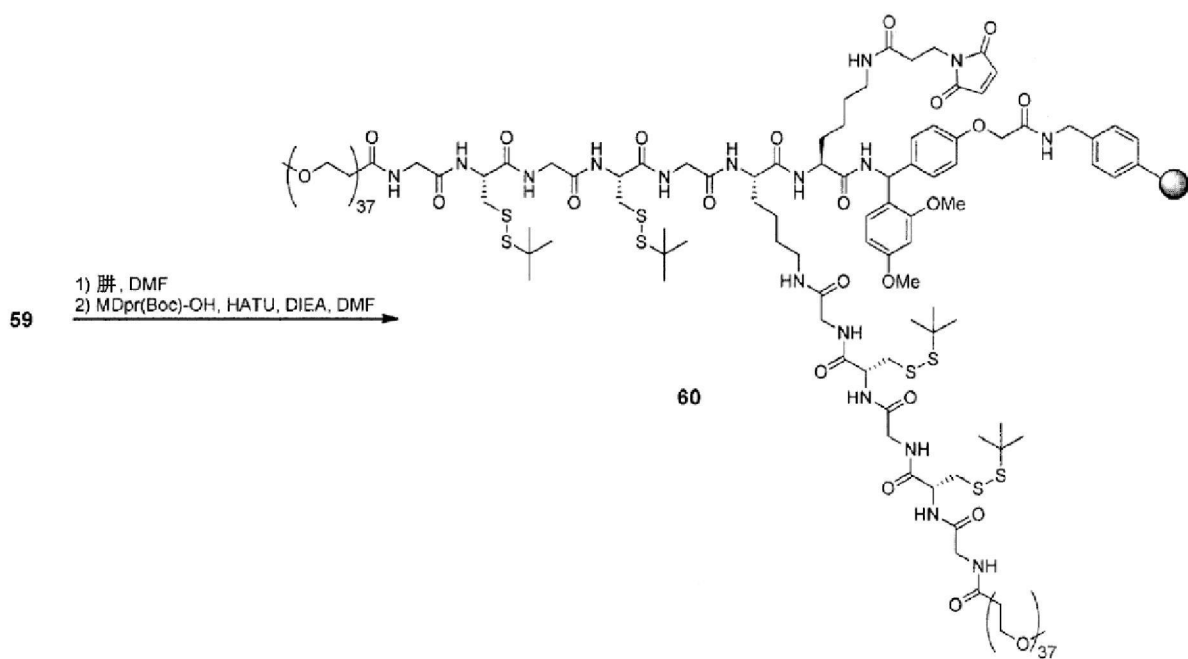
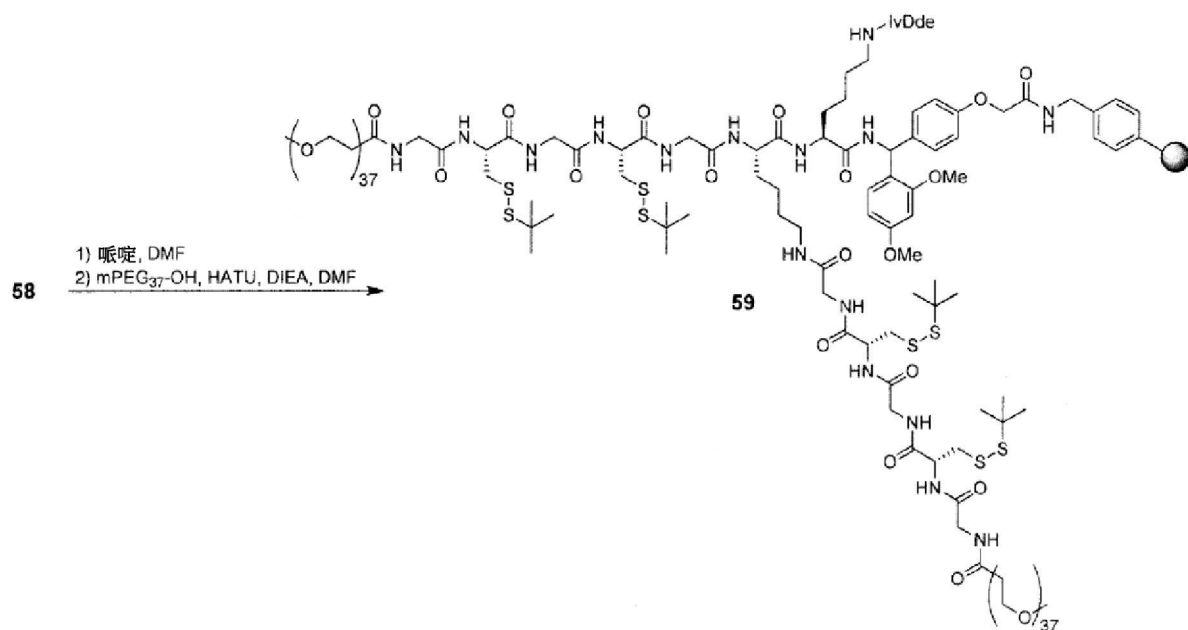
流程14：分支聚乙二醇化藥物-載體架構(架構C)



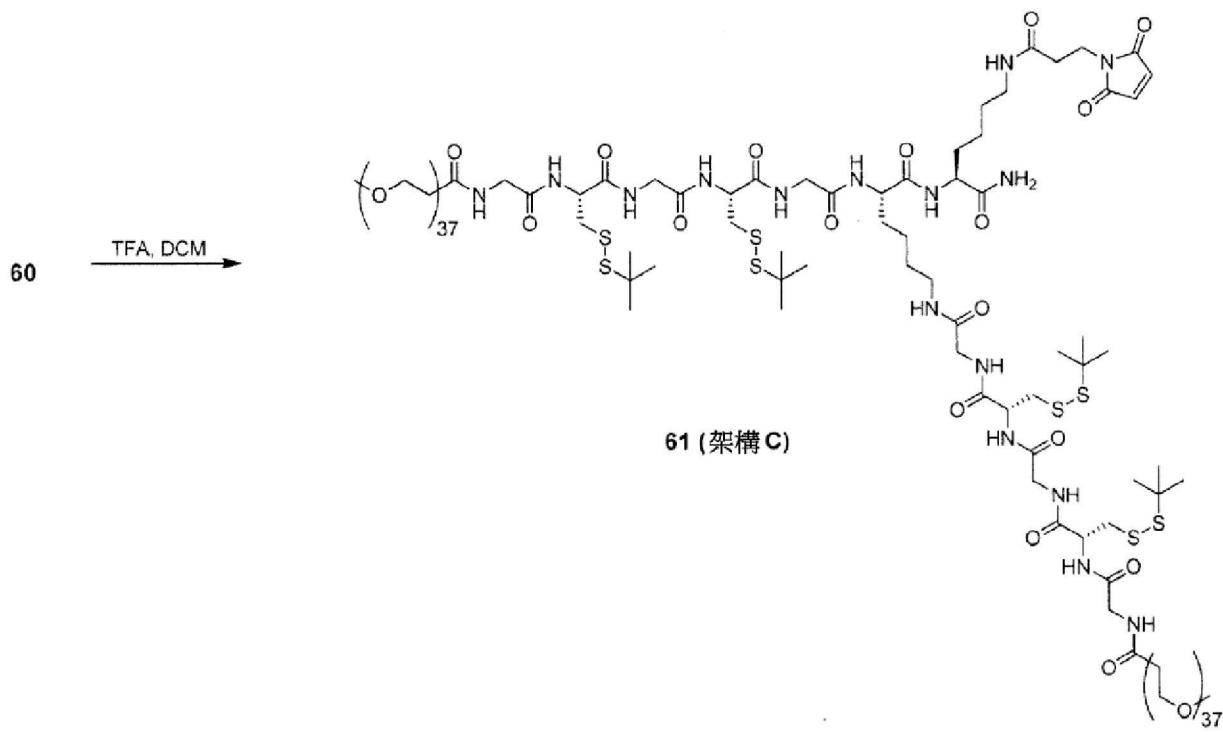
流程14 (對照): 分支聚乙二醇化藥物-載體架構(架構C)



流程14(對照)：分支聚乙二醇化藥物-載體架構(架構C)



流程14(對照)：分支聚乙二醇化藥物-載體架構(架構C)



在表6中給出根據流程12至14製備之架構A、B及C之MS數據

表6.多重聚乙二醇化架構之質譜數據

聚乙二醇化藥物架構	質量計算值	質量實驗值
分支藥物載體架構(架構C，其中n為37)	4872.5	1624.92，以(M+3H)/3計
MDpr-Cys(StBu)-Ala-Cys(StBu)-PEG36-OH (架構B，其中n為36)	2293.2	1147.85，以(M+2H)/2計
mPEG ₂₄ -Cys(StBu)-Lys(MDpr)-Cys(StBu)-PEG ₂₄ -OH (架構A，其中n為23)	2920.5	1461.32，以(M+2H)/2計

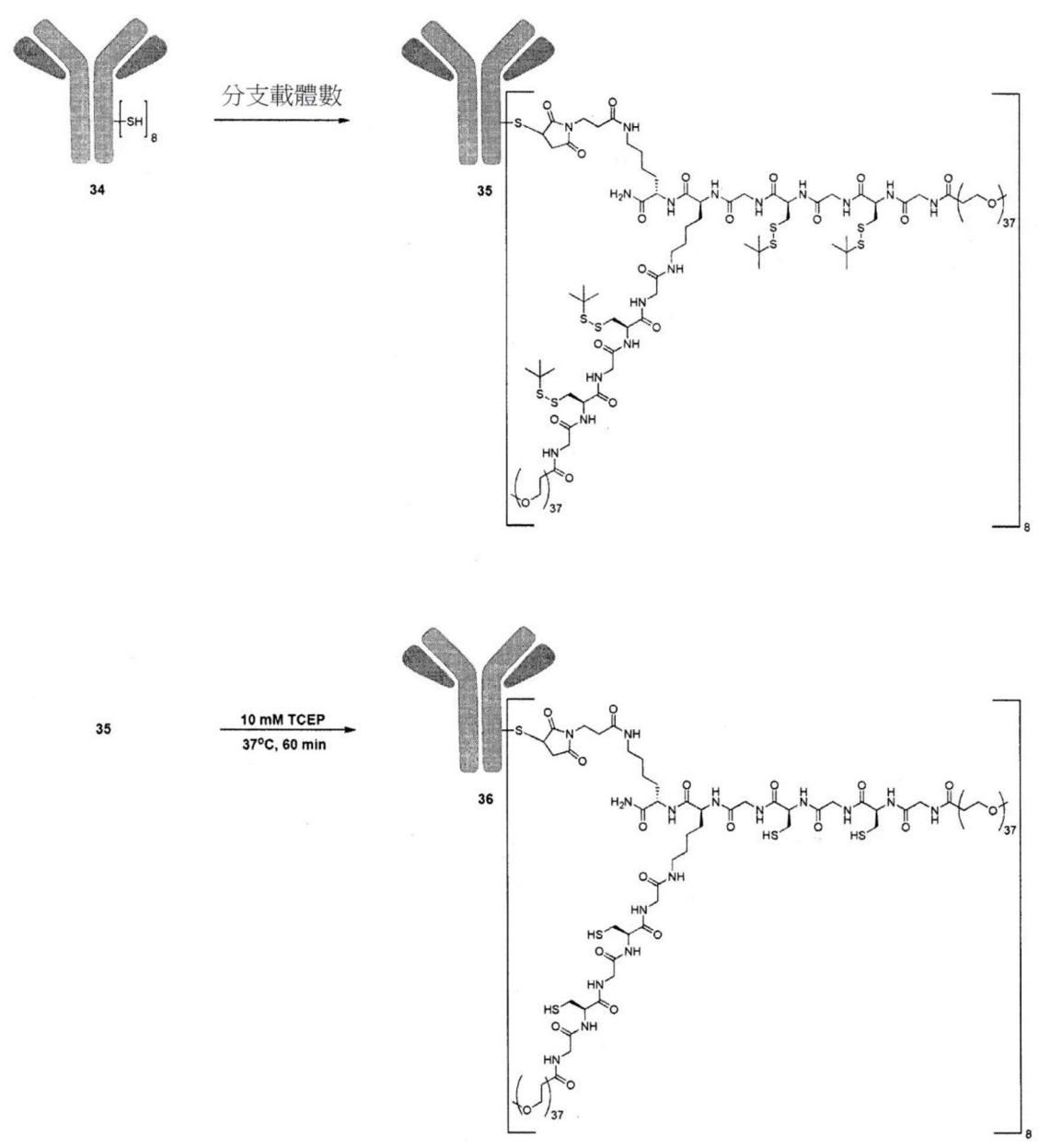
實例23 製備併入多重聚乙二醇化架構之ADC

流程15至16描繪聚乙二醇化架構結合至抗體及藥物連接子。向濃度為約10 mg/mL之完全還原抗體(34)於含有EDTA (2 mM)之PBS中且用額外磷酸鉀(100 mM，pH 7.4)緩衝之溶液中添加12莫耳當量來自5-20 mM DMSO儲備溶液之聚乙二醇化分支藥物載體架構。在室溫下靜置所得溶液30 min。藉由逆相層析確定完全結合。若結合不完全，則再添加PEG試劑。在結合之後，抗體溶液使用注射泵結合至1 mL HiTrap MabSelect

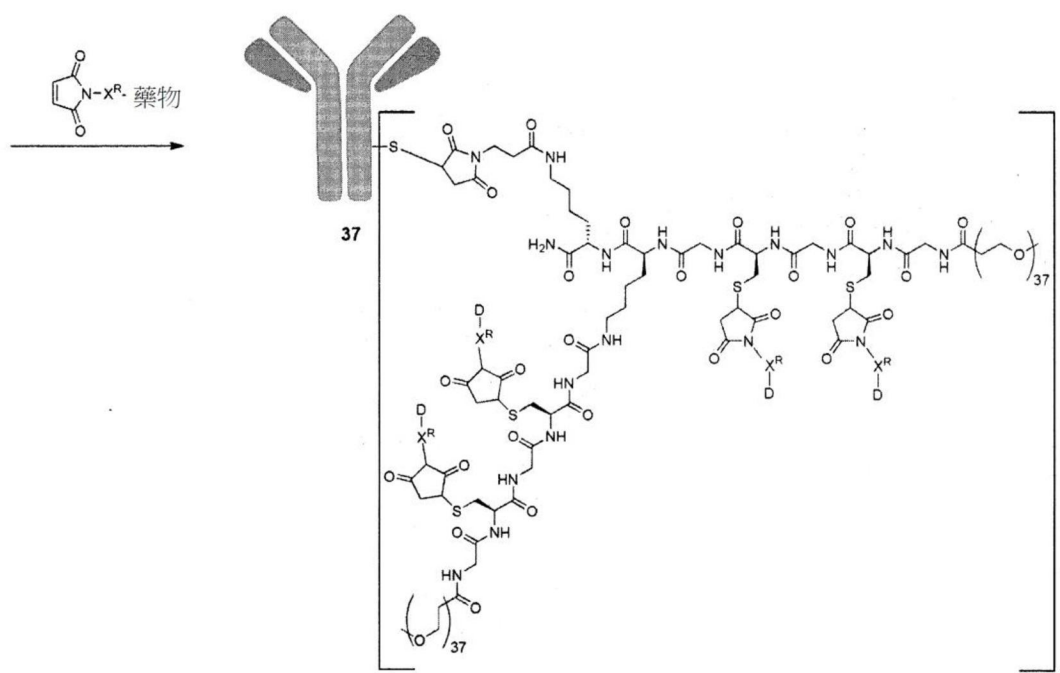
SuRe管柱(GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA)且用10 mL含有EDTA (2 mM)之PBS以1 mL/min洗滌。為移除第三丁基巯基保護基，在37°C下經1小時用3 mL用額外磷酸鉀(100 mM，pH 7.4)緩衝之10 mM TCEP洗滌管柱。接著用10 mL含有EDTA (2 mM)之PBS以1 mL/min洗滌管柱且用50 mM甘胺酸(pH 3.0)溶離經純化之抗體-架構結合物。組合含有蛋白質之溶離份且用10% (v/v) 800 mM磷酸鉀、500 mM NaCl及500 mM EDTA (pH 7.4)中和。所得溶液(36)經由無菌0.22 μ m離心濾膜過濾且立即使用或儲存於-80°C下。

向濃度為約5 mg/mL之脫除保護基之聚乙二醇化抗體(35)於含有EDTA (2 mM)之PBS中且用額外磷酸鉀(100 mM，pH 7.4)緩衝之溶液中添加48莫耳當量來自5-20 mM DMSO儲備溶液之含有順丁烯二醯亞胺之藥物連接子。在室溫下靜置所得溶液30 min。藉由逆相層析確定完全結合。若結合不完全，則再添加藥物連接子。在結合之後，經由30 kDa MWCO濾膜藉由3輪稀釋及4,000 $\times$ g下之離心使抗體溶液去鹽至PBS中。所得聚乙二醇化抗體-藥物結合物溶液(37)經由無菌0.22 μ m離心濾膜過濾，藉由尺寸排外層析法(SEC)及逆相層析法分析，且儲存於-80°C下。

流程15：結合含有順丁烯二醯亞胺之聚乙二醇化分支藥物載體架構並移除第三丁基巯基保護基



流程16：含有順丁烯二醯亞胺之藥物連接子結合至分支藥物載體：



實例24.具有多重聚乙二醇化架構之ADC之製備及生物活性

32單位負載之奧瑞他汀及喜樹鹼ADC使用實例23之程序由聚乙二醇化多重架構C來製備，其中 $n=37$ 。凝集量低於定量水準，但尺寸排外層析法展示32單位MMAE ADC可以二聚合形式存在。

具有mc-VC-PABA-MMAE之-X-D部分體之cAC10 32單位負載之結合物展示相比於8單位負載ADC 5倍以上針對L540cy(CD30複本數433K)之細胞毒性改良，即使藥物負載僅增加4倍。甚至更顯著的是，32單位負載之結合物針對作為另一霍奇金淋巴瘤細胞株之L-428具有活性，但彼細胞株具有較低目標抗原複本數(CD30複本數77K)，而8負載結合物視為惰性的($IC_{50}>1\text{ }\mu\text{M}$)。此外，32負載MMAE結合物對CD30⁺多重耐藥ALCL細胞株具有細胞毒活性。相比而言，8負載MMAE結合物視為對兩種重耐藥細胞株為惰性的，但其具有與32單位負載結合物對親本細胞株類似之活

性。

具有MDpr-PAB(gluc)喜樹鹼之-X-D部分體的cAC10 32負載結合物展示相比於8單位負載結合物針對L540cy之細胞毒性之3至4倍改良，但相同8單位負載結合物視為針對L-428為惰性的。32單位負載結合物具有相比於8單位負載結合物5倍以上之針對ALCL多重耐藥細胞株之細胞毒性。

亦具有MDpr-PAB(gluc)-喜樹鹼之-X-D部分體的hBU12 32單位負載結合物亦展示相比於8單位負載結合物5倍以上之針對Raj及拉莫斯之細胞毒性改良且對具有最低C19複本數之RL具有活性。相比而言，8單位負載結合物為惰性的。

表7. 具有多重聚乙二醇化架構之ADC的質譜數據

ADC	質量計算值(輕鏈、重鏈)	質量實驗值(輕鏈、重鏈)
16單位負載MDpr-葡萄糖醛酸苷-喜樹鹼cOKT9 ADC (1)	29,092、ND	29,094、ND
32單位負荷MDpr-葡萄糖醛酸苷-喜樹鹼cAC10 ADC (2)	32,501、ND	32,505、ND
16單位負荷MDpr-VC-MMAE cAC10 ADC ⁽¹⁾	29,104、66,460	29,108、66,465
16單位負荷mc-VC -MMAE cAC10 ADC ⁽³⁾	28,476、64,575	28,481、64,582
32單位負荷mc-VC -MMAE cAC10 ADC ⁽²⁾	33,514、79,690	33,514、79,691
32單位負荷MDpr-葡萄糖醛酸苷-MMAE cAC10 ADC (2)	33,505、79,664	33,504、79,665

- 1：由mPEG₂₄-Cys(StBu)-Lys(MDpr)-Cys(StBu)-PEG₂₄-OH製備
- 2：由PEG₃₇分支藥物載體架構製備

3：由MDpr-Cys(StBu)-Ala-Cys(StBu)-PEG36-OH製備

【序列表】

<110> 美商西雅圖遺傳學公司(Seattle Genetics, Inc.)

<120> 改良配體-藥物結合物之藥物動力學之聚乙二醇化藥物連接子

<130> 2700-00114PC

<150> 61/891,320
<151> 2013-10-15

<150> 61/941,904
<151> 2014-02-19

<150> 61/947,742
<151> 2014-03-04

<150> 61/975,318
<151> 2014-04-04

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 117
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 1

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 2
<211> 111
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 3

<211> 118
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人類化大鼠序列

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人類化大鼠序列

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 5
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人類化大鼠序列

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人類化大鼠序列

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Val	Tyr	Pro	Phe	Thr
85				90				95							
Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg					
100				105											
<210> 7															
<211> 330															
<212> PRT															
<213> 智人															
<400> 7															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1	5				10				15						
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
20				25				30							
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
35				40				45							
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
50				55				60							
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65	70				75				80						
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
85				90				95							
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
100				105				110							
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
115				120				125							
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
130				135				140							

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

I736047

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> 重鏈可變區

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> 輕鏈可變區

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

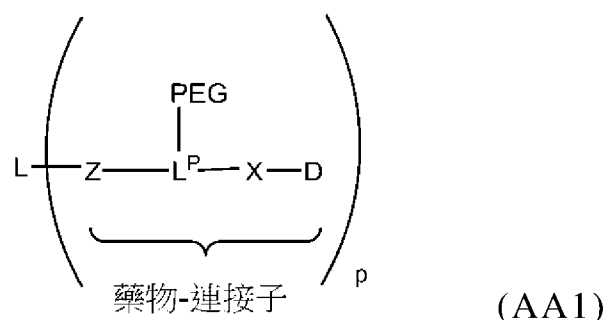
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種醫藥組合物，其包含配體-藥物結合物化合物或其醫藥學上可接受之鹽形式之群體，以及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑，其中該群體係由下式AA1所表示：



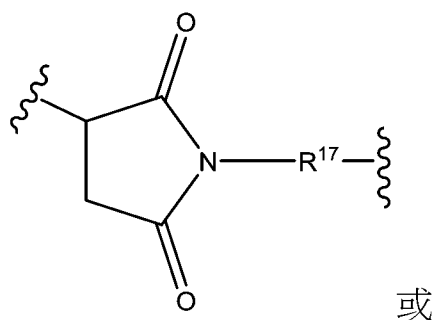
其中

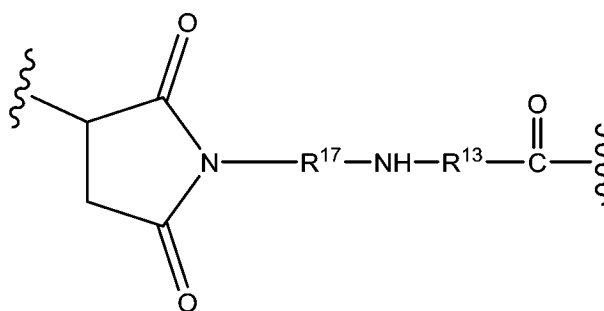
L為配體單元，其係來自抗體或抗體之抗原結合片段，藉以界定抗體藥物結合物化合物之群體之抗體配體單元，其中該抗原結合片段具有需要數量之用於連接至藥物-連接子之位點，且其中該抗體或抗原結合片段係能特異性結合癌細胞表面上之抗原；

D係來自疏水性化合物，藉以界定疏水性藥物單元，其中該疏水性化合物為單甲基奧瑞他汀E (MMAE)或具有與MMAE相當或更高之疏水性；

PEG為聚乙二醇單元，其包含8至24個重複-OCH₂CH₂-單元；

Z為延伸子單元，其具有如下結構：





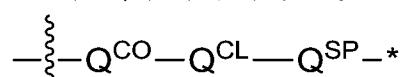
其中與 R^{17} 或羧基之碳原子相鄰之波浪線指示與 L^P 之共價連接位點，且另一條波浪線指示與來自該抗體配體單元之硫原子共價連接位點，且其中丁二醯亞胺環視情況為水解形式；

R^{13} 為- C_1 - C_6 伸烷基-、- C_3 - C_8 碳環基-、-伸芳基-、- C_1 - C_{10} 伸雜烷基-、- C_3 - C_8 雜環基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 碳環基)-、-(C_3 - C_8 碳環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 雜環基)-或-(C_3 - C_8 雜環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-；以及

R^{17} 為- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_1 - C_{10} 伸雜烷基-、- C_3 - C_8 碳環基-、-O-(C_1 - C_8 烷基)-、-伸芳基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 碳環基)-、-(C_3 - C_8 碳環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_3 - C_8 雜環基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 雜環基)-、-(C_3 - C_8 雜環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-C(=O)-、- C_1 - C_{10} 伸雜烷基-C(=O)-、- C_3 - C_8 碳環基-C(=O)-、-O-(C_1 - C_8 烷基)-C(=O)-、-伸芳基-C(=O)-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-伸芳基-C(=O)-、-伸芳基- C_1 - C_{10} 伸烷基-C(=O)-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 碳環基)-C(=O)-、-(C_3 - C_8 碳環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-C(=O)-、- C_3 - C_8 雜環基-C(=O)-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 雜環基)-C(=O)-、-(C_3 - C_8 雜環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-C(=O)-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-NH-、- C_1 - C_{10} 伸雜烷基-NH-、- C_3 - C_8 碳環基-NH-、-O-(C_1 -

C₈烷基)-NH-、-伸芳基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-NH-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-NH-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-NH-、-C₃-C₈雜環基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-NH-、-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-NH-、-C₁-C₁₀伸烷基-S-、-C₁-C₁₀伸雜烷基-S-、-C₃-C₈碳環基-S-、-O-(C₁-C₈烷基)-S-、-伸芳基-S-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-S-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-S-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-S-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-S-、-C₃-C₈雜環基-S-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-S-或-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-S-，其視情況可經-(CH₂)_xNH₂、-(CH₂)_xNHR^a及-(CH₂)_xNR^a₂取代，其中下標x為1-4之整數且各R^a係獨立地為C₁₋₆烷基或兩個R^a基團與其二者所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基；

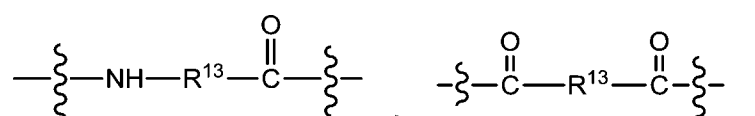
X為可釋放組合單元，其能夠將該疏水性化合物釋放至該癌細胞中或附近，其中該可釋放組合單元具有下式：

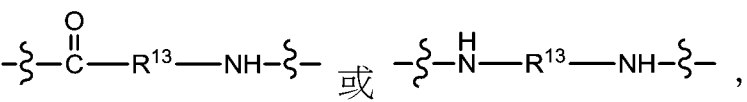


其中Q^{CO}為視情況存在之共價連接單元；Q^{SP}為視情況存在之間隔子單元；Q^{CL}為可裂解單元；星號指示共價連接至藥物單元之位點；且波浪線指示共價連接至L^P；

其中該共價連接單元(Q^{CO})為天然或非天然胺基酸、胺基醇、胺基醛或二胺殘基，或為視情況經取代之C₁₋₈伸雜烷基；

或Q^{CO}具有以下結構：





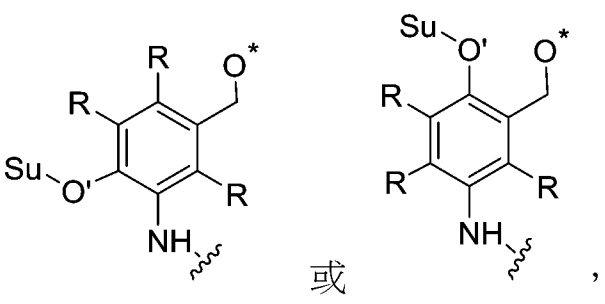
其中波浪線指示共價連接至 Q^{CO} 或 Q^{CL} 及 L^{P} ；且

R^{13} 為- C_1 - C_6 伸烷基-、- C_3 - C_8 碳環基-、-伸芳基-、- C_1 - C_{10} 伸雜烷基-、- C_3 - C_8 雜環基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 碳環基)-、-(C_3 - C_8 碳環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-、- C_1 - C_{10} 伸烷基-(C_3 - C_8 雜環基)-或-(C_3 - C_8 雜環基)- C_1 - C_{10} 伸烷基-；

其中該可裂解單元(Q^{CL})為包含二肽之肽可裂解單元，其視 Q^{SP} 之存在或不存在分別具有可裂解鍵連接至 Q^{SP} 或 D ，其中該可裂解鍵係可藉由腫瘤相關蛋白酶裂解；

其中該間隔子單元(Q^{SP})當存在時，其包含對胺基苯甲醇(PAB)部分體，該PAB部分體係經由該PAB部分體之胺基氮原子連接至該肽可裂解單元之二肽且經由碳酸酯、胺基甲酸酯或醚官能基直接連接至藥物單元，其中該PAB部分體及相鄰之該碳酸酯或胺基甲酸酯官能基之羰基團為該間隔子單元之一部分，或

其中該可裂解單元(Q^{CL})具有下式：



其中 Su 係糖部分體且 $-\text{O}'-$ 表示可由糖苷酶裂解之糖苷鍵之氧原子，

各 R 獨立地為氫、鹵素、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{NO}_2$ ；且波浪線指示直接或經由該共價連接單元(Q^{CO})間接共價連接至 L^{P} 之位點，以及星號指示直接或

經由間隔子單元(Q^{SP})間接共價連接至藥物單元之位點；以及

L^P 為平行連接體單元，其中各平行連接體單元包含 α 、 β 或 γ 胺基酸或其他含胺殘基，其具有或經修飾以具有於各藥物連接部分體中共價連接該平行連接體單元至三個化學部分體Z、PEG及X之官能化側鏈；

下標p為該群體之平均藥物-連接子負載，且為每個抗體配體單元至少約6或至少約8個藥物-連接子部分體；

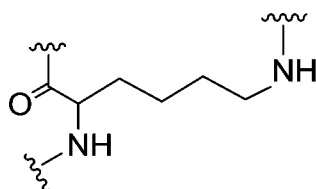
其中各藥物-連接子部分體之該PEG單元係相對於藥物單元呈平行取向且具有適當大小以遮蔽該疏水性藥物單元之疏水性，

其中，與相同或實質上相同之抗體藥物結合物化合物但缺乏該PEG單元或含有該PEG單元但以相對於其抗體配體單元及藥物單元呈串聯取向之群體相比，該抗體藥物結合物化合物之群體整體展現改良之藥物動力學特性，或

其中該抗體藥物結合物化合物之群體展現與其未結合時之抗體組分相同或實質上相同之藥物動力學特性。

【第2項】

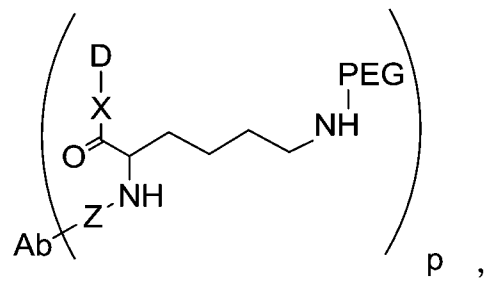
如請求項1之醫藥組合物，其中該平行連接體單元(L^P)具有下列結構：



其中與其中一個氮原子相鄰之波浪線指示共價連接至該PEG單元，且其他波浪線指示共價連接至該延伸子單元(Z)及可釋放組合單元(X)。

【第3項】

如請求項2之醫藥組合物，其中該抗體藥物結合物係如下列結構所示：



其中Ab為該抗體配體單元。

【第4項】

如請求項1之醫藥組合物，其中

R^{13} 為-C₁-C₆伸烷基-；且

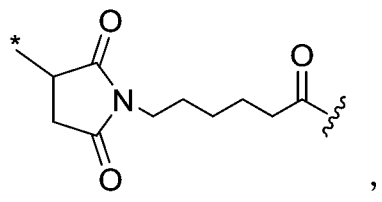
R^{17} 為-C₂-C₅伸烷基-C(=O)-，其中該伸烷基係未經取代或經-(CH₂)_xNH₂、-(CH₂)_xNHR^a及-(CH₂)_xN(R^a)₂取代，

其中x為1-4之整數；且

各R^a係獨立地為C₁₋₆烷基，或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。

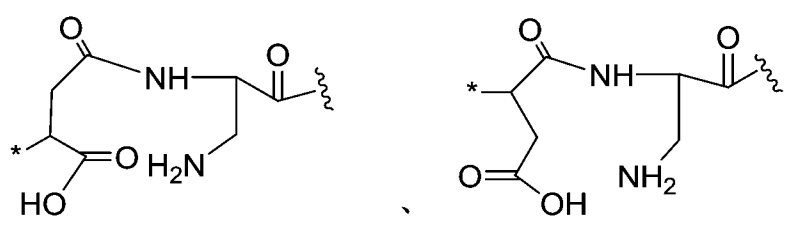
【第5項】

如請求項4之醫藥組合物，其中Z具有下列結構：



其視情況具有水解形式之丁二醯亞胺環，或

其中Z具有下列結構：



或其醫藥學上可接受之鹽，

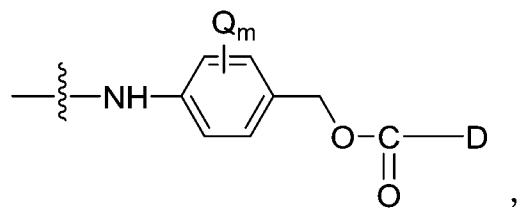
其中星號指示連接至來自該抗體配體單元之硫原子，且波浪線指示共價連接至L^P。

【第6項】

如請求項1之醫藥組合物，其中該肽可裂解單元為-Val-Cit-、-Phe-Lys-或-Val-Ala-。

【第7項】

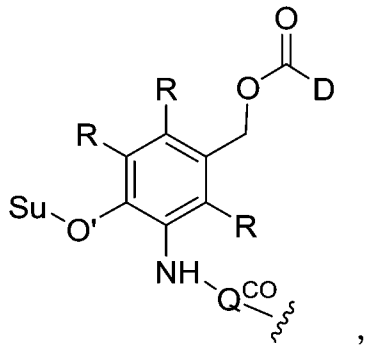
如請求項6之醫藥組合物，其中-Q^{SP}-D具有下列結構：



其中Q為-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為0-4範圍內之整數。

【第8項】

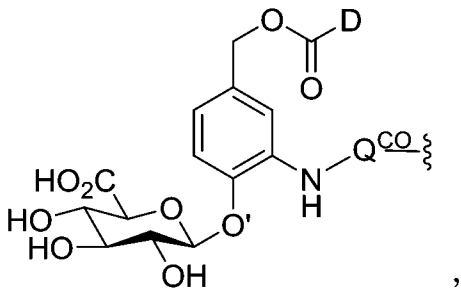
如請求項1之醫藥組合物，其中-X-D具有下列結構：



其中波浪線指示共價連接至L^P。

【第9項】

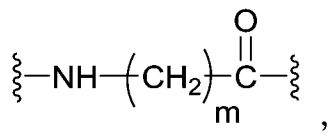
如請求項7之醫藥組合物，其中-X-D具有下列結構：



其中波浪線指示共價連接至 L^P ，且-O'-表示可由糖苷酶裂解之糖苷鍵之氧原子，其中該糖苷酶為 β -葡萄糖醛酸酶。

【第10項】

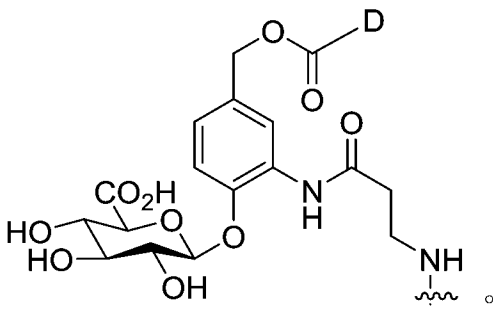
如請求項9之醫藥組合物，其中 Q^{CO} 具有下列結構：



其中與氮原子相鄰之波浪線指示共價連接至 L^P ，且與羰基相鄰之波浪線指示共價連接至可裂解單元；以及下標 m 為1至6或2至4。

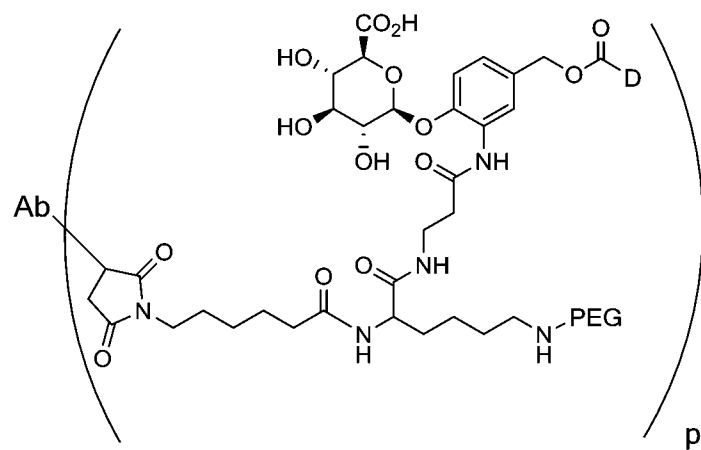
【第11項】

如請求項10之醫藥組合物，其中X-D具有下列結構：



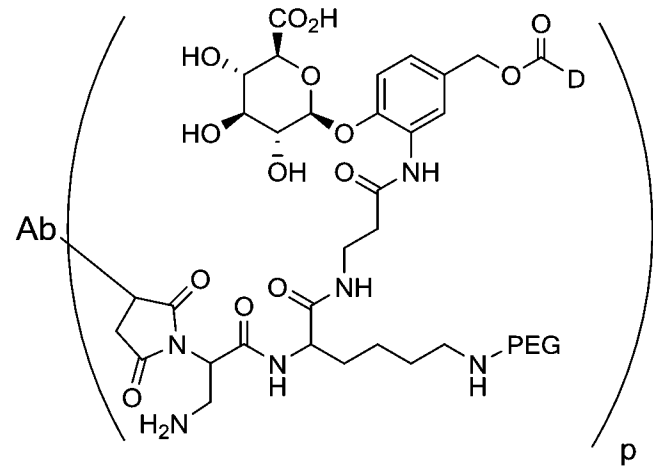
【第12項】

如請求項11之醫藥組合物，其中該抗體藥物結合物係如下列結構所示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其視情況具有水解形式之丁二醯亞胺環，其中Ab為該抗體配體單元，或

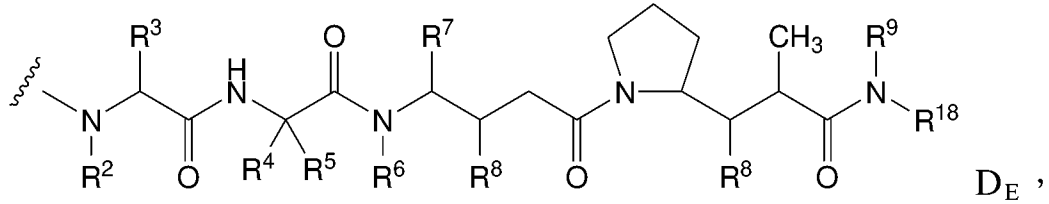
其中該抗體藥物結合物係如下列結構所示：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中Ab為該抗體配體單元且該丁二醯亞胺環係水解形式。

【第13項】

如請求項1至12中任一項之醫藥組合物，其中該疏水性藥物單元係來自具有式D_E結構之奧瑞他汀(auristatin)化合物：



其中波浪線指示共價連接至該可釋放組合單元(X)，且在各位位置獨

立：

R^2 係選自由H及C₁-C₈烷基組成之群；

R^3 係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R^4 係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R^5 係選自由H及甲基組成之群；

或 R^4 及 R^5 共同形成碳環且具有式-(CR^aR^b)_n-，其中R^a及R^b獨立地選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基及C₃-C₈碳環且下標n係選自由以下組成之群：2、3、4、5及6；

R^6 係選自由H及C₁-C₈烷基組成之群；

R^7 係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

各 R^8 係獨立地選自由以下組成之群：H、OH、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環及O-(C₁-C₈烷基)；

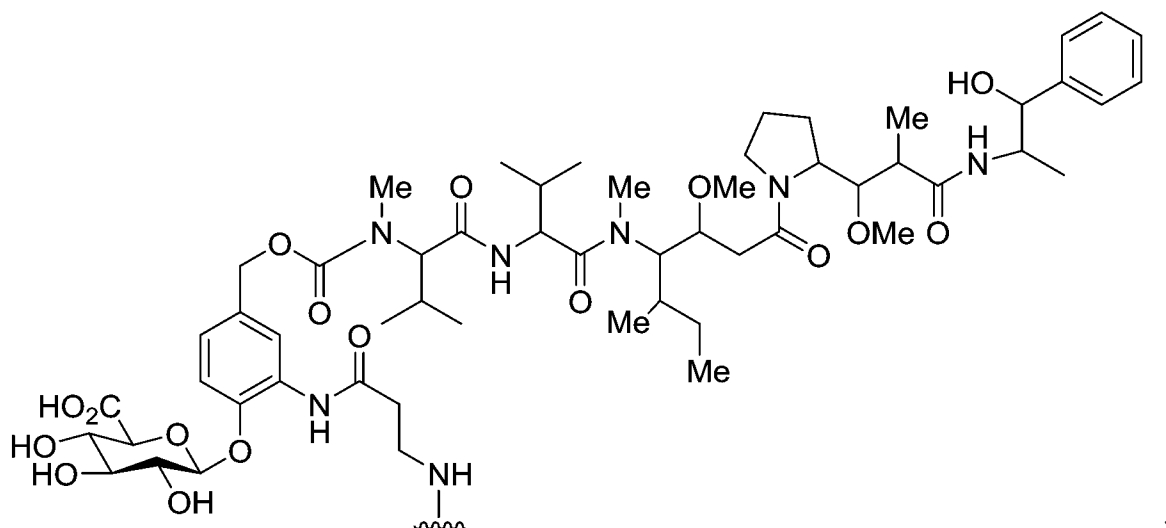
R^9 係選自由H及C₁-C₈烷基組成之群；

R^{18} 係選自由以下組成之群：-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-芳基、-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈雜環)及-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈碳環)，

條件為該奧瑞他汀化合物為MMAE或具有與MMAE相當或更高之疏水性。

【第14項】

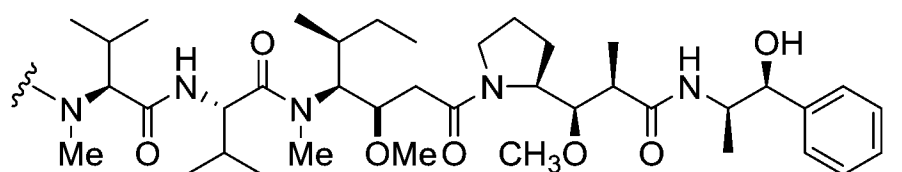
如請求項1之醫藥組合物，其中-X-D具有下列結構：



或其醫藥學上可接受之鹽。

【第15項】

如請求項13之醫藥組合物，其中該疏水性藥物單元具有下列結構：



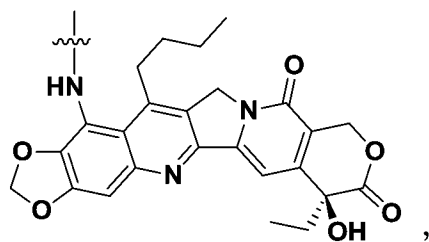
其中波浪線指示共價連接至該可釋放組合單元(X)。

【第16項】

如請求項1至12中任一項之醫藥組合物，其中該疏水性藥物單元係來自喜樹鹼(camptothecin)、長春花(vinca)或蒽環黴(anthracyclin)化合物，條件為該化合物具有與MMAE相當或更高之疏水性。

【第17項】

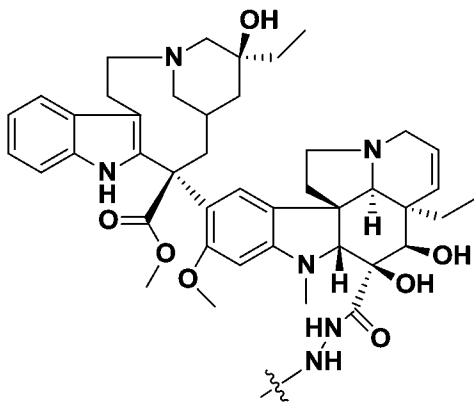
如請求項16之醫藥組合物，其中該疏水性藥物單元係來自喜樹鹼化合物且具有下列結構：



其中波浪線指示共價連接至該可釋放組合單元(X)。

【第18項】

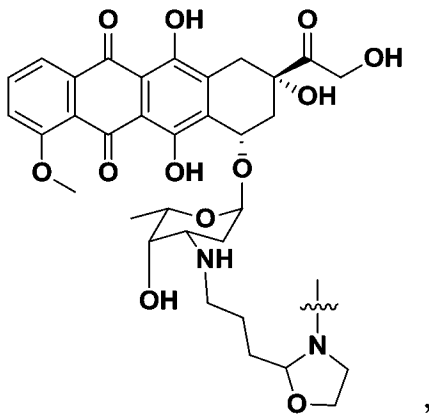
如請求項16之醫藥組合物，其中該疏水性藥物單元係來自長春花化合物且具有下列結構：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中波浪線指示共價連接至該可釋放組合單元(X)。

【第19項】

如請求項16之醫藥組合物，其中該疏水性藥物單元係來自蔥環黴化合物且具有下列結構：



其中波浪線指示共價連接至該可釋放組合單元(X)。

【第20項】

如請求項1至12中任一項之醫藥組合物，其中該抗體配體單元係來自單株抗體。

【第21項】

如請求項20之醫藥組合物，其中共價連接至該延伸子單元(Z)之該抗體配體單元之硫原子係來自具有還原之鏈間二硫鍵之抗體，或係來自引進至該抗體之半胱胺酸殘基。

【第22項】

如請求項21之醫藥組合物，其中下標p為約6至約14、約6至約12、約8至約14、或約8至約12。

【第23項】

如請求項1之醫藥組合物，其中該藥物動力學特性之改良係來自體外(*in vitro*)觀察式AA1抗體藥物結合物(ADC)相對於比較物ADC之凝集程度降低，該比較物ADC具有4%或更高、5%或更高、或10%或更高之凝集，其係如尺寸排外層析法(SEC)所量測。

【第24項】

如請求項1之醫藥組合物，其中該式AA1抗體藥物結合物具有體外凝集程度約1%、或約2%、或約3%，其係如尺寸排外層析法(SEC)所量測。

【第25項】

如請求項23或24之醫藥組合物，其中該藥物動力學特性之改良係由下列所指示：

(a) 測定於第一體積之血漿或血清中具有未結合抗體配體單元之該式AA1 ADC之濃度，以及

(b)測定於第二體積之血漿或血清中該比較物ADC之濃度，

其中該第一及第二體積之血漿或血清係於1至56天間之相同時間點對相同物種之齧齒類分開注射藥物當量之該式AA1及比較物ADC後所獲得，

其中該藥物動力學特性之改良係由該式AA1 ADC相對於該比較物ADC於該等時間點之濃度上升所指示，

或

其中該藥物動力學特性之改良係由下列所指示：

(a')測定每單位時間清除具有未結合抗體配體單元之該式AA1 ADC之第一體積之血漿或血清，且

(b')測定每單位時間清除該比較物ADC之第二體積之血漿或血清，

其中每單位時間之該第一及第二體積清除之測定係於對相同物種之齧齒類分開注射藥物當量之該式AA1及比較物ADC之後進行，

其中該藥物動力學特性之改良係由每單位時間清除之該第一體積之血漿或血清相對於該第二體積之血漿或血清減少所指示，

或

其中該藥物動力學特性之改良係由下列所指示：

(a'')測定具有未結合抗體配體單元之該式AA1 ADC之抗體藥物結合物濃度-時間曲線之第一區間，

(b'')測定該比較物ADC之抗體藥物結合物濃度-時間曲線之第二區間，

其中該第一及第二區間之測定係於對相同物種之齧齒類分開注射藥物當量之該式AA1及比較物ADC之後進行，

其中該藥物動力學之改良係由該第一區間相對於該第二區間之增加所指示。

【第26項】

如請求項25之醫藥組合物，其中該比較物ADC係與該式AA1 ADC具有下列結構相關性：

於其各藥物連接子部分體中將該式AA1 ADC之-L^P(PEG)-組分以具有相同數量之重複-OCH₂CH₂-單元之等同之聚乙二醇部分體取代，該聚乙二醇部分體對該藥物連接子部分體之其他組分係呈連續取向，

或

於其各藥物連接子部分體中將該式AA1 ADC之-L^P(PEG)-組分以終止官能基取代。

【第27項】

如請求項26之醫藥組合物，其中每單位時間清除之該第一體積之血漿或血清之減少使得每單位時間清除之該第二體積之血漿或血清至少為每單位時間清除之該第一體積之血漿或血清之2倍或至少3倍。

【第28項】

如請求項26之醫藥組合物，其中該第一區間係該第二區間之至少2倍或至少3倍。

【第29項】

如請求項23或24之醫藥組合物，其中

該藥物動力學特性之改良係由下列所指示：

(a)測定於第一體積之血漿或血清中具有未結合抗體配體單元之該

式AA1 ADC之濃度，以及

(b)測定於第二體積之血漿或血清中與該未結合抗體配體單元結構對應之非結合(unconjugated)之抗體之濃度，

其中該第一及第二體積之血漿或血清係於1至56天間之相同時間點對相同物種之齧齒類分開注射藥物當量之該式AA1及非結合之抗體後所獲得，

其中該藥物動力學特性之改良係由該式AA1 ADC於該等時間點之濃度與非結合之抗體相同或更高所指示，

或

其中該藥物動力學特性之改良係由下列所指示：

(a')測定每單位時間清除具有未結合抗體配體單元之該式AA1 ADC之第一體積之血漿或血清，且

(b')測定每單位時間清除與該未結合抗體配體單元結構對應之非結合之抗體之第二體積之血漿或血清，

其中每單位時間之該第一及第二體積清除之測定係於對相同物種之齧齒類分開注射抗體當量之該式AA1及非結合之抗體之後進行，

其中該藥物動力學特性之改良係由每單位時間清除之該第一體積之血漿或血清相對於該第二體積之血漿或血清實質相同或較低所指示，或

其中該藥物動力學特性之改良係由下列所指示：

(a'')測定具有未結合抗體配體單元之該式AA1 ADC之抗體藥物結合物濃度-時間曲線之第一區間，

(b'')測定與該未結合抗體配體單元結構對應之非結合之抗體之抗

體濃度-時間曲線之第二區間，

其中該第一及第二區間之測定係於對相同物種之齧齒類分開注射抗體當量之該式AA1 ADC及非結合之抗體之後進行，

其中該藥物動力學之改良係由該第一區間相對於該第二區間實質相同或更大所指示。

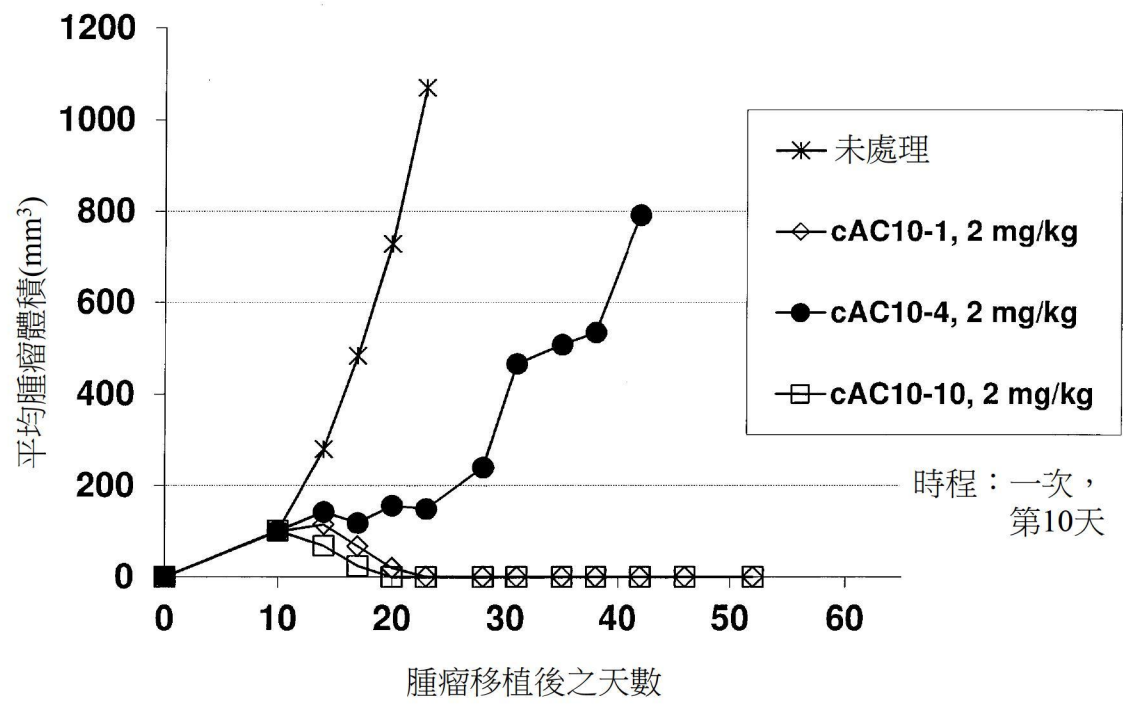
【第30項】

如請求項23或24之醫藥組合物，其中該組合物係呈藉由注射遞送之液體形式，且該至少一種賦形劑係無菌稀釋劑。

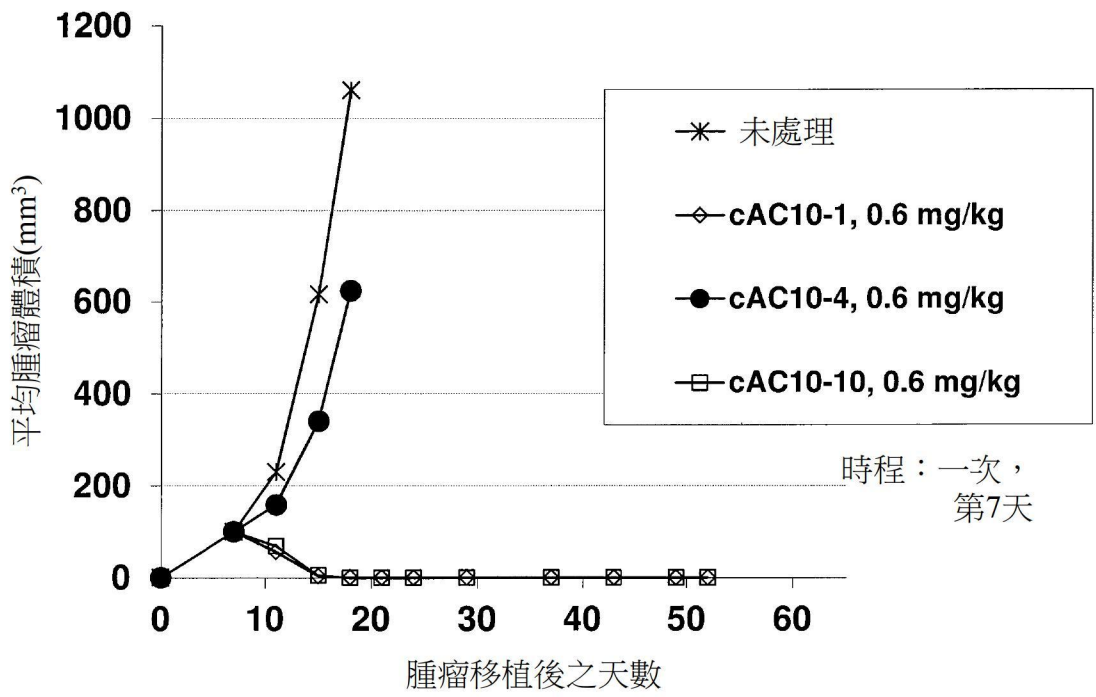
【第31項】

如請求項30之醫藥組合物，其中該抗體藥物結合物之含量係該組合物之重量計至少約0.01%。

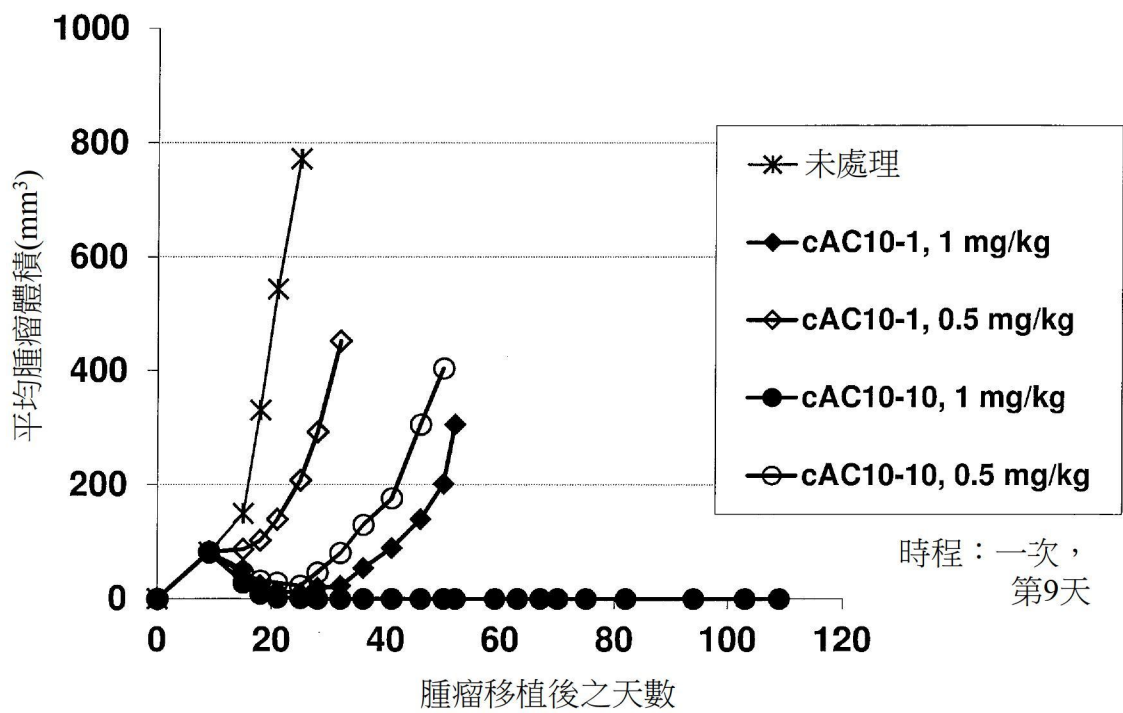
【發明圖式】



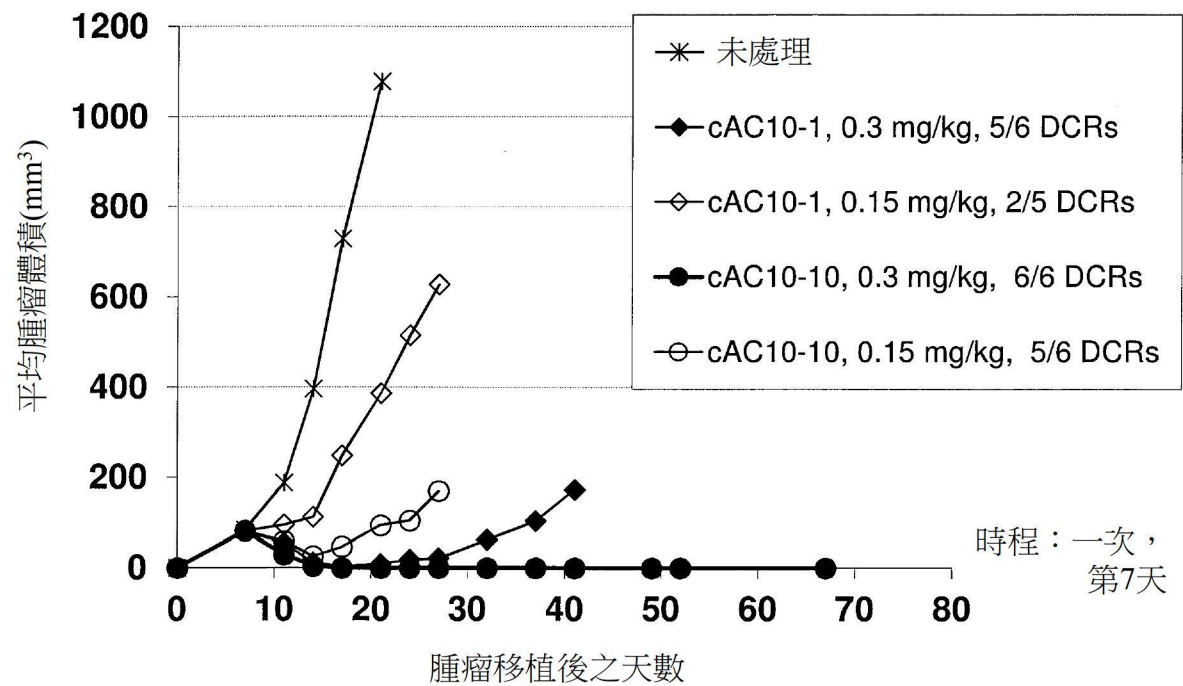
【圖1】



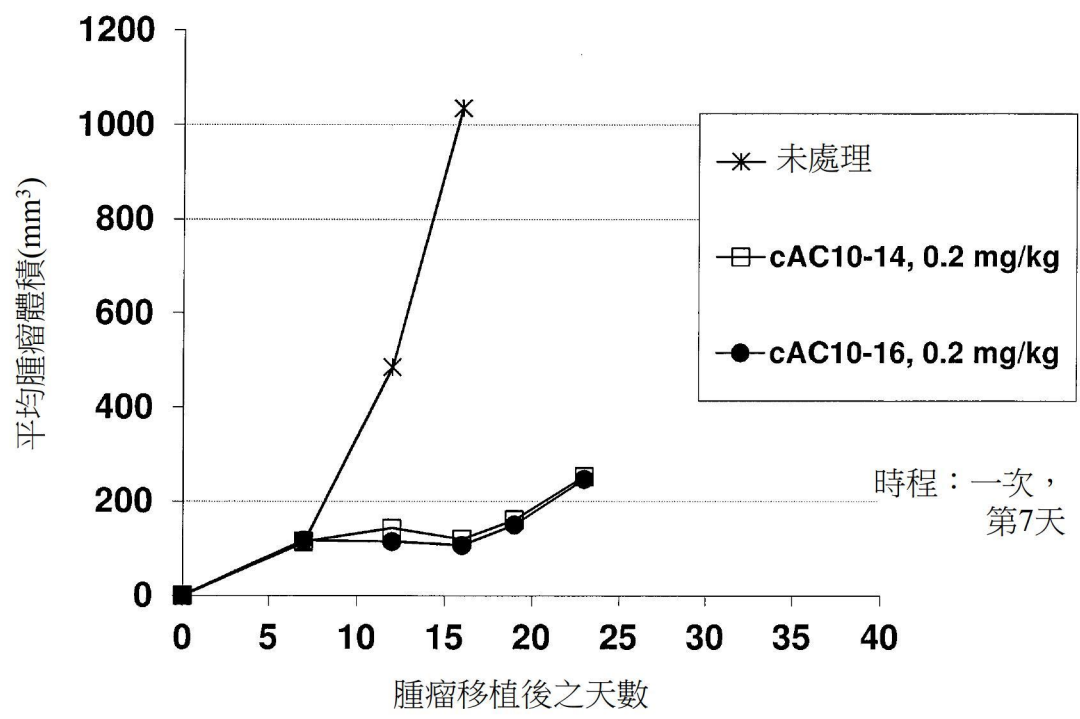
【圖2】



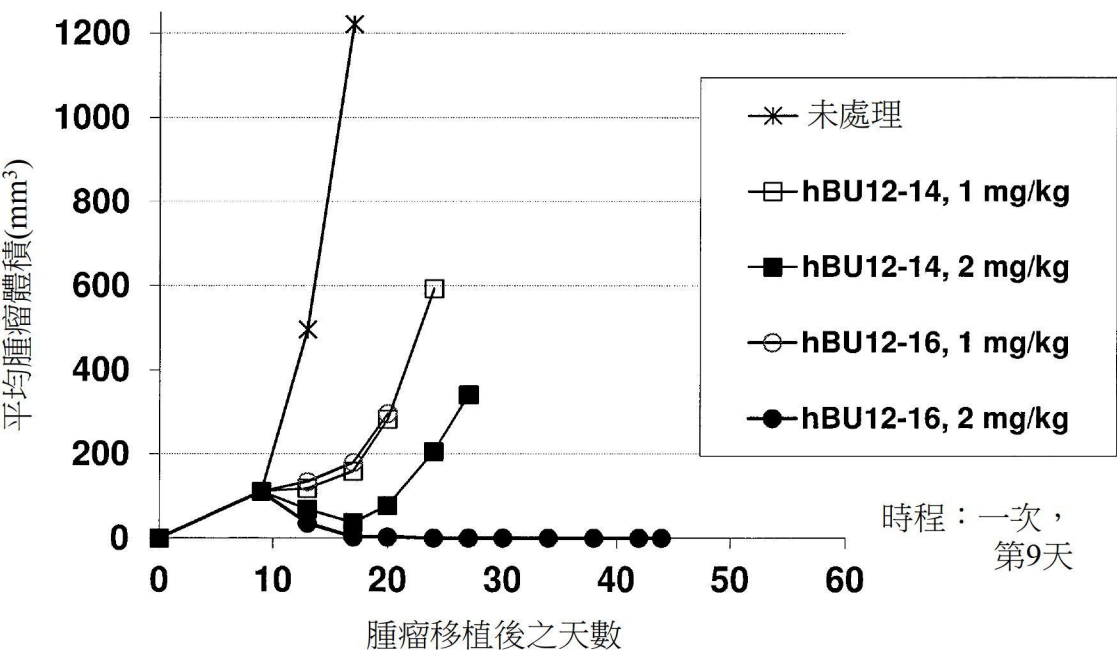
【圖3】



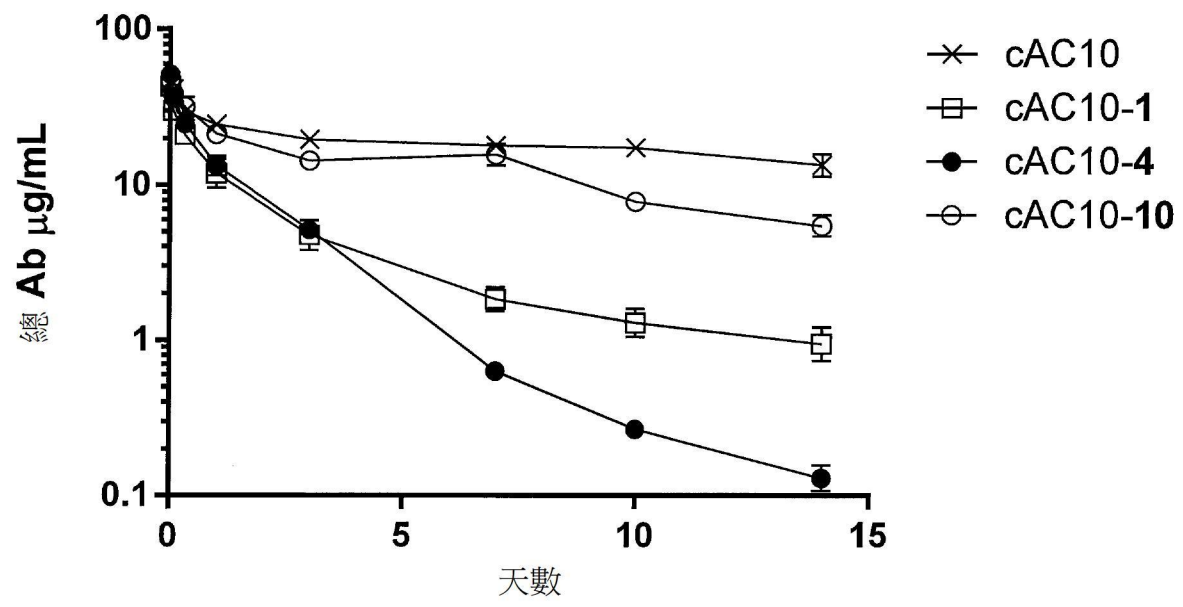
【圖4】



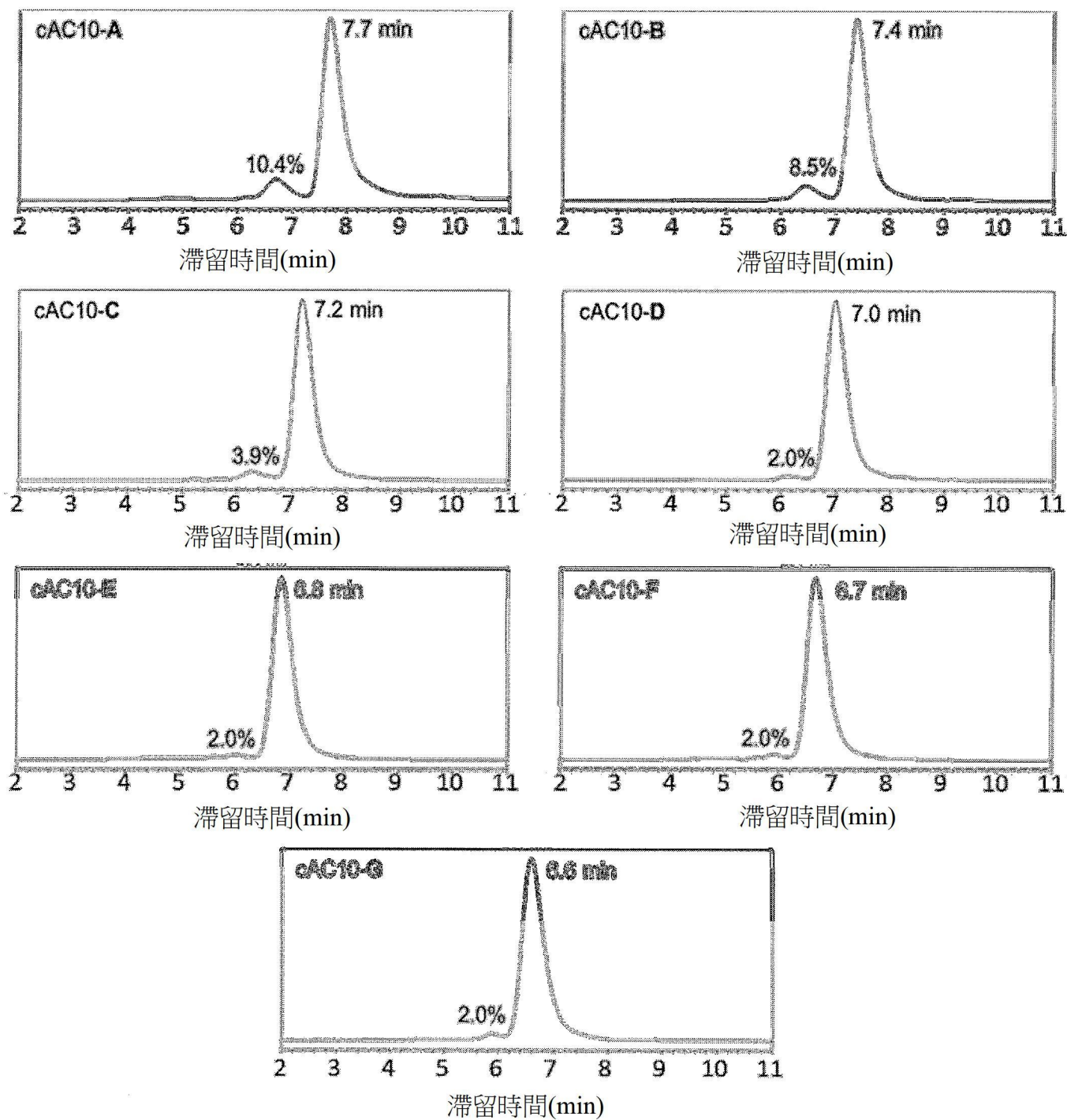
【圖5】



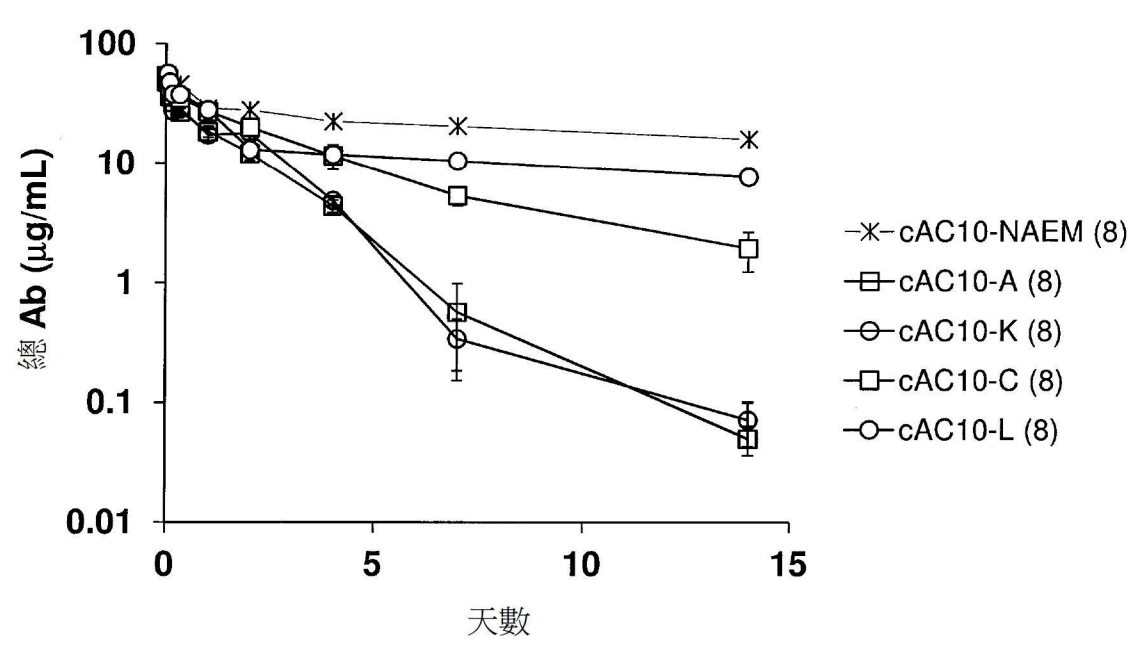
【圖6】



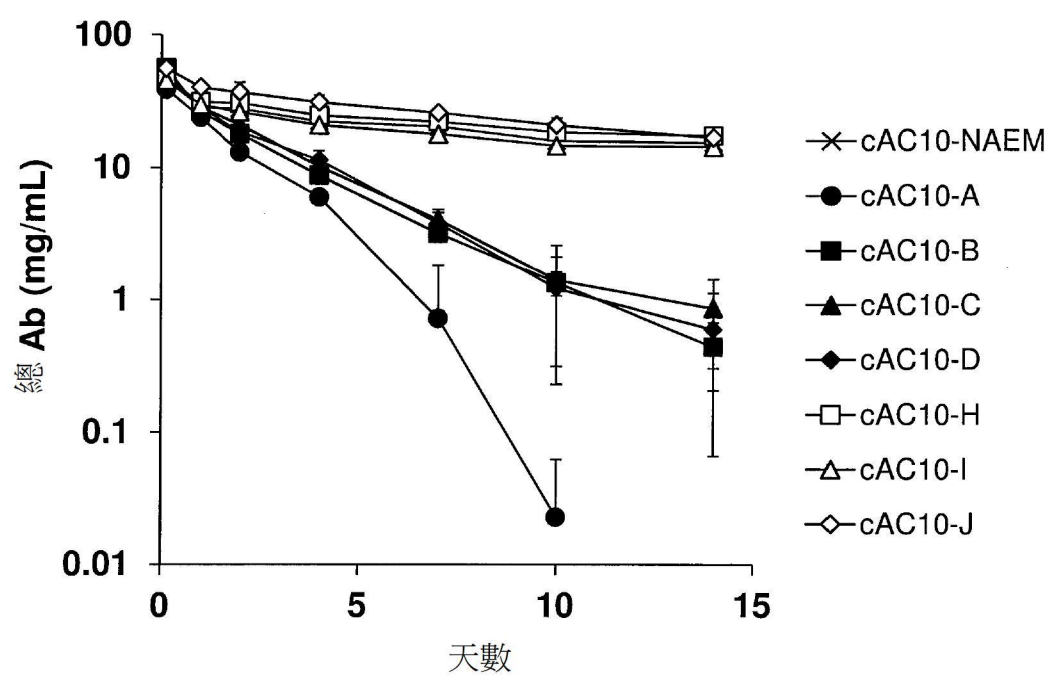
【圖7】



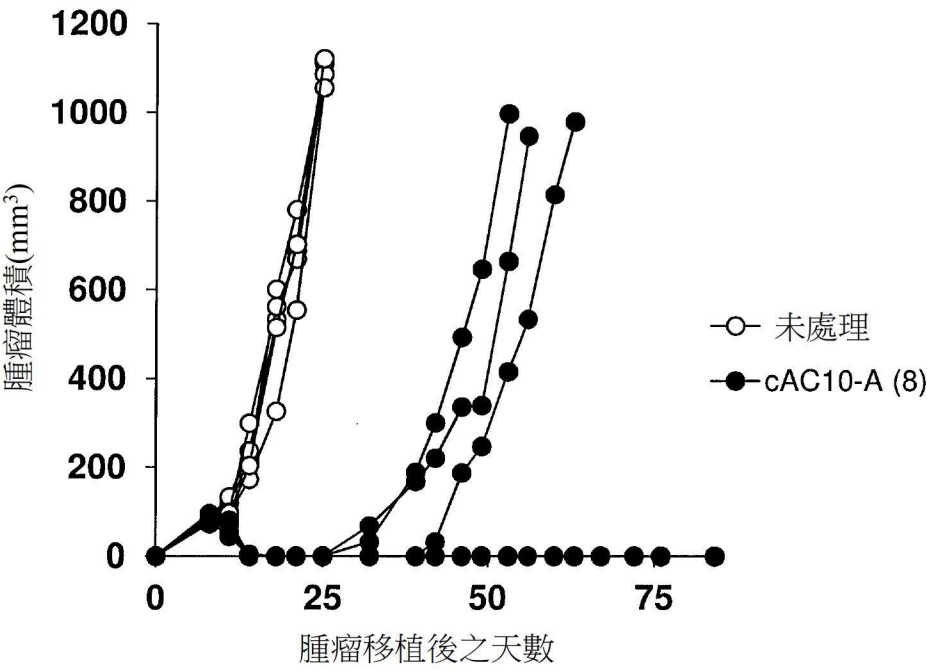
【圖8】



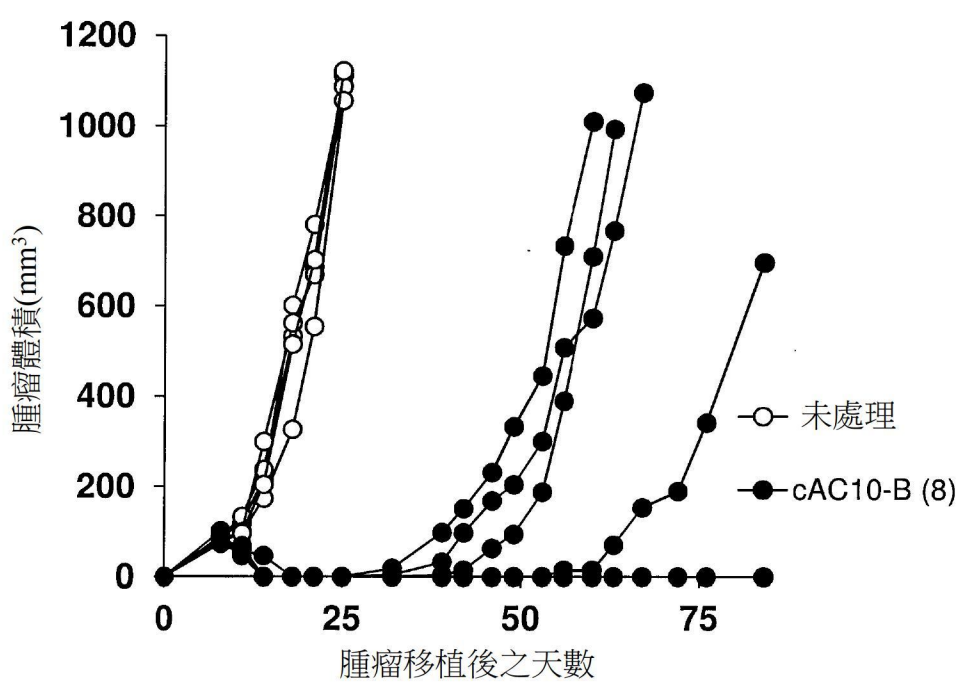
【圖9】



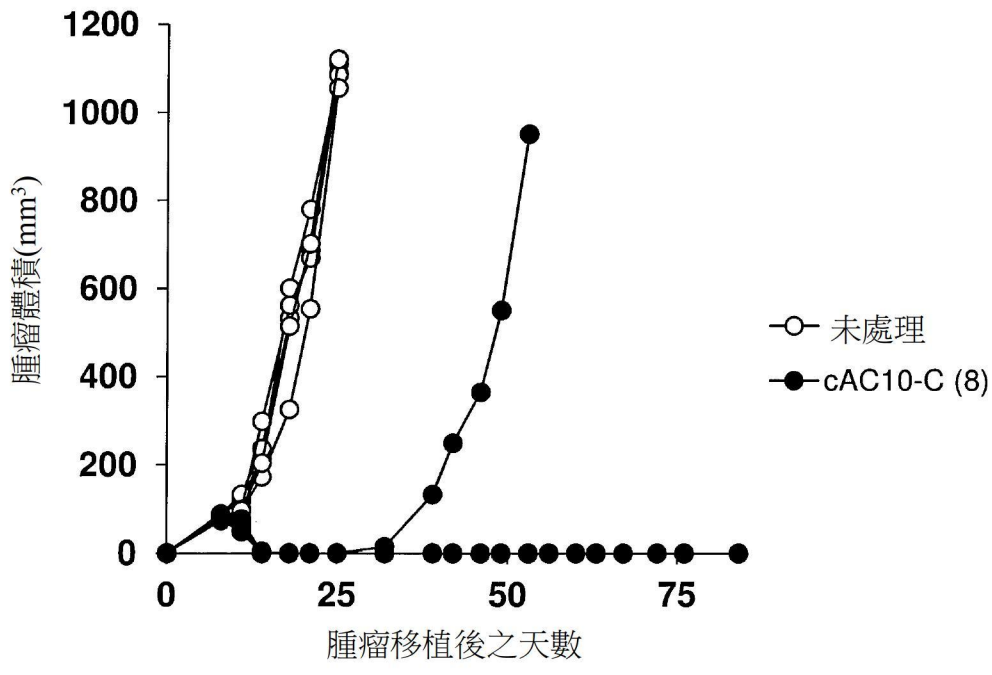
【圖10】



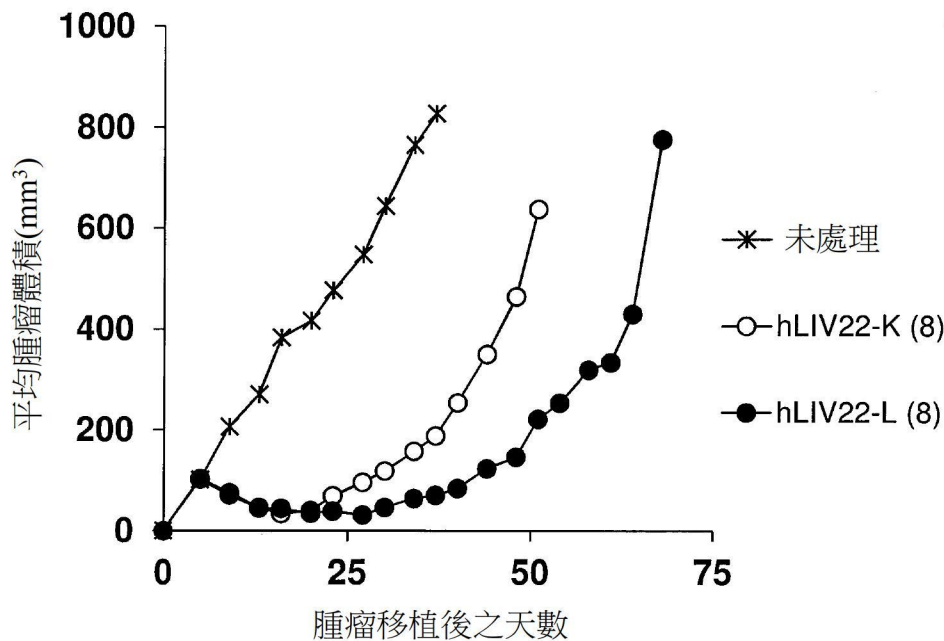
【圖11】



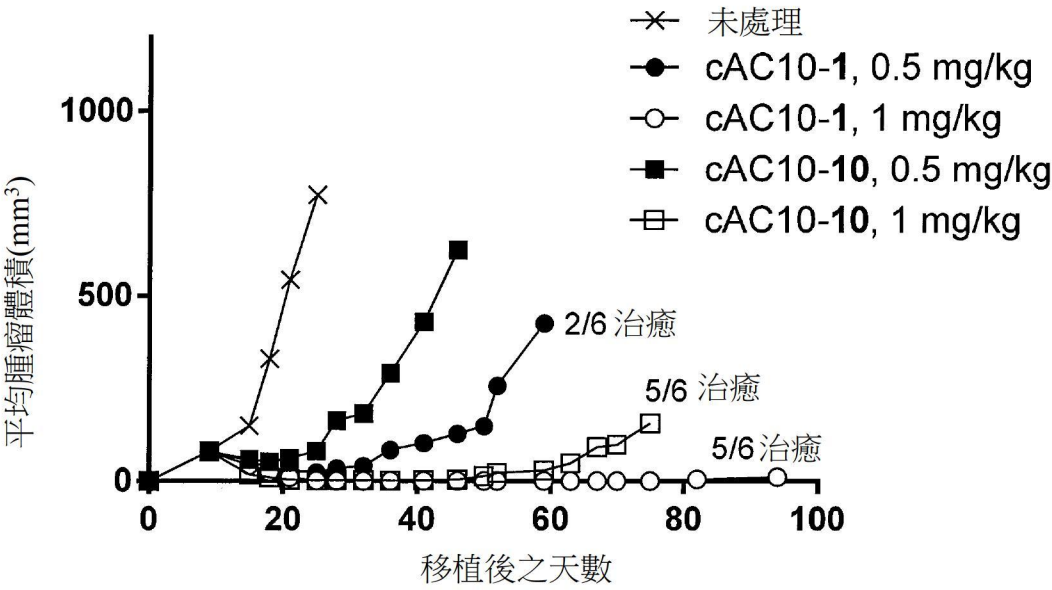
【圖12】



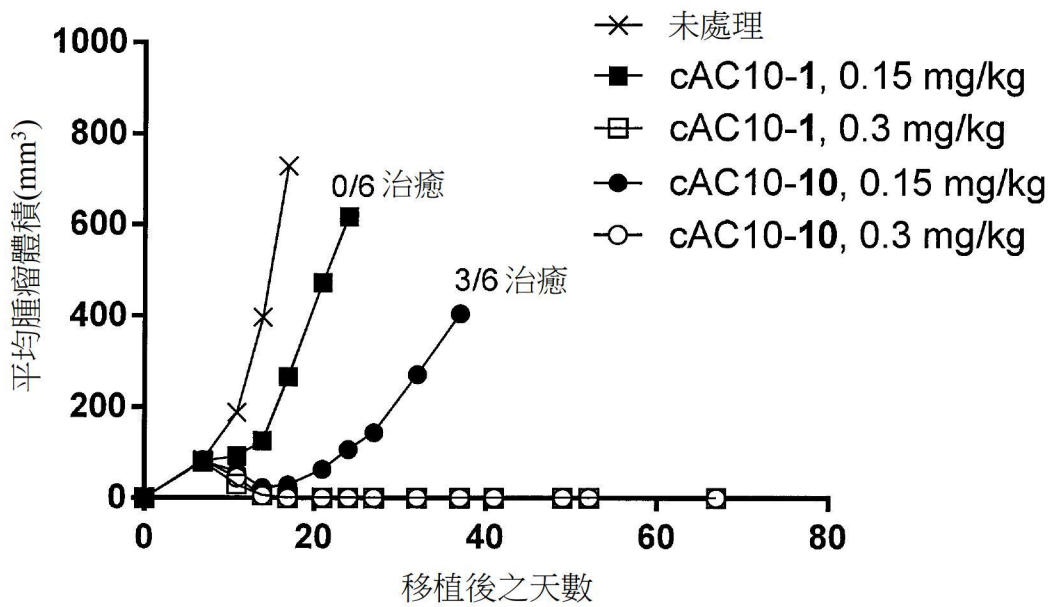
【圖13】



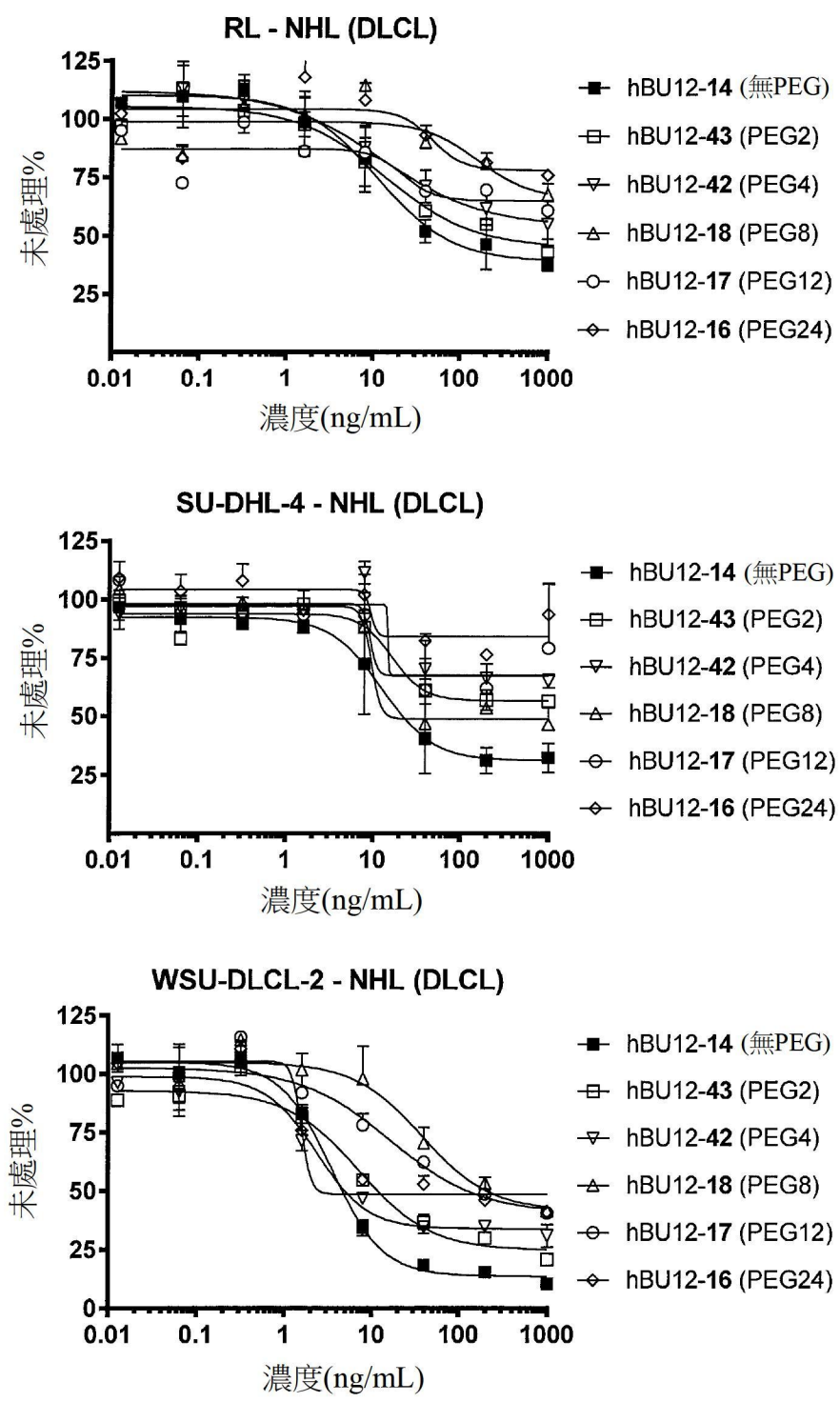
【圖14】



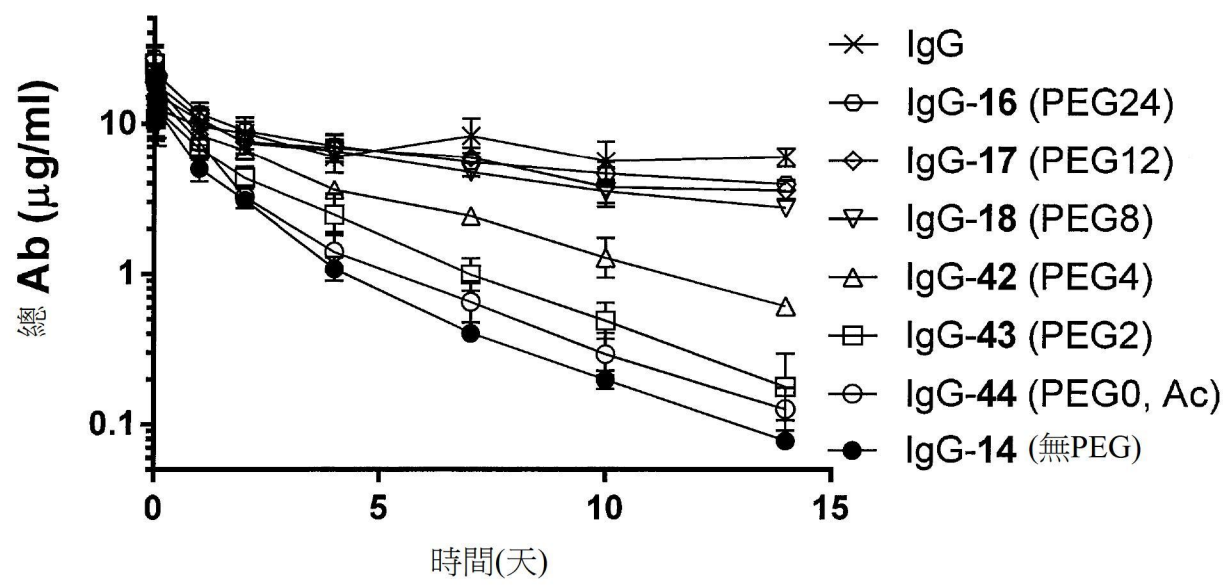
【圖15】



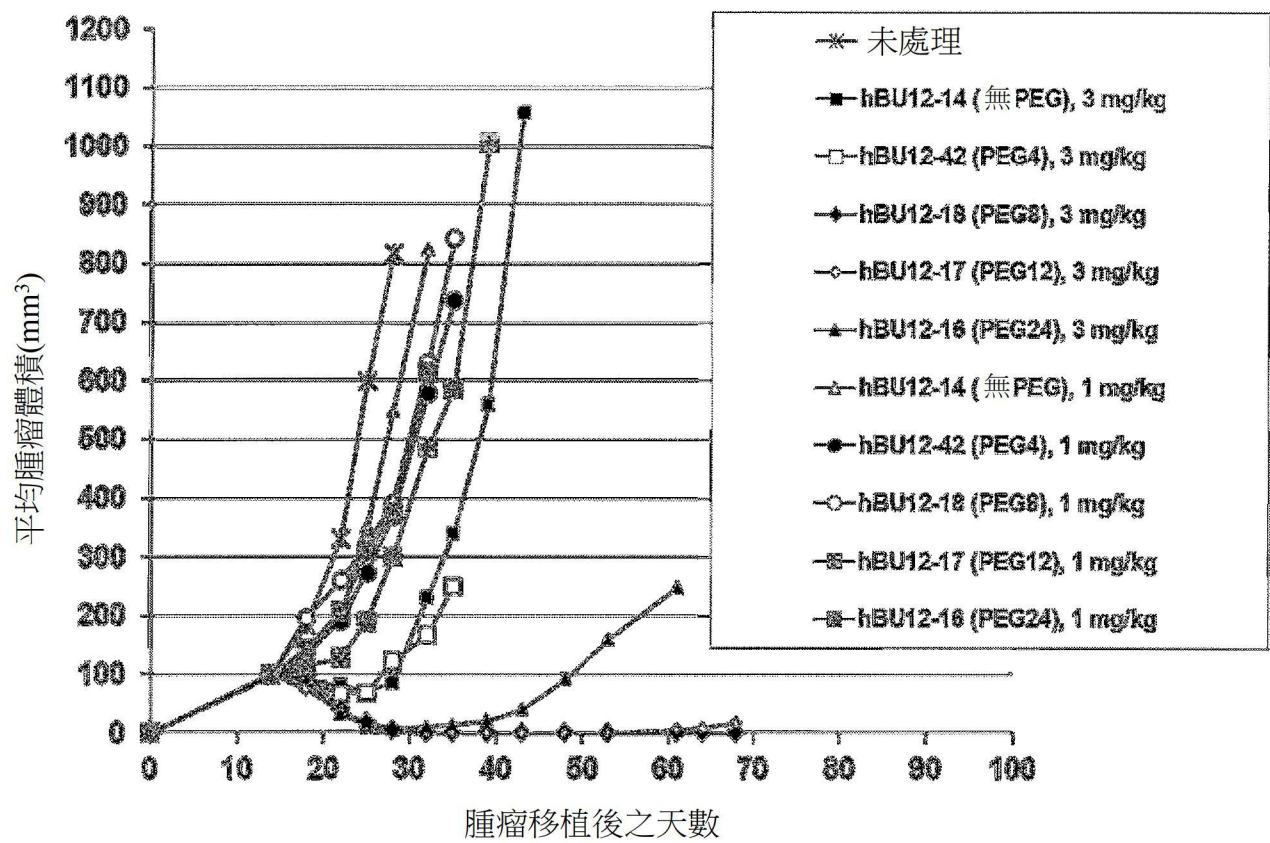
【圖16】



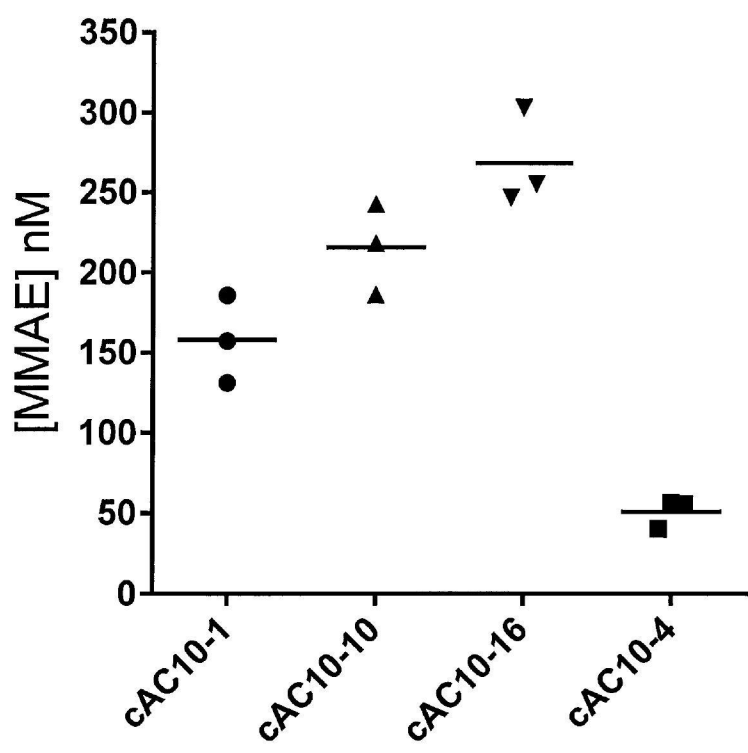
【圖17】



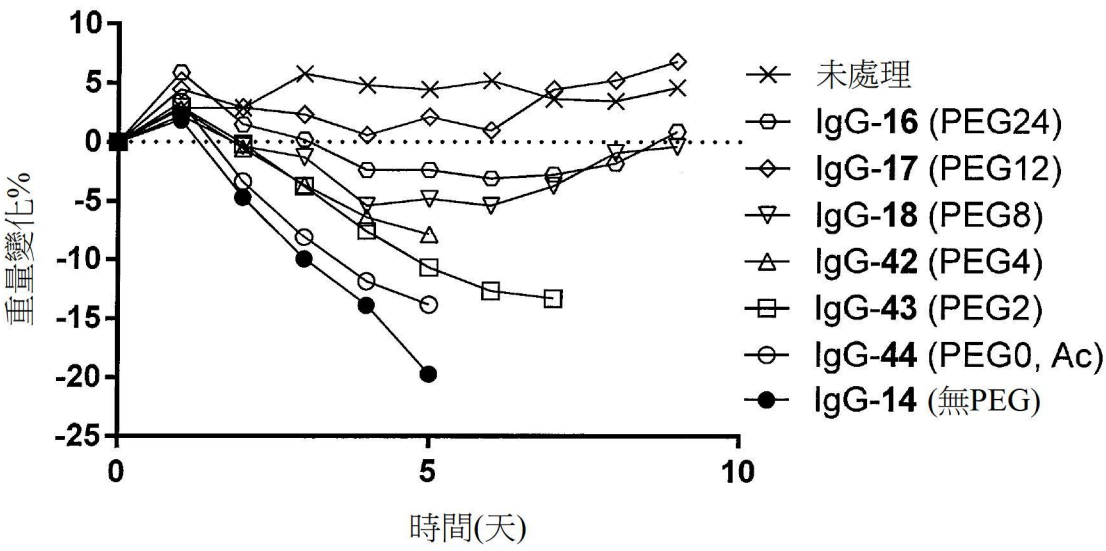
【圖18】



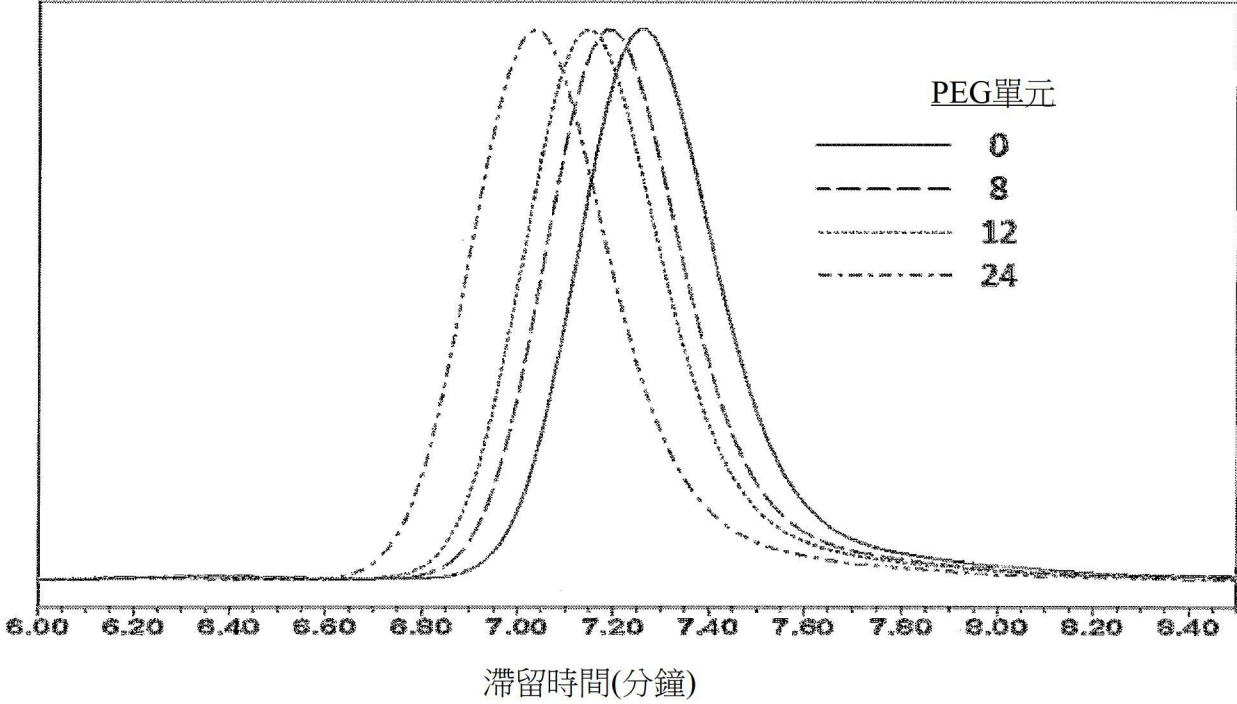
【圖19】



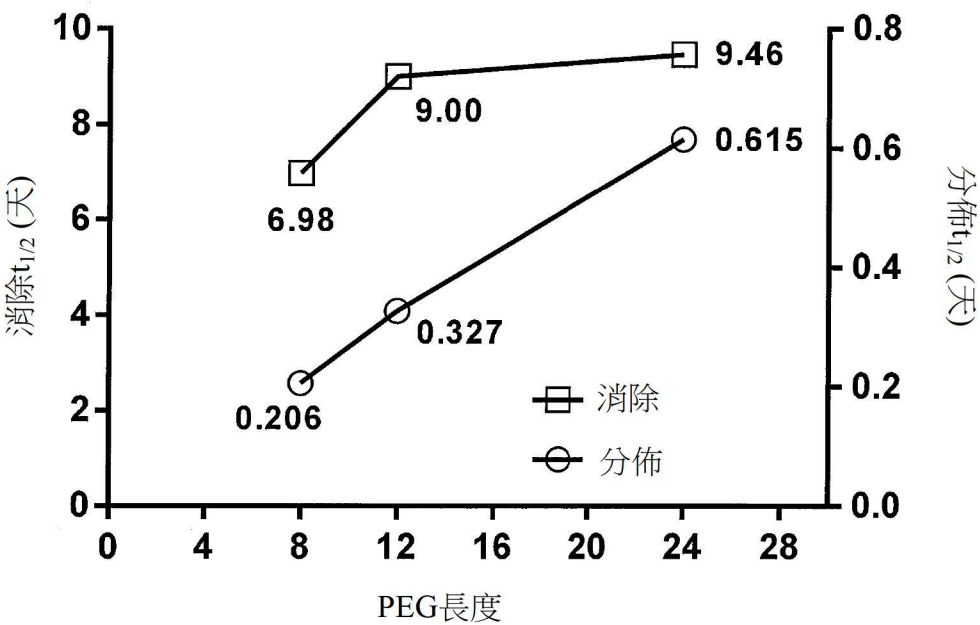
【圖20】



【圖21】



【圖22】



【圖23】