



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119584992 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 07

(21) 申请号 202380043883.1
(22) 申请日 2023.04.05
(30) 优先权数据
10-2022-0043049 2022.04.06 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.29
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2023/000193 2023.04.05
(87) PCT国际申请的公布数据
W02023/194800 EN 2023.10.12
(71) 申请人 瑞嘉化学生物科学股份有限公司
地址 韩国大田市
(72) 发明人 朴昌植 宋昊永 金惠正 郑哲雄
S·阿尔贝蒂

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287
专利代理师 姚丛

(51) Int.Cl.
A61K 47/68 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

权利要求书34页 说明书68页
序列表（电子公布） 附图10页

(54) 发明名称

包含抗人TROP2的抗体的抗体-药物缀合物及其用途

(57) 摘要

本公开涉及靶向人TROP2 (肿瘤相关钙信号转导子2, TACSTD2) 的抗体-药物缀合物 (ADC) 以及其用途, 并且更具体地, 本发明涉及: 包括与人TROP2结合的抗体或其抗原结合片段的ADC; 和ADC用于制造用于治疗 and/或治疗疾病的药物的用途, 更具体地, 疾病是过度增生性和/或血管生成疾病, 诸如癌症疾病。



1. 一种具有以通式I所表示的结构的多聚体或其药学上可接受的盐:

[通式I]

$Ab-[L-(B)_1]_m$

其中,

Ab是抗TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,也称为TACSTD2)抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中

所述重链可变区包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR3;并且

所述轻链可变区包含:包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3;

L是连接子;

B是活性剂;并且

1和m各自独立地是1至20。

2. 根据权利要求1所述的多聚体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含:

SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列;

与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少90%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的所述重链CDR1、包含

SEQ ID NO:4的氨基酸序列的所述重链CDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的所述重链CDR3的序列;或

与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少95%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的所述重链CDR1、包含

SEQ ID NO:4的氨基酸序列的所述重链CDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的所述重链CDR3的序列。

3. 根据权利要求1或2所述的多聚体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含:

SEQ ID NO:16的氨基酸序列;

与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的所述轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的所述轻链CDR3的序列;或

与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的所述轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的所述轻链CDR3的序列。

4. 根据权利要求1所述的多聚体,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的多聚体,其中所述抗体是人源化抗体。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的多聚体,其中所述人源化抗体包含:

(i) 来自人抗体重链或来自人共同构架的可变重链构架区,其中所述可变重链构架区包含以下氨基酸序列变化中的一者或多者:Y27F、T30S、V37L、M48I、G49A、I70L和R72V;和

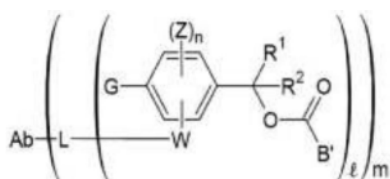
(ii) 来自人抗体轻链或来自人共同构架的可变轻链构架区, 其中所述可变轻链构架区包含以下氨基酸序列变化: Y49S。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的缀合物, 其中所述抗体或其抗原结合片段选自单克隆抗体、域抗体 (dAb)、单链抗体 (scAb)、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、scFab 片段、Fv 片段、dsFv 片段、单链可变片段 (scFv)、scFv-Fc 片段、单域重链抗体、单域轻链抗体、变体抗体、多聚抗体、微型抗体、双功能抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的缀合物, 其中 L 是可裂解的。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物具有以通式 IIa 表示的结构或其药学上可接受的盐:

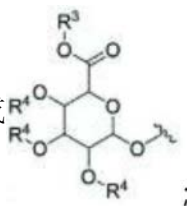
[通式 IIa]



其中

每个 B' 是活性剂;

每个 G 独立地是葡萄糖醛酸部分或



R³ 是氢或羧基保护基;

每个 R⁴ 独立地是氢或羟基保护基;

R¹ 和 R² 各自独立地是氢、C₁₋₈ 烷基或 C₃₋₈ 环烷基;

W 是 -C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-SO₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-SONR'- 或 -PO₂NR'-, 其中 C、S 或 P 直接键合至式 IIa 的苯环;

R' 和 R'' 各自独立地是氢、C₁₋₈ 烷基、C₃₋₈ 环烷基、C₁₋₈ 烷氧基、C₁₋₈ 烷硫基、单-C₁₋₈ 烷基氨基或二-C₁₋₈ 烷基氨基、C₃₋₂₀ 杂芳基或 C₆₋₂₀ 芳基;

每个 Z 独立地是氢、C₁₋₈ 烷基、卤素、氰基或硝基;

n 是 0、1、2 或 3;

L 包含:

A) C₁₋₅₀ 亚烷基或 C₁₋₅₀ 亚杂烷基, 并且包含

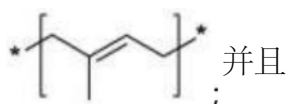
(i) 一个或多个不饱和键

(ii) 亚杂芳基; 或

(iii) 被至少一个 C₁₋₂₀ 烷基取代; 或

B) 至少一个具有以通式 III 表示的结构的异戊二烯基:

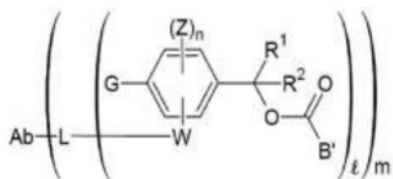
[通式 III]



1和m各自独立地是1至20。

10. 一种具有以通式IIa表示的结构的缀合物或其药学上可接受的盐：

[式IIa]

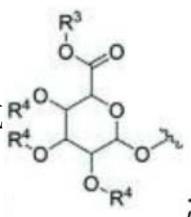


其中

Ab是抗TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,也称为TACSTD2)抗体或其抗原结合片段；

每个B'是活性剂；

每个G独立地是葡萄糖醛酸部分或



R³是氢或羧基保护基；

每个R⁴独立地是氢或羟基保护基；

R¹和R²各自独立地是氢、C₁₋₈烷基或c₃₋₈环烷基；

W是 -c(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-SO₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-SONR'-或-PO₂NR'-, 其中C、S或P直接键合至式IIa的苯环；

R'和R''各自独立地是氢、C₁₋₈烷基、C₃₋₈环烷基、C₁₋₈烷氧基、C₁₋₈烷硫基、单-C₁₋₈烷基氨基或二-C₁₋₈烷基氨基、C₃₋₂₀杂芳基或C₆₋₂₀芳基；

每个Z独立地是氢、C₁₋₈烷基、卤素、氰基或硝基；

n是0、1、2或3；

L包含：

A) C₁₋₅₀亚烷基或C₁₋₅₀亚杂烷基, 并且包含

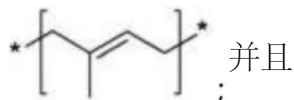
(i) 一个或多个不饱和键

(ii) 亚杂芳基；或

(iii) 被至少一个C₁₋₂₀烷基取代；或

B) 至少一个具有以通式III表示的结构的异戊二烯基：

[通式III]



1和m各自独立地是1至20。

11. 根据权利要求10所述的缀合物, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 其中：

所述重链可变区包含：包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR3；并且

所述轻链可变区包含：包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11

的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

12. 根据权利要求11所述的缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,所述重链可变区包含:

SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列;

与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少90%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的所述轻链CDR1、包含

SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的所述轻链CDR3的序列;或

与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少95%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的所述轻链CDR1、包含

SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的所述轻链CDR3的序列。

13. 根据权利要求11或12所述的缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,所述轻链可变区包含:

SEQ ID NO:16的氨基酸序列;

与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的所述轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的所述轻链CDR3的序列;或

与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的所述轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的所述轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的所述轻链CDR3的序列。

14. 根据权利要求11所述的缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

15. 根据权利要求11至14中任一项所述的缀合物,其中所述抗体是人源化抗体。

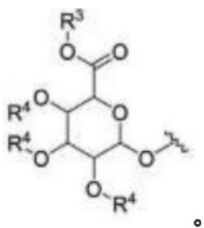
16. 根据权利要求11至15中任一项所述的缀合物,其中所述人源化抗体包含:

(i) 来自人抗体重链或来自人共同构架的可变重链构架区,其中所述可变重链构架区包含以下氨基酸序列变化中的一者或多者:Y27F、T30S、V37L、M48I、G49A、I70L和R72V;和

(ii) 来自人抗体轻链或来自人共同构架的可变轻链构架区,其中所述可变轻链构架区包含以下氨基酸序列变化:Y49S。

17. 根据权利要求11至16中任一项所述的缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段选自单克隆抗体、域抗体(dAb)、单链抗体(scAb)、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFab片段、Fv片段、dsFv片段、单链可变片段(scFv)、scFv-Fc片段、单域重链抗体、单域轻链抗体、变体抗体、多聚抗体、微型抗体、双功能抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。

18. 根据权利要求9至17中任一项所述的缀合物,其中每个G是



19. 根据权利要求9至18中任一项所述的缀合物,其中 R^1 和 R^2 各自是氢。
20. 根据权利要求9至19中任一项所述的缀合物,其中 R^3 是氢。
21. 根据权利要求9至20中任一项所述的缀合物,其中每个 R^4 是羟基保护基。
22. 根据权利要求9至21中任一项所述的缀合物,其中 n 是0。
23. 根据权利要求9至22中任一项所述的缀合物,其中每个 W 是 $-C(O)NR'$,另外其中 C 直接键合至式IIa的苯环,并且 NR' 键合至 L 。
24. 根据权利要求9至23中任一项所述的缀合物,其中每个 R^4 独立地是氢。
25. 根据权利要求9至18中任一项所述的缀合物,其中:
 R^1 和 R^2 各自是氢;
 n 是0;并且
每个 W 是 $-C(O)NR'$, C 直接键合至式IIa的苯环,并且 R' 是氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 C_{1-8} 烷硫基、单- C_{1-8} 烷基氨基或二- C_{1-8} 烷基氨基、 C_{3-20} 杂芳基或 C_{6-20} 芳基,其中 NR' 键合至 L 。
26. 根据权利要求9至25中任一项所述的缀合物,其中 L 包含含氮的1至50元亚杂烷基。
27. 根据权利要求9至26中任一项所述的缀合物,其中 L 包含亲水性氨基酸。
28. 根据权利要求27所述的缀合物,其中 W 包含所述亲水性氨基酸的两个或更多个原子,并且 W 的氮与所述亲水性氨基酸的羰基形成肽键。
29. 根据权利要求9至28中任一项所述的缀合物,其中
 L 是含氮的1至50元亚杂烷基,
所述连接子包含亲水性氨基酸的两个或更多个原子,并且
所述氮与所述亲水性氨基酸的羰基形成肽键。
30. 根据权利要求9至29中任一项所述的缀合物,其中 L 通过硫醚键共价键合至所述抗体且所述硫醚键包含所述抗体的半胱氨酸的硫原子。
31. 根据权利要求30所述的缀合物,其中:
所述抗体包含能够通过所述抗体的C端处被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序,并且
所述硫醚键包含所述氨基酸基序的半胱氨酸的硫原子。
32. 根据权利要求31所述的缀合物,其中所述氨基酸基序具有CYYX序列,另外其中:
 C 是半胱氨酸;
 Y 是脂肪族氨基酸;
 X 选自谷氨酰胺、谷氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸和亮氨酸;并且
所述硫醚键包含所述氨基酸基序的半胱氨酸的硫原子。
33. 根据权利要求31所述的缀合物,其中所述氨基酸基序具有CYYX序列,另外其中:
 Y 选自丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸。
34. 根据权利要求31所述的缀合物,其中所述氨基酸基序具有CVIM (SEQ ID NO:24) 或 CVLL序列 (SEQ ID NO:25)。
35. 根据权利要求31至34中任一项所述的缀合物,其中所述氨基酸基序前1至20个氨基酸中的至少一者是甘氨酸。
36. 根据权利要求1至35中任一项所述的缀合物,其中 L 包含在C端处的GGGGGGGCVIM

(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列。

37. 根据权利要求1至36中任一项所述的缀合物,其中L包含C₁₋₅₀亚杂烷基。

38. 根据权利要求1至37中任一项所述的缀合物,其中L包含肟。

39. 根据权利要求38所述的缀合物,其中所述肟的氧原子在L连接至W的一侧且所述肟的碳原子在L连接至Ab的一侧。

40. 根据权利要求38所述的缀合物,其中所述肟的碳原子在L连接至W的一侧且所述肟的氧原子在L连接至Ab的一侧。

41. 根据权利要求1至36中任一项所述的缀合物,其中

L是含肟的C₁₋₅₀亚杂烷基,

所述肟的氧原子在L连接至W的一侧,

所述肟的碳原子在L连接至Ab的一侧,或

所述肟的碳原子在L连接至W的一侧,并且

所述肟的氧原子在L连接至Ab的一侧。

42. 根据权利要求1至41中任一项所述的缀合物,其中L包含肟,并且至少一个异戊二烯基单元将所述肟共价键合至Ab(例如至少一个异戊二烯基单元将所述肟直接或间接键合至Ab)。

43. 根据权利要求1至42中任一项所述的缀合物,其中L还包含以通式VIII或通式IX表示的连接单元:

[通式VIII]

$-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$

[式IX]

$-(CH_2CH_2X)_w-$

V是单键、-O-、-S-、-NR²¹-、-C(O)NR²²-、-NR²³C(O)-、-NR²⁴SO₂-或-SO₂NR²⁵-;

X是-O-、C₁₋₈亚烷基或-NR²¹-;

R²¹至R²⁵各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷基C₆₋₂₀芳基或C₁₋₆烷基-C₃₋₂₀杂芳基;

r是0至10;

p是0至10;

q是1至20;并且

w是1至20。

44. 根据权利要求43所述的缀合物,其中q是1至10。

45. 根据权利要求43或44所述的缀合物,其中r是1或2。

46. 根据权利要求43至45中任一项所述的缀合物,其中p是1或2。

47. 根据权利要求43至46中任一项所述的缀合物,其中V是-O-。

48. 根据权利要求43所述的缀合物,其中:

q是1至10;

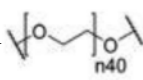
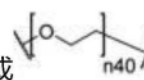
r和p各自是1或2;并且

V是-O-。

49. 根据权利要求43至48中任一项所述的缀合物,其中X是-O-。

50. 根据权利要求43至48中任一项所述的缀合物,其中w是1至10。

51. 根据权利要求43至48中任一项所述的缀合物, 其中:
 所述X是-O-; 并且
 w是1至10。

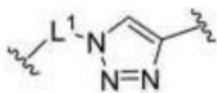
52. 根据权利要求43至51中任一项所述的缀合物, 其中L包含  或 , 其中n40是1至10, 优选至少2。

53. 根据权利要求43至52中任一项所述的缀合物, 其中L包含肟, 并且至少一个聚乙二醇单元将所述肟共价键合至活性剂。

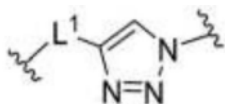
54. 根据权利要求43至53中任一项所述的缀合物, 其中L包含由炔烃与叠氮基之间或由醛或酮基团与肟或羟胺之间的反应形成的结合单元。

55. 根据权利要求43至54中任一项所述的缀合物, 其中L还包含由以下通式IVa、IVb、IVc、IVd或IVe表示的结合单元:

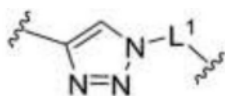
[通式IVa]



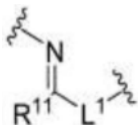
[通式IVb]



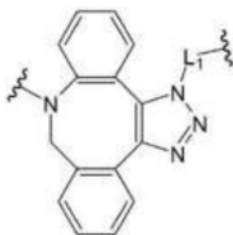
[通式IVc]



[通式IVd]



[通式IVe]



其中

L₁和L₂各自独立地是单键或C₁₋₃₀亚烷基; 并且

R₁₁是氢或C₁₋₁₀烷基。

56. 根据权利要求55所述的缀合物, 其中L₁和L₂各自独立地是单键、C₁₁亚烷基或C₁₂亚烷基。

57. 根据权利要求3至56中任一项所述的缀合物, 其中所述类异戊二烯转移酶为法呢基蛋白质转移酶(FTase)或香叶基香叶基转移酶(GGTase)。

58. 根据权利要求1至57中任一项所述的缀合物, 其中L是支链的且包含:

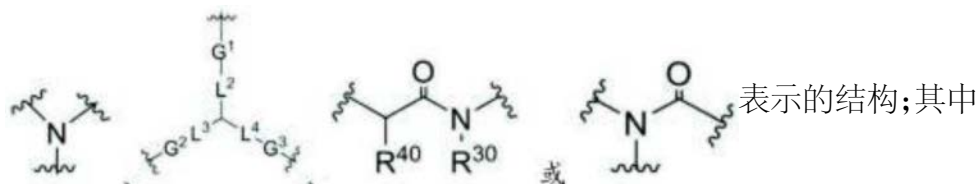
- i) 通过一级连接子与所述抗体共价偶合的分支单元;
- ii) 第一分支, 其中第一活性剂通过二级连接子和裂解基团共价偶合至所述分支单元;

和

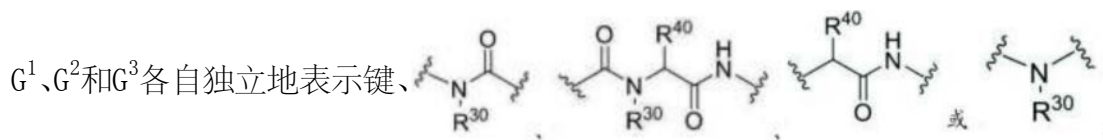
iii) 第二分支, 其中:

- a) 第二活性剂通过二级连接子和裂解基团共价偶合至所述分支单元; 或
- b) 聚乙二醇部分共价偶合至所述分支单元。

59. 根据权利要求58所述的缀合物, 其中所述分支单元具有以



L^2 、 L^3 和 L^4 各自独立地是键或 $-C_nH_{2n}-$,
n是1至30;



R^{30} 是氢或 C_{1-30} 烷基;

R^{40} 是氢或 L^5-COOR_6 ; 并且

L^5 是键或 $-C_{n'}H_{2n'}-$;

n' 是1至10; 并且

R_6 是氢或 C_{1-30} 烷基。

60. 根据权利要求58或59所述的缀合物, 其中所述裂解基团能够在靶细胞中裂解且能够释放一种或多种活性剂。

61. 根据权利要求58至60中任一项所述的缀合物, 其中:

至少一个分支连接子共价偶合至Ab; 并且

至少两种活性剂共价偶合至所述分支连接子。

62. 根据权利要求61所述的缀合物, 其中一个分支连接子偶合至Ab。

63. 根据权利要求61所述的缀合物, 其中两个分支连接子偶合至Ab。

64. 根据权利要求61所述的缀合物, 其中三个分支连接子偶合至Ab。

65. 根据权利要求61所述的缀合物, 其中四个分支连接子偶合至Ab。

66. 根据权利要求59至65中任一项所述的缀合物, 其中各分支连接子偶合至两种活性剂。

67. 根据权利要求59至66中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物包含至少两种不同的活性剂。

68. 根据权利要求59至67中任一项所述的缀合物, 其中至少一个分支连接子偶合至两种不同的活性剂。

69. 根据权利要求59至68中任一项所述的缀合物, 其中所述分支单元是氮原子。

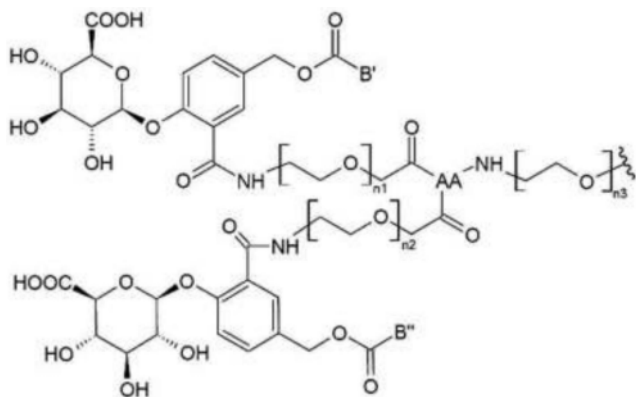
70. 根据权利要求59至68中任一项所述的缀合物, 其中所述分支单元是酰胺且所述一

级连接子包含所述酰胺的羰基。

71. 根据权利要求59至69中任一项所述的缀合物, 其中所述分支单元是酰胺且所述二级连接子包含所述酰胺的羰基。

72. 根据权利要求59至71中任一项所述的缀合物, 其中所述分支单元是赖氨酸。

73. 根据权利要求1至72中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物包含由以下表示的结构:



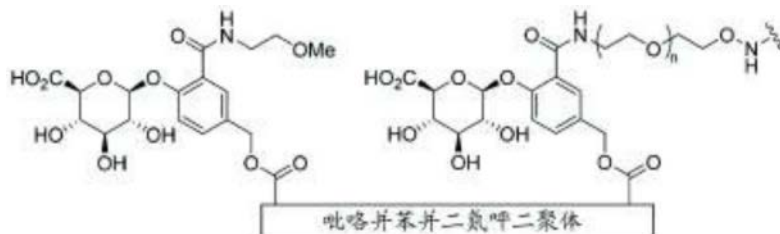
或其药学上可接受的盐; 其中

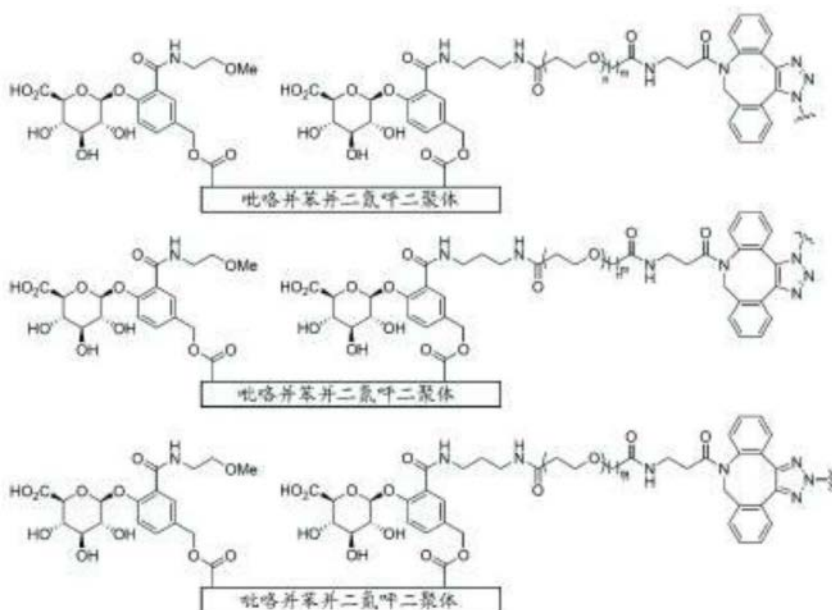
B'和B''各自是活性剂;

n1至n3各自独立地是0至30; 并且

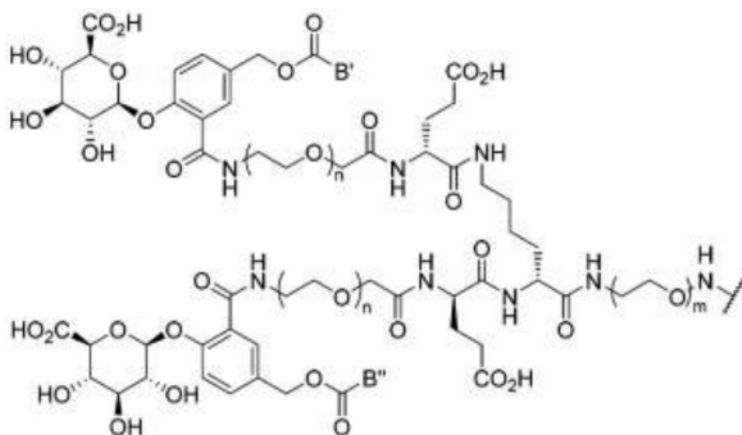
AA是氨基酸基团。

74. 根据权利要求1至73中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物包含由以下表示的结构:





或



其中B'和B''是指彼此相同或不同的活性剂;

所述吡咯并苯并二氮唑二聚体,例如式III化合物;并且

m和n各自独立地是指0至30,

或其药学上可接受的盐。

75. 根据权利要求1至74中任一项所述的缀合物,其中所述活性剂是化学治疗剂或毒素。

76. 根据权利要求1至75中任一项所述的缀合物,其中所述活性剂是免疫调节化合物、抗癌剂、抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗寄生虫剂或其组合。

77. 根据权利要求1至73中任一项所述的缀合物,其中所述活性剂选自:

(a) 厄洛替尼(erlotinib)、硼替佐米(bortezomib)、氟维司群(fulvestrant)、舒癌特(sutent)、来曲唑(letrozole)、甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)、PTK787/ZK 222584、奥沙利铂(oxaliplatin)、5-氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸、雷帕霉素(rapamycin)、拉帕替尼(lapatinib)、洛那法尼(lonafarnib)、索拉非尼(sorafenib)、吉非替尼(gefitinib)、AG1478、AG1571、噻替派(thiotepa)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)、哌泊舒凡(piposulfan)、苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米

特多巴 (meturedopa)、尤利多巴 (uredopa)、伸乙基亚胺、六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷酰胺、三伸乙基硫代磷酰胺、三羟甲基密胺、布拉他辛 (bullatacin)、布拉他辛酮 (bullatacinone)、喜树碱 (camptothecin)、拓朴替康 (topotecan)、苔藓抑素 (bryostatins)、海洋抑素 (callystatin)、CC-1065、阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin)、比折来新 (bizelesin)、念珠藻素1 (cryptophycin 1)、念珠藻素8、海兔毒素 (dolastatin)、多卡霉素 (duocarmycin)、KW-2189、CB1-TM1、艾榴塞洛素 (eleutherobin)、盘克斯他汀 (pancratistatin)、沙考地汀 (sarcodictyin)、海绵抑素 (spongistatin)、氯芥苯丁酸 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、氯磷酰胺、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺、甲基二(氯乙基)胺 (mechlorethamine)、美法仑 (melphalan)、新恩比兴 (novembichin)、芬司特瑞 (phenesterine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、曲洛磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard)、卡莫司汀 (carmustine)、氯脲霉素、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine)、雷莫司汀 (ranimustine)、卡奇霉素 (calicheamicin)、卡奇霉素 γ 1、卡奇霉素 ω 1、达内霉素 (dynemicin)、达内霉素A、氯屈膦酸盐 (clodronate)、埃斯培拉霉素 (esperamicin)、新抑癌菌素发色团 (neocarzinostatin chromophore)、阿克拉霉素 (aclacinomysins)、放线菌素 (actinomycin)、安曲霉素 (antrmycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博莱霉素 (bleomycins)、放线菌素C (cactinomycin)、卡柔比星 (carabycin)、洋红霉素 (caminomycin)、嗜癌菌素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素D (dactinomycin)、道诺比星 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素 (doxorubicin)、吗啉基-阿霉素、氰基吗啉基-阿霉素、2-吡咯啉基-阿霉素、脂质阿霉素、去氧阿霉素、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素C (mitomycin C)、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺加霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泼非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、奎那霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链霉素 (streptomycin)、链脲佐菌素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin)、5-氟尿嘧啶、迪诺特宁 (denopterin)、甲胺喋呤 (methotrexate)、蝶罗呤 (pteropterin)、曲美沙特 (trimetrexate)、氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯嘌呤 (6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thiguanine)、安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (6-azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、二去氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine)、卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone)、胺格鲁米特 (aminogluthetimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane)、醛叶酸、乙酰葡萄糖酯、醛磷酰胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶 (eniluracil)、安吡啶 (amsacrine)、贝斯布西 (bestrabucil)、比生群 (bisantrene)、依达曲沙 (edatraxate)、地磷酰胺 (defofamine)、地美可辛 (demecolcine)、地吡醌 (diaziquone)、艾弗鸟氨酸 (elfomithine)、依利醋铵 (elliptinium acetate)、依托格鲁 (etoglucid)、硝酸镓、羟基脲、蘑菇多糖 (lentinan)、氯尼达明 (lonidainine)、美登素 (maytansine)、胺沙托辛 (ansamitocin)、米托胍脲 (mitoguazone)、米托蒽醌

(mitoxantrone)、莫比达摩(mopidanmol)、二胺硝吡啶(nitraerine)、喷司他汀(pentostatin)、苯来美特(phenamet)、吡柔比星(pirarubicin)、洛索蒽醌(losoxantrone)、2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide)、丙卡巴肼(procarbazine)、多糖-k(polysaccharide-k)、雷佐生(raZoXane)、根瘤菌素(rhizoxin)、西索菲兰(sizofiran)、锗螺胺(spirogermanium)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)、三亚胺醌(triaziquone)、2,2',2''-三氯三乙胺、T-2毒素、弗纳库林A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)、胺癸叮(anguidine)、乌拉坦(urethane)、长春地辛(vindesine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、甘露醇氮芥(mannomustine)、二溴甘露醇(mitobronitol)、二溴卫矛醇(mitolactol)、哌泊溴烷(pipobroman)、加西托星(gacytosine)、阿拉伯糖苷(arabinoside)、环磷酰胺、噻替派、紫杉醇(paclitaxel)、紫杉醇、紫杉醇的白蛋白工程化纳米粒子调配物、多西他赛(docetaxel)、氯芥苯丁酸、吉西他滨(gemcitabine)、6-硫鸟嘌呤、巯嘌呤、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、长春碱(vinblastine)、铂、依托泊苷(etoposide)、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱(vincristine)、长春瑞滨(vinorelbine)、诺凡特龙(novantrone)、替尼泊苷(teniposide)、依达曲沙(edatrexate)、道诺霉素(daunomycin)、氨基喋呤(aminopterin)、希罗达(xeloda)、伊班膦酸盐(ibandronate)、CPT-11、拓扑异构酶(topoisomerase)抑制剂RFS2000、二氟甲基鸟氨酸、视黄酸、卡培他滨(capecitabine)或其药学上可接受的盐、溶剂合物或酸;

(b) 单核因子(monokine)、淋巴介质、传统的多肽激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、松弛素、松弛素原、糖蛋白质激素、促卵泡激素、促甲状腺激素、促黄体激素、肝生长因子、纤维母细胞生长因子、促乳素、胎盘催乳激素、肿瘤坏死因子、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、苗勒(mullerian)抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、活化素、血管内皮生长因子、血小板生成素、红细胞生成素、骨诱导因子、干扰素、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、群落刺激因子(CSF)、巨噬细胞-CSF、颗粒球-巨噬细胞-CSF、颗粒球-CSF、白介素(IL)、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、肿瘤坏死因子、多肽因子、LIF、kit配体或其组合;

(c) 白喉毒素、肉毒杆菌毒素、破伤风毒素、痢疾毒素、霍乱毒素、瓢菌素(amanitin)、 α -瓢菌素、吡咯并苯并二氮呋、吡咯并苯并二氮呋衍生物、吲哚啉苯并二氮呋、吡啶并苯并二氮呋、河豚毒素、双鞭甲藻毒素(brevetoxin)、雪卡藻毒素(ciguatoxin)、蓖麻毒素、AM毒素、奥瑞他汀(auristatin)、微管溶素、格尔德霉素(geldanamycin)、类美登素(maytansinoid)、卡奇霉素、柔红霉素、阿霉素、甲胺喋呤、长春地辛、SG2285、尾海兔素、尾海兔素类似物、奥瑞他汀、念珠藻素、喜树碱、根霉素、根霉素衍生物、CC-1065、CC-1065类似物或衍生物、多卡霉素、烯二炔抗生素、埃斯培拉霉素、埃坡霉素(epothilone)、类毒素或其组合;

(d) 亲和配体,其中所述亲和配体是底物、抑制剂、活性剂、神经传递素、放射性同位素或其组合;

(e) 放射性标记、 ^{32}P 、 ^{35}S 、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、链霉抗生物素蛋白质、地高辛(dioxigenin)、半抗原、免疫原性蛋白质、具有与目标互补的序列的核酸分子或其组合;

(f) 免疫调节化合物、抗癌剂、抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗寄生虫剂或其组合;

(g) 他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)或托瑞米芬(toremifene);

(h) 4(5)-咪唑、胺鲁米特(aminoglutethimide)、乙酸甲地孕酮、依西美坦(exemestane)、来曲唑或阿那曲唑(anastrozole);

(i) 氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)、戈舍瑞林(goserelin)或曲沙他滨(troxacitabine);

(j) 芳香酶抑制剂;

(k) 蛋白质激酶抑制剂;

(l) 脂质激酶抑制剂;

(m) 反义寡核苷酸;

(n) 核糖核酸酶;

(o) 疫苗;和

(p) 抗血管生成剂。

78. 根据权利要求1至77中任一项所述的缀合物, 其中:

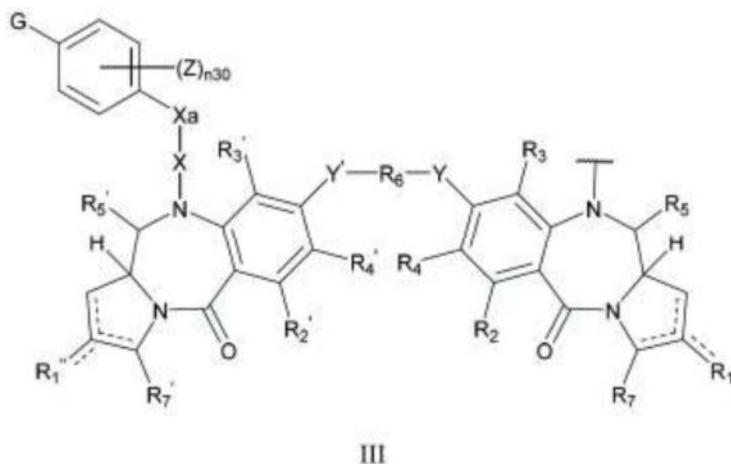
所述活性剂是吡咯并苯并二氮呋二聚体;

所述吡咯并苯并二氮呋二聚体在N10位置被X取代, 或在N'10位置被X'取代, 其中X或X'将所述吡咯并苯并二氮呋二聚体连接至所述连接子;

X和X'各自独立地是-C(O)O-*或-C(O)-*; 并且

*是指所述吡咯并苯并二氮呋二聚体与所述连接子之间的结合位。

79. 根据权利要求78所述的缀合物, 其中所述吡咯并苯并二氮呋二聚体以式III表示:



其中

波浪线表示与所述缀合物的连接点(例如式IIa的羰基连接至B'); 虚线表示任选的双键;

R_1 和 R_1' 各自独立地选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R^m、OR^m、=CH-R^{m'}=C(R^{m'})₂、O-SO₂-R^m、CO₂R^m、COR^m、卤基和二卤基;

R^{m'}选自R^m、CO₂R^m、COR^m、CHO、CO₂H和卤基;

R^m选自被取代或未被取代的C₁₋₁₂烷基、被取代或未被取代的C₂₋₁₂烯基、被取代或未被取代的C₂₋₁₂炔基、被取代或未被取代的C₅₋₂₀芳基、被取代或未被取代的C₃₋₆杂芳基、被取代或未

被取代的C₃₋₆环烷基、被取代或未被取代的3至7元杂环基、被取代或未被取代的3至7元杂环烷基和被取代或未被取代的5至7元杂芳基,其中当所述C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、C₅₋₂₀芳基、C₅₋₂₀杂芳基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环基、3至7元杂环烷基或5至7元杂芳基被取代时,所述C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、C₅₋₂₀芳基、C₅₋₂₀杂芳基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环基、3至7元杂环烷基或5至7元杂芳基中的相应氢原子可各自独立地被甲氧基、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、C₅₋₂₀芳基、C₅₋₂₀杂芳基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环基、3至7元杂环烷基和5至7元杂芳基置换;

R₂、R₃、R₅、R₂'、R₃'和R₅'各自独立地选自H、R^m、OH、OR^m、SH、SR^m、NH₂、NHR^m、NR^mR^m'、NO₂、Me₃Sn和卤基;

R₄和R₄'各自独立地选自H、R^m、OH、OR^m、SH、SR^m、NH₂、NHR^m、NR^mR^m'、NO₂、Me₃Sn、卤基、被取代或未被取代的C₁₋₆烷基、被取代或未被取代的C₁₋₆烷氧基、被取代或未被取代的C₂₋₆烯基、被取代或未被取代的C₂₋₆炔基、被取代或未被取代的C₃₋₆环烷基、被取代或未被取代的3至7元杂环烷基、被取代或未被取代的C₅₋₁₂芳基、被取代或未被取代的5至7元杂芳基、-CN、-NCO、-ORⁿ、-OC(O)Rⁿ、-OC(O)NRⁿRⁿ'、-OS(O)Rⁿ、-OS(O)₂Rⁿ、-SRⁿ、-S(O)Rⁿ、-S(O)₂Rⁿ、-S(O)NRⁿRⁿ'、-S(O)₂NRⁿRⁿ'、-OS(O)NRⁿRⁿ'、-OS(O)₂NRⁿRⁿ'、-NRⁿRⁿ'、-NRⁿC(O)R^o、-NRⁿC(O)OR^o、-NRⁿC(O)NR^oR^o'、-NRⁿS(O)R^o、-NRⁿS(O)₂R^o、-NRⁿS(O)NR^oR^o'、-NRⁿS(O)₂NR^oR^o'、-C(O)Rⁿ、-C(O)ORⁿ和-C(O)NRⁿRⁿ',其中所述C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环烷基、C₅₋₁₂芳基和5至7元杂芳基中的氢原子可各自独立地被C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环烷基、C₅₋₁₂芳基、5至7元杂芳基、-OR^p、-OC(O)R^p、-OC(O)NR^pR^p'、-OS(O)R^p、-OS(O)₂R^p、-SR^p、-S(O)R^p、-S(O)₂R^p、-S(O)NR^pR^p'、-S(O)₂NR^pR^p'、-OS(O)NR^pR^p'、-OS(O)₂NR^pR^p'、-NR^pR^p'、-NR^pC(O)R^q、-NR^pC(O)OR^q、-NR^pC(O)NR^qH、-NR^pS(O)R^q、-NR^pS(O)₂R^q、-NR^pS(O)NR^qH、-NR^pS(O)₂NR^qH、-C(O)R^p、-C(O)OR^p或-C(O)NR^pR^p置换,当所述C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环烷基、C₅₋₁₂芳基和5至7元杂芳基;

Rⁿ、Rⁿ'、R^o、R^o'、R^p、R^p'和R^q各自独立地选自H、C₁₋₇烷基、C₂₋₇烯基、C₂₋₇炔基、C₃₋₁₃环烷基、3至7元杂环烷基、C₆₋₁₀芳基和5至7元杂芳基;

X选自-c(O)O-、-S(O)O-、-c(O)-、-c(O)NR-、-S(O)₂NR-、-P(O)R'NR-、-S(O)NR-和-PO₂NR-;

Xa是键或被取代或未被取代的C₁₋₆亚烷基,其中C₁₋₆亚烷基当被取代时是被C₁₋₈烷基或C₃₋₈环烷基取代;

R和R'各自独立地表示H、OH、NH₂、ONH₂、NHNH₂、被取代或未被取代的C₁₋₈烷基、被取代或未被取代的C₃₋₈环烷基、被取代或未被取代的C₁₋₈烷氧基、被取代或未被取代的C₁₋₈烷硫基、被取代或未被取代的C₃₋₂₀杂芳基、被取代或未被取代的C₅₋₂₀芳基或单-C₁₋₈烷氨基或二-C₁₋₈烷氨基,其中所述C₁₋₈烷基、C₃₋₈环烷基、C₁₋₈烷氧基、C₁₋₈烷硫基、C₃₋₂₀杂芳基和C₅₋₂₀芳基当被取代时是被选自OH、N₃、CN、NO₂、SH、NH₂、ONH₂、NHNH₂、卤基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基和C₆₋₁₂芳基的取代基取代;

Y和Y'各自独立地选自O、S和N(H);

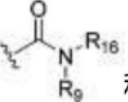
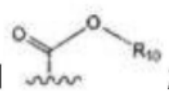
R₆是被取代或未被取代的饱和或不饱和C₃₋₁₂烃链,其中所述链可间杂有一个或多个杂原子、NMe或被取代或未被取代的芳环,所述链或芳环可在所述链或芳环上的任一个或多个氢原子位置处被-NH-、-NR^m、-NHC(O)R^m、-NHC(O)CH₂-[OCH₂CH₂]_n-R或-[CH₂CH₂O]_n-R取代或未

被取代,其中 R^m 和 R 各自如上文关于 R^m 和 R 所定义,并且 n 是1至12;并且

R_7 和 R_7' 各自独立地是H、被取代或未被取代的 C_{1-6} 烷基、被取代或未被取代的 C_{2-6} 烯基、被取代或未被取代的 C_{2-6} 炔基、被取代或未被取代的 C_{3-6} 环烷基、被取代或未被取代的3至7元杂环烷基、被取代或未被取代的 C_{6-10} 芳基、被取代或未被取代的5至7元杂芳基、 $-OR^r$ 、 $-OC(O)R^r$ 、 $-OC(O)NR^rR^{r'}$ 、 $-OS(O)R^r$ 、 $-OS(O)_2R^r$ 、 $-SR^r$ 、 $-S(O)R^r$ 、 $-S(O)_2R^r$ 、 $-S(O)NR^rR^{r'}$ 、 $-S(O)_2NR^rR^{r'}$ 、 $-OS(O)NR^rR^{r'}$ 、 $-OS(O)_2NR^rR^{r'}$ 、 $-NR^rR^{r'}$ 、 $-NR^rC(O)R^s$ 、 $-NR^rC(O)OR^s$ 、 $-NR^rC(O)NR^sR^{s'}$ 、 $-NR^rS(O)R^s$ 、 $-NR^rS(O)_2R^s$ 、 $-NR^rS(O)NR^sR^{s'}$ 、 $-NR^rS(O)_2NR^sR^{s'}$ 、 $-c(O)R^r$ 、 $-C(O)OR^s$ 或 $-c(O)NR^rR^{r'}$,其中所述 c_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{6-10} 芳基和5至7元杂芳基中的氢原子可各自独立地被 c_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{6-10} 芳基、5至7元杂芳基、 $-OR^t$ 、 $-OC(O)R^t$ 、 $-Oc(O)NR^tR^{t'}$ 、 $-OS(O)R^t$ 、 $-OS(O)_2R^t$ 、 $-SR^t$ 、 $-S(O)R^t$ 、 $-S(O)_2R^t$ 、 $-S(O)NR^tR^{t'}$ 、 $-S(O)_2NR^tR^{t'}$ 、 $-OS(O)NR^tR^{t'}$ 、 $-OS(O)_2NR^tR^{t'}$ 、 $-NR^tR^{t'}$ 、 $-NR^tC(O)R^u$ 、 $-NR^tC(O)OR^u$ 、 $-NR^tC(O)NR^uR^{u'}$ 、 $-NR^tS(O)R^u$ 、 $-NR^tS(O)_2R^u$ 、 $-NR^tS(O)NR^uR^{u'}$ 、 $-NR^tS(O)_2NR^uR^{u'}$ 、 $-C(O)R^t$ 、 $-C(O)OR^t$ 或 $-C(O)NR^tR^{t'}$ 置换,当所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{6-10} 芳基和5至7元杂芳基;

R^r 、 $R^{r'}$ 、 R^s 、 $R^{s'}$ 、 R^t 、 $R^{t'}$ 、 R^u 和 $R^{u'}$ 各自独立地选自H、 C_{1-7} 烷基、 C_{2-7} 烯基、 C_{2-7} 炔基、 C_{3-13} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{5-10} 芳基和5至7元杂芳基;

G是葡萄糖苷基团或半乳糖苷基团;

每个Z选自H、 C_{1-8} 烷基、卤基、 NO_2 、CN、和; R_9 、 R_{10} 和 R_{16} 各自独立地选

自H、 C_{1-8} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 c_{1-6} 烷氧基、烷氧基烷基和甲氧基乙基;并且
 n_{30} 是1至3。

80. 根据权利要求79所述的缀合物,其中Y是O。

81. 根据权利要求79或80所述的缀合物,其中Y'是O。

82. 根据权利要求79至81中任一项所述的缀合物,其中虚线表示携带 R_1 和 R_7 或 R_1 和 R_7 的碳之间存在双键。

83. 根据权利要求79至82中任一项所述的缀合物,其中 R_1 是 R^m 且 R^m 选自被取代或未被取代的 c_{1-6} 烷基、被取代或未被取代的 C_{2-6} 烯基、被取代或未被取代的 C_{5-7} 芳基和被取代或未被取代的 C_{3-6} 杂芳基。

84. 根据权利要求79至83中任一项所述的缀合物,其中 R_2 、 R_3 和 R_5 各自独立地是H或OH。

85. 根据权利要求79至84中任一项所述的缀合物,其中 R_4 是 C_{1-6} 烷氧基。

86. 根据权利要求79至84中任一项所述的缀合物,其中 R_4 是甲氧基、乙氧基或丁氧基。

87. 根据权利要求79至86中任一项所述的缀合物,其中

X选自 $-C(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 和 $-C(O)NR-$;并且

R各自独立地表示H、OH、 N_3 、CN、 NO_2 、SH、 NH_2 、 ONH_2 、 $NHNH_2$ 、卤基、被取代或未被取代的 C_{1-8} 烷基或被取代或未被取代的 C_{1-8} 烷氧基,其中 C_{1-8} 烷基或 C_{1-8} 烷氧基当被取代时是被OH、 N_3 、CN、 NO_2 、SH、 NH_2 、 ONH_2 、 $NHNH_2$ 或卤基取代。

88. 根据权利要求79至87中任一项所述的缀合物,其中X是 $-C(O)NR-$ 。

89. 根据权利要求79至88中任一项所述的缀合物,其中 R_6 是被取代或未被取代的饱和或

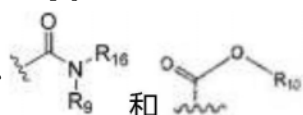
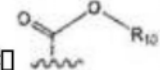
不饱和 C_{3-8} 烃链,其中

所述烃链的碳原子中的一个或多个碳原子被杂原子或被取代或未被取代的芳环置换,其中所述杂原子是O、S或N(H)且所述芳环是苯、吡啶、咪唑或吡唑,并且所述链或芳环可在所述链或芳环上的任一个或多个氢原子位置处被 $-NHC(O)CH_2-[OCH_2CH_2]_n-R$ 或 $-[CH_2CH_2O]_n-R$ 取代;并且

n是1至6。

90. 根据权利要求79至89中任一项所述的缀合物,其中n是1至10。

91. 根据权利要求79至90中任一项所述的缀合物,其中Xa是键或 C_{1-3} 亚烷基。

92. 根据权利要求99至110中任一项所述的缀合物,其中Z是H、 和 , 其

中 R_9 、 R_{10} 和 R_{16} 各自独立地选自H、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 烷氧基和烷氧基甲基。

93. 根据权利要求92所述的缀合物,其中 R_9 是甲氧基烷基。

94. 根据权利要求92或93所述的缀合物,其中 R_{10} 是甲氧基烷基。

95. 根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物,其中 R_{16} 是甲氧基烷基。

96. 根据权利要求92至95中任一项所述的缀合物,其中 R_9 、 R_{10} 或 R_{16} 是 $-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_{m2}CH_3$,另外其中m是1至6且m2是0至2。

97. 根据权利要求92至95中任一项所述的缀合物,其中m是1。

98. 根据权利要求92至95中任一项所述的缀合物,其中m2是1。

99. 根据权利要求79所述的缀合物,其中 R_2 是H。

100. 根据权利要求99所述的缀合物,其中 R_3 是H。

101. 根据权利要求99或100所述的缀合物,其中 R_7 是H。

102. 根据权利要求99至101中任一项所述的缀合物,其中 R_4 是烷氧基(例如甲氧基)。

103. 根据权利要求99至102中任一项所述的缀合物,其中 R_5 是OH。

104. 根据权利要求99至103中任一项所述的缀合物,其中 R_1 是 $=CH_2$ 、 CH_3 或苯基,任选地被甲氧基取代。

105. 根据权利要求99至104中任一项所述的缀合物,其中Y是O。

106. 根据权利要求99至105中任一项所述的缀合物,其中 R_2' 是H。

107. 根据权利要求99至106中任一项所述的缀合物,其中 R_3' 是H。

108. 根据权利要求99至107中任一项所述的缀合物,其中 R_7' 是H。

109. 根据权利要求99至108中任一项所述的缀合物,其中 R_4' 是烷氧基(例如甲氧基)。

110. 根据权利要求99至109中任一项所述的缀合物,其中 R_5' 是OH。

111. 根据权利要求99至110中任一项所述的缀合物,其中 R_1' 是 $=CH_2$ 、 CH_3 或苯基,任选地被甲氧基取代。

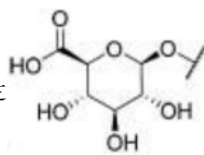
112. 根据权利要求99至111中任一项所述的缀合物,其中Y'是O。

113. 根据权利要求99至112中任一项所述的缀合物,其中X是 $-C(O)O-$ 。

114. 根据权利要求99至113中任一项所述的缀合物,其中Xa是 CH_2 。

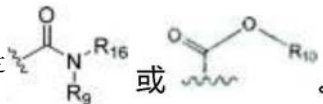
115. 根据权利要求99至114中任一项所述的缀合物,其中G是葡萄糖苷酸基团。

116. 根据权利要求115所述的缀合物, 其中G是



117. 根据权利要求99至116中任一项所述的缀合物, 其中n₃₀是1。

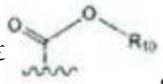
118. 根据权利要求99至117中任一项所述的缀合物, 其中Z是



119. 根据权利要求118所述的缀合物, 其中R₉是H。

120. 根据权利要求118或119所述的缀合物, 其中R₁₀是烷氧基烷基 (例如甲氧基乙基)。

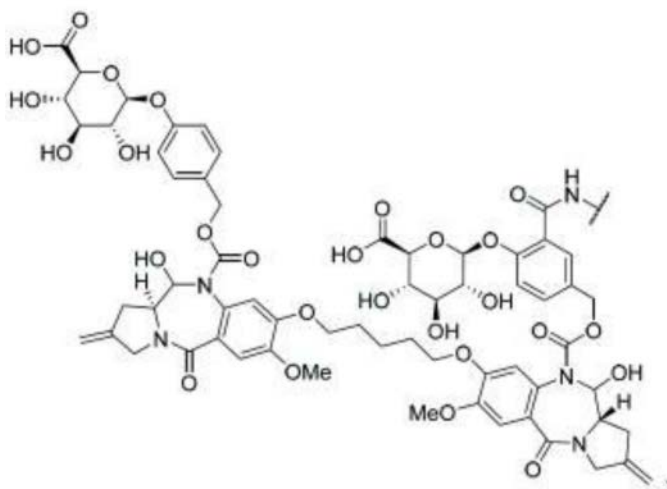
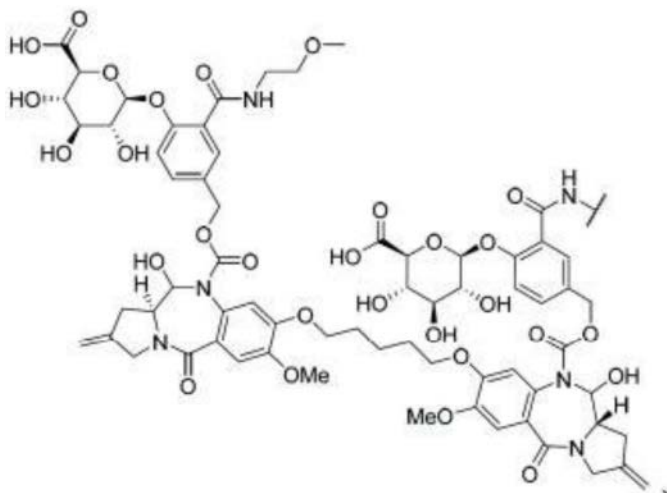
121. 根据权利要求99至117中任一项所述的缀合物, 其中Z是

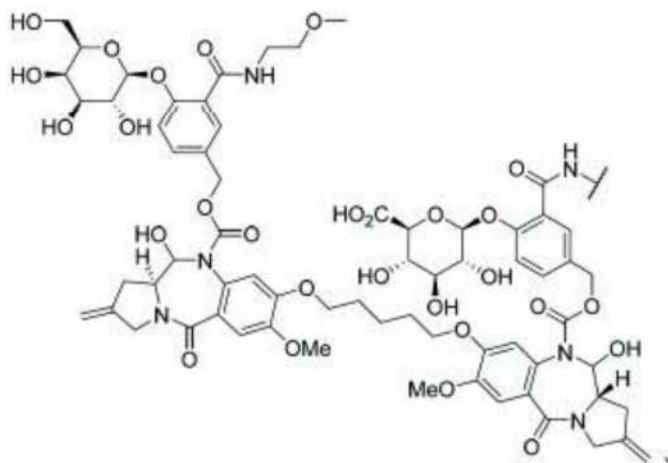
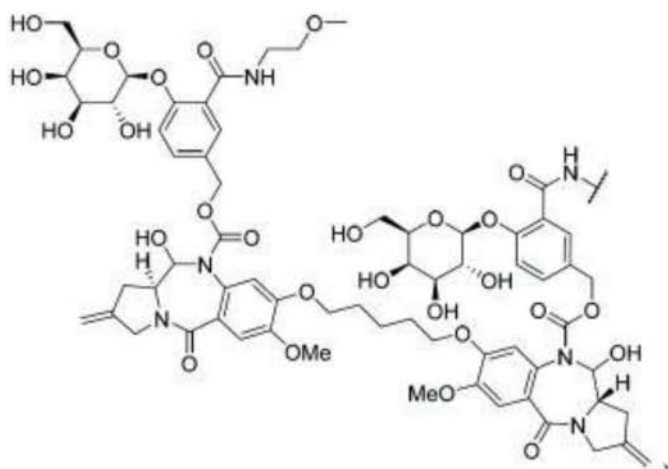
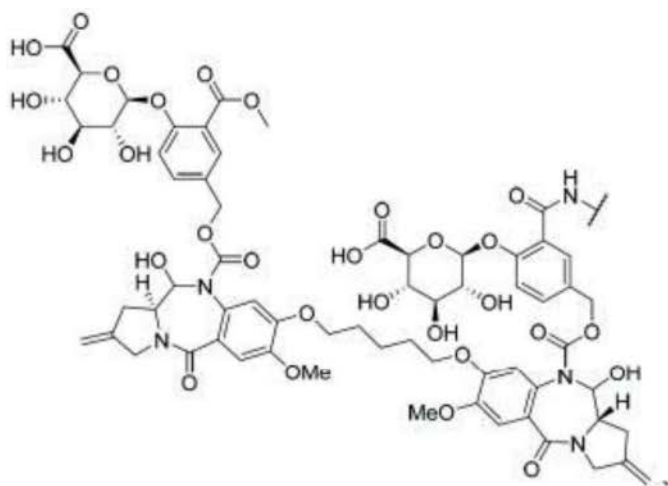


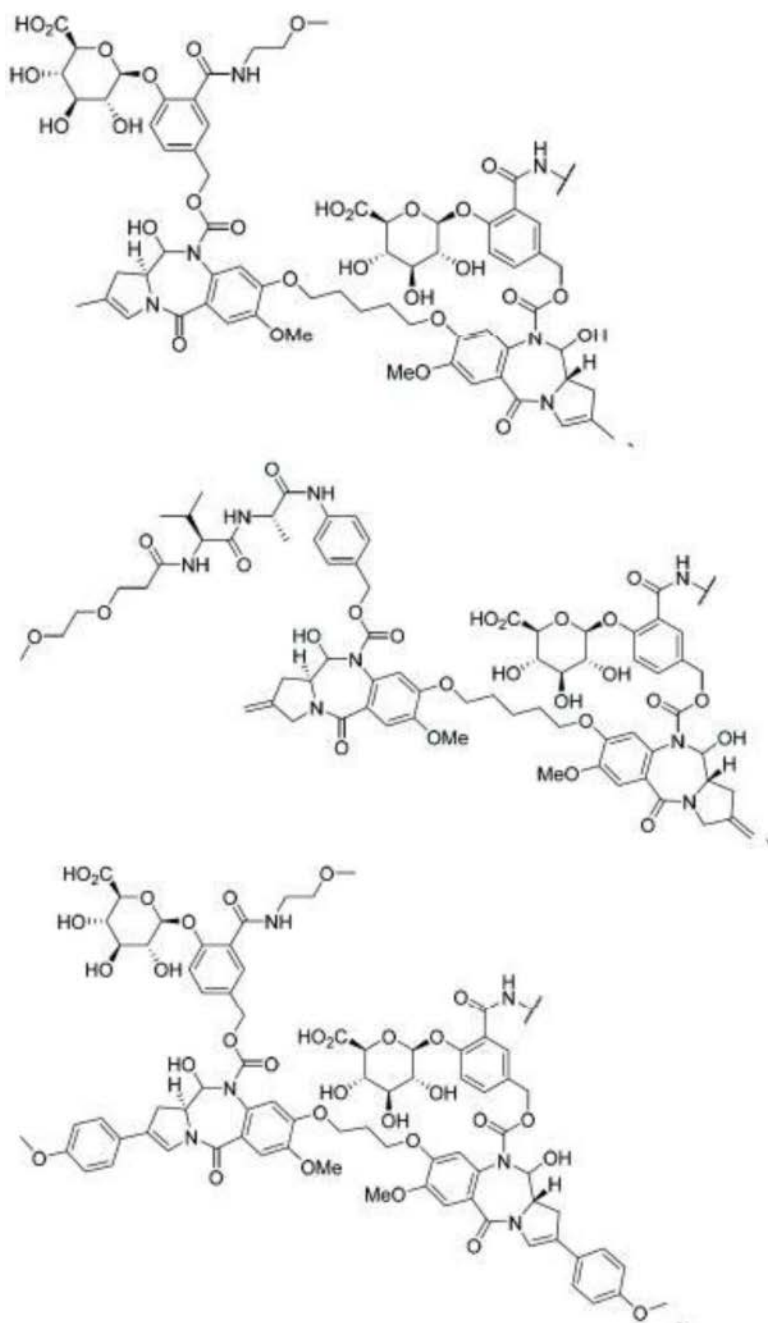
122. 根据权利要求121所述的缀合物, 其中R₁₀是烷基 (例如甲基)。

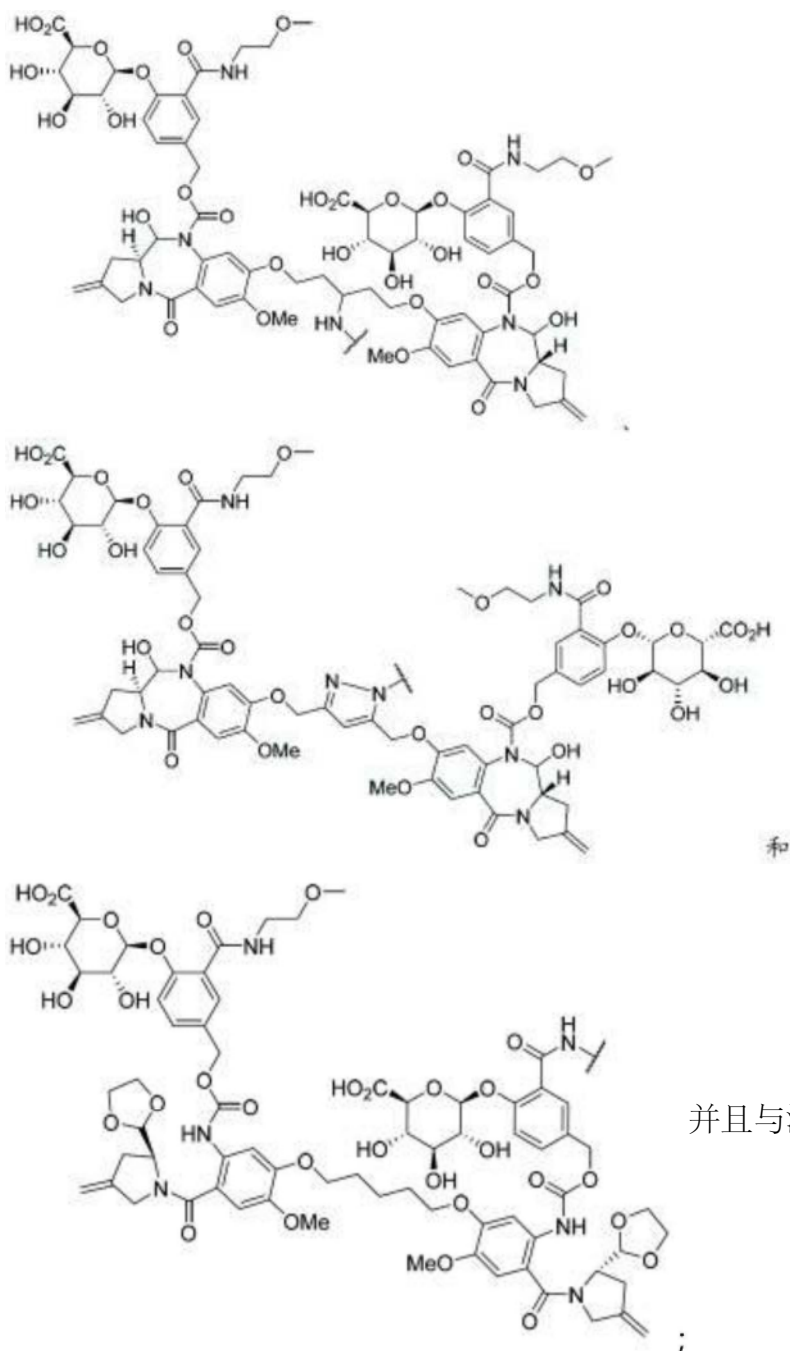
123. 根据权利要求121所述的缀合物, 其中R₆是烷基 (例如戊基)。

124. 根据权利要求1至123中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物包含选自以下的结构:



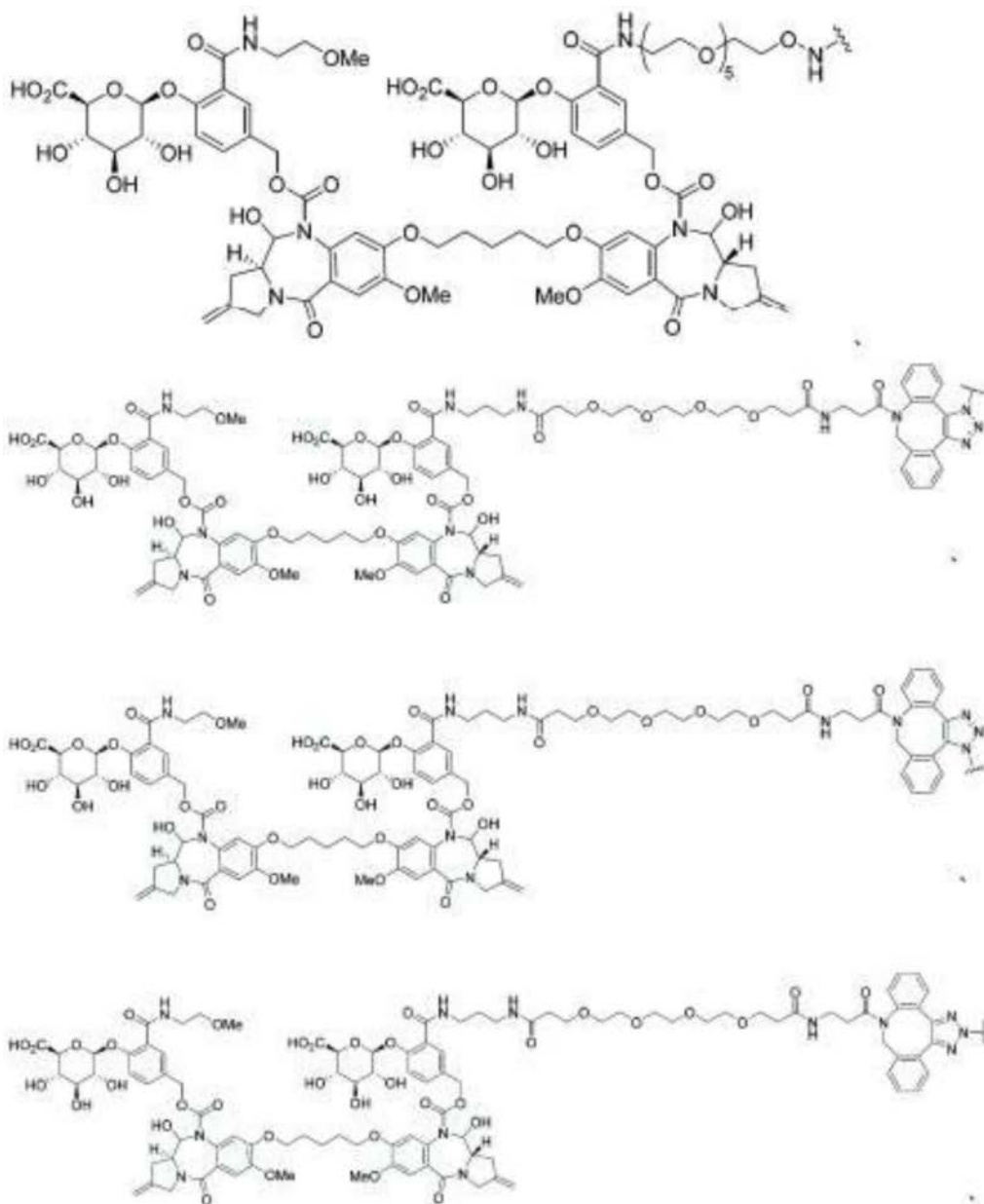


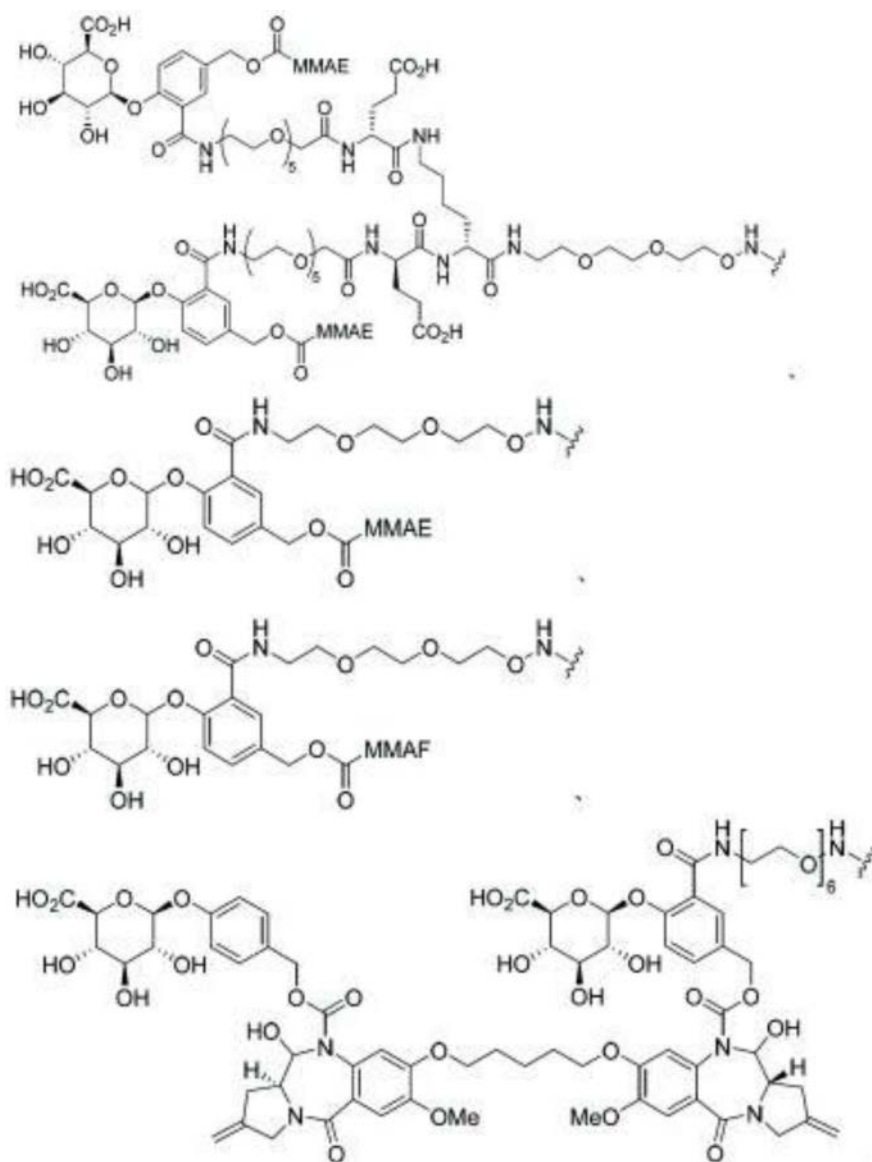


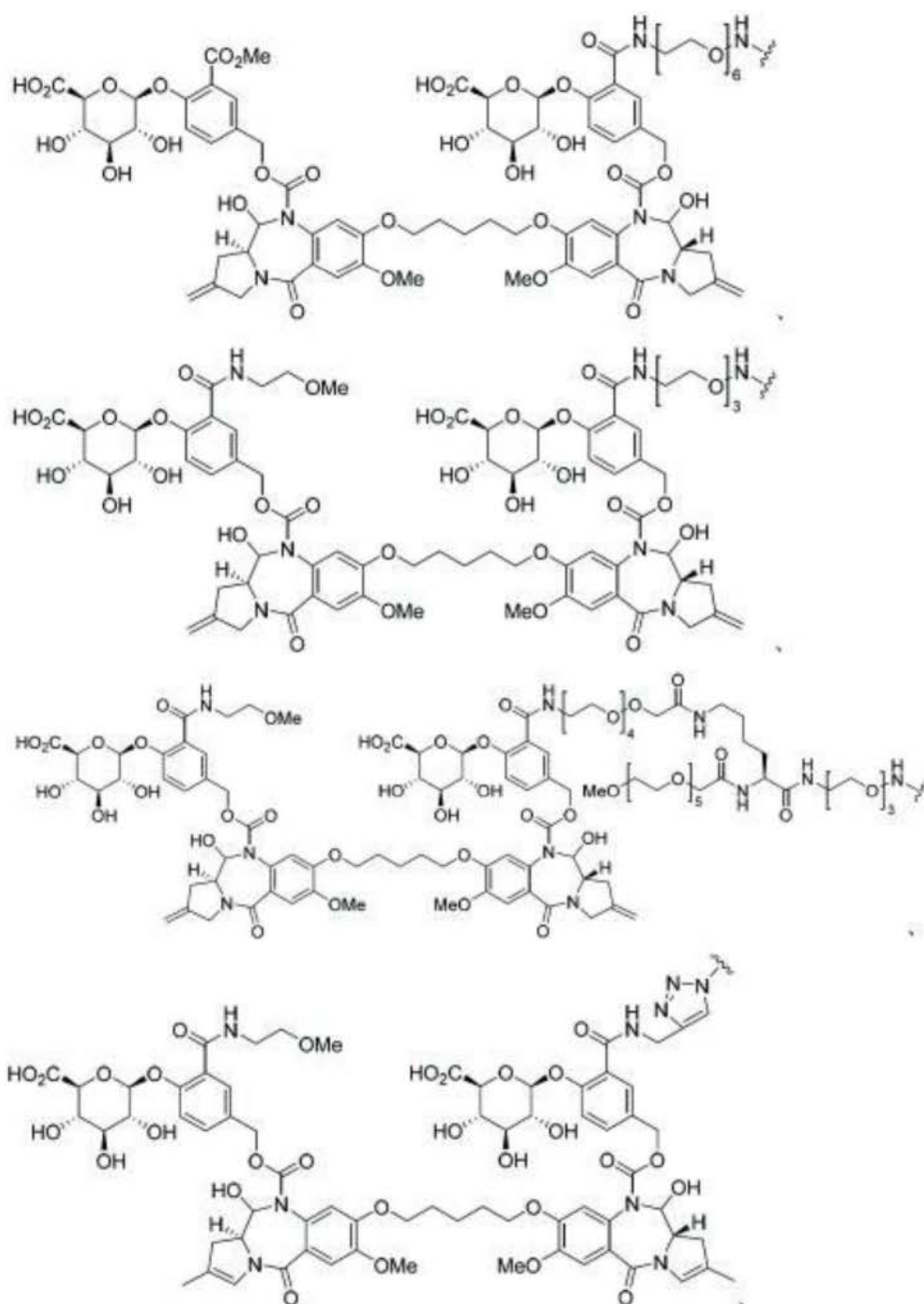


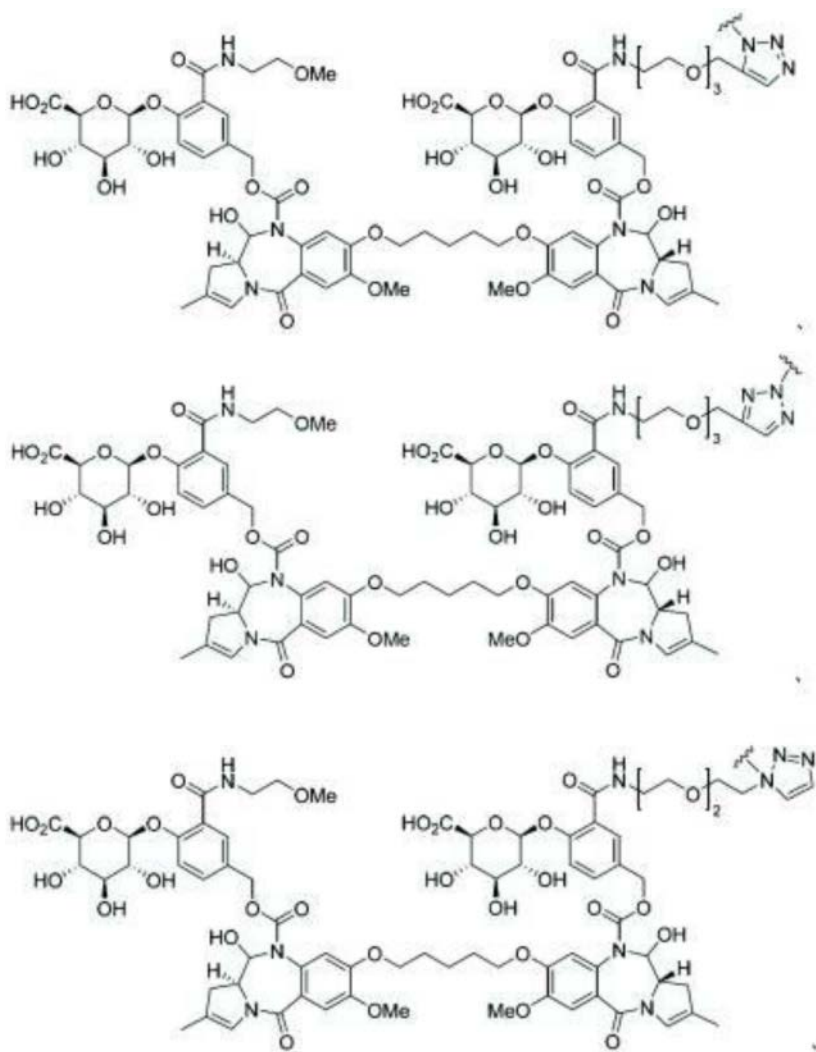
接点。

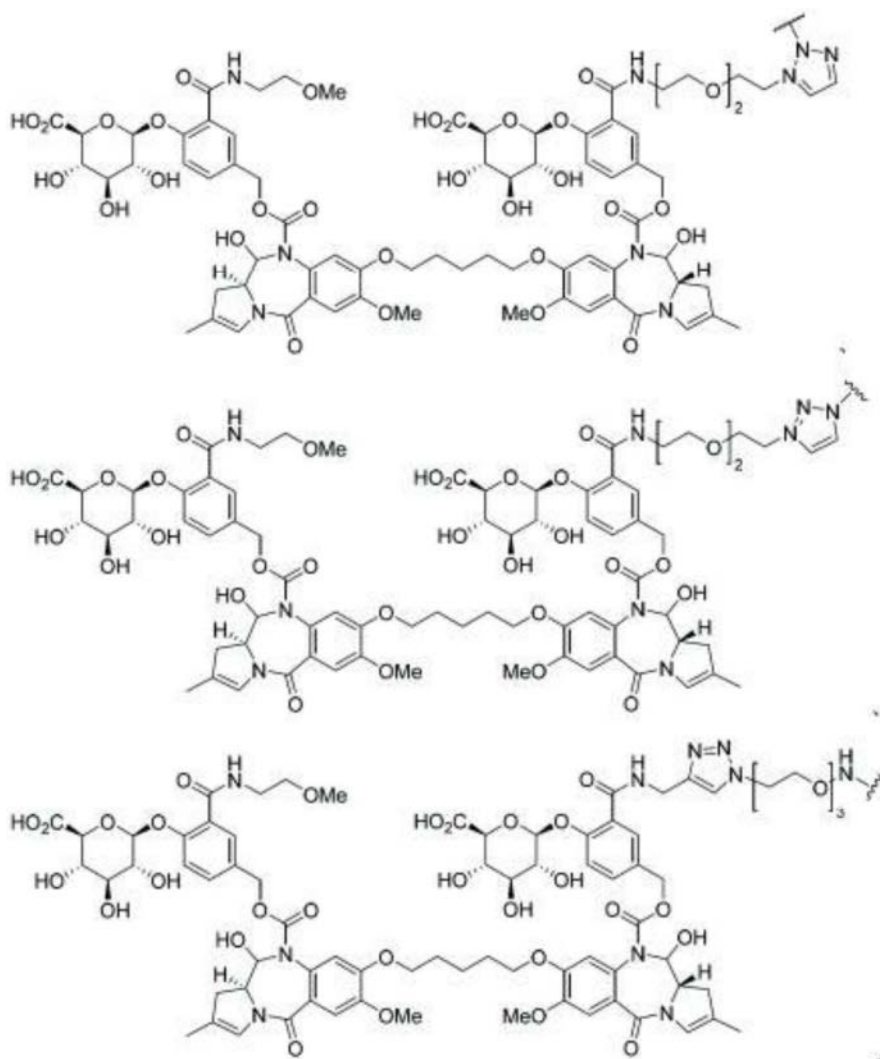
125. 根据权利要求1至124中任一项所述的缀合物, 其中所述缀合物包含选自以下的结构:

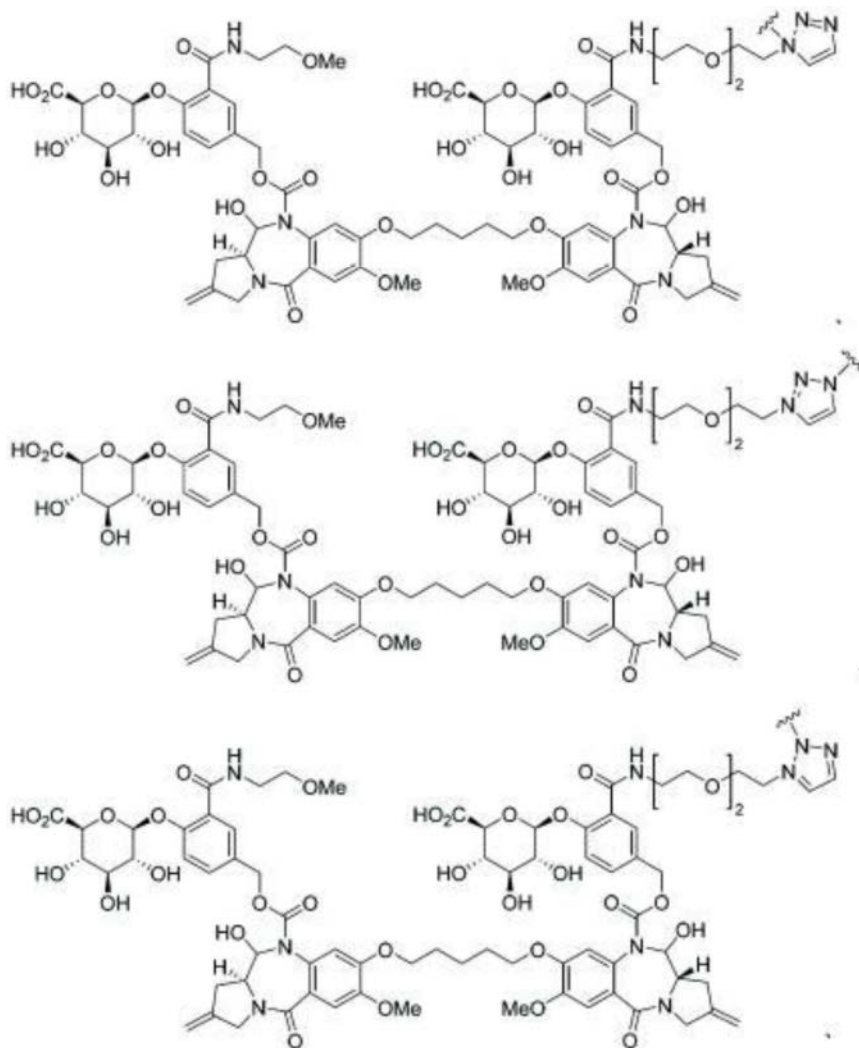


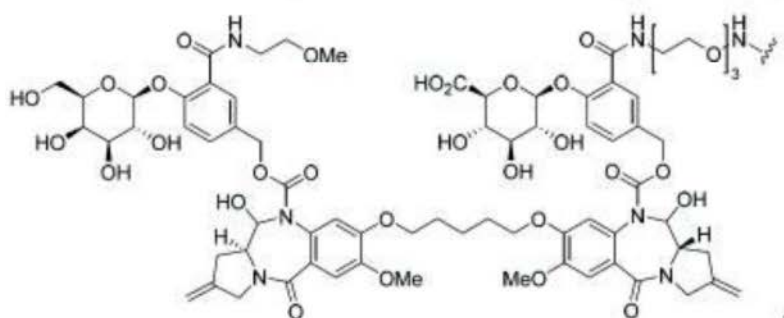
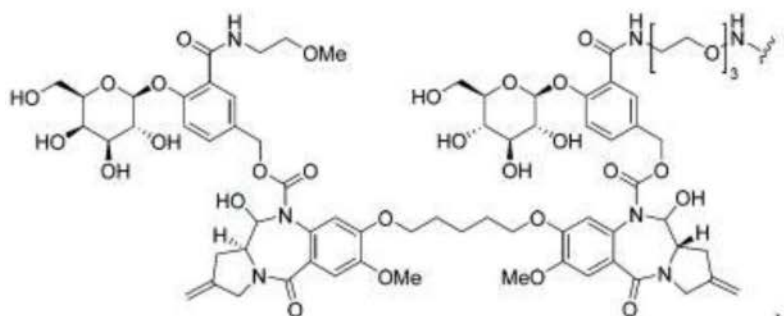
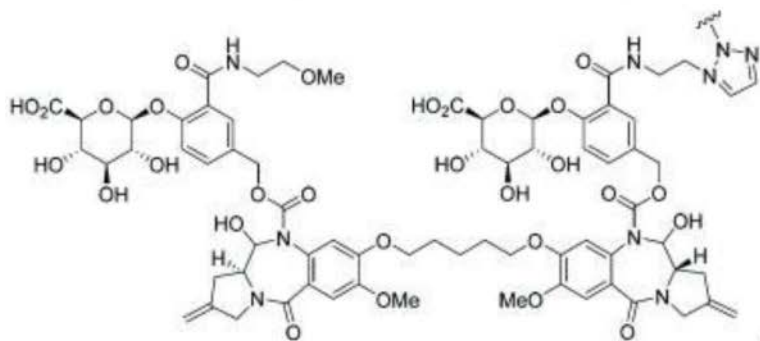
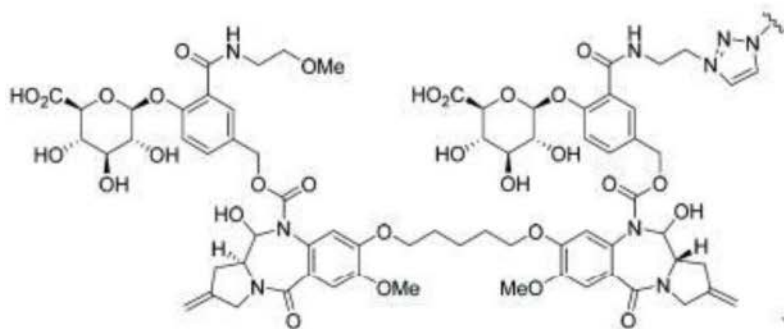


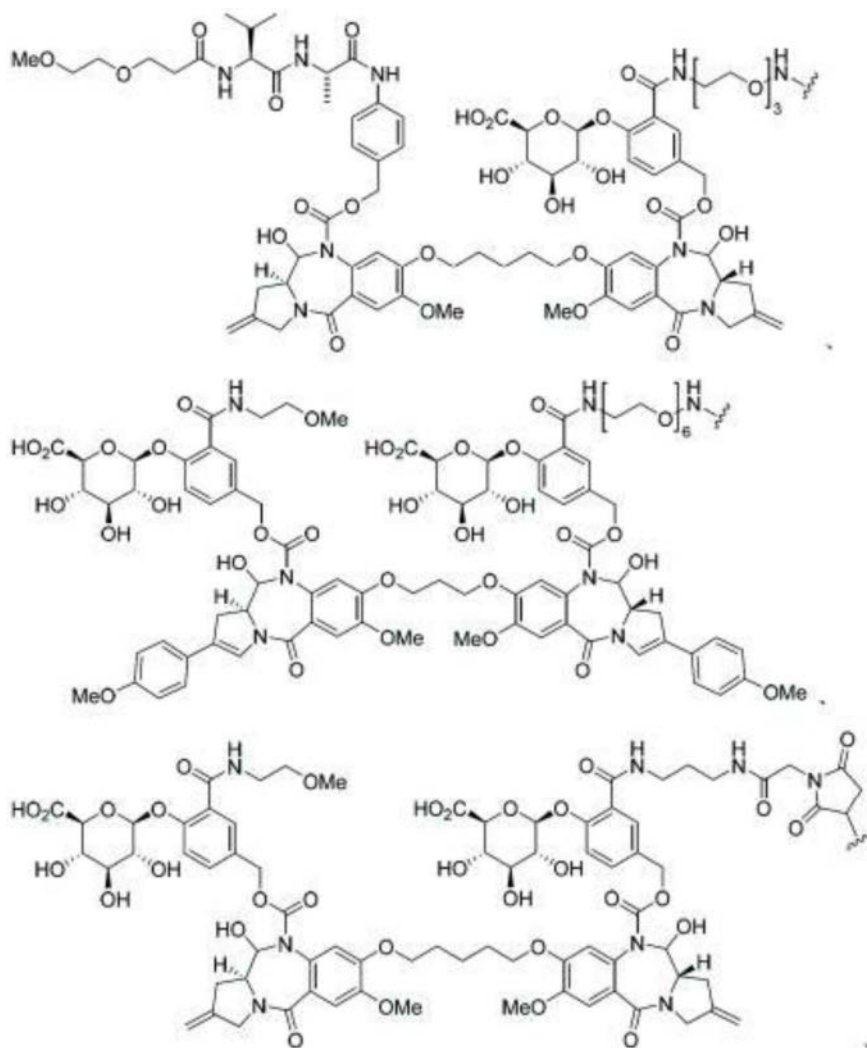


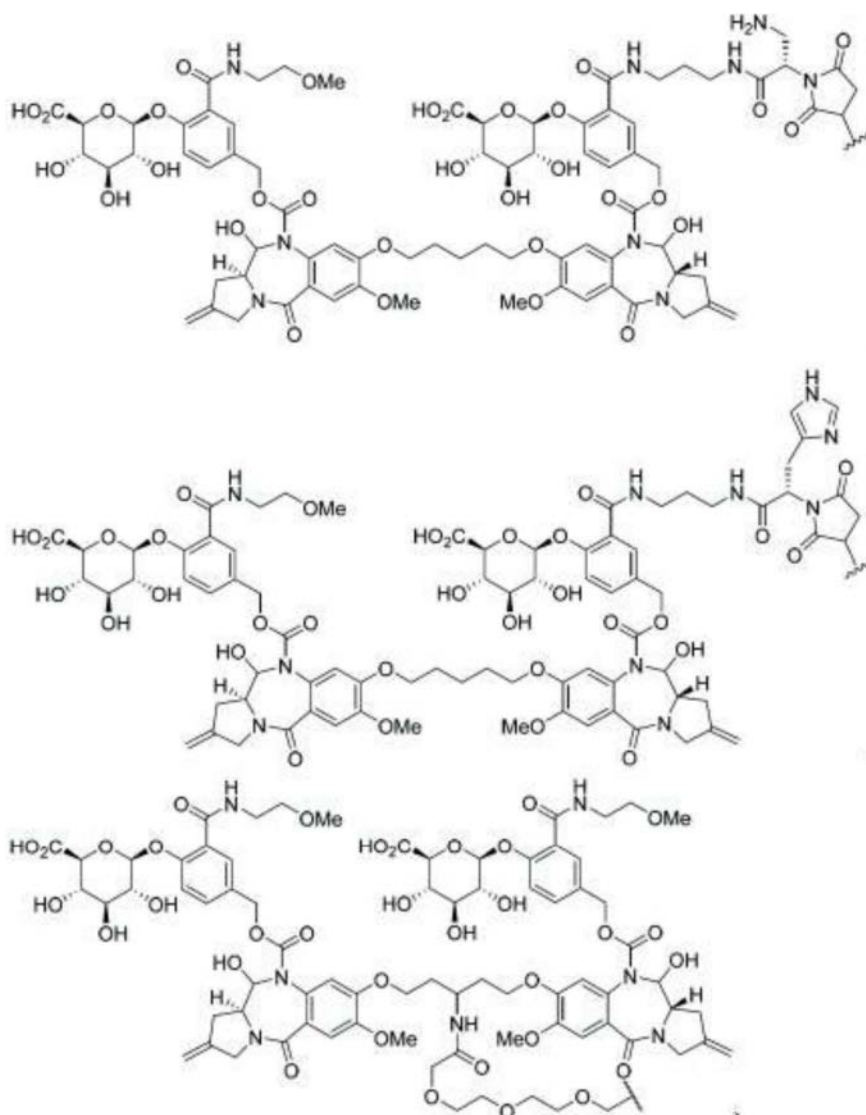


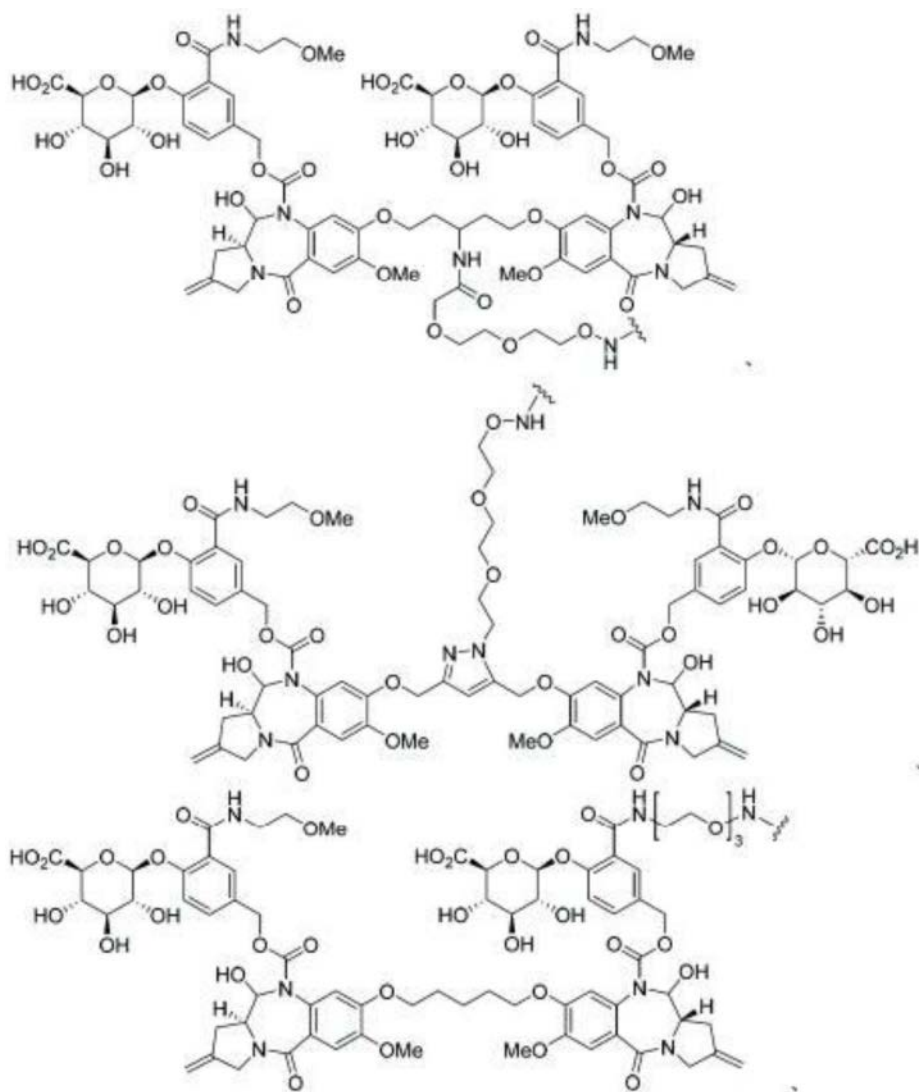


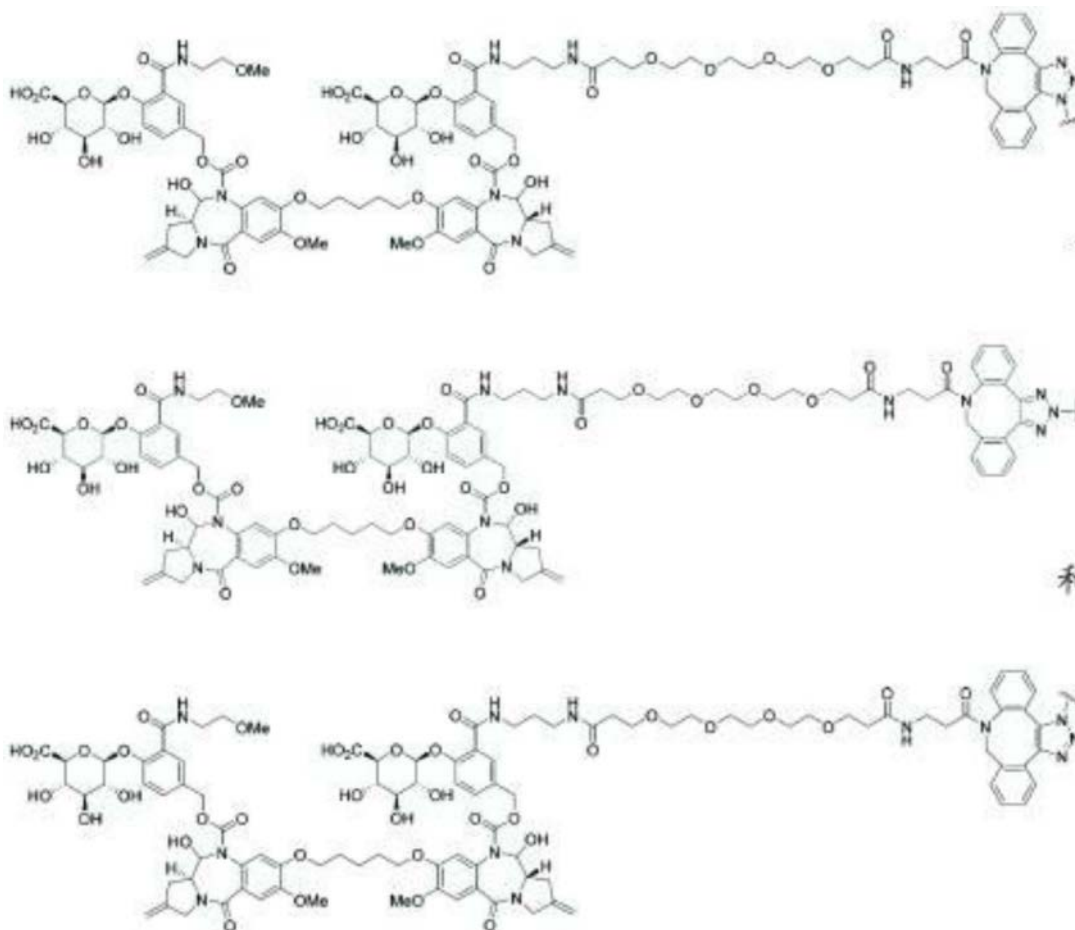












其中MMAE是单甲基奥瑞他汀E；

MMAF是单甲基奥瑞他汀F；并且

波浪线表示与所述缀合物的连接点。

126. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至125中任一项所述的缀合物和药学上可接受的赋形剂。

127. 一种用于预防或治疗过度增生、癌症或血管生成疾病的药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1至125中任一项所述的缀合物。

128. 根据权利要求127所述的药物组合物,所述药物组合物还包含药学上有效量的化学治疗剂。

129. 根据权利要求127或128所述的药物组合物,其中所述癌症选自肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、结肠癌、肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤和黑色素瘤。

130. 一种药物制剂,所述药物制剂包含根据权利要求1至125中任一项所述的缀合物和药学上可接受的载剂,所述药物制剂选自注射剂、片剂、丸剂、粉末、颗粒、胶囊、糖衣锭、悬浮液、内用液体、乳状液、糖浆、乳状液、冻干制剂和栓剂。

131. 一种治疗对其有需要的个体的癌症或血管生成疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用根据权利要求1至125中任一项所述的缀合物或其药学上可接受的盐。

132. 根据权利要求131所述的方法,其中所述方法治疗癌症。

133. 根据权利要求131或132所述的方法,其中所述癌症是肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、

结肠癌、肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤和黑色素瘤。

包含抗人TROP2的抗体的抗体-药物缀合物及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年4月6日提交的韩国专利申请10-2022-0043049的优先权,该专利申请的内容以全文引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 癌症是指由身体组织的自发性过度生长所致的异常生长的肿块引起的疾病,并且是各种组织中不受控的细胞生长的结果。早期肿瘤可通过手术和放射性治疗手段去除,并且转移的肿瘤一般使用化学疗法治疗。

[0004] 大多数肠胃外施用的化学治疗剂可能由于全身性施用而诱发不想要的副作用且甚至严重的毒性。因此,研发重点在于研发可达成提高的功效和/或减少的最小毒性/副作用的疗法,例如经由在肿瘤细胞或紧邻组织中选择性应用这些化学治疗剂。

发明内容

[0005] 在某些方面中,本发明提供包含结合到TROP2的抗TROP2抗体的抗体-药物缀合物。在某些实施方案中,本文所公开的抗体结合到肿瘤中表达的TROP且可用于将药物递送到肿瘤。在某些实施方案中,本文所公开的抗体药物缀合物与本领域中已知的抗体药物缀合物相比具有改进的稳定性。

[0006] 在某些方面中,本发明提供具有以通式I表示的结构的缀合物或其药学上可接受的盐:

[0007] [通式I]

[0008] $Ab-[L-(B)_1]_m$

[0009] 其中,

[0010] Ab是抗TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,也称为TACSTD2)抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中

[0011] 该重链可变区包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR3;并且

[0012] 该轻链可变区包含:包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3;

[0013] L是连接子;

[0014] B是活性剂部分,并且

[0015] 1和m各自独立地是选自1至20的整数。

附图说明

[0016] 图1是绘示根据本发明的一个实施方案的制备抗体-药物缀合物ADC1的方法的示意图。

[0017] 图2是绘示根据本发明的一个实施方案的制备抗体-药物缀合物ADC2的方法的示

意图。

[0018] 图3是绘示根据本发明的一个实施方案的制备抗体-药物缀合物ADC3的方法的示意图。

[0019] 图4是绘示根据本发明的一个实施方案的制备抗体-药物缀合物ADC4的方法的示意图。

[0020] 图5A和图5B绘示经由第一活体内实验,在移植有胰腺癌细胞系BxPC-3的小鼠模型(图5A)和移植有乳腺癌细胞系MDA-MB-468的小鼠模型(图5B)中确认根据本发明的一个实施方案的抗体-药物缀合物的肿瘤生长抑制功效的结果。

[0021] 图6A至图6D绘示经由第二活体内实验,在移植有乳腺癌细胞系MDA-MB-468的小鼠模型(图6A)、移植有胰腺癌细胞系BxPC-3的小鼠模型(图6B)、移植有胃癌细胞系NCI-N87的小鼠模型(图6C)和移植有非小细胞肺癌细胞系HCC827的小鼠模型(图6D)中确认根据本发明的一个实施方案的抗体-药物缀合物的肿瘤生长抑制功效的结果。

[0022] 图7A至图7E绘示在移植有胰腺癌细胞系BxPC-3的小鼠模型(图7A)、移植有非小细胞肺癌细胞系HCC827的小鼠模型(图7B)、移植有胰腺癌细胞系Capan-1的小鼠模型(图7C)、移植有非小细胞肺癌细胞系NCI-H2170的小鼠模型(图7D)和移植有结肠癌细胞系HT29的小鼠模型(图7E)中确认根据本发明的一个实施方案的抗体-药物缀合物的肿瘤生长抑制功效的结果。

具体实施方式

[0023] 抗体-药物缀合物(ADC)是一种用于将毒素或药物结合到与抗原结合的抗体,从而在细胞中释放毒素以引起癌细胞和其类似物死亡的靶向技术。ADC能够将药物精确递送到目标癌细胞,同时对健康细胞的影响最小,并且仅在特定条件下释放,并且因此与抗体治疗剂本身相比具有极佳功效,并且与现有抗癌剂相比可显著降低副作用的风险。

[0024] 这些抗体-药物缀合物的基本结构为“抗体-连接子-小分子药物(毒素)”。在此结构中,连接子在连接抗体与药物方面发挥功能性作用,但在一些情况下也确保药物在适当时间自抗体释放,例如在到达靶细胞之后。即,连接子的稳定性对抗体-药物缀合物的功效和安全性(例如全身性毒性)起着极重要作用(发现医学(Discovery Medicine)2010,10(53):329-39)。

[0025] 使用单克隆抗体进行癌症治疗已取得巨大成功。举例来说,单克隆抗体适用于肿瘤组织和肿瘤细胞的靶向定址。抗体-药物缀合物已成为用于治疗淋巴瘤和实体癌症的新颖且有效的选择方案,并且免疫调节抗体最近也已在临床试验中取得巨大成功。治疗性抗体的研发是基于对癌症血清学、蛋白质工程改造技术和其作用、抗性机制和免疫系统与癌细胞之间相互作用的深刻理解。

[0026] 表达于人癌细胞表面上的抗原定义为与正常组织相比过度表达、突变和选择性表达的广泛目标。主要挑战是鉴别适用于基于抗体的疗法的抗原。这些治疗剂介导抗原或受体功能的变化(即充当刺激剂或拮抗剂),经由Fc和T细胞活化来调节免疫系统,并且经由递送与靶向特定抗原的抗体结合的特定药物来展现功效。可改变抗体药物动力学、作用功能、大小和免疫刺激的分子技术正在成为研发新颖的基于抗体的疗法的关键因素。来自癌症患者中的治疗性抗体的临床试验的证据突出了用于选择最佳化抗体的方法的重要性,包括目

标抗原与抗体的亲和力和结合、抗体结构的选择和治疗方法(信号传导阻断或免疫功能)。

[0027] 人TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,TACSTD2)是具有323个氨基酸(274个胞外域、23个跨膜域和26个胞内域)的35-46kDa跨膜钙信号转导子糖蛋白,并且属于上皮细胞粘附分子(EpCAM)家族,它是细胞信号传导、增殖和分化中的重要组分。TROP2的表达与各种癌症中的肿瘤诱导或肿瘤抑制相关,但已知TROP2通常充当肿瘤诱导剂。

[0028] 274个胞外域中的R87与T88之间的区域的裂解诱导TROP2结构重排,引起生物活性发生变化。尽管此裂解不出现在正常组织中,但TROP2裂解出现在大部分癌症中,包括皮肤癌、卵巢癌、结肠癌和乳腺癌,并且因此TROP2充当肿瘤诱导剂。

[0029] 在某些方面中,本发明提供抗体-连接子-药物(例如毒素)系统,其通过应用任选地包含自我分解型基团的连接子而:在循环中(例如在血浆中)更稳定,使得药物能够容易在癌细胞中释放以使功效最大化,并且使得药物和/或毒素能够稳定地到达靶细胞。

[0030] 因此,在某些实施方案中,本发明提供靶向人TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,TACSTD2)的抗体-药物缀合物以及其药学上可接受的盐。

[0031] 在另一方面中,本发明提供包含本文所公开的抗体-药物缀合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0032] 在某些方面中,本发明提供由以下通式I表示的缀合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物:

[0033] [通式I]

[0034] $Ab-[L-(B)_1]_m$

[0035] 其中,

[0036] Ab是抗TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,也称为TACSTD2)抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中

[0037] 该重链可变区包含:包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR3;并且

[0038] 该轻链可变区包含:包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3;

[0039] L是连接子;

[0040] B是活性剂部分;并且

[0041] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括包含以下项的重链可变区:SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的序列。

[0042] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括重链可变区,该重链可变区包含:SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0043] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括重链可变区,该重链可变区由以下项组成:SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性,

同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0044] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括重链可变区,该重链可变区包含:SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列;与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0045] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括重链可变区,该重链可变区由以下项组成:SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列;与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列;或与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0046] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括包含以下项的轻链可变区:SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的序列。

[0047] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括轻链可变区,该轻链可变区包含:SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0048] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括轻链可变区,该轻链可变区由以下项组成:SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0049] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括轻链可变区,该轻链可变区包含:SEQ ID NO:16的氨基酸序列;与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3;或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0050] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可包括轻链可变区,该轻链可变区由以下项组成:SEQ ID NO:16的氨基酸序列;与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3;或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0051] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;或包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的重链可变区,和包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的轻链可变区,并且特异性结合到人TROP2。

[0052] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段由以下项组成:包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;或包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的重链可变区,和由与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列组成,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的轻链可变区,并且特异性结合到人TROP2。

[0053] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;或包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的重链可变区,和包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的轻链可变区,并且特异性结合到人TROP2。

[0054] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含:由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;或包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的重链可变区,和由与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的氨基酸序列组成,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的轻链可变区,并且特异性结合到人TROP2。

[0055] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区;或包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少81%序列同一性、至少82%序列同一性、至少83%序列同一性、至少84%序列同一性、至少85%序列同一性、至少86%序列同一性、至少

87%序列同一性、至少88%序列同一性、至少89%序列同一性、至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或至少99.5%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的重链可变区,以及与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少81%序列同一性、至少82%序列同一性、至少83%序列同一性、至少84%序列同一性、至少85%序列同一性、至少86%序列同一性、至少87%序列同一性、至少88%序列同一性、至少89%序列同一性、至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或至少99.5%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的轻链可变区,并且特异性结合到人TROP2。

[0056] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含:包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的轻链可变区;或包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少81%序列同一性、至少82%序列同一性、至少83%序列同一性、至少84%序列同一性、至少85%序列同一性、至少86%序列同一性、至少87%序列同一性、至少88%序列同一性、至少89%序列同一性、至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或至少99.5%序列同一性的氨基酸序列,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的重链可变区,以及由与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%序列同一性、至少81%序列同一性、至少82%序列同一性、至少83%序列同一性、至少84%序列同一性、至少85%序列同一性、至少86%序列同一性、至少87%序列同一性、至少88%序列同一性、至少89%序列同一性、至少90%序列同一性、至少91%序列同一性、至少92%序列同一性、至少93%序列同一性、至少94%序列同一性、至少95%序列同一性、至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性、至少99%序列同一性或至少99.5%序列同一性的氨基酸序列组成,同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的轻链可变区,并且特异性结合到人TROP2。

[0057] 在某些实施方案中,抗体是人源化抗体。

[0058] 在某些实施方案中,人源化抗体包含:(a) (i) 来自人抗体重链或来自人共同构架的可变重链构架区;和(ii) 来自人抗体轻链或来自人共同构架的可变轻链构架区。在一些实施方案中,来自重链的可变域构架区中的至少一个氨基酸经来自小鼠抗体重链或小鼠共同构架的对应氨基酸取代;或来自轻链的可变域构架区经来自小鼠抗体轻链或小鼠共同构架的对应氨基酸取代。在一些实施方案中,重链的氨基酸取代选自以下氨基酸取代:

[0059] 在位置27处F(小鼠)取代Y(人);

- [0060] 在位置30处S(小鼠)取代T(人)；
- [0061] 在位置37处L(小鼠)取代V(人)；
- [0062] 在位置48处I(小鼠)取代M(人)；
- [0063] 在位置49处A(小鼠)取代G(人)；
- [0064] 在位置70处L(小鼠)取代I(人)；和
- [0065] 在位置72处V(小鼠)取代R(人)，以及
- [0066] (ii)轻链的氨基酸取代是在位置49处Y(人)经S(小鼠)取代。
- [0067] 在某些实施方案中，重链的氨基酸取代可进一步包括以下氨基酸取代：
- [0068] 在位置67处K(小鼠)取代R(人)；和/或
- [0069] 在位置68处A(小鼠)取代V(人)。
- [0070] 在某些实施方案中，轻链的氨基酸取代可进一步包括以下氨基酸取代：
- [0071] 在位置67处Y(小鼠)取代S(人)；
- [0072] 在位置2处T(小鼠)取代I(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人)；
- [0073] 在位置22处R(小鼠)取代T(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人)；
- [0074] 在位置42处E(小鼠)取代K(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人)；
- [0075] 在位置64处S(小鼠)取代G(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人)；
- [0076] 在位置67处Y(小鼠)取代S(人)和在位置72处V(小鼠)取代T(人)；或
- [0077] 在位置67处Y(小鼠)取代S(人)和在位置85处D(小鼠)取代T(人)。
- [0078] 在某些实施方案中，人源化抗体包含：(a) (i) 来自人抗体重链或来自人共同构架的可变重链构架区，其中可变重链构架区包含以下氨基酸序列变化中的一者或多者：Y27F、T30S、V37L、M48I、G49A、I70L和R72V；以及(ii) 来自人抗体轻链或来自人共同构架的可变轻链构架区，其中可变轻链构架区包含以下氨基酸序列变化：Y49S。
- [0079] 氨基酸取代可增加亲和力、增强抗体的稳定性，同时维持其抗原结合活性。治疗性抗体的稳定化可引起血清半衰期改进、剂量需求降低、副作用减少和储存寿命改进。首先建构了嵌合型CH-2EF和CH-2G10抗体，随后是早期的人源化版本：Hu-2EF-4、Hu-2G10-1等。这些抗体可能表现出不良特征，例如化学不稳定性，从而形成聚集体和损失溶解度(针对CH-2EF抗体)，和对Trop-2的亲和力损失。氨基酸取代可产生具有高亲和力的人源化单克隆抗体，包括未由抗小鼠抗体识别的Hu-2EF-7、H、Hu-2G10-5和Hu-2G10-6，尤其针对Trop2的细胞外域的不同区域和各种形式的翻译后修饰。
- [0080] 在某些实施方案中，在Genbank数据库内检索与本文所公开的VH构架同源的人VH序列，并且选择由具有NCBI寄存编号：X65888.1的人cDNA编码的VH序列作为人源化受体(X65888.1-VH)。在某些实施方案中，本文所公开的VH的CDR序列首先转移至X65888.1-VH的对应位置。在某些实施方案中，在构架位置27、30、37、48、49、67、68、70和72(从成熟形式的第一个氨基酸编号)(即可变区的三维模型表明与CDR有显著接触的位置)处，人氨基酸残基经对应的小鼠残基取代。
- [0081] 尽管预测小鼠2G10 VH中位置67处的Lys和位置68处的Ala(均紧邻CDR)对CDR结构的形成至关重要，但人受体X65888.1-VH中的氨基酸残基是位置67处的Arg和位置68处的Val，其在分子特性和结构上与相应的小鼠残基相似。因此，为了进一步降低潜在的免疫原性，设计第二人源化VH(VH2)，其中人受体的氨基酸残基分别维持在位置67和68处，即Arg和

Val。

[0082] 基于与VL构架序列的GenBank同源性检索,选择由具有NCBI寄存编号:AY043146.1的cDNA编码的人VK区域作为人源化受体。VL的CDR序列首先转移至AY043146.1VL的对应位置。接着,在位置49和67(即可变区的三维模型表明与CDR有显著接触的位置)处,人氨基酸残基经小鼠VL的对应残基取代。尽管预测小鼠VL中位置67处的Tyr对CDR结构的形成至关重要,但对2G10可变区的三维模型的进一步分析表明了此位置67处的Tyr经Ser(位于人受体AY043146.1VL中对应位置的残基)置换而不影响抗原结合的可能性。因此,为了进一步降低潜在的免疫原性,设计第二人源化VL(衍生自VL1),其中维持人受体序列中位置67处的Ser。

[0083] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可选自由以下项组成的组:单克隆抗体、域抗体(dAb)、单链抗体(scAb)、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFab片段、Fv片段、dsFv片段、单链可变片段(scFv)、scFv-Fc片段、单域重链抗体、单域轻链抗体、变体抗体、多聚抗体、微型抗体、双功能抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。

[0084] 本文所描述的连接子可以是可裂解的、不可裂解的和亲水性的或疏水性的。

[0085] 在某些实施方案中,可裂解连接子可在细胞内或细胞外条件下裂解,由此在细胞内环境中从抗体构建体-活性剂缀合物释放活性剂。

[0086] 可裂解连接子可通过存在于细胞内环境(例如溶酶体、内体或胞膜窖)中的裂解剂裂解。可裂解连接子可以是例如由细胞内肽酶或蛋白酶裂解的肽基连接子,该蛋白酶包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶。一般来说,肽基连接子的长度是至少两个氨基酸或长度是至少三个氨基酸。裂解剂可包括组织蛋白酶B、组织蛋白酶D和纤维蛋白溶酶,已知其皆可水解二肽药物衍生物以在靶细胞中释放活性药物(参见例如Dubowchik和Walker,1999,医药治疗学(Pharm. Therapeutics) 83:67-123)。最常见的是可由存在于表达抗原的细胞中的酶裂解的肽基连接子。举例来说,可使用可由在癌症组织中大量表达的硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B裂解的肽基连接子(例如Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly连接子)。这些连接子的其它示例描述于例如美国专利第6,214,345号中。此外,可由细胞内蛋白酶裂解的肽基连接子可以是例如Val-Cit连接子、Phe-Lys连接子(参见例如美国专利第6,214,345号,其描述使用Val-Cit连接子来合成阿霉素(doxorubicin))或Val-Ala连接子。Val-Cit连接子或Val-Ala连接子可含有五氟苯基,并且可含有丁二酰亚胺基或顺丁烯二酰亚胺基。或者,Val-Cit连接子或Val-Ala连接子可含有五氟苯基、可含有4-胺基苯甲酸(PABA)基团和顺丁烯二酰亚胺基,并且可含有PABA基团和丁二酰亚胺基。

[0087] 此外,可裂解连接子可以对pH值敏感的方式,即在特定pH值下易于水解。一般来说,对pH值敏感的连接子可在酸性条件下水解。举例来说,可使用可在溶酶体中水解的酸不稳定连接子(例如脲、半卡巴脲、硫半卡巴脲、顺乌头酰胺、原酸酯、缩醛和缩酮)(参见例如:美国专利第5,122,368号、第5,824,805号和5,622,929号;以及Dubowchik和Walker,1999,医药治疗学(Pharm. Therapeutics) 83:67-123;和Neville等人,1989,生物化学(Biol. Chem.) 264:14653-14661)。这些连接子在中性pH条件下(例如在血液中)相对稳定,但在pH 5.5(此接近溶酶体的pH)下或在小于pH 5.0下不稳定。可水解连接子的示例包括硫醚连接子(例如,经由酰脲键附接至治疗剂的硫醚)(参见例如美国专利第5,622,929号)。

[0088] 再者,连接子可在还原条件下裂解(例如二硫化物连接子)。举例来说,包括N-丁二酰亚胺基-5-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)、N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯

(SPDP)、N-丁二酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)和N-丁二酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-硫基)甲苯)-(SMPT)的各种二硫化物连接子,以及可使用SPDB和SMPT形成的二硫化物连接子(参见例如:Thorpe等人,1987,癌症研究(CancerRes.) 47: 5924-5931;和美国专利第4,880,935号)。

[0089] 此外,连接子可以是丙二酸酯连接子(Johnson等人,1995,抗癌研究(Anticancer Res.) 15:1387-93)、顺丁烯二酰亚胺基苯甲酰基连接子(Lau等人,1995,生物有机化学与医药化学通讯(Bioorg-Med-Chem.) 3(10):1299-1304)、3'-N-酰胺类似物(Lau等人,1995,生物有机化学与医药化学通讯3(10):1305-12)、 β -葡萄糖苷酸连接子(Jeffery等人,2006,生物共轭化学(Bioconjug Chem.) 17(3):832-40)或 β -半乳糖苷连接子(Kolodych等人,2017,欧洲医药化学(Eur J Med Chem.) 12月15日;142:376-382)。

[0090] 不可裂解连接子可以是顺丁烯二酰亚胺基己酰基连接子。顺丁烯二酰亚胺基己酰基连接子可包括N-顺丁烯二酰亚胺基甲基环己烷-1-甲酸酯。顺丁烯二酰亚胺基己酰基连接子可含有丁二酰亚胺基。顺丁烯二酰亚胺基己酰基连接子可含有五氟苯基。连接子可以是顺丁烯二酰亚胺基与一个或多个聚乙二醇分子的组合。连接子可以是顺丁烯二酰亚胺基己酰基与一个或多个聚乙二醇分子的组合。连接子可以是顺丁烯二酰亚胺基-PEG4连接子。连接子可以是含有丁二酰亚胺基的顺丁烯二酰亚胺基己酰基连接子与一种或多种聚乙二醇分子的组合。连接子可以是五氟苯基和含有一个或多个聚乙二醇分子的顺丁烯二酰亚胺基己酰基连接子的组合。连接子可含有连接至聚乙二醇分子的顺丁烯二酰亚胺,其中聚乙二醇使得连接子柔性更大或使得能够使用更长的连接子。连接子可以是(顺丁烯二酰亚胺基己酰基)-(缬氨酸-瓜氨酸)-(对胺基苯甲氧基羰基)连接子。

[0091] 在某些实施方案中,连接子可以是可裂解连接子。

[0092] 在某些实施方案中,连接子可以是蛋白酶可裂解连接子、酸可裂解连接子、二硫化物连接子、自我分解型连接子或自我稳定型连接子、丙二酸酯连接子、顺丁烯二酰亚胺基苯甲酰基连接子、3'-N-酰胺类似物、 β -葡萄糖苷酸连接子或 β -半乳糖苷连接子。

[0093] 在某些实施方案中,蛋白酶可裂解连接子可包括硫醇反应性间隔子或二肽,并且更具体地,蛋白酶可裂解连接子可包括硫醇反应性顺丁烯二酰亚胺基己酰基间隔子、缬氨酸-瓜氨酸二肽或对胺基-苯甲氧基羰基间隔子。

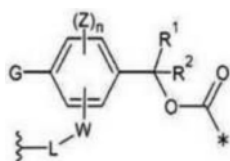
[0094] 在某些实施方案中,酸可裂解连接子可以是肼连接子或四级铵连接子。

[0095] 例示性抗体药物缀合物公开于US 10,583,197、US 9,993,568、US 9,951,072、US 9,919,057、US 9,669,107、US 11,413,353、US 11,173,214、US 11,167,040、US 10,980,890、US 10,583,197、US 10,383,949、US 10,273,235、US10,183,997和US10,118,965中,其内容各自以全文引用的方式并入本文中。

[0096] 在某些实施方案中,连接子可具有通式II的结构。

[0097] [通式II]

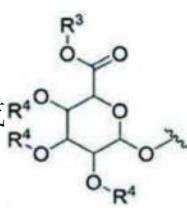
[0098]



[0099] 其中:在通式II中,

[0100] 波浪符号是与特异性结合到人TROP2的抗体或其抗原结合片段的连接位,并且

[0101] *是与活性剂的连接位;

[0102] G是葡萄糖醛酸部分或  R^3 是氢或羧基保护基,并且每个 R^4 独立地是氢或

羟基保护基;

[0103] R^1 和 R^2 各自独立地是氢、 C_{1-8} 烷基或 C_{3-8} 环烷基;

[0104] W是-C(O)-、-C(O)NR'-、-C(O)O-、-SO₂NR'-、-P(O)R''NR'-、-SONR'-或-PQ₂NR'-,其中C、S或P直接键合至苯环;并且R'和R''各自独立地是氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 C_{1-8} 烷硫基、单- C_{1-8} 烷氨基或二- C_{1-8} 烷氨基、 C_{3-20} 杂芳基或 C_{6-20} 芳基;

[0105] Z独立地是氢、 C_{1-8} 烷基、卤素、氰基或硝基;

[0106] n是0至3;并且

[0107] L是选自以下A)或B)的任一者:

[0108] A) C_{1-50} 亚烷基或1至50元亚杂烷基,满足以下中的至少一者:

[0109] (i)L包括一个或多个不饱和键;

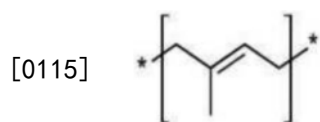
[0110] (ii)L中的两个原子经二价取代基取代,形成亚杂芳基;

[0111] (iii)L是1至50元亚杂烷基;

[0112] (iv)亚烷基被至少一个 C_{1-20} 烷基取代;和

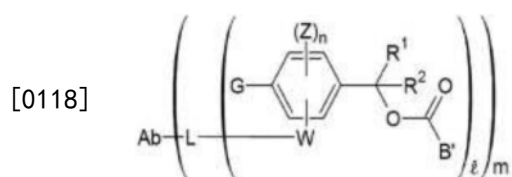
[0113] B) 包含至少一个以下通式III的异戊二烯基衍生物单元,其可被类异戊二烯转移酶识别:

[0114] [式III]



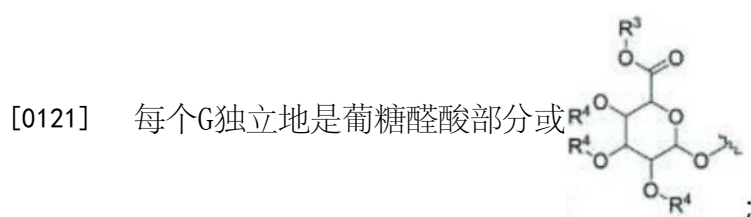
[0116] 在某些实施方案中,缀合物可具有通式IIa的结构。

[0117] [通式IIa]



[0119] 其中

[0120] 每个B'是活性剂;



[0122] R^3 是氢或羧基保护基;

[0123] 每个 R^4 独立地是氢或羟基保护基；

[0124] R^1 和 R^2 各自独立地是氢、 C_{1-8} 烷基或 C_{3-8} 环烷基；

[0125] W是 $-c(O)-$ 、 $-c(O)NR'-$ 、 $-c(O)O-$ 、 $-SO_2NR'-$ 、 $-P(O)R''NR'-$ 、 $-SONR'-$ 或 $-PO_2NR'-$ ，其中c、S或P直接键合至式IIa的苯环；

[0126] R' 和 R'' 各自独立地是氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 C_{1-8} 烷硫基、单- C_{1-8} 烷氨基或二- C_{1-8} 烷氨基、 C_{3-20} 杂芳基或 C_{6-20} 芳基；

[0127] 每个Z独立地是氢、 C_{1-8} 烷基、卤素、氰基或硝基；

[0128] n是0、1、2或3；

[0129] L包含：

[0130] A) C_{1-50} 亚烷基或 C_{1-50} 亚杂烷基且包含

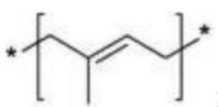
[0131] (i) 一个或多个不饱和键

[0132] (ii) 亚杂芳基；或

[0133] (iii) 被至少一个 C_{1-20} 烷基取代；或

[0134] B) 至少一个具有以通式III表示的结构的双烯基：

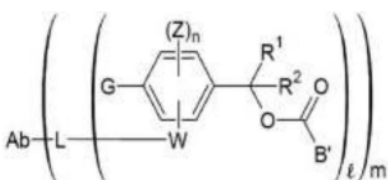
[0135] [通式III]

[0136]  并且

[0137] l和m各自独立地是1至20。

[0138] 本发明还提供由以下通式IIa表示的缀合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0139] [通式IIa]

[0140] 

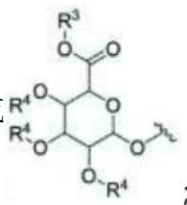
[0141] 其中

[0142] Ab是抗TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,也称为TACSTD2)

[0143] 抗体或其抗原结合片段；

[0144] 每个B'是活性剂；

[0145] 每个G独立地是葡糖醛酸部分或



[0146] R^3 是氢或羧基保护基；

[0147] 每个 R^4 独立地是氢或羟基保护基；

[0148] R^1 和 R^2 各自独立地是氢、 C_{1-8} 烷基或 C_{3-8} 环烷基；

[0149] W是 $-C(O)-$ 、 $-C(O)NR'-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-SO_2NR'-$ 、 $-P(O)R''NR'-$ 、 $-SONR'-$ 或 $-PO_2NR'-$ ，其中C、S或P直接键合至式IIa的苯环；

[0150] R' 和 R'' 各自独立地是氢、 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 C_{1-8} 烷硫基、单- C_{1-8} 烷氨基

基或二-C₁₋₈烷基氨基、C₃₋₂₀杂芳基或C₆₋₂₀芳基；

[0151] 每个Z独立地是氢、C₁₋₈烷基、卤素、氰基或硝基；

[0152] n是0、1、2或3；

[0153] L包含：

[0154] A) C₁₋₅₀亚烷基或C₁₋₅₀亚杂烷基且包含

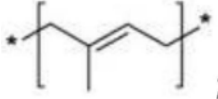
[0155] (i) 一个或多个不饱和键

[0156] (ii) 亚杂芳基；或

[0157] (iii) 被至少一个C₁₋₂₀烷基取代；或

[0158] B) 至少一个具有以通式III表示的结构的双烯基：

[0159] [通式III]

[0160]  并且

[0161] 1和m各自独立地是1至20。

[0162] 与此结构相关的其它缀合物以及详细制备方法公开于US 9,919,057、US 9,993,568、US 10,980,890和US 11,413,353中；其内容各自以全文引用的方式并入本文中。

[0163] 在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中：

[0164] 该重链可变区包含：包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的重链CDR1、包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的重链CDR2和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链CDR3；并且

[0165] 该轻链可变区包含：包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0166] 在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段包含重链可变区，该重链可变区包含：

[0167] SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列；

[0168] 与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少90%序列同一性，同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的序列；或

[0169] 与SEQ ID NO:15或20的氨基酸序列具有至少95%序列同一性，同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的序列。

[0170] 在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区，该轻链可变区包含：

[0171] SEQ ID NO:16的氨基酸序列；

[0172] 与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性，同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的序列；或

[0173] 与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性，同时维持包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链CDR1、包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链CDR2和包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链CDR3的序列。

[0174] 在某些实施方案中，抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

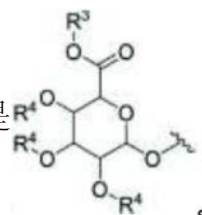
[0175] 在某些实施方案中,抗体是人源化抗体。在某些实施方案中,人源化抗体包含:

[0176] (i) 来自人抗体重链或来自人共同构架的可变重链构架区,其中该可变重链构架区包含以下氨基酸序列变化中的一者或多者:Y27F、T30S、V37L、M48I、G49A、I70L和R72V;和

[0177] (ii) 来自人抗体轻链或来自人共同构架的可变轻链构架区,其中该可变轻链构架区包含以下氨基酸序列变化:Y49S。

[0178] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段选自单克隆抗体、域抗体(dAb)、单链抗体(scAb)、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、scFab片段、Fv片段、dsFv片段、单链可变片段(scFv)、scFv-Fc片段、单域重链抗体、单域轻链抗体、变体抗体、多聚抗体、微型抗体、双功能抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。

[0179] 在某些优选实施方案中,每个G是



[0180] 在某些实施方案中,R¹和R²各自是氢。

[0181] 在某些实施方案中,R³是氢。

[0182] 在某些实施方案中,每个R⁴是羟基保护基。

[0183] 在某些实施方案中,n是0。

[0184] 在某些优选实施方案中,每个W是-C(O)NR'-,另外其中C直接键合至式IIa的苯环,并且NR'键合至L。

[0185] 在某些实施方案中,每个R₄独立地是氢。

[0186] 在某些实施方案中,R¹和R²各自是氢;

[0187] n是0;并且

[0188] 每个W是-C(O)NR'-,c直接键合至式IIa的苯环,并且R'是氢、C₁₋₈烷基、C₃₋₈环烷基、C₁₋₈烷氧基、C₁₋₈烷硫基、单-C₁₋₈烷基氨基或二-C₁₋₈烷基氨基、C₃₋₂₀杂芳基或C₆₋₂₀芳基,其中NR'键合至L。

[0189] 在某些实施方案中,L包含含氮的1至50元亚杂烷基。

[0190] 在某些实施方案中,L包含亲水性氨基酸。在某些实施方案中,W包含亲水性氨基酸的两个或更多个原子,并且W的氮与亲水性氨基酸的羰基形成肽键。

[0191] 在某些实施方案中,L是含氮的1至50元亚杂烷基,连接子包含亲水性氨基酸的两个或更多个原子,并且

[0192] 氮与亲水性氨基酸的羰基形成肽键。

[0193] 在某些实施方案中,L通过硫醚键共价键合至抗体且硫醚键包含抗体的半胱氨酸的硫原子。

[0194] 在某些实施方案中,抗体包含在抗体的c端处的可被类异戊二烯转移酶识别的氨基酸基序,并且

[0195] 硫醚键包含氨基酸基序的半胱氨酸的硫原子。

[0196] 在某些实施方案中,氨基酸基序具有CYXX序列,另外其中:

[0197] c是半胱氨酸;

- [0198] Y是脂肪族氨基酸；
- [0199] X选自谷氨酰胺、谷氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸和亮氨酸；并且
- [0200] 硫醚键包含氨基酸基序的半胱氨酸的硫原子。
- [0201] 在某些实施方案中，氨基酸基序具有CYXX序列，另外其中：
- [0202] Y选自丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸。
- [0203] 在某些优选实施方案中，氨基酸基序具有CVIM (SEQ ID NO:24) 或CVLL序列 (SEQ ID NO:25)。
- [0204] 在某些实施方案中，氨基酸基序之前的1至20个氨基酸中的至少一者是甘氨酸。
- [0205] 在某些优选实施方案中，L包含C端处的GGGGGGGCVIM的氨基酸序列 (SEQ ID NO:22)。
- [0206] 在某些实施方案中，L包含C₁₋₅₀亚烷基。
- [0207] 在某些优选实施方案中，L包含肟。在某些实施方案中，肟的氧原子在L连接至W的一侧且肟的碳原子在L连接至Ab的一侧。在某些实施方案中，肟的碳原子在L连接至W的一侧且肟的氧原子在L连接至Ab的一侧。
- [0208] 在某些实施方案中，L是含有肟的C₁₋₅₀亚烷基，
- [0209] 肟的氧原子在L连接至W的一侧，
- [0210] 肟的碳原子在L连接至Ab的一侧，或
- [0211] 肟的碳原子在L连接至W的一侧，并且
- [0212] 肟的氧原子在L连接至Ab的一侧。
- [0213] 在某些优选实施方案中，L包含肟，并且至少一个异戊二烯基单元将该肟共价键合至Ab (例如至少一个异戊二烯基单元将该肟直接或间接键合至Ab)。
- [0214] 在某些实施方案中，L包含以通式VIII或通式IX表示的连接单元：
- [0215] [通式VIII]
- [0216] $-(\text{CH}_2)_r(\text{V}(\text{CH}_2)_p)_q-$
- [0217] [式IX]
- [0218] $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_w-$
- [0219] V是单键、-O-、-S-、-NR²¹-、-C(O)NR²²-、-NR²³C(O)-、-NR²⁴SO₂-或-SO₂NR²⁵-；
- [0220] X是-O-、C₁₋₈亚烷基或-NR²¹-；
- [0221] R²¹至R²⁵各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷基C₆₋₂₀芳基或C₁₋₆烷基-C₃₋₂₀杂芳基；
- [0222] r是0至10；
- [0223] p是0至10；
- [0224] q是1至20；并且
- [0225] w是1至20。
- [0226] 在某些实施方案中，q是1至10。
- [0227] 在某些实施方案中，r是1或2。
- [0228] 在某些实施方案中，p是1或2。
- [0229] 在某些实施方案中，V是-O-。
- [0230] 在某些实施方案中，q是1至10；
- [0231] r和p各自是1或2；并且

[0232] V是-O-。

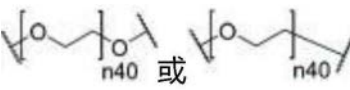
[0233] 在某些实施方案中,Z是-O-。

[0234] 在某些实施方案中,w是1至10。

[0235] 在某些实施方案中,其中:

[0236] Z是-O-;并且

[0237] w是1至10。

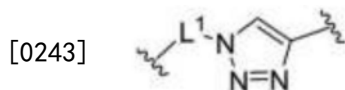
[0238] 在某些优选实施方案中,L包含  , 其中n40是1至10, 优选至少2。

[0239] 在某些实施方案中,L包含脒,并且至少一个聚乙二醇单元将脒共价键合至活性剂。

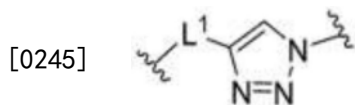
[0240] 在某些实施方案中,L包含由炔烃与叠氮基之间或由醛或酮基团与肼或羟胺之间的反应形成的结合单元。

[0241] 在某些实施方案中,L还包含由以下通式IVa、IVb、IVc、IVd或IVe表示的结合单元:

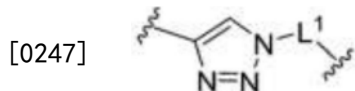
[0242] [通式IVa]



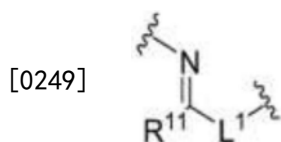
[0244] [通式IVb]



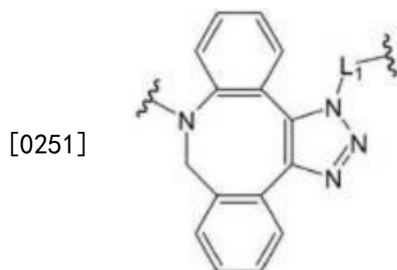
[0246] [通式IVc]



[0248] [通式IVd]



[0250] [通式IVe]



[0252] 其中

[0253] L₁和L₂各自独立地是单键或C₁₋₃₀亚烷基;并且

[0254] R₁₁是氢或C₁₋₁₀烷基。

[0255] 在某些实施方案中,L₁和L₂各自独立地是单键、C₁₁亚烷基或C₁₂亚烷基。

[0256] 在某些实施方案中,类异戊二烯转移酶是法呢基蛋白质转移酶 (Ftase) 或香叶基香叶基转移酶 (GGTase)。

[0257] 在某些实施方案中,L是支链的且包含:

[0258] i) 通过一级连接子与抗体共价偶合的分支单元;

[0259] ii) 第一分支,其中第一活性剂通过二级连接子和裂解基团共价偶合至该分支单元;和

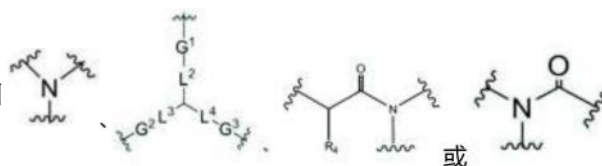
[0260] iii) 第二分支,其中:

[0261] a) 第二活性剂通过二级连接子和裂解基团共价偶合至分支单元;

[0262] 或

[0263] b) 聚乙二醇部分共价偶合至分支单元。

[0264] 在某些实施方案中,分支单元具有由

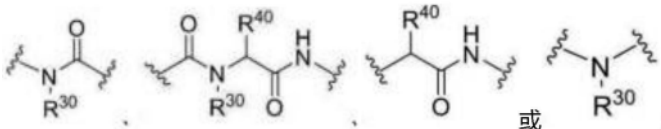


表示的结构,其中:

[0265] L^2 、 L^3 和 L^4 各自独立地是键或 $-C_nH_{2n}-$,

[0266] n是1至30;

[0267] G^1 、 G^2 和 G^3 各自独立地表示键、



[0268] R³⁰是氢或C₁₋₃₀烷基;

[0269] R^{40} 是氢或 L^5-COOR_6 ; 并且

[0270] L^5 为键或 $-C_nH_{2n}-$;

[0271] n' 为1至10;并且

[0272] R₆是氢或C₁₋₃₀烷基。

[0273] 在某些优选实施方案中,裂解基团能够在靶细胞中裂解且能够释放一种或多种活性剂。

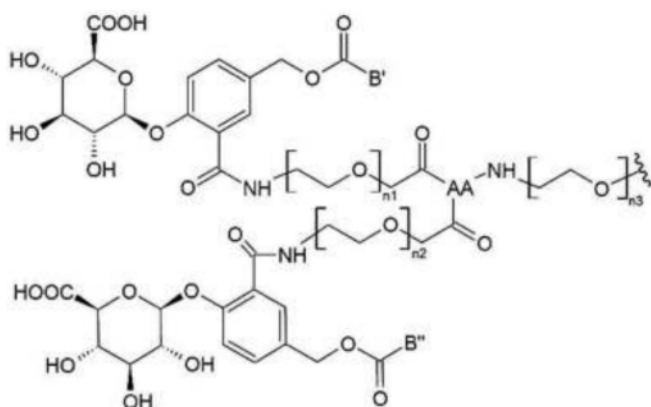
[0274] 在某些实施方案中,至少一个分支连接器共价偶合至Ab;并且

[0275] 至少两种活性剂共价偶合至分支连接子。在某些实施方案中,一个分支连接子偶合至Ab。在某些实施方案中,两个分支连接子偶合至Ab。在某些实施方案中,三个分支连接子偶合至Ab。在某些实施方案中,四个分支连接子偶合至Ab。在某些实施方案中,各分支连接子偶合至两种活性剂。在某些实施方案中,缀合物包含至少两种不同的活性剂。在某些实施方案中,至少一个分支连接子偶合至两种不同的活性剂。

[0276] 在某些实施方案中,分支单元是氮原子。在其它实施方案中,分支单元是酰胺且一级连接子包含酰胺的羰基。在其它实施方案中,分支单元是酰胺且二级连接子包含酰胺的羰基。在某些优选实施方案中,分支单元是赖氨酸。

[0277] 在某些实施方案中, 缀合物包含由以下表示的结构:

[0278]



[0279] 或其药学上可接受的盐；其中

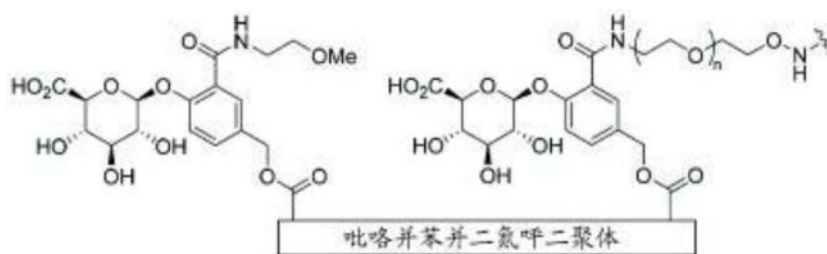
[0280] B'和B''各自是活性剂；

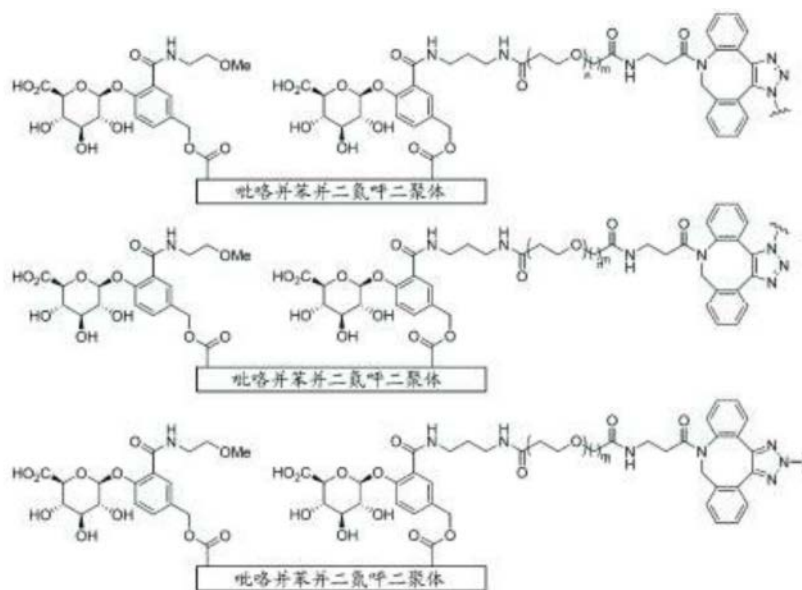
[0281] n1至n3各自独立地是0至30；并且

[0282] AA是氨基酸基团。

[0283] 在某些实施方案中,缀合物包含由以下表示的结构或其药学上可接受的盐:

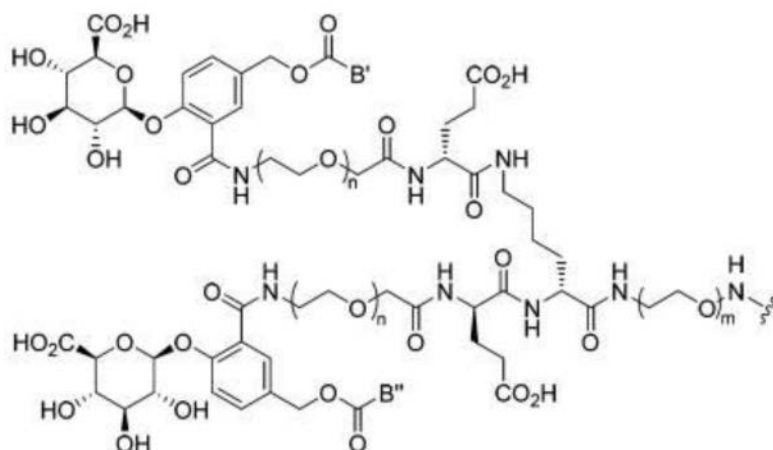
[0284]





[0285]

或



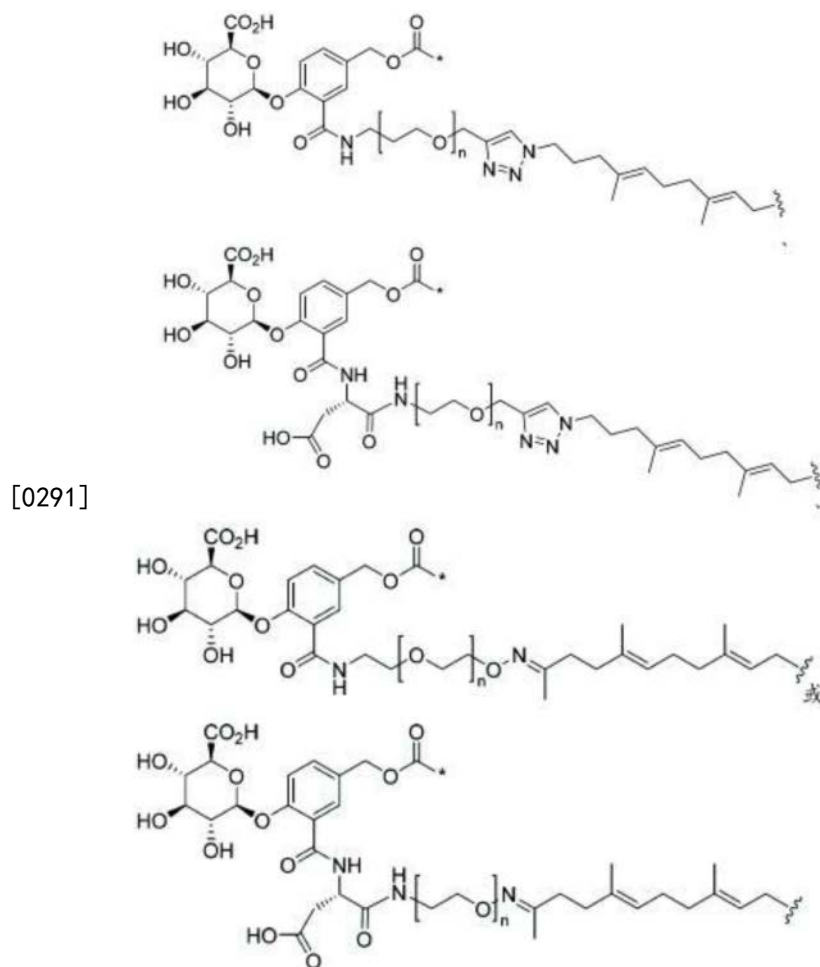
[0286] 其中B'和B''是指彼此相同或不同的活性剂；

[0287] 吡咯并苯并二氮呋二聚体,例如式III化合物;并且

[0288] m和n各自独立地是指0至30,

[0289] 或其药学上可接受的盐。

[0290] 在某些实施方案中,缀合物包含由以下表示的结构:



[0292] 或其药学上可接受的盐,其中波浪符号表示抗体构建体的结合位,*表示活性剂的结合位,并且n是0至20。

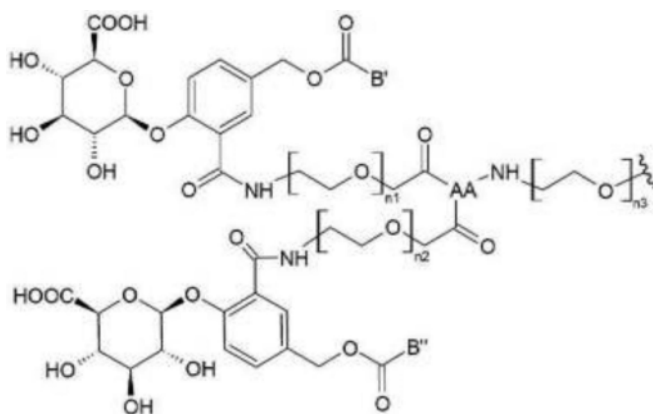
[0293] 在某些实施方案中,抗体-药物缀合物的第一连接子包含具有1至100个碳原子、优选1至50个碳原子的亚烷基,或亚烷基包括至少一个不饱和键,亚烷基包含至少一个亚杂芳基,亚烷基的碳原子经一个或多个选自氮(N)、氧(O)和硫(S)的杂原子取代,或亚烷基进一步经一个或多个具有1至20个碳原子的烷基取代。

[0294] 在某些实施方案中,亚烷基的至少一个碳原子经氮取代,第一连接子包括亲水性氨基酸的至少两个原子,并且氮与亲水性氨基酸的主链羰基一起形成肽键。亲水性氨基酸可以是例如精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、脯氨酸、丝氨酸或苏氨酸。

[0295] 在某些实施方案中,抗体活性剂的分支连接子包含具有侧链的氨基酸,该侧链具有在水溶液中在中性pH下携带电荷的部分,该氨基酸优选精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸或鸟氨酸。氨基酸可位于分支连接子上的任何位置。举例来说,分支连接子的脒可共价键合至分支连接子的聚乙二醇单元。或者或另外,这些氨基酸可存在于第二连接子中,任选地存在于各第二连接子内。

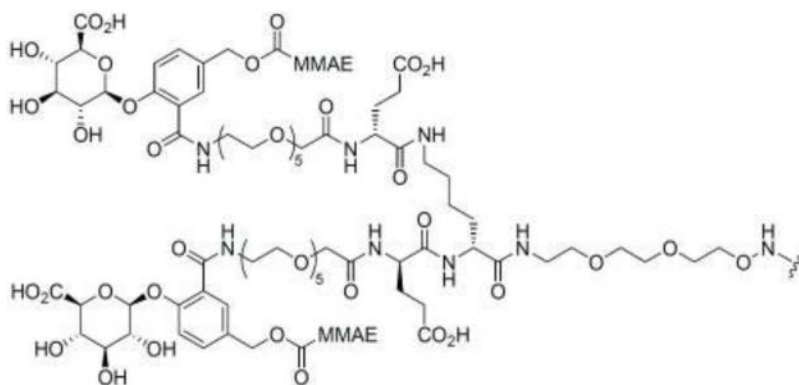
[0296] 在某些实施方案中,缀合物包含由以下表示的结构:

[0297]



- [0298] 或其药学上可接受的盐；
- [0299] 其中B'和B''各自是活性剂；
- [0300] n1至n3各自独立地指0至30；并且
- [0301] AA是指氨基酸基团。
- [0302] 在某些实施方案中,AA是指其中一个或多个氨基酸键合的氨基酸基团。
- [0303] 在某些实施方案中,i) 连接子包括多个氨基酸的肽序列；并且ii) 至少两种活性剂共价键合至氨基酸的侧链。
- [0304] 在某些实施方案中,氨基酸基团是通过1至20个氨基酸的主链键联或侧链键联而形成的基团。
- [0305] 在某些实施方案中,氨基酸基团是通过1至20个精氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、脯氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基的主链键联或侧链键联而形成的基团。
- [0306] 在某些实施方案中,氨基酸基团是通过1至20个精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸或鸟氨酸残基的主链键联或侧链键联而形成的基团。
- [0307] 在某些实施方案中,氨基酸基团包括1至20个氨基酸,例如至少一个赖氨酸。
- [0308] 在某些实施方案中,氨基酸基团包含赖氨酸的主链或侧链键联。
- [0309] 在某些实施方案中,缀合物包含由以下表示的结构:

[0310]



- [0311] 其中,MMAE是单甲基奥瑞他汀 (auristatin)E。
- [0312] 与此结构相关的其它缀合物以及详细制备方法公开于US 11,173,214和US 11,167,040中；其内容各自以全文引用的方式并入本文中。
- [0313] 在某些实施方案中,如本文所用的术语“活性剂部分”是指包含活性剂和共价键的

化合物,该等共价键将活性剂结合到连接子或其一部分。

[0314] 在本发明中,活性剂部分可直接结合到连接子,并且一个或多个、尤其两个或更多个、三个或更多个或四个或更多个活性剂部分可直接结合到连接子。

[0315] 在某些实施方案中,活性剂各自独立地选自化学治疗剂和毒素。

[0316] 另外,活性剂可以是免疫调节化合物、抗癌剂、抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗寄生虫剂或其组合,并且可选自以下列出的活性剂以供使用:

[0317] (a) 厄洛替尼(erlotinib)、硼替佐米(bortezomib)、氟维司群(fulvestrant)、舒癌特(sutent)、来曲唑(letrozole)、甲磺酸伊马替尼(imatinibmesylate)、PTK787/ZK 222584、奥沙利铂(oxaliplatin)、5-氟尿嘧啶、甲酰四氢叶酸、雷帕霉素(rapamycin)、拉帕替尼(lapatinib)、洛那法尼(lonafarnib)、索拉非尼(sorafenib)、吉非替尼(gefitinib)、AG1478、AG1571、噻替派(thiotepa)、环磷酰胺、白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)、哌泊舒凡(piposulfan)、苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)、尤利多巴(uredopa)、伸乙基亚胺、六甲蜜胺、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷酰胺、三伸乙基硫代磷酰胺、三羟甲基密胺、布拉他辛(bullatacin)、布拉他辛酮(bullatacinone)、喜树碱(camptothecin)、拓朴替康(topotecan)、苔藓抑素(bryostatin)、海洋抑素(callystatin)、CC-1065、阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)、比折来新(bizelesin)、念珠藻素1(cryptophycin1)、念珠藻素8、海兔毒素(dolastatin)、多卡霉素(duocarmycin)、KW-2189、CB1-TM1、艾榴塞洛素(eleutherobin)、盘克斯他汀(pancratistatin)、沙考地汀(sarcodictyin)、海绵抑素(spongistatin)、氯芥苯丁酸(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺、甲基二(氯乙基)胺(mechlorethamine)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、卡莫司汀(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡奇霉素 γ 1、卡奇霉素 ω 1、达内霉素(dynemicin)、达内霉素A、氯屈膦酸盐(clodronate)、埃斯培拉霉素(esperamicin)、新抑癌菌素发色团(neocarzinostatinchromophore)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(antrmycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博莱霉素(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、道诺比星(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素(doxorubicin)、吗啉基-阿霉素、氰基吗啉基-阿霉素、2-吡咯啉基-阿霉素、脂质阿霉素、去氧阿霉素、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素C(mitomycin C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泼非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链霉素(streptomycin)、链脲佐菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)、5-氟尿嘧啶、迪诺特宁(denopterin)、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶罗呤(pteropterin)、曲美沙

特(trimetrexate)、氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolonepropionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone)、胺格鲁米特(aminogluthetamide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)、醛叶酸、乙酰葡萄糖、醛磷酸胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶(eniluracil)、安吡啶(amsacrine)、贝斯布西(bestrabucil)、比生群(bisantrene)、依达曲沙(edatraxate)、地磷酰胺(defofamine)、地美可辛(demecolcine)、地吡醌(diaziquone)、艾弗鸟氨酸(elfomithine)、依利醋铵(elliptinium acetate)、依托格鲁(etoglucid)、硝酸镓、羟基脲、蘑菇多糖(lentinan)、氯尼达明(lonidainine)、美登素(maytansine)、胺沙托辛(ansamitocin)、米托胍脲(mitoguazone)、米托蒽醌(mitoxantrone)、莫比达摩(mopidanmol)、二胺硝吡啶(nitraerine)、喷司他汀(pentostatin)、苯来美特(phenamet)、吡柔比星(pirarubicin)、洛索蒽醌(losoxantrone)、2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide)、丙卡巴肼(procarbazine)、多糖-k(polysaccharide-k)、雷佐生(raZoxane)、根瘤菌素(rhizoxin)、西索菲兰(sizofiran)、锗螺胺(spirogermanium)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)、三亚胺醌(triaziquone)、2,2',2''-三氯三乙胺、T-2毒素、弗纳库林A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridinA)、胺癸叮(anguidine)、乌拉坦(urethane)、长春地辛(vindesine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、甘露醇氮芥(mannomustine)、二溴甘露醇(mitobronitol)、二溴卫矛醇(mitolactol)、哌泊溴烷(pipobroman)、加西托星(gacytosine)、阿拉伯糖苷(arabinoside)、环磷酰胺、噻替派、紫杉醇(paclitaxel)、紫杉醇、紫杉醇的白蛋白工程化纳米粒子调配物、多西他赛(docetaxel)、氯芥苯丁酸、吉西他滨(gemcitabine)、6-巯鸟嘌呤、巯嘌呤、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、长春碱(vinblastine)、铂、依托泊苷(etoposide)、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱(vincristine)、长春瑞滨(vinorelbine)、诺凡特龙(novantrone)、替尼泊苷(teniposide)、依达曲沙(edatrexate)、道诺霉素(daunomycin)、氨基喋呤(aminopterin)、希罗达(xeloda)、伊班膦酸盐(ibandronate)、CPT-11、拓扑异构酶(topoisomerase)抑制剂RFS 2000、二氟甲基鸟氨酸、视黄酸、卡培他滨(capecitabine)或其药学上可接受的盐、溶剂合物或酸;

[0318] (b) 单核因子(monokine)、淋巴介质、传统的多肽激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、松弛素、松弛素原、糖蛋白激素、促卵泡激素、促甲状腺激素、促黄体激素、肝生长因子、纤维母细胞生长因子、促乳素、胎盘催乳激素、肿瘤坏死因子、肿瘤坏死因子- α 、肿瘤坏死因子- β 、苗勒(mullerian)抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、活化素、血管内皮生长因子、血小板生成素、红细胞生成素、骨诱导因子、干扰素、干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ 、群落刺激因子(CSF)、巨噬细胞-CSF、颗粒球-巨噬细胞-CSF、颗粒球-CSF、白介素(IL)、IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、肿瘤坏死因子、多肽因子、LIF、kit配体或其组合;

[0319] (c) 白喉毒素、肉毒杆菌毒素、破伤风毒素、痢疾毒素、霍乱毒素、瓢菌素(amanitin)、 α -瓢菌素、吡咯并苯并二氮呋、吡咯并苯并二氮呋衍生物、吲哚啉苯并二氮呋、

吡啶并苯并二氮呋、河豚毒素、双鞭甲藻毒素(brevetoxin)、雪卡藻毒素(ciguatoxin)、蓖麻毒素、AM毒素、奥瑞他汀、微管溶素、格尔德霉素(geldanamycin)、类美登素(maytansinoid)、卡奇霉素、柔红霉素、阿霉素、甲胺喋呤、长春地辛、SG2285、尾海兔素、尾海兔素类似物、奥瑞他汀、念珠藻素、喜树碱、根霉素、根霉素衍生物、CC-1065、CC-1065类似物或衍生物、多卡霉素、烯二炔抗生素、埃斯培拉霉素、埃坡霉素(epothilone)、类毒素或其组合;

[0320] (d) 亲和配体,其中该亲和配体是底物、抑制剂、活性剂、神经传递素、放射性同位素或其组合;

[0321] (e) 放射性标记、³²P、³⁵S、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、链霉抗生物素蛋白、地高辛(dioxigenin)、半抗原、免疫原性蛋白质、具有与目标互补的序列的核酸分子或其组合;

[0322] (f) 免疫调节化合物、抗癌剂、抗病毒剂、抗细菌剂、抗真菌剂、抗寄生虫剂或其组合;

[0323] (g) 他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)或托瑞米芬(toremifene);

[0324] (h) 4(5)-咪唑、胺鲁米特(aminoglutethimide)、乙酸甲地孕酮、依西美坦(exemestane)、来曲唑或阿那曲唑(anastrozole);

[0325] (i) 氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)、戈舍瑞林(goserelin)或曲沙他滨(troxacitabine);

[0326] (j) 芳香酶抑制剂;

[0327] (k) 蛋白激酶抑制剂;

[0328] (l) 脂质激酶抑制剂;

[0329] (m) 反义寡核苷酸;

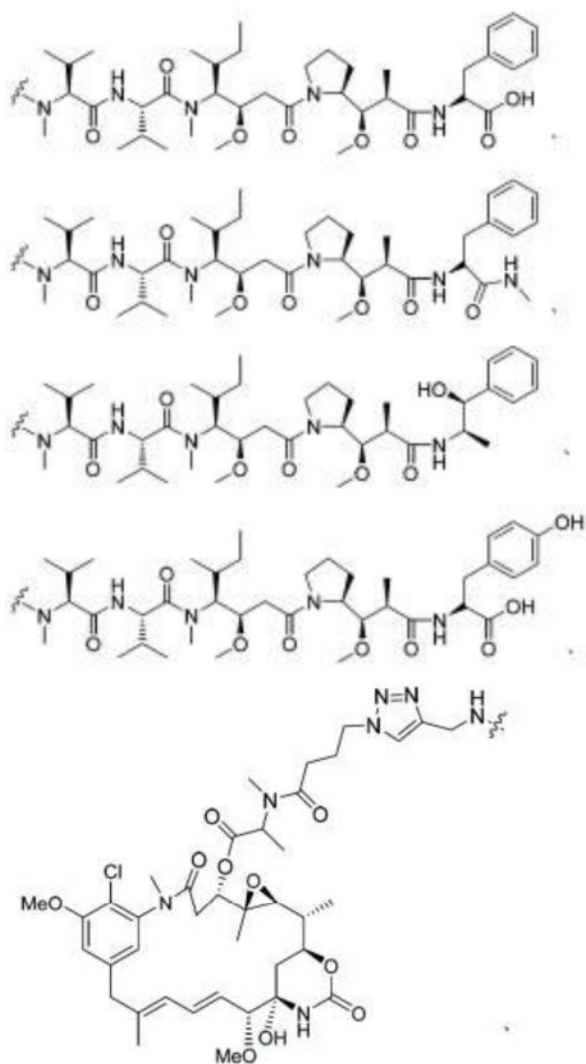
[0330] (n) 核糖核酸酶;

[0331] (o) 疫苗;和

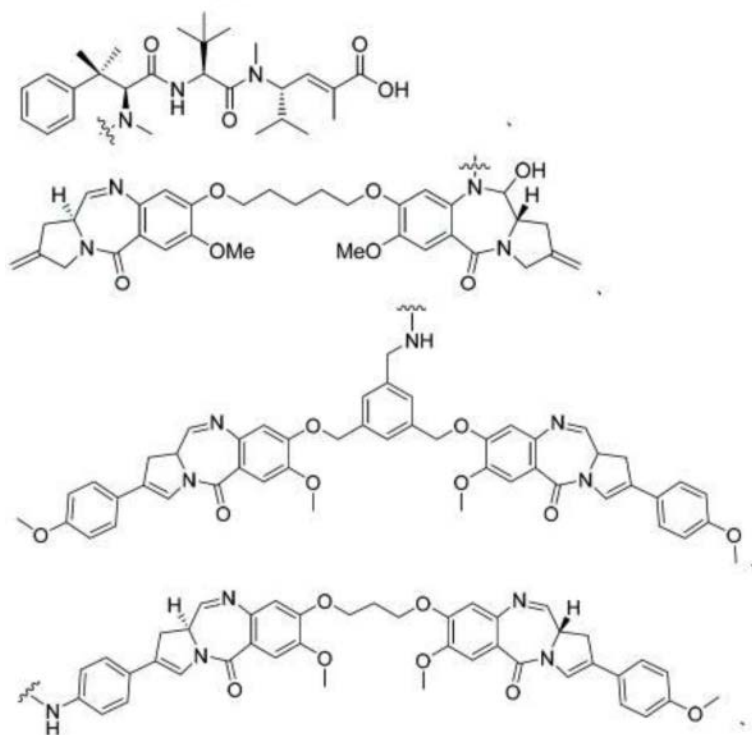
[0332] (p) 抗血管生成剂。

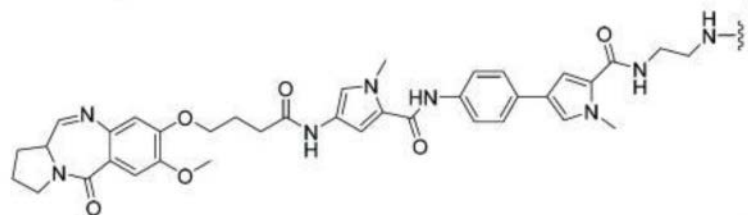
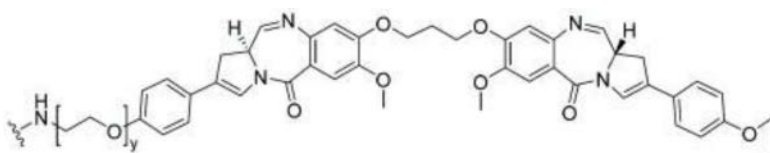
[0333] 在某些实施方案中,活性剂是

[0334]

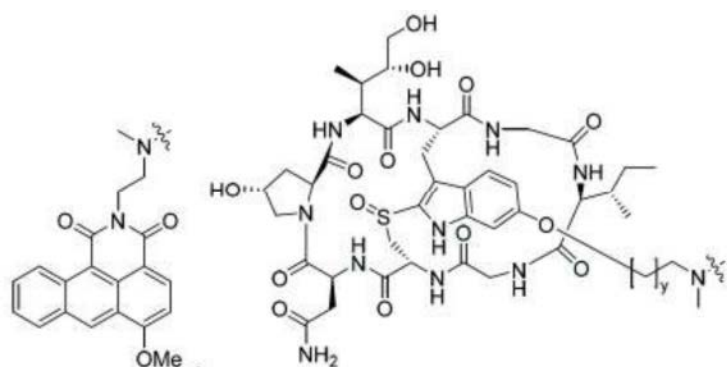
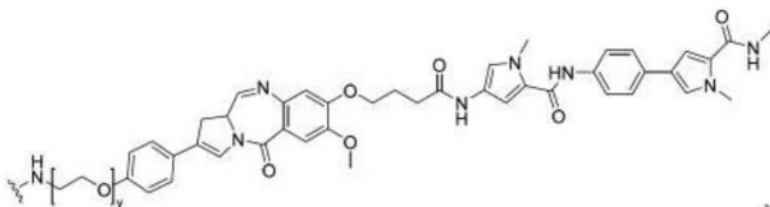
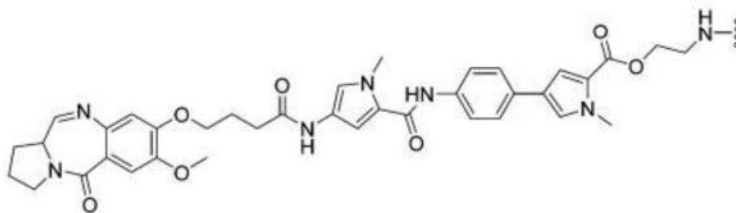


[0335]



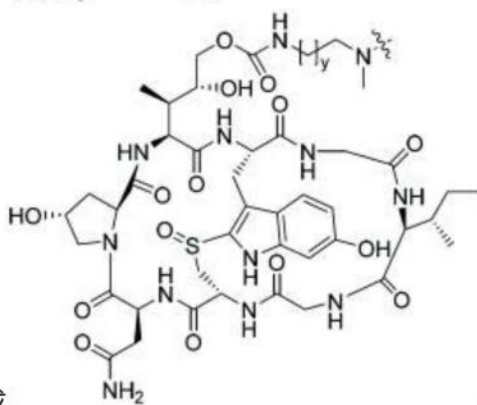


[0336]



SEQ ID

[0337]



NO:26, 或

SEQ ID NO:27,

[0338] 其中Y是1至10;并且

[0339] 波浪线表示与缀合物的连接。

[0340] 在某些实施方案中,活性剂是吡咯并苯并二氮呋二聚体;

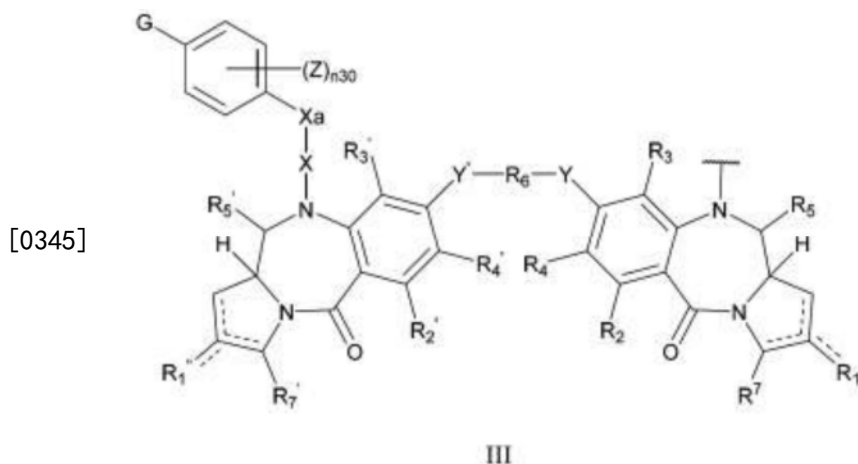
[0341] 该吡咯并苯并二氮呋二聚体在N10位置经X取代,或在N'10位置经X'取代,其中X或

X'将该吡咯并苯并二氮呋二聚体连接至连接子；

[0342] X和X'各自独立地是-C(O)O-*或-c(O)-*；并且

[0343] *是该吡咯并苯并二氮呋二聚体与该连接子之间的结合位。

[0344] 在某些优选实施方案中,吡咯并苯并二氮呋二聚体由式III表示:



[0346] 其中

[0347] 波浪线表示与缀合物的连接点(例如式IIa的羰基连接至B')；

[0348] 虚线表示任意的双键；

[0349] R_1 和 R_1' 各自独立地选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R^m、OR^m、=CH-R^{m'}=C(R^{m'})₂、O-SO₂-R^m、CO₂R^m、COR^m、卤基和二卤基；

[0350] R^{m'}选自R^m、CO₂R^m、COR^m、CHO、CO₂H和卤基；

[0351] R^m选自被取代或未被取代的C₁₋₁₂烷基、被取代或未被取代的C₂₋₁₂烯基、被取代或未被取代的C₂₋₁₂炔基、被取代或未被取代的C₅₋₂₀芳基、被取代或未被取代的C₃₋₆杂芳基、被取代或未被取代的C₃₋₆环烷基、被取代或未被取代的3至7元杂环基、被取代或未被取代的3至7元杂环烷基和被取代或未被取代的5至7元杂芳基,其中当该C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、C₅₋₂₀芳基、C₅₋₂₀杂芳基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环基、3至7元杂环烷基或5至7元杂芳基被取代时,该C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、C₅₋₂₀芳基、C₅₋₂₀杂芳基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环基、3至7元杂环烷基或5至7元杂芳基中的相应氢原子可各自独立地被甲氧基、C₁₋₁₂烷基、C₂₋₁₂烯基、C₂₋₁₂炔基、C₅₋₂₀芳基、C₅₋₂₀杂芳基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环基、3至7元杂环烷基和5至7元杂芳基置换；

[0352] R₂、R₃、R₅、R_{2'}、R_{3'}和R_{5'}各自独立地选自H、R^m、OH、OR^m、SH、SR^m、NH₂、NHR^m、NR^mR^{m'}、NO₂、Me₃Sn和卤基；

[0353] R₄和R_{4'}各自独立地选自H、R^m、OH、OR^m、SH、SR^m、NH₂、NHR^m、NR^mR^{m'}、NO₂、Me₃Sn, 卤基、被取代或未被取代的C₁₋₆烷基、被取代或未被取代的C₁₋₆烷氧基、被取代或未被取代的C₂₋₆烯基、被取代或未被取代的C₂₋₆炔基、被取代或未被取代的C₃₋₆环烷基、被取代或未被取代的3至7元杂环烷基、被取代或未被取代的C₅₋₁₂芳基、被取代或未被取代的5至7元杂芳基、-CN、-NCO、-ORⁿ、-OC(O)Rⁿ、-OC(O)NRⁿR^{n'}、-OS(O)Rⁿ、-OS(O)₂Rⁿ、-SRⁿ、-S(O)Rⁿ、-S(O)₂Rⁿ、-S(O)NRⁿR^{n'}、-S(O)₂NRⁿR^{n'}、-OS(O)NRⁿR^{n'}、-OS(O)₂NRⁿR^{n'}、-NRⁿR^{n'}、-NRⁿC(O)R^o、-NRⁿC(O)OR^o、-NRⁿC(O)NR^oR^{o'}、-NRⁿS(O)R^o、-NRⁿS(O)₂R^o、-NRⁿS(O)NR^oR^{o'}、-NRⁿS(O)₂NR^oR^{o'}、-C(O)Rⁿ、-C(O)ORⁿ和-C(O)NRⁿR^{n'}, 其中该C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3至7元杂环烷基、

C_{5-12} 芳基和5至7元杂芳基中的氢原子可各自独立地被 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{5-12} 芳基、5至7元杂芳基、 $-OR^p$ 、 $-OC(O)R^p$ 、 $-OC(O)NR^pR^{p'}$ 、 $-OS(O)R^p$ 、 $-OS(O)_2R^p$ 、 $-SR^p$ 、 $-S(O)R^p$ 、 $-S(O)_2R^p$ 、 $-S(O)NR^pR^{p'}$ 、 $-S(O)_2NR^pR^{p'}$ 、 $-OS(O)NR^pR^{p'}$ 、 $-OS(O)_2NR^pR^{p'}$ 、 $-NR^pR^{p'}$ 、 $-NR^pC(O)R^q$ 、 $-NR^pC(O)OR^q$ 、 $-NR^pC(O)NR^qH$ 、 $-NR^pS(O)R^q$ 、 $-NR^pS(O)_2R^q$ 、 $-NR^pS(O)NR^qH$ 、 $-NR^pS(O)_2NR^qH$ 、 $-C(O)R^p$ 、 $-C(O)OR^p$ 或 $-C(O)NR^pR^{p'}$ 置换, 当该 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{5-12} 芳基和5至7元杂芳基;

[0354] R^n 、 $R^{n'}$ 、 R^o 、 $R^{o'}$ 、 R^p 、 $R^{p'}$ 和 R^q 各自独立地选自H、 C_{1-7} 烷基、 C_{2-7} 烯基、 C_{2-7} 炔基、 C_{3-13} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{6-10} 芳基和5至7元杂芳基;

[0355] X选自 $-c(O)O-$ 、 $-S(O)O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-c(O)NR-$ 、 $-S(O)_2NR-$ 、 $-P(O)R'NR-$ 、 $-S(O)NR-$ 和 $-PO_2NR-$;

[0356] Xa是键或被取代或未被取代的 C_{1-6} 亚烷基, 其中 C_{1-6} 亚烷基当被取代时是被 C_{1-8} 烷基或 C_{3-8} 环烷基取代;

[0357] R和R'各自独立地表示H、OH、 NH_2 、 ONH_2 、 $NHNH_2$ 、被取代或未被取代的 C_{1-8} 烷基、被取代或未被取代的 C_{3-8} 环烷基、被取代或未被取代的 C_{1-8} 烷氧基、被取代或未被取代的 C_{1-8} 烷硫基、被取代或未被取代的 C_{3-20} 杂芳基、被取代或未被取代的 C_{5-20} 芳基或单- C_{1-8} 烷氨基或二- C_{1-8} 烷氨基, 其中该 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{1-8} 烷氧基、 C_{1-8} 烷硫基、 C_{3-20} 杂芳基和 C_{5-20} 芳基当被取代时是被选自OH、 N_3 、CN、 NO_2 、SH、 NH_2 、 ONH_2 、 $NHNH_2$ 、卤基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和 C_{6-12} 芳基的取代基取代;

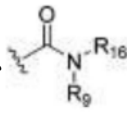
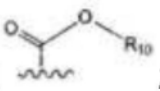
[0358] Y和Y'各自独立地选自O、S和N(H);

[0359] R_6 是被取代或未被取代的饱和或不饱和 C_{3-12} 烃链, 其中该链可间杂有一个或多个杂原子、NMe或被取代或未被取代的芳环, 该链或芳环可在该链或芳环上的任一个或多个氢原子位置处被 $-NH-$ 、 $-NR^m$ 、 $-NHC(O)R^m$ 、 $-NHC(O)CH_2-[OCH_2CH_2]_n-R$ 或 $-[CH_2CH_2O]_n-R$ 取代或未被取代, 其中 R^m 和R各自如上文关于 R^m 和R所定义, 并且n是1至12; 并且

[0360] R_7 和 R_7' 各自独立地是H、被取代或未被取代的 C_{1-6} 烷基、被取代或未被取代的 C_{2-6} 烯基、被取代或未被取代的 C_{2-6} 炔基、被取代或未被取代的 C_{3-6} 环烷基、被取代或未被取代的3至7元杂环烷基、被取代或未被取代的 C_{6-10} 芳基、被取代或未被取代的5至7元杂芳基、 $-OR^r$ 、 $-OC(O)R^r$ 、 $-OC(O)NR^rR^{r'}$ 、 $-OS(O)R^r$ 、 $-OS(O)_2R^r$ 、 $-SR^r$ 、 $-S(O)R^r$ 、 $-S(O)_2R^r$ 、 $-S(O)NR^rR^{r'}$ 、 $-S(O)_2NR^rR^{r'}$ 、 $-OS(O)NR^rR^{r'}$ 、 $-OS(O)_2NR^rR^{r'}$ 、 $-NR^rR^{r'}$ 、 $-NR^rC(O)R^s$ 、 $-NR^rC(O)OR^s$ 、 $-NR^rC(O)NR^sR^{s'}$ 、 $-NR^rS(O)R^s$ 、 $-NR^rS(O)_2R^s$ 、 $-NR^rS(O)NR^sR^{s'}$ 、 $-NR^rS(O)_2NR^sR^{s'}$ 、 $-c(O)R^r$ 、 $-C(O)OR^s$ 或 $-c(O)NR^rR^{r'}$, 其中该 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{6-10} 芳基和5至7元杂芳基中的氢原子可各自独立地被 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{6-10} 芳基、5至7元杂芳基、 $-OR^t$ 、 $-OC(O)R^t$ 、 $-OC(O)NR^tR^{t'}$ 、 $-OS(O)R^t$ 、 $-OS(O)_2R^t$ 、 $-SR^t$ 、 $-S(O)R^t$ 、 $-S(O)_2R^t$ 、 $-S(O)NR^tR^{t'}$ 、 $-S(O)_2NR^tR^{t'}$ 、 $-OS(O)NR^tR^{t'}$ 、 $-OS(O)_2NR^tR^{t'}$ 、 $-NR^tR^{t'}$ 、 $-NR^tC(O)R^u$ 、 $-NR^tC(O)OR^u$ 、 $-NR^tC(O)NR^uR^{u'}$ 、 $-NR^tS(O)R^u$ 、 $-NR^tS(O)_2R^u$ 、 $-NR^tS(O)NR^uR^{u'}$ 、 $-NR^tS(O)_2NR^uR^{u'}$ 、 $-C(O)R^t$ 、 $-C(O)OR^t$ 或 $-C(O)NR^tR^{t'}$ 置换, 当该 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{6-10} 芳基和5至7元杂芳基;

[0361] R^r 、 $R^{r'}$ 、 R^s 、 $R^{s'}$ 、 R^t 、 $R^{t'}$ 、 R^u 和 $R^{u'}$ 各自独立地选自H、 C_{1-7} 烷基、 C_{2-7} 烯基、 C_{2-7} 炔基、 C_{3-13} 环烷基、3至7元杂环烷基、 C_{5-10} 芳基和5至7元杂芳基;

[0362] G是葡萄糖苷酸基团或半乳糖苷基团;

[0363] 每个Z选自H、C₁₋₈烷基、卤基、NO₂、CN、和;

[0364] R₉、R₁₀和R₁₆各自独立地选自H、C₁₋₈烷基、C₂₋₆烯基、C₁₋₆烷氧基、烷氧基烷基和甲氧基乙基;并且

[0365] n₃₀是1至3。

[0366] 在某些实施方案中,虚线表示携带R₁和R₇或R₁和R₇的碳之间存在双键。

[0367] 在某些实施方案中,R₁是R^m且R^m选自被取代或未被取代的C₁₋₆烷基、被取代或未被取代的C₂₋₆烯基、被取代或未被取代的C₅₋₇芳基和被取代或未被取代的C₃₋₆杂芳基。

[0368] 在某些实施方案中,R₂、R₃和R₅各自独立地是H或OH。

[0369] 在某些实施方案中,R₄是C₁₋₆烷氧基。

[0370] 在某些实施方案中,R₄是甲氧基、乙氧基或丁氧基。

[0371] 在某些实施方案中,X选自-C(O)O-、-C(O)-和-C(O)NR-;并且R各自独立地表示H、OH、N₃、CN、NO₂、SH、NH₂、ONH₂、NHNH₂、卤基、被取代或未被取代的C₁₋₈烷基或被取代或未被取代的C₁₋₈烷氧基,其中C₁₋₈烷基或C₁₋₈烷氧基当被取代时是被OH、N₃、CN、NO₂、SH、NH₂、ONH₂、NHNH₂或卤基取代。

[0372] 在某些实施方案中,X是-C(O)NR-。

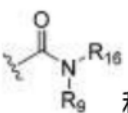
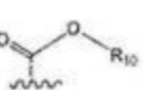
[0373] 在某些实施方案中,R₆是被取代或未被取代的饱和或不饱和C₃₋₈烃链,其中

[0374] 该烃链的碳原子中的一个或多个碳原子经杂原子或被取代或未被取代的芳环置换,其中该杂原子是O、S或N(H)且该芳环为苯、吡啶、咪唑或吡唑,并且该链或芳环可在该链或芳环上的任一个或多个氢原子位置处被-NHC(O)CH₂-[OCH₂CH₂]_n-R或-[CH₂CH₂O]_n-R取代;并且

[0375] n是1至6。

[0376] 在某些实施方案中,n是1至10。

[0377] 在某些实施方案中,Xa是键或C₁₋₃亚烷基。

[0378] 在某些实施方案中,z是H、和,其中R₉、R₁₀和R₁₆各自独立地选自

H、C₁₋₃烷基、C₁₋₃烷氧基和烷氧基甲基。

[0379] 在某些实施方案中,R₉是甲氧基烷基。

[0380] 在某些实施方案中,R₁₀是甲氧基烷基。

[0381] 在某些实施方案中,R₁₆是甲氧基烷基。

[0382] 在某些实施方案中,R₉、R₁₀或R₁₆是-(CH₂CH₂O)_m-(CH₂)_{m2}CH₃,另外其中m是1至6且m₂是0至2.3。

[0383] 在某些实施方案中,R₂是H。

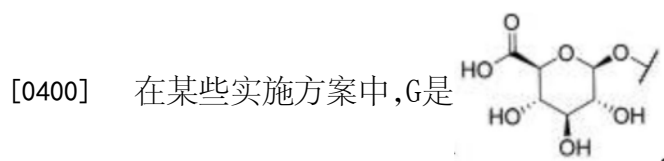
[0384] 在某些实施方案中,R₃是H。

[0385] 在某些实施方案中,R₇是H。

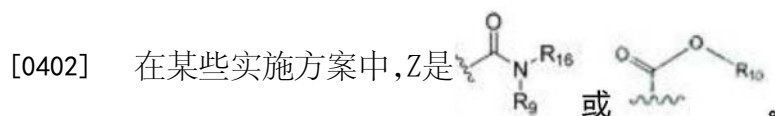
[0386] 在某些实施方案中,R₄是烷氧基(例如甲氧基)。

[0387] 在某些实施方案中,R₅是OH。

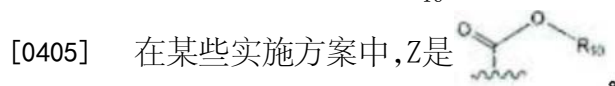
- [0388] 在某些实施方案中, R_1 是 $=CH_2$ 、 CH_3 或苯基, 任选地被甲氧基取代。
- [0389] 在某些实施方案中, Y 是 O 。
- [0390] 在某些实施方案中, R_2' 是 H 。
- [0391] 在某些实施方案中, R_3' 是 H 。
- [0392] 在某些实施方案中, R_7' 是 H 。
- [0393] 在某些实施方案中, R_4' 是烷氧基 (例如甲氧基)。
- [0394] 在某些实施方案中, R_5' 是 OH 。
- [0395] 在某些实施方案中, R_1' 是 $=CH_2$ 、 CH_3 或苯基, 任选地被甲氧基取代。
- [0396] 在某些实施方案中, Y' 是 O 。
- [0397] 在某些实施方案中, X 是 $-C(O)O-$ 。
- [0398] 在某些实施方案中, Xa 是 CH_2 。
- [0399] 在某些实施方案中, G 是葡萄糖苷酸基团。



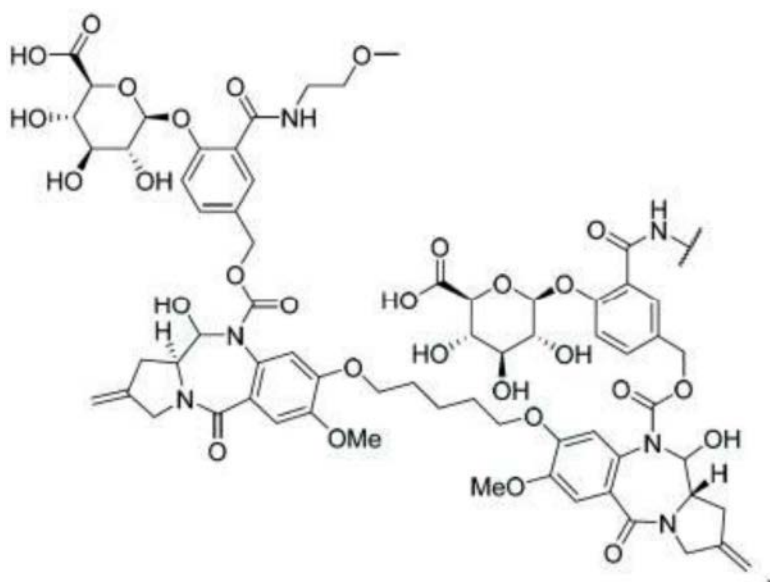
- [0401] 在某些实施方案中, n_{30} 是 1。



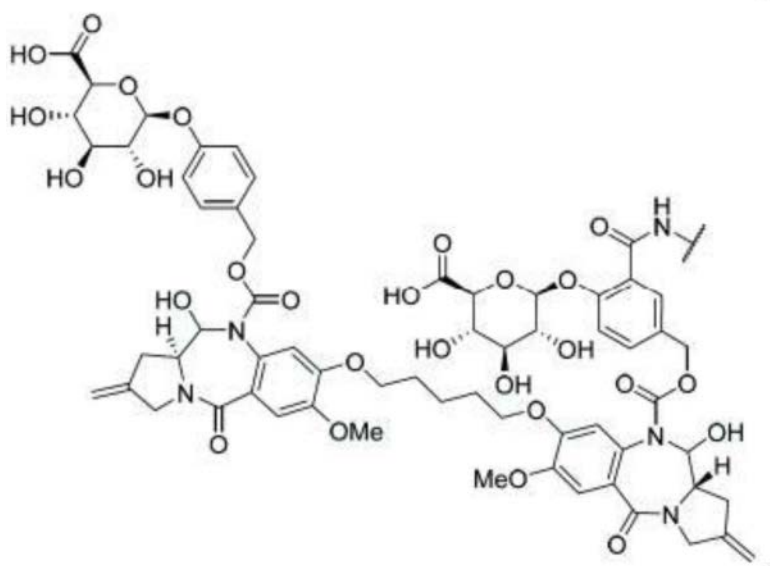
- [0403] 在某些实施方案中, R_9 是 H 。
- [0404] 在某些实施方案中, R_{16} 是烷氧基烷基 (例如甲氧基乙基)。



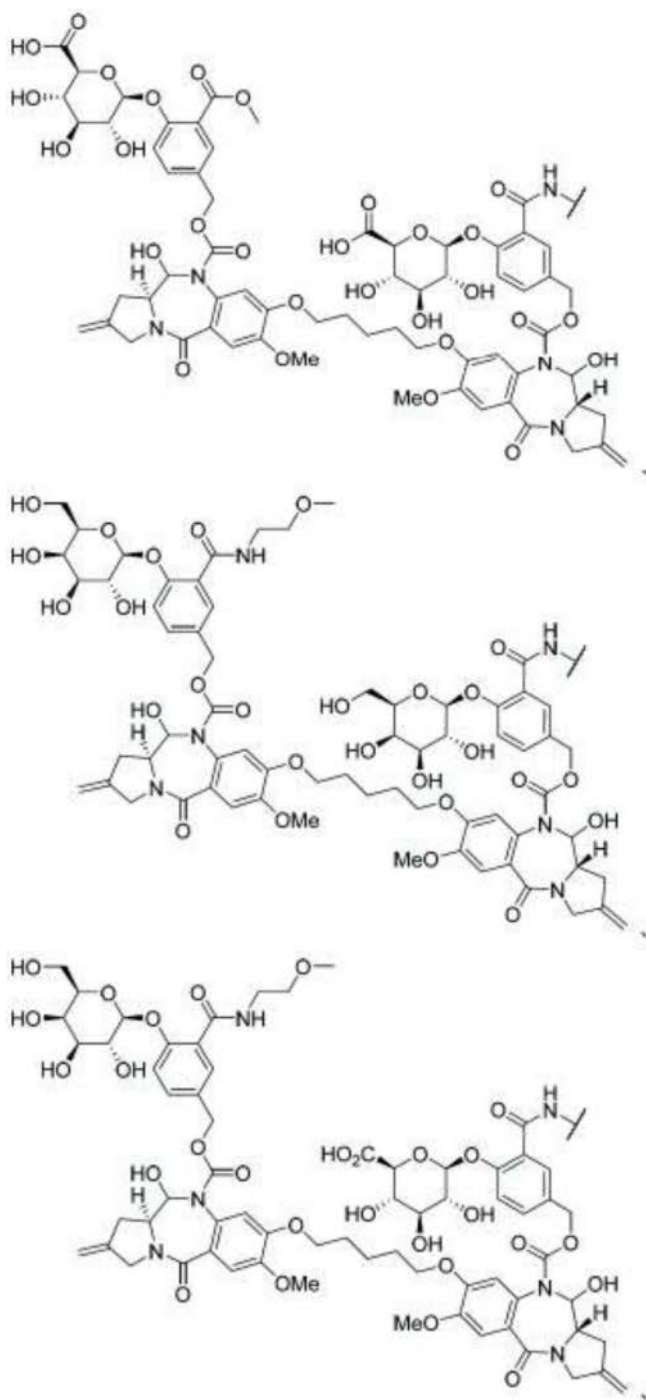
- [0406] 在某些实施方案中, R_{10} 是烷基 (例如甲基)。
- [0407] 在某些实施方案中, R_6 是烷基 (例如戊基)。
- [0408] 在某些实施方案中, 缀合物包含选自以下的结构:



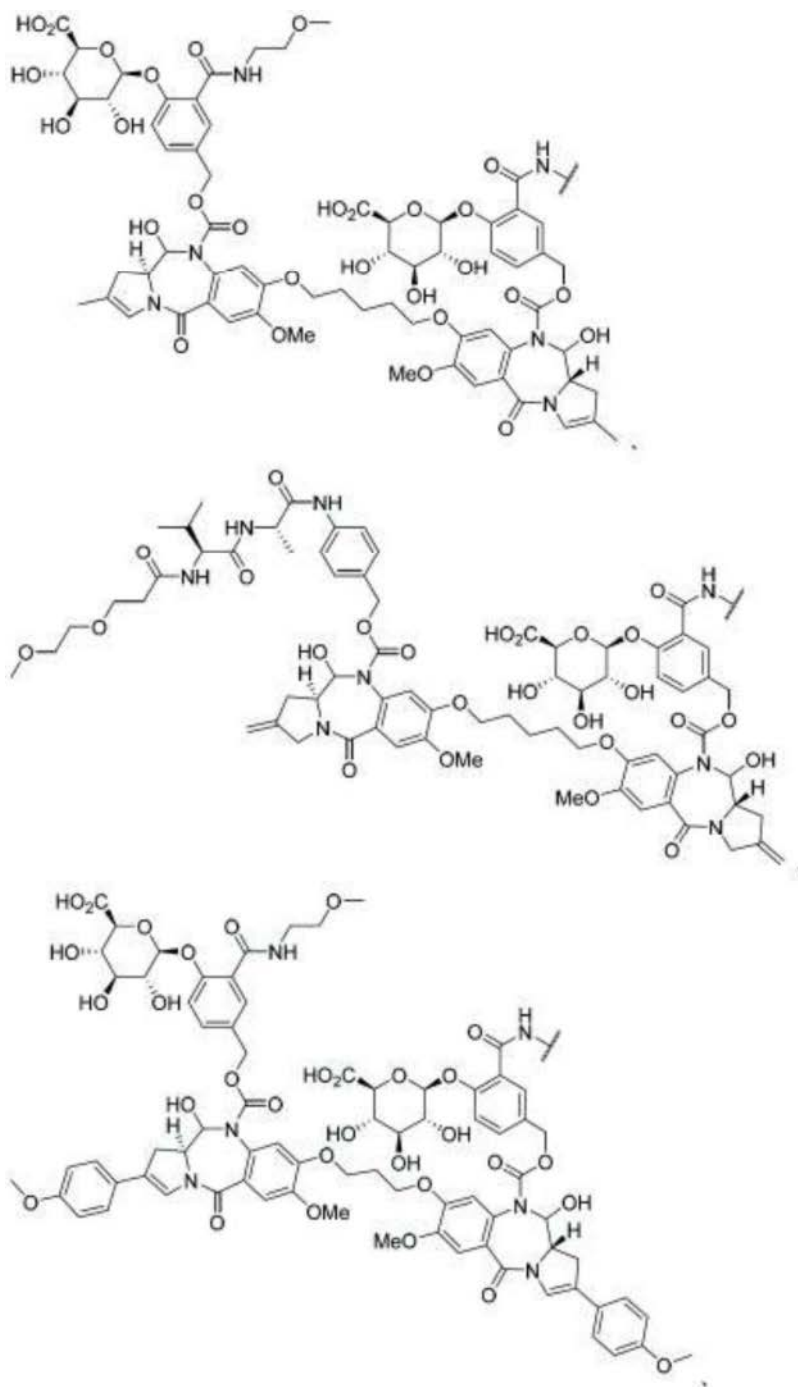
[0409]

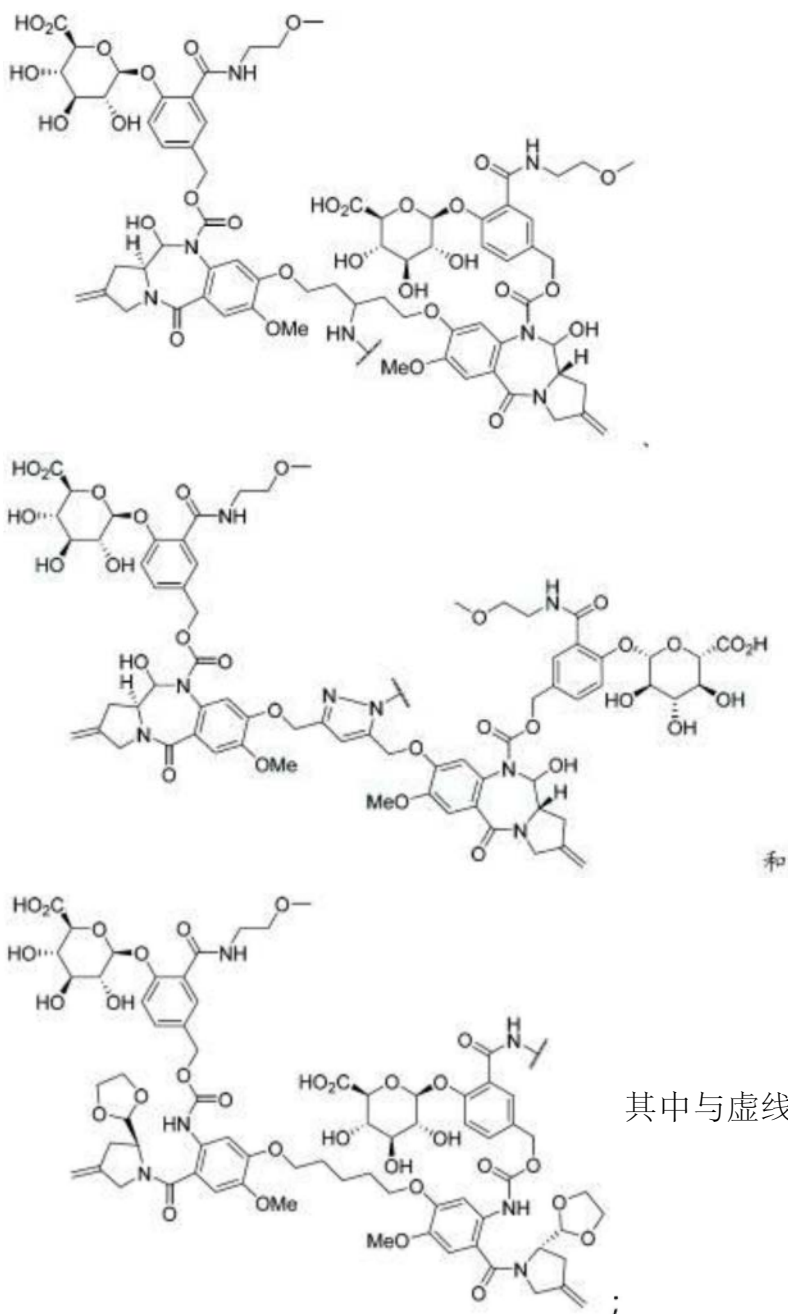


[0410]



[0411]

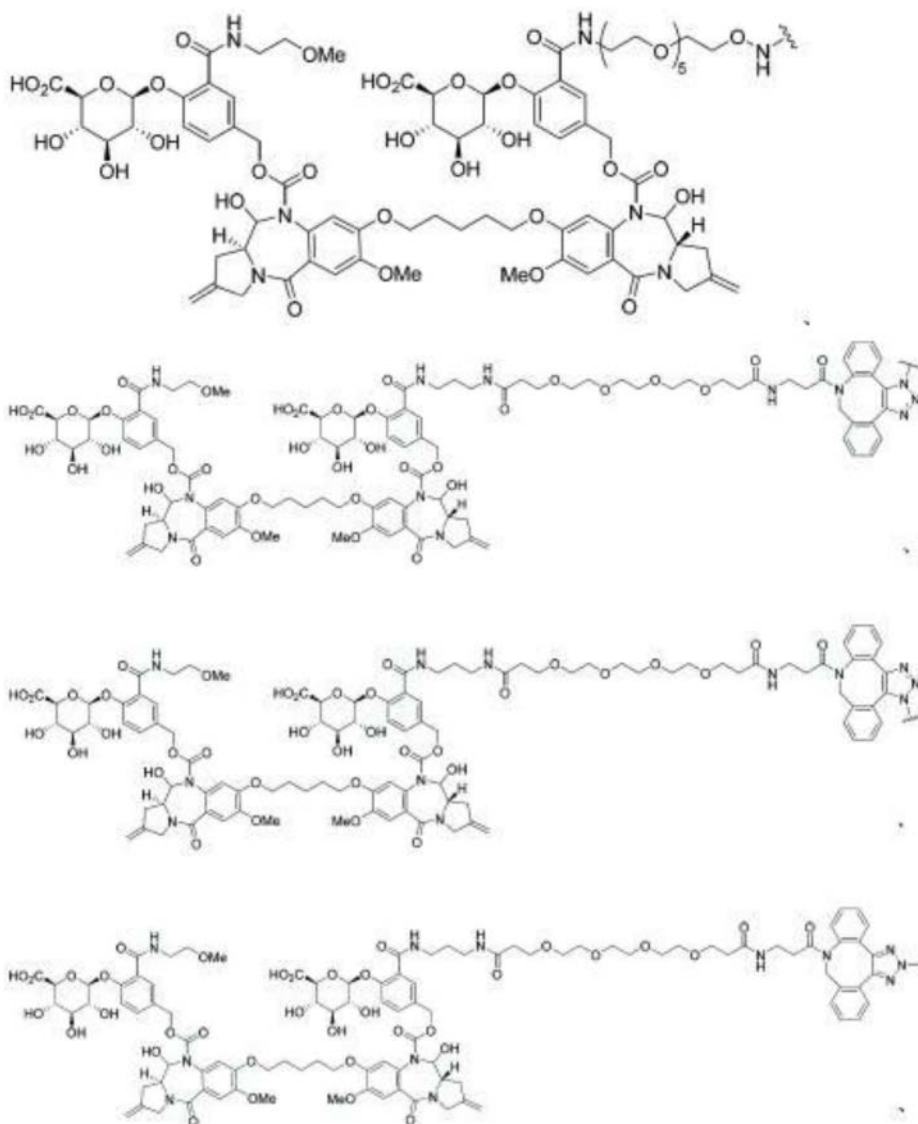




其中与虚线重叠的键表示与L的连

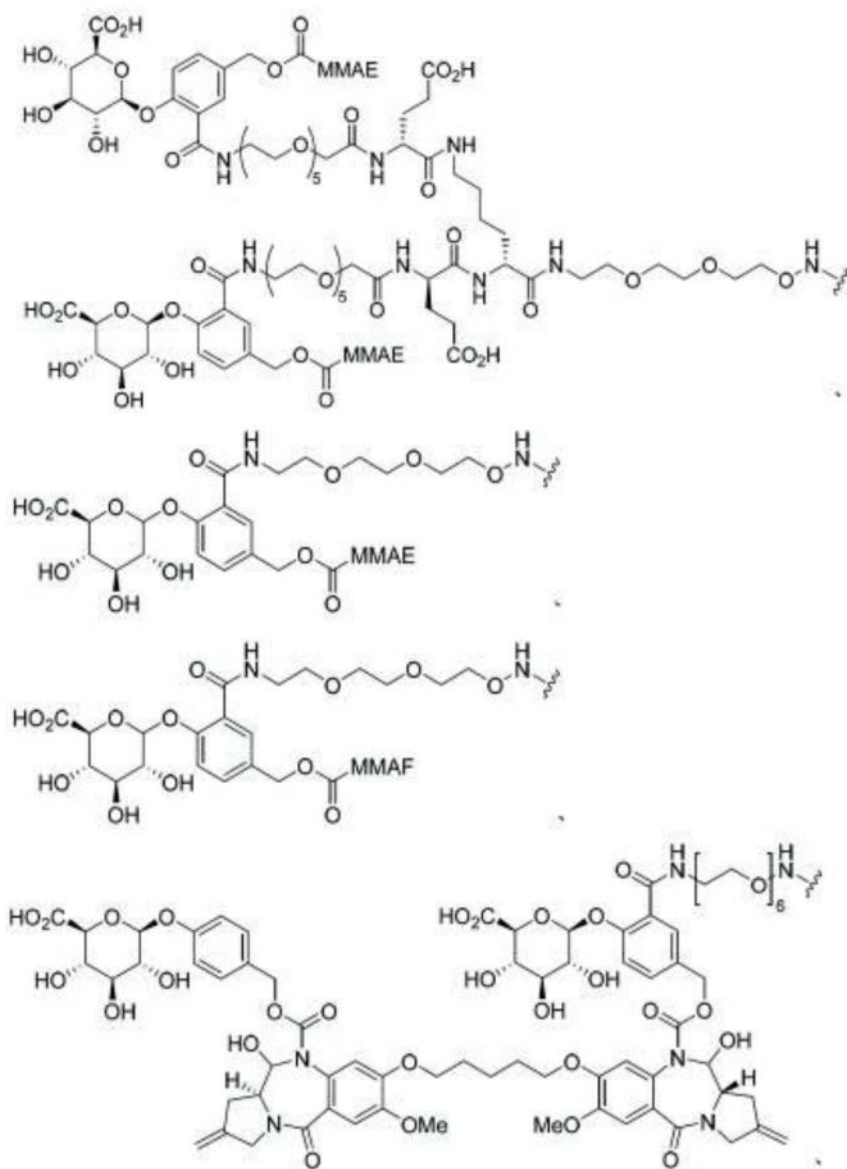
接点。

[0412] 在某些实施方案中,缀合物包含选自以下的结构:

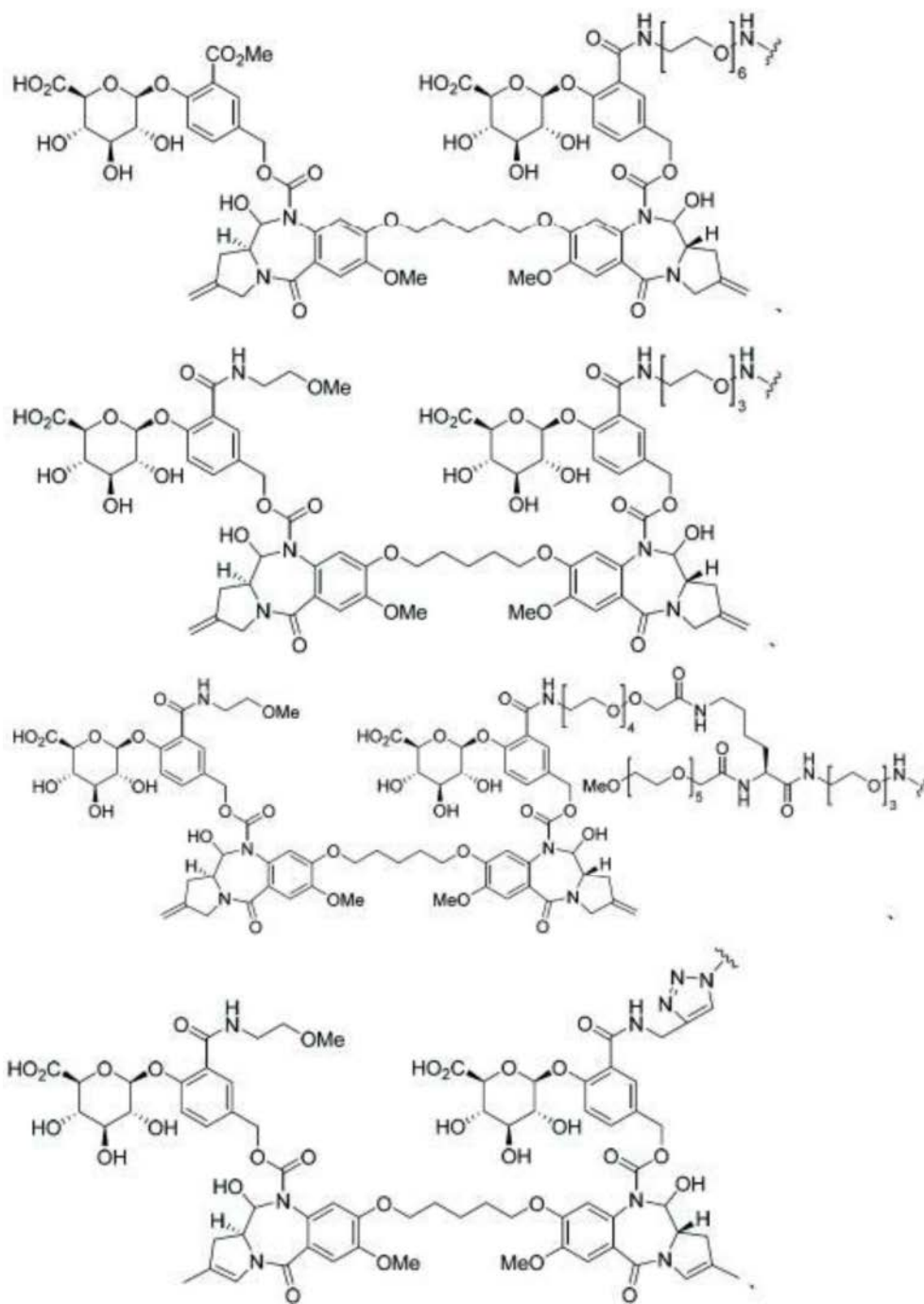


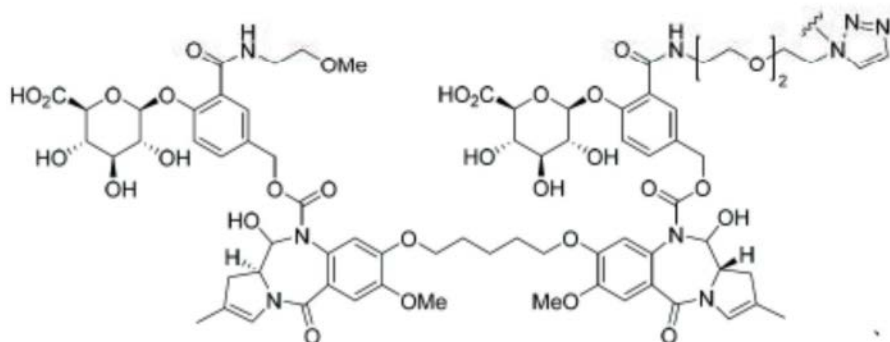
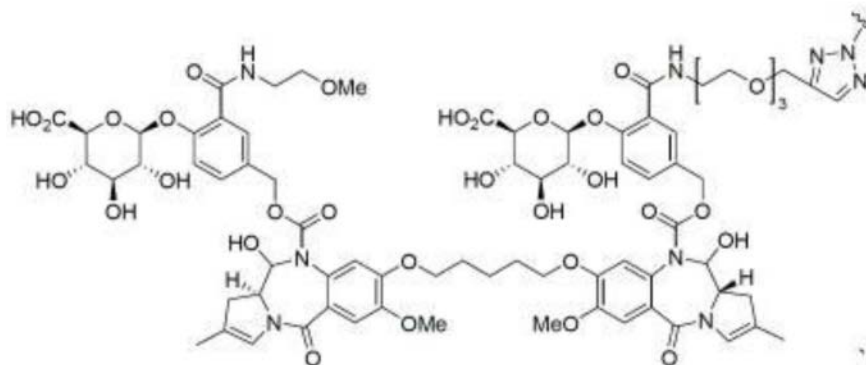
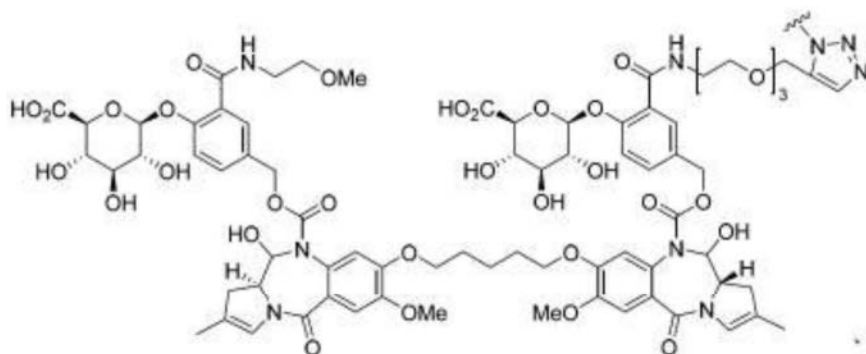
[0413]

[0414]



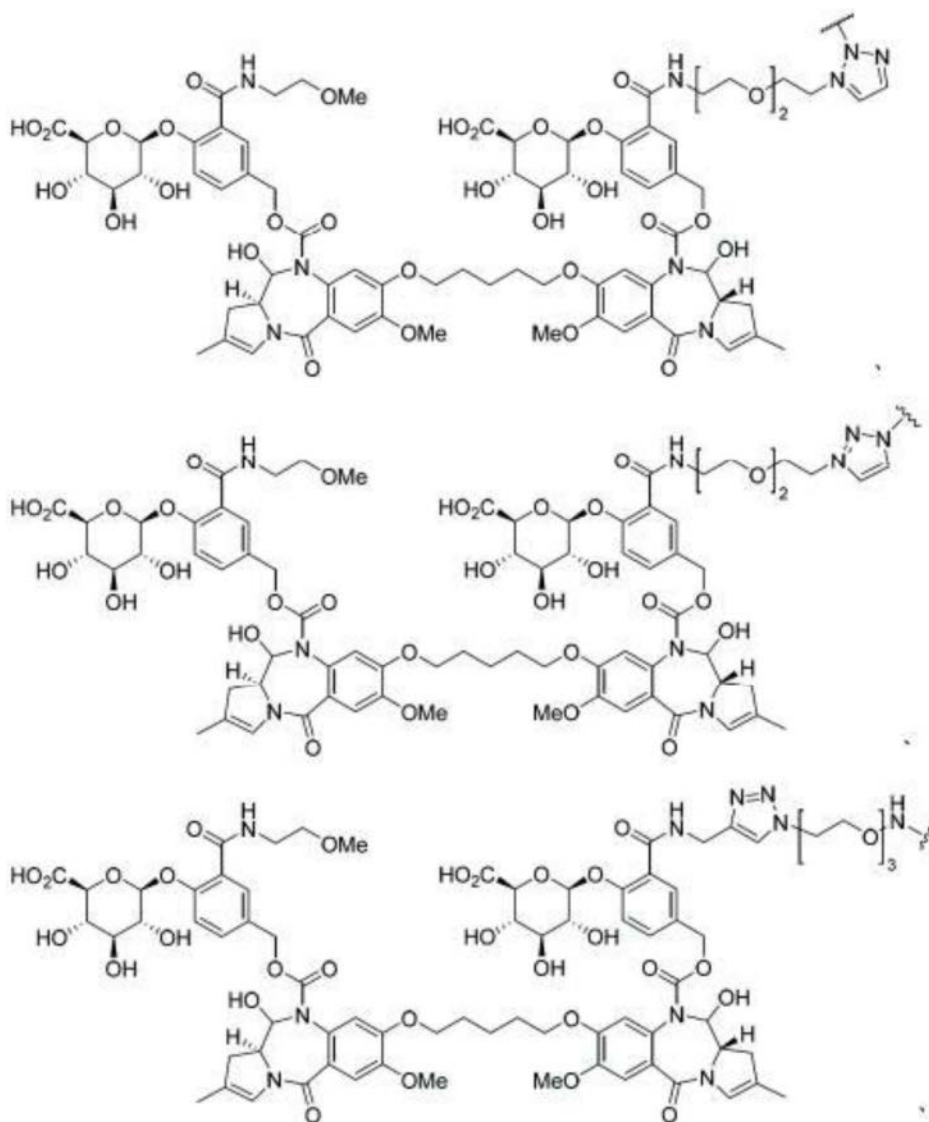
[0415]

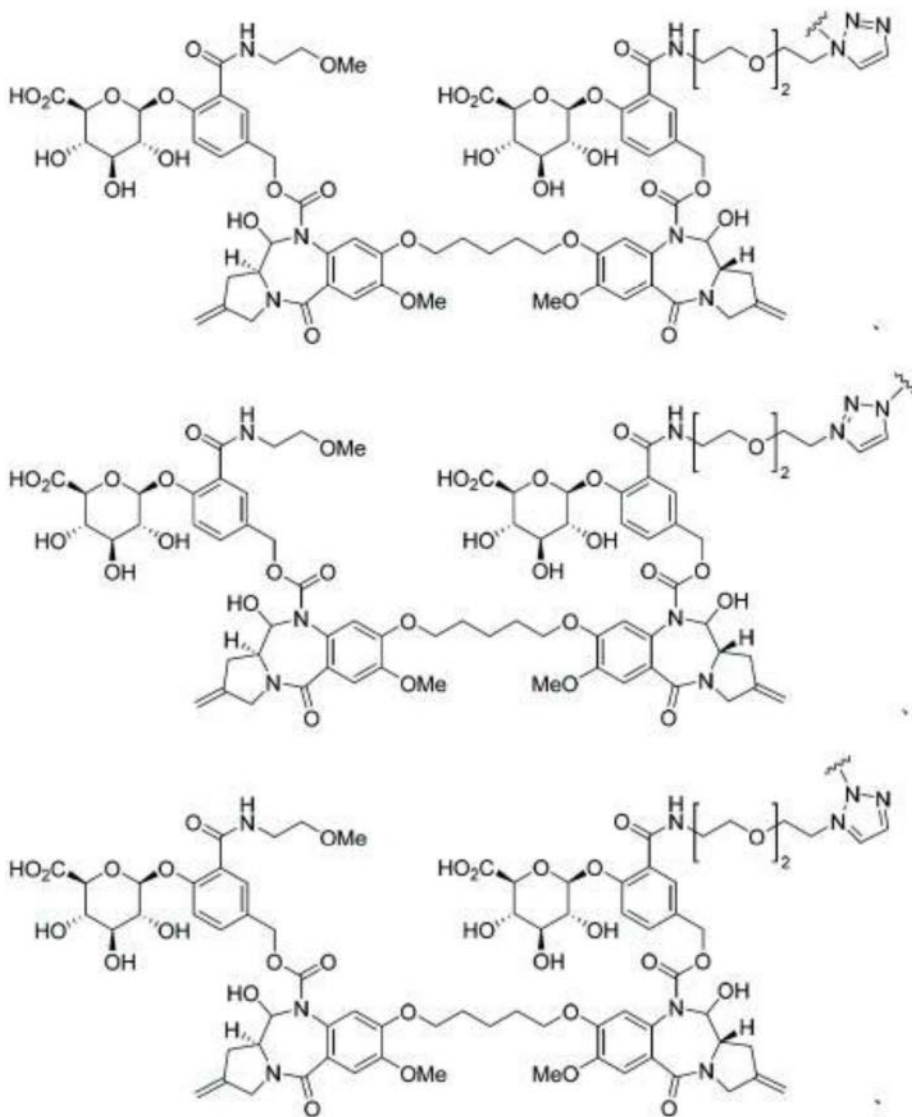


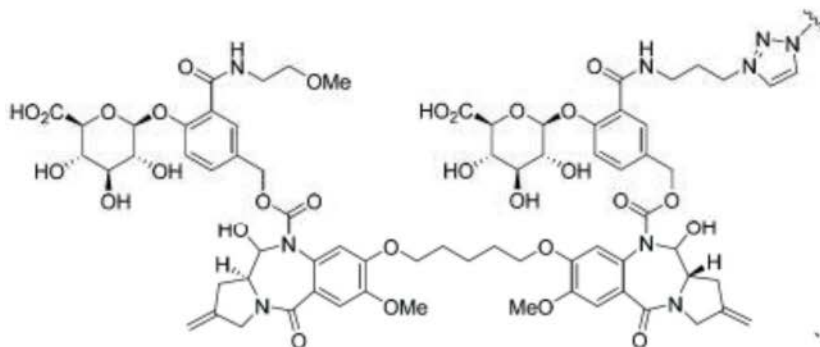
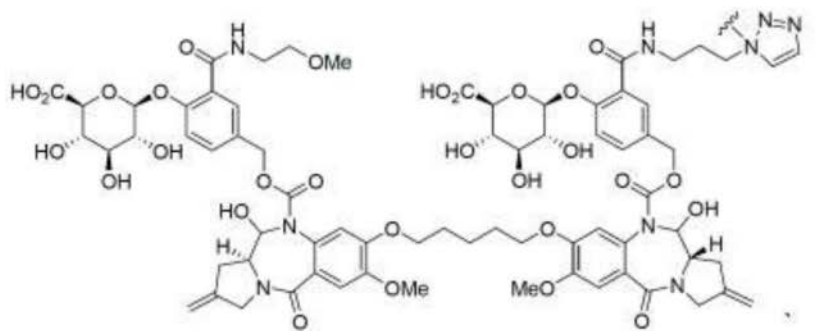


[0417]

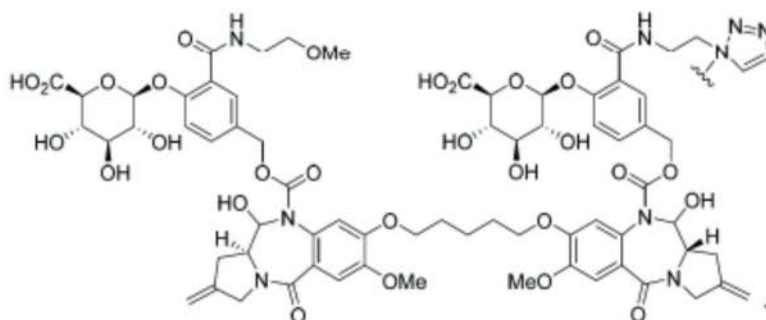
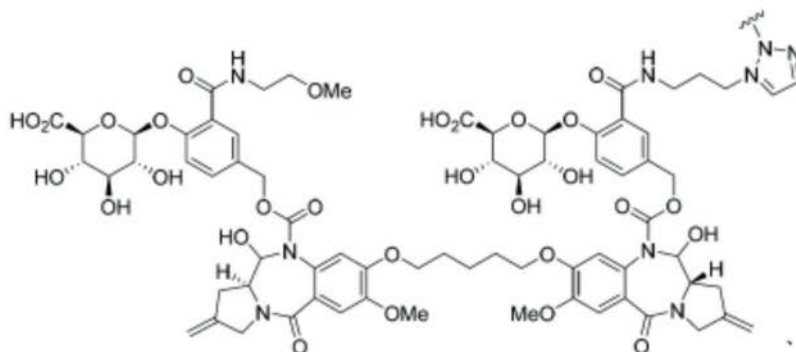
[0418]

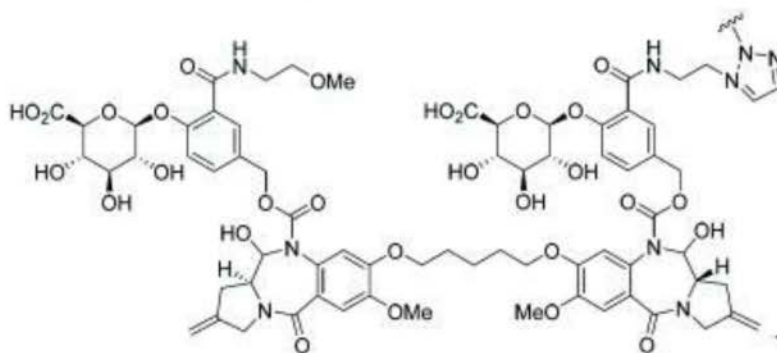
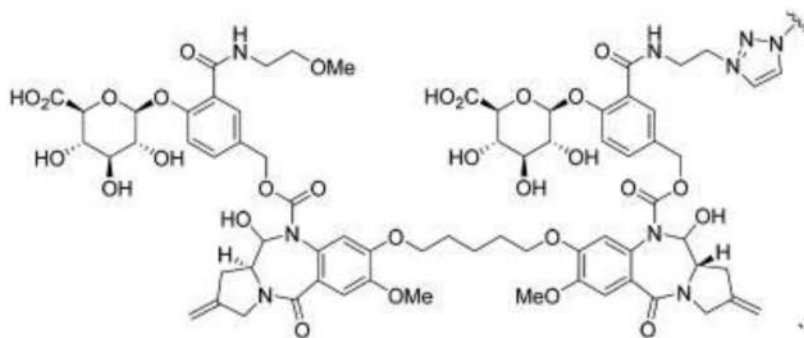




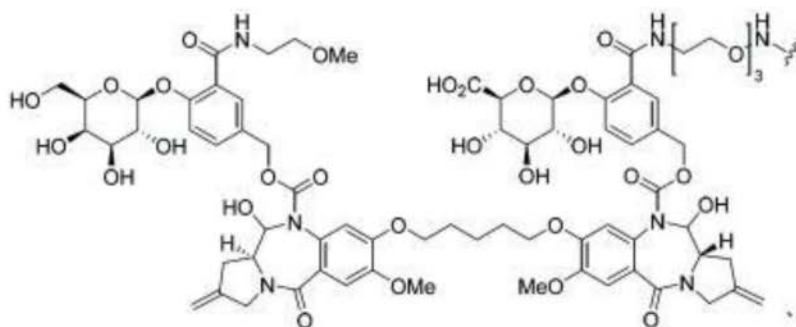
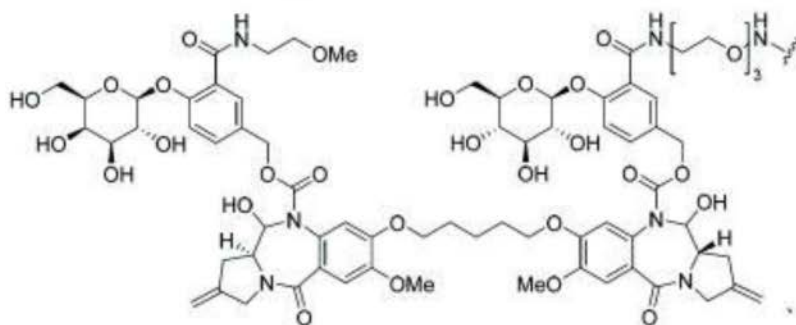


[0420]

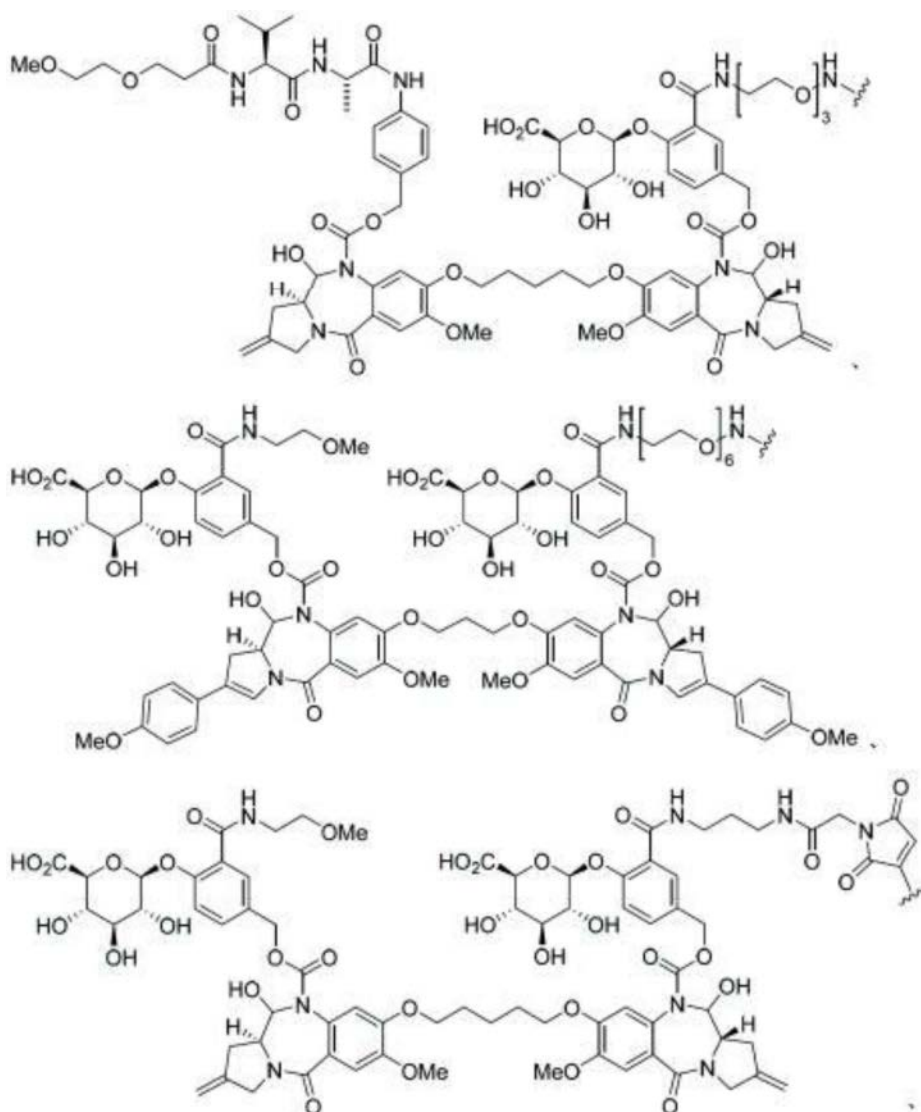




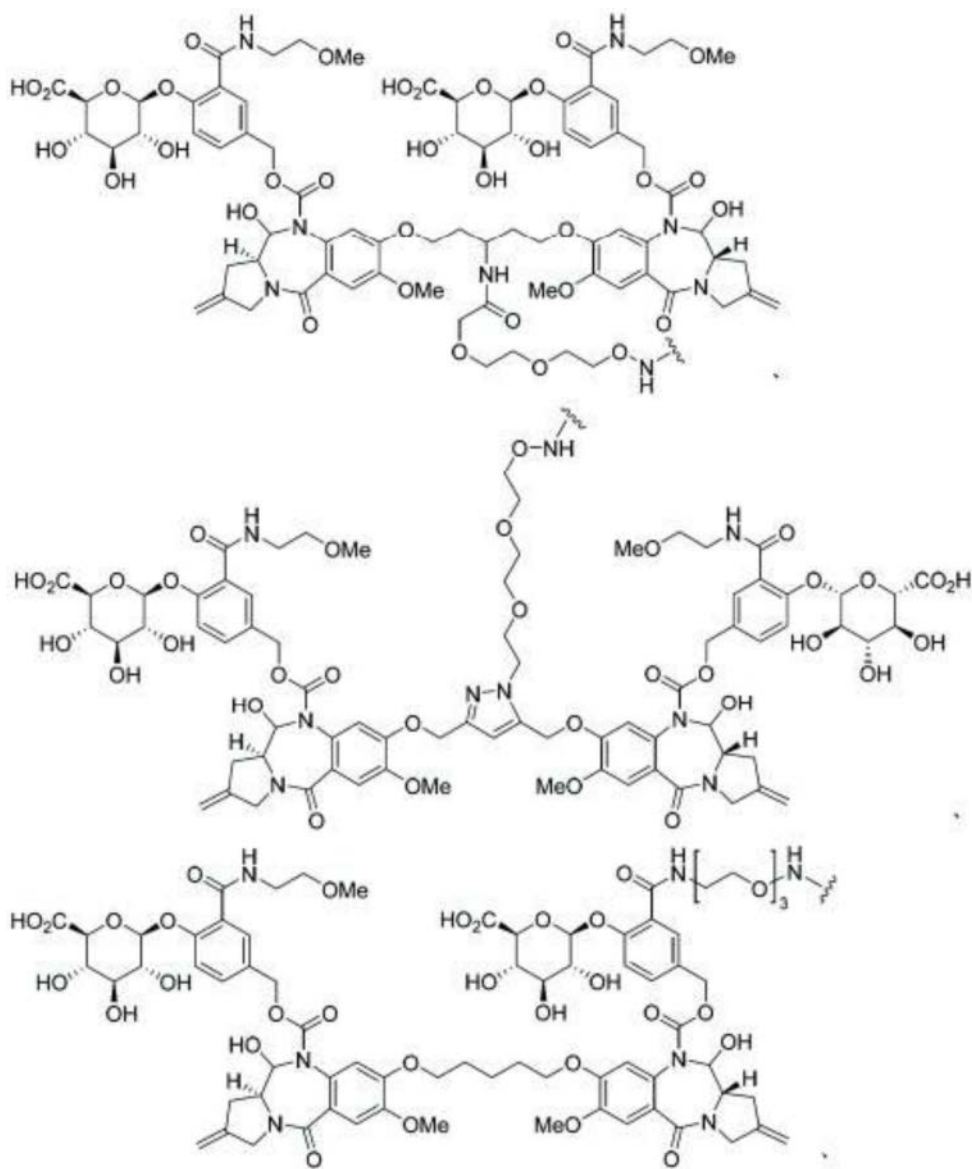
[0421]

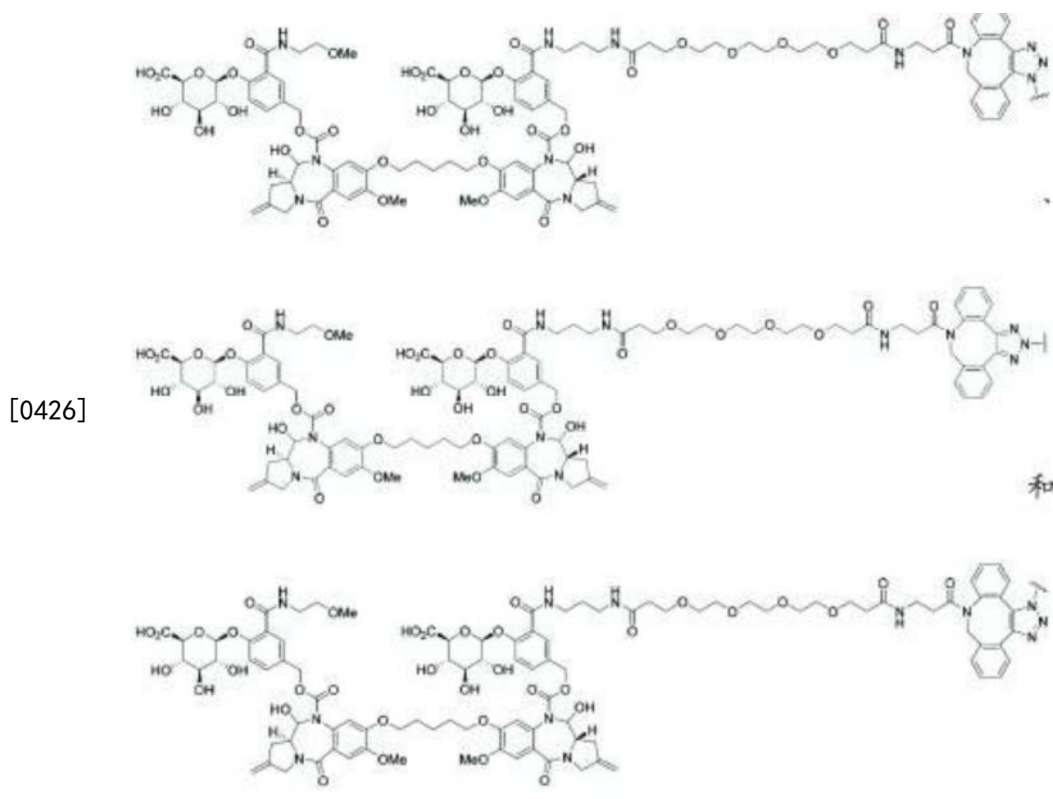


[0422]



[0425]





[0427] 其中MMAE是单甲基奥瑞他汀E；

[0428] MMAF是单甲基奥瑞他汀F；并且

[0429] 波浪线是与缀合物的连接点。

[0430] 在某些方面中，本发明还提供用于预防或治疗过度增生、癌症或血管生成疾病的药物组合物，包括缀合物。

[0431] 在某些实施方案中，药物组合物还包含药学上有效量的化学治疗剂。

[0432] 在某些实施方案中，癌症选自肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、结肠癌、肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)和黑色素瘤。

[0433] 本发明还提供包含缀合物的药物制剂。

[0434] 抗体或其抗原结合片段

[0435] 本发明提供结合到人TROP2 (肿瘤相关钙信号转导子2, TACSTD2) 的抗体。如本文所描述，根据本发明的抗体是包含一个或多个互补决定区域或区(CDR)的多肽。

[0436] 在一些实施方案中，CDR包括于“构架”区中，并且构架定向CDR以使得CDR可具有适当的抗原结合特性。

[0437] 在某些方面中，本发明提供包含结合到TROP2的抗TROP2抗体的抗体-药物缀合物。在某些实施方案中，本文所公开的抗体结合到肿瘤中表达的TROP且可用于将药物递送到肿瘤。在某些实施方案中，本文所公开的抗体药物缀合物与本领域中已知的抗体药物缀合物相比具有改进的稳定性。

[0438] 在某些实施方案中，抗体包含但不限于单克隆抗体、双特异性抗体、双功能抗体、多特异性抗体、多功能抗体、微型抗体、域抗体、抗体模拟物(或合成抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或抗体融合物(或抗体缀合物)和其片段，并且包括本文所公开的抗体的各

种形式。

[0439] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体的抗体片段包括Fab、Fab';F(ab')₂、scFab、Fv、dsFv、scFv、scFv-Fc、微型抗体、双功能抗体、scAb或dAb。

[0440] 在某些实施方案中,本发明的抗体可由仅具有轻链的多肽或仅具有重链的多肽组成,该等轻链或重链包括表1至表3所示的可变区。

[0441] 根据本发明的一个实施方案的抗体或其抗原结合片段的重链和轻链可变区中可能包括的CDR序列分别展示于表1至表3中。

[0442] 根据本发明的抗体与本文所公开的其他抗体共用某些区或序列。在某些实施方案中,可共用抗体或其抗原结合片段的恒定区。在某些实施方案中,可共用Fc区。在某一个实施方案中,可共用可变区的框架。

[0443] 根据本发明的重链可变区和轻链可变区可与至少一部分人恒定区连接。恒定区的选择可部分地通过是否需要抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬作用和/或补体依赖性细胞毒性来确定。举例来说,人同型IgG1和IgG3具有补体依赖性细胞毒性,而人同型IgG2和IgG4不具有此类细胞毒性。另外,人IgG1和IgG3诱导细胞介导的效应功能强于人IgG2和IgG4。轻链恒定区可以是λ或κ。

[0444] 免疫球蛋白链的可变区通常具有相同的整体结构且包括通过三个高变区连接的相对保守的构架区(FR),该等高变区称为“互补决定区域或区或域”或互补决定区(CDR)。源自各链(包括重链/轻链对)的可变区的CDR通常通过构架区对齐,以形成与目标蛋白质的特定抗原决定基特异性结合的结构。从N端至C端,通常按以下次序包括天然存在的轻链和重链可变区的这些因子:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。对应于各可变区的氨基酸序列的位置可通过Kabat(Kabat等人,(1983),美国卫生和人类服务部(U.S.Dept,of Health and Human Services),“免疫学关注的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”)、Chothia(Chothia和Lesk,分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 196:901-917(1987))或以与OPAL库相关的方式(Hye Young Yang等人,2009,分子与细胞(Mol.Cells) 27:225)来确定。当彼此相比较时,由各定义确定的CDR可以是重叠的子集或彼此包括的子集。基于抗体的可变区序列,一般熟悉本领域的人员将能够容易地如上所定义来选择CDR序列。

[0445] 在某些实施方案中,根据本发明的抗体是人源化抗体。人源化抗体是指其中非人抗体的恒定区被人形式的恒定区完全取代,并且非人抗体的可变区的至少一部分(除结合到目标结构的各可变区外部的氨基酸序列的三个环以外)被人抗体的对应部分完全或部分取代的任何抗体。

[0446] 可将某些突变引入构架区以增强抗体的稳定性,同时维持其抗原结合活性。治疗性抗体的稳定化可引起血清半衰期改进、剂量需求降低、副作用减少、储存寿命改进以及装运和储存成本降低。

[0447] 在某些实施方案中,根据本发明的人源化抗体包含:

[0448] (a) (i) 来自人抗体重链或来自人共同构架的可变重链构架区;和(ii) 来自人抗体轻链或来自人共同构架的可变轻链构架区。

[0449] 在某些实施方案中,来自重链的可变域构架区中的至少一个氨基酸被来自小鼠抗体重链或小鼠共同构架的对应氨基酸取代;或来自轻链的可变域构架区被来自小鼠抗体轻

链或小鼠共同构架的对应氨基酸取代。

[0450] 在某些实施方案中,重链的氨基酸取代选自以下氨基酸取代:

[0451] 在位置27处F(小鼠)取代Y(人);

[0452] 在位置30处S(小鼠)取代T(人);

[0453] 在位置37处L(小鼠)取代V(人);

[0454] 在位置48处I(小鼠)取代M(人);

[0455] 在位置49处A(小鼠)取代G(人);

[0456] 在位置70处L(小鼠)取代I(人);和

[0457] 在位置72处V(小鼠)取代R(人),以及

[0458] (ii)轻链的氨基酸取代是在位置49处Y(人)被S(小鼠)取代。

[0459] 在某些实施方案中,重链的氨基酸取代可进一步包括以下氨基酸取代:

[0460] 在位置67处K(小鼠)取代R(人);和/或

[0461] 在位置68处A(小鼠)取代V(人)。

[0462] 在某些实施方案中,轻链的氨基酸取代可进一步包括以下氨基酸取代:

[0463] 在位置67处Y(小鼠)取代S(人);

[0464] 在位置2处T(小鼠)取代I(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人);

[0465] 在位置22处R(小鼠)取代T(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人);

[0466] 在位置42处E(小鼠)取代K(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人);

[0467] 在位置64处S(小鼠)取代G(人)和在位置67处Y(小鼠)取代S(人);

[0468] 在位置67处Y(小鼠)取代S(人)和在位置72处V(小鼠)取代T(人);或

[0469] 在位置67处Y(小鼠)取代S(人)和在位置85处D(小鼠)取代T(人)。

[0470] 在某些实施方案中,人源化抗体包含:(a) (i) 来自人抗体重链或来自人共同构架的可变重链构架区,其中可变重链构架区包含以下氨基酸序列变化中的一者或多者:Y27F、T30S、V37L、M48I、G49A、I70L和R72V;以及(ii) 来自人抗体轻链或来自人共同构架的可变轻链构架区,其中可变轻链构架区包含以下氨基酸序列变化:Y49S。

[0471] 在某些实施方案中,包括取代的重链和轻链可变区序列分别展示于表1至表3中。在某些实施方案中,取代包括表1至表3中所示的FR区的取代。

[0472] 在某些实施方案中,本发明公开一个或多个与本文所公开的一个或多个氨基酸序列具有显著的序列同一性的氨基酸序列。显著的同源性意指本文所公开的效果在存在序列变化的情况下可得以维持。在某些实施方案中,氨基酸序列与表1至表3中所示的重链可变区具有约90%同一性、约95%同一性或约99%同一性。在另一个实施方案中,氨基酸序列与表1至表3中所示的轻链可变区具有约90%同一性、约95%同一性或约99%同一性。举例来说,就与根据本发明的抗体或其抗原结合片段的序列展现90%同一性、95%同一性或99%同一性的变体来说,任何突变发生于可变区的构架而非CDR中。

[0473] 在某些实施方案中,编码本发明的抗体或其片段的核酸是编码全长抗体的核酸,该全长抗体包括本文所公开的CDR、包括CDR的可变区以及可变区和恒定区。一旦确定了氨基酸序列,即可根据已知的反转录程序、密码子使用等容易地确定核酸序列。

[0474] 抗体的抗原特异性和亲和力

[0475] 在某些优选实施方案中,根据本发明的抗体或其抗原结合片段对人TROP2抗原具

有特异性且具有适用作抗体治疗剂/诊断剂的亲和力。在某些实施方案中,对聚集体的亲和力可以是 $KD < 1,000nM$ 、 $< 100nM$ 、 $< 10nM$ 、 $< 1nM$ 、 $< 0.1nM$ 、 $< 0.01nM$ 或 $< 0.001nM$,并且可以是例如 $10^{-6}M$ 至 $10^{-12}M$ 。

[0476] 抗体的产生

[0477] 在本发明中,非人抗体可来源于例如任何产生抗体的动物,例如小鼠、大鼠、兔、山羊、驴或非人灵长类动物(例如猴,例如食蟹猕猴或恒河猴)或猿(例如黑猩猩)。非人抗体可通过使用本领域中已知的方法使动物免疫而产生。根据本发明的一个实施方案,一种产生人源化抗体的方法参照美国专利第15/532598号。全人抗体可通过以下方式产生:向包括人免疫球蛋白基因座的被转型动物施用抗原,或通过用抗原处理表达人抗体库的噬菌体呈现库,并且随后选择目标抗体。抗体可以是多克隆或单克隆抗体,或可经由表达重组DNA在细胞宿主内合成。

[0478] 单克隆抗体(mAb)可使用传统的单克隆抗体方法来产生,例如文献中的标准体细胞杂交技术(参见:Kohler和Milstein,1975,自然(Nature)256:495)。

[0479] 表达抗体的方法

[0480] 本文所公开的抗体可在融合瘤细胞系或除融合瘤以外的表达细胞系中表达。编码抗体的表达构建体可用以转型哺乳动物、昆虫或微生物宿主细胞。如前述描述中所述,可使用用于将多核苷酸引入宿主细胞中的各种已知方法中的任一者来产生构建体,例如质粒。具体方法可根据宿主细胞的类型而变化。用于将异质多核苷酸引入哺乳动物细胞中的方法在本领域中广为人知,并且包括但不限于例如聚葡萄糖介导的转移、磷酸钙沉淀、凝聚胺介导的转移、原生质体融合、电泳、使用脂质体对转移多核苷酸进行囊封、核酸与带正电脂质混合和将DNA直接显微注射至细胞核中。

[0481] 抗人TROP2抗体药物缀合物用于治疗目的的用途

[0482] TROP2在癌症中的表达与癌症患者的不良预后有关,并且已知还影响癌症转移。举例来说,TROP2在肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、结肠癌、肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、黑色素瘤等癌症中过度表达。举例来说,在抗癌抗体治疗中,如本文所描述的抗人TROP2抗体可以经由连接子连接至各种细胞毒性剂的形式使用,以去除过度表达TROP2的癌细胞。因此,与TROP2结合的抗体可单独使用或以与抗癌化学治疗剂、细胞毒性剂或放射性物质结合的形式使用,或可体现为细胞治疗剂(例如CAR-T细胞)以靶向抗癌目标,并且因此可用作针对表达TROP2的细胞的靶向治疗剂。

[0483] 治疗方法:药物调配物和施药途径

[0484] 本发明的一个实施方案还提供使用抗体-药物缀合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物的治疗方法。在某些实施方案中,向患者提供抗体-药物缀合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物。抗体-药物缀合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物通过结合到癌细胞表面上表达的人TROP2来抑制癌细胞转移。在某些实施方案中,抗体以与细胞毒性剂结合的形式结合到癌细胞表面上表达的人TROP2,从而将与抗体结合的细胞毒性剂特异性递送到癌细胞,以诱导癌细胞死亡。在某些实施方案中,抗体以对同一目标或另一目标具有特异性的抗体形式结合到癌细胞表面上表达的人TROP2,从而增加多种抗体对癌细胞的特异性或诱导癌细胞与其它类型细胞(例如免疫细胞)之间的连接,以诱导癌细胞死亡。

[0485] 本发明还提供一种药物组合物,其包括治疗有效量的抗体-药物缀合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物以及药学上可接受的稀释剂、载剂、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。此外,举例来说,提供一种通过施用此类药物组合物来治疗癌症患者的方法。术语“患者”包括人患者。

[0486] 药物组合物可包括药学上可接受的载剂。载剂的含义包括赋形剂、稀释剂或助剂。载剂可选自由例如以下组成的组:乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藻糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯酮、水、生理盐水、缓冲剂(例如PBS)、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。组合物可包括填充剂、抗凝血剂、润滑剂、湿润剂、调味剂、乳化剂、防腐剂或其组合。

[0487] 药物组合物可根据一般方法制备为任何调配物。组合物可调配成用于经口施用的调配物(例如散剂、片剂、胶囊、糖浆、丸剂或颗粒剂)或用于肠胃外施用的调配物(例如注射剂)。此外,组合物可制备为全身调配物或局部调配物。

[0488] 药物组合物可包括有效量的抗体或其抗原结合片段、抗癌剂或其组合。术语“有效量”是指当施用需要预防或治疗的个体时足以产生预防或治疗作用的量。一般熟悉本领域的人员可根据所选择的细胞或个体适当地选择有效量。可根据包括以下的因素来确定有效量:疾病严重程度、患者的年龄、体重、健康状况和性别、患者对药物的敏感性、施用时间、施药途径、排泄速率、治疗时段和与所用组合物组合使用或同时使用的药物,和医学领域中熟知的其它因素。

[0489] 药物组合物的剂量范围可以是例如每个成人10gg/kg至约30mg/kg,任选0.1mg/kg至约30mg/kg,或者0.3mg/kg至约20mg/kg。药物组合物可一天一次、一天多次、每1至4周一次或一年一次至12次施用。

[0490] 在下文中,将参考实施例和实验实施例更详细地描述本发明。

[0491] 以下实施例和实验实施例旨在帮助理解本发明且不希望限制本发明的范围。

[0492] 定义

[0493] 除非在本发明中另外定义,否则本文所使用的科学和技术术语具有如一般熟悉本领域的人员通常理解的含义。此外,除非上下文另外具体要求,否则单数包括复数且复数包括单数。一般来说,本文所描述的与化学、细胞和组织培养、分子生物学、细胞和癌症生物学、神经生物学、神经化学、病毒学、免疫学、微生物学、药理学、遗传学以及蛋白质和核酸化学结合使用的命名法和其技术是本领域中熟知的且常用的。

[0494] 除非另外指示,否则本发明的方法和技术通常根据本领域中熟知的传统方法且如本说明书通篇所引用和论述的各种一般和更特定参考文献中所描述来进行。参见例如“神经科学原理(Principles of Neural Science)”,McGraw-Hill Medical,New York,N.Y.(2000);Motulsky,“直观生物统计学(Intuitive Biostatistics)”,牛津大学出版社有限公司(Oxford University Press,Inc.)(1995);Lodish等人,“分子细胞生物学(Molecular Cell Biology)第4版”,W.H.Freeman&Co.,New York(2000);Griffiths等人,“遗传分析导论(Introduction to Genetic Analysis)第7版”,W.H.Freeman&Co.,N.Y.(1999);和Gilbert等人,“发育生物学(Developmental Biology)第6版”,Sinauer Associates,Inc.,Sunderland,MA(2000)。

[0495] 除非本文中另外定义,否则本文所用的化学术语是根据本领域中的传统用法使用,如“McGraw-Hill化学术语词典(The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms)”,Parker,S.编,McGraw-Hill,San Francisco,C-A.(1985)所例示。

[0496] 本申请中所提及的所有上述内容和任何其它出版物、专利和公开专利申请以引用的方式具体地并入本文中。倘若有冲突,将以本说明书(包括其特定定义)为主。

[0497] 术语“药剂”在本文中用以表示化学化合物(例如有机或无机化合物、化合物的混合物)、生物大分子(例如核酸、抗体(包括其部分)以及人源化抗体、嵌合抗体和人抗体和单克隆抗体、蛋白质或其部分,例如肽、脂质、碳水化合物)或由生物材料(例如细菌、植物、真菌或动物(尤其哺乳动物)细胞或组织)制成的提取物。药剂包括例如结构已知的药剂和结构未知的药剂。

[0498] “患者”、“个体(subject)”或“个人(individual)”可互换使用且是指人或非人动物。这些术语包括哺乳动物,例如人、灵长类动物、家畜动物(包括牛科动物、猪科动物等)、伴侣动物(例如犬科动物、猫科动物等)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。

[0499] 可使用熟悉本领域的人员已知的多种方法中的一者向个体“施用”物质、化合物或试剂或进行物质、化合物或试剂的“施用”。举例来说,可静脉内、动脉、皮内、肌内、腹膜内、皮下、经眼、舌下、经口(通过摄食)、鼻内(通过吸入)、脊椎内、颅内和经皮(通过吸收,例如经由皮肤管道)施用化合物或药剂。也可通过可再充电或可生物降解的聚合物装置或其它装置(例如贴剂和泵或调配物,其使得化合物或药剂的释放延长、减缓或受控)适当地引入化合物或药剂。施用也可执行例如一次、复数次和/或历经一个或多个经延长的周期。

[0500] 向个体施用物质、化合物或药剂的适当方法也将视例如个体的年龄和/或身体状况和化合物或药剂的化学和生物特性(例如,可溶性、可消化性、生物可用性、稳定性和毒性)而定。在一些实施方案中,例如通过摄入向个体经口施用化合物或药剂。在一些实施方案中,经口施用的化合物或药剂是延长释放或缓曼释放调配物形式,或使用用于此类缓曼释放或延长释放的装置施用。

[0501] 如本文所用,短语“联合施用”是指两种或更多种不同治疗剂的任何施用形式,该形式使得在先前施用的治疗剂在体内仍有效时施用第二药剂(例如,两种药剂在患者体内同时生效,这可以包括两种药剂的协同效应)。举例来说,不同治疗性化合物可以同一调配物或以单独调配物形式同时或依次施用。因此,接受此类治疗的个体可受益于不同治疗剂的组合作用。

[0502] 如本文所用,术语“任选的(optional)”或“任选地(optionally)”意指随后描述的事件或情形可能出现或可能不出现,并且本说明书包括其中事件或情形出现的情况以及不出现的情况。举例来说,“任选地被取代的烷基”是指烷基可被取代以及烷基未被取代的情况。

[0503] 应理解,本发明的化合物上的取代基和取代模式可由一般熟悉本领域者选择,以产生可易于通过本领域中已知的技术以及下文给出的方法由容易获得的起始材料合成的化学稳定化合物。如果取代基本身经超过一个基团取代,则应了解,这些多个基团可在同一碳上或不同的碳上,只要产生稳定结构即可。

[0504] 如本文所用,术语“任选地被取代”是指给定结构中的一至六个氢基被指定取代基的自由基置换,指定取代基包括但不限于:羟基、羟烷基、烷氧基、卤素、烷基、硝基、硅基、酰

基、酰氧基、芳基、环烷基、杂环基、氨基、胺烷基、氰基、卤烷基、卤烷氧基、 $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 烷基、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{烷基})_2$ 或 $-\text{CH}_2-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{烷基})_2$ 。优选地，“任选地被取代”是指既定结构中的一至四个氢自由基被上文所提及的取代基置换。更优选地，一至三个氢自由基被如上文所提及的取代基置换。应理解，取代基可进一步被取代。

[0505] 如本文所用的术语“缀合物”是指共价键合至细胞毒性化合物的一个或多个分子的细胞结合剂。就此来说，“细胞结合剂”是对生物目标具有亲和力的分子，并且可以是例如抗体，尤其单克隆抗体或抗体片段，并且结合剂用于将生物活性化合物引导至生物目标。在某些实施方案中，缀合物可经设计以经由细胞表面抗原靶向肿瘤细胞。抗原可以是过度表达或在异常细胞类型中表达的细胞表面抗原。具体地，目标抗原可仅在增殖细胞（例如肿瘤细胞）上表达。可基于不同表达（通常在增殖组织与正常组织之间）选择目标抗原。在本发明中，抗体结合到连接子。

[0506] 在本发明中，多肽（例如抗原结合片段、蛋白质或抗体）的“变体”为其中与其它多肽序列相比，插入、缺失、添加和/或取代发生在一个或多个氨基酸残基处的多肽，并且包括融合多肽。蛋白质变体也包括通过蛋白质酶促裂解、磷酸化或其它翻译后修饰来修饰，但保持了本文所公开的抗体的生物活性，例如对ROR1的结合和特异性的变体。变体与本发明的抗体或其抗原结合片段的序列可具有约99%同一性、约98%同一性、约97%同一性、约96%同一性、约95%同一性、约94%同一性、约93%同一性、约92%同一性、约91%同一性、约90%同一性、约89%同一性、约88%同一性、约87%同一性、约86%同一性、约85%同一性、约84%同一性、约83%同一性、约82%同一性、约81%同一性或约80%同一性。同一性百分比(%)或同源性可通过本领域中已知的方法来计算。

[0507] 在某些实施方案中，同源性或同一性百分比可通过 $100 \times [(\text{相同位置}) / \min(\text{TGA}, \text{TGB})]$ 来计算，其中TGA和TGB是待比较的序列A和B中的残基数目和内部空位位置的总和（Russell等人，分子生物学杂志(J.MolBio1.)，244:332-350(1994)）。

[0508] 在本发明中，保守性氨基酸取代是指不会实质上影响多肽的活性或抗原株的取代。多肽可包括一个或多个保守取代。其非限制性示例展示于下表3中。

[0509] 如本文所用，术语多肽的“衍生物”是指经由与其它化学部分结合而在一个或多个残基处进行化学修饰的多肽，其与插入、缺失、添加或取代变体不同。

[0510] 如本文所用，关于多肽、核酸、宿主细胞和其类似物的术语“天然存在”是指天然存在的物质。

[0511] 术语两个多肽或多核苷酸序列之间的“序列同一性百分比”是指考虑到为使两个序列最佳比对而必须引入的添加或缺失（即空位），在比较窗口上序列所共用的一致匹配位置的数目。匹配位置是在目标和参考序列中呈现一致核苷酸或氨基酸的任何位置。不对目标序列中呈现的空位进行计数，因为空位不是核苷酸或氨基酸。类似地，不对参考序列中呈现的空位进行计数，因为对目标序列核苷酸或氨基酸而非来自参考序列的核苷酸或氨基酸进行计数。序列同一性百分比是通过以下方式计算：测定两个序列中存在一致氨基酸残基或核酸碱基的位置数以产生匹配位置数，将匹配位置数除以比较窗口中的总位置数且将结果乘以100，得到序列同一性百分比。序列的对比和两个序列之间序列同一性百分比的测定可使用易于获得的软件程序实现。适合的软件程序可从各种来源获得，并且用于比对蛋白质和核苷酸序列。一种测定序列同一性百分比的适合程序是b12seq，它是可自美国政府国

家生物技术信息中心 (U.S.government's National Center for Biotechnology Information) BLAST 网点 (全球信息网的 blast.ncbi.nlm.nih.gov) 获得的 BLAST 套装软件的一部分。B12seq 使用 BLASTN 或 BLASTP 演算法进行两个序列之间的比较。BLASTN 用于比较核酸序列, 而 BLASTP 用于比较氨基酸序列。其它适合的程序是例如 Needle、Stretcher、Water 或 Matcher (生物信息学程序的 EMBOSS 套装软件的一部分) 且也可自 European Bioinformatics Institute (EBI) 在全球信息网的 ebi.ac.uk/Tools/psa 获得。

[0512] 如本文所用, 关于肽、多肽或抗体序列的“同源性”是指在比对序列且视需要引入空位以达成最大序列同一性百分比之后, 并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分, 候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基一致的氨基酸残基的百分比。出于测定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以本领域的技能范围内的各种方式达成, 例如使用公开可用的电脑软件, 例如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 MEGALIGN™ (DNASTAR) 软件。熟悉本领域的人员可确定用于测量比对的适当参数, 包括用于达成所比较序列的全长内的最大比对所需的本领域中已知的任何演算法。

[0513] 在本发明中, “亲和力”是抗体或其抗原结合片段与抗原之间的相互作用力, 并且根据抗原的特性, 例如抗原的尺寸、形状和/或电荷, 和抗体或其抗原结合片段的 CDR 序列来测定。测定亲和力的方法是本领域中已知的, 并且以下可用作参考。

[0514] 当解离常数 (KD) 为 $\leq 10^{-6}$ M 时, 称抗体或其抗原结合片段“特异性结合”至其目标 (例如抗原)。当 KD 为 $\leq 1 \times 10^{-8}$ M 时, 抗体以“高亲和力”特异性结合到目标。

[0515] 如本发明中所用, 抗体或免疫球蛋白质的链 (重链或轻链) 的“抗原结合片段”包括抗体的一部分, 该部分相比于全长链缺少一些氨基酸, 但可特异性结合到抗原。此片段可视为具有生物活性, 因为该片段可特异性结合到目标抗原, 或可与其它抗体或其抗原结合片段竞争结合到特定抗原决定基。在某些实施方案中, 此类片段包括至少一个存在于全长轻链或重链中的 CDR, 并且在一些实施方案中, 包括短链重链和/或轻链或其一部分。此生物活性片段可通过重组 DNA 技术产生或可例如通过酶促或化学裂解完整抗体产生。免疫功能性免疫球蛋白片段包括但不限于 Fab、Fab₂、F(ab)₂、scFab、dsFv、Fv、scFv、scFv-Fc、双功能抗体、微型抗体、73cab 和 dAb, 并且可来源于任何哺乳动物, 包括但不限于人、小鼠、大鼠、骆驼或兔。抗体的功能性部分 (例如本发明中所公开的一个或多个 CDR) 可通过共价键与二级蛋白质或小化合物连接, 并且因此用作特定目标的靶向治疗剂。

[0516] 在本发明中, “Fc”区包括两条重链片段, 其包括抗体的 CH2 和 CH3 域。此两条重链片段通过两个或更多个二硫键与 CH3 域的疏水性相互作用而彼此连接。

[0517] 在本发明中, “Fab 片段”由一条轻链和一条重链组成, 其中仅包括可变区和 CH1。Fab 分子的重链不能与另一条重链分子形成双硫键。在 scFab 中, 两个 Fab 分子通过柔性连接子连接。

[0518] 在本发明中, “Fab' 片段”包括 Fab 片段且另外包括重链的 CH1 与 CH2 域之间的区域。可在两个分子的 Fab' 片段的两条重链之间形成二硫键, 从而形成 F(ab')₂ 分子。

[0519] 在本发明中, 如上文所描述, “F(ab')₂ 片段”包括两条轻链和两条重链, 其包括可变区 CH1 和 CH1 与 CH2 域之间的恒定区的一部分, 其中在两条重链之间形成链间双硫键。因此, F(ab')₂ 片段由两个 Fab' 片段组成, 并且两个 Fab' 片段通过其间的二硫键彼此接合。

[0520] 在本发明中, “Fv 区”是抗体的片段, 其包括重链和轻链的各可变区, 但不包括恒定

区。在sdFv中,重链和轻链通过二硫键连接。在scFc中,Fv通过柔性连接子连接。在scFv-Fc中,Fc连接至scFv。在微型抗体中,CH3连接至scFv。双功能抗体包括两个分子的scFv。

[0521] 在本发明中,"单链Fv"或"scFv"抗体片段包括抗体的VH和VL域,并且这些域存在于单一多肽链内。Fv多肽可另外包括VH域(其使得scFv能够形成用于抗原结合的目标结构)与VL域之间的多肽连接子。

[0522] 在本发明中,"短链抗体(74cab)"是单一多肽链,其包括一个重链恒定区或轻链可变区,其中重链和轻链可变区通过柔性连接子连接。对于短链抗体,可参考美国专利第5,260,203号,并且在本文中以引用的方式公开短链抗体。

[0523] 在本发明中,"域抗体(dAb)"为仅包括重链可变区或轻链可变区的免疫功能性免疫球蛋白片段。在某些实施方案中,两个或更多个VH区经由肽连接子通过共价键连接,形成二价域抗体。此二价域抗体的两个VH区可靶向相同或不同的抗原。

[0524] 在本发明中,"互补决定区"(CDR;即CDR1、CDR2和CDR3)表示抗体的可变域的氨基酸残基,它是结合到抗原所必需的。各可变域通常具有三个CDR域,标识为CDR1、CDR2和CDR3。

[0525] 在本发明中,"构架区"(FR)为除CDR残基以外的可变域残基。各可变域通常具有四个FR,标识为FR1、FR2、FR3和FR4。

[0526] 在本发明中,"二价抗原结合蛋白质"或"二价抗体"包括两个抗原结合位。二价抗体中所包括的两个抗原结合位可具有相同抗原特异性,或可以是抗原结合位结合到不同抗原的双特异性抗体。

[0527] 在本发明中,"多特异性抗原结合蛋白质"或"多特异性抗体"靶向两个或更多个抗原或抗原决定基。

[0528] 在本发明中,"连接子"是指将细胞毒性化合物共价键合至抗体的化合物。

[0529] 在本发明中,"未被取代或被取代"用于指可未被取代或被取代的母体基团,"被取代"是指具有至少一个取代基的母体基团,并且取代基是指共价键合至母体基团或与母体基团耦合的化学部分。

[0530] 在本发明中,"卤基"是指氟、氯、溴、碘和其类似基团。

[0531] 在本发明中,"烷基"是通过自脂肪族或脂环、饱和或不饱和(不饱和、完全不饱和)烃化合物的碳原子去除氢原子而获得的单价部分。如本文所使用的术语"烷基"是指饱和脂肪族基团,包括但不限于C₁-C₁₀直链烷基或C₁-C₁₀分支链烷基。优选地,"烷基"是指C₁-C₆直链烷基或C₁-C₆分支链烷基。最优选地,"烷基"是指C₁-C₄直链烷基或C₁-C₄分支链烷基。"烷基"的示例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、新戊基、1-己基、2-己基、3-己基、1-庚基、2-庚基、3-庚基、4-庚基、1-辛基、2-辛基、3-辛基或4-辛基等。"烷基"基团可任选地被取代。此外,术语"烷基"是指饱和脂肪族基团,包括直链烷基、分支链烷基、环烷基(脂环)基团、被烷基取代的环烷基和被环烷基取代的烷基。在优选实施方案中,直链或分支链烷基在其主链中具有30个或更少碳原子(例如直链C₁₋₃₀、分支链C₃₋₃₀),并且更优选20个或更少碳原子。饱和烷基的示例可包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基等,饱和直链烷基的示例可包括甲基、乙基、正丙基、正戊基(戊基)、正己基、正庚基等,饱和分支链环烷基的示例可包括异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、新戊基等。

[0532] 术语“酰基”是本领域中公认的且是指以通式烃基C(O)-、优选烷基c(O)-表示的基团。

[0533] 术语“酰胺基”是本领域中公认的且是指被酰基取代的胺基,并且可例如以式烃基C(O)NH-表示。

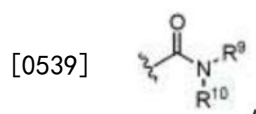
[0534] 术语“酰氧基”是本领域中公认的且是指以通式烃基C(O)O-、优选烷基c(O)O-表示的基团。

[0535] 术语“C_{x-y}”或“C_x-C_y”当与例如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基的化学部分结合使用时意在包括链中含有x至y个碳的基团。C₀烷基在基团处于末端位置时表示氢,若处于内部则表示键。举例来说,C₁₋₆烷基在链中含有一至六个碳原子。

[0536] 如本文所用的术语“烷氨基”是指被至少一个烷基取代的胺基。

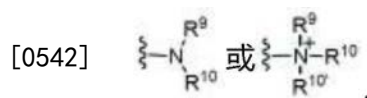
[0537] 如本文所用的术语“烷硫基”是指被烷基取代的硫醇基且可以通式烷基S-表示。

[0538] 如本文所用的术语“酰胺基”是指基团



[0540] 其中R⁹和R¹⁰各自独立地表示氢或烃基,或R⁹和R¹⁰与其附接的N原子一起形成在环结构中具有4至8个原子的杂环。

[0541] 术语“胺”和“胺基”是本领域中公认的且是指未被取代与被取代的胺和其盐,例如可由以下表示的部分



[0543] 其中R⁹、R¹⁰和R^{10'}各自独立地表示氢或烃基,或R⁹和R¹⁰与其附接的N原子一起形成在环结构中具有4至8个原子的杂环。

[0544] 如本文所用的术语“胺烷基”是指经胺基取代的烷基。

[0545] 如本文所用的术语“芳烷基”是指经芳基取代的烷基。

[0546] 如本文所用的术语“烷氧基”是指-OR,其中R是烷基,并且其示例可包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、仲丁氧基、异丁氧基、三级丁氧基和其类似基团。

[0547] 如本文所用的术语“烯基”为具有至少一个碳-碳双键的烷基。不饱和烯基的示例可包括乙烯基(ethenyl)(乙烯基(vinyl), -CH=CH₂)、1-丙烯基(-CH=CHCH₃)、2-丙烯基、异丙烯基、丁烯基、戊烯基和己烯基。

[0548] 在本发明中,如本文所用的术语“炔基”是指具有至少一个碳-碳三键的烷基,并且不饱和炔基的示例可包括乙炔基和2-丙炔基。

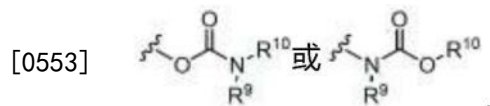
[0549] 如本文所用的术语“羧基”是指-C(=O)OH。

[0550] 如本文所用的术语“甲酰基”是指-C(=O)H。

[0551] 如本文所用的术语“芳基”是指通过自芳香族化合物的芳环原子去除氢原子而获得的单价部分。举例来说,术语“C₅₋₇芳基”是指具有5至7个环原子的部分,它是通过自芳香族化合物的芳环原子去除氢原子而获得的单价部分,并且术语“C₅₋₁₀芳基”是指具有5至10个环原子的部分,它是通过自芳香族化合物的芳环原子去除氢原子而获得的单价部分。就此来说,字首(C₅₋₇、C₅₋₁₀等)是指环原子数目或环原子数目范围,而与是否为碳原子或杂原

子无关。举例来说,术语“C₅₋₆芳基”是指具有5个或6个环原子的芳基。就此来说,环原子可均为碳原子,如“碳芳基”。碳芳基的示例包括但不限于衍生自苯、萘、蒽、菲、稠四苯和茚的碳芳基。含有稠合环(其中至少一个为芳香族环)的芳基的示例包括但不限于衍生自茛满、茛、异茛、四氢萘、茛、茛、茛、醋菲(acephenanthrene)和醋蒽(aseantrene)的基团。或者,环原子可含有一个或多个杂原子,如“杂芳基”。

[0552] 术语“氨基甲酸酯”是本领域中公认的且是指基团



[0554] 其中R⁹和R¹⁰独立地表示氢或烃基。

[0555] 如本文所用的术语“碳环基烷基”是指被碳环基取代的烷基。

[0556] 术语“碳环”包括5至7元单环和8至12元双环。双环碳环的各环可选自饱和、不饱和及芳香族环。碳环包括双环分子,其中两个环之间共用一个、两个或三个或更多个原子。术语“稠合碳环”是指双环碳环,其中各环与另一环共用两个相邻原子。稠合碳环的各环可选自饱和、不饱和及芳香族环。在一例示性实施方案中,芳环(例如苯基)可稠合至饱和或不饱和环,例如环己烷、环戊烷或环己烯。饱和、不饱和及芳香族双环的任何组合在价数准许时包括于碳环的定义中。例示性“碳环”包括环戊烷、环己烷、双环[2.2.1]庚烷、1,5-环辛二烯、1,2,3,4-四氢萘、双环[4.2.0]辛-3-烯、萘和金刚烷。例示性稠合碳环包括十氢萘、萘、1,2,3,4-四氢萘、双环[4.2.0]辛烷、4,5,6,7-四氢-1H-茛和双环[4.1.0]庚-3-烯。“碳环”可在能够具有氢原子的任一个或多个位置处被取代。

[0557] 术语“碳酸酯”是本领域中公认的且是指基团-OC(=O)-。

[0558] 如本文所用的术语“羧基”是指由式-C(=O)H表示的基团。

[0559] 如本文所用的术语“环烷基”是指作为环基的烷基,并且是指通过自环烃化合物的脂环族环原子去除氢原子而获得的单价部分。环烷基的示例包括但不限于衍生自以下的环烷基:饱和单环烃化合物,例如环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环庚烷、甲基环丙烷、二甲基环丙烷、甲基环丁烷、二甲基环丁烷、甲基环戊烷、二甲基环戊烷和甲基环己烷;或不饱和单环烃化合物,例如环丙烯、环丁烯、环戊烯、环己烯、甲基环丙烯、二甲基环丙烯、甲基环丁烯、二甲基环丁烯、甲基环戊烯、二甲基环戊烯和甲基环己烯;以及饱和杂环烃化合物,例如降莰烷、降莰烯、降莰烯。

[0560] 如本文所用的术语“酯”是指基团-c(O)OR⁹,其中R⁹表示烃基。

[0561] 如本文所用的术语“醚”是指经由氧连接至另一烃基的烃基。因此,烃基的醚取代基可以是烃基-O-。醚基可以是对称或不对称的。醚的示例包括但不限于杂环-O-杂环和芳基-O-杂环。醚包括“烷氧基烷基”,其可以通式烷基-O-烷基表示。

[0562] 如本文所用的术语“卤基”或“卤素”是指氟(-F)、氯(-Cl)、溴(-Br)和碘(-I)。

[0563] 如本文所用的术语“杂芳烷基(hetaralkyl/heteroaralkyl)”是指被杂芳基取代的烷基。

[0564] 如本文所用的术语“杂原子”意指除碳或氢之外的任何元素的原子。优选杂原子为氮、氧和硫。

[0565] 如本文所用的术语“杂环基烷基”是指被杂环基团取代的烷基。

[0566] 如本文所用的术语“杂芳基”是指含有一个或多个杂原子的芳基,并且其示例可包括吡啶;嘧啶;苯并噻吩;呋喃基;二氧戊环基;吡咯基;噁唑基;吡啶基;哒嗪基和嘧啶基。更具体地,其示例可包括苯并呋喃;异苯并呋喃;吡啶;异吡啶;吡啶;吡啶啉;异吡啶啉;嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤);苯并咪唑;吡啶;苯并噁唑;苯并异噁唑;苯并;氧杂环戊烯;苯并呋喃;苯并三唑二苯并硫呋喃;苯并噻唑;具有衍生自苯并噻唑、色烯、异色烯、色满、异色满、苯并二噁烷、喹啉、异喹啉、喹啉、苯并噁唑、苯并二噁唑、吡啶并吡啶、喹啉、喹啉啉、噻啉、呋喃、萘啶的两个稠合环的C₉;具有衍生自喹啉的两个稠合环的C₁₀;具有衍生自苯并二氮呋、咪唑、二苯并呋喃、二苯并噻吩、咪唑、嘧啶的两个稠合环的C₁₁;具有衍生自吡啶并吡啶、吡啶、咕吨、噻吨、二苯并对二噁英、啡噻唑、啡噻、啡噻唑、啡噻唑、噻噻、啡啶、啡啉的三个稠合环的C₁₃;以及具有衍生自啡噻的三个稠合环的C₁₄。

[0567] 如本文所用的术语“杂环基”是指通过从杂环化合物的环原子去除氢原子而获得的单价部分。此外,本文所用的术语“杂环基”或“杂环”是指单饱和或部分不饱和非芳香族化合物或非芳香族多环系统,其中环中包括至少一个杂原子(即选自氧、氮和硫的至少一个环杂原子)。除非另外规定,否则杂环基具有5至约20个环原子,例如3至12个环原子,例如5至10个环原子。因此,该术语包括单饱和或部分不饱和环(例如3、4、5、6或7员环),其在环中具有约1至6个环碳原子和选自氧、氮和硫的约1至3个环杂原子。多缩合环系统的环可经由稠合、螺环和交联键彼此连接,只要满足价数要求即可。杂环的示例包括氮杂环丁烷、氮杂环丙烷、咪唑烷、吗啉、环氧乙烷(环氧化物)、氧杂环丁烷、哌嗪、哌啶、吡啶啉、哌啶、吡咯烷、吡咯烷酮、四氢呋喃、四氢噻吩、二氢吡啶、四氢吡啶、奎宁环、N-溴吡咯烷、N-氯哌啶等。

[0568] 如本文所用的术语“烃基”是指经由碳原子结合的基团,该基团不具有=O或=S取代基,并且通常具有至少一个碳-氢键和主要碳主链,但可任选地包括杂原子。因此,出于本申请的目的,将如甲基、乙氧基乙基、2-吡啶基和甚至三氟甲基的基团视为烃基,但例如乙酰基(其在连接碳上具有=O取代基)和乙氧基(其经氧而非碳连接)的取代基并非烃基。烃基包括但不限于芳基、杂芳基、碳环、杂环、烷基、烯基、炔基和其组合。

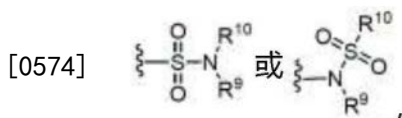
[0569] 如本文所用的术语“羟烷基”是指经羟基取代的烷基。

[0570] 术语“低碳”当与例如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基的化学部分结合使用时,希望包括取代基中存在十个或更少,优选六个或更少原子的基团。“低碳烷基”例如是指含有十个或更少于十个、优选六个或更少于六个碳原子的烷基。在某些实施方案中,本文所定义的酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基取代基分别是低碳酰基、低碳酰氧基、低碳烷基、低碳烯基、低碳炔基或低碳烷氧基,不管其单独出现或与其它取代基组合出现,例如在所叙述的羟烷基和芳烷基中(在该情形中,例如,当对烷基取代基中的碳原子计数时,芳基内的原子不计数)。

[0571] 术语“多环基”、“多环”和“多环状”是指两个或更多个环(例如,环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基),其中两个或更多个原子为两个邻接环所共用,例如,该等环为“稠环”。多环的各环可被取代或未被取代。在某些实施方案中,多环的各环在环中含有3至10个,优选5至7个原子。

[0572] 术语“硫酸酯基”是本领域中公认的且是指基团-OSO₃H或其药学上可接受的盐。

[0573] 术语“磺酰胺基”是本领域中公认的且是指由以下通式表示的基团



[0575] 其中 R^9 和 R^{10} 独立地表示氢或烃基。

[0576] 术语“亚砷”是本领域中公认的且是指基团 $-S(O)^-$ 。

[0577] 术语“磺酸酯基”是本领域中公认的且是指基团 $-SO_3H$ 或其药学上可接受的盐。

[0578] 术语“砷”是本领域中公认的且是指基团 $-S(O)_2^-$ 。

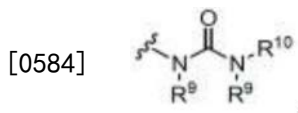
[0579] 术语“被取代”是指部分具有置换主链的一个或多个碳上的氢的取代基。应了解，“取代”或“被取代”包括隐含限制条件，即此类取代与被取代原子和取代基的允许价态一致，并且取代产生稳定化合物，例如其不会自发地例如通过重排、环化、消去等进行转化。如本文所用，术语“被取代”预期包括有机化合物的所有可容许取代基。在一个广泛方面中，可容许取代基包括有机化合物的非环状和环状、分支链和非分支链、碳环和杂环、芳香族和非芳香族取代基。对于合适的有机化合物，可容许取代基可以是一个或多个和相同或不同的。出于本发明的目的，例如氮的杂原子可具有氢取代基和/或满足杂原子价数的本文所述的有机化合物的任何可容许取代基。取代基可包括本文所述的任何取代基，例如卤素、羟基、羰基（例如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基）、硫羰基（例如硫酯基、硫乙酸酯基或硫甲酸酯基）、烷氧基、磷酸基、磷酸酯基、膦酸酯基、亚膦酸酯基、氨基、酰胺基、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、硫氢基、烷硫基、硫酸酯基、磺酸酯基、胺磺酰基、磺酰胺基、磺酰基、杂环基、芳烷基或芳香族或杂芳香族部分。熟悉本领域的人员应了解，在烃链上进行取代的部分本身在适当时可被取代。

[0580] 如本文所用的术语“硫烷基”是指被硫醇基取代的烷基。

[0581] 如本文所用的术语“硫酯”是指基团 $-C(O)SR^9$ 或 $-SC(O)R^9$ ，其中 R^9 表示烃基。

[0582] 如本文所用的术语“硫醚”等效于醚，其中氧被硫置换。

[0583] 术语“脲”是本领域中公认的且可由以下通式表示



[0585] 其中 R^9 和 R^{10} 独立地表示氢或烃基。

[0586] 如本文所用的术语“调节”包括抑制或遏制功能或活性（例如细胞增殖）以及增强功能或活性。

[0587] 适用于本发明的方法和组合物的多种化合物在其结构中具有至少一个立体对称中心。此立体对称中心可存在于R或S组态中，该R和S符号是与纯化学与应用化学 (Pure Appl. Chem.) (1976), 45, 11-30中所描述的规则一致地使用。本发明涵盖例如化合物、盐、前药或其混合物的对映异构形式和非对映异构形式的所有立体异构形式（包括立体异构物的所有可能混合物）。参见例如WO 01/062726。

[0588] 此外，含有烯基的某些化合物可以Z（同侧）或E（异侧）异构体的形式存在。在各情况下，本发明包括混合物和单独的个别异构体两者。

[0589] “前药”或“药学上可接受的前药”是指在施用之后在宿主中代谢，例如水解或氧化以形成本发明化合物（例如式I化合物）的化合物。前药的典型示例包括在活性化合物的官能性部分上具有生物学不稳定或可裂解（保护）基团的化合物。前药包括可发生氧化、还原、

胺化、脱胺化、羟基化、脱羟基化、水解、脱水解、烷基化、脱烷基化、酰化、脱酰化、磷酸化或脱磷酸化以产生活性化合物的化合物。使用酯或氨基磷酸酯作为生物学不稳定或可裂解(保护)基团之前药的示例公开于美国专利6,875,751、7,585,851和7,964,580中,该等专利的公开内容以引用的方式并入本文中。本发明的前药经代谢以产生式I化合物。本发明的范围内包括本文所描述的化合物之前药。用于选择和制备适合前药的传统程序描述于例如“前药设计(Design of Prodrugs)”,H.Bundgaard编,Elsevier,1985中。

[0590] 如本文所用的短语“药学上可接受的载剂”意指药学上可接受的材料、组合物或媒剂,例如适用于调配用于医学或治疗用途的药物的液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封材料。

[0591] 如本文所用的术语“溶解度的Log”、“LogS”或“logS’”在本领域中用于定量化合物的水溶解度。化合物的水溶解度显著影响其吸收和分布特征。低溶解度通常与不良吸收相关。LogS值是以摩尔/升为单位所测量的溶解度的单位剥离对数(以10为底)。

[0592] 在本发明中,字首(例如C₁₋₁₂、C₃₋₈等)是指环原子的数目或环原子的数目范围,而与是否为碳原子或杂原子无关。举例来说,如本文所用的术语“C₃₋₆杂环基”是指具有3至6个环原子的杂环基。

[0593] 如本文所用的术语“前药”是指在活体内生理条件(例如酶促氧化、还原和/或水解)下可通过酶或胃酸的作用而直接或间接转化为吡咯并苯并二氮呋药物的化合物。

[0594] 在本发明中,“药学上可接受的盐”可以是由药学上可接受的游离酸形成的酸加成盐,并且有机酸或无机酸可用作游离酸。

[0595] 有机酸的示例包括但不限于柠檬酸、乙酸、乳酸、酒石酸、马来酸、富马酸、甲酸、丙酸、乙二酸、三氟乙酸、苯甲酸、葡萄糖酸、甲磺酸、乙醇酸、丁二酸、4-甲苯磺酸、谷氨酸和天冬氨酸。又,无机酸的示例包括但不限于盐酸、溴酸、硫酸和磷酸。

[0596] 举例来说,当化合物具有阴离子或可能为阴离子的官能基时(例如-COOH可以是-COO⁻),化合物可与适合的阳离子形成盐。适合的无机阳离子的示例包括但不限于碱金属离子(例如Na⁺和K⁺)、碱土金属阳离子(例如Ca²⁺和Mg²⁺)和其它阳离子(例如Al³⁺)。适合的有机阳离子的示例包括但不限于铵离子(即NH₄⁺)和被取代的铵离子(例如NH₃R⁺、NH₂R₂⁺、NHR₃⁺和NR₄⁺)。

[0597] 一些适合的被取代的铵离子的示例是衍生自以下的铵离子:乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苯甲胺、苯基苯甲胺、胆碱、葡甲胺和缓血酸胺,以及氨基酸(例如赖氨酸和精氨酸)。典型四级铵离子的示例包括N(CH₃)₄⁺。

[0598] 当化合物具有阳离子或可能为阳离子的官能基时(例如-NH₂可以是-NH₃⁺),化合物可与适合的阴离子形成盐。适合的无机阴离子的示例包括但不限于衍生自以下无机酸的无机阴离子:盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸、硝酸、亚硝酸、磷酸和亚磷酸。

[0599] 适合的有机阴离子的示例包括但不限于衍生自以下有机酸的有机阴离子:2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、依地酸、乙二磺酸、乙磺酸、富马酸、葡庚糖酸、葡萄糖酸、谷氨酸、乙醇酸、羟基马来酸、羟基萘羧酸、羟乙基磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘液酸、油酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、泛酸、苯基乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、丁二酸、磺氨酸、酒石酸、甲苯磺酸和戊酸。适合的聚合有机阴离子的示例包括(但不限于)衍生自以下聚合酸的聚合有机阴

离子:鞣酸和羧甲基纤维素。

[0600] 如本文所用的术语“溶剂合物”是指根据本发明的化合物与溶剂分子之间的分子复合物,并且该等溶剂分子的示例包括但不限于水、异丙醇、乙醇、甲醇、二甲亚砜、乙酸乙酯、乙酸、乙醇胺,或结合到混合溶剂的根据本发明的化合物。

[0601] 可便利或合乎需要地制备、纯化和/或处置活性化合物的等效溶剂合物。术语“溶剂合物”在本文中以其传统意义使用,指溶质(例如活性化合物或其盐)与溶剂的复合物。当溶剂为水时,溶剂合物可适宜地称为水合物,例如单水合物、二水合物或三水合物。

[0602] 如本文所用的短语“有效量”或“治疗有效量”是指达成目标治疗结果所需的量(针对施用数量和施用时段和方式)。有效剂量是使对象获得最小治疗效果所必需的最小活化剂量,并且小于毒性剂量。举例来说,每个患者的剂量可在约100ng至约100mg/kg范围内,更通常在约1 μ g/kg至约10mg/kg范围内。当活性化合物是盐、酯、酰胺、前药等时,基于母体化合物计算剂量,并且因此所用实际重量按比例增加。根据本发明的吡咯并苯并二氮呋化合物可调配为每单位剂型包括0.1mg至3000mg、1mg至2000mg或10mg至1000mg活性成分,但本发明不限于此。可施用活性成分以使活性化合物的血浆峰浓度达到约0.05 μ M至约100 μ M、约1 μ M至约50 μ M或约5 μ M至约30 μ M。举例来说,活性成分在盐水中的0.1w/v%至5w/v%溶液可经由静脉内注射施用。

[0603] 活性化合物在药物组合物中的浓度可通过药物的吸收、失活和排泄速率和一般熟悉本领域的人员已知的其它因素来测定。剂量可视症状/疾病的严重程度而变化。此外,考虑到患者的症状/疾病的严重程度、必要性、年龄、药物反应等,特定患者的剂量和施用方法可根据施药监察员的专业判断来调整,并且本文所描述的浓度范围仅具例示性且不希望限制所要求的组合物的实施方案。此外,活性成分可施用一次,或也可以多次剂量施用较小剂量的活性成分。

[0604] 如本文所用的术语“连接子”是指将细胞毒性化合物共价键合至抗体的化合物。

[0605] 如本文所用的术语“细胞内裂解(intracellularly cleaved/intracellular cleavage)”是指抗体构建体-活性剂缀合物在细胞内的代谢过程或反应,借此活性剂(B)与抗体构建体(Ab)之间的共价附接(例如连接子)断裂,从而引起游离药物或缀合物的其它代谢物在细胞内与抗体分离。

[0606] 实施例

[0607] 现已大体描述本发明,参考以下实施例将更容易理解本发明,仅出于说明本发明的某些方面和实施方案的目的而包括该等实施例,并且不希望限制本发明。

[0608] 实施例1:对人TROP2(肿瘤相关钙离子信号转导子2,TACSTD2)具有特异性的抗体的产生

[0609] 通过美国专利第15/532598号中所描述的方法产生抗TROP2人源化抗体2G10-5和2G10-6,其更强力地特异性结合到主要在肿瘤中表达的TROP2(肿瘤相关钙信号转导子2,TACSTD2)。另外,抗体的氨基酸序列展示于以下表1和表2中。

[0610] [表1]

[0611]

2G10-5 重链		SEQ ID NO:
FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFS	1
CDR1	SSYIS	2
FR2	WLRQAPGQRLEWIA	3
CDR2	WIYAGTGGTSYNQKFTG	4
FR3	KATLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	5
CDR3	HNPRYYAMDY	6
FR4	WGQGTITVTVSS	7
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFS SSYISWLRQAPGQRLEWIA WIYAGTGGTSYNQKFTG KATLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR HNPRYYAMDYWGQGTITVTVSS	15

[0612]

HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFS SSYISWLRQAPGQRLEWIA WIYAGTGGTSYNQKFTG KATLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR HNPRYYAMDYWGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	17
2G10-5 轻链		SEQ ID NO:
FR1	DTQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	8
CDR1	ITSTDIDDDMN	9
FR2	WYQQKPGKAPKLLIS	10
CDR2	EGNTRP	11
FR3	GVPSRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYYC	12
CDR3	LQSDNLPYT	13
FR4	FGGGTKVEIK	14
VL	DTQMTQSPSSLSASVGDRVTITC ITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYYCLQSDNLPYTFGGGTVEIK	16
LC	DTQMTQSPSSLSASVGDRVTITC ITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLLISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDFTFITISLQPEDATYYCLQSDNLPYTFGGGTVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	18

[0613] [表2]

[0614]

2G10-6 重链		SEQ ID NO:
FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFS	1
CDR1	SSYIS	2
FR2	WLRQAPGQRLEWIA	3
CDR2	WIYAGTGGTSYNQKFTG	4
FR3	RVTLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	19
CDR3	HNPRYYAMDY	6
FR4	WGQGTITVTVSS	7
VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFS SSYISWLRQAPGQRLEWIA WIYAGTGGTSYNQKFTG RVTLTVDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR HNPRYYAMDYWGQGTITVTVSS	20

[0615]

HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSSSYISWLRQAPGQRLE WIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRVTLTVDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARHNPRYYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	21
2G10-6 轻链		SEQ ID NO:
FR1	DTQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	8
CDR1	ITSTDIDDDMN	9
FR2	WYQQKPGKAPKLLIS	10
CDR2	EGNTLRP	11
FR3	GVPSRFSGSGYGTDFFTISSLPEDIATYYC	12
CDR3	LQSDNLPYT	13
FR4	FGGGTKVEIK	14
VL	DTQMTQSPSSLSASVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLL ISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLPEDIATYYCLQSDNLPY TFGGGTKVEIK	16
LC	DTQMTQSPSSLSASVGDRVTITCITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLL ISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLPEDIATYYCLQSDNLPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	18

[0616] 另外,对于ADC合成,通过将CaaX肽部分 (GGGGGGCVIM; SEQ ID NO:22) 融合至抗体 2G10-5的轻链 (SEQ ID NO:18) 的C端来构建抗体植株2G10-5-CaaX,并且经由基于CHO细胞的短暂表达来产生抗体。所产生的抗体2G10-5-CaaX用于ADC合成。抗体的氨基酸序列展示于表3中。

[0617] [表3]

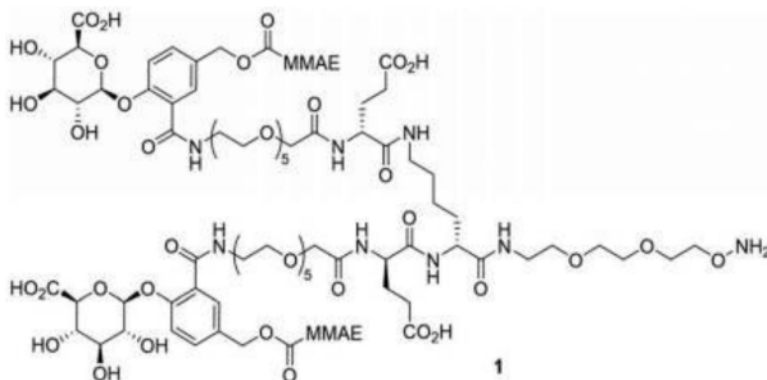
[0618]

2G10-5-CaaX 重链		SEQ ID NO:
FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFS	1
CDR1	SSYIS	2
FR2	WLRQAPGQRLEWIA	3
CDR2	WIYAGTGGTSYNQKFTG	4
FR3	KATLTVDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	5
CDR3	HNPRYYAMDY	6
FR4	WGQGTITVTVSS	7

[0619]	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSSSYISWLRQAPGQRLE WIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKATLTVDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARHNPRYYAMDYWGQGTITVTVSS	15
	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFSSSYISWLRQAPGQRLE WIAWIYAGTGGTSYNQKFTGKATLTVDTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARHNPRYYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	17
	2G10-5-CaaX 轻链		SEQ ID NO:
	FR1	DTQMTQSPSSLSASVGDRVITIC	8
	CDR1	ITSTDIDDDMN	9
	FR2	WYQQKPGKAPKLLIS	10
	CDR2	EGNTLRP	11
	FR3	GVPSRFSGSGYGTDFFTISSLPEDIATYYC	12
	CDR3	LQSDNLPYT	13
	FR4	FGGGTKVEIK	14
	VL	DTQMTQSPSSLSASVGDRVITICITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLL ISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLPEDIATYYCLQSDNLPY TFGGGTKVEIK	16
	LC	DTQMTQSPSSLSASVGDRVITICITSTDIDDDMNWYQQKPGKAPKLL ISEGNTLRPGVPSRFSGSGYGTDFFTISSLPEDIATYYCLQSDNLPY TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGGGGGGCVIM	23

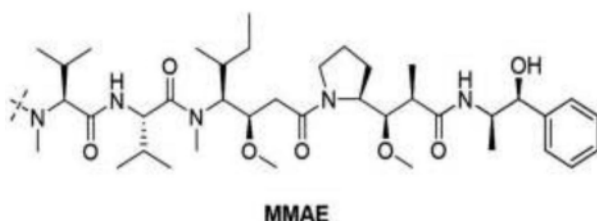
[0620] 实施例2:化合物1、化合物2、化合物3和化合物4的合成制备

[0621] <2-1>化合物1的制备



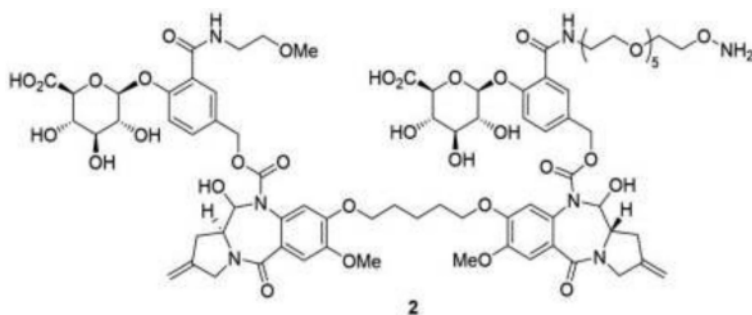
[0622] 化合物1是使用韩国专利申请第10-2018-7018068号中所描述的方法来制备。

[0623] 化合物1中的单甲基奥瑞他汀E (MMAE) 的结构如下:



[0624] <2-2>化合物2的制备

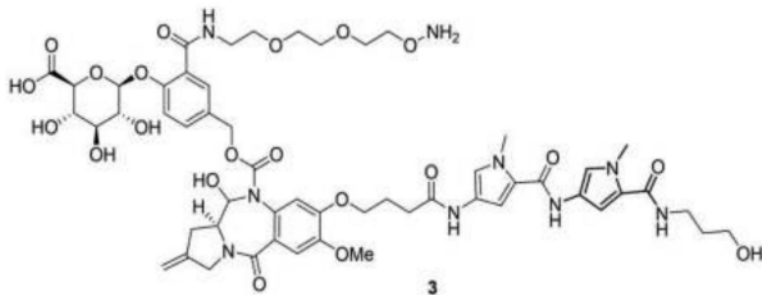
[0627]



[0628] 化合物2是使用韩国专利申请第10-2018-0036895号中所描述的方法来制备。

[0629] <2-3>化合物3的制备

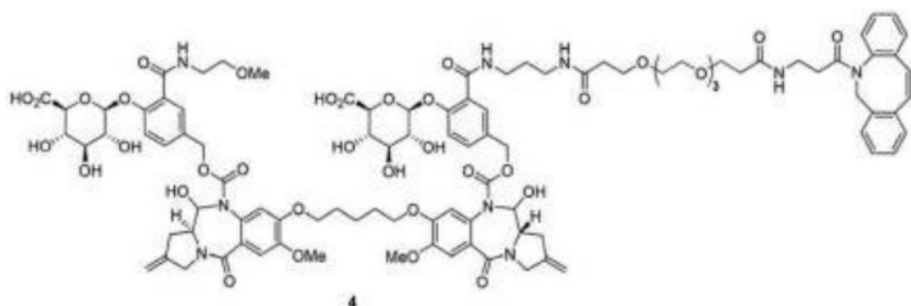
[0630]



[0631] 化合物3是使用韩国专利申请第10-2020-0188314号中所描述的方法来制备。

[0632] <2-4>化合物4的制备

[0633]

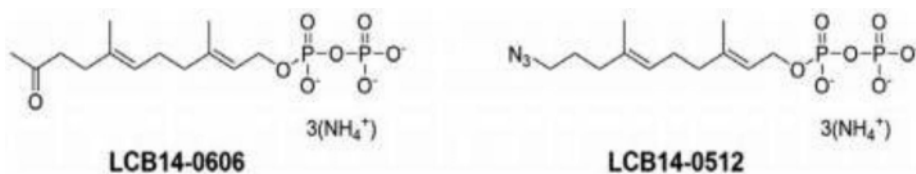


[0634] 化合物4是使用韩国专利申请第10-2018-0036895号中所描述的方法来制备。

[0635] 实施例3:ADC的合成制备

[0636] ADC是经由以下两个步骤制备,并且通常使用的LCB14-0606和LCB14-0512是使用韩国专利申请第10-2013-7032628号中所描述的方法来制备。LCB14-0606和LCB14-0512的结构式如下:

[0637]



[0638] 步骤1:聚异戊二烯化抗体的产生

[0639] <使用LCB14-0606产生聚异戊二烯化抗体>

[0640] 制备实施例1的抗体2G10-5-CaaX的聚异戊二烯化反应混合物且使反应在30℃下进行16小时。反应混合物由24μM抗体、600nM法呢基转移酶(Genscript)和含有144μM LCB14-0606的缓冲溶液(50mM Tris-HCl(pH 7.4)、5mM MgCl₂、10μM ZnCl₂和0.5mM DTT)组成。反应完成后,使用通过PBS缓冲溶液平衡的G25琼脂糖凝胶柱(AKTA纯化器,GE

healthcare)使聚异戊二烯化抗体脱盐。

[0641] <使用LCB14-0512产生聚异戊二烯化抗体>

[0642] 制备实施例1的抗体2G10-5-CaaX的聚异戊二烯化反应混合物且使反应在30℃下进行2小时。反应混合物由24μM抗体、600nM法呢基转移酶(Genscript)和含有200μM LCB14-0512的缓冲溶液(50mM Triss-HCl(pH 7.4)、5mM MgCl₂、10μM ZnCl₂和0.1mM DTT)组成。反应完成后,使用通过PBS缓冲溶液平衡的G25琼脂糖凝胶柱(AKTA纯化器,GE healthcare)使聚异戊二烯化抗体脱盐。

[0643] 步骤2:药物结合方法

[0644] <通过脒键形成进行的结合>

[0645] 通过将100μM Na-乙酸盐缓冲溶液pH 5.2、10%DMSO、24μM聚异戊二烯化抗体和240μM连接子-药物(内部,实施例2的化合物1、2或3)混合,并且在30℃下轻轻搅拌来制备用于聚异戊二烯化抗体与连接子-药物之间的脒键形成反应的混合物。在反应6小时或24小时之后,进行FLPC(AKTA纯化器,GE healthcare)过程以去除过量的所用小型化合物,并且收集且浓缩蛋白质洗脱份。

[0646] <通过无铜点击反应进行的结合>

[0647] 为了使用聚异戊二烯化抗体与连接子-药物之间的无铜点击偶合反应来制备ADC,将PBS缓冲溶液(pH 7.4)、1%DMSO、10μM聚异戊二烯化抗体和100μM连接子-药物(内部,实施例2中的化合物4)混合,得到反应混合物,并且在25℃下反应6小时后,经由FPLC(AKTA纯化器,GE healthcare)或G25琼脂糖凝胶柱工艺去除过量的小分子化合物,并且收集且浓缩蛋白质洗脱份。

[0648] 经由以上两个步骤产生的ADC展示于以下表4和图1至图4中。

[0649] [表4]

[0650]	ADC	抗体	聚异戊二烯化基团	毒素
	ADC1	2G10-5	LCB12-0606	化合物 1
	ADC2			化合物 2
	ADC3			化合物 3
[0651]	ADC4		LCB14-0512	化合物 4

[0652] <实验实施例1>活体外细胞毒性评估

[0653] 测量根据<实施例2>产生的ADC和单独的ADC中所包括的药物对癌细胞系的细胞增殖抑制活性。

[0654] 具体地,使用作为癌细胞系市售的人胰腺癌细胞系(BxPC-3、Capan-1和PATU-8988s)、乳腺癌细胞系(JIMT-1和MDA-MB-468)、胃癌细胞系(NCI-N87、SNU-601和SNU-620)、结肠癌细胞系(HCT15、HT29、DLD-1、SW480和COLO205)、卵巢癌细胞系(OVCAR-3)、前列腺癌细胞系(PC-3和LNCaP)和非小细胞肺癌细胞系(NCI-H1781、HCC827、Calu-1和Calu-3)。使用根据实施例3制备的ADC中所包括的呈单独药物形式的MMAE和作为PBD二聚体的SG2057(cAS#:260417-62-7,MedKooBiosciences)。将500个细胞/孔至5,000个细胞/孔的各癌细胞系接种至96孔盘中且培养24小时,并且接着以0.256pM至100nM的浓度(5倍连续稀释)处理

根据实施例3产生的各ADC1、ADC2和ADC3以及单独的药物MMAE和SG2057。144小时后,使用磺酰若丹明B(sulforhodamine B,SRB)染料或Cell titer glo对活细胞的数目进行定量。

[0655] 因此,如表5至表7中所示,证实与基于奥瑞他汀的抗体-药物缀合物(ADC1)相比,基于吡咯并苯并二氮呋的抗体-药物缀合物(ADC2和ADC3)在大部分癌细胞系中展现更强的细胞毒性。

[0656] [表5]

测试样品	CC ₅₀ (nM)							
	BxPC-3	Capan-1	Patu8988S	JIMT-1	MDA-MB-468	NCI-N87	SNU-601	SNU-620
MMAE	0.606	0.520	0.334	0.154	0.640	0.725	0.268	0.651
SG2057	-	-	-	-	-	-	-	-
ADC1	4.639	18.060	1.412	0.231	6.104	0.582	7.267	19.180
ADC2	3.605	-	-	-	0.580	0.148	-	-
ADC3	53.680	-	-	-	11.540	0.357	-	-

[0658] [表6]

测试样品	CC ₅₀ (nM)							
	HCT15	HT29	DLD-1	SW480	COLO205	OVCAR-3	PC-3	LNCaP
MMAE	3.865	0.330	8.883	3.825	0.628	0.304	0.946	0.551
SG2057	0.161	0.020	0.050	-	-	-	-	-
ADC1	>100	4.043	>100	>100	11.950	10.030	42.900	44.450
ADC2	57.160	1.065	31.030	-	-	-	-	-
ADC3	42.000	5.435	42.470	-	-	-	-	-

[0660] [表7]

测试样品	CC ₅₀ (nM)			
	NCI-H1781	HCC827	Calu-1	Calu-3
MMAE	0.208	0.674	0.971	0.400
SG2057	-	-	-	-
ADC1	3.220	11.290	59.580	3.538
ADC2	-	-	-	-
ADC3	-	-	-	-

[0662] <实验实施例2>活体内肿瘤生长抑制功效的分析

[0663] 在移植肿瘤的小鼠模型中,分析根据实施例3产生的ADC的肿瘤生长抑制功效。

[0664] 具体地,培养胰腺癌细胞系(BxPC-3和Capan-1)、乳腺癌细胞系(MDA-MB-468)、胃癌细胞系(NCI-N87)、结肠癌细胞系(HT29)和非小细胞肺癌细胞系(HCC827和NCI-H2170)。将培养过的细胞悬浮于100μl PBS中使得细胞数目变为 1×10^6 至 7×10^6 ,与100μl基质胶混合,并且接着移植至Balb/c-裸小鼠中。当肿瘤尺寸达到100mm³至200mm³时,根据以下表8至表10中所示的给药方案静脉内施用根据实施例3制备的各ADC。在即将初次施用(第1天)之前测量小鼠中移植的肿瘤尺寸,并且接着定期测量持续56天。作为对照,施用Trodelvy(戈沙妥珠单抗-hziy(sacituzumab govitecan-hziy))或DS-1062BS(达博妥单抗德鲁替康(Datopotamab deruxtecan))。

[0665] [表8]

初次(QD×1)	MDA-MB-468	BxPC-3
ADC1	2、4mpk	2、4mpk
ADC2	0.2、0.3、0.4mpk	-
ADC3	1、4mpk	-

[0667] [表9]

	第二次	MDA-MB-468	BxPC-3	NCI-N87	HCC827
[0668]	ADC1	0.5 mpk (Q4D×4) 1 mpk (Q4D×4) 2 mpk (QD×1)	0.5 mpk (2QW×4) 1 mpk (2QW×2) 2 mpk (QD×1)	2 mpk (QD×1) 4 mpk (QD×1)	4 mpk (2QW×2) 4 mpk (QD×1) 10 mpk (QD×1)
	Trodelvy	12.5 mpk (Q4D×4)	25 mpk (2QW×4)	17.5 mpk (2QW×4)	12.5 mpk (2QW×2)

[0669] [表10]

	第三次	BxPC-3	HCC827	Capan-1	NCI-H2170	HT-29
[0670]	ADC1	2 mpk (QD×1) 2 mpk (2QW×2)	4 mpk (2QW×2) 10 mpk (QD×1)	10 mpk (QD×1) 10 mpk (QW×3)	4 mpk (2QW×2) 10 mpk (QD×1)	5 mpk (QD×1) 5 mpk (2QW×2)
	Trodelvy	25 mpk (2QW×4)	12.5 mpk (2QW×4)	25 mpk (2QW×4)	25 mpk (2QW×4)	12.5 mpk (2QW×4)
	DS-1062BS	3 mpk (QW×2)	10 mpk (QD×1)	10 mpk (QD×1) 10 mpk (QW×3)	4 mpk (2QW×2) 10 mpk (QD×1)	5 mpk (2QW×2)

[0671] 因此,如图5A和图5B中所绘示,经由第一实验证实,当向移植胰腺癌细胞系的小鼠模型施用使用肱反应的基于奥瑞他汀的抗体-药物缀合物(ADC1)时,与对照组相比,2mg/kg和4mg/kg两种情况均以剂量依赖性方式展现出肿瘤生长抑制功效(图5A)。在移植乳腺癌细胞系的小鼠模型中,施用使用肱反应的基于奥瑞他汀的抗体-药物缀合物(ADC1)组和施用基于吡咯并苯并二氮呋类的抗体-药物缀合物(ADC2和ADC3)组均证实了肿瘤生长抑制功效。

[0672] 如图6A至图6D所绘示,也经由第二实验证实,与市售药物Trodelvy相比,ADC1在所有四种移植癌细胞系的小鼠模型(MDA-MB-468、BxPC-3、NCI-N87和HCC827)中均具有极佳功效。

[0673] 如图7A至图7E所绘示,也经由第三实验证实,与市售药物Trodelvy相比,ADC1在所有五种移植癌细胞系的小鼠模型(BxPC-3、HCC827、Capan-1、NCI-H2170和HT-29)中均具有极佳功效,并且ADC1的功效与竞争性药物DS-1062BS相当。

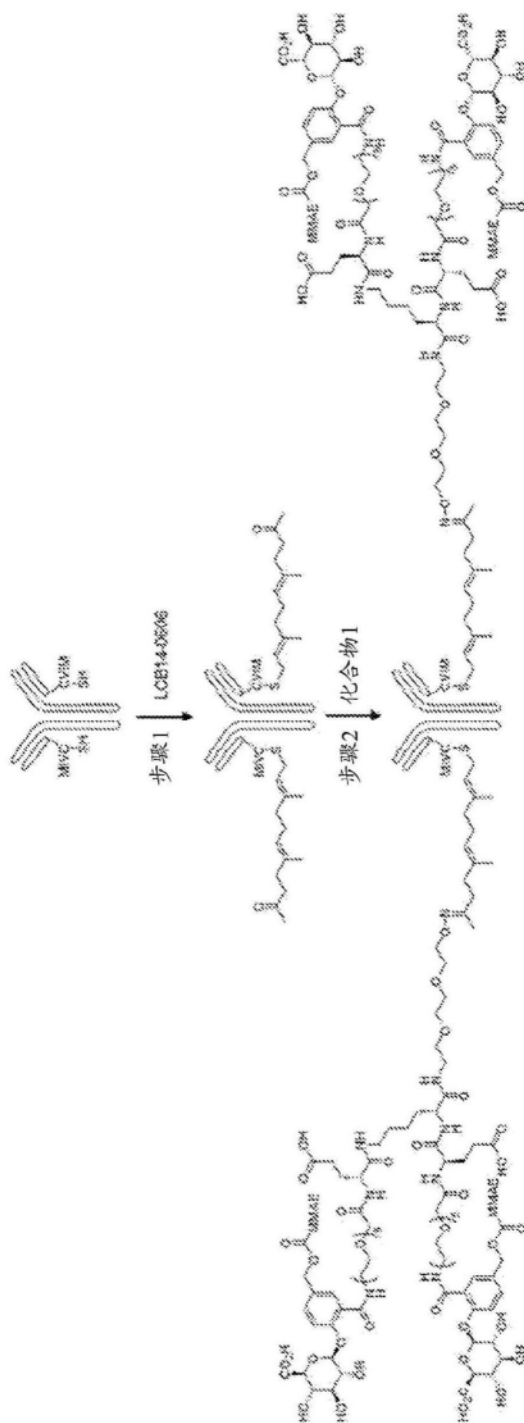


图1

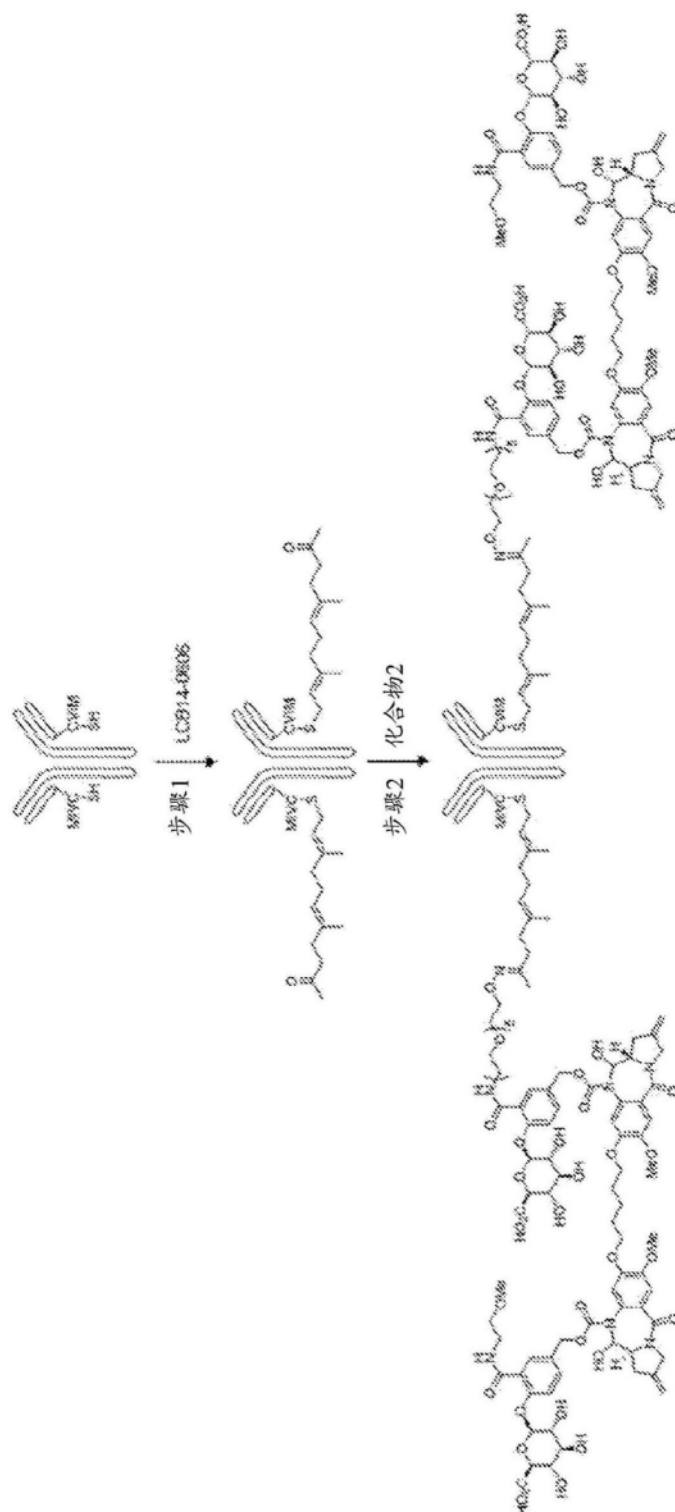


图2

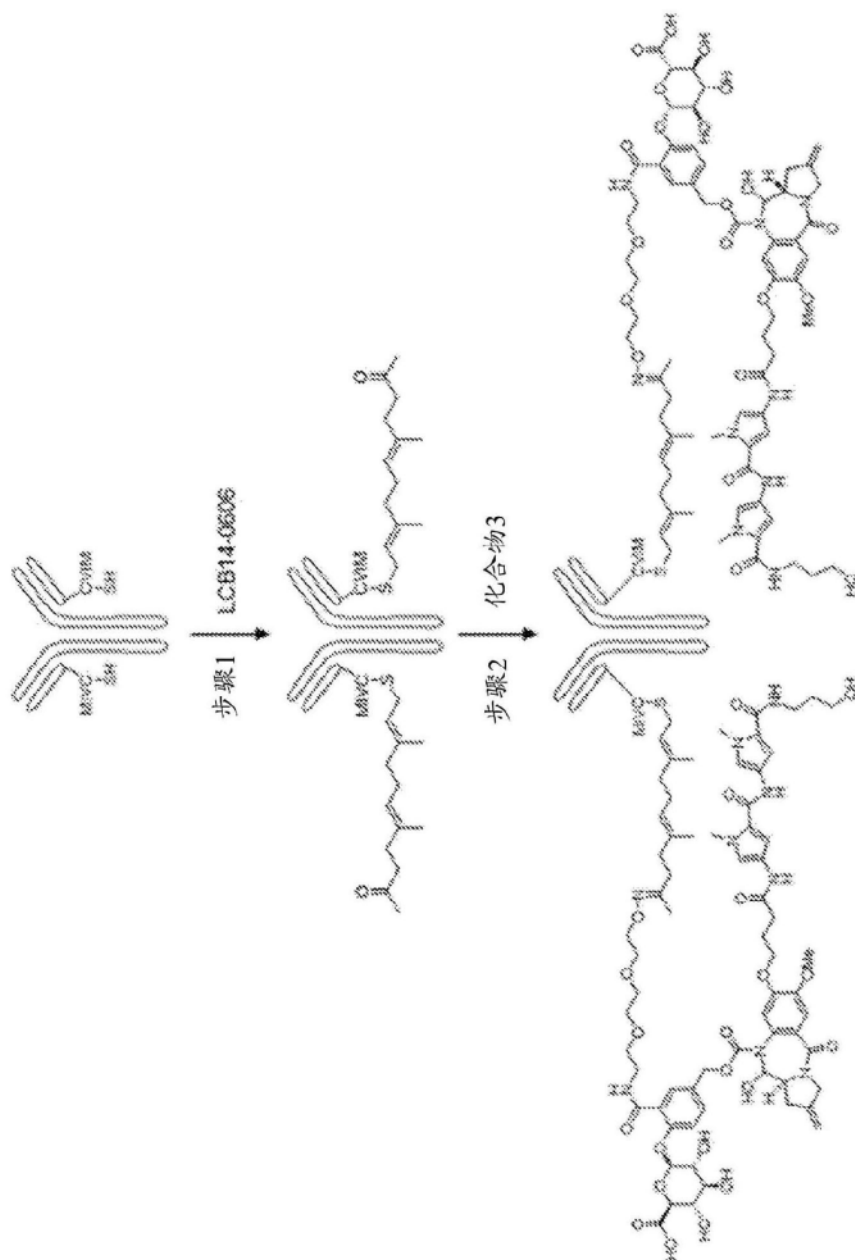


图3

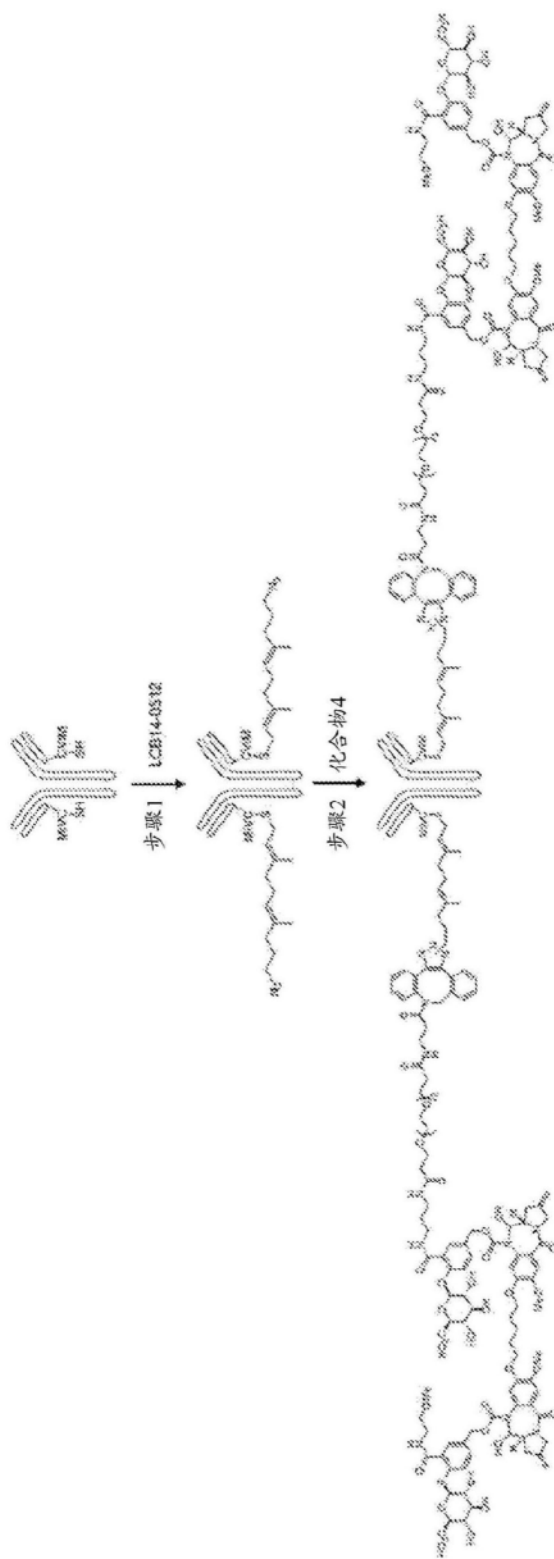


图4

BxPC3 (胰腺癌)异种移植模型

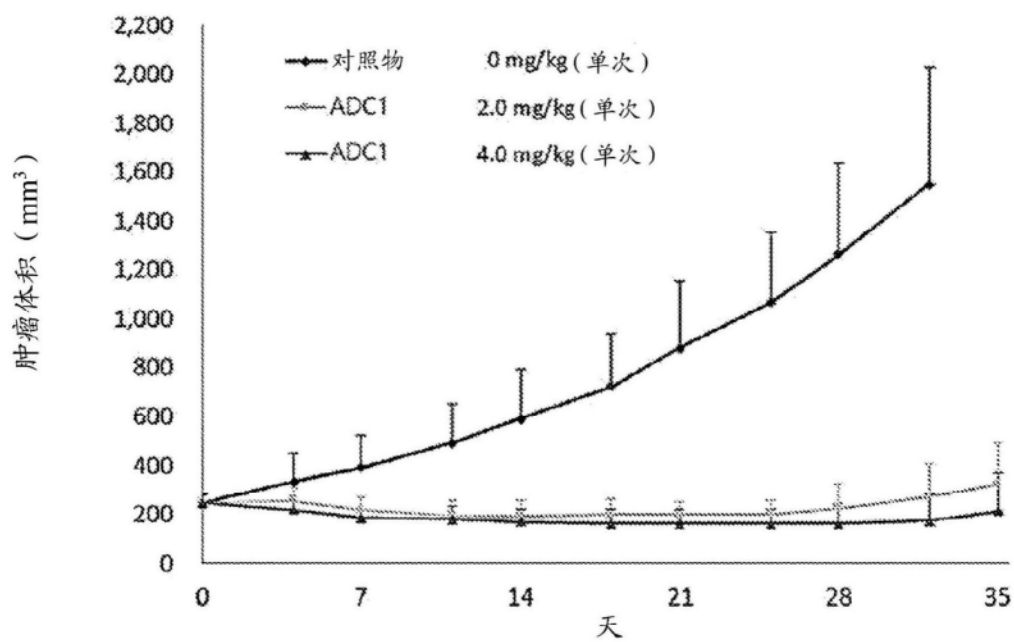


图5A

MDA-MB-468异种移植模型

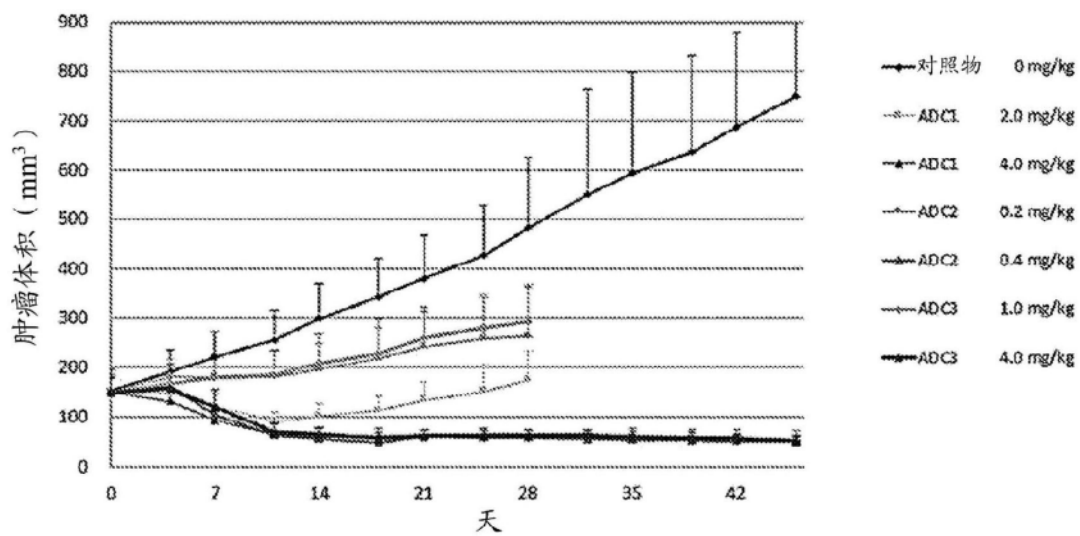


图5B

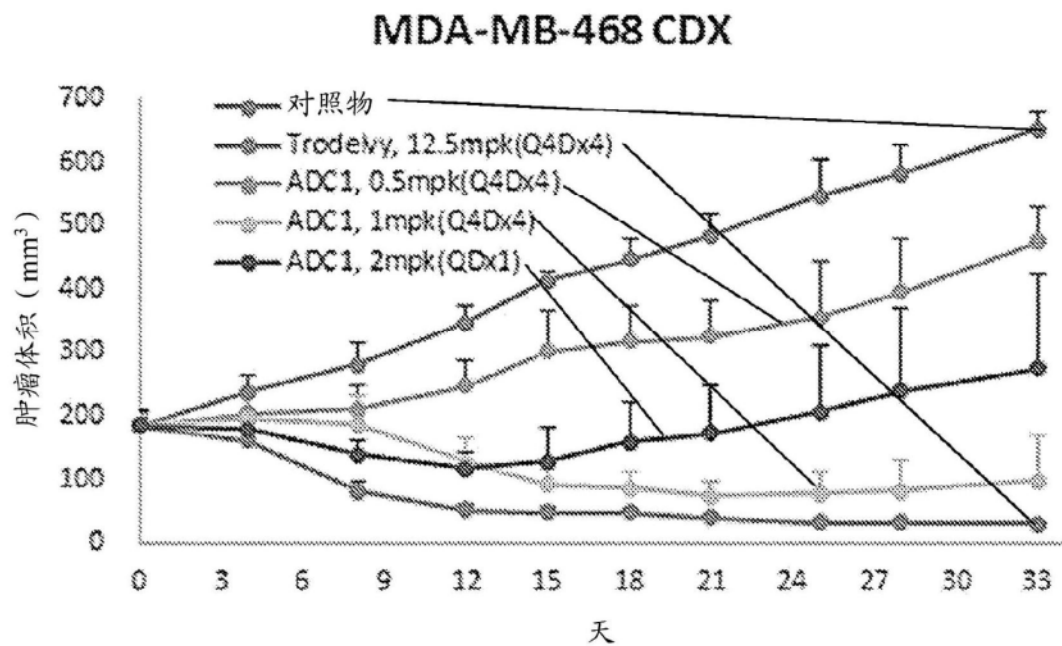


图6A

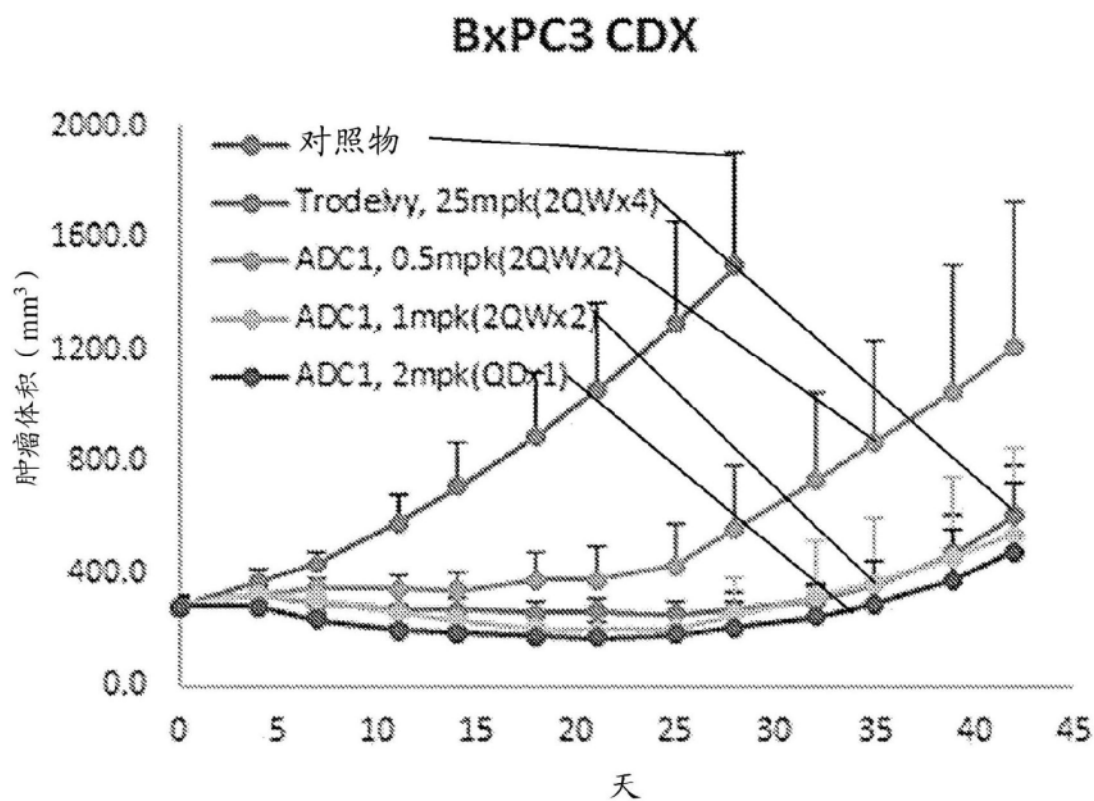


图6B

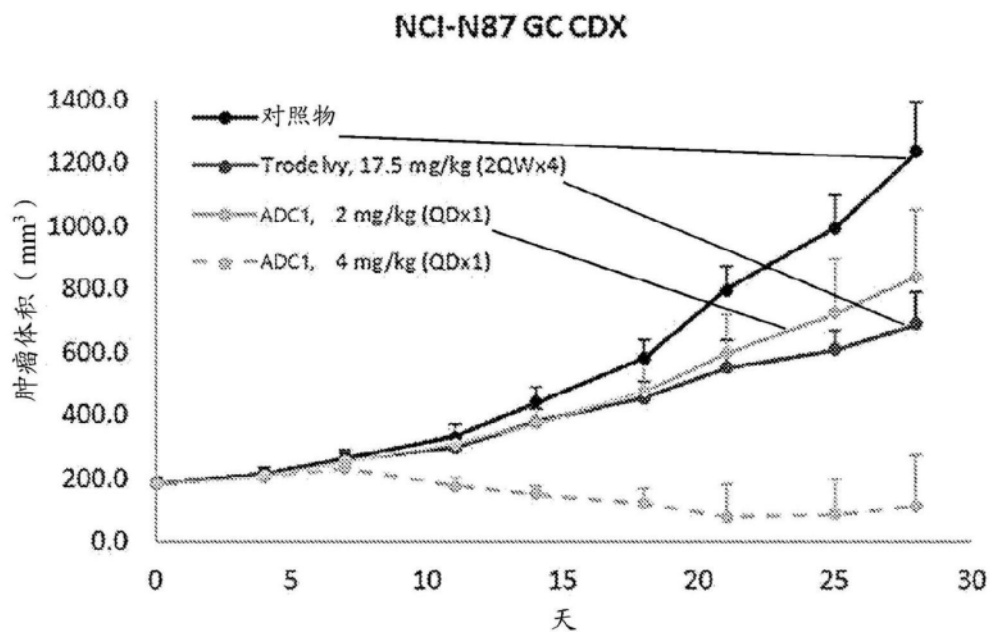


图6C

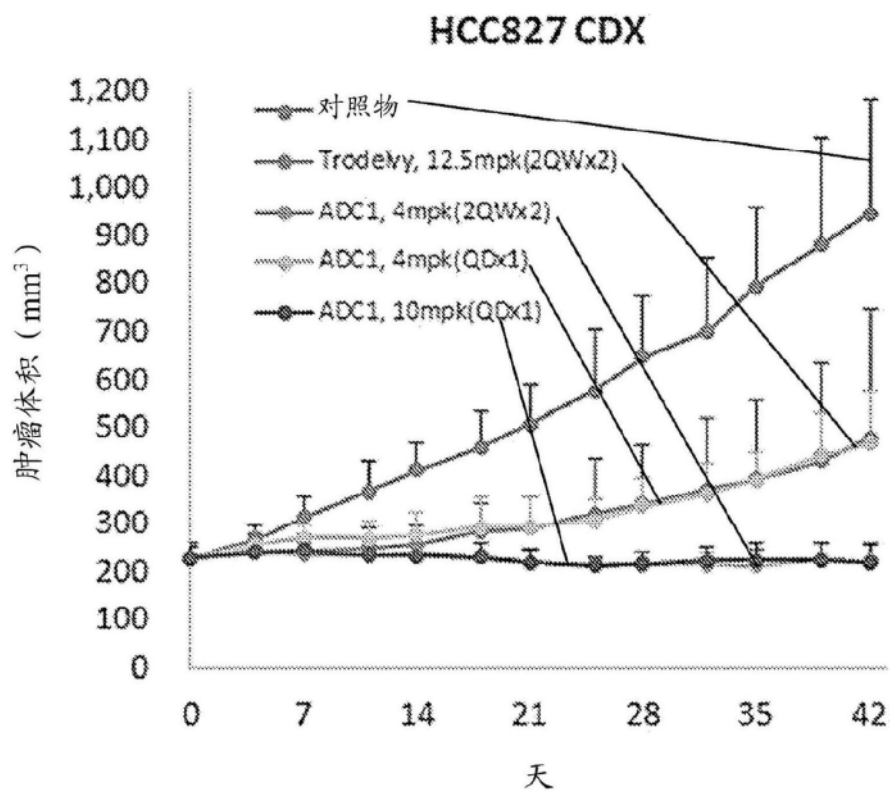


图6D

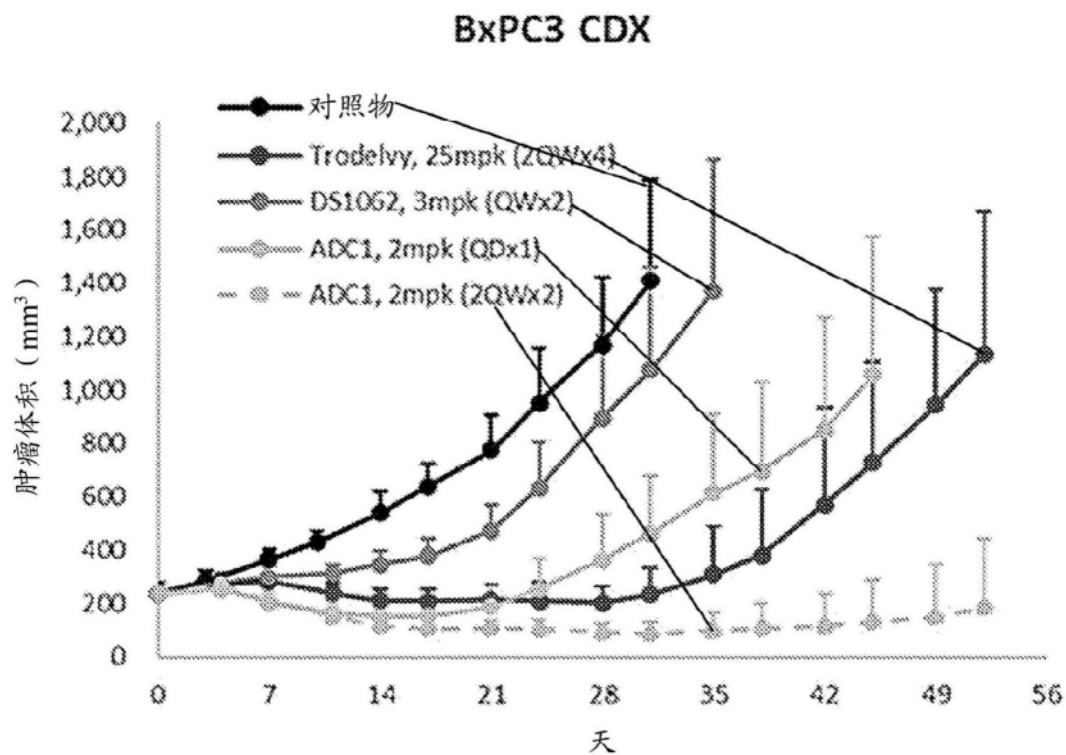


图7A

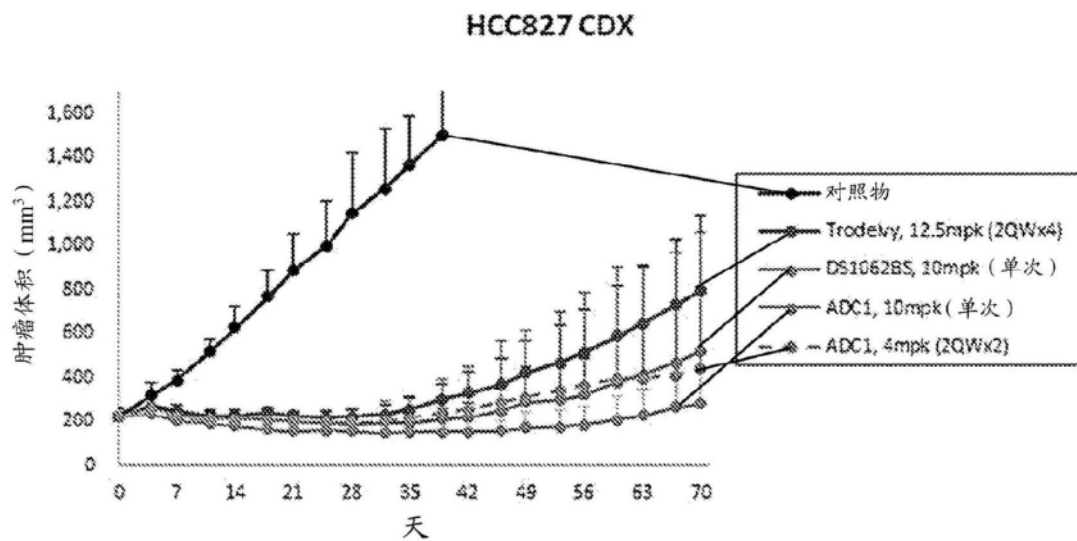


图7B

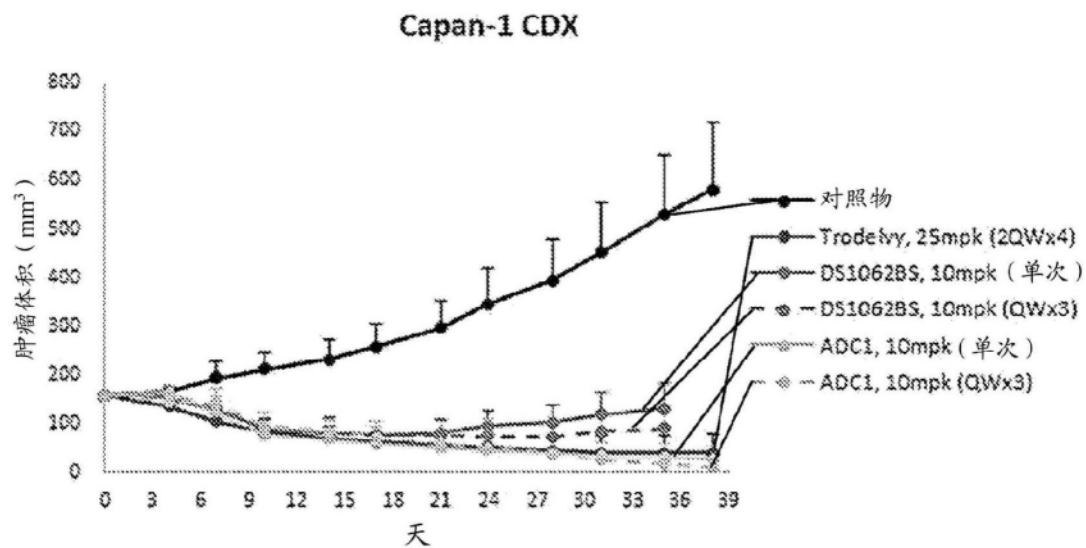


图7C

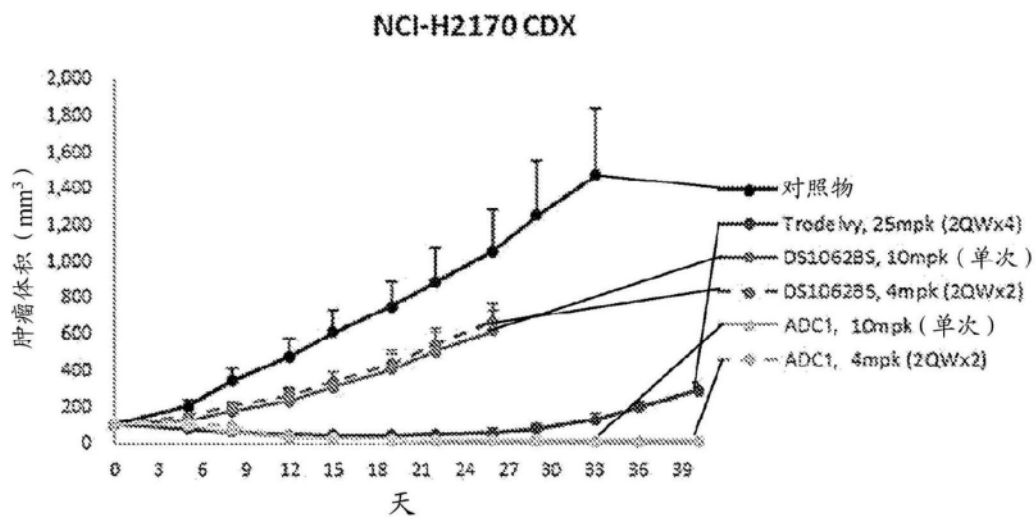


图7D

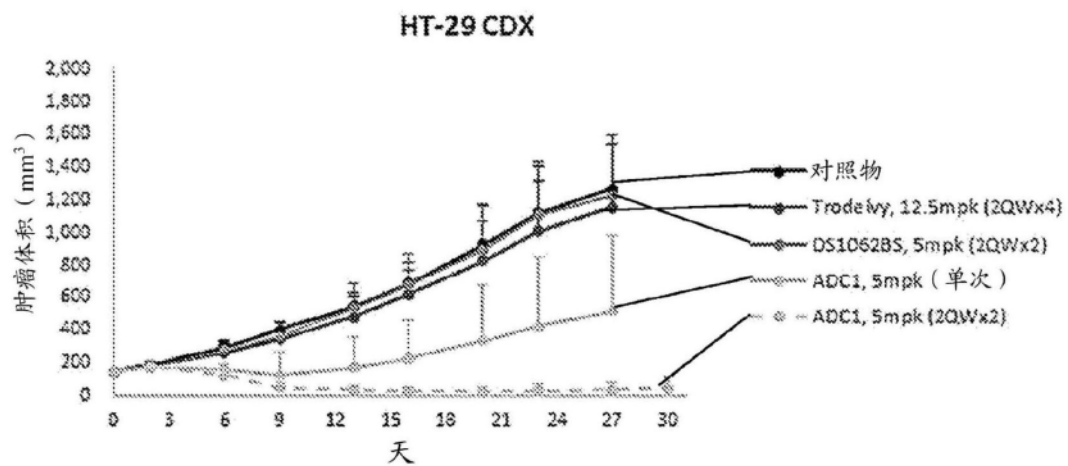


图7E