(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103702686 B
(45)授权公告日 2016.11.23

(21)申请号 201280018499.8
(22)申请日 2012.02.15
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103702686 A
(43)申请公布日 2014.04.02
(30)优先权数据
61/443,062 2011.02.15 US
61/443,092 2011.02.15 US
61/483,499 2011.05.06 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.10.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/025257 2012.02.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/112687 EN 2012.08.23
(83)生物保藏信息
PTA-10774 2010.04.07
PTA-10772 2010.04.07
PTA-10773 2010.04.07

(73)专利权人 伊缪诺金公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 N·菲什金 M·米勒 李为
R·辛格
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平

(51)Int.Cl.
A61K 47/48(2006.01)
C07D 487/04(2006.01)
C07D 519/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2010091150 A1,2010.08.12,说明书摘要,权利要求1-2,37,实施例14.
CN 1684948 A,2005.10.19,说明书摘要,实施例4.
审查员 王斯婷
权利要求书27页 说明书115页
序列表7页 附图29页

(54)发明名称

缀合物的制备方法

(57)摘要

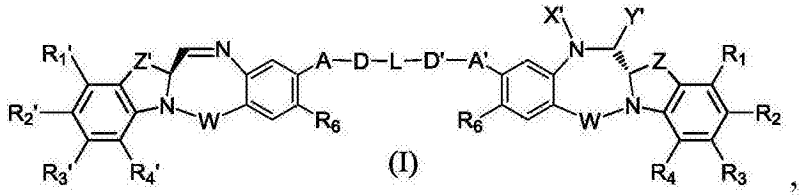
本发明涉及制备细胞结合剂与药物(例如细胞毒性化合物)的缀合物的方法。所述方法包括使用亚胺反应性化合物以使细胞毒性化合物与细胞结合剂有效缀合。

CN 103702686 B

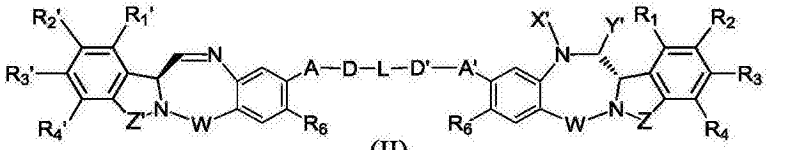
1.一种用于制备缀合物的方法，所述缀合物包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)，所述方法包括使修饰的细胞毒性化合物在pH4至9下与修饰的CBA反应，其中：

a)修饰的CBA包含键合于CBA的双官能交联剂的残基，且所述残基包含连接基团和硫醇反应性基团；且

b)所述修饰的细胞毒性化合物包含硫醇基团并通过使含有亚胺的化合物与亚胺反应剂反应而产生，其中所述含有亚胺的化合物由下式或其药学上可接受的盐表示：



(I)，



(II)，

其中：

X'选自-H，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，以及任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

Y'选自-H、氧代基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由-SO_2R'表示的砜，磺酸盐-$SO_3^-M^+$，硫酸盐-$OSO_3^-M^+$，由-SO_2NR'R"表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"；

每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，-NR_2，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环；

n是1至24的整数；

W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、$-NO_2$或卤素；

Z和Z'独立地选自$-(CH_2)_{n'}-$、$-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$、$-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$、$-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$和$-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$；

n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-$，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-$；

A和A'相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、$-N(R_5)-$和$-CRR'N(R_5)-$，

每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，和聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-$；

L不存在，或当存在时包含硫醇基，或是聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-$，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代；且

所述亚胺反应剂选自亚硫酸盐，偏亚硫酸氢盐，单、二、三和四硫代磷酸盐，硫代磷酸酯，羟胺，肼、NH_2O-R^i、$R^{i'}NH-R^i$、NH_2-R^i，$NH_2-CO-NH_2$，$NH_2-C(=S)-NH_2$，硫代硫酸盐、连二亚硫酸盐、$P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$或其盐，异羟肟酸，酰肼，甲醛次硫酸盐，糖化的核苷酸，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$的取代基取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

2.根据权利要求1所述的方法，其进一步包括在与所述修饰的CBA反应前纯化所述修饰的细胞毒性化合物。

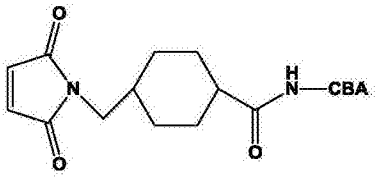
3.根据权利要求1所述的方法，其中所述修饰的CBA通过使所述CBA与双官能交联剂反应而制备，所述双官能交联剂包含所述硫醇反应性基团和与所述CBA反应性的基团，两者均键合于所述连接基团。

4.根据权利要求3所述的方法，其中与CBA反应性的所述基团与CBA的氨基或与CBA的硫醇基反应。

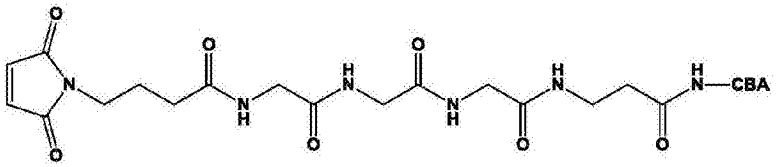
5.根据权利要求1所述的方法，其中所述硫醇反应性基团选自马来酰亚胺、乙烯基吡啶、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺、基于卤代乙酰基的基团和二硫基。

6.根据权利要求1所述的方法，其中所述硫醇反应性基团是马来酰亚胺、卤代乙酰胺基或$-SSR^d$，其中R^d是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基、苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基、2-硝基吡啶基、4-硝基吡啶基或3-羧基-4-硝基吡啶基。

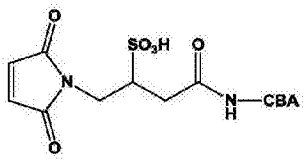
7.根据权利要求1所述的方法，其中所述修饰的CBA是：


O
O
N
H
N—CBA
O
O

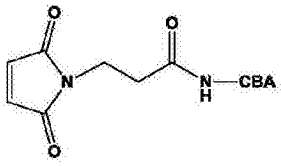
，


O
O
N
O
H
N
O
H
N
O
H
N
O
H
N—CBA
O
O

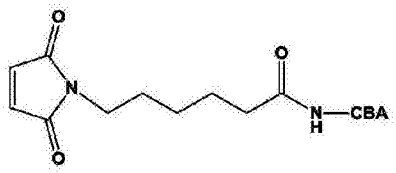
，


O
O
N
SO3H
O
H
N—CBA
O

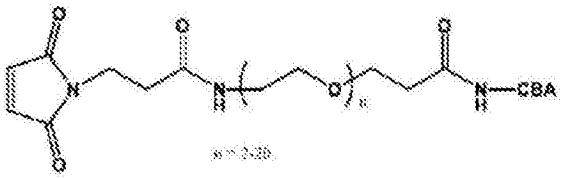
，


O
O
N
O
H
N—CBA
O

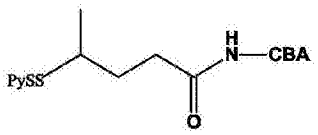
，


O
O
N
O
H
N—CBA
O

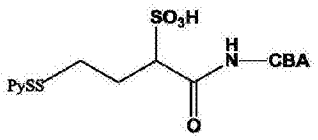
，


O
O
N
O
H
N
O
O
H
N—CBA
O
O

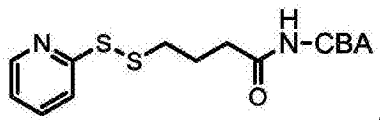
，


PySS
H
N—CBA
O

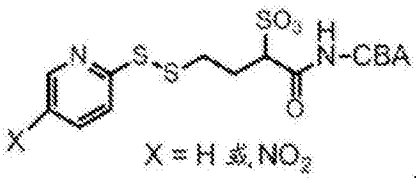
，


SO3H
PySS
H
N—CBA
O

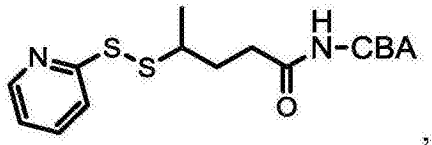
，


N
S
S
H
N-CBA
O

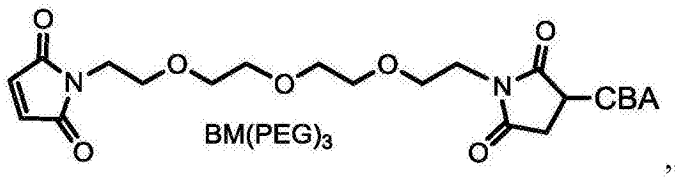
，


SO3
H
N
S
S
N-CBA
O
X
X = H 或 NO2

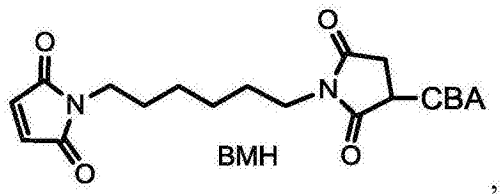
，



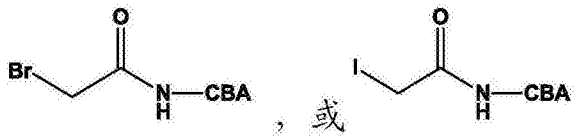
，



，

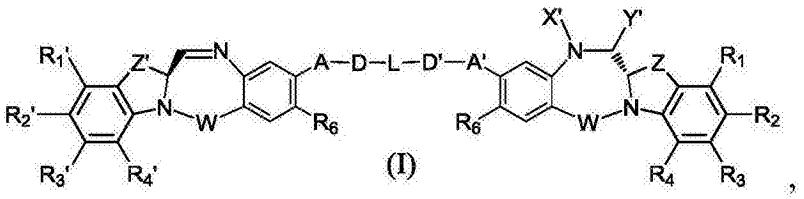


，



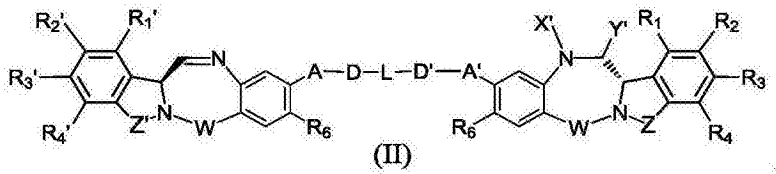
，或 。

8.一种用于制备缀合物的方法，所述缀合物包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)，所述方法包括使所述CBA与含有亚胺的细胞毒性化合物、亚胺反应剂和包含连接基团的双官能交联剂反应以形成所述缀合物，其中所述含有亚胺的细胞毒性化合物由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示：



(I)

，



(II)

，

其中：

X'选自-H，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，以及任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

Y'选自-H、氧代基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直

链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由-SO_2R'表示的砜，磺酸盐-$SO_3^-M^+$，硫酸盐-$OSO_3^-M^+$，由-SO_2NR'R"表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"；

每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，-NR_2，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环；

n是1至24的整数；

W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素；

Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-；

n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-；

A和A'相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-，

每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，和聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-；

L不存在，或当存在时包含硫醇基，或是聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代；且

所述亚胺反应剂选自亚硫酸盐，偏亚硫酸氢盐，单、二、三和四硫代磷酸盐，硫代磷酸酯，羟胺，肼、NH_2O-R^i、R^i'NH-R^i、NH_2-R^i，NH_2-CO-NH_2，NH_2-C(=S)-NH_2，硫代硫酸盐、连二亚硫酸盐、P(=S)(OR^k)(SH)(OH)或其盐，异羟肟酸，酰肼，甲醛次硫酸盐，糖化的核苷酸，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自-N(R^j)$_2$、-CO_2H、-SO_3H和-PO_3H的取代基取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

9.根据权利要求8所述的方法，其中将所述CBA与含有亚胺的细胞毒性化合物和亚胺反应剂接触以形成第一混合物；且然后将所述第一混合物与所述双官能交联剂接触以形成所述缀合物。

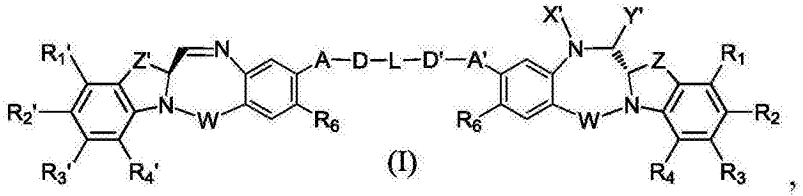
10.根据权利要求9所述的方法，其中在形成所述第一混合物之后立即将所述双官能交联剂与所述第一混合物接触。

11.根据权利要求8所述的方法，其进一步包括纯化所述缀合物。

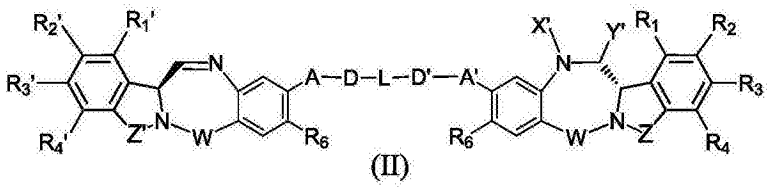
12.一种用于制备缀合物的方法，所述缀合物包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)，所述方法包括：

a)将修饰的细胞毒性化合物与包含所述连接基团的双官能交联剂、与所述CBA反应性的基团以及与所述修饰的细胞毒性化合物反应性的基团反应以形成共价键合于所述双官能交联剂残基的第二修饰的细胞毒性化合物，其中所述残基包括连接基团和与所述CBA反应性的基团；

其中所述修饰的细胞毒性化合物通过使含有亚胺的化合物与亚胺反应剂反应而产生，其中所述含有亚胺的化合物由下式或其药学上可接受的盐表示：



,



,

其中：

X'选自-H，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，以及任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

Y'选自-H、氧代基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由-SO_2R'表示的砜，磺酸盐-$SO_3^-M^+$，硫酸盐-$OSO_3^-M^+$，由-SO_2NR'R"表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"；

每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任

选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，-NR_2，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环；

n是1至24的整数；

W选自C＝O、C＝S、CH_2、BH、SO和SO_2；

R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素；

Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-；

n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-；

A和A'相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(＝O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-，

每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$-；

L不存在，或当存在时，包含硫醇基或为聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$-，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代；且，

所述亚胺反应剂选自亚硫酸盐，偏亚硫酸氢盐，单、二、三和四硫代磷酸盐，硫代磷酸酯，羟胺，肼、NH_2O-R^i、R^i'NH-R^i、NH_2-R^i，NH_2-CO-NH_2，NH_2-C(＝S)-NH_2，硫代硫酸盐、连二亚硫酸盐、P(＝S)(OR^k)(SH)(OH)或其盐，异羟肟酸，酰肼，甲醛次硫酸盐，糖化的核苷酸，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自-N(R^j)$_2$、-CO_2H、-SO_3H和-PO_3H的取代基取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；和

b)使所述第二修饰细胞毒性化合物在pH4至9下通过与CBA反应性的基团与CBA反应以形成所述缀合物。

13.根据权利要求12所述的方法，其中所述与CBA反应性的基团是硫醇基、马来酰亚胺基、卤代乙酰胺基或胺基。

14.根据权利要求12所述的方法，其中所述修饰的细胞毒性化合物包含硫醇基，且与所述修饰的细胞毒性化合物反应性的基团是硫醇反应性基团。

15.根据权利要求14所述的方法，其进一步包含在步骤a)前纯化所述修饰的细胞毒性

化合物。

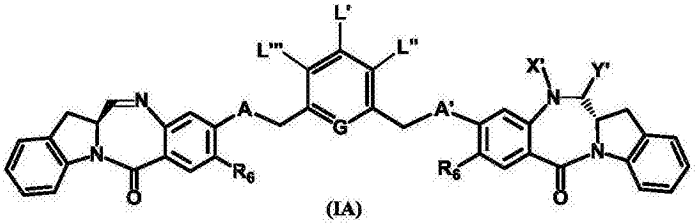
16.根据权利要求12所述的方法，其进一步包含在步骤b)之前纯化所述第二修饰细胞毒性化合物。

17.根据权利要求12所述的方法，其中将反应混合物冷冻贮藏，然后在步骤a)实施前将其解冻。

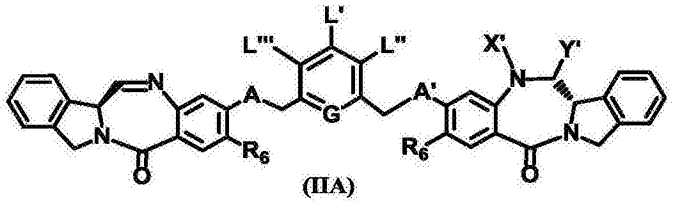
18.根据权利要求12所述的方法，其中将步骤a)中获得的反应混合物冷冻贮藏，然后在步骤b)实施之前将其解冻。

19.根据权利要求12所述的方法，其中所述双官能交联剂是双马来酰亚胺己烷或BMPEO。

20.根据权利要求1、8和12中任一项所述的方法，其中所述含有亚胺的化合物或含有亚胺的细胞毒性化合物由下式中的任一者或其药学上可接受的盐表示：



(IA)，或



(IIA)，

其中：

L'、L"和L"'相同或不同，且独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NR'COR"，-SR，由-SOR'所表示的亚砜，由-SO_2R'所表示的砜，磺酸盐-SO_3M，硫酸盐-OSO_3M，由-SO_2NR'R"所表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"；

M是-H或药学上可接受的阳离子；且

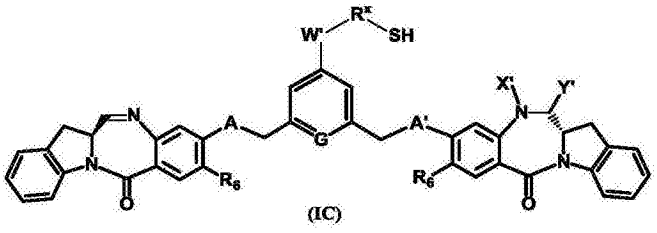
G选自-CH-或-N-。

21.根据权利要求20所述的方法，其中L'、L"或L"'中的一者具有硫醇基，而其它是-H。

22.根据权利要求21所述的方法，其中L'具有硫醇基，而L"和L"'是-H。

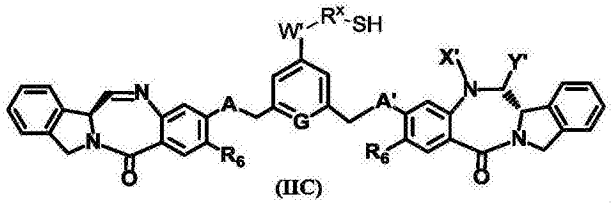
23.根据权利要求22所述的方法，其中A和A'均是-O-；R_6是-OMe；且G是-CH-。

24.根据权利要求1、8和12中任一项所述的方法，其中所述含有亚胺的化合物或含有亚胺的细胞毒性化合物由下式中的任一者或其药学上可接受的盐表示：



(IC)

，或



(IIC)

，

其中：

W'不存在，或当存在时，选自-$CR^eR^{e'}$-、-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-S-、-SO-、-SO_2-、-CH_2-S-、-CH_2O-、-CH_2NR^e-、-O-(C=O)O-、-O-(C=O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-C(=O)-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)O-、-N(C(=O)R^e)C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-(O-CH_2-CH_2)$_n$-、-SS-或-C(=O)-或氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽；

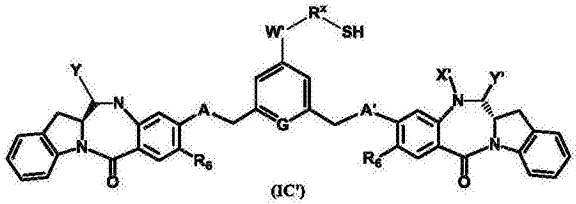
R^x不存在，或当存在时是任选被取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，具有6至10个碳原子的芳基，或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环；

R^e和$R^{e'}$相同或不同，且选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基，任选地具有仲氨基-NHR^{101}或叔氨基-$NR^{101}R^{102}$或5或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

n是1至24的整数；和

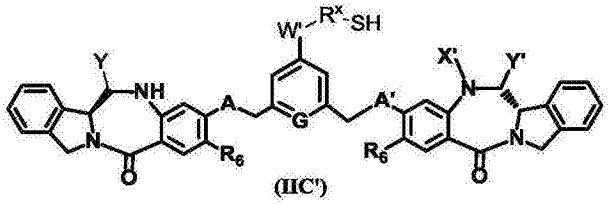
G选自-CH-或-N-。

25.根据权利要求1或12所述的方法，其中所述修饰的细胞毒性化合物由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示：



(IC')

，或



(IIC')

，

其中：

Y是-SO_3M、-SO_2M或-OSO_3M；

M是-H或药学上可接受的阳离子；

X'选自-H、-OH、取代的或未取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基、苯基和氨基保护基；

Y'选自-H、氧代基团、取代的或未取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

A和A'选自-O-和-S-；

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

R^x不存在，或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基，任选地具有仲氨基-NHR^{101}或叔氨基-$NR^{101}R^{102}$或5或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

G选自-CH-或-N-。

26.根据权利要求24所述的方法，其中：

X'选自-H，-OH，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，以及氨基保护基团；

Y'选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

A和A'选自-O-和-S-；

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

R^x不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基-NHR^{101}或叔氨基-$NR^{101}R^{102}$基团或5或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

G选自-CH-或-N-。

27.根据权利要求26所述的方法，其中W'是-N(R^e)-。

28.根据权利要求27所述的方法，其中R^e是-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

29.根据权利要求28所述的方法，其中R^k是-H或-Me。

30.根据权利要求29所述的方法，其中R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

31.根据权利要求29所述的方法，其中R^x是-(CH_2)$_p$-(CR^fR^g)-，其中R^f和R^g各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且p是0、1、2或3。

32.根据权利要求31所述的方法，其中R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

33.根据权利要求28所述的方法，其中：

X'和Y'均是-H；

A和A'均是-O-；

R_6是-OMe；且

R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

34.根据权利要求1、8或12所述的方法，其中所述双官能交联剂选自：4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-氨基己酸酯)(LC-SMCC)、κ-马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、γ-马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α-马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SMPB)、N-(对马来酰亚氨基苯基)异氰酸酯(PMPI)、N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA)，溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBA)和3-(溴代乙酰氨基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBAP)、双-马来酰亚胺聚乙二醇(BMPEO)、$BM(PEO)_2$、$BM(PEO)_3$、N-(β-马来酰亚胺丙基氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、5-马来酰亚胺戊酸NHS、HBVS、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酰肼·HCl(MPBH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺己烷(BMH)、双-马来酰亚胺乙烷(BMOE)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ-马来酰亚胺丁基氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ε-马来酰亚胺己酰氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ-马来酰亚胺十一烷氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMPB)、CX1-1、磺基-Mal、PEG_n-Mal、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、和N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)2-硫代丁酸酯(磺基-SPDB)。

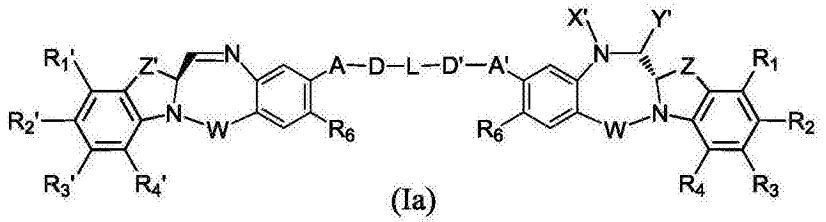
35.根据权利要求34所述的方法，其中所述双官能交联剂选自SMCC、磺基-SMCC、BMPS、GMBS、SIA、SIAB、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯、双-马来酰亚胺己烷或BMPEO。

36.一种用于制备缀合物的方法，所述缀合物包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)，所述方法包括使第二修饰的细胞毒性化合物在pH4至9下与CBA反应，其中所述第二修饰的细胞毒性化合物包含：

键合于所述细胞毒性化合物的双官能交联剂的残基，且所述残基包含连接基团和选自反应性酯和硫醇反应性基团的反应性基团，

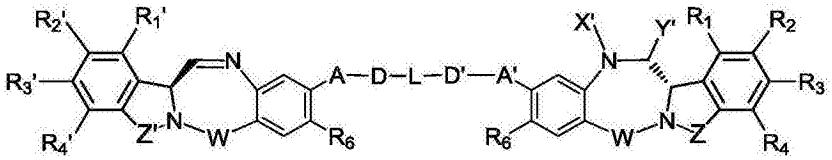
并且，

通过将亚胺反应剂与具有所述连接基团和所述反应性基团的含有亚胺的细胞毒性化合物反应而产生，其中所述含有亚胺的细胞毒性化合物由下式或其药学上可接受的盐表示：



(Ia)

，或



(IIa)

，

其中：

X'选自-H，氨基保护基团，具有键合至其的反应性基团的连接基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

Y'选自-H、氧代基团、具有键合至其的反应性基团的连接基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基，或具有键合至其的反应性基团的连接基团；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'所表示的亚砜，由-SO_2R'所表示的砜，磺酸盐-$SO_3^-M^+$，硫酸盐-$OSO_3^-M^+$，由-SO_2NR'R"所表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"和具有键合至其的反应性基团的连接基团；

每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，-NR_2，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

n是1至24的整数；

W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2、卤素或具有键合至其的反应性基团的连接基团；

Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-；

n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-；

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

每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$-；

L不存在，为具有键合至其的反应性基团的连接基团，聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$-，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基为任选被具有键合至其的反应性基团的连接基团取代；苯基或杂环或杂芳基环任选被取代，其中所述取代基任选地是具有键合至其的反应性基团的连接基团；且

所述亚胺反应剂选自亚硫酸盐，偏亚硫酸氢盐，单、二、三和四硫代磷酸盐，硫代磷酸酯，羟胺，肼、NH_2O-R^i、R^i'NH-R^i、NH_2-R^i，NH_2-CO-NH_2，NH_2-C(=S)-NH_2，硫代硫酸盐、连二亚硫酸盐、P(=S)(OR^k)(SH)(OH)或其盐，异羟肟酸，酰肼，甲醛次硫酸盐，糖化的核苷酸，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自-N(R^j)$_2$、-CO_2H、-SO_3H和-PO_3H的取代基取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

37.根据权利要求36所述的方法，其进一步包括在与所述CBA反应之前纯化所述第二修饰的细胞毒性化合物。

38.根据权利要求36所述的方法，其中所述反应性酯选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基酯、二硝基苯基酯、四氟苯基酯、磺基四氟苯基酯和五氟苯基酯。

39.根据权利要求36所述的方法，其中所述反应性酯是N-羟基琥珀酰亚胺酯。

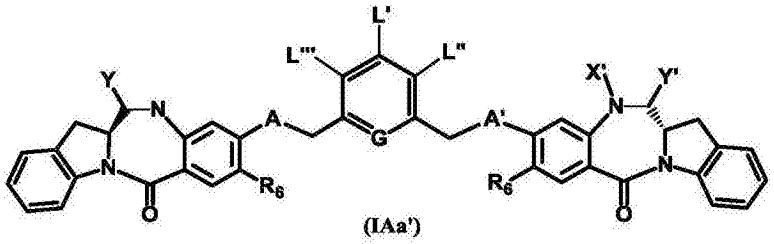
40.根据权利要求36所述的方法，其中所述硫醇反应性基团选自马来酰亚胺、乙烯基吡啶、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺、基于卤代乙酰基和二硫基。

41.根据权利要求36所述的方法，其中所述硫醇反应性基团是马来酰亚胺、卤代乙酰胺基或-SSR^d，其中R^d是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基，苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基、2-硝基吡啶基、4-硝基吡啶基或3-羧基-4-硝基吡啶基。

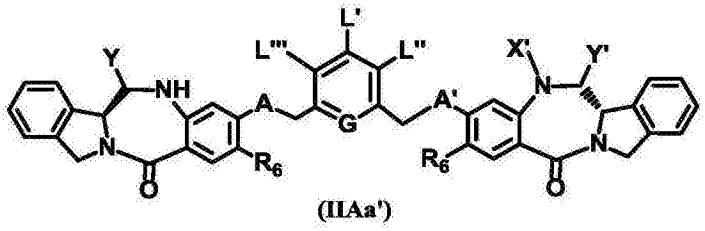
42.根据权利要求12或36所述的方法，其中L不存在，或选自任选取代的苯基和任选取代的吡啶基，其中所述苯基和吡啶基具有连接基团，所述连接基团具有键合至其的反应性基团，或L是具有连接基团的胺基，所述连接基团具有键合至其的反应性基团，或L是具有1至6个碳原子且具有连接基团的直链、支链或环状的烷基或烯基，所述连接基团具有键合至

其的反应性基团。

43.根据权利要求42所述的方法，其中所述第二修饰的细胞毒性化合物由下式中的任一者或其药学上可接受的盐表示：



(IAa')，



(IIAa')，

其中：

L'、L"和L"'相同或不同，且独立地选自-H、具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-R^c$，卤素，胍基$[-NH(C=NH)NH_2]$，-OR，-NR'R"，$-NO_2$，-NR'COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由$-SO_2R'$表示的砜，磺酸盐$-SO_3M$，硫酸盐$-OSO_3M$，由$-SO_2NR'R"$表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"和具有键合至其的反应性基团的连接基团，条件是L'、L"和L"'中仅一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团；

M是-H或药学上可接受的阳离子；

G选自-CH-或-N-；且

式(IAa')或(IAa")中的-C(Y)-N(H)-结构由亚胺反应剂与含有亚胺的细胞毒性化合物反应得到。

44.根据权利要求43所述的方法，其中L'、L"或L"'中的一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团，而其它是-H。

45.根据权利要求44所述的方法，其中L'是具有键合至其的反应性基团的连接基团，而L"和L"'均是-H。

46.根据权利要求45所述的方法，其中A和A'均是-O-，R_6是-OMe，且G是-CH-。

47.根据权利要求46所述的方法，其中L'由下式表示：

$-W'-R^x-V-R^y-J$，

其中：

W'和V相同或不同，且各自独立地不存在或选自$-CR^eR^{e'}-$、-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-S-、-SO-、$-SO_2-$、$-CH_2-S-$、$-CH_2O-$、$-CH_2NR^e-$、-O-(C=O)O-、-O-(C=O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-C(=O)-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)O-、-N(C(=O)R^e)C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、$-(O-CH_2-CH_2)_n-$、-SS-或-C(=O)-或氨基酸，或具有2至8个氨基酸的肽；

R^x和R^y相同或不同，且各自独立地不存在或者是具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，具有6至10个碳原子的芳基或具有1至3个选自O、N或S

的杂原子的3至8元杂环；

R^e和$R^{e'}$相同或不同，且选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基，任选地具有仲氨基$-NHR^{101}$或叔氨基$-NR^{101}R^{102}$或5或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

n是1至24的整数；

J包含键合至其的反应性基团，且选自马来酰亚胺、卤代乙酰氨基、-SH、$-SSR^d$、$-CH_2SH$、$-CH(Me)SH$、$-C(Me)_2SH$和-COE，其中-COE表示反应性酯，其选自但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基酯、二硝基苯基酯、磺基-四氟苯基酯和五氟苯基酯，且，

R^d选自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基。

48.根据权利要求47所述的方法，其中J是-SH、$-SSR^d$、马来酰亚胺或N-羟基琥珀酰亚胺酯。

49.根据权利要求48所述的方法，其中：

$R^{e'}$是-H或-Me；

R^e是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$；

n是2至8的整数；且

R^k是-H、-Me或$-CH_2CH_2-NMe_2$。

50.根据权利要求47所述的方法，其中V是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。

51.根据权利要求50所述的方法，其中，V是缬氨酸-瓜氨酸、gly-gly-gly或ala-leu-ala-leu。

52.根据权利要求47所述的方法，其中：

W'是-O-、$-N(R^e)-$或$-N(R^e)-C(=O)-$；

R^e是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$；

R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；

V不存在、为$-(O-CH_2-CH_2)_n-$、$-C(=O)-NH-$、-S-、$-NH-C(=O)-$；

R^y不存在或者是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且

J是-SH、$-SSR^d$或-COE。

53.根据权利要求47所述的方法，其中：

W'是-O-、$-N(R^e)-$或$-N(R^e)-C(=O)-$；

R^e是-H、-Me或$-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$；

n是2至6的整数；

R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；

V和R^y不存在；且

J是-COE。

54.根据权利要求52所述的方法，其中-COE为N-羟基琥珀酰亚胺酯。

55.根据权利要求52所述的方法，其中L'由下式表示：

$-W'-[CR_{1''}R_{2''}]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_{3''}R_{4''}]_b-COE$，

其中：

$R_{1"}$、$R_{2"}$和$R_{3"}$各自独立地为-H或-Me；

$R_{4"}$是-H、-Me、$-SO_3H$或$-SO_3^-M^+$，其中M^+是药学上可接受的阳离子；

a是0-2的整数，b是0-3的整数；且

Cy是具有N杂原子的任选取代的5元杂环。

56.根据权利要求55所述的方法，其中W'是$-N(R^e)-$。

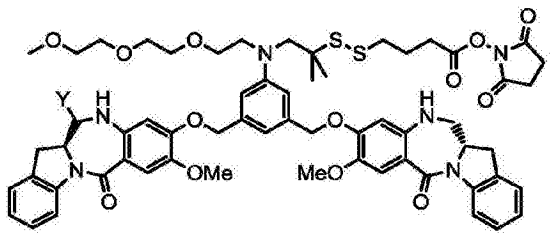
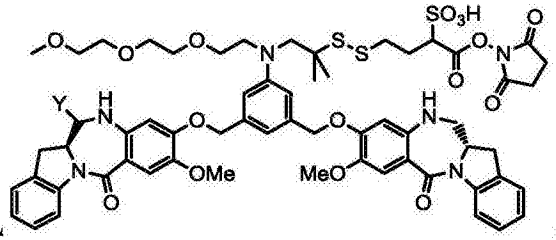
57.根据权利要求55所述的方法，其中R^e是$-(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

58.根据权利要求55所述的方法，其中V是-S-或-SS-。

59.根据权利要求55所述的方法，其中L'由下式表示：

$-NR^e-[CR_{1"}R_{2"}]_a-S-[CR_{3"}R_{4"}]_b-COE$。

60.根据权利要求47所述的方法，其中所述第二修饰细胞毒性化合物是：


，或

，

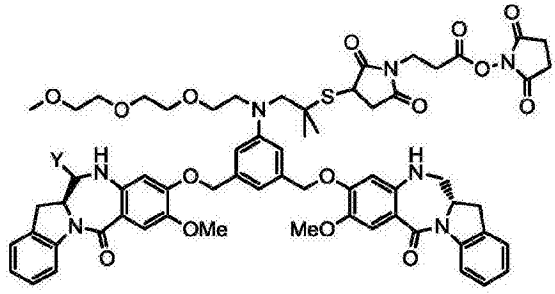
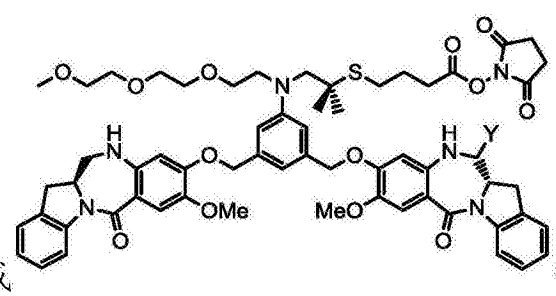
或其药学上可接受的盐，

其中Y是$-SO_3M$；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

61.根据权利要求55所述的方法，其中L'由下式表示：

$-NR^e-[CR_{1"}R_{2"}]_a-S-Cy-[CR_{3"}R_{4"}]_b-COE$。

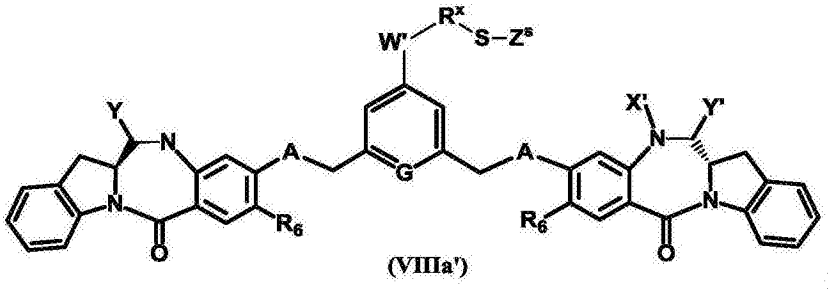
62.根据权利要求47所述的方法，其中所述第二修饰细胞毒性化合物是：


，或

，

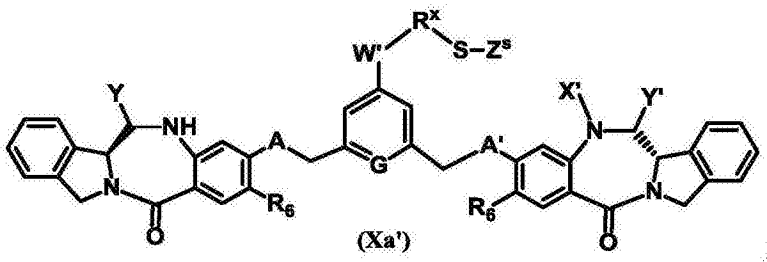
或其药学上可接受的盐，

其中Y是$-SO_3M$，且M是-H或药学上可接受的阳离子。

63.根据权利要求43所述的方法，其中所述第二修饰细胞毒性化合物由下式中的任一者或其药学上可接受的盐表示：



(VIIIa')，或



(Xa')；

其中：

Y选自-SO_3M、-SO_2M或-OSO_3M；

M是-H或药学上可接受的阳离子；

X'选自-H，-OH，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，以及氨基保护基团；

Y'选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

A和A'选自-O-和-S-；

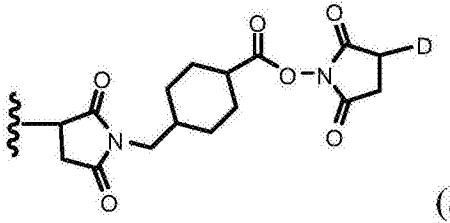
W'不存在或选自-O-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-或-CH_2-S-、-CH_2NR^e-；

R^x不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

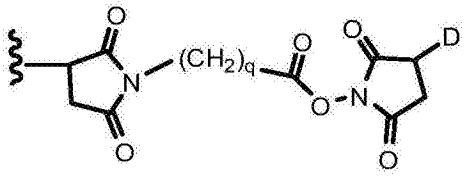
R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基-NHR^{101}或叔氨基-$NR^{101}R^{102}$基团或5或6元含氮杂环，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

G选自-CH-或-N-；

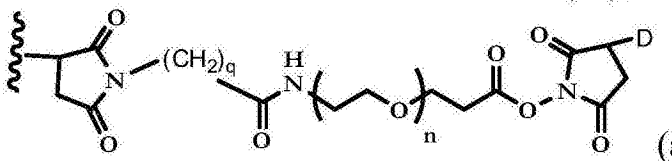
Z^s选自下式中的任一者：



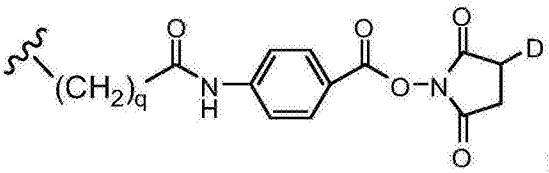
(a1);



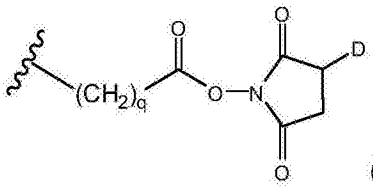
(a2);



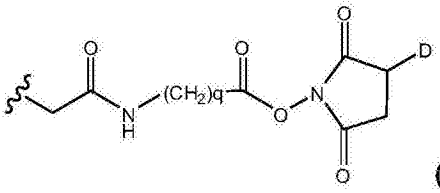
(a3);



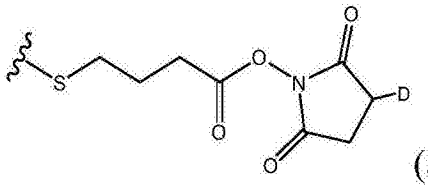
(a4);



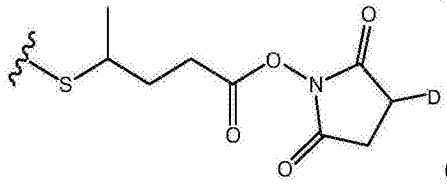
(a5);



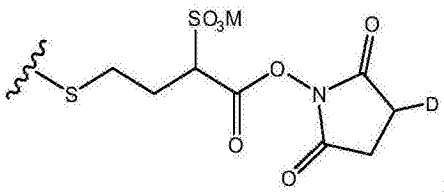
(a6);



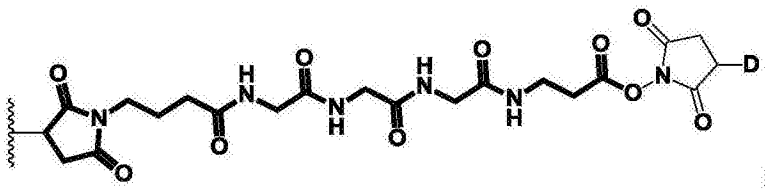
(a7);



(a8);



(a9)，和



(a10)，

其中：

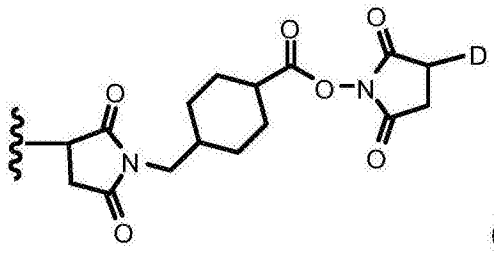
q是1至5的整数；

n是2至6的整数；

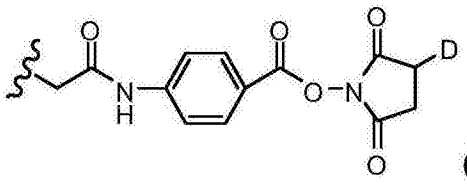
D是-H或-SO_3M；

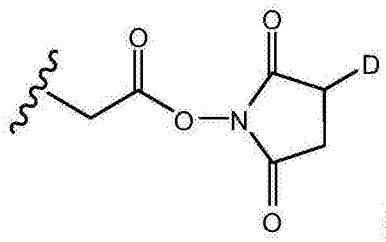
M是-H或药学上可接受的阳离子。

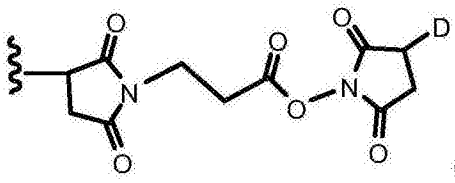
64.根据权利要求63所述的方法，其中Z^s由下式中的任一者表示：

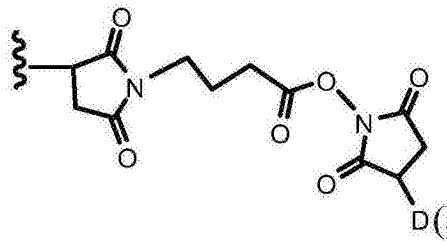


(a1);


(a4');


(a5');


(a12);


(a13)。

65.根据权利要求63所述的方法，其中W'是-N(R^e)-。

66.根据权利要求65所述的方法，其中R^e是-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

67.根据权利要求66所述的方法，其中R^k是-H或-Me。

68.根据权利要求67所述的方法，其中R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

69.根据权利要求67所述的方法，其中R^x是-(CH_2)$_p$-(CR^fR^g)-，其中R^f和R^g各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且p是0、1、2或3。

70.根据权利要求69所述的方法，其中R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

71.根据权利要求67所述的方法，其中：

Y是-SO_3M；

M是-H或药学上可接受的阳离子；

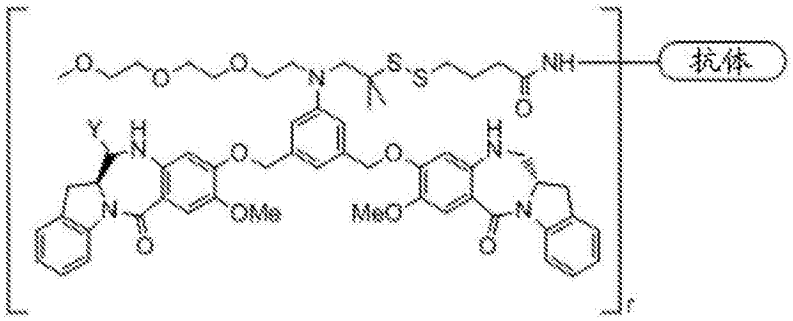
X'和Y'均是-H；

A和A'均是-O-；

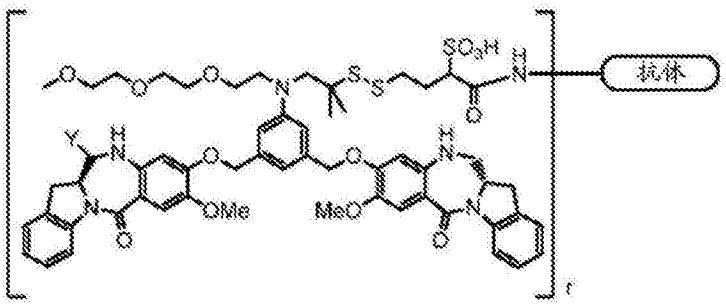
R_6是-OMe；且

R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

72.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中所述缀合物为：



，或



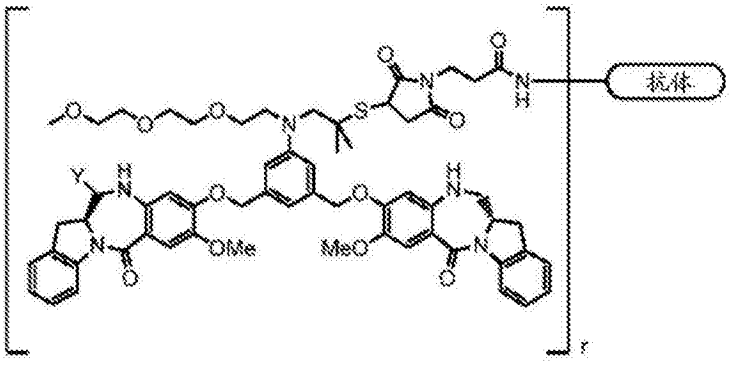
，

或其药学上可接受的盐，

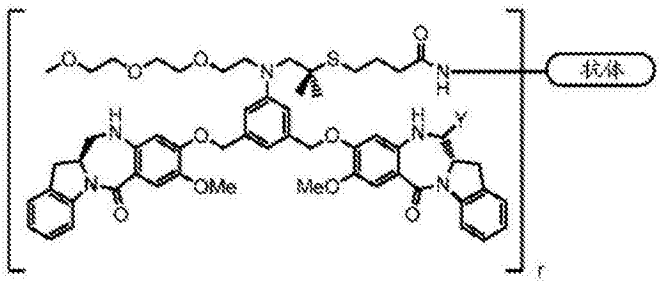
其中r是1至10的整数，Y是-SO_3M；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

73.根据权利要求72所述的方法，其中所述抗体是huMy9-6。

74.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中所述缀合物是：



，或



，

或其药学上可接受的盐，

其中r是1至10的整数，Y是-SO_3M；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

75.根据权利要求74所述的方法，其中所述抗体是huMy9-6。

76.根据权利要求72所述的方法，其中M是-H、Na^+或K^+。

77.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中W是C＝O。

78.根据权利要求77所述的方法，其中Z和Z'是-CH_2-。

79.根据权利要求78所述的方法，其中X'选自-H，-OH，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，以及氨基保护基团。

80.根据权利要求79所述的方法，其中X'是-H、-OH、或Me。

81.根据权利要求80所述的方法，其中X'是-H。

82.根据权利要求80所述的方法，其中Y'选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。

83.根据权利要求82所述的方法，其中Y'是-H或氧代基团。

84.根据权利要求83所述的方法，其中Y'是-H。

85.根据权利要求83所述的方法，其中A和A'相同或不同，且选自-O-、-S-、-N(R_5)-和氧代(C＝O)。

86.根据权利要求85所述的方法，其中A和A'相同或不同，且选自-O-和-S-。

87.根据权利要求86所述的方法，其中A和A'是-O-。

88.根据权利要求86所述的方法，其中D和D'相同或不同，且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$，其中n是1至24的整数，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-NR'COR"、-SR和-COR'的取代基取代。

89.根据权利要求88所述的方法，其中D和D'是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。

90.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中：

W是C＝O；

R_1、R_2、R_1'、R_2'、R_4和R_4'是-H；

R_3或R_3'中的一者是-H；

R_6是-OMe；

Z和Z'是-CH_2-；

X'是-H；

Y'是-H；且

A和A'是-O-。

91.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中所述缀合物包含1-10种细胞毒性化合物或修饰的细胞毒性化合物，各个细胞毒性化合物或修饰的细胞毒性化合物通过连接基团与所述CBA连接，且所述缀合物上的各个细胞毒性化合物或修饰的细胞毒性化合物是相同的。

92.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中所述细胞结合剂结合至选自肿瘤细胞、病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自身免疫细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞或黑素细胞的靶细胞；表达的CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA，或Her-2抗原；Her-3抗原的细胞；或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体和叶酸受体的细胞。

93.根据权利要求92所述的方法，其中所述细胞结合剂是抗体、特异性结合于靶细胞的

抗体片段，淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子或营养转运分子。

94.根据权利要求93所述的方法，其中所述细胞结合剂是嵌合抗体、特异性结合于靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、或特异性结合于靶细胞的结构域抗体片段。

95.根据权利要求93所述的方法，其中所述细胞结合剂是表面重构抗体、表面重构单链抗体或表面重构抗体片段。

96.根据权利要求93所述的方法，其中所述细胞结合剂是单克隆抗体、单链单克隆抗体或其单克隆抗体片段。

97.根据权利要求93所述的方法，其中所述细胞结合剂是人源化抗体、人源化单链抗体或人源化抗体片段。

98.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中所述亚胺反应剂选自亚硫酸盐、羟胺、肼和脲。

99.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法，其中所述亚胺反应剂是$NaHSO_3$或$KHSO_3$。

100.根据权利要求99所述的方法，其中对含有亚胺的细胞毒性化合物使用0.1至30摩尔当量的亚胺反应剂。

101.根据权利要求99所述的方法，其中对含有亚胺的细胞毒性化合物使用1至10摩尔当量的亚胺反应剂。

102.根据权利要求99所述的方法，其中对含有亚胺的细胞毒性化合物使用3至5摩尔当量的亚胺反应剂。

103.根据权利要求36所述的方法，其中所述双官能交联剂选自：4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-氨基己酸酯)(LC-SMCC)、κ-马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、γ-马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α-马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SMPB)、N-(对马来酰亚氨基苯基)异氰酸酯(PMPI)、N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA)，溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBA)和3-(溴代乙酰氨基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBAP)、双-马来酰亚胺聚乙二醇(BMPEO)、$BM(PEO)_2$、$BM(PEO)_3$、N-(β-马来酰亚胺丙基氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、5-马来酰亚胺戊酸NHS、HBVS、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酰肼·HCl(MPBH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺己烷(BMH)、双-马来酰亚胺乙烷(BMOE)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ-马来酰亚胺丁基氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ε-马来酰亚胺己酰氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ-马来酰亚胺十一烷氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMPB)、CX1-1、磺基-Mal、PEG_n-Mal、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-

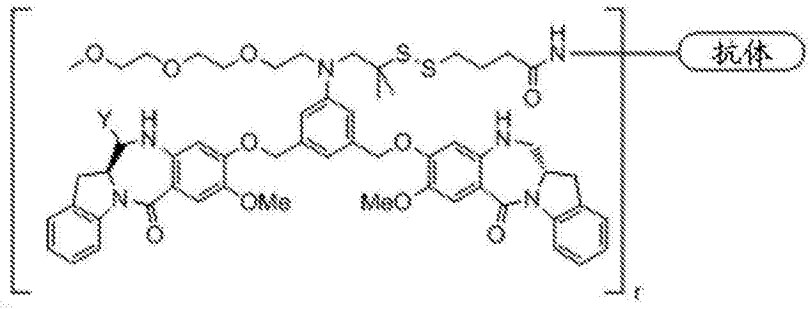
(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、和N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)2-硫代丁酸酯(磺基-SPDB)。

104.根据权利要求103所述的方法,其中所述双官能交联剂选自SMCC、磺基-SMCC、BMPS、GMBS、SIA、SIAB、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯、双-马来酰亚胺己烷或BMPEO。

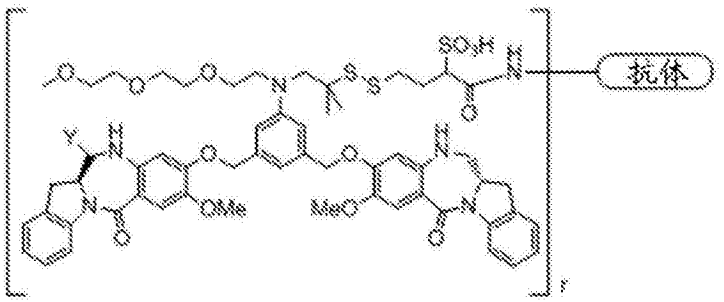
105.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法,其中所述缀合物经正切流动过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀、非吸附过滤或其组合而纯化。

106.根据权利要求1、8、12和36中任一项所述的方法,其中所述缀合物经正切流动过滤和/或吸附色谱法而纯化。

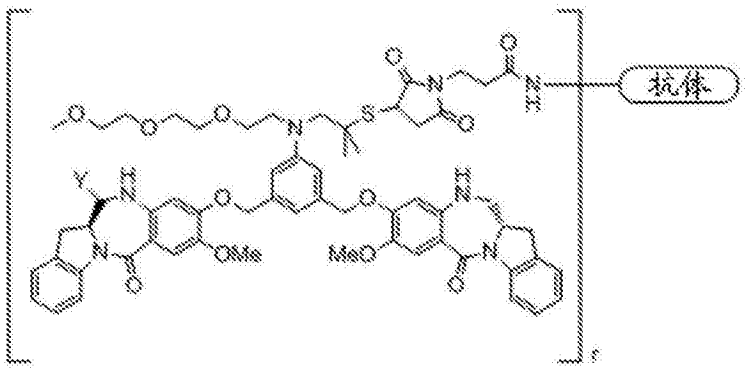
107.一种方法,其用于制备下式的缀合物或其药学上可接受的盐:



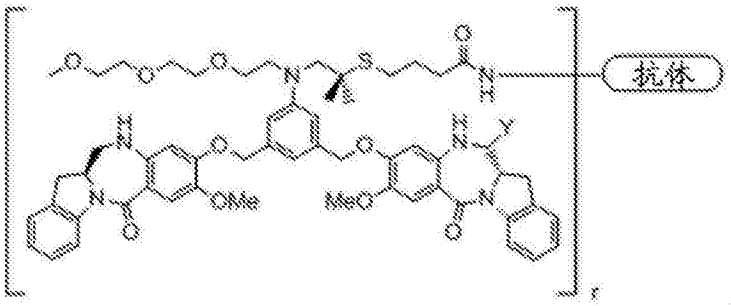
,



,

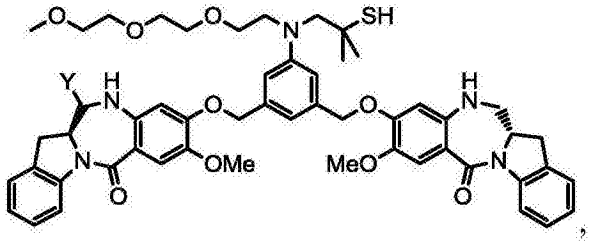


, 或



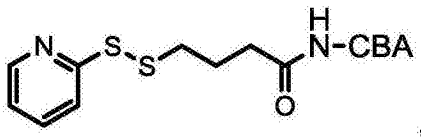
，

所述方法包括将下式修饰的细胞毒性化合物或其药学上可接受的盐

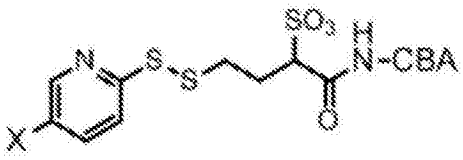


，

在pH4至9下，分别与下式的修饰的CBA反应，

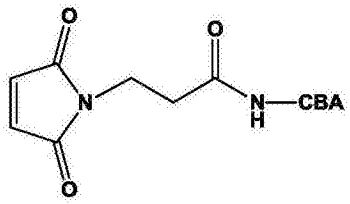


，

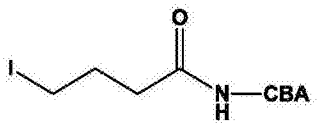


X = -H 或 -NO2

，



，



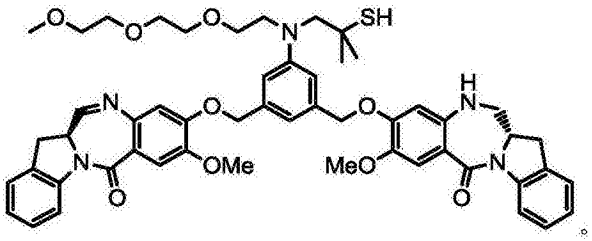
，

其中：

r是1至10的整数；且

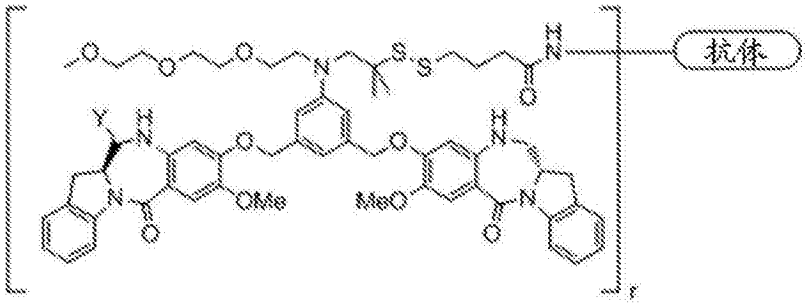
Y是-SO_3M；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

108.根据权利要求107所述的方法，其中所述修饰的细胞毒性化合物通过使亚胺反应剂与下式含有亚胺的细胞毒性化合物反应而产生：

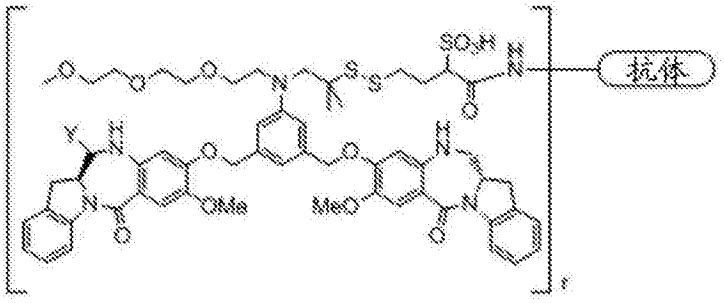


109.根据权利要求108所述的方法，其中所述CBA是huMy9-6。

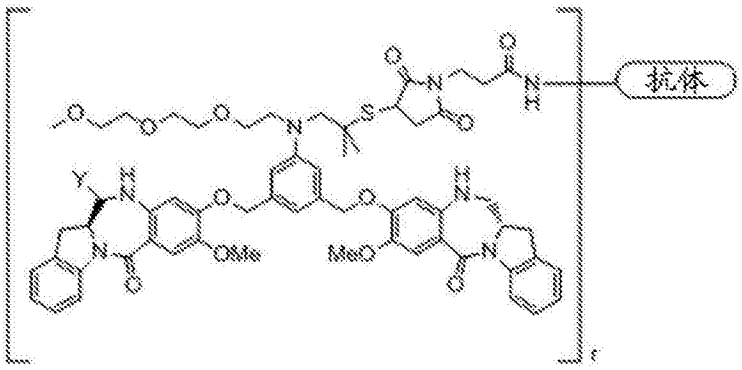
110.一种方法，其用于制备下式的缀合物或其药学上可接受的盐：



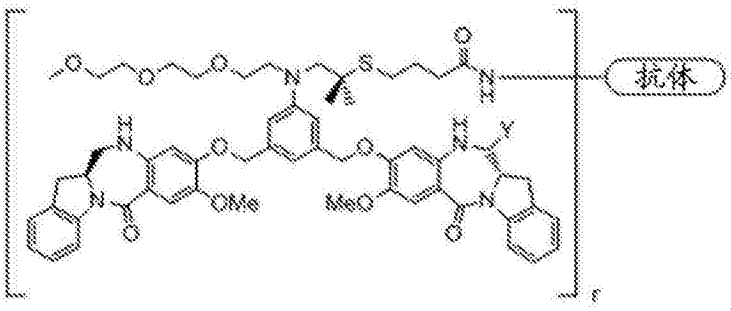
，



，



，或



，

所述方法包括使CBA与含有亚胺的细胞毒性化合物、亚胺反应剂和包含连接基团的双

官能交联剂反应以形成缀合物，

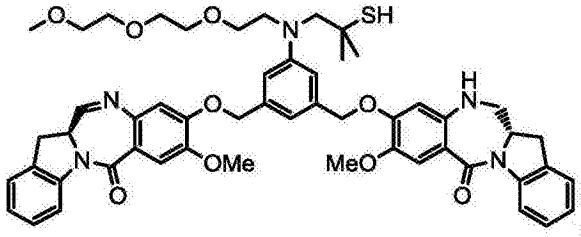
其中：

Y是-SO_3M；

M是-H或药学上可接受的阳离子；

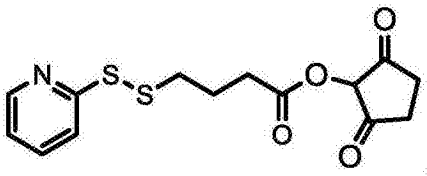
r是1至10的整数；

含有亚胺的细胞毒性化合物是：

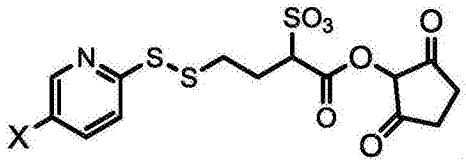


或其药学上可接受的盐；

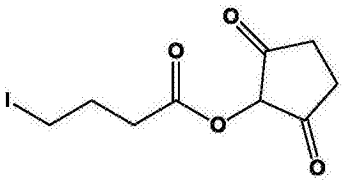
双官能交联剂分别是：



，

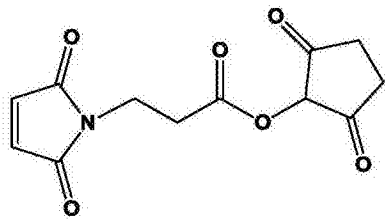


，



且

，



，或

亚胺反应剂是亚硫酸盐，其中X是-H或-NO_2。

111.根据权利要求110所述的方法，其中所述CBA是huMy9-6。

缀合物的制备方法

[0001] 参考相关申请

[0002] 本申请要求提交于2011年2月15目的美国临时申请No.61/443,062、提交于2011年5月6目的美国临时申请No.61/483,499和提交于2011年2月15日的美国临时申请No.61/443,092在35u.s.c.§119(e)下的提交日期的权益,其全部内容(包括所有附图、化学式、说明书和权利要求)通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明描述亚胺反应剂用于制备细胞结合剂与含有一个或多个亚胺官能团的DNA-结合细胞毒性药物的缀合物的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 单克隆抗体越来越多地被开发为癌症的治疗剂。几种针对癌细胞表面抗原的单克隆抗体已得到批准用于癌症治疗,例如利妥昔单抗用于非霍奇金淋巴瘤、曲妥珠单抗用于乳腺癌、西妥昔单抗用于头颈和结直肠癌、西妥昔单抗、帕尼单抗(panitimumab)和贝伐单抗用于结直肠癌,以及阿仑珠单抗用于慢性淋巴细胞白血病(Strome,S.E.,SausviUe E.A.和Mann,D.,2007,The Oncologist,12,1084-1095)。然而,“裸露”抗体的细胞毒性活性可被限制于受体功能抑制、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的机制。

[0006] 一种增强面向靶癌细胞的抗体的细胞毒性活性的方法是将抗体与细胞毒性效应子连接(A.D.Ricart,和A.w.Tolcher,2007,Nat.Clin.Pract.Oncol.4,245-255;Lambert,J.,2010,Drugsofthe Future35,471-480)。抗体-细胞毒性药物缀合物(ADC)特异结合于癌细胞,然后缀合物内化和降解,这导致细胞内有毒药物的释放并最终导致癌细胞死亡。已用于与抗体连接的细胞毒性药物包括抗微管蛋白药物(诸如美登素类(maytansinoids)和奥瑞他汀类(auristatins))、DNA-结合药物(诸如引起序列特异性的双链DNA裂解的加利车霉素(calicheamicin))。另一类DNA-结合细胞毒性药物包括含有亚胺吡咯并苯并二氮杂䓬(PBD)诸如N-2-咪唑基烷基取代的1,2,5-苯并噻二嗪-1,1-二氧化物,美国专利No.6,156,746)、苯并-吡啶并或二吡啶并硫二氮杂䓬(WO2004/069843)、吡咯并[1,2-b][1,2,5]苯并硫二氮杂䓬和吡咯[1,2-b][1,2,5]苯并二氮杂䓬衍生物(WO2007/015280)、托马霉素(tomaymycin)衍生物(如,吡咯并[1,4]苯并二氮杂䓬),诸如描述于WO00/12508、WO2005/085260、WO2007/085930、EP2019104和美国专利No.6,156,746中的那些)。其它DNA-结合苯二氮䓬类药物描述于美国专利公布No.2010/0203007A1中。这些含有亚胺键的苯二氮䓬类药物结合于DNA的小沟并干扰DNA的功能,导致细胞死亡。

[0007] 需要新方法用于制备细胞结合剂和具有亚胺基团的细胞毒性药物的缀合物。

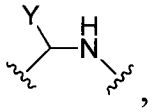
[0008] 发明概述

[0009] 本发明描述使用亚胺反应剂用于处理含有亚胺药物,这导致了其与细胞结合剂(CBA)诸如抗体结合反应的出人意料的改善。该试剂使得药物的细胞杀伤性能没有降低且完全保持了CBA(抗体)的完整性。

[0010] 在一个实施方案中，本发明涉及制备缀合物的方法，所述缀合物包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)，所述方法包括使细胞毒性化合物在pH约4至约9下与修饰的CBA反应，其中：

[0011] a)修饰的CBA包含键合于CBA的双官能交联剂的残基，且所述残基包含连接基团和硫醇反应性基团；且

[0012] b)细胞毒性化合物包含硫醇基团和由下式表示的基团：

[0013]  ，

[0014] 其中：

[0015] Y是离去基团，且是亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2^-或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯($(R^iO)_2PS(OR^i)$)、R^iS-、R^iSO、R^1SO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐($HS_2O_3^-$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐($HS_2O_4^-$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

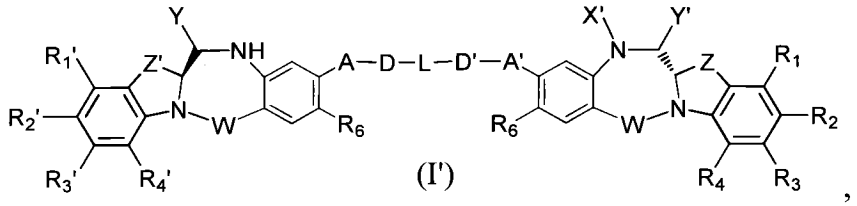
[0016] 在某些实施方案中，细胞毒性化合物通过使具有硫醇基的含有亚胺的细胞毒性化合物与亚胺反应剂反应而产生。

[0017] 在另一实施方案中，本发明涉及制备缀合物的方法，所述缀合物包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)，所述方法包括使CBA与含有亚胺的细胞毒性化合物、亚胺反应剂和包含连接基团的双官能交联剂反应以形成缀合物。

[0018] 在另一实施方案中，本发明涉及制备缀合物的方法，所述缀合物包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)，所述方法包括：

[0019] a)使细胞毒性化合物与双官能交联剂(包含连接基团、与CBA反应性的基团(诸如硫醇基、马来酰亚胺基、卤代乙酰胺基或胺基)及与细胞毒性化合物反应性的基团)反应，以形成共价键合于双官能交联剂残基的修饰的细胞毒性化合物，其中该残基包括连接基团和与CBA反应性的基团；

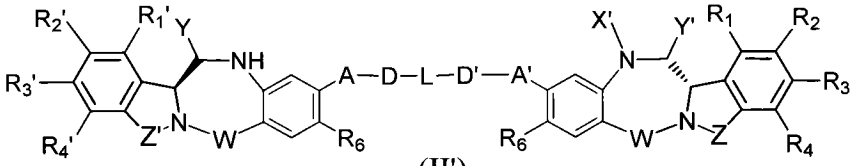
[0020] 其中该细胞毒性化合物由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示：



(I')

,

[0021]



(II')

，且，

[0022] 其中：

[0023] Y是离去基团，且是亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2^-或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^ISO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；

[0024] X'选自-H，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，以及任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0025] Y'选自-H、氧代基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

[0026] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基；

[0027] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-R^c$，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，$-NO_2$，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由$-SO_2R'$表示的砜，磺酸盐$-SO_3^-M^+$，硫酸盐$-OSO_3^-M^+$，由$-SO_2NR'R"$表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"；

[0028] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0029] R'和R"各自独立地选自-H,-OH,-OR,-NHR,-NR_2,-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环;

[0030] n是1至24的整数;

[0031] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2;

[0032] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素;

[0033] Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-;

[0034] n'和na'相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0035] R_7和R_8相同或不同,且各自独立地选自-H,-OH,-SH,-COOH,-NHR',聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0036] R_9独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-;

[0037] A和A'相同或不同,且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-,

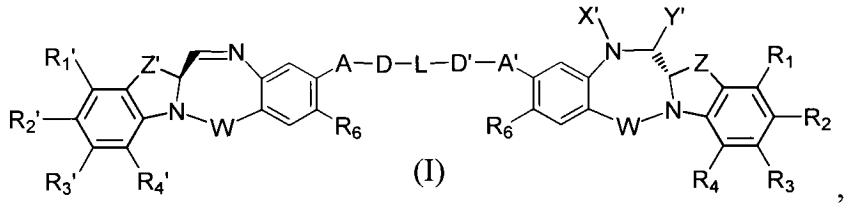
[0038] 每次出现时,R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基;

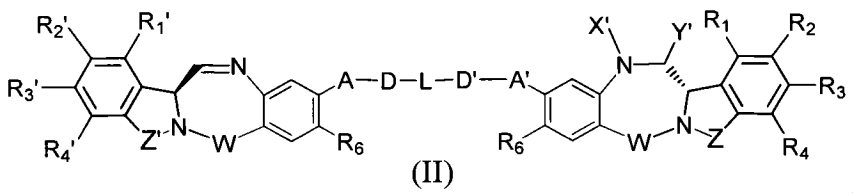
[0039] D和D'相同或不同,且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-;

[0040] L不存在,或当存在时,包含硫醇基或为聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基,苯基,具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环,其中烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代;且,

[0041] b)使修饰的细胞毒性化合物在pH约4至约9下通过与CBA反应性的基团与CBA反应以形成缀合物。

[0042] 在上述任一实施方案中,含有亚胺的细胞毒性化合物可由下式中的任一者或其药学上可接受的盐表示:

[0043] 
(I)
,


(II)
,

[0044] 其中:

[0045] X'选自-H,氨基保护基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,以及任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0046] Y'选自-H、氧代基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;

[0047] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基;

[0048] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c,卤素,胍基[-NH(C=NH)NH_2],-OR,-NR'R",-NO_2,-NCO,-NR'COR",-SR,由-SOR'所表示的亚砜,由-SO_2R'所表示的砜,磺酸盐-$SO_3^-M^+$,硫酸盐-$OSO_3^-M^+$,由-SO_2NR'R"所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基,-COR',-OCOR',-OCONR'R"和连接基团;

[0049] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0050] R'和R"各自独立地选自-H,-OH,-OR,-NHR,-NR_2,-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环;

[0051] n是1至24的整数;

[0052] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2;

[0053] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素;

[0054] Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-;

[0055] n'和na'相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0056] R_7和R_8相同或不同,且各自独立地选自-H,-OH,-SH,-COOH,-NHR',聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0057] R_9独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-;

[0058] A和A'相同或不同,且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-,

[0059] 每次出现时,R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基;

[0060] D和D'相同或不同,且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-;

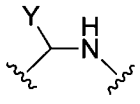
[0061] L不存在,或当存在时,包含硫醇基,且是聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-,具有1至10个

碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代。

[0062] 在又一实施方案中，本发明涉及制备包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)的缀合物的方法，所述方法包括使修饰的细胞毒性化合物在pH约4至约9下与CBA反应，其中所述修饰的细胞毒性化合物包含：

[0063] a)键合于所述细胞毒性化合物的双官能交联剂的残基，且所述残基包含连接基团和选自反应性酯和硫醇反应性基团的反应性基团，以及，

[0064] b)由下式表示的基团：

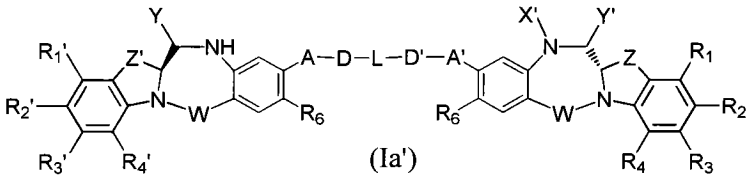
[0065]  ，

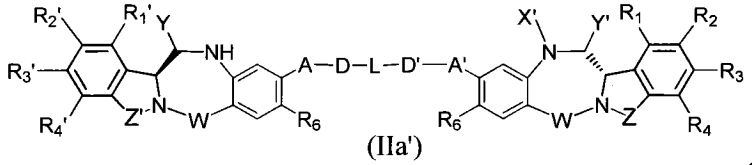
[0066] 其中：

[0067] Y是离去基团，且是亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯($(R^iO)_2PS(OR^i)$)、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐($HS_2O_3^-$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐($HS_2O_4^-$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

[0068] 在某些实施方案中，修饰的细胞毒性化合物通过将亚胺反应剂与具有连接基团和反应性基团的含有亚胺的细胞毒性化合物反应而产生。

[0069] 在上述任一实施方案中，修饰的细胞毒性化合物由下式中的任一者

[0070] 
(Ia')，


(IIa')，

[0071] 或其药学上可接受的盐表示，其中：

[0072] Y是亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、

PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；

[0073] X'选自-H，氨基保护基团，具有键合至其的反应性基团的连接基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0074] Y'选自-H、氧代基团、具有键合至其的反应性基团的连接基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

[0075] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基，或具有键合至其的反应性基团的连接基团；

[0076] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-R^c$，卤素，胍基[$-NH(C=NH)NH_2$]，-OR，-NR'R"，$-NO_2$，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'所表示的亚砜，由$-SO_2R'$所表示的砜，磺酸盐$-SO_3^-M^+$，硫酸盐$-OSO_3^-M^+$，由$-SO_2NR'R"$所表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"和具有键合至其的反应性基团的连接基团；

[0077] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0078] R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，$-NR_2$，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0079] n是1至24的整数；

[0080] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

[0081] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、$-NO_2$、卤素或具有键合至其的反应性基团的连接基团；

[0082] Z和Z'独立地选自$-(CH_2)_{n'}-$、$-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$、$-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$、$-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$和$-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$；

[0083] n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

[0084] R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元-

$(OCH_2CH_2)_n$-，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0085] R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-；

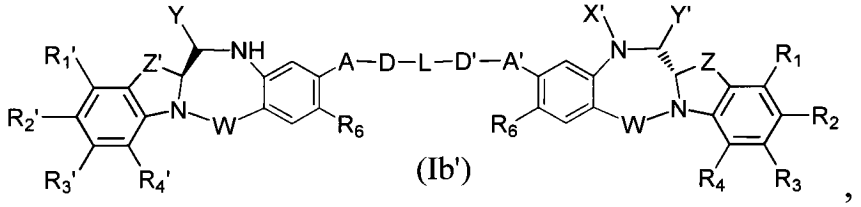
[0086] A和A'相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR_5和-CRR'$N(R_5)$-；

[0087] 每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

[0088] D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，和聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-；

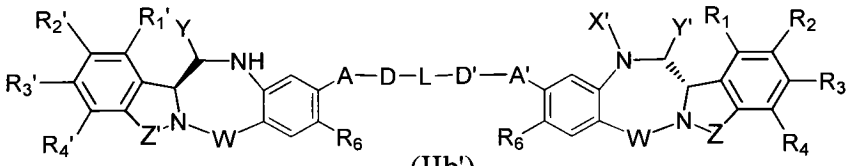
[0089] L不存在，为具有键合至其的反应性基团的连接基团，聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基为任选被具有键合至其的反应性基团的连接基团取代；苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代，其中所述取代基可以是具有键合至其的反应性基团的连接基团。

[0090] 在上述任一实施方案中，细胞毒性化合物和缀合物的连接基团由下式中的任一者



(Ib')，

[0091]



(IIb')，

[0092] 或其药学上可接受的盐表示，其中：

[0093] Y是离去基团，且是亚硫酸盐(HSO_3、HSO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}$C(=O)NOH或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自-$N(R^j)_2$、-CO_2H、-SO_3H和-PO_3H中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；

[0094] X'选自-H,氨基保护基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0095] Y'选自-H,氧代基团,连接基团,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,任选取代的6至18元芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环;

[0096] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基或连接基团;

[0097] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c,卤素,胍基[-NH(C=NH)NH_2],-OR,-NR'R",-NO_2,-NCO,-NR'COR",-SR,由-SOR'所表示的亚砜,由-SO_2R'所表示的砜,磺酸盐-$SO_3^-M^+$,硫酸盐-$OSO_3^-M^+$,由-SO_2NR'R"所表示的磺酰胺,氰基,叠氮基,-COR',-OCOR',-OCONR'R"和连接基团;

[0098] M是-H或药学上可接受的阳离子诸如Na^+;

[0099] 每次出现时,R独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c,任选取代的具有6至18个碳原子的芳基,任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环,或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环;

[0100] R'和R"各自独立地选自-H,-OH,-OR,-NHR,-NR_2,-COR,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c,和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环;

[0101] n是1至24的整数;

[0102] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2;

[0103] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2、卤素或连接基团;

[0104] Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-;

[0105] n'和na'相同或不同,且选自0、1、2和3;

[0106] R_7和R_8相同或不同,且各自独立地选自-H,-OH,-SH,-COOH,-NHR',聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽单元,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0107] R_9独立地选自-H,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基,聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-;

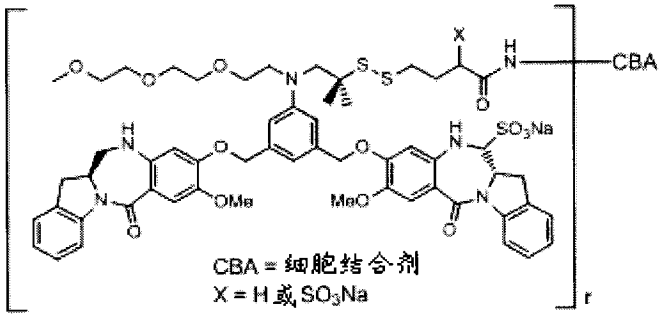
[0108] A和A'相同或不同,且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-,

[0109] 每次出现时,R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基;

[0110] D和D'相同或不同,且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,和聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)n-;

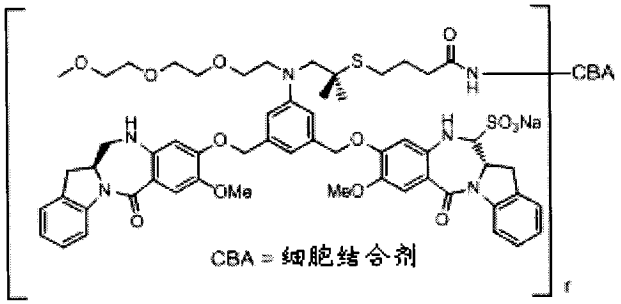
[0111] L不存在，为连接基团，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-$，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基或烯基任选地被连接基团取代；苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代，其中所述取代基可包括连接基团。

[0112] 可根据本发明中任一方法制备的若干优选的缀合物包括：

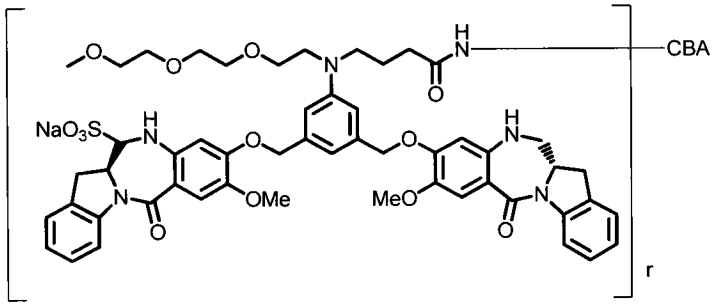


，

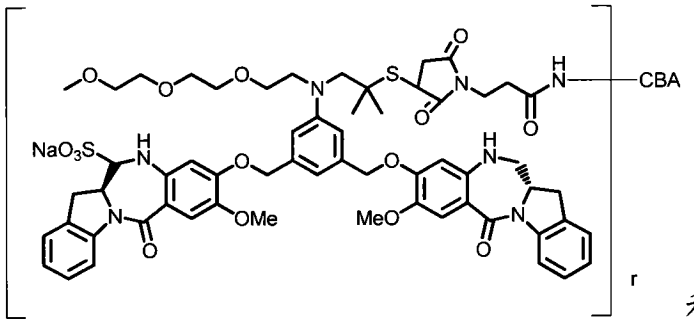
[0113]



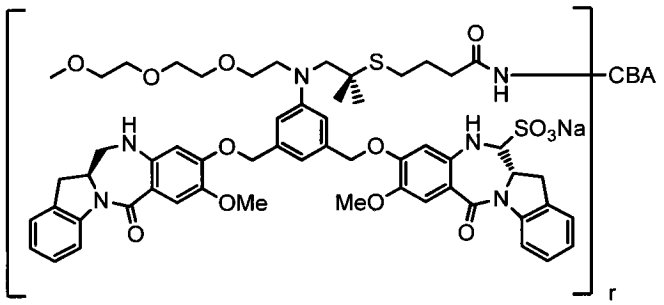
，



，

[0114] 

和



，

[0115] 其中CBA是细胞结合剂，诸如抗体，且r是1-20之间，优选1-10或1-5之间的整数。

[0116] 如本文所用，当提到基团时（如，R^c、L、X'等）"是/为"（或"不是"）连接基团或具有键合至其的反应性基团的连接基团，其意指该基团"包含"（或"不包含"）连接基团或具有键合至其的反应性基团的连接基团。

[0117] 附图简述

[0118] 图1示出在不含和含有亚硫酸氢盐下制备的去糖基化的huMy9-6-2缀合物的质谱，其分别含有1.4DAR(A)和3.1DAR(B)。DAR:药物抗体比率。

[0119] 图2示出在不含和含有亚硫酸氢钠下制备的HuMy9-6-药物2缀合物对表达CD33-抗原的HL60细胞的类似的体外细胞毒性。

[0120] 图3示出在不含和含有亚硫酸氢钠下制备的抗-CD22Ab-药物2缀合物对表达CD22-抗原的BJAB细胞的类似的体外细胞毒性。

[0121] 图4示出药物2和经亚硫酸氢钠处理的药物2的反相HPLC分析。

[0122] 图5示出在含有或不含亚硫酸氢钠下使用7摩尔当量的1/抗体来制备的去糖基化的huMy9-6-SPDB-药物1的MS分析。A)在不含亚硫酸氢钠下制备的缀合物，其药物1/Ab平均值为1.4并且抗体种类为具有多达三个连接的药物1分子。B)在含有亚硫酸氢钠下制备的缀合物，其1/Ab平均值为2.5并且抗体种类为具有多达七个连接的药物1分子。

[0123] 图6示出向药物1的缀合反应加入亚硫酸氢钠不会导致抗体的片段化(非还原性SDS-PAGE;凝胶芯片分析)。

[0124] 图7-11示出用于制备细胞结合剂-药物缀合物的本发明的示例性方法。

[0125] 图12示出通过将含有1NHS酯的化合物直接缀合于抗体赖氨酸(一步试剂法)或将化合物1d缀合于二硫代吡啶修饰的抗体(两步法)而制得的去糖基化My9-6-SPDB-1的质谱(MS)分析。

[0126] 图13示出在不同pH条件下使用两步法制得的My9-6-磺基-SPDB-1的MS数据。增加的反应时间似乎与在HL60-QC细胞上测量的增加的CD33抗原非依赖性体外细胞毒性相关

联，该HL60-QC细胞用1μM未缀合的huMy9-6预处理。抗原依赖性杀伤力对所有缀合物为同样高(～4pM IC_{50})。优选短反应时间(1-3h)以将抗体片段化和对My9-6-磺基-SPDB-1的体外非特异性细胞杀伤力降至最低。

[0127] 图14示出在不同的化合物1d/连接子比率下使用两步法制得的chKTI-磺基-SPDB-1的MS数据。

[0128] 图15示出使用共价亚胺反应物来提高Ab-药物缀合物规格(单体%和药物负荷)。

[0129] 图16示出代表性抗体-药物缀合物的两步合成方案。

[0130] 图17示出huMy9-6-SPDB-1f缀合物对各种细胞系的体外细胞毒性和特异性。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0131] 图18示出二聚体的缀合不会降低抗体的结合亲和力。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0132] 图19示出huMy9-6缀合物的体内抗肿瘤活性。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0133] 图20示出huMy9-6-SPDB-1缀合物对抗原阳性细胞的体外细胞毒性。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0134] 图21示出huMy9-6-SPDB-1f(A)、huMy9-6-磺基SPDB-1f(B)和huMy9-6-BMPS-1f(C)对阻断和未阻断抗原结合位点的HL60/QC(Ag^+)细胞的体外细胞毒性。注意，在所有三个试验(34A、34B和34C)中均向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0135] 图22示出chB38.1-SPDB-1f(A)和chB38.1-磺基SPDB-1f(B)对COLO205(Ag^+)细胞的体外细胞毒性。注意，在两个试验中均向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0136] 图23示出huMy9-6-SPDB-1f在具有HL60/QC小鼠的体内效力。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠。

[0137] 图24示出通过比较(A)huMy9-6-SPDB-1f、(B)huMy9-6-磺基SPDB-1f和(C)huMy9-6-BMPS-1f对阻断或未阻断抗原结合位点的OCI-AML3(Ag^+)细胞的抗增殖活性。注意，在所有三个试验中均向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0138] 图25示出huMy9-6-BMPS-1f在具有MOLM-13肿瘤的小鼠的体内效力。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0139] 图26示出磺化叶酸/细胞毒性化合物缀合物的代表性合成方案。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0140] 图27示出huMy9-6-药物2在具有MOLM-13肿瘤的小鼠中的体内效力。注意，向缀合反应中加入亚硫酸氢钠用于制备缀合物。

[0141] 图28示出使用高反应性的4-硝基Py-磺基-SPDB连接子制备huMy9-6-磺基-SPDB-1d。

[0142] 发明详述

[0143] 现在将详细参考本发明的某些实施方案，在附随的结构和式中阐明本发明的实例。尽管将结合所列举的实施方案来描述本发明，但应理解，它们并非旨在将本发明限制于那些实施方案中。相反，本发明旨在涵盖所有的备选方案、修改和等效物，它们可如由权利要求所定义的那样包括在本发明的范围内。本领域技术人员将认识到许多方法和材料与本文描述的那些类似或等效，可将这些方法和材料用于本发明的实践。

[0144] 应当理解，包括在本发明的不同方面(如，化合物、化合物-连接分子、缀合物、组合物、制备和使用方法)和说明书的不同部分(包括仅在实施例中描述的实施方案)所描述的那些在内的本文所述的任何实施方案，可与本发明的一种或多种其它实施方案组合，除非明确地排除或不适当。实施方案的组合不限于经由多个从属权利要求所要求的那些特定的组合。

[0145] 定义

[0146] 本文使用的“直链或支链烷基”是指1至20个碳原子的饱和直链或支链单价烃基。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、1-丁基、2-甲基-1-丙基、-$CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基、2-甲基-2-丙基、1-戊基、2-戊基3-戊基、2-甲基-2-丁基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基)、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基、3,3-二甲基-2-丁基、1-庚基、1-辛基等。优选地，烷基具有1至10个碳原子。更优选地，烷基具有1至4个碳原子。

[0147] “直链或支链烯基”是指具有至少一个不饱和位点(即，碳-碳双键)的2至20个碳原子的直链或支链单价烃基，其中该烯基包括具有“顺式”和“反式”取向，或者可选地，具有“E”和“Z”取向的基团。实例包括但不限于亚乙烷基(ethylenyl)或乙烯基(-$CH=CH_2$)、烯丙基(-$CH_2CH=CH_2$)等。优选地，烯基具有2至10个碳原子。更优选地，烷基具有2至4个碳原子。

[0148] “直链或支链炔基”是指具有至少一个不饱和位点(即，碳-碳三键)的2至20个碳原子的直链或支链单价烃基。实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、己炔基等。优选地，炔基具有2至10个碳原子。更优选地，炔基具有2至4个碳原子。

[0149] 术语“碳环(carbocycle)”、“碳环基”和“碳环(carbocyclic ring)”是指具有3至12个碳原子作为单环或7至12个碳原子作为双环的单价非芳族、饱和或部分不饱和的环。具有7至12个原子的双环碳环可排列为，例如，双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统，而具有9或10个环原子的双环碳环可排列为双环[5,6]或[6,6]系统或排列为桥环系统诸如双环[2.2.1]庚烷、双环[2.2.2]辛烷和双环[3.2.2]壬烷。单环碳环的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环己二烯基、环庚基、环辛基、环壬基、环癸基、环十一烷基、环十二烷基等。

[0150] 术语“环烷基(cyclic alkyl)”和“环烷基(cycloalkyl)”可互换使用。它们是指单价饱和碳环基团。优选地，环烷基是3至7元单环基团。更优选地，环烷基是环己基。

[0151] 术语“环烯基”是指在环结构中具有至少一个双键的碳环基团。

[0152] 术语“环炔基”是指在环结构中具有至少一个三键的碳环基团。

[0153] “芳基”意指从母体芳族环系统的单个碳原子上去除一个氢原子而得到的6-18个碳原子的单价芳族烃基。一些芳基在示例性结构中表示为“Ar”。芳基包括含有稠合于饱和、部分不饱和环或芳族碳环或杂环的双环基团。典型的芳基包括但不限于来自于苯(苯基)、取代的苯、萘、蒽、茚基、二氢茚基、1,2-二氢萘、1,2,3,4-四氢萘基等的基团。优选地，芳基是苯基。

[0154] 术语“杂环(heterocycle)”、“杂环基”和“杂环(heterocyclic ring)”在本文中可

互换使用且是指饱和或部分不饱和的(即,环内具有一个或多个双键和/或三键)3至18个环原子的碳环基团,其中至少一个环原子选自氮、氧、磷和硫的杂原子,其余的环原子是C,其中一个或多个环原子任选被下文所述的一个或多个取代基独立地取代。杂环可以是具有3至7个环成员的单环(2至6个碳原子和1至4个选自N、O、P和S的杂原子)或具有7至10个环成员的双环(4至9个碳原子和1至6个选自N、O、P和S的杂原子),例如:双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统。杂环描述于Paquette,Leo A。;"Principles of Modem Heterocyclic Chemistry"(W.A.Benjamin,New York,1968),特别是第1、3、4、6、7和9章;The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A series of Monographs'(John Wiley&Sons,New York,1950年至今),特别是第13、14、16、19和28卷;和J。Am。Chem。Soc。(1960)82:5566。"杂环基"还包括其中杂环基与饱和、部分不饱和环或芳族碳环或杂环稠合的基团。杂环的实例包括但不限于吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶子基、吗啉代、硫代吗啉代、噻噁烷基、哌嗪基、高哌嗪基、氮杂环丁基、氧杂环丁基、硫杂环丁基、高哌啶基、氧杂环庚基、硫杂环庚基、氧氮杂萘基、二氮杂萘基、硫氮杂萘基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氢吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二噁烷基、1,3-二氧戊环基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫戊环基、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡唑烷基咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂二环[3.1.0]己基、3-氮杂二环[4.1.0]庚基和氮杂二环[2.2.2]己基。螺环部分也包括在此定义的范围内。其中环原子被氧代(=O)部分取代的杂环基团的实例是嘧啶酮基和1,1-二氧代-硫代吗啉基。

[0155] 术语"杂芳基"是指5或6元环的单价芳族基团,且包含含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-18个原子的稠环系统(其中至少一者是芳族)。杂芳基的实例是吡啶基(包括,例如2-羟基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基(包括,例如4-羟基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噁唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、二氢吲哚基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、呋咱基、苯并呋咱基、苯并苯硫基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、萘啶基和呋喃吡啶基。

[0156] 该杂环或杂芳基可连接有碳(碳连接的)或氮(氮连接的)(在此类连接可能的情况下)。通过实例而非限制的方式,碳键合的杂环或杂芳基键合于吡啶的2、3、4、5或6位,哒嗪3、4、5或6位,嘧啶的2、4、5或6位,吡嗪的2、3、5或6位,呋喃、四氢呋喃、噻吩(thiofuran)、噻吩(thiophene)、吡咯、四氢吡咯的2、3、4或5位,噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位,异噁唑、吡唑或异噻唑的3,4或5位,氮丙啶的2或3位,氮杂环丁烷的2、3或4位,喹啉的2、3、4、5、6、7或8位,或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。

[0157] 通过实例而非限制的方式,氮键合的杂环或杂芳基连接于氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、二氢吲哚、1H-吲唑的1位,异吲哚或二氢异吲哚的2位,吗啉的4位和咔唑或O-咔啉的9位。

[0158] 存在于杂芳基或杂环基中的杂原子包括诸如NO、SO和SO_2的氧化形式。

[0159] 术语"卤代"或"卤素"是指F、Cl、Br或I。

[0160] 上述的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基

环可任选被一个以上(如,2、3、4、5、6或更多个)取代基取代。

[0161] 如果取代基被描述为被“取代的”,那么非氢取代基代替取代基的碳、氧、硫或氮上的氢取代基。因此,例如,取代的烷基取代基是其中至少一个非氢取代基代替烷基取代基上的氢取代基的烷基取代基。举例而言,单氟烷基是被一个氟代取代基取代的烷基,而二氟烷基是被两个氟代取代基取代的烷基。应该认识到,如果在取代基上存在多于一个的取代基,那么每个非氢取代基可相同或不同(除非另有说明)。

[0162] 如果取代基被描述为“任选取代的”,那么该取代基可以是(1)未被取代的,或(2)被取代的。如果取代基的碳被描述为任选被一系列取代基的一个或多个取代时,那么碳上的一个或多个氢原子(在存在任何氢原子的程度上)可单独地和/或一起被独立选择的任选取代基替换。如果取代基的氮被描述为任选被一系列取代基的一个或多个取代时,那么氮上的一个或多个氢原子(在存在任何氢原子的程度上)可被独立选择的任选取代基替换。一个示例性取代基可表示为-NR'R",其中R'和R"与它们连接的氮原子一起可形成杂环。由R'和R"与它们连接的氮原子一起形成的杂环可部分或完全饱和。在一个实施方案中,杂环由3至7个原子组成。在另一实施方案中,该杂环选自吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、异噁唑基、吡啶基和噻唑基。

[0163] 本说明书中的术语“取代基”、“基团(radical)”和“基团(group)”可互换使用。

[0164] 如果一组取代基统称为任选地被一系列取代基的一个或多个取代时,所述基团可包括:(1)未被取代的取代基,(2)未被任选的取代基取代的可取代的取代基,和/或(3)被一个或多个任选的取代基取代的可取代的取代基。

[0165] 如果取代基被描述为任选地被多达特定数目的非氢取代基取代,那么该取代基可以是(1)未被取代的;或(2)被多达该特定数目的非氢取代基取代或者被多达取代基的可取代位置上的最大数目的取代基取代(以较小者为准)。因此,例如,如果取代基被描述为任选被多达3个非氢取代基取代的杂芳基,那么具有小于3个可取代位置的任何杂芳基将任选地被多达仅与杂芳基所具有的可取代位置一样多的非氢取代基取代。在非限制性实施例中,此类取代基可选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂芳基,杂环基,卤素、胍基[-NH(C=NH)NH_2],$-OR^{100}$,$NR^{101}R^{102}$,$-NO_2$,$-NR^{101}COR^{102}$,$-SR^{100}$,由$-SOR^{101}$表示的亚砜,由$-SO_2R^{101}$表示的砜,磺酸盐$-SO_3M$,硫酸盐$-OSO_3M$,由$-SO_2NR^{101}R^{102}$表示磺酰胺,氰基,叠氮基,$-COR^{101}$,$-OCOR^{101}$,$-OCONR^{101}R^{102}$和聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$,其中M是H或药学上可接受的阳离子(诸如Na^+或K+);R^{101}、R^{102}和R^{103}各自独立地选自H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-R^{104}$,其中n为1至24的整数,具有6至10个碳原子的芳基,具有3至10个碳原子的杂环和具有5至10个碳原子的杂芳基;且R^{104}是H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,其中由R^{100}、R^{101}、R^{102}、R^{103}和R^{104}表示的基团中的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和杂环基任选被一个或多个(如,2、3、4、5、6或更多个)独立地选自卤素、-OH、-CN、NO_2的取代基和具有1至4个碳原子的未取代的直链或支链的烷基取代。优选地,上文描述的任选取代的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、碳环基、芳基、杂环基和杂芳基的取代基包括卤素、-CN、$NR^{102}R^{103}$、$-CF_3$、$-OR^{101}$、芳基、杂芳基、杂环基、$-SR^{101}$、$-SOR^{101}$、$-SO_2R^{101}$和$-SO_3M$。

[0166] 术语“化合物”或“细胞毒性化合物、“细胞毒性二聚体”以及“细胞毒性二聚体化合物”可互换使用。它们旨在包括这样的化合物,对于该化合物而言,其结构式或化学式或生

物学反应性衍生物已公开于本发明或已通过引用并入的结构式或化学式或其任何衍生物。该术语还包括本发明公开的所有式的化合物的立体异构体、几何异构体、互变异构体、溶剂化物、代谢物、盐(如,药学上可接受的盐)和前药及前药盐。该术语还包括任何溶剂化物、水合物和前述的任何多晶型物。在本申请中描述的本发明某些方面中,“立体异构体”、“几何异构体”、“互变异构体”、“溶剂化物”、“代谢物”、“盐”、“前药”、“前药盐”“缀合物”、“缀合物盐”、“溶剂化物”、“水合物”或“多晶型物”的特定引用在使用术语“化合物”而未引用这些其它形式的情况下不应理解为在本发明其它方面的这些形式的有意省略。在一个实施方案中,细胞毒性化合物包含连接基团或具有键合至其的反应性基团的连接基团。可选地,细胞毒性化合物不包含连接基团或具有键合至其的反应性基团的连接基团。

[0167] 本文使用的术语“缀合物”是指本文所述的化合物或其连接于细胞结合剂的衍生物。

[0168] 本文使用的术语“可连接于细胞结合剂”是指本文所述的化合物或其衍生物,其包含适于将这些化合物或其衍生物键合于细胞结合剂的至少一个连接基团或前体。

[0169] 给定基团的术语“前体”是指可通过任何脱保护、化学修饰或缀合反应而产生该基团的任何基团。

[0170] 术语“连接于细胞结合剂”是指包含至少一种本文所述化合物(如,本文所述的化合物和药物-连接子化合物)或其经由合适的连接基团结合于细胞结合剂的衍生物或其前体的缀合物分子。

[0171] 术语“手性”是指具有镜像配偶体(mirror image partner)的不重叠性性质的分子,而术语“非手性”是指其镜像配偶体可重叠的分子。

[0172] 术语“立体异构体”是指具有相同的化学组成和连接性,但是其原子在空间具有不同取向的化合物,该取向不能通过单键旋转互换。

[0173] “非对映异构体”是指具有两个或多个手性中心且其分子并非彼此镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同的物理性质,如熔点、沸点、光谱特性和反应性。非对映异构体混合物可在高分辨率分析程序(诸如结晶、电泳和色谱法)下进行分离。

[0174] “对映体”是指彼此为非重叠镜像化合物的两种立体异构体。

[0175] 本文使用的立体化学的定义和惯例通常遵循S.P Parker,编辑,McGraw-Hill Dictionary ofChemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;及Eliel,E.和Wilen,S.,“Stereochemistry of Organic Compounds,’”John Wiley&Sons,Inc.,New York,1994。本发明的化合物可含有不对称或手性中心,并因此存在不同的立体异构形式。预期包括但不限于非对映体、对映体和阻转异构体以及其混合物例如外消旋混合物的本发明化合物的所有立体异构形式,形成本发明的一部分。许多有机化合物以光学活性形式存在,即,它们具有旋转平面偏振光的平面的能力。在描述光学活性化合物时,前缀D和L,或R和S用于表示分子在其手性中心处的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于表示化合物的平面偏振光旋转的标记,其中(-)或l意指该化合物是左旋的。前缀为(+)或d的化合物是右旋的。对于给定的化学结构,除了彼此互为镜像以外,这些立体异构体是相同的。特定的立体异构体也可称为对映体,且此类异构体的混合物经常被称为对映体混合物。50:50的对映体混合物被称为外消旋混合物或外消旋物,它们可在化学反应或过程中没有立体选择性或立体特异性的情况下产生。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”是指无光学活性的两种对映体

种类的等摩尔混合物。

[0176] 术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指经由低能量屏障可相互转化的不同能量的结构异构体。例如，质子互变异构体(也称为质子异变互变异构体)包括经由质子迁移的互变，如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。价互变异构体包括通过一些成键电子的重组而相互转化。

[0177] 在本申请中所用的术语“前药”是指本发明化合物的前体或衍生形式，其能够被酶或水解激活或转化成更具活性的母体形式。参见，如，Wilman，“Prodrugs in Cancer Chemotherapy”Biochemical Society Transactions，14，第375-382页，615th Meeting Belfast(1986)和Stella 等人，“Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”，Directed Drug Delivery，Borchardt等人，(编辑)，第247-267页，Humana Press(1985)。本发明的前药包括但不限于，含酯的前药、含磷酸酯的前药、含有硫代磷酸酯的前药、含硫酸酯的前药、含肽的前药、D-氨基酸修饰的前药、糖基化的前药、含β-内酰胺类的前药、任选取代的含苯氧基乙酰胺的前药、任选取代的含苯乙酰胺的前药、5-氟胞嘧啶和可转化为更具活性的无细胞毒素药物的其它5-氟尿苷前药。可被衍生成用于本发明前药形式的细胞毒性药物的实例包括但不限于本发明的化合物和诸如上述的化疗剂。

[0178] 术语“前药”也意在包括在生物学条件下(体外或体内)可水解、氧化或发生其它反应的化合物的衍生物以提供本发明的化合物。前药可仅在生物学条件下在此类反应中活化，或者它们可以其未反应的形式具有活性。本发明涵盖的前药的实例包括但不限于本文公开的包含可生物水解部分的任一式的化合物的类似物或衍生物，诸如可生物水解的酰胺、可生物水解的酯、可生物水解的氨基甲酸酯、可生物水解的碳酸酯、可生物水解的酰脲和可生物水解的磷酸酯类似物。前药的其它实例包括本文公开的任一式的化合物的衍生物，其包括-NO、$-NO_2$、-ONO或$-ONO_2$部分。前药通常可使用众所周知的方法制备，如Burger’s Medicinal Chemistry和Drug Discovery(1995)172-178，949-982(Manfred E。Wolff编辑，第5版)；还可参见Goodman and Gilman’s，The Pharmacological basis of Therapeutics，第8版，McGraw-Hill，Int。编辑于1992，“Biotransformation of Drugs”。

[0179] 本发明前药的一种优选形式包括本发明的化合物(含有或不含任何连接子基团)和缀合物，其包含在化合物/缀合物的亚胺键和亚胺反应剂之间形成的加合物。

[0180] 术语“亚胺反应剂”是指能够与亚胺基团反应的试剂。亚胺反应剂的实例包括但不限于，亚硫酸盐(H_2SO_3，H_2SO_2，与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)、偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_3$、POS_3H_3、PS_4H_3或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯($(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iSH、R^iSOH、R^iSO_2H、R^iSO_3H)，各种胺(羟胺(如，NH_2OH)，肼(如，NH_2NH_2)、NH_2O-R^i、$R^{i'}NH-R^i$、NH_2-R^i)，$NH_2-CO-NH_2$，$NH_2-C(=S)-NH_2$，硫代硫酸盐($H_2S_2O_3$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)、连二亚硫酸盐($H_2S_2O_4$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)、二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^kC(=O)NHOH$或与阳离子形成的盐)，酰肼($R^kCONHNH_2$)，甲醛次硫酸氢盐氢钠($HOCH_2SO_2H$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如，$HOCH_2SO_2^-Na^+$)，糖化的核苷酸(诸如GDP-甘露糖)，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$的取代基取代；R^i和$R^{i'}$可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或

支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基(优选地，R^k是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；更优选地，R^k是甲基、乙基或丙基)。优选地，阳离子是单价阳离子，诸如Na^+或K^+。优选地，亚胺反应剂选自亚硫酸盐、羟胺、脲和肼。更优选地，亚胺反应剂是$NaHSO_3$或$KHSO_3$。

[0181] 除非另外指明，否则本文使用的术语“可生物水解的酰胺”、“可生物水解的酯”、“可生物水解的氨基甲酸酯”、“可生物水解的碳酸酯”、“可生物水解的酰脲”“’和“可生物水解的磷酸盐酯类似物”分别意指酰胺、酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、酰脲或磷酸盐酯类似物，它们或者：1)不破坏化合物的生物活性并赋予该化合物在体内有利的特性，诸如吸收、作用持续时间或作用开始；或者2)其本身无生物活性但在体内转化为生物活性化合物。可生物水解的酰胺的实例包括但不限于低级烷基酰胺、α-氨基酸酰胺、烷氧基酰基酰胺和烷基氨基烷基羰基酰胺。可生物水解的酯的实例包括但不限于低级烷基酯、烷氧基酰氧基酯、烷基酰氨基烷基酯和胆碱酯。可生物水解的氨基甲酸酯的实例包括但不限于低级烷基胺、取代的乙二胺、氨基酸、羟基烷基胺、杂环胺和杂芳香胺及聚醚胺。特别优选的前药和前药盐是将此类化合物施用于哺乳动物时提高本发明化合物生物利用度的那些。

[0182] 本文使用的短语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的有机盐或无机盐。示例性的盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、单宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐(gentisinate)、富马酸盐、葡糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、蔗糖盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲烷磺酸盐“甲磺酸盐”、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、扑酸盐(即，1，1’-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸))盐、碱金属(如，钠和钾)盐、碱土金属(如，镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及引入另一种分子如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他平衡离子。平衡离子可以是使母体化合物上的电荷稳定的任何有机或无机部分。此外，药学上可接受的盐在其结构中可具有一个以上的带电原子。多个带电原子为药学上可接受盐的一部分的情况可具有多个平衡离子。因此，药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个平衡离子。

[0183] 如果本发明的化合物是碱，那么所需的药学上可接受的盐可通过本领域可获得的任何合适的方法制备，例如，用以下酸来处理游离碱：用无机酸，如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等；或用有机酸，如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃酮侧基酸(如葡糖醛酸或半乳糖醛酸)、α-羟基酸(如柠檬酸或酒石酸)、氨基酸(如天冬氨酸或谷氨酸)、芳族酸(如苯甲酸或肉桂酸)、磺酸(如对甲苯磺酸或乙磺酸)等。

[0184] 如果本发明的化合物是酸，那么所需的药学上可接受的盐可通过任何合适的方法制备，例如，用无机或有机碱，如胺(伯胺、仲胺或叔胺)、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等处理游离酸。合适盐的示例性实例包括但不限于衍生自氨基酸(如甘氨酸和精氨酸)的有机盐，氨，伯胺、仲胺、叔胺及环胺，如哌啶、吗啉和哌嗪以及衍生自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

[0185] 本文使用的术语“溶剂化物”意指进一步包括化学计算量或非化学计量的溶剂，如水、异丙醇、丙酮、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺二氯甲烷、2-丙醇等的化合物，

其通过非共价分子间力结合。化合物的溶剂化物或水合物易于通过向化合物中加入至少一摩尔当量的羟基溶剂(如甲醇、乙醇、1-丙醇、2-丙醇或水)而导致亚胺部分的溶剂化或水合来制备。

[0186] “代谢物”是通过特定化合物、其衍生物或其缀合物或其盐的体内代谢而产生的产物。化合物、其衍生物,或其缀合物的代谢物可使用本领域已知的常规技术进行鉴定并使用如本文所述的那些试验来测定其活性。此类产物可通过施用化合物的例如氧化、羟基化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺、酯化、脱酯、酶裂解等而产生。因此,本发明包括本发明的化合物、其衍生物,或其缀合物的代谢物,其包括通过包括使本发明的化合物、其衍生物或其缀合物与哺乳动物接触足够的时间以产生其代谢产物的方法而产生的化合物、其衍生物或其缀合物。

[0187] 短语“药学上可接受的”表示物质或组合物在化学上和/或毒理学上与构成制剂的其它成分和/或用其治疗的哺乳动物是可相容的。

[0188] 术语“保护基”或“保护部分”是指通常用于阻断或保护特定的官能团而使化合物、其衍生物或其缀合物上的其它官能团发生反应的取代基。例如,“氨基保护基团”或“氨基保护部分”是连接于阻断或保护化合物中氨基官能团的氨基基团的取代基。此类基团是本领域熟知的(参见例如PWuts和T.Greene,2007,Protective Groups in Organic Synthesis,第7章,J.Wiley&Sons,NJ)并通过氨基甲酸酯,如甲基和氨基甲酸乙酯、FMOC、取代的氨基甲酸乙酯、通过1,6-β-消除(也称为“自我切除”)断裂的氨基甲酸酯、脲、酰胺、肽、烷基和芳基衍生物例示。合适的氨基保护基团包括乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、苄氧基羰基(CBZ)和9-芴基亚甲氧基羰基(Fmoc)。对于保护基及其用途的一般描述,参见PGM.Wuts&T.W. Greene,Protective Groups in Organic Synthesis,John Wiley&Sons,New York,2007。

[0189] 术语“离去基团”是指在置换或取代期间脱离的带电或不带电部分的基团。此类离去基团是本领域熟知的,包括但不限于卤素、酯类、烷氧基、羟基、甲苯磺酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯、腈、叠氮化物、氨基甲酸酯、二硫化物、硫酯、硫醚和重氮化合物。

[0190] 术语“双官能交联剂”、“双官能连接子”或“交联剂”是指具有连接于“连接基团”的两个反应性基团的修饰剂,其中一者能与细胞结合剂反应,而另一者与细胞毒性化合物反应以将两部分连接在一起。此类双官能交联剂是本领域熟知的(参见,例如,Isalm和Dent in Bioconjugation第5章,第218-363页,Groves Dictionaries Inc。New York,1999)。例如,能够通过硫醚键连接的双官能交联剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)引入马来酰亚胺基,或用N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)引入碘乙酰基。将马来酰亚胺基或卤代乙酰基引入于细胞结合剂的其它双官能交联剂是本领域熟知的(参见美国专利申请2008/0050310,20050169933,获自Pierce Biotechnologv Inc.,P.O.Box117,Rockland,IL61105,USA)且包括但不限于双-马来酰亚胺聚乙二醇(BMPEO)、BM(PEO)$_2$、BM(PEO)$_3$、N-(p-马来酰亚胺丙基氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、γ-马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、£-马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、5-马来酰亚胺戊酸NHS、HBVS、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(其是SMCC的“长链”类似物(LC-SMCC))、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、4-(4-N-马来酰亚胺苯基)-丁酸酰肼或HCl盐(MPBH)、3-(溴

代乙酰胺基)丙酸-N-琥珀酰亚胺酯(SBAP1、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA)、κ-马来酰胺基十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SMPB)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺基已烷(BMH)、双-马来酰亚胺乙烷(BMOE)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环已烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ-马来酰亚胺丁基氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ε-马来酰亚胺乙酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ-马来酰亚胺十一酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)和4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMPB)。

[0191] 异双官能交联剂是具有两个不同反应性基团的双官能交联剂。含有胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺基团(NHS基团)和羰基反应性酰肼基团的异双官能交联剂也可用于将本文描述的细胞毒性化合物与细胞结合剂(如,抗体)反应。此类商业上可获得的杂双官能交联剂的实例包括6-丙酮腙基烟酸琥珀酰亚胺酯(SANH)、4-酰肼对苯二酸琥珀酰亚胺酯盐酸盐(SHTH)和肼基烟酸琥珀酰亚胺酯盐酸盐(SHNH)。具有对酸敏感连接的缀合物还可通过使用本发明的含肼的苯二氮䓬类衍生物来制备。可使用的双官能交联剂的实例包括琥珀酰亚胺基-对甲酰基苯甲酸酯(SFB)和琥珀酰亚胺基-对甲酰苯氧乙酸酯(SFPA)。

[0192] 能够使细胞结合剂与细胞毒性化合物通过二硫键连接的双官能交联剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯和本领域已知的其它试剂,其包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯(SPDB)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基二硫代)2-硫代丁酸酯(磺基-SPDB)以引入二硫代吡啶基。其它可用于引入二硫基的双官能交联剂是本领域已知的且公开于美国专利6,913,748、6,716,821和美国专利公布20090274713和20100129314中,其全部通过引用并入本文。可选地,也可使用引入硫醇基的交联剂,诸如2-亚氨基硫杂环戊烷、高半胱氨酸硫内酯或S-乙酰琥珀酸酸酐。

[0193] 本文所定义的“连接子”、“连接子部分”或“连接基团”是指将诸如细胞结合剂和细胞毒性化合物的两部分连接在一起的部分。双官能交联剂可包含两个反应性基团,在连接子部分的每个末端各一个,使得一个反应性基团可首先与细胞毒素化合物反应以提供具有连接部分和第二反应性基团的化合物,该化合物随后可与细胞结合剂反应。可选地,双官能交联剂的一端可首先与细胞结合剂反应以提供具有连接子部分和第二反应性基团的细胞结合剂,其随后可与细胞毒性化合物反应。该连接部分可含有使细胞毒性部分在特定位点释放的化学键。适合的化学键在本领域是众所周知的且包括二硫键、硫醚键、对酸不稳定的键、对光不稳定的键、对肽酶不稳定的键、以及对酯酶不稳定的键(参见例如美国专利5,208,020、5,475,092、6,441,163、6,716,821、6,913,748、7,276,497、7,276,499、7,368,565、7,388,026和7,414,073)。优选二硫键、硫醚、对肽酶不稳定的键。可用于本发明的其它连接子包括非裂解性连接子,例如美国公开第20050169933号中详细描述中描述的那些,或带电荷的连接子或亲水性连接子并且描述于US2009/0274713、US2010/01293140和WO2009/134976,其各自通过引用明确地并入本文,其各自通过引用明确地并入本文。

[0194] 在一个实施方案中，在一端连接有反应性基团的连接基团(诸如反应性酯)选自下述“列表1”：

[0195] $-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0196] $-O(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0197] $-O(CR_{20}R_{21})_m$(炔基)$_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0198] $-O(CR_{20}R_{21})_m$(哌嗪子基)$_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0199] $-O(CR_{20}R_{21})_m$(吡咯并)$_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0200] $-O(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0201] $-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0202] $-S(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0203] $-S(CR_{20}R_{21})_m$(炔基)$_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0204] $-S(CR_{20}R_{21})_m$(吡嗪子基)$_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0205] $-S(CR_{20}R_{21})_m$(吡咯并)$_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0206] $-S(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0207] $-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(Cr_{40}r_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0208] $-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0209] $-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m$(炔基)$_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q-(CO)_tX''$、

[0210] $-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m$(哌嗪子基)$_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_rX''$、

[0211] $-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_m$(吡咯并)$_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q-(CO)_tX''$、

[0212] $-NR_{33}(C=O)_{p''}(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0213] $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0214] $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0215] $-(CR_{20}R_{21})_m$(炔基)$_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0216] $-(CR_{20}R_{21})$m(哌嗪子基)$_{t'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0217] $-(CR_{20}R_{21})_mA''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0218] $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0219] $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}(CR_{26}=CR_{27})_{m'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0220] $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}$(炔基)$_{n'}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$、

[0221] $-(CR_{20}R_{21})_m(CR_{29}=N-NR_{30})_{n''}A''_{m''}(CR_{22}R_{23})_n(OCH_2CH_2)_p(CR_{40}R_{41})_{p''}Y''(CR_{24}R_{25})_q(CO)_tX''$，

[0222] 其中：

[0223] m、n、p、q、m’、n’、t’是1至10的整数，或任选地是0；

[0224] t、m”、n”和p”是0或1；

[0225] X”选自OR_{36}、SR_{37}、$NR_{38}R_{39}$，其中R_{36}、R_{37}、R_{38}、R_{39}是H，或具有1至20个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基和，或聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$，R_{37}任选地是硫醇基保护基团，当t＝1时，COX”形成选自以下的反应性酯：N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯基酯及其衍生物，其中所述衍生物促进酰胺键的形成；

[0226] Y”不存在或选自O、S、S-S或NR_{32}，其中R_{32}具有上述R给出的相同的定义，或

[0227] 当Y，，不是S-S且t＝0时，X”选自马来酰亚胺基或卤代乙酰基或SR_{37}，其中R_{37}具有上述相同的定义；

[0228] A，，是选自甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸和谷氨酸的氨基酸或含有2至20个氨基酸单元的多肽。

[0229] R_{20}、R_{21}、R_{22}、R_{23}、R_{24}、R_{25}、R_{26}和R_{27}相同或不同且是H或具有1至5个碳原子的直链或支链的烷基。

[0230] R_{29}和R_{30}相同或不同且是H或1至5个碳原子的烷基。

[0231] R_{33}是H或具有1至12个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$或R_{33}是-COR_{34}、-CSR_{34}、-SOR_{34}或-SO_2R_{34}，其中R_{34}是H或具有1至20个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，或聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$；且

[0232] R_{40}和R_{41}中的一者任选地是带负或正电荷的官能团而另一者是H或具有1至4个碳原子的烷基、烯基、炔基。

[0233] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸或由NH_2-C($R^{aa'}$ R^{aa})-C(＝O)OH表示的非天然存在的氨基酸，其中R^{aa}和$R^{aa'}$各自独立为H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂芳基或杂环基。术语“氨基酸”还指当从胺和/或氨基酸的羧基末端去除一个氢原子时相应的残基，诸如-NH-C(R^{aa} R^{aa})-C(＝O)O-。

[0234] 术语“阳离子”是指带正电荷的离子。阳离子可以是单价的(如，Na^+、K^+、等)，二价的(如，Ca^{2+}、Mg^{2+}、等)或多价的(如，Al^{3+}等)。优选地，阳离子是单价的。

[0235] 术语“治疗上的有效量”意指引发受试者中所需的生物反应的活性化合物或缀合物的量。与没有治疗或预防、抑制或延缓疾病病症或疾病本身的进展相比，此类反应包括缓解正在治疗的疾病或病症的症状，预防、抑制或延缓疾病的病症的复发或疾病本身，增加受试者的寿命。特别地根据本文提供的详细公开内容，有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内。化合物I的毒性和治疗效应可通过细胞培养物和实验动物中的标准药学方法来确定。本发明的化合物或缀合物或待施用于受试者的其它治疗剂的有效量将取决于受试者多发性骨髓瘤的阶段、种类和状态及受试者的特征，诸如一般健康、年龄、性别、体重和药物耐受性。本发明的化合物或缀合物或待施用的其它治疗剂的有效量也将取决于施用途径和剂型。可单独调整剂量和间隔以提供足以维持所需的治疗效应的血浆水平的活性化合物。

[0236] 术语“硫醇反应性基团”是指将与硫醇部分反应的官能团。硫醇反应性基团的实例包括但不限于马来酰亚胺、乙烯基吡啶、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺、基于卤代乙酰基的基团(如，卤代乙酰胺基)或二硫化物如，-SSR^d，其中R^d是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基，苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基、2-硝基吡啶基、4-硝基吡啶基或3-羧基-4-硝基吡啶基)。

[0237] 术语“反应性酯”是指含有易于被氨基或羟基取代的离去基团的酯。反应性酯的实例包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基酯、二硝基苯基酯、四氟苯基酯、磺基四氟苯基酯和五氟苯基酯。优选地，反应性酯是N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯。

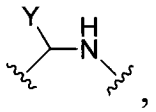
[0238] 术语“含有亚胺的药物”或含有亚胺的细胞毒性化合物”是指本文描述的具有至少一个亚胺官能团的化合物(不含连接子基团)。优选地，含有亚胺的药物包含一个亚胺官能团。

[0239] 本发明的方法

[0240] 在第一方面，本发明涉及用于制备包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)的缀合物的方法，该方法包括使细胞毒性化合物在pH约4至约9下与修饰的CBA反应，其中：

[0241] a)修饰的CBA包含键合于CBA的双官能交联剂的残基，且所述残基包含连接基团和硫醇反应性基团；且

[0242] b)细胞毒性化合物包含硫醇基团和由下式表示的基团：

[0243] 

，

[0244] 其中：

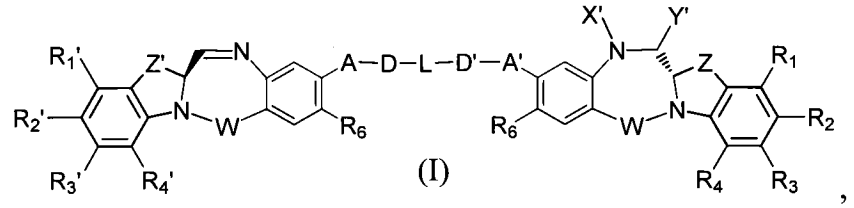
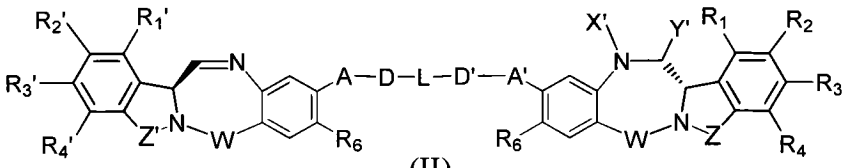
[0245] Y是离去基团，且是亚硫酸盐(HSO_3、HSO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

[0246] 在某些实施方案中，细胞毒性化合物通过使具有硫醇基的含有亚胺的细胞毒性化合物与亚胺反应剂反应而产生。

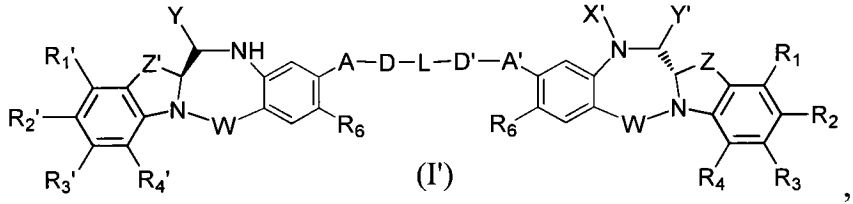
[0247] 在某些实施方案中，该方法可进一步包括在与修饰的CBA反应之前纯化该细胞毒性化合物。

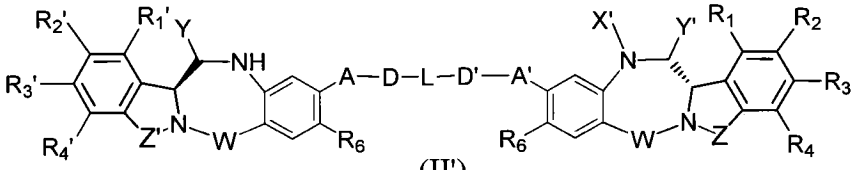
[0248] 在某些实施方案中，

[0249] (1)含有亚胺的细胞毒性化合物由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示：

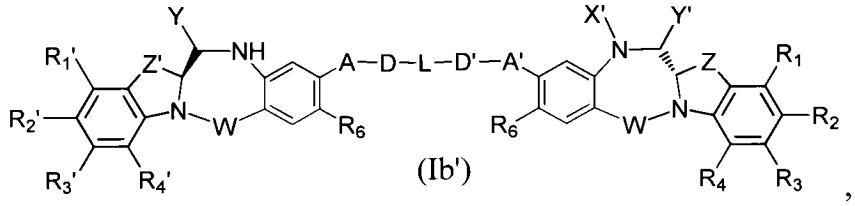
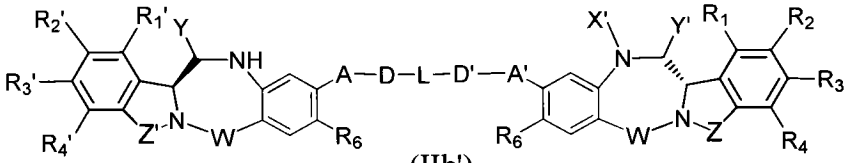
[0250] 
(I)
，

(II)
，

[0251] (2)细胞毒性化合物由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示：


(I')
，

[0252] 
(II')
，且，

[0253] (3)缀合物的细胞毒性化合物和连接基团由下式中的一者表示：

[0254] 
(Ib')
，

(IIb')
，

[0255] 其中：

[0256] X'选自-H，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，以及任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0257] Y'选自-H、氧代基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

[0258] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基；

[0259] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子

的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由-SO_2R'表示的砜，磺酸盐-$SO_3^-M^+$，硫酸盐-$OSO_3^-M^+$，由-SO_2NR'R"表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"；

[0260] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0261] R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，-NR_2，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环；

[0262] n是1至24的整数；

[0263] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

[0264] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2或卤素；

[0265] Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-；

[0266] n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

[0267] R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0268] R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-；

[0269] A和A，相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-，

[0270] 每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

[0271] D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-；

[0272] L不存在，或当存在时包含硫醇基，或是聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代；

[0273] 其中，X'、Y'、R_6、R^c、R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'、R_4'、L(如通过任选取代的基团)中的至少一者键合于式(Ib')或(IIb')中的连接基团。

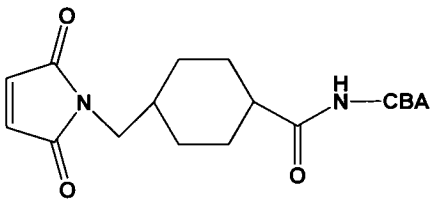
[0274] 在某些实施方案中，修饰的CBA通过使CBA与双官能交联剂反应而制备，所述双官能交联剂包含硫醇反应性基团和与CBA反应性的基团，两者均键合于连接基团。

[0275] 在某些实施方案中，与CBA反应性的基团与CBA的氨基(诸如Lys侧链的氨基)或与CBA的硫醇基(诸如Cys侧链的硫醇基)反应。

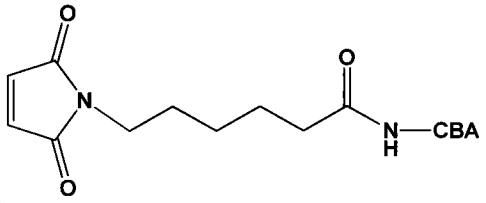
[0276] 在某些实施方案中，硫醇反应性基团选自马来酰亚胺、乙烯基吡啶、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺、基于卤代乙酰基的基团和二硫基。

[0277] 可选地，硫醇反应性基团可以是马来酰亚胺、卤代乙酰胺基或-SSR^d，其中R^d为具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基，苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基、2-硝基吡啶基、4-硝基吡啶基或3-羧基-4-硝基吡啶基。

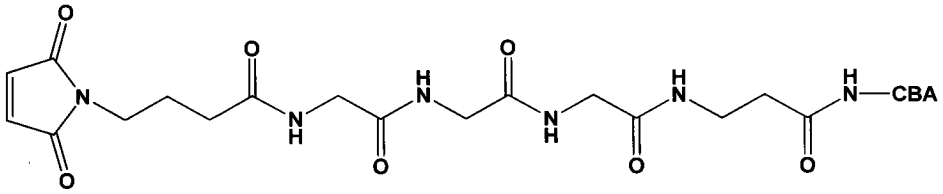
[0278] 在某些实施方案中，修饰的CBA是：



，

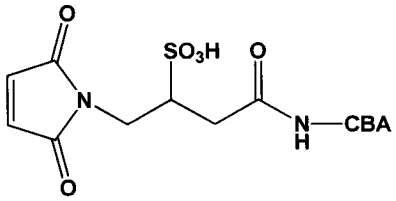


，

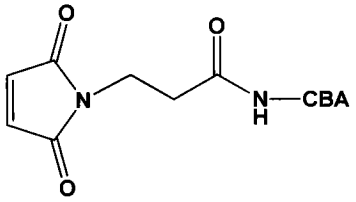


，

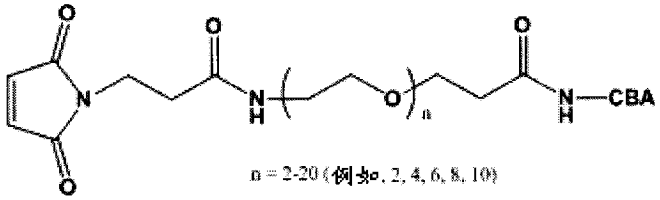
[0279]



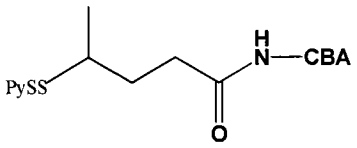
，



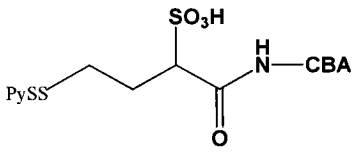
，



，

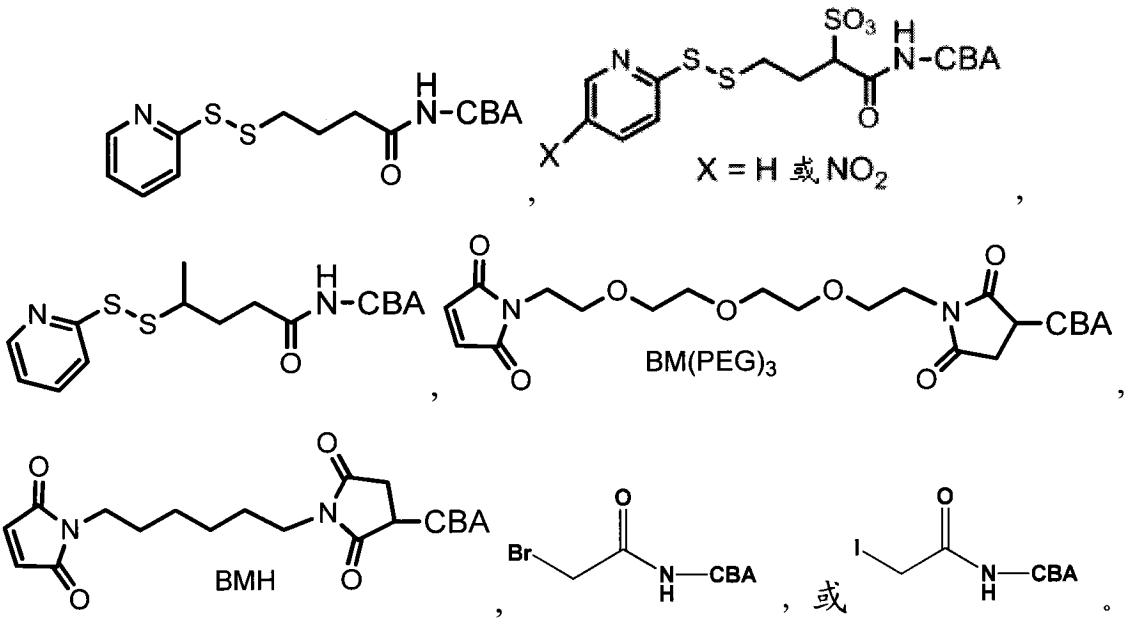


，



，

[0280]



[0281] 示例性的反应方案示于图8，其中在“步骤1”中，将亚胺反应剂(反应流程图中示为亲核试剂(Nuc:))加至含硫醇的药物并使其反应，形成具有硫醇基团的修饰药物。将修饰药物任选地纯化以除去过量的亚胺反应剂。在“步骤2”中，将抗体用含有硫醇反应性基团X的连接子修饰(马来酰亚胺、SSPy、乙烯基砜等)，并与具有硫醇基团的修饰药物在pH6-9下反应以在药物和抗体之间产生稳定的二硫键或硫醚键。在“步骤3”中，除去副产物(诸如过量的亚胺反应剂，不与抗体反应的修饰药物，等)并制成缀合物。缀合于抗体的药物分子的数目等于n，其可以是，例如，1-10。

[0282] 两步缀合法的代表性实例描述于图16中，其中首先用双官能交联剂修饰抗体，产生具有所需数目连接子的抗体，该抗体适于与具有游离硫醇部分的二聚体化合物反应。在该实例中，首先用SPDB修饰抗体huMy9-6以得到具有含有二硫代吡啶基部分的连接子的抗体。然后将修饰的抗体暴露于游离的硫醇，诸如2a，产生所需的缀合物huMy9-6-SPDB-2a。其它合适的可用于类似反应的硫醇反应连接子包括在图16中。

[0283] 亚胺反应剂可与具有硫醇基的药物在有机溶剂(如，二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、乙腈、乙醇、甲醇、二氯甲烷、氯仿、二噁烷或其混合物)或水(如，去离子水)和一种或多种有机溶剂的混合物中混合。当仅使用有机溶剂时，亚胺反应剂可与药物在室温下混合30分钟或更长时间(例如，约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约10小时、约24小时或直到反应完全)。优选地，孵育/反应时间是约0-4小时，或1-3小时。所得的混合物可立即用于与在pH约4至约9，优选约6至约9下缓冲的硫醇反应性基团修饰的细胞结合剂(如，抗体)反应。可选地，可将混合物冷冻并贮藏，例如，在-20℃或-80℃下，并随后使用，同时保持其与细胞结合剂(如，抗体)反应。如果水和有机溶剂的混合物被用作混溶的共溶剂系统(如，水和二甲基乙酰胺)，那么药物和亚胺反应剂的反应混合物立即被使用或冷冻保存直至混合以与具有硫醇反应性基团的细胞结合剂反应后使用。如果水和有机溶剂的混合物被用作不溶混的共溶剂系统如，水和二氯甲烷)，那么将药物和亚胺反应剂混合10分钟或更长时间(例如，约30分钟、约1小时、约2小时、约5小时、约10小时、约24小时或直到反应完全)，收集水层，对药物和反应性硫醇进行定量(如，通过紫外光谱和用DTNB(5,5’-二硫

代)双-(2-硝基苯甲酸))试剂的埃尔曼测定(Ellman's assay))并加至在pH约4至约9,优选地约6至约9下缓冲的具有硫醇反应性基团的细胞结合剂(如,抗体)中。

[0284] 在第二方面,本发明提供制备包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)的缀合物的方法,该方法包括使CBA与含有亚胺的细胞毒性化合物、亚胺反应剂和包含连接基团的双官能交联剂反应以形成该缀合物。

[0285] 在某些实施方案中,细胞结合剂(如,抗体)与药物(如,含有亚胺的细胞毒性化合物)和亚胺反应剂接触以形成第一混合物,然后将第一混合物与双官能交联剂接触以形成细胞结合剂-药物缀合物。优选地,在形成第一混合物之后立即使双官能交联剂与第一混合物接触。可选地,在第一混合物与双官能交联剂接触之前,将第一混合物放置一段时间(如,约1-10分钟、约10-30分钟、约30分钟至1小时、约1至5小时,约5-24小时,或约1-2天)。

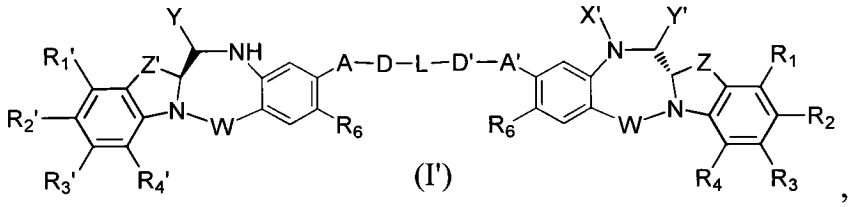
[0286] 在某些实施方案中,该方法可进一步包括纯化该缀合物。

[0287] 示例性的反应方案示于图10中,其中在"步骤1"中,将亚胺反应剂(在反应方案中示为亲核试剂(Nuc:))加至CBA(如,抗体)、含有硫醇的药物、含有硫醇反应性基团X(马来酰亚胺、SSPy、乙烯基砜等)和反应性酯基两者的双官能交联剂中,并使反应在pH6-9下进行以产生稳定的药物-抗体缀合物。在"步骤2"中,除去副产物(诸如过量的亚胺反应剂、不与抗体反应的修饰药物等)并制成缀合物。缀合于抗体的药物分子的数目等于n,其可以是,例如,1-10。

[0288] 在第三方面,本发明提供用于制备缀合物的方法,所述缀合物包含缀合于带有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA),所述方法包括:

[0289] a)使细胞毒性化合物与双官能交联剂(包含连接基团、与CBA反应性的基团(诸如硫醇基、马来酰亚胺基、卤代乙酰胺基或胺基)及与细胞毒性化合物反应性的基团)反应,以形成共价键合于双官能交联剂残基的修饰的细胞毒性化合物,其中该残基包括连接基团和与CBA反应性的基团;

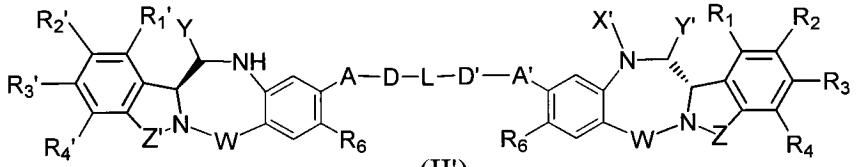
[0290] 其中该细胞毒性化合物由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示:



(I')

,

[0291]



(II')

, 且,

[0292] 其中:

[0293] Y是离去基团,且是亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2^-或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐),偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐),硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3,硫代硫酸盐($HS_2O_3^-$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的

盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；

[0294] X，选自-H，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，以及任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0295] Y′选自-H、氧代基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

[0296] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基；

[0297] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-R^c$，卤素，胍基[$-NH(C=NH)NH_2$]，-OR，-NR，R”，$-NO_2$，-NCO，-NR’COR”，-SR，由-SOR’表示的亚砜，由$-SO_2R'$表示的砜，磺酸盐$-SO_3^-M^+$，硫酸盐$-OSO_3^-M^+$，由$-SO_2NR'R''$表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR’，-OCOR’，-OCONR’R”；

[0298] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0299] R’和R”各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，$-NR_2$，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环；

[0300] n是1至24的整数；

[0301] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

[0302] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR’R”、$-NO_2$或卤素；

[0303] Z和Z’独立地选自$-(CH_2)_{n'}-$、$-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$、$-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$、$-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$和$-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$；

[0304] n’和na’相同或不同，且选自0、1、2和3；

[0305] R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR’，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-$，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0306] R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-$；

[0307] A和A’相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR’O-、-CRR’-、-S-、-

CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-，

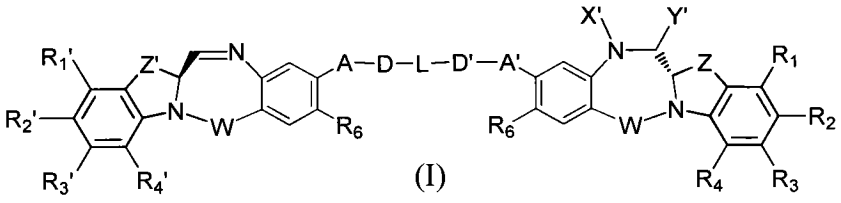
[0308] 每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

[0309] D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，和聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$-；

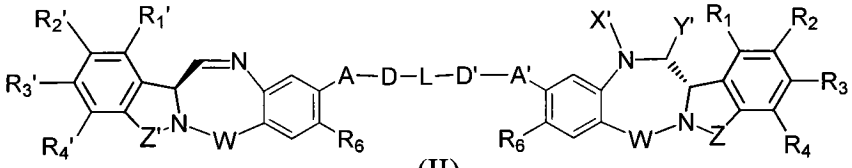
[0310] L不存在，或当存在时，包含硫醇基或为聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$-，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代；且，

[0311] b)使修饰的细胞毒性化合物在pH约4至约9下通过与CBA反应性的基团与CBA反应以形成缀合物。

[0312] 在某些实施方案中，细胞毒性化合物通过使具有下式硫醇基的含有亚胺的细胞毒性化合物与亚胺反应剂在反应混合物中反应而产生

[0313] 

(I)，

[0314] 

(II)。

[0315] 在某些实施方案中，该方法可进一步包括在步骤a)之前纯化该细胞毒性化合物。

[0316] 在某些实施方案中，该方法可进一步包括在步骤b)之前纯化该修饰的细胞毒性化合物。

[0317] 在某些实施方案中，在将冷冻混合物解冻和进行步骤a)之前将反应混合物冷冻贮藏。

[0318] 在某些实施方案中，该方法可进一步包括在解冻之前和步骤b)进行之前将步骤a)的反应混合物冷冻保存。

[0319] 在某些实施方案中，双官能交联剂是双-马来酰亚胺己烷或BMPEO。

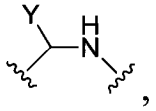
[0320] 示例性的反应方案示于图11，其中在“步骤1”中，将亚胺反应剂(在反应方案中示为亲核试剂(Nuc:))加至含有硫醇的细胞毒性化合物中。将所得的细胞毒性化合物任选纯化，之后将细胞毒性化合物与双官能交联剂(如双马来酰亚胺己烷或BMPEO)在“步骤2”中反应以产生具有硫醇反应性基团的第二修饰药物。然后在“步骤3”中，加入含有硫醇的CBA(如抗体)，并使反应继续进行(在pH6-9下)以产生稳定的药物-抗体缀合物。在“步骤4”中，除去副产物(诸如过量的亚胺反应剂、不与抗体反应的修饰药物，等)并制成缀合物。缀合于抗体的药物分子的数目等于n，其可以是，例如，1-10。

[0321] 亚胺反应剂可与具有硫醇反应性基团的药物在有机溶剂(如,二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜、乙腈、乙醇、甲醇、二氯甲烷、氯仿、二噁烷或其混合物)或水(如,去离子水)和一种或多种有机溶剂的混合物中混合。当仅使用有机溶剂时,亚胺反应剂可与药物在室温下混合30分钟或更长时间(例如,约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约10小时、约24小时或直到反应完全)。优选地,孵育/反应时间是约0-4小时,或1-3小时。所得的混合物可立即用于与在pH约4至约9,优选约6至约9下缓冲的硫醇反应性基团修饰的细胞结合剂(如,抗体)反应。可选地,可将混合物冷冻并贮藏,例如,在-20℃或-80℃下,并随后使用,同时保持其与细胞结合剂(如,抗体)反应。如果水和有机溶剂的混合物被用作混溶的共溶剂系统(如,水和二甲基乙酰胺),那么药物和亚胺反应剂的反应混合物在混合之后立即使用或冷冻保存直至用于与具有硫醇-反应性基团的细胞结合剂反应。如果水和有机溶剂的混合物被用作不溶混的共溶剂系统(如,水和二氯甲烷),那么将药物和亚胺反应剂混合10分钟或更长时间(例如,约30分钟、约1小时、约2小时、约5小时、约10小时、约24小时或直至反应完全),收集水层,对药物进行定量(如,通过紫外光谱法)并加至缓冲至pH约4至约9,优选地约6至约9的具有硫醇基的细胞结合剂(如,抗体)中。

[0322] 在第四方面,本发明涉及用于制备包含缀合于具有连接基团的细胞毒性化合物的细胞结合剂(CBA)的缀合物的方法,该方法包括使修饰的细胞毒性化合物在pH约4至约9下与CBA反应,其中该修饰的细胞毒性化合物包含:

[0323] a)键合于所述细胞毒性化合物的双官能交联剂的残基,且所述残基包含连接基团和选自反应性酯和硫醇反应性基团的反应性基团,以及,

[0324] b)由下式表示的基团:

[0325]  ,

[0326] 其中:

[0327] Y是离去基团,且是亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2^-或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐),偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐),单、二、三和四硫代磷酸盐($PO_3SH_3^-$、$PO_2S_2H_2^-$、$POS_3H_2^-$、$PS_4H_2^-$或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐),硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3,硫代硫酸盐($HS_2O_3^-$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐),连二亚硫酸盐($HS_2O_4^-$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐),二硫代磷酸盐(P(=S)($OR^{k'}$)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐),异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐),甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐,诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物,其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代;R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代;R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;Rk'是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,芳基,杂环基或杂芳基。

[0328] 在某些实施方案中,修饰的细胞毒性化合物通过将亚胺反应剂与具有连接基团和反应性基团的含有亚胺的细胞毒性化合物反应而产生。

[0329] 在某些实施方案中,该方法可进一步包括在与CBA反应之前,纯化该修饰的细胞毒性化合物。

[0330] 在某些实施方案中，该反应性酯可选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基酯、二硝基苯基酯、四氟苯基酯、磺基四氟苯基酯和五氟苯基酯。优选地，反应性酯是N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0331] 在某些实施方案中，硫醇反应性基团可选自马来酰亚胺、乙烯基吡啶、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺、基于卤代乙酰基的基团和二硫基。

[0332] 在某些实施方案中，硫醇反应性基团可以是马来酰亚胺、卤代乙酰胺基或-SSR^{d}，其中R^{d}是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基，苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基、2-硝基吡啶基、4-硝基吡啶基或3-羧基-4-;硝基吡啶基。

[0333] 示例性的反应方案示于图7，其中在“步骤1”中，将亚胺反应剂(反应方案中示为亲核试剂(Nuc:))加至含反应性酯(1c)的药物中并使其反应以形成修饰药物。该修饰药物可任选地被纯化以除去过量的亚胺反应剂。在“步骤2”中，具有反应性酯的修饰药物与缓冲至pH6-9的抗体反应。“步骤3”，除去副产物(如过量亚胺反应剂、不与抗体反应的修饰药物，等)，并制成缀合物。缀合于抗体的药物分子的数目等于n，其可以是，例如，1至10。

[0334] 描述本发明示例性方法的另一反应方案示于图9。在“步骤1”中，将亚胺反应剂加至含硫醇-反应性基团(其中R是马来酰亚胺基团、SSPy等)的药物中并使其反应形成修饰药物。将修饰药物任选地纯化以除去过量的亚胺反应剂。在“步骤2”中，将修饰药物与含有反应性硫醇的抗体反应以形成具有抗体通过稳定的二硫键或硫醚键共价连接于药物的抗体-药物缀合物。具有反应性硫醇的抗体可通过本文所述的方法产生，例如，通过降低链间二硫键、遗传编码半胱氨酸，或用含有硫醇或化学上掩蔽的硫醇的连接子修饰抗体。在“步骤3”中，除去不与抗体反应的药物并制成缀合物。缀合于抗体的药物分子的数目等于n，其可以是，例如，1-10。

[0335] 亚胺反应剂可与具有活化酯(如N-羟基琥珀酰亚胺酯、五氟苯酚酯、磺基N-羟基琥珀酰亚胺酯)的药物在有机溶剂(如，二甲基乙酰胺、乙醇、二氯甲烷、氯仿、二噁烷或其混合物)或水(如，去离子水)和一种或多种有机溶剂的混合物中混合。当仅使用有机溶剂时，亚胺反应剂可与药物在0至100℃的温度下，优选在0-30℃的温度下，更优选在室温下混合5分钟或更长时间(例如，约30分钟、1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约10小时、约24小时或直到反应完全)。优选地，孵育/反应时间是约0-4小时，或1-3小时。可将所得的反应混合物立即用于与缓冲至pH约4至约9，优选约6至约9的细胞结合剂(如抗体)反应。可选地，可将反应混合物冷冻并贮藏，例如在约-20℃或-80℃下，随后使用，同时保持其与抗体的反应性。优选地，不需要纯化中间产物。当水和有机溶剂的混合物被用作混溶的共溶剂系统(如，水和二甲基乙酰胺)时，药物和亚胺反应混合物在混合之后立即使用或冷冻保存直至使用，以与细胞结合剂(如，抗体)反应。当水和有机溶剂的混合物被用作不溶混的共溶剂系统(如水和二氯甲烷)时，将药物和亚胺反应剂混合10分钟或更长时间，收集水层，对药物进行定量，并加至缓冲至pH约4至约9，优选地约6至约9的细胞结合剂(如抗体)中。

[0336] 在上述任一方面，可使用合适量的亚胺反应剂。例如，对药物可使用约0.1至约30摩尔当量的亚胺反应剂。优选地，可使用约1至约10摩尔当量，更优选地，约1至约5摩尔当量，甚至更优选地约3至约5摩尔当量的亚胺反应剂。

[0337] 使用该通用方法，在上述任一方面，可使用下述亚胺反应剂中的任一种：亚硫酸盐(H_2SO_3、H_2SO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子

形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_3$、POS_3H_3、PS_4H_3或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯($(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iSH、R^iSOH、R^iSO_2H、R^iSO_3H)，各种胺(羟胺(如，NH_2OH)，肼(如，NH_2NH_2)、NH_2O-R^i、$R^{i'}NH-R^i$、NH_2-R^i)，$NH_2-CO-NH_2$，$NH_2-C(=S)-NH_2$，硫代硫酸盐($H_2S_2O_3$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐($H_2S_2O_4$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)、二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^kC(=O)NHOH$或与阳离子形成的盐)，酰肼($R^kCONHNH_2$)，甲醛次硫酸氢盐氢钠($HOCH_2SO_2H$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)，糖化的核苷酸(诸如GDP-甘露糖)，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$的取代基取代；R^i和$R^{i'}$可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基(优选地，R^k是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；更优选地，R^k是甲基、乙基或丙基)。优选地，阳离子是单价阳离子，诸如Na^+或K^+。

[0338] 优选地，亚胺反应剂选自亚硫酸盐(如，$NaHSO_3$or $KHSO_3$)、羟胺、肼和脲。更优选地，亚胺反应剂是$NaHSO_3$或$KHSO_3$。

[0339] 在一个实施方案中，在上述任一方面描述的修饰药物在与细胞结合剂反应之前进行纯化。任何合适的本领域已知方法可用于纯化修饰药物。例如，修饰药物可通过柱色谱法(如，硅胶色谱法)或HPLC进行纯化。

[0340] 在另一实施方案中，根据上述任一方面制备的细胞结合剂-药物缀合物通过用正切流动过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀、非吸附性过滤或其组合进行纯化。优选地，将正切流动过滤(TFF，也称为交叉流动过滤、超滤和渗滤)和/或吸附色谱树脂用于纯化缀合物。

[0341] 可使用任何合适的TFF系统，包括Pellicon型系统(Millipore，Billerica，Mass.)、Sartocon盒式系统(Sartorius AG，EdgeWood，N.Y.)和Centrasette型系统(Pall Corp.，East Hills，N.Y.)。

[0342] 可使用任何合适的吸附色谱树脂。优选的吸附色谱树脂包括用于羟磷灰石色谱、疏水电荷诱导色谱(HCIC)、疏水相互作用色谱(HIC)、离子交换色谱、混合模式离子交换色谱、固定化金属亲和色谱(IMAC)、染料配体色谱、亲和色谱、反相色谱及其组合的树脂。合适的羟磷灰石树脂的实例包括陶瓷羟磷灰石(CHT I型和II型，Bio-Rad Laboratories，Hercules，Calif.)、HA Ultrogel羟磷灰石(Pall Corp.，East Hills，N.Y.)和陶瓷氟磷灰石(CFT I型和II型，Bio-Rad Laboratories，Hercules，Calif.)。合适的HCIC树脂的实例是MEP Hypercel树脂(Pall Corp.，East Hills，N.Y.)。合适的HIC树脂的实例包括丁基-琼脂糖、己基-琼脂糖、苯基-琼脂糖和辛基-琼脂糖树脂(均来自于GE Healthcare，Piscataway，N.J.)以及Macro-prep甲基和Macro-Prep叔丁基树脂(Biorad Laboratories，Hercules，Calif.)。合适的离子交换树脂的实例包括SP-琼脂糖、CM-琼脂糖和Q-琼脂糖树脂(均来自于GE Healthcare，Piscataway，N。J。)和Unosphere S树脂(Bio-Rad Laboratories，Hercules，Calif.)。合适的混合模式离子交换剂的实例包括Bakerbond ABx树脂(JT Baker，Phillipsburg，N.J.)。合适的IMAC树脂的实例包括螯合琼脂糖树脂(GE Healthcare，Piscataway，N.J.)和Profinity IMAC树脂(Bio-Rad Laboratories，

Hercules,Calif.)。合适的染料配体树脂的实例包括蓝色琼脂糖树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)和Affi-gel蓝色树脂(Bio-Rad Laboratories,Hercules,Calif.)。合适的亲和树脂的实例包括蛋白A琼脂糖树脂(如,MabSelect,GE Healthcare,Piscataway,N。J。)其中,细胞结合剂是抗体,以及凝集素亲和树脂,如Lentil凝集素琼脂糖树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.),其中细胞结合剂具有适当的凝集素结合位点。可选地,可使用对细胞结合剂特异的抗体。此类抗体可固定于,例如,琼脂糖4Fast Flow树脂(GE Healthcare,Piscataway,N.J.)。合适的反相树脂的实例包括C4、C8和C18树脂(Grace Vydac,Hesperia,Calif)。

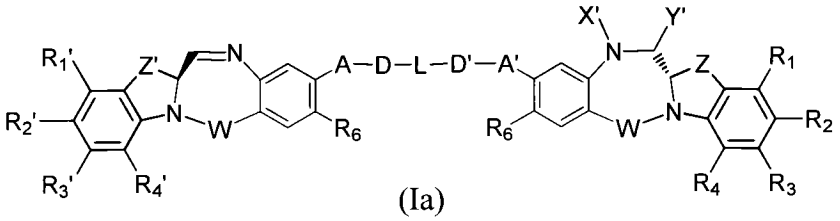
[0343] 任何合适的非吸附色谱树脂可用于本发明的方法。合适的色谱树脂的实例包括但不限于SEPHADEX™G-25、G-50、G-100、SEPHACRYL™树脂(如,S-200和S-300),SUPERDEX™树脂(如,SUPERDEX™75和SUPERDEX™200),BIO-GEL®树脂(如,P-6、P-10、P-30、P-60和P-100)和本领域的普通技术人员已知的其它树脂。

[0344] 具有连接部分的药物

[0345] 可用于本发明方法的药物包括描述于US2010/0316656、US2010/003641、US2010/0203007中的化合物,所有这些文献均通过引入并入本文。

[0346] 在某些其它实施方案中,可经由连接基团与细胞结合剂缀合的细胞毒性化合物不包含连接基团。相反,可能需要双官能交联剂(包括连接基团)以使无连接子的细胞毒性化合物通过连接子基团与CBA缀合。

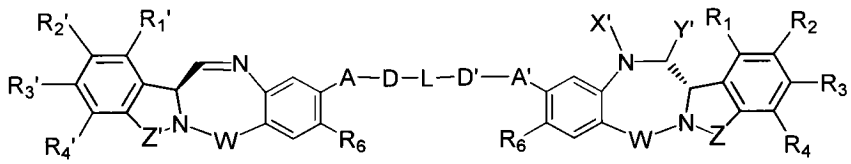
[0347] 因此在第一具体实施方案中,与具有键合至其的反应性基团的共价连接于连接基团的药物,其可用于本发明方法(诸如在本发明上文的第四方面描述的1-步试剂法),或其可以是本发明方法的中间产物(诸如本发明的第三方面描述的方法)是具有反应性基团的细胞毒性化合物,诸如反应性酯或硫醇反应性基团(统称为“反应性基团”),包括具有键合至其的反应性基团的连接基团,能够将细胞毒性化合物共价连接于CBA,其中该细胞毒性化合物由下式中的任一者



(Ia)

，或

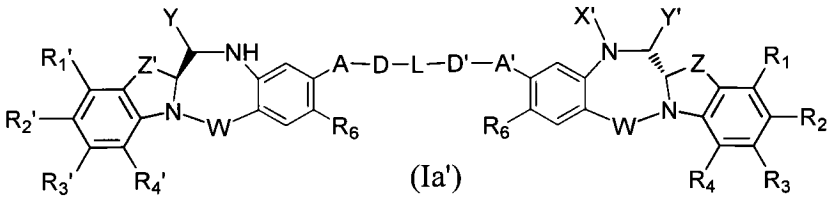
[0348]



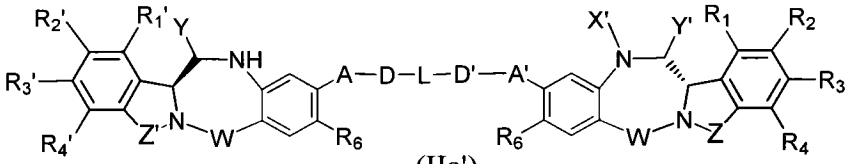
(IIa)

，

[0349] 或其药学上可接受的盐表示。一旦与亚胺反应剂发生反应,细胞毒性化合物可由下式中的任一者表示:

[0350] 

(Ia')，或

[0351] 

(IIa')，

[0352] 其中：

[0353] Y是亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2^-或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐($HS_2O_3^-$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐($HS_2O_4^-$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；

[0354] X'选自-H，-OH，氨基保护基团，具有键合至其的反应性基团的连接基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0355] Y'选自-H、氧代基团、具有键合至其的反应性基团的连接基团、任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环；

[0356] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基，或具有键合至其的反应性基团的连接基团；

[0357] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-R^c$，卤素，胍基[$-NH(C=NH)NH_2$]，-OR，-NR'R"，$-NO_2$，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'所表示的亚砜，由$-SO_2R'$所表示的砜，磺酸盐$-SO_3^-M^+$，硫酸盐$-OSO_3^-M^+$，由$-SO_2NR'R,"$所表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"和具有键合至其的反应性基团的连接基团；

[0358] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状

的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0359] R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，-NR_2，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0360] n是1至24的整数；

[0361] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

[0362] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2、卤素或具有键合至其的反应性基团的连接基团；

[0363] Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-；

[0364] n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

[0365] R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0366] R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-；

[0367] A和A'相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-NR_5-和-CRR'N(R_5)-；

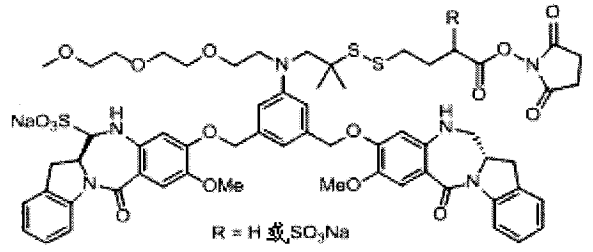
[0368] 每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

[0369] D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-；

[0370] L不存在，为具有键合至其的反应性基团的连接基团，聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基为任选被具有键合至其的反应性基团的连接基团取代；苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代，其中所述取代基可以是具有键合至其的反应性基团的连接基团。

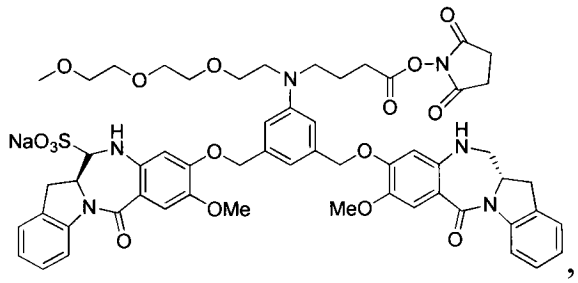
[0371] 优选地，L不存在或选自任选取代的苯基和任选取代的吡啶基，其中苯基和吡啶基任选具有键合至其的反应性基团的连接基团，或L是具有键合至其的反应性基团的连接基团的氨基(即，-N(连接基)-)，所述连接基团具有键合至其的反应性基团，或L是具有1至6个碳原子且具有连接基团的直链、支链或环状的烷基或烯基，所述连接基团具有键合至其的反应性基团。

[0372] 式(Ia')和(IIa')的若干代表性化合物列于下文：

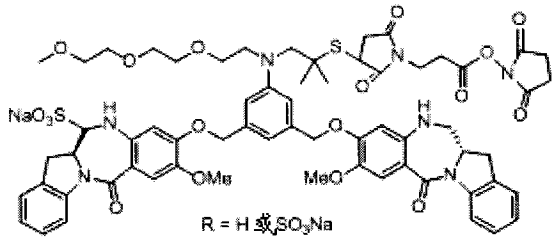


，

[0373]



，



。

[0374] 在某些实施方案中，

[0375] X’选自-H，-OH，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，具有键合至其的反应性基团的连接基团，以及氨基保护基团。优选地，X’是-H、-OH、-Me或具有键合至其的反应性基团的连接基团。更优选地，X’是-H；

[0376] Y，选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。优选地，Y’选自-H或氧代。更优选地，Y’是-H；

[0377] W是C＝O；

[0378] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’和R_4’各自独立地选自-H、-NR’R”、-NR’(C＝O)R、-OR、-SR、-NO_2和具有键合至其的反应性基团的连接基团。优选地，R_2、R_3、R_2’和R_3’中的一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团且其余的是-H；

[0379] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或苯基；

[0380] R’和R ”相同或不同且独立地选自-H，-OH，-OR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或苯基；

[0381] R_6是-OR^c或-SR^c，其中R^c是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。优选地，R_6是-OMe或-SMe。甚至更优选地，R_6是-OMe；

[0382] Z和Z’是-CH_2-；

[0383] A和A’相同或不同，且选自-O-、-S-、-NR_5，和氧代(C＝O)。优选地，A和A’相同或不同，且选自-O-和-S-。更优选地，A和A’是-O-；

[0384] D和D’相同或不同，且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$，其中n是1至24的整数，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基

或炔基，其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个(如，2、3、4、5、6或更多个)独立地选自卤素、-OR、-MR'COR"、-SR和-COR'的取代基取代；

[0385] 优选地，D和D'相同或不同，且独立地选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。更优选地，D和D'是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。更优选地，D和D'相同或不同，且选自具有1至4个碳原子的直链烷基。

[0386] L不存在或选自任选取代的苯基和任选取代的吡啶基，其中苯基和吡啶基具有键合至其的反应性基团的连接基团，或L是具有键合至其的反应性基团的连接基团的氨基(即，-N(连接基)-)或L是具有1至6个碳原子且具有键合至其的反应性基团的连接基团的直链、支链或环状的烷基或烯基。

[0387] 在第二具体实施方案中，对于细胞毒性二聚物(Ia)或(IIa)，变量如下所述：

[0388] W是C=O；

[0389] R_1、R_2、R_1'、R_2'、R_4和R_4'是-H；

[0390] R_3或R_3'中的一者任选为具有键合至其的反应性基团的连接基团且另一者是-H；

[0391] R_6是-OMe；

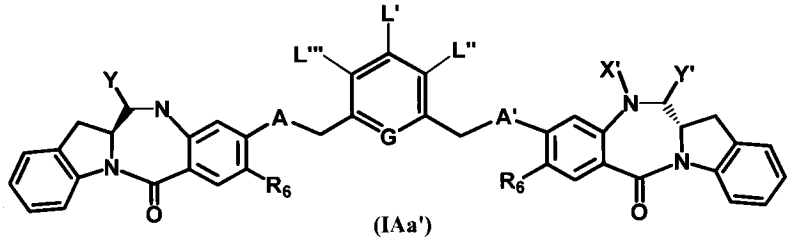
[0392] Z和Z'是-CH_2-；

[0393] X'是-H；

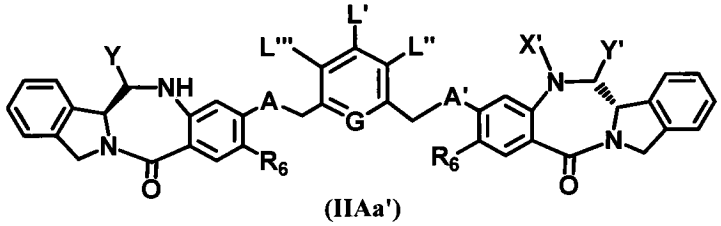
[0394] Y'是-H；

[0395] A和A'是-O-；且剩余的变量如第一具体实施方案所述。

[0396] 在第三具体实施方案中，式(Ia')和(IIa')的细胞毒性二聚体(键合于具有连接至其的反应性基团的连接基团)由下式表示：

[0397] 

(IAa')
；

[0398] 

(IIAa')
，

[0399] 其中：

[0400] X，选自-H，-OH，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，以及氨基保护基团。优选地，X'是-H、-OH或-Me。更优选地，X'是-H；

[0401] Y，选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。优选地，Y'选自-H或-Me。更优选地，Y'是-H；

[0402] L，、L，，和L"'相同或不同，且独立地选自-H，具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NR，COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由-SO_2R'表示的砜，磺酸盐-

$SO_3^-M^+M$，硫酸盐-$OSO_3^+M^-$，由-$SO_2NR'R''$表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"和具有键合至其的反应性基团的连接基团，条件是L'、L"和L"'中仅一者是具有键合至其的反应性基团的连接基团。优选地，L'是具有键合至其的反应性基团的连接基团。可选地，L'、L"或L"'中的一者为具有键合至其的反应性基团，而其它为-H的连接基团。更优选地，L'是具有键合至其的反应性基团的连接基团，而L"和L"'均是-H；

[0403] R_6是-OR^c或-SR^c，其中R^c是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。优选地，R_6是-OMe或-SMe。甚至更优选地，R_6是-OMe；

[0404] A和A'选自-O-和-S-。优选地，A和A'是-O-；

[0405] R是-H，具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或PEG基团$(CH_2CH_2O)n-R^c$；

[0406] n是1至24的整数；且

[0407] R^c是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；

[0408] R'和R"相同或不同，且选自-H，-OH，-OR，-NRR^g，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环，PEG基团-$(CH_2CH_2O)_n-R^c$，其中n是1至24的整数，优选地n是2、4或8；且$R^{g'}$是-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或PEG基团$(CH_2CH_2O)n-R^c$；

[0409] G选自-CH-或-N-；而其余的变量如第一具体实施方案所述。

[0410] 在第四具体实施方案中，对于式(IAa')或(IIAa')的细胞毒性二聚体，L'由下式表示：

[0411] -W'-R^x-V-R^y-J，

[0412] 其中：

[0413] W'和V相同或不同，且各自独立地不存在或选自-$CR^eR^{e'}$-、-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-S-、-SO-、-SO_2-、-CH_2-S-、-CH_2O-、-CH_2NR^e-、-O-(C=O)O-、-O-(C=O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-C(=O)-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)O-、-N(C(=O)R^e)C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-$(O-CH_2-CH_2)_n$-、-SS-或-C(=O)-或氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽；

[0414] R^x和R^y相同或不同，且各自独立地不存在或者是具有1至10个碳原子的任选取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，具有6至10个碳原子的芳基或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环；

[0415] R^e和$R^{e'}$相同或不同，且选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基，任选地具有仲氨基(如，-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)或5或6元含氮杂环，诸如哌啶或吗啉，其中R^{101}和R^{102}为各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；优选地，R^{101}和R^{102}为各自独立地具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；

[0416] n是1至24的整数；且

[0417] J包含键合至其的反应性基团，且选自马来酰亚胺、卤代乙酰氨基、-SH、-SSR^d、-CH_2SH、-CH(Me)SH、-$C(Me)_2SH$和-COE，其中-COE表示反应性酯，其选自但不限于N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、硝基苯基(如，2或4-硝基苯基)酯、二硝基苯基(如，2，4-二硝基苯基)酯、磺基-四氟苯基(如，4-磺基-2，3，5，6-四氟苯基)酯和五氟苯基酯，且其

中R^{c1}是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基，且，

[0418] R^d选自苯基、硝基苯基(如，2或4-硝基苯基)、二硝基苯基(如，2或4-硝基苯基)、羧基硝基苯基(如，3-羧基-4-硝基苯基)、吡啶基或硝基吡啶基(如，4-硝基吡啶基)。

[0419] 优选地，J是-SH、-SSR^d、马来酰亚胺或N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0420] 优选地，$R^{e'}$是-H或-Me；R^e是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$；n是2至8的整数，优选地R^k是-H、-Me或-$CH_2CH_2-NMe_2$，而其余的变量如在上面第三具体实施方案中所述。

[0421] 在另一优选的实施方案中，V是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。更优选地，V是缬氨酸-瓜氨酸、gly-gly-gly或ala-leu-ala-leu。

[0422] 在另一优选的实施方案中，w'是-O-、-N(R^e)-或-N(R^e)-C(=O)-；R^e是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基，或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$；R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；V不存在、为-$(O-CH_2-CH_2)_n$-、-C(=O)NH-、-S-、-NH-C(=O)；R^y不存在或者是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且J是-SH、-SSR^d或-COE(优选地，N-羟基琥珀酰亚胺酯)。剩余的变量如第四具体实施方案所述。

[0423] 在另一优选的实施方案中，W'是-O-、-N(R^e)-或-N(R^e)-C(=O)-；R^e是H、-Me或-$(CH_2-CH_2-O)_n-Me$；n是2至6的整数；R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；V和R^y不存在；且J是-COE，优选N-羟基琥珀酰亚胺酯。

[0424] 在第五具体实施方案中，L'由下式表示：

[0425] -W'-$[CR_{1''}R_{2''}]_a$-V-$[Cy]_{0-1}$-$[CR_{3''}R_{4''}]_b$-COE，

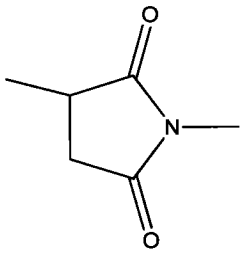
[0426] 其中：

[0427] $R_{1''}$、$R_{2''}$和$R_{3''}$各自独立地为-H或-Me；

[0428] $R_{4''}$是-H、-Me、-SO_3H或-$SO_3^-M^+$，其中M^+是药学上可接受的阳离子；

[0429] a是0-2的整数，b是0-3的整数；且

[0430] Cy是具有N杂原子的任选取代的5元杂环，优选地Cy是

[0431] 

。

[0432] 在某些实施方案中，诸如在第四或第五具体实施方案中，W'是-N(R^e)-。

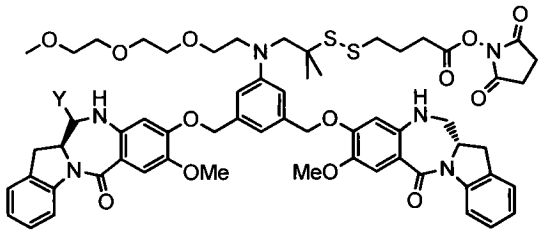
[0433] 在某些实施方案中，诸如在第四或第五具体实施方案中，R^e是-$(CH_2-CH_2-O)_{2-6}-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[0434] 在某些实施方案中，诸如在第四或第五具体实施方案中，V是-S-或-SS-。

[0435] 在第六具体实施方案中，诸如在第四或第五具体实施方案中，L'由下式表示：

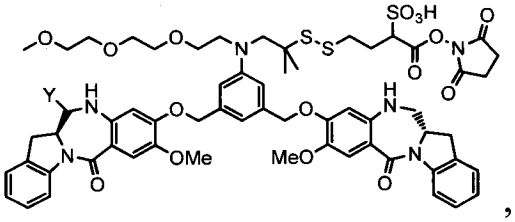
[0436] -NR^e-$[CR_{1''}R_{2''}]_a$-S-$[CR_{3''}R_{4''}]_b$-COE。

[0437] 在某些实施方案中，如在第4、第5和第6具体实施方案中，键合于具有连接至其的反应性基团的连接基团的细胞毒性化合物是：



，或

[0438]



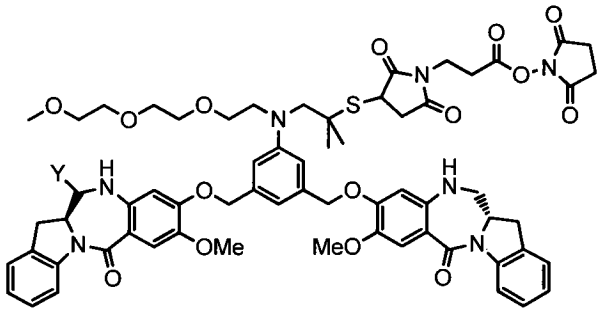
，

[0439] 其中Y是-SO3M，且M是-H或药学上可接受的阳离子。

[0440] 在第七具体实施方案中，诸如在第四、第五或第六具体实施方案中，L'由下式表示：

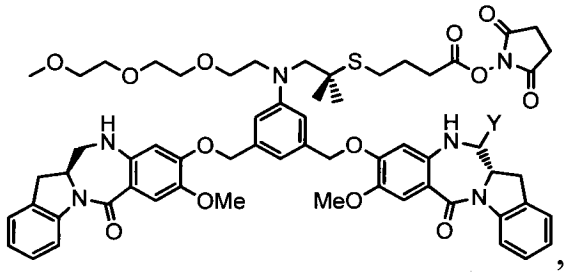
[0441] $-NR^{e}-[CR^{1''}R^{2''}]_{a}-S-Cy-[CR_{3''}R_{4''}]_{b}-COE$。

[0442] 在某些实施方案中，如在第4、第5和第7具体实施方案中，键合于具有连接至其的反应性基团的连接基团的细胞毒性化合物是：



，或

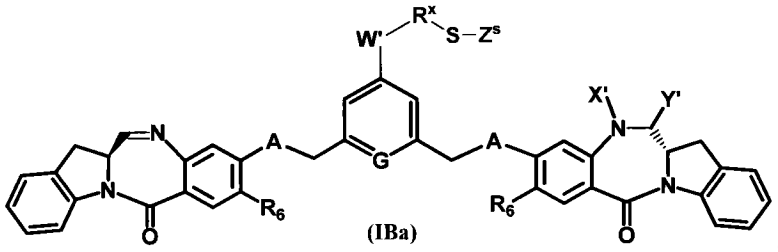
[0443]



，

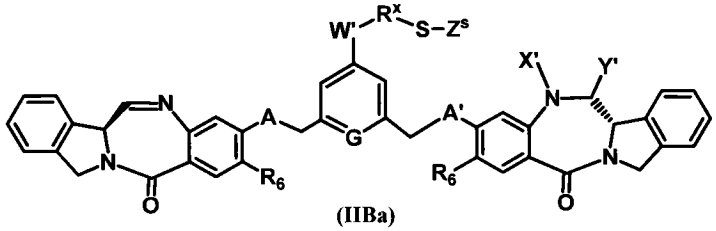
[0444] 其中Y是-SO_3M，且M是-H或药学上可接受的阳离子。

[0445] 在第八具体实施方案中，式(Ia)和(IIa)的细胞毒性化合物由下式表示：

[0446] 

(IBa)

,



(IIBa)

[0447] 其中：

[0448] W'不存在或选自-O-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-或-CH_2-S-、-CH_2NR^e-；

[0449] R^x不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0450] R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基(如，-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)基团或5或6元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；优选地，R^{101}和R^{102}各自独立地为具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；

[0451] Z^s是-H、-SR^m；

[0452] R^m是R^d或具有1至4个碳原子的取代或未取代的具有反应性酯的直链或支链的烷基，所述反应性酯选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、二硝基苯基酯、五氟苯酯；

[0453] R^d选自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基；

[0454] n是1至24的整数，且剩余的变量如上文第四具体实施方案所述。

[0455] 优选地，R^k是-H或-Me且n是2至8的整数。优选地，R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；且剩余的变量如上文第五具体实施方案所述。

[0456] 在某些实施方案中，对于在第八具体实施方案中所述的式(IBa)和(IIBa)的化合物，变量如下所述：

[0457] X'和Y'均是-H；

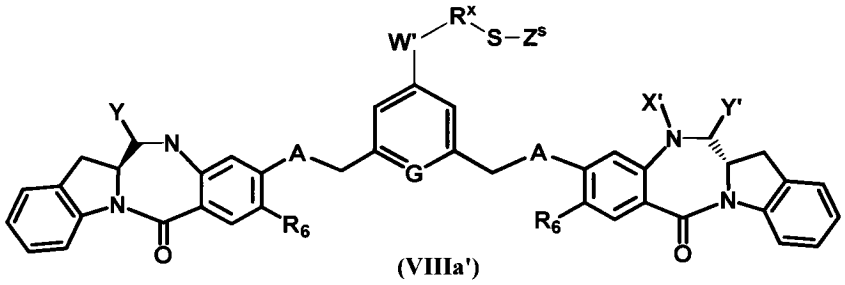
[0458] A和A'均是-O-；

[0459] R_6是-OMe；

[0460] R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；且剩余的变量如上文第八具体实施方案所述。

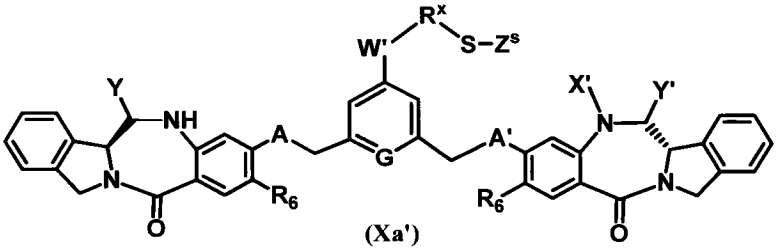
[0461] 优选地，R^x是-(CH_2)$_p$-(CR^fR^g)-，其中R^f和R^g各自独立地选自H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；p是0、1、2或3。更优选地，R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

[0462] 在第九具体实施方案中，键合于具有连接至其的反应性基团的连接基团的细胞毒性化合物由下式中的任一者表示：



(VIIIa')

[0463] ，或



(Xa')

，

[0464] 其中：

[0465] Y选自-SO_3M、-SO_2M或-OSO_3M；

[0466] M是-H或药学上可接受的阳离子诸如Na^+或K^+；

[0467] X’选自-H，-OH，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，以及氨基保护基团；

[0468] Y’选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

[0469] A和A’选自-O-和-S-；

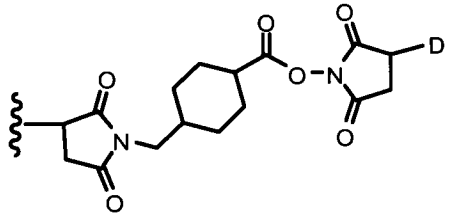
[0470] W’不存在或选自-O-、-$N(R^e)$-、-$N(R^e)$-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-或-CH_2-S-、-CH_2NR^e-；

[0471] R^x不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0472] R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基(如，-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)基团或5或6元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

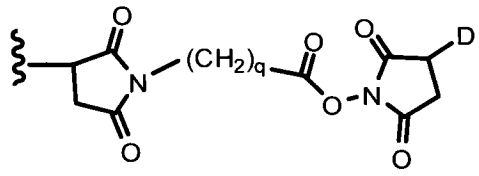
[0473] G选自-CH-或-N-；

[0474] Z^s是-H，或选自下式中的任一者：

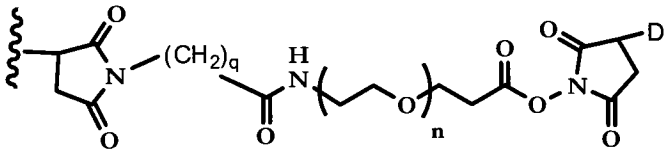


(a1);

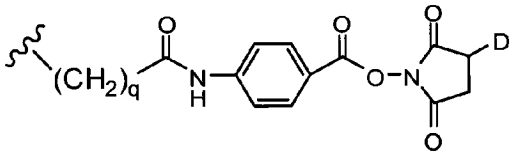
[0475]



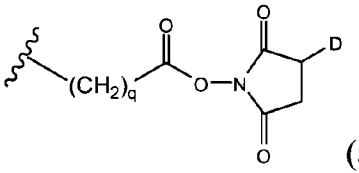
(a2);



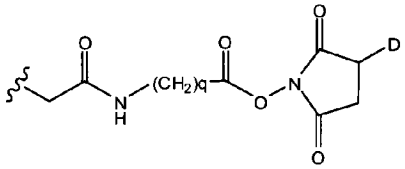
(a3);



(a4);

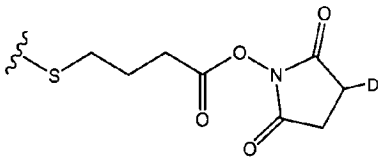


(a5);

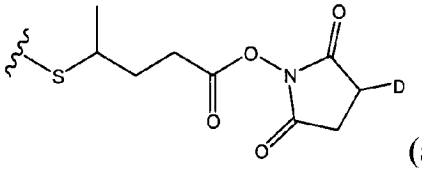


(a6);

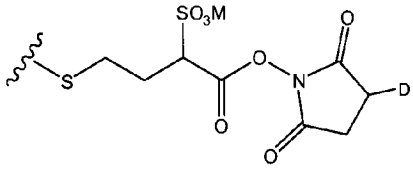
[0476]



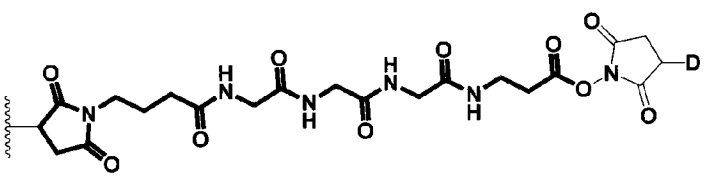
(a7);



(a8);



(a9)，和



(a10)，

[0477] 其中：

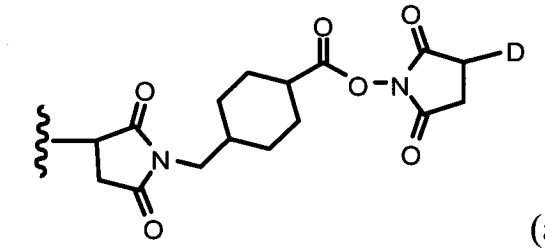
[0478] q是1至5的整数，优选地q是2；

[0479] n是2至6的整数，优选地n是4。

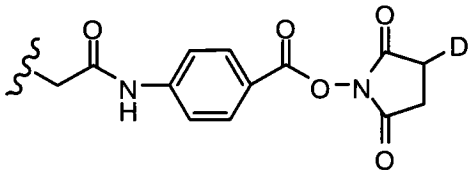
[0480] D是-H或-SO_3M；

[0481] M是-H或药学上可接受的阳离子，诸如Na^+或K^+。

[0482] 在某些实施方案中，Z^s由下式中的任一者表示：

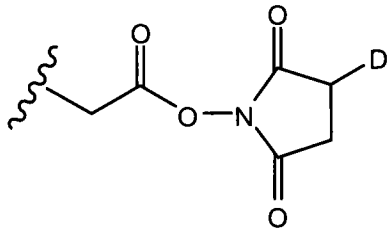


(a1);

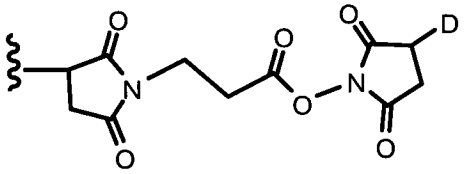


(a4');

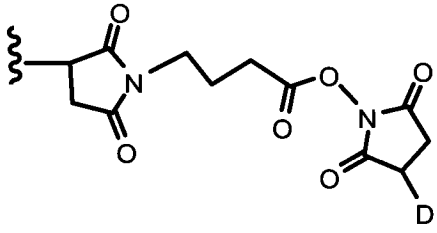
[0483]



(a5');



(a12);



(a13)。

[0484] 在某些实施方案中，诸如第九具体实施方案，W'是-$N(R^e)$-。

[0485] 在某些实施方案中，R^e是-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[0486] 在某些实施方案中，R^k是-H或-Me，n是4，且q是2。

[0487] 在某些实施方案中，R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0488] 在某些实施方案中，R^x是-$(CH_2)_p-(CR^fR^g)$-，其中R^f和R^g各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且p是0、1、2或3。

[0489] 在某些实施方案中，R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

[0490] 在第十具体实施方案中，第九具体实施方案的变量如下所示：Y是-SO_3M；M是-H或

药学上可接受的阳离子(如,Na^+);X'和Y'均是-H;A和A'均是-O-;R_6是-OMe,且R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0491] 在任何以上实施方案中,诸如第1至第9具体实施方案,Y选自-SO_3M、-SO_2M和硫酸盐-OSO_3M。优选地,Y是-SO_3M,其中M优选是-H、Na^+或K^+。

[0492] 在任何以上实施方案中,诸如第1至第10具体实施方案,W当存在时是C=O。

[0493] 在任何以上实施方案中,诸如第1至第10具体实施方案,Z和Z'当存在时是-CH_2-。

[0494] 在任何以上实施方案中,诸如第1至第10具体实施方案中,X'选自-H,-OH,任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,苯基,具有键合至其的反应性基团的连接基团,以及氨基保护基团。优选地,X'是-H、-OH、-Me或具有键合至其的反应性基团的连接基团。更优选地,X'是-H。

[0495] 在任何以上实施方案中,诸如第1至第10具体实施方案,Y'选自-H,氧代基团,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。优选地,Y'是-H或氧代。更优选地,Y'是-H。

[0496] 在任何以上实施方案中,诸如第1至第10具体实施方案,A和A'相同或不同,且选自-O-、-S-、-NR_5-,和氧代-(C=O)-。优选地,A和A'相同或不同,且选自-O-和-S-。更优选地,A和A'是-O-。

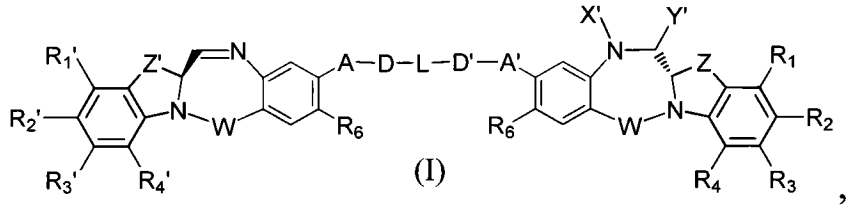
[0497] 在任何以上实施方案中,诸如第1至第10具体实施方案,D和D,当存在时相同或不同,且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$,其中n是1至24的整数,氨基酸,具有2至6个氨基酸的肽,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-MR'COR"、-SR和-COR'的取代基取代。优选地,D和D'是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。

[0498] 在第十一具体实施方案中,各组的第一、第三和第九具体实施方案的细胞毒性化合物表示如下:W是C=O;R_1、R_2、R_1'、R_2'、R_4和R_4'是-H;R_3或R_3'中的一者任选为具有键合至其的反应性基团的连接基团,而另一者是-H;R_6是-OMe;Z和Z'是-CH_2-,X'是-H;Y'是-H,且A和A'是-O-。

[0499] 在另一实施方案中,如同上文任一具体实施方案的具有连接至其的反应性基团的连接基团是列表1中所列的那些的任一者。

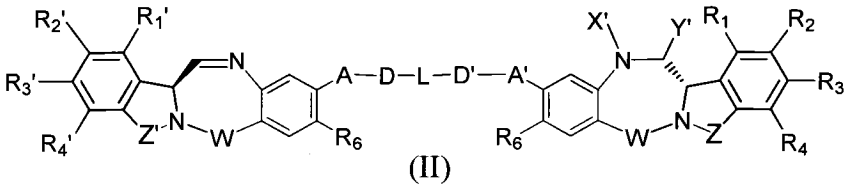
[0500] 在另一实施方案中,不含连接至其的连接子部分(诸如上述的连接子部分)的细胞毒性二聚体可进一步与双官能交联剂反应,以形成具有连接至其的反应性基团的连接部分的药物,以便用于本发明方法(如,以进一步与细胞结合剂反应以形成药物-CBA缀合物)。可选地,不含连接至其的连接子部分(诸如上述的连接子部分)的细胞毒性二聚体可进一步以一步反应与双官能交联剂和细胞结合剂反应,以直接形成药物-CBA缀合物。在任一情况下,可在反应之前将亚胺反应剂加至反应混合物中以形成药物-亚胺反应剂加合物(诸如亚硫酸氢盐加合物),以产生药物-CBA缀合物。优选地,不含连接至其的连接子部分(诸如上述的连接子部分)的细胞毒性二聚体可首先与亚胺反应剂预孵育以形成加合物,然后将反应混合物用于随后的反应以形成药物-CBA缀合物。

[0501] 因此在第十二具体实施方案中,含有亚胺的细胞毒性化合物由下式中的任一者或其药学上可接受的盐表示:



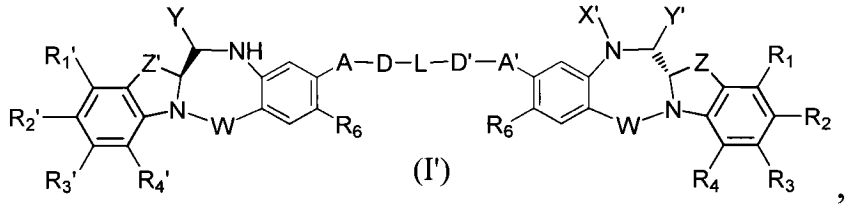
(I)

[0502]



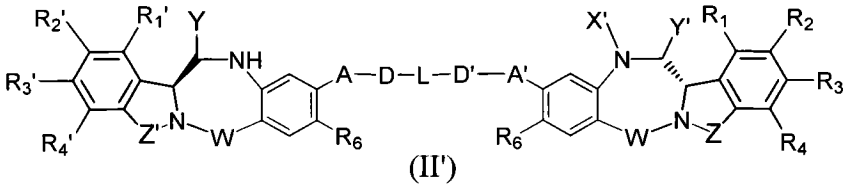
(II)

[0503] 并且，在与亚胺反应剂反应之后，细胞毒性化合物由下式或其药学上可接受的盐表示：



(I')

[0504]



(II')

[0505] 其中：

[0506] Y为亚硫酸盐(HSO_3、HSO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；优选地，Y是亚硫酸氢盐、次硫酸盐，或偏亚硫酸氢盐或其盐(诸如钠盐)的加合物；

[0507] X'选自-H，-OH，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子(如，苯基)的芳基，任选取代的含有一个或多个杂原子独立地选自氮、氧和硫杂原子的5至18元杂芳环和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环。优选地，X'是-H、-OH或-Me。更优选地，X'是-H；

[0508] Y'选自-H，氧代基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、

烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至18元杂环。优选地，Y'选自-H或氧代。更优选地，Y'是-H；

[0509] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基；

[0510] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-R^c$，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，$-NO_2$，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'所表示的亚砜，由$-SO_2R'$所表示的砜，磺酸盐$-SO_3^-M^+$，硫酸盐$-OSO_3^-M^+$，由$-SO_2NR'R"$所表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'和-OCONR'R"。优选地，1、2、3，或所有的R_2、R_3、R_2'和R_3'是-H；

[0511] M是-H或药学上可接受的阳离子；

[0512] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0513] R'和R"相同或不同，且独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，$-NR_2$，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环；

[0514] n是1至24的整数；

[0515] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

[0516] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、$-NO_2$、卤素、$-OR^c$或$-SR^c$；优选地，R_6是-OMe或-SMe。甚至更优选地，R_6是-OMe；

[0517] Z和Z'独立地选自$-(CH_2)_{n'}-$、$-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}-$，$-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}-$、$-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}-$和$-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}-$；

[0518] n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

[0519] R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-$，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0520] R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-$；

[0521] A和A'相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、$-N(R_5)-$和$-CRR'N(R_5)-$。优选地，A和A'相同或不同，且选自-O-和-S-。更优选地，A和A'是-O-；

[0522] 每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

[0523] D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-$；

[0524] L不存在，或当存在时，包含硫醇基，且是聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n-$，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子

的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基、苯基或杂环或杂芳基环任选被取代。

[0525] 此类含有亚胺的细胞毒性化合物的代表性结构示于表15。参见化合物1、3、4、5和1d。

[0526] 在某些实施方案中，

[0527] W是C=O；

[0528] R_1、R_2、R_3、R_4、$R_{1'}$、$R_{2'}$、$R_{3'}$和$R_{4'}$是-H；

[0529] Z和Z'是$-CH_2-$；

[0530] A和A'均是-O-；

[0531] W是-(C=O)-；

[0532] G是-CH-；

[0533] R_6是-H或任选取代的C1-C10直链、C1-C10支链或C3-C7环烷基，-O-烷基或-O-卤代烷基，诸如-OMe；

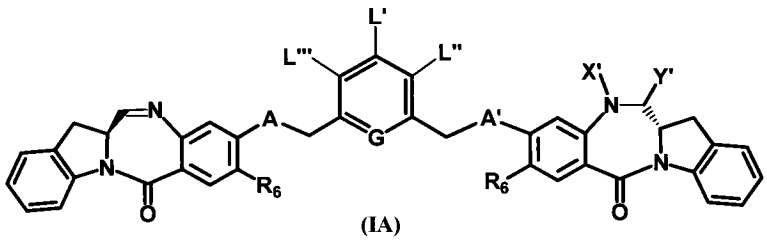
[0534] X'选自-H，-OH，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，以及氨基保护基团；且

[0535] Y'选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。

[0536] 优选地，Y选自$-SO_3M$、$-SO_2M$或$-OSO_3M$，且其中M是-H或药学上可接受的阳离子，诸如Na^+或K^+。

[0537] 优选地，Y是$-SO_3M$；M是-H或Na^+。

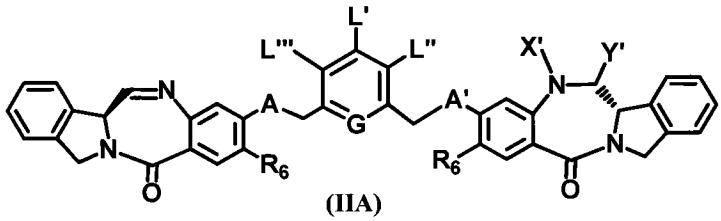
[0538] 在某些实施方案中，含有亚胺的细胞毒性化合物由下式中的任一者表示：



(IA)

，或

[0539]



(IIA)

，

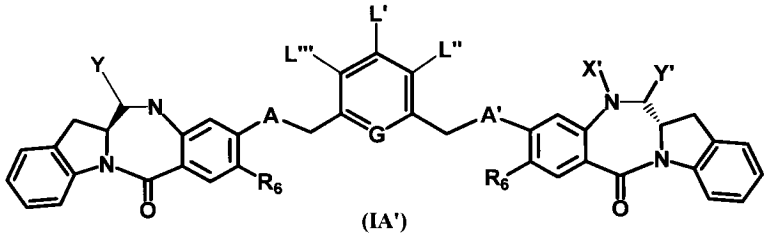
[0540] 其中：

[0541] L，、L，"和L"'相同或不同，且独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(OCH_2CH_2)_n-R^c$，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，$-NO_2$，-NR'COR"，-SR，由-SOR'所表示的亚砜，由$-SO_2R'$所表示的砜，磺酸盐$-SO_3M$，硫酸盐$-OSO_3M$，由$-SO_2NR'R"$所表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"；

[0542] M是-H或药学上可接受的阳离子；且

[0543] G选自-CH-或-N-。

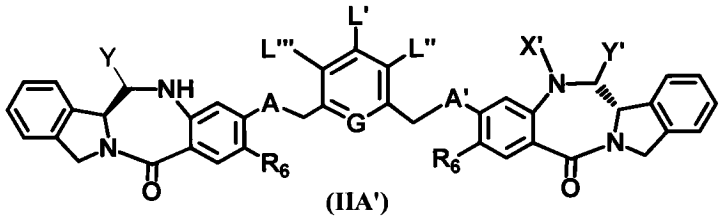
[0544] 在某些实施方案中，细胞毒性化合物当存在时由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示：



(IA')

，或

[0545]



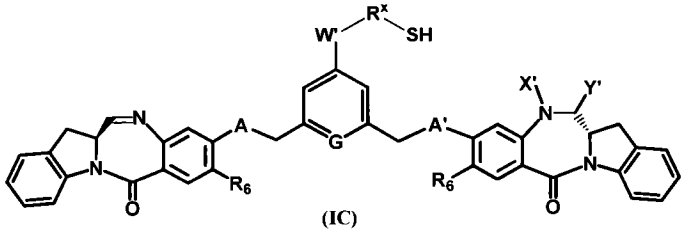
(IIA')

。

[0546] 在某些实施方案中，L'、L"或L"'中的一者具有硫醇基，而其它的是-H。优选地，L'具有硫醇基"而L"和L'"是-H。

[0547] 在某些实施方案中，A和A'均是-O-；R_6是-OMe；且G是-CH-。

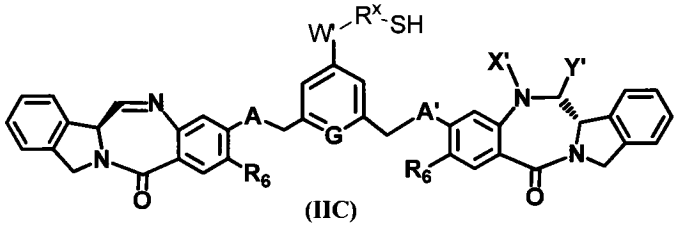
[0548] 在某些实施方案中，含有亚胺的细胞毒性化合物可由下式中的任一者表示：



(IC)

，或

[0549]



(IIC)

，

[0550] 其中：

[0551] w'不存在，或当存在时，选自$-CR^eR^{e'}-$、-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-S-、-SO-、$-SO_2-$、$-CH_2-S-$、$-CH_2O-$、$-CH_2NR^e-$、-O-(C=O)O-、-O-(C=O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-C(=O)-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)O-、-N(C(=O)R^e)C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、$-(O-CH_2-CH_2)_n-$、-SS-或-C(=O)-或氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽；

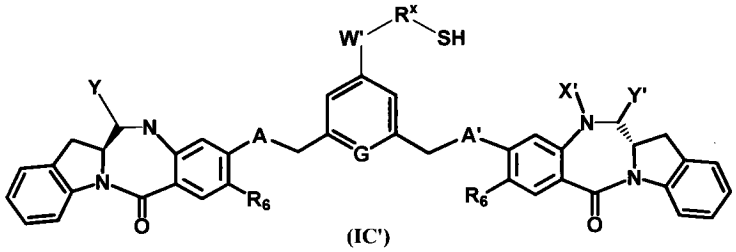
[0552] R^x不存在，或当存在时是任选被取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，具有6至10个碳原子的芳基，或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环；

[0553] R^e和$R^{e'}$相同或不同，且选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基，

任选地具有仲氨基(如,-NHR[101])或叔氨基(-NR[101]R[R02])或5或6元含氮杂环,诸如哌啶或吗啉,其中R[101]和R[102]是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;优选地,R[101]和R[102]是各自独立地具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

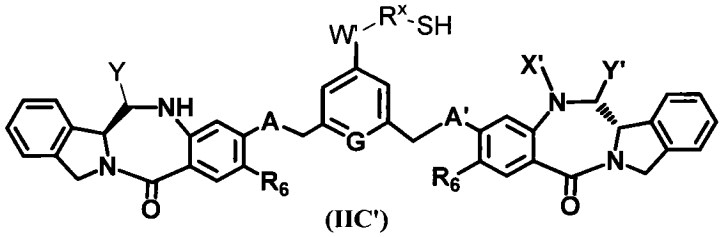
[0554] n是1至24的整数。

[0555] 在某些实施方案中,细胞毒性化合物当存在时可由下式中的一者或其药学上可接受的盐表示:



(IC'),或

[0556]



(IIC')。

[0557] 在某些实施方案中,

[0558] Y选自-SO3M、-SO2M或-OSO3M;

[0559] M是-H或药学上可接受的阳离子诸如Na+或K+;

[0560] X'选自-H,-OH,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基,苯基,以及氨基保护基团;

[0561] Y'选自-H,氧代基团,具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;

[0562] A和A'选自-O-和-S-;

[0563] w'不存在或选自-O-、-N(R[e])-、-N(R[e])-C(=O)-、-N(C(=O)R[e])-、-S-或-CH2-S-、-CH2NR[e]-;

[0564] R[x]不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0565] R[e]是-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH2-CH2-O)n-R[k],其中R[k]是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基,任选地具有仲氨基(如,-NHR[101])或叔氨基(-NR[101]R[102])基团或5或6元含氮杂环,如哌啶或吗啉,其中R[101]和R[102]各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;

[0566] G选自-CH-或-N-。

[0567] 在某些实施方案中,w'是-N(R[e])-。

[0568] 在某些实施方案中,R[e]是-(CH2-CH2-O)n-R[k],其中R[k]是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[0569] 在某些实施方案中,R[k]是-H或-Me,n是4,且q是2。

[0570] 在某些实施方案中,R[x]是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0571] 在某些实施方案中，R^x是-$(CH_2)_p$-(CR^fR^g)-，其中R^f和R^g各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且p是0、1、2或3。

[0572] 在某些实施方案中，R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

[0573] 在某些实施方案中，

[0574] Y是-SO_3M、-SO_2M或硫酸盐-OSO_3M；优选为-SO_3M；

[0575] M是-H或药学上可接受的阳离子(如，Na^+)；

[0576] X'和Y'均是-H；

[0577] A和A'均是-O-；

[0578] R_6是-OMe；且

[0579] R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

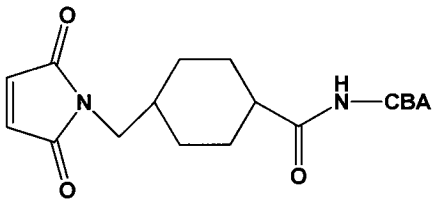
[0580] 在某些实施例中，双官能交联剂是：

[0581] 基于马来酰亚胺的部分，其选自：4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-氨基己酸酯)(LC-SMCC)、κ-马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、γ-马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α-马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SMPB)、N-(对马来酰亚氨基苯基)异氰酸酯(PMPI)、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯；或，

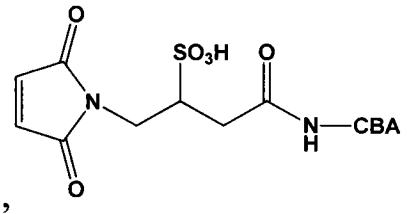
[0582] 基于卤代乙酰的部分，其选自：N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA)，溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBA)和3-(溴代乙酰氨基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBAP)、双-马来酰亚胺聚乙二醇(BMPEO)、$BM(PEO)_2$、$BM(PEO)_3$、N-(β-马来酰亚胺丙基氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、5-马来酰亚胺戊酸NHS、HBVS、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酰肼·HCl(MPBH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺己烷(BMH)、双-马来酰亚胺乙烷(BMOE)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ-马来酰亚胺丁基氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ε-马来酰亚胺己酰氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ-马来酰亚胺十一烷氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMPB)、CX1-1、磺基-Mal和PEG_n-Mal。

[0583] 在某些实施方案中，双官能交联剂选自SMCC、磺基-SMCC、BMPS、GMBS、SIA、SIAB、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯、双-马来酰亚胺己烷或BMPEO。

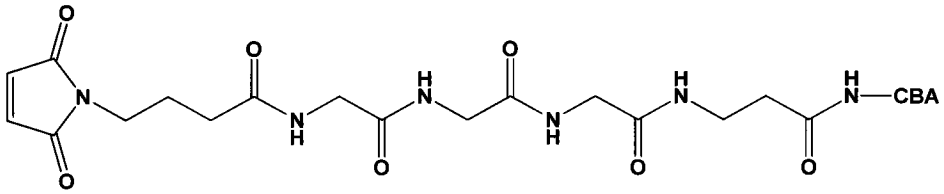
[0584] 在某些实施方案中，修饰的CBA当存在时是：


O
N
O
H
N—CBA
O

,

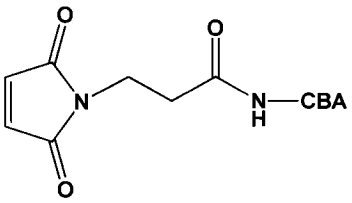

O
SO3H
O
N
O
H
N—CBA
O

,

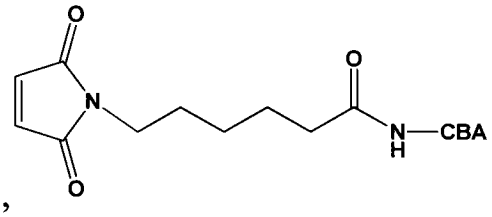

O
N
O
H
N—CBA
O

,

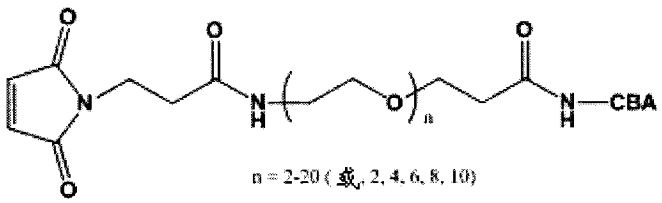
[0585]


O
N
O
H
N—CBA
O

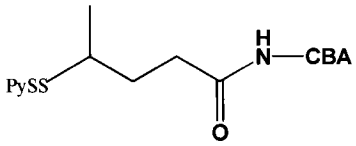
,


O
N
O
H
N—CBA
O

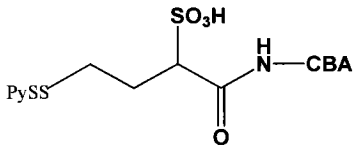
,


O
N
O
H
N
O
n
H
N—CBA
O
n = 2-20 (或, 2, 4, 6, 8, 10)

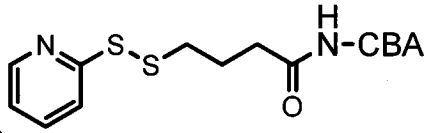
,


PySS
H
N—CBA
O

,

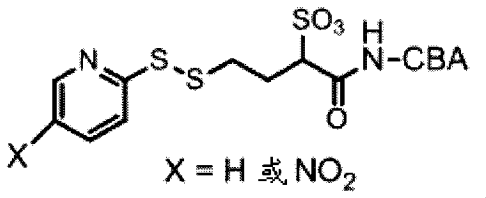

SO3H
PySS
H
N—CBA
O

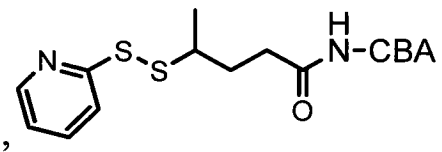
,


N
S
S
H
N-CBA
O

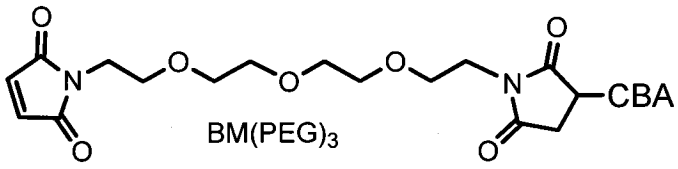
,

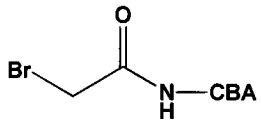
[0586]



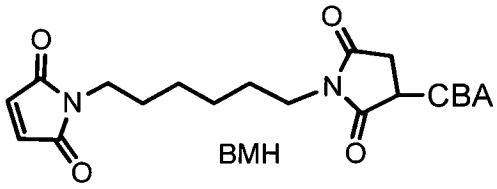
,


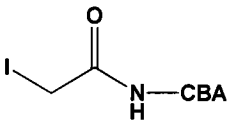
,



,


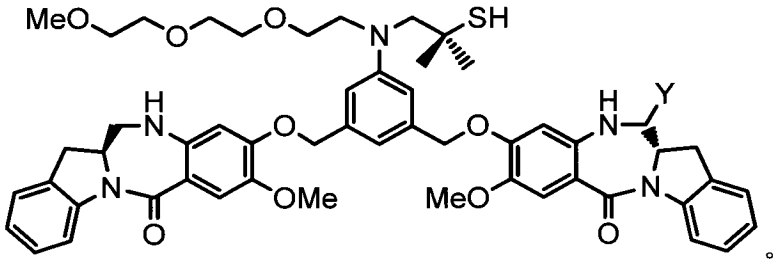
,



, 或


。

[0587] 在第十三具体实施方案中，含有亚胺的细胞毒性化合物是：

[0588]


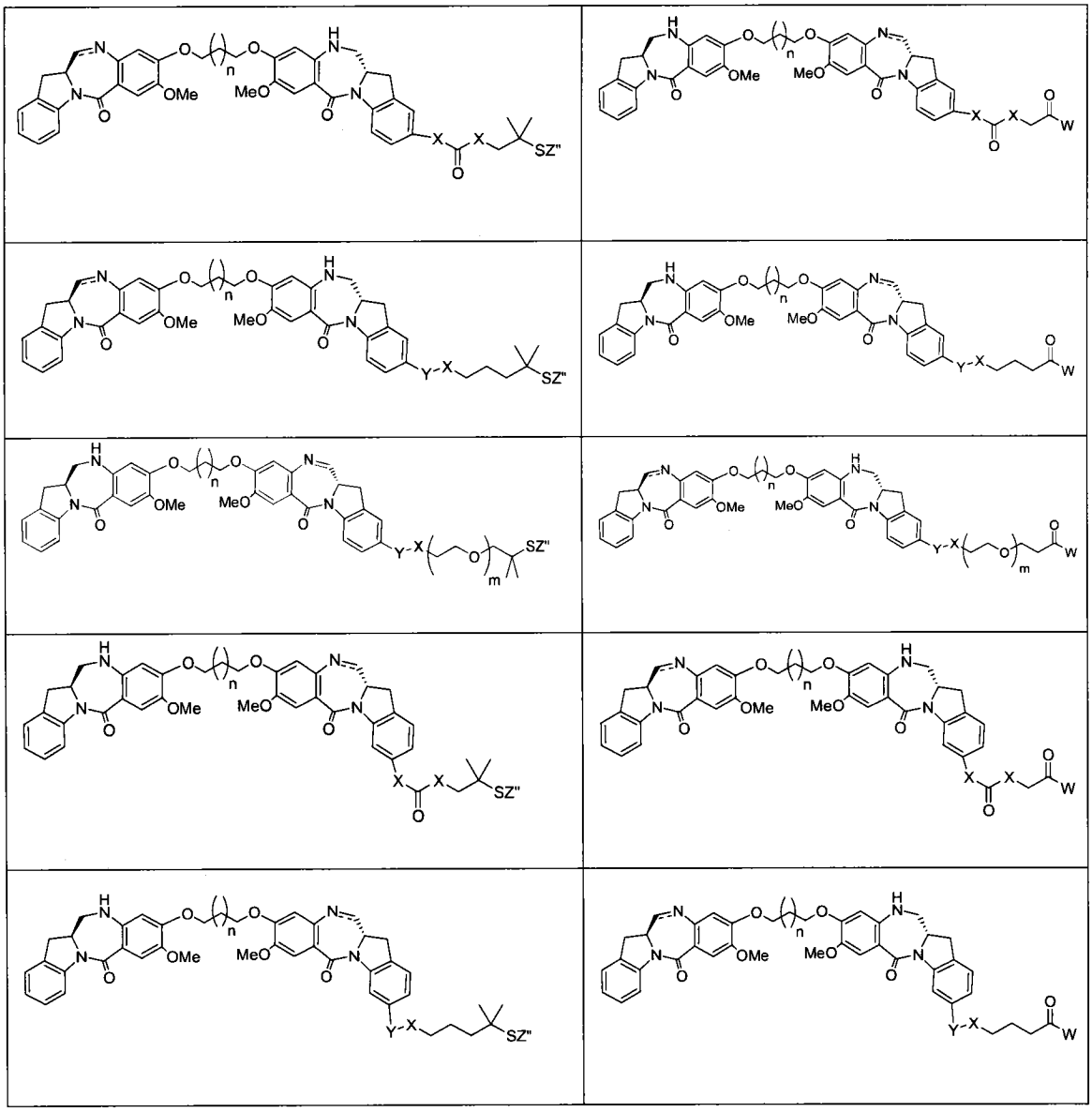
。

[0589] 该双官能交联剂可以是本领域已知的任何双官能连接子。例如，可用于制备药物-连接子化合物的双官能连接子是与细胞毒性化合物形成二硫键、硫醚键、对酸不稳定的键、对光不稳定的键、对肽酶不稳定的键、以及对酯酶不稳定的键的那些(参见例如美国专利5,208,020;5,475,092;6,441,163;6,716,821;6,913,748;7,276,497;7,276,499;7,368,565;7,388,026和7,414,073，所有这些文献均通过引用并入本文)。优选地，双官能交联剂是与细胞毒性化合物形成二硫键、硫醚和对肽酶不稳定的键的那些。可用于本发明的其它双官能交联剂包括不可裂解的连接子，诸如描述于美国公开第US2005/0169933号的那些，或带电荷的连接子或亲水性连接子以及描述于US2009/0274713、US2010/01293140和WO2009/134976，其各自通过引用明确地并入本文。可用于制备本发明的药物-连接子化合物的双官能交联剂还包括描述于Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook的那些，其全部教导通过引用并入本文。

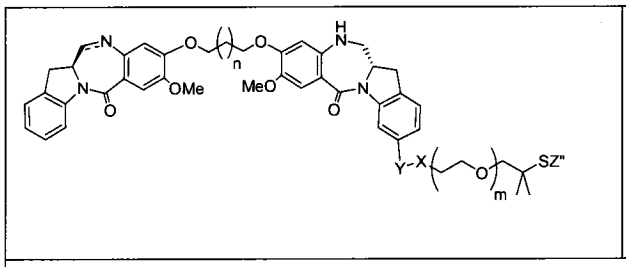
[0590] 在另一优选的实施方案中，可用于本发明的药物(含有或不含连接至其的反应性基团的连接子基团)是示于表1-7中任一者的化合物。在另一优选的实施方案中，可通过本发明制备的细胞结合剂-药物缀合物是示于表8中的缀合物的任一者。

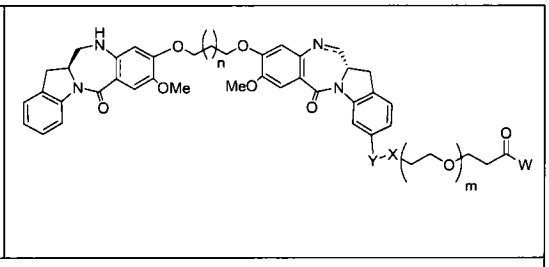
[0591] 表1.本发明中代表性化合物的结构。

[0592]



[0593]





注释:

n=1 或 3

m=3 或 4

W = OH、OMe、ONHS、$NHNH_2$、H、Me、Ph、肽

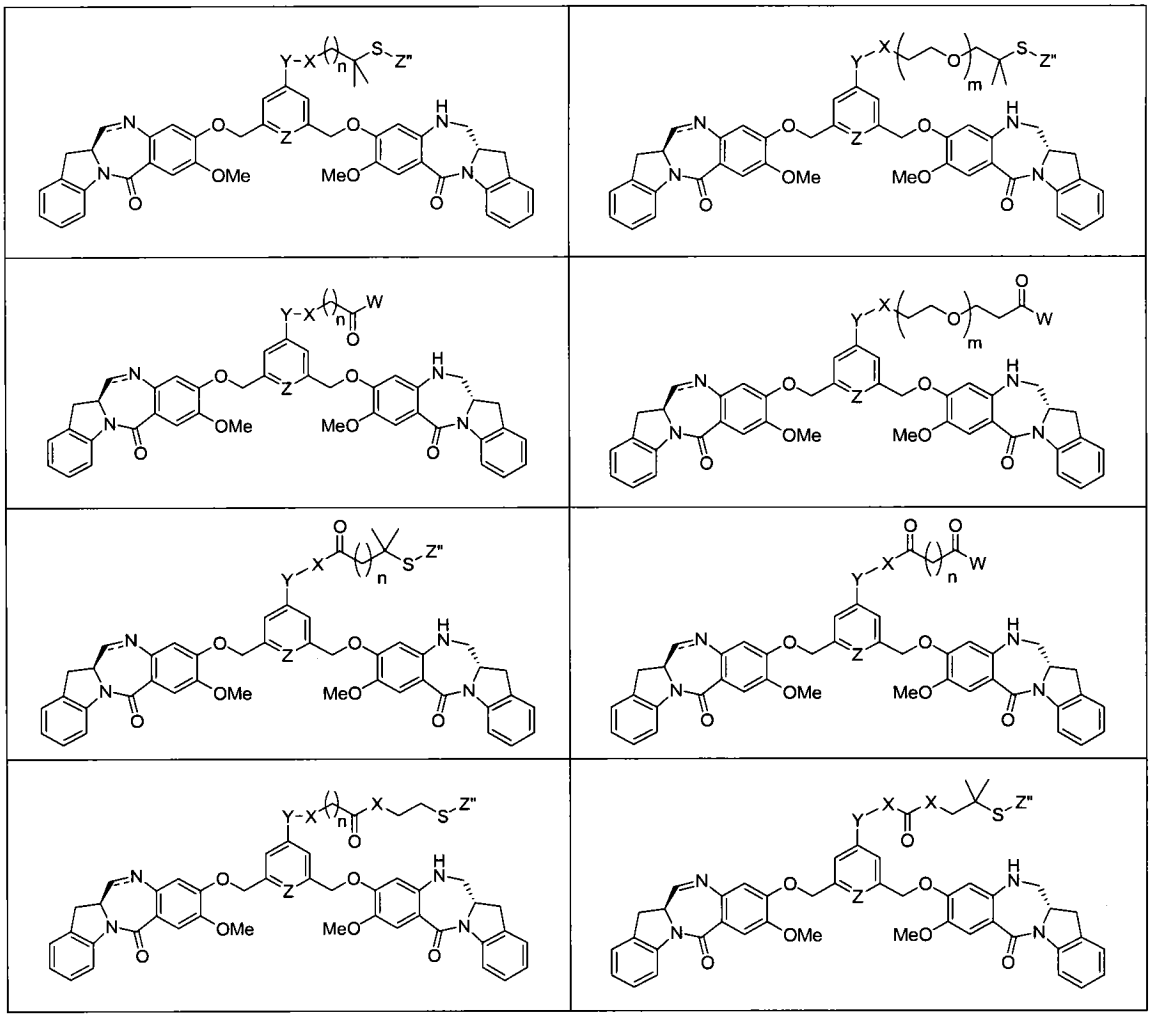
X=CH_2、O、S、NH 或 NMe

Y = CH_2 或不存在

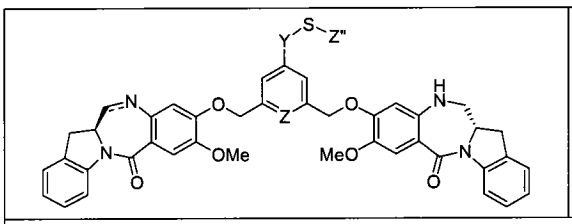
Z" = H、Me、SMe、$S(CH_2)_3C(O)NHS$ 或 $CH_2C(O)NHS$ 或 BMPS 或 SMCC 或 SPy 或 $SPy\text{-}NO_2$

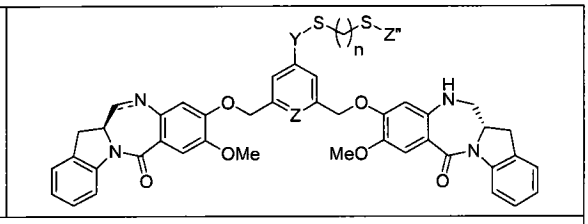
[0594] 表2.本发明代表性化合物的结构(续)。

[0595]



[0596]





注释:

n=1、2 或 3

m=3 或 4

W = OH、OMe、ONHS、$NHNH_2$、H、Me、Ph、肽

X=CH_2, O、S、NH 或 NMe

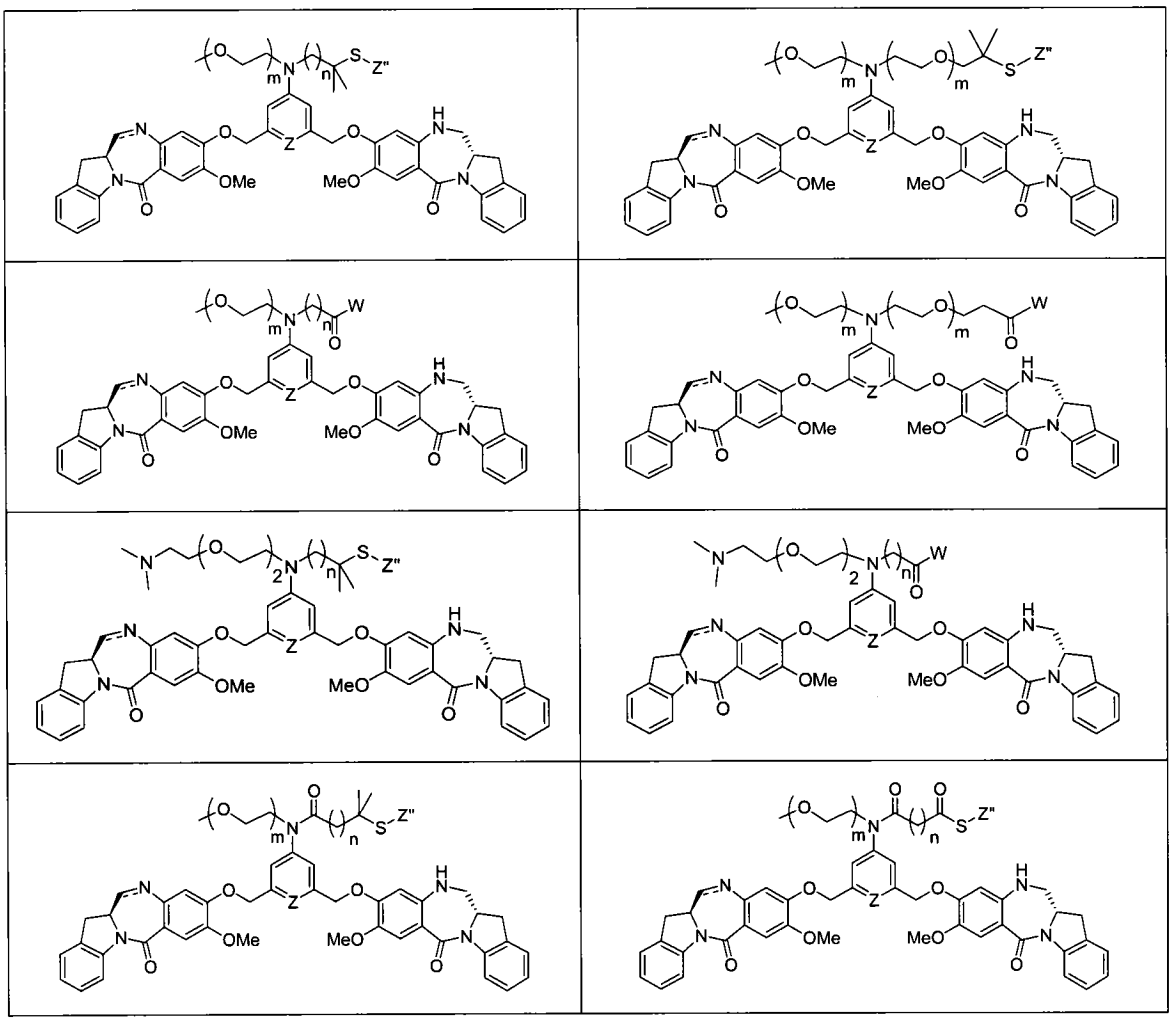
Y = 不存在或 CH_2

Z=CH 或 N

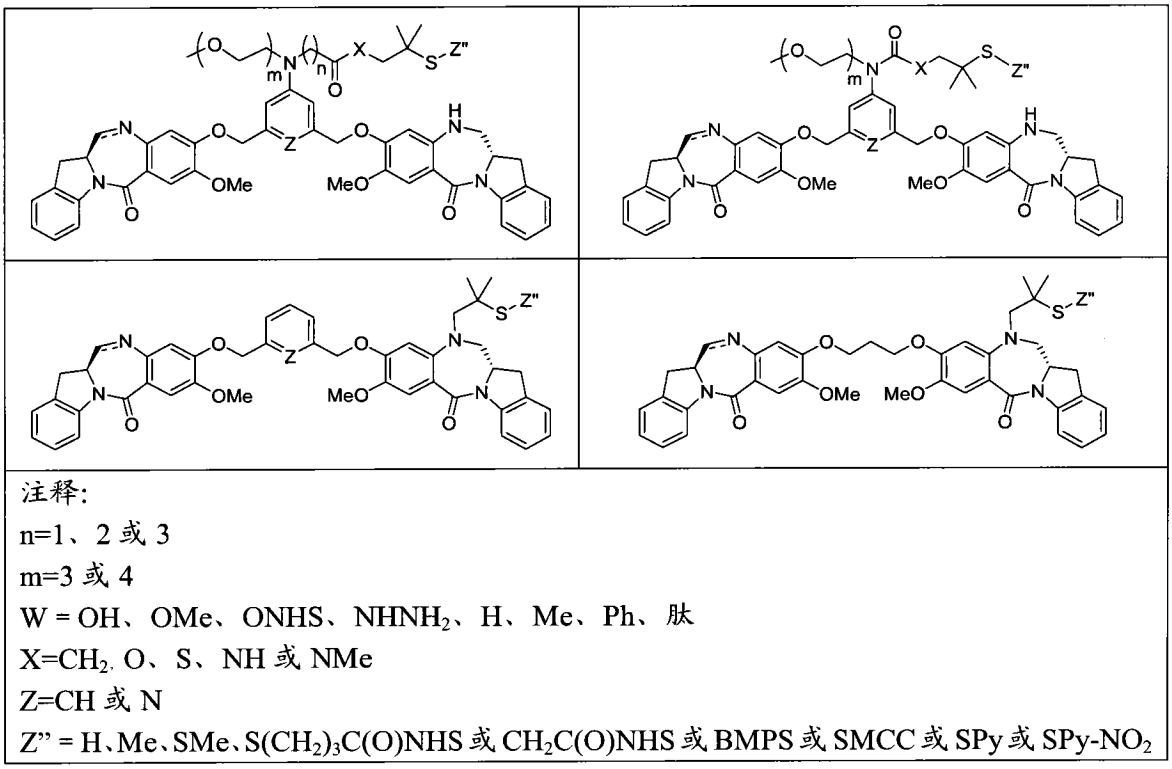
Z" = H、Me、SMe、$S(CH_2)_3C(O)NHS$ 或 $CH_2C(O)NHS$ 或 BMPS 或 SMCC 或 SPy 或 SPy-NO_2

[0597] 表3.本发明代表性化合物的结构(续)。

[0598]



[0599]



注释:

n=1、2 或 3

m=3 或 4

W = OH、OMe、ONHS、$NHNH_2$、H、Me、Ph、肽

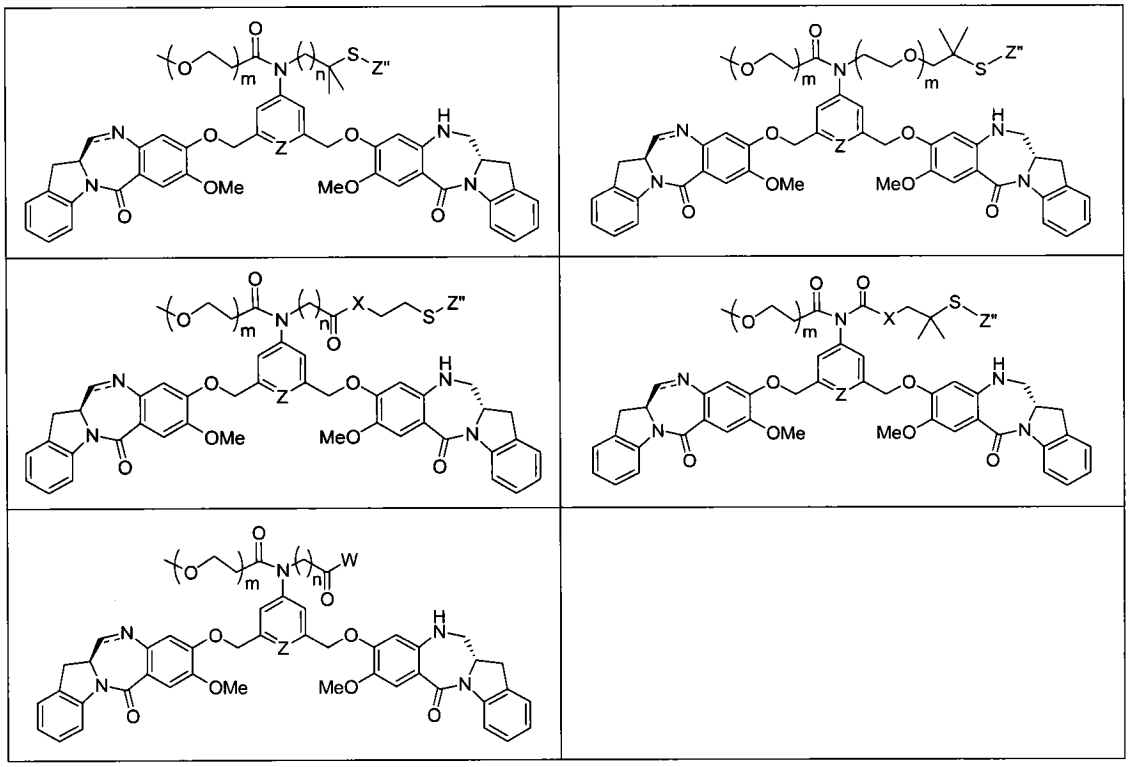
X=CH_2、O、S、NH 或 NMe

Z=CH 或 N

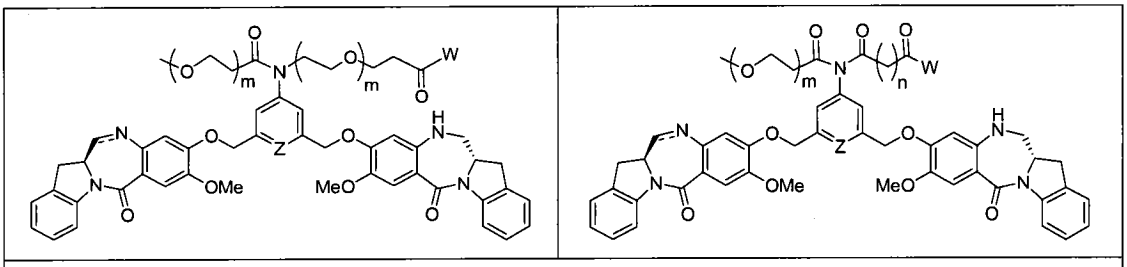
Z" = H、Me、SMe、$S(CH_2)_3C(O)NHS$ 或 $CH_2C(O)NHS$ 或 BMPS 或 SMCC 或 SPy 或 SPy-NO_2

[0600] 表4.本发明代表性化合物的结构(续)。

[0601]



[0602]



注释:

n=1、2 或 3

m=3 或 4

W = OH、OMe、ONHS、$NHNH_2$、H、Me、Ph、肽

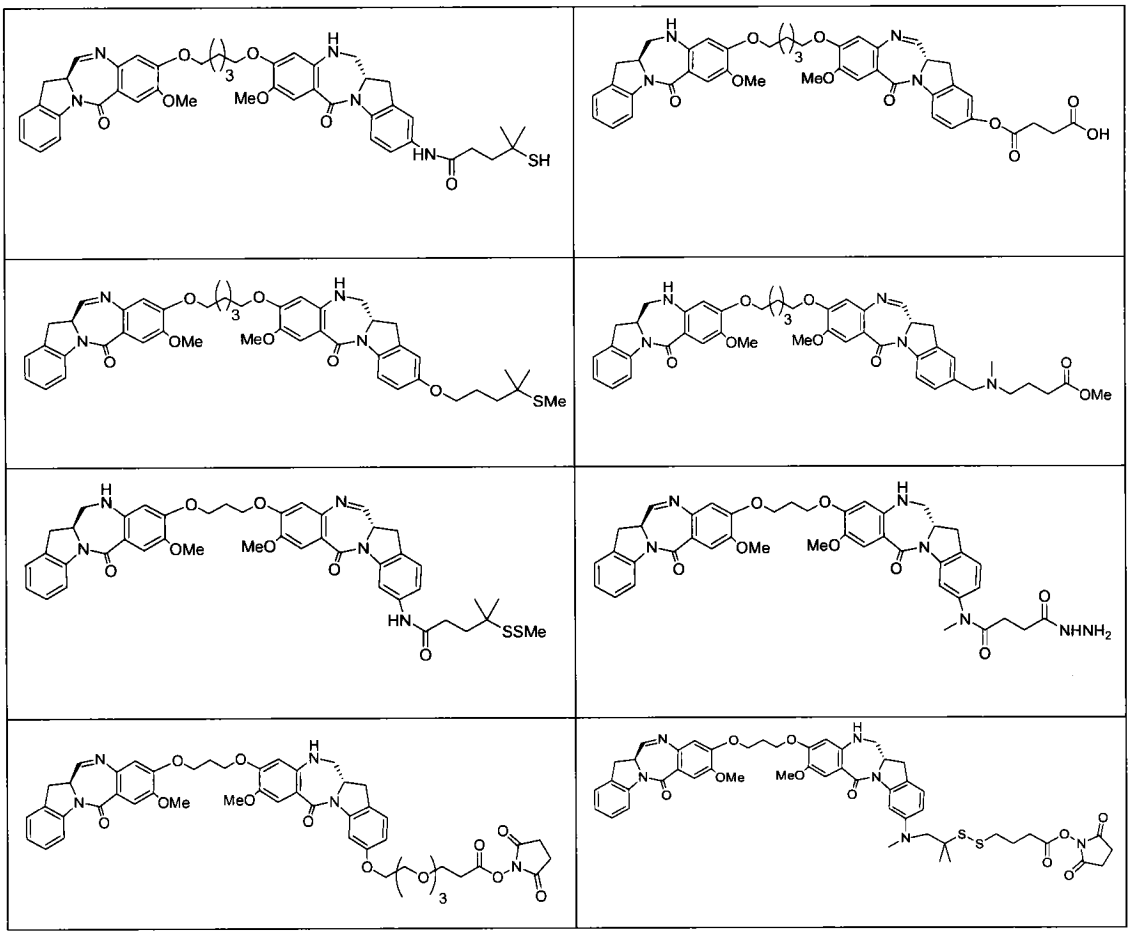
X=CH_2、O、S、NH 或 NMe

Z=CH 或 N

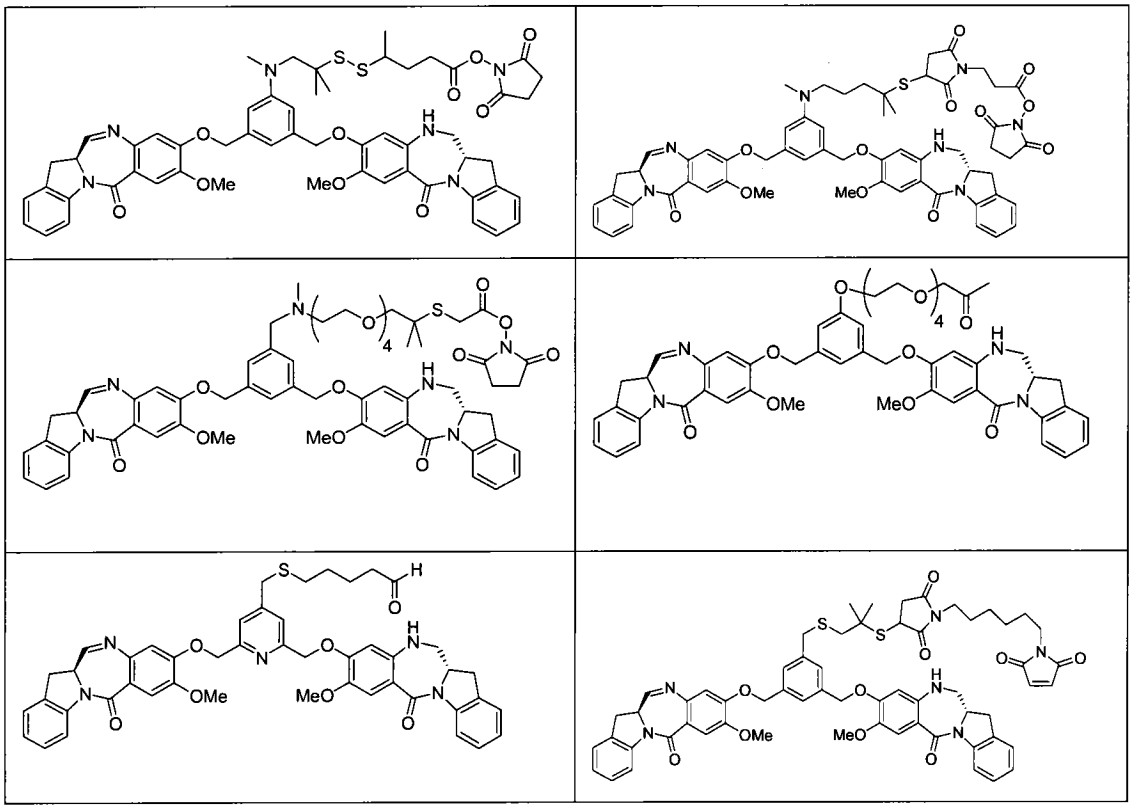
Z" = H、Me、SMe、$S(CH_2)_3C(O)NHS$ 或 $CH_2C(O)NHS$ 或 BMPS 或 SMCC 或 SPy 或 SPy-NO_2

[0603] 表5.本发明中代表性化合物的结构。

[0604]

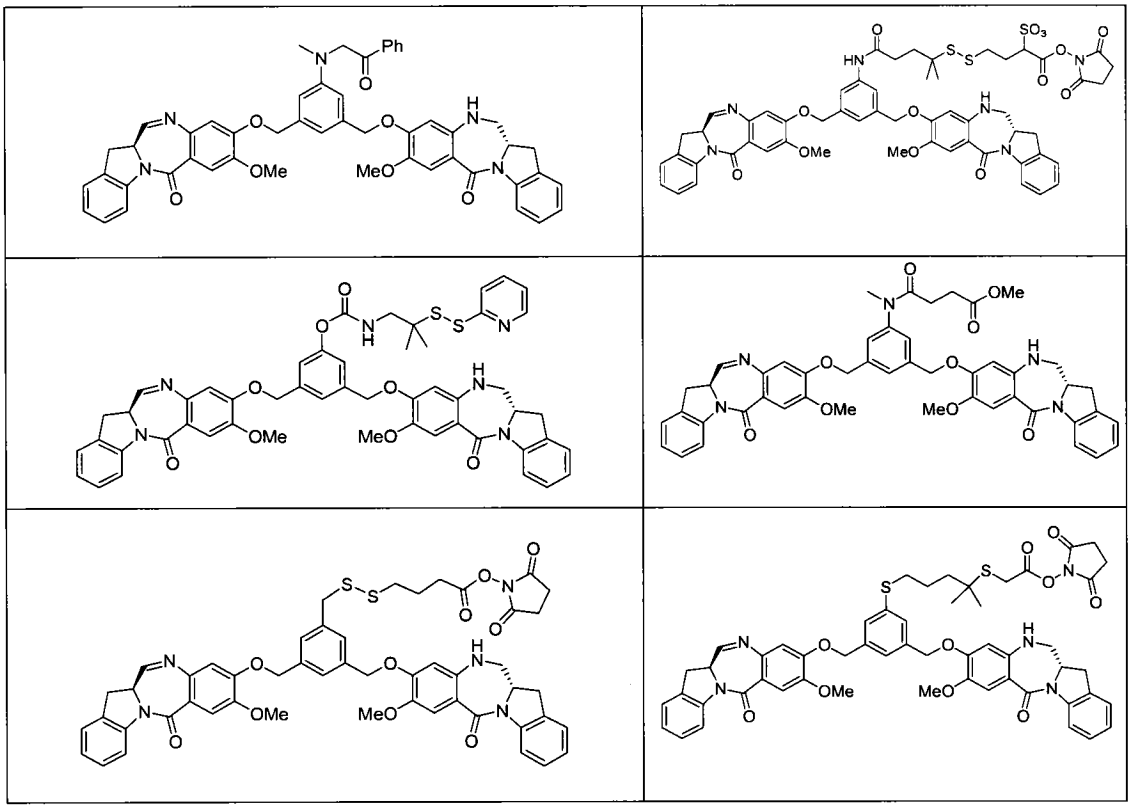


[0605]

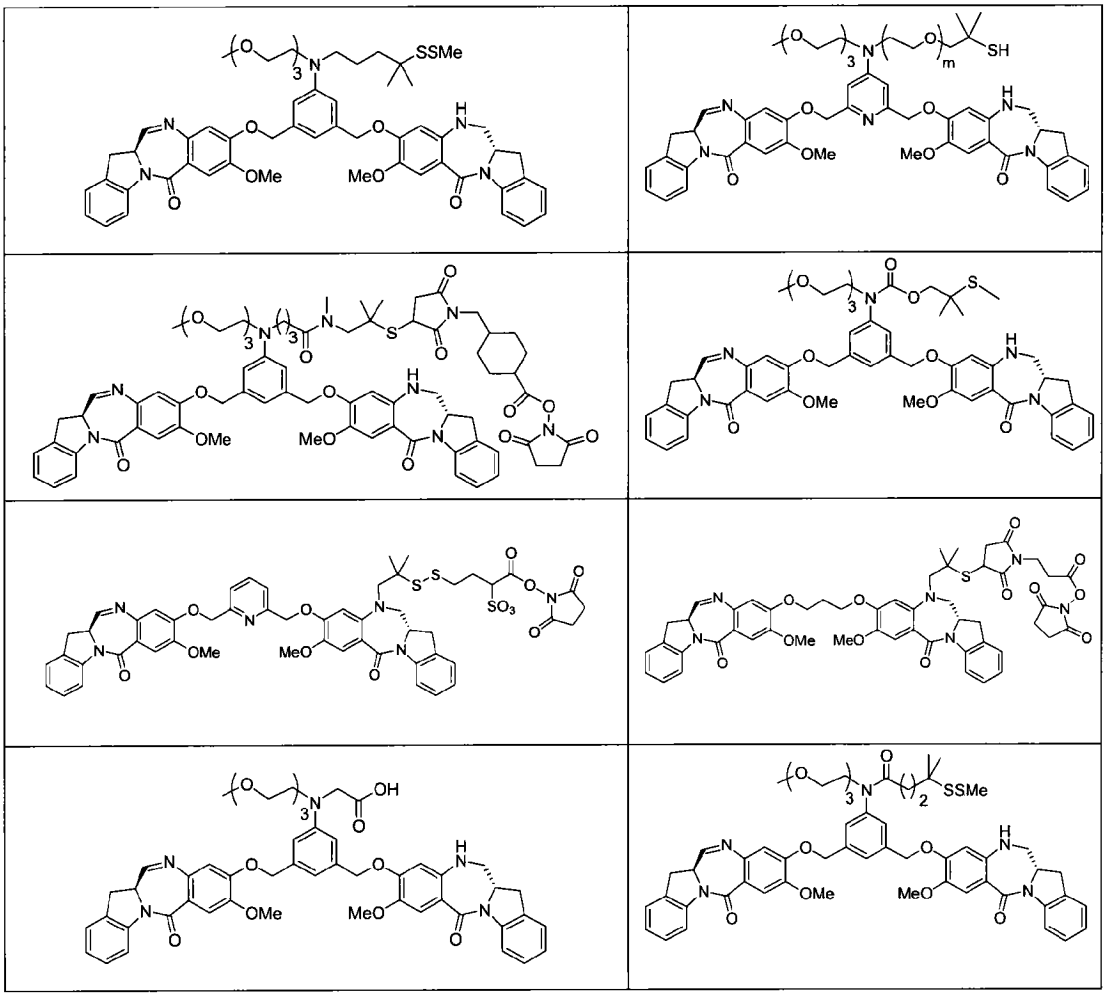


[0606] 表6.本发明代表性化合物的结构(续)。

[0607]

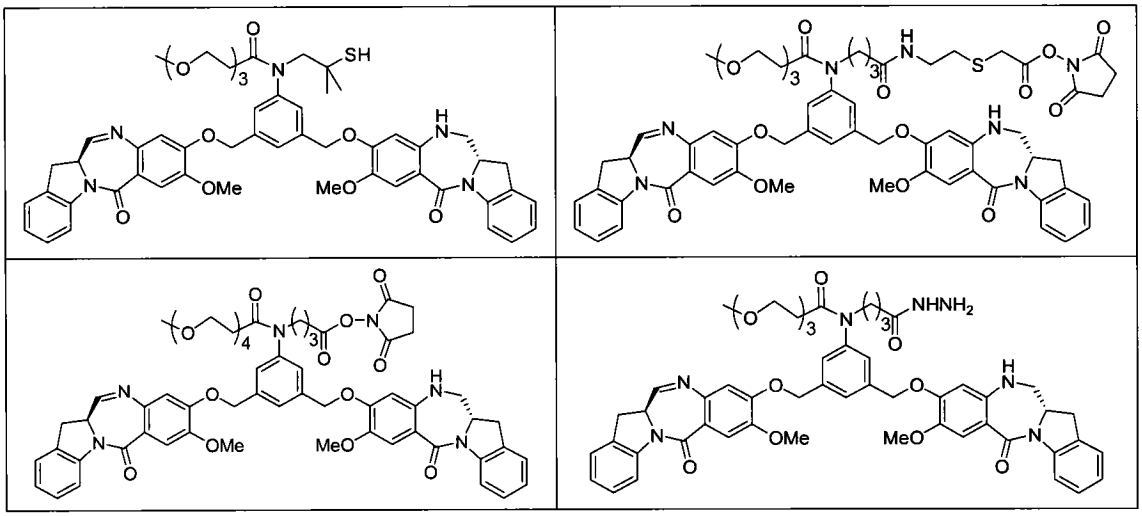


[0608]



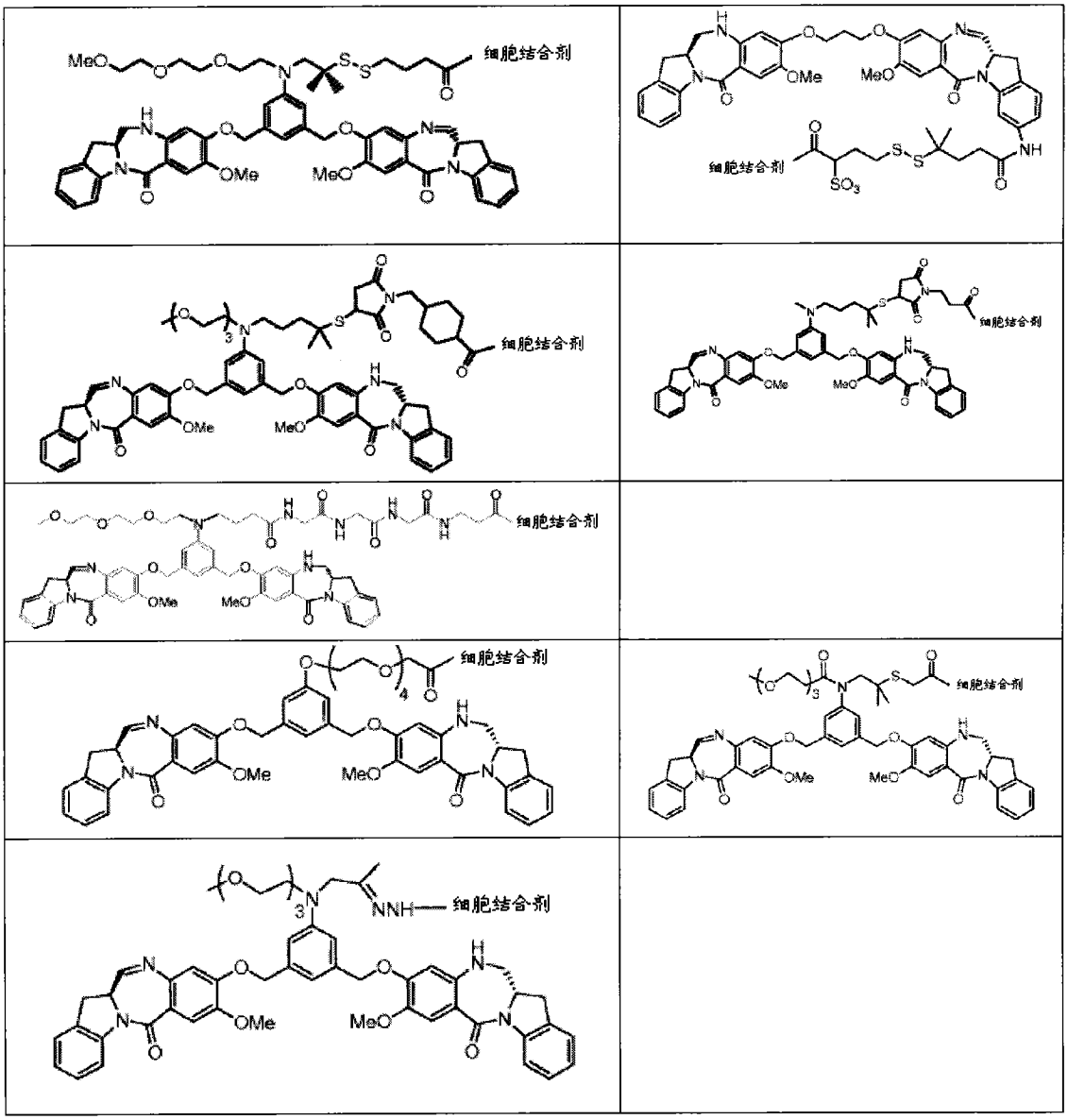
[0609] 表7.本发明代表性化合物的结构(续)。

[0610]



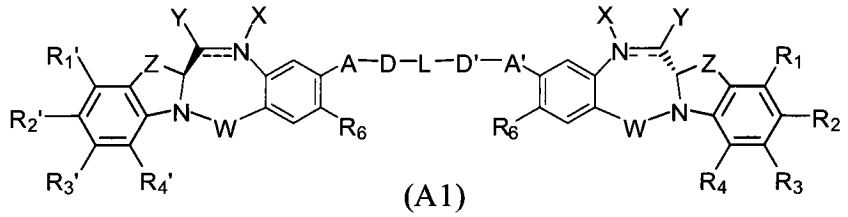
[0611] 表8.本发明的代表性缀合物的结构。

[0612]



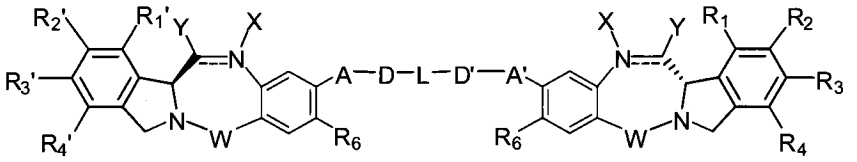
[0613] 在上述表1-8中描述的任一种化合物或缀合物，根据本发明方法亚胺双键可与/已与亚胺反应剂(诸如本文描述的那些)反应以形成加合物，包括亚硫酸氢盐加合物。表1-7的化合物中的此类保护亚胺的加合物可根据本发明的方法用于进一步反应以产生本发明的缀合物。类似地，包含受保护亚胺的加合物的化合物可用于本发明的方法以产生表8的缀合物。

[0614] 在另一实施方案中，可用于本发明方法的任选具有连接部分的药物(如，具有连接至其的反应性基团的连接子基团)由式(A1)或(A2)表示：



(A1)

[0615]



(A2) ;

[0616] 其中：

[0617] N和C之间的双线＝表示单键或双键，条件是N和C之间的至少一个＝代表双键，且当它是双键时，X不存在且Y是-H，当其是单键时，X是-H或将化合物转化为前药的氨基保护部分；优选地，当其是双键时，X不存在且Y是-H，且在将加合物用于本发明方法中以产生药物-CBA缀合物之前，该双键可与本发明的亚胺反应剂反应而形成加合物(诸如亚硫酸氢盐加合物)；

[0618] Y选自-H、-OR、由-OCOR'表示的酯、由-OCOOR'表示的碳酸酯、-OCONR'R"表示的氨基甲酸酯、由-NR'R"表示的胺或羟基胺、由-NRCOR'表示的酰胺、由-NRCOP表示的肽(其中P是氨基酸或具有2至20个氨基酸单元的多肽)、由-SR'表示的硫醚、由-SOR'表示的亚砜、由-SO_2R'表示的砜、亚硫酸盐-SO_3、亚硫酸氢盐-OSO_3、-SO_2M、-SO_3M、-OSO_3M、卤素、氰基、叠氮基或硫醇；其中M是-H或药学上可接受的阳离子(诸如Na^+)；或，

[0619] Y是亚硫酸盐(HSO_3、HSO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯($R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐(P(＝S)($OR^{k'}$)(S)(OH)或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}$C(＝O)NOH或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自-N(R^j)$_2$、-CO_2H、-SO_3H和-PO_3H中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；

[0620] R、R'和R"相同或不同，且选自-H，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$(其中n是1至2000的整数(优选地1-200，或1-20))，含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5或6元杂芳基环，5至18元稠环系统，其中至少一个环是芳香族的，含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子，具有6至18个碳原子的芳基，具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环，其中取代基选自卤素、-OR_7、-NR_8R_9、-NO_2、-NRCOR'、-SR_{10}、由-SOR'表示的亚砜、由-SO_2R'表示的砜、亚硫酸盐-SO_3、亚硫酸氢盐-OSO_3、由-SO_2NRR'表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、-COR_{11}、-$OCOR_{11}$或-$OCONR_{11}R_{12}$；

[0621] R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}和R_{12}各自独立地选自-H，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n$(其中n是1至2000的整数(优选地1-200，或1-20))，含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5或6元杂芳基环，5至18元稠环系统，其中至少一个环是芳香族的，含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子，具有6至18个碳原子的芳基，具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的具有3至18元杂环的3至10元杂环，且R_{10}任选为SR_{13}或COR_{13}；

[0622] R_{13}选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5或6元杂芳基环，5至18元稠环系统，其中至少一个环是芳香族的，含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子，具有6至18个碳原子的芳基，具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的具有3至18元杂环，R_{11}任选为OR_{14}，其中R_{14}与R具有相同的定义，R"任选为-OH；

[0623] W是C=O、C=S、CH_2、BH、SO或SO_2；

[0624] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n$(其中n是1至2000的整数(优选1-200，或1-20))或取代基，该取代基选自卤素、胍基$[-NH(C=NH)NH_2]$、$-OR_7$、$-NR_8R_9$、$-NO_2$、-NRCOR'、$-SR_{10}$、由-SOR'表示的亚砜、$-SO_2R'$表示的砜、亚硫酸盐$-SO_3$、亚硫酸氢盐$-OSO_3$、由$-SO_2NRR'$表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、$-COR_{11}$、$-OCOR_{11}$或$-OCONR_{11}R_{12}$，其中R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}和R_{12}如上所定义，任选地，R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'或R_4'中的任一者是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，其可选自聚吡咯并、聚-吲哚基、聚-咪唑基、聚吡咯并-咪唑基、聚-吡咯并-吲哚基或聚咪唑并-吲哚基单元，这些基团任选地具有连接基团，所述连接基团具有连接至其的反应性基团。

[0625] Z选自$-(CH_2)_n-$(其中n是1、2或3)、$-CR_{15}R_{16}$、$-NR_{17}$、-O-或-S-，其中R_{15}、R_{16}和R_{17}各自独立地选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n$，其中n是1至2000的整数(优选1-200，或1-20)；

[0626] R_6是-OR、-SR或-NRR'，其中R和R'具有以上给出的相同的定义，R_6任选为具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)；

[0627] X'选自$-CH_2$、-NR、-CO、-BH、-SO或$-SO_2$其中R具有以上给出的目同的定义；

[0628] Y'是-O-、$-CH_2-$、-NR或-S，其中R具有以上给出的相同的定义；

[0629] Z'是$-CH_2$或$-(CH_2)_n$，其中n是2、3或4，条件是X'、Y'和Z'不同时均为CH2；

[0630] A和A'相同或不同且选自-O-、-CRR'O、S、-CRR'S、$-NR_{15}$或-CRR'NHR_{15}，其中R和R'具有以上给出的相同的定义且其中R_{15}具有与R相同的定义。

[0631] D和D'相同或不同，且独立地选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，任选被下述任一者取代：卤素、$-OR_7$、$-NR_8R_9$、$-NO_2$、-NRCOR'、$-SR_{10}$、由-SOR'表示的亚砜、由$-SO_2R'$表示的砜、亚硫酸盐$-SO_3$、亚硫酸氢盐$-OSO_3$、由$-SO_2NRR'$表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、$-COR_{11}$、$-OCOR_{11}$或$-OCONR_{11}R_{12}$，其中R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}和R_{12}如上定义，或聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n$，其中n是1至2000的整数(优选1-200，或1-20)；

[0632] L是任选的苯基或具有1至6个选自O、S、N和P的杂原子的任选被取代的3至18元杂环，其中取代基是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，其任选被下述任一者取代：卤素、$-OR_7$、-

NR_8R_9、$-NO_2$、-NRCOR'、$-SR_{10}$、由-SOR'表示的亚砜、由$-SO_2R'$表示的砜、亚硫酸盐$-SO_3$、亚硫酸氢盐$-OSO_3$、由$-SO_2NRR'$表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、$-COR_{11}$、$OCOR_{11}$或$OCONR_{11}R_{12}$，其中R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}和R_{12}具有如上给出的相同的定义，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)n$，其中n是1至2000的整数(优选1-200，或1-20)；任选地，L自身是具有连接至其的反应性基团的连接基团；或其药学上可接受的溶剂化物、盐、水合物或水合盐，其光学异构体、外消旋体、非对映异构体、对映异构体或这些化合物的多晶结构，条件是所述化合物具有不超过一个具有连接至其的反应性基团的连接基团。

[0633] 在一个优选的实施方案中，对于式(A1)或(A2)的药物：

[0634] N和C之间的双线＝表示单键或双键，条件是当其是双键时，X不存在且Y是-H，且当其为单键时，X是-H或将该化合物转化为前药的氨基保护基。

[0635] Y选自-H、-OR、NR'R"、亚硫酸盐$-SO_3M$或亚硫酸氢盐$-OSO_3M$，其中M是-H或药学上可接受的阳离子(诸如Na^+)；

[0636] R选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n$，其中n是1至2000的整数(优选1-200或1-20)，具有6至10个碳原子的芳基，具有3至10个碳原子的杂环；

[0637] W是C＝O、CH_2或SO_2；

[0638] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H、$-NO_2$或具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)；

[0639] R_6是$-OR_{18}$，其中R_{18}具有与R相同的定义；

[0640] Z选自$-(CH_2)_n$(其中n是1、2或3)、$-CR_{15}R_{16}$、$-NR_{17}$、-O-或-S-，其中R_{15}、R_{16}和R_{17}各自独立地选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n$，其中n是1至2000的整数(优选1-200，或1-20)；

[0641] X'选自$-CH_2$或C＝O。

[0642] Y'是-O-、-NR或-S，其中R如上定义；

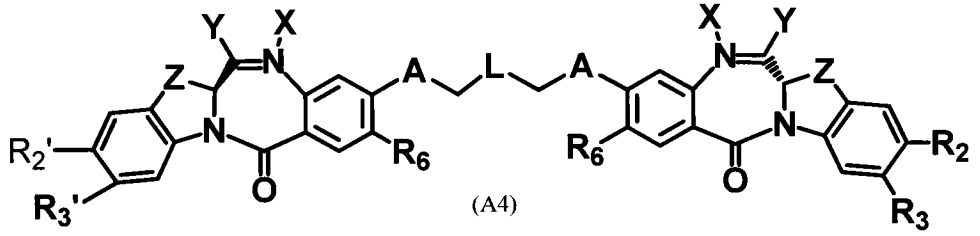
[0643] Z'是$-CH_2-$或$-(CH_2)_2-$；

[0644] A和A'各自为-O-；

[0645] D和D'相同或不同，且独立地选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

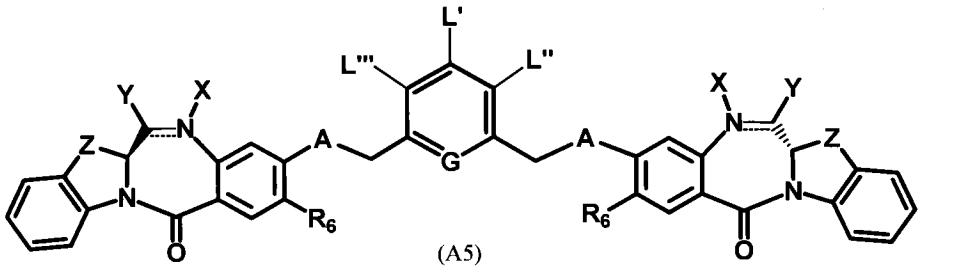
[0646] L是任选的苯基或具有任选被取代的3至10个碳原子的杂环，其中取代基是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，其任选被下述任一者取代：卤素、$-OR_7$、$-NR_8R_9$、$-NO_2$、-NRCOR'、$-SR_{10}$、-SOR'表示的亚砜、$-SO_2R'$表示的砜、$-SO_3$亚硫酸盐、$-OSO_3$亚硫酸氢盐、由$-SO_2NRR'$表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、$-COR_{11}$、$-OCOR_{11}$或$OCONR_{11}R_{12}$，聚乙二醇单元$(-OCH_2CH_2)_n$，其中n是1至2000的整数(优选1-200或1-20)；任选地，L自身是具有连接至其的反应性基团的连接基团；或其药学上可接受的溶剂化物、盐、水合物或水合盐，其光学异构体、外消旋体、非对映异构体、对映异构体或这些化合物的多晶结构。

[0647] 在另一优选的实施方案中，式(A1)或(A2)的药物由式(A4)或(A5)的化合物表示：



,

[0648]



,

[0649] 其中：

[0650] N和C之间的双线＝表示单键或双键，条件是当其是双键时，X不存在且Y是-H，当其为单键时，X是-H或将该化合物转化为前药的氨基保护基；

[0651] Y选自-H，-OH，由-OR表示的醚、-MR'R"、亚硫酸盐-SO_3M或亚硫酸氢盐-OSO_3M；

[0652] M是-H或药学上可接受的阳离子(诸如Na^+)；

[0653] R、R'和R"选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。

[0654] R_2、R_3、R_2'和R_3'中的一者是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)0而其它为-H、-NRCOR'或-NO_2；

[0655] R_6是-OR，其中R具有以上相同的定义；

[0656] Z是-CH_2-或-NR，其中R具有以上相同定义；

[0657] A是-O-或-NR_{15}；

[0658] L是-$(CH_2)_{nn}$-，其中nn是0或1至5之间的整数，或具有2至4个碳原子的取代或未取代的烷基或烯基，其中取代基选自卤素、-OR_7、-NR_8R_9、-NO_2、-NRCOR'、-SR_{10}、-SOR'表示的亚砜、-SO_2R'表示的砜、亚硫酸盐-SO_3、亚硫酸氢盐-OSO_3、由-SO_2NRR'表示的磺酰胺、氰基、叠氮基、-COR_{11}、-$OCOR_{11}$或-$OCONR_{11}R_{12}$；

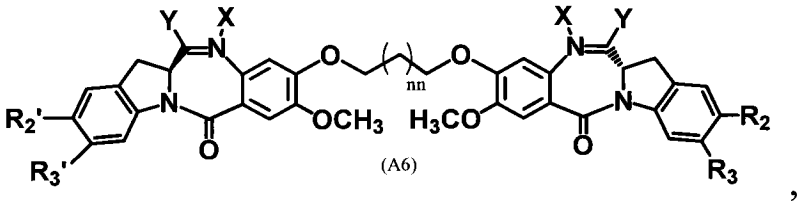
[0659] R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}、R_{12}和R_{15}具有如上所述相同的定义；

[0660] 任选地，L本身是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)；

[0661] L'、L"或L"'是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，而其它为-H；优选L'是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)；且

[0662] G是-CH-或-N-，或其药学上可接受的溶剂化物、盐、水合物或水合盐、其光学异构体、外消旋体、非对映异构体、对映异构体或这些化合物的多晶结构。

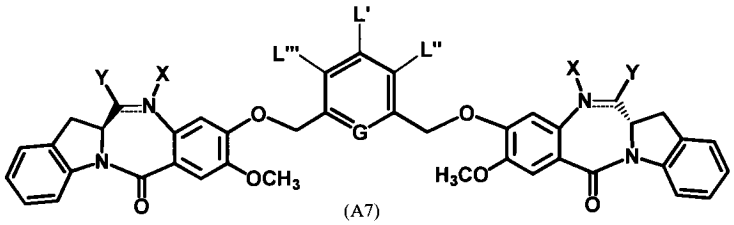
[0663] 在另一优选的实施方案中，式(A1)或(A2)的化合物由式(A6)或(A7)的化合物表示：



(A6)

,

[0664]



(A7)

[0665] 其中：

[0666] N和C之间的双线＝表示单键或双键，条件是当其是双键时，X不存在且Y是-H，当其为单键时，X是-H或将该化合物转化为前药的氨基保护基；

[0667] Y选自-H，-OH，由-OR表示的醚、亚硫酸盐-SO_3或亚硫酸氢盐-OSO_3；

[0668] R选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

[0669] nn是0或1至5的整数。

[0670] R_2、R_3、R_2'和R_3'中的一者是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，而其它为-H、-NRCOR'或-NO_2；

[0671] L'、L"或L"'是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，条件是L'、L'或L"'中的一者是具有连接至其的反应性基团的连接基团，而其它为-H(如，如果L'是具有连接至其的反应性基团的连接基团，那么L"和L"'是-H)；

[0672] G是-CH-或-N-，或其药学上可接受的溶剂化物、盐、水合物或水合盐、其光学异构体、外消旋体、非对映异构体、对映异构体或这些化合物的多晶结构。

[0673] 在另一具体实施方案中，式(A4)和(A6)中R_2、R_3、R_2'和R_3'中的一者是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，且由式-w'-R^x-V-R^y-J表示，且其余的是-H；式(A5)和(A7)的L"和L"'是-H，而L'是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在)，且由式

[0674] -W，-R^x-V-R^y-J表示

[0675] 其中：

[0676] W'不存在、为-CR^cR^e-、-O-、-O-C(＝O)-、-S-、-CH_2-S-、-O-(C＝O)O-、-O-(C＝O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(＝O)-、-N(R^e)-C(＝O)O-或-C(＝O)-；

[0677] R^x不存在或为任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

[0678] V不存在、为-(CH_2-CH_2-O)$_n$-、-O-、-O-C(＝O)-、-S-、-O-(C＝O)O-、O-(C＝O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(＝O)-、-N(R^e)-C(＝O)O-、-C(＝O)-、氨基酸或具有2到8个氨基酸的肽；

[0679] R^y不存在或者是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0680] R^e是-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；

[0681] R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^c，

[0682] n是1至24的整数;且

[0683] J如上第四具体实施方案中所述。

[0684] 优选地,R^c是-H或-Me;R^e是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^c$;n是2至8的整数,而其余的变量如上第三具体实施方案中所述。

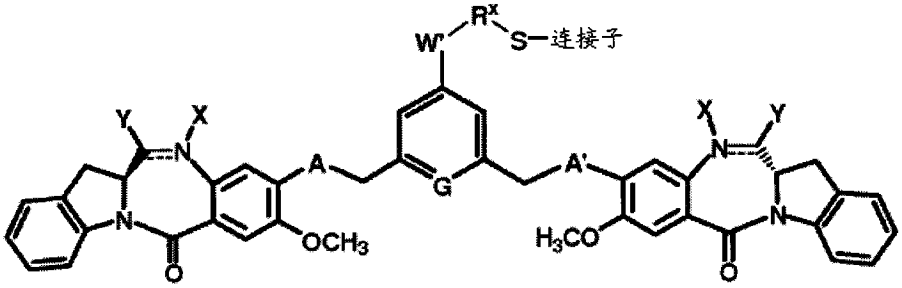
[0685] 在另一优选的实施方案中,V是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。更优选地,V是缬氨酸-瓜氨酸、gly-gly-gly或ala-leu-ala-leu。

[0686] 优选地,J是如上所述的-SH、$-SSR^d$或-COE。

[0687] 在另一具体实施方案中,式(A4)和(A6)中R_2、R_3、R_2'和R_3'中的一者是具有连接至其的反应性基团的连接基团(如果存在),且由式$-w'-R^x-S-Z^s$表示;式(A5)和(A7)的L"和L"'是-H,且L'由$-W'-R^x-S-Z^s$表示,其中变量如第八和第九具体实施方案所述。

[0688] 在另一实施方案中,如果具有连接至其的反应性基团的连接基团已不存在,那么式(A1)-(A7)(用或未用亚胺反应剂预先孵育),可进一步与上述的双官能交联剂反应以形成具有连接基团(具有连接至其的反应性基团)的含有亚胺药物,其可用于本发明的方法。

[0689] 在某些实施方案中,可用于本发明方法的具有连接基团(具有连接至其的反应性基团)的含有亚胺药物由下式中的任一者表示:

[0690] 

(A8)

[0691] 其中:

[0692] "连接子"由上述(在第九具体实施方案中)(a1)、(a2)、(a3)、(a4)、(a5)、(a6)、(a7)或(a8)表示;

[0693] q是1至5的整数;

[0694] n是2至6的整数;

[0695] D是-H或$-SO_3M$;

[0696] M是-H或药学上可接受的阳离子,诸如Na^+或K^+;且其余变量如第八或第九具体实施方案所述。

[0697] 优选地,q是2且n是4。

[0698] 在优选的实施方案中,连接子由上述式(a1)、(a4)、(a5),(a9)或(a10)表示。

[0699] 在某些实施方案中,对于上面刚刚描述的式(A8)化合物,变量如下所述:

[0700] W'是-O-、$-N(R^e)-$、$-N(R^e)-C(=O)-$、$-N(COR^e)-$、-S-或$-CH_2-S-$;

[0701] R^x不存在或选自具有1至6个碳原子的直链、支链或环状的烷基;

[0702] R^e是-H,具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$,其中R^k是-H,具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基,其任选地具有伯、仲或叔氨基或5或6元含氮杂环,诸如哌啶或吗啉;

[0703] n是1至24的整数;且剩余的变量如上文紧接的具体实施方案所述。

[0704] 优选地，R^k是-H或-Me且n是2至8的整数。优选地，R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0705] 在另一优选的实施方案中，连接子由如上所示的选自式(a1)、(a4)、(a5)、(a10)和(a11)的任一者表示；且剩余的变量如上文第九具体实施方案所述。

[0706] 在某些实施方案中，对于上文实施方案中描述的式(A8)化合物，变量如下所述：

[0707] X'和Y'均是-H；

[0708] A和A'均是-O-；

[0709] R_6是-OMe；

[0710] R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；且剩余的变量如上文所述。

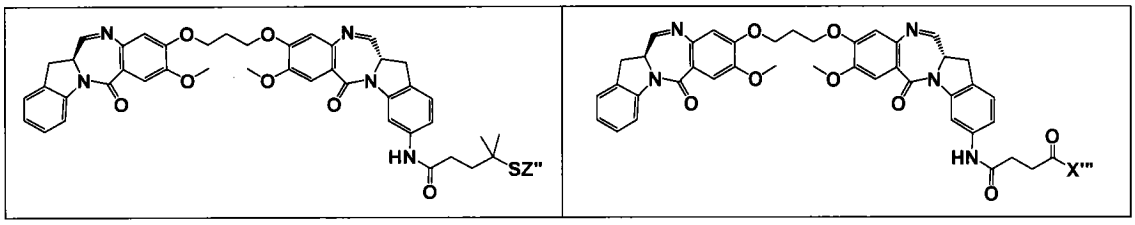
[0711] 优选地，R^x是$-(CH_2)_p-(CR^fR^g)-$，其中R^f和R^g各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；p是0、1、2或3。更优选地，R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

[0712] 在另一优选的实施方案中，连接子由如上所示的选自式(a1)、(a4)、(a5)、(a10)和(a11)的任一者表示；且剩余的变量如上所述。

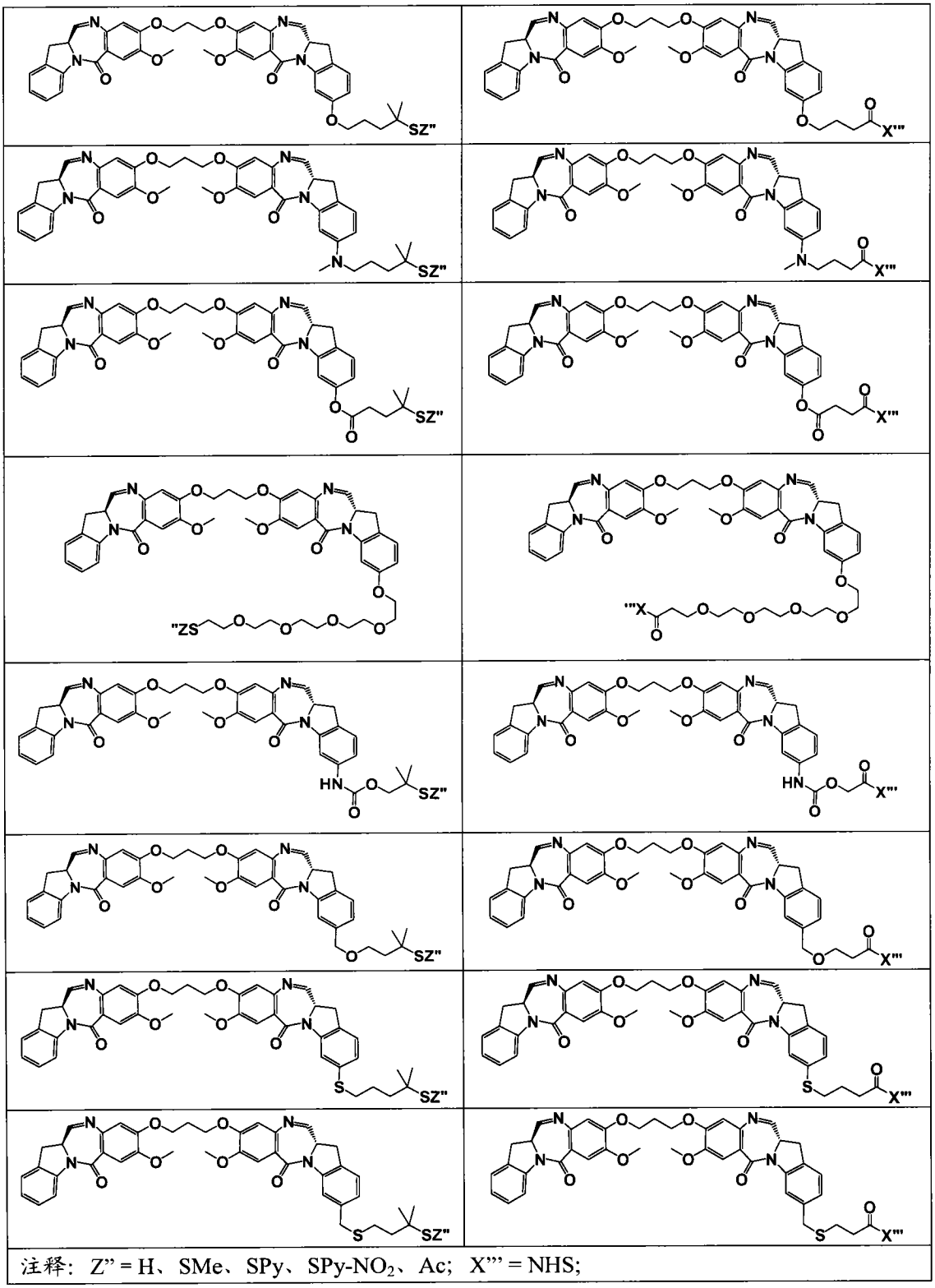
[0713] 在另一优选的实施方案中，式(A1)、(A2)或(A3)的药物是示于表11-13中的化合物的任一者，并且可通过本发明方法制备的缀合物是示于表14中的缀合物的任一者。

[0714] 表11.可用于本发明方法的代表性药物的结构。

[0715]

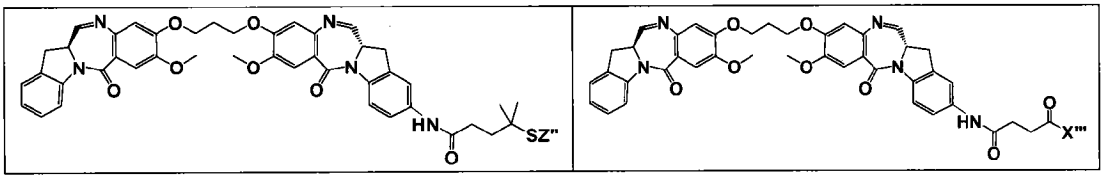


[0716]

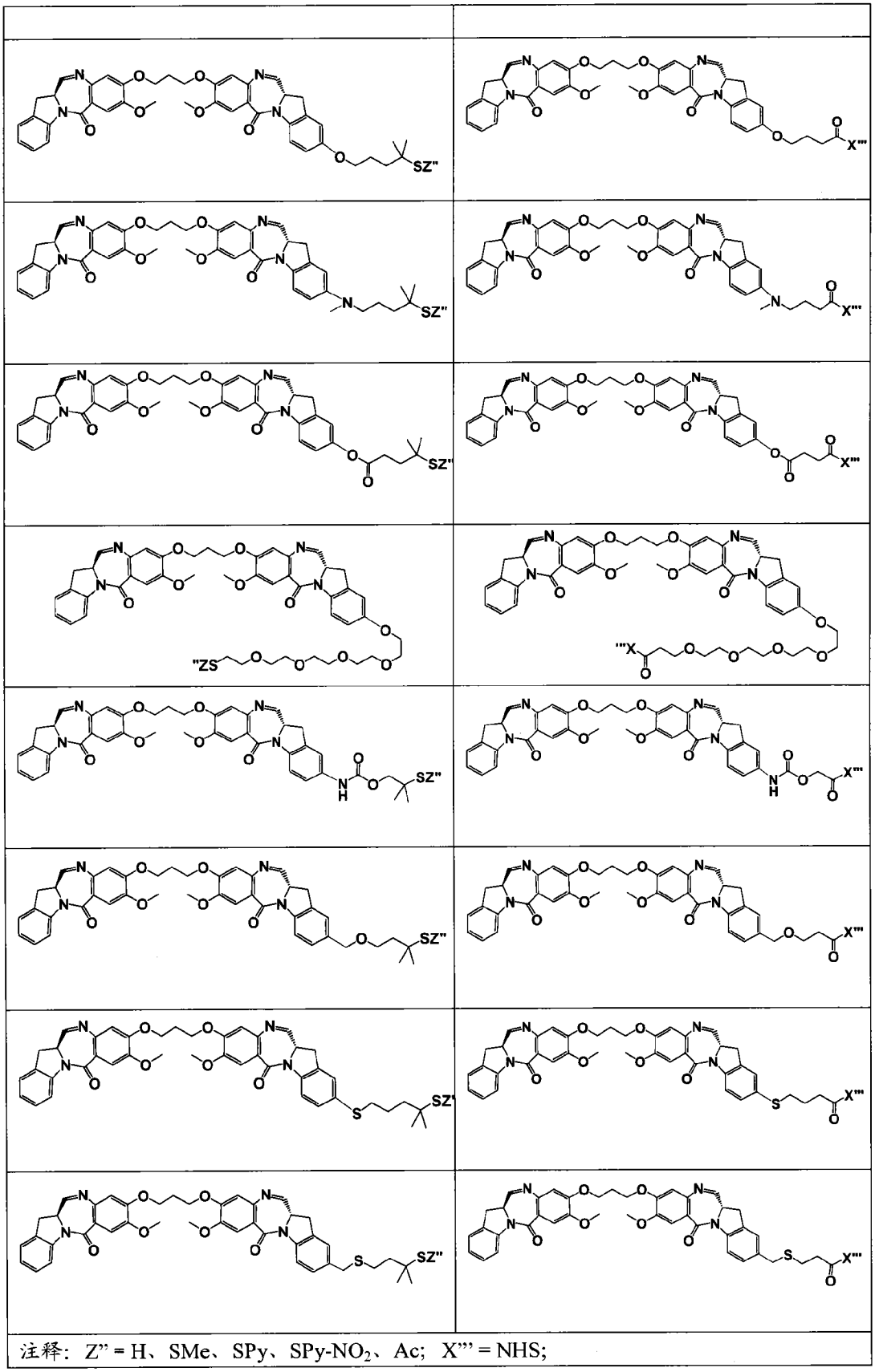


[0717] 表12.可用于本发明方法的代表性药物的结构(续)。

[0718]

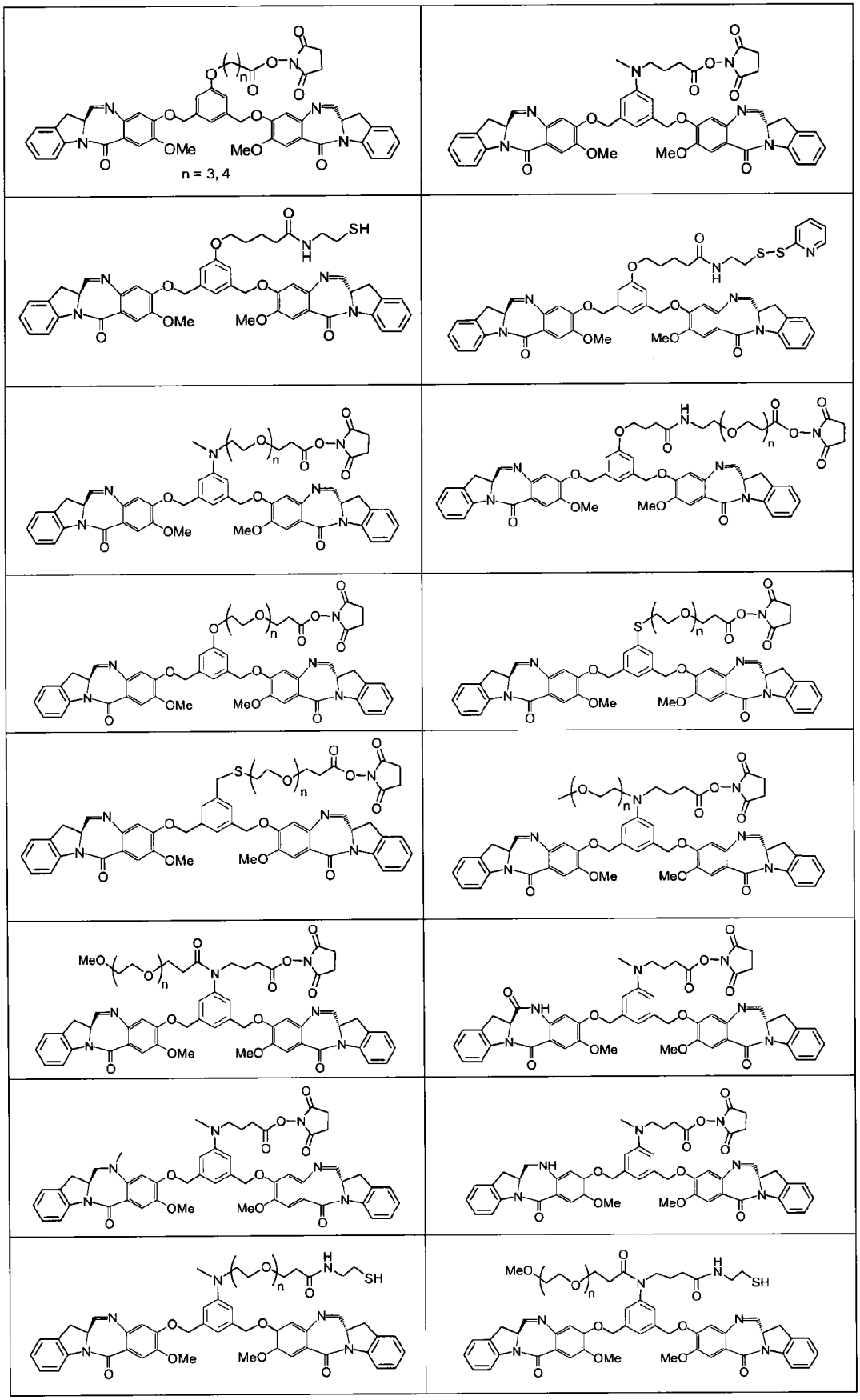


[0719]

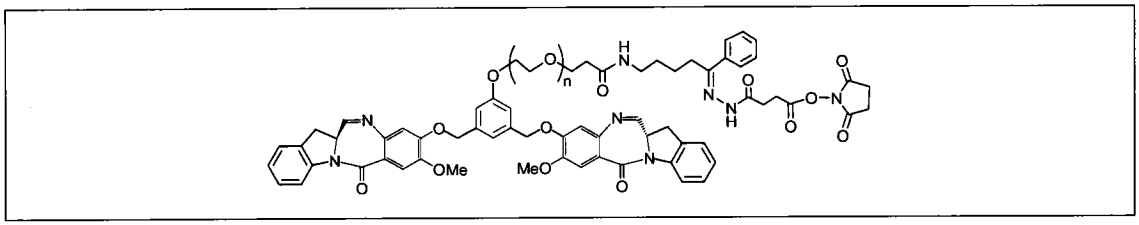


[0720] 表13.可用于本发明方法的代表性药物的结构(续)。

[0721]

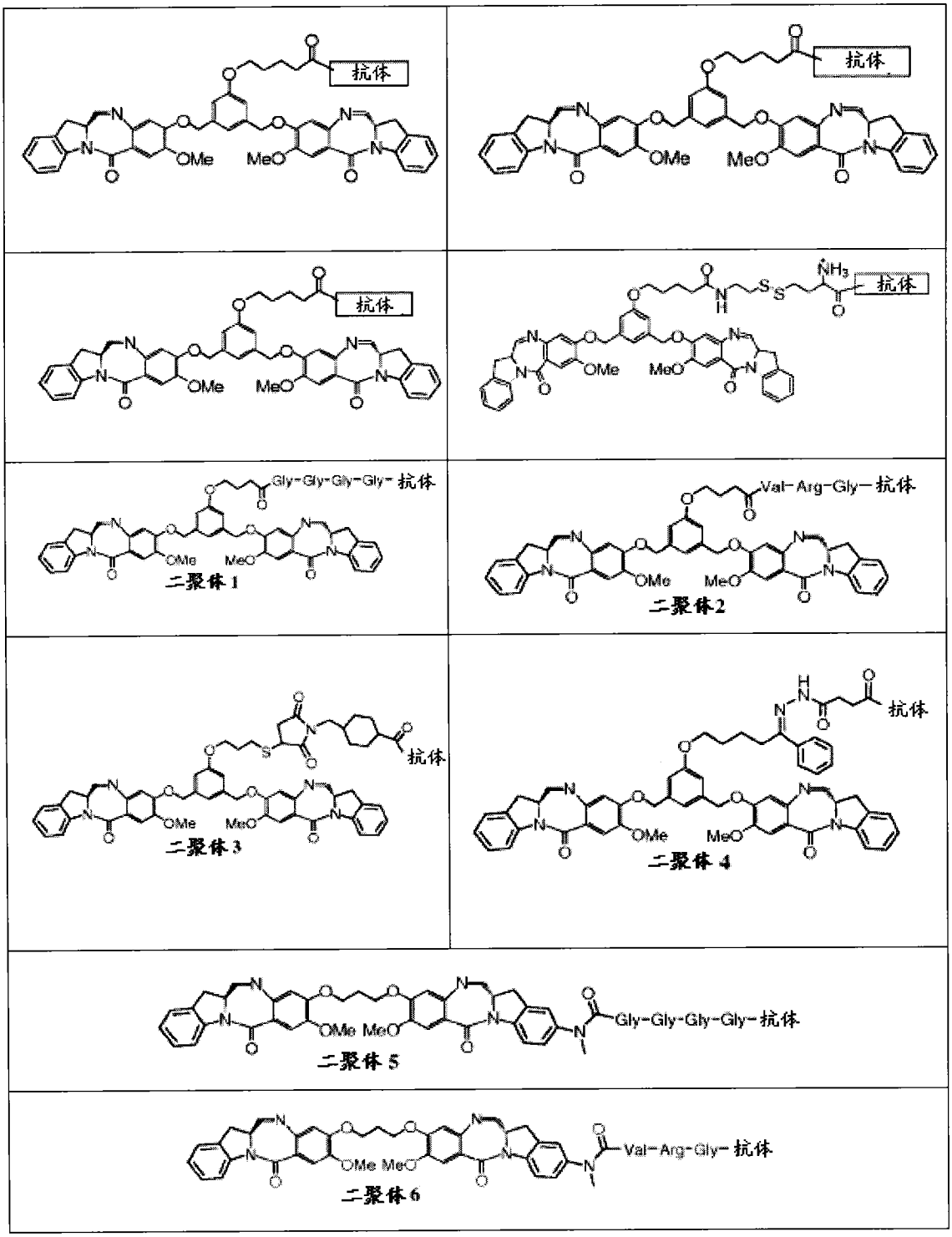


[0722]

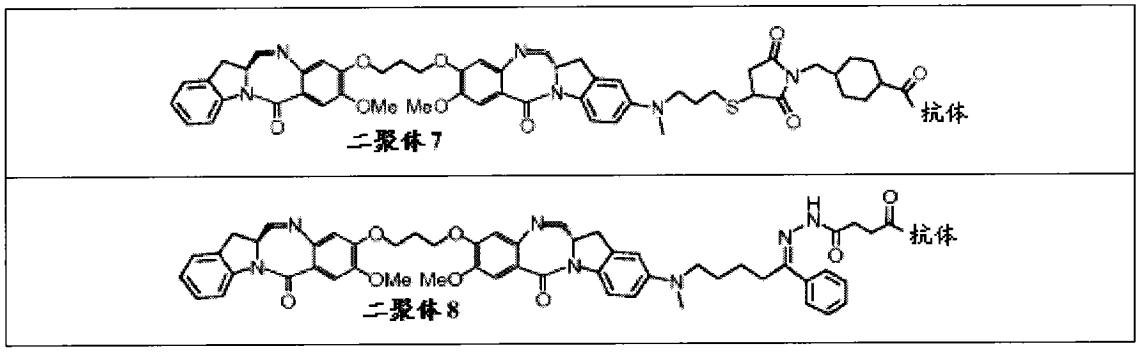


[0723] 表14.可通过本发明方法制备的代表性缀合物的结构。

[0724]



[0725]



[0726] 表11-13中的任何化合物和表14中的任何缀合物可使其亚胺键的至少一个与主题亚胺反应剂反应，从而形成加合物，诸如亚硫酸氢盐加合物。

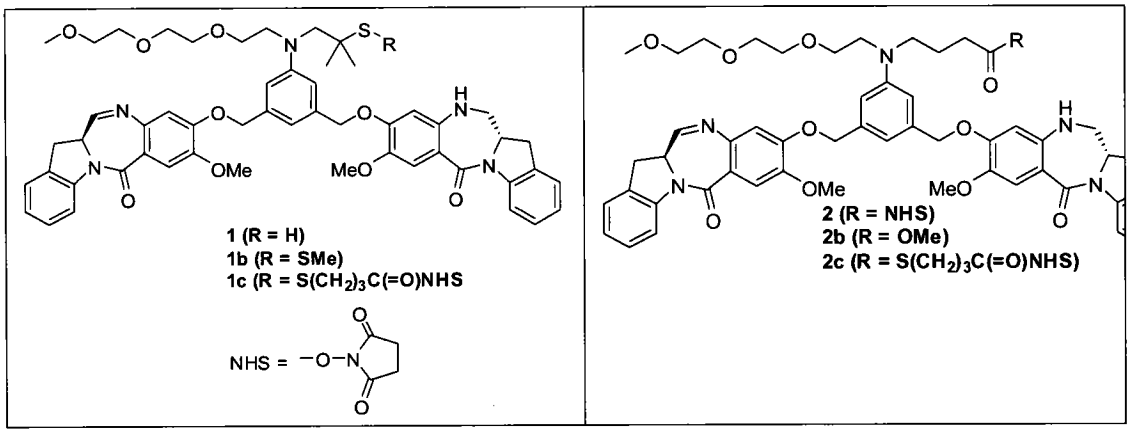
[0727] 在一个实施方案中，具有连接部分的含有亚胺药物是上文所述的具有反应性酯基、硫醇或硫醇反应性基团的那些。

[0728] 可选地，上文所述的药物可进一步与双官能交联剂反应以形成具有连接部分的药物。可使用描述的任何双官能交联剂。

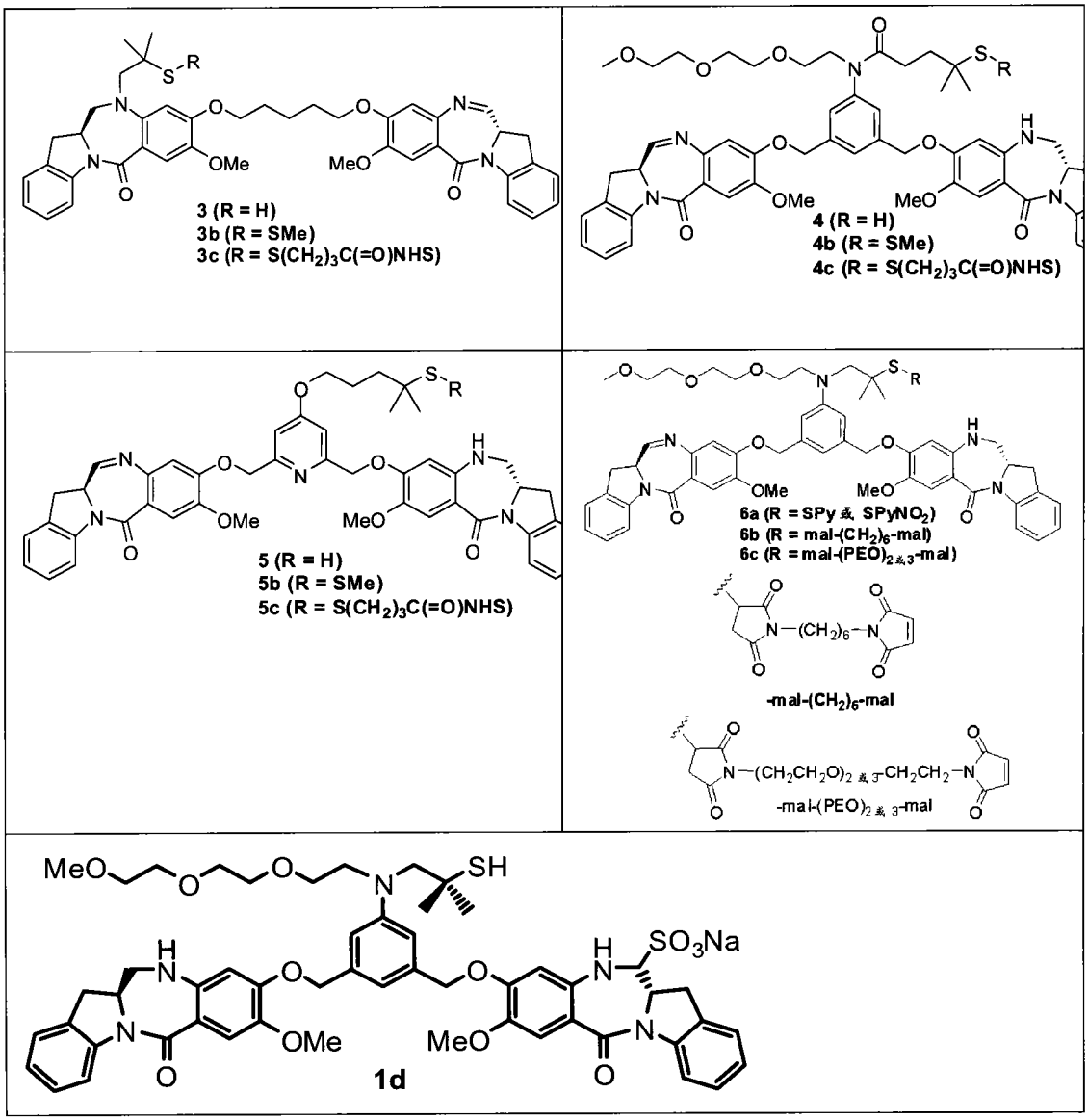
[0729] 在另一优选的实施方案中，可用于本发明的药物是示于表15中的任一种化合物。

[0730] 表15.可用于本方法的代表性的药物化合物。

[0731]



[0732]



[0733] 细胞-结合剂

[0734] 本发明的缀合物作为治疗剂的有效性取决于对合适的细胞结合剂的谨慎选择。细胞结合剂可以是目前已知的或变得已知的任一种，且包括肽和非肽。通常，这些可以是抗体(特别是单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素(诸如叶酸等，为此它们可结合于细胞表面受体，如，叶酸受体)、营养运输分子(诸如转铁蛋白)或任何其它细胞结合分子或物质。

[0735] 在某些实施方案中，细胞结合剂是蛋白或多肽或包含蛋白或多肽的化合物。优选地，蛋白或多肽包含一个或多个具有侧链-NH_2基团的Lys残基。可选地或另外，所述蛋白或多肽包含一个或多个Cys残基。Cys残基的侧链-SH基团可以是完整的，或可以是在可被还原的二硫键中。优选地，二硫键的还原对蛋白或多肽的细胞结合功能的不利影响不显著(如，就抗体或其抗原结合片段而言，二硫键的还原基本上不会增加轻链/重链的解离)。

[0736] Lys侧链-NH_2基和/或Cys侧链-SH基可共价连接于连接子，该连接子进而连接于本发明的二聚体化合物，从而将细胞结合剂缀合于本发明的二聚体化合物。每种基于蛋白的

细胞结合剂可包含用于通过双官能交联剂连接本发明化合物的多个Lys侧链NH_2基和/或Cys侧链-SH基。

[0737] 可使用的细胞结合剂的更具体的实施例包括：

[0738] 多克隆抗体；

[0739] 单克隆抗体；

[0740] 抗体片段诸如Fab、Fab'和$F(ab')_2$、Fv、微型抗体、二聚体、三聚体、四聚体(Parham,J.Immunol..131:2895-2902(1983);Spring等人J. Immunol.113:470-478(1974);Nisonoff等人Arch.Biochem.Biophys.89:230-244(1960),Kim等人,Mol,Cancer Ther.,7:2486-2497(2008),Carter,Nature Revs.,6:343-357(2006))；

[0741] 干扰素(如α、β、γ)；

[0742] 淋巴因子诸如IL-2、IL-3、IL-4、IL-6；

[0743] 激素诸如胰岛素、TRH(促甲状腺素释放激素)、MSH(促黑素细胞激素)、类固醇激素,诸如雄激素和雌激素；

[0744] 生长因子和集落刺激因子,诸如EGF、TGF-α、FGF、VEGF、G-CSF,M-CSF和GM-CSF(Burgess,ImmunologyToday5:155-158(1984))；

[0745] 转铁蛋白(O'Keefe等人J. Biol.Chem.260:932-937(1985))；

[0746] 维生素,诸如叶酸；

[0747] 基于纤连蛋白III型(FN3)重复序列的共有序列的蛋白支架(也称为Centyrins;参见美国专利公布2010/0255056,通过引用并入本文)；

[0748] 设计者锚蛋白重复蛋白(DARPins;美国专利申请No.20040132028;20090082274;20110118146;20110224100,通过引用并入本文),C.Zahnd等人2010,Cancer Res.,70;1595-1605,其通过引用并入本文)；及,

[0749] 纤连蛋白结构域支架蛋白(Adnectins:美国专利申请No.20070082365;20080139791,其通过引用并入本文)。

[0750] 单克隆抗体技术允许以特异性的单克隆抗体形式制备非常特异的细胞结合剂。本领域特别熟知的是用于制备单克隆抗体的技术,所述单克隆抗体通过免疫小鼠、大鼠、仓鼠或任何其它具有关注抗原(诸如完整的靶细胞、从靶细胞分离的抗原、全病毒、减毒的全病毒和病毒蛋白如病毒外壳蛋白)的哺乳动物而产生。也可使用致敏的人体细胞。制备单克隆抗体的另一种方法是使用scFv(单链可变区)的噬菌体文库,尤其是人类scFv(参见如,Griffiths等人,美国专利No.5,885,793和5,969,108;McCafferty等,WO92/01047;Liming等人,WO99/06587)。此外,也可使用公开于美国专利No.5,639,641的表面重构抗体,如嵌合抗体和人源化抗体。选择合适的细胞结合剂是选择的问题,这取决于待靶向的特定细胞群,但是如果可得到合适的细胞群,一般而言人类单克隆抗体是优选的。

[0751] 例如,单克隆抗体MY9是鼠IgG_1抗体,其特异结合于CD33抗原{J.D.Griffin等人8Leukemia Res.,521(1984)),如果在急性骨髓性白血病(AML)疾病中,靶细胞表达CD33,那么可使用该抗体。细胞结合剂可以是以特异性或非特异性方式结合细胞的任何化合物。通常,这些可以是抗体(特别是单克隆抗体和抗体片段)、干扰素、淋巴因子、激素、生长因子、维生素、营养转运分子(诸如转铁蛋白)或任何其它细胞结合分子或物质。

[0752] 在细胞结合剂是抗体的情况下,该抗体结合于抗原,该抗原是多肽并且可以是跨

膜分子(如受体)或配体诸如生长因子。示例性的抗原包括以下分子,诸如肾素;生长激素,包括人体生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺素;促甲状腺激素;脂蛋白;α-1-抗胰蛋白酶;胰岛素A链;胰岛素B链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;促黄体激素;胰高血糖素;凝血因子诸如因子vmc、因子IX、组织因子(TF),和血管性血友病(von Willebrands)因子;抗凝血因子,诸如蛋白C;心房利钠因子;肺表面活性物质;纤溶酶原激活物,诸如尿激酶或人尿液或组织型纤溶酶原激活物(t-PA);铃蟾肽;凝血酶;造血生长因子;肿瘤坏死因子-α和-β;脑啡肽酶;RANTES(调节激活正常T-细胞表达和分泌);人体巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1-α);血清白蛋白,诸如人血清白蛋白;抑制穆氏管(Muellerian)物质;松弛素A链;松弛素B链;松弛素原;小鼠促性腺素相关肽;微生物蛋白,诸如β-内酰胺酶;DNA酶;IgE;细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA),诸如CTLA-4;抑制素;激活素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;蛋白A或D;类风湿因子;神经营养因子,诸如骨源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3、-4、-5,或-6(NT-3、NT4、NT-5或NT-6),或神经生长因子,诸如NGF-β;血小板衍生生长因子(PDGF);成纤维细胞生长因子诸如aFGF和bFGF;成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2);表皮生长因子(EGF);转化生长因子(TGF)诸如TGF-α和TGF-β,包括TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、TGF-β4或TGF-β5;胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II),des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白、EpCAM、GD3、FLT3、PSMA、PSCA、MUC1、MUC16、STEAP、CEA、TENB2、EphA受体、EphB受体、叶酸受体、FOLR1、间皮素、cripto、$\alpha_v\beta_6$、结合素类、VEGF、VEGFR、EGFR、转铁蛋白(tarnsferrin)受体、IRTA1、IRTA2、IRTA3、IRTA4、IRTA5;CD蛋白诸如CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD8、CD11、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD25、CD26、CD28、CD30、CD33、CD36、CD37、CD38、CD40、CD44、CD52、CD55、CD56、CD59、CD70、CD79、CD80、CD81、CD103、CD105、CD134、CD137、CD138、CD152或公开在美国公开No.20080171040或美国公布No.20080305044中结合于一个或多个肿瘤相关抗原或细胞表面受体的抗体,且该公开通过引用整体并入;促红细胞生成素;骨诱导因子;免疫毒素类;骨形态生成蛋白(BMP);干扰素,如干扰素-α、-β和-γ;集落刺激因子(CSF),如,M-CSF、GM-CSF和G-CSF;白细胞介素类(IL),如,IL-1至IL-10;超氧化物歧化酶;T细胞受体;表面膜蛋白;衰变加速因子;病毒抗原诸如,例如HIV包膜部分;运输蛋白;归巢受体;地址素;调节蛋白;结合素类,诸如CD11a、CD11b、CD11c、CD18、ICAM、VLA-4和VCAM;肿瘤相关抗原,诸如HER2、HER3或HER4受体;内皮因子、c-Met、1GF1R、PSGR、NGEP、PSMA、PSCA、LGR5、B7H4和上面列出的多肽的任一片段。

[0753] 另外,结合于骨髓细胞的GM-CSF可用作急性髓性白血病患病细胞的细胞结合剂。结合于活化T细胞的IL-2可用于预防移植排斥、用于治疗和预防移植物抗宿主病和用于治疗急性T细胞白血病。结合于黑素细胞的MSH可用于治疗黑素瘤,可以是针对黑素瘤的抗体。叶酸可用于靶向在卵巢和其它肿瘤中表达的叶酸受体。表皮生长因子可用于靶向鳞癌,诸如肺癌和头颈癌。生长抑素可用于靶向神经母细胞瘤和其它肿瘤类型。

[0754] 可分别成功地用雌激素(或雌激素类似物)或雄激素(或雄激素类似物)作为细胞结合剂来靶向乳腺癌和睾丸癌。

[0755] 在一个实施方案中,细胞结合剂是人源化单克隆抗体。在另一实施方案中,细胞结合剂是huMy9-6或其它相关的抗体,该抗体描述于美国专利No.7,342,110和7,557,189(通过引用并入本文)中。在另一实施方案中,细胞结合剂是抗叶酸受体抗体,该抗体描述于美

国临时申请No.61/307,797、61/346,595,61/413,172和美国申请No.13/033,723(公开为US2012-0009181A1中)。所有这些申请的教义均通过引用全文并入本文。

[0756] 在某些实施方案中,细胞结合剂可以是单克隆抗体或其抗原结合部分,它们共享对于抗原与本文公开的抗体结合来说关键的序列,诸如huMy9-6或其相关抗体,其描述于美国专利No.7,342,110和7,557,189(通过引用并入本文)中。这些衍生的抗体与本文所述的抗体相比可基本上具有相同或同一的(1)轻链和/或重链CDR3区域;(2)轻链和/或重链CDR1、CDR2和CDR3区域;或(3)轻链和/或重链区域。这些区域中的序列可含有保守氨基酸置换,包括CDR区域内的置换。优选地,存在不超过1、2、3、4或5个保守性置换。在某些实施方案中,衍生抗体具有至少约90%、95%、99%或100%同一于本文所述抗体的轻链区域和/或重链区域。与本文所述的抗体相比,这些衍生抗体与靶抗原可具有基本相同的结合特异性和/或亲和力。优选地,衍生抗体的K_d和/或k_{off}值是本文所述抗体的10倍(更高或更低)、5倍(更高或更低)、3倍(更高或更低)或2倍(更高或更低)。这些衍生抗体可以是完全人体抗体或人源化抗体或嵌合抗体。衍生抗体可根据任何本领域公认的方法制备。

[0757] 在一个实施方案中,抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段,其中所述抗体包含:(a)包含GYFMN(SEQ ID NO:1)的重链CDR1;包含RIHPYDGDTFYNQXaa$_1$FXaa$_2$Xaa$_3$(SEQ ID NO:2)的重链CDR2;;和包含YDGSRAMDY(SEQ ID NO:3)的重链CDR3;;和(b)包含KASQSVSFAGTSLMH(SEQ ID NO:4)的轻链CDR1;(b)包含RASNLEA(SEQ ID NO:5)的轻链CDR2;和包含QQSREYPYT(SEQ ID NO:6)的轻链CDR3;其中Xaa$_1$选自K、Q、H和R;Xaa$_2$选自Q、H、N和R;且Xaa$_3$选自G、E、T、S、A和V。优选地,重链CDR2序列包含RIHPYDGDTFYNQKFQG(SEQ ID NO:7)。

[0758] 在另一实施方案中,抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段,该抗体包含具有下述氨基酸序列的重链

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K(SEQ ID NO:8)。

[0759] 在另一实施方案中,抗叶酸抗体是人源化抗体或由质粒DNA编码的其抗原结合片段,该DNA于2010年4月7日保藏于ATCC及具有的ATCC保藏号是PTA-10772和PTA-10773或10774。

[0760] 在另一实施方案中,抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段,该抗体包含具有下述氨基酸序列的轻链

[0761] DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC

QQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:9);或DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC QQSREYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:10)。

[0762] 在另一实施方案中,抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其特异结合于人叶酸受体1的抗原结合片段,该抗体包含具有SEQ ID NO:8氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的轻链。优选地,抗体包含具有SEQ ID NO:8氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:10(hu FOLR1)氨基酸序列的轻链。

[0763] 在另一实施方案中,抗叶酸受体抗体是人源化抗体或由质粒DNA编码的其抗原结合片段,该质粒DNA于2010年4月7日保藏于ATCC及具有的ATCC保藏号是PTA-10772和PTA-10773或10774。

[0764] 在另一实施方案中,抗叶酸受体抗体是人源化抗体或其抗原结合片段,该抗体包含与QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQS LEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATHVDKSSNTAHMELLSLTSE DFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:11)至少约90%、95%、99%或100%相同的重链可变区和与DIVHQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYC QQSREYPYTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO:12);或DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQ QPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYC QQSREYPYTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO:13)至少约90%、95%、99%或100%相同的轻链可变区。

[0765] 细胞结合剂,诸如抗体,可用具有氨基反应性基团的异双官能交联剂修饰,诸如N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS基团)、硫醇-反应性马来酰亚胺、乙烯基吡啶、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺或基于卤代乙酰基的基团,或硫醇基。

[0766] 抗体中的硫醇残基可通过多种本领域公知的方法引入,包括:a)具有硫醇-产生剂的抗体的修饰,诸如2-亚氨基四氢噻吩或同型半胱氨酸硫代内脂,或b)经由与含二硫化物的异双官能交联剂(诸如SPP、SPDP、SPDB、磺基-SPDB)反应,接着用DTT或TCEP还原二硫键产生游离的硫醇,c)突变以引入非天然半胱氨酸残基(诸如半胱氨酸改造的抗体(美国2007/0092940A1、美国2010/0003766A1、美国7723485B2),或d)天然二硫键的还原(del Rosario,R.B.等人,Cancer Res.Suppl.1990,50,804s-808s)。

[0767] 抗体中的硫醇-反应性基团,诸如马来酰亚胺基、乙烯基吡啶、乙烯基砜、乙烯基磺酰胺,或基于卤代乙酰基的基团可通过用具有硫醇反应性基团的异双官能交联剂修饰抗体而引入(包括但不限于SPDB、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯、磺基-SMCC、SMCC、LC-SMCC、KMUA、BMPS、GMBS、磺基-GMBS、EMCS、磺基-EMCS、AMAS、SVSB、SPP、NHS-(PEG)n-mal,其中n=1至24,优选2、4、8、12和24)。包含基于马来酰亚胺部分的交联剂包括4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-羧酸N-琥珀酰亚胺酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰胺基己酸乙酯),其为SMCC(LC-SMCC)的“长链”类似物、κ-

马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、γ-马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α-马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(SMPB)和N-(对马来酰亚氨基苯基)异氰酸酯(PMPI)。含有乙烯基吡啶的硫醇反应性化合物描述于(Friedman M等人Int.J.PeptideProtein Res.1974,6,183-185;Mak A.等人Anal.Biochem.1978,84,432-440)。含有乙烯基砜部分的硫醇反应性化合物已描述于(Masri M.S.J.Protein Chem.,1988,7,49-54;Morpurgo,M.等人Bioconjugate Chem.1996,7,363-368)中。包含基于卤代乙酰部分的交联剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA)、溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBA)和3-(溴代乙酰胺基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBAP)。

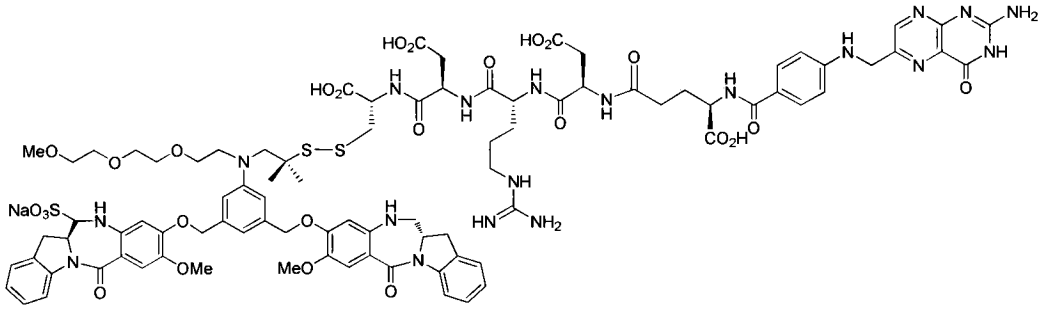
[0768] 修饰的抗体可用本领域已知的任何合适的方法纯化,例如,凝胶过滤、TFF或离子交换色谱或亲和色谱。

[0769] 本文所引用的和下述实施例中的所有参考均通过引用明确地整体并入。

[0770] 细胞结合剂-药物缀合物

[0771] 本发明提供制备细胞结合剂-药物缀合物的改进的方法,该方法包括通过各种连接子将细胞结合剂连接于一种或多种本发明的细胞毒性化合物,该连接子包括但不限于二硫化物连接子、硫醚连接子、酰胺键合的连接子、肽酶不稳定性连接子、酸不稳定性连接子、酯酶不稳定性连接子。

[0772] 可使用本发明的方法制备的代表性的缀合物包括抗体/细胞毒性化合物、抗体片段/细胞毒性化合物/、表皮生长因子(EGF)/细胞毒性化合物、促黑素细胞激素(MSH)/细胞毒性化合物、促甲状腺激素(TSH)/细胞毒性化合物、生长抑素/细胞毒性化合物、叶酸/细胞毒性化合物、雌激素/细胞毒性化合物、雌性激素类似物/细胞毒性化合物、雄激素/细胞毒性化合物和雄激素类似物/细胞毒性化合物。代表性的叶酸/细胞毒性化合物的缀合物如下所述,并且任选的-SO_3Na加合物在两种药物单体中的一者的亚胺键上。该缀合物的代表性合成方案示于图26。

[0773] 

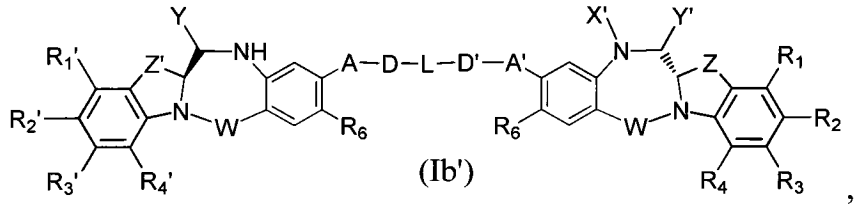
[0774] 叶酸/细胞毒性化合物缀合物

[0775] 在优选的实施方案中,本发明提供制备包含二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物(如,式(Ib')、(IIb')、(Iab')、(IIAb')、(IBb')、(IIBb')、(XIIIb')、(Xb')等)和通过共价键连接的细胞结合剂的缀合物的方法。该连接子可在肿瘤/不希望的增殖细胞位点裂解以许多方式将细胞毒性剂传送至其靶标。该连接子可,例如,通过低pH(脲)、还原环境(二硫化物)、蛋白裂解(酰胺/肽键)或通过酶促反应(酯酶/糖苷酶)裂解。

[0776] 在优选的方面，可通过本发明方法产生的代表性的细胞毒性缀合物是抗体/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、抗体片段/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、表皮生长因子(EGF)/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、促黑素细胞激素(MSH)/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、促甲状腺激素(TSH)/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、生长抑素/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、叶酸/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、雌激素/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、雌激素类似物/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、前列腺特异性膜抗原(PSMA)抑制剂/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、蛋白裂解酶抑制剂/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物、雄激素/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物及雄激素类似物/二氢吲哚并苯并二氮杂䓬二聚体化合物。

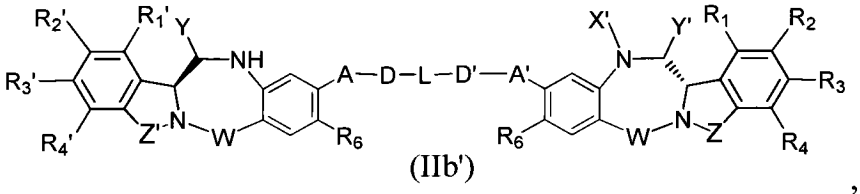
[0777] 因此，在第十四具体实施方案中，本发明的方法产生缀合物，其包含：细胞毒性化合物和细胞结合剂(CBA)，其中细胞毒性化合物通过连接基团共价连接于CBA，且其中缀合物的细胞毒性化合物和连接基团部分由下式中的任一者

[0778]



(Ib')

,



(IIb')

,

[0779] 或其药学上可接受的盐表示，其中：

[0780] Y为亚硫酸盐(HSO_3^-、HSO_2^-或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；优选地，Y是亚硫酸氢盐、次硫酸盐，或偏亚硫酸氢盐或其盐(诸如钠盐)的加合物；

[0781] X'选自-H，氨基保护基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元$-(CH_2CH_2O)_n-R^c$，任选取代的具有6至18个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，和任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至1 8元杂环；

[0782] Y'选自-H，氧代基团，连接基团，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环

状的烷基、烯基或炔基，任选取代的6至18元芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至1 8元杂芳基环，任选取代的具有1至6个杂原子的3至1 8元杂环；

[0783] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基或连接基团；

[0784] R_1、R_2、R_3、R_4、R_1'、R_2'、R_3'和R_4'各自独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-NR'R"，-NO_2，-NCO，-NR'COR"，-SR，由-SOR'所表示的亚砜，由-SO_2R'所表示的砜，磺酸盐-$SO_3^-M^+$，硫酸盐-$OSO_3^-M^+$，由-SO_2NR'R"所表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"和连接基团；

[0785] M是-H或药学上可接受的阳离子诸如Na^+；

[0786] 每次出现时，R独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，任选取代的具有6至1 8个碳原子的芳基，任选取代的含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5至18元杂芳基环，或任选取代的含有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至1 8元杂环；

[0787] R'和R"各自独立地选自-H，-OH，-OR，-NHR，-NR_2，-COR，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(CH_2CH_2O)_n$-R^c，和任选取代的具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3-18元杂环；

[0788] R^c是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基或连接基团；

[0789] n是1至24的整数；

[0790] W选自C=O、C=S、CH_2、BH、SO和SO_2；

[0791] R_6是-H、-R、-OR、-SR、-NR'R"、-NO_2、卤素或连接基团；

[0792] Z和Z'独立地选自-$(CH_2)_{n'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-CR_7R_8-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-NR_9-$(CH_2)_{na'}$-、-$(CH_2)_{n'}$-O-$(CH_2)_{na'}$-和-$(CH_2)_{n'}$-S-$(CH_2)_{na'}$-；

[0793] n'和na'相同或不同，且选自0、1、2和3；

[0794] R_7和R_8相同或不同，且各自独立地选自-H，-OH，-SH，-COOH，-NHR'，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽单元，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0795] R_9独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-；

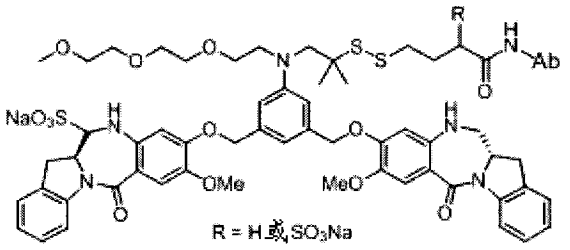
[0796] A和A'相同或不同，且独立地选自-O-、氧代(-C(=O)-)、-CRR'O-、-CRR'-、-S-、-CRR'S-、-N(R_5)-和-CRR'N(R_5)-，

[0797] 每次出现时，R_5独立地为-H或任选取代的具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基；

[0798] D和D'相同或不同，且独立地不存在或选自任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-；

[0799] L不存在，为连接基团，聚乙二醇单元(-$OCH_2CH_2)_n$-，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基或烯基，苯基，具有1至6个独立地选自O、S、N和P的杂原子的3至18元杂环或5至18元杂芳基环，其中所述烷基、烯基任选被连接基团取代；苯基或杂环或杂芳基环可任选被取代，其中所述取代基可包括连接基团。

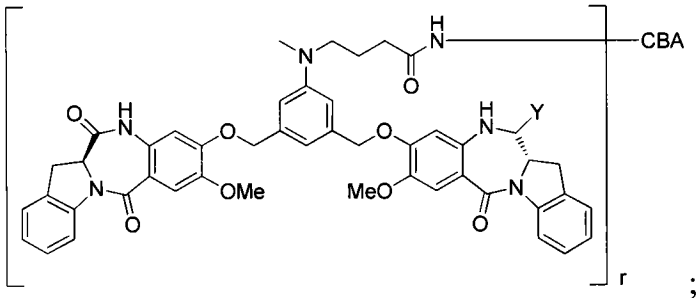
[0800] 代表性的缀合物示于下文(“Ab”代表CBA,诸如抗体):

[0801] 

。

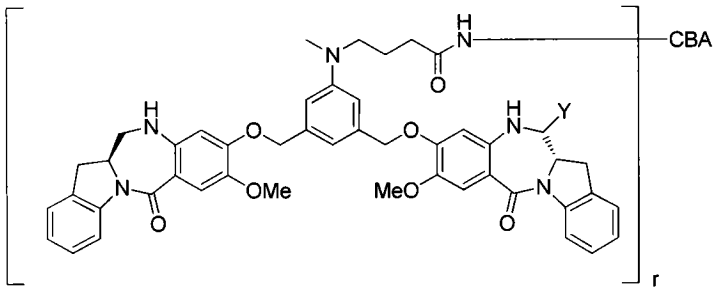
[0802] 在某些实施方案中,Y是-SO_2M、-SO_3M或-OSO_3M。

[0803] 在某些实施方案中,可通过本发明方法合成的缀合物包括以下:

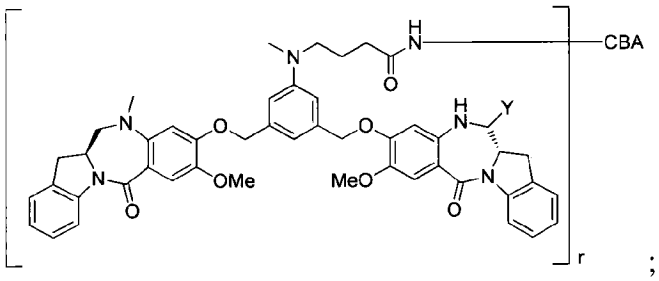


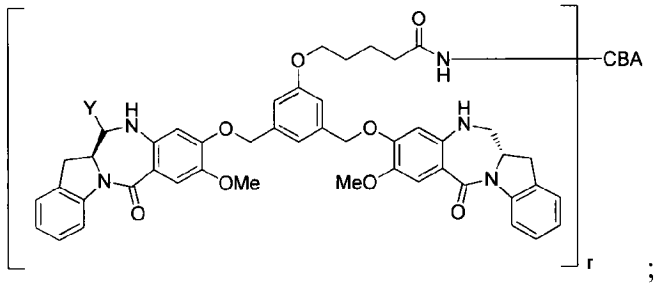
;

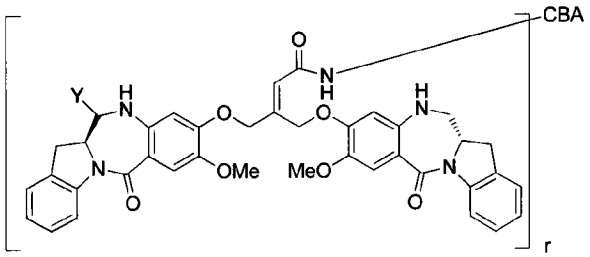
[0804]



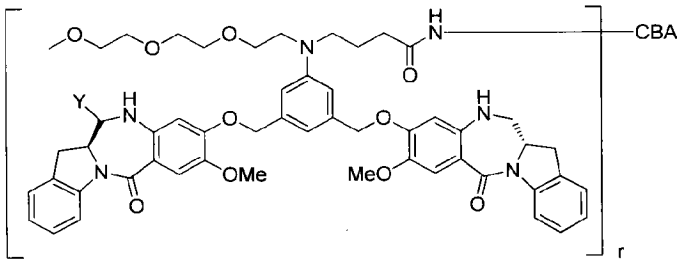
;

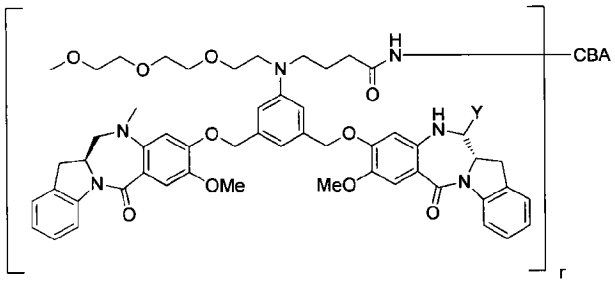


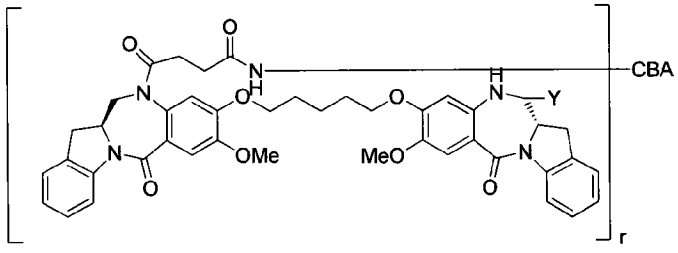




[0805]







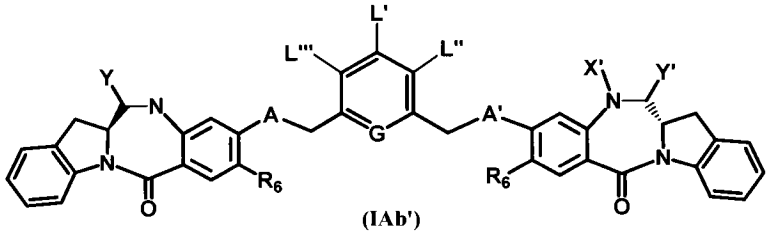
[0806] 其中：

[0807] CBA是细胞结合剂，r是1至10的整数，Y是-H，亚硫酸氢盐、次硫酸盐、偏亚硫酸氢盐

的加合物，或其盐，或-SO_3M，且M是-H或药学上可接受的阳离子。

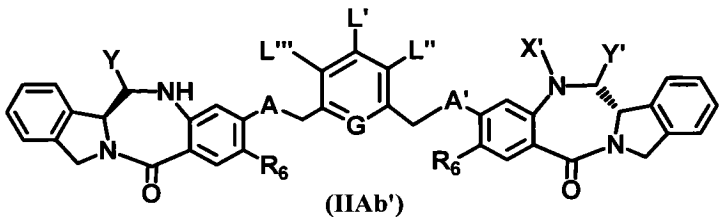
[0808] 在某些实施方案中，L不存在，或为选自任选取代的苯基和任选取代的吡啶基，其中苯基和吡啶基具有连接基团，或L是具有连接基团的胺基(即，-N(连接基团)-)或L是具有1至6个碳原子且具有连接基团的直链、支链或环状的烷基或烯基。

[0809] 在第十五具体实施方案中，键合于连接基团的细胞毒性化合物由下式中的任一者表示：



(IAb')，或

[0810]



(IIAb')，

[0811] 其中：

[0812] L'、L"和L"'相同或不同，且独立地选自-H，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，聚乙二醇单元-$(OCH_2CH_2)_n$-R^c，卤素，胍基[-NH(C=NH)NH_2]，-OR，-MR'R"，-NO_2，-NR'COR"，-SR，由-SOR'表示的亚砜，由-SO_2R'表示的砜，磺酸盐-SO_3M，硫酸盐-OSO_3M，由-SO_2NR'R"表示的磺酰胺，氰基，叠氮基，-COR'，-OCOR'，-OCONR'R"和连接基团，条件是L'、L"和L"'中仅一者是连接基团；且

[0813] G选自-CH-或-N-。其余的基团如上文第十四具体实施方案中所述。

[0814] 在某些实施方案中，L'、L"或L"'中的一者是连接基团，而其它的是-H。优选地，L'是连接基团，而L"和L"'是-H。

[0815] 在某些实施方案中，A和A'均是-O-；R_6是-OMe，且G是-CH-。

[0816] 在第十六具体实施方案中，L'由下式表示：

[0817] -W'-R^x-V-R^y-J，

[0818] 其中：

[0819] w'和V相同或不同，且各自独立地不存在或选自-$CR^eR^{e'}$-、-O-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-S-、-SO-、-SO_2-、-CH_2-S-、-CH_2O-、-CH_2NR^e-、-O-(C=O)O-、-O-(C=O)N(R^e)-、-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)-、-C(=O)-N(R^e)-、-N(R^e)-C(=O)O-、-N(C(=O)R^e)C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-$(O-CH_2-CH_2)_n$-、-SS-或-C(=O)-或氨基酸，或具有2至8个氨基酸的肽；

[0820] R^x和R^y相同或不同，且各自独立地不存在或为任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，具有6至10个碳原子的芳基或具有1至3个选自O、N或S的杂原子的3至8元杂环；

[0821] R^e和$R^{e'}$相同或不同，且选自-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链的环状的烷基，

任选地具有仲氨基(如,-NHR^{101})或叔氨基(-NR^{101}R^{102})或5或6元含氮杂环,诸如哌啶或吗啉,其中R^{101}和R^{102}是各自独立地具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基;优选地,R^{101}和R^{102}是各自独立地具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[0822] n是1至24的整数;且

[0823] J共价键合于CBA,且选自琥珀酰亚胺、乙酰氨基、-S-、-SS-、-CH$_2$S-、-CH(Me)S-、-C(Me)$_2$S-、-NR^{c1}-、-CH$_2$NR^{c1}-、-NR^{c1}N-和-C(=O)-,其中R^{c1}是-H或具有1至4个碳原子的取代或未取代的直链或支链的烷基。

[0824] 在某些实施方案中,J是-S-、-SS-,琥珀酰亚胺,或-C(=O)-。

[0825] 在某些实施方案中,R$^{e'}$是-H或-Me;R^{e}是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基或-(CH$_2$-CH$_2$-O)$_n$-R^{k};n是2至8的整数,且R^{k}是-H、-Me或-CH$_2$CH$_2$-NMe$_2$,而其余的变量如在上文第十五具体实施方案中所述。

[0826] 在某些实施方案中,V是氨基酸或具有2至8个氨基酸的肽。

[0827] 在某些实施方案中,V是缬氨酸-瓜氨酸、gly-gly-gly或ala-leu-ala-leu。

[0828] 在某些实施方案中,

[0829] W'是-O-、-N(R^{e})-或-N(R^{e})-C(=O)-;

[0830] R^{e}是H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基或-(CH$_2$-CH$_2$-O)$_n$-R^{k};

[0831] R^{x}是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[0832] V不存在、为-(O-CH$_2$-CH$_2$)$_n$-、-C(=O)-NH-、-S-、-NH-C(=O)-;

[0833] R^{y}不存在或者是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基;且

[0834] J是-S-、-SS-或-C(=O)-,而其余的基团如第十六具体实施方案所定义。

[0835] 在某些实施方案中,

[0836] W'是-O-、-N(R^{e})-或-N(R^{e})-C(=O)-;

[0837] R^{e}是-H、-Me或-(CH$_2$-CH$_2$-O)$_n$-Me;

[0838] n是2至6的整数;

[0839] R^{x}是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基;

[0840] V和R^{y}不存在;且

[0841] J是-C(=O)-。其余的基团如第十六具体实施方案所定义。

[0842] 在第十七具体实施方案中,第十六具体实施方案中的L'由下式表示:

[0843] -W'-[CR$_{1''}$R$_{2''}$]$_a$-V-[Cy]$_{0-1}$-[CR$_{3''}$R$_{4''}$]$_b$-C(=O)-,

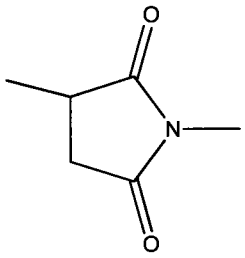
[0844] 其中:

[0845] R$_{1''}$、R$_{2''}$和R$_{3''}$各自独立地为-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基,优选为-Me;

[0846] R$_{4''}$是-H、具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基(优选-Me)、-SO$_3$H或-SO$_3^-$M$^+$,其中M$^+$是药学上可接受的阳离子;

[0847] a是0-5(如,从0至2、3、4或5)的整数,且b是0-6(如,从0至3、4、5或6)的整数;且

[0848] Cy是具有N杂原子的任选取代的5元杂环,优选地Cy是

[0849]  。

[0850] 在某些实施方案中，诸如在第十六或第十七具体实施方案中，W'是-N(R^e)-。

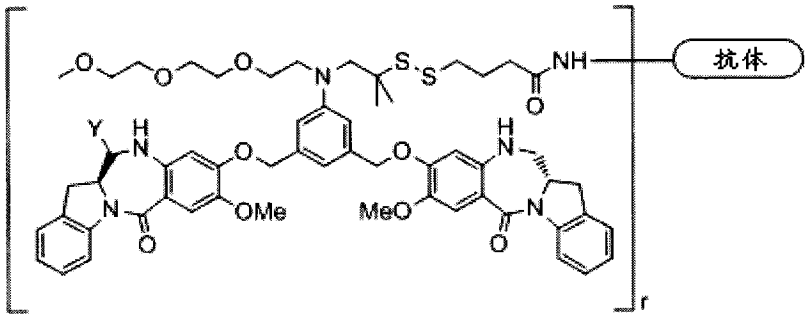
[0851] 在某些实施方案中，诸如在第十六或第十七具体实施方案中，R^e是-(CH_2-CH_2-O)$_{2-6}$-R^k，其中R^k是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0852] 在某些实施方案中，诸如在第十六或第十七具体实施方案中，V是-S-或-SS-。

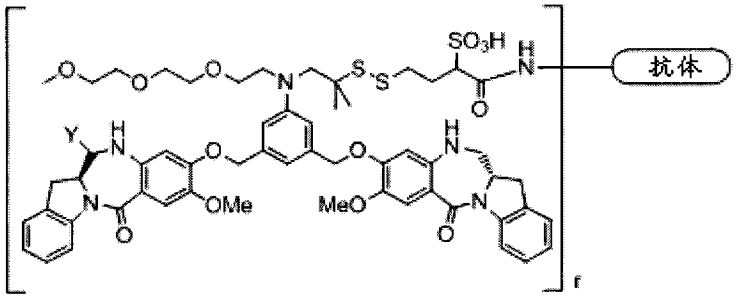
[0853] 在第十八具体实施方案中，在第十六或第十七具体实施方案中的L'由下式表示：

[0854] -NR^e-[$CR_1"R_2"$]$_a$-S-[$CR_3"R_4"$]$_b$-C(=O)-。

[0855] 在某些实施方案中，诸如在第十六至第十七具体实施方案中，缀合物是

[0856] 

，或

[0857] 

，

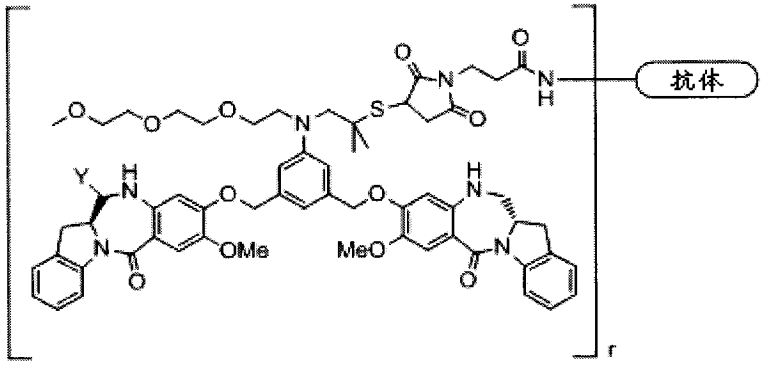
[0858] 其中r是1至10的整数，Y是-SO_3M；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

[0859] 在某些实施方案中，诸如在第十六至第十八具体实施方案中，抗体是huMv9-6。

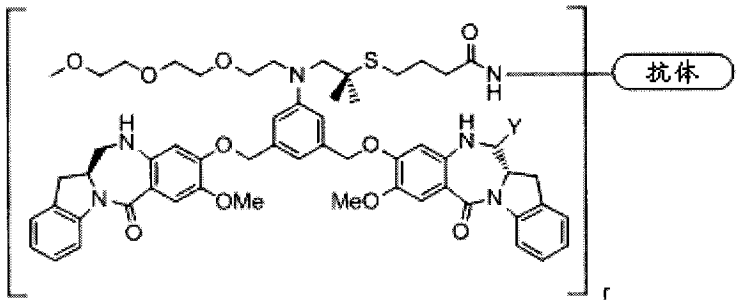
[0860] 在第十九具体实施方案中，在第十六或第十七具体实施方案中的L'由下式表示：

[0861] -NR^e-[$CR_1"R_2"$]$_a$-S-Cy-[$CR_3"R_4"$]$_b$-C(=O)-。

[0862] 在某些实施方案中，诸如在第十六、第十七和第十九具体实施方案中，缀合物是：

[0863] 

，或

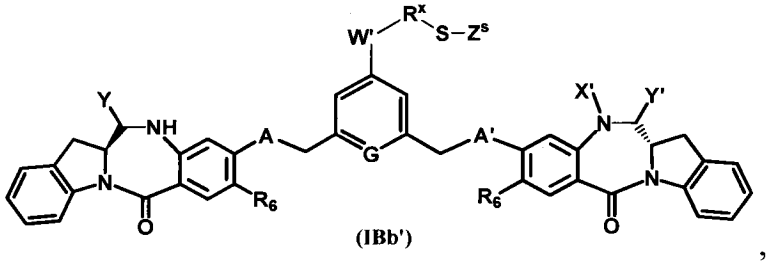


，

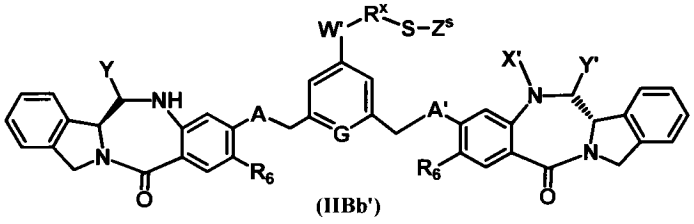
[0864] 其中r是1至10的整数，Y是-SO_3M；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

[0865] 在某些实施方案中，诸如在第十六、第十七和第十九具体实施方案中，抗体是huMy9-6。

[0866] 在第二十具体实施方案中，键合于连接基团的细胞毒性化合物由下式表示：

[0867] 

，



，

[0868] 其中：

[0869] w'不存在或选自-O-、-$N(R^e)$-、-$N(R^e)$-C(=O)-、-N(C(=O)R^e)-、-S-、-CH_2-S-或-CH_2NR^e-；

[0870] R^x不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0871] R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或-$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基(如，-NHR^{101})或叔氨基(-$NR^{101}R^{102}$)基团或5或6元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

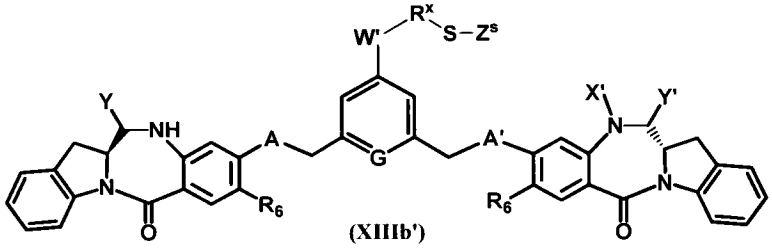
[0872] Z^s连接于CBA，且为键或$-SR^m-$；

[0873] R^m是R^d或是具有1至4个碳原子的取代的具有反应性酯的直链或支链的烷基，其选自N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺酯，N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯基酯、二硝基苯基酯和五氟苯酯；

[0874] R^d选自苯基、硝基苯基、二硝基苯基、羧基硝基苯基、吡啶基或硝基吡啶基；且

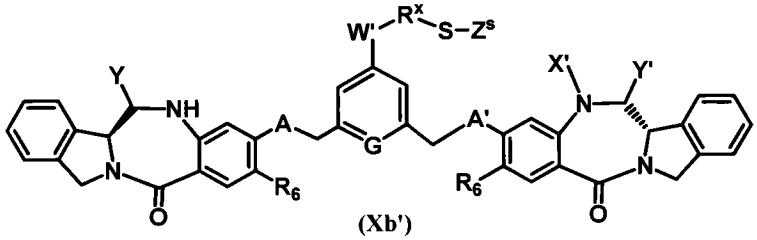
[0875] n是1至24的整数，且剩余的变量如上文第八或第十五具体实施方案所述。

[0876] 在第二十一具体实施方案中，键合于连接基团的细胞毒性化合物由下式表示：



(XIIIb')，

[0877]



(Xb')，

[0878] 其中：

[0879] w'不存在或选自-O-、$-N(R^e)-$、$-N(R^e)-C(=O)-$、$-N(C(=O)R^e)-$、-S-、$-CH_2-S-$或$-CH_2NR^e-$；

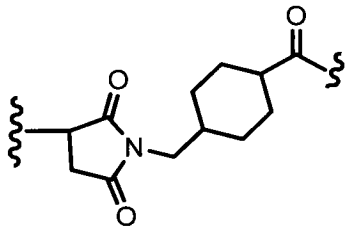
[0880] R^x不存在或选自具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基；

[0881] R^e是-H，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基或$-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基，任选地具有仲氨基(如，$-NHR^{101}$)或叔氨基($-NR^{101}R^{102}$)基团或5或6元含氮杂环，如哌啶或吗啉，其中R^{101}和R^{102}各自独立地为具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基；

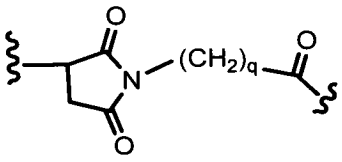
[0882] n是2至6的整数；

[0883] Z^s连接至所述CBA，且选自：

[0884] 键；

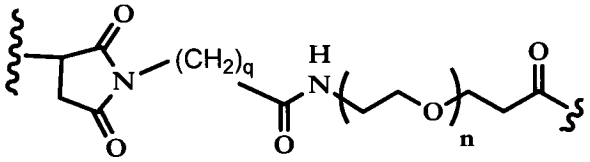


(b1);

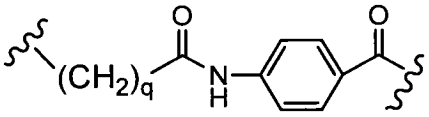


(b2);

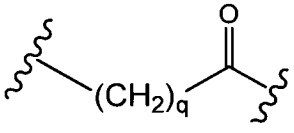
[0885]



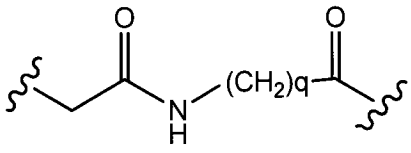
(b3);



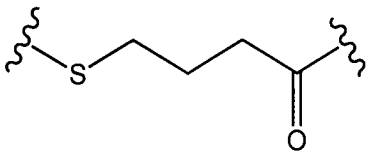
(b4);



(b5);

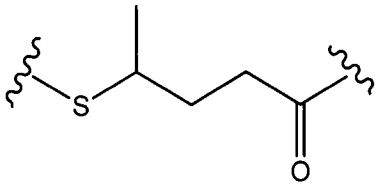


(b6);

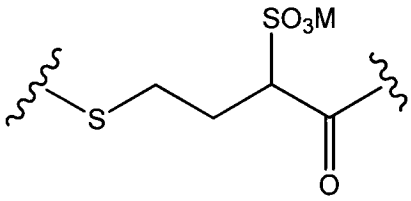


(b7);

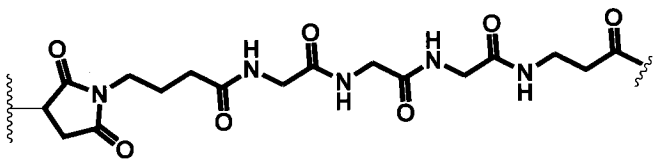
[0886]



(b8);



(b9)和



(b10),

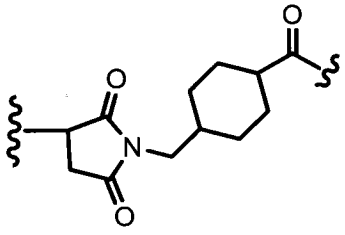
[0887] 其中：

[0888] q是1至5的整数；且

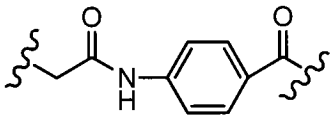
[0889] M是-H或药学上可接受的阳离子，诸如Na^+或K^+。

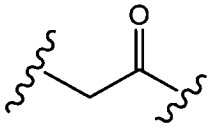
[0890] 在某些实施方案中，Z^s由下式中的任一者表示：

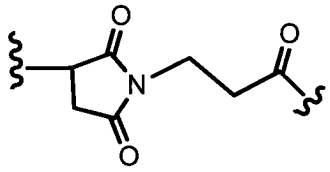
[0891]

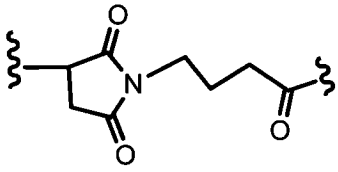


(b1);


(b4');


(b5');

[0892] 
(b12);


(b13)。

[0893] 在某些实施方案中，诸如第21具体实施方案中，w'是-N(R^e)-。

[0894] 在某些实施方案中，诸如第21具体实施方案中，R^e是-(CH_2-CH_2-O)$_n$-R^k，其中R^k是-H，具有1至6个碳原子的直链、支链环状的烷基。

[0895] 在某些实施方案中，诸如第21具体实施方案中，R^k是-H或-Me，n是4，且q是2。

[0896] 在某些实施方案中，诸如第21具体实施方案中，R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0897] 在某些实施方案中，诸如第21具体实施方案中，R^x是-(CH_2)$_p$-(CR^fR^g)-，其中R^f和R^g各自独立地选自H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；且p是0、1、2或3。

[0898] 在某些实施方案，诸如第21具体实施方案中，R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

[0899] 在第二十二具体实施方案中，第二十一具体实施方案中所述的式(VIIIb')和(Xb')的缀合物，其中变量如下所述：

[0900] Y是-SO_3M；

[0901] M是-H或药学上可接受的阳离子(如，Na^+)；

[0902] X'和Y'均是-H；

[0903] A和A'均是-O-；

[0904] R_6是-OMe；且

[0905] R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0906] 在某些实施方案中，诸如第14至第21具体实施方案，Y选自-SO_3M、-SO_2M和硫酸盐-OSO_3M。优选地，Y是-SO_3M。优选地，M是-H、Na^+或K^+。

[0907] 在某些实施方案，诸如第14到第22具体实施方案中，W当存在时是C=O。

[0908] 在某些实施方案，诸如第14至22具体实施方案中，Z和Z'当存在时是-CH_2-。

[0909] 在某些实施方案，诸如第14至第22具体实施方案中，X'选自-H，-OH，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，连接基团，以及氨基保护基团。在某些实施方案中，X'是-H、-OH、-Me或连接基团。优选地，X'是-H。

[0910] 在某些实施方案，诸如第14至第22具体实施方案中，Y'选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。优选地，Y'是-H或氧代。更优选地，-H。

[0911] 在某些实施方案，诸如第14到第22具体实施方案中，A和A'相同或不同，且选自-O-、-S-、-N(R_5)-和氧代(C=O)。优选地，A和A'相同或不同，且选自-O-和-S-。更优选地，A和A'是-O-。

[0912] 在某些实施方案，诸如第14至第22具体实施方案中，D和D'当存在时相同或不同，且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$，其中n是1至24的整数，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-NR'COR"、-SR和-COR'的取代基取代。优选地，D和D'是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。

[0913] 在第二十三具体实施方案中，对于第二十具体实施方案中所述的式(Ibb')或(IIBb')的化合物，变量如下所述：

[0914] Y是-SO_3M；

[0915] M是-H或Na^+；

[0916] X'和Y'均是-H；

[0917] A和A'均是-O-；

[0918] R_6是-OMe；

[0919] R^x是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基。

[0920] 优选地，R^x是-$(CH_2)_p$-(CR^fR^g)-，其中R^f和R^g各自独立地选自-H或具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基；p是0、1、2或3。更优选地，R^f和R^g相同或不同，且选自-H和-Me；且p是1。

[0921] 在第二十四具体实施方案中，如第十四、第十五，或第二十一具体实施方案中所述的本发明的缀合物由下述表示：

[0922] Y是-SO_3M；其中M是-H或药学上可接受的阳离子(如，Na^+)；

[0923] W是C=O；

[0924] R_1、R_2、R_1'、R_2'、R_4和R_4'是-H；

[0925] R_3或R_3'中的一者任选为连接基团，而另一者是-H；

[0926] R_6是-OMe；

[0927] Z和Z'是-CH_2；

[0928] X'是-H；

[0929] Y'是-H；且

[0930] A和A'是-O-。

[0931] 对于本发明上文的缀合物的任一具体实施方案，诸如第14至第24具体实施方案，Y选自-SO_3M、-SO_2M和硫酸盐-OSO_3M。优选地，Y是-SO_3M。

[0932] 在某些实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，M是-H、Na^+或K^+。

[0933] 在本发明上文的缀合物的任一具体实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，W当存在时是C=O。

[0934] 在本发明上文的缀合物的任一具体实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，Z

和Z'当存在时是-CH_2-。

[0935] 在本发明上文的缀合物的任一具体实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，X'选自-H，-OH，任选取代的具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，苯基，连接基团，以及氨基保护基团。在某些实施方案中，X'是-H、-OH、-Me或连接基团。在某些实施方案中，X'是-H。

[0936] 在本发明上文的缀合物的任一具体实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，Y'选自-H，氧代基团，具有1至10个碳原子的取代或未取代的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基。在某些实施方案中，Y'是-H或氧代。在某些实施方案中，Y'是-H。

[0937] 在本发明上文的缀合物的任一具体实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，A和A'相同或不同，且选自-O-、-S-、-N(R_5)-和氧代(C=O)。在某些实施方案中，A和A'相同或不同，且选自-O-和-S-。在某些实施方案中，A和A'是-O-。

[0938] 在本发明上文的缀合物的任一具体实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，D和D'当存在时相同或不同，且独立地选自聚乙二醇单元(-OCH_2CH_2)$_n$，其中n是1至24的整数，氨基酸，具有2至6个氨基酸的肽，具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立地选自卤素、-OR、-NR'COR"、-SR和-COR'的取代基取代。在某些方案中，D和D'是具有1至4个碳原子的直链或支链的烷基。

[0939] 在某些实施方案中，诸如第14至24具体实施方案的任一所述实施方案的缀合物均可包含1-10种细胞毒性化合物、2-9种细胞毒性化合物、3-8种细胞毒性化合物、4-7种细胞毒性化合物或5-6种细胞毒性化合物，包含将细胞毒性化合物连接于CBA的连接基团的每种细胞毒性化合物和缀合物上的各种细胞毒性化合物是相同的。

[0940] 在某些实施方案中，诸如第14至24具体实施方案的任一所述实施方案的缀合物均可包含1-10种细胞毒性化合物、2-9种细胞毒性化合物、3-8种细胞毒性化合物、4-7种细胞毒性化合物或5-6种细胞毒性化合物，包含将细胞毒性化合物连接于CBA的连接基团的每种细胞毒性化合物和缀合物上的各种细胞毒性化合物是相同的。

[0941] 在某些实施方案中，诸如第14至第24具体实施方案的任一所述实施方案的缀合物均可包含1-10种总细胞毒性化合物和(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物、2-9种总细胞毒性化合物和(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物、3-8种总细胞毒性化合物和(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物、4-7种总细胞毒性化合物和(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物，或5-6种总细胞毒性化合物和(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物，包含将细胞毒性化合物或(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物连接于CBA的连接基团的每种细胞毒性化合物或(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物以及缀合物上的每种细胞毒性化合物或(未修饰的)含有亚胺的细胞毒性化合物是相同的(除了(亚硫酸氢盐)修饰以外)。

[0942] 在任一缀合物实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，细胞结合剂可结合至选自肿瘤细胞、病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自身免疫细胞、活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞或黑素细胞的靶细胞；结合至表达的CD4、CD6、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD44、CD56、EpCAM、CanAg、CALLA，或Her-2抗原；Her-3抗原的细胞；或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体和叶酸受体的细胞。

[0943] 在任一缀合物实施方案，诸如第14至第24具体实施方案中，细胞结合剂可以是抗体、单链抗体、特异性结合于靶细胞的抗体片段、单克隆抗体、单链单克隆抗体或特异性结

合于靶细胞的单克隆抗体片段、嵌合抗体、特异性结合于靶细胞的嵌合抗体片段、结构域抗体、特异性结合于靶细胞结构域抗体片段、淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子或营养转运分子。

[0944] 抗体可以是表面重构抗体、表面重构单链抗体或表面重构抗体片段。

[0945] 该抗体可以是单克隆抗体、单链单克隆抗体或其单克隆抗体片段。

[0946] 抗体可以是人源化抗体、人源化单链抗体或人源化抗体片段。

[0947] 在本文的任一具体实施方案，诸如第1至第24具体实施方案中，亚胺反应剂选自亚硫酸盐(H_2SO_3、H_2SO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)、偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_3$、POS_3H_3、PS_4H_3或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯($(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iSH、R^iSOH、R^iSO_2H、R^iSO_3H)，各种胺(羟胺(如，NH_2OH)，肼(如，NH_2NH_2)，NH_2O-R^i，R^i，$NH-R^i$，NH_2-R^i)，$NH_2-CO-NH_2$，$NH_2-C(=S)-NH_2$，硫代硫酸盐($H_2S_2O_3$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)、连二亚硫酸盐($H_2S_2O_4$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)、二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^kC(=O)NHOH$或与阳离子形成的盐)，酰肼($R^kCONHNH_2$)，甲醛次硫酸氢盐氢钠($HOCH_2SO_2H$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)，糖化的核苷酸(诸如GDP-甘露糖)，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$的取代基取代；R^i和$R^{i'}$可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

[0948] 优选地，亚胺反应剂选自亚硫酸盐、羟胺、肼和脲。更优选地，亚胺反应剂是$NaHSO_3$或$KHSO_3$。

[0949] 在本文的任一具体实施方案，诸如第1至第24具体实施方案中，对含有亚胺的细胞毒性化合物使用了约0.1至约30摩尔当量的亚胺反应剂。在某些实施方案中，对于含有亚胺的细胞毒性化合物使用了约1至约10摩尔当量的亚胺反应剂。在某些实施方案中，对于含有亚胺的细胞毒性化合物使用了约3至约5摩尔当量的亚胺反应剂。

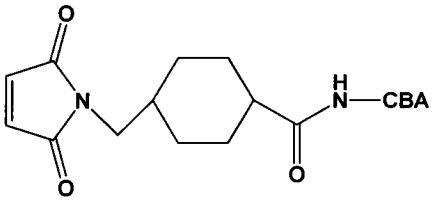
[0950] 在本文任一种具体实施方案，诸如第1至第24具体实施方案中，双官能交联剂将细胞毒性剂通过硫醚键与细胞结合剂连接且可具有马来酰亚胺基或基于卤代乙酰基的部分，其中具有基于马来酰亚胺基部分的双官能交联剂选自：4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸N-琥珀酰亚胺酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧基-(6-氨基己酸乙酯)(LC-SMCC)、κ-马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺酯(KMUA)、γ-马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α-马来酰亚胺基乙酰氧基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸N-琥珀酰亚胺酯(SMPB)、N-(对马来酰亚氨基苯基)异氰酸酯(PMPI)、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯；并且，其中具有基于卤代乙酰基的部分的双官能交联剂选自：N-琥珀酰亚胺基-4-(碘代乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、碘乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SIA)，溴乙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBA)和3-(溴代乙酰氨基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SBAP)、双-马来酰亚胺聚乙二醇(BMPEO)、$BM(PEO)_2$、$BM(PEO)_3$、N-(β-马来酰亚胺丙基氧基)琥珀酰亚胺酯(BMPS)、5-马来酰亚胺戊酸NHS、HBVS、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)-丁酸酰肼·HCl

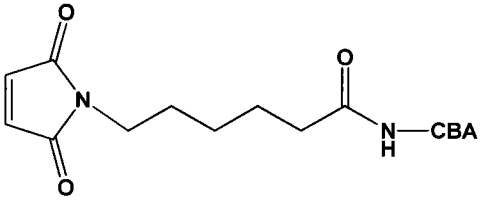
(MPBH)、琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基磺酰基)苯甲酸酯(SVSB)、二硫代双-马来酰亚胺乙烷(DTME)、1,4-双-马来酰亚胺丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双-马来酰亚胺己烷(BMH)、双-马来酰亚胺乙烷(BMOE)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMCC)、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SIAB)、间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-MBS)、N-(γ-马来酰亚胺丁基氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-GMBS)、N-(ε-马来酰亚胺己酰氧基)硫代琥珀酰亚胺酯(磺基-EMCS)、N-(κ-马来酰亚胺十一烷氧基)磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-KMUS)、4-(对马来酰亚氨基苯基)丁酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基-SMPB)、CX1-1、磺基-Mal和PEG_n-Mal。

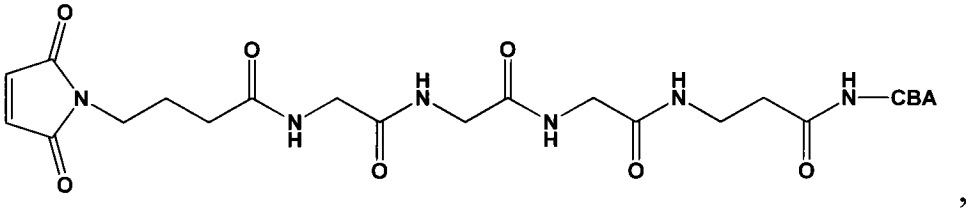
[0951] 在某些实施方案中,双官能交联剂选自SMCC、磺基-SMCC、BMPS、GMBS、SIA、SIAB、N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯、双-马来酰亚胺己烷或BMPEO。

[0952] 在任一实施方案,诸如第1至第24的具体实施方案中,通过正切流动过滤、吸附色谱法、吸附过滤、选择性沉淀、非吸附过滤或其组合来纯化缀合物。优选地,通过正切流动过滤和/或吸附色谱法来纯化该缀合物。

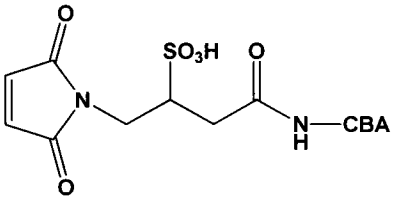
[0953] 在某些实施方案,诸如第1至第24具体实施方案中,具有硫醇反应性基团的细胞结合剂(CBA)是:

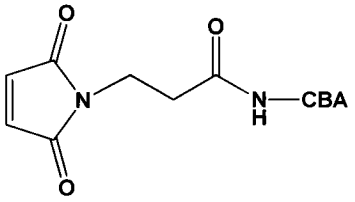

O
N
O
H
N—CBA
O
，

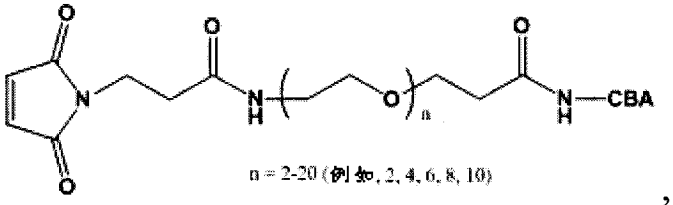

O
N
O
N
H
CBA
O
，

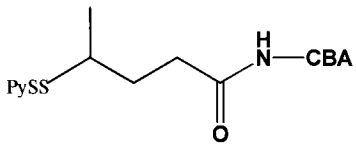

O
N
O
H
N
O
H
N
O
H
N
H
N—CBA
O
，

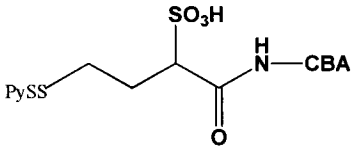
[0954]

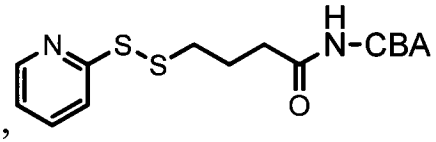

O
SO3H
O
N
O
N
H
CBA
，

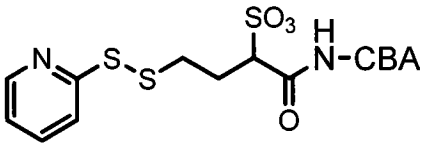

O
O
N
O
N
H
CBA
，

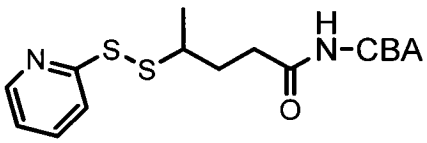

O
O
N
O
N
H
O
n
N
H
CBA
n = 2-20 (例如, 2, 4, 6, 8, 10)
，

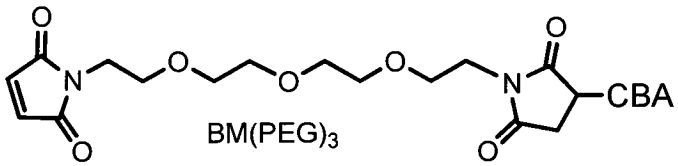

PySS
H
N—CBA
O
，

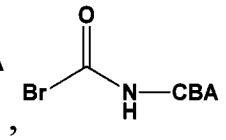

SO3H
PySS
H
N—CBA
O
，


N
S
S
H
N-CBA
O
，

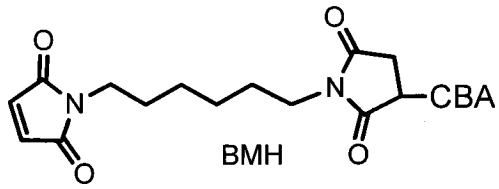

SO3
N
S
S
H
N-CBA
O
，

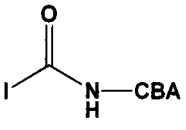

N
S
S
H
N-CBA
O
，


O
N
O
O
O
O
N
CBA
O
O
BM(PEG)3
，

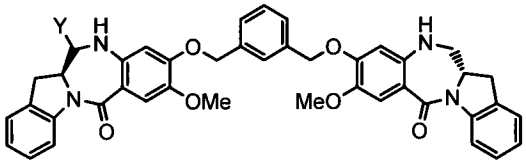

O
Br
N—CBA
H
，

[0955]

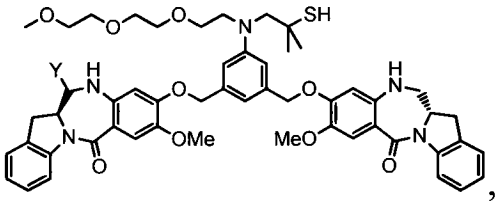

O
O
N
O
N
CBA
O
BMH
，或


O
I
N—CBA
H
。

[0956] 通过本发明方法制备的化合物或缀合物特别地包括：

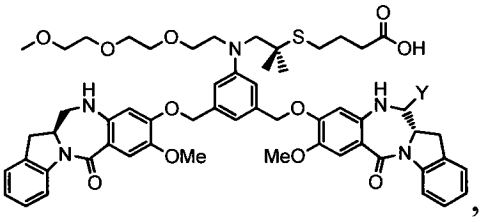


,

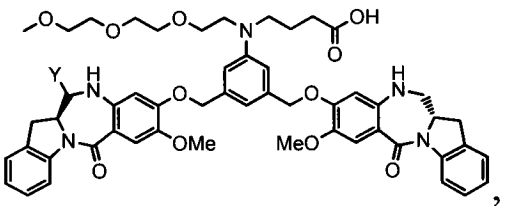


,

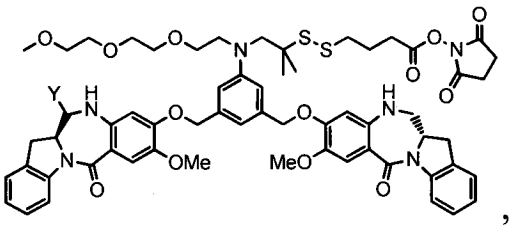
[0957]



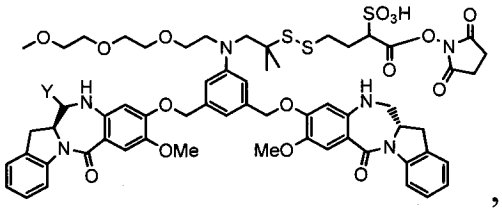
,

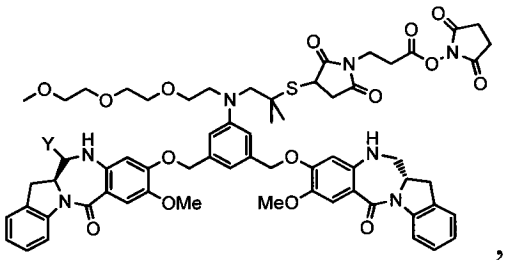


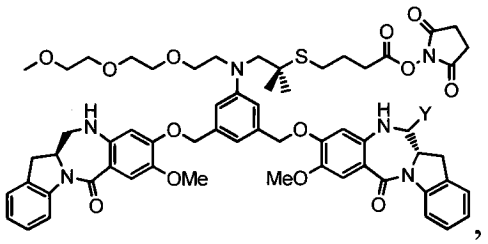
,



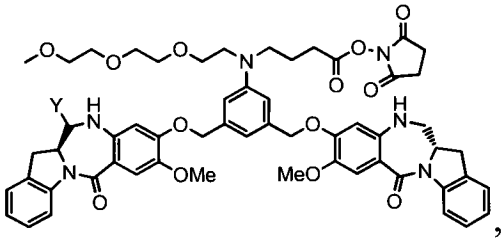
,

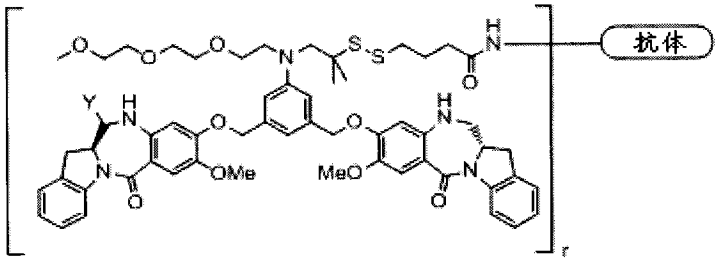

SO3H
Y
OMe
MeO
,

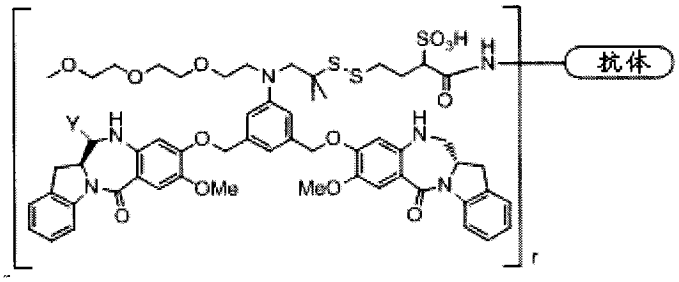

Y
OMe
MeO
,

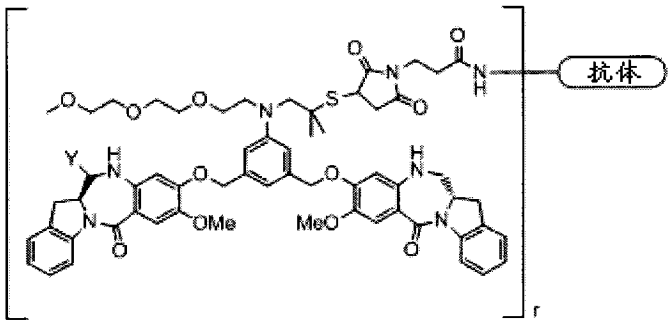

Y
OMe
MeO
,

[0958]


Y
OMe
MeO
,

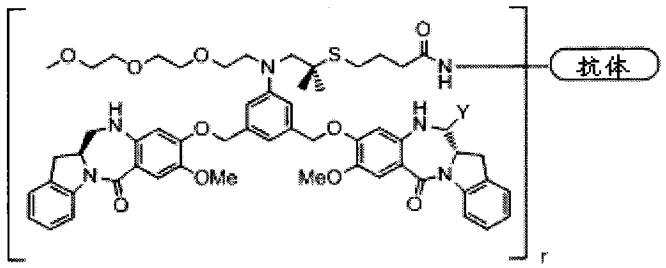

抗体
Y
OMe
MeO
r
,


SO3H
抗体
Y
OMe
MeO
r
,

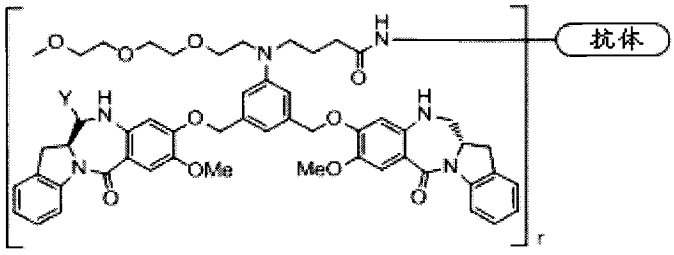


，

[0959]



，

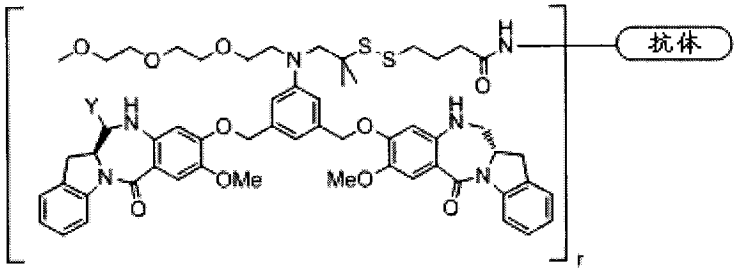


，

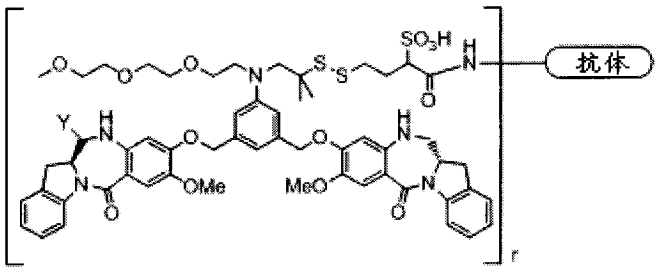
[0960] 其中r是1至10的整数，Y是-H或-SO_3M；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

[0961] 在第25具体实施方案中，本发明提供了用于制备下式的缀合物的方法：

[0962]

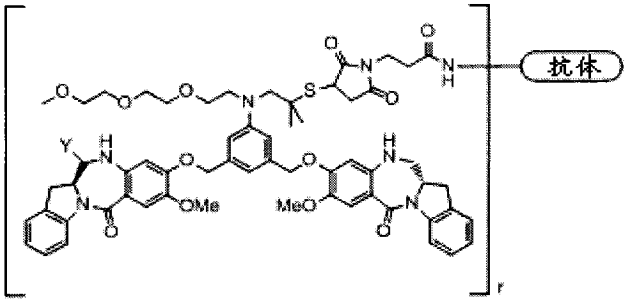


，

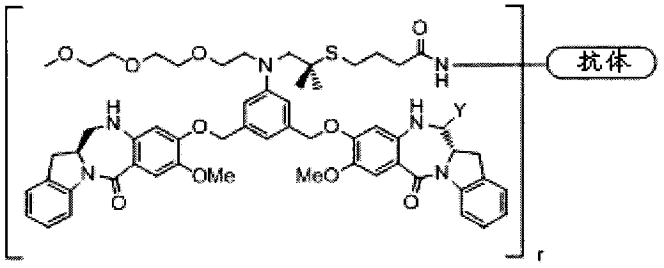


，

[0963]



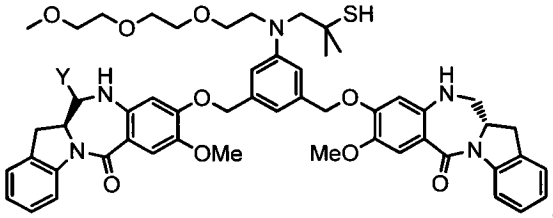
，或



，

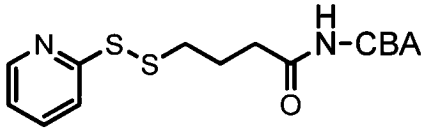
[0964] 该方法包括将下式的细胞毒性化合物

[0965]



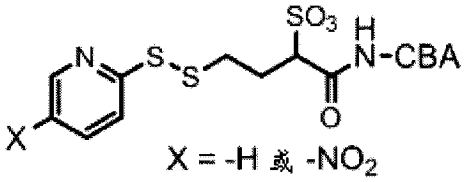
，

[0966] 在pH约4至约9下，分别与下式的修饰的CBA反应，

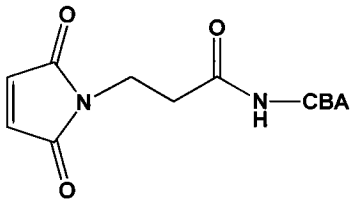


，

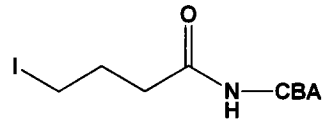
[0967]



，

[0968] 

，或



，

[0969] 其中：

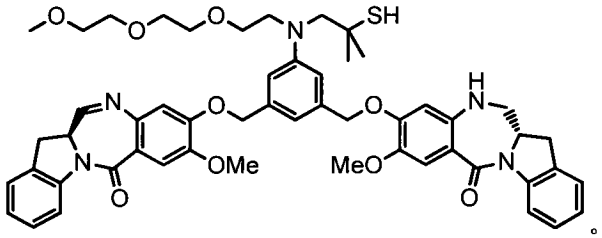
[0970] r是1至10的整数；

[0971] Y是离去基团，且是亚硫酸盐(HSO_3、HSO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_2$、POS_3H_2、PS_4H_2或与阳离子形成PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯$(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iS-、R^iSO、R^iSO_2、R^iSO_3，硫代硫酸盐(HS_2O_3或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)，连二亚硫酸盐(HS_2O_4或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)，二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^{k'})(S)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^{k'}C(=O)NOH$或与阳离子形成的盐)，甲醛次硫酸氢盐($HOCH_2SO_2^-$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)或其混合物，其中R^i是具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$中的至少一个取代基取代；R^i可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；$R^{k'}$是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基；优选地Y为$-SO_3M$；且

[0972] M是-H或药学上可接受的阳离子。

[0973] 在某些实施方案中，Y是$-SO_3M$；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

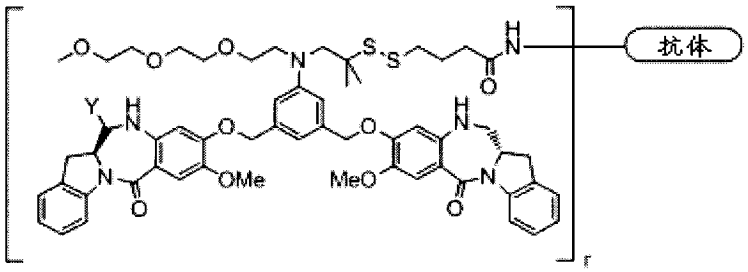
[0974] 在某些实施方案中，细胞毒性化合物通过使亚胺反应剂与下式的含有亚胺的细胞毒生化合物反应而产生：

[0975] 

。

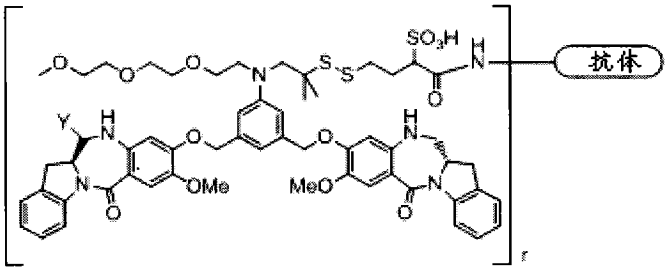
[0976] 在某些实施方案中，CBA是huMy9-6。

[0977] 在第26具体实施方案中，本发明提供了用于制备下式的缀合物的方法：

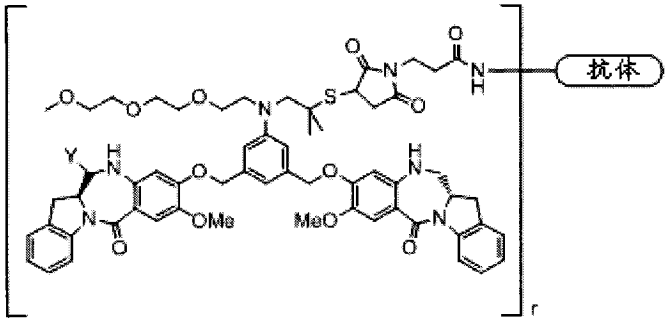


，

[0978]

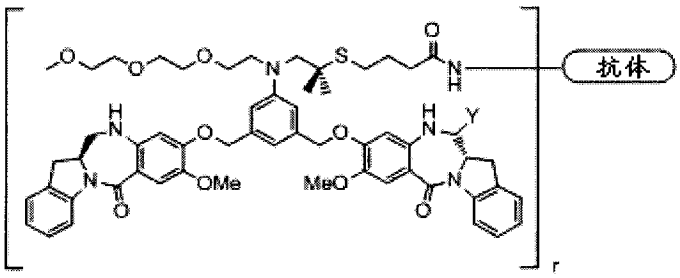


，



，或

[0979]



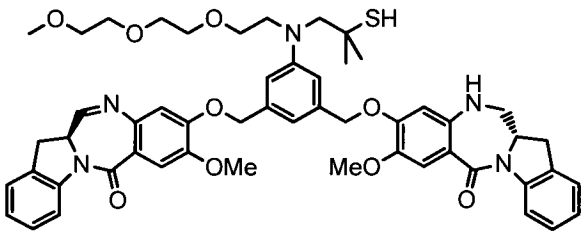
，

[0980] 所述方法包括使CBA与含有亚胺的细胞毒性化合物、亚胺反应剂和包含连接基团的双官能交联剂反应以形成缀合物，

[0981] 其中：

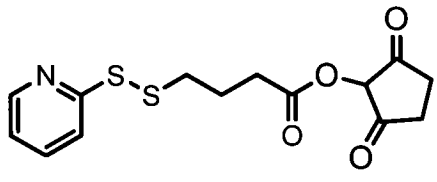
[0982] 含有亚胺的细胞毒性化合物是：

[0983]

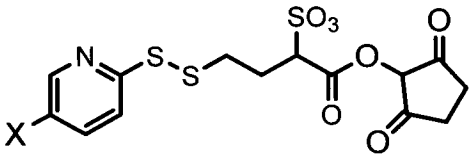


；

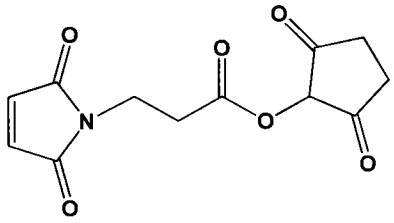
[0984] 双官能交联剂分别是：



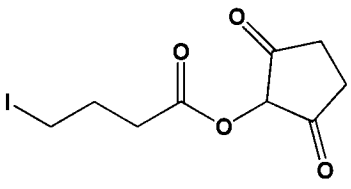
，

[0985] 

(X = -H 或-NO_2)，



，或

[0986] 

且

，

[0987] 亚胺反应剂选自：亚硫酸盐(H_2SO_3、H_2SO_2或与阳离子形成的HSO_3^-、SO_3^{2-}或HSO_2^-的盐)，偏亚硫酸氢盐($H_2S_2O_5$或与阳离子形成的$S_2O_5^{2-}$的盐)，单、二、三和四硫代磷酸盐(PO_3SH_3、$PO_2S_2H_3$、POS_3H_3、PS_4H_3或与阳离子形成的PO_3S^{3-}、$PO_2S_2^{3-}$、POS_3^{3-}或PS_4^{3-}的盐)，硫代磷酸酯($(R^iO)_2PS(OR^i)$、R^iSH、R^iSOH、R^iSO_2H、R^iSO_3H)，各种胺(羟胺(如，NH_2OH)，肼(如，NH_2NH_2)，NH_2O-R^i，$R^{i'}NH-R^i$，NH_2-R^i)，$NH_2-CO-NH_2$，$NH_2-C(=S)-NH_2$，硫代硫酸盐($H_2S_2O_3$或与阳离子形成的$S_2O_3^{2-}$的盐)、连二亚硫酸盐($H_2S_2O_4$或与阳离子形成的$S_2O_4^{2-}$的盐)、二硫代磷酸盐($P(=S)(OR^k)(SH)(OH)$或其与阳离子形成的盐)，异羟肟酸($R^kC(=O)NHOH$或与阳离子形成的盐)，酰肼($R^kCONHNH_2$)，甲醛次硫酸氢盐氢钠($HOCH_2SO_2H$或与阳离子形成的$HOCH_2SO_2^-$的盐，诸如$HOCH_2SO_2^-Na^+$)，糖化的核苷酸(诸如GDP-甘露糖)，氟达拉滨或其混合物，其中R^i和$R^{i'}$各自独立地为具有1至10个碳原子的直链或支链的烷基且被至少一个选自$-N(R^j)_2$、$-CO_2H$、$-SO_3H$和$-PO_3H$的取代基取代；R^i和$R^{i'}$可进一步被本文所述的烷基取代基任选取代；R^j是具有1至6个碳原子的直链或支链的烷基；R^k是具有1至10个碳原子的直链、支链或环状的烷基、烯基或炔基，芳基，杂环基或杂芳基。

[0988] 在某些实施方案中，Y是$-SO_3M$；且M是-H或药学上可接受的阳离子。

[0989] 在某些实施方案中，CBA是huMy9-6。

[0990] 化合物和缀合物的体外细胞毒性

[0991] 本发明方法产生的细胞毒性化合物和细胞结合剂-药物缀合物可对它们抑制各种癌细胞系体外增殖的能力进行评价。例如，可将细胞系诸如人结肠癌细胞系COLO205、横纹肌肉瘤细胞系RH-30和多发性骨髓瘤细胞系MOLP-8用于评价这些化合物和缀合物的细胞毒性。待评价的细胞可被暴露于化合物或缀合物1-5天且细胞的存活部分通过已知的方法以

直接测定进行测量。然后可由测定的结果来计算IC_{50}值。可选地或另外，体外细胞系敏感度筛选，诸如由美国国家癌症研究所(参见Voskoglou-Nomikos等人，2003，Clinical Cancer Res.9:42227-4239，通过引用并入本文)描述的一类可用作指南之一，以确定可对由本发明方法所产生的化合物或缀合物敏感的癌症的类型。

[0992] 由本发明方法产生的抗体-细胞毒性剂缀合物的体外效能和靶特异性的实例示于图17中。所有缀合物对在低皮摩尔范围内的IC_{50}抗原阳性癌细胞有极强的细胞毒性。当暴露于相同的缀合物时，抗原阴性细胞系保持活力。当用未缀合的抗体huMy9-6(抗-CD33)阻断时，该二氢吲哚并苯并二氮杂萘二聚体示出小于160倍效能的靶特异性效能(图17)及当用未缀合的抗体FOLR1(抗叶酸受体抗体)阻断时，该二氢吲哚并苯并二氮杂萘二聚体示出小于40倍效能的靶特异性效能(结果未示出)。例如，用具有亚硫酸氢盐加合物的huMy9-6-SPDB-1f缀合物杀死IC_{50}值为10.5pM的抗原阳性HL60/QC细胞，而加入过量未缀合的huMy9-6抗体减少该细胞毒性效应(IC_{50}＝1.69nM)，这证明了抗原特异性(图17A)。此外，huMy9-6-SPDB-1f缀合物对IC_{50}值为21pM的HL60/ATCC细胞系和IC_{50}为190pM的NB-4细胞系(图17B和17C)也是高度有效的。

[0993] 通过比较未缀合的huMy9-6抗体和huMy9-6-SPDB-1f缀合物两者对HL60/QC细胞系的结合来测量缀合物对抗体结合的效应(图18)。FACS分析表明缀合物与裸露抗体的结合能力没有变化，这表明没有因为细胞毒性剂缀合于抗体而削弱结合。

[0994] 在一个实例中，对细胞结合剂/细胞毒性剂的体内功效进行了测量。用huMy9-6-SPDB-1f缀合物来处理具有人类HL60/QC肿瘤的裸鼠，在多剂量下观察到显著的肿瘤消退，而未处理的小鼠肿瘤生长迅速(图19)。在低至20μg/kg的剂量时，观察到比最大耐受剂量低至少35倍的反应性。

[0995] 亚胺饱和对耐受性的影响示于表9。在多剂量下对二亚胺huFOLR1-药物1进行测试，发现所有这些是高度有毒的仅留下在50μg/kg下测试的最低测试组的幸存者。相比之下，发现部分还原的单-亚胺huFOLR1-药物2和huFOLR1-SPDB-IGN(huFOLR1-SPDB-1f)缀合物具有显著改善的耐受性，而huFOLR1-SPDB-IGN(huFOLR1-SPDB-1f)缀合物在最高测试剂量560μg/kg时，这表明100％的动物存活。

实施例

[0996] 实施例1

[0997] 将2mg/ml的人源化My9-6抗体与9摩尔当量的2-NHS酯(化合物2)在25℃下在含有15％DMA(v/v)的85％PBS，pH7.4中缀合3小时，然后在PBS，pH7.4中经G25脱盐柱纯化，以除去未反应的或水解的、未缀合的药物。将缀合物在10mM组氨酸，250mM甘氨酸，pH6.5缓冲液(含有1％蔗糖)中透析。基于在280和320nm下的紫外吸收和使用药物和抗体在280nm和320nm下的消光系数的计算，该缀合物的药物/抗体比率(DAR)测定为1.4DAR。

[0998] 在TSK-Gel G300SWXL柱(7.8mm×300mm，5μm粒度)中，使用400mm高氯酸钠、150mM磷酸钾缓冲液、pH7.0的等度流动相，以1ml/min，通过尺寸排阻色谱法(SEC)分析缀合物的单体％。通过监测所有抗体种类在280nm下的紫外吸收和测量每个抗体峰的曲线下面积(AUC)来测定单体的百分比(单体％)和聚集体。此外，通过监测所有抗体种类在320nm和280nm下的紫外吸收和测量每个抗体峰的AUC来测定单体和聚集体两者上2药物的百分比

(%)。含有1.4DAR的huMy9-6-2缀合物的单体%是91%。单体上的%2是80%。

[0999] 对于游离(未缀合)的药物测定,用丙酮萃取缀合物以除去蛋白质,干燥,重新溶解于流动相中,并使用20%乙腈和80%去离子水直到100%乙腈(均含有0.025%乙酸)的线性梯度,在1ml/min下经48分钟进样于VYDAC208TP C8反相HPLC柱(4.6×250mm,7μm粒度)中,并与药物-甲酯标准品进行比较。缀合物中游离的、未缀合药物的百分比测定为<1%的缀合药物。

[1000] 在脱糖基化之后用质谱(MS)来分析具有1.4药物/抗体比率(DAR)的huMy9-6-2缀合物(图1A)。缀合物的MS示出未缀合的抗体(D0)为最大峰、较小的D1峰(具有1种连接的药物的抗体)和2和3种连接的药物/抗体的小得多的D2和D3峰。在9倍摩尔过量的2-NHS酯与抗体缀合之后,缀合的效率低至1.4缀合的DAR。

[1001] 实施例2

[1002] 对于使用亚硫酸氢钠的2-NHS酯(化合物2)的缀合,将2-NHS酯(化合物2)与0.9摩尔当量的亚硫酸氢钠(去离子水中新鲜制备的$NaHSO_3$)在25℃下在66%DMA(二甲基乙酰胺)水溶液中孵育30分钟。将2mg/ml的HuMy9-6抗体与9摩尔当量的2-NHS酯(加入有$NaHSO_3$)在25℃下在85%PBS,pH7.4,15%DMA(v/v)中缀合3h,然后经G25脱盐柱在PBS,pH7.4中纯化,以除去未反应的或水解的药物。将缀合物在10mM组氨酸、250mM甘氨酸,1%蔗糖,pH6.5缓冲液中透析。

[1003] 用亚硫酸氢钠制备的huMy9-6-2缀合物的DAR通过紫外分光光度计在280和320nm下测量,并计算为3.1DAR。缀合物的单体%是95%且单体上%2是91%。使用亚硫酸氢钠随后去糖基化制备的缀合物的MS示出具有一种连接的药物的D1最大峰,和具有2-6种连接的药物/抗体的D2、D3、D4、D5、D6峰(图1B)。

[1004] 与未用亚硫酸氢钠制备的1.4DAR缀合物相比,用亚硫酸氢钠制备的huMy9-6-2缀合物示出3.1DAR的更大的药物结合。用亚硫酸氢钠制备的3.1DAR缀合物的MS示出1-6种连接的药物的缀合物峰,而最高D1峰具有1种连接的药物。相比之下,未用亚硫酸氢钠制备的1.4DAR缀合物的MS示出未缀合的抗体(D0)的最高峰和小得多的D1、D2和D3连接的药物缀合物峰。对于用亚硫酸氢钠制备的huMy9-6-2缀合物,单体上的药物%是91%,其高于未用亚硫酸氢钠制备的huMy9-6-2缀合物单体上80%的药物。因此,用亚硫酸氢钠制备的huMy9-6-2缀合物的整体缀合物质量大大高于未用亚硫酸氢钠的传统缀合程序。

[1005] 在存在亚硫酸氢钠($NaHSO_3$)下进行若干种药物(1、2、3和4)的NHS酯与抗体的的缀合,并与未用$NaHSO_3$的传统缀合方法进行比较。结果示于表16中。在所有情况下,与未加入亚硫酸氢钠制备的缀合物相比,缀合中加入亚硫酸氢钠示出单体上较高DAR和较高药物%的显著较好质量的缀合。

[1006] 表16.抗体与未加入或加入亚硫酸氢钠($NaHSO_3$)的若干药物-NHS酯的缀合物的比较

[1007]

$NaHSO_3$ 加入	药物类型	DAR	单体%	单体上药物%
-	2	1.4	91	80
+		3.0	95	91
-	3	0.5	95	35
+		2.5	95	91
-	4	1.0	90	65
+		3.8	90	84
-	1	1.1	95	40
+		2.7	92	87

[1008] 用亚硫酸氢钠制备的huMy9-6-2缀合物与未用亚硫酸氢钠制备的缀合物示出类似的体外细胞毒性(图2)。因此,用亚硫酸氢钠制备较高DAR和较高单体上药物%的较好质量的缀合物,而不损失任何细胞毒性效能。用亚硫酸氢钠制备的抗-CD22抗体-2缀合物与未用亚硫酸氢钠制备的缀合物相比示出类似的体外细胞毒性(图3)。

[1009] 通过非还原性SDS-PAGE使用凝胶芯片分析仪来分析时用亚硫酸氢钠制备的huMy9-6-2缀合物。该缀合物仅示出完整的抗体条带;未观察到重链和轻链条带,这表明加入亚硫酸氢钠未引起抗体中天然链间二硫键的任何不希望的还原的出人意料的优点。

[1010] 将2-NHS酯或3、4、1和5SPDB-NHS酯与0.5至3摩尔当量的亚硫酸氢钠(在去离子水中新鲜制备的NaHSO3)在66-98%DMA(二甲基乙酰胺)水溶液中在25℃下预孵育15min至4h。同样使一些反应在4℃下放置过夜并用于20h后的缀合。

[1011] 通过HPLC,使用VYDAC C8反相柱,用20%乙腈和80%去离子水至100%乙腈(均含有0.025%乙酸)的线性梯度,在1ml/min下经48分钟来分析用亚硫酸氢钠或未用亚硫酸氢钠处理的DMA中的2-NHS酯。如图4所示,母体2-NHS酯在～23分钟处洗脱出。用0.9摩尔当量的$NaHSO_3$于66%DMA的水溶液中在25℃下处理30分钟之后,大多数的2-NHS转化为在～14分钟处洗脱出的磺化的、极性更大的形式。出乎意料的是,未观察到不希望的磺化水解的2的峰。因此,观察到令人惊讶的亚硫酸氢钠对亚胺键的加入的有利反应,而未与NHS酯反应。

[1012] 类似地,在与抗体缀合之前用亚胺反应剂而不是亚硫酸氢钠处理药物NHS酯。替代缀合方法是处理药物-NHS酯和带有亚硫酸氢钠或其它亚胺反应剂的抗体的混合物。

[1013] 实施例3

[1014] 使用合成的1-SPDB-NHS酯(化合物1c)制备二硫键-连接的抗体-SPDB-1缀合物。用3摩尔当量的亚硫酸氢钠(使用新鲜制备的$NaHSO_3$水溶液)在96-98%DMA水溶液中在25℃下保持4-5h来预处理1-SPDB-NHS酯。使用VYDAC C8反相HPLC柱,用20%乙腈和80%去离子水(含有0.025%乙酸)的线性梯度在1ml/min下保持48分钟来分析在DMA中经亚硫酸氢钠-处理的1-SPDB-NHS酯。反相HPLC分析示出仅有所需的对亚胺键的亚硫酸氢盐加成反应,而没有不需要的亚硫酸氢盐与NHS酯的反应。

[1015] 对于缀合,将2mg/mL的人源化抗体与5-7摩尔当量的1-SPDB-NHS酯(用$NaHSO_3$预处

理)在含有15%N,N-二甲基乙酰胺(DMA)的85%PBS,pH7.4水性缓冲液中,在25℃下反应6h,然后经G25凝胶过滤柱在PBS,pH7.4下纯化,以除去未反应或水解的药物。将人源化抗体-SPDB-1缀合物在10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1%蔗糖,pH6.5缓冲液中透析。通过在280至320nm下的紫外吸收测量并使用药物和抗体在280nm和320nm下的消光系数测得缀合物的药物抗体比率(DAR)是2.2-2.9。经SEC(尺寸排阻色谱)测定,缀合物制剂中单体的百分比为90%。基于SEC中单体峰的紫外吸收也证明了单体缀合物峰具有连接的药物分子。通过丙酮萃取和反相HPLC的未缀合药物%示出为小于1%。

[1016] 与未用亚硫酸氢钠缀合获得的缀合物的MS相比,缀合前用加入亚硫酸氢钠制备的去糖基化抗体-SPDB-1缀合物的MS示出较高的缀合(图5)。在未用亚硫酸氢钠制备的缀合物的MS具有1.41/Ab的平均值和具有多达三个连接的1分子的抗体种类(图5A)。相比之下,在加入亚硫酸氢钠制备的缀合物的MS示出平均2.51/Ab和具有多达七个连接的1分子的抗体种类(图5B)。

[1017] 通过非还原SDS-PAGE凝胶芯片分析,用亚硫酸氢钠制备的二硫键-连接的抗体-SPDB-1缀合物仅示出完整的抗体条带。凝胶芯片测定使用Agilent蛋白230蛋白芯片来进行,并使用Agilent2300生物分析仪来分析。未观察到重链和轻链条带,这表明加入亚硫酸氢钠未引起天然抗体-链间二硫键的任何不希望的还原的出乎意料的优点(图6)。使用亚硫酸氢钠制备的来自于抗体-SPDB-1缀合物中获得的连接的药物也令人惊奇地证明,缀合物中的二硫键连接子对加入的亚硫酸氢钠是稳定的。

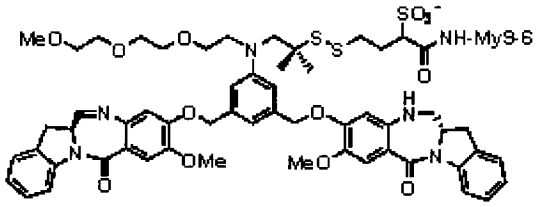
[1018] 实施例4

[1019] 对于缀合物制备,将1f-SPDB-NHS酯(化合物1c,图7)与3摩尔当量的亚硫酸氢钠(新鲜制备的$NaHSO_3$中的去离子水溶液)在96%DMA(二甲基乙酰胺)水溶液中在25℃下预孵育5h,然后在4℃下过夜孵育直到需要用于缀合。在不存在或存在亚硫酸氢钠(-/+$NaHSO_3$)的情况下,将2-3mg/ml的人源化抗体在25℃下在95%50mM HEPES,pH8.5的水相缓冲液(含有5%DMA(v/v))中用8摩尔当量的1f-SPDB-NHS酯衍生4h,然后两者均经G25脱盐柱纯化至PBS,pH7.4中,以除去未反应的、水解的药物。将缀合物在10mM组氨酸、250mM甘氨酸,1%蔗糖,pH6.5缓冲液中透析。通过紫外分光光度法在280和320nm下测量缀合物的DAR。通过SEC来测定缀合物中单体%和单体上药物%。在丙酮萃取后,通过反相HPLC来测定缀合物中未缀合的药物。用若干人源化抗体来进行这些缀合。

[1020] 实施例5

[1021] 为了将药物硫醇与掺入抗体的反应性二硫键连接子缀合,将8mg/ml的人源化mAb在25℃下在90%PBS,pH7.5,含有5%DMA(v/v)的水性缓冲液中用4-6摩尔当量的SPDB异双官能连接子衍生1.5h,然后经G25脱盐柱纯化至35mM柠檬酸盐、2mM EDTA、150mMNaCl、pH5.5缓冲液中,以除去未反应的、水解的连接子。在未加入和加入50mM二硫苏糖醇(以测量总抗体和释放的SPy)下通过在280和343nm下的紫外吸收来测量LAR(连接子抗体比率)。使2mg/ml的SPDB-修饰的抗体与2摩尔当量的亚硫酸氢钠-处理的药物硫醇/连接子在25℃下在85-90%的50mM磷酸钾、50mM NaCl,pH7.5缓冲液中反应2至20h,然后经G25脱盐柱在PBS,pH7.4中纯化,以除去未反应的、水解的药物。通过在280和320nm下的紫外吸收来测量抗体-SPDB-药物缀合物的DAR,并通过SEC来测定缀合物制剂中单体的百分比和单体上药物的百分比。

[1022] 实施例6huMy9-6-磺基-SPDB-1的制备(2步法)

[1023] 

My9-6-磺基-SPDB-1

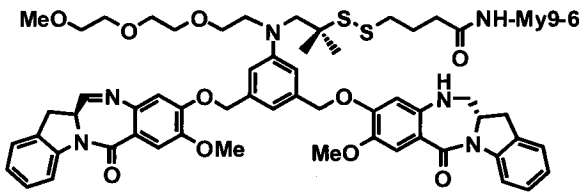
[1024] 将含有6mg/mL huMy9-6抗体和9摩尔当量的磺基-SPDB连接子(20mM在DMA中的储备液)的反应物在25℃下在50mM EPPS缓冲液pH8中孵育3h。使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA级,GE Healthcare)除去未反应的连接子,并基于抗体浓度和通过紫外-可见(对于2-硫代吡啶酮,ε_{343nm}=8,080$cm^{-1}M^{-1}$)的DTT释放的硫代吡啶浓度,测定连接子抗体比率(LAR)为3.7

[1025] 将磺基-SPDB修饰的huMy9-6在50mM EPPS pH8.5,10%v/vDMA中稀释至2mg/ml,并与2摩尔当量的化合物1d/连接子(5mM在DMA中的储备液;7.4当量/抗体)在25℃下反应3h。

[1026] 反应后,使用脱盐柱(G-25Sephadex,细粒级,GE Healthcare)来纯化缀合物,将缓冲液更换为pH6.2下的250mM甘氨酸,10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01%Tween-20、50μM亚硫酸氢钠。

[1027] 发现纯化的缀合物具有平均每个抗体连接有2.9个化合物1(通过紫外-可见,对化合物1使用的摩尔消光系数为ε_{330nm}=15,484$cm^{-1}M^{-1}$和ε_{280nm}=30,115$cm^{-1}M^{-1}$,对My9-6抗体,ε_{280nm}=207,000$cm^{-1}M^{-1}$)、97.8%单体(通过尺寸排阻色谱法)、<1%未缀合的化合物1(用丙酮萃取/反相HPLC)、基于所使用抗体量的60%的收率,基于所使用的化合物1d量的18%的总收率。使用该方法制备的缀合物无需缀合物沉淀即可被浓缩(通过搅拌细胞或Amicon离心过滤装置)至>3mg/ml。

[1028] 实施例7huMy9-6-SPDB-1的制备

[1029] 

My9-6-SPDB-1

[1030] 方法1(一步试剂法):

[1031] 将含有2mg/mL的huMy9-6抗体和7摩尔当量的1-SPDB-NHS(预先用5倍过量的硫酸氢钠在25℃于90:10DMA:水,v/v中预处理1h,然后在4℃下过夜)在50mMHEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)pH8.5的缓冲液和10%v/v DMA(N,N-二甲基乙酰胺)助溶剂中在25℃下孵育3h。

[1032] 反应后,使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA Grade,GE Healthcare)来纯化缀合物,将缓冲液更换为250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01%Tween、50μM亚硫酸氢钠制剂缓冲液。在相同缓冲液中在室温下利用Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific 20,000MWCO)进行4小时的透析。

[1033] 发现纯化的缀合物具有平均每个抗体连接有4.0个化合物1分子(通过紫外-可见,对化合物1使用的摩尔消光系数ε_{330nm}=15,484$cm^{-1}M^{-1}$和ε_{280nm}=30,115$cm^{-1}M^{-1}$,对My9-6抗

体，ε_{280nm}＝207,000$cm^{-1}M^{-1}$)、92％单体(通过尺寸排阻色谱法，TSK3000，TOSOHBiosciences)、<1％未缀合的化合物1(用丙酮萃取/反相HPLC)、基于所使用抗体量的72％的收率，基于所使用的1-SPDB-NHS的40％的总收率为及1.0mg/ml的最终蛋白浓度。

[1034] 方法2(两步法)：

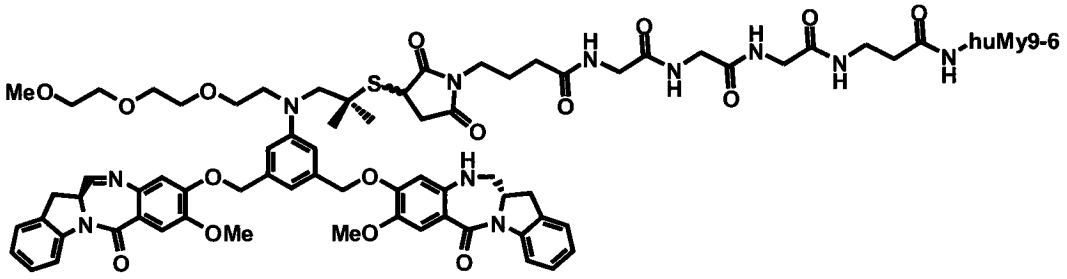
[1035] 将含有4.8mg/mL的huMy9-6抗体和6摩尔当量的SPDB连接子(18.5mM的储备液在乙醇中)的反应液在25℃下在PBS pH7.4下孵育3h。使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNAGrade,GE Healthcare)除去未反应的连接子，且基于抗体浓度和通过紫外-可见(对于2-硫代吡啶酮，ε_{343nm}＝8,080$cm^{-1}M^{-1}$)的DTT释放的2-硫代吡啶酮浓度，连接子对抗体的比率(LAR)测定为4.0。

[1036] 将SPDB修饰的huMy9-6在50mM EPPS pH8.5,10％v/v DMA中稀释至2mg/ml，并与1.75摩尔当量的化合物1d/连接子(5mM在DMA中的储备液;7当量/抗体)在25℃下反应3h。

[1037] 反应后，使用脱盐柱(Illustra SephadeX G-25DNA Grade,GE Healthcare)来纯化缀合物，将缓冲液更换为pH6.2下的250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1％蔗糖、0.01％Tween-20、50μM亚硫酸氢钠。

[1038] 发现纯化的缀合物具有平均每个抗体连接有3.8个化合物1分子(通过紫外-可见，对化合物1使用的摩尔消光系数ε_{330nm}＝15,484$cm^{-1}M^{-1}$和ε_{280nm}＝30,115$cm^{-1}M^{-1}$，对My9-6抗体，ε_{280nm}＝207,000$cm^{-1}M^{-1}$)、91.6％单体(通过尺寸排阻色谱法，TSK3000，TOSOHBiosciences)、<1％未缀合的化合物1(用丙酮萃取/反相HPLC)、基于所使用抗体量的40％的收率，基于所使用的化合物1d量的22％的总收率为及0.5mg/ml的最终蛋白浓度。

[1039] 实施例8huMy9-6-CX1-1-1的制备

[1040] 

huMy9-6-CX1-1-1

[1041] 方法1(原位一步试剂法)：

[1042] 使含有1.9mM的化合物1d、具有N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和马来酰亚胺基团的1mM CX1-1异双官能连接子及20mM的二异丙基乙基胺(DIPEA)的DMA溶液在环境温度下反应8分钟。然后加入3mM的马来酰亚胺丙酸(MPA)以淬灭过量的化合物1d。将1-CX1-1-NHS反应混合物冷冻贮藏于-80℃下，随后在25℃下融化后将其分两部分加入huMy9-6的缓冲溶液(2mg/ml,100mM EPPS,pH8.0,10％v/v DMA)中;4.8摩尔当量/抗体(基于连接子的浓度)，随后在30分钟后为4.2当量。反应2h后，使用脱盐柱(快速自旋蛋白(Quick-spin protein),G-25细粒树脂,Roche)来纯化缀合物，并将缓冲液更换为pH6.2下的250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1％蔗糖、0.01％Tween-20、50μM亚硫酸氢钠，透析，并最终经0.22μm无菌过滤。

[1043] 发现纯化的缀合物具有平均每个抗体连接有3.3化合物1分子(通过紫外-可见，对化合物1使用的摩尔消光系数为ε_{330nm}＝15,484$cm^{-1}M^{-1}$和ε_{280nm}＝30,115$cm^{-1}M^{-1}$，对My9-6抗

体，ε_{280nm}＝207,000$cm^{-1}M^{-1}$)、95％单体(通过尺寸排阻色谱，TSK3000，TOSOHBiosciences)、＜1％未缀合的化合物1(用丙酮萃取/反相HPLC)、基于所使用抗体量的45％的收率，基于所使用的化合物1d的17％的总收率及0.7mg/ml的最终蛋白浓度。

[1044] 方法2(一步法)：

[1045] 向huMy9-6抗体的缓冲溶液(2mg/ml、50mM EPPS，pH8.5，8％v/v DMA)中加入14摩尔当量的化合物1d(5mM在DMA中的储备液)，然后加入7摩尔当量的CX1-1连接子(15mM在乙醇中的储备液)并在25℃下孵育3h。

[1046] 反应后，使用脱盐柱(1llustra Sephadex G-25DNA级，GEHealthcare)来纯化缀合物，将缓冲液更换为pH6.2下的250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1％蔗糖、0.01％Tween-20、50μM亚硫酸氢钠，然后在4℃下在Slide-a-Lyzer透析盒(ThermoScientific20,000MWCO)中进行2×透析。

[1047] 发现纯化的缀合物具有平均每个抗体连接有3.4个化合物1分子(通过紫外-可见，对化合物1使用的摩尔消光系数为ε_{330nn}＝15,484$cm^{-1}M^{-1}$和ε_{280nm}＝30,115$cm^{-1}M^{-1}$，对My9-6抗体，ε_{280nm}＝207,000$cm^{-1}M^{-1}$)、90％单体(通过尺寸排阻色谱，TSK3000，TOSOHBiosciences)、＜1％未缀合的化合物1(用丙酮萃取/反相HPLC)、基于所使用抗体量的44％的收率，基于所使用的化合物1d的11％的总收率及1.48mg/ml的最终蛋白浓度。

[1048] 实施例9去糖基化My9-6-SPDB-1f的MS分析

[1049] 制备My9-6-SPDB-1f或者通过将含有1fNHS酯的化合物直接缀合于抗体赖氨酸(即，如上所述的一步试剂法)，或通过将化合物1d缀合于二硫代吡啶修饰的抗体(即，如上所述的两步法)。然后如上所述对去糖基化的My9-6-SPDB-1f进行质谱(MS)分析。

[1050] 一步试剂法产生具有0-9种化合物1f修饰的缀合物、不对称的缀合药物分布和显著量的未缀合抗体。另一方面，由两步法制备的缀合物具有的MS曲线为0-6种化合物1f修饰、对称的缀合药物分布和非常少量的未缀合抗体。参见图12。通过紫外-可见分析，缀合物具有类似的～4的平均化合物1f/抗体比率。

[1051] 实施例10pH对My9-6-磺基-SPDB-1的两步合成的影响

[1052] 使用两步法在不同pH条件下得到的My9-6-磺基-SPDB-1f的MS数据示于图13。简言之，使My9-6-磺基SPDB(3.7个连接子/抗体)与3当量的化合物1d/连接子(或约11.1当量/抗体)在pH6、7、8和8.5下反应18h。MS数据示出随着反应pH的增加，未反应的连接子减少(260amu卫星峰)。因此，似乎pH影响My9-6-磺基-SPDB-1f缀合物合成中的缀合反应。具体而言，化合物1d需要pH＞8以与抗体上的磺基-SPDB连接子完全反应。

[1053] 实施例11化合物/连接子比率对chKTI-磺基-SPDB-1的两步合成的影响

[1054] 图14示出使用两步法用不同化合物1d/连接子比率制备的chKTI-磺基-SPDB-1的MS数据。使chKTI-磺基SPDB(3.7个连接子/抗体)与1.1、1.3、1.5或2当量的化合物1d/连接子在25℃，pH8.5下反应3h。MS示出随着化合物1d/连接子当量的增加，未反应的连接子(260amu卫星峰)减少。在该条件下，似乎化合物1d/连接子的比率需要＞1.3以与抗体上的磺基-SPDB连接子完全反应。将化合物1d的当量/连接子增至1.5以上导致抗体片段化增加(14-19％)，而1.1-1.3个化合物1d/连接子未引起显著的抗体片段化。

[1055] 实施例12抗体-SPDB-药物缀合物的制备

[1056] 将化合物1c用3摩尔当量的亚硫酸氢钠(使用新鲜制备的$NaHSO_3$水溶液)在96-

98％DMA水溶液中在25℃下保持4-5小时进行预处理。对于缀合，使2mg/mL的人源化抗体与5-7摩尔当量的化合物1c(用$NaHSO_3$预处理)在25℃下，在85-90％PBS，pH7.4，水性缓冲液或50mM HEPES，pH8.5，水性缓冲液(含有10-15％N，N-二甲基乙酰胺(DMA))中反应6h，然后在PBS，pH7.4中经G25凝胶过滤柱纯化，以除去未反应或水解的药物化合物。将人源化的抗体-SPDB-药物缀合物在10mM组氨酸、250mM甘氨酸、1％蔗糖，pH6.5缓冲液中透析。通过在280至320nm下的紫外吸收测量并使用药物和抗体在280nm(215,000$M^{-1}cm^{-1}$)和320nm(9137$M^{-1}cm^{-1}$)下的消光系数来测量缀合物的药物抗体比率(DAR)是2.2-2.9。使用TSK-Gel G300SWXL柱(7.8mm×300mm，5μm粒度)通过SEC(尺寸排阻色谱)测定缀合物中单体的百分比为＞90％。基于SEC中单体峰的紫外吸收也证明了单体缀合物峰具有连接的药物分子。对于游离(未缀合)的药物测定，用丙酮萃取缀合物以除去蛋白质，干燥并重新溶解在流动相中，并进样于VYDAC 208TPC8反相HPLC柱(4.6×250mm，7μm粒径)中，并与标准品相比较。测定缀合物中游离药物化合物的百分比为＜0.5％的缀合药物化合物。

[1057] 人源化Ab-SPDB-2a缀合物的制备：

[1058] 将8mg/mL的人源化的Ab与4-6摩尔当量的SPDB异双官能连接子在25℃下在95％PBS，PH7.4(含有5％DMA(v/v))中衍生1.5h，然后经G25脱盐柱纯化至柠檬酸盐缓冲液(35mM柠檬酸盐缓冲液，pH5.5，含有2mM EDTA，150mM NaCl)中以除去未反应的连接子。在不加入和加入50mM二硫苏糖醇下使用280和343nm下的紫外吸收测量LAR(连接子抗体比率)(以测量总抗体和二硫苏糖醇释放的SPy)并测定为2.7-4.1 LAR。将2mg/mL的SPDB-修饰的抗体与2摩尔当量的化合物2a(HCl盐)/连接的SPDB在环境温度下在85％柠檬酸盐缓冲液、15％DMA(v/v)中反应20h，然后经G25脱盐柱纯化至PBS，pH7.4中，以除去未缀合的药物化合物。通过紫外分光光度计在280至350nm下测量最终人源化的Ab-SPDB-2a缀合物的DAR并计算为～1.7-2.1 DAR。通过HPLC使用SEC(尺寸排阻色谱)柱来测定缀合物中单体和单体上连接的药物化合物的百分比。参见图16。

[1059] 实施例13使用共价亚胺反应物来提高Ab-药物缀合物规格(单体％和药物负荷)。

[1060] 用5摩尔当量的亚胺反应物在25℃下经NHS-BMPS-1在90％DMSO/10％PBS pH7.4下反应4小时以形成加合物。然后将反应混合物加至huMy9-6抗体(4摩尔当量药物，2mg/ml，10％v/v DMSO，50mM HEPES缓冲液，pH8.5，5h，25℃)中。使用连二亚硫酸钠、亚硫酸氢钠或焦亚硫酸钠制备的缀合物具有类似的药物/Ab比率和单体％，而未用添加剂处理制得的缀合物导致非常低的药物结合。

[1061] 实施例14huFOLR-1缀合物的体内耐受性研究

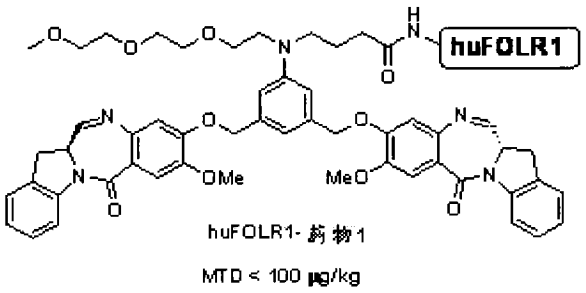
[1062] 在雌性CD-1小鼠中研究huFOLR-1缀合物的体内耐受性。在研究开始前观察动物7天，发现没有疾病或病症。给小鼠施用单次静脉内注射的具有亚硫酸氢盐的缀合物并且每天监测动物的体重减轻、发病率或死亡率。表9示出对于huFOLR1-药物1，缀合物仅在50μg/kg的最低测试剂量具有耐受性。相比之下，发现单亚胺缀合物huFOLR1-药物2和huFOLR1-SPDB-1f两者具有更好的耐受性，其最大耐受剂量分别是＜198μg/kg和＞560μg/kg。

[1063] 表9.(A)huFOLR1-药物1，(B)huFOLR1-药物2，和(C)huFOLR1-SPDB-1f缀合物的耐受性比较数据。

[1064]

A)

剂量 (μg/kg)	存活%
50	100
100	0
200	0
300	0
400	0

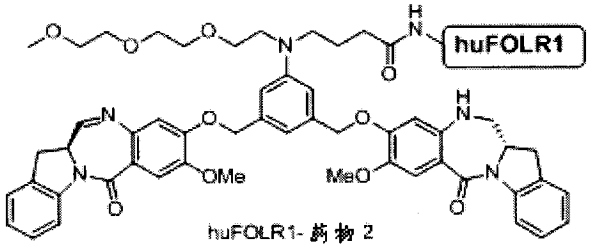


huFOLR1-药物1

MTD < 100 μg/kg

B)

剂量 (μg/kg)	% 存活
66	100
132	100
198	50
264	25

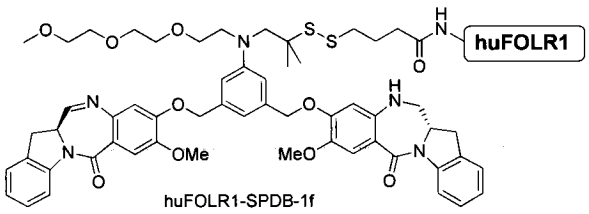


huFOLR1-药物2

MTD < 198 μg/kg

C)

剂量 (μg/kg)	% 存活
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100



huFOLR1-SPDB-1f

MTD > 560 μg/kg

[1065] 实施例15制剂和缀合物中丙二醇的作用

[1066] 本实施例证明存在丙二醇作为助溶剂时进行的主题缀合反应未示出缀合物的沉淀，并且可使用高达40%(可能甚至更高)的丙二醇而不会引起所得缀合物单体%的降低(在2%二甲基乙酰胺存在下-数据未示出)。

[1067] 更重要的是，纯化期间存在丙二醇导致收率显著增加(表10)。

[1068] 尽管不希望受任何特定理论的束缚，申请人认为在主题缀合物的缀合期间问题的主要来源之一是缀合物分子组分的固有疏水性。这可至少部分地解释低的纯化收率，并且有时观察到主题缀合物的异常质量分布曲线。

[1069] 还值得注意，在主题缀合物的尺寸排阻色谱期间加入异丙醇大大降低了表观聚集群体。该观察表明，小的疏水性助溶剂可增加本发明药物和缀合物的溶解度。

[1070] 因此主题缀合反应、反应后的纯化步骤和/或所形成的缀合物的制剂优选地在小的疏水性助溶剂，诸如丙二醇(如，5、10、15、20、25、30、35、40、45%)存在下进行。

[1071] 根据前述方法，通过向抗体(huMy9-6)的水溶液(含有3%DMA)中加入磺基-SPDB的

N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯形式,并在pH8.5下缓冲保持3小时来制备抗体-磺基-SPDB。将所得中间体(抗体-磺基-SPDB)经由G25Sephadex纯化以除去过量的连接子。通过紫外-可见分光光度计测量在不存在还原剂时在280nm下的吸光度及在存在～50mMDTT时在343nm下的吸光度来定量抗体和连接子,以测量缀合的连接子中2-硫代吡啶的释放。

[1072] 为缀合药物,上述制备的抗体-磺基-SPDB以2mg/mL抗体和2倍摩尔过量的化合物1d在指定助溶剂存在下反应,同时用EPPS缓冲液保持pH在8.5(最终浓度60mM)。不经进一步纯化即直接使用二甲基乙酰胺(SAFC)和丙二醇(Alfa Aesar)。所有缓冲液均通过0.22微米过滤器(Coming)的通道灭菌,并将水通过反渗透/去离子进行纯化。将反应物在25℃下孵育3小时,然后使用一次性G25Sephadex柱(Nap25,GE Healthcare)纯化至制剂缓冲液,该制剂缓冲液由10mM组氨酸、250甘氨酸、1%蔗糖、0.01%聚山梨酸酯20、50μM亚硫酸氢钠(缓冲至pH6.2)以及指定百分比的丙二醇(v/v)组成。

[1073] 通过吸光光谱来测定反应收率和药物负荷。通过分析尺寸排阻色谱法,所有样品均示出＞96%的单体。

[1074] 下文表10示出缀合物的收率%(根据反应混合物或制剂中的丙二醇)。通过将化合物1d与抗体-磺基-SPDB在pH8.5下反应4小时(显示为非水组分),然后经G25Sephadex纯化来制备抗体-磺基-SPDB-1。

[1075] 表10

[1076]

		制剂	
		所有水相	15%丙二醇
反应	0%丙二醇+10%DMA	**59**	**79**
	30%丙二醇+2%DMA	**53***	**83**

[1077] *纯化后在Sephadex柱上观察到粘稠的白色沉淀

[1078] 实施例16使用高反应性的4-硝基Py-磺基-SPDB连接子制备huMy9-6-磺基-SPDB-1d

[1079] 将含有6mg/mL的huMy9-6抗体和5摩尔当量的高反应性的N-琥珀酰亚胺基-4-(4-硝基吡啶基-2-二硫代)丁酸酯连接子(20mM在乙醇中的储备液)的反应在25℃下于50mMEPPS缓冲液(pH8)中孵育3h。使用NAP脱盐柱(Illustra Sephadex G-25DNA Grade,GE Healthcare)除去未反应的连接子。基于抗体浓度和通过紫外-可见(对于2-硫代-4-硝基吡啶酮,$\varepsilon_{394nm}=14205cm^{-1}M^{-1}$)的DTT-释放的硝基吡啶基-2-硫酮浓度,连接子抗体比率(LAR)测定为约2.3。

[1080] 将连接子修饰的huMy9-6在50mMHEPES缓冲液(pH8.5,10%v/vDMA)中稀释至2mg/mL,并与2摩尔当量的化合物1d/连接子(5mM在DMA中的储备液;4.6当量/抗体)在25℃下反应30分钟。通过监测在394nm下的紫外吸收的增加来确定二硫化物交换反应的完成。反应后,使用脱盐柱(G-25Sephadex,细粒级,GE Healthcare)来纯化缀合物,将缓冲液更换为pH6.2下的250mM甘氨酸、10mM组氨酸、1%蔗糖、0.01%Tween-20、50μM亚硫酸氢钠。

[1081] 发现纯化的缀合物具有平均每个抗体连接有2.1分子的1d(通过紫外-可见,对1d

使用摩尔消光系数ε_{330nm}=15,484$cm^{-1}M^{-1}$和ε_{280nm}=30,115$cm^{-1}M^{-1}$,对huMy9-6,ε_{280nm}=207,000$cm^{-1}M^{-1}$)、98%单体(通过尺寸排阻色谱法)、<1%未缀合的1d(用丙酮萃取/反相HPLC)、70%蛋白质产量和32%的1d的总收率。参见图28。

序列表

<110> 伊缪诺金公司

<120> 缀合物的制备方法

<130> 121162-00320

<140>
<141>

<150> 61/483,499
<151> 2011-05-06

<150> 61/443,062
<151> 2011-02-15

<150> 61/443,092
<151> 2011-02-15

<160> 14

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 1
Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

[0001]

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> Lys、Gln、His或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Gln、His、Asn或Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> Gly、Glu、Thr、Ser、Ala或Val

<400> 2
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0002]

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 3
Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 4
Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 5
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 6
Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 7
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 8
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

[0003] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

[0004]

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 9
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 9
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

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

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

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

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

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 10
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 10
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

[0005] Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

[0006]

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 12
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

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

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

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

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

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 13
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

[0007] Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

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

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

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

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 14
Ala Leu Ala Leu
1

在不含或含有亚硫酸氢盐下制备的去糖基化的huMy9-6-2级合物的质谱，其分别含有1.4 DAR (A)和3.1DAR (B)

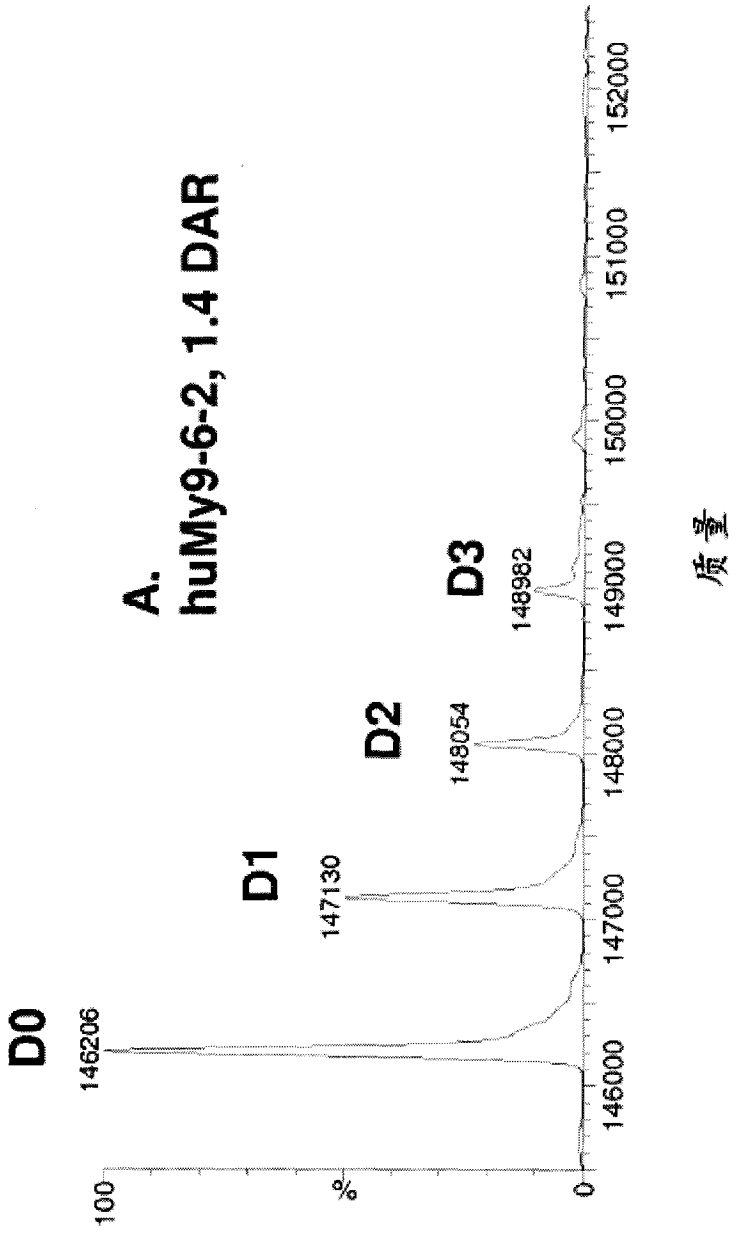


图1A

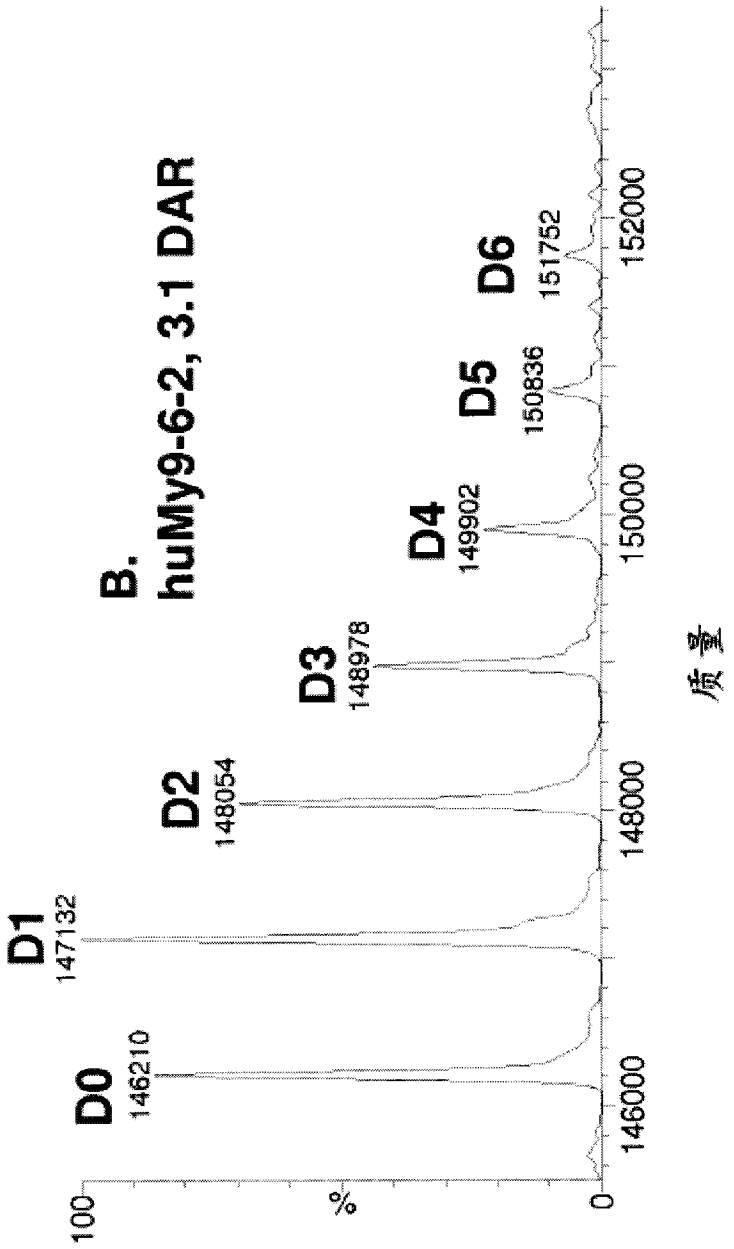

B.
huMy9-6-2, 3.1 DAR
D0
146210
D1
147132
D2
148054
D3
148978
D4
149902
D5
150836
D6
151752
100
%
0
146000
148000
150000
152000
质量

图1B

在不含或含有亚硫酸氢钠下制备的 HuMy9-6-2 缀合物对表达 CD33- 抗原的 HL60 细胞示出类似的体外细胞毒性

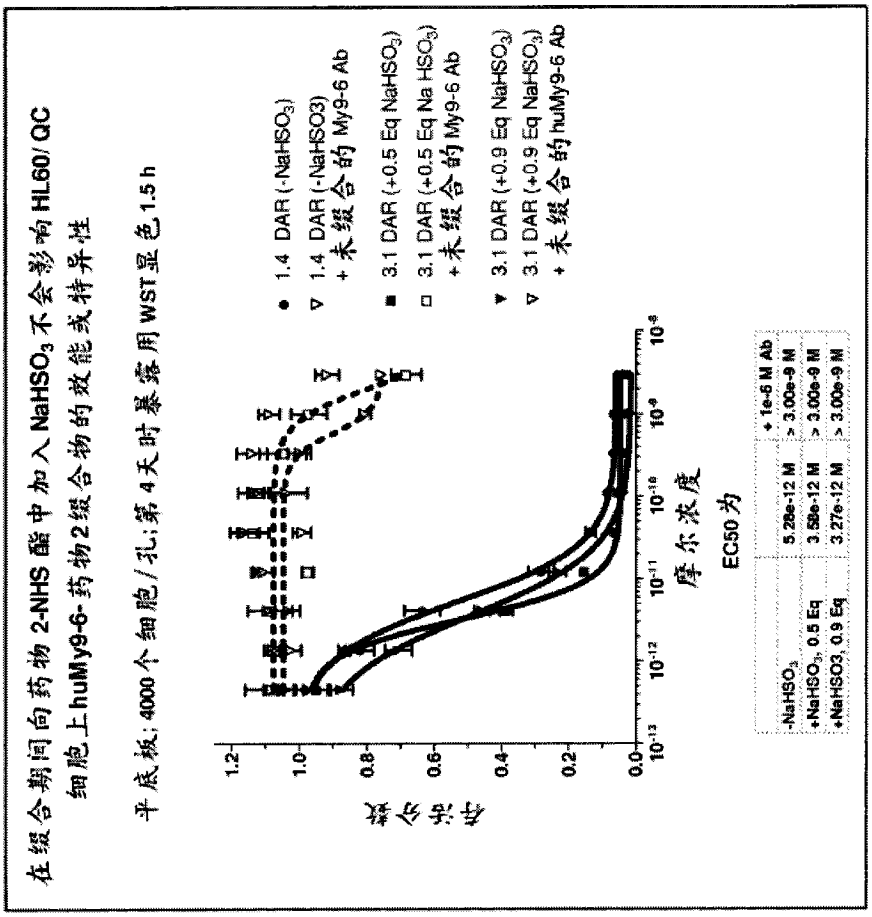


图2

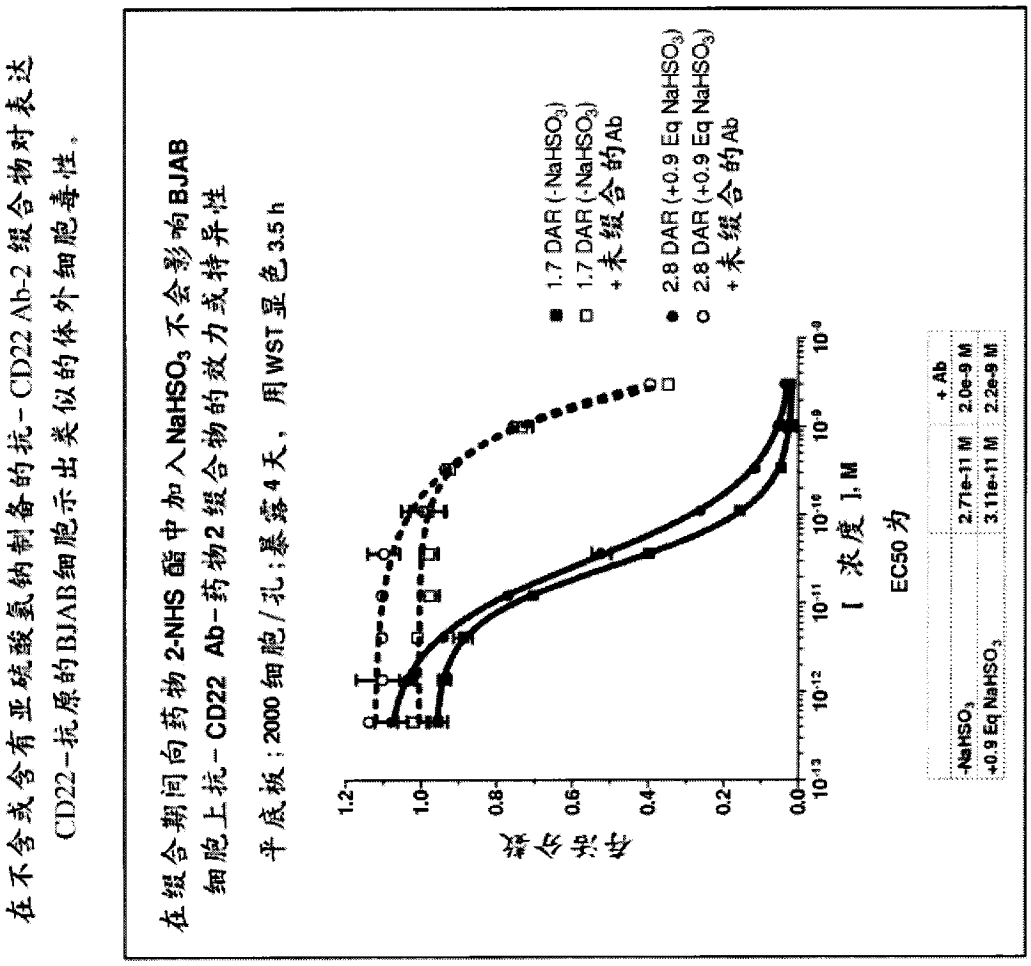

在不含或含有亚硫酸氢钠制备的抗-CD22 Ab-2 缀合物对表达CD22-抗原的BJAB细胞示出类似的体外细胞毒性。
在缀合期间向药物 2-NHS 酯中加入 $NaHSO_3$ 不会影响 BJAB 细胞上抗-CD22 Ab-药物2 缀合物的效力或特异性
平底板：2000 细胞/孔；暴露 4 天，用 WST 显色 3.5 h
1.7 DAR (-$NaHSO_3$)
1.7 DAR (-$NaHSO_3$) +未缀合的Ab
2.8 DAR (+0.9 Eq $NaHSO_3$)
2.8 DAR (+0.9 Eq $NaHSO_3$) +未缀合的Ab
[浓度], M
EC50 为
+ Ab
-$NaHSO_3$ 2.71e-11 M 2.0e-9 M
+0.9 Eq $NaHSO_3$ 3.11e-11 M 2.2e-9 M

图3

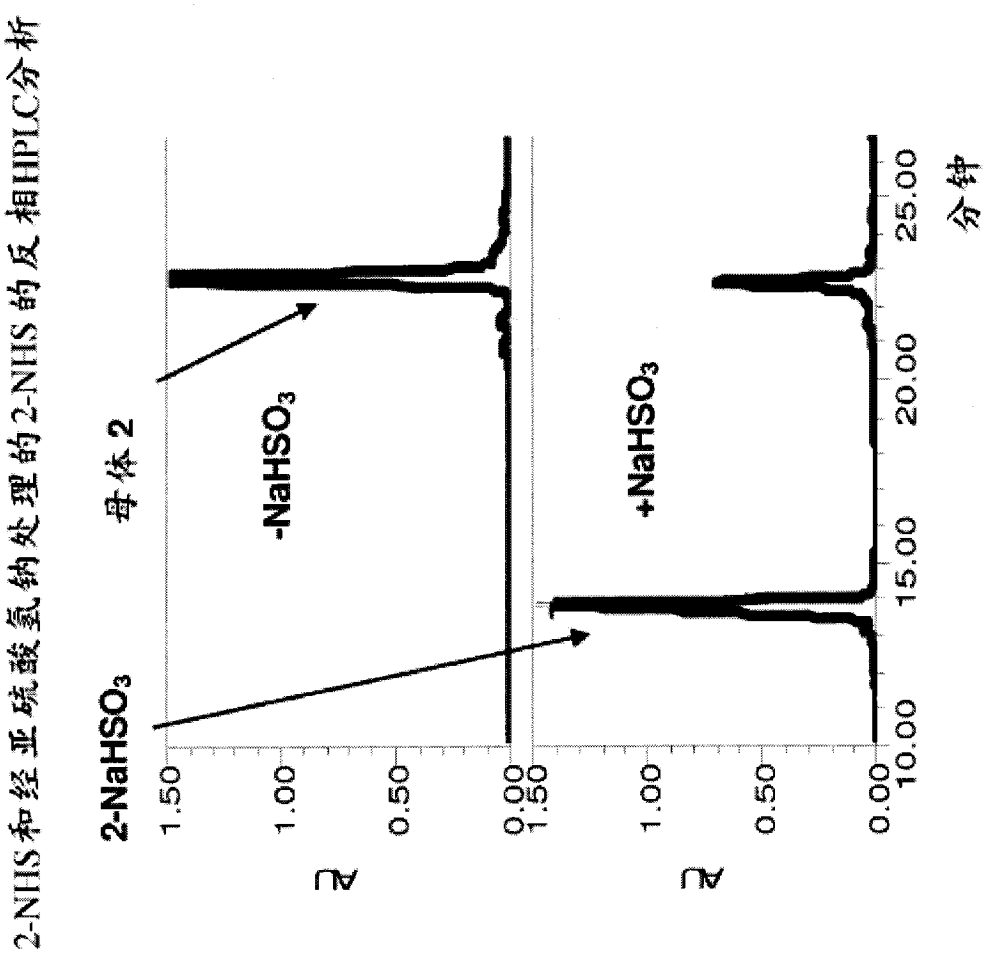

2-NHS和经亚硫酸氢钠处理的2-NHS的反相HPLC分析
2-NaHSO3
母体2
-NaHSO3
+NaHSO3
AU
AU
1.50
1.00
0.50
0.00
1.50
1.00
0.50
0.00
10.00
15.00
20.00
25.00
分钟

图4

在含有或不含亚硫酸氢钠下使用7摩尔当量的1-SPDB-NHS/抗体下制备去糖基化的huMy9-6-SPDB-1的MS分析。A.在不含亚硫酸氢钠和平均1.4 l/Ab下制备的缀合物且抗体种类具有多达3个连接的1分子。B.在含有亚硫酸氢钠和平均2.5 l/Ab下制备的缀合物且抗体种类具有多达7个连接的1分子。

图5

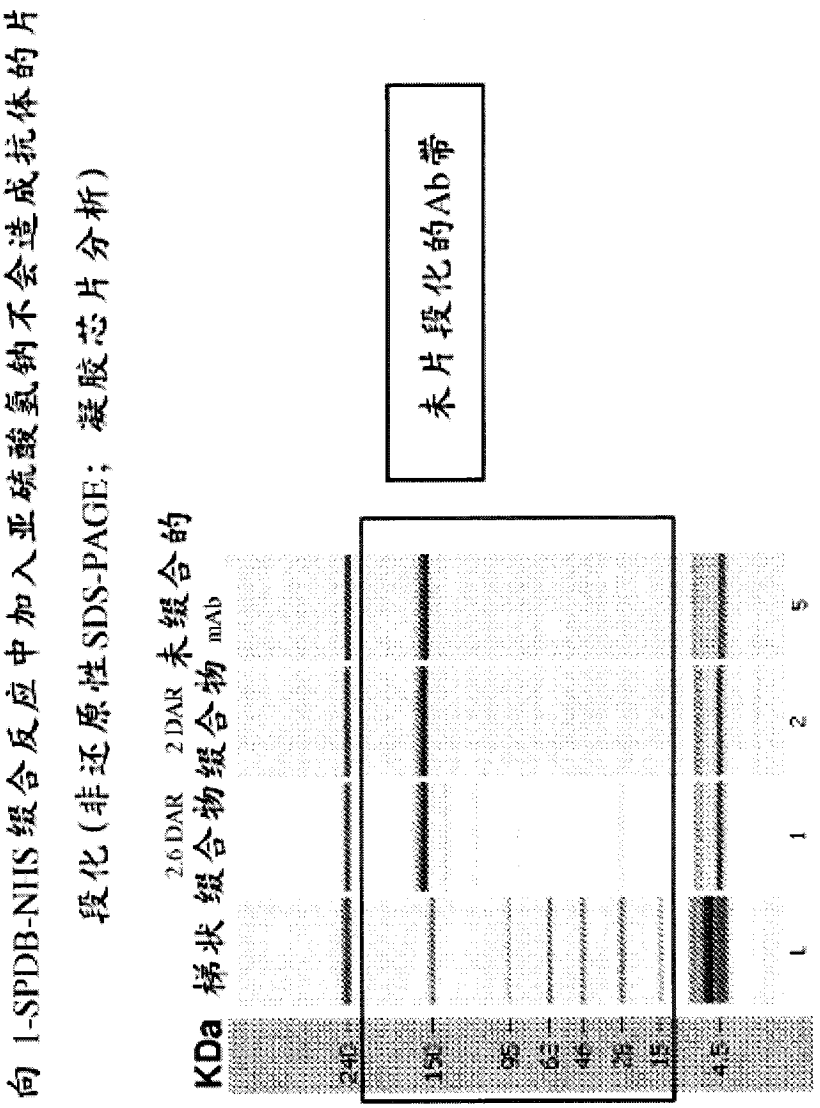

向 1-SPDB-NHS 缀合反应中加入亚硫酸氢钠不会造成抗体的片段化（非还原性 SDS-PAGE；凝胶芯片分析）
KDa
梯状
缀合物
2.6 DAR
2 DAR
未缀合的缀合物 mAb
未片段化的Ab带
240
151
95
63
46
28
15
45
L
1
2
5

图6

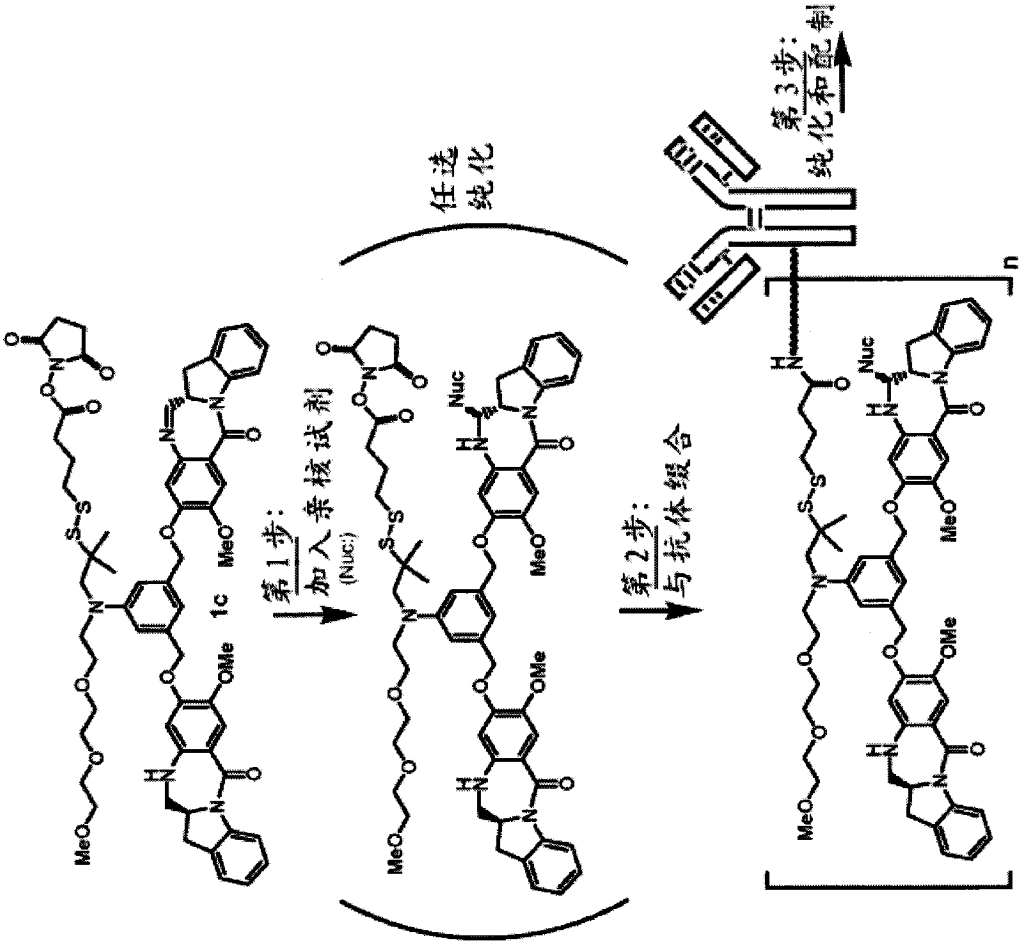


图7

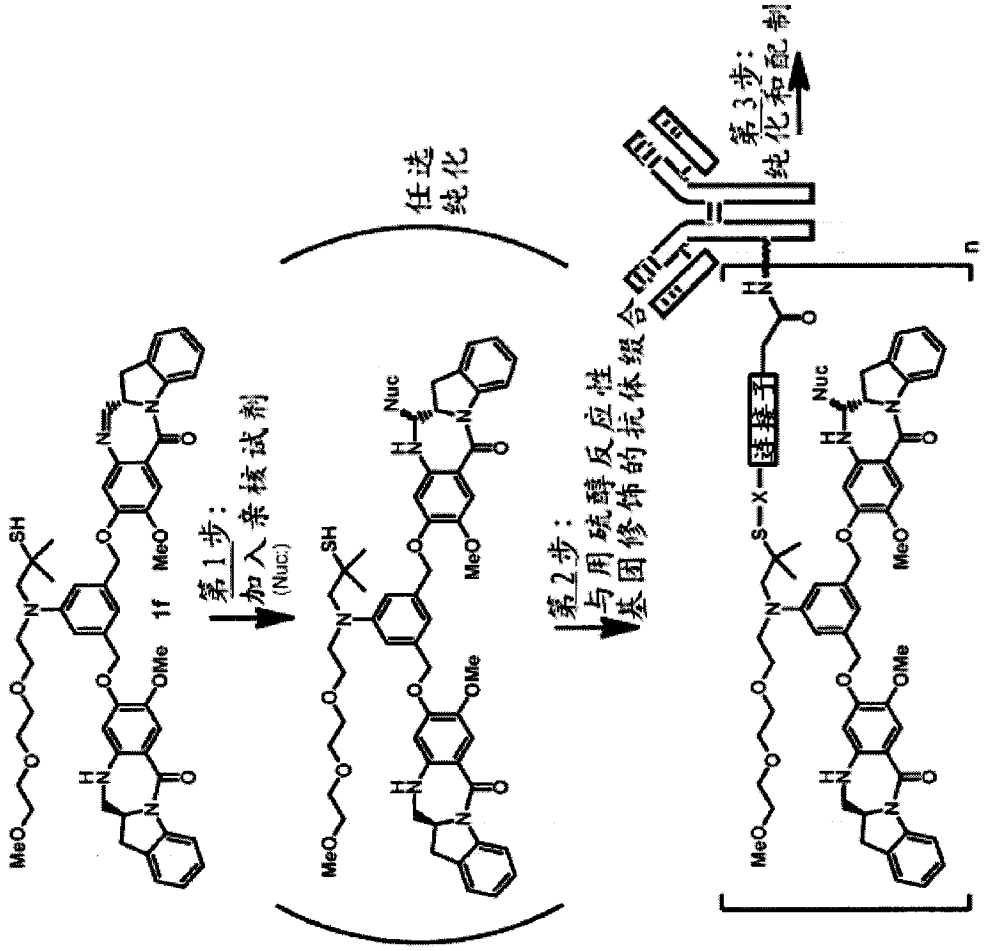

任选
纯化
第1步：
加入亲核试剂
(Nuc)
第2步：
与用硫醇反应性
基团修饰的抗体缀合
第3步：
纯化和配制
1f
MeO
OMe
SH
Nuc
连接子
n

图8

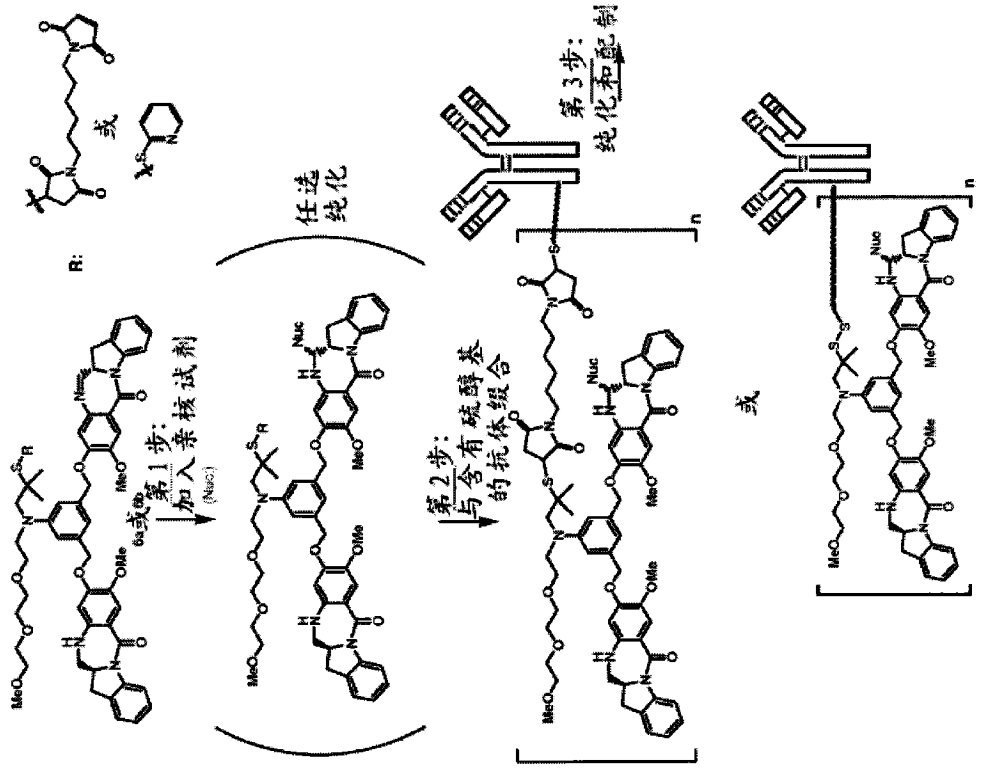


图9

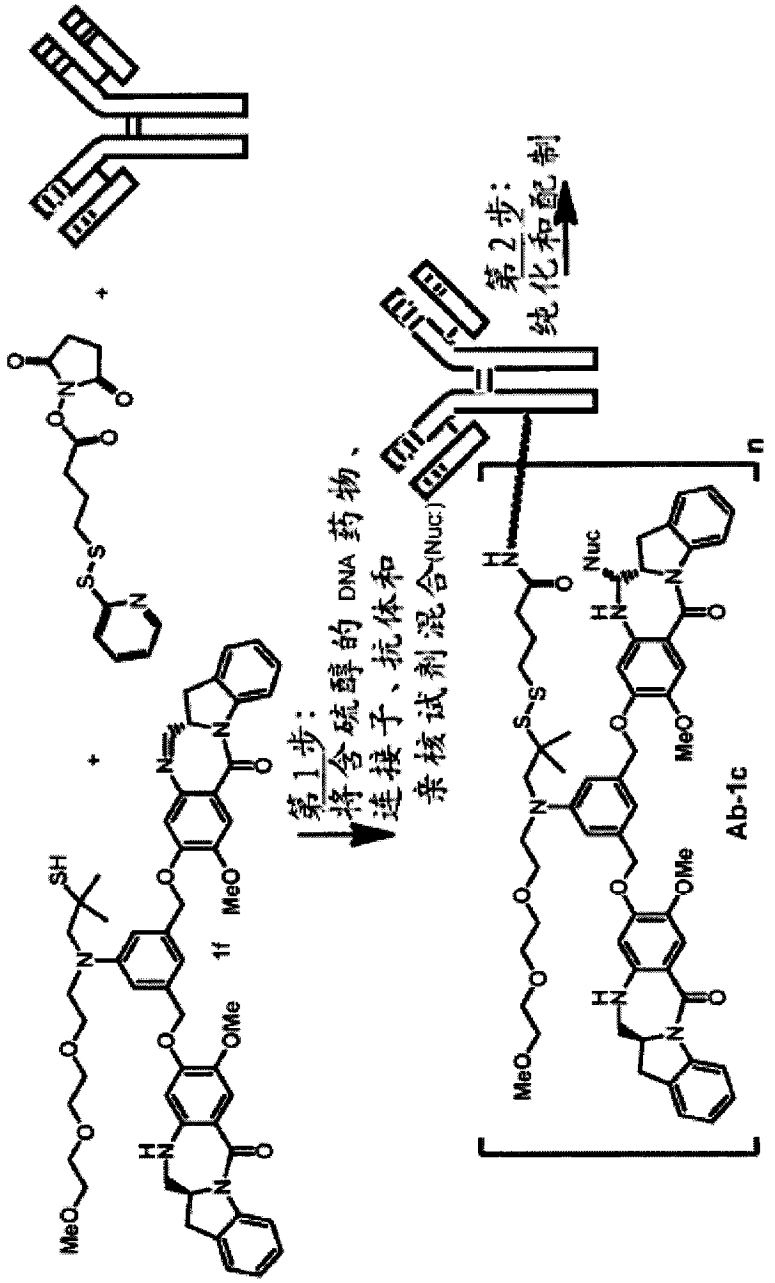

第1步：
将含硫醇的 DNA 药物、
连接子、抗体和
亲核试剂混合(Nuc)
第2步：
纯化和配制
Ab-1c
1f
MeO
OMe
Nuc
n

图10

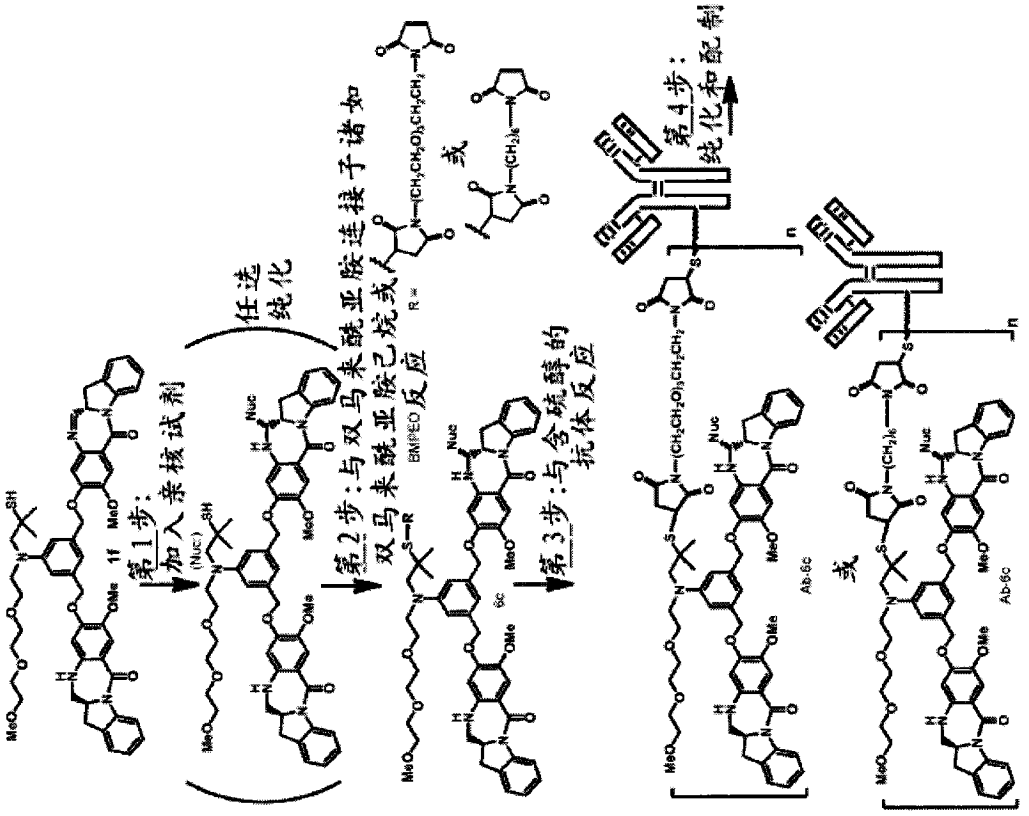

第1步：
加入亲核试剂
任选
纯化
第2步：与双马来酰亚胺连接子诸如
双马来酰亚胺己烷或
BMPEO 反应
第3步：与含巯醇的
抗体反应
第4步：
纯化和配制
或
或

图11

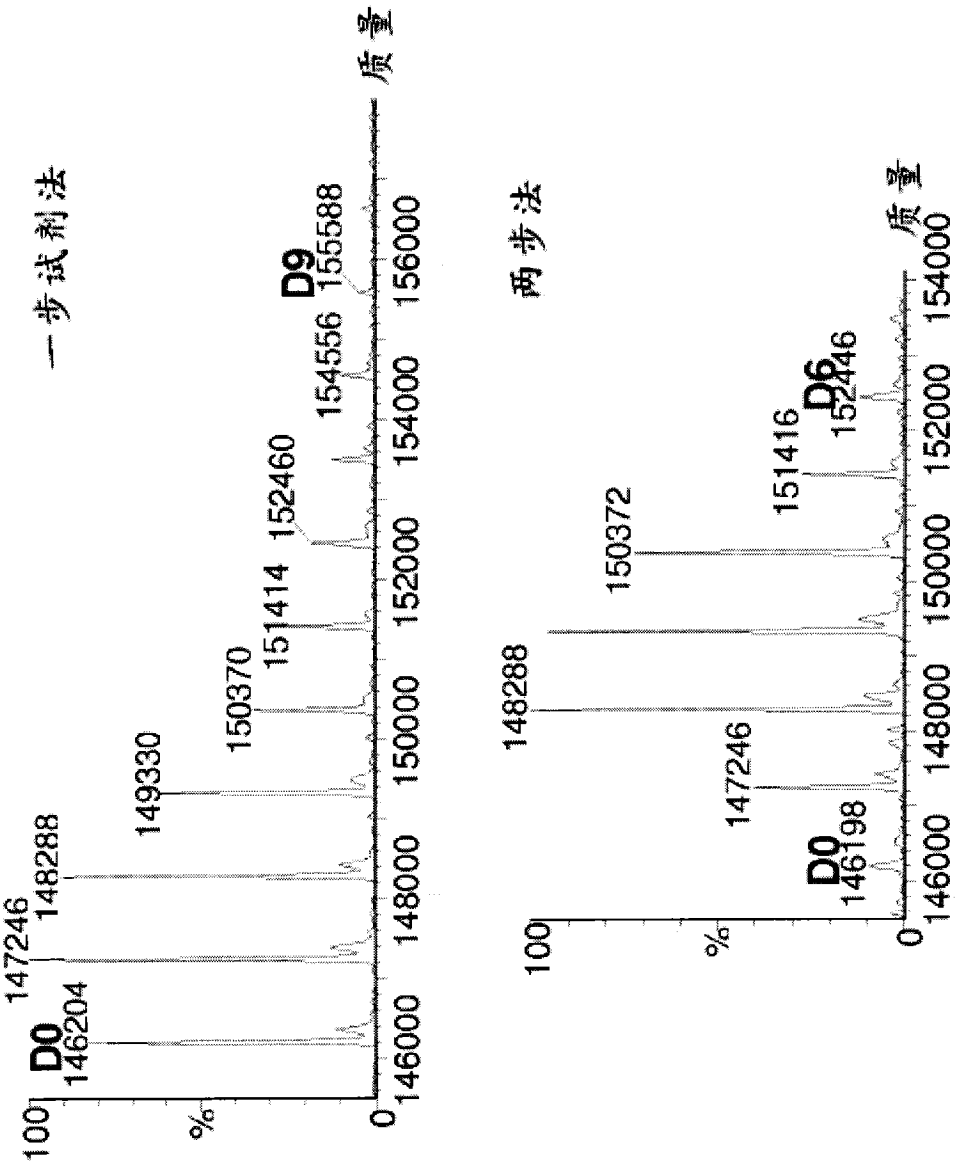

一步试剂法
两步法
D0
D9
D6
质量
%
100
0
146000
148000
150000
152000
154000
156000
146204
147246
148288
149330
150370
151414
152460
154556
155588
146198
147246
148288
150372
151416
152446

图12

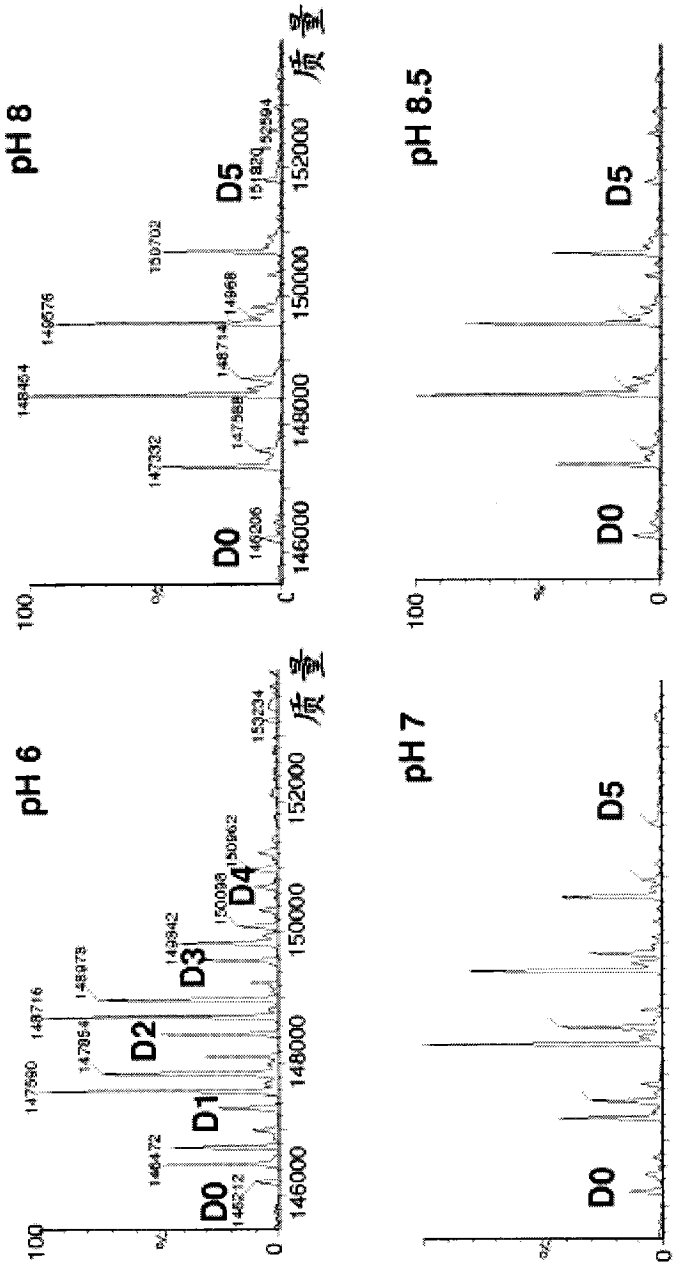


图13

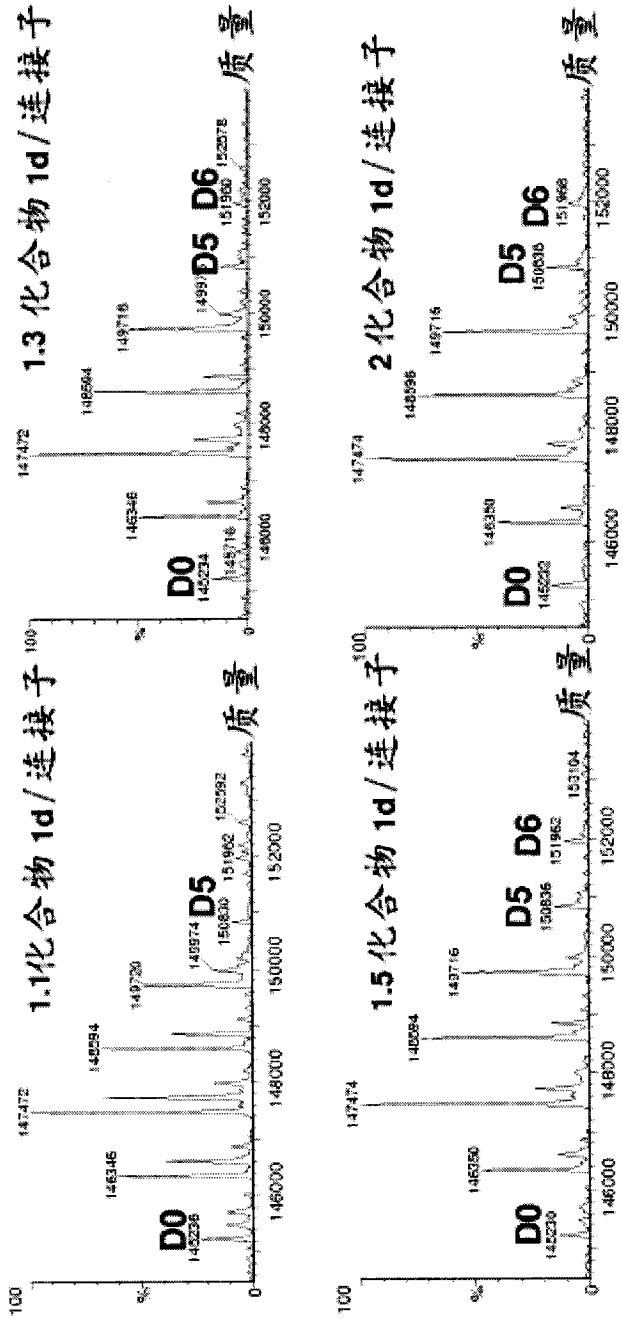


图14

反应物	药物/Ab (UV)	单体% (SEC)	单体上药物 %
连二亚硫酸钠	2.6	88	82
亚硫酸氢钠	2.6	88	83
偏亚硫酸氢钠	2.7	88	82
无添加剂	0.1	98	94

图15

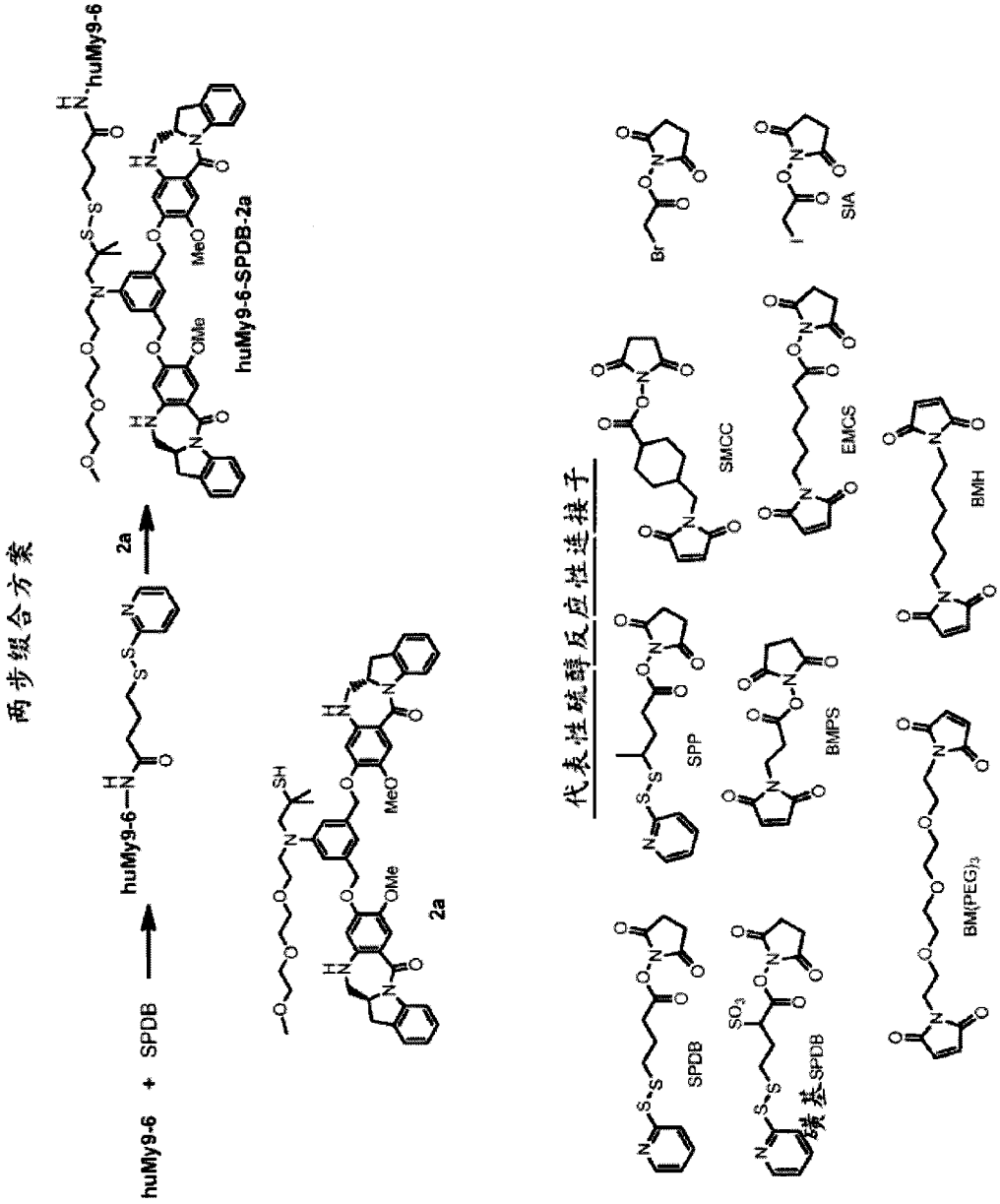

两步缀合方案
huMy9-6 + SPDB
huMy9-6
2a
huMy9-6-SPDB-2a
代表性硫醇反应性连接子
SPDB
SPP
SMCC
SIA
EMCS
BMPS
BMH
BM(PEG)3
磺基SPDB

图16

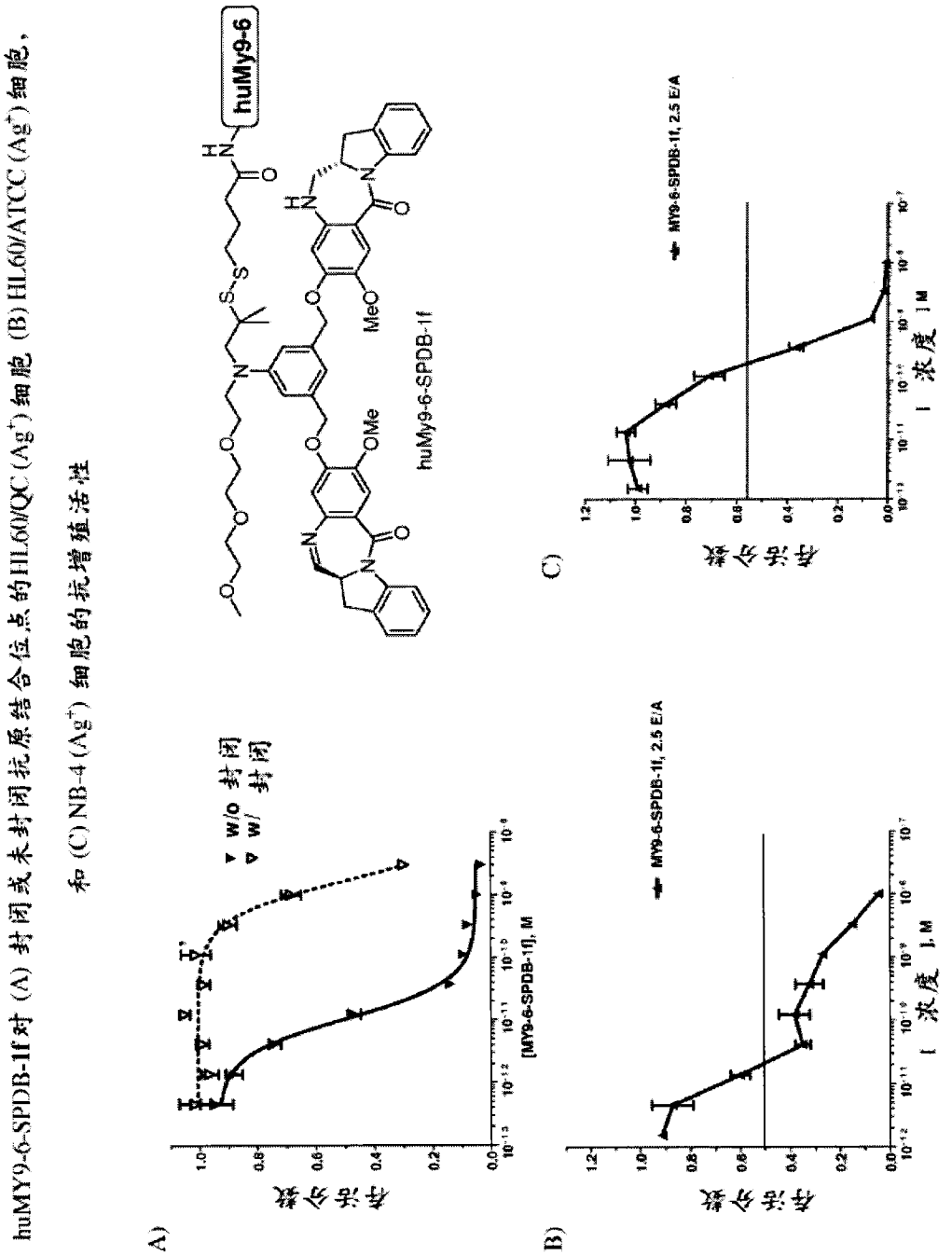

huMY9-6-SPDB-1f 对 (A) 封闭或未封闭抗原结合位点的HL60/QC (Ag^+) 细胞 (B) HL60/ATCC (Ag^+) 细胞，
和 (C) NB-4 (Ag^+) 细胞的抗增殖活性
huMy9-6
huMy9-6-SPDB-1f
MeO
OMe
A)
w/o 封闭
w/ 封闭
存活分数
[MY9-6-SPDB-1f], M
B)
MY9-6-SPDB-1f, 2.5 E/A
浓度], M
C)
MY9-6-SPDB-1f, 2.5 E/A
浓度], M

图17

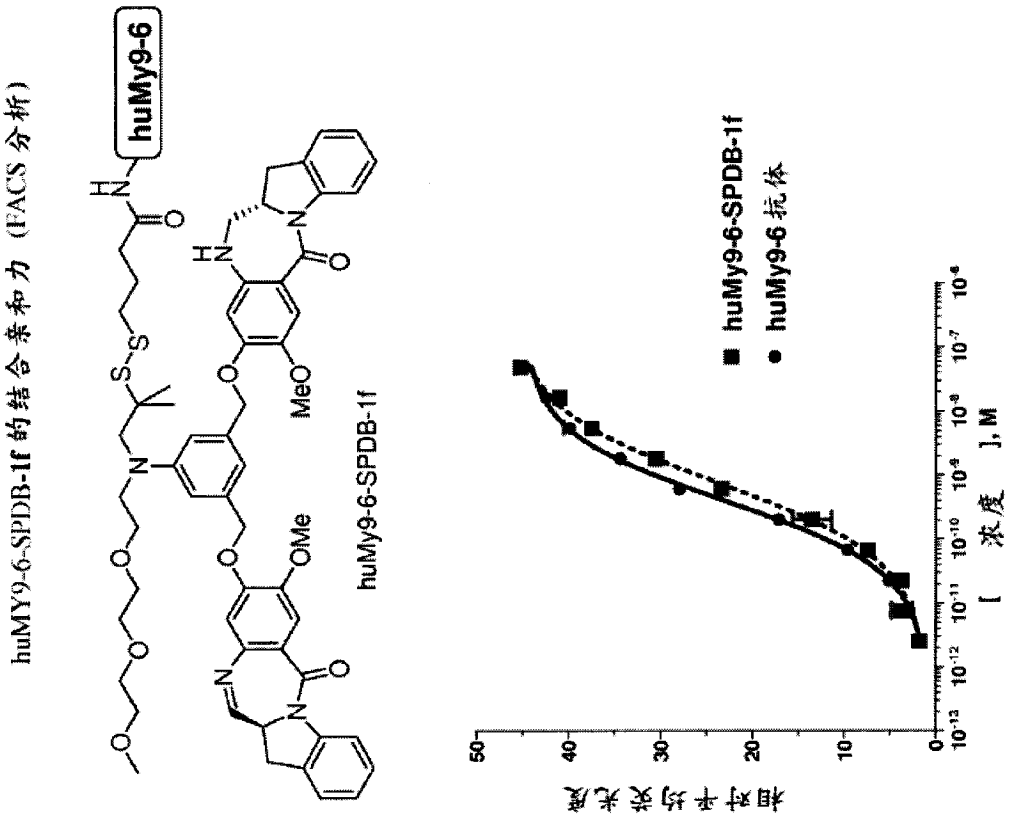

huMY9-6-SPDB-1f 的结合亲和力 (FACS 分析)
huMy9-6
MeO
OMe
huMy9-6-SPDB-1f
huMy9-6-SPDB-1f
huMy9-6 抗体
相对平均荧光度
[浓度], M

图18

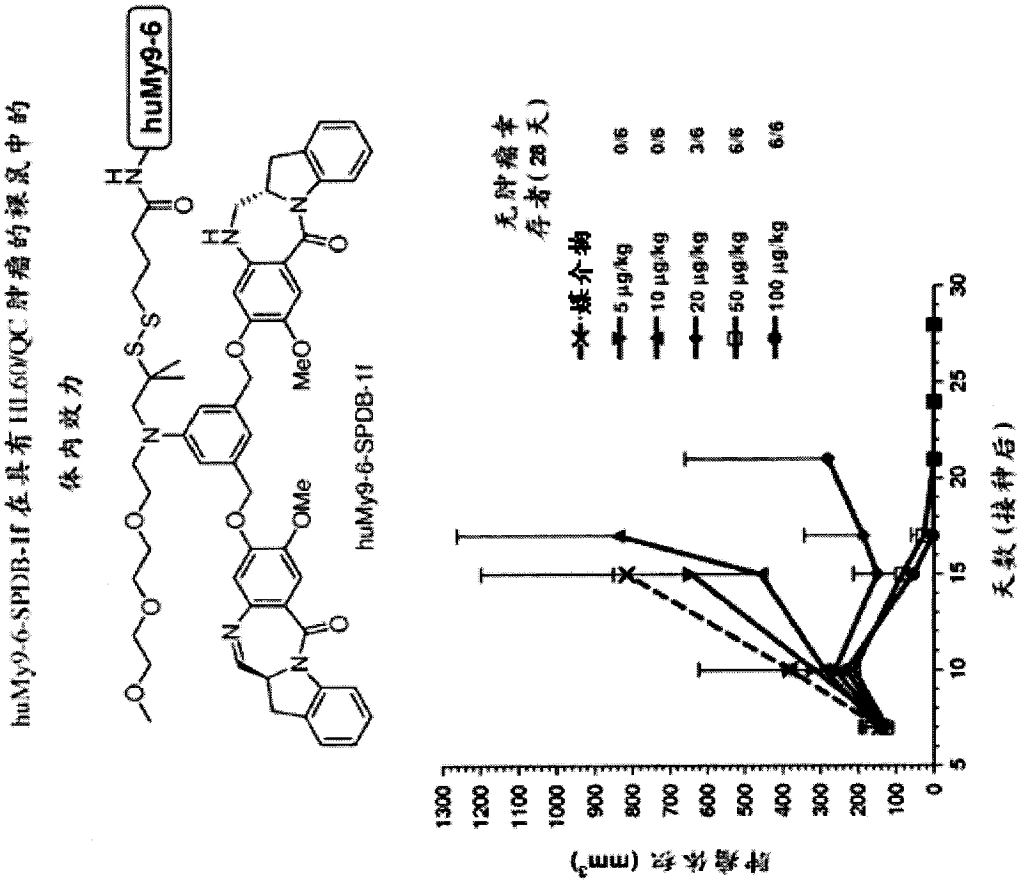

huMy9-6-SPDB-1f 在具有 HL60/QC 肿瘤的裸鼠中的
体内效力
huMy9-6
MeO
OMe
huMy9-6-SPDB-1f
无肿瘤幸存者(28天)
媒介物 0/6
5 μg/kg 0/6
10 μg/kg 3/6
20 μg/kg 6/6
50 μg/kg 6/6
100 μg/kg 6/6
肿瘤体积 (mm³)
天数(接种后)

图19

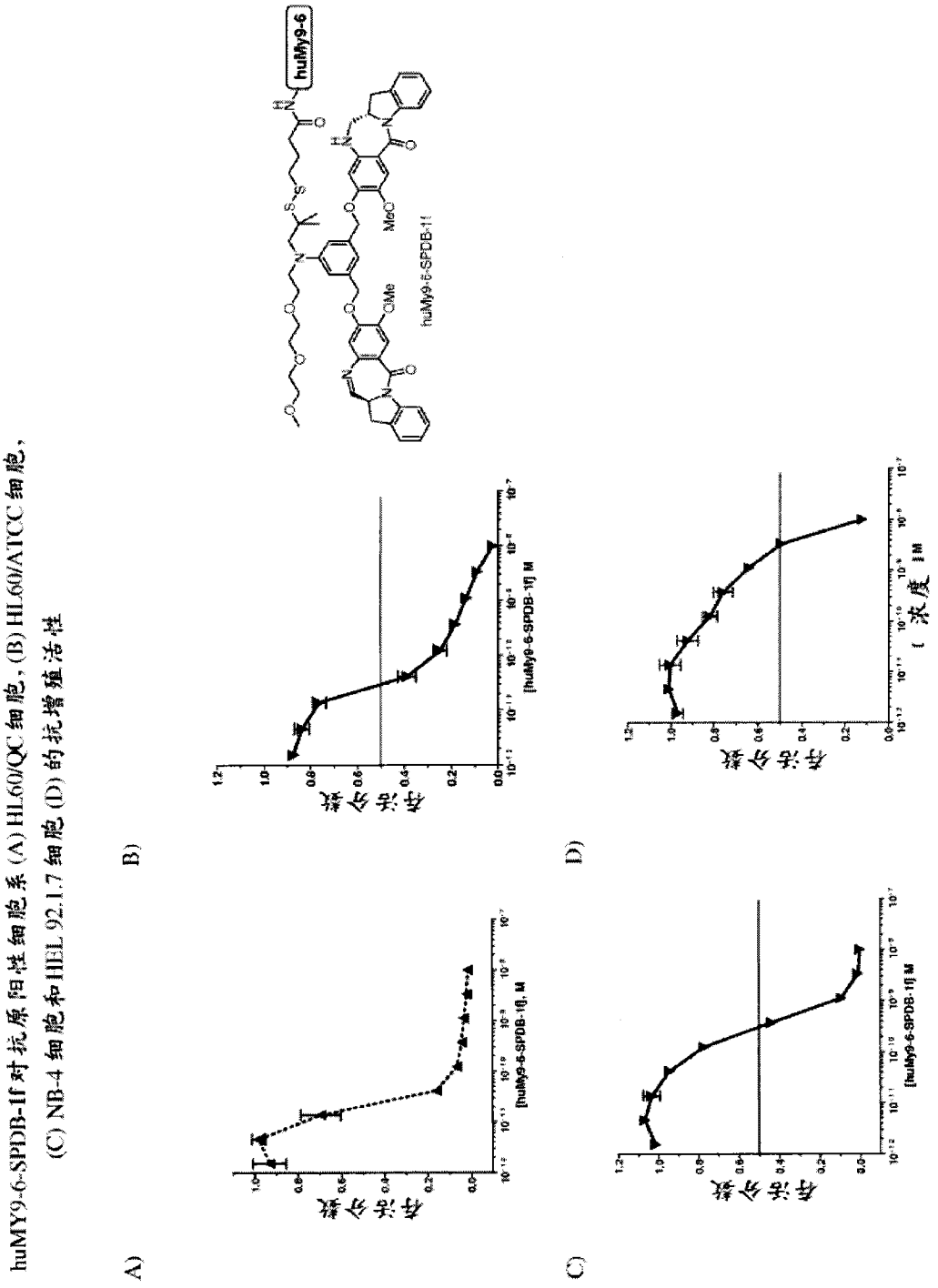

huMY9-6-SPDB-1f 对抗原阳性细胞系 (A) HL60/QC 细胞，(B) HL60/ATCC 细胞，
(C) NB-4 细胞和 HEL 92.1.7 细胞 (D) 的抗增殖活性
A)
B)
C)
D)
huMy9-6
huMy9-6-SPDB-1f
存活分数
浓度 M

图20

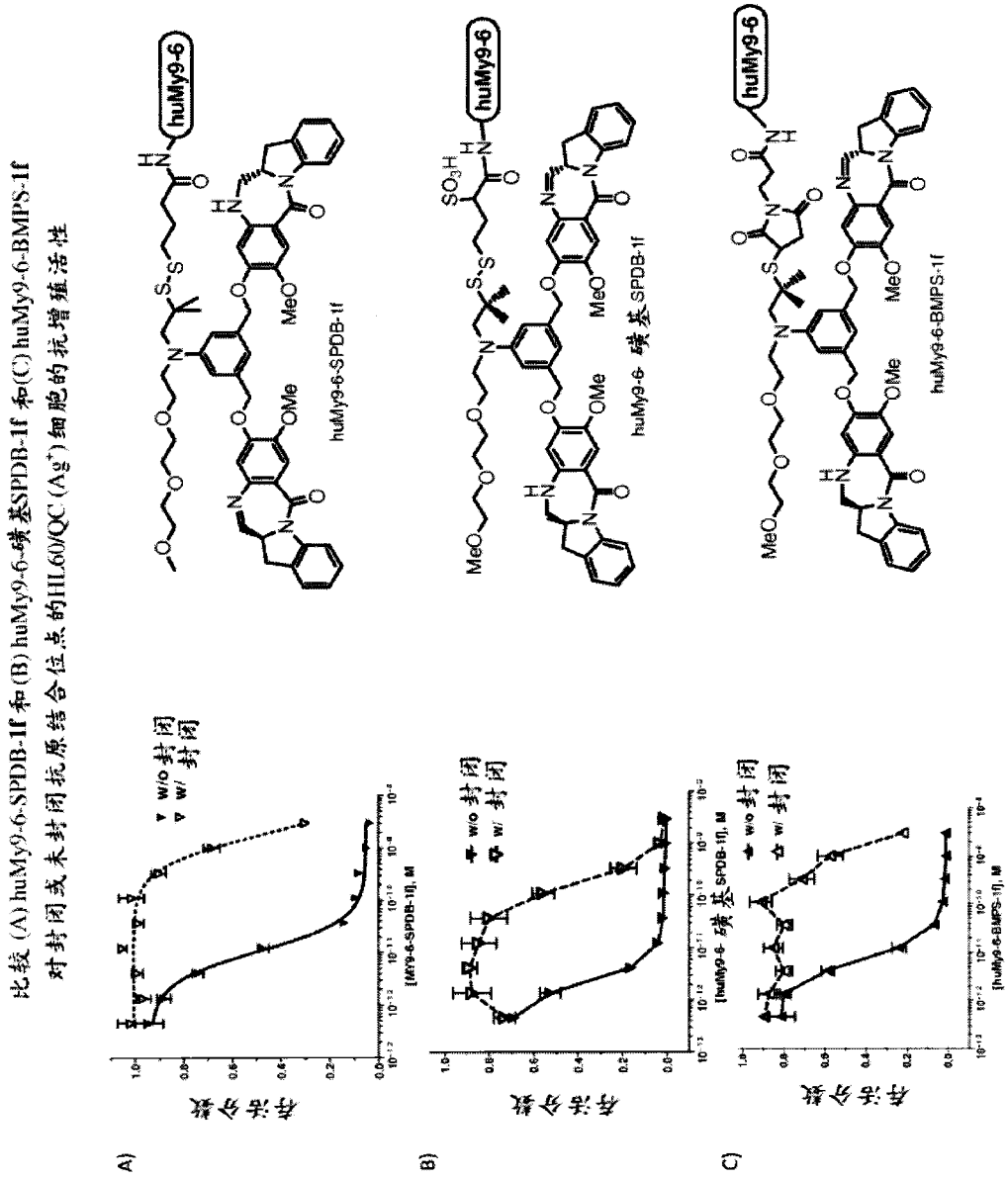

比较 (A) huMy9-6-SPDB-1f 和 (B) huMy9-6-碳基SPDB-1f 和(C) huMy9-6-BMPS-1f
对封闭或未封闭抗原结合位点的HL60/QC (Ag^+) 细胞的抗增殖活性
huMy9-6
huMy9-6-SPDB-1f
huMy9-6-碳基SPDB-1f
huMy9-6-BMPS-1f
w/o 封闭
w/ 封闭
存活分数
A)
B)
C)

图21

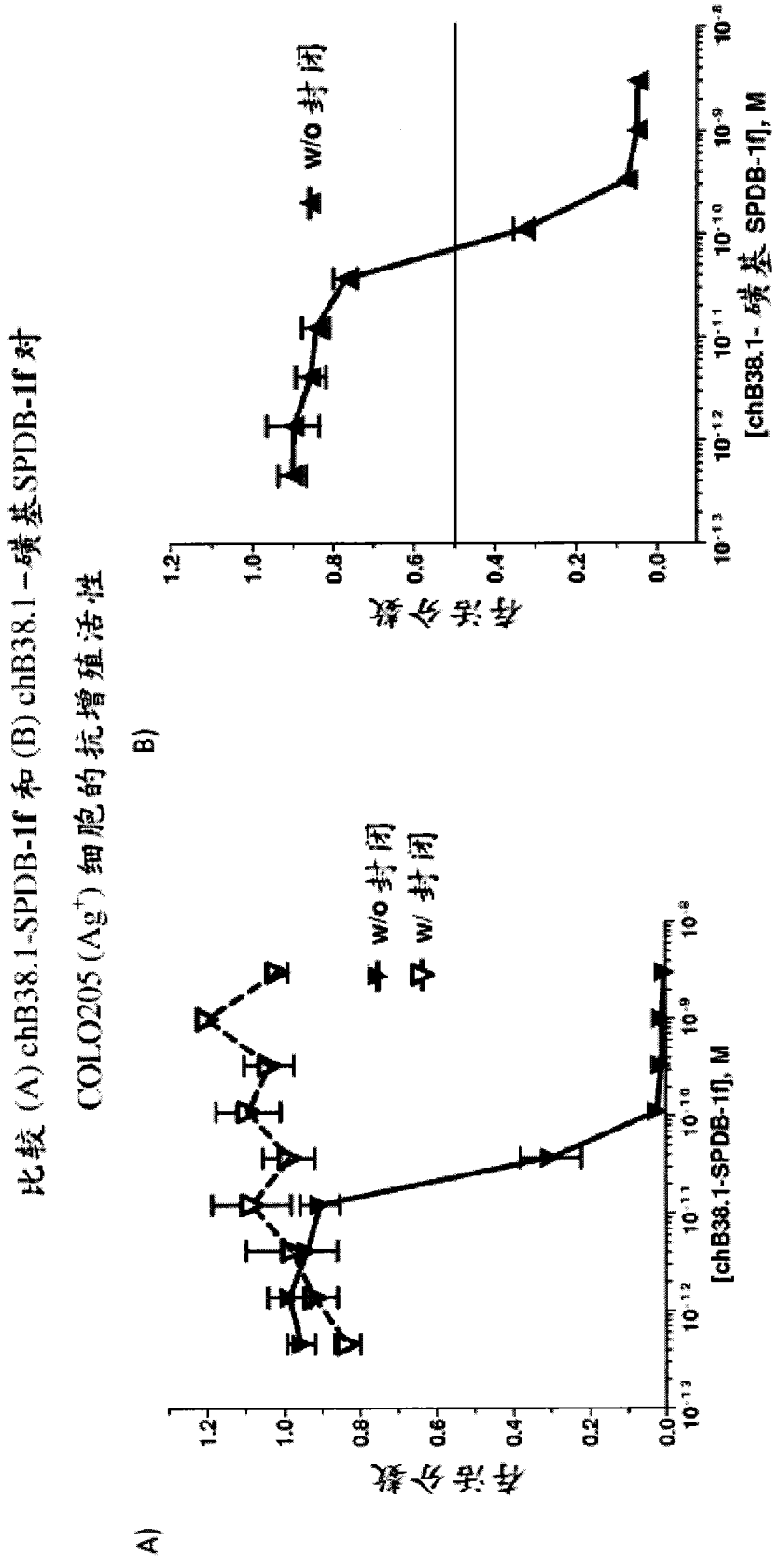

比较 (A) chB38.1-SPDB-1f 和 (B) chB38.1－磺基SPDB-1f 对
COLO205 (Ag^+) 细胞的抗增殖活性
A)
存活分数
[chB38.1-SPDB-1f], M
w/o 封闭
w/ 封闭
B)
存活分数
[chB38.1- 磺基 SPDB-1f], M
w/o 封闭

图22

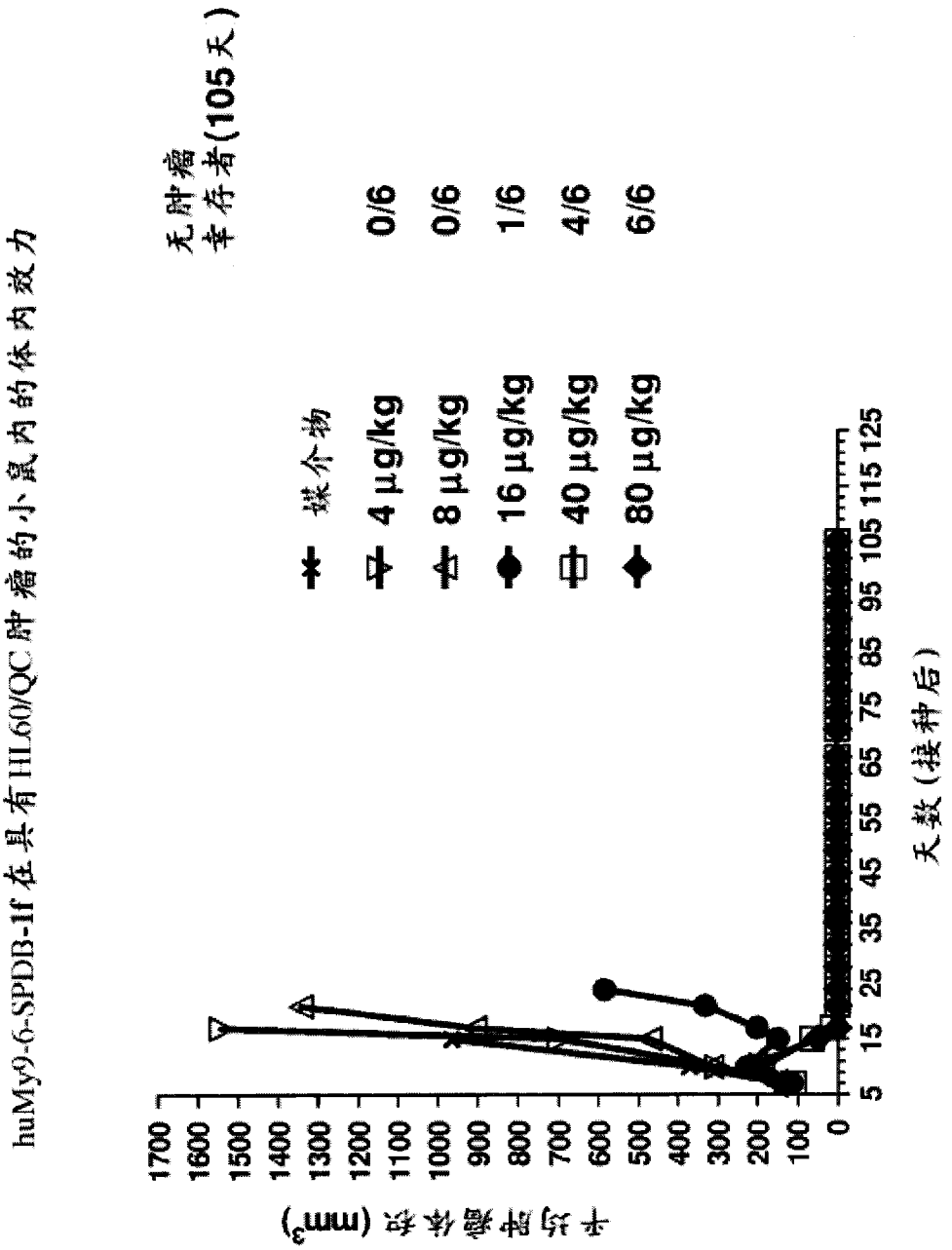

huMy9-6-SPDB-1f 在具有 HL60/QC 肿瘤的小鼠内的体内效力
无肿瘤幸存者(105天)
媒介物 0/6
4 μg/kg 0/6
8 μg/kg 1/6
16 μg/kg 4/6
40 μg/kg 6/6
80 μg/kg
平均肿瘤体积 (mm³)
天数(接种后)
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700
5 15 25 35 45 55 65 75 85 95 105 115 125

图23

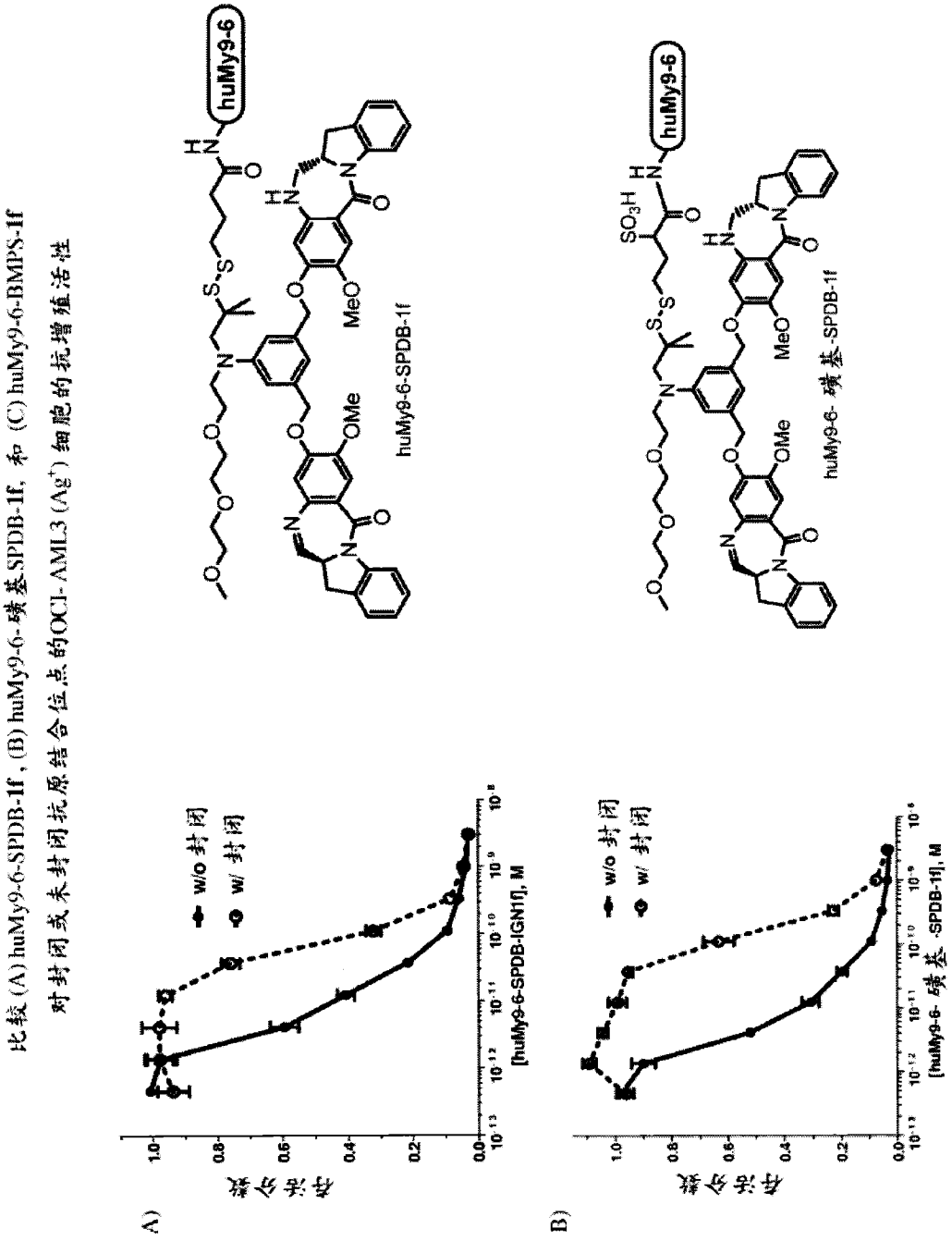
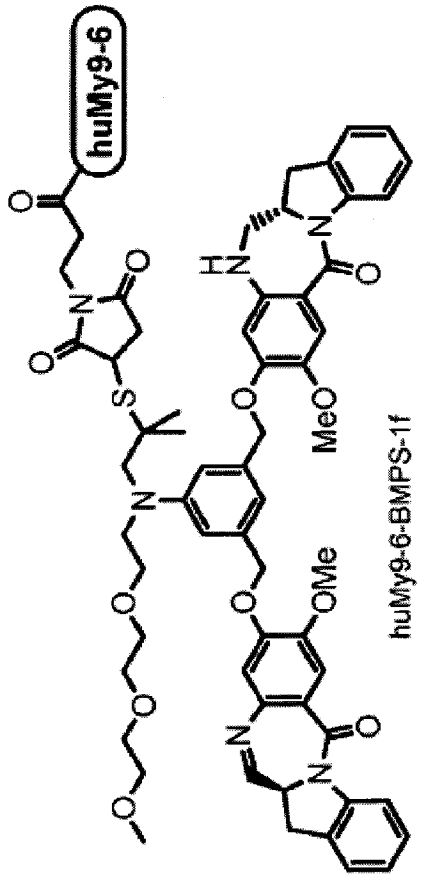

比较 (A) huMy9-6-SPDB-1f , (B) huMy9-6- 磺基-SPDB-1f, 和 (C) huMy9-6-BMPS-1f
对封闭或未封闭抗原结合位点的OCI-AML3 (Ag^+) 细胞的抗增殖活性
huMy9-6
huMy9-6-SPDB-1f
huMy9-6- 磺基-SPDB-1f
w/o 封闭
w/ 封闭
存活分数
[huMy9-6-SPDB-IGN1f], M
[huMy9-6- 磺基 -SPDB-1f], M
A)
B)

图24


huMy9-6
MeO
OMe
huMy9-6-BMPS-1f

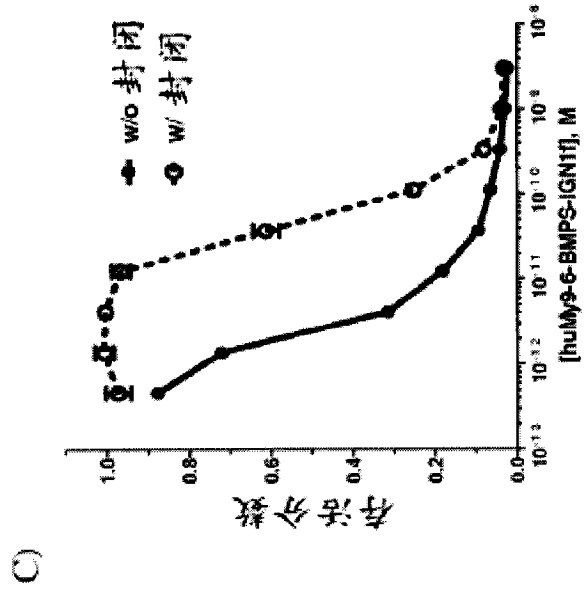

w/o 封闭
w/ 封闭
存活分数
[huMy9-6-BMPS-IGN1f], M

图24(续)

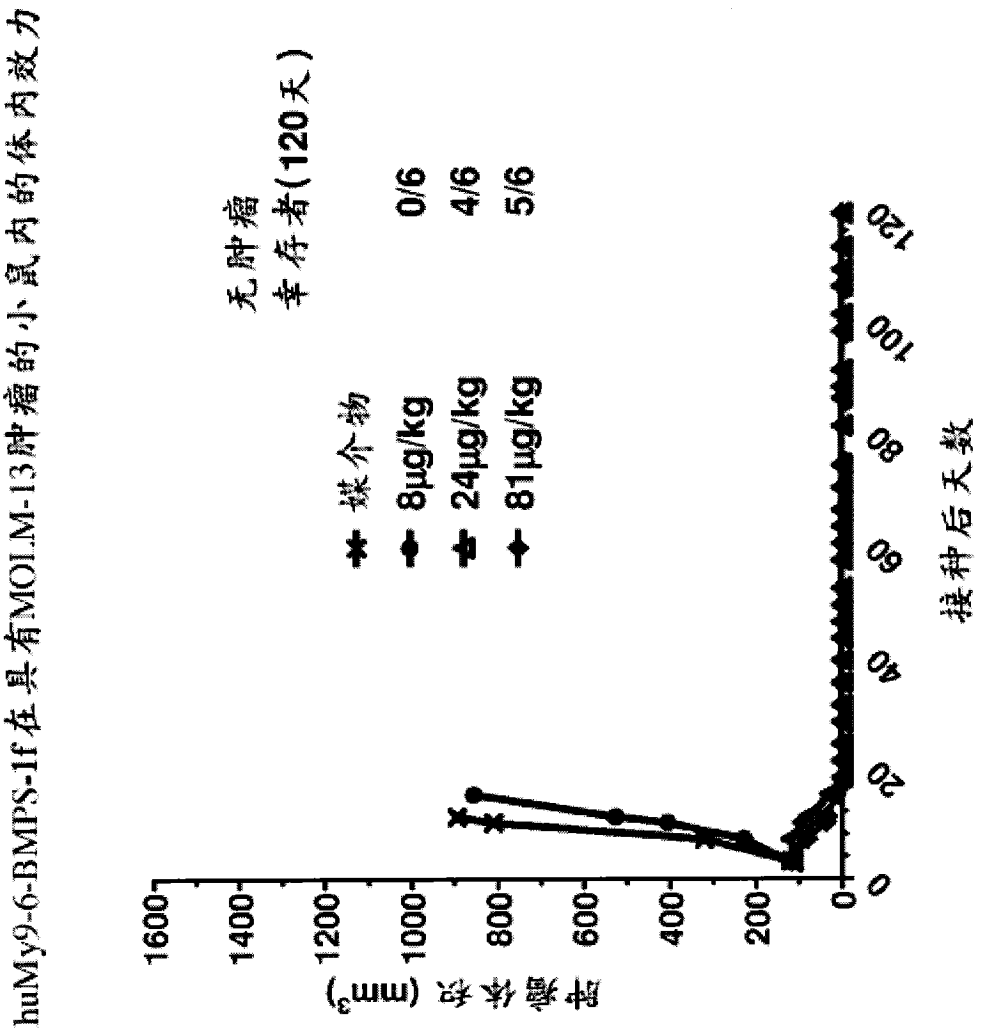

huMy9-6-BMPS-1f在具有MOLM-13肿瘤的小鼠内的体内效力
无肿瘤
幸存者(120天)
媒介物
8μg/kg 0/6
24μg/kg 4/6
81μg/kg 5/6
肿瘤体积 (mm³)
接种后天数
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120

图25

磺化叶酸/细胞毒性化合物缀合物的代表性合成方案

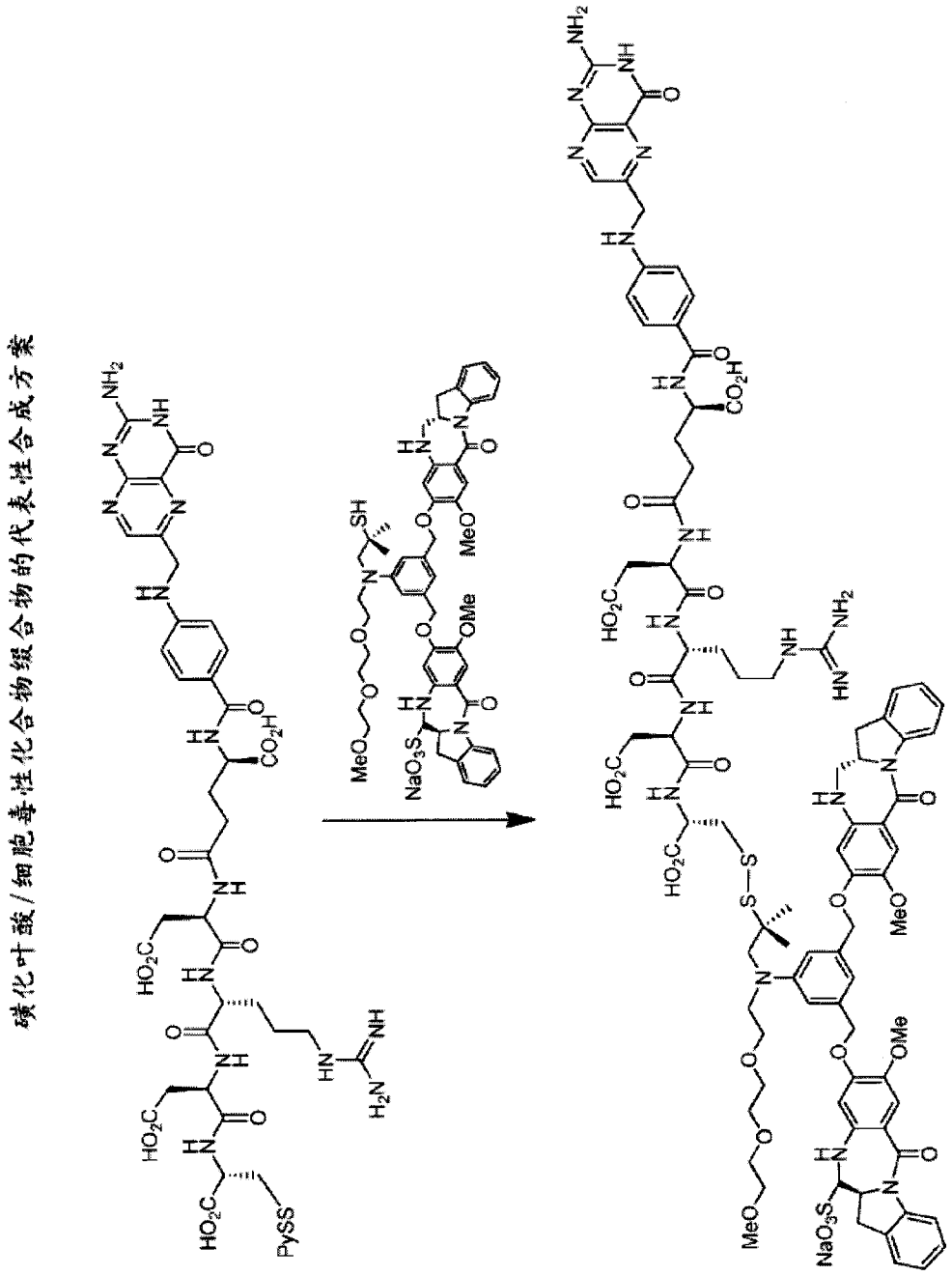


图26

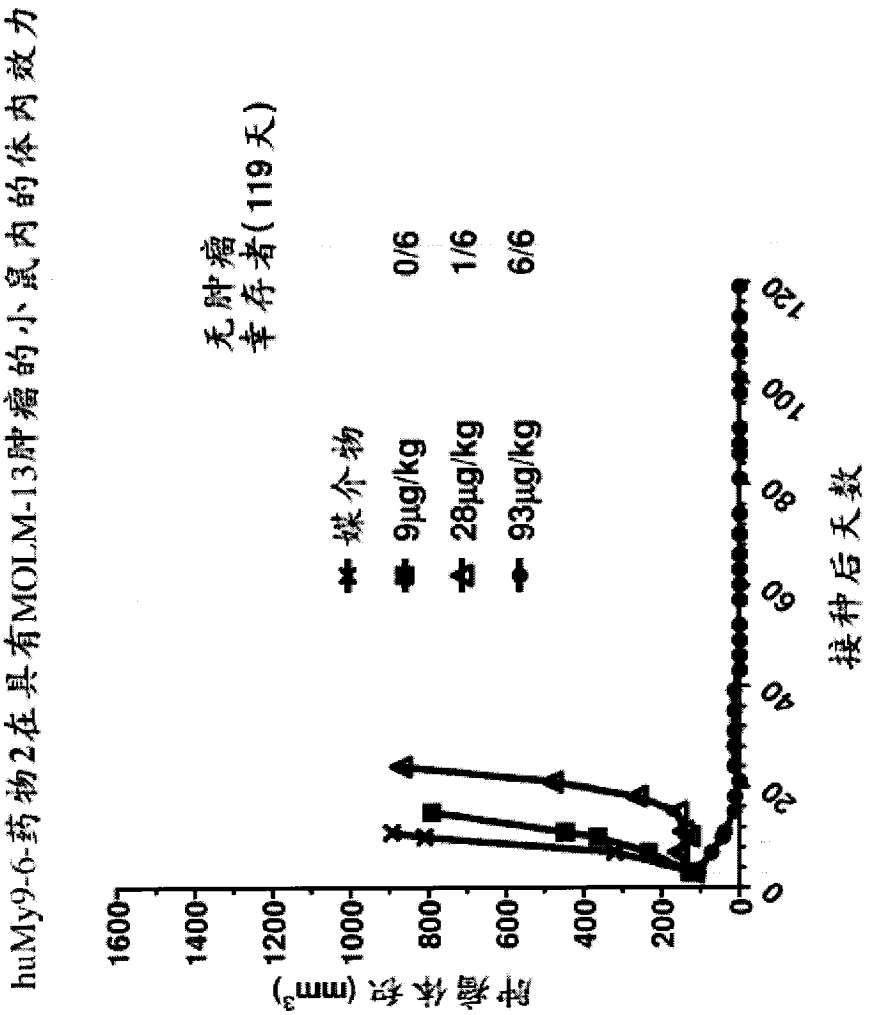

huMy9-6-药物2在具有MOLM-13肿瘤的小鼠内的体内效力
无肿瘤
幸存者(119天)
媒介物 0/6
9μg/kg 1/6
28μg/kg 6/6
93μg/kg
肿瘤体积 (mm³)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
120
接种后天数

图27

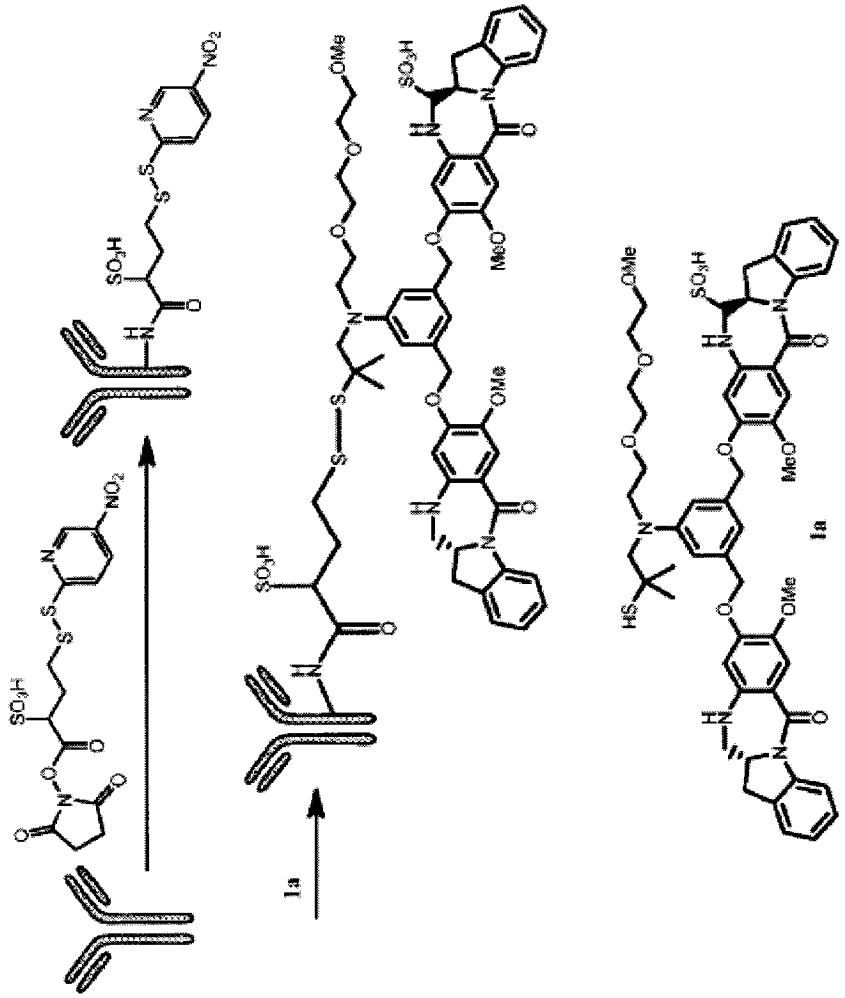


图28