



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107198778 A

(43)申请公布日 2017. 09. 26

(21)申请号 201710333830.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2004.10.12

A61K 47/68(2017.01)

(30)优先权数据

A61K 31/5365(2006.01)

60/509,901 2003.10.10 US

A61P 35/00(2006.01)

10/960,602 2004.10.08 US

A61P 35/02(2006.01)

(62)分案原申请数据

200480026459.3 2004.10.12

(71)申请人 伊缪诺金公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R·斯蒂夫斯 R·卢茨 R·查里

H·谢 Y·科夫通

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 黄海波

权利要求书7页 说明书68页 附图37页

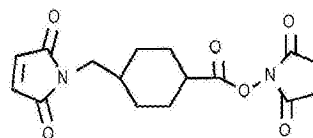
(54)发明名称

用经不可切割接头连接的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物

(57)摘要

本发明公开了一种方法,用于将美登木素生物碱靶向选择细胞群,方法包括:用细胞结合剂美登木素生物碱偶联物接触怀疑含有所述选择细胞群的细胞群或组织,其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割的接头共价连接于所述细胞结合剂,并且所述细胞结合剂结合选择细胞群中的细胞。

SMCC (琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)



1. 包含经不可切割接头被连接至细胞结合剂的至少一个含硫醇美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,

其中所述细胞结合剂是特异性地结合靶细胞的抗体、单链抗体、或抗体片段,

其中所述抗体、单链抗体、或抗体片段包含人恒定区,

其中所述不可切割接头是基本上抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫键切割的接头,

其中所述偶联物是高度细胞毒性的,并且

其中所述细胞结合美登木素生物碱偶联物在啮齿动物中的最大耐受剂量 (MTD) 是至少约150mg/kg,

限制条件是所述细胞结合剂不是抗erbB抗体。

2. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分。

3. 权利要求2所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分,选自:N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酸基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)、或其磺基琥珀酰亚胺基变体或类似物。

4. 权利要求3所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述不可切割接头来源于SMCC。

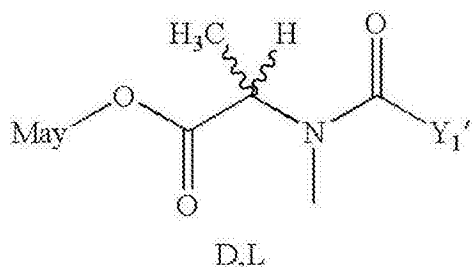
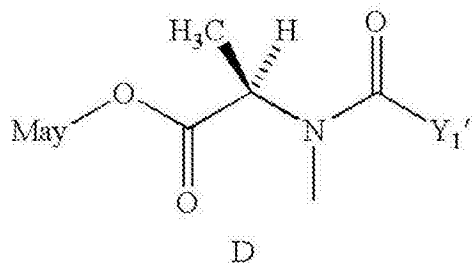
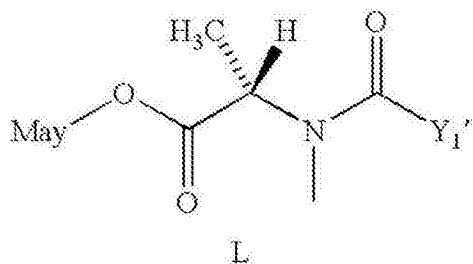
5. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述接头位于所述至少一个美登木素生物碱的C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基中的任一处。

6. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

7. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-半胱氨酸的酯。

8. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱由以下式(II'-L)、(II'-D)或(II'-D,L)表示:

(II')



其中:

Y_1' 表示

$(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5R_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3R_4)_n CR_1R_2S^-$,

其中:

R_1 至 R_{12} 各自独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,而且 R_2 至 R_{12} 还可以是H;

A、B和D,各自独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的各自独立地是0或从1至5的整数,只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0;和

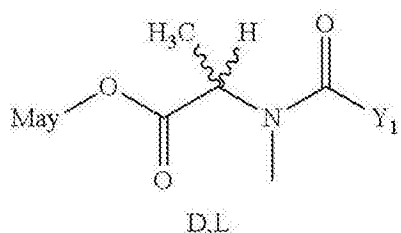
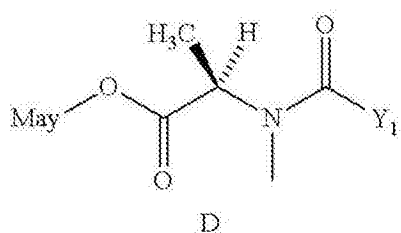
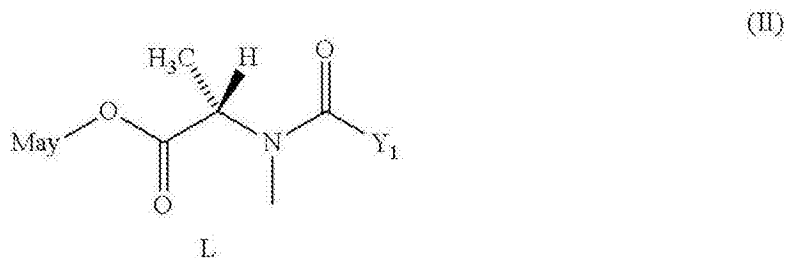
May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

9. 权利要求8所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

10. 权利要求8所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、

R₇和R₈各自是H, 1和m各自是1, 并且n是0; 或其中R₁和R₂是甲基, R₅、R₆、R₇、R₈各自是H, 1和m是1, 并且n是0。

11. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述至少一个美登木素生物碱由以下式 (II-L)、(II-D) 或 (II-D,L) 表示:



其中:

Y₁表示 (CR₇R₈)₁ (CR₅R₆)_m (CR₃R₄)_n CR₁R₂S⁻, 其中:

R₁至R₈各自独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 而且R₂至R₈还可以是H;

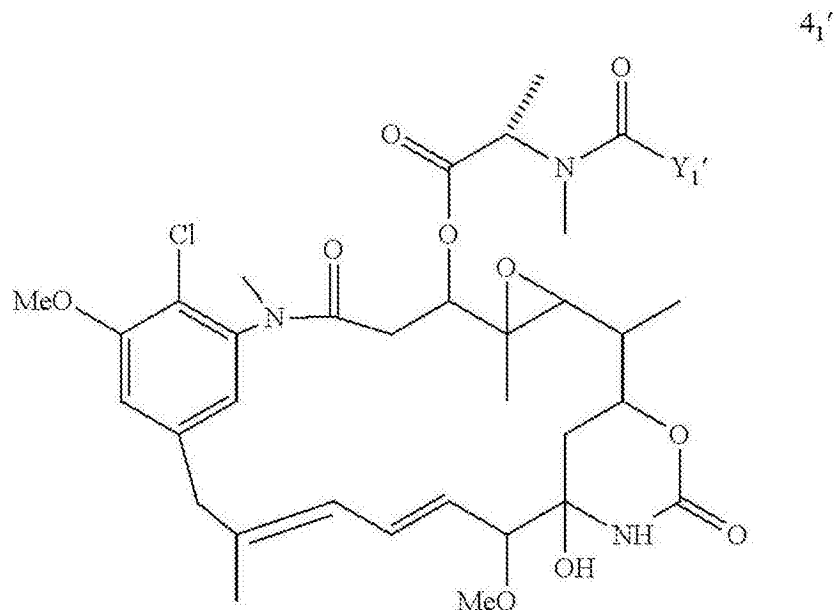
1、m和n各自独立地是从1至5的整数, 而且n还可以是0; 和

May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

12. 权利要求11所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中R₁是甲基并且R₂是H, 或R₁和R₂是甲基。

13. 权利要求11所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中R₁是甲基, R₂是H, R₅、R₆、R₇和R₈各自是H, 1和m各自是1, 并且n是0; 或其中R₁和R₂是甲基, R₅、R₆、R₇、R₈各自是H, 1和m是1, 并且n是0。

14. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述至少一个美登木素生物碱由以下式4i' 表示:



其中:

Y₁' 表示

(CR₇R₈)₁ (CR₉=CR₁₀)_p (C≡C)_q A_o (CR₅R₆)_m D_u (CR₁₁=CR₁₂)_r (C≡C)_s B_t (CR₃R₄)_n CR₁R₂S⁻,

其中:

R₁至R₁₂各自独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,而且R₂至R₁₂还可以是H;

A、B和D,各自独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

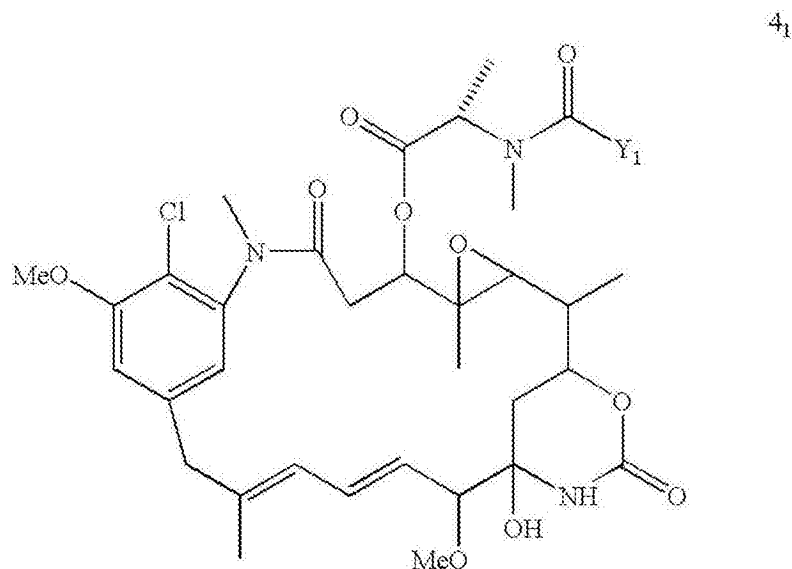
l、m、n、o、p、q、r、s、t和u各自独立地是0或从1至5的整数,只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0;和

May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

15. 权利要求14所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中R₁是甲基并且R₂是H,或R₁和R₂是甲基。

16. 权利要求14所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中R₁是甲基,R₂是H,R₅、R₆、R₇和R₈各自是H,l和m各自是1,并且n是0;或其中R₁和R₂是甲基,R₅、R₆、R₇、R₈各自是H,l和m是1,并且n是0。

17. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱由下式4₁表示:



其中：

Y_1 表示 $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$ ，其中：

R_1 至 R_8 各自独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基，而且 R_2 至 R_8 还可以是H；和

l 、 m 和 n 各自独立地是从1至5的整数，而且 n 还可以是0。

18. 权利要求17所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中 R_1 是甲基并且 R_2 是H，或 R_1 和 R_2 是甲基。

19. 权利要求17所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中 R_1 是甲基， R_2 是H， R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自是H， l 和 m 各自是1，并且 n 是0；或其中 R_1 和 R_2 是甲基， R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 各自是H， l 和 m 是1，并且 n 是0。

20. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中所述至少一个美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1)。

21. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中所述至少一个美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)。

22. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中所述至少一个美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

23. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中所述细胞结合剂结合于肿瘤细胞；病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自体免疫细胞、移植排斥或移植物抗宿主病中的活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞、或黑素细胞；表达CD33、CD19、CanAg、或CALLA抗原的细胞；或表达胰岛素生长因子受体或叶酸受体的细胞。

24. 权利要求23所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中所述细胞结合剂结合于细胞，所述细胞选自：乳腺癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、结直肠癌细胞、胃癌细胞、鳞癌细胞、小细胞肺癌细胞、非小细胞肺癌细胞、胰腺癌细胞、睾丸癌细胞、神经母细胞瘤细胞、黑素瘤细胞或来自淋巴器官的癌症的细胞。

25. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中所述细胞结合剂是特异性地结合靶细胞的表面重构的抗体、表面重构的单链抗体、或表面重构的抗体片段。

26. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异性地结合靶细胞的人源化的抗体、人源化的单链抗体、或人源化的抗体片段。

27. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异性地结合靶细胞的人抗体、人单链抗体、或人抗体片段。

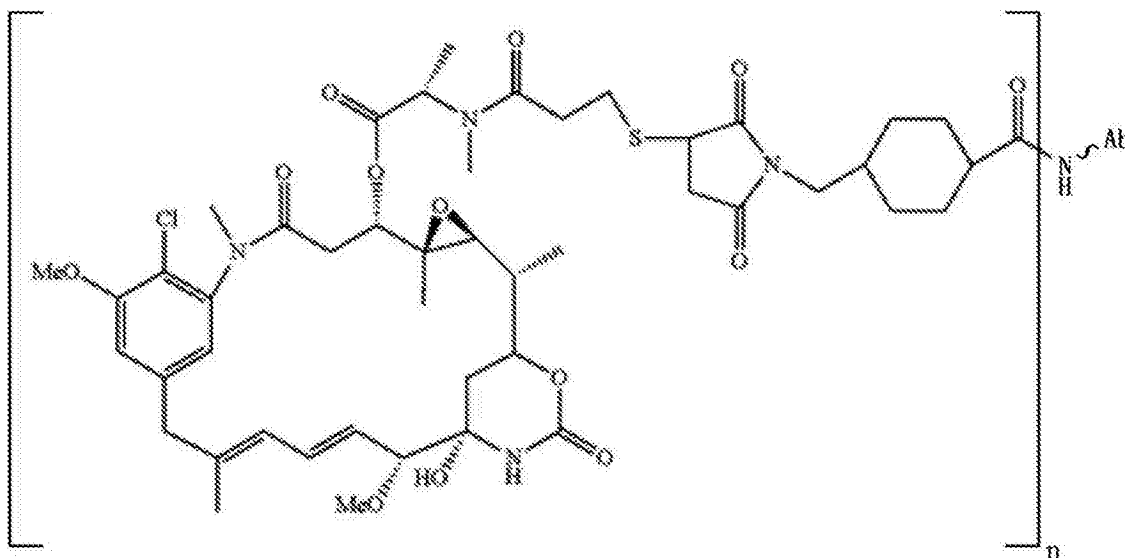
28. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是抗-PSMA抗体、抗-CanAg抗体、抗CD-19抗体、抗CD-33抗体、抗CALLA抗体、抗CD-56抗体、或抗IGF-IR抗体。

29. 权利要求8所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)或 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

30. 权利要求11所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)或 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

31. 权利要求14所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM3)或 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巯基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

32. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其具有以下结构;



Ab=抗体

或其片段,其中n在1至10范围内。

33. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中平均1至约10个美登木素生物碱被共价结合至细胞结合剂。

34. 权利要求1所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中

所述细胞结合剂是特异性地结合靶细胞的表面重构的抗体、表面重构的单链抗体、表面重构的抗体片段、人源化的抗体、人源化的单链抗体、或人源化的抗体片段,

所述美登木素生物碱是 $N^{2'}$ -脱乙酰- $N^{2'}$ -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1),并且所述接头来源于SMCC。

35. 组合物,包括权利要求1-34中任一项所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物和

载体。

用经不可切割接头连接的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物

[0001] 本申请是申请日为2004年10月12日的中国专利申请 200480026459.3的分案申请。本申请要求2003年10月10日提交的美 国临时申请系列号60/509,901的权益,其全部公开内容在此并入,作 为参考。

技术领域

[0002] 符合本发明的一种方法涉及,用经不可切割接头(non-cleavable linker)连接的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物(cell-binding agent maytansinoid conjugates)靶向特定细胞群。符合本发明的另一种方法是 制备所述偶联物的方法。符合本发明的一种组合物涉及新颖的细胞结 合剂美登木素生物碱偶联物,其中将美登木素生物碱经不可切割接头 连接于细胞结合剂。符合本发明的另一种组合物涉及新颖的美登木素 生物碱酯(maytansinoid esters)。

背景技术

[0003] 美登木素生物碱(maytansinoids)是高度细胞毒性的药物。美登素 (maytansine)首先由Kupchan等人从东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)中分离出来,它比传统的癌症化疗剂如甲氨蝶呤、柔红霉素 和长春新碱的细胞毒性强100至1000倍(美国专利3,896,111号)。随后,发现一些微生物也产生美登木素生物碱,如美登木醇(maytansinol)和美登木醇的C-3酯(美国专利4,151,042号)。也报道了合成的美登木 醇C-3酯及美登木醇的类似物(Kupchan等人,21J. Med. Chem. 31-37 (1978); Higashide等人270Nature 721-722 (1977); Kawai等人,32Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984))。制备C-3酯的美登木醇类似物的例子 包括,在芳环上有修饰(例如,脱氯)或在C-9、C-14(例如,羟化的甲 基)、C-15、C-18、C-20和C-4,5处有修饰的美登木醇。

[0004] 天然发生的和合成的C-3酯可以被分为两组:

[0005] (a) 带有简单羧酸的C-3酯(美国专利4,248,870;4,265,814; 4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,317,821;4,322,348和4,331,598), 和

[0006] (b) 带有N-甲基-L-丙氨酸衍生物的C-3酯(美国专利4,137,230 和4,260,608;和 Kaiwa等人,32Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984))。

[0007] 发现组(b)的酯比组(a)的酯更有细胞毒性。

[0008] 美登素是有丝分裂抑制剂。已报道,用美登素在体内处理L1210 细胞,导致细胞的67%积累在有丝分裂期。据报道,未被处理的对照 细胞显示了范围在3.2%至5.8%之间的有丝分裂指数(Sieber等人,43 Bibl. Haematol. 495-500 (1976))。用海胆卵和蛤卵进行的实验表明,美 登素通过抑制微管蛋白质(microtubule)——微管蛋白(tubulin)的聚 合而干扰微管的形成,从而抑制有丝分裂(Remillard等人,189Science 1002-1005 (1975))。

[0009] 在体外,已发现P388、L1210和LY5178鼠白血病细胞悬液被美 登素抑制,美登素的剂量是 10^{-3} 至 10^{-1} $\mu\text{g}/\text{ml}$,其中P388细胞系最为敏 感。也已显示,美登素是人鼻咽癌细胞的体外生长的活性抑制剂,并 且据报道,人急性淋巴细胞白血病系C.E.M. 被低至 10^{-7} $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的

浓度所抑制(Wolpert-DeFillippes等人,24Biochem.Pharmacol.1735-1738 (1975))。

[0010] 也已显示,美登素在体内是活性的。在50倍至100倍的剂量范围内,P388淋巴细胞白血病系统中的肿瘤生长被抑制,这表明了高的治疗指数;用L1210鼠白血病系统、人Lewis肺癌系统和人B-16黑素瘤系统,也可以显示出显著的抑制活性(Kupchan, 33Ped.Proc.2288-2295 (1974))。

[0011] 由于美登素生物碱是高度细胞毒性的,预期它们在治疗许多疾病如癌症中 useful。此预期尚需实现。美登素的临床试验不是令人满意的,这归因于许多副作用(Issel等人,5Cancer Treat.Rev.199-207 (1978))。对中枢神经系统和胃肠症状的不利作用(adverse effect)是一些患者拒绝进一步治疗的原因(Issel at 204),并且美登素似乎和周围神经病相关,该周围神经病可能是累积的(Issel at 207)。

[0012] 因此,应用靶向技术(targeting techniques)将药物选择性地输送至靶细胞(target cell)。对几种药物研究了可切割的和不可切割的接头,但是在大多数情形下,包括美登素生物碱的情形下,体外细胞毒性实验揭示了,抗体-药物偶联物极少达到与游离的非连接药物相同的细胞毒性能力。因此,普遍接受的是,为了使美登素生物碱的靶向输送有效,美登素生物碱和细胞结合剂之间的连接必需是可切割的。

[0013] 此外,在免疫毒素(immunotoxin)领域中,已显示,含有接头的偶联物,所述接头在单克隆抗体和有催化活性的蛋白毒素(toxins)之间具有二硫桥键,比含其它接头的偶联物更具细胞毒性。参见,Lambert 等人,260J.Biol.Chem.12035-12041 (1985);Lambert等人,Immunotoxins 175-209 (A.Frankel,ed.1988),和Ghetie等人,48Cancer Res.2610-2617 (1988)。这归因于细胞内谷胱甘肽的高浓度,其有助于有效切割抗体分子和毒素之间二硫键。最近,经不可切割接头SMCC连接于抗Her2乳腺癌抗体TA.1的美登素生物碱偶联物显示出,比经带有可切割二硫键的接头连接于TA.1的美登素生物碱偶联物的效力低200倍(Chari等人,52Cancer Res.127-133 (1992))。

[0014] 因此,试图找到通过含二硫的可切割接头连接的细胞毒性偶联物。Shen等人描述了甲氨蝶呤转化为巯基乙酰胺衍生物,随后通过二硫键与聚-D-赖氨酸(poly-D-lysine)连接(260J.Biol.Chem.10905-10908 (1985))。也描述了制备含三硫的毒性药物加利车霉素(calicheamicin)与抗体的偶联物(Menendez等人,Fourth International Conference on Monoclonal Antibody Immunoconjugates for Cancer, San Diego, Abstract 81 (1989))。

[0015] 美国专利5,208,020和5,416,064,其全部公开内容在此特意并入作为参考,公开了细胞毒性偶联物,其包括经可切割接头连接于特异性美登素生物碱衍生物的细胞结合剂,所述接头如含有二硫基团的接头、含有酸不稳定基团的接头、含有光不稳定基团的接头、含有肽酶不稳定基团的接头、和含有酯酶不稳定基团的接头。

[0016] 美国专利6,333,410B1,其全部公开内容特别地在此并入作为参考,公开了制备和纯化用于和细胞结合剂连接的含硫醇的美登素生物碱的过程,以及美国专利6,441,163B1,其全部公开内容特别地在此并入作为参考,公开了制备美登素生物碱和细胞结合剂的细胞毒性偶联物的一步法,其中接头是含二硫的可切割接头。

[0017] 此外,美国专利5,208,020教导了带有不可切割接头的抗体-美登素生物碱偶联物,其中接头包括马来酰亚胺基团(maleimido group)。然而,该参考文献中没有实验数

据证明这种偶联物对治疗疾病有效。

[0018] 出乎意料地,现在发现,经不可切割接头连接的美登木素生物碱 和细胞结合剂的细胞毒性偶联物非常有效,并且在许多情形下,比具 有可切割接头的美登木素生物碱和细胞结合剂的偶联物有出乎意料的 优势。

[0019] 发明概述

[0020] 下面描述的本发明的例证性、非限制性实施方案克服了上述不利 之处和上面没有描述的其它不利之处。同时,本发明不需要克服上述 不利之处,下面描述的本发明的例证性、非限制性实施方案可以不克 服上述的任何问题。

[0021] 本发明的一个方面是,将美登木素生物碱(maytansinoid)靶向(target)选择细胞群(selected cell population)的方法,包括,用细胞结合 剂美登木素生物碱偶联物接触细胞群或组织,该细胞群或组织被怀疑 含有来自所述选择细胞群的细胞,其中一个或多个美登木素生物碱通 过不可切割接头连接于细胞结合剂。

[0022] 本发明的另一方面是治疗肿瘤、自身免疫病、移植排斥、移植物 抗宿主病、病毒感染、寄生虫感染和其它疾病的方法,所述疾病可以 通过靶向疗法来治疗,其中靶向制剂(targeting agent)是细胞结合剂,所 述方法包括,向需要治疗的患者给予有效量的细胞结合剂美登木素生 物碱偶联物,其中一个或多个美登木素生物碱被连接于细胞结合剂, 或所述偶联物的药学上可接受的制剂(formulation)或溶剂合物(solvate)。

[0023] 本发明的另一方面是细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中一 个或多个美登木素生物碱经不可切割接头连接于细胞结合剂。

[0024] 本发明的另一方面是包括上述偶联物的组合物。

[0025] 本发明的另一方面是制备上述偶联物的方法。

[0026] 本发明的另一方面是新颖的美登木素生物碱酯。

[0027] 本发明提供了下述项:

[0028] 1.使美登木素生物碱靶向选择细胞群的方法,方法包括:用细胞 结合剂美登木素生物碱偶联物接触怀疑含有所述选择细胞群的细胞群 或组织,其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割接头共价连接 于所述细胞结合剂并且所述细胞结合剂结合选择细胞群中的细胞。

[0029] 2.项1所述的方法,其中所述不可切割接头基本上抗酸诱导的切 割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割或二硫键切割。

[0030] 3.项1所述的方法,其中所述不可切割接头不具有硫原子。

[0031] 4.项3所述的方法,其中所述接头来源于基于二羧酸的部分。

[0032] 5.项4所述的方法,其中所述接头来源于基于 α, ω -二羧酸的部 分,其中所述 α, ω -二羧酸的通式是 $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$,其中X 是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基,Y是具有 3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的取代 的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且其中 l、m和n的每一个是0或1,条件是它们不同时均 为0。

[0033] 6.项5所述的方法,其中所述 α, ω -二羧酸是己二酸、戊二酸、庚二酸、己烯-1,6- 二酸、戊烯-1,5-二酸、环己烷-二酸或环己烯-二酸。

[0034] 7.项1所述的方法,其中所述不可切割接头带有硫原子。

[0035] 8. 项7所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分。

[0036] 9. 项8所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分, 选自: N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基) 环己烷羧酸酯 (SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯) (LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯 (KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯 (GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯 (EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰基)-琥珀酰亚胺酯 (AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰胺基) 己酸酯 (SMPH)、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯 (SMPB)、和N-(p-马来酰亚胺苯基) 异氰酸酯 (PMPI)。

[0037] 10. 项9所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于SMCC。

[0038] 11. 项7所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分。

[0039] 12. 项11所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分, 选自N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯 (SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯 (SBA) 和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基) 丙酸酯 (SBAP)。

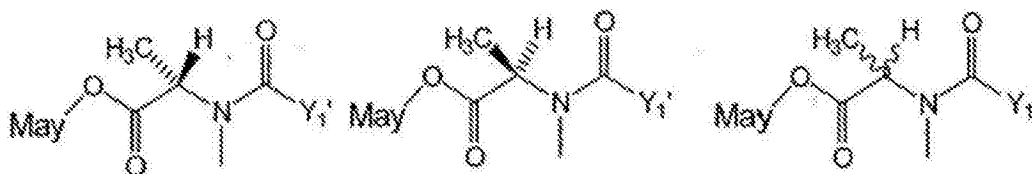
[0040] 13. 项12所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于SIAB。

[0041] 14. 项1所述的方法, 其中所述接头位于至少一个美登木素生物碱的C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基中的任一处。

[0042] 15. 项1所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

[0043] 16. 项1所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-半胱氨酸的酯。

[0044] 17. 项1所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式 (II'-L)、(II'-D) 或 (II'-DL) :



[0045]

L

D

DL

(II')

[0046] 其中:

[0047] Y_1' 代表

[0048] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0049] 其中:

[0050] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0051] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

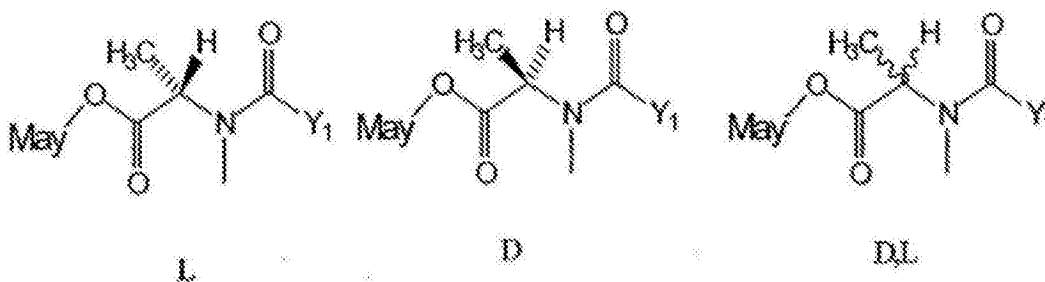
[0052] 1、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要1、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0;和

[0053] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0054] 18. 项17所述的方法,其中所述R₁是甲基并且R₂是H,或R₁和R₂是甲基。

[0055] 19. 项17所述的方法,其中所述R₁是甲基,R₂是H,R₅、R₆、R₇和R₈的每一个是H,1和m的每一个是1,并且n是0;或其中R₁和R₂是甲基,R₅、R₆、R₇、R₈的每一个是H,1和m是1,并且n是0。

[0056] 20. 项1所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II-L)、(II-D)或(II-D,L):



[0057]

(II)

[0058] 其中:

[0059] Y₁代表 (CR₇CR₈)₁ (CR₅CR₆)_m (CR₃CR₄)_n CR₁R₂S-, 其中:

[0060] R₁至R₈每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外,R₂至R₈可以是H;

[0061] 1、m和n的每一个独立地是从1至5的整数,此外,n可以是0;和

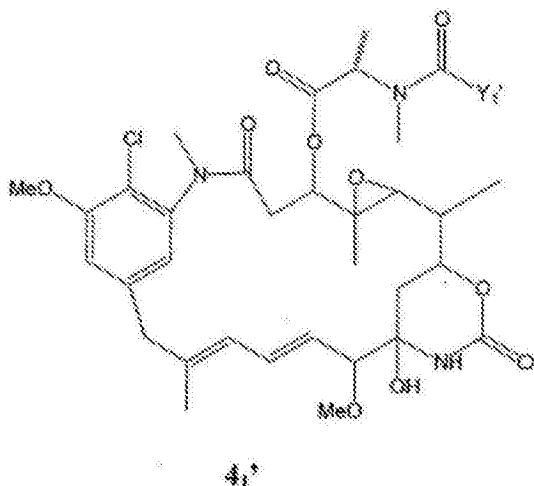
[0062] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0063] 21. 项20所述的方法,其中所述R₁是甲基并且R₂是H,或R₁和R₂是甲基。

[0064] 22. 项20所述的方法,其中所述R₁是甲基,R₂是H,R₅、R₆、R₇和R₈的每一个是H,1和m的每一个是1,并且n是0;或其中R₁和R₂是甲基,R₅、R₆、R₇、R₈的每一个是H,1和m是1,并且n是0。

[0065] 23. 项1所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式41':

[0066]



[0067] 其中:

[0068] Y₁' 代表

[0069] $(\text{CR}_7\text{CR}_8)_1 (\text{CR}_9=\text{CR}_{10})_p (\text{C}\equiv\text{C})_q \text{A}_o (\text{CR}_5\text{CR}_6)_m \text{D}_u (\text{CR}_{11}=\text{CR}_{12})_r (\text{C}\equiv\text{C})_s \text{B}_t (\text{CR}_3\text{CR}_4)_n \text{CR}_1\text{R}_2\text{S}-$,

[0070] 其中:

[0071] R₁至R₁₂每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外,R₂至R₁₂可以是H;

[0072] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;和

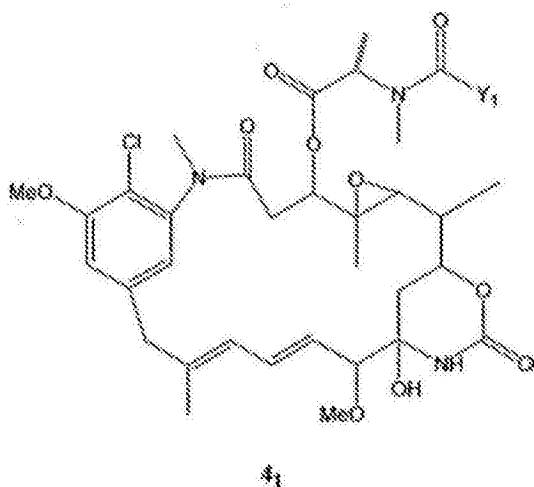
[0073] l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0。

[0074] 24. 项23所述的方法,其中所述R₁是甲基并且R₂是H,或R₁和R₂是甲基。

[0075] 25. 项23所述的方法,其中所述R₁是甲基,R₂是H,R₅、R₆、R₇和R₈的每一个是H,l和m的每一个是1,并且n是0;或其中R₁和R₂是甲基,R₅、R₆、R₇、R₈的每一个是H,l和m是1,并且n是0。

[0076] 26. 项1所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为 41:

[0077]



[0078] 其中:

[0079] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$, 其中:

[0080] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 此外, R_2 至 R_8 可以是H; 和

[0081] 1、m和n的每一个独立地是从1至5的整数, 此外, n可以是0。

[0082] 27. 项26所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H, 或 R_1 和 R_2 是甲基。

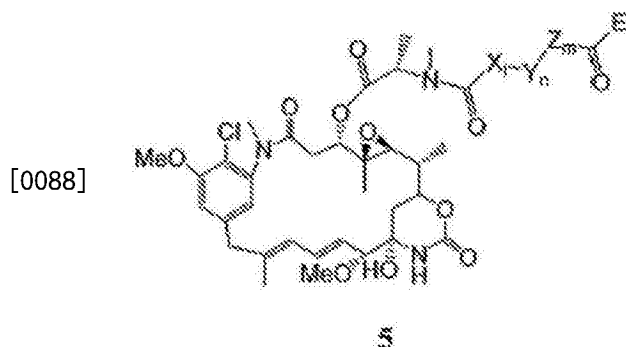
[0083] 28. 项26所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, 1和m的每一个是1, 并且n是0; 或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, 1和m是1, 并且n是0。

[0084] 29. 项1所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是DM1。

[0085] 30. 项1所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是DM3。

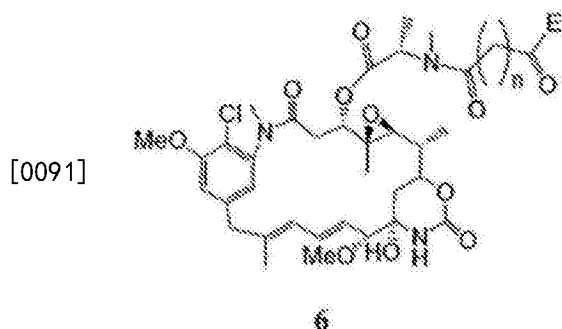
[0086] 31. 项1所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是DM4。

[0087] 32. 项1所述的方法, 其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱, 得到式5化合物:



[0089] 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基, Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基, Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基, 或取代的或未取代的杂环基团, 其中杂原子选自N、O或S, 并且1、m和n的每一个是0或1, 条件是它们不同时均为0; 以及E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯, 和磺酰基四氟苯酯。

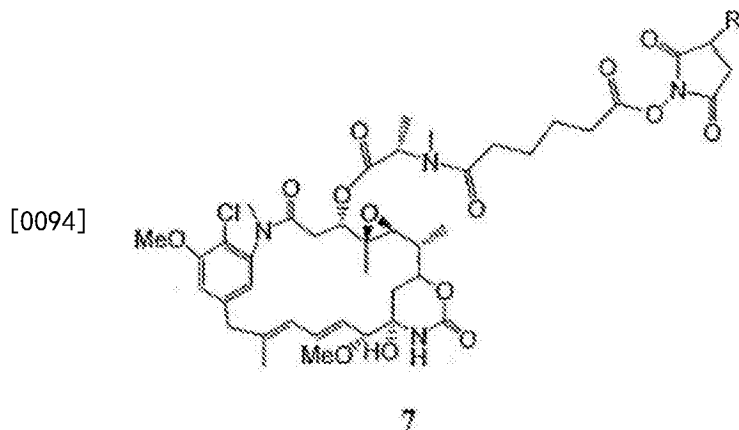
[0090] 33. 项1所述的方法, 其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱, 得到式6化合物:



[0092] 其中n代表从3至24的整数, 并且E和羰基一同形成活性酯如 N-羟基琥珀酰亚胺基

和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯、邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯，和磺酰基四氟苯酯。

[0093] 34. 项1所述的方法，其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱，得到式7化合物：



[0095] 其中R是H或 $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ 。

[0096] 35. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂结合于肿瘤细胞；病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自体免疫细胞、活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞、或黑素细胞；表达CD33、CD19、CanAg、CALLA、或Her-2抗原的细胞；或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体或叶酸受体的细胞。

[0097] 36. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂结合于细胞，所述细胞选自：乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、直肠癌细胞、胃癌细胞、鳞癌细胞、小细胞肺癌细胞、睾丸癌细胞、和神经母细胞瘤细胞。

[0098] 37. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体、抗体片段，特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、单克隆抗体片段，特异地和靶细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段，特异地和靶细胞结合的结构区抗体、结构区抗体片段，淋巴因子，激素，维生素，生长因子，集落刺激因子或营养物运输分子。

[0099] 38. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂是干扰素、IL2、IL3、IL4、IL6、胰岛素、促甲状腺激素释放激素、黑素细胞刺激素、类固醇激素、生长激素释放抑制因子、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、MCSF、GM-CSF、叶酸、转铁蛋白、雌激素、雌激素类似物、雄激素、或雄激素类似物。

[0100] 39. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体或抗体片段。

[0101] 40. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的抗体、表面重构的单链抗体、或表面重构的抗体片段。

[0102] 41. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的人源化的抗体、人源化的单链抗体、或人源化的抗体片段。

[0103] 42. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0104] 43. 项1所述的方法，其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的

单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构 的单克隆抗体片段。

[0105] 44. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合 的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克 隆抗体片段。

[0106] 45. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合 的嵌合抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0107] 46. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结 合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0108] 47. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结 合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重 构的单克隆抗体片段。

[0109] 48. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结 合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单 克隆抗体片段。

[0110] 49. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结 合的嵌合抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0111] 50. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞 或乳腺癌细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片 段。

[0112] 51. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞 或乳腺癌细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆 抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0113] 52. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞 或乳腺癌细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、 或人源化的单克隆抗体片段。

[0114] 53. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和乳腺癌细胞 结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面 重构的单克隆抗体片段。

[0115] 54. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和乳腺癌细胞 结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的 单克隆抗体片段。

[0116] 55. 项1至34中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是抗 -CanAg抗体、抗 CD-19抗体、抗CD-33抗体、抗CALLA抗体、抗 EGFR抗体、抗CD-56抗体、抗IGF-1R抗体、或抗 Her2抗体。

[0117] 56. 项1至34中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是表 面重构的抗体 My9-6、KS77、或N901。

[0118] 57. 项1至34中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是曲 妥珠单抗、B4抗体 或huC242抗体。

[0119] 58. 项1至34中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是 huC242抗体。

[0120] 59. 项1至34中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是曲 妥珠单抗。

[0121] 60. 项1所述的方法, 其中与包括至少一个经可切割接头连接于细 胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相 比, 所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的毒 性较低。

[0122] 61. 项1所述的方法, 其中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物 的血浆清除和单独的抗体大约相同。

[0123] 62. 项1所述的方法, 其中与包括至少一个经可切割接头连接于细 胞结合剂的美

登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的最大耐受剂量较高。

[0124] 63.项1所述的方法,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的生物活性持久性较高。

[0125] 64.项1所述的方法,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物对抗原阴性细胞的活性较低。

[0126] 65.项1所述的方法,其中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物显示出最小的旁观者效应。

[0127] 66.清除细胞的方法,所述方法包括:用细胞结合剂美登木素生物碱偶联物接触所述细胞,其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割的接头共价连接于所述细胞结合剂,以及所述细胞结合剂结合于所述细胞。

[0128] 67.项66所述的方法,其中所述不可切割接头基本上抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割或二硫键切割。

[0129] 68.项66所述的方法,其中所述不可切割接头不带有硫原子。

[0130] 69.项68所述的方法,其中所述接头来源于基于二羧酸的部分。

[0131] 70.项69所述的方法,其中所述接头来源于基于 α, ω -二羧酸的部分,其中所述 α, ω -二羧酸的通式是 $\text{HOOCC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$,其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基,Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且其中l、m和n的每一个是0或1,条件是它们不同时均为0。

[0132] 71.项70所述的方法,其中所述 α, ω -二羧酸是己二酸、戊二酸、庚二酸、己烯-1,6-二酸、戊烯-1,5-二酸、环己烷-二酸或环己烯-二酸。

[0133] 72.项66所述的方法,其中所述不可切割接头带有硫原子。

[0134] 73.项72所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分。

[0135] 74.项73所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分,选自:N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-羟琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)和N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)。

[0136] 75.项74所述的方法,其中所述不可切割接头来源于SMCC。

[0137] 76.项72所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分。

[0138] 77.项76所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分,选自N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP)。

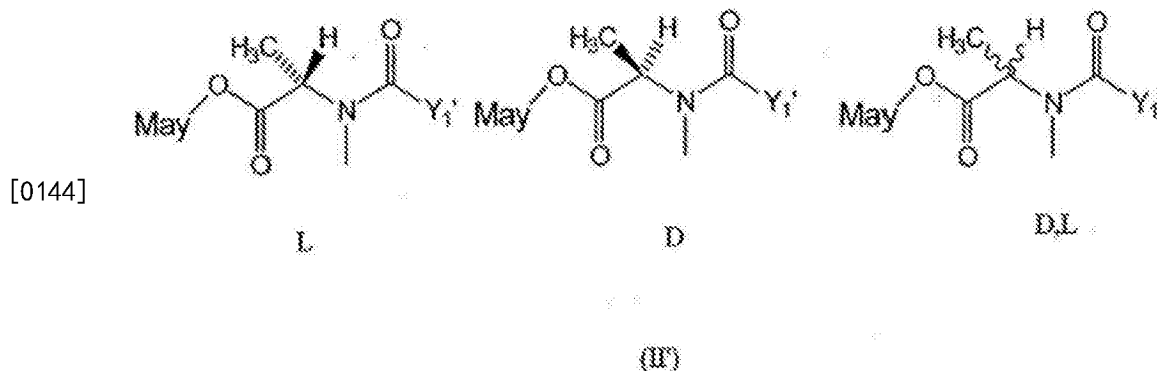
[0139] 78. 项77所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于SIAB。

[0140] 79. 项66所述的方法, 其中所述接头位于至少一个美登木素生物碱的C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基中的任一处。

[0141] 80. 项66所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

[0142] 81. 项66所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-半胱氨酸的酯。

[0143] 82. 项66所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式 (II'-L)、(II'-D) 或 (II'-D,L) :



[0145] 其中:

[0146] Y_1' 代表

[0147] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m Du (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0148] 其中:

[0149] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0150] A、B和D, 每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

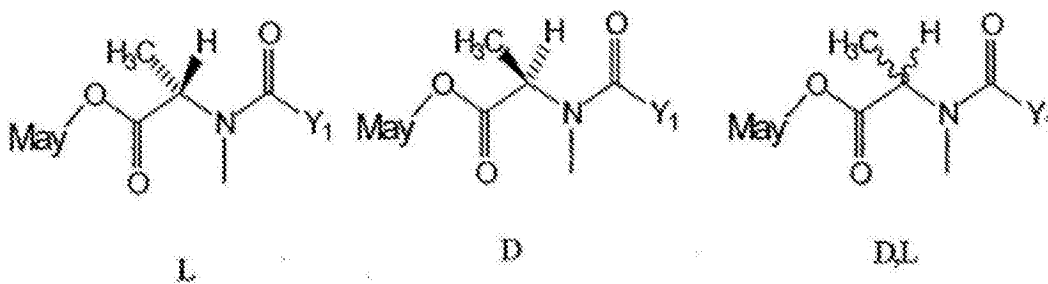
[0151] 1、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数, 只要1、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0; 和

[0152] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0153] 83. 项82所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H, 或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0154] 84. 项82所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, 1和m的每一个是1, 并且n是0; 或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, 1和m是1, 并且n是0。

[0155] 85. 项66所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式 (II-L)、(II-D) 或 (II-D,L) :



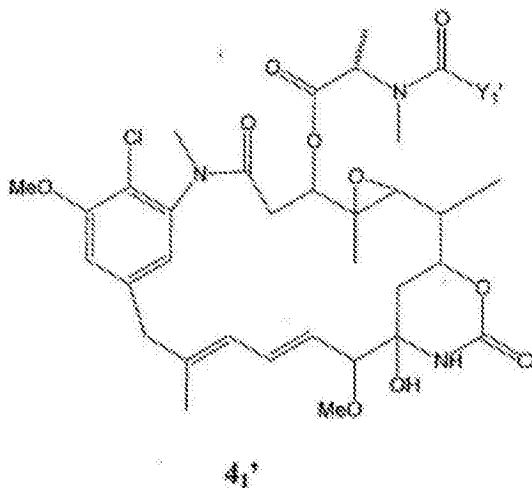
[0156]

(III)

[0157] 其中:

[0158] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1 (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$, 其中:[0159] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;[0160] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0; 和

[0161] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处 带有侧链的美登木素生物碱。

[0162] 86. 项85所述的方法,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。[0163] 87. 项85所述的方法,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。[0164] 88. 项66所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示 为式 $4_1'$:

[0165]

[0166] 其中:

[0167] Y_1' 代表[0168] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0169] 其中:

[0170] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至

R₁₂可以是H;

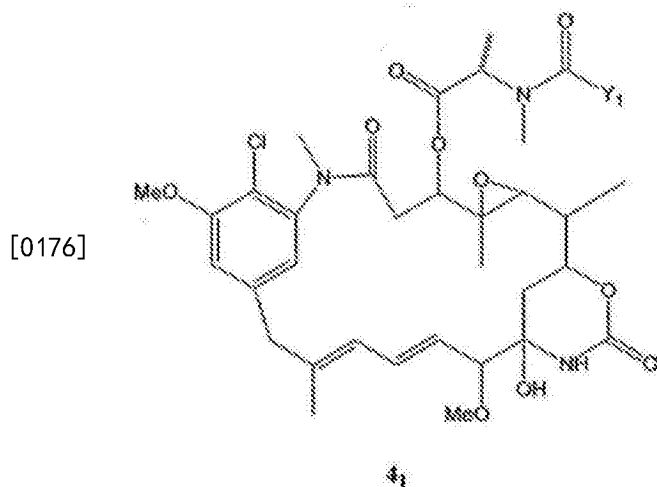
[0171] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;和

[0172] l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0。

[0173] 89.项88所述的方法,其中所述R₁是甲基并且R₂是H,或R₁和R₂是甲基。

[0174] 90.项89所述的方法,其中所述R₁是甲基,R₂是H,R₅、R₆、R₇和R₈的每一个是H,l和m的每一个是1,并且n是0;或其中R₁和R₂是甲基,R₅、R₆、R₇、R₈的每一个是H,l和m是1,并且n是0。

[0175] 91.项66所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为41:



[0177] 其中:

[0178] Y₁代表 (CR₇CR₈)_l (CR₅CR₆)_m (CR₃CR₄)_n CR₁R₂S-, 其中:

[0179] R₁至R₈每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外,R₂至R₈可以是H;和

[0180] l、m和n的每一个独立地是从1至5的整数,此外,n可以是0。

[0181] 92.项91所述的方法,其中所述R₁是甲基并且R₂是H,或R₁和R₂是甲基。

[0182] 93.项91所述的方法,其中所述R₁是甲基,R₂是H,R₅、R₆、R₇和R₈的每一个是H,l和m的每一个是1,并且n是0;或其中R₁和R₂是甲基,R₅、R₆、R₇、R₈的每一个是H,l和m是1,并且n是0。

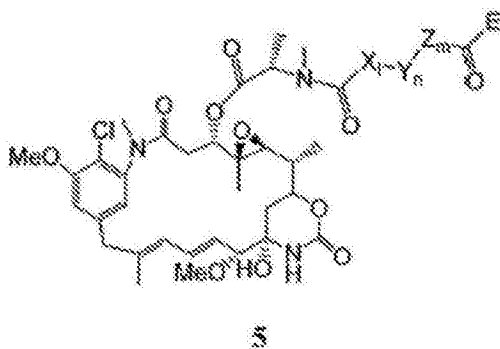
[0183] 94.项66所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM1。

[0184] 95.项66所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM3。

[0185] 96.项66所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM4。

[0186] 97.项66所述的方法,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式5化合物:

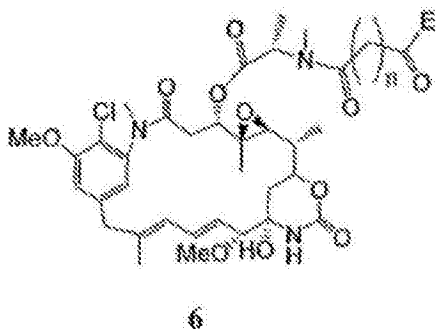
[0187]



[0188] 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基，Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基，Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基，或取代的或未取代的杂环基团，其中杂原子选自N、O或S，并且l、m和n的每一个是0或1，条件是它们不同时均为0；以及E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯，和磺酰基四氟苯酯。

[0189] 98. 项66所述的方法，其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱，得到式6化合物：

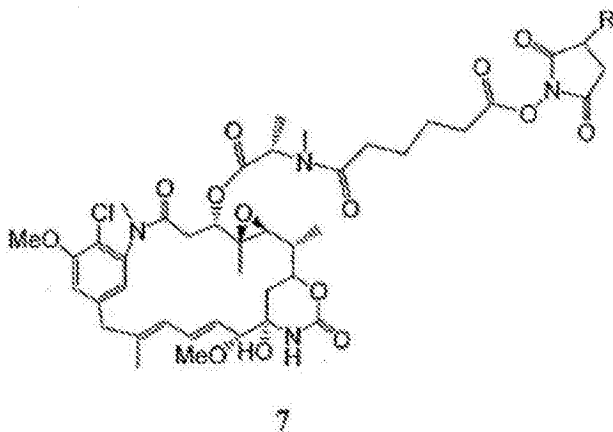
[0190]



[0191] 其中n代表从3至24的整数，并且E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯，和磺酰基四氟苯酯。

[0192] 99. 项66所述的方法，其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱，得到式7化合物：

[0193]



[0194] 其中R是H或 SO_3^-Na^+ 。项63所述的方法,其中所述细胞结合剂结合于肿瘤细胞;病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自体免疫细胞、活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞、或黑素细胞;表达CD33、CD19、CanAg、CALLA、或Her-2抗原的细胞;或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体或叶酸受体的细胞。

[0195] 100. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂结合于细胞,所述细胞选自:乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、直肠癌细胞、胃癌细胞、鳞癌细胞、小细胞肺癌细胞、睾丸癌细胞、和神经母细胞瘤细胞。

[0196] 101. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体、抗体片段,特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、单克隆抗体片段,特异地和靶细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段,特异地和靶细胞结合的结构区抗体、结构区抗体片段,淋巴因子,激素,维生素,生长因子,集落刺激因子或营养物运输分子。

[0197] 102. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是干扰素、IL2、IL3、IL4、IL6、胰岛素、促甲状腺激素释放激素、黑素细胞刺激素、类固醇激素、生长激素释放抑制因子、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、MCSF、GM-CSF、叶酸、转铁蛋白、雌激素、雌激素类似物、雄激素、或雄激素类似物。

[0198] 103. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体或抗体片段。

[0199] 104. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的抗体、表面重构的单链抗体、或表面重构的抗体片段。

[0200] 105. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的人源化的抗体、人源化的单链抗体、或人源化的抗体片段。

[0201] 106. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0202] 107. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0203] 108. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0204] 109. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0205] 110. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0206] 111. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0207] 112. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0208] 113. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0209] 114. 项66所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0210] 115. 项66所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0211] 116. 项66所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0212] 117. 项66所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和乳腺癌细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0213] 118. 项66所述的方法, 其中所述细胞结合剂是特异地和乳腺癌细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0214] 119. 项66至99中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是抗-CanAg抗体、抗CD-19抗体、抗CD-33抗体、抗CALLA抗体、抗EGFR抗体、抗CD-56抗体、抗IGF-1R抗体、或抗Her2抗体。

[0215] 120. 项66至99中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是表面重构的抗体My9-6、KS77、或N901。

[0216] 121. 项66至99中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是曲妥珠单抗、B4抗体或huC242抗体。

[0217] 122. 项66至99中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是huC242抗体。

[0218] 123. 项66至99中的任一项所述的方法, 其中所述细胞结合剂是表面重构的C242抗体。

[0219] 124. 项66所述的方法, 其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比, 所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的毒性较低。

[0220] 125. 项66所述的方法, 其中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的血浆清除和单独的抗体大约相同。

[0221] 126. 项66所述的方法, 其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比, 所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的最大耐受剂量较高。

[0222] 127. 项66所述的方法, 其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比, 所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的生物活性持久性较高。

[0223] 128. 项66所述的方法, 其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比, 所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物对抗原阴性细胞的活性较低。

[0224] 129. 项66所述的方法, 其中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物显示出最小的旁观者效应。

[0225] 130. 治疗病痛的方法, 所述病痛选自肿瘤、自身免疫病、移植排斥、移植物抗宿主病、病毒感染、和寄生虫感染, 所述方法包括: 向需要治疗的对象给予有效量的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割接头共价连接于细胞结合剂, 以及细胞结合剂和病痛的患病细胞或感染细胞相结合。

[0226] 131. 项130所述的方法, 其中所述肿瘤选自: 肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌和淋巴器官癌症。

[0227] 132. 项130所述的方法, 其中所述自身免疫病选自系统性红斑狼疮、风湿性关节炎和多发性硬化。

[0228] 133. 项130所述的方法, 其中所述移植排斥选自: 肾移植排斥、心脏移植排斥和骨髓移植排斥。

[0229] 134. 项130所述的方法, 其中所述病毒感染选自CMV、HIV和AIDS。

[0230] 135. 项130所述的方法, 其中所述寄生虫感染选自贾第鞭毛虫病、阿米巴病和血吸虫病。

[0231] 136. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述不可切割接头基本上抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割或二硫键切割。

[0232] 137. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述不可切割接头不带有硫原子。

[0233] 138. 项137所述的方法, 其中所述接头来源于基于二羧酸的部分。

[0234] 139. 项138所述的方法, 其中所述接头来源于基于 α, ω -二羧酸的部分, 其中所述 α, ω -二羧酸的通式是 $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$, 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基, Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基, Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基, 或取代的或未取代的杂环基团, 其中杂原子选自N、O或S, 并且1、m和n的每一个是0或1, 条件是它们不同时均为0。

[0235] 140. 项139所述的方法, 其中所述 α, ω -二羧酸是己二酸、戊二酸、庚二酸、己烯-1,6-二酸、戊烯-1,5-二酸、环己烷-二酸或环己烯-二酸。

[0236] 141. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述不可切割接头带有硫原子。

[0237] 142. 项141所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分。

[0238] 143. 项142所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分, 选自: N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-羟琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酸基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、和N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)。

[0239] 144. 项143所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于SMCC。

[0240] 145. 项141所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分。

[0241] 146. 项145所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分, 选自N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP)。

[0242] 147. 项146所述的方法, 其中所述不可切割接头来源于SIAB。

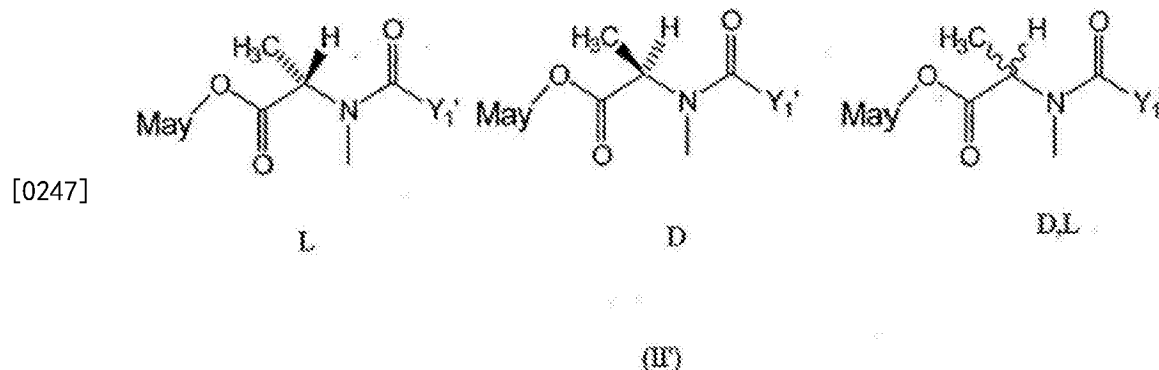
[0243] 148. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述接头位于至少一个美登木素生物碱的C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基中的任一处。

[0244] 149. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美

登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

[0245] 150. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-半胱氨酸的酯。

[0246] 151. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II'-L)、(II'-D)或(II'-D,L):



[0248] 其中:

[0249] Y_1' 代表

[0250] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0251] 其中:

[0252] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0253] A、B和D, 每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

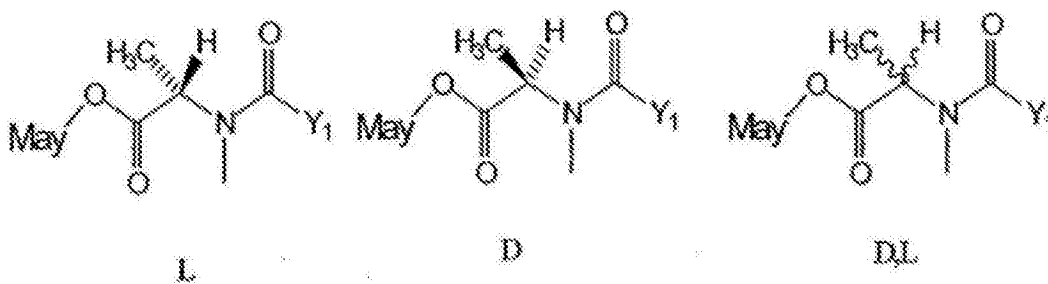
[0254] l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数, 只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0; 和

[0255] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0256] 152. 项151所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H, 或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0257] 153. 项151所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l和m的每一个是1, 并且n是0; 或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l和m是1, 并且n是0。

[0258] 154. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II-L)、(II-D)或(II-D,L):



[0259]

(III)

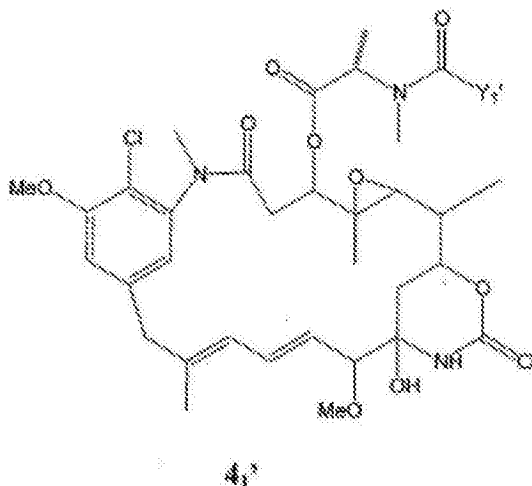
[0260] 其中:

[0261] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1 (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$, 其中:[0262] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 此外, R_2 至 R_8 可以是H;[0263] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数, 此外, n 可以是0; 和

[0264] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0265] 155. 项154所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H, 或 R_1 和 R_2 是甲基。[0266] 156. 项154所述的方法, 其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1, 并且 n 是0; 或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1, 并且 n 是0。

[0267] 157. 项130至135的任一项所述的方法, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式41':



[0268]

[0269] 其中:

[0270] Y_1' 代表[0271] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0272] 其中:

[0273] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳

原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

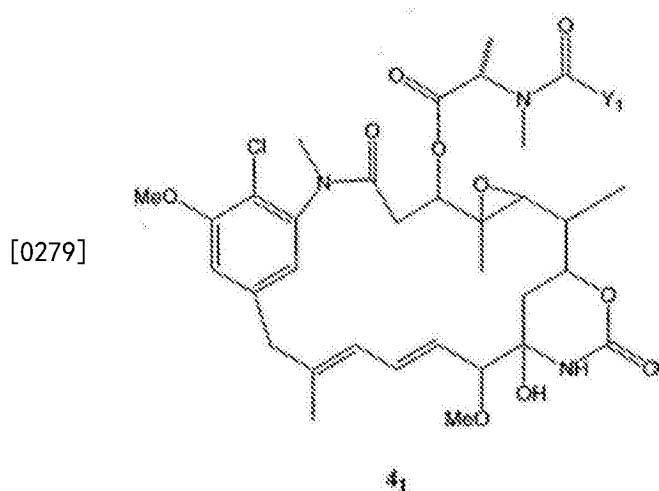
[0274] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;和

[0275] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 中的至少两个不同时为0。

[0276] 158.项157所述的方法,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0277] 159.项157所述的方法,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

[0278] 160.项130至135的任一项所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为41:



[0280] 其中:

[0281] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_l (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$, 其中:

[0282] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;和

[0283] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0。

[0284] 161.项160所述的方法,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

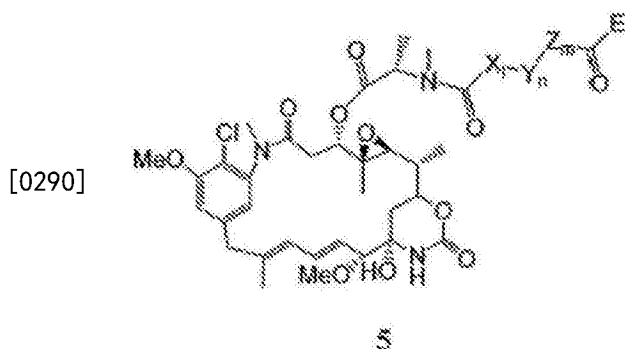
[0285] 162.项160所述的方法,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

[0286] 163.项130至135的任一项所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM1。

[0287] 164.项130至135的任一项所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM3。

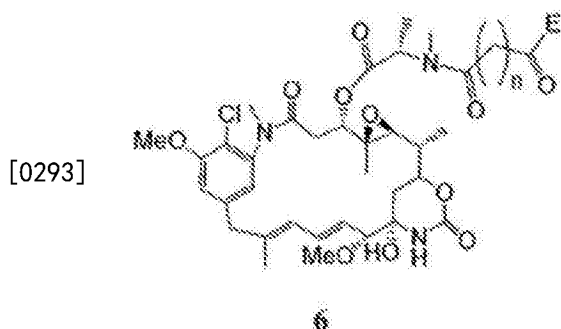
[0288] 165.项130至135的任一项所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM4。

[0289] 166. 项130至135的任一项所述的方法,其中用不含硫的交联剂 修饰所述美登木素生物碱,得到式5化合物:



[0291] 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基, Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基, Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且l、m和n的每一个是0或1,条件是它们不同时均为0;以及E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

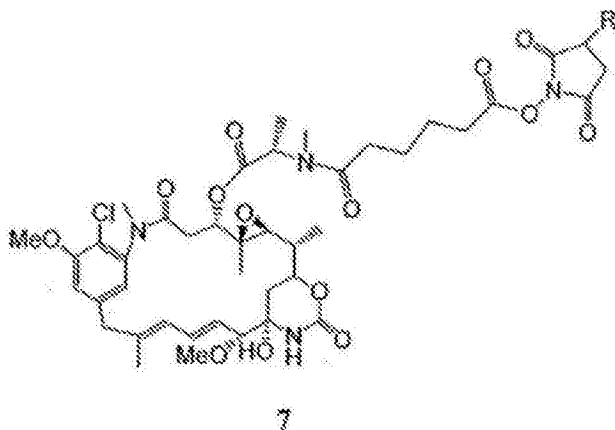
[0292] 167. 项130至135的任一项所述的方法,其中用不含硫的交联剂 修饰所述美登木素生物碱,得到式6化合物:



[0294] 其中n代表从3至24的整数,并且E和羰基一同形成活性酯如 N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

[0295] 168. 项130至135的任一项所述的方法,其中用不含硫的交联剂 修饰所述美登木素生物碱,得到式7化合物:

[0296]

[0297] 其中R是H或 SO_3^-Na^+ 。

[0298] 169. 项130至135的任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂是 特异地和病痛的患病细胞或感染细胞结合的抗体、单链抗体或抗体片段。

[0299] 170. 项130至135的任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂是 特异地和病痛的患病细胞或感染细胞结合的表面重构的抗体、表面重 构的单链抗体、或表面重构的抗体片段。

[0300] 171. 项130至135的任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂是 特异地和病痛的患病细胞或感染细胞结合的人源化的抗体、人源化的 单链抗体、或人源化的抗体片段。

[0301] 172. 项130至135的任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂是 特异地和病痛的患病细胞或感染细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆 抗体、或单克隆抗体片段。

[0302] 173. 项130至135的任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂是 特异地和病痛的患病细胞或感染细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0303] 174. 项130至135的任一项所述的方法,其中所述细胞结合剂是 特异地和病痛的患病细胞或感染细胞结合的人源化的单克隆抗体、人 源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0304] 175. 项130所述的方法,其中所述细胞结合剂是抗-CanAg抗体、抗CD-19抗体、抗CD-33抗体、抗CALLA抗体、抗EGFR抗体、抗 CD-56抗体、抗IGF-1R抗体、或抗Her2抗体。

[0305] 176. 项130所述的方法,其中所述细胞结合剂是表面重构的抗体My9-6、KS77、或N901。

[0306] 177. 项130所述的方法,其中所述细胞结合剂是曲妥珠单抗、B4 抗体或huC242抗体。

[0307] 178. 项130所述的方法,其中所述细胞结合剂是huC242抗体。

[0308] 179. 项130所述的方法,其中所述细胞结合剂是表面重构的C242 抗体。

[0309] 180. 体外应用以处理下列物质的方法:处理自体骨髓细胞,这是 在将它们植入同一患者之前实施的,目的是清除患病细胞或肿瘤细胞; 处理骨髓细胞或其它组织,这是在移植它们之前实施的,目的是清除 活性T细胞(competent T cell)并防止移植物抗宿主病(GVHD);处理细 胞培养物,目的是清除不表达靶抗原的所需变异体之外的所有细胞;或处 理细胞培养物,目的是清除表达不需要的抗原的变异细胞;方法 包括,用有效量的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物处理细胞,其中 一个或多个美登木素生物碱通过不可切割接

头共价连接于细胞结合剂,以及细胞结合剂和欲清除的细胞相结合。

[0310] 181.项180所述的方法,其中所述不可切割接头基本上抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割或二硫键切割。

[0311] 182.项180所述的方法,其中所述不可切割接头不带有硫原子。

[0312] 183.项182所述的方法,其中所述接头来源于基于二羧酸的部分。

[0313] 184.项183所述的方法,其中所述接头来源于基于 α, ω -二羧酸的部分,其中所述 α, ω -二羧酸的通式是 $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$,其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基,Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且1、m和n的每一个是0或1,条件是它们不同时均为0。

[0314] 185.项184所述的方法,其中所述 α, ω -二羧酸是己二酸、戊二酸、庚二酸、己烯-1,6-二酸、戊烯-1,5-二酸、环己烷-二酸或环己烯-二酸。

[0315] 186.项180所述的方法,其中所述不可切割接头带有硫原子。

[0316] 187.项186所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分。

[0317] 188.项187所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分,选自:N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-羟琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、和N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)。

[0318] 189.项180所述的方法,其中所述不可切割接头来源于SMCC。

[0319] 190.项186所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分。

[0320] 191.项190所述的方法,其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分,选自N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP)。

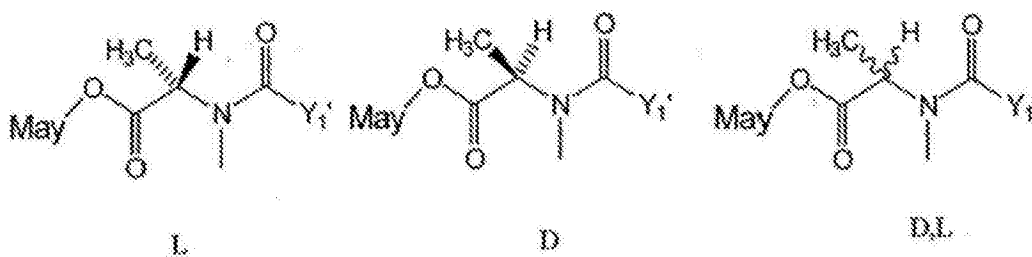
[0321] 192.项191所述的方法,其中所述不可切割接头来源于SIAB。

[0322] 193.项180所述的方法,其中所述接头位于至少一个美登木素生物碱的C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基中的任一处。

[0323] 194.项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

[0324] 195.项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-半胱氨酸的酯。

[0325] 196.项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II'-L)、(II'-D)或(II'-D,L):



[0326]

(III)

[0327] 其中:

[0328] Y_1' 代表

[0329] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0330] 其中:

[0331] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0332] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

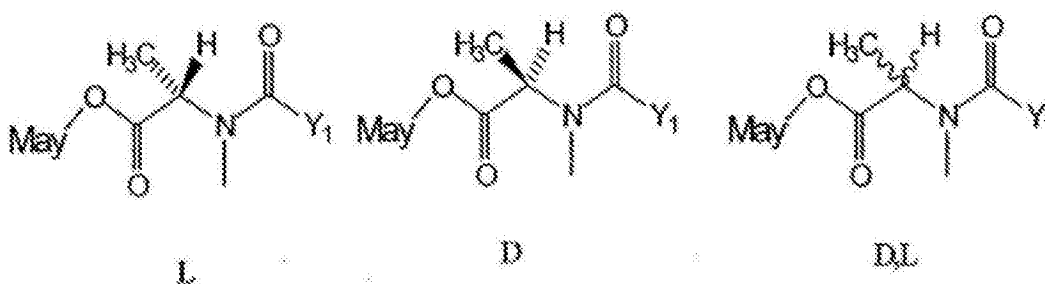
[0333] l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0;和

[0334] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0335] 197. 项196所述的方法,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0336] 198. 项196所述的方法,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H,l和m的每一个是1,并且n是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H,l和m是1,并且n是0。

[0337] 199. 项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II-L)、(II-D)或(II-D,L):



[0338]

(III)

[0339] 其中:

[0340] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1 (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$, 其中:

[0341] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;

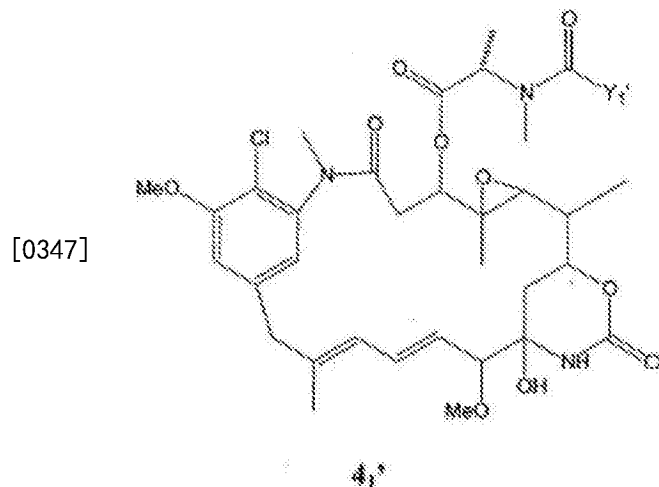
[0342] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0; 和

[0343] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0344] 200.项199所述的方法,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0345] 201.项199所述的方法,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

[0346] 202.项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式41' :



[0348] 其中:

[0349] Y_1' 代表

[0350] $(CR_7CR_8)_l (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0351] 其中:

[0352] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0353] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;和

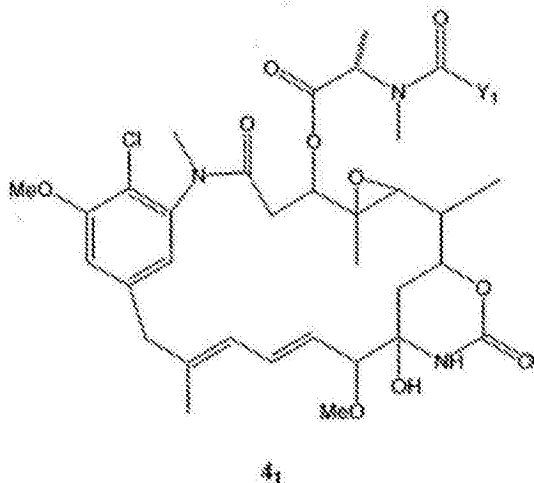
[0354] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 中的至少两个不同时为0。

[0355] 203.项202所述的方法,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0356] 204.项202所述的方法,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

[0357] 205.项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为41:

[0358]



[0359] 其中:

[0360] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_l (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$, 其中:[0361] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;[0362] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0; 和

[0363] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处 带有侧链的美登木素生物碱。

[0364] 206. 项205所述的方法,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。[0365] 207. 项205所述的方法,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

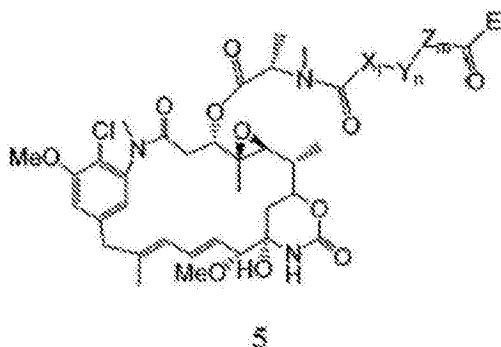
[0366] 208. 项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是 DM1。

[0367] 209. 项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是 DM3。

[0368] 210. 项180所述的方法,其中所述至少一个美登木素生物碱是 DM4。

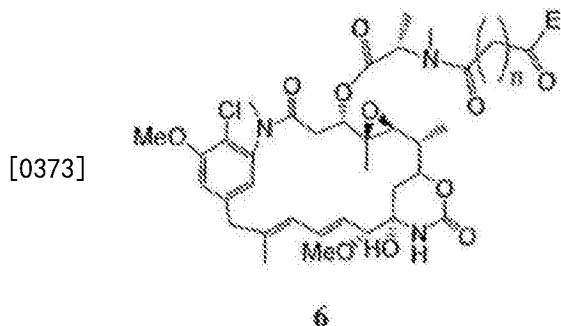
[0369] 211. 项180所述的方法,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式5化合物:

[0370]

[0371] 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基, Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且 l 、 m 和 n 的每一个是0或1,条件是它们不同时均为0;以及E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、

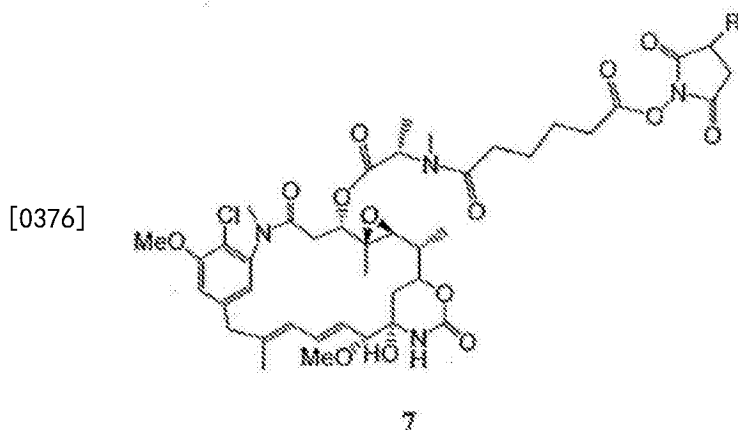
N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

[0372] 212.项180所述的方法,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式6化合物:



[0374] 其中n代表从3至24的整数,并且E和羰基一同形成活性酯如 N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

[0375] 213.项180所述的方法,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式7化合物:



[0377] 其中R是H或 $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ 。

[0378] 214.项180所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和欲清除的细胞结合的抗体、单链抗体或抗体片段。

[0379] 215.项180所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和欲清除的细胞结合的表面重构的抗体、表面重构的单链抗体、或表面重构的抗体片段。

[0380] 216.项180所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和欲清除的细胞结合的人源化的抗体、人源化的单链抗体、或人源化的抗体片段。

[0381] 217.项180所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和欲清除的细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0382] 218.项180所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和欲清除的细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0383] 219. 项180所述的方法,其中所述细胞结合剂是特异地和欲清除的细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0384] 220. 项180所述的方法,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的毒性较低。

[0385] 221. 项180所述的方法,其中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的血浆清除和单独的抗体大约相同。

[0386] 222. 项180所述的方法,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的最大耐受剂量较高。

[0387] 223. 项180所述的方法,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的生物活性持久性较高。

[0388] 224. 项180所述的方法,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物对抗原阴性细胞的活性较低。

[0389] 225. 项180所述的方法,其中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物显示出最小的旁观者效应。

[0390] 226. 细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其具有至少一个经不可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱,条件是当所述细胞结合剂是抗体时,该接头不来自下列交联剂:琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、硫代-SMCC、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、硫代-MBS和N-琥珀酰亚胺基-碘乙酸酯(SIA)。

[0391] 227. 细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其具有至少一个经不可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱,条件是所述细胞结合剂不是抗体。

[0392] 228. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述不可切割接头基本上抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割或二硫键切割。

[0393] 229. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述不可切割接头不带有硫原子。

[0394] 230. 项229所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述接头来源于基于二羧酸的部分。

[0395] 231. 项230所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述接头来源于基于 α, ω -二羧酸的部分,其中所述 α, ω -二羧酸的通式是 $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$, 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基,Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且其中l、m和n的每一个是0或1,条件是它们不同时均为0。

[0396] 232. 项231所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 α, ω -二羧酸是己二酸、戊二酸、庚二酸、己烯-1,6-二酸、戊烯-1,5-二酸、环己烷-二酸或环己烯-二酸。

[0397] 233. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述不可切割接头带有硫原子。

[0398] 234. 项233所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分。

[0399] 235. 项234所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述不可切割接头来源于基于马来酰亚胺的部分, 选自: N-琥珀酰亚胺基-4-(马来酰亚胺甲基)-环己烷羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯)(LC-SMCC)、κ-马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、γ-马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、ε-马来酰亚胺己酸N-羟琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α-马来酰亚胺乙酰基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基-4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、和N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPT)。

[0400] 236. 项235所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述不可切割接头是SMCC。

[0401] 237. 项233所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分。

[0402] 238. 项237所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述不可切割接头来源于基于卤代乙酰基的部分, 选自N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP)。

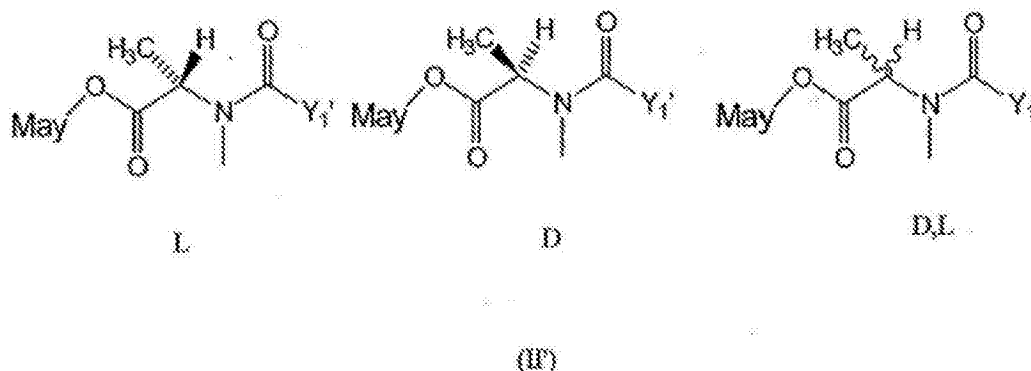
[0403] 239. 项238所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述不可切割接头来源于SIAB。

[0404] 240. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述接头位于至少一个美登木素生物碱的C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基中的任一处。

[0405] 241. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

[0406] 242. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

[0407] 243. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II'-L)、(II'-D)或(II'-D,L):



[0409] 其中:

[0410] Y_1' 代表

[0411] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m Du (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0412] 其中:

[0413] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0414] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

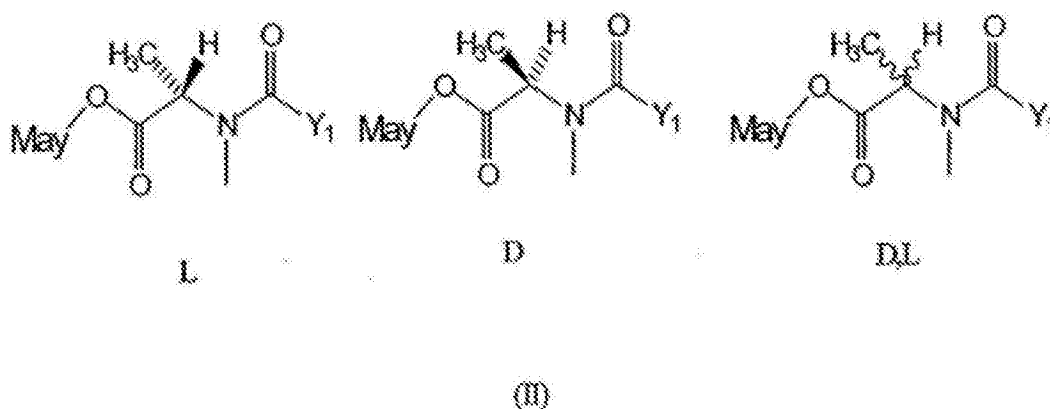
[0415] l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0;和

[0416] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0417] 244. 项243所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0418] 245. 项243所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H,l和m的每一个是1,并且n是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H,l和m是1,并且n是0。

[0419] 246. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II-L)、(II-D)或(II-D,L):



[0421] 其中:

[0422] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1 (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,其中:

[0423] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;

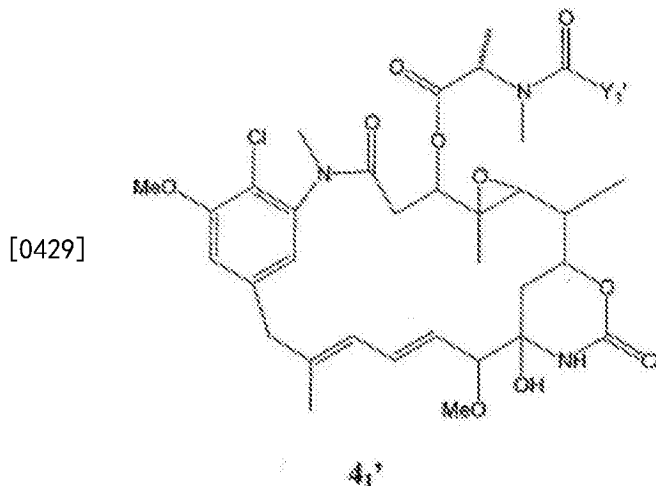
[0424] l、m和n的每一个独立地是从1至5的整数,此外,n可以是0;和

[0425] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0426] 247. 项246所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0427] 248. 项246所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1, 并且 n 是0; 或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1, 并且 n 是0。

[0428] 249. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式41' :



[0430] 其中:

[0431] Y_1' 代表

[0432] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0433] 其中:

[0434] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0435] A、B和D, 每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

[0436] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 的每一个独立地是0或从1至5的整数, 只要 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 中的至少两个不同时为0; 和

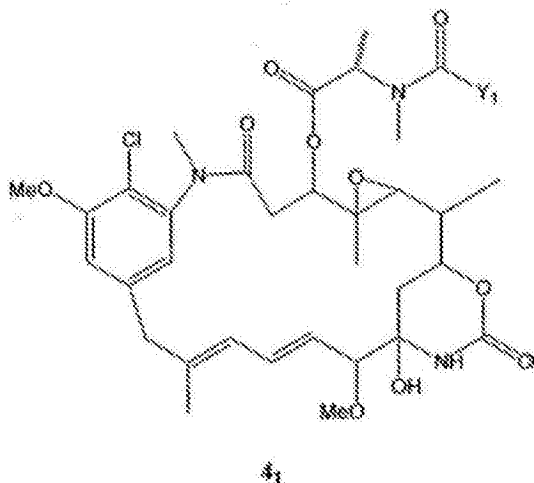
[0437] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0438] 250. 项249所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H, 或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0439] 251. 项249所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1, 并且 n 是0; 或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1, 并且 n 是0。

[0440] 252. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为41:

[0441]



[0442] 其中:

[0443] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1(CR_5CR_6)_m(CR_3CR_4)_nCR_1R_2S-$, 其中:[0444] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;和[0445] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0。[0446] 253. 项252所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。[0447] 254. 项252所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

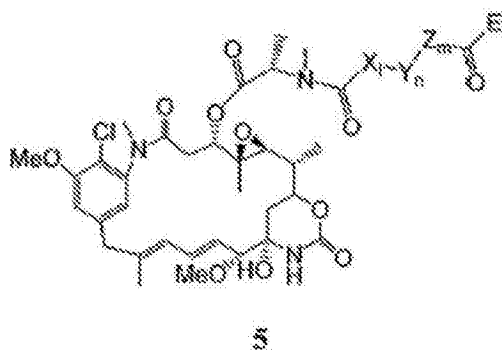
[0448] 255. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM1。

[0449] 256. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM3。

[0450] 257. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM4。

[0451] 258. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式5化合物:

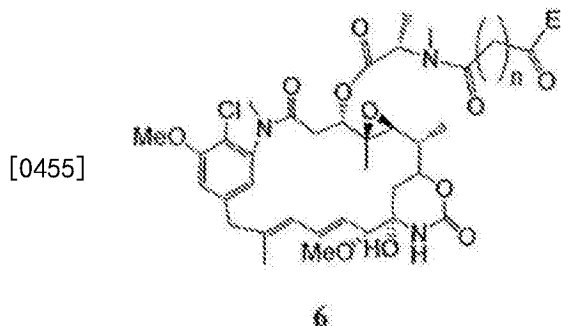
[0452]



[0453] 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基,Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基,或取代的或

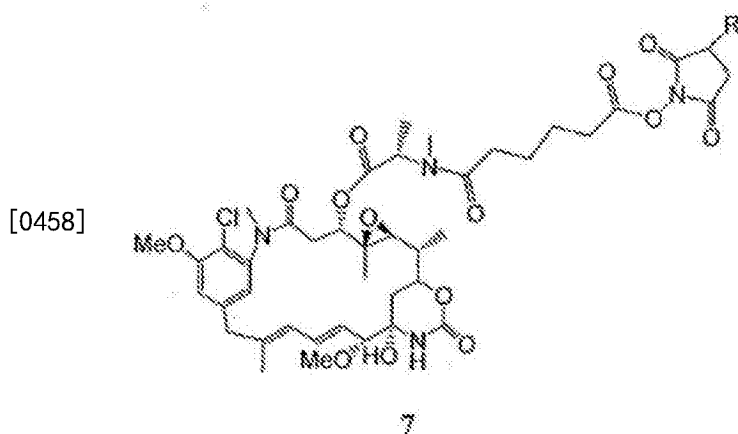
未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且l、m和n的每一个是0或1,条件是它们不同时均为0;以及E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

[0454] 259. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式6化合物:



[0456] 其中n代表从3至24的整数,并且E和羰基一同形成活性酯如 N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

[0457] 260. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式7化合物:



[0459] 其中R是H或 $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ 。

[0460] 261. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂结合于肿瘤细胞;病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自体免疫细胞、活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞、或黑素细胞;表达CD33、CD19、CanAg、CALLA、或Her-2抗原的细胞;或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体或叶酸受体的细胞。

[0461] 262. 项261所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂结合于细胞,所述细胞选自:乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、直肠癌细胞、胃癌细胞、鳞癌细胞、小细胞肺癌细胞、睾丸癌细胞、和神经母细胞瘤细胞。

[0462] 263. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特

异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体、抗体片段,特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、单克隆抗体片段,特异地和靶细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段,特异地和靶细胞结合的结构区抗体、结构区抗体片段,淋巴因子,激素,维生素,生长因子,集落刺激因子或营养物运输分子。

[0463] 264.项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子或营养物运输分子

[0464] 265.项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是干扰素、IL2、IL3、IL4、IL6、胰岛素、促甲状腺激素释放激素、黑素细胞刺激素、类固醇激素、生长激素释放抑制因子、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、MCSF、GM-CSF、叶酸、转铁蛋白、雌激素、雌激素类似物、雄激素、或雄激素类似物。

[0465] 266.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体或抗体片段。

[0466] 267.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的抗体、表面重构的单链抗体、或表面重构的抗体片段。

[0467] 268.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的人源化的抗体、人源化的单链抗体、或人源化的抗体片段。

[0468] 269.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0469] 270.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0470] 271.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0471] 272.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0472] 273.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0473] 274.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0474] 275.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0475] 276.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0476] 277.项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0477] 278. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的表面重构的单 克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片 段。

[0478] 279. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的人源化的单克 隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0479] 280. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的表面重构的单 克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片 段。

[0480] 281. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是特异地和乳腺癌细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源 化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0481] 282. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是抗-CanAg抗体、抗CD-19抗体、抗CD-33抗体、抗CALLA 抗体、抗EGFR抗体、抗CD-56抗体、抗 IGF-IR抗体、或抗Her2抗 体。

[0482] 283. 项282所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 美登木素生物碱是DM1、DM2或DM3。

[0483] 284. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是表面重构的抗体My9-6、KS77、或N901。

[0484] 285. 项284所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 美登木素生物碱是DM1、DM2或DM3。

[0485] 286. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是曲妥珠单抗、B4抗体或huC242抗体。

[0486] 287. 项286所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 美登木素生物碱是DM1、DM2或DM3。

[0487] 288. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是huC242抗体。

[0488] 289. 项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其中所述 细胞结合剂是表面重构的C242抗体。

[0489] 290. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其 中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱 的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的 细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的毒性较低。

[0490] 291. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其 中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的血浆清除和单独的抗体大 约相同。

[0491] 292. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其 中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱 的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的 细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的最大耐受剂量较高。

[0492] 293. 项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其 中与包括至少一

个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱 的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的 细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的生物活性持久性较高。

[0493] 294.项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其 中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱 的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的 细胞结合剂美登木素生物碱偶联物对抗原阴性细胞的活性较低。

[0494] 295.项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,其 中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物显示出最小的旁观者效应。

[0495] 296.组合物,包括项226所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联 物和载体。

[0496] 297.组合物,包括项227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联 物和载体。

[0497] 298.项296或297所述的组合物,其中所述不可切割接头基本上 抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割 或二硫键切割。

[0498] 299.项296或297所述的组合物,其中所述不可切割接头不带有 硫原子。

[0499] 300.项299所述的组合物,其中所述接头来源于基于二羧酸的部 分。

[0500] 301.项300所述的组合物,其中所述接头来源于基于 α, ω -二羧酸 的部分,其中所述 α, ω -二羧酸的通式是 $\text{HOOC}-\text{X}_1-\text{Y}_n-\text{Z}_m-\text{COOH}$,其 中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基,Y是 具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的 取代的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子 选自N、O或S,并且其中l、m和n的每一个是0或1,条件是它们 不同时均为0。

[0501] 302.项301所述的组合物,其中所述 α, ω -二羧酸是己二酸、戊 二酸、庚二酸、己烯-1,6-二酸、戊烯-1,5-二酸、环己烷-二酸或环己烯- 二酸。

[0502] 303.项296或297所述的组合物,其中所述不可切割接头带有硫 原子。

[0503] 304.项303所述的组合物,其中所述不可切割接头来源于基于马 来酰亚胺的部分。

[0504] 305.项304所述的组合物,其中所述不可切割接头来源于基于马 来酰亚胺的部分,选自:N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷 羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧 基-(6-酰氨基己酸酯)(LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺十一 烷酸N-琥珀酰亚 胺基酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -马来酰 亚胺己酸N-羟琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基 -N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰基)-琥珀酰亚胺 酯(AMAS)、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰胺 基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、和N-(p-马来 酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)。

[0505] 306.项305所述的组合物,其中所述不可切割接头是SMCC。

[0506] 307.项303所述的组合物,其中所述不可切割接头来源于基于卤 代乙酰基的部分。

[0507] 308.项307所述的组合物,其中所述不可切割接头来源于基于卤 代乙酰基的部分,选自N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯 (SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯 (SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP)。

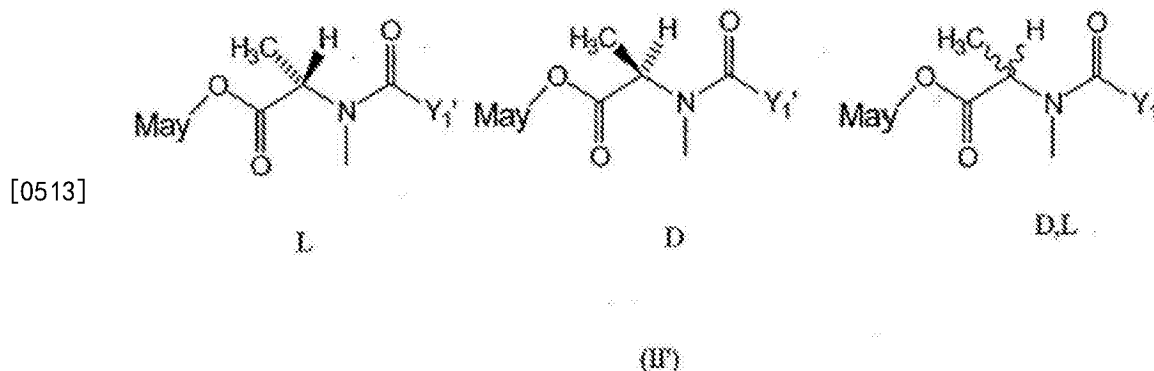
[0508] 309. 项308所述的组合物, 其中所述不可切割接头来源于SIAB。

[0509] 310. 项296或297所述的组合物, 其中所述接头位于至少一个美登木素生物碱的C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基中的任一处。

[0510] 311. 项296或297所述的组合物, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯。

[0511] 312. 项296或297所述的组合物, 其中所述至少一个美登木素生物碱是美登木醇的含N-甲基-半胱氨酸的酯。

[0512] 313. 项296或297所述的组合物, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II'-L)、(II'-D)或(II'-D,L):



[0514] 其中:

[0515] Y_1' 代表

[0516] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m Du (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0517] 其中:

[0518] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基, 此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

[0519] A、B和D, 每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;

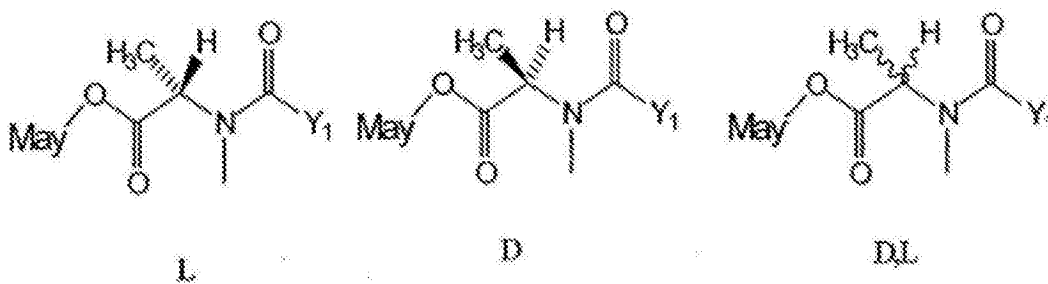
[0520] l、m、n、o、p、q、r、s、t和u的每一个独立地是0或从1至5的整数, 只要l、m、n、o、p、q、r、s、t和u中的至少两个不同时为0; 和

[0521] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处带有侧链的美登木素生物碱。

[0522] 314. 项313所述的组合物, 其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H, 或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0523] 315. 项313所述的组合物, 其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l和m的每一个是1, 并且n是0; 或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l和m是1, 并且n是0。

[0524] 316. 项296或299所述的组合物, 其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式(II-L)、(II-D)或(II-D,L):



[0525]

(III)

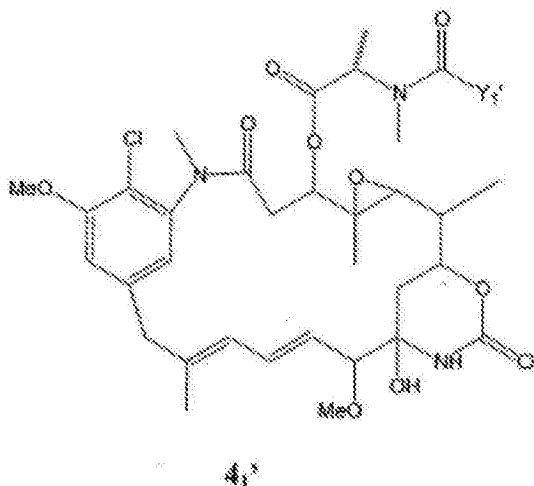
[0526] 其中:

[0527] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_1 (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$, 其中:[0528] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;[0529] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0; 和

[0530] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基处 带有侧链的美登木素生物碱。

[0531] 317. 项316所述的组合物,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。[0532] 318. 项316所述的组合物,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

[0533] 319. 项296或297所述的组合物,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为式41' :



[0534]

[0535] 其中:

[0536] Y_1' 代表[0537] $(CR_7CR_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5CR_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$,

[0538] 其中:

[0539] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳

原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_{12} 可以是H;

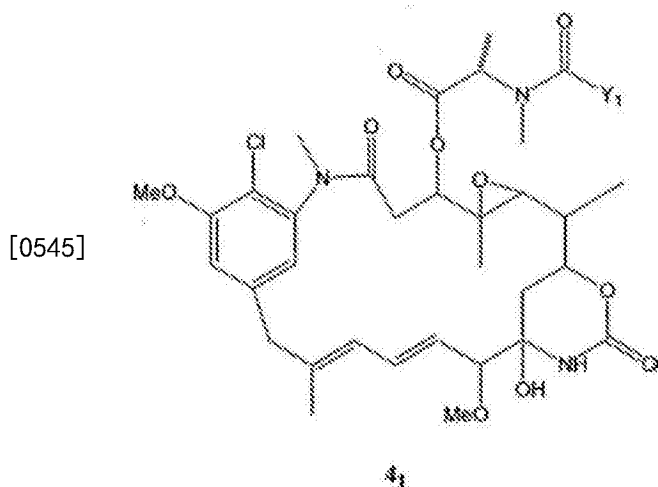
[0540] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基;和

[0541] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 中的至少两个不同时为0。

[0542] 320.项319所述的组合物,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0543] 321.项319所述的组合物,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

[0544] 322.项296或297所述的组合物,其中所述至少一个美登木素生物碱被表示为41:



[0546] 其中:

[0547] Y_1 代表 $(CR_7CR_8)_l (CR_5CR_6)_m (CR_3CR_4)_n CR_1R_2S-$, 其中:

[0548] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H;和

[0549] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0。

[0550] 323.项323所述的组合物,其中所述 R_1 是甲基并且 R_2 是H,或 R_1 和 R_2 是甲基。

[0551] 324.项323所述的组合物,其中所述 R_1 是甲基, R_2 是H, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;或其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0。

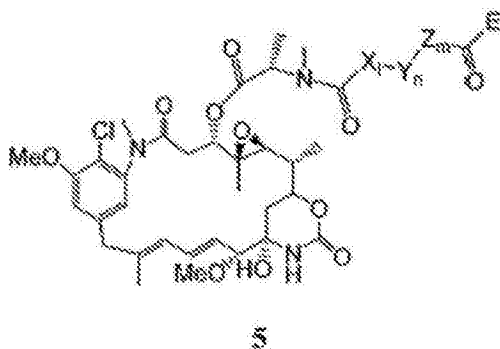
[0552] 325.项296或297所述的组合物,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM1。

[0553] 326.项296或297所述的组合物,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM3。

[0554] 327.项296或297所述的组合物,其中所述至少一个美登木素生物碱是DM4。

[0555] 328.项296或297所述的组合物,其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱,得到式5化合物:

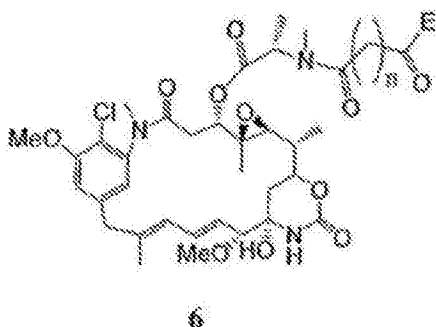
[0556]



[0557] 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基，Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基，Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基，或取代的或未取代的杂环基团，其中杂原子选自N、O或S，并且l、m和n的每一个是0或1，条件是它们不同时均为0；以及E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯，和磺酰基四氟苯酯。

[0558] 329. 项296或297所述的组合物，其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱，得到式6化合物：

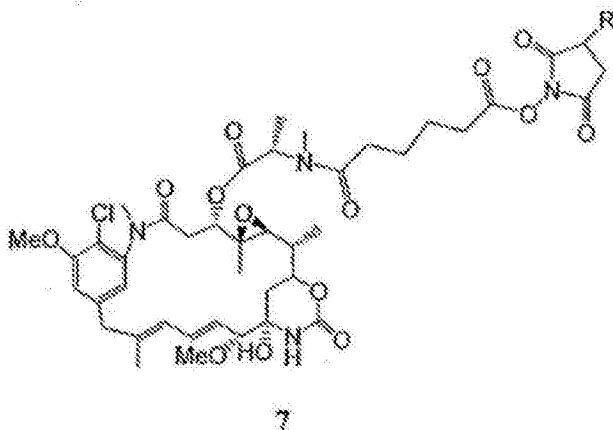
[0559]



[0560] 其中n代表从3至24的整数，并且E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯，和磺酰基四氟苯酯。

[0561] 330. 项296或297所述的组合物，其中用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱，得到式7化合物：

[0562]



[0563] 其中R是H或 SO_3^-Na^+ 。

[0564] 331. 项296或297所述的组合物, 其中所述细胞结合剂结合于肿瘤细胞; 病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自体免疫细胞、活化细胞、骨髓细胞、活化的T细胞、B细胞、或黑素细胞; 表达CD33、CD19、CanAg、CALLA、或Her-2抗原的细胞; 或表达胰岛素生长因子受体、表皮生长因子受体或叶酸受体的细胞。

[0565] 332. 项331所述的组合物, 其中所述细胞结合剂结合于细胞, 所述细胞选自: 乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、卵巢癌细胞、直肠癌细胞、胃癌细胞、鳞癌细胞、小细胞肺癌细胞、睾丸癌细胞、和神经母细胞瘤细胞。

[0566] 333. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体、抗体片段, 特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、单克隆抗体片段, 特异地和靶细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段, 特异地和靶细胞结合的结构区抗体、结构区抗体片段, 淋巴因子, 激素, 维生素, 生长因子, 集落刺激因子或营养物质运输分子。

[0567] 334. 项296或297所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是淋巴因子、激素、维生素、生长因子、集落刺激因子或营养物质运输分子。

[0568] 335. 项296或297所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是干扰素、IL2、IL3、IL4、IL6、胰岛素、促甲状腺激素释放激素、黑素细胞刺激素、类固醇激素、生长激素释放抑制因子、EGF、TGF- α 、FGF、G-CSF、VEGF、MCSF、GM-CSF、叶酸、转铁蛋白、雌激素、雌激素类似物、雄激素、或雄激素类似物。

[0569] 336. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的抗体、单链抗体或抗体片段。

[0570] 337. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的抗体、表面重构的单链抗体、或表面重构的抗体片段。

[0571] 338. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的人源化的抗体、人源化的单链抗体、或人源化的抗体片段。

[0572] 339. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0573] 340. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0574] 341. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0575] 342. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和靶细胞结合的嵌合抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0576] 343. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0577] 344. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0578] 345. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0579] 346. 项296所述的组合物, 其中所述细胞结合剂是特异地和肿瘤细胞结合的嵌合

抗体、嵌合抗体片段、结构区抗体、或结构区抗体片段。

[0580] 347. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的单克隆抗体、单链单克隆抗体、或单克隆抗体片段。

[0581] 348. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0582] 349. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0583] 350. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是特异地和直肠癌细胞或乳腺癌细胞结合的表面重构的单克隆抗体、表面重构的单链单克隆抗体、或表面重构的单克隆抗体片段。

[0584] 351. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是特异地和乳腺癌细胞结合的人源化的单克隆抗体、人源化的单链单克隆抗体、或人源化的单克隆抗体片段。

[0585] 352. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是抗-CanAg抗体、抗CD-19抗体、抗CD-33抗体、抗CALLA抗体、抗EGFR抗体、抗CD-56抗体、抗IGF-1R抗体、或抗Her2抗体。

[0586] 353. 项352所述的组合物,其中所述美登木素生物碱是DM1、DM2 或DM3。

[0587] 354. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是表面重构的抗体My9-6、KS77、或N901。

[0588] 355. 项354所述的组合物,其中所述美登木素生物碱是DM1、DM2 或DM3。

[0589] 356. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是曲妥珠单抗、B4抗体或huC242抗体。

[0590] 357. 项356所述的组合物,其中所述美登木素生物碱是DM1、DM2 或DM3。

[0591] 358. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是huC242抗体。

[0592] 359. 项296所述的组合物,其中所述细胞结合剂是表面重构的C242抗体。

[0593] 360. 项296或297所述的组合物,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的毒性较低。

[0594] 361. 项296或297所述的组合物,其中所述细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的血浆清除和单独的抗体大约相同。

[0595] 362. 项296或297所述的组合物,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的最大耐受剂量较高。

[0596] 363. 项296或297所述的组合物,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的生物活性持久性较高。

[0597] 364. 项296或297所述的组合物,其中与包括至少一个经可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比,所述包括不可切割接头的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物对抗原阴性细胞的活性较低。

[0598] 365. 项296或297所述的组合物, 其中所述细胞结合剂美登木素 生物碱偶联物显示出最小的旁观者效应。

[0599] 366. 制备项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物 的方法, 所述方法包括:

[0600] (a) 提供细胞结合剂

[0601] (b) 用交联剂修饰所述细胞结合剂, 和

[0602] (c) 连接修饰的细胞结合剂和美登木素生物碱或含硫醇美登 木素生物碱, 从而在细胞结合剂和美登木素生物碱或含硫醇美登木素 生物碱之间提供不可切割接头, 生成偶联物。

[0603] 367. 制备项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物 的方法, 所述方法包括:

[0604] (a) 提供美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱,

[0605] (b) 用交联剂修饰所述美登木素生物碱或含硫醇美登木素生 物碱, 从而形成不可切割接头, 和

[0606] (c) 连接修饰的美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱以 及细胞结合剂, 从而在细胞结合剂和美登木素生物碱或含硫醇美登木 素生物碱之间提供不可切割接头, 生成偶联物。

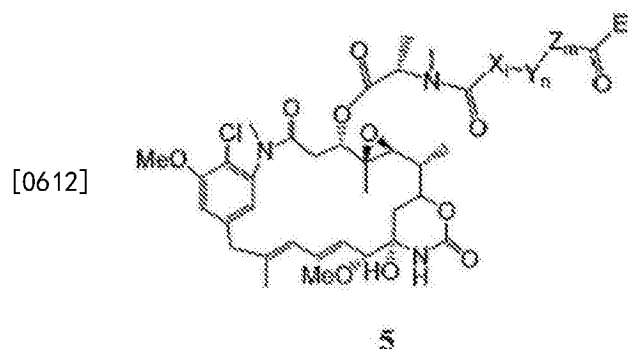
[0607] 368. 制备项226或227所述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物 的方法, 所述方法包括:

[0608] (a) 提供美登木素生物碱,

[0609] (b) 用不含硫的交联剂修饰所述美登木素生物碱, 产生美登木 素生物碱的酯, 和

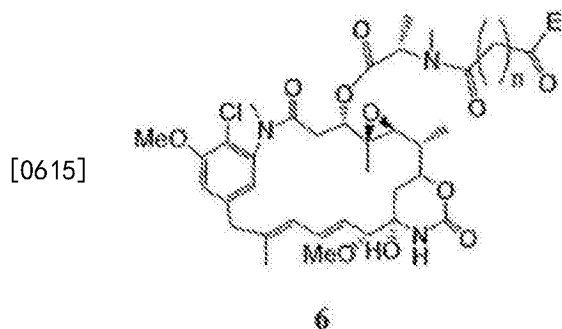
[0610] (c) 连接所述美登木素生物碱的酯和细胞结合剂, 从而在细胞 结合剂和美登木素生物碱之间提供不可切割接头, 生成偶联物。

[0611] 369. 式5化合物:



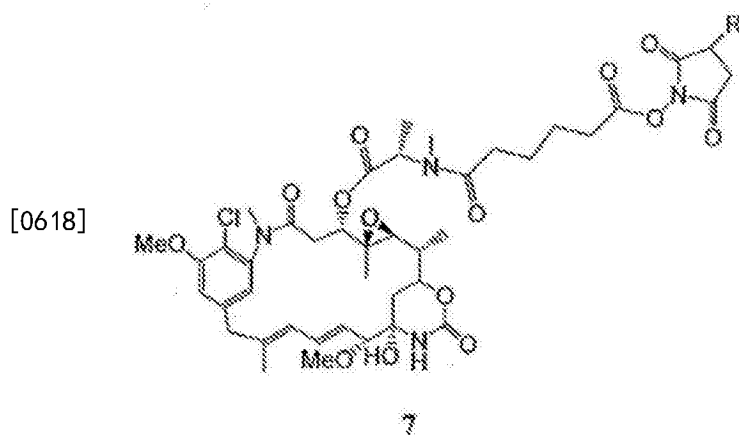
[0613] 其中X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基, Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基, Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基, 或取代的或未取代的杂环基团, 其中杂原子选自N、O或S, 并且l、m和n的每一个是0或1, 条件是它们不同时均为0; 以及E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯, 和磺酰基四氟苯酯。

[0614] 370.式6化合物:



[0616] 其中n代表从3至24的整数,并且E和羰基一同形成活性酯如 N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯、邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯, 和磺酰基四氟苯酯。

[0617] 371.式7化合物:



[0619] 其中R是H或 $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ 。

[0620] 372.下式的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物:

[0621] 曲妥珠单抗-SMCC-美登木素生物碱。

[0622] 373.下式的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物:

[0623] 曲妥珠单抗-SMCC-DM1。

[0624] 374.下式的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物:

[0625] huC242-SMCC-美登木素生物碱。

[0626] 375.下式的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物:

[0627] huC242-SMCC-DM1。

[0628] 附图简述

[0629] 图1显示了SMCC的结构。

[0630] 图2显示了DM1的结构。

[0631] 图3以图形显示了FACS结合试验 (FACS binding assay) 的结果,该 试验比较 huC242抗体和抗体-美登木素生物碱偶联物 huC242-SMCC-DM1。

[0632] 图4以图形显示了huC242-SMCC-DM1的细胞毒性。

[0633] 图5显示了 huC242-SMCC-DM1 的尺寸排阻色谱 (size exclusion

chromatography)。

[0634] 图6A-C和图7以图形显示了,与用含二硫的接头制备的偶联物相比,huC242-SMCC-DM1的细胞毒性。

[0635] 图8A-D以图形显示了连接于多种细胞结合剂的SMCC-DM1偶联物的细胞毒性。

[0636] 图9以图形显示了抗体-美登木素生物碱偶联物 huC242-SIAB-DM1的细胞毒性。

[0637] 图10A以图形显示了,huC242-SMCC-DM1对抗SCID小鼠中的 COLO205人结肠癌异种移植物(xenografts)的抗肿瘤活性。

[0638] 图10B以图形显示了,huC242-SMCC-DM1对抗SCID小鼠中的 SUN16人胃肿瘤异种移植物的抗肿瘤活性。

[0639] 图10C以图形显示了,曲妥珠单抗-SMCC-DM1 (trastuzumab-SMCC-DM1)对抗SCID小鼠中的人MCF7肿瘤异种移植物的抗肿瘤效应。

[0640] 图11以图形显示了,与用含二硫的接头制备的偶联物相比, huC242-SMCC-DM1的血浆清除率。

[0641] 图12A-D以图形显示了,与用含二硫的接头制备的偶联物相比, huC242-SMCC-DM1的急性毒性试验(acute toxicity studies)的结果。

[0642] 图13显示了,与用含二硫的接头制备的偶联物相比, huC242-SMCC-DM1显示的细胞周期停滞(cell cycle arrest)和细胞破坏活性的持久性。

[0643] 图14A-C显示了用含二硫的接头制备的偶联物相比, huC242-SMCC-DM1的最小旁观者效应(bystander effect)活性。

[0644] 图15显示了基于马来酰亚胺(maleimido)的交联剂(cross-linking agent)的代表性结构。

[0645] 图16显示了基于卤代乙酰基(haloacetyl)的交联剂的代表性结构。

[0646] 图17显示了抗体-SMCC-DM1偶联物的结构。

[0647] 图18显示了抗体-SIAB-DM1偶联物的结构。

[0648] 图19显示了抗体-SMCC-DM4偶联物的结构。

[0649] 图20显示了抗体-SIAB-DM4偶联物的结构。

[0650] 图21显示了经不含S的不可切割接头连接的美登木素生物碱细胞结合剂偶联物的合成过程。

[0651] 图22以图形显示了huC242-不含S的不可切割接头-DM1的细胞毒性。

[0652] 图23以图形显示了huC242-不含S的不可切割接头-DM1的FACS结合试验结果。

[0653] 图24以图形显示了HER2ECD平板结合试验的结果,将曲妥珠单抗和抗体-美登木素生物碱偶联物曲妥珠单抗-SMCC-DM1相比较。

[0654] 图25以图形显示了曲妥珠单抗-SMCC-DM1的细胞毒性和特异性。

[0655] 图26显示了曲妥珠单抗-SMCC-DM1的尺寸排阻色谱。

[0656] 图27以图形显示了HER2ECD平板结合试验的结果,将曲妥珠单抗和抗体-美登木素生物碱偶联物曲妥珠单抗-SIAB-DM1相比较。

[0657] 图28以图形显示了曲妥珠单抗-SIAB-DM1的细胞毒性和特异性。

[0658] 图29显示了曲妥珠单抗-SIAB-DM1的尺寸排阻色谱。

[0659] 本发明代表性实施方案详述

[0660] 本领域揭示了,修饰现有药物而不减低其细胞毒性潜能,是极端困难的。然而,美国专利6,441,163 B1、6,333,410 B1、5,416,064和 5,208,020证明,可以经可切割接头,特别是含二硫基团的可切割接头,将美登木素生物碱连接于合适的细胞结合剂,产生有效的细胞毒剂。细胞结合剂美登木素生物碱偶联物使美登木素生物碱的细胞毒性作用充分地以靶向方式被应用,仅对抗不需要的细胞,从而避免了由于损害非靶向的健康细胞造成的副作用。

[0661] 本发明人出乎意料地发现,经不可切割接头连接于细胞结合剂的美登木素生物碱,在几个重要方面优于经可切割接头连接的美登木素生物碱。具体来说,当和含有可切割接头的偶联物相比时,带有不可切割接头的偶联物显示了同等的体外和体内抗肿瘤活性,而在血浆清除率和毒性方面,带有不可切割接头的偶联物显示了显著的降低。

[0662] 因此,本发明提供了改进的方法,用于靶向细胞,特别是欲被破坏的细胞如肿瘤细胞(特别是实体瘤细胞)、病毒感染细胞、微生物感染细胞、寄生虫感染细胞、自体免疫细胞(产生自身抗体的细胞)、活化细胞(参与移植排斥或移植抗宿主病的那些细胞)、或任何其它形式的患病或非正常细胞,同时显示出最小的副作用。

[0663] 用于本发明方法的偶联物带有一个或多个美登木素生物碱,通过不可切割的接头连接于细胞结合剂。在制备偶联物的一种方法中,首先用交联剂如SMCC修饰细胞结合剂,例如抗体。在第二步中,带有硫醇基团的活性美登木素生物碱,如DM1,和修饰的抗体反应,产生抗体-美登木素生物碱偶联物。选择性地,可以用交联剂修饰美登木素生物碱,随后使美登木素生物碱和细胞结合剂反应。参见,例如,美国专利6,441,163 B1号。

[0664] 合适的美登木素生物碱

[0665] 适用于本发明的美登木素生物碱在本领域中是已知的,并且可以根据已知方法从天然来源分离,用遗传工程技术生产(参见,Yu等人, 99 PNAS 7968-7973(2002)),或根据已知方法合成制备。

[0666] 合适的美登木素生物碱的例子包括美登木醇和美登木醇类似物(analogues)。合适的美登木醇类似物的例子包括包括那些具有修饰的芳环和那些在其它位置带有修饰的化合物。

[0667] 具有修饰的芳环的合适的美登木醇类似物的具体例子包括:

[0668] (1) C-19-脱氯(美国专利4,256,746号)(经安丝菌素P2的LAH还原而制备);

[0669] (2) C-20-羟基(或C-20-去甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利4,361,650和4,307,016号)(用链霉菌(*Streptomyces*)或放线菌(*Actinomyces*)经去甲基化,或用LAH经脱氯化而制备);和

[0670] (3) C-20-脱甲氧基,C-20-酰氧基(-OCOR),+/-脱氯(美国专利4,294,757号)(用酰基氯经酰化作用而制备)。

[0671] 在其它位置有修饰的合适的美登木醇类似物的具体例子包括:

[0672] (1) C-9-SH(美国专利4,424,219号)(通过美登木醇与H₂S或P₂S₅反应而制备);

[0673] (2) C-14-烷氧甲基(去甲氧基/CH₂OR)(美国专利4,331,598号);

[0674] (3) C-14-羟甲基或酰氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利4,450,254号)(从诺卡氏菌属(*Nocardia*)制备);

[0675] (4) C-15-羟基/酰氧基(美国专利4,364,866号)(由链霉菌经美登木醇的转化而

制备)；

[0676] (5) C-15-甲氧基(美国专利4,313,946和4,315,929号)(从滑桃树(*Trewia nudiflora*)分离)；

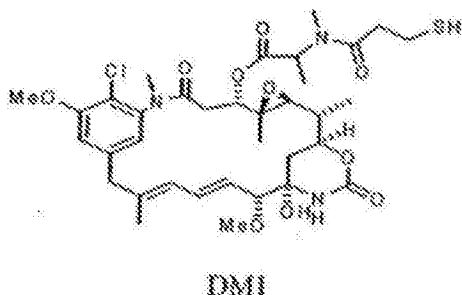
[0677] (6) C-18-N-去甲基(美国专利4,362,663和4,322,348号)(由链霉菌进行美登木醇去甲基化而制备)；和

[0678] (7) 4,5-脱氧(美国专利4,371,533号)(经美登木醇的三氯化肽 /LAH还原而制备)。

[0679] 已知美登木醇上的许多位点用作连接位点,这取决于连接的类型。例如,对于形成酯键,带有羟基的C-3位点、用羟甲基修饰的C-14位点、用羟基修饰的C-15位点和带有羟基的C-20位点,都是合适的。然而C-3位点是优选的,并且美登木醇的C-3位点是特别优选的。

[0680] 根据本发明,优选的美登木素生物碱具有游离的硫醇基团。包括游离硫醇基团的特别优选的美登木素生物碱包括含N-甲基-丙氨酸的酯,美登木醇的含N-甲基-半胱氨酸的酯是美登木醇及其类似物的C-3酯。优选的酯包括美登木醇的含N-甲基-丙氨酸的酯和含N-甲基-半胱氨酸的酯。带有硫醇基团的美登木醇酯的合成方法在以前已经描述过,例如美国专利5,208,020,Chari等人,52Cancer Res.,127-131(1992),和Liu等人,93Proc Natl.Acad.Sci.,8618-8623(1996)。此外,美国专利6,333,410 B1,其全部公开内容在此并入作为参考,提供了制备和纯化含硫醇美登木素生物碱的方法,所述美登木素生物碱适于和细胞结合剂连接。

[0681] 下面示例的本发明的许多偶联物应用含硫醇美登木素生物碱DM1,正式的命名是N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-(3-巯基-1-氧丙基)-美登素。DM1由下列结构式表示:

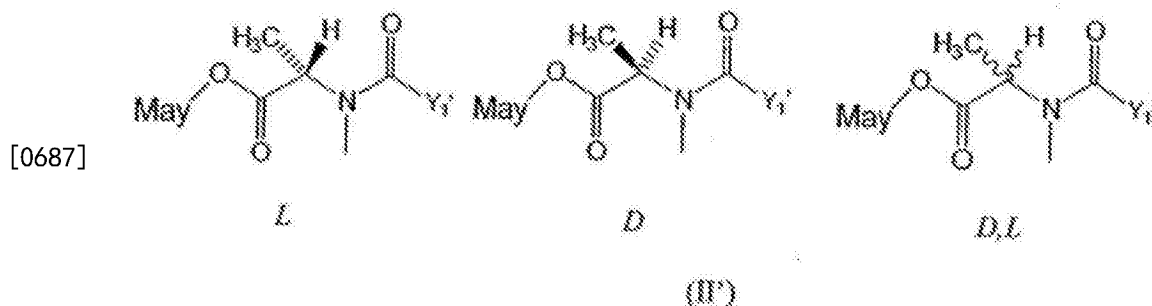


[0683] 含硫醇的美登木素生物碱DM1的合成方法在以前已经描述过(美国专利5,208,020号)。

[0684] 美国专利申请10/849,136,其全部公开内容在此并入作为参考,描述了含空间位阻(sterically hindered)硫醇的美登木素生物碱,其在带有硫醇官能团的 α -碳上具有一个或两个烷基取代基。此外,带有巯基的美登木素生物碱的酰化的氨基酸侧链的酰基,在酰胺的羰基和硫原子之间,具有至少3个碳原子的线性链长度。这些新颖的美登木素生物碱适用于本发明。

[0685] 可以参照美国专利申请10/849,136,特别是其中的图3,描述具有空间位阻硫醇基团的美登木素生物碱的合成方法。

[0686] 在本发明的一个方面,美登木素生物碱含有空间位阻的硫醇基团,并且被表示为式(II'-L)、(II'-D)或(II'-D,L):



[0688] 在式(II')中,

[0689] Y_1' 代表

[0690] $(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5R_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3R_4)_n CR_1R_2SH$.

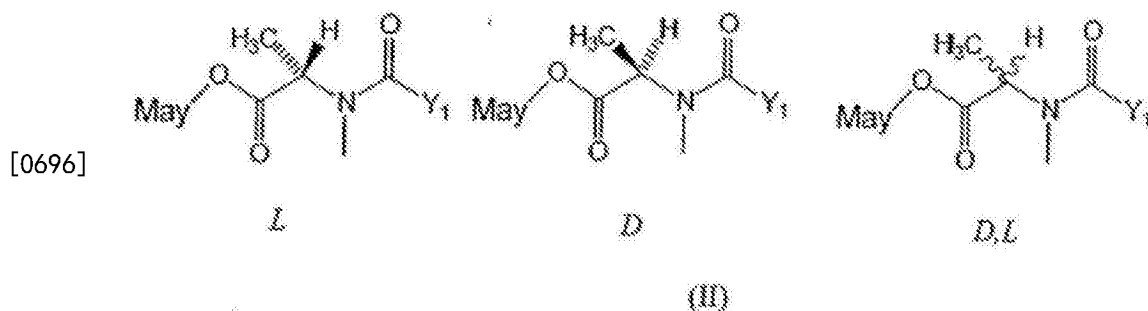
[0691] A、B和D,每一个独立地是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基、简单的或取代的芳基、或杂环芳基或杂环烷基。

[0692] R_1 至 R_{12} 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_{12} 可以是H。

[0693] l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 的每一个独立地是0或从1至5的整数,只要 l 、 m 、 n 、 o 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 和 u 中的至少两个不同时为0。

[0694] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基(desmethyl)处带有侧链的美登木素生物碱。

[0695] 用于本发明的另一种美登木素生物碱被表示为式(II-L)、(II-D)或(II-D,L):



[0697] 在式(II)中,

[0698] Y_1 代表 $(CR_7R_8)_1 (CR_5R_6)_m (CR_3R_4)_n CR_1R_2SH$ 。

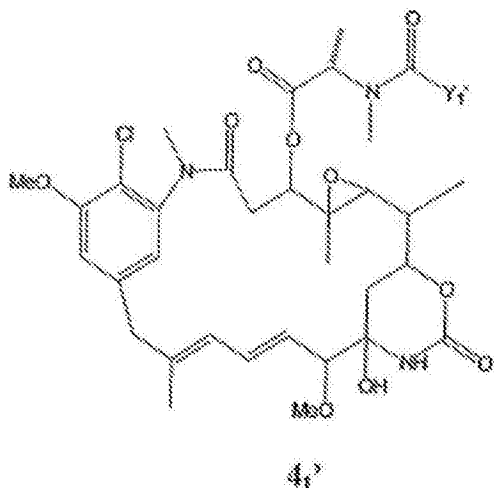
[0699] R_1 至 R_8 每一个独立地是具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基、具有3至10个碳原子的分支的或环状的烷基或烯基、苯基、取代的苯基或杂环芳基或杂环烷基,此外, R_2 至 R_8 可以是H。

[0700] l 、 m 和 n 的每一个独立地是从1至5的整数,此外, n 可以是0。

[0701] May代表在C-3羟基、C-14羟甲基、C-15羟基或C-20去甲基(desmethyl)处带有侧链的美登木醇。

[0702] 另一有用的美登木素生物碱被表示为式4i' :

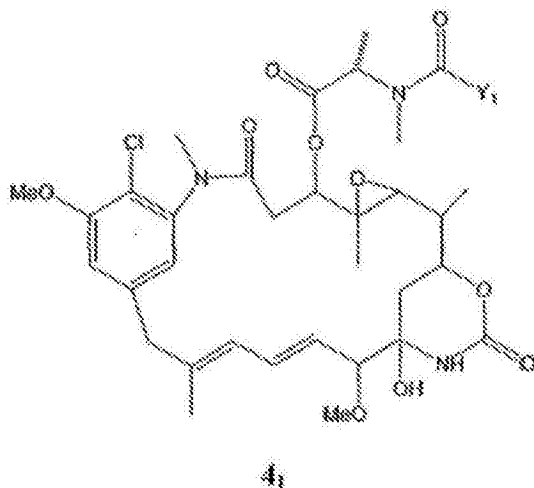
[0703]



[0704] 其中,取代基如上面的式(II')所定义。

[0705] 另一有用的美登木素生物碱被表示为式 4_t :

[0706]



[0707] 其中,取代基如上面的式(II)所定义。

[0708] 优选的是任意上述化合物,其中 R_1 是H并且 R_2 是甲基,或者 R_1 和 R_2 是甲基。

[0709] 特别优选的是任意上述化合物,其中 R_1 是H, R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 的每一个是1,并且 n 是0;和其中 R_1 和 R_2 是甲基, R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 的每一个是H, l 和 m 是1,并且 n 是0的那些化合物。

[0710] 进一步地,优选L-氨酰基立体异构体。

[0711] 具有1至10个碳原子的线性烷基或烯基的例子包括但不限于,甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、丙烯基、丁烯基和己烯基。

[0712] 具有3至10个碳原子的分支烷基或烯基的例子包括但不限于,异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、1-乙基丙基、异丁烯基和异戊烯基。

[0713] 具有3至10个碳原子的环状烷基或烯基的例子包括但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环戊烯基和环己烯基。

[0714] 简单的芳基(simple aryls)包括具有6至10个碳原子的芳基,取代的芳基包括具有6至10个碳原子的芳基,其带有至少一个含1至4个碳原子的烷基取代基,或烷氧基取代基如甲氧基、乙氧基,或卤素取代基或硝基取代基。

[0715] 含有6至10个碳原子的简单的芳基的例子包括但不限于苯基和萘基。

[0716] 取代的芳基的例子包括但不限于硝基苯基、二硝基苯基。

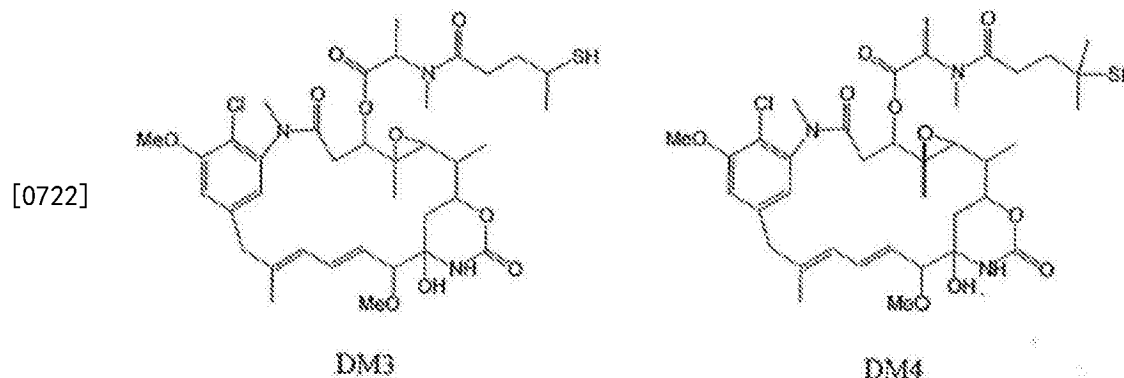
[0717] 杂环芳基包括具有3至10元环的基团,其含有一个或两个选自N、O或S的杂原子。

[0718] 杂环芳基的例子包括但不限于,吡啶基、硝基吡啶基、吡咯基 (pyrrolyl)、噁唑基、噻吩基、噻唑基和呋喃基。

[0719] 杂环烷基包括环状化合物,其包括3至10元环体系,包含一个或两个杂原子,选自N、O或S。

[0720] 杂环烷基的例子包括但不限于,二氢呋喃、四氢呋喃、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基和吗啉基(morpholino)。

[0721] 特别优选的、包括含有空间位阻硫醇键侧链的美登木素生物碱是美登木素生物碱N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-(4-巯基-1-氧戊基)-美登素(被称为DM3)和N^{2'}-脱乙酰-N^{2'}-(4-甲基-4-巯基-1-氧戊基)-美登素(被称为DM4)。DM3和DM4被表示为下列结构式:



[0723] 细胞结合剂

[0724] 本发明的化合物作为治疗剂的有效性取决于对合适的细胞结合剂的仔细选择。细胞结合剂可以是目前已知的,或是正在成为已知的任意种类,包括肽和非肽物质。通常地,它们可以是抗体(特别是单克隆抗体)、淋巴因子、激素、生长因子、维生素、营养输送分子(如转铁蛋白)、或特异地和靶结合的任意其它的细胞结合分子或物质。

[0725] 可以被应用的细胞结合剂的更具体的例子包括:

[0726] 多克隆抗体和单克隆抗体;包括完整的人抗体;

[0727] 单链抗体(多克隆抗体和单克隆抗体);

[0728] 抗体片段(多克隆抗体和单克隆抗体)如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv (Parham, 131J.Immunol.2895-2902(1983);Spring等人,113J.Immunol. 470-478(1974);Nisonoff等人,89Arch.Biochem.Biophys.230-244 (1960));

[0729] 嵌合抗体及其抗原结合片段;

[0730] 结构区抗体(domain antibodies) (dAbs)及其抗原结合片段,包括 camelid抗体(Desmyter等,3Nature Struct.Biol,752,1996);

[0731] 称作新抗原受体(new antigen receptors) (IgNAR)的鲨鱼抗体 (Greenberg等, 374Nature,168,1995;Stanfield等305 Science 1770-1773,2004);

[0732] 干扰素(例如, α 、 β 、 γ);

[0733] 淋巴因子如IL-2、IL-3、IL-4、IL-6;

[0734] 激素如胰岛素、TRH(促甲状腺激素释放激素)、MSH(黑素细胞刺激激素)、类固醇激素如雄激素和雌激素;

[0735] 生长因子和集落刺激因子如EGF、TGF- α 、FGF、VEGF、G-CSF、M-CSF和GM-CSF (Burgess, 5Immunology Today 155-158 (1984));

[0736] 转铁蛋白 (O'Keefe等, 260J. Biol. Chem. 932-937 (1985)); 和

[0737] 维生素, 如叶酸盐或酯。

[0738] 单克隆抗体技术使得以特异的单克隆抗体的形式产生极度特异的 细胞结合剂。在本领域中, 制备单克隆抗体的技术是特别公知的, 所述抗体是通过用感兴趣的抗原免疫小鼠、大鼠、仓鼠或任意其它的哺乳动物而产生的, 所述抗原例如完整的靶细胞、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衣壳蛋白。也可以应用致敏的人细胞。制备单克隆抗体的另一种方法是应用scFv (单链可变区) 噬菌体文库, 特别是人scFv噬菌体文库 (参见, 例如, Griffiths等, 美国专利5,885,793和5,969,108号; McCafferty等, WO 92/01047; Liming等, WO 99/06587)。此外, 也可以应用美国专利5,639,641号 中公开的表面重构抗体, 如可以应用人源化的抗体。

[0739] 对合适的细胞结合剂的选择, 取决于欲靶向的特定细胞群, 但通常地, 如果可以得到合适的人单克隆抗体, 则优选人单克隆抗体。

[0740] 例如, 单克隆抗体J5是鼠IgG2a抗体, 其对普通型急性淋巴细胞白血病抗原 (CALLA) 具有特异性 (Ritz等, 283Nature 583-585 (1980)), 如果靶细胞表达CALLA, 如在急性淋巴细胞白血病时, 可以应用该抗体。

[0741] 单克隆抗体MY9是鼠IgG₁抗体, 其特异性结合于CD33抗原 (J.D. Griffin等 8Leukemia Res., 521 (1984)), 如果靶细胞表达CD33, 例如 在急性骨髓性白血病 (AML) 中, 可以应用该抗体。

[0742] 类似地, 单克隆抗体抗B4, 也可以互换地称为B4, 是鼠IgG₁, 其结合于B细胞上的CD19抗原 (Nadler等, 131J. Immunol. 244-250 (1983)), 如果靶细胞是表达此抗原的B细胞或患病细胞, 例如在非霍奇金淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病中, 可以应用该抗体。

[0743] 此外, 单克隆抗体C242, 其结合于CanAg抗原 (美国专利5,552,293号), 可以用其治疗表达CanAg的肿瘤, 如直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和胃癌。HuC242是单克隆抗体C242的人源化形式, 在美国专利 5,552,293中描述, 其杂交瘤保藏于欧洲生物制品收藏中心 (ECACC), 保藏编号 (identification Number) 是90012601。人源化形式可以通过应用CDR-移植方法学 (CDR-grafting methodology) (美国专利5,585,089; 5,693,761和5,693,762号) 或表面重构方法学 (resurfacing methodology) (美国专利5,639,641号) 而制备。也可以用HuC242治疗表达CanAg的肿瘤, 如直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和胃癌。

[0744] 进一步地, 可以用抗体曲妥珠单抗治疗乳腺癌和其它癌症, 如表达Her2抗原的前列腺癌和卵巢癌。

[0745] 结合于胰岛素生长因子受体的抗-IGF-IR抗体也是有用的。

[0746] 可以用例如抗-MUCI抗体, 如抗-HMFG-2 (Taylor-Papadimitriou等, 28.Int. J. Cancer 17-21, 1981) 或hCTM01 (56 Cancer Res. 5179-5185, 1996) 和抗-PSMA (前列腺特异性膜抗原) 如J591 (Liu等 57 Cancer Res. 3629-3634, 1997), 分别成功地靶向于卵巢癌和前列腺癌。

[0747] 可以用非抗体分子靶向特定细胞群。例如, 可以将结合于骨髓细胞的GM-CSF用作细胞结合剂, 靶向于来自急性髓性白血病的患病细胞。此外, 可以用与活化的T细胞结合的

IL-2预防移植排斥,用以治疗和预防移植物抗宿主病和治疗急性T细胞白血病。可以用结合于黑素细胞的MSH治疗黑素瘤。可以用叶酸靶向于卵巢癌和其它肿瘤上表达的叶酸受体。可以用表皮生长因子(EGF)靶向于鳞癌如肺部和头部以及颈部的鳞癌。可以用生长激素释放抑制因子靶向神经母细胞瘤和其它肿瘤类型。可以分别用雌激素(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,成功地靶向乳腺癌和睾丸癌。

[0748] 交联剂(cross-linking reagent)

[0749] 美登木素生物碱是通过交联剂的方式连接于细胞结合剂的,所述交联剂在反应时,在美登木素生物碱和细胞结合剂之间形成不可切割接头。

[0750] 如此处所应用,“接头”(linker)是将细胞结合剂共价连接于美登木素生物碱的任何化学部分。在一些情况下,接头的一部分是美登木素生物碱提供的。例如,DM1,其为含硫醇美登木素生物碱(图2),是天然的美登木素生物碱——美登素的衍生物,并且提供了一部分接头。美登素C-3羟基处的侧链终止于 $-CO-CH_3$,DM1的侧链终止于 $-CO-CH_2-CH_2-SH$ 。因此,最终的接头是由两个部分组成的,交联剂被导入细胞结合剂和来自DM1的侧链中。

[0751] 可切割接头是,在适度条件下可以被切割的接头,即,在所述条件下,美登木素生物碱药物的活性未受影响。许多已知接头属于此范围内,描述于下。

[0752] 含二硫的接头是可以通过二硫交换(disulfide exchange)而切割的接头,这在生理条件下可以发生。

[0753] 酸不稳定接头是,在酸性pH下可切割的接头。例如,一些细胞内区室如胞内体(endosome)和溶酶体,具有酸性的pH值(pH 4-5),提供了适于切割酸不稳定接头的条件。

[0754] 在体表和可以接受光的许多体腔中,光不稳定接头是有用的。此外,红外光可以穿透组织。

[0755] 一些接头可以被肽酶切割。仅一些肽容易在细胞内或细胞外被切割。参见,Trouet等,79Proc.Natl.Acad.Sci.USA,626-629(1982)和 Umemoto等43Int.J.Cancer,677-684(1989)。此外,肽由 α -氨基酸和肽键组成,肽键在化学上是一个氨基酸的羧酸酯和第二个氨基酸的 α -氨基之间的酰胺键。其它的酰胺键,如赖氨酸的羧酸酯和 ϵ -氨基之间的键,被理解为不是肽键,并且被认为是不可切割的。

[0756] 一些接头可以被酯酶切割。同样地,仅一些酯可以被存在于细胞内和细胞外的酯酶切割。酯由羧酸和醇缩合形成。简单酯是简单醇生成的酯,如脂族醇以及小的环状醇和小的芳香醇。例如,本发明的发明人没有发现在美登素C-3处切割酯的酯酶,原因是该酯的醇组分美登木醇,是非常大和非常复杂的。

[0757] 不可切割的接头是,能够以稳定的共价方式将美登木素生物碱连接于细胞结合剂,并且不被归入如上列出的可切割接头范围的任何化学部分。因此,不可切割接头基本上抗酸诱导的切割、光诱导的切割、肽酶诱导的切割、酯酶诱导的切割和二硫键切割。

[0758] “基本上抗”(substantially resistant)切割意味着,在细胞结合剂美登木素生物碱偶联物群的至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、甚至更优选地至少95%、和最优选地至少99%中,接头中或与接头相连的化学键保持不被酸、光不稳定切割剂、肽酶、酯酶或化学或生理化合物所切割,所述化合物切割可切割接头中的化学键(如二硫键),持续时间是上述任何制剂处理几小时至几天内。

[0759] 此外,“不可切割”(non-cleavable)是指,在美登木素生物碱或细胞结合剂不丧

失其活性的条件下,接头中或与接头相连的化学键抵抗切割的能力,所述切割是由酸、光不稳定切割剂、肽酶、酯酶或切割二硫键的化学或生理化合物诱导的。

[0760] 本领域的普通技术人员将容易地将不可切割接头和可切割接头区分开来。

[0761] 用于检验一个接头是否基本上抗切割的合适对照物(control)的例子是,带有化学键如二硫键的接头,其对上述任意制剂的切割敏感。在从几小时至几天之间的时间段内,典型地是4小时至5天,通过用ELISA、HPLC或其它合适的方法测定偶联物的稳定性,可以检验接头是否基本上抗切割。可以用ELISA分析测定稳定的偶联物的血浆浓度水平。

[0762] 不可切割接头也被表征为,含有不可切割接头的偶联物的体内半衰期比含有可切割接头的偶联物的半衰期通常长大约20%。在 小鼠中,经不可切割接头连接的IgG-美登木素生物碱偶联物的体内半衰期是至少4天。

[0763] 在美登木素生物碱和细胞结合剂之间形成不可切割接头的合适的交联剂,是本领域中已知的,并且可以形成含有硫原子(如SMCC)或不带有硫原子的不可切割接头。

[0764] 在美登木素生物碱和细胞结合剂之间形成不可切割接头的优选的交联剂,包括基于马来酰亚胺或卤代乙酰基的部分。根据本发明,将这种不可切割接头表述为,来源于基于马来酰亚胺或卤代乙酰基的部分。包括基于马来酰亚胺部分的交联剂包括N-琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷羧酸酯(SMCC)、N-琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸酯),其为SMCC的“长链”类似物(LC-SMCC)、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、N-(α -马来酰亚胺乙酰基)-琥珀酰亚胺酯[AMAS]、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰基)己酸酯(SMPH)、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、和N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPT) (关于基于马来酰亚胺的交联剂的代表性结构,参见图15)。这些交联剂形成不可切割接头,所述接头来源于基于马来酰亚胺的部分。

[0765] 包括基于卤代乙酰基部分的交联剂包括N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP) (关于基于卤代乙酰基的交联剂的代表性结构,参见图16)。这些交联剂形成不可切割接头,所述接头来源于基于卤代乙酰基的部分。

[0766] 尽管图15和16中描述的活性酯是由N-琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯组成的,但也可以应用其它活性酯,如N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯、邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

[0767] 特别优选的交联剂形成不含有硫原子的不可切割接头。图21显示了与交联剂发生衍生作用(derivatized with)的美登木素生物碱分子,所述交联剂来源于 α, ω -二羧酸(烷烃或烯烃二酸,其中烷烃或烯烃有3-24个碳原子)。当与细胞结合剂反应时,交联剂将形成不含硫的不可切割接头(不含S的不可切割接头)。

[0768] 图21的美登木素生物碱分子是如下制备的。首先,在二环己基碳二亚胺存在下,用一当量的2-三甲基甲硅烷乙醇(2-trimethylsilylethanol)处理,制备己二酸(也称作己二酸(hexanedioic acid)或1,6-己烷二羧酸)单酯。用异丁基氯甲酸酯活化剩余的羧基团,随后和N-甲基-L-丙氨酸反应,产生酰化的N-甲基-L-丙氨酸。在二环己基碳二亚胺和

氯化锌存在下,和美登木醇反应,随后用氯化四丁基铵去除三甲基甲硅烷保护基团,生成带有游离羧基的美登木素生物碱的酯。在二环己基碳二亚胺存在下和硫代N-羟基琥珀酰亚胺反应,酯化羧基,生成美登木醇的活性酯,其可以和细胞结合剂反应,得到不含硫原子的不可切割的偶联物。

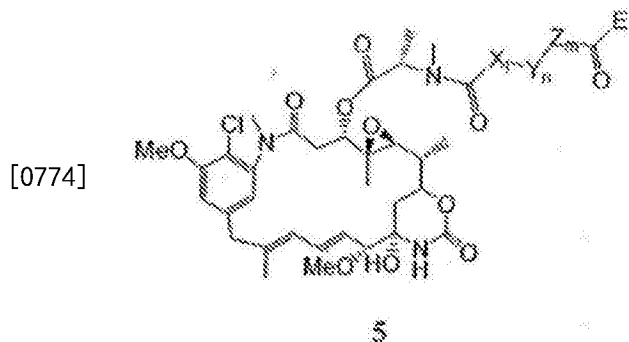
[0769] 应用上述方法,不含硫原子的不可切割接头也可以来源于基于其它二羧酸的部分。基于其它二羧酸的合适部分包括但不限于,通式(IV)的 α, ω -二羧酸:

[0770] $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$

[0771] (IV)

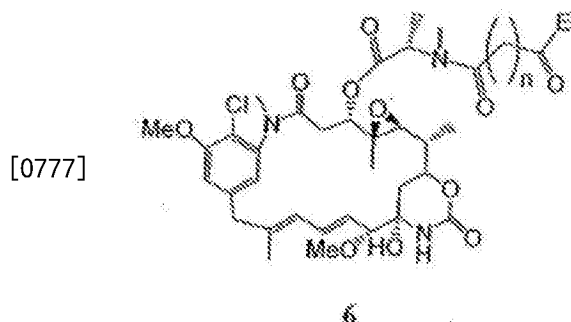
[0772] 在式(IV)中,X是具有2至20个碳原子的线性或分支的烷基、烯基或炔基,Y是具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基,Z是具有6至10个碳原子的取代的或未取代的芳基,或取代的或未取代的杂环基团,其中杂原子选自N、O或S,并且其中1、m和n的每一个是0或1,条件是它们不同时均为0。

[0773] 美登木素生物碱可以由式5表示,所述美登木素生物碱被衍生,以含有活性酯,该活性酯可以和细胞结合剂直接反应,形成带有不含S的不可切割接头的偶联物:



[0775] 其中X、Y、Z、1、m和n均如上面的式(IV)所定义,进一步地,其中E和羰基一同形成活性酯如N-羟基琥珀酰亚胺基和硫代琥珀酰亚胺基酯、N-羟基邻苯二甲酰亚胺基酯、N-羟基硫代邻苯二甲酰亚胺基酯、邻-硝基苯酯、对-硝基苯酯、2,4-二硝基苯酯、3-磺酰基-4-硝基苯酯、3-羧基-4-硝基苯酯、五氟苯酯,和磺酰基四氟苯酯。

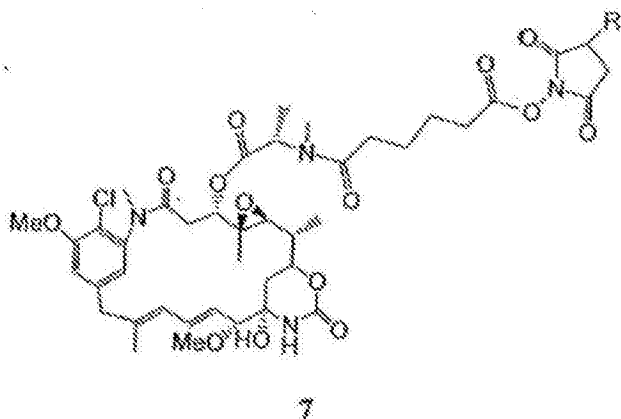
[0776] 优选的是衍生的美登木素生物碱,表示为式6:



[0778] 其中n代表从3至24的整数,E和式5的美登木素生物碱的限定相同。

[0779] 更优选的实施方案是衍生的美登木素生物碱,表示为式7:

[0780]

[0781] 其中R是H或 $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ 。

[0782] 式5、6和7的化合物是新的美登木素生物碱。

[0783] 具有2至20个碳原子的线性烷基、烯基或炔基的例子包括但不限于,乙基、丙基、丁基、戊基、己基、丙烯基、丁烯基和己烯基。

[0784] 具有2至20个碳原子的分支烷基、烯基或炔基的例子包括但不限于,异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、1-乙基丙基、异丁烯基、异戊烯基、乙炔基、丙炔基(炔丙基)、1-丁炔基、2-丁炔基,和1-己炔基。

[0785] 具有3至10个碳原子的环烷基或环烯基的例子包括但不限于,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环戊烯基、环己烯基和环庚二烯基。

[0786] 含有6至10个碳原子的芳基的例子包括但不限于,苯基和萘基。

[0787] 取代的芳基的例子包括但不限于,硝基苯基和二硝基苯基。

[0788] 杂环芳基包括但不限于,具有3至10元环的基团,其含有一个或两个选自N、O或S的杂原子。

[0789] 取代的和未取代的杂环芳基的例子包括但不限于,吡啶基、硝基吡啶基、吡咯基(pyrolyl)、噁唑基、噻吩基、噻唑基和呋喃基。

[0790] 杂环烷基包括但不限于环状化合物,其包括3至10元环体系,包含一个或两个杂原子,选自N、O或S。

[0791] 杂环烷基的例子包括但不限于,二氢呋喃、四氢呋喃、四氢吡咯基(tetrahydropyrolllyl)、哌啶基、哌嗪基和吗啉基。

[0792] 通式 $\text{HOOC-X}_1\text{-Y}_n\text{-Z}_m\text{-COOH}$ 的 α, ω -二羧酸的例子包括但不限于,己二酸、戊二酸、庚二酸、己烯-1,6-二酸、戊烯-1,5-二酸、环己烷-二酸、和环己烯-二酸。

[0793] 细胞毒性偶联物的合成

[0794] 可以用任何目前已知或以后开发出的技术,形成细胞结合剂和 美登木素生物碱的偶联物。

[0795] 连接细胞结合剂和美登木素生物碱的方法通常涉及两个反应步骤。在一种方法中,其描述于美国专利5,208,020中,可以用交联剂修饰细胞结合剂如抗体,以导入一个或多个活性基团,通常是1-10个。然后,使修饰的细胞结合剂与一个或多个含硫醇的美登木素生物碱反应,生成偶联物。

[0796] 选择性地,如美国专利6,441,163 B1所公开,首先可以用交联剂修饰含硫醇的美登木素生物碱,随后使修饰的美登木素生物碱和细胞结合剂反应。例如,可以使含硫醇的

美登木素生物碱和图15描述的马来酰亚胺化合物或图16描述的卤代乙酰基化合物反应,得到带有活性琥珀酰亚胺基酯或硫代琥珀酰亚胺基酯的美登木素生物碱硫醚。含有活性接头部分的这些美登木素生物碱和细胞结合剂的反应,提供了产生不可切割的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的另一方法。

[0797] 如上所公开,在本发明的另一方面,可以首先用基于二羧酸的交联剂而衍生不含硫原子的美登木素生物碱,随后使美登木素生物碱和细胞结合剂反应,形成偶联物,其中美登木素生物碱通过不含S的不可切割接头连接于细胞结合剂。

[0798] 典型地,每个抗体连接平均1-10个美登木素生物碱。可以通过 Sephadex G-25柱纯化偶联物。

[0799] 美国专利5,208,020和6,441,163 B1的全部公开内容特别地在此并入作为参考。

[0800] 本发明的代表性偶联物是抗体-美登木素生物碱衍生物,抗体片段-美登木素生物碱衍生物,生长因子-美登木素生物碱偶联物如表皮生长因子(EGF)-美登木素生物碱衍生物,激素-美登木素生物碱偶联物如促黑素细胞激素(MSH)-美登木素生物碱衍生物、促甲状腺激素(TSH)-美登木素生物碱衍生物、雌激素-美登木素生物碱衍生物、雌激素类似物-美登木素生物碱衍生物、雄激素-美登木素生物碱衍生物、雄激素类似物-美登木素生物碱衍生物,和维生素-美登木素生物碱偶联物如叶酸-美登木素生物碱。

[0801] 抗体、抗体片段、蛋白激素、蛋白生长因子和其它蛋白的美登木素生物碱偶联物是以相同的方法制备的。例如,可以用上面提到的不可切割的交联剂修饰肽和抗体。抗体在含水缓冲液中的溶液可以和摩尔数过量的抗体修饰交联剂(antibody-modifying cross-linking reagent)温育,抗体修饰交联剂如琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、硫代-SMCC、-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、硫代-MBS、琥珀酰亚胺基-碘乙酰胺、或N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB 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),其为SMCC的长链类似物(LC-SMCC)、硫代-LC-SMCC、 κ -马来酰亚胺十一烷酸N-琥珀酰亚胺基酯(KMUA)、硫代-KMUA、 γ -马来酰亚胺丁酸N-琥珀酰亚胺基酯(GMBS)、硫代-GMBS、 ϵ -马来酰亚胺己酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(EMCS)、硫代-EMCS、N-(α -马来酰亚胺乙酰基)-琥珀酰亚胺酯(AMAS)、硫代-AMAS、琥珀酰亚胺基-6-(β -马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH)、硫代-SMPH、N-琥珀酰亚胺基4-(p-马来酰亚胺苯基)-丁酸酯(SMPB)、硫代-SMPH、N-(p-马来酰亚胺苯基)异氰酸酯(PMPI)、N-琥珀酰亚胺基-4-(碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基碘乙酸酯(SIA)、N-琥珀酰亚胺基溴乙酸酯(SBA)和N-琥珀酰亚胺基3-(溴乙酰氨基)丙酸酯(SBAP),如文献中所描述。参见,Yoshitake等,101Eur.J.Biochem. 395-399 (1979);Hashida等,J.Applied Biochem.56-63(1984);和Liu等,18 690-697(1979);Uto等,138J.Immunol.Meth.87-94(1991);Rich等18J.Med.Chem.1004-1010(1975);Kitagawa and Aikawa,79J. Biochem.(Tohyo) 233-236(1976);Tanimori等,62J.Immunol.Meth. 123-128(1983);Hashida等,6J.Appl.Biochem.56-63(1984);Thorpe等,140Eur.J.Biochem.63-71(1984),Chrisey等24Nucl.Acids Res. 3031-3039(1996),Annunziato等,4Bioconjugate Chem.212-218(1993),Rector等,24J.Immunol.Meth.321-336(1978),和Inman等2 Bioconjugate.Chem.458-463(1991)。

[0802] 然后,用含硫醇美登木素生物碱处理修饰的抗体(1.25摩尔当量/马来酰亚胺基

或碘乙酰基),产生偶联物。使混合物在大约4℃温育过夜。经Sephadex G-25柱凝胶过滤纯化抗体-美登木素生物碱偶联物。分光光度法测定252nm和280nm处的吸光度的比值,确定每个抗体分子结合的美登木素生物碱分子的数目。典型地,每个抗体结合平均1-10个美登木素生物碱。

[0803] 一种优选的方法是,用琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)修饰抗体,导入马来酰亚胺基,随后使修饰的抗体与含硫醇美登木素生物碱反应,得到硫醚连接的偶联物。也得到了每个抗体分子带有1至10个药物分子的偶联物。抗体-美登木素生物碱偶联物的例子显示于图17-20。

[0804] 相似地,例如,通过和适当保护的含硫醇的氯化羧酸(carboxylic acid chloride)如3-S-乙酰丙酰氯(3-S-acetylpropanoyl chloride)反应,雌激素和雄激素细胞结合剂如雌二醇和雄二醇的C-17羟基可以被酯化。也可以应用其它酯化方法,如文献中所述(Haslam,36Tetrahedron 2400-2433(1980))。然后,保护的或含游离硫醇的雄激素或雌激素可以和含硫醇美登木素生物碱反应,生成偶联物。偶联物可以经柱层析在硅胶上纯化,或经HPLC纯化。

[0805] 一种特别优选的方法是,用交联剂修饰美登木素生物碱,所述交联剂导致不含任何硫原子的连接,随后使修饰的美登木素生物碱和抗体反应,生成偶联物。

[0806] 本发明的细胞毒性偶联物的治疗效应

[0807] 可以评价本发明的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物,评价它们在体外抑制多种细胞系增殖的能力。例如,可以用细胞系如人结肠癌细胞系COLO 205、人黑素瘤细胞系A-375、人骨髓白血病细胞系HL 60、人乳腺癌细胞系SKBR3、或人表皮样癌细胞系KB评价这些偶联物的细胞毒性。可以将欲被评价的细胞暴露于化合物24小时,并通过已知方法直接分析来测定细胞的存活分数。(参见,例如,Goldmacher等,135J.Immunol.3648-3651(1985),和Goldmacher等,102J.Cell Biol.1312-1319(1986)。)然后,从分析结果可以计算出IC₅₀值。

[0808] 高细胞毒性被定义为,显示出IC₅₀值(毒性物质的抑制浓度,所述毒性物质允许的存活分数为0.5)为大约10⁻⁸M或更低的细胞毒性,这是用SKBR3在体外暴露于药物24小时时所测定的。

[0809] 图4显示了本发明的抗体-美登木素生物碱偶联物的体外效力和靶特异性。用交联剂SMCC的huC242与DM1的偶联物对于破坏抗原阳性的SKBR3细胞,是高度有效的,IC₅₀值是3.5x10⁻¹²M。与之对照,抗原阴性的A-375细胞的敏感度低大约800倍,这说明本发明的美登木素生物碱偶联物是高度有效的和高度特异的。

[0810] 在克隆形成试验(clonogenic assay)(图6A-C)和间接细胞毒性试验(图7)中,与用含二硫的接头制备的偶联物相比,huC242-SMCC-DM1偶联物具有相同的或更大的效力。基于以前公开的数据,这些结果是出乎意料的,以前公开的数据证明,通过SMCC连接于美登木素生物碱的抗Her2抗体不显示特异活性(Chari等,52Cancer Res.127-133(1992))。

[0811] 用SMCC不可切割接头制备的偶联物的活性不限于huC242偶联物。用抗Her2抗体曲妥珠单抗;抗CD33抗体My9-6;抗EGFR抗体KS77;和抗CD56抗体N901的SMCC-DM1偶联物也观察到体外特异活性(图8A-D和25)。

[0812] 此外,在体外显示出特异活性的带有不可切割接头的偶联物不限于SMCC接头。在

体外克隆形成试验中,用不可切割接头SIAB合成的DM1的huC242偶联物,显示了效力和抗原特异性细胞毒性(图9)。进一步地,在克隆形成试验中,用SIAB合成的DM1的曲妥珠单抗偶联物也是细胞毒性的(图28)。进一步地,在体外克隆形成试验中, huC242-不含S的不可切割接头-DM1偶联物也证实了效力和抗原特异性细胞毒性(antigen-specific cytotoxicity)(图22)。

[0813] 应用SMCC接头的抗体与DM1的偶联物在小鼠中显示了对抗人肿瘤异种移植物的效应(图10A-C)。首先,如图10A所示,用huC242-SMCC-DM1处理COLO 205结肠肿瘤移植体之后,观察到肿瘤生长的显著抑制。在本试验中,用huC242-SMCC-DM1处理带有已形成皮下肿瘤的1组5个动物,偶联DM1的剂量是150 μ g/kg。定期测量肿瘤体积,并且以肿瘤体积对肿瘤接种后的时间作图。尽管3个动物在此后的不同时间点复发,但是所有5个被处理动物完全缓解,而2个动物保持无肿瘤状态直至试验结束(图10A)。此外,如图10B所示,在不影响小鼠体重的偶联物剂量下观察到此抗肿瘤活性,小鼠体重是药物毒性的一个衡量标准。在本试验中,用huC242-SMCC-DM1处理3组5个动物,每一动物带有已形成的皮下SUN肿瘤,偶联DM1的剂量分别是15 μ g/kg、30 μ g/kg和60 μ g/kg。定期测量肿瘤体积,并且以肿瘤体积对肿瘤接种后的时间作图。huC242-SMCC-DM1显示出剂量依赖的抗肿瘤效应。结果显示,用huC242-SMCC-DM1偶联物处理带有COLO 205结肠癌肿瘤异种移植体的小鼠,导致肿瘤完全消退,一些小鼠在处理后2个月期间保持没有可检测到的肿瘤(图10A)。再次地,在不影响小鼠体重的偶联物浓度下得到此活性。在带有MCF-7乳腺癌细胞系的小鼠肿瘤异种移植体模型中,曲妥珠单抗-SMCC-DM1偶联物也显示出显著的肿瘤消退作用(图10C)。

[0814] 用不可切割接头SMCC合成的抗体-美登木素生物碱偶联物的血浆清除率(plasma clearance)是非常慢的,并且比得上抗体单独的清除率。这与用相对不稳定的二硫键制备的偶联物如huC242-SPP-DM1的血浆清除形成鲜明的对照。例如,SMCC偶联物清除的半衰期是大约320小时,而SPP偶联物的半衰期是40-50小时范围(图11)。然而,每一类偶联物的抗体组分的清除率是相同的,这提示,在SPP-DM1偶联物的情形下,测定的偶联物清除率的差异归因于美登木素生物碱从抗体偶联物的丢失。不可切割的SMCC接头从而比SPP-DM1偶联物对存在于体内的美登木素生物碱-接头切割活性更具有抵抗性。进一步地,与SPP-DM1偶联物相比,SMCC连接的偶联物的清除率降低,导致动物的美登木素生物碱总暴露量增加几乎5倍,如曲线下面积(AUC)所测定。在一些情形下,此增加的暴露对药物效应可以有实质上的影响。

[0815] 与用可切割的二硫接头制备的偶联物相比,用不可切割接头如SMCC制备的美登木素生物碱偶联物在小鼠中显示出不曾意料的增加的耐受能力(tolerability)。在雌性CD-1小鼠中进行了应用单次静脉内剂量的急性毒性试验。通过监测小鼠死亡(图12A和B)以及毒性体征(图12C和D),在每一偶联物的4个逐渐上升的系列剂量范围,对huC242-SMCC-DM1偶联物(不可切割)和用含有可切割二硫键的接头制备的huC242偶联物的耐受能力进行比较。SMCC-DM1偶联物的最大耐受剂量(MTD)比检测的最高剂量(150mg/kg)高,而二硫连接的偶联物SPP-DM1的MTD范围是45-90mg/kg。在150mg/kg时,SMCC-DM1处理组的所有小鼠存活,而在处理后96小时,SPP-DM1处理组的所有小鼠中观察到致死毒性(lethal toxicity)。

[0816] 认为美登木素生物碱偶联物通过抑制微管蛋白质的聚合而施加其细胞破坏的活

性。微管蛋白质多聚化的这种抑制导致细胞周期停滞，主要在G2/M期。由抗体-美登木素生物碱偶联物造成的细胞抗原依赖性停滞在G2/M期，可以通过流式细胞仪分析来监测(图13)。用 huC242-SPP-DM1或huC242-SMCC-DM1偶联物处理COLO205细胞，导致在6-10小时的完全G2/M期停滞。然而，在处理30小时后，由于用二硫连接的huC242-SPP-DM1偶联物处理而停滞的一些细胞，逃脱了细胞周期停滞并重新开始细胞分裂。令人惊讶的是，在此较晚的时间点，用不可切割偶联物处理的细胞不逃脱细胞周期阻滞。这两种偶联物活性的持久性的差异也反映在30小时时间点处的死亡细胞的百分数上，如应用台盼兰进行的染料排斥试验(dye exclusion assay)所断定。这些结果证明了该分子事件的不曾预料的持久性，所述事件是用不可切割的SMCC接头偶联物处理而诱导的。

[0817] 用不可切割接头制备的偶联物相比于具有可切割二硫接头的偶联物的另一方面是，当其密切接近抗原阳性细胞时，对抗原阴性细胞没有活性，这在此被称为旁观者效应。即，用不可切割接头制备的偶联物有最小的旁观者活性。当分别培养时，huC242-SPP-DM1(可切割)和huC242-SMCC(不可切割)偶联物均对抗原阳性COLO 205细胞系显示出细胞破坏活性，并且对抗原阴性细胞系Namalwa没有活性(图14A-C)。然而，用huC242-SPP-DM1处理COLO 205和Namalwa的共培养物揭示，偶联物甚至对抗原阴性Namalwa细胞显示出显著的细胞破坏活性。与之对照，在这些情况下，huC242-SMCC-DM1偶联物不显示任何这样的旁观者活性。甚至在Namalwa细胞和抗原阳性COLO 205细胞共培养时，用huC242-SMCC-DM1偶联物没有观察到对Namalwa细胞的细胞破坏活性。如此体外分析所测定，不可切割偶联物的这种最小旁观者活性，可以有助于急性毒性试验中观察到的带有不可切割接头的偶联物的耐受能力增加。

[0818] 上面的实验结果说明，和以前描述的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物相比，本发明的带有不可切割接头的美登木素生物碱偶联物具有大大改进的抗肿瘤活性。

[0819] 使用方法

[0820] 可以将上述偶联物用于将美登木素生物碱靶向于选择细胞群的方法，方法包括：用细胞结合剂美登木素生物碱偶联物接触怀疑含有选择细胞群的细胞群或组织，其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割接头共价连接于细胞结合剂，并且细胞结合剂结合于选择细胞群中的细胞。

[0821] 也可以将上述偶联物用于破坏细胞的方法中，方法包括：用细胞结合剂美登木素生物碱偶联物接触细胞，其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割接头共价连接于细胞结合剂，并且细胞结合剂和细胞结合。

[0822] 也可以将上述偶联物用于治疗病痛的方法中，所述病痛包括但不限于，恶性肿瘤、自身免疫病、移植排斥、移植物抗宿主病、病毒感染、微生物感染、和寄生虫感染，方法包括：向需要治疗的对象给予有效量的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割接头共价连接于细胞结合剂，并且细胞结合剂与病痛的患病细胞或感染细胞结合。

[0823] 可以根据本发明方法治疗的医疗状况的例子包括但不限于任何类型的恶性肿瘤，包括例如，肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、胰腺癌、卵巢癌和淋巴器官癌症；自身免疫病如系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、和多发性硬化；移植排斥如肾移植排斥、肝移植排斥、肺移植排斥、心脏移植排斥和骨髓移植排斥；移植物抗宿主病；病毒感染如CMV感

染、HIV感染、AIDS等等；和寄生虫感染如贾第鞭毛虫病、阿米巴病、血吸虫病、和如本领域的普通技术人员所确定的其它疾病。

[0824] 本方法可以在体外或体内实施。

[0825] 可以将上述偶联物用于体外应用的方法，以处理例如自体骨髓细胞，这是在将它们植入同一患者之前实施的，目的是破坏患病细胞或恶性细胞；处理骨髓细胞或其它组织，这是在移植它们之前实施的，目的是破坏T细胞和其它淋巴样细胞(lymphoid cells)并防止移植物抗宿主病(GVHD)；处理细胞培养物，目的是破坏除不表达靶抗原的所需变异体(variants)之外的所有细胞；或处理细胞培养物，目的是破坏表达不期望抗原的变异细胞；方法包括，用有效量的细胞结合剂美登木素生物碱偶联物处理细胞，其中一个或多个美登木素生物碱通过不可切割接头共价连接于细胞结合剂，并且细胞结合剂结合于欲破坏的细胞。

[0826] 本领域的普通技术人员容易确定临床和非临床体外用途的情况。

[0827] 例如，可以如下进行处理。可以从患者或其它个体采集骨髓，然后在含有血清的培养基中温育，培养基中加入本发明的细胞毒剂，浓度范围是从大约10pM至1nM，在大约37℃持续大约30分钟至大约48分钟。本领域的普通技术人员可以容易地确定确切的浓度条件和温育时间，即剂量。温育之后，用含有血清的培养基洗涤骨髓细胞，并且根据已知方法经静脉回输给患者。在采集骨髓和再输注处理细胞的时间之间，患者接受其它治疗如消融化疗过程或全身放疗过程的情况下，可以用标准的医疗设备，将处理的骨髓细胞冷冻保存在液氮中。

[0828] 对于临床体内用途，可以将细胞毒剂以溶液或冻干粉末供应，所述溶液或冻干粉末未被检测了无菌状态和内毒素水平。如下是给予偶联物的合适方案的例子。可以每周给予偶联物，持续4周，给予的是静脉丸剂(intravenous bolus)的形式。丸剂量(Bolus doses)可以在50至500ml的标准生理盐水中给予，生理盐水中可以加入5至10ml的人血清白蛋白。剂量将是，每次给药10mg至2000mg，静脉内给予(范围是每日100ng至20mg/kg)。治疗4周之后，患者可以在每周的基础上(on weekly basis)继续接受治疗。

[0829] 关于给药路径、赋形剂、稀释剂、剂量、时间等等的具体的体内临床方案，可以由本领域的普通技术人员随临床情况允许而确定。

[0830] 如果需要，可以随偶联物给予其它的活性剂如其它抗肿瘤剂。

[0831] 新的偶联物、组合物和制备偶联物的方法

[0832] 尽管经不可切割接头连接的抗体和美登木素生物碱的一些偶联物是已知的，但是其它的偶联物是新的。因此，提供了细胞结合剂美登木素生物碱偶联物，其具有至少一个美登木素生物碱，通过不可切割接头和细胞结合剂相连接，如果当细胞结合剂是抗体时，该接头不包括来自下述交联剂的基团，所述交联剂选自：琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、硫代-SMCC、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、硫代-MBS和琥珀酰亚胺基-碘乙酸酯。

[0833] 可以制备新的偶联物，并如上述应用。

[0834] 组合物包括细胞结合剂美登木素生物碱偶联物和载体。

[0835] 载体可以是药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0836] 合适的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂是公知的，并且可以由本领域的普

通技术人员随临床情况允许而确定。

[0837] 合适的载体、稀释剂和/或赋形剂的例子包括：(1) Dulbecco磷酸盐缓冲盐水，pH 是大约7.4，含有或不含有大约1mg/ml至25mg/ml 的人血清白蛋白，(2) 0.9%生理盐水 (0.9%w/v NaCl)，和(3) 5% (w/v) 葡萄糖；并且也可以含有抗氧化剂如色胺和稳定剂如吐温20。

[0838] 对于这些新的偶联物，也提供了合成方法。

[0839] 制备细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的方法之一包括：

[0840] (a) 提供细胞结合剂

[0841] (b) 用交联剂修饰细胞结合剂，和

[0842] (c) 连接修饰的细胞结合剂和美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱，从而在细胞结合剂和美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱之间提供不可切割接头，生成偶联物。

[0843] 制备细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的另一方法包括：

[0844] (a) 提供美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱，

[0845] (b) 用交联剂修饰美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱，从而形成不可切割接头，和

[0846] (c) 连接修饰的美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱和细胞结合剂，从而在细胞结合剂和美登木素生物碱或含硫醇美登木素生物碱之间提供不可切割接头，生成偶联物。

[0847] 制备细胞结合剂美登木素生物碱偶联物的另外的方法包括：

[0848] (a) 提供美登木素生物碱，

[0849] (b) 修饰美登木素生物碱，以提供带有活性酯的不含硫的美登木醇，和

[0850] (c) 连接修饰的美登木素生物碱和细胞结合剂，从而在细胞结合剂与美登木醇之间提供不含S的不可切割接头，生成偶联物。这些方法在上面详述以及在此处引用并特别地在此并入作为参考的美国专利中描述。

实施例

[0851] 现在，将参考非限制性实施例阐述本发明。如无其它陈述，所有的百分数、比值、份(parts)等等，是以重量计的。

[0852] 用于下列试验的缓冲液是：50mM磷酸钾(KPi)/50mM氯化钠(NaCl)/2mM乙二胺四乙酸(EDTA)，pH值是6.5(缓冲液A)；1x磷酸盐缓冲盐水(PBS)，pH值是6.5(缓冲液B)；和0.1M KPi缓冲液/2mM EDTA，pH值是7.5(分析缓冲液)。

[0853] SMCC(产品号22360，M.W.334.33g/mole)和SIAB(产品号22329，M.W.402.15g/mole)购自Pierce。huC242抗体是人源化形式的单克隆抗体C242，描述于美国专利5,552,293，其杂交瘤保藏为ECACC 保藏号(Identification Number)90012601)。曲妥珠单抗得自Genentech。DM1(游离硫醇形式；M.W.737.5g/mole)如以前在美国专利5,208,020和6,333,410 B1所描述而制备。

[0854] 用购自Amersham Biosciences的层析柱(Sephadex G25NAP-25 预填充柱(Amersham 17-0852-02)；HiPrep 26/10脱盐柱(Desalting Columns)，Sephadex G25优质

树脂(fine resin),3个串联(3connected in series)(Amersham 17-5087-01))进行层析。也应用TSK-GEL G3000SWXL层析柱(TOSOH Bioscience,08541),其带有TSK Column Guard SWxl(TOSOH Bioscience 08543)。

[0855] 用于下列试验的溶剂是二甲基亚砷(DMSO)、二甲基乙酰胺(DMA)、乙醇(EtOH)和溶于DMSO的100mM Ellman's Reagent(DTNB,可以从Cayman Chemical得到)。

[0856] 实施例1A

[0857] 制备huC242-SMCC-DM1偶联物

[0858] a.制备和测定huC242抗体

[0859] 用280nm处的消光系数 $1.48(\text{mg/mL})^{-1}$ 和分子量147,000g/mole,测定抗体浓度。

[0860] b.制备和测定SMCC贮存液

[0861] 在二甲基亚砷中制备20mM的SMCC溶液(6.69mg/mL)。在分析缓冲液(Assay Buffer)中稀释溶液1/40,在302nm处测定样品的吸光度。用消光系数 $602\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 计算贮存液的浓度。

[0862] c.制备和测定DM1贮存液

[0863] 在二甲基乙酰胺(DMA)中制备10mM的DM1溶液(游离硫醇形式)(7.37mg/mL)(图2)。在280nm处测定贮存液溶于乙醇(EtOH)的稀释液的吸光度。用280nm处的消光系数 5700M^{-1} 计算贮存DM1的浓度。用Ellman's试剂(DTNB)测定游离的巯基或硫醇基(-SH)在贮存DM1制备物中的浓度。在分析缓冲液中制备贮存液的稀释液,分析缓冲液制备为3%(v/v)DMA,随后加入溶于DMSO的100mM DTNB(1/100th 体积)。测定412nm处的吸光度针对空白试剂的增加值,用消光系数 14150^{-1}cm^{-1} 计算浓度。用Ellman's分析得到的-SH浓度代表连接条件下计算的DM1贮存浓度。

[0864] d.用SMCC交联剂修饰huC242

[0865] 将抗体分为2个样品;一个用7.5倍过量摩尔数的SMCC交联剂修饰,另一个用8.5倍过量摩尔数的SMCC交联剂修饰。在8mg/mL 抗体时使样品反应。在含有DMSO(5%v/v)的缓冲液A(95%v/v)中进行反应,室温下持续2小时,同时搅拌。

[0866] e.G25层析以去除过量的SMCC

[0867] 在缓冲液A中平衡1.5x4.9cm Sephadex G25树脂预填充柱,使huC242-SMCC反应混合物通过该柱进行凝胶过滤。上样和洗脱体积根据制造商的说明书确定。用上述消光系数分析修饰的抗体洗脱液,以确定抗体浓度。对于7.5倍过量摩尔数的SMCC反应,修饰抗体的产率是74.6%;对于8.5倍过量摩尔数的SMCC反应,修饰抗体的产率是81.6%。

[0868] f.连接huC242-SMCC和DM1

[0869] 使修饰的抗体样品和比接头过量1.7倍的DM1反应(假设每个抗体5个接头)。在2.5mg/mL抗体浓度下进行反应,所述抗体溶于具有DMA(3%v/v)的缓冲液A(97%v/v)中。加入DM1之后,室温下温育反应物大约20小时,同时搅拌。

[0870] g.通过G25层析纯化偶联物

[0871] 使连接反应混合物通过1.5x4.9cm的在缓冲液B中平衡的Sephadex G25树脂预填充柱进行凝胶过滤。上样和洗脱体积根据制造商的说明书确定。通过测定252nm和280nm处的洗脱物的吸光度,确定每摩尔huC242连接的DM1分子数目。发现7.5倍过量摩尔数的SMCC样品的DM1/抗体比值是3.54,发现8.5倍过量摩尔数的SMCC样品的DM1/抗体比值是

3.65。连接步骤的产率分别是83.7%和75.4%。将两个连接物合并在一起,进行无菌过滤并重新分析药物和抗体浓度。将合并的样品指定为Lot#1713-146C,并分析其结合、细胞毒性、特异性、聚合程度以及游离药物含量。

[0872] 表I.huC242-SMCC-DM1的特性

[0873]

参考号 (Reference Number)	最终的蛋白浓度 (mg/ml)	最终的 DM1 浓 度(μ g/ml)	DM1/Ab
1713-146C	1.77	29.96	3.05

[0874] 实施例1B

[0875] huC242-SMCC-DM1的体外检测

[0876] a.结合(Binding)

[0877] 在C0L0 205细胞上,用间接方法,比较huC242抗体和 huC242-SMCC-DM1的结合亲和力(bindind affinity),其中应用每孔 5×10^3 个细胞,于冰上初步温育3小时。结果显示于图3。裸抗体(naked antibody)以 5.1×10^{-1} M的KD结合,偶联物以 5.52×10^{-10} M的KD结合。因此,与DM1连接似乎不改变huC242的结合亲和力。

[0878] b.细胞毒性和特异性

[0879] 用持续暴露克隆形成试验(continuous exposure clonogenic assay) 评价 huC242-SMCC-DM1偶联物的体外细胞毒性和特异性。结果显示 于图4.huC242-SMCC-DM1对于破坏抗原阳性SKBR3细胞是有效的 ($IC_{50} = 3.5 \times 10^{-12}$ M)。特异性是通过比较靶SKBR3细胞的 IC_{50} 值和抗 原阴性细胞系A375的 IC_{50} 值显示的,其中偶联物的 IC_{50} 值大于 3.0×10^{-9} M。

[0880] c.尺寸排阻色谱分析

[0881] 用TSK3000尺寸排阻柱分析偶联物(图5)。峰4代表偶联物的单 体部分,而较早的峰代表多聚体以及较晚的峰代表片段。每一曲线下 的面积除以总峰面积代表该峰对样品的贡献。发现偶联物样品为 96.0%的单体。

[0882] d.游离药物

[0883] 用ELISA测定游离药物的百分数,发现其为4.4%。

[0884] 实施例2A

[0885] 制备曲妥珠单抗-SMCC-DM1偶联物

[0886] 抗体曲妥珠单抗从Genentech得到,用于用不可切割的异双功能(heterobifunctional)交联剂SMCC和DM1连接。抗体从pH 6.0的50mM 磷酸钾/2mM EDTA,缓冲交换进入pH 6.5的50mM磷酸钾/50mM氯化钠/2mM EDTA(缓冲液A)。然后,在抗体和DM1连接之前,使抗体 和7.5倍摩尔数过量的SMCC接头反应,并经Sephadex G25树脂纯化。再次用Sephadex G25树脂纯化最终的偶联物。得到的偶联物含有每摩 尔抗体3.1摩尔DM1。

[0887] a.制备和测定抗体曲妥珠单抗

[0888] 使溶于pH 6.0的50mM磷酸钾/2mM EDTA缓冲液的曲妥珠单 抗通过用缓冲液A平衡的Sephadex G25柱,并洗脱为缓冲液A。用产 色的鲎变形细胞溶解产物试验(chromogenic Lymulus amoebocyte lysate (LAL))法(Cambrex),检测本试验的所有缓冲液为,不含内毒素。用280nm处的消光系数 $1.45 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 和分子量145,423g,测定抗 体浓度。

[0889] b. 制备和测定SMCC贮存液

[0890] 在DMSO中制备20mM的SMCC溶液(6.69mg/mL)。在分析缓冲液中稀释该溶液1/40, 在302nm处测定样品的吸光度。用摩尔消光系数 $602\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 计算贮存液的浓度。

[0891] c. 制备和测定DM1贮存液

[0892] 在DMA中制备10mM的DM1溶液(游离硫醇形式)(7.37mg/mL)(图2)。在280nm处测定贮存液溶于乙醇(EtOH)的稀释液的吸光度。用280nm处的摩尔消光系数 5700M^{-1} 计算贮存的DM1的浓度。用Ellman's 试剂(DTNB)测定游离-SH在贮存的DM1制备物中的浓度。在分析缓冲液中制备贮存液的稀释液, 分析缓冲液制备为3%(v/v)DMA, 随后加入溶于DMSO的100mM DTNB(1/100th体积)。测定412nm处的吸光度针对空白试剂的增加值, 用消光系数 $14150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 计算浓度。用Ellman's分析得到的-SH浓度代表连接条件下计算的DM1贮存浓度。

[0893] d. 用SMCC交联剂修饰曲妥珠单抗

[0894] 在20mg/mL抗体时, 用7.5倍过量摩尔数的SMCC修饰抗体。在具有DMSO(5%v/v)的缓冲液A(95%v/v)中进行反应, 室温下持续2小时, 同时搅拌。

[0895] e. G25层析以去除过量的SMCC

[0896] 使曲妥珠单抗-SMCC反应混合物通过1.5x4.9cm的在缓冲液A中平衡的Sephadex G25树脂预填充柱进行凝胶过滤。上样和洗脱体积根据制造商的说明书确定(Amersham Biosciences)。用上述消光系数分光光度法分析修饰的抗体溶液的浓度。基于蛋白浓度, 修饰抗体的产率是88%。

[0897] f. 连接曲妥珠单抗-SMCC和DM1

[0898] 使修饰的抗体和比接头过量1.7倍的DM1反应(假设每个抗体5个接头)。在10mg/mL抗体浓度下进行反应, 所述抗体溶于具有DMA(6%v/v)的缓冲液A(94%v/v)中。加入DM1之后, 室温下温育反应物16.5小时, 同时搅拌。

[0899] g. 经G25层析纯化偶联物

[0900] 使连接反应混合物通过1.5x4.9cm的在缓冲液B中平衡的Sephadex G25树脂预填充柱进行凝胶过滤。上样和洗脱体积根据制造商的说明书确定(Amersham Biosciences)。通过测定252nm和280nm处的洗脱物的吸光度, 确定每摩尔曲妥珠单抗连接的DM1分子数目。发现DM1/抗体比值是3.13, 连接步骤的产率是95.7%。基于起始抗体, 连接的曲妥珠单抗的总产率是84%。分析得到的偶联物的结合、细胞毒性、特异性、聚合程度以及游离药物含量。

[0901] 表II. 曲妥珠单抗-SMCC-DM1的特性

[0902]

参考号	最终的蛋白浓度 (mg/ml)	最终的DM1浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	DM1/Ab
1762-14	6.71	106	3.13

[0903] 实施例2B

[0904] 曲妥珠单抗-SMCC-DM1的体外检测

[0905] 结合试验显示, 抗体和DM1的连接不影响表观 K_D ; 裸曲妥珠单抗抗体和曲妥珠单

抗-SMCC-DM1偶联物对ECD平板有相同的结合亲和力($5.5 \times 10^{-11} \text{M}$)。对样品的体外细胞毒性评价显示,曲妥珠单抗-SMCC-DM1偶联物既是高度毒性的(对抗原阳性细胞系的 IC_{50} 是 $3.6 \times 10^{-12} \text{M}$)也是特异性的(对抗原阴性细胞系的 IC_{50} 大于 $3.0 \times 10^{-9} \text{M}$)。

[0906] a. 结合

[0907] 用Genentech提供的HER2ECD平板结合试验比较曲妥珠单抗和曲妥珠单抗-SMCC-DM1的结合亲和力。结果显示于图24。裸抗体和偶联物均以 $5.5 \times 10^{-11} \text{M}$ 的表观 K_D 结合。因此,与DM1连接不改变曲妥珠单抗的结合亲和力。

[0908] b. 细胞毒性和特异性

[0909] 用持续暴露克隆形成试验(continuous exposure clonogenic assay)评价曲妥珠单抗-SMCC-DM1偶联物的体外细胞毒性和特异性。结果显示于图25。曲妥珠单抗-SMCC-DM1对破坏抗原阳性SKBR3细胞是有效的($\text{IC}_{50} = 3.6 \times 10^{-12} \text{M}$)。比较靶SKBR3细胞的 IC_{50} 值和抗原阴性细胞系A375的 IC_{50} 值时,显示了特异性,后者中偶联物的 IC_{50} 值大于 $3.0 \times 10^{-9} \text{M}$ 。

[0910] c. 尺寸排阻色谱分析

[0911] 用TSK3000尺寸排阻柱分析偶联物(图26)。峰1代表多聚体,峰2代表二聚体,峰3代表单体。每一曲线下的面积除以总峰面积代表该峰对样品的贡献。发现偶联物样品为95.3%的单体。

[0912] d. 游离药物分析

[0913] 用ELISA测定游离药物的百分数,发现其为3.4%。

[0914] e. 内毒素水平

[0915] 用色谱LAL试验(chromatographic LAL test)检测偶联物,发现含有0.03EU/mg。

[0916] 实施例3A

[0917] 制备曲妥珠单抗-SIAB-DM1偶联物

[0918] 曲妥珠单抗抗体从Genentech得到,用于用不可切割的异双功能交联剂SIAB和DM1连接。在pH 6.5时,使抗体和7.0倍摩尔数过量的SIAB接头反应,并经Sephadex G25F树脂纯化。合并含有抗体的部分,在pH 6.5及室温的标准连接条件下、但是在暗处,和DM1反应过夜。从反应容器移除等分试样(aliquot),并分析确定DM1的并入情况。NAP 5过滤后,等分试样被测定为,仅有1.4药物/Ab。向反应物加入另外的8倍过量的SIAB,持续2小时,然后在加入另外的1.5倍过量的DM1/SIAB之前,将pH增加至8。使反应进行,并且用Sephadex G25F树脂纯化。得到的偶联物含有每摩尔抗体3.42摩尔DM1。

[0919] a. 测定曲妥珠单抗

[0920] 用280nm处的消光系数 $1.45 \text{mL mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 和分子量145,423g,测定抗体浓度。

[0921] b. 制备和测定SIAB贮存液

[0922] 在DMSO中制备18mM的SIAB溶液(7.2mg/mL)。记录稀释入pH4缓冲液的溶液的波长扫描,仅用于信息目的。

[0923] c. 制备和测定DM1贮存液

[0924] 在DMA中制备大约30mM的DM1溶液(游离硫醇形式)。用Ellman's试剂(DTNB)测定游离-SH在贮存的DM1制备物中的浓度。在分析缓冲液中制备贮存液的稀释液,分析缓冲液制备为3% (v/v) DMA,随后加入溶于DMSO的100mM DTNB(1/100体积)。测定412nm处的吸光度针对空白试剂的增加值,用摩尔消光系数 $14150 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 计算浓度。用Ellman's分析得到

的-SH浓度代表以连接状态计算的DM1贮存 浓度。

[0925] d.用SIAB交联剂修饰曲妥珠单抗

[0926] 在20mg/mL抗体时,用7.0倍过量摩尔数的SIAB修饰抗体。在具有DMSO (5% v/v) 的缓冲液A (95% v/v) 中进行反应,室温下持续2 小时,同时搅拌。

[0927] e.G25层析以去除过量的SIAB

[0928] 使曲妥珠单抗-SIAB反应混合物通过在缓冲液A中平衡的 HiPrep 26/10脱盐柱 (Desalting Columns) 凝胶过滤。在280nm,似乎 存在来自SIAB试剂的干扰,因此假定修饰抗体的产率是100%并且假定5个接头/抗体的修饰用于确定连接反应中的DM1量。

[0929] f.连接曲妥珠单抗-SIAB和DM1

[0930] 使修饰的抗体和比接头过量1.7倍的DM1反应,如上所述,假设产率是100%和5个交联剂/抗体。估计反应物中的抗体浓度是 12.5mg/ml,并且在具有DMA (3% v/v) 的缓冲液A (97% v/v) 中进行反应。加入DM1之后,室温下在暗处温育反应物16.5小时,同时搅拌。

[0931] g.连接反应物分析

[0932] 移除反应混合物的0.25mL等分试样,并通过在缓冲液B中平衡 的预填充Sephadex G25柱进行凝胶过滤。通过测定252nm和280nm 处的洗脱物的吸光度,确定每摩尔曲妥珠单抗连接的DM1分子数目。DM1/抗体比值仅为1.4。

[0933] h.附加修饰/连接反应

[0934] 加入另外的8倍摩尔数过量的SIAB,并使之在室温下温育2小 时。加入比SIAB摩尔数过量1.5倍的DM1,添加1N NaOH使反应的 pH值增加至8。室温暗处温育反应物,并经过在缓冲液B中平衡的G25F 树脂柱凝胶过滤。

[0935] i.合并和表征偶联物

[0936] 合并含有蛋白的部分,过滤并在252nm以及280nm处测定吸光 度。检测偶联物样品的内毒素水平、结合、特异以及非特异细胞毒性、单体百分数和游离药物水平。

[0937] 表III.曲妥珠单抗-SIAB-DM1的特性

[0938]

参考号	最终的蛋白浓度 (mg/ml)	最终的 DM1 浓 度(μ g/ml)	DM1/Ab
1806-32	5.62	97.3	3.42

[0939] 实施例3B

[0940] 曲妥珠单抗-SIAB-DM1的体外检测

[0941] 结合试验显示,抗体和DM1的连接不影响表观 K_D ;裸曲妥珠 单抗和曲妥珠单抗-SIAB-DM1有相似的结合亲和力(Ab的表观 K_D 是 $1.2 \times 10^{-10}M$,偶联物的表观 K_D 是 $1.9 \times 10^{-10}M$)。对样品的体外毒性评 价显示,曲妥珠单抗-SIAB-DM1偶联物既是高度毒性的(对抗原阳性细 胞系SKBR3的 IC_{50} 是 $5 \times 10^{-12}M$)也是特异性的(对于抗原阴性细胞系 A375的 IC_{50} 大于 $3.0 \times 10^{-9}M$)。

[0942] a.结合

[0943] 用Genentech提供的HER2 ECD平板结合分析比较曲妥珠单抗 和曲妥珠单抗-SIAB-DM1的结合亲和力。结果显示于图27。裸露的曲 妥珠单抗和曲妥珠单抗-SIAB-DM1有

相似的结合亲和力(抗体的表观 K_D 是 $1.2 \times 10^{-10} M$, 偶联物的表观 K_D 是 $1.9 \times 10^{-10} M$)。

[0944] b. 细胞毒性和特异性

[0945] 对样品的体外细胞毒性评价显示, 曲妥珠单抗-SIAB-DM1 偶联物既是高度毒性的(对抗原阳性细胞系 SKBR3 的 $IC_{50} = 5 \times 10^{-12} M$) 也是特异性的(对于抗原阴性细胞系 A375 的 IC_{50} 大于 $3.0 \times 10^{-9} M$)。参见图 28。

[0946] c. 尺寸排阻色谱分析

[0947] 用 TSK3000 尺寸排阻柱分析偶联物(图 29)。峰 1 代表二聚体, 峰 2 代表单体。每一曲线下的面积除以总峰面积代表该峰对样品的贡献。发现偶联物样品为 96.4% 的单体。

[0948] d. 游离药物

[0949] 用 ELISA 测定游离药物的百分数, 发现其为 0.35%。

[0950] e. 内毒素水平

[0951] 用色谱 LAL 试验检测偶联物, 发现其含有 $< 0.04 EU/mg$ 。

[0952] 实施例 4

[0953] huC242 与形成不含 S 不可切割接头的交联剂的连接

[0954] a. 合成

[0955] 在 DMA 中制备交联剂的贮存液(其结构参见图 21), 去除 (spin out) 不溶性沉淀物, 用 $\epsilon^{280} = 5700 M^{-1} cm^{-1}$ 的消光系数确定残余溶液的浓度, 该消光系数是 DM1 在此波长下的消光系数。由于没有测定此物质的真正消光系数, 这仅是对浓度的估计值。应该指出, DM1 的 $\epsilon^{252} / \epsilon^{280}$ 是 4.7 (在 EtOH 中), 而此交联剂溶液的 $\epsilon^{252} / \epsilon^{280}$ (在 pH 7.5 缓冲液中) 被测定为 1.42, 表明或是不同消光值 (extinction) 或是存在杂质。

[0956] 用 2.8 mg/ml huC242 抗体, 以 2 mg 的水平进行连接反应, 所述抗体溶于缓冲液 E 中的 16% DMA 中, pH 7.5 (缓冲液 E = 50 mM 磷酸钠、150 mM NaCl、10 mM EDTA)。根据贮存液中的估计的交联剂浓度, 应用 30 当量的交联剂/抗体 (应用 10 当量交联剂/抗体的较早试验产生了仅具有 0.9 DM1/抗体的偶联物)。使反应进行 3 小时, 然后经过 Nap 10 (G25) 柱纯化偶联物。过滤后 (Millex GV 过滤器, 0.2 μm 孔径), 偶联物具有 2.56 DM1/抗体 (Lot#1749-119A, 抗体回收 = 78%)。经 HPLC (HiPrep 柱) 测定偶联物的等分试样中的游离 DM1, 在 12.09' 处观察到相当大的 DM1 峰。从而将样品在缓冲液 B 中透析, 以去除此峰, 然后重新分析。最终的偶联物样品 (Lot#1749-124A) 经 HPLC 分析没有游离的 DM1, 并且有 1.84 DM1/抗体。对偶联物进行 SEC HPLC, 显示出其为 97% 的单体抗体。

[0957] b. 细胞毒性和结合

[0958] 发明人对 huC242-不含 S 的不可切割接头-DM1 偶联物进行结合和细胞毒性研究。首先, 在 COLO 205 细胞上, 用间接方法, 比较 huC242 抗体、huC242-SMNP-DM3 和 huC242-不含 S 的不可切割接头-DM1 的结合亲和力。应用每孔 5×10^3 个细胞, 在冰上初步温育 3 小时。结果显示在图 23 中, 其显示出, huC242-不含 S 的不可切割接头-DM1 偶联物比游离抗体的表观离解常数 (apparent dissociation constant) 高大约 2 倍 (参见图 23)。此外, huC242-不含 S 的不可切割接头-DM1 偶联物的体外细胞毒性是可以和 huC242-SMNP-DM3 相比美的 (不含 S 的不可切割接头偶联物的 $IC_{50} = 7.0 \times 10^{-12} M$) (参见图 22)。

[0959] 尽管参考其具体实施方案详细描述了本发明, 但对本领域的技术人员显然的是, 可以在其中进行各种变化和修改, 而不背离本发明的精神和范围。

[0960] 此处引用的所有专利、出版物和其它参考文献特别地以其整体 并入,作为参考。

SMCC (琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)

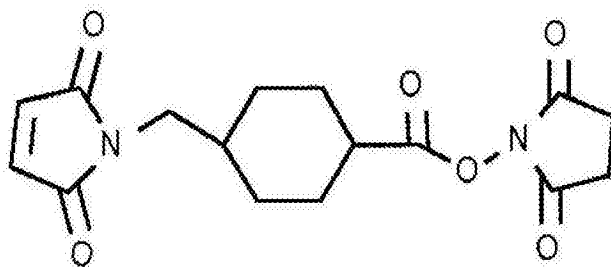


图1

DM1 (硫醇化的美登木素生物碱)

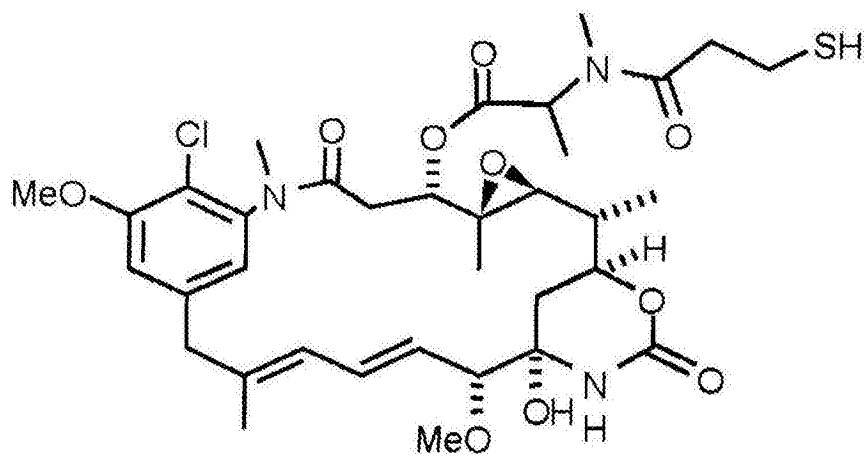


图 2

huC242抗体和huC242偶联物
对COLO 205细胞的FACS结合试验

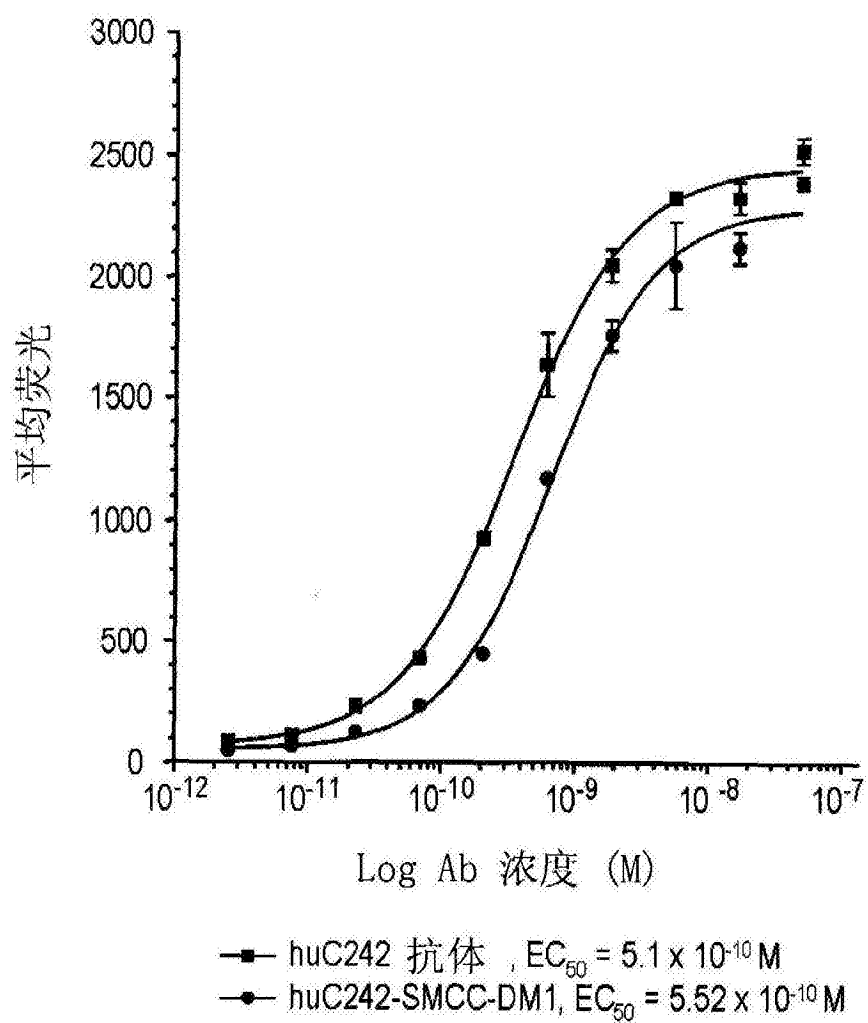


图3

huC242-SMCC-DM1的效力评价
持续暴露克隆形成试验

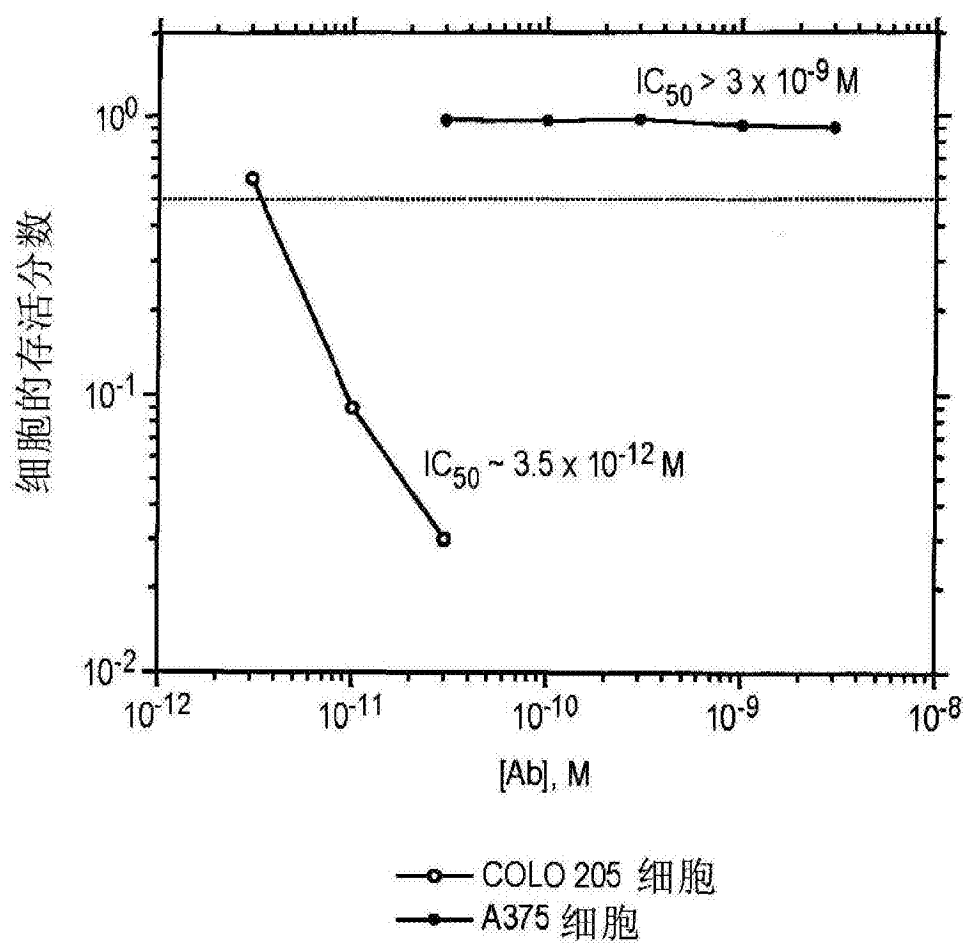


图4

huC242-SMCC-DM1的尺寸排阻色谱

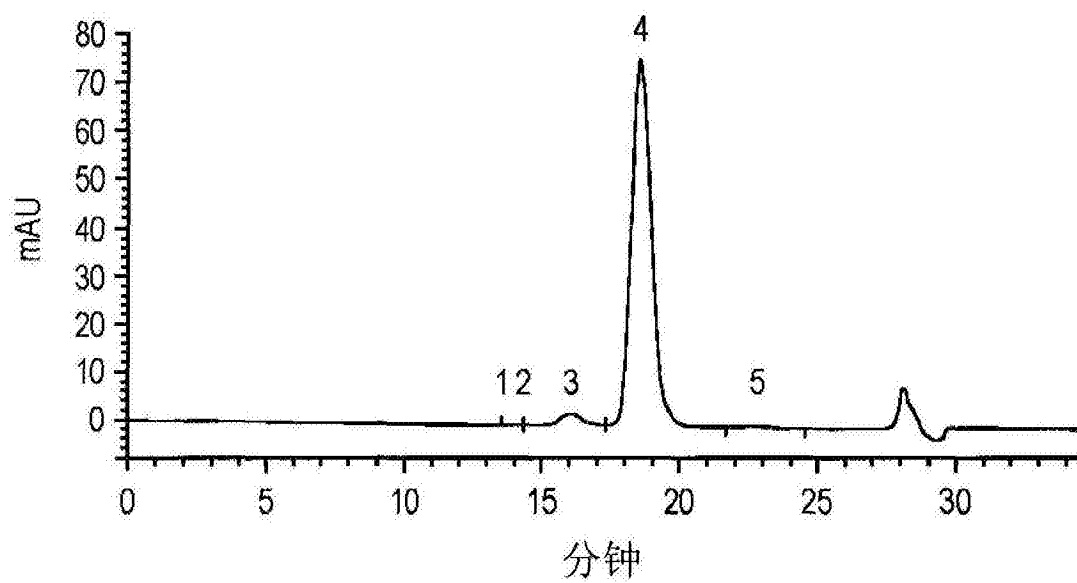


图5

huC242-SMCC-DM1对COLO 205(+)和A375(-)的细胞毒性
持续暴露克隆形成试验

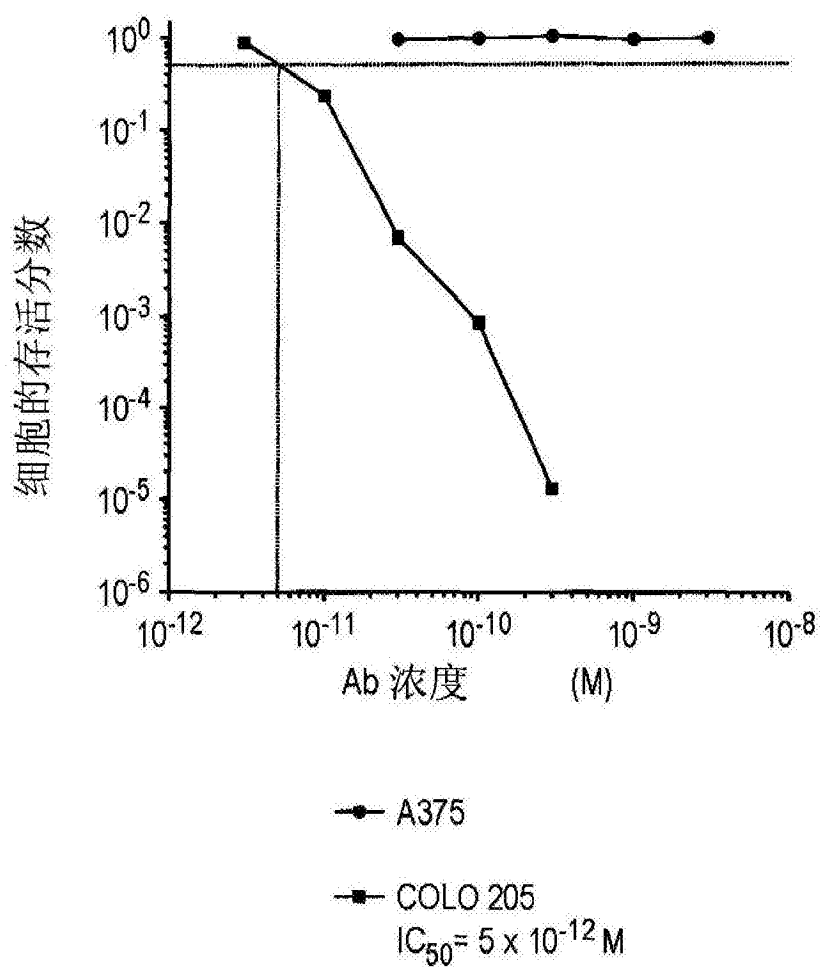


图6A

huC242偶联物对COLO 205细胞的细胞毒性
24小时暴露克隆形成试验

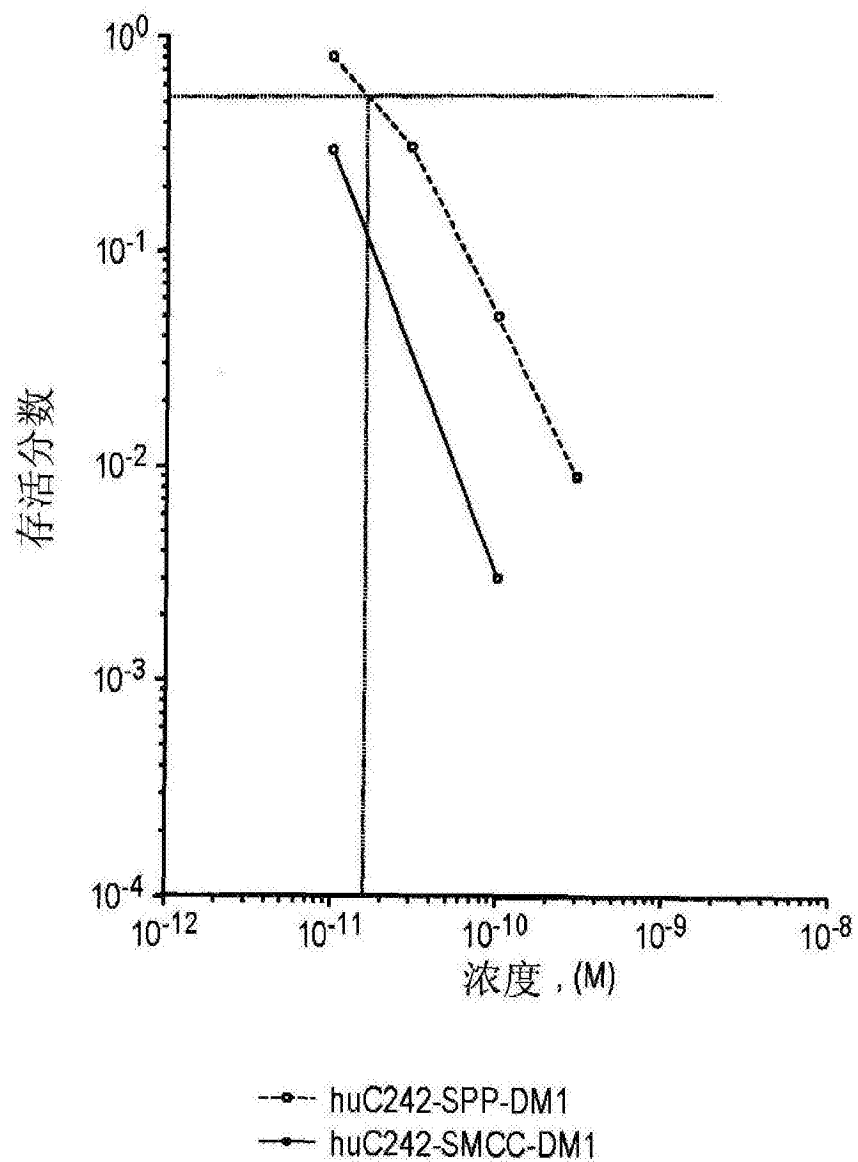


图6B

huC242偶联物对COLO 205细胞的细胞毒性
4小时暴露克隆形成试验

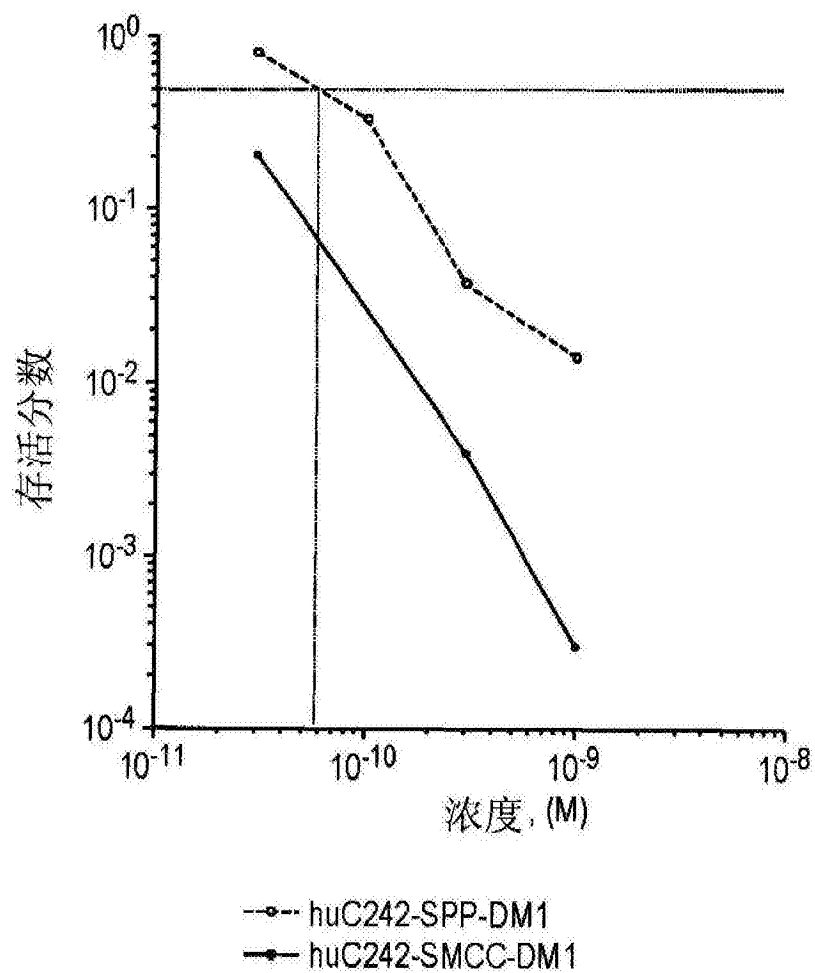


图6C

huC242-SMCC-DM1偶联物对COLO 205(+)和Namalwa(-)细胞的体外细胞毒性
温育5天, MTT分析

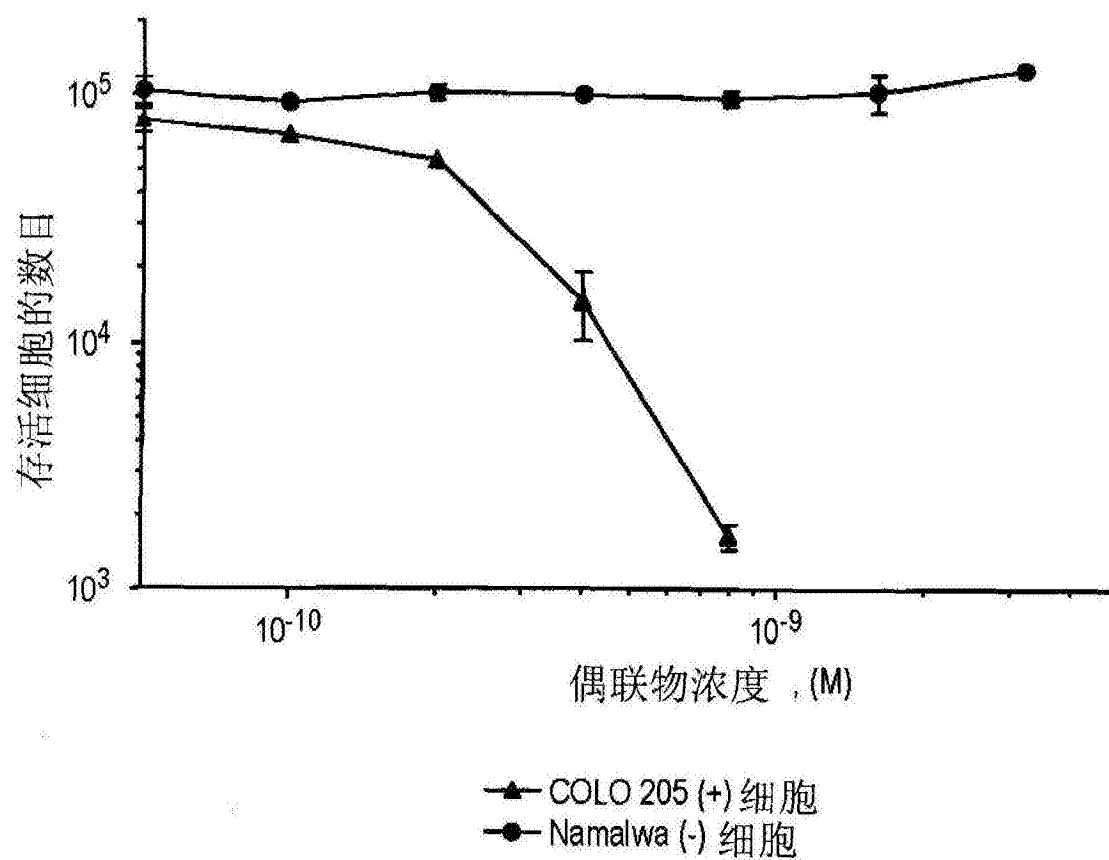


图7

曲妥珠单抗-SMCC-DM1对SKBR3
和A375细胞的细胞毒性

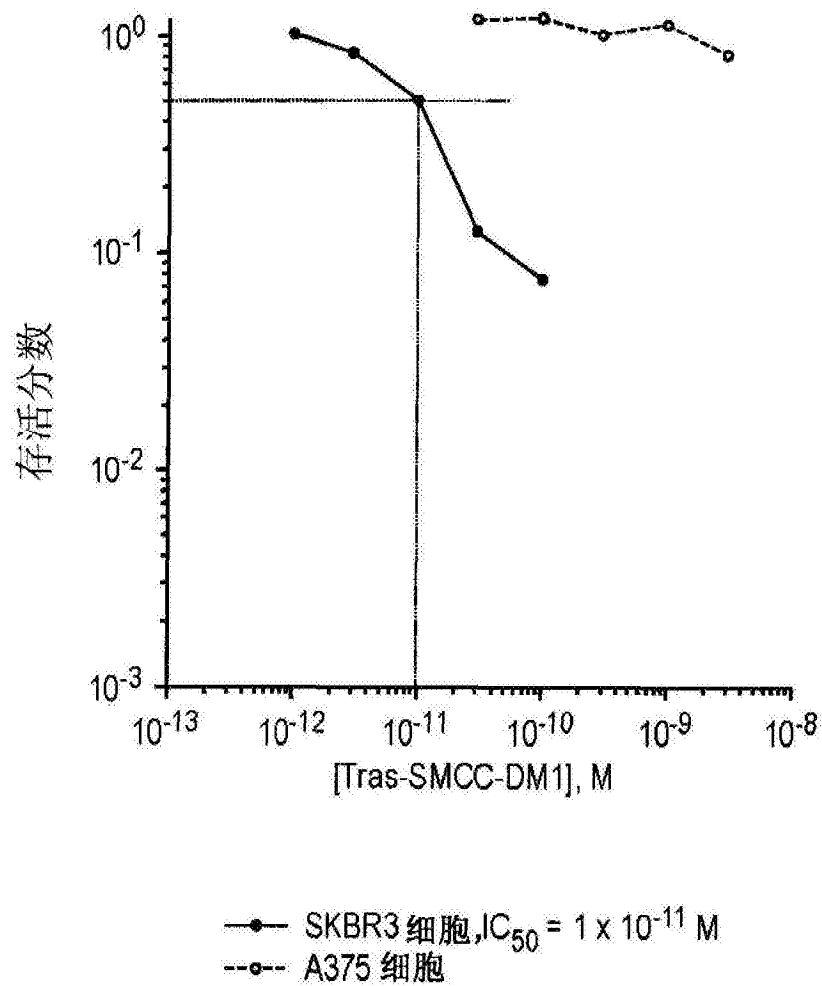


图8A

My9-6-SMCC-DM1对HIP-1细胞的效力评价
持续暴露克隆形成试验

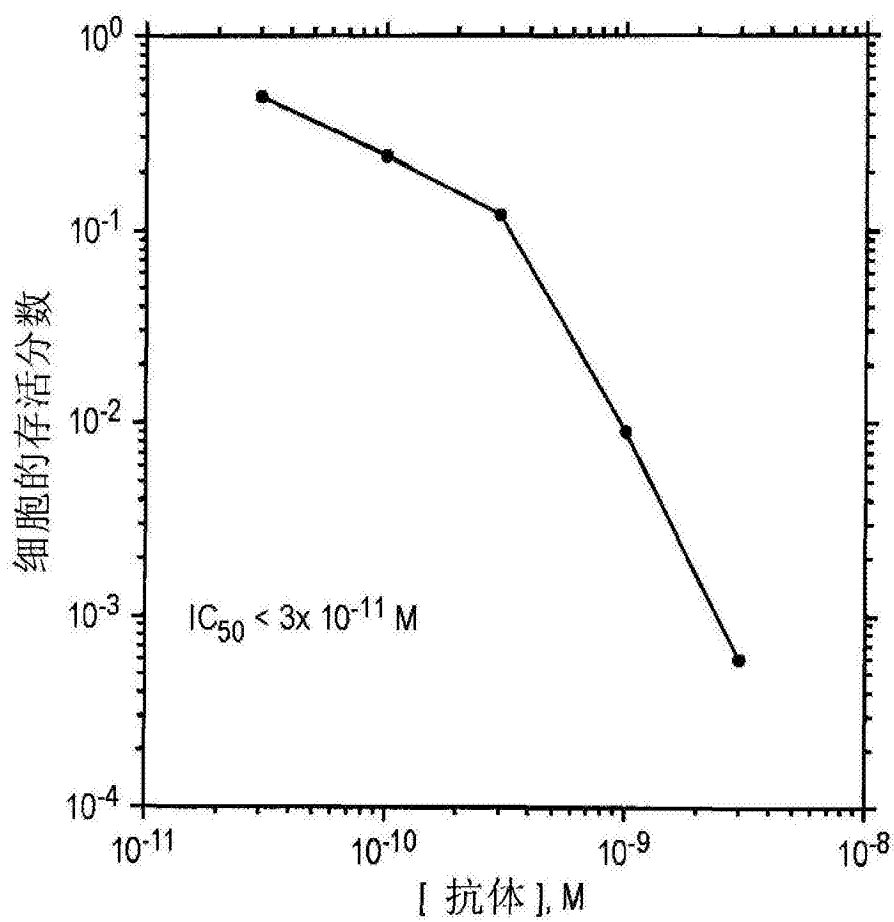


图8B

KS77-SMCC-DM1对A431(+)和A375(-)细胞的细胞毒性
持续暴露克隆形成试验

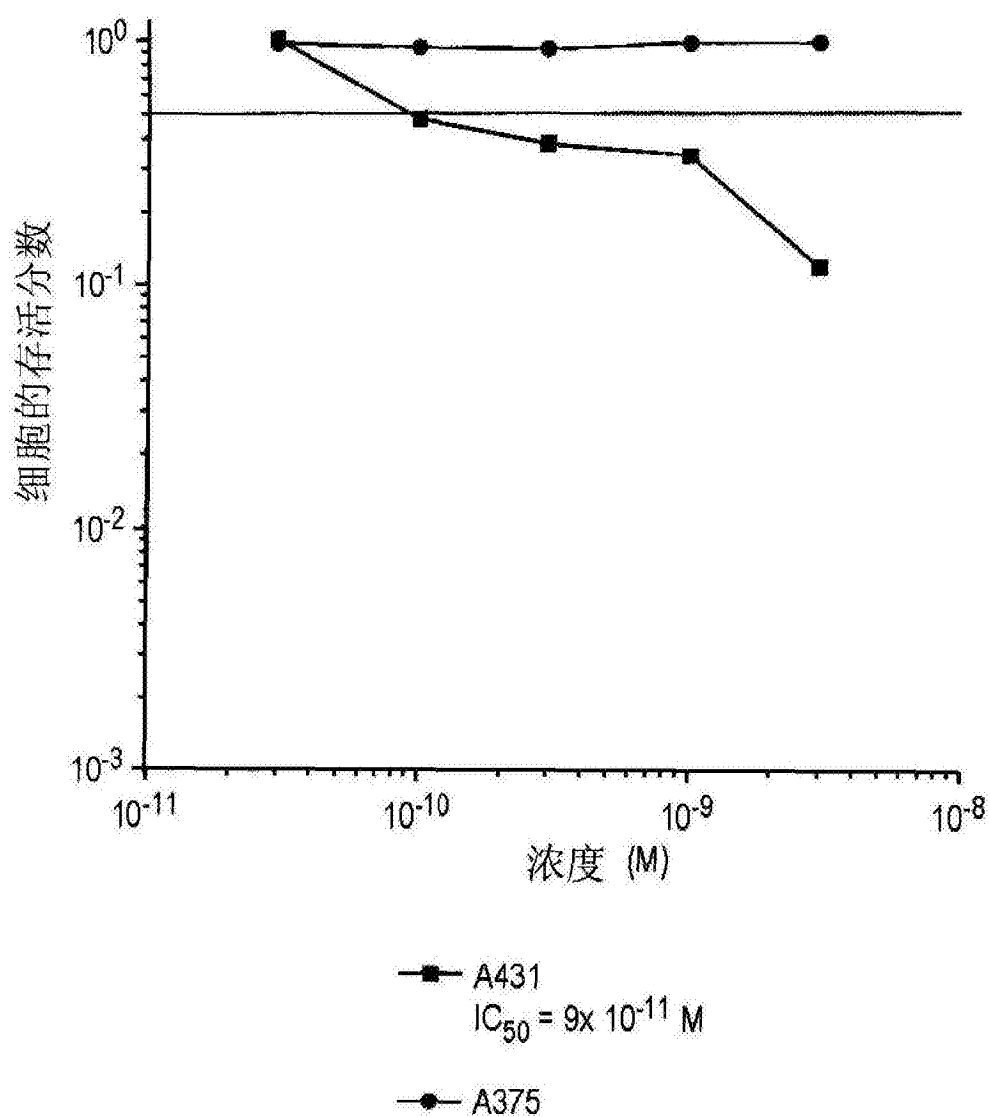


图8C

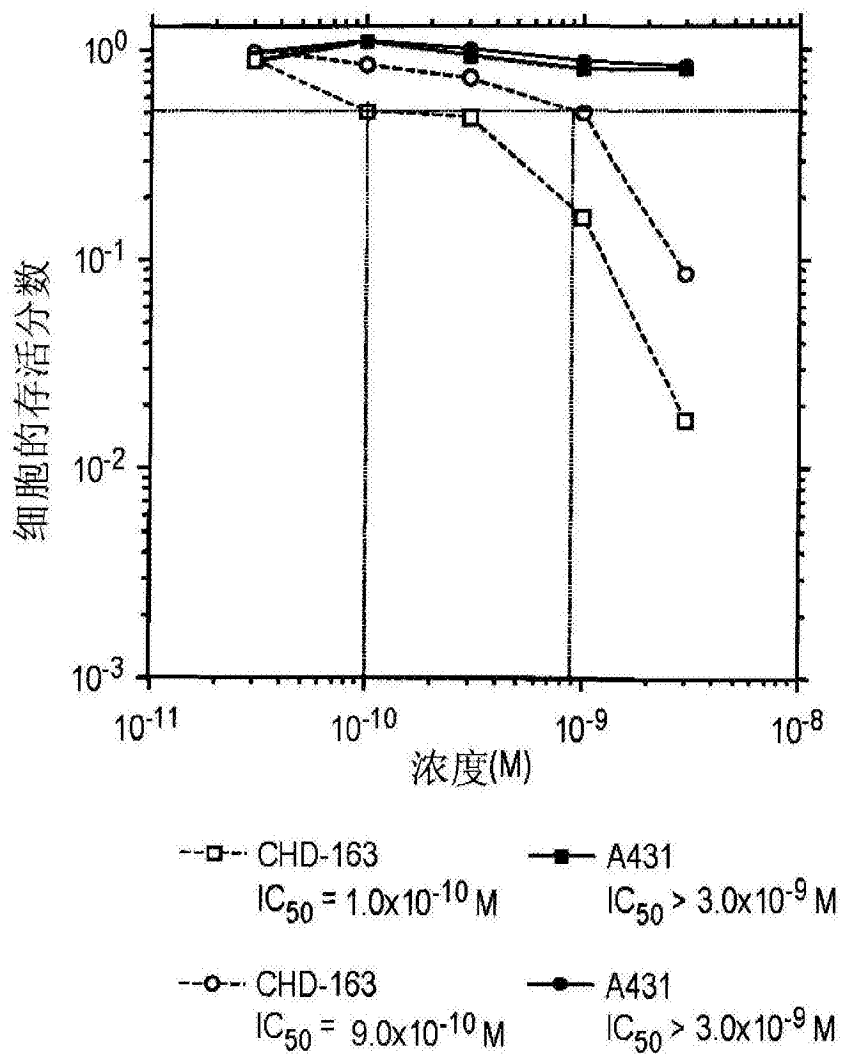
N901-SMCC-DM1偶联物对CHD-163(+)和A431(-)的细胞毒性
持续暴露克隆形成试验

图8D

huC242-SIAB-DM1对COLO 205(+)和A375(-)细胞的效力评价
持续暴露克隆形成试验

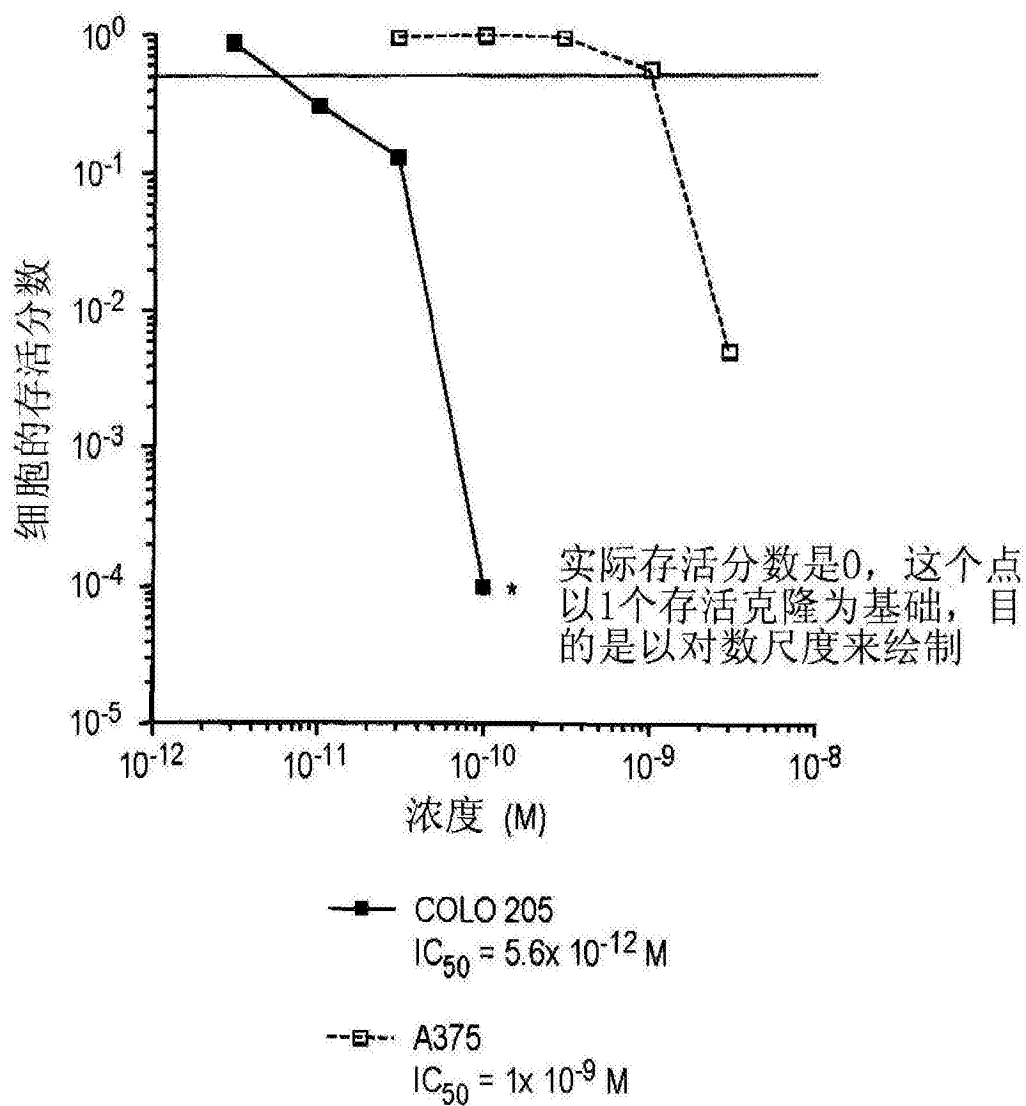


图9

huC242-SMCC-DM1对抗SCID小鼠中的COLO 205
人结肠癌异种移植物的抗肿瘤活性

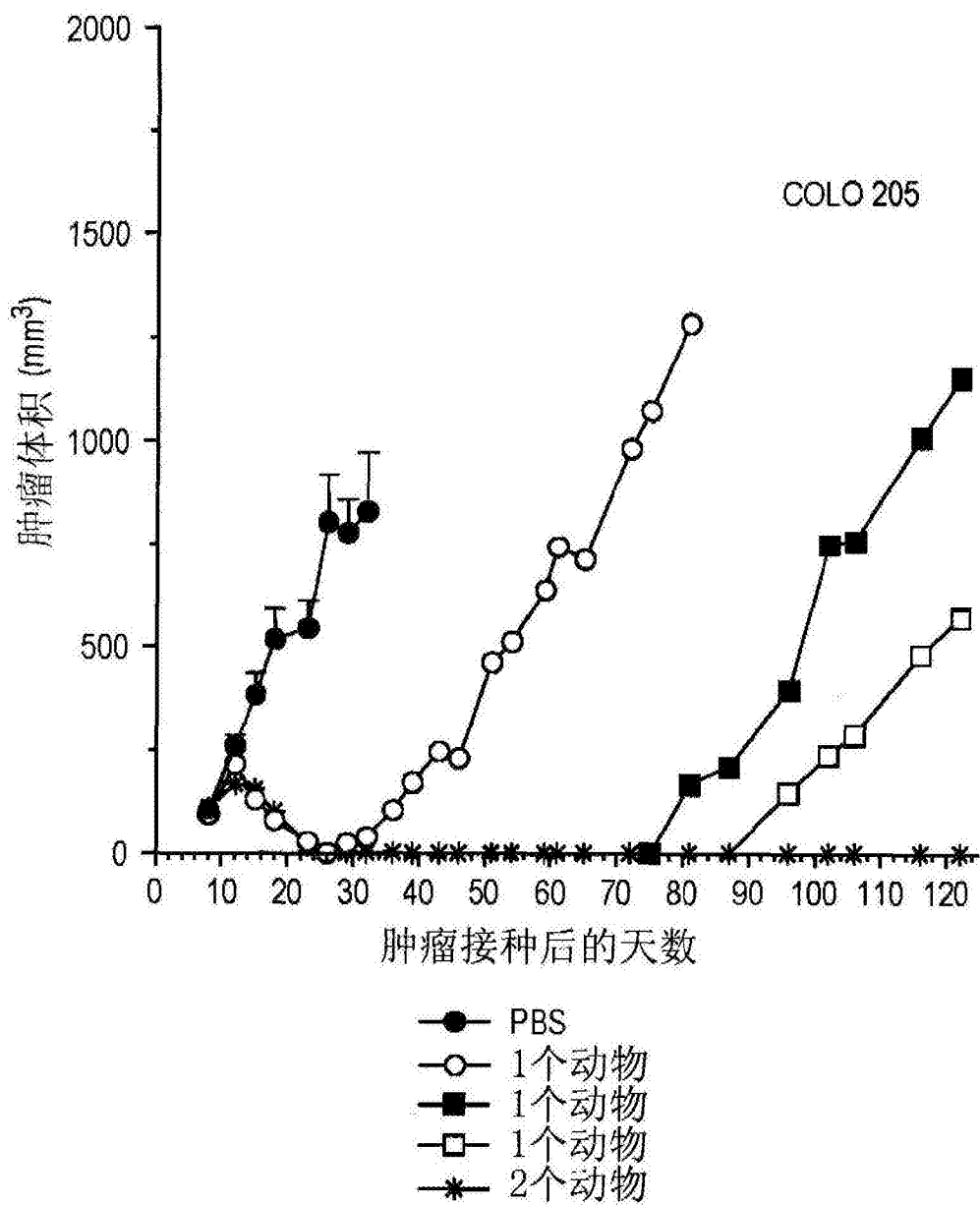


图10A

huC242-SMCC-DM1对抗SCID小鼠中的SUN 16
人胃肿瘤异种移植物的抗肿瘤活性

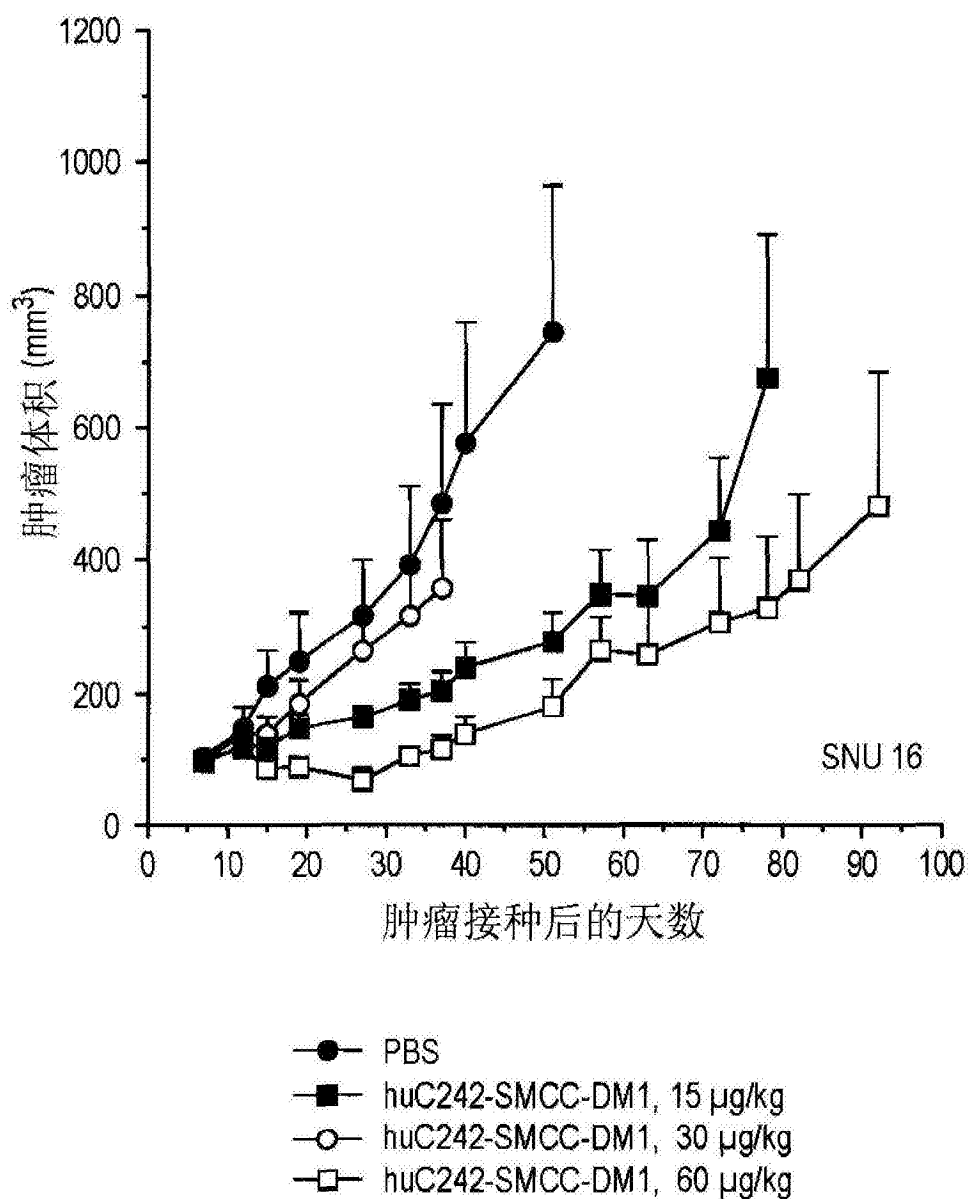


图10B

曲妥珠单抗-SMCC-DM1对CB. 17 SCID
小鼠中的MCF7异种移植物的抗肿瘤活性

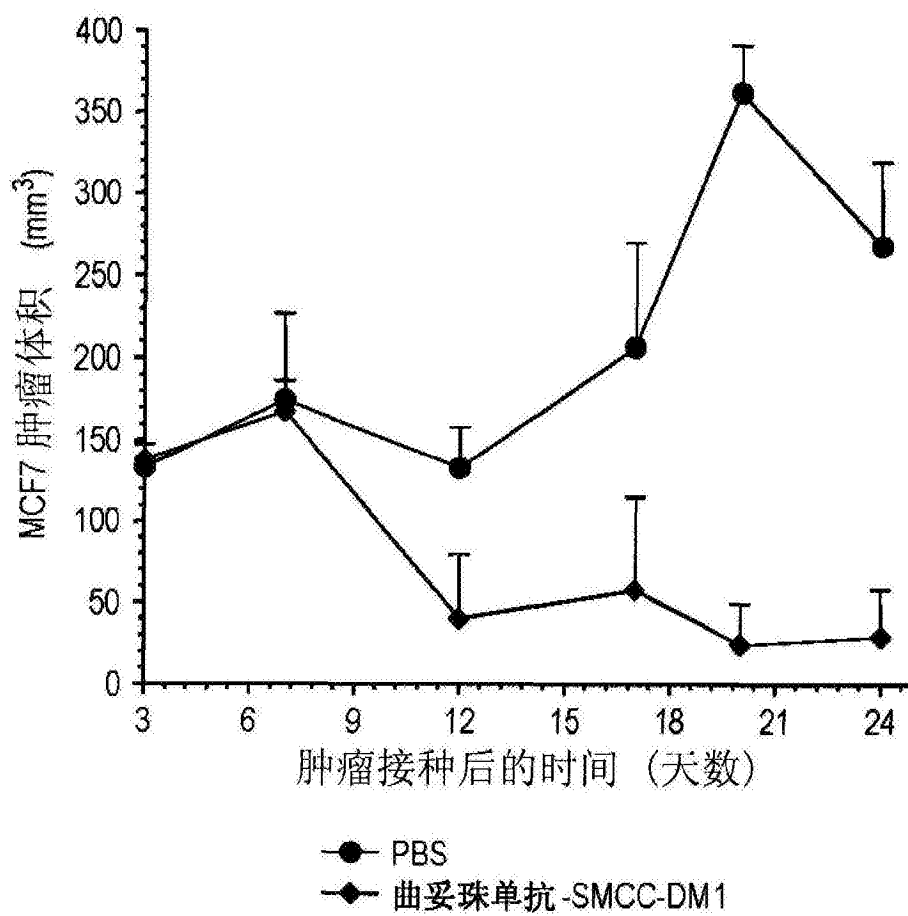
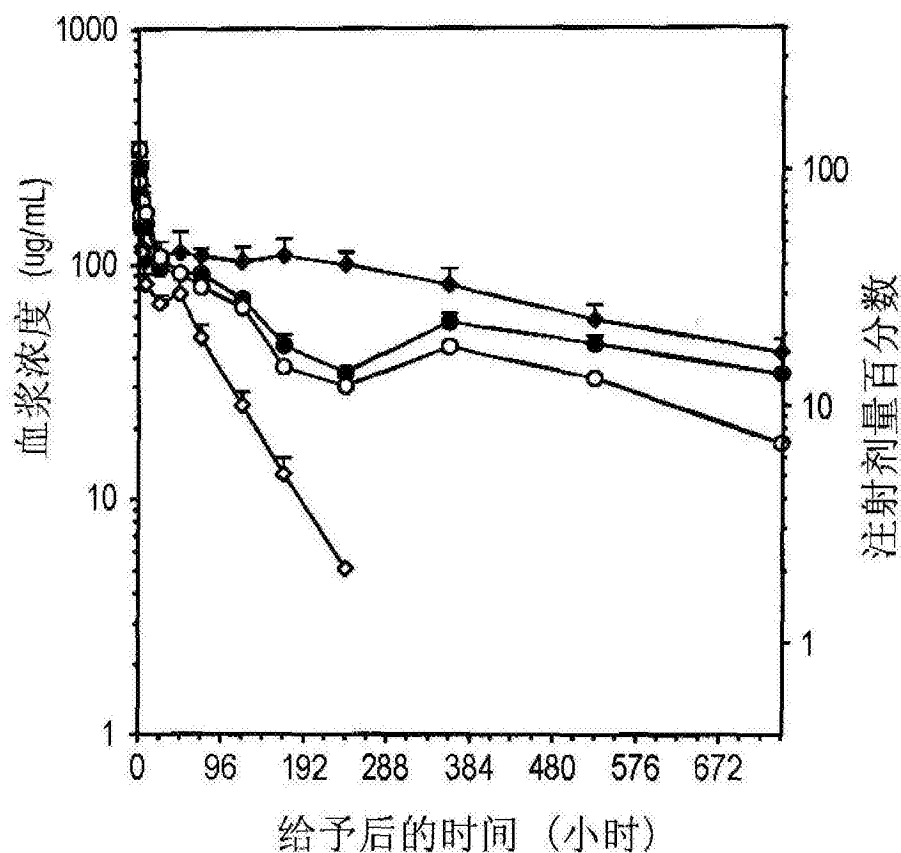


图10C

huC242-SPP-DM1和huC242-SMCC-DM1偶联物
在CD-1小鼠中的药物动力学研究
血浆清除曲线和药物动力学参数



◇ huC242-SPP-DM1 偶联物 ○ huC242-SMCC-DM1 偶联物
 ◆ huC242-SPP-DM1 抗体 ● huC242-SMCC-DM1 抗体

免疫偶联物	DM1/AB	C _{max}	t _{1/2}	AUC	CL	V _{ss}
		ug/mL	小时	小时.ug/mL	mL/小时/kg	mL/kg
huC242-SMCC-DM1	3.17	312.2	318.3	40374.2	0.3	112.5
huC242-SMCC		262.9	533.7	65953.9	0.2	119.6
huC242-SPP-DM1	3.26	191.4	49.8	9205.7	1.1	92.6
huC242-SPP		212.5	499.2	89345.7	0.1	78.2

图11

用huC242-SPP-DM1处理的CD-1小鼠的存活情况

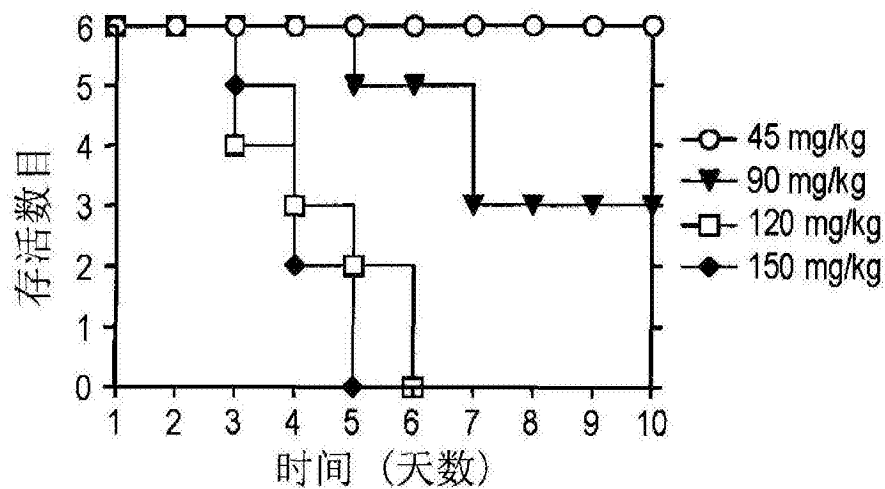


图12A

用huC242-SMCC-DM1处理的CD-1小鼠的存活情况

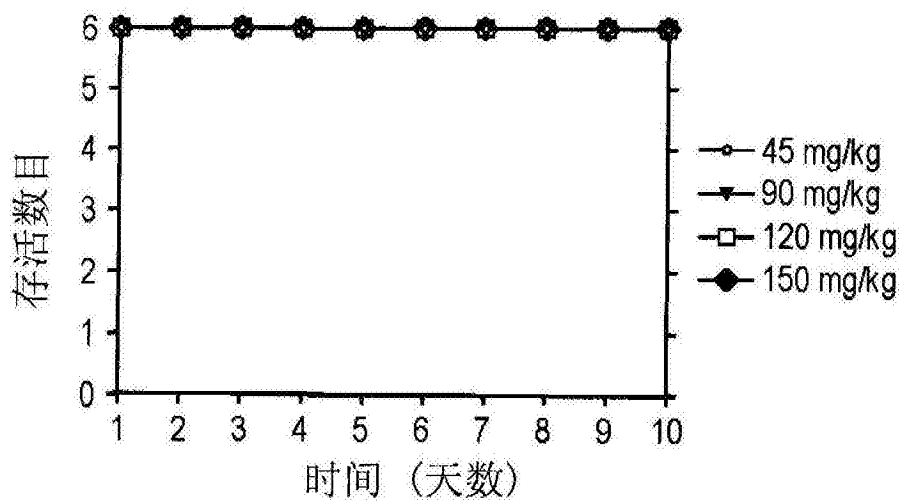


图12B

用huC242-SPP-DM1处理的CD-1小鼠的体重

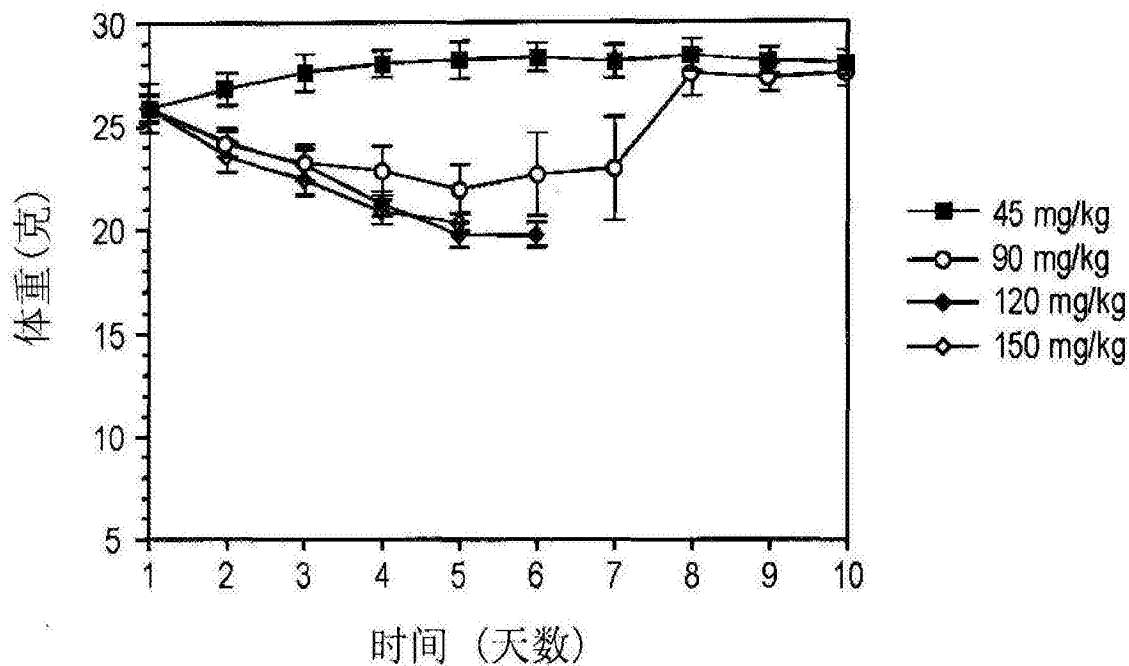


图12C

用huC242-SMCC-DM1处理的CD-1小鼠的体重

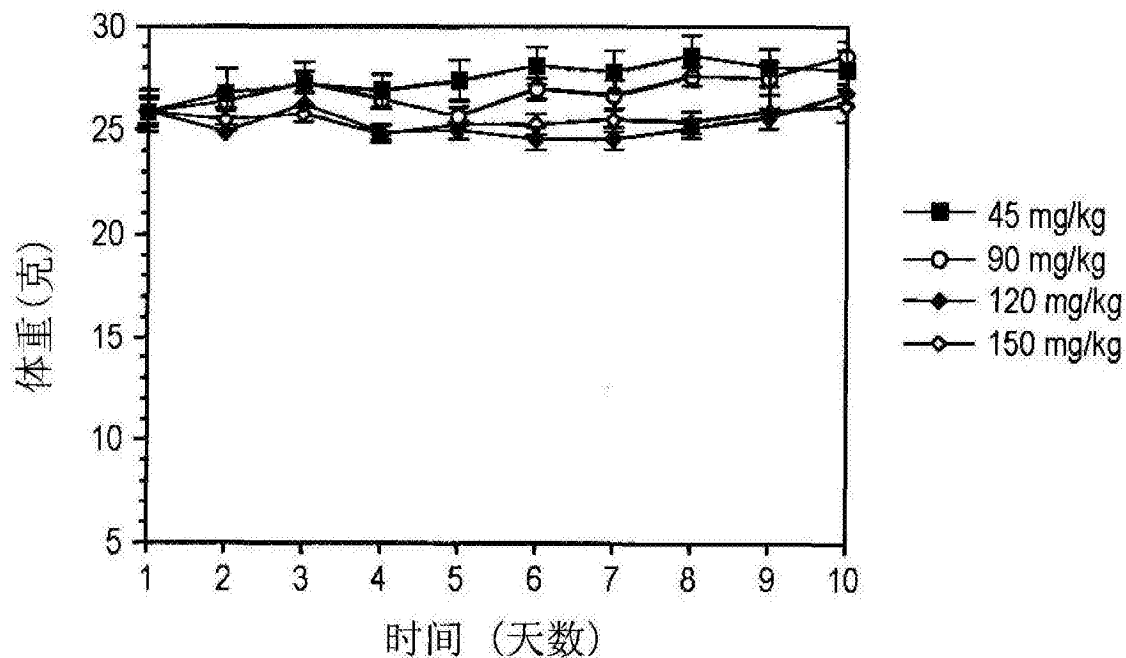
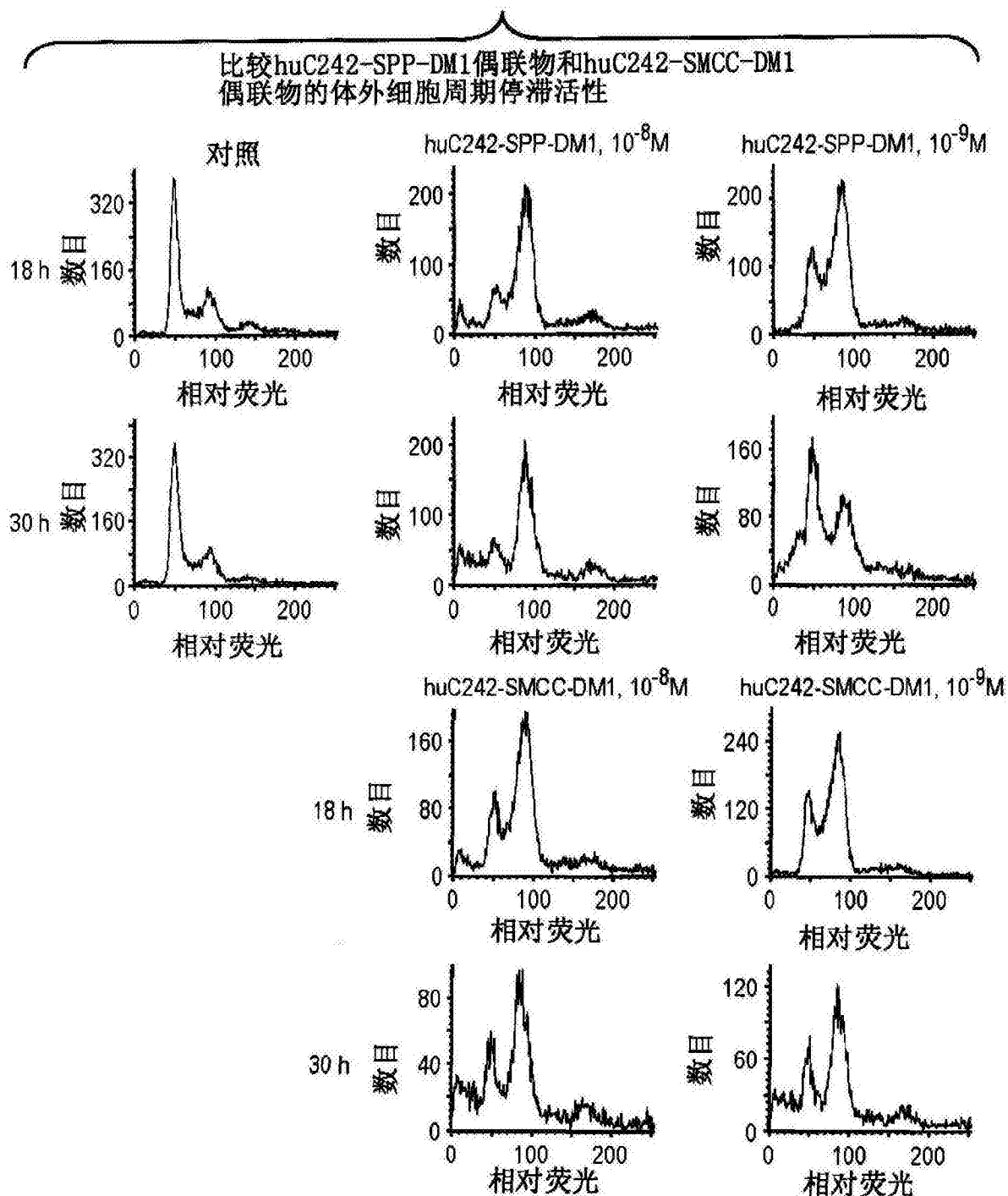


图12D



			细胞停滞活性		细胞杀伤活性
偶联物	浓度	细胞系	18 小时	30 小时	30 小时
C242-SPP-DM1	$1 \times 10^{-8} M$	Colo205	+++	+++	
	$1 \times 10^{-9} M$	Colo205	+++	++	25%
C242-SMCC-DM1	$1 \times 10^{-8} M$	Colo205	+++	+++	
	$1 \times 10^{-9} M$	Colo205	+++	+++	33-37%

图13

huC242-SPP-DM1与COLO 205 (抗原+, Ag+) 及
Namalwa (抗原-, Ag-) 细胞

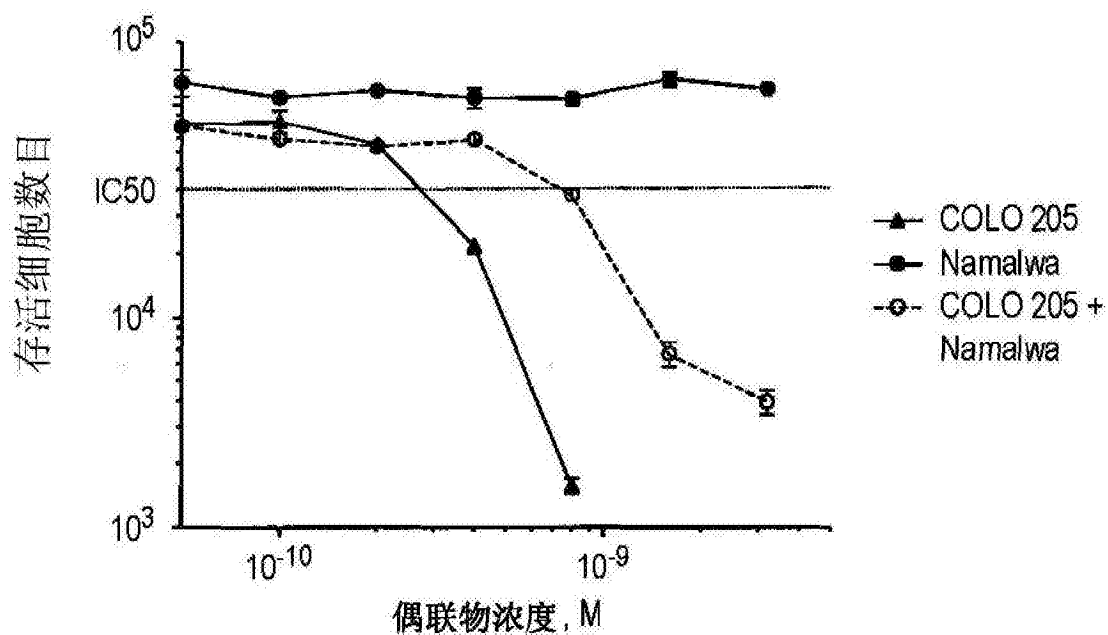


图14A

huC242-SMCC-DM1与COLO 205 (Ag+) 及
Namalwa (Ag-) 细胞

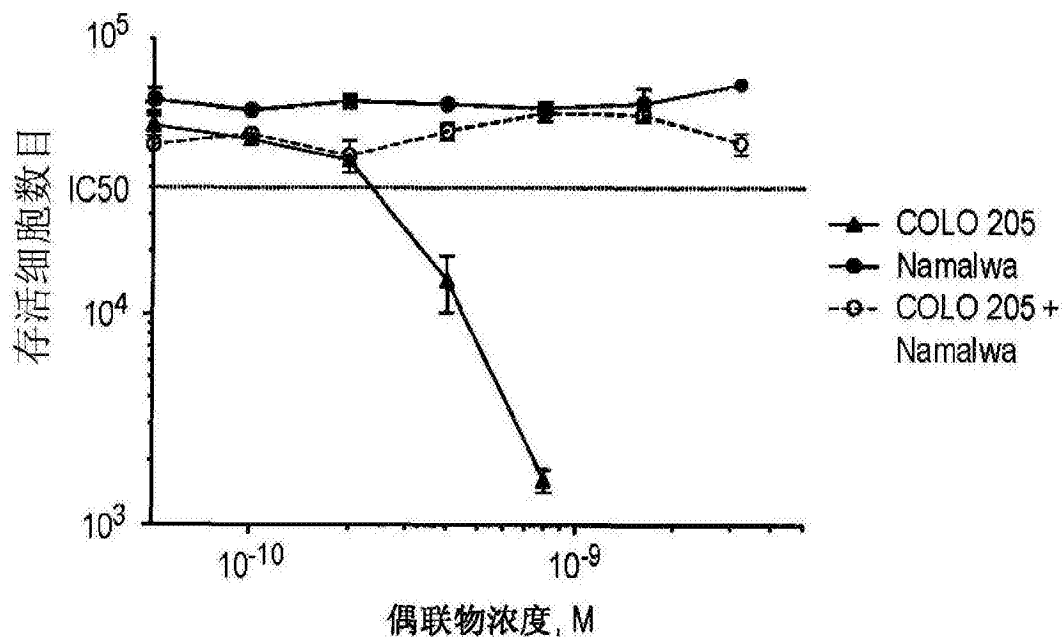


图14B

huC242偶联物的浓度: 8×10^{-10} M

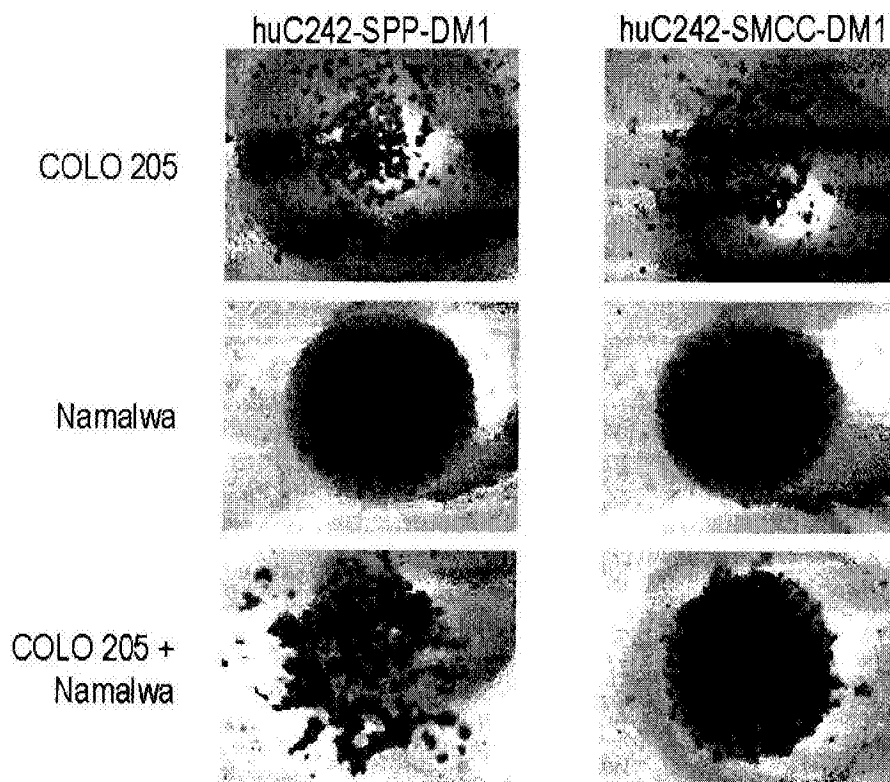
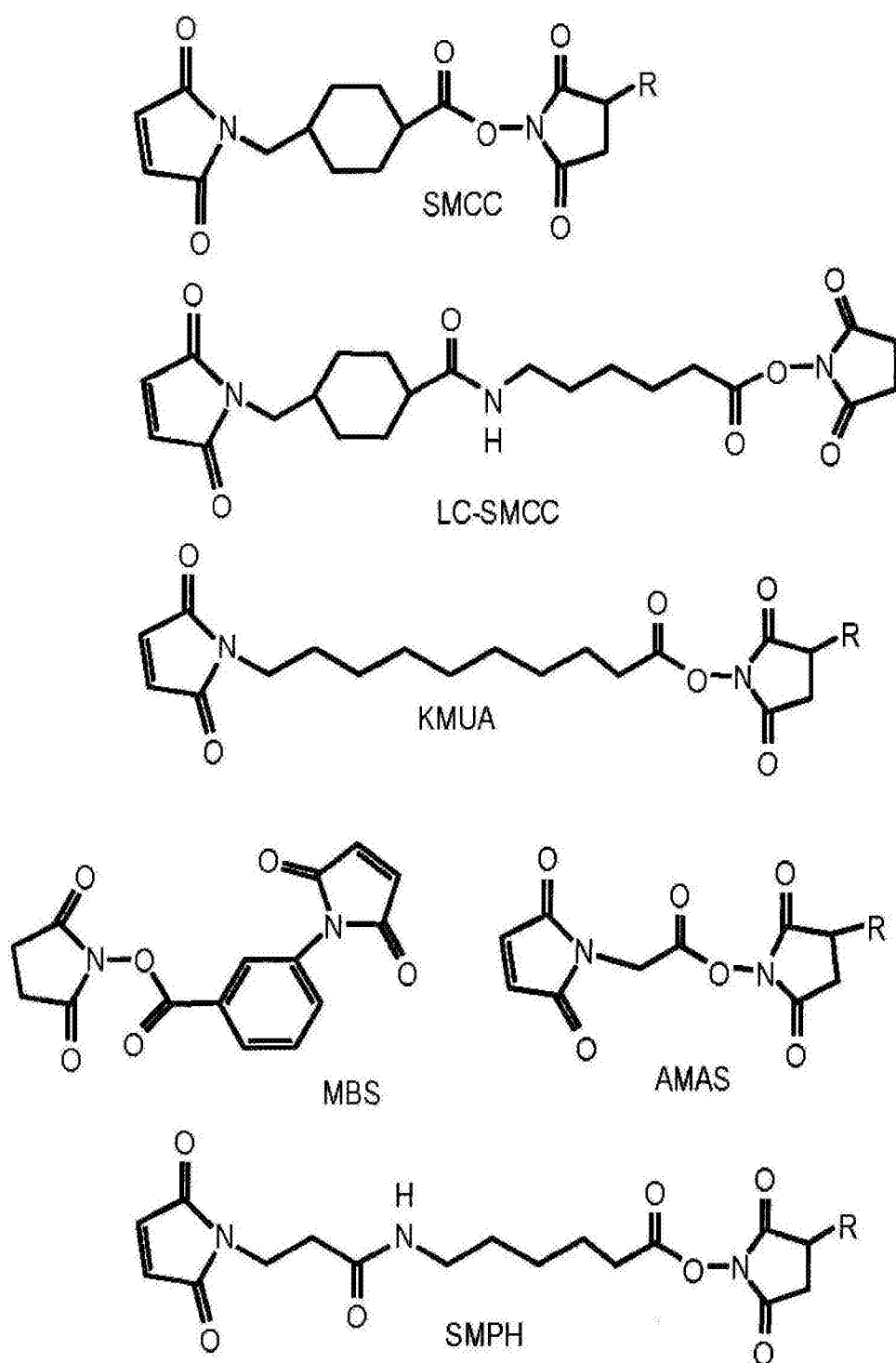


图14C

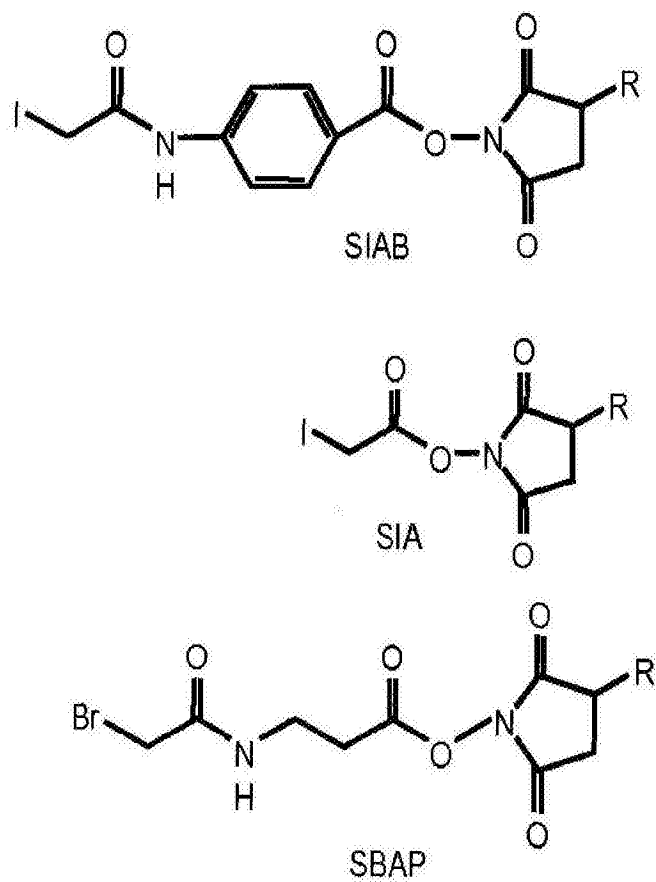
基于马来酰亚胺的交联剂的代表性结构



在所有情形下R=H或SO₃⁻

图15

基于卤代乙酰基的交联剂的代表性结构



在所有情形下R=H或 SO_3^-

图16

DM1和来自马来酰亚胺衍生抗体的抗体-DM1偶联物的结构。
作为示例，应用SMCC交联剂。

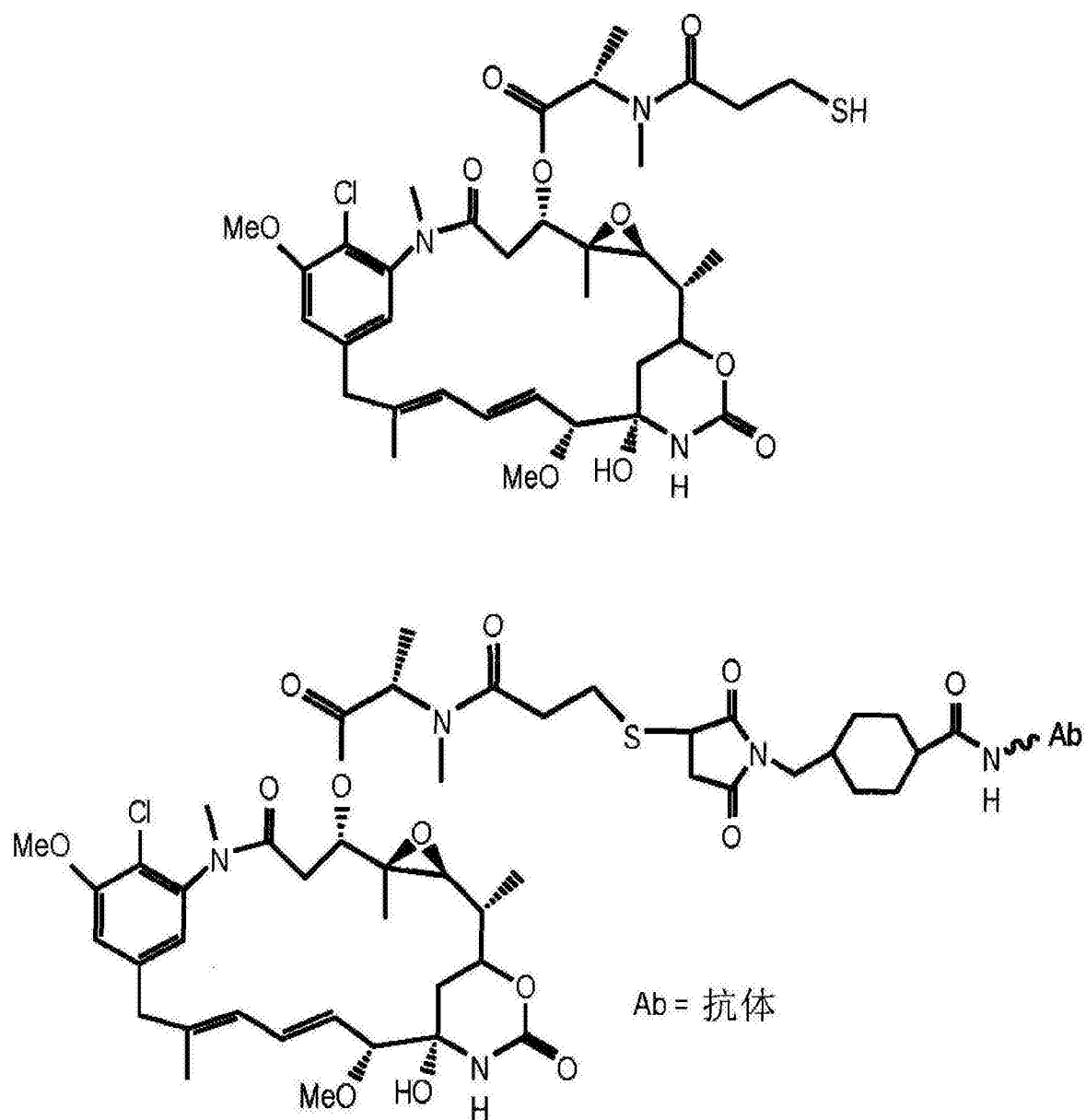


图17

来自卤代乙酰基衍生抗体的抗体-DM1偶联物的结构。
作为示例，应用SIAB交联剂(上面的结构)和SIA交联剂
(下面的结构)。

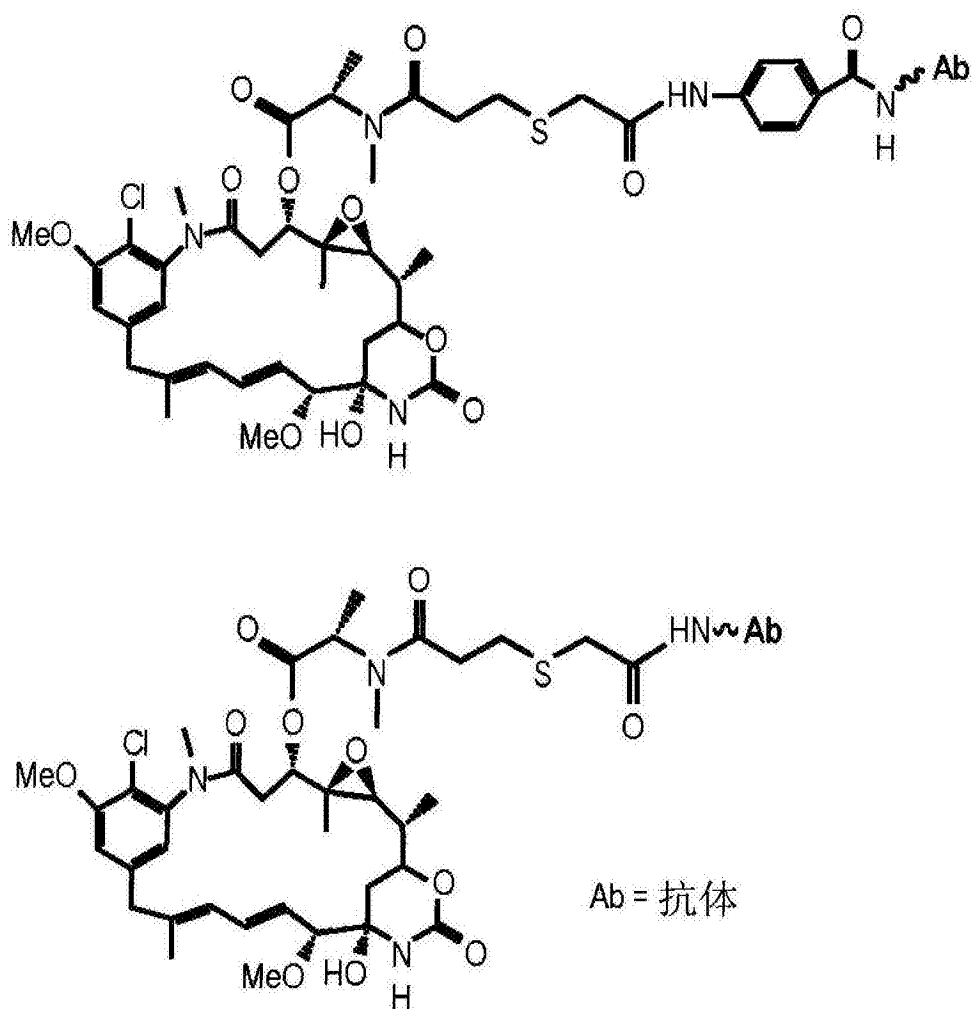


图18

DM4和来自马来酰亚胺衍生抗体的抗体-DM4偶联物的结构。
作为示例，应用SMCC交联剂。

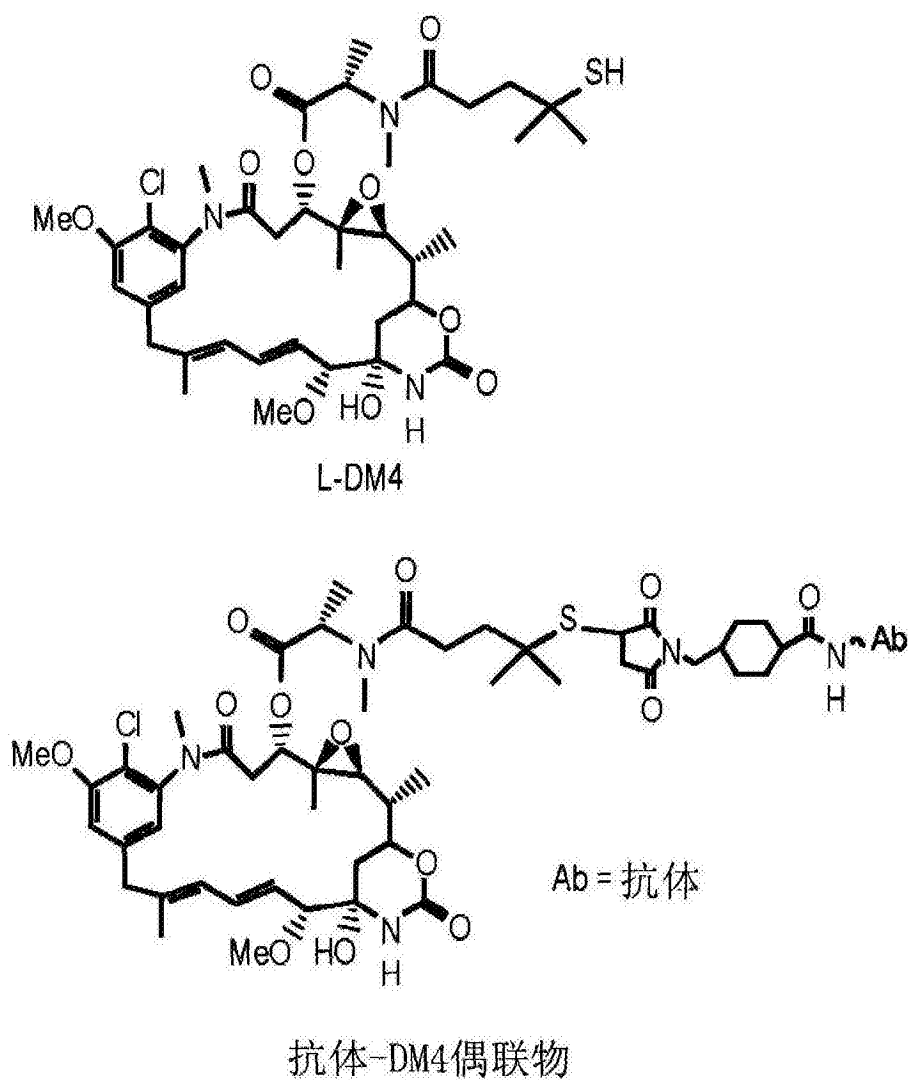


图19

来自卤代乙酰基衍生抗体的抗体-DM4偶联物的结构。
作为示例，应用SIAB交联剂(上面的结构)和SIA交联剂
(下面的结构)。

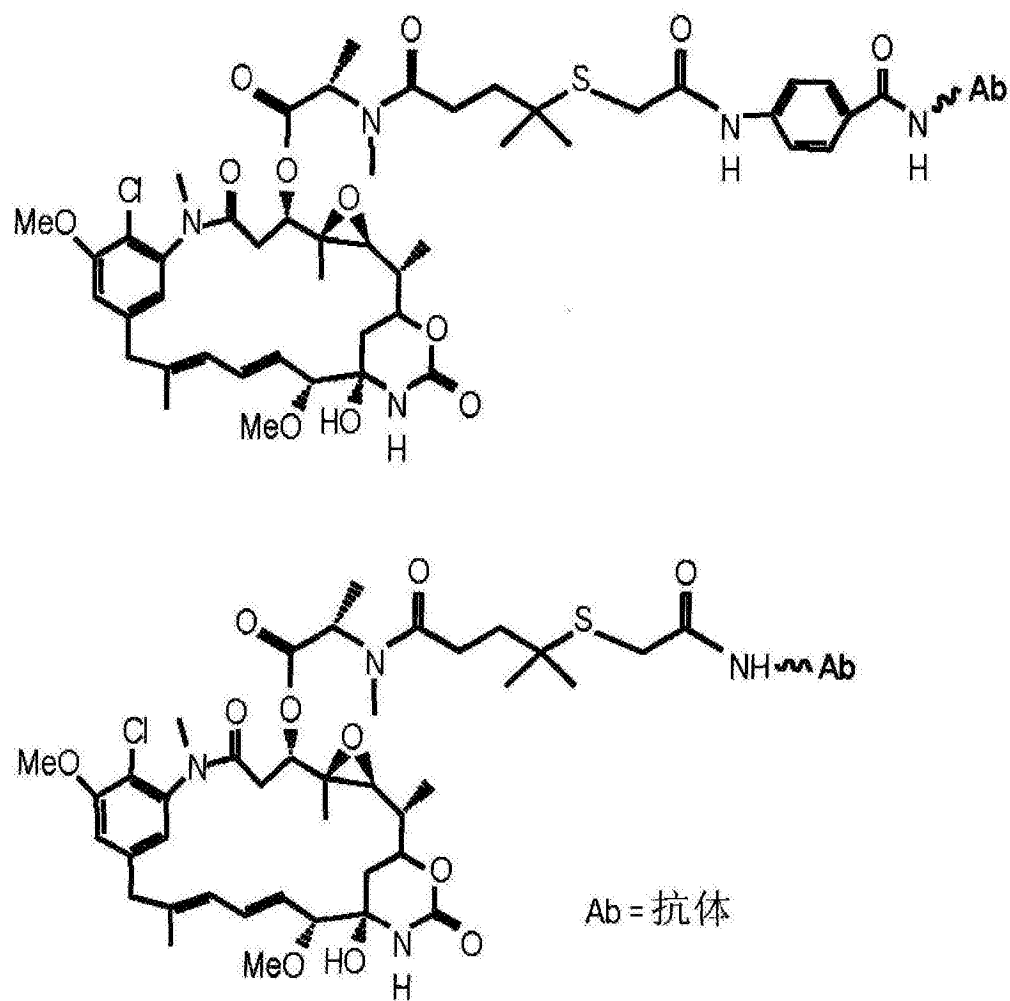


图20

无硫接头

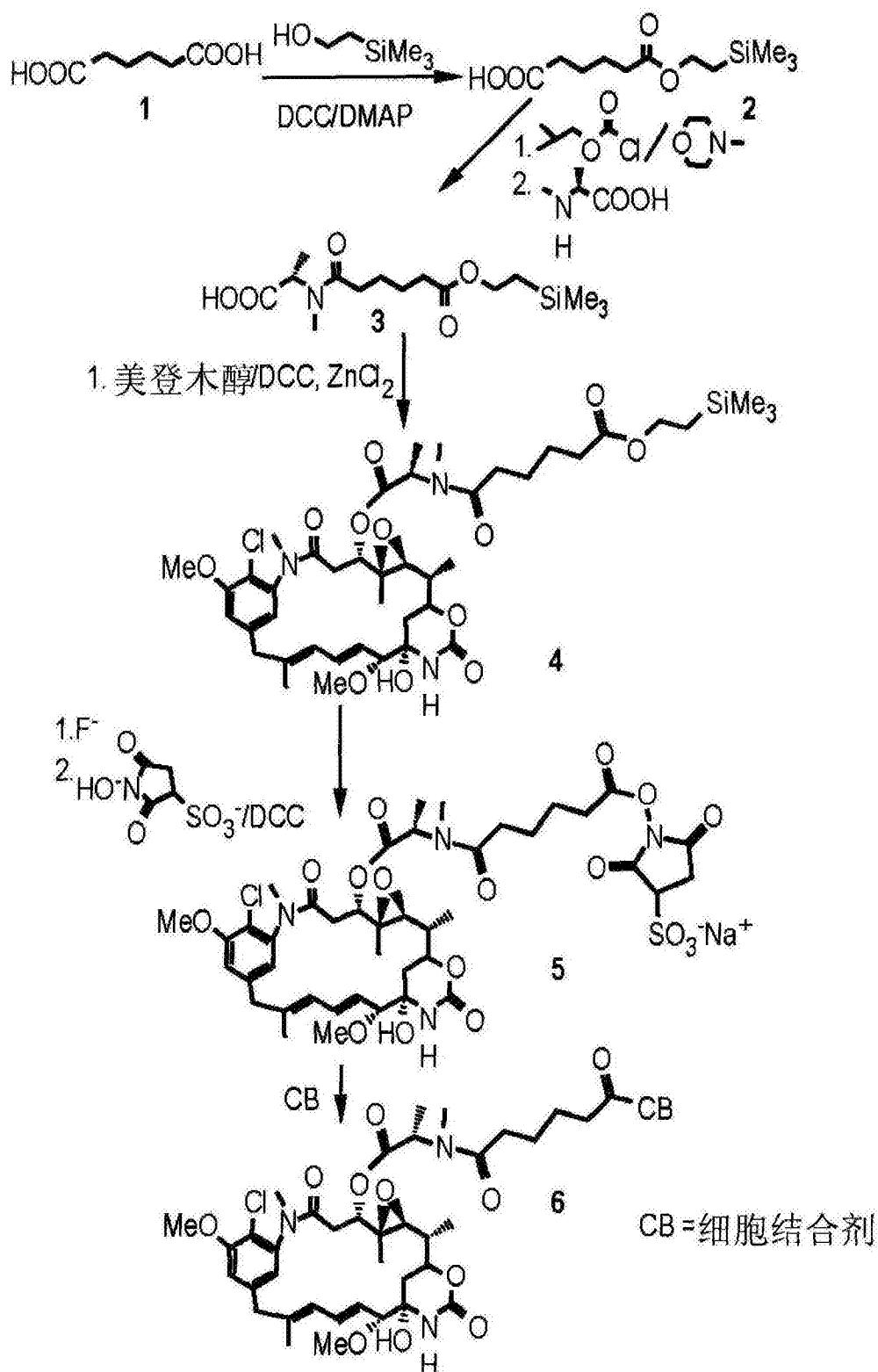


图21

HuC242-不含S的不可切割接头-DM1和huC242-SMNP-DM3
对COLO 205和A375细胞的细胞毒性
持续暴露克隆形成试验

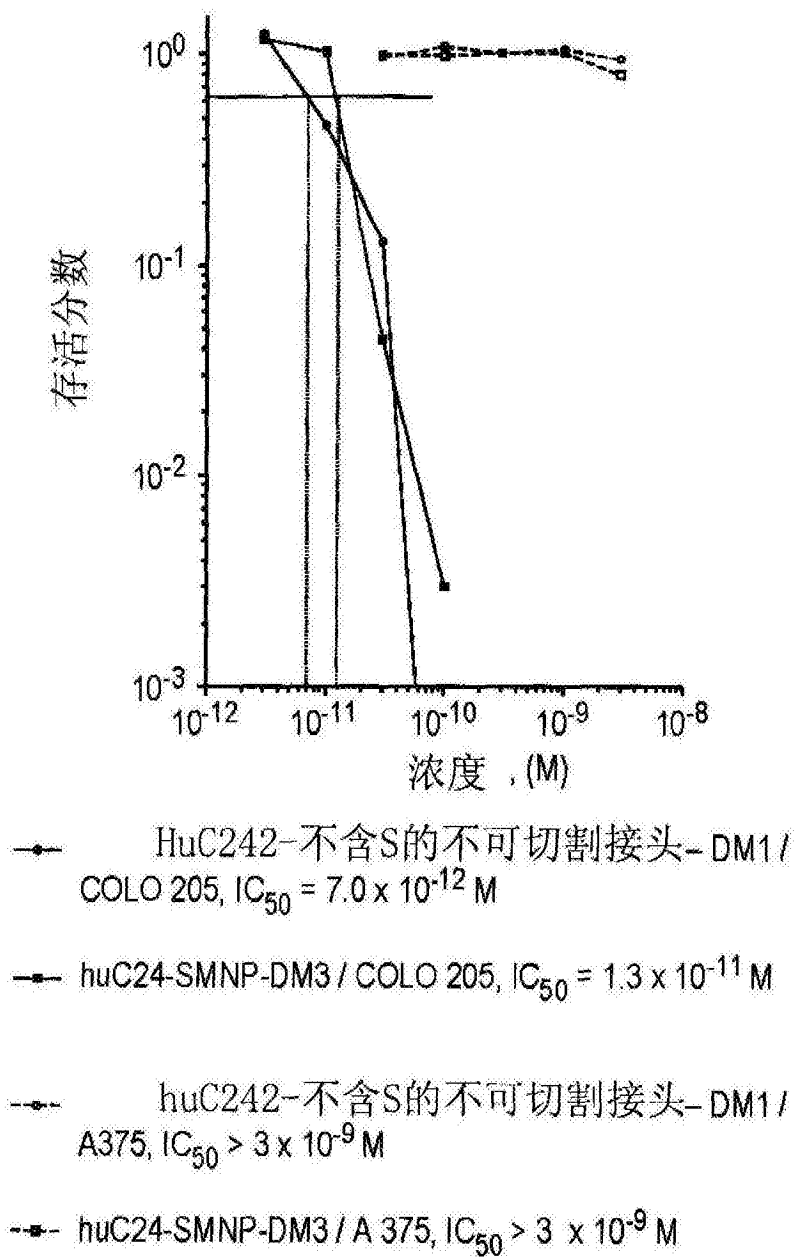
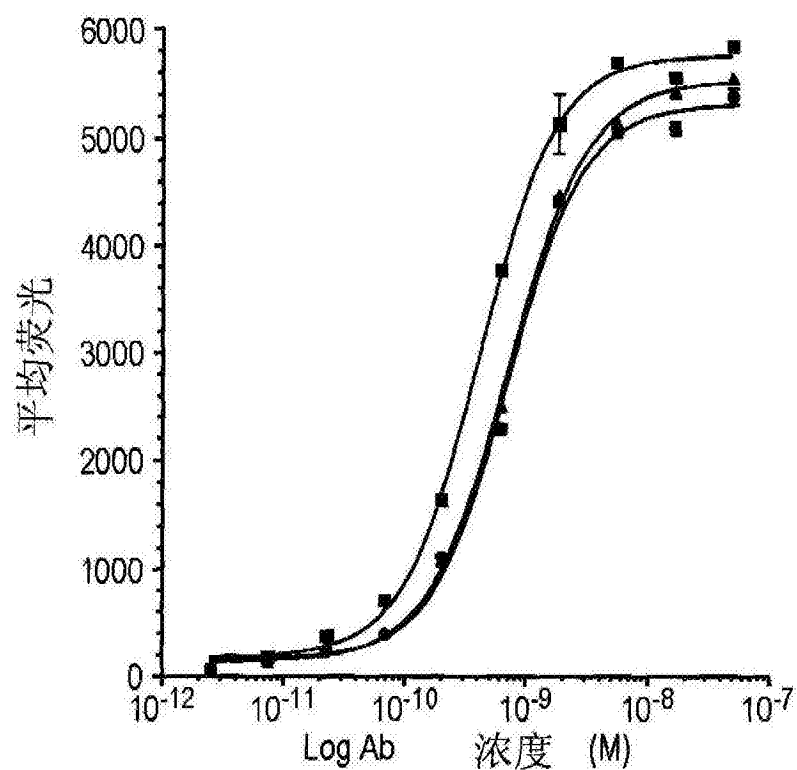


图22

HuC242-不含S的不可切割接头-DM1和huC242-SMNP-DM3
对COLO 205细胞的FACS结合试验



- huC242
 $EC_{50} = 4.12 \times 10^{-10} \text{ M}$
- ▲ huC242-不含S的不可切割接头-DM1
 $EC_{50} = 7.04 \times 10^{-10} \text{ M}$
- huC242-SMNP-DM3
 $EC_{50} = 7.08 \times 10^{-10} \text{ M}$

图23

ELISA: 曲妥珠单抗-SMCC-DM1和
曲妥珠单抗抗体对以0.3ng/孔包被
的ECD平板的结合

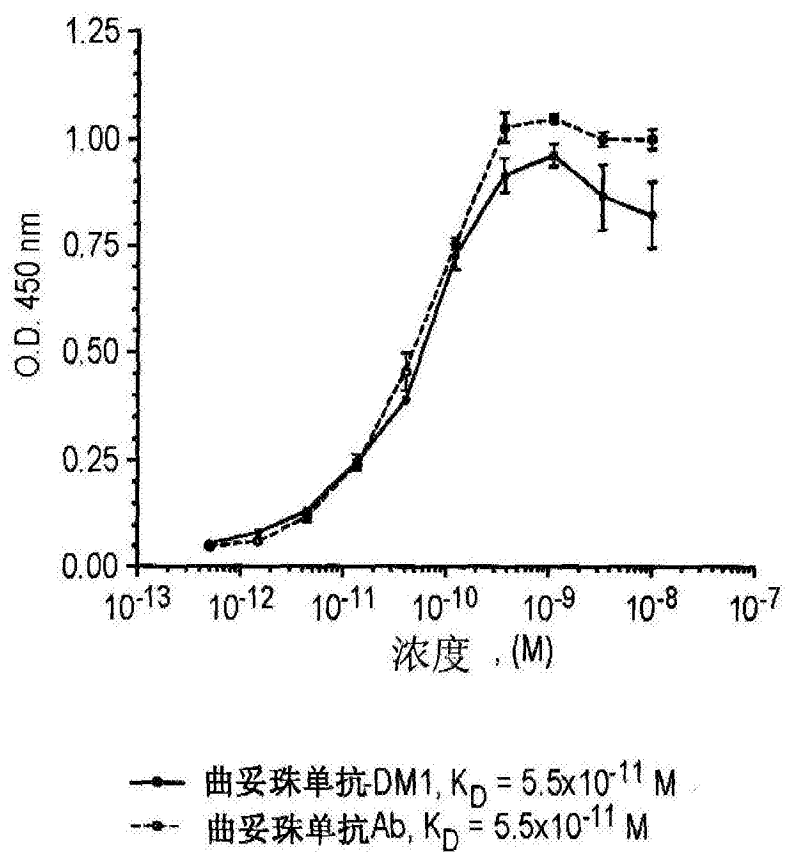


图24

曲妥珠单抗-SMCC-DM1对SKBR3和A375 细胞的细胞毒性
持续暴露克隆形成试验

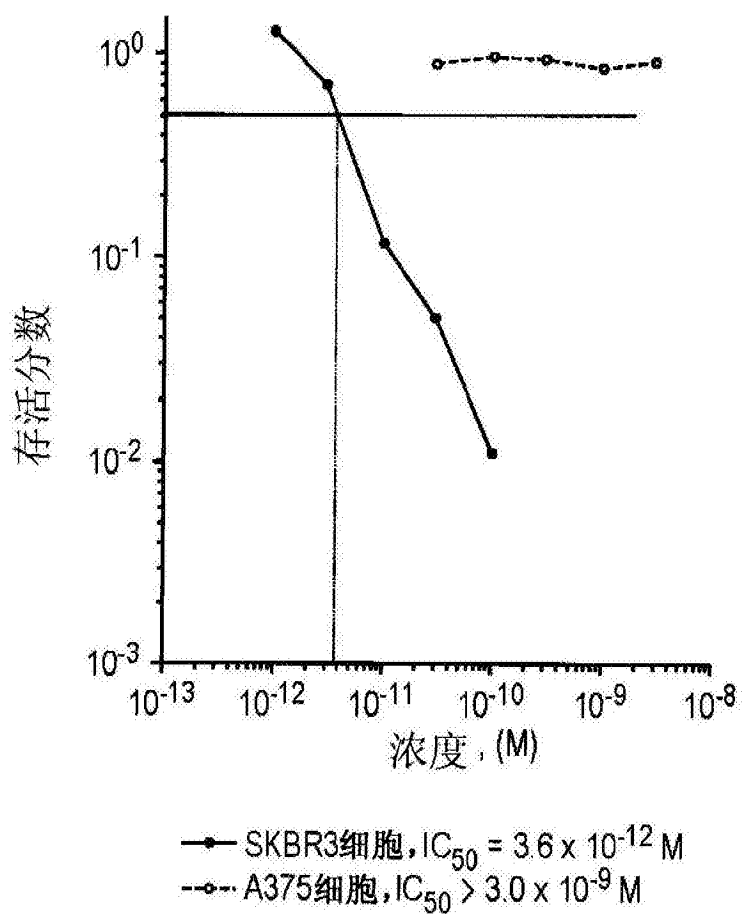


图25

曲妥珠单抗-SMCC-DM1的尺寸排阻色谱

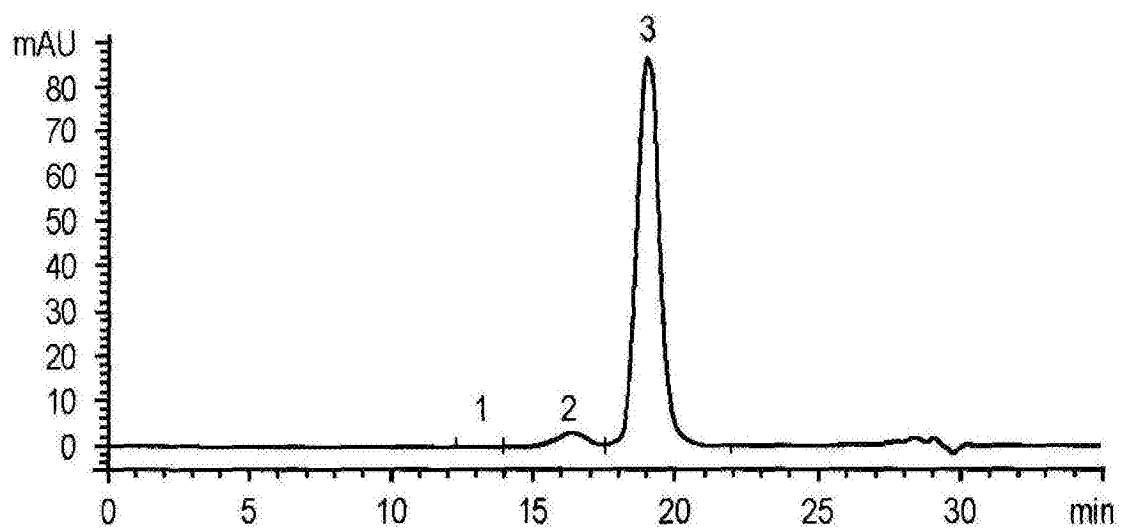


图26

ELISA: 曲妥珠单抗-SIAB-DM1和曲妥珠单抗抗体
对以0.3ng/孔包被的ECD平板的结合

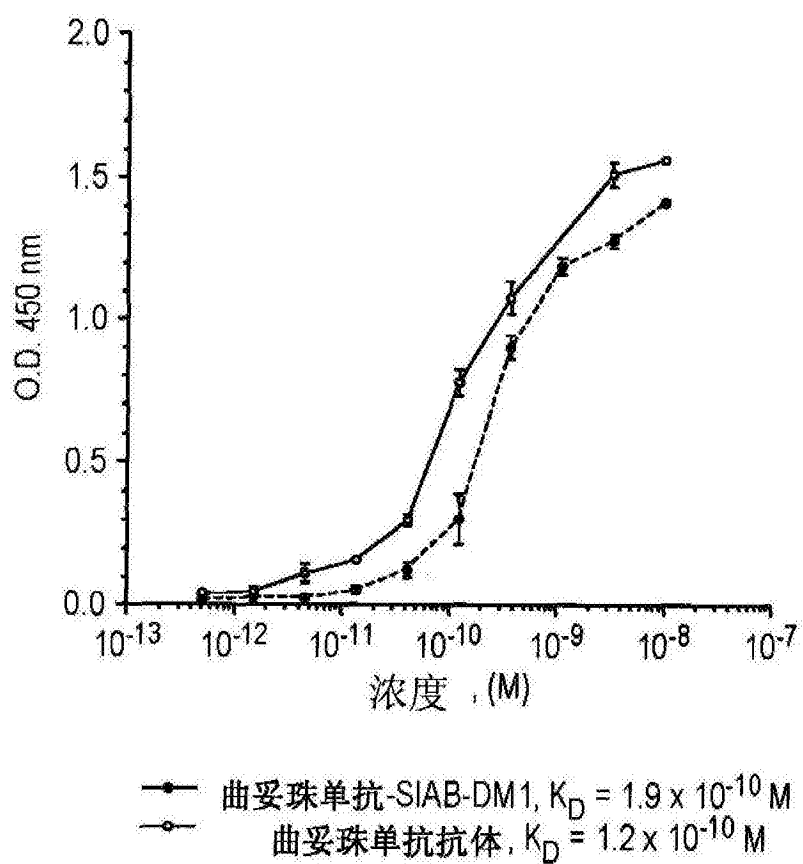


图27

曲妥珠单抗-SIAB-DM1对SKBR3和A375 细胞的细胞毒性
持续暴露克隆形成试验

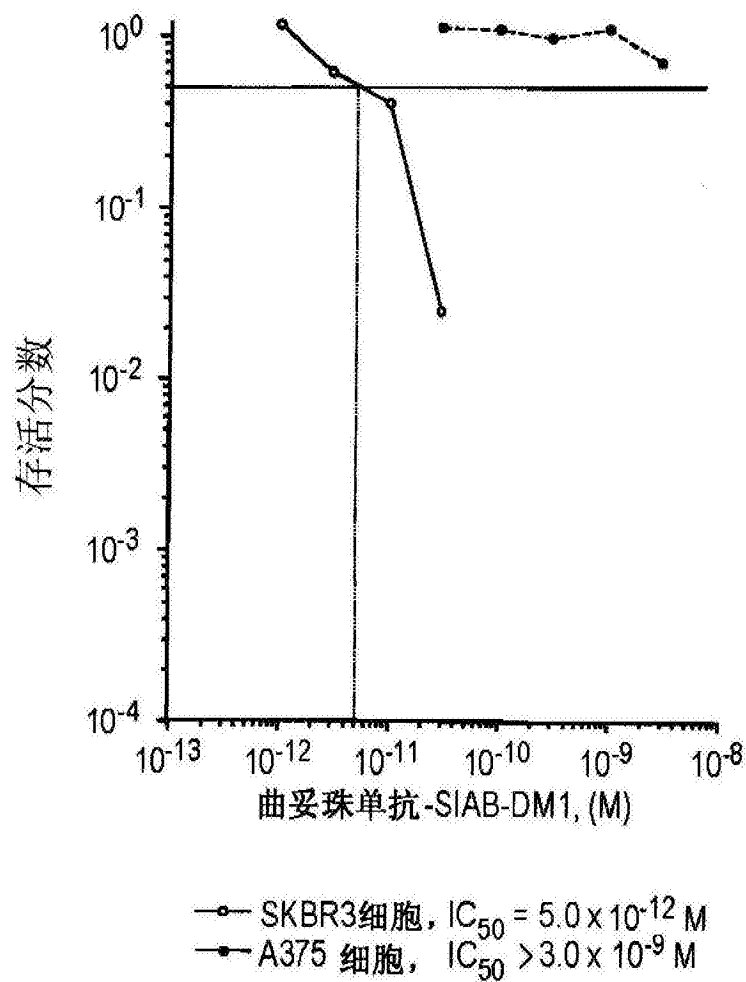


图28

曲妥珠单抗-SIAB-DM1的尺寸排阻色谱

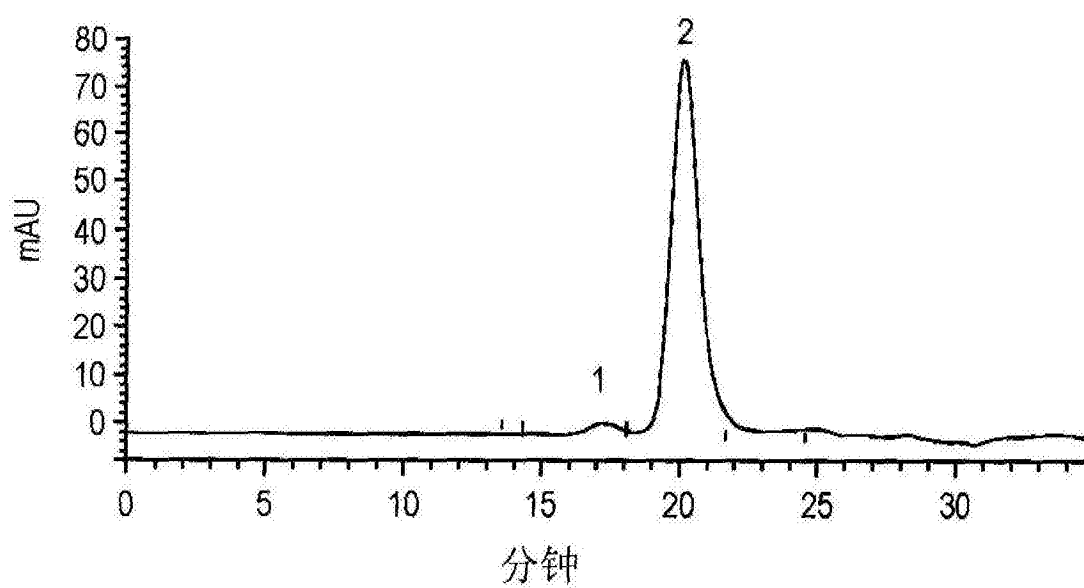


图29