(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 118251241 B
(45)授权公告日 2024.12.13

(21)申请号 202380014453.7
(22)申请日 2023.07.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118251241 A
(43)申请公布日 2024.06.25
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/106014 2022.07.15 CN
PCT/CN2023/086107 2023.04.04 CN
PCT/CN2023/088115 2023.04.13 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.05.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/107444 2023.07.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/012566 EN 2024.01.18
(73)专利权人 启德医药科技(苏州)有限公司
地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区若水路398号D座5层
(72)发明人 杨冬 胡明宇 孙亚军 宋鎬英 徐涵文 秦刚
(74)专利代理机构 北京永新同创知识产权代理有限公司 11376
专利代理师 栾星明 程大军
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
A61K 47/65(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
(56)对比文件
WO 2021136475 A1,2021.07.08
审查员 吴冲

权利要求书5页 说明书98页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

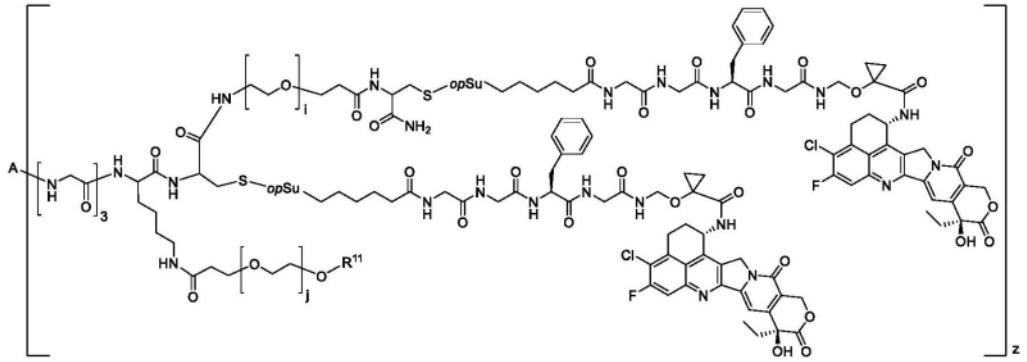
抗体、连接子、负载物、缀合物及其应用

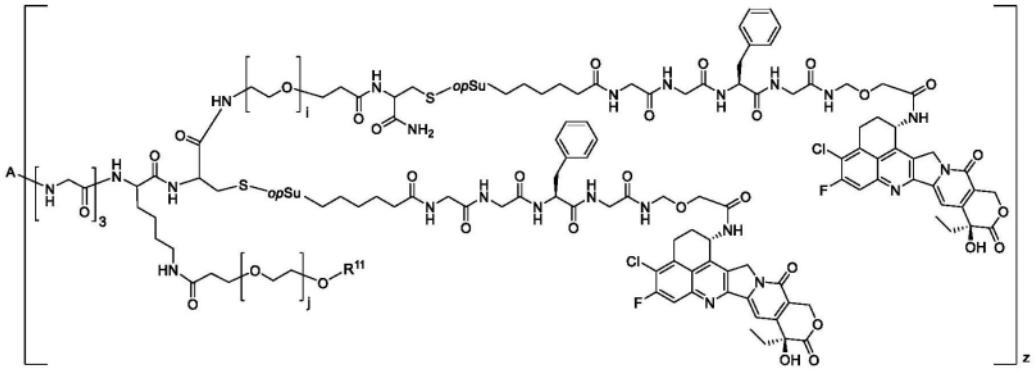
(57)摘要

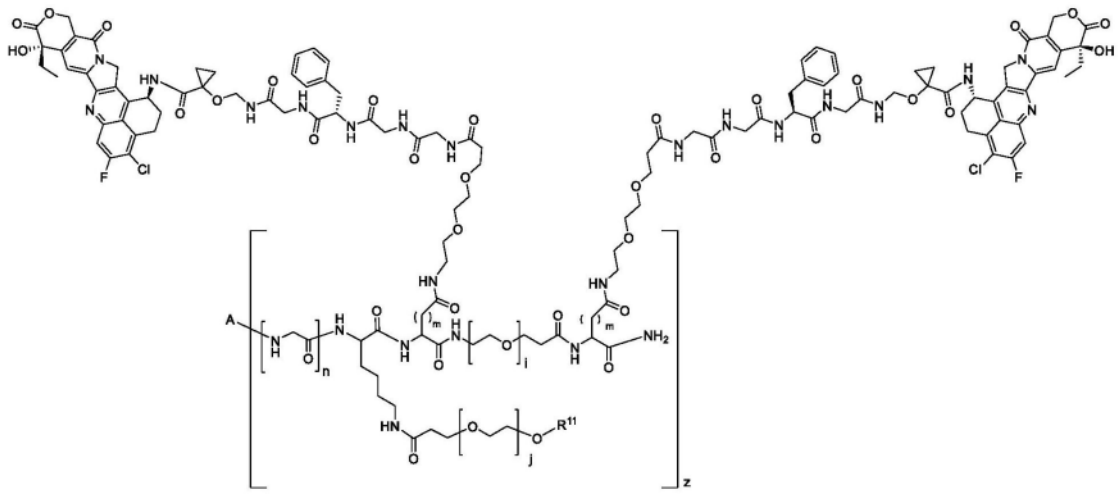
本申请涉及一种用于靶向分子-药物缀合物的抗体、负载物和连接子分子,以及其相应缀合物、制备和用途。

CN 118251241 B

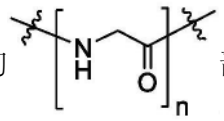
1.缀合物,选自

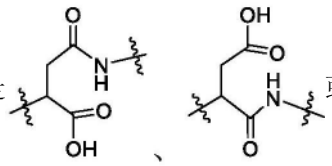






其中,A是抗TROP2抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段被修饰成与式

中的  部分连接;

opSu是  或其混合物;

R^{11}是C_{1-10}烷基;

i独立地是1至8的整数;

j是8至12的整数;

m是1或2;

z是1至4的整数。

2.根据权利要求1所述的缀合物,其中

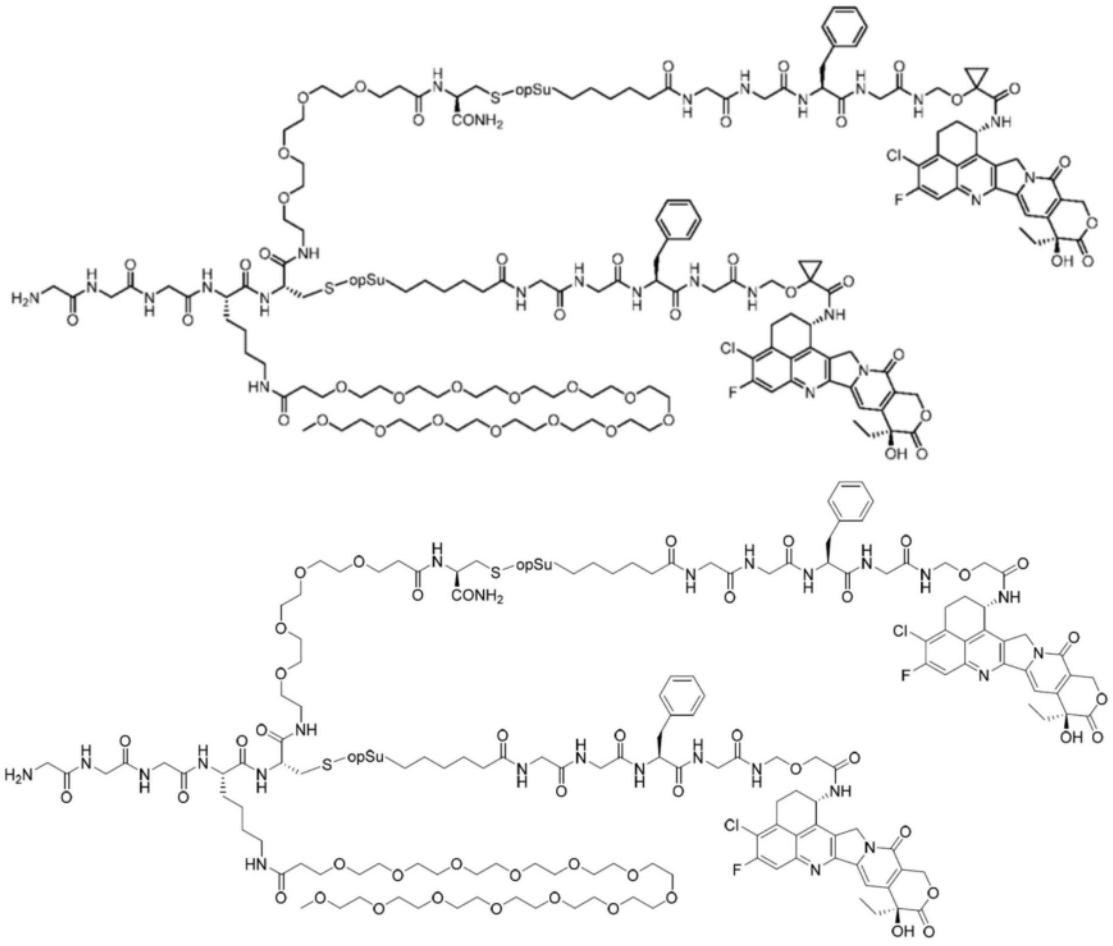
所述i是4;

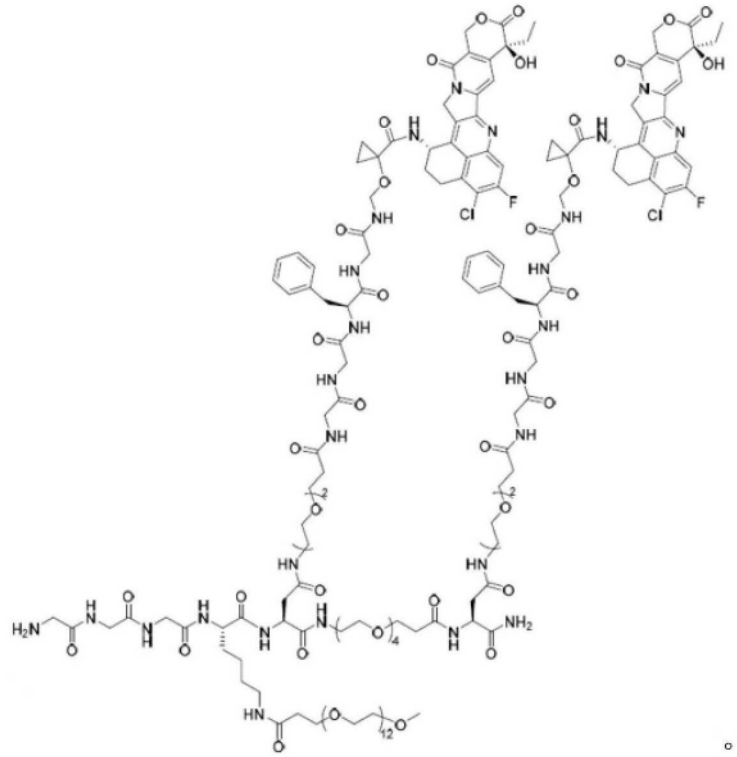
所述j是8或12;

所述m是1;

所述z是2。

3.根据权利要求1所述的缀合物,其通过以下中间物结构制备得到:





4.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中

所述V_H包含:

(i)如SEQ ID NO:4的氨基酸序列所示的HCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:8的氨基酸序列所示的HCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HCDR3;

和

所述V_L包含:

(i)如SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的LCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的LCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的LCDR3;

或

所述V_H包含:

(i)如SEQ ID NO:5的氨基酸序列所示的HCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:9的氨基酸序列所示的HCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:12的氨基酸序列所示的HCDR3;

和

所述V_L包含:

(i)如SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的LCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的LCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的LCDR3;

或

所述V_H包含:

(i)如SEQ ID NO:4的氨基酸序列所示的HCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的HCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HCDR3;

和

所述V_L包含:

(i)如SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的LCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的LCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的LCDR3;

或

所述V_H包含:

(i)如SEQ ID NO:7的氨基酸序列所示的HCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的HCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HCDR3;

和

所述V_L包含:

(i)如SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的LCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的LCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的LCDR3;

或

所述V_H包含:

(i)如SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的HCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:8的氨基酸序列所示的HCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HCDR3;

和

所述V_L包含:

(i)如SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的LCDR1,

(ii)如SEQ ID NO:15的氨基酸序列所示的LCDR2,和

(iii)如SEQ ID NO:16的氨基酸序列所示的LCDR3。

5.根据权利要求4所述的缀合物,其中所述V_H包含与SEQ ID NO:21至25的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;和

所述V_L包含与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

6.根据权利要求4所述的缀合物,其中所述抗体或抗原结合片段包含:重链恒定结构域(CH),所述CH包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;和

轻链恒定结构域,所述轻链恒定结构域包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

7.根据权利要求4所述的缀合物,其中所述抗体或抗原结合片段以0.5nM至20nM的平衡解离常数(K_D)结合至TROP2。

8.根据权利要求4所述的缀合物,其中所述抗体或抗原结合片段包含:重链,所述重链包含与SEQ ID NO:30至33的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;和轻链,所述轻链包含与SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

9.根据权利要求8所述的缀合物,其中所述抗体或所述抗原结合片段包含所述重链的C末端修饰和/或所述轻链的C末端修饰,由此使所述抗体、Sp和连接酶供体底物的识别序列依序连接;Sp是选自GA、GGGGS(SEQ ID NO:42)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:43)和GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:44)的间隔子序列;所述连接酶供体底物的识别序列是LPXTGJ(SEQ ID NO:49),其中X可以是任何单一天然或非天然氨基酸;J不存在,或是包含1-10个氨基酸的氨基酸片段。

10.根据权利要求9所述的缀合物,其中经过修饰的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:30至33的重链和SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:41的轻链;

或

经过修饰的抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:36至39的重链和SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的轻链。

11.根据权利要求1所述的缀合物,其中所述缀合物具有的药物与抗体比(DAR)是1至8的整数或非整数。

12.一种药物组合物,所述药物组合物包含预防或治疗有效量的根据权利要求1至11中任一项所述的缀合物;以及至少一种药学上可接受的载体。

13.根据权利要求1至11中任一项所述的缀合物或者根据权利要求12所述的药物组合物在制造用于治疗疾病的药剂中的用途;其中所述疾病是TROP2相关肿瘤。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述TROP2相关肿瘤包括过表达TROP2的肿瘤或具有TROP2基因突变的肿瘤。

15.根据权利要求13所述的用途,其中所述肿瘤包含乳腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌和泌尿道上皮癌。

抗体、连接子、负载物、缀合物及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及生物制药领域,具体地说,涉及制备靶向分子-药物缀合物的抗体、负载物和连接子,以及其相应缀合物、制备方法和用途。

背景技术

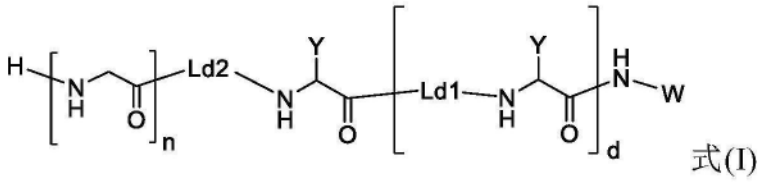
[0002] TROP2是一种跨膜蛋白并且已发现,它在包括子宫内膜癌、前列腺癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌、口腔癌、神经胶质瘤在内的若干癌症类型中过表达,使其成为开发靶向疗法的天然候选物。TROP2充当细胞自我更新、增殖和转化中的调控因子。实验显示,TROP2可以促进肿瘤生长,而当TROP2基因被敲除时,肿瘤细胞增殖会受到干扰。TROP2的有限组织表达将降低治疗的毒性,这也是靶向TROP2的疗法的优点。已经提出多种靶向TROP2的ADC,如DS-1062、TRODELVY、BAT8003。这些治疗剂显著提高TROP2阳性癌症患者的存活率。

[0003] DS-1062是第一三共公司(Daiichi Sankyo)使用其专有的DXd ADC技术开发的抗体缀合物。它是由连接至DXd的靶向Trop2蛋白质的单克隆抗体构成。包括较多NSCLC患者的数据显示,DS-1062展现出良好的剂量依赖性抗癌活性。随着剂量增加,越来越多的NSCLC患者的肿瘤缩小。TRODELVY是首个获FDA批准的专门用于复发性或难治性转移性TNBC的ADC,还是首个获FDA批准的抗TROP2 ADC。它由连接至SN-38的靶向TROP2的抗体组成,SN-38是化学治疗药物伊立替康(irinotecan)的活性代谢物。

[0004] 然而,对于靶向TROP2的新颖ADC药物的需求量仍然很大,并且高安全性ADC仍是新颖药物的一个开发方向。

发明内容

[0005] 在第一方面,提供一种式(I)化合物:

[0006] 

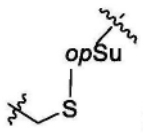
式(I)

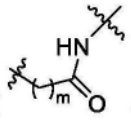
[0007] 其中

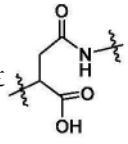
[0008] W是氢、LKb或$-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$;

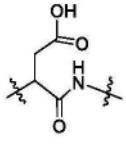
[0009] Y是氢或是LKa-LKb;

[0010] 条件是,W和Y不同时是氢;

[0011] 每个LKa独立地选自 

和 

; opSu是 

、 

或其混合物;

[0012] 每个LKb独立地是L^2-L^1-B;

[0013] 每个B独立地是端基R^{10},或以下1)、2)和3)的组合:1)自切除间隔子Sp1;2)化学键,

或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-;以及3)端基R^{10};

[0014] R^{10}是氢,或是当与负载物中的基团反应时可离去的基团;

[0015] L^1是包含可以被酶切割的氨基酸序列的可切割序列1,并且可切割序列1包含1-10个氨基酸;

[0016] L^2是化学键;或是C_{2-20}亚烷基,其中所述亚烷基中的一个或多个-CH_2-结构任选地被-CR^3R^4-、-O-、-(CO)-、-S(=O)$_2$-、-NR^5-、-$N^{\oplus}R^6R^7$-、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基、亚苯基置换;其中所述亚环烷基、亚杂环基和亚苯基各自独立地未被取代或被至少一个取代基取代,所述取代基选自卤素、-C_{1-10}烷基、-C_{1-10}卤烷基、-C_{1-10}亚烷基-NH-R^8和-C_{1-10}亚烷基-O-R^9;

[0017] Ld2和每个Ld1独立地是化学键;或选自-NH-C_{1-20}亚烷基-(CO)-、-NH-(PEG)$_i$-(CO)-,或是天然氨基酸或聚合度为2-10的低聚天然氨基酸,所述天然氨基酸或低聚天然氨基酸独立地未被取代或其侧链被-(PEG)$_j$-R^{11}取代;

[0018] -(PEG)$_t$-、-(PEG)$_i$-和-(PEG)$_j$-各自是PEG片段,所述PEG片段包含指定数量的连续-(O-C_2H_4)-结构单元或连续-(C_2H_4-O)-结构单元,所述结构单元在一端处具有可选的额外C_{1-10}亚烷基;

[0019] R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地选自氢、卤素、-C_{1-10}烷基、-C_{1-10}卤烷基、C_{4-10}亚环烷基;或

[0020] R^1和R^2与其所连接的碳原子一起形成3-6元环烷基;或

[0021] R^3和R^4与其所连接的碳原子一起形成3-6元环烷基;

[0022] R^{11}是C_{1-10}烷基;

[0023] m是1至3的任何整数;

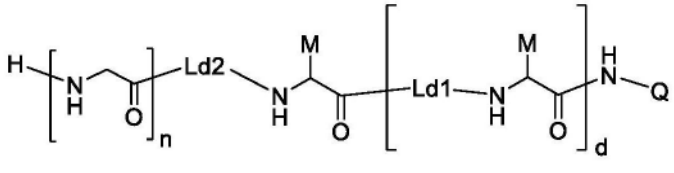
[0024] n是2至20的任何整数;

[0025] d是0,或是1至6的任何整数;每个i独立地是0至100的整数,优选是0至20的整数;优选地,每个i独立地是0至12的整数;更优选是0至8的整数;具体地说是4;

[0026] 每个j独立地是1至100的整数,优选是1至20的整数;优选地,每个j独立地是1至12的整数;更优选是8至12的整数;具体地说是8或12;

[0027] 每个t独立地是1至100的整数,优选是1至20的整数;优选地,每个t独立地是1至12的整数;更优选是8至12的整数;具体地说是8或12。

[0028] 在第二方面,提供一种具有式(II)结构的化合物:

[0029] 

式(II)

[0030] 其中

[0031] Q是氢、-C_2H_4-(PEG)$_t$-(CO)NH_2或LKb—P;

[0032] M是氢或LKa-LKb—P;

[0033] 条件是,Q和M不同时是氢;

[0034] P是负载物,所述负载物连接至式(I)化合物的B部分或L^1部分;

[0035] n、d、Ld1、Ld2、t、LKa和LKb如式(I)中所定义;

[0036] 优选地,M是氢或LKa-L^2—L^1—B—P;其中每个B独立地不存在,或是以下1)和2)的组合:1)自切除间隔子Sp1;和2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-;

[0037] 优选地,Sp1选自PABC、缩醛、杂缩醛(heteroacetal)及其组合;更优选地,Sp1是缩醛、杂缩醛或PABC;进一步优选地,所述杂缩醛选自N,O-杂缩醛;更优选地,Sp1是-O-CH_2-U-或-NH-CH_2-U-;其中所述-O-或所述-NH-连接至可切割序列1,并且U不存在,或是O、S或NH,优选是O或S。

[0038] 在第三方面,提供一种抗TROP2抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中

[0039] 所述V_H包含

[0040] (i)包含氨基酸序列X_1AGMN(SEQ ID NO:56)的HCDR1,其中X_1是N或A;

[0041] (ii)包含氨基酸序列WINTDSGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO:10)或WINTYTGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO:8)的HCDR2;和

[0042] (iii)包含氨基酸序列GGFGSSYWYFDV(SEQ ID NO:11)的HCDR3;和/或

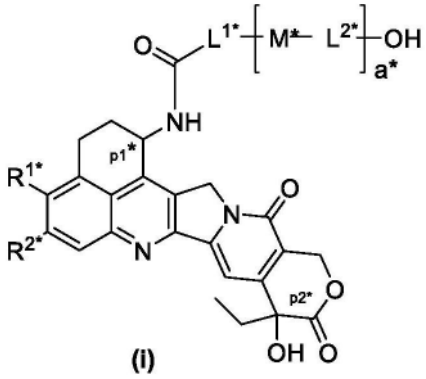
[0043] 所述V_L包含:

[0044] (i)包含氨基酸序列KASQDVSIAVA(SEQ ID NO:13)或KASQDVSTAVA(SEQ ID NO:14)的LCDR1;

[0045] (ii)包含氨基酸序列SASYRYT(SEQ ID NO:15)的LCDR2;和

[0046] (iii)包含氨基酸序列QQHYITPLT(SEQ ID NO:16)的LCDR3。

[0047] 在第四方面,提供一种具有式(i)的结构的细胞毒素:

[0048] 

(i)

[0049] 其中

[0050] a*是0或1;

[0051] 标记有p1*和p2*的碳原子各自是不对称中心,并且所述不对称中心是S构型、R构型或外消旋的;

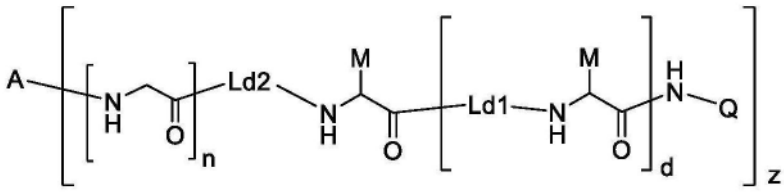
[0052] L^{1*}选自C_{1-6}亚烷基,所述亚烷基未被取代或被一个选自卤素、-OH和-NH_2的取代基取代;

[0053] M*是-CH_2-、-NH-或-O-;

[0054] L^{2*}是C_{1-3}亚烷基;

[0055] R^{1*}和R^{2*}各自独立地选自氢、C_{1-6}烷基、卤素和C_{1-6}烷氧基。

[0056] 在第五方面,提供一种具有式(III)的结构的缀合物:

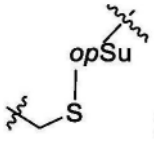
[0057] 

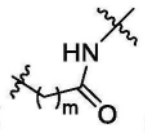
式(III)

[0058] 其中

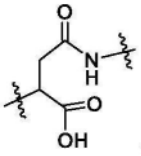
[0059] Q是氢、-C_2H_4-(PEG)$_t$-(CO)NH_2或LKb－P;

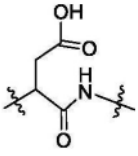
[0060] M是氢或LKa-LKb－P;

[0061] 每个LKa独立地选自 

和 

;

[0062] opSu是 

、 

或其混合物;

[0063] 每个LKb独立地是L^2－L^1－B;

[0064] m、n、d、Ld1、Ld2、t、LKa和LKb如式(I)中所定义;

[0065] 每个B独立地不存在,或是以下1)和2)的组合:1)自切除间隔子Sp1;和2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-;优选地,B是-NH-CH_2-U-、不存在、-NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-或NH-CH_2-U-$(CH_2)_g$-(CO)-;

[0066] 条件是,Q和M不同时是氢;

[0067] P是负载物,所述负载物连接至式(I)化合物的B部分或L^1部分;

[0068] 每个L^1独立地是包含可以被酶切割的氨基酸序列的可切割序列1,并且可切割序列1包含1-10个氨基酸;

[0069] 每个L^2独立地是化学键;或是C_{2-20}亚烷基,其中所述亚烷基中的一个或多个-CH_2-结构任选地被-CR^3R^4-、-O-、-(CO)-、-S(=O)$_2$-、-NR^5-、-$N^{\oplus}R^6R^7$-、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基、亚苯基置换;其中所述亚环烷基、亚杂环基和亚苯基各自独立地未被取代或被至少一个取代基取代,所述取代基选自卤素、-C_{1-10}烷基、-C_{1-10}卤烷基、-C_{1-10}亚烷基-NH-R^8和-C_{1-10}亚烷基-O-R^9;

[0070] -(PEG)$_t$-、-(PEG)$_i$-和-(PEG)$_j$-各自是PEG片段,所述PEG片段包含指定数量的连续-(O-C_2H_4)-结构单元或连续-(C_2H_4-O)-结构单元,所述结构单元在一端处具有可选的额外C_{1-10}亚烷基;

[0071] R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地选自氢、卤素、-C_{1-10}烷基、-C_{1-10}卤烷基、C_{4-10}亚环烷基;或

[0072] R^1和R^2与其所连接的碳原子一起形成3-6元环烷基;或

[0073] R^3和R^4与其所连接的碳原子一起形成3-6元环烷基;

[0074] 每个i独立地是0至100的整数,优选是0至20的整数;优选地,每个i独立地是0至12的整数;更优选是0至8的整数;具体地说是4;

[0075] 每个j独立地是1至100的整数,优选是1至20的整数;优选地,每个j独立地是1至12的整数;更优选是8至12的整数;具体地说是8或12;

[0076] 每个t独立地是1至100的整数,优选是1至20的整数;优选地,每个t独立地是1至12的整数;更优选是8至12的整数;具体地说是8或12;

[0077] 每个g独立地是1至10的整数,例如1、2、3、4、5、6、7;

[0078] A是抗TROP2抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段连接至式(I)化合物的G_n部分;G是甘氨酸;

[0079] z是1至20的整数。

[0080] 在第六方面,提供抗TROP2抗体或抗原结合片段或者其药物组合物在制造用于预防或治疗疾病的药剂中的用途;其中所述疾病是肿瘤。

[0081] 在第七方面,提供多核苷酸,所述多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段。

[0082] 在第八方面,提供一种载体,所述载体包含所述多核苷酸。

[0083] 在第九方面,提供一种宿主细胞,所述宿主细胞包含所述多核苷酸或所述载体。

[0084] 在第十方面,提供一种产生所述抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括:

[0085] (i)在适于所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下,培养宿主细胞,以及

[0086] (ii)从所述宿主细胞或其细胞培养物回收所述抗体或其抗原结合片段。

[0087] 在另一方面,提供药物组合物,所述药物组合物包含预防或治疗有效量的缀合物,以及至少一种药学上可接受的载体。

[0088] 在另一方面,提供药物组合物,所述药物组合物包含预防或治疗有效量的抗体或抗原结合片段,以及至少一种药学上可接受的载体。

[0089] 在另一方面,提供所述缀合物、所述抗体或所述药物组合物在制造用于预防或治疗疾病的药剂中的用途;其中所述疾病是肿瘤。

[0090] 在另一方面,提供一种用于治疗罹患疾病的受试者或预防疾病进展的方法,所述方法包括施用所述缀合物、所述抗体或所述药物组合物;并且所述疾病是肿瘤。

[0091] 在一个实施例中,所述肿瘤是TROP2相关肿瘤。

[0092] 在一些实施例中,所述疾病是肿瘤。在一些实施例中,所述疾病包括TROP2阳性肿瘤。在一些实施例中,所述疾病包括过表达TROP2的肿瘤或具有TROP2基因突变的肿瘤。在一些实施例中,所述疾病选自由以下组成的组:纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮细胞肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、黑色素瘤、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓质癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、威尔姆斯氏肿瘤(Wilms'tumor)、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤以及视网膜母细胞瘤。在一个实施例中,TROP2相关肿瘤选自乳腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌和泌尿道上皮癌。

[0093] 在另一方面,提供了包含所述抗体的抗体药物缀合物。

附图说明

[0094] 图1.1显示抗体在MBA-MD-468上的内化,图1.2显示在Trop2 ECD上的结合活性,图1.3显示在NCI-N87上的内化。

[0095] 图2显示ADC-7和DS1062a对FaDu细胞的活力的影响。

[0096] 图3显示ADC-1和DS1062a对人胰腺癌细胞BxPC-3的活力的影响。

[0097] 图4显示ADC-1和DS1062a对人乳腺癌细胞MDA-MB-468的活力的影响。

[0098] 图5显示ADC-7和DS1062a对胃癌细胞NCI-N87的活力的影响。

[0099] 图6显示ADC-2、ADC-3和ADC-1对咽鳞状细胞癌FaDu的活力的影响。

[0100] 图7.1显示ADC-2、ADC-3和ADC-1对人胰腺癌细胞BxPC-3的增殖的影响,图7.2显示ADC-2对BxPC-3的增殖的影响,图7.3显示ADC-2对FaDu的增殖的影响,图7.4显示ADC-2对NCI-N87的增殖的影响。

[0101] 图8显示ADC-1对BxPC-3小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0102] 图9显示ADC-1对NCI-N87小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0103] 图10显示ADC-1对BR-05-0028小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0104] 图11显示ADC-2和ADC-3对BxPC-3小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0105] 图12显示ADC-2、ADC-3和ADC-1对NCI-N87小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0106] 图13.1显示ADC-2、ADC-3和ADC-1对FaDu小鼠异种移植肿瘤的抑制作用,图13.2显示ADC-2对MDA-MB-468小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0107] 图14显示ADC-5和ADC-6对BxPC-3小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0108] 图15显示ADC-5和ADC-6对NCI-N87小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0109] 图16显示ADC-5和ADC-6对FaDu小鼠异种移植肿瘤的抑制作用。

[0110] 图17显示ADC-1的血清稳定性结果。

具体实施方式

[0111] 以下提供具体实施例以说明本申请的技术内容。本领域的技术人员可以通过本说明书中所公开的内容,容易地了解本申请的其它优点和作用。本申请也可以通过其它不同的具体实施例实施或应用。在不脱离本申请的精神情况下,本领域的技术人员可以作出各种修改和变化。

[0112] 定义

[0113] 除非下文另外定义,否则在此使用的所有技术和科学术语都具有与本领域技术人员通常所理解相同的含义。本文中使用的技术是指本领域中一般理解的技术,包括本领域的技术人员显而易见的变化形式和等效取代。尽管相信本领域的技术人员可容易地理解以下术语,但阐述以下定义将更好地说明本申请。当本文中存在商品名时,它是指相应的商品或其活性成分。本文所引用的所有专利、公布的专利申请和出版物均特此以引用的方式并入。

[0114] 当某一量、浓度或者其它值或参数是以范围、优选范围或者优选上限或优选下限的形式阐述时,应理解,它相当于具体地披露通过组合任何上限或优选值与任何下限或优选值所形成的任何范围,不管所述范围是否明确地叙述。除非另外陈述,否则本文中所列的数值范围意图包括所述范围的端点以及在所述范围内的所有整数和分数(小数)。例如,表

述“i是1至20的整数”意思指,i是1至20的任何整数,例如,i可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。其它类似的表述也应当以类似方式理解。

[0115] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式如“一”和“所述”包括复数形式。表述“一个(种)或多个(种)”或“至少一个(种)”可以指1、2、3、4、5、6、7、8、9个(种)或更多个(种)。

[0116] 术语“约”和“大约”当与数字变量结合使用时,一般意味着所述变量的值和所述变量的所有值都在实验误差范围内(例如在平均值的95%置信区间内)或在指定值的±10%范围内,或在更宽范围内。

[0117] 术语“化学计量比”意思是指将各种物质按照一定的重量比进行配比。例如,在本文中,将活性成分与填充剂、粘合剂和润滑剂以指定的重量比混合。

[0118] 术语“可选的”或“任选地”意思指,随后描述的事件可能但未必会发生,并且这一描述包括所述事件或情况发生或不发生的情形。

[0119] 表述“包含”、“包括”、“含有”和“具有”是开放式的,并且不排除另外的未阐述的元件、步骤或成分。表述“由……组成”不包括未指明的任何元件、步骤或成分。表述“基本上由……组成”意思指,范围限于指定元件、步骤或成分,以及任选地存在且大体上不会影响所要求主题的基本和新颖特征的元件、步骤或成分。应理解,表述“包含”涵盖表述“基本上由……组成”和“由……组成”。

[0120] 如本文所使用,术语“抗体”是以广义方式使用,并且特定地包括完整单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)及抗体片段,只要它们具有所希望的生物活性即可。抗体可以属于任何亚型(如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)或亚类,并且可以来源于任何适合的物种。在一些实施例中,抗体是人类或鼠类来源的。抗体还可以是完全人源化抗体、人源化抗体或通过重组方法制备的嵌合抗体。

[0121] 单克隆抗体在本文中用于指从大体上同种类的抗体群体获得的抗体,即,构成所述群体的各个抗体除了少量可能存在的天然突变外,其余是相同的。单克隆抗体对单一抗原位点具有高度特异性。“单克隆”一词是指抗体的特征是来源于大体上同种类的抗体群体,而不应解释为需要一些特定的方法来制备抗体。

[0122] 完整抗体或全长抗体基本上包含一个或多个抗原结合可变区,以及一个或多个轻链恒定区(CL)和一个或多个重链恒定区(CH),所述一个或多个重链恒定区取决于抗体的亚型而可以包括CH1、CH2、CH3和CH4。抗原结合可变区(又称为片段可变区、Fv片段)典型地包含轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)。恒定区可以是具有天然序列(如具有人源天然序列的恒定区)或其氨基酸序列变体的恒定区。可变区识别靶标抗原并与之相互作用。恒定区可被免疫系统识别并与之相互作用。

[0123] 抗体片段可包含完整抗体的一部分,优选地其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab’、$F(ab')_2$、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、Fv片段、单结构域抗体(dAb)片段以及分离的互补决定区(CDR)。Fab片段是通过用木瓜蛋白酶消化全长免疫球蛋白获得的抗体片段,或具有通过例如重组表达产生的相同结构的片段。Fab片段包含轻链(包含VL和CL)和另一条链,其中所述另一条链包含重链的可变结构域(VH)和重链的恒定区结构域(CH1)。F(ab’)2片段是通过在pH 4.0-4.5下用胃蛋白酶消化免疫球蛋白获得的抗体片段,或通过例如重组表达产生的具有相同结构的片段。F(ab’)2片段基本上包含两个Fab片段,其中每个重链部分包含几个另外的氨基酸,包括半胱氨酸,所述半胱氨酸形成连接两个片

段的二硫键。Fab'片段是包含F(ab')2片段的一半(一条重链和一条轻链)的片段。抗体片段可包含例如经由二硫键和/或经由肽连接子接合在一起的多条链。抗体片段的实例还包括单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、双功能抗体、Fd和Fd'片段,以及其它片段,包括经过修饰的片段。抗体片段典型地包含至少或约50个氨基酸并且典型地包含至少或约200个氨基酸。抗原结合片段可包括当插入抗体构架中(例如通过取代相应区域)时可产生免疫特异性结合至抗原的任何抗体片段。

[0124] 本文公开的抗体可使用本领域众所周知的技术,如以下技术或其组合制备:重组技术、噬菌体展示技术、合成技术或本领域中已知的其它技术。例如,基因工程改造的重组抗体(或抗体模拟物)可利用适合培养系统(例如大肠杆菌或哺乳动物细胞)表达。工程改造可以指例如在末端引入连接酶特异性识别序列。

[0125] 细胞毒素是指抑制或阻止细胞的表达活性、细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。当前用于ADC中的细胞毒素的毒性高于化学治疗药物。细胞毒素的实例包括但不限于靶向以下靶标的药物:微管细胞骨架、DNA、RNA、驱动蛋白(kinesin)介导的蛋白质运输、细胞凋亡调控。靶向微管细胞骨架的药物可以是例如微管稳定剂或微管蛋白聚合抑制剂。微管稳定剂的实例包括但不限于紫杉烷类(taxanes)。微管蛋白聚合抑制剂的实例包括但不限于美登素类(maytansinoids)、奥瑞他汀类(auristatins)、长春碱类(vinblastines)、秋水仙碱类(colchicines)和海兔毒素类(dolastatins)。靶向DNA的药物可以是例如直接破坏DNA结构的药物或拓扑异构酶抑制剂。直接破坏DNA结构的药物的实例包括但不限于DNA双链断裂剂、DNA烷基化剂、DNA嵌入剂。DNA双链断裂剂可以是例如烯二炔类抗生素,包括但不限于达内霉素(dynemicin)、埃斯培拉霉素(esperamicin)、新制癌菌素(neocarzinostatin)、安西拉霉素(uncialamycin)等。DNA烷基化剂可以是例如DNA双烷基化剂(即,DNA交联剂)或DNA单烷基化剂。DNA烷基化剂的实例包括但不限于吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮杂卓(PBD)二聚体、1-(氯甲基)-2,3-二氢-1H-苯并[e]吲哚(CBI)二聚体、CBI-PBD异二聚体、二氢吲哚并苯并二氮杂卓(IGN)二聚体、倍癌霉素(duocarmycin)化合物等。拓扑异构酶抑制剂的实例包括但不限于依沙替康(exatecan)和其衍生物(如DX8951f、DXd-(1)和DXd-(2),其结构描绘于下)、喜树碱类(camptothecins)和蒽环霉素类(anthracyclines)。靶向RNA的药物可以是例如抑制剪接的药物,并且其实例包括但不限于普拉地内酯(pladienolide)。靶向驱动蛋白介导的蛋白质运输的药物可以是例如有丝分裂驱动蛋白抑制剂,包括但不限于纺锤体驱动蛋白(KSP)抑制剂。

[0126] 间隔子是位于不同结构模块之间并且能在空间上隔开各结构模块的结构。间隔子的定义不受它是否具有某一功能或它是否能在体内被切割或降解限制。间隔子的实例包括但不限于氨基酸和非氨基酸结构,其中非氨基酸结构可以是但不限于氨基酸衍生物或类似物。"间隔子序列"是指充当间隔子的氨基酸序列,并且其实例包括但不限于单一氨基酸、含有多个氨基酸的序列,例如含有两个氨基酸如GA的序列等;或例如GGGGS(SEQ ID NO:42)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:43)、GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:44)等。自切除间隔子是是共价组件,其使得前体中的保护性部分激活后两个化学键相继裂解:在刺激时,所述保护性部分(如可切割序列)被移除,由此产生级联的分解反应,使得较小分子在时间上依序释放。自切除间隔子的实例包括但不限于PABC(对苯甲氧羰基)、缩醛、杂缩醛以及其组合。

[0127] 术语"烷基"是指由碳原子和氢原子组成的直链或分支链饱和脂肪烃基团,所述基

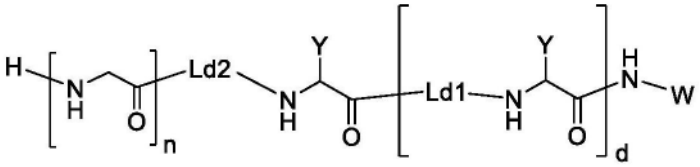
团通过单键连接至分子的其余部分。烷基可以含有1至20个碳原子，指C_1-C_{20}烷基，例如C_1-C_4烷基、C_1-C_3烷基、C_1-C_2烷基、C_3烷基、C_4烷基、C_3-C_6烷基。烷基的非限制性实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、2-甲基丁基、1-甲基丁基、1-乙基丙基、1,2-二甲基丙基、新戊基、1,1-二甲基丙基、4-甲基戊基、3-甲基戊基、2-甲基戊基、1-甲基戊基、2-乙基丁基、1-乙基丁基、3,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,1-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基或1,2-二甲基丁基，或它们的异构体。二价基团是指由相应单价基团，通过从具有一个或多个自由价电子的碳原子去除一个氢原子获得的基团。二价基团具有两个连接至分子其余部分的连接位点。例如，“亚烷基”或“次烷基”是指直链或分支链饱和二价烃基。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基(-CH_2-)、亚乙基(-C_2H_4-)、亚丙基(-C_3H_6-)、亚丁基(-C_4H_8-)、亚戊基(-C_5H_{10}-)、亚己基(-C_6H_{12}-)、1-甲基亚乙基(-$CH(CH_3)CH_2$-)、2-甲基亚乙基(-$CH_2CH(CH_3)$-)、甲基亚丙基、乙基亚丙基等。

[0128] 如本文所使用，当将一个基团与另一个基团组合时，所述基团的连接可以是线性或分支的，只要形成化学上稳定的结构即可。由此类组合形成的结构可通过所述结构中的任何适合原子，优选地通过指定化学键连接至分子其它部分。例如，当将两个或更多个选自以下的二价基团组合在一起形成组合时：-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-，所述两个或更多个二价基团可彼此形成线性连接，如-CR^1R^2-C_{1-10}亚烷基-(CO)-、-CR^1R^2-C_{4-10}亚环烷基-(CO)-、-CR^1R^2-C_{4-10}亚环烷基-C_{1-10}亚烷基-(CO)-、-CR^1R^2-$CR^{1'}R^{2'}$-(CO)-、-CR^1R^2-$CR^{1'}R^{2'}$-$CR^{1''}R^{2''}$-(CO)-等。由此得到的二价结构可进一步连接至分子的其它部分。

[0129] 如本文所使用，表述“抗体-偶联药物”和“抗体-药物缀合物”具有相同含义。

[0130] 式(I)化合物

[0131] 在一个方面，提供一种式(I)化合物：

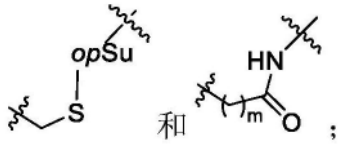
[0132] 

[0133] 其中

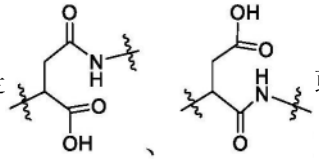
[0134] W是氢、LKb或-C_2H_4-$(PEG)_t$-(CO)NH_2；

[0135] Y是氢或是LKa-LKb；

[0136] 条件是，W和Y不同时是氢；

[0137] 每个LKa独立地选自 

和 ；

[0138] opSu是 

或其混合物；

[0139] 每个LKb独立地是L^2—L^1—B；

[0140] 每个B独立地是端基R^{10}，或以下1)、2)和3)的组合：1)自切除间隔子Sp1；2)化学键，

或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-;以及3)端基R^{10};

[0141] R^{10}是氢,或是当与负载物中的基团反应时可离去的基团;

[0142] 每个L^1独立地是包含可以被酶切割的氨基酸序列的可切割序列1,并且可切割序列1包含1-10个氨基酸;

[0143] 每个L^2独立地是化学键;或是C_{2-20}亚烷基,其中所述亚烷基中的一个或多个-CH_2-结构任选地被-CR^3R^4-、-O-、-(CO)-、-S(=O)$_2$-、-NR^5-、-$N^{\oplus}R^6R^7$-、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基、亚苯基置换;其中所述亚环烷基、亚杂环基和亚苯基各自独立地未被取代或被至少一个取代基取代,所述取代基选自卤素、-C_{1-10}烷基、-C_{1-10}卤烷基、-C_{1-10}亚烷基-NH-R^8和-C_{1-10}亚烷基-O-R^9;

[0144] Ld2和每个Ld1独立地是化学键;或选自-NH-C_{1-20}亚烷基-(CO)-、-NH-(PEG)$_i$-(CO)-,或是天然氨基酸或聚合度为2-10的低聚天然氨基酸,所述天然氨基酸或低聚天然氨基酸独立地未被取代或其侧链被-(PEG)$_j$-R^{11}取代;

[0145] -(PEG)$_t$-、-(PEG)$_i$-和-(PEG)$_j$-各自是PEG片段,所述PEG片段包含指定数量的连续-(O-C_2H_4)-结构单元或连续-(C_2H_4-O)-结构单元,所述结构单元在一端处具有可选的额外C_{1-10}亚烷基;

[0146] R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9各自独立地选自氢、卤素、-C_{1-10}烷基、-C_{1-10}卤烷基、C_{4-10}亚环烷基;或

[0147] R^1和R^2与其所连接的碳原子一起形成3-6元环烷基;或

[0148] R^3和R^4与其所连接的碳原子一起形成3-6元环烷基;

[0149] R^{11}是C_{1-10}烷基;

[0150] m是1至3的任何整数;

[0151] n是2至20的任何整数;

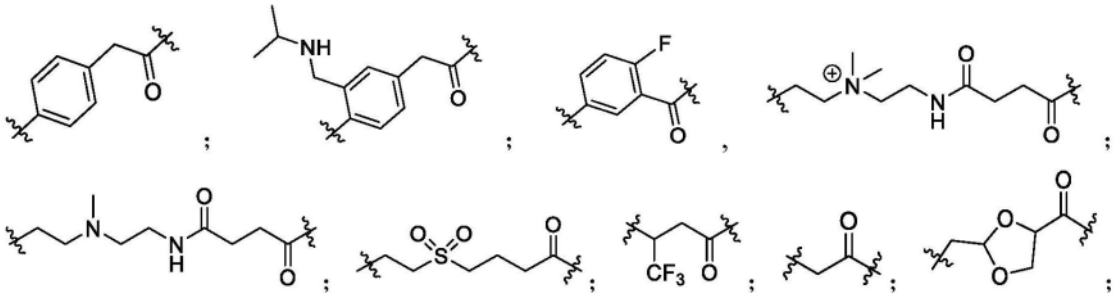
[0152] d是0,或是1至6的任何整数;

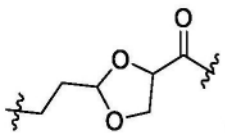
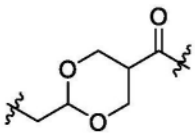
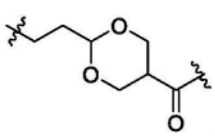
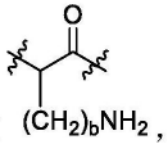
[0153] 每个i独立地是0至100的整数,优选是0至20的整数;优选地,每个i独立地是0至12的整数;更优选是0至8的整数;具体地说是4;

[0154] 每个j独立地是1至100的整数,优选是1至20的整数;优选地,每个j独立地是1至12的整数;更优选是8至12的整数;具体地说是8或12;

[0155] 每个t独立地是1至100的整数,优选是1至20的整数;优选地,每个t独立地是1至12的整数;更优选是8至12的整数;具体地说是8或12。

[0156] 在一个实施例中,L^2选自:-$(CH_2)_p$-$(CH_2)_2$(CO)-,p是0或1至5的整数;

[0157] 

[0158]  ；  ；  ；和  ，b是1至10的整数。

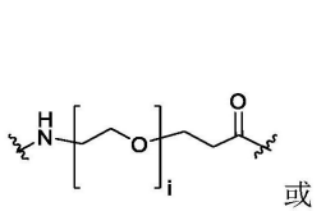
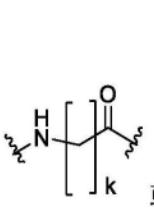
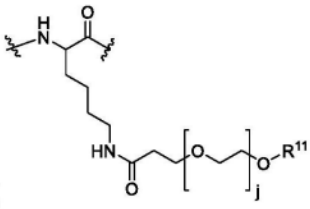
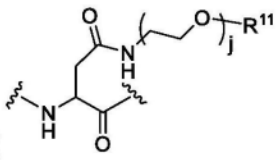
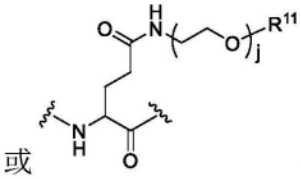
[0159] 在一个实施例中，p是0至3；优选是3。

[0160] 在一个实施例中，L^2选自：$-(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$，p是1至5的整数；更优选地，p是2或4。

[0161] 在一个实施例中，以上每个L^2结构中的羰基连接至L^1，并且另一连接位点连接至opSu。

[0162] 在一个实施例中，以上每个L^2结构中羰基连接至L^1，并且另一连接位点连接至酰胺。

[0163] Ld2和每个Ld1独立地是化学键或

[0164]  或  或  或  或  ；

[0165] 每个i独立地是0至100的整数；

[0166] 每个j和k独立地是1至100的整数。

[0167] 在一个实施例中，每个i独立地是0至20的整数。在一个实施例中，每个i独立地是0至12的整数。

[0168] 在一个实施例中，每个j和k独立地是1至20的整数。在一个实施例中，每个j和k独立地是1至12的整数。

[0169] 在一些实施例中，每个i独立地是0至8的整数；具体地说是4。

[0170] 在一些实施例中，每个j独立地是8至12的整数；具体地说是8或12。

[0171] 在一些实施例中，每个k独立地是1至7的整数；具体地说是1或3或5。

[0172] 在一个实施例中，Ld2和每个Ld1独立地是化学键；或在两端分别具有氨基和羰基的C_{1-20}亚烷基，或在两端分别具有氨基和羰基的某一长度的PEG片段(表示为$-(PEG)_i-$)，或者一个或多个天然氨基酸，所述天然氨基酸独立地未被取代或其侧链被某一长度的PEG片段(表示为$-(PEG)_j-$)取代。

[0173] 在一个实施例中，$-(PEG)_i-$包含$-(O-C_2H_4)_i-$或$-(C_2H_4-O)_i-$，并且在一端处具有可选的额外C_{1-10}亚烷基；$-(PEG)_j-$包含$-(O-C_2H_4)_j-$或$-(C_2H_4-O)_j-$，并且在一端处具有可选的额外C_{1-10}亚烷基。在一个实施例中，$-(PEG)_i-$包含$-C_2H_4-(O-C_2H_4)_i-$或$-(C_2H_4-O)_i-C_2H_4-$。

[0174] 应理解，当在分子中存在两个或更多个Ld1、B、L^2或L^1结构时，每个Ld1、B、L^2或L^1的结构是独立选择的。当在分子中存在两个或更多个R^x(x是1、2、3、4、5、6、7、8、9等)时，每个R^x

是独立选择的。在一些实施例中,分子中的“x”是以具有或不具有额外单撇号(')或多撇号(如”、”'、””等)的形式表示,例如R、$R^{1'}$、$R^{1''}$、$R^{1'''}$、$R^{2'}$、$R^{2''}$、$R^{2'''}$等,其中具有或不具有额外单撇号或多撇号的每个R^x是独立选择的。其它R^x,如R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9,以及“Ld1”、“B”、“$L^{2''}$”和“$L^{1''}$”应以类似方式理解。在一些实施例中,分子中的“i”是以具有或不具有额外数字的形式表示,例如i1、i2、i3、i4等,其中所述数字并不指示任何顺序,而是仅用于区别“i”。并且具有或不具有额外数字的每个“i”是独立选择的。

[0175] 在一个实施例中,可切割序列1选自Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:45)、Phe-Lys、Val-Cit、Val-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:46)、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:47)、Ala-Ala-Ala和其组合;优选地,可切割序列1是Gly-Gly-Phe-Gly(SEQ ID NO:45)。

[0176] 在一个实施例中,W是氢。

[0177] 在一个实施例中,W是$-C_2H_4-(PEG)_{t-}(CO)NH_2$,其中t独立地是1至100的整数,优选是1至20的整数;优选地,每个t独立地是1至12的整数;更优选是8至12的整数;具体地说是8或12。

[0178] 在一个实施例中,R^{11}是C_{1-6}烷基,优选是甲基。

[0179] 在一个实施例中,n是2至5的整数,尤其是3。

[0180] 在一个实施例中,d是0,或是1至4的任何整数;优选是0、1、2或3。

[0181] 硫代琥珀酰亚胺在生理条件下不稳定并且易于发生反向迈克尔加成(Michael addition),导致在缀合位点处切割。此外,当系统中存在另一种硫醇化合物时,硫代琥珀酰亚胺还可与所述另一种硫醇化合物发生硫醇交换。这些反应都会引起负载物的掉落并引起有毒副作用。在本文中,当应用于连接子中时,开环琥珀酰亚胺结构不再经历反向迈克尔加成或硫醇交换,且因此产物更稳定。开环反应的方法可见于WO2015165413A1。

[0182] 包含开环琥珀酰亚胺部分的化合物可以通过半制备型/制备型HPLC或其它适合的分离手段纯化以获得高纯度化合物和确定的组合物,而不管琥珀酰亚胺开环反应的效率如何。

[0183] 包含连接酶受体或供体底物的识别序列的部分

[0184] 在一个实施例中,式(I)化合物的G_n部分是连接酶受体底物的识别序列,它有助于式(I)化合物与靶向分子在连接酶催化下发生的酶催化偶联。靶向分子任选地被修饰并且包含连接酶供体底物的相应识别序列。

[0185] 在一个实施例中,连接酶是转肽酶。在一个实施例中,连接酶选自由以下组成的组:天然转肽酶、非天然转肽酶、其变体和其组合。非天然转肽酶可以是但不限于通过天然转肽酶工程改造获得的那些。在一个优选实施例中,连接酶选自由以下组成的组:天然分选酶、非天然分选酶和其组合。天然分选酶的种类包括分选酶A、分选酶B、分选酶C、分选酶D、植物乳杆菌(L.plantarum)分选酶等(详细描述可见于US20110321183A1,所述专利以引用的方式并入本文中)。连接酶的类型对应于连接酶识别序列并由此用于实现不同分子或结构片段之间的特异性缀合。

[0186] 在一些实施例中,连接酶是选自以下的分选酶:分选酶A、分选酶B、分选酶C、分选酶D和植物乳杆菌分选酶。在这些实施例中,连接酶受体底物的识别序列选自由以下组成的组:低聚甘氨酸、低聚丙氨酸和聚合度是3-10的低聚甘氨酸/丙氨酸的混合物。在一个特定实施例中,连接酶受体底物的识别序列是G_n,其中G是甘氨酸(Gly),并且n是2至10的整数。

[0187] 在另一特定实施例中,连接酶是来自金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的分选酶A。因此,连接酶识别序列可以是典型酶识别序列,如LPXTG(SEQ ID NO:48)。在又一特定实施例中,连接酶供体底物的识别序列是LPXTGJ(SEQ ID NO:49),并且连接酶受体底物的识别序列是G_n,其中X可以是任何单一天然或非天然氨基酸;J不存在或是包含1-10个氨基酸的任选被标记的氨基酸片段。在一个实施例中,J不存在。在又另一实施例中,J是包含1-10个氨基酸的氨基酸片段,其中每个氨基酸独立地是任何天然或非天然氨基酸。在另一实施例中,J是G_m,其中m是1至10的整数。在又一特定实施例中,连接酶供体底物的识别序列是LPETG(SEQ ID NO:50)。在另一特定实施例中,连接酶供体底物的识别序列是LPETGG(SEQ ID NO:51)。

[0188] 在一个实施例中,连接酶是来自金黄色葡萄球菌的分选酶B并且相应供体底物识别序列可以是NPQTN(SEQ ID NO:52)。在另一实施例中,连接酶是来自炭疽杆菌(Bacillus anthracis)的分选酶B并且相应供体底物识别序列可以是NPKTG(SEQ ID NO:53)。

[0189] 在又另一个实施例中,连接酶是来自酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)的分选酶A并且相应供体底物识别序列可以是LPXTGJ(SEQ ID NO:49),其中J如上文所定义。在另一实施例中,连接酶是来自天蓝色链霉菌(Streptomyces coelicolor)的分选酶亚家族5,并且相应供体底物识别序列可以是LAXTG(SEQ ID NO:54)。

[0190] 在另一实施例中,连接酶是来自植物乳酸杆菌(Lactobacillus plantarum)的分选酶A并且相应供体底物识别序列可以是LPQTSEQ(SEQ ID NO:55)。

[0191] 连接酶识别序列还可以是通过人工筛选优化的其它全新的转肽酶识别序列。

[0192] 包含反应性基团的部分

[0193] 与负载物连接的反应性基团

[0194] 在一个实施例中,B是端基R^{10},并且L^1中的可切割序列1连接至负载物。在此情况下,B不存在于可切割序列1与负载物连接得到的分子中。在一个实施例中,B被用于连接至负载物。为了与负载物连接,式(I)化合物包含反应性基团。在一个实施例中,式(I)化合物中的B通过酰胺键或酯键或醚键连接至负载物。在一个实施例中,式(I)中的B中的反应性基团独立地是用于缩合反应、亲核加成或亲电子加成的反应性基团(如反应性C=O部分、反应性C=C-C=O部分、氨基、胺基、羟基、硫醇基)或用于取代反应的反应性基团(如连接至O、C、N或S原子的离去基团)。在一个实施例中,B中的反应性基团独立地选自羧基、活性酯、醛基、氨基、胺基、羟基和硫醇基。在一个具体实施例中,用于连接至负载物的B中的反应性基团独立地选自氨基、胺基、羟基、硫醇基、羧基和活性酯。

[0195] 在一个实施例中,B中的反应性基团独立地是氨基、胺基或羟基,所述基团与负载物中的相应基团(如羧基、磺酸基、具有游离-OH端的磷酰基、活性酯、酰氯或异氰酸酯基)反应。在另一个实施例中,B中的反应性基团独立地是羧基或活性酯,所述基团与负载物中的相应基团(如氨基、胺基或羟基)反应。

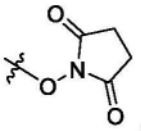
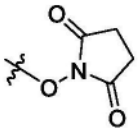
[0196] 在一个实施例中,B中的反应性基团独立地是氨基、羟基或硫醇基,所述基团与负载物中的相应基团(如卤素、羟基、醛基)反应。在另一实施例中,B中的反应性基团独立地是羟基,所述基团与负载物中的相应基团(如卤素或羟基)反应。

[0197] 在一个实施例中,每个B独立地是R^{10},或以下1)、2)和3)的组合:1)自切除间隔子Sp1;2)化学键或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚

烷基和-(CO)-;以及3)端基R^{10}。

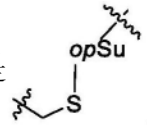
[0198] 在一个实施例中,Sp1选自PABC、缩醛、杂缩醛和其组合。在一个实施例中,Sp1是缩醛、杂缩醛或PABC。在一个实施例中,杂缩醛选自N,O-杂缩醛。在一个实施例中,Sp1是-O-CH_2-U-或-NH-CH_2-U-,其中-O-或-NH-连接至可切割序列1;U不存在或是O、S或NH,优选是O或S。在一个实施例中,U不存在,或是O、S或NH,优选是O或S。

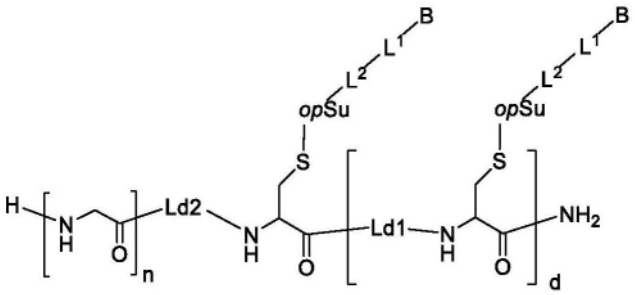
[0199] 在一个实施例中,B是R^{10}、-NH-CH_2-U-R^{10}、-NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-R^{10}或-NH-CH_2-U-$(CH_2)_g$-(CO)-R^{10}。

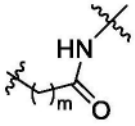
[0200] 在一个实施例中,R^{10}是氢、羟基或  。在一个实施例中,R^{10}是氢。在一个实施例中,R^{10}是羟基或  。

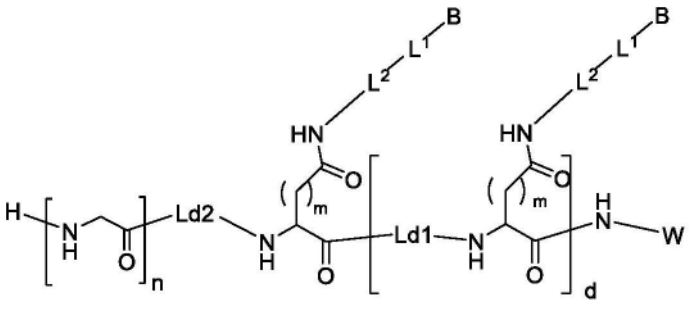
[0201] 在一个实施例中,R^{10}表示不会出现在B与负载物反应产生的产物分子中的结构部分。

[0202] 式(I)化合物的具体实施例

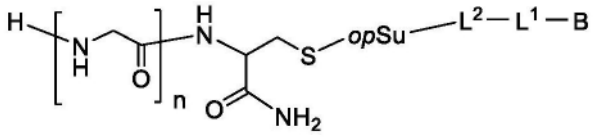
[0203] 在一个实施例中,W是氢,每个LKa是  。在一个实施例中,式(I)具有式(I-a)的结构

[0204] 
式(I-a)。

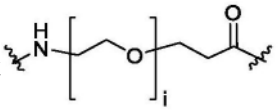
[0205] 在一些实施例中,每个LKa是  。在一些实施例中,式(I)具有式(I-b)的结构

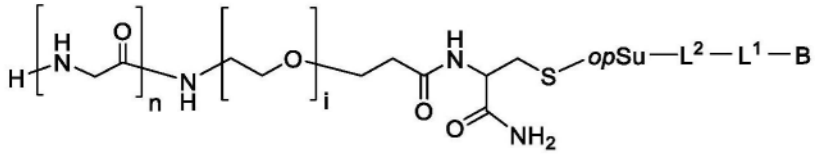
[0206] 
式(I-b)。

[0207] 在一些实施例中,Ld2是化学键,d是0。在一些实施例中,式(I-a)化合物如下:

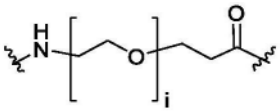
[0208] 

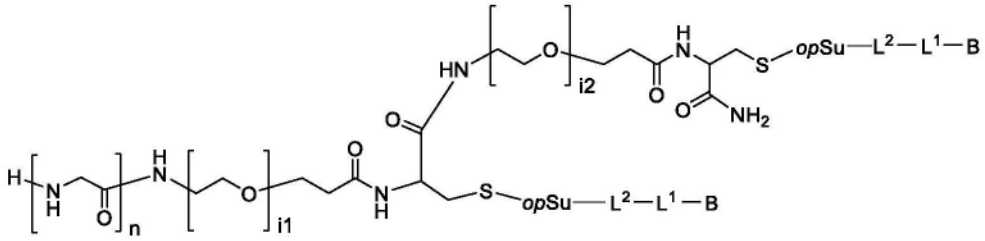
(I-a-0-1)。

[0209] 在一些实施例中,d是0,Ld2是  。在一些实施例中,式(I-a)化合物如下:

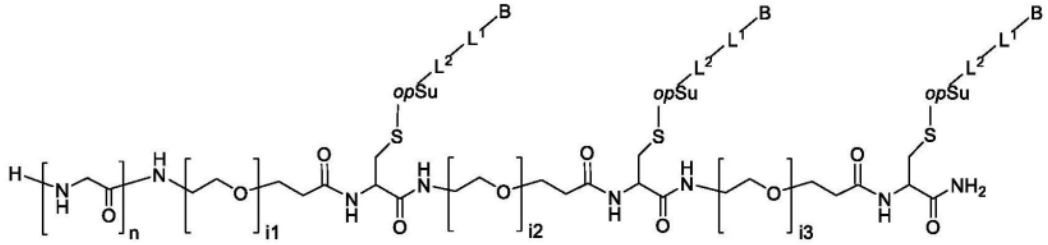
[0210] 

(I-a-0-2)。

[0211] 在一些实施例中,d是1、2或3,Ld2和每个Ld1独立地选自  。在一些实施例中,式(I-a)化合物如下:

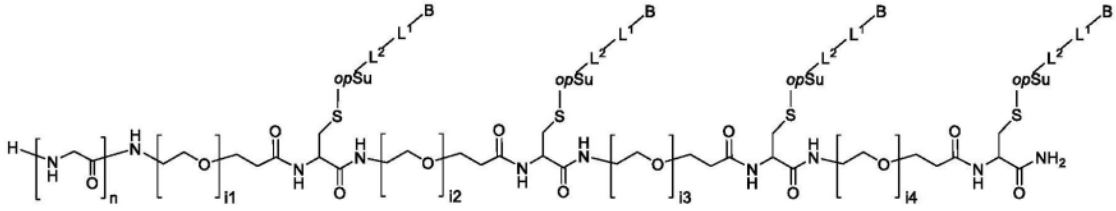
[0212] 

(I-a-0-3)

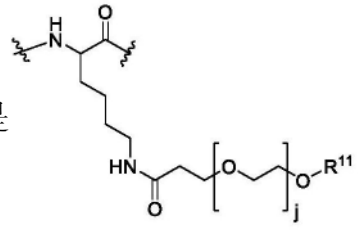


(I-a-0-4)

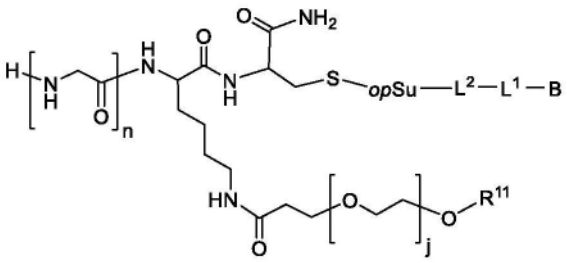
[0213] 或



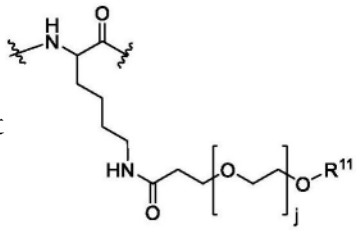
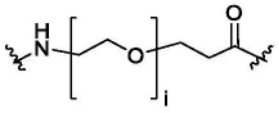
(I-a-0-5)。

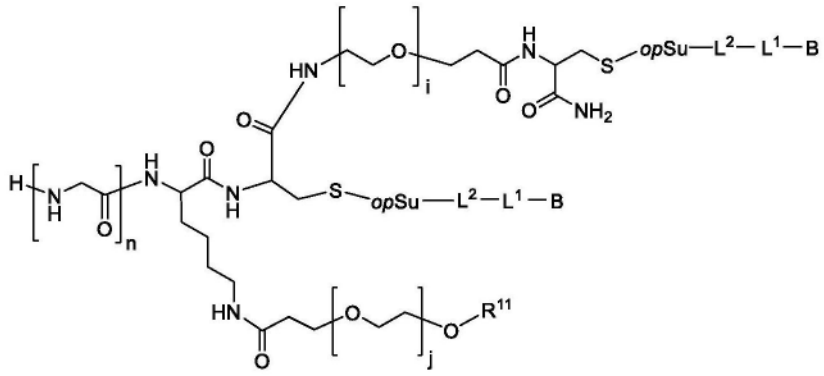
[0214] 在一些实施例中,Ld2是  ,d是0。在一些实施例中,式(I-

a)化合物如下：

[0215] 

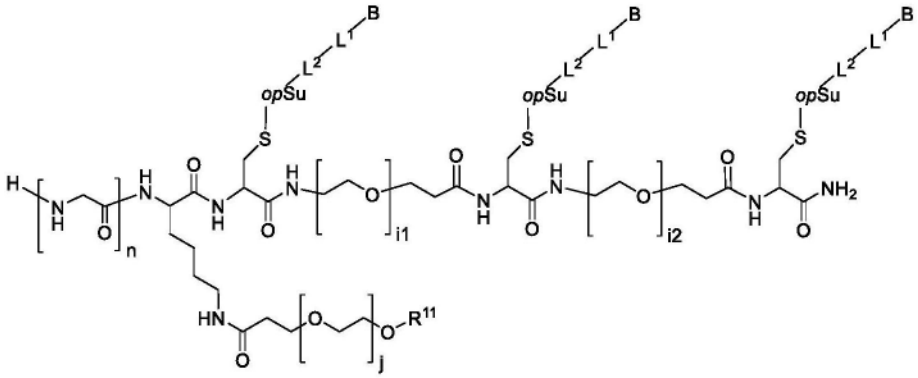
(I-a-1-1)。

[0216] 在一些实施例中,d是1、2或3,Ld2是  并且每个Ld1独立地选自  。在一些实施例中,式(I-a)化合物如下：



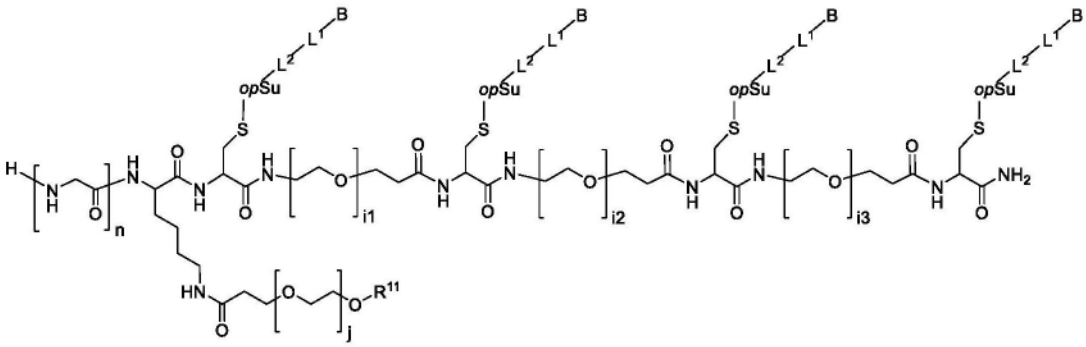
(I-a-1-2)

[0217]

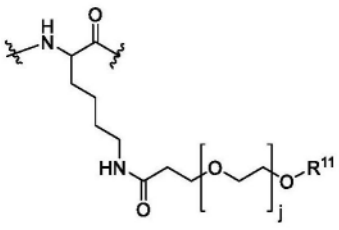
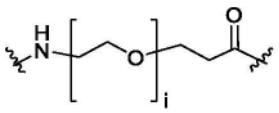


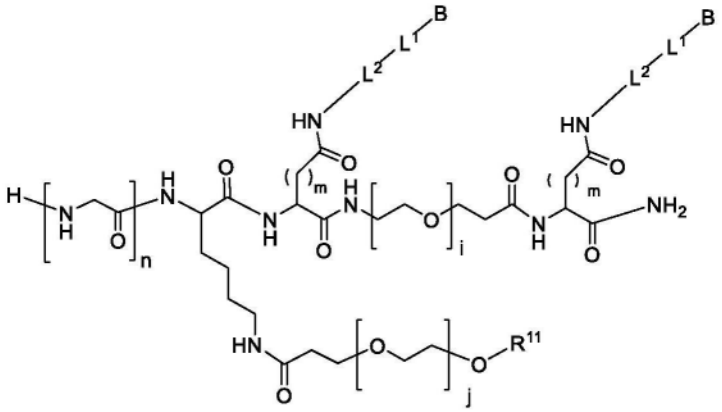
(I-a-1-3)

或

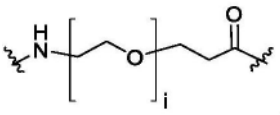


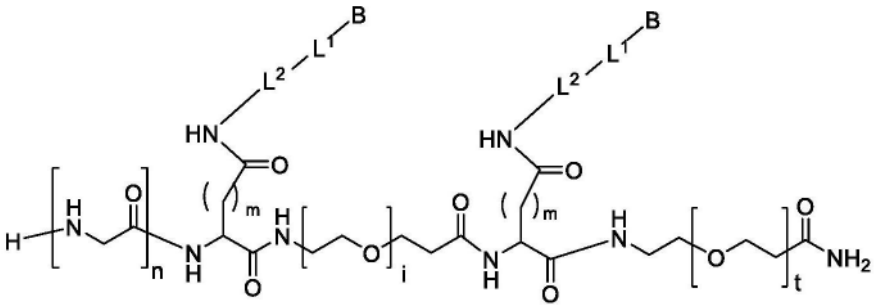
(I-a-1-4)。

[0218] 在一些实施例中,d是1,W是氢,Ld2是  并且每个Ld1独立地选自  。 在一些实施例中,式(I-b)化合物如下:

[0219] 

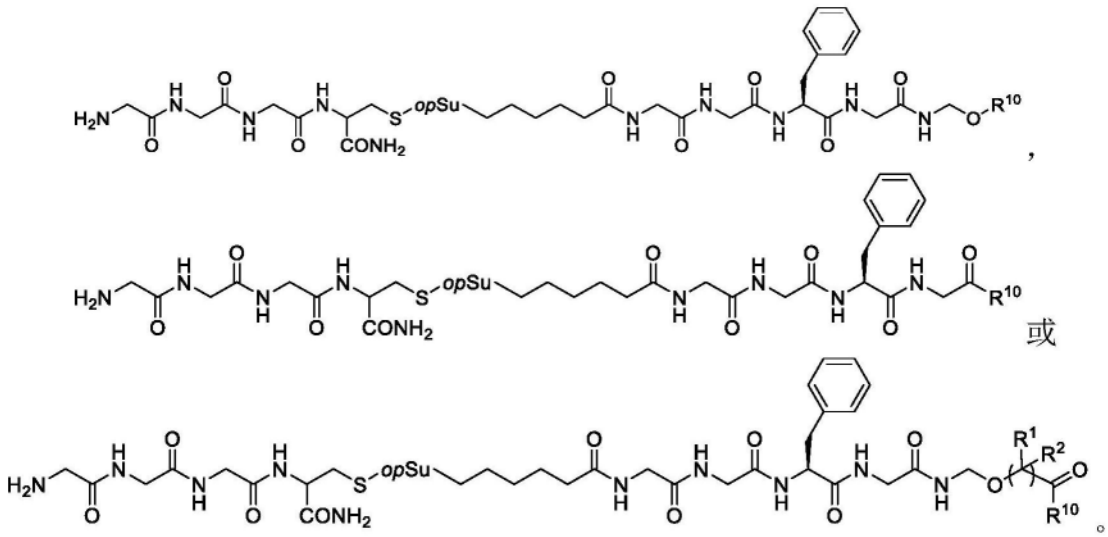
(I-b-1)。

[0220] 在一些实施例中,d是1,W是-C_2H_4-$(PEG)_t$-C(O)NH_2,Ld2是化学键,并且每个Ld1独立地选自  。在一些实施例中,式(I-b)化合物如下:

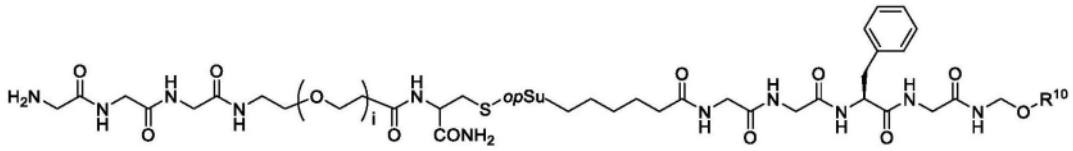
[0221] 

(I-b-0)。

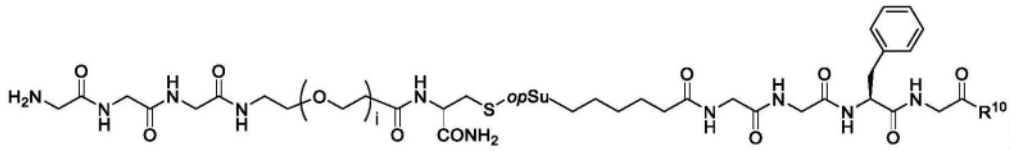
[0222] 在一些实施例中,n是3,L^2是-$(CH_2)_p$-$(CH_2)_2$(CO)-,p是3,L^1是GGFG,B是-NH-CH_2-U-R^{10}或-R^{10}或-NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-R^{10},U是O,g是1。在一些实施例中,I-a-0-1具有以下结构:

[0223] 

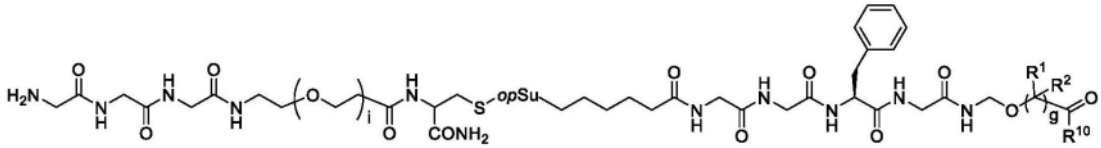
[0224] 在一些实施例中,I-a-0-2具有以下结构:



,

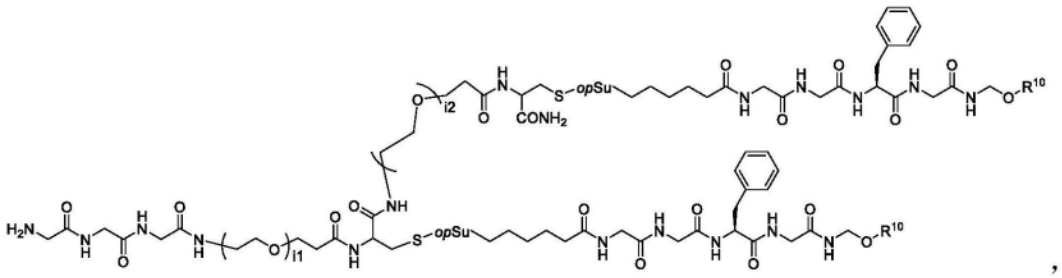
[0225] 

或

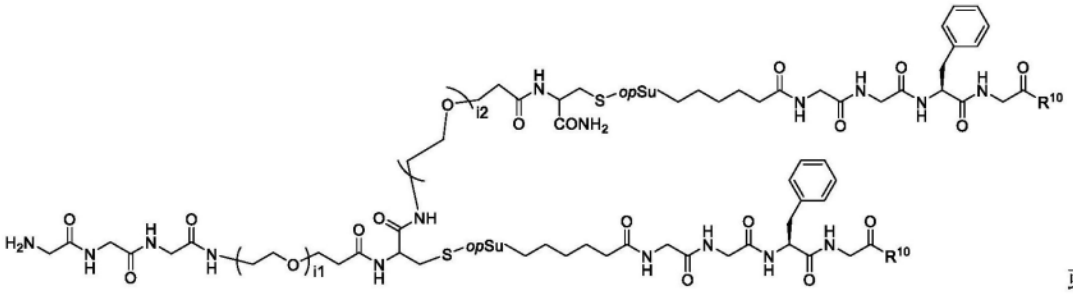


。

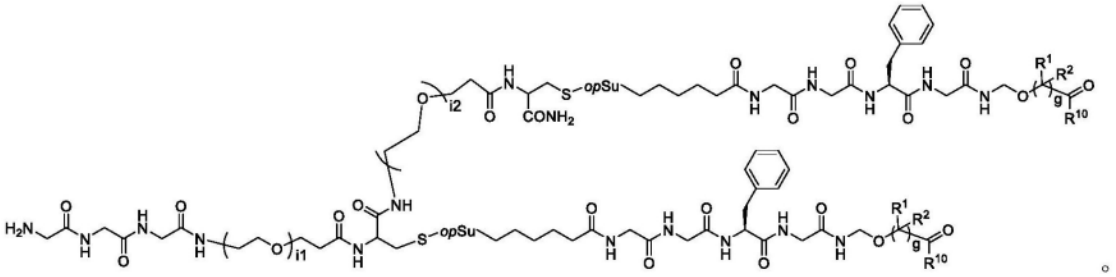
[0226] 在一些实施例中,I-a-0-3具有以下结构:



,

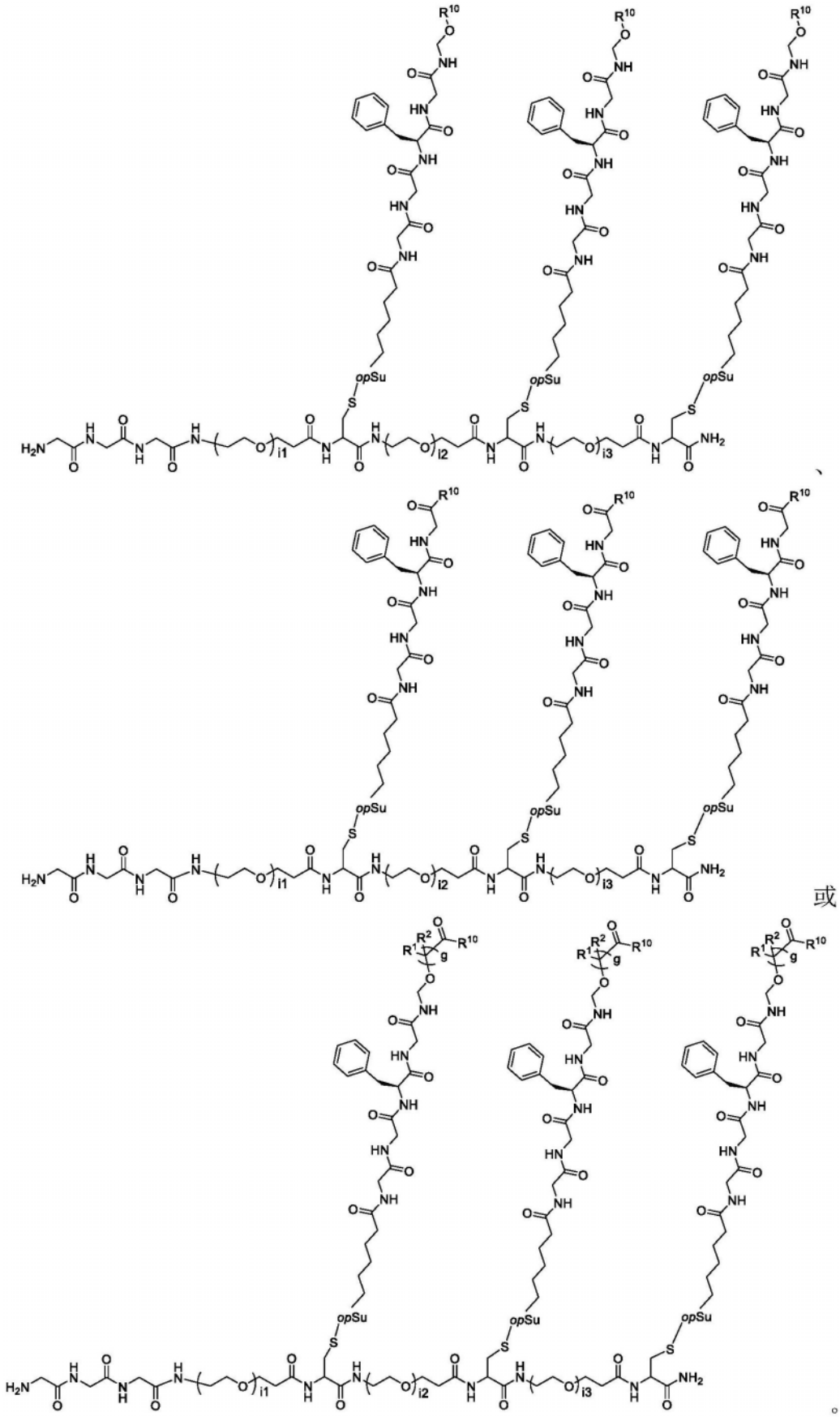
[0227] 

或



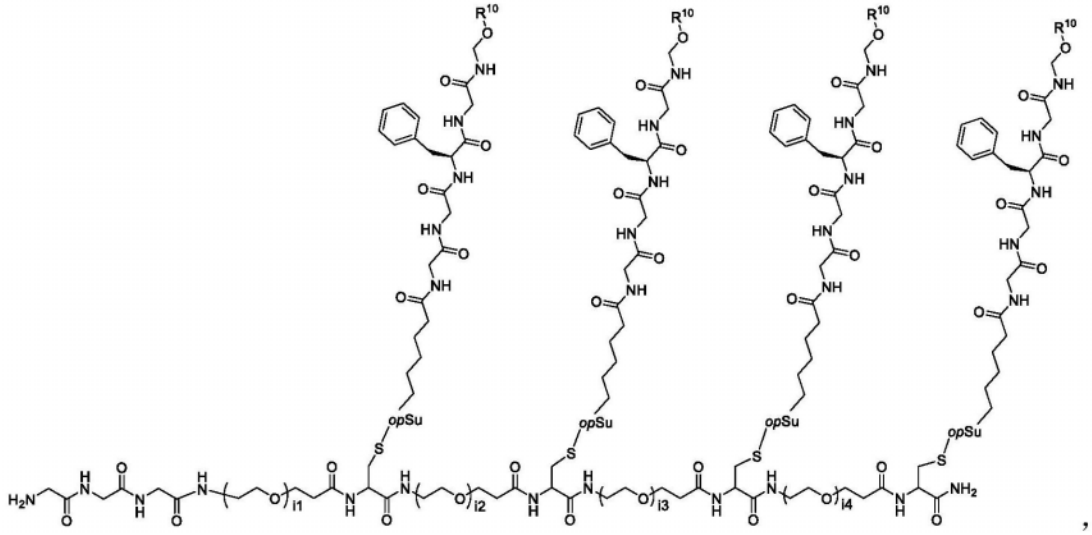
。

[0228] 在一些实施例中,I-a-0-4具有以下结构:

[0229] 

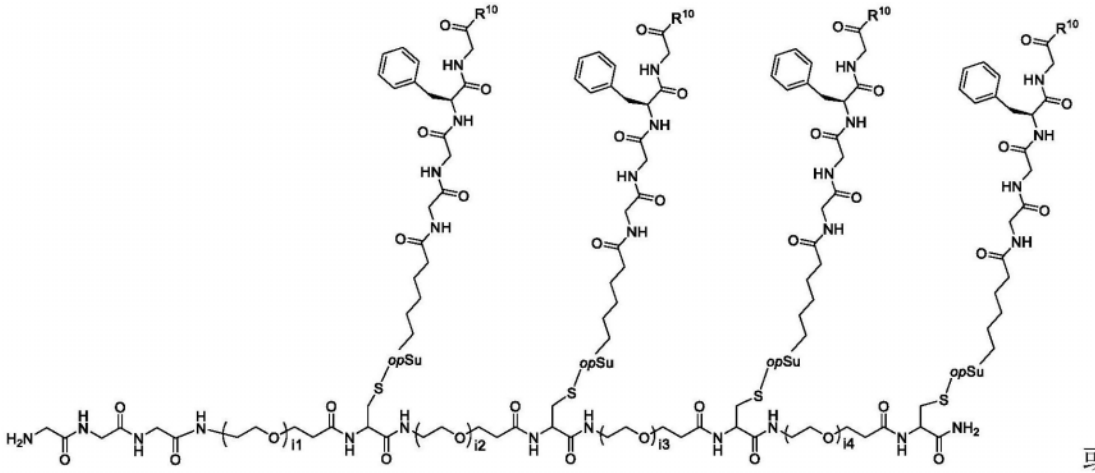
或

[0230] 在一些实施例中,I-a-0-5具有以下结构:

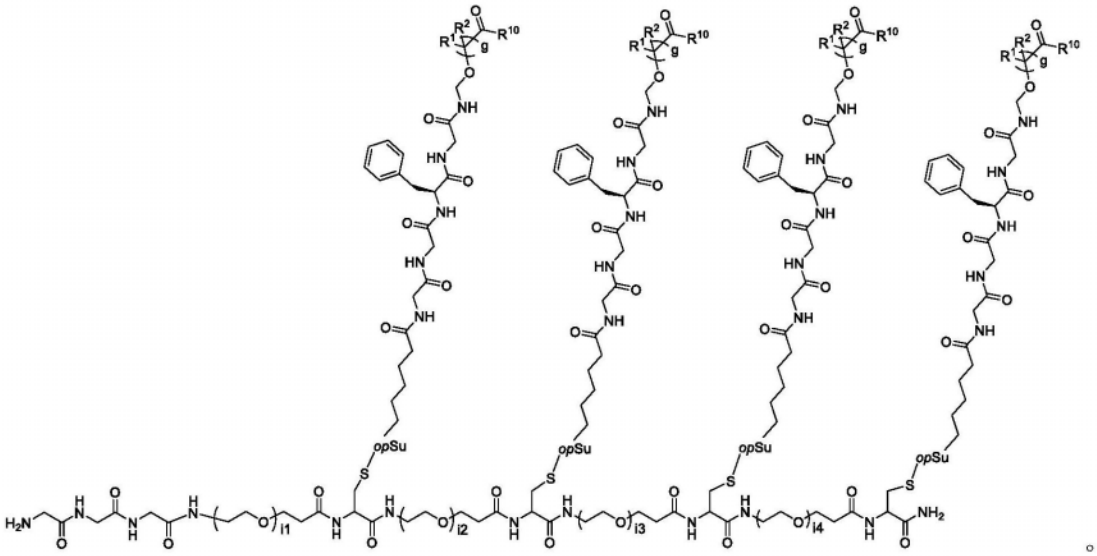


,

[0231]

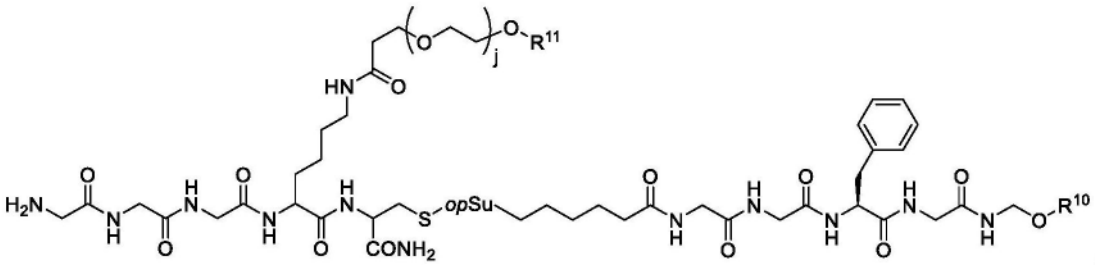


或



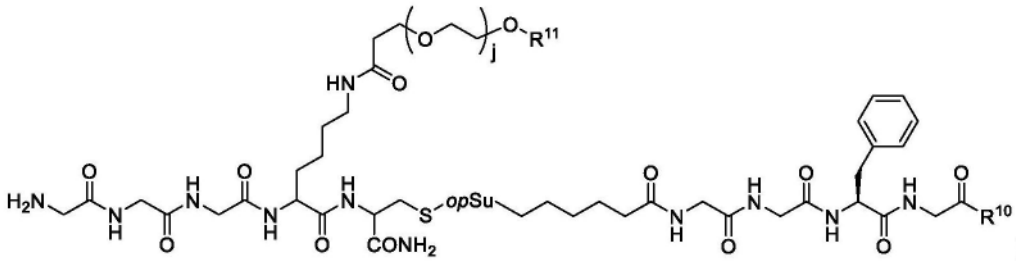
。

[0232] 在一些实施例中,I-a-1-1具有以下结构:

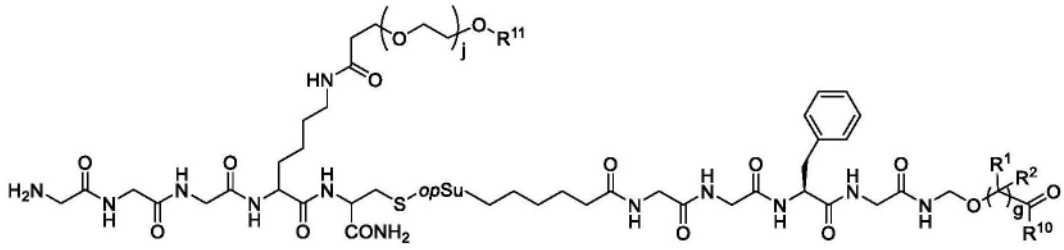


,

[0233]

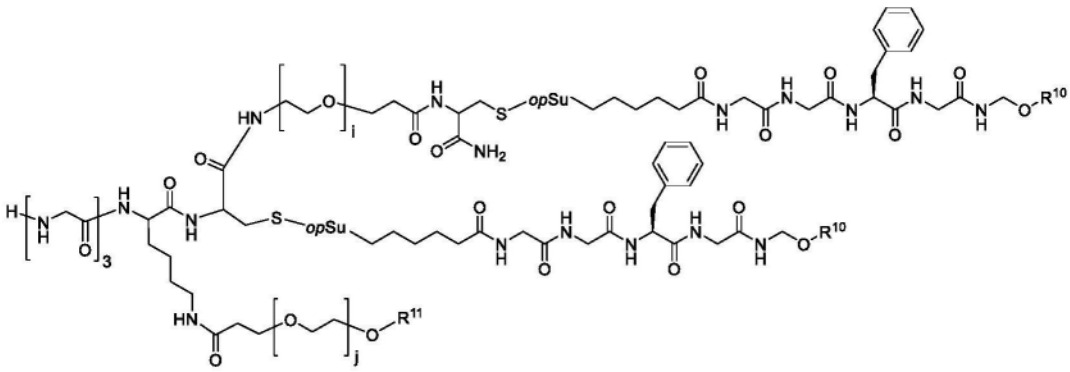


或



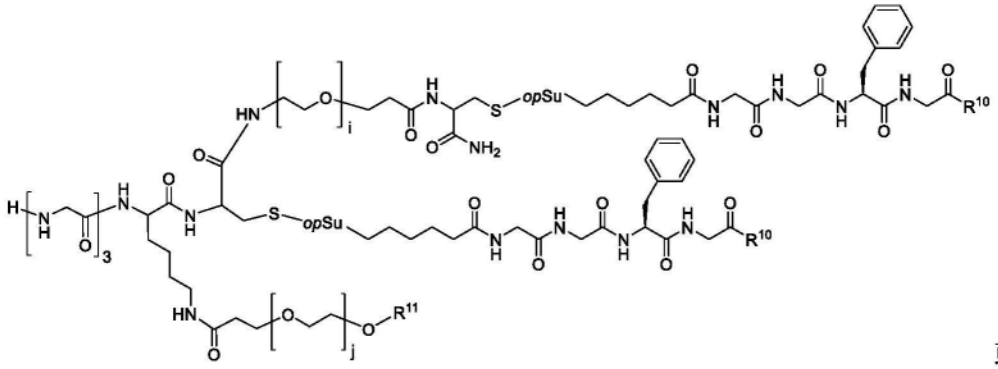
。

[0234] 在一些实施例中,I-a-1-2具有以下结构:

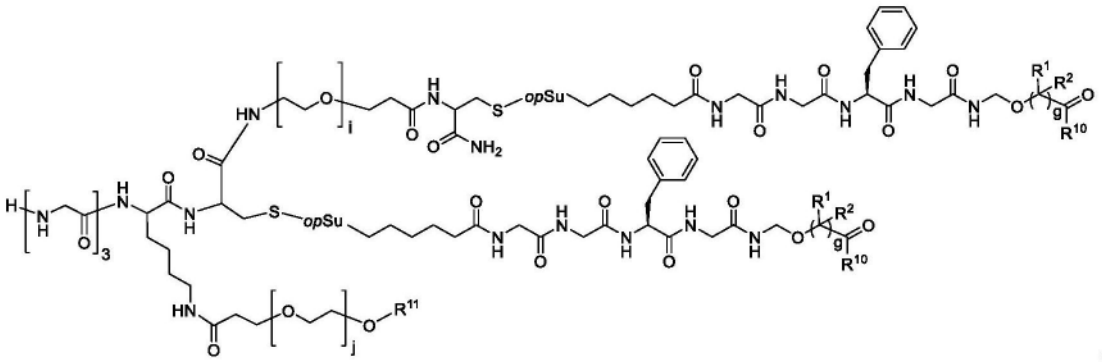


,

[0235]

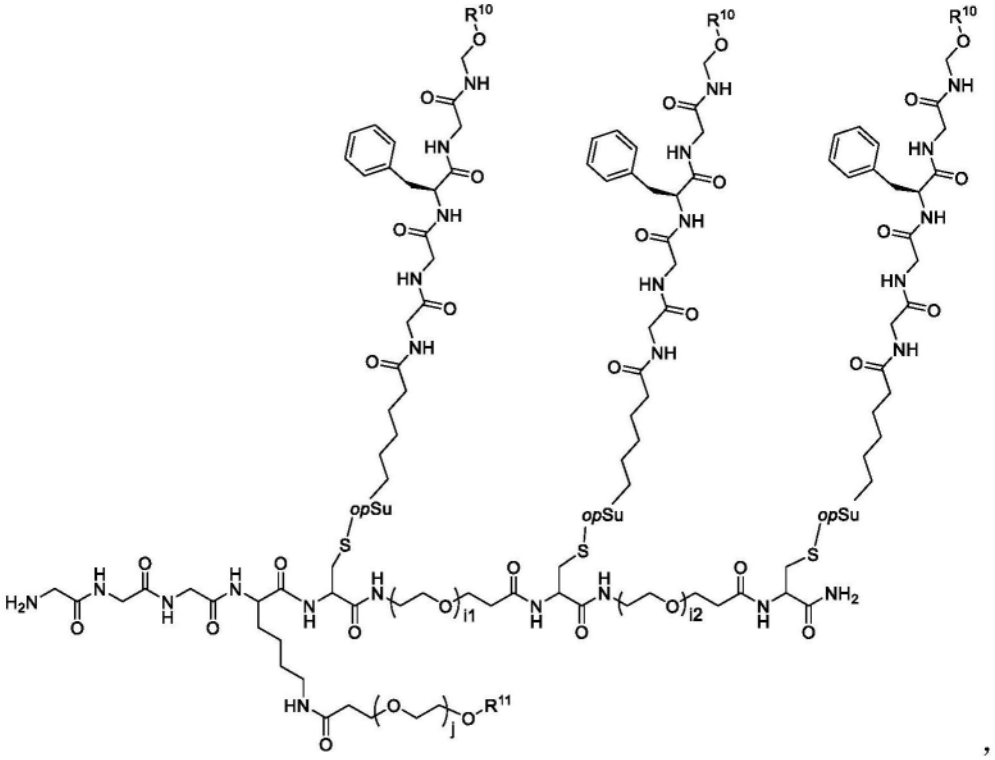


或

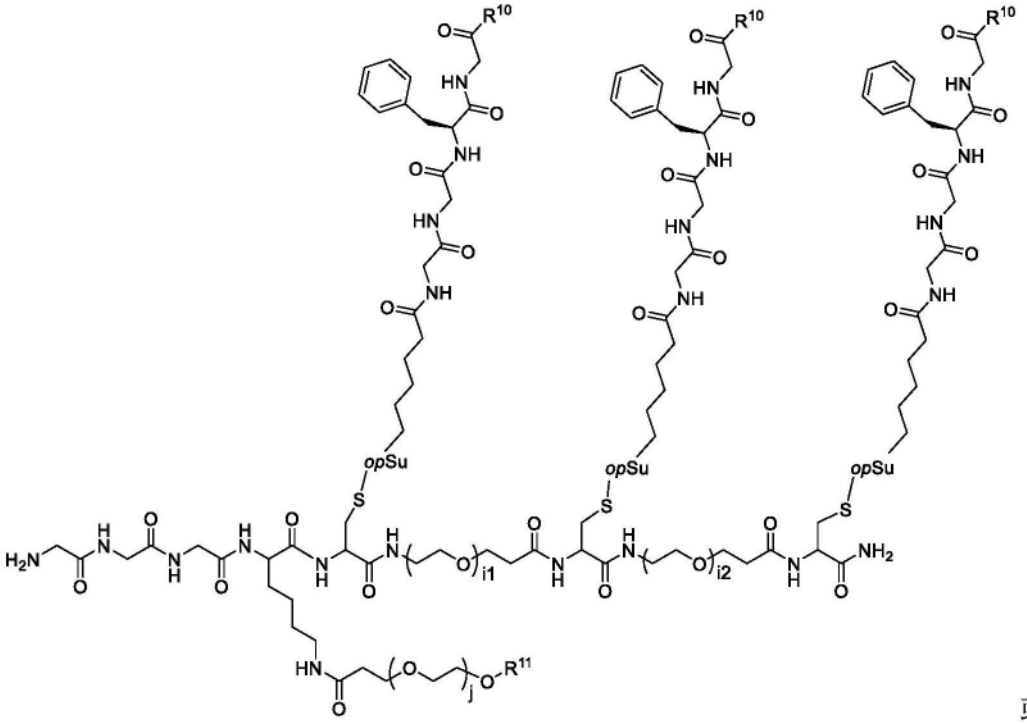
[0236] 

。

[0237] 在一些实施例中,I-a-1-3具有以下结构:

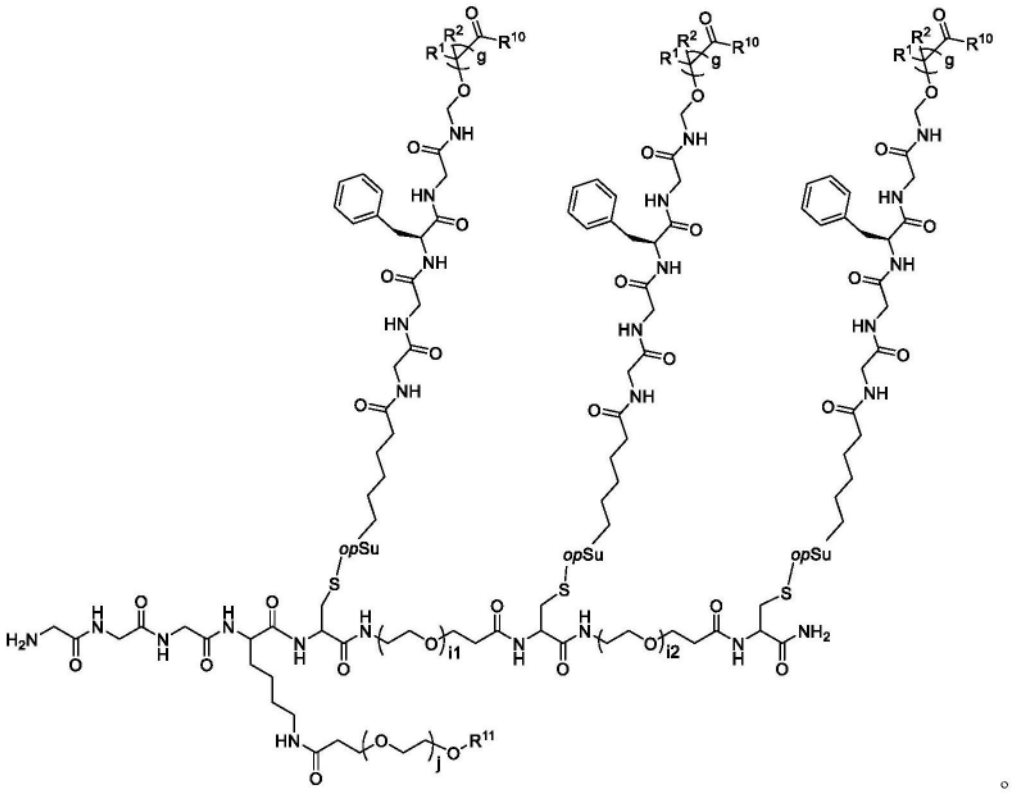
[0238] 

,



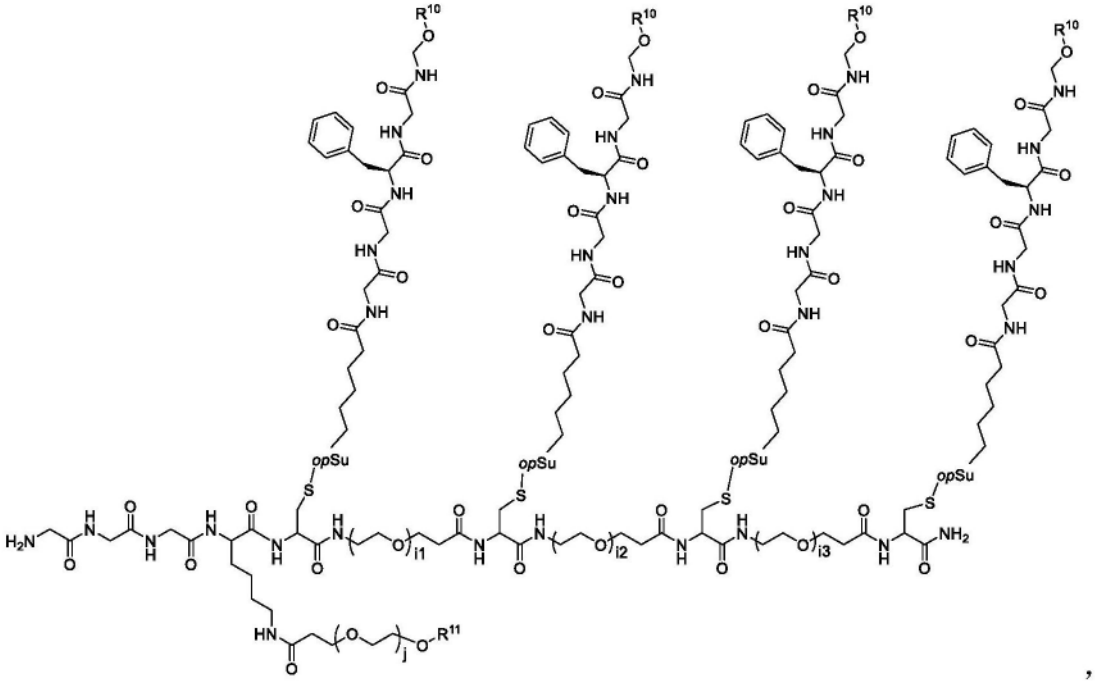
或

[0239]

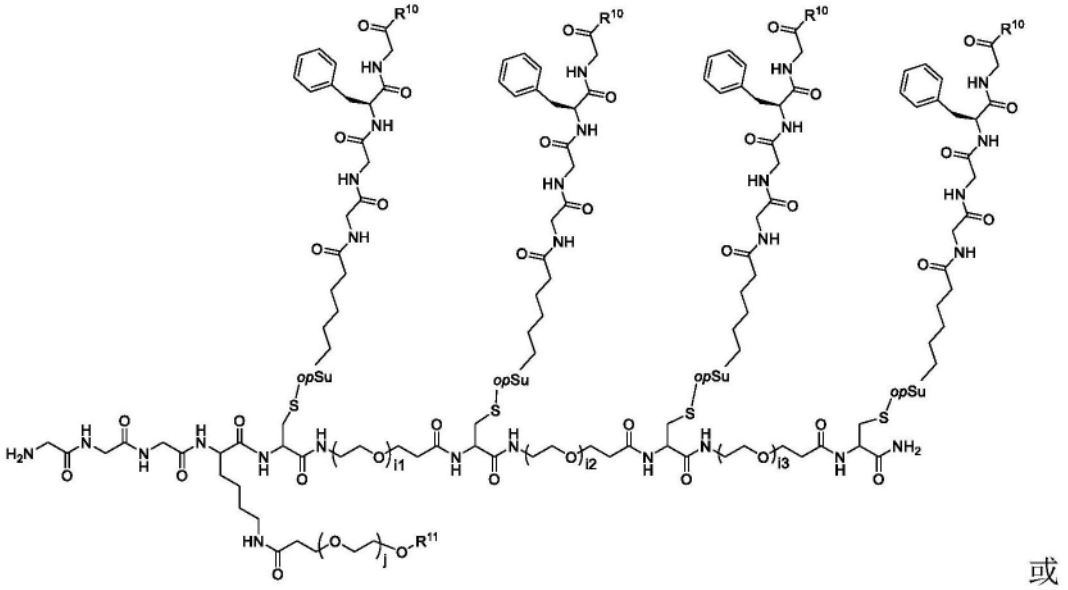


[0240] 在一些实施例中,I-a-1-4具有以下结构:

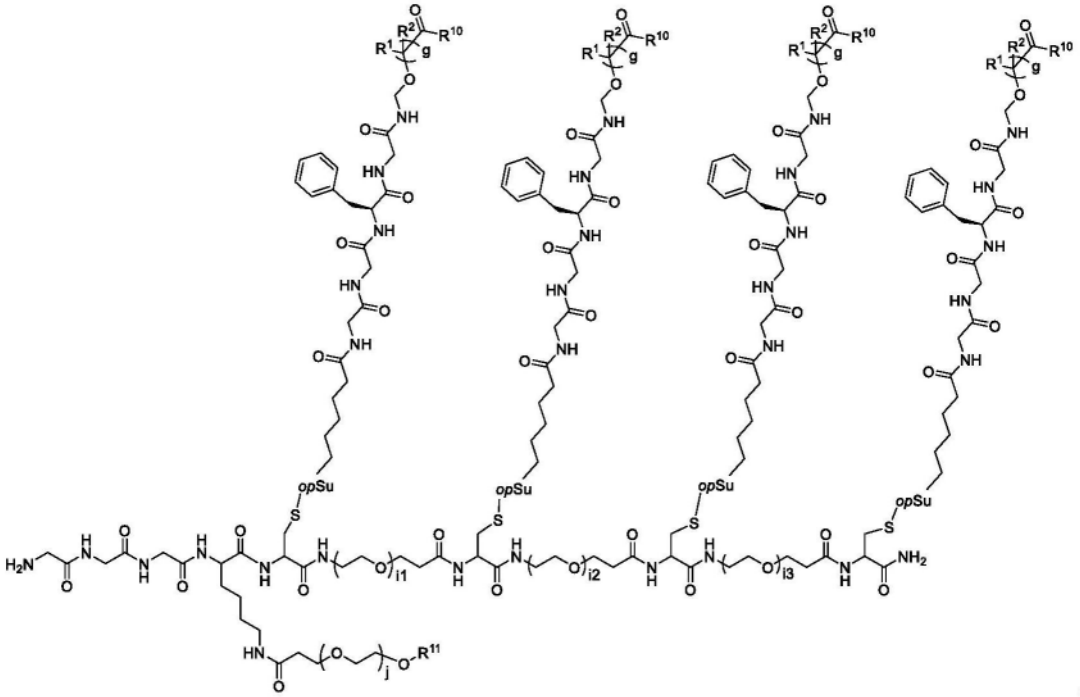
[0241]



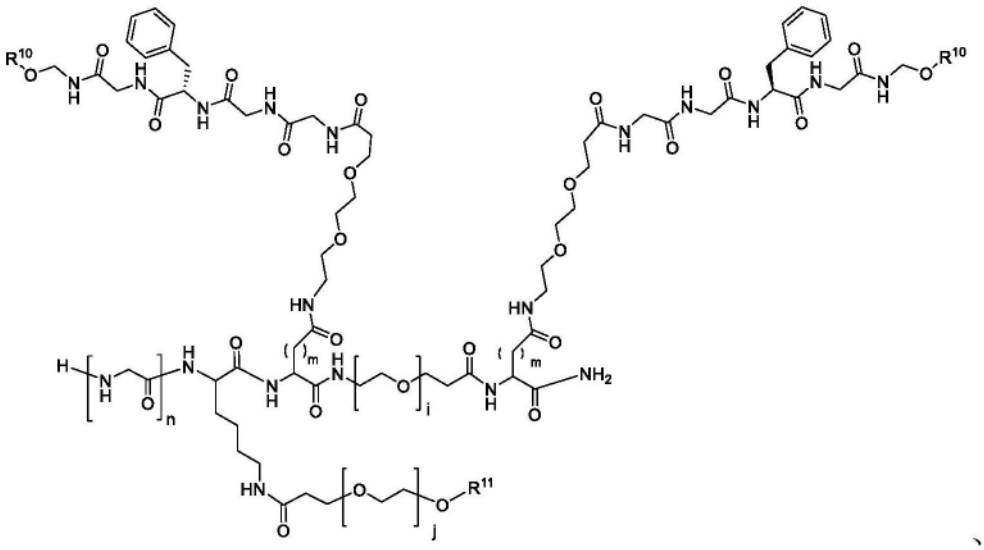
,

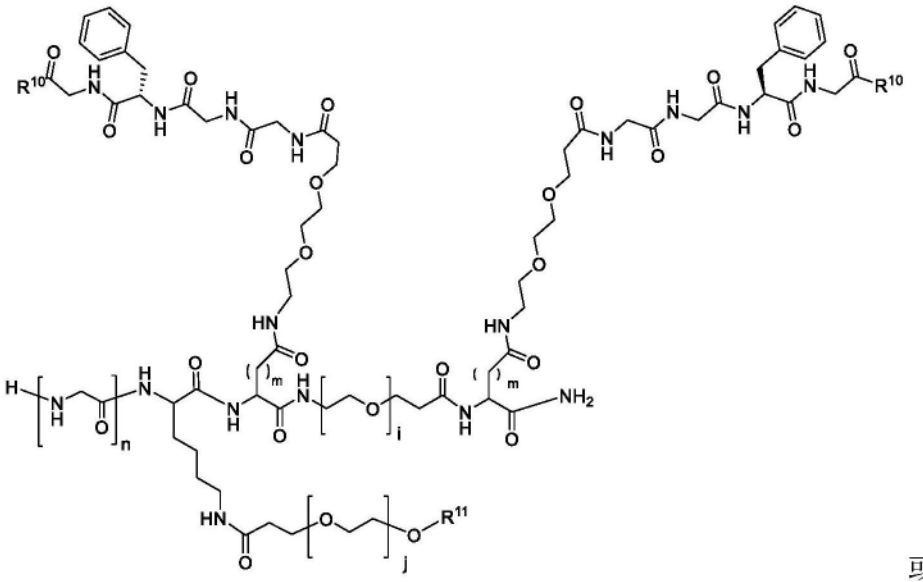


或

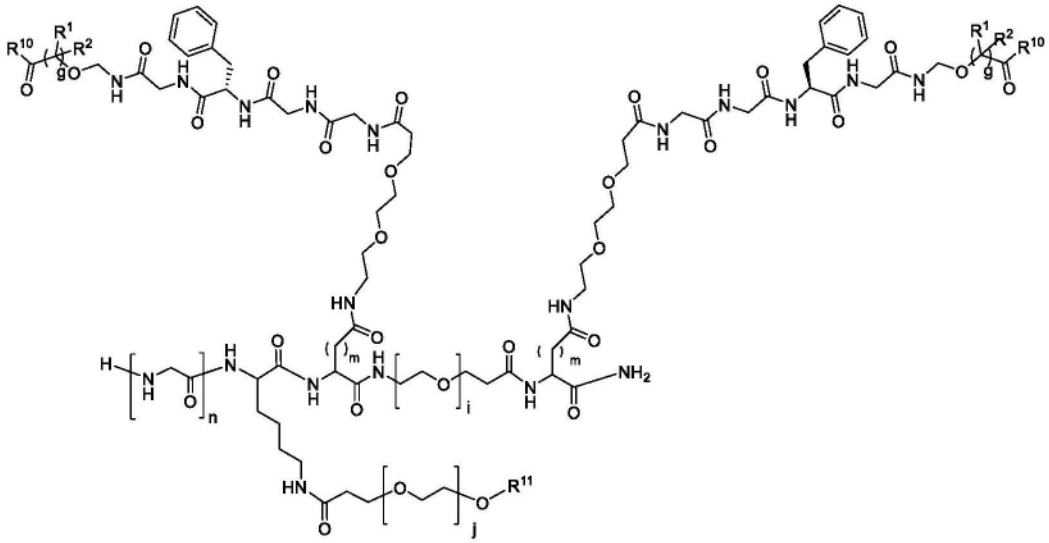
[0242] 

[0243] 在一些实施例中,n是3,L^2是-$(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$,p是2,$L^1$是GGFG,B是-NH-$CH_2$-U-$R^{10}$或-$R^{10}$或-NH-$CH_2$-U-$(CR^1R^2)_g-(CO)-R^{10}$,U是O,g是1。在一些实施例中,I-b-1具有以下结构:

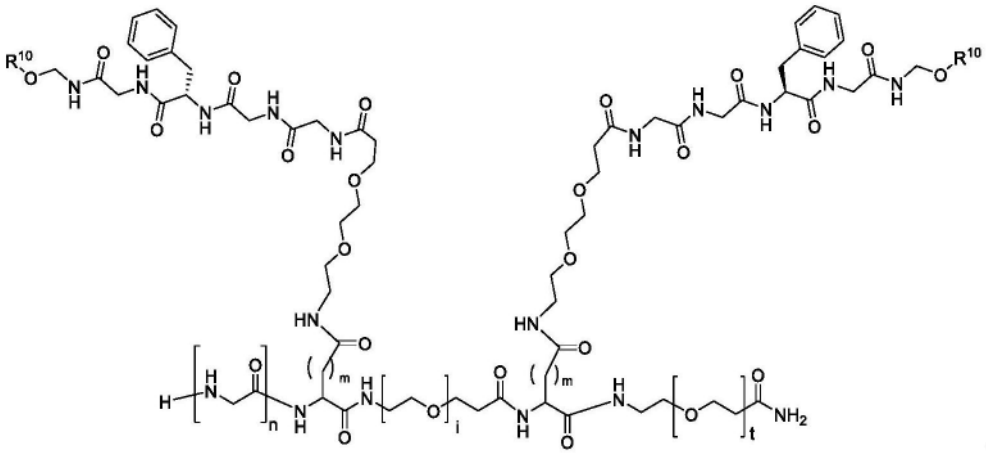
[0244] 

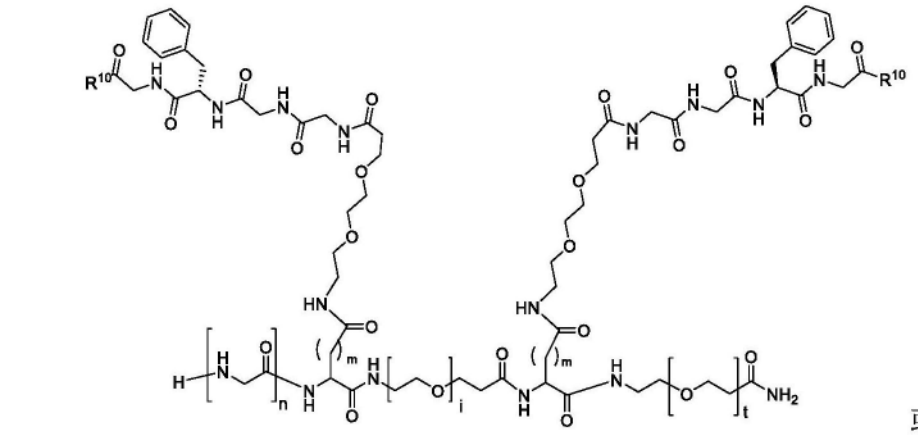
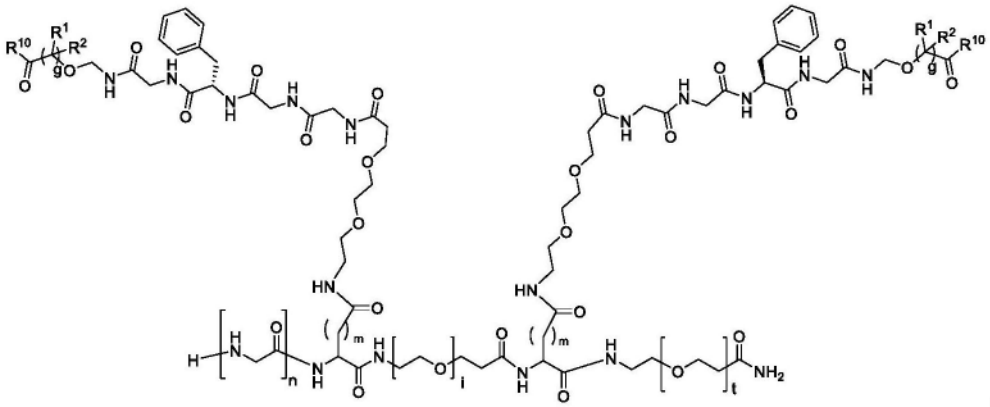
[0245] 

或



[0246] 在一些实施例中,n是3,L^2是-$(C_2H_4-O)_p-(CH_2)_2(CO)-$,p是2,$L^1$是GGFG,B是-NH-$CH_2$-U-$R^{10}$或-$R^{10}$或-NH-$CH_2$-U-$(CR^1R^2)_g-(CO)-R^{10}$,U是O,g是1。在一些实施例中,I-b-O具有以下结构:

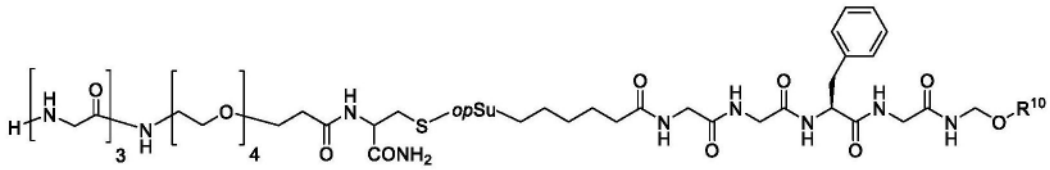
[0247] 

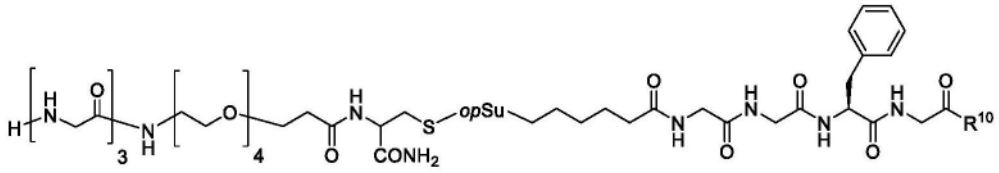
[0248] 
或

。

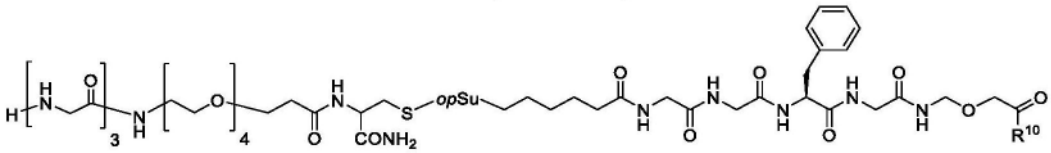
[0249] 在一些实施例中,i是4,g是1,R^{11}是甲基。

[0250] 在一些实施例中,i是2,g是1,R^{11}是甲基。

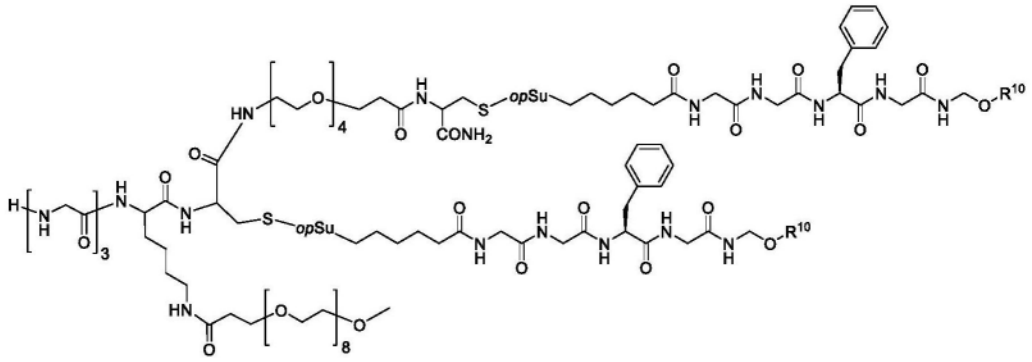
[0251] 在一些实施例中,I-a-0-2如下(I-a-0-2-1至I-a-0-2-3):


(I-a-0-2-1)

[0252] 
(I-a-0-2-2)

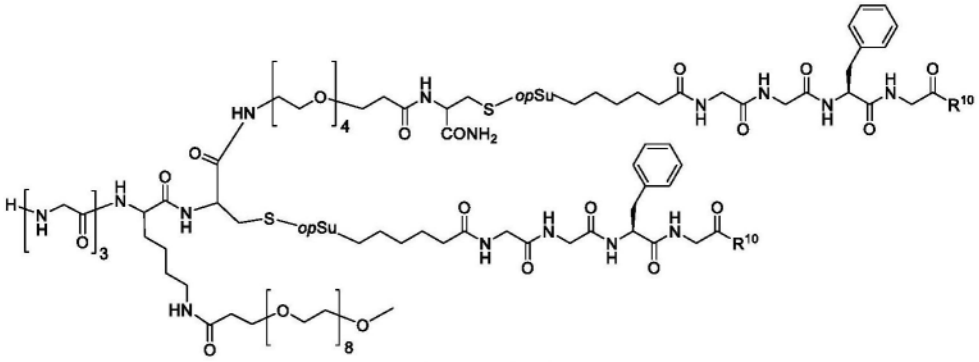

(I-a-0-2-3)。

[0253] 在一些实施例中,i是4,j是8,g是1,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-a-1-2如下(I-a-1-2-1至I-a-1-2-3):

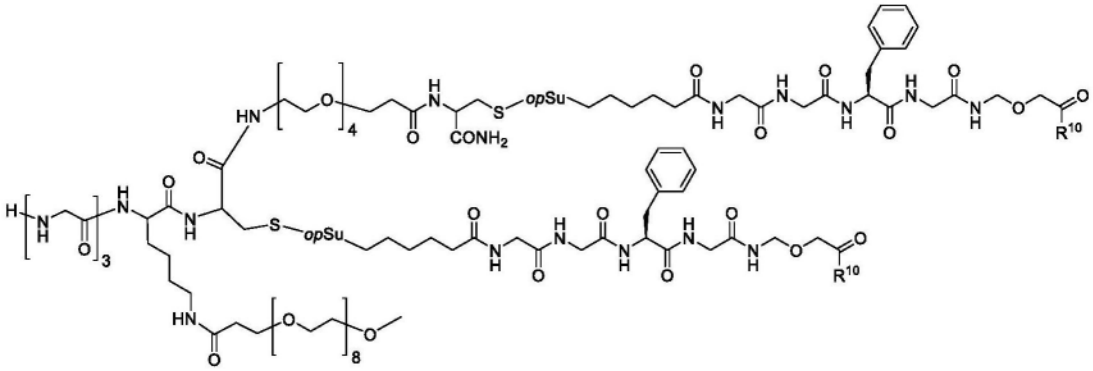


(I-a-1-2-1)

[0254]



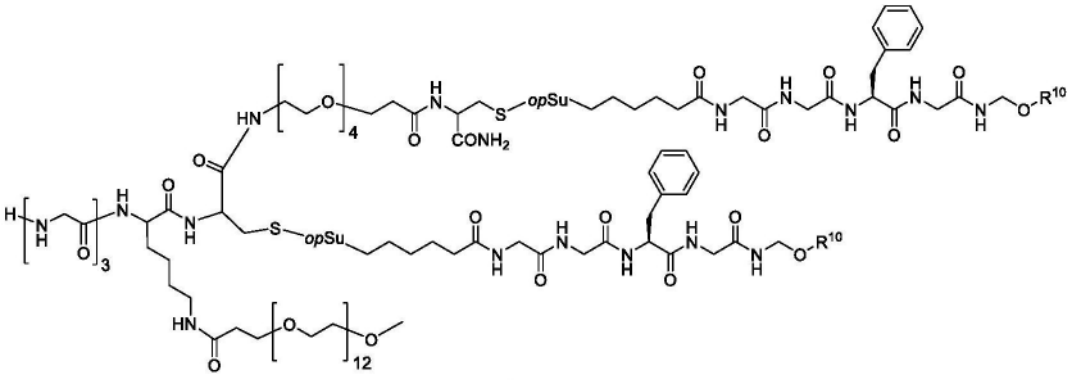
(I-a-1-2-2)



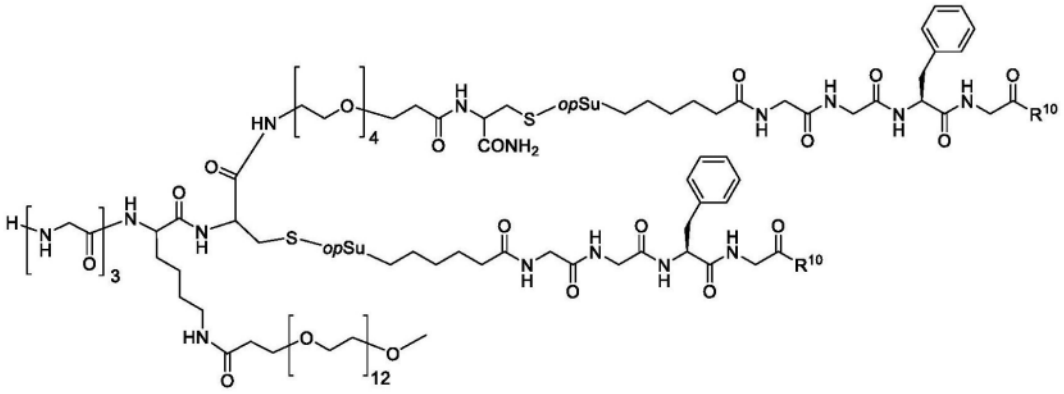
(I-a-1-2-3)。

[0255] 在一些实施例中,n是3,i是4,j是12,g是1,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-a-1-2如下(I-a-1-2-4至I-a-1-2-6):

[0256]

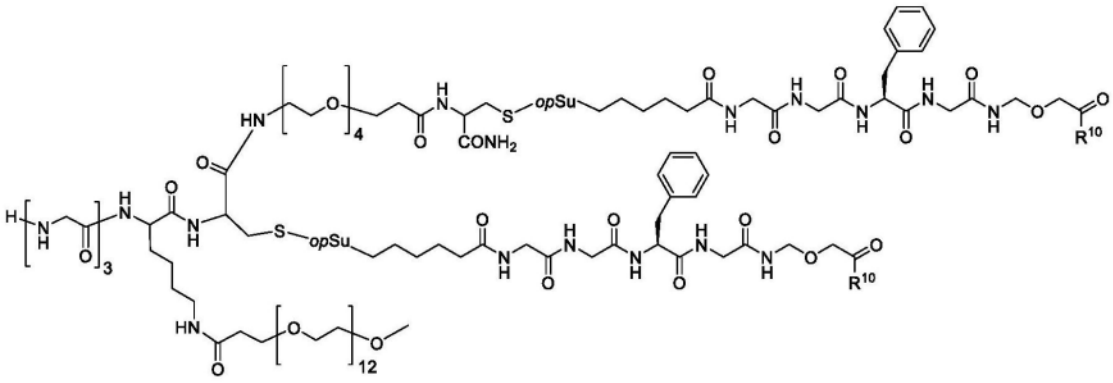


(I-a-1-2-4)



(I-a-1-2-5)

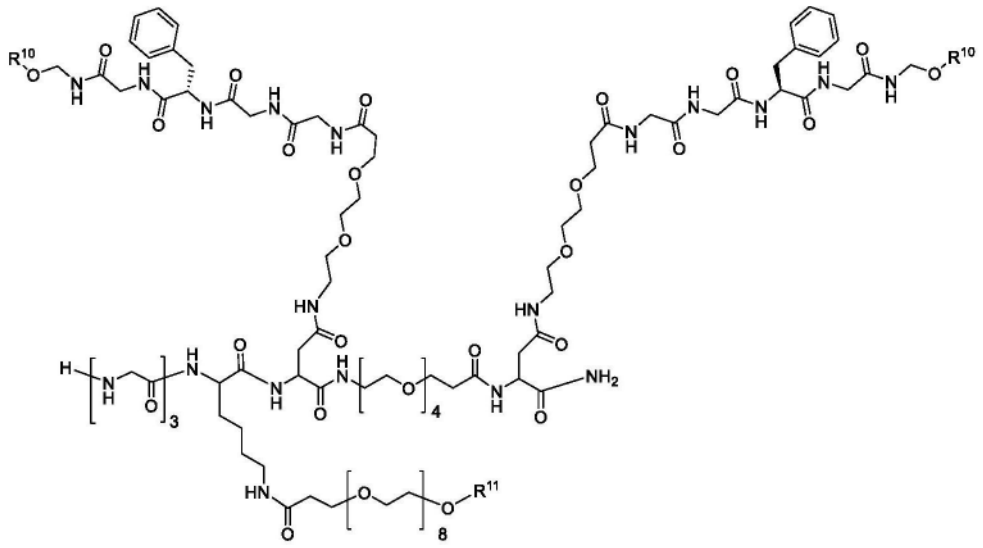
[0257]



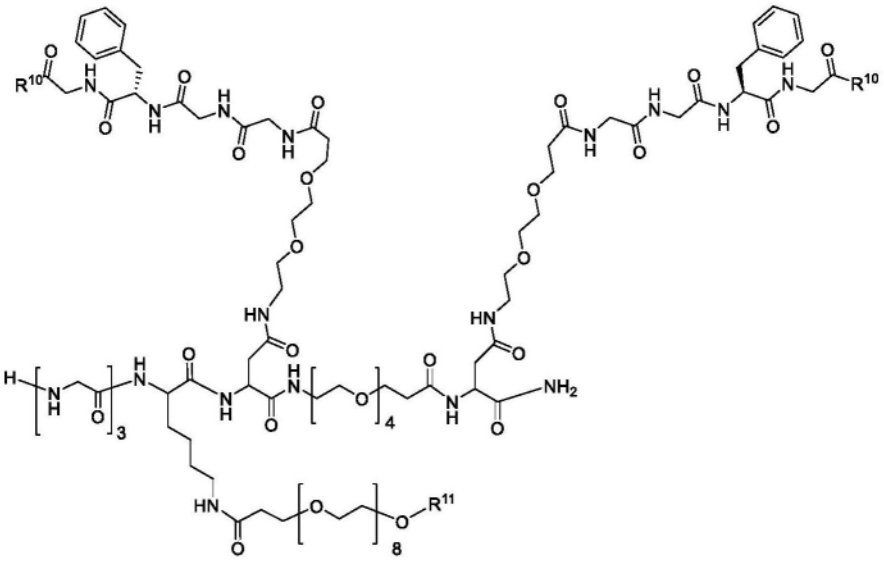
(I-a-1-2-6)。

[0258] 在一些实施例中,i是4,j是8,g是1,m是1,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-1如下(I-b-1-1至I-b-1-3):

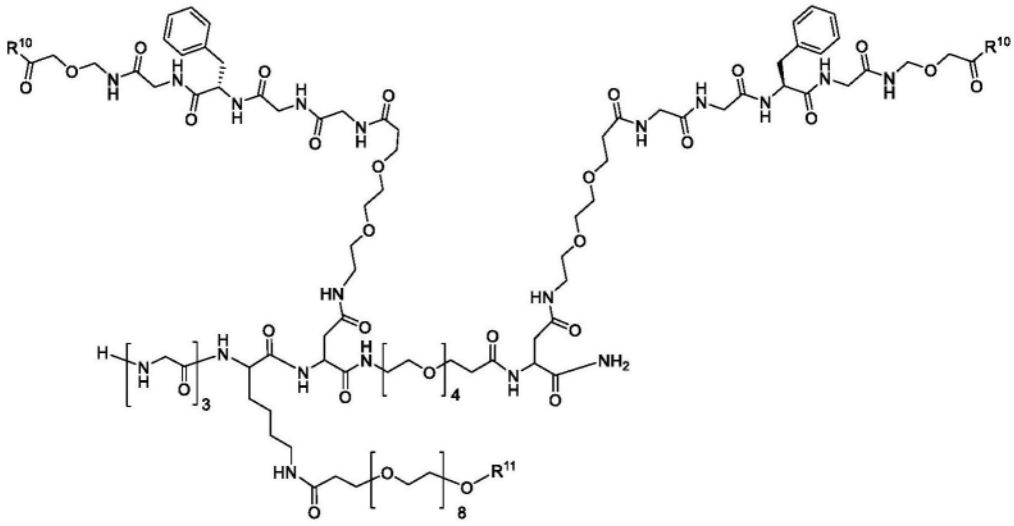
[0259]



(I-b-1-1)



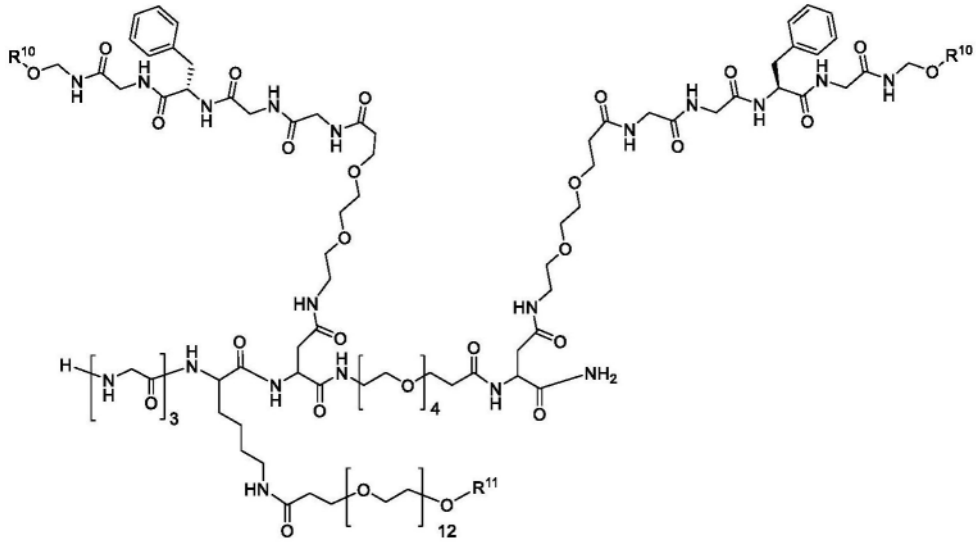
[0260] (I-b-1-2)



(I-b-1-3)。

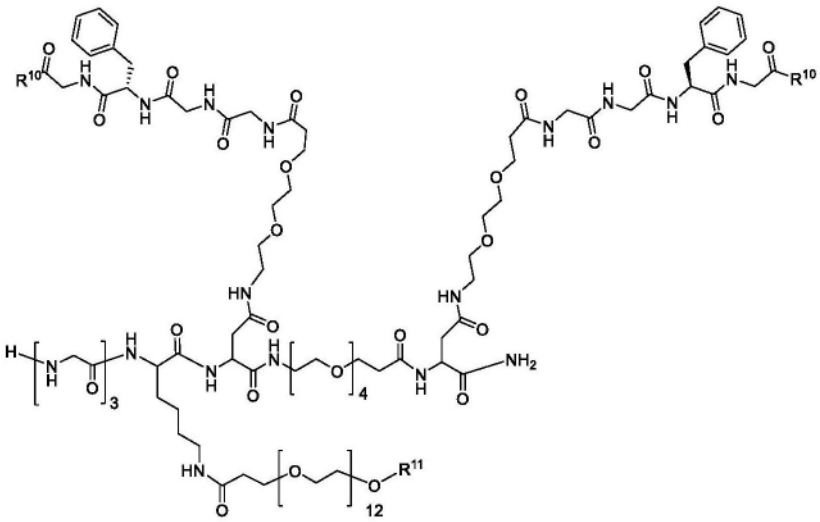
[0261] 在一些实施例中,i是4,j是12,g是1,m是1,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-1如下(I-b-1-4至I-b-1-1-6):

[0262]

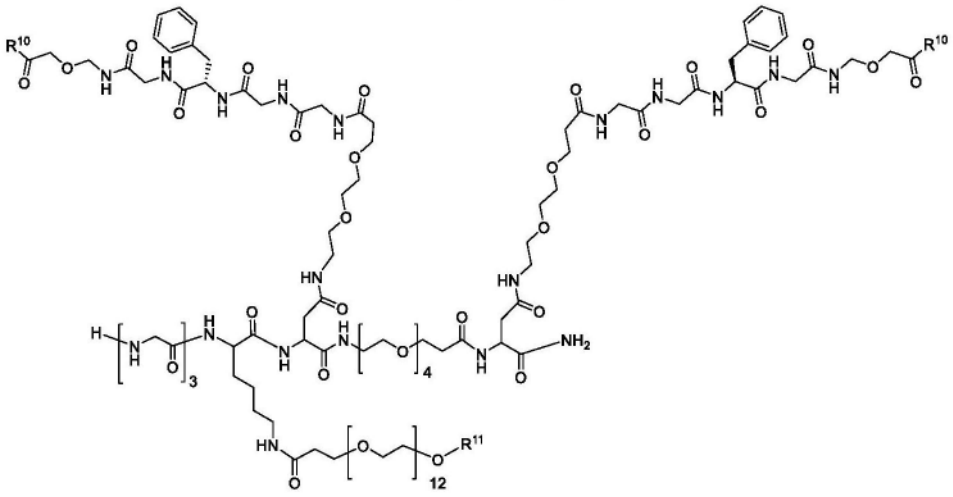


(I-b-1-4)

[0263]



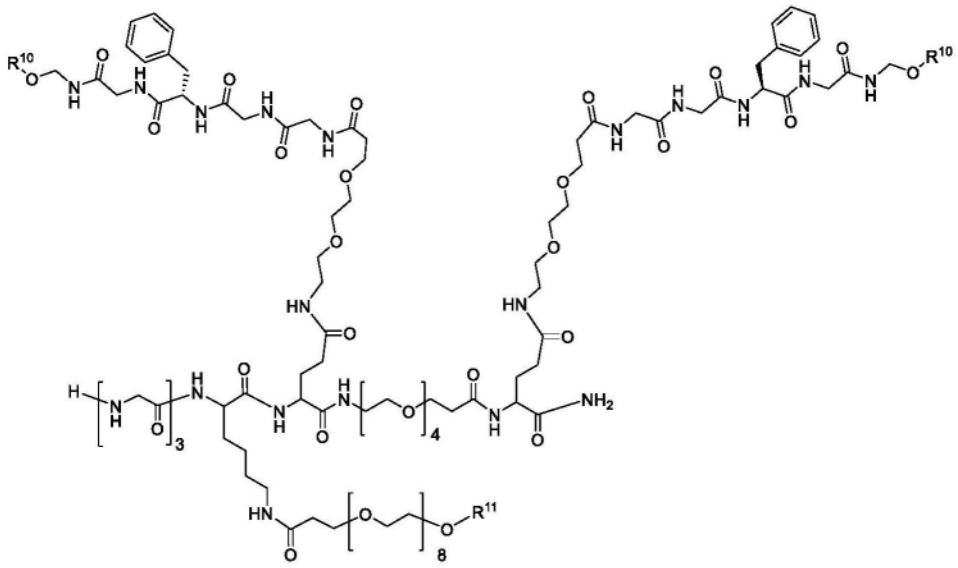
(I-b-1-5)



(I-b-1-6)。

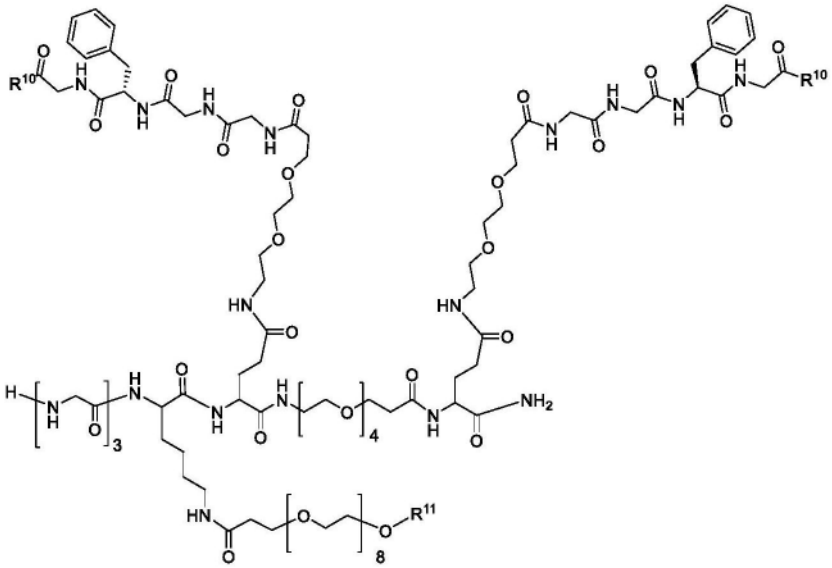
[0264] 在一些实施例中,i是4,j是8,g是1,m是2,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-1如下(I-b-1-7至I-b-1-9):

[0265]

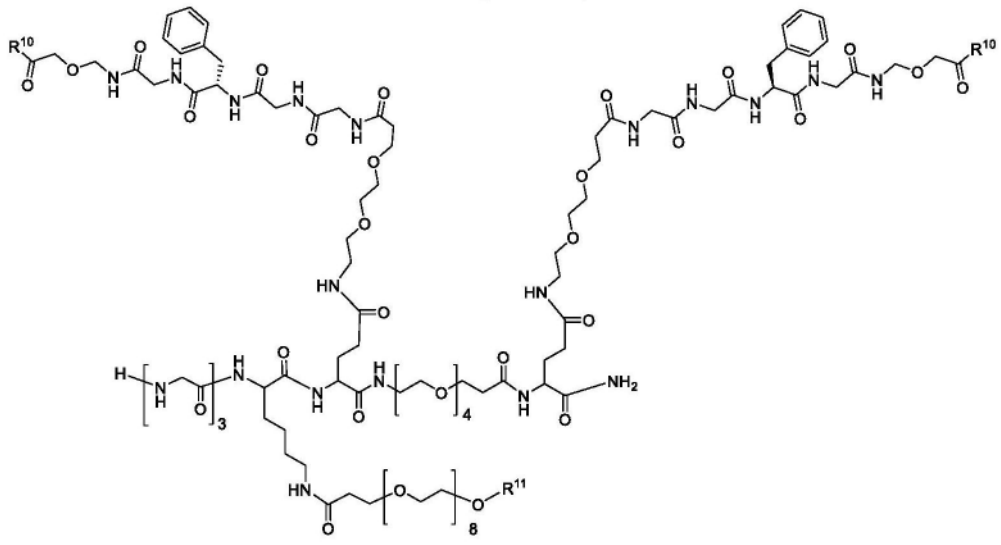


(I-b-1-7)

[0266]



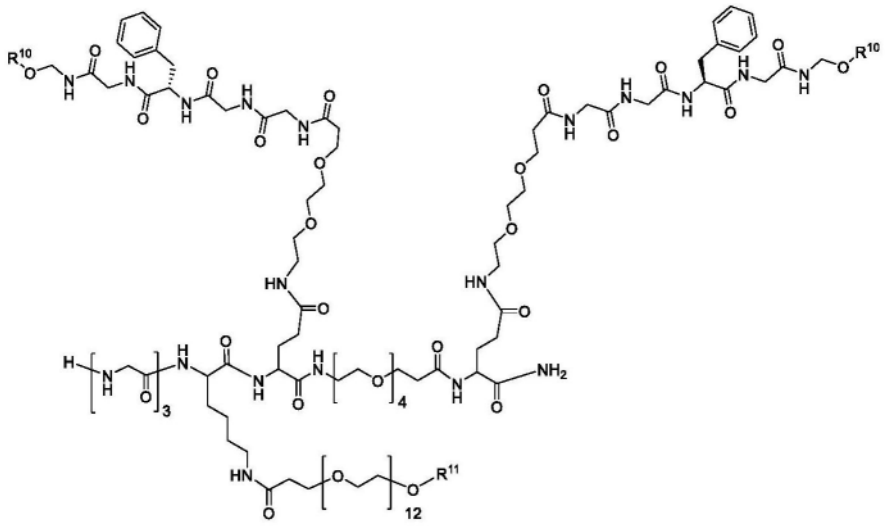
(I-b-1-8)



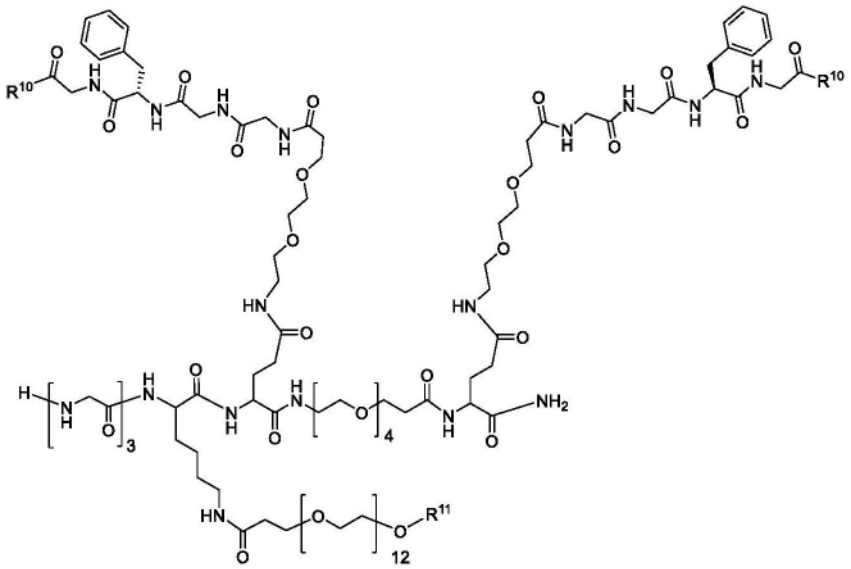
(I-b-1-9)。

[0267] 在一些实施例中,i是4,j是12,g是1,m是2,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-1如下(I-b-1-10至I-b-1-12):

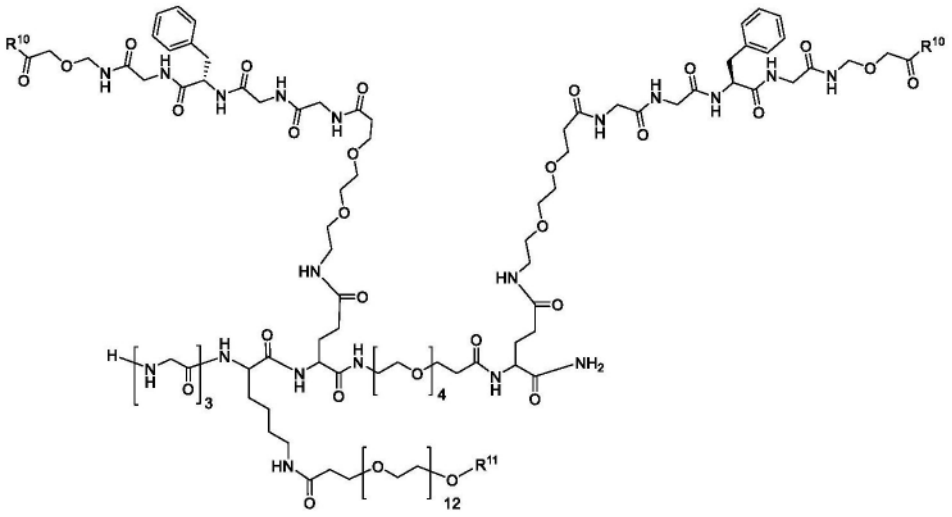
[0268]



(I-b-1-10)



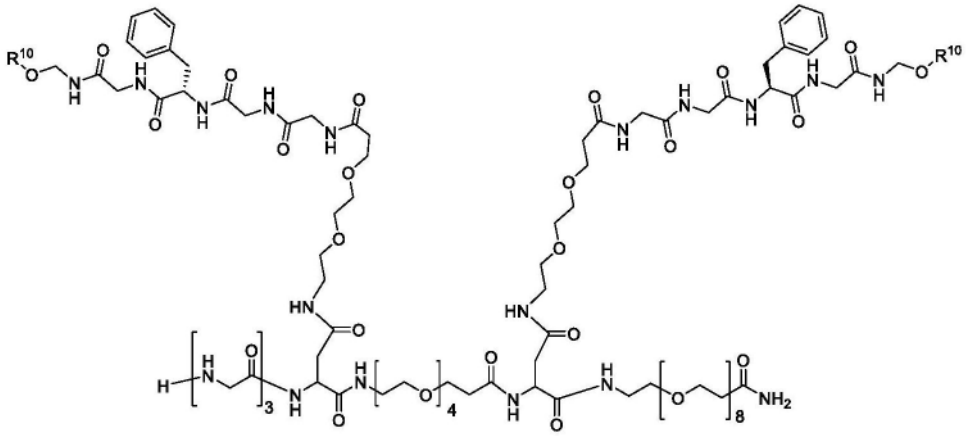
[0269] (I-b-1-11)



(I-b-1-12)。

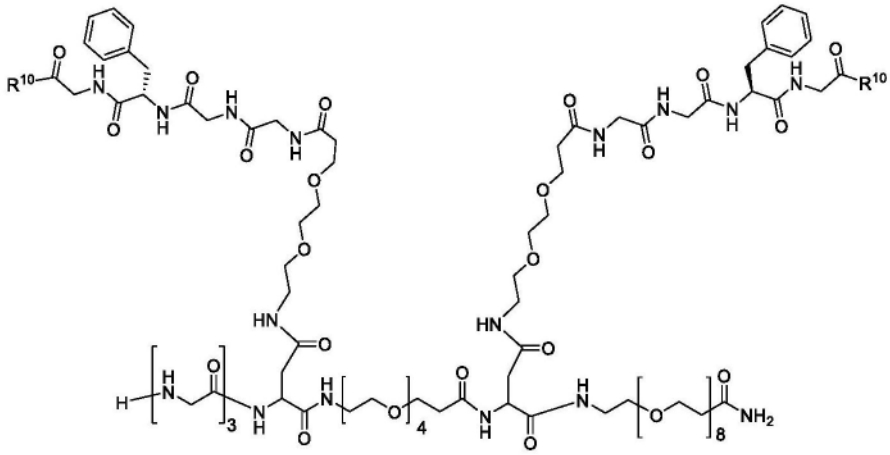
[0270] 在一些实施例中,i是4,t是8,g是1,m是1,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-0如下(I-b-0-1至I-b-0-3):

[0271]

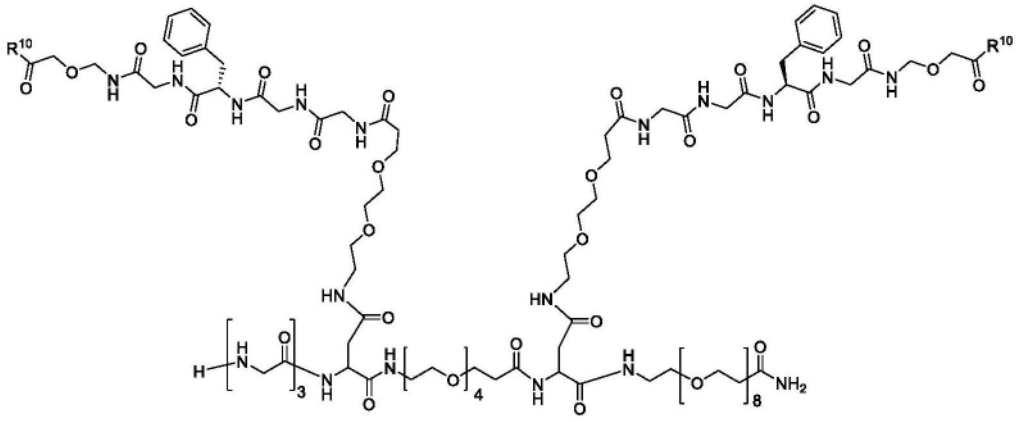


(I-b-0-1)

[0272]



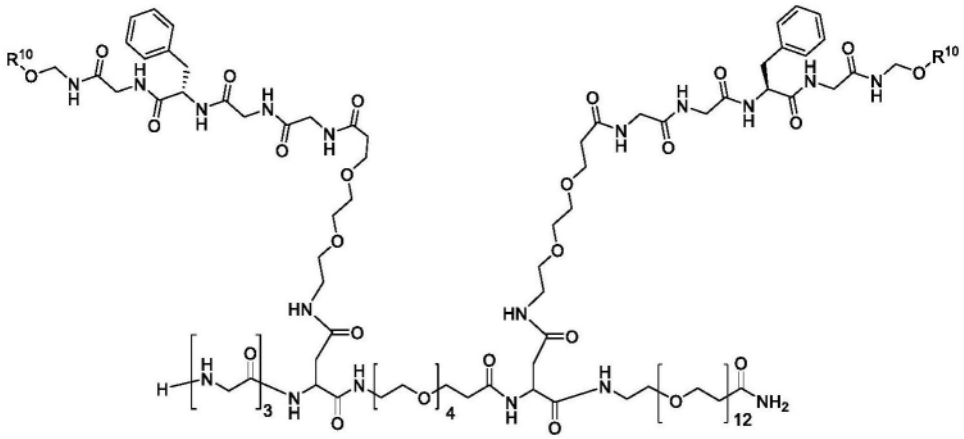
(I-b-0-2)



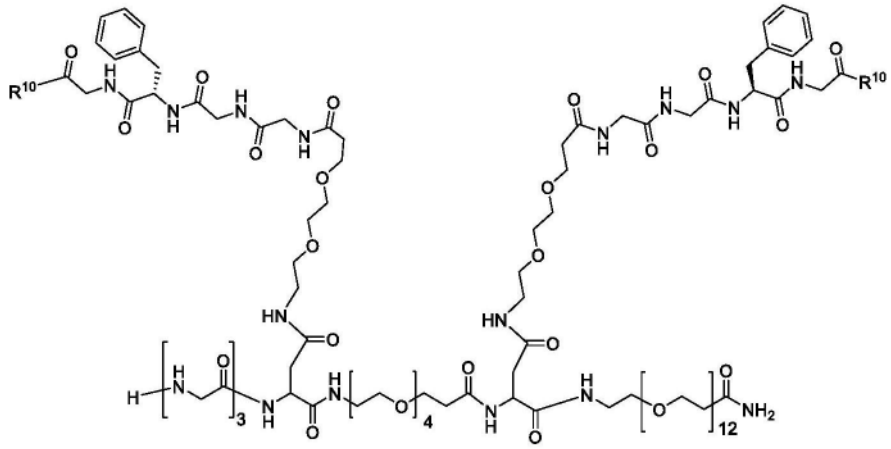
(I-b-0-3)。

[0273] 在一些实施例中,i是4,t是12,g是1,m是1,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-0如下(I-b-0-4至I-b-0-6):

[0274]

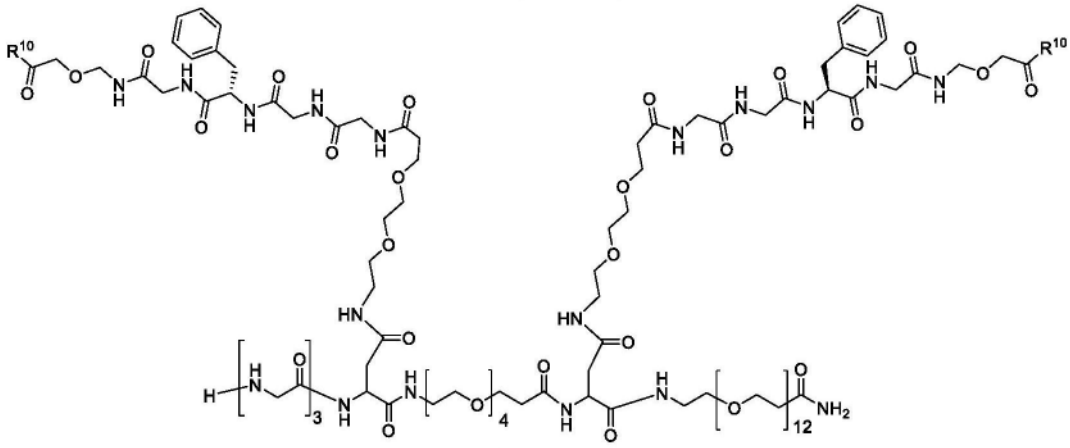


(I-b-0-4)



(I-b-0-5)

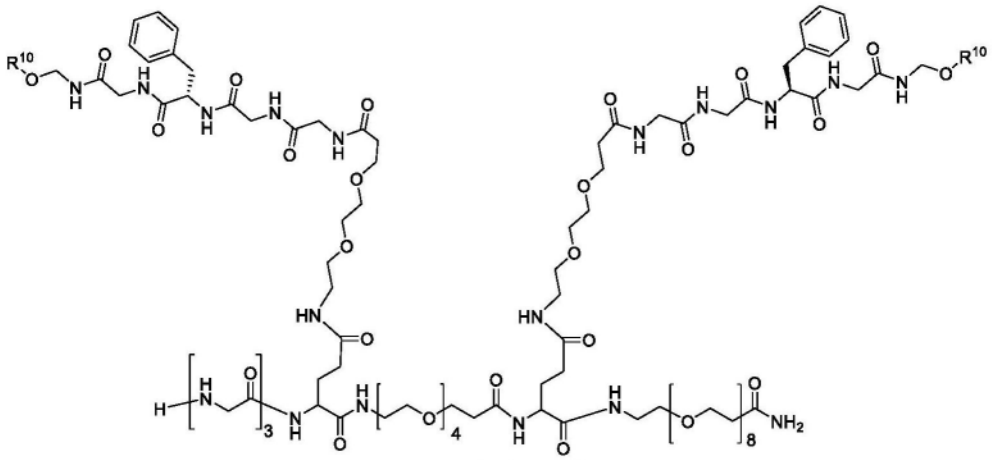
[0275]



(I-b-0-6)。

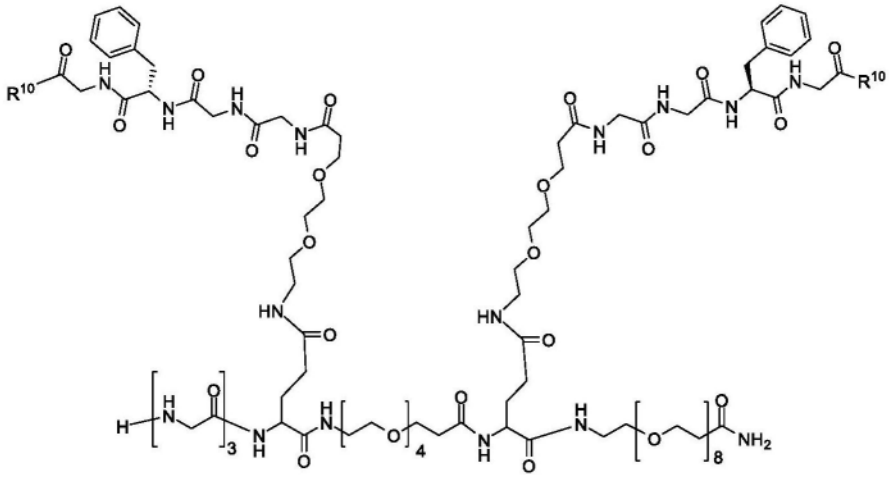
[0276] 在一些实施例中,i是4,t是8,g是1,m是2,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-0如下(I-b-0-7至I-b-0-9):

[0277]

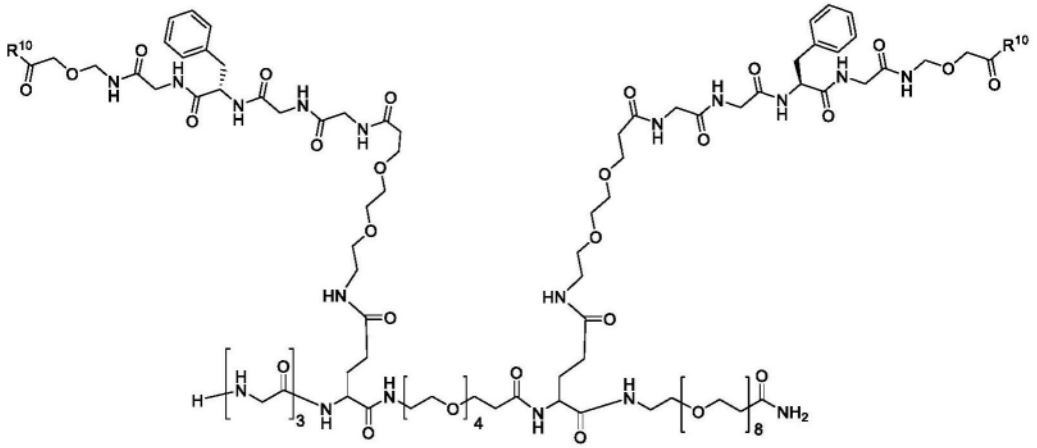


(I-b-0-7)

[0278]



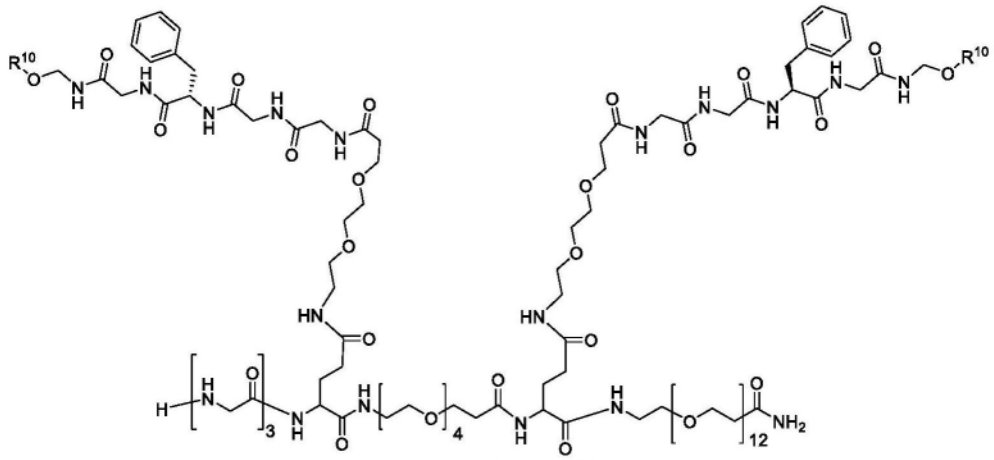
(I-b-0-8)



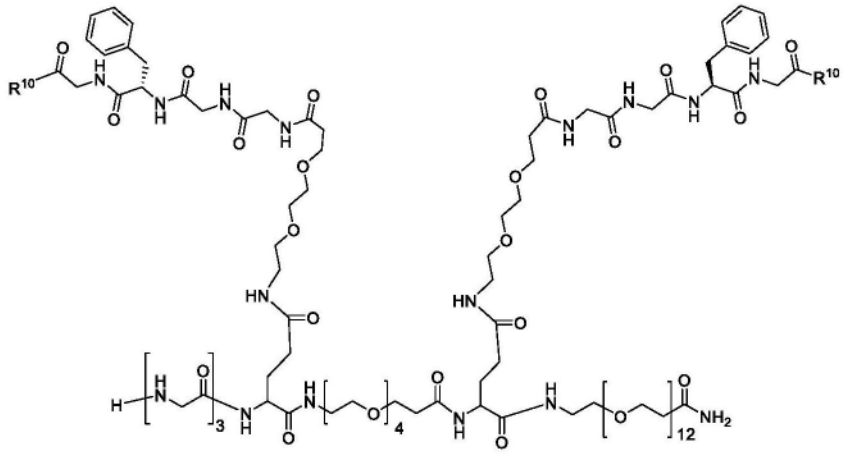
(I-b-0-9)。

[0279] 在一些实施例中,i是4,t是12,g是1,m是2,n是3,R^{11}是甲基。在一些实施例中,I-b-0如下(I-b-0-10至I-b-0-12):

[0280]

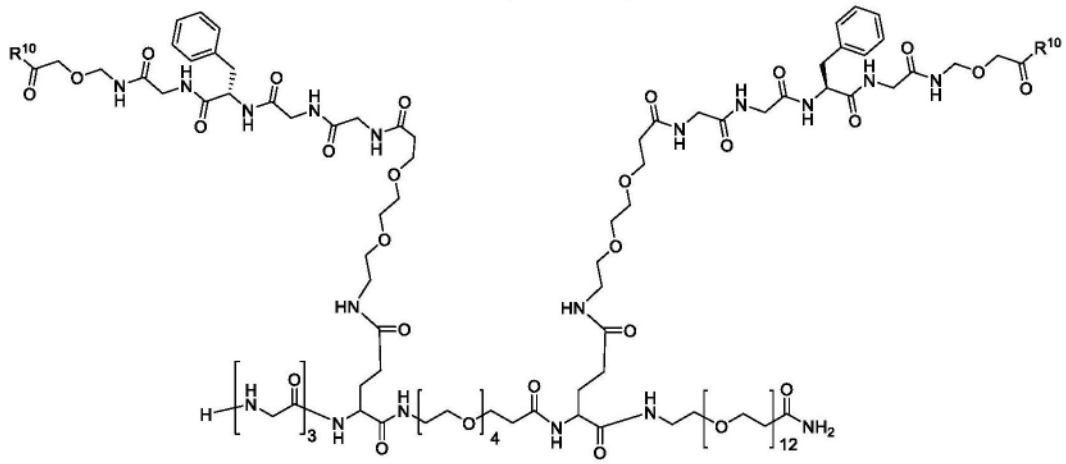


(I-b-0-10)



(I-b-0-11)

[0281]

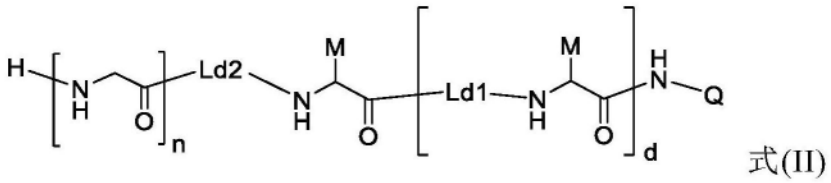


(I-b-0-12)。

[0282] 带负载物的式(I)化合物

[0283] B中包含的反应性基团与含有另一反应性基团的负载物共价缀合,得到带负载物的式(I)化合物。

[0284] 在又另一方面,提供一种具有式(II)的结构的化合物

[0285] 

式(II)

[0286] 其中

[0287] Q是氢、-C_2H_4-(PEG)$_t$-(CO)NH_2或LKb－P;

[0288] M是氢或LKa-LKb－P;

[0289] 条件是,Q和M不同时是氢;

[0290] P是负载物,所述负载物连接至式(I)化合物的B部分或L^1部分;

[0291] n、d、Ld1、Ld2、t、LKa和LKb如式(I)中所定义。

[0292] 如上文所定义,在式(I)化合物中,每个LKb独立地是L^2－L^1－B;每个B独立地是端基R^{10},或以下1)、2)和3)的组合:1)自切除间隔子Sp1;2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-;以及3)端基R^{10};R^{10}是氢,或是当与负载物中的基团反应时可离去的基团。在一个实施例中,R^{10}表示不会出现在B与负载物反应产生的产物分子中的结构部分。

[0293] 在一个实施例中,P连接至式(I)化合物的B部分以形成式(II)化合物。如上文所定义,R^{10}不会出现在式(II)化合物的B－P结构中。

[0294] 应理解,当式(I)化合物中的B是端基R^{10}时,R^{10}不会出现在式(II)化合物中。因此,作为结果,B不存在于式(II)化合物的B－P结构中。

[0295] 在一个实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P;其中P是负载物,所述负载物连接至式(I)化合物的B部分或L^1部分;每个B独立地是端基R^{10},或以下1)、2)和3)的组合:1)自切除间隔子Sp1;2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-;以及3)端基R^{10};R^{10}是氢或是当与负载物中的基团反应时可离去的基团;R^{10}表示不会出现在B与负载物反应产生的产物分子中的结构部分。

[0296] 在一个实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P;其中每个B独立地不存在,或是以下1)和2)的组合:1)自切除间隔子Sp1;和2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-。在一个优选实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P;其中每个B独立地不存在,或是-NH-CH_2-U-或是-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)$_g$-(CO)-。在另一个实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P。在一个实施例中,在LKa-L^2－L^1－B－P中,B不存在。在一个实施例中,在LKa-L^2－L^1－B－P中,B是以下1)和2)的组合:1)自切除间隔子Sp1;和2)化学,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-。在一个实施例中,在LKa-L^2－L^1－B－P中,B是-NH-CH_2-U-或是-NH-CH_2-U-(CR^1R^2)$_g$-(CO)-;U不存在,或是O、S或NH,优选是O或S。在一个实施例中,式(I)化合物中的B通过酰胺键或酯键或醚键连接至负载物。

[0297] 如上文所定义,当式(I)化合物中的B是端基R^{10}时,B不存在于式(II)化合物的B－P结构中。在这种情况下,还可以理解,L^1中的可切割序列1连接至负载物形成式(II)化合物,其中B不存在于连接可切割序列1与负载物所得到的分子中。因此,在一个实施例中,P连接

至式(I)化合物的L^1部分形成式(II)化合物。因此,在一个实施例中,M是LKa-L^2—L^1—B—P,并且B不存在;且M还可以表示为LKa-L^2—L^1—P。

[0298] 负载物

[0299] 在本文中,负载物可选自由以下组成的组:小分子化合物、核酸和类似物、示踪分子(包括荧光分子等)、短肽、多肽、拟肽以及蛋白质。在一个实施例中,负载物选自由以下组成的组:小分子化合物、核酸分子和示踪分子。在一个优选实施例中,负载物选自小分子化合物。在一个更优选的实施例中,负载物选自由细胞毒素和其片段组成的组。

[0300] 在一个实施例中,细胞毒素选自由靶向微管细胞骨架的药物组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:紫杉烷类;美登素类;奥瑞他汀类;埃博霉素类(epothilones);磷酸康普瑞汀(combretastatin)A-4、康普瑞汀A-4和其衍生物;吲哚-磺酰胺类;长春碱类,如长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、长春瑞滨(vinorelbine)、长春氟宁(vinflunine)、长春甘酯(vinglycinate)、无水长春碱;海兔毒素10和类似物;软海绵素B(halichondrin B);以及艾日布林(eribulin);吲哚-3-氧代乙酰胺;鬼臼毒素类(podophyllotoxins);7-二乙基氨基-3-(2'-苯并噁唑基)-香豆素(DBC);圆皮海绵内酯(discodermolide);莱利霉素(laulimalide)。在另一个实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:DNA拓扑异构酶抑制剂,如喜树碱类和其衍生物、米托蒽醌(mitoxantrone)、米托胍腙(mitoguazone)。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:氮芥类,如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、凡那明(phenamet)、胆固醇对苯乙酸氮芥(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)。在又一优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:亚硝基脲类,如卡莫司汀(carmustine)、氟苯隆(flubenzuron)、福莫特罗(formoterol)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、拉莫司汀(ramustine)。在一个实施例中,细胞毒素选自由氮丙啶类组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedepa)和乌瑞替哌(uredepa)。在一个实施例中,细胞毒素选自由抗肿瘤抗生素组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由烯二炔类抗生素组成的组。在一个更优选的实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:达内霉素、埃斯培拉霉素、新制癌菌素和阿克拉霉素(aclacinomycin)。在另一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(antramycin)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素C、卡柔比星(carabicin)、洋红霉素(carminomycin)和抗癌霉素(cardinophyllin)、洋红霉素、放线菌素D、道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、阿霉素(adriamycin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycins)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、铁阿霉素、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(rufocromomycin)、链脲霉素(streptozocin)、净司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)。在又一优选实施例中,细胞毒素选自由单端孢霉烯(trichothecene)组成的组。在一个更优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:T-2毒素、粘液霉素A、杆孢菌素

(bacillocporin)A和蛇形菌素(anguidine)。在一个实施例中,细胞毒素选自由抗肿瘤氨基酸衍生物组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:乌苯美司(ubenimex)、氮杂丝氨酸、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸。在另一个实施例中,细胞毒素选自由叶酸类似物组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:二甲基叶酸、甲氨蝶呤(methotrexate)、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)和依达曲沙(edatrexate)。在一个实施例中,细胞毒素选自由嘌呤类似物组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫米嘌呤(tiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine)。在又另一个实施例中,细胞毒素选自嘧啶类似物。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:安西他滨(ancitabine)、吉西他滨(gemcitabine)、依诺他滨(enocitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、氟尿苷(floxuridine)。在一个实施例中,细胞毒素选自由雄激素组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:二甲睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸酯(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone)。在另一个实施例中,细胞毒素选自由抗肾上腺剂组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane)。在一个实施例中,细胞毒素选自由抗雄激素剂组成的组。在一个优选实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、乙酸亮丙瑞林(leuprorelin acetate)和戈舍瑞林(goserelin)。在又另一个实施例中,细胞毒素选自由蛋白激酶抑制剂和蛋白酶体抑制剂组成的组。在另一个实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:长春碱类、秋水仙碱类、紫杉烷类、奥瑞他汀类、美登素类、卡奇霉素、阿霉素、倍癌霉素(duocarmucin)、SN-38、念珠藻环肽类似物、德鲁替康(deruxtecan)、多卡马嗪(duocarmazine)、卡奇霉素、辛坦霉素(centanamycin)、多拉坦辛(dolastansine)和吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。在一个特定实施例中,细胞毒素选自由以下组成的组:长春碱类、秋水仙碱类、紫杉烷类、奥瑞他汀类和美登素类。

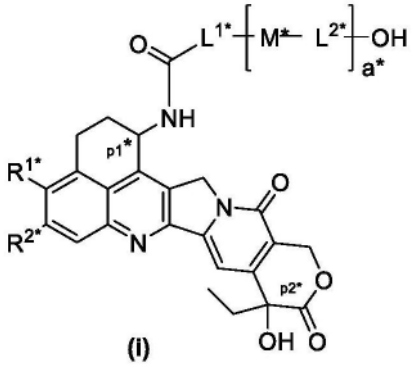
[0301] 在一个特定实施例中,细胞毒素是依沙替康(exatecan)或其衍生物,如DX8951f等。

[0302] 在另一特定实施例中,细胞毒素是美登素类,如DM1等。应注意,在使用包含硫醇部分的细胞毒素,所述硫醇部分能够与顺丁烯二酰亚胺部分反应形成硫代琥珀酰亚胺,例如美登素类,例如DM1时,细胞毒素可经由硫代琥珀酰亚胺直接连接。在这种情况下,可理解,在一些实施例中,负载物和硫醇部分一起构成细胞毒素,并因此,在这种情况下,负载物表示细胞毒素分子中除硫醇部分外的其余部分。

[0303] 在一个特定实施例中,细胞毒素是奥瑞他汀,如MMAE(单甲基奥瑞他汀E)、MMAF(单甲基奥瑞他汀F)、MMAD(单甲基奥瑞他汀D)等。奥瑞他汀化合物的合成和结构描述于US20060229253中,其全部公开内容以引用的方式并入本文中。

[0304] 负载物含有反应性基团,所述反应性基团可与式(I)化合物中的反应性基团反应,并由此将负载物与式(I)化合物共价缀合。不含反应性基团的化合物需要适当衍生化,得到负载物。

[0305] 在一个实施例中,细胞毒素是下式(i)的化合物

[0306] 

(i)

[0307] 其中

[0308] a*是0或1;

[0309] 标记有p1*和p2*的碳原子各自是不对称中心,并且所述不对称中心是S构型、R构型或外消旋的;

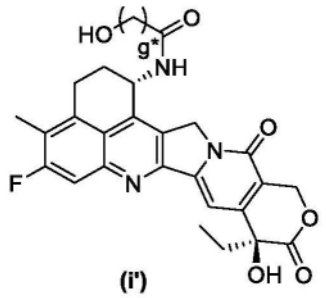
[0310] L^{1*}选自C_{1-6}亚烷基,所述亚烷基未被取代或被一个选自卤素、-OH和-NH_2的取代基取代;

[0311] M*是-CH_2-、-NH-或-O-;

[0312] L^{2*}是C_{1-3}亚烷基;

[0313] R^{1*}和R^{2*}各自独立地选自氢、C_{1-6}烷基、卤素和C_{1-6}烷氧基。

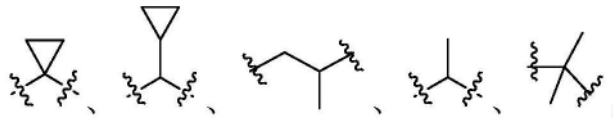
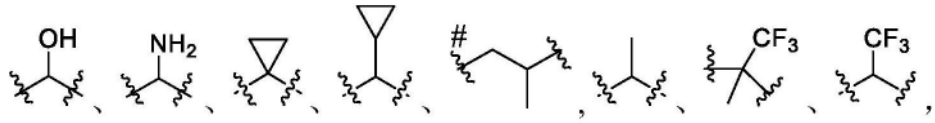
[0314] 在一个特定实施例中,细胞毒素是下式(i')的化合物

[0315] 

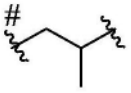
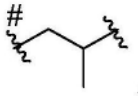
(i')

[0316] 其中g是1至6的任何整数。

[0317] 在一个实施例中,g*是1至3的任何整数,优选是1。

[0318] 在一个实施例中,L^{1*}选自C_{1-6}直链亚烷基、C_{1-6}分支链亚烷基、C_{3-6}环状亚烷基和C_{3-4}环状烷基-C_{1-2}直链亚烷基,其各自独立地未被取代或被一个选自卤素、-OH和-NH_2的取代基取代。在一个实施例中,L^{1*}选自C_{1-4}亚烷基,所述亚烷基未被取代或被一个选自卤素、-OH和-NH_2的取代基取代。在一个优选实施例中,L^{1*}选自-CH_2-、-C_2H_4-、  ,其各自独立地未被取代或被至少一个取代基取代,所述取代基选自卤素、-OH和-NH_2。在一个优选实施例中,L^{1*}选自-CH_2-、 

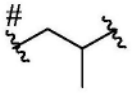
,其中"#"标记连接至羰

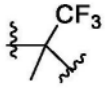
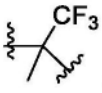
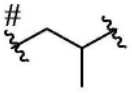
基的位置。在一个更优选的实施例中，L^{1*}选自-CH_2-、  、  、  、  ，其中“#”标记连接至羰基的位置。在一个特定实施例中，L^{1*}选自-CH_2-、  和  ，其中“#”标记连接至羰基的位置。在一个优选实施例中，卤素选自F、Cl和Br，尤其是F。

[0319] 在一个实施例中，a*是1，M*是-CH_2-、-NH-或-O-；并且L^{2*}是-C_2H_4-。在另一个实施例中，a*是1，M*是-CH_2-，并且L^{2*}是-CH_2-。在一个实施例中，a*是0。

[0320] 在一个实施例中，标记有p1*的碳原子是S构型或外消旋的，优选是S构型。在另一个实施例中，标记有p2*的碳原子是S构型或外消旋的，优选是S构型。

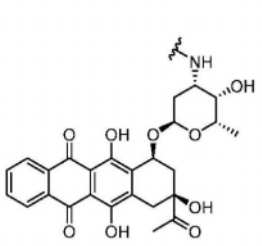
[0321] 在一个实施例中，R^{1*}和R^{2*}各自独立地选自氢、C_{1-3}烷基、卤素和C_{1-3}烷氧基。在一个优选实施例中，R^{1*}和R^{2*}各自独立地选自CH_3-、F、Cl、Br和CH_3O-。在一个实施例中，R^{1*}选自CH_3-和Cl。在另一个实施例中，R^{2*}是F。

[0322] 在一个实施例中，a*是0，L^{1*}选自-CH_2-、  、  、  和  ，其中“#”标记连接至羰基的位置。在一个实施例中，a*是1，L^{1*}是  ，M*是O，并且L^{2*}是-C_2H_4-。

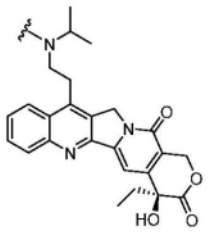
[0323] 在一些实施例中，a*是0，R^{1*}是Cl，R^{2*}是F，并且L^{1*}选自-CH_2-、  、  和  。在一些实施例中，a*是0，R^{1*}是CH_3-，R^{2*}是F，并且L^{1*}选自  和  ，其中“#”标记连接至羰基的位置。

[0324] 在一些实施例中，a*是1，R^{1*}是CH_3-，R^{2*}是F，L^{1*}是  ，M是O，并且L^{2*}是-C_2H_4-。

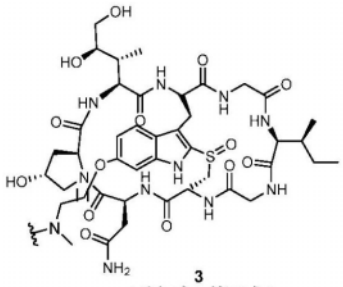
[0325] 在一个实施例中，细胞毒素选自以下化合物；其中波状键显示与式(I)化合物连接的连接位点。



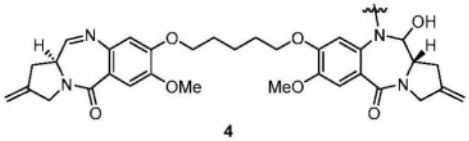
1
（伊达比星）



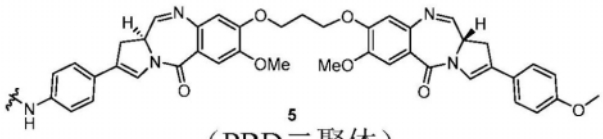
2
（贝洛替康）



3
（鹅膏蕈碱）



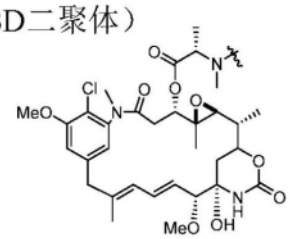
4
（PBD二聚体）



5
（PBD二聚体）

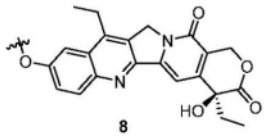


6
（PBD单体）

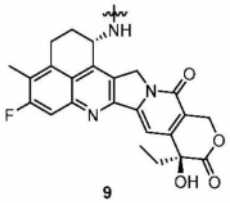


7
(DM)

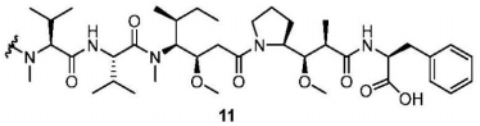
[0326]



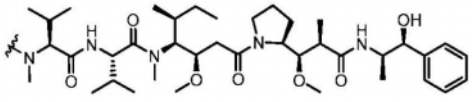
8
(SN-38)



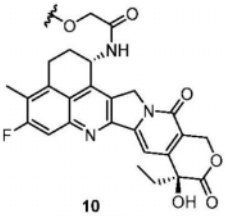
9
(DX8951f)



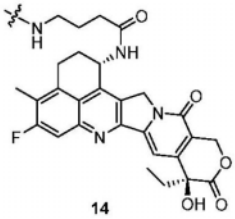
11
(MMAF)



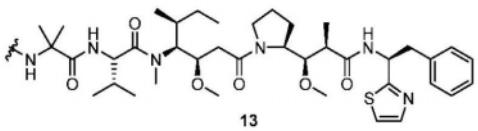
12
(MMAE)



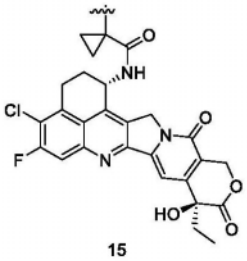
10
(Dxd-(1))



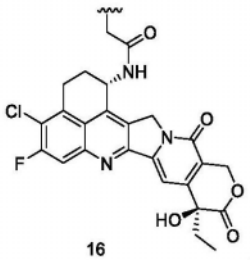
14
(Dxd-(2))



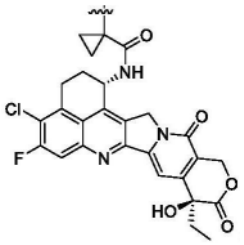
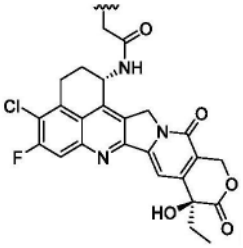
13
（奥瑞他汀0101）

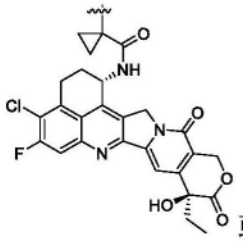
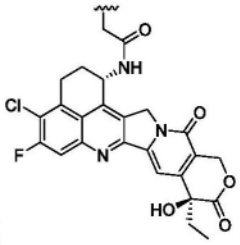
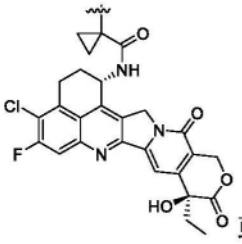
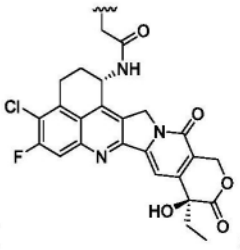
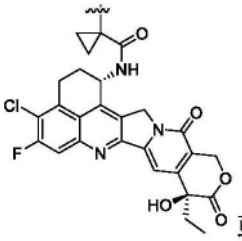
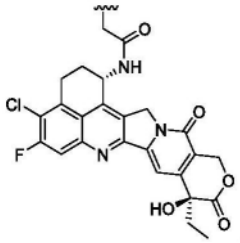


15



16

[0327] 在一些实施例中,负载物选自DX8951f(化合物9)、DXd-(1)(化合物10)、DXd-(2)(化合物14)、  (化合物15)、  (化合物16),优选地选自

DX8951f、DXd-(1)、  或  ，更优选地选自DXd-(1)、  或  ，最优选地选自  或  。

[0328] 带负载物的式(I)化合物的制备

[0329] 在一个实施例中,连接单元与负载物是使用本领域中已知的任何反应,通过上文所定义的反应性基团连接,所述反应包括但不限于缩合反应、亲核加成、亲电子加成等。

[0330] 在一个实施例中,负载物是细胞毒素。在一个实施例中,连接单元-负载物中间物(编号为LBx)如下表中所示。

[0331]

式(II)化合物	连接子的式	i 和 j 的值(适用时)*	负载物
II-a-0-1-1	I-a-0-1	-	化合物 10
II-a-0-2-1	I-a-0-2	i 是 4	化合物 10
II-a-0-3-1	I-a-0-3	i1 是 4，i2 是 4	化合物 10
II-a-0-4-1	I-a-0-4	i1、i2、i3 分别是 4	化合物 10
II-a-0-5-1	I-a-0-5	i1、i2、i3 和 i4 分别是 4	化合物 10
II-a-1-1-1	I-a-1-1	j 是 8	化合物 10
II-a-1-1-4	I-a-1-1	j 是 12	化合物 10
II-a-1-2-1	I-a-1-2	i 是 4，j 是 8	化合物 10

[0332]

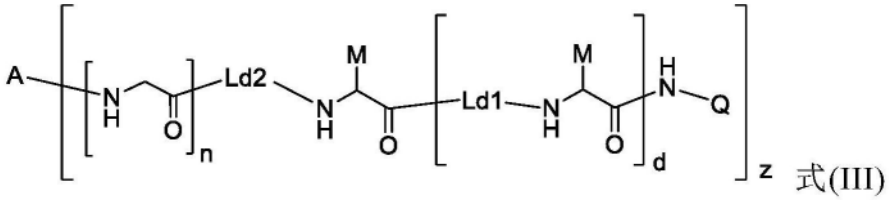
II-a-1-2-4-1	I-a-1-2	i 是 4，j 是 12	化合物 10
II-a-1-2-4-2	I-a-1-2	i 是 4，j 是 12	化合物 15
II-a-1-2-4-3	I-a-1-2	i 是 4，j 是 12	化合物 16
II-a-1-2-6	I-a-1-2	i 是 4，j 是 12，g 是 1，R^{11} 是甲基	化合物 9
II-a-1-3-1	I-a-1-3	i1 是 4，i2 是 4，j 是 8	化合物 10
II-a-1-3-4	I-a-1-3	i1 是 4，i2 是 4，j 是 12	化合物 10
II-a-1-4-1	I-a-1-4	i1、i2、i3 分别是 4，j 是 8	化合物 10
II-a-1-4-4	I-a-1-4	i1、i2、i3 分别是 4，j 是 12	化合物 10
II-b-1-1-4	I-b-1-1	i 是 4，j 是 12，g 是 1，m 是 1，R^{11} 是甲基	化合物 15

[0333] *:对于列出的所有连接子,n是3。

[0334] 缀合物和其制备

[0335] 此外,具有含连接酶识别序列的部分的带负载物的式(I)化合物可与包含连接酶识别序列的其它分子偶联,并由此可用于例如制备靶向分子-药物缀合物,如抗体-药物缀合物。因此,在又另一方面,提供一种缀合物,所述缀合物包含式(I)化合物、靶向分子和负载物。

[0336] 在又另一方面,提供一种具有式(III)结构的缀合物:

[0337] 

式(III)

[0338] 其中

[0339] n、d、Ld1和Ld2如式(I)中所定义;

[0340] Q是氢、$-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$或LKb－P;

[0341] M是氢或LKa-LKb－P;

[0342] 条件是,Q和M不同时是氢;

[0343] P是负载物,所述有负载物连接至式(I)化合物的B部分或L^1部分;

[0344] A是抗Trop2抗体或其抗原结合片段,它连接至式(I)化合物的G_n部分;G是甘氨酸;

[0345] z是1至20的整数。

[0346] 在一个实施例中,LKa和LKb如式(I)中所定义。

[0347] 在一个实施例中,缀合物具有1至20的整数或非整数药物与抗体比(DAR)。

[0348] 如上文所定义,在一个实施例中,式(I)化合物的G_n部分是连接酶受体底物的识别序列,它有助于式(I)化合物与靶向分子在连接酶催化下发生的酶催化偶联。靶向分子任选地被修饰并且包含连接酶受体或供体底物的相应识别序列。

[0349] 应理解,当抗体(或抗原结合片段)与式(I)化合物的G_n部分在连接酶的催化下缀

合时,连接酶受体底物的识别序列与连接酶供体底物的识别序列彼此反应并形成所得到的序列。

[0350] 在一个实施例中,抗体(或抗原结合片段)包含LPXTGJ(SEQ ID NO:49)作为连接酶供体底物的识别序列,其中J如上文所定义。当与作为连接酶受体底物的相应识别序列的G_n缀合时,在LPXTGJ(SEQ ID NO:49)序列中甘氨酸上游的肽键被分选酶A切割,并将由此得到的中间物连接至G_n的游离N末端以产生新肽键。所得到的序列是LPXTG_n(SEQ ID NO:57)。序列G_n和LPXTGJ(SEQ ID NO:49)如上文所定义。

[0351] 在一个实施例中,P连接至式(I)化合物的B部分或L^1部分,并且A连接至式(I)化合物的G_n部分形成式(III)化合物。

[0352] 如上文所定义,R^{10}不会出现在式(III)化合物的B－P结构中。如上文所定义,当式(I)化合物中的B是端基R^{10}时,B不存在于式(III)化合物的B－P结构中。

[0353] 如上文所定义,在式(III)化合物的A－G_n结构中,A任选地包含由连接酶受体底物的识别序列与连接酶供体底物的识别序列反应产生的相应序列。

[0354] 在一个实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P;其中P是负载物,所述负载物连接至式(I)化合物的B部分或L^1部分;每个B独立地是端基R^{10},或以下1)、2)和3)的组合:1)自切除间隔子Sp1;2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-;以及3)端基R^{10};R^{10}是氢,或是当与负载物中的基团反应时可离去的基团;R^{10}表示不会出现在B与负载物反应产生的产物分子中的结构部分。

[0355] 在一个实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P;其中每个B独立地不存在,或是以下1)和2)的组合:1)自切除型间隔子Sp1;和2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-。在一个优选实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P;其中每个B独立地不存在,或是-NH-CH_2-U-或是-NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-。在另一个实施例中,M是氢或LKa-L^2－L^1－B－P。在一个实施例中,在LKa-L^2－L^1－B－P中,B不存在。在一个实施例中,在LKa-L^2－L^1－B－P中,B是以下1)和2)的组合:1)自切除间隔子Sp1;和2)化学键,或选自以下的二价基团中的一者或者两者或更多者的组合:-CR^1R^2-、C_{1-10}亚烷基、C_{4-10}亚环烷基、C_{4-10}亚杂环基和-(CO)-。在一个实施例中,在LKa-L^2－L^1－B－P中,B是-NH-CH_2-U-或是-NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-,U不存在,或是O、S或NH,优选是O或S。在一个实施例中,式(I)化合物中的B通过酰胺键或酯键或醚键连接至负载物。在一个实施例中,M是LKa-L^2－L^1－B－P,并且B不存在;且M还可以表示为LKa-L^2－L^1－P。

[0356] 靶向分子

[0357] 在一个实施例中,靶向分子是抗Trop2抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中

[0358] 所述V_H包含:

[0359] (i)包含氨基酸序列$X_1X_2GMX_3$(SEQ ID NO:1)的HCDR1,其中X_1是N、T或A,X_2是Y或A,X_3是N或Q;

[0360] (ii)包含氨基酸序列WINT$X_4X_5GX_6PX_7YX_8X_9$DFKG(SEQ ID NO:2)的HCDR2,其中X_4是Y、H或D,X_5是T或S,X_6是E或V,X_7是T或K,X_8是T或A,X_9是D或E;

[0361] (iii)包含氨基酸序列X_{10}GFGSSYWYFDV(SEQ ID NO:3)的HCDR3,其中X_{10}是G或S;

[0362] 和/或

[0363] 所述V_L包含:

[0364] (i)包含氨基酸序列KASQDVSIAVA(SEQ ID NO:13)或KASQDVSTAVA(SEQ ID NO:14)的LCDR1;

[0365] (ii)包含氨基酸序列SASYRYT(SEQ ID NO:15)的LCDR2;和

[0366] (iii)包含氨基酸序列QQHYITPLT(SEQ ID NO:16)的LCDR3。

[0367] 在一个实施例中,HCDR1包含氨基酸序列NYGMN、TAGMQ、AAGMN或NAGMN。

[0368] 在一个实施例中,HCDR2包含氨基酸WINTYTGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO:8)、WINTHSGVPKYAEDFKG(SEQ ID NO:9)、WINTDSGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO:10)。

[0369] 在一个实施例中,HCDR3包含氨基酸GGFGSSYWYFDV(SEQ ID NO:11)或SGFGSSYWYFDV(SEQ ID NO:12)。

[0370] 在一个实施例中,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),其中

[0371] 所述V_H包含:

[0372] (i)包含氨基酸序列X_1AGMN(SEQ ID NO:56)的HCDR1,其中X_1是N或A;

[0373] (ii)包含氨基酸序列WINTDSGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO:10)的HCDR2;

[0374] (iii)包含氨基酸序列GGFGSSYWYFDV(SEQ ID NO:11)的HCDR3;

[0375] 和/或

[0376] 所述V_L包含:

[0377] (i)包含氨基酸序列KASQDVSIAVA(SEQ ID NO:13)或KASQDVSTAVA(SEQ ID NO:14)的LCDR1;

[0378] (ii)包含氨基酸序列SASYRYT(SEQ ID NO:15)的LCDR2;

[0379] (iii)包含氨基酸序列QQHYITPLT(SEQ ID NO:16)的LCDR3。

[0380] 在一个实施例中,所述V_H包含:

[0381] (i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1,

[0382] (ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2,和

[0383] (iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR3;

[0384] 和/或

[0385] 所述V_L包含:

[0386] (i)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LCDR1,

[0387] (ii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的LCDR2,和

[0388] (iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR3。

[0389] 在一些实施例中,所述V_H包含:

[0390] (i)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HCDR1,

[0391] (ii)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HCDR2,和

[0392] (iii)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HCDR3;

[0393] 和/或

[0394] 所述V_L包含:

[0395] (i)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的LCDR1,

[0396] (ii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的LCDR2,和

[0397] (iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR3。

[0398] 在一些实施例中,所述V_H包含:

[0399] (i)包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HCDR1,

[0400] (ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR2,和

[0401] (iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR3;

[0402] 和/或

[0403] 所述V_L包含:

[0404] (i)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LCDR1,

[0405] (ii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的LCDR2,和

[0406] (iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR3。

[0407] 在一些实施例中,所述V_H包含:

[0408] (i)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HCDR1,

[0409] (ii)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HCDR2,和

[0410] (iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR3;

[0411] 和/或

[0412] 所述V_L包含:

[0413] (i)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LCDR1,

[0414] (ii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的LCDR2,和

[0415] (iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR3。

[0416] 在一些实施例中,所述V_H包含:

[0417] (i)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HCDR1,

[0418] (ii)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HCDR2,和

[0419] (iii)包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HCDR3;

[0420] 和/或

[0421] 所述V_L包含:

[0422] (i)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的LCDR1,

[0423] (ii)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的LCDR2,和

[0424] (iii)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的LCDR3。

[0425] 在一些实施例中,所述V_H包含以下结构:FR1-HCDR1-FR2-HCDR2-FR3-HCDR3-FR4,所述FR1包含SEQ ID NO:17的氨基酸,所述FR2包含SEQ ID NO:18的氨基酸,所述FR3包含SEQ ID NO:19的氨基酸,所述FR4包含SEQ ID NO:20的氨基酸。

[0426] 在一些实施例中,所述V_H包含与SEQ ID NO:21-25的氨基酸序列具有至少约90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

[0427] 在一些实施例中,所述V_L包含与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列具有

至少约90％序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_L包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_L包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。

[0428] 在一些实施例中,所述V_H包含与SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24的氨基酸序列具有至少约90％序列同一性的氨基酸序列;和/或所述V_L包含与SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:27的氨基酸序列具有至少约90％序列同一性的氨基酸序列。

[0429] 在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,所述V_L包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,所述V_L包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,所述V_L包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列,所述V_L包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在一些实施例中,所述V_H包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列,所述V_L包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0430] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链恒定结构域(CH),所述CH包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少约90％序列同一性的氨基酸序列;和/或

[0431] 轻链恒定结构域,所述轻链恒定结构域包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少约90％序列同一性的氨基酸序列。

[0432] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链恒定结构域(CH),所述CH包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列,和

[0433] 轻链恒定结构域,所述轻链恒定结构域包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。

[0434] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段以约0.5nM至约20nM的平衡解离常数(K_D)结合至TROP2。在一个实施例中,K_D值是约0.5nM、约1nM、约2nM、约3nM、约4nM、约5nM、约6nM、约7nM、约8nM、约9nM、约10nM、约11nM、约12nM、约13nM、约15nM、约18nM、约20nM或在任何两个值之间的范围(包括端点值在内)。在一个实施例中,K_D值是约7.5nM至约13.5nM。

[0435] 在一个实施例中,靶向分子是抗人TROP2抗体或其抗原结合片段。

[0436] 在一个实施例中,所述抗体是选自单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、抗体片段和抗体模拟物的重组抗体。在一个实施例中,抗体模拟物选自scFv、微型抗体、双功能抗体、纳米抗体。

[0437] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链,其包含与SEQ ID NO:30-33的氨基酸序列具有至少约90％序列同一性的氨基酸序列;和/或

[0438] 轻链,其包含与SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的氨基酸序列具有至少约90％序列同一性的氨基酸序列。

[0439] 至少约90％是约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％、约100％或在任何两个值之间的范围(包括端点值在内)。

[0440] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链,其包含SEQ ID NO:30-33的氨基酸序列;和/或;

[0441] 轻链,其包含SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0442] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链,其包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列;和轻链,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0443] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;和轻链,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0444] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链,其包含SEQ ID NO:32氨基酸序列;和轻链,其包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0445] 在一个实施例中,所述抗体或抗原结合片段包含:重链,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列;和轻链,其包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0446] 抗人TROP2抗体的实例包括但不限于Trodelvy的抗体(hRS7)和DS1062的抗体(达博妥单抗(Datopotamab))。抗体序列示于表1中。

[0447] 在一个实施例中,所述药物组合物包含抗体或抗原结合片段。

[0448] 表1抗体序列

[0449]

名称	氨基酸	SEQ ID NO	名称	氨基酸	SEQ ID NO
HCDR1	NYGMN	4	LCDR1	KASQDVSIAVA	13
	TAGMQ	5			
	AAGMN	6		KASQDVSTAVA	14
	NAGMN	7			
HCDR2	WINTYTGEPTYTDDFKG	8	LCDR2	SASYRYT	15
	WINTHSGVPKYAEDFKG	9			
	WINTDSGEPTYTDDFKG	10			
HCDR3	GGFGSSYWYFDV	11	LCDR3	QQHYITPLT	16
	SGFGSSYWYFDV	12			
名称	氨基酸				SEQ ID NO
VH-FR1	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT				17
VH-FR2	WVKQAPGQGLKWMG				18
VH-FR3	RFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCAR				19

[0450]

VH-FR4	WGQGSLVTVSS	20
V_H	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS	21
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAP GQGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQL SSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSS	22
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNAGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS	23
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTAAGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS	24
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSS	25
V_L	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC QQHYITPLTFGAGTKVEIKRTV	26
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC QQHYITPLTFGQGTKLEIKRTV	27
C_H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	28
C_L	AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	29
HC	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNAGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS	31

[0451]

	SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTAAGMNWVKQAP GQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQIS SLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	32
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAP GQGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQL SSLKSEDTAVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	33
LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC QQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	34
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC QQHYITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	35

[0452] 与连接子-负载物缀合的抗体

[0453] 为了与式(I)化合物缀合,本文的抗体可包含经过修饰的部分以与式(I)化合物中的Gn连接。这种经过修饰的部分的引入位置不受限制,例如,其引入位置可以是但不限于位于抗体重链或轻链的C末端或N末端。

[0454] 在一个实施例中,通过抗人TROP2抗体与负载物缀合形成的本文的缀合物可特异性结合至肿瘤细胞表面上的TROP2并选择性杀灭表达TROP2的肿瘤细胞。在另一个优选实施例中,提供了本文的缀合物或本文的药物组合物在制造用于治疗选自TROP2阳性肿瘤的疾病、病症或疾患的药剂中的用途。在一个更优选的实施例中,所述疾病、病症或疾患选自乳

腺癌、尿道上皮癌、肺癌、肝癌、子宫内膜癌、头颈癌、卵巢癌等。

[0455] 在一个替代性实施例中,与式(I)化合物中Gn缀合的修饰的部分可以使用例如化学修饰方法引入抗体重链或轻链的非末端位置。

[0456] 在一个实施例中,本文的靶向分子是抗体或其抗原结合片段,其可包含末端修饰。末端修饰是指在抗体重链或轻链C末端或N末端处的修饰,所述修饰例如包含连接酶识别序列。在另一个实施例中,末端修饰还可包括含2-100个氨基酸的间隔子Sp2,其中抗体、Sp2和连接酶识别序列是依序连接的。在一个优选实施例中,Sp2是含有2-20个氨基酸的间隔子序列。在一个特定实施例中,Sp2是选自以下的间隔子序列:GA、GGGGS(SEQ ID NO:42)、GGGGSGGGGS(SEQ ID NO:43)和GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:44),尤其是GA。

[0457] 在一个优选实施例中,抗体或其抗原结合片段的轻链包括3种类型:野生型(LC);C末端修饰的轻链(LCCT),它是通过直接引入连接酶识别序列LPXTG(SEQ ID NO:48)修饰的;以及C末端修饰的轻链($LCCT_L$),它是通过引入短肽间隔子加连接酶供体底物识别序列LPXTG(SEQ ID NO:48)修饰的。抗体或其抗原结合片段的重链包括3种类型:野生型(HC);C末端修饰的重链(HCCT),它是通过直接引入连接酶识别序列LPXTG(SEQ ID NO:48)修饰的;以及C末端修饰的重链($HCCT_L$),它是通过引入短肽间隔子加连接酶供体底物识别序列LPXTG(SEQ ID NO:48)修饰的。X可以是任何天然或非天然单一氨基酸。在一个实施例中,X是甘氨酸。经过修饰的抗体的序列示于表2中。

[0458] 本文的缀合物还可包含负载物。负载物如上文所描述。

[0459] 在一个实施例中,所述药物组合物包含抗体-药物缀合物(ADC)。

[0460] 表2经过修饰的抗体的序列

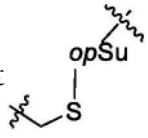
[0461]

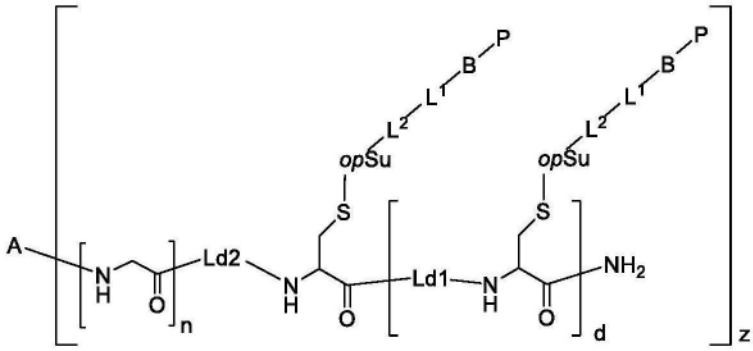
名称	氨基酸	SEQ ID NO
HC	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPG QGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLK ADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGALPETGG	36
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNAGMNWVKQAPG QGLKWMGWINTDSGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLK ADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFP	37

[0462]

	LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGALPETGG	
	QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTAAGMNWVKQAPGQ GLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKA DDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGALPETGG	38
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTAGMQWVRQAPG QGLEWMGWINTHSGVPKYAEDFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLK SEDTAVYYCARSGFGSSYWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGALPETGG	39
LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYI TPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGALPETGG	40
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQH YITPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGALPETGG	41

[0463] 缀合物的具体实施例

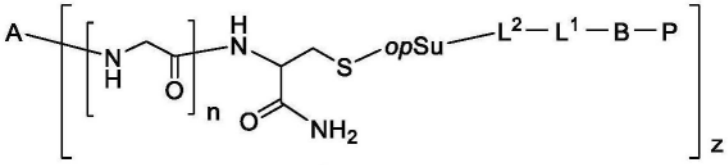
[0464] 在一个实施例中,Q是氢,每个LKa是  在一个实施例中,式(III)具有式(III-a)的结构:

[0465] 

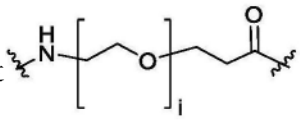
式(III-a),

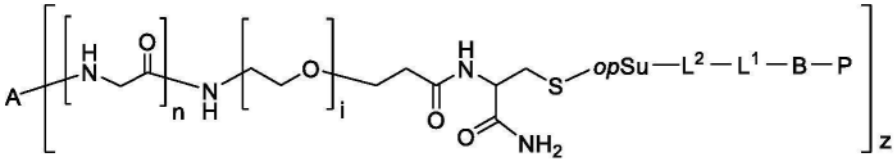
[0466] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,并且所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0467] 在一个实施例中,Ld2是化学键,d是0。在一个实施例中,式(III-a)化合物如下:

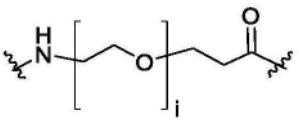
[0468] 

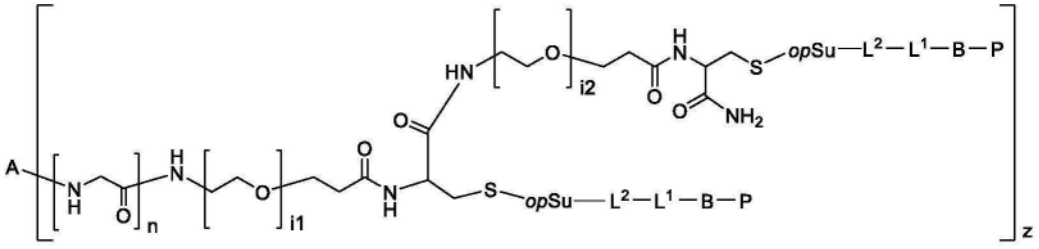
(缀合物 III-a-0-1)

[0469] 在一个实施例中,d是0,Ld2是  在一个实施例中,式(III-a)化合物如下:

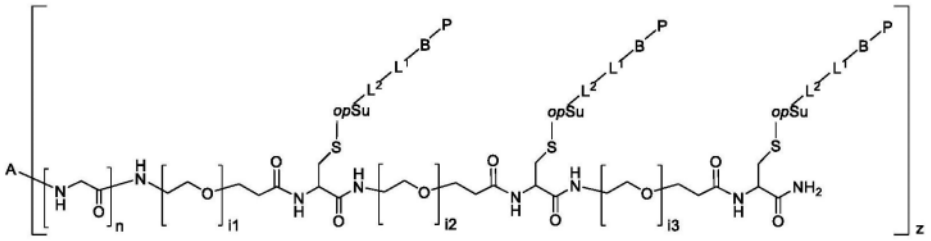
[0470] 

(缀合物 III-a-0-2)

[0471] 在一个实施例中,d是1、2或3,Ld2和每个Ld1独立地选自  在一个实施例中,式(III-a)化合物如下:

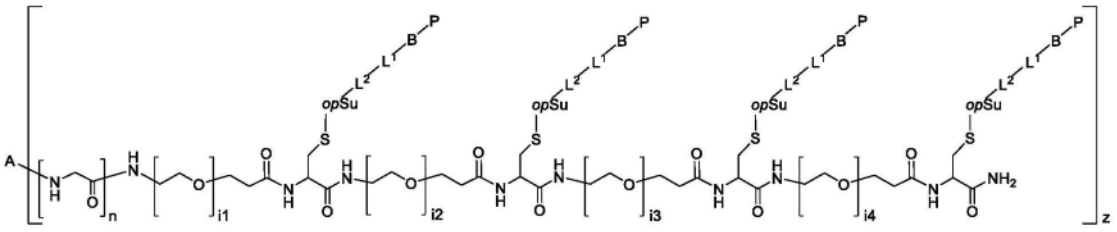
[0472] 

(缀合物 III-a-0-3)

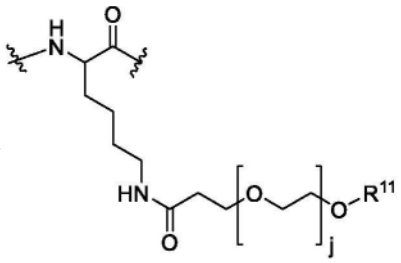


(缀合物 III-a-0-4)

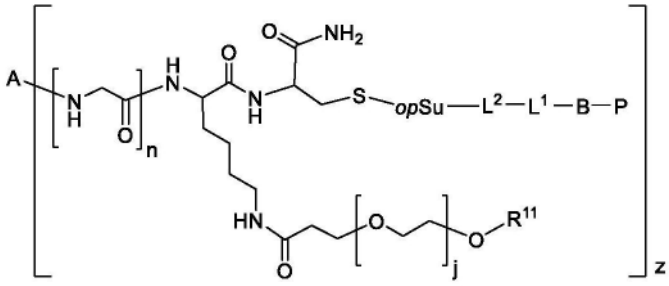
[0473]



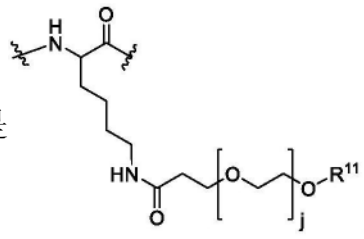
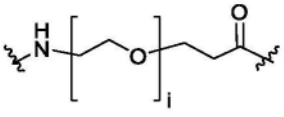
(缀合物 III-a-0-5)。

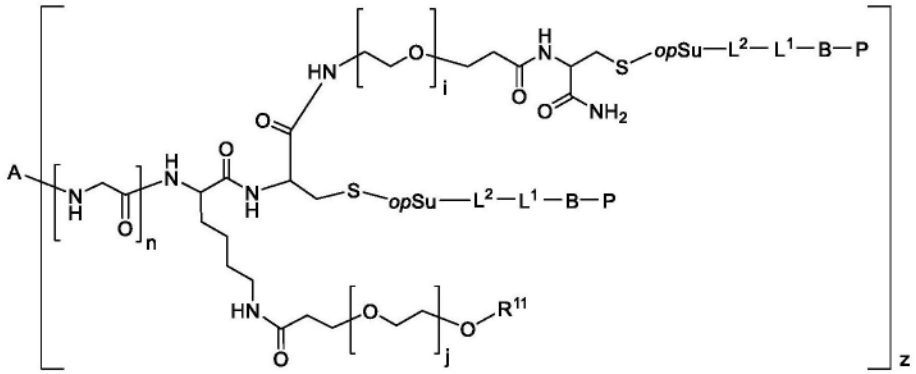
[0474] 在一个实施例中,Ld2是  d是0。在一个实施例中,式(III-a)化合物如下:

[0475]



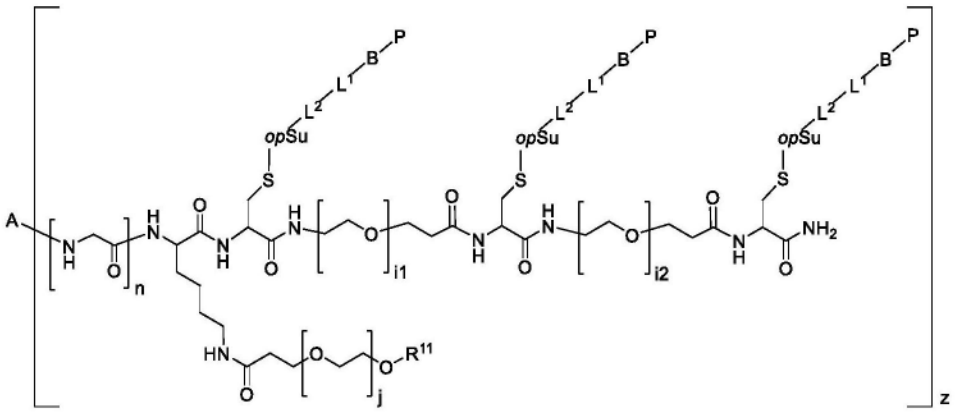
(缀合物 III-a-1-1)。

[0476] 在一个实施例中,d是1、2或3,Ld2是  并且每个Ld1独立地选自  。在一个实施例中,式(III-a)化合物如下:

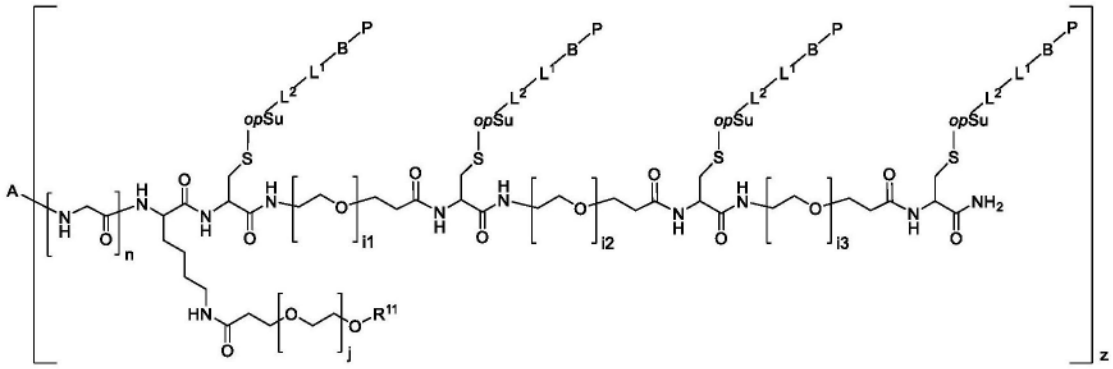


(缀合物 III-a-1-2)

[0477]

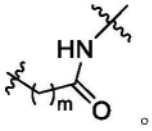


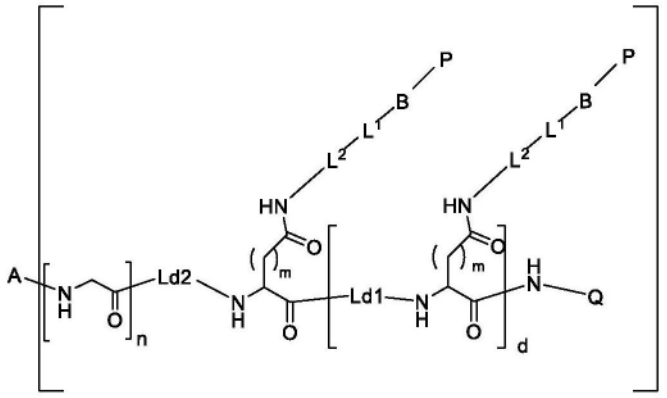
(缀合物 III-a-1-3)



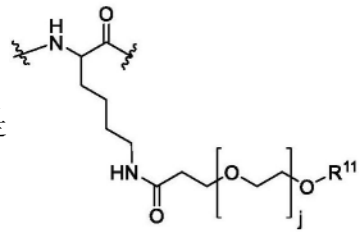
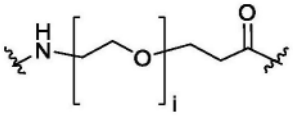
(缀合物 III-a-1-4)。

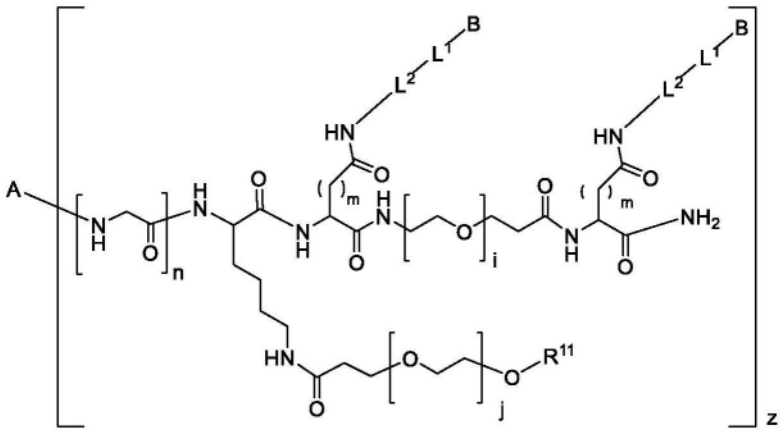
[0478] 在一个实施例中,z是1至4。在一个实施例中,z是2或4。在一个实施例中,z是2。在一个实施例中,在缀合物III-a-0-1、III-a-0-2、III-a-1-1中,z是2或4。在一个实施例中,在缀合物III-a-0-3、III-a-0-4、III-a-0-5、III-a-1-3和III-a-1-4中,z是2。在一个实施例中,在缀合物III-a-1-2中,z是4。

[0479] 在一个实施例中,LKa是  在一个实施例中,式(III)具有式(III-b)的结构:

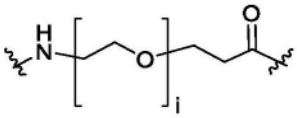
[0480]  式(III-b),

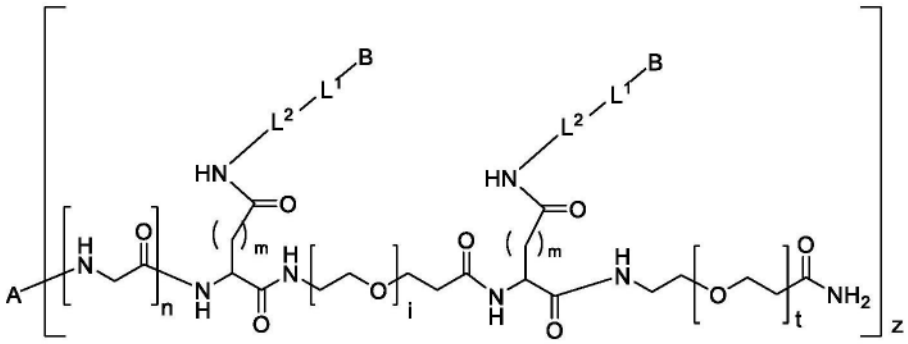
[0481] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0482] 在一个实施例中,Q是氢,d是1,Ld2是  并且Ld1选自  。在一个实施例中,式(III-b)化合物如下:

[0483] 

(缀合物 III-b-1)。

[0484] 在一个实施例中,Q是$-C_2H_4-(PEG)_t-(CO)NH_2$,d是1,Ld2是化学键,并且Ld1选自  。在一个实施例中,式(III-b)化合物如下:

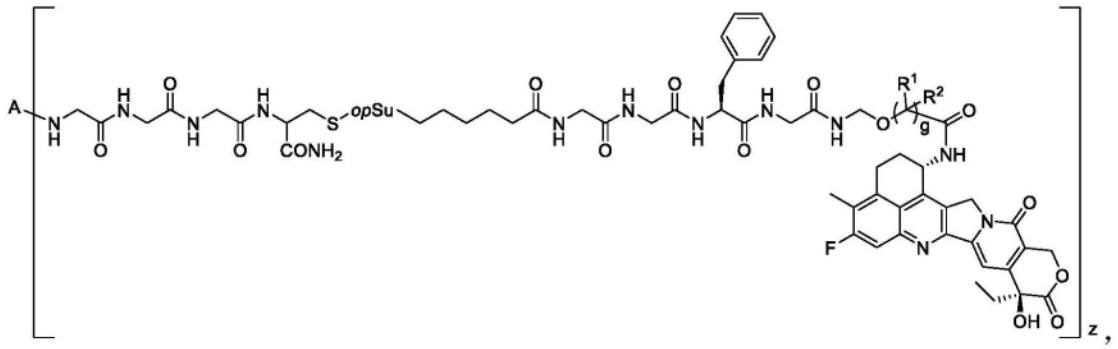
[0485] 

(缀合物 III-b-0)。

[0486] 在一个实施例中,z是1至4。在一个实施例中,z是2或4。在一个实施例中,z是2。在一个实施例中,在缀合物III-b-1-1和III-b-0-1中,z是2或4。在一个实施例中,在缀合物III-b-1-1和III-b-0-1中,z是4。

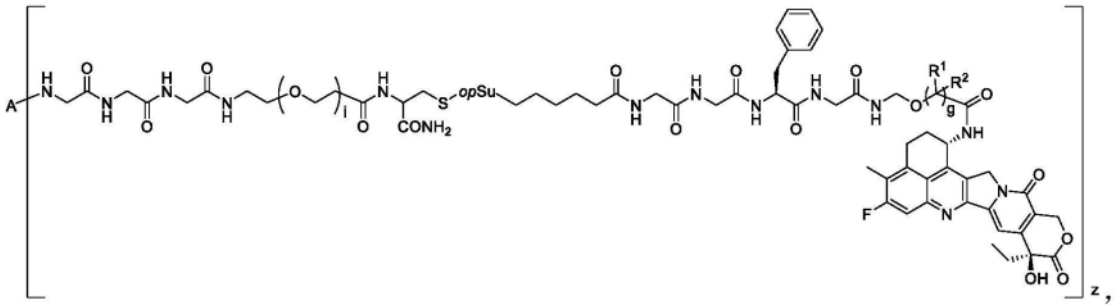
[0487] 在一个实施例中,式(I)化合物中的B是端基R^{10},并且L^1中的可切割序列1连接至负载物以形成式(II)化合物,其中B不存在于可切割序列1与负载物连接得到的分子中。在这种情况下,M可理解为LKa-L2－L1－B－P,其中B不存在。在这种情况下,M也可表示为LKa-L^2－L^1－P。在一个实施例中,n是3,L^2是-$(CH_2)_p$-$(CH_2)_2$(CO)-,p是3,L^1是GGFG,B是-NH-CH_2-U-或不存在,或是-NH-CH_2-U-$(CR^1R^2)_g$-(CO)-,U是O,g是1。

[0488] 在一个实施例中,缀合物III-a-0-1具有以下结构:

[0489] 

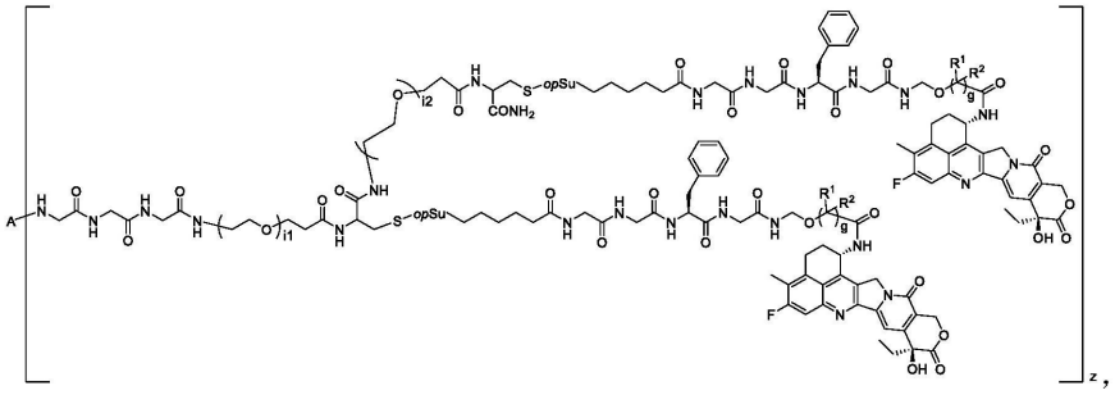
[0490] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0491] 在一个实施例中,缀合物III-a-0-2具有以下结构:

[0492] 

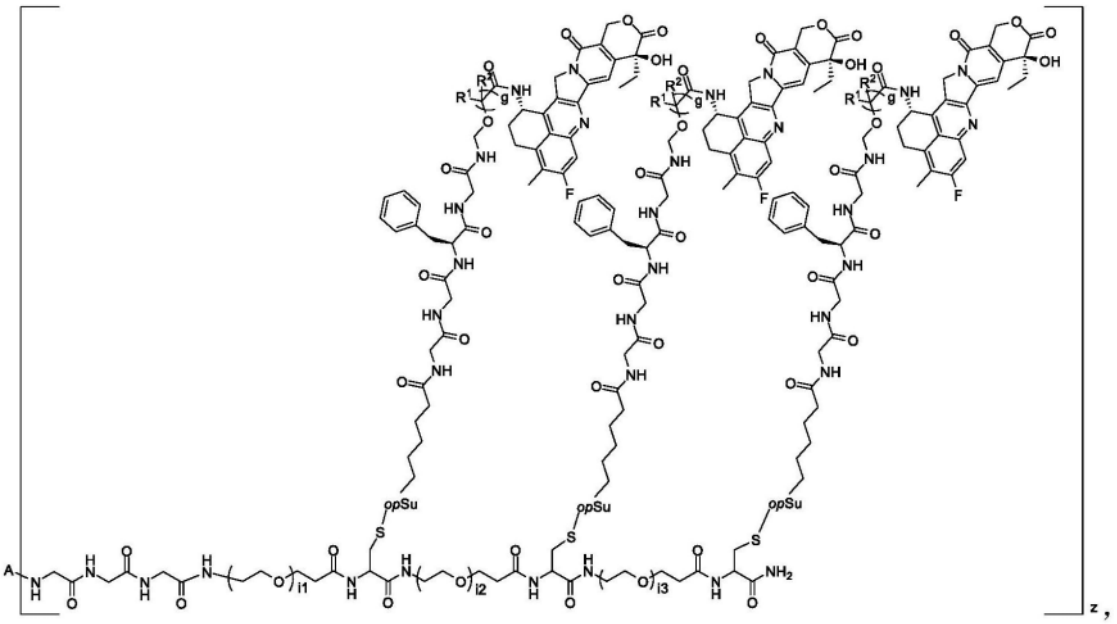
[0493] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0494] 在一个实施例中,缀合物III-a-0-3具有以下结构:

[0495] 

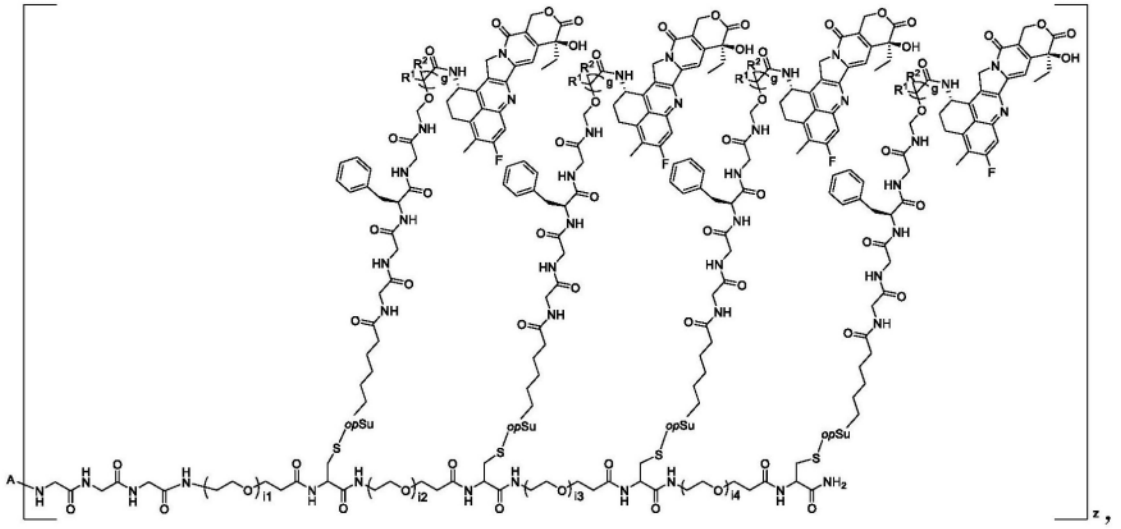
[0496] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0497] 在一个实施例中,缀合物III-a-0-4具有以下结构:

[0498] 

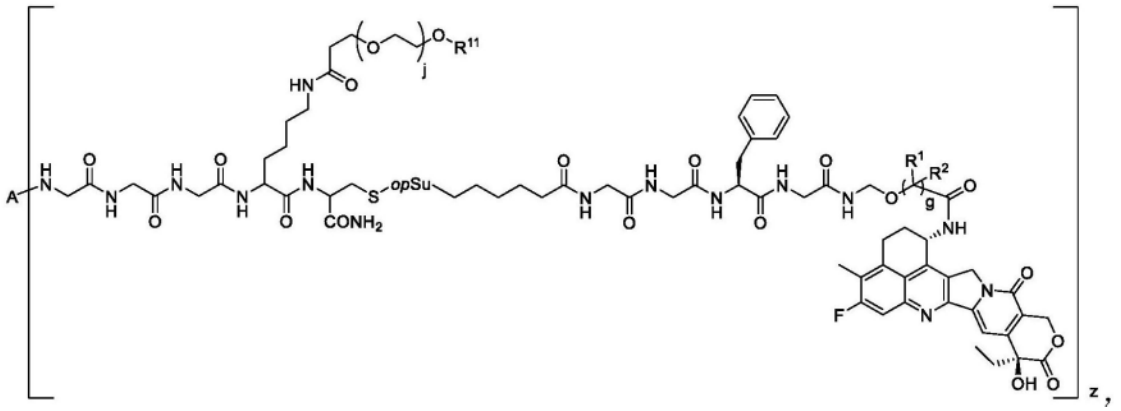
[0499] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0500] 在一个实施例中,缀合物III-a-0-5具有以下结构:

[0501] 

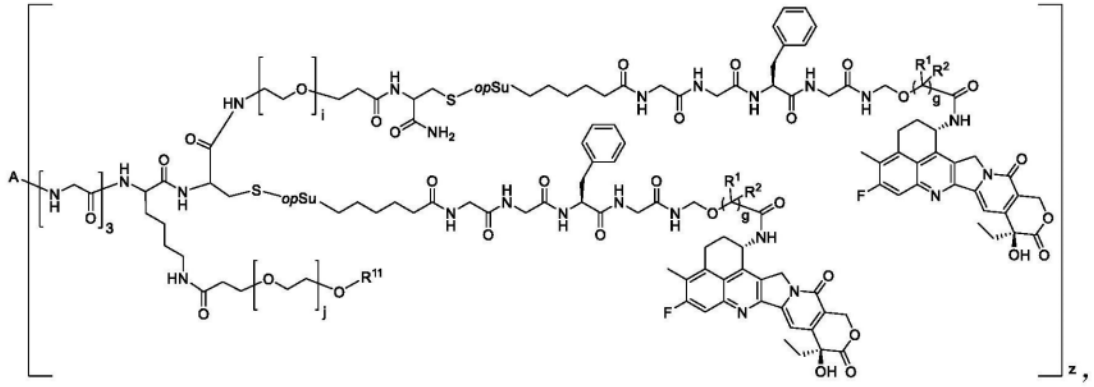
[0502] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

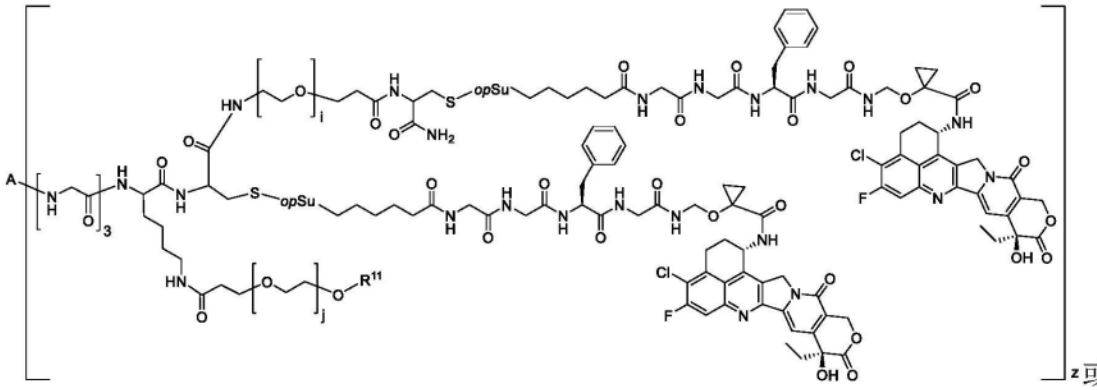
[0503] 在一个实施例中,缀合物III-a-1-1具有以下结构:

[0504] 

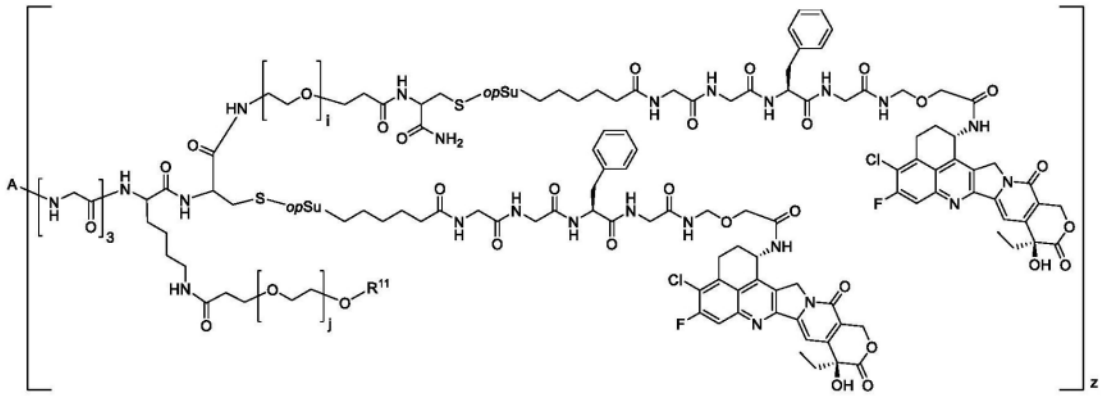
[0505] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0506] 在一个实施例中,缀合物III-a-1-2具有以下结构:

[0507] 

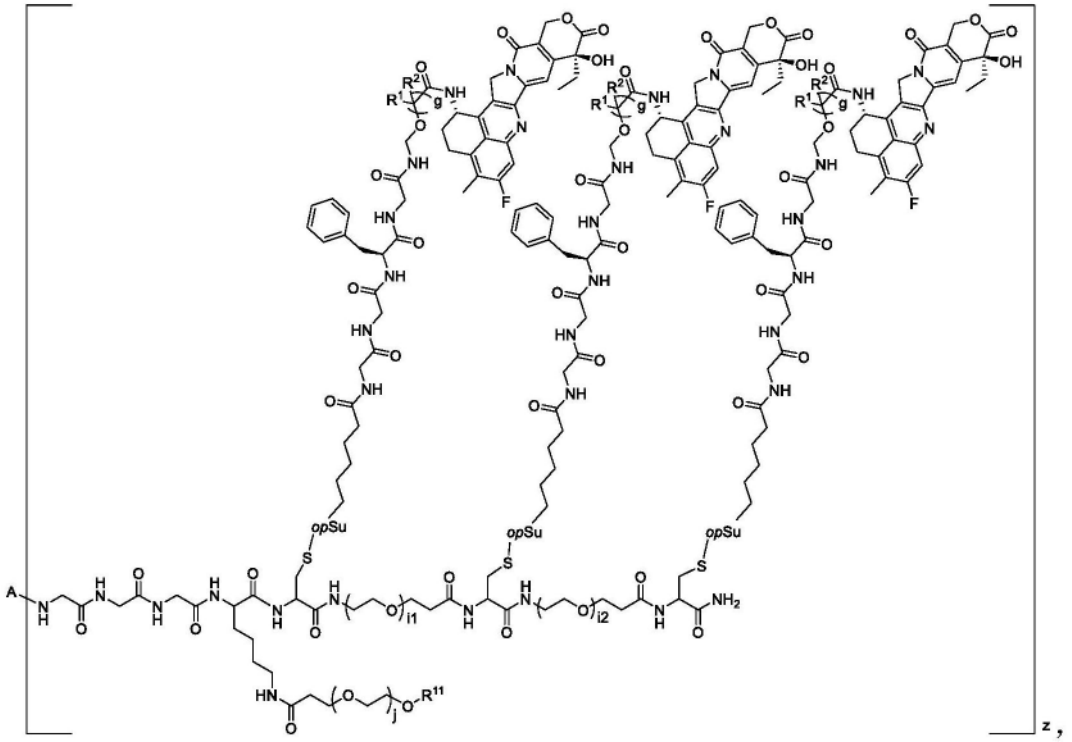


或

[0508] 

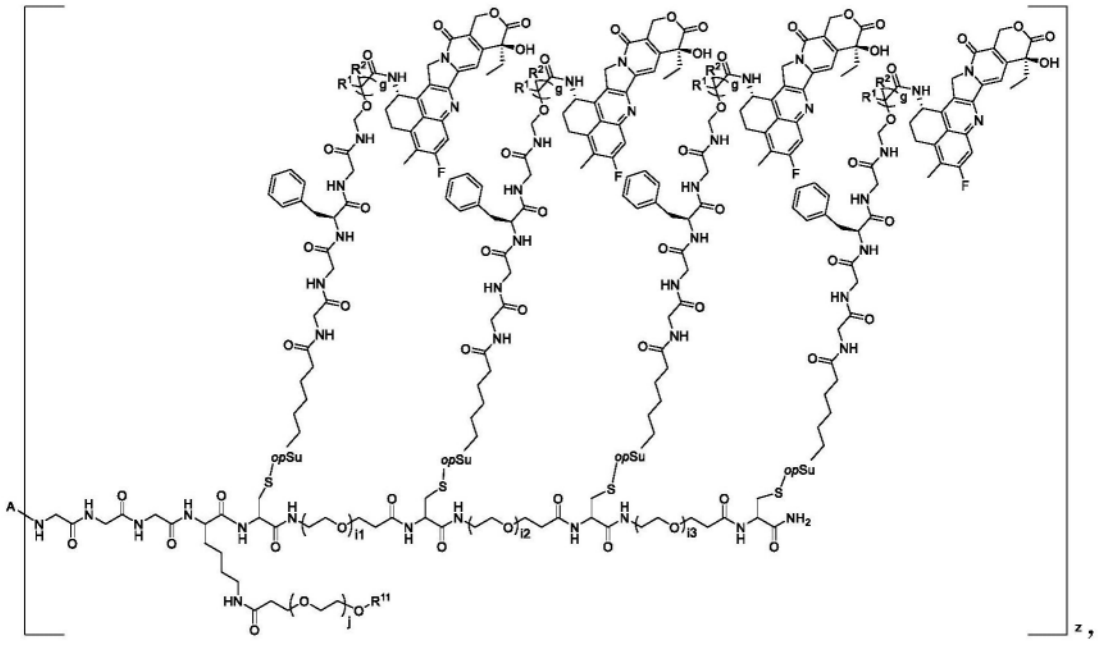
[0509] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0510] 在一个实施例中,缀合物III-a-1-3具有以下结构:

[0511] 

[0512] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

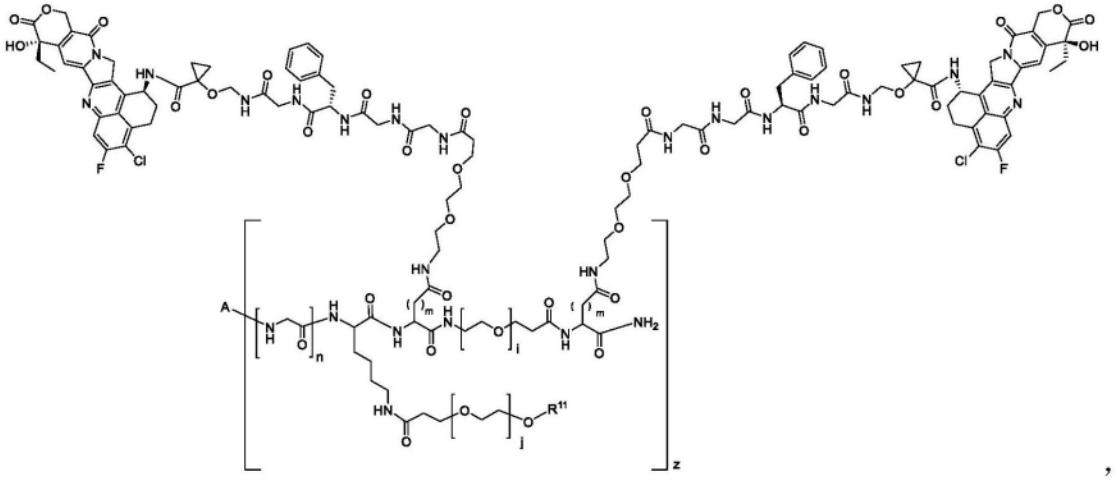
[0513] 在一个实施例中,缀合物III-a-1-4具有以下结构:

[0514] 

[0515] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

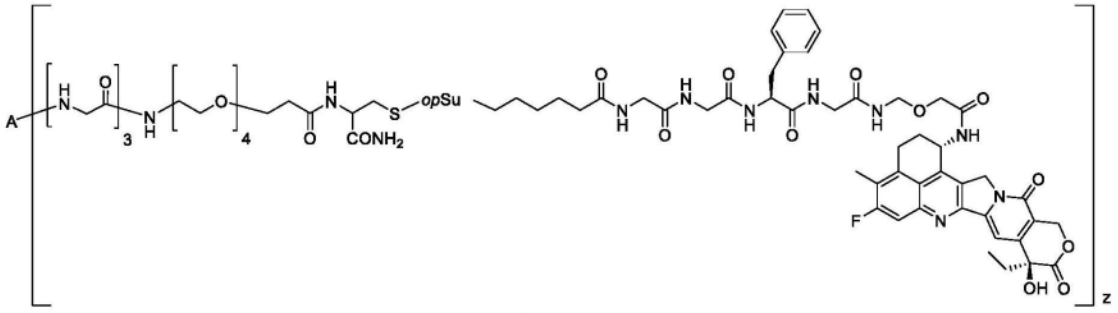
[0516] 在一个实施例中,i是4,g是1,R^{11}是甲基。

[0517] 在一个实施例中,n是3,L^2是-$(C_2H_4-O)_p$-$(CH_2)_2(CO)$-,p是2,L^1是GGFG,B是-NH-CH_2-U-,U是O。在一个实施例中,缀合物III-b-1-1具有以下结构:

[0518] 

[0519] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

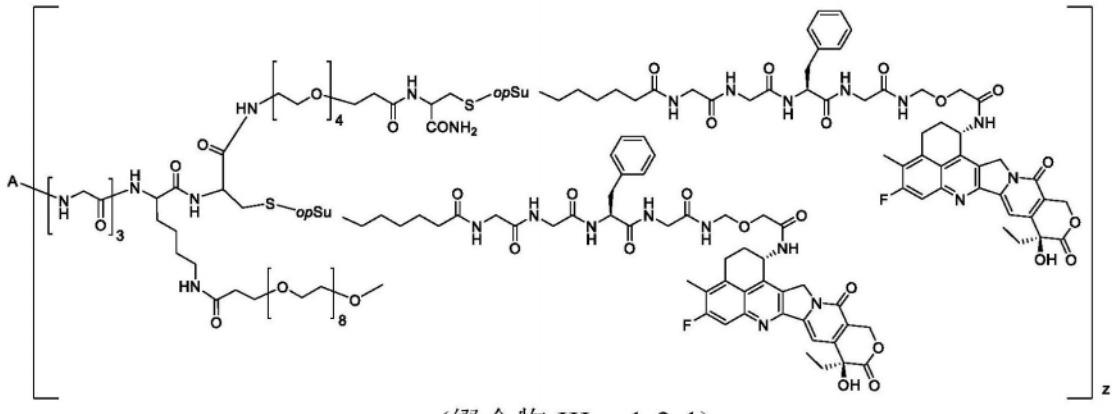
[0520] 在一个实施例中,缀合物III-a-0-2如下(缀合物III-a-0-2-1):

[0521] 

(缀合物 III-a-0-2-1),

[0522] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与(Gly)n连接。

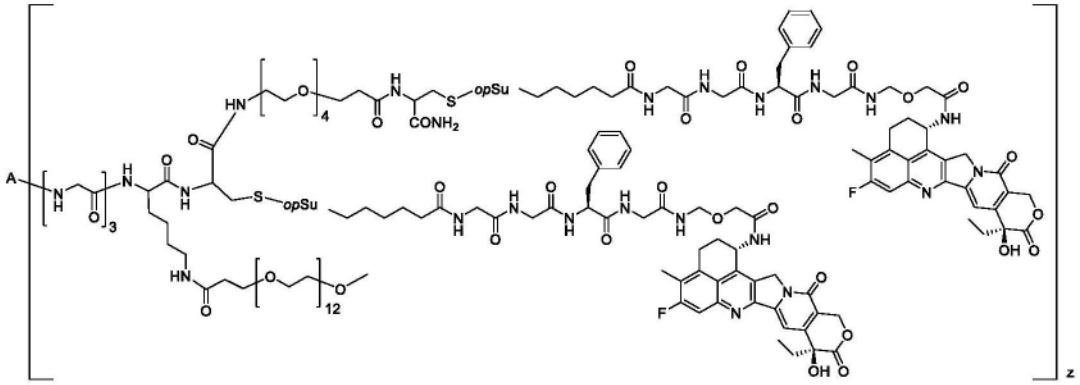
[0523] 在一个实施例中,i是4,j是8,g是1,R^{11}是甲基。在一个实施例中,缀合物III-a-1-2如下(缀合物III-a-1-2-1):

[0524] 

(缀合物 III-a-1-2-1),

[0525] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

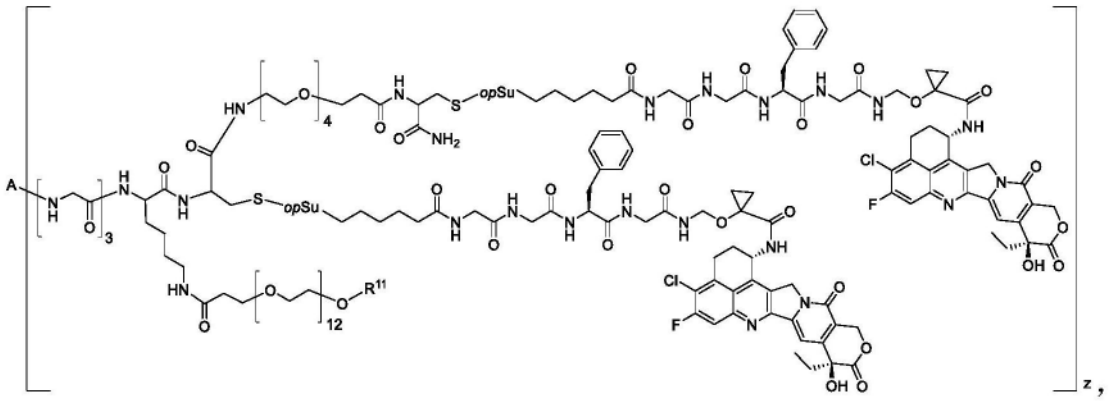
[0526] 在一个实施例中,i是4,j是12,g是1,R^{11}是甲基。在一个实施例中,缀合物III-a-1-2如下(缀合物III-a-1-2-4-1):

[0527] 

(缀合物 III-a-1-2-4-1),

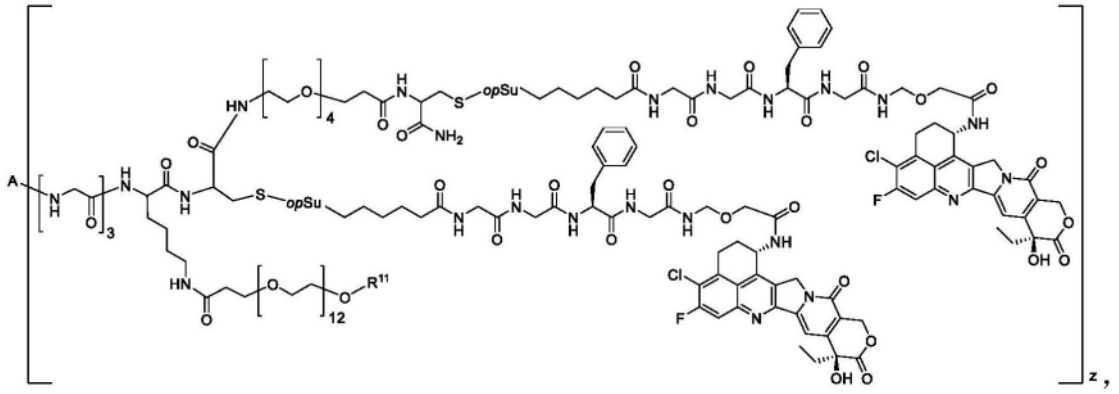
[0528] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0529] 在一个实施例中,i是4,j是12,R^{11}是甲基。在一个实施例中,缀合物III-a-1-2如下(缀合物III-a-1-2-4-2):

[0530] 

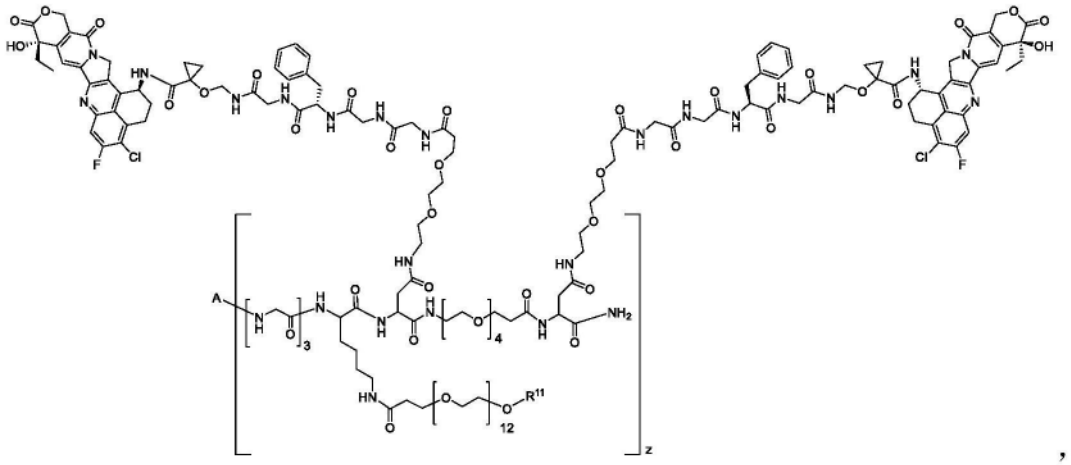
[0531] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0532] 在一个实施例中,i是4,j是12,R^{11}是甲基。在一个实施例中,缀合物III-a-1-2如下(缀合物III-a-1-2-4-3):

[0533] 

[0534] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0535] 在一个实施例中,n是3,i是4,j是12,m是1,R^{11}是甲基。在一个实施例中,缀合物III-b-1-1如下(缀合物III-b-1-1-4):

[0536] 

[0537] 其中A是抗TROP2抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段被修饰以与$(Gly)_n$连接。

[0538] 缀合物的制备

[0539] 本文的缀合物可以由本领域中已知的任何方法制备。在一些实施例中,缀合物是通过连接酶催化的靶向分子与带负载物的式(I)化合物的位点特异性缀合来制备,其中靶向分子被连接酶识别序列修饰。所述方法包括步骤A和步骤B。

[0540] 步骤A.连接单元-负载物中间物的制备

[0541] 在一个优选实施例中,式(I)化合物中的B通过反应性基团与含有另一反应性基团的负载物共价连接。

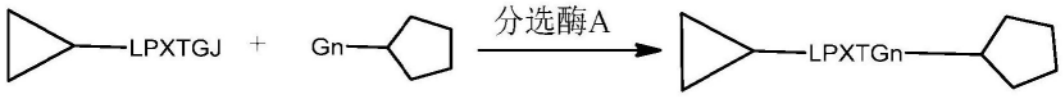
[0542] 使用本文的式(I)化合物制备的连接单元-负载物中间物具有确定的结构、确定的组成和高纯度,由此使得当与抗体进行缀合反应时,引入较少的杂质或不引入其它杂质。当使用此类中间物与含连接酶识别序列的修饰的抗体进行连接酶催化的位点特异性缀合时,可获得具有高度可控的质量的均质ADC。

[0543] 步骤B.将靶向分子连接至带有负载物的式(I)化合物

[0544] 本文的靶向分子可通过本领域中已知的任何方法与带负载物的式(I)化合物(即,式(II)化合物)缀合。

[0545] 靶向分子与带负载物的式(I)化合物通过连接酶特异性的底物识别序列彼此连接。识别序列取决于所采用特定连接酶。在一个实施例中,靶向分子是在轻链和/或重链的C末端处引入基于识别序列的末端修饰的抗体;在野生型或优化的工程改造的连接酶或其任何组合催化下以及适合催化反应条件下,靶向分子与式(II)化合物进行缀合。

[0546] 在一个具体实施例中,连接酶是分选酶A并且缀合反应可由以下方案表示:

[0547] 

[0548] 三角形表示抗体的一部分;并且五边形表示式(II)化合物的一部分。n、X和J分别如上文所定义。当与作为受体底物的相应识别序列的G_n缀合时,在LPXTGJ(SEQ ID NO:49)序列中甘氨酸上游的肽键被分选酶A切割,并将由此得到的中间物连接至G_n的游离N末端以产生新肽键。所得到的氨基酸序列是$LPXTG_n$(SEQ ID NO:57)。序列G_n和LPXTGJ(SEQ ID NO:49)如上文所定义。

[0549] 缀合物在生理环境中的代谢

[0550] 当一部分或整个连接子在肿瘤细胞中被切割时,抗肿瘤化合物部分被释放而展现出抗肿瘤化合物的抗肿瘤作用。由于连接子是在与药物的连接位置被切割,故抗肿瘤化合物以其固有结构释放而展现出其固有抗肿瘤作用。

[0551] 在一个实施例中,可切割序列1(如GGFG)可被溶酶体酶(如组织蛋白酶B和/或组织蛋白酶L)切割。

[0552] 在一个实施例中,Sp1包含自切除间隔子。在一个实施例中,Sp1包含PABC、缩醛或杂缩醛。在一个实施例中,L^1是GGFG。在一个实施例中,连接子包含-GGFG-NH-CH_2-O-。在一个实施例中,-GGFG-NH-CH_2-O-表示限制酶位点与自切除间隔子的组合,它会在细胞中被切割并释放目标分子(如药物)。

[0553] 药物组合物和药物制剂

[0554] 本文的另一目的是提供一种药物组合物,所述药物组合物包含预防或治疗有效量的本文缀合物,以及至少一种药学上可接受的载体。

[0555] 本文的另一目的是提供一种药物组合物,所述药物组合物包含预防或治疗有效量的本文抗TROP2抗体,以及至少一种药学上可接受的载体。

[0556] 本文的药物组合物可通过任何方式施用,只要它实现预防、缓解、预防或治愈人或动物的症状即可。例如,可根据施用途径(尤其是注射),可以制备各种适合的剂型,如注射用冻干粉、注射液或注射用无菌粉末。

[0557] 术语“药学上可接受的”意思指当在正常医学判断的范围内与患者的组织接触时,不应产生过度毒性、刺激或过敏反应等,具有合理的优点-缺点比并对预定用途有效。

[0558] 术语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的且不会干扰缀合物的生物活性和特性的载体材料。水性载体的实例包括但不限于缓冲盐水等。药学上可接受的载体还包括使组合物接近生理条件的载体材料,如pH调节剂、缓冲剂、毒性调节剂等,以及乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。在一些实施例中,术语“载体”是指与治疗用活性成分一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒剂。此类药物载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油和芝麻油。当药物组合物经静脉内施用时,水是优选的载体。盐水以及葡萄糖于水或甘油中的溶液也可用作液体载体,特别是对于注射来说。适合的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。必要时,所述组合物还可包含少量润湿剂、乳化剂,或pH缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。

[0559] 在一个实施例中,本公开的药物组合物具有约1至约20,如约1至约10、约1至约8、约1至约6、约1至约4、约1至约3、约1至约2.5、约1至约2的整数或非整数的药物与抗体比(DAR)。在一个特定实施例中,本公开的缀合物的DAR是约2、约4、约6或约8。

[0560] 治疗方法和用途

[0561] 所述缀合物或抗体可用于治疗肿瘤和/或自身免疫疾病。对缀合物治疗敏感的肿瘤包括以特定肿瘤相关抗原或细胞表面受体表征的肿瘤,并且所述特定肿瘤相关抗原或细胞表面受体将被缀合物中的靶向分子识别,并且可以被缀合物中的负载物/细胞毒素杀灭。

[0562] 因此,在又另一方面,还提供了本文的缀合物或抗体或者本文的药物组合物在制

造用于治疗疾病、病症或疾患的药剂中的用途,所述疾病、病症或疾患选自肿瘤或自身免疫疾病。

[0563] 在另一方面,提供了用于治疗肿瘤或自身免疫疾病的本文的缀合物或本文的药物组合物。

[0564] 在另一方面,提供了用于治疗肿瘤或自身免疫疾病的本文的抗体或本文的药物组合物。

[0565] 在另一方面,提供一种治疗肿瘤或自身免疫疾病的方法,所述方法包括向有需要的个体施用有效量的本文的缀合物或抗体或者本文的药物组合物。

[0566] 在一个优选实施例中,通过抗人TROP2抗体与小分子细胞毒素缀合形成的本文的缀合物可以特异性结合至肿瘤细胞表面上的TROP2并选择性杀灭表达TROP2的肿瘤细胞。在另一个优选实施例中,提供了本文的缀合物(或抗体)或本文的药物组合物在制造用于治疗选自TROP2阳性肿瘤的疾病、病症或疾患的药剂中的用途。在一个更优选的实施例中,所述疾病、病症或疾患是TROP2阳性肿瘤。在一个实施例中,TROP2阳性肿瘤选自由以下组成的组:乳腺癌、胃癌、肺癌、卵巢癌、泌尿道上皮癌等。

[0567] 施用给受试者的缀合物(或抗体)的剂量可在相当大的范围内调整。剂量可根据特定施用途径和受试者的需要而变化,并且可由健康护理专业人员判断。

[0568] 有益效果

[0569] 本发明的抗体-药物缀合物使用专门设计的连接子-负载物,并且更稳定且可以在较低DAR下实现极大功效,并因此可减少副作用且增加治疗指数。

[0570] 本文利用了具有独特结构的连接单元并使用连接酶催化靶向分子与负载物的缀合。本文的缀合物具有良好均质性、高活性和高选择性。此外,连接单元-负载物中间物的毒性比游离负载物的毒性低得多,并因此,药物的制造过程无明显不利,这将有利于工业生产。

[0571] 本文的缀合物实现以下技术作用中的至少一者:

[0572] (1)针对靶标细胞的高抑制活性或对靶标细胞的强大杀灭作用。

[0573] (2)良好的物理化学特性(例如溶解度、物理和/或化学稳定性)。

[0574] (3)良好的药物动力学特性(例如在血浆中的良好稳定性、适当的半衰期和作用持续时间)。

[0575] (4)良好的安全性(对非靶标正常细胞或组织的低毒性,和/或较少的副作用、较宽的治疗范围)等。

[0576] (5)高度模块化设计、多种药物的简单组装。

[0577] 实施例

[0578] 制备实例

[0579] 为了更清楚地说明目的和技术解决方案,以下将参照具体实例进一步描述本文。应理解,这些实例并不打算限制本文的范围。以下实例中未提到的具体实验方法是根据常规实验方法进行。

[0580] 仪器、材料和试剂

[0581] 除非另外陈述,否则实例中使用的仪器和试剂是可商购的。试剂可不经进一步纯化即直接使用。

[0582] MS:Thermo Fisher Q Exactive Plus、Water2795-Quattro微型三重四极杆质谱仪

[0583] HPLC:Waters 2695、Agilent 1100、Agilent 1200

[0584] 半制备型HPLC:Lisure HP plus 50D

[0585] 流式细胞仪:CytoFLEX S

[0586] HIC-HPLC:Butyl-HIC;流动相A:25mM PB、2M$(NH_4)_2SO_4$,pH 7.0;流动相B:25mM PB,pH 7.0;流动速率:0.8ml/min;采集时间:25分钟;注射量:20μg;柱温:25℃;检测波长:280nm;样品室温度:8℃。

[0587] SEC-HPLC:柱:TSK-gel G3000 SWXL,TOSOH 7.8mm ID×300mm,5μm;流动相:0.2M KH_2PO_4、0.25M KCl,pH 6.2;流动速率:0.5ml/min;采集时间:30分钟;注射体积:50μl;柱温:25℃;检测波长;280nm;样品盘温度:8℃。

[0588] CHO是从Thermo Fisher Scientific获得;pcDNA 3.3是从Life Technology获得;HEK293F是从Prejin获得;PEIMAX转染试剂是从Polyscience获得;MabSelect Sure ProA是从GE获得;Capto S ImpAct是从GE获得;Rink-酰胺-MBHA-树脂和二氯树脂是从Nankai synthesis获得;HCC1954是从ATCC目录号CRL-2338获得;SK-BR-3是从ATCC获得(目录号HTB-30);BT-474是从ATCC获得(目录号HTB-20);NCI-N87细胞是从ATCC获得(目录号CRL-5822);MCF7是从ATCC获得(目录号HTB-22);MDA-MB-231是从ATCC获得(目录号HTB-26);MDA-MB-468是从ATCC获得(目录号HTB-132);CFPAC-1是从ATCC获得(目录号CRL-1918);NCI-H2110是从ATCC获得(目录号CRL-5924);JIMT-1是从Wuxi Apptech获得;Capan-1是从ATCC获得(目录号CRL-1573);来源于金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)的优化的重组酶分选酶A是在大肠杆菌(E.coli)中制备。

[0589] 实例1抗体表达载体的构建、抗体表达、纯化和鉴别

[0590] 1.1编码抗TROP2抗体的表达载体的构建

[0591] 为了产生编码抗TROP2抗体轻链的表达载体,将LC的核酸序列单独地克隆到pCDNA 3.3载体(Life technology)中;为了产生编码抗TROP2抗体重链的表达载体,将HC的核酸序列单独地克隆到pCDNA 3.3载体(Life technology)中。

[0592] 表3抗体的序列

[0593]

名称	HC 或 LC	SEQ ID NO
hRS7(来自 TRODELVY)	HC	30
	LC	34
达博妥单抗	HC	33
	LC	35
Ab13	HC	31
	LC	34
Ab16	HC	32
	LC	34
GQhRS7	HC	30
	LC	40
GQAb13	HC	31
	LC	40
GQAb16	HC	32
	LC	40

[0594] 注意:在ADC的制备过程中,LPETGG(SEQ ID NO:51)序列中GG的上游肽键被分选酶A切割,并将所得到的中间物连接至连接子-负载物中G_3的游离N末端以产生新肽键。

[0595] 1.2抗TROP2抗体的表达

[0596] 使编码抗TROP2抗体轻链和重链的质粒配对并以2:1的质量比混合。将质粒对和PEIMAX(Polyscience)转染试剂分别稀释于HEK293F基础培养基中,接着均匀混合。使混合物在室温下静置并添加至HEK293F种子细胞培养物中。将细胞在32度下培养24小时,取样进行细胞密度和活力分析,并补充10体积%的HEK293F补料培养基。接着,将培养物温度转变成32℃用于后续培养。在培育72小时的时候,再次对细胞培养物取样以进行细胞密度和活力分析。在培育144小时的时候,对细胞培养物取样以进行细胞密度和活力分析。

[0597] 1.3抗TROP2抗体的纯化

[0598] 遵循制造商的说明,通过亲和色谱法纯化抗体。简单来说,向色谱柱(中国上海的BestChrom)中装填MabSelect SureLX树脂(GE Healthcare)并用50mM Tris、150mM NaCl(pH 7.4)平衡。接着,获得细胞培养物上清液并施加至柱上。将柱用50mM Tris、150mM NaCl(pH 7.4)洗涤以去除非特异性结合的蛋白质。接着,将抗体用pH3.5的50mM柠檬酸盐缓冲液洗脱,并使用1M Tris-HCl(pH 9.0)将含抗体的洗脱液调至pH 6.5。最后,通过Anicon Ultra-15离心过滤器(Merk Millipore)将抗体的缓冲液交换成50mM Tris、150mM NaCl,pH 7.4。

[0599] 1.4结合动力学和亲和力分析

[0600] 执行结合动力学和亲和力分析。遵循制造商的说明,在具有传感芯片蛋白质A(GE healthcare)的Biacore T200(GE healthcare)上执行表面等离子体共振(SPR)分析。所有测量都在25℃下于HBS-EP^+缓冲液(10mM HEPES,pH 7.4,150mM NaCl、3mM EDTA和0.05%表

面活性剂P20)中执行。约110-140RU(共振单元)的各纯化抗体分别被捕获于传感芯片的流槽2和4(即,反应表面)上。将流槽1和3用HBS-EP$^+$缓冲液处理以充当参照表面。

[0601] 在HBS-EP$^+$缓冲液中制备人TROP2(即,分析物)(Acrobio系统)的重组细胞外结构域的连续稀释液(分别是243、81、27、9、3、1、0.333和0.111nM)。捕获抗体之后是以30μL/min的流动速率进行的三分钟的TROP2连续稀释液注射(缔合阶段)以及十分钟的缓冲液流动(解离阶段)。通过以50μL/min流动速率进行10mM盐酸甘氨酸(pH 1.5)的两次30秒脉冲注射,使芯片表面再生。使用本领域中已知的方法,在Biacore T200评估软件上处理收集到的数据,所述处理包括以下步骤:(1)将y轴上的反应和x轴上的注射起点设置为零;(2)通过首先从反应表面数据减去参照表面数据以得到分析物注射曲线,然后从分析物注射曲线减去缓冲液注射曲线,执行双参照;以及(3)使用1:1结合模型,利用全局拟合执行动力学分析。每种抗体的结果以Ka(缔合速率)、Kd(解离速率)和K_D(平衡解离常数)呈现。

[0602] 1.5抗TROP2抗体的SEC-HPLC检测

[0603] 将抗体样品以12 000rpm离心5分钟,并将上清液施加至SEC-HPLC柱上以检测每种抗体的单体形式(对应于完整抗体)、高分子量形式(HMW,对应于由聚集产生的抗体聚集物)和低分子量形式(LMW,对应于由降解产生的抗体片段)的百分比。

[0604]

抗体	K_D(nM)	纯度(SEC-HPLC)			HIC 滞留时间
		HMW(%)	单体(%)	LMW(%)	
达博妥单抗(DS1062a Ab)	13	0.41	99	0	6.605±0.056
hRS7	1.28	1.22	99	0.1	9.412±0.003
Ab13	8.16	0.62	99	0	7.476±0.025
Ab16	13.1	0.47	99	0	9.358±0.037

[0605] Trop2在正常组织中广泛表达,Ab13和Ab16的亲和力降低。低亲和力抗体应当能够提高安全性,同时维持功效,这在现有实验中已得到验证。

[0606] 1.6内化活性

[0607] 将有良好活力的MDA-MB-468用胰蛋白酶处理,收集,使其悬浮于冷FACS缓冲液(DPBS+2% FBS)中,并调至2×10^6个细胞/毫升。将抗Trop2抗体和同型对照抗体样品通过与抗人IgG-Fc-AF647二次抗体在室温下以1:1的摩尔比混合20分钟来进行荧光标记。将标记后的抗体添加至细胞悬浮液中,最终浓度是10μg/ml。将抗体-细胞混合物在冰上培育一小时。表面结合之后,将抗体-细胞混合物用冷FACS缓冲液洗涤两次,以去除过量的抗体。将细胞在37℃下培育0分钟、10分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟和240分钟以进行抗体内化,并在每个时间点,将1×10^5个细胞/孔转移至V形底96孔板中。通过将细胞放回冰浴来停止内化。将非内化细胞(0分钟)分成MAX组和MIN组,而抗体内化的细胞标记为I组。将MIN组和I组用淬灭缓冲液(150mM NaCl+100mM甘氨酸,pH=2.0至2.5)洗涤两次以解离表面结合的抗体。淬灭之后,将所有组用FACS缓冲液洗涤两次,并在APC通道中用流式细胞术进行分析。

[0608] 将MFI数据代入下式中,并在Prism 6中用单相指数关联函数分析结果。

[0609] 同型对照:$MFI_{(I)}=MFI_{(样品,I)}-MFI_{(同型对照抗体,I)}$

[0610] $MFI_{(MAX)}=MFI_{(样品,MAX)}-MFI_{(阴性抗体,MAX)}$

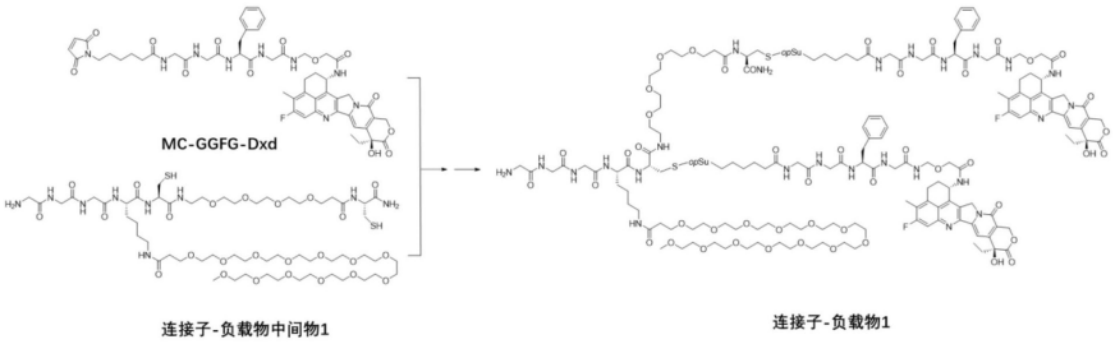
[0611] $MFI_{(MIN)}=MFI_{(样品,MIN)}-MFI_{(阴性抗体,MIN)}$

[0612] 内化比:$R_{(t)}=(MFI_{(I)}-MFI_{(MIN)})/MFI_{(MAX)}\times100\%$。

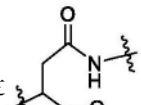
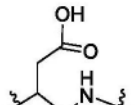
[0613] 如图1.1中所示,全部四种抗体在MDA-MB-468上显示出类似的内化活性。

[0614] 实例2中间物的制备

[0615] 实例2.1连接子-负载物1和连接子-负载物2的制备

[0616] 

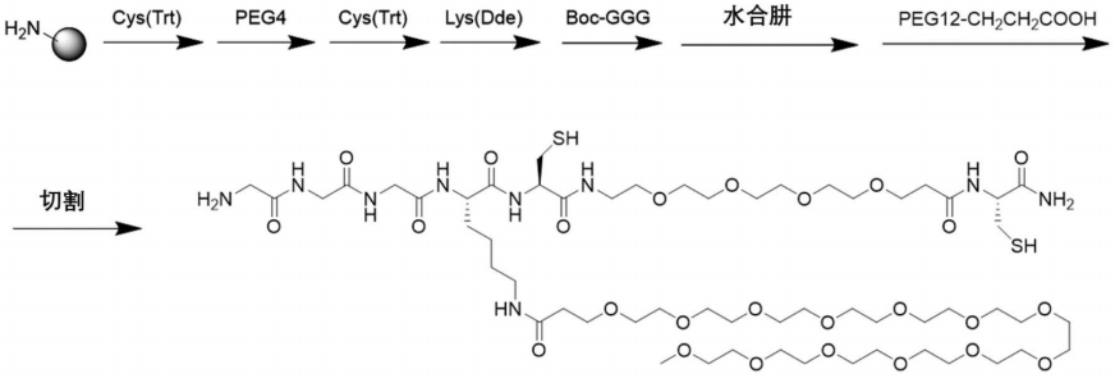
连接子-负载物中间物1　　连接子-负载物1

[0617] opSu是  和  的混合物;

[0618] 中间物MC-GGFG-DXd的制备

[0619] 中间物MC-GGFG-DXd是可商购的或遵循EP2907824中所描述的程序制备。使用这种化合物制备连接子-负载物1。

[0620] 连接子-负载物中间物1的制备

[0621] 

连接子-负载物中间物1

[0622] 可以通过常规固相多肽合成,使用Rink-酰胺-MBHA-树脂合成连接子-负载物中间物1。使用Fmoc保护连接单元中的氨基酸。偶联试剂选自HOBT、HOAt/DIC、DCC、EDCI或HATU。合成之后,使用TFA/TIS/H_2O溶液从树脂切割产物。将产物通过HPLC纯化,冻干并储存待用。MS m/z:$[M-H]^-$=1382.6。

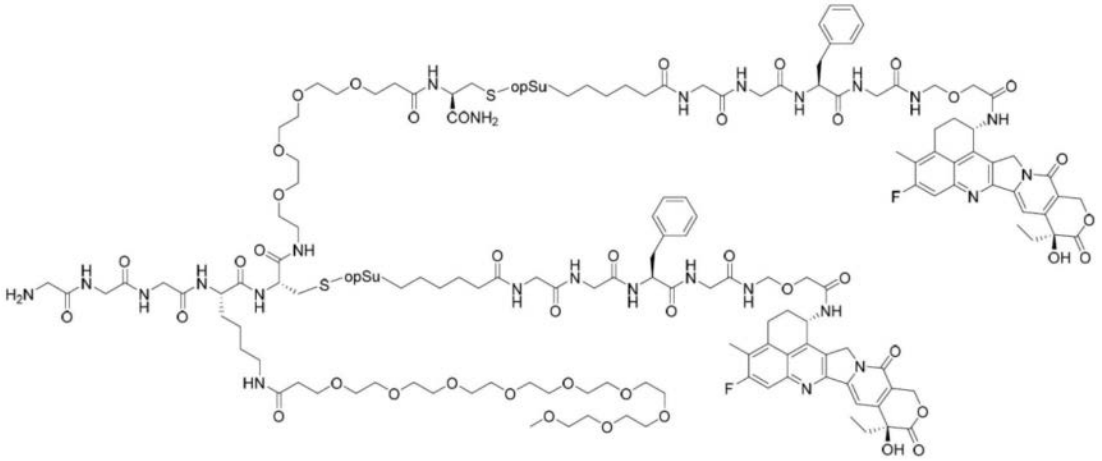
[0623] 连接子-负载物1的制备

[0624] 称取连接子-负载物中间物1和MC-GGFG-DXd(摩尔比为约1:2)并将其分别溶解于水和DMF中,然后充分混合,得到混合物,使所述混合物在0-40℃下反应0.5-30小时。反应完成后,就向反应混合物中直接添加适量的Tris碱溶液或其它促进开环反应的溶液,并在0-40℃下再反应0.2-20小时。反应完成之后,将产物通过半制备型/制备型HPLC纯化并冻干,

得到连接子-负载物1。MS m/z:[(M+3H)/3]$^{+}$=1163.3。

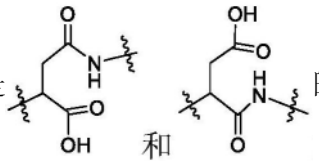
[0625] 连接子-负载物2的制备

[0626] 以下连接子-负载物2可以使用与连接子-负载物1类似的合成途径和试剂制备。

[0627] 

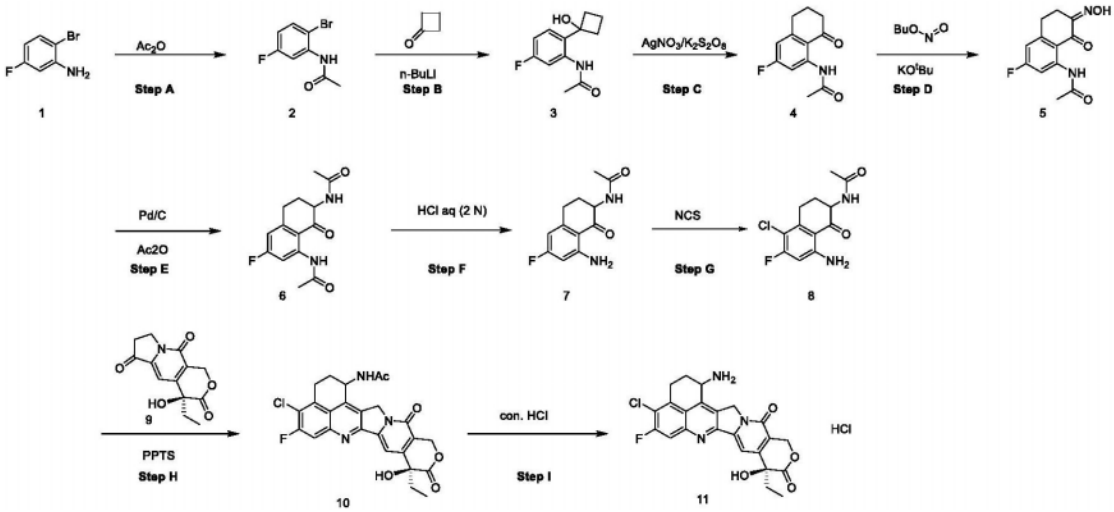
连接子-负载物2

。

[0628] opSu是  的混合物。

[0629] 实例2.2连接子-负载物3和连接子-负载物4的制备

[0630] 中间物11的制备

[0631] 

[0632] 步骤A(Step A):N-(2-溴-5-氟苯基)乙酰胺:向乙酸酐(214g,2.10mol)于乙酸(500mL)中的搅拌的溶液中添加浓H_2SO_4(3mL),随后在室温下分数份添加2-溴-5-氟苯胺(100g,526.27mmol)。将混合物搅拌3小时,接着倒入2000mL冰-水中。形成沉淀物,通过过滤收集沉淀物并在室温下真空干燥,得到呈黄色固体状的N-(2-溴-5-氟苯基)乙酰胺(105g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.68(dd,J=8.9,6.0Hz,1H),7.61(ddd,J=10.7,5.3,3.1Hz,1H),7.02(ddd,J=8.9,8.0,3.1Hz,1H),2.11(s,3H)。MS m/z 232.0(M+H)。

[0633] 步骤B(Step B):N-(5-氟-2-(1-羟基环丁基)苯基)乙酰胺:在-78℃下,经1小时向N-(2-溴-5-氟苯基)乙酰胺(105g,452.48mmol)于THF(1000mL)中的搅拌的溶液中逐滴添加

n-BuLi(594mL,1.6M于正己烷中,950.22mmol)。完成后,在N_2下,将混合物搅拌0.5小时。接着,在-78℃下,经0.5小时逐滴添加环丁酮(38.06g,542.98mmol)于THF(50mL)中的溶液,将混合物在-78℃至室温下搅拌6小时。在0℃下,将混合物倒入500mL饱和NH_4Cl水溶液中。用乙酸乙酯(500mL×3)萃取,用盐水(250mL×2)洗涤,经Na_2SO_4干燥并浓缩。将混合物用(PE/EA=1:1,100mL)研磨10分钟,过滤并收集滤饼,在真空中干燥,得到呈黄色固体状的N-(5-氟-2-(1-羟基环丁基)苯基)乙酰胺(24g)。LCMS m/z 206.1(M-18+H),246.1(M+Na)。

[0634] 步骤C(Step C):N-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺:向N-(5-氟-2-(1-羟基环丁基)苯基)乙酰胺(24g,107.50mmol)于CH_2Cl_2(170mL)和水(170mL)中的搅拌的混合物中添加硝酸银($AgNO_3$)(5.48g,32.25mmol)和过硫酸钾($K_2S_2O_8$)(58.12g,215.01mmol),将混合物在30℃下搅拌6小时。将混合物在硅藻土(Celite)上过滤并用CH_2Cl_2(100mL)洗涤,将滤液浓缩并通过FCC(EA/PE=0-40%)纯化,得到呈浅黄色固体状的N-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(14g)。MS m/z 222.1(M+H)。

[0635] 步骤D(Step D):N-(3-氟-7-(羟基亚氨基)-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺:在0℃下,向N-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(14g,63.28mmol)于THF(500mL)中的正在搅拌的混合物中添加亚硝酸1-丁酯(8.48g,63.28mmol),随后添加t-BuOK(8.52g,75.94mmol)。将混合物在0℃下搅拌2小时。完成后,将混合物用HCl(2N)酸化以调至pH=3。将混合物用乙酸乙酯(200mL×3)萃取,用盐水(100mL×2)洗涤,经Na_2SO_4干燥并减压浓缩。将粗混合物用叔丁基甲基醚(200mL)研磨10分钟,过滤并收集滤饼,在真空中干燥,得到呈黄色固体状的N-(3-氟-7-(羟基亚氨基)-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(12g)。MS m/z 251.1(M+H)。

[0636] 步骤E(Step E):N,N'-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺:向N-(3-氟-7-(羟基亚氨基)-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1-基)乙酰胺(12g,47.96mmol)于乙酸酐(90mL)和THF(90mL)中的溶液中添加10% Pd/C(1g),在H_2气氛下将混合物在25℃下搅拌16小时。冷却至0℃后,逐滴添加Et_3N(20mL),将混合物在0℃下搅拌1小时。在硅藻土上过滤,将滤液倒入冰-水(500mL)中。用乙酸乙酯(500mL×3)萃取,用盐水(250mL×2)洗涤,经Na_2SO_4干燥并浓缩。将残余物用叔丁基甲基醚(120mL)研磨10分钟,过滤并收集滤饼,在真空中干燥,得到呈黄色固体状的N,N'-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺(7.9g)。MS m/z 279.1(M+H)。

[0637] 步骤F(Step F):N,N'-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺:向N,N'-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺(7.9g,28.39mmol)于MeOH(150mL)中的溶液中添加HCl水溶液(2N,150mL),将混合物在50℃下搅拌7小时。冷却至0℃后,逐滴添加饱和$NaHCO_3$水溶液以调至pH=8。用乙酸乙酯(200mL×3)萃取,用盐水(200mL×2)洗涤,经Na_2SO_4干燥并减压浓缩,得到呈黄色固体状的N,N'-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺(6.0g)。^1H NMR(400MHz,氯仿-d)δ6.57(s,3H),6.18(td,J=11.1,2.4Hz,2H),4.52(dt,J=13.3,5.0Hz,1H),3.13(ddd,J=17.5,13.0,4.6Hz,1H),3.00-2.81(m,1H),2.69(dtd,J=9.4,4.6,2.5Hz,1H),2.09(s,3H),1.79(qd,J=13.0,4.3Hz,1H)。MS m/z 237.1(M+H)。

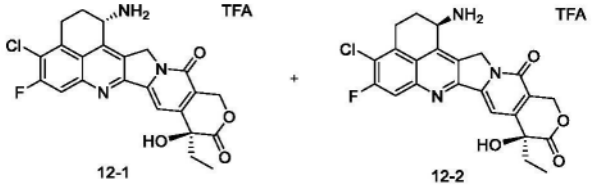
[0638] 步骤G(Step G):N-(8-氨基-5-氯-6-氟-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺:在0℃下,向N,N'-(3-氟-8-氧代-5,6,7,8-四氢萘-1,7-二基)二乙酰胺(4.0g,16.93mmol)

于DMF(80mL)中的溶液中分批添加NCS(2.26g,16.93mmol),将混合物在室温下搅拌16小时。将混合物倒入200mL冰-水中。形成沉淀物,通过过滤收集沉淀物并在室温下真空干燥,得到呈黄色固体状的N-(8-氨基-5-氯-6-氟-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺(4.0g)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.11(d,J=8.0Hz,1H),7.71(s,2H),6.62(d,J=11.9Hz,1H),4.53(ddd,J=13.0,8.0,4.7Hz,1H),3.18-3.04(m,1H),2.91(ddd,J=17.5,12.4,4.8Hz,1H),2.21-2.08(m,1H),1.99-1.83(m,4H)。MS m/z271.0(M+H)。

[0639] 步骤H(Step H):N-((9S)-4-氯-9-乙基-5-氟-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺:向N-(8-氨基-5-氯-6-氟-1-氧代-1,2,3,4-四氢萘-2-基)乙酰胺(4.0g,14.78mmol)于甲苯(400mL)中的混合物中添加(S)-4-乙基-4-羟基-7,8-二氢-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚嗪-3,6,10(4H)-三酮(4.28g,16.25mmol)、对甲苯磺酸吡啶(1.11g,4.43mmol)和邻甲酚(10mL),将混合物在N_2下加热至回流,保持24小时。通过减压去除溶剂并将混合物通过FCC(THF/CH_2Cl_2=0-60%)纯化,得到呈褐色固体状的N-((9S)-4-氯-9-乙基-5-氟-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺(4.1g)。MS m/z 498.1(M+H)。

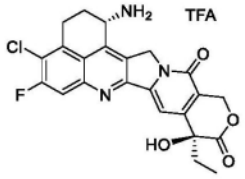
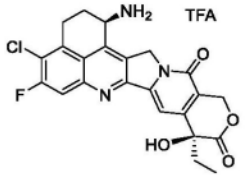
[0640] 步骤I(Step I):(9S)-1-氨基-4-氯-9-乙基-5-氟-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮:在N_2下,在70℃下将N-((9S)-4-氯-9-乙基-5-氟-9-羟基-10,13-二氧代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-1-基)乙酰胺(2.0g,4.02mmol)于20mL浓HCl水溶液中的混合物搅拌36小时。将混合物减压浓缩,得到呈褐色固体状的粗(9S)-1-氨基-4-氯-9-乙基-5-氟-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮盐酸盐(2g)。MS(ESI)m/z 456.1(M+H)。

[0641] 中间物12(12-1、12-2)的制备

[0642] 

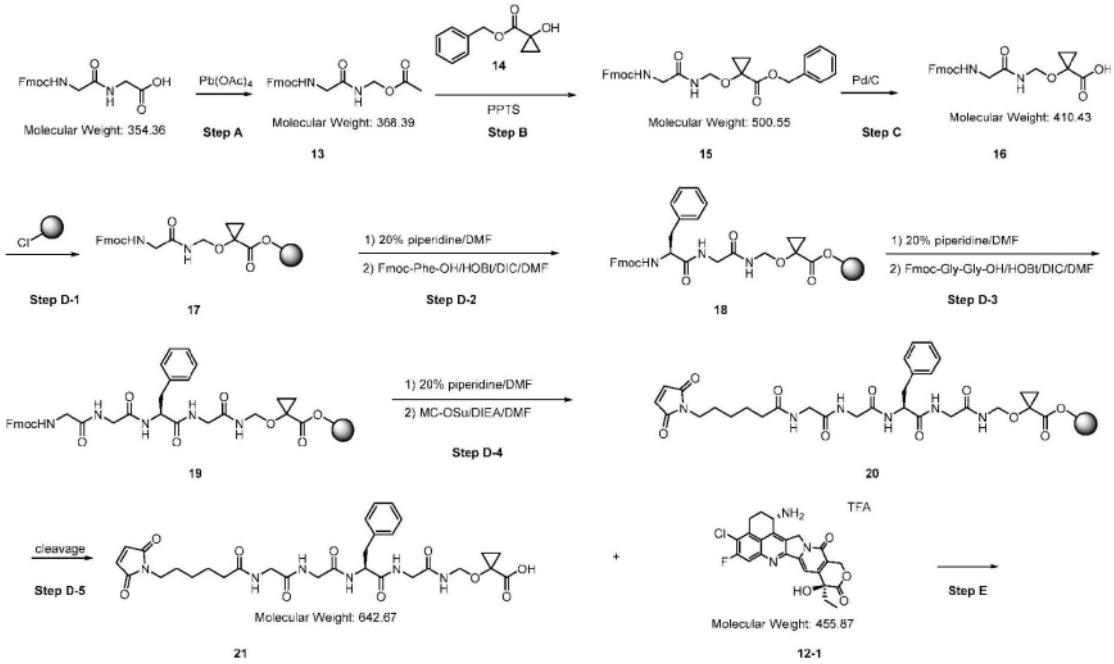
[0643] 12-1和12-2是通过制备型HPLC,从(9S)-1-氨基-4-氯-9-乙基-5-氟-9-羟基-1,2,3,9,12,15-六氢-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚嗪并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮盐酸盐(中间物11)以TFA盐形式制备。

[0644]

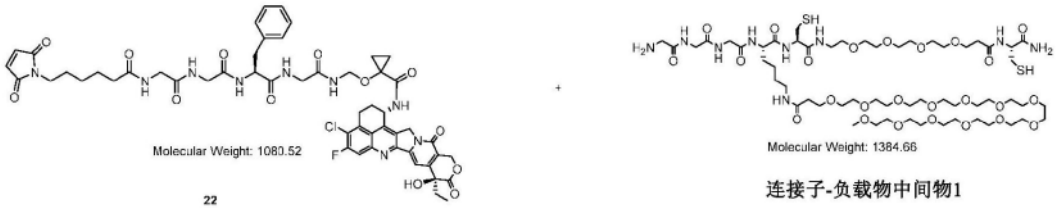
编号	结构	^{1}HNMR	MS (M+H)	在 HPLC 上的滞留时间(分钟)
12-1		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ8.51 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 8.17 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 5.74 (d, *J* = 19.4 Hz, 1H), 5.52 - 5.40 (m, 3H), 5.16 (s, 1H), 3.44 (dd, *J* = 16.3, 4.1 Hz, 1H), 3.19 (t, *J* = 13.9 Hz, 1H), 2.57 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 2.26 (t, *J* = 14.3 Hz, 1H), 1.89 (hept, *J* = 7.0 Hz, 2H), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)。	456.0	1.395
12-2		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.56 (s, 2H), 8.17 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 5.74 (d, J = 19.4 Hz, 1H), 5.53 - 5.28 (m, 3H), 5.16 (s, 1H), 3.59 - 3.01 (m, 2H), 2.35 - 2.19 (m, 2H), 2.00 - 1.78 (m, 2H), 0.88 (t, J = 7.3 Hz, 3H)。	456.0	1.541

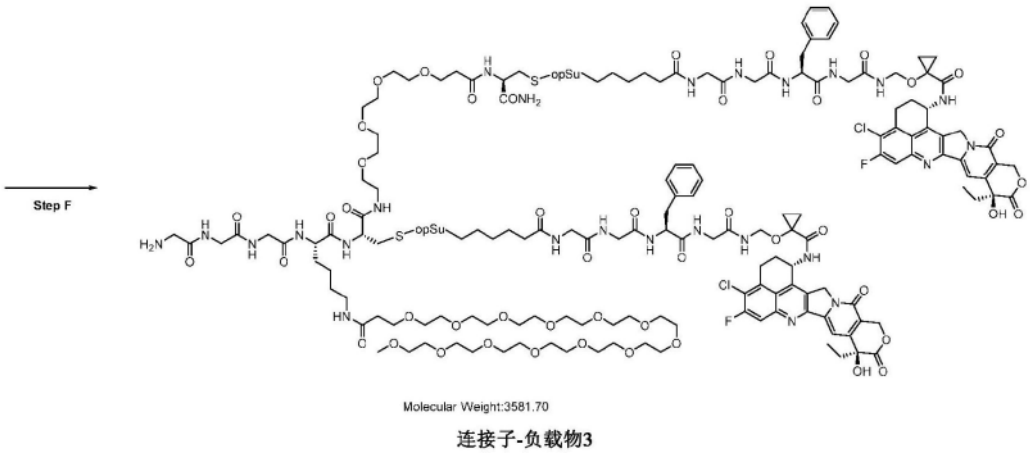
[0645] 以上HPLC的条件:设备:Agilent 1200;色谱柱:Waters XBridge C18 4.6*50mm, 3.5um;流量:2.0mL/min;洗脱梯度:5.0%-95.0%-95.0%-5.0%-5.0%,0.00分钟-1.50分钟-2.50分钟-2.52分钟-3.00分钟;温度:40℃;相:A:乙腈;B:H_2O(0.05% TFA);波长:214nm/254nm。

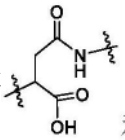
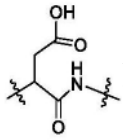
[0646] 连接子-负载物3的制备



[0647]





[0648] opSu是  和  的混合物。

[0649] 化合物13的制备(步骤A,Step A)

[0650] 称取4.33g Fmoc-Gly-Gly-OH和6.84g $Pb(OAc)_4$并添加至500ml单颈圆底烧瓶中。在氮气气氛下,添加无水THF/甲苯(120/40ml)并搅拌溶解。接着,将1.16mL吡啶添加至反应系统中。将反应系统加热至80℃并在氮气气氛下回流5小时。获取样品并通过HPLC检测以监测反应。

[0651] 将反应系统冷却至室温,过滤,并将滤饼用EA洗涤3次。将滤液合并,并浓缩至干。执行柱色谱法(PE:EA=100:0-50:100),得到约2000mg呈白色固体状的目标产物,产率是44%。

[0652] 化合物15的制备(步骤B,Step B)

[0653] 称取200mg化合物13并添加至100ml单颈圆底烧瓶中。接着,添加15ml THF并搅拌溶解。接着,将化合物14(312mg,3.0e.q.)和TsOH·H_2O(15mg,0.15e.q.)添加至反应系统中。使反应系统在室温下反应过夜。获取样品并通过TLC(PE/EA=1:1)检测以监测反应。原料基本上消失,并检测到新点。

[0654] 添加饱和碳酸氢钠溶液以淬灭反应。用EA萃取3次。将有机相合并,并用盐水洗涤,用无水硫酸镁干燥并浓缩。将粗产物通过柱色谱法(PE:EA=5:1-1:1)纯化,得到约80mg呈无色油状的目标产物,产率是29%。MS m/z:$[M+H]^+$=501.1

[0655] 化合物16的制备(步骤C,Step C)

[0656] 称取200mg化合物15并添加至100ml单颈圆底烧瓶中。接着,添加10ml EtOH和5ml EA以完全溶解。接着,在氮气气氛下,将40mg钯碳添加至反应系统中,并用氢气净化反应系统三次。将反应系统保持在氢气气氛下并在室温下搅拌0.5小时。获取样品并通过TLC(DCM/MeOH=10:1)检测以监测反应。原料基本上消失,并检测到新点。

[0657] 将反应系统过滤,并将滤饼用EA洗涤3次。将滤液合并,并浓缩至干,得到200mg呈白色固体状的产物,产率100%。产物不经纯化即可直接用于下一步反应中。MS m/z:$[M-H]^-$=409.4。

[0658] 化合物21的制备(步骤D,Step D)

[0659] 步骤D-1

[0660] 称取2.0g二氯树脂并放入多肽合成管中。添加DCM(10ml)并使其在室温下膨胀30分钟。通过真空抽吸去除溶剂。将树脂用DCM洗涤两次,其中每次洗涤的体积是7mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。接着,称取化合物16(200mg)并添加至50ml离心管中。添加DCM(约10ml)。通过振荡,将固体溶解。添加至以上树脂中。进行搅拌以将所有树脂都浸泡在溶液中(如果有树脂附着在管壁上,则使用少量DCM洗涤管壁)。搅拌4-5小时。反应完成后,添加适量的甲醇。搅拌30分钟。通过真空抽吸去除溶剂。将树脂依序用DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次,DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次并用DMF洗涤两次,其中每次洗涤的体积是10mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。取少量干树脂进行茚三酮检测。树脂是无色且透明的,且溶液呈微黄色,表明适合用于接下来的偶联步骤。

[0661] 步骤D-2

[0662] 通过添加10mL现有的20%哌啶/DMF溶液并且每次反应10分钟,进行两次脱保护。反应完成后,通过真空抽吸去除溶液。将树脂依序用DMF洗涤两次,甲醇洗涤一次,DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次且DMF洗涤两次,其中每次洗涤的体积是10mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。取少量干树脂进行茚三酮检测。树脂和溶液都呈深蓝色。

[0663] 向50mL离心管中添加563mg Fmoc-Phe-OH、197mg HOBt。接着,添加约7mL DMF。通过振荡,将固体溶解。接着,添加0.24mL DIC。活化10-30分钟,得到活化的反应溶液。

[0664] 将3摩尔当量的活化反应溶液添加至树脂中。进行搅拌以将树脂完全浸泡于所述溶液中(如果有树脂附着在管壁上,则使用少量DCM洗涤管壁)。搅拌2-3小时。反应完成后,

通过真空抽吸去除溶剂。将树脂依序用DMF洗涤两次,甲醇洗涤一次,DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次且DMF洗涤两次,其中每次洗涤的体积是10mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。取少量干树脂进行茚三酮检测。树脂是无色且透明的,并且溶液呈微黄色,表明适合用于接下来的偶联步骤。

[0665] 步骤D-3

[0666] 通过添加10mL现有的20％哌啶/DMF溶液并且每次反应10分钟,进行两次脱保护。反应完成后,通过真空抽吸去除溶液。将树脂依序用DMF洗涤两次,甲醇洗涤一次,DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次且DMF洗涤两次,其中每次洗涤的体积是10mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。取少量干树脂进行茚三酮检测。树脂和溶液都呈深蓝色。

[0667] 向50mL离心管添加531mg Fmoc-GG-OH、197mg HOBt。接着,添加约10mL DMF。通过振荡,将固体溶解。接着,添加0.24mL DIC。活化10-30分钟,得到活化的反应溶液。

[0668] 将3摩尔当量的活化反应溶液添加至树脂。进行搅拌以将树脂完全浸泡于所述溶液中(如果有树脂附着在管壁上,则使用少量DCM洗涤管壁)。搅拌2-3小时。反应完成后,通过真空抽吸去除反应溶液。将树脂依序用DMF洗涤两次,甲醇洗涤一次,DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次且DMF洗涤两次,其中每次洗涤的体积是10mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。取少量干树脂进行茚三酮检测。树脂是无色且透明的,并且溶液呈微黄色,表明适合用于接下来的偶联步骤。

[0669] 步骤D-4

[0670] 通过添加10mL现有的20％哌啶/DMF溶液并且每次反应10分钟,进行两次脱保护。反应完成后,通过真空抽吸去除溶液。将树脂依序用DMF洗涤两次,甲醇洗涤一次,DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次且DMF洗涤两次,其中每次洗涤的体积是10mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。取少量干树脂进行茚三酮检测。树脂和溶液都呈深蓝色。接着,将462mg MC-OSu放入50mL离心管中,添加约10mL DMF。通过振荡,将固体溶解。接着,将0.24mL DIEA添加至树脂中。进行搅拌以将树脂完全浸泡于所述溶液中(如果有树脂附着在管壁上,则使用少量DCM洗涤管壁)。搅拌2-3小时。反应完成后,通过真空抽吸去除反应溶液。将树脂依序用DMF洗涤两次,甲醇洗涤一次,DMF洗涤一次,甲醇洗涤一次且DMF洗涤两次,其中每次洗涤的体积是10mL且时间长度是1分钟。通过真空抽吸去除溶剂。取少量干树脂进行茚三酮检测。树脂是无色且透明的,并且溶液呈微黄色,表明适合用于接下来的偶联步骤。

[0671] 步骤D-5

[0672] 将树脂用10mL甲醇洗涤两次。接着,通过真空抽吸完全去除溶剂。倒出树脂并称重。在250mL锥形瓶中制备裂解缓冲液,其中:TFE/DCM的比率是80％/20％,且体积是肽树脂重量的7-8倍。将裂解缓冲液添加至肽树脂中,充分振荡。将树脂完全浸泡于裂解缓冲液中,并在室温下裂解2-3小时。接着,使用由注射器制成的简易过滤器过滤裂解缓冲液,并将树脂用1-2ml DCM洗涤,并丢弃。接着,将150mL预先冷却的无水乙醚添加至裂解缓冲液中,充分振荡,接着静置20-30分钟。使用50mL离心管,将以上系统在离心机中以3500rpm离心3分钟,倒出上清液并丢弃。将固体与预先冷却的无水乙醚一起振荡,在超声波下洗涤一次,以3500rpm离心3分钟,倒出上清液并丢弃。将固体放入离心管中并使其空气干燥过夜,接着进行制备型纯化,得到125mg呈白色固体状的产物,产率是40％。MS m/z:$[M-H]^-$=641.5。

[0673] 化合物22的制备(步骤E,Step E)

[0674] 称取150mg原料化合物21和55mg TSTU并添加至10mL单颈圆底烧瓶中,在氮气气氛下添加无水DMF(3mL)并搅拌20分钟。接着,将18mg化合物12-1和20μl DIEA依序添加至反应系统中。在氮气气氛下,在室温下搅拌2-8小时。获取样品并通过HPLC检测以监测反应。原料峰完全消失,并且检测到新峰。

[0675] 对反应系统进行制备型纯化,收集目标产物并冻干,得到约22mg呈微黄色固体状的产物。MS m/z:$[M+H]^+$=1081.0。

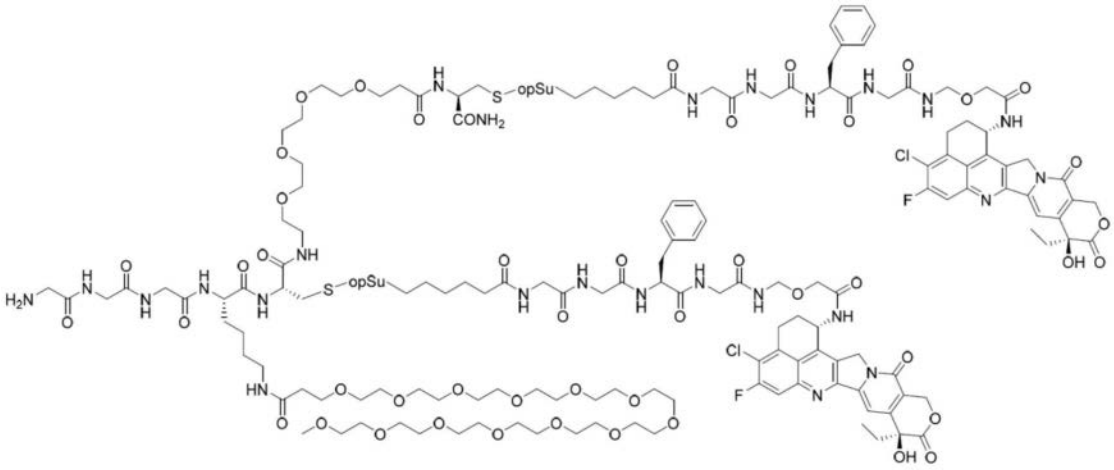
[0676] 连接子-负载物3的制备(步骤F,Step B)

[0677] 称取化合物22(30mg)并添加至10ml单颈圆底烧瓶中,添加纯化水(2ml)。进行搅拌以溶解。将含有连接子-负载物中间物1(19.5mg)的DMF溶液(2ml)添加至反应系统中并搅拌。反应过夜后,使用HPLC监测反应,直至所有原料都已转化成中间物。向反应混合物中直接添加适量的Tris碱溶液或其它促进开环反应的溶液,并在0-40℃下再反应0.2-20小时。通过HPLC监测反应,直至所有中间物都消耗,接着利用乙酸溶液淬灭。

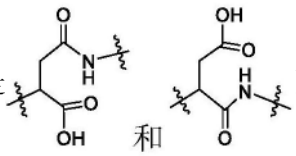
[0678] 对反应系统进行制备型纯化,收集目标产物并冻干,得到约25mg呈微黄色固体状的连接子-负载物3。MS m/z:$[(M+3H)/3]^+$=1194.4。

[0679] 连接子-负载物4的制备

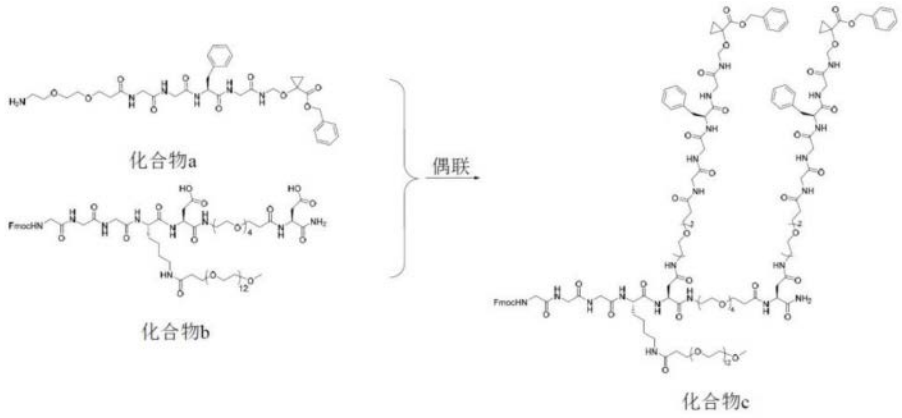
[0680] 以下连接子-负载物4可以使用与连接子-负载物3类似的合成途径和试剂制备。连接子-负载物4如下:

[0681] 

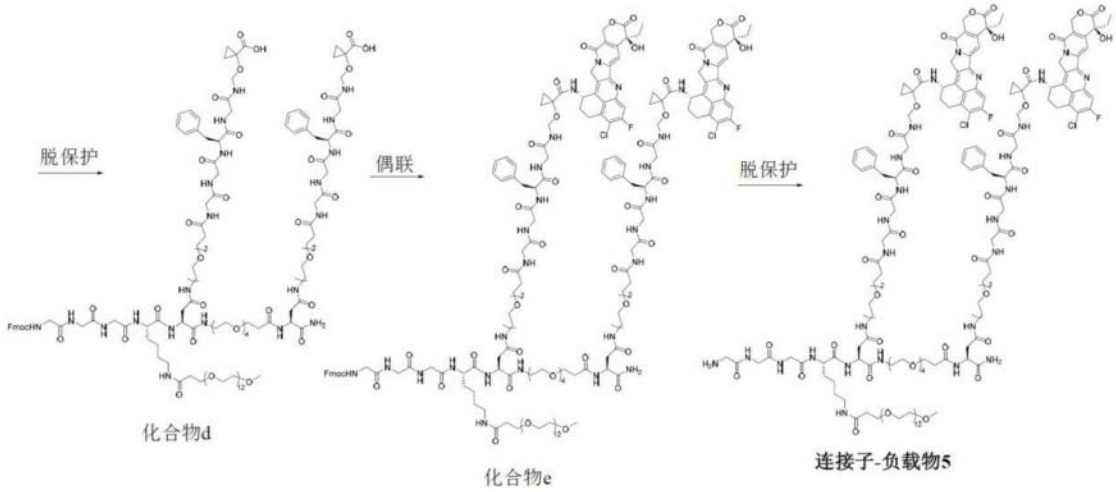
连接子-负载物4

[0682] opSu是  的混合物。

[0683] 实例2.3连接子-负载物5的制备



[0684]



[0685] 步骤1:中间物化合物b的制备

[0686] 步骤1.1NH_2-Asp(OtBu)-Rink酰胺树脂的制备

[0687] 称取400g Rink酰胺树脂并用2400mL DCM使其完全膨胀。添加2400mL脱保护试剂以完全去除Fmoc,接着在室温下用DMF和DCM洗涤数次。在随后的茚三酮测试中,树脂显示蓝色。

[0688] 称取88.87g Fmoc-Asp(OtBu)-OH和29.19g HOBT并将其溶解于2000mL DMF和80mL DIC溶液中。在-10℃冰浴中放置0.5小时后,将其缓慢添加至含树脂的反应釜中,并在氮气下,在室温下搅拌反应2-5小时,接着过滤。将树脂相继用DMF和DCM洗涤,并且在随后的茚三酮测试中,树脂显示无色或浅黄色。

[0689] 添加2400mL脱保护试剂以完全去除Fmoc,接着在室温下用DMF和DCM洗涤数次。在随后的茚三酮测试中,树脂显示蓝色。

[0690] 步骤1.2NH_2-PEG4-Asp(OtBu)-Rink酰胺树脂的制备

[0691] 称取131.64g Fmoc-PEG4-OH和48.64g HOBT并将其溶解于2000mL DMF和80.0mL DIC溶液中。在-10℃的冰浴中放置0.5小时后,将其缓慢添加至含树脂的反应釜中,并在氮气下,在室温下搅拌反应2-4小时,接着过滤。将树脂相继用DMF和DCM洗涤,并且在随后的茚三酮测试中,树脂显示无色或浅黄色。

[0692] 添加2400mL脱保护试剂以完全去除Fmoc,接着在室温下用DMF和DCM洗涤数次。在随后的茚三酮测试中,树脂显示蓝色。

[0693] 步骤1.3NH_2-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink酰胺树脂的制备

[0694] 称取222.18g Fmoc-Asp(OtBu)-OH和72.96g HOBT并将其溶解于2000mL DMF和80mL DIC溶液中。在-10℃的冰浴中放置0.5小时后,将其缓慢添加至含树脂的反应釜中,并在氮气下,在室温下搅拌反应2-4小时,接着过滤。将树脂相继用DMF和DCM洗涤,并且在随后的茚三酮测试中,树脂显示无色或浅黄色。

[0695] 添加2400mL脱保护试剂以完全去除Fmoc,接着在室温下用DMF和DCM洗涤数次。在随后的茚三酮测试中,树脂显示蓝色。

[0696] 步骤1.4Dde-Lys(NH_2)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink酰胺树脂的制备

[0697] 称取191.75g Dde-Lys(Fmoc)-OH和48.64g HOBT并将其溶解于2000mL DMF和80.0mL DIC溶液中。在-10℃的冰浴中放置0.5小时后,将其缓慢添加至含树脂的反应釜中,并在氮气下,在室温下搅拌反应2-4小时,接着过滤。将树脂相继用DMF和DCM洗涤,并且在随后的茚三酮测试中,树脂显示无色或浅黄色。

[0698] 添加2400mL脱保护试剂以完全去除Fmoc,接着在室温下用DMF和DCM洗涤数次。在随后的茚三酮测试中,树脂显示蓝色。

[0699] 步骤1.5Dde-Lys(mPEG12)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink酰胺树脂的制备

[0700] 称取170.84g m-PEG12-CH_2CH_2COOH和48.64g HOBT并将其溶解于2000mL DMF和80.0mL DIC溶液中。在-10℃的冰浴中放置0.5小时后,将其缓慢添加至含树脂的反应釜中,并在氮气下,在室温下搅拌反应2-4小时,接着过滤。将树脂相继用DMF和DCM洗涤,并且在随后的茚三酮测试中,树脂显示无色或浅黄色。

[0701] 步骤1.6NH_2-Lys(PEG12)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink酰胺树脂的制备

[0702] 添加2400mL脱Dde试剂,并在氮气下,在室温下搅拌反应0.5小时,接着过滤。重复此操作3次后,将树脂相继用DMF和DCM洗涤,并且在随后的茚三酮测试中,树脂显示蓝色。

[0703] 步骤1.7Fmoc-Gly-Gly-Gly-Lys(PEG12)-Asp(OtBu)-PEG4-Asp(OtBu)-Rink酰胺树脂的制备

[0704] 称取111.08g Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH和48.64g HOBT并将其溶解于2000mL DMF和80.0mL DIC溶液中。在-10℃的冰浴中放置0.5小时后,将其缓慢添加至含树脂的反应釜中,并在氮气下,在室温下搅拌反应2-4小时,接着过滤。将树脂相继用DMF和DCM洗涤,并且在随后的茚三酮测试中,树脂显示无色或浅黄色。将树脂肽用无水乙醇洗涤三次,过滤并等待切割。

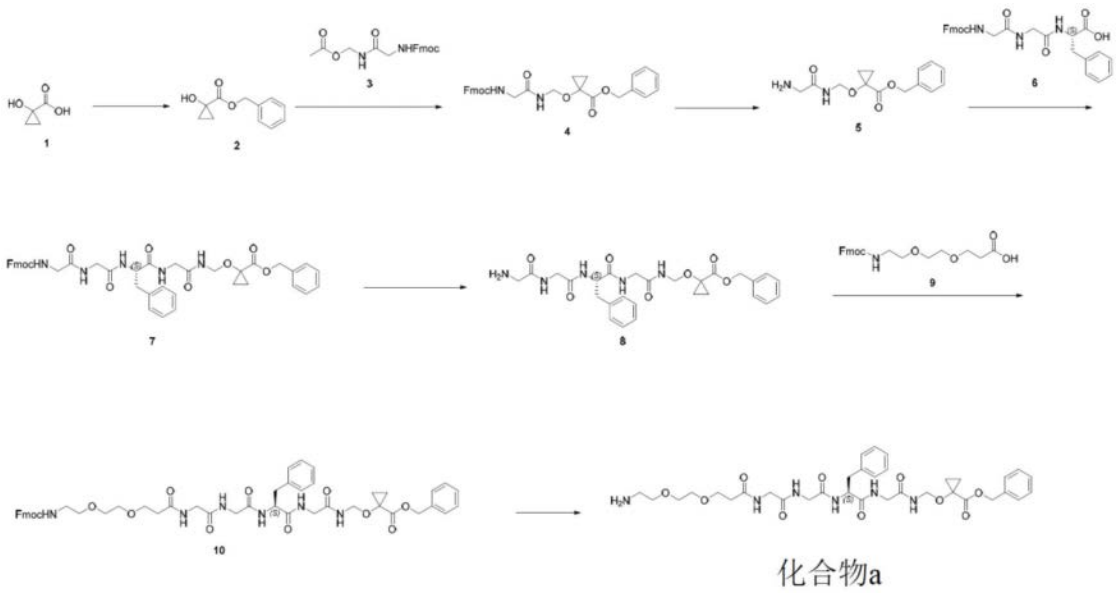
[0705] 步骤1.8中间物化合物b的制备

[0706] 将10000mL切割试剂(TFA:TIS:H_2O=95:2.5:2.5)添加至10L反应器中并冷却至-10±2℃。添加干燥并称重的树脂。使反应物升温至室温并在氮气下搅拌2-3小时。之后,将树脂过滤并用100mL TFA洗涤一次。将滤液与洗涤溶液合并。

[0707] 将40L预先冷却的(低于-10℃)冷乙醚添加至产物溶液中。将混合物搅拌10分钟,接着对沉淀物进行离心。离心后,丢弃上清液,收集沉淀物并用冷乙醚洗涤,并且对沉淀物再次离心(每次离心的速度设置为3600rpm,离心时间是5分钟,并且离心机空腔的温度是-5℃)。

[0708] 收集沉淀物作为粗化合物b。将粗产物通过制备型HPLC纯化并冻干,得到纯化合物b。

[0709] 步骤2:中间物化合物a的制备

[0710] 

化合物a

[0711] 步骤2.1化合物2的制备

[0712] 将化合物1(1e.q.)和DMF(5v/v)添加至反应烧瓶中,并且在氮气保护下搅拌并溶解混合物。将冰浴冷却至0-5℃后,逐滴添加DIEA(3e.q.),并在逐滴添加后,将混合物在5℃下搅拌10分钟。接着,逐滴添加苯甲基溴(1.3e.q.),并在逐滴添加完成后,使其自然升温至约20℃的室温并搅拌16小时。

[0713] 将反应溶液缓慢倒入冰水中,添加MTBE并搅拌,并使溶液静置以进行分离。将水相用MTBE萃取4次,将合并的有机相用饱和盐水洗涤,接着将有机相经无水硫酸钠干燥,并在真空下浓缩,得到粗黄色油状物,将所述黄色油状物以湿法施加至柱上。通过PE/EA=6:1洗脱,获得浅黄色油状物,并且产率是100%。

[0714] 步骤2.2化合物4的制备

[0715] 在氮气保护下,将中间物2(2.0e.q.)、化合物3(1e.q.)和THF(10v/v)添加至反应烧瓶中,并搅拌溶解,称取TsOH(0.1e.q.)并添加至反应物中,并在20-22℃下保持反应4小时。将反应溶液缓慢倒入冰水中,用EA萃取3次,将合并的有机相依序用饱和碳酸氢钠水溶液、水和饱和盐水洗涤,将有机相用无水硫酸钠干燥,过滤并在真空下干燥,得到粗产物。通过混合硅胶样品,使其穿过柱,用PE/EA=1:1洗脱,收集产物,并浓缩,得到白色固体,产率是40%。

[0716] 步骤2.3化合物7的制备

[0717] 在氮气保护下,将化合物4和DMAc(10v/v)添加至反应烧瓶中并搅拌溶解。将反应物冷却至14-18℃,逐滴添加DBU(0.5e.q.)并在这一温度下搅拌反应1.5小时,通过TLC监测原料反应的完成。将反应物冷却至0-5℃,添加PPTS(0.5e.q.)、EDCI(1e.q.)、HOBT(1e.q.)和化合物6(0.85eq)并在0-10℃下反应3-4小时,并且通过LCMS监测反应。

[0718] 将反应溶液添加至冰水中,添加2-甲基四氢呋喃萃取一次,并将水相用2-甲基四氢呋喃萃取两次。将有机相合并,用0.5M盐酸洗涤,用饱和$NaHCO_3$水溶液、水和饱和盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,蒸发至干,与硅胶混合,并通过柱纯化。通过DCM/MeOH洗脱来收集产物,并在真空下干燥,得到白色固体,产率是78%。

[0719] 步骤2.4化合物10的制备

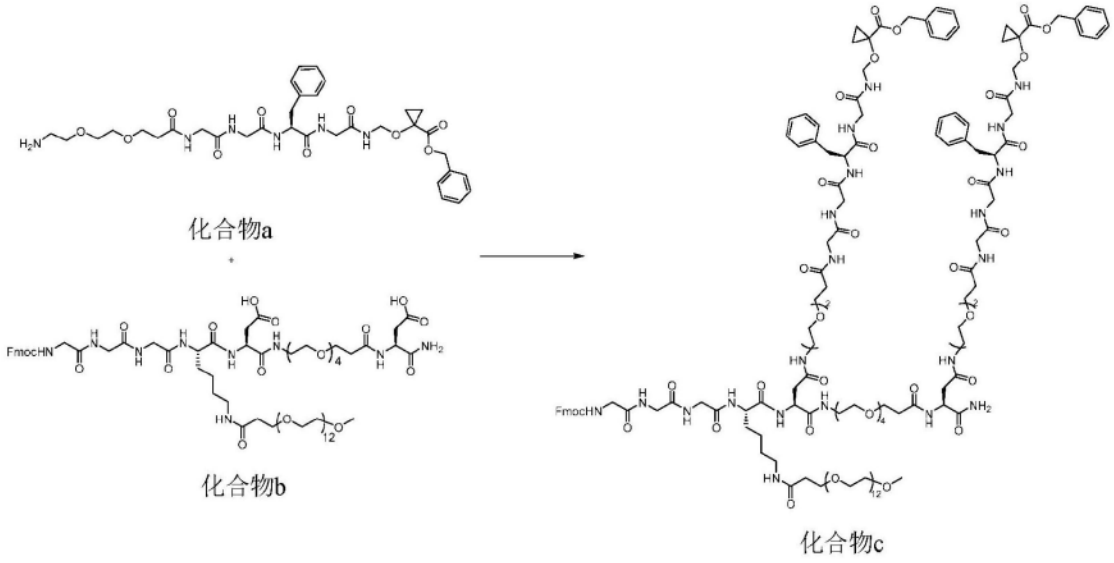
[0720] 在氮气保护下,将中间物7和DMAc(10v/v)添加至反应烧瓶中并搅拌溶解。将反应物冷却至14-18℃,逐滴添加DBU(0.5e.q.),并在这一温度下搅拌反应1.5小时,通过TLC监测反应的完成。将反应物冷却至0-5℃,添加PPTS(0.5e.q.)、EDCI(1e.q.)、HOBT(1e.q.)和化合物9(0.85e.q.)并在0-10℃下反应3-4小时,并且通过LCMS监测反应。

[0721] 将反应溶液添加至冰水中,添加2-甲基四氢呋喃萃取一次,并将水相用2-甲基四氢呋喃萃取两次。将有机相合并,用0.5M盐酸、饱和$NaHCO_3$水溶液、水和饱和盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,蒸发至干,与硅胶混合,并通过柱纯化。通过DCM/MeOH洗脱来收集产物,并在真空下干燥,得到白色固体,产率是50%。

[0722] 步骤2.5化合物a的制备

[0723] 在氮气保护下,将中间物10溶解于DCM(15v/v)中,在20℃下逐滴添加DBU(0.5e.q.),并在18-22℃下搅拌反应5小时。通过LCMS监测到完全反应。将反应溶液用DCM稀释,通过湿法进行柱纯化,并通过DCM:MeOH洗脱来收集产物,得到白色固体,产率是82%。

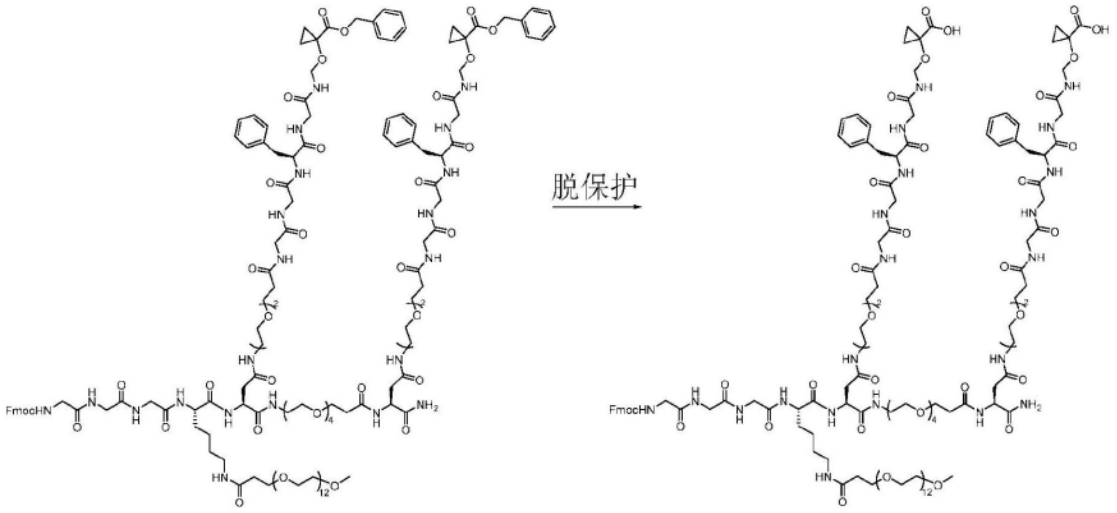
[0724] 步骤3:中间物化合物c的制备

[0725] 

[0726] 将化合物b(400mg,0.245mmol)和化合物a(377mg,0.539mmol)溶解于DMF(6ml)中,接着将DIPEA(159mg,1.23mmol)和HATU(233mg,0.613mmol)添加至反应溶液中,并在室温下搅拌反应2小时。化合物b消失后,通过制备型HPLC对其进行纯化,并将制备溶液冻干,得到380mg产物,产率是52%。$C_{142}H_{207}O_{49}N_{21}[(M+3H)/3]^+$的计算值:997.8,实验值:875.9(裂解的质量)。

[0727] 步骤4:中间物化合物d的制备

[0728]

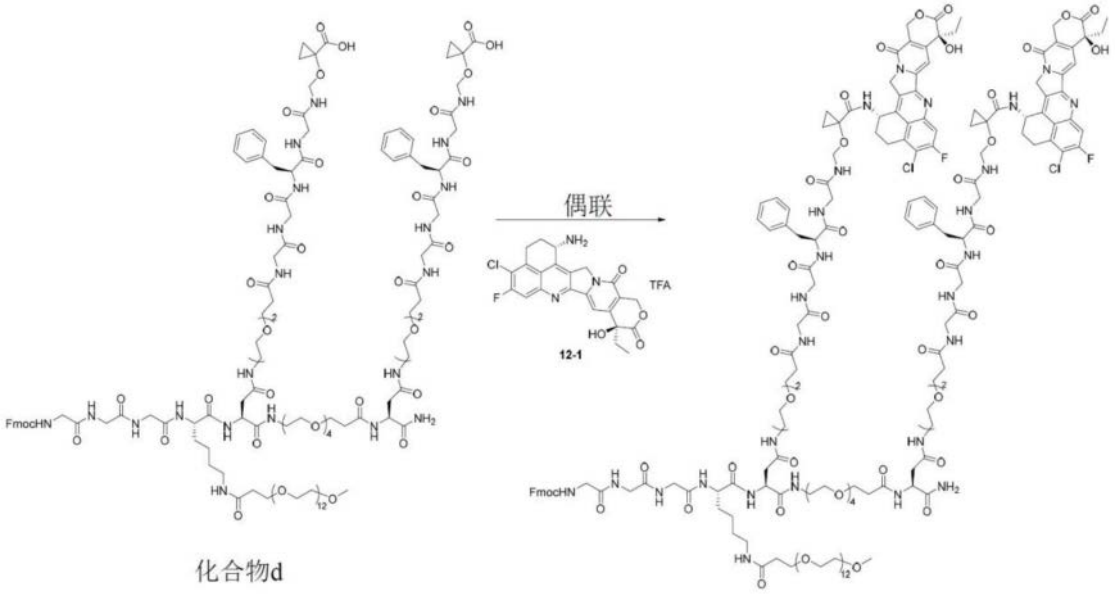


化合物c 化合物d

[0729] 将化合物c(380mg,0.245mmol)溶解于纯化水(80ml)中,并添加氢氧化钯(38mg)。系统用氢气置换3次,在室温下搅拌反应1.5小时。在此期间,监测反应进程,在原料消失后立即停止反应以防止脱Fmoc产物增加。将反应溶液过滤并通过制备型HPLC纯化,得到270mg产物,产率是76%。$C_{128}H_{195}O_{49}N_{21}$[(M+3H)/3]$^+$的计算值:937.8,实验值:875.9(裂解的质量)。

[0730] 步骤5:中间物化合物e的制备

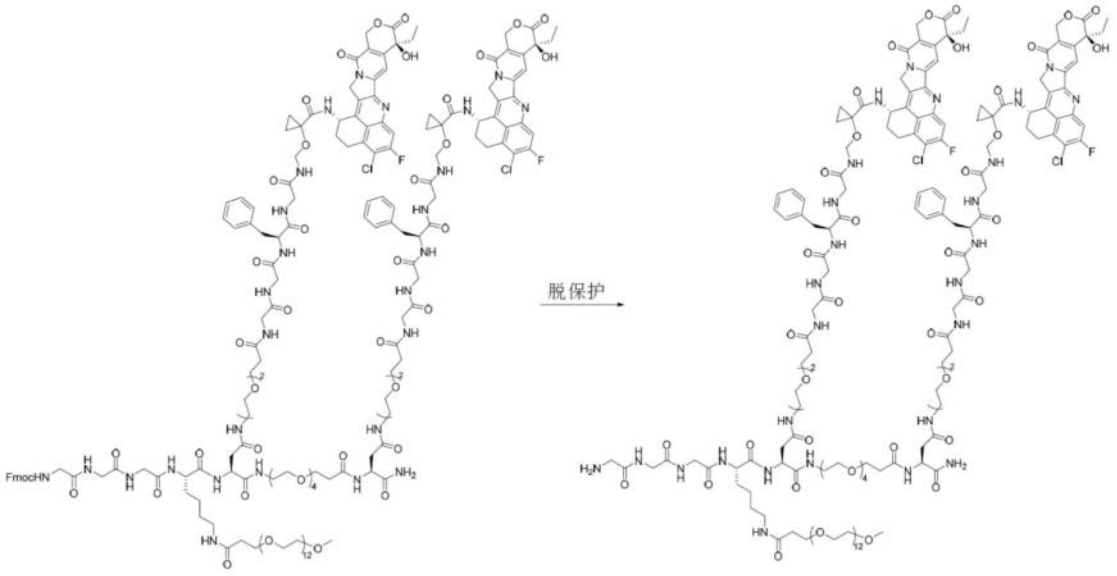
[0731]



化合物d 化合物e

[0732] 将化合物d(270mg,0.096mmol)和12-1(120mg,0.211mmol)溶解于DMF(5ml)中,接着将DIPEA(62mg,0.48mmol)和HATU(92mg,0.24mmol)添加至反应溶液中并在室温下搅拌2-16小时。通过HPLC监测到反应完成后,将反应混合物直接通过制备型HPLC纯化,并将收集到的洗脱液合并,并冻干,得到235mg产物,产率是66%。$C_{174}H_{229}O_{55}Cl_2F_2N_{27}$[(M+3H)/3]$^+$的计算值:1229.2,实验值:1229.3。

[0733] 步骤6:连接子-负载物5的制备

[0734] 

化合物e 连接子-负载物5

[0735] 将化合物e(210mg,0.057mmol)溶解于DMF(5ml)中,接着添加二乙胺(0.5ml)并使反应物在室温下反应15分钟,通过HPLC监测反应终点。反应完成后,在冰浴下,用10% TFA水溶液将其调至中性,并通过制备型HPLC纯化反应物,在冻干后获得145mg产物,产率是73%。$C_{159}H_{219}O_{53}Cl_2F_2N_{27}[(M+3H)/3]^+$计算值:1155.2,实验值:1155.3。

[0736] 实例3靶向分子-药物缀合物的制备

[0737] 3.1DS1062a类似物和Trodelvy的制备

[0738] DS1062a类似物(DS1062a和DS-1062*)是根据专利US20160297890A中所描述的方法制备,或是由WuXi Biologics生产。

[0739] Trodelvy是可商购的。

[0740] 3.2ADC-1的制备

[0741] 3.2.1GQhRS7的处理

[0742] 通过超滤、透析或脱盐柱处理GQhRS7。储存溶液替换为连接酶缓冲液。

[0743] 3.2.2酶催化的ADC-1偶联

[0744] 通过使GQhRS7与连接子-负载物1在野生型分选酶A或基于所述分选酶A优化或工程改造的突变型连接酶催化下发生偶联反应来制备ADC-1。在连接酶缓冲液中,将经过修饰的抗体和连接子-负载物以1:1至1:100的摩尔比充分地混合,并添加至固相偶联系统中。固相偶联系统包含固定于固相偶联系统的基质上的连接酶。固定的连接酶催化抗体GQhRS7与连接子-负载物1的偶联反应。偶联反应在4-40℃下进行0.5-20小时。反应完成之后,对反应混合物进行超滤或透析以去除未反应的中间物,得到ADC-1。将ADC-1在4℃或-80℃下储存于含有20mM柠檬酸、200mM NaCl的pH 5.0缓冲液中。

[0745] 3.2.3ADC-1的HIC-HPLC检测和分析

[0746] 通过HIC-HPLC分析ADC-1的DAR(药物与抗体比)分布。在无细胞毒素情况下抗体GQhRS7小于5%;并且偶联产物主要含有ADC-1,且DAR是3.5。

[0747] 3.2.4ADC-1的SEC-HPLC检测和分析

[0748] 通过SEC-HPLC分析ADC-1的高分子量聚集的程度。结果显示,在ADC-1中未检测到

高分子量聚合物,指示偶联反应条件是温和的,并且不会引起抗体结构的损害。

[0749] 3.3将连接子-负载物中间物分别通过连接酶以位点特异性方式与抗体缀合,形成ADC。缀合反应的方法可见于WO2015165413A1。所得到的ADC列于下表中:

[0750]

ADC的名称	连接子-负载物	抗体
ADC-1	连接子-负载物1	GQhRS7
ADC-2	连接子-负载物3	GQhRS7
ADC-3	连接子-负载物4	GQhRS7
ADC-4	连接子-负载物5	GQhRS7
ADC-5	连接子-负载物5	GQAb13
ADC-6	连接子-负载物5	GQAb16
ADC-7	连接子-负载物2	GQhRS7

[0751] 3.4结合活性

[0752] 将0.5μg/mL浓度的人Trop 2ECD涂布于96孔板上,在4℃下保持过夜。接着,在室温下,用3% BSA-PBST将板封闭1小时。用PBST(0.05% Tween)洗涤之后,将不同浓度的包括ADC-2(即,ADC2)、Trodelvy和GQhRS7在内的一系列测试物样品分别添加至96孔板中,接着在室温下培育60分钟。培育之后,以1:100000比率添加山羊抗人Fc二次抗体(HRP)(Sinobiological,SSA001)并在室温下再培育60分钟。洗涤之后,用作为HRP底物的TMB溶液(Sigma,T0440)处理板,并用1M H_2SO_4停止反应。在450nm波长下检测每个孔的吸光度。

[0753] 这一分析的结果示于图1.2中。结果展示,ADC-2与GQhRS7和Trodelvy具有类似的结合亲和力。

[0754] 3.5内化活性

[0755] 将有良好活力的NCI-N87用胰蛋白酶处理,收集,使其悬浮于冷FACS缓冲液(DPBS+2% FBS)中。将细胞与最终浓度为50μg/ml的测试药物溶液一起在冰上培育一小时。将抗体-细胞混合物用冷FACS缓冲液洗涤两次以去除过量抗体。将抗体结合的细胞通过与500倍稀释的冰冷的抗人IgG-Fc-AF647二次抗体溶液混合30分钟来进行荧光标记。荧光标记之后,将抗体-细胞混合物再洗涤两次。将细胞在37℃下培育10分钟、30分钟、60分钟、90分钟、150分钟和210分钟以使测试药物内化。用淬灭缓冲液(150mM NaCl+100mM甘氨酸,pH=2.0至2.5)使细胞悬浮以解离细胞表面上结合的抗体。酸化之后,将细胞用冷FACS缓冲液洗涤两次,并在APC通道中通过流式细胞仪进行分析。

[0756] 将MFI数据代入下式中,并在Prism8中用单相指数关联函数分析结果。内化量:A=MFI(I)-MFI(MIN)。内化比:

[0757] R=[MFI(I)-MFI(MIN)]/[MFI(MAX)-MFI(Blank)]×100%

[0758] 如图1.3中所示,ADC2与DS1062、Trodelvy和GQhRS7在NCI-N87上显示出类似的内化活性。

[0759] 效果实例1缀合物在BxPC-3/HepG2中的旁观者杀伤作用

[0760] 效果实例1.1在BxPC-3/HepG2共培养测定中ADC-1针对HepG2的旁观者杀灭作用

[0761] 将Trop2阳性细胞BxPC-3和Trop2阴性细胞HepG2的细胞浓度调至1×10^6个细胞/毫升,并取每孔200μL(细胞体积BxPC-3:HepG2=4:1)接种至六孔板中,并补充2.8mL的45% RPMI-1640+45% DMEM+10% FBS培养基。在细胞培育箱中,在37℃、5% CO_2下将细胞培育

过夜。将3mL的20nM ADC-1和DS1062a分别添加至细胞中,培养过夜(最终药物浓度是每孔10nM)。阴性对照组设置为:将3mL的45％ RPMI-1640+45％ DMEM+10％ FBS培养基添加至每个孔中。处理之后,将细胞移至培育箱中并培育96小时。培育之后,将细胞消化,并用1×PBS洗涤一次,接着转移至流式管中,并以2000rpm离心3分钟。接着,丢弃上清液,并检测细胞量和细胞活力。用1×PBS洗涤一定量的细胞,在离心之后丢弃上清液,添加200μL的100nM抗人Trop2抗体,并将细胞混合且在4℃下培育30分钟。将细胞用1×PBS洗涤,在离心之后丢弃上清液,添加200μL的5μg/mL人IgG Fc抗体,并在混合之后,将所得到的细胞继续在4℃下培育30分钟。最后,用1×PBS洗涤细胞,在离心之后丢弃上清液,并将细胞再悬浮于PBS中,通过流式细胞仪检测并通过FlowJo软件进行分析。结果示于表4中。

[0762] 表4ADC-1和DS1062a的旁观者杀伤的测试结果

[0763]

分组	活细胞数量(10^4)	细胞比例(%)		细胞量(10^4)	
		BxPC-3	HepG2	BxPC-3	HepG2
对照组	259.0	22.5	77.5	58.28	200.73
DS1062a	44.6	24.4	75.6	10.88	33.72
ADC-1	59.3	33.4	66.6	19.81	39.49

[0764] 效果实例1.2在BxPC-3/HepG2共培养测定中ADC-2针对HepG2的旁观者杀伤作用

[0765] 将Trop2阳性细胞BxPC-3和Trop2阴性细胞HepG2的细胞浓度调至1×10^6个细胞/毫升,并取每孔300μL(细胞体积BxPC-3:HepG2＝2:1)接种至六孔板中,并补充2.7mL的45％ RPMI-1640+45％ DMEM+10％ FBS培养基。在细胞培育箱中,在37℃、5％ CO_2下将细胞培育过夜。将3mL的20nM ADC-2和DS1062a分别添加至细胞中,培养过夜(最终药物浓度是每孔10nM)。并且接下来的过程是使用与上述相同的方法来评估ADC-2和DS1062a的旁观者杀伤作用。结果示于表5中。

[0766] 表5.ADC-2和DS1062a的旁观者杀伤的测试结果

[0767]

分组	活细胞数量(10^4)	细胞比例(%)		细胞量(10^4)	
		BxPC-3	HepG2	BxPC-3	HepG2
对照组	452.0	22.4	77.6	101.25	350.75
DS1062a	157.0	7.8	92.2	12.25	144.75
ADC-2	70.0	21.8	78.2	15.26	54.74

[0768] 效果实例1.3在BxPC-3/HepG2共培养测定中ADC-6针对HepG2的旁观者杀伤作用

[0769] 使用与效果实例1.2相同的方法评估对照(达博妥单抗)、DS1062a、ADC-1、ADC-2、ADC-4和ADC-6的旁观者杀伤作用。结果示于表6中。

[0770] 表6ADC-6的旁观者杀灭伤的测试结果

[0771]

分组	活细胞数量(10^4)	细胞比例(%)		细胞量(10^4)	
		BxPC-3	HepG2	BxPC-3	HepG2
对照组	452.0	22.4	77.6	101.25	350.75
DS1062a	157.0	7.8	92.2	12.25	144.75
ADC-4	156.0	9.9	90.2	15.37	140.63
ADC-1	177.0	9.0	91.0	15.86	161.14
ADC-2	70.0	21.8	78.2	15.26	54.74
ADC-6	66.4	21.5	78.5	14.28	52.12

[0772] 结论

[0773] 作用实例1.1的实验结果显示,ADC-1和DS1062a类似物均具有旁观者杀伤作用,并且其功效无显著差异。

[0774] 作用实例1.2的实验结果显示,ADC-2的旁观者杀伤作用优于DS1062a的旁观者杀伤作用。

[0775] 作用实例1.3的实验结果显示,ADC-1、ADC-2、ADC-4、ADC-6和DS1062a类似物都具有旁观者杀伤作用。ADC-2和ADC-6的旁观者杀伤作用优于DS1062a的旁观者杀伤作用。ADC-6的旁观者杀伤作用明显优于ADC-4的旁观者杀伤作用。

[0776] 效果实例2:靶向TROP2的缀合物对细胞增殖的影响

[0777] 效果实例2.1ADC-7和ADC-1对肿瘤细胞增殖的抑制作用

[0778] 效果实例2.1.1ADC-7对人咽鳞状细胞癌FaDu的增殖的抑制作用

[0779] 将两千个具有高TROP2表达的人咽鳞状细胞癌FaDu以每孔100μL培养基接种于96孔板中,并在细胞培育箱中,在37℃和5% CO_2下培育过夜。将100μL不同浓度(200nM、40nM、8nM、1.6nM、0.32nM、0.064nM、0.0128nM、0.00256nM、0.000512nM和0.0001024nM)的ADC-7和DS1062a添加至每个孔(每种浓度3个重复孔)中。设置阳性对照组:将100μL浓度为10μg/mL的嘌呤霉素添加至每个孔中。设置阴性对照组:将100μL含FaDu细胞的完全培养基添加至每个孔中。施用完成之后,将细胞移至培育箱中并培育96小时。从37℃细胞培育箱中取出96孔板并平衡至室温,保持30分钟。丢弃培养基之后,将100μL的DMEM和50μL的CellTiter Glo试剂添加至每个孔中,并在暗处,将细胞以200rpm振荡15分钟,并通过微板读数仪检测冷光信号,所述冷光信号反映细胞活力。测试药物对人咽鳞状细胞癌FaDu的增殖的抑制作用示于图2和表7中。

[0780] 表7ADC-7和DS1062a对咽鳞状细胞癌FaDu的增殖的抑制作用

[0781]

药物	IC_{50}(nM)
ADC-7	0.4617
DS1062a	0.5508

[0782] 效果实例2.1.2ADC-1对人胰腺癌细胞BxPC-3的增殖的抑制作用

[0783] 将实例2.1.1中的人咽鳞状细胞癌FaDu替换为人胰腺癌细胞BxPC-3(每孔100μL含有2000个细胞),并使用相同方法评估ADC-1的抑制作用。测试药物对人胰腺癌细胞BxPC-3的增殖的抑制作用示于图3和表8中。

[0784] 表8ADC-1和DS1062a对人胰腺癌细胞BxPC-3的增殖的抑制作用

[0785]

药物	IC_{50}(nM)
ADC-1	0.4741
DS1062a	0.5835

[0786] 效果实例2.1.3ADC-1对人乳腺癌细胞MDA-MB-468的增殖的抑制作用

[0787] 将实例2.1.1中的人咽鳞状细胞癌FaDu替换为人乳腺癌细胞MDA-MB-468(每孔100μL含有4000个细胞),并使用相同方法评估ADC-1的抑制作用。测试药物对人乳腺癌细胞MDA-MB-468的增殖的抑制作用示于图4和表9中。

[0788] 表9ADC-1和DS1062a对人乳腺癌细胞MDA-MB-468的增殖的抑制作用

[0789]

药物	IC_{50}(nM)
ADC-1	3.347
DS1062a	2.501

[0790] 效果实例2.1.4 ADC-7对人胃癌细胞NCI-N87的增殖的抑制作用

[0791] 将实例2.1.1中的人咽鳞状细胞癌FaDu替换为人胃癌细胞NCI-N87(每孔100μL含有5000个细胞),并使用相同方法评估ADC-7的抑制作用。测试药物对人胃癌细胞NCI-N87的增殖的抑制作用示于图5和表10中。

[0792] 表10 ADC-7和DS1062a对胃癌细胞NCI-N87的增殖的抑制作用

[0793]

药物	IC_{50}(nM)
ADC-7	1.518
DS1062a	1.262

[0794] 效果实例2.2 ADC-2和ADC-3对肿瘤细胞增殖的抑制作用

[0795] 效果实例2.2.1 ADC-2和ADC-3对人咽鳞状细胞癌FaDu的增殖的抑制作用

[0796] 将实例2.1.1中的测试药物ADC-1和DS1062a替换为ADC-2、ADC-3和ADC-1,并使用相同方法评估抑制作用。测试药物对人咽鳞状细胞癌FaDu的增殖的抑制作用示于图6和表11中。

[0797] 表11 ADC-2、ADC-3和ADC-1对咽鳞状细胞癌FaDu的增殖的抑制作用

[0798]

药物	IC_{50}(nM)
ADC-2	0.2376
ADC-3	0.1761
ADC-1	0.1618

[0799] 效果实例2.2.2 ADC-2和ADC-3对人胰腺癌细胞BxPC-3的增殖的抑制作用

[0800] 将实例2.2.1中的人咽鳞状细胞癌FaDu替换为人胰腺癌细胞BxPC-3,并使用相同方法评估ADC-2的抑制作用。测试药物对人胰腺癌细胞BxPC-3的增殖的抑制作用示于图7.1和表12中。

[0801] 表12 ADC-2、ADC-3和ADC-1对人胰腺癌细胞BxPC-3的增殖的抑制作用

[0802]

药物	IC_{50}(nM)
ADC-2	0.4526
ADC-3	0.6909
ADC-1	0.8316

[0803] 效果实例2.3 ADC-2和DS-1062a对BxPC-3、FaDu和NCI-N87的增殖的抑制作用

[0804] 使用Trop2阳性癌细胞BxPC-3(图7.2)、FaDu(图7.3)和NCI-N87(图7.4)执行细胞毒性测定,以分析缀合物对肿瘤细胞增殖的作用。测试药物包括缀合物ADC2、DS1062a和GQhRS7。简单来说,将3000至5000个细胞平板接种于96孔板中,并且细胞能够附着过夜。将细胞用各种浓度的指定药物处理168小时。利用CellTiter-Glo®发光法细胞活力测定检查细胞活力,并计算细胞活力百分比。

[0805] 在Trop2阳性BxPC-3、FaDu和NCI-N87中,ADC2展现出比DS1062a更强效的细胞毒性。ADC2的IC_{50}值小于DS1062a(参见下表)。

[0806]

药物 \ 细胞系	IC50(nM)		
	BxPC-3	FaDu	NCI-N87
ADC2	0.2260	0.1282	0.7416
DS1062a	0.6922	0.1701	2.101

[0807] 结论

[0808] 效果实例2.1.1的结果显示,ADC-7和DS1062a均可抑制FaDu细胞的增殖,并且ADC-7的抑制作用略优。

[0809] 效果实例2.1.2的结果显示,ADC-1和DS1062a均可抑制BxPC-3细胞的增殖。

[0810] 效果实例2.1.3的结果显示,ADC-1和DS1062a均可抑制MDA-MB-468细胞的增殖。

[0811] 效果实例2.1.4的结果显示,ADC-7和DS1062a均可抑制NCI-N87细胞的增殖。

[0812] 效果实例2.2.1的结果显示,ADC-2、ADC-3和ADC-1均可抑制FaDu细胞的增殖。

[0813] 效果实例2.2.2的结果显示,ADC-2、ADC-3和ADC-1可以抑制BxPC-3细胞的增殖,并且ADC-2的抑制作用略微优于ADC-3和ADC-1的抑制作用。

[0814] 效果实例2.3的结果显示,ADC-2可以抑制BxPC-3细胞、FaDu细胞和NCI-N87细胞的增殖,并且ADC-2的抑制作用优于DS1062a的抑制作用。

[0815] 效果实例3体内功效评估测试

[0816] 效果实例3.1ADC-1的体内功效评估

[0817] 效果实例3.1.1ADC-1针对BxPC-3细胞的体内功效的评估

[0818] I.收集对数生长期的BxPC-3并用基质胶缓冲液(PBS:基质胶=1:1)将细胞密度调至10×10^6个细胞/毫升。将0.2mL所制备的BxPC-3细胞悬浮液皮下注射至6-8周龄的SPF雌性BALB/c裸小鼠的右肩胛骨中。

[0819] II.用游标卡尺测量肿瘤直径并根据下式计算肿瘤体积:$V=0.5a\times b^2$(其中a是肿瘤的最长直径且b是肿瘤的最短直径)。细胞接种之后6天,当平均肿瘤体积是约151mm^3时,将动物随机分成媒剂对照组、DS1062a 3mg/kg组和ADC-1 3mg/kg组,其中每组6只动物。每组动物通过尾静脉注射施用,并且对照组给予相等体积的媒剂。在施用后35天内,一周两次测量每组动物的肿瘤体积,并在第35天比较各组动物的肿瘤体积。使用肿瘤体积计算T/C和TGI值。计算公式如下:$T/C\%=T_{RTV}/C_{RTV}\times100\%$($T_{RTV}$:处理组的RTV;$C_{RTV}$:媒剂对照组的RTV)。基于肿瘤测量结果计算相对肿瘤体积(RTV),并且计算公式是:$RTV=V_t/V_0$,其中V_0是在分组(即,D0)时测量的平均肿瘤体积,V_t是在一次测量时的平均肿瘤体积,并且T_{RTV}和C_{RTV}采用同一天的数据。TGI(%)的计算:TGI(%)=[1-(在处理组施用结束时的平均肿瘤体积-在处理组开始施用时的平均肿瘤体积)/(在媒剂对照组处理结束时的平均肿瘤体积-在媒剂对照组处理开始时的平均肿瘤体积)]×100%。

[0820] III.用药35天之后,ADC-1 3mg/kg组(T/C=49.05%,TGI=57.56%,p=0.002)和DS1062a 3mg/kg组(T/C=64.05%,TGI=40.54%,p=0.010)的平均肿瘤体积分别为648mm^3和847mm^3。结果示于图8和表13中。

[0821] 表13ADC-1对BxPC-3小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0822]

用药组	肿瘤体积(mm^3) 第0天	肿瘤体积(mm^3) 第35天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	151 ± 13	1,322 ± 58	--	-	--
DS1062a，3 mg/kg	151 ± 12	847 ± 104	64.05	40.54	0.010
ADC-1，3 mg/kg	151 ± 11	648 ± 109	49.05	57.56	0.002

[0823] 结论

[0824] 根据效果实例3.1.1的结果,与对照组相比较,ADC-1 3mg/kg组和DS1062a 3mg/kg组都能明显抑制肿瘤生长。

[0825] 效果实例3.1.2ADC-1针对NCI-N87胃癌细胞的体内功效的评估

[0826] 将实例3.1.1中的BxPC-3细胞替换为NCI-N87胃癌细胞,并在细胞接种之后7天,当平均肿瘤体积是约227mm^3时,将动物随机分成媒剂对照组、IMMU-132(Trodelvy)3mg/kg组、DS1062a 3mg/kg组和ADC-1 3mg/kg组,其中每组6只动物。使用与效果实例3.1.1类似的方法评估ADC-1的体内功效,并且结果示于图9和表14中。

[0827] 表14ADC-1对NCI-N87小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0828]

用药组	肿瘤体积 (mm^3) 第0天	肿瘤体积 (mm^3) 第32天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	227 ± 24	1,307 ± 117	--	--	--
IMMU-132(BIW*6，3 mg/kg)	227 ± 21	864 ± 114	65.85	41.10	0.006
DS1062a(单次剂量，3 mg/kg)	228 ± 20	658 ± 43	49.98	60.23	<0.001
ADC-1(单次剂量，3 mg/kg)	227 ± 24	697 ± 34	57.17	55.09	<0.001

[0829] 结论

[0830] 用药32天之后,ADC-1 3mg/kg组(T/C＝57.17％,TGI＝55.09％,p<0.001)和DS1062a 3mg/kg组(T/C＝49.98％,TGI＝60.23％,p<0.001)的平均肿瘤体积分别为697mm^3和658mm^3,它们都能够明显抑制肿瘤生长。

[0831] 效果实例3.1.3ADC-1针对人乳腺癌BR-05-0028的体内功效的评估

[0832] 人乳腺癌BR-05-0028模型(IHC 3+)来源于在临床手术中切除的肿瘤样品。将P0代的肿瘤样品接种至裸小鼠体内,并且本实例中使用的肿瘤组织是P5代。将约30mm^3体积的肿瘤组织皮下接种至6-8周龄的SPF雌性BALB/c裸小鼠的右后背中。接种肿瘤组织之后28天,当平均肿瘤体积是约171mm^3时,将动物随机分成媒剂对照组、IMMU-132 5mg/kg组、DS1062a 5mg/kg组、ADC-1 5mg/kg组,其中每组6只动物。使用与作用实例3.1.1类似的方法评估ADC-1的体内功效,并且结果示于图10和表15中。

[0833] 表15ADC-1对BR-05-0028小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0834]

用药组	肿瘤体积 (mm^3) 第0天	肿瘤体积 (mm^3) 第21天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	171 ± 26	1,576 ± 362	--	--	--
IMMU-132(BIW*6，5 mg/kg)	171 ± 29	5 ± 2	0.35	111.76	0.037
DS1062a(单次剂量，5 mg/kg)	171 ± 23	8 ± 1	0.48	111.60	0.037
ADC-1(单次剂量，5 mg/kg)	171 ± 25	4 ± 2	0.23	111.88	0.037
ADC-1(单次剂量，10 mg/kg)	171 ± 22	4 ± 1	0.23	111.88	0.037

[0835] 结论

[0836] 用药21天之后,IMMU-132 5mg/kg组(T/C＝0.35％,TGI＝111.76％,p＝0.037)、DS1062a 5mg/kg组(T/C＝0.48％,TGI＝111.60％,p＝0.037)、ADC-1 5mg/kg组(T/C＝0.23％,TGI＝111.88％,p＝0.037)和ADC-1 10mg/kg组(T/C＝0.23％,TGI＝111.88％,p＝0.037)都能够明显抑制肿瘤生长。

[0837] 效果实例3.2ADC-2和ADC-3的体内功效的评估

[0838] 效果实例3.2.1ADC-2和ADC-3针对BxPC-3细胞的体内功效的评估

[0839] 细胞接种之后6天,当平均肿瘤体积是约151mm^3时,将动物随机分成媒剂对照组、DS1062a 3mg/kg组、ADC-1 3mg/kg组、ADC-2 3mg/kg组和ADC-3 3mg/kg组,其中每组6只动物。使用与作用实例3.1.1类似的方法评估ADC-2和ADC-3的体内功效,并且结果示于图11和表16中。

[0840] 表16ADC-2和ADC-3对BxPC-3小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0841]

用药组	肿瘤体积 (mm^3) 第0天	肿瘤体积 (mm^3) 第28天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	151 ± 13	906 ± 82	--	-	--
ADC-1，3 mg/kg	151 ± 11	355 ± 80	38.20	72.94	0.005
ADC-2，3 mg/kg	151 ± 12	116 ± 21	12.72	104.54	0.001
ADC-3，3 mg/kg	151 ± 13	225 ± 51	23.44	90.25	0.001
DS1062a，3 mg/kg	151 ± 12	540 ± 74	58.49	48.52	0.049

[0842] 结论

[0843] 用药28天之后,ADC-2 3mg/kg组(T/C＝12.72％,TGI＝104.54％,p＝0.001)和DS1062a 3mg/kg组(T/C＝58.49％,TGI＝48.52％,p＝0.049)的平均肿瘤体积分别为116mm^3和540mm^3,这表明ADC-2 3mg/kg组能明显抑制肿瘤生长。

[0844] 效果实例3.2.2ADC-2和ADC-3针对NCI-N87胃癌细胞的体内功效的评估

[0845] 将实例3.2.1中的BxPC-3胰腺癌细胞替换为NCI-N87胃癌细胞,并且在细胞接种之后8天,当平均肿瘤体积是约188mm^3时,将动物随机分成媒剂对照组、DS1062a 3mg/kg组、ADC-1 3mg/kg组、ADC-2 3mg/kg组和ADC-3 3mg/kg组,其中每组6只动物。使用与作用实例3.2.1类似的方法评估ADC-2的体内功效,并且结果示于图12和表17中。

[0846] 表17ADC-2对NCI-N87小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0847]

用药组	肿瘤体积(mm^3) 第0天	肿瘤体积(mm^3) 第28天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	189±8	634±84	--	--	--
ADC-2，3 mg/kg	188±11	89±21	14.08	122.25	<0.001
ADC-3，3 mg/kg	188±9	212±21	33.43	94.72	<0.001
ADC-1，3 mg/kg	189±10	293±63	46.15	76.62	<0.001
DS1062a，3 mg/kg	188±11	255±35	40.30	84.96	<0.001

[0848] 结论

[0849] 用药28天之后,ADC-2 3mg/kg组(T/C＝14.08％,TGI＝122.25％,p<0.001)、ADC-3 3mg/kg组(T/C＝33.43％,TGI＝94.72％,p<0.001)、ADC-1 3mg/kg组(T/C＝46.15％,TGI＝76.62％,p<0.001)和DS1062a 3mg/kg组(T/C＝40.30％,TGI＝84.96％,p<0.001)的平均肿瘤体积分别为89、212、293和255mm^3,这表明所有测试药物都能明显抑制NCI-N87肿瘤生长。

[0850] 效果实例3.2.3ADC-2和ADC-3针对人咽鳞状细胞癌FaDu的体内功效的评估

[0851] 将实例3.2.1中的BxPC-3细胞替换为人咽鳞状细胞癌FaDu,并在细胞接种之后11天,当平均肿瘤体积是约123mm^3时,将动物随机分成媒剂对照、DS1062a 3mg/kg组、ADC-1 3mg/kg组、ADC-2 3mg/kg组和ADC-2 3mg/kg组,其中每组6只动物。使用与作用实例3.2.1类似的方法评估ADC-2的体内功效,并且结果示于图13.1和表18中。

[0852] 表18ADC-2对FaDu小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0853]

用药组	肿瘤体积 (mm^3) 第0天	肿瘤体积 (mm^3) 第28天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	123±12	1,676±211	--	--	--
ADC-2，3 mg/kg	123±12	0±0	0.00	107.90	0.003
ADC-3，3 mg/kg	123±10	4±3	0.25	107.63	0.003
ADC-1，3 mg/kg	123±13	21±6	1.23	106.59	0.003
DS1062a，3 mg/kg	123±13	28±14	1.68	106.11	0.003

[0854] 结论

[0855] 用药28天之后,ADC-2 3mg/kg组(T/C＝0.00％,TGI＝107.90％,p＝0.003)、ADC-3 3mg/kg组(T/C＝0.25％,TGI＝107.63％,p＝0.003)、ADC-1 3mg/kg组(T/C＝1.23％,TGI＝106.59％,p＝0.003)和DS1062a 3mg/kg组(T/C＝1.68％,TGI＝106.11％,p＝0.003)的平均肿瘤体积分别为0、4、21和28mm^3,这表明所有测试药物都能明显抑制FaDu肿瘤生长。此外,在实验结束时,ADC-2 3mg/kg组中的6只小鼠和ADC-3 3mg/kg组中的3只小鼠分别出现肿瘤完全消退。

[0856] 效果实例3.2.4ADC-2针对MDA-MB-468的体内功效的评估

[0857] 在37℃和含0％ CO_2的空气环境中,将MDA-MB-468肿瘤细胞(ATCC,HTB-132)在体外以单层培养物形式维持在补充有10％胎牛血清和1％抗生素-抗霉菌素的L-15培养基中。收集在指数生长期中生长的细胞并对其计数以用于肿瘤接种。对于体内抗肿瘤功效研究,将含10×10^6个MDA-MB-468人乳腺癌细胞(Trop2阳性)的0.2mL含基质胶的PBS(1:1)皮下接

种于BALB/c裸小鼠的右侧腹中。24天之后,当肿瘤体积平均达到187mm^{3}时,对荷瘤小鼠分组并静脉内施用0.5mg/kg、1.5mg/kg和4.5mg/kg的ADC-2、4.5mg/kg的Trodelvy和4.5mg/kg的DS1062a。每周两次用卡尺测量肿瘤体积。使用肿瘤体积计算T/C和TGI值。

[0858] 结论

[0859] 用药35天之后,ADC-2 4.5mg/kg组为:T/C＝0.00％,TGI＝137.93％;DS1062a4.5mg/kg组为T/C＝1.35％,TGI＝136.06％;Trodelvy 4.5mg/kg组为T/C＝78.73％＝。结果示于图13.2和下表中。ADC-2显示出明显优于Trodelvy的功效且略优于DS1062a的功效。

[0860] ADC-2对MDA-MB-468小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0861]

处理	N	肿瘤体积(mm^3) 第35天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	6	678 ± 68	--	--	--
Trodelvy，4.5 mg/kg	6	535 ± 60	78.73	29.24	0.701
DS1062a，4.5 mg/kg	6	9 ± 9	1.35	136.06	0.001
ADC-2，0.5 mg/kg	5	588 ± 85	86.04	18.65	0.975
ADC-2，1.5 mg/kg	6	202 ± 41	29.77	96.85	0.004
ADC-2，4.5 mg/kg	6	0 ± 0	0.00	137.93	0.002

[0862] 效果实例3.3ADC-5和ADC-6的体内功效的评估

[0863] 效果实例3.3.1ADC-5和ADC-6针对BxPC-3胰腺癌细胞的体内功效的评估

[0864] 细胞接种之后6天,当平均肿瘤体积是约159mm^{3}时,将动物随机分成媒剂对照组、ADC-5 3mg/kg组、ADC-6 3mg/kg组和DS1062a 3mg/kg组,其中每组6只动物。使用与作用实例3.1.1类似的方法评估ADC-5和ADC-6的体内功效,并且结果示于图14和表19中。

[0865] 表19ADC-5和ADC-6对BxPC-3小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0866]

用药组	肿瘤体积(mm^3) 第0天	肿瘤体积(mm^3) 第42天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	159 ± 5	1,088 ± 145	--	--	--
ADC-5，3 mg/kg	159 ± 7	8 ± 7	0.75	116.20	0.003
ADC-6，3 mg/kg	159 ± 9	27 ± 11	2.48	114.17	0.003
DS1062a，3 mg/kg	159 ± 11	302 ± 73	27.69	84.60	0.007

[0867] 结论

[0868] 用药42天之后,ADC-5 3mg/kg组(T/C＝0.75％,TGI＝116.20％,p＝0.003)、ADC-6 3mg/kg组(T/C＝2.48％,TGI＝114.17％,p＝0.003)和DS1062a 3mg/kg组(T/C＝27.69％,TGI＝84.60％,p＝0.007)的平均肿瘤体积分别为8mm^3、27mm^{3}和302mm^3,这表明所有测试药物都能明显抑制肿瘤生长;ADC-5和ADC-6的抑制作用明显优于DS1062a的抑制作用。

[0869] 效果实例3.3.2ADC-5和ADC-6针对NCI-N87胃癌细胞的体内功效的评估

[0870] 将实例3.3.1中的BxPC-3胰腺癌细胞替换为NCI-N87胃癌细胞,并且在细胞接种之后6天,当平均肿瘤体积是约196mm^{3}时,将动物随机分成媒剂对照组、ADC-5 3mg/kg组、ADC-

6 3mg/kg组和DS1062a 3mg/kg组,其中每组6只动物。使用与作用实例3.3.1类似的方法评估ADC-5和ADC-6的体内功效,并且结果示于图15和表20中。

[0871] 表20ADC-5和ADC-6对NCI-N87小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0872]

用药组	肿瘤体积(mm^3) 第0天	肿瘤体积(mm^3) 第42天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	196 ± 11	1,226 ± 102	--	--	--
ADC-5，3 mg/kg	196 ± 15	133 ± 51	10.88	106.06	< 0.001
ADC-6，3 mg/kg	196 ± 12	48 ± 19	3.89	114.36	< 0.001
DS1062a，3 mg/kg	196 ± 14	437 ± 89	35.67	76.58	< 0.001

[0873] 结论

[0874] 用药42天之后,ADC-5 3mg/kg组(T/C＝10.88％,TGI＝106.06％,p<0.001)、ADC-6 3mg/kg组(T/C＝3.89％,TGI＝114.36％,p<0.001)和DS1062a 3mg/kg组(T/C＝35.67％,TGI＝76.58％,p<0.001)的平均肿瘤体积分别为133mm^3、48mm^3和437mm^3,这表明所有测试药物都能明显抑制肿瘤生长;ADC-5和ADC-6的抑制作用明显优于DS1062a的抑制作用。

[0875] 效果实例3.3.3ADC-5和ADC-6针对人咽鳞状细胞癌FaDu的体内功效的评估

[0876] 将实例3.3.1中的BxPC-3胰腺癌细胞替换为人咽鳞状细胞癌FaDu,并在细胞接种之后10天,当平均肿瘤体积是约119mm^3时,将动物随机分成媒剂对照组、ADC-5 2mg/kg组、ADC-6 2mg/kg组和DS1062a 2mg/kg组,其中每组6只动物。使用与作用实例3.3.1类似的方法评估ADC-5和ADC-6的体内功效,并且结果示于图16和表21中。

[0877] 表21ADC-5和ADC-6对FaDu小鼠异种移植肿瘤的抑制作用

[0878]

用药组	肿瘤体积(mm^3) 第0天	肿瘤体积(mm^3) 第31天	T/C (%)	TGI (%)	*p* 值
媒剂	119 ± 10	1,911 ± 279	--	--	--
ADC-5，2 mg/kg	119 ± 11	217 ± 216	11.34	94.56	0.004
ADC-6，2 mg/kg	119 ± 12	1 ± 0	0.05	106.60	0.004
DS1062a，2 mg/kg	119 ± 11	296 ± 125	15.47	90.15	0.005

[0879] 结论

[0880] 用药31天之后,ADC-5 2mg/kg组(T/C＝11.34％,TGI＝94.56％,p＝0.004)、ADC-6 2mg/kg组(T/C＝0.05％,TGI＝106.60％,p＝0.004)和DS1062a 2mg/kg组(T/C＝15.47％,TGI＝90.15％,p＝0.005)的平均肿瘤体积分别为217mm^3、1mm^3和296mm^3,这表明所有测试药物都能明显抑制肿瘤生长;ADC-6的抑制作用明显优于DS1062a的抑制作用。

[0881] 效果实例4ADC-1的血清稳定性

[0882] 适量的Trop 2通过共价偶联与CNBr活化的琼脂糖微球体结合,形成固定的抗原。封闭之后,添加一定比例的与血浆一起预培育的稳定样品,并在振荡下培育。通过固定的抗原特异性捕获基质中的ADC-1和DS1062a(ADC药物)以形成固相抗原/抗体复合物,并通过洗涤去除未结合的物质。培育之后,使用N-糖苷酶切除ADC药物抗体中Fc区的偶联糖链,接着

通过甲酸洗脱回收ADC,并通过LC-MS检测DAR。结果示于图17中。

[0883] 结论

[0884] 结果显示,ADC-1的血清稳定性明显优于DS1062a的血清稳定性。

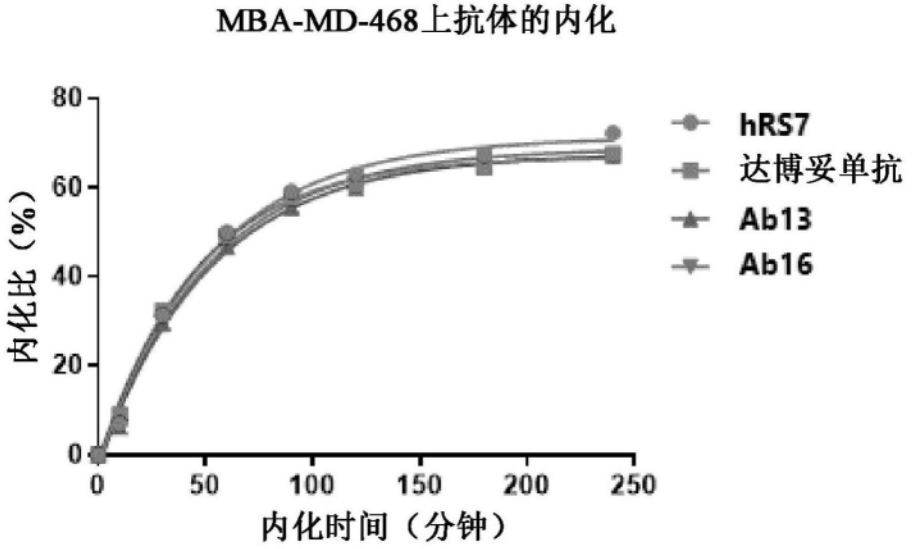

MBA-MD-468上抗体的内化
内化比（%）
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
内化时间（分钟）
hRS7
达博妥单抗
Ab13
Ab16

图1.1

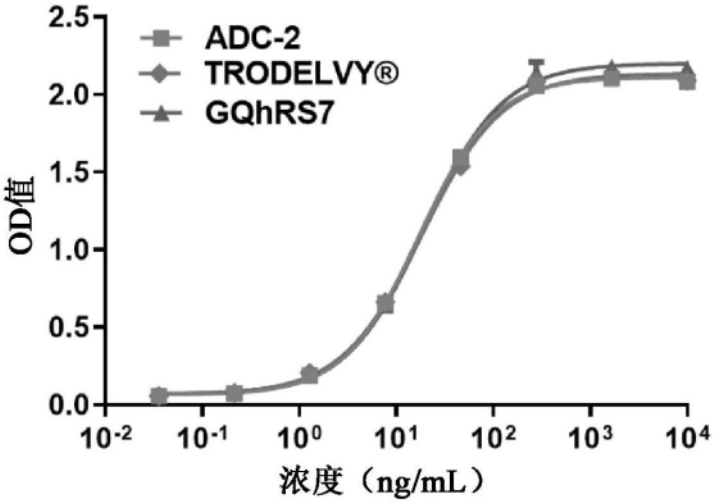

OD值
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-2
10-1
100
101
102
103
104
浓度（ng/mL）
ADC-2
TRODELVY®
GQhRS7

图1.2

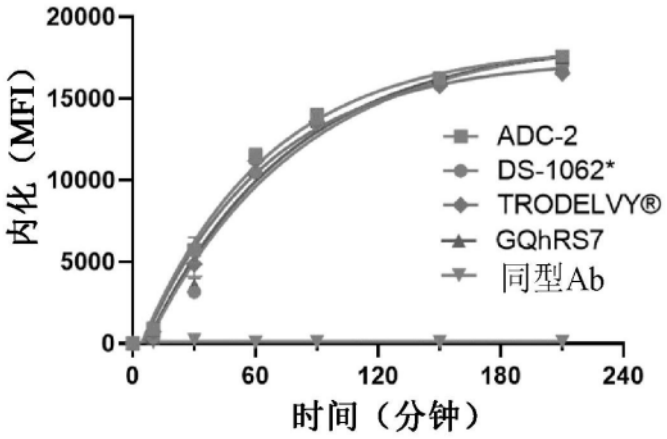

20000
15000
10000
5000
0
内化（MFI）
0
60
120
180
240
时间（分钟）
ADC-2
DS-1062*
TRODELVY®
GQhRS7
同型Ab

图1.3

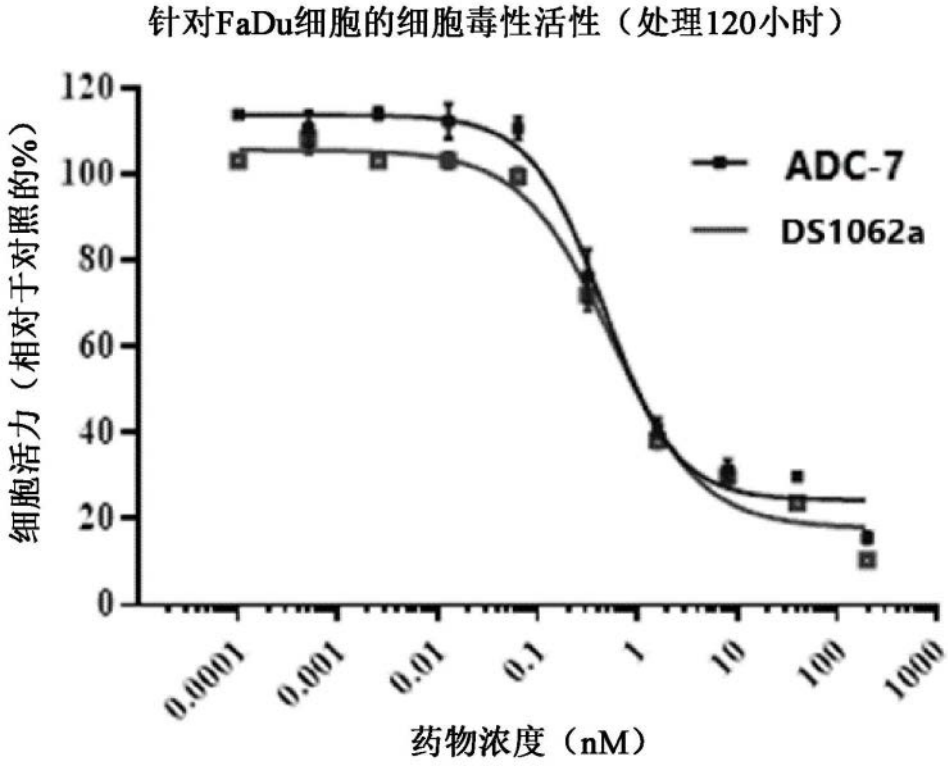

针对FaDu细胞的细胞毒性活性（处理120小时）
120
100
80
60
40
20
0
细胞活力（相对于对照的%）
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
药物浓度（nM）
ADC-7
DS1062a

图2

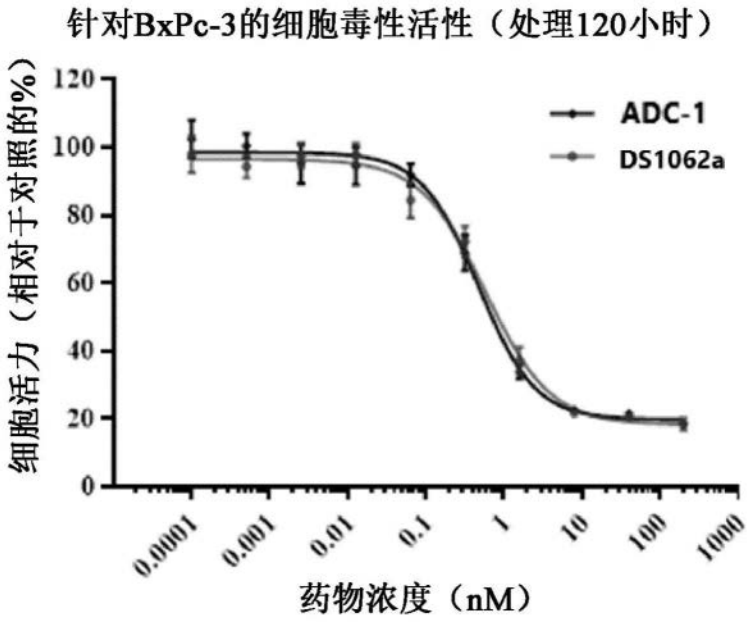

针对BxPc-3的细胞毒性活性（处理120小时）
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
ADC-1
DS1062a
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
药物浓度（nM）

图3

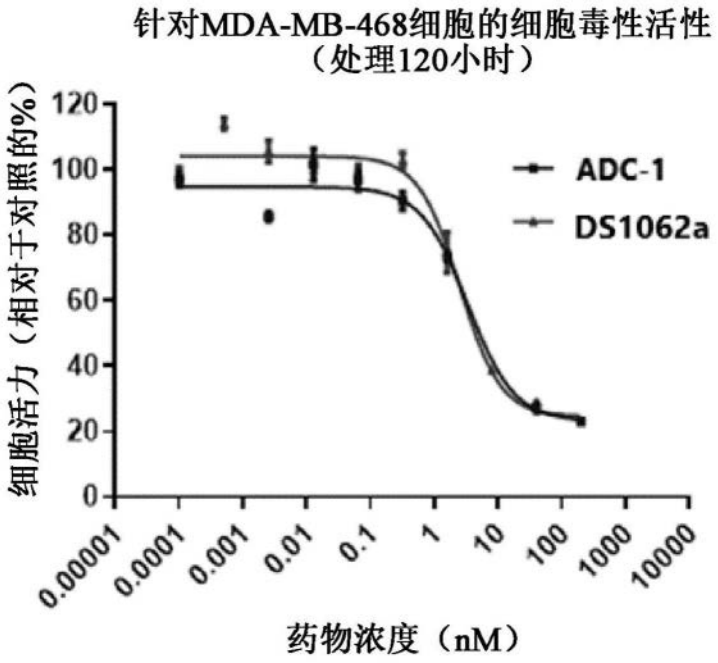

针对MDA-MB-468细胞的细胞毒性活性
（处理120小时）
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
ADC-1
DS1062a
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
药物浓度（nM）

图4

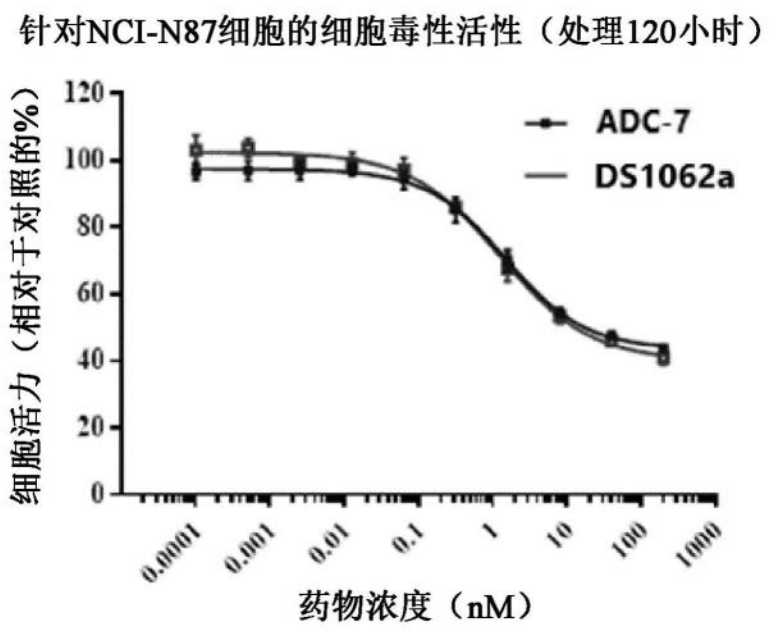

针对NCI-N87细胞的细胞毒性活性（处理120小时）
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
ADC-7
DS1062a
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
药物浓度（nM）

图5

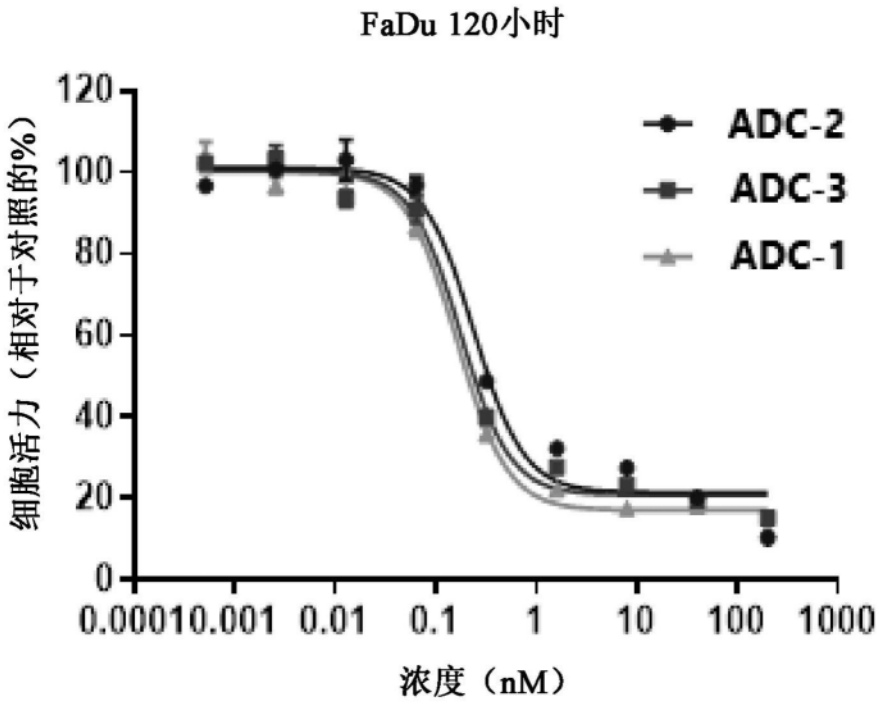

FaDu 120小时
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
ADC-2
ADC-3
ADC-1
0.00010.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度（nM）

图6

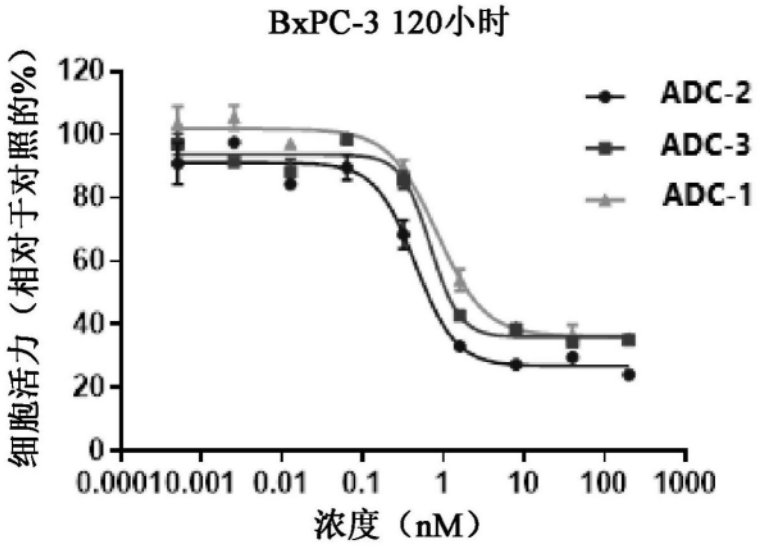

BxPC-3 120小时
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0.00010.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度（nM）
ADC-2
ADC-3
ADC-1

图7.1

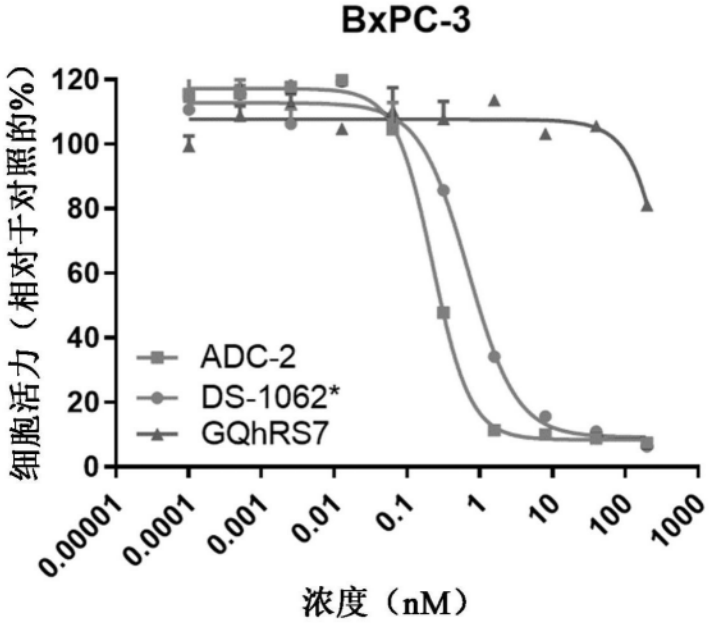

BxPC-3
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度（nM）
ADC-2
DS-1062*
GQhRS7

图7.2

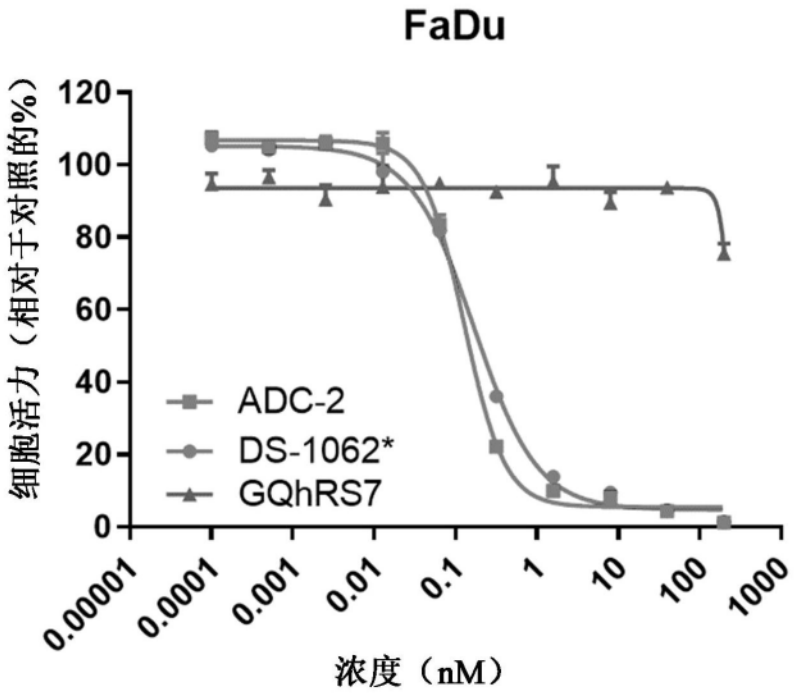

FaDu
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
ADC-2
DS-1062*
GQhRS7
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度（nM）

图7.3

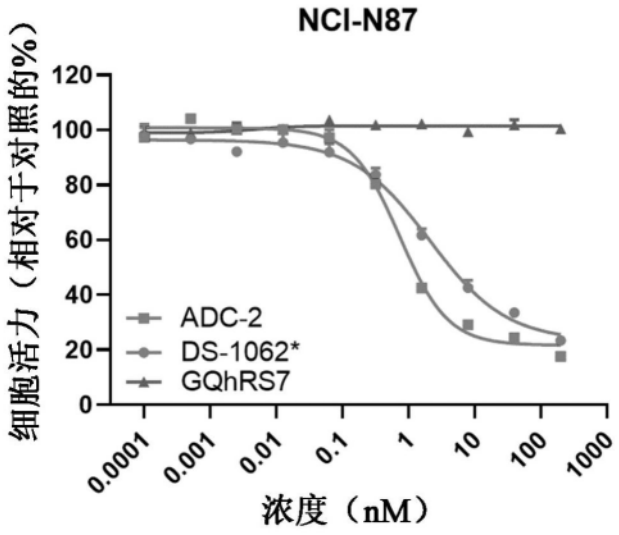

NCI-N87
细胞活力（相对于对照的%）
120
100
80
60
40
20
0
ADC-2
DS-1062*
GQhRS7
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度（nM）

图7.4

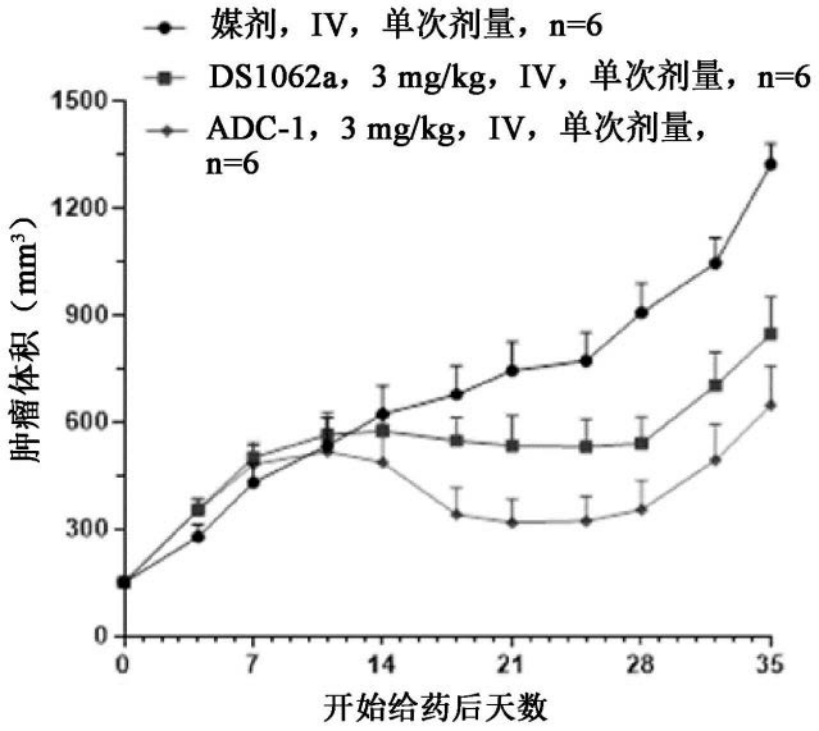

媒剂，IV，单次剂量，n=6
DS1062a，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-1，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
1500
1200
900
600
300
0
0
7
14
21
28
35
开始给药后天数

图8

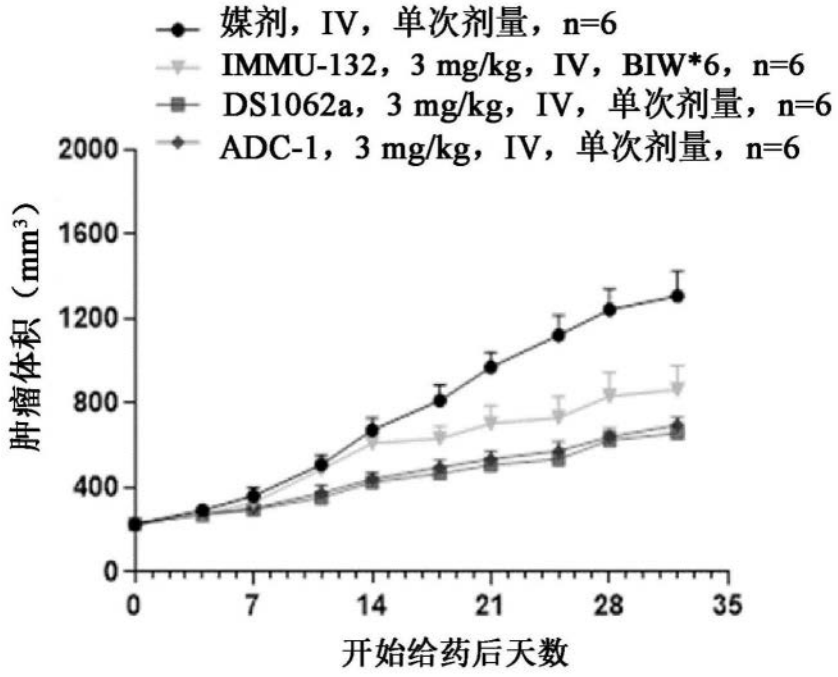

媒剂，IV，单次剂量，n=6
IMMU-132，3 mg/kg，IV，BIW*6，n=6
DS1062a，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-1，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
2000
1600
1200
800
400
0
0
7
14
21
28
35
开始给药后天数

图9

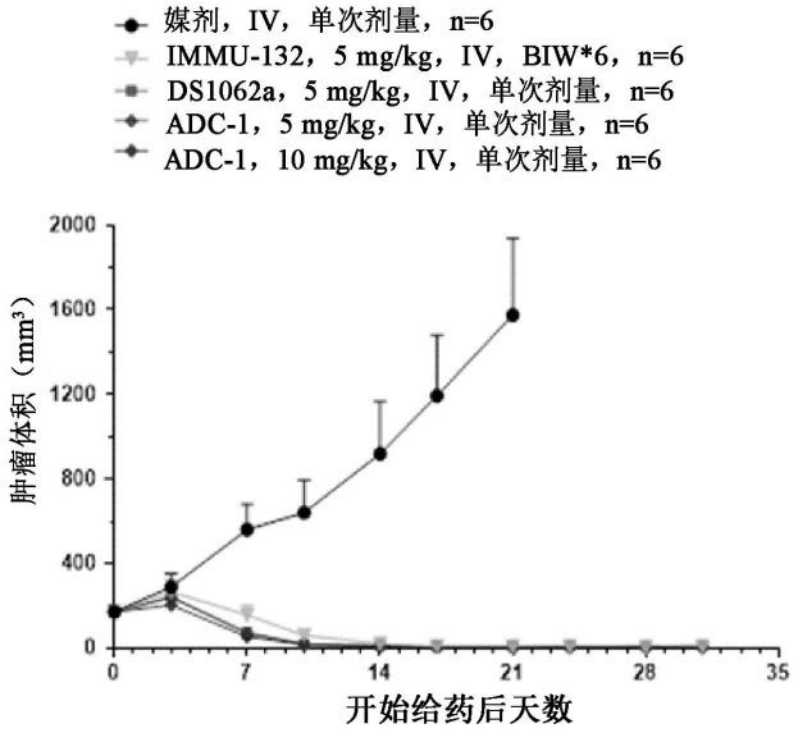

媒剂，IV，单次剂量，n=6
IMMU-132，5 mg/kg，IV，BIW*6，n=6
DS1062a，5 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-1，5 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-1，10 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
2000
1600
1200
800
400
0
0
7
14
21
28
35
开始给药后天数

图10

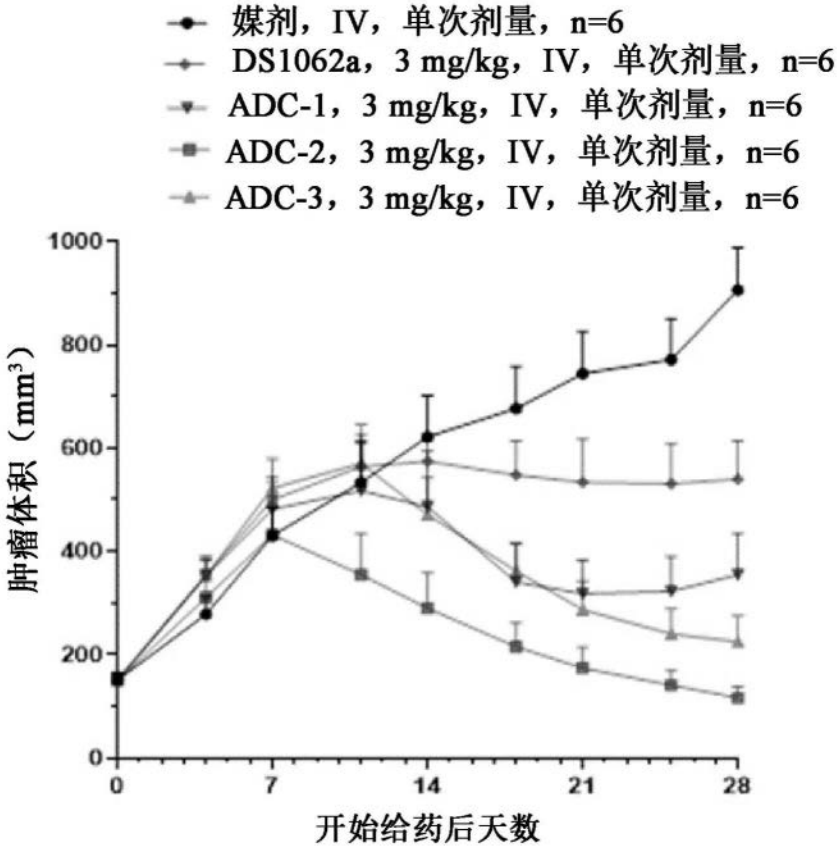

媒剂，IV，单次剂量，n=6
DS1062a，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-1，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-2，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-3，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
开始给药后天数

图11

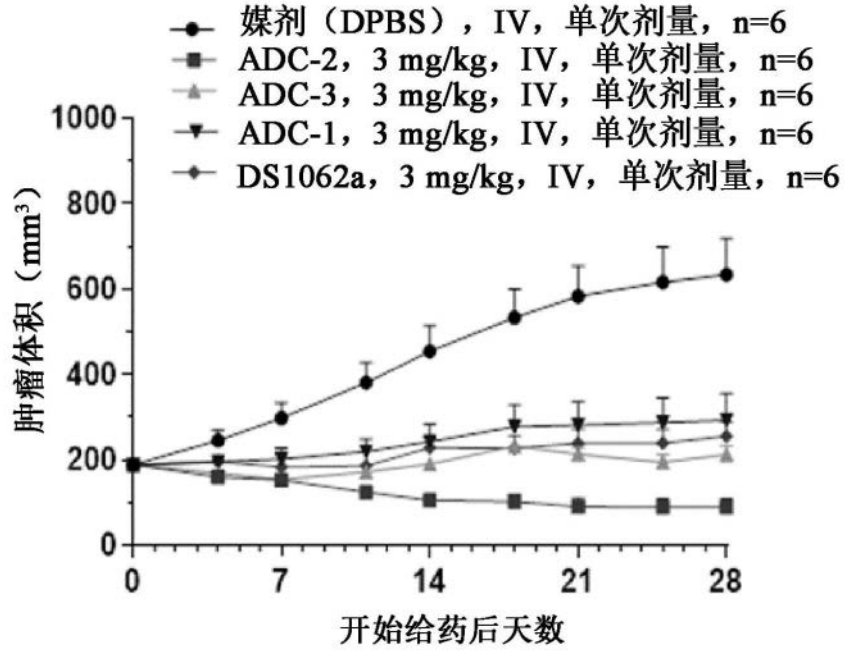

媒剂（DPBS），IV，单次剂量，n=6
ADC-2，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-3，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-1，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
DS1062a，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
开始给药后天数

图12

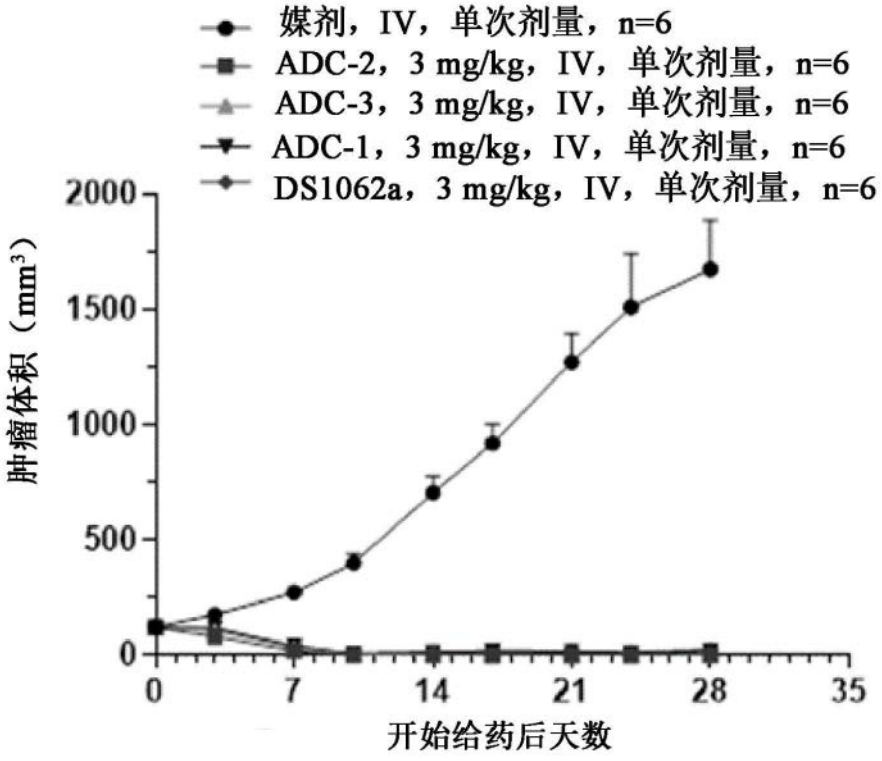

媒剂，IV，单次剂量，n=6
ADC-2，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-3，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-1，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
DS1062a，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
开始给药后天数

图13.1

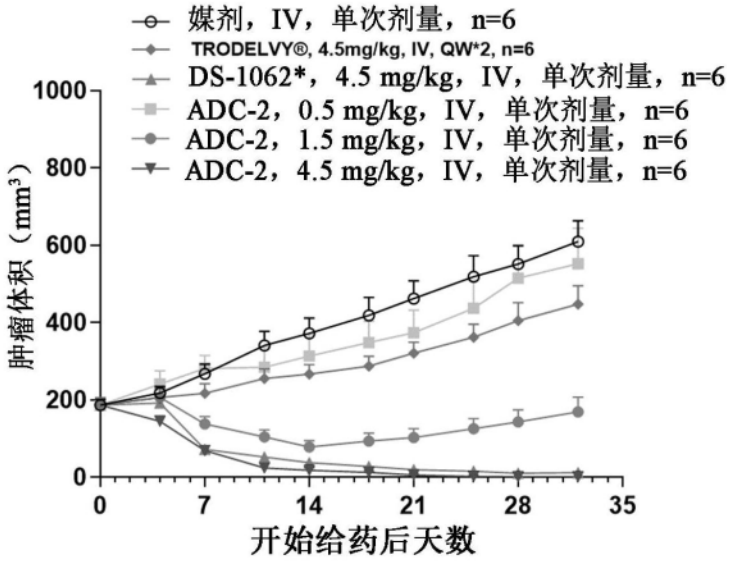

媒剂，IV，单次剂量，n=6
TRODELVY®, 4.5mg/kg, IV, QW*2, n=6
DS-1062*，4.5 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-2，0.5 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-2，1.5 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-2，4.5 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
1000
800
600
400
200
0
0
7
14
21
28
35
开始给药后天数

图13.2

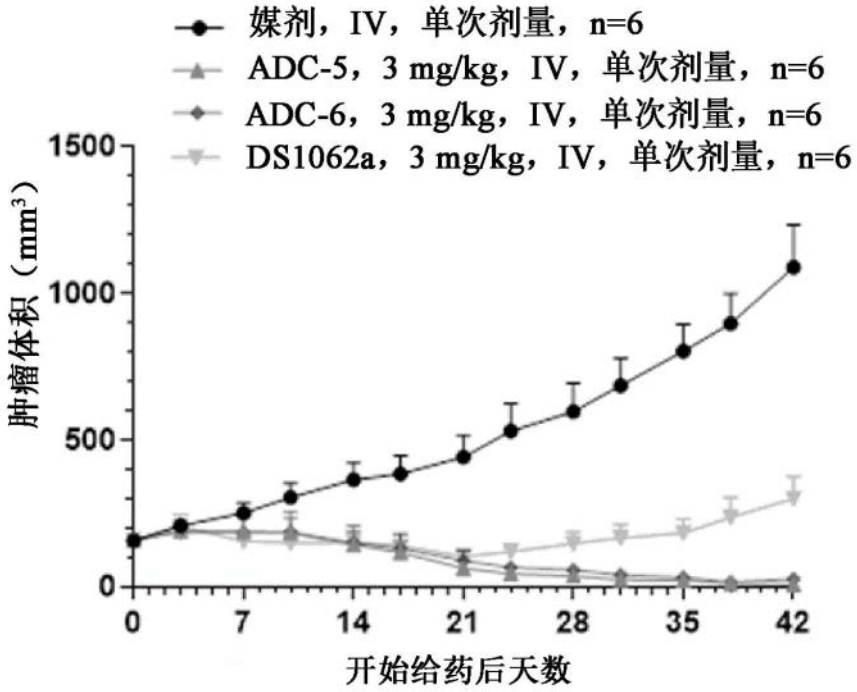

媒剂，IV，单次剂量，n=6
ADC-5，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-6，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
DS1062a，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
开始给药后天数

图14

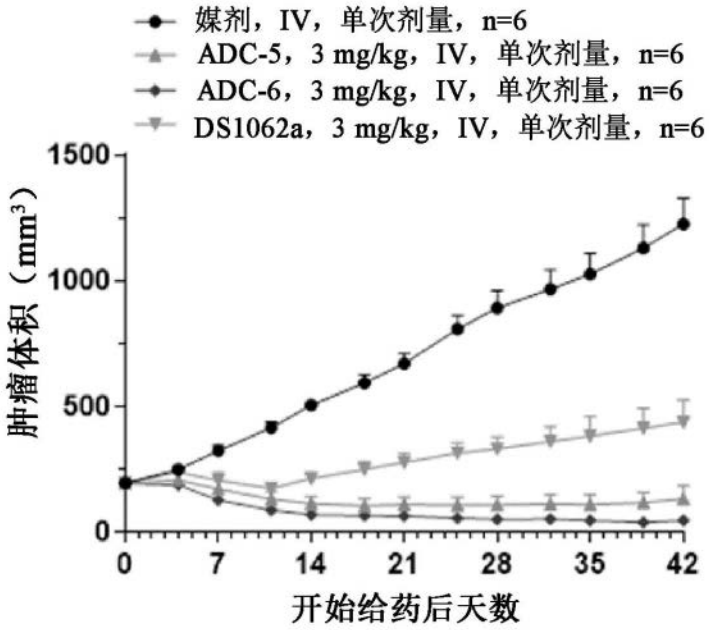

媒剂，IV，单次剂量，n=6
ADC-5，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-6，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
DS1062a，3 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
开始给药后天数

图15

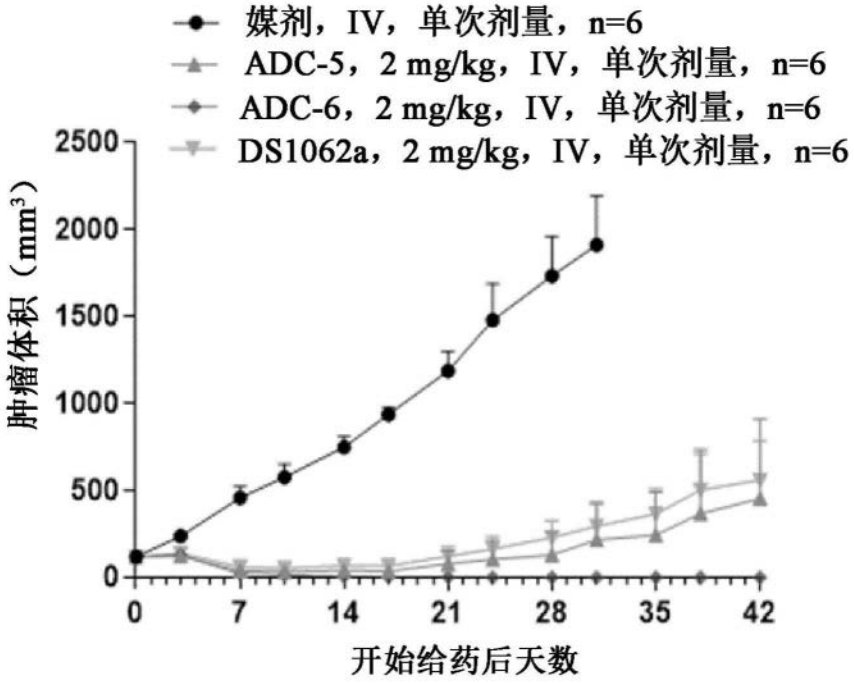

媒剂，IV，单次剂量，n=6
ADC-5，2 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
ADC-6，2 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
DS1062a，2 mg/kg，IV，单次剂量，n=6
肿瘤体积（mm³）
2500
2000
1500
1000
500
0
0
7
14
21
28
35
42
开始给药后天数

图16

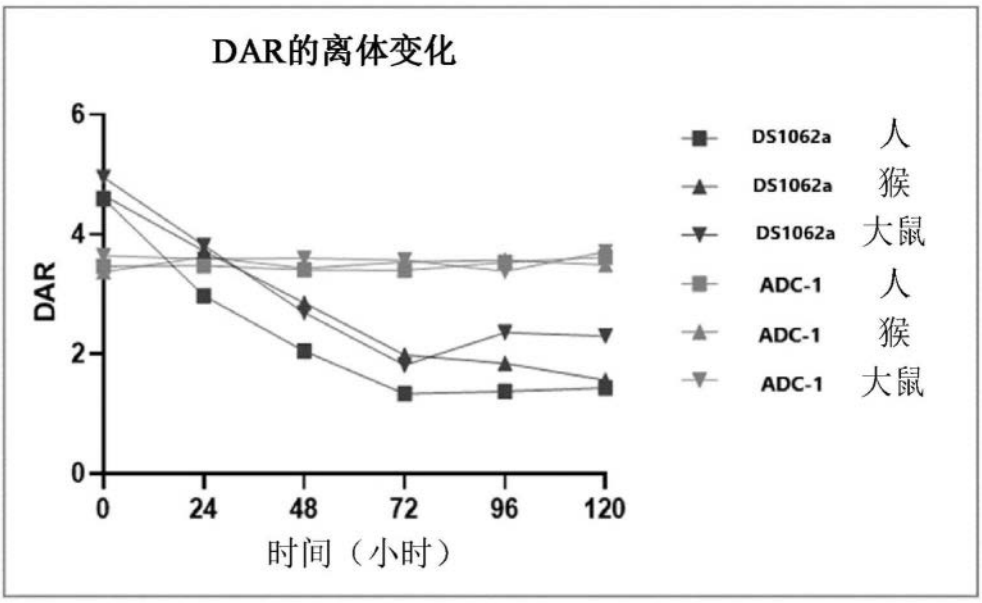

DAR的离体变化
DAR
6
4
2
0
0
24
48
72
96
120
时间（小时）
DS1062a 人
DS1062a 猴
DS1062a 大鼠
ADC-1 人
ADC-1 猴
ADC-1 大鼠

图17