一种抗体药物偶联物及其应用

技术领域

[01] 本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种基于一个或多个半胱氨酸残基或半胱氨酸衍生物残基作为药物连接载体形成的抗体药物偶联物及其应用，所述药物连接载体可根据需要在抗体的有限连接位点上同时偶联一个或多个药物。

背景技术

[02] 抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate，ADC)，是指通过化学连接子（Linker）将具有生物活性的药物（Drug）和抗体（Antibody）连接起来的一类生物药。ADC 就像是精确制导武器体系，其中具有生物活性的药物作为杀伤性弹药，在抗体的指引下，精准打击病变细胞。因此，ADC 结合了细胞毒药物分子的高效能和抗体高靶向性的双重优点。截止到 2019 年 7 月，全球仅批准了 6 种抗体偶联药物（表 1）。

表 1 已上市抗体药物偶联物

药品通用名	公司	上市时间	适应症
Brentuximab vedotin	Seattle、武田	2011 年	霍奇金淋巴瘤
Trastuzumab emtansine	基因泰克	2013 年	乳腺癌
Inotuzumab ozogamicin	辉瑞	2017 年	急性淋巴细胞白血病
Gemtuzumab ozogamicin	辉瑞	2017 年	急性髓性白血病
Moxetumomab pasudotox	阿斯利康	2018 年	毛细胞白血病
Polatuzumab vedotin-piiq	基因泰克	2019 年	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤

[03] 由于在抗体上选择的连接位点的非唯一性以及连接反应的复杂性，因此实际最终得到的 ADC 产品是一个抗体上连接药物数量不一，位点不一的 ADC 混合物，ADC 药物制备的非均一性对药物的生产、质量控制造成很大的挑战。在考虑产品均一性时，有一项重要的指标----DAR 值(drug-antibody ratio，药物抗体比)，即单位数量的抗体上所能携带的药物分子数量。如果平均 DAR 值偏小，则抗体上携带药物分子过少，会影响

整体药效。而如果平均 DAR 值偏大，抗体上负载了过多的药物分子，则会使 ADC 整体变得不稳定，改变其药代动力学参数，并有可能导致血浆清除率上升、半衰期缩短以及系统性药物毒性的增大。

[04] 目前 ADC 有三种经典的偶联方式，一种是氨基偶联、一种是巯基偶联、第三种是桥接偶联（cross-link）。

[05] 氨基偶联是将药物通过连接子偶联在抗体的赖氨酸（Lys）残基上，第一代 ADC 药物 Mylotarg 采用的就是氨基偶联的方式，但是 IgG 上包括了近百个赖氨酸，偶联的位置可能会发生在抗体轻链和重链上近 40 个外露的赖氨酸残基上，而且通过赖氨酸偶联每个抗体会偶联多个数量不等的小分子药物，因此通过氨基偶联获得的 ADC 药物高度异质混合，产品均一性极差，这严重影响药物的 PK/PD 和治疗窗口（参见 http://www.sohu.com/a/277791166_464404）。

[06] 巯基偶联是先将抗体中的链间二硫键打开形成游离的半胱氨酸（Cys）残基，再和能与半胱氨酸残基配对的连接子-药物复合物进行偶联，由于 IgG 上只有 4 对链间二硫键，链间二硫键被全部打开后会形成 8 个游离的半胱氨酸残基，因此通过单巯基偶联形成的 ADC，其平均 DAR 值为 0-8，尽管巯基偶联能够较好地控制每个抗体上连接的数量，但是链间二硫键的断去会极大的降低抗体的稳定性。

[07] 桥接偶联是在巯基偶联的基础上演变的一种新的偶联方式，同巯基偶联一样，它是先将抗体中的链间二硫键打开形成两个游离的半胱氨酸残基，之后再同时与这两个游离的半胱氨酸残基配对，由于一个抗体上只有 4 对链间二硫键，链间二硫键被全部打开后会形成 8 个游离的半胱氨酸残基，因此通过桥接偶联形成的 ADC，其平均 DAR 值为 0-4，与巯基偶联相比，桥接偶联既能更好的控制产品的均一性，又能大大的提供偶联后抗体的稳定性，但是桥接偶联方式的 DAR 值最大为 4，即一个抗体上最多会偶联 4 个药物，由于肿瘤细胞表面上抗原数量有限，有效的 ADC 活性所需的抗原表达水平根据不同抗原特性而变化。ADC 需要至少 10^4 个抗原/细胞，以确保能够递送致死数量的细胞毒性药物。理想情况下，ADC 的抗体部分所针对的抗原应在肿瘤细胞表面均匀表达且拷贝数较高（$>10^5$/细胞）。肿瘤细胞表面通常只有有限数量的抗原（大约 5000 到 10^6 个抗原/细胞），而 ADC 的平均 DAR 为 3.5-4（如 Brentuximab vedotin 的平均 DAR 值为 4、Trastuzumab emtansine 的平均 DAR 值为 3.5），输送到肿瘤细胞的药物量很低，因此对于肿瘤细胞的药效较低，这也被认为

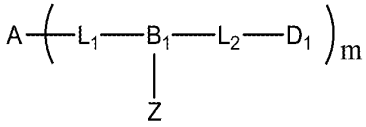
是 ADC 临床失败的主要原因之一。

[08] 基于肿瘤细胞表面只有有限数量的抗原，为了保证抗体所携带的有限数量的小分子药物能够有效的杀死肿瘤细胞，临床上往往采用毒性特别强的小分子药物。目前 ADC 使用的小分子药物主要有 auristatin、美登素（maytansine）、卡奇霉素（calicheamicin）、多柔比星（doxorubicin）等几大类，这些小分子药物与传统的化疗药物相比，对癌细胞具备更强的杀伤效力，通常平均四到六个分子的剂量就可实现对靶细胞杀伤，但是，这些毒性特别强的小分子药物在体内一旦出现脱靶，对患者的伤害是致命的，除此之外，由于这些小分子药物的毒性特别强（如 DM1 对很多细胞的 IC_{50} 约为 10^{-11}mol/L、DM4 的 IC_{50} 约为 10^{-12}mol/L(文献 1：Widdison WC, Wilhelm SD, Cavangh EE, et al. Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer [J]. J Med Chem, 2006, 49: 4392-4408;文献 2： Lambert JM. Antibody-maytansinoid conjugates: a new strategy for the treatment of cancer [J]. Drugs Future, 2010, 35: 471-480.）、MMAE 的 IC_{50} 约为 10^{-11}-10^{-9}mol/L），因此如果出现脱靶及药物提前释放等情况，则对患者存在极大的风险。FDA 对收到的 20 个 ADC 研究中新药（invesligational new drugs，IND）进行汇总分析，发现 ADC 药物在动物中表现出来的毒性主要为造血系统毒性、肝毒性和生殖毒性，部分还存在皮肤毒性和肾毒性，其中造血系统、肝和生殖系统的毒性与小分子细胞毒药物直接相关(文献 3：Saber H, Leighton JK. An FDA oncology analysis of antibody- drug conjugates［J］. Regul Toxicol Pharmacol，2015，71（3）：444-452)。而如果选择毒性偏低的小分子药物，则往往因为有效荷载的小分子药物数量过低，产生的药效过低进而导致临床失败。

发明内容

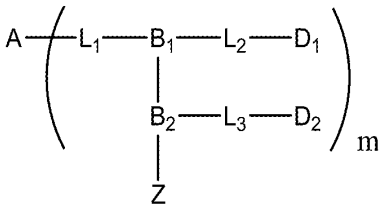
[09] 为了解决上述问题，本发明提供了一种能够偶联更多个活性单元（Drug）的新型抗体药物偶联物，本发明的技术方案如下所示：

[10] 本发明提供了一种如式（Ⅰ）—（Ⅳ）所示的抗体药物偶联物，



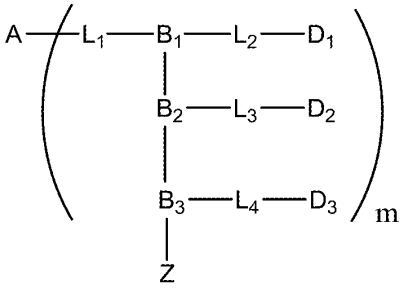
（Ⅰ）

或



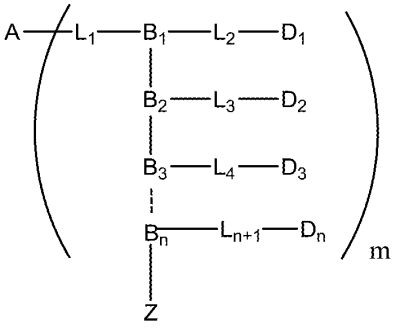
（II）

或



（III）

或



（IV）

其中：

A 为任一抗体或其功能性结合片段；

B_1、B_2、B、……、B_n 为半胱氨酸残基或半胱氨酸衍生物残基，可相同也可以不同，B_1 与 B_2、B_2 与 B_3、……、B_{n-1} 与 B_n 通过脱水缩合形成的肽键连接；

L_1、L_2、L_3、L_4、……、L_{n+1} 为任一连接单元且相互独立，可相同也可以不同，所述 L_1 与 B_1 中氨基端共价相连，所述 L_2 与 B_1、L_3 与 B_2、L_4 与 B_3、……、L_{n+1} 与 B_n 是通过巯基共价连接，所述 L_2 与 D_1、L_3 与 D_2、L_4 与 D_3、……、L_{n+1} 与 D_n 共价相连；

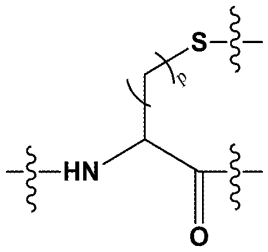
D_1、D_2、D_3、.....、D_n 是任一活性药物单元且相互独立，可相同也可以不同；

Z 为任一基团，共价连接于式（Ⅰ）中 B_1 的羰基上或式（Ⅱ）中 B_2 的羰基上或式（Ⅲ）中 B_3 的羰基上或式（Ⅳ）中 B_n 的羰基上；

n 为大于或等于 4 的整数，代表连接活性药物单元支链的数量；

m 选自 1、2、3、4、5、6、7、8。

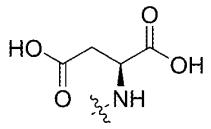
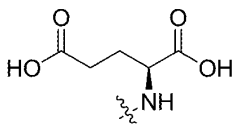
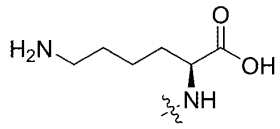
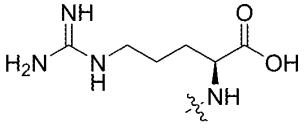
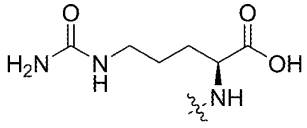
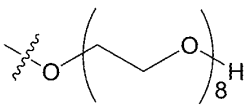
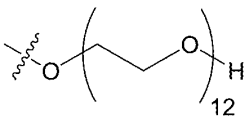
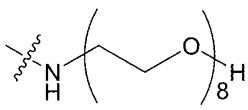
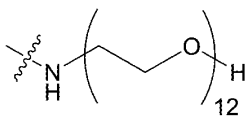
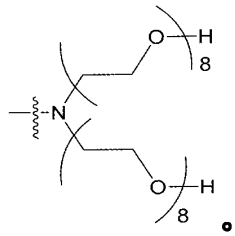
[11] 进一步的，所述的 B_1、B_2、B_3、.....、B_n 的结构分别如式（V）所示：



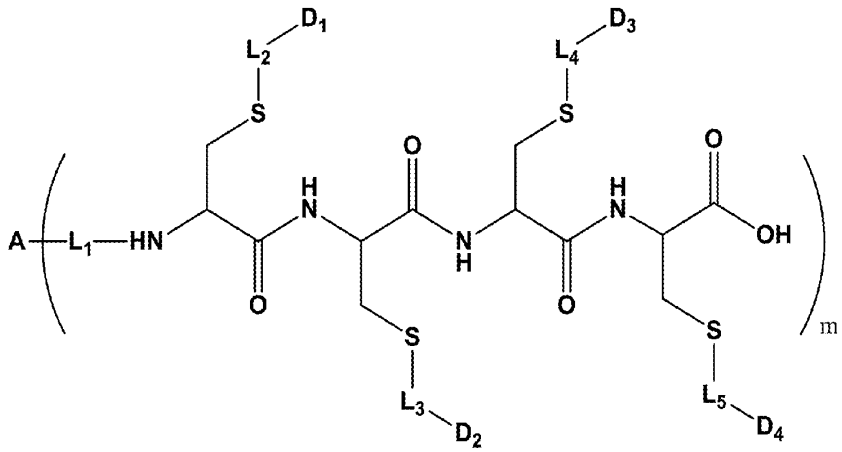
(V)

其中，p 选自 1、2、3、4、5、6、7、8。

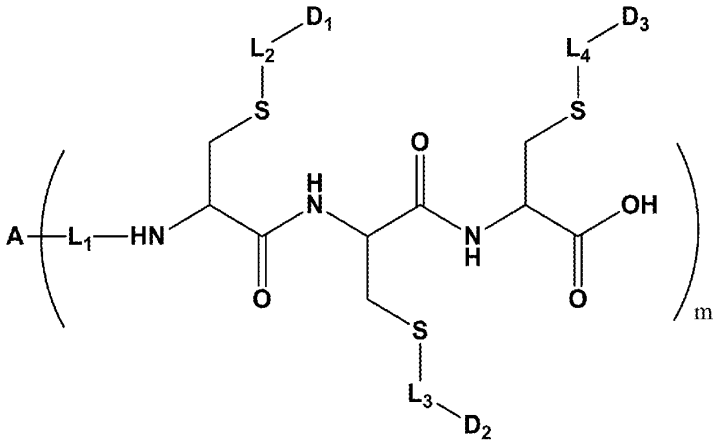
[12] 进一步的，所述的 Z 选自：

OH、SH、NH_2、、、、、、、、、、。

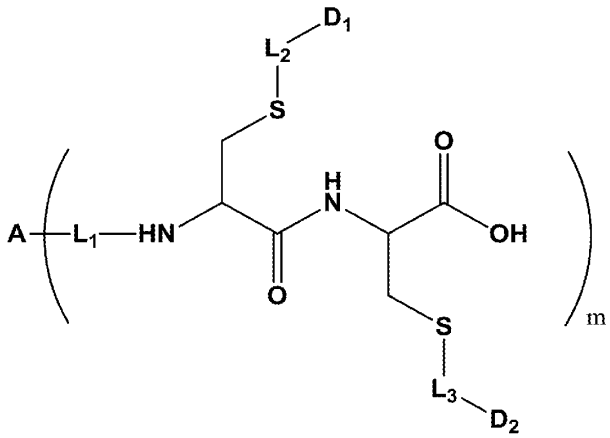
[13] 进一步的，所述的抗体药物偶联物具有式（VI-1）-（VI-5）所示的结构：



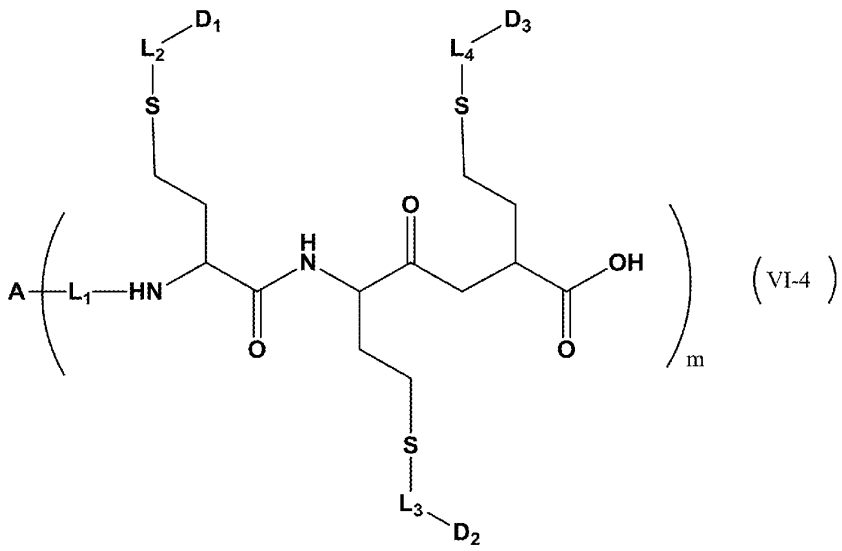
(VI-1)



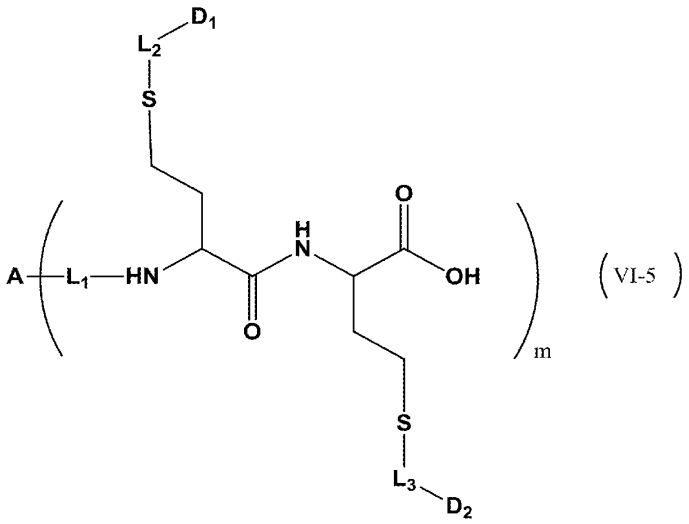
(VI-2)



(VI-3)



(VI-4)



(VI-5)

其中：

A 为任一抗体或其功能性结合片段；

L_1、L_2、L_3、L_4、L_5 为任一连接单元且相互独立，可相同也可以不同；

D_1、D_2、D_3、D_4 是任一活性药物单元且相互独立，可相同也可以不同；

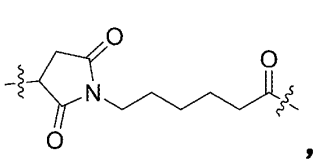
m 选自 1、2、3、4、5、6、7、8。

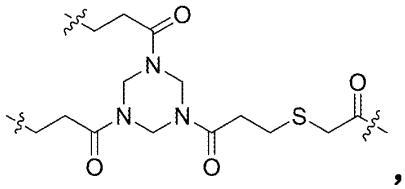
[14] 进一步的，所述 L_1 与抗体上氨基残基或巯基残基共价连接；优选的，所述 L_1 与抗体上的巯基残基共价连接；更优选的，所述 L_1 与抗体上的链间二硫健打开后形成的巯基残基共价连接。

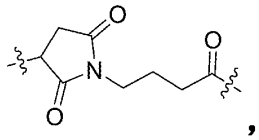
[15] 进一步的，所述 L_1、L_2，L_3，L_4、……、L_{n+1} 为可裂解连接子、可裂解连接子组合或不可裂解连接子。

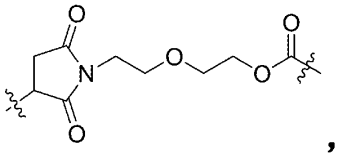
[16] 更进一步的，所述的可裂解的连接子包括肽单元和多硫键，所述的肽单元包含 2-20 个氨基酸，优选的所述的肽单元选自由-缬氨酸-瓜氨酸-（-Val-Cit-）、-甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸-（-Gly-Gly-Phe-Gly-）、-缬氨酸-丙氨酸-（-Val-Ala-）、-缬氨酸-赖氨酸-（-Val-Lys-）、-缬氨酸-精氨酸-（-Val-Arg-）、-苯丙氨酸-瓜氨酸-（-Phe-Cit-）、-苯丙氨酸-赖氨酸-（-Phe-Lys-）、-苯丙氨酸-精氨酸-（-Phe-Arg-）及它们的组合；所述的多硫键包含 2-8 个硫原子，优选的所述的多硫键选自于二硫键（-S-S-）、三硫键（-S-S-S-）、四硫键（-S-S-S -S-）。

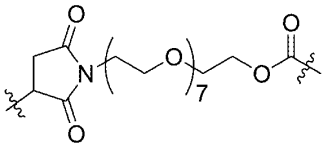
[17] 在某些具体的实施例中，所述的 L_1 可选自以下结构：

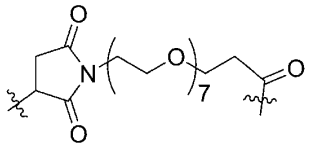

，

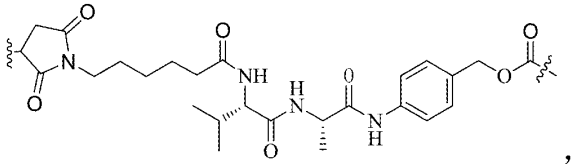

，

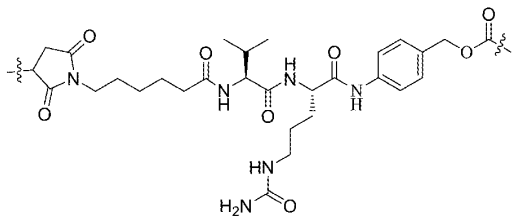

，

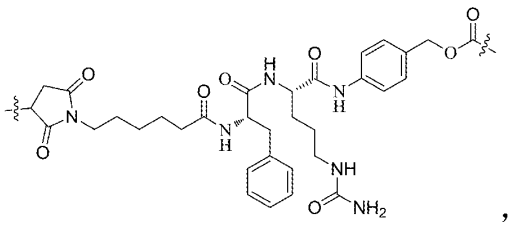

，

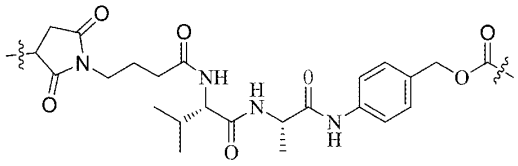

，

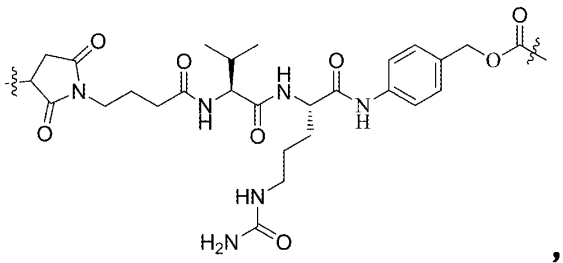

，

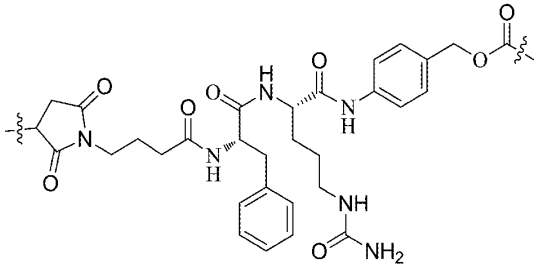

，

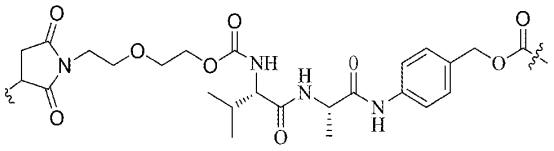

，

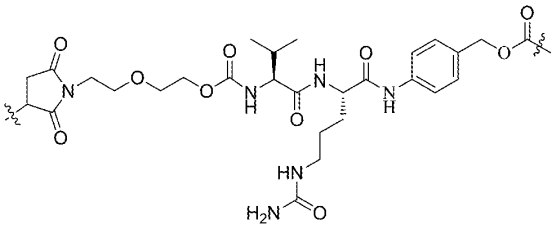

,

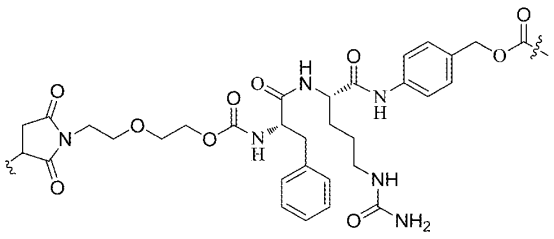

,

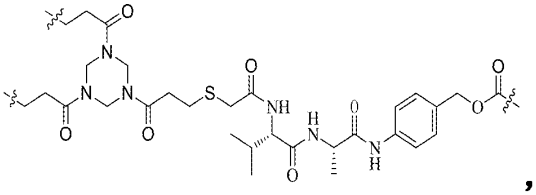

,

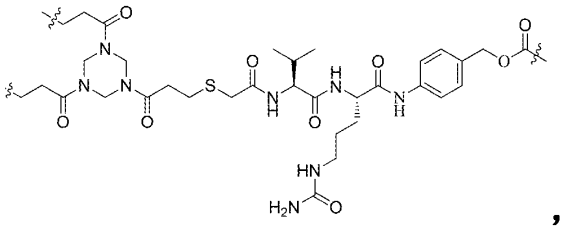

,

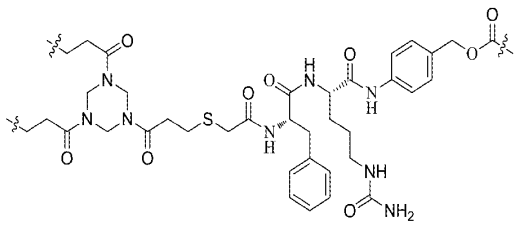

,

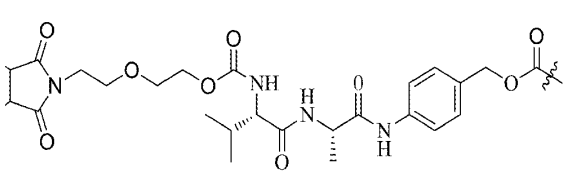

,

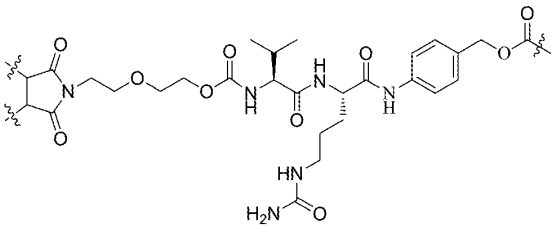

,

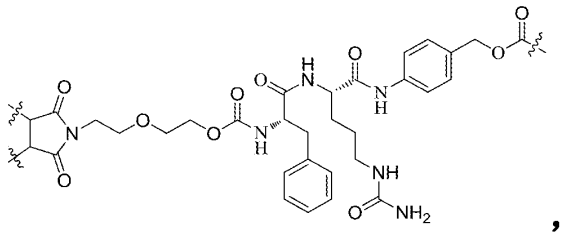

,

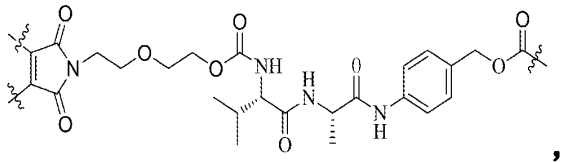

,

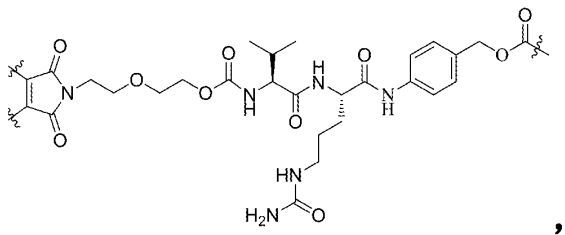

,

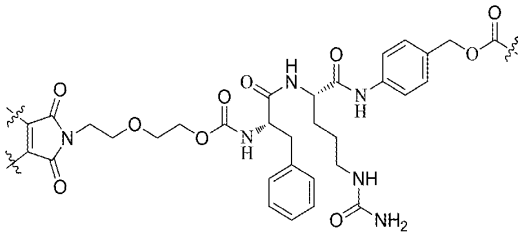

,

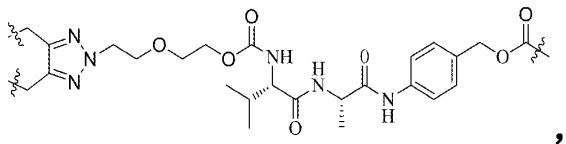

,

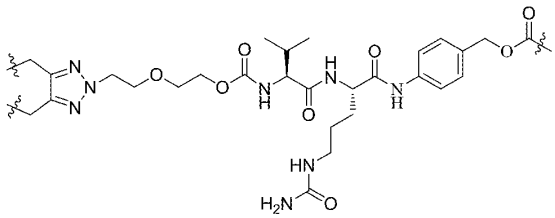

,

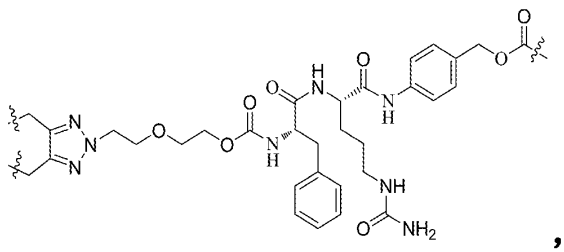

,

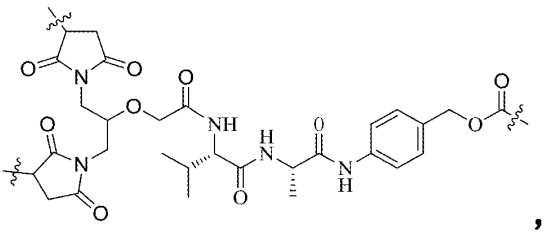

,

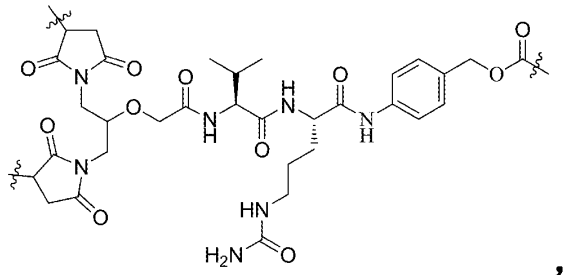

,

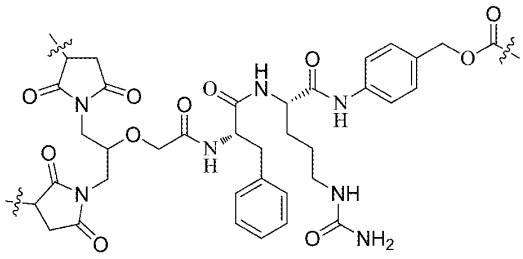

,

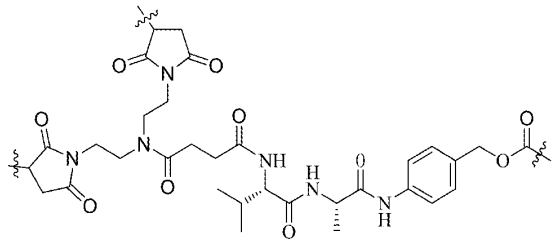
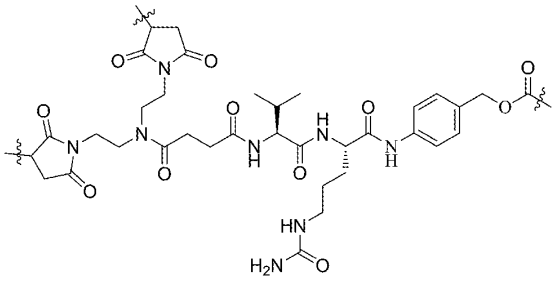
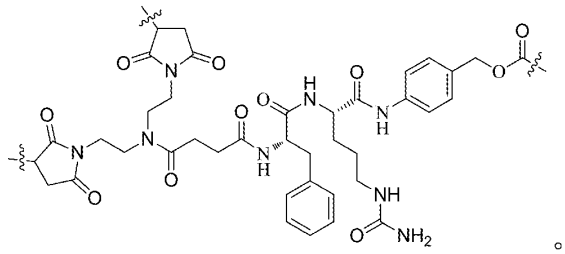

,


,

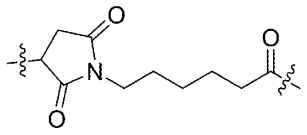
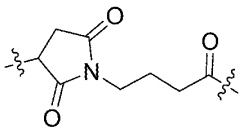
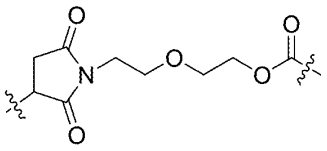
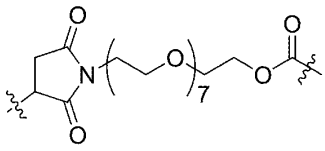
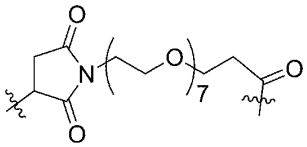
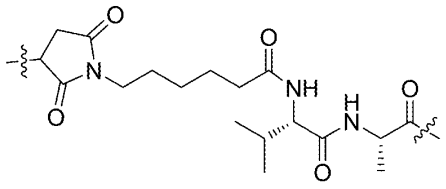
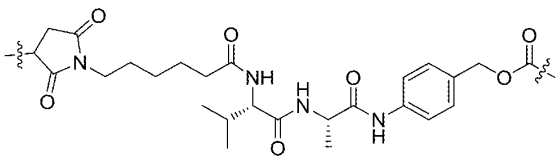
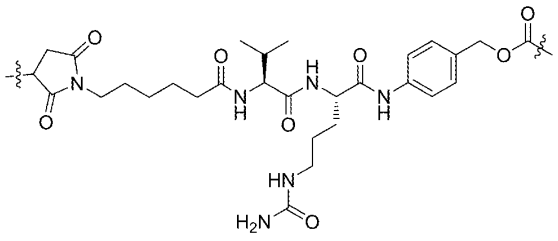

,

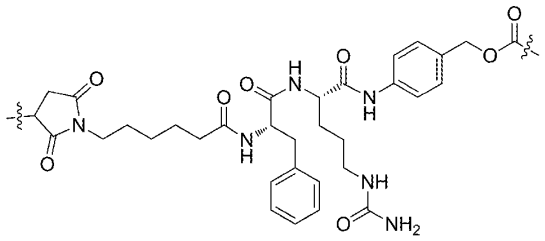

,


,

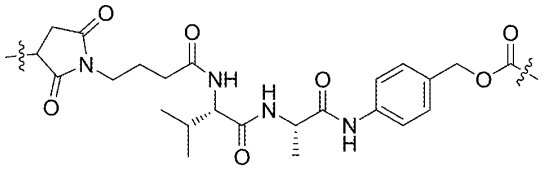

，

，

。

[18] 在某些具体的实施例中，所述的 L_2，L_3，L_4、……、L_{n+1} 可选自以下结构：

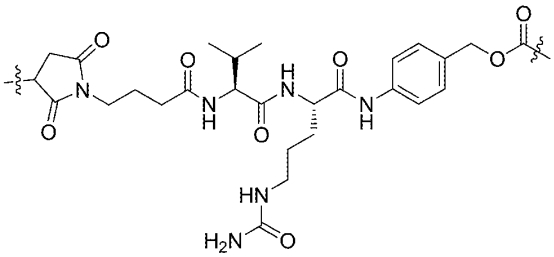

，

，

，

，

，

，

，

，



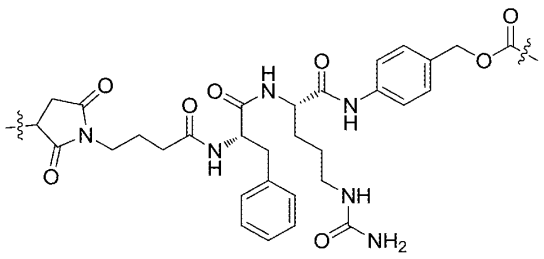
,



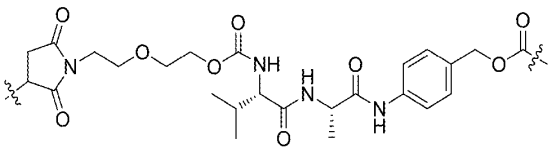
,



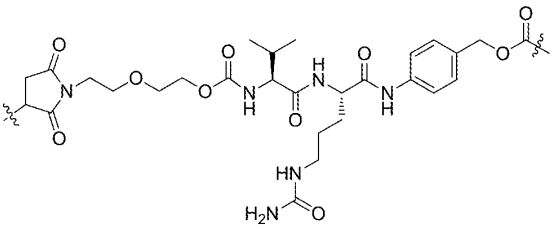
,



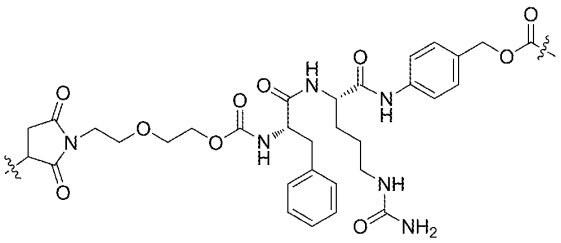
,



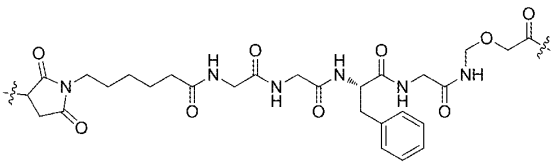
,



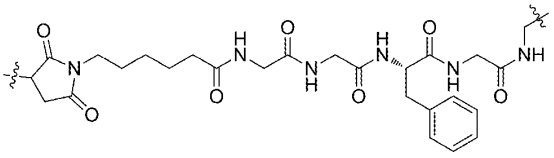
,



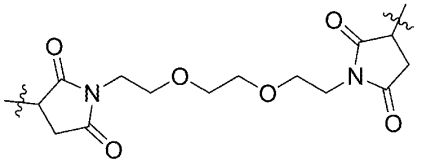
,



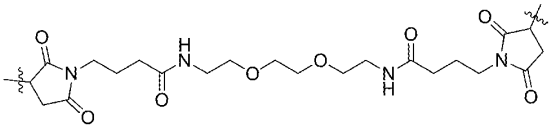
,



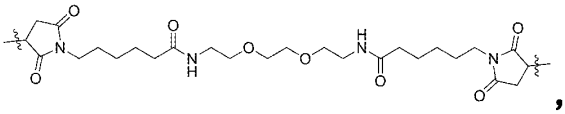
,



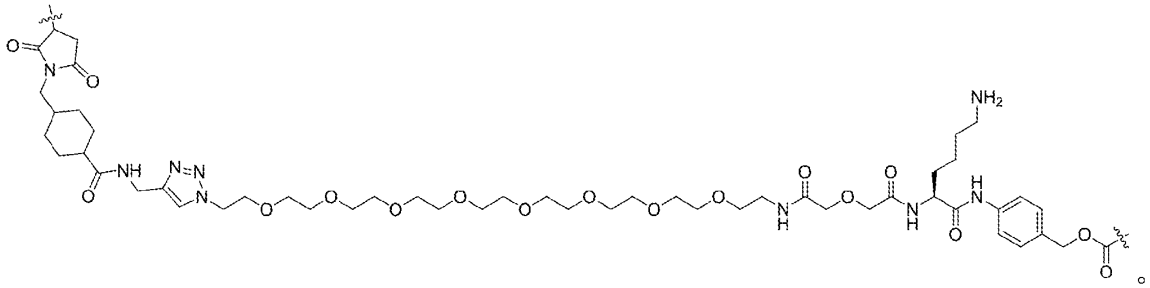
,



,



,

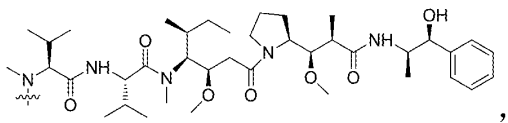


[19] 进一步的，所述的抗体或其功能性结合片段包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段、Fab、Fab '、Fab '-SH、F(ab ')2、Fv、单链 Fv(“scFv”)、双抗体、线性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、或包含抗体的抗原结合部分的融合蛋白；优选的，所述的抗体为人源化单克隆抗体或全人抗体。

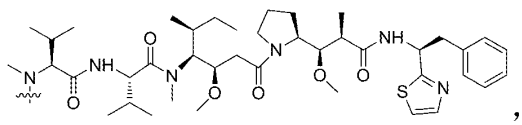
[20] 更进一步的，所述的抗体为 IgG 抗体或其功能性结合片段，更进一步优选的，所述的抗体为 IgG_1、IgG_2、 IgG_3、IgG_4。

[21] 进一步的，所述的活性药物单元为细胞毒分子、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或治疗传染性疾病的药物。

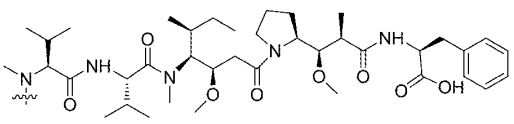
[22] 更进一步的，所述细胞毒分子包括但不限于微管蛋白抑制剂或 DNA 损伤剂；进一步优选的，所述微管蛋白抑制剂包括但不限于海兔毒素（dolastatin）及奥瑞他汀（auristatin）类细胞毒分子，美登素（maytansine）类细胞毒分子；所述 DNA 损伤剂包括但不限于卡奇霉素类（calicheamicin）、倍癌霉素（duocarmycin）类、安曲霉素类衍生物 PBD、喜树碱(camptothecins)及喜树碱类衍生物、SN-38；进一步优选的，所述奥瑞他汀（auristatin）类细胞素分子包括但不限于 MMAE 或 MMAF 或它们的衍生物，所述美登素类细胞毒分子包括但不限于 DM1、DM4 或它们的衍生物；进一步优选的，所述细胞毒分子包括以下分子：



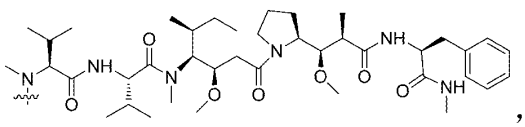
，



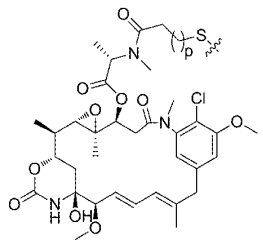
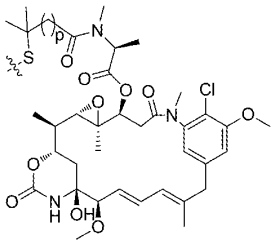
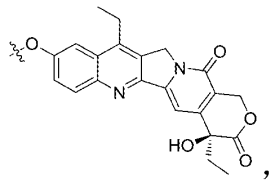
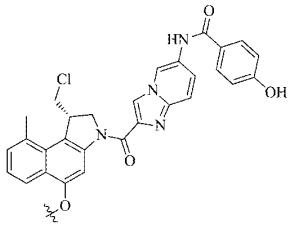
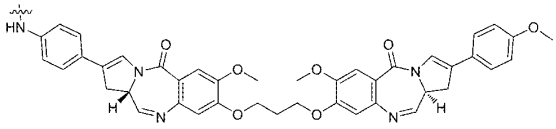
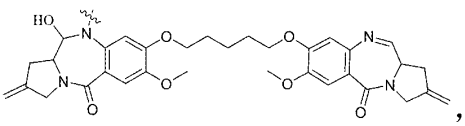
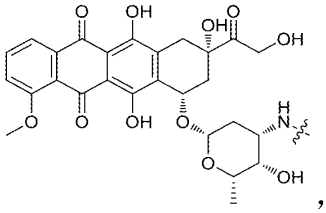
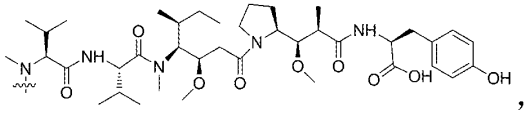
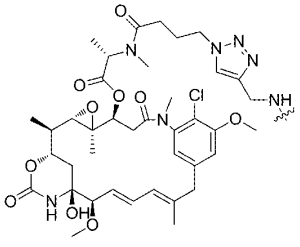
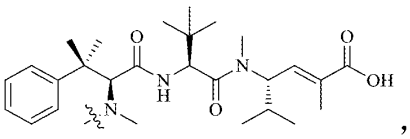
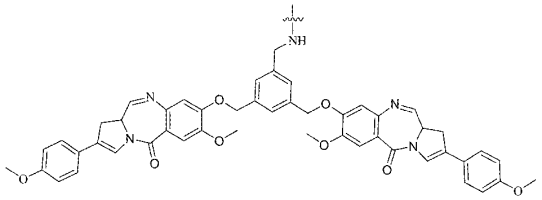
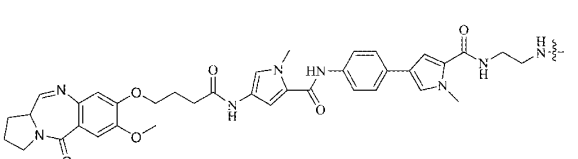
，

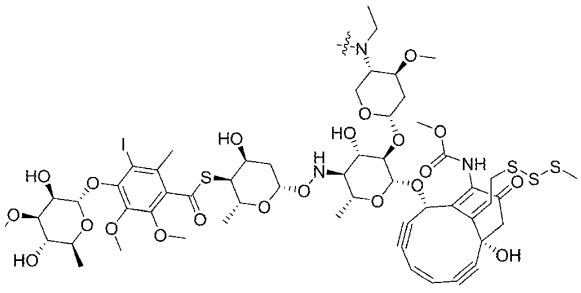
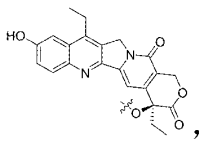
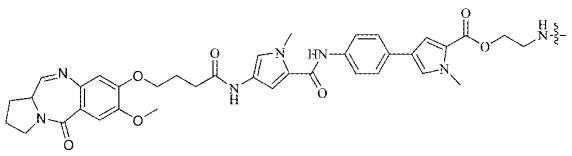
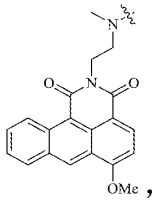
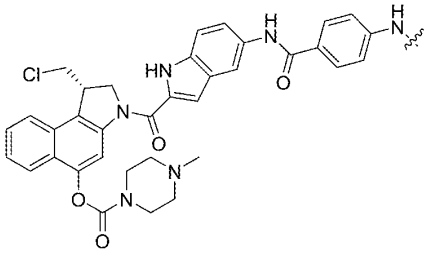
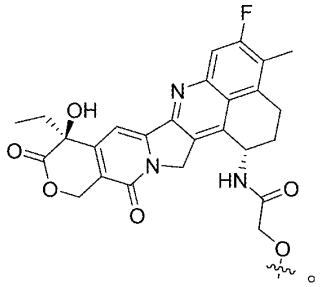


，

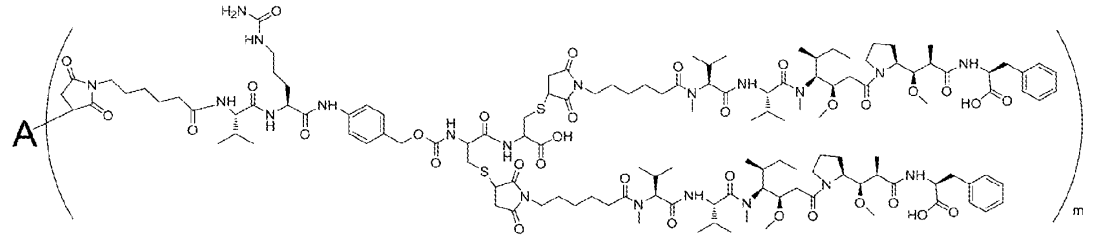


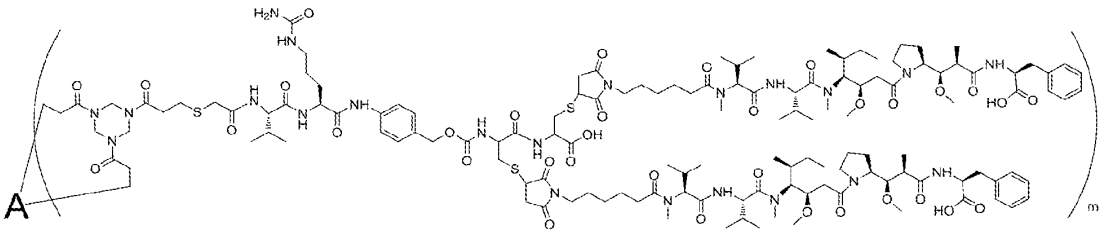
，

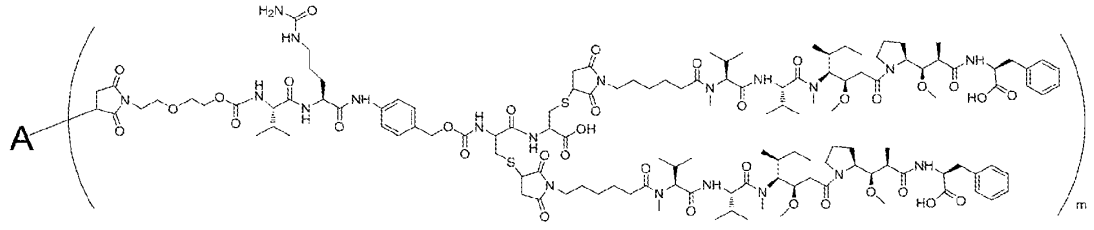

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

,

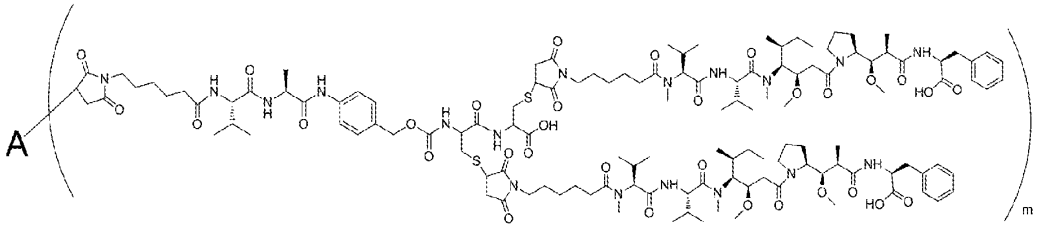

,

,

,

,

,

。

[23] 进一步的，所述抗体药物偶联物结构如下所示：

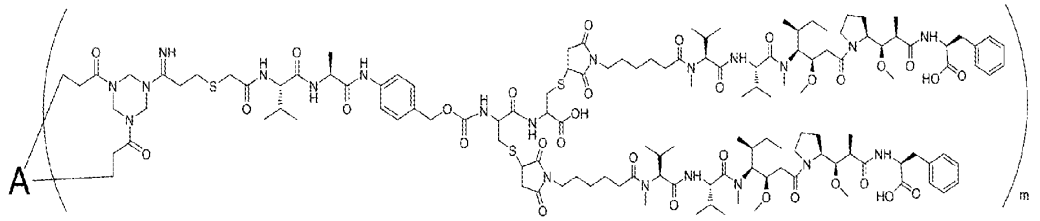

ADC-1


ADC-2

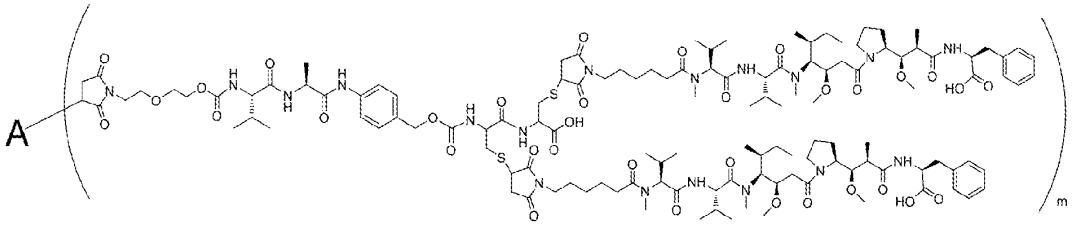

ADC-3



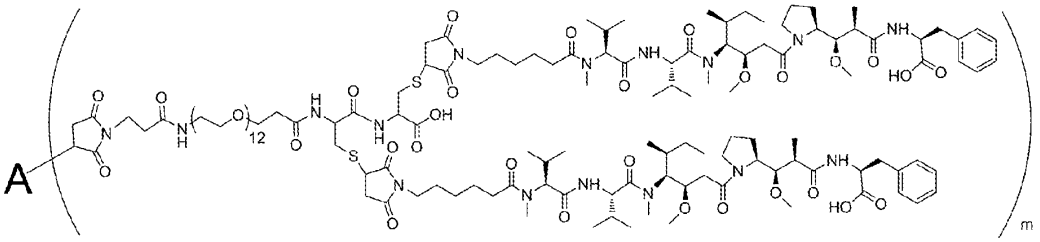
ADC-4



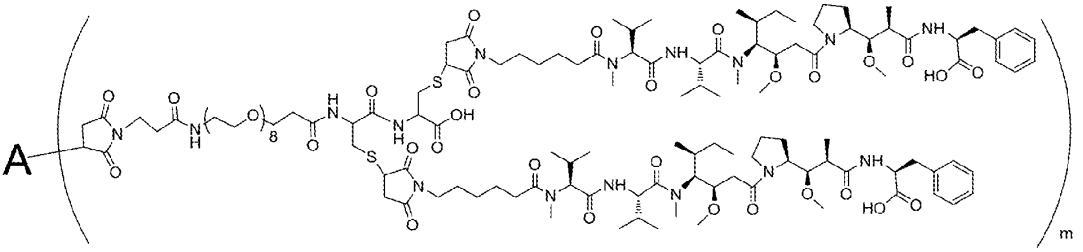
ADC-5



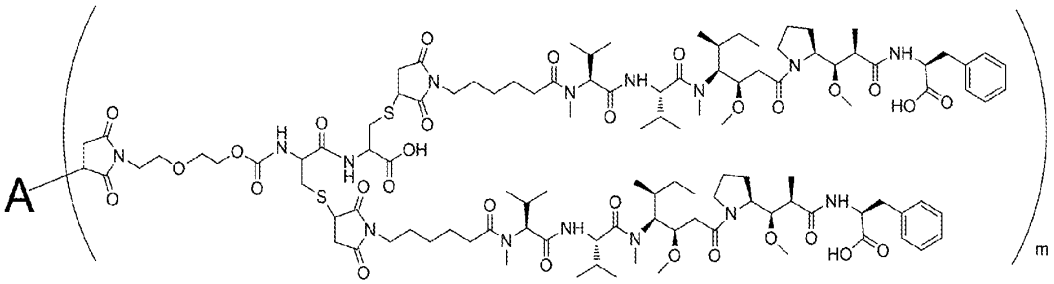
ADC-6



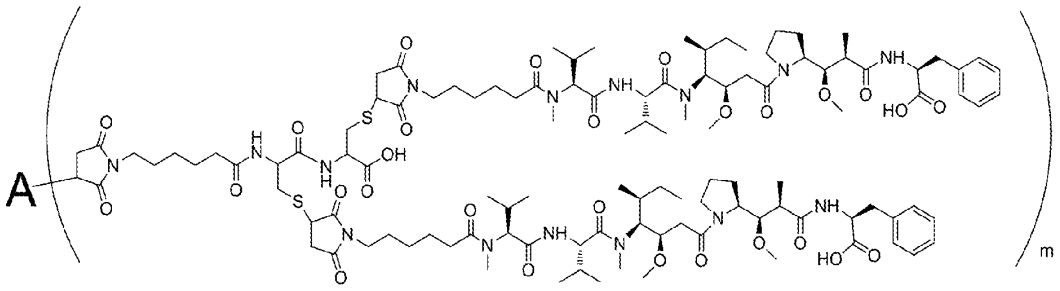
ADC-7



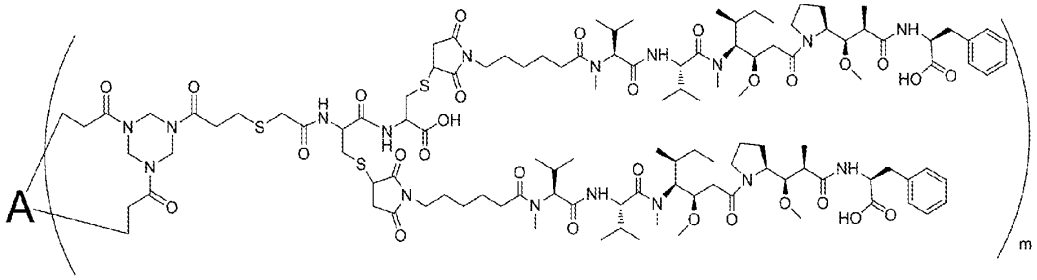
ADC-8



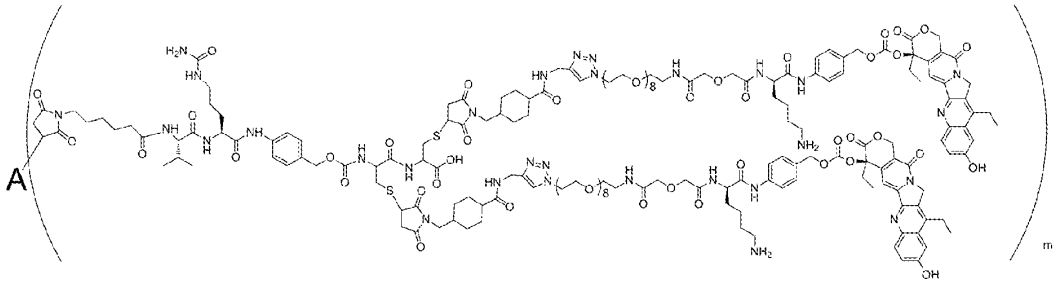
ADC-9



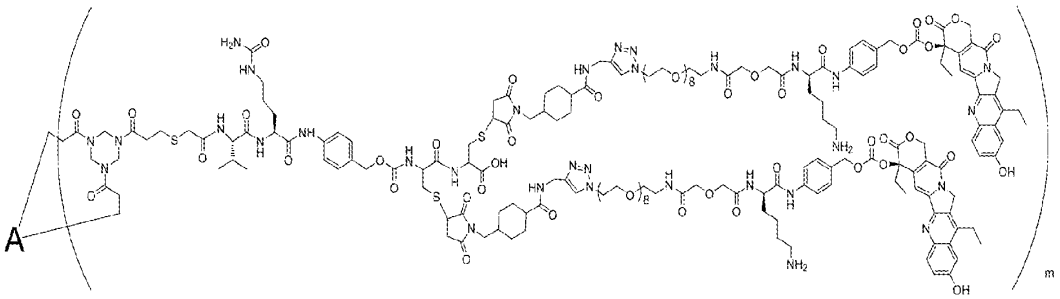
ADC-10



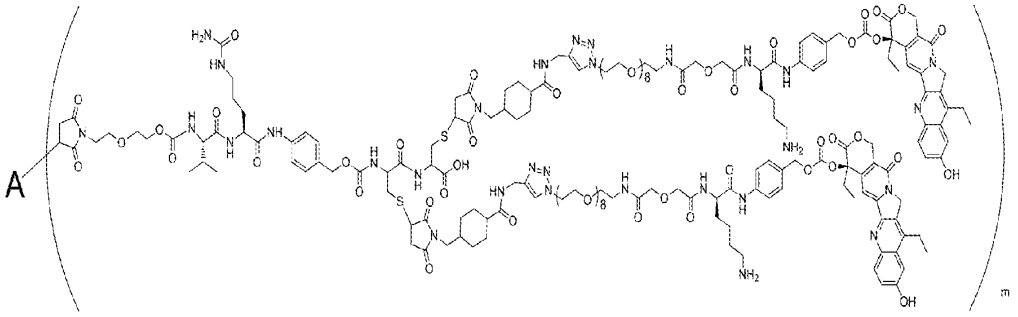
ADC-11



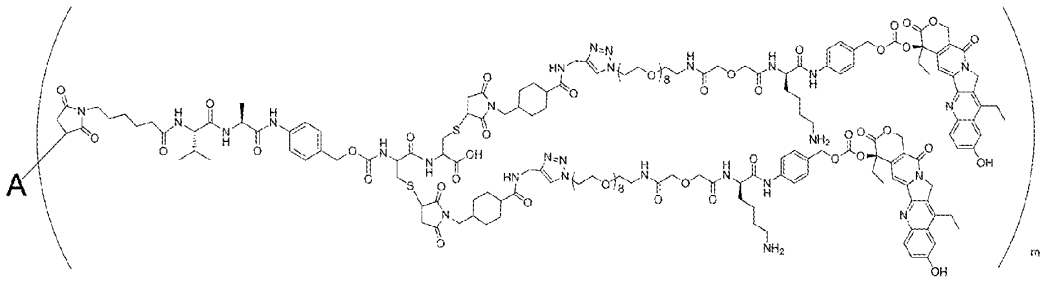
ADC-12



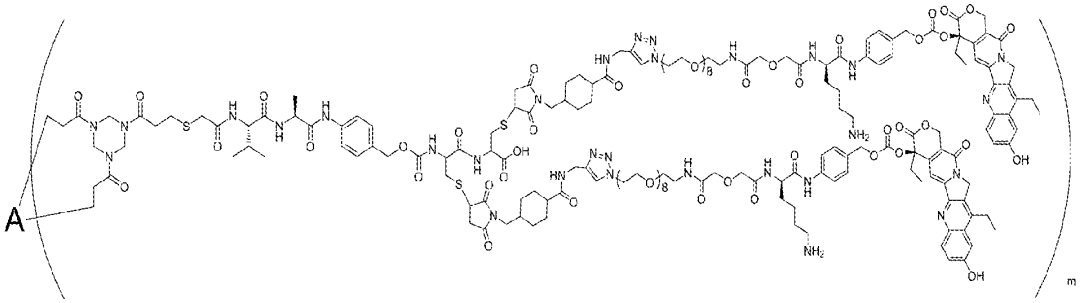
ADC-13



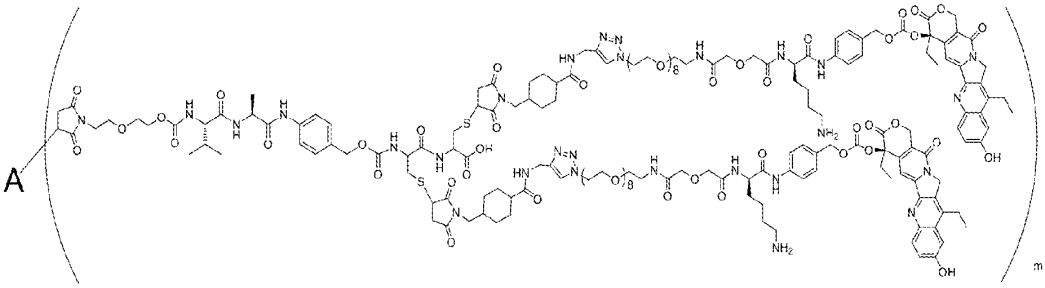
ADC-14



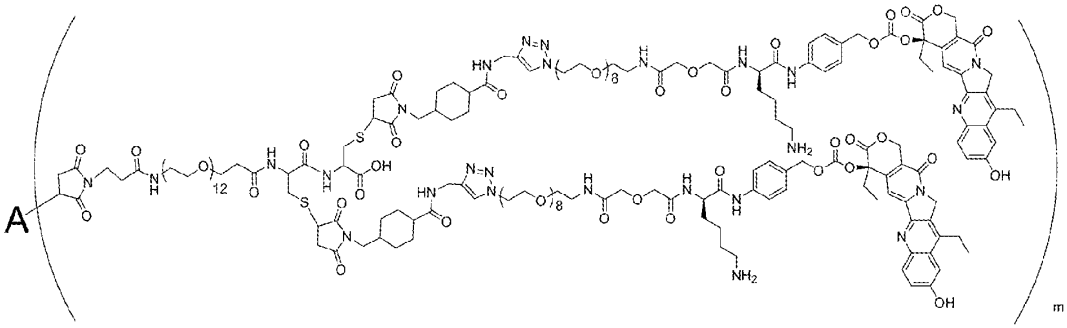
ADC-15



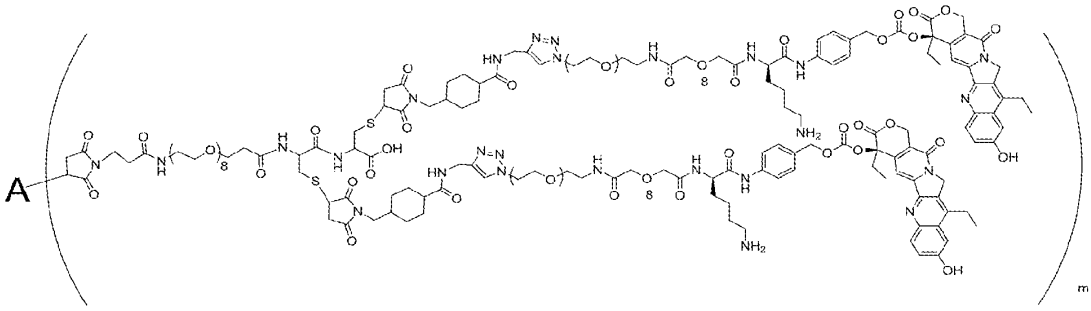
ADC-16



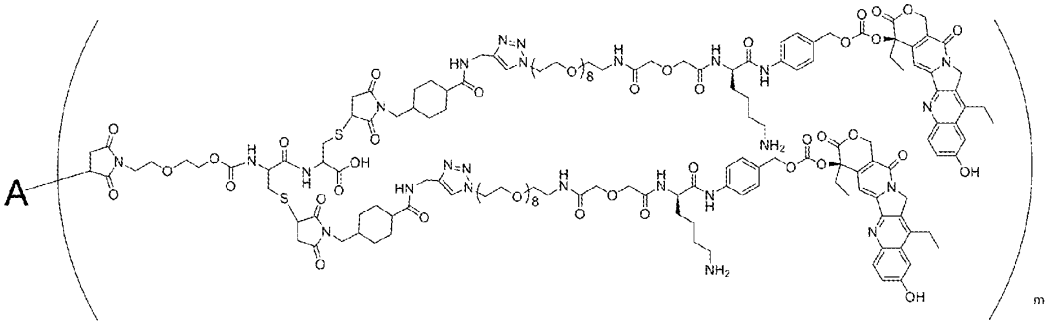
ADC-17



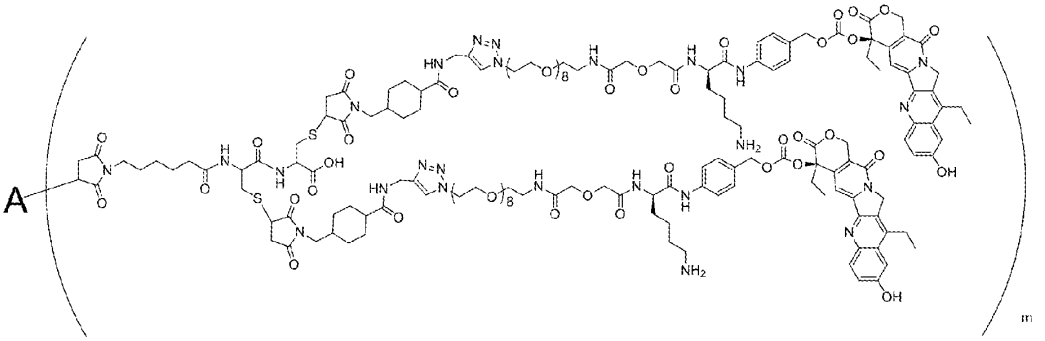
ADC-18



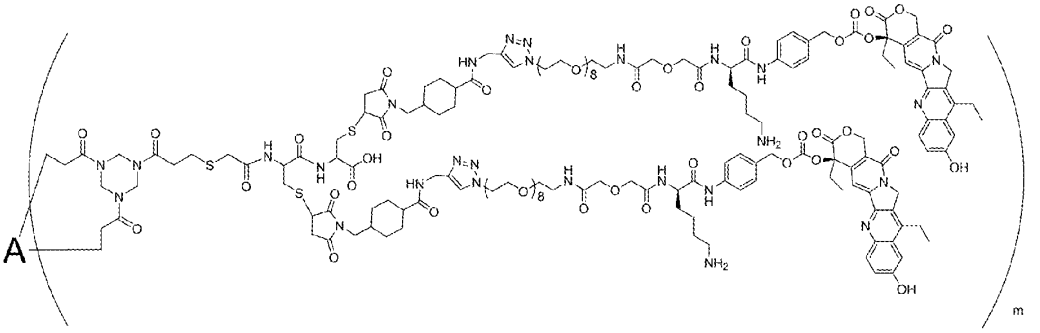
ADC-19



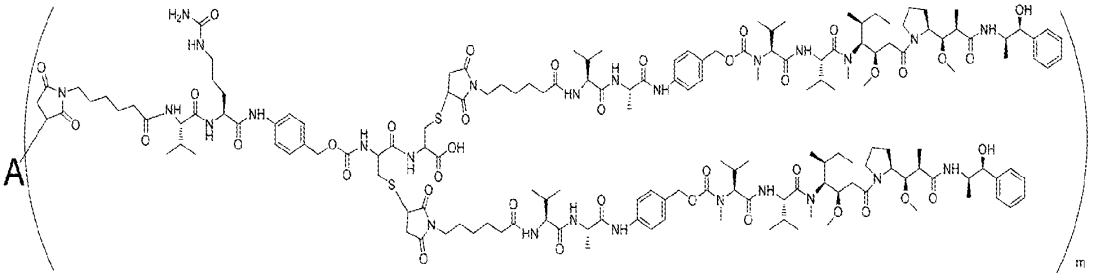
ADC-20



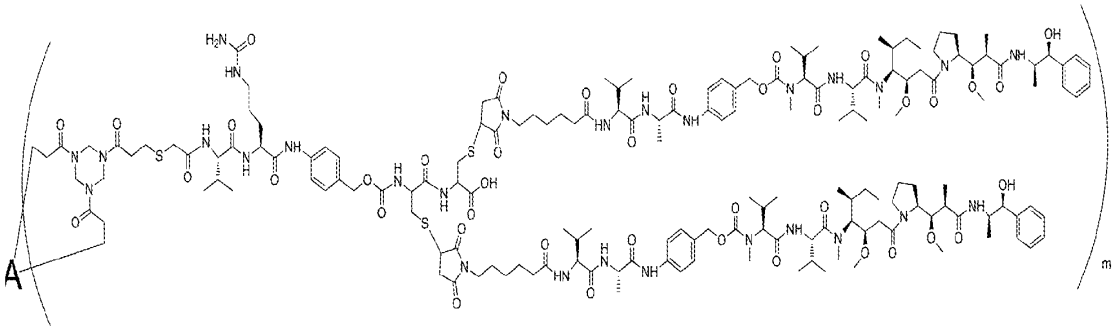
ADC-21



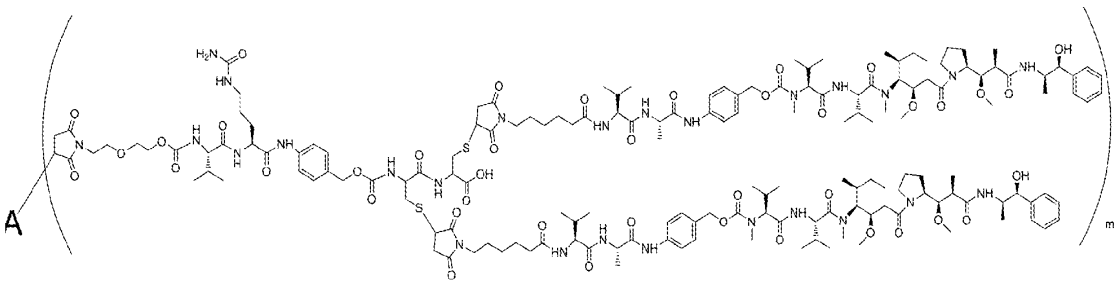
ADC-22



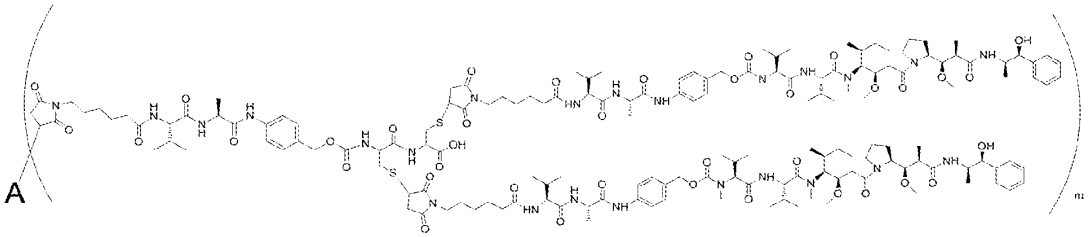
ADC-23



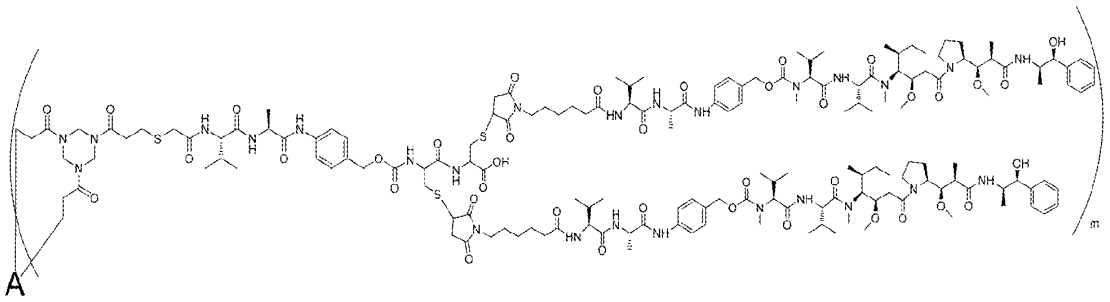
ADC-24



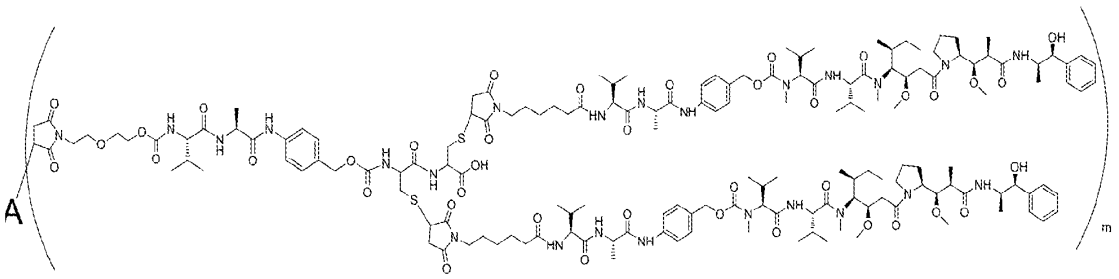
ADC-25



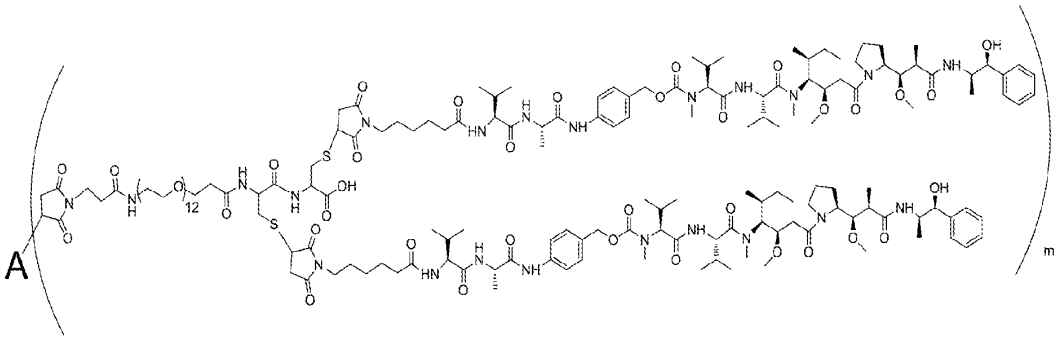
ADC-26



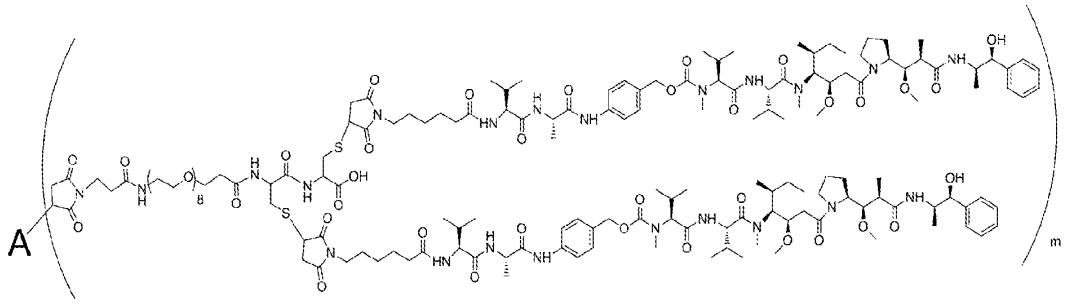
ADC-27



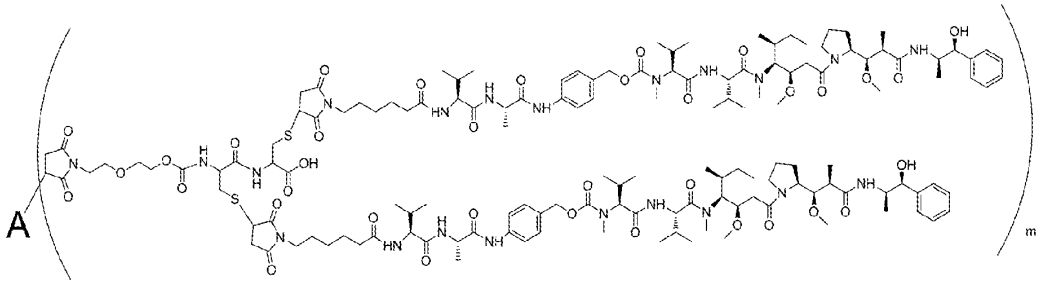
ADC-28



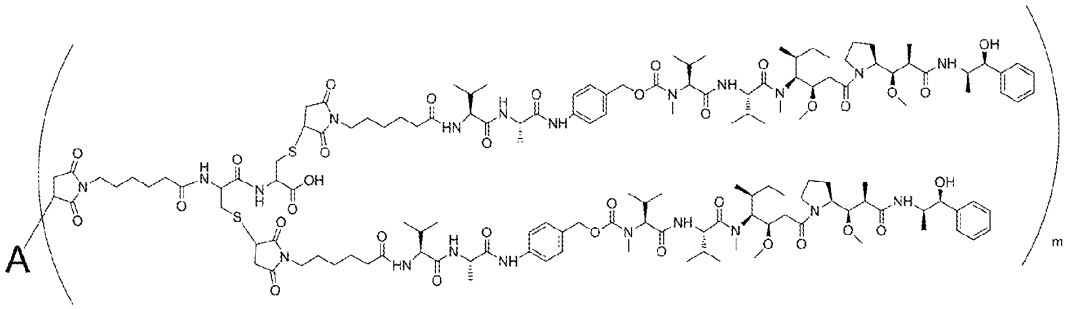
ADC-29



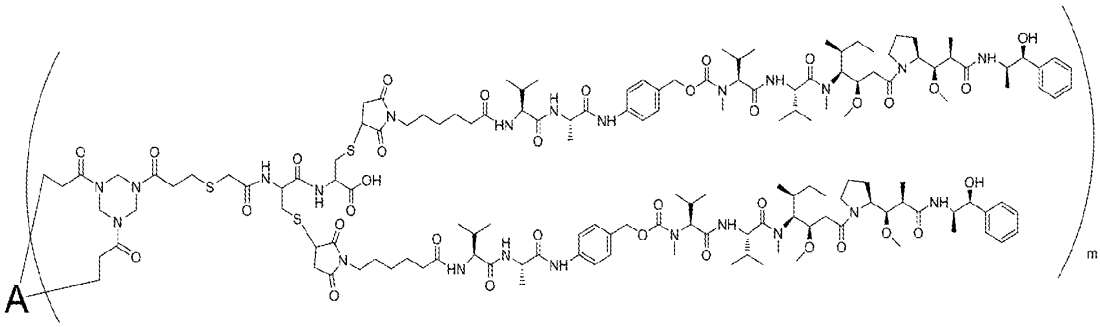
ADC-30



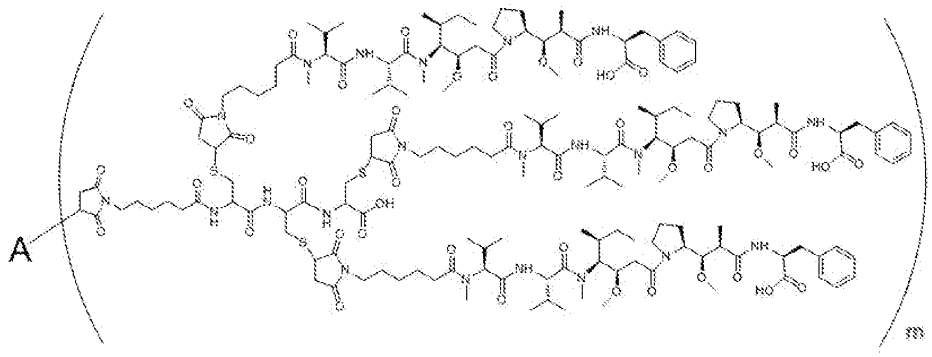
ADC-31



ADC-32



ADC-33



ADC-34

[24] 其中：

A 为任一抗体或其功能性结合片段；

m 选自 1、2、3、4、5、6、7、8。

[25] 本发明还提供了一种药物组合物，其包含有效量的上述任一项所述抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂合物，以及药学上可接受的辅料。

[26] 本发明还提供了上述任一项所述的抗体药物偶联物在制备治疗癌症药物中的用途。

[27] 本发明的抗体药物偶联物通过一个或多个半胱氨酸残基或半胱氨酸衍生物残基作为药物连接载体，在抗体的有限连接位点上同时偶联一个或多个药物，从而可以容易的制备获得药物载量（payload）更高的抗体药物偶联物。理论上，由于可以制备更高药物载量的 ADC，其可选择偶联的药物范围也更大，从而可以选择毒性较低的药物制备 ADC 产品，从而获得治疗窗口更大的 ADC 产品。此外，由于可在一个连接位点偶联多个药物分子，因此在制备相同 DAR 值的抗体药物偶联物情况下，通过本发明方法所获得的 ADC 产品均一性也更好。并且在生产中所需要使用的抗体用量也能得以大幅降低，从而有效的降低了生产成本。另外，在实验中，我们还惊奇的发现，采用本发明方法所制备的抗体药物偶联物，与同一位点仅能连接一个药物分子的抗体药物偶联物相比，在偶联的药物分子总量大幅降低的情况下，对肿瘤细胞仍能起到相同的抑制或杀伤效果。

具体实施方式

[定义]

[28] 与说明书的各方面相关的各种术语在说明书和权利要求书中通篇使用。除非另外指明，否则此类术语被赋予本领域的普通含义。其它具体定

义的术语应按照与本文所提供的定义相符的方式理解。

[29] 如本文所用，术语“一个”和“一种”和“所述”是按照标准惯例使用的并且意指一个或多个， 除非上下文另有指示。因此例如，对“一种抗体药物偶联物”的提及包括两个或更多个抗体药物偶联物的组合等等。

[30] 应当理解，无论何处在本文中用语言“包含”描述方面，除此之外还提供了以 “由 .....组成”和/或“基本上由 .....组成”描述的类似方面。

[31] 尽管本发明的广义范围所示的数字范围和参数近似值，但是具体实施例中所示的数值尽可能准确的进行记载。然而，任何数值本来就必然含有一定的误差，其是由它们各自的测量中存在的标准偏差所致。另外，本文公开的所有范围应理解为涵盖其中包含的任何和所有子范围。例如记载的“1 至 10”的范围应认为包含最小值 1 和最大值 10 之间(包含端点)的任何和所有子范围；也就是说，所有以最小值 1 或更大起始的子范围，例如 1 至 6.1，以及以最大值 10 或更小终止的子范围，例如 5.5 至 10。另外，任何称为“并入本文”的参考文献应理解为以其整体并入。

[32] 本发明中所用的“-§-”是指含“-§-”的基团在此处与其他基团通过化学键连接。

[33] 本发明中的连接单元、连接子可以互换使用；本发明中的活性单元、药物、毒物可以互换使用。

[34] 本发明中的术语“抗原”是指引发免疫应答或能够被抗体或抗原结合分子结合的任何分子。免疫应答可以涉及抗体产生或特异性免疫活性细胞的活化或这两者。本领域技术人员将容易理解任何大分子，包括几乎所有蛋白质或肽均可以充当抗原。通常，抗原可以内源性表达，即由基因组 DNA 表达，或者其可以重组表达，或者其可以化学合成。本发明涉及的“抗原”特指那些肿瘤相关抗原，这些肿瘤相关抗原是业内所熟知的，可以通过业内熟知的抗体制备方法和信息来制备。为了开发可用于癌症诊断与治疗的有效的细胞水平目标物，研究人员力图找寻跨膜或其他肿瘤相关多肽。这些目标物能够特异性地表达在一种或多种癌症细胞表面，而在一种或多种非癌细胞表面表达很少或不表达。通常，相对于非癌细胞表面而言,这样的肿瘤相关多肽在癌细胞表面更加过度表达。确认这样的肿瘤相关因子，可大大提高基于抗体治疗癌症的专一靶向特性。肿瘤相关抗原包括但不局限于，以下列出的肿瘤相关抗原(1)-(36)。为方便起见，为业内所熟知的抗原相关信息标示如下，包括名称，其它名称，基因库登录号。

与肿瘤相关抗原对应的核酸和蛋白序列可参见公开数据库，例如Genbank。抗体靶向对应的肿瘤相关抗原包括所有的氨基酸序列变种和同种，与实际确认的序列具有至少70%，80%，85%，90%，或95%的同源性，或者具备与引用的肿瘤相关抗原序列具有完全一致的生物性质和特征。肿瘤相关抗原(1)-(37)：

(1) BMPR1B(骨形态发生蛋白受体-IB型，Genbank登录号NM_001203)；

(2) E16(LAT1，SLC7A5，Genbank登录号NM_003486)；

(3) STEAP1(六次跨膜的前列腺上皮抗原，Genbank登录号NM_012449)；

(4) 0772P(CA125，MUC16，Genbank登录号AF361486)；

(5) MPF(MPF，MSLN，SMR、巨核细胞强化因子，间皮素，Genbank登录号NM_005823)；

(6) Napi3b(NAPI-3B，NPTIIb，SLC34A2，溶质载运体家族34(磷酸钠)成员2，II型钠依赖型磷酸转运子3b，Genbank登录号NM_006424)；

(7) Sema 5b(FLJ10372，KIAA1445，Mm.42015，SEMA5B，SEMAG，脑信号蛋白5b Hlog，sema结构域，七个血小板反应蛋白重复序列(1型和类1型)，跨膜结构域(TM)和短胞质结构域，(脑信号蛋白)5B，Genbank登录号AB040878)；

(8)PSCA hlg(2700050C12Rik,C530008016Rik,RIKEN cDNA 2700050C12,RIKEN cDNA 2700050C12基因，Genbank登录号AY358628)；

(9) ETBR(内皮缩血管肽B型受体，Genbank登录号AY275463)；

(10) MSG783(RNF124,假拟蛋白FLJ20315,Genbank登录号NM_017763)；

(11)STEAP2(HGNC_8639,IPCA-1,PCANAP1,STAMP1,STEAP2,STMP,前列腺癌相关基因1，前列腺癌相关蛋白1，六次跨膜的前列腺上皮抗原2，六次跨膜的前列腺蛋白，Genbank登录号AF455138)；

(12) TrpM4(BR22450,FLJ20041,TRPM4,TRPM4B,瞬时受体电势阳离子通道，亚家族M，成员4，Genbank登录号NM_017636)；

(13) CRIPTO(CR,CR1,CRGF,CRIPTO,TDGF1,畸胎瘤衍生生长因子，Genbank 登录号 NP_003203 或 NM_003212);

(14) CD21(CR2(补体受体 2)或 C3DR(C3d/EB 病毒受体)或 Hs.73792,Genbank 登录号 M26004);

(15) CD79b(CD79B,CD79β,IGb(免疫球蛋白相关β),B29,Genbank 登录号 NM_000626);

(16) FcRH2(IFGP4,IRTA4,SPAP1A(含有磷酸酶锚定蛋白 1a 的 SH2 结构域),SPAP1B,SPAP1C,Genbank 登录号 NM_030764);

(17) HER2(ErbB2,Genbank 登录号 M11730);

(18) NCA(CEACAM6,Genbank 登录号 M18728);

(19) MDP(DPEP1,Genbank 登录号 BC017023);

(20) IL20Rα(IL20Ra,ZCYTOR7,Genbank 登录号 AF184971);

(21) Brevican(BCAN,BEHAB,Genbank 登录号 AF229053);

(22)EphB2R(DRT,ERK,Hek5,EPHT3,Tyro5,Genbank 登录号 NM_004442);

(23) ASLG659(B7h,Genbank 登录号 AX092328);

(24) PSCA(前列腺干细胞抗原前体，Genbank 登录号 AJ297436);

(25) GEDA(Genbank 登录号 AY260763);

(26) BAFF-R(B 细胞活化因子受体，BLyS 受体 3，BR3,Genbank 登录号 AF116456);

(27) CD22(B 细胞受体 CD22-B 同种型,Genbank 登录号 AK026467);

(28) CD79a(CD79A,CD79α,免疫球蛋白相关α，能够与 Ig β(CD79B)发生共价作用并在表面与 Ig M 分子形成复合物，转导参与 B 细胞分化信号的 B 细胞特异性蛋白，Genbank 登录号 NP_001774.1);

(29) CXCR5(伯基特氏(Burkitt’s)淋巴瘤受体 1，被 CXCL13 趋化因子活化的 G 蛋白偶联受体，在淋巴细胞迁移和体液防御中发挥作用，在 HIV-2 感染 以及可能在艾滋病，淋巴瘤，骨髓瘤，和白血病中发挥作用，Genbank 登录号 NP_001701.1);

(30) HLA-DOB(MHCII 类分子的 Beta 亚基(Ia 抗原)，其结合肽并将

其呈递到 CD4+T 淋巴小细胞，Genbank 登录号 NP_002111.1)；

(31) P2X5(嘌呤受体 P2X 配体门控离子通道 5，由胞外 ATP 门控的离子通道，可能涉及突触传递和神经新生，其缺陷可能导致特发性逼尿肌不稳定的病理生理状况，Genbank 登录号 NP_002552.2)；

(32) CD72(B 细胞分化抗原 CD72,Lyb-2,Genbank 登录号 NP_001773.1)；

(33) LY64(淋巴细胞抗原 64(RP105),富含亮氨酸重复的 I 型膜蛋白(LRR)家族，调节 B 细胞活化和凋亡，功能的丧失与系统性红斑狼疮患者疾病活动增加有关，Genbank 登录号 NP_005573.1)；

(34) FcRH1(Fc 受体样蛋白 1，推定的免疫球蛋白 Fc 结构域受体，包含 C2 型类 Ig 样和 ITAM 结构域，可能在 B 淋巴细胞分化中起作用，Genbank 登录号 NP_443170.1)；

(35) IRTA2(易位相关免疫球蛋白超家族受体 2，推定的免疫受体，可能在 B 细胞发育和淋巴瘤产生中起作用；由易位导致的基因失调发生在一些 B 细胞恶性病上，Genbank 登录号 NP_112571.1)；

(36) TENB2(推定的跨膜蛋白聚糖，与生长因子的 EGF/调蛋白(heregulin)家族和卵泡抑素(follistatin)相关，Genbank 登录号 AF179274)；

(37)其他相关的抗原。

[35] 本发明中的术语“抗体”以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、和抗体片段。通常，抗体可以包含通过二硫键相互连接的至少两条重链和两条轻链，或其抗原结合分子。每条重链包含重链可变区和重链恒定区。重链恒定区包含三个恒定结构域：CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含轻链可变区和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个恒定结构域：CL。重链可变区和轻链可变区可以进一步细分为高变的区域，称为互补决定区(CDR)，散布着更保守的区域，称为框架区(FR)。每个重链可变区和轻链可变区包含三个 CDR 和四个 FR，以下列顺序从氨基末端到羧基末端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。Ab 的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。除非另有说明，本发明中的术语“抗体”还涵盖完整免疫球蛋白或其抗原结合部分，其与完整抗体竞争特异性结

合。抗原结合部分可以通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学切割来产生。抗原结合部分尤其包括 Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv、结构域抗体(dAb)、包括互补决定区(CDR)的片段、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、二价抗体、三价抗体、四价抗体和含有足以赋予与多肽结合的特异性抗原的至少一部分免疫球蛋白的多肽。本发明中的术语“抗体”还包括天然存在的和非天然存在的(重组产生的)抗体两者、人和非人抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体(参见，例如 Stocks ,(2004)Drug DiscoveryToday 9(22):960-66)、抗体融合物(该术语涵盖抗体-药物缀合物并且其在本文有时称为“ 抗体缀合物”)、异缀合抗体(heteroconjugate antibody)、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链 Fv(scFv)、骆驼源化抗体、亲和体(affybody)、Fab 片段、F(ab’)2 片段、二硫键连接的 Fv(sdFv)、抗独特型(抗 Id)抗体(包括例如，抗-抗 Id 抗体)、微抗体、结构域抗体、合成抗体(本文有时称为“ 抗体模拟物”)及其抗原结合片段。

[36] 本发明中的术语“功能性片段”是指抗体片段由其来源抗体的重或轻可变链的部分序列构成或者包含它们，所述部分序列足以保留与其来源抗体相同的结合特异性和充分的亲和力，优选至少等于其来源抗体亲和力的 1/100，在更优选方式中至少等于 1/10。这种功能片段将包含最少 5 个氨基酸，优选其来源的抗体序列的 10、15、25、50 和 100 个连续氨基酸。

[37] 术语“人源化抗体”是指一种抗体，其包含来源于非人源抗体的 CDR 区、并且该抗体分子的其他部分来源于一种(或几种)人抗体。而且，为了保留结合亲和力，可以修饰骨架(称为 FR)区段的一些残基(Jones et al.，Nature，321：522-525，1986；Verhoeyen et al.，Science，239：1534-1536，1988；Riechmann et al.，Nature，332：323-327，1988)。通过本领域技术人员已知的技术可以制备根据本发明的人源化抗体或其片段(例如，描述于文件 Singer et al.，J.Immun.150：2844-2857，1992；Mountain et al.，Biotechnol.Genet.Eng.Rev.，10：1-142，1992；或 Bebbington et al.，Bio/Technology，10：169-175，1992)。

[38] 术语“嵌合抗体”是指以下抗体，其中的可变区序列来自一物种而恒定区序列来自另一物种，例如可变区序列来自小鼠抗体而恒定区序列来自人抗体的抗体。通过使用基因重组技术可以制备根据本发明的嵌合抗体或其

片段。例如，所述嵌合抗体可以通过克隆重组 DNA 来生产，所述重组 DNA 包含启动子和编码根据本发明的非人尤其是鼠单克隆抗体可变区的序列、以及编码人抗体恒定区的序列。由这种重组基因编码的本发明嵌合抗体将是，例如，鼠-人嵌合体，该抗体的特异性由来源于鼠 DNA 的可变区确定，并且其同种型由来源于人 DNA 的恒定区来确定。对于制备嵌合抗体的方法，例如，可以参考文件 Verhoeyn et al.(BioEssays, 8: 74, 1988)。

[39] 术语“单克隆抗体”系指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示出对于特定表位的单一结合特异性和亲和性。

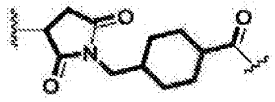
[40] 在某些具体的实施例中，本发明涉及的抗体包括但不限于以下：莫罗单抗-CD3、阿昔单抗、利妥昔单抗、达利珠单抗、帕利珠单抗、英夫利昔单抗、曲妥珠单抗、依那西普、巴利昔单抗、吉妥珠单抗、阿仑单抗、替伊莫单抗、阿达木单抗、阿法赛特、奥马珠单抗、依法利珠单抗、托西莫单抗、西妥昔单抗、ABT-806、贝伐单抗、那他珠单抗、雷珠单抗、帕尼单抗、依库丽单抗、利纳西普、赛妥珠单抗、罗米司亭、AMG-531、戈利木单抗、优特克单抗、ABT-874、贝拉西普、贝利木单抗、阿塞西普、抗 CD20 抗体、卡纳单抗、托珠单抗、阿特珠单抗、美泊利单抗、帕妥珠单抗、HuMax CD20、曲美木单抗、替西木单抗、伊匹单抗、IDEC-114、英妥珠单抗、HuMax EGFR、阿柏西普、HuMax-CD4、特普利珠单抗、奥特西珠单抗、卡妥索单抗、抗 EpCAM 抗体 IGN101、阿德木单抗、奥戈伏单抗、地妥西单抗、吉瑞妥昔单抗、地诺单抗、巴匹珠单抗、莫维珠单抗、依福谷单抗、瑞西巴库、LY2469298 和维妥珠单抗。

[41] 本发明中的术语“连接单元”是指一种具有双官能团或多官能团的分子，可分别与蛋白/抗体分子和药物分子反应，因此做为一种“桥梁”将蛋白/抗体与药物分子连接起来。按照在细胞内药物释放的机制，“连接子”或“抗体药物偶联物的连接子”可被分为两类：不可断裂连接子(non-cleavable linker)和可断裂连接子(cleavable linker)。

[42] 不可断裂连接子是一种相对比较稳定的连接子，其结构很难在体内环境下降解断裂。对于含有不可断裂连接子的抗体药物偶联物，其药物释放机制为：偶联物与抗原结合并被细胞内吞后，抗体在溶酶体中被酶解，释放出由小分子药物，连接子，和抗体氨基酸残基共同组成的活性分子。由此带来的药物分子结构改变并不减弱其细胞毒性，但由于活性分子是带电荷的(氨基酸残基)，从而导致其不能渗入邻近细胞。因此，此类活性药物不能杀死邻近不表达靶向抗原(抗原阴性细胞)的肿瘤细胞(旁观者效

应,bystander effect)(Bioconjugate Chem.2010，21，5-13)。常见的不可断裂连接子例如 MC 连接子和 MCC 连接子等：





。

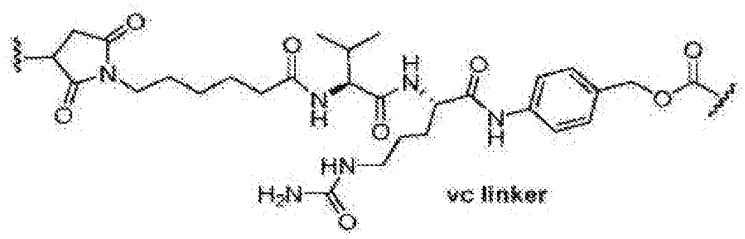
[43] 可断裂连接子，顾名思义，可以在目标细胞内断裂并释放出活性药物(小分子药物本身)。可断裂连接子可分为两个主要的类别：化学不稳定连接子和酶不稳定连接子。

[44] 化学不稳定连接子可以由于血浆和细胞质性质的不同而选择性的断裂。这样的性质包括 pH 值，谷胱甘肽浓度等。

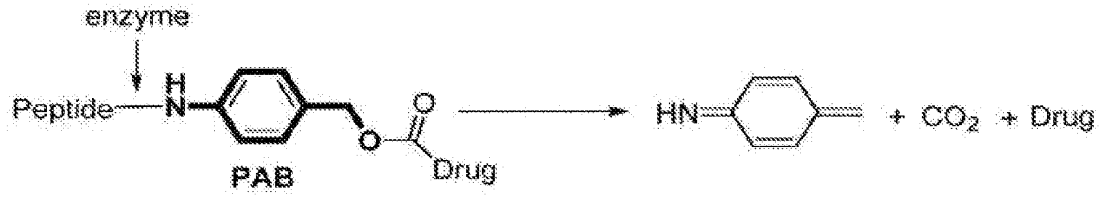
[45] 对 pH 值敏感的连接子，通常又称为酸断裂连接子。这样的连接子在血液的中性环境下相对稳定(pH 7.3-7.5)，但是在弱酸性的内涵体(pH 5.0-6.5)和溶 酶体(pH 4.5-5.0)内将会被水解。第一代的抗体药物偶联物大多应用这类连接子，例如腙，碳酸酯，缩醛，缩酮类。由于酸断裂连接子有限的血浆稳定性，基于此类连接子的抗体药物偶联物通常具有较短的半衰期(2-3 天)。这种较短的半衰期在一定程度上限制了 pH 敏感连接子在新一代抗体药物偶联物中的应用。

[46] 对于谷胱甘肽敏感的连接子，又称二硫键连接子。药物释放是基于细胞内谷胱甘肽的高浓度(毫摩尔范围)与血液中相对较低的谷胱甘肽浓度(微摩尔范围)差异引起的。对于肿瘤细胞而言尤其如此，其低含氧量导致还原酶的活性增强，因而导致更高的谷胱甘肽浓度。二硫键具有热力学稳定性，因此在血浆中具有较好的稳定性。

[47] 酶不稳定连接子，如肽连接子，能够更好地控制药物释放。肽连接子能够被溶酶体内蛋白酶，如组织蛋白酶(Cathepsin B)或纤溶酶(在一些肿瘤组织中此类酶含量增加)有效地切断。这种肽连接被认为在血浆循环中非常稳定，这是因为细胞外不合宜的 pH 值及血清蛋白酶抑制剂导致蛋白酶通常在细胞外不具备活性。鉴于较高的血浆稳定性和良好的细胞内断裂选择性和有效性，酶不稳定连接子被广泛用做抗体药物偶联物的可断裂连接子。典型的酶不稳定连接子例如 vc 连接子等。



[48] 自杀式连接子一般嵌合在可断裂连接子与活性药物之间，或者本身就是可断裂连接子的一部分。自杀式连接子的作用机制是：当可断裂连接子在合宜的条件下断裂后，自杀式连接子能够自发地进行结构重排，进而释放与之连接的活性药物。常见的自杀式连接子如对氨基苄醇类(PAB)等。



[49] 本发明中的术语“活性单元”泛指任何具有期望的生物活性，并具有反应性官能团以便制备本发明所述偶联物的化合物。期望的生物活性包括诊断、治愈、缓解、治疗、预防人或其它动物的疾病。随着新型药物不断被发现和发展，这些新药也应纳入本发明所述的药物中。具体的，所述的药物包括但不限于细胞毒性药物、细胞分化因子、干细胞营养因子、类固醇类药物、治疗自身免疫疾病的药物、抗炎症药物或传染性疾病的药物。更具体的，所述的药物包括但不限于微管蛋白抑制剂或者 DNA、RNA 损伤剂。优选的，本发明所涉及的活性单元包括但不限于以下：

(a)厄洛替尼、硼替佐米、氟维司群、索坦、来曲唑、甲磺酸伊马替尼、PTK787/ZK222584、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶、亚叶酸、雷帕霉素、拉帕替尼、洛那法尼、索拉非尼、吉非替尼、AG1478、AG1571、噻替派、环磷酰胺、白消安、英丙舒凡、哌泊舒凡、苯并多巴、卡巴醌、美妥替哌、乌瑞替派、乙烯亚胺、六甲蜜胺、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺、三羟甲基三聚氰胺、泡番荔枝辛、泡番荔枝辛酮、喜树碱、拓扑替康、苔藓抑素、卡利斯汀、CC-1065、阿多来新、卡折来新、比折来新、念珠藻素 1、念珠藻素 8、多拉司他汀、多卡米星、KW-2189、CB1-TM1、五加素、水鬼蕉碱、匍枝珊瑚醇、海绵抑制素、苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、美法仑、

新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥、卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀、卡里奇霉素、卡里奇霉素γ1、卡里奇霉素ω1、达内霉素、达内霉素 A、氯膦酸盐、埃斯培拉霉素、新制癌菌素发色团、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、卡比柔星、洋红霉素、嗜癌素、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、吗啉代阿霉素、氰基吗啉代阿霉素、2-吡咯啉代-阿霉素、脂质体阿霉素、脱氧阿霉素、表柔比星、依索比星、麻西罗霉素、丝裂霉素 C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、派来霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链霉黑素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀、佐柔比星、5-氟尿嘧啶、二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙、氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤、安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯、氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦、亚叶酸、醋葡醛内酯、醛磷酰胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶、安吖啶、巴斯布西、比生群、依达曲沙、地磷酰胺、秋水仙胺、地吖醌、依氟鸟氨酸、依利醋铵、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖、氯尼达明、美登素、安丝菌素、米托胍腙、米托蒽醌、莫哌达醇、二胺硝吖啶、喷司他丁、蛋氨氮芥、吡柔比星、洛索蒽醌、2-乙基酰肼、甲基苄肼、多糖-k、雷佐生、根霉素、西佐糖、锗螺胺、细交链孢菌酮酸、三亚胺醌、2,2',2”-三氯三乙胺、T-2 毒素、托抱菌素 A、杆孢菌素 A、以及蛇形菌素、乌拉坦、长春地辛、达卡巴嗪、甘露醇氮芥、二溴甘露醇、二溴卫矛醇、哌泊溴烷、干胞嘧啶、阿拉伯糖苷、环磷酰胺、噻替派、紫杉醇、紫杉醇的白蛋白工程纳米粒子制剂、多烯紫杉醇、苯丁酸氮芥、吉西他滨、6-硫鸟嘌呤、巯基嘌呤、顺铂、卡铂、长春花碱、铂、依托泊苷、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞滨、米托蒽醌、替尼泊苷、依达曲沙、道诺霉素、氨基喋呤、希罗达、伊班膦酸盐、CPT-11、拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000、二氟甲基鸟氨酸、视黄酸、卡培他滨，或任何前述的药学上可接受的盐、溶剂化物或酸；

(b)单核因子、淋巴因子、传统多肽激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、松弛素、松弛素原、糖蛋白激素、促卵泡激素、促甲状腺激素、黄体生成素、肝生长因子、成纤维细胞生长因子、催乳素、胎盘催乳素、肿瘤坏死因子-α、肿瘤坏死因子-β、缪勒抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、激活素、血管内皮生长因子、血小板生成素、红细胞生成素、骨诱

导因子、干扰素、干扰素-α、干扰素-β、干扰素-γ、集落刺激因子(“CSF”)、巨噬细胞-CSF、粒细胞-巨噬细胞-CSF、粒细胞-CSF、白介素(IL)、IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、肿瘤坏死因子、TNF-α、TNF-β、多肽因子、LIF、kit 配体，或任何前述的组合；

(c)白喉毒素、肉毒毒素、破伤风毒素、痢疾毒素、霍乱毒素、鹅膏蕈碱、鹅膏蕈碱衍生物、α-鹅膏蕈碱、吡咯并苯并二氮杂卓、吡咯并苯并二氮杂卓衍生物、河豚毒素、短裸甲藻毒素、雪卡毒素、蓖麻毒素、AM毒素、微管蛋白裂解素、格尔德霉素、美登素类化合物、卡里奇霉素、柔红霉素、阿霉素、甲氨蝶呤、长春地辛、SG2285、多拉司他汀、多拉司他汀类似物、奥瑞他汀、念珠藻素、喜树碱、喜树碱衍生物和代谢物、根霉素、根霉素衍生物、CC-1065、CC-1065 类似物或衍生物、倍癌霉素、烯二炔抗生素、埃斯培拉霉素、埃博霉素、阿吃那非得、阿普立定、类毒素，或任何前述的组合；

(d)亲和配体，其中所述亲和配体是底物、抑制剂、刺激剂、神经递质、放射性同位素，或任何前述的组合；

(e)放射性标记物、32P、35S、荧光染料、电子致密试剂、酶、生物素、链霉亲和素、洋地黄毒苷、半抗原、免疫原性蛋白质、具有与靶标互补的序列的核酸分子，或任何前述的组合；

(f)免疫调节化合物、抗癌剂、抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂和抗寄生虫剂，或任何前述的组合；

(g)他莫昔芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、那洛昔芬、LY117018、奥那司酮或托瑞米芬；

(h)4(5)-咪唑、氨鲁米特、醋酸甲地孕酮、依西美坦、来曲唑或阿那曲唑；

(i)氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林、戈舍瑞林或曲沙他滨；

(j)芳香酶抑制剂；

(k)蛋白激酶抑制剂；

(l)脂质激酶抑制剂；

(m)反义寡核苷酸；

(n)核酶；

(o)疫苗；和

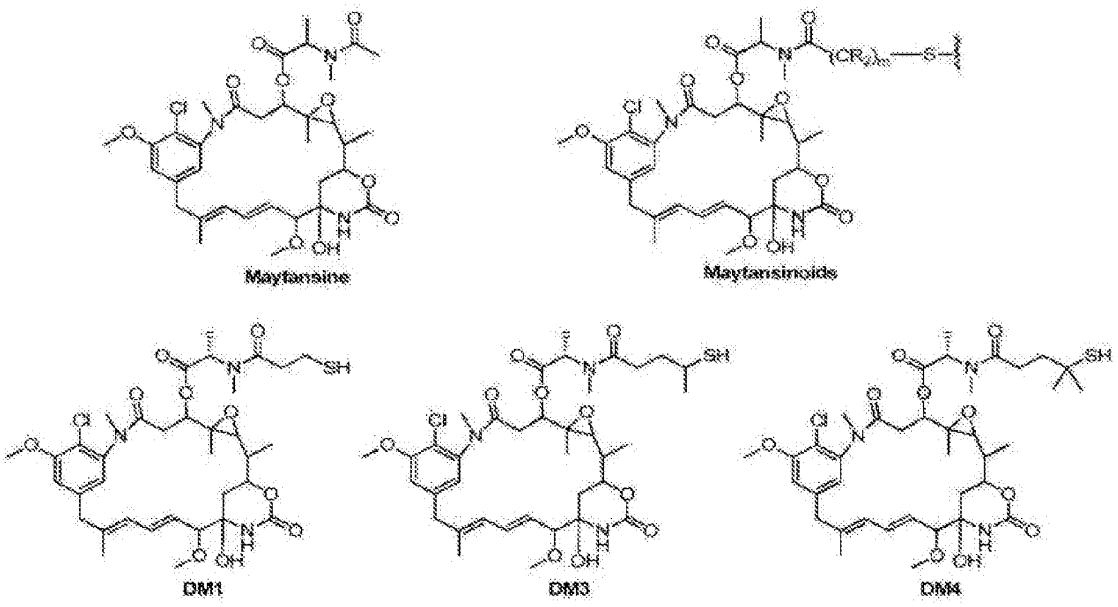
(p)抗血管生成剂。

[50] 在本发明的一些实施方案中，所述“活性单元”选自：美坦生类化合物、V-ATP 酶抑制剂、促凋亡剂、Be12 抑制剂、McL1 抑制剂、HSP90 抑制剂、IAP 抑制剂、mTOr 抑制剂、微管稳定剂、微管去稳定剂、阿里他汀 (auristatin)、多拉司他汀(dolastatin)、MetAP (甲硫氨酸氨肽酶）、蛋白质 CRMl 的核输出抑制剂、DPPIV 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、线粒体中磷酰基转移反应的抑制剂、蛋白质合成抑制剂、激酶抑制剂、CDK2 抑制剂、CDK9 抑制剂、驱动蛋白抑制剂、HDAC 抑制剂、DNA 损伤剂、DNA 烷基化剂、DNA 嵌入剂、DNA 小沟结合剂、DHFR 抑制剂、以及海兔毒素肽、维生素 A 前体、叶酸。

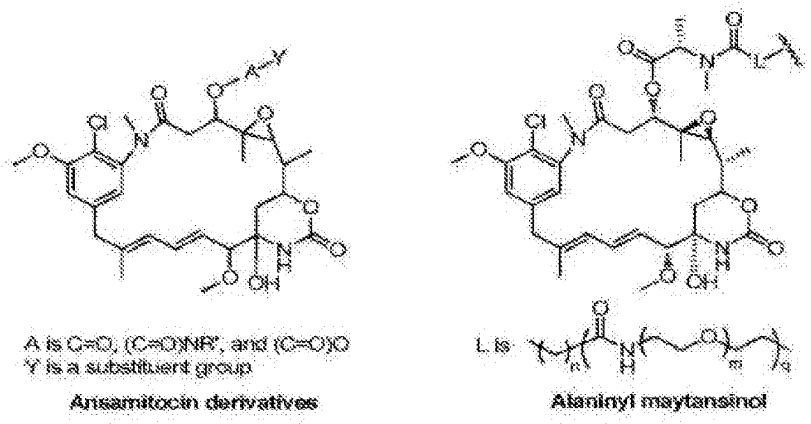
[51] 在本发明的一些实施方案中，所述“活性单元”为细胞毒性药物（例如抗代谢药、抗肿瘤抗生素、生物碱）、免疫增强剂或放射性同位素。优选地，所述药物可选自瓢菌素(amanitins)、蒽环类物(anthracyclines)、浆果赤霉素(baccatins)、喜碱(camptothecins)、西马多丁(cemadotins)、秋水仙碱(colchicines)、秋水树仙胺(colcimids)、考布他汀(combretastatins)、隐菲辛(cryptophycins)、圆皮海绵内酯(discodermolides)、多烯紫杉醇(docetaxel)、阿霉素(doxorubicin)、棘霉素(echinomycins)、艾榴塞洛素(eleutherobins)、埃博霉素(epothilones)、雌莫司汀(estramustines)、偏端霉素(lexitropsins)、美登素(maytansines)、氨甲蝶呤(methotrexate)、纺锤菌素(netropsins)、嘌呤霉素(puromycins)、根瘤菌素(rhizoxins)、紫杉烷(taxanes)、微管蛋白裂解素(tubulysins)、或长春花生物碱(vinca alkaloids)。更优选地，所述“药物”可选自 MMAD（单甲基澳瑞他汀 D,Monomethyl auristatin D）及其衍生物、MMAE（单甲基澳瑞他汀 E,Monomethyl auristatin E）及其衍生物、MMAF（单甲基澳瑞他汀 F,Monomethyl auristatin F）及其衍生物、美登素类衍生物 DM1（Mertansine derivative M1）、美登素类衍生物 DM4（Mertansine derivative M4）、倍癌霉素（Duocarmycine）及其衍生物、卡其霉素（Calicheamicin）及其衍生物、PBDA（Pyrrolobenzodiazepines）、阿霉素（Doxorubicin）、长春花生物碱（Vinca Alkaloids）、Metrotrexate、长春花碱（Vinblastine）、道诺霉素（Daunorubicin）及其衍生物、微管蛋白裂解素（tubulysins）及其衍生物。

[52] 在某些特定的实施例中，所述的“活性单元”是美登素(maytansine)

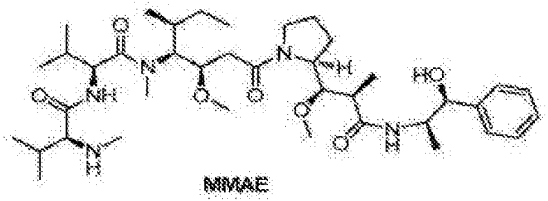
或类美登素(maytansinoids)。美登素化合物通过抑制微管蛋白的微管形成来抑制细胞增殖(Science 1975，189，1002-1005；US 5208020)。类美登素是美登素的衍生物。美登素和类美登素都具有高效的细胞毒性，但是它们在癌症治疗的临床应用上具有很大的局限性，这主要是源于此类分子对肿瘤的低选择性。但是，这种高细胞毒性促使它们成为抗体药物偶联物的首选药物部分。以下列出了美登素，类美登素，以及在抗体药物偶联物应用中经常利用的三个类美登素分子结构。

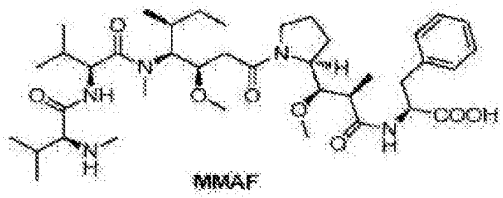


[53] 合成类美登素的主要原料是美登醇(maytansinol)，主要由安丝菌素(ansamitocins)水解得到。安丝菌素可以通过发酵的方式制备。安丝菌素衍生物(WO 2012/061590)和丙氨酰基美登醇(US 2012/0121615)据报道也可作为抗体药物偶联物的药物“弹头”。

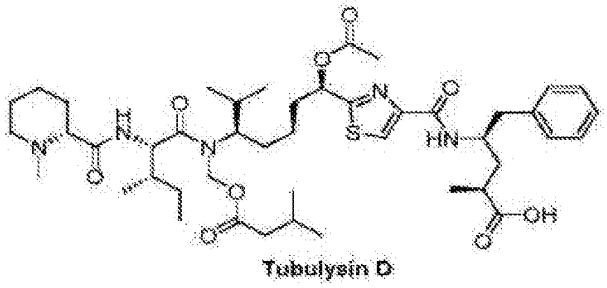


[54] 在某些特定的实施例中，所述的“活性单元”是耳抑素肽类(auristatins)药物。耳抑素肽类药物是海兔毒素 10(dolastatin 10)的类似物，而后者是从海洋软体动物海兔体内分离出来的具有生物活性的多肽(US 7498298)。海兔毒素 10 通过结合微管蛋白(与长春新碱同样的结合区域)而抑制微管蛋白聚合。海兔毒素 10，耳抑素肽 PE，耳抑素肽 E 都是线性多肽，含有四个氨基酸(其中三个氨基酸是海兔毒素类化合物所独有的)和 C-端酰胺基团。两个代表性的耳抑素肽类化合物，单甲基耳抑素肽 E(MMAE)和单甲基耳抑素肽 F(MMAF)，都是抗体药物偶联物的首选药物部分。

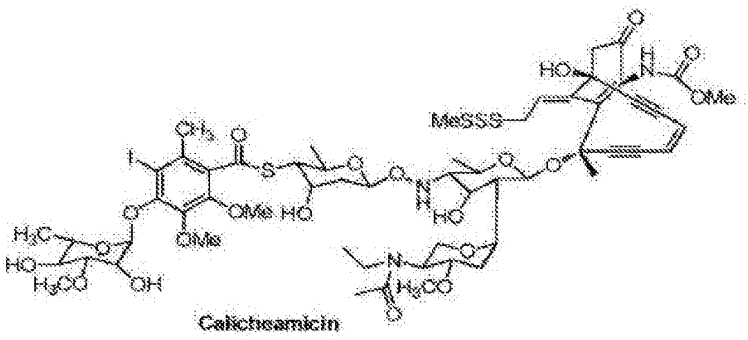




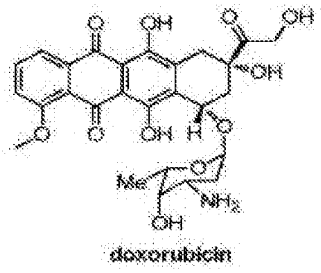
[55] 在某些特定的实施例中，所述的“活性单元”是是 Tubulysins 类药物。Tubulysins 是从粘细菌中提取出来的一类天然产物，能有效抑制微管蛋白的聚合，因此具有抗细胞有丝分裂的活性，其中 Tubulysin D 的活性最好。Tubulysin D 是一个复杂的四肽化合物，其结构中含有 O-酰基/N,O-缩醛官能团，因此在酸性和碱性条件下都不稳定。US2011/0021568 和 US 2013/0224228 分别披露了一系列 tubulysin 的类似物，其结构中去除了以上不稳定官能团，同时又具有高细胞活性。



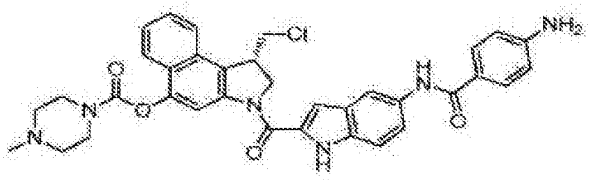
[56] 在某些特定的实施例中，所述的“活性单元”是卡奇霉素类(calichemicins)药物。卡奇霉素类药物是抗肿瘤抗生素，通过结合 DNA 小沟并促使特定位点双螺旋 DNA 断裂，而导致细胞凋亡。卡奇霉素类药物具有体外亚皮克摩尔级别的高活性，但是它们的低治疗指数排除了临床应用前景。然而这种高活性却是它们成为抗体药物偶联物的理想候选药物(如吉妥单抗和 Inotuzumab Ozogamicin)。



[57] 在某些特定的实施例中，所述的“活性单元”是阿霉素类(doxorubicins)。阿霉素能够嵌入 DNA 双螺旋结构从而阻断 DNA 复制，因此被用作化疗药物。但是由于阿霉素类较低的细胞 毒性(针对人源癌细胞系，半数抑制浓度为 0.1-0.2 微摩尔，而用于抗体药物偶联物的细胞毒性药物活性通常为亚纳摩尔级)，导致其在抗体药物偶联物中的应用并不普遍。

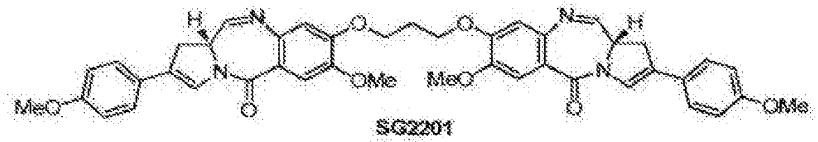


[58] 在某些特定的实施例中，所述的“活性单元”是苯并二吡咯类抗生素(duocarmycins,CC-1065 等) 和 其 它 的 环 丙 基 吡 咯 吲 哚 -4- 酮(cyclopropapyrroloind-4-one,CPI)衍生物。这类化合物是有效的 DNA 小沟结合-烷基化试剂。环丙苯并吲哚-4-酮(cyclopropabenzindol-4-one,CBI)类似物的化学结构更稳定，生物活性更高，而且与它们含有天然 CPI 烷基化亚基的父系化合物相比更容易合成。一个代表性的 CBI 衍生物是酚羟基保护衍生物 CBI(见下图)，具有弱化的前药毒性和增强的水溶性。

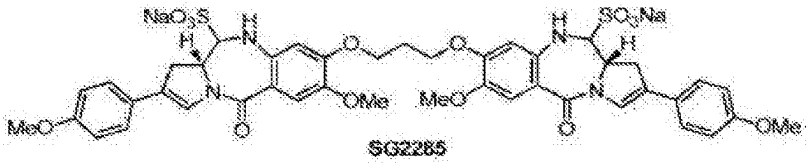


[59] 在某些特定的实施例中，所述的“活性单元”是吡咯并苯二氮卓类

(pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodi-azepines， PBDs)或者 PBD 二聚体类(PBD dimers)。PBD 是一类由链霉菌产生的天然产物，其独特特性在于能够在 DNA 小沟，确切是在嘌呤-鸟嘌呤-嘌呤序列处，形成非扭曲的共价加和物。应用 PBD 作为部分小分子策略靶向锁定 DNA 序列以及作为新型的抗癌和抗菌药物引起了越来越多的兴趣(Biochemistry 2008, 47, 11818-11829)。应用一个柔性碳链连接两个 PBD 单元的 C8/C8′的羟基基团，所得的二聚体具有增强的生物活性(WO 2011/130616)。PBD 二聚体被认为是可以产成序列选择性的 DNA 损伤，例如倒序的 5′-Pu-GATC-Py-3′链间交联，从而导致其生物活性。这些化合物已被证明是高效的细胞毒性药物，可作为抗体药物偶联物的备选药物。



SG2201



SG2285

[60] 在其他特定的实施例中，所述的“活性单元”是并不仅仅局限于上述提到的类别，还包括所有可用于抗体药物偶联物的药物。

[61] 本发明中的术语“药物组合物”表示组合在一起以实现某种特定目的的至少一种药物以及任选地可药用载体或辅料的组合。在某些实施方案中，所述药物组合物包括在时间和/或空间上分开的组合，只要其能够共同作用以实现本发明的目的。例如，所述药物组合物中所含的成分可以以整体施用于对象，或者分开施用于对象。当所述药物组合物中所含的成分分开地施用于对象时，所述成分可以同时或依次施用于对象。优选地，所述可药用载体是水、缓冲水溶液、等渗盐溶液如 PBS(磷酸盐缓冲液)、葡萄糖、甘露醇、右旋葡萄糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素、碳酸镁、0.3%甘油、透明质酸、乙醇或聚亚烷基二醇如聚丙二醇、甘油三酯等。所用可药用载体的类型尤其依赖于根据本发明的组合物是否配制为用于口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉施用。根据本发明的组合物可包含润湿剂、乳化剂或缓冲液物质作为添加剂。

[62] 本发明的药物组合物、疫苗或者药物制剂可通过任何适宜的途径施

用，例如可口服、鼻、皮内、皮下、肌内或静脉内施用。

[63] 本发明中的术语“有效量”包含足以改善或预防医学疾病的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：例如，待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

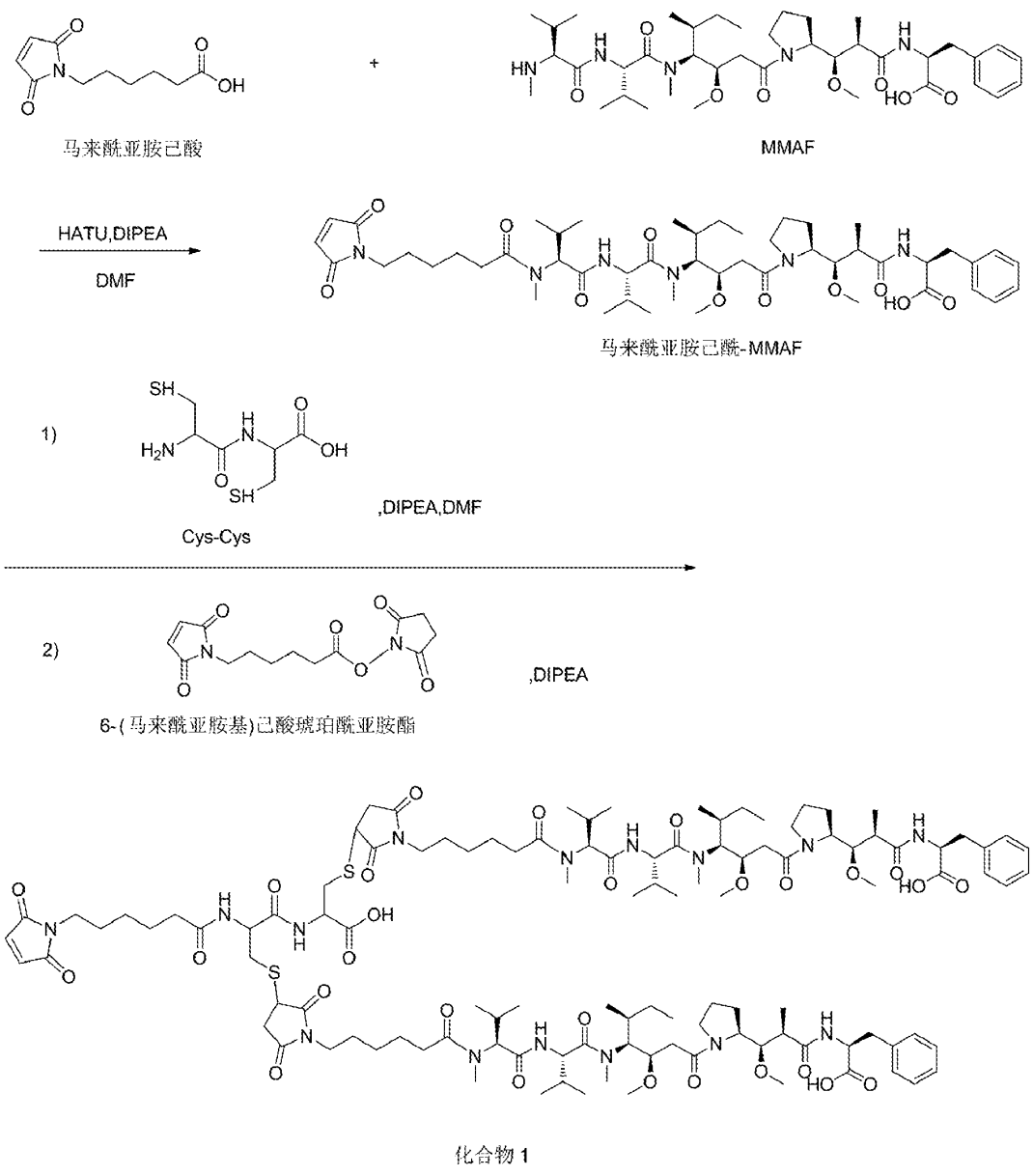
[具体实施例]

[64] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件或按照制造厂商建议的条件进行，未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。除非另外说明，否则所有的百分数、比率、比例、或份数按重量计。

[65] 本发明中的重量体积百分比中的单位是本领域技术人员所熟知的，例如是指在 100 毫升的溶液中溶质的重量。

[66] 除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用于与本领域熟悉人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明办法中。文中所述的较佳实施方式与材料仅作示范之用。

[67] 实施例 1 化合物 1 的制备



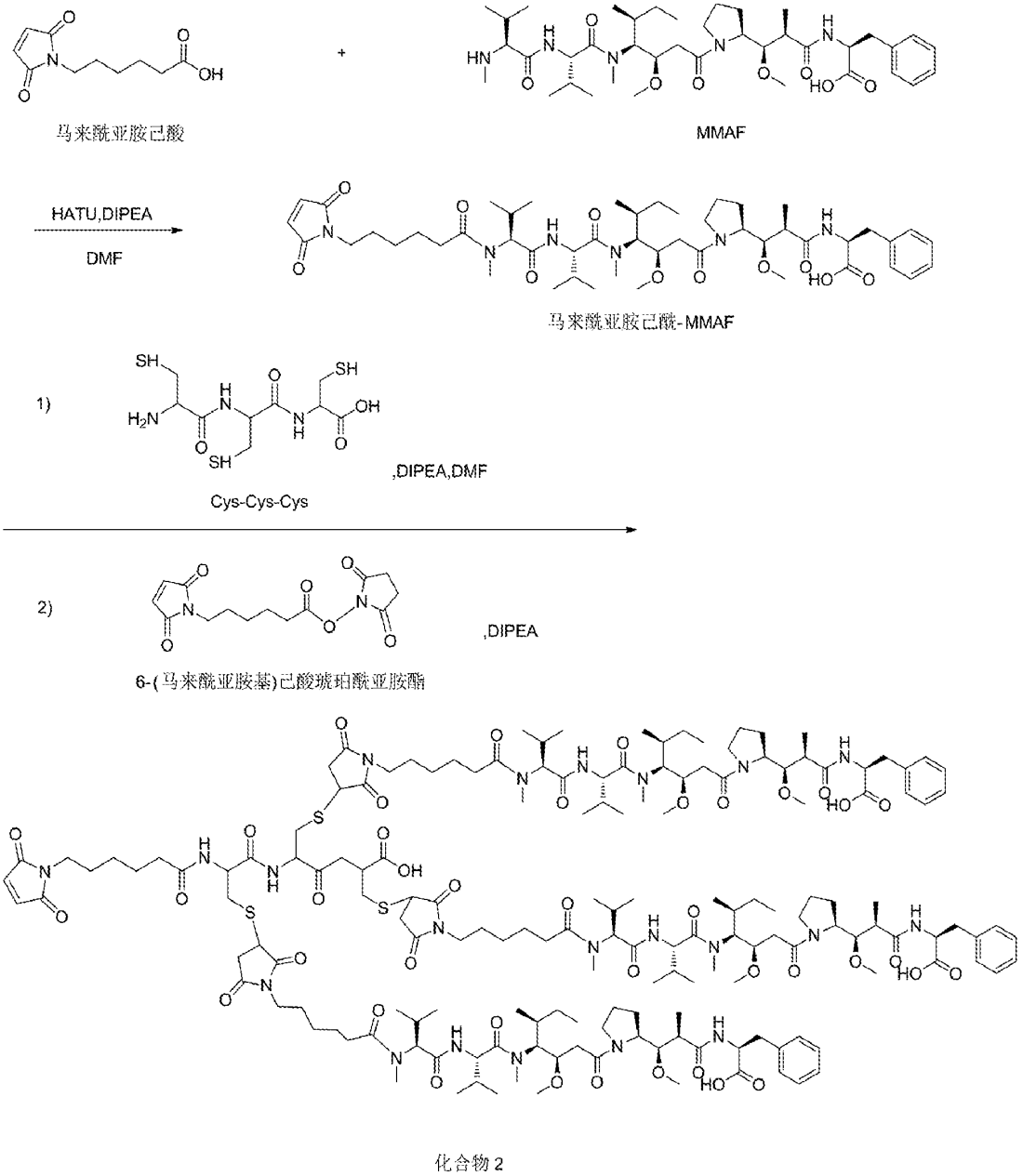
化合物 1

[68] 将 145.4 mg 马来酰亚胺己酸溶于 10 mL DMF 中，加入 244.7 mg HATU 和 226 uL DIPEA，室温搅拌。将 201.9 mgMMAF 溶于 5 mL DMF 中，缓慢滴加至上述反应体系中，室温搅拌 16 h。减压蒸馏出溶剂，制备液相法纯化，得到产品（马来酰亚胺己酰-MMAF，Mc-MMAF）90.3 mg，收率 36%。LC-MS ：$(M+H)^+$ 924.8，$(M-H)^-$ 923.2。

[69] 将 36.1 mg 马来酰亚胺己酰-MMAF 溶于 1.5 mL DMF 中，加入 5.6 mg Cys-Cys 和 2.1 uL DIPEA，室温搅拌 3 h，再加入 1.1 mg Cys-Cys，室温搅拌 2 h。加入 17.7 mg 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯和 25 uL DIPEA，室温搅拌 15 h。减压蒸馏出溶剂，制备液相法纯化，得到化合

物 1 20.0mg，收率 45%。LC-MS ：$(M+2H)^{2+}$ 1134.1，$(M-2H)^{2-}$ 1132.2。

[70] 实施例 2 化合物 2 的制备

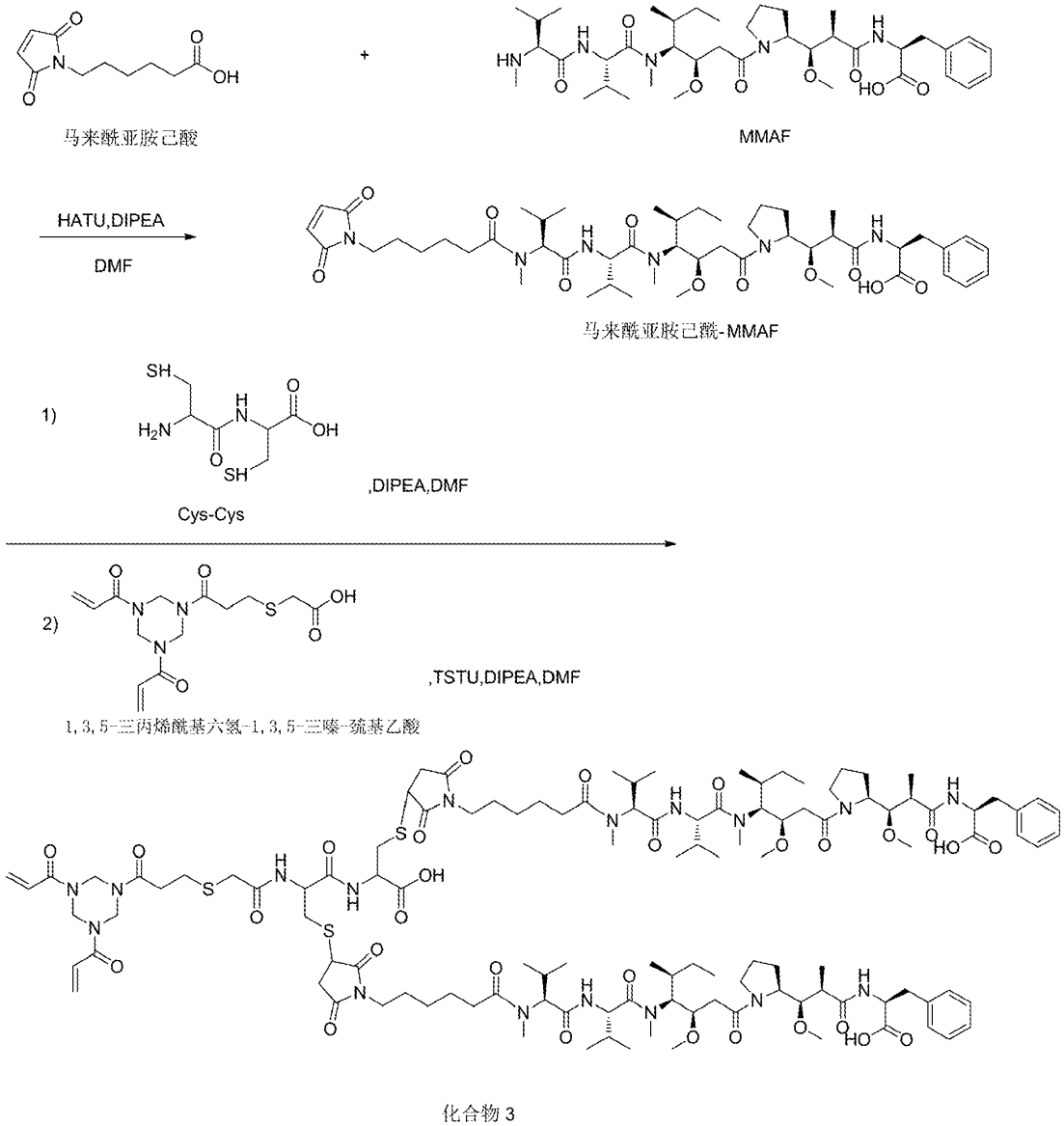


化合物 2

[71] 按照实施例 1 的制备方法制备马来酰亚胺己酰-MMAF。将 40.1 mg 马来酰亚胺己酰-MMAF 溶于 1.5 mL DMF 中，加入 4.4 mg Cys-Cys-Cys 和 2.1 uL DIPEA，室温搅拌 2 h，再加入 1.8 mg Cys-Cys-Cys，室温反应 2 h，再加入 0.9 mg Cys-Cys-Cys，室温反应 2 h。加入 13.5 mg 6-(马来酰亚胺基)己酸琥珀酰亚胺酯和 21 uL DIPEA，室温搅拌 15 h。减压蒸馏出

溶剂，制备液相法纯化，得到化合物 2 23.1 mg，收率 49%。LC-MS：$(M+3H)^{3+}$ 1648.4，$(M-3H)^{3-}$ 1646.3。

[72] 实施例 3 化合物 3 的制备

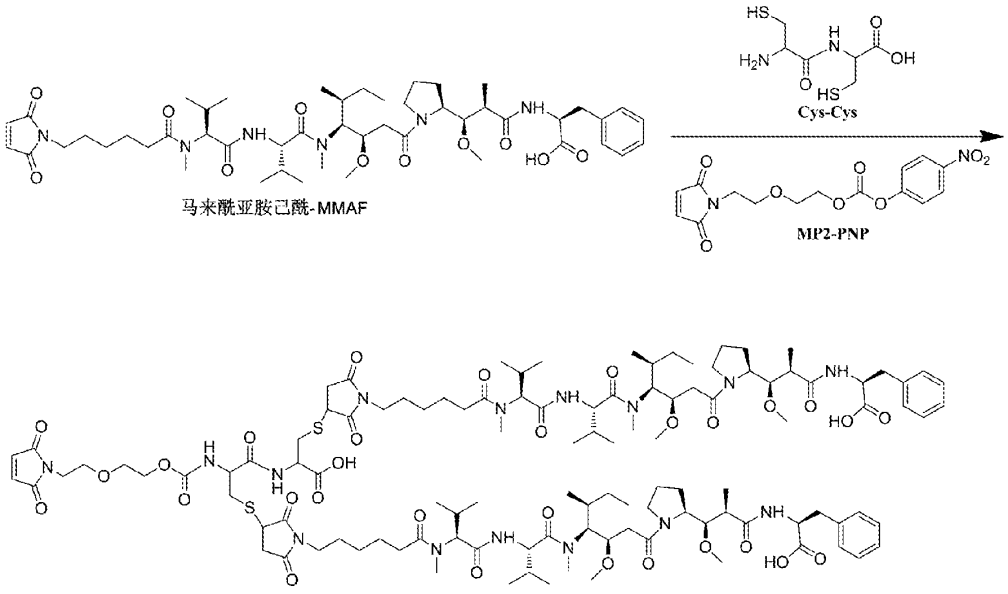


化合物 3

[73] 按照实施例 1 的制备方法制备马来酰亚胺己酰-MMAF。将 31.6 mg 马来酰亚胺己酰-MMAF 溶于 2 mL DMF 中。加入 3.9 mg Cys-Cys 和 2.9 uL DIPEA，室温搅拌 4 h，再加入 1.2 mg Cys-Cys，室温搅拌 3 h，再加入 0.8 mg Cys-Cys，室温搅拌 16 h。另将 12.1 mg 1,3,5-三丙烯酰基六氢-1,3,5-三嗪-巯基乙酸和 10.4 mg TSTU 溶于 1.5 mL DMF 中，加入 17 uL DIPEA，室温搅拌 2 h 后加入上述反应体系中，室温搅拌 5 h。减压蒸馏

出溶剂，制备液相法纯化，得到化合物 3 18.4 mg，收率 29%。LC-MS: $(M+2H)^{2+}$ 1199.3，$(M-2H)^{2-}$ 1197.4。

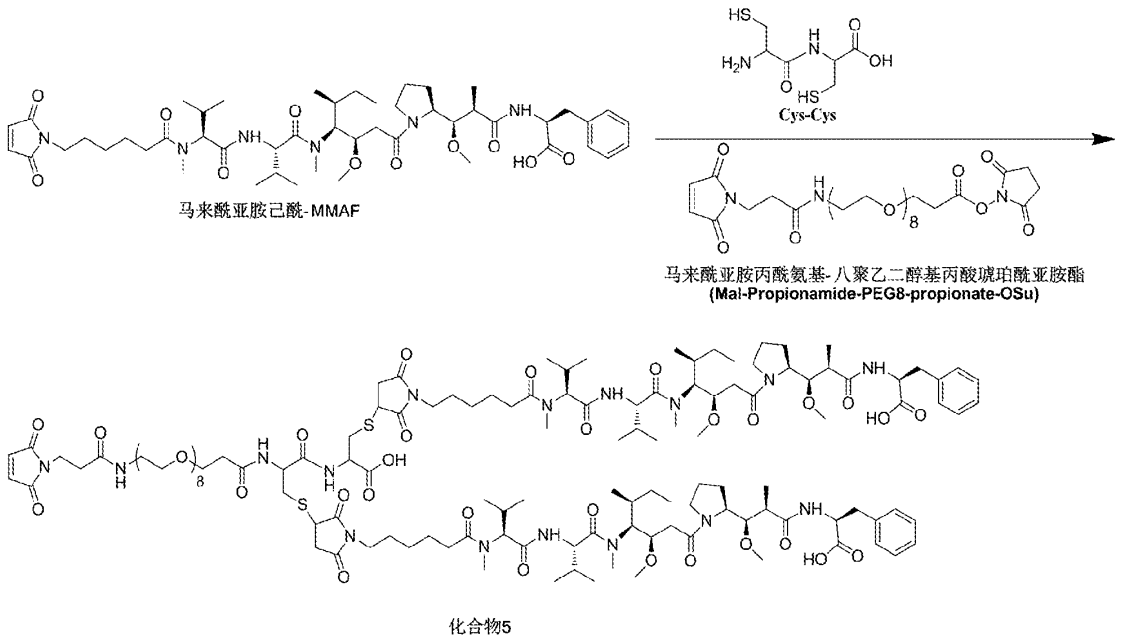
[74] 实施例 4 化合物 4 的制备



化合物4

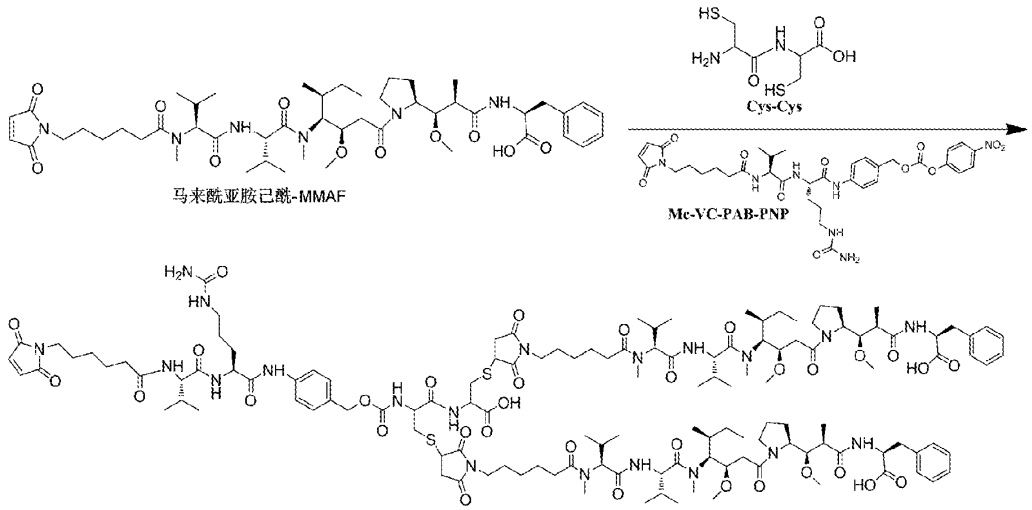
[75] 按照实施例 1 的制备方法制备马来酰亚胺己酰-MMAF。将 55.0 mg 马来酰亚胺己酰-MMAF 溶于 1.5 mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入 11.6 mg Cys-Cys，加入 4.3 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 3 h。加入 36.1 mg MP2-PNP（2-(2-Maleimidoethoxy)ethyl (4-nitrophenyl) carbonate，马来酰亚胺基乙氧基乙基-对硝基苯碳酸酯）于反应体系，再加入 51 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 15 h。减压蒸馏出溶剂，制备液相法纯化，得到化合物 4 18.0 mg，收率 27%。LC-MS: $(M+2H)^{2+}$ 1142.3, $(M-2H)^{2-}$ 1141.1。

[76] 实施例 5 化合物 5 的制备



[77] 按照实施例 1 的制备方法制备马来酰亚胺己酰-MMAF。将 55.0 mg 马来酰亚胺己酰-MMAF 溶于 1.5 mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入 11.6 mg Cys-Cys，加入 4.3 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 3 h。加入 71.0 mg 马来酰亚胺丙酰氨基-八聚乙二醇基丙酸琥珀酰亚胺酯（Mal-Propionamide-PEG8-propionate-OSu）于反应体系，再加入 51 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 15 h。减压蒸馏出溶剂，制备液相法纯化，得到化合物 5 19.3mg。收率 28%，LC-MS：$(M+2H)^{2+}$ 1324.1，$(M-2H)^{2-}$ 1324.0。

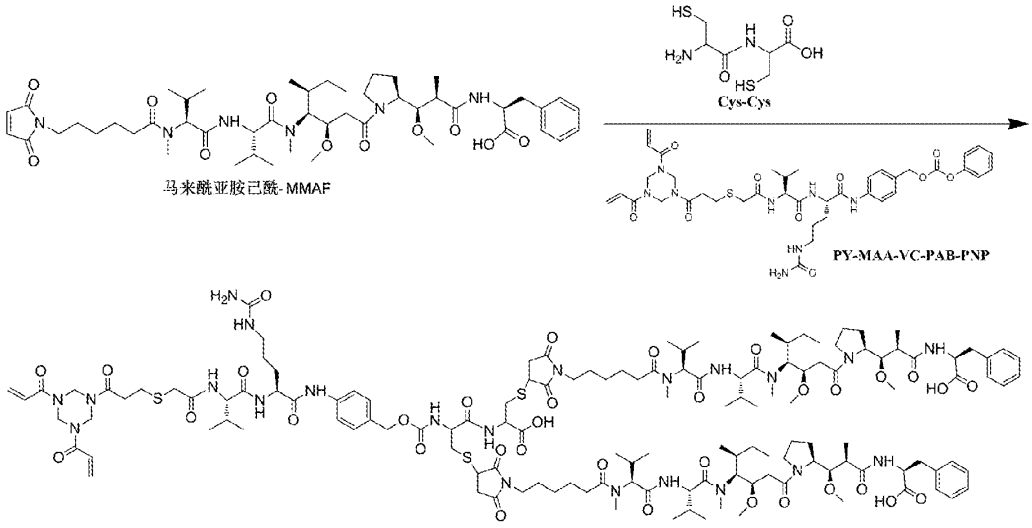
[78] 实施例 6 化合物 6 的制备



化合物6

[79] 按照实施例 1 的制备方法制备马来酰亚胺己酰-MMAF。将 63.0 mg 马来酰亚胺己酰-MMAF 溶于 2.0 mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入 13.3 mg Cys-Cys，加入 4.8 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 3 h。加入 86.6 mg Mc-VC-PAB-PNP 于反应体系，再加入 58 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 15 h。减压蒸馏出溶剂，制备液相法纯化，得到化合物 6 47.4 mg，收率 52%，LC-MS：$(M+2H)^{2+}$ 1336.0，$(M-2H)^{2-}$ 1334.6。

[80] 实施例 7 化合物 7 的制备



化合物7

[81] 按照实施例 1 的制备方法制备马来酰亚胺己酰-MMAF。将 46.6 mg

马来酰亚胺己酰-MMAF 溶于 2.0 mL N,N-二甲基甲酰胺中，加入 10.9 mg Cys-Cys，加入 3.6 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 3 h。加入 84.4mg PY-MAA-VC-PAB-PNP 于反应体系，再加入 48 uL N,N-二异丙基乙胺，室温搅拌 15 h。减压蒸馏出溶剂，制备液相法纯化，得到化合物 7 31.0 mg，收率 43%，LC-MS：$(M+2H)^{2+}$ 1401.2，$(M-2H)^{2-}$ 1399.4。

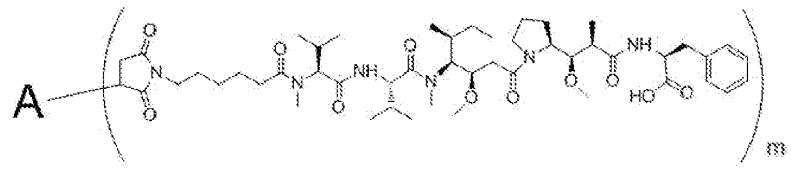
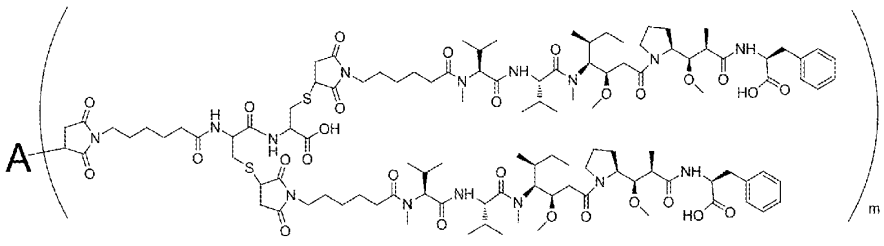
[82] 实施例 8 抗体药物偶联物（ADC）的制备

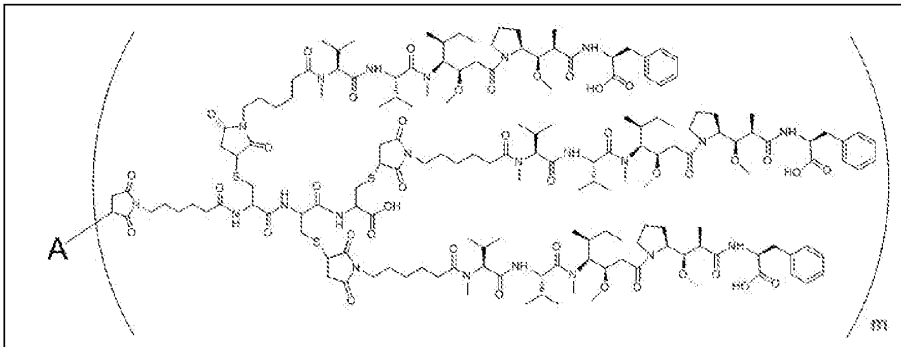
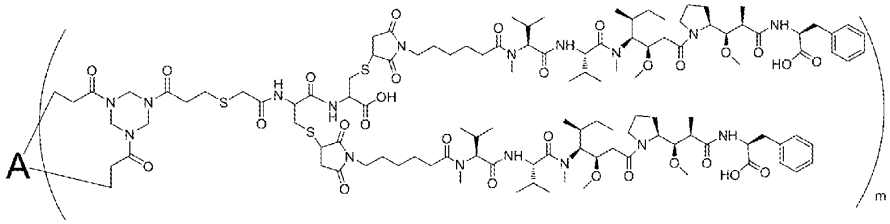
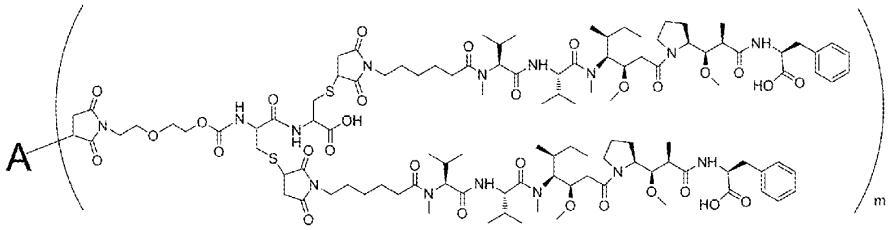
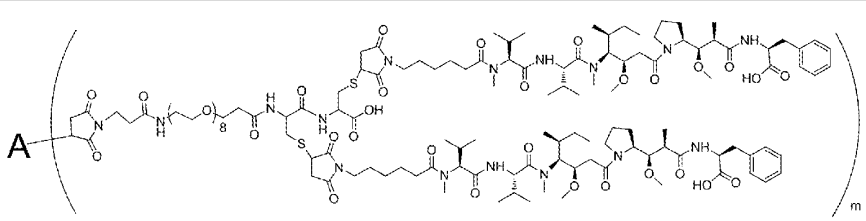
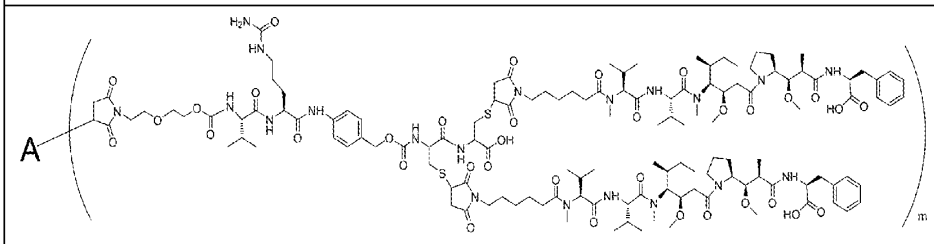
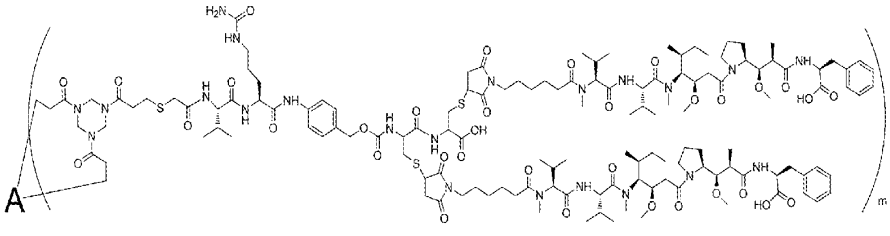
[83] 抗体药物偶联物合成的通用方法为：

[84] 方法 A：用 pH=7.4 的 PBS 缓冲液，把抗 Her-2 抗体配制为 10 mg/mL 的溶液，加入 2.4 摩尔当量的 TCEP，振荡混匀 1 小时，再加入 5.0 摩尔当量的连接子-毒素，振荡混匀，反应 1 h，反应结束后，超滤除去残留的小分子，加载至疏水色谱（HIC-HPLC）进行 DAR、药物分布、裸抗比例检测。

[85] 方法 B：用 pH=9 的硼酸-硼砂缓冲液，把抗 Her-2 抗体配制为 10 mg/mL 的溶液，加入 5 摩尔当量的 TCEP，振荡混匀 1 小时，再加入 6.0 摩尔当量的连接子-毒素，振荡混匀，反应 3 h，反应结束后，超滤除去残留的小分子，加载至疏水色谱（HIC-HPLC）进行 DAR、药物分布、裸抗比例检测。

[86] 采用上述通用的 ADC 制备方法制备出如下化合物（A 为任一抗体或其功能性结合片段，m 为 1、2、3、4、5、6、7、8），下述化合物的：

	ADC-0
	ADC-10

	ADC-34
	ADC-11
	ADC-9
	ADC-8
	ADC-3
	ADC-2

[87] 实施例 9 ADC 对 SK-BR-3 肿瘤细胞株的抑制实验

[88] 消化 SK-BR-3 肿瘤细胞(人乳腺癌细胞)，离心收集后，进行计数，并将细胞液稀释至 0.5-1.5×10^5 个/mL，96 孔板中每孔加入 100 μL 该细胞悬液。37℃、5%CO_2 培养箱孵育过夜；第二天加入相应 9 个浓度梯度的 ADC 药物，外加一组零浓度 ADC 药物的细胞对照。培养 72h 后采用 Cell Counting Kit-8（简称 CCK-8 试剂盒）进行活性显色，显色后的 96 孔板通过酶标仪检测 450 nm 处 OD 值。Prism 软件通过 OD 值计算得出 IC50 值。当拟合的曲线呈“S 型曲线”且 R^2 ≥ 0.95 时，IC50 值有效可报告。

[89] 我们选取了平均 DAR 值为 3.87 的 ADC-0（比较例 1）、平均 DAR 值为 7.18 的 ADC-0（比较例 2）、平均 DAR 值为 4.3 的 ADC-10（比较例 3）、平均 DAR 值为 4.29 的 ADC-34（比较例 4）进行 SK-BR-3 肿瘤细胞株的抑制实验，其 IC50 值如表 2 所示：

表 2 SK-BR-3 肿瘤细胞株的抑制实验细胞评价

	ADC	DAR	IC50 (10^{-3} nmol/L)				R^2	最大抑制率（%）
			ADC	ADC 用量变化*	MMAF	MMAF 用量变化*		
比较例 1	ADC-0	3.87	5.52	0	21.3624	0	0.999	89.93
比较例 2	ADC-0	7.18	3.55	-35.7%	25.489	19.3%	0.996	83.78
比较例 3	ADC-10	4.3	1.88	-65.9%	16.168	-24.3%	0.997	91.55
比较例 4	ADC-34	4.29	0.8	-85.5%	10.296	-51.8%	1.000	88.09

*以比较例 1 作为基数，抗体用量变化＝（比较例 X－比较例 1）/比较例 1；X 代表相应比较例；

*以比较例 1 为基数，MMAF 用量变化＝（比较例 X－比较例 1）/比较例 1；X 代表相应比较例；

[90] 比较例 2 通过提高抗体中连接的 MMAF 数量位点，将 DAR 值提高到 7.18。与比较例 1 相比，在达到相同的效果的情况下，比较例 2 可以有效降低抗体使用量（即 ADC 中的抗体量，在不考虑合成过程抗体用量损耗的情况下，抗体的使用量等于 ADC 的浓度），但 MMAF 使用量增加了 19.3%。

[91] 比较例 3 在一个连接子上连接有两个 MMAF，DAR 值（4.3）与比较例 1（3.87）相当，与比较例 1 相比，在达到相同的效果的情况下，比较例 3 有效降低抗体使用量 65.9%，MMAF 使用量降低 24.3%。

[92] 比较例 4 在一个连接子上连接有三个 MMAF，DAR 值与比较例 1 相

当，与比较例 1 相比，在达到相同的效果的情况下，比较例 4 有效降低抗体使用量 85.5%，MMAF 使用量降低 51.8%。

[93] 从以上比较数据来看，ADC-10 和 ADC-34 表现出更高效的细胞活性，其所带来的效果并不仅仅是单纯的通过提高抗体中 MMAF 的数量来提升 ADC 的效果，还进一步反映了在携带相同 MMAF 数量的情况下，通过单点多弹头（细胞毒药物）的连接方式，起到了有效降低抗体使用量以及毒素使用量的效果，起到了意料不到的技术效果。并且通过单连接点多弹头的方式，还能极为有效的提高 ADC 产品的均一性，可以有效的促进药品药物生产、质量控制过程。

[94] 本发明已通过各个具体实施例作了举例说明。但是，本领域普通技术人员能够理解，本发明并不限于各个具体实施方式，普通技术人员在本发明的范围内可以作出各种改动或变型，并且在本说明书中各处提及的各个技术特征可以相互组合，而仍不背离本发明的精神和范围。这样的改动和变型均在本发明的范围之内。