



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115666656 A

(43) 申请公布日 2023.01.31

(21) 申请号 202180020233.6

M·A·维基德文 S·S·范博凯尔

(22) 申请日 2021.01.13

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

(30) 优先权数据

20151551.7 2020.01.13 EP

专利代理师 张拥 孙占华

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.09

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 47/64 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/050594 2021.01.13

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/144313 EN 2021.07.22

(71) 申请人 西纳福克斯股份有限公司

地址 荷兰奥斯

(72) 发明人 F·L·范代尔夫特 J·胡根布姆

S·珀帕 A·J·范沙尔克

L·德比弗 R·范吉尔

权利要求书5页 说明书92页

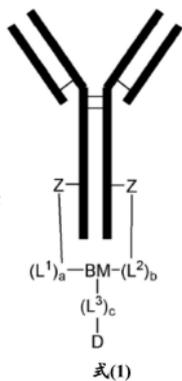
序列表5页 附图18页

(54) 发明名称

通过环加成双侧功能化抗体

(57) 摘要

本发明提供了具有有效负载与抗体的比率为1的抗体-有效负载缀合物。抗体-有效负载缀

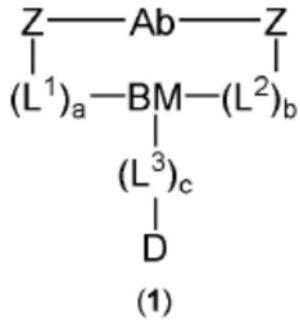


合物具有结构(1)：

其中：-a、b和c

各自独立地是0或1；-L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>是接头；-D是有效负载；-BM是分支部分；-Z是可通过环加成反应获得的连接基团。本发明还提供了制备根据本发明的抗体-有效负载缀合物的方法、在该制备方法中的中间体化合物以及根据本发明的抗体-有效负载缀合物的医学用途。

1. 一种具有结构(1)的抗体-有效负载缀合物



其中:

-Ab是抗体;

-a、b和c各自分别是0或1;

-L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>是接头;

-D是有效负载;

-BM是分支部分;

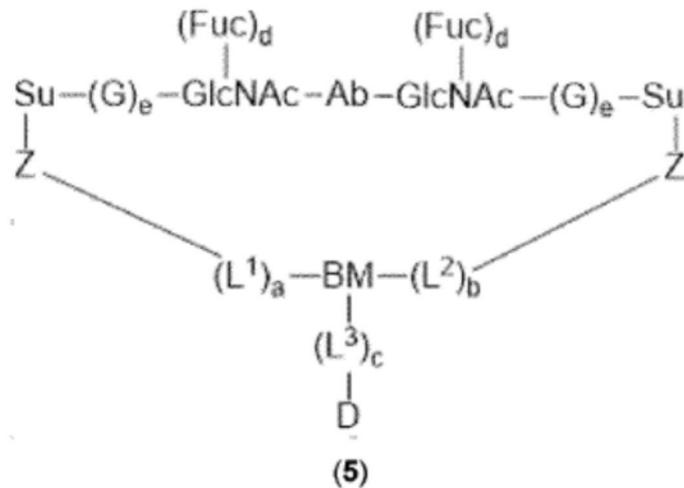
-Z是可通过环加成反应获得的连接基团。

2. 根据权利要求1所述的抗体-有效负载缀合物,其中Z可以通过[4+2]环加成或1,3-偶极环加成获得。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体-有效负载缀合物,其中Z含有三唑、环己烯、环己二烯、异噁唑啉、异噁唑烷、吡唑啉、哌嗪。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其中L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>中的每一个,如果存在,是选自C、N、O、S和P的至少2个原子、优选5至100个原子的链。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其具有结构(5):



其中:

-e为0-10范围内的整数;

-Su是单糖;

-G是单糖部分;

-GlcNAc是N-乙酰葡萄糖胺部分;

-Fuc是岩藻糖部分;

-d是0或1。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其中a和b是1,优选其中L<sup>1</sup>和L<sup>2</sup>相同,更优选其中所述抗体-有效负载缀合物是根据权利要求5的结构并且每次出现的Su、Z、G和e也相同。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其中分支部分BM选自碳原子、氮原子、磷原子、(杂)芳环、(杂)环或多环部分。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其中L<sup>3</sup>是-(L<sup>4</sup>)<sub>n</sub>-(L<sup>5</sup>)<sub>o</sub>-(L<sup>6</sup>)<sub>p</sub>-(L<sup>7</sup>)<sub>q</sub>-,其中L<sup>4</sup>、L<sup>5</sup>、L<sup>6</sup>和L<sup>7</sup>是一起形成接头L<sup>3</sup>的接头;n、o、p和q分别是0或1,优选其中:

(a) 接头L<sup>4</sup>可以由-(W)<sub>k1</sub>-(A)<sub>d1</sub>-(B)<sub>e1</sub>-(A)<sub>f1</sub>-(B)<sub>g1</sub>-C(O)-表示,其中:

-d1=0或1;

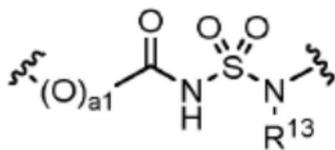
-e1=0-10范围内的整数;

-f1=0或1;

-g1=0-10范围内的整数;

-k1=0或1,条件是如果k1=1,则d1=0;

-A是根据结构(23)的磺酰胺基



(23)

其中a1=0或1,且R<sup>13</sup>选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳烷基,C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳烷基任选地被一个或多个选自O、S和NR<sup>14</sup>的杂原子取代和间断,其中R<sup>14</sup>独立地选自氢和C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基,或R<sup>13</sup>是可能通过间隔基部分连接到N的D;

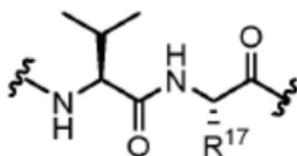
-B是-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-或-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-部分,或(B)<sub>e1</sub>是-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>e3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-部分,其中e3的定义与e1相同;

-W是-OC(O)-、-C(O)O-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)-、-C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)NH-或-(4-Ph)CH<sub>2</sub>NHC(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)NH-,

其中m是0-10范围内的整数

和/或

(b) 接头L<sup>5</sup>是肽间隔基,优选二肽,其中L<sup>5</sup>由一般结构(27)表示:

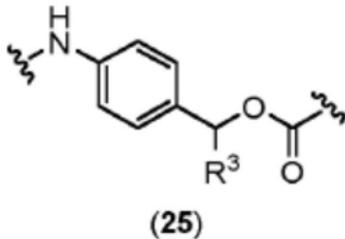


(27)

其中,R<sup>17</sup>=CH<sub>3</sub>或CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>;

和/或

(c) 接头L<sup>6</sup>是自分解的间隔基,优选是根据结构(25)的对氨基苄氧羰基(PABC)衍生物。



R<sup>3</sup>是H、R<sup>4</sup>或C(O)R<sup>4</sup>,其中R<sup>4</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>(杂)烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>(杂)环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>(杂)芳烷基,其被一个或多个选自O、S和NR<sup>5</sup>的杂原子任选地取代和间断,其中R<sup>5</sup>独立地选自氢和C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基,优选其中R<sup>3</sup>是H或C(O)R<sup>4</sup>,其中R<sup>4</sup>=4-甲基-哌嗪或吗啉,最优选其中R<sup>3</sup>是H;

和/或

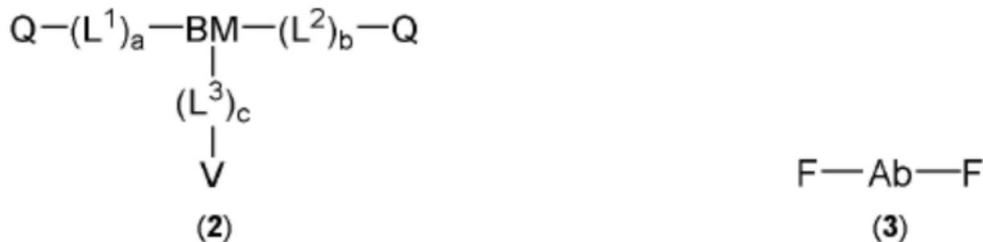
(d) 接头L<sup>7</sup>是根据结构-N-(C<sub>x</sub>-亚烷基)-C(O)-的氨基链烷酸间隔基,其中x是1-10范围内的整数;或

接头L<sup>7</sup>是根据结构-N-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>e6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>e7</sub>-C(O)-的乙二醇间隔基,其中e6是1-10范围内的整数,e7是1-3范围内的整数。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其中D是细胞毒素,选自PBD二聚体、吡啶并苯并二氮革二聚体(IGN)、烯二炔、PNU159,682、多卡霉素二聚体、鹅膏蕈碱和澳瑞他汀,优选PBD二聚体、吡啶并苯并二氮革二聚体(IGN)、烯二炔或PNU159,682。

10. 一种制备抗体-有效负载缀合物的方法,所述抗体-有效负载缀合物具有假定的有效负载与抗体的比率为1,包含以下步骤:

(a) 使含有至少两个反应基团Q的具有结构(2)的化合物与具有结构(3)的抗体反应,该抗体被两个反应基团F功能化:



其中:

-Ab是抗体;

-a、b和c各自分别是0或1;

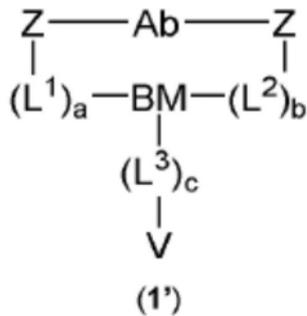
-L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>是接头;

-V是反应基团Q'或有效负载D;

-BM是分支部分;

-Q和F是能够进行环加成反应的反应基团,其中它们以连接基团Z连接;

以获得根据结构(1)的功能化抗体:



其中Z是通过Q与F环加成反应获得的连接基团；

其中在V是有效负载D的情况下，根据结构(1')的功能化抗体是抗体-有效负载缀合物；或在V是反应基团Q'的情况下，根据结构(1')的功能化抗体根据步骤(b)进一步反应；

(b) 在V=Q'的情况下，反应基团Q'与包含反应基团F'的有效负载反应以获得在V是有效负载D的情况下的抗体-有效负载缀合物。

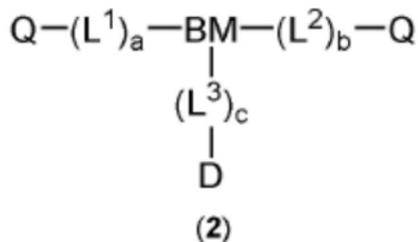
11. 根据权利要求10所述的方法，其中所述环加成反应为[4+2]环加成或1,3-偶极环加成反应。

12. 根据权利要求10或11所述的方法，其中Q包含末端炔烃或环辛炔部分，优选双环壬炔(BCN)、氮杂二苯并环辛炔(DIBAC/DBC0)或二苯并环辛炔(DIB0)或磺酰化二苯并环辛炔(s-DIB0)，更优选BCN或DIBAC/DBC0，最优选BCN。

13. 根据权利要求10至12中任一项所述的方法，其中在步骤(a)中获得根据结构(1)的功能化抗体，其中D是有效负载，并且不进行步骤(b)。

14. 根据权利要求10至13中任一项所述的方法，其中在步骤(a)中获得根据结构(1)的功能化抗体，其中D是反应基团Q，并且进行步骤(b)。

15. 一种具有结构(2)的化合物：



其中

-a、b和c各自分别为0或1；

-L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>是接头；

-D是有效负载；

-BM是分支部分；

-Q包含(杂)环辛炔部分。

16. 根据权利要求15所述的化合物，其中Q是双环壬炔(BCN)、氮杂二苯并环辛炔(DIBAC/DBC0)、二苯并环辛炔(DIB0)或磺酰化二苯并环辛炔(s-DIB0)，更优选BCN或DIBAC/DBC0，最优选BCN。

17. 根据权利要求15或16所述的化合物，其中D是细胞毒素。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的化合物，其中L<sup>1</sup>和L<sup>2</sup>均存在且相同。

19. 根据权利要求15至18中任一项所述的化合物,其中 $a=b=c=1$ 。
20. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至9中任一项中所述的抗体-有效负载缀合物和药学上可接受的载体。
21. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其用于治疗需要其的受试者。
22. 根据权利要求1至9中任一项所述的抗体-有效负载缀合物,其用于治疗癌症。
23. 用于根据权利要求21或22所述用途的抗体-有效负载缀合物,其中 $e=0$ 且所述缀合物不与Fc  $\gamma$  受体CD16结合。

## 通过环加成双侧功能化抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物缀合领域,特别涉及含有单一有效负载(药物-抗体比率为1)的抗体缀合物。更具体地,本发明涉及适合于通过环加成反应将有效负载连接至IgG型抗体的缀合物、组合物和方法。作为化合物、组合物和方法的单功能化抗体缀合物可用于,例如为靶向递送有效负载提供新药,例如高效细胞毒剂或免疫调节剂。

### 背景技术

[0002] 抗体-药物缀合物(ADC)(被认为是治疗中的灵丹妙药)由连接有药剂的抗体组成。抗体(也称为配体)可以是小蛋白形式(scFv's、Fab片段、DARPinS、Affibodies等),但通常是单克隆抗体(mAbs),这些抗体是基于它们对给定抗原的高选择性和亲和力、长循环半衰期和几乎没有免疫原性而选择的。因此,mAb作为精心选择的生物受体的蛋白质配体为药物的选择性靶向提供了理想的递送平台。例如,已知与特定癌症相关抗原选择性结合的单克隆抗体可通过结合、内化、细胞内加工和最终释放活性分解代谢物而用于将化学缀合的细胞毒剂递送至肿瘤。细胞毒剂可以是小分子毒素、蛋白质毒素或其他形式,如寡核苷酸。因此,可以选择性地清除肿瘤细胞,同时保留未被抗体靶向的正常细胞。类似地,抗菌药物(抗生素)与抗体的化学缀合可用于治疗细菌感染,而抗炎药物的缀合物正在研究用于治疗自身免疫性疾病,例如将寡核苷酸连接至抗体上是一种潜在的有前途的治疗神经肌肉疾病的方法。因此,将活性药物靶向递送至选择的特定细胞位置的概念是治疗多种疾病的有效方法,与相同药物的全身给药相比具有许多有益方面。

[0003] 使用单克隆抗体靶向递送特定蛋白质试剂的替代策略是通过将后一种蛋白质基因融合到一个(或多个)抗体的末端,该末端可以是轻链或重链(或两者)上的N端或C端。在这种情况下,将感兴趣的生物活性蛋白(例如蛋白质毒素如假单胞菌(Pseudomonas)外毒素A(PE38)或抗CD3单链可变片段(scFv))基因编码为与抗体的融合体(可能但不一定通过肽间隔基),因此将抗体表达为融合蛋白。肽间隔基可以包含或不包含蛋白酶敏感的切割位点。

[0004] 单克隆抗体也可以在蛋白质序列本身中进行基因修饰,以修饰其结构从而引入(或去除)特定特性。例如,可以在抗体Fc片段中进行突变以消除与Fc- $\gamma$ 受体的结合,可以调节与FcRn受体的结合或与特定癌症靶点的结合,或者可以对抗体进行工程改造以降低p1和控制循环中的清除率。癌症治疗中的新兴策略涉及使用能够与上调的肿瘤相关抗原(TAA或简单靶点)以及存在于破坏癌症的免疫细胞(例如T细胞或NK)上的受体结合的抗体,也称为T细胞或NK细胞重定向抗体。尽管免疫细胞重定向的方法已经有30多年的历史,但新技术正在克服第一代免疫细胞重定向抗体的局限性,特别是延长半衰期以允许间歇给药,降低免疫原性并提高安全性。最常见的,T细胞重定向双特异性抗体(TRBA)是通过将FAB片段的一个臂中的补体依赖区(CDR)基因交换为与T细胞上的CD3或CD137(4-1BB)紧密结合的抗体片段而产生的。然而,除了这些传统的与T细胞结合的双特异性抗体外,还开发了多种其他分子结构,通常是IgG型,例如Yu和Wang,J.Cancer Res.Clin.Oncol.2019,145,941—956中

所公开的。同样,NK细胞向肿瘤微环境的募集也在广泛研究中。NK细胞衔接通常基于插入到与CD16、CD56、NKp46或其他NK细胞特异性受体选择性结合的抗体(片段)的IgG骨架中。

[0005] ADC领域以及免疫细胞衔接领域中的一种常见策略采用阻断(nihilation)或消除抗体与Fc-抗受体的结合能力,这具有多种药理学意义。去除与Fc-结受体的结合的第一个后果是减少Fc- $\gamma$ 受体介导的抗体摄取,例如通过巨噬细胞或巨核细胞的摄取,这可能导致剂量限制性毒性,如例如**Kadcyla**<sup>®</sup>(曲妥珠单抗(trastuzumab)-DM1)和LOP628报道的。体内抗体的选择性去糖基化为治疗患有抗体介导的自身免疫的患者提供了机会。去除重组治疗性糖蛋白中的高甘露糖糖型可能是有益的,因为已知高甘露糖糖型会通过内源性甘露糖受体的非特异性摄取而损害治疗功效并导致快速清除,如例如Gorovits和Krinos-Fiorotti, *Cancer Immunol. Immunother.* 2013, 62, 217-223和Goetze等人, *Glycobiology* 2011, 21, 949-959所述,均通过引用纳入本文。此外, Van de Bovenkamp等人, *J. Immunol.* 2016, 196, 1435-1441(通过引用纳入本文)描述了高甘露糖聚糖如何影响免疫力。Reusch和Tejada, *Glycobiology* 2015, 25, 1325-1334(通过引用纳入本文)描述了单克隆抗体中不适当的糖基化可能导致表达的Ig基因的无效产生。在免疫治疗领域,糖基化抗体与免疫细胞上的Fc- $\gamma$ 受体的结合可能会在抗体与肿瘤相关抗原结合之前诱导免疫系统的全身激活,从而导致细胞因子风暴(细胞因子释放综合征, CRS)。因此,为了降低CRS的风险,临床上绝大多数的免疫细胞衔接器都是基于缺乏与Fc- $\gamma$ 受体结合的能力的Fc沉默抗体。此外,双特异性抗体领域的多家公司正在定制分子结构,其在靶标结合与免疫细胞结合抗体结构域方面具有确定的比率。例如, Roche正在开发基于不对称单克隆抗体的T细胞衔接器,该抗体通过两个CDR保持了对TAA(例如CD20或CEA)的二价结合能力,但仅一个额外的抗CD3片段被改造成两条重链之一(靶标结合:CD3结合的比率为2:1)。同样策略可用于T细胞与抗CD137(4-1BBB)的结合/激活或NK细胞与抗CD16、CD56、NKp46或其他NK细胞特异性受体的结合/激活。

[0006] 可以通过多种方式实现与Fc- $\gamma$ 受体的结合的消除,例如通过抗体(特别是Fc片段)中的特定突变或通过去除天然存在于Fc片段中的聚糖(C<sub>H</sub>2结构域,N297附近)。聚糖去除可以通过Fc结构域中的基因修饰来实现,例如N297Q突变或T299A突变,或通过抗体的重组表达后使用例如PNGase F或糖苷内切酶酶促去除聚糖。例如,已知内切糖苷酶H可修剪高甘露糖和杂合糖型,但不能修剪复合型聚糖,而内切糖苷酶S能够修剪复合型聚糖和在某种程度上能够修剪杂合聚糖,但不能修剪高甘露糖形式。内切糖苷酶F2能够修剪复合聚糖(但不是杂合聚糖),而内切糖苷酶F3只能修剪同样是1,6-岩藻糖基化的复合聚糖。另一种糖苷内切酶,糖苷内切酶D只能水解Man5(M5)聚糖。不同内切糖苷酶的特异性活性的概述描述于Freeze等人, *Curr. Prot. Ntol. Biol.*, 2010, 89:17.13A.1-17,其通过引用纳入本文。用于治疗用途的蛋白质去糖基化的另一个优点是促进了批次间的一致性和显著改善的均质性。

[0007] 在ADC领域中,通常使用化学接头将药物连接到抗体上。该接头需要具备许多关键属性,包括要求在长时间给药后在血浆中保持稳定。稳定的接头能够将ADC定位到体内的预计位点或细胞,并防止有效负载在循环中过早释放,这将无差别地诱导各种不期望的生物反应,从而降低ADC的治疗指数。内化后,应加工ADC从而使得有效负载被有效释放,以便它可以结合到其靶标。

[0008] 有两个系列的接头,不可裂解的和可裂解的。不可裂解接头由抗体和有效负载之间的原子链组成,其在生理条件下完全稳定,无论抗体-药物缀合物位于哪个器官或哪个生

物区室。因此,使用不可裂解接头使有效负载从ADC中释放依赖于ADC内化到细胞中后抗体的完全(溶酶体)降解。由于这种降解,有效负载将被释放,仍然携带接头,以及来自接头最初连接的抗体的肽片段和/或氨基酸。可裂解接头利用细胞或细胞区室的固有特性以用于从ADC中选择性释放有效负载,这通常不会留下接头代谢加工后的痕迹。对于可裂解接头,有三种常用的机制:1)对特定酶的敏感性,2) pH敏感性,以及3)对细胞(或其微环境)的氧化还原状态的敏感性。

[0009] 基于酶的策略通常基于特定蛋白酶、酯酶、糖苷酶或其他酶的内源性存在。例如,肿瘤学中使用的大多数ADC利用肿瘤细胞溶酶体中发现的优势蛋白酶来识别和裂解接头中的特定肽序列。Dubowchik等人, *Bioconj. Chem.* 2002, 13, 855-69 (通过引用纳入本文), 率先发现特定二肽作为组织蛋白酶的细胞内裂解机制。已知在肿瘤溶菌酶或肿瘤微环境中上调的其他酶是血纤维蛋白溶酶、基质金属蛋白酶(MMP)、尿激酶等,所有这些酶都可以识别ADC中的特定肽序列并通过水解裂解多个肽键中的一个来诱导从接头释放有效负载。酯酶也可用于在酯键水解后有效负载的细胞内释放,例如Barthel等人, *J. Med. Chem.* 2012, 55, 6595-6607 (通过引用纳入本文) 证明,人类羧酸酯酶2 (CES2, hiCE) 证明了阿霉素前药对CES2阳性异种移植物的体内抗肿瘤功效优于或等于有效负载本身的抗肿瘤功效。第三,各种糖苷酶可用于选择性切割特定单糖,特别是半乳糖苷酶(用于去除半乳糖)或葡萄糖醛酸酶(用于去除葡萄糖醛酸),如例如分别在Torgov等人, *Bioconj. Chem.* 2005, 16, 717-721和Jeffrey等人, *J. Med. Chem.* 2006, 17, 831-840中所说明的,通过引用纳入本文。可用于肿瘤特异性水解裂解键的其他内源酶例如是磷酸酶或硫酸酯酶。

[0010] 除了使用内源性酶外,任何可能不是天然丰富的选择的酶的局部浓度增强可以通过以下策略实现:诸如通过静脉注射的全身给药、肿瘤内注射或其他方法如ADEPT (抗体导向酶前药疗法)。

[0011] 酸敏感性策略利用与人类细胞的胞质溶胶 (pH 7.4) 相比,核内体 (pH5-6) 和溶酶体 (pH 4.8) 隔室中较低的pH值来触发接头内酸不稳定基团的水解,例如脘,参见例如Ritchie等人, *mAbs* 2013, 5, 13-21, 其通过引用纳入本文。也可以使用替代的酸敏感接头,如例如基于硅醚,公开于US20180200273中。

[0012] 第三种基于氧化还原机制的释放策略利用了细胞内谷胱甘肽的浓度比血浆中更高。因此,包含二硫键的接头在被谷胱甘肽还原后会释放游离的硫醇基,这可能会保留有效负载的一部分或进一步自分解以释放游离的有效负载。用于释放游离有效负载的替代还原机制可以基于将(芳香族)硝基或(芳香族)叠氮基转化为苯胺,苯胺可以是有效负载的一部分或自分解 (self-immolative) 组装单元的一部分。

[0013] 抗体-药物缀合物中的自分解组装单元将药物单元连接到缀合物的剩余部分或其药物-接头中间体。自分解组装单元的主要功能是在配体单元靶向的位点处有条件地释放游离药物。可激活的自分解部分包含可激活的基团和自分解的间隔基单元。在活化可活化基团时,例如通过将酰胺基酶促转化为氨基或通过将二硫化物还原为游离硫醇基,启动自分解反应序列,这导致游离药物通过各种机制的一种或多种释放,其可能涉及(临时的)对氨基苄基1,6-消除为对醌甲基化物,任选地释放二氧化碳和/或随后是第二环化释放机制。自分解组装单元可以是连接抗体和有效负载(通过官能团)的化学间隔基的一部分。或者,自分解基团不是化学间隔基的固有部分,而是从连接抗体和有效负载的化学间隔基分支出

来的。

[0014] 大多数已获市场批准或目前处于后期临床试验的抗体-药物缀合物采用上述释放活性药物的机制之一。例如, **Adcetris**<sup>®</sup>是一种用于治疗各种血液肿瘤的ADC,并由靶向CD30的抗体(配体)组成,通过接头连接到高效微管蛋白抑制剂MMAE(有效负载),该接头由连接到自分解对氨基苄氧基羰基(PAB)的组织蛋白酶敏感片段组成。释放MMAE的相同机制对泊洛妥珠单抗(polatuzumab-vedotin) (**Polivy**<sup>®</sup>)有效。在关键试验中使用蛋白酶/肽酶敏感接头的其他ADC是SYD985、ADCT-402、ASG-22CE和DS-8201a。蛋白酶介导的有效负载释放也是RG7861(DSTA4637S)设计的一部分, RG7861(DSTA4637S)是肿瘤学以外领域正在开发的ADC,专门用于治疗细菌感染。

[0015] 两种ADC已获批准 (**Besponsa**<sup>®</sup>和**Mylotarg**<sup>®</sup>),它们由通过酸敏感基团(特别是胺基)连接到破坏DNA的有效负载(卡利奇霉素(calicheamicin))的抗体组成。类似地,戈沙妥珠单抗(sacituzumab govectin),一种处于III期临床研究中的ADC,通过碳酸基团的酸性水解释放有效负载。对谷胱甘肽敏感的二硫化物基团是索星-米妥昔单抗(mirvetuximab soravtansine)中接头的一部分,用于将抗体连接到美登素有效负载DM4以及IMGN853中。目前,超过75个ADC处于临床试验的不同阶段,其中至少70%包含一种形式的可裂解接头。

[0016] 如上所述,在许多ADC中,自分解单元是接头的一部分,其在大多数情况下,至少存在与蛋白酶敏感肽片段连接的(酰化)对氨基苄基单元,用于酶促释放氨基。除了氨基苄基,其他芳族部分也可用作自分解单元的一部分,例如杂芳族部分,例如吡啶或噻唑,参见例如US7,754,681和US2005/0256030。氨基苄基的取代可以在对位或在邻位,在这两种情况下均导致相同的1,6-消除机制。苄基位置可以被烷基或羰基衍生物取代,例如衍生自扁桃酸的酯或酰胺,如例如公开于W02015/038426,其通过引用纳入本文。自分解单元的苄基位置连接到杂原子离去基团,通常基于但不限于氧或氮。主要地,苄基官能团存在氨基甲酸酯部分,其将在触发1,6-消除机制时释放二氧化碳,以及伯氨基或仲氨基。伯氨基或仲氨基可以是毒性有效负载自身的一部分,并且可以是芳族氨基或脂族氨基。在后一种情况下,释放的有效负载的氨基很可能具有更高的pKa,因此在生理条件(pH 7-7.5)下,特别是在肿瘤的酸性环境(pH<7)下主要处于质子化状态。

[0017] 伯氨基或仲氨基也可以是另一个自分解基团的一部分,例如N,N-二烷基乙二胺部分。另一端的N,N-二烷基乙二胺部分可以连接到另一个氨基甲酸酯基团,以在环化时释放醇基团作为毒性有效负载的一部分,如例如证明于Elgersma等人, Mol.Pharm.2015,12,1813-1835,其通过引用纳入本文。氨基甲酸酯部分的伯氨基或仲氨基也可以形成N,O-乙缩醛的一部分,该方法已用于多种药物递送策略,例如释放5-氟尿嘧啶(Madec-Lougerstay等人, J.Chem.Soc.Perkin Trans I,1999,1369-1375)和SN-38(Santi等人, J.Med.Chem.2014,57,2303-2314)。最近,类似的构造被Kolakowski等人, Angew.Chem.Int.Ed.2016,55,7948-7951(通过引用纳入本文)所采用用于设计由于ADC循环时间长而具有延长血清暴露的接头,并结合 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶促进释放机制,以释放脂肪醇。自分解芳族部分的苄基位置处的官能团也可以是酚氧,参见例如Toki等人, J.Org.Chem.2002,67,1886-1872和US7,553,816(通过引用纳入本文),然而不能是脂肪醇,因为脂肪醇不具备足够的离去基团能力(典型pKa 13-15)。苄基官能团的另一种选择是季

铵基团,其会在消除时释放三烷基氨基或杂芳基胺,如Burke等人,Mol.Cancer Ther.2016,15,938-945和Staben等人,Nat.Chem.2016,8,1112-1119报道的,其通过引用纳入本文。

[0018] 目前,ADC中使用的有效负载主要包括微管破坏剂[例如单甲基澳瑞他汀(auristatin)E(MMAE)和美登木素衍生的DM1和DM4]、DNA损伤剂[例如,卡利奇霉素、吡咯并苯二氮卓(PBD)二聚体、吡啶并苯二氮平二聚体、倍癌霉素(duocarmycin)、葱环]、拓扑异构酶抑制剂[例如SN-38、依喜替康(exatecan)及其衍生物、希明替康(simmitecan)]或RNA聚合酶II抑制剂[例如鹅膏蕈碱(amanitin)]。尽管ADC已显示出临床和临床前活性,但尚不清楚除了靶向肿瘤细胞上的抗原表达外,还有哪些因素决定了这种效力。例如,药物:抗体比(DAR)、ADC结合亲和力、有效负载的效力、受体表达水平、内化率、运输、多重耐药性(MDR)状态和其他都与影响体外ADC治疗的结果有关的因素。除了直接杀死抗原阳性肿瘤细胞外,ADC还具有杀死相邻抗原阴性肿瘤细胞的能力:所谓的“旁观者杀伤”效应,最初由Sahin等人,Cancer Res.1990,50,6944-6948报道,并且例如由Li等人,Cancer Res.2016,76,2710-2719研究。一般而言,中性的细胞毒性有效负载会显示出旁观者杀伤,而离子(带电)有效负载则不会,这是因为事实是离子物质不易通过被动扩散通过细胞膜。例如,对一系列依喜替康衍生物的评估表明,与各种氨基酰化的依喜替康衍生物相比,伯胺与羟基乙酸的酰化提供了具有显著增强的旁观者杀伤的衍生物(DXd),如由Ogitani等人,Cancer Sci.2016,107,1039-1046公开,其通过引用纳入本文。

[0019] 该领域中大多数经过临床测试和销售的ADC的一个缺点是毒性有效负载可能会引起剂量限制的脱靶毒性,由Donaghy等人审核,MAbs 2016,8,659-71,其通过引用纳入本文。例如证明于Thon等人.Blood 2012,120,1975-84(通过引用纳入本文),ADC可通过分化造血干细胞,释放毒性有效负载,抑制巨核细胞增殖和分化,从而阻止血小板生成,最终导致血小板减少而被吸收。同样,认为腺接头的不稳定性在**Mylotarg<sup>®</sup>**的安全问题中发挥了作用,该药物于2010年退出市场(但后来重新引入)。已经证明,设计用于通过组织蛋白酶进行蛋白水解裂解的接头也可以被其他酶如酯酶Ces1c裂解(由Dorywalska等人,Mol.Cancer Ther.2016,15,958-970报道,其通过引用纳入本文)。实际上,由Caculitan等人证明,Cancer Res.2017,7027-7037(通过引用纳入本文),即使在没有组织蛋白酶B的情况下,基于肽的可裂解接头也很容易进行细胞加工以释放游离的有效负载。此外,由Zhao等人(Mol.Cancer Ther.2017,16,1866-1876,其通过引用纳入本文)证明,通过分化中性粒细胞排出弹性蛋白酶可能导致毒性有效负载的过早释放,并且是中性粒细胞减少症的原因之一,中性粒细胞减少症是用基于MMAE的ADC治疗的癌症患者的常见不良事件。

[0020] 本领域已知的抗体缀合物可能具有若干缺点。对于抗体-药物缀合物,抗体与毒素的负载的量度由药物-抗体比率(DAR)给出,其给出每个抗体的活性物质分子的平均数。一般而言,可以确定两种生成ADC的通用方法,一种是通过随机(random)(随机(stochastic))缀合到内源氨基酸,另一种涉及缀合到抗体中的一个或多个特定位点,该位点可能是抗体中的天然位点或为此目的被改造到抗体中的位点。

[0021] 通过随机缀合制备ADC的过程通常会生成DAR介于2.5和4之间的产物,但实际上这样的ADC包含抗体缀合物的混合物,其具有从0到8或更高的数量的感兴趣的分子。换言之,通过随机缀合的抗体缀合物通常由具有高标准差的DAR形成。例如,吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)是50%缀合物(每个IgG分子0到8个卡利奇霉素部分,平均2或3个,随机连接到

抗体的溶剂暴露的赖氨酸残基)和50%非缀合抗体的异质混合物(Bross等人,Clin.Cancer Res.2001,7,1490;Labrijn等人,Nat.Biotechnol.2009,27,767,两者均通过引用纳入本文)。对于临床上的维布妥昔单抗(brentuximab vedotin) (**Adcetris**<sup>®</sup>)、**Kadcyla**<sup>®</sup> (T-DM1) 和其他ADC,仍然无法精确控制有多少药物连接在任何给定的抗体上,因此ADC作为缀合物的统计分布获得,其中大多数具有DAR3-4。实现更高DAR的一种方法是通过减少单克隆抗体中的所有(4)个链间二硫键,从而释放总共8个半胱氨酸侧链作为游离巯醇,然后与马来酰亚胺功能化的有效负载进行全局缀合,以达到最终DAR在6-8之间。该方法应用于各种临床阶段的ADC,包括例如IMMU-132、IMMU-110、DS-8201a、U3-1402、SGN-CD48a和SGN-CD228A,并且可以应用于各种有效负载,然而由于还原步骤期间的片段干扰,不太适合于IgG1以外的抗体。

[0022] 许多技术以生物缀合而闻名,总结于G.T.Hermanson,“Bioconjugate Techniques”,Elsevier,3<sup>rd</sup> Ed 2013(通过引用纳入本文)。两种主要技术可用于通过随机缀合制备ADC,均基于赖氨酸侧链的酰化或基于半胱氨酸侧链的烷基化。赖氨酸侧链中 $\epsilon$ -氨基的酰化通常通过将蛋白质加入基于活化酯或活化碳酸酯衍生物的试剂来实现,例如用于制造**Kadcyla**<sup>®</sup>的SMCC。半胱氨酸侧链中巯醇基烷基化的主要化学方法是基于马来酰亚胺试剂的使用,例如用于制造**Adcetris**<sup>®</sup>的试剂。除了标准马来酰亚胺衍生物外,一系列马来酰亚胺变体也可用于更稳定的半胱氨酸缀合,如例如由James Christie等人,J.Contr.Rel.2015,220,660-670和Lyon等人,Nat.Biotechnol.2014,32,1059-1062所证明的,均通过引用纳入本文。与半胱氨酸侧链缀合的另一项重要技术是通过二硫键的方式,已用于将蛋白质毒素、化疗药物、探针与载体分子可逆地连接的生物激活的连接(参见例如Pillow等人,Chem.Sci.2017,8,366-370)。半胱氨酸烷基化的其他方法包括例如卤代乙酰胺(通常是溴乙酰胺或碘乙酰胺)的亲核取代,参见例如Alley等人,Bioconj.Chem.2008,19,759-765(通过引用纳入本文),或基于不饱和键上的亲核加成的各种方法,例如与丙烯酸酯试剂的反应,参见例如Bernardim等人,Nat.Commun.2016,7,DOI:10.1038/ncomms13128和Ariyasu等人,Bioconj.Chem.2017,28,897-902(均通过引用纳入本文),与膦酰胺的反应,参见例如Kasper等人,Angew.Chem.Int.Ed.2019,58,11625-11630(通过引用纳入本文),与联烯酰胺反应,参见例如Abbas等人,Angew.Chem.Int.Ed.2014,53,7491-7494(通过引用纳入本文),与氰基乙炔基试剂反应,参见例如Kolodych等人,Bioconj.Chem.2015,26,197-200(通过引用纳入本文),与乙烯砜反应,参见例如Gil de Montes等人,Chem.Sci.2019,10,4515-4522(通过引用纳入本文),或与乙烯基吡啶反应,参见例如<https://iksuda.com/science/ermalink/>(Jan 7<sup>th</sup>,2020访问)。Toda等人,Angew.Chem.Int.Ed.2013,52,12592-12596(通过引用纳入本文)还报道了用于半胱氨酸缀合的与甲基磺酰基苯噁二唑的反应。

[0023] 尽管大多数(-65%)临床ADC是基于随机有效负载连接,但基于观察到的位点特异性ADC具有改善的治疗指数,这是向位点特异性缀合的ADC的明显趋势。为此,已经开发了能够通过位点特异性缀合到抗体中的一个(或多个)预定位点来产生具有确定的DAR的抗体-药物缀合物的许多方法。位点特异性缀合通常通过将特定氨基酸(或序列)被改造到抗体中,作为有效负载连接的锚点来实现,参见例如Aggerwal和Bertozzi,Bioconj.Chem.2014,

53,176-192(通过引用纳入本文),最典型的半胱氨酸的工程化。此外,在过去十年中探索了一系列其他位点特异性缀合技术,最突出的是非天然氨基酸的遗传编码,例如适用于胍连接的对乙酰苯丙氨酸,或适用于点击化学缀合的对叠氮甲基苯丙氨酸。大多数基于抗体基因再改造的方法导致ADC的DAR为~2。在不再改造抗体的情况下进行抗体缀合的替代方法包括减少链间二硫键,然后加入连接到半胱氨酸交联试剂的有效负载,例如双砷试剂,参见例如Balan等人,Bioconj.Chem.2007,18,61-76和Bryant等人,Mol.Pharmaceutics 2015,12,1872—1879(均通过引用纳入本文),单或双溴马来酰亚胺,参见例如Smith等人,J.Am.Chem.Soc.2010,132,1960-1965和Schumacher等人,Org.Biomol.Chem.2014,37,7261-7269(均通过引用纳入本文),双马来酰亚胺试剂,参见例如W02014114207,双(苯硫基)马来酰亚胺,参见例如Schumacher等人,Org.Biomol.Chem.2014,37,7261-7269和Aubrey等人,Bioconj.Chem.2018,29,3516-3521(均通过引用纳入本文),双溴哒嗪二酮,参见例如Robinson等人,RSC Advances 2017,7,9073-9077(通过引用纳入本文),双(卤甲基)苯,参见例如Ramos Tomillero等人,Bioconj.Chem.2018,29,1199-1208(通过引用纳入本文),或其他双(卤甲基)芳烃,参见例如W02013173391。通常,通过半胱氨酸交联制备的ADC的药物抗体负载量为4(DAR4)。

[0024] 通过van Geel等人,Bioconj.Chem.2015,26,2233-2242和Verkade等人,Antibodies 2018,7,12(均通过引用纳入本文)已经在W02014065661中证明,基于N297处天然抗体聚糖的酶促重塑(通过内切糖苷酶修剪并在糖基转移酶的作用下引入叠氮基修饰的GalNAc衍生物),随后使用点击化学连接细胞毒性有效负载,可以制备均质ADC并选择性地针对DAR2或DAR4定制。发现通过该技术制备的ADC相较于一系列其他缀合技术和目前临床应用的聚糖重塑缀合技术(例如ADCT-601(ADC疗法))显示出显著扩大的治疗指数。

[0025] 将抗体转化为叠氮修饰抗体的类似酶促方法,由Lhospice等人,Mol.Pharmaceut.2015,12,1863-1871(通过引用纳入本文)报道,采用细菌酶谷氨酰胺转移酶(BTG或TGase)。结果表明,具有PNGase F的天然糖基化位点N297的去糖基化释放相邻的N295以成为TGase介导引入的底物,其在TGase存在下经受叠氮基分子后,将去糖基化的抗体转化为双叠氮基抗体。随后,双叠氮基抗体与DBCO修饰的细胞毒素反应以产生具有DAR2的ADC。一种基于C末端TGase介导的叠氮化物引入,随后在ADC中通过无金属点击化学转化的基因方法由Cheng等人,Mol.Cancer Therap.2018,17,2665-2675(通过引用纳入本文)报道。

[0026] 已经报道了将叠氮化物引入抗体的其他方法,这些方法基于抗体先前的遗传修饰,随后使用基于AMBER抑制密码子的遗传编码引入非天然氨基酸,如例如由Axup等人.Proc.Nat.Aced.Sci.2012,109,16101-16106(通过引用纳入本文)所证明的。同样,Zimmerman等人,Bioconj.Chem.2014,25,351-361(通过引用纳入本文),已经采用无细胞蛋白质合成方法将叠氮甲基苯丙氨酸(AzPhe)引入单克隆抗体,以通过无金属点击化学转化为ADC。同样在这种情况下,制备具有DAR2的ADC,或在首先引入两个AzPhe氨基酸的情况下制备DAR4。同样,其也由Nairn等人,Bioconj.Chem.2012,23,2087-2097(通过引用纳入本文)表明,甲硫氨酸类似物如叠氮高丙氨酸(Aha)可以通过营养缺陷菌的方式引入到蛋白质中,并通过(铜催化的)点击化学的方式进一步转化为蛋白质缀合物。最后,Nguyen等人,J.Am.Chem.Soc.2009,131,8720-8721(通过引用纳入本文)表明,使用吡咯赖氨酰-tRNA合

成酶/tRNA<sub>CUA</sub>对重组蛋白中的脂肪族叠氮化物进行遗传编码,并且标记通过点击化学保护。后一种方法也应该适用于产生DAR2 ADC,类似于由Oller Salvia等人, *Angew.Chem.Int.Ed.* 2018, 57, 2831-2834报道的方法。

[0027] 其也由Bruins等人, *Bioconjugate Chem.* 2017, 28, 1189-1193, (通过引用纳入本文)表明,抗体可以通过酪氨酸酶介导氧化的适当定位的酪氨酸通过中间体1,2-醌与细胞毒性有效负载进行特异性缀合,该中间体随后可以与环炔烃或环烯炔经历环加成反应。

[0028] 还开发了化学方法对抗体进行位点特异性修饰,而无需预先进行基因修饰,如例如强调于Yamada和Ito, *ChemBioChem.* 2019, 20, 2729-2737。

[0029] 通过亲和肽 (CCAP) 进行化学缀合以进行位点特异性修饰,已由Kishimoto等人, *Bioconj.Chem.* 2019开发,通过使用与人IgG-Fc具有高亲和力的肽,从而能够用生物素部分或细胞毒性有效负载选择性修饰Fc片段中的单个赖氨酸。同样,Matsuda等人, *ACS Omega* 2019, 4, 20564-20570已经证明,类似的方法 (AJICAP™技术) 可用于在抗体重链中的单个赖氨酸上位点特异性引入硫醇基。CCAP或AJICAP™技术也可用于引入叠氮基或其他功能。

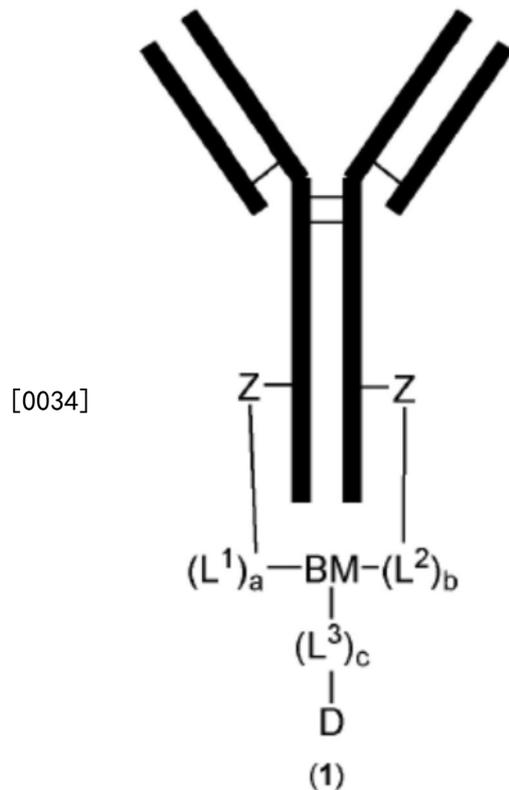
[0030] 虽然市场上和临床上的主流ADC的载药量在2到8之间,如上所述,但对于一些高细胞毒性有效负载,例如大多数PBD二聚体是相关的IGN型有效负载,以及基于烯二炔的有效负载、鹅膏蕈碱等,优选较低的DAR。已经发现,人类对于极强的有效负载的最大耐受剂量可能会降低到远低于1mg/kg的值,通常甚至低于<300µg/kg或甚至<100µg/kg。因此,给药后(通常是静脉内)没有达到体内受体饱和,导致肿瘤摄取不理想和清除增强。对于这种情况,具有相同有效负载的DAR1形式可能更优选,因为MTD相较于类似的DAR2形式可能会高出两倍。Ruddle等人, *ChemMedChem* 2019, 14, 1185-1195最近表明,通过选择性还原C<sub>H1</sub>和C<sub>L</sub>链间二硫键,可以由抗体Fab片段(通过木瓜蛋白酶消化完整抗体或重组表达制备)制备DAR1缀合物,随后通过用包含两个马来酰亚胺单元的对称PBD二聚体处理来重新桥接该片段。所得DAR1型Fab片段显示出高度均一、在血清中稳定并显示出优异的细胞毒性。在后续出版物中,White等人, *MAbs* 2019, 11, 500-515, 以及W02019034764 (通过引用纳入本文), 表明在预先对抗体进行改造后, DAR1缀合物也可以由完整的IgG抗体制备: 使用在铰链区只有一个链内二硫键的抗体 (Flexmab技术, 报道于Dimasi等人, *J Mol. Biol.* 2009, 393, 672-692 (通过引用纳入本文)) 或使用具有额外游离半胱氨酸的抗体, 其可以通过天然氨基酸突变 (例如HC-S239C) 或通过插入道序列中 (例如HC-i239C, 报道于Dimasi等人, *Mol. Pharmaceut.* 2017, 14, 1501-1516) 而获得。通过所得的半胱氨酸工程化ADC与双马来酰亚胺衍生的PBD二聚体反应, 两种工程化抗体均表明能产生DAR1 ADC。结果表明, Flexmab衍生的DAR1 ADC对血清中的有效负载损失具有高度抗性, 并在HER2阳性胃癌异种移植模型中表现出有效的抗肿瘤活性。此外, 相较于使用单一含马来酰亚胺的PBD二聚体制备的位点特异性DAR2 ADC, 该ADC在大鼠中的耐受剂量是其两倍。然而, 没有注意到治疗窗期的改善, 因为DAR1 ADC相较于DAR2ADC的最小有效剂量 (MED) 以相同的因子2增加。

[0031] 迄今为止, 尚未报道相较于DAR2 ADC可提高治疗指数的DAR1技术。此外, 尚未报道在不需要重建单克隆抗体的情况下通过全抗体的DAR1 ADC产生的技术。治疗指数的改善和/或对DAR1 ADC的遗传方法都将代表为开发更佳的ADC以及更快的临床时间做出重大贡献。

### 发明内容

[0032] 提出了一种技术,可将任何全长抗体转化为具有单一药物负载(DAR1)的稳定且位点特异性的ADC,而无需预先重建抗体。该技术适用于任何IgG亚型,并能够通过环加成缀合反应连接有效负载,从小分子细胞毒素到蛋白质骨架(细胞因子、scFvs)到寡核苷酸等,再到抗体。根据一个优选的实施方案的程序,其涉及用内切糖苷酶对聚糖进行预先修剪,伴随Fc- $\gamma$ 受体结合的清除,从而去除效应子功能。

[0033] 根据本发明的抗体-有效负载缀合物是根据结构(1):



[0035] 其中:

[0036] -a、b和c各自独立地是0或1;

[0037] -L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>是接头;

[0038] -D是有效负载;

[0039] -BM是分支部分;

[0040] -Z是可通过环加成反应获得的连接基团。

[0041] 本发明还提供了制备根据本发明的抗体-有效负载缀合物的方法、在该制备方法中的中间体化合物、以及根据本发明的抗体-有效负载缀合物的医学用途。

### 附图说明

[0042] 图1示出了生物分子中具有代表性(但不全面)的一组官能团(F),无论是天然存在的还是通过改造引入的,其与反应基团反应后产生连接基团Z。官能团F可以在任何选择的位置人工引入(改造的)到生物分子中。吡啶连接基(底部线)是四氮杂双环[2.2.2]辛烷连接基重排的产物,在四嗪与炔烃反应后生成,失去N<sub>2</sub>。在本文中,X可能是卤素,X<sup>9</sup>可以是H、烷基或吡啶基。结构(10e)-(10h)的连接基团Z优选用于本发明的连接基团。

[0043] 图2示出了半乳糖胺UDP糖衍生物的几种结构,其可能在2位例如被叠氮乙酰基(11b)或叠氮二氟乙酰基(11c)修饰,或在n-乙酰半乳糖胺(11d)的6位被叠氮基修饰。单糖(即去除UDP)是用于本发明中的优选部分Su。

[0044] 图3示出了将单克隆抗体非遗传转化为聚糖重组抗体的一般过程,该抗体包含两个叠氮基(一个位于任一天然糖基化位点)。在与二价环辛炔构建体反应后,单个有效负载(R)连接到双叠氮基抗体上。这种剪切也可以通过使用具有两个末端乙炔基团(未描绘)的二价构建体的铜催化点击反应来实现。

[0045] 图4示出了适用于无金属点击化学的环辛炔。该列表并不全面,例如炔烃可以通过氟化、通过芳环取代或在芳环中引入杂原子来进一步活化。

[0046] 图5示出了存在于图3和4的二价构建体中的R基团的实例,其被定义为抗体-药物缀合物中的有效负载。R基团可以通过可裂解部分连接到二价构建体,例如顶部结构中描述的肽可裂解接头。也可以使用酸可裂解或基于二硫化物的接头(未描绘),或通过另一种机制裂解的接头。R基团也可以通过不可裂解的接头(底部结构)连接。R基团本身可以例如是细胞毒性分子(但不限于细胞毒性分子)。

[0047] 图6是适用于通过剪切到双叠氮基抗体上产生DAR1 ADC的二价环辛炔构建体的示意图,其中两个环辛炔部分连接到具有二聚体结构(例如PBD二聚体或倍癌霉素二聚体)的有效负载的两个位点。如PBD二聚体所图示,接头可以是可裂解性质或不可裂解性质。二聚体细胞毒性有效负载在性质上不一定是对称的,如所示意的实例,例如,倍癌霉素单体和PBD单体的组合也是可能的。

[0048] 图7示出了一种以DAR1形式连接有效负载的间接方法,该方法通过使用与双叠氮基-mAb反应的三价环辛炔构建体,留下一个游离环辛炔用于随后的点击化学(图示为叠氮化物修饰的有效负载,其他选择可以是与硝酮、腈氧化物、重氮化合物、四嗪等的点击化学)。

[0049] 图8示出了用于与双聚糖修饰的mAb反应的三价构建体的各种选择。三价构建体可以是同三价或异三价(2+1形式)。同三价构建体( $X=Y$ )可以由 $3x$ 环辛炔或 $3x$ 乙炔组成。异三价构建体( $X\neq Y$ )可以例如由两个环辛炔基和一个马来酰亚胺基或一个反式环辛烯基组成。异三价构建体可以存在X和Y的任何组合,除非X和Y彼此反应(例如BCN+四嗪)。

[0050] 图9示出了一系列二价BCN试剂(105、107、118、125、129、134)、三价BCN试剂(143、145、150)、用于分选(sortagging)的单价BCN试剂(157、161、163、168)或用于分选的单价四嗪试剂(154)。

[0051] 图10示出了一系列二价或三价交联剂(XL07-XL13)。

[0052] 图11示出了作为后续转化为抗体缀合物的原料的一系列抗体变体。

[0053] 图12示出了一系列基于MMAE或MMAF的双BCN修饰的细胞毒性药物,以用于通过与双叠氮基修饰抗体交联来生成DAR1 ADC。

[0054] 图13示出了一系列基于MMAE(303)、PBD二聚体(304)、卡利奇霉素(305)或PNU159,682(306)的其他双BCN修饰的细胞毒性药物,以用于通过与双叠氮基修饰抗体交联来生成DAR1 ADC。

[0055] 图14示出了一系列基于MMAE或MMAF的具有各种环辛炔(BCN、DIBO、DBCO,具有各种环辛炔间接头变体)或叠氮化物的二价细胞毒性药物,以用于通过与双叠氮基修饰抗体或

双炔烃修饰抗体交联来生成DAR1 ADC。

[0056] 图15示出了基于BCN-MMAE (312) 或叠氮化物-MMAF (313) 的两种单价线性接头药物的结构。

[0057] 图16示出了SDS-PAGE分析:泳道1—利妥昔单抗;泳道2—rit-v1a;泳道3—rit-v1a-145;泳道4—rit-v1a-(201)<sub>2</sub>;泳道5—rit-v1a-145-204;泳道6—rit-v1a-145-PF01;泳道7—rit-v1a-145-PF02。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。非还原条件下在6%SDS-PAGE上(左图)和还原条件下在12%SDS-PAGE上(右图)分析样品。

[0058] 图17示出了B12-v1a(上迹线)和B12-v1a-145(下迹线)的RP-HPLC迹线。样品在进行RP-HPLC分析前已用IdeS消化。

[0059] 图18示出了SDS-PAGE分析:泳道1—trast-v1a;泳道2—trast-v1a-XL11;泳道3和4—trast-v1a-XL11-PF01;泳道5—rit-v1a;泳道6—rit-v1a-XL11;泳道7和8—rit-v1a-XL11-PF01。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。非还原条件下在6%SDS-PAGE上(左图)和还原条件下在12%SDS-PAGE上(右图)分析样品。

[0060] 图19示出了去糖基化曲妥珠单抗用双-BCN-MMAE LD03 (=303) 处理后的RP-HPLC数据。

[0061] 图20示出了非还原条件下在6%凝胶上的SDS-PAGE分析:泳道1—利妥昔单抗;泳道2—rit-v1a-(201)<sub>2</sub>;泳道3—rit-v1a-145-PF08;泳道4—B12-v1a-145-PF01;泳道5—B12-v1a-145-PF08。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。泳道1和2作为非缀合mAb和2:2分子形式的参考物。

[0062] 图21示出了非还原条件下在6%凝胶上的SDS-PAGE分析:泳道1—rit-v1a-(201)<sub>2</sub>;泳道2—rit-v1a-145-PF01;泳道3—rit-v1a;泳道4—rit-v1a-PF22;泳道5—trast-v1a-PF22。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。泳道1和2作为非缀合mAb和2:2分子形式的参考物。

[0063] 图22示出了非还原条件下在6%凝胶上的SDS-PAGE分析:泳道1—trast-v1a;泳道2—trast-v1a-PF23。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。泳道1作为非缀合mAb的参考物。

[0064] 图23示出了非还原条件下在6%凝胶上的SDS-PAGE分析:泳道1—rit-v1a;泳道2—rit-v1a-(201)<sub>2</sub>;泳道3—rit-v1a-145-PF01;泳道4—rit-v1a-PF22;泳道5—trast-v1a-PF23。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。泳道1至4作为非缀合mAb、2:1和2:2分子形式的参考物。

[0065] 图24示出了非还原条件下在6%凝胶上的SDS-PAGE分析:泳道1—rit-v1a-145;泳道2—rit-v1a-145-PF09;泳道3—rit-v1a-145;泳道4—trast-v1a-145-PF09;泳道5—trast-v1a;泳道6—rit-v1a-(PF07)<sub>2</sub>;泳道7—trast-v1a;泳道8—trast-v1a-(PF07)<sub>2</sub>。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。

[0066] 图25示出了非还原性SDS-PAGE分析:泳道1—Trast-v1a-(PF.)<sub>1-2</sub>;泳道2—trast-v1a-(209)<sub>1-2</sub>;泳道3—trast-v1a-(PF11)<sub>1-2</sub>;泳道4—trast-v1a;泳道5—trast-v1a-145-PF12;泳道6—trast-v1a-145。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。

[0067] 图26示出了非还原条件下在6%凝胶上的SDS-PAGE分析:泳道1—rit-v1a-145;泳道2—rit-v1a-145-PF17;泳道3—rit-v1a-145;泳道4—trast-v1a-145-PF17。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。

[0068] 图27示出了非还原条件下在6%凝胶上的SDS-PAGE分析:泳道1—trast-v1a;泳道2—trast-v1a-PF29;泳道3—rit-v1a;泳道4—rit-v1a-PF29。凝胶用考马斯染色以显示总蛋白质。

[0069] 图28示出了基于hOKT3 200的双特异性抗体对人PBMC杀伤RajiB肿瘤细胞的影响。双特异性抗体和计算的EC<sub>50</sub>值在图例中示出。B12-v1a-145-PF01作为阴性对照。

[0070] 图29示出了基于抗4-1BB PF31的双特异性抗体对人PBMC杀伤RajiB肿瘤细胞的影响。双特异性抗体和计算的EC<sub>50</sub>值在图例中示出。B12-v1a-145-PF31作为阴性对照。

[0071] 图30示出了在与基于hOKT3 200的双特异性抗体孵育后,RajiB-PBMC共培养物在上清液中的细胞因子水平。鼠OKT3 mIgG2a抗体(Invitrogen 16-0037-81)作为阳性对照。

[0072] 图31示出了在与基于抗4-1BB PF31的双特异性抗体孵育后,RajiB-PBMC共培养物在上清液中的细胞因子水平。鼠OKT3 mIgG2a抗体(Invitrogen 16-0037-81)作为阳性对照。

## 具体实施方式

### [0073] 定义

[0074] 如在本说明书和权利要求书中使用的动词“包含”及其变体以其非限制性意义使用,表示包括该词之后的项目,但不排除未具体提及的项目。此外,不定冠词“一个(a)”或“一个(an)”对元素的引用不排除存在多个元素的可能性,除非上下文明确要求存在一个且只有一个元素。因此,不定冠词“一个(a)”或“一个(an)”通常表示“至少一个”。

[0075] 本说明书和权利要求书中公开的化合物可以包含一个或多个不对称中心,并且化合物可以存在不同的非对映异构体和/或对映异构体。除非另有说明,否则本说明书和权利要求书中对任何化合物的描述旨在包括所有非对映异构体及其混合物。此外,除非另有说明,否则本说明书和权利要求书中对任何化合物的描述旨在包括单独的对映异构体以及对映异构体的任何混合物、外消旋体或其他形式。当化合物的结构被描述为特定的对映异构体时,应理解为本申请的发明不限于该特定的对映异构体。

[0076] 这些化合物可以以不同的互变异构形式存在。除非另有说明,否则根据本发明的化合物旨在包括所有互变异构形式。当化合物的结构被描述为特定的互变异构体时,应理解为本申请的发明不限于该特定的互变异构体。

[0077] 本说明书和权利要求书中公开的化合物还可以作为外型 and 内型非对映异构体存在。除非另有说明,否则说明书和权利要求书中对任何化合物的描述旨在包括化合物的单独的外型和单独的内型非对映异构体,以及它们的混合物。当化合物的结构被描述为特定的内型或外型非对映体时,应理解为本申请的发明不限于该特定的内型或外型非对映体。

[0078] 此外,本说明书和权利要求书中公开的化合物可以以顺式和反式异构体存在。除非另有说明,否则说明书和权利要求书中对任何化合物的描述旨在包括化合物的单独的顺式和单独的反式异构体,以及它们的混合物。例如,当化合物的结构被描述为顺式异构体时,应理解为相应的反式异构体或顺式和反式异构体的混合物不排除在本申请的发明之外。当化合物的结构被描述为特定的顺式或反式异构体时,应理解本申请的发明不限于该特定的顺式或反式异构体。

[0079] 根据本发明的化合物可以以盐的形式存在,其也包括在本发明中。盐通常是药学

上可接受的盐,包含药学上可接受的阴离子。术语“其盐”是指当酸质子(通常是酸的质子),被阳离子(如金属阳离子或有机阳离子等)替代时形成的化合物。在适用的情况下,盐是药学上可接受的盐,但是这对于非用于给予患者的盐而言不是必需的。例如,在化合物的盐中,该化合物可以被无机酸或有机酸质子化以形成阳离子,无机酸或有机酸的共轭碱作为盐的阴离子组分。

[0080] 术语“药学上可接受的”盐是指对给予患者(如哺乳动物)可接受的盐(具有抗衡离子的盐对于给定的剂量方案具有可接受的哺乳动物安全性)。此类盐可以衍生自药学上可接受的无机或有机碱和药学上可接受的无机或有机酸。“药学上可接受的盐”是指化合物的药学上可接受的盐,该盐衍生自本领域已知的多种有机和无机抗衡离子,包括例如钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等,且分子含有基本功能时,有机或无机酸的盐类,如盐酸盐、氢溴酸盐、甲酸盐、酒石酸盐、苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。

[0081] 术语“蛋白质”在本文中以其标准的科学含义使用。在本文中,包含约10个或更多个氨基酸的多肽被认为是蛋白质。蛋白质可包含天然氨基酸,但也可包含非天然氨基酸。

[0082] 术语“单糖”在本文中以其标准的科学含义使用,是指由含5-9个(羟基化)碳原子的链环化后形成的分子内半缩醛形成的含氧杂环,最常见的是包含5个碳原子(戊糖),6个碳原子(己糖)或9个碳原子(唾液酸)。典型的单糖为核糖(Rib)、木糖(Xyl)、阿拉伯糖(Ara)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、葡萄糖醛酸(GlcA)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)和N-乙酰神经氨酸(NeuAc)。

[0083] 术语“抗体”在本文中以其标准的科学含义使用。抗体是由免疫系统产生的能够识别和结合特定抗原的蛋白质。抗体是糖蛋白的一个实例。本文中的术语抗体以其最广泛的含义使用,具体包括单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、抗体片段以及双链和单链抗体。术语“抗体”在本文还旨在包括人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和特异性结合癌抗原的抗体。术语“抗体”旨在包括完整的免疫球蛋白,也包括抗体的抗原结合片段。此外,该术语包括基因工程抗体和抗体衍生物。抗体、抗体片段和基因工程抗体可以通过本领域已知的方法获得。抗体的典型实例包括,阿昔单抗(abciximab)、利妥昔单抗(rituximab)、巴利昔单抗(basiliximab)、帕利珠单抗(palivizumab)、英夫利昔单抗(infliximab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、依法利珠单抗(efalizumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、阿达木单抗(adalimumab)、托西莫单抗-I131(tositumomab-I131)、西妥昔单抗(cetuximab)、替伊莫单抗(ibrituximab tiuxetan)、奥马珠单抗(omalizumab)、贝伐珠单抗(bevacizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、雷珠单抗(ranibizumab)、帕尼单抗(panitumumab)、依库珠单抗(eculizumab)、赛妥珠单抗(certolizumab pegol)、戈利木单抗(golimimumab)、卡那奴单抗(canakinumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、乌司奴单抗(ustekinumab)、托珠单抗(tocilizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、地诺单抗(denosumab)、贝利木单抗(belimumab)、伊匹木单抗(ipilimumab)和维布妥昔单抗(brentuximab)等。

[0084] “抗体片段”在本文中定义为完整抗体的一部分,包含其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段、双抗体、微抗体、三抗体、四抗体、线性抗体、单链抗体分子、scFv、scFv-Fc、由一个或多个抗体片段形成的多特异性抗体片段、由Fab表达文库产生的一个或多个片段,或任何上述免疫特异性结合靶抗原(例如,癌细胞抗原、

病毒抗原或微生物抗原)的表位结合片段。

[0085] “抗原”在本文中定义为抗体特异性结合的实体。

[0086] 术语“特异性结合 (specific binding)”和“特异性结合 (specifically binds)”在本文中定义为一种或多种抗体与其对应的靶抗原表位结合而不是与大量其他抗原结合的高度选择性方式。通常,抗体或抗体衍生物以亲和力为至少约 $1 \times 10^{-7}$ M,且更优选 $10^{-8}$ M至 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M、或 $10^{-12}$ 结合,并且以这样的亲和力结合预定抗原:以至少大于其与除预定抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲和力两倍的亲和力。

[0087] 术语“大量的”或“大量地”在本文中定义为混合物或样品的大多数,即 $>50\%$ 的群体,优选大于 $50\%$ 、 $55\%$ 、 $60\%$ 、 $65\%$ 、 $70\%$ 、 $75\%$ 、 $80\%$ 、 $85\%$ 、 $90\%$ 、 $91\%$ 、 $92\%$ 、 $93\%$ 、 $94\%$ 、 $95\%$ 、 $96\%$ 、 $97\%$ 、 $98\%$ 或 $99\%$ 的群体。

[0088] “接头”在本文中定义为连接化合物的两个或更多个元件的部分。例如,在抗体缀合物中,抗体和有效负载通过接头彼此共价连接。接头可以包含一个或多个接头和连接接头内的各种部分的间隔基部分。

[0089] “极性接头”在本文中定义为包含结构元件的接头,其具体目的是增加接头的极性,从而提高水溶性。极性接头可以例如包含一个或多个单元或其组合,其选自乙二醇、羧酸部分、磺酸酯部分、砷部分、酰化磺酰胺部分、磷酸酯部分、次磷酸酯部分、氨基或铵基。

[0090] “间隔基”或间隔基部分在本文中定义为间隔(即提供之间的距离)并将接头的两个(或更多)部分共价连接在一起的部分。接头可以是例如下文定义的接头-构建体、接头-缀合物或生物缀合物的一部分。

[0091] “自分解基团”在本文中定义为抗体-药物缀合物中接头的一部分,其功能是在配体单元靶向的位点处有条件地释放游离药物。可激活的自分解部分包含可活化基团(AG)和自分解间隔基单元。在激活可激活基团时,例如通过将酰胺基酶促转化为氨基或通过二硫化物还原为游离硫醇基团,启动自分解反应序列,这导致通过各种机制的一种或多种释放游离药物,其可能涉及(临时的)对氨基苄基1,6-消除为对醌甲基化物,任选地释放二氧化碳和/或随后是第二环化释放机制。自分解组装单元可以是连接抗体和有效负载(通过官能团)的化学间隔基的一部分。或者,自分解基团不是化学间隔基的固有部分,而是从连接抗体和有效负载的化学间隔基分支出来。

[0092] “可激活基团”在本文中定义为连接到芳族基团的官能团,其可以经过生化加工步骤,例如酰胺键的蛋白水解或二硫键的还原,在该生化加工步骤上,芳香族基团的自分解过程将被启动。可激活基团也可以称为“激活基团”。

[0093] “生物缀合物”在本文中定义为其中生物分子通过接头共价连接至有效负载的化合物。生物缀合物包含一种或多种生物分子和/或一种或多种有效负载。抗体-缀合物,例如抗体-有效负载缀合物和抗体-药物-缀合物是生物缀合物,其中生物分子是抗体。

[0094] “生物分子”在本文中定义为可从自然界分离的任何分子或由源自自然界的大分子结构组成部分的较小分子结构单元组成的任何分子,特别是核酸、蛋白质、聚糖和脂质。生物分子的实例包括酶、(非催化)蛋白质、多肽、肽、氨基酸、寡核苷酸、单糖、寡糖、多糖、聚糖、脂质和激素。

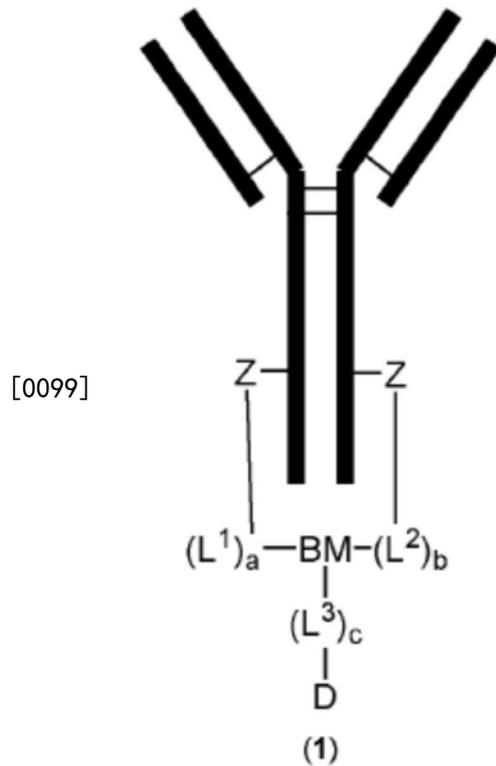
[0095] 术语“有效负载”是指共价连接至靶向部分(例如抗体)的部分,也指在接头裂解时

从缀合物释放的分子。因此,有效负载是指具有一个开放端的单价部分,其通过接头共价连接到靶向部分,在本发明的上下文中其称为D,并且还指从其中释放的分子。

[0096] 术语“2:1分子形式”是指由与单一功能有效负载缀合的二价单克隆抗体(IgG型)组成的蛋白质缀合物。

[0097] 根据本发明的抗体-有效负载缀合物

[0098] 本发明涉及具有结构(1)的抗体-有效负载缀合物:



[0100] 其中:

[0101] -a、b和c各自独立地是0或1;

[0102] -L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>是接头;

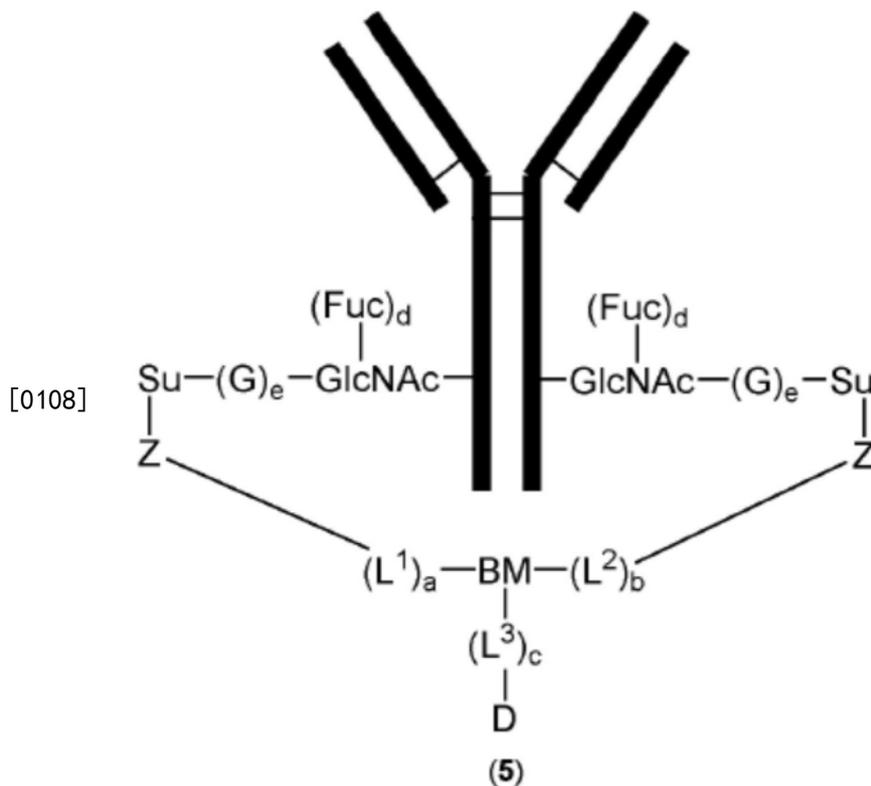
[0103] -D是有效负载;

[0104] -BM是分支部分;

[0105] -Z是可通过环加成反应获得的连接基团。

[0106] 在抗体-有效负载缀合物(1)中,有效负载D通过连接基团Z连接到抗体AB,任选接头L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>和分支部分BM。在(1)中,a、b和c各自独立地选自0和1。本发明优选的抗体-有效负载缀合物具有a=b=1,即L<sup>1</sup>和L<sup>2</sup>均存在,更优选L<sup>1</sup>和L<sup>2</sup>相同。特别优选的是对称的抗体-有效负载缀合物,其中每次出现的Z、a/b和L<sup>1</sup>/L<sup>2</sup>均相同。

[0107] 在一个优选的实施方案中,抗体通过聚糖与有效负载D缀合,在这种情况下,根据本发明的抗体-有效负载缀合物具有结构(5):



[0109] 其中：

[0110] -e为0-10范围内的整数；

[0111] -Su是单糖；

[0112] -G是单糖部分；

[0113] -GlcNAc是N-乙酰葡萄糖胺部分；

[0114] -Fuc是岩藻糖部分；

[0115] -d是0或1。

[0116] 抗体AB

[0117] 在(1)中,AB是抗体。优选AB是单克隆抗体,更优选选自IgA、IgD、IgE、IgG和IgM抗体。甚至更优选AB是IgG抗体。IgG抗体可以是任何IgG亚型。抗体可以是任何IgG亚型,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。优选AB是全长抗体,但AB也可以是Fc片段。

[0118] (5)中的GlcNAc部分优选存在于抗体AB的Fc片段中的天然N-糖基化位点。优选地,所述GlcNAc部分与AB的区域290-305中的天冬酰胺氨基酸连接。在进一步优选的实施方案中,抗体是IgG型抗体,并且取决于具体的IgG型抗体,所述GlcNAc部分存在于AB的氨基酸天冬酰胺297(Asn297或N297)上。

[0119] 连接基团Z

[0120] 在抗体-有效负载缀合物(1)中,Z是连接基团。如上文更详细描述,术语“连接基团”是指连接化合物的一部分和相同化合物的另一部分的结构元件。在(1)中,Z可能通过间隔基将抗体与分支部分BM相连接,通过 $\text{L}^1$ 和/或 $\text{L}^2$ (如果存在)。 $\text{L}^1$ 和/或 $\text{L}^2$ 是否存在取决于a和b的值。在优选的实施方案中,两次出现的Z是相同的。

[0121] 如本领域技术人员将理解的,连接基团的性质取决于获得所述化合物各部分之间连接的环加成反应的类型。例如,Z可以通过[4+2]环加成或1,3-偶极环加成获得。

[0122] 用于将反应基团Q连接到反应基团F的环加成反应在本领域中是已知的。因此,多种连接基团Z可以存在于根据本发明的缀合物中。在一个实施方案中,连接基团Z选自上述选项,优选如图1所示。

[0123] 例如,当F包含炔基或是炔基时,互补基团Q包括叠氮基,并且对应的连接基团Z如图1所示。

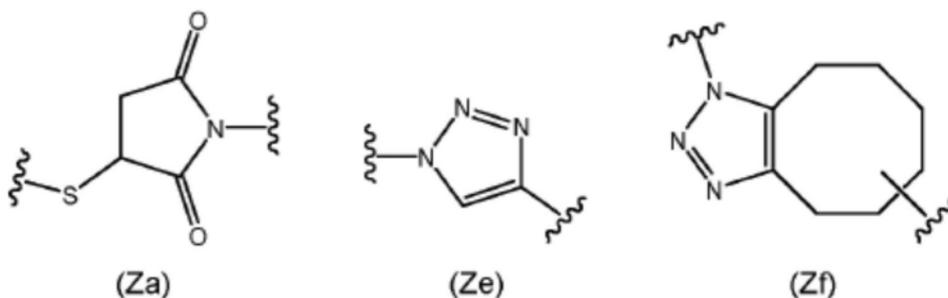
[0124] 例如,当F包含叠氮基或是叠氮基时,互补基团Q包括炔基,并且对应的连接基团Z如图1所示。

[0125] 例如,当F包含或是环丙烯基、反式环辛烯基或环炔基时,互补基团Q包括四嗪基,并且对应的连接基团Z如图1所示。具体情况下,Z仅为中间结构并排出 $N_2$ ,从而产生二氢哒嗪(来自与烯炔的反应)或哒嗪(来自与炔炔的反应)。

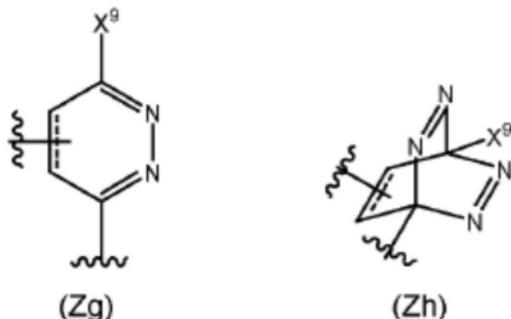
[0126] 例如,当F包含或是四嗪基时,互补基团Q包括环丙烯基、反式环辛烯基或环炔基,并且对应的连接基团Z如图1所示。具体情况下,Z仅为中间结构并排出 $N_2$ ,从而产生二氢哒嗪(来自与烯炔的反应)或哒嗪(来自与炔炔的反应)。

[0127] F和Q的其他合适组合以及所得连接基团Z的性质为本领域技术人员已知,并例如描述于G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3rd Ed. 2013 (ISBN: 978-0-12-382239-0), 特别是第3章, 第229-258页, 通过引用纳入本文。适用于生物缀合过程的互补反应基团的列表公开于G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3rd Ed. 2013 (ISBN: 978-0-12-382239-0) 的第3章第230-232页的表3.1, 且该表的内容明确通过引用纳入本文。

[0128] 在一个优选的实施方案中,连接基团Z是如下定义的结构(Za)、(Ze)至(Zh)、(Zj)和(Zk)中的任一种。优选地,Z是结构(Za)、(Ze)或(Zj):



[0129]



[0130] 在本文中,

[0131] -X选自H、 $C_{1-12}$ 烷基和吡啶基,其中 $C_{1-12}$ 烷基优选为 $C_{1-4}$ 烷基,最优选甲基。

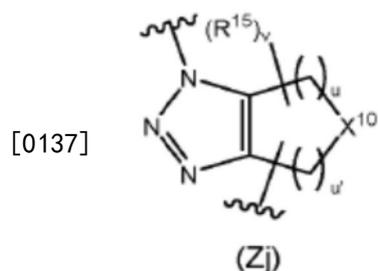
[0132] -在结构(Zg)和(Zh)中,----键代表单键或双键,并且可以通过该键的任一侧连接至接头L。

[0133] -波浪线表示与接头L的连接。连接性取决于Q和F的具体性质。尽管根据(Za)至(Zh)的连接基团的任一位点都可以连接到L,但优选是如图所示的这些基团的最左边连接到 $(L^1)_a / (L^2)_b$ 。

[0134] 连接基团(Zh)通常会随着 $N_2$ 的释放而重新排列为(Zg)。

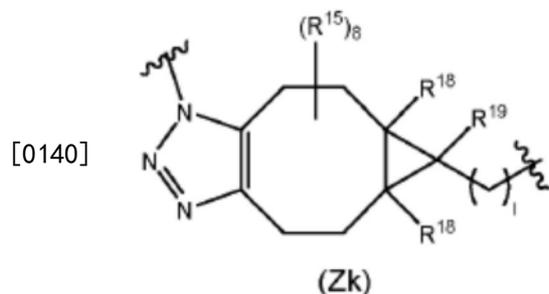
[0135] 在一个优选的实施方案中,每个Z独立地包含选自三唑、环己烯、环己二烯、异噁唑啉、异噁唑烷、吡唑啉、哌嗪、硫醚、酰胺或酰亚胺基团的部分。三唑部分特别优选存在于Z中。

[0136] 在一个特别优选的实施方案中,连接基团Z包含三唑部分并且根据结构(Zj) :



[0138] 在本文中, $R^{15}$ 、 $X^{10}$ 、 $u$ 、 $u'$ 和 $v$ 如(Q36)所定义,并且其所有优选实施方案同样适用于(Zj)。波浪线表示与相邻部分(Su和 $(L^1)_a$ 或 $(L^2)_b$ )的连接,并且连接性取决于Q和F的具体性质。尽管根据(Zj)的连接基团的任一位点都可以连接到 $(L^1)_a / (L^2)_b$ ,但优选是如图所示的上波浪键代表与Su的连接。根据结构(Zf)和(Zk)的连接基团是根据(Zj)的连接基团的优选实施方案。

[0139] 在一个特别优选的实施方案中,连接基团Z包含三唑部分并且根据结构(Zk) :



[0141] 在本文中, $R^{15}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 和I如(Q37)所定义,并且其所有优选实施方案同样适用于(Zj)。波浪线表示与相邻部分(Su和 $(L^1)_a$ 或 $(L^2)_b$ )的连接,并且连接性取决于Q和F的具体性质。尽管根据(Zj)的连接基团的任一位点都可以连接到 $(L^1)_a$ ,但优选是如图所示的波浪键代表与Su的连接。

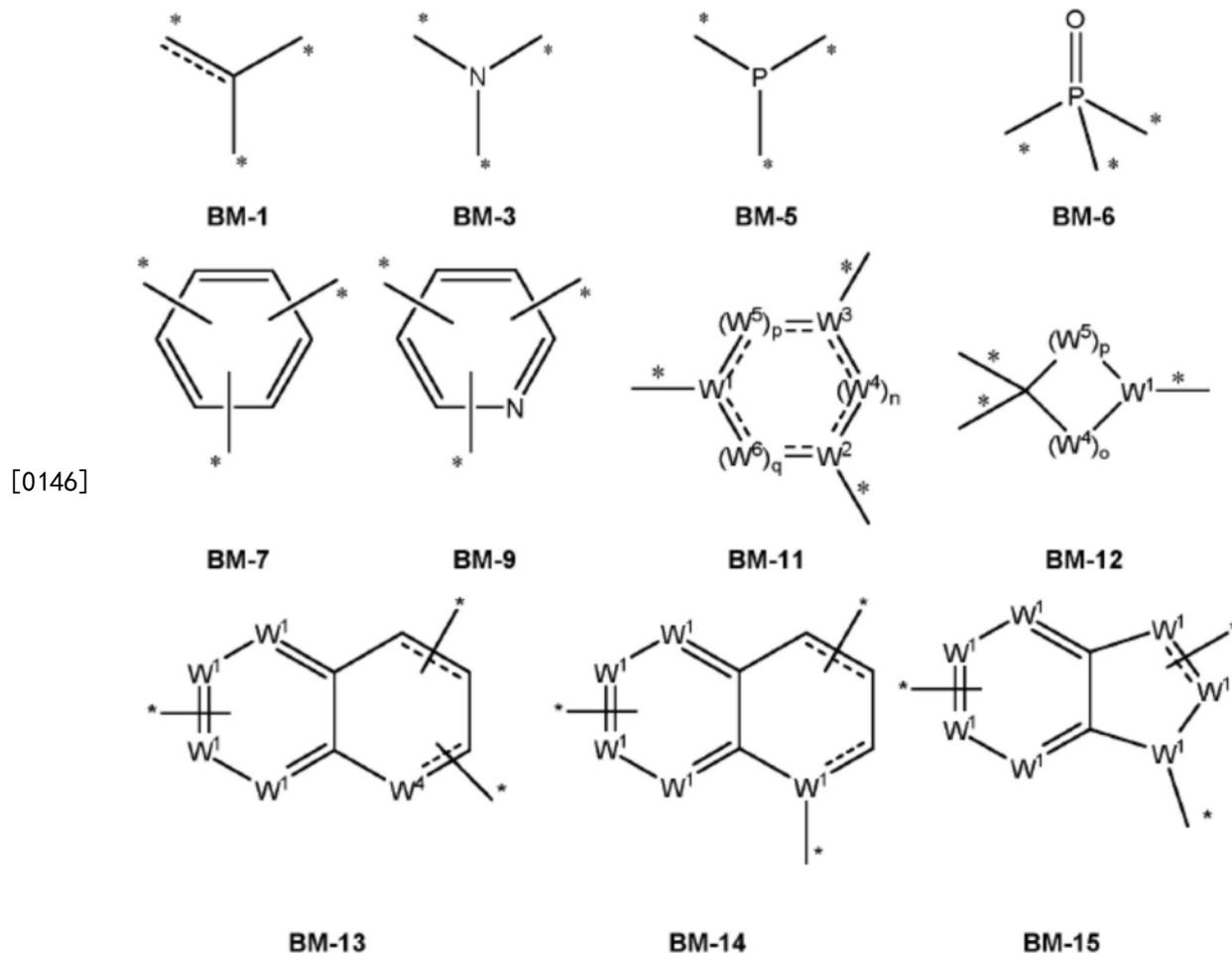
[0142] 在一个优选的实施方案中,Q包含或是炔烃部分且F是叠氮基部分,使得连接基团Z包含三唑部分。优选的包含噻唑部分的连接基团是根据结构(Ze)或(Zj)的连接基团,其中根据结构(Zj)的连接基团优选是根据结构(Zk)或(Zf)。在一个优选的实施方案中,连接基团是根据结构(Zj),更优选是根据结构(Zk)或(Zf)。

[0143] 分支部分BM

[0144] 本发明上下文中的“分支部分”是指嵌入连接三个部分的接头中的部分。换言之,分支部分包含至少三个与其他部分连接的键,一个与反应基团F、连接基团Z或有效负载D连接的键,一个与反应基团Q或连接基团Z连接的键,以及一个与反应基团Q或连接基团Z连接

的键。

[0145] 包含至少三个与其他部分连接的键的任何部分都适合作为本发明上下文中的分支部分。适合的分支部分包括碳原子 (BM-1)、氮原子 (BM-3)、磷原子 (磷 (BM-5) 和氧化磷 (BM-6))、芳环例如苯环 (例如BM-7) 或吡啶环 (例如BM-9)、(杂) 环 (例如BM-11和BM-12) 和多环部分 (例如BM-13、BM-14和BM-15)。优选的分支部分选自碳原子和苯环, 最优选BM是碳原子。下文描述了结构 (BM-1) 至 (BM-15), 其中三个分支, 即与如上文定义的其他部分连接的键, 通过\*表示 (用\*标记的键)。



[0147] 在 (BM-1) 中, 用\*标记的分支之一可以是单键或双键, 用----表示。在 (BM-11) 至 (BM-15) 中, 以下适用:

[0148] -n、p、q和q中的每一个各自为0-5范围内的整数, 优选0或1, 最优选1;

[0149] -W<sup>1</sup>、W<sup>2</sup>和W<sup>3</sup>中的每一个独立地选自C(R<sup>21</sup>)<sub>w</sub>和N;

[0150] -W<sup>4</sup>、W<sup>5</sup>和W<sup>6</sup>中的每一个独立地选自C(R<sup>21</sup>)<sub>w+1</sub>、N(R<sup>22</sup>)<sub>w</sub>、O和S;

[0151] -每个----代表单键或双键;

[0152] -w是0或1或2, 优选0或1;

[0153] -每个R<sup>21</sup>独立地选自氢、OH、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷氧基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基, 其中C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷氧基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基被一个或多个选自O、S、NR<sup>3</sup>的杂原子任选地取代和间断, 其中R<sup>3</sup>独立地选自氢和C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基, 以及

[0154] -每个 $R^{22}$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_3-C_{24}$ 环烷基、 $C_2-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_3-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_3-C_{24}$ (杂)芳基烷基,其中 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_1-C_{24}$ 烷氧基、 $C_3-C_{24}$ 环烷基、 $C_2-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_3-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_3-C_{24}$ (杂)芳基烷基被一个或多个选自O、S、 $NR^3$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢和 $C_1-C_4$ 烷基。

[0155] 本领域技术人员应理解w的值和由---表示的键的键顺序是相互依赖的。因此,每当W与环内双键键合出现时,对于W的出现,w=1,而每当W与两个环内单键键合出现时,对于W的出现,w=0。对于BM-12,o和p中至少有一个不为0。

[0156] 根据结构(BM-11)和(BM12)的分支部分的代表性实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基、氮杂环丙烷、氮杂环丁烷、二氮杂环丁烷、氧杂环丁烷、硫杂环丁烷、吡咯烷、二氢吡咯基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、咪唑啉基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑啉基、四氢噻唑基、异噻唑烷基、二氧戊环基、二硫环基、呱啶基、噁烷基(oxanyl)、噻烷基(thianyl)、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、二噁烷基、三噁烷基、二噻烷基、三噻烷基、氮杂基、氧杂环庚烷基和硫杂环庚烷基。用作分支部分的优选环状部分包括环丙烯基、环己基、噁烷基(四氢吡喃)和二噁烷基。三个分支的取代模式决定了分支部分是结构(BM-11)还是结构(BM-12)。

[0157] 根据结构(BM-13)至(BM-15)的分支部分的代表性实例包括萘烷、四氢化萘、二氢化萘、萘、茛、二氢化茛、异茛、吡啶、异吡啶、二氢吡啶、异二氢吡啶等。

[0158] 在一个优选的实施方案中,BM是碳原子。如果碳原子是根据结构(BM-1)并且具有连接不同部分的所有四个键,则碳原子是手性的。碳原子的立体化学对于本发明来说不是关键的,并且可以是S或R。这同样适用于磷(BM-6)。最优选地,碳原子是根据结构(BM-1)。根据结构(BM-1),碳原子中用\*表示的分支之一可以是双键,在这种情况下,碳原子可以是烯烃或亚胺的一部分。如果过BM是碳原子,碳原子可以是较大官能团的一部分,例如乙缩醛、缩酮、半缩酮、原酸酯、原碳酸酯、氨基酸等。这也适用于BM是氮或磷原子的情况,在这种情况下,其可以是酰胺、酰亚胺、亚胺、氧化磷(如在BM-6中)或磷酸三酯的一部分。

[0159] 在一个优选的实施方案中,BM是苯环。最优选地,苯环根据结构(BM-7)。苯环的取代模式可以是任何区域选择性化学,例如1,2,3-取代的苯环、1,2,4-取代的苯环或1,3,5-取代的苯环。为了获得最佳的灵活性和构象自由度,优选苯环根据结构(BM-7),最优选苯环是1,3,5-取代的。这同样适用于(BM-9)的吡啶环。

[0160] 在一个优选的实施方案中,分支部分BM选自碳原子、氮原子、磷原子、(杂)芳环、(杂)环或多环部分。

[0161] 接头

[0162]  $L^1$ 、 $L^2$ 和 $L^3$ 中的每一个可以不存在或存在,但优选所有三个连接单元都存在。在一个优选的实施方案中, $L^1$ 、 $L^2$ 和 $L^3$ 中的每一个如果存在,独立地是选自C、N、O、S和P的至少2个、优选5至100个原子的链。在本文中,原子链是指从连接单元的末端开始的最短的原子链。链内的原子也可以称为主链原子。如技术人员将理解的,具有多于两个化合价的原子,例如C、N和P,可以被适当地功能化以完成这些原子的化合价。换言之,主链原子任选地被功能化。在一个优选的实施方案中, $L^1$ 、 $L^2$ 和 $L^3$ 中的每一个如果存在,独立地是选自C、N、O、S和P的至少5至50、优选6至25个原子的链。主链原子优选选自C、N和O。

[0163] 接头 $L^1$ 和 $L^2$ 连接BM与反应部分Q或连接基团Z。优选 $L^1$ 和 $L^2$ 都存在,即 $a=b=1$ ,更优选它们是相同的。在一个特别优选的实施方案中, $(L^1)_a-Z$ 与 $(L^2)_b-Z$ 相同,且 $(L^1)_a-Q$ 与 $(L^2)_b-Q$ 相同。

[0164]  $L^1$ 和 $L^2$ 可独立地选自直链或支链 $C_1-C_{200}$ 亚烷基、 $C_2-C_{200}$ 亚烯基、 $C_2-C_{200}$ 亚炔基、 $C_3-C_{200}$ 亚环烷基、 $C_5-C_{200}$ 亚环烯基、 $C_8-C_{200}$ 亚环炔基、 $C_7-C_{200}$ 烷基亚芳基、 $C_7-C_{200}$ 芳基亚烷基、 $C_8-C_{200}$ 芳基亚烯基和 $C_9-C_{200}$ 芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^3$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。当亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个如上定义的杂原子间断时,优选所述基团被一个或多个O-原子,和/或一个或多个S-S基团间断。

[0165] 更优选地, $L^1$ 和 $L^2$ 如果存在,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{100}$ 亚烷基、 $C_2-C_{100}$ 亚烯基、 $C_2-C_{100}$ 亚炔基、 $C_3-C_{100}$ 亚环烷基、 $C_5-C_{100}$ 亚环烯基、 $C_8-C_{100}$ 亚环炔基、 $C_7-C_{100}$ 烷基亚芳基、 $C_7-C_{100}$ 芳基亚烷基、 $C_8-C_{100}$ 芳基亚烯基和 $C_9-C_{100}$ 芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^3$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0166] 甚至更优选地, $L^1$ 和 $L^2$ 如果存在,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{50}$ 亚烷基、 $C_2-C_{50}$ 亚烯基、 $C_2-C_{50}$ 亚炔基、 $C_3-C_{50}$ 亚环烷基、 $C_5-C_{50}$ 亚环烯基、 $C_8-C_{50}$ 亚环炔基、 $C_7-C_{50}$ 烷基亚芳基、 $C_7-C_{50}$ 芳基亚烷基、 $C_8-C_{50}$ 芳基亚烯基和 $C_9-C_{50}$ 芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^3$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0167] 甚至更进一步优选地, $L^1$ 和 $L^2$ 如果存在,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{20}$ 亚烷基、 $C_2-C_{20}$ 亚烯基、 $C_2-C_{20}$ 亚炔基、 $C_3-C_{20}$ 亚环烷基、 $C_5-C_{20}$ 亚环烯基、 $C_8-C_{20}$ 亚环炔基、 $C_7-C_{20}$ 烷基亚芳基、 $C_7-C_{20}$ 芳基亚烷基、 $C_8-C_{20}$ 芳基亚烯基和 $C_9-C_{20}$ 芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^3$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0168] 在这些优选的实施方案中,进一步优选亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^3$  (优选O)的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢和 $C_1-C_4$ 烷基,优选是氢或甲基。

[0169] 最优选地, $L^1$ 和 $L^2$ 如果存在,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{20}$ 亚烷基,亚烷基被一个或多个选自O、S、 $NR^3$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。在该实施方案中,进一步优选亚烷基未被取代且被一个或多个选自O、S、 $NR^3$  (优选O和/或S-S)的杂原子任选地间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢和 $C_1-C_4$ 烷基,优选是氢或甲基。

[0170] 优选的接头 $L^1$ 和 $L^2$ 包括 $-(CH_2)_{n_1}-$ 、 $-(CH_2CH_2)_{n_1}-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_{n_1}-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_{n_1}-$ 、

$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}\text{CH}_2\text{CH}_2^-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{n1}^-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}^-$ 、 $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_{n1}^-$ 、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2^-$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_{n1}^-$ ,其中 $n1$ 是1至50范围内的整数,优选1至40范围内的整数,更优选1至30范围内的整数,甚至更优选1至20范围内的整数且甚至更优选1至15范围内的整数。更优选 $n1$ 是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,更优选1、2、3、4、5、6、7或8,甚至更优选1、2、3、4、5或6,甚至更进一步优选1、2、3或4。

[0171] 在一个实施方案中, $L^3$ 不存在且 $c=0$ 。在其他且更优选的实施方案中, $L^3$ 存在且 $c=1$ 。如果 $L^3$ 存在,则它可以与 $L^1$ 和 $L^2$ 相同或不同,优选为不同。

[0172] 在一个优选的实施方案中, $L^3$ 可包含一个或多个 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 和 $L^7$ 。因此,在一个实施方案中, $L^3$ 是 $-(L^4)_n-(L^5)_o-(L^6)_p-(L^7)_q-$ ,其中 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 和 $L^7$ 是一起形成如下文进一步定义的接头 $L$ 的接头; $n$ 、 $o$ 、 $p$ 和 $q$ 分别为0或1。在一个优选的实施方案中,至少接头 $L^4$ 和 $L^5$ 存在(即 $n=1$ ;  $o=1$ ;  $p=0$ 或 $1$ ;  $q=0$ 或 $1$ ),更优选接头 $L^4$ 、 $L^5$ 和 $L^6$ 存在且 $L^7$ 存在或不存在(即 $n=1$ ;  $o=1$ ;  $p=1$ ;  $q=0$ 或 $1$ )。在一个实施方案中,接头 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 和 $L^7$ 存在(即 $n=1$ ;  $o=1$ ;  $p=1$ ;  $q=1$ )。在一个实施方案中,接头 $L^4$ 、 $L^5$ 和 $L^6$ 存在且 $L^7$ 不存在(即 $n=1$ ;  $o=1$ ;  $p=1$ ;  $q=0$ )。在一个实施方案中, $n+o+p+q=1$ 、2、3或4,优选2、3或4,更优选3或4。在一个优选的实施方案中, $L^5$ 和 $L^6$ 均存在,即 $o+p=2$ 。最优选地, $n+o+p+q=4$ 。

[0173] 接头 $L^3$ 可包含连接基团 $Z^3$ ,其在有效负载 $D$ 连接至接头构建体时形成,其可以在接头构建体(特别是反应部分 $Q$ )与功能化抗体(特别是反应部分 $F$ )反应前或反应后。接头 $L^3$ 内的连接基团可在连接单元 $L^4$ 、 $L^5$ 、 $L^6$ 和 $L^7$ 中的任何一个连接处形成,或可单独存在于接头 $L^3$ 中。例如, $L^3$ 可能用 $-Z^3-(L^4)_n-(L^5)_o-(L^6)_p-(L^7)_q-$ 或 $-(L^4)_n-Z^3-(L^5)_o-(L^6)_p-(L^7)_q-$ 表示,在本文中, $Z$ 可以是任何形式,且对于通过 $Q$ 和 $F$ 的反应获得的连接基团优选如下所述进一步定义。

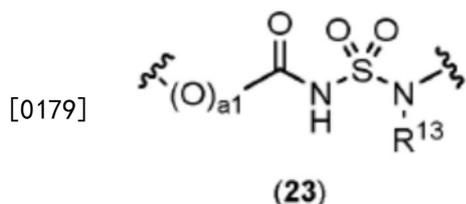
[0174] 接头 $L^4$

[0175] 接头 $L^4$ 不存在( $n=0$ )或存在( $n=1$ )。优选地, $L^4$ 存在且 $n=1$ 。 $L^4$ 可以例如选自直链或支链 $C_1$ - $C_{200}$ 亚烷基、 $C_2$ - $C_{200}$ 亚烯基、 $C_2$ - $C_{200}$ 亚炔基、 $C_3$ - $C_{200}$ 亚环烷基、 $C_5$ - $C_{200}$ 亚环烯基、 $C_8$ - $C_{200}$ 亚环炔基、 $C_7$ - $C_{200}$ 烷基亚芳基、 $C_7$ - $C_{200}$ 芳基亚烷基、 $C_8$ - $C_{200}$ 芳基亚烯基和 $C_9$ - $C_{200}$ 芳基亚炔基。任选地亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被取代,且任选地所述基团可以被一个或多个杂原子间断,优选1至100个杂原子,所述杂原子优选选自 $O$ 、 $S$ ( $O$ ) $_y$ 和 $NR^{15}$ ,其中 $y$ 是0、1或2,优选 $y=2$ ,且 $R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $C_1$ - $C_{24}$ 烷基、 $C_6$ - $C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7$ - $C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7$ - $C_{24}$ (杂)芳烷基。

[0176]  $L^4$ 可包含(聚)乙二醇二胺(例如1,8-二氨基-3,6-二氧杂辛烷或包含较长乙二醇链的等价物)、聚乙二醇或聚环氧乙烷链、聚丙二醇或聚环氧丙烷链和1, $z$ -二氨基烷烃,其中 $z$ 是烷烃中的碳原子数( $z$ 例如可以是1-10范围内的整数)。

[0177] 在一个优选的实施方案中,接头 $L^4$ 包含乙二醇基、羧酸部分、磺酸酯部分、砒部分、磷酸酯部分、次磷酸酯部分、氨基、铵基或磺酰胺基。

[0178] 在一个优选的实施方案中,接头 $L^4$ 包含磺酰胺基,优选是根据结构(23)的磺酰胺基:



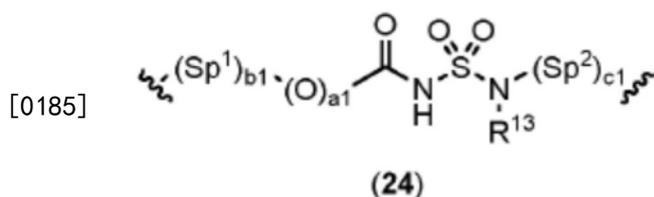
[0180] 波浪线表示与化合物剩余部分的连接,通常与BM和L<sup>5</sup>、L<sup>6</sup>、L<sup>7</sup>或D,优选与BM和L<sup>5</sup>连接。优选地,(O)<sub>a1</sub>C(O)部分连接到BM, NR<sup>13</sup>部分连接到L<sup>5</sup>、L<sup>6</sup>、L<sup>7</sup>或D,优选连接到L<sup>5</sup>。

[0181] 在结构(23)中,a<sub>1</sub>=0或1,优选a<sub>1</sub>=1,且R<sup>13</sup>选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳烷基,C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳烷基任选地被一个或多个选自O、S和NR<sup>14</sup>的杂原子间断,其中R<sup>14</sup>独立地选自氢和C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基。

[0182] 或者,R<sup>13</sup>是可能通过间隔基部分连接到N的D。在一个实施方案中,这种连接是通过下文所定义的间隔基部分Sp<sup>2</sup>,优选D通过下文所进一步定义的(B)<sub>e1</sub>-(A)<sub>f1</sub>-(B)<sub>g1</sub>-C(O)-或通过-(B)<sub>e1</sub>-(A)<sub>f1</sub>-(B)<sub>g1</sub>-C(O)-(L<sup>5</sup>)<sub>o</sub>-(L<sup>6</sup>)<sub>p</sub>-(L<sup>7</sup>)<sub>q</sub>连接到N。在另一个实施方案中,R<sup>13</sup>还连接到有效负载D的第一个实例,从而形成环状结构。例如,N是哌嗪部分的一部分,其通过碳原子或氮原子连接到D,优选地通过哌嗪环的第二个氮原子。优选地,环状结构,例如哌嗪环通过下文所进一步定义的(B)<sub>e1</sub>-(A)<sub>f1</sub>-(B)<sub>g1</sub>-C(O)-或通过-(B)<sub>e1</sub>-(A)<sub>f1</sub>-(B)<sub>g1</sub>-C(O)-(L<sup>5</sup>)<sub>o</sub>-(L<sup>6</sup>)<sub>p</sub>-(L<sup>7</sup>)<sub>q</sub>连接到D。

[0183] 在一个优选的实施方案中,R<sup>13</sup>是氢或C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基,更优选R<sup>13</sup>是氢或C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>烷基,甚至更优选R<sup>13</sup>是氢或C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基,其中烷基被一个或多个选自O、S、NR<sup>14</sup>(优选O)的杂原子任选地取代和间断,其中R<sup>14</sup>独立地选自氢和C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基。在一个优选的实施方案中,R<sup>13</sup>是氢。在另一个优选的实施方案中,R<sup>13</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基,更优选是C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>烷基,甚至更优选是C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基,其中烷基任选地被一个或多个O-原子间断,并且其中烷基任选地被OH基团取代,优选末端-OH基团。在该实施方案中,进一步优选R<sup>13</sup>是包含末端-OH基团的(聚)乙二醇链。在另一个优选实施方案中,R<sup>13</sup>选自氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基和叔丁基,更优选选自氢、甲基、乙基、正丙基和异丙基,甚至更优选选自氢、甲基和乙基。更进一步优选地,R<sup>13</sup>是氢或甲基,最优选地,R<sup>13</sup>是氢。

[0184] 在一个优选的实施方案中,L<sup>4</sup>是根据结构(24):



[0186] 在本文中,a和R<sup>13</sup>如上文所定义,Sp<sup>1</sup>和Sp<sup>2</sup>是独立的间隔基部分,并且b<sub>1</sub>和c<sub>1</sub>独立地是0或1。优选地,b<sub>1</sub>=0或1且c<sub>1</sub>=1,更优选地b<sub>1</sub>=0和c<sub>1</sub>=1。在一个实施方案中,间隔基Sp<sup>1</sup>和Sp<sup>2</sup>独立地选自直链或支链C<sub>1</sub>-C<sub>200</sub>亚烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>200</sub>亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>200</sub>亚炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>200</sub>亚环烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>200</sub>亚环烯基、C<sub>8</sub>-C<sub>200</sub>亚环炔基、C<sub>7</sub>-C<sub>200</sub>烷基亚芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>200</sub>芳基亚烷基、C<sub>8</sub>-C<sub>200</sub>芳基亚烯基和C<sub>9</sub>-C<sub>200</sub>芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、NR<sup>16</sup>的杂原子任选地取代和间断,其中R<sup>16</sup>独立地选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>炔基和C<sub>3</sub>-C<sub>24</sub>环烷基,烷基、

烯基、炔基和环烷基任选地被取代。当亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个如上定义的杂原子间断时,优选所述基团被一个或多个O-原子,和/或一个或多个S-S基团间断。

[0187] 更优选地,间隔基部分 $Sp^1$ 和 $Sp^2$ 如果存在,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{100}$ 亚烷基、 $C_2-C_{100}$ 亚烯基、 $C_2-C_{100}$ 亚炔基、 $C_3-C_{100}$ 亚环烷基、 $C_5-C_{100}$ 亚环烯基、 $C_8-C_{100}$ 亚环炔基、 $C_7-C_{100}$ 烷基亚芳基、 $C_7-C_{100}$ 芳基亚烷基、 $C_8-C_{100}$ 芳基亚烯基和 $C_9-C_{100}$ 芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^{16}$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^{16}$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0188] 甚至更优选地,间隔基部分 $Sp^1$ 和 $Sp^2$ 如果存在,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{50}$ 亚烷基、 $C_2-C_{50}$ 亚烯基、 $C_2-C_{50}$ 亚炔基、 $C_3-C_{50}$ 亚环烷基、 $C_5-C_{50}$ 亚环烯基、 $C_8-C_{50}$ 亚环炔基、 $C_7-C_{50}$ 烷基亚芳基、 $C_7-C_{50}$ 芳基亚烷基、 $C_8-C_{50}$ 芳基亚烯基和 $C_9-C_{50}$ 芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^{16}$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^{16}$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0189] 甚至更进一步优选地,间隔基部分 $Sp^1$ 和 $Sp^2$ 如果存在,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{20}$ 亚烷基、 $C_2-C_{20}$ 亚烯基、 $C_2-C_{20}$ 亚炔基、 $C_3-C_{20}$ 亚环烷基、 $C_5-C_{20}$ 亚环烯基、 $C_8-C_{20}$ 亚环炔基、 $C_7-C_{20}$ 烷基亚芳基、 $C_7-C_{20}$ 芳基亚烷基、 $C_8-C_{20}$ 芳基亚烯基和 $C_9-C_{20}$ 芳基亚炔基,亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^{16}$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^{16}$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0190] 在这些优选的实施方案中,进一步优选亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基被一个或多个选自O、S、 $NR^{16}$  (优选O)的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^{16}$ 独立地选自氢、 $C_1-C_4$ 烷基,优选是氢或甲基。

[0191] 最优选地,间隔基部分 $Sp^1$ 和 $Sp^2$ ,独立地选自直链或支链 $C_1-C_{20}$ 亚烷基,亚烷基被一个或多个选自O、S、 $NR^{16}$ 的杂原子任选地取代和间断,其中 $R^{16}$ 独立地选自氢、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_2-C_{24}$ 烯基、 $C_2-C_{24}$ 炔基和 $C_3-C_{24}$ 环烷基,烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。在该实施方案中,进一步优选亚烷基未被取代且被一个或多个选自O、S、 $NR^{16}$  (优选O和/或S-S)的杂原子任选地间断,其中 $R^3$ 独立地选自氢和 $C_1-C_4$ 烷基,优选是氢或甲基。

[0192] 因此,优选的间隔基部分 $Sp^1$ 和 $Sp^2$ 包括 $-(CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(OCH_2CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2CH_2O)_r-$ 、 $-(OCH_2CH_2CH_2)_r-$ 、 $-(CH_2CH_2CH_2O)_rCH_2CH_2CH_2-$ 和 $-CH_2CH_2CH_2(OCH_2CH_2CH_2)_r-$ ,其中r是1至50范围内的整数,优选1至40范围内的整数,更优选1至30范围内的整数,甚至更优选1至20范围内的整数且甚至更优选1至15范围内的整数。更优选r是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,更优选1、2、3、4、5、6、7或8,甚至更优选1、2、3、4、5或6,甚至更进一步优选1、2、3或4。

[0193] 或者,优选的接头 $L^4$ 可以由 $-(W)_{k1}-(A)_{d1}-(B)_{e1}-(A)_{f1}-(C(O))_{g1}$ 表示,其中:

[0194]  $-d1=0$ 或 $1$ ,优选 $d1=1$ ;

[0195]  $-e1=0-10$ 范围内的整数,优选 $e1=0、1、2、3、4、5$ 或 $6$ ,优选 $1-10$ 范围内的整数,最

优选 $e_1=1, 2, 3$ 或 $4$ ;

[0196]  $-f_1=0$ 或 $1$ , 优选 $f_1=0$ ;

[0197]  $-$ 其中 $d_1+e_1+f_1$ 至少为 $1$ , 优选在 $1-5$ 的范围内, 且优选其中 $d_1+f_1$ 至少为 $1$ , 优选 $d_1+f_1=1$ 。

[0198]  $-g_1=0$ 或 $1$ , 优选 $g_1=1$ ;

[0199]  $-k_1=0$ 或 $1$ , 优选 $k_1=1$ ;

[0200]  $-A$ 是根据结构(23)的磺酰胺基;

[0201]  $-B$ 是 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 或 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 部分, 或 $(B)_{e_1}$ 是 $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{e_3}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 部分, 其中 $e_3$ 的定义与 $e_1$ 相同;

[0202]  $-W$ 是 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 或 $-(4-\text{Ph})\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ , 优选其中 $W$ 是 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ , 且其中 $m$ 是 $0-10$ 范围内的整数, 优选 $m=0, 1, 2, 3, 4, 5$ 或 $6$ , 最优选 $m=2$ 或 $3$ ;

[0203]  $-$ 优选其中 $L^4$ 通过 $(A)_{d_1}-(B)_{e_1}$ 连接至 $\text{BM}$ 且通过 $(\text{C}(\text{O}))_{g_1}$  (优选通过 $\text{C}(\text{O})$ ) 连接至 $(L^5)$ 。

[0204] 在本实施方案的上下文中, 结构(23)中的波浪线表示与相邻基团(例如 $(W)_{k_1}$ 、 $(B)_{e_1}$ 和 $(\text{C}(\text{O}))_{g_1}$ )的连接。优选 $A$ 是根据结构(23), 其中 $a_1=1$ 且 $R^{13}=\text{H}$ 或 $\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 烷基, 更优选 $R^{13}=\text{H}$ 或甲基, 最优选 $R^{13}=\text{H}$ 。

[0205] 优选的接头 $L^4$ 如下所示:

[0206] (a)  $k_1=0$ ;  $d_1=1$ ;  $g_1=1$ ;  $f_1=0$ ;  $B=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ;  $e_1=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_1=2$ 。

[0207] (b)  $k_1=1$ ;  $W=-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ;  $m=2$ ;  $d_1=0$ ;  $(B)_{e_1}=-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{e_3}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ;  $f_1=0$ ;  $g_1=1$ ;  $e_3=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_1=1$ 。

[0208] (c)  $k_1=1$ ;  $W=-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ ;  $d_1=0$ ;  $B=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ;  $g_1=1$ ;  $f_1=0$ ;  $e_1=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_1=2$ 。

[0209] (d)  $k_1=1$ ;  $W=-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ;  $m=2$ ;  $d_1=0$ ;  $(B)_{e_1}=-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{e_3}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ;  $f_1=0$ ;  $g_1=1$ ;  $e_3=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_3=4$ 。

[0210] (e)  $k_1=1$ ;  $W=-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ ;  $d_1=0$ ;  $(B)_{e_1}=-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{e_3}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ;  $g_1=1$ ;  $f_1=0$ ;  $e_3=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_3=4$ 。

[0211] (f)  $k_1=1$ ;  $W=- (4-\text{Ph})\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ,  $m=3$ ;  $d_1=0$ ;  $(B)_{e_1}=-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_{e_3}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ;  $g_1=1$ ;  $f_1=0$ ;  $e_3=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_3=4$ 。

[0212] (g)  $k_1=0$ ;  $d_1=0$ ;  $g_1=1$ ;  $f_1=0$ ;  $B=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ;  $e_1=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_1=2$ 。

[0213] (h)  $k_1=1$ ;  $W=-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ;  $d_1=0$ ;  $g_1=1$ ;  $f_1=0$ ;  $B=-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ;  $e_1=1, 2, 3$ 或 $4$ , 优选 $e_1=2$ 。

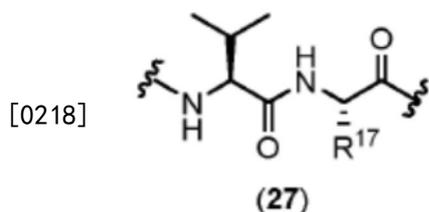
[0214] 在一个实施方案中, 接头 $L^4$ 包含支链氮原子, 其位于 $\text{BM}$ 和 $(L^5)$ 之间的链中, 并且其包含另一部分 $D$ 作为取代基, 其优选通过接头连接至支链氮原子。支链氮原子的一个实例是结构(23)中的氮原子 $\text{NR}^{13}$ , 其中 $R^{13}$ 通过间隔基部分与第二次出现的 $D$ 连接。或者, 支链氮原子可以位于根据结构 $-(W)_{k_1}-(A)_{d_1}-(B)_{e_1}-(A)_{f_1}-(\text{C}(\text{O}))_{g_1}-$ 的 $L^4$ 内。在一个实施方案中,  $L^4$ 表示为 $-(W)_{k_1}-(A)_{d_1}-(B)_{e_1}-(A)_{f_1}-(\text{C}(\text{O}))_{g_1}-\text{N}^*[-(A)_{d_1}-(B)_{e_1}-(A)_{f_1}-(\text{C}(\text{O}))_{g_1}]_2-$ , 其中 $A, B, W, d_1, e_1, f_1, g_1$ 和 $k_1$ 如上文所定义, 每次出现时单独选择, 且 $\text{N}^*$ 是支链氮原子, 其中两个实

例- (A)<sub>d1</sub>- (B)<sub>e1</sub>- (A)<sub>f1</sub>- (C(O))<sub>g1</sub>- 与其相连。在本文中,两个 (C(O))<sub>g1</sub> 部分都连接到- (L<sup>5</sup>)<sub>o</sub>- (L<sup>6</sup>)<sub>p</sub>- (L<sup>7</sup>)<sub>q</sub>-D,其中L<sup>5</sup>、L<sup>6</sup>、L<sup>7</sup>、o、p、q和D如上文所定义,每次都是单独选择。在最优选的实施方案中,不存在这样的分支原子且接头L<sup>4</sup>不包含与另一部分D的连接。

[0215] 接头L<sup>5</sup>

[0216] 接头L<sup>5</sup>不存在 (o=0) 或存在 (o=1)。优选地,接头L<sup>5</sup>存在且o=1。接头L<sup>5</sup>是本领域已知的肽间隔基,优选包含2-5个氨基酸,更优选二肽或三肽间隔基,最优选二肽间隔基。尽管可以使用任何肽间隔基,优选的接头L<sup>5</sup>选自Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Arg、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Phe-Arg、Ala-Lys、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn,更优选Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Ala-Ala-Asn,更优选Val-Cit、Val-Ala、Ala-Ala-Asn。在一个实施方案中,L<sup>5</sup>=Val-Cit。在一个实施方案中,L<sup>5</sup>=Val-Ala。

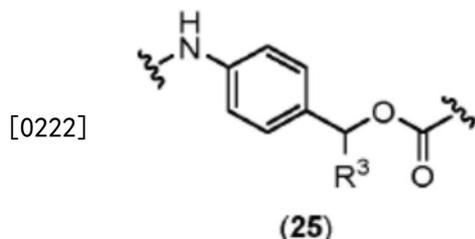
[0217] 在一个优选的实施方案中,L<sup>5</sup>由一般结构(27)表示:



[0219] 在本文中,R<sup>17</sup>=CH<sub>3</sub>或CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>。波浪线表示与(L<sup>4</sup>)<sub>n</sub>和(L<sup>6</sup>)<sub>p</sub>的连接,优选地,根据结构(27)的L<sup>5</sup>通过NH连接到(L<sup>4</sup>)<sub>n</sub>,且通过C(O)连接到(L<sup>6</sup>)<sub>p</sub>。

[0220] 接头L<sup>6</sup>

[0221] 接头L<sup>6</sup>不存在 (p=0) 或存在 (p=1)。优选地,接头L<sup>6</sup>存在且p=1。接头L<sup>6</sup>是自裂解间隔基,也称为自分解间隔基。优选L<sup>6</sup>是对氨基苄氧基羰基(PABC)衍生物,更优选是根据结构(25)的PABC衍生物。



[0223] 在本文中,波浪线表示与(L<sup>5</sup>)<sub>n</sub>和(L<sup>7</sup>)<sub>p</sub>的连接。通常,PABC衍生物通过NH连接到(L<sup>5</sup>)<sub>n</sub>,并通过O连接到(L<sup>7</sup>)<sub>p</sub>。

[0224] R<sup>3</sup>是H、R<sup>4</sup>或C(O)R<sup>4</sup>,其中R<sup>4</sup>是C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>(杂)烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>(杂)环烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>(杂)芳基、C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>(杂)芳烷基,其被一个或多个选自O、S和NR<sup>5</sup>的杂原子任选地取代和间断,其中R<sup>5</sup>独立地选自氢和C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基。优选地,R<sup>4</sup>的C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>(杂)环烷基或聚亚烷基二醇。聚亚烷基二醇优选是聚乙二醇或聚丙二醇,更优选-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>H或-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>H。聚亚烷基二醇最优选是聚乙二醇,优选-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>H,其中s是1-10范围内的整数,优选1-5范围内的整数,最优选s=1、2、3或4。更优选地,R<sup>3</sup>是H或C(O)R<sup>4</sup>,其中R<sup>4</sup>=4-甲基-哌嗪或吗啉。最优选地,R<sup>3</sup>是H。

[0225] 接头L<sup>7</sup>

[0226] 接头L<sup>7</sup>不存在 (q=0) 或存在 (q=1)。优选地,接头L<sup>7</sup>存在并且q=1。接头L<sup>7</sup>是氨基

链烷酸间隔基,即-N-(C<sub>h</sub>-亚烷基)-C(O)-,其中h是1至20范围内的整数,优选1-10范围内的整数,最优选1-6范围内的整数。在本文中,氨基链烷酸间隔基通常通过氮原子连接到L<sup>6</sup>,并通过羰基部分连接到D。优选的接头L<sup>7</sup>选自6-氨基己酸(Ahx,h=6)、β-丙氨酸(h=2)和甘氨酸(Gly,h=1),甚至更优选6-氨基己酸或甘氨酸。在一个实施方案中,L<sup>7</sup>=6-氨基己酸。在一个实施方案中,L<sup>7</sup>=甘氨酸。或接头L<sup>7</sup>是根据结构-N-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>e6</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>e7</sub>-C(O)-的乙二醇间隔基,其中e6是1-10范围内的整数,e7是1-3范围内的整数。

[0227] 有效负载D

[0228] 在根据本发明的接头-缀合物的一个优选实施方案中,有效负载选自活性物质、报告分子、聚合物、固体表面、水凝胶、纳米颗粒、微粒和生物分子。特别优选的有效负载是活性物质和报告分子,特别是活性物质。

[0229] 本文中的术语“活性物质”涉及药理学和/或生物学物质,即具有生物学和/或药理学活性的物质,例如药物、前药、诊断剂、蛋白质、肽、多肽、肽标签、氨基酸、聚糖、脂质、维生素、类固醇、核苷酸、核苷、多核苷酸、RNA或DNA。肽标签的实例包括细胞穿透肽,如人乳铁蛋白或聚精氨酸。聚糖的一个实例是寡甘露糖。氨基酸的一个实例是赖氨酸。

[0230] 当有效负载是活性物质时,活性物质优选选自药物和前药。更优选地,活性物质选自药物活性化合物,特别是低至中等分子量的化合物(例如约200至约2500Da,优选约300至约1750Da)。在进一步优选的实施方案中,活性物质选自细胞毒素、抗病毒剂、抗菌剂、肽和寡核苷酸。细胞毒素的实例包括秋水仙碱、长春花生物碱、葱环类、喜树碱、阿霉素、柔红霉素、紫杉烷、卡奇霉素、微管溶素(tubulysin)、伊立替康、抑制肽、鹅膏蕈碱、deBouganin、倍癌霉素、美登素、奥瑞他汀、烯二炔、吡咯并苯并二氮杂~~草~~(PBD)或吡啶并苯并二氮杂~~草~~二聚体(IGN)或PNU159,682。

[0231] 本文中的术语“报告分子”是指其存在易于检测的分子,例如诊断剂、染料、荧光团、放射性同位素标记、造影剂、磁共振成像剂或质量标记。

[0232] 多种荧光团,也称为荧光探针,是本领域技术人员已知的。在例如G.T.Hermanson,“Bioconjugate Techniques”,Elsevier,3<sup>rd</sup> Ed.2013,Chapter 10:“Fluorescent probes”,p.395-463(通过引用纳入本文)中更详细地描述了几种荧光团。荧光团的实例包括所有种类的Alexa Fluor(例如Alexa Fluor 555)、花菁染料(例如Cy3或Cy5)和花菁染料衍生物、香豆素衍生物、荧光素和荧光素衍生物、罗丹明和罗丹明衍生物、硼二吡咯亚甲基衍生物、茈萘衍生物、萘二甲酰亚胺衍生物、藻胆蛋白衍生物(例如别藻蓝蛋白)、色霉素、镧系元素螯合物和量子点纳米晶体。

[0233] 放射性同位素标记的实例包括<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>114m</sup>In、<sup>115</sup>In、<sup>18</sup>F、<sup>14</sup>C、<sup>64</sup>Cu、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>212</sup>Bi、<sup>88</sup>Y、<sup>90</sup>Y、<sup>67</sup>Cu、<sup>186</sup>Rh、<sup>188</sup>Rh、<sup>66</sup>Ga、<sup>67</sup>Ga和<sup>10</sup>B,其任选地通过螯合部分连接,例如DTPA(二乙烯三胺五乙酸酐)、DOTA(1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、NOTA(1,4,7-三氮杂环壬烷-N,N',N''-三乙酸)、TETA(1,4,8,11-四氮杂环十四烷-N,N',N'',N'''-四乙酸)、DTTA(N'-(对异硫氰酸苄基)-二亚乙基三胺-N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>3</sup>-四乙酸)、去铁胺或DFA(N'-[5-[[4-[[5-(乙酰基羟氨基)戊烷基]氨基]-1,4-二氧丁基]羟氨基]戊烷基]-N-(5-氨基戊烷基)-N-羟基丁烷二酰胺)或HYNIC(联胍尼克酰胺)。同位素标记技术是本领域技术人员已知的,并且更详细地描述于例如G.T.Hermanson,“Bioconjugate Techniques”,Elsevier,3<sup>rd</sup> Ed.2013,Chapter 12:“Isotopic labeling techniques”,p.507-534(通过

引用纳入本文)。

[0234] 适合用作根据本发明的化合物中的有效负载D的聚合物是本领域技术人员已知的,并且几个实例更详细地描述于例如G.T.Hermanson,“Bioconjugate Techniques”, Elsevier, 3<sup>rd</sup> Ed. 2013, Chapter 18: “PEGylation and synthetic polymer modification”, p.787-838 (通过引用纳入本文)。当有效负载D是聚合物时,有效负载D优选独立地选自聚(乙二醇)(PEG)、聚环氧乙烷(PEO)、聚丙二醇(PPG)、聚环氧丙烷(PP0), 1,x-联嘧啶(diaminoalkane)聚合物(其中x是烷烃中的碳原子数,优选x是2至200范围内的整数,优选2至10范围内的整数), (聚)乙二醇二胺(例如1,8-二氨基-3,6-二噁辛烷和包含较长乙二醇链的等价物)、多糖(例如葡聚糖)、聚(氨基酸)(例如聚(L-赖氨酸))和聚(乙烯醇)。

[0235] 适合用作有效负载D的固体表面是本领域技术人员已知的。固体表面例如是功能表面(例如纳米材料、碳纳米管、富勒烯或病毒衣壳的表面)、金属表面(例如钛、金、银、铜、镍、锡、铈或锌表面)、金属合金表面(其中合金来自例如铝、铋、铬、钴、铜、镓、金、铟、铁、铅、镁、汞、镍、钾、钪、铈、铈、铈、银、钠、钛、锡、铀、锌和/或锆)、聚合物表面(其中聚合物是例如聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚(二甲基硅氧烷)或聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯酰胺)、玻璃表面、硅树脂表面、色谱载体表面(其中色谱载体是例如二氧化硅载体、琼脂糖载体、纤维素载体或氧化铝载体)等。当有效负载D是固体表面时,优选D独立地选自功能表面或聚合物表面。

[0236] 水凝胶是本领域技术人员已知的。水凝胶是水膨胀的网络,由聚合物成分之间交联形成。参见例如A.S.Hoffman, Adv. Drug Delivery Rev. 2012, 64, 18 (通过引用纳入本文)。当有效负载是水凝胶时,优选水凝胶由作为聚合物基础的聚(乙烯)乙二醇(PEG)组成。

[0237] 适合用作有效负载D的微米颗粒和纳米颗粒是本领域技术人员已知的。各种适合的微米颗粒和纳米颗粒描述于例如G.T.Hermanson,“Bioconjugate Techniques”, Elsevier, 3<sup>rd</sup> Ed. 2013, Chapter 14: “Microparticles and nanoparticles”, p.549-587 (通过引用纳入本文)。微米颗粒或纳米颗粒可以是任何形状,例如球、棒、管、立方体、三角形和圆锥。优选地,微米颗粒或纳米颗粒是球形的。微米颗粒和纳米颗粒的化学成分可能会有所不同。当有效负载D是微米颗粒或纳米颗粒时,微米颗粒或纳米颗粒例如是聚合微米颗粒或纳米颗粒、二氧化硅微米颗粒或纳米颗粒或者金微米颗粒或纳米颗粒。当颗粒是聚合微米颗粒或纳米颗粒时,聚合物优选地是聚苯乙烯或苯乙烯的共聚物(例如苯乙烯和二乙烯基苯、丁二烯、丙烯酸酯和/或乙烯基甲苯的共聚物)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚乙烯基甲苯、聚(甲基丙烯酸羟乙酯(pHEMA)或聚(乙二醇二甲基丙烯酸酯/2-羟乙基甲基丙烯酸酯)[聚(EDGMA/HEMA)]。任选地,微米颗粒或纳米颗粒表面被改性,例如用去污剂、通过二级聚合物的接枝聚合或通过另一种聚合物或间隔基部分的共价连接等。

[0238] 有效负载D也可以是生物分子。下文更详细地描述了生物分子及其优选的实施方案。当有效负载D是生物分子时,优选该生物分子选自蛋白质(包括糖蛋白和抗体)、多肽、肽、聚糖、脂质、核酸、寡核苷酸、多糖、寡糖、酶、激素、氨基酸和单糖。

[0239] 根据本发明的DAR1抗体-有效负载缀合物特别适合与高效细胞毒素一起使用,例如PBD二聚体、吡啶并苯并二氮杂 $\text{萘}$ 二聚体(IGN)、烯二炔、PNU159,682、多卡霉素二聚体、鹅膏蕈碱和澳瑞他汀,优选PBD二聚体,吡啶并苯并二氮杂 $\text{萘}$ 二聚体(IGN)、烯二炔或PNU159,

682。在一个特别优选的实施方案中,有效负载选自PBD二聚体、吡啶并苯并二氮杂萘二聚体(IGN)、烯二炔、PNU159,682、多卡霉素二聚体、鹅膏蕈碱和澳瑞他汀,优选PBD二聚体、吡啶并苯并二氮杂萘二聚体(IGN)、烯二炔或PNU159,682。在进一步优选的实施方案中,有效负载不是对称的或二聚体的有效负载。

[0240] 在一个优选的实施方案中,根据本发明的抗体-有效负载缀合物是根据结构(5)。根据该实施方案的缀合物包含(G)<sub>e</sub>和Su,下文将进一步定义。

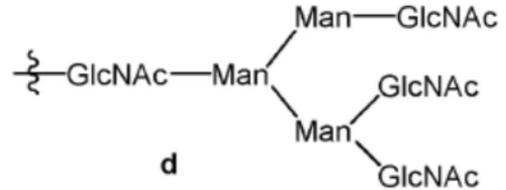
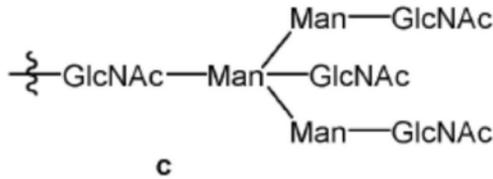
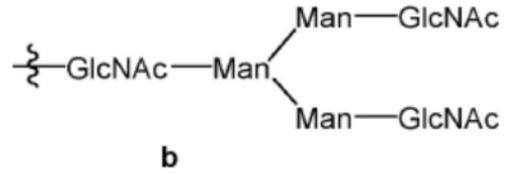
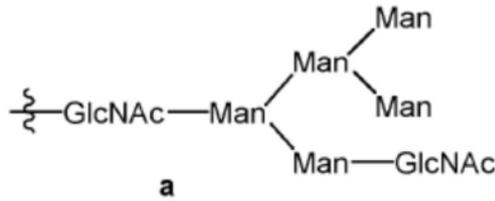
[0241] (4)中的两个GlcNAc部分中的每一个优选存在于抗体AB的Fc片段中的天然N-糖基化位点。优选地,所述GlcNAc部分与AB的290-305区域中的天冬酰胺氨基酸连接。在进一步优选的实施方案中,抗体是IgG型抗体,并且取决于具体的IgG型抗体,所述GlcNAc部分存在于抗体的氨基酸天冬酰胺297(Asn297或N297)上。

[0242] G是单糖部分,e是0-10范围内的整数。G优选选自葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、N-乙酰神经氨酸(NeuNAc)和唾液酸和木糖(Xyl)。更优选地,G选自葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

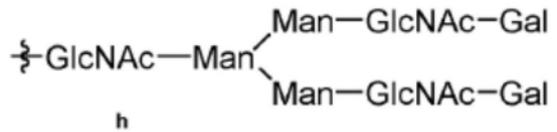
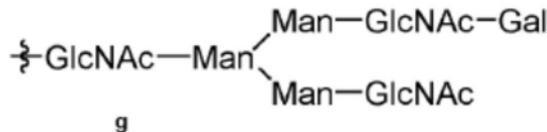
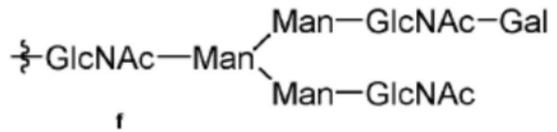
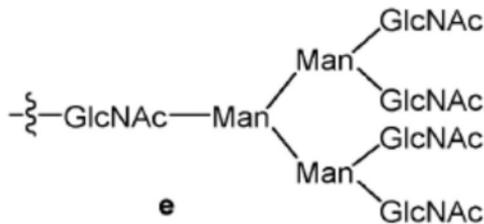
[0243] 在一个优选的实施方案中,e为0且G不存在。当抗体的聚糖被修剪时,G通常不存在。修剪是指用内切糖苷酶处理,从而只保留聚糖的核心GlcNAc部分。

[0244] 在另一个优选实施方案中,e是1-10范围内的整数。在该实施方案中,进一步优选G选自葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)、N-乙酰神经氨酸(NeuNAc)和唾液酸和木糖(Xyl)。更优选选自葡萄糖(Glc)、半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)和N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

[0245] 当e为3-10时,(G)<sub>e</sub>可以是直链或支链的。支链寡糖(G)<sub>e</sub>的优选实例是(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(h),如下所示。



[0246]



[0247] 在G存在的情况下,优选其以GlcNAc结尾。换言之,与Su直接相连的单糖残基是GlcNAc。GlcNAc部分的存在促进了功能化抗体的合成,因为单糖衍生物Su可以容易地通过糖基转移引入到末端GlcNAc残基上。在具有结构(a) - (h)的(G)<sub>e</sub>的上述优选实施方案中,部分Su可以连接到任何末端GlcNAc残基,即不是具有连接到抗体上核心GlcNAc残基的波浪键的那个。

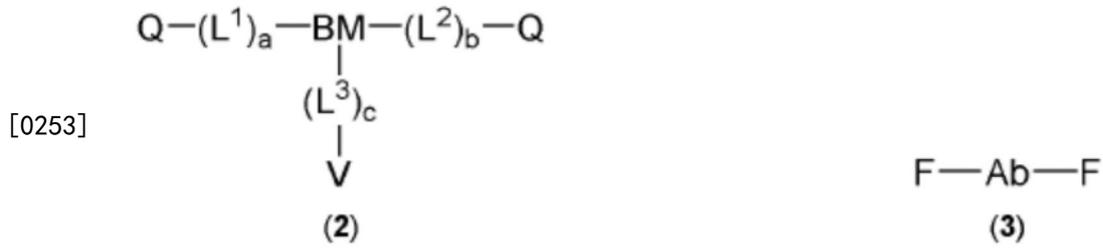
[0248] 特别优选G不存在,即e=0。其中e=0的抗体-有效负载缀合物(1)的优点是当临床使用这种缀合物时,与Fc $\gamma$ 受体CD16、CD32和CD64的结合显著降低或完全消除。

[0249] Su是单糖衍生物,也称为糖衍生物。优选地,糖衍生物能够通过糖基转移的方式掺入到功能化抗体中。可以引入的核苷酸-糖衍生物的一些优选实例参见图2。更优选地,Su是Gal、Glc、GalNAc或GlcNAc,更优选是Gal或GalNAc,最优选是GalNAc。术语衍生物是指被适当功能化以连接到(G)<sub>e</sub>和F的单糖。

#### [0250] 制备方法

[0251] 本发明还涉及一种制备抗体-有效负载缀合物的方法,所述抗体-有效负载具有假定的有效负载与抗体的比率为1,包含以下步骤:

[0252] (a) 使含有至少两个反应基团Q的具有结构(2)的化合物与具有结构(3)的抗体反应,该抗体被两个反应基团F功能化:



[0254] 其中：

[0255] -Ab是抗体；

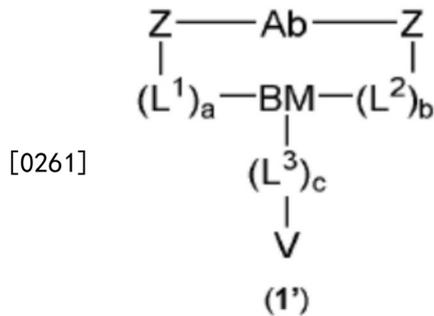
[0256] -a、b和c各自分别是0或1；

[0257] -L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>和L<sup>3</sup>是接头；

[0258] -V是反应基团Q'或有效负载D；

[0259] -BM是分支部分；

[0260] -Q和F是能够进行环加成反应的反应基团，其中它们以连接基团Z连接；



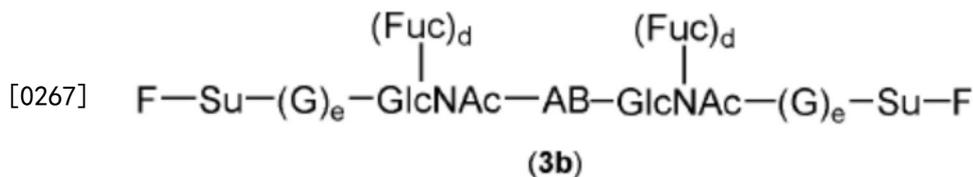
[0262] 其中Z是通过Q与F反应获得的连接基团；

[0263] 其中在V是有效负载D的情况下，根据结构(1')的功能化抗体是抗体-有效负载缀合物；

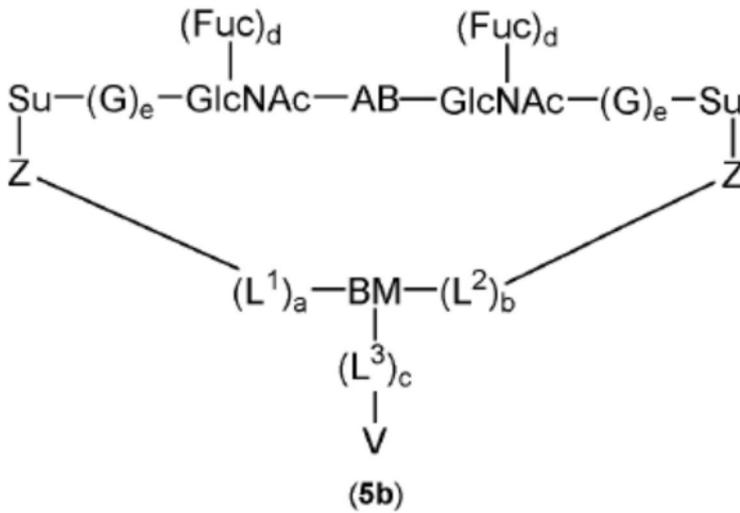
[0264] 或在V是反应基团Q'的情况下，根据结构(1')的功能化抗体根据步骤(b)进一步反应以获得在V是有效负载D的情况下的抗体-有效负载缀合物；

[0265] (b) 在V=Q'的情况下，反应基团Q'与包含反应基团F'的有效负载反应以获得在V是有效负载D的情况下的抗体-有效负载缀合物；

[0266] 在一个优选的实施方案中，具有结构(3)的抗体具有结构(3b)：



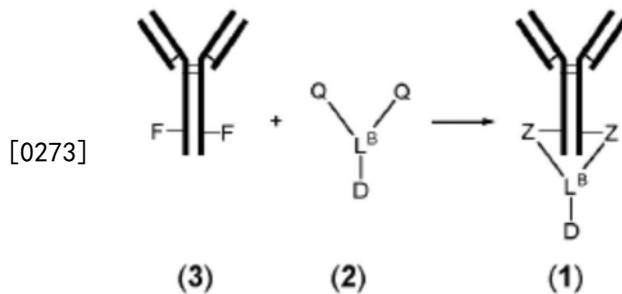
[0268] 在一个优选的实施方案中，根据结构(1)的功能化抗体具有结构(5b)：



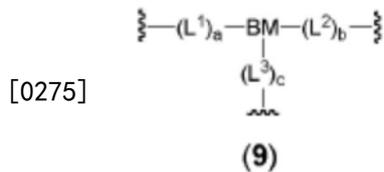
[0270] 根据本发明的方法可以采取两种主要形式,其中一种是不进行步骤(b),其中另一种是进行步骤(b)。

[0271] 在一个实施方案中,不进行步骤(b)并且存在于具有结构(2)的化合物上的V是有效负载D。在这种情况下,步骤(a)直接提供最终的缀合物(结构(1))。根据该优选实施方案的方法可以根据方案1表示。

[0272] 方案1



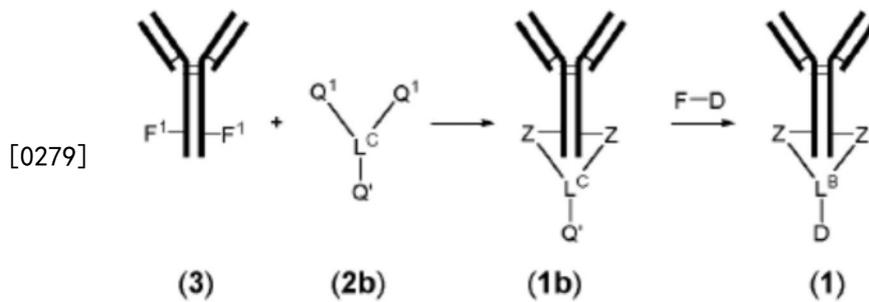
[0274] 在本文中,  $L^B$  代表根据结构(9)的三价接头,其在上文进一步定义。



[0276] 因此,在一个优选的实施方案中,根据结构(1)的功能化抗体在步骤(a)中获得,其中D是有效负载,并且不进行步骤(b)。

[0277] 在一个实施方案中,进行步骤(b)并且存在于具有结构(2)的化合物上的V是反应基团Q'。在这种情况下,步骤(a)提供了具有结构(1)的中间功能化抗体,其中V=Q' (下文描述为(1b))。该中间功能化抗体含有另一个反应基团Q',其与具有反应基团F的适当功能化有效负载反应,以获得具有结构(1)的最终缀合物,其中V=D。根据该优选实施方案的方法可以根据方案2表示。

[0278] 方案2



[0280] 在本文中， $Q^1$ 和 $F^1$ 与 $Q$ 和 $F$ 一样是反应部分， $Q$ 和 $F$ 的定义和优选实施方案同样适用于 $Q^1$ 和 $F^1$ 。接头化合物(2)中 $Q^1$ 的存在不应干扰反应，这可以通过 $Q^1$ 和 $F^1$ 之间的反应中 $Q'$ 的惰性来完成。发明人已经发现一种三价接头化合物，其中 $Q^1$ 和 $Q'$ 都是相同的反应部分，与 $Ab(F^1)_2$ 的反应仅在 $Q^1/Q'$ 两种组合时发生，并且第三反应部分保持未反应。通过在稀释条件下进行反应来实现接头化合物处发生的第三反应的进一步减少。

[0281] 因此，在一个优选的实施方案中，在步骤(a)中获得根据结构(1')的功能化抗体，其中 $V$ 是反应基团 $Q'$ ，即结构(1b)，并且进行步骤(b)。

[0282] “有效负载与抗体的比率”，也称为药物与抗体的比率(DAR)，是指缀合物中有效负载分子与抗体分子的比率。本发明提供了获得DAR为1的缀合物的有效途径，即一个有效负载分子与一个抗体分子缀合。产物的有效负载与抗体的比率可能略低于假定的有效负载与抗体的比率，因为并非所有功能化抗体都可以与结构(2)的接头化合物反应，因此实际的有效负载与抗体比率可能与假定的有效负载与抗体的比率稍有偏差(即可能稍低)。根据本发明的方法提供的产物混合物的有效负载与抗体的比率接近假定的比率1。

[0283] 与常规方法相比，本发明提供了一种用于制备具有有效负载与抗体比率为1的抗体缀合物的高度改善的方法。传统方法难以在抗体中仅引入单个连接位点。抗体含有许多氨基酸，因此随机缀合，例如马来酰亚胺-半胱氨酸缀合，通常会产生广泛的分布，同时缀合物可承载多达8个甚至更多个有效负载。其他缀合方法受制于抗体是对称的这一事实，因此提供了至少两个可以使用的任何连接点。因此，可以依靠基因工程来设计仅含有一个连接点的重组抗体。

[0284] 另一种现有技术方法涉及使用对称功能化的有效负载，其中对称有效负载(二聚体)通过接头用两个相同的反应部分对称地功能化。然后这两个反应部分与抗体中提供的两个连接点反应。

[0285] 根据本发明的方法通过在抗体的两个连接点上剪切双功能接头化合物，完美地将抗体的两个连接点转化为单个连接点。如实施例中所证明的，有效负载与抗体比率为1的缀合物可以如此完美地获得。此外，由于分支部分，任何有效负载均可以与抗体缀合，使得本方法不限于对称有效负载。

[0286] 在 $V=D$ 的情况下，步骤(a)的反应是缀合反应。另外，在 $V=Q'$ 的情况下，步骤(b)的反应是缀合反应。根据本发明的方法与任何缀合技术兼容，并且任何这样的技术都可以用于步骤(a)和步骤(b)(如果进行的话)。

[0287] 在一个优选的实施方案中，步骤(a)的反应是[4+2]环加成或1,3-偶极环加成。

[0288] 根据结构(3)的抗体可以通过本领域已知的任何方法制备。例如，还原抗体的链间二硫键，然后与确定数量的含有马来酰亚胺构建体(或其他硫醇反应构建体)的反应部分 $F$

反应导致可通过化学计量定制的基团F的负载。可以实现更可控的、位点特异性的抗体缀合过程,例如通过对抗体进行基因工程使其含有两个未配对的半胱氨酸(每条重链一个或每条轻链一个),从而在抗体与含有F的马来酰亚胺构建体结合后,在抗体上准确地提供两个反应部分F。通过应用AMBER终止密码子,遗传编码使抗体能够在特定位点直接表达包含预定数量的反应部分F。还报道了一系列酶促方法将确定数量的反应部分F安装到抗体上,例如基于谷氨酰胺转移酶(TGase)、分选酶、甲酰甘氨酸生成酶(FGE)等。因此,在一个实施方案中,通过还原链间二硫键然后与含F的硫醇反应构建体反应、引入未配对的半胱氨酸残基然后与含F的硫醇反应构建体反应、酶促引入反应部分F,以及通过基因工程引入反应部分来制备功能化抗体。在本申请的上下文中,基因工程的使用是最不优选的,而反应部分F的酶促引入是最优选的。

[0289] 在一个优选的实施方案中,GlycoConnect技术(参见例如W02014/065661和Van Geel等人,Bioconj.Chem.2015,26,2233—2242,通过引用纳入本文)利用单克隆抗体重链上天然存在的聚糖来引入固定数量的点击探针,特别是叠氮化物。因此,在一个优选的实施方案中,功能化抗体通过以下方法制备:(i)用合适的糖苷内切酶任选地修剪天然聚糖,从而释放通常存在于Asn-297上的核心GlcNAc,然后(ii)在合适的糖基转移酶的作用下,从相应的UDP糖转移非天然、含有叠氮基的糖底物(例如用半乳糖基转移酶突变体Gal-T(Y289L)转移GalNAz或用GalNAc-转移酶(GalNAc-T)转移6-叠氮基GalNAc)。或者,GalNAc-T也可用于安装到在Ac基团上含有芳香部分或硫醇官能团的核心GlcNAc GalNAc衍生物上。使用该技术可以获得根据结构(5)的功能化抗体,其中可以使用修剪步骤(i)获得 $e=0$ 的功能化抗体,或者可以省略修剪步骤获得 $e=1-10$ 的功能化抗体。优选地,进行步骤(i)且 $e=0$ 。

[0290] 反应部分Q和F

[0291] 在本发明的上下文中,术语“反应部分”可以指包含官能团的化学部分,也可以指官能团本身。例如,环辛炔基是包含官能团即C-C三键的反应基团。然而,官能团,例如叠氮基官能团、硫醇官能团或炔基官能团,在本文中也可称为反应基团。

[0292] 为了在根据本发明的方法中具有反应性,反应部分Q应该能够与存在于功能化抗体上的反应部分F反应。换言之,反应部分Q对存在于功能化抗体上的反应部分F具有反应性。其中,任选地在存在其他官能团的情况下,当所述第一反应部分与所述第二反应部分选择性地反应时,反应部分被定义为对另一个反应部分反应。互补的反应部分是本领域技术人员已知的,并且在下文中更详细地描述,并示例在图1中。因此,缀合反应是Q和F之间的化学反应,形成包含抗体和有效负载之间的共价连接的缀合物。此处提供的反应部分Q的定义同样适用于F、 $O^1$ 、 $F^1$ 和 $Q^1$ 。

[0293] 在一个优选的实施方案中,反应部分选自任选取代的烯基、炔基、四嗪基、叠氮基、氧化腈基、硝酮基、腈亚胺基、重氮基、酮基、(O-烷基)羟基氨基、胍基、联烯酰胺(allenamide)基、三嗪基、亚磷酰胺基。在一个特别优选的实施方案中,反应部分Q是叠氮基或炔基,最优选反应部分Q是炔基。在Q是炔基的情况下,优选Q选自末端炔基、(杂)环炔基和双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团。

[0294] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是烯基,包括环烯基,优选Q是烯基。烯基可以是直链或支链的,并且任选被取代。烯基可以是末端或内部烯基。烯基可以包含多于一个C-C双键,优选包含一个或两个C-C双键。当烯基是二烯基时,更优选两个C-C双键被一个C-C

单键隔开(即优选二烯基是共轭二烯基)。优选地,所述烯基是 $C_2-C_{24}$ 烯基,更优选 $C_2-C_{12}$ 烯基,甚至更优选 $C_2-C_6$ 烯基。更优选烯基是末端烯基。更优选地,所述烯基根据如下所示的结构(Q8),其中I是0至10范围内的整数,优选0至6范围内的整数,且p是0至10范围内的整数,优选0至6范围内的整数。更优选地,I是0、1、2、3或4,更优选I是0、1或2,最优选I是0或1。更优选地,p是0、1、2、3或4,更优选p是0、1或2,最优选p是0或1。特别优选p是0且I是0或1,或p是1且I是0或1。

[0295] 特别优选的烯基是环烯基,包括杂环烯基,其中环烯基任选地被取代。优选地,所述环烯基是 $C_3-C_{24}$ 环烯基,更优选 $C_3-C_{12}$ 环烯基,甚至更优选 $C_3-C_8$ 环烯基。在一个优选的实施方案中,环烯基是反式-环烯基,更优选反式-环辛烯基(也称为TCO基团),最优选是如下所示的根据结构(Q9)或(Q10)的反式-环辛烯基。在另一个优选的实施方案中,环烯基是环丙烯基,其中环丙烯基任选地被取代。在另一个优选的实施方案中,环烯基是降冰片烯基、氧代降冰片烯基、降冰片二烯基或氧代降冰片二烯基,其中降冰片烯基、氧代降冰片烯基、降冰片二烯基或氧代降冰片二烯基任选地被取代。在进一步优选的实施方案中,环烯基是根据如下所示的结构(Q11)、(Q12)、(Q13)或(Q14),其中 $X^4$ 是 $CH_2$ 或O, $R^{27}$ 独立地选自氢、直链或支链 $C_1-C_{12}$ 烷基或 $C_4-C_{12}$ (杂)芳基,并且 $R^{14}$ 选自氢和氟化烃。优选地, $R^{27}$ 独立地是氢或 $C_1-C_6$ 烷基,更优选地, $R^{27}$ 独立地是氢或 $C_1-C_4$ 烷基。甚至更优选 $R^{27}$ 独立地是氢或甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基或叔丁基。更进一步优选地, $R^{27}$ 独立地是氢或甲基。在进一步优选的实施方案中, $R^{14}$ 选自氢和 $-CF_3$ 、 $-C_2F_5$ 、 $-C_3F_7$ 和 $-C_4F_9$ ,更优选是氢和 $-CF_3$ 。在进一步优选的实施方案中,环烯基是根据结构(Q11),其中一个 $R^{27}$ 是氢,另一个 $R^{27}$ 是甲基。在另一个进一步优选的实施方案中,环烯基是根据结构(Q12),其中两个 $R^{27}$ 都是氢。在这些实施方案中,进一步优选I是0或1。在另一个进一步优选的实施方案中,环烯基是根据结构(Q13)的降冰片烯基( $X^4$ 是 $CH_2$ )或氧代降冰片烯基( $X^4$ 是O),或根据结构(Q14)的降冰片二烯基( $X^4$ 是 $CH_2$ )或氧代降冰片二烯基( $X^4$ 是O),其中 $R^{27}$ 是氢且 $R^{14}$ 是氢或 $-CF_3$ ,优选 $-CF_3$ 。

[0296] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是炔基,包括环炔基,优选Q包含炔基。炔基可以是直链或支链的,并且任选地被取代。炔基可以是末端或内部炔基。优选所述炔基是 $C_2-C_{24}$ 炔基,更优选 $C_2-C_{12}$ 炔基,甚至更优选 $C_2-C_6$ 炔基。更优选炔基是末端炔基。更优选地,炔基是根据如下所示的结构(Q15),其中I是0-10范围内的整数,优选0-6范围内的整数。更优选地,I是0、1、2、3或4,更优选I是0、1或2且最优选I是0或1。

[0297] 特别优选的炔基是环炔基,包括任选地被取代的杂环炔基、环烯基。优选地,(杂)环炔基是(杂)环辛炔基,即杂环辛炔基或环辛炔基,其中(杂)环辛炔基任选地被取代。在进一步优选的实施方案中,(杂)环辛炔基是根据结构(Q36)并在下文进一步定义。(杂)环辛炔基的优选实例包括结构(Q16),也称为DIBO基团,(Q17),也称为DIBAC基团,或(Q18),也称为BARAC基团,(Q19),也称为COMBO基团,和(Q20),也称为BCN基团,均如下所示,其中 $X^5$ 为O或 $NR^{27}$ , $R^{27}$ 的优选实施方案如上文所定义。(Q16)中的芳环任选在一个或多个位置,优选在两个位置,最优选在(Q40)中被O-磺酰化(磺酰化二苯并环辛炔(s-DIBO)),而(Q17)和(Q18)的环可以在一个或多个位置被卤化。特别优选的环炔基是双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团(BCN基团),其任选地被取代。优选地,双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团是根据如下所示的结构(Q20)。

[0298] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是共轭(杂)二烯基,优选Q是能够在Diels-

Alder反应中反应的共轭(杂)二烯基。优选的(杂)二烯基包括任选取代的四嗪基、任选取代的1,2-醌基和任选取代的三嗪基。更优选地,所述四嗪基是根据如下所示的结构(Q21),其中 $R^{27}$ 选自氢、直链或支链 $C_1-C_{12}$ 烷基或 $C_4-C_{12}$ (杂)芳基。优选地, $R^{27}$ 是氢、 $C_1-C_6$ 烷基或 $C_4-C_{10}$ (杂)芳基,更优选 $R^{27}$ 是氢、 $C_1-C_4$ 烷基或 $C_4-C_6$ (杂)芳基。甚至更优选 $R^{27}$ 是氢、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基或吡啶基。还更优选 $R^{27}$ 是氢、甲基或吡啶基。更优选地,所述1,2-醌基是根据结构(Q22)或(Q23)。所述三嗪基可以是任何位置异构体。更优选地,所述三嗪基是1,2,3-三嗪基或1,2,4-三嗪基,它们可以通过任何可能的位置连接,例如结构(Q24)中所示。最优选1,2,3-三嗪作为三嗪基。

[0299] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是叠氮基,优选Q是叠氮基。优选地,叠氮基是根据如下所示的结构(Q25)。

[0300] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是腈氧基,优选Q是腈氧基。优选地,腈氧基是根据如下所示的结构(Q27)。

[0301] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是硝酮基,优选Q是硝酮基。优选地,硝酮基是根据如下所示的结构(Q28),其中 $R^{29}$ 选自直链或支链 $C_1-C_{12}$ 烷基和 $C_6-C_{12}$ 芳基。优选地, $R^{29}$ 是 $C_1-C_6$ 烷基,更优选 $R^{29}$ 是 $C_1-C_4$ 烷基。甚至更优选 $R^{29}$ 是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基或叔丁基。甚至更优选 $R^{29}$ 是甲基。

[0302] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是腈亚胺基,优选Q是腈亚胺基。优选地,腈亚胺基是根据如下所示的结构(Q29)或(Q30),其中 $R^{30}$ 选自直链或支链 $C_1-C_{12}$ 烷基和 $C_6-C_{12}$ 芳基。优选地, $R^{30}$ 是 $C_1-C_6$ 烷基,更优选 $R^{30}$ 是 $C_1-C_4$ 烷基。甚至更优选 $R^{30}$ 是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基或叔丁基。甚至更优选 $R^{30}$ 是甲基。

[0303] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是重氮基,优选Q是重氮基。优选地,重氮基是根据如下所示的结构(Q31),其中 $R^{33}$ 选自氢或羰基衍生物。更优选地, $R^{33}$ 是氢。

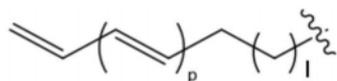
[0304] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是酮基,优选Q是酮基。优选地,酮基是根据如下所示的结构(Q32),其中 $R^{34}$ 选自直链或支链的 $C_1-C_{12}$ 烷基和 $C_6-C_{12}$ 芳基。优选地, $R^{34}$ 是 $C_1-C_6$ 烷基,更优选 $R^{34}$ 是 $C_1-C_4$ 烷基。甚至更优选 $R^{34}$ 是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基或叔丁基。甚至更优选 $R^{34}$ 是甲基。

[0305] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是(O-烷基)羟氨基,优选Q是(O-烷基)羟氨基。优选地,(O-烷基)羟氨基是根据如下所示的结构(Q33)。

[0306] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是胼基,优选Q是胼基。优选地,胼基团是根据如下所示的结构(Q34)。

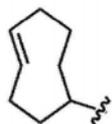
[0307] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是联烯酰胺基,优选Q是联烯酰胺基。优选地,联烯酰胺基是根据结构(Q35)。

[0308] 在另一个优选的实施方案中,Q包含或是膦酰胺基,优选Q是膦酰胺基。优选地,膦酰胺基是根据结构(Q36)。



(Q8)

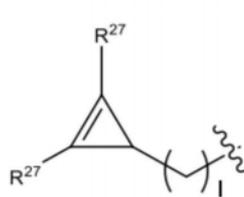
[0309]



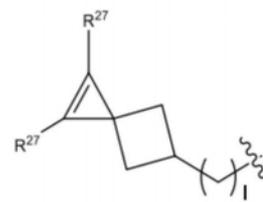
(Q9)



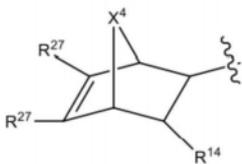
(Q10)



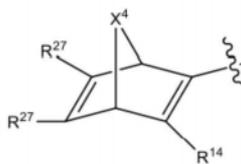
(Q11)



(Q12)



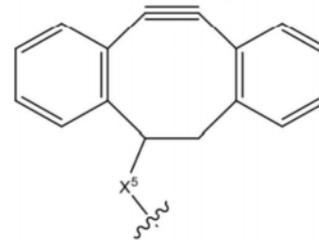
(Q13)



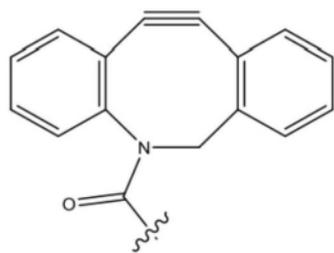
(Q14)



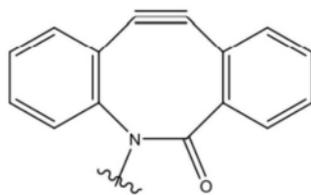
(Q15)



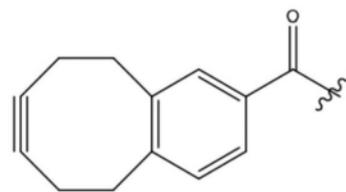
(Q16)



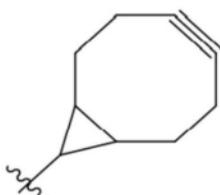
(Q17)



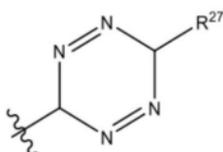
(Q18)



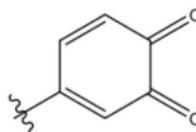
(Q19)



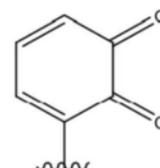
(Q20)



(Q21)

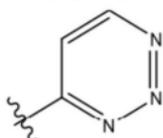


(Q22)



(Q23)

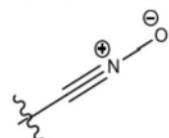
[0310]



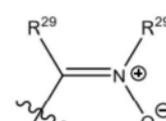
(Q24)



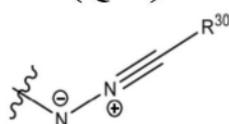
(Q25)



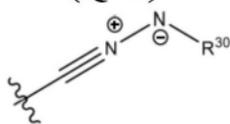
(Q27)



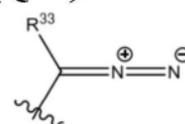
(Q28)



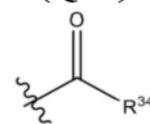
(Q29)



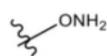
(Q30)



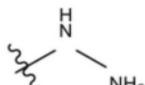
(Q31)



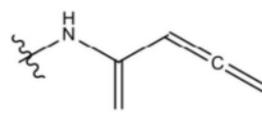
(Q32)



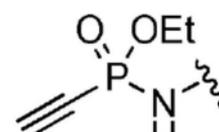
(Q33)



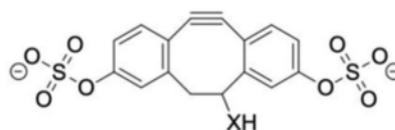
(Q34)



(Q35)



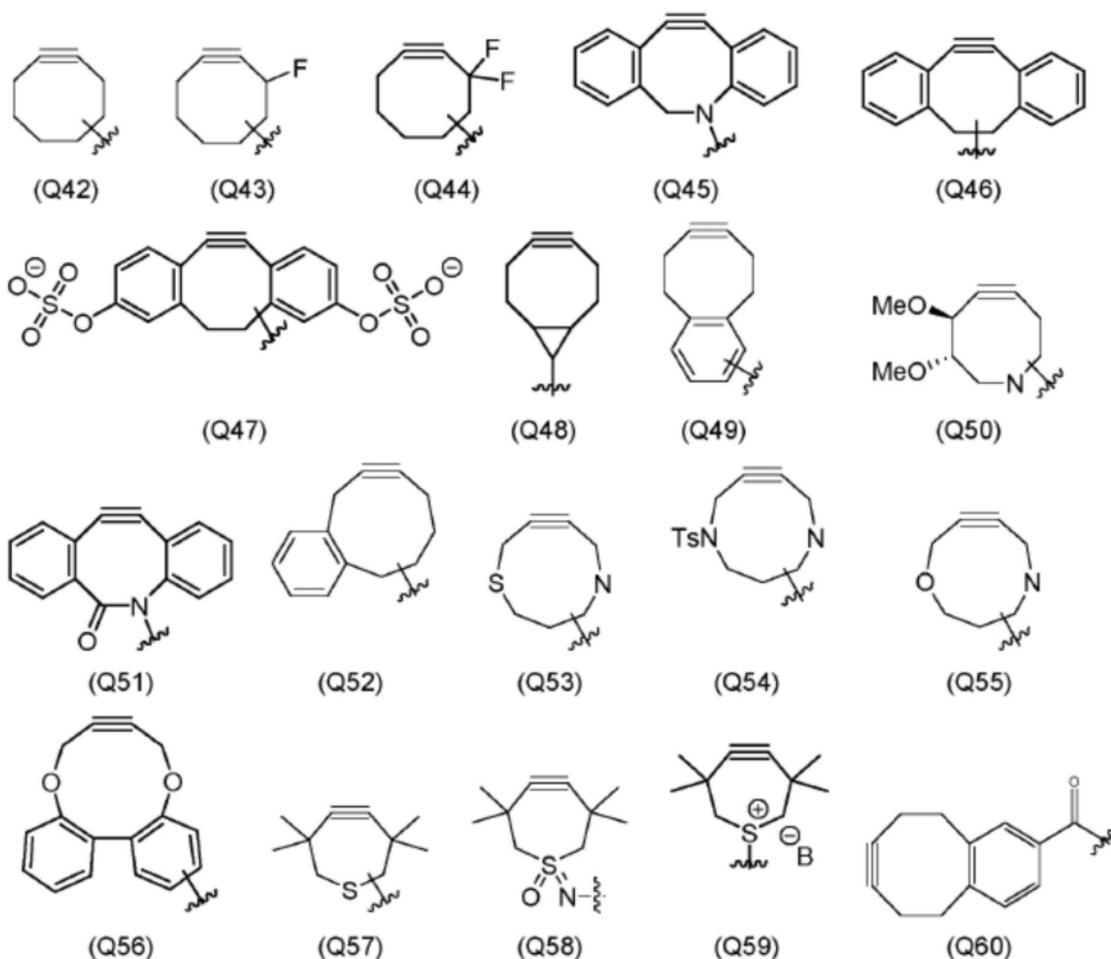
(Q36)



(Q40)

[0311] 在本文中, (Q16) 中的芳环任选在一个或多个位置被O-磺酰化, 而(Q17) 和(Q18) 的环可以在一个或多个位置被卤化。

[0312] 在Q是(杂)环炔基的情况下, 优选Q选自(Q42) - (Q60) :



[0313]

[0314] 在本文中,用波浪键描绘的与分子剩余部分的连接可以是连接到Q的任何可用的碳或氮原子。(Q50)、(Q53)、(Q54)和(Q55)的氮原子可以带有连接,或可包含氢原子或任选地被功能化。 $B^{(-)}$ 是阴离子,其优选选自 $(-)\text{OTf}$ 、 $\text{Cl}^{(-)}$ 、 $\text{Br}^{(-)}$ 或 $\text{I}^{(-)}$ ,最优选 $B^{(-)}$ 是 $(-)\text{OTf}$ 。在缀合反应中, $B^{(-)}$ 不需要是药学上可接受的阴离子,因为 $B^{(-)}$ 无论如何都会与反应混合物中存在的阴离子交换。在(Q59)用于Q的情况下,带负电荷的反离子在分离根据本发明的抗体-缀合物中优选是药学上可接受的,使得抗体-缀合物易于用作药物。

[0315] 图1描述了F和Q及其相应产物(连接基团Z)之间反应的一些代表性实例。

[0316] 通过环加成实现缀合。在一个优选的实施方案中,通过[4+2]环加成或1,3-偶极环加成实现缀合,并且亲核反应是迈克尔加成或亲核取代。因此,在根据本发明的缀合方法的优选实施方案中,缀合通过[4+2]环加成或1,3-偶极环加成,优选1,3-偶极环加成来完成。

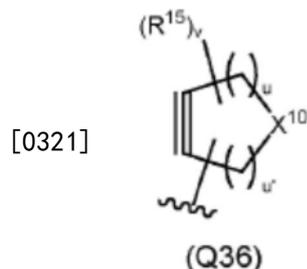
[0317] 典型的[4+2]环加成是Diels-Alder反应,其中Q是二烯或亲二烯体。如本领域技术人员所理解的,Diels-Alder反应的上下文中的术语“二烯”是指1,3-(杂)二烯,并且包括共轭二烯( $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}-\text{CR}=\text{CR}_2$ )、亚胺(例如 $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}-\text{N}=\text{CR}_2$ 或 $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}-\text{CR}=\text{NR}$ 、 $\text{R}_2\text{C}=\text{N}-\text{N}=\text{CR}_2$ )和羰基(例如 $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}-\text{CR}=\text{O}$ 或 $\text{O}=\text{CR}-\text{CR}=\text{O}$ )。与含N-和O-的二烯的杂-Diels-Alder反应在本领域中是已知的。本领域已知适用于[4+2]环加成的任何二烯均可用作反应基团Q。优选的二烯包括如上所述的四嗪、如上所述的1,2-醌和如上所述的三嗪。尽管本领域已知适用于[4+2]环加成的任何亲二烯体均可用作反应基团Q,但亲二烯体优选为如上所述的烯炔或炔炔基团,最优选为炔炔基团。用于通过[4+2]环加成的缀合,优选Q为亲二烯体(F为二烯),

更优选Q是或包含炔基。

[0318] 对于1,3-偶极环加成,Q是1,3-偶极子或亲偶极体。本领域已知适用于1,3-偶极环加成的任何1,3-偶极子可用作反应基团Q。优选的1,3-偶极子包括叠氮基、硝酮基、氧化腈基、腈亚胺基和重氮基。尽管本领域已知适用于1,3-偶极环加成的任何亲偶极体可用作反应基团Q,但亲偶极体优选为烯炔或炔基,最优选为炔基。用于通过1,3-偶极环加成的缀合,优选Q是亲偶极体(并且F是1,3-偶极子),更优选Q是或包含炔基。

[0319] 因此,在一个优选的实施实施方案中,Q选自亲偶极体和亲二烯体。优选地,Q是烯炔或炔基。在一个特别优选的实施实施方案中,Q包含炔基,优选选自如上所述的炔基、如上所述的环烯基、如上所述的(杂)环炔基和双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团。更优选Q包含末端炔炔或环辛炔部分,优选双环壬炔(BCN)、氮杂二苯并环辛炔(DIBAC/DBC0)或二苯并环辛炔(DIBO),更优选BCN或DIBAC/DBC0,最优选BCN。在其他的优选实施实施方案中,Q选自式(Q5)、(Q6)、(Q7)、(Q8)、(Q20)和(Q9),更优选选自式(Q6)、(Q7)、(Q8)、(Q20)和(Q9)。最优选地,Q是双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团,优选式(Q20)。已知这些基团在与叠氮基功能化抗体缀合中非常有效。

[0320] 在一个特别优选的实施实施方案中,反应基团Q包含炔基并且是根据结构(Q36):



[0322] 在本文中:

[0323]  $-R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_6-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基,其中烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选被取代,其中两个取代基 $R^{15}$ 可以连接在一起以形成退火的环烷基或退火的(杂)芳炔取代基,并且其中 $R^{16}$ 独立地选自氢、卤素、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_6-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基;

[0324]  $-X^{10}$ 是 $C(R^{17})_2$ 、O、S或 $NR^{17}$ ,其中 $R^{17}$ 是 $R^{15}$ ;

[0325]  $-u$ 是0、1、2、3、4或5;

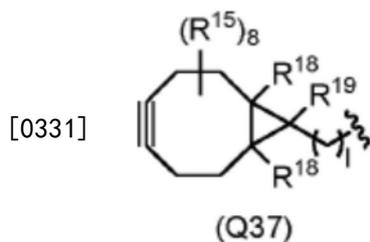
[0326]  $-u'$ 是0、1、2、3、4或5;

[0327] -其中 $u+u'=5$ ;

[0328]  $-v=9$ 或 $10$ 。

[0329] 根据结构(Q36)的反应基团的优选实施实施方案是根据结构(Q37)、(Q6)、(Q7)、(Q8)、(Q9)和(Q20)的反应基团。

[0330] 在一个特别优选的实施实施方案中,反应基团Q包含炔基并且是根据结构(Q37):



[0332] 在本文中:

[0333]  $-R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_5-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基,其中烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选被取代,其中两个取代基 $R^{15}$ 可以连接在一起以形成退火的环烷基或退火的(杂)芳烃取代基,并且其中 $R^{16}$ 独立地选自氢、卤素、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_6-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基;

[0334]  $-R^{18}$ 独立地选自氢、卤素、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_6-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基;

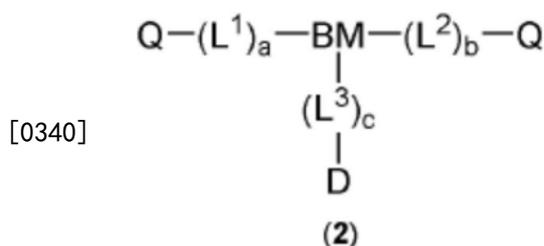
[0335]  $-R^{19}$ 选自氢、卤素、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_6-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基,烷基任选地被选自O、N和S的多个杂原子之一间断,其中烷基、(杂)烷基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基独立地任选被取代;以及

[0336]  $-I$ 是0到10范围内的整数。

[0337] 在根据结构(Q37)的反应基团的一个优选实施方案中, $R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $C_1-C_6$ 烷基、 $C_5-C_6$ (杂)芳基,其中 $R^{16}$ 是氢或 $C_1-C_6$ 烷基,更优选 $R^{15}$ 独立地选自氢和 $C_1-C_6$ 烷基,最优选所有 $R^{15}$ 都是H。在根据结构(Q37)的反应基团的一个优选实施方案中, $R^{18}$ 独立地选自氢、 $C_1-C_6$ 烷基,最优选两个 $R^{18}$ 都是H。在根据结构(Q37)的反应基团的一个优选实施方案中, $R^{19}$ 是H。在根据结构(Q37)的反应基团的一个优选实施方案中, $I$ 是0或1,更优选 $I$ 是1。根据结构(Q37)的反应基团的一个特别优选的实施方案是根据结构(Q20)的反应基团。

[0338] 化合物

[0339] 在另一方面,本发明涉及结构(2)的化合物:



[0341] 其中:

[0342]  $-a$ 、 $b$ 和 $c$ 各自分别为0或1;

[0343]  $-L^1$ 、 $L^2$ 和 $L^3$ 是接头;

[0344]  $-D$ 是有效负载;

[0345]  $-BM$ 是分支部分;

[0346]  $-Q$ 包含(杂)环辛炔部分。

[0347] 部分 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 、 $D$ 、 $BM$ 和 $Q$ 在上文进一步定义,其同样适用于本方面,包括上文定义的优选实施方案。在优选实施方案中, $D$ 是上文进一步定义的细胞毒素。优选结构(2)的

化合物是对称的,即 $a/b$ 、 $L^1/L^2$ 和 $Q$ 的每次出现都是相同的。优选的, $a=b=1$ ,更优选 $c=1$ 。

[0348] 在本方面的上下文中, $Q$ 包含(杂)环辛炔部分,其任选被取代并且可以是杂环辛炔基或环辛炔基,优选环辛炔基。在进一步优选的实施方案中,(杂)环辛炔基是根据结构(Q36)。(杂)环辛炔基的优选实例包括结构(Q16),也称为DIBO基团,(Q17),也称为DIBAC基团,或(Q18),也称为BARAC基团,(Q19),也称为COMBO基团,和(Q20),也称为BCN基团,其中 $X^5$ 是O或 $NR^{27}$ ,且 $R^{27}$ 的优选实施方案如上所定义。(Q16)中的芳族环任选在一个或多个位置,优选在两个位置被O-磺酰化,最优选根据(Q37),而(Q17)和(Q18)的环可以在一个或多个位置被卤化。特别优选的环辛炔基是任选被取代的双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团(BCN基团)。优选地,双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团是根据如下所示的结构(Q20)。在一个实施方案中, $Q$ 是双环壬炔(BCN)、氮杂二苯并环辛炔(DIBAC/DBC0)、二苯并环辛炔(DIBO)或磺酰化二苯并环辛炔(s-DIBO),更优选BCN或DIBAC/DBC0,最优选BCN。

[0349] 根据该方面的化合物理想地适合作为制备根据本发明的抗体-有效负载缀合物的中间体。

#### [0350] 应用

[0351] 本发明的缀合物特别适用于治疗癌症。因此,本发明进一步涉及根据本发明的缀合物在医学中的用途。在另一方面,本发明还涉及治疗需要其的受试者的方法,包括将根据本发明的缀合物给予受试者。根据该方面的方法也可以表述为根据本发明的缀合物用于治疗。根据该方面的方法也可以表述为根据本发明的缀合物用于制备药物的用途。在本文中,给药通常与治疗有效量的根据本发明的缀合物一起发生。

[0352] 本发明还涉及一种在需要其的受试者中治疗特定疾病的方法,包括给予如上定义的本发明的缀合物。特定疾病可以选自癌症、病毒感染、细菌感染、神经系统疾病、自身免疫疾病、眼病、高胆固醇血症和淀粉样变性,更优选选自癌症和病毒感染,最优选的疾病是癌症。需要其的受试者通常是癌症患者。根据本发明的缀合物在此类治疗中的用途是众所周知的,特别是在癌症治疗领域中,并且根据本发明的缀合物特别适用于该方面。在根据该方面的方法中,缀合物通常以治疗有效量给药。本发明的该方面也可以表述为根据本发明的缀合物用于治疗需要其的受试者的特定疾病,优选用于治疗癌症。换言之,该方面涉及根据本发明的缀合物在制备用于治疗需要其的受试者的特定疾病、优选用于治疗癌症的药物或药物组合物中的用途。

[0353] 优选地,根据本发明的缀合物是Fc沉默的,即当临床使用时不显著结合Fc- $\gamma$ 受体CD16、CD32和CD64。这是G不存在时的情况,即 $e=0$ 。

[0354] 本发明上下文中的给药是指全身给药。因此,在一个实施方案中,本文定义的方法用于全身给予缀合物。鉴于缀合物的特异性,它们可以全身给药,但在目的的组织(例如肿瘤)中或附近发挥其活性。全身给药相较于局部给药具有很大的优势,因为该药物也可能到达成像技术无法检测到的肿瘤转移,并且可能适用于血液肿瘤。

[0355] 本发明进一步涉及包含根据本发明的抗体-有效负载缀合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

#### [0356] 实施例

[0357] 本发明通过以下实施例进行说明。

#### [0358] 一般程序

[0359] 化学品购自通用供应商 (Sigma-Aldrich、Acros、Alfa Aesar、Fluorochem、Apollo Scientific Ltd和TCI) 且无需进一步纯化即可使用。用于化学转化、后续处理和色谱的溶剂 (包括干燥的溶剂) 购自Aldrich (Dorset, UK), 为HPLC级, 且无需进一步蒸馏即可使用。硅胶60F254分析薄层色谱 (TLC) 板购自Merck (Darmstadt, Germany), 在紫外光下用高锰酸钾染色剂或茴香醛染色剂进行可视化。使用Acros硅胶 (0.06-0.200, 60A) 或预装柱 (Silicycle) 结合Buchi Sepacore C660组分收集器 (Flawil, Switzerland) 进行色谱分离。使用配备Waters Xbridge C18色谱柱 (5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, PN186002982) 的Agilent 1200系统进行反相HPLC纯化。用于NMR光谱的氘代溶剂购自Cambridge Isotope Laboratories。H-ValAla-PABC-MMAF.TFA获得自Levena Biopharm, 双-mal-Lys-PEG<sub>4</sub>-TFP酯 (177) 获得自Quanta Biodesign, 0-(2-氨基乙基)-0'-(2-叠氮乙基) 二乙二醇 (XL07) 和化合物344和179获得自Broadpharm, 2,3-双(溴甲基)-6-喹啉羧酸 (178) 获得自ChemScene, 32-叠氮基-5-氧代-3,9,12,15,18,21,24,27,30-九氧杂-6-氮杂三十烷酸 (348) 获得自arbosynth。

[0360] 单克隆抗体和ADC质谱分析的一般程序

[0361] 在质谱分析之前, 用IdeS (Fabricator<sup>TM</sup>) 处理IgG以分析Fc/2片段。将20 $\mu$ g (修饰的) IgG与0.5 $\mu$ L IdeS (50U/ $\mu$ L) 在pH 6.6磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时, 总体积为10 $\mu$ L。将样品稀释至40 $\mu$ L, 然后在JEOL AccuTOF上进行电喷雾电离飞行时间 (ESI-TOF) 分析。使用Magtran软件获得去卷积质谱。

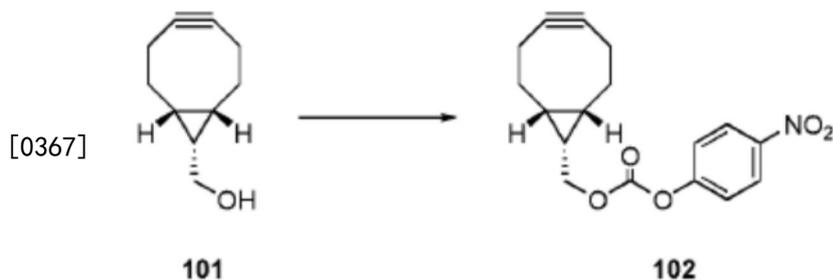
[0362] 分析型RP-HPLC的一般程序

[0363] 在RP-HPLC之前, 用IdeS处理IgG以分析Fc/2片段。将 (修饰的) IgG (100 $\mu$ L, 1mg/mL 在PBS pH 7.4中) 的溶液与1.5 $\mu$ L IdeS/Fabricator<sup>TM</sup> (50U/ $\mu$ L) 在pH 6.6磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。通过加入49%乙腈、49%水、2%甲酸 (100 $\mu$ L) 终止反应。RP-HPLC分析在Agilent 1100系列 (Hewlett Packard) 上进行。以0.5mL/min的速度将样品 (10 $\mu$ L) 进样到柱温为70 $^{\circ}$ C的ZORBAX Poroshell 300SB-C8色谱柱 (1 $\times$ 75mm, 5 $\mu$ m, Agilent)。在25分钟内从30至54%乙腈和水在0.1%TFA中应用线性梯度。

[0364] 分析型HPLC-SEC的一般程序

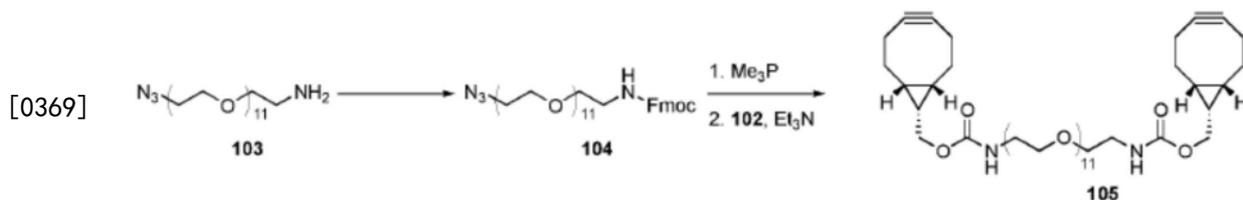
[0365] HPLC-SEC分析在Agilent 1100系列 (Hewlett Packard) 上进行。将样品 (4 $\mu$ L, 1mg/mL) 以0.86mL/min的速度进样到Xbridge BEH200A (3.5 $\mu$ M, 7.8 $\times$ 300mm, PN186007640 Waters) 色谱柱。使用0.1M磷酸钠缓冲液pH 6.9 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 进行16分钟等度洗脱。

[0366] 实施例1. 化合物102的合成



[0368] 向4-硝基苯基氯甲酸酯 (30.5g, 151mmol) 在DCM (500mL) 中的冷却溶液 (0 $^{\circ}$ C) 中加入吡啶 (24.2mL, 23.7g, 299mmol)。将BCN-OH (101, 18.0g, 120mmol) 在DCM (200mL) 中的溶液滴加到反应混合物中。加入完成后, 加入饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (500mL) 和水 (200mL)。分离后, 水相用DCM (2 $\times$ 500mL) 萃取。将合并的有机相干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。粗物质通过硅胶色谱法纯

化,得到所需产物102,为灰白色固体(18.7g,59mmol,39%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.32-8.23 (m,2H),7.45-7.34 (m,2H),4.40 (d,J=8.3Hz,2H),2.40-2.18 (m,6H),1.69-1.54 (m,2H),1.51 (五重峰,J=9.0Hz,1H),1.12-1.00 (m,2H)。

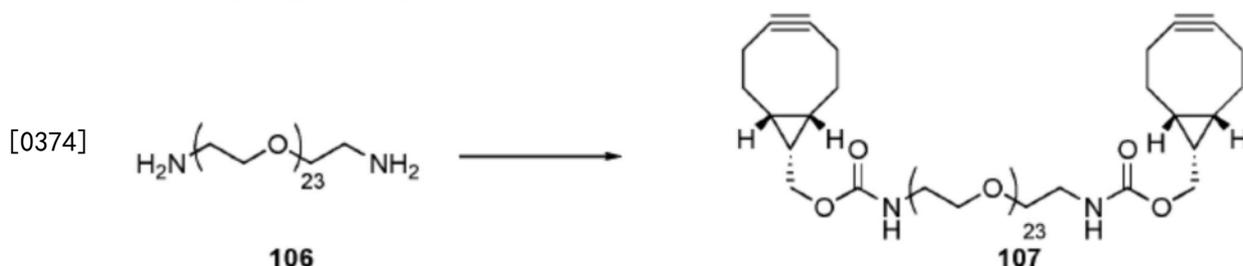


[0370] 实施例2.化合物104的合成

[0371] 向叠氮基-PEG<sub>11</sub>-胺(103)(182mg,0.319mmol)在THF(3mL)中的冷却溶液(-5℃)中加入10%NaHCO<sub>3</sub>水溶液(1.5mL)和溶解在THF(2mL)中的9-苄基甲氧基碳酸酐(99mg,0.34mmol)。2小时后,加入EtOAc(20mL),用盐水(2×6mL)洗涤混合物,用MgSO<sub>4</sub>干燥和浓缩。通过硅胶柱色谱法(0→11%MeOH的DCM溶液)纯化,得到104,为透明油状,产率为98%(251mg,0.316mmol)。LCMS(ESI+)计算C<sub>39</sub>H<sub>60</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup>(M+Na<sup>+</sup>)815.42,实测值815.53。

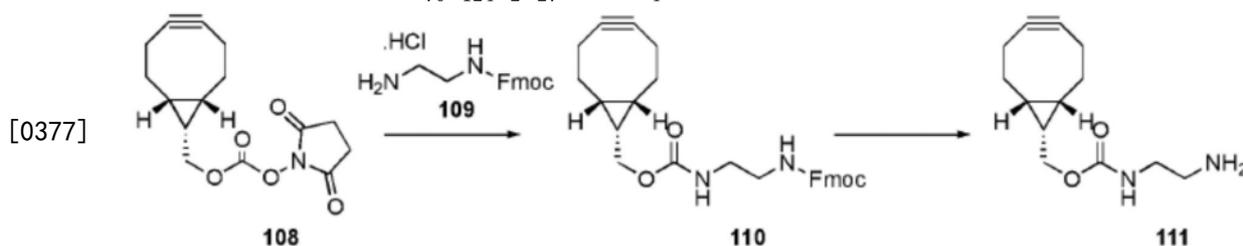
[0372] 实施例3.化合物105的合成

[0373] 制备104(48mg,0.060mmol)在THF(3mL)和水(0.2mL)中的溶液并冷却至0℃。加入三甲基磷(1M在甲苯中,0.24mL,0.24mmol)并将混合物搅拌23小时。通过用DCM(6mL)萃取去除水。向该溶液中加入(1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(102)(25mg,0.079mmol)和三乙胺(10μL,0.070mmol)加入。27小时后,将混合物浓缩并将残余物溶解在DMF(3mL)中,然后加入吡啶(400μL)。1小时后,将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法(0→21%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到105,为无色油状(8.3mg,0.0092mmol)。LCMS(ESI+)计算C<sub>46</sub>H<sub>76</sub>N<sub>2</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup>(M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)914.52,实测值914.73。



[0375] 实施例4.化合物107的合成

[0376] 将(1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(102)(4.1mg,0.013mmol)在干燥DCM(500μL)中的溶液缓慢加入到氨基-PEG23-胺(106)(12.3mg,0.0114mmol)在干燥DCM(500μL)中的溶液中。20小时后,将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法(0→25%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到所需化合物107,产率为73%(12mg,0.0080mmol)。CMS(ESI+)计算C<sub>70</sub>H<sub>124</sub>N<sub>2</sub>O<sub>27</sub><sup>+</sup>(M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)1443.73,实测值1444.08。



## [0378] 实施例5. 化合物108的合成

[0379] 向BCN-OH (101, 21.0g, 0.14mol) 在MeCN (450mL) 中的溶液中加入碳酸二琥珀酰亚胺酯 (53.8g, 0.21mol) 和三乙胺 (58.5mL, 0.42mol)。将混合物搅拌140分钟后, 将其真空浓缩并将残余物与MeCN (400mL) 共蒸发一次。将残余物溶解在EtOAc (600mL) 中并用H<sub>2</sub>O (3×200mL) 洗涤。有机层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并真空浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱法 (0→4% EtOAc的DCM溶液) 纯化, 并得到108, 为白色固体 (11.2g, 38.4mmol, 产率为27%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 4.45 (d, 2H, J=8.4Hz), 2.85 (s, 4H), 2.38-2.18 (m, 6H), 1.65-1.44 (m, 3H), 1.12-1.00 (m, 2H)。

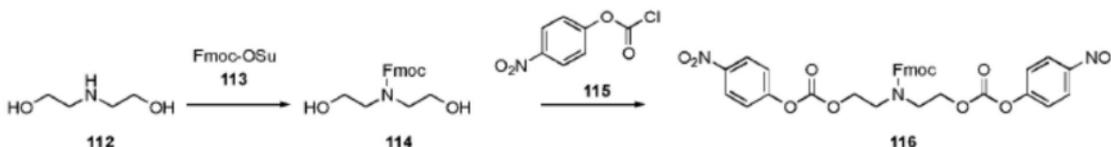
## [0380] 实施例6. 化合物110的合成

[0381] 向 (1R, 8S, 9s) - 双环 [6.1.0] 壬-4-炔-9-基甲基N-琥珀酰亚胺碳酸酯 (108) (500mg, 1.71mmol) 在DCM (15mL) 中的溶液中加入三乙胺 (718μL, 5.14mmol) 和单-Fmoc乙二胺盐酸盐 (109) (657mg, 2.06mmol)。将混合物搅拌45分钟, 用EtOAc (150mL) 稀释并用50%饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (50mL) 洗涤。水层用EtOAc (50mL) 萃取, 合并的有机层用H<sub>2</sub>O (10mL) 洗涤。将合并的有机萃取物真空浓缩, 将一半残余物通过硅胶柱色谱法 (0→3% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物110, 产率为42% (332mg, 0.72mmol)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.77 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.59 (d, J=7.4Hz, 2H), 7.44-7.37 (m, 2H), 7.36-7.28 (m, 2H), 5.12 (br s, 1H), 4.97 (br s, 1H), 4.41 (d, J=6.8Hz, 2H), 4.21 (t, J=6.7Hz, 1H), 4.13 (d, J=8.0Hz, 2H), 3.33 (br s, 4H), 2.36-2.09 (m, 6H), 1.67-1.45 (m, 2H), 1.33 (五重峰, J=8.6Hz, 1H), 1.01-0.85 (m, 2H)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 459.23, 实测值459.52。

## [0382] 实施例7. 化合物111的合成

[0383] 将化合物110 (327mg, 0.713mmol) 溶解在DMF (6mL) 中并加入哌啶 (0.5mL)。2小时后, 将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0→32% 0.7N NH<sub>3</sub> MeOH的DCM溶液) 纯化残余物, 得到所需化合物111, 为黄色油状 (128mg, 0.542mmol, 76%)。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm, 旋转异构体) 5.2 (bs, 1H), 4.15 (d, J=8.0Hz, 2H), 3.48-3.40 (m, 2/3H), 3.33-3.27 (m, 2/3H), 3.27-3.19 (m, 11/3H), 2.85-2.80 (m, 11/3H), 2.36-2.17 (m, 6H), 1.67-1.50 (m, 2H), 1.36 (五重峰, J=8.5Hz, 1H), 1.01-0.89 (m, 2H)。

## [0384]



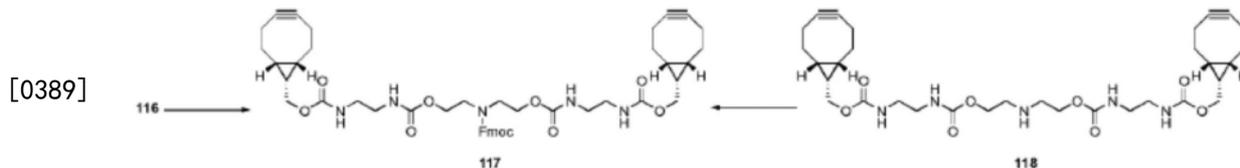
## [0385] 实施例8. 化合物114的合成

[0386] 向二乙醇胺 (112) (208mg, 1.98mmol) 在水 (20mL) 中的溶液中加入MeCN (20mL)、NaHCO<sub>3</sub> (250mg, 2.97mmol) 和Fmoc-OSu (113) (601mg, 1.78mmol) 在MeCN (20mL) 中的溶液。将混合物搅拌2小时并加入DCM (50mL)。分离后, 有机相用水 (20mL) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。得到所需产物114, 为无色粘稠油状 (573mg, 1.75mmol, 98%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.79-7.74 (m, 2H), 7.60-7.54 (m, 2H), 7.44-7.37 (m, 2H), 7.36-7.30 (m, 2H), 4.58 (d, J=5.4Hz, 2H), 4.23 (t, J=5.3Hz, 1H), 3.82-3.72 (m, 2H), 3.48-3.33 (m, 4H), 3.25-3.11 (m, 2H)。

## [0387] 实施例9. 化合物116的合成

[0388] 向114 (567mg, 1.73mmol) 在DCM (50mL) 中的溶液中加入4-硝基苯基氯甲酸酯 (115)

(768mg, 3.81mmol) 和  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.2mL, 875mg)。将混合物搅拌18小时并浓缩。残余物通过硅胶色谱法 (0%→10% MeOH 的 DCM 溶液, 随后 20%→70% EtOAc 的庚烷溶液) 纯化, 然后得到 32mg (49 $\mu\text{mol}$ , 2.8%) 所需产物 116。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.31-8.20 (m, 4H), 7.80-7.74 (m, 2H), 7.59-7.54 (m, 2H), 7.44-7.37 (m, 2H), 7.37-7.29 (m, 6H), 4.61 (d,  $J=5.4\text{Hz}$ , 2H), 4.39 (t,  $J=5.1\text{Hz}$ , 2H), 4.25 (t,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 4.02 (t,  $J=5.0\text{Hz}$ , 2H), 3.67 (t,  $J=4.8\text{Hz}$ , 2H), 3.45 (t,  $J=5.2\text{Hz}$ , 2H)。

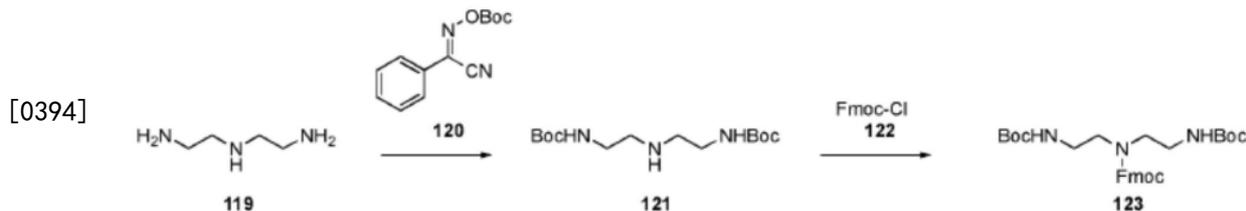


[0390] 实施例10. 化合物117的合成

[0391] 向 116 (34mg, 0.050mmol) 在 DCM (2mL) 中的溶液中加入 111 (49mg, 0.21mmol) 和三乙胺 (20 $\mu\text{L}$ , 0.14mmol)。混合物在室温下搅拌过夜。23小时后, 将混合物浓缩。通过硅胶柱色谱法 (0→40% MeOH 的 DCM 溶液) 纯化, 得到 117, 为白色固体, 产率为 61% (27mg, 0.031mmol)。LCMS (ESI+) 计算  $\text{C}_{47}\text{H}_{57}\text{N}_5\text{O}_{10}^+$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 851.41, 实测值 852.49。

[0392] 实施例11. 化合物118的合成

[0393] 化合物 118 在制备 117 (3.8mg, 0.0060mmol) 的过程中得到。LCMS (ESI+) 计算  $\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_8^+$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 629.34, 实测值 630.54。

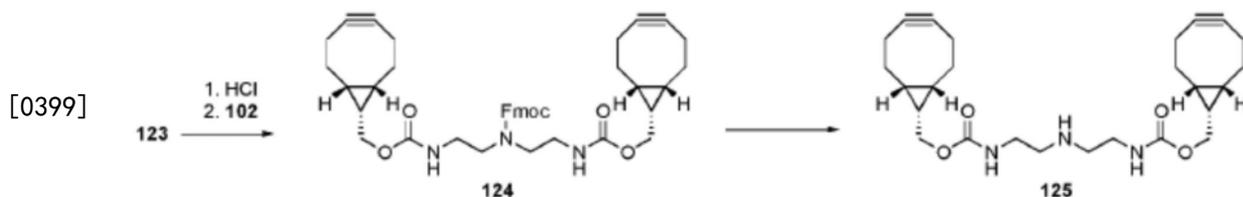


[0395] 实施例12. 化合物121的合成

[0396] 将二亚乙基三胺 (119) (73 $\mu\text{L}$ , 0.67mmol) 和三乙胺 (283 $\mu\text{L}$ , 2.03mmol) 在 THF (6mL) 中的溶液冷却至  $-5^\circ\text{C}$  并置于氮气气氛下。将 2-(Boc-氧亚氨基)-2-苯基乙腈 (120) (334mg, 1.35mmol) 溶解在 THF (4mL) 中并缓慢加入冷却的溶液中。2.5小时后, 移去冰浴并将混合物在室温下再搅拌 2.5 小时, 并真空浓缩。将残余物重新溶解在 DCM (15mL) 中并用 5% NaOH 水溶液 (2 $\times$  5mL)、盐水 (2 $\times$  5mL) 洗涤并用  $\text{MgSO}_4$  干燥。通过硅胶柱色谱法 (0→14% MeOH 的 DCM 溶液) 纯化得到 121, 为无色油状, 产率为 91% (185mg, 0.610mmol)。 $^1\text{H}$ -NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.08 (s, 2H), 3.30-3.12 (m, 4H), 2.74 (t,  $J=5.9\text{Hz}$ , 4H), 1.45 (s, 18H)。

[0397] 实施例13. 化合物123的合成

[0398] 向 121 (33.5mg, 0.110mmol) 在 THF (2mL) 中的冷却溶液 ( $-10^\circ\text{C}$ ) 中加入 10%  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (500 $\mu\text{L}$ ) 和溶解在 THF (1mL) 中的 9-芴基甲氧基碳酰氯 (122) (34mg, 0.13mmol)。1 小时后, 将混合物浓缩并将残余物重新溶解在 EtOAc (10mL) 中, 用盐水 (2 $\times$  5mL) 洗涤, 经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥并浓缩。通过硅胶柱色谱法 (0→50% MeOH 的 DCM 溶液) 纯化得到 123, 产率为 86% (50mg, 0.090mmol)。 $^1\text{H}$ -NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.77 (d,  $J=7.4\text{Hz}$ , 2H), 7.57 (d,  $J=7.4\text{Hz}$ , 2H), 7.43-7.38 (m, 2H), 7.36-7.31 (m, 2H), 5.57 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 2H), 4.23 (t,  $J=5.1\text{Hz}$ , 1H), 3.40-2.83 (m, 8H), 1.41 (s, 18H)。

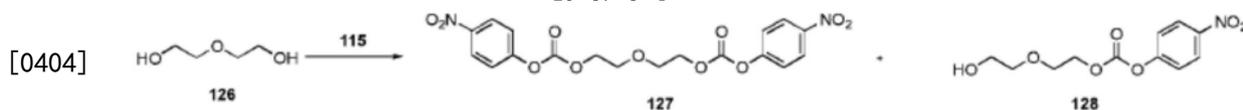


[0400] 实施例14. 化合物124的合成

[0401] 向123 (50mg, 0.095mmol) 在DCM (3mL) 中的溶液中加入二噁烷 (200 $\mu$ L) 中的4M HCl。将混合物搅拌19小时, 浓缩并得到白色固体 (35mg)。未经纯化, 将去保护的中间体和 (1R, 8S, 9s) - 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基 (4硝基苯基) 碳酸酯 (102) (70mg, 0.22mmol) 溶解在DMF (3mL) 中, 并加入三乙胺 (34 $\mu$ L, 0.24mmol)。2小时后, 将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0 $\rightarrow$ 25% MeOH的DCM溶液) 纯化残余物, 得到124, 产率为48% (31mg, 0.045mmol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{41}H_{47}N_3O_6^+$  (M+H<sup>+</sup>) 677.35, 实测值678.57。

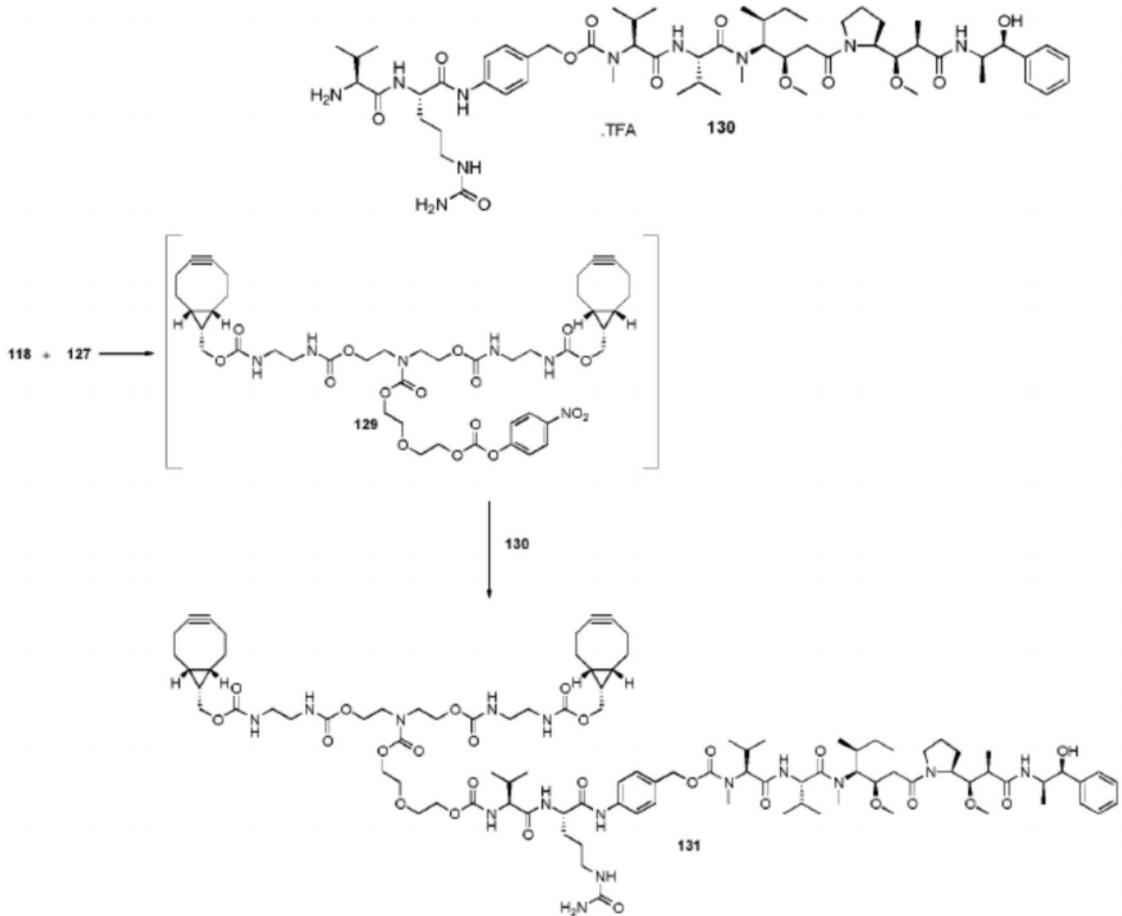
[0402] 实施例15. 化合物125的合成

[0403] 向124 (10mg, 0.014mmol) 在DMF (500 $\mu$ L) 中的溶液中加入哌啶 (20 $\mu$ L)。3.5小时后, 将混合物浓缩。通过硅胶柱色谱法 (0 $\rightarrow$ 20% MeOH的DCM溶液) 纯化得到125, 产率为58% (3.7mg, 0.0080mmol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{26}H_{37}N_3O_4^+$  (M+H<sup>+</sup>) 455.28, 实测值456.41。



[0405] 实施例16. 化合物127和128的合成

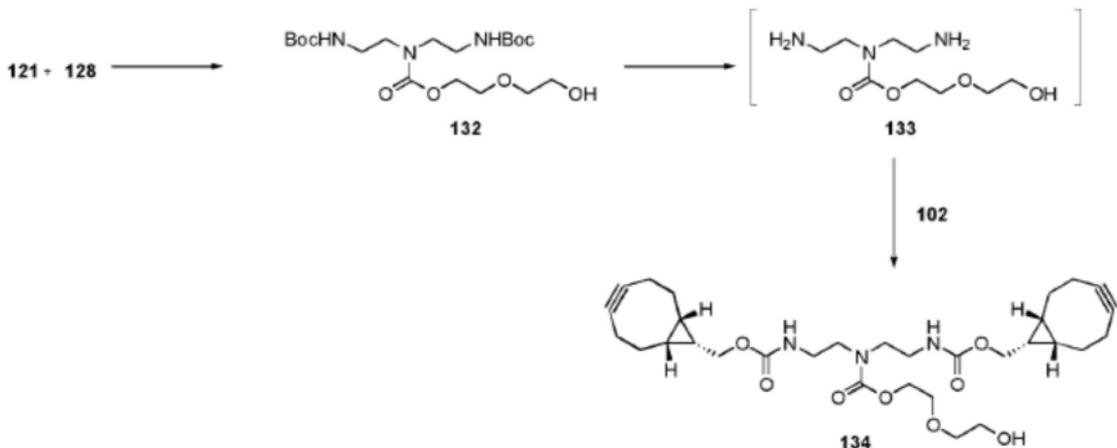
[0406] 向二甘醇 (126) (446 $\mu$ L, 0.50g, 4.71mmol) 在DCM (20mL) 中的溶液中加入4-硝基苯基氯甲酸酯 (115) (1.4g, 7.07mmol) 和Et<sub>3</sub>N (3.3mL, 2.4g, 23.6mmol)。将混合物搅拌、过滤并真空浓缩 (在55 $^{\circ}$ C)。残余物通过硅胶色谱法 (15% $\rightarrow$ 75% EtOAc的庚烷溶液) 纯化并分离两种产物。得到产物127, 为白色固体 (511mg, 1.17mmol, 25%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.32-8.24 (m, 2H), 7.43-7.36 (m, 2H), 4.50-4.44 (m, 2H), 3.86-3.80 (m, 2H), 3.81-3.74 (m, 2H), 3.69-3.64 (m, 2H)。



[0407]

[0408] 实施例17. 化合物131的合成

[0409] 向118 (2.3mg, 3.7 $\mu$ mol) 在DMF (295 $\mu$ L) 中的溶液中加入127 (3.2mg, 7.4 $\mu$ mol) 在DMF (65 $\mu$ L) 中的溶液和Et<sub>3</sub>N (1.6 $\mu$ L, 1.1mg, 11.1 $\mu$ mol)。将混合物静置17小时并加入HOBT (0.5mg, 3.7 $\mu$ mol) 在DMF (14 $\mu$ L) 中的溶液。4小时后, 加入Et<sub>3</sub>N (5.2 $\mu$ L, 3.8mg, 37 $\mu$ mol) 和vc-PABC-MMAE.TFA (130, 13.8mg, 11 $\mu$ mol) 在DMF (276 $\mu$ L) 中的溶液。3天后, 混合物通过RP HPLC (C18, 30%→90%MeCN (1%AcOH) 的水 (1%AcOH) 溶液) 进行纯化。得到所需产物131, 为无色薄膜状 (1.5mg, 0.78 $\mu$ mol, 21%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>96</sub>H<sub>148</sub>N<sub>15</sub>O<sub>25</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1911.08, 实测值 1912.08。



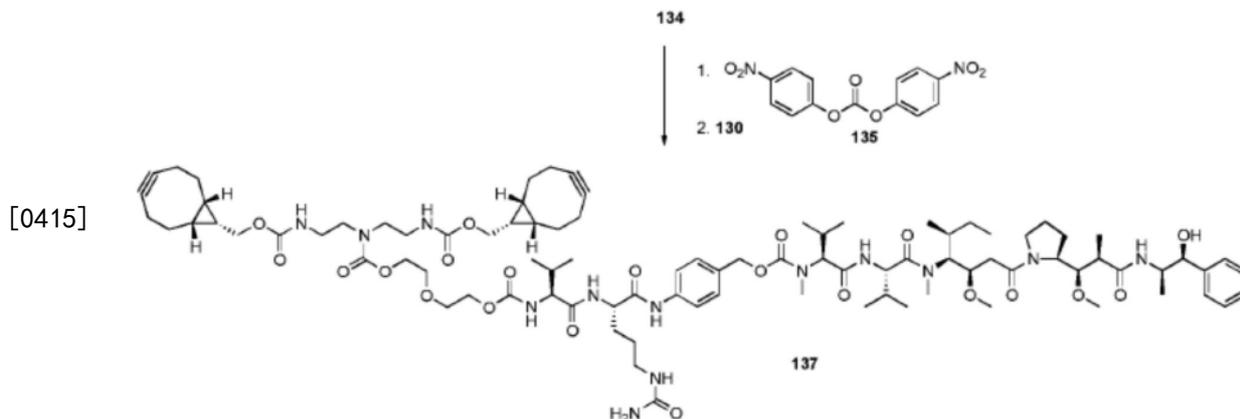
[0410]

[0411] 实施例18. 化合物132的合成

[0412] 向121 (168mg, 0.554mmol) 在DCM (2mL) 中的溶液中加入128 (240mg, 0.89mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液和Et<sub>3</sub>N (169mg, 233μL)。将混合物搅拌17小时, 浓缩并通过硅胶色谱法 (EtOAc在庚烷中的梯度) 纯化。得到所需产物132, 为淡黄色油状 (85mg, 0.20mmol, 35%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5.24-5.02 (m, 2H), 4.36-4.20 (m, 3H), 3.84-3.67 (m, 4H), 3.65-3.58 (m, 2H), 3.47-3.34 (m, 4H), 3.34-3.18 (m, 4H), 1.44 (bs, 18H)。

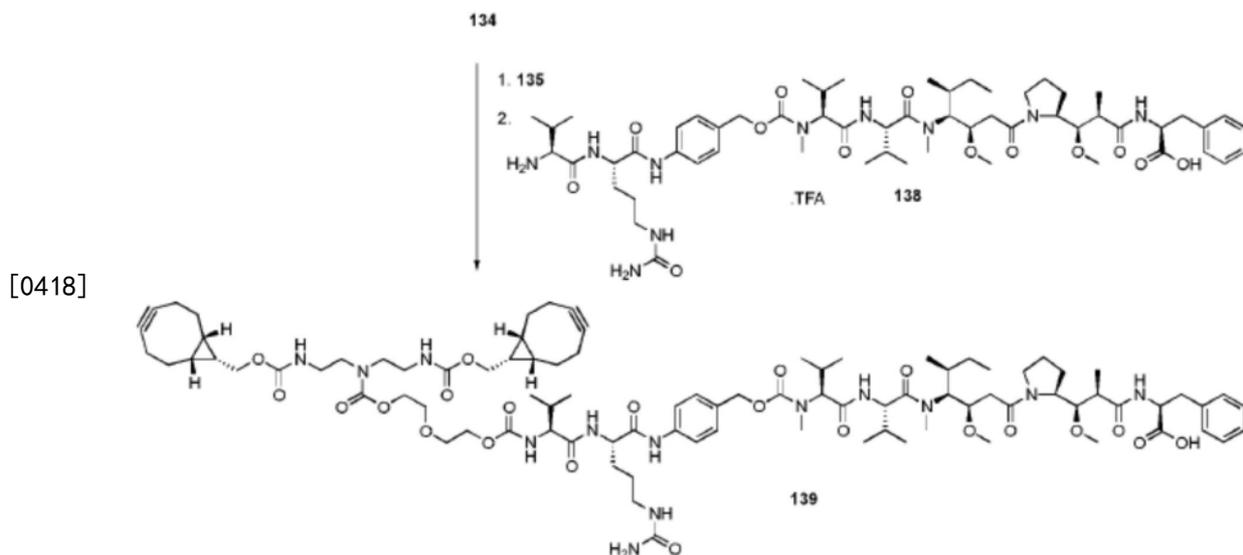
[0413] 实施例19. 化合物134的合成

[0414] 向132 (81mg, 0.19mmol) 在DCM (3mL) 中的溶液中加入二噁烷 (700μL) 中的4N HCl。将混合物搅拌19小时, 浓缩并将残余物溶解在DMF (0.5mL) 中。加入Et<sub>3</sub>N (132μL, 96mg, 0.95mmol)、DMF (0.5mL) 和(1R, 8S, 9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(102) (132mg, 0.42mmol) 并将所得混合物搅拌2小时。将混合物浓缩并通过硅胶色谱法 (0%→3% MeOH的DCM溶液) 纯化残余物。得到所需产物134, 为无色薄膜状 (64mg, 0.11mmol, 57%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.31-4.23 (m, 2H), 4.22-4.08 (m, 4H), 3.80-3.68 (m, 4H), 3.66-3.58 (m, 2H), 3.50-3.28 (m, 8H), 2.80-2.65 (m, 1H), 2.40-2.10 (m, 12H), 1.68-1.48 (m, 4H), 1.35 (五重峰, J=8.1Hz, 1H), 1.02-0.87 (m, 2H)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 588.33, 实测值588.43。



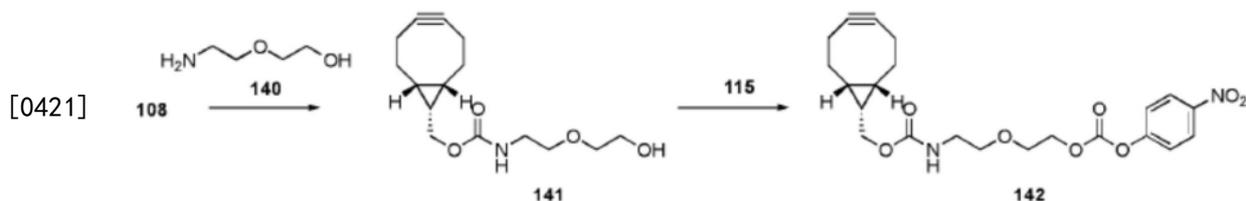
[0416] 实施例20. 化合物137的合成

[0417] 向134 (63mg, 0.11mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入双(4-硝基苯基)碳酸酯(35) (32.6mg, 0.107mmol) 和Et<sub>3</sub>N (32.5mg, 45μL, 0.32mmol)。2小时后, 从主反应混合物中去除77μL, 加入vc-PABC-MMAE.TFA (130, 10mg, 8.1μmol) 在DMF (200μL) 中的溶液和Et<sub>3</sub>N (3.4μL, 2.5mg, 24μmol)。18小时后, 加入2,2'-(亚乙基二氧基)双(乙胺) (4.9μL, 5.0mg, 34μmol) 并将混合物静置45分钟。将混合物通过RP HPLC (C18, 30%→90% MeCN (1% AcOH) 的水 (1% AcOH) 溶液) 纯化。得到所需产物137, 为无色薄膜状 (8.7mg, 5.0μmol, 61%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>90</sub>H<sub>138</sub>N<sub>13</sub>O<sub>21</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1737.01, 实测值1738.01。



[0419] 实施例21. 化合物139的合成

[0420] 向134 (63mg, 0.11mmol) 在DCM(1mL) 中的溶液中加入双(4-硝基苯基) 碳酸酯(35) (32.6mg, 0.107mmol) 和Et<sub>3</sub>N(32.5mg, 45μL, 0.32mmol)。20小时后, 从主反应混合物中去除77μL, 加入vc-PABC-MMAF.TFA(138, 9.6mg, 8.2μmol) 在DMF(240μL) 中的溶液和Et<sub>3</sub>N(3.4μL, 2.5mg, 24μmol)。3小时后, 加入2,2'-(亚乙基二氧基) 双(乙胺) (20μL, 20mg, 0.14mmol) 并将混合物静置20分钟。混合物通过RP HPLC(C18, 30%→90%MeCN(1%AcOH) 的水(1%AcOH) 溶液) 纯化。得到所需产物139, 为无色薄膜状(5.3mg, 3.2μmol, 39%)。LCMS(ESI+) 计算C<sub>87</sub>H<sub>130</sub>N<sub>11</sub>O<sub>21</sub> + (M+H<sup>+</sup>) 1664.94, 实测值1665.99。



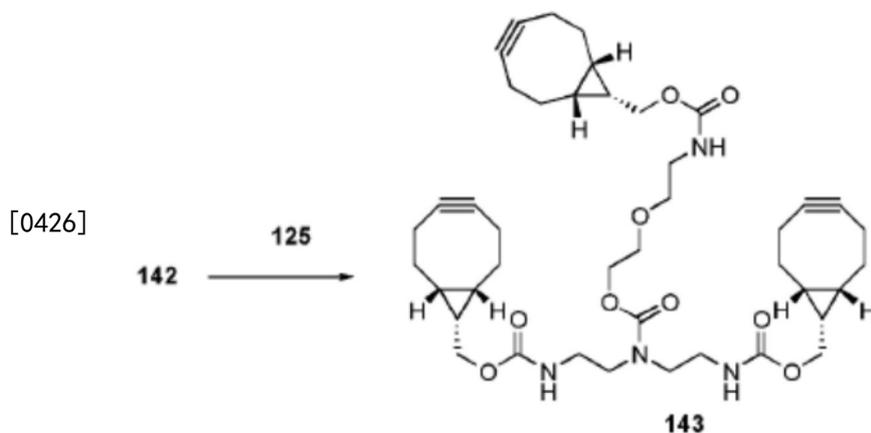
[0422] 实施例22. 化合物141的合成

[0423] 向(1R, 8S, 9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基N-琥珀酰亚胺碳酸酯(108) (16.35g, 56.13mmol) 在DCM(400mL) 中的溶液中加入2-(2-氨基乙氧基) 乙醇(140) (6.76mL, 67.35mmol) 和三乙胺(23.47mL, 168.39mmol)。将所得淡黄色溶液在室温搅拌90分钟。将混合物真空浓缩并将残余物与乙腈(400mL) 共蒸发一次。将所得油状物溶解在EtOAc(400mL) 中并用H<sub>2</sub>O(3×200mL) 洗涤。将有机层真空浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱法(50%→88% EtOAc的庚烷溶液) 纯化, 得到141(11.2g, 39.81mmol, 产率为71%), 为淡黄色油状。<sup>1</sup>H-NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 5.01(br s, 1H), 4.17(d, 2H, J=12.0Hz), 3.79-3.68(m, 2H), 3.64-3.50(m, 4H), 3.47-3.30(m, 2H), 2.36-2.14(m, 6H), 1.93(br s, 1H), 1.68-1.49(m, 2H), 1.37(五重峰, 1H, J=8.0Hz), 1.01-0.89(m, 2H)。

[0424] 实施例23. 化合物142的合成

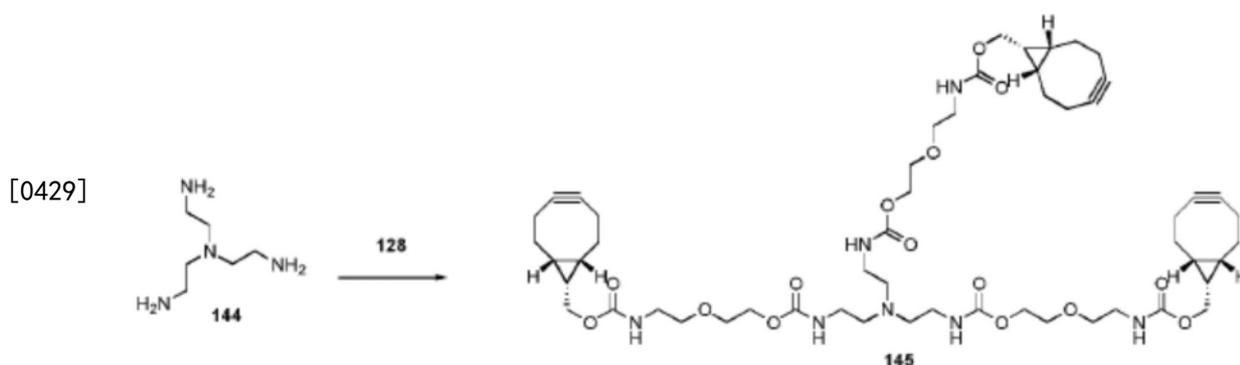
[0425] 向141(663mg, 2.36mmol) 在DCM(15mL) 中的溶液中加入三乙胺(986μL, 7.07mmol) 和4-硝基苯基氯甲酸酯(115) (712mg, 3.53mmol)。将混合物搅拌4小时并真空浓缩。通过硅胶柱色谱法(0→20%EtOAc的庚烷溶液) 纯化, 得到142(400mg, 0.9mmol, 产率为38%), 为淡

黄色油状。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.29 (d, J=9.4Hz, 2H), 7.40 (d, J=9.3Hz, 2H), 5.05 (br s, 1H), 4.48-4.41 (m, 2H), 4.16 (d, J=8.0Hz, 2H), 3.81-3.75 (m, 2H), 3.61 (t, J=5.0Hz, 2H), 3.42 (q, J=5.4Hz, 2H), 2.35-2.16 (m, 6H), 1.66-1.50 (m, 2H), 1.35 (五重峰, J=8.6Hz, 1H), 1.02-0.88 (m, 2H)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub><sup>+</sup> (M+Na<sup>+</sup>) 469.16, 实测值469.36。



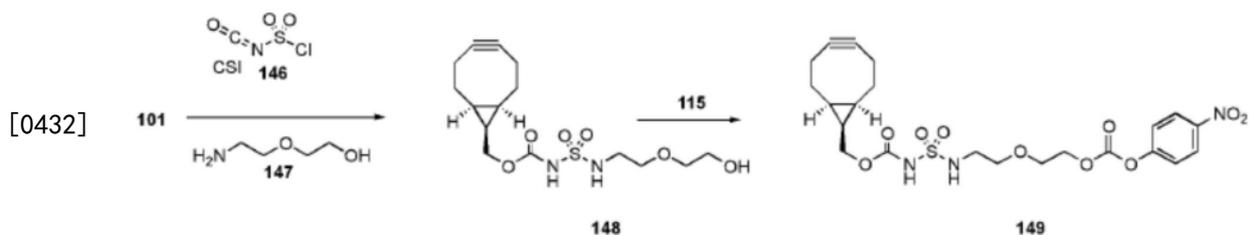
[0427] 实施例24. 化合物143的合成

[0428] 将142 (2.7mg, 6.0μmol) 在DMF (48μL) 中的溶液和Et<sub>3</sub>N (2.1μL, 1.5mg, 15μmol) 加入到125 (2.3mg, 5.0μmol) 在DMF (0.32mL) 中的溶液。将混合物静置4天, 用DMF (100μL) 稀释并通过RP HPLC (C18, 30%→100%MeCN (1%AcOH) 的水 (1%AcOH) 溶液) 纯化。得到产物143, 为无色薄膜状 (2.8mg, 3.7μmol, 74%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>42</sub>H<sub>59</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 763.43, 实测值763.53。



[0430] 实施例25. 化合物145的合成

[0431] 向128 (200mg, 0.45mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入三乙胺 (41.6μL, 0.30mmol) 和三(2-氨基乙基)胺144 (14.9μL, 0.10mmol)。将混合物搅拌150分钟后, 将其真空浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱法 (25%→100%EtOAc的DCM溶液, 然后0%→10%MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到145, 为黄色油状, 产率为43% (45.4mg, 42.5μmol)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.68-5.18 (m, 6H), 4.32-4.18 (m, 6H), 4.18-4.11 (d, J=7.9Hz, 6H), 3.74-3.61 (m, 6H), 3.61-3.51 (m, 6H), 3.43-3.29 (m, 6H), 3.29-3.15 (m, 6H), 2.65-2.47 (m, 6H), 2.37-2.16 (m, 18H), 1.69-1.49 (m, 6H), 1.35 (五重峰, J=8.9Hz, 3H), 1.03-0.87 (m, 6H)。

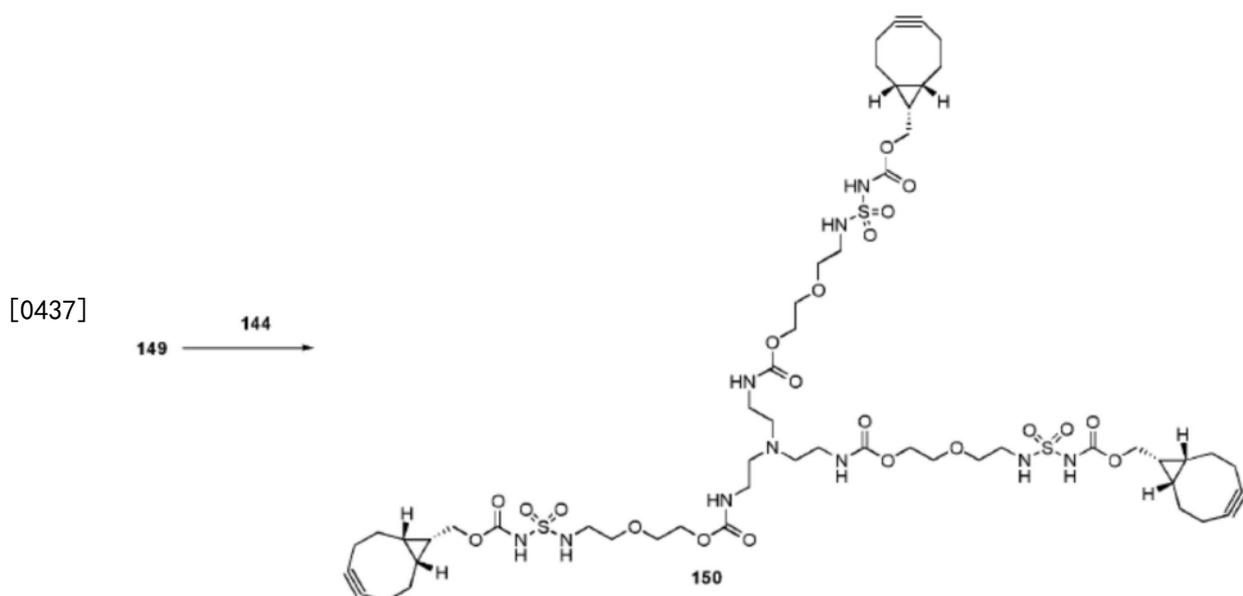


[0433] 实施例26. 化合物148的合成

[0434] 向BCN-OH (101) (3.0g, 20mmol) 在DCM (300mL) 中的溶液中加入CSI (146) (1.74mL, 2.83g, 20mmol)。将混合物搅拌15分钟后, 加入Et<sub>3</sub>N (5.6mL, 4.0g, 40mmol)。将混合物搅拌5分钟并加入2-(2-氨基乙氧基)乙醇 (147) (2.2mL, 2.3g, 22mmol)。将所得混合物搅拌15分钟并加入饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (300mL)。分离各层, 水相用DCM (200mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。残余物通过硅胶色谱法 (0%至10%MeOH的DCM溶液) 纯化。浓缩含有所需产物的级分。将残余物溶解在EtOAc (100mL) 中并浓缩。得到所需产物148, 为淡黄色油状 (4.24g, 11.8mmol, 59%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5.99-5.79 (bs, 1H), 4.29 (d, J=8.3Hz, 2H), 3.78-3.74 (m, 2H), 3.66-3.56 (m, 4H), 3.37-3.30 (m, 2H), 2.36-2.16 (m, 6H), 1.63-1.49 (m, 2H), 1.40 (五重峰, J=8.7Hz, 1H), 1.05-0.94 (m, 2H)。

[0435] 实施例27. 化合物149的合成

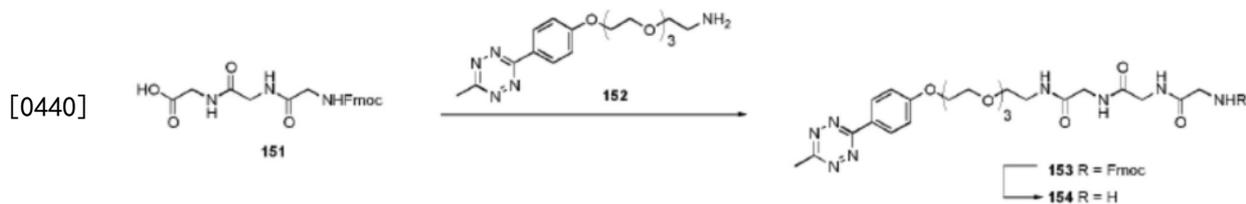
[0436] 向148 (3.62g, 10.0mmol) 在DCM (200mL) 中的溶液中加入4-硝基苯基氯甲酸酯 (15) (2.02g, 10.0mmol) 和Et<sub>3</sub>N (4.2mL, 3.04g, 30.0mmol)。将混合物搅拌1.5小时并浓缩。残余物通过硅胶色谱法 (20%→70%EtOAc (1%AcOH) 的庚烷 (1%AcOH) 溶液) 纯化。得到产物149, 为白色泡沫状 (4.07g, 7.74mmol, 74%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.32-8.26 (m, 2H), 7.45-7.40 (m, 2H), 5.62-5.52 (m, 1H), 4.48-4.42 (m, 2H), 4.28 (d, J=8.2Hz, 2H), 3.81-3.76 (m, 2H), 3.70-3.65 (m, 2H), 3.38-3.30 (m, 2H), 2.35-2.16 (m, 6H), 1.62-1.46 (m, 2H), 1.38 (五重峰, J=8.7Hz, 1H), 1.04-0.93 (m, 2H)。



[0438] 实施例28. 化合物150的合成

[0439] 向149 (200mg, 0.38mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入三乙胺 (35.4μL, 0.24mmol) 和三(2-氨基乙基)胺 (144) (12.6μL, 84.6μmol)。混合物搅拌120分钟并真空浓缩。将残余物

通过硅胶柱色谱法 (25%→100%EtOAc的DCM溶液, 然后0%→10%MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到150, 产率为36% (40.0mg, 30.6 $\mu$ mol), 为白色泡沫状。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 6.34-5.72 (m, 6H), 4.34-4.18 (m, 12H), 3.76-3.58 (m, 12H), 3.43-3.30 (m, 6H), 3.30-3.18 (m, 6H), 2.64-2.49 (m, 6H), 2.38-2.14 (m, 18H), 1.65-1.47 (m, 6H), 1.39 (五重峰, J=9.1Hz, 3H), 1.06-0.90 (m, 6H)。

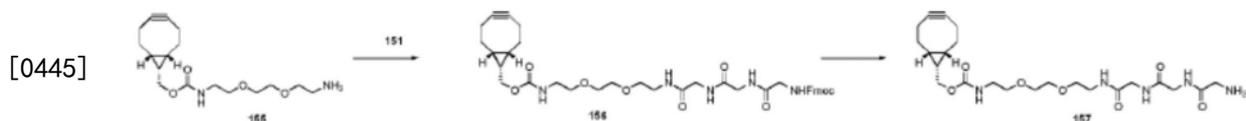


[0441] 实施例29. 化合物153的合成

[0442] 向Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (151) (31.2mg, 75.8 $\mu$ mol) 在无水DMF (1mL) 中的混合物中加入N,N-二异丙基乙胺 (40 $\mu$ L, 29mg, 0.23mmol) 和HATU (30.3mg, 79.6 $\mu$ mol)。10分钟后, 加入四嗪-PEG3-乙胺 (152) (30.3mg, 75.8 $\mu$ mol) 并将混合物涡旋。2小时后, 混合物通过RP HPLC (C18, 30%→90%MeCN (1%AcOH) 的水 (1%AcOH) 溶液) 纯化。得到所需产物, 为粉红色薄膜状 (24.1mg, 31.8 $\mu$ mol, 42%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>38</sub>H<sub>45</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 757.33, 实测值757.46。

[0443] 实施例30. 化合物154的合成

[0444] 向153 (24.1mg, 31.8 $\mu$ mol) 在DMF (500 $\mu$ L) 中的溶液中加入二乙胺 (20 $\mu$ L, 14mg, 191 $\mu$ mol)。将混合物静置2小时并通过RP HPLC (C18, 5%→90%MeCN (1%AcOH) 的水 (1%AcOH) 溶液) 纯化。得到所需产物154, 为粉红色薄膜状 (17.5mg, 32.7 $\mu$ mol, 定量)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 535.26, 实测值535.37。

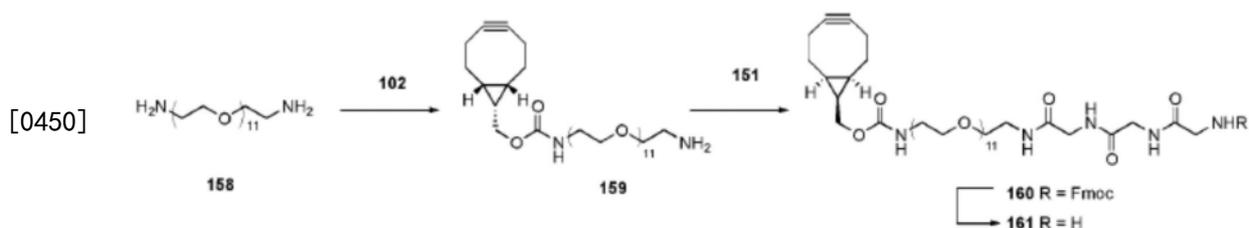


[0446] 实施例31. 化合物156的合成

[0447] 将N-[(1R, 8S, 9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基氧基羰基]-1,8-二氨基-3,6-二氧杂辛烷 (155) (68mg, 0.21mmol) 在干燥DMF (2mL) 中的溶液转移到Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (151) (86mg, 0.21mmol) 在干燥DMF (2mL) 中的溶液中。加入DIPEA (100 $\mu$ L, 0.630mmol) 和HATU (79mg, 0.21mmol)。1.5小时后, 将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0→11%MeOH的DCM溶液) 纯化残余物, 得到所需化合物156, 产率为34% (52mg, 0.072mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 717.34, 实测值718.39。

[0448] 实施例32. 化合物157的合成

[0449] 将化合物156 (21mg, 0.029mmol) 溶解在DMF (2.4mL) 中并加入哌啶 (600 $\mu$ L)。20分钟后, 将混合物浓缩并通过制备型HPLC纯化残余物, 得到所需化合物157, 为白色固体 (9.3mg, 0.018mmol, 64%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 495.27, 实测值496.56。



[0451] 实施例33. 化合物159的合成

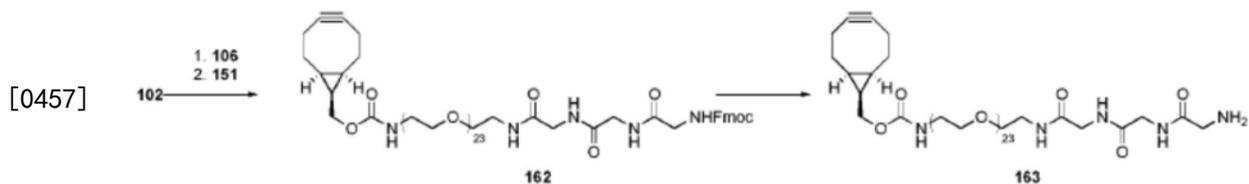
[0452] 向氨基-PEG<sub>11</sub>-胺 (158) (143mg, 0.260mmol) 在DCM (5mL) 中的溶液中缓慢加入溶解在DCM (5mL) 中的 (1R, 8S, 9s) - 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基 (4-硝基苯基) 碳酸酯 (102) (41mg, 0.13mmol)。1.5小时后, 将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0→20% 0.7N NH<sub>3</sub> MeOH 的DCM溶液) 纯化残余物, 得到所需化合物159, 为透明油状物 (62mg, 0.086mmol, 66%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 720.44, 实测值721.56。

[0453] 实施例34. 化合物160的合成

[0454] 将159 (62mg, 0.086mmol) 在干燥DMF (2mL) 中的溶液转移到Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (151) (36mg, 0.086mmol) 在干燥DMF (2mL) 中的溶液中。加入DIPEA (43μL, 0.25mmol) 和HATU (33mg, 0.086mmol)。18小时后, 将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0→20% MeOH的DCM溶液) 纯化残余物, 得到所需化合物160, 产率为62% (60mg, 0.054mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>56</sub>H<sub>83</sub>N<sub>5</sub>O<sub>18</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1113.57, 实测值1114.93。

[0455] 实施例35. 化合物161的合成

[0456] 将化合物160 (36mg, 0.032mmol) 溶解在DMF (2mL) 中并加入哌啶 (200μL)。2小时后, 将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0→40% 0.7N NH<sub>3</sub> MeOH的DCM溶液) 纯化残余物, 得到所需化合物161, 为黄色油状 (16.7mg, 0.0187mmol, 58%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>41</sub>H<sub>73</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 891.51, 实测值892.82。

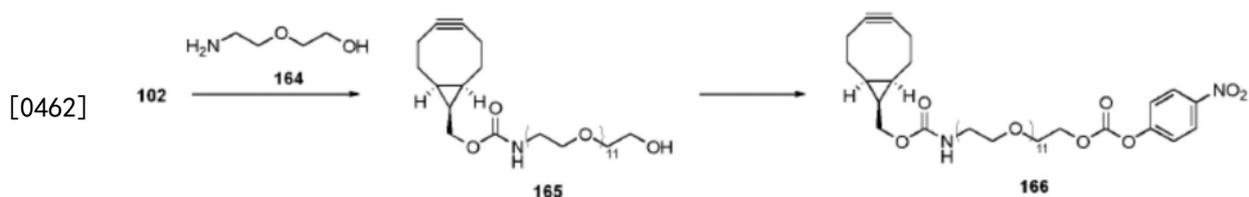


[0458] 实施例36. 化合物162的合成

[0459] 向氨基-PEG<sub>23</sub>-胺 (106) (60mg, 0.056mmol) 在DCM (3mL) 中的溶液中缓慢加入溶解在DCM (5mL) 中的 (1R, 8S, 9s) - 双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基 (4-硝基苯基) 碳酸酯 (102) (12mg, 0.037mmol)。4小时后, 将混合物浓缩并重新溶解在DMF (2mL) 中, 然后加入Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (51) (23mg, 0.056mmol)、HATU (21mg, 0.056mmol) 和DIPEA (27μL, 0.16mmol)。20小时后, 将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0→27% MeOH的DCM溶液) 纯化残余物, 得到93%的所需化合物162 (57mg, 0.043mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>80</sub>H<sub>131</sub>N<sub>5</sub>O<sub>30</sub><sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 1641.89, 实测值1659.92。

[0460] 实施例37. 化合物163的合成

[0461] 将化合物162 (57mg, 0.034mmol) 溶解在DMF (1mL) 中并加入哌啶 (120μL)。2小时后, 将混合物浓缩, 重新溶解于水中, 用乙醚 (3×10mL) 萃取去除Fmoc-哌啶副产物。冷冻干燥后, 得到163, 为黄色油状 (46.1mg, 0.032mmol, 95%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>65</sub>H<sub>121</sub>N<sub>5</sub>O<sub>28</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1419.82, 实测值1420.91。

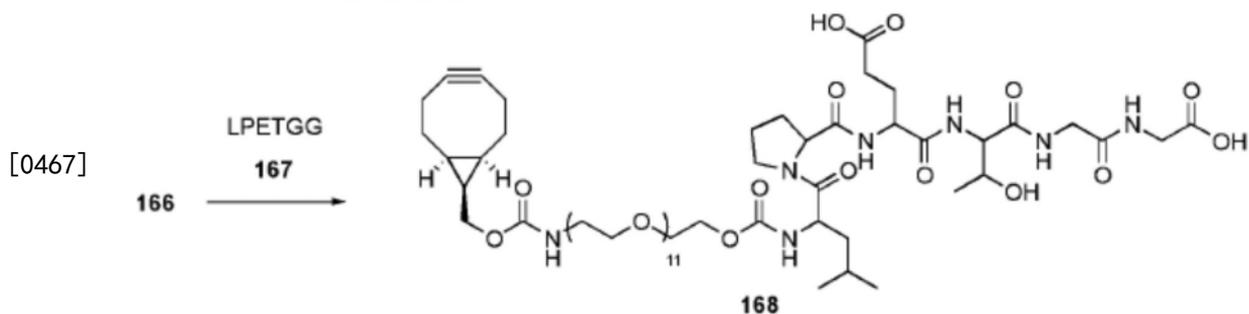


[0463] 实施例38. 化合物165的合成

[0464] 向(1R,8S,9s)-双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基(4-硝基苯基)碳酸酯(102)(204mg,0.650mmol)的溶液中加入氨基-PEG12-醇(164)(496mg,0.908mmol)和三乙胺(350μL,2.27mmol)。19小时后,将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法(2→20%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到165,为透明黄色油状(410mg,0.560mmol,87%)。LCMS(ESI+)计算 $C_{35}H_{63}NO_{14}^+$ ( $M+Na^+$ )721.42,实测值744.43。

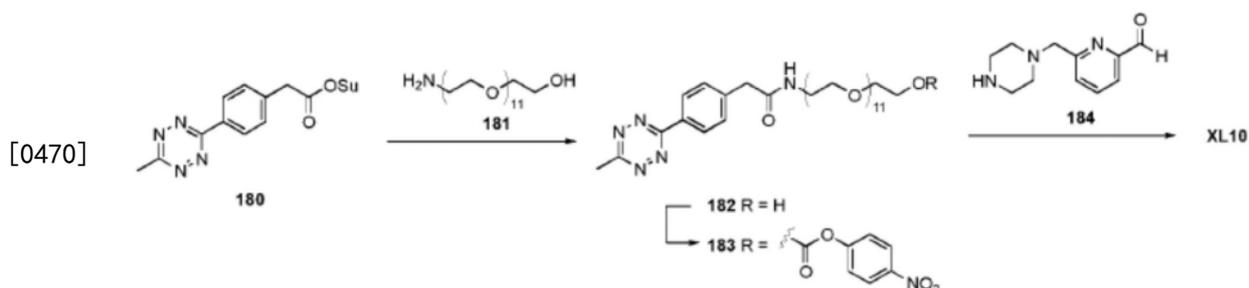
[0465] 实施例39. 化合物166的合成

[0466] 向165(410mg,0.560mmol)在DCM(6mL)中的溶液中加入4-硝基苯基氯甲酸酯(171,0.848mmol)和三乙胺(260μL,1.89mmol)。18小时后,将混合物浓缩并通过硅胶柱色谱法(0→7%MeOH的DCM溶液)纯化残余物,得到所需化合物166,为透明油状(350mg,0.394mmol,70%)。LCMS(ESI+)计算 $C_{42}H_{66}N_2O_{18}^+$ ( $M+Na^+$ )886.43,实测值909.61。



[0468] 实施例40. 化合物168的合成

[0469] 向166(15mg,0.017mmol)在DMF(2mL)中的溶液中加入肽LPETGG(167)(9.7mg,0.017mmol)和三乙胺(7μL,0.05mmol)。46小时后,将混合物浓缩并通过制备型HPLC纯化残余物,得到63%的所需化合物168(14mg,0.010mmol)。LCMS(ESI+)计算 $C_{60}H_{101}N_7O_{25}^+$ ( $M+H^+$ )1319.68,实测值1320.92。



[0471] 实施例42. 化合物182的合成

[0472] 向180(甲基四嗪-NHS酯,19mg,0.058mmol)在DCM(0.8mL)中的溶液中加入181(33.6mg,0.061mmol)和 $Et_3N$ (24μL,0.17mmol)。在室温下搅拌2.5小时后,将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法(0→15%MeOH的DCM溶液)纯化,得到所需化合物182,产率为93%(41mg,0.054mmol)。LCMS(ESI+)计算 $C_{35}H_{60}N_5O_{13}^+$ ( $M+H^+$ )758.88,实测值758.64。

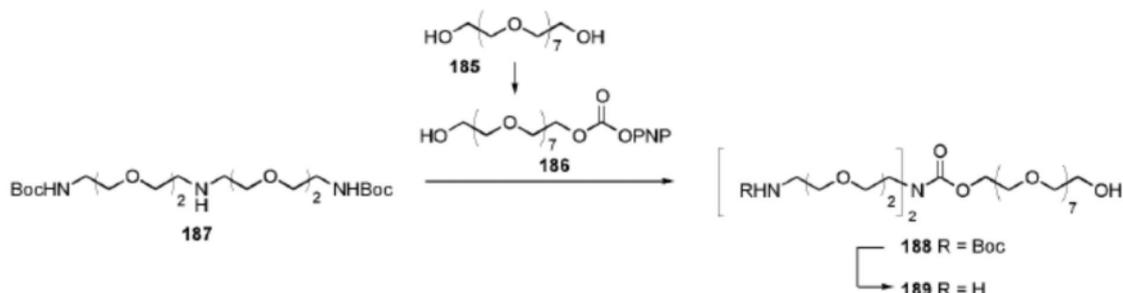
[0473] 实施例43. 化合物183的合成

[0474] 向182 (41mg, 0.054mmol) 在DCM (3mL) 中的溶液中加入4-硝基苯基氯甲酸酯 (16mg, 0.081mmol) 和Et<sub>3</sub>N (23μL, 0.16mmol)。在室温下搅拌21小时后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (梯度: A. 0% → 20% EtOAc 的DCM溶液 (直到对硝基苯酚被洗脱)) 纯化, 然后为梯度B. 0% → 13% MeOH 的DCM溶液), 得到所需化合物183, 产率为76% (37.9mg, 0.041mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>42</sub>H<sub>63</sub>N<sub>6</sub>O<sub>17</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 923.98, 实测值923.61。

[0475] 实施例44. XL10的合成

[0476] 向184 (5.6mg, 0.023mmol) 在无水DMF (0.1mL) 中的溶液 (根据MacDonald等人, Nat. Chem. Biol. 2015, 11, 326-334 (通过引用纳入本文) 制备) 中加入溶解在无水DMF (0.3ml) 中的183 (14.3mg, 0.015mmol) 和Et<sub>3</sub>N (7μL, 0.046mmol)。在室温下搅拌2小时后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0 → 15% MeOH 的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物XL10, 产率为50% (7.5mg, 0.0076mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>47</sub>H<sub>73</sub>N<sub>8</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 990.13, 实测值990.66。

[0477]



[0478] 实施例45. 186的合成

[0479] 向八乙二醇185在DCM (10mL) 中的溶液中加入三乙胺 (1.0mL, 7.24mmol, 2.5当量), 然后在28分钟内逐滴加入4-硝基苯基氯甲酸酯 (0.58g, 2.90mmol, 1当量) 在DCM (5mL) 中的溶液。将混合物搅拌90分钟后, 真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法 (75% → 0% EtOAc 的DCM溶液, 然后是0% → 7% MeOH 的DCM溶液) 纯化。得到产物186, 产率为36%, 为无色油状 (584.6mg, 1.09mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>13</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 536.23, 实测值536.93。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.28 (d, J = 12.0Hz, 2H), 7.40 (d, J = 12.0Hz, 2H), 4.47-4.42 (m, 2H), 3.84-3.79 (m, 2H), 3.75-3.63 (m, 26H), 3.63-3.59 (m, 2H), 2.70-2.55 (bs, 1H)。

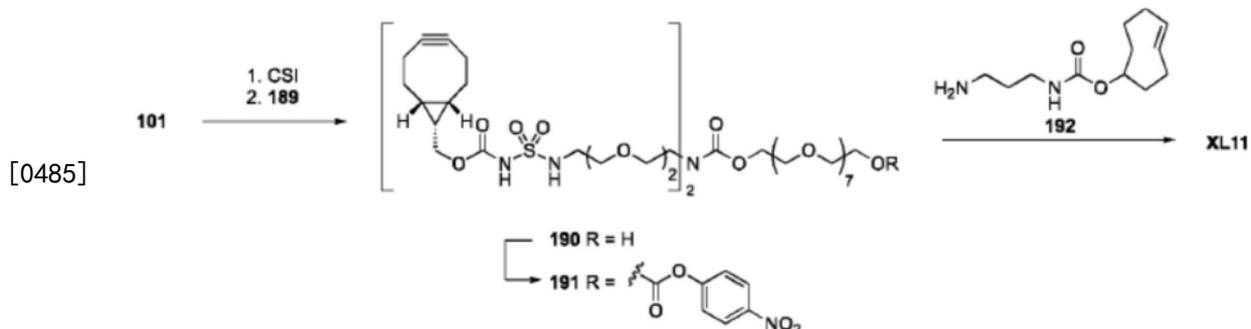
[0480] 实施例46. 188的合成

[0481] 向187 (BocNH-PEG<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH, 202mg, 0.42mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入部分 (0.5mL, 0.54mmol 1.3当量) 制备的186储备溶液 (DCM (1mL) 中584mg), 然后是三乙胺 (176μL, 1.26mmol, 3当量) 和HOBt (57mg, 0.42mmol, 1当量)。将混合物搅拌8天后, 真空浓缩。将残余物溶解在乙腈 (4.2mL) 和0.1N NaOH<sub>(aq)</sub> (4.2mL, 1当量) 和额外量固体NaOH (91.5mg) 的混合物中。将混合物再搅拌21.5小时后, 用DCM (3 × 40mL) 萃取混合物。将合并的有机层真空浓缩并通过硅胶柱色谱法 (0% → 15% MeOH 的DCM溶液) 纯化残余物。得到产物188, 产率为87%, 为淡黄色油状 (320.4mg, 0.37mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>39</sub>H<sub>78</sub>N<sub>3</sub>O<sub>18</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 876.53, 实测值876.54。

[0482] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.15-5.02 (bs, 2H), 4.25-4.19 (m, 2H), 3.76-3.46 (m, 50H), 3.35-3.26 (m, 4H), 2.79-2.69 (br. s, 1H), 1.44 (s, 18H)。

[0483] 实施例47. 189的合成

[0484] 将188 (320mg, 0.37mmol) 溶解在DCM (1mL) 中。然后加入二噁烷中的4M HCl (456μL, 1.83mmol, 5当量)。将混合物搅拌3.5小时后, 加入额外的二噁烷中的4M HCl (450μL, 1.80mmol, 4.9当量)。再将混合物搅拌3.5小时后, 加入额外二噁烷中的4M HCl (450μL, 1.80mmol, 4.9当量)。将混合物搅拌16.5小时后, 真空浓缩混合物。以定量产率得到产物189, 为白色粘性固体。其直接用于下一步。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ (ppm) 8.07-7.81 (bs, 6H), 4.15-4.06 (m, 2H), 3.75-3.66 (m, 2H), 3.65-3.48 (m, 48H), 3.03-2.92 (m, 4H)。



[0486] 实施例48. 190的合成

[0487] 向BCN-OH (101, 164mg, 1.10mmol, 3当量) 在DCM (3mL) 中的溶液中加入CSI (76μL, 0.88mmol, 2.4当量)。搅拌15分钟后加入三乙胺 (255μL, 5.50mmol, 5当量)。通过加入DCM (3mL) 和三乙胺 (508μL, 11.0mmol, 10当量) 制备189的溶液。6分钟后将该储备溶液加入到原始反应混合物中。将混合物搅拌21.5小时后, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法 (0% → 10% MeOH 的DCM溶液) 纯化残余物。得到产物190, 产率为39%, 为淡黄色油状 (165.0mg, 139μmol)。  
LCMS (ESI+) 计算C<sub>43</sub>H<sub>72</sub>N<sub>5</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1186.54, 实测值1186.65。

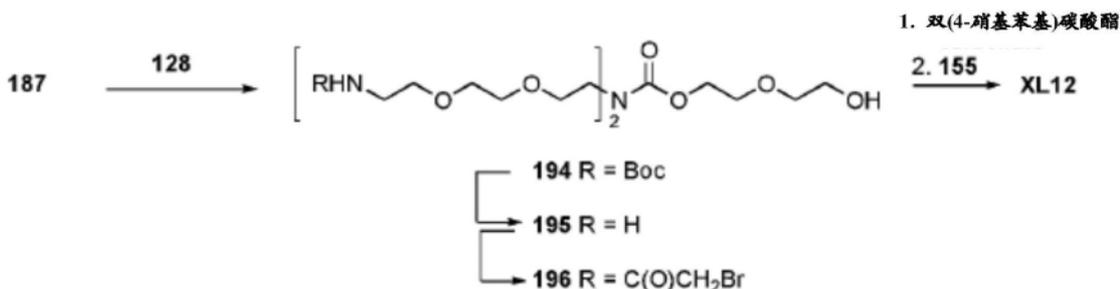
[0488] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) 6.09-5.87 (m, 2H), 4.31-4.19 (m, 6H), 3.76-3.50 (m, 50H), 3.40-3.29 (m, 4H), 2.38-2.16 (m, 12H), 1.66-1.47 (m, 4H), 1.40 (五重峰, J = 8.0Hz, 2H), 1.04-0.94 (m, 4H)。

[0489] 实施例49. 191的合成

[0490] 向190 (101mg, 0.085mmol) 在DCM (2.0mL) 中的溶液中加入双(4-硝基苯基)碳酸酯 (39mg, 0.127mmol) 和Et<sub>3</sub>N (36μL, 0.25mmol)。在室温下搅拌42小时后, 将粗混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (A. 0% → 25% EtOAc 的DCM溶液 (直到对硝基苯酚被洗脱), 然后为梯度B. 0% → 12% MeOH 的DCM溶液) 纯化。得到191, 为透明油状 (49mg, 0.036mmol, 42%)。  
LCMS (ESI+) 计算C<sub>58</sub>H<sub>91</sub>N<sub>6</sub>O<sub>26</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1352.50, 实测值1352.78。

[0491] 实施例50. XL11的合成

[0492] 向191 (7mg, 0.0059mmol) 在无水DMF (130μL) 中的溶液中加入Et<sub>3</sub>N (2.2μL, 0.015mmol) 和TCO-胺盐酸盐 (Broadpharm) (1.8mg, 0.0068mmol)。在室温下搅拌19小时后, 将粗混合物通过硅胶快速柱色谱法 (0% → 15% MeOH 的DCM溶液) 纯化, 得到XL11, 为透明油状 (1.5mg, 0.001mmol, 17%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>64</sub>H<sub>111</sub>N<sub>8</sub>O<sub>25</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 1456.73, 实测值1456.81。



[0494] 实施例51. 194的合成

[0495] 向可获得的187 (638mg, 1.33mmol) 在DCM (8.0mL) 中的溶液中加入128 (470mg, 1.73mmol)、Et<sub>3</sub>N (556.0μL, 4.0mmol) 和1-羟基苯并三唑 (179.0mg, 1.33mmol)。在环境温度下搅拌41小时后,将混合物真空浓缩并重新溶解在MeCN (10mL) 中,然后加入0.1M NaOH水溶液 (10mL) 和固体NaOH颗粒 (100.0mg)。1.5小时后,加入DCM (20mL) 并将所需化合物萃取四次。将有机层真空浓缩,残余物通过硅胶快速柱色谱法 (0%→12% MeOH的DCM溶液) 纯化,得到194,为透明黄色油状 (733mg, 1.19mmol, 90%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.29-4.23 (m, 2H), 3.77-3.68 (m, 4H), 3.65-3.56 (m, 14H), 3.56-3.49 (m, 8H), 3.37-3.24 (m, 4H), 1.45 (s, 18H)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>27</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 612.73, 实测值612.55。

[0496] 实施例52. 195的合成

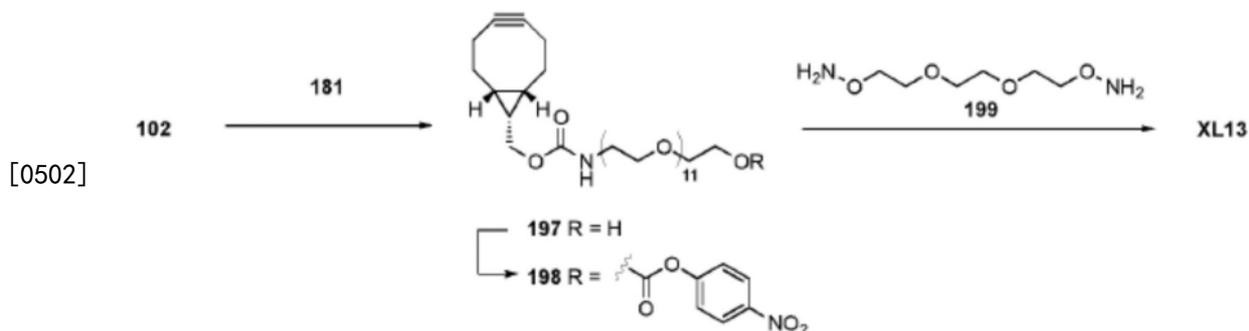
[0497] 向194 (31.8mg, 0.052mmol) 在DCM (1.0mL) 中的溶液加入二恶烷 (0.4mL) 中的4.0M HCl。在环境温度下搅拌2.5小时后,将反应混合物真空浓缩并在其间重新溶解在DCM (2mL) 中并浓缩。以定量产率得到化合物195,为透明油状。LCMS (ESI+) 计算C<sub>17</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 412.50, 实测值412.45。

[0498] 实施例53. 196的合成

[0499] 向195 (21.4mg, 0.052mmol) 在DCM (1.0mL) 中的冷却溶液 (0℃) 中加入Et<sub>3</sub>N (36μL, 0.26mmol) 和2-溴乙酰溴 (10.5μL, 0.12mmol)。在冰上搅拌10分钟后,移除冰浴并加入0.1M NaOH水溶液 (0.8mL)。在室温下搅拌20分钟后,用DCM (2×5mL) 萃取水层。将有机层合并并真空浓缩。将粗棕色油状物通过硅胶快速柱色谱法 (0%→18% MeOH的DCM溶液) 纯化,得到196,为透明油状 (6.9mg, 0.011mmol, 20%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 654.36, 实测值654.29。

[0500] 实施例54. XL12的合成

[0501] 向196 (6.9mg, 0.011mmol) 在DCM (0.8mL) 中的溶液中加入双(4-硝基苯基)碳酸酯 (3.8mg, 0.012mmol) 和Et<sub>3</sub>N (5μL, 0.03mmol)。在室温下搅拌18小时后,加入溶解在DCM (0.5mL) 中的155 (BCN-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 3.3mg, 0.01mmol)。再搅拌2小时后,将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (梯度:A. 0%→30% EtOAc的DCM溶液 (直到对硝基苯酚被洗脱), 然后为梯度B. 0%→20% MeOH的DCM溶液) 纯化。得到XL12,为透明油状 (1.0mg, 0.001mmol, 9%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>39</sub>H<sub>66</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1004.77, 实测值1004.51。



[0503] 实施例55. 197的合成

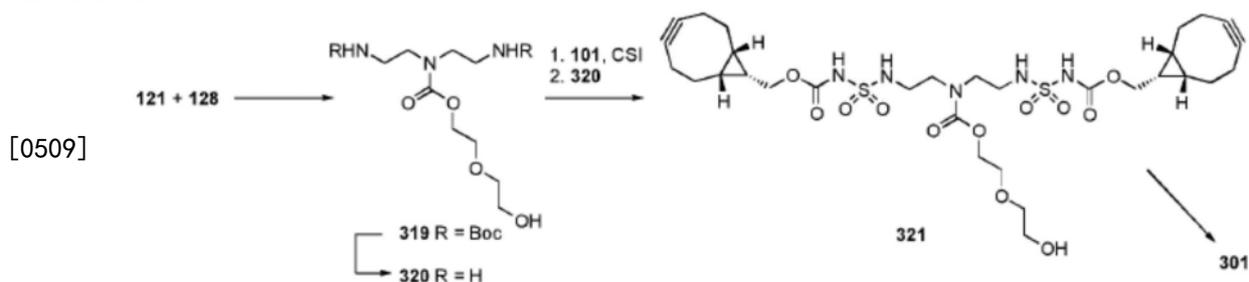
[0504] 向102 (204mg, 0.647mmol) 在DCM (20mL) 中的溶液中加入181 (496mg, 0.909mmol) 和  $\text{Et}_3\text{N}$  (350 $\mu\text{L}$ , 2.27mmol)。在室温下搅拌19小时后, 将溶剂真空浓缩, 残余物通过硅胶快速柱色谱法 (2 $\rightarrow$ 20% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物197, 为黄色油状, 产率为87% (410mg, 0.567mmol)。LCMS (ESI+) 计算  $\text{C}_{35}\text{H}_{63}\text{NO}_{14}\text{Na}^+$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) 744.86, 实测值744.43。

[0505] 实施例56. 198的合成

[0506] 向197 (410mg, 0.567mmol) 和4-硝基苯基氯甲酸酯 (172mg, 0.853mmol) 在DCM (6mL) 中的溶液中加入  $\text{Et}_3\text{N}$  (260 $\mu\text{L}$ , 1.88mmol)。在室温下搅拌18小时后, 将溶剂真空浓缩, 残余物通过硅胶快速柱色谱法 (0 $\rightarrow$ 7% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物198, 为透明油状, 产率为70% (350mg, 0.394mmol)。LCMS (ESI+) 计算  $\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{N}_2\text{O}_{18}\text{Na}^+$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) 909.96, 实测值909.61。

[0507] 实施例57. XL13的合成

[0508] 向198 (44.2mg, 0.05mmol) 在DCM (5mL) 中的溶液中加入199 (双-氨基氧基-PEG<sub>2</sub>, 33.3mg, 0.18mmol) 和  $\text{Et}_3\text{N}$  (11 $\mu\text{L}$ , 0.07mmol)。在室温下搅拌67小时后, 将混合物真空浓缩并通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu\text{m}$  OBD, 30 $\times$ 100mm, 5% $\rightarrow$ 90% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1% 乙酸) 溶液) 纯化。得到产物XL13, 为透明油状 (8.1mg, 0.0087 $\mu\text{mol}$ , 17%)。LCMS (ESI+) 计算  $\text{C}_{42}\text{H}_{78}\text{N}_3\text{O}_{19}^+$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) 929.08, 实测值928.79。



[0510] 实施例58. 319的合成

[0511] 向化合物121 (442mg, 1.46mmol) 在DCM (1mL) 和DMF (200 $\mu\text{L}$ ) 中的溶液中加入化合物128在DCM (1mL) 中的溶液和三乙胺 (609 $\mu\text{L}$ , 4.37mmol)。将混合物搅拌16小时后, 真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法 (50% $\rightarrow$ 100% EtOAc的庚烷溶液) 纯化, 得到319 (316mg), 将其通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu\text{m}$  OBD, 30 $\times$ 100mm, 5% $\rightarrow$ 90% MeCN (1% AcOH) 的水 (1% AcOH) 溶液)。得到产物319, 产率为17%, 为无色油状 (110mg, 0.25mmol)。LCMS (ESI+) 计算  $\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{NaO}_8^+$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) 458.25, 实测值458.33。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 5.41-4.89 (m, 2H), 4.31-4.24 (m, 2H), 3.78-3.68 (m, 4H), 3.65-3.59 (m, 2H), 3.44-3.34 (m, 4H), 3.34-3.19

(m, 4H), 1.43 (s, 18H)。

[0512] 实施例59. 320的合成

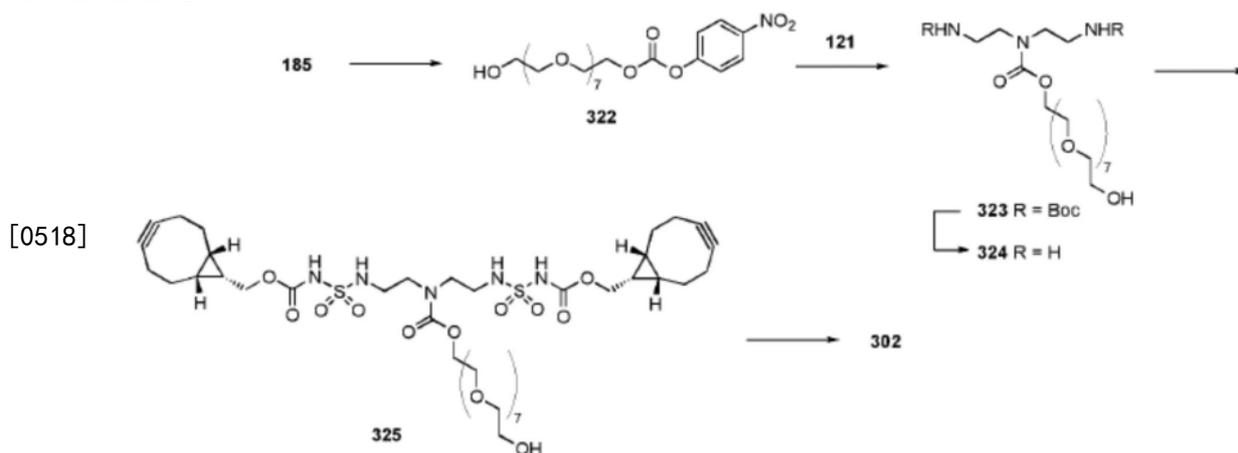
[0513] 将化合物319 (107mg, 0.25mmol) 溶解在DCM (1mL) 中。然后加入二噁烷中的4M HCl (300 $\mu$ L, 1.2mmol, 4.8当量)。将混合物搅拌15小时后, 将其从沉淀中倾倒入并将沉淀用DCM (2mL) 洗涤一次。以定量产率得到产物320, 为白色粘性固体 (89.9mg, 0.29mmol)。其直接用于下一步。

[0514] 实施例60. 321的合成

[0515] 向101 (75mg, 0.50mmol, 2当量) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入CSI (41 $\mu$ L, 0.48mmol, 1.9当量)。搅拌6分钟后, 加入三乙胺 (139 $\mu$ L, 1.0mmol, 4当量)。通过加入DMF (200 $\mu$ L) 和DCM (2mL), 然后加入三乙胺 (139 $\mu$ L, 0.75mmol, 3当量) 来制备320的储备溶液。将部分这种320的储备溶液 (32 $\mu$ L, 0.25mmol) 加入到含有CSI的原始反应混合物中。将混合物搅拌16小时后, 真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法 (0%  $\rightarrow$  10% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到产物321, 产率为3%, 为无色油状 (11mg, 14.2 $\mu$ mol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{31}H_{48}N_5O_{12}S_2^+$  ((M+H<sup>+</sup>) 746.27, 实测值 746.96。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) 6.36-5.94 (m, 2H), 4.38-4.17 (m, 6H), 3.84-3.79 (m, 2H), 3.77-3.72 (m, 2H), 3.68-3.63 (m, 2H), 3.54-3.45 (m, 4H), 3.39-3.27 (m, 4H), 2.38-2.16 (m, 12H), 1.67-1.47 (m, 5H), 1.40 (五重峰, J=8.0Hz, 2H), 1.05-0.93 (m, 4H)。

[0516] 实施例61. 301 (LD01) 的合成

[0517] 向321 (10.6mg, 14.2 $\mu$ mol) 在DCM (100 $\mu$ L) 中的溶液中加入双(4-硝基苯基)碳酸酯 (4.3mg, 14.2 $\mu$ mol, 1.0当量) 和三乙胺 (5.9 $\mu$ L, 42.6 $\mu$ mol, 3.0当量)。搅拌66小时后, 用vc-PABC-MMAE.TFA在DMF中的储备溶液 (200 $\mu$ L, 50mg/mL) 和额外量的三乙胺 (5.9 $\mu$ L, 42.6 $\mu$ mol, 3.0当量) 处理该混合物的一部分。24小时后, 部分真空浓缩。残余物通过RP HPLC (柱 Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, 5%  $\rightarrow$  90% MeCN (1% AcOH) 的水 (1% AcOH) 溶液) 纯化。得到化合物301, 产率为28%, 为薄膜状 (3.4mg, 1.9 $\mu$ mol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{90}H_{140}N_{15}O_{25}S_2^+$  ((M+H<sup>+</sup>) 1894.96, 实测值 1895.00。



[0519] 实施例62. 322的合成

[0520] 向185 (八乙二醇) 在DCM (10mL) 中的溶液中加入三乙胺 (1.0mL, 7.24mmol; 2.5当量), 然后在28分钟内逐滴加入4-硝基苯基氯甲酸酯 (0.58g; 2.90mmol; 1当量) 在DCM (5mL) 中的溶液。将混合物搅拌90分钟后, 真空浓缩。通过硅胶柱色谱法 (75%  $\rightarrow$  0% EtOAc的DCM溶液, 然后为0%  $\rightarrow$  7% MeOH的DCM溶液) 纯化残余物。得到产物322, 产率为38%, 为无色油状

(584.6mg; 1.09mmol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{23}H_{38}NO_{13}^+$  (M+H<sup>+</sup>) 536.23, 实测值536.93。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.28 (d, J=12.0Hz, 2H), 7.40 (d, J=12.0Hz, 2H), 4.47-4.42 (m, 2H), 3.84-3.79 (m, 2H), 3.75-3.63 (m, 26H), 3.63-3.59 (m, 2H), 2.70-2.55 (br. s, 1H)。

[0521] 实施例63. 323的合成

[0522] 向化合物121 (127mg, 0.42mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入部分 (0.5mL; 0.54mmol, 1.3当量) 制备的322的储备溶液 (DCM (1mL) 中584mg)。然后加入三乙胺 (176μL, 1.26mmol; 3当量) 和HOBt (57mg; 0.42mmol; 1当量)。将混合物搅拌4.5天后, 真空浓缩。将残余物溶解在乙腈 (4.2mL) 和0.1N NaOH (4.2mL, 1当量) 的混合物中。将混合物搅拌24小时后, 加入额外的固体NaOH (104.5mg)。将混合物再搅拌5小时后, 混合物用DCM (2×10mL) 萃取。将合并的有机层真空浓缩并将残余物通过硅胶柱色谱法 (0%→15% MeOH的DCM溶液) 纯化。得到产物323, 产率为54%, 为淡黄色油状 (164.5mg, 0.23mmol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{26}H_{54}N_3O_{12}^+$  (M-BOC<sup>+</sup>) 600.36, 实测值600.49。<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.27-5.05 (m, 2H), 4.26-4.21 (m, 2H), 3.76-3.59 (m, 30H), 3.43-3.33 (m, 4H), 3.33-3.22 (m, 4H), 1.43 (s, 18H)。

[0523] 实施例64. 324的合成

[0524] 将化合物323 (164mg, 0.23mmol) 溶解在DCM (1mL) 中。然后加入二噁烷中的4M HCl (293μL, 1.17mmol, 5当量)。将混合物搅拌18小时后, 加入额外的二噁烷中的4M HCl溶液 (293μL, 1.17mmol, 5当量)。将混合物再搅拌5小时后, 将混合物真空浓缩。以定量产率得到产物324, 为白色粘性固体 (132mg, 0.23mmol)。其直接用于下一步。

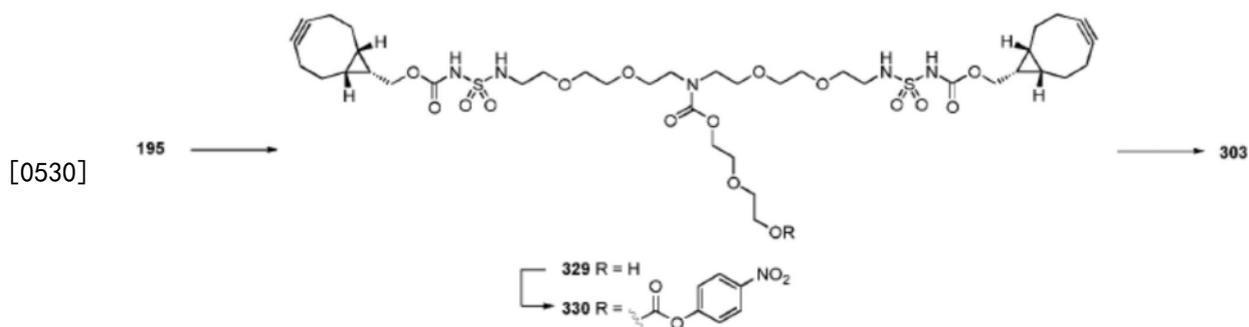
[0525] 实施例65. 325的合成

[0526] 向101 (81mg, 0.54mmol, 2.3当量) 在DCM (2mL) 中的溶液中加入CSI (43μL, 0.49mmol, 2.1当量)。在搅拌15分钟后加入三乙胺 (164μL, 1.17mmol, 5当量)。通过加入DCM (2mL) 和三乙胺 (164μL, 1.17mmol, 5当量) 制备324的溶液。在6分钟后将该储备溶液加入到原始反应混合物中。将混合物搅拌23小时后, 真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法 (0%→12% MeOH的DCM溶液) 纯化。得到产物325, 产率为31%, 为淡黄色油状 (73.0mg, 72.2μmol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{43}H_{72}N_5O_{18}S_2^+$  (M+H<sup>+</sup>) 1010.43, 实测值1010.50。

[0527] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 6.21-5.85 (m, 2H), 4.38-4.17 (m, 6H), 3.80-3.57 (m, 30H), 3.57-3.44 (m, 4H), 3.44-3.30 (m, 4H), 2.38-2.16 (m, 12H), 1.64-1.48 (m, 4H), 1.40 (五重峰, J=8.0Hz, 2H), 1.05-0.91 (m, 4H)。

[0528] 实施例66. 302 (LD02) 的合成

[0529] 向325 (19.5mg, 19.7μmol) 在DCM (100μL) 中的溶液中加入双 (4-硝基苯基) 碳酸酯 (6.0mg, 19.7μmol, 1.0当量) 和三乙胺 (8.2μL, 59.1μmol, 3.0当量)。搅拌66小时后, 用vc-PABC-MMAE.TFA在DMF中的储备溶液 (200μL, 50mg/mL) 和额外量的三乙胺 (8.2μL, 59.1μmol, 3.0当量) 处理该混合物的一部分。95小时后, 部分真空浓缩。残余物通过RP HPLC (柱 Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90% MeCN (1% AcOH) 的水 (1% AcOH) 溶液) 纯化。得到化合物302, 产率为9%, 为薄膜状 (3.7mg, 1.71μmol)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{102}H_{165}N_{15}O_{31}S_2^{2+}$  (M+2H<sup>+</sup>) 1080.56, 实测值1080.74。



[0531] 实施例67. 329的合成

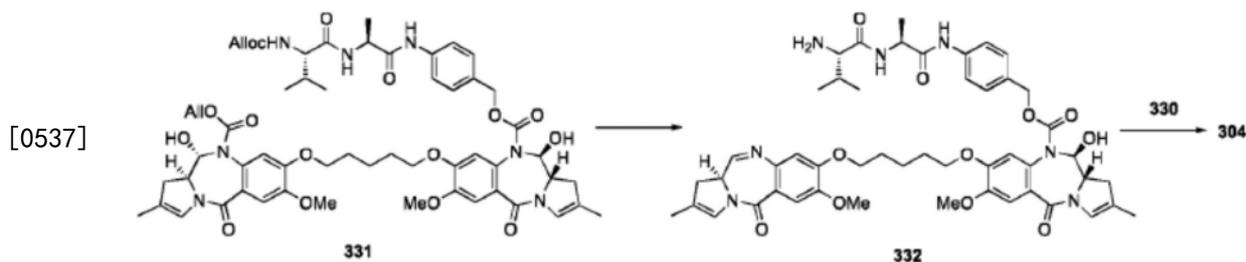
[0532] 向101 (18mg, 0.12mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入氯磺酰基异氰酸酯 (CSI)。30分钟后, 加入Et<sub>3</sub>N (37μL, 27mg, 0.27mmol)。向195 (26mg, 0.054mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入Et<sub>3</sub>N (37μL, 27mg, 0.27mmol)。将该混合物加入到反应混合物中。45分钟后, 将反应混合物浓缩并通过硅胶色谱法 (DCM至7% MeOH的DCM溶液) 纯化残余物。得到产物329, 为无色薄膜状 (27mg, 0.029mmol, 54%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>39</sub>H<sub>64</sub>N<sub>5</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 922.38, 实测值922.50。

[0533] 实施例68. 330的合成

[0534] 向329在DCM (1mL) 中的溶液中加入双(4-硝基苯基) 碳酸酯 (8.9mg, 29.3μmol) 和Et<sub>3</sub>N (12.2μL, 8.9mg, 87.9μmol)。1天后, 0.28mL用于制备化合物303。2天后, 将额外的双(4-硝基苯基) 碳酸酯 (7.0mg, 23μmol) 加入到主反应混合物中。1天后, 将反应混合物浓缩, 残余物用硅胶柱色谱法纯化。得到产物330, 为无色薄膜状 (17.5mg, 0.016mmol, 55% (76%校正))。LCMS (ESI+) 计算C<sub>46</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub><sup>2+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1087.38, 实测值1087.47。

[0535] 实施例69. 303 (LD03) 的合成

[0536] 向330的反应混合物 (0.28mL, 理论上含有8.8mg, 8.1μmol) 中加入Et<sub>3</sub>N (3.4μL, 2.5mg, 24.3μmol) 和vc-PABC-MMAE.TFA (10mg, 8.1μmol) 在DMF (200μL) 中的溶液。21小时后, 加入2,2'-(乙烯二氧) 双(乙胺) (4.7μL, 4.8mg, 32μmol)。45分钟后, 反应混合物在氮气流下浓缩。残余物通过RP-HPLC (柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 30%至90% MeCN (1% AcOH) 的水 (1% AcOH) 溶液) 纯化。得到产物303, 为无色薄膜状 (5.6mg, 2.7μmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>98</sub>H<sub>157</sub>N<sub>15</sub>O<sub>29</sub>S<sub>2</sub><sup>2+</sup> ((M+2H<sup>+</sup>)/2) 1036.53, 实测值1036.70。



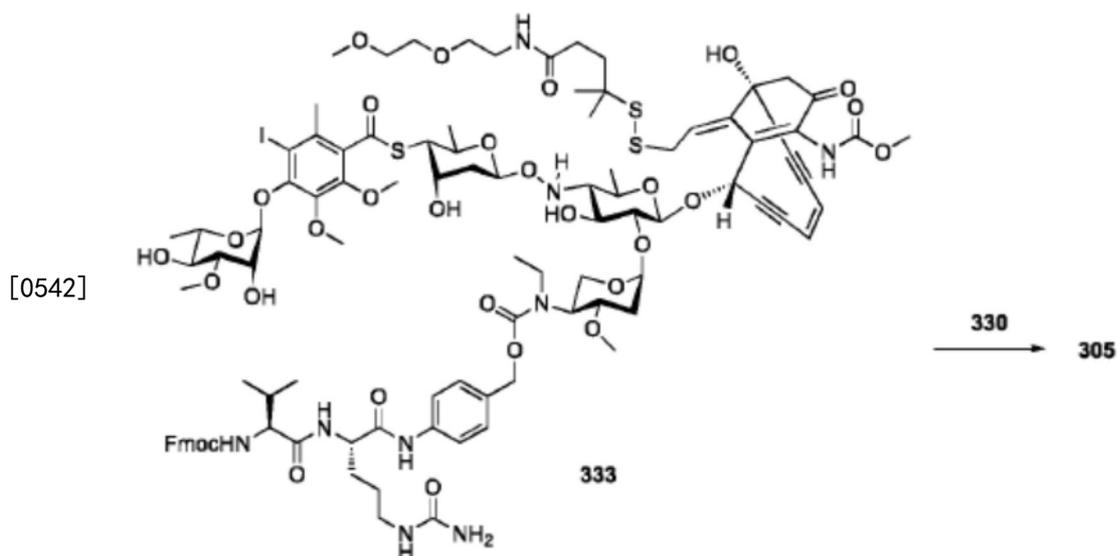
[0538] 实施例70. 332的合成

[0539] 向Alloc<sub>2</sub>-va-PABC-PBD 331 (10.0mg, 0.009mmol) 在脱气DCM (400μL, 通过DCM吹扫N<sub>2</sub> 5分钟得到) 中的溶液中加入吡咯烷 (1.9μL, 0.027mmol) 和Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1.6mg, 0.0014mmol)。在环境温度下搅拌15分钟后, 将反应混合物用DCM (10mL) 稀释并加入饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (10mL)。粗混合物用DCM (3×10mL) 萃取。合并有机层, 用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并真空浓缩。将黄色残余物重新溶解在DMF (450μL) 和MeCN (450μL) 中, 并通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有0.1%甲酸) 溶液) 纯

化。通过SPE柱(PL-HCO<sub>3</sub> MP, 500mg/6mL)中和纯组分,浓缩并与MeCN(2×5mL)共蒸发,得到白色固体332(4.8mg, 0.005mmol, 58%)。LCMS(ESI+) 计算C<sub>49</sub>H<sub>60</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup>(M+H<sup>+</sup>) 923.04, 实测值923.61。

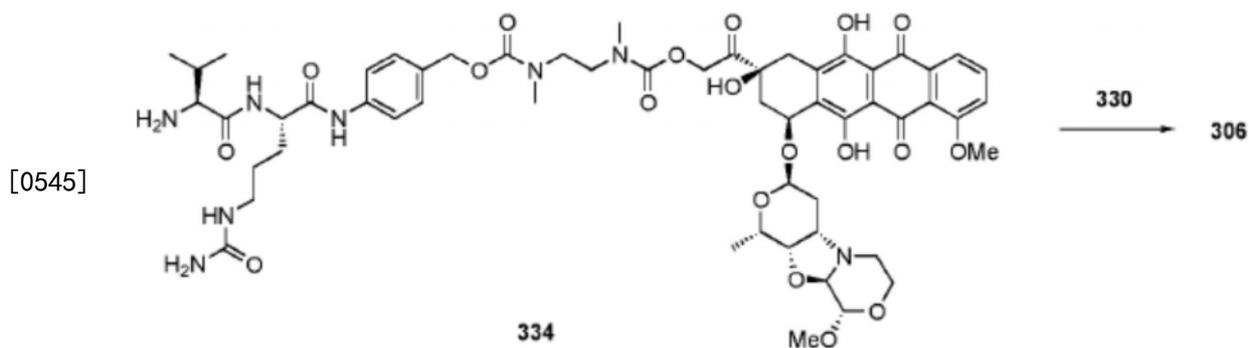
[0540] 实施例71. 304(LD04)的合成

[0541] 向332(4.8mg, 0.005mmol)在无水脱气DMF(60μL, 通过DCM吹扫N<sub>2</sub> 5分钟得到)中的溶液中加入330(10mg, 0.009mmol, 溶于48μL无水脱气DMF)、Et<sub>3</sub>N(3.6μL, 0.026mmol)和HOBt(无水脱气DMF储备溶液, 5.1μL, 0.35mg, 0.0026mmol, 0.5当量)。在环境温度下在黑暗中搅拌41小时后,粗反应混合物用DCM(300μL)稀释并通过硅胶快速柱色谱法(0%→12%MeOH的DCM溶液)纯化,得到304,为透明黄色油状(4.0mg, 0.0021mmol, 41%)。LCMS(ESI+) 计算C<sub>89</sub>H<sub>121</sub>N<sub>12</sub>O<sub>28</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>(M+H<sup>+</sup>) 1871.11, 实测值1871.09。



[0543] 实施例72. 305(LD05)的合成

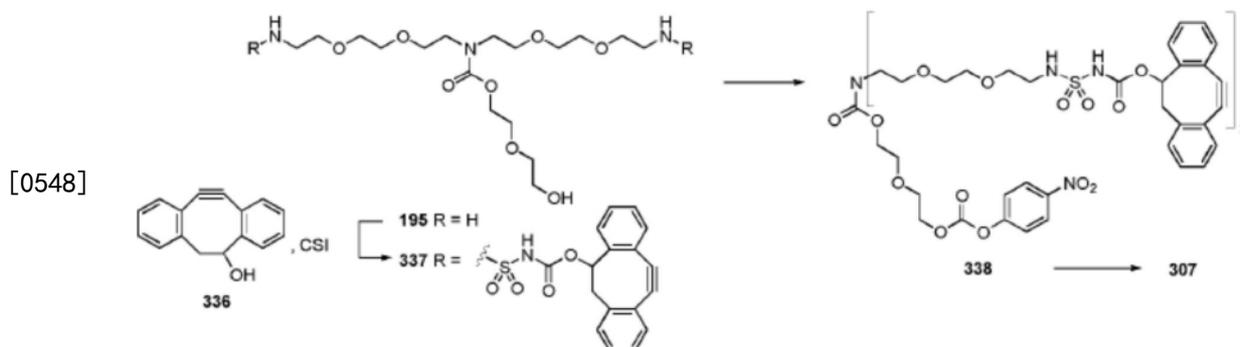
[0544] 向333(2.9mg, 0.0013mmol) (根据W20191 10725A1, 实施例5-5制备, 通过引用纳入本文)在无水DMF(60μL)中的溶液中加入330(1.45mg, 0.0013mmol)和Et<sub>3</sub>N(1.2μL, 0.023mmol)。在室温下搅拌48小时后,将反应混合物用DMF(500μL)稀释并通过RP HPLC(柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 30%→100%MeCN的H<sub>2</sub>O(均含有1%乙酸)溶液)纯化。得到产物305,为无色薄膜状(0.6mg, 0.207μmol, 16%)。LCMS(ESI+) 计算C<sub>124</sub>H<sub>182</sub>N<sub>14</sub>O<sub>46</sub>S<sub>5</sub><sup>+</sup>(M/2+H<sup>+</sup>) 1447.03, 实测值1447.19。



[0546] 实施例73. 306(LD06)的合成

[0547] 向330(7mg, 0.006mmol)在无水DMF(150μL)中的溶液中加入vcPABC-DMEA-PNU

(334) 在无水DMF (125 $\mu$ L, 5.7mg, 0.005mmol) 中的储备溶液和Et<sub>3</sub>N (2 $\mu$ L, 0.015mmol) 中。在室温下搅拌25小时后, 将反应混合物用DCM (0.3mL) 稀释并通过硅胶快速柱色谱法 (0% $\rightarrow$ 20% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到306, 为红色薄膜状 (5mg, 0.0024mmol, 47%)。LCMS (ESI+) 计算 C<sub>96</sub>H<sub>133</sub>N<sub>13</sub>O<sub>36</sub>S<sub>3</sub><sup>+</sup> (M/2+H<sup>+</sup>) 1055.64, 实测值1055.50。



[0549] 实施例74. 337的合成

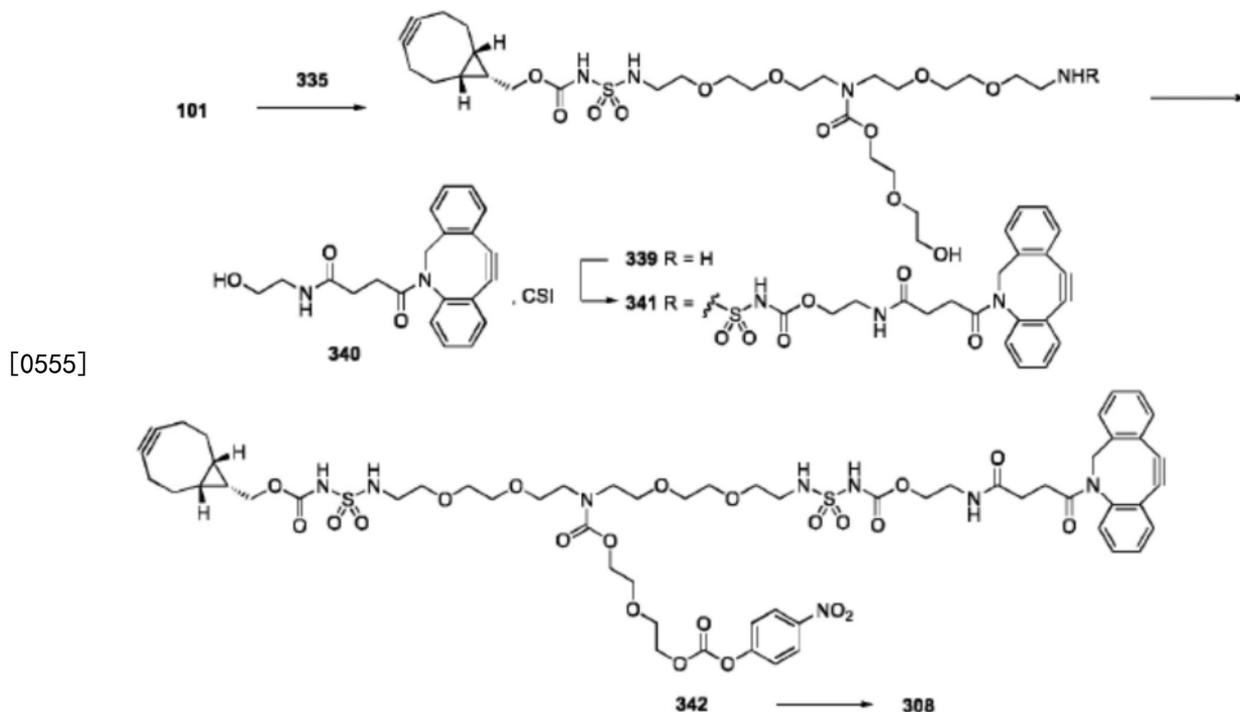
[0550] 将化合物336 (DIBO, 95mg, 0.43mmol) 溶解在DCM (1.0mL) 中, 在室温下加入异氰酸氯磺酰酯 (33.0 $\mu$ L, 0.37mmol), 2分钟后形成不溶物。在室温下再搅拌15分钟后, 加入Et<sub>3</sub>N (120.0 $\mu$ L, 0.85mmol), 所有不溶物消失, 并加入溶解在DCM (1.0mL) 和Et<sub>3</sub>N (120.0 $\mu$ L, 0.85mmol) 中的195 (71mg, 0.0171)。在室温下搅拌16小时后, 将粗混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0% $\rightarrow$ 15% MeOH的DCM溶液) 纯化, 然后与EtOAc (2 $\times$ ) 共蒸发以完全去除MeOH。得到产物337, 为蜡状白色固体 (136.0mg, 0.12mmol, 75%)。LCMS (ESI+) 计算 C<sub>51</sub>H<sub>63</sub>N<sub>6</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 1080.21, 实测值1080.59。

[0551] 实施例75. 338的合成

[0552] 向337 (136.0mg, 0.12mmol) 在DCM (2.0mL) 中的溶液中加入双 (4-硝基苯基) 碳酸酯 (47.0mg, 0.15mmol) 和Et<sub>3</sub>N (54.0 $\mu$ L, 0.38mmol)。在室温下搅拌18小时后, 将粗混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (梯度: A. 0% $\rightarrow$ 35% EtOAc的DCM溶液 (直到对硝基苯酚被洗脱), 然后为梯度B. 0% $\rightarrow$ 13% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到338, 为淡黄色油状物 (89.0mg, 0.07mmol, 60%)。LCMS (ESI+) 计算 C<sub>48</sub>H<sub>66</sub>N<sub>7</sub>O<sub>20</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 1245.31, 实测值1245.64。

[0553] 实施例76. 307 (LD07) 的合成

[0554] 向338 (6.95mg, 0.005mmol) 在无水DMF (93.0 $\mu$ L) 中的溶液中加入Et<sub>3</sub>N (2.4 $\mu$ L, 0.017mmol) 和vc-PABC-MMAE.TFA (Levena Bioscience) 在无水DMF (70 $\mu$ L, 7.0mg, 0.005mmol) 中的储备溶液。在室温下搅拌18小时后, 加入DMF (450 $\mu$ L), 粗混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, 30% $\rightarrow$ 100% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1% 乙酸) 溶液) 纯化。得到产物307, 为无色薄膜状 (4.5mg, 0.002mmol, 36%)。LCMS (ESI+) 计算 C<sub>110</sub>H<sub>152</sub>N<sub>15</sub>O<sub>29</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M/2+H<sup>+</sup>) 1106.30, 实测值1106.79。



[0556] 实施例77. 341的合成

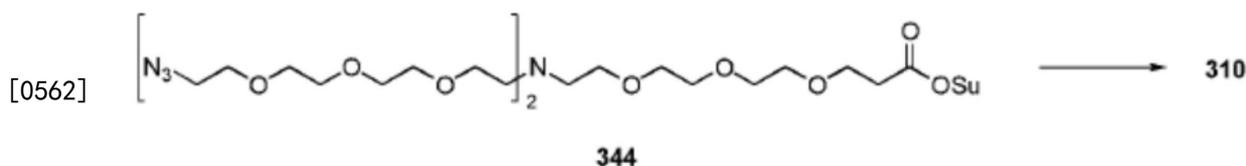
[0557] 将化合物101 (16.3mg, 0.10mmol) 溶解在DCM (0.8mL) 中并在室温下加入氯磺酰基异氰酸酯 (8.6μL, 0.099mmol)。在室温下搅拌15分钟后,加入Et<sub>3</sub>N (69.0μL, 0.49mmol), 然后加入溶解在DCM (1.0mL) 和Et<sub>3</sub>N (69.0μL, 0.49mmol) 中的335 (40mg, 0.099mmol)。将该混合物在室温下搅拌1.5小时 (混合物1), 得到粗产物339。在另一个小瓶中, 将340 (DBC0-C<sub>2</sub>-OH, Broadpharm) (34.0mg, 0.099mmol) 在室温下溶解在DCM (0.8mL) 中, 并加入氯磺酰基异氰酸酯 (7.75μL, 0.089mmol)。在室温下搅拌15分钟后, 加入Et<sub>3</sub>N (69.0μL, 0.49mmol), 然后加入粗品339。在室温下再搅拌2小时后, 将反应混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0% → 15% MeOH的DCM溶液) 纯化, 然后与EtOAc (2×) 共蒸发以完全去除MeOH。得到产物341, 为透明黄色油状 (20.0mg, 0.017mmol, 17%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>50</sub>H<sub>70</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1121.26, 实测值1121.59。

[0558] 实施例78. 342的合成

[0559] 向341 (20.0mg, 0.17mmol) 在DCM (1.0mL) 中的溶液中加入双 (4-硝基苯基) 碳酸酯 (5.6mg, 0.019mmol) 和Et<sub>3</sub>N (7.5μL, 0.053mmol)。在室温下搅拌40小时, 将粗混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (梯度A. 0% → 30% EtOAc的DCM溶液 (直到对硝基苯酚被洗脱), 然后为梯度B. 0% → 20% MeOH的DCM溶液) 纯化。得到342, 为澄清淡黄色油状 (6.9mg, 0.005mmol, 30%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>57</sub>H<sub>73</sub>N<sub>8</sub>O<sub>22</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1286.36, 实测值1286.57。

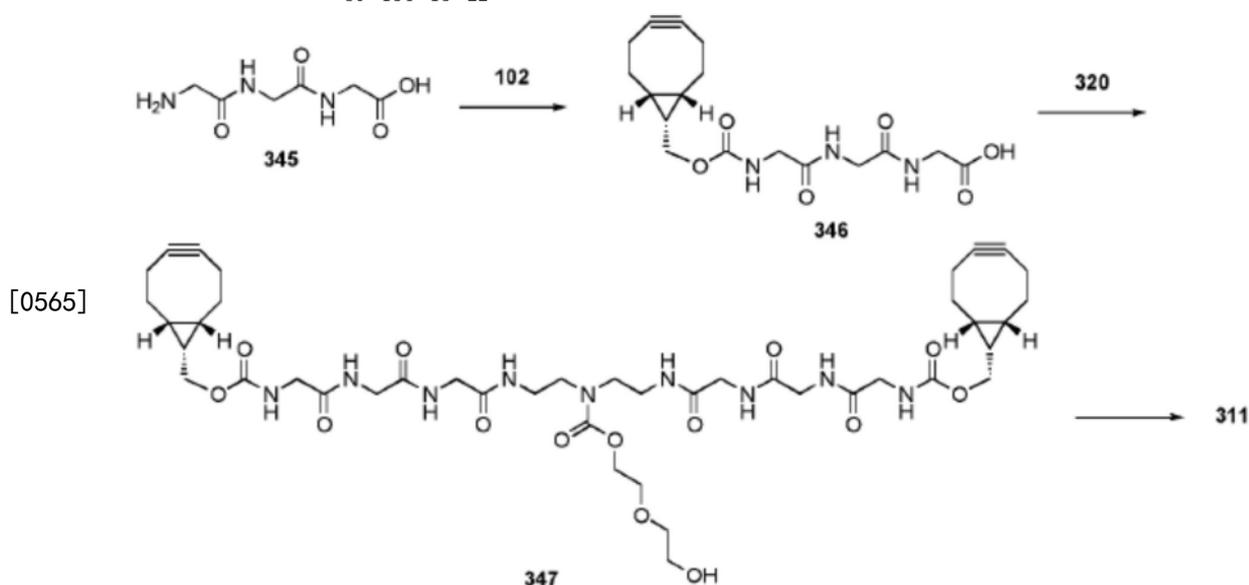
[0560] 实施例79. 308 (LD08) 的合成

[0561] 向342 (3.6mg, 0.0028mmol) 在无水DMF (35.0μL) 中的溶液中加入Et<sub>3</sub>N (1.2μL, 0.008mmol) 和vc-PABC-MMAE.TFA (Levena Bioscience) 在无水DMF (34μL, 3.4mg, 0.0028mmol) 中的储备溶液。在室温下搅拌27小时后, 加入DCM (400μL), 粗混合物通过硅胶快速柱色谱法纯化 (0% → 30% MeOH的DCM溶液), 得到308, 为无色薄膜状 (3.7mg, 0.0016mmol, 58%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>109</sub>H<sub>161</sub>N<sub>17</sub>O<sub>31</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> (M/2+H<sup>+</sup>) 1135.84, 实测值1135.73。



[0563] 实施例80. 310 (LD10) 的合成

[0564] 向含有344 (4.3mg, 6.0 $\mu$ mol, 1.7当量) 的Eppendorf小瓶中加入DMF (4.00mg, 100 $\mu$ L, 34.31毫摩尔, 3.43 $\mu$ mol, 1.0当量) 中的vc-PABC-MMAF.TFA盐, 然后加入三乙胺 (1.43 $\mu$ L, 10.3 $\mu$ mol, 3.0当量)。混合混合物并将所得无色溶液在室温下放置约3小时。然后将反应混合物直接通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, 30% $\rightarrow$ 90%MeCN (1% AcOH) 的水 (1% AcOH) 溶液) 纯化。得到所需产物310, 为无色残渣 (4.5mg, 2.7 $\mu$ mol, 产率为79%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>80</sub>H<sub>134</sub>N<sub>15</sub>O<sub>22</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 1656.98, 实测值1657.03。



[0566] 实施例81. 346的合成

[0567] 向含有102 (54.7mg, 1.00当量, 173 $\mu$ mol) 和345 (三甘氨酸, 28.8mg, 0.878当量, 152 $\mu$ mol) 的Eppendorf小瓶中加入无水DMF (250 $\mu$ L) 和三乙胺 (52.7mg, 72.5 $\mu$ L, 3当量, 520 $\mu$ mol)。将得到的黄色悬浮液在室温下搅拌21小时, 然后将50 $\mu$ L H<sub>2</sub>O加入到RM中。将反应混合物在室温下再搅拌一天, 然后加入额外的H<sub>2</sub>O (200 $\mu$ L) 并将反应混合物在室温下再搅拌3天。接下来, 加入MeCN (大约0.5mL) 和额外的Et<sub>3</sub>N (约10滴), 并将所得悬浮液在室温下搅拌1小时, 然后真空浓缩。将黄色残余物溶解在DMF (600 $\mu$ L) 中并将所得黄色悬浮液通过膜过滤器过滤。用200 $\mu$ L额外的DMF洗涤膜过滤器, 合并的滤液直接通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, 30% $\rightarrow$ 90%MeCN (1% AcOH) 的水 (1% AcOH) 溶液) 纯化。得到所需产物346, 为棕色油状 (41.5mg, 114 $\mu$ mol, 产率为66%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>43</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 366.17, 实测值366.27。

[0568] 实施例82. 347的合成

[0569] 向346 (21.6mg, 0.056mmol) 在无水DMF (0.3mL) 中的溶液中加入DIPEA (30 $\mu$ L, 0.171mmol) 和HATU (21.6mg, 0.056mmol)。在室温下搅拌10分钟后, 加入溶解在DCM (310 $\mu$ L) 中的320 (7.37mg, 0.031mmol)。在室温下搅拌24小时后, 混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, 30% $\rightarrow$ 100%MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1% AcOH) 溶液) 纯化。得到

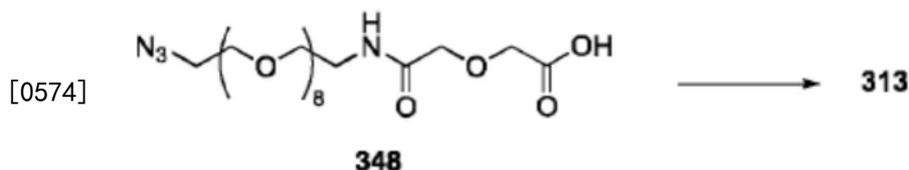
产物347,为灰白色油状(5.2mg,0.005mmol,20%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{43}H_{64}N_9O_{14}^+$  ( $M+H^+$ ) 931.02,实测值931.68。

[0570] 实施例83. 311 (LD13) 的合成

[0571] 向347(5.2mg,0.0056mmol) 在无水DMF(200 $\mu$ L) 中的溶液中加入双(4-硝基苯基)碳酸酯(1.9mg,0.006mmol) 和 $Et_3N$ (2.4 $\mu$ L,0.016mmol)。在室温下搅拌27小时后,加入vc-PABC-MMAE.TFA (Levena Bioscience) (66 $\mu$ L,6.6mg,0.0053mmol) 和 $Et_3N$ (2 $\mu$ L,0.014mmol) 的储备溶液。在室温下再搅拌17小时后,将粗混合物用DMF(250 $\mu$ L) 稀释并通过RP HPLC(柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD,30 $\times$ 100mm,5%*rep* C18 5% $\rightarrow$ 90%MeCN的的 $H_2O$ (均含有1% AcOH) 溶液) 纯化。得到产物311,为透明油状(0.6mg,0.28 $\mu$ mol,5%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{102}H_{156}N_{19}O_{27}^+$  ( $M/2+H^+$ ) 1040.71,实测值1040.85。

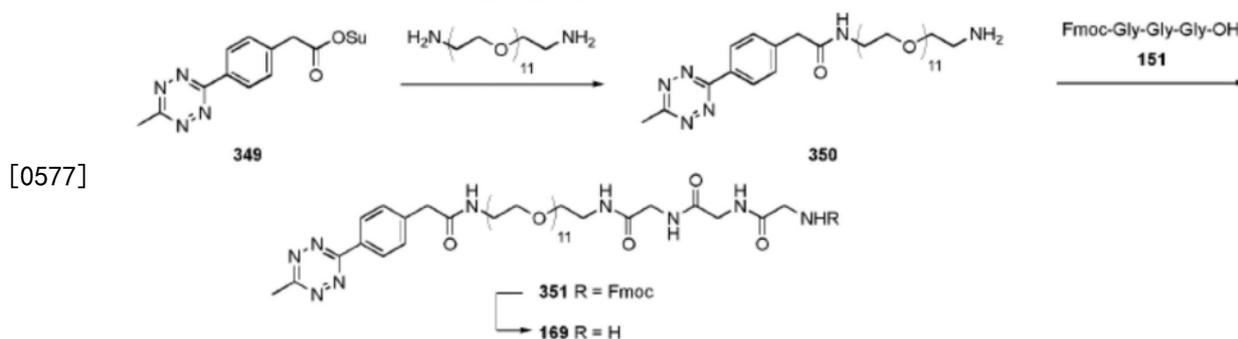
[0572] 实施例84. 312 (LD11) 的合成

[0573] 化合物312 (LD11) 根据Verkade等人,Antibodies 2018,7,doi:10.3390/antib7010012(通过引用纳入本文) 描述的方法制备。



[0575] 实施例85. 313 (LD12) 的合成

[0576] 向含有348(2.7mg,1.1当量,4.9 $\mu$ mol) 的小瓶中加入DMF(60 $\mu$ L) 和纯三乙胺(1.9 $\mu$ L,3当量,13 $\mu$ mol)。接下来,加入HBTU在干燥DMF(2.0mg,11 $\mu$ L,472毫摩尔,1.2当量,5.3 $\mu$ mol) 中的溶液并将混合物混合。将反应混合物在室温下放置30分钟,然后加入va-PABC-MMAF.TFA盐(5.2mg,0.13mL,34.31mmol,1当量,4.4 $\mu$ mol)。将所得混合物混合并在室温下放置110分钟,然后直接通过RP HPLC(柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD,30 $\times$ 100mm,30% $\rightarrow$ 90% MeCN(1% AcOH) 的水(1% AcOH) 溶液) 纯化。得到所需产物313,为无色油状(1.8mg,1.1 $\mu$ mol,产率为26%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{77}H_{127}N_{12}O_{23}^+$  ( $M+H^+$ ) 1587.91,实测值1588.05。



[0578] 实施例86. 350的合成

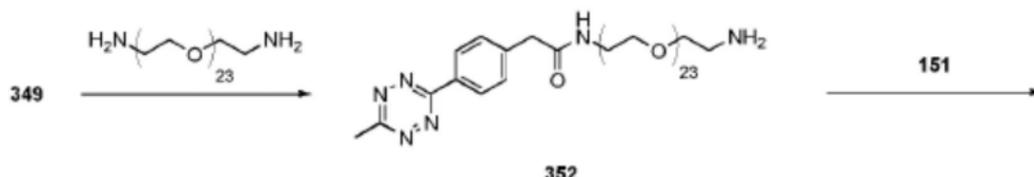
[0579] 向甲基四嗪-NHS酯349(19mg,0.057mmol) 在DCM(400 $\mu$ L) 中的溶液中加入溶解在DCM(800 $\mu$ L) 中的氨基-PEG<sub>11</sub>-胺(47mg,0.086mmol)。在室温下搅拌20分钟后,将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法(0 $\rightarrow$ 50%MeOH(0.7M  $NH_3$ ) 的DCM溶液) 纯化,得到所需化合物350,为粉红色油状(17mg,0.022mmol,39%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{35}H_{61}N_6O_{12}^+$  ( $M+H^+$ ) 757.89,实测值757.46。

[0580] 实施例87. 351的合成

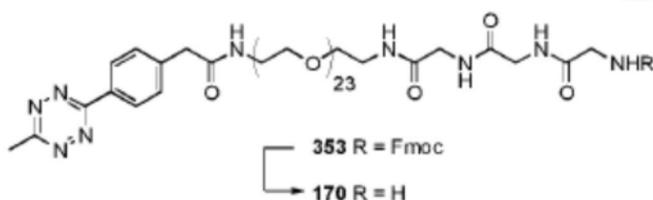
[0581] 向151 (Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH, 10mg, 0.022mmol) 在无水DMF (500 $\mu$ L) 中的搅拌溶液中加入DIPEA (11 $\mu$ L, 0.067mmol) 和HATU (8.5mg, 0.022mmol)。10分钟后, 加入溶解在无水DMF (500 $\mu$ L) 中的350 (17mg, 0.022mmol)。在室温下搅拌18.5小时后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0 $\rightarrow$ 17% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物351, 为粉红色油状 (26mg, 0.022mmol, 定量)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{56}H_{83}N_{10}O_{17}^+$  ( $M+NH_4^+$ ) 1168.32, 实测值1168.67。

[0582] 实施例88. 169的合成

[0583] 向351 (26mg, 0.022mmol) 在无水DMF (500 $\mu$ L) 中的溶液中加入二乙胺 (12 $\mu$ L, 0.11mmol)。在室温下搅拌1.5小时后, 粗混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, 5% $\rightarrow$ 90% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1% 乙酸) 溶液) 纯化。得到产物169, 为透明粉红色油状 (10.9mg, 0.011mmol, 53%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{41}H_{70}N_9O_{15}^+$  ( $M+H^+$ ) 929.05, 实测值929.61。



[0584]



[0585] 实施例89. 352的合成

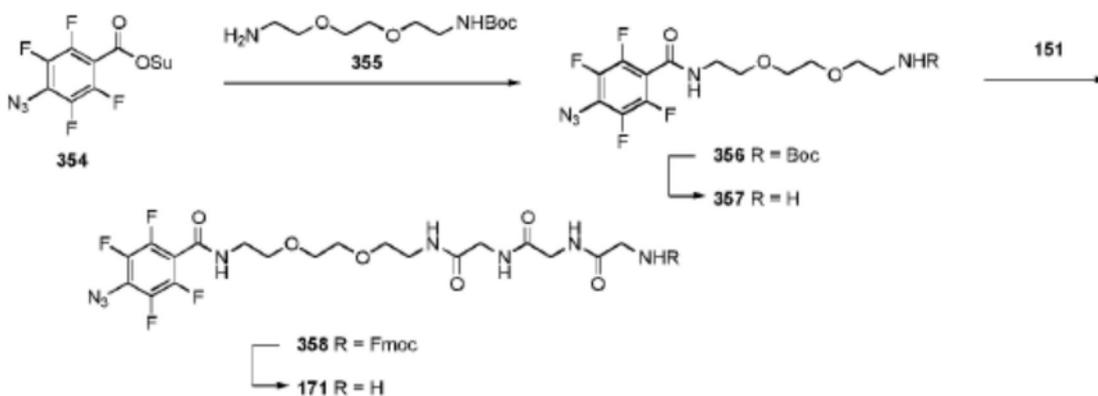
[0586] 向349 (甲基四嗪-NHS酯, 10.3mg, 0.031mmol) 在DCM (200 $\mu$ L) 中的溶液中加入溶解在DCM (200 $\mu$ L) 中的氨基-PEG23-胺 (50mg, 0.046mmol)。在室温下搅拌50分钟后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0 $\rightarrow$ 60% MeOH (0.7M NH<sub>3</sub>) 的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物352, 为粉红色油状 (17.7mg, 0.013mmol, 44%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{59}H_{109}N_6O_{24}^+$  ( $M+H^+$ ) 1286.52, 实测值1286.72。

[0587] 实施例90. 353的合成

[0588] 向151 (5.7mg, 0.013mmol) 在无水DMF (500 $\mu$ L) 中的搅拌溶液中加入DIPEA (7 $\mu$ L, 0.04mmol) 和HATU (5.3mg, 0.013mmol)。10分钟后, 加入溶解在无水DMF (500 $\mu$ L) 中的352 (17.7mg, 0.013mmol)。在室温下搅拌6小时, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0 $\rightarrow$ 18% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物353, 为粉红色油状 (21mg, 0.012mmol, 91%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{80}H_{131}N_{10}O_{29}^+$  ( $M/2+NH_4^+$ ) 857.45, 实测值857.08。

[0589] 实施例91. 170的合成

[0590] 向353 (21mg, 0.012mmol) 在无水DMF (500 $\mu$ L) 中的溶液中加入二乙胺 (6.7 $\mu$ L, 0.06mmol)。在室温下搅拌4小时后, 粗混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5 $\mu$ m OBD, 30 $\times$ 100mm, 5% $\rightarrow$ 90% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1% 乙酸) 溶液) 纯化。得到产物170, 为粉红色油状 (11.6mg, 0.008mmol, 66%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{65}H_{118}N_9O_{27}^+$  ( $M+H^+$ ) 1457.68, 实测值1457.92。



[0591]

[0592] 实施例92. 356的合成

[0593] 向354 (四氟苯基叠氮-NHS酯, 40mg, 0.12mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入355 (Boc-NH-PEG<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, 33mg, 0.13mmol) 和Et<sub>3</sub>N (50μL, 0.36mmol)。在室温下在黑暗中搅拌30分钟后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0→7% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物356, 为透明油状 (47mg, 0.10mmol, 84%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>F<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 466.41, 实测值466.23。

[0594] 实施例93. 357的合成

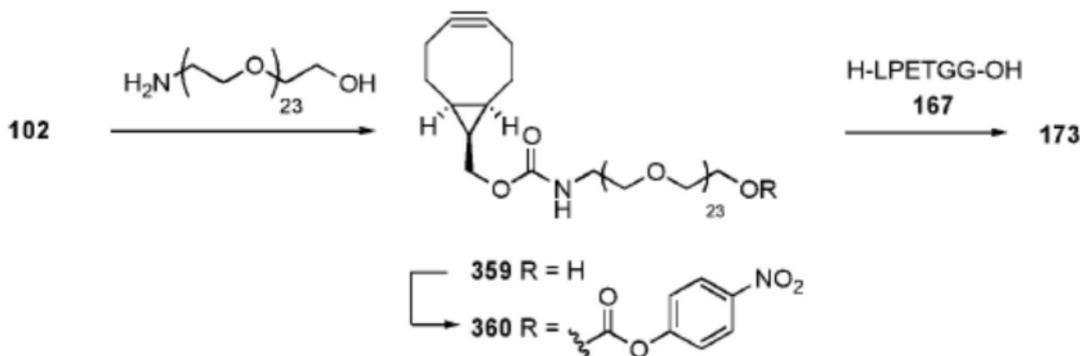
[0595] 向356 (47mg, 0.10mmol) 在DCM (2mL) 中的溶液中加入二噁烷 (300μL) 中的4.0M HCl溶液。在室温下在黑暗中搅拌17.5小时后, 将混合物浓缩并以定量产率获得357, 为白色固体 (36mg, 0.10mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>F<sub>4</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 366.29, 实测值366.20。

[0596] 实施例94. 358的合成

[0597] 向151 (Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH, 42mg, 0.10mmol) 在无水DMF (600μL) 中的搅拌溶液中加入DIPEA (50μL, 0.30mmol) 和HATU (39mg, 0.10mmol)。在黑暗中15分钟后, 加入溶解在无水DMF (500μL) 中的357 (36mg, 0.10mmol)。在室温下在黑暗中搅拌41小时后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0→20% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物358, 为透明油状 (36mg, 0.047mmol, 47%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>F<sub>4</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 759.68, 实测值759.38。

[0598] 实施例95. 171的合成

[0599] 向358 (36mg, 0.047mmol) 在无水DMF (750μL) 中的溶液中加入二乙胺 (24μL, 0.24mmol)。在室温下在黑暗中搅拌55分钟后, 将粗混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1%乙酸) 溶液) 纯化。得到产物171, 为透明油状 (18.7mg, 0.034mmol, 74%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>F<sub>4</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> (M+H<sup>+</sup>) 537.45, 实测值537.29。



[0600]

[0601] 实施例96. 359的合成

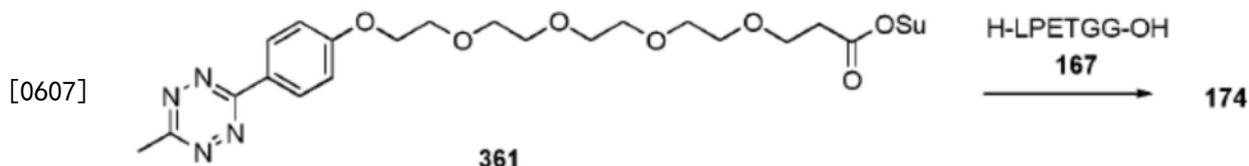
[0602] 向102 (56mg, 0.17mmol) 在DCM (8mL) 中的溶液中加入氨基-PEG<sub>24</sub>-醇 (214mg, 0.199mmol) 和Et<sub>3</sub>N (80μL, 0.53mmol)。在室温下搅拌20小时, 将溶剂真空浓缩, 残余物通过快速硅胶柱色谱法 (2→30% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物359, 为黄色油状, 产率为95% (210mg, 0.168mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>59</sub>H<sub>111</sub>N<sub>26</sub>O<sub>26</sub>Na<sup>+</sup> (M+Na<sup>+</sup>) 1273.50, 实测值1273.07。

[0603] 实施例97. 360的合成

[0604] 向359 (170mg, 0.136mmol) 和4-硝基苯基氯甲酸酯 (44mg, 0.22mmol) 在DCM (7mL) 中的溶液中加入Et<sub>3</sub>N (63μL, 0.40mmol)。在室温下搅拌41小时后, 将溶剂浓缩并通过快速硅胶柱色谱法 (0→10% MeOH的DCM溶液) 纯化残余物, 得到所需化合物360, 为透明油状物, 产率为67% (129mg, 0.091mmol)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>66</sub>H<sub>114</sub>N<sub>2</sub>O<sub>30</sub>Na<sup>+</sup> (M+Na<sup>+</sup>) 1438.59, 实测值1438.13。

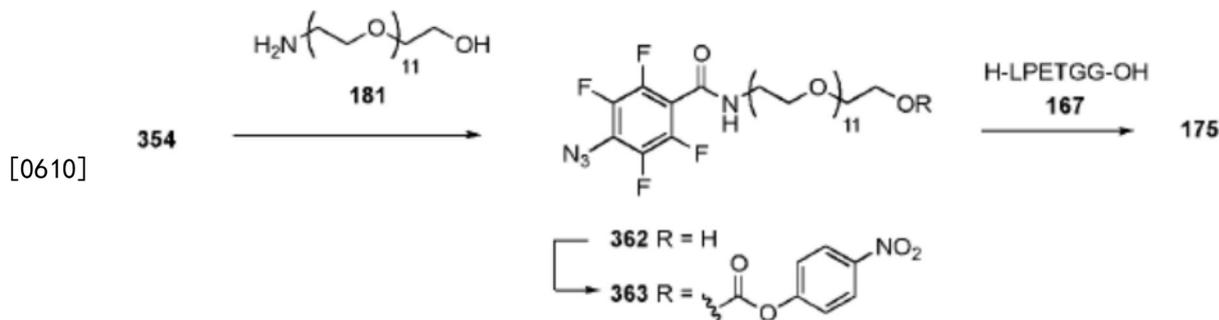
[0605] 实施例98. 173的合成

[0606] 向360 (16mg, 0.011mmol) 在无水DMF (800μL) 中的溶液中加入167 (肽H-LPETGG-OH, 6.5mg, 0.011mmol) 和Et<sub>3</sub>N (5μL, 0.04mmol)。在室温下搅拌95小时后, 粗混合物通过RP HPLC (柱Xbndge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1% 乙酸) 溶液) 纯化。得到产物173, 为透明油状 (12.6mg, 0.0068mmol, 62%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>84</sub>H<sub>153</sub>N<sub>8</sub>O<sub>37</sub><sup>+</sup> (M/2+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 942.55, 实测值924.26。



[0608] 实施例99. 174的合成

[0609] 向361 (甲基四嗪-PEGs-NHS酯, 6.1mg, 0.011mmol) 在无水DMF (230μL) 中的溶液中加入肽H-LPETGG-OH (6.5mg, 0.011mmol) 和Et<sub>3</sub>N (4μL, 0.028mmol)。在室温下搅拌22小时后, 粗混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90% MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1% 乙酸) 溶液) 纯化。得到产物174, 为透明粉红色油状 (9.9mg, 0.01mmol, 91%)。LCMS (ESI+) 计算C<sub>44</sub>H<sub>70</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub><sup>+</sup> (M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) 1009.09, 实测值1009.61。



[0611] 实施例100. 362的合成

[0612] 向354 (31mg, 0.093mmol) 在DCM (1mL) 中的溶液中加入181 (56mg, 0.10mmol) 和Et<sub>3</sub>N (40μL, 0.28mmol)。在室温下在黑暗中搅拌25分钟后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0→15% MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物362, 为透明油状 (55mg, 0.072mmol,

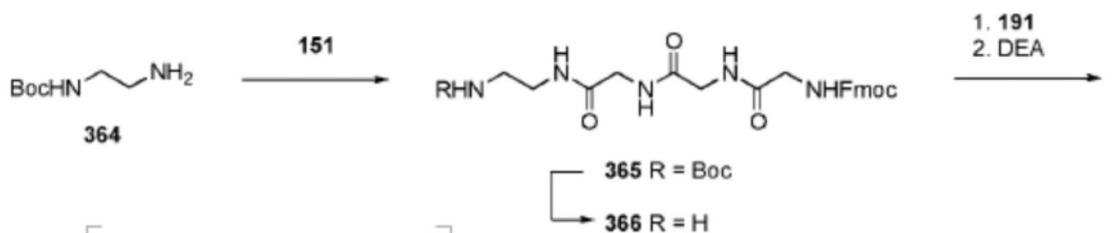
77%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{31}H_{51}F_4N_4O_{13}^+$  (M+H<sup>+</sup>) 763.75, 实测值763.08。

[0613] 实施例101. 363的合成

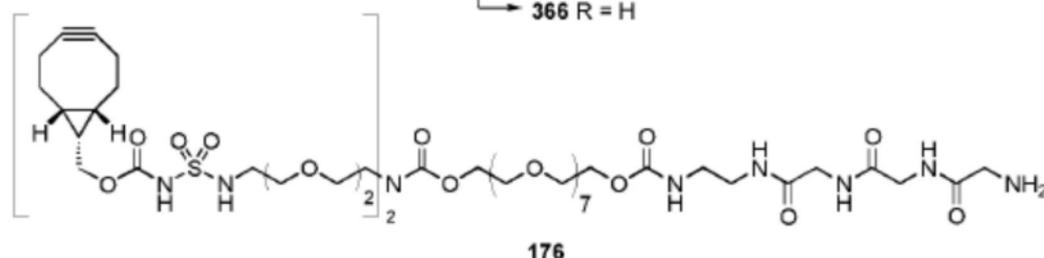
[0614] 向362 (55mg, 0.072mmol) 在DCM (2mL) 中的溶液中加入4-硝基苯基氯甲酸酯 (13mg, 0.064mmol) 和Et<sub>3</sub>N (30μL, 0.21mmol)。在室温下在黑暗中搅拌21小时后, 将混合物真空浓缩并通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90%MeCN (1%AcOH) 的水 (1%AcOH) 溶液) 纯化。得到产物363, 为黄色油状 (13.3mg, 0.014mmol, 20%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{38}H_{54}F_4N_5O_{17}^+$  (M+H<sup>+</sup>) 928.85, 实测值928.57。

[0615] 实施例102. 175的合成

[0616] 向363 (13.3mg, 0.014mmol) 在无水DMF (300μL) 中的溶液中加入167 (肽H-LPETGG-OH, 8.2mg, 0.014mmol) 和Et<sub>3</sub>N (8μL, 0.043mmol)。在黑暗中26小时后, 粗混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90%MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1%乙酸) 溶液) 纯化。得到产物175, 为透明油状 (11.4mg, 0.0084mmol, 59%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{56}H_{89}F_4N_{10}O_{24}^+$  (M+H<sup>+</sup>) 1362.35, 实测值1362.81。



[0617]



[0618] 实施例103. 365的合成

[0619] 向151 (Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH, 20mg, 0.049mmol) 在无水DMF (350μL) 中的搅拌溶液中加入DIPEA (25μL, 0.15mmol) 和HATU (18mg, 0.049mmol)。10分钟后, 加入溶于无水的化合物364 (N-Boc-乙二胺, 7.8mg, 0.049mmol)。在室温下搅拌45分钟后, 将混合物真空浓缩并通过硅胶快速柱色谱法 (0→30%MeOH的DCM溶液) 纯化, 得到所需化合物365, 为透明油状 (12.4mg, 0.022mmol, 46%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{28}H_{36}N_5O_7^+$  (M+H<sup>+</sup>) 554.61, 实测值554.46。

[0620] 实施例104. 366的合成

[0621] 向365 (12.4mg, 0.022mmol) 在DCM (0.7mL) 中的搅拌溶液中加入二噁烷 (400μL) 中的4.0M HCl。在室温下搅拌1小时后, 将混合物浓缩, 得到366, 为白色固体 (11mg, 0.022mmol, 定量)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{23}H_{28}N_5O_7^+$  (M+H<sup>+</sup>) 545.50, 实测值454.33。

[0622] 实施例105. 176的合成

[0623] 向191 (8mg, 0.0059mmol) 在无水DMF (300μL) 中的溶液中加入Et<sub>3</sub>N (2.5μL, 0.017mmol) 和366在无水DMF (110μL, 3.0mg, 0.0059mmol) 中的储备溶液。在室温下搅拌18小时后, 加入二乙胺 (2μL)。再过2小时后, 混合物通过RP HPLC (柱Xbridge prep C18 5μm OBD, 30×100mm, 5%→90%MeCN的H<sub>2</sub>O (均含有1%乙酸) 溶液) 纯化。得到产物176, 为透明油状 (1.3mg, 0.0009mmol, 15%)。LCMS (ESI+) 计算 $C_{60}H_{103}N_{10}O_{26}S_2^+$  (M+H<sup>+</sup>) 1444.64, 实测值

1444.75。

[0624] 实施例106.抗-4-1BB PF31

[0625] 抗-4-1BB scFv设计为具有C端分选酶A识别序列,之后是His标签(氨基酸序列由SEQ ID NO:4表示)。抗-4-1BB scFv在HEK293细胞中瞬时表达,然后由Absolute Antibody Ltd (Oxford, United Kingdom) 进行IMAC纯化。质谱分析显示一种主要产物(观测质量28013Da,预期的质量28018Da)。

[0626] 实施例107.将SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18) 克隆到pET32a表达载体中

[0627] SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18) (氨基酸序列由SEQ ID NO:5表示) 设计为具有N端(M) SYR序列,其中甲硫氨酸在表达后将切割,留下N端丝氨酸,以及SYR序列和IL15之间的柔性 $(G_4S)_3$ 间隔基。将密码子优化的DNA序列插入NdeI和XhoI之间的pET32A表达载体中,从而去除编码硫氧还蛋白融合蛋白的序列,并获得自Genscript, Piscataway, USA。

[0628] 实施例108.SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18) 的大肠杆菌表达和包涵体分离

[0629] SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18) 的表达始于将质粒(pET32a-SYR $(G_4S)_3$ -IL15) 转化到BL21细胞(Novagen) 中。将转化的细胞铺在含有氨苄青霉素的LB-琼脂上,并在37°C下孵育过夜。挑取单菌落,并用于接种50mL TB培养基+氨苄青霉素,然后在37°C下孵育过夜。接下来,用过夜培养物接种1000mL TB培养基+氨苄青霉素。将培养物在37°C下以160RPM孵育,当OD600达到1.5时,用1mM IPTG(1mL 1M储备溶液) 诱导。在37°C下以160RPM诱导>16小时后,通过离心(5000×g-5分钟) 沉淀培养物。将从1000mL培养物中获得的细胞沉淀在含有1500单位的全能核酸酶(Benzonase) 的60mL BugBuster™中裂解,并在室温下在滚轴(roller bank) 上孵育30分钟。裂解后,通过离心(15分钟,15000×g) 将不溶部分与可溶部分分离。将一半的不溶部分溶解在含有溶菌酶的30mL Bug Buster™中(最终浓度:200μg/mL),并在滚轴上孵育10分钟。接下来,将溶液用6倍体积的1:10稀释的BugBuster™稀释,并以15000×g离心15分钟。通过使用均质器将沉淀重悬于200mL 1:10稀释的BugBuster™中,并以12000×g离心10分钟。最后一步重复3次。

[0630] 实施例109.从分离的包涵体中重折叠SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18)

[0631] 将含有SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18) 的纯化包涵体溶解在含有40mM半胱胺和20mM Tris pH 8.0的30mL 5M胍中并使其变性。将悬浮液以16.000×g离心5分钟以沉淀剩余的细胞碎片。用5M胍、40mM半胱胺和20mM Tris pH 8.0将上清液稀释至1mg/mL,并在滚轴上在室温下孵育2小时。在4°C的冷冻室中将1mg/mL溶液逐滴加入10体积的重折叠缓冲液(50mM Tris、10.53mM NaCl、0.44mM KCl、2.2mM MgCl<sub>2</sub>、2.2mM CaCl<sub>2</sub>、0.055%PEG-4000、0.55M L-精氨酸、4mM半胱胺、4mM胍胺,pH 8.0),需要搅拌。将溶液在4°C下至少放置24小时。使用Spectrum™Spectra/Por™ 3 RC透析膜管3500Dalton MWCO将溶液透析至10mM NaCl和20mM Tris pH 8.0,1×过夜和2×4小时。将重折叠的SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18) 装载到AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的平衡Q-trap阴离子交换柱(GE health care) 上。该柱首先用缓冲液A(20mM Tris,10mM NaCl,pH 8.0) 洗涤。用缓冲液B(20mM Tris缓冲液,1M NaCl,pH 8.0),在从缓冲液A到缓冲液B的30mL梯度上洗脱保留的蛋白质。质谱分析显示对应于PF18的重量为14122Da(预期质量:14122Da)。使用AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的HiPrep™ 26/10脱盐柱(Cytiva) 将纯化的SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF18) 缓冲液交换为PBS。

[0632] 实施例110.将SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26) 克隆到pET32a表达载体中

[0633] SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26) (氨基酸序列由SEQ ID NO:6表示) 设计为具有N端(M)SYR序列,其中甲硫氨酸将在表达后被切割,留下N端丝氨酸,和SYR序列和IL15Ra-接头-IL15之间的柔性 $(G_4S)_3$ 间隔基。将密码子优化的DNA序列插入NdeI和XhoI之间的pET32A表达载体中,从而去除编码硫氧还蛋白融合蛋白的序列,并获得自Genscript, Piscataway, USA。

[0634] 实施例111. SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26) 的大肠杆菌表达和包涵体分离

[0635] SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26) 的表达始于将质粒(pET32a-SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15)转化到BL21细胞(Novagen)中。下一步是用BL21细胞接种1000mL培养物(TB培养基+氨苄青霉素)。当OD<sub>600</sub>达到1.5时,用1mM IPTG(1mL的1M储备溶液)诱导培养物。在37°C以160RPM诱导>16小时后,通过离心(5000×g-5分钟)沉淀培养物。将从1000mL培养物中获得的细胞沉淀在含有1500单位的全能核酸酶的60mL BugBuster™中裂解,并在室温下在滚轴上孵育30分钟。裂解后,通过离心(15分钟,15000×g)将不溶部分与可溶部分分离。将一半的不溶部分溶解在含有溶菌酶的30mL BugBuster™中(最终浓度:200μg/mL),并在滚轴上孵育10分钟。接下来,将溶液用6倍体积的1:10稀释的BugBuster™进行稀释,并以15000×g离心15分钟。使用均质器将沉淀重悬于200mL 1:10稀释的BugBuster™中,并以12000×g离心10分钟。最后一步重复3次。

[0636] 实施例112. 从分离的包涵体中重折叠SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26)

[0637] 将含有SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26) 的纯化包涵体溶解在含有40mM半胱胺和20mM Tris pH 8.0的30mL 5M胍中并使其变性。将悬浮液以16.000×g离心5分钟以沉淀剩余的细胞碎片。用5M胍、40mM半胱胺和20mM Tris pH 8.0将上清液稀释至1mg/mL,并在滚轴上在室温下孵育2小时。在4°C的冷冻室中将1mg/mL溶液逐滴加入10体积的重折叠缓冲液(50mM Tris、10.53mM NaCl、0.44mM KCl、2.2mM MgCl<sub>2</sub>、2.2mM CaCl<sub>2</sub>、0.055%PEG-4000、0.55M L-精氨酸、4mM半胱胺、4mM胍, pH 8.0),需要搅拌。将溶液在4°C下至少放置24小时。使用Spectrum™Spectra/Por™ 3 RC透析膜管3500 Dalton MWC0将溶液透析至10mM NaCl和20mM Tris pH 8.0,1×过夜和2×4小时。将重折叠的SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26) 装载到AKTA Purifier-10(GE Healthcare)上的平衡Q-trap阴离子交换柱(GE health care)上。该柱首先用缓冲液A(20mM Tris,10mM NaCl,pH 8.0)洗涤。用缓冲液B(20mM Tris缓冲液,1M NaCl,pH 8.0),在从缓冲液A到缓冲液B的30mL梯度上洗脱保留的蛋白质。质谱分析显示对应于PF26的重量为24146Da(预期质量:24146Da)。使用AKTA Purifier-10(GE Healthcare)上的HiPrep™ 26/10脱盐柱(Cytiva)将纯化的SYR- $(G_4S)_3$ -IL15Ra-接头-IL15 (PF26) 缓冲液交换为PBS。

[0638] 实施例113. 人源化OKT3 200

[0639] 从Absolute Antibody Ltd(Oxford,United Kingdom)获得具有C端分选酶A识别序列(C端标签由SEQ ID NO:1表示)的人源化OKT3(hOKT3)。质谱分析显示一种主要产物(观测质量28836Da)。

[0640] 实施例114. 使用分选酶A将化合物GGG-PEG<sub>2</sub>-BCN(157)的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>2</sub>-BCN 201

[0641] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A(由SEQ ID NO:2表示)进行C端分选来制备。向hOKT3 200(500μL,500μg,35μM在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A(58μL,384μ

g, 302 $\mu$ M在TBS pH 7.5+10%甘油中)、GGG-PEG<sub>2</sub>-BCN (157, 28 $\mu$ L, 50mM在DMSO中)、CaCl<sub>2</sub> (69 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5 (39 $\mu$ L)。反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜,然后在AKTA Explorer-100 (GE Healthcare)上的His-trap excel 1mL柱 (GE Healthcare)上进行纯化。用缓冲液A (20mM Tris, 200mM NaCl, 20mM咪唑, pH 7.5)使柱平衡,并以1mL/min装载样品。收集流出物,质谱分析显示一种主要产物 (观测质量27829Da),对应于201。将样品对PBS pH 7.4进行透析,并通过旋转过滤 (Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10膜, Millipore)浓缩以获得hOKT3-PEG<sub>2</sub>-BCN 201 (60 $\mu$ L, 169 $\mu$ g, 101 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)。

[0642] 实施例115. 使用分选酶A五突变体将化合物GGG-PEG<sub>2</sub>-BCN (157)的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>2</sub>-BCN 201

[0643] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A五突变体 (BPS Bioscience, 目录号71046)进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (14.3 $\mu$ L, 14 $\mu$ g, 35 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A五突变体 (0.5 $\mu$ L, 1 $\mu$ g, 92 $\mu$ M在40mM Tris pH 8.0, 110mM NaCl, 2.2mM KCl, 400mM咪唑和20%甘油中)、GGG-PEG<sub>2</sub>-BCN (157, 2 $\mu$ L, 20mM在DMSO:MQ=2:3中)、CaCl<sub>2</sub> (2 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5 (1.2 $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量27829Da),对应于hOKT3-PEG<sub>2</sub>-BCN 201。

[0644] 实施例116. 使用分选酶A将化合物GGG-PEG<sub>11</sub>-BCN (161)的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>11</sub>-BCN 202

[0645] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A (由SEQ ID NO:2表示)进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (14.3 $\mu$ L, 14 $\mu$ g, 35 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A (0.9 $\mu$ L, 12 $\mu$ g, 582 $\mu$ M在TBS pH 7.5+10%甘油中)、GGG-PEG<sub>11</sub>-BCN (161, 2 $\mu$ L, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub> (2 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5 (0.9 $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量21951Da, 约85%),对应于分选酶A,次要产物 (观测质量28227Da, 约5%),对应于hOKT3-PEG<sub>11</sub>-BCN 202,和另外两种次要产物 (观测质量28051Da和28325Da, 各约为5%)。

[0646] 实施例117. 使用分选酶A五突变体将化合物GGG-PEG<sub>11</sub>-BCN (161)的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>11</sub>-BCN 202

[0647] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A五突变体 (BPS Bioscience, 目录号71046)进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (14.3 $\mu$ L, 14 $\mu$ g, 35 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A五突变体 (0.5 $\mu$ L, 1 $\mu$ g, 92 $\mu$ M在40mM Tris pH 8.0, 110mM NaCl, 2.2mM KCl, 400mM咪唑和20%甘油中)、GGG-PEG<sub>11</sub>-BCN (161, 2 $\mu$ L, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub> (2 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5 (1.2 $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量28225Da, 约60%),对应于hOKT3-PEG<sub>11</sub>-BCN 202,和一种次要产物 (观测质量28326Da, 约40%)。

[0648] 实施例118. 使用分选酶A将化合物GGG-PEG<sub>23</sub>-BCN (163)的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>23</sub>-BCN 203

[0649] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A (由SEQ ID NO:2表示)通过C端分选来制备。向hOKT3 200 (14.3 $\mu$ L, 14 $\mu$ g, 35 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A (0.9 $\mu$ L, 12 $\mu$ g, 582 $\mu$ M在TBS pH 7.5+10%甘油中)、GGG-PEG<sub>23</sub>-BCN (163, 2 $\mu$ L, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub> (2 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5 (0.9 $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量21951Da, 约70%),对应于分选酶A,和一种次要产物 (观测质量28755Da, 约

30%), 对应于hOKT3-PEG<sub>23</sub>-BCN203。

[0650] 实施例119. 使用分选酶A五突变体将化合物GGG-PEG<sub>23</sub>-BCN (163) 的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>23</sub>-BCN 203

[0651] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A五突变体 (BPS Bioscience, 目录号71046) 进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (14.3μL, 14μg, 35μM在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入分选酶A五突变体 (0.5μL, 1μg, 92μM在40mM Tris pH 8.0, 110mM NaCl, 2.2mM KCl, 400mM咪唑和20%甘油中)、GGG-PEG<sub>23</sub>-BCN (163, 2μL, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub> (2μL, 100mM在MQ中) 和TBS pH 7.5 (1.2μL)。将反应在37°C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量28754Da), 对应于hOKT3-PEG<sub>23</sub>-BCN 203。

[0652] 实施例120. 使用分选酶A将化合物GGG-PEG<sub>4</sub>-四嗪 (154) 的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204

[0653] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A (由SEQ ID NO:2表示) 进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (500μL, 500μg, 35μM在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入分选酶A (58μL, 384μg, 302μM在TBS pH 7.5+10%甘油中)、GGG-PEG<sub>4</sub>-四嗪 (154, 35μL, 40mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub> (69μL, 100mM在MQ中) 和TBS pH 7.5 (32μL)。反应在37°C下孵育过夜, 然后在AKTA Explorer-100 (GE Healthcare) 上的His-trap excel 1mL柱 (GE Healthcare) 上进行纯化。用缓冲液A (20mM Tris, 200mM NaCl, 20mM咪唑, pH 7.5) 使柱平衡, 并以1mL/min装载样品。收集流出物, 质谱分析显示一种主要产物 (观测质量27868Da), 对应于104。将样品对PBS pH 7.4进行透析并通过旋转过滤 (Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10膜, Millipore) 浓缩以获得hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204 (70μL, 277μg, 143μM在PBS pH 7.4中)。

[0654] 实施例121. 使用分选酶A五突变体将化合物GGG-PEG<sub>4</sub>-四嗪 (154) 的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204

[0655] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A五突变体 (BPS Bioscience, 目录号71046) 进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (14.3μL, 14μg, 35μM在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入分选酶A五突变体 (0.5μL, 1μg, 92μM在40mM Tris pH 8.0, 110mM NaCl, 2.2mM KCl, 400mM咪唑和20%甘油中)、GGG-PEG<sub>4</sub>-四嗪 (154, 2μL, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub> (2μL, 100mM在MQ中) 和TBS pH 7.5 (1.2μL)。反应在37°C下孵育过夜。将反应在37°C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量27868Da), 对应于hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204。

[0656] 实施例122. 使用分选酶A将GGG-PEG<sub>11</sub>-四嗪 (169) 的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF01

[0657] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A (由SEQ ID NO:2表示) 进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (1908μL, 5mg, 91μM在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入分选酶A (81μL, 948μg, 533μM在TBS pH 7.5+10%甘油中)、GGG-PEG<sub>11</sub>-四嗪 (169, 347μL, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub> (347μL, 100mM在MQ中) 和TBS pH 7.5 (789μL)。将反应在37°C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量28258Da), 对应于hOKT3-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF01。反应在AKTA Explorer-100 (GE Healthcare) 上的His-trap excel 1mL柱 (GE Healthcare) 上纯化。用缓冲液A (20mM Tris, 200mM NaCl, 20mM咪唑, pH 7.5) 使柱平衡, 并以1mL/min装载样品。收集流出物, 使用HiPrep 26/10脱盐柱 (GE Healthcare) 将缓冲液交换为PBS pH 6.5。在4°C下对PBS pH 6.5额外进行透析3天, 以去除残留的169。

[0658] 实施例123. 使用分选酶A将GGG-PEG<sub>23</sub>-四嗪(170)的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>23</sub>-四嗪PF02

[0659] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A(由SEQ ID NO:2表示)进行C端分选来制备。向hOKT3 200(1908 $\mu$ L, 5mg, 91 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A(81 $\mu$ L, 948 $\mu$ g, 533 $\mu$ M在TBS pH 7.5+10%甘油中), GGG-PEG<sub>23</sub>-四嗪(170, 347 $\mu$ L, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub>(347 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5(789 $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物(观测质量28787Da), 对应于hOKT3-PEG<sub>23</sub>-四嗪PF02。反应在AKTA Explorer-100(GE Healthcare)上的His-trap excel 1mL柱(GE Healthcare)上纯化。用缓冲液A(20mM Tris, 200mM NaCl, 20mM咪唑, pH 7.5)使柱平衡, 并以1mL/min装载样品。将流出物透析至PBS pH 6.5, 然后在AKTA Purifier-10(GE Healthcare)上的Superdex75 10/300GL柱(GE Healthcare)上使用PBS pH 6.5作为流动相进行纯化。

[0660] 实施例124. 使用分选酶A将GGG-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮(171)的C端分选到hOKT3 200以获得hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03

[0661] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A(由SEQ ID NO:2表示)进行C端分选来制备。向hOKT3 200(2092 $\mu$ L, 5mg, 83 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A(95 $\mu$ L, 950 $\mu$ g, 456 $\mu$ M在TBS pH 7.5+10%甘油中), GGG-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮(171, 347 $\mu$ L, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub>(347 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5(591 $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物(观测质量27865Da), 对应于hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03。反应在AKTA Explorer-100(GE Healthcare)上的His-trap excel 1mL柱(GE Healthcare)上纯化。用缓冲液A(20mM Tris, 200mM NaCl, 20mM咪唑, pH 7.5)使柱平衡, 并以1mL/min装载样品。流出物在AKTA Purifier-10(GE Healthcare)上的Superdex75 10/300GL柱(GE Healthcare)上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。

[0662] 实施例125. 使用分选酶A对抗-4-1BB PF31中的GGG-PEG<sub>11</sub>-四嗪(169)进行C端分选以获得抗-4-1BB-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF08

[0663] 向含有蛋白质PF31(1151 $\mu$ L, 93 $\mu$ M在PBS pH 7.5中)的溶液中加入TBS pH 7.5(512 $\mu$ L)、CaCl<sub>2</sub>(214 $\mu$ L, 100mM)和GGG-PEG<sub>11</sub>-四嗪(169, 220 $\mu$ L, 20mM在MQ中)和分选酶A(50 $\mu$ L, 533 $\mu$ M在TBS pH 7.5中)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 然后在AKTA Explorer-100(GE Healthcare)上的His-trap excel 1mL柱(GE Healthcare)上进行纯化。用缓冲液A(20mM Tris, 200mM NaCl, 20mM咪唑, pH 7.5)使柱平衡, 并以1mL/min装载样品。收集流出物, 质谱分析显示一种主要产物(观测质量27989Da)对应于4-1BB-四嗪PF08。

[0664] 实施例126. 使用分选酶A对抗-4-1BB PF31中的化合物GGG-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮(171)进行C端分选以获得抗-4-1BB PF09

[0665] 根据本发明的生物缀合物通过使用分选酶A(由SEQ ID NO:2表示)进行C端分选来制备。向抗-4-1BB-PF31(665 $\mu$ L, 2mg, 107 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入分选酶A(100 $\mu$ L, 1mg, 357 $\mu$ M在TBS pH 7.5+10%甘油中), GGG-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮(171, 140 $\mu$ L, 20mM在MQ中)、CaCl<sub>2</sub>(140 $\mu$ L, 100mM在MQ中)和TBS pH 7.5(355 $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 然后在AKTA Explorer-100(GE Healthcare)上的His-trap excel 1mL柱(GE Healthcare)上进行纯化。用缓冲液A(20mM Tris, 200mM NaCl, 20mM咪唑, pH 7.5)使柱平衡, 并以1mL/min装载样品。收集流出物, 质谱分析显示一种主要产物(观测质量27592Da), 对应于抗-4-1BB-叠氮PF09。

[0666] 实施例127.使用分选酶A对GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 (208) 中的芳基叠氮-PEG<sub>11</sub>-LPETGG (175) 进行N端分选以获得芳基叠氮-PEG<sub>11</sub>-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF13)

[0667] 向含有蛋白质208 (2000 $\mu$ L, 140 $\mu$ M在PBS pH 7.5中) 的溶液中加入TBS pH 7.5 (2686 $\mu$ L)、CaCl<sub>2</sub> (559 $\mu$ L, 100mM) 和175 (83 $\mu$ L, 50mM在DMSO中) 和分选酶A (260 $\mu$ L, 537 $\mu$ M在TBS pH 7.5中), 并在37 $^{\circ}$ C下孵育3小时(避光)。孵育后, 使用Ni-NTA珠 (500 $\mu$ L珠=1mL浆液) 从溶液中去掉分选酶A。将溶液在4 $^{\circ}$ C下与Ni-NTA珠在滚轴上孵育, 然后将溶液离心 (5分钟, 7.000 $\times$ g)。通过从沉淀中分离上清液来收集含有产物PF13的上清液。使用PBS pH 7.4作为流动相, 流速为0.5mL/min, 将反应混合物装载到AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的Superdex 7510/300GL柱 (GE Healthcare) 上。质谱分析显示对应于PF13的重量为24193Da (预期质量: 24193Da)。

[0668] 实施例128. BCN-PEG<sub>12</sub>-氨基(XL13) 与SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF26) 的N端脐连接以获得BCN-PEG<sub>12</sub>-SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF14)

[0669] 在标记PF26之前, 使用高碘酸钠氧化N端丝氨酸。向含有蛋白质PF26 (700 $\mu$ L, 70 $\mu$ M在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入PBS pH 7.4 (286 $\mu$ L)、NaIO<sub>4</sub> (0.98 $\mu$ L, 100mM在MQ中) 和L-甲硫氨酸 (5 $\mu$ L, 100mM在MQ中) 并在4 $^{\circ}$ C下孵育5分钟。质谱分析显示24114和24130Da的重量, 对应于24114 (醛) 和24132Da (水合物) 的预期质量。使用PD-10脱盐柱去除过量的NaIO<sub>4</sub>和L-甲硫氨酸。使用Amicon自旋过滤器0.5、MWC0 10kDa (Merck-Millipore) 将氧化的PF26浓缩至50 $\mu$ M的浓度。向含有氧化的PF26 (416 $\mu$ L, 50 $\mu$ M在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入XL13 (41.6 $\mu$ L, 50mM在DMSO中)。在37 $^{\circ}$ C下孵育后, 使用装有Sephadex G-25树脂 (Cytiva) 的PD-10脱盐柱纯化反应混合物并使用PBS洗脱。质谱分析显示对应于PF14的重量为25024Da (预期质量: 25042Da)。

[0670] 实施例129. IL15R $\alpha$ -IL15 PF26的N端BCN功能化以获得BCN-IL15R $\alpha$ -IL15 PF15

[0671] 向IL15R $\alpha$ -IL15 PF26 (2.9mg, 50 $\mu$ M在PBS中) 中加入2当量NaIO<sub>4</sub> (4.8 $\mu$ L 50mM PBS储备溶液) 和10当量L-甲硫氨酸 (12.5 $\mu$ L 100mM PBS储备溶液)。将反应在4 $^{\circ}$ C下孵育5分钟。质谱分析显示丝氨酸氧化成相应的醛和水合物 (观测质量24114Da和24132Da)。使用装有Sephadex G-25树脂 (Cytiva) 的PD-10脱盐柱纯化反应混合物并使用PBS洗脱。向洗脱液 (2.6mg, 50 $\mu$ M在PBS中) 中加入160当量N-甲基羟胺.HCl (340 $\mu$ L 50mM在PBS中的储备溶液) 和160当量对氨基苯甲醚 (340 $\mu$ L 50mM在PBS中的储备溶液)。将反应混合物在25 $^{\circ}$ C下孵育3小时。质谱分析显示对应于N-甲基-亚胺-氧化物-IL15的一个单峰 (观测质量24143Da)。使用装有Sephadex G-25树脂 (Cytiva) 的PD-10脱盐柱纯化反应混合物并使用PBS洗脱。向洗脱液 (2.47mg, 50 $\mu$ M在PBS中) 中加入25当量双-BCN-PEG<sub>11</sub> (105) (51 $\mu$ L, 50mM在DMSO中) 和150 $\mu$ L DMF。反应在室温下孵育过夜。使用Superdex 75 10/300柱 (Cytiva) 纯化反应。质谱分析显示对应于BCN-IL15R $\alpha$ -IL15 PF15的一个主峰 (观测质量25041Da)。

[0672] 实施例130. IL15 PF18的N端重氮转移反应以获得叠氮基-IL15 PF19

[0673] 向IL15 PF18 (5mg, 50 $\mu$ M在0.1M TEA缓冲液pH 8.0中) 中加入咪唑-1-磺酰叠氮酸盐 (708 $\mu$ L, 50mM在50mM NaOH中) 并在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。使用HiPrep<sup>TM</sup> 26/10脱盐柱 (Cytiva) 纯化反应。质谱分析显示对应于叠氮基-IL15 PF19的一个主峰 (观测质量14147Da)。

[0674] 实施例131. 使用2PCA在SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 (PF18) N端掺入四嗪-PEG<sub>12</sub>-2PCA (XL10)

以获得四嗪-PEG<sub>12</sub>-SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 (PF21)

[0675] 向SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 (PF18) (1052μL, 50μM在PBS中) 中加入20当量四嗪-PEG<sub>12</sub>-2PCA (XL10) (112μL 50mM在DMSO中的储备溶液) 和4359μL PBS。反应在37℃下孵育过夜。使用旋转过滤 (Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10膜, Millipore) 将样品浓缩到<1mL, 并装载到 AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的 Superdex 75 10/300GL柱 (GE Healthcare) 上, 使用PBS pH7.4作为流动相, 流速为0.5mL/min。质谱分析显示对应于原料SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 (PF18) 的重量为24121Da (预期质量: 14121Da) 和对应于产物PF21的质量为15093Da (预期质量: 15094Da)。

[0676] 实施例132. 三-BCN (150) 与hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03缀合以获得双-BCN-hOKT3 PF22

[0677] 向hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03 (87μL, 1mg, 411μM在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入 PBS pH 7.4 (559μL)、DMF (49μL) 和化合物150 (22μL, 40mM溶液在DMF中, 25当量)。将反应在室温下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量29171Da), 对应于双-BCN-hOKT3 PF22。使用PBS pH 7.4作为流动相, 在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的 Superdex75 10/300GL柱 (GE Healthcare) 上纯化反应。

[0678] 实施例133. 用分选酶A对hOKT3 200的GGG-双-BCN 176进行C端分选以获得双-BCN-hOKT3 PF23

[0679] 根据本发明的生物缀合物通过用分选酶A (由SEQ ID NO:2识别) 进行C端分选来制备。向hOKT3 200 (272μL, 0.7mg, 83μM在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入分选酶A (25μL, 250μg, 456μM在TBS pH 7.5+10%甘油中)、GGG-双-BCN (176, 45μL, 20mM在DMSO中)、CaCl<sub>2</sub> (45μL, 100mM在MQ中) 和TBS pH 7.5 (64μL)。将反应在37℃下孵育过夜。质谱分析显示一种主要产物 (观测质量28772Da), 对应于双-BCN-hOKT3 PF23。使用PBS pH 7.4作为流动相, 在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的 Superdex75 10/300GL柱 (GE Healthcare) 上纯化反应。

[0680] 实施例134. 使用菌株促进的炔烃-叠氮化物环加成将三-BCN (150) N端掺入到N<sub>3</sub>-SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 (PF19) 以获得双-BCN-SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 (PF29)

[0681] 向N<sub>3</sub>-IL15 PF19 (706μL, 50μM在PBS中) 中加入4当量三-BCN (150) (3.5μL 40mM在DMF中的储备溶液) 和67μL DMF。将反应在室温下孵育过夜 (o/n)。质谱分析证实形成了双-BCN-SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 PF29 (观测质量15453Da, 预期质量15453Da)。使用装有Sephadex G25树脂 (Cytiva) 的PD-10脱盐柱纯化反应混合物并使用PBS洗脱。使用旋转过滤 (Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10膜, Millipore), 用400μL PBS进行6次额外洗涤, 以去除剩余的三-BCN (150)。

[0682] 实施例135. 用PNGase F对曲妥珠单抗进行酶促去糖基化

[0683] 曲妥珠单抗 (Herzuma) (20mg, 12.5mg/mL在PBS pH 7.4中) 与PNGase F (16μL, 8000单元) 在37℃下孵育。IdeS处理后样品的质谱分析显示一种主要的Fc/2产物 (观测质量23787Da), 对应于预期产物。

[0684] 实施例136. 用PNGase F对利妥昔单抗进行酶促去糖基化

[0685] 利妥昔单抗 (6mg, 10mg/mL在PBS pH 7.4中) 与PNGase F (6μL, 3000单元) 在37℃下孵育。IdeS处理后样品的质谱分析显示一种主要的Fc/2产物 (观测质量23754Da), 对应于预期产物。

[0686] 实施例137.MTGase催化的叠氮基-PEG<sub>3</sub>-胺掺入到去糖基化的曲妥珠单抗上以获得双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v3

[0687] 向去糖基化的曲妥珠单抗(806 $\mu$ L,10mg,12.4mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入PBS pH 7.4(3544 $\mu$ L)、叠氮基-PEG<sub>3</sub>-胺(可从BroadPharm商购,500 $\mu$ L,10mM溶液在MQ中,75当量相较于IgG)和重组微生物谷氨酰胺转移酶(可从Zedira商购,150 $\mu$ L,15U,0.1U/ $\mu$ L)。反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物(观测质量23988Da),对应于双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v3。使用AKTA Explorer-100(GE Healthcare)上的protA柱(5mL,MabSelect Sure,GE Healthcare)纯化反应,然后透析至PBS pH 7.4。

[0688] 实施例138.MTGase催化的叠氮基-PEG<sub>3</sub>-胺掺入到去糖基化的利妥昔单抗上以获得双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v3

[0689] 向去糖基化的利妥昔单抗(90 $\mu$ L,1.8mg,20.2mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入PBS pH 7.4(693 $\mu$ L)、叠氮基-PEG<sub>3</sub>-胺(可从BroadPharm商购,90 $\mu$ L,10mM溶液在MQ中,75当量相较于IgG)和重组微生物谷氨酰胺转移酶(可从Zedira商购,27 $\mu$ L,2.7U,0.1U/ $\mu$ L)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物(观测质量23956Da),对应于双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v3。使用离心过滤器(Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa,Merck Millipore)将反应缓冲液交换为PBS pH 7.4。

[0690] 实施例139.曲妥珠单抗(6-N<sub>3</sub>-GalNAc)<sub>2</sub> 205与201缀合以获得缀合物206

[0691] 通过将BCN修饰的hOKT3 201与叠氮化物修饰的曲妥珠单抗205缀合来制备根据本发明的生物缀合物。向根据W02016170186制备的曲妥珠单抗-(6-N<sub>3</sub>-GalNAc)<sub>2</sub>溶液(205,2 $\mu$ L,75 $\mu$ g,250 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)中加入hOKT3-PEG<sub>2</sub>-BCN 201(9.9 $\mu$ L,28 $\mu$ g,101 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)。反应在室温下孵育过夜。Fabricator<sup>TM</sup>消化样品的质谱分析显示两种主要产物(观测质量24368Da和52196Da,各约为50%),分别对应于叠氮基修饰的Fc/2片段和缀合物206。

[0692] 实施例140.将His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15 $\alpha$ -IL15克隆到pET32a表达载体中

[0693] IL15R $\alpha$ -IL15融合蛋白207设计有N端His标签(HHHHHH)、TEV蛋白酶识别序列(SSGENLYFQ)和N端分选酶A识别序列(GGG)。含有DNA序列的pET32A载体编码碱基对158和692之间的His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15 $\alpha$ -IL15(SEQ ID NO:3),从而去除硫氧还蛋白编码序列,获得自Genscript。

[0694] 实施例141.His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15 $\alpha$ -IL15(207)的大肠杆菌表达和包涵体分离

[0695] His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15 $\alpha$ -IL15 207的表达始于将质粒(pET32a-IL15 $\alpha$ -IL15)转化到BL21细胞(Novagen)中。下一步是用BL21细胞接种500mL培养物(TB培养基+氨苄青霉素)。当OD<sub>600</sub>达到0.7时,用1mM IPTG(500 $\mu$ L的1M储备溶液)诱导培养物。在37 $^{\circ}$ C下诱导4小时后,通过离心沉淀培养物。将从500mL培养物中获得的细胞沉淀在含有625单位的全能核酸酶的25mL BugBuster<sup>TM</sup>中裂解,并在室温下在滚轴上孵育20分钟。裂解后,通过离心(20分钟,12000 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C)将不溶部分与可溶部分分离。将不溶部分溶解在含有溶菌酶的25mL BugBuster<sup>TM</sup>(最终浓度:200 $\mu$ g/mL)中,并在滚轴上孵育5分钟。接下来,将溶液用6倍体积的1:10稀释的BugBuster<sup>TM</sup>进行稀释,并在4 $^{\circ}$ C下以9000 $\times$ g离心15分钟。使用均质器将沉淀重悬于250mL 1:10稀释的BugBuster<sup>TM</sup>中,并在4 $^{\circ}$ C下以9000 $\times$ g离心15分钟。最后一步重复3次。

[0696] 实施例142.从分离的包涵体中重折叠His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 207

[0697] 纯化的包含His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 207的包涵体在4℃下在25mL变性缓冲液(5M胍,0.3M亚硫酸钠)和2.5mL 50mM 2-硝基-5-磺基苯甲酸二钠中磺化过夜(o/n)。用10倍体积的冷冻Milli-Q稀释溶液并离心(8000×g离心10分钟)。使用均质器将沉淀溶解在125mL冷冻Milli-Q中并离心(8000×g 10分钟)。最后一步重复3次。纯化的His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 207在5M胍中变性并稀释至1mg/mL蛋白质浓度。使用直径为0.8mm的注射器,在冰上将变性蛋白质逐滴加入10体积的重折叠缓冲液(50mM Tris, 10.53mM NaCl,0.44mM KCl,2.2mM MgCl<sub>2</sub>,2.2mM CaCl<sub>2</sub>,0.055%PEG-4000,0.55M L-精氨酸,8mM半胱胺,4mM胱胺,pH 8.0)并在4℃下孵育48小时(不需要搅拌)。将重新折叠的His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 207装载到AKTA Purifier-10(GE Healthcare)上的20mL HisTrap excel柱(GE health care)上。该柱首先用缓冲液A(5mM Tris缓冲液,20mM咪唑,500mM NaCl,pH 7.5)洗涤。保留的蛋白质用缓冲液B(20mM Tris缓冲液,500mM咪唑,500mM NaCl,pH 7.5)在从缓冲液A到缓冲液B的25mL梯度上洗脱。通过SDS-PAGE在聚丙烯酰胺凝胶(16%)上分析组分。合并含有纯化目标蛋白的组分,并通过在4℃下进行透析过夜以将缓冲液与TBS(20mM Tris pH 7.5和150mM NaCl<sub>2</sub>)交换。使用Amicon Ultra-0.5、MWC0 3kDa(Merck-Millipore)将纯化的蛋白质浓缩至至少2mg/mL。质谱分析显示重量为25044Da(预期:25044Da)。产物在进一步使用前储存在-80℃下

[0698] 实施例143.TEV剪切His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 207以获得GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 208

[0699] 向His<sub>6</sub>-SSGENLYFQ-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15(207,330 $\mu$ L,2 3mg/mL在TBS pH 7.5中)的溶液中加入TEV蛋白酶(50.5 $\mu$ L,10单元/ $\mu$ L在50mM Tris-HCl,250mM NaCl,1mM TCEP,1mM EDTA,50%甘油,pH 7.5中,New England Biolabs)。将反应在30℃下孵育1小时。在TEV剪切后,使用尺寸排阻色谱法纯化溶液。将反应混合物装载到AKTA Purifier-10(GE Healthcare)上的Superdex 75 10/300GL柱(GE Healthcare)上,使用TBS pH 7.5作为流动相,流速为0.5mL/min。GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 208以12mL的保留时间洗脱。使用Amicon Ultra-0.5、MWC0 3kDa(Merck Millipore)将纯化的蛋白质浓缩至至少2mg/mL。产物用质谱分析(观测质量:22965Da,预期质量:22964Da),对应于GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 208。产物在进一步使用前储存在-80℃下。

[0700] 实施例144.使用分选酶A将BCN-PEG<sub>12</sub>-LPETGG(168)掺入到GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 208以获得BCN-PEG<sub>12</sub>-IL15R $\alpha$ -IL15(209)

[0701] 向GGG-IL15R $\alpha$ -IL15(208,219 $\mu$ L,91.4 $\mu$ M在TBS pH 7.5中)的溶液中加入TBS pH 7.5(321 $\mu$ L)、CaCl<sub>2</sub>(40.0 $\mu$ L,100mM)和BCN-PEG<sub>12</sub>-LPETGG(168,120 $\mu$ L,5mM在DMSO中)并在37℃下孵育1小时。168的掺入完成后,使用与反应体积(800 $\mu$ L)相同体积的Ni-NTA珠从溶液中去除分选酶A。将溶液在转轮/或台式振荡器中孵育1小时,然后将溶液离心(2分钟,13000rpm)并弃去上清液。BCN-PEG<sub>12</sub>-IL15R $\alpha$ -IL15(209)通过在台式振荡器中以800rpm将珠与800 $\mu$ L洗涤缓冲液(40mM咪唑,20mM Tris,0.5M NaCl)一起孵育5分钟,然后从珠中收集。将珠离心(2分钟,13000×rpm),分离含有209的上清液,并在4℃下通过透析过夜(o/n)将缓冲液交换为TBS。最后,使用Amicon自旋过滤器0.5、MWC0 3kDa(Merck-Millipore)将溶液浓缩至0.5-1mg/mL。质谱分析显示重量为24155Da(预期质量:24152),对应于BCN-PEG<sub>12</sub>-IL15

$\alpha$ -IL15 (209)。

[0702] 实施例145. BCN-PEG<sub>12</sub>-IL15 $\alpha$ -IL15 (209) 与曲妥珠单抗 (6-N<sub>3</sub>-GalNAc)<sub>2</sub> 205 缀合以获得缀合物210

[0703] 根据本发明的生物缀合物通过将209与叠氮基修饰的曲妥珠单抗 (205, 曲妥珠单抗 (6-N<sub>3</sub>-GalNAc)<sub>2</sub>, 根据W02016170186制备) 以2:1的摩尔比缀合来制备。因此, 向BCN-PEG<sub>12</sub>-IL15 $\alpha$ -IL15 (209, 20 $\mu$ L, 20 $\mu$ M在TBS pH 7.4中) 的溶液中加入曲妥珠单抗 (6-N<sub>3</sub>-GalNAc)<sub>2</sub> (205, 1.2 $\mu$ L, 82 $\mu$ M在PBS pH 7.4中) 并在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜 (o/n)。IdeS消化样品的质谱分析显示质量为48526Da (预期质量: 48518Da), 对应于缀合物210的Fc/2-片段。

[0704] 实施例146. 曲妥珠单抗- (叠氮化物) 与二价接头105分子内交联以获得211

[0705] 向根据W02016170186制备的曲妥珠单抗- (6-叠氮基GalNAc)<sub>2</sub> (7.5 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 17.56mg/mL在PBS pH 7.4中; 也称为trast-v1a) 的溶液中加入化合物105 (2.5 $\mu$ L, 0.8mM溶液在DMF中, 2当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck-Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。对IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物 (计算质量49625Da, 观测质量49626Da), 对应于分子内交联的曲妥珠单抗衍生物211。HPLC-SEC显示<4%的聚集, 因此不包括分子间交联。

[0706] 实施例147. 曲妥珠单抗- (叠氮化物)<sub>2</sub> 与二价接头107分子内交联以获得212

[0707] 向曲妥珠单抗- (6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub> (7.5 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 17.56mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入化合物107 (2.5 $\mu$ L, 4mM溶液在DMF中, 10当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck-Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示产物 (计算质量50153Da, 观测质量50158Da), 对应于分子内交联的曲妥珠单抗衍生物212。HPLC-SEC显示<4%的聚集, 因此不包括分子间交联。

[0708] 实施例148. 曲妥珠单抗- (叠氮化物)<sub>2</sub> 与二价接头117分子内交联以获得213

[0709] 向曲妥珠单抗- (6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub> (7.5 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 17.56mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入化合物117 (2.5 $\mu$ L, 0.8mM溶液在DMF中, 2当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck-Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物 (计算质量49580Da, 观测质量49626Da), 对应于分子内交联的曲妥珠单抗衍生物213。HPLC-SEC显示<4%的聚集, 因此不包括分子间交联。

[0710] 实施例149. 曲妥珠单抗- (叠氮化物)<sub>2</sub> 与二价接头118分子内交联以获得214

[0711] 向曲妥珠单抗- (6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub> (7.5 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 17.56mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入化合物118 (2.5 $\mu$ L, 4mM溶液在DMF中, 10当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck-Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示产物 (计算质量49358Da, 观测质量49361Da), 对应于分子内交联的曲妥珠单抗衍生物214。HPLC-SEC显示<4%的聚集, 因此不包括分子间交联。

[0712] 实施例150. 曲妥珠单抗- (叠氮化物)<sub>2</sub> 与二价接头124分子内交联以获得215

[0713] 向曲妥珠单抗- (6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub> (7.5 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 17.56mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入化合物124 (2.5 $\mu$ L, 4mM溶液在DMF中, 10当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1

天,然后使用离心过滤器(Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa,Merck-Millipore)将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示产物(计算质量49406Da,观测质量49409Da),对应于分子内交联的曲妥珠单抗衍生物215。HPLC-SEC显示<4%的聚集,因此不包括分子间交联。

[0714] 实施例151.曲妥珠单抗-(叠氮化物)<sub>2</sub>与二价接头125分子内交联以获得216

[0715] 向曲妥珠单抗-(6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub>(7.5μL,150μg,17.56mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入化合物125(2.5μL,0.8mM溶液在DMF中,2当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天,然后使用离心过滤器(Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa,Merck-Millipore)将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物(计算质量49184Da,观测质量49184Da),对应于分子内交联的曲妥珠单抗衍生物216。HPLC-SEC显示<4%的聚集,因此不包括分子间交联。

[0716] 实施例152.曲妥珠单抗-(叠氮化物)<sub>2</sub>与二价接头145分子内交联以获得217

[0717] 向曲妥珠单抗-(6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub>(320μL,2mg,5.56mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入化合物145(80μL,1.66mM溶液在DMF中,10当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天,然后使用离心过滤器(Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa,Merck-Millipore)将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物(计算质量49796Da,观察质量49807Da),对应于分子内交联的曲妥珠单抗衍生物217。HPLC-SEC显示<4%的聚集,因此不包括分子间交联。

[0718] 实施例153.曲妥珠单抗-(叠氮化物)<sub>2</sub>与二价接头-有效负载构建体137分子内交联以获得DAR1 ADC 218

[0719] 向曲妥珠单抗-(6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub>(37.5μL,250μg,6.67mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入化合物137(12.5μL,0.67mM溶液在DMF中,5当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天,然后使用离心过滤器(Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa,Merck-Millipore)将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物(计算质量50464Da,观测质量50474Da),对应于通过分子内交联获得的缀合ADC 218。HPLC-SEC显示<4%的聚集,因此不包括分子间交联。RP-HPLC显示Fc/2(t<sub>r</sub> 6.099)、Fc-毒素(t<sub>r</sub> 8.275,对应于总Fc/2片段的82.4%)和Fab(t<sub>r</sub> 9.320)片段。

[0720] 实施例154.曲妥珠单抗-(叠氮化物)<sub>2</sub>与二价接头-有效负载构建体131分子内交联以获得DAR1 ADC 219

[0721] 向曲妥珠单抗-(6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub>(37.5μL,250μg,6.67mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入化合物131(12.5μL,0.67mM溶液在DMF中,5当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天,然后使用离心过滤器(Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa,Merck-Millipore)将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物(计算质量50638Da,观测质量50649Da),对应于通过分子内交联获得的ADC 219。HPLC-SEC显示<4%的聚集,因此不包括分子间交联。RP-HPLC显示Fc/2(t<sub>r</sub> 6.082)、Fc-毒素(t<sub>r</sub> 9.327,对应于总Fc/2片段的76.7%)和Fab(t<sub>r</sub> 9.347)片段。

[0722] 实施例155.曲妥珠单抗-(叠氮化物)<sub>2</sub>与二价接头-有效负载构建体139分子内交联以获得DAR1 ADC 220

[0723] 向曲妥珠单抗-(6-叠氮基-GalNAc)<sub>2</sub>(37.5μL,250μg,6.67mg/mL在PBS pH 7.4中)

的溶液中加入化合物139 (12.5 $\mu$ L, 0.67mM溶液在DMF中, 5当量相较于IgG)。反应在室温下孵育1天, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck-Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物 (计算质量50392Da, 观测质量50402Da), 对应于通过分子内交联获得的ADC 220。HPLC-SEC显示<4%的聚集, 因此不包括分子间交联。RP-HPLC显示Fc/2 ( $t_r$  6.062)、Fc-毒素 ( $t_r$  8.548, 对应于总Fc/2片段的89.5%) 和Fab ( $t_r$  9.295) 片段。

[0724] 实施例156. 曲妥珠单抗衍生物217 (含有单个BCN) 与四嗪修饰的抗CD3免疫细胞接合器204分子内交联以得到具有2:1分子形式的T细胞接合器221

[0725] 向217 (8 $\mu$ L, 141 $\mu$ g, 17.7mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪 (204, 13.15 $\mu$ L, 280 $\mu$ g, 21.45mg/mL在PBS pH 7.4中, 2当量相较于IgG)。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物 (计算质量77664Da, 观测质量77647Da), 对应于缀合的Fc-PEG<sub>4</sub>-hOKT3 (221)。

[0726] 实施例157. 双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v1a与三价接头145分子内交联以获得BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145

[0727] 向根据W02016170186制备的双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v1a (494 $\mu$ L, 30mg, 60.7mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入PBS pH 7.4 (2506 $\mu$ L)、丙二醇 (2980 $\mu$ L) 和三价接头145 (20 $\mu$ L, 40mM溶液在DMF中, 4.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的Superdex200 10/300GL柱 (GE Healthcare) 上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。还原性SDS-PAGE显示一种主要的HC产物, 对应于交联的重链 (参见图16, 右图, 泳道3), 表明形成了rit-v1a-145。此外, 非还原性SDS-PAGE显示一个与rit-v1a高度相同的主要条带 (参见图16, 左图, 泳道3), 表明仅发生分子内交联。

[0728] 实施例158. 双-叠氮基-B12 B12-v1a与三价接头145分子内交联以获得BCN-B12 B12-v1a-145

[0729] 向根据W02016170186制备的双-叠氮基-B12 B12-v1a (415 $\mu$ L, 4mg, 9.6mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入丙二醇 (412 $\mu$ L) 和三价接头145 (2.7 $\mu$ L, 40mM在DMF中的溶液, 4.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的Superdex200 10/300GL柱 (GE Healthcare) 上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。IdeS消化样品的RP-HPLC分析显示B12-v1a-145的形成 (参见图17)。

[0730] 实施例159. 双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v1a与双-BCN-TCO XL11分子内交联以获得TCO-曲妥珠单抗trast-v1a-XL11

[0731] 向根据W02016170186制备的双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v1a (36 $\mu$ L, 2mg, 56.1mg/mL在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入PBS pH 7.4 (164 $\mu$ L)、丙二醇 (195 $\mu$ L) 和双-BCN-TCO XL11 (5.3 $\mu$ L, 10mM溶液在DMF中, 4.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。还原性SDS-PAGE显示两种主要的HC产物, 对应于非缀合的重链和交联的重链 (参见图18, 右图, 泳道2), 表明部分转换为trast-v1a-XL11。此外, 非还原性SDS-PAGE在trast-v1a的高度显示一个主要条带 (参见图18, 左图, 泳道2), 表明仅发生分子内交联。

[0732] 实施例160. 双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v1a与双-BCN-TCO XL11分子内交联以获得TCO-利妥昔单抗rit-v1a-XL11

[0733] 向双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v1a (37 $\mu$ L, 2mg, 54.5mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入PBS pH 7.4 (163 $\mu$ L)、丙二醇 (195 $\mu$ L) 和双-BCN-TCO XL11 (5.3 $\mu$ L, 10mM溶液在DMF中, 4.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。还原性SDS-PAGE显示两种主要的HC产物, 对应于非缀合的重链和交联的重链 (参见图18, 右图, 泳道6), 表明部分转换为rit-v1a-XL11。此外, 非还原性SDS-PAGE在rit-v1a的高度显示一个主要条带 (参见图18, 左图, 泳道2), 表明仅发生分子内交联。

[0734] 实施例161. 双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v3与双-BCN-MMAE 137分子内交联以获得DAR1 ADC trast-v3-137

[0735] 向trast-v3 (15 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 10mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入双-BCN-MMAE (137, 15 $\mu$ L, 0.27mM溶液在PG中, 4当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育16小时, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物 (观测质量49719Da), 对应于通过分子内交联获得的trast-v3-137。

[0736] 实施例162. 去糖基化曲妥珠单抗与双-BCN-MMAE LD03的分子内交联

[0737] 将去糖基化的曲妥珠单抗 (8.3 $\mu$ L, 0.15mg, 18.1mg/mL在PBS 5.5中) 与双-BCN-MMAE (LD03, 8.3 $\mu$ L, 1.2mM在PG中) 和蘑菇酪氨酸酶 (3 $\mu$ L, 10mg/mL在磷酸盐缓冲液pH 6.0中, Sigma Aldrich T3824中) 在室温下孵育16小时。另参见荷兰专利申请号2026947, 通过引用纳入本文。DTT处理的ADC的RP-HPLC分析显示35%转化为trast-v4-LD03 (参见图19)。

[0738] 实施例163. 双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v3与双-BCN-MMAE LD03分子内交联以获得DAR1 ADC trast-v3-LD03

[0739] 向trast-v3 (22.5 $\mu$ L, 5mg, 6.7mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入双-BCN-MMAE (LD03, 7.5 $\mu$ L, 0.53mM溶液在DMF中, 4当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育16小时, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物 (观测质量50052Da), 对应于通过分子内交联获得的trast-v3-LD03。

[0740] 实施例164. 双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v3与双-BCN-MMAE LD03分子内交联以获得DAR1 ADC rit-v3-LD03

[0741] 向rit-v3 (22.5 $\mu$ L, 5mg, 6.7mg/mL在PBS pH 7.4中)的溶液中加入双-BCN-MMAE (LD03, 7.5 $\mu$ L, 0.53mM溶液在DMF中, 4当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育16小时, 然后使用离心过滤器 (Amicon Ultra-0.5mL MWC0 10kDa, Merck Millipore) 将缓冲液交换为PBS pH 7.4。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物 (质量49989Da), 对应于通过分子内交联获得的rit-v3-LD03。

[0742] 实施例165. 双-BCN-IL15R $\alpha$ -IL15 PF27通过菌株促进的炔烃-叠氮化物环加成 (SPAAC) 与trast-v3分子内交联 (P:A比率1:1)

[0743] Trast-v3 (2.57 $\mu$ L, 0.05mg, 19.5mg/mL在PBS中) 与双-BCN-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF27, 5.6 $\mu$ L, 3当量双-BCN标记的IL15R $\alpha$ -IL15, 7.6mg/mL在PBS中) 在室温下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一种主要的Fc/2产物 (观测质量73432Da), 对应于预期产物trast-v3-PF27。

[0744] 实施例166.hOKT3-双-BCN PF22通过SPAAC与trast-v3分子内交联(P:A比率1:1)

[0745] Trast-v3 (2.57 $\mu$ L, 0.05mg, 19.5mg/mL在PBS中)与hOKT3-双-BCN PF22 (5.15 $\mu$ L, 3当量, 5.7mg/mL在PBS中)在室温下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要的Fc/2产物(观测质量77150Da), 对应于预期产物trast-v3-PF22。

[0746] 实施例167.hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-204

[0747] 向rit-v1a-145 (287 $\mu$ L, 6.6mg, 154 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中添加hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204 (247 $\mu$ L, 1.9mg, 269 $\mu$ M在PBS pH 6.5中, 1.5当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare)上的Superdex200 10/300GL柱 (GE Healthcare)上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物, 由与单个hOKT3缀合的抗体组成(参见图16, 左图, 泳道5), 从而证实rit-v1a-145-204的形成。此外, 还原性SDS-PAGE证实了一种主要的HC产物, 对应于与单个hOKT3缀合的两条重链(参见图16, 右图, 泳道5)。

[0748] 实施例168.hOKT3-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF01与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF01

[0749] 向rit-v1a-145 (247 $\mu$ L, 6.3mg, 171 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF01 (304 $\mu$ L, 2.0mg, 230 $\mu$ M在PBS pH 6.5中, 1.7当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare)上的Superdex200 10/300GL柱 (GE Healthcare)上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物, 由与单个hOKT3缀合的抗体组成(参见图16, 左图, 泳道6), 从而证实rit-v1a-145-PF01的形成。此外, 还原性SDS-PAGE证实了一种主要的HC产物, 对应于与单个hOKT3缀合的两条重链(参见图16, 右图, 泳道6)。

[0750] 实施例169.hOKT3-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF01与BCN-B12 B12-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器B12-v1a-145-PF01

[0751] 向B12-v1a-145 (38 $\mu$ L, 1.0mg, 178 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF01 (44 $\mu$ L, 0.3mg, 230 $\mu$ M在PBS pH 6.5中, 1.5当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare)上的Superdex200 10/300GL柱 (GE Healthcare)上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物, 由与单个hOKT3缀合的抗体组成(参见图20, 泳道4), 从而证实了B12-v1a-145-PF01的形成。

[0752] 实施例170.hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204与TCO-曲妥珠单抗trast-v1a-XL11缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-XL11-204

[0753] 向TCO-曲妥珠单抗trast-v1a-XL11 (5.7 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 117 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204 (5 $\mu$ L, 38 $\mu$ g, 269 $\mu$ M在PBS pH 6.5中, 2.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示两种主要产物, 对应于非缀合的抗体和缀合于单个hOKT3的抗体(参见图22, 左图, 泳道3), 从而证实了trast-v1a-XL11-204的形成。此外, 还原性SDS-PAGE证实了OKT3与含有TCO反应部分(reactive handle)的交联重链缀合(参见图22, 右图, 泳道3)。

[0754] 实施例171.hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204与TCO-利妥昔单抗trast-v1a-XL11缀合以获得

2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-XL11-204

[0755] 向TCO-利妥昔单抗rit-v1a-XL11 (56.3 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 106 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>4</sub>-四嗪204 (5 $\mu$ L, 38 $\mu$ g, 269 $\mu$ M在PBS pH 6.5中, 2.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示两种主要产物, 对应于非缀合的抗体和缀合于单个hOKT3的抗体 (参见图22, 左图, 泳道7), 从而证实了trast-v1a-XL11-204的形成。此外, 还原性SDS-PAGE证实了OKT3与含有TCO反应部分的交联重链缀合 (参见图22, 右图, 泳道7)。

[0756] 实施例172.hOKT3-PEG<sub>23</sub>-四嗪PF02与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF02

[0757] 向rit-v1a-145 (247 $\mu$ L, 6.3mg, 171 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>23</sub>-四嗪PF02 (262 $\mu$ L, 2.0mg, 267 $\mu$ M在PBS pH 6.5中, 1.7当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的Superdex200 10/300GL柱 (GE Healthcare) 上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物, 由与单个hOKT3缀合的抗体组成 (参见图18, 左图, 泳道7), 从而证实了rit-v1a-145-PF02的形成。此外, 还原性SDS-PAGE证实了一种主要的HC产物, 对应于与单个hOKT3缀合的两条重链 (参见图18, 右图, 泳道7)。

[0758] 实施例173.hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03与BCN-曲妥珠单抗trast-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-145-PF03

[0759] 向trast-v1a-145 (2.9 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 347 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03 (4.9 $\mu$ L, 56 $\mu$ g, 411 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 2.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。还原样品的质谱分析显示一种主要的重链产物 (观测质量为128388Da), 对应于trast-v1a-145-PF03。

[0760] 实施例174.hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF03

[0761] 向rit-v1a-145 (30 $\mu$ L, 1.5mg, 337 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入hOKT3-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF03 (49 $\mu$ L, 0.6mg, 411 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 2.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜, 然后在AKTA Purifier-10 (GE Healthcare) 上的Superdex200 10/300GL柱 (GE Healthcare) 上使用PBS pH 7.4作为流动相进行纯化。还原样品的质谱分析显示一种主要的重链产物 (观测质量128211Da), 对应于rit-v1a-145-PF03。

[0762] 实施例175.双-BCN-hOKT3 PF22与双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-PF22

[0763] 向trast-v1a (1.8 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 374 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入PBS pH 7.4 (4.5 $\mu$ L) 和双-BCN-hOKT3 PF22 (13.7 $\mu$ L, 78 $\mu$ g, 194 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 4.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物, 由与单个hOKT3缀合的抗体组成 (参见图21, 泳道5), 从而证实了trast-v1a-PF22的形成。

[0764] 实施例176.双-BCN-hOKT3 PF22与双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF22

[0765] 向rit-v1a (1.8 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 363 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入PBS pH 7.4 (7.9 $\mu$ L) 和双-BCN-hOKT3 PF22 (10.3 $\mu$ L, 58 $\mu$ g, 194 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 3.0当量相较于IgG)。将反

应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物,由与单个hOKT3缀合的抗体组成(参见图21,泳道4),从而证实了rit-v1a-PF22的形成。

[0766] 实施例177. 双-BCN-hOKT3 PF23与双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-PF23

[0767] 向trast-v1a (1.8 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 373 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入PBS pH 7.4 (9.9 $\mu$ L)和双-BCN-hOKT3 PF23 (8.4 $\mu$ L, 58 $\mu$ g, 239 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 3.0当量相较于IgG)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示两种主要产物,由非缀合的曲妥珠单抗和与双-BCN-hOKT3 PF23缀合的曲妥珠单抗组成(参见图22,泳道2),从而证实了trast-v1a-PF23的部分形成。

[0768] 实施例178. 双-BCN-hOKT3 PF23与双-叠氮基-利妥昔单抗rit-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-PF23

[0769] 向rit-v1a (1.8 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 363 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入PBS pH 7.4 (13.6 $\mu$ L)和双-BCN-hOKT3 PF23 (4.3 $\mu$ L, 30 $\mu$ g, 239 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 1.5当量相较于IgG)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示两种主要产物,由非缀合的利妥昔单抗和与双-BCN-hOKT3 PF23缀合的利妥昔单抗组成(参见图23,泳道5),从而证实了rit-v1a-PF23的部分形成。

[0770] 实施例179. 4-1BB-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF08与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF08

[0771] 向rit-v1a-145 (35 $\mu$ L, 0.9mg, 170 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入4-1BB-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF08 (40 $\mu$ L, 248 $\mu$ g, 222 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 1.5当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物,由与4-1BB-PEG<sub>23</sub>-BCN PF08缀合的利妥昔单抗组成(参见图20,泳道3),从而证实了rit-v1a-145-PF08的部分形成。

[0772] 实施例180. 4-1BB-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF08与BCN-B12 B12-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器B12-v1a-145-PF08

[0773] 向B12-v1a-145 (34 $\mu$ L, 0.9mg, 178 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入4-1BB-PEG<sub>11</sub>-四嗪PF08 (40 $\mu$ L, 248 $\mu$ g, 222 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 1.5当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物,由与4-1BB-PEG<sub>23</sub>-BCN PF08缀合的B12组成(参见图20,泳道5),从而证实了B12-v1a-145-PF08的部分形成。

[0774] 实施例181. 4-1BB-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF09与BCN-曲妥珠单抗trast-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-145-PF09

[0775] 向trast-v1a-145 (1.9 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 347 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入4-1BB-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF09 (5.9 $\mu$ L, 37 $\mu$ g, 225 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 2.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物,由与4-1BB-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF09缀合的曲妥珠单抗组成(参见图24,泳道4),从而证实了trast-v1a-145-PF09的部分形成。

[0776] 实施例182. 4-1BB-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF09与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF09

[0777] 向rit-v1a-145 (2.0 $\mu$ L, 100 $\mu$ g, 337 $\mu$ M在PBS pH 7.4中)的溶液中加入4-1BB-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF09 (5.9 $\mu$ L, 37 $\mu$ g, 225 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 2.0当量相较于IgG)。将反应在室温下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物,由与单个4-1BB-PEG<sub>2</sub>-芳基叠氮PF09

缀合的利妥昔单抗组成(参见图24,泳道2),从而证实了trast-v1a-145-PF09的部分形成。

[0778] 实施例183. 四嗪-PEG<sub>3</sub>-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF12) 与BCN-曲妥珠单抗trast-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-145-PF12

[0779] Trast-v1a-145 (75 $\mu$ L, 1.575mg, 21mg/mL在PBS中) 与PF12 (80 $\mu$ L, 2当量, 6.5mg/mL在PBS中) 在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。非还原性SDS-PAGE分析证实了Trast-v1a-145-PF12的形成(参见图25,泳道5)。

[0780] 实施例184. 芳基叠氮-PEG<sub>11</sub>-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF13) 与BCN-曲妥珠单抗trast-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-145-PF13

[0781] Trast-v1a-145 (280 $\mu$ L, 5.2mg, 18.6mg/mL在PBS中) 与PF13 (477 $\mu$ L, 1.5当量, 2.6mg/mL在PBS中) 在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要产物为73991Da, 对应于与PF13缀合的交联Fc片段(预期质量73989Da), 从而证实了trast-v1a-145-PF13的形成。

[0782] 实施例185. 芳基叠氮-PEG<sub>11</sub>-GGG-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF13) 与BCN-利妥昔单抗Rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器Rit-v1a-145-PF13

[0783] Rit-v1a-145 (0.5 $\mu$ L, 0.025mg, 50.6mg/mL在PBS中) 与PF13 (6.6 $\mu$ L, 4当量, 2.6mg/mL在PBS中) 在室温下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要产物为73927Da, 对应于与PF13缀合的交联Fc片段(预期质量73925Da), 从而证实了rit-v1a-145-PF13的形成。

[0784] 实施例186. 双-BCN-SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF27) 与双-叠氮基-曲妥珠单抗trast-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-145-PF27

[0785] Trast-v1a (1.78 $\mu$ L, 0.099mg, 56.1mg/mL在PBS中) 与PF27 (18.4 $\mu$ L, 4当量, 7.62mg/mL在PBS中) 和2.87 $\mu$ L PBS在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要产物为74193Da, 对应于与PF27缀合的交联Fc片段(预期质量74178Da), 从而证实了trast-v1a-145-PF27的形成。

[0786] 实施例187. 双-BCN-SYR-(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15R $\alpha$ -IL15 (PF27) 与双-叠氮基-利妥昔单抗Rit-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器Rit-v1a-145-PF27

[0787] Rit-v1a (1 $\mu$ L, 0.055mg, 54.6mg/mL在PBS中) 与PF27 (8.9 $\mu$ L, 4当量, 6.2mg/mL在PBS中) 和1.6 $\mu$ L PBS在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要产物为74118Da, 对应于与PF27缀合的交联Fc片段(预期质量74114Da), 从而证实了rit-v1a-145-PF27的形成。

[0788] 实施例188. 叠氮基-IL15R $\alpha$ -IL15 PF17与BCN-曲妥珠单抗trast-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-145-PF17

[0789] 向trast-v1a-145 (29 $\mu$ L, 1.5mg, 347 $\mu$ M在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入叠氮基-IL15R $\alpha$ -IL15 PF17 (97 $\mu$ L, 1.1mg, 411 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 4.0当量相较于IgG)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物, 由与单个叠氮基-IL15R $\alpha$ -IL15 PF17缀合的曲妥珠单抗组成(参见图26,泳道4), 从而证实了trast-v1a-145-PF17的形成。

[0790] 实施例189. 叠氮基-IL15R $\alpha$ -IL15 PF17与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF17

[0791] 向rit-v1a-145 (3 $\mu$ L, 150 $\mu$ g, 337 $\mu$ M在PBS pH 7.4中) 的溶液中加入叠氮基-IL15R

$\alpha$ -IL15 PF17 (9.7 $\mu$ L, 111 $\mu$ g, 411 $\mu$ M在PBS pH 7.4中, 4.0当量相较于IgG)。将反应在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。非还原性SDS-PAGE分析显示一种主要产物, 由与单个叠氮基-IL15R $\alpha$ -IL15 PF17缀合的利妥昔单抗组成(参见图26, 泳道2), 从而证实了rit-v1a-145-PF17的形成。

[0792] 实施例190. 叠氮基-IL15 PF19与BCN-曲妥珠单抗tras-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器tras-v1a-145-PF19

[0793] Trast-v1a-145 (4.0 $\mu$ L, 0.075mg, 18.6mg/mL在PBS中) 与PF19 (4.6 $\mu$ L, 5当量, 7.7mg/mL在PBS中) 在室温下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要产物为63941Da, 对应于与PF19缀合的交联Fc片段(预期质量63936Da), 从而证实了trast-v1a-145-PF19的形成。

[0794] 实施例191. 叠氮基-IL15 PF19与BCN-利妥昔单抗rit-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器rit-v1a-145-PF19

[0795] Rit-v1a-145 (2.0 $\mu$ L, 0.112mg, 50.6mg/mL在PBS中) 与PF19 (5.1 $\mu$ L, 4当量, 7.7mg/mL在PBS中) 在室温下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要产物为63882Da, 对应于与PF19缀合的交联Fc片段(预期质量63879Da), 从而证实了rit-v1a-145-PF19的形成。

[0796] 实施例192. 双-BCN-SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF29) 与双-叠氮基-曲妥珠单抗tras-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器tras-v1a-PF29

[0797] Trast-v1a (1 $\mu$ L, 0.056mg, 56.1mg/mL在PBS中) 与PF29 (11 $\mu$ L, 4当量, 3.6mg/mL在PBS中) 在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。非还原性SDS-PAGE分析显示两种主要产物, 对应于非缀合的曲妥珠单抗和与单个双-BCN-SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 PF29缀合的曲妥珠单抗(参见图27, 泳道2), 从而证实了部分转化为Tras-v1a-PF29。

[0798] 实施例193. 双-BCN-SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF29) 与双-叠氮基-利妥昔单抗Rit-v1a缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器Rit-v1a-PF29

[0799] Rit-v1a (1 $\mu$ L, 0.055mg, 54.6mg/mL在PBS中) 与PF29 (11 $\mu$ L, 4当量, 3.6mg/mL在PBS中) 在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。非还原性SDS-PAGE分析显示两种主要产物, 对应于非缀合的利妥昔单抗和与单个双-BCN-SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 PF29缀合的利妥昔单抗组成(参见图27, 泳道4), 从而证实了部分转化为rit-v1a-PF29。

[0800] 实施例194. 四嗪-PEG<sub>12</sub>-SYR- $(G_4S)_3$ -IL15 (PF21) 与BCN-曲妥珠单抗trast-v1a-145缀合以获得2:1分子形式的T细胞接合器trast-v1a-145-PF21

[0801] Trast-v1a (2 $\mu$ L, 0.042mg, 21mg/mL在PBS中) 与PF21 (10 $\mu$ L, 6.7当量, 2.9mg/mL在PBS中) 在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。IdeS处理后样品的质谱分析显示一个主要产物为64865Da, 对应于与PF21缀合的交联Fc片段(预期质量64863Da), 从而证实了trast-v1a-145-PF21的形成。

[0802] 实施例195. CD3结合分析

[0803] 使用在细胞表面表达CD3的Jurkat E6.1细胞和在细胞表面不表达CD3的MOLT-4细胞评估与CD3的特异性结合。两种细胞系均在补充有1% pen/strep和10% 胎牛血清的RPMI 1640中培养, 浓度为 $2 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^6$ 细胞/ml。实验前将细胞在新鲜培养基中洗涤, 并以每孔100,000个细胞接种在96孔板(双孔)中。6种抗体的稀释系列在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中制备。将抗体在细胞悬液中稀释10倍, 并在4 $^{\circ}$ C下避光孵育30分钟。孵育后, 将细胞在冷冻PBS/

0.5%BSA中洗涤两次,并与抗HIS-PE(仅适用于200)或抗IgG1-PE(适用于所有其他化合物)在4℃下在黑暗中孵育30分钟。在第二个孵育步骤之后,将细胞洗涤两次。添加7AAD进行活-死染色。使用Guava 5HT流式细胞仪进行黄色B通道(抗IgG1-PE和抗HIS-PE)和红色B通道(7AAD)中的荧光的检测。活细胞中黄色B通道(抗IgG1-PE和抗HIS-PE)中的平均荧光强度用Kaluzza软件测定。所有双特异性抗体,除了阴性对照利妥昔单抗,都显示出与CD3阳性Jurkat E6.1细胞系的浓度依赖性结合(表1)。相比之下,没有观察到与CD3阴性MOLT-4细胞系的结合(表2)。

[0804] 表1.通过FACS分析与CD3阳性细胞(Jurkat E6.1)结合的抗体。显示了每个测试浓度的重复的平均荧光强度。

浓度(nM)	Rit-v1a-201	Rit-v1a-145-204	Rit-v1a-145-PF01	Rit-v1a-145-PF02	利妥昔单抗	200
0.32	104.79	77.80	80.30	58.79	58.28	63.63
1	90.00	82.15	88.23	71.52	56.55	66.22
3.16	159.28	112.67	116.72	114.55	55.37	83.74
10	160.91	113.22	142.62	168.91	60.83	109.70
31.6	202.99	165.47	221.00	229.84	58.71	154.42
100	248.66	200.74	252.20	278.91	55.49	177.16
316	294.49	263.83	256.79	291.09	54.99	223.52
1000	420.46	315.13	366.89	355.26	66.36	416.61

[0806] 表2.通过FACS分析与CD3阴性细胞(MOLT-4)结合的抗体。显示了每个测试浓度的平均荧光强度。

浓度(nM)	Rit-v1a-201	Rit-v1a-145-204	Rit-v1a-145-PF01	Rit-v1a-145-PF02	利妥昔单抗	200
1	75.76	78.38	79.32	73.79	78.96	79.40
10	72.18	75.93	81.42	72.70	75.92	76.59
100	61.51	62.37	79.01	70.44	68.42	70.49
1000	62.96	73.90	59.89	61.81	67.39	61.37

[0808] 实施例196.FcRn结合分析

[0809] 使用Biacore T200(序列号1909913)使用单循环动力学并运行Biacore T200评估软件V2.0.1在pH 7.4和pH 6.0下测定与FcRn受体的结合。CM5芯片在乙酸钠pH 5.5中通过标准胺化学与FcRn偶联。在PBS pH 7.4时使用0.05%吐温-20(9点(points);2倍稀释系列;8000nM最高浓度(Top conc.))和在PBS pH 6.0时使用0.05%吐温-20(3点;2倍稀释系列;4000nM最高浓度)测定双特异性抗体和对照的系列稀释度。使用30 $\mu$ l/min的流速和40秒的结合时间和75秒的解离时间。稳态分析用于分析样品。在pH 6.0下观察到所有双特异性抗体的FcRn结合,在pH 7.4下未观察到结合(表3)

[0810] 表3.Biacore测定的不同双特异性抗体、中间体和对照抗体在pH 6.0或pH 7.4时与FcRn的结合。

	抗体	pH	K <sub>D</sub> (M)	R <sub>MAX</sub> (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
[0811]	不相关的 IgC1 WT	6.0	1.74E-06	67	0.783
		7.4	-	-	-
	利妥昔单抗	6.0	1.57E-06	96.4	2.82
		7.4	-	-	-
	Rit-v1a-201	6.0	2.16E-06	149.6	8.53
		7.4	-	-	-
	Rit-v1a-145-204	6.0	1.91E-06	122.9	5.36
		7.4	-	-	-
	Rit-v1a-145-PF01	6.0	1.90E-06	114.6	4.02
		7.4	-	-	-
	Rit-v1a-145-PF02	6.0	2.05E-06	123.5	5.47
		7.4	-	-	-
	Rit-v1a-145	6.0	1.89E-06	89.8	2.01
		7.4	-	-	-

[0812] 实施例197. 双特异性抗体对人PBMC杀伤Raji-B肿瘤细胞的影响。

[0813] 将Raji-B细胞 (5e4细胞) 和人PBMC (5e5) (1:10细胞比率) 接种到96孔板中的重复孔中。将双特异性抗体的系列稀释液 (1:10稀释度; 8点; 10nM最高浓度) 加入到孔中, 并在37°C下在组织培养箱中孵育24小时。样品用CD19、CD20抗体染色, 并在获取BD Fortessa细胞分析仪之前添加碘化丙啶。基于PI-/CD19+/CD20+染色通过流式细胞术分析对活RajiB细胞进行定量。相对于未处理的细胞, 计算活RajiB细胞的百分比。对于基于hCKT3 200的双特异性抗体 (图28) 和基于抗4-1BB PF31的双特异性抗体 (图29), 都证明了靶向依赖性细胞杀伤。

[0814] 实施例198. 双特异性抗体对Raji-B肿瘤细胞和人PBMC的共培养物中的细胞因子分泌的影响。

[0815] 将Raji-B细胞 (5e4细胞) 和人PBMC (5e5) (1:10细胞比率) 接种到96孔板中的重复孔中。将双特异性抗体的系列稀释液 (1:10稀释度; 8点; 10nM最高浓度) 加入到孔中, 并在37°C下在组织培养箱中孵育24小时。对上清液进行TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  和IL-10的细胞因子分析 (试剂盒: HCYTOMAG-60K-05, Merck Millipore)。图30显示了基于hCKT3 200的双特异性抗体的细胞因子水平, 图31显示了基于抗4-1BB PF31的双特异性抗体的细胞因子水平。

[0816] 序列表

[0817] C端分选酶A识别序列的序列鉴定 (SEQ.ID NO:1):

[0818] GGGSGGGSLPETGGHHHHHHHHHH

[0819] 分选酶A的序列鉴定 (SEQ.ID NO:2):

[0820] TGSHHHHHHGSKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVKEQASKDKKQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADI  
KEPVYPGPATPEQLNRGVSFAEENESLDDQNI SIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRD

VKPTDVGVLDEQKGDQKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK

[0821] His6-TEVsite-GGG-IL15 $\alpha$ -IL15的序列鉴定 (SEQ.ID NO:3) :

[0822] MGSSHHHHHSSGENLYFQGGGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVL  
NKATNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRAPPSSGGSGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYT  
ESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFV  
HIVQMFINTS

[0823] 抗-4-1BB PF31的序列鉴定 (SEQ.ID NO:4) :

[0824] DIVMTQSPPTLSLSPGERVTLSCRASQISDYLHWYQQKPGQSPRLLIKYASQISGIPARFSGSGSGT  
DFTLTISSLEPEDFAVYYCQDGHSPPTFGGGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVK  
VSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQRLEWMGEINPGNGHTNYSQKFQGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYC  
ARSFTTARAFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSLPETGGHHHHHH

[0825] SYR- (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 (PF18) 的序列鉴定 (SEQ.ID NO:5) :

[0826] SYRGGGSGGGSGGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVIS  
LESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

[0827] SYR- (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>-IL15 $\alpha$ -接头-IL15 (PF26) 的序列鉴定 (SEQ.ID NO:6) :

[0828] SYRGGGSGGGSGGGGITCPPPMSVEHADINIVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTSSLTECVLNKA  
TNVAHWTTPSLKCIRDPALVHQRAPPSSGGSGGGSGGGSGGGSLQNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESD  
VHPSCKVTAMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIV  
QMFINTS

## 序列表

&lt;110&gt; Synaffix B.V.

&lt;120&gt; 通过环加成的DAR1缀合物

&lt;130&gt; P6090977PCT

&lt;150&gt; EP 20151551.7

&lt;151&gt; 2020-01-13

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; c端分选酶A识别序列的序列鉴定

&lt;400&gt; 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Pro Glu Thr Gly Gly  
 1                    5                    10                    15  
 His  
                   20                    25

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 分选酶A的序列鉴定

&lt;400&gt; 2

Thr Gly Ser His His His His His His Gly Ser Lys Pro His Ile Asp  
 1                    5                    10                    15  
 Asn Tyr Leu His Asp Lys Asp Lys Asp Glu Lys Ile Glu Gln Tyr Asp  
                   20                    25                    30  
 Lys Asn Val Lys Glu Gln Ala Ser Lys Asp Lys Lys Gln Gln Ala Lys  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Ile Pro Lys Asp Lys Ser Lys Val Ala Gly Tyr Ile Glu Ile  
                   50                    55                    60  
 Pro Asp Ala Asp Ile Lys Glu Pro Val Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Pro  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Gln Leu Asn Arg Gly Val Ser Phe Ala Glu Glu Asn Glu Ser Leu  
                   85                    90                    95

Asp Asp Gln Asn Ile Ser Ile Ala Gly His Thr Phe Ile Asp Arg Pro  
 100 105 110  
 Asn Tyr Gln Phe Thr Asn Leu Lys Ala Ala Lys Lys Gly Ser Met Val  
 115 120 125  
 Tyr Phe Lys Val Gly Asn Glu Thr Arg Lys Tyr Lys Met Thr Ser Ile  
 130 135 140  
 Arg Asp Val Lys Pro Thr Asp Val Gly Val Leu Asp Glu Gln Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Asp Lys Gln Leu Thr Leu Ile Thr Cys Asp Asp Tyr Asn Glu Lys  
 165 170 175  
 Thr Gly Val Trp Glu Lys Arg Lys Ile Phe Val Ala Thr Glu Val Lys  
 180 185 190

<210> 3

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> His6-TEVsite-GGG-IL15R -IL15的序列鉴定

<400> 3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Glu Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Tyr Phe Gln Gly Gly Gly Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu  
 20 25 30  
 His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg  
 35 40 45  
 Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu  
 50 55 60  
 Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro  
 85 90 95  
 Ala Pro Pro Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Leu Gln Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu  
 115 120 125  
 Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu  
 130 135 140  
 Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys  
 145 150 155 160

Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala  
 165 170 175  
 Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser  
 180 185 190  
 Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu  
 195 200 205  
 Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His  
 210 215 220  
 Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser  
 225 230  
 <210> 4  
 <211> 268  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 抗-4-1BB PF31的序列鉴定  
 <400> 4  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Pro Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asp Gly His Ser Phe Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln  
 115 120 125  
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser  
 130 135 140  
 Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp  
 145 150 155 160  
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly  
 165 170 175

Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Ser Gln Lys Phe Gln  
 180 185 190  
 Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met  
 195 200 205  
 Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 210 215 220  
 Arg Ser Phe Thr Thr Ala Arg Ala Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 245 250 255  
 Leu Pro Glu Thr Gly Gly His His His His His His  
 260 265

<210> 5

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SYR- (G4S) 3-IL15 (PF18) 的序列鉴定

<400> 5

Ser Tyr Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp  
 20 25 30  
 Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp  
 35 40 45  
 Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu  
 50 55 60  
 Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr  
 65 70 75 80  
 Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly  
 85 90 95  
 Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys  
 100 105 110  
 Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe  
 115 120 125  
 Ile Asn Thr Ser  
 130

<210> 6

<211> 229

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SYR- (G4S) 3-IL15R?-linker-IL15 (PF26) 的序列鉴定

<400> 6

```

Ser Tyr Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1           5           10           15
Gly Ser Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile
           20           25           30
Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn
           35           40           45
Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val
           50           55           60
Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys
65           70           75           80
Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser
           85           90           95
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
           100          105          110
Ser Leu Gln Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu
           115          120          125
Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser
           130          135          140
Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu
145          150          155          160
Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp
           165          170          175
Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn
           180          185          190
Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu
           195          200          205
Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met
           210          215          220
Phe Ile Asn Thr Ser
225

```

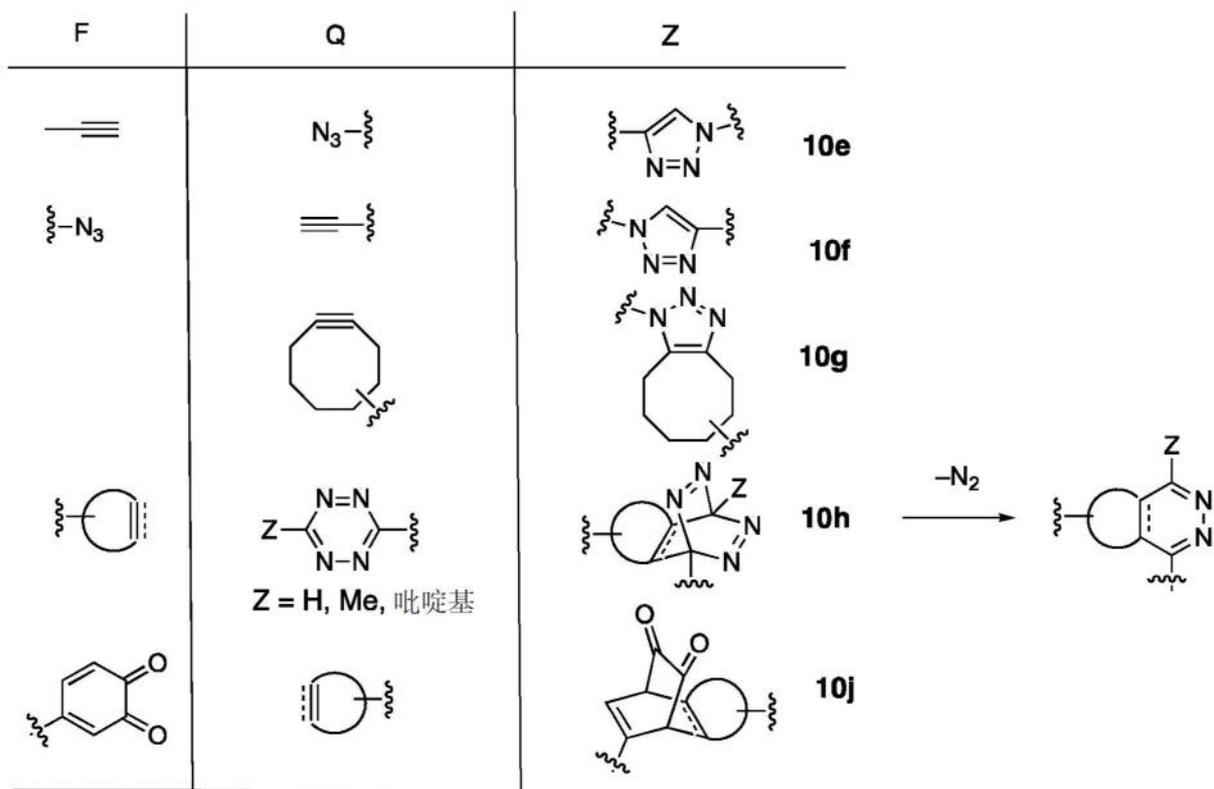


图1

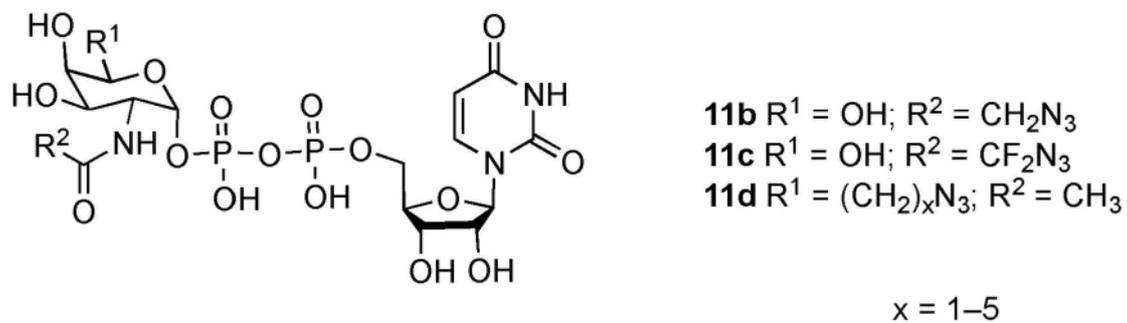


图2

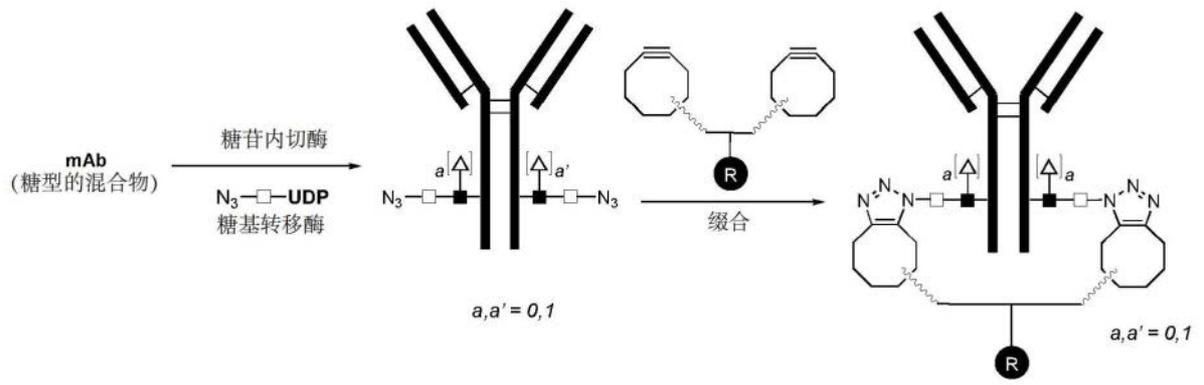


图3

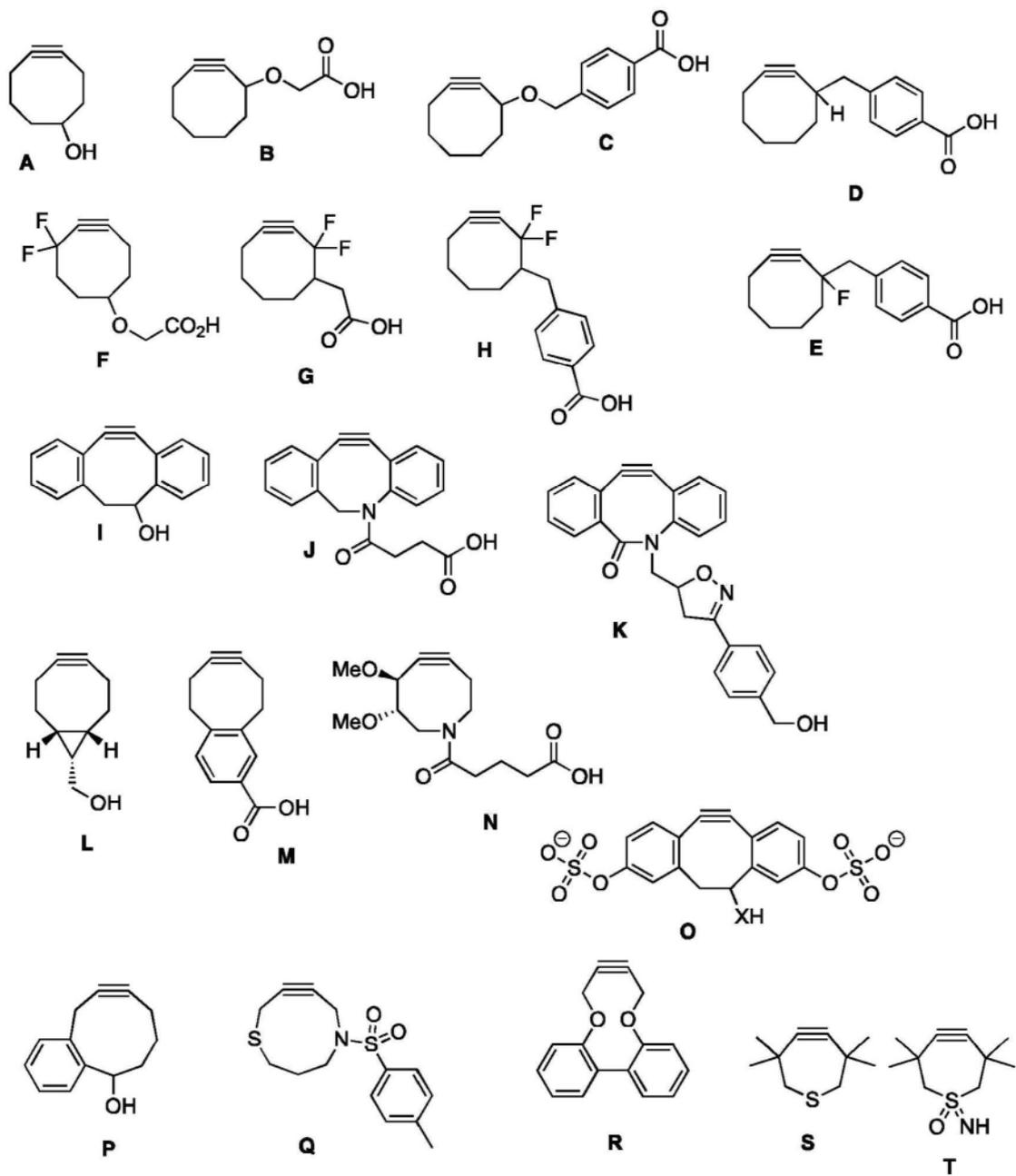


图4

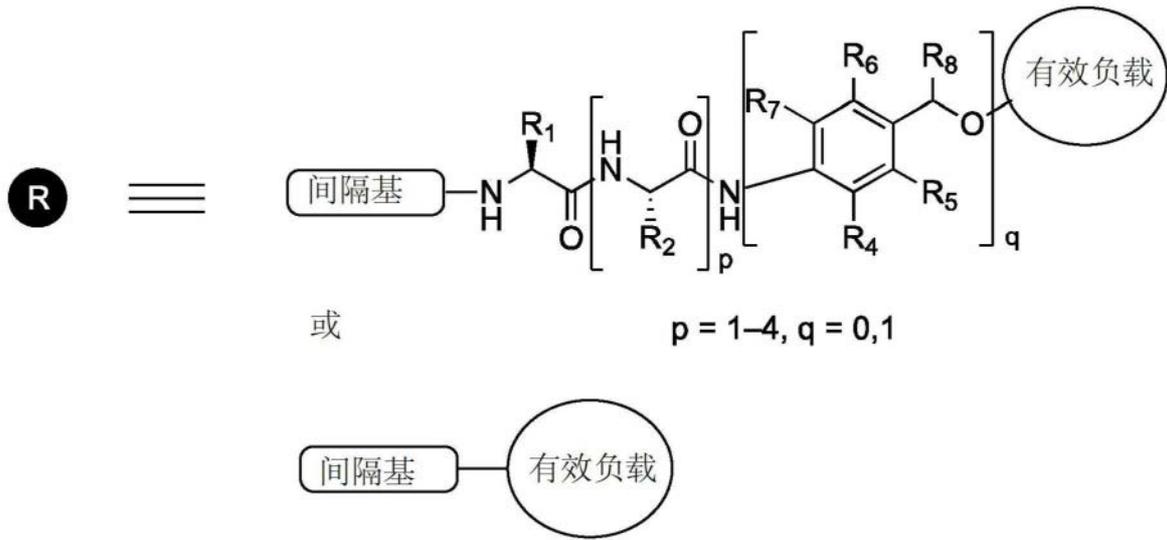


图5

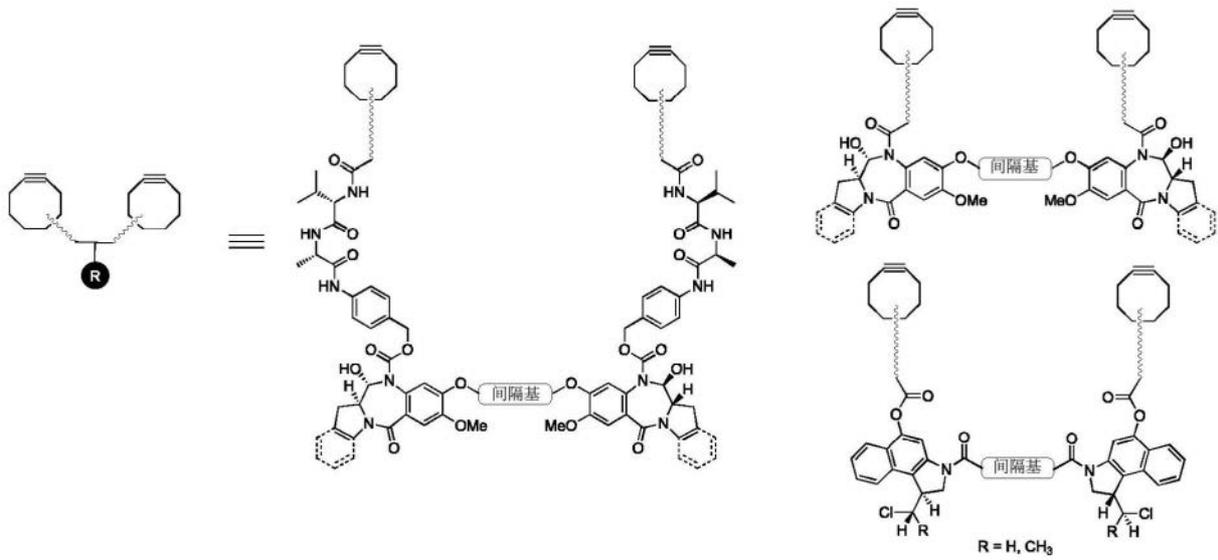


图6

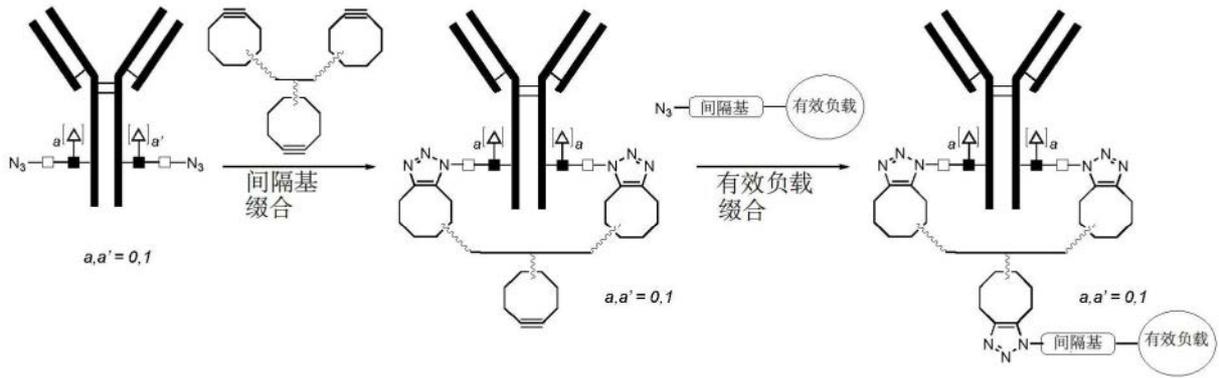


图7

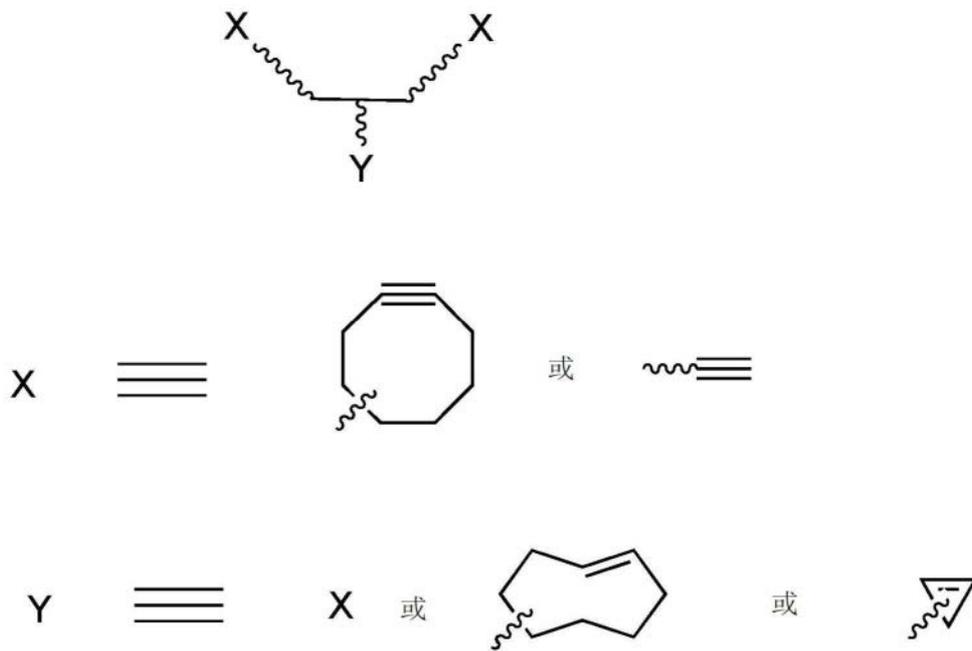


图8

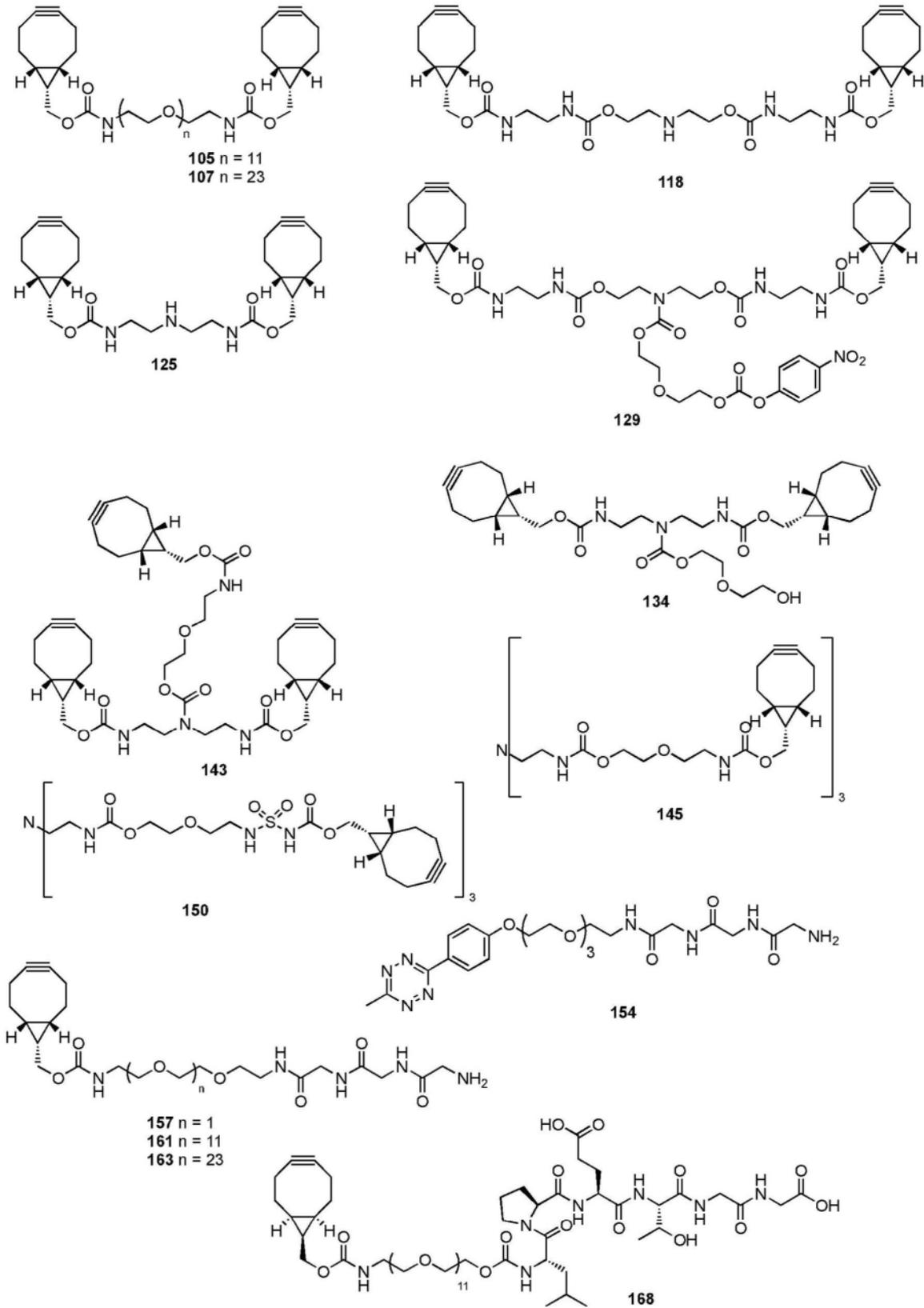


图9



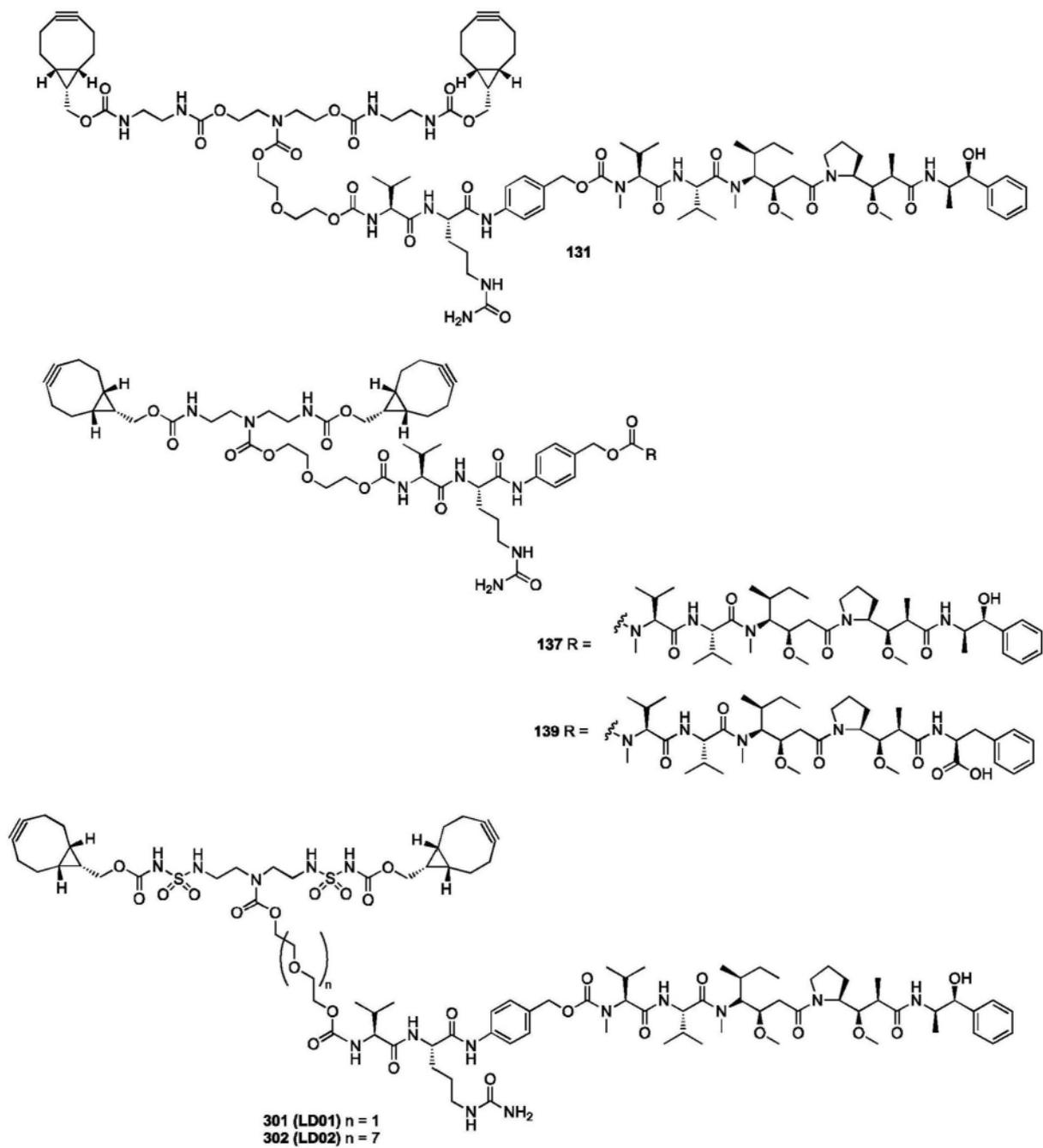


图12



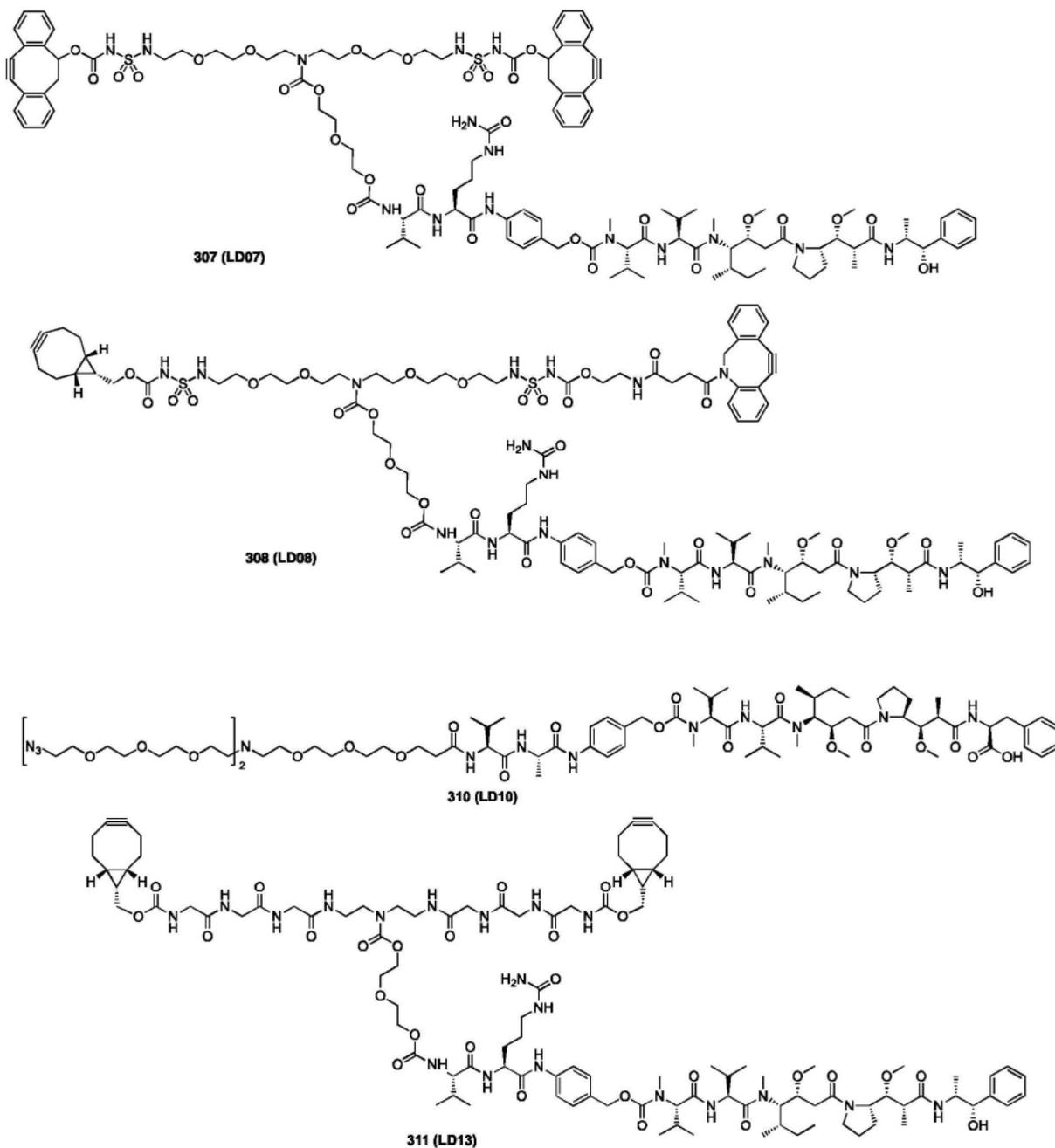


图14

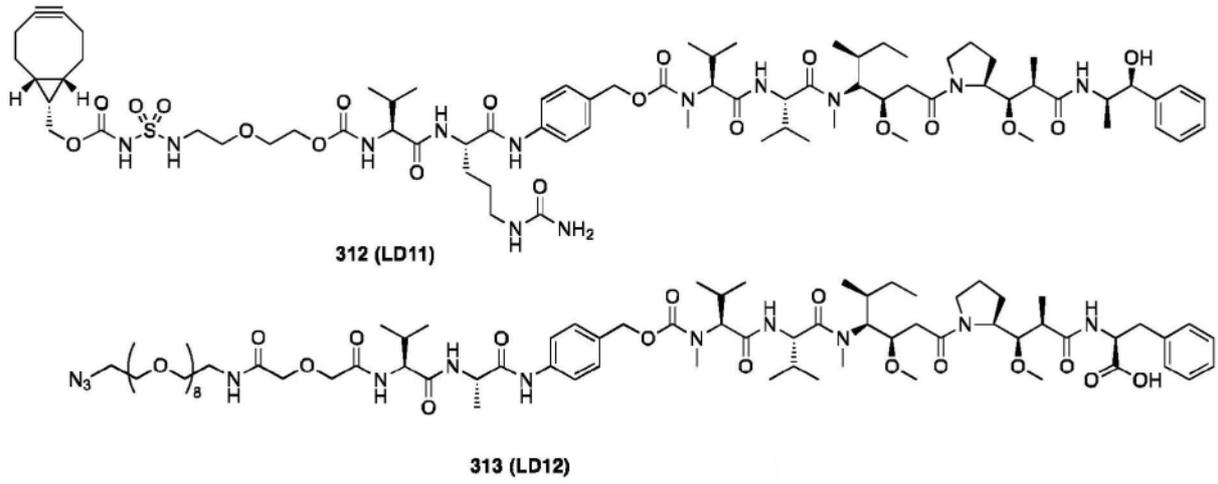


图15

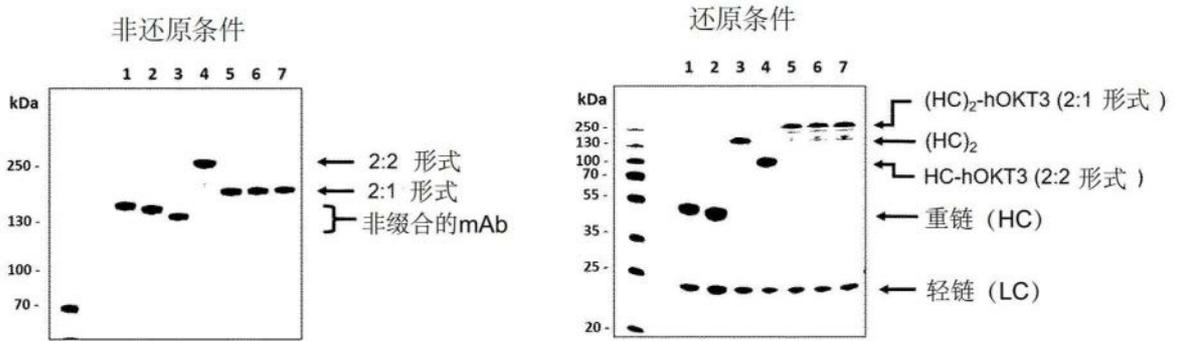


图16

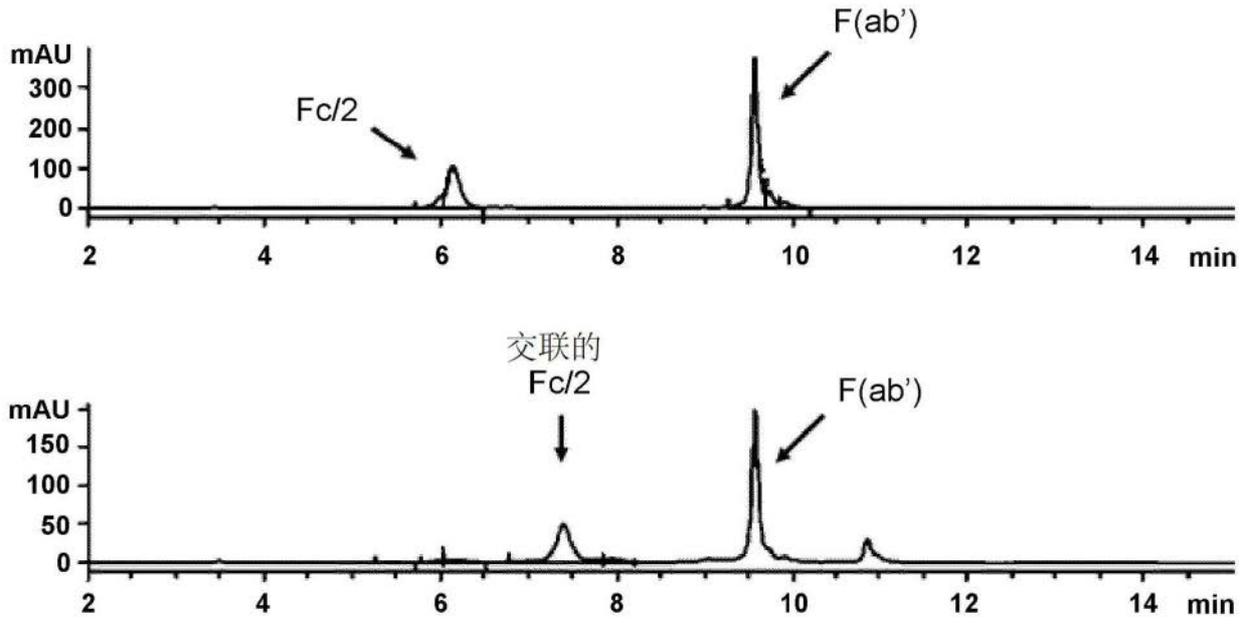


图17

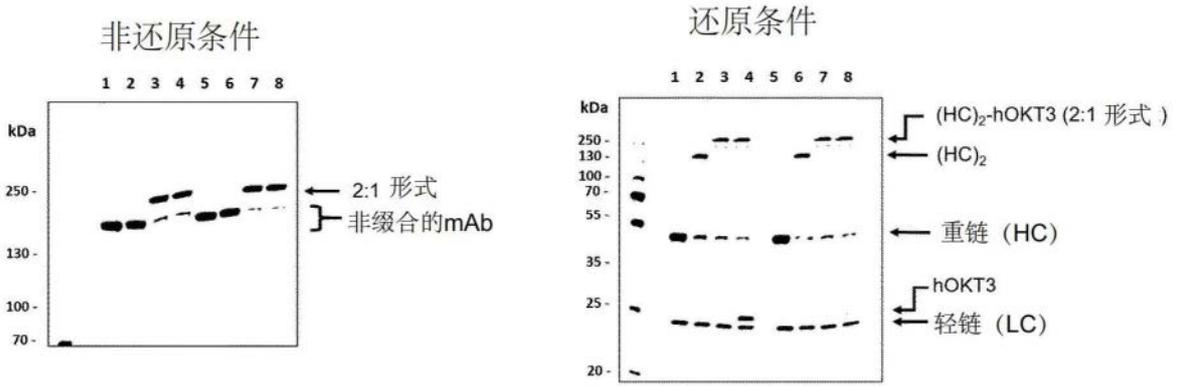


图18

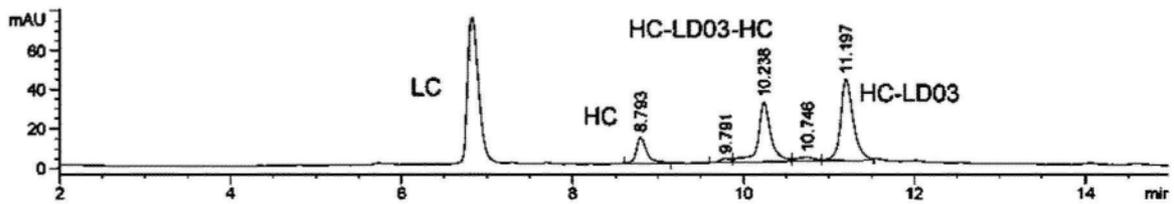


图19

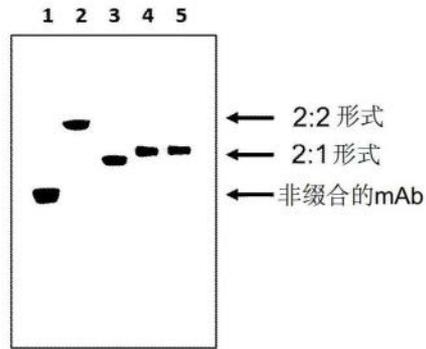


图20

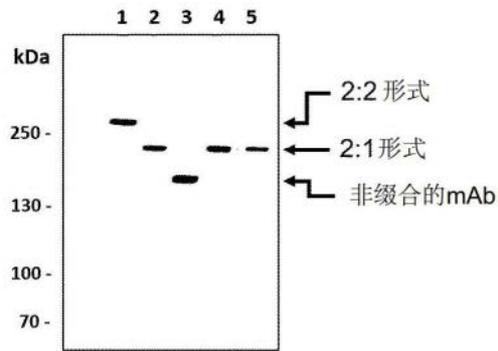


图21

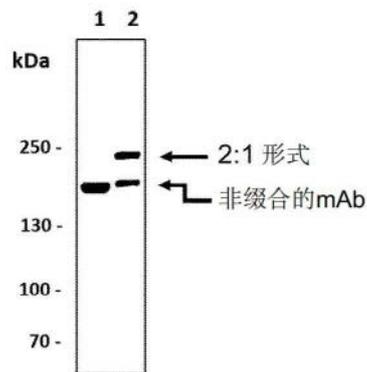


图22

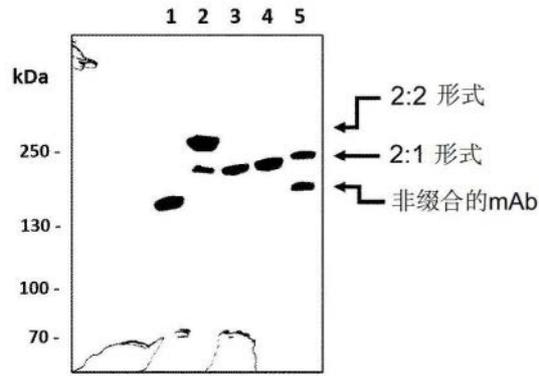


图23

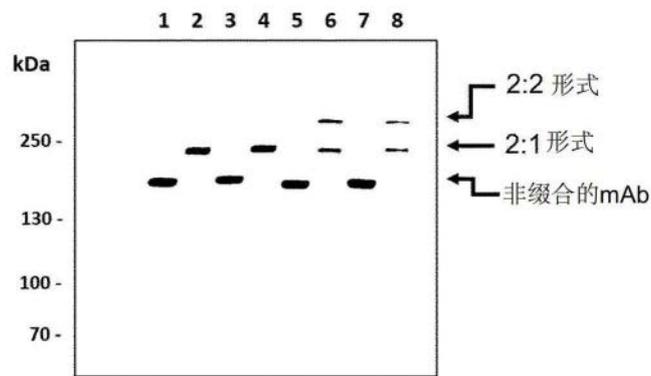


图24



图25

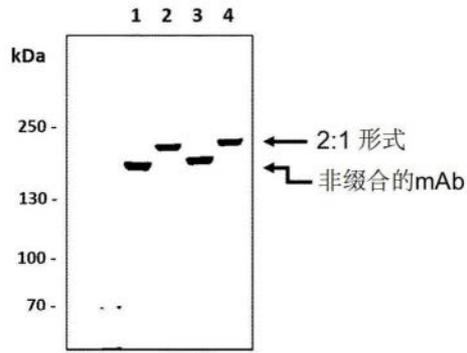


图26

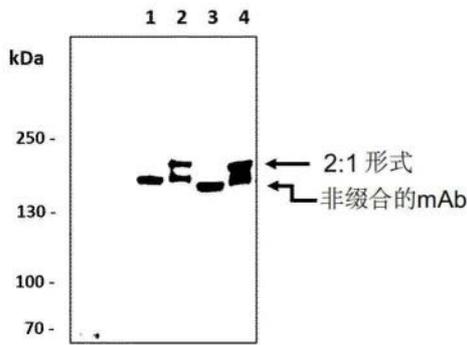


图27

- ◆ Rit-v1a-201 ( $EC_{50} = 5.3 \text{ pM}$ )
- ◆ Rit-v1a-145-204 ( $EC_{50} = 92.6 \text{ pM}$ )
- ◆ Rit-v1a-145-PF01 ( $EC_{50} = 100.3 \text{ pM}$ )
- ◆ Rit-v1a-145-PF02 ( $EC_{50} = 133.3 \text{ pM}$ )
- ◆ B12-v1a-145-PF01 ( $EC_{50} = 741.0 \text{ pM}$ )

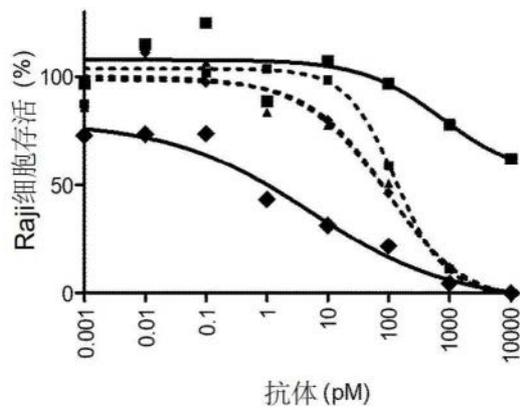


图28

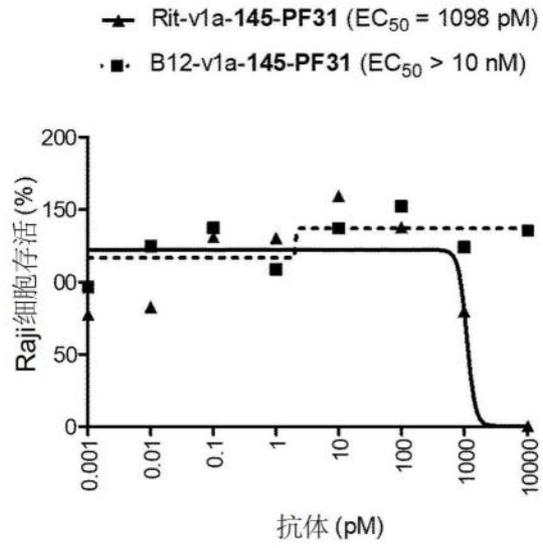


图29

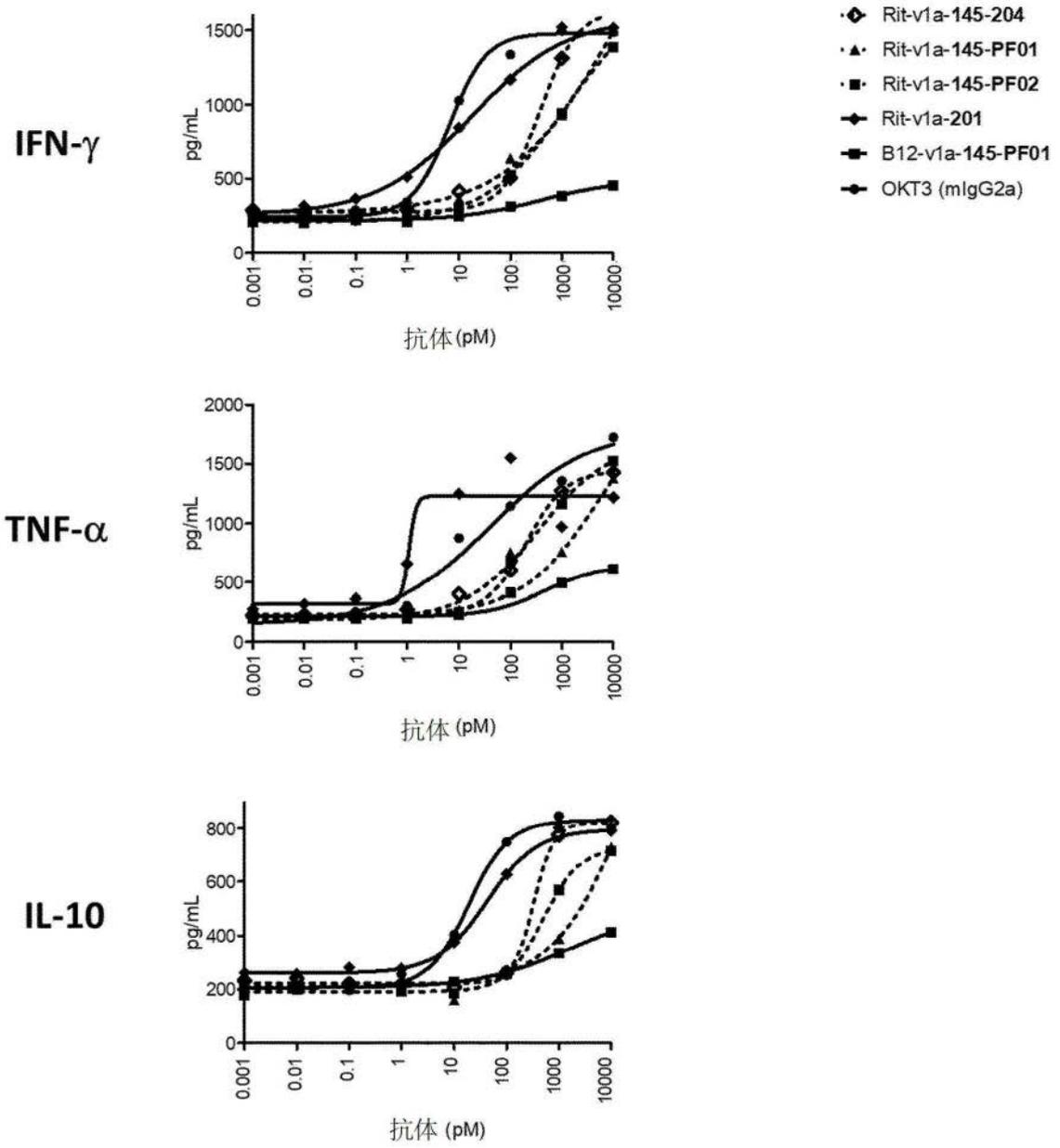


图30

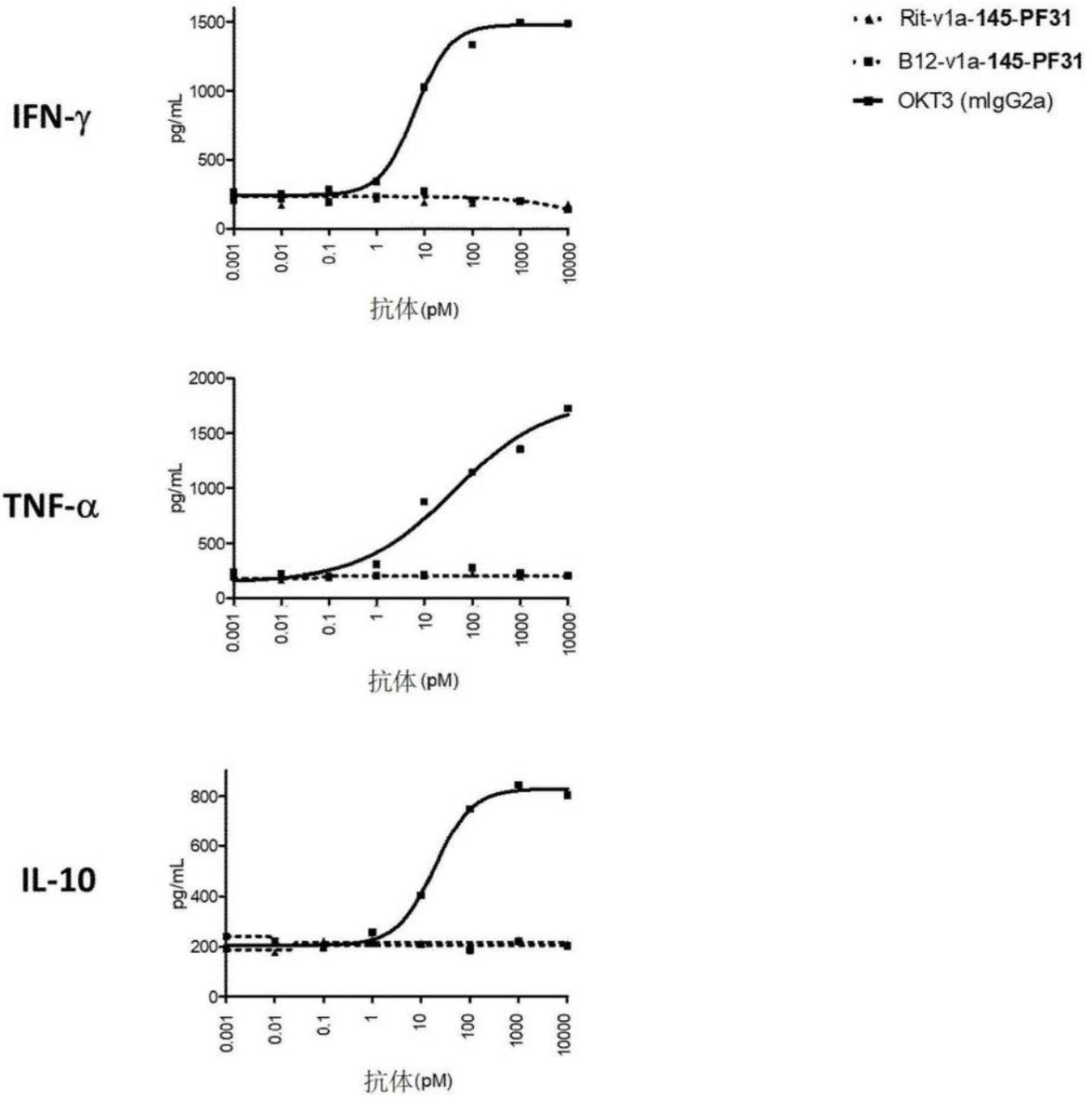


图31