



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116744977 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 12

(21) 申请号 202180090403.8

(22) 申请日 2021.11.22

(30) 优先权数据

2026947 2020.11.20 NL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2021/050714 2021.11.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/108452 EN 2022.05.27

(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·J·布鲁因斯 H·B·阿尔马达

M·A·维基德文

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

专利代理师 侯婧 王志伟

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

权利要求书6页 说明书46页

序列表8页 附图19页

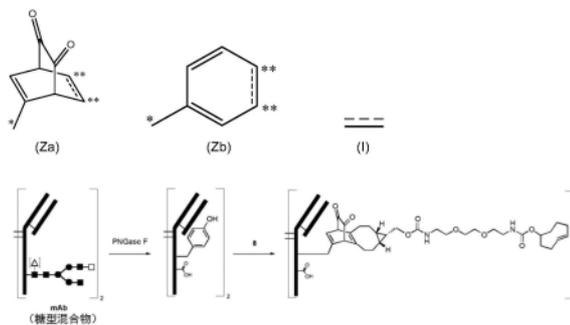
(54) 发明名称

基于酪氨酸的抗体缀合物

(57) 摘要

本发明涉及这样的发现,即天然N-糖蛋白对氧化酶如酪氨酸酶或(多)酚氧化酶不敏感,然而,如果天然N-聚糖被修饰,使得糖蛋白在酪氨酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖,则糖蛋白的酪氨酸残基暴露于氧化酶,并对氧化酶敏感,导致邻醌的形成。通过在应变炔烃或烯烃的存在下进行酶促氧化,所得邻醌进行原位[4+2]环加成,形成具有结构(1a)或(1b)的缀合物:(1a);Pr-[Z<sup>1</sup>-L-(Q<sup>2</sup>)<sub>x</sub>]<sub>y</sub>或(1b);Pr-[Z<sup>1</sup>-L-(D)<sub>x</sub>]<sub>y</sub>,其中:-Pr是N-糖蛋白;-Z<sup>1</sup>包含结构(Za)或(Zb);其中用\*标记的碳在位于N-糖基化位点的10个氨基酸内的氨基酸处直接连接到抗体的肽链上,所述N-糖基化位点已经被修饰,使得糖蛋白在氨基酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖,并且用\*\*标记的两个碳原子都连接到L,并且描绘为(I)的键是单键或双键;-L是连接体;-x是1-4范围内的整数;-y是1-4范围内的整数;-Q<sup>2</sup>是对适当官能化的有效负

载具有反应性的化学柄;-D是有效负载。



1. 一种制备糖蛋白缀合物的方法,包括:

(a) 提供具有暴露的酪氨酸残基的N-糖蛋白,其中所述暴露的酪氨酸残基位于N-糖基化位点的10个氨基酸内,但是所述N-糖基化位点已经被修饰,使得糖蛋白在暴露的酪氨酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖;

(b) 通过将糖蛋白与能够氧化酪氨酸的氧化酶接触,将暴露的酪氨酸残基的酚部分转化为邻醌部分;

(c) 通过[4+2]环加成使邻醌部分与烯烃或炔烃化合物反应,其中所述化合物包含(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分和(i)用有效负载进一步修饰所述化合物的化学柄,或(ii)有效负载。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述暴露的酪氨酸残基位于N-糖基化位点的5个氨基酸内。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述具有暴露的酪氨酸残基的N-糖蛋白通过以下方式提供:

(a1) 通过使N-糖蛋白与酰胺酶接触,优选与PNGase F接触,对其进行去糖基化,以获得去除了聚糖的N-糖蛋白;或者

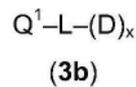
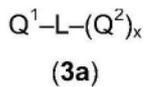
(a2) 通过使N-糖蛋白与内切糖苷酶接触对其进行修饰,以形成具有结构-GlcNAc(Fuc)<sub>b</sub>的聚糖的N-糖蛋白,其中b是0或1;或者

(a3) 提供突变的N-糖蛋白,其中糖基化天冬酰胺被非糖基化氨基酸取代。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述氧化酶是酪氨酸酶或(多)酚氧化酶。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(b)和(c)通过使N-糖蛋白同时与氧化酶和烯烃或炔烃化合物接触而一锅进行。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述烯烃或炔烃化合物具有结构(3a)或(3b)



其中:

-Q<sup>1</sup>是(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分;

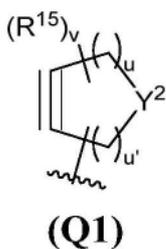
-L是连接体;

-x是1-4范围内的整数;

-Q<sup>2</sup>是对适当官能化的有效负载有反应性但对Q<sup>1</sup>没有反应性的化学柄;

-D是有效负载。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中Q<sup>1</sup>是根据结构(Q1)的(杂)环炔烃:



其中：

-R<sup>15</sup>独立地选自氢、卤素、-OR<sup>16</sup>、-NO<sub>2</sub>、-CN、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>16</sup>、-S(O)<sub>3</sub><sup>(-)</sup>、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基,其中烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基R<sup>15</sup>可以连接在一起形成任选取代的环状环烷基或任选取代的环状(杂)芳烃取代基,并且其中R<sup>16</sup>独立地选自氢、卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基;

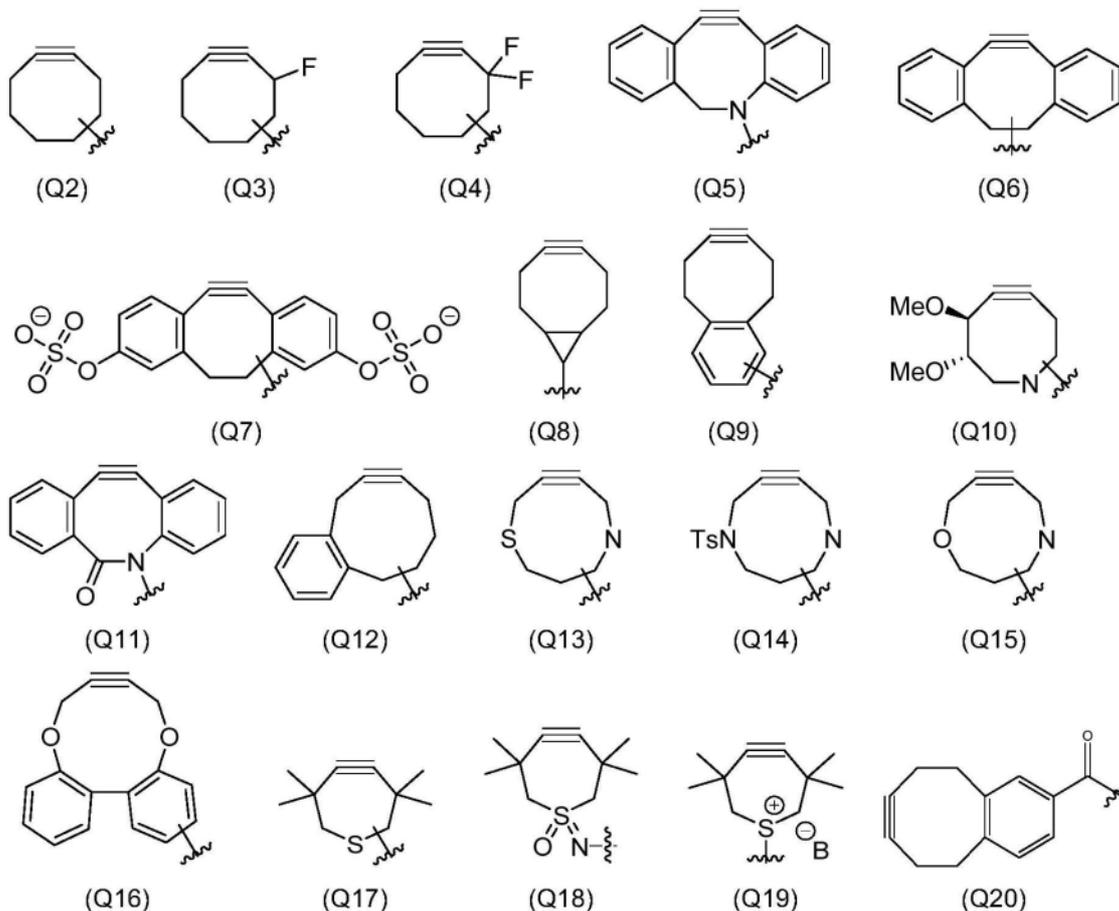
-Y<sup>2</sup>是C(R<sup>31</sup>)<sub>2</sub>、O、S、S<sup>(+)</sup>R<sup>31</sup>、S(O)R<sup>31</sup>、S(O)=NR<sup>31</sup>或NR<sup>31</sup>,其中S<sup>(+)</sup>是被B<sup>(-)</sup>平衡的阳离子硫原子,其中B<sup>(-)</sup>是阴离子,并且其中每个R<sup>31</sup>独立地是R<sup>15</sup>或通过L连接的与Q<sup>2</sup>或D的连接;

-u是0、1、2、3、4或5;

-u'是0、1、2、3、4或5,其中u+u'=4、5、6、7或8;

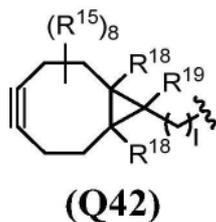
-v=8-16范围内的整数。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中Q<sup>1</sup>选自(Q2)-(Q20):



其中B<sup>(-)</sup>是阴离子。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中Q<sup>1</sup>是根据结构(Q42)的环辛炔:



其中：

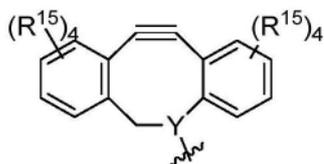
-R<sup>15</sup>独立地选自氢、卤素、-OR<sup>16</sup>、-NO<sub>2</sub>、-CN、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>16</sup>、-S(O)<sub>3</sub><sup>(-)</sup>、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基，其中烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代，其中两个取代基R<sup>15</sup>可以连接在一起形成任选取代的环状环烷基或任选取代的环状(杂)芳烃取代基，并且其中R<sup>16</sup>独立地选自氢、卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基；

-R<sup>18</sup>独立地选自氢、卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基；

-R<sup>19</sup>选自氢、卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基，所述烷基任选地被一个或多个选自O、N和S的杂原子中断，其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基独立地任选被取代，或者R<sup>19</sup>是第二个存在的由间隔基部分连接的Q<sup>1</sup>或D；和

-1是0至10范围内的整数；

或者其中Q<sup>1</sup>是根据结构(Q43)的(杂)环辛炔：



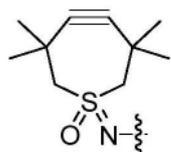
(Q43)

其中

-R<sup>15</sup>独立地选自氢、卤素、-OR<sup>16</sup>、-NO<sub>2</sub>、-CN、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>16</sup>、-S(O)<sub>3</sub><sup>(-)</sup>、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基，其中烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代，其中两个取代基R<sup>15</sup>可以连接在一起形成任选取代的环状环烷基或任选取代的环状(杂)芳烃取代基，并且其中R<sup>16</sup>独立地选自氢、卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基；

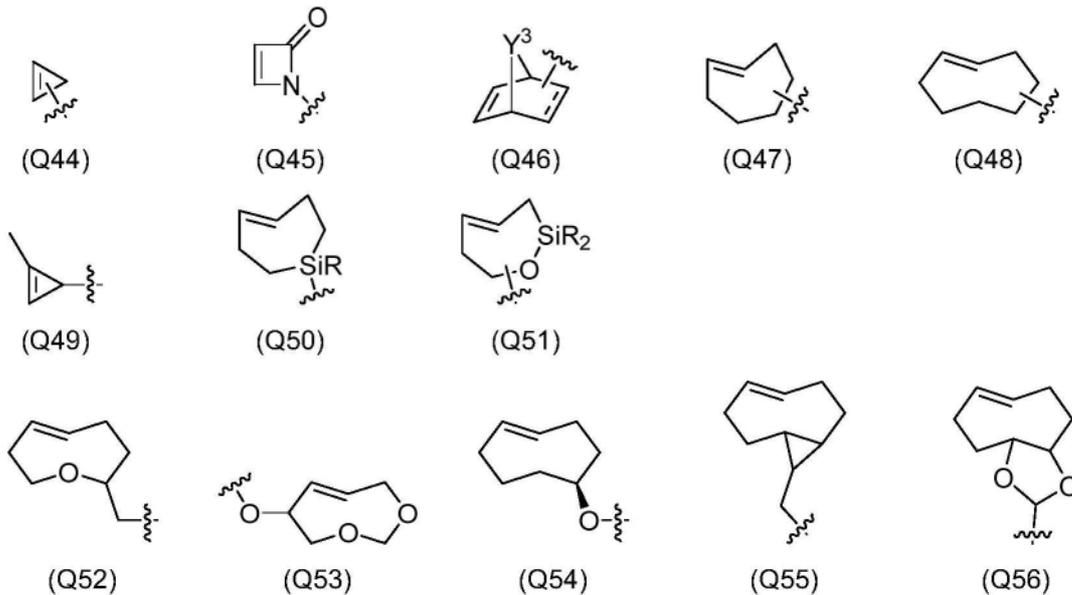
-Y是N或CR<sup>15</sup>；

或者其中Q<sup>1</sup>是根据结构(Q37)的杂环庚炔：



(Q37)。

10. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法，其中Q<sup>1</sup>是选自任选取代的(杂)环丙烯基、(杂)环丁烯基、降冰片烯基、降冰片二烯基、反式-(杂)环庚烯基、反式-(杂)环辛烯基、反式-(杂)环壬烯基或反式-(杂)环癸烯基的(杂)环烯烃，优选Q<sup>1</sup>选自(Q44)-(Q56)：



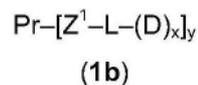
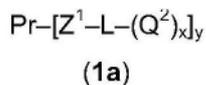
其中 $Y^3$ 选自 $C(R^{24})_2$ 、 $NR^{24}$ 或 $O$ ,其中每个 $R^{24}$ 独立地是氢、 $C_1-C_6$ 烷基或任选地通过间隔基连接到 $L$ ,标记为 $\equiv$ 的键是单键或双键,并且(Q50)和(Q51)中 $Si$ 上的 $R$ 基团是烷基或芳基。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述化合物包含(i)用有效负载进一步修饰所述化合物的化学柄,且所述方法还包括:

(d) 将步骤(c)中获得的糖蛋白的化学柄,优选 $Q^2$ ,与具有结构 $F^2-D$ 或 $F^2-L^2-(D)_x$ 的有效负载进行缀合反应,其中 $F^2$ 对化学柄具有反应性, $L^2$ 是连接体, $x$ 是1-4范围内的整数。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述有效负载 $D$ 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。

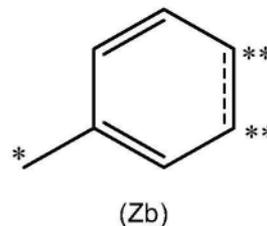
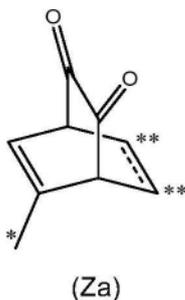
13. 根据结构(1a)或(1b)的糖蛋白缀合物:



其中:

-Pr是N-糖蛋白;

- $Z^1$ 包含结构(Za)或(Zb):

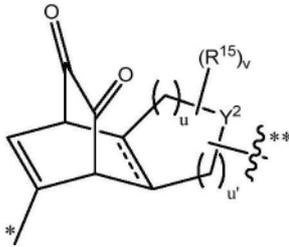


其中用\*标记的碳在位于N-糖基化位点的10个氨基酸内的氨基酸处直接连接到糖蛋白的肽链上,所述N-糖基化位点已经被修饰,使得糖蛋白在氨基酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖,并且用\*\*标记的两个碳原子都连接到 $L$ 上,并且描绘为 $\equiv$ 的键是单键或双键;

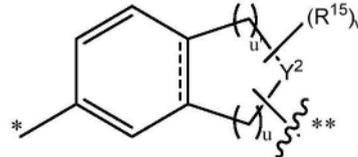
- $L$ 是连接体;

- x是1-4范围内的整数；
- y是1-4范围内的整数；
- Q<sup>2</sup>是对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄；
- D是有效负载。

14. 根据权利要求13所述的糖蛋白缀合物,其中Z<sup>1</sup>具有以下结构:



(Z1a)



(Z1b)

其中:

-用\*标记的碳直接连接到糖蛋白的肽链上,用\*\*标记的键连接到L上,描绘成的键是单键或双键;

-R<sup>15</sup>独立地选自氢、卤素、-OR<sup>16</sup>、-NO<sub>2</sub>、-CN、-S(O)<sub>2</sub>R<sup>16</sup>、-S(O)<sub>3</sub><sup>(-)</sup>、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基,其中烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基R<sup>15</sup>可以连接在一起形成任选取代的环状环烷基或任选取代的环状(杂)芳烃取代基,并且其中R<sup>16</sup>独立地选自氢、卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>烷基、C<sub>6</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>烷基(杂)芳基和C<sub>7</sub>-C<sub>24</sub>(杂)芳基烷基;

-Y<sup>2</sup>是C(R<sup>31</sup>)<sub>2</sub>、O、S、S<sup>(+)</sup>R<sup>31</sup>、S(O)R<sup>31</sup>、S(O)=NR<sup>31</sup>或NR<sup>31</sup>,其中S<sup>(+)</sup>是被B<sup>(-)</sup>平衡的阳离子硫原子,其中B<sup>(-)</sup>是阴离子,并且其中每个R<sup>31</sup>独立地是R<sup>15</sup>或通过L连接的与Q<sup>2</sup>或D的连接;

-u是0、1、2、3、4或5;

-u'是0、1、2、3、4或5,其中u+u'=0、1、2、3、4、5、6、7或8;

-v=8-16范围内的整数。

15. 根据权利要求13或14所述的糖蛋白缀合物,其中Q<sup>2</sup>在环加成中具有反应性。

16. 根据权利要求13-15中任一项所述的糖蛋白缀合物,其中所述有效负载D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。

17. 一种制备糖蛋白缀合物的方法,包括使根据权利要求13-16中任一项所述的根据结构(1a)的糖蛋白与具有结构D-F<sup>2</sup>或F<sup>2</sup>-L<sup>2</sup>-(D)<sub>x</sub>的有效负载反应,其中F<sup>2</sup>在缀合反应中,优选在环加成反应中对化学柄Q<sup>2</sup>具有反应性,L<sup>2</sup>是连接体,x是1-4范围内的整数。

18. 药物组合物,其包含根据权利要求13-16中任一项所述的根据结构(1b)的糖蛋白缀合物和药学上可接受的载体。

19. 根据权利要求13-16中任一项所述的根据结构(1b)的糖蛋白缀合物,其用于治疗需要其的受试者,优选用于治疗癌症。

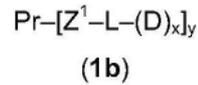
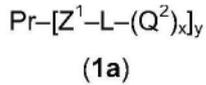
20. 一种制备蛋白质缀合物的方法,包括:

(a) 提供突变蛋白,其天然形式对能够氧化酪氨酸的氧化酶无反应性,但通过提供所述蛋白的突变形式使其对这些酶有反应性,其中在所述蛋白氨基酸序列的非天然位置引入酪氨酸残基,在所述位置它对能够氧化酪氨酸的氧化酶有反应性;

(b) 通过将蛋白质与能够氧化酪氨酸的氧化酶接触, 将酪氨酸残基的酚部分转化为邻醌部分;

(c) 通过[4+2]环加成使邻醌部分与烯烃或炔烃化合物反应, 其中所述化合物包含(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分和(i)用有效负载进一步修饰所述化合物的化学柄, 或(ii)有效负载。

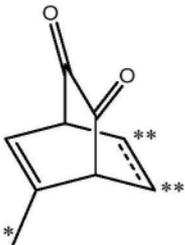
21. 根据结构(1a)或(1b)的蛋白质缀合物:



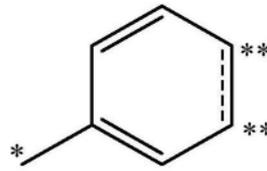
其中:

-Pr是蛋白质;

-Z<sup>1</sup>包含结构(Za)或(Zb):



(Za)



(Zb)

其中用\*标记的碳直接连接到糖蛋白肽链上的氨基酸上, 所述氨基酸是蛋白质的天然形式, 而不是酪氨酸残基, 用\*\*标记的两个碳原子都连接到L上, 描绘为— —的键是单键或双键;

-L是连接体;

-x是1-4范围内的整数;

-y是1-4范围内的整数;

-Q<sup>2</sup>是对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄;

-D是有效负载。

21. 根据权利要求20所述的蛋白质缀合物, 其中连接基团Z<sup>1</sup>所连接的氨基酸位于酪氨酸残基对能够氧化酪氨酸的氧化酶具有反应性的位置。

22. 根据权利要求20或21所述的蛋白质缀合物, 其中Pr是突变蛋白质, 其天然形式对能够氧化酪氨酸的氧化酶不具有反应性, 但通过提供所述蛋白质的突变形式而使其对所述酶具有反应性, 其中在所述蛋白质的氨基酸序列中对能够氧化酪氨酸的氧化酶具有反应性的位置的非天然位置引入酪氨酸残基。

## 基于酪氨酸的抗体缀合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗体-药物缀合物领域,特别是通过酪氨酸酶介导的生物缀合制备的抗体-药物缀合物,其适用于治疗癌症。

### 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,由其中连接有药物试剂的抗体组成。抗体(也称为配体)通常是单克隆抗体(mAb),基于它们对给定抗原的高选择性和亲和力、它们的长循环半衰期以及很少或没有免疫原性来选择这些单克隆抗体。因此,mAb作为精心选择的生物受体的蛋白质配体,为医疗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用于通过结合、内化、细胞内加工和最终释放活性分解代谢物将化学缀合的有效负载递送至肿瘤。有效负载可以是小分子毒素、蛋白质毒素或其他形式,如寡核苷酸。因此,可以选择性地根除肿瘤细胞,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。最后,寡核苷酸与被肌肉细胞选择性吸收的抗体的连接是治疗神经肌肉疾病的潜在的有前途的方法。因此,将活性医疗药物靶向递送至所选的特定细胞位置的概念是治疗多种疾病的有力方法,与相同药物的全身递送相比,具有许多有益方面。

[0003] 在ADC领域,通常使用化学连接体将医疗药物连接到抗体上。这种连接体需要具有许多关键属性,包括在给药后长时间在血浆中保持稳定的要求。稳定的连接体能够使ADC定位于体内的预计部位或细胞,并防止循环中有效负载的过早释放,这将不加选择地诱导各种不希望的生物反应,从而降低ADC的治疗指数。在内化时,应该处理ADC,使得有效负载被有效地释放,从而它可以结合到其靶点。

[0004] 有两类连接体,不可裂解的和可裂解的。不可裂解的连接体由抗体和有效负载之间的原子链组成,不管抗体-药物缀合物位于哪个器官或生物区室中,其在生理条件下完全稳定。因此,从具有不可裂解的连接体的ADC中释放有效负载依赖于ADC内化进入细胞后抗体的完全(溶酶体)降解。由于这种降解,将释放有效负载,其仍然带有连接体,以及来自连接体最初连接的抗体的肽片段和/或氨基酸。可裂解的连接体利用细胞或细胞区室的固有特性从ADC中选择性释放有效负载,这通常在代谢处理后不会留下连接体的痕迹。对于可裂解的连接体,有三种常用的机制:1)对特定酶的敏感性,2) pH敏感性,和3)对细胞氧化还原状态(或其微环境)的敏感性。可裂解的连接体也可以含有自牺牲(self-immolative)单元,例如基于对氨基苯甲醇基团及其衍生物。连接体还可以含有额外的非功能性元件,通常称为间隔基或延伸子单元,以将连接体与反应性基团连接,从而与抗体反应。

[0005] 目前,细胞毒性有效负载包括例如微管破坏剂[例如澳瑞他汀(auristatin)如单甲基澳瑞他汀E(MMAE)和单甲基澳瑞他汀F(MMAF),美登木素生物碱(maytansinoid),如DM1和DM4,微管溶素(tubulysin)],DNA损伤剂[例如卡奇霉素(calicheamicin)、吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)二聚体、吡咯并苯并二氮杂卓二聚体、倍癌霉素(duocarmycin)、蒽环霉素

(anthracyclin)], 拓扑异构酶抑制剂[例如DXd、SN-38]或RNA聚合酶II抑制剂[例如鹅膏蕈碱]。已经获得市场批准的ADC包括例如有效负载MMAE、MMAF、DM1、卡奇霉素、SN-38和DXd,而基于倍癌霉素、DM4和PBD二聚体的ADC正在进行各种关键试验。更多种类的有效负载仍在临床评估中,或在过去已处于临床试验中,例如艾瑞布林(eribulin)、吡喹并苯并二氮杂卓二聚体、PNU-159,682、hemi-asterlin、阿霉素、长春花生物碱等。最后,各种处于后期临床前阶段的ADC与新的有效负载例如鹅膏蕈碱、KSP抑制剂、MMAD等缀合。

[0006] 除了sacituzumab govetican(**Trodelvy**<sup>®</sup>)之外,所有临床和上市的ADC都含有不适合作为独立药物的细胞毒性药物。**Trodelvy**<sup>®</sup>是一个例外,因为它以SN-38为细胞毒性有效负载,它也是依立替康(SN-38前药)的活性分解代谢物。目前临床ADC中使用的其他几种有效负载已作为游离药物进行了初步化疗评估,例如卡奇霉素、PBD二聚体和艾瑞布林。但是因为细胞毒素的极高效力(皮摩尔-低纳摩尔IC<sub>50</sub>值)相比于标准化疗药物如紫杉醇和阿霉素的典型低微摩尔效力,所以失败了。

[0007] 尽管ADC已经显示了临床和临床前活性,但是除了靶向肿瘤细胞上的抗原表达之外,还不清楚是什么因素决定了这种潜能。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、多种药物抗性(MDR)状态和其他因素都会影响体外ADC治疗的结果。除了直接杀死抗原阳性肿瘤细胞之外,ADC还具有杀死邻近的抗原阴性肿瘤细胞的能力:所谓的“旁观者效应(bystander killing)”效应,最初由Sahin et al., Cancer Res. 1990, 50, 6944-6948报告,其通过引用纳入,并且例如由Li et al., Cancer Res. 2016, 76, 2710-2719所研究的,其通过引用纳入。一般来说,中性的细胞毒性有效负载将显示旁观者效应,而离子(带电)有效负载则不会,这是因为离子形式不容易通过被动扩散穿过细胞膜。具有确定的旁观者效应的有效负载例如是MMAE和DXd。不显示旁观者效应的有效负载的实例是MMAF或Kadcyla的活性分解代谢物(赖氨酸-MCC-DM1)。

[0008] ADC通过反应性连接体-药物与蛋白质的化学连接来制备,这一过程称为生物缀合。许多生物缀合技术是已知的,如G.T.Hermanson, “Bioconjugate Techniques”, Elsevier, 3<sup>rd</sup> Ed. 2013中所概述的,其通过引用纳入。对于抗体的随机缀合,有两种公认的主要技术,一种基于赖氨酸侧链的酰化,一种基于半胱氨酸侧链的烷基化。赖氨酸侧链中ε-氨基的酰化通常通过将蛋白质置于基于活化的酯或活化的碳酸酯衍生物的试剂中来实现,例如SMCC用于**Kadcyla**<sup>®</sup>的制备。半胱氨酸侧链中巯基的烷基化的主要化学反应基于使用马来酰亚胺试剂,例如在**Adcetris**<sup>®</sup>中应用的。除了标准的马来酰亚胺衍生物,一系列马来酰亚胺变体也用于更稳定的半胱氨酸缀合,例如由James Christie et al., J. Contr. Rel. 2015, 220, 660-670和Lyon et al., Nat. Biotechnol. 2014, 32, 1059-1062所证明的,两者都通过引用纳入。半胱氨酸烷基化的其他方法包括例如卤代乙酰胺(通常是溴代乙酰胺或碘代乙酰胺)的亲核取代,参见例如Alley et al., Bioconj. Chem. 2008, 19, 759-765,其通过引用纳入,或者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 et al., Nat. Commun. 2016, 7, DOI:10.1038/ncomms13128和Ariyasu et al., Bioconj. Chem. 2017, 28, 897-902,两者均通过引用纳入;与烷基磷酸胺的反应,参见例如Kasper et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 11625-11630,其通过引用纳入;与联烯酰胺的反应,参见例如Abbas et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 7491-

7494,其通过引用纳入;与氰基乙炔基试剂的反应,参见例如Kolodych et al., *Bioconj.Chem.* 2015, 26, 197-200,其通过引用纳入;与乙烯基砜的反应,参见例如Gil de Montes et al., *Chem.Sci.* 2019, 10, 4515-4522,其通过引用纳入;或与乙烯基吡啶的反应,参见例如<https://iksuda.com/science/permalink/> (2020年1月7日获取)。通过半胱氨酸的抗体缀合的另一种方法包括加入与半胱氨酸交联剂如双砜试剂连接的有效负载,参见例如Balan et al., *Bioconj.Chem.* 2007, 18, 61-76和Bryant et al., *Mol.Pharmaceutics* 2015, 12, 1872-1879,两者均通过引用纳入;单-或双-溴马来酰亚胺,参见例如Smith et al., *J.Am.Chem.Soc.* 2010, 132, 1960-1965和Schumacher et al., *Org.Biomol.Chem.* 2014, 37, 7261-7269,两者均通过引用纳入;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 et al., *Org.Biomol.Chem.* 2014, 37, 7261-7269和Aubrey et al., *Bioconj.Chem.* 2018, 29, 3516-3521,两者均通过引用纳入;双溴哒嗪二酮,参见例如Robinson et al., *RSC Advances* 2017, 7, 9073-9077,其通过引用纳入;双(卤甲基)苯,参见例如Ramos-Tomillero et al., *Bioconj.Chem.* 2018, 29, 1199-1208,其通过引用纳入;或其他双(卤甲基)芳族烃,参见例如W02013173391。通常,通过半胱氨酸交联制备的ADC的药物与抗体负载量为约4 (DAR4)。与半胱氨酸侧链缀合的另一种有用的技术是通过二硫键,已被用于可逆地将蛋白毒素、化疗药物和探针连接到载体分子上的生物活性连接(参见例如Pillow et al., *Chem.Sci.* 2017, 8, 366-370,其通过引用纳入)。

[0009] 将连接体药物与叠氮基修饰的蛋白质连接的一种常用方法是应变促进的炔烃-叠氮化物环加成(SPAAC)。在SPAAC反应中,连接体-药物用环炔烃官能化,并且与叠氮基修饰的抗体的环加成由环间张力的释放驱动。相反,连接体-药物用叠氮化物官能化,抗体用环炔烃官能化。适用于无金属点击化学的各种应变炔烃如图1所示。除了环辛炔之外,某些环庚炔也适用于无金属点击化学,如Weterings et al., *Chem.Sci.* 2020, doi:10.1039/d0sc03477k中所报告的,其通过引用纳入。也可以使用较小的应变炔烃,但是在大多数情况下,由于固有的不稳定性,需要原位产生应变炔烃。

[0010] 应变炔烃与四嗪的反应也是无金属点击反应。此外,四嗪也与应变烯烃反应(四嗪连接)。应变炔烃和应变烯烃均通过反电子需求Diels-Alder (IEDDA) 反应与四嗪发生反应,表现出非常快的反应动力学。例如,反式环辛烯(TCO)与四嗪的反应在其反应速度上是无与伦比的,并且这种快速反应已经能够应用于啮齿动物模型和其他大型生物,在这些环境中仅容许最小的反应时间和试剂浓度。三嗪和其他杂芳族部分也可以与应变炔烃或烯烃反应。值得注意的是,应变烯烃通常不与叠氮化物反应。适用于无金属点击化学的各种应变烯烃如图2所示。

[0011] 除了叠氮化物之外,应变炔烃还可以与一系列其他官能团反应,例如腈氧化物、硝酮、邻醌、二氧噻吩和悉尼酮。图3提供了无金属点击化学的官能团对F和Q(=应变炔烃或应变烯烃)对的列表。Nguyen and Prescher, *Nature rev.* 2020, doi:10.1038/s41570-020-0205-0提供了用于生物缀合的无金属点击化学的综合概述,也延伸到蛋白质(例如,聚糖、核酸)之外,其通过引用纳入。

[0012] 基于以上所述,制备蛋白质缀合物,例如图4中的单克隆抗体的一般方法,需要使含有x个反应性部分F的蛋白与含有单个分子Q的连接体-药物构建体反应。

[0013] 将叠氮化物或四嗪部分引入蛋白质可以通过基因编码、酶安装或化学酰化来实

现。一种方法是基于非天然氨基酸的遗传编码,例如适用于脞连接的对乙酰苯丙氨酸,或适用于点击化学缀合的对叠氮基甲基苯丙氨酸或对叠氮基苯丙氨酸,如Axup et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2012, 109, 16101-16106所证明的,其通过引用纳入。类似地, Zimmerman et al., *Bioconj. Chem.* 2014, 25, 351-361,其通过引用纳入,已采用无细胞蛋白质合成方法将叠氮基甲基苯丙氨酸(AzPhe)引入单克隆抗体中,通过无金属点击化学转化为ADC。此外, Nairn et al., *Bioconj. Chem.* 2012, 23, 2087-2097,其通过引用纳入,也显示了甲硫氨酸类似物如叠氮基高丙氨酸(Aha)可通过营养缺陷型细菌引入蛋白质中,并通过(铜催化的)点击化学进一步转化为蛋白质缀合物。最后, Nguyen et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 8720-8721,其通过引用纳入,显示了使用吡咯赖氨酰-tRNA合成酶/tRNA<sub>CUA</sub>对遗传编码重组蛋白中的脂肪族叠氮化物,标签由点击化学固定。

[0014] 另一种方法是基于非天然功能的酶促安装。例如Dennler et al., *Bioconj. Chem.* 2014, 25, 569-578和Lhospice et al., *Mol. Pharmaceut.* 2015, 12, 1863-1871,两者均通过引用纳入,使用细菌酶转谷氨酰胺酶(BTG或TGase)将叠氮化物部分安装到抗体上。为此, TGase介导的安装的关键谷氨酰胺残基首先通过PNGase F介导的天然N-聚糖的去除而被释放,如Jeger et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9995-9997中首次证明的,其通过引用纳入。Cheng et al., *Mol. Cancer Therap.* 2018, 17, 2665-2675报告了一种基于C-末端TGase介导的叠氮化物引入,然后在ADC中用无金属点击化学进行转化的遗传方法,其通过引用纳入。

[0015] van Geel et al., *Bioconj. Chem.* 2015, 26, 2233-2242和Verkade et al., *Antibodies* 2018, 7, 12,其均通过引用纳入,已证明天然抗体聚糖在N297的酶促改造也能够通过叠氮糖将叠氮化物引入抗体,适合于使用点击化学连接细胞毒性有效负载。还开发了化学方法用于抗体的位点特异性修饰,而无需预先的遗传修饰,例如Yamada and Ito, *ChemBioChem.* 2019, 20, 2729-2737中所强调的。

[0016] 在图3中的官能部分F中,叠氮化物和硝酮也可以通过化学修饰安装到天然蛋白质上。然后,所得含叠氮化物或硝酮的蛋白质可以与合适的探针Q进行无金属点击缀合,在简单的两步法中提供所得蛋白质缀合物。例如,用重氮转移试剂处理天然蛋白质导致游离氨基向叠氮基团的化学转化,如Schoffelen et al., *Chem. Sci.* 2011, 2, 701-705所报告的,其通过引用纳入。此外,在某些情况下小心滴定pH会导致具有最低pKa的胺(通常是模型蛋白质N-末端的胺)的选择性转化。基于应变促进的官能化的环烷烃的环加成,对所得叠氮化物进行修饰。此外, Ning et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 3065-3068,其通过引用纳入,证明了通过高碘酸盐介导的N-末端丝氨酸或苏氨酸的氧化,接着用过量的N-烷基羟胺处理,可以在天然多肽上产生N-末端硝酮。得到的硝酮显示出与应变炔烃进行快速原位环加成。

[0017] 在表3中的官能部分F中,邻醌可以通过酪氨酸侧链的氧化从天然蛋白质中直接产生,如Bruins et al., *Chem. Eur. J.* 2017, 24, 4749-4756中所述的,其通过引用纳入。与叠氮化物或硝酮相比,产生邻醌的一个主要优点是,邻醌能够进行原位后续化学反应,在一步法中产生蛋白质缀合物,而无需分离醌中间体。例如, Wilchek and Miron, *Bioconj. Chem.* 2015, 26, 502,其通过引用纳入,报告了酪氨酸中的酚基团直接化学转化为邻醌可以通过用亚硝基二磺酸钾(PTN,也称为Fremy盐)处理并将其用于蛋白质聚合来实

现。类似地,George et al.,ChemistrySelect 2017,2,7117-7112,其通过引用纳入,表明通过用Fremy盐生成邻醌,然后与双环壬炔(BCN)原位反应,应变促进的氧化控制的环辛炔-1,2-醌环加成(SPOCQ)可用于蛋白质修饰,如图5中突出显示的。然而,使用强氧化剂如Fremy盐可导致半胱氨酸和甲硫氨酸侧链的间接氧化,在反应后需要从蛋白质溶液中除去氧化剂。此外,多个酪氨酸部分可以氧化成邻醌,从而导致蛋白质缀合物的异质混合物。

[0018] 避开化学氧化剂的一个很好的解决方案是使用酶来产生邻醌。几十年来,已知酪氨酸酶和酚氧化酶介导的邻醌的产生通过非选择性酪氨酸-酪氨酸、酪氨酸-半胱氨酸和酪氨酸-赖氨酸键介导肉、乳清和面粉中蛋白质之间的交联。通过在合适的外部亲核试剂的存在下进行酶介导的邻醌的产生,氧化的蛋白质将容易进行化学缀合,例如Struck et al., J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3038-3045所证明的。蛋白质的酶促氧化的缺点是大多数或所有的酪氨酸部分通常被包埋在蛋白质的疏水内部,因此对于像酪氨酸酶这样的大体积酶来说是不可接近的。另一方面,缺乏用于氧化的天然酪氨酸为通过引入具有暴露酪氨酸的N-末端或C-末端融合标签的选择性外周蛋白氧化铺平了道路。例如, Bruins et al., Bioconj. Chem. 2017, 28, 1189-1193, 其通过引用纳入,表明了通过将C-末端G<sub>4</sub>Y-标签融合到葡聚糖酶上,可以在SPOCQ上选择性地荧光团修饰laminarase A,一种超稳定的内-β-1,3-葡聚糖酶,而融合到曲妥珠单抗轻链上的相同C-末端G<sub>4</sub>Y-标签能够在与BCN-连接体-MMAE反应时产生位点特异性抗体-药物缀合物。Bruins et al., Chem. Commun. 2018, 54, 7338-7341, 其通过引用纳入,证明了抗体-药物缀合物可以通过C-末端邻醌与基于构象应变的反式环辛烯(sTCO)的连接体-澳瑞他汀构建体的反应产生。Marmelstein et al., J. Am. Chem. Soc. 2020, 142, 5078-5086, 其通过引用纳入,最近报告了一种类似的方法,表明曲妥珠单抗单链上的C-末端GGY标签能够实现各种标签的选择性酪氨酸酶介导的偶联。

[0019] 在上述所有情况下,官能团F的引入需要蛋白质的遗传修饰(非天然氨基酸的遗传编码,特异性融合标签的引入)或两步法,其中官能团F首先通过化学或酶法引入。然而,目前不存在基于通过无金属点击化学修饰天然氨基酸侧链的天然蛋白质一步修饰的通用方法。

## 发明内容

[0020] 本发明人惊奇地发现,天然N-糖蛋白对氧化酶如酪氨酸酶或(多)酚氧化酶不敏感,然而,如果天然N-聚糖被修饰,例如(a)被去除,例如通过PNGase F水解,或(b)被修饰,例如通过内切糖苷酶,或(c)突变为另一种氨基酸,糖蛋白附近的酪氨酸残基变得暴露,并对氧化酶敏感,导致邻醌的形成(图6)。通过在(官能化的)应变炔烃或烯炔(图7中的示例性结构)的存在下进行酶促氧化,所得邻醌可以与应变炔烃或应变烯炔进行原位[4+2]环加成,从而在一锅法中形成糖蛋白缀合物。

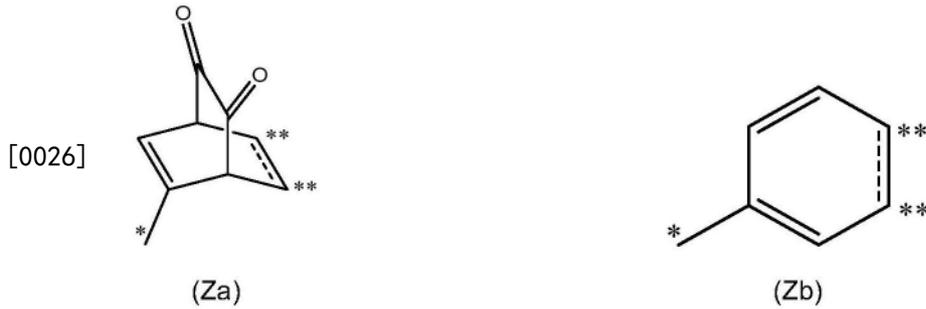
[0021] 本发明首先涉及具有结构(1a)或(1b)的缀合物:



[0023] 其中:

[0024] -Pr是N-糖蛋白;

[0025] -Z<sup>1</sup>包含结构(Za)或(Zb):



[0027] 其中用\*标记的碳在位于N-糖基化位点的10个氨基酸内的氨基酸处直接连接到抗体的肽链,所述N-糖基化位点已经被修饰,使得糖蛋白在氨基酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖,并且用\*\*标记的两个碳原子都连接到L,并且描绘为——的键是单键或双键;

[0028] -L是连接体;

[0029] -x是1-4范围内的整数;

[0030] -y是1-4范围内的整数;

[0031] -Q<sup>2</sup>是对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄;

[0032] -D是有效负载。

[0033] 本发明还涉及用于合成根据本发明的缀合物的方法、根据本发明的缀合物的医疗用途以及包含根据本发明的缀合物的药物组合物。

#### 附图说明

[0034] 图1显示了适用于无金属点击化学的环炔烃,以及反应性部分Q<sup>1</sup>和Q<sup>2</sup>的优选实施方案。该列表并非穷举,例如炔烃可以通过氟化、取代芳环或在芳环中引入杂原子而进一步活化。

[0035] 图2显示了适用于无金属点击化学的环烯烃,以及反应性部分Q<sup>1</sup>和Q<sup>2</sup>的优选实施方案。该列表并非穷举,例如烯烃可以通过氟化、通过引入(杂)芳环而被进一步活化,(杂)芳环可以被进一步取代。

[0036] 图3显示了一组代表性的(但并非穷举的)官能团(F),它们可以通过工程化、化学修饰或酶方法引入糖蛋白中,在与互补的反应性基团Q进行无金属点击反应后,产生连接基团Z。官能团F可以通过工程化、化学或酶修饰引入糖蛋白中的任意位置。已知各种官能团专门或高度优选与应变炔烃(叠氮化物、悉尼酮)反应。其他官能团F(腈氧化物、硝酮、醌、二氧噻吩、四嗪、三嗪)对应变炔烃和应变烯烃都具有反应性。由邻醌或二氧噻吩与应变炔烃反应形成的双环环加合物可以分别消除CO或SO<sub>2</sub>,形成芳环。类似的消除也可以发生在与应变烯烃的环加成之后,但是也需要中间体二氢苯环的后续氧化。吡啶或哒嗪连接基团是四氮杂双环[2.2.2]辛烷连接基团重排的产物,该连接基团是在三嗪或四嗪分别与炔烃(而不是烯烃)反应并失去N<sub>2</sub>时形成的。相似的官能团(F)通常存在或者可以被引入到有效负载中,用于通过与互补的反应性基团Q的无金属点击反应而缀合,产生连接基团Z。

[0037] 图4显示了通过含有x个官能团F的单克隆抗体(在大多数情况下为对称二聚体)的反应制备抗体-药物缀合物的一般方案。通过将抗体-(F)<sub>x</sub>与过量的连接体-药物构建体(Q-间隔基-连接体-有效负载)孵育,由F与Q的反应形成连接基团Z获得缀合物。

[0038] 图5描述了在蛋白质上氧化介导产生邻醌,然后用合适的应变炔烃(例如BCN)原位[4+2]环加成的一般概念。

[0039] 图6描述了在 $C_H2$ 结构域中N-糖基化的天然抗体(例如N297)对酶促氧化缺乏反应性(向左箭头),然而在去除整个聚糖(用PNGase F或其他水解酶N297聚糖被水解,留下天冬氨酸-297)或修饰聚糖(用内切糖苷酶)时,抗体变得对酪氨酸酶介导的邻近酪氨酸的氧化敏感。

[0040] 图7描绘了适用于与邻醌进行环加成的连接体有效负载的代表性结构。例如,连接体-有效负载可以用应变炔烃如BCN官能化,可以含有一个或多个氨基甲酰磺酰胺单元,可以是分支的,并且可以含有基于缬氨酸-瓜氨酸或缬氨酸-丙氨酸的可裂解连接体(都是顶部结构)。或者,连接体-有效负载可以用应变炔烃如sTCO官能化,并且可以含有不可裂解的连接体(底部结构)。

[0041] 图8显示了人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4以及小鼠IgG1、IgG2ab、IgG2aa、IgG2b、IgG3的 $C_H2$ 恒定区的氨基酸序列。天然糖基化位点(N)用下划线标出,酪氨酸部分(Y)在聚糖被去除或截短后会被氧化,用粗斜体标出。

[0042] 图9描绘了用于缀合邻醌官能团的各种官能化点击试剂的结构(例如染料、ODN、蛋白质)。

[0043] 图10描绘了具有MMAE(6a和6b)或PBD(7)的BCN-连接体-有效负载的结构。

[0044] 图11描绘了双官能化试剂8的结构,用应变炔烃(BCN)和应变炔烃(TCO)官能化。还描绘了各种甲基四嗪修饰的报告分子的结构,即TAMRA(9a)、IL-2(9b)、UCHT1(9c)和ODN1826(9d)。

[0045] 图12显示了曲妥珠单抗(泳道I)、PNGase F去糖基化的曲妥珠单抗(泳道II)和在BCN-丽丝胺1的存在下用蘑菇酪氨酸酶处理后的去糖基化的曲妥珠单抗(泳道III)还原SDS-PAGE。左图=考马斯染色,右图=荧光图像。只有曲妥珠单抗在去糖基化和在1存在下的酪氨酸酶处理时才有明显的荧光带。

[0046] 图13描绘了IdeS处理的曲妥珠单抗(上部)、PNGase F去糖基化的曲妥珠单抗(中部)和在BCN-丽丝胺1存在下,用蘑菇酪氨酸酶处理后的去糖基化曲妥珠单抗(底部)的Fc片段的MS数据。左图显示全量程(0-100,000Da),右图显示变焦(23,000-27,000)。

[0047] 图14描绘了IdeS处理的西妥昔单抗(上部)、PNGase F去糖基化的西妥昔单抗(中部)和在BCN-丽丝胺1存在下用蘑菇酪氨酸酶处理后的去糖基化的西妥昔单抗(下部)的Fc片段的MS数据。左图显示全量程(0-100,000Da),右图显示变焦(23,000-27,000)。

[0048] 图15描绘了在蘑菇酪氨酸酶存在下,BCN-丽丝胺(1)的化学计量与去糖基化的曲妥珠单抗之间的关系。最低2.5当量的1即可实现完全转化为新产物(保留时间8.7分钟)( $t=6.4$ 分钟=LC; $t=8.3$ 分钟=HC0; $t=8.7$ 分钟=HC1)。

[0049] 图16显示了在TCO-AF568(3)的存在下用酪氨酸酶处理时,用于标记去糖基化的曲妥珠单抗和西妥昔单抗的还原SDS-PAGE。

[0050] 图17显示了去糖基化的曲妥珠单抗(顶部),在酪氨酸酶存在下与BCN-丽丝胺(1)反应后(中部)和在酪氨酸酶存在下与TCO-AF<sub>568</sub>(3)反应后(底部)的HPLC迹线( $t=6.6$ 分钟=LC; $t=7.9$ 分钟=HC0; $t=8.1$ 分钟=HC1(与3); $t=8.6$ 分钟=HC1(与1))。

[0051] 图18显示了由于在天然糖基化位点附近缺乏天然酪氨酸,在去糖基化之前和之后

的小鼠IgG1和人IgG2以及在3处理存在下的酪氨酸酶缺乏荧光标记。

[0052] 图19显示了在BCN-丽丝胺(1)和TCO-AF<sub>568</sub>(3)存在下,用于标记曲妥珠单抗-LC-G<sub>4</sub>Y(迹线A)的竞争实验(底部迹线D)的HPLC迹线,显示了主要是LC-G<sub>4</sub>Y和1的加合物(t=7.1分钟)和微量LC-G<sub>4</sub>Y与3的加合物(t=6.4分钟)的清晰形成。为1(迹线B)和3(迹线C)描绘了单独的实验。在所有显示的迹线中,t=6.2对应于未修饰的LC-G<sub>4</sub>Y(LC0),t=7.4分钟对应于未修饰的HC0。

[0053] 图20描述了通过(a)去糖基化,和(b)在酪氨酸酶存在下用双官能化的BCN-TCO试剂8处理,将抗体转化为TCO标记的抗体的策略。

[0054] 图21显示了通过减少SDS-PAGE(考马斯染色和荧光成像)用试剂9a-9d(泳道B-E)处理曲妥珠单抗-TCO(图8泳道A所示)的结果。试剂9a-9c的考马斯染色可见分子量高于HC的新条带的形成,而HC的荧光条带在9d可见。

[0055] 图22显示了PNGase F-去糖基化的曲妥珠单抗的MS数据和RP-HPLC数据。

[0056] 图23显示了PNGase F-去糖基化的B12的MS数据和RP-HPLC数据。

[0057] 图24显示了经BCN-MMAE(6a)处理后,PNGase F-去糖基化的曲妥珠单抗的SEC数据、MS数据和RP-HPLC数据。

[0058] 图25显示了用BCN-MMAE<sub>2</sub>(6b)处理后,PNGase F-去糖基化的曲妥珠单抗的SEC数据、MS数据和RP-HPLC数据。

[0059] 图26显示了经BCN-PBD(7)处理后,PNGase F-去糖基化的曲妥珠单抗的SEC数据、MS数据和RP-HPLC数据。注:\*BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-va-PABC-PBD在样品处理和分析中使用的酸性条件下不稳定。因此,观察到一些峰加宽,因此转化率由剩余的起始材料的量决定。

[0060] 图27显示了用BCN-MMAE<sub>2</sub>(6b)处理后,PNGase F-去糖基化的B12的SEC数据、MS数据和RP-HPLC数据。

[0061] 图28显示了由曲妥珠单抗或B12(阴性对照)制备的各种抗体缀合物对HER2阳性细胞系SK-BR-3的体外功效。作为阳性对照,包括GC-ADC:在用6-叠氮GalNAc进行酶促改造后与曲妥珠单抗缀合的BCN-MMAE 6a(根据W02016170186,其通过引用纳入)。

[0062] 图29显示了通过曲妥珠单抗(主要是岩藻糖基化的)的内切糖苷酶修饰,然后与酪氨酸酶和连接体-有效负载6a一起孵育获得的抗体缀合物的RP-HPLC分析。

[0063] 图30显示了通过修饰高甘露糖曲妥珠单抗(非岩藻糖基化的)然后与酪氨酸酶和连接体-有效负载6a一起孵育获得的抗体缀合物的质谱数据。

[0064] 图31显示了通过修饰高甘露糖曲妥珠单抗(非岩藻糖基化的)然后与酪氨酸酶和连接体-有效负载6a一起孵育获得的抗体缀合物的RP-HPLC分析。

## 具体实施方式

### [0065] 定义

[0066] 本说明书和权利要求书中所用的动词“包含”及其结合形式以其非限制性含义使用,以意指包括该词之后的项,但并不排除未指定提及的项。此外,除非上下文明确要求有且只有一个元素,否则用不定冠词“一”或“一个(种)”提及元素时不排除存在多于一个所述元素的可能性。因此,所述不定冠词“一”或“一个(种)”通常意指“至少一个(种)”。

[0067] 本说明书和权利要求书中公开的化合物可包含一个或多个不对称中心,并且可存

在所述化合物的不同的非对映异构体和/或对映异构体。除非另有说明,对本说明书和权利要求书中的任何化合物的描述意指包括所有的非对映异构体及其混合物。此外,除非另有说明,对本说明书和权利要求书中的任何化合物的描述意指包括单独的对映异构体,以及对映异构体的任意混合物、外消旋体或其他形式。当一种化合物的结构被描述为具体的对映异构体时,应理解,本申请的发明不限于所述具体的对映异构体。

[0068] 所述化合物可以不同的互变异构体形式存在。除非另有说明,本发明的化合物意指包括所有的互变异构体形式。当化合物的结构被描述为具体的互变异构体时,应理解,本申请的发明不限于所述具体的互变异构体。

[0069] 本说明书和权利要求中公开的化合物还可以R和S立体异构体的形式存在。除非另有说明,在本说明书和权利要求中对任何化合物的描述意指包括化合物的单独的R和单独的S立体异构体,及其混合物。当化合物的结构被描述为具体的S或R立体异构体时,应理解,本申请的发明不限于所述具体的S或R立体异构体。

[0070] 本说明书和权利要求中公开的化合物还可以R和S立体异构体的形式存在。除非另有说明,对本说明书和权利要求中对任何化合物的描述意指包括化合物的单独的R和单独的S立体异构体,及其混合物。当化合物的结构被描述为具体的S或R立体异构体时,应理解,本申请的发明不限于所述具体的S或R立体异构体。

[0071] 本说明书和权利要求书中公开的化合物还可以外型(exo)和内型(endo)非对映异构体存在。除非另有说明,对本说明书和权利要求书中的任何化合物的描述意指包括化合物的单独的外型和单独的内型非对映异构体,及其混合物。当化合物的结构被描述为具体的内型或外型非对映异构体时,应理解,本申请的发明不限于所述具体的内型或外型非对映异构体。

[0072] 根据本发明的化合物可以盐形式存在,这也包括在本发明中。所述盐通常是药学上可接受的盐,含有药学上可接受的阴离子。术语“其盐”意指当酸性质子(通常为酸的质子)被阳离子(例如金属阳离子或有机阳离子等)替换而形成的化合物。如果适用,所述盐是药学上可接受的盐,尽管这不是并不旨在用于给药至患者的盐所必需的。例如,在化合物的盐中,所述化合物可被无机或有机酸质子化以形成阳离子,同时所述无机酸或有机酸的共轭碱作为盐的阴离子组分。

[0073] 术语“药学上可接受的”盐意指对于给药至患者(例如哺乳动物)是可接受的盐(对于给定的剂量方案,其为包含具有可接受的哺乳动物安全性的抗衡离子的盐)。这种盐可衍生自药学上可接受的无机碱或有机碱,以及衍生自药学上可接受的无机酸或有机酸。“药学上可接受的盐”是指化合物的药学上可接受的盐,所述盐衍生自本领域已知的多种有机和无机抗衡离子,并且包括例如钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等,并且当分子包含碱性官能团时,所述盐为有机酸或无机酸的盐,例如盐酸盐、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。

[0074] 术语“蛋白质”在本文中以其通常的科学含义使用。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。蛋白质可包含天然的和非天然的氨基酸。

[0075] 术语“抗体”在本文中以其通常的科学含义使用。抗体是通过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。在本文中,术语抗体以其最宽泛的含义使用,并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、以及双链抗体和单链抗体。在本文中,术语“抗体”也意指包括人抗体、人源化抗体、嵌合抗体和特异性结合癌症抗原的抗体。术语“抗体”意指包括全免疫球蛋白,以及抗体的抗原结合片段。此外,所述术语包括遗传工程化抗体和抗体衍生物。抗体、抗体片段和遗传工程化抗体可通过本领域已知的方法获得。

[0076] “抗体片段”在本文中被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,小抗体,三抗体,四抗体,线性抗体,单链抗体分子,scFv,scFv-Fc,由抗体片段形成的多特异性抗体片段,由Fab表达文库产生的片段或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)的上述任一个的表位结合片段。

[0077] “抗原”在本文中被定义为抗体特异性结合的实体。

[0078] 术语“特异性结合(specific binding)”和“特异性结合(specifically bind)”在本文中被定义为高选择性方式,其中一种或多种抗体与其靶抗原的相应表位结合,而不与多种其他抗原结合。通常,抗体或抗体衍生物以至少约 $1 \times 10^{-7}$ M,优选 $10^{-8}$ M至 $10^{-9}$ M、 $10^{-10}$ M、 $10^{-11}$ M或 $10^{-12}$ M的亲和力结合,并以比其结合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)的亲和力高至少两倍的亲和力结合预定抗原。

[0079] 术语“基本上(substantial,substantially)”在本文中被定义为大多数,即群体、混合物或样品的 $>50\%$ ,优选大于群体的 $50\%$ 、 $55\%$ 、 $60\%$ 、 $65\%$ 、 $70\%$ 、 $75\%$ 、 $80\%$ 、 $85\%$ 、 $90\%$ 、 $91\%$ 、 $92\%$ 、 $93\%$ 、 $94\%$ 、 $95\%$ 、 $96\%$ 、 $97\%$ 、 $98\%$ 或 $99\%$ 。

[0080] “连接体”在本文中被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连接体彼此共价连接。连接体可包含一个或多个连接体和连接连接体内各种部分的间隔基部分。

[0081] “间隔基”或间隔基部分在本文中被定义为使连接体的两部分(或更多部分)间隔开(即提供它们之间的距离)并且共价连接在一起的部分。所述连接体可为例如,如下所定义的连接体-构建体、连接体-缀合物或生物缀合物的部分。

[0082] “自牺牲基团”在本文中被定义为抗体-药物缀合物中连接体的一部分,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。可活化的自牺牲部分包含可活化基团(AG)和自牺牲间隔基单元。在可活化基团活化后,例如通过将酰胺基团酶促转化为氨基或通过二硫化物还原为游离硫醇基团,引发自牺牲反应序列,导致通过一种或多种不同机制释放游离药物,这可能涉及对氨基苯基的(暂时)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。自牺牲装配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,自牺牲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。

[0083] “缀合物”在本文中被定义为一种化合物,其中抗体通过连接体共价连接到有效负载上。缀合物包含一种或多种抗体和/或一种或多种有效负载。

[0084] 术语“有效负载”是指共价连接到靶向部分(如抗体)的部分,也指在摄取蛋白质缀合物和/或裂解连接体时从缀合物中释放的分子。因此,有效负载是指具有一个开放末端的单价部分,该开放末端通过连接体共价连接到靶向部分,也指从其释放的分子。在本发明的上下文中,所述有效负载为依喜替康。

[0085] 术语“酪氨酸酶”和“(多)酚氧化酶”是指能够催化单酚部分邻位羟基化为邻二羟

基苯(儿茶酚)部分,随后邻二羟基苯部分进一步氧化产生邻醌(1,2-醌)部分的酶。

[0086] 术语“去糖基化”是指用酰胺酶处理N-糖蛋白以除去整个聚糖,即通过酶水解蛋白质的氨基酸(通常为天冬酰胺)和聚糖还原端的第一个单糖(通常为GlcNAc)之间的酰胺键。

[0087] 术语“去糖基化的蛋白质”是指已经用酰胺酶处理以去除整个聚糖的N-糖蛋白,即通过酶水解蛋白质的氨基酸(通常为天冬酰胺)和聚糖还原端的第一个单糖(通常为GlcNAc)之间的酰胺键。

[0088] 术语“修饰”是指用内切糖苷酶处理N-糖蛋白,以水解第一个单糖(通常为GlcNAc)和第二个单糖(通常为GlcNAc)之间的糖苷键,所述第一个单糖位于连接到氨基酸(通常为天冬酰胺)的聚糖的还原端。

[0089] 术语“修饰的蛋白”是指已经用内切糖苷酶处理过的N-糖蛋白,以水解第一个单糖(通常为GlcNAc)和第二个单糖(通常为GlcNAc)之间的糖苷键,所述第一个单糖位于连接到氨基酸(通常为天冬酰胺)的聚糖的还原端。

[0090] 本发明

[0091] 本发明人已经发现,通常通过酶如酪氨酸酶或(多)酚氧化酶对酪氨酸残基的酶促氧化没有反应性的N-糖蛋白,通过缩短或去除聚糖,可以变得有反应性。这一发现为制备糖蛋白缀合物提供了新的机会,因为这些酪氨酸残基现在可以容易地转化为邻醌部分,而邻醌部分又是可以与(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分反应的化学柄。因此,当邻醌部分与包含(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分的化合物反应时,在N-糖蛋白和该化合物之间形成共价连接,并且当该化合物进一步包含(i)用有效负载进一步修饰该化合物的化学柄,或(ii)有效负载本身时,容易形成N-糖蛋白和有效负载的缀合物。

[0092] 在第一个方面,本发明涉及一种制备N-糖蛋白缀合物的方法。根据本发明的方法包括:

[0093] (a) 提供具有暴露的酪氨酸残基的N-糖蛋白,其中所述暴露的酪氨酸残基位于N-糖基化位点的10个氨基酸内,但是该N-糖基化位点已经被修饰,使得糖蛋白在暴露的酪氨酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖;

[0094] (b) 通过将抗体与能够氧化酪氨酸的氧化酶接触,将暴露的酪氨酸残基的酚部分转化为邻醌部分;

[0095] (c) 通过[4+2]环加成使邻醌部分与烯烃或炔烃化合物反应,其中所述化合物包含(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分和(i)用有效负载进一步修饰所述化合物的化学柄,或(ii)有效负载。

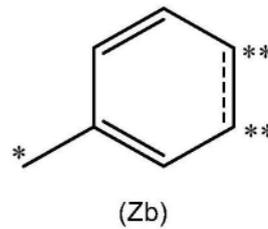
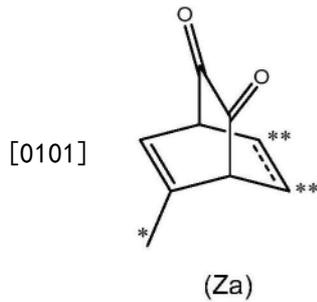
[0096] 本发明进一步涉及可通过根据本发明的方法获得的缀合物。根据本发明的缀合物也可以定义为具有结构(1a)或(1b):



[0098] 其中:

[0099] -Pr是N-糖蛋白;

[0100] -Z<sup>1</sup>包含结构(Za)或(Zb):



[0102] 其中用\*标记的碳在位于N-糖基化位点的10个氨基酸内的氨基酸处直接连接到抗体的肽链上,所述N-糖基化位点已经被修饰,使得糖蛋白在氨基酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖,并且用\*\*标记的两个碳原子都连接到L上,并且描绘为的键是单键或双键;

[0103] -L是连接体;

[0104] -x是1-4范围内的整数;

[0105] -y是1-4范围内的整数;

[0106] -Q<sup>2</sup>是对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄;

[0107] -D是有效负载。

[0108] 本发明进一步涉及由根据式(1a)的缀合物合成根据式(1b)的缀合物的方法、根据式(1b)的缀合物的医疗用途以及包含根据式(1b)的缀合物的药物组合物。

[0109] N-糖蛋白

[0110] 步骤(a)中提供的N-糖蛋白含有暴露的酪氨酸残基。在本发明的上下文中,酪氨酸残基被认为是暴露的,因为它通常位于N-糖基化位点的10个氨基酸内,但是该N-糖基化位点已经被修饰,使得糖蛋白在暴露的酪氨酸残基的10个氨基酸内不含长于两个单糖残基的聚糖。换句话说,这个N-糖基化位点不含长于两个单糖残基的聚糖。本文中,“在X个氨基酸内”是指位于暴露的酪氨酸残基和(修饰的)N-糖基化位点之间的最多X-1个氨基酸,使得暴露的酪氨酸残基最多是从糖基化氨基酸算起的第X个氨基酸。因此,暴露的酪氨酸残基位于天然N-糖基化位点的10个氨基酸内。这种天然N-糖基化位点通常位于天冬酰胺残基。优选地,暴露的酪氨酸残基位于这种N-糖基化位点的8个氨基酸内,更优选5个氨基酸内或甚至3个氨基酸内。位于天然N-糖基化位点的10个氨基酸内的暴露的酪氨酸残基也可以指例如通过点突变在N-糖基化氨基酸位置引入的酪氨酸残基,通常是天冬酰胺残基。通过引入酪氨酸残基代替天冬酰胺残基,N-聚糖将不存在,即聚糖没有单糖残基,并且引入的酪氨酸残基满足位于天然N-糖基化位点10个氨基酸内的位置要求。

[0111] 糖基化位点处的N-聚糖结构可以有多种同工型(例如G0、G1、G2),其具有至少5个单糖残基,但通常更多,例如至少7个。这些大的聚糖阻止附近的酪氨酸残基与氧化酶反应,并且这些酪氨酸残基可被这些酶利用(“暴露”)。酪氨酸残基的酚侧链通常向蛋白质内部折叠,因此它们不与氧化酶反应。然而,N-糖基化位点附近的酪氨酸残基的酚侧链通常指向蛋白质的外部,因此如果聚糖不碍事,它们可能对氧化酶有反应性。对于通常在N-糖基化位点附近具有一个或两个酪氨酸残基的抗体来说尤其如此,在根据本发明的方法的步骤(b)中,所述抗体被暴露用于与氧化酶反应。

[0112] 糖蛋白在暴露的酪氨酸残基的10个氨基酸内不具有长于两个单糖残基的聚糖。优

选地,这种聚糖不存在于15个氨基酸或甚至20个氨基酸内。最优选地,糖蛋白根本不包含长于两个单糖残基的聚糖。通常,这是指天然N-糖基化位点的聚糖。发明人发现,至多两个单糖残基的聚糖可存在于暴露的酪氨酸残基周围的该范围内,并且步骤(b)的反应仍将发生,而如果聚糖更长,则这种酪氨酸残基将被封闭(即未暴露)。发现部分(留下多达两个单糖残基)和完全去除聚糖暴露了原本被封闭的酪氨酸残基,并使其可用于步骤(b)中的反应。在一个优选的实施方案中,聚糖完全不存在或具有结构-GlcNAc(Fuc)<sub>b</sub>,其中b是0或1。在本文中,GlcNAc部分直接连接到糖蛋白肽链中氨基酸的氮原子上,主要连接到天冬酰胺残基的酰胺氮上。这种GlcNAc部分被称为核心GlcNAc部分。核心GlcNAc部分可以进一步在其6-OH被 $\alpha$ -Fuc取代,在这种情况下b=1。核心GlcNAc部分的这种任选地岩藻糖基化是抗体的共同特征,并且在本发明的上下文中,岩藻糖基部分的存在是不相关的。

[0113] 由于N-糖蛋白的N-聚糖可能在步骤(a)中被完全除去,具有暴露的酪氨酸残基的N-糖蛋白可能根本不含N-聚糖。由于酪氨酸残基最初被聚糖封闭,在本发明的上下文中,去除聚糖后剩余的蛋白质仍被称为N-糖蛋白。

[0114] 根据本发明的方法中使用的原始或天然N-糖蛋白可以具有一个以上的酪氨酸残基。优选的是,N-糖蛋白在暴露前仅含有封闭的酪氨酸残基。因此,优选的是,在暴露酪氨酸残基之前,N-糖蛋白对能够氧化酪氨酸的氧化酶,如酪氨酸酶或(多)酚氧化酶不起反应。或者,N-糖蛋白也可含有一个或多个对氧化酶有反应性的酪氨酸残基,所述氧化酶即使没有修饰N-聚糖也能氧化酪氨酸。根据本发明的方法对于这种糖蛋白仍然是有益的,因为一个或多个额外的酪氨酸残基可用作缀合位点,因此能够制备具有更高有效负载的糖蛋白缀合物。N-糖蛋白优选包含1-4个暴露的酪氨酸残基,更优选糖蛋白包含1、2或4个暴露的酪氨酸残基,最优选糖蛋白包含2或4个暴露的酪氨酸残基。在缀合的定义中,这个数也表示为y。暴露的酪氨酸残基可以通过N-糖蛋白的遗传修饰引入,或者优选位于天然位置。

[0115] 在优选的实施方案中,N-糖蛋白是在哺乳动物宿主系统中产生的抗体,优选重组抗体。抗体通常在天冬酰胺-297(N297)处(或周围)具有保守的N-糖基化位点,作为N-糖基化NST共有序列的一部分,也参见图8。各种同工型(例如G0、G1、G2)的聚糖结构可存在于该糖基化位点,其可具有12至18个单糖残基。这些大聚糖阻止附近的酪氨酸残基与氧化酶反应。因此,在N-糖蛋白是抗体的情况下,优选N-糖基化位点是抗体氨基酸序列的297位或其附近的糖基化位点,例如294-300位,优选295-298位,最优选297位。因此,暴露的酪氨酸残基位于该N-糖基化位点的10个氨基酸内,优选8个氨基酸内,更优选5个氨基酸内,最优选3个氨基酸内。因此,优选暴露的酪氨酸残基位于抗体氨基酸序列的284-310,优选287-307,优选289-305,更优选292-302,最优选294-300的氨基酸位置。更具体地,在N-糖蛋白是抗体的情况下,优选N-糖基化位点是N297或其附近的糖基化位点,并且暴露的酪氨酸残基位于该N-糖基化位点的10个氨基酸内,优选8个氨基酸内,更优选5个氨基酸内,最优选3个氨基酸内。甚至更具体地,在N-糖蛋白是抗体的情况下,优选N-糖基化位点是N297的糖基化位点,并且暴露的酪氨酸残基位于该N-糖基化位点的10个氨基酸内,即在抗体氨基酸序列的287-307范围内的位置,优选在8个氨基酸内,即在289-305范围内的位置,更优选在5个氨基酸内,即在292-302范围内的位置,最优选在3个氨基酸内,即在294-300范围内的位置。优选地,Y296和/或Y300位的酪氨酸残基是暴露的。优选的氨基酸序列如图8所示。

[0116] 暴露的酪氨酸残基可以位于天然位置,即天然N-糖蛋白的氨基酸序列中的酪氨酸

残基位置,或者位于非天然位置,其中在N-糖基化位点的10个氨基酸内的位置引入酪氨酸残基。在蛋白质氨基酸序列的特定位置引入特定氨基酸残基的这种点突变在本领域是众所周知的。优选地,天然酪氨酸残基在本发明的上下文中用作暴露的酪氨酸残基。

[0117] 具有暴露的酪氨酸残基的N-糖蛋白可以通过本领域已知的任何方法制备。合适的技术包括去糖基化、修饰、通过非糖基化氨基酸去除糖基化氨基酸和/或在非天然位置引入酪氨酸残基。更具体地,具有暴露的酪氨酸残基的N-糖蛋白可以通过以下方法制备:

[0118] (a1) 通过使N-糖蛋白与酰胺酶接触,优选与PNGase F接触,对其进行去糖基化,以获得去除了聚糖的N-糖蛋白;或者

[0119] (a2) 通过使N-糖蛋白与内切糖苷酶接触而对其进行修饰,以形成具有结构-GlcNAc(Fuc)<sub>b</sub>的聚糖的N-糖蛋白,其中b是0或1;或者

[0120] (a3) 提供突变的N-糖蛋白,其中N-糖基化的氨基酸被非糖基化的氨基酸取代。

[0121] 步骤(a1)的去糖基化是本领域已知的,并且可以以任何合适的方式进行。通常,将N-糖蛋白,如抗体,与去除聚糖的酰胺酶接触。因此,步骤(a1)提供了N-糖蛋白,其中聚糖被完全除去,没有剩余的单糖部分。尽管任何酰胺酶都可以使用,但PNGase F已经获得了有益的结果。

[0122] 如选项(a2)中的糖蛋白的修饰是本领域已知的,例如来自Yamamoto, Botechnol.Lett.2013,35,1733、WO 2007/133855或WO 2014/065661,其全部内容纳入本文。步骤(a2)的修饰可以以任何合适的方式进行。通常,将N-糖蛋白,如抗体,与内切糖苷酶接触。在本文中,内切糖苷酶能够在核心GlcNAc单元处修饰糖蛋白(如抗体)上的复杂聚糖,仅在糖蛋白上留下核心GlcNAc残基,其任选地被岩藻糖基化。根据聚糖的性质,可以选择合适的内切糖苷酶。内切糖苷酶优选选自EndoS、EndoA、EndoE、EfEndo18A、EndoF、EndoM、EndoD、EndoH、EndoT和EndoSH和/或其组合,其选择取决于聚糖的性质。在PCT/EP2017/052792中描述了EndoSH,参见实施例1-3和SEQ.ID No:1,其通过引用纳入本文。

[0123] 如选项(a3)中,提供突变的糖蛋白是本领域众所周知的。在本发明的上下文中,糖蛋白可以以任何合适的方式突变,通常通过点突变。在本文中,N-糖基化氨基酸,通常是天冬酰胺,被任何其他未糖基化的氨基酸替代。在这种情况下,任何非糖基化的氨基酸都是合适的,通常是除天冬酰胺以外的任何氨基酸。

[0124] 优选地,使用非突变的N-糖蛋白,其中根据选项(a1)或(a2),最优选地通过选项(a1)修饰聚糖。

[0125] 在本发明的另一个方面,在步骤(a)中,提供了一种突变蛋白,其天然形式对能够氧化酪氨酸的氧化酶不起反应,但通过提供该蛋白的突变形式,使其对这种酶具有反应性,其中在该蛋白的氨基酸序列中对能够氧化酪氨酸的氧化酶具有反应性的位置的非天然位置引入了一个酪氨酸残基。如果这种突变蛋白经过根据本发明的方法的步骤(b)、(c)和任选地(d),它将与一种或多种有效负载缀合。

[0126] 尽管在本方面的上下文中,蛋白质可以是N-糖蛋白,但这不是必须的,因为酪氨酸残基不是通过修饰聚糖而暴露,而是通过在特定位置引入酪氨酸残基而暴露。技术人员能够确定引入酪氨酸残基的位置,例如通过突变蛋白的3D建模来确定侧链的方向。该突变通常是点突变。

[0127] 氧化步骤(b)

[0128] N-糖蛋白的暴露的酪氨酸残基在步骤(b)中被氧化,其中酪氨酸残基的酚侧链被转化成邻醌部分。氧化是通过能够氧化酪氨酸的氧化酶的作用进行的。这种氧化酶是本领域已知的,优选选自酪氨酸酶、酚氧化酶和多酚氧化酶。酪氨酸残基的氧化在本领域中是已知的,但是还从未对被附近的聚糖封闭的酪氨酸残基进行过氧化。本发明人首次能够通过暴露这些酪氨酸残基使其氧化。

[0129] 反应步骤(c)

[0130] 在步骤(b)中形成的邻醌部分可用作进一步功能化N-糖蛋白的化学柄。因此,在有效负载被对邻醌部分具有反应性的部分官能化的情况下,有效负载可以与N-糖蛋白缀合。在步骤(c)中,进行该反应或缀合。因此,包含邻醌部分的N-糖蛋白与包含(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分的化合物接触,所述(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分在[4+2]环加成中与邻醌部分反应,形成糖蛋白与化合物的共价连接。

[0131] 该化合物还包含(i)化学柄,在本文中也称为 $Q^2$ ,以进一步用有效负载D修饰该化合物,或(ii)有效负载D。化学柄 $Q^2$ 可用于在如下定义的其他步骤(d)中引入有效负载。因此,提供了糖蛋白和有效负载分子的缀合物。共价连接到糖蛋白上的化合物以及步骤(c)反应后形成的连接基团在下面进一步定义。

[0132] 在无金属点击化学中使用(杂)环烯烃和(杂)环炔烃,例如步骤(c)的[4+2]环加成,是本领域公知的(参见例如WO 2014/065661和Nguyen and Prescher, Nature rev. 2020, doi:10.1038/s41570-020-0205-0,两者均通过引用纳入)。这些环加成可以是应变促进的,这也是本领域众所周知的(例如应变促进的炔烃-叠氮化物环加成,SPAAC)。在一个优选的实施方案中,该反应是无金属应变促进的环加成反应。

[0133] 在一个优选的实施方案中,步骤(b)和(c)在单个罐中进行,其中N-糖蛋白同时与氧化酶和烯烃或炔烃化合物接触。

[0134] 任选地步骤(d)

[0135] 在步骤(c)中使用的化合物包含化学柄 $Q^2$ 的情况下,优选根据本发明的方法包括步骤(d),其中步骤(c)中获得的化学柄与具有结构 $F^2$ -D的有效负载进行缀合反应,其中 $F^2$ 对化学柄具有反应性。两个相容的反应性基团(本文为 $Q^2$ 和 $F^2$ )之间的缀合反应在本领域中是众所周知的,并且在本发明的范围内,可以使用缀合方法。

[0136] 应当注意,化学柄 $Q^2$ 的存在不会干扰步骤(c)的反应。因此,优选 $Q^2$ 不与邻醌部分反应,或者 $Q^2$ 与邻醌部分的反应性低于 $Q^1$ 与邻醌部分的反应性,这样在步骤(c)中只有 $Q^1$ 会反应。然后,步骤(c)的产物是用化学柄 $Q^2$ 修饰的糖蛋白,其可用于步骤(d)的进一步反应。还优选 $Q^2$ 不与 $Q^1$ 反应,以避免化合物的聚合。换句话说, $Q^2$ 与 $Q^1$ 是兼容的。

[0137] 在一个优选的实施方案中, $Q^2$ 和 $F^2$ 之间的缀合反应与 $Q^1$ 和邻醌部分之间的缀合反应是同一类型的。因此,优选 $Q^2$ 和 $F^2$ 之间的缀合反应是环加成,优选1,3-偶极环加成或[4+2]环加成。步骤(d)的环加成优选是无金属应变促进的环加成。 $Q^2$ 的优选选项与下面定义的 $Q^1$ 的选项相同,技术人员能够确定 $Q^1$ 和 $Q^2$ 的哪种组合是合适的,使得 $Q^1$ 在步骤(c)中比 $Q^2$ 更具反应性。

[0138] 典型的[4+2]环加成是(杂)-Diels-Alder反应,其中 $Q^2$ 是二烯或亲二烯体。如本领域技术人员所理解的,术语“二烯”在Diels-Alder反应中是指1,3-(杂)二烯,并且包括缀合的二烯( $R_2C=CR-CR=CR_2$ )、亚胺(例如 $R_2C=CR-N=CR_2$ 或 $R_2C=CR-CR=NR$ 、 $R_2C=N-N=CR_2$ )

和羰基(例如 $R_2C=CR-CR=O$ 或 $O=CR-CR=O$ )。与含N和含O二烯的杂-Diels-Alder反应是本领域已知的。本领域已知的适用于[4+2]环加成的任何二烯都可以用作反应性基团 $Q^2$ 。优选的二烯包括四嗪、1,2-醌和三嗪。尽管本领域已知适用于[4+2]环加成的任何亲二烯体都可以用作反应性基团 $Q^2$ ,但亲二烯体优选为如上所述的烯烃或炔烃基团,最优选炔烃基团。对于通过[4+2]环加成的缀合,优选 $Q^2$ 是亲二烯体(并且 $F^2$ 是二烯),更优选 $Q^2$ 是或包含炔基。

[0139] 对于1,3-偶极环加成, $Q^2$ 是1,3-偶极或亲偶极体试剂。本领域已知的适用于1,3-偶极环加成的任何1,3-偶极均可用作反应性基团 $Q^2$ 。优选的1,3-偶极包括叠氮基、硝酮基、腈氧化物基、腈亚胺基和重氮基。尽管本领域已知的适用于1,3-偶极环加成的任何亲偶极体都可以用作反应性基团 $Q^2$ ,但是亲偶极体优选是烯烃或炔烃基团,最优选炔烃基团。对于通过1,3-偶极环加成的缀合,优选 $Q^2$ 是亲偶极体(并且 $F^2$ 是1,3-偶极),更优选 $Q^2$ 是或包含炔基。

[0140] 因此,在一个优选的实施方案中, $Q^2$ 选自亲偶极体和亲双烯体。

[0141] 技术人员也能够确定 $Q^2$ 和 $F^2$ 的哪种组合适合于合适的缀合反应。 $F^2$ 的优选选项选自叠氮化物、四嗪、三嗪、硝酮、腈氧化物、腈亚胺、重氮化合物、邻醌、二氧噻吩和悉尼酮,优选 $F^2$ 是叠氮化物部分。下面提供了 $F^2$ 的进一步优选选项。

[0142] 化合物

[0143] 步骤(c)中反应的化合物包含(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分和(i)用有效负载进一步修饰化合物的化学柄,或(ii)有效负载。通常,该化合物具有结构(3a)或(3b):



[0145] 在本文中:

[0146]  $-Q^1$ 是(杂)环烯烃或(杂)环炔烃部分;

[0147]  $-L$ 是连接体;

[0148]  $-x$ 是1-4范围内的整数;

[0149]  $-Q^2$ 是对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄;

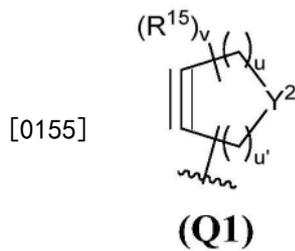
[0150]  $-D$ 是有效负载。

[0151] 化学柄 $Q^1$

[0152]  $Q^1$ 作为连接邻醌部分的化学柄。换句话说, $Q^1$ 对[4+2]环加成中的邻醌部分具有反应性。 $Q^1$ 是环(杂)烯烃或环(杂)炔烃部分,最优选 $Q^1$ 是环(杂)炔烃部分。

[0153] 在一个特别优选的实施方案中, $Q^1$ 包含环(杂)炔烃部分。炔基也可以称为(杂)环炔基,即杂环炔基或环炔基,其中(杂)环炔基任选地被取代。优选地,(杂)环炔基是(杂)环庚炔基、(杂)环辛炔基、(杂)环壬炔基或(杂)环癸炔基。在本文中,(杂)环炔基可以任选地被取代。优选地,(杂)环炔基是任选取代的(杂)环庚炔基或任选取代的(杂)环辛炔基。最优选地,(杂)环炔基是(杂)环辛炔基,其中(杂)环辛炔基任选地被取代。

[0154] 在一个特别优选的实施方案中, $Q^1$ 包含(杂)环炔基,并且根据结构(Q1):



[0156] 在本文中:

[0157]  $-R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_{24}$ 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)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基 $R^{15}$ 可以连接在一起形成任选取代的环状烷基或任选取代的环状(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;

[0158]  $-Y^2$ 是 $C(R^{31})_2$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $S^{(+)}R^{31}$ 、 $S(O)R^{31}$ 、 $S(O)=NR^{31}$ 或 $NR^{31}$ ,其中 $S^{(+)}$ 是被 $B^{(-)}$ 平衡的阳离子硫原子,其中 $B^{(-)}$ 是阴离子,并且其中每个 $R^{31}$ 独立地是 $R^{15}$ 或通过L连接的与 $Q^2$ 或D的连接;

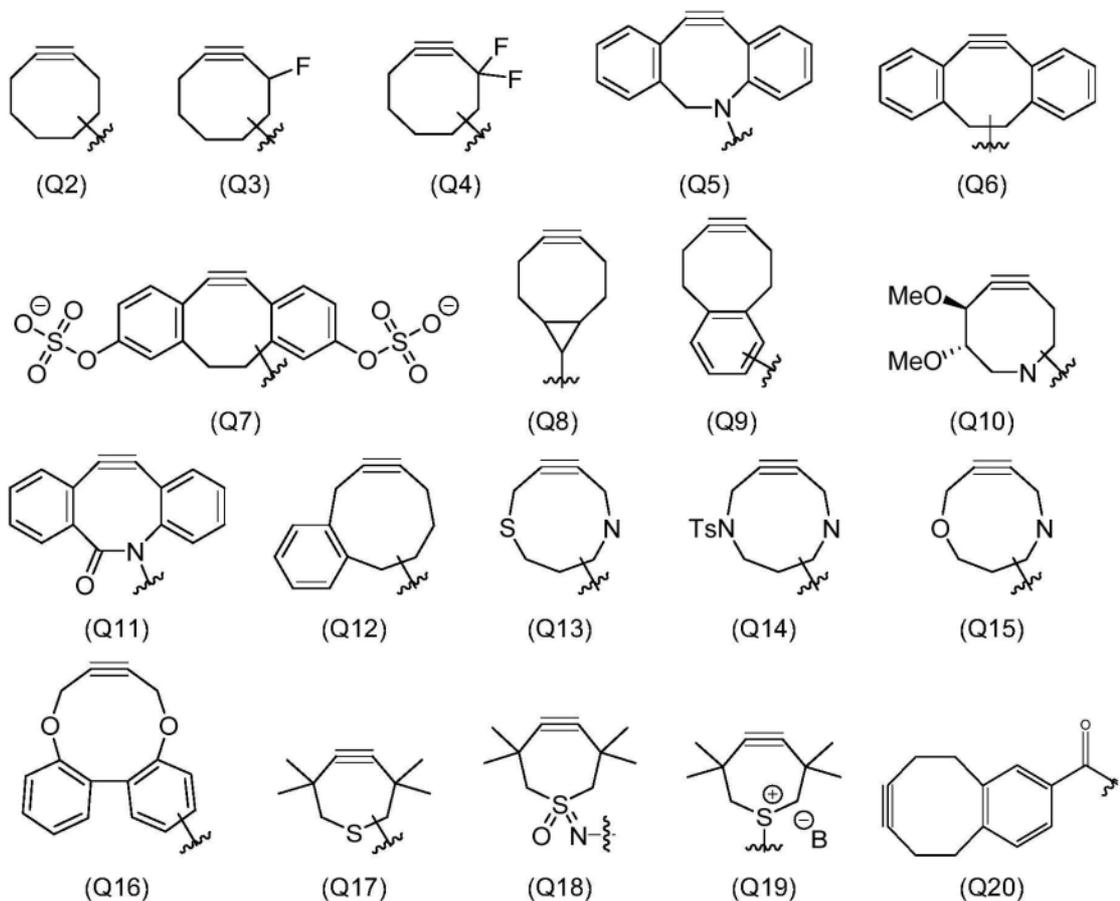
[0159]  $-u$ 是0、1、2、3、4或5;

[0160]  $-u'$ 是0、1、2、3、4或5,其中 $u+u'=4、5、6、7$ 或8;

[0161]  $-v=8-16$ 范围内的整数。

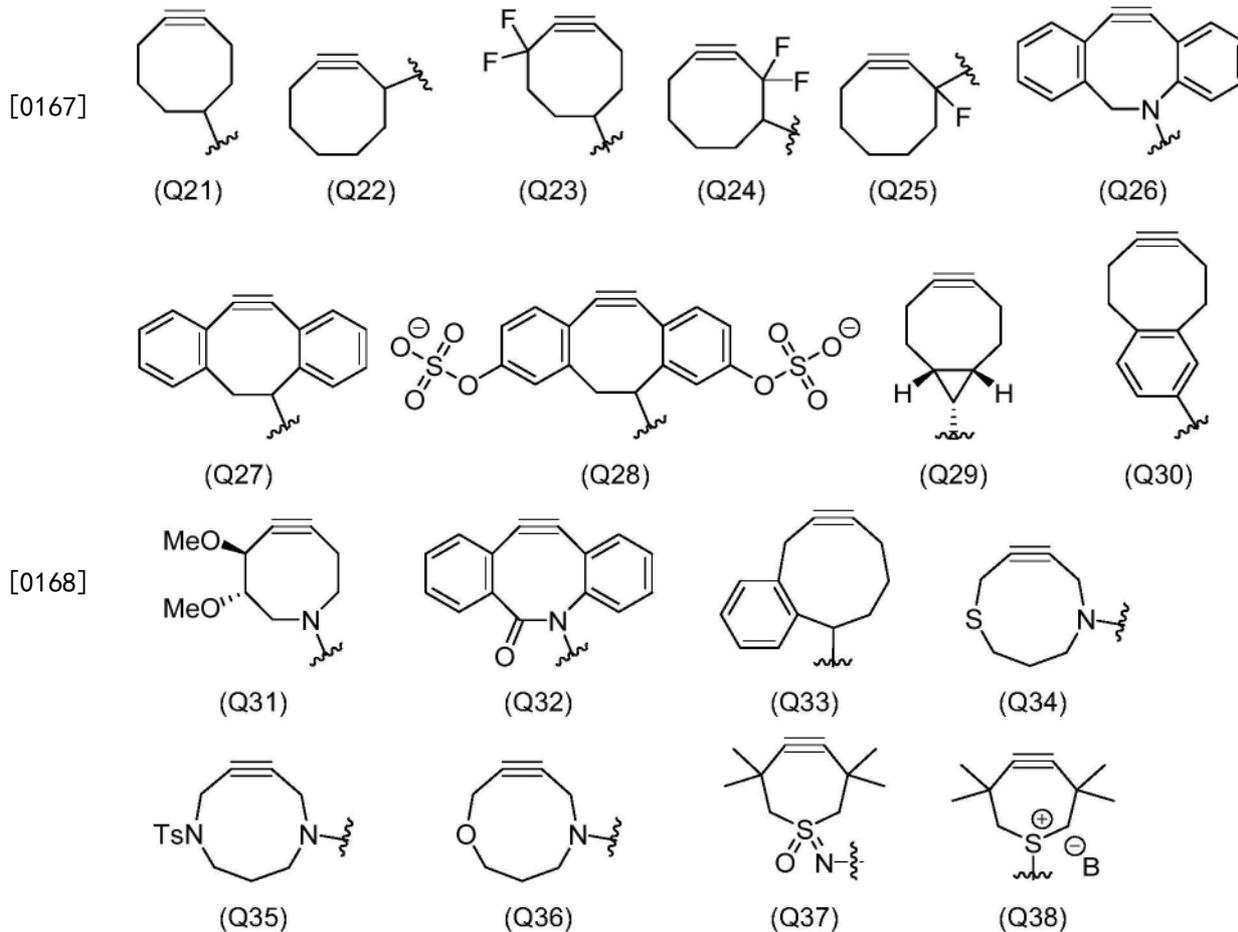
[0162] 在一个优选的实施方案中, $u+u'=4、5$ 或6,更优选 $u+u'=5$ 。通常, $v=(u+u') \times 2$ 或 $(u+u') \times 2 - 1$ 。在一个优选的实施方案中, $v=8、9$ 或10,更优选 $v=9$ 或10,最优选 $v=10$ 。

[0163] 在一个优选的实施方案中, $Q^1$ 选自下面描述的(Q2)-(Q20)。



[0165] 在本文中,用波浪键描绘的与L的连接可以是与 $Q^1$ 的任何可用的碳或氮原子的连接。(Q10)、(Q13)、(Q14)和(Q15)的氮原子可以与L连接,或者可以含有氢原子或者任选地被官能化。 $B^{(-)}$ 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(Q19)用于 $Q^1$ 的情况下,在分离根据本发明的缀合物时,带负电荷的抗衡离子优选是药学上可接受的,使得缀合物易于用作药物。

[0166] 在进一步优选的实施方案中, $Q^1$ 选自下面描述的(Q21) - (Q38)。



[0169] 在结构(Q38)中, $B^{(-)}$ 是阴离子,其优选选自 $(-)\text{OTf}$ 、 $\text{Cl}^{(-)}$ 、 $\text{Br}^{(-)}$ 或 $\text{I}^{(-)}$ ,最优选 $B^{(-)}$ 是 $(-)\text{OTf}$ 。

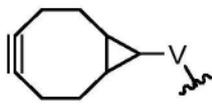
[0170] 在一个优选的实施方案中, $Q^1$ 包含根据结构(Q8),更优选根据(Q29)的(杂)环辛炔部分,也称为双环[6.1.0]壬-4-炔-9-基]基团(BCN基团),其任选地被取代。在本实施方案的上下文中, $Q^1$ 优选是根据如下所示结构(Q39)的(杂)环辛炔部分,其中V是 $(\text{CH}_2)_1$ ,1是0至10的整数,优选0至6。更优选地,1是0、1、2、3或4,更优选地1是0、1或2,最优选地1是0或1。在基团(Q39)的上下文中,1最优选为1。最优选地, $Q^1$ 根据下面进一步定义的结构(Q42)。

[0171] 在一个替代的优选实施方案中, $Q^1$ 包含根据结构(Q26)、(Q27)或(Q28)的(杂)环辛炔部分,也称为DIBO、DIBAC、DBC0或ADIBO基团,其任选地被取代。在本实施方案的上下文中, $Q^1$ 优选是根据如下所示结构(Q40)或(Q41)的(杂)环辛炔部分,其中 $Y^1$ 是O或 $\text{NR}^{11}$ ,其中 $R^{11}$ 独立地选自氢、直链或支链 $\text{C}_1$ - $\text{C}_{12}$ 烷基或 $\text{C}_4$ - $\text{C}_{12}$ (杂)芳基。(Q40)中的芳族环任选地在一个或多个位置被O-磺酰化,而(Q41)的环可以在一个或多个位置被卤化。最优选地, $Q^1$ 根据下面

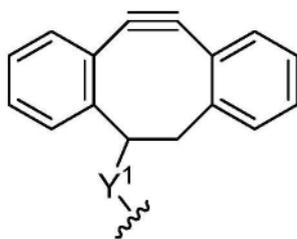
进一步定义的结构(Q43)。

[0172] 在一个可替代的优选实施方案中,  $Q^1$  包含杂环庚炔基, 并且根据结构(Q37)。

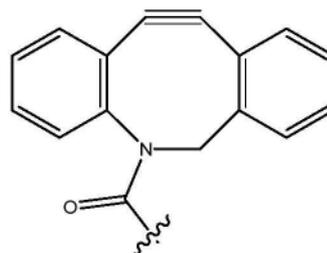
[0173]



(Q39)



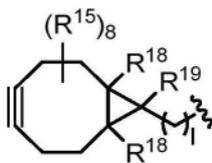
(Q40)



(Q41)

[0174] 在一个特别优选的实施方案中,  $Q^1$  包含环辛炔基并根据结构(Q42) :

[0175]



(Q42)

[0176] 在本文中:

[0177]  $-R^{15}$  独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_{24}$  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) 芳基烷基任选地被取代, 其中两个取代基  $R^{15}$  可以连接在一起形成任选取代的环状烷基或任选取代的环状 (杂) 芳基取代基, 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;

[0178]  $-R^{18}$  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;

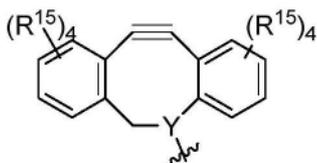
[0179]  $-R^{19}$  选自氢、卤素、 $C_1-C_{24}$  烷基、 $C_6-C_{24}$  (杂) 芳基、 $C_7-C_{24}$  烷基 (杂) 芳基和  $C_7-C_{24}$  (杂) 芳基烷基, 所述烷基任选地被一个或多个选自 O、N 和 S 的杂原子中断, 其中所述烷基、(杂) 芳基、烷基 (杂) 芳基和 (杂) 芳基烷基独立地任选地被取代, 或者  $R^{19}$  是第二个存在的由间隔基部分连接的  $Q^1$  或 D; 和

[0180]  $-l$  是 0 至 10 范围内的整数。

[0181] 在根据结构 (Q42) 的反应性基团的优选实施方案中,  $R^{15}$  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 (Q42) 的反应性基团的优选实施方案中,  $R^{18}$  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 (Q42) 的反应性基团的优选实施方案中,  $R^{19}$  是 H。在根据结构 (Q42) 的反应性基团的优选实施方案中,  $l$  是 0 或 1, 更优选  $l$  是 1。

[0182] 在一个特别优选的实施方案中,  $Q^1$  包含 (杂) 环辛炔基并根据结构 (Q43) :

[0183]



(Q43)

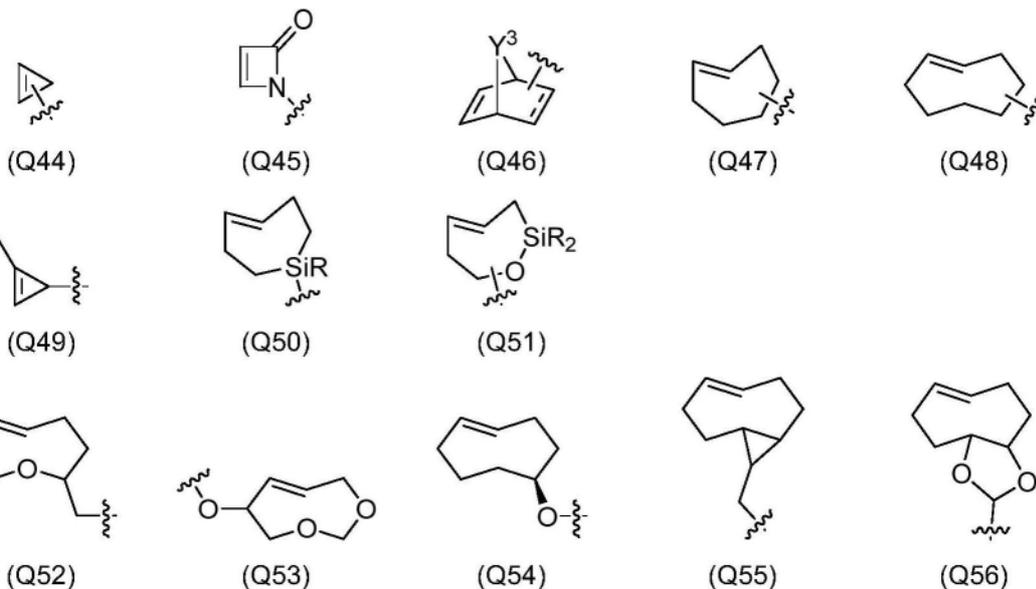
[0184] 在本文中:

[0185]  $-R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_{24}$ 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)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基 $R^{15}$ 可以连接在一起形成任选取代的环状环烷基或任选取代的环状(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;

[0186]  $-Y$ 是N或 $CR^{15}$ 。

[0187] 在根据结构(Q43)的反应性基团的优选实施方案中, $R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_6$ 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 $-S(O)_3^{(-)}$ 。在根据结构(Q43)的反应性基团的优选实施方案中, $Y$ 是N或CH,更优选 $Y=N$ 。

[0188] 在一个替代的优选实施方案中, $Q^1$ 包含环烯炔部分。烯基 $Q^1$ 也可以称为(杂)环烯基,即杂环烯基或环烯基,优选环烯基,其中(杂)环烯基任选地被取代。优选地,(杂)环烯基是(杂)环丙烯基、(杂)环丁烯基、降冰片烯基、降冰片二烯基、反式-(杂)环庚烯基、反式-(杂)环辛烯基、反式-(杂)环壬烯基或反式-(杂)环癸烯基,其均可以任选地被取代。特别优选的是(杂)环丙烯基、反式-(杂)环庚烯基或反式-(杂)环辛烯基,其中(杂)环丙烯基、反式-(杂)环庚烯基或反式-(杂)环辛烯基任选地被取代。优选地, $Q^1$ 包含根据结构(Q44)的环丙烯基部分、根据结构(Q45)的杂环丁烯部分、根据结构(Q46)的降冰片烯或降冰片二烯基团、根据结构(Q47)的反式-(杂)环庚烯基部分或根据结构(Q48)的反式-(杂)环辛烯基部分。在本文中, $Y^3$ 选自 $C(R^{24})_2$ 、 $NR^{24}$ 或O,其中每个 $R^{24}$ 独立地是氢、 $C_1-C_6$ 烷基或任选地通过间隔基连接到L,标记为 $\equiv$ 的键是单键或双键。在另一个优选的实施方案中,环丙烯基根据结构(Q49)。在另一个优选的实施方案中,反式-(杂)环庚烯基团根据结构(Q50)或(Q51)。在另一个优选的实施方案中,反式-(杂)环辛烯基团根据结构(Q52)、(Q53)、(Q54)、(Q55)或(Q56)。



[0189]

[0190] 在本文中,(Q50)和(Q51)中Si上的R基团通常是烷基或芳基,优选 $C_1-C_6$ 烷基。

[0191] 在一个替代的优选实施方案中, $Q^1$ 选自图1和2所示的结构。

[0192]  $Q^2$ 是一种对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄。 $Q^2$ 的反应性在上文步骤

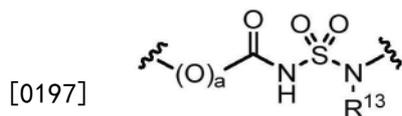
(d)中进一步定义。适当官能化的有效负载也可称为 $F^2$ -D或 $F^2$ -L<sup>2</sup>-(D)<sub>x</sub>,其中 $F^2$ 对化学柄 $Q^2$ 具有反应性, $L^2$ 是连接体, $x$ 是1-4范围内的整数,优选1或2。在一个优选的实施方案中, $Q^2$ 选自与 $Q^1$ 相同的基团,但是对邻醌部分的反应性较低。在一个特别优选的实施方案中, $Q^1$ 是(杂)环辛炔基部分, $Q^2$ 是(杂)环辛烯基部分。特别优选的组合是根据结构(Q42)的 $Q^1$ 和根据结构(Q48)的 $Q^1$ 。

[0193] 连接体L

[0194] 连接体,也称为连接单元,是本领域众所周知的,可以使用任何合适的连接体。在结构(3a)或(3b)的化合物中,连接体L将化学柄 $Q^1$ 与化学柄 $Q^2$ 或有效负载D连接起来。在步骤(c)的反应之后,连接体L将连接基团 $Z^1$ 与化学柄 $Q^2$ 或有效负载D连接起来。连接体L<sup>2</sup>将反应性部分 $F^2$ 与有效负载D连接起来。连接体可以为可裂解的或不可裂解的连接体。连接体可以含有一个或多个分支点,用于将多个有效负载D或多个化学柄 $Q^2$ 连接到单个(杂)环烯炔或(杂)环炔基部分 $Q^1$ 上。下文对连接体的进一步定义同样适用于连接体L和连接体L<sup>2</sup>。

[0195] 连接体可以例如选自直链或支链的 $C_1$ - $C_{200}$ 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、 $C_9$ - $C_{200}$ 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可以被取代,并且任选地,所述基团可以被一个或多个杂原子,优选1至100个杂原子中断,所述杂原子优选选自O、S(O)<sub>y</sub>和NR<sup>12</sup>,其中y是0、1或2,优选y=2,并且R<sup>12</sup>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。连接体可以含有(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,例如可以在2-25的范围内。

[0196] 在一个优选的实施方案中,连接体L包含磺酰胺基团,优选根据结构(L1)的磺酰胺基团:



(L1)

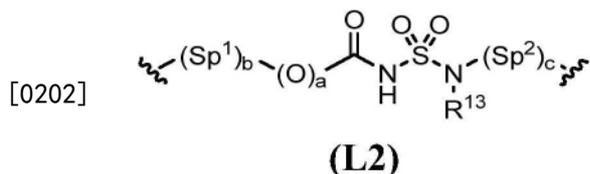
[0198] 波浪线代表与化合物或缀合物的其余部分的连接,通常是与 $Q^1$ 或 $Z^1$ 以及与 $Q^2$ 或D的连接,任选地通过间隔基。优选地,(O)<sub>a</sub>C(O)部分与 $Q^1$ 或 $Z^1$ 连接,NR<sup>13</sup>部分与 $Q^2$ 或D连接。

[0199] 在结构(L1)中,a=0或1,优选a=1,R<sup>13</sup>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,所述 $C_1$ - $C_{24}$ 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)芳基烷基被一个或多个选自O、S和NR<sup>14</sup>的杂原子任选地取代和任选地中断,其中R<sup>14</sup>独立地选自氢和 $C_1$ - $C_4$ 烷基,或者R<sup>13</sup>是通过间隔基部分(优选如下文定义的Sp<sup>2</sup>)连接到N上的第二个出现的 $Q^2$ 或D。

[0200] 在一个优选的实施方案中,R<sup>13</sup>是氢或 $C_1$ - $C_{20}$ 烷基,更优选R<sup>13</sup>是氢或 $C_1$ - $C_{16}$ 烷基,甚至更优选R<sup>13</sup>是氢或 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基,其中所述烷基被一个或多个选自O、S和NR<sup>14</sup>,优选O的杂原子任选地取代和任选地中断,其中R<sup>14</sup>独立地选自氢和 $C_1$ - $C_4$ 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 $C_1$ - $C_{20}$ 烷基,更优选 $C_1$ - $C_{16}$ 烷基,甚至更优选 $C_1$ -

C<sub>10</sub>烷基,其中所述烷基任选地被一个或多个O-原子中断,并且其中所述烷基任选地被-OH基团,优选末端-OH基团取代。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。在另一个优选的实施方案中,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。又甚至更优选地,R<sup>13</sup>是氢或甲基,最优选地,R<sup>13</sup>是氢。

[0201] 在一个优选的实施方案中,连接体是根据结构(L2):



[0203] 在本文中,a、R<sup>13</sup>和波浪线如上所定义,Sp<sup>1</sup>和Sp<sup>2</sup>独立地是间隔基部分,b和c独立地是0或1。优选地,b=0或1且c=1,更优选地b=0且c=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的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,所述亚烷基、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和NR<sup>20</sup>的杂原子任选地取代和任选地中断,其中R<sup>20</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,所述烷基、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中断时,优选所述基团被一个或多个O-原子和/或一个或多个S-S基团中断。

[0204] 更优选地,间隔基部分Sp<sup>1</sup>和Sp<sup>2</sup>,如果存在,独立地选自直链或支链的C<sub>1</sub>-C<sub>100</sub>亚烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>100</sub>亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>100</sub>亚炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>100</sub>亚环烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>100</sub>亚环烯基、C<sub>8</sub>-C<sub>100</sub>亚环炔基、C<sub>7</sub>-C<sub>100</sub>烷基亚芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>100</sub>芳基亚烷基、C<sub>8</sub>-C<sub>100</sub>芳基亚烯基和C<sub>9</sub>-C<sub>100</sub>芳基亚炔基,所述亚烷基、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和NR<sup>20</sup>的杂原子任选地取代和任选地中断,其中R<sup>20</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,所述烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0205] 甚至更优选地,间隔基部分Sp<sup>1</sup>和Sp<sup>2</sup>,如果存在,独立地选自直链或支链的C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>亚烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>50</sub>亚炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>50</sub>亚环烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>50</sub>亚环烯基、C<sub>8</sub>-C<sub>50</sub>亚环炔基、C<sub>7</sub>-C<sub>50</sub>烷基亚芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>50</sub>芳基亚烷基、C<sub>8</sub>-C<sub>50</sub>芳基亚烯基和C<sub>9</sub>-C<sub>50</sub>芳基亚炔基,所述亚烷基、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和NR<sup>20</sup>的杂原子任选地取代和任选地中断,其中R<sup>20</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,所述烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

[0206] 又甚至更优选地,间隔基部分Sp<sup>1</sup>和Sp<sup>2</sup>,如果存在,独立地选自直链或支链的C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>亚烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>亚炔基、C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>亚环烷基、C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>亚环烯基、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>亚环炔基、C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>烷基亚芳基、C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>芳基亚烷基、C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>芳基亚烯基和C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>芳基亚炔基,所述亚烷基、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和NR<sup>20</sup>的杂原子任选地取代和任选地中断,其中R<sup>20</sup>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,所述烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。

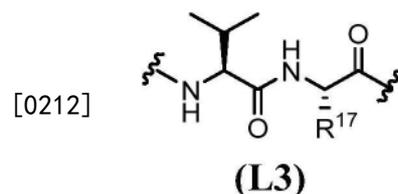
[0207] 在这些优选的实施方案中,进一步优选所述亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、烷基亚芳基、芳基亚烷基、芳基亚烯基和芳基亚炔基是未取代的,并且任选地被一个或多个选自O、S和 $NR^{20}$ ,优选O的杂原子中断,其中 $R^{20}$ 独立地选自氢和 $C_1-C_4$ 烷基,优选氢或甲基。

[0208] 最优选地,间隔基部分 $Sp^1$ 和 $Sp^2$ ,如果存在,独立地选自直链或支链的 $C_1-C_{20}$ 亚烷基,所述亚烷基被一个或多个选自O、S和 $NR^{20}$ 的杂原子任选地取代和任选地中断,其中 $R^{20}$ 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,所述烷基、烯基、炔基和环烷基任选地被取代。在该实施方案中,进一步优选所述亚烷基是未取代的,并且任选地被一个或多个选自O、S和 $NR^{20}$ ,优选O和/或S-S的杂原子中断,其中 $R^{20}$ 独立地选自氢和 $C_1-C_4$ 烷基,优选氢或甲基。

[0209] 另一类合适的连接体包括可裂解的连接体。可裂解的连接体是本领域众所周知的。例如,Shabat et al., Soft Matter 2012, 6, 1073, 其通过引用纳入本文,公开了可裂解的连接体,其包含在生物触发例如酶促裂解或氧化事件时释放的自牺牲部分。合适的可裂解的连接体的一些实例是在被蛋白酶(例如组织蛋白酶、血纤维蛋白溶酶或金属蛋白酶)特异性识别时被裂解的肽连接体,或在被糖苷酶(例如葡糖苷酶)特异性识别时被裂解的基于糖苷的连接体,或在缺氧、低氧区域被还原的硝基芳族烃。

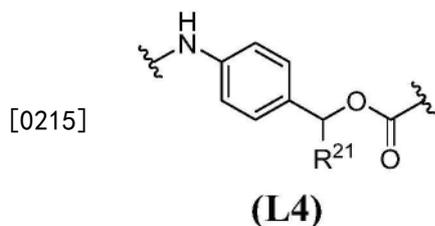
[0210] 连接体L可以进一步含有本领域已知的肽间隔基,优选本领域已知的二肽或三肽间隔基,优选二肽间隔基。尽管可以使用任何二肽或三肽间隔基,优选所述肽间隔基选自Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Val-Arg、AcLys-Val-Cit、AcLys-Val-Ala、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Phe-Arg、Ala-Lys、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Ala-Ala-Asn、Ala-Asn,更优选Val-Cit、Val-Ala、Val-Lys、Phe-Cit、Phe-Ala、Phe-Lys、Ala-Ala-Asn,更优选Val-Cit、Val-Ala、Ala-Ala-Asn。在一个实施方案中,肽间隔基是Val-Cit。在一个实施方案中,肽间隔基是Val-Ala。肽间隔基也可以连接到有效负载上,其中肽间隔基的氨基端在根据本发明第一个方面的方法中方便地用作胺基。

[0211] 在一个优选的实施方案中,肽间隔基由通式结构(L3)表示:



[0213] 在本文中, $R^{17}=CH_3$  (Val) 或 $CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$  (Cit)。波浪线表示与分子其余部分的连接,优选地,根据结构(L3)的肽间隔基通过NH与 $Q^1$ 或 $Z^1$ 连接,通常通过间隔基,并且通过C(O)与 $Q^2$ 或D连接,通常通过间隔基。

[0214] 连接体L可以进一步含有可自裂解的间隔基,也称为自牺牲间隔基。可自裂解的间隔基也可以连接到有效负载上。优选地,可自裂解的间隔基是对氨基苄基氧基羰基(PABC)衍生物,更优选根据结构(L4)的PABC衍生物。



[0216] 在本文中,波浪线表示与分子其余部分的连接。通常,PABC衍生物通过NH连接到 $Q^1$ 或 $Z^1$ ,通常通过间隔基,并且通过OC(O)连接到 $Q^2$ 或D,通常通过间隔基。

[0217]  $R^{21}$ 是H、 $R^{22}$ 或C(O) $R^{22}$ ,其中 $R^{22}$ 是 $C_1$ - $C_{24}$ (杂)烷基、 $C_3$ - $C_{10}$ (杂)环烷基、 $C_2$ - $C_{10}$ (杂)芳基、 $C_3$ - $C_{10}$ 烷基(杂)芳基和 $C_3$ - $C_{10}$ (杂)芳基烷基,其被一个或多个选自O、S和 $NR^{23}$ 的杂原子任选地取代和任选地中断,其中 $R^{23}$ 独立地选自氢和 $C_1$ - $C_4$ 烷基。优选地, $R^{22}$ 是 $C_3$ - $C_{10}$ (杂)环烷基或聚亚烷基二醇。聚亚烷基二醇优选聚乙二醇或聚丙二醇,更优选 $-(CH_2CH_2O)_sH$ 或 $-(CH_2CH_2CH_2O)_sH$ 。聚亚烷基二醇最优选聚乙二醇,优选 $-(CH_2CH_2O)_sH$ ,其中s是1-10范围内,优选1-5范围内的整数,最优选s=1、2、3或4。更优选地, $R^{21}$ 是H或C(O) $R^{22}$ ,其中 $R^{22}$ =4-甲基-哌嗪或吗啉。最优选地, $R^{21}$ 是H。

[0218] 有效负载D

[0219] 连接体L将(杂)环烷烃或(杂)环炔烃部分 $Q^1$ 与化学柄 $Q^2$ 或有效负载D连接起来。有效负载D也可以在步骤(d)中引入。有效负载分子是本领域众所周知的,尤其是在抗体-药物缀合物领域,作为共价连接到抗体上并在摄取缀合物和/或裂解连接体时从其释放的部分。在一个优选的实施方案中,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,尤其是活性物质。

[0220] 术语“活性物质”在本文中涉及药理学和/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、细胞毒素、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,如人乳铁蛋白或多聚精氨酸。聚糖的一个实例是甘露寡糖。氨基酸的一个实例是赖氨酸。

[0221] 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、蒽环霉素、喜树碱、阿霉素、道诺霉素、紫杉烷、刺孢霉素、微管溶素、依立替康、抑制肽、鹅膏蕈碱、deBouganin、杜卡霉素、美登素、澳瑞他汀、烯二炔、吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)或吡咯并苯并二氮杂卓二聚体(IGN)或PNU159,682及其衍生物。优选的有效负载选自MMAE、MMAF、依喜替康、SN-38、DXd、美登木素生物碱、卡奇霉素、PNU159,685和PBD二聚体。特别优选的有效负载是PBD、SN-38、MMAE、依喜替康或DXd。在一个实施方案中,有效负载是MMAE。在一个实施方案中,有效负载是依喜替康或DXd。在一个实施方案中,有效负载是SN-38。在一个实施方案中,有效负载是MMAE。在一个实施方案中,有效负载是PBD二聚体。

[0222] 术语“报告分子”在本文中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。

[0223] 多种荧光团,也称为荧光探针,是本领域技术人员已知的。几种荧光团在例如

G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3<sup>rd</sup> Ed. 2013, Chapter 10: "Fluorescent probes", p. 395-463中有更详细的描述,其通过引用纳入。荧光团的实例包括所有种类的Alexa Fluor (例如Alexa Fluor 555)、花青染料(例如Cy3或Cy5)和花青染料衍生物、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、芘衍生物、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。

[0224] 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(二亚乙基三胺五乙酸酐)、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<sup>1</sup>-(对异硫氰酸基苄基)-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-(乙酰基羟基氨基)戊基]氨基]-1,4-二氧丁基]羟基氨基]戊基]-N-(5-氨基戊基)-N-羟基丁二酰胺)或HYNIC(胍基烟酰胺)。同位素标记技术是本领域技术人员已知的,并且在例如G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3<sup>rd</sup> Ed. 2013, Chapter 12: "Isotopic labelling techniques", p. 507-534中有更详细的描述,其通过引用纳入。

[0225] 适合在根据本发明的化合物中用作有效负载D的聚合物是本领域技术人员已知的,并且在例如G.T.Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Elsevier, 3<sup>rd</sup> Ed. 2013, Chapter 18: "PEGylation and synthetic polymer modification", p. 787-838中更详细地描述了几个实例,其通过引用纳入。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(PPO)、1,q-二氨基烷烃聚合物(其中q是烷烃中的碳原子数,优选q是2至200范围内,优选2至10范围内的整数)、(聚)乙二醇二胺(例如1,8-二氨基-3,6-二氧杂辛烷和包含更长乙二醇链的等价物)、聚糖(例如葡聚糖)、聚(氨基酸)(例如聚(L-赖氨酸))和聚(乙烯醇)。

[0226] 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、硅酮表面、色谱支持物表面(其中色谱支持物是例如二氧化硅支持物、琼脂糖支持物、纤维素支持物或氧化铝支持物)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。

[0227] 水凝胶是本领域技术人员已知的。水凝胶是通过聚合成分之间的交联形成的水溶胀网络。参见例如A.S.Hoffman, Adv. Drug Delivery Rev. 2012, 64, 18, 其通过引用纳入本文。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(乙二醇)(PEG)组成。

[0228] 适合用作有效负载D的微粒和纳米颗粒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 14: "Microparticles and nanoparticles", p. 549-587中描述了各种合适的微粒和纳米颗粒,其通过引用纳入。微粒或纳米颗粒可以是任何形状,例如球形、棒状、管状、立方体、三角形



[0242]  $-Q^2$ 是对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄；

[0243]  $-D$ 是有效负载。

[0244] 整数 $y$ 表示在步骤(b)中被氧化并随后在步骤(c)和任选地(d)中用作缀合位点的酪氨酸残基的数量。优选地, $y=1,2$ 或 $4$ ,最优选 $y=2$ 或 $4$ 。整数 $x$ 表示连接到连接体上的化学柄 $Q^2$ 或有效负载 $D$ 的数量。连接体可以是线性的,只有一个 $Q^2$ 或 $D$ 与之连接,或者可以含有一个或多个分支点,以将最多4个 $Q^2$ 或 $D$ 连接到相同的连接基团 $Z^1$ 上。优选地, $x$ 是1或2。在根据结构(3b)的化合物在步骤(c)中反应的情况下,并且在缀合物根据结构(1b)的情况下,优选 $x$ 是1或2,最优选 $x=2$ 。在根据结构(3a)的化合物在步骤(c)中反应的情况下,并且在缀合物根据结构(1a)的情况下,优选 $x$ 是1或2,最优选 $x=1$ 。

[0245] 糖蛋白Pr、连接体L、有效负载D和化学柄 $Q^2$ 在上文中进一步定义,这些定义同样适用于根据本方面的缀合物。

[0246] 连接基团 $Z^1$

[0247] 在步骤(c)的反应中形成连接基团,在本文中也称为 $Z^1$ 。连接基团 $Z^1$ 将糖蛋白与如上定义的化合物共价连接,更特别地与化学柄 $Q^2$ 或有效负载 $D$ 共价连接。连接基团 $Z^1$ 包含结构(Za)或(Zb):



[0249] 在本文中,用\*标记的碳直接连接到抗体的肽链上,用\*\*标记的两个碳原子都连接到L上。描绘为 $\text{---}$ 的键是单键或双键,并且:

[0250]  $-L$ 是连接体;

[0251]  $-x$ 是1-4范围内的整数;

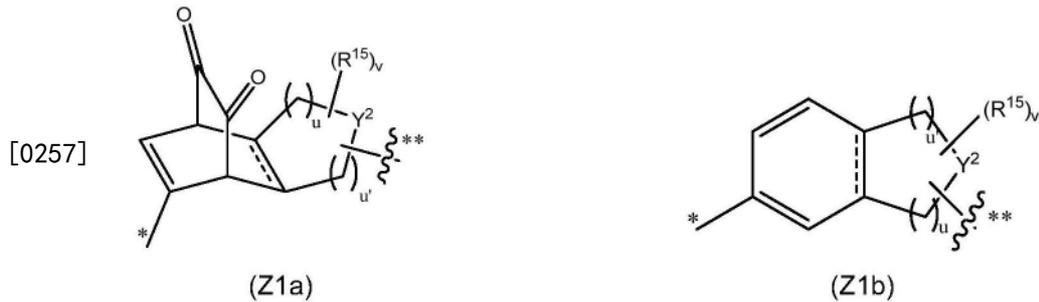
[0252]  $-Q^2$ 是对适当官能化的有效负载具有反应性的化学柄;

[0253]  $-D$ 是有效负载

[0254] 连接基团 $Z^1$ 由邻醌部分与(杂)环烯炔部分反应形成,使得 $\text{---}$ 为单键,或者由(杂)环炔炔部分形成,使得 $\text{---}$ 为双键。由于(杂)烯炔或(杂)炔炔存在于环状结构中,所得 $\text{C---C}$ 键的两个碳原子(用\*\*标记)也将处于环状结构中。换句话说,两个碳原子都通过环状结构与L连接。用\*标记的碳来源于暴露的酪氨酸残基,对应于将酚部分连接到糖蛋白的肽主链的 $\text{CH}_2$ 部分。在连接基团中,用\*标记的 $\text{CH}_2$ 部分因此直接连接到肽主链上。

[0255] 在[4+2]环加成中,首先形成结构(Za)的连接基团。取决于条件,该连接基团可以消除两个CO分子并原位形成结构(Zb)的连接基团。在本发明的上下文中,连接基团的确切性质是不相关的,因为在任何情况下,它都作为 $Q^2$ 或 $D$ 与糖蛋白的共价连接。

[0256] 在一个实施方案中, $Z^1$ 包含(杂)环烯炔部分,即由包含(杂)环炔炔部分的 $Q^1$ 形成。在一个替代的实施方案中, $Z^1$ 包含(杂)环烷炔部分,即由包含(杂)环烯炔部分的 $Q^1$ 形成。在一个优选的实施方案中, $Z^1$ 具有结构(Z1a)或(Z1b):



[0258] 在本文中,用\*标记的碳直接连接到抗体的肽链上,用\*\*标记的键连接到L上,描绘成的键是单键或双键。此外:

[0259]  $-R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_{24}$ 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)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基 $R^{15}$ 可以连接在一起形成任选取代的环状环烷基或任选取代的环状(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;

[0260]  $-Y^2$ 是 $C(R^{31})_2$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $S^{(+)}R^{31}$ 、 $S(O)R^{31}$ 、 $S(O)=NR^{31}$ 或 $NR^{31}$ ,其中 $S^{(+)}$ 是被 $B^{(-)}$ 平衡的阳离子硫原子,其中 $B^{(-)}$ 是阴离子,并且其中每个 $R^{31}$ 独立地是 $R^{15}$ 或通过L连接的与 $Q^2$ 或D的连接;

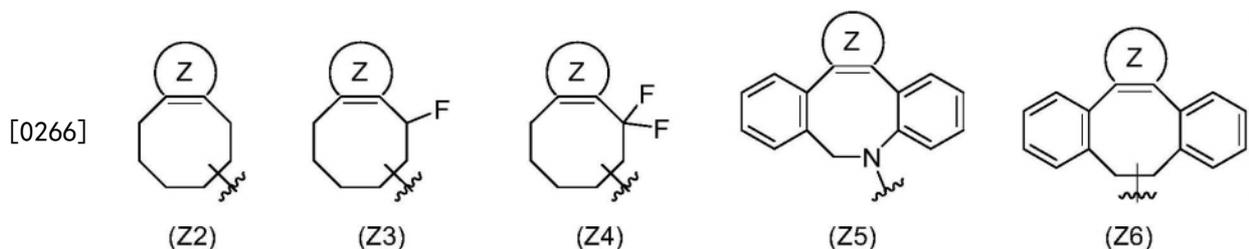
[0261]  $-u$ 是0、1、2、3、4或5;

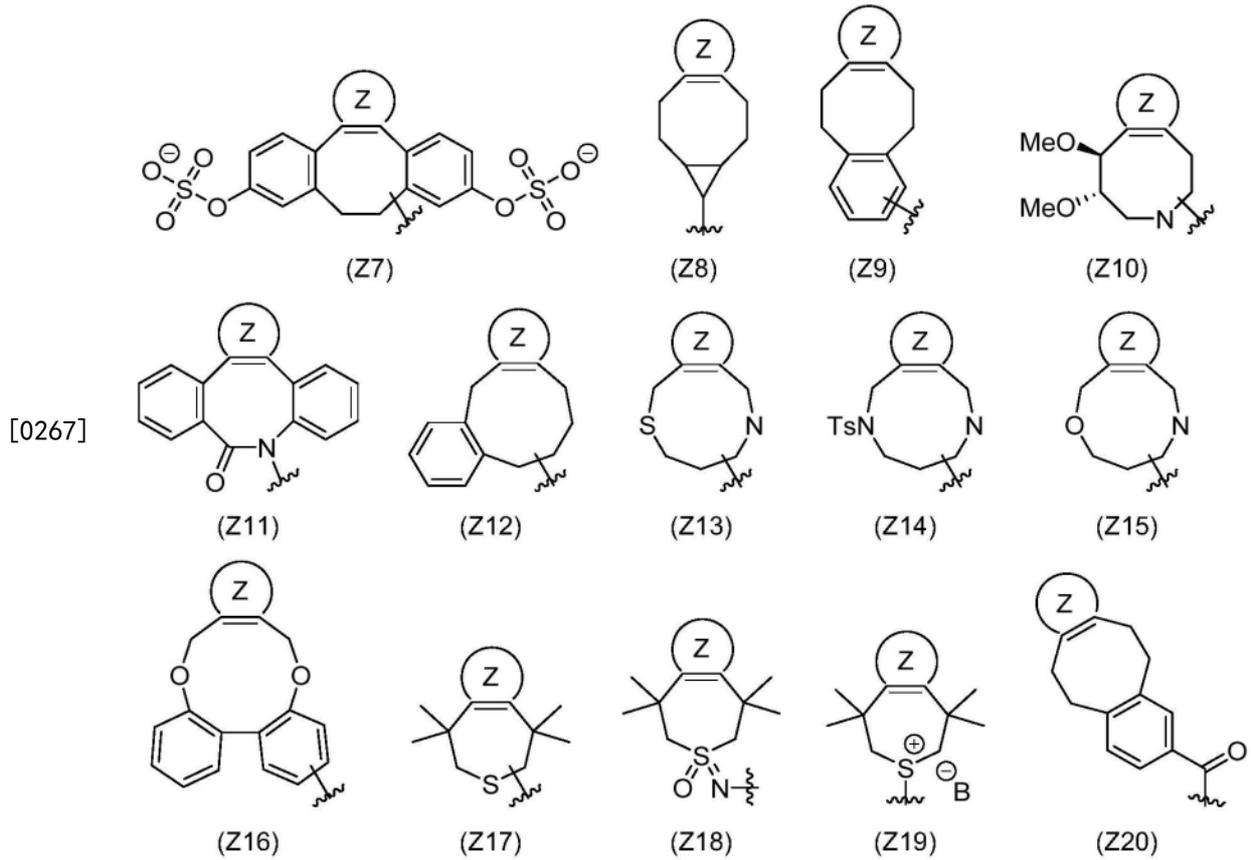
[0262]  $-u'$ 是0、1、2、3、4或5,其中 $u+u'=0、1、2、3、4、5、6、7$ 或8;

[0263]  $-v=8-16$ 范围内的整数。

[0264] 在描绘为的键是双键的情况下,优选 $u+u'=4、5、6、7$ 或8。

[0265] 特别优选 $Z^1$ 包含(杂)环烯烃部分,即描绘为的键是双键。在一个优选的实施方案中, $Z^1$ 选自下面描述的结构(Z2)-(Z20):

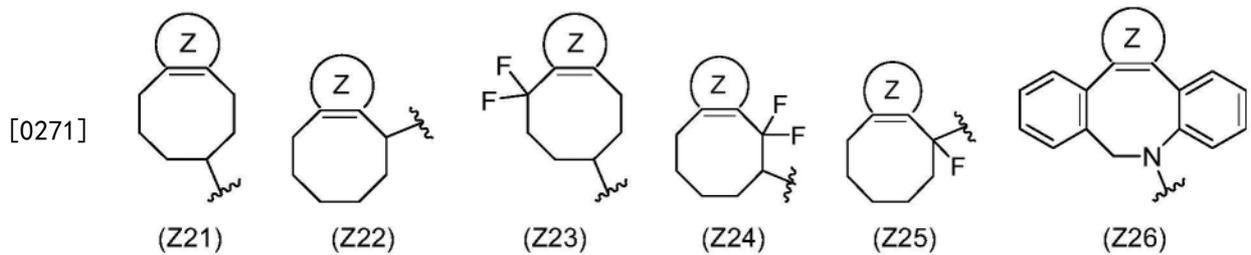


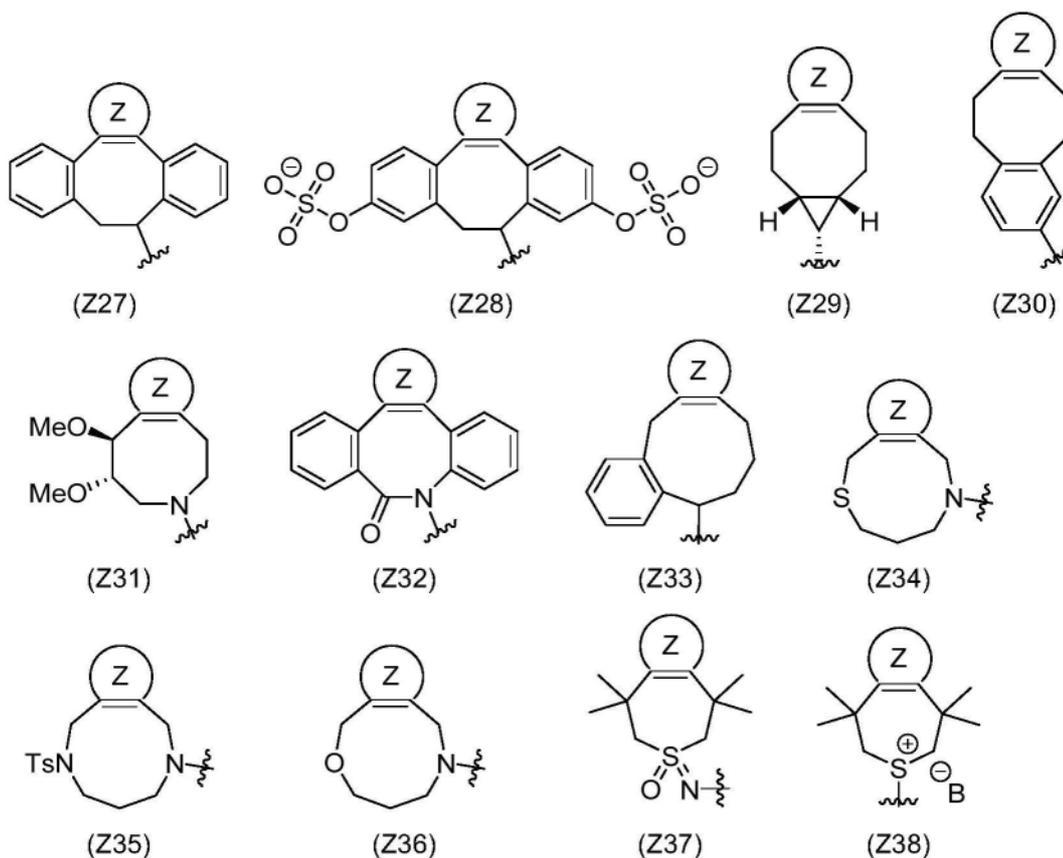


[0268] 在本文中,与L的连接用波浪键表示。B<sup>(-)</sup>是阴离子,优选药学上可接受的阴离子。环Z是结构(Za)或结构(Zb),其中用\*\*标记的碳原子对应于与环Z耦合的(Z2) - (Z20)的(杂)环烷烃环的两个碳原子,用\*标记的碳直接连接到抗体的肽链上。因为在本实施方案的上下文中,连接基团Z是通过与(杂)环炔烃反应形成的,所以上面描述为 —— 的键是双键。



[0270] 在进一步优选的实施方案中,Z<sup>1</sup>选自下面描述的结构(Z21) - (Z38):



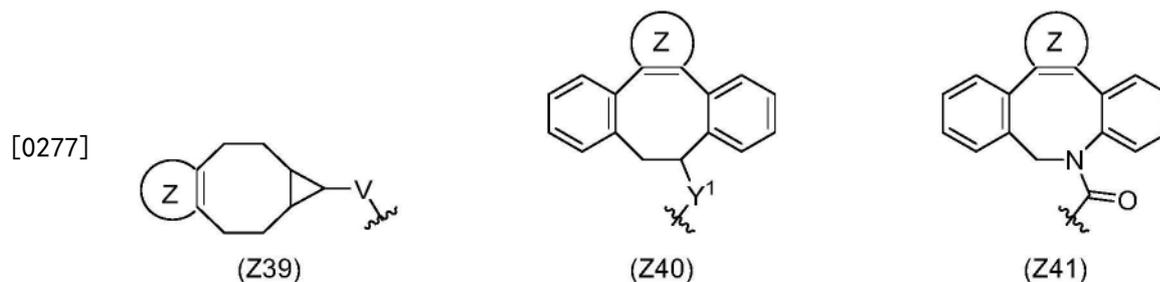


[0273] 在本文中,与L的连接用波浪键表示。在结构(Z38)中, $B^{(-)}$ 是阴离子,优选药学上可接受的阴离子。环Z是如上定义的结构(Za)或结构(Zb)。

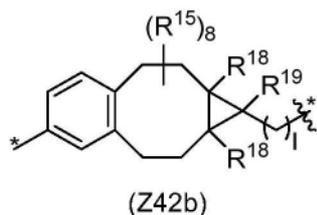
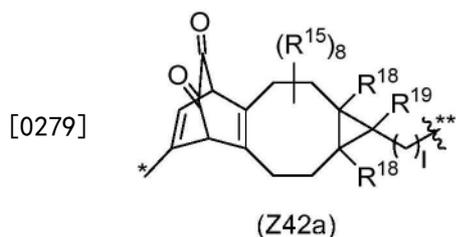
[0274] 在一个优选的实施方案中, $Z^1$ 包含根据结构(Z8),更优选根据(Z29)的(杂)环辛烯部分,其任选地被取代。在本实施方案的上下文中, $Z^1$ 优选包含如下所示的根据结构(Z39)的(杂)环辛烯部分,其中V是 $(CH_2)_1$ ,1是0至10的整数,优选0至6。更优选地,1是0、1、2、3或4,更优选地1是0、1或2,最优选地1是0或1。在基团(Z39)的上下文中,1最优选为1。最优选地, $Z^1$ 根据下面进一步定义的结构(Z42)。

[0275] 在一个替代的优选实施方案中, $Z^1$ 包含根据结构(Z26)、(Z27)或(Z28)的(杂)环辛烯部分,其任选地被取代。在本实施方案的上下文中, $Z^1$ 优选包含如下所示的根据结构(Z40)或(Z41)的(杂)环辛烯部分,其中 $Y^1$ 是O或 $NR^{11}$ ,其中 $R^{11}$ 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。(Z40)中的芳族环任选地在一个或多个位置被O-磺酰化,而(Z41)的环可以在一个或多个位置被卤化。最优选地, $Z^1$ 根据下面进一步定义的结构(Z43)。

[0276] 在一个替代的优选实施方案中, $Z^1$ 包含杂环庚烯基并根据结构(Z37)。



[0278] 在一个特别优选的实施方案中, $Z^1$ 包含环辛炔基并根据结构(Z42a)或(Z42b)：



[0280] 在本文中:

[0281] -用\*标记的碳直接与抗体的肽链连接,用\*\*标记的波状键与L连接;

[0282] - $R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_{24}$ 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)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基 $R^{15}$ 可以连接在一起形成任选取代的环状环烷基或任选取代的环状(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;

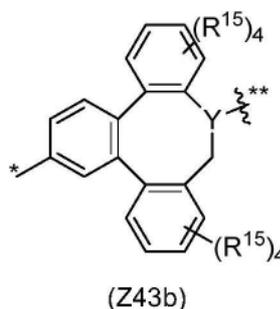
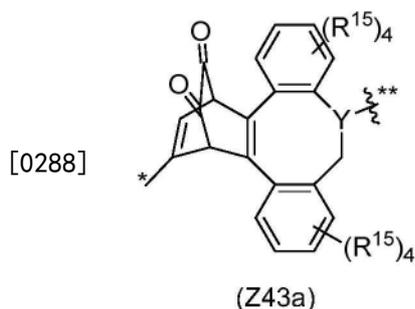
[0283] - $R^{18}$ 独立地选自氢、卤素、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_6-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基;

[0284] - $R^{19}$ 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,所述烷基任选地被一个或多个选自O、N和S的杂原子中断,其中所述烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基独立地任选被取代,或者 $R^{19}$ 是第二个存在的由间隔基部分连接的 $Q^1$ 或D;和

[0285] -I是0至10范围内的整数。

[0286] 在根据结构(Z42a)或(Z42b)的反应性基团的优选实施方案中, $R^{15}$ 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(Z42a)或(Z42b)的反应性基团的优选实施方案中, $R^{18}$ 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(Z42a)或(Z42b)的反应性基团的优选实施方案中, $R^{19}$ 是H。根据结构(Z42a)或(Z42b)的反应性基团的优选实施方案中,I是0或1,更优选I是1。

[0287] 在一个特别优选的实施方案中, $Q^1$ 包含(杂)环辛炔基并根据结构(Z43a)或(Z43b):



[0289] 在本文中:

[0290] -用\*标记的碳直接与抗体的肽链连接,用\*\*标记的波状键与L连接;

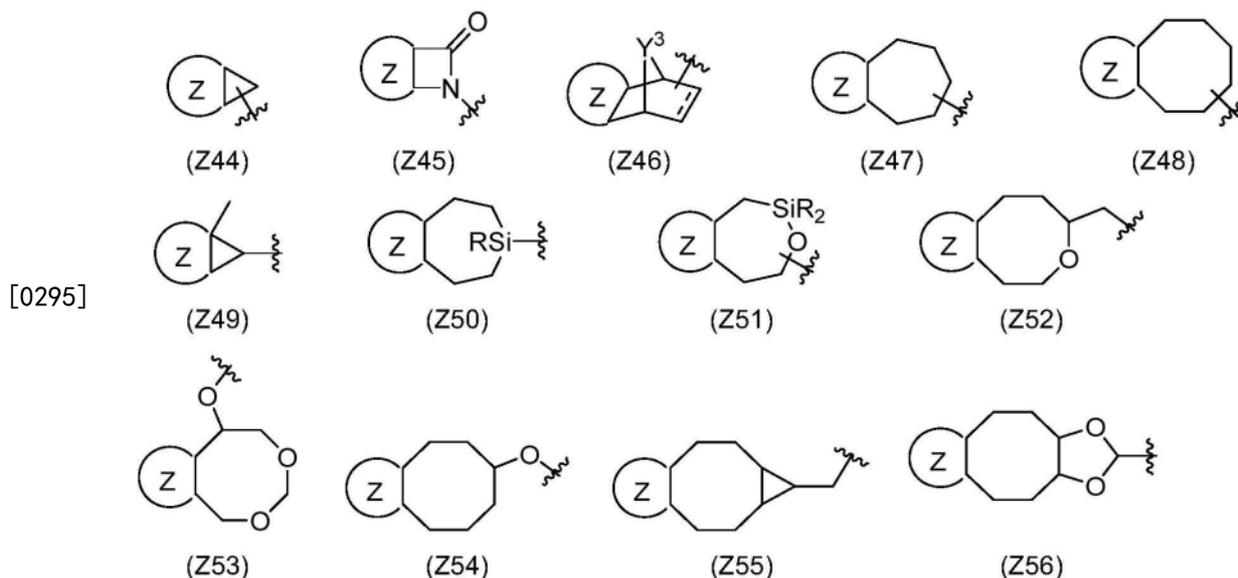
[0291] - $R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-S(O)_2R^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_{24}$ 烷基、 $C_5-C_{24}$ (杂)芳基、 $C_7-C_{24}$ 烷基(杂)芳基和 $C_7-C_{24}$ (杂)芳基烷基,其中烷基、(杂)芳基、烷基(杂)芳基和(杂)芳基烷基任选地被取代,其中两个取代基 $R^{15}$ 可以连接在一起形成任选取代的环状环

烷基或任选取代的环状(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;

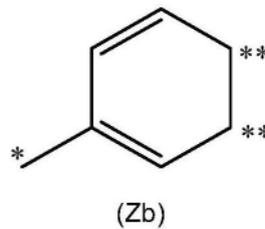
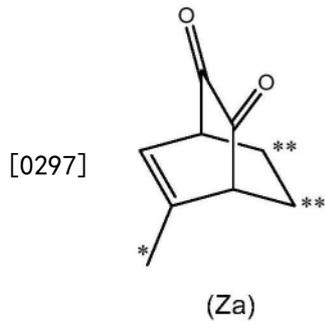
[0292] -Y是N或 $CR^{15}$ 。

[0293] 在根据结构(Z43a)或(Z43b)的反应性基团的优选实施方案中, $R^{15}$ 独立地选自氢、卤素、 $-OR^{16}$ 、 $-S(O)_3^{(-)}$ 、 $C_1-C_6$ 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 $-S(O)_3^{(-)}$ 。在根据结构(Z43a)或(Z43b)的反应性基团的优选实施方案中,Y是N或CH,更优选Y=N。

[0294] 在一个替代的优选的实施方案中, $Z^1$ 包含(杂)环烷烃部分,即描绘为的键是单键。(杂)环烷基也可称为杂环烷基或环烷基,优选环烷基,其中(杂)环烷基任选地被取代。优选地,(杂)环烷基是(杂)环丙烷基、(杂)环丁烷基、降冰片烷基、降冰片烯基、(杂)环庚烷基、(杂)环辛烷基、(杂)环壬烷基或(杂)环癸烷基,其都可以任选地被取代。特别优选的是(杂)环丙烷基、(杂)环庚烷基或(杂)环辛烷基,其中(杂)环丙烷基、反式-(杂)环庚烷基或(杂)环辛烷基任选地被取代。优选地, $Z^1$ 包含根据结构(Z44)的环丙烷基部分、根据结构(Z45)的杂环丁烷部分、根据结构(Z46)的降冰片烷或降冰片烯基团、根据结构(Z47)的(杂)环庚烷基部分或根据结构(Z48)的(杂)环辛烷基部分。在本文中, $Y^3$ 选自 $C(R^{24})_2$ 、 $NR^{24}$ 或O,其中每个 $R^{24}$ 独立地是氢、 $C_1-C_6$ 烷基或任选地通过间隔基连接到L,标记为的键是单键或双键。在进一步优选的实施方案中,环丙烷基根据结构(Z49)。在另一个优选的实施方案中,(杂)环庚烷基根据结构(Z50)或(Z51)。在另一个优选的实施方案中,(杂)环辛烷基根据结构(Z52)、(Z53)、(Z54)、(Z55)或(Z56)。



[0296] 在本文中,(Z50)和(Z51)中Si上的R基团通常是烷基或芳基,优选 $C_1-C_6$ 烷基。环Z是结构(Za)或结构(Zb),其中用\*\*标记的碳原子对应于与环Z稠合的(Z44)-(Z56)的(杂)环烷烃环的两个碳原子,用\*标记的碳直接连接到抗体的肽链上。因为在本实施方案的上下文中,连接基团Z是通过与(杂)环烯烃反应形成的,所以上面描绘为的键是单键。

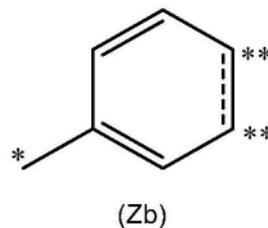
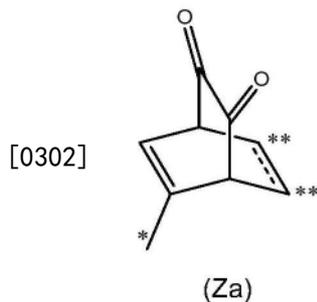


[0298] 在一个替代的优选实施方案中,  $Z^1$  包含 (杂) 环烷烃基团或通过邻醌和选自图1和2所示结构的化学柄的缀合反应形成的 (杂) 环烷烃基团。

[0299] 在本发明的一个替代的方面, 糖蛋白缀合物具有结构 (1a) 或 (1b), 其中:

[0300] -Pr 是蛋白质;

[0301]  $-Z^1$  包含结构 (Za) 或 (Zb):



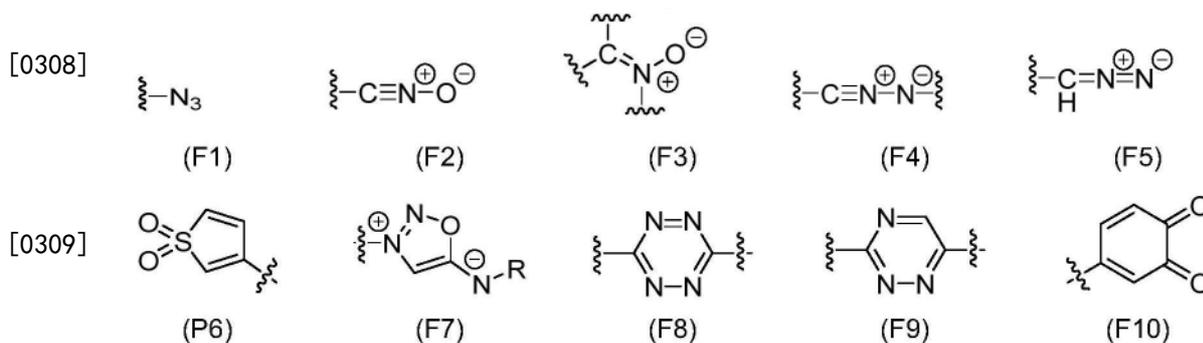
[0303] 其中用\*标记的碳直接连接到糖蛋白肽链上的氨基酸上, 所述氨基酸是蛋白质的天然形式而不是酪氨酸残基, 用\*\*标记的两个碳原子都连接到L上, 描绘为的键是单键或双键。

[0304]  $Z^1$ 、L、x、y、 $Q^2$  和 D 如别处进一步定义。

[0305] 所述蛋白是一种突变蛋白, 其天然形式对能够氧化酪氨酸的氧化酶不起反应, 但通过提供所述蛋白的突变形式使其对这种酶具有反应性, 其中在所述蛋白的氨基酸序列中对能够氧化酪氨酸的氧化酶具有反应性的位置的非天然位置引入了酪氨酸残基。因此, 连接基团  $Z^1$  所连接的氨基酸位于酪氨酸残基对能够氧化酪氨酸的氧化酶具有反应性的位置。通常, 所述蛋白已经经历了点突变以在期望的位置引入酪氨酸残基。

[0306] 本发明的另一部分是制备根据结构 (1b) 的缀合物的方法, 包括使根据结构 (1a) 的缀合物与具有结构  $D-F^2$  或  $D-L^2-(F^2)_x$  的有效负载反应, 其中  $F^2$  在缀合反应中对  $Q^2$  有反应性。在本文中,  $L^2$  是连接体, x 是 1-4 范围内的整数。在本发明的上下文中, 有效负载也可以被称为官能化的有效负载。缀合反应对应于上面定义的步骤 (d), 并且步骤 (d) 中定义的一切同样适用于根据本方面的方法, 反之亦然。

[0307] 将官能化的有效负载与根据结构 (1a) 的缀合物接触。在本文中,  $F^2$  在缀合反应, 优选环加成中对  $Q^2$  具有反应性。优选地,  $F^2$  对 (杂) 环烯烃和/或 (杂) 环炔烃具有反应性, 并且通常选自叠氮化物、四嗪、三嗪、硝酮、腈氧化物、腈亚胺、重氮化合物、邻醌、二氧噻吩和悉尼酮。反应性基团的优选结构是下面描述的结构 (F1) - (F10)。



[0310] 在本文中,波状键表示与有效负载的连接。对于(F3)、(F4)、(F8)和(F9),有效负载可以连接到任何一个波状键。另一个波状键然后可以连接到选自氢、 $C_1$ - $C_{24}$ 烷基、 $C_2$ - $C_{24}$ 酰基、 $C_3$ - $C_{24}$ 环烷基、 $C_2$ - $C_{24}$ (杂)芳基、 $C_3$ - $C_{24}$ 烷基(杂)芳基、 $C_3$ - $C_{24}$ (杂)芳基烷基和 $C_1$ - $C_{24}$ 磺酰基的R基团上,其中每个基团(除了氢之外)可以任选地被取代并且任选地被一个或多个选自O、S和 $NR^{32}$ 的杂原子中断,其中 $R^{32}$ 独立地选自氢和 $C_1$ - $C_4$ 烷基。本领域技术人员理解哪些R基团可以用于每个基团F。例如,连接到(F3)的氮原子的R基团可以选自烷基和芳基,连接到(F3)的碳原子的R基团可以选自氢、烷基、芳基、酰基和磺酰基。优选地,F2选自叠氮化物或四嗪。最优选地,F<sup>2</sup>是叠氮化物。

#### [0311] 应用

[0312] 根据结构(1b)的缀合物特别适用于治疗癌症。由于缺乏N-聚糖,根据结构(1b)的缀合物将不再能够结合Fc- $\gamma$ 受体,因此在癌症的治疗中非常有效。因此,本发明还涉及根据结构(1b)的缀合物在医疗中的用途,优选在治疗癌症中的用途。在另一个方面,本发明还涉及治疗需要其的受试者的方法,包括向受试者给予根据结构(1b)的缀合物。根据该方面的方法也可以表述为根据结构(1b)的缀合物,其用于治疗,特别是用于治疗需要其的受试者。根据该方面的方法还可以表述为根据结构(1b)的缀合物用于制备药剂的用途。在本文中,通常以治疗有效量的根据结构(1b)的缀合物进行给药。

[0313] 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根据本发明的缀合物。通常,特定疾病是癌症,需要其的受试者是癌症患者。抗体-药物缀合物在癌症治疗中的使用是众所周知的,并且根据结构(1b)的缀合物在这方面特别合适。在根据该方面的方法中,通常以治疗有效量给予缀合物。本发明的该方面也可以表述为根据结构(1b)的缀合物,其用于治疗需要其的受试者的特定疾病,优选用于治疗癌症。换句话说,该方面涉及根据结构(1b)的缀合物用于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剂或药物组合物的用途。

[0314] 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缀合物的全身给药。鉴于缀合物的特异性,它们可以全身给药,并在目的组织(例如肿瘤)中或附近发挥其活性。全身给药比局部给药具有很大的优势,因为该药物还可以到达用成像技术无法检测的肿瘤转移处,并且它可以适用于血液肿瘤。

[0315] 本发明还涉及包含根据结构(1b)的缀合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

#### [0316] 实施例

[0317] 本发明通过以下实施例来说明。

[0318] 通用试剂和分析

[0319] 溶剂购自Sigma-Aldrich或Fisher Scientific,收到后直接使用。用指定的溶剂混合物在硅胶包被的平板(Kieselgel 60F254,Merck,Germany)上进行薄层色谱,通过KMnO<sub>4</sub>染色(1.5g KMnO<sub>4</sub>、10g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、2.5mL 5%NaOH溶液、150mL H<sub>2</sub>O)、对茴香醛染色(9.2mL 对茴香醛、321mL EtOH、17mL H<sub>2</sub>O、3.75mL AcOH、12.7mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)和UV检测来检测斑点。在Bruker Biospin 400(400MHz)和Bruker DMX300(300MHz)上记录NMR谱。在JEOL AccuTOF JMS-T100CS(电喷雾电离(ESI)飞行时间)或JEOL AccuTOF JMS-100GCv(电子电离(EI),化学电离(CI))上记录蛋白质质谱(HRMS)。在ThermoScientific Advantage LCQ线性离子阱电喷雾和Waters LCMS(由2767样品管理器、2525泵、2996UV检测器和带有Xbridge™C18 3.5 μm柱(ESI)的Micromass ZQ组成)上记录低分辨率质谱(LRMS)。

[0320] 曲妥珠单抗(Herzuma)和西妥昔单抗(Cerbitux)获得自药房。PNGase F获得自新英格兰生物实验室(NEB)。化合物2(结构见图9)获得自ClickChemistryTools(<https://clickchemistrytools.com/product/tamra-dbc0/>)。化合物3(结构见图9)获得自ClickChemistryTools(<https://clickchemistrytools.com/product/af-568-tco>)。化合物4(结构见图9)和9d由Eurogentec([www.eurogentec.com](http://www.eurogentec.com))定制合成。化合物9a获得自Broadpharm:<https://broadpharm.com/web/product.php?catalog=BP-22443>。化合物9b和9c根据Bruins et al.,ACS Omega 2019,4,11801-11807制备,其通过引用纳入。人IgG2购自Abcam(<https://www.abcam.com/native-human-igg2-protein-ab90284.html?productWallTab=ShowAll#top-200>)。小鼠IgG1购自Abcam(<https://www.abcam.com/mouse-igg1-kappa-monoclonal-mopc-21-isotyp e-control-ab18443.html>)。

#### [0321] 简化SDS-PAGE、考马斯染色和荧光检测的一般程序

[0322] 根据BIO-RAD bulletin 6201方案制备12%丙烯酰胺凝胶。将5μL 1mg/mL抗体溶液用包含5%2-巯基乙醇的5μL 2x样品缓冲液稀释,并加热至95℃保持5分钟。装载样品后,使用BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra垂直电泳池在150伏下运行凝胶,直到完成。

[0323] 在染色之前,使用BioRad ChemiDoc™系统对荧光标记的蛋白质进行分析。随后,使用含有1g/L考马斯亮蓝R-250的5:4:1(v/v/v)甲醇:水:乙酸的染色溶液将凝胶染色30分钟。随后使用5:4:1(v/v/v)的甲醇:水:乙酸对凝胶脱色60分钟,之后使用软化水进一步脱色过夜。

#### [0324] 生成Fc/2片段的一般程序

[0325] 将20μg(修饰的)IgG溶液与IdeS/Fabricator™(1.25U/μL)在pH 6.6的PBS中于37℃孵育1小时,总体积为10μL。

#### [0326] RP-HPLC分析的一般程序

[0327] 在RP-HPLC分析之前,将IgG(10μL,1mg/mL在pH 7.4的PBS中)加入到12.5mM DTT、100mM pH 8.0的TrisHCl(40μL)中,并在37℃下孵育15分钟。通过加入49%乙腈、49%水、2%甲酸(50μL)来淬灭反应。RP-HPLC分析在Agilent 1100系列(Hewlett Packard)上进行。将样品(10μL)以0.5mL/min注射到Bioresolve RP mAb 2.1\*150mm 2.7μm(Waters)上,柱温为70℃。在16.8分钟内施用在0.1%TFA和水中的30至54%乙腈的线性梯度。

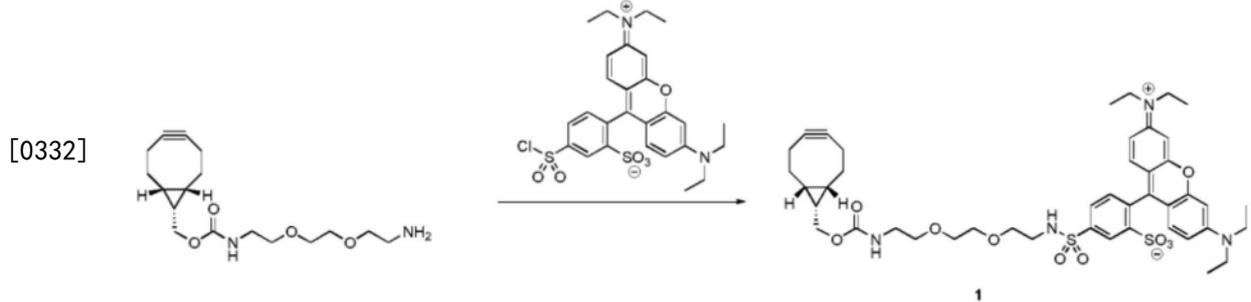
#### [0328] SEC分析的一般程序

[0329] HPLC-SEC分析在Agilent 1100系列(Hewlett Packard)上使用Xbridge BEH200A(3.5μM,7.8x300 mm,PN 186007640 Waters)柱进行。将样品在PBS中稀释至1mg/mL,并用

0.86mL/min等度法(0.1M磷酸钠缓冲液,pH 6.9( $\text{NaHPO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$ ),含有10%异丙醇)测量16分钟。

[0330] 分析MS分析的一般程序

[0331] 在质谱分析之前,用IdeS处理IgG,这允许分析Fc/2片段。为了分析Fc/2片段,将20  $\mu\text{g}$  (修饰的) IgG溶液与IdeS/Fabricator<sup>TM</sup> (1.25U/ $\mu\text{L}$ ) 在pH 6.6的PBS中在37°C下孵育1小时,总体积为10 $\mu\text{L}$ 。将样品稀释至80 $\mu\text{L}$ ,然后在JEOL AccuTOF上进行电喷雾电离飞行时间(ESI-TOF)分析。使用Magtran软件获得解卷积光谱。



[0333] 实施例1.BCN-丽丝胺化合物1的合成

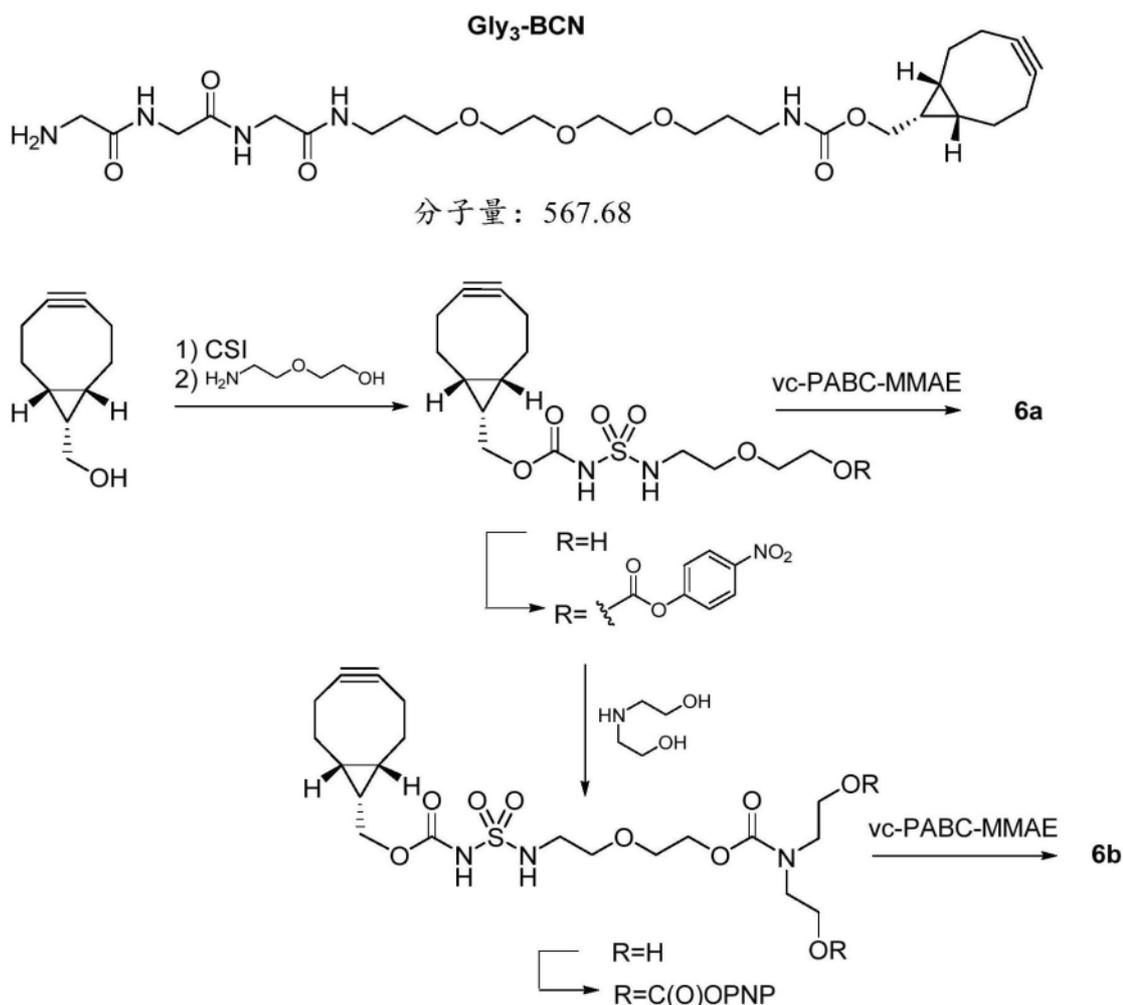
[0334] 化合物1通过BCN-二甘醇-NH<sub>2</sub> (如W02014065661实施例1中化合物24所述制备) 与市售可得磺基罗丹明B酰氯 (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/86186>) 的磺酰化来制备。

[0335] 实施例2.BCN-scFv缀合物5的制备

[0336] 根据Bartels et al., Methods 2019, 154, 93-101制备BCN-UCHT1缀合物,其通过引用纳入。因此,将1当量UCHT1-G<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub> (见下面的序列) 与1当量分拣酶A和30当量Gly<sub>3</sub>-BCN标签(图) 孵育。典型条件:向在pH 8.0的TBS中的100 $\mu\text{L}$  1.86mg/mL UCHT1-G<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>中加入在pH 8.0的TBS中的10 $\mu\text{L}$  17mg/mL分拣酶A(1当量)、在pH 8.0的TBS中的13.6 $\mu\text{L}$  100 mM CaCl<sub>2</sub>、在DMSO中的Gly<sub>3</sub>-BCN(4 $\mu\text{L}$  50mM, 30当量) 和9.6 $\mu\text{L}$  DMSO(10%最终浓度),在37°C下孵育过夜。将未反应的UCHT1-G<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>通过Ni-NTA柱除去,随后的SEC-柱产生纯缀合物。

[0337] UCHT1序列:

[0338] **VQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHG  
KNLEWMGLINPYKGVSTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELLSLT  
SEDSAVYYCARSYYGSDWYFDVWGAGTTVTVSSGGGSGGGSG  
GGSGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQQ  
KPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSKFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAT  
YFCQQGNTLPWTFAGGTKLEIKRAGGGGSLPETGGHHHHH**



[0340] 图10描述了6a、6b和7的化学结构。

[0341] 实施例3a. BCN-MMAE化合物6a的合成

[0342] 化合物6a(根据Verkade et al., *Antibodies* 2018, 7, doi:10.3390/antib7010012中描述的制备,其通过引用纳入)。在N<sub>2</sub>气氛下,向BCN醇(1.5g, 10mmol)在DCM(150mL)中的溶液中加入CSI(0.87mL, 1.4g, 10mmol)、Et<sub>3</sub>N(2.8mL, 2.0g, 20mmol)和2-(2-氨基乙氧基)乙醇(1.2mL, 1.26g, 12mmol)。将混合物搅拌10分钟,通过加入含水NH<sub>4</sub>Cl(饱和, 150mL)淬灭。分离后,将水层用DCM(150mL)萃取。将合并的有机层干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并浓缩。将残余物用柱色谱纯化。获得淡黄色稠油状的产物醇(2.06g, 5.72mmol, 57%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 6.0(bs, 1H), 4.28(d, J=8.2Hz, 2H), 3.78-3.73(m, 2H), 3.66-3.61(m, 2H), 3.61-3.55(m, 2H), 3.34(t, J=4.9Hz, 2H), 2.37-2.15(m, 6H), 1.64-1.48(m, 2H), 1.40(五重, J=8.7Hz, 1H), 1.05-0.92(m, 2H)。

[0343] 向上面制备的醇(229mg, 0.64mmol)在DCM(20mL)中的溶液中加入对硝基苯基氯甲酸酯(128mg, 0.64mmol)和Et<sub>3</sub>N(268μL, 194mg, 1.92mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜,随后减压浓缩。将残余物通过梯度柱色谱(20→70%EtOAc在庚烷(1%AcOH)中纯化,得到白色固体的PNP碳酸酯衍生物(206mg, 0.39mmol, 61%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 8.31-8.26(m, 2H), 7.45-7.40(m, 2H), 5.56(t, J=6.0Hz, 1H), 4.48-4.40(m, 2H), 4.27(d, J=8.2Hz, 2H), 3.81-3.75(m, 2H), 3.68(t, J=5.0Hz, 2H), 3.38-3.30(m, 2H), 2.36-2.14(m, 6H), 1.61-

1.45(m, 2H), 1.38(五重, J=8.7Hz, 1H), 1.04-0.94(m, 2H)。

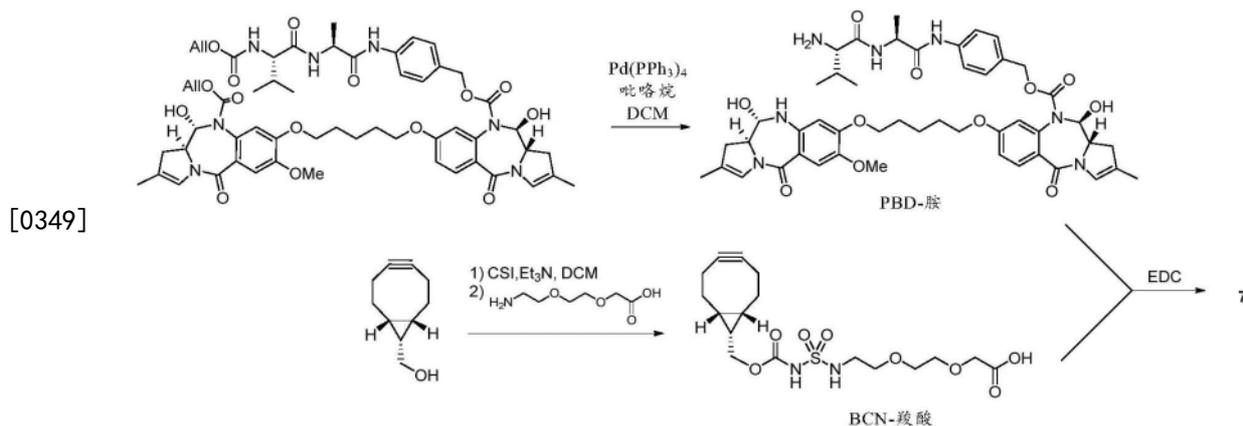
[0344] 向上面制备的PNP碳酸酯(4.7mg, 9.0 $\mu$ mol)在DMF(200 $\mu$ L)中的溶液中加入固体H-Val-Cit-PABC-MMAE(vc-PABC-MMAE, 10mg, 8.1 $\mu$ mol), 随后加入Et<sub>3</sub>N(3.7 $\mu$ L, 2.7mg, 27 $\mu$ mol)。23小时后, 加入于DMF中的2'-(亚乙二氧基)双(乙胺)(1.3 $\mu$ L, 1.3mg, 8.9 $\mu$ mol)(13 $\mu$ L 10%于DMF中的溶液)。将混合物放置4小时, 通过反相(C18)HPLC色谱(30 $\rightarrow$ 90%MeCN(1% AcOH)在H<sub>2</sub>O(1% AcOH)中)纯化。获得无色薄膜状的产物6a(10.7mg, 7.1 $\mu$ mol, 87%), C<sub>74</sub>H<sub>117</sub>N<sub>12</sub>O<sub>19</sub>S<sup>+</sup>(M+H<sup>+</sup>)的LCMS(ESI<sup>+</sup>)计算值为1509.83, 实际值为1510.59。

[0345] 实施例3b. BCN-MMAE化合物6b的合成

[0346] 化合物6b(根据Verkade et al., *Antibodies* 2018, 7, doi:10.3390/antib7010012中描述的化合物7的程序制备, 其通过引用纳入)。向6a的合成中制备的PNP碳酸酯(0.39g; 0.734mmol)在DCM(30mL)中的溶液中加入二乙醇胺(DEA, 107mg; 1.02mmol)在DMF(2mL)和Et<sub>3</sub>N(305 $\mu$ L; 221mg; 2.19mmol)中的溶液。将所得混合物在室温下搅拌17小时, 用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(30mL)洗涤。将水相用DCM(30mL)萃取, 将合并的有机层干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并浓缩。将残余物通过快速柱色谱(DCM $\rightarrow$ MeOH/DCM 1/9)纯化。获得无色薄膜状的产物二醇(163mg; 0.33mmol; 45%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) 6.29(bs, 1H), 4.33-4.29(m, 2H), 4.28(d, J=8.2Hz, 2H), 3.90-3.80(m, 4H), 3.69-3.64(m, 2H), 3.61(t, J=4.8Hz, 2H), 3.52(t, J=5.0Hz, 4H), 3.32(t, J=5.1Hz, 2H), 2.37-2.18(m, 6H), 1.60-1.55(m, 2H), 1.39(五重, J=8.7Hz, 1H), 1.05-0.94(m, 2H)。

[0347] 向上面制备的二醇(163mg, 0.33mmol)和氯甲酸4-硝基苯酯(134mg, 0.66mmol)在DCM(10mL)中的溶液中加入Et<sub>3</sub>N(230 $\mu$ L; 167mg; 1.65mmol)。将反应混合物搅拌17小时并浓缩。将残余物通过快速柱色谱纯化(50%EtOAc在庚烷中 $\rightarrow$ 100%EtOAc)。获得无色油状产物(69mg; 0.084mmol; 25%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm) 8.29-8.23(m, 4H), 7.42-7.35(m, 4H), 5.81-5.71(m, 1H), 4.53-4.43(m, 4H), 4.36-4.30(m, 2H), 4.25(d, J=8.2Hz, 2H), 3.81-3.70(m, 4H), 3.70-3.65(m, 2H), 3.62-3.56(m, 2H), 3.32-3.24(m, 2H), 2.34-2.14(m, 6H), 1.60-1.45(m, 2H), 1.35(五重, J=8.7Hz, 1H), 1.02-0.91(m, 2H)。

[0348] 向双PNP-碳酸酯(27mg, 33 $\mu$ mol)在DMF(400 $\mu$ L)中的溶液中加入三乙胺(22 $\mu$ L; 16mg; 158 $\mu$ mol)和vc-PABC-MMAE.TFA(96mg; 78 $\mu$ mol)在DMF(1.0mL)中的溶液。将混合物静置19小时, 并加入2, 2'-(亚乙二氧基)双(乙胺)(37 $\mu$ L, 38mg, 253 $\mu$ mol)。2小时后, 将反应混合物用DMF(100 $\mu$ L)稀释, 并通过RP HPLC(C18, 30% $\rightarrow$ 90%MeCN(1% AcOH)在水(1% AcOH)中纯化。获得无色薄膜状的所需产物6b(41mg, 14.7 $\mu$ mol, 45%)。C<sub>138</sub>H<sub>219</sub>N<sub>23</sub>O<sub>35</sub>S<sup>2+</sup>(M+2H<sup>+</sup>)的LCMS(ESI<sup>+</sup>)的计算值为1395.79, 实际值为1396.31。



[0350] 实施例4. BCN-PBD化合物7的制备

[0351] 化合物7 (根据W02017137456中描述的用于化合物130的程序制备, 其通过引用纳入)。

[0352] BCN羧酸的制备

[0353] 在N<sub>2</sub>气氛下, 将BCN醇 (0.384g, 2.55mmole) 在MeCN (25mL) 中的溶液冷却至0°C, 并滴加氯磺酰异氰酸酯 (CSI) (0.255mL, 415mg, 2.93mmole, 1.15当量)。搅拌15分钟后, 滴加Et<sub>3</sub>N (1.42mL, 1.03g, 10.2mmole, 4当量), 并继续搅拌另外10分钟。接下来, 加入2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)乙酸 (1.0g, 6.1mmole, 2.4当量) 在H<sub>2</sub>O (5mL) 中的溶液, 将反应混合物搅拌至室温保持2小时。此后, 加入CHCl<sub>3</sub> (50mL) 和H<sub>2</sub>O (100mL), 分离层。向分液漏斗中的水层中加入CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mL), 用1N HCl将pH调节至4, 然后分离层。将水层用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×100mL) 萃取两次, 将有机层合并并干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并浓缩。将残余物通过二氧化硅上的快速色谱谱纯化, 用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>至20%甲醇于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中洗脱。得到0.42g (1.0mmole, 39%) 无色粘性蜡状的BCN羧酸。

[0354] PBD胺的制备

[0355] 称取四三苯基膦钯Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (4.8mg, 4.15μmol) 并置于N<sub>2</sub>气氛下。吡咯烷 (5.0μL, 4.3mg, 60μmol) 在DCM (1mL) 中的溶液通过使N<sub>2</sub>鼓泡通过该溶液而脱气。Alloc保护的PBD胺 (27mg, 24μmol) 在DCM (6mL) 中的溶液通过使N<sub>2</sub>鼓泡通过该溶液而脱气。当N<sub>2</sub>仍然鼓泡通过溶液时, 加入脱气的吡咯烷溶液。将称重的Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 溶解在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1mL) 中, 并加入0.9mL该溶液。N<sub>2</sub>鼓泡50分钟后, 加入CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25mL), 将混合物用饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (25mL) 洗涤。分离后, 将水层用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×25mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。将残余物通过RP-HPLC (30-90% MeCN (0.1% 甲酸) 在H<sub>2</sub>O (0.1% 甲酸) 中纯化。将合并的馏分通过SPE (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 柱并浓缩。加入MeCN (50mL) 后, 将混合物再次浓缩。所得残余物用于下一步。

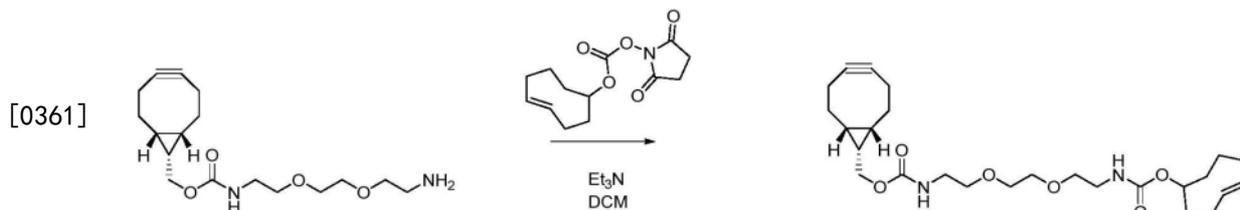
[0356] BCN-PBD化合物7的制备

[0357] 向PBD胺在CHCl<sub>3</sub> (5mL) 中的溶液中加入BCN羧酸 (15mg, 36μmol) 在CHCl<sub>3</sub> (0.8mL) 中的溶液。将所得混合物加入固体EDC·HCl (4.7mg, 25μmol) 中, 加入CHCl<sub>3</sub> (5mL), 将混合物静置16小时。加入DCM (30mL), 将所得混合物用水 (30mL) 洗涤。分离后, 将水相用DCM (30mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。将残余物通过RP-HPLC (30-90% MeCN (无酸) 在H<sub>2</sub>O (0.01% 甲酸) 中纯化。在收集前, HPLC收集管中装有5%的含水 (NH<sub>4</sub>) HCO<sub>3</sub>。将合并的HPLC馏分用DCM (3×20mL) 萃取。将合并的有机层干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并浓缩。获得浅黄色油状的产物7 (21mg, 16μmol, mw 1323g/mole, 从Alloc保护的PBD胺经过两步得到67%)。

## [0358] 实施例5.TCO-OSu的合成

[0359] 将起始的TCO-OH(按照Blackman et al., J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 41, 13518-13519所述的制备,其通过引用纳入)(120mg, 0.953mmol, 1eq.)在氮气下溶解在5mL干DCM中。加入三乙胺(193mg, 1.91mmol, 2eq.)和N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯(269mg, 1.05mmol, 1.1eq.)并搅拌直到TLC指示完成(室温下16小时)。将样品在真空下浓缩并通过快速柱色谱(20-30%EtOAc在正庚烷中)纯化,产生TCO-OSu(192mg, 0.720mmol, 76%产率)。

## [0360] 实施例6.双官能团的BCN-TCO化合物8的合成



[0362] 在氮气下,将BCN-二甘醇-NH<sub>2</sub>(如W02014065661,实施例1中所述制备)(20.1mg, 0.0620mmol, 1eq)溶解在2ml干DCM中。加入三乙胺(12.5mg, 0.124mmol, 2eq)。加入TCO-OSu(19.9mg, 0.0743mmol, 1.2eq)。搅拌反应直至TLC显示完成(室温下2小时)。将样品在真空下浓缩,通过快速柱色谱(5%甲醇在DCM中)纯化。

[0363] 8、9a-d的化学结构如图11所示。

## [0364] 实施例7.甲基四嗪-IL-2化合物9b的制备

[0365] 根据Bartels et al., Methods 2019, 154, 93-101制备MeTz-IL-2缀合物9b,其通过引用纳入。因此,将1当量的IL-2-G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>(见下面的序列)与1当量的分拣酶A和30当量的Gly<sub>3</sub>-MeTz标签(图)孵育。典型条件:向在pH 8.0的TBS中的100μL 1.2mg/mL IL-2-G<sub>4</sub>SGG<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>中加入在pH 8.0的TBS中的10μL 17mg/mL分拣酶A(1当量)、在pH 8.0的TBS中的13.6μL 100 mM CaCl<sub>2</sub>、在DMSO中的Gly<sub>3</sub>-MeTz(4μL 50mM, 30当量)和9.6μL DMSO(10%最终浓度),在37°C下孵育过夜。通过Ni-NTA柱除去未反应的IL-2-G<sub>4</sub>SGG<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>,随后的SEC柱产生纯的缀合物。

[0366] IL-2序列:

[0367] APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLTKKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEV  
LNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT

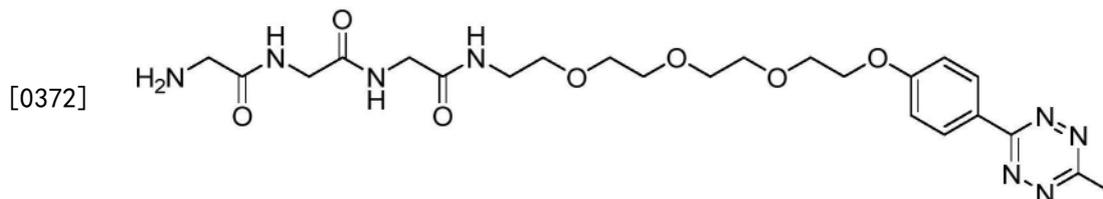
[0368] IL-2-G<sub>4</sub>SGG<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>序列:

**APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTAMLT  
K  
KFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLIS  
[0369] NINIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGG  
GGSGGGGSLPETGGHHHHH**

## [0370] 实施例8.甲基四嗪-UCHT1化合物9c的制备

[0371] 根据Bartels et al., Methods 2019, 154, 93-101制备MeTz-UCHT1缀合物,其通过引用纳入。因此,将1当量的UCHT1-G<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>(见上述序列)与1当量的分拣酶A和30当量的Gly<sub>3</sub>-MeTz孵育。典型条件:向在pH 8.0的TBS中的100μL 2mg/mL UCHT1-G<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>中加入在pH 8.0的TBS中的10μL 17mg/mL分拣酶A(1当量)、在pH 8.0的TBS中的13.6μL 100mM

CaCl<sub>2</sub>、在DMSO中的Gly<sub>3</sub>-MeTz (4μL 50mM 30当量)和9.6μL DMSO (10%最终浓度),在37℃下孵育过夜。通过Ni-NTA柱除去未反应的UCHT1-G<sub>4</sub>SLPETGGH<sub>6</sub>,随后的SEC柱产生纯的缀合物。

Gly<sub>3</sub>-MeTz

分子量: 534.57

[0373] 实施例9. 用PNGase F对曲妥珠单抗或西妥昔单抗进行酶促去糖基化

[0374] 将曲妥珠单抗 (Herzuma) (12mg, 18.4mg/mL在pH 7.4的PBS中) 与PNGase F (15μL, 7500单位) 在37℃下孵育。孵育过夜后,透析抗体 (3次,用pH 5.5的PBS) 并浓缩至15.3mg/mL。IdeS处理后样品的质谱分析显示对应于预期产物的一种主要的Fc/2产物 (观察到的质量为23787Da)。

[0375] 西妥昔单抗 (Cerbitux) 也同样去糖基化。IdeS处理后样品的质谱分析显示对应于预期产物的一种主要的Fc/2产物 (观察到的质量为23,787Da)。去糖基化的曲妥珠单抗和西妥昔单抗的HPLC图谱分别如图22和23所示。

[0376] 实施例10. 去糖基化的曲妥珠单抗与1的缀合

[0377] 将去糖基化的曲妥珠单抗 (8.0μL, 5.0mg/mL, 40μg在pH 5.5的PBS中) 用4.8μL pH 5.5的PBS稀释, 并与1 (1.6μL, 2.0mg/mL, 2.3mM, 在DMF或DMSO中) 和蘑菇酪氨酸酶 (1.6μL, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中) 在4℃下孵育16小时。完成后,使用蛋白A纯化来纯化产物。如上所述进行SDS-PAGE,这表明在曲妥珠单抗的重链上形成了荧光带 (图12)。IdeS处理后样品的质谱分析显示对应于预期产物的一种主要的Fc/2产物 (观察到的质量为24666Da) (图13)。如上所述进行HPLC分析,结果表明完全转化 (图17)。

[0378] 实施例11. 去糖基化的西妥昔单抗与1的缀合

[0379] 将去糖基化的西妥昔单抗 (8.0μL, 5.0mg/mL, 40μg, 在pH 5.5的PBS中) 用4.8μL pH 5.5的PBS稀释, 并与1 (1.6μL, 2.0mg/mL, 2.3mM, 在DMF或DMSO中) 和蘑菇酪氨酸酶 (1.6μL, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中) 在4℃下孵育16小时。完成后,使用蛋白A纯化来纯化产物。IdeS处理后样品的质谱分析显示对应于预期产物的一种主要的Fc/2产物 (观察到的质量为24667Da) (图14)。

[0380] 实施例12. 用于标记西妥昔单抗的BCN-丽丝胺1的化学计量评估

[0381] 为了评估化学计量比的1与去糖基化的西妥昔单抗的作用,在蘑菇酪氨酸酶存在下,将不同浓度的1与去糖基化的西妥昔单抗一起孵育。将pH 5.5的PBS中的1.39μL 7.2mg/mL去糖基化的西妥昔单抗用3μL pH5.5的PBS稀释。向混合物中加入在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中的0.5μL 10mg/mL蘑菇酪氨酸酶和在DMSO中的0.5μL BCN-丽丝胺1,每个样品的浓度不同 (见表)。将样品在4℃下反应24小时,之后通过HPLC测定转化率 (图15和下表)。

样品 #	浓度 1 (mg/mL)	1 (eq.每个酪氨酸)	转化率(%)
1	0.145	0.625	46
[0382] 2	0.289	1.25	69
3	0.578	2.5	93
4	0.867	3.75	95
5	1.445	6.25	93

[0383] 实施例13.用TCO-AF<sub>568</sub> (3)对曲妥珠单抗和西妥昔单抗进行标记的评估

[0384] 将去糖基化的西妥昔单抗(8.0 $\mu$ L, 5.0mg/mL, 40 $\mu$ g, 在pH 5.5的PBS中)或曲妥珠单抗(类似量)用4.8 $\mu$ L pH 5.5的PBS稀释,并与3(1.6 $\mu$ L, 4.0mg/mL, 4.3mM, 在DMF或DMSO中)和蘑菇酪氨酸酶(1.6 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中)在4 $^{\circ}$ C下孵育16小时。完成后,使用蛋白A纯化对产物进行纯化。如上所述进行SDS-PAGE,这表明在曲妥珠单抗和西妥昔单抗的重链上形成了荧光带(图16)。如上所述进行HPLC分析,结果表明完全转化(图17)。

[0385] 实施例14:试图用3标记完整的小鼠IgG1。

[0386] 将在pH 7.1的PBS中的小鼠IgG 1(10 $\mu$ L, 0.5mg/mL)与TCO-AF568 3(1.0 $\mu$ L, 4.0mg/mL, 在DMSO中, 65eq.)和蘑菇酪氨酸酶(1.0 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.5的磷酸盐缓冲液中)在4 $^{\circ}$ C下孵育48小时。如上所述进行SDS-PAGE分析(图18)。没有观察到抗体的氧化。

[0387] 实施例15:尝试用3标记去糖基化的小鼠IgG1

[0388] 将pH 7.1的PBS中的小鼠IgG1(200 $\mu$ L, 0.5mg/mL)与PNGase F(10 $\mu$ L 0.1mg/mL)在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。将反应物用旋转过滤(MWC0 100kDa)再缓冲至pH 7.1的PBS,去除PNGase F。将去糖基化的小鼠IgG1(1.1 $\mu$ L, 4.5mg/mL)用6.9 $\mu$ L pH 7.1的PBS稀释,并与TCO-AF568 3(1.0 $\mu$ L, 4.0mg/mL, 在DMSO中, 65eq.)和蘑菇酪氨酸酶(1.0 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.5的磷酸盐缓冲液中)在4 $^{\circ}$ C下孵育48小时。如上所述进行SDS-PAGE分析(图18)。没有观察到抗体的氧化。

[0389] 实施例16:尝试用3标记完整的人IgG2。

[0390] 将在pH 7.1的PBS中的人IgG 2(2.5 $\mu$ L, 2.1mg/mL)用5.5 $\mu$ L pH 7.1的PBS稀释,并与TCO-AF568 3(1.0 $\mu$ L, 4.0mg/mL, 在DMSO中, 62eq.)和蘑菇酪氨酸酶(1.0 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.5的磷酸盐缓冲液中)在4 $^{\circ}$ C下孵育48小时。如上所述进行SDS-PAGE分析(图18)。没有观察到抗体的氧化。

[0391] 实施例17:尝试用3标记去糖基化的人IgG2

[0392] 将pH 7.1的PBS中的人IgG 2(50 $\mu$ L, 2.1mg/mL)与PNGase F(10 $\mu$ L 0.1mg/mL)在37 $^{\circ}$ C下孵育16小时。将反应物用旋转过滤(MWC0 100kDa)再缓冲至pH 7.1的PBS,去除PNGase F。将去糖基化的人IgG2(1 $\mu$ L, 4.8mg/mL)用7.0 $\mu$ L pH 7.1的PBS稀释,并与TCO-AF568 3(1.0 $\mu$ L, 4.0mg/mL, 在DMSO中, 67eq.)和蘑菇酪氨酸酶(1.0 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.5的磷酸盐缓冲液中)在4 $^{\circ}$ C下孵育48小时。如上所述进行SDS-PAGE分析(图18)。没有观察到抗体的氧化。

[0393] 实施例19.BCN试剂1和TCO试剂3之间的曲妥珠单抗LC-G<sub>4</sub>Y标记的竞争实验。

[0394] (A)将在pH 5.5的PBS中的Tras[LC]G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y(1, 73 $\mu$ L, 28.9mg/mL, 50 $\mu$ g)用8.27 $\mu$ L PBS稀释,并在4 $^{\circ}$ C下孵育16小时。如上所述进行HPLC分析,显示Tras[LC]G<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y的清晰的轻链和重链迹线。图19A中描绘了HPLC迹线。

[0395] (B)将在pH 5.5的PBS中的Tras[LC]<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y(1,73μL,28.9mg/mL,50μg)用6.78μL pH 5.5的PBS稀释。向该溶液中加入BCN-丽丝胺1(0.5μL,5.0mg/mL,2.5μg,4.3eq.,每个酪氨酸标签)。样品均质化后,加入蘑菇酪氨酸酶(1.0μL,10mg/mL,在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中)。将混合物在4℃下反应16小时。如上所述进行HPLC分析,并显示Tras[LC]<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y轻链上的完全转化,保留时间偏移1分钟。图19B中描绘了HPLC迹线。

[0396] (C)将在pH 5.5的PBS中的Tras[LC]<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y(1,73μL,28.9mg/mL,50μg)用6.65μL pH 5.5的PBS稀释。向其中加入TCO-AF5683(0.625μL 4.0mg/mL,2.5μg,4.03eq.,每个酪氨酸标签)。均质化样品后,加入蘑菇酪氨酸酶(1.0μL,10mg/mL,在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中)。将混合物在4℃下反应16小时。如上所述进行HPLC分析,并显示Tras[LC]<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y的轻链上的完全转化,保留时间偏移0.2分钟。图19C描绘了HPLC迹线。

[0397] (D)将在pH 5.5的PBS中的Tras[LC]<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y(1,73μL,28.9mg/mL,50μg)用6.15μL pH 5.5的PBS稀释。向其中加入BCN-丽丝胺1(0.5μL,5.0mg/mL,2.5μg,4.3eq.,每个酪氨酸标签)和TCO-AF568 3(0.625μL 4.0mg/mL,2.5μg,4.03eq.,每个酪氨酸标签)。均质化样品后,加入蘑菇酪氨酸酶(1.0μL,10mg/mL,在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中)。如上所述进行HPLC分析,显示出Tras[LC]<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y轻链的完全转化,保留时间偏移1分钟,表明主要形成了BCN-缀合物。图19D描绘了HPLC迹线。

[0398] Tras[LC]<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>Y序列:

[0399] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGRSRSGT  
DFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGG  
SGGGGY

[0400] 实施例20. 去糖基化的西妥昔单抗与双官能团的BCN-TCO试剂8的缀合产生西妥昔单抗-TCO(在图20中概念地描述)。

[0401] 将去糖基化的西妥昔单抗(11.0μL,9.0mg/mL,在pH 5.5的PBS中)用33.0μL pH 5.5的PBS稀释。向其中加入BCN-TCO 8(5.5μL,5.0mg/mL,27.5μg,44eq.,每个酪氨酸标签,在DMSO中),随后加入蘑菇酪氨酸酶(5.5μL,10mg/mL,在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中)。将混合物在4℃下反应16小时。将反应物用旋转过滤(MWCO 100kDa)再缓冲至pH 7.1的PBS,去除未反应的BCN-TCO 8。TCO修饰的西妥昔单抗最终浓度为5.2mg/mL。

[0402] 实施例21. 西妥昔单抗TCO与甲基四嗪试剂9a-9d的反应

[0403] 将TCO修饰的西妥昔单抗(1.0μL,5.2mg/mL)用3.5μL pH 7.1的PBS稀释,随后与MeTz-TAMRA 9a(0.5μL,1.0mg/mL,9.3eq.每个TCO)在DMSO中孵育。将样品在4℃下孵育30分钟。如上所述进行SDS-PAGE分析,这表明在重链上形成了荧光带(图21E)。

[0404] 将TCO修饰的西妥昔单抗(1.0μL,5.2mg/mL)用3.5μL pH 7.1的PBS稀释,随后与MeTz-IL2 9b(0.5μL,7.4mg/mL,3.0eq.,每个TCO)在pH 7.1的PBS中孵育。将样品在4℃下孵育30分钟。如上所述进行SDS-PAGE分析,这表明在重链上形成了荧光带(图21B)。

[0405] 将TCO修饰的西妥昔单抗(1.0μL,5.2mg/mL)用3.33μL pH 7.1的PBS稀释,随后与MeTz-UCHT1 9c(0.67μL,9.1mg/mL,3.1eq.,每个TCO)在pH 7.1的PBS中孵育。将样品在4℃下孵育30分钟。如上所述进行SDS-PAGE分析,这表明在重链上形成了荧光带(图21C)。

[0406] 将TCO修饰的西妥昔单抗(1.0μL,5.2mg/mL)用2.0μL pH 7.1的PBS稀释,随后与

MeTz-ODN1826 9d (2.0 $\mu$ L, 100 $\mu$ M, 2.8eq., 每个TCO) 在MilliQ中孵育。将样品在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。如上所述进行SDS-PAGE分析, 这表明在重链上形成了荧光带(图21D)。

[0407] 实施例22. B12的瞬时表达和纯化

[0408] 由Evitria (Zurich, Switzerland) 以1L的规模在CHO K1细胞中瞬时表达B12。将上清液使用蛋白质A柱(25mL, CaptivA PriMAB) 纯化。将上清液上样到柱上, 然后用至少10倍柱体积的25mM pH 7.5的Tris, 150mM NaCl (TBS) 洗涤。将保留的蛋白质用0.1M pH 3.5的NaOAc洗脱。将洗脱的产物立即用2.5M pH 7.2的Tris-HCl中和, 并对TBS透析。接下来, 将IgG(15-20mg/mL) 使用Vivaspin Turbo 4超滤装置(Sartorius) 浓缩。

[0409] 实施例23. 用PNGase F对B12进行酶促去糖基化

[0410] 将B12(6mg, 10mg/mL, 在pH 7.4的PBS中) 与PNGase F(6 $\mu$ L, 3000单位, NEB) 在37 $^{\circ}$ C下孵育。孵育过夜后, 透析抗体(3次, 用pH 5.5的PBS) 并浓缩至23.6mg/mL。IdeS处理后样品的质谱分析显示对应于预期产物的一种主要的Fc/2产物(观察到的质量为23756Da, 约占总Fc/2的70%), 以及对应于预期产物+赖氨酸的一种次要产物(观察到的质量为23885Da, 约占总Fc/2的25%)。

[0411] 实施例24. 去糖基化的曲妥珠单抗与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-vc-PABC-MMAE(6a)的缀合

[0412] 将去糖基化的曲妥珠单抗(196 $\mu$ L, 3mg, 15.3mg/mL, 在5.5的PBS中) 与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-vc-PABC-MMAE 6a(40 $\mu$ L, 5mM在DMF中) 和蘑菇酪氨酸酶(60 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中, Sigma Aldrich T3824) 孵育16小时。随后, 将反应物用300 $\mu$ L PBS稀释, 并以13.000rpm离心2分钟。将液体在AKTA纯化器-10(GE Healthcare) 上的Superdex200 Increase 10/300GL(GE Healthcare) 柱上纯化。IdeS消化样品的质谱分析显示对应于缀合的Fc/2片段的一种主要产物(观察到的质量为25311Da, 约占总Fc/2片段的90%)。图24中描绘的缀合物的SEC、MS和HPLC图谱。

[0413] 实施例25. 去糖基化的曲妥珠单抗与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-(vc-PABC-MMAE)<sub>2</sub>(6b)的缀合

[0414] 将去糖基化的曲妥珠单抗(196 $\mu$ L, 3mg, 15.3mg/mL, 在5.5的PBS中) 与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-(vc-PABC-MMAE)<sub>2</sub> 6b(40 $\mu$ L, 5mM在DMF中) 和蘑菇酪氨酸酶(60 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中, Sigma Aldrich T3824) 孵育16小时。随后, 将反应物用300 $\mu$ L PBS稀释, 并以13.000rpm离心2分钟。将液体在AKTA纯化器-10(GE Healthcare) 上的Superdex200 Increase 10/300GL(GE Healthcare) 柱上纯化。IdeS消化样品的质谱分析显示对应于缀合的Fc/2片段的一种主要产物(观察到的质量为26591Da, 约占总Fc/2片段的90%)。图25中描绘了缀合物的SEC、MS和HPLC图谱。

[0415] 实施例26. 去糖基化的曲妥珠单抗与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-va-PABC-PBD(7)的缀合

[0416] 将去糖基化的曲妥珠单抗(196 $\mu$ L, 3mg, 15.3mg/mL, 在5.5的PBS中) 与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-va-PABC-PBD 7(40 $\mu$ L, 5mM在DMF中) 和蘑菇酪氨酸酶(60 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中, Sigma Aldrich T3824) 孵育16小时。随后, 将反应物用300 $\mu$ L PBS稀释, 并以13.000rpm离心2分钟。将液体在AKTA纯化器-10(GE Healthcare) 上的Superdex200 Increase 10/300GL(GE Healthcare) 柱上纯化。IdeS消化样品的质谱分析显示对应于缀合的Fc/2片段的一种主要产物(观察到的质量为25122Da, 约占总Fc/2片段的90%)。图26中描绘了缀合物的SEC、MS和HPLC图谱。

[0417] 实施例27. 去糖基化的B12与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-(vc-PABC-MMAE)<sub>2</sub>(6b)的缀合

[0418] 将去糖基化的B12 (127 $\mu$ L, 3mg, 23.6mg/mL, 在5.5的PBS中) 与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>- (vc-PABC-MMAE)<sub>2</sub> 6b (40 $\mu$ L, 5mM在DMF中) 和蘑菇酪氨酸酶 (60 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中, Sigma Aldrich T3824) 和PBS (73 $\mu$ L, pH 5.5) 孵育16小时。随后, 将反应物用300 $\mu$ L PBS稀释, 并以13.000rpm离心2分钟。将液体在AKTA纯化器-10 (GE Healthcare) 上的Superdex200 Increase 10/300GL (GE Healthcare) 柱上纯化。IdeS消化样品的质谱分析显示对应于缀合的Fc/2片段的一种主要产物 (观察到的质量为26599Da, 约占总Fc/2片段的70%), 和对应于具有C-末端赖氨酸的缀合的Fc/2片段的一种次要产物 (观察到的质量为26687Da, 约占总Fc/2片段的20%)。图27中描绘了B12与6b的缀合物的SEC、MS和HPLC图谱。

[0419] 汇总表:

缀合物	%转化率	%单体	%产率	DAR
T-6a (BCN-MMAE)	90.0	98.2	88	1.8
T-6b (BCN-MMAE) <sub>2</sub>	91.6	97.5	50	3.67
T-7 (BCN-PBD)	97.0	94.5	84	3.88
B12-6b (BCN-MMAE) <sub>2</sub>	90.3	98.5	67	3.61

[0421] 实施例28. 体外分析

[0422] 将SK-BR-3 (Her2<sup>3+</sup>) 和MCF-7 (Her2<sup>-</sup>) 细胞铺在补充有10%胎牛血清 (FBS) (ATCC®30202™) 的RPMI 1640 (Merck, R7388) 的96孔板 (5000个细胞/孔) 中, 并在37°C和5%CO<sub>2</sub>的潮湿空气中孵育过夜。将化合物T-6a/b、T-7和B-6b以三倍稀释系列一式四份加入, 以获得2pM至21nM的终浓度。将细胞在37°C和5%CO<sub>2</sub>的潮湿空气中孵育5天。培养基由补充有10%胎牛血清 (FBS) (ATCC®30202™) 的RPMI 1640 (Merck, R7388) 中的0.01mg/mL刃天青 (Sigma Aldrich) 代替。在37°C和5%CO<sub>2</sub>的潮湿空气中约3至4小时后, 用荧光板阅读器 (Envision多标签板阅读器) 在531nm激发和590nm发射下检测荧光。通过将没有细胞的孔设定为0%存活力, 将含有未处理细胞的孔设定为100%存活力, 将相对荧光单位 (RFU) 标准化为细胞存活力百分比。不同浓度的各种构建体的细胞杀伤潜力绘制在图28中。

[0423] 实施例29: 融合蛋白EndoSH对曲妥珠单抗的酶促修饰

[0424] 将曲妥珠单抗 (Herzuma) (1mg, 10mg/mL, 在pH 7.4的PBS中) 与EndoSH (2 $\mu$ L, 4.2mg/mL) 在37°C下孵育。孵育过夜后, 透析抗体 (3次, 用pH 5.5的PBS) 并浓缩至11mg/mL。IdeS处理后样品的质谱分析显示对应于预期产物的一种主要的Fc/2产物 (观察到的质量为24134Da)。

[0425] 实施例30: 通过融合蛋白EndoSH对高甘露糖曲妥珠单抗进行酶促修饰

[0426] 将具有高甘露糖聚糖的曲妥珠单抗 (通过Evitria (Zurich, Switzerland) 在 kifunensin存在下在CHO K1细胞中进行瞬时表达获得) (1.4mg, 11.4mg/mL, 在pH 7.4的PBS中) 与EndoSH (2.7 $\mu$ L, 4.2mg/mL) 在37°C孵育。孵育6小时后, 透析抗体 (3次, 用pH 5.5的PBS) 并浓缩至16mg/mL。IdeS处理后样品的质谱分析显示对应于预期产物的一种主要的Fc/2产物 (观察到的质量为23990Da)。

[0427] 实施例31. 修饰的曲妥珠单抗与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-vc-PABC-MMAE (6a) 的缀合

[0428] 将修饰的曲妥珠单抗 (20 $\mu$ L, 0.2mg, 10mg/mL, 在5.5的PBS中) 与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-vc-PABC-MMAE 6a (4 $\mu$ L, 3.33mM在DMF中) 和蘑菇酪氨酸酶 (4 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓

冲液中, Sigma Aldrich T3824) 孵育16小时。DTT减少后的RP-HPLC分析显示, 通过对应于缀合产物的重链峰的偏移, 约10%转化(图29)。

[0429] 实施例32. 修饰的高甘露糖曲妥珠单抗与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-vc-PABC-MMAE(6a)的缀合

[0430] 将修饰的高甘露糖曲妥珠单抗(20 $\mu$ L, 0.2mg, 10mg/mL, 在5.5的PBS中)与BCN-HS-PEG<sub>2</sub>-vc-PABC-MMAE 6a(4 $\mu$ L, 3.33mM在DMF中)和蘑菇酪氨酸酶(4 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中, Sigma Aldrich T3824)孵育16小时。随后, 加入额外部分的蘑菇酪氨酸酶(4 $\mu$ L, 10mg/mL, 在pH 6.0的磷酸盐缓冲液中, Sigma Aldrich T3824), 并将反应再孵育24小时。IdeS消化样品的质谱分析显示一种主要产物(观察到的质量为25512Da, 约占总Fc/2片段的40%)和一种碎片化产物(观察到的质量为24752Da, 约占总Fc/2片段的30%), 两个峰都对应于缀合产物(图30)。RP-HPLC分析(图31)表明很好地转化为了药物与抗体的比率为1.50的缀合物。

## 序列表

<110> 西纳福克斯股份有限公司

<120> 基于酪氨酸的抗体缀合物

<130> P6096903PCT

<150> 2026947

<151> 2020-11-20

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1           5           10           15
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
           20           25           30
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
           35           40           45

```

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 50 55 60  
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln  
 65 70 75 80  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
 85 90 95  
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys  
 100 105

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

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

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 20 25 30  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 35 40 45  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu





65					70					75					80
Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys
					85					90					95
Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Ile	Lys		
			100					105					110		
<210>	9														
<211>	110														
<212>	PRT														
<213>	小鼠														
<400>	9														
Ala	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys
1				5					10					15	
Pro	Lys	Asp	Ala	Leu	Met	Ile	Ser	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val
			20					25					30		
Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	His	Val	Ser	Trp	Phe
		35					40					45			
Val	Asp	Asn	Lys	Glu	Val	His	Thr	Ala	Trp	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Ala
	50					55					60				
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His
65					70					75				80	
Gln	Asp	Trp	Met	Arg	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys
					85					90				95	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys		
			100					105					110		
<210>	10														
<211>	263														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	UCHT1														
<400>	10														
Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser
1				5					10					15	
Met	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Thr
			20					25					30		
Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Asn	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
		35					40					45			
Leu	Ile	Asn	Pro	Tyr	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
	50					55					60				



Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60  
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95  
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110  
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile  
 115 120 125  
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu  
 130 135 140  
 Pro Glu Thr Gly Gly His His His His His His  
 145 150 155  
 <210> 12  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> LC-GGGGY  
 <400> 12  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140



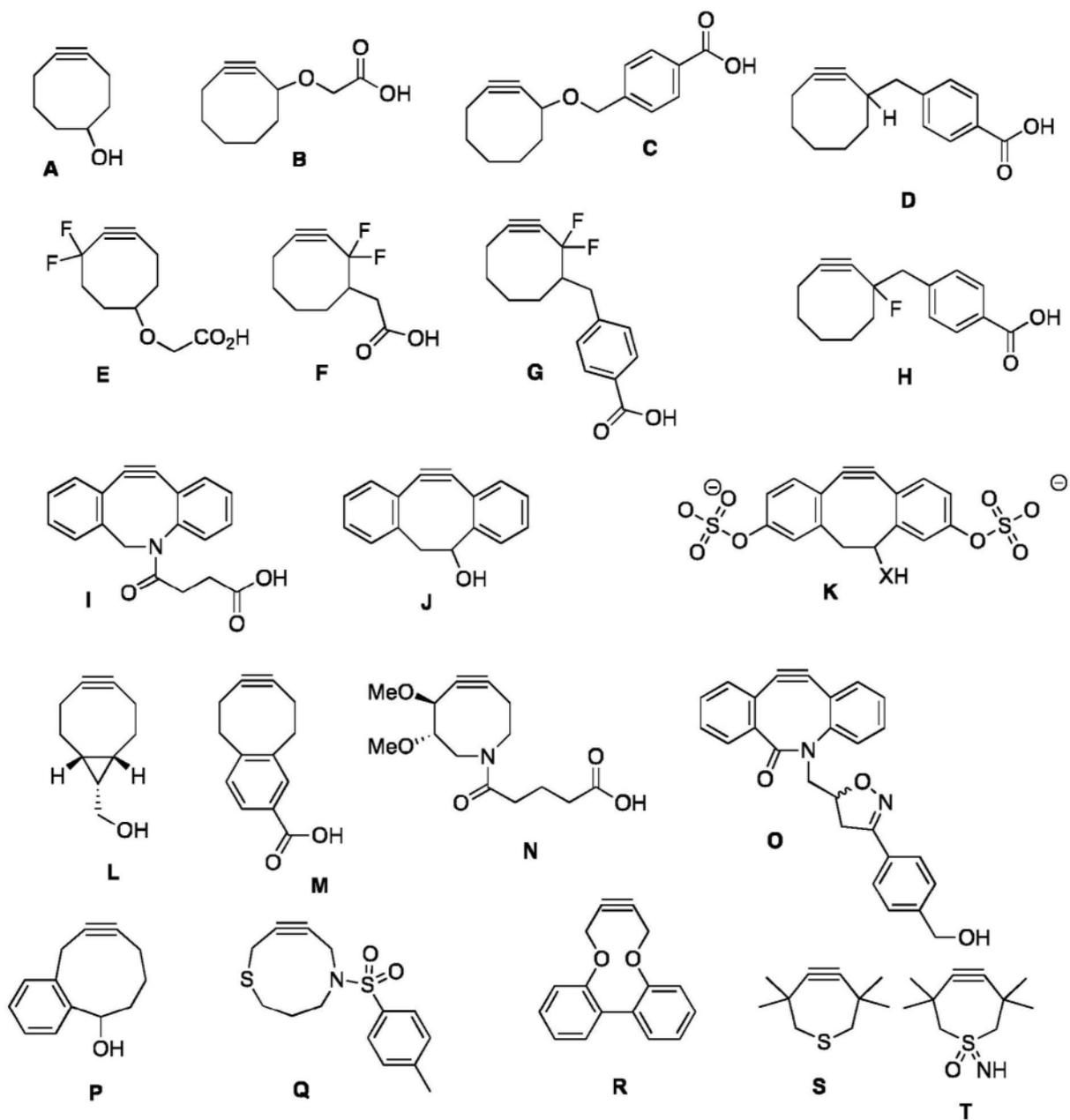


图1

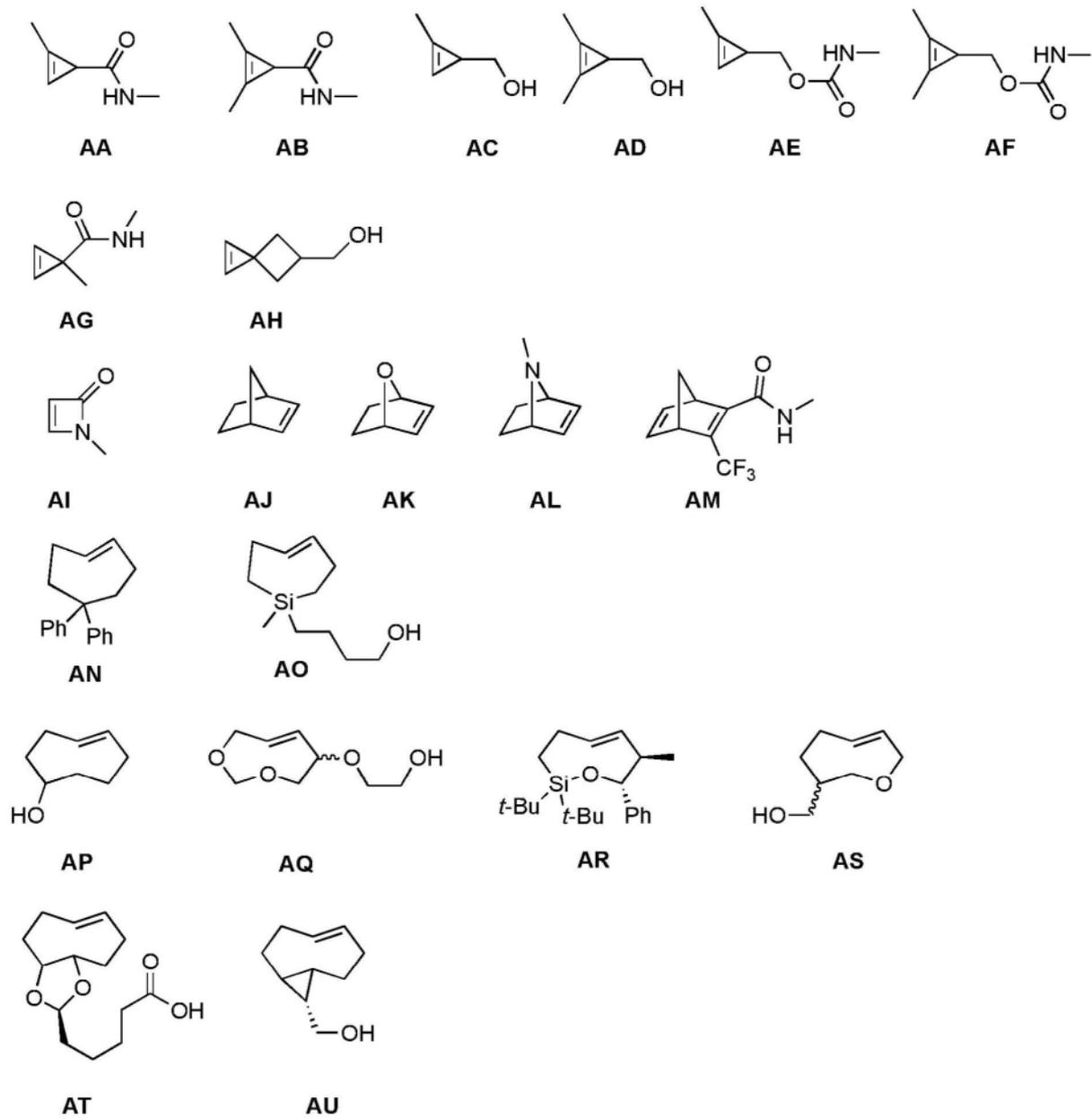
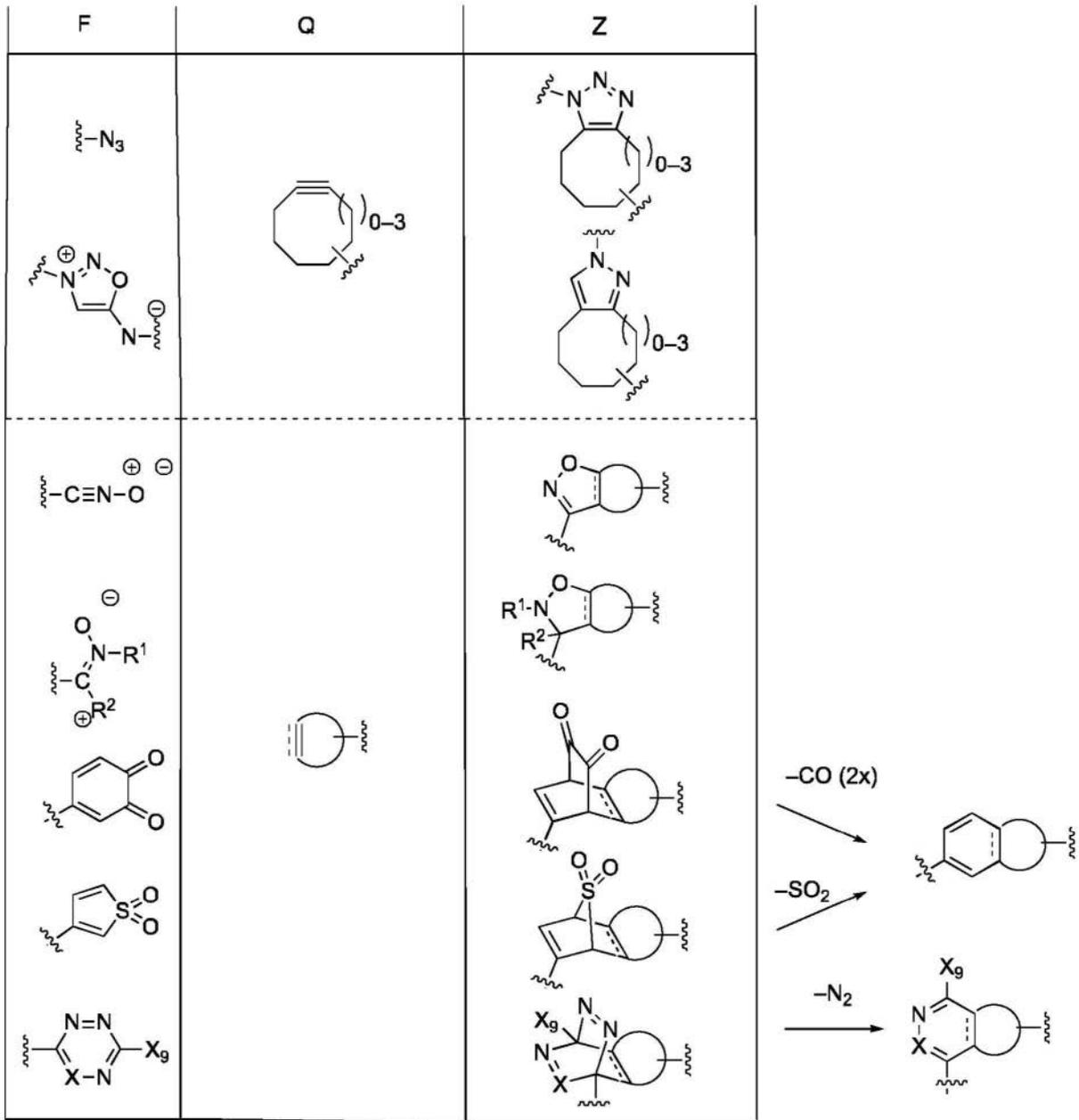


图2



Z = H, Me, Ph, 吡啶基  
 X = N, CH

图3

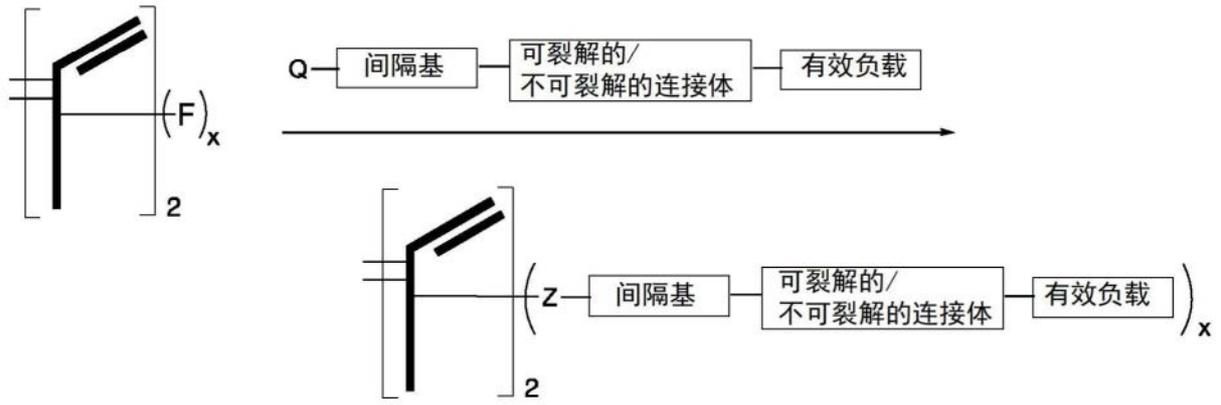


图4

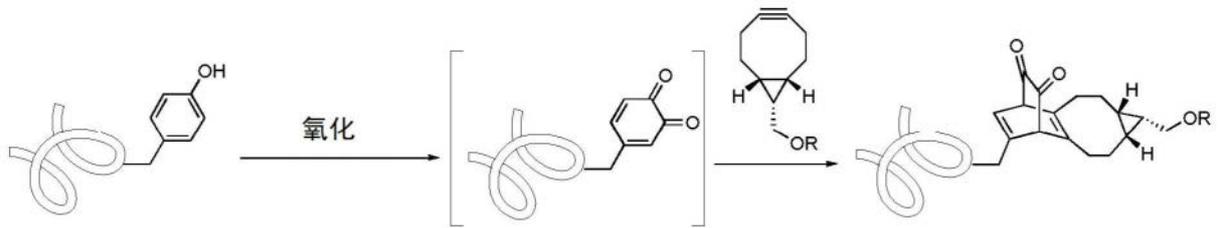


图5

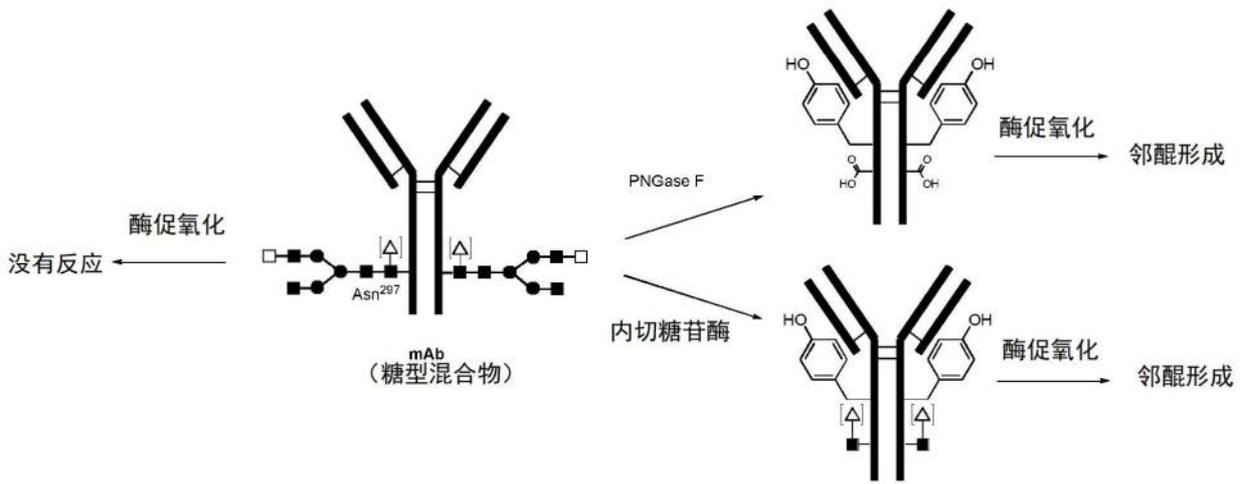


图6



人

IgG1  
 231            241            251            261            271            281  
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK  
 291            301            311            321            331  
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK

IgG2  
 APP\_VAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK  
 PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK

IgG3  
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKTK

IgG4  
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK  
 PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK

小鼠

IgG1  
 VPEV\_\_SSV FIFPPKPKDV LTITLTPKVT CVVVDISKDD PEVQFSWFVD DVEVHTAQTQ  
 PREEQFNSTF RSVSELPIMH QDWLNGKEFK CRVNSAAFP A PIEKTISKTK

IgG2ab  
 APDLLGGPSV FIFPPKIKDV LMISLSPMVT CVVVDVSEDD PDVQISW FVN NVEVHTAQTQ  
 THREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMSGKEFK CKVNNRALPS PIEKTISKPR

IgG2aa  
 APNLLGGPSV FIFPPKIKDV LMISLSPIVT CVVVDVSEDD PDVQISW FVN NVEVHTAQTQ  
 THREDYNSTL RVVSALPIQH QDWMSGKEFK CKVNNKDLPA PIERTISKPK

IgG2b  
 APNLEGGPSV FIFPPNIKDV LMISLTPKVT CVVVDVSEDD PDVQISW FVN NVEVHTAQTQ  
 THREDYNSTI RVVSTLPIQH QDWMSGKEFK CKVNNKDLPS PIERTISKIK

IgG3  
 AGNILGGPSV FIFPPKPKDA LMISLTPKVT CVVVDVSEDD PDVHVSWFVD NKEVHTAWTQ  
 PREAQYNSTF RVVSALPIQH QDWMRGKEFK CKVNNKALPA PIERTISKPK

图8

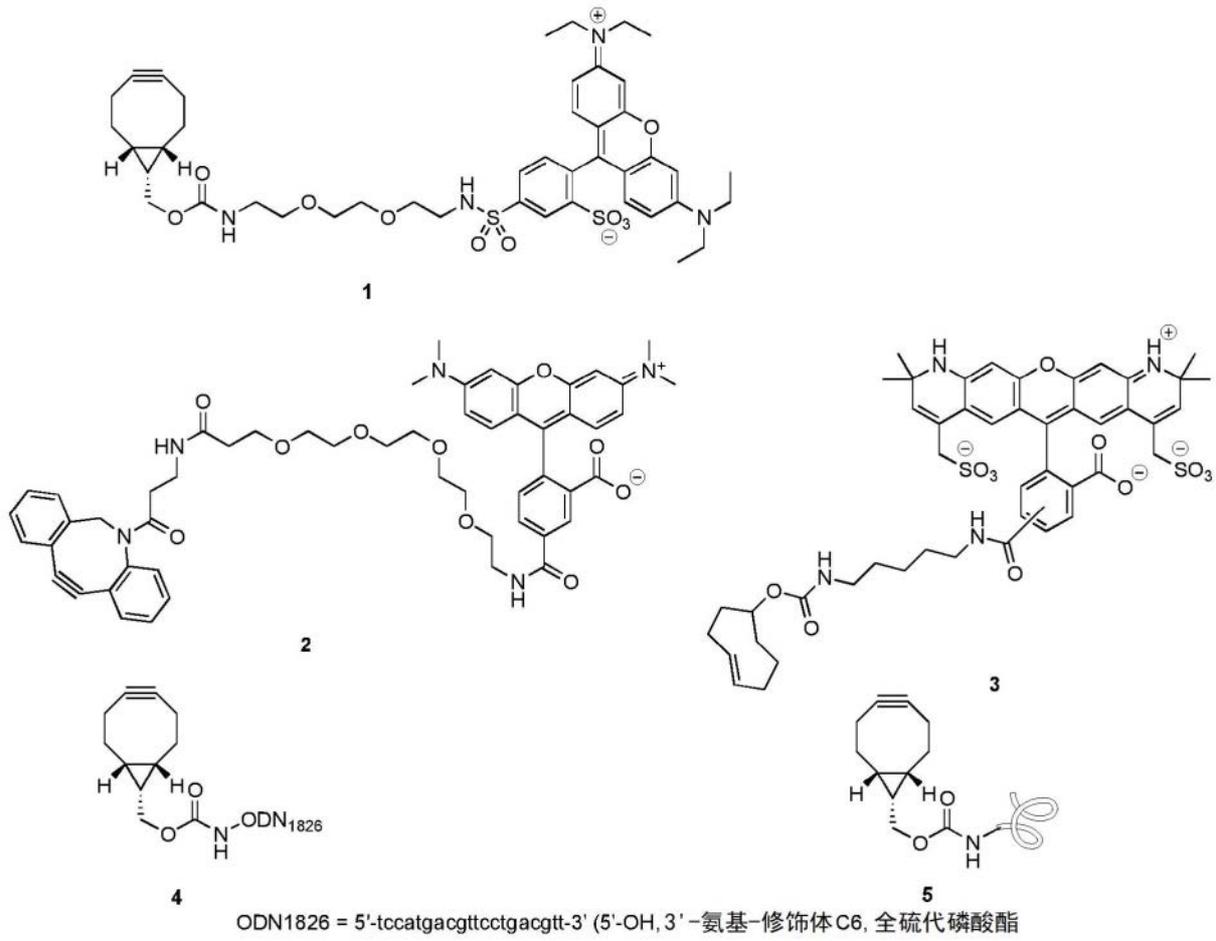


图9

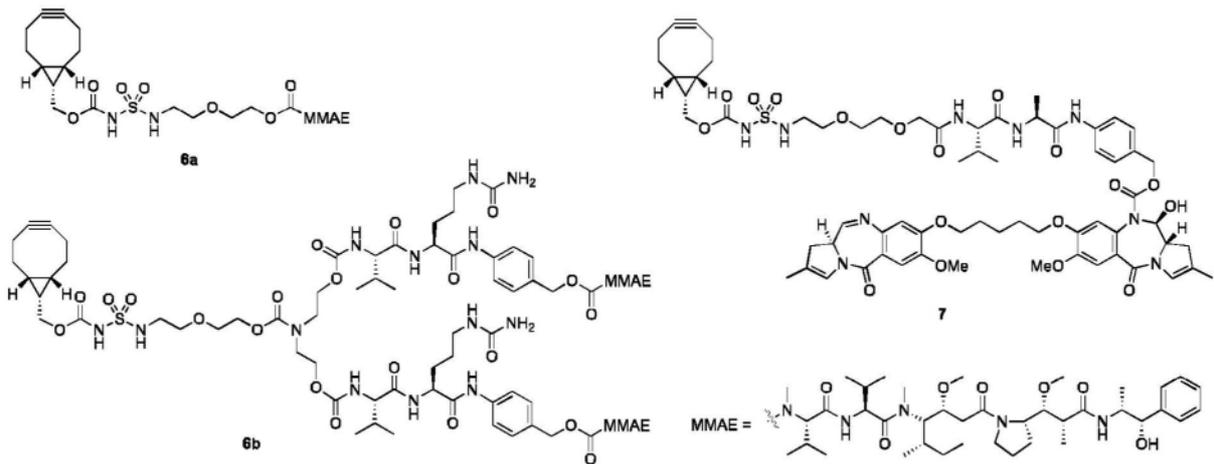


图10

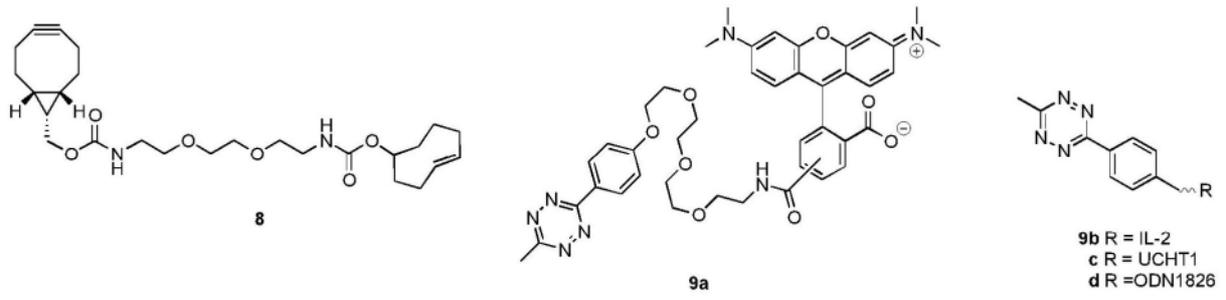


图11

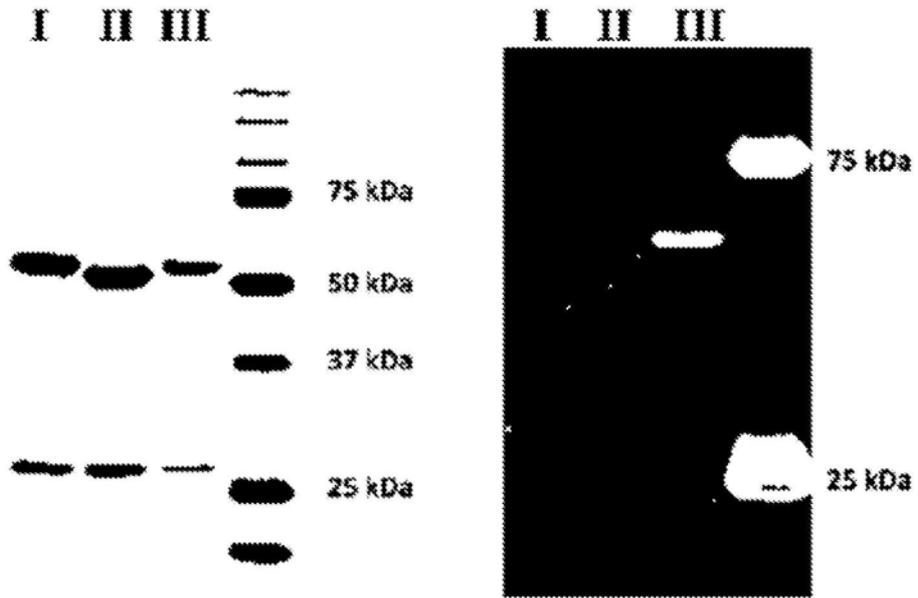


图12

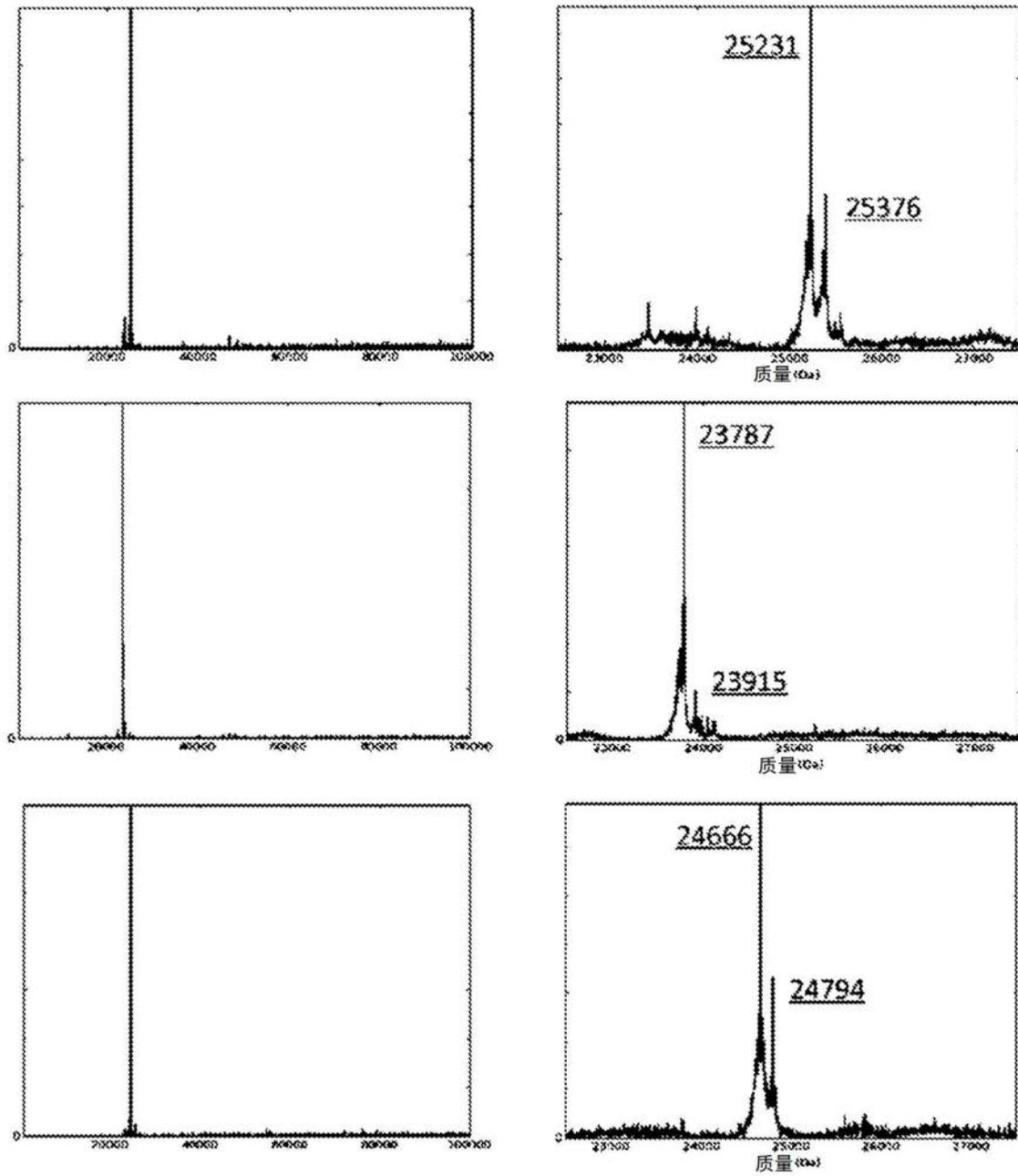


图13

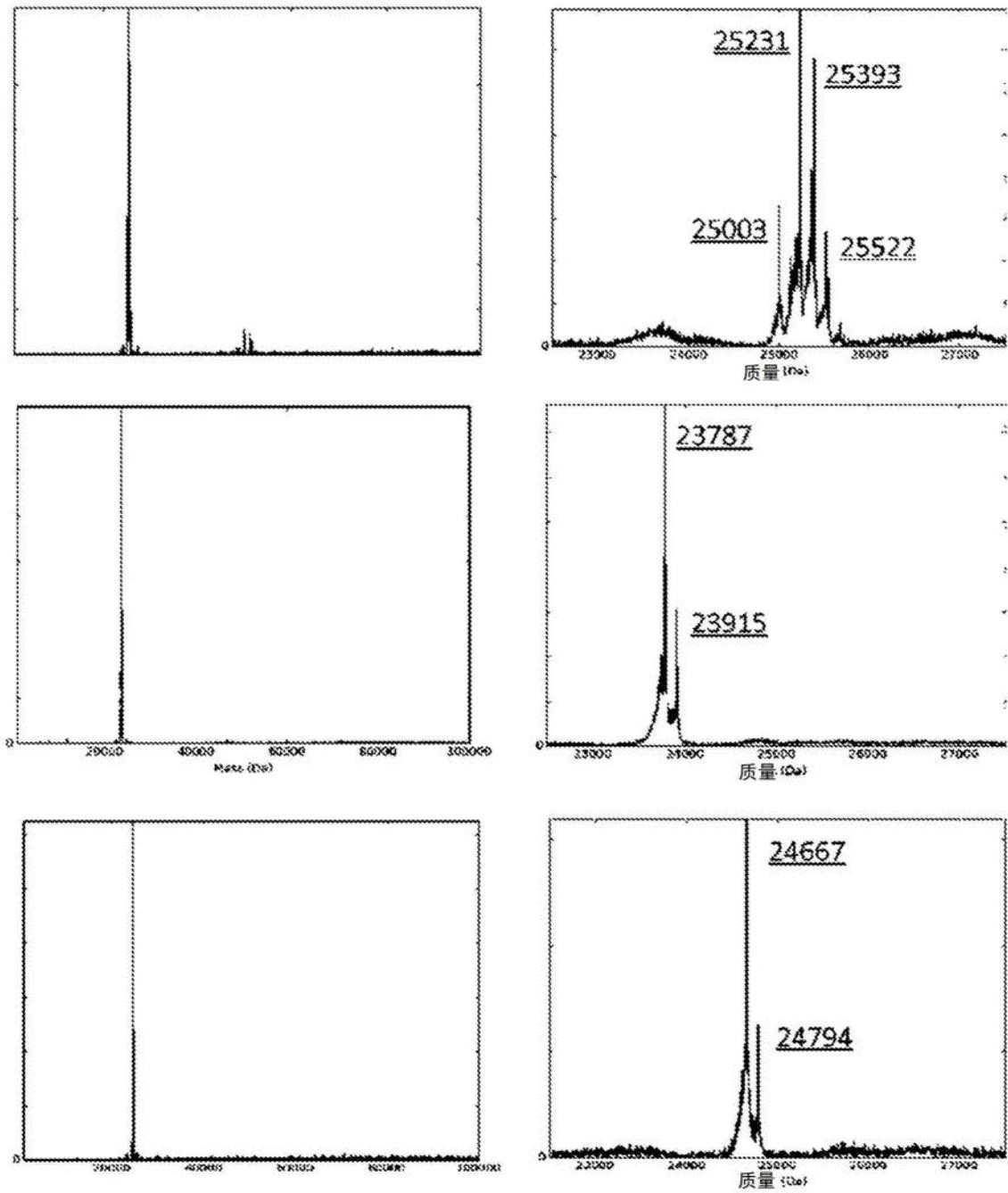


图14

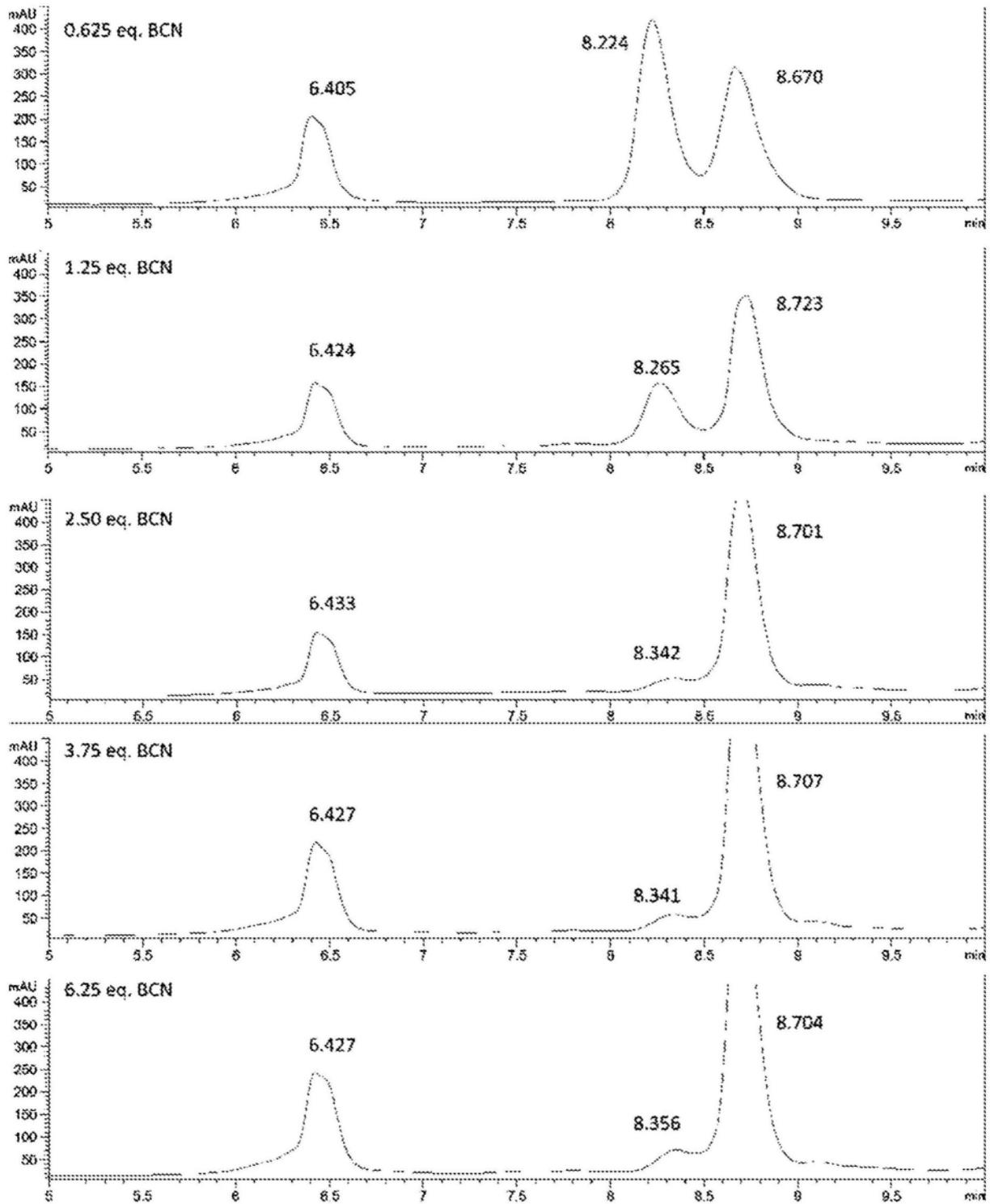


图15

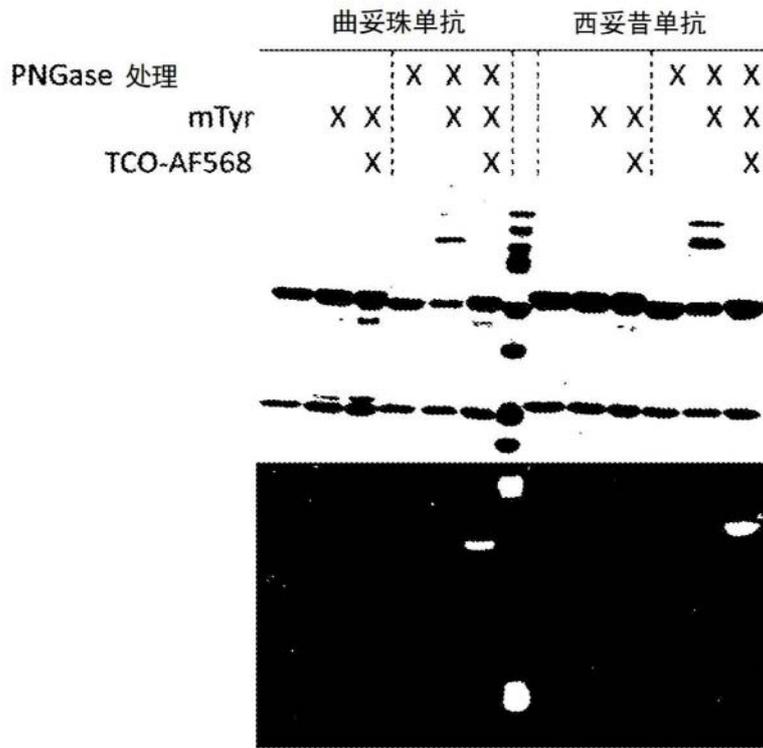


图16

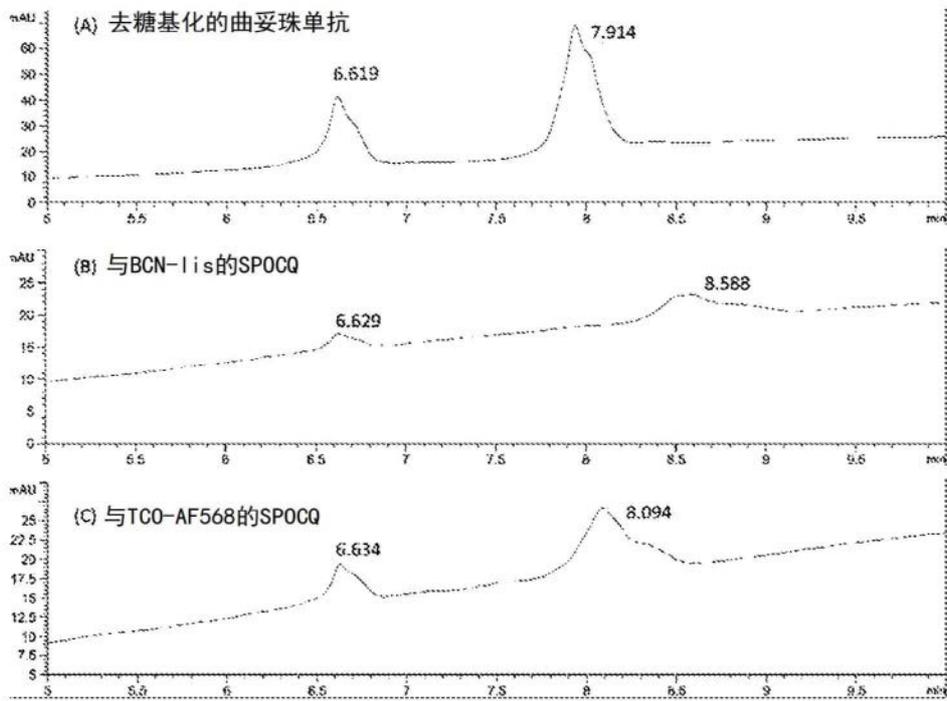


图17

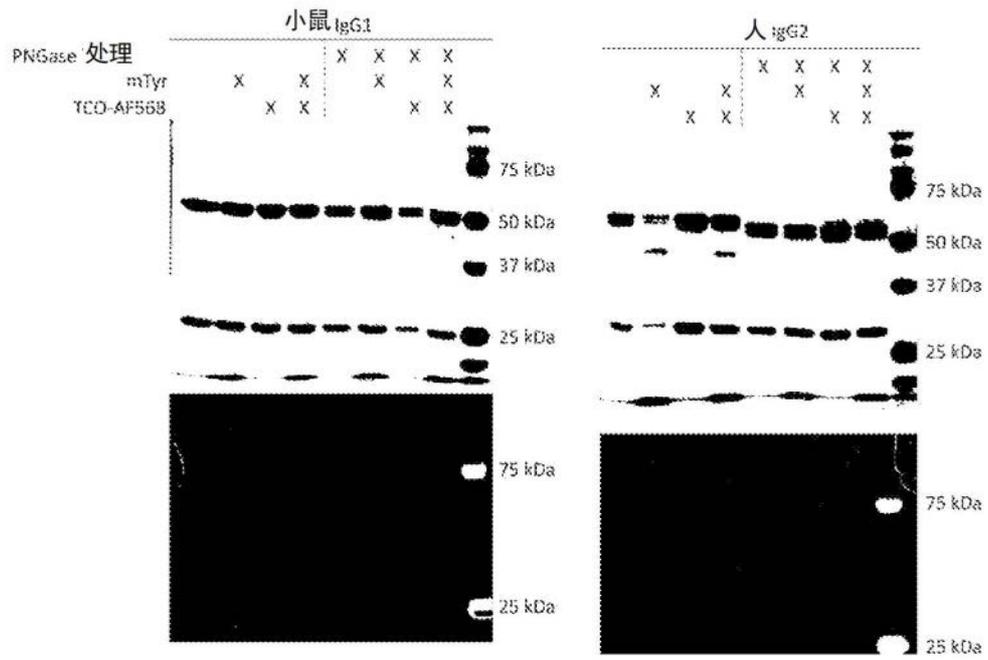


图18

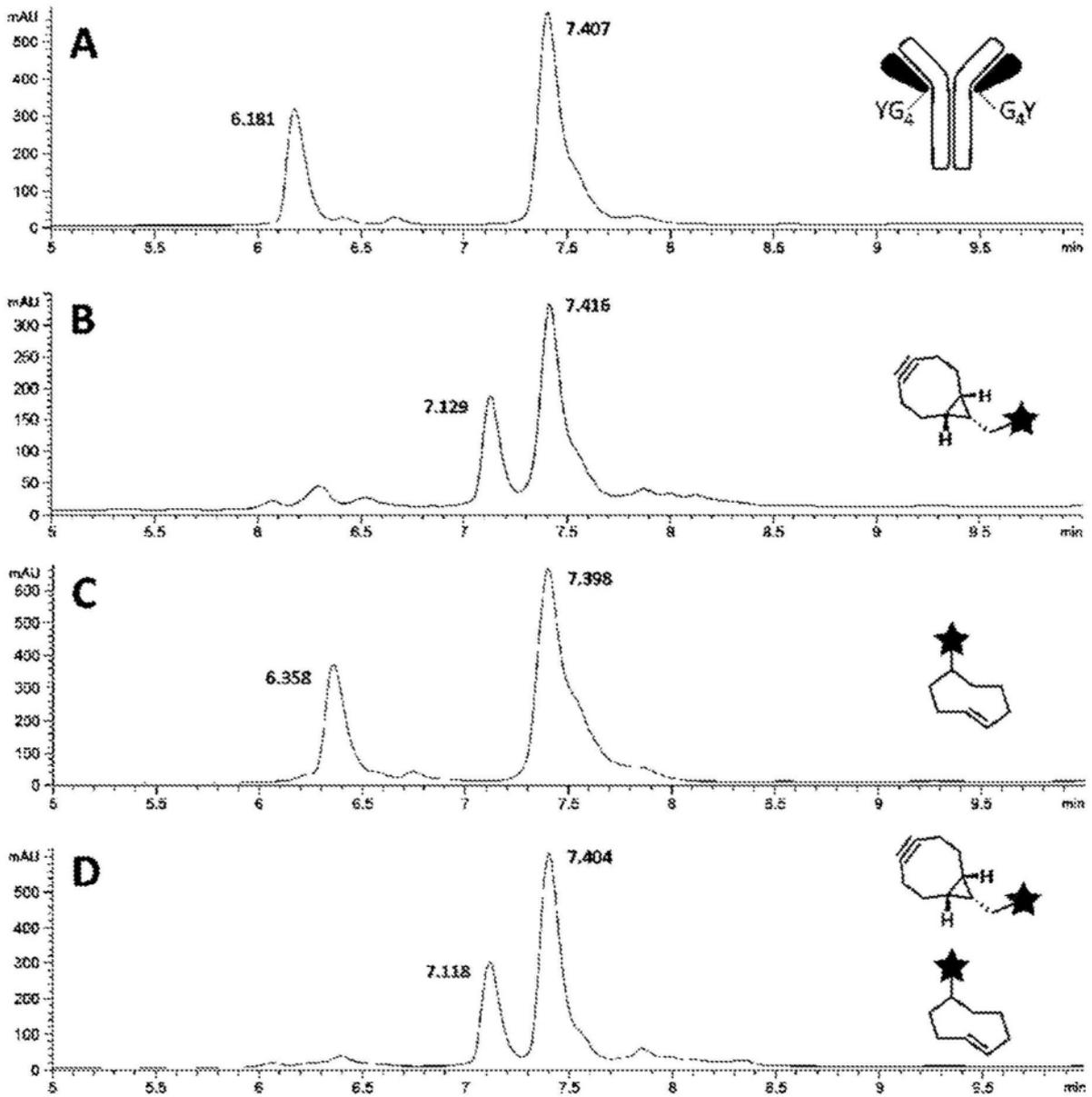


图19

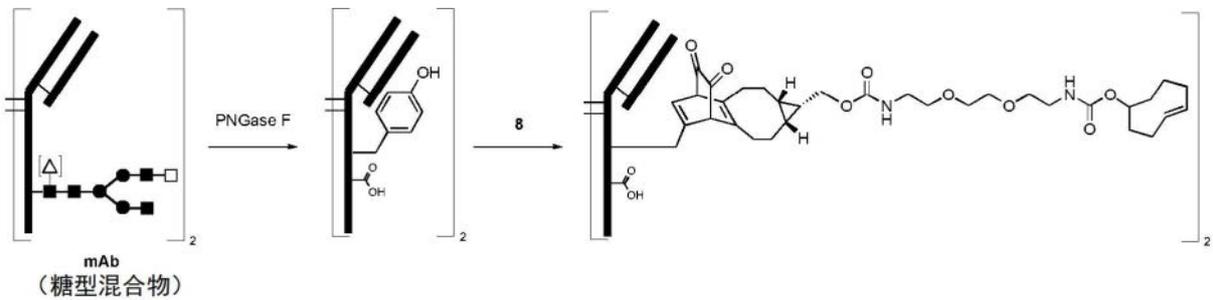


图20

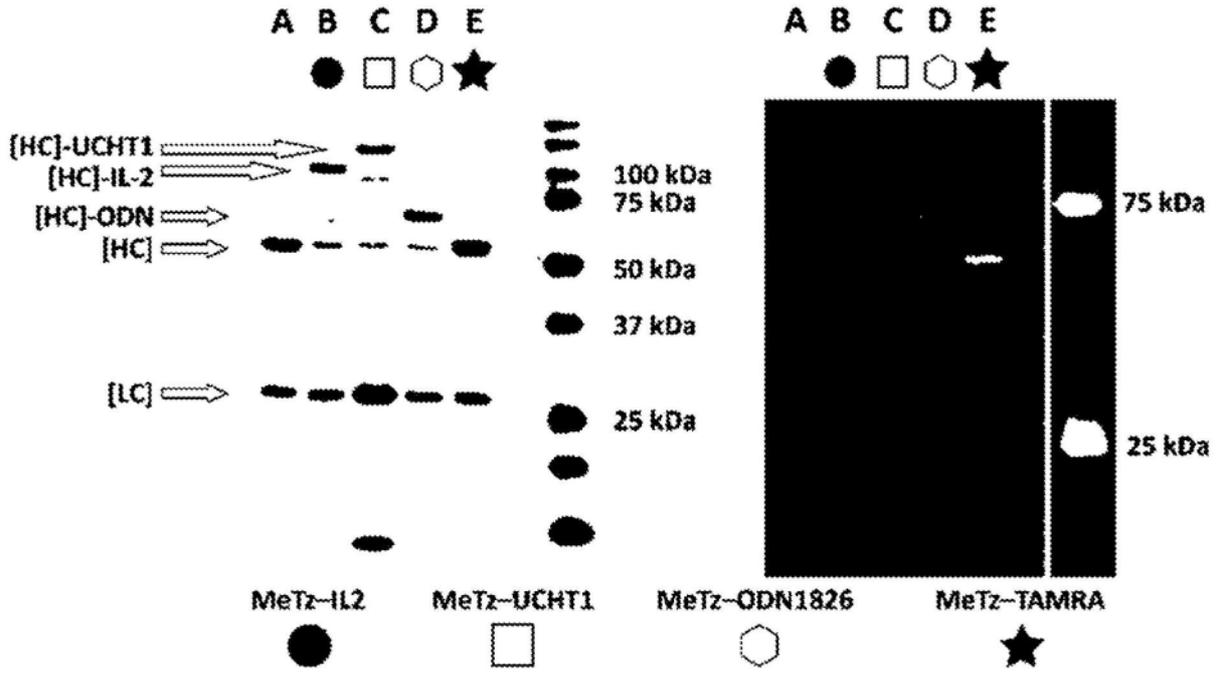


图21

去糖基化的曲妥珠单抗

MS



RP-HPLC

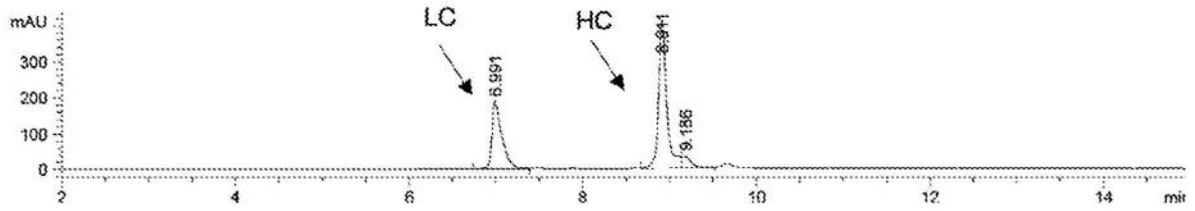


图22

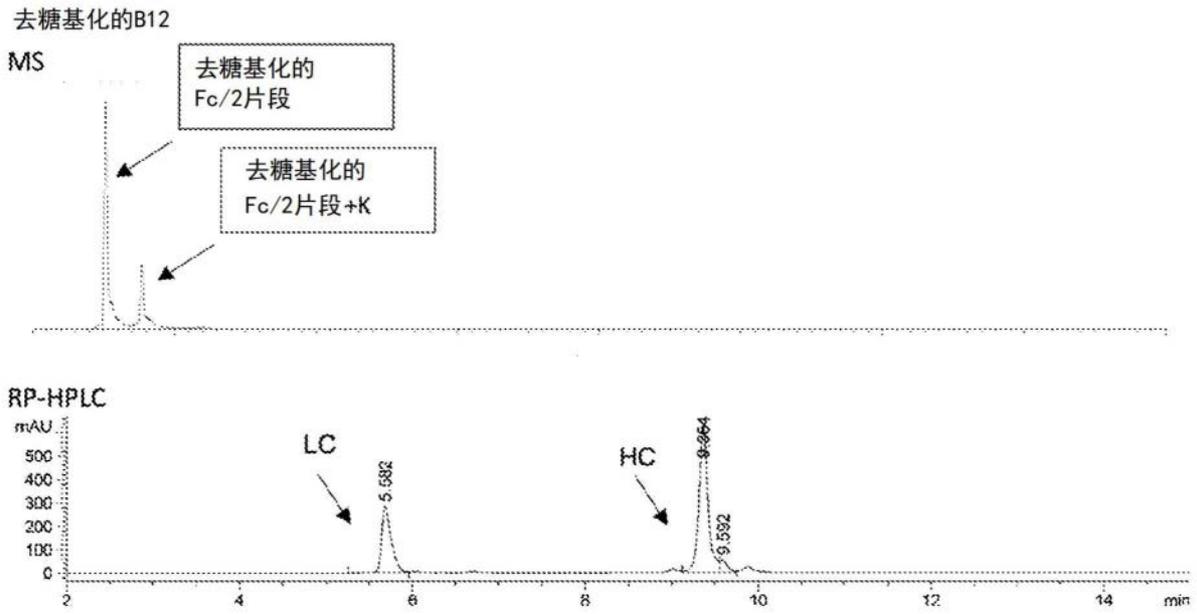


图23

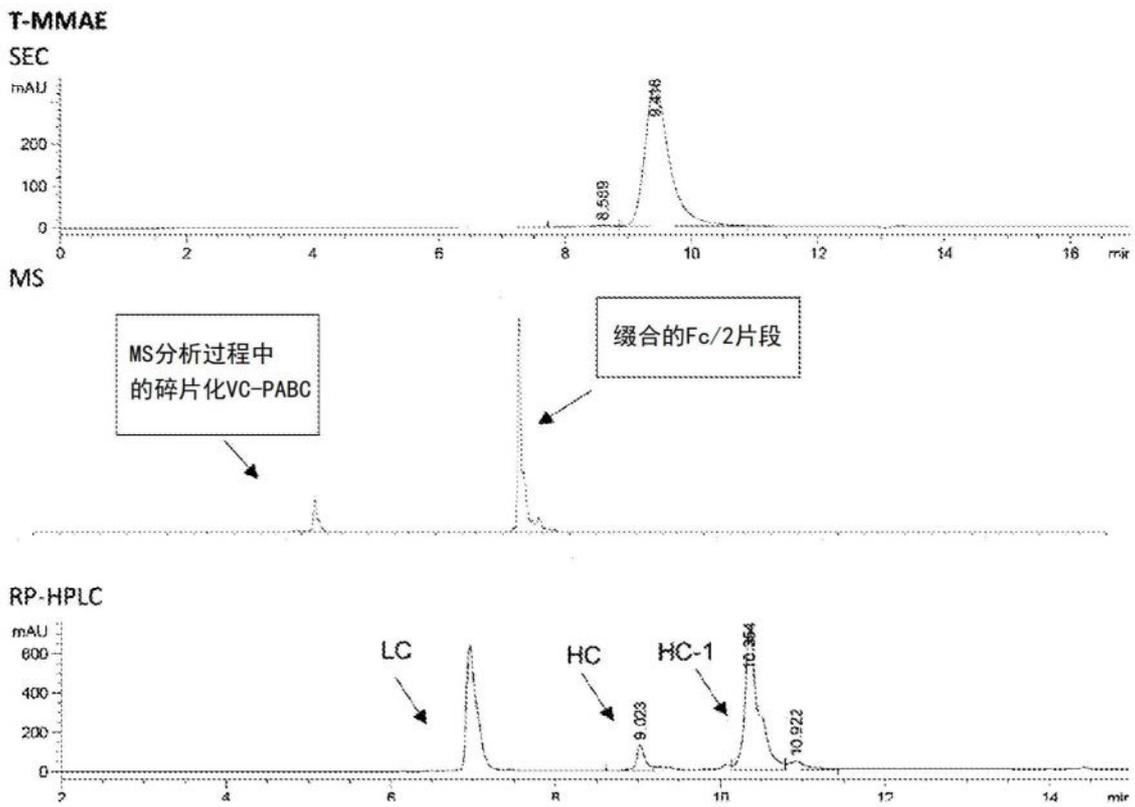


图24

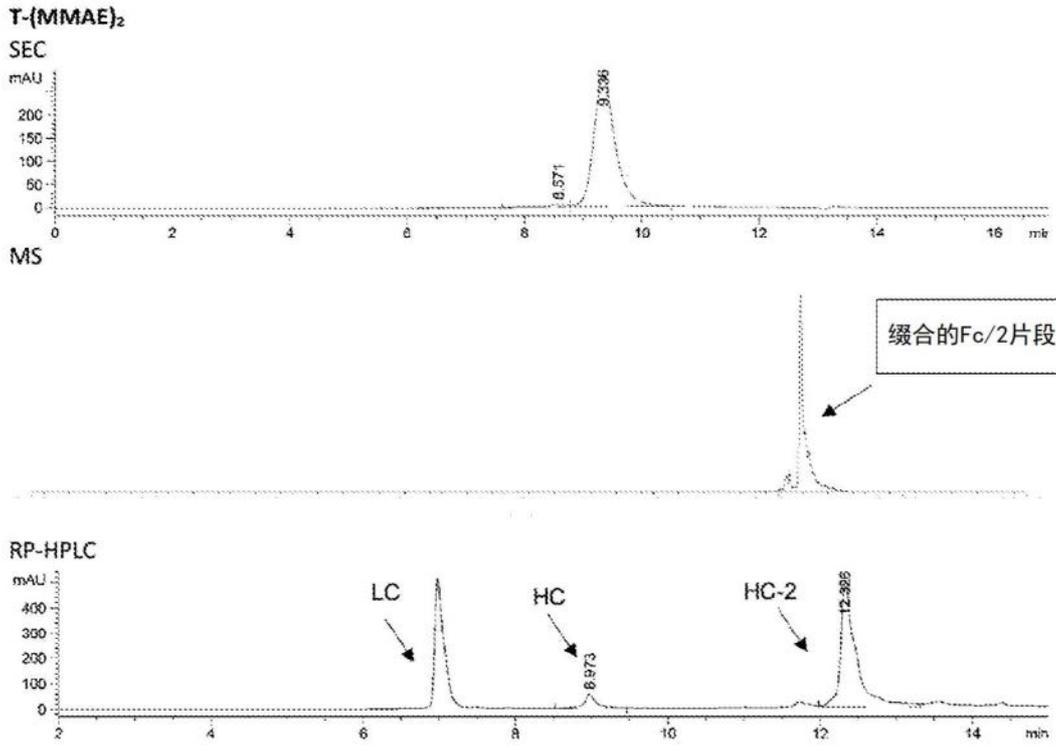


图25

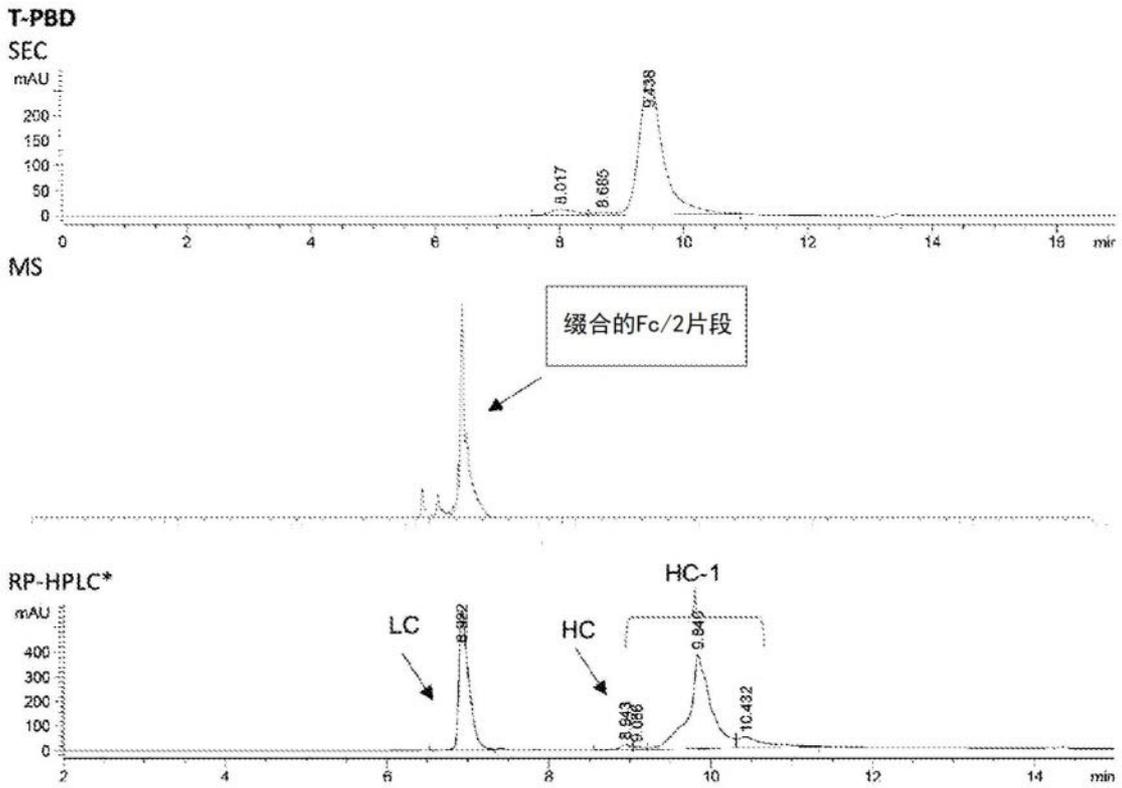


图26

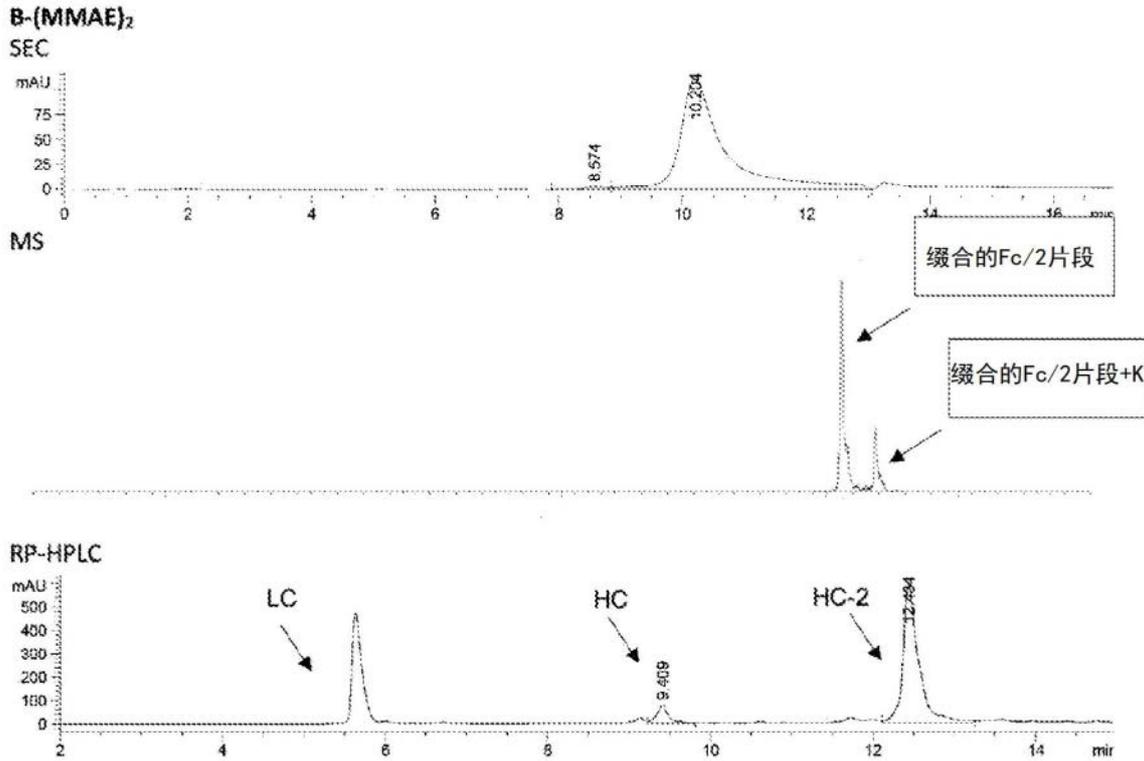


图27

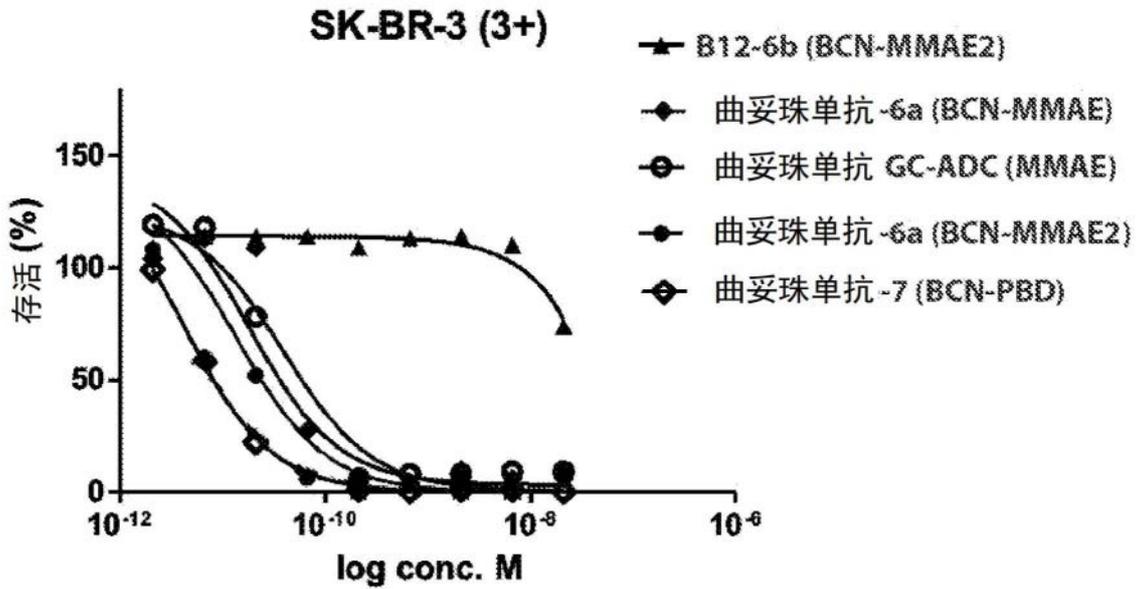


图28

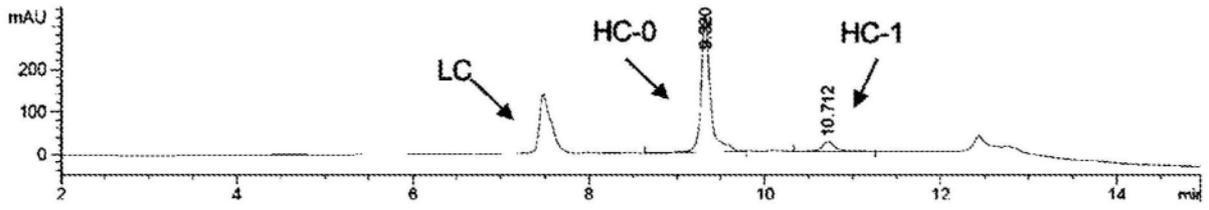


图29

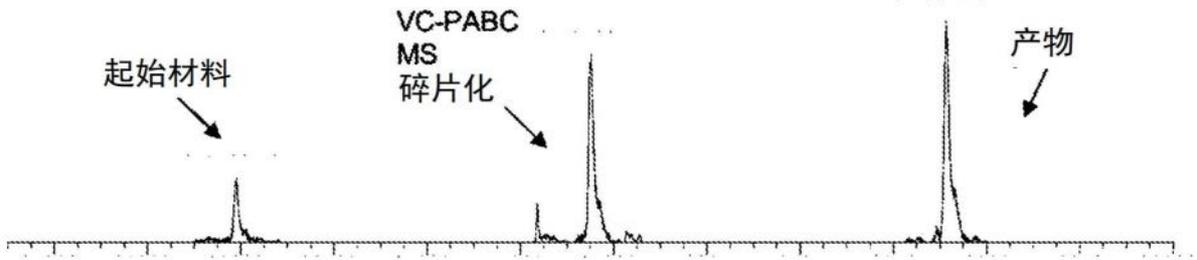


图30

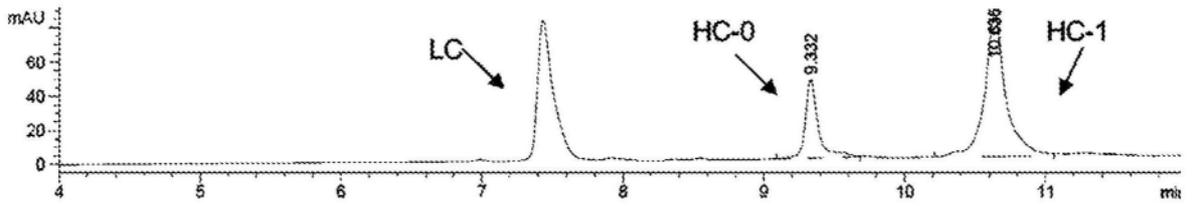


图31