



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201400131 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：102117162

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 14 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)*

C07D207/452(2006.01)

(30)優先權：2012/05/15 美國

61/647,373

2013/03/05 美國

61/773,067

2013/03/13 美國

13/799,244

(71)申請人：西雅圖遺傳學公司(美國) SEATTLE GENETICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：萊恩 羅伯特 LYON, ROBERT (US)；多羅尼那 斯斐拉那 O DORONINA,

SVETLANA O. (RU)；波威 提姆帝 BOVEE, TIMOTHY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：62 項 圖式數：11 共 166 頁

(54)名稱

自行穩定之接合劑共軛物

SELF-STABILIZING LINKER CONJUGATES

(57)摘要

本發明提供配位體-藥物共軛物、藥物-接合劑、接合劑及配位體-接合劑共軛物，其包含自行穩定之接合劑總成組成部分。

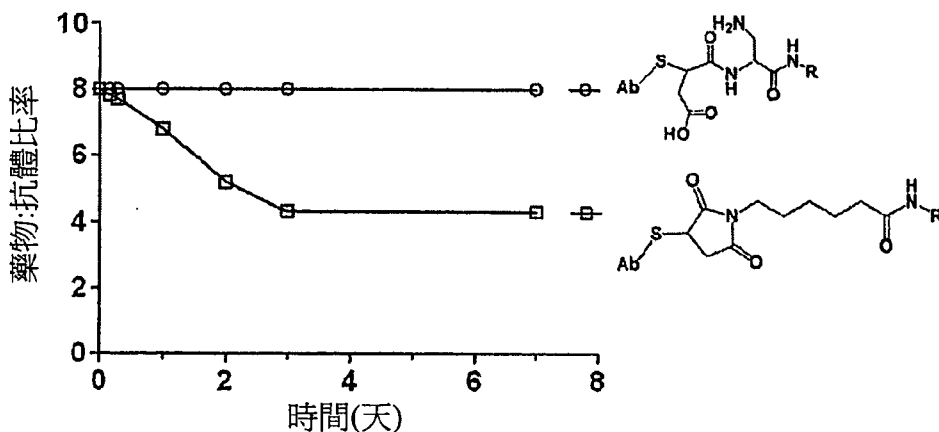


圖8



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201400131 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：102117162

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 14 日

(51)Int. Cl. : *A61K47/48 (2006.01)*

C07D207/452(2006.01)

(30)優先權：2012/05/15 美國

61/647,373

2013/03/05 美國

61/773,067

2013/03/13 美國

13/799,244

(71)申請人：西雅圖遺傳學公司(美國) SEATTLE GENETICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：萊恩 羅伯特 LYON, ROBERT (US)；多羅尼那 斯斐拉那 O DORONINA,

SVETLANA O. (RU)；波威 提姆帝 BOVEE, TIMOTHY (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：62 項 圖式數：11 共 166 頁

(54)名稱

自行穩定之接合劑共軛物

SELF-STABILIZING LINKER CONJUGATES

(57)摘要

本發明提供配位體-藥物共軛物、藥物-接合劑、接合劑及配位體-接合劑共軛物，其包含自行穩定之接合劑總成組成部分。

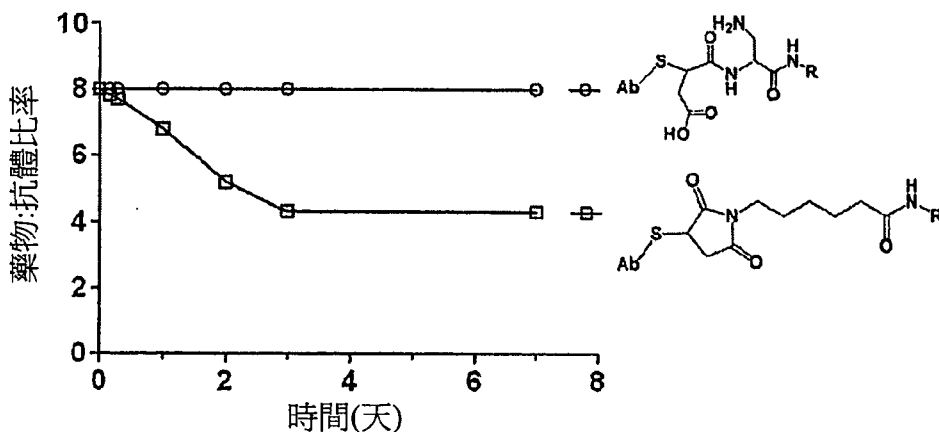


圖8

發明摘要

A67K⁴⁷/₁₈ (2005.01)
C07D²⁰⁷/₄₅₂ (2005.01)

※ 申請案號：102117162

※ 申請日：102.5.14

※IPC 分類：C07K; A61K; A61P

【發明名稱】

自行穩定之接合劑共軛物

SELF-STABILIZING LINKER CONJUGATES

【中文】

本發明提供配位體-藥物共軛物、藥物-接合劑、接合劑及配位體-接合劑共軛物，其包含自行穩定之接合劑總成組成部分。

【英文】

The present invention provides Ligand-Drug Conjugates, Drug-Linkers, Linkers, and Ligand-Linker Conjugates comprising a self-stabilizing linker assembly component.

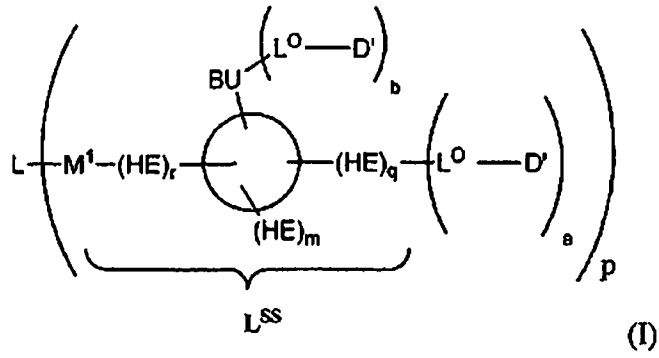
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（8）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

自行穩定之接合劑共軛物

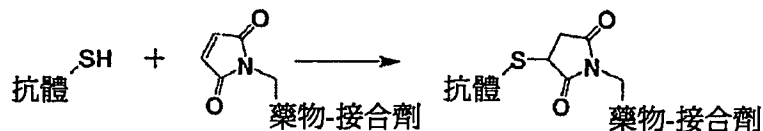
SELF-STABILIZING LINKER CONJUGATES

連續性

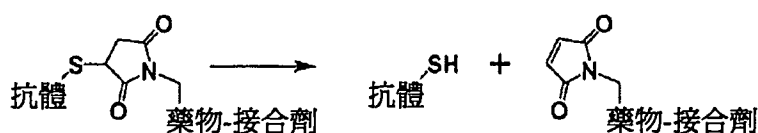
本申請案主張2012年5月15日申請之美國臨時專利申請案第61/647,373號及2013年3月5日申請之美國臨時專利申請案第61/773,067號之權益，且亦主張2013年3月13日申請之美國申請案第13/799,244號之優先權，其各自全部且出於所有目的併入本文中。

【先前技術】

隨著FDA批准貝倫妥單抗維多汀(Brentuximab Vedotin)用於治療所選患者群且隨著許多其他抗體-藥物共軛物(ADC)在臨床中之進展，ADC領域已取得重大進展。在研發在良好耐受劑量下具高度活性之最佳化治療劑時，ADC之接合劑組分為一個重要特徵。已證實親電子順丁烯二醯亞胺官能基極適用於製備ADC，因為其與硫醇基反應之特異性程度較高且在溫和條件下具有極快硫醇加成動力學。



如在生物共軛物領域中多個研究者已提到，親電子順丁烯二醯亞胺官能基與抗體之自由硫醇之間反應的硫取代產物經歷緩慢消除，因此使以上反應逆向進行：



當在ADC之純化製備中發生此可逆反應時，反應基本上不可偵

測，因為經由消除製程再生之順丁烯二醯亞胺及硫醇簡單地再次反應，因此再形成完整共軛物。然而，當其他硫醇存在時，淨效應可使順丁烯二醯亞胺由ADC之抗體轉移至任何其他可用硫醇上。已記載此製程發生於在血漿中，其中ADC之順丁烯二醯亞胺轉移至血清白蛋白之半胱胺酸34 (Alley等人, *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 759-765)。當在過量半胱胺酸或麩胱甘肽存在下培育ADC時亦已報導此製程 (Shen等人, *Nature Biotech*, 30(2):184-9, 2012)。本發明尤其提供不進行此轉移反應之生物共軛物。

【發明內容】

本發明尤其提供接合劑、藥物-接合劑、配位體-藥物共軛物、配位體-接合劑共軛物、配位體-功能劑共軛物及功能劑-接合劑以及製備及使用其之方法。配位體-藥物共軛物在循環中穩定，又能夠一旦在腫瘤細胞附近或在腫瘤細胞內釋放即造成細胞死亡。

【圖式簡單說明】

圖1提供說明人類IgG1之鏈間二硫化物之還原、隨後所得硫醇與自行穩定之接合劑的共軛及丁二醯亞胺環之後續水解的反應流程(上部)；及使用質譜分析來監測由於水解造成之抗體共軛物之分子量變化(下部)。

圖2說明藉由電噴霧質譜分析量測之自行穩定之抗體共軛物之丁二醯亞胺環水解的時程。在pH 7.2及22°C下執行完全還原之cAC10與順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE之共軛，接著藉由LC-MS在指定時間對樣品進行分析(上部)。繪製所得水解百分比數據相較於時間之曲線且用指數方程擬合以確定動力學參數(底部)。

圖3提供用IgG1抗體及在順丁烯二醯亞胺與鹼性基團(一級胺)之間具有不同間距的自行穩定之接合劑製備之生物共軛物之水解動力學曲線。在pH 8及37°C下執行共軛，接著即刻藉由質譜分析監測IgG1輕

鏈共軛物之水解，以時間函數形式繪製曲線，且用指數方程擬合。

圖4提供用IgG1抗體及在順丁烯二醯亞胺與鹼性基團(一級胺)之間具有不同間距的自行穩定之順丁烯二醯亞胺接合劑製備之生物共軛物之水解動力學曲線。在pH 8及37°C下執行共軛，接著即刻藉由質譜分析監測IgG1輕鏈共軛物之水解，以時間函數形式繪製曲線，且用指數方程擬合。

圖5提供用IgG1抗體及各種N取代之順丁烯二醯亞胺製備之生物共軛物之水解動力學曲線。在pH 7.4及22°C下執行共軛，接著即刻藉由質譜分析監測IgG1輕鏈共軛物之水解，以時間函數形式繪製曲線，且用指數方程擬合。順丁烯二醯亞胺基-己醯基共軛物之水解(底部結構)過慢而不能在此等條件下在24小時內產生任何可偵測水解。甲醯胺拉電子基團(EWG)或一級胺(鹼)之存在使水解加速，且兩者之組合(上部結構)產生在此等溫和條件下以小於20分鐘之半衰期水解的共軛物。

圖6提供用 α -二胺基丙酸(α -DPR，開放圓圈)及用 β -二胺基丙酸(β -DPR，填充圓圈)製備之自行穩定之順丁烯二醯亞胺基藥物-接合劑的水解動力學曲線。雖然彼此為異構體，但鹼性胺基之定位及相對於丁二醯亞胺之拉電子甲醯胺使得在丁二醯亞胺水解速率方面產生17倍差異。

圖7說明用自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-DPR藥物-接合劑製備之ADC相較於用順丁烯二醯亞胺基-己醯基藥物接合劑製備之ADC當在含有過量硫醇之緩衝液中培育時隨時間推移藥物負載量之變化。兩種ADC在時間為零及時間為培育後14天時之逆相層析圖展示於上部圖中。層析峰賦值L0、L1、H0、H1、H2及H3分別對應於未共軛輕鏈、具有一份藥物之輕鏈、未共軛重鏈及具有1、2或3份藥物之重鏈。相較於用順丁烯二醯亞胺基-己醯基藥物接合劑製備之ADC(開放方

形)，自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-DPR藥物-接合劑以開放圓圈表示。對於自行穩定之藥物-接合劑(開放圓圈)而言，藥物負載量保持恆定於每份抗體8份，但對於順丁烯二醯亞胺基-己醯基藥物接合劑(開放方形)而言，歷時14天下降至每份抗體4份藥物，反映因順丁烯二醯亞胺消除造成藥物損失。

圖8說明用自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-DPR藥物-接合劑及順丁烯二醯亞胺基-己醯基藥物接合劑製備之ADC當在大鼠血漿中於37°C下培育時隨時間推移藥物負載量之變化(R=val-cit-PAB-MMAE)。在各時間點藉由Ig選擇親和力樹脂純化ADC樣品且藉由對ADC進行逆相HPLC分析來評估其藥物負載量。

圖9提供經由順丁烯二醯亞胺基-己醯基藥物-接合劑(方形)或自行穩定之順丁烯二醯亞胺接合劑(圓圈)與抗體共軛之藥物在大鼠(開放圖例)或人類(填充圖例)血漿中培育期間的穩定性曲線(R=val-cit-PAB-MMAE)。在各時間點ADC捕獲於蛋白A親和力樹脂上且藥物經由其蛋白酶可裂解接合劑以酶促方式釋放。接著藉由LC-MS/MS定量所釋放之藥物且經校正為初始值。各時間點反映在t0時所觀測之共軛藥物百分比。

圖10說明對於用自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-DPR藥物-接合劑及順丁烯二醯亞胺基-己醯基藥物接合劑製備之ADC而言活體內(大鼠)藥物負載量降低(R=val-cit-PAB-MMAE)。靜脈內給予ADC且藉由Ig選擇親和力樹脂純化各時間點之血漿樣品且藉由對ADC進行逆相HPLC分析來評估其藥物負載量。

圖11說明ADC在ALCL (Karpas-299細胞株)之鼠類異種移植模型中之抗腫瘤活性。用抗-CD30抗體cAC10及含有經由順丁烯二醯亞胺基-己醯基(封閉圓圈)或自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-DPR基團(開放圓圈)與該抗體鍵聯之val-cit-PAB-MMAE細胞毒性有效負載之藥物接

合劑製備ADC。使腫瘤達至約250 mm³之體積，然後以每週1 mg/kg給藥，進行三種給藥(每個給藥組六隻小鼠)。自行穩定之ADC給藥組在所有六隻動物中經歷完全反應(無可偵測腫瘤)，其中五隻動物經歷耐久消退，而順丁烯二醯亞胺基-己醯基ADC不經歷完全反應。

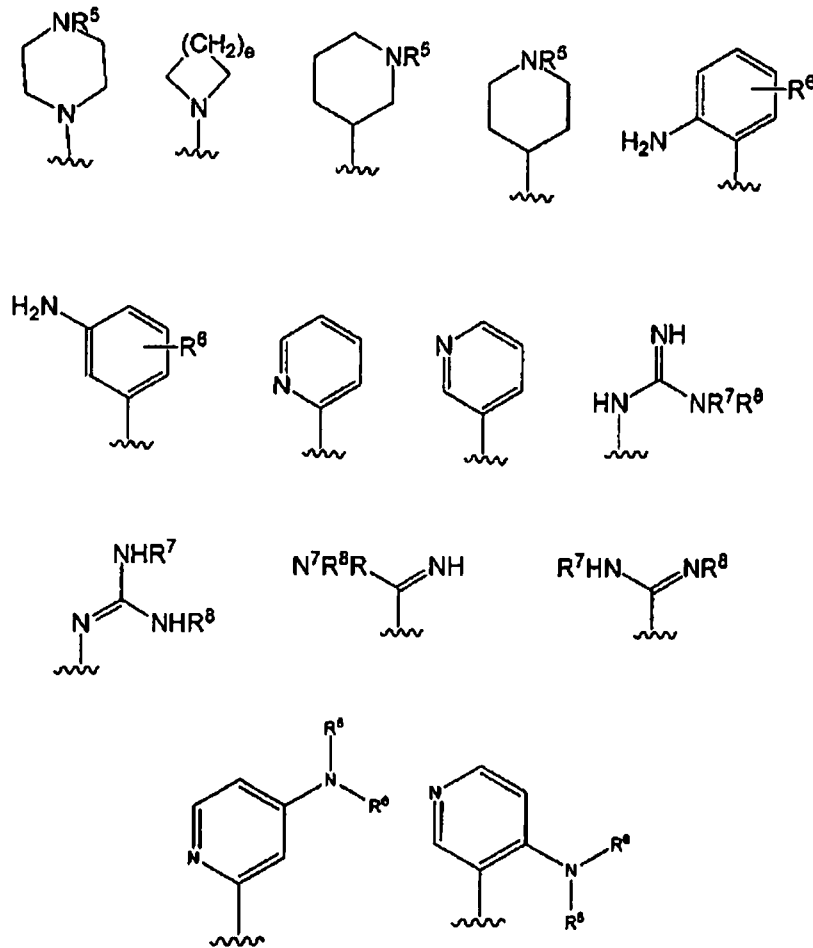
【實施方式】

縮寫及定義

除非另有說明，否則如本文所用之以下術語及片語意欲具有以下含義。當本文中使用的商標名時，除非上下文中另外指明，否則商標名包括商標名產品之產品調配物、通用藥物及活性醫藥成分。

術語「拉電子基團」係指將電子由反應中心拉開之官能基。例示性拉電子基團包括(但不限於)-C(=O)、-CN、-NO₂、-CX₃、-X、-COOR、-CONR₂、-COR、-COX、-SO₂R、-SO₂OR、-SO₂NHR、-SO₂NR₂、-PO₃R₂、-P(O)(CH₃)NHR、NO、-NR₃⁺、-CR=CR₂及-C≡CR，其中X為F、Br、Cl或I，且R在每次出現時係獨立地選自由氫及C₁₋₆烷基組成之群。例示性拉電子基團亦可包括芳基(例如苯基)及某些雜芳基(例如吡啶)。術語「拉電子基團」包括進一步經拉電子基團取代之芳基或雜芳基。較佳拉電子基團為-C(=O)、-CN、-NO₂、-CX₃及-X。

術語「鹼」係指使水去質子化以產生氫氧根離子之官能基。例示性鹼為胺及含氮雜環。代表性鹼包括-N(R³)(R⁴)，其中R³及R⁴係獨立地選自H或C₁₋₆烷基，較佳H或甲基；



其中 R^5 、 R^6 、 R^7 及 R^8 在每次出現時係獨立地選自氫或 C_{1-6} 烷基，較佳H或甲基，且 e 為0-4。在一些態樣中，該鹼為含氮鹼。

術語「抗體」在本文中係以最廣泛意義使用且特定言之涵蓋完整單株抗體、多株抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及展現所需生物活性之抗體片段。完整抗體主要具有兩個區：可變區及恆定區。可變區與標靶抗原結合且與其相互作用。可變區包括識別特定抗原上之特定結合位點且與其結合之互補決定區(CDR)。恆定區可由免疫系統識別且與其相互作用(參見例如Janeway等人, 2001, *Immuno. Biology*, 第5版, Garland Publishing, New York)。抗體可具有任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類。抗體可衍生自任何適合物種。在一些實施例中，抗體具有人類或鼠類起源。舉例而言，抗體可為人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

如本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上均質之抗體群體獲得之抗體，亦即構成此群體之個別抗體除可少量存在之可能天然存在之突變外為相同的。單株抗體針對單一抗原位點具高度特異性。修飾語「單株」指示抗體之特徵為自實質上均質之抗體群體獲得，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生該抗體。

「完整抗體」為按抗體類別之需要包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定域(C_L)及重鏈恆定域(C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 及 C_{H4})之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，包含其抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 及Fv片段、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、線性抗體、單鏈抗體分子、scFv、scFv-Fc、由抗體片段(由Fab表現文庫產生之片段)形成之多特異性抗體片段或以上任一者的抗原決定基-結合片段，其與標靶抗原(例如癌細胞抗原、病毒抗原或微生物抗原)免疫特異性結合。

「抗原」為與抗體特異性結合之實體。

術語「特異性結合 (specific binding)」及「特異性結合 (specifically binds)」意謂抗體或抗體衍生物將以高度選擇性方式與其相應標靶抗原結合，而不與許多其他抗原結合。通常，抗體或抗體衍生物以至少約 1×10^{-7} M且較佳 10^{-8} M至 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M之親和力結合且以其與不同於預定抗原或密切相關抗原之非特異性抗原(例如BSA、酪蛋白)結合之親和力至少兩倍的親和力與預定抗原結合。

術語「抑制(inhibit)」或「抑制(inhibition of)」意謂降低可量測量或完全阻止。

術語「治療有效量」係指有效治療哺乳動物之疾病或病症的藥

物量。在癌症之狀況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞數目；減小腫瘤大小；抑制(亦即在一定程度上延緩，且較佳終止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在一定程度上延緩，且較佳終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上緩解與癌症相關之一或多種症狀。達至藥物可抑制所存在之癌細胞生長及/或將其殺死的程度，其可具細胞生長抑制性及/或細胞毒性。關於癌症療法，可例如藉由評定疾病進展時間(TTP)及/或測定反應率(RR)來量測功效。

術語「實質性」或「實質上」係指大部分，亦即>50%之群體、混合物或樣品，較佳超過50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之群體。

術語「細胞內裂解(intracellularly cleaved)」及「細胞內裂解(intracellular cleavage)」係指在配位體藥物共軛物(例如抗體藥物共軛物(ADC)或其類似物)上之細胞內部代謝過程或反應，藉此破壞藥物部分(D)與配位體單元(例如抗體(Ab))之間的共價連接(例如接合劑)，產生自由藥物或自細胞內部之抗體解離之共軛物的其他代謝物。因此，藥物-接合劑-配位體共軛物之裂解部分為細胞內代謝物。

術語「細胞毒性活性」係指藥物-接合劑-配位體共軛物化合物或藥物-接合劑-配位體共軛物之細胞內代謝物之殺死細胞、細胞生長抑制或抗增殖性作用。細胞毒性活性可以IC₅₀值表示，其為一半細胞存活時每單位體積之濃度(莫耳濃度或質量)。

如本文所用之術語「細胞毒性劑」係指抑制或抑制細胞之功能及/或引起細胞損壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sm、²¹²Bi、³²P、⁶⁰C及Lu之放射性同位素)、化學治療劑及毒素(諸如具有細菌、真菌、植物或動物起源之小分子毒素或酶促活性毒素)，包括其合成類似物及衍生

物。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物中通常以未調節細胞生長為特徵之生理病狀或病症。「腫瘤」包含一或多個癌細胞。

「自體免疫疾病」在本文中為由個體自身組織或蛋白質產生且針對個體自身組織或蛋白質之疾病或病症。

「患者」之實例包括(但不限於)人類、大鼠、小鼠、天竺鼠、猴、豬、山羊、牛、馬、狗、貓、鳥及家禽。在一例示性實施例中，患者為人類。

除非上下文另外指明，否則術語「治療(treat)」或「治療(treatment)」係指治療性治療及用於預防復發之預防性措施，其中目標為抑制或減緩(減輕)不希望的生理變化或病症，諸如癌症之發展或擴散。出於本發明之目的，有益或所需臨床結果包括(但不限於)：症狀緩解、疾病程度減小、疾病病況穩定化(亦即不惡化)、疾病進程延遲或減緩、疾病病況改善或減輕、及病徵緩解(部分抑或完全)，該等結果為可偵測抑或不可偵測的。「治療」亦可意謂與不接受治療時之預期存活相比延長存活。需要治療之彼等患者包括已具有病狀或病症之彼等患者以及易於具有病狀或病症之彼等患者。

在癌症之情形下，術語「治療」包括以下任一者或所有：抑制腫瘤細胞、癌細胞或腫瘤之生長；抑制腫瘤細胞或癌細胞之複製；減輕總腫瘤負荷或降低癌細胞數目；及改善與疾病相關之一或多種症狀。

在自體免疫疾病之情形下，術語「治療」包括以下任一者或所有：抑制與自體免疫疾病病況相關之細胞(包括(但不限於)產生自體免疫抗體之細胞)的複製、減輕自體免疫-抗體負荷及改善自體免疫疾病之一或多種症狀。

如本文所用，術語「偵測單元」係指產生或可誘導產生可偵測

信號之任何分子。可藉由成像設備偵測之具有報導分子之偵測單元包括(但不限於)放射性、順磁性、螢光或不透射線化學實體。在一些實施例中，偵測單元將為放射性化合物、化學發光劑、螢光劑或色原體。在一些實施例中，偵測單元將為螢光分子，諸如螢光團。

如本文所用，術語「穩定性單元」係指當向患者投與時例如藉由增加配位體之系統性滯留來提昇共軛物穩定性之化合物。穩定性單元亦可增加共軛物之水溶性。例示性穩定性單元為聚乙二醇。

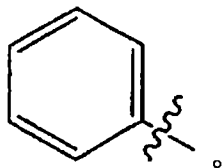
如本文所用之片語「醫藥學上可接受之鹽」係指化合物(例如藥物、藥物-接合劑或配位體-藥物共軛物)之醫藥學上可接受之有機或無機鹽。化合物可含有至少一個胺基且因此可使用該胺基形成酸加成鹽。例示性鹽包括(但不限於)硫酸鹽、三氟乙酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、乙二酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、丁二酸鹽、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、葡糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(亦即1,1'-亞甲基-雙(2-羥基-3-萘甲酸鹽))。醫藥學上可接受之鹽可涉及包括另一分子，諸如乙酸根離子、丁二酸根離子或其他相對離子。相對離子可為使母體化合物上之電荷穩定化之任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽在其結構中可具有一個以上帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽的一部分之情況可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

除非另外指明，否則術語「烷基」單獨或作為另一術語之一部分係指具有指定數目之碳原子的經取代或未經取代之直鏈或分支鏈飽

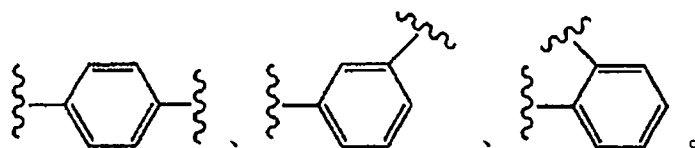
和或不飽和烴(例如「-C₁-C₈烷基」或「-C₁-C₁₀」烷基係指分別具有1至8或1至10個碳原子之烷基)。當未指定碳原子數目時，烷基具有1至8個碳原子。代表性直鏈「-C₁-C₈烷基」包括(但不限於)-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基及-正辛基；而分支鏈-C₁-C₈烷基包括(但不限於)-異丙基、-第二丁基、-異丁基、-第三丁基、-異戊基及-2-甲基丁基；不飽和-C₂-C₈烷基包括(但不限於)-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-異丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、-1-己基、2-己基、-3-己基、-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基及-3-甲基-1-丁炔基。在一些實施例中，烷基未經取代。烷基可經一或多個基團取代。在一些態樣中，烷基將為飽和的。

除非另外指明，否則「伸烷基」單獨或作為另一術語之一部分係指具有所述數目之碳原子(通常1-10個碳原子)且具有藉由自母體烴之同一或兩個不同碳原子移除兩個氫原子而衍生之兩個單價基團中心之經取代或未經取代之飽和分支鏈或直鏈或環狀烴基。典型伸烷基包括(但不限於)亞甲基(-CH₂-)、1,2-乙基(-CH₂CH₂-)、1,3-丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)及其類似基團。在較佳態樣中，伸烷基為分支鏈或直鏈烴(亦即其不為環狀烴)。

除非另外指明，否則「芳基」單獨或作為另一術語之一部分意謂藉由自母體芳環系統之單一碳原子移除一個氫原子而衍生之具有6-20個碳原子之經取代或未經取代之單價碳環芳族烴基。一些芳基係以如「Ar」之例示性結構表示。典型芳基包括(但不限於)衍生自苯、經取代之苯、萘、蔥、聯苯基及其類似物之基團。例示性芳基為如下苯基：



除非另外指明，否則「伸芳基」單獨或作為另一術語之一部分為如上文所定義之芳基，其具有兩個共價鍵(亦即其為二價的)且可呈如以下結構中所示之鄰位、間位或對位組態，以苯基作為例示性基團：



除非另外指明，否則「 C_3-C_8 雜環」單獨或作為另一術語之一部分係指單價經取代或未經取代之芳族或非芳族單環或雙環系統，其具有3至8個碳原子(亦稱為環成員)及一至四個獨立地選自N、O、P或S之雜原子環成員，且藉由自母體環系統之環原子移除一個氫原子而衍生。雜環中之一或多個N、C或S原子可經氧化。包括雜原子之環可為芳族環或非芳族環。除非另外指出，否則雜環在任何雜原子或碳原子處與其側基連接，從而產生穩定結構。 C_3-C_8 雜環之代表性實例包括(但不限於)吡咯啉基、氮雜環丁烷基、哌啉基、嗎啉基、四氫呋喃基、四氫哌喃基、苯并呋喃基、苯并噻吩、吲哚基、苯并吡啶基、吡咯基、噻吩基(噻吩)、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、嘧啶基、吡啶基、吡嗪基、噻嗪基、異噻唑基及異噁唑基。「 C_3-C_8 雜芳基」為芳族 C_3-C_8 雜環。

除非另外指明，否則「 C_3-C_8 雜環基」單獨或作為另一術語之一部分係指以上定義之 C_3-C_8 雜環基，其中雜環基之氫原子之一經一鍵置換(亦即其為二價的)。「 C_3-C_8 伸雜芳基」單獨或作為另一術語之一部分係指以上定義之 C_3-C_8 雜芳基，其中雜芳基之氫原子之一經一鍵置換(亦即其為二價的)。

除非另外指明，否則「C₃-C₈碳環」單獨或作為另一術語之一部分為藉由自母體環系統之環原子移除一個氫原子而衍生之3員、4員、5員、6員、7員或8員單價經取代或未經取代之飽和或不飽和非芳族單環或雙環碳環。代表性-C₃-C₈碳環包括(但不限於)環丙基、環丁基、環戊基、環戊二烯基、環己基、環己烯基、1,3-環己二烯基、1,4-環己二烯基、環庚基、1,3-環庚二烯基、1,3,5-環庚三烯基、環辛基及環辛二烯基。

除非另外指明，否則「C₃-C₈碳環基」單獨或作為另一術語之一部分係指以上定義之C₃-C₈碳環基，其中碳環基之氫原子中之另一者經一鍵置換(亦即其為二價的)。

除非另外指明，否則術語「雜烷基」單獨或與另一術語組合除非另外陳述，否則意謂完全飽和或含有1至3不飽和度且由所述數目之碳原子及一至十個、較佳一至三個選自由O、N、Si及S組成之群的雜原子組成之穩定直鏈或分支鏈烴或其組合，且其中氮及硫原子可視情況經氧化且氮雜原子可視情況經四級銨化。雜原子O、N及S可位於雜烷基之任何內部位置處或烷基與分子之其餘部分連接之位置處。雜原子Si可位於雜烷基之任何位置處，包括烷基與分子之其餘部分連接之位置。實例包括-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-O-CH₃及-CH=CH-N(CH₃)-CH₃。多達兩個雜原子可為連續的，諸如-CH₂-NH-OCH₃及-CH₂-O-Si(CH₃)₃。在較佳實施例中，C₁至C₄雜烷基或伸雜烷基具有1至4個碳原子及1或2個雜原子，且C₁至C₃雜烷基或伸雜烷基具有1至3個碳原子及1或2個雜原子。在一些態樣中，雜烷基或伸雜烷基為飽和的。

除非另外指明，否則術語「伸雜烷基」單獨或作為另一取代基

之一部分意謂如藉由 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 及 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 所例示之衍生自雜烷基(如上文所論述)之二價基團。對於伸雜烷基，雜原子亦可佔據任一或兩個鏈末端。另外，對於伸烷基及伸雜烷基鍵聯基團，未暗示鍵聯基團之定向。

「經取代之烷基」及「經取代之芳基」分別意謂烷基及芳基，其中一或多個氫原子各自獨立地經取代基置換。典型取代基包括(但不限於) $-\text{X}$ 、 $-\text{R}$ 、 $-\text{O}^-$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{S}^-$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{NR}_3$ 、 $=\text{NR}$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCN}$ 、 $-\text{SCN}$ 、 $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NO}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $=\text{N}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NRC}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 、 $-\text{PO}_3^-$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{AsO}_2\text{H}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{X}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}$ 、 $-\text{CO}_2^-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{OR}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_2$ 或 $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}_2$ ，其中各 X 獨立地為鹵素： $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 或 $-\text{I}$ ；且各 R 獨立地為 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1-\text{C}_{20}$ 烷基、 $-\text{C}_6-\text{C}_{20}$ 芳基、 $-\text{C}_3-\text{C}_{14}$ 雜環、保護基或前藥部分。如上文所述之伸烷基、碳環、碳環基、伸芳基、雜烷基、伸雜烷基、雜環、雜環基、雜芳基及伸雜芳基亦可類似地經取代。

RG 為含有能夠與接合劑單元之任一組成部分(亦即 A 、 W 、 Y)或藥物單元 D 形成一鍵之反應性位點(RS)之反應性基團。 RS 為反應性基團(RG)內之反應性位點。反應性基團包括用以形成雙硫鍵或硫醚鍵之硫氫基；用以形成腙鍵之醛、酮或肼基；用以形成肽鍵之羧基或胺基；用以形成酯鍵之羧基或羥基；用以形成磺醯胺鍵之磺酸；用以形成胺基甲酸酯鍵之醇；及用以形成磺醯胺鍵或胺基甲酸酯鍵之胺。下表說明反應性基團、反應性位點及在反應性位點反應之後可形成之例示性官能基。該表不具限制性。熟習此項技術者應瞭解，該表中所提及之 R' 及 R'' 部分有效地為可與在使 RG 轉化為一種例示性官能基時所提供之鍵形成相容的任何有機部分(例如烷基、芳基、雜芳基；或經

取代之烷基、芳基或雜芳基)。亦應瞭解，當應用於本發明之實施例時，視情況而定R'可表示自行穩定之接合劑或視情況選用之二級接合劑之一或多個組成部分，且視情況而定R''可表示視情況選用之二級接合劑之一或多個組成部分、藥物單元、穩定性單元或偵測單元。

| RG | RS | 例示性官能基 |
|---|-----------------------|-----------------------------|
| 1) R'-SH | -S- | R'-S-R'' R'-S-S-R'' |
| 2) R'-C(=O)OH | -C(=O)- | R'-C(=O)NH-R'' |
| 3) R'-C(=O)ONHS | -C(=O)- | R'-C(=O)NH-R'' |
| 4) R'S(=O) ₂ -OH | -S(=O) ₂ - | R'S(=O) ₂ NH-R'' |
| 5) R'-CH ₂ -X (X is Br, I, Cl) | -CH ₂ - | R'-CH ₂ -S-R'' |
| 6) R'-NH ₂ | -N- | R'-NHC(=O)R'' |

應瞭解，一旦反應，反應性位點RS即可視情況而定與接合劑單元之組成部分或藥物單元形成新鍵。反應性位點RS一旦與接合劑單元之其餘部分連接即通常喪失其反應性。

如本文所用之術語「二內醯胺」係指由存在於自行穩定之接合劑總成上之硫取代之丁二醯亞胺與鹼的巨環化反應形成之環醯胺。

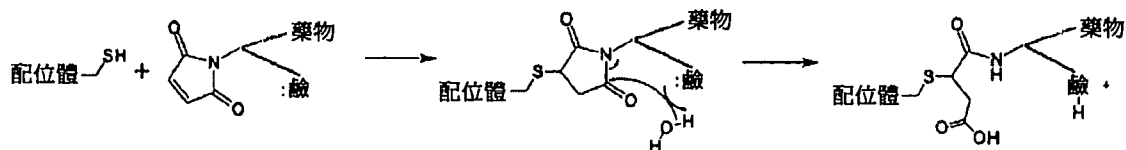
概述

順丁烯二醯亞胺(或硫取代之丁二醯亞胺)之水解表示親核加成反應，其中充當親核劑之水攻擊順丁烯二醯亞胺環(或丁二醯亞胺環)之一個親電子羰基碳原子。此反應之速率受羧基之親電子性影響，羧基之親電子性可隨著存在於醯亞胺基之氮上之推電子或拉電子基團之取代而變化。水解反應之速率亦受水性溶劑之pH值影響，水性溶劑隨著pH值增加有效地增加水之親核性。本發明人已發現使鹼性基團位於N-取代之順丁烯二醯亞胺上亦使水解速率增加。藉由小心地工程改造順丁烯二醯亞胺上之N-取代基，可使用其對順丁烯二醯亞胺環之拉電子影響(因此增加其親電子性)與局域化鹼性(增加附近水之有效親核性)之組合來調節母體順丁烯二醯亞胺或其硫取代之丁二醯亞胺衍生物之水解速率。本發明尤其提供水解速率在適用範圍內之N-取代之順

丁烯二醯亞胺，在該適用範圍內N-取代之順丁烯二醯亞胺與硫醇之反應與其水解為順丁烯二酸衍生物相比進行得較快，但其以足夠快速以在極適合於製造蛋白質基生物共軛物之溫和條件下達成完全水解之水解速率產生硫取代之丁二醯亞胺。

本發明部分基於以下發現：順丁烯二醯亞胺近端之鹼性官能基將催化在順丁烯二醯亞胺與蛋白質硫醇發生共軛從而產生穩定生物共軛物時形成之硫取代之丁二醯亞胺之水解。藉由使近端鹼性基團與拉電子基團進一步組合，硫取代之丁二醯亞胺環水解之速率可調節至所需水準。影響水解速率之設計參數包括鹼性基團之pKa、拉電子基團(若存在)之強度及兩種基團與順丁烯二醯亞胺羰基碳之接近度。影響水解百分比之設計參數包括鹼之性質及其與順丁烯二醯亞胺羰基碳之接近度。

在概念上，在不限制本發明的情況下，包含自行穩定之接合劑總成之接合劑單元在本文中稱為自行穩定之接合劑或自行穩定之接合劑單元。在與配位體單元共軛之前，自行穩定之接合劑包含順丁烯二醯亞胺基團。自行穩定之接合劑係憑藉在接合劑單元內順丁烯二醯亞胺基團與鹼之接近度而自行穩定，其在與配位體單元共軛之後催化其自身的硫取代之丁二醯亞胺之水解。此示意性表示如下：



應瞭解，術語自行穩定之接合劑係指穩定化之前與之後的接合劑單元。

鑒於以上內容，在一組實施例中，本發明提供一種配位體-功能劑共軛物，其包含配位體單元及至少一種選自藥物單元、偵測單元或穩定化單元之功能劑，其中配位體單元及各功能劑係藉由自行穩定之

接合劑總成連接，該自行穩定之接合劑總成包含經由硫醚鍵聯與配位體單元直接共軛之丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺環；及可操作地鍵聯以使共軛物相對於缺乏自行穩定之接合劑總成之配位體藥物共軛物在血漿中穩定化(亦即藉由增加丁二醯亞胺環水解速率)之鹼及拉電子基團(經由丁二醯亞胺與配位體單元共軛)。在一些態樣中，拉電子基團經定位以增加丁二醯亞胺之親電子性從而使其與水更具反應性，且鹼經定位以輔助丁二醯亞胺環水解(例如藉由分子內鹼催化機制)。在一些態樣中，當鹼與丁二醯亞胺環反應時，形成二內醯胺而非丁二醯亞胺環。在另一組實施例中，提供功能劑-接合劑單元，其中接合劑部分包含自行穩定之接合劑總成。在另一組實施例中，提供配位體-接合劑共軛物，其中接合劑部分包含自行穩定之接合劑總成。在一些實施例中，接合劑部分進一步包含視情況選用之二級接合劑總成(L⁰)。

在一些態樣中，配位體-功能劑共軛物為配位體-藥物共軛物。因此，在一組實施例中，本發明提供一種包含配位體單元及至少一個藥物單元之配位體-藥物共軛物，其中配位體單元及各藥物單元係藉由自行穩定之接合劑總成連接，該自行穩定之接合劑總成包含經由硫醚鍵聯與配位體單元直接共軛之丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺環；及可操作地鍵聯以使共軛物相對於缺乏自行穩定之接合劑總成之配位體藥物共軛物在血漿中穩定化(亦即藉由增加丁二醯亞胺環水解速率)之鹼及拉電子基團(經由丁二醯亞胺環與配位體單元共軛)。在一些態樣中，拉電子基團經定位以增加丁二醯亞胺之親電子性從而使其與水更具反應性，且鹼經定位以輔助丁二醯亞胺環水解(例如藉由分子內鹼催化機制)。在一些態樣中，當鹼與丁二醯亞胺環反應時，形成二內醯胺而非丁二醯亞胺環。在另一組實施例中，提供藥物-接合劑單元，其中接合劑部分包含自行穩定之接合劑總成。在另一組實施例

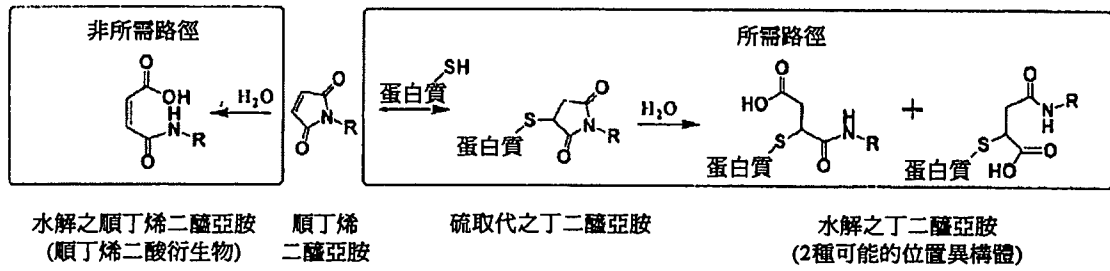
中，提供配位體-接合劑共軛物，其中接合劑部分包含自行穩定之接合劑總成。在一些實施例中，接合劑部分進一步包含視情況選用之二級接合劑總成(L⁰)。在一些實施例中，二級接合劑總成爲可釋放接合劑總成(L^R)，其包含可裂解單元及視情況選用之延伸子及間隔子單元中之一或多者。在一些其他實施例中，二級接合劑總成爲非可釋放接合劑總成(L^N)，其包含延伸子單元及間隔子單元中之一或多者。在其他實施例中，本發明提供使用包含自行穩定之接合劑總成之配位體-藥物共軛物治療癌症、免疫疾病、感染性疾病及其他疾病及病症之方法。

除自行穩定之接合劑總成以外，配位體-功能劑共軛物(或配位體-藥物共軛物)之接合劑單元可進一步包含使各功能劑(或藥物單元)與自行穩定之接合劑總成連接之視情況選用之二級接合劑總成(L⁰)。二級接合劑總成可爲可釋放接合劑總成或非可釋放接合劑總成。

術語接合劑單元在本文中可用於指包含自行穩定之接合劑總成及視情況選用之二級接合劑總成之配位體-功能劑共軛物(或配位體-藥物共軛物)之接合劑部分。

自行穩定之接合劑總成

自行穩定之接合劑經設計以使得丁二醯亞胺環之共軛後水解速率將爲可控制的且在所需範圍內。此範圍之限度通常由在配位體-藥物共軛物之製造中出現之問題指示。一方面，過慢之水解將需要製造製程不可接受之延遲或侵襲性pH及溫度條件，其可誘導損壞蛋白質主鏈。反之，與水反應性過強之順丁烯二醯亞胺在其可與可用蛋白質硫醇反應之前可水解爲相應順丁烯二酸衍生物(參見非所需路徑)：

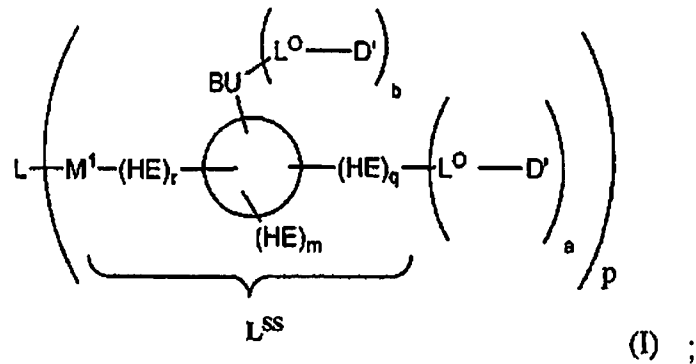


該等順丁烯二酸衍生物不與硫醇反應，且因此此反應路徑不產生生物共軛物。因此，在適用條件下經歷水解快於硫醇加成之順丁烯二醯亞胺並非適用試劑。一般而言，使硫取代之丁二醯亞胺之水解速率增加之結構特徵亦將使母體順丁烯二醯亞胺之水解速率增加。

在設計本發明之自行穩定之接合劑時，應瞭解鹼性基團之pKa、拉電子基團之強度及兩種基團與順丁烯二醯亞胺之接近度為相關之變數，且將影響順丁烯二醯亞胺與相應硫取代之丁二醯亞胺產物之水解速率。因此，拉電子基團及鹼之定位將視鹼之pKa及拉電子基團之強度而定。熟練技術人員將瞭解，對於特別強之拉電子基團(諸如氟、三氟甲基及硝基)而言，該基團可進一步來自順丁烯二醯亞胺。在一些實施例中，水解反應可與巨環化反應競爭，使得所得共軛物包含水解的硫取代之丁二醯亞胺共軛物與環化硫取代之二內醯胺共軛物之異質混合物。在較佳實施例中，將不形成二內醯胺。

本發明之所選實施例

在一些實施例中，配位體-功能劑共軛物係由式I或其鹽(例如其醫藥學上可接受之鹽)表示：



其中

L為配位體單元；

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^0 為視情況選用之二級接合劑總成；且

L^{SS} 為自行穩定之接合劑總成，其中

M^1 為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或與BU一起形成二內醯胺；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；

下標a及b各自為0或1，且 $a+b$ 之總和為1；且

下標p介於1至20範圍內。

在一些態樣中，當r為1時，HE不包含羰基(亦即 $C(=O)$)。

在一些態樣中，r為零。在一些態樣中，a為1且b為零。在其他態樣中，a為零且b為1。

在一些態樣中， $m+q+r$ 為0。在該等態樣中，骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基且充當拉電子基團。例示性芳基及雜芳基包括苯基及吡啶基。

在一些態樣中， $m+q+r$ 為1或2。

在一些態樣中，共軛物由式I或其鹽表示，其中a為1及r為零。

在一些態樣中，共軛物由式I或其鹽表示，其中 L^0 存在且為可釋放接合劑總成，圓圈表示骨架，即 C_{1-8} 伸烷基或 C_{1-8} 伸雜烷基(較佳為 C_{1-4} 伸烷基或 C_{1-4} 伸雜烷基)，a為1、r為零，且 $m+q$ 之總和為1。在一

些該等態樣中，骨架為C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈。

在一些態樣中，共軛物由式I或其鹽表示，其中L⁰存在且為可釋放接合劑總成，圓圈表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳為C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)，a為1，且m及r為零。在一些該等態樣中，骨架為C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈。

在一些態樣中，共軛物由式I或其鹽表示，其中L⁰存在且為可釋放接合劑總成，圓圈表示骨架，即C₁、C₂、C₃或C₄直鏈或分支鏈伸烷基，a為1、r為零，且m+q之總和為1。

在一些態樣中，共軛物由式I或其鹽表示，其中L⁰存在且為可釋放接合劑總成，圓圈表示骨架，即C₁、C₂、C₃或C₄直鏈或分支鏈伸烷基，a為1，且m及r為零。

在一些態樣中，在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個且不超過6個介入原子，且在拉電子基團與丁二醯亞胺環(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不超過5個原子、不超過4個原子、不超過3個原子或不超過2個介入原子。

在各個此等實施例中，伸烷基或伸雜烷基鏈可為直鏈或分支鏈。在一些態樣中，伸烷基或伸雜烷基鏈將為直鏈。在其他態樣中，其將為分支鏈。

在各個此等實施例中，p可介於1至20、較佳1至12、甚至更佳1至10或1至8範圍內。

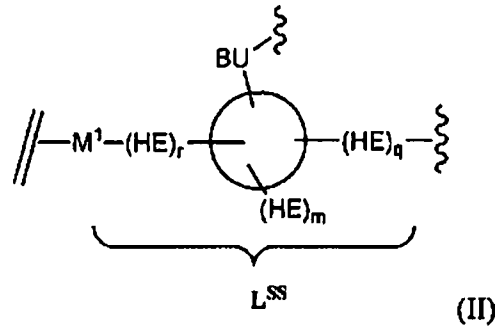
在各個此等實施例中，M¹較佳為丁二醯亞胺環(亦即未水解)或水解之丁二醯亞胺環(在本文中亦稱為水解之丁二醯亞胺)。

在各個此等實施例中，D'可為藥物單元D且配位體-功能劑共軛物

可為配位體-藥物共軛物。

在骨架本身與視情況選用之二級接合劑總成或D'直接連接之一些態樣中(例如在當q為零或當q為零且r為零時之所選實施例中)，骨架將包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點。

在一些實施例中，自行穩定之接合劑總成(L^{SS})係由式II或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：



其中波形線指示用於使視情況選用之二級接合劑總成與D'或D連接之點，且其中//指示與配位體單元連接之點。在以上自行穩定之接合劑總成中，M¹表示丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺環或當鹼與丁二醯亞胺環反應時形成之二內醯胺，BU為鹼性單元，HE為包含拉電子基團之水解增強劑，且圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成、D'或D連接之反應性位點；且下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基。

在一些態樣中，當r為1時，HE不包含羰基(亦即C(=O))。

在一些態樣中，自行穩定之接合劑總成由式II表示，其中r為零。

在一些態樣中，m+q+r為0。在該等態樣中，C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基充當拉電子基團。例示性芳基及雜芳基包括苯基及吡啶基。

在一些態樣中，m+q+r為1或2。

在一些態樣中，自行穩定之接合劑總成由式II或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳為C₁₋₄伸烷基或伸雜烷基)，r為零，且m+q之總和為1。在一些該等態樣中，骨架為C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈伸烷基。

在一些態樣中，自行穩定之接合劑總成由式II或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳為C₁₋₄伸烷基或伸雜烷基)且m及r為零。在一些該等態樣中，骨架為C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈伸烷基。

在一些態樣中，自行穩定之接合劑總成由式II或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即C₁、C₂、C₃或C₄直鏈或分支鏈伸烷基，r為零，且m+q之總和為1。

在一些態樣中，自行穩定之接合劑總成由式II或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即C₁、C₂、C₃或C₄直鏈或分支鏈伸烷基，且m及r為零。

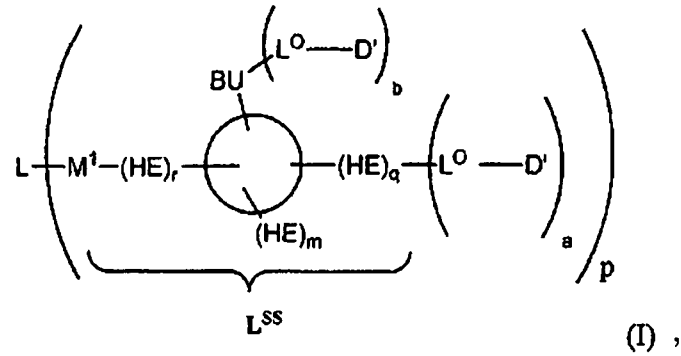
在一些態樣中，在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個且不超過6個介入原子，且在拉電子基團與丁二醯亞胺環(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不超過5個原子、不超過4個原子、不超過3個原子或不超過2個介入原子。

在各個此等實施例中，伸烷基或伸雜烷基鏈將較佳為直鏈或分支鏈。在一些態樣中，伸烷基或伸雜烷基鏈將為直鏈。在其他態樣中，其將為分支鏈。

在各個此等實施例中，M¹較佳為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺環。

在各個此等實施例中，D'較佳為D(藥物單元)。

返回至配位體-功能劑共軛物具有式(I)或其鹽之本發明實施例：



其中骨架、L、M^I、HE、BU、L^O、D'及下標p、a、b、m、q及r各自具有以上提供之含義，所選實施例包括彼等實施例，其中：

- 1) m為1，且q及r為0；
- 2) q為1，且m及r為0；
- 3) r為1，且m及q為0；
- 4) m為1，q及r為0，且a為1；
- 5) q為1，m及r為0，且a為1；
- 6) r為1，m及q為0，且a為1；
- 7) m為1，q及r為0，且D'為藥物單元D；
- 8) q為1，m及r為0，且D'為藥物單元D；
- 9) r為1，m及q為0，且D'為藥物單元D；
- 10) m為1，q及r為0，a為1，且D'為藥物單元D；
- 11) q為1，m及r為0，a為1，且D'為藥物單元D；或
- 12) r為1，m及q為0，a為1，且D'為藥物單元D。

在包括基於以上1)、2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)、9)、10)、11)及12)之各個所選實施例的彼等實施例之其他所選實施例中，鹼性單元(BU)包含一級胺、二級胺或三級胺。在包括基於以上1)、2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)、9)、10)、11)及12)之各個所選實施例的彼等實施例之其他所選實施例中，鹼性單元選自由以下組成之群：-(C(R⁹)(R¹⁰))_xNH₂、-(C(R⁹)(R¹⁰))_xNHR^a及-(C(R⁹)(R¹⁰))_xNR^a₂，其中x為

0-4 (或1至4)之整數且各R^a獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件為若x為零，則在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子，且各R⁹及R¹⁰獨立地選自H或C₁₋₃烷基。在包括基於以上1)、2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)、9)、10)、11)及12)之各個所選實施例的彼等實施例之其他所選實施例中，鹼性單元選自由以下組成之群：
 -(CH₂)_xNH₂、-(CH₂)_xNHR^a及-(CH₂)_xNR^a₂，其中x為0至6 (較佳0至4或1至4)之整數，其限制條件為若x為零，則在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子，且各R^a獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。在其他所選實施例中，x為1至4之整數。在包括基於以上1)、2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)、9)、10)、11)及12)之各個所選實施例的彼等實施例之甚至其他所選實施例中，鹼性單元為-NH₂、-CH₂NH₂、-CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂CH₂NH₂或-CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂，其限制條件為若該鹼性單元為-NH₂，則在鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子。

在包括基於以上2)、5)、8)及11)之所選實施例的彼等實施例且包括基於前一段實施例之彼等實施例的其他所選實施例中，HE較佳包含羰基、磺醯基或磷醯基部分。

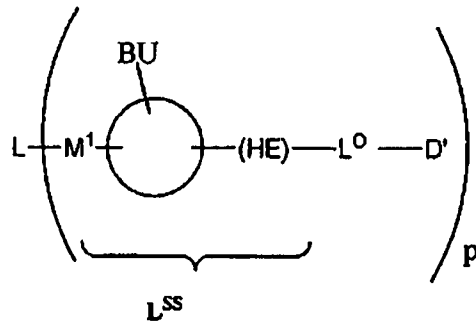
在包括基於以上各個所選實施例的彼等實施例(例如以上1)、2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)、9)、10)、11)及12)之各個所選實施例)且包括基於前述段落之實施例的彼等實施例之其他所選實施例中，在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個且不超過6個介入原子，且在拉電子基團與丁二醯亞胺

環(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不超過5個原子、不超過4個原子、不超過3個原子或不超過2個介入原子。

在包括基於以上各個所選實施例的彼等實施例(例如以上1)、2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)、9)、10)、11)及12)之各個所選實施例)且包括基於前述段落之實施例的彼等實施例之其他所選實施例中， M^1 為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺。

在包括基於以上各個所選實施例的彼等實施例(例如以上1)、2)、3)、4)、5)、6)、7)、8)、9)、10)、11)及12)之各個所選實施例)且包括基於前述段落之實施例的彼等實施例之其他所選實施例中，圓圈表示骨架，即 C_{1-8} 伸烷基或 C_{1-8} 伸雜烷基(較佳為 C_{1-4} 伸烷基或 C_{1-4} 伸雜烷基)。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈伸烷基。

在其他所選實施例中，配位體-功能劑共軛物具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中骨架、 L 、 M^1 、 HE 、 BU 、 L^0 、 D' 及下標 p 各自具有以上所提供之含義，所選實施例包括彼等實施例，其中：

1) 鹼性單元(BU)包含一級胺、二級胺或三級胺，且 D' 較佳為藥物單元 D 。

2) 鹼性單元選自由以下組成之群： $-(C(R^9)(R^{10}))_xNH_2$ 、 $-(C(R^9)(R^{10}))_xNHR^a$ 及 $-(C(R^9)(R^{10}))_xNR^a_2$ ，其中 x 為0-4 (或1-4)之整數，且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條

件為若 x 為零，則在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子，且 R^9 及 R^{10} 獨立地選自H或 C_{1-3} 烷基，且 D' 較佳為藥物單元 D 。

3) 鹼性單元選自由以下組成之群： $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中 x 為0至6 (較佳0至4或1至4)之整數，其限制條件為若 x 為零，則在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子，且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，且 D' 較佳為藥物單元 D 。在其他所選實施例中， x 為1至4之整數。

4) 鹼性單元為 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 或 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ ，其限制條件為若鹼性單元為 $-NH_2$ ，則在鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子；且 D' 較佳為藥物單元 D 。

在包括基於以上各個所選實施例之彼等實施例的其他所選實施例中， HE 包含羰基、磺醯基或磷醯基部分，且 D' 較佳為藥物單元 D 。

在包括基於以上各個所選實施例之彼等實施例的其他所選實施例中，在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個且不超過6個介入原子，且在拉電子基團與丁二醯亞胺環(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不超過5個原子、不超過4個原子、不超過3個原子或不超過2個介入原子，且 D' 較佳為藥物單元(D)。

在包括基於以上各個所選實施例之彼等實施例的其他所選實施例中， M^1 為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺，且 D' 較佳為藥物單元(D)。

在包括基於以上各個所選實施例之彼等實施例的其他所選實施

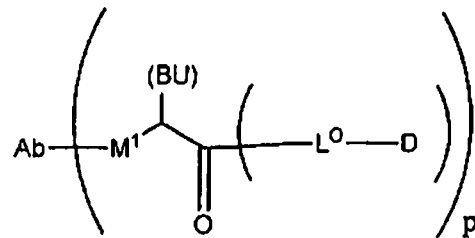
例中，圓圈表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳為C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)，且D'較佳為藥物單元(D)。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈伸烷基。

在包括基於以上各個所選實施例之彼等實施例的其他所選實施例中，HE為羰基，且D'較佳為藥物單元(D)。

在包括基於以上各個所選實施例之彼等實施例的其他所選實施例中，HE為羰基且圓圈表示骨架，即直鏈C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳為C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)，且D'較佳為藥物單元(D)。

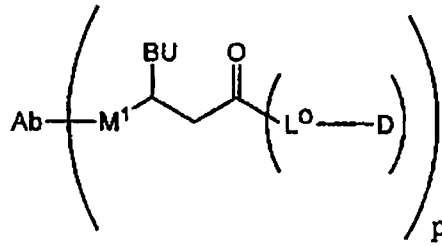
在包括基於以上各個所選實施例之彼等實施例的其他所選實施例中，HE為羰基且圓圈表示骨架，即分支鏈C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳為C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)，且D'較佳為藥物單元(D)。

在其他所選實施例中，配位體-藥物共軛物具有下式：



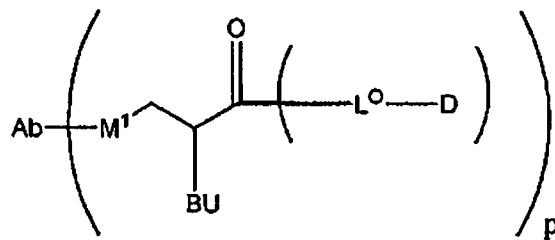
或其醫藥學上可接受之鹽，其中配位體部分為抗體(Ab)，下標p介於1至20(較佳1至12)範圍內，且M¹、BU、L⁰如本文所提供之任一實施例中所描述，且D為藥物單元。舉例而言，在一些態樣中，L⁰為可釋放接合劑總成，且BU為-(CH₂)_xNH₂、-(CH₂)_xNHR^a及-(CH₂)_xNR^a₂，其中x為1-4之整數，且各R^a獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。在其他態樣中，L⁰為可釋放接合劑總成，且BU為-CH₂NH₂、-CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂CH₂NH₂或-CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂。在一些態樣中，Ab可經非抗體蛋白質置換。M¹較佳為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺環。

在其他所選實施例中，配位體-藥物共軛物具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中配位體部分為抗體(Ab)且下標 p 介於1至20 (較佳1至12)範圍內，且 M^1 、BU及 L^0 如本文所提供之任一實施例中所描述，且D為藥物單元。舉例而言，在一些態樣中， L^0 為可釋放接合劑總成，且BU為 $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中 x 為1-4之整數，且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。在其他態樣中， L^0 為可釋放接合劑總成，且BU為 $-CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2NH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ 或 $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ 。在一些態樣中，Ab可經非抗體蛋白質置換。 M^1 較佳為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺環。

在其他所選實施例中，配位體-藥物共軛物具有下式：



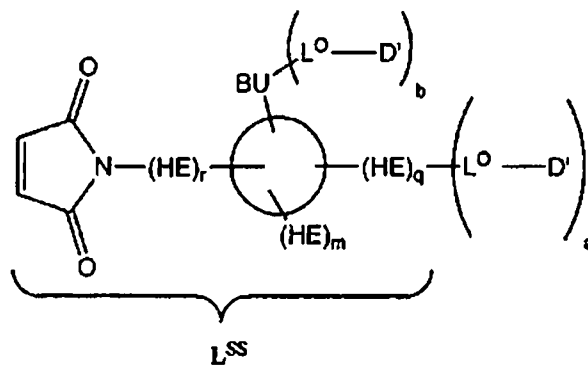
或其醫藥學上可接受之鹽，其中配位體部分為抗體(Ab)，下標 p 介於1至20 (較佳1至12)範圍內，且 M^1 、BU及 L^0 如本文所提供之任一實施例中所描述，且D為藥物單元。舉例而言，在一些態樣中， L^0 為可釋放接合劑總成，且BU為 $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中 x 為0-4之整數，且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。在其他態樣中， L^0 為可釋放接合劑總成，且

BU 爲 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 。在一些態樣中，Ab可經非抗體蛋白質置換。M¹較佳爲丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺環。

已描述多種由本發明提供之配位體-功能劑共軛物及配位體-藥物共軛物，熟習此項技術者應瞭解組分總成亦適用。因此，本發明提供功能劑-接合劑共軛物(例如藥物-接合劑共軛物)、接合劑及配位體-接合劑總成。

功能劑-接合劑共軛物

在另一實施例中，本發明提供具有下式之功能劑-接合劑共軛物(例如藥物-接合劑共軛物)：



或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)，其中，

D'爲藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^O爲視情況選用之二級接合劑總成；且

L^{SS}爲自行穩定之接合劑總成，其中

BU爲鹼性單元；

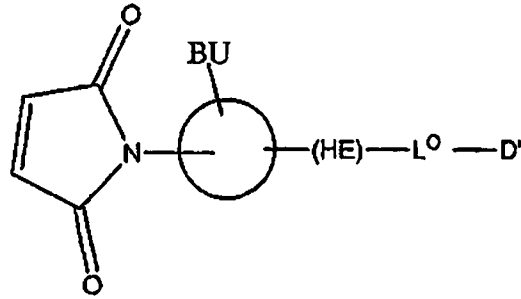
HE爲包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可爲C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點；

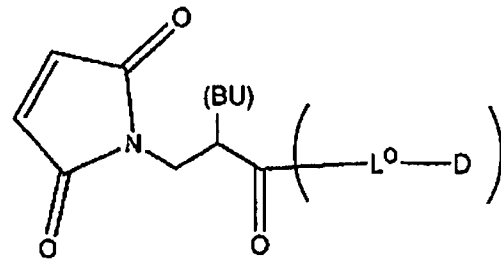
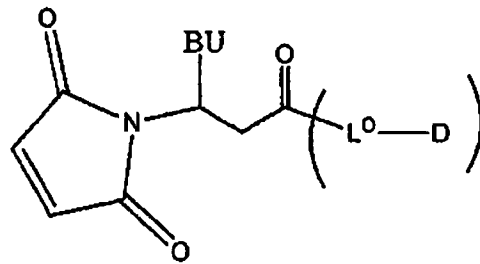
下標m、q及r各自爲0或1，且m+q+r之總和爲0、1或2，其限制條件爲若m+q+r爲0，則該骨架爲C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且

下標a及b各自為0或1，且a+b之總和為1。

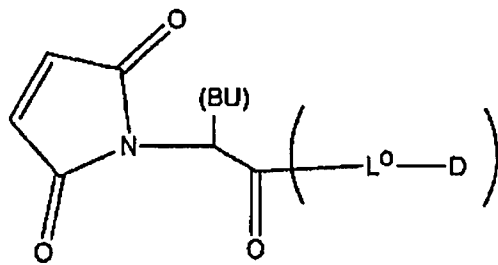
在某些所選實施例中，功能劑-接合劑共軛物由下式或基鹽表示：



而在其他所選實施例中，藥物-接合劑共軛物由下式或其鹽表示：



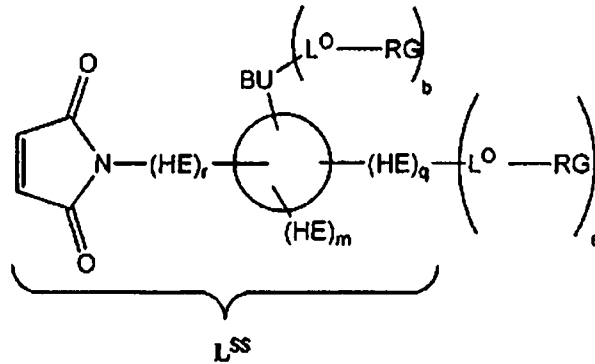
或



其中圓圈、HE、BU、 L^0 及 D' 具有本文關於式I所提供之含義且 D 為藥物單元。另外，關於圓圈、HE、BU、 L^0 及 D' (對於式I或本文所提供之任一共軛物)特定敘述之各個所選實施例同樣適用於此等藥物-接合劑共軛物。在較佳態樣中， D' 為藥物單元 D 。

接合劑

本文中亦提供具有下式之接合劑：



或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)，其中

RG為位於 L^O 末端之適合於連接藥物單元之反應性基團(包含反應性位點)；

L^O 為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；且

L^{SS} 為自行穩定之接合劑總成，其中

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

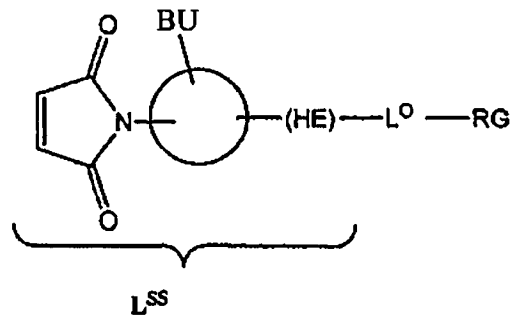
圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成或藥物單元連接之反應性位點；

下標 m 、 q 及 r 各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；且

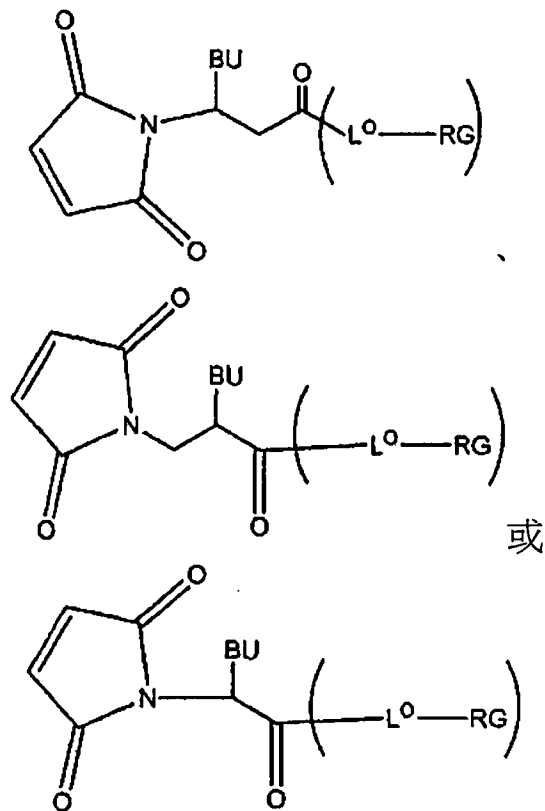
下標 a 及 b 各自為0或1，且 $a+b$ 之總和為1。

在接合劑與偵測單元或穩定性單元連接之一些態樣中，RG為含有能夠與偵測單元或穩定性單元而非藥物單元形成一鍵之反應性位點之反應性基團。

在某些所選實施例中，接合劑由下式或其鹽表示：



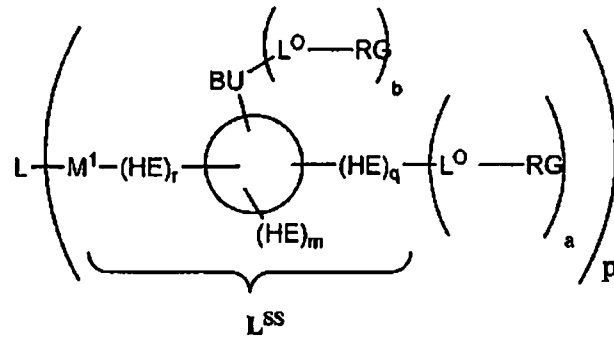
而在其他所選實施例中，接合劑由下式或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：



其中圓圈、HE、BU、 L^O 及RG具有以上所提供之含義。另外，關於BU、 L^O 及RG (對於本文所提供之任一共軛物)特定敘述之各個所選實施例同樣適用於此等接合劑。

配位體-接合劑共軛物

本文亦提供配位體-接合劑共軛物，其具有下式：



或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)，其中

L為配位體單元；

下標p介於1至20範圍內；

RG為位於L⁰末端之反應性基團(包含反應性位點)，其適合於連接藥物單元；

L⁰為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；且

L^{SS}為自行穩定之接合劑總成，其中

M¹為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

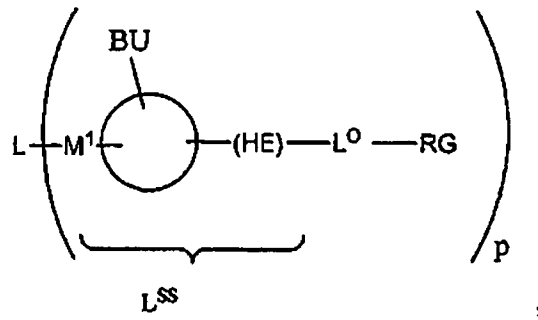
圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成或藥物單元連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；且

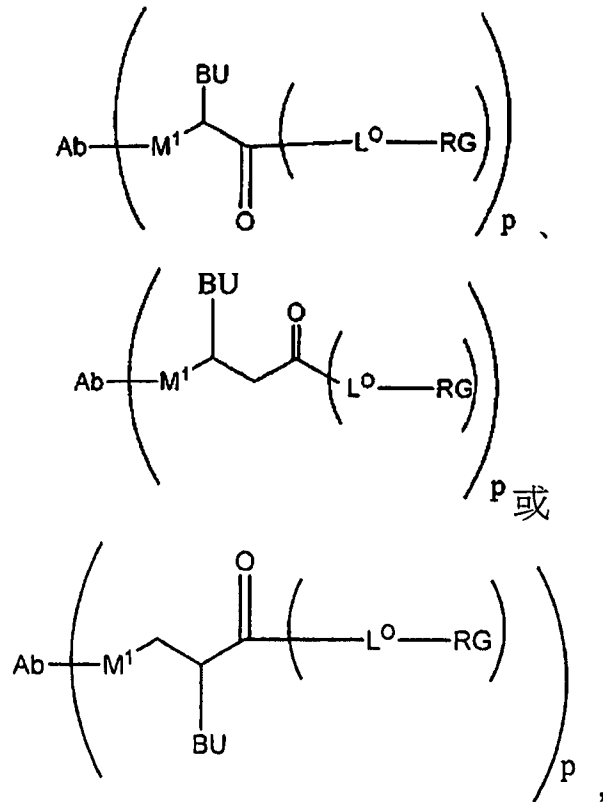
下標a及b各自為0或1，且a+b之總和為1。

在配位體-接合劑共軛物與偵測單元或穩定性單元而非藥物單元連接之一些態樣中，RG為含有能夠與偵測單元或穩定性單元而非藥物單元形成一鍵之反應性位點之反應性基團。

在某些所選實施例中，配位體-接合劑共軛物由下式或其鹽表示：



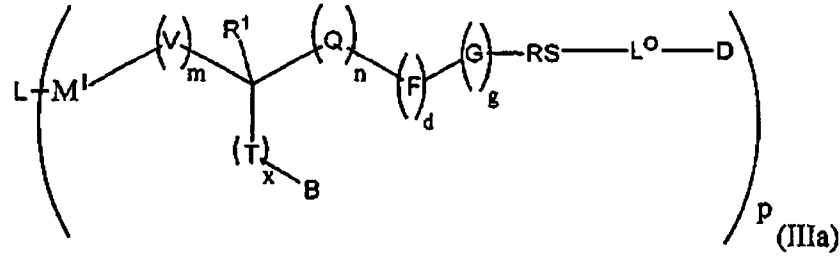
而在其他所選實施例中，配位體-接合劑共軛物由下式或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：



其中L為抗體(Ab)，且圓圈、HE、M¹、BU、L⁰及RG具有以上所提供之含義。另外，關於Ab、M¹、BU、L⁰及RG (對於本文所提供之任一共軛物)特定敘述之各個所選實施例同樣適用於此等配位體-接合劑共軛物。

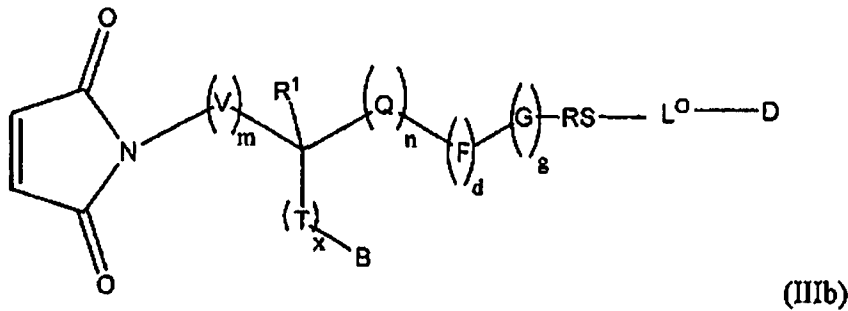
在本發明的一些實施例中，自行穩定之接合劑總成並非由關於L^{SS}之結構表示，而是由L^{TT}表示且具有式(III)：

在所選實施例中，配位體-藥物共軛物具有下式：



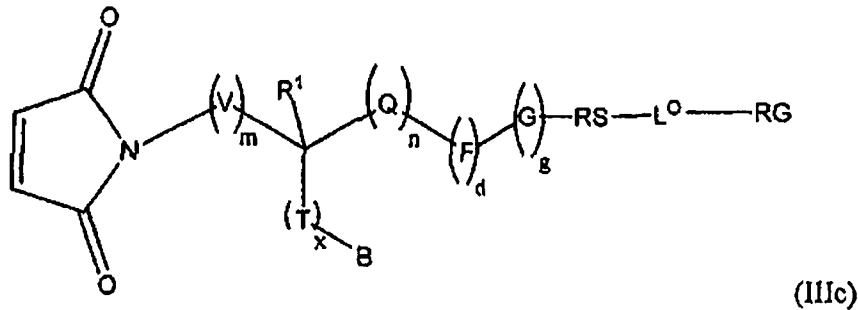
或其醫藥學上可接受之鹽。

在所選實施例中，藥物-接合劑具有下式：



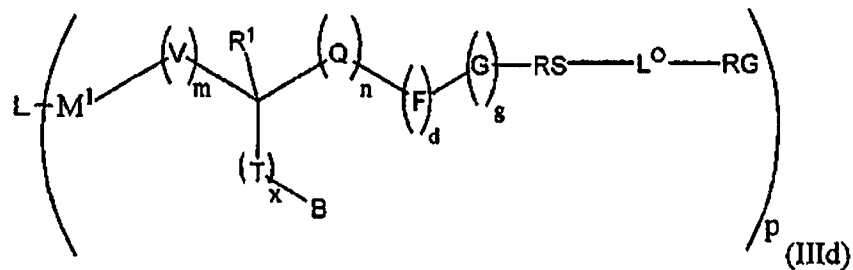
或其醫藥學上可接受之鹽。

在所選實施例中，接合劑具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽。

在所選實施例中，配位體-接合劑共軛物具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽。

在式 IIIa、IIIb、IIIc 及 III d 或其醫藥學上可接受之鹽中：

L (若存在) 為配位體單元；

L^0 為視情況選用之二級接合劑總成；

RG(若存在)為位於 L^0 末端之反應性基團(包含反應性位點)，其適合於連接藥物單元；

M^1 (若存在)為非水解或水解之丁二醯亞胺或 M^1 與B形成二內醯胺(例如當鹼與丁二醯亞胺環反應時，形成二內醯胺)，其中丁二醯亞胺或二內醯胺經由硫醚鍵聯與配位體單元共軛；

V、Q、T及G獨立地選自 $-(C(R^9)(R^{10}))-$ ；

R^1 為H或 C_{1-3} 烷基；

R^9 及 R^{10} 在每次出現時獨立地選自H或 C_{1-3} 烷基；

F為 $C(E^1)(E^2)$ ，其中 E^1 及 E^2 獨立地選自氫、拉電子基團或 E^1 及 E^2 一起為(=O)；

RS為用於與視情況選用之二級接合劑總成之組成部分或藥物單元共軛之反應性位點；

g為0至5；

m為0至5；

n為0至5；

d為0或1；

x為0至4，其前提條件為當m為0時，x為1至4；

p(若存在)介於1至20、較佳1至12範圍內；

且B為鹼。

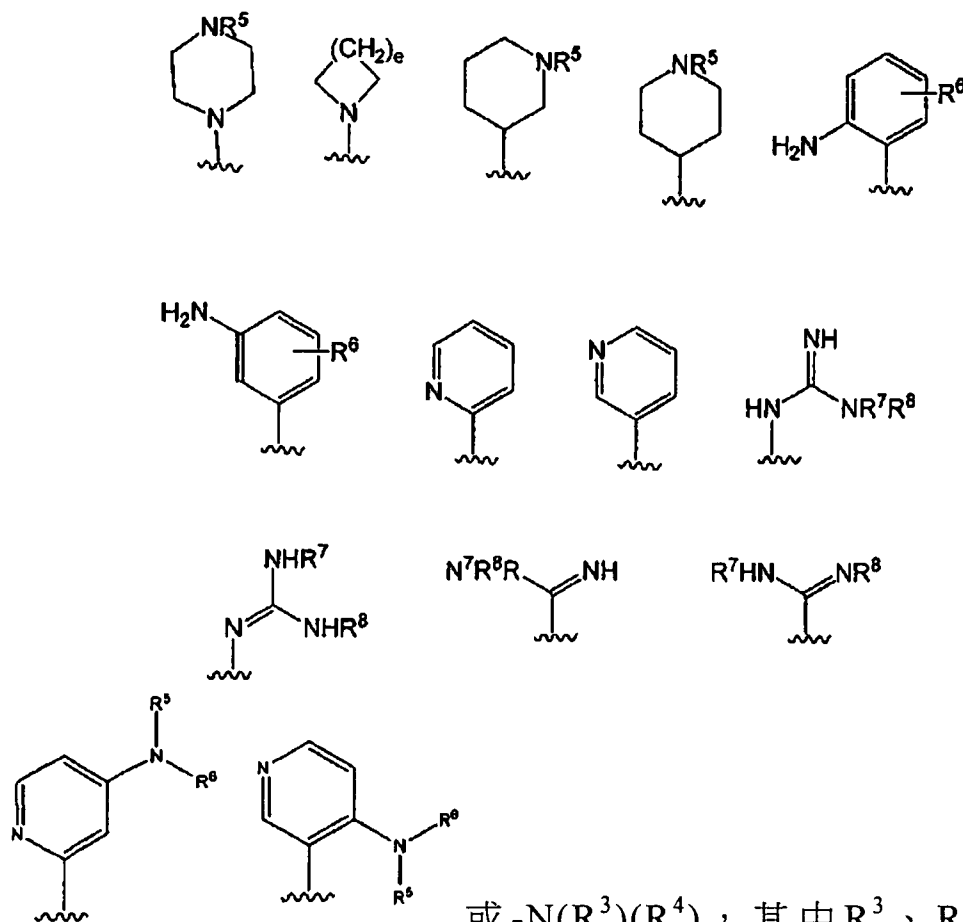
應瞭解，對於式III(包括IIIa、IIIb、IIIc及III d)及其醫藥學上可接受之鹽，拉電子基團將由F(例如 E^1 、 E^2 或 E^1 及 E^2)或由反應性位點RS表示。舉例而言，當d為零時或當 E^1 及 E^2 為氫時，反應性位點將充當拉電子基團。在一些態樣中，當d為零時，RS為 $-C(=O)-$ 。在一些態樣中，n、d及g為零或m、n、d及g為零且RS為 $-C(=O)-$ 。

配位體-藥物共軛物、藥物-接合劑、接合劑或配位體-接合劑共

軛物由式III (或視情況而定式IIIa、IIIb、IIIc或IIIId)或其醫藥學上可接受之鹽表示之例示性實施例包括彼等實施例，其中m為零；m為零且n為零、一、二或三；x為1；x為零且n為零、一、二或三；以及m為零，n為零且x為1。例示性實施例包括本文所述之彼等實施例，其中R⁹及R¹⁰為氫。例示性實施例包括彼等實施例，其中E¹及E²獨立地選自H、-CN、-NO₂、-CX₃；其中X為鹵素或E¹及E²一起為(=O)。取代基之其餘部分如所定義。

配位體-藥物共軛物、藥物-接合劑、接合劑或配位體-接合劑共軛物由式III (或視情況而定式IIIa、IIIb、IIIc或IIIId)或其醫藥學上可接受之鹽表示之例示性實施例包括彼等實施例，其中：

- (i) E¹及E²獨立地選自氫、-CN、-NO₂、-CX₃及-X，其中X為鹵素或E¹及E²一起為(=O)；
- (ii) m為零且n為零、一、二或三；
- (iii) x為1；
- (iv) x為4；
- (v) x為零且n為零、一、二或三；
- (vi) m為零，n為零，且x為1；
- (vii) d為1且g為1至5；
- (viii) d為1且g為2至5；
- (ix) n、d及g為零；
- (x) m、n、d及g為零；
- (xi) RS為-C(=O)-；
- (xii) E¹及E²一起為(=O)；
- (xiii) B為



(xiv) B 為 $-N(R^3)(R^4)$ ，其中 R^3 及 R^4 獨立地選自 H 或 C_{1-6} 烷基；

(xv) B 如 (xiii) 或 (xiv) 中且 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 及 R^8 獨立地選自 H 或 C_{1-3} 烷基；

(xvi) B 如 (xiii) 或 (xiv) 中且 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 及 R^8 獨立地選自 H 或 甲基；

(xvii) B 如 (xiii) 或 (xiv) 或 (xvi) 中且 R^3 及 R^4 為 氫；

(xviii) B 如 (xiii) 或 (xiv) 或 (xvi) 中且 R^3 及 R^4 中之至少一者為 氫；

(xix) B 如 (xiii) 或 (xiv) 或 (xvi) 中且 R^3 及 R^4 中之至少一者不為 氫；

(xx) R^1 、 R^9 及 R^{10} 獨立地選自 H 或 甲基；

(xxi) R^1 、 R^9 及 R^{10} 為 氫；

(xxii) R^1 、 R^9 及 R^{10} 獨立地選自 H 或 甲基；

(xxiii) 可裂解單元存在；

(xxiv) 可裂解單元存在且具有下式

$-(AA-AA)_{1-6}-$ ；其中AA在每次出現時獨立地選自胺基酸；

(xxv) 可裂解單元存在且與藥物單元直接共軛；

(xxvi) 可裂解單元存在且經由可裂解肽鍵、雙硫鍵或脙鍵與藥物單元直接共軛；

(xxvii) 可裂解單元存在且間隔子及延伸子單元不存在；

(xxviii) 藥物為奧瑞他汀(auristatin)；

(xxix) M^1 為水解或非水解之丁二醯亞胺；

(xxx) p為約4；

(xxxi) p為約8；

(xxxii) 在pH 7.4及22°C下，自行穩定之接合劑單元之硫取代之丁二醯亞胺水解之 $t_{1/2}$ 為約10分鐘至約2.5小時；

(xxxiii) 在pH 7.4及22°C下，自行穩定之接合劑單元之硫取代之丁二醯亞胺水解之 $t_{1/2}$ 為約10分鐘至約1小時；

(xxxiv) 在pH 7.4及22°C下，自行穩定之接合劑單元之硫取代之丁二醯亞胺水解之 $t_{1/2}$ 為約10分鐘至約30分鐘；

(xxxv) 配位體單元為抗體；

(xxxvi) 配位體單元為抗體且經由鏈間二硫化物之半胱胺酸殘基與接合劑單元連接；

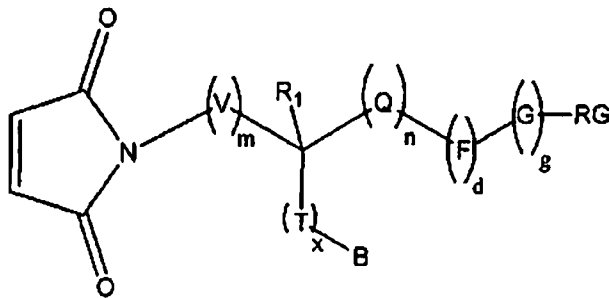
(xxxvii) 配位體單元為單株抗體；

及(i)至(xxxvii)之任何組合或子組合，其限制條件為該等組合或子組合彼此不衝突(例如xxx與xxxi因為p不能同時為約4及約8而衝突)。舉例而言，在所選實施例中，m為零，且n為零、一、二或三。在其他所選實施例中，m為零，n為零，且x為一。在此等所選實施例中之任一者中，d可為一且g可為1至5或d可為一且g可為2至5。在此等實施例中之任一者中，可應用(i)、(iii)或(xi)-(xxxvi)中之一或多者。

在配位體-藥物共軛物、藥物-接合劑、接合劑或配位體-接合劑共軛物由式III (或視情況而定式IIIa、IIIb、IIIc或IIIId)或其醫藥學上可接受之鹽表示之各個所選實施例中，視情況選用之二級接合劑總成可由下式表示：

$-\xi-A_{a'}-W_{w'}-Y_{y'}-\xi-$ ，其中-A-為視情況選用之延伸子單元，下標a'為0或1；-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；且-Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標y'為0或1。

亦包括接合劑具有下式或其醫藥學上可接受之鹽的所選實施例：

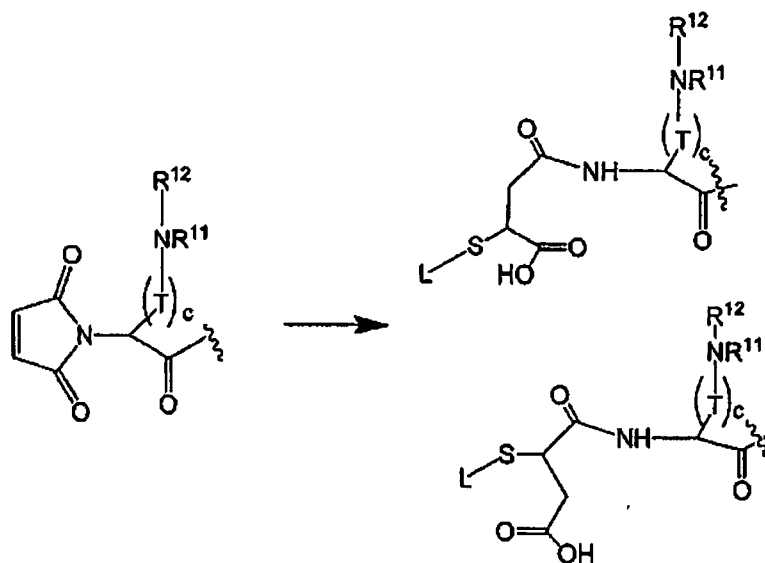
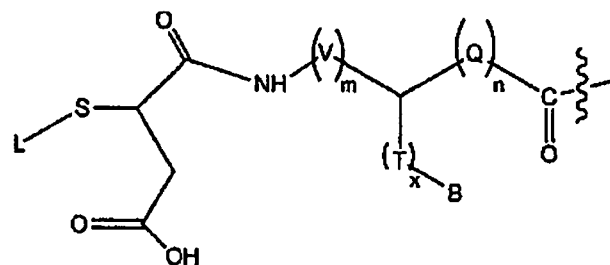
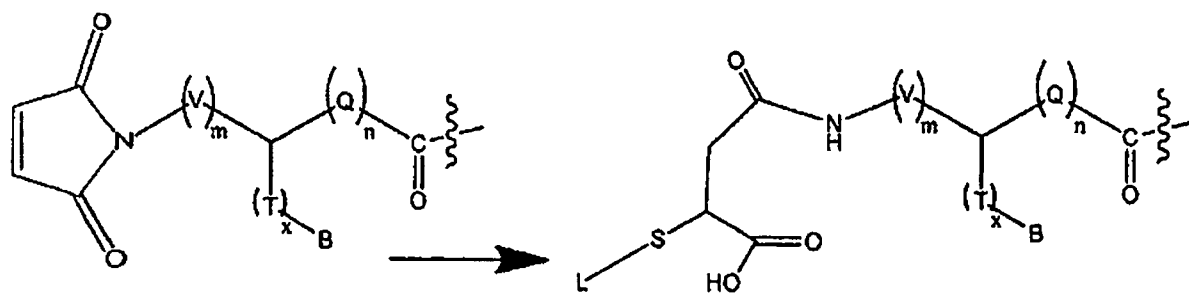


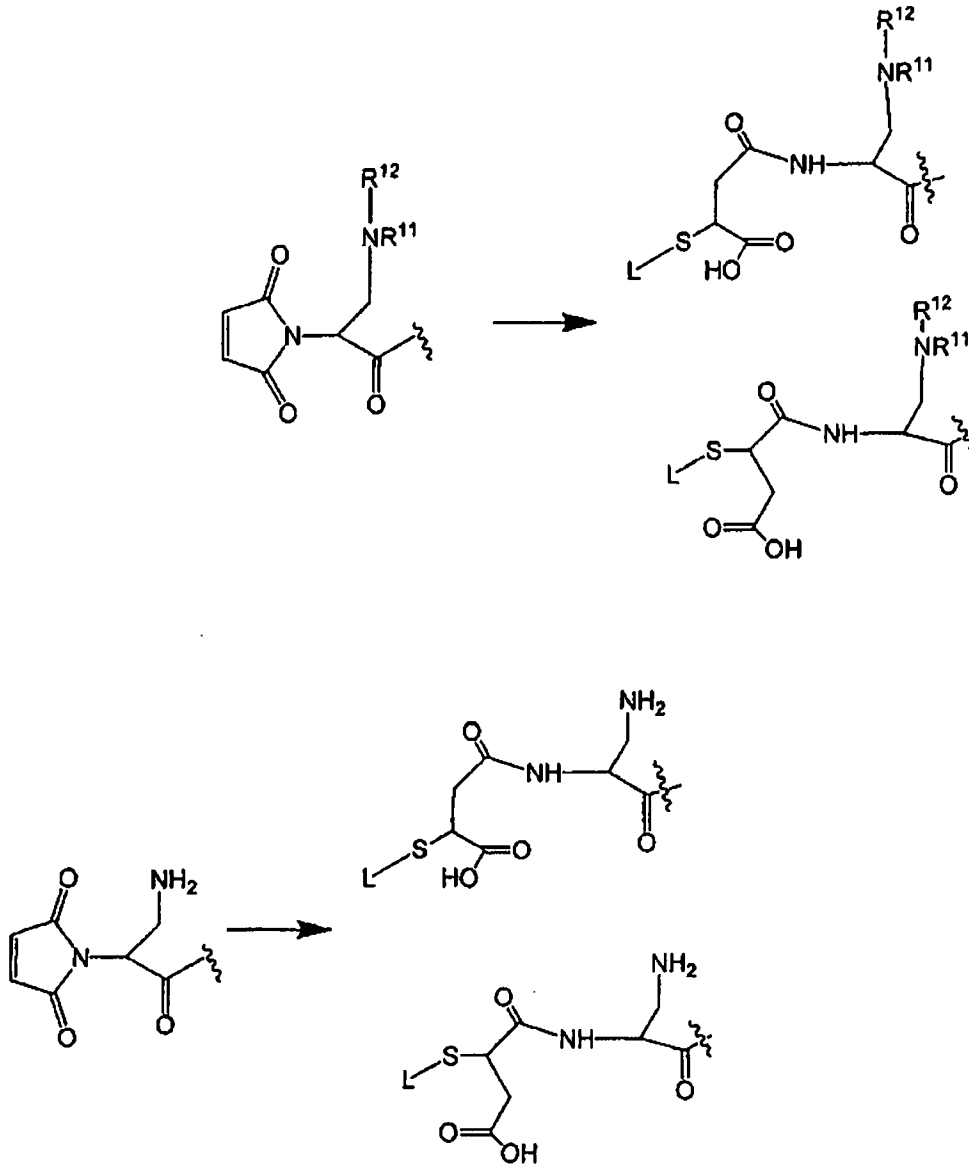
其中V、T、B、R¹、Q、F、G、m、x、n、d及g如關於式III所定義，且RG為包含用於與藥物單元D (當二級接合劑總成不存在時)或二級接合劑總成之組成部分共軛之反應性位點RS之反應性基團，其中二級接合劑總成二級接合劑具有下式：

$-\xi-A_{a'}-W_{w'}-Y_{y'}-\xi-$ ，其中-A-為視情況選用之延伸子單元，下標a'為0或1；-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；且-Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標y'為0或1。

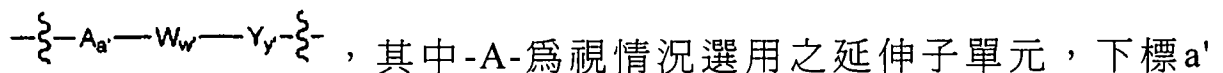
本發明之其他實施例

與配位體共軛之前及硫取代之丁二醯亞胺(其在共軛時形成)共軛及水解之後的例示性自行穩定之接合劑總成如下：



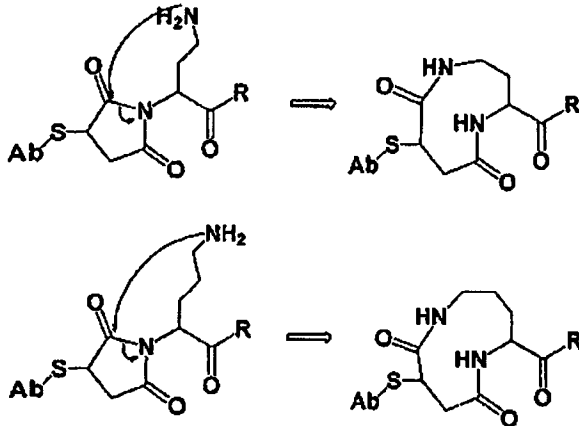


或其醫藥學上可接受之鹽，其中V、Q、T、m、n、x及B如上文關於式III或任何其他所選實施例所定義，c為1至4，且R¹¹及R¹²在每次出現時獨立地選自H或C₁-C₆烷基。在一例示性實施例中，c為1或4。水解之硫代丁二醯亞胺之「S」表示配位體(例如抗體)之硫原子。波形線指示與二級接合劑總成或藥物單元之鍵聯。在一例示性實施例中，波形線指示與以下二級接合劑總成之鍵聯：



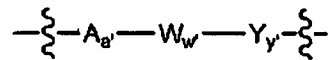
其中-A-為視情況選用之延伸子單元，下標a'為0或1；-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；且-Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標y'為0或1。應瞭解，一種以上(例如1至20種)藥物-接合劑可與各配位體連接。

在本發明之一些態樣中，自行穩定之接合劑總成可經歷巨環化以形成如下二內醯胺，其中R表示共軛物之其餘部分：



二級接合劑總成

視情況選用之二級接合劑可包含多種鍵聯基團。在包括特定敘述之實施例的本文所提供之各個實施例中， L^0 可存在且具有下式：



其中

- A-為視情況選用之延伸子單元，下標 a' 為0或1；
- W-為視情況選用之可裂解單元，下標 w' 為0或1；且
- Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標 y' 為0或1。

視情況選用之二級接合劑總成可為可釋放接合劑總成 L^R 。在彼等實施例中， w 為1。在一些其他態樣中，視情況選用之二級接合劑總成為非可釋放接合劑總成。在彼等實施例中， w 為0且藥物之釋放係經由總蛋白質降解路徑(亦即非可裂解路徑)。

配位體單元

在本發明的一些實施例中，存在配位體單元。配位體單元(L-)為特異性結合於標靶部分之靶向劑。配位體可特異性結合於細胞組分(細胞結合劑)或其他相關標靶分子。在一些態樣中，配位體單元用於將藥物單元遞送至與配位體單元相互作用之特定標靶細胞群體。配位體包括(但不限於)蛋白質、多肽及肽。適合配位體單元包括例如抗體

(例如全長抗體及其抗原結合片段)、干擾素、淋巴因子、激素、生長因子及群落刺激因子、維生素、養分轉運分子(諸如但不限於運鐵蛋白)或任何其他細胞結合分子或物質。在一些態樣中，配位體為非抗體蛋白質靶向劑。在一些態樣中，提供配位體-功能劑，其中D'為偵測單元或穩定性單元且配位體單元為蛋白質(例如非抗體蛋白質)。

在一些態樣中，配位體單元經由配位體之硫氫基與自行穩定之鹼性單元之順丁烯二醯亞胺形成一鍵，從而形成硫取代之丁二醯亞胺。硫氫基可存在於呈配位體之天然狀態(例如天然存在之殘基)之配位體上或可經由化學修飾引入配位體中。

關於生物共軛物已觀察到藥物共軛之位點可影響多個參數，包括共軛容易性、藥物-接合劑穩定性、對所得生物共軛物之生物物理學性質的影響及活體外細胞毒性。就藥物-接合劑穩定性而論，藥物-接合劑與配位體之共軛位點可影響共軛藥物-接合劑進行消除反應之能力，且對於藥物接合劑而言，可影響由生物共軛物之配位體轉移至存在於生物共軛物環境中之替代反應性硫醇(諸如白蛋白、游離半胱胺酸或麩胱甘肽(當在血漿中時)中之反應性硫醇)的能力。當在若使用非自行穩定之烷基順丁烯二醯亞胺(例如順丁烯二醯亞胺基-己醯基藥物接合劑)則對消除反應及藥物-接合劑之後續轉移敏感之位點處與硫醇殘基共軛時，使用本發明之自行穩定之接合劑尤其有益。該等位點包括例如鏈間二硫化物以及所選半胱胺酸工程改造位點。使用本發明之自行穩定之接合劑可提供穩定鍵聯及使多種藥物與各配位體單元連接之能力。

在一個態樣中，配位體單元具有一或多個可經化學修飾以引入一或多個硫氫基之離胺酸殘基。可用於修飾離胺酸之試劑包括(但不限於)S-乙醯基硫基乙酸N-丁二醯亞胺酯(SATA)及鹽酸2-亞胺基硫雜環戊烷(特勞特試劑(Traut's Reagent))。

在另一實施例中，配位體單元可具有一或多個可經化學修飾以具有一或多個硫氫基之碳水化合物基團。

在另一實施例中，配位體為抗體且藉由還原鏈間二硫化物產生硫氫基。因此，在一些實施例中，接合劑單元與經還原鏈間二硫化物之半胱胺酸殘基共軛。

在另一實施例中，硫氫基以化學方式例如藉由引入半胱胺酸殘基引入抗體中。因此，在一些實施例中，接合劑單元與所引入之半胱胺酸殘基共軛。

適用之非免疫活性蛋白、多肽或肽配位體包括(但不限於)運鐵蛋白、表皮生長因子(「EGF」)、鈴蟾素、胃泌素、胃泌素釋放肽、血小板衍生之生長因子、IL-2、IL-6、轉型生長因子(「TGF」)(諸如TGF- α 及TGF- β)、牛痘生長因子(「VGF」)、胰島素及胰島素樣生長因子I及II、生長抑素、凝集素及來自低密度脂蛋白之缺輔基蛋白。

尤佳配位體為抗體。適用多株抗體為衍生自免疫動物之血清的抗體分子之異質群體。適用單株抗體為針對特定抗原決定子(例如癌細胞抗原、病毒抗原、微生物抗原、蛋白質、肽、碳水化合物、化學品、核酸或其片段)之抗體的均質群體。針對相關抗原之單株抗體(mAb)可藉由使用為由連續細胞株在培養中產生抗體分子而提供之此項技術中已知之任何技術來製備。

適用單株抗體包括(但不限於)人類單株抗體、人類化單株抗體或嵌合人類-小鼠(或其他物種)單株抗體。抗體包括全長抗體及其抗原結合片段。人類單株抗體可藉由此項技術中已知之許多技術中之任一者來製備(例如Teng等人, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7308-7312; Kozbor等人, 1983, *Immunology Today* 4:72-79; 及Olsson等人, 1982, *Metk Enzymol* 92:3-16)。

抗體可為與標靶細胞(例如癌細胞抗原、病毒抗原或微生物抗原)

免疫特異性結合之抗體或與腫瘤細胞或基質結合之其他抗體的功能活性片段、衍生物或類似物。就此而言，「功能活性」意謂片段、衍生物或類似物能夠得到與衍生出該片段、衍生物或類似物之抗體識別相同的抗原之抗體個體基因型抗體。特定言之，在一例示性實施例中，免疫球蛋白分子之個體基因型之抗原性可藉由缺失構架及特異性識別抗原之CDR序列的C端CDR序列來增強。為確定哪些CDR序列結合抗原，可使用含有CDR序列之合成肽藉由此項技術中已知之任何結合分析方法(例如BIA核心分析)進行抗原結合分析(參見例如Kabat等人, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E等人, 1980, *J Immunology* 125(3):961-969)。

其他適用抗體包括抗體片段，諸如但不限於F(ab')₂片段、Fab片段、Fv、單鏈抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、scFv、scFv-Fv或具有與抗體相同之特異性的任何其他分子。

另外，可使用標準重組DNA技術製備之包含人類與非人類部分之重組抗體(諸如嵌合及人類化單株抗體)為適用抗體。嵌合抗體為不同部分衍生自不同動物物種之分子，諸如具有衍生自鼠類單株之可變區及人類免疫球蛋白恆定區之彼等分子。(參見例如美國專利第4,816,567號；及美國專利第4,816,397號，其以全文引用之方式併入本文中。)人類化抗體為來自非人類物種之抗體分子，其具有一或多個來自非人類物種之互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子之構架區。(參見例如美國專利第5,585,089號，其以全文引用的方式併入本文中。)該等嵌合及人類化單株抗體可藉由此項技術中已知之重組DNA技術產生，例如使用描述於以下中之方法：國際公開案第WO 87/02671號；歐洲專利公開案第0 184 187號；歐洲專利公開案第0 171 496號；歐洲專利公開案第0 173 494號；國際公開案第WO

86/01533號；美國專利第4,816,567號；歐洲專利公開案第012 023號；Berter等人, 1988, *Science* 240:1041-1043；Liu等人, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443；Liu等人, 1987, *J. Immunol* 139:3521-3526；Sun等人, 1987, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84:214-218；Nishimura等人, 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005；Wood等人, 1985, *Nature* 314:446-449；及Shaw等人, 1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80:1553-1559；Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207；Oi等人, 1986, *BioTechniques* 4:214；美國專利第5,225,539號；Jones等人, 1986, *Nature* 321:552-525；Verhoeyan等人, 1988, *Science* 239:1534；及Beidler等人, 1988, *J. Immunol* 141:4053-4060；其各自以全文引用的方式併入本文中。

完全人類抗體為尤其需要的且可使用不能表現內源性免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因但可表現人類重鏈及輕鏈基因之轉殖基因小鼠產生。

抗體包括類似物及衍生物，其均經修飾，亦即藉由共價連接任何類型之分子，只要該共價連接允許抗體保持其抗原結合免疫特異性即可。舉例而言(但不以限制方式)，抗體之衍生物及類似物包括已例如藉由糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、用已知保護/阻斷基團衍生化、蛋白水解分裂、與細胞抗體單元或其他蛋白質鍵聯等而經進一步修飾的彼等衍生物及類似物。許多化學修飾中之任一者均可藉由已知技術來進行，包括(但不限於)特異性化學裂解、乙醯化、甲醯化、在衣黴素存在下代謝合成等。另外，類似物或衍生物可含有一或多種非天然胺基酸。

抗體可在與Fc受體相互作用之胺基酸殘基中具有修飾(例如取代、缺失或添加)。特定言之，抗體可在經識別為參與抗-Fc域及FcRn受體之間的相互作用之胺基酸殘基中具有修飾(參見例如國際公開案

第WO 97/34631號，其以全文引用的方式併入本文中)。

抗體對癌細胞抗原之免疫特異性可在商業上獲得或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(諸如化學合成或重組表現技術)產生。編碼對癌細胞抗原具免疫特異性之抗體的核苷酸序列可例如自GenBank資料庫或與其類似之資料庫、文獻出版物或藉由常規選殖及測序獲得。

在一特定實施例中，可使用已知用於治療癌症之抗體。抗體對癌細胞抗原之免疫特異性可在商業上獲得或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(諸如重組表現技術)產生。編碼對癌細胞抗原具免疫特異性之抗體的核苷酸序列可例如自GenBank資料庫或與其類似之資料庫、文獻出版物或藉由常規選殖及測序獲得。

在另一特定實施例中，根據本發明之組合物及方法使用用於治療自體免疫疾病之抗體。對負責產生自體免疫抗體之細胞的抗原具免疫特異性之抗體可獲自任何組織(例如大學科學家或公司)或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(諸如化學合成或重組表現技術)產生。在另一實施例中，適用抗體對治療自體免疫疾病具免疫特異性，包括(但不限於)抗-核抗體；抗-ds DNA；抗-ss DNA；抗-心磷脂抗體IgM、IgG；抗-磷脂抗體IgM、IgG；抗-SM抗體；抗-粒線體抗體；甲狀腺抗體；微粒體抗體；甲狀腺球蛋白抗體；抗-SCL-70抗體；抗-Jo抗體；抗-U₁RNP抗體；抗-La/SSB抗體；抗-SSA；抗-SSB抗體；抗-壁細胞抗體；抗-組蛋白抗體；抗-RNP抗體；C-ANCA抗體；P-ANCA抗體；抗-著絲點抗體；抗-纖維蛋白抗體及抗-GBM抗體。

在某些實施例中，適用抗體可與表現於活化淋巴細胞上之受體或受體複合物結合。受體或受體複合物可包含免疫球蛋白基因超家族成員、TNF受體超家族成員、整合素、細胞因子受體、趨化因子受體、主要組織相容性蛋白、凝集素或補體控制蛋白。適合免疫球蛋白超家族成員之非限制性實例為CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、

CD20、CD22、CD28、CD30、CD70、CD79、CD90、CD152/CTLA-4、PD-1及ICOS。適合TNF受體超家族成員之非限制性實例為CD27、CD40、CD95/Fas、CD134/OX40、CD137/4-1BB、TNF-R1、TNFR-2、RANK、TACI、BCMA、骨保護素、Apo2/TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4及APO-3。適合整合素之非限制性實例CD11a、CD11b、CD11c、CD18、CD29、CD41、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD103及CD104。適合凝集素之非限制性實例為C型、S型及I型凝集素。

藥物單元D

藥物單元(D)可為任何細胞毒性藥物、細胞生長抑制藥物或免疫抑制藥物，在本文中亦稱為細胞毒性劑、細胞生長抑制劑或免疫抑制劑。藥物單元具有可與接合劑單元形成一鍵之原子。在一些實施例中，藥物單元D具有可與接合劑單元形成一鍵之氮原子。在其他實施例中，藥物單元D具有可與接合劑單元形成一鍵之羧酸。在其他實施例中，藥物單元D具有可與接合劑單元形成一鍵之硫氫基。在其他實施例中，藥物單元D具有可與接合劑單元形成一鍵之羥基或酮。

適用類別之細胞毒性劑或免疫抑制劑包括例如抗微管蛋白劑、奧瑞他汀、DNA小溝結合劑、DNA複製抑制劑、烷基化劑(例如鉑複合物，諸如順鉑、單(鉑)、雙(鉑)及三-核鉑複合物及卡鉑)、蔥環黴素、抗生素、抗葉酸劑、抗代謝物、化學療法增感劑、倍癌黴素、依托泊苷(etoposide)、氟化嘧啶、離子載體、萊克希托普森(lexitropsin)、亞硝基脲、順氯氨鉑(platinol)、預成型化合物、嘌呤抗代謝物、嘌呤黴素(puromycin)、輻射增感劑、類固醇、紫杉烷、拓撲異構酶抑制劑、長春花屬生物鹼或其類似物。適用類別之細胞毒性劑之實例尤其包括例如DNA小溝結合劑、DNA烷基化劑及微管蛋白抑制劑。例示性細胞毒性劑包括例如奧瑞他汀、喜樹鹼、倍癌黴素、依

托泊苷、美登素(maytansine)及類美登素(例如DM1及DM4)、紫杉烷、苯并二氮呋(例如吡咯并[1,4]苯并二氮呋(PBD)、吲哚啉并苯并二氮呋及噁唑啉并苯并二氮呋)及長春花屬生物鹼。含有藥物之所選苯并二氮呋描述於WO 2010/091150、WO 2012/112708、WO 2007/085930及WO 2011/023883中。

個別細胞毒性劑或免疫抑制劑包括例如雄性激素、安醯黴素(anthracycline)(AMC)、天冬醯胺酶、5-氮雜胞嘧啶核苷、硫唑嘌呤、博萊黴素(bleomycin)、白消安(busulfan)、丁硫胺酸磺醯亞胺、刺孢黴素、喜樹鹼、卡鉑、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)、CC-1065、苯丁酸氮芥、順鉑、秋水仙鹼、環磷醯胺、阿糖胞苷、胞嘧啶核苷阿拉伯糖苷、細胞遲緩素B、達卡巴嗪(dacarbazine)、放線菌素(先前為放射菌素)、道諾黴素(daunorubicin)、達卡巴嗪(decarbazine)、多西他賽(docetaxel)、小紅莓、依託泊苷、雌性激素、5-氟脫氧尿苷、5-氟尿嘧啶、吉西他濱(gemcitabine)、短桿菌素D、羥基脲、艾達黴素(idarubicin)、異環磷醯胺、伊立替康(irinotecan)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、美登素、氮芥、美法侖(melphalan)、6-巯基嘌呤、甲胺嘌呤、光神黴素、絲裂黴素C、米托蒽醌(mitoxantrone)、硝基咪唑、太平洋紫杉醇、岩沙海葵毒素、普卡黴素、丙卡巴肼、根黴素、鏈佐黴素、特諾波賽(tenoposide)、6-硫鳥嘌呤、噻替派(thioTEPA)、拓朴替康(topotecan)、長春鹼、長春新鹼、長春瑞濱(vinorelbine)、VP-16及VM-26。

在一些典型實施例中，適合細胞毒性劑包括例如DNA小溝結合劑(例如烯二炔及萊克希托普森、CBI化合物；亦參見美國專利第6,130,237號)、倍癌黴素(參見美國公開案第20060024317號)、紫杉烷(例如太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇)、嘌呤黴素、長春花屬生物鹼、CC-1065、SN-38、拓朴替康、(N-嗎啉基)-小紅莓、根黴素、氰基(N-

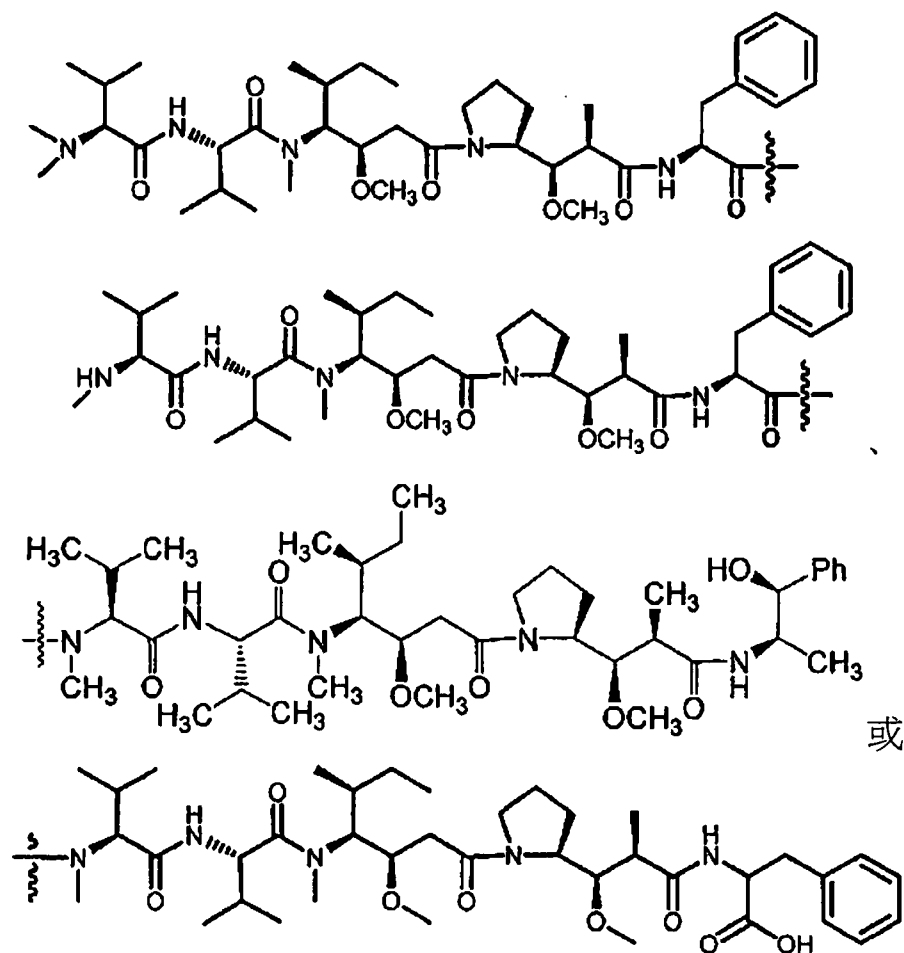
嗎啉基)-小紅莓、棘黴素、考布他汀(combretastatin)、紡錘菌素、埃坡黴素(epothilone) A及B、雌莫司汀(estramustine)、克瑞普托非森(cryptophysin)、西馬多丁(cemadotin)、類美登素、迪斯德莫來(discodermolide)、艾榴素(eleutherobin)及米托蒽醌(mitoxantrone)。

在一些實施例中，藥物單元為抗-微管蛋白劑。抗-微管蛋白劑之實例包括(但不限於)紫杉烷(例如Taxol®(太平洋紫杉醇)、Taxoterc®(多烯紫杉醇))、T67 (Tularik)及長春花屬生物鹼(例如長春新鹼、長春鹼、長春地辛(vindesine)及長春瑞濱)。其他抗微管蛋白劑包括例如漿果赤黴素衍生物、紫杉烷類似物(例如埃坡黴素A及B)、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙鹼及秋水醯胺(colcimid)、雌莫司汀、克瑞普托非森、西馬多丁、類美登素、考布他汀、迪斯德莫來及艾榴素。

在某些實施例中，細胞毒性劑為美登素或類美登素(另一組抗-微管蛋白劑)。(ImmunoGen, Inc.; 亦參見Chari等人, 1992, *Cancer Res.* 52:127-131及美國專利第8,163,888號)。

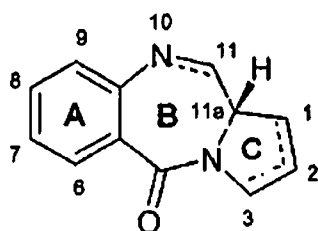
在一些實施例中，藥物單元為奧瑞他汀。奧瑞他汀包括(但不限於)AE、AFP、AEB、AEVB、MMAF及MMAE。奧瑞他汀之合成及結構描述於美國專利申請公開案第2003-0083263號、第2005-0238649號、第2005-0009751號、第2009-0111756號及第2011-0020343號；國際專利公開案第WO 04/010957號、國際專利公開案第WO 02/088172號及美國專利第7,659,241號及第8,343,928號中；其各自以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中。本發明之例示性奧瑞他汀結合微管蛋白且對所需細胞株發揮細胞毒性或細胞生長抑制作用。

例示性奧瑞他汀藥物單元具有下式或其醫藥學上可接受之鹽，其中波形線指示與接合劑單元連接之位點：



在一些實施例中，藥物為苯并二氮呋(包括含有藥物之苯并二氮呋，例如吡咯并[1,4]苯并二氮呋(PBD)、吲哚啉并苯并二氮呋及噁唑啉并苯并二氮呋)。

PBD具有以下通式結構：



但取代基之數目、類型及位置；其芳族A環及吡咯并C環及C環之飽和度可不同。在B環中，在N10-C11位置處存在亞胺(N=C)、甲醇胺(NH-CH(OH))或甲醇胺甲醚(NH-CH(OMe))，其為負責烷化DNA之親電子中心。所有已知天然產物在對掌性C11a位置處均具有(S)組態，當由C環朝向A環查看時，該(S)組態為其提供右旋扭轉。此為其提供關於B形式DNA之小溝的等螺旋性之適當三維形狀，從而在結合位點

處產生緊密貼合。PBD在小溝中形成加合物之能力使其能夠干擾DNA加工，因此其用作抗腫瘤劑。此等分子之生物活性可藉由例如使兩個PBD單元經由其C8/C'-羥基官能基經由可撓性伸烷基接合劑連接在一起來增強。認為PBD二聚體形成序列選擇性DNA損傷，諸如被認為主要負責其生物活性之倒序5'-Pu-GATC-Py-3'股間交聯。

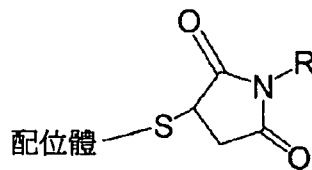
存在多種可用於確定配位體-藥物共軛物是否對細胞株施加細胞生長抑制或細胞毒性作用之不同分析。在一個用於確定配位體-藥物共軛物是否對細胞株施加細胞生長抑制或細胞毒性作用之實例中，使用胸苷併入分析。舉例而言，在96孔培養板上以每孔5,000個細胞之密度培養細胞72小時時期且使細胞在72小時時期之最後8小時期間曝露於0.5 μCi 之 ^3H -胸苷，且在存在及不存在配位體-藥物共軛物下量測 ^3H -胸苷併入至培養物之細胞中之情況。若培養物之細胞與在相同條件下培養但不與配位體-藥物共軛物接觸之相同細胞株之細胞相比具有降低之 ^3H -胸苷併入，則配位體-藥物共軛物對細胞株具有細胞生長抑制或細胞毒性作用。

在另一實例中，為確定配位體-藥物共軛物是否對細胞株施加細胞生長抑制或細胞毒性作用，藉由測定細胞中染料(諸如中性紅、錐蟲藍或ALAMAR™藍)之吸收來量測細胞生存力(參見例如Page等人, 1993, *Intl. J. of Oncology* 3:473-476)。在該種分析中，在含有染料之培養基中培育細胞，洗滌細胞，且以分光光度法量測剩餘染料，其反映細胞對染料之吸收。亦可使用蛋白質結合染料磺醯羅丹明B (SRB)來量測細胞毒性(Skehan等人, 1990, *J. Nat'l Cancer Inst.* 82:1107-12)。較佳配位體-藥物共軛物包括對細胞株具有小於1000 ng/ml、較佳小於500 ng/ml、更佳小於100 ng/ml、甚至最佳小於50或甚至小於10 ng/ml之 IC_{50} 值(定義為提供50%細胞殺死之mAB濃度)的彼等配位體-藥物共軛物。

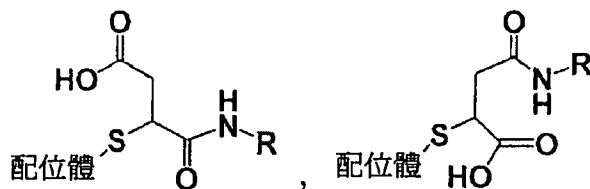
使藥物與接合劑鍵聯之一般程序為此項技術中已知的。參見例如美國專利第8,163,888號、第7,659,241號、第7,498,298號、美國公開案第US20110256157號及國際申請案第WO2011023883號及第WO2005112919號。

M¹-丁二醯亞胺

經由硫醚鍵聯與配位體單元共軛之非水解之丁二醯亞胺(在本文中亦稱為丁二醯亞胺環)可如下表示，其中R表示接合劑單元中視情況與藥物單元、偵測單元或穩定性單元共軛之其餘部分：



經由硫醚鍵聯與配位體單元共軛之水解之丁二醯亞胺(在本文中亦稱為水解之丁二醯亞胺環)可表示為如下其兩種位置異構體之一，其中R表示接合劑單元中視情況與藥物單元、偵測單元或穩定性單元共軛之其餘部分：

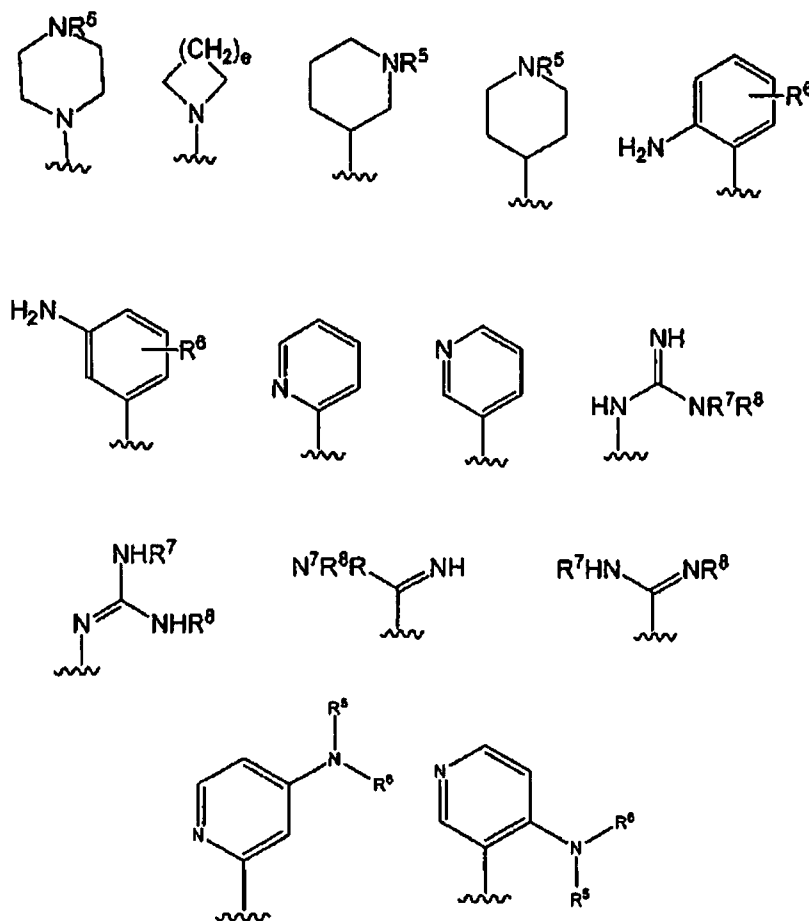


對於非水解之丁二醯亞胺及水解之丁二醯亞胺表示，應瞭解，存在1至20、較佳1至12、1至10或1至8種與各配位體共軛之自行穩定之接合劑。在一些態樣中，存在1至20、較佳1至12、1至10或1至8種與各配位體共軛之藥物-接合劑。另外，對於不連接配位體之本文所述之共軛物，丁二醯亞胺呈如順丁烯二醯亞胺之不飽和形式(能夠與硫醇或配位體反應)。

鹼性單元

在式I以及包含自行穩定之接合劑之其他式子(L^{SS})中，鹼性單元

(BU)基本上可為能夠促進氫氧根離子(或水)進攻以使附近丁二醯亞胺基團水解之任何鹼。因此，BU表示任何「鹼」，但通常為包含繫栓之胺或含氮雜環的基團；該胺或含氮雜環充當鹼性單元之鹼。代表性胺包括 $-N(R^3)(R^4)$ ，其中 R^3 及 R^4 係獨立地選自H或 C_{1-6} 烷基，較佳為H或甲基；



其中 R^5 、 R^6 、 R^7 及 R^8 在每次出現時係獨立地選自氫或 C_{1-6} 烷基，較佳為H或甲基，且 e 為0-4。在上式中，波形線指示與繫栓基團(通常為伸烷基接合劑 $-(C(R^9)(R^{10}))_x-$ ，其中下標 x 為0至6 (或1至6)之整數，其限制條件為若 x 為0，則在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子，且 R^9 及 R^{10} 獨立地選自H或 C_{1-3} 烷基)連接之點。在一些態樣中，伸烷基接合劑為 $-(CH_2)_x-$ ，其中下標 x 為0至6 (或1至6)之整數，其限制條件為若 x 為0，則在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子

之間存在不小於2個介入原子。下標x較佳為0至4、1至4或1至3或2至3或2至4，但亦可為0、1、2、3或4。因此，在一些實施例中，鹼性單元將選自由以下組成之群： $-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^a$ 及 $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^a_2$ ，其中x為0至4、1至4或1至3或2至3或2至4之整數，但亦可為0、1、2、3或4，且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。在較佳態樣中，鹼性單元之鹼將為含氮鹼。

水解增強劑(HE)及拉電子基團

式I以及包含自行穩定之接合劑之其他式子(L^{SS})之水解增強劑(HE)基本上可為能夠促進附近丁二醯亞胺基團之水解的任何拉電子基團。水解進一步藉由幫助氫氧根離子(或水)進攻以使附近丁二醯亞胺基團水解；或使得附近丁二醯亞胺基團對水解較敏感之鹼性單元(BU)來促進。因此，HE可包括由反應中心向外拉電子之官能基。例示性拉電子基團包括(但不限於) $-\text{C}(=\text{O})$ 、 $(=\text{O})$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CX}_3$ 、 $-\text{X}$ 、 $-\text{COOR}$ 、 $-\text{CONR}_2$ 、 $-\text{COR}$ 、 $-\text{COX}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NHR}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_2$ 、 $-\text{PO}_3\text{R}_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{CH}_3)\text{NHR}$ 、 NO 、 $-\text{NR}_3^+$ 、 $-\text{CR}=\text{CR}_2$ 及 $-\text{C}\equiv\text{CR}$ ，其中X為F、Br、Cl或I，且R在每次出現時係獨立地選自由氫及 C_{1-6} 烷基組成之群。例示性拉電子基團亦可包括芳基(例如苯基)及某些雜芳基(例如吡啉)。術語「拉電子基團」包括經拉電子基團進一步取代之芳基或雜芳基。

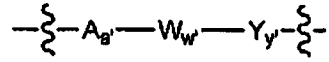
在一些實施例中，HE包含羰基、磺醯基或磷醯基部分。在一些實施例中，水解增強劑(HE)為 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 。

在HE與二級接合劑總成或藥物單元或穩定性單元或偵測單元直接鍵聯之一些實施例中，HE將包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成或藥物單元連接之反應性位點。在一些態樣中，拉電子基團本

身將充當拉電子基團與用於與視情況選用之二級接合劑總成或藥物單元連接之反應性位點(例如-C(=O)-)。

視情況選用之二級接合劑總成(L⁰)

如上文所提及，視情況選用之二級接合劑總成可由下式表示：

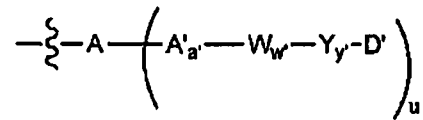


其中-A-為視情況選用之延伸子單元，下標a'為0或1；-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；且-Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標y'為0或1。與視情況選用之延伸子單元相鄰之波形線指示與自行穩定之接合劑總成連接之位點，且與視情況選用之間隔子單元相鄰之波形線指示與藥物單元連接之位點。

使藥物單元、偵測單元或穩定性單元與配位體單元鍵聯之一般方法為此項技術中已知的且此項技術中已知之接合劑可適合於與自行穩定之接合劑總成一起使用或使用本文所述之教示經修飾以包括鹼性組成部分及/或拉電子基團。舉例而言，當前奧瑞他汀及美登素ADC處於治療癌症之臨床進展中。單甲基奧瑞他汀E經由蛋白酶可裂解肽接合劑與抗體共軛，單甲基奧瑞他汀F經由順丁烯二醯亞胺基己酸與抗體直接共軛，DM1經由二硫化物或直接經由異型雙官能SMCC接合劑共軛，且DM4經由二硫化物接合劑共軛。此等接合劑系統可適合於與自行穩定之接合劑總成一起使用或使用本文所述之教示經修飾以包括鹼性組成部分及/或拉電子基團且視所用接合劑系統而定藉由可裂解或非可裂解系統提供藥物釋放。雙硫鍵、硫醚鍵、肽鍵、胍鍵、酯鍵或胺基甲酸酯鍵為可用於使藥物單元與接合劑單元連接之鍵的所有實例。延伸子單元、可裂解單元及間隔子單元更詳細地描述於下文中。

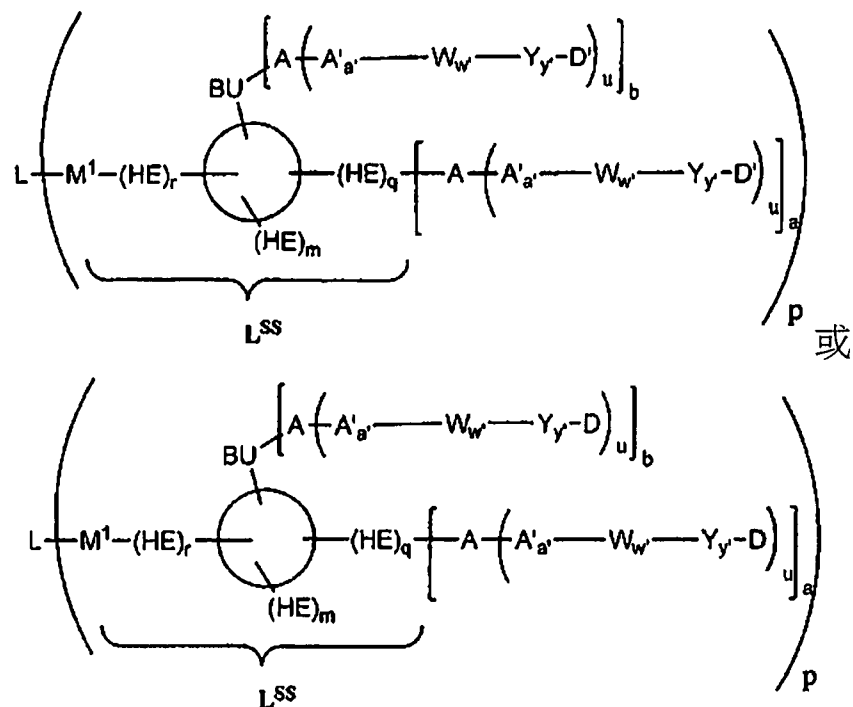
本發明內亦涵蓋分支鏈接合劑。因此，在一個態樣中，以允許例如一種以上藥物單元或偵測單元或穩定性單元之連接在接合劑單元

內分支至如由下式表示之各自行穩定之接合劑總成之方式設計延伸子單元：



其中波形線指示與自行穩定之接合劑總成連接之位點，-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；-Y-為視情況選用之間隔子單元，下標y'為0或1，u為2至20（較佳2至10）；A為延伸子單元，A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；且a'為0或1。A'、W、Y及D'各自可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與延伸子單元(A或A')連接。在一些態樣中，D'為藥物單元D。

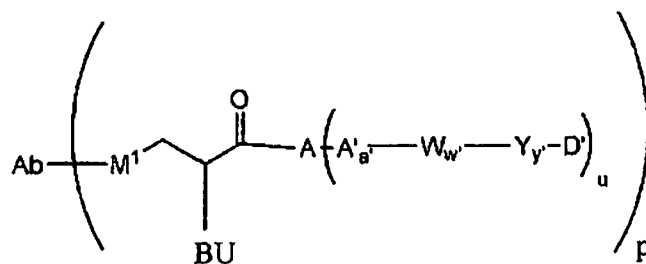
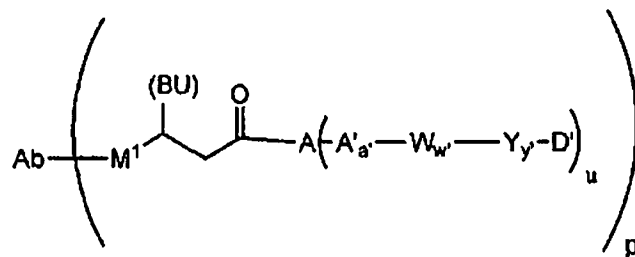
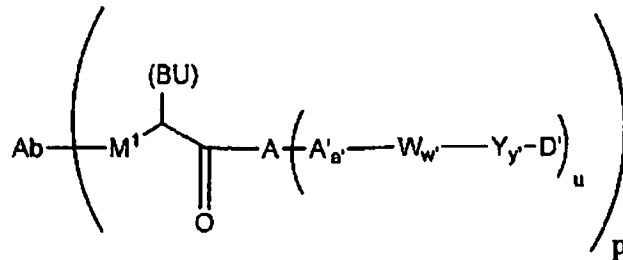
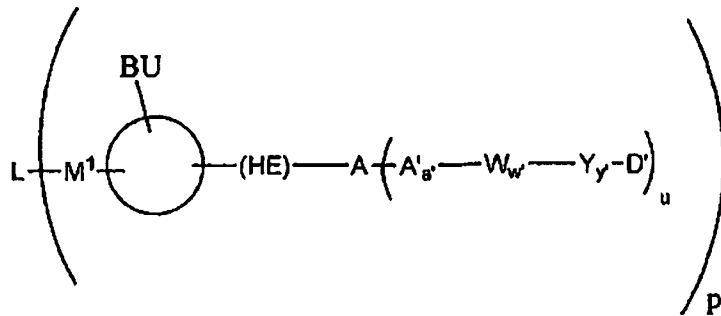
具有分支鏈或非分支鏈接合劑之例示性配位體-功能劑共軛物或配位體-藥物共軛物具有下式：



或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)，其中L、M¹、HE、BU、D'及下標p、a、b、m、q及r各自具有關於式I及關於式I之所選實施例中之任一者所提供之含義，D為藥物單元，圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈

伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與A、W、Y或D'(或視情況而定為D)連接之反應性位點；-W-為視情況選用之可裂解單元，下標 w' 為0或1；-Y-為視情況選用之間隔子單元，下標 y' 為0或1，A為延伸子單元，A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分； a' 為0或1；且 u 為1至20（較佳1至10），其中當 u 為2至20時，A存在，且當 u 為1時，A可存在或不存在。各A'、W、Y及D'(或視情況而定為D)可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與延伸子單元(A或A')連接。在一些態樣中， w' 為1。在一些態樣中， w' 為1且 a' 為0。在接合劑不為分支鏈之態樣中， u 為1且 a' 為0。在接合劑為分支鏈之其他態樣中， u 為2至20（較佳2至10）。在各個此等所選實施例中，圓圈可表示骨架，即 C_{1-8} 伸烷基或 C_{1-8} 伸雜烷基（較佳 C_{1-4} 伸烷基或 C_{1-4} 伸雜烷基）或 C_{1-3} 伸烷基或 C_{1-3} 伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈。

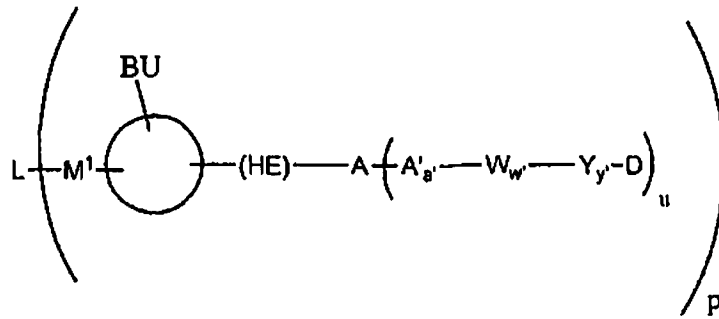
具有分支鏈或非分支鏈接合劑之配位體-功能劑共軛物可由下式或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：

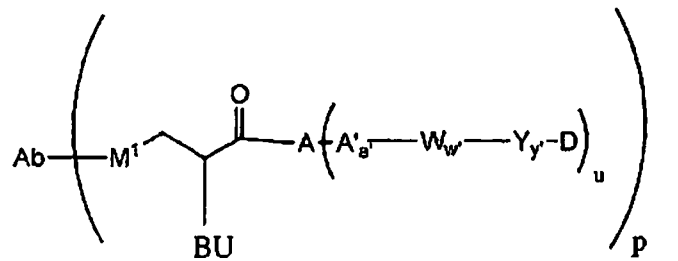
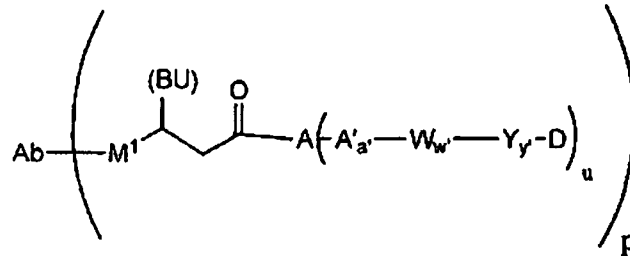
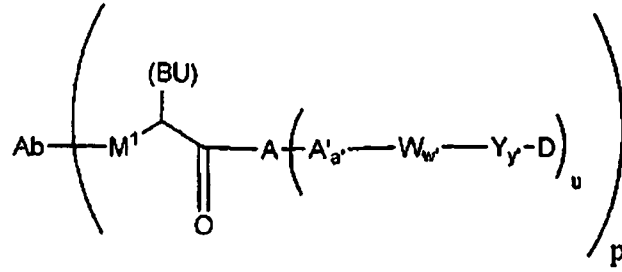


其中L、M¹、HE、BU、D'及下標p各自具有關於式I及關於式I之所選實施例中之任一者所提供之含義，圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與A、W、Y或D'連接之反應性位點，-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；-Y-為視情況選用之間隔子單元，下標y'為0或1，A為延伸子單元，A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；a'為0或1；且u為1至20（較佳1至10），其中當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。各A'、W、Y及D'可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與延伸子

單元(A或A')連接。在一些態樣中，w'為1。在一些態樣中，w'為1且a'為0。在接合劑不為分支鏈之態樣中，u為1，a'為0，且A可存在或不存在。在接合劑為分支鏈之其他態樣中，u為2至20 (較佳2至10)。在一些較佳實施例中，BU係選自由以下組成之群： $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中x為0-4之整數，且各R^a獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件為在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)之氮原子之間存在不小於2個介入原子。在一些該等態樣中，X為0-4且各R^a為C₁₋₆烷基。

具有分支鏈或非分支鏈接合劑之配位體-藥物共軛物可由下式或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：

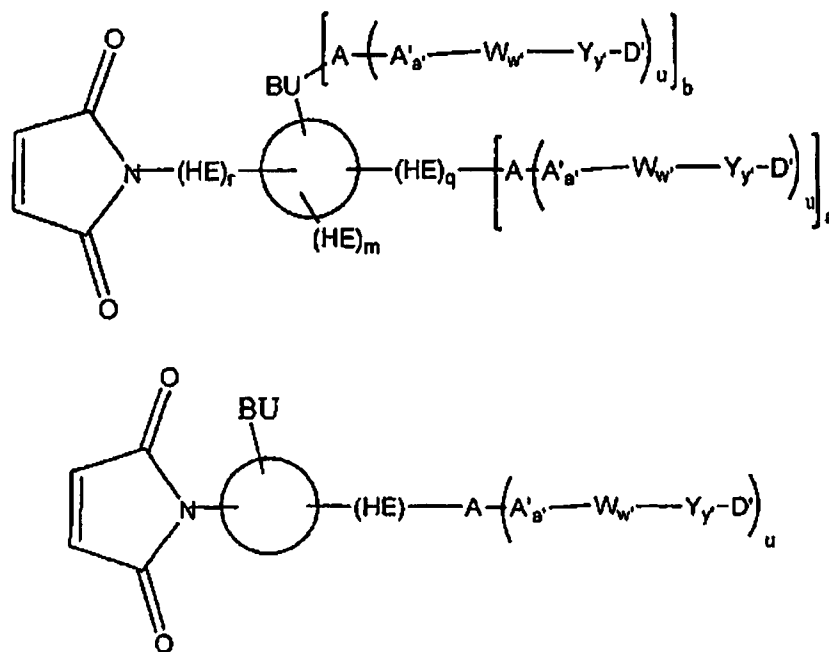




其中L、M¹、HE、BU及下標p各自具有關於式I及關於式I之所選實施例中之任一者所提供之含義，D為藥物單元，圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與A、W、Y或D連接之反應性位點，-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；-Y-為視情況選用之間隔子單元，下標y'為0或1，A為延伸子單元，A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；a'為0或1；且u為1至20（較佳1至10），其中當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。各A'、W、Y及D可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與延伸子單元(A或A')連接。在一些態樣中，w'為1。在一些態樣中，w'為1且a'為0。在接合劑不為分支鏈之態樣中，u為1，a'為0，且A可存在或不存在。在接合劑為分支鏈之其他態樣中，u為2至20（較佳2

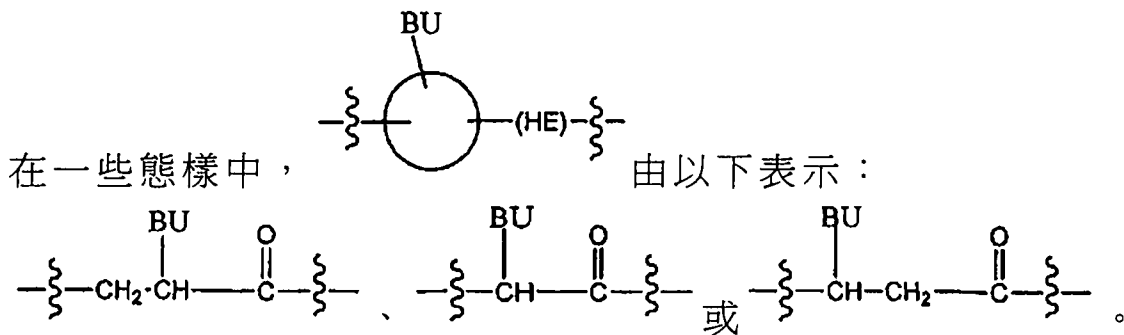
至 10)。在一些較佳實施例中，BU 係選自由以下組成之群：- $(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^a$ 及 $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^a_2$ ，其中 x 為 0-4 之整數，且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件為在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)之氮原子之間存在不小於 2 個介入原子。在一些該等態樣中， x 為 0-4 且各 R^a 為 C_{1-6} 烷基。

具有分支鏈或非分支鏈接合劑之功能劑-接合劑共軛物可由下式或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：



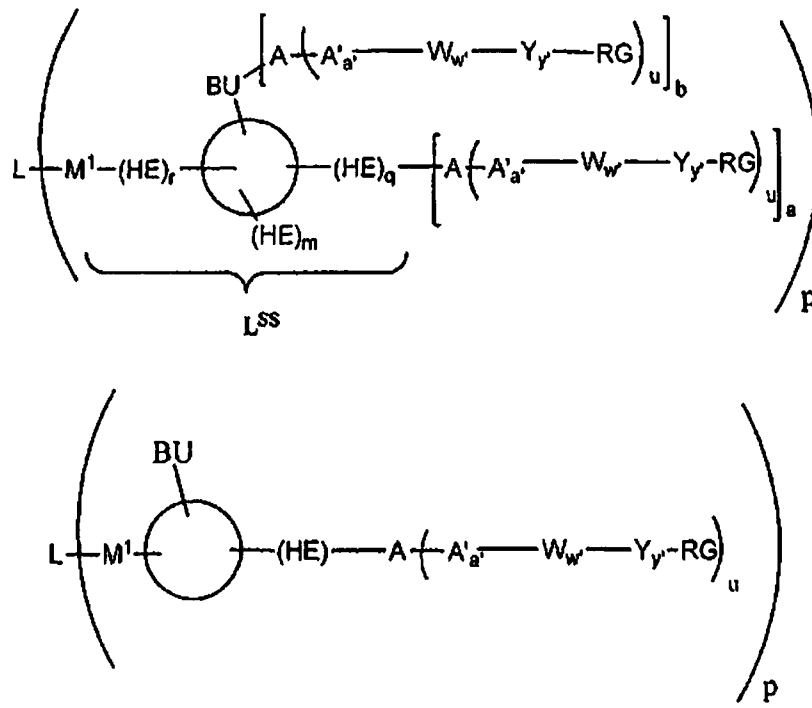
其中 HE、BU、 D' 及下標 p 、 a 、 b 、 m 、 q 及 r 各自具有關於式 I 及關於式 I 之所選實施例中之任一者所提供之含義，圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與 A、W、Y 或 D' 連接之反應性位點，-W- 為視情況選用之可裂解單元，下標 w' 為 0 或 1；-Y- 為視情況選用之間隔子單元，下標 y' 為 0 或 1，A 為延伸子單元， A' 為位於 A 末端之視情況選用之延伸子單元組成部分； a' 為 0 或 1；且 u 為 1 至 20 (較佳 1 至 10)，其中當 u 為 2 至 20 時，A 存在，且當 u 為 1 時，A 可存在或不存在。各 A' 、W、Y 及 D' 可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與

延伸子單元(A或A')連接。在一些態樣中，w'為1。在一些態樣中，w'為1且a'為0。在接合劑不為分支鏈之態樣中，u為1，a'為0，且A可存在或不存在。在接合劑為分支鏈之其他態樣中，u為2至20 (較佳2至10)。在各個此等所選實施例中，圓圈可表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)或C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈。在各個此等所選實施例中，D'可為D。



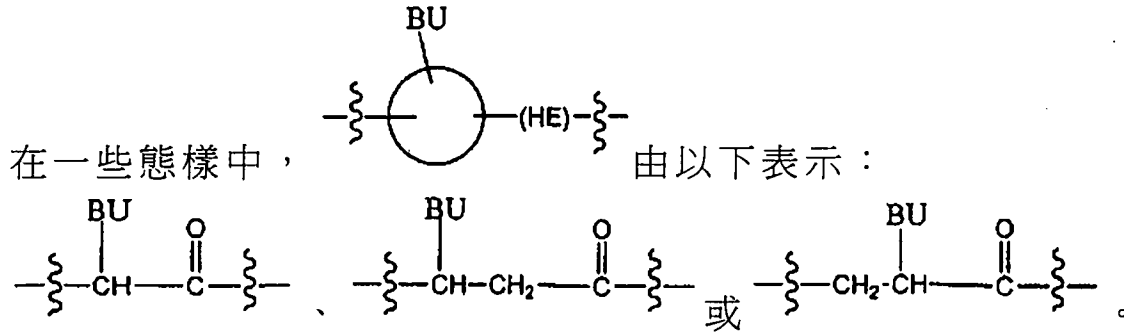
在一些該等態樣中，D'為D。在一些較佳實施例中，BU係選自由以下組成之群： $-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^a$ 及 $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^a_2$ ，其中x為0-4之整數，且各R^a獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件為在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)之氮原子之間存在不小於2個介入原子。在一些該等態樣中，X為0-4且各R^a為C₁₋₆烷基。

具有分支鏈或非分支鏈接合劑之配位體-接合劑共軛物可由下式或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：



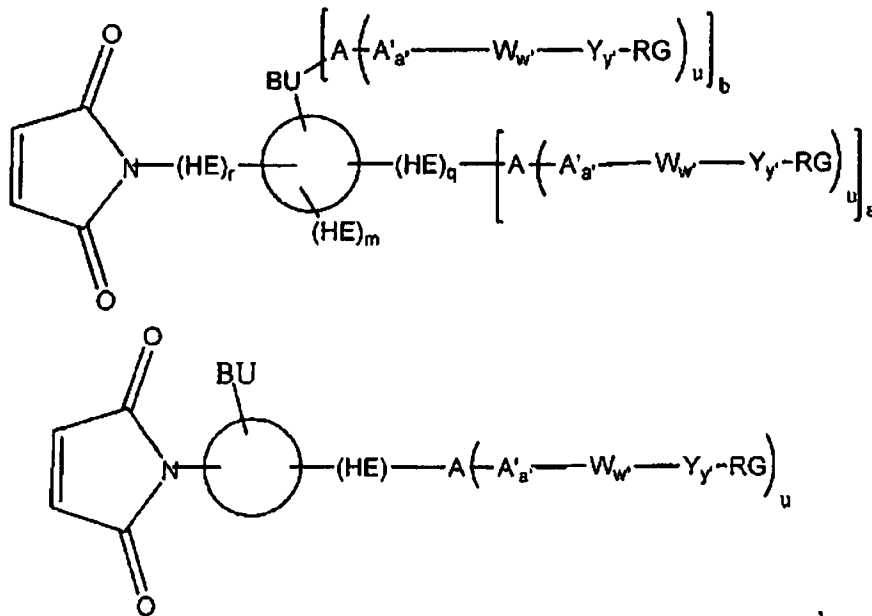
其中L、M¹、HE、BU及下標p、a、b、m、q及r各自具有關於式I及關於式I之所選實施例中之任一者所提供之含義，圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與A、W、Y或D連接之反應性位點；RG為適合於連接藥物單元(或者偵測單元或穩定性單元)之位於 $\begin{matrix} \xi \\ \text{---} \\ \xi \end{matrix} A-A'_{a'}-W_{w'}-Y_{y'}-\begin{matrix} \xi \\ \text{---} \\ \xi \end{matrix}$ 末端之反應性基團(包含反應性位點)，W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；-Y-為視情況選用之間隔子單元，下標y'為0或1，A為延伸子單元，A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；a'為0或1；且u為1至20(較佳1至10)，其中當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。各A'、W、Y及D可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與延伸子單元(A或A')連接。在一些態樣中，w'為1。在一些態樣中，w'為1且a'為0。在接合劑不為分支鏈之態樣中，u為1，a'為0，且A可存在或不存在。在接合劑為分支鏈之其他態樣中，u為2至20(較佳2至10)。在各個此等所選實施例中，圓圈可表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)或C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在

一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈。



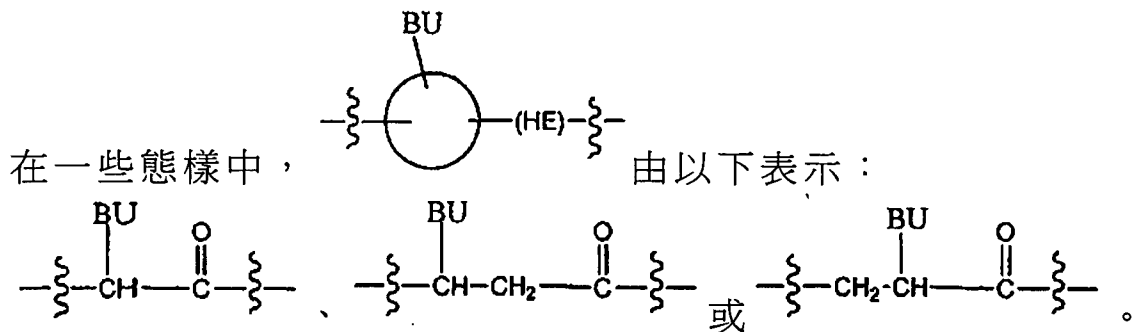
在一些較佳實施例中，BU係選自由以下組成之群： $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中x為0-4之整數，且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件為在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)之氮原子之間存在不小於2個介入原子。在一些該等態樣中，X為0-4且各 R^a 為 C_{1-6} 烷基。

分支鏈或非分支鏈接合劑可由下式或其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)表示：



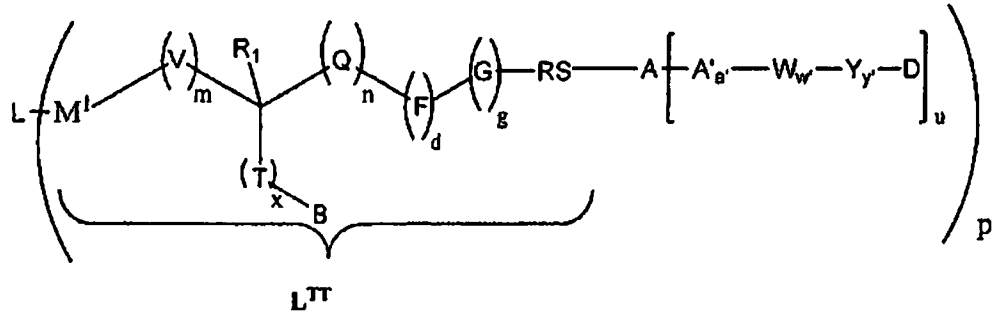
其中骨架、HE、BU及下標a、b、m、q及r各自具有關於式I及關於式I之所選實施例中之任一者所提供之含義，圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與A、W、Y或D連接之反應性位點；RG為適合於連接藥

物單元(或者偵測單元或穩定性單元)之位於 $-\xi-A-A_{a'}-W_w-Y_{y'}-\xi-$ 末端之反應性基團(包含反應性位點), W-為視情況選用之可裂解單元, 下標 w' 為 0 或 1; -Y- 為視情況選用之間隔子單元, 下標 y' 為 0 或 1, A 為延伸子單元, A' 為位於 A 末端之視情況選用之延伸子單元組成部分; a' 為 0 或 1; 且 u 為 1 至 20 (較佳 1 至 10), 其中當 u 為 2 至 20 時, A 存在, 且當 u 為 1 時, A 可存在或不存在。各 A'、W、Y 及 D 可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與延伸子單元(A 或 A') 連接。在一些態樣中, w' 為 1。在一些態樣中, w' 為 1 且 a' 為 0。在接合劑不為分支鏈之態樣中, u 為 1, a' 為 0, 且 A 可存在或不存在。在接合劑為分支鏈之其他態樣中, u 為 2 至 20 (較佳 2 至 10)。在各個此等所選實施例中, 圓圈可表示骨架, 即 C₁₋₈ 伸烷基或 C₁₋₈ 伸雜烷基(較佳 C₁₋₄ 伸烷基或 C₁₋₄ 伸雜烷基)或 C₁₋₃ 伸烷基或 C₁₋₃ 伸雜烷基。在一些該等態樣中, 伸烷基為直鏈或分支鏈。



在一些較佳實施例中, BU 係選自由以下組成之群: $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$, 其中 x 為 0-4 之整數, 且各 R^a 獨立地選自由 C₁₋₆ 烷基及 C₁₋₆ 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基, 其限制條件為在鹼性單元之鹼與丁二醯亞胺(水解或非水解)之氮原子之間存在不小於 2 個介入原子。在一些該等態樣中, X 為 0-4 且各 R^a 為 C₁₋₆ 烷基。

在一些其他態樣中, 具有分支鏈或非分支鏈接合劑之例示性配位體-藥物共軛物具有下式:



或其醫藥學上可接受之鹽，其中L、M^I、V、R¹、T、B、Q、F、G及RS以及下標p、m、x、n、d及g各自具有關於式III及關於式III之所選實施例中之任一者所提供之含義，L為配位體單元，W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；-Y-為視情況選用之間隔子單元，下標y'為0或1，A為延伸子單元，A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；a'為0或1；且u為1至20（較佳1至10），其中當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。各A'、W、Y及D可相同或不同。各可裂解單元可經由延伸子單元上之相同或不同官能基與延伸子單元(A或A')連接。在一些態樣中，w'為1。在一些態樣中，w'為1且a'為0。在接合劑不為分支鏈之態樣中，u為1，a'為0，且A可存在或不存在。在接合劑為分支鏈之其他態樣中，u為2至20（較佳2至10）。

延伸子單元、可裂解單元及間隔子單元更詳細地描述於下文中。

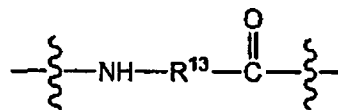
延伸子單元

延伸子單元(-A-)(當存在時)延伸接合劑單元之構架以在自行穩定之接合劑總成與藥物單元之間提供較大距離。延伸子單元能夠使自行穩定之接合劑總成與可裂解單元(當可裂解單元存在時)、自行穩定之接合劑總成與間隔子單元(當可裂解單元不存在但間隔子單元存在時)及自行穩定之接合劑總成與藥物單元(當可裂解單元與間隔子單元均不存在時)鍵聯。如所描述，延伸子單元能夠與一種以上可裂解單

元、間隔子單元及/或藥物單元連接。

延伸子單元亦可用於改變藥物-接合劑之物理化學性質，視延伸子單元之組分而定。在一些態樣中，將添加延伸子單元以便增加藥物-接合劑之溶解性且延伸子單元將包含一種或多種溶解性增強基團，諸如離子基團或水溶性聚合物。水溶性物通常包括在室溫下可溶於水中之任何區段或聚合物，且包括聚(乙)二醇基團以及其他聚合物，諸如聚伸乙基亞胺。

延伸子單元可包含一種或多種延伸子基團。例示性延伸子基團包括例如-NH-C₁-C₁₀伸烷基-、-NH-C₁-C₁₀伸烷基-NH-C(O)-C₁-C₁₀伸烷基-、-NH-C₁-C₁₀伸烷基-C(O)-NH-C₁-C₁₀伸烷基-、-NH-(CH₂CH₂O)_s-、-NH-(CH₂CH₂O)_s-CH₂-、-NH-(CH₂CH₂NH)_s-(CH₂)_s、-NH-(CH₂CH₂NH)_s-(CH₂)_s-NH-C(O)-(CH₂)_s、-NH-(C₃-C₈碳環基)-、-NH-(伸芳基)-及-NH-(C₃-C₈雜環基)-，其中各s獨立地為1-10。具有用於與接合劑單元或藥物單元之其餘部分鍵聯之羰基的代表性延伸子基團如下：



其中R¹³為-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₃-C₈碳環基-、-伸芳基-、-C₁-C₃₀伸雜烷基-、-C₃-C₈雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-、-(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)-、-(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-(CH₂CH₂O)₁₋₁₀-(CH₂)₁₋₃-或-(CH₂CH₂NH)₁₋₁₀-(CH₂)₁₋₃-。在一些實施例中，R¹³為-C₁-C₁₀伸烷基-或-C₁-C₃₀伸雜烷基-。在一些實施例中，R¹³為-C₁-C₁₀伸烷基-、-(CH₂CH₂O)₁₋₁₀-(CH₂)₁₋₃-或-(CH₂CH₂NH)₁₋₁₀-(CH₂)₁₋₃-。在一些實施例中，R¹³為-C₁-C₁₀伸烷基-聚乙二醇或聚伸乙基亞胺。

非可裂解藥物釋放系統為此項技術中已知的且可適合於以延伸子單元及/或間隔子單元形式與本發明之自行穩定之接合劑總成一起使用。非可裂解接合劑能夠使藥物單元與配位體以通常穩定且共價之方式鍵聯且實質上對酸誘導之裂解、光誘導之裂解、肽酶或酯酶誘導之裂解及雙硫鍵裂解具抵抗性。藥物經由替代機制(諸如蛋白水解配位體降解)自含有非可裂解接合劑之配位體藥物共軛物釋放。

在類美登素藥物與配位體之間形成非可裂解接合劑之交聯試劑在此項技術中為熟知的且可適合於在本文中使用的。在類美登素藥物與配位體之間形成非可裂解接合劑之例示性交聯試劑包含基於順丁烯二醯亞胺基或鹵乙醯基之部分。其包括4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)-環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸)N-丁二醯亞胺酯(其為SMCC之「長鏈」類似物(LC-SMCC))、 κ -順丁烯二醯亞胺基十一酸N-丁二醯亞胺酯(KMUA)、 γ -順丁烯二醯亞胺基丁酸N-丁二醯亞胺酯(GMBS)、 ϵ -順丁烯二醯亞胺基己酸N-羥基丁二醯亞胺酯(EMCS)、間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯(MBS)、N-(α -順丁烯二醯亞胺基乙醯氧基)-丁二醯亞胺酯[AMAS]、6-(β -順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸丁二醯亞胺酯(SMPH)、4-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸N-丁二醯亞胺酯(SMPB)及N-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)異氰酸酯(PMPI)、4-(碘乙醯基)-胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)、碘乙酸N-丁二醯亞胺酯(SIA)、溴乙酸N-丁二醯亞胺酯(SBA)及3-(溴乙醯胺基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SBAP)。與本發明之自行穩定之接合劑總成組合使用之其他延伸子單元可見於例如美國專利第8,142,784號中，其以全文引用的方式且出於所有目的併入本文中。

可裂解單元

可裂解單元(-W-)(當存在時)能夠使自行穩定之接合劑總成與間隔

子單元(當間隔子單元存在時)或自行穩定之接合劑總成與藥物單元(當間隔子單元不存在時)鍵聯。自自行穩定之接合劑總成鍵聯至間隔子單元或藥物單元可直接始於自行穩定之接合劑總成(當延伸子單元不存在時)或經由延伸子單元(若延伸子單元存在)。

在一些實施例中，可裂解單元將在一端與自行穩定之接合劑總成直接共軛且在另一端與藥物單元直接共軛。在其他實施例中，可裂解單元將在一端與延伸子單元直接共軛且在另一端與藥物單元直接共軛。在其他實施例中，可裂解單元將在一端與延伸子單元直接共軛且在另一端與間隔子單元直接共軛。在甚至其他實施例中，可裂解單元將在一端與自行穩定之接合劑總成直接共軛且在另一端與間隔子單元直接共軛。本文所述之任何特定描述之自行穩定之接合劑總成均可用於此等實施例中。

可裂解單元能夠與藥物單元或間隔子單元形成可裂解鍵。用於形成可裂解鍵之反應性基團可包括例如用以形成雙硫鍵之硫氫基；用以形成腙鍵之醛、酮或肼基；用以形成肽鍵之羧基或胺基；及用以形成酯鍵之羧基或羥基。

可裂解單元之性質可廣泛變化。舉例而言，可裂解接合劑包括可經由二硫化物交換裂解之含二硫化物之接合劑；可在酸性pH值下裂解之酸不穩定接合劑；及可藉由水解酶、肽酶、酯酶及葡糖醛酸酶裂解之接合劑。

在一些態樣中，可裂解單元之結構及序列使得該單元藉由存在於標靶位點處之酶的作用而裂解。在其他態樣中，可裂解單元可藉由其他機制裂解。可裂解單元可包含一個或多個裂解位點。

在一些實施例中，可裂解單元將包含一個胺基酸或一或多個胺基酸序列。舉例而言，可裂解單元可包含單肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。

各胺基酸可為天然或非天然的及/或D-異構體或L-異構體，當然其限制條件為存在可裂解鍵。在一些實施例中，可裂解單元將僅包含天然胺基酸。在一些態樣中，可裂解單元將包含1至12個呈相連序列之胺基酸。

在一些實施例中，各胺基酸獨立地選自由以下組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、脯胺酸、色胺酸、纈胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸、硒半胱胺酸、鳥胺酸、青黴胺、 β -丙胺酸、胺基烷酸、胺基炔酸、胺基烷二酸、胺基苯甲酸、胺基-雜環基-烷酸、雜環基-羧酸、瓜胺酸、他汀(statine)、二胺基烷酸及其衍生物。在一些實施例中，各胺基酸獨立地選自由以下組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、脯胺酸、色胺酸、纈胺酸、半胱胺酸、甲硫胺酸及硒半胱胺酸。在一些實施例中，各胺基酸獨立地選自由以下組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、脯胺酸、色胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，各胺基酸選自蛋白型或非蛋白型胺基酸。

在另一實施例中，各胺基酸獨立地選自由以下L-(天然)胺基酸組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、色胺酸及纈胺酸。

在另一實施例中，各胺基酸獨立地選自由此等天然胺基酸之以下D-異構體組成之群：丙胺酸、精胺酸、天冬胺酸、天冬醯胺、組胺酸、甘胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、苯丙胺酸、離胺酸、白胺酸、絲胺

酸、酪胺酸、蘇胺酸、異白胺酸、色胺酸及纈胺酸。

在一些實施例中，可裂解單元與藥物單元之間的鍵可以酶促方式藉由一或多種酶(包括腫瘤相關蛋白酶)裂解以釋放藥物單元(-D)，該藥物單元在一個實施例中在釋放時活體內經質子化以提供藥物(D)。

適用可裂解單元可經設計且在其由特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解之選擇性方面經最佳化。在一個實施例中，可裂解單元與藥物單元或間隔子單元之間的鍵聯(或鍵)為如下鍵聯(或鍵)，其裂解係藉由組織蛋白酶B、C及D或纖維蛋白溶酶蛋白酶催化。

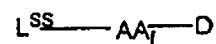
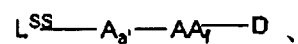
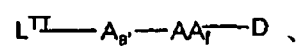
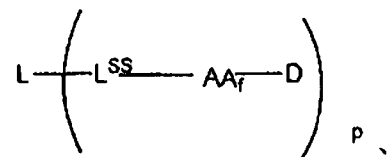
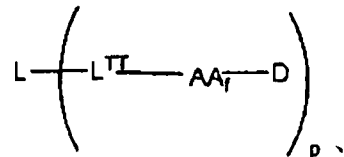
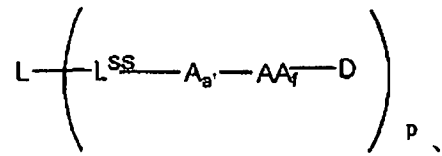
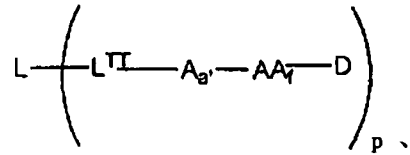
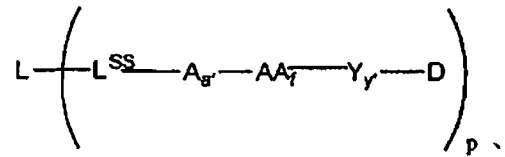
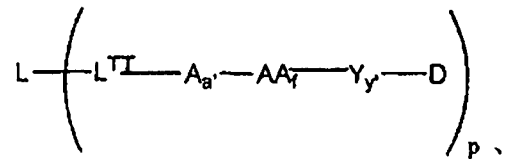
在某些實施例中，可裂解單元可僅包含天然胺基酸。在其他實施例中，可裂解單元可僅包含非天然胺基酸。在一些實施例中，可裂解單元可包含與非天然胺基酸鍵聯之天然胺基酸。在一些實施例中，可裂解單元可包含與天然胺基酸之D-異構體鍵聯之天然胺基酸。

例示性可裂解單元為二肽-Val-Cit-、-Phe-Lys-或-Val-Ala。

在一些實施例中，可裂解單元將包含肽且將包含1至12個胺基酸。在一些該等實施例中，肽將與藥物單元直接共軛且間隔子單元將不存在。在一些該等實施例中，延伸子單元及間隔子單元將不存在。在一個態樣中，肽將為二肽。

在一些實施例中，可裂解單元- W_w -將由 $(-AA-)_{1-12}$ -或 $(-AA-AA-)_{1-6}$ 表示，其中AA在每次出現時獨立地選自天然或非天然胺基酸。在一個態樣中，AA在每次出現時獨立地選自天然胺基酸。熟習此項技術者將瞭解，胺基酸通常經由存在於胺基酸中之功能單元(例如其羧酸或胺基末端)與藥物單元或間隔子單元鍵聯。

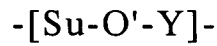
在一些該等態樣中，配位體藥物共軛物及藥物-接合劑由下式或其鹽表示，其中L、 L^{SS} 、 L^{TT} 、A、a'、AA、Y、y'、D及p如本文所述之任一實施例中所定義且f為1至12之整數：



應瞭解，雖然上式中未反映，但該等式子可如本文中所教示經修飾以包括分支鏈接合劑，亦即多個藥物單元可與各自行穩定之接合劑總成連接。

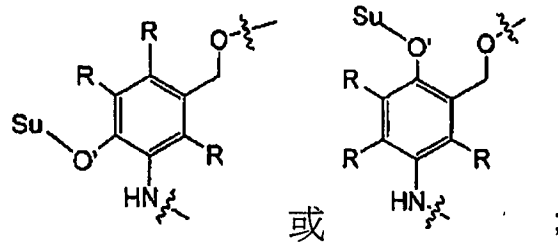
在其他態樣中，可裂解單元將包含葡糖苷酸單元，較佳1或2個葡糖苷酸單元。在一些該等實施例中，葡糖苷酸單元包含經由糖苷鍵

(-O'-)與自行分解之間隔子鍵聯的糖部分(Su)：

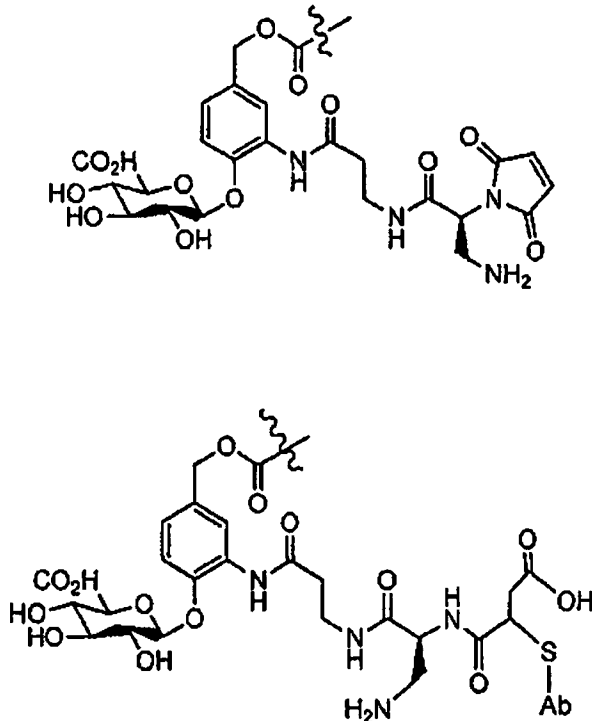


糖苷鍵(-O'-)通常為β-葡糖醛酸酶-裂解位點，諸如可藉由人類溶酶體β-葡糖醛酸酶裂解之鍵。

在一些態樣中，-[Su-O'-Y]-由下式表示：



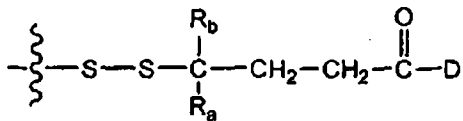
其中Su為糖部分，-O'-表示糖苷鍵；各R獨立地為氫、鹵素、-CN或-NO₂；其中與氮原子相鄰之波浪鍵指示與延伸子單元或配位體之共價連接，且與氧相鄰之波浪鍵指示與間隔子單元或藥物單元之共價連接。在與抗體共軛之前及共軛後包含葡糖苷酸之例示性接合劑單元如下，其中波形線指示與藥物單元或間隔子單元之連接，且Ab表示抗體且S為抗體之硫原子。應瞭解，一種以上自行穩定之總成可與各抗體連接：



在一些實施例中，可裂解單元本身將包含能夠與間隔子單元或

藥物單元之硫原子形成一鍵之硫原子以形成二硫化物或受阻二硫化物。二硫化物之兩個硫原子之間發生裂解。在一些該等實施例中，一個硫原子自藥物單元裂解，且其限制條件為不存在其他釋放機制，另一硫原子保持與藥物單元連接。包含具有硫原子之可裂解單元的接合劑單元能夠與間隔子單元或藥物單元之硫原子形成一鍵以形成二硫化物或受阻二硫化物。

例示性接合劑包括例如以下藥物-接合劑，其中波形線指示與接合劑單元之其餘部分連接之位點，D為類美登素藥物，且R_a及R_b獨立地選自H或甲基。



多種二硫化物接合劑為此項技術中已知的且可適合於用於本發明中，包括例如可使用以下物質形成之彼等二硫化物接合劑：SATA (S-乙醯基硫基乙酸N-丁二醯亞胺酯)、SPDP (3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯)、SPDB (3-(2-吡啶基二硫基)丁酸N-丁二醯亞胺酯)、SMPT (N-丁二醯亞胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫基)甲苯)及SPP (4-(2-吡啶基二硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯)。(參見例如Thorpe等人, 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak等人, *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C.W. Vogel編, Oxford U. Press, 1987)。亦參見美國專利第4,880,935號。)

在一些實施例中，可裂解接合劑為pH-敏感的且將包含例如可在溶酶體中水解之酸不穩定接合劑(例如脲、半卡巴脲、硫半卡巴脲、順式-烏頭酸醯胺、原酸酯、縮醛或縮酮基團)。(參見例如美國專利第5,122,368號；第5,824,805號；第5,622,929號；Dubowchik及Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123；Neville等人, 1989, *Biol Chem.*

264:14653-14661。)該等連接子在中性pH值條件(諸如血液中之pH值條件)下相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0(近似溶酶體之pH值)下不穩定。

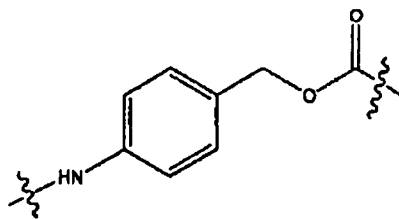
在一些實施例中，可裂解單元將與藥物單元直接共軛，且間隔子單元將不存在，且可裂解單元將經由可裂解肽鍵、雙硫鍵或胺鍵與藥物單元鍵聯。

間隔子單元

間隔子單元(-Y-)(當存在時)使可裂解單元與藥物單元或延伸子單元與藥物單元或自行穩定之接合劑總成與藥物單元鍵聯。與延伸子單元類似，間隔子單元(當存在時)可用於延伸接合劑單元之構架。間隔子單元可包含多種自行分解或非自行分解之基團。在一些實施例中，間隔子單元包含一或多個自行分解之基團。在此情形下，術語「自行分解之基團」係指能夠使兩個間隔開之化學部分共價鍵聯在一起成為通常穩定之三重分子的雙官能化學部分。若其與第一部分之鍵裂解，則其將自發地與第二化學部分分離。在其他實施例中，間隔子單元為不自行分解的。在此等實施例中，部分或所有間隔子單元保持與藥物單元連接。

在一些實施例中，-Y-為自行分解之基團且經由自行分解之基團的亞甲基碳原子與可裂解單元鍵聯，且經由碳酸酯基、胺基甲酸酯基或醚基與藥物單元直接連接。

在一些實施例中，-Yy-為對胺基苯甲基醇(PAB)單元，其伸苯基部分視情況經-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基取代。在另一實施例中，-Yy-可為碳酸酯基。未經取代PAB單元如下：



自行分解之基團之其他實例包括(但不限於)電子學上與PAB基團類似之芳族化合物，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(參見例如Hay等人, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)及鄰胺基苯甲基乙醛或對胺基苯甲基乙醛。可使用在醯胺鍵水解時經歷環化之間隔子，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁醯胺(參見例如Rodrigues等人, 1995, *Chemistry Biology* 2:223)、經適當取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(參見例如Storm等人, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815)及2-胺基苯基丙醯胺(參見例如Amsberry等人, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867)。在甘胺酸之 α 位置處經取代之含胺藥物之消除(參見例如Kingsbury等人, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447)亦為自行分解之基團的實例。

其他適合間隔子單元揭示於已公開之美國專利申請案第2005-0238649號中，其揭示內容以引用之方式併入本文中。

可與本發明組合物及方法一起使用之例示性延伸子單元、可裂解單元及間隔子單元描述於WO 2004010957、WO 2007/038658、WO 2005/112919、美國專利第6,214,345號、第7,659,241號、第7,498,298號、第7,968,687號、第8,163,888號及美國公開案第2009-0111756號、第2009-0018086號、第2009-0274713號中，其各自以全文引用之方式且出於任何目的併入本文中。

在共軛物與穩定性單元或偵測單元替代藥物單元共軛之實施例中，視情況選用之二級接合劑總成通常將不存在。在二級接合劑總成存在之實施例中，延伸子單元通常將存在，但可裂解單元及間隔子單元將不存在。延伸子單元將延伸接合劑單元之構架以在自行穩定之總

成與偵測單元或穩定性單元之間提供較大距離。在該等態樣中，延伸子單元能夠使自行穩定之接合劑總成與偵測單元或穩定性單元鍵聯。

藥物負載量

每個配位體對應之自行穩定之接合劑數目由 p 表示。在接合劑不為分支鏈之實施例中， p 表示每個配位體分子(例如抗體)對應之藥物-接合劑分子(或偵測-接合劑或穩定性-接合劑分子)數目。視情形而定， p 可表示每個配位體對應之自行穩定之接合劑之平均數目(或在接合劑不為分支鏈之實施例中，每個配位體(例如抗體)對應之藥物-接合劑分子(或偵測-接合劑或穩定性-接合劑分子)之平均數目)。變數 p 介於1至20、通常1至12、1至10範圍內且較佳為1至8。在一些較佳實施例中，當 p 表示每個抗體對應之自行穩定之接合劑之平均數目時， p 介於約2至約5範圍內。在一些實施例中， p 為約2、約4或約8。在一些較佳實施例中，當 p 表示每個抗體對應之藥物-接合劑分子之平均數目時， p 介於約2至約5範圍內。在一些實施例中， p 為約2、約4或約8。每個自行穩定之接合劑對應之 D' 數目由 u 表示。 u 介於1至10範圍內。

在自共軛反應製備時，每個配位體單元對應之藥物單元平均數目可藉由習知手段(諸如質譜分析、ELISA分析、HIC及HPLC)表徵。亦可確定就 p 而言藥物-接合劑-配位體共軛物之定量分佈。在一些情況下，當 p 為來自具有其他藥物負載量之配位體-藥物共軛物的特定值時，可藉由諸如逆相HPLC或電泳之手段來達成均質配位體-藥物共軛物之分離、純化及表徵。

自行穩定之接合劑總成(L^{SS} 或 L^{TT})及水解速率

自行穩定之接合劑總成使配位體單元與延伸子單元鍵聯(若延伸子單元存在)，使配位體單元與可裂解單元鍵聯(若延伸子單元不存在且可裂解單元存在)，使配位體單元與間隔子單元鍵聯(若延伸子單元及可裂解單元不存在且間隔子單元存在)或使配位體單元與 D' (例如藥

物單元)鍵聯(若延伸子單元、可裂解單元及間隔子單元不存在)。在一些實施例中，延伸子單元、可裂解單元及間隔子單元將不存在且自行穩定之接合劑總成將與D'(例如藥物單元)直接共軛。在其他實施例中，延伸子單元、可裂解單元及間隔子單元中之一或多者將存在。

當配位體-藥物共軛物之一部分經歷水解時自行穩定之接合劑之硫取代之丁二醯亞胺之速率可使用水解之 $t_{1/2}$ 來定量，水解之 $t_{1/2}$ 係指在所述條件(例如pH 7.4及22°C)下相關化合物之一半水解(亦即經歷開環)所消耗之時間。在本發明之一些實施例中，使用以下分析及所述條件，自行穩定之接合劑單元之硫取代之丁二醯亞胺之水解之 $t_{1/2}$ 小於4小時，較佳小於3小時，甚至更佳小於2小時，小於1小時，小於45分鐘，小於30分鐘，小於15分鐘。

在與抗體半胱胺酸共軛後順丁烯二醯亞胺基藥物接合劑之水解反應速率可藉由質譜分析確定，因為水解產物具有大於未水解共軛物18道爾頓之分子量。人類IgG1之鏈間二硫化物之還原在輕鏈上產生單一還原半胱胺酸且在重鏈上產生三個還原半胱胺酸。自行穩定之順丁烯二醯亞胺藥物-接合劑可接著在pH 7.4及22°C下與還原抗體共軛且經由分離共軛輕鏈及重鏈之逆相HPLC管柱引入高解析度電噴霧質譜儀中。因此，可量測共軛輕鏈及重鏈之質量，且藉由標準質譜分析數據處理軟體(例如MassLynx)確定峰強度。藉由隨時間推移執行一系列注射，可監測到對應於原始未水解共軛物之質量的峰消失且對應於水解共軛物之質量的峰出現，在各時間點測定峰強度且計算水解共軛物之百分比。藉由繪製水解百分比相較於時間之曲線，產生(例如使用PRISM)可用包括關於 $t_{1/2}$ 之參數的用於指數現象之標準方程擬合之曲線。

在一些態樣中，自行穩定之接合劑將經設計使得自行穩定之接合劑之順丁烯二醯亞胺組成部分在與配位體單元共軛之前實質上不經

歷水解。

在本發明之一些實施例中，在約7至約7.5（例如7.4）之pH值及約22°C之溫度下，自行穩定之接合劑之硫取代之丁二醯亞胺之水解的 $t_{1/2}$ 為約5或約10分鐘至約24小時，較佳約5或約10分鐘至約12小時，更佳約5或約10分鐘至約5小時，更佳約5或約10分鐘至約2.5小時，甚至更佳約5或約10分鐘至約1小時，甚至更佳約5或約10分鐘至約30分鐘，甚至更佳約5或約10分鐘至約20分鐘且甚至更佳約10分鐘至約15分鐘。

在水解之 $t_{1/2}$ 如以上所述之一些該等實施例中，水解完全。若硫取代之丁二醯亞胺之90%水解，則認為達成完全水解。較佳地，將達成95%或較大95%、96%、97%、98%、99%或100%水解。在一些實施例中，水解反應將與二內醯胺形成競爭且將不會達成完全。在一些該等實施例中，至少90%之反應產物將為水解之硫取代之丁二醯亞胺配位體-藥物共軛物或硫取代之二內醯胺配位體-藥物共軛物之組合。較佳地，至少95%或大於95%、96%、97%、98%、99%或100%之反應產物將為水解之硫取代之配位體-藥物共軛物或硫取代之二內醯胺配位體-藥物共軛物之組合。水解百分比可由在最後時間點共軛物之質譜分析數據，藉由測定對應於原始未水解共軛物之質量的峰強度及對應於水解共軛物之質量的峰強度且使用峰強度之總和來確定水解百分比及未水解百分比來計算。

除用水解之 $t_{1/2}$ 及/或水解反應之效率表徵配位體-藥物共軛物之外，亦可用配位體-藥物共軛物經歷消除反應及對於藥物-接合劑而言由配位體單元轉移至存在於配位體-藥物共軛物之環境中之替代反應性硫醇之能力來表徵配位體-藥物共軛物之穩定性。在一些實施例中，在以下分析及所述條件下藥物-接合劑將展現不會或實質上不會自配位體解離。若在樣品中小於40%、較佳小於20%、甚至更佳小於

10%或甚至更佳小於5%或小於2%之藥物-接合劑自配位體解離，則視為達成片語「實質上不會自配位體解離」。

含有酶可裂解接合劑之藥物-接合劑自抗體之消除可在離體血漿中藉由以下方法量測。將共軛物置放於無菌血漿中且在37°C下培育。在培育開始時及在自1小時至1週或更長之不同時間點下，在-80°C下冷凍下移出等分試樣。在各時間點完成時，使樣品穿過蛋白A親和力樹脂以捕獲抗體，用緩衝液洗滌樹脂，且接著藉由用適當酶(例如針對基於肽之可裂解接合劑的番木瓜蛋白酶或蛋白酶K)處理來自所捕獲之抗體釋放藥物。接著，可藉由標準LC-MS方法定量所釋放之藥物，且用在各時間點所量測之藥物量除以針對預培育等分試樣所量測之藥物量以確定在各時間點剩餘之與抗體共軛之藥物的百分比。此分析之精確度可藉由包括使用同位素標記型式之相同藥物-接合劑製備之內標抗體-藥物共軛物來改良，使得自其釋放之藥物可在LC-MS分析中與自測試藥物-接合劑釋放之藥物憑藉其質量差異相獨立地偵測到。在即將進行蛋白A捕獲步驟之前將此同位素標記之內標抗體-藥物共軛物等量添加至各樣品中。接著，藉由習知LC-MS技術以與來自內標之信號進行比率分析之方式對自測試ADC釋放之藥物進行定量。

用於評估順丁烯二醯亞胺藥物-接合劑自抗體(或其他配位體)之消除的替代方法為在緩衝液(例如磷酸鹽緩衝生理食鹽水)中在略微較高之pH值(例如pH 8.0)下在較大過量之將與自母體共軛物消除之任何順丁烯二醯亞胺反應之小分子硫醇(例如N-乙醯基半胱胺酸，NAC)存在下培育共軛物。可執行LC-MS分析以偵測且定量與NAC共軛之藥物-接合劑或母體配位體-共軛物。在後一情況下，若配位體-共軛物為穩定的，則可量測配位體-共軛物與未共軛配位體之比率且其隨時間推移將保持恆定。其他方法提供於實例部分中。

癌症之治療

配位體-藥物共軛物適用於抑制腫瘤細胞或癌細胞之繁殖，從而在腫瘤或癌細胞中引起細胞凋亡，或適用於治療患者之癌症。因此，配位體-藥物共軛物可用於供治療癌症之多種設定中。配位體-藥物共軛物可用於將藥物遞送至腫瘤細胞或癌細胞。在不受理論約束的情況下，在一個實施例中，配位體-藥物共軛物之配位體單元與癌細胞或腫瘤細胞相關抗原結合或與其締合，且配位體-藥物共軛物可在腫瘤細胞或癌細胞內部經由受體介導之內飲作用或其他內化機制攝入(內化)。抗原可與腫瘤細胞或癌細胞連接或可為與腫瘤細胞或癌細胞締合之細胞外基質蛋白。一旦位於細胞內部，即經由可裂解或非可裂解機制在細胞內釋放藥物，視接合劑系統之組成部分而定。在一替代實施例中，藥物或藥物單元在腫瘤細胞或癌細胞外部自配位體-藥物共軛物裂解，且藥物或藥物單元隨後穿透細胞。

配位體-藥物共軛物可提供共軛特異性腫瘤或癌症藥物靶向，因此降低藥物之一般毒性。在一些實施例中，接合劑單元使配位體-藥物共軛物在血液中穩定，又能夠一旦位於細胞內部即釋出藥物。

在一個實施例中，配位體單元與腫瘤細胞或癌細胞結合。

在另一實施例中，配位體單元與位於腫瘤細胞或癌細胞表面上之腫瘤細胞或癌細胞抗原結合。

在另一實施例中，配位體單元與作為與腫瘤細胞或癌細胞締合之細胞外基質蛋白之腫瘤細胞或癌細胞抗原結合。

配位體單元對特定腫瘤細胞或癌細胞之特異性對於測定最有效治療之彼等腫瘤或癌症而言可為重要的。舉例而言，具有BR96配位體單元之配位體藥物共軛物可適用於治療抗原陽性癌瘤，包括肺、乳房、結腸、卵巢及胰臟之抗原陽性癌瘤。具有抗-CD30或抗-CD70結合配位體單元之配位體-藥物共軛物可適用於治療血液科惡性疾病。

可用配位體藥物共軛物治療之其他特定類型之癌症包括(但不限

於)表1中所揭示之癌症：

表1

實體腫瘤，包括(但不限於)：

纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肉瘤、軟骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴內皮肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏腫瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、結腸直腸癌、腎癌、胰臟癌、骨癌、乳房癌、卵巢癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、口腔癌、鼻癌、喉癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、囊腺癌、髓性癌、支氣管癌、腎細胞癌、肝癌、膽管癌、絨膜癌、精原細胞瘤、胚胎癌、威耳姆士氏腫瘤(Wilms' tumor)、子宮頸癌、子宮癌、睪丸癌、小細胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、神經膠質瘤、多形性膠質母細胞瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、皮膚癌、黑素瘤、神經母細胞瘤、視網膜胚細胞瘤

血源性癌，包括(但不限於)：

急性淋巴母細胞白血病「ALL」、急性淋巴母細胞B細胞白血病、急性淋巴母細胞T細胞白血病、急性骨髓母細胞白血病「AML」、急性前髓細胞白血病「APL」、急性單核母細胞白血病、急性紅白血病、急性巨核母細胞白血病、急性骨髓單核細胞白血病、急性非淋巴細胞白血病、急性未分化白血病、慢性骨髓細胞白血病「CML」、慢性淋巴細胞白血病「CLL」、毛細胞白血病、多發性骨髓瘤

急性及慢性白血病：

淋巴母細胞白血病、骨髓性白血病、淋巴細胞白血病、骨髓細胞白血病

淋巴瘤：

霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia)、重鏈疾病、真性多血症(Polycythemia vera)

癌症之多峰性療法

癌症(包括(但不限於)腫瘤、轉移或以不受控細胞生長為特徵之其他疾病或病症)可藉由投與配位體-藥物共軛物來治療或抑制。

在其他實施例中，提供用於治療癌症之方法，包括向有需要之患者投與有效量之配位體-藥物共軛物及化學治療劑。在一個實施例中，化學治療劑為已發現不難治療癌症之化學治療劑。在另一實施例中，化學治療劑為已發現難以治療癌症之化學治療劑。可向亦已經歷手術作為癌症治療的患者投與配位體-藥物共軛物。

在一些實施例中，患者亦接受其他治療，諸如放射療法。在一特定實施例中，配位體-藥物共軛物與化學治療劑或放射療法同時投與。在另一特定實施例中，在投與配位體藥物共軛物之前或之後投與化學治療劑或放射療法。

化學治療劑可經一系列階段投與。可投與任一種化學治療劑或化學治療劑之組合，諸如護理化學治療劑之標準物。

另外，提供用配位體-藥物共軛物作為化學療法或放射療法之替代來治療癌症之方法，其中化學療法或放射療法已經證實或可證實對於所治療之個體而言毒性過大，例如產生不可接受或不堪忍受之副作用。所治療之患者可視情況經另一癌症治療來治療，諸如手術、放射療法或化學療法，視發現哪一療法可接受或可忍受而定。

自體免疫疾病之治療

配位體-藥物共軛物適用於殺死產生自體免疫疾病之細胞或抑制其複製或適用於治療自體免疫疾病。因此，配位體-藥物共軛物可用

於供治療患者之自體免疫疾病的多種設定中。配位體-藥物共軛物可用於將藥物遞送至標靶細胞。在不受理論束縛的情況下，在一個實施例中，配位體-藥物共軛物與標靶細胞表面上之抗原締合，且接著配位體藥物共軛物經由受體介導之內飲作用在標靶細胞內部溶解。一旦位於細胞內部，接合劑單元內之一或多個特異性肽序列即裂解，引起藥物或藥物單元之釋放。接著，所釋放之藥物或藥物單元在細胞溶質中自由遷移且誘導細胞毒性或細胞生長抑制活性。在一替代實施例中，藥物在標靶細胞外部自配位體-藥物共軛物裂解且藥物或藥物單元隨後穿透細胞。

在一個實施例中，配位體單元與自體免疫抗原結合。在一個態樣中，抗原位於涉及自體免疫病狀之細胞的表面上。

在另一實施例中，配位體單元與位於細胞表面上之自體免疫抗原結合。

在一個實施例中，配位體單元與自體免疫疾病病況相關之活化淋巴細胞結合。

在另一實施例中，配位體-藥物共軛物殺死產生與特定自體免疫疾病相關之自體免疫抗體之細胞或抑制其繁殖。

可用配位體藥物共軛物治療之特定類型之自體免疫疾病包括(但不限於)Th2淋巴細胞相關病症(例如異位性皮炎、異位性哮喘、鼻結膜炎、過敏性鼻炎、歐門氏症候群(Omenn's syndrome)、全身性硬化症及移植物抗宿主疾病)；Th1淋巴細胞相關病症(例如類風濕性關節炎、多發性硬化、牛皮癬、休格連氏症候群(Sjorgren's syndrome)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷弗氏病(Grave's disease)、原發性膽汁性肝硬化、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)及結核病)；活化B淋巴細胞相關病症(例如全身性紅斑狼瘡、古德帕斯丘氏症候群(Goodpasture's syndrome)、類風濕性關節

炎及第I型糖尿病)；及表2中所揭示之彼等自體免疫疾病。

表2

慢性活動性肝炎、艾迪森氏病(Addison's Disease)、過敏性肺泡炎、過敏性反應、過敏性鼻炎、阿爾波特氏症候群(Alport's Syndrome)、全身性過敏反應、僵直性脊椎炎、抗磷脂症候群、關節炎、蛔蟲病、麴菌病、異位性過敏症、萎縮性皮炎、萎縮性鼻炎、白塞氏病(Behcet's Disease)、養鳥者肺(Bird-Fancier's Lung)、支氣管哮喘、卡普蘭氏症候群(Caplan's Syndrome)、心肌症、腹腔疾病、蔡格司氏病(Chagas' Disease)、慢性絲球體腎炎、科根氏症候群(Cogan's Syndrome)、冷凝集素疾病、先天性風疹感染、CREST症候群、克羅恩氏病(Crohn's Disease)、冷球蛋白血症、庫欣氏症候群(Cushing's Syndrome)、皮膚炎、盤狀狼瘡、德雷斯勒氏症候群(Dressler's Syndrome)、伊頓-蘭伯特症候群(Eaton-Lambert Syndrome)、埃可病毒感染(Echovirus Infection)、腦脊髓炎、內分泌眼病變、艾伯斯坦-巴爾病毒感染(Epstein-Barr Virus Infection)、馬氣喘病(Equine Heaves)、紅斑、艾瓦氏症候群(Evan's Syndrome)、費爾蒂氏症候群(Felty's Syndrome)、肌肉纖維疼痛、法曲氏睫狀體炎(Fuch's Cyclitis)、胃萎縮、胃腸過敏、巨細胞動脈炎、絲球體腎炎、古德帕斯丘氏症候群、移植物抗宿主疾病、格雷弗氏病、格林-巴利疾病(Guillain-Barre Disease)、橋本氏甲狀腺炎、溶血性貧血、亨諾-許蘭紫癍(Henoch-Schonlein Purpura)、特發性腎上腺萎縮、特發性肺纖維化、IgA腎病、發炎性腸道疾病、胰島素依賴性糖尿病、幼年型關節炎、幼年型糖尿病(第I型)、蘭伯特-伊頓症候群(Lambert-Eaton Syndrome)、蹄葉炎、扁平苔癬、類狼瘡肝炎、狼瘡、淋巴球減少症、梅尼爾氏病(Meniere's Disease)、混合結締組織疾病、多發性硬化、重症肌無力、惡性貧血、多腺症候群、初老期癡呆症、原發性無

γ 球蛋白血症、原發性膽汁性肝硬化、牛皮癬、牛皮癬性關節炎、雷諾現象(Raynauds Phenomenon)、復發性流產、萊特氏症候群(Reiter's Syndrome)、風濕熱、類風濕性關節炎、薩姆普特氏症候群(Sampster's Syndrome)、血吸蟲病、施密特氏症候群(Schmidt's Syndrome)、硬皮病、舒爾曼氏症候群(Shulman's Syndrome)、休格連氏症候群、僵人症候群(Stiff-Man Syndrome)、交感神經眼炎、全身性紅斑狼瘡、高安氏動脈炎(Takayasu's Arteritis)、顛動脈炎、甲狀腺炎、血小板減少、甲狀腺中毒症、中毒性表皮壞死溶解、B型胰島素抗性、第I型糖尿病、潰瘍性結腸炎、葡萄膜炎、白斑病、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症、韋格納氏肉芽腫病

自體免疫疾病之多藥物療法

亦揭示用於治療自體免疫疾病之方法，其包括向有需要之患者投與有效量之配位體-藥物共軛物及已知用於治療自體免疫疾病之另一治療劑。

感染性疾病之治療

配位體-藥物共軛物適用於殺死產生感染性疾病之細胞或抑制其繁殖或適用於治療感染性疾病。因此，配位體-藥物共軛物可用於供治療患者之感染性疾病的多種設定中。配位體-藥物共軛物可用於將藥物遞送至標靶細胞。在一個實施例中，配位體單元與感染性疾病細胞結合。

在一個實施例中，共軛物殺死產生特定感染性疾病之細胞或抑制其繁殖。

可用配位體-藥物共軛物治療之特定類型之感染性疾病包括(但不限於)表3中所揭示之彼等感染性疾病。

表3

細菌性疾病：

白喉、百日咳、隱性菌血症、尿道感染、胃腸炎、蜂窩組織炎、會厭炎、氣管炎、腺樣增殖體肥大、咽後膿腫、膿皰、痘瘡、肺炎、心內膜炎、敗血性關節炎、肺炎球菌病、腹膜炎、菌血症、腦膜炎、急性化膿性腦膜炎、尿道炎、子宮頸炎、直腸炎、咽炎、輸卵管炎、附睪炎、淋病、梅毒、李氏菌病、炭疽病、奴卡菌病、沙門氏菌病、傷寒熱、痢疾、結膜炎、竇炎、布氏桿菌病(Brucellosis)、兔熱病、霍亂、黑死病、破傷風、壞死性腸炎、放線菌病、混合厭氧感染、梅毒、復發性發熱、鉤端螺旋體病、萊姆病(Lyme Disease)、鼠咬熱、結核病、淋巴腺炎、麻瘋病、衣原體病、衣原體肺炎、沙眼、包涵體結膜炎

全身性真菌性疾病：

組織胞漿病、球孢子菌病、芽生菌病、孢子絲菌病、隱球菌病、全身性念珠菌病、麴菌病、白黴菌病、足菌病、產色黴菌病

立克次體病(Rickettsial Disease)：

斑疹傷寒、落基山斑點熱(Rocky Mountain Spotted Fever)、埃立克體病、東部扁虱源性立克次體病、痘立克次體病、Q熱、巴東體病

寄生蟲疾病：

瘧疾、焦蟲病、非洲睡眠病、蔡格司氏病、利什曼體病(Leishmaniasis)、黑熱病、弓蟲病、腦膜腦炎、角膜炎、內阿米巴屬病、梨形鞭毛蟲病、隱孢子蟲病、等孢子蟲病、圓孢子蟲病、微孢子蟲病、蛔蟲病、鞭蟲感染、鉤蟲感染、絲線蟲感染、眼幼蟲移行症、旋毛蟲病、幾內亞蠕蟲病、淋巴絲蟲病、羅阿絲蟲病、河盲、犬絲蟲感染、血吸蟲病、游泳皮癢症、東方肺吸蟲病、東方肝吸蟲病、片吸蟲病、薑片吸蟲病、肝吸蟲病、條蟲感染、包蟲病、肺泡型包蟲病

病毒性疾病：

麻疹、亞急性硬化性全腦炎、普通感冒、流行性腮腺炎、風

疹、玫瑰疹、第五疾病、水痘、呼吸道融合病毒感染、喉炎、細支氣管炎、感染性單核白血球增多症、小兒麻痺症、疱疹性咽峽炎、手足口病、博恩霍爾姆病(Bornholm Disease)、生殖器疱疹、生殖器疣、無菌性腦膜炎、心肌炎、心包炎、胃腸炎、後天免疫缺乏症候群(AIDS)、人類免疫缺乏病毒(HIV)、雷氏症候群(Reye's Syndrome)、川崎症候群(Kawasaki Syndrome)、流感、支氣管炎、病毒性「行走」肺炎(Viral 「Walking」 Pneumonia)、急性發熱性呼吸道疾病、急性咽結膜熱、傳染性角膜結膜炎、單純性疱疹病毒1(HSV-1)、單純性疱疹病毒2(HSV-2)、帶狀疱疹、巨大細胞包涵體疾病、狂犬病、進行性多病灶腦白質病、庫魯病(Kuru)、致命性家族性失眠、古茲菲德-雅各氏病(Creutzfeldt-Jakob Disease)、格斯曼-斯托斯勒-謝恩克爾疾病(Gerstmann-Straussler-Scheinker Disease)、熱帶痙攣性後體輕癱、西方馬腦炎、加利福尼亞腦炎(California Encephalitis)、聖路易腦炎(St. Louis Encephalitis)、黃熱病、登革熱、淋巴細胞脈絡叢腦膜炎、拉沙熱(Lassa Fever)、出血性熱、漢坦病毒肺症候群(Hantavirus Pulmonary Syndrome)、馬堡病毒感染(Marburg Virus Infections)、伊波拉病毒感染(Ebola Virus Infections)、天花

感染性疾病之多藥物療法

揭示用於治療感染性疾病之方法，其包括向有需要之患者投與配位體-藥物共軛物及作為抗感染性疾病劑之另一治療劑。

組合物及投藥方法

本發明提供包含本文所述之配位體-藥物共軛物及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。配位體-藥物共軛物可呈允許將化合物投與患者以治療與配位體單元所結合之抗原的表現相關之病症的任何形式。舉例而言，共軛物可呈液體或固體形式。較佳投藥途徑為非經腸。非經腸投藥包括皮下注射、靜脈內、肌肉內、胸骨內注射或輸注

技術。在一個態樣中，非經腸投與組合物。在一個態樣中，靜脈內投與化合物。

本發明亦提供包含本文所述之配位體-功能劑共軛物及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。配位體-藥物共軛物可呈允許將化合物投與患者以治療病症或用於診斷目的之任何形式。

醫藥組合物可經調配以便使得化合物在向患者投與組合物時為生物可用的。組合物可採取一或多個劑量單位之形式，其中例如錠劑可為單一劑量單位。

用於製備醫藥組合物之材料在所用量下可為無毒的。一般技術者將顯而易見，醫藥組合物中活性成分之最佳劑量將取決於多種因素。相關因素包括(但不限於)動物之類型(例如人類)、化合物之特定形式、投藥方式及所用組合物。

組合物可例如呈液體形式。液體可適用於藉由注射遞送。在用於藉由注射投藥之組合物中，亦可包括界面活性劑、防腐劑、濕潤劑、分散劑、懸浮劑、緩衝劑、穩定劑及等張劑中之一或多者。

液體組合物(無論其為溶液、懸浮液或其他類似形式)亦可包括以下一或多者：無菌稀釋劑，諸如注射用水、生理食鹽水溶液(較佳生理食鹽水)、林格氏溶液(Ringer's solution)、等張氯化鈉、不揮發性油(諸如合成單酸甘油酯或二酸甘油酯，其可充當溶劑或懸浮介質)、聚乙二醇、甘油、環糊精、丙二醇或其他溶劑；抗細菌劑，諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸；緩衝劑，諸如胺基酸、乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；清潔劑，諸如非離子型界面活性劑、多元醇；及用於調節張力之試劑，諸如氯化鈉或右旋糖。非經腸組合物可封閉於由玻璃、塑膠或其他材料製成之安瓿、拋棄式注射器或多劑量瓶中。生理食鹽水為例示性佐劑。可注射組合物較佳為無菌的。

在特定病症或病狀之治療中有效之共軛物量將取決於病症或病狀之性質，且可藉由標準臨床技術來測定。另外，可視情況使用活體外或活體內分析來幫助鑑別最佳劑量範圍。欲用於組合物中之精確劑量亦將視投藥途徑及疾病或病症之嚴重性而定，且應根據行醫者之判斷及各患者之情況來決定。

組合物包含有效量之化合物，使得將獲得適合劑量。通常，此量為以組合物之重量計至少約0.01%之化合物。

對於靜脈內投藥，組合物可包含每公斤動物體重約0.01至約100 mg之配位體-藥物共軛物。在一個態樣中，組合物可包括每公斤動物體重約1至約100 mg之配位體-藥物共軛物。在另一態樣中，投與量將在每公斤體重約0.1至約25 mg化合物範圍內。

一般而言，向患者投與之化合物劑量通常為每公斤個體體重約0.01 mg至約100 mg。在一些實施例中，向患者投與之劑量在每公斤個體體重約0.01 mg至約15 mg之間。在一些實施例中，向患者投與之劑量在每公斤個體體重約0.1 mg與約15 mg之間。在一些實施例中，向患者投與之劑量在每公斤個體體重約0.1 mg與約20 mg之間。在一些實施例中，所投與之劑量在每公斤個體體重約0.1 mg至約5 mg或約0.1 mg至約10 mg之間。在一些實施例中，所投與之劑量在每公斤個體體重約1 mg至約15 mg之間。在一些實施例中，所投與之劑量在每公斤個體體重約1 mg至約10 mg之間。在一些實施例中，經一個治療週期所投與之劑量在每公斤個體體重約0.1至4 mg、甚至更佳0.1至3.2 mg或甚至更佳0.1至2.7 mg之間。

配位體-功能劑共軛物(例如配位體-藥物共軛物)可藉由任何適宜途徑投與，例如藉由輸注或快速注射、藉由經由上皮或黏膜與皮膚襯裡(例如口腔黏膜、直腸及腸道黏膜)吸收。投藥可為全身或局部投藥。已知各種遞送系統，例如囊封於脂質體、微米粒子、微囊、膠囊

中，且其可用於投與化合物。在某些實施例中，向患者投與一種以上化合物或組合物。

術語「載劑」係指與化合物一起投與之稀釋劑、佐劑或賦形劑。該等醫藥學載劑可為液體，諸如水及油，包括石油、動物、植物或合成來源之彼等油，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油。載劑可為生理食鹽水、阿拉伯膠、明膠、澱粉糊劑、滑石、角蛋白、膠態二氧化矽、尿素。另外，可使用助劑、穩定劑、增稠劑、潤滑劑及著色劑。在一個實施例中，當向患者投與時，化合物或組合物及醫藥學上可接受之載劑為無菌的。當靜脈內投與化合物時，水為例示性載劑。亦可使用生理食鹽水溶液及右旋糖水溶液及甘油溶液作為液體載劑，尤其用於可注射溶液。適合之醫藥學載劑亦包括賦形劑，諸如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石、氯化鈉、乾燥脫脂牛奶、甘油、丙二醇、水、乙醇。必要時，本發明組合物亦可含有少量濕潤劑或乳化劑或pH緩衝劑。

在一實施例中，根據常規程序將共軛物調配成適合於向動物、尤其人類靜脈內投與之醫藥組合物。通常，用於靜脈內投與之載劑或媒劑為無菌等張緩衝水溶液。必要時，組合物亦可包括增溶劑。用於靜脈內投與之組合物可視情況包含局部麻醉劑(諸如利諾卡因(lignocaine))以減輕注射部位之疼痛。通常，該等成分係單獨提供或以單位劑型混合在一起，例如呈於指示活性劑量之氣密密封容器(諸如安瓿或藥囊)中之乾燥凍乾粉末或無水濃縮物形式。當欲藉由輸注投與共軛物時，其可例如用含有無菌醫藥級水或生理食鹽水之輸注瓶來分配。當藉由注射投與共軛物時，可提供注射用無菌水或生理食鹽水之安瓿，使得該等成分可於投與之前混合。

醫藥組合物通常經調配為無菌、實質上等張的，且完全符合美

國食品藥物管理局之所有良好製造規範(GMP)細則。

本發明之醫藥組合物包含本發明之配位體藥物共軛物及醫藥學上可接受之載劑。在一些較佳實施例中，所有或實質上所有或超過50%之存在於醫藥組合物中之配位體藥物共軛物包含水解之硫取代之丁二醯亞胺。在一些較佳實施例中，超過55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之存在於醫藥組合物中之配位體藥物共軛物包含水解之硫取代之丁二醯亞胺。

用於製備配位體-藥物共軛物之方法

在另一態樣中，本發明提供製備包含自行穩定之接合劑之配位體-藥物共軛物或配位體-功能劑共軛物之方法。

在一些實施例中，本發明之方法包含以下步驟：提供如本文中所述之藥物-接合劑或接合劑單元，使該藥物-接合劑或接合劑單元與配位體單元之硫氫基共軛以形成共軛物，使所得共軛物經歷水解反應以形成包含硫取代之水解丁二醯亞胺之配位體-藥物共軛物。

硫取代之丁二醯亞胺水解之速率可藉由在藥物-接合劑與配位體共軛之後調節反應條件(例如藉由調節pH值或溫度)來操縱。在本發明之一些實施例中，所有、實質上所有或至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或甚至95%之硫取代之丁二醯亞胺在不操縱反應條件的情況下水解，亦即水解反應與共軛反應發生在相同反應條件下。在一些實施例中，所有、實質上所有或至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或甚至95%之硫取代之丁二醯亞胺在共軛後20分鐘至4小時、較佳在共軛後20分鐘至2小時水解。在例示性實施例中，共軛條件為約7.4之pH值及約22°C之溫度。

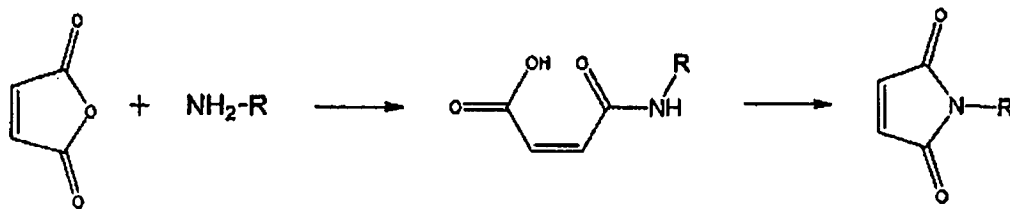
在一些實施例中，用於製備配位體-藥物共軛物之方法包含以下步驟：提供包含自行穩定之接合劑之藥物-接合劑或接合劑單元；使

該藥物-接合劑或接合劑單元與配位體之硫氫基共軛以形成包含未水解硫取代之丁二醯亞胺的配位體-藥物共軛物；使未水解硫取代之丁二醯亞胺經歷水解反應，其中所有、實質上所有或至少50%、60%、70%、80%或甚至85%之丁二醯亞胺在共軛後10分鐘至4小時水解。在一些實施例中，所有、實質上所有或至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或甚至95%之丁二醯亞胺在共軛後10分鐘、20分鐘、40分鐘、60分鐘、90分鐘或120分鐘水解。在一些實施例中，水解反應與共軛反應在相同反應條件下進行。在例示性實施例中，共軛條件為約7.4之pH值及約22°C之溫度。

合成自行穩定之接合劑之方法

本發明尤其提供自行穩定之接合劑。製備自行穩定之接合劑單元之方法涵蓋於本發明範疇內。

通常由相應胺藉由一級胺與順丁烯二酸酐之反應、隨後順丁烯醯胺酸之環化脫水作用製備順丁烯二醯亞胺化合物。製備順丁烯二醯亞胺化合物之總流程展示於以下流程中。



為製備在起始胺之側鏈中含有鹼性基團之順丁烯二醯亞胺，必要時應保護該等鹼性基團。適當保護基在順丁烯二醯亞胺製備條件下應為穩定的，隨後在順丁烯二醯亞胺存在下又應為可移除的。適合保護基由酸不穩定保護基組成，但不限於酸不穩定保護基。「Boc」保護基為一種較佳保護基。

順丁烯二醯亞胺製備之第一步(即形成順丁烯醯胺酸)為極便捷的且通常可藉由緩慢添加胺至含有化學計量過量之順丁烯二酸酐的懸浮液中而以良好產率實現。

第二步(即順丁烯醯胺酸之環化脫水作用)可以熟習此項技術者已知之多種方式實現。舉例而言，使用化學脫水劑已為實現此步驟之良好確立之方法。碳二醯亞胺與異構化醇(例如DCC/HOBt)組合已用於實現醯胺酸(amic acid)至順丁烯二醯亞胺之環化脫水作用。

在酸催化劑存在下使用共沸蒸餾之熱環化脫水作用為產生順丁烯二醯亞胺之另一熟知方法。使用共沸溶劑允許當水共產物形成時將其有效移除，從而驅使反應生成順丁烯二醯亞胺。適合共沸溶劑包括環己烷、苯、甲苯、乙苯、均三甲苯及其類似物。認為甲苯最理想，因為其在110°C下在大氣壓下沸騰。低於200°C之沸騰溫度為較佳的，以使可能的順丁烯醯胺酸熱異構化為熱力學上較穩定之反式(反丁烯二醯胺酸)結構減至最少。

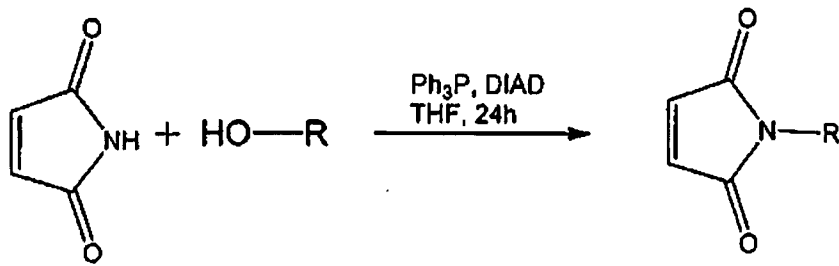
使用極性非質子性共溶劑可有益於總產率改良以及減少環化脫水作用時間。包括二甲基甲醯胺、二甲基乙醯胺、乙腈、N-甲基吡咯啉酮、二甲亞砷及磺酸酯之若干極性非質子性溶劑已聲稱為適用的。最適用之極性非質子性溶劑為二甲基甲醯胺。

根據專利US 5,973,166，併入某些胺鹽替代非質子性溶劑可進一步有益於順丁烯二醯亞胺形成。

亦已報導不使用溶劑以順丁烯二酸酐及適當胺為起始物之一步微波輔助順丁烯二醯亞胺合成(H.N. Borah等人, *J. Chem. Research(S)*, 1998, 272-272)。

使用水作為溶劑用於順丁烯二醯亞胺形成之實例已報導於V. Ondrus等人之*ARKIVOC*, 2001(v) 60-67中。

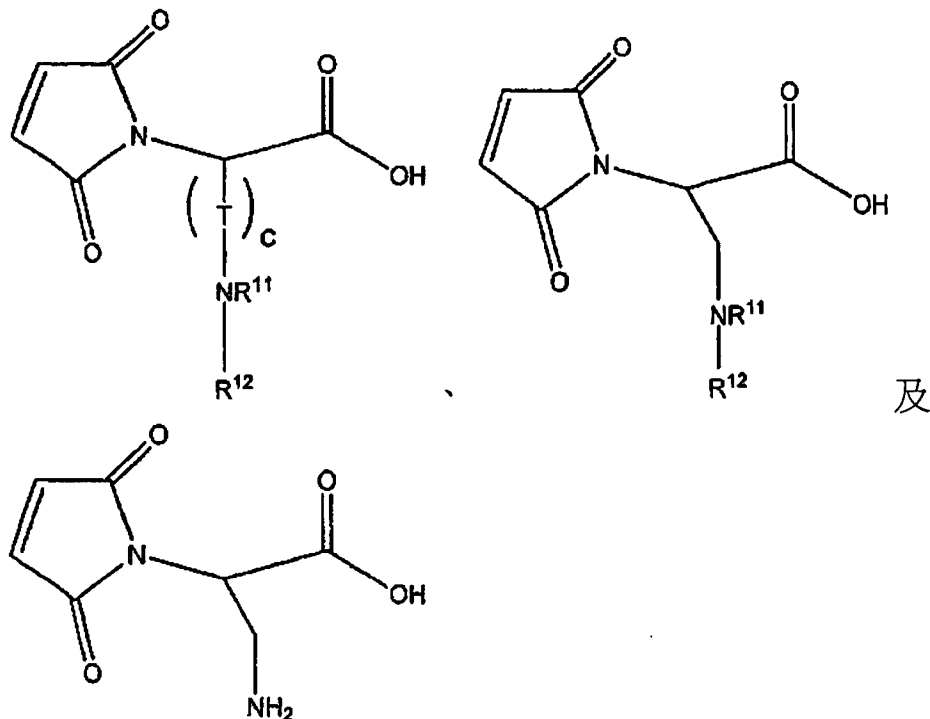
或者，可如以下流程所示使用例如光延反應條件由順丁烯二醯亞胺及適當醇產生順丁烯二醯亞胺化合物(M.A. Walker, *Tetrahedron Letters*, 1994, 第35卷, 第5期, 第665-668頁)。

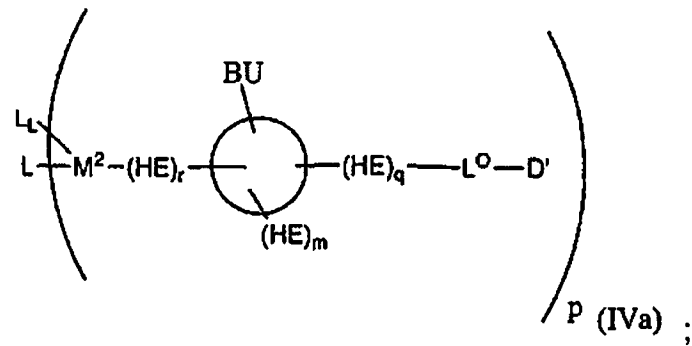


使用本文所述之教示結合此項技術中已知之方法使本發明之自行穩定之接合劑總成與延伸子單元、可裂解單元、間隔子單元或藥物單元鍵聯。使用本文所述之教示結合此項技術中已知之方法使接合劑及藥物-接合劑與配位體單元共軛。舉例而言，為與鏈間二硫化物共軛，可用還原劑(諸如二硫蘇糖醇(DTT))處理抗體以還原一些或所有鏈間二硫化物半胱胺酸殘基，從而形成高度親核之半胱胺酸硫醇基。隨後，完全還原之抗體或部分還原之抗體可與接合劑單元之順丁烯二醯亞胺共軛。在例示性實施例中，共軛條件為溫和條件，pH值為約7且溫度為約22°C。

中間體

本發明提供用於製備自行穩定之接合劑之中間體。中間體包括以下物質，其中T、c、R¹¹及R¹²如先前所描述。





其中

L為配位體單元

L_L 為可存在或不存在之配位體單元，其中L與 L_L 可為相同或不同配位體單元；

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^O 為視情況選用之二級接合劑總成；

M^2 為經由硫醚鍵聯與L或 L_L 中之至少一者共軛之順丁烯二醯亞胺環、水解之順丁烯二醯亞胺、丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺；且

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與 L^O 、A、W、Y或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；

下標p介於1至20範圍內；

-W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

-A-為視情況選用之延伸子單元，

-A'-為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a'為0或1；且

u為1至20，其限制條件為當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

L、HE及BU、L^o、A、W及Y具有關於配位體-藥物共軛物所提供之含義。另外，關於圓圈、L、HE、BU、L^o、A、W及Y特定敘述之各個所選實施例同樣適用於此等共軛物。L及L₁可為不同配位體單元或相同配位體單元。在L及L₁為相同配位體單元之實施例中，丁二醯亞胺或順丁烯二醯亞胺可與位於配位體單元之相同或不同多肽鏈上之配位體單元共軛。

在一些態樣中，當r為1時，HE不包含羰基(亦即C(=O))。

在一些態樣中，m+q+r為0、1或2。

在一些態樣中，r為零。

在一些態樣中，配位體-功能劑共軛物由式IV或式IVa或其鹽表示，其中r及m為零且q為一。

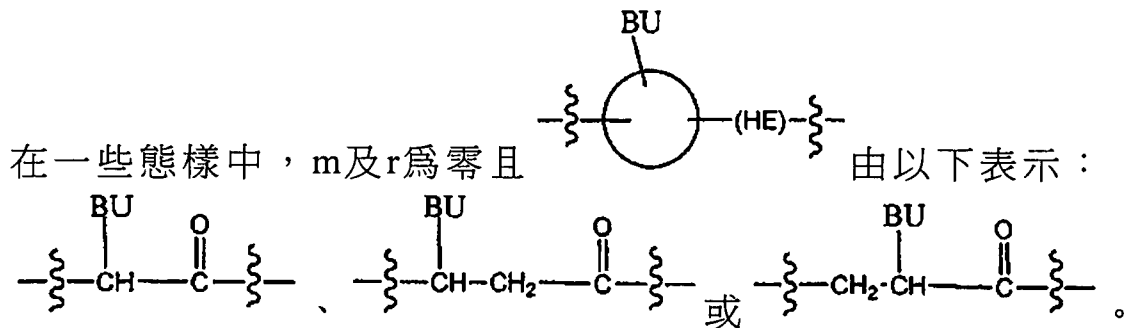
在一些態樣中，配位體-功能劑共軛物由式IV或式IVa或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)，r為零，且m+q之總和為1。在一些該等態樣中，骨架為C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈。

在一些態樣中，配位體-功能劑共軛物由式IV或式IVa或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基(較佳C₁₋₄伸烷基或C₁₋₄伸雜烷基)，且m及r為零。在一些該等態樣中，骨架為C₁₋₃伸烷基或C₁₋₃伸雜烷基。在一些該等態樣中，伸烷基為直鏈或分支鏈。

在一些態樣中，配位體-功能劑共軛物由式IV或式IVa或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即C₁、C₂、C₃或C₄直鏈或分支鏈伸烷基，r

為零，且 $m+q$ 之總和為 1。

在一些態樣中，配位體-功能劑共軛物由式 IV 或式 IVa 或其鹽表示，其中圓圈表示骨架，即 C_1 、 C_2 、 C_3 或 C_4 直鏈或分支鏈伸烷基，且 m 及 r 為零。



在一些態樣中，在鹼性單元之鹼與順丁烯二醯亞胺或丁二醯亞胺(水解或非水解)之氮原子之間存在不小於 2 個且不超過 6 個介入原子，且在拉電子基團與順丁烯二醯亞胺或丁二醯亞胺(水解或非水解)之氮原子之間存在不超過 5 個原子、不超過 4 個原子、不超過 3 個原子或不超過 2 個介入原子。

在一些態樣中， M^2 為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺且 L_L 存在。在一些態樣中， M^2 為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺且 L_L 不存在。在一些態樣中， M^2 為順丁烯二醯亞胺環或水解之順丁烯二醯亞胺且 L_L 存在。在一些態樣中， M^2 為順丁烯二醯亞胺環或水解之順丁烯二醯亞胺且 L_L 不存在。在一些態樣中，當 M^2 為順丁烯二醯亞胺環或水解之順丁烯二醯亞胺時， L_L 存在或不存在，且當 M^2 為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺時， L_L 存在。在各個此等實施例中，當 L 及 L_L 存在時， L 及 L_L 可為相同配位體單元或不同配位體單元。在 L 及 L_L 存在且為相同配位體單元之一些態樣中，順丁烯二醯亞胺或丁二醯亞胺可與位於配位體單元之相同或不同多肽鏈上之配位體單元共軛。

在各個此等實施例中，伸烷基或伸雜烷基鏈可為直鏈或分支鏈。在一些態樣中，伸烷基或伸雜烷基鏈將為直鏈。在其他態樣中，

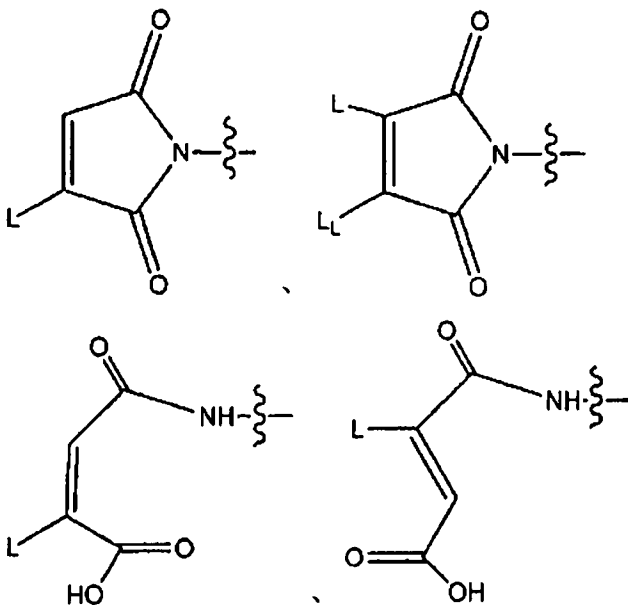
其將為分支鏈。

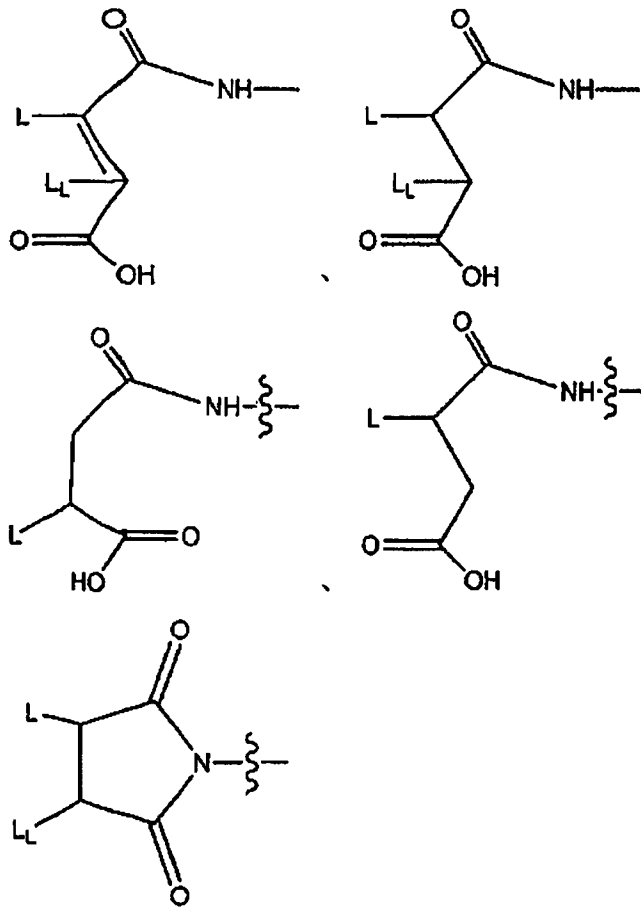
在各個此等實施例中， p 可介於1至20、較佳1至12、甚至更佳1至10或1至8範圍內。

在骨架本身與視情況選用之二級接合劑總成或D'直接鍵聯之一些態樣中(例如在當 q 為零時或當 q 為零且 r 為零時所選之實施例中)，骨架將包含適合於與視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點。

在骨架本身與視情況選用之二級接合劑總成或D'直接鍵聯之一些態樣中(例如在當 q 為零時或當 q 為零且 r 為零時所選之實施例中)，骨架將包含適合於與A或D'連接之反應性位點。

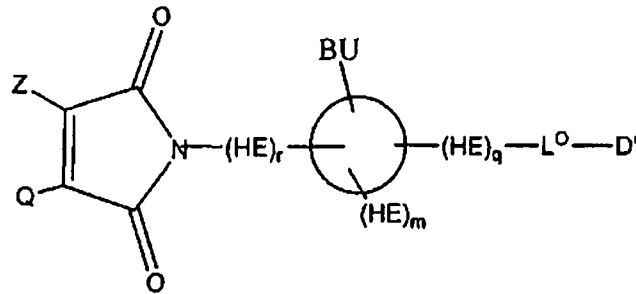
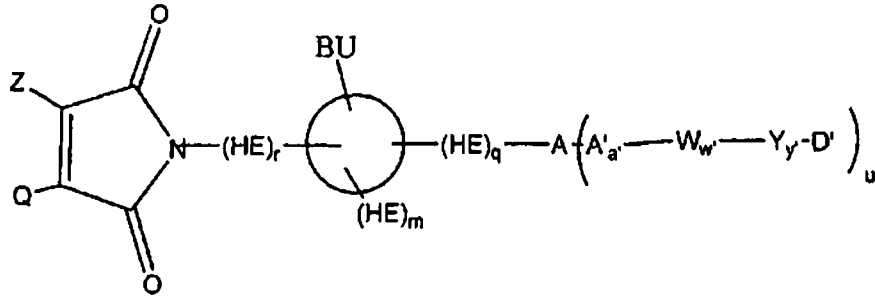
順丁烯二醯亞胺環可如下文所說明以非水解與水解形式經由一個或兩個硫醚鍵聯與配位體單元共軛，且丁二醯亞胺環可如下文所說明以非水解與水解形式經由兩個硫醚鍵聯與配位體單元共軛，其中波形線指示與接合劑共軛物或接合劑-功能劑共軛物之其餘部分連接之點：





在順丁烯二醯亞胺環、水解之順丁烯二醯亞胺、丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺經由兩個硫醚鍵聯與配位體共軛之實施例中， p 通常介於1至10或1至8或1至4範圍內，且順丁烯二醯亞胺或丁二醯亞胺可與配位體之相同或不同多肽鏈共軛。在一些態樣中，配位體為抗體。在其他態樣中，配位體為非抗體蛋白質。

具有分支鏈或非分支鏈接合劑之功能劑-接合劑共軛物可由下式或其鹽(例如其醫藥學上可接受之鹽)表示：



其中

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L⁰為視情況選用之二級接合劑總成；

Q及Z為氫或鹵素，其中Q及Z中之至少一者為鹵素；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與L⁰、A、W、Y或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；

W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

A為視情況選用之延伸子單元，

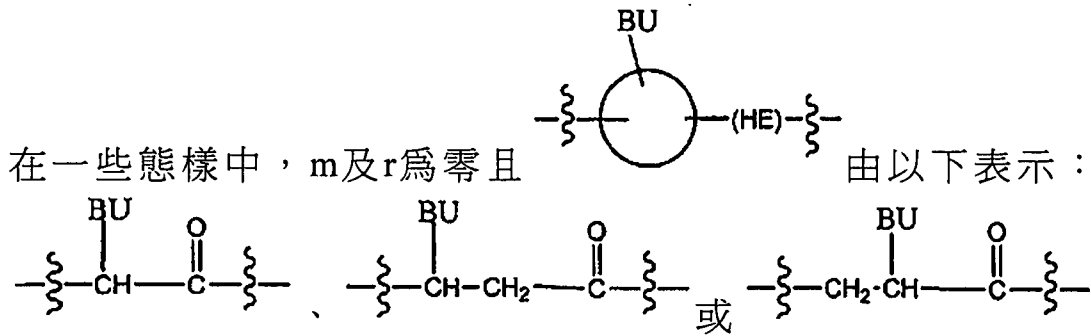
A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a'為0或1；且

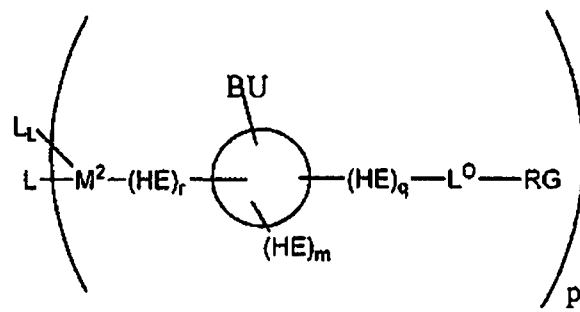
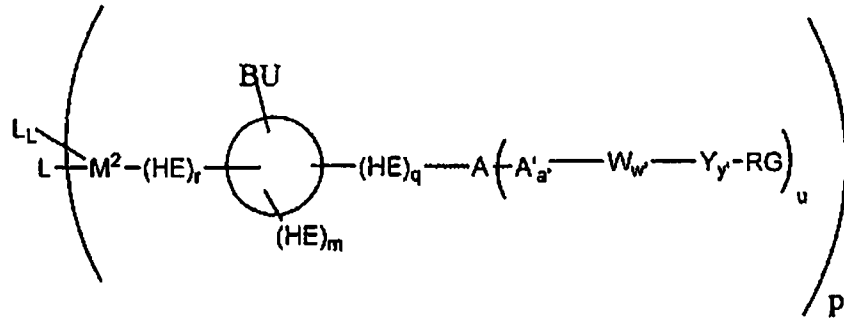
u為1至20，其限制條件為當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

在一些態樣中，鹵素為溴。

HE及BU、L⁰、A、W及Y具有關於藥物-藥物共軛物所提供之含義。另外，關於圓圈、HE、BU、L⁰、A、W及Y特定敘述之各個所選實施例同樣適用於此等共軛物。



具有分支鏈或非分支鏈接合劑之配位體-接合劑共軛物可由下式或其鹽(例如其醫藥學上可接受之鹽)表示：



其中

L為配位體單元；

L_L 為可存在或不存在之配位體單元，其中L與 L_L 可為相同或不同配位體單元；

RG為位於 L^O 或 $\left\{ -A-A'-W-W'-Y-Y'- \right\}$ 末端之反應性基團(包含反應性位點)，其適合於連接藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^O 為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；

M^2 為經由硫醚鍵聯與L或 L_L 中之至少一者共軛之順丁烯二醯亞胺環、水解之順丁烯二醯亞胺、丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺；且

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與 L^O 、A、W、Y或FA連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；

下標p介於1至20範圍內。

W-為視情況選用之可裂解單元，

下標 w' 為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標 y' 為0或1，

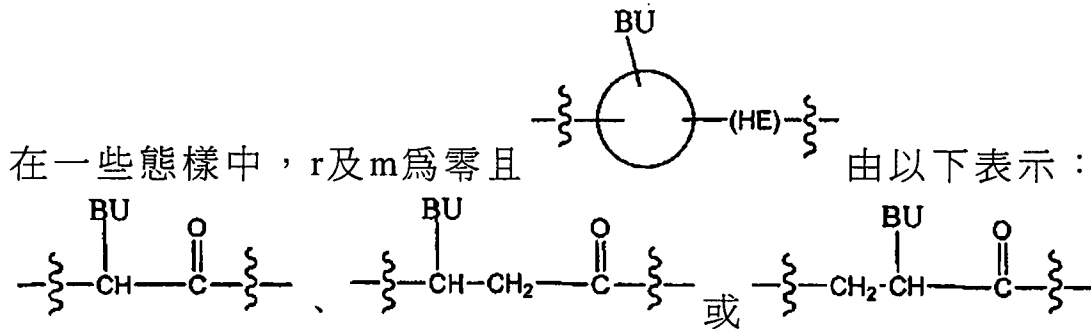
A為視情況選用之延伸子單元，

A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

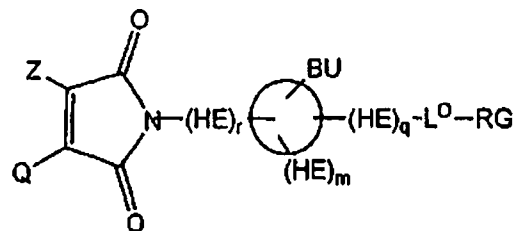
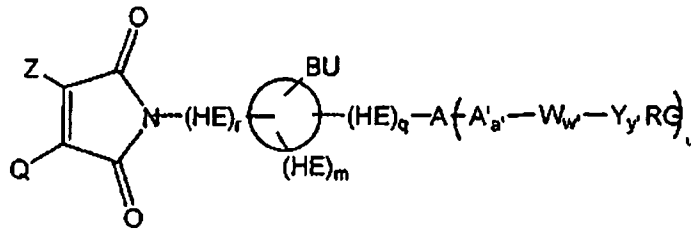
a' 為0或1；且

u 為1至20，其限制條件為當 u 為2至20時，A存在，且當 u 為1時，A可存在或不存在。

L、HE及BU、L⁰、A、W及Y具有關於配位體-藥物共軛物所提供之含義。另外，關於圓圈、L、HE、BU、L⁰、A、W及Y特定敘述之各個所選實施例同樣適用於此等共軛物。



分支鏈或非分支鏈接合劑可由下式或其鹽(例如其醫藥學上可接受之鹽)表示：



其中

RG為位於L⁰或 $-\zeta-A-A'-W-W'-Y-\zeta-$ 末端之反應性基團(包含反應

性位點)，其適合於連接藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L⁰為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；

Q及Z為氫或鹵素，其中Q及Z中之至少一者為鹵素；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基

或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與L⁰、A、W、Y或RG連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；

W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

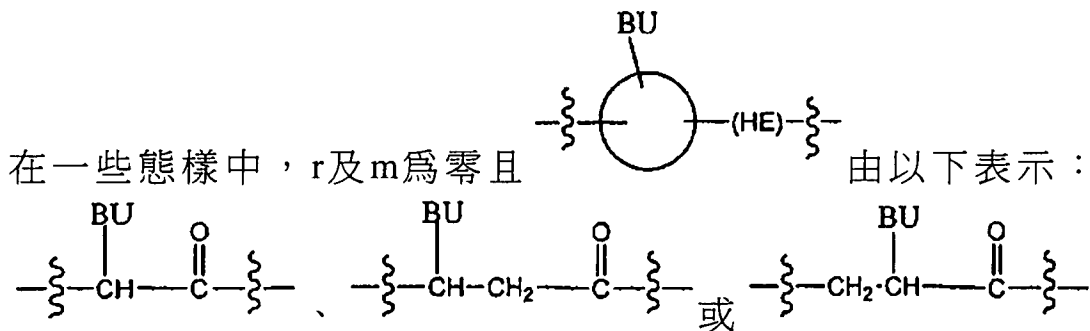
A為視情況選用之延伸子單元，

A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a'為0或1；且

u為1至20，其限制條件為當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

HE及BU、L⁰、A、W及Y具有關於配位體-藥物共軛物所提供之含義。另外，關於圓圈、HE、BU、L⁰、A、W及Y特定敘述之各個所選實施例同樣適用於此等共軛物。

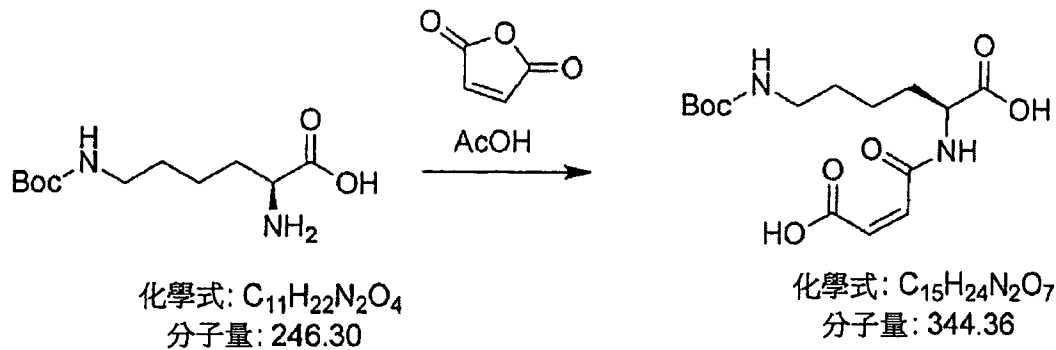


製備單或二硫取代之鹵基順丁烯二醯亞胺以及二硫取代之丁二醯亞胺之方法為此項技術中已知的，其為使其與配位體共軛之方法，參見例如Ryan等人，*Chem. Commun.*, 2011, 47, 5452-5454及Smith等人，*J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132(6), 1960-1965。

實例

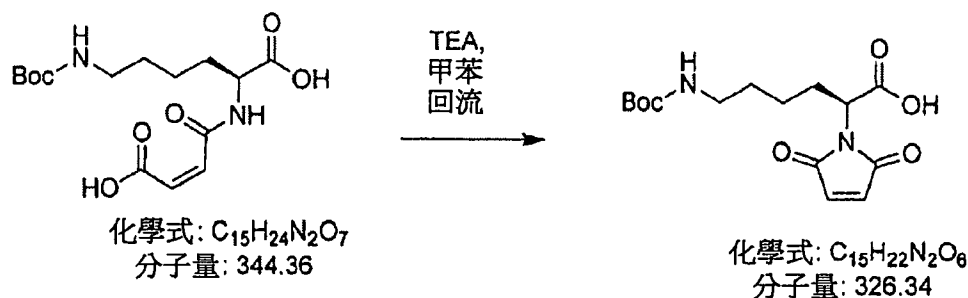
實例1-代表性自行穩定之組成部分之合成

順丁烯酸醯基(maleyl)-離胺酸(boc)OH



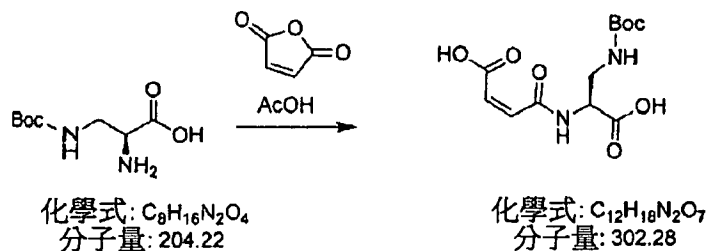
在50 ml圓底燒瓶中，將H-Lys(boc)-OH (246 mg, 1 mmol)及順丁烯二酸酐(98 mg, 1 mmol)溶解於1 ml (4體積)乙酸中且在室溫下攪拌溶液3小時。在旋轉蒸發儀上將反應混合物濃縮為油狀物，且藉由添加約10 ml二氯甲烷使產物沈澱。藉由真空過濾收集沈澱，用二氯甲烷洗滌，且在真空烘箱中乾燥隔夜。回收270 mg呈白色粉末之產物。(85%產率)

順丁烯二醯基(maleoyl)-離胺酸(boc)-OH



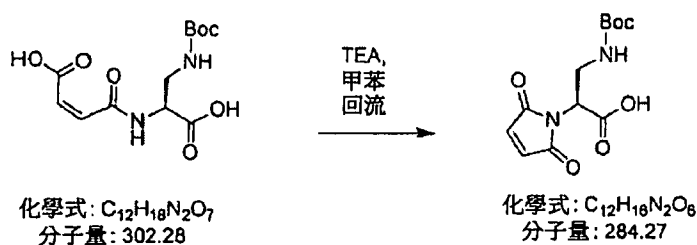
在裝備有冷凝器之50 ml圓底燒瓶中經分子篩將順丁烯酸醯基-Lys(boc)-OH (100 mg, 0.29 mmol)懸浮於甲苯(3 ml)及三乙胺(224 μ L)中。添加DMA (約150 μ L)以輔助溶解。加熱溶液至125 $^{\circ}$ C且回流4小時，其後藉由LCMS顯示反應完成。在旋轉蒸發儀上反應混合物濃縮至乾燥，再溶解於DMSO中且藉由製備型HPLC純化。分離56 mg呈白色粉末之產物。(60%產率)

順丁烯酸醯基-DPR(boc)OH



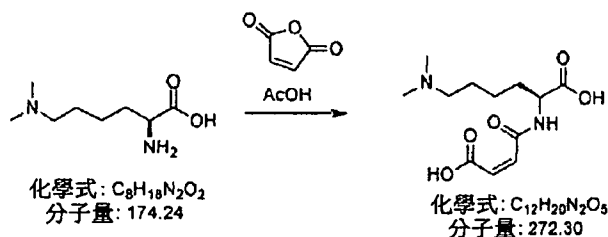
以與順丁烯酸醯基-離胺酸(boc)OH相同之方式製備順丁烯酸醯基-DPR(boc)-OH。(503 mg, 67%)

順丁烯二醯基-DPR(boc)-OH



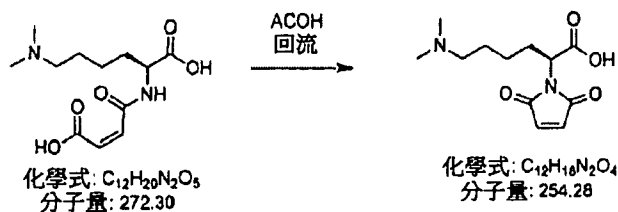
以與順丁烯二醯基-Lys(boc)相同之方式製備順丁烯二醯基-DPR(boc)-OH。(340 mg, 71%)

順丁烯酸醯基-二甲基離胺酸



以與順丁烯酸醯基-lys(boc)-OH相同之方式製備順丁烯酸醯基-二甲基離胺酸，除了在添加二氯甲烷之後產物不沈澱。實際上，使油狀物與1:1二氯甲烷/己烷共蒸發直至獲得白色泡沫且在高真空下乾燥隔夜。(109 mg, 99%)

順丁烯二醯基-二甲基離胺酸



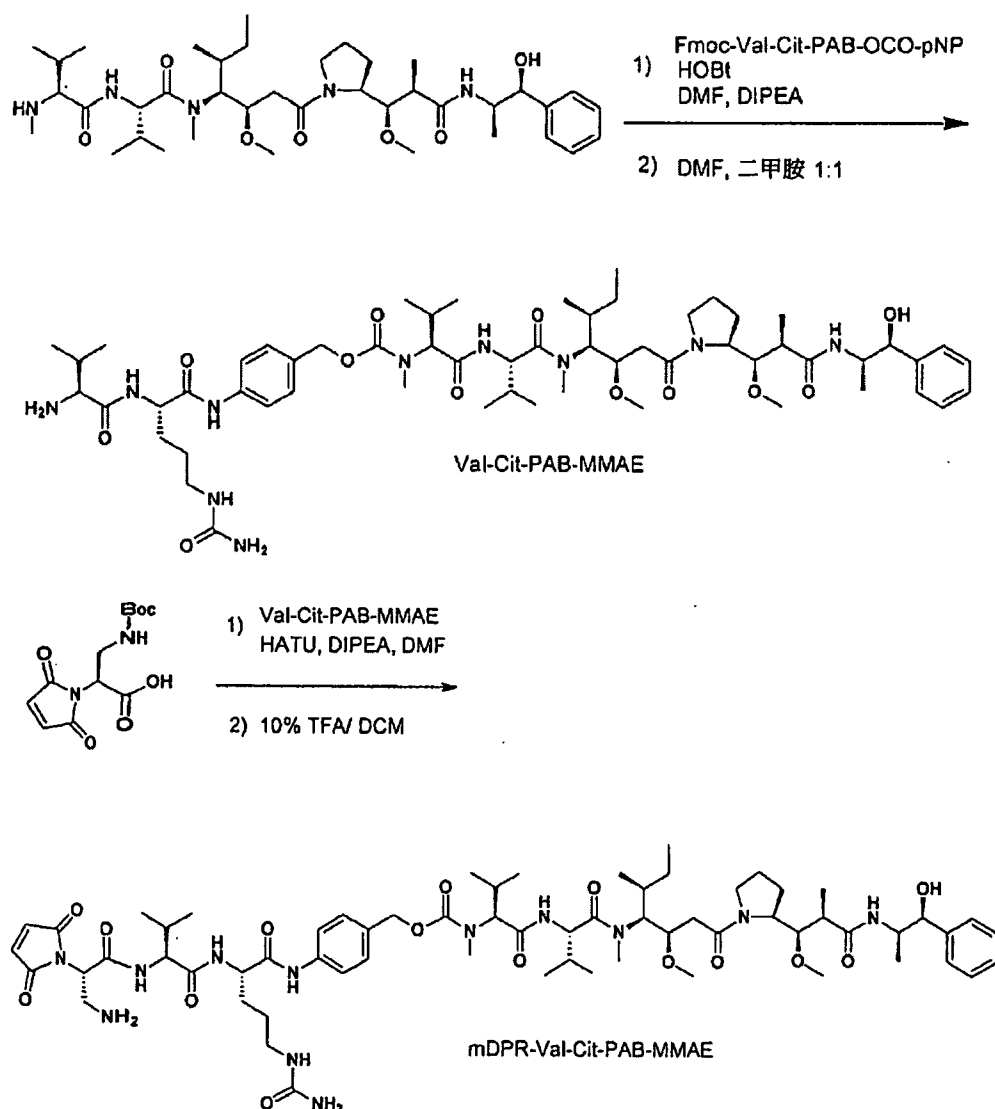
在10 ml圓底燒瓶中，將順丁烯酸醯基-二甲基離胺酸(100 mg)溶解於乙酸(1 ml)中且回流4小時。4小時後，將反應混合物在旋轉蒸發

儀上濃縮至乾燥且在高真空下乾燥為白色泡沫。基於6.9 ppm處之單峰之比率及來自起始材料之烯質子，粗物質之NMR顯示約80%轉化率。

實例2-mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE之合成

使用肽偶合之標準方法藉由使受Boc保護之mDPR與Val-Cit-PAB-MMAE偶合來製備mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE。在最後步驟中移除Boc基團。

流程：



Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE之製備

將MMAE (5.34 g, 6.94 mmol)、Fmoc-Val-Cit-PAB-OCO-pNP (5.0 g, 6.94 mmol)及HOBt (1.4 mmol)饋入經N₂吹掃之250 ml圓底燒瓶

中，且溶解於15 ml DMA中。接著添加DIPEA (2.44 ml, 14 mmol)，且在室溫下在惰性氛圍下攪拌溶液隔夜。藉由製備型HPLC，使用經40分鐘自30% MeCN (0.05% TFA)至100% MeCN (0.05% TFA)之線性梯度分離產物。將含有產物之溶離份在旋轉蒸發儀上濃縮為白色粉末，得到3.2 g (34%)

Val-Cit-PAB-MMAE之製備

在室溫下將3.2 g Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE於7 ml DMF及7 ml二乙胺中之溶液攪拌3小時。接著，將反應混合物在旋轉蒸發儀上濃縮為稠油狀物。在乙醚(100 ml)中沈澱產物並過濾，得到2.0 g呈灰白色粉末之產物，其不經進一步純化即使用。

mDPR(boc)Val-Cit-PAB-MMAE之製備

在50 ml圓底燒瓶中，將mDPR(boc)-OH (25 mg, 0.089 mmol)、Val-Cit-PAB-MMAE (100 mg, 0.089 mmol)及HATU (41 mg, 0.107 mmol)溶解於2 ml DMF中。添加DIPEA (34 μ L)且在室溫下攪拌溶液1小時。用1 ml DMSO稀釋反應混合物且藉由製備型HPLC分離產物。(70 mg, 56%)

mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE之製備

將以上材料溶解於2 ml 10% TFA/二氯甲烷中且在室溫下攪拌1 h。將反應混合物濃縮至乾燥，在1 ml DMSO中復水，且藉由製備型HPLC純化。(56 mg, 86%)

實例3-監測硫代丁二醯亞胺水解

自行穩定之生物共軛物之硫代丁二醯亞胺水解可藉由電噴霧質譜分析監測，因為添加水至共軛物中使共軛物之可觀測分子量增加18道爾頓。當藉由完全還原人類IgG1抗體之鏈間二硫化物且使順丁烯二醯亞胺與所得半胱胺酸共軛來製備共軛物時，抗體之各輕鏈將含有單一順丁烯二醯亞胺修飾且各重鏈將含有三個順丁烯二醯亞胺修飾(參

見圖1，上部)。在所得硫代丁二醯亞胺水解完成時，輕鏈之質量將因此增加18道爾頓，同時重鏈之質量將增加54道爾頓。此說明於圖1(底部)中，其中本發明之自行穩定之順丁烯二醯亞胺藥物-接合劑(mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE，分子量1289 Da)與完全還原之抗-CD30抗體cAC10共軛且隨後水解。重鏈上單一N-鍵聯糖基化位點之存在引起在未共軛抗體中觀察到之質量非均質性。

實例4-監測 $t_{1/2}$ 水解

藉由監測自行穩定之生物共軛物(mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE)之質譜中隨時間推移非水解及水解峰之強度，可評估水解動力學。此舉係藉由繪製在各時間點已水解之總群體的百分比相較於時間之曲線(圖2，上部)來進行。接著，將此等數據用以下指數方程擬合：

$$Y = Y_{\max} \times (1 - e^{-Kt})$$

其中Y為時間t時所觀測之水解百分比， Y_{\max} 為漸進最大水解%，且K為水解速率常數。水解反應之半衰期定義為

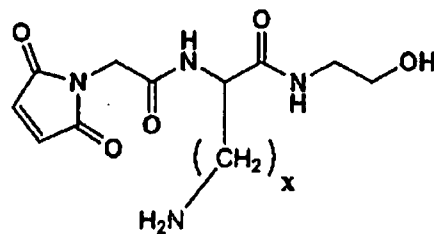
$$t_{1/2} = \ln(2)/K$$

當對經還原hIgG1抗體之輕鏈執行此程序時，相當直接地進行分析，因為每條輕鏈僅存在一個共軛位點且反應為未水解物質至水解物質之簡單進程，其中質量變化為18道爾頓。對重鏈執行此分析為複雜的，此係因為以下事實：存在總共三個共軛位點，隨著共軛物經歷水解產生+18、+36及+54道爾頓之一系列峰。因為存在多種糖型，故重鏈之分析為更複雜的。藉由僅評估由最豐富糖型產生之峰(54195 Da至54250 Da之過渡)且假定此等峰為重鏈糖型之整個群體之合理替代物來執行呈現於圖2中之分析。如圖2中顯而易見，對於輕鏈及重鏈所觀測到之動力學曲線極類似。出於此原因且因為以上提及之關於重鏈定量水解速率之增加之複雜性，由對輕鏈水解之評估確定用於表徵與抗體共軛之自行穩定之順丁烯二醯亞胺之水解速率的大多數數據。

此方法之一個侷限性為電噴霧電離過程傾向於在所觀測峰中產生小比例之鈉加合物(在用於產生圖2中之數據的條件下約10%)，其質量觀測值比母體質量大22道爾頓。許多質譜儀不具有足夠高之解析度來將此+22質量與由總分子質量超過25,000道爾頓之蛋白質的水解產生之+18質量區分開。因此，在早期時間點處，當水解程度較低時，在約+20道爾頓處出現之峰為此兩種效應之組合，該等效應不能容易地以實驗方式分離。因此，在最早時間點處水解產物百分比之估計值可能為過度估計值，但隨著反應進行接近完成，此效應之量值減小。

實例5-評估自行穩定之接合劑總成中順丁烯二醯亞胺與鹼性基團之間
的間距

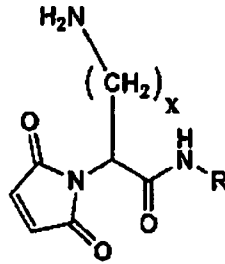
假定與順丁烯二醯亞胺相鄰之鹼性胺基之存在將加速用彼等順丁烯二醯亞胺製備之硫代丁二醯亞胺之水解且因此產生穩定生物共軛物。順丁烯二醯亞胺與鹼性胺基之間的距離公認為該等自行穩定之單元之設計中的重要參數。為評估此間距之作用，製備一系列具有以下通式結構之順丁烯二醯亞胺：



其中x由1變化至4。接著，此等順丁烯二醯亞胺與完全還原之人類IgG1在pH 8及37°C下共軛，且即刻藉由電噴霧質譜分析加以監測以測定水解速率。鹼性基團與順丁烯二醯亞胺之間的距離與水解速率成反比-即距離愈大，水解愈慢。此結果說明使鹼性胺基接近於順丁烯二醯亞胺定位使得用順丁烯二醯亞胺製備之生物共軛物之丁二醯亞胺環水解的速率增加。然而，甚至在本文所測試之最短間距(x=1)情況下，抗體共軛物亦將必須在pH 8及37°C下保持約5小時以達成完全水

解(約5個半衰期)。抗體或其他蛋白質長期曝露於該等條件可潛在地產生共價修飾及錯誤摺疊事件，且因此探尋具有甚至更快的水解速率之順丁烯二醯亞胺。

為製備具有更快水解速率之生物共軛物，製備一系列具有以下通式結構之順丁烯二醯亞胺：



其中 $x=1$ 至 4 且 $R=\text{val-cit-PAB-MMAE}$ 。接著，此等順丁烯二醯亞胺與完全還原之人類IgG1在pH 8及 37°C 下共軛，且即刻藉由電噴霧質譜分析加以監測以測定水解速率。如圖4 (上部)所示，在此系列之結構上相關之化合物內鹼性基團與順丁烯二醯亞胺之間的距離對水解反應之進程產生深刻影響。如在前一實例中，順丁烯二醯亞胺與鹼性胺之間的距離愈短，水解愈快。由於已知鹼性條件(亦即高pH值)使順丁烯二醯亞胺及丁二醯亞胺環水解之速率增加，故推測此效應為因一般鹼機制產生分子內催化的實例。在此系列內， $x=2$ 及 $x=3$ 之化合物在3小時培育期間並不獲得完全水解，而是分別達至約80%及50%下之漸近線(曲線經校正為最大限度地達成水解)。此現象可由諸如一級胺對丁二醯亞胺環之直接親核攻擊的競爭性反應產生或可歸因於順丁烯二醯亞胺中產生兩相水解動力學之異構體雜質。

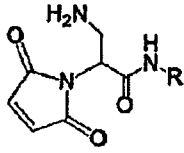
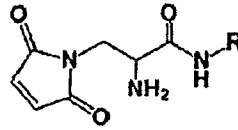
實例6-水解動力學

先前實例說明鹼性基團對生物共軛物中之丁二醯亞胺環水解速率可具有之影響，其視母體分子中鹼性基團與順丁烯二醯亞胺之間的距離而定。然而，預期拉電子或推電子基團之存在亦將影響環水解之速率，因為此等基團將影響環中羰基碳處之電子密度(且因此影響親

電子性)。在實例5之共軛物中，甲醯胺基團存在於相對於環氮之 α 位置(亦即在環氮與甲醯胺之羰基碳之間存在單一碳原子)。因為甲醯胺為弱拉電子基團，故其存在可能影響所觀測之水解速率。為更好地理解鹼性胺基及拉電子甲醯胺基對所觀測水解速率之相對貢獻，在pH 7.4、22°C下使一系列順丁烯二醯亞胺與經還原人類IgG1抗體共軛，且藉由質譜分析測定水解速率(圖5)。此等順丁烯二醯亞胺僅含有 α 位置之甲醯胺(三角形)，僅含有 β 位置之一級胺(倒三角形)或含有甲醯胺與一級胺(圓圈)。亦評估在順丁烯二醯亞胺附近不含該兩種基團之對照順丁烯二醯亞胺，不過在此等條件下其水解如此緩慢以致未觀測到反應且未繪製數據。在此等條件下，含有鹼與拉電子基團之自行穩定之順丁烯二醯亞胺產生生物共軛物且水解 $t_{1/2}$ 為僅12分鐘，而僅含有胺之順丁烯二醯亞胺得到2.5小時之 $t_{1/2}$ ，且僅含有甲醯胺之順丁烯二醯亞胺得到24小時之 $t_{1/2}$ 。此結果表明鹼性基團及拉電子基團共同起作用產生共軛物，且水解動力學極快速，其對於在所需溫和條件下製造生物共軛物最適宜。用二胺基丙醯基順丁烯二醯亞胺製備之共軛物(圓圈)展現理想水解特徵，且在極溫和條件下 $t_{1/2}$ 小於15分鐘且在約2小時內反應接近100%完成。

實例7-評估自行穩定之接合劑總成中順丁烯二醯亞胺與甲醯胺基團之間的時間

展示於以上實例5及6中之在用自行穩定之二胺基丙醯基順丁烯二醯亞胺基藥物-接合劑酸(DPR)製備之共軛物中觀測到之快速且完全丁二醯亞胺水解表明鹼性基團與拉電子基團對設計之重要性。用二胺基丙酸製備第二異構體順丁烯二醯亞胺基藥物-接合劑，以進一步評估此兩種組成部分對所得共軛物之水解特性的作用。該等結構稱為 α -順丁烯二醯亞胺基DPR及 β -順丁烯二醯亞胺基DPR且展示於下文中。

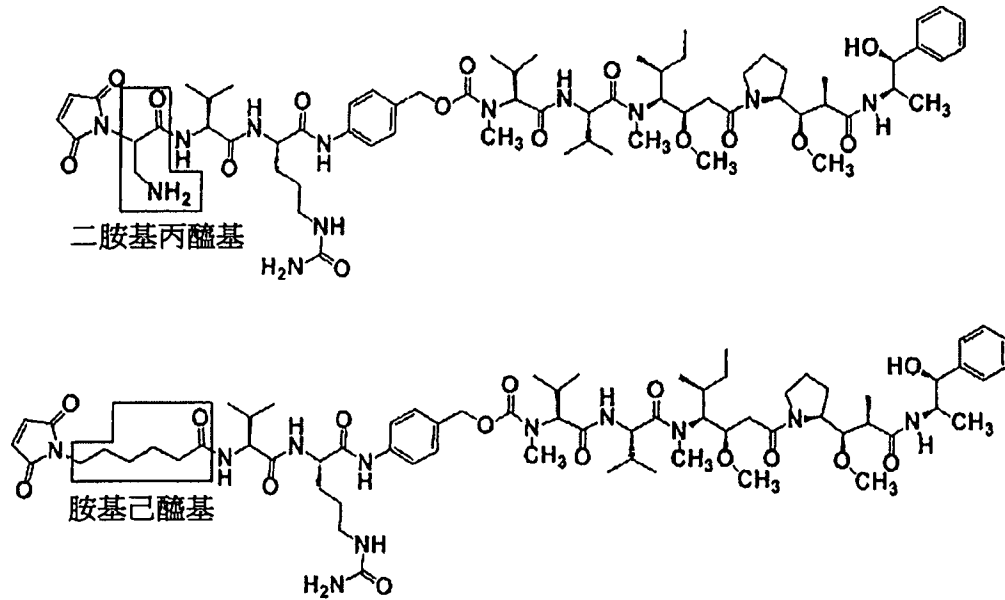
 α -順丁烯二醯亞胺基DPR β -順丁烯二醯亞胺基DPR

R = val-cit-PAB-MMAE

兩種DPR順丁烯二醯亞胺均具有鹼性一級胺，其藉由兩個碳原子與順丁烯二醯亞胺基氮分離。兩者亦均具有拉電子甲醯胺基，然而甲醯胺與順丁烯二醯亞胺基氮之距離由1個碳單元變化至2個碳單元(分別為 α 及 β)。最後，鹼性胺與甲醯胺之間的時間隔亦由1個碳單元變化至2個碳單元(分別為 β 及 α)。總之，此意謂相對於 α -DPR，在 β -DPR中甲醯胺對順丁烯二醯亞胺環施加較小拉電子影響，但對一級胺施加較大拉電子影響。此預期藉由降低順丁烯二醯亞胺之親電子性與一級胺之鹼性使水解速率減慢。當此等順丁烯二醯亞胺基藥物-接合劑與經還原抗體共軛且關於丁二醯亞胺水解進行監測時，對於 β -DPR而言相對於 α -DPR觀測到17倍降低之水解速率(圖6)。此實例說明鹼性基團與拉電子基團之相對定位如何可用於『調節』水解速率。

實例8-15

為評估用自行穩定之藥物-接合劑製備之ADC的穩定性及藥理學活性，製備自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-藥物-接合劑。此藥物-接合劑含有經由蛋白酶可裂解之val-cit PAB自行分解之基團與細胞毒性劑MMAE偶合之順丁烯二醯亞胺基-DPR基團(在本文中稱為順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE)。為進行比較，使用非自行穩定之藥物-接合劑(在本文中稱為順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE)。此等試劑之間的唯一差異為val-cit接合劑中順丁烯二醯亞胺與羧基基團之間的單元。此等藥物-接合劑之順丁烯二醯亞胺單元分別可使用順丁烯二酸酐及單保護之二胺基丙酸及胺基己酸來製備



實例8-評估配位體-藥物共軛物在緩衝液中之穩定性

在標準緩衝液系統中，順丁烯二醯亞胺自使用硫醇-順丁烯二醯亞胺化學製備之生物共軛物的消除基本上不可偵測，因為消除之順丁烯二醯亞胺再次與硫醇快速反應，產生遠離完整共軛物側之平衡。然而，添加硫醇清除劑至緩衝液中會產生自生物共軛物消除之順丁烯二醯亞胺可實際上與清除劑反應之系統，引起順丁烯二醯亞胺自蛋白質之持久性可觀測損失。用以自行穩定之二胺基丙醯基(DPR)順丁烯二醯亞胺基藥物-接合劑以及非穩定之己醯基藥物-接合劑製備之抗體-藥物共軛物執行使用該種系統之實驗。使用完全還原之人類化IgG1用每份順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE或順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE之抗體8份藥物製備ADC。藉由逆相HPLC在如先前所述(Sun 2005)之聚合PLRP-S管柱上確定藥物負載量。亦藉由電噴霧質譜分析確定自行穩定之接合劑之完全丁二醯亞胺水解。此等ADC置放於150 mM Tris緩衝液(pH 8, 2.5 mg/mL, 含有10 mM N-乙醯基半胱胺酸作為清除劑)中，且在37°C下培育2週。在培育期間，在七個時間點，移出各ADC之等分試樣並在-80°C下冷凍。在時程完成時，藉由以上逆相HPLC方法分析所有樣品以測定藥物:抗體比率。此

研究之結果展示於圖7中。用自行穩定之DPR順丁烯二醯亞胺基藥物-接合劑製備之ADC展現經此時程之最小藥物損失(經14天每份抗體8.0份藥物變為7.9份藥物)，而用己醯基順丁烯二醯亞胺基藥物-接合劑製備之ADC在此等條件下損失其藥物負載量之約一半(經14天每份抗體由8.0份藥物變為3.9份藥物)。

實例9-離體血漿穩定性(逆相方法)

藉由實例8中所述之逆相HPLC方法評定在非人類血漿樣品中人類化ADC之藥物負載量可藉由首先用Ig選擇樹脂(GE Healthcare)分離與人類Fc域選擇性結合之ADC來達成。使用完全還原之人類IgG1用每份順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE或順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE之抗體8份藥物製備ADC。在無菌大鼠血漿中於37°C下培育此等ADC (0.25 mg/mL) 7天。在培育期間，在七個時間點，移出各ADC之50 µL等分試樣並在-80°C下冷凍。在時程完成時，自各樣品純化ADC且藉由逆相HPLC分析以測定藥物:抗體比率。此研究之結果繪製於圖8中。如在緩衝液中所觀測，在由順丁烯二醯亞胺基-己醯基ADC產生約一半藥物損失之條件下，在大鼠血漿中培育用自行穩定之順丁烯二醯亞胺製備之ADC亦產生極少或不可觀測之藥物損失。

實例10-離體血漿穩定性(共軛藥物方法)

利用第二分析格式來評估ADC在大鼠及人類血漿中之離體穩定性。使用部分還原至每份抗體4份硫醇之程度的人類IgG1用每份順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE或順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE之抗體4份藥物製備ADC (產生每份抗體4份藥物之ADC)。將此兩種ADC外加至大鼠及人類血漿中且在37°C下培育7天。在此培育期間，在七個時間點，移出等分試樣且在-80°C下冷凍直至時程完成。接著，將ADC自各樣品分離且如先前所述(Sanderson

2005)以蛋白分解方式自所分離之ADC釋放MMAE。接著，藉由LC-MS/MS定量所釋放之MMAE且將其校正為各ADC之初始值(圖9)。在大鼠與人類血漿中，用自行穩定之順丁烯二醯亞胺製備之ADC在此等條件下損失極少或不損失藥物，而順丁烯二醯亞胺基-己醯基ADC損失約一半之藥物。

實例11-活體內穩定性

如以上實例10中所描述，在用Ig選擇樹脂純化後，可藉由逆相HPLC分析量測在大鼠血漿中關於ADC之藥物:抗體比率。對衍生自在大鼠中之活體內藥物動力學實驗之樣品應用此方法。使用部分還原至每份抗體4份硫醇之平均值的人類化IgG1用每份順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE或順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE之抗體4份藥物製備ADC(產生之藥物:抗體比率為4)。如先前所述(Sanderson 2005)藉由疏水性相互作用層析進一步純化此等ADC，以分離每份抗體含有4份藥物之物質。在史泊格-多利大鼠(Sprague-Dawley rat)中，以10 mg/kg靜脈內給予此等ADC。在五個時間點，將來自各給藥組之三隻動物處死且將所收集之血液加工成血漿並在-80°C下冷凍。研究完成時，藉由上述Ig選擇樹脂方法加工所有樣品，除了樣品體積有變化。此研究中在各時間點之藥物:抗體比率繪製於圖10中。如在離體大鼠血漿中所觀測，用自行穩定之順丁烯二醯亞胺製備之ADC展現最小活體內藥物損失，7天後由每份抗體4.1份藥物之初始值降至每份抗體3.6份藥物之值(降低12%)。在此相同時間範圍期間，用順丁烯二醯亞胺基-己醯基接合劑製備之ADC的藥物:抗體比率由3.9之初始值降至1.5之值(降低61%)。此說明離體觀測到之自行穩定之藥物-接合劑之增加之穩定性轉化為活體內設定。

實例12-藥物動力學

因為順丁烯二醯亞胺基-己醯基ADC易於經由順丁烯二醯亞胺消

除損失藥物，而自行穩定之順丁烯二醯亞胺ADC不易如此，故預測在等效劑量之兩種ADC之後曝露於抗體共軛之藥物的程度將較大為合理的。為證實此預測，使用部分還原至每份抗體4份硫醇之平均值的人類IgG1用每份順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE或順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE之抗體4份藥物製備ADC (產生之藥物:抗體比率為4)。在史泊格-多利大鼠中以2 mg/kg給予此兩種ADC，且在七個時間點取得血液樣品並加工成血漿。使此等血漿樣品連同用於製備校準曲線之各ADC之標準物經歷mAb選擇樹脂捕獲及以上實例10中所描述之番木瓜蛋白酶釋放程序，以量測抗體共軛之MMAE的濃度。對於用自行穩定之藥物-接合劑製備之ADC而言，抗體共軛之藥物濃度較高，且隨時間推移差異之量值增加(數據未圖示)。初始抗體共軛之藥物濃度為可重疊的，反映ADC之劑量及藥物:抗體比率相等。然而，在第一天內觀測到差異，截至第3天達至兩倍差異。對於自行穩定之ADC而言，此等較高濃度使得抗體-共軛之藥物AUC相對於順丁烯二醯亞胺基-己醯基ADC大約40%。

實例13-毒理學

為評估自行穩定之順丁烯二醯亞胺對毒理學之影響，使用部分還原至每份抗體4份硫醇之平均值的人類化IgG1 (其已知不與任何大鼠抗原結合)用每份順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE或順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE之抗體4份藥物製備ADC (產生之平均藥物:抗體比率為4)。在雌性CD@IGS大鼠(Charles River Laboratories)中以10 mg/kg靜脈內給予此等ADC (每種測試物品6隻大鼠加上僅接受媒劑之6隻大鼠)。在給藥之前且在3個給藥後時間點，取得血液樣品以便對毒性之生物標記進行血液學及血清化學分析。對於自行穩定之共軛物而言，由MMAE ADC誘導之嗜中性白細胞減少症相比順丁烯二醯亞胺基-己醯基ADC呈現較小嚴重程度(數據未圖

示)。

實例14-所釋放藥物之血漿濃度

以上實例13中所描述之毒理學實驗亦包括在給藥後一小時及24小時抽取血液，將其連同給藥後4天及7天之樣品一起藉由LC-MS/MS分析血漿中之未共軛MMAE。此分析之結果表明對於自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-DPR-val-cit-PAB-MMAE ADC而言，循環MMAE之峰濃度相對於順丁烯二醯亞胺基-己醯基-val-cit-PAB-MMAE低約2倍(數據未圖示)。

實例15.異種移植物活性

為評估自行穩定之藥物-接合劑對ADC之抗腫瘤活性之影響，用抗-CD30抗體cAC10使用含有經由順丁烯二醯亞胺基-己醯基或自行穩定之順丁烯二醯亞胺基-DPR基團與抗體鍵聯之val-cit-PAB-MMAE細胞毒性有效負載之藥物-接合劑製備共軛物。在CD30+人類惡性疾病之兩種各別鼠類異種移植物模擬中評估此等ADC。在第一模型(圖11)中，在雌性SCID小鼠中皮下植入Karpas-299 (人類ALCL)細胞且使腫瘤生長為約250 mm³之體積，然後以每週1 mg/kg給藥，進行三次給藥(每個劑量組六隻小鼠)。給予順丁烯二醯亞胺基-己醯基ADC之所有六隻小鼠相對於未經處理組均經歷一定腫瘤生長延遲，且兩隻動物經歷部分腫瘤縮小；然而，所有腫瘤均長出且整個組均由大腫瘤處死。在所有六隻動物中，自行穩定之ADC劑量組經歷完全反應(無可偵測腫瘤)，其中在研究過程中五隻動物經歷耐久消退且僅一隻動物在研究第55天時在其腫瘤回復之後處死。此研究之結果表明用自行穩定之藥物-接合劑製備之ADC的活體內抗腫瘤活性顯著較大。在第二模型中，在雌性NSG小鼠中皮下植入L428 (人類霍奇金淋巴瘤(Hodgkin Lymphoma))細胞且使腫瘤生長為約100 mm³之體積，然後每四天以1 mg/kg給藥，進行四次給藥(每個劑量組六隻小鼠)。在兩種ADC劑量

組中之所有動物在處理期間均經歷顯著生長延遲，然而在研究第28天後所有腫瘤均開始長出，且在順丁烯二醯亞胺基-己醯基與自行穩定之ADC之間並無顯著差異。因此，在異種移植物研究中用自行穩定之ADC所觀測到之抗腫瘤活性改良似乎具模型依賴性。

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種配位體-功能劑共軛物，其包含：

配位體單元及至少一種功能劑，該至少一種功能劑選自由藥物單元、偵測單元及穩定性單元組成之群，其中該配位體單元與該(等)功能劑中之每一者藉由自行穩定之接合劑總成連接，該自行穩定之接合劑總成包含經由硫醚鍵聯與該配位體單元直接共軛之丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或二內醯胺；或其中該配位體單元與該(等)功能劑中之每一者藉由自行穩定之接合劑總成連接，該自行穩定之接合劑總成包含丁二醯亞胺環、順丁烯二醯亞胺環、水解之丁二醯亞胺環或水解之順丁烯二醯亞胺環，其中該丁二醯亞胺環、順丁烯二醯亞胺環、水解之丁二醯亞胺環或水解之順丁烯二醯亞胺環經由一個或兩個硫醚鍵聯與該配位體單元直接共軛；及鹼及拉電子基團，其可操作地鍵聯以使該共軛物在血漿中相對於缺乏該自行穩定之接合劑總成之配位體-功能劑共軛物穩定化。

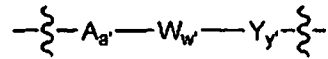
2. 如請求項1之配位體-功能劑共軛物，其包含：

配位體單元及至少一種功能劑，該至少一種功能劑選自由藥物單元、偵測單元及穩定性單元組成之群，其中該配位體單元與該(等)功能劑中之每一者藉由自行穩定之接合劑總成連接，該自行穩定之接合劑總成包含經由硫醚鍵聯與該配位體單元直接共軛之丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或二內醯胺；及鹼及拉電子基團，其可操作地鍵聯以使該共軛物在血漿中相對於缺乏該自行穩定之接合劑總成之配位體-功能劑共軛物穩定化。

3. 如請求項1或2之配位體-功能劑共軛物，其中該配位體-功能劑為包含藥物單元作為該功能劑之配位體-藥物共軛物，且該配位體-

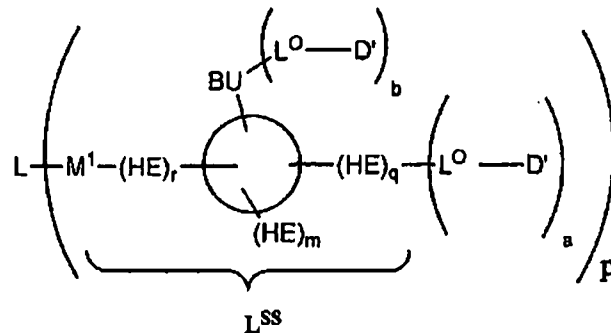
藥物共軛物進一步包含使各藥物與自行穩定之接合劑總成連接之接合劑總成。

4. 如請求項3之配位體-功能劑共軛物，其中該接合劑總成具有下式：



其中-A-為視情況選用之延伸子單元，下標a'為0或1；-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；且-Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標y'為0或1；且波形線指示與該自行穩定之接合劑總成及該藥物單元連接之點。

5. 如請求項4之配位體-功能劑共軛物，其中下標w'為1，且W為二肽、三肽或四肽。
6. 如請求項1之配位體-功能劑共軛物，其具有下式：



或其鹽，其中

L為配位體單元；

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L⁰為視情況選用之二級接合劑總成；且

L^{SS}為該自行穩定之接合劑總成，其中

M¹為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或與BU一起形成二內醯胺；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

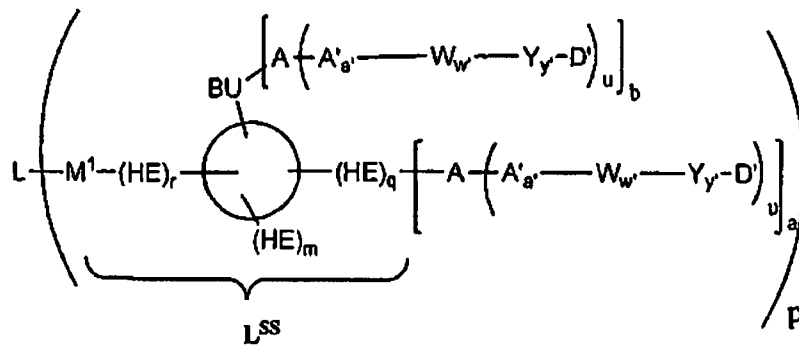
圓圈表示骨架，其為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；

下標a及b各自為0或1，且a+b之總和為1；且

下標p介於1至20範圍內。

7. 如請求項1或2之配位體-功能劑共軛物，其具有下式：



或其鹽，其中

L為配位體單元；

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^{SS}為該自行穩定之接合劑總成，其中

M¹為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或與BU一起形成二內醯胺；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限

制條件為若 $m+q+r$ 為 0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；

下標 a 及 b 各自為 0 或 1，且 $a+b$ 之總和為 1；

下標 p 介於 1 至 20 範圍內；

-W- 為視情況選用之可裂解單元，

下標 w' 為 0 或 1；

-Y- 為視情況選用之間隔子單元，

下標 y' 為 0 或 1，

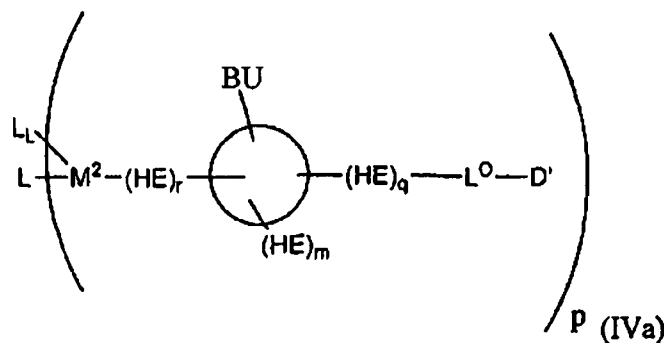
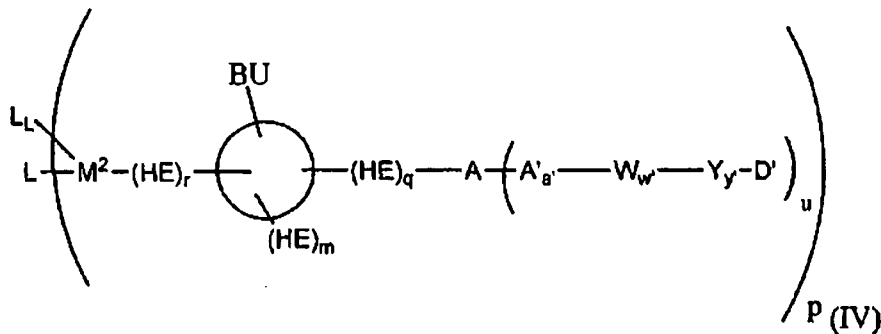
A 為延伸子單元，

A' 為位於 A 末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a' 為 0 或 1；且

u 為 1 至 20，其中當 u 為 2 至 20 時，A 存在，且當 u 為 1 時，A 可存在或不存在。

8. 如請求項 2 之配位體-功能劑共軛物，其由式 IV 或式 IVa 或其醫藥學上可接受之鹽表示：



其中

L為配位體單元

L_L 為可存在或不存在之配位體單元，其中L與 L_L 可為相同或不同配位體單元；

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^O 為視情況選用之二級接合劑總成；

M^2 為經由硫醚鍵聯與L或 L_L 中之至少一者共軛之順丁烯二醯亞胺環、水解之順丁烯二醯亞胺、丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺；且

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與 L^O 、A、W、Y或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；

下標p介於1至20範圍內；

-W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

-A-為視情況選用之延伸子單元，

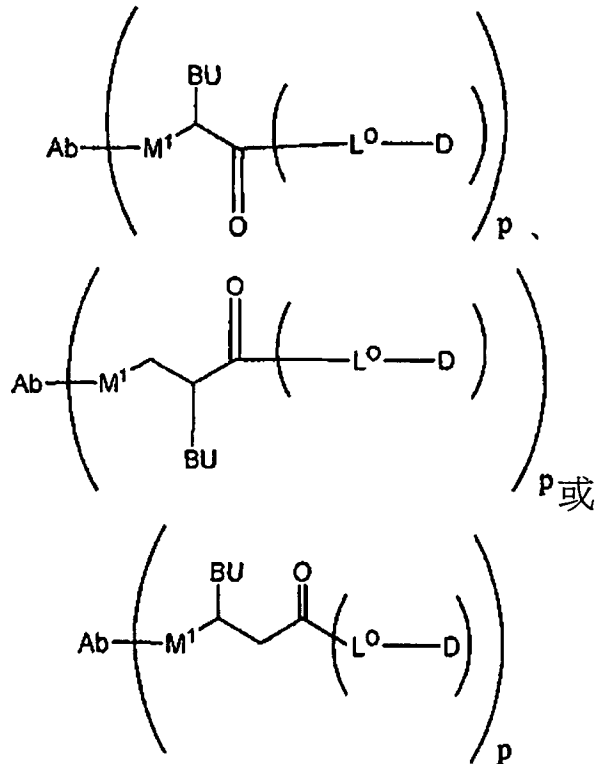
-A'-為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a'為0或1；且

u為1至20，其限制條件為當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

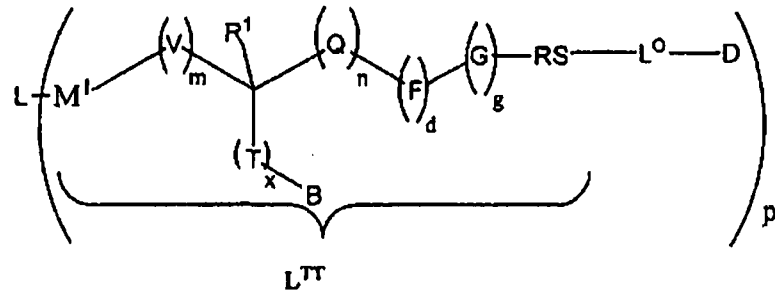
9. 如請求項6、7或8中任一項之配位體-功能劑共軛物，其為配位體-藥物共軛物，其中D'為藥物單元，q為1且m及r為0。
10. 如請求項6、7或8中任一項之配位體-功能劑共軛物，其為配位體-藥物共軛物，其中D'為藥物單元，m為1且q及r為0。
11. 如請求項6、7或8中任一項之配位體-功能劑共軛物，其為配位體-藥物共軛物，其中D'為藥物單元，r為1且m及q為0且HE不包含羰基作為該拉電子基團。
12. 如請求項6至11中任一項之配位體-功能劑共軛物，其為配位體-藥物共軛物，其中D'為藥物單元且a為1。
13. 如請求項6、7或8中任一項之配位體-功能劑共軛物，其為配位體-藥物共軛物，其中D'為藥物單元，a為1，q為1且m及r為0。
14. 如請求項6至13中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中該圓圈表示骨架，其為C₁₋₈伸烷基或C₁₋₈伸雜烷基。
15. 如請求項6至13中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中該圓圈表示骨架，其為C₁₋₃伸烷基。
16. 如請求項6至15中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中該鹼性單元包含一級或二級胺。
17. 如請求項6至15中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中該鹼性單元係選自由以下組成之群： $-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^a$ 及 $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^a_2$ ，其中x為0-4之整數且各R^a獨立地選自由C₁₋₆烷基及C₁₋₆鹵烷基組成之群，或兩個R^a基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件為在該鹼性單元之鹼與該丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子。
18. 如請求項1至17中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中該拉電子基團包含羰基、磺醯基或磷醯基部分。

19. 如請求項6、7或8中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中r爲零，m+q爲1，且HE係選自由以下組成之群： $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 及 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 。
20. 如請求項6或7中任一項之配位體-功能劑共軛物，其爲配位體-藥物共軛物，其具有下式：



或其鹽，其中D爲藥物單元，且Ab爲抗體。

21. 如請求項20之配位體-功能劑共軛物，其中BU係選自由以下組成之群： $-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^a$ 及 $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^{a_2}$ ，其中x爲0-4之整數且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群，或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件爲在該鹼性單元之鹼與該丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個介入原子。
22. 如請求項1之配位體-功能劑共軛物，其爲配位體-藥物共軛物，其具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中L為配位體單元；

D為藥物單元；

L^O為視情況選用之二級接合劑總成；

L^{TT}為該自行穩定之接合劑總成，其中

M^I為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或與B一起形成二內醯胺；

V、Q、T及G獨立地選自-(C(R⁹)(R¹⁰))-；

R¹為H或C₁₋₃烷基；

R⁹及R¹⁰在每次出現時獨立地選自H或C₁₋₃烷基；

F為C(E¹)(E²)，其中E¹及E²獨立地選自氫、拉電子基團，或E¹及E²一起為(=O)；

RS為用於與該視情況選用之二級接合劑總成之組成部分或藥物單元共軛之反應性位點；

g為0至5；

m為0至5；

n為0至5；

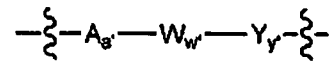
d為0或1；

x為0至4，其限制條件為當m為0時，x為1至4；

且B為鹼，其限制條件為當d為零或E¹及E²為氫時，RS為拉電子基團。

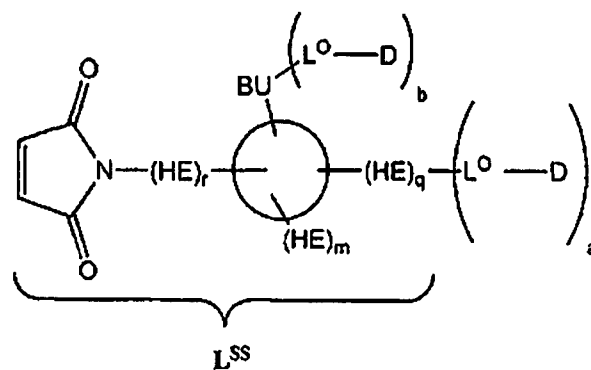
23. 如請求項22之配位體-功能劑共軛物，其中m為0，且n為0。

24. 如請求項20至23中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中L⁰具有下式：



其中-A-為視情況選用之延伸子單元，下標a'為0或1；-W-為視情況選用之可裂解單元，下標w'為0或1；且-Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標y'為0或1；且波形線指示與該自行穩定之接合劑總成及該藥物單元連接之點。

25. 如請求項24之配位體-功能劑共軛物，其中w'為1且W與該藥物單元直接共軛。
26. 如請求項24之配位體-功能劑共軛物，其中w'為1且W與該間隔子單元直接共軛。
27. 如請求項24之配位體-功能劑共軛物，其中w'為1且W經由可裂解肽鍵、雙硫鍵或肼鍵與該藥物單元或間隔子單元直接共軛。
28. 如請求項24之配位體-功能劑共軛物，其中W不存在。
29. 如請求項24之配位體-功能劑共軛物，其中W存在且該間隔子單元及延伸子單元不存在。
30. 如請求項6至29中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中D係選自由奧瑞他汀(auristatin)及PBD組成之群。
31. 一種藥物-接合劑共軛物，其具有下式：



或其鹽，其中

D為藥物單元；

L^O 為視情況選用之二級接合劑總成；且

L^{SS} 為該自行穩定之接合劑總成，其中

BU為鹼性單元；

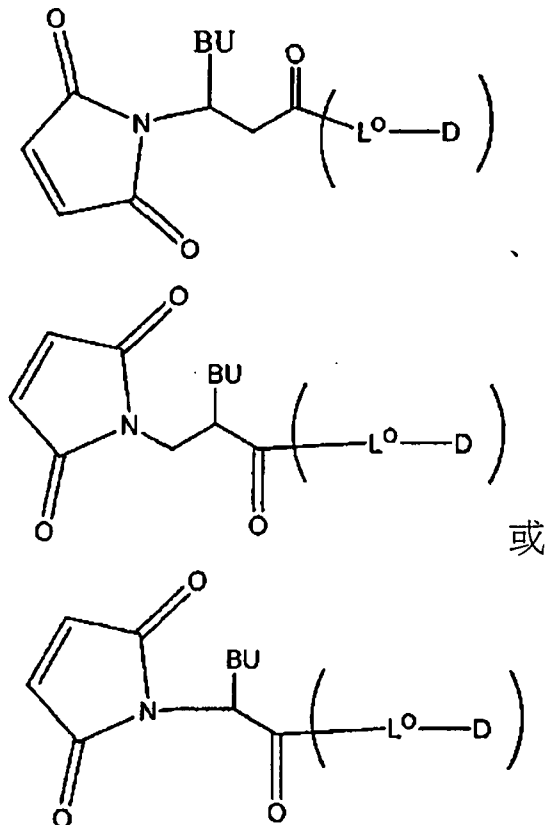
HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或藥物單元連接之反應性位點；

下標 m 、 q 及 r 各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；且

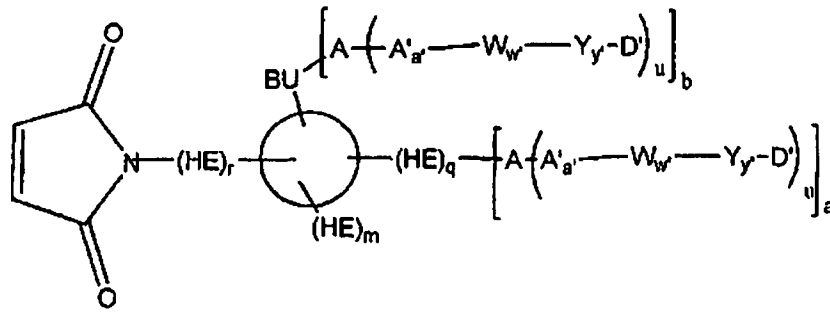
下標 a 及 b 各自為0或1，且 $a+b$ 之總和為1。

32. 如請求項31之藥物-接合劑共軛物，其具有下式：



或其鹽。

33. 一種功能劑-接合劑共軛物，其具有下式：



或其鹽，其中

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；

下標a及b各自為0或1，且a+b之總和為1；

-W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

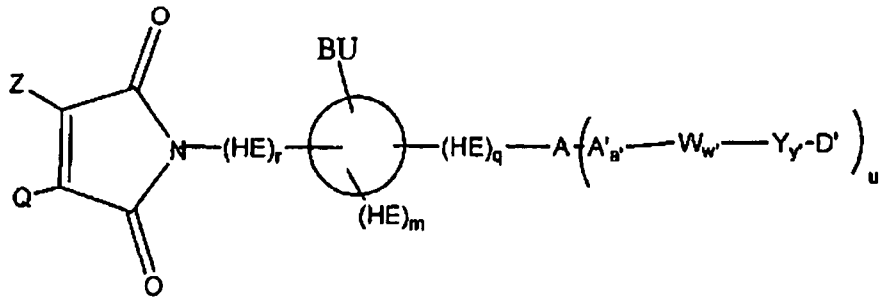
A為延伸子單元，

A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

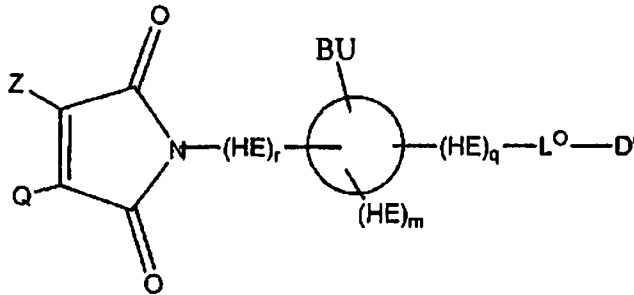
a'為0或1；且

u為1至20，其中當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

34. 一種功能劑-接合劑共軛物，其具有下式：



或



或其鹽；

其中

D'為藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^o為視情況選用之二級接合劑總成；

Q及Z為氫或鹵素，其中Q及Z中之至少一者為鹵素；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與L^o、A、W、Y或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；

-W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

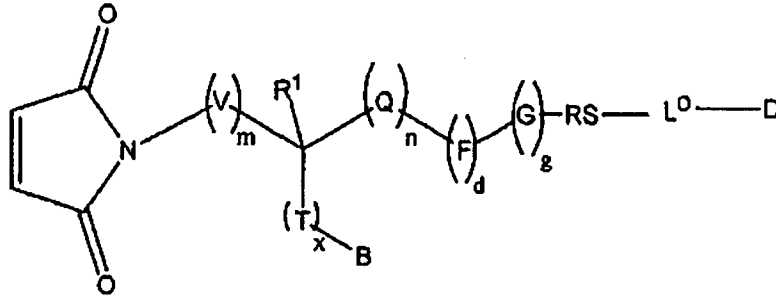
-A-為視情況選用之延伸子單元，

-A'-為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a'為0或1；且

u為1至20，其限制條件為當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

35. 一種藥物-接合劑，其具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中

D為藥物單元；

L⁰為視情況選用之二級接合劑總成；

V、Q、T及G獨立地選自-(C(R⁹)(R¹⁰))-；

R¹為H或C₁₋₃烷基；

R⁹及R¹⁰在每次出現時獨立地選自H或C₁₋₃烷基；

F為C(E¹)(E²)，其中E¹及E²獨立地選自氫、拉電子基團，或E¹及E²一起為(=O)；

RS為用於與該視情況選用之二級接合劑總成之組成部分或藥物單元共軛之反應性位點；

g為0至5；

m為0至5；

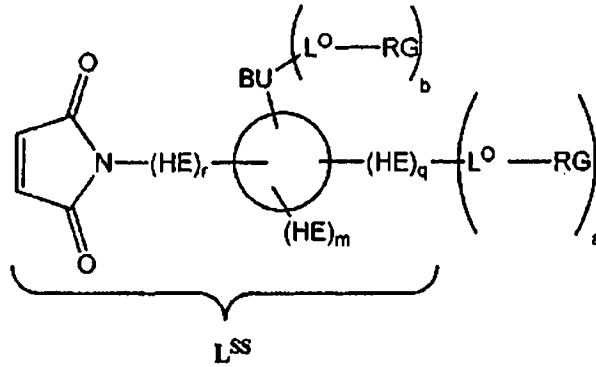
n為0至5；

d為0或1；

x為0至4，其限制條件為當m為0時，x為1至4；

且B為鹼，其限制條件為當d為零或E¹及E²為氫時，RS為拉電子基團。

36. 一種接合劑，其具有下式：



或其鹽，其中

RG為位於L⁰末端之包含反應性位點之反應性基團，適合於連接藥物單元；

L⁰為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；且

L^{SS}為該自行穩定之接合劑總成，其中

BU為鹼性單元；

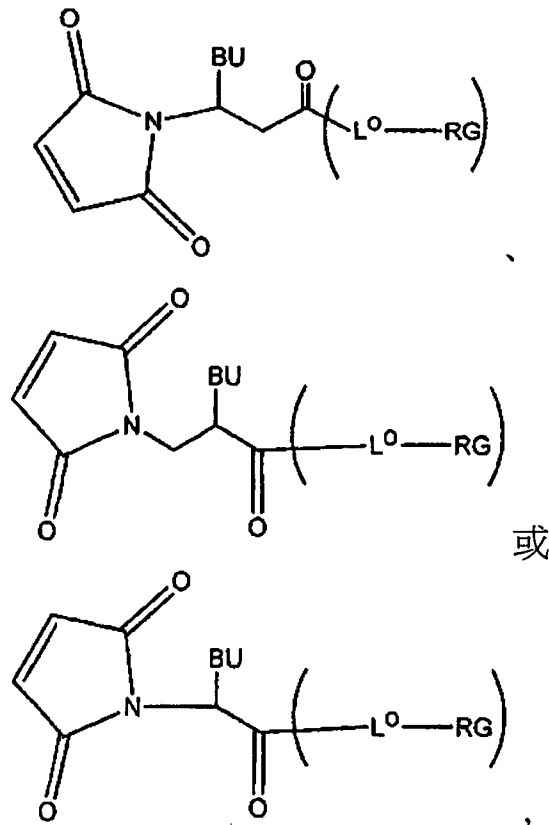
HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或藥物單元連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；且

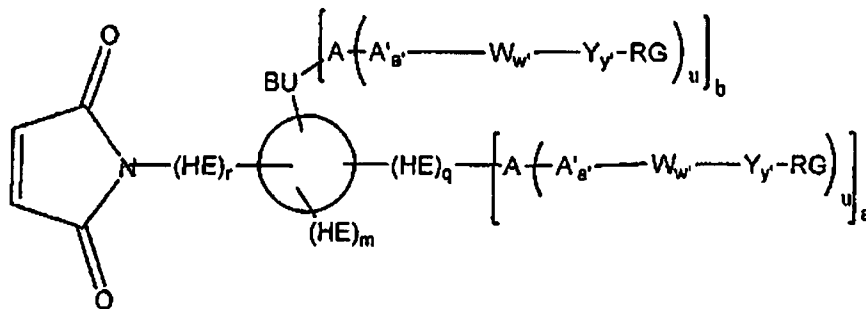
下標a及b各自為0或1，且a+b之總和為1。

37. 如請求項36之接合劑，其具有下式：



或其鹽。

38. 一種接合劑，其具有下式：



或其鹽，其中

RG為位於 $\xi-A-A'_a-W_w-Y_y-\xi$ 末端之包含反應性位點之反應性基團，其適合於連接藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或與藥物單元、偵測單元或穩定性單元連接之反應性

位點；

下標 m 、 q 及 r 各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；

下標 a 及 b 各自為0或1，且 $a+b$ 之總和為1；

-W-為視情況選用之可裂解單元，

下標 w' 為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

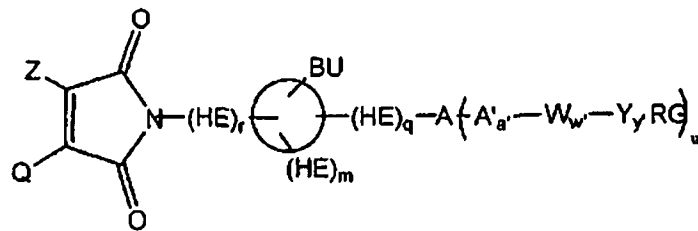
下標 y' 為0或1，

-A-為延伸子單元，

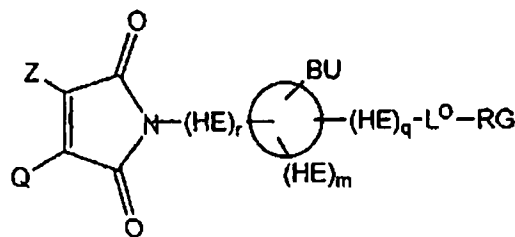
-A'-為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a' 為0或1；且 u 為1至20，其中當 u 為2至20時，A存在，且當 u 為1時，A可存在或不存在。

39. 一種接合劑，其由選自由以下組成之群的式子或其鹽表示：



及



其中

RG為位於 L^0 或 $\text{-}\{\text{-A-A}'_a\text{-W}_w\text{-Y}_y\text{-}\}$ 末端之反應性基團(包含反應性位點)，其適合於連接藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^0 為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；

Q及Z為氫或鹵素，其中Q及Z中之至少一者為鹵素；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與L⁰、A、W、Y或RG連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；

W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

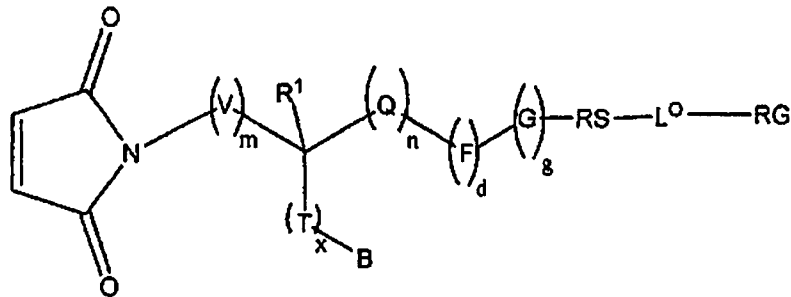
A為視情況選用之延伸子單元，

A'為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a'為0或1；且

u為1至20，其限制條件為當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

40. 一種接合劑，其具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中

L⁰為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；

RG為位於L⁰末端之包含反應性位點之反應性基團，其適合於連接藥物單元；

M^1 為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或與B一起形成二內醯胺；

V、Q、T及G獨立地選自 $-(C(R^9)(R^{10}))-$ ；

R^1 為H或 C_{1-3} 烷基；

R^9 及 R^{10} 在每次出現時獨立地選自H或 C_{1-3} 烷基；

F為 $C(E^1)(E^2)$ ，其中 E^1 及 E^2 獨立地選自氫、拉電子基團或 E^1 及 E^2 一起為 $(=O)$ ；

RS為用於與該視情況選用之二級接合劑總成之組成部分共軛之反應性位點；

g為0至5；

m為0至5；

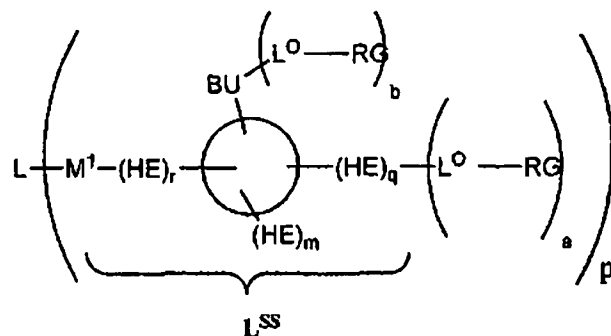
n為0至5；

d為0或1；

x為0至4，其限制條件為當m為0時，x為1至4；

且B為鹼，其限制條件為當d為零或 E^1 及 E^2 為氫時，RS為拉電子基團。

41. 一種配位體-接合劑共軛物，其具有下式：



或其鹽，其中

L為配位體單元；

下標介於1至32範圍內；

L^0 為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；

RG為位於L⁰末端之包含反應性位點之反應性基團，其適合於連接藥物單元；

L^{SS}為該自行穩定之接合劑總成，其中

M¹為丁二醯亞胺；

BU為鹼性單元；

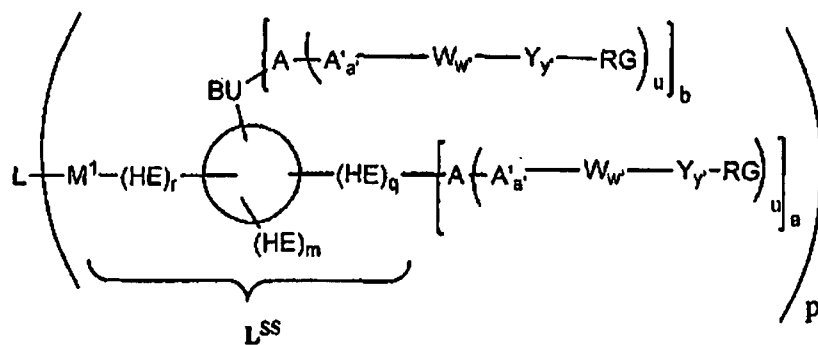
HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或藥物單元連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；且

下標a及b各自為0或1，且a+b之總和為1。

42. 一種配位體-接合劑共軛物，其具有下式：



或其鹽，其中

L為配位體單元；

RG為位於 $-\xi-A-A'_a-W_w-Y_y-\xi-$ 末端之包含反應性位點之反應性基團，其適合於連接藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^{SS}為該自行穩定之接合劑總成，其中

M¹為丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺或與BU一起形成二內醯胺；

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其為C₁₋₈伸烷基、C₁₋₈伸雜烷基、C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基，且視情況包含適合於與該視情況選用之二級接合劑總成或D'連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且m+q+r之總和為0、1或2，其限制條件為若m+q+r為0，則該骨架為C₆₋₁₀伸芳基或C₄₋₁₀伸雜芳基；

下標a及b各自為0或1，且a+b之總和為1；

下標p介於1至20範圍內；

-W-為視情況選用之可裂解單元，

下標w'為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

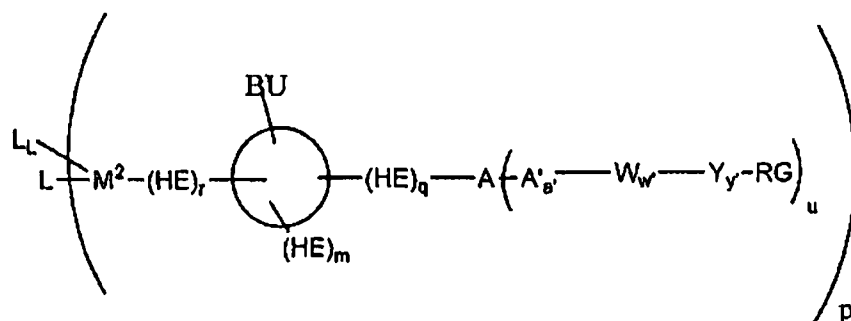
-A-為延伸子單元，

-A'-為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

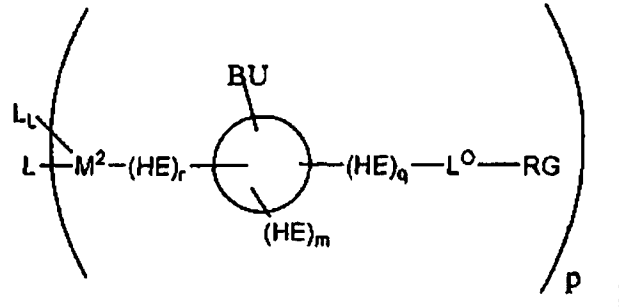
a'為0或1；且

u為1至20，其中當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

43. 一種配位體-接合劑共軛物，其由選自由以下組成之群的式子或其醫藥學上可接受之鹽表示：



及



其中

L為配位體單元；

L_L 為可存在或不存在之配位體單元，其中L與 L_L 可為相同或不同配位體單元；

RG為位於 L^O 或 $\left\{ -A-A_{w'}-W_{w'}-Y_{y'}-\right\}$ 末端之反應性基團(包含反應性位點)，其適合於連接藥物單元、偵測單元或穩定性單元；

L^O 為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；

M^2 為經由硫醚鍵聯與L或 L_L 中之至少一者共軛之順丁烯二醯亞胺環、水解之順丁烯二醯亞胺、丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺；且

BU為鹼性單元；

HE為包含拉電子基團之水解增強劑；

圓圈表示骨架，其可為 C_{1-8} 伸烷基、 C_{1-8} 伸雜烷基、 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基，且視情況包含適合於與 L^O 、A、W、Y或FA連接之反應性位點；

下標m、q及r各自為0或1，且 $m+q+r$ 之總和為0、1或2，其限制條件為若 $m+q+r$ 為0，則該骨架為 C_{6-10} 伸芳基或 C_{4-10} 伸雜芳基；

下標p介於1至20範圍內；

-W-為視情況選用之可裂解單元，

下標 w' 為0或1；

-Y-為視情況選用之間隔子單元，

下標y'為0或1，

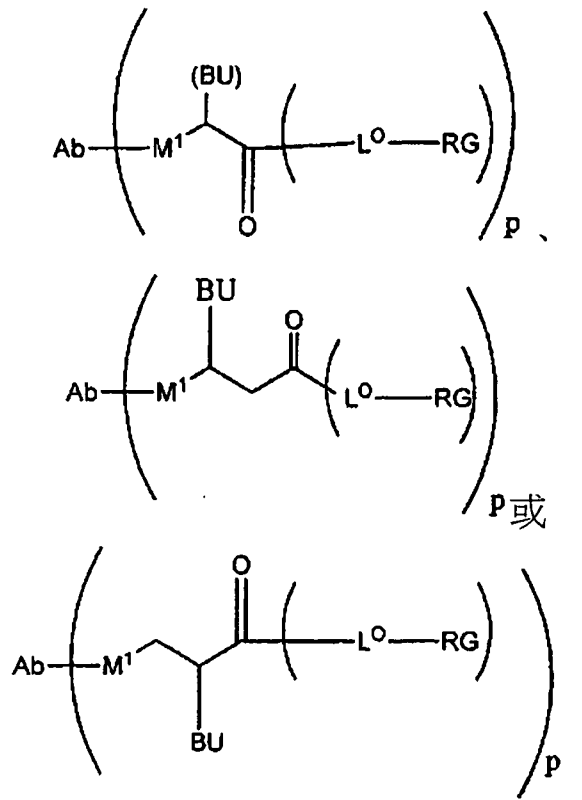
-A-為視情況選用之延伸子單元，

-A'-為位於A末端之視情況選用之延伸子單元組成部分；

a'為0或1；且

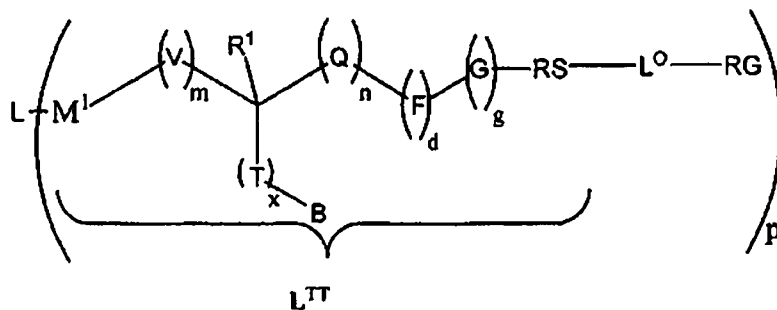
u為1至20，其限制條件為當u為2至20時，A存在，且當u為1時，A可存在或不存在。

44. 如請求項41之配位體-接合劑共軛物，其中L為具有下式之抗體 (Ab)：



或其鹽。

45. 一種配位體-接合劑共軛物，其具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽，其中L為配位體單元；

L^0 為所存在之視情況選用之二級接合劑總成；

RG為位於 L^0 末端之反應性位點，其適合於連接藥物單元；

L^{TT} 為該自行穩定之接合劑總成，其中

M^1 為非水解丁二醯亞胺或水解之丁二醯亞胺或與B一起形成二內醯胺；

V、Q、T及G獨立地選自 $-(C(R^9)(R^{10}))-$ ；

R^1 為H或 C_{1-3} 烷基；

R^9 及 R^{10} 在每次出現時獨立地選自H或 C_{1-3} 烷基；

F為 $C(E^1)(E^2)$ ，其中 E^1 及 E^2 獨立地選自氫、拉電子基團或 E^1 及 E^2 一起為(=O)；

RS為用於與該視情況選用之二級接合劑總成之組成部分共軛之反應性位點；

g為0至5；

m為0至5；

n為0至5；

d為0或1；

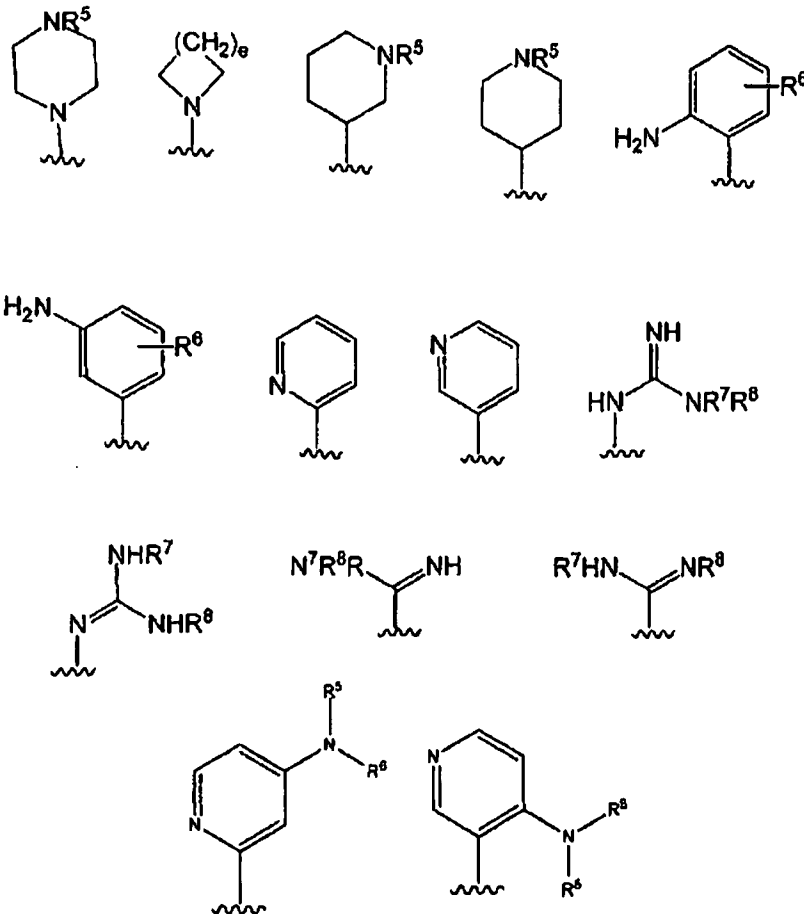
x為0至4，其限制條件為當m為0時，x為1至4；

且B為鹼，其限制條件為當d為零或 E^1 及 E^2 為氫時，RS充當拉電子基團。

46. 如請求項1至30中任一項之配位體-功能劑共軛物或如請求項41至45中任一項之配位體-接合劑共軛物，其中該配位體單元為單株抗體。
47. 如請求項6至30中任一項之配位體-功能劑共軛物或如請求項41至45中任一項之配位體-接合劑共軛物，其中p為約4至約8。
48. 如請求項6至30中任一項之配位體-功能劑共軛物或如請求項31或

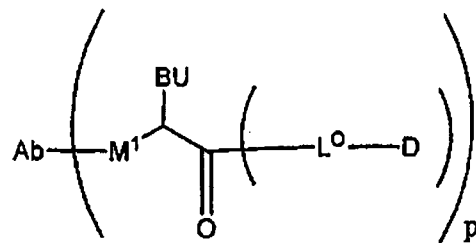
32之藥物-接合劑共軛物或如請求項33或34之功能劑-接合劑共軛物或如請求項35之藥物-接合劑或如請求項36至39中任一項之接合劑或如請求項41至45中任一項之配位體-接合劑共軛物，其中該鹼性單元係選自由以下組成之群： $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中x為0-4之整數且各 R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群，或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基，其限制條件為在該鹼性單元之鹼與 M^1 之氮原子之間存在不小於2個介入原子。

49. 如請求項6至30中任一項之配位體-功能劑共軛物或如請求項31或32之藥物-接合劑共軛物或如請求項33或34之功能劑-接合劑共軛物或如請求項35之藥物-接合劑或如請求項36至39中任一項之接合劑或如請求項41至45中任一項之配位體-接合劑共軛物，其中該鹼性單元包含：



其中 R^5 、 R^6 、 R^7 及 R^8 在每次出現時獨立地選自由氫及 C_{1-6} 烷基組成之群，且 e 為0-4且波形線指示與繫栓該鹼性單元與該共軛物、藥物-接合劑或接合劑之基團連接之點。

50. 如請求項6至30中任一項之配位體-功能劑共軛物或如請求項31或32之藥物-接合劑共軛物或如請求項33或34之功能劑-接合劑共軛物或如請求項35之藥物-接合劑或如請求項36至39中任一項之接合劑或如請求項41至45中任一項之配位體-接合劑共軛物，其中在該鹼性單元之鹼與該丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個且不超過6個介入原子，且在該拉電子基團與該丁二醯亞胺環(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不超過5個介入原子。
51. 如請求項6至30中任一項之配位體-功能劑共軛物或如請求項31或32之藥物-接合劑共軛物或如請求項33或34之功能劑-接合劑共軛物或如請求項35之藥物-接合劑或如請求項36至39中任一項之接合劑或如請求項41至45中任一項之配位體-接合劑共軛物，其中在該鹼性單元之鹼與該丁二醯亞胺(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不小於2個且不超過6個介入原子，且在該拉電子基團與該丁二醯亞胺環(水解或非水解)或二內醯胺之氮原子之間存在不超過3個介入原子。
52. 如請求項20之配位體-藥物共軛物，其具有下式：

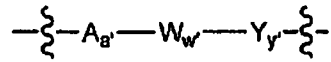


或其醫藥學上可接受之鹽，其中Bu係選自由以下組成之群： $-(CH_2)_xNH_2$ 、 $-(CH_2)_xNHR^a$ 及 $-(CH_2)_xNR^a_2$ ，其中 x 為1-4之整數且各

R^a 獨立地選自由 C_{1-6} 烷基及 C_{1-6} 鹵烷基組成之群或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合以形成氮雜環丁烷基、吡咯啉基或哌啉基。

53. 如請求項**52**之配位體-藥物共軛物，其中 x 為1、2、3或4且 R^a 為 C_{1-6} 烷基。

54. 如請求項**53**之配位體-藥物共軛物，其中 L^0 為



其中

-A-為視情況選用之延伸子單元，下標 a' 為0或1；

-W-為視情況選用之可裂解單元，下標 w' 為1；且

-Y-為視情況選用之間隔子單元，且下標 y' 為0或1。

55. 如請求項**53**之配位體-藥物共軛物，其中 p 為約4或約8。

56. 如請求項**55**之配位體-藥物共軛物，其中D為奧瑞他汀。

57. 如請求項**56**之配位體-藥物共軛物，其中Ab為單株抗體。

58. 一種治療表現標靶抗原之癌症、自體免疫疾病或感染性疾病之方法，其包含投與如請求項**1**至**30**中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中該配位體為與該標靶抗原特異性結合之單株抗體。

59. 如請求項**1**至**30**中任一項之配位體-功能劑共軛物，其中該自行穩定之接合劑總成包含與該配位體單元直接共軛之丁二醯亞胺環或水解之丁二醯亞胺。

60. 如請求項**59**之配位體-功能劑共軛物，其中該自行穩定之接合劑總成包含丁二醯亞胺環且其中該拉電子基團經定位以增加該丁二醯亞胺環之親電子性，從而使其與水之反應性更強，且該鹼經定位以輔助該丁二醯亞胺環之水解。

61. 如請求項**59**之配位體-功能劑共軛物，其中該自行穩定之接合劑總成包含水解之丁二醯亞胺環，且其中該拉電子基團及鹼經定位使得其與缺乏該自行穩定之接合劑總成之配位體藥物共軛物

中之丁二醯亞胺環水解相比增加丁二醯亞胺環水解之速率。

62. 如請求項**59**之配位體-功能劑共軛物，其中該自行穩定之接合劑與該配位體上特定位點處之硫醇殘基共軛，若非自行穩定之烷基順丁烯二醯亞胺用作藥物-接合劑，則該等位點對該藥物-接合劑之消除反應及後續轉移敏感。

圖式

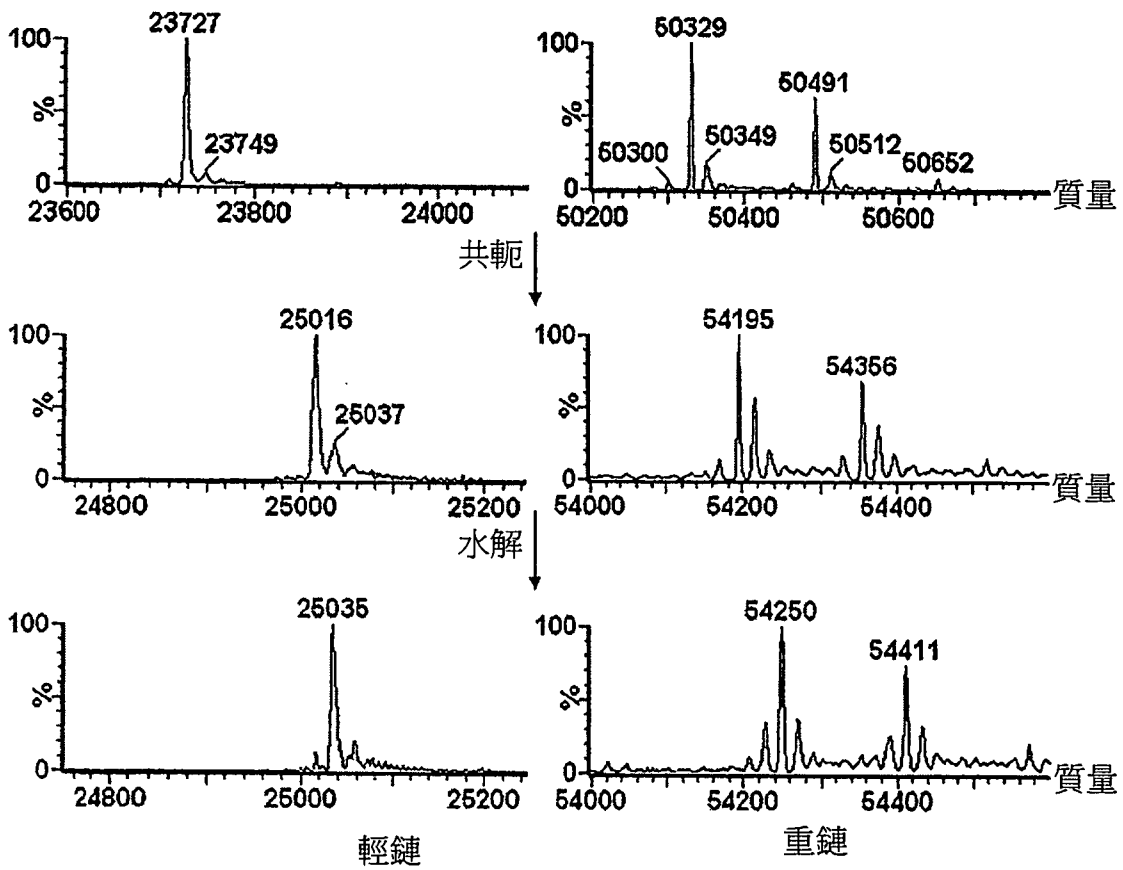
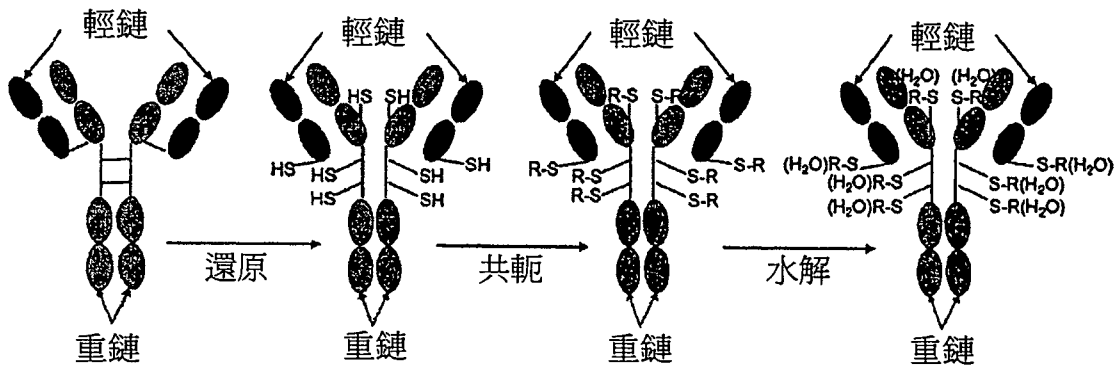


圖1

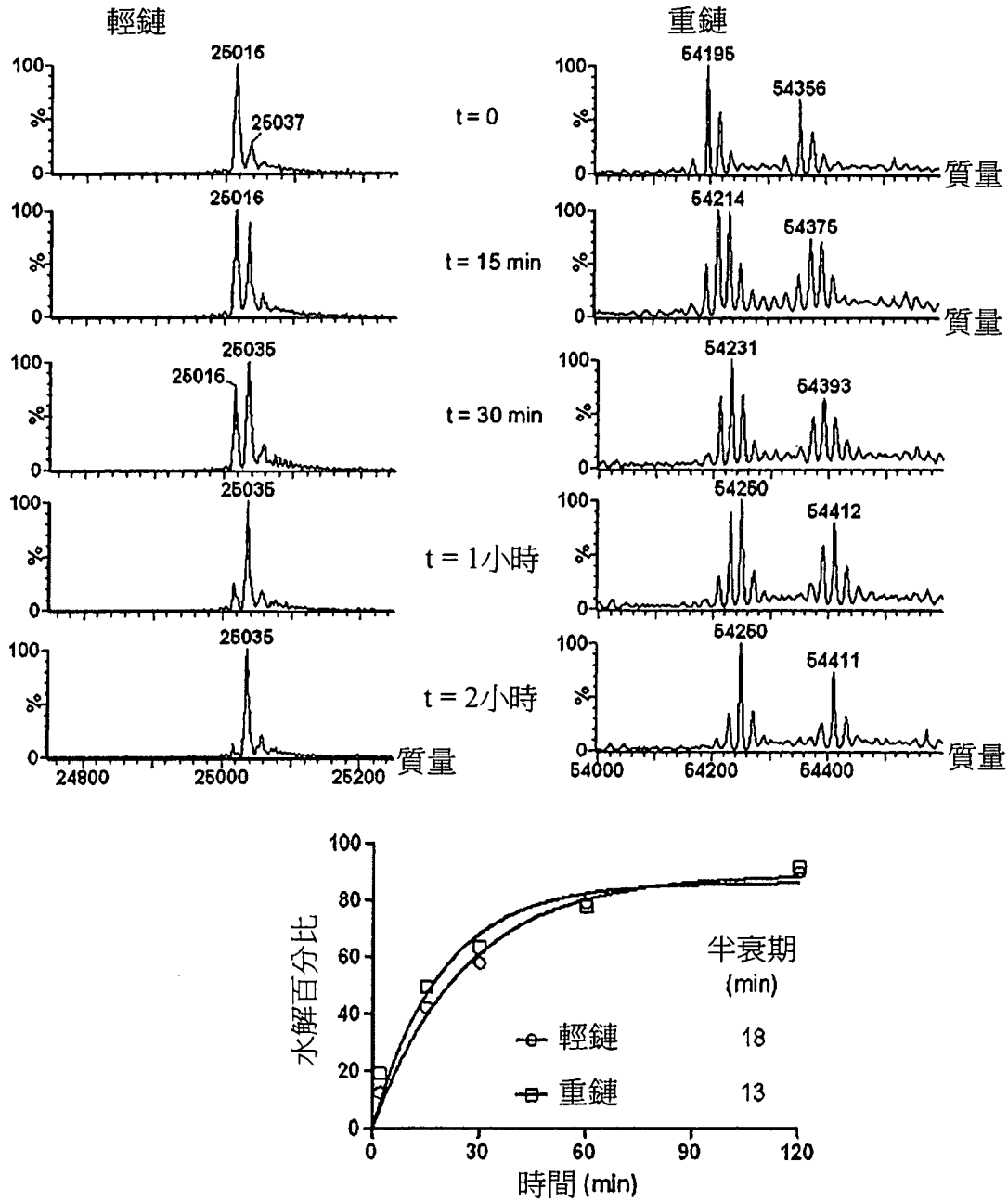


圖2

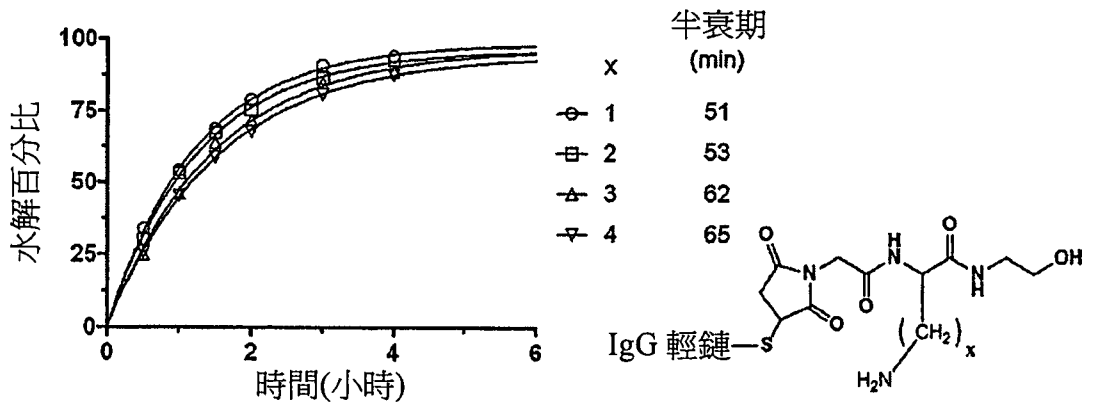


圖3

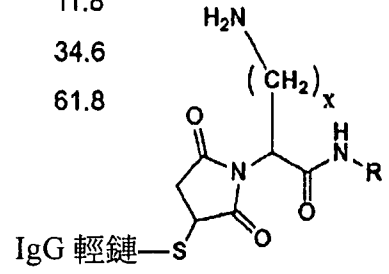
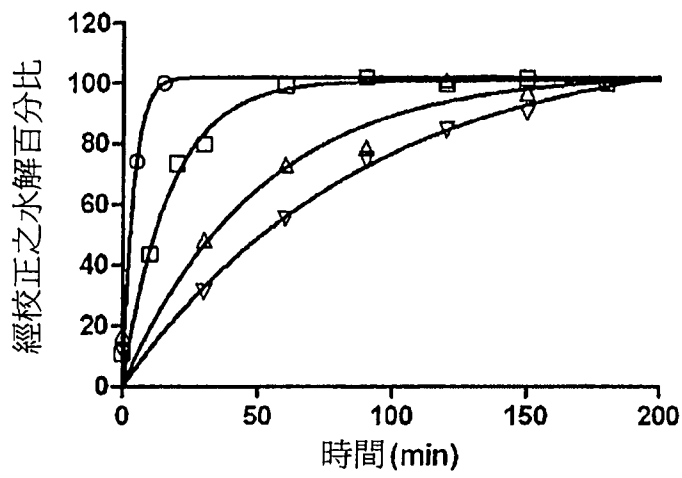


圖4

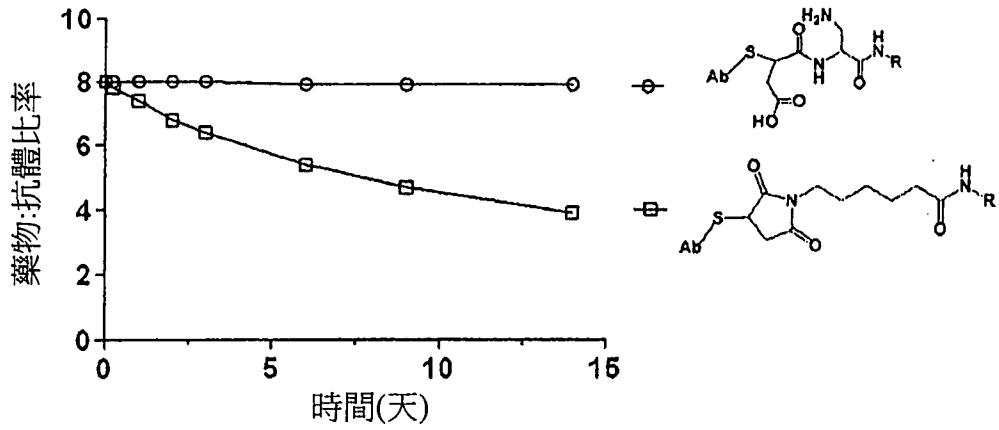
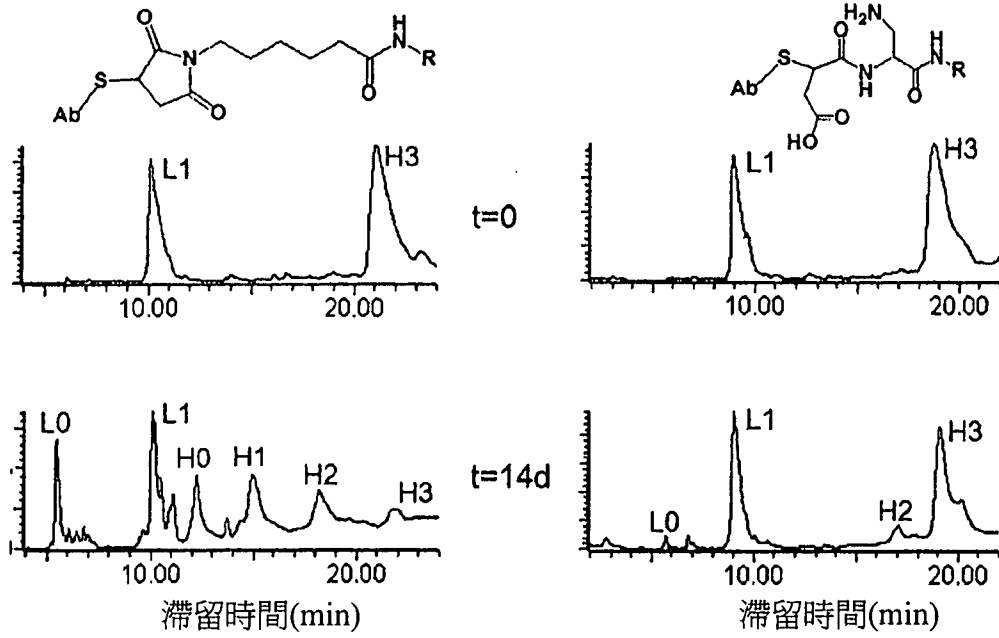


圖7

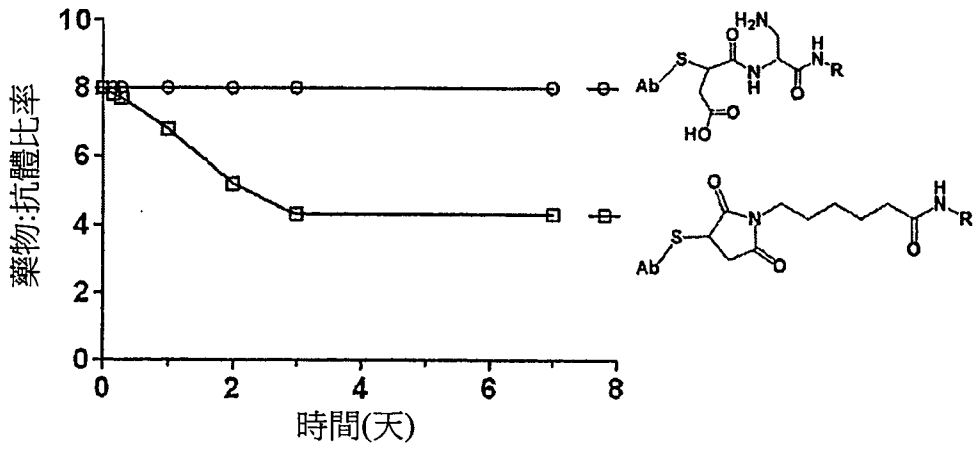


圖8

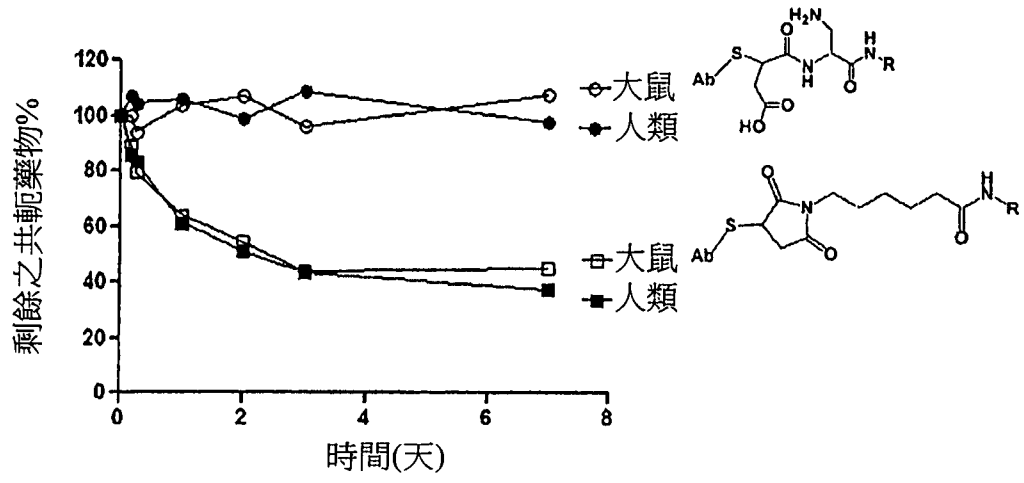


圖9

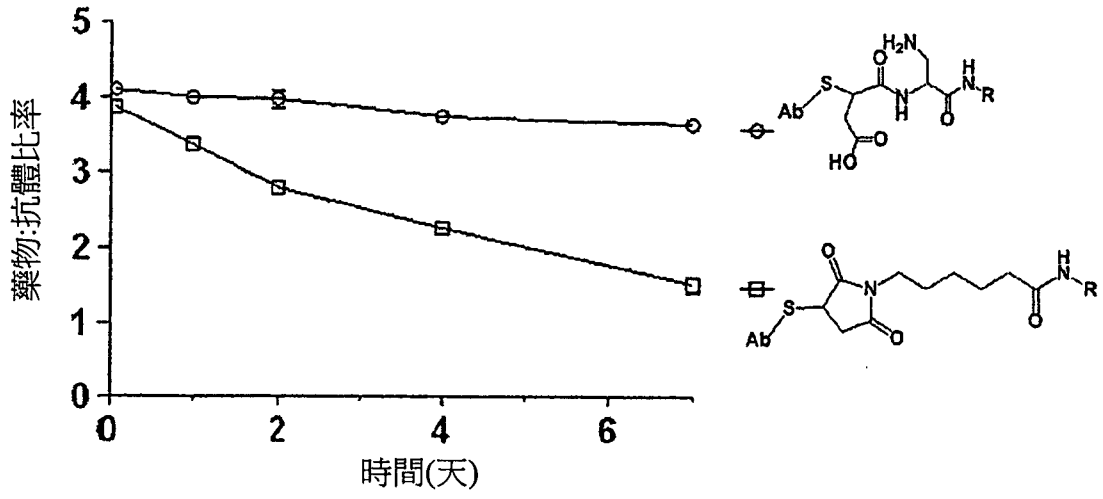
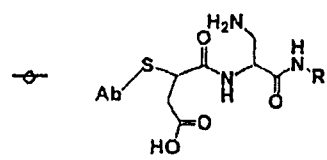


圖10

× 未處理



Ab = cAC10 (抗-CD30)
R = val-cit-PAB-MMAE

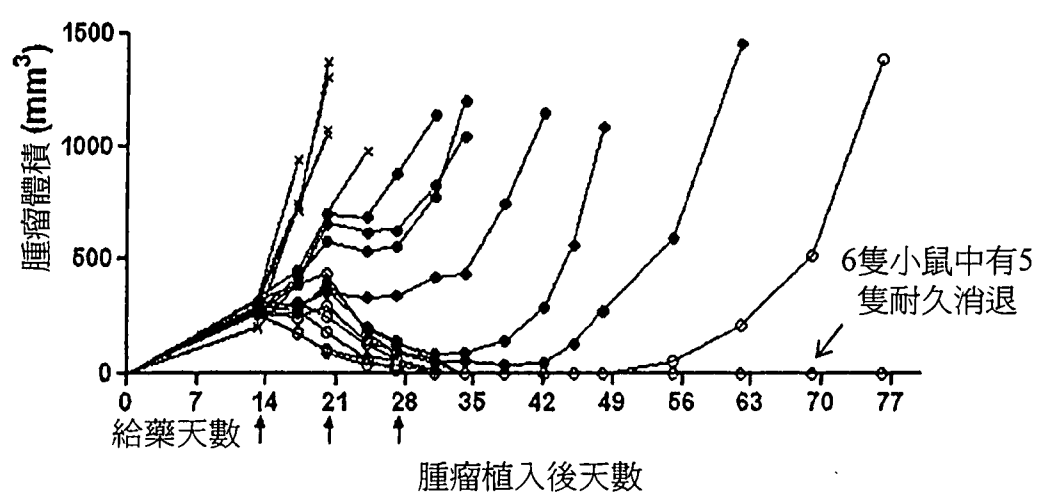
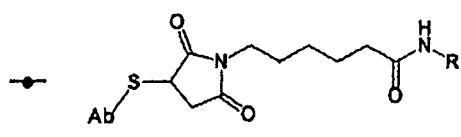


圖11

