

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/395

C07K 16/00

C12N 15/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02825631. X

[43] 公开日 2005 年 4 月 13 日

[11] 公开号 CN 1606454A

[22] 申请日 2002. 10. 22 [21] 申请号 02825631. X

[30] 优先权

[32] 2001. 10. 22 [33] US [31] 60/344,614

[32] 2002. 9. 19 [33] US [31] 60/412,455

[86] 国际申请 PCT/US2002/033991 2002. 10. 22

[87] 国际公布 WO2003/059251 英 2003. 7. 24

[85] 进入国家阶段日期 2004. 6. 21

[71] 申请人 斯克里普斯研究学院

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 C·F·巴巴斯 C·拉德尔

S·C·辛哈 R·莱纳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

权利要求书 20 页 说明书 56 页 附图 15 页

[54] 发明名称 抗体靶向化合物

[57] 摘要

本发明提供抗体靶向化合物，其中通过将靶向制剂共价或非共价连接于抗体结合位点已经将抗体的特异性重新编程。通过这个方法，共价修饰的抗体对靶向制剂呈现结合特异性。化合物可以具有由靶向制剂或分开的生物制剂提供的生物学活性。提供本发明化合物的各种用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种包含一种或更多种靶向制剂或一种或更多种生物制剂或者包含一种或更多种靶向制剂和一种或更多种生物制剂的抗体靶向化合物，所述制剂共价连接于抗体结合位点。
5
2. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述制剂以保留结合靶或呈现生物学活性的能力的方式连接。
3. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述制剂不是抗体。
4. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中在共价连接前所述抗体的
10 抗原结合特异性在共价连接后基本上不被修饰。
5. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中在共价连接前所述抗体的抗原结合特异性在共价连接后基本上被修饰。
6. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述制剂对非免疫球蛋白分子有特异性。
- 15 7. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述制剂对免疫球蛋白分子有特异性并且在它的结合位点外部结合免疫球蛋白。
8. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述抗体为催化抗体。
9. 权利要求8的抗体靶向化合物，其中所述催化抗体选自醛缩酶抗体、 β -内酰胺酶抗体和酯酶抗体或酰胺酶抗体。
- 20 10. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述制剂通过互补性决定区连接于所述抗体的结合位点。
11. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述制剂通过变化的构架区连接于所述抗体的结合位点。
12. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述抗体为全长。
- 25 13. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述抗体为全长抗体的片段。
14. 权利要求13的抗体靶向化合物，其中所述全长抗体的片段为Fab、Fab'F(ab')₂、Fv或者sFv。

15. 权利要求 1 的抗体靶向化合物, 其中所述抗体为人抗体、人源化抗体或者嵌合人抗体。

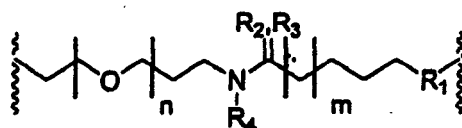
16. 权利要求 1 的抗体靶向化合物, 其中所述制剂共价连接于线性或者分支接头, 所述接头共价连接于抗体结合位点。

5 17. 权利要求 16 的抗体靶向化合物, 其中所述接头包含 5-100 个选自 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 的原子, 或其盐的线性序列段。

10 18. 权利要求 16 的抗体靶向化合物, 其中所述接头包含一种或更多种选自以下的基团: 烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基、磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基和磷酸炔基。

19. 权利要求 16 的靶向制剂-接头, 其中所述接头包含 2-100 个单元之间的重复醚单元。

15 20. 权利要求 16 的靶向制剂-接头, 其中所述接头包含下式的杂烃基结构



其中

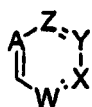
R_2-R_4 为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或其盐;

n 为 1-100; 和

20 m 为 1-100。

21. 权利要求 16 的抗体靶向化合物, 其中所述接头包含一种或更多种环结构。

22. 权利要求 21 的抗体靶向化合物, 其中所述一种或更多种环结构包括一种或更多种下式的六元环



25

其中

A、Z、Y、X或W独立为C或N。

23. 权利要求20的抗体靶向化合物，其中所述一种或更多种环结构包括一种或更多种下式的五元环



5

其中

A、Z、Y或X独立为C、O、N或S。

24. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中两种或更多种靶向制剂或者两种或更多种生物制剂连接于抗体结合位点。

10 25. 权利要求24的抗体靶向化合物，其中所述两种或更多种靶向制剂或者两种或更多种生物制剂是相同的。

26. 权利要求24的抗体靶向化合物，其中所述两种或更多种靶向制剂或者两种或更多种生物制剂是不同的。

15 27. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述抗体靶向化合物包含两种靶向制剂或两种生物制剂，所述抗体具有两个结合位点，并且所述结合位点中的每一个连接于靶向制剂或生物制剂。

28. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述一种或更多种生物制剂中至少一种是治疗剂。

29. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中所述治疗药物是前药。

20 30. 权利要求1的抗体靶向化合物，其中至少一种所述靶向制剂或生物制剂对生物分子有特异性。

31. 权利要求30的抗体靶向化合物，其中所述生物分子为细胞表面表达的或者颗粒表面表达的配体或者受体。

25 32. 权利要求31的抗体靶向化合物，其中所述细胞表面表达的配体或者受体为整联蛋白、叶酸受体、细胞因子受体、白介素受体、病毒蛋白或者酶。

33. 权利要求 31 的抗体靶向化合物，其中所述生物分子为流体相生物分子。

34. 权利要求 31 的抗体靶向化合物，其中所述生物分子为胞外基质生物分子。

5 35. 权利要求 1 的抗体靶向化合物，其中所述共价键是不可逆的。

36. 权利要求 1 的抗体靶向化合物，其中所述共价键是可逆的。

37. 权利要求 1 的抗体靶向化合物，其中所述共价键是不稳定的。

38. 权利要求 1 的抗体靶向化合物，其中所述不稳定的键是 pH 敏感的键，为酶的底物或者易于经辐射降解。

10 39. 权利要求 16 的抗体靶向化合物，其中所述制剂与所述接头之间或者所述接头与所述抗体之间或者两种情况皆存在的所述共价键是不可逆的。

40. 权利要求 16 的抗体靶向化合物，其中所述制剂与所述接头之间或者所述接头与所述抗体之间或者两种情况皆存在的所述共价键是
15 可逆的。

41. 权利要求 16 的抗体靶向化合物，其中所述制剂与所述接头之间或者所述接头与所述抗体之间或者两种情况皆存在的所述共价键是不稳定的。

42. 权利要求 16 的抗体靶向化合物，其中所述不稳定的键是 pH
20 敏感的键，为酶的底物或者易于经辐射降解。

43. 一种制备包含一种或更多种靶向制剂或一种或更多种生物制剂或者包含一种或更多种靶向制剂和一种或更多种生物制剂的抗体靶向化合物的方法，所述方法包括使所述制剂共价连接于抗体的结合位点。

25 44. 权利要求 43 的方法，其中所述制剂以保留结合靶或呈现生物学活性的能力的方式连接。

45. 权利要求 43 的方法，其中所述连接采用线性或分支接头实现。

46. 权利要求 45 的方法，其中所述连接通过制备包含靶向制剂或生物制剂或者两者和包含用于与抗体结合位点反应的反应基团的接头的制剂接头化合物来实现，并且所述制剂-接头化合物的所述接头的所述反应基团共价连接于抗体结合位点。

5 47. 权利要求 45 的方法，其中所述连接通过制备包含抗体和包含用于使所述一种或更多种靶向制剂或生物制剂反应的反应基团的接头的抗体-接头化合物来实现，并且抗体-接头化合物的反应基团连接于所述一种或更多种靶向制剂或生物制剂。

48. 权利要求 45 的方法，其中所述连接通过以下方法得到：

10 (a) 制备包含靶向制剂或生物制剂或者两者和包含反应基团的接头的制剂接头化合物；和

(b) 制备包含抗体和包含适合于与步骤(a)的反应基团反应的化学基团的接头的抗体-接头化合物；或者

(c) 制备包含抗体和包含反应基团的接头的抗体-接头化合物；和

15 (d) 制备包含靶向制剂或生物制剂或者两者和包含与步骤(c)的所述反应基团反应的化学基团的接头的制剂接头化合物；和

(e) 通过所述反应性和易敏基团，使所述抗体-接头化合物的接头连接于靶向制剂-接头化合物或生物制剂-接头化合物的接头。

49. 权利要求 43 的方法，其中所述制剂不是抗体。

20 50. 权利要求 43 的方法，其中在共价连接前抗体的所述抗原结合特异性在共价连接后基本上不被修饰。

51. 权利要求 43 的方法，其中在共价连接前抗体的所述抗原结合特异性在共价连接后基本上被修饰。

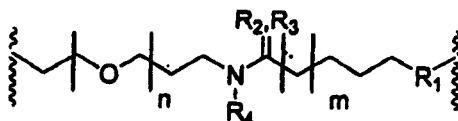
25 52. 权利要求 43 的方法，其中所述制剂对非免疫球蛋白分子有特异性。

53. 权利要求 43 的方法，其中所述制剂对免疫球蛋白分子是特异性的并且在它的结合位点的外部结合免疫球蛋白。

54. 权利要求 43 的方法，其中所述抗体为催化抗体。

55. 权利要求 54 的方法, 其中所述催化抗体选自醛缩酶抗体、 β -内酰胺酶抗体和酯酶抗体或酰胺酶抗体。
56. 权利要求 43 的方法, 其中所述制剂通过互补性决定区连接于所述抗体的结合位点。
- 5 57. 权利要求 43 的方法, 其中所述制剂通过变化的构架区连接于所述抗体的结合位点。
58. 权利要求 43 的方法, 其中所述抗体为全长的。
59. 权利要求 43 的方法, 其中所述抗体为全长抗体的片段。
60. 权利要求 59 的方法, 其中所述全长抗体的片段为 Fab、
- 10 Fab'F(ab')₂、Fv 或者 sFv。
61. 权利要求 43 的方法, 其中所述抗体为人抗体、人源化抗体或者嵌合人抗体。
62. 权利要求 45 的方法, 其中所述接头包含 5-100 个选自 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 的原子或其盐的线性序列段。
- 15 63. 权利要求 45 的方法, 其中所述接头包含一种或更多种选自以下的基团: 烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基、磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基和磷酸炔基。
64. 权利要求 45 的方法, 其中所述接头包含 2-100 个单位之间的
- 20 重复醚单元。
65. 权利要求 45 的方法, 其中所述接头具有下式
- $$X-Y-Z$$
- 其中
- X 为包含 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 中任何一种的
- 25 原子或其盐的线性或分支连接链;
- Y, 如果存在, 为单或稠合 5 或 6 元高-或杂碳环饱和或不饱和环;
- 和
- Z 为反应基团。

66. 权利要求 65 的方法，其中 X 为下式的杂烃基结构



其中

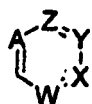
R_2 - R_4 为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或其盐；

5 n 为 1-100；和

m 为 1-100。

67. 权利要求 45 的方法，其中所述接头包含一种或更多种环结构。

10 68. 权利要求 67 的方法，其中所述一种或更多种环结构包括一种或更多种下式的六元环



其中

A、Z、Y、X 或 W 独立为 C 或 N。

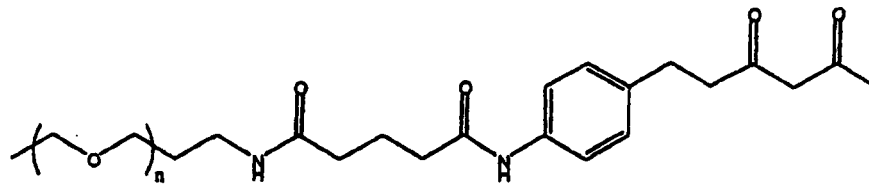
15 69. 权利要求 67 的方法，其中所述一种或更多种环结构包括一种或更多种下式的五元环



其中

A、Z、Y 或 X 独立为 C、O、N 或 S。

70. 权利要求 45 的方法，其中所述接头具有以下结构，



35

其中 n 为 1-100。

71. 权利要求 43 的方法，其中两种或更多种靶向制剂或者两种或更多种生物制剂连接于抗体的结合位点。

5 72. 权利要求 71 的方法，其中所述两种或更多种靶向制剂或者两种或更多种生物制剂是相同的。

73. 权利要求 71 的方法，其中所述两种或更多种靶向制剂或者两种或更多种生物制剂是不同的。

74. 权利要求 43 的方法，其中所述一种或更多种生物制剂中的至少一种 10 是治疗药物。

75. 权利要求 74 的方法，其中所述治疗药物是前药。

76. 权利要求 45 的方法，其中所述接头包含一种以上的连接链、一种以上的识别基团或者一种以上的反应基团，或其组合。

77. 权利要求 43 的方法，其中至少一种所述靶向制剂或者生物制 15 剂对生物分子有特异性。

78. 权利要求 77 的方法，其中所述生物分子为细胞表面表达的或者颗粒表面表达的配体或者受体。

79. 权利要求 78 的方法，其中所述细胞表面表达的配体或者受体 20 为整联蛋白、叶酸受体、细胞因子受体、白介素受体、病毒蛋白或者酶。

80. 权利要求 77 的方法，其中所述生物分子为流体相生物分子。

81. 权利要求 77 的方法，其中所述生物分子为胞外基质生物分子。

82. 权利要求 43 的方法，其中所述共价键是不可逆的。

83. 权利要求 43 的方法，其中所述共价键连是可逆的。
84. 权利要求 43 的方法，其中所述共价键是不稳定的。
85. 权利要求 84 的方法，其中所述不稳定的键是 pH 敏感的键，是酶的底物或者易于经辐射降解。
- 5 86. 权利要求 45 的方法，其中所述制剂与所述接头之间或者所述接头与所述抗体之间或者两种情况皆存在的所述共价键是不可逆的。
87. 权利要求 45 的方法，其中所述制剂与所述接头之间或者所述接头与所述抗体之间或者两种情况皆存在的所述共价键是可逆的。
88. 权利要求 45 的方法，其中所述制剂与所述接头之间或者所述
10 接头与所述抗体之间或者两种情况皆存在的所述共价键是不稳定的。
89. 权利要求 88 的方法，其中所述不稳定的键是 pH 敏感的键，是酶的底物或者易于经辐射降解。
90. 一种通过权利要求 43 的方法制备的抗体靶向化合物。
91. 一种修饰抗体的方法，该抗体对特定的靶分子呈现低的或不可
15 检测的结合亲和性，以使抗体对特定的靶分子具有增加的结合特异性，所述方法包括使对特定的靶分子具有特异性的一种或更多种靶向制剂或者生物制剂共价连接于抗体的结合位点，以产生抗体靶向化合物，其中所述制剂以保留结合特定靶分子的能力的方式被连接。
92. 权利要求 91 的方法，其中所述抗体在共价连接前对所述特定
20 靶分子呈现少于约 1×10^{-5} 摩尔/升的亲和性。
93. 权利要求 91 的方法，其中所述抗体在共价连接后对所述具体靶分子呈现大于约 1×10^{-6} 摩尔/升的亲和性。
94. 权利要求 91 的方法，其中所述抗体为催化抗体。
95. 权利要求 91 的方法，其中所述连接使用线性或分支接头实
25 现。
96. 权利要求 91 的方法，其中所述连接通过制备包含一种或更多种靶向制剂和包含用于与抗体结合位点反应的反应基团的接头来的靶

向制剂-接头化合物实现，并且所述靶向制剂-接头化合物的所述接头的所述反应基团共价连接于抗体的结合位点。

97. 权利要求 91 的方法，其中所述连接通过制备包含抗体和包含用于使所述一种或更多种靶向制剂反应的反应基团的接头的抗体-接头化合物来实现，并且使抗体-接头化合物的反应基团连接到所述一种或更多种靶向制剂。

98. 权利要求 91 的方法，其中所述连接通过以下方法实现：

(a) 制备包含靶向制剂和包含反应基团的接头的靶向制剂接头化合物；和

10 (b) 制备包含抗体和包含适合于与步骤(a)的反应基团反应的化学基团的接头的抗体-接头化合物；或者

(c) 制备包含抗体和包含反应基团的接头的抗体-接头化合物；和

(d) 制备包含靶向制剂和包含与步骤(c)的所述反应基团反应的化学基团的接头的靶向制剂接头化合物；和

15 (e) 通过所述反应性和易敏基团，使所述抗体-接头化合物的接头连接于靶向制剂-接头化合物的接头。

99. 权利要求 91 的方法，其中所述一种或更多种靶向制剂不是抗体。

100. 一种通过权利要求 91 的方法制备的抗体靶向化合物。

20 101. 一种改变靶向制剂或生物制剂的至少一种生物学特性的方法，所述方法包括将靶向制剂或生物制剂共价连接于抗体结合位点，其中所述共价连接改变靶向制剂或生物制剂的至少一种生物特性。

102. 权利要求 101 的方法，其中所述抗体为催化抗体。

25 103. 权利要求 101 的方法，其中所述连接使用线性或分支接头实现。

104. 权利要求 103 的方法，其中所述连接通过制备包含靶向制剂或生物制剂或两者和包含用于与抗体结合位点反应的反应基团的接头

的制剂接头化合物来实现，并且所述制剂-接头化合物的所述接头的所述反应基团共价连接于抗体的结合位点。

105. 权利要求 103 的方法，其中所述连接通过制备包含抗体和包含用于使所述一种或更多种靶向制剂或生物制剂反应的反应基团的接头的抗体-接头化合物来实现，并且使抗体-接头化合物的反应基团连接到所述一种或更多种靶向制剂或生物制剂。

106. 权利要求 103 的方法，其中所述连接通过以下方法实现：

- (a) 制备包含靶向制剂或生物制剂或两者和包含反应基团的接头的制剂接头化合物；和
- 10 (b) 制备包含抗体和包含适合于与步骤(a)的反应基团反应的化学基团的接头的抗体-接头化合物；或者
- (c) 制备包含抗体和包含反应基团的接头的抗体-接头化合物；和
- (d) 制备包含靶向制剂或生物制剂或两者和包含与步骤(c)的所述反应基团反应的化学基团的接头的制剂接头化合物；和
- 15 (e) 通过所述反应性和易敏基团，使所述抗体-接头化合物的接头连接于靶向制剂-接头化合物或生物制剂-接头化合物的接头。

107. 权利要求 101 的方法，其中所述至少一种改变的特性为药动学、药效学、免疫原性、结合亲和力、降解易敏性、溶解度、亲脂性、亲水性、疏水性、稳定性和刚性。

20 108. 一种通过权利要求 101 的方法制备的抗体靶向化合物。

109. 一种用于非共价连接于抗体结合位点的制剂-接头-抗原化合物，所述制剂-接头-抗原化合物包含两种或更多种不为抗体的靶向制剂或者包含两种或更多种生物制剂或包含其中至少一种为靶向制剂而另一种为生物制剂的至少两种制剂，所述制剂-接头化合物通过接头共价连接于经抗体识别的抗原，其中所述接头为包含 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 中任何一种的原子或其盐的线性或分支连接链。

25 110. 权利要求 109 的制剂-接头-抗原，其中所述制剂以保留结合靶向或呈现生物学活性的能力的方式连接。

111. 权利要求 109 的制剂-接头-抗原化合物, 其中所述接头包含一种或更多种选自以下的基团: 烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基、磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基和磷酸炔基。

5 112. 权利要求 109 的制剂-接头-抗原化合物, 其中所述接头包含一种或更多种单或稠合的高-或杂饱和或不饱和的 5-7 元碳环。

113. 权利要求 109 的制剂-接头-抗原化合物, 其中所述接头是分支的。

10 114. 权利要求 109 的制剂-接头-抗原化合物, 其中至少两种所述制剂被连接于所述分支接头的不同分支。

115. 一种抗体靶向化合物, 它包含与对所述抗原具有特异性的抗体结合位点非共价相关联的权利要求 109 的制剂-接头-抗原。

15 116. 一种修饰抗体的结合特异性的方法, 它包括使所述抗体与权利要求 109 的制剂-接头-抗原接触, 其中所述抗体对所述抗原具有特异性且所述抗体获得靶向制剂或生物制剂的结合特异性。

117. 一种用于共价连接抗体的结合位点的制剂-接头化合物, 所述制剂-接头化合物包含一种或更多种靶向制剂或一种或更多种生物制剂或两者, 下式的所述接头

X-Y-Z

20 其中

X 为包含 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 中任何一种的原子或其盐的线性或分支连接链,

Y, 如果存在, 为单或稠合 5 或 6 元高-或杂碳环饱和或不饱和环;
和

25 Z 为酮、二酮、 β -内酰胺、活性酯、卤代酮、内酯、酸酐、环氧化物、醛、马来酰亚胺二硫化物或者芳基卤化物; 和

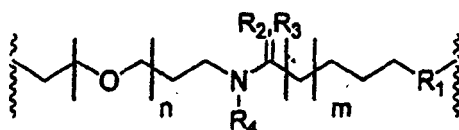
其中 Z 为用于将制剂共价连接于抗体结合位点中的活性氨基酸的侧链的反应基团, 所述靶向制剂或生物制剂被连接于 X 或 Y(如果存在)

或者 X 和 Y 两者(如果 Y 存在)。

118. 权利要求 117 的制剂-接头, 其中所述制剂以保留结合靶或呈现生物学活性的能力的方式连接。

119. 权利要求 117 的制剂-接头, 其中 X 包含 5-200 原子之间的
5 线性序列段。

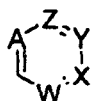
120. 权利要求 117 的靶向制剂-接头, 其中 X 为下式的杂烃基结构



其中

10 R_2 - R_4 为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或其盐;
n 为 1-100; 和
m 为 1-100。

121. 权利要求 117 的制剂-接头, 其中 Y 为下式的六元环



其中

15 A、Z、Y、X 或 W 独立为 C 或 N。

122. 权利要求 117 的制剂-接头, 其中 Y 为下式的五元环

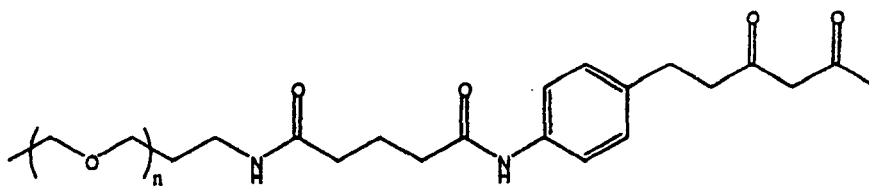


其中

20 A、Z、Y 或 X 独立为 C、O、N 或 S。

123. 权利要求 117 的制剂-接头, 其中所述接头通过加入一种或更多种连接链被分支, 所述接头包含一种以上的识别基团, 所述接头包含一种以上的反应基团, 或其组合。

124. 权利要求 117 的制剂-接头, 其中所述接头具有以下结构,



35

其中 n 为 1-100。

125. 一种抗体靶向制剂, 它包含共价连接于抗体结合位点的权利要求 117 的制剂-接头。

126. 一种用于共价连接于抗体结合位点的制剂-接头化合物, 所述制剂-接头化合物包含一种或更多种靶向制剂或者一种或更多种生物制剂或两者, 下式的所述接头

X-Y-Z

10 其中

X 为包含 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 中任何一种的原子或其盐的线性或分支连接链, 并且包含 0-100 个单位之间的重复醚单元;

15 Y 为位于 Z 的 1-20 个原子内的单或稠合 5 或 6 元高-或杂碳环饱和或不饱和环; 和

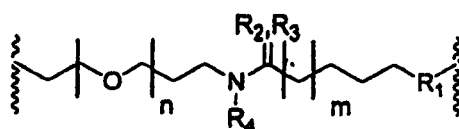
Z 为用于将制剂共价连接于在抗体结合位点中的活性氨基酸的侧链的反应基团。

127. 权利要求 126 的制剂-接头, 其中所述制剂以保留结合靶或呈现生物学活性的能力的方式连接。

20 128. 权利要求 126 的制剂-接头, 其中 Z 选自酮、二酮、 β -内酰胺、活性酯、卤代酮、内酯、酸酐、环氧化物、醛、马来酰亚胺、二硫化物和芳基卤化物。

129. 权利要求 126 的制剂-接头, 其中 X 包含 10-200 个原子之间的线性序列段。

25 130. 权利要求 126 的制剂-接头, 其中 X 为下式的杂烃基



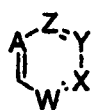
其中

R_2 - R_4 为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或其盐;

n 为 1-100; 和

5 m 为 1-100。

131. 权利要求 126 的靶向制剂-接头, 其中 Y 为下式的六元环



其中

A、Z、Y、X 或 W 独立为 C 或 N。

10 132. 权利要求 126 的靶向制剂-接头, 其中 Y 为下式的五元环



其中

A、Z、Y 或 X 独立为 C、O、N 或 S。

15 133. 权利要求 126 的靶向制剂-接头, 其中所述接头包含一种以上的连接链、一种以上的识别基团或一种以上的反应基团, 或其组合。

134. 一种抗体靶向制剂, 它包含共价连接于抗体结合位点的权利要求 126 的制剂-接头。

20 135. 一种将生物学活性传递至个体的细胞、组织胞外基质生物分子或在流体中的生物分子的方法, 所述方法包括给予个体权利要求 1、90、120、108、115、125 或 134 中任何一项的抗体靶向化合物, 其中所述抗体靶向化合物对所述细胞、组织胞外基质生物分子或流体生物分子具有特异性, 并且其中所述抗体靶向化合物包含生物学活性。

136. 一种治疗或预防个体疾病或病症的方法，其中所述疾病或病症涉及表达靶分子的细胞、组织或流体，所述方法包括给予个体治疗有效量的权利要求 1、90、120、108、115、125 或 134 中任何一项的抗体靶向化合物，其中所述抗体靶向化合物对所述靶分子具有特异性，并且其中所述靶向化合物包含有效对抗疾病或病症的生物学活性。

137. 权利要求 136 的方法，其中所述生物制剂为细胞因子、毒素、药物、核酸或同位素。

138. 权利要求 136 的方法，其中所述疾病或病症为一种感染并且所述靶分子经微生物因子或病毒表达。

139. 权利要求 136 的方法，其中所述化合物经体内给予。

140. 权利要求 136 的方法，其中所述化合物经局部给予。

141. 一种对个体中的细胞或组织造影的方法，其中所述细胞或组织表达靶分子，所述方法包括给予个体连接于可检测的标记物的权利要求 1、90、120、108、115、125 或 134 中任何一项的靶向抗体。

142. 一种减少存在于表面的微生物细胞或病毒颗粒的感染性的方法，所述方法包括使所述表面与有效量的权利要求 1、90、120、108、115、125 或 134 中任何一项的抗体靶向化合物接触，其中所述抗体靶向化合物包含对在所述微生物细胞或病毒颗粒上的受体具有特异性的靶向制剂或者生物制剂。

143. 一种筛选用于受体的激动剂或拮抗剂的化学文库的方法，该方法包括使化学文库的个体成员共价连接于抗体结合位点，然后测试在受体和对受体的配体之间抗体连接的文库对结合受体或对结合的抑制作用。

144. 权利要求 143 的方法，其中所述受体由细胞表达并且通过检测由所述结合或结合的抑制作用引起的细胞信号测定所述结合或结合的抑制作用

145. 一项测定样品中的分析物的量的免疫测定法, 所述方法包括:

(a) 在含有所述样品的介质中, 在分析物和至少一种对分析物具有特异性的抗体之间形成复合物;

5 (b) 分析所述介质以检测所述复合物的量; 和

(c) 使所述复合物的量与样品中分析物的量相关, 所述改进包括形成与至少一种对分析物具有特异性的抗体靶向化合物的复合物, 所述特异性由非抗体靶向制剂或对分析物具有特异性的生物制剂提供, 所述靶向制剂或生物制剂共价连接于抗体的结合位点。

10 146. 权利要求 145 的测定法, 其中所述抗体在共价连接前对所述分析物呈现少于约 1×10^{-5} 摩尔/升的亲合性。

147. 权利要求 145 的测定法, 其中所述抗体在共价连接后对所述分析物呈现大于约 1×10^{-6} 摩尔/升的亲合性。

148. 权利要求 145 的测定法, 其中所述抗体为催化抗体。

15 149. 一项直接或间接结合测定法, 其中存在的分析物通过使用对分析物具有特异性的抗体测定, 所述改进包括使用对分析物具有特异性的抗体靶向化合物测定所述分析物的存在, 所述特异性由非抗体靶向制剂或对分析物具有特异性的生物制剂提供, 所述靶向制剂或生物制剂共价连接于抗体的结合位点。

20 150. 权利要求 149 的测定法, 其中所述抗体在共价连接前对所述分析物呈现少于约 1×10^{-5} 摩尔/升的亲合性。

151. 权利要求 149 的测定法, 其中所述抗体在共价连接后对所述分析物呈现大于约 1×10^{-6} 摩尔/升的亲合性。

152. 权利要求 149 的测定法, 其中所述抗体为催化抗体。

25 153. 一种将生物学活性传递至个体的细胞、组织胞外基质生物分子或在流体中的生物分子的方法, 所述方法包括分开给予个体权利要求 109 的制剂-接头-抗原化合物和对抗原具有特异性的抗体, 其中所述制剂-接头-抗原化合物与抗体结合位点在体内非共价相关, 并且其中

所述制剂-接头-抗原化合物对细胞、组织胞外基质生物分子或流体生物分子具有特异性。

5 154. 一种治疗或预防个体疾病或病症的方法，其中所述疾病或病症涉及表达靶分子的细胞、组织或流体，所述方法包括给予个体治疗有效量的权利要求 109 的单个制剂-接头-抗原化合物和对抗原具有特异性的抗体，其中所述制剂-接头-抗原被分开给予并且在体内非共价相关，所述制剂-接头-抗原化合物对细胞、组织胞外基质生物分子或流体生物分子具有特异性，并且其中所述制剂-接头-抗原或抗体包含有效对抗疾病或病症的生物学活性。

10 155. 权利要求 154 的方法，其中所述生物制剂为细胞因子、毒素、药物、核酸或同位素。

156. 权利要求 154 的方法，其中所述疾病或病症为一种感染并且所述靶分子被微生物因子或病毒表达。

157. 权利要求 154 的方法，其中所述化合物经体内给予。

15 158. 权利要求 154 的方法，其中所述化合物经局部给予。

159. 一种对个体中的细胞或组织造影的方法，其中所述细胞或组织表达靶分子，所述方法包括分开给予个体连接于可检测的标记物的权利要求 109 的制剂-接头-抗原化合物和对抗原具有特异性的抗体，其中所述制剂-接头-抗原化合物与抗体结合位点在体内非共价相关并且其中所述制剂-接头-抗原化合物对在所述细胞或组织中的靶是特异性的。

20

160. 一种抑制或减少细胞渗透靶向制剂或生物制剂穿过细胞膜的能力的方法，所述方法包括通过将本身不穿过细胞膜的抗体结合位点共价连接于靶向制剂或生物制剂形成抗体靶向化合物，其中所述抗体与

25 所述靶向制剂或生物制剂的连接减少或抑制制剂穿过细胞膜的能力。

161. 权利要求 160 的方法，其中所述制剂以保留结合靶或呈现生物学活性的能力的方式连接。

162. 权利要求 160 的方法，其中所述连接使用线性或分支接头实现。

163. 权利要求 162 的方法，其中所述连接通过制备包含靶向制剂或生物制剂或两者和包含用于与抗体结合位点反应的反应基团的接头的制剂接头化合物来实现，并且所述制剂-接头化合物的所述接头的所述反应基团共价连接于抗体的结合位点。

164. 权利要求 162 的方法，其中所述连接通过制备包含抗体和包含用于使所述一种或更多种靶向制剂或生物制剂反应的反应基团的接头的抗体-接头化合物来实现，并且使抗体-接头化合物的反应基团连接所述一种或更多种靶向制剂或生物制剂。

165. 权利要求 162 的方法，其中所述连接通过以下方法得到：

(a) 制备包含靶向制剂或生物制剂或两者和包含反应基团的接头的制剂接头化合物；和

(b) 制备包含抗体和包含易于与步骤(a)的反应基团的反应的化学基团的接头的抗体-接头化合物；或者

(c) 制备包含抗体和包含反应基团的接头的抗体-接头化合物；和

(d) 制备包含靶向制剂或生物制剂或两者和包含易于与步骤(c)的所述反应基团的反应易敏的化学基团的接头的制剂接头化合物；和

(e) 通过所述活性和易敏基团，使步骤(a)和(b)或步骤(c)和(d)的接头共价连接在一起以形成抗体靶向化合物。

166. 权利要求 162 的方法，其中所述制剂不是抗体。

167. 一种介导细胞内活性药物的细胞内传递的方法，所述方法包括：

(a) 制备抗体靶向化合物，其中所述化合物包含通过接头共价连接于所述抗体结合位点的一种或更多种靶向制剂或一种或更多种生物制剂或两者，其中所述一种或更多种靶向制剂或生物制剂结合于细胞受体并且介导内在化，并且其中所述靶向化合物也包括在细胞内具有活性的药物；和

(b) 使表达所述受体的细胞与步骤(a)的抗体靶向化合物接触，其中所述接触导致抗体靶向制剂的内在化和所述药物的细胞内传递。

168. 权利要求 167 的方法，其中所述细胞内的活性药物为前药，当所述药物接触细胞内室时变为有活性的。

5 169. 权利要求 167 的方法，其中所述抗体靶向化合物进一步包括使导向内在化的抗体靶向化合物的信号传递至特定的细胞内室。

170. 权利要求 167 的方法，其中两种或更多种靶向制剂或生物制剂或两者共价连接于抗体结合位点，由此增加所述抗体靶向化合物和所述细胞受体之间的亲和力，导致受体介导的内在化增加和药物传递的增加。

171. 一种修饰抗体靶向化合物的物理或生物性质的方法，所述方法包括：

(a) 制备包含抗体的抗体靶向化合物，一种或更多种靶向制剂或一种或更多种生物制剂通过接头已经共价连接于该抗体的结合位点；

15 (b) 修饰接头的一种或更多种化学特性；和

(c) 测定是否抗体靶向化合物的物理或生物学性质已经被修饰。

172. 权利要求 171 的方法，其中所述物理或生物学性质为药动学、药效学、免疫原性、结合亲和力、降解易敏性、溶解度、亲脂性、亲水性、疏水性、稳定性和刚性。

20

抗体靶向化合物

5 发明背景

本发明涉及靶向生物分子的化合物和制备及使用这些化合物的方法。常规开发的药物和生物效应物分子经常由于高毒性在疗法中的应用受到限制。多年来，已采用各种方法改善这样的药物或者效应物的治疗指数。一种方法就是使药物或者效应物偶合于配体靶向制剂例如抗体。在这种情况下，抗体被用来改变药物或者效应物的分布，以使其大部分可以定位于体内最需要的部位。通过使药物或者效应物与大分子量化合物络合，已经达到小分子量药物或者效应物的改善的靶向。例如，例如，欧洲专利 EP 217577 公开通过在体内半抗原修饰剂和抗-半抗原抗体之间形成络合物可达到药物增加的半衰期和靶向。类似地，国际专利申请公布 WO 98/22141 公开了治疗剂和半抗原的缀合物。缀合物被给予患者并且在患者的血流中循环。循环的缀合物被识别并且通过患者体内存在的抗体结合。Shokat 和 Schultz(J. Am. Chem. Soc., 1991, 113: 1862-1864)也已公开采用称之为配基-介导的免疫原性的方法重新诱导免疫应答的方法。按照这种说法，不变的抗原与特异的配体络合并给予患者。那么络合的不变的抗原与存在于患者体内的天然来源的抗体结合。

发明简述

本发明提供用于许多用途的具有独特的特异性和生物学性质的抗体靶向化合物。本发明的抗体靶向化合物包含共价或者非共价连接于抗体结合位点的一种或者更多种靶向制剂或者生物制剂或者一种或者更多种靶向制剂和生物制剂。线性或者分支的接头(linker)优选用于共价或者非共价键。接头的化学特性被公开。依情况而定，与靶向制剂或者生物制剂共价或者非共价连接后，结合位点的抗体

特异性可以被修饰或者消除。在某些实施方案中，共价键合之前的抗体的抗原结合特异性在共价键合之后可以基本上保持不变。

5 抗体靶向化合物具有超过那些成分自身的多种益处。例如，化合物的抗体部分一般可以延长更小体积的靶向或者生物制剂的体内的半衰期。通过增加由化合物的抗体部分(例如补体介导的效应物功能)提供的效应物功能，也可以改善具体的靶向或者生物制剂的生物学效价或者其它的生物学特性。另外，靶向制剂或者结合制剂，通过连接于抗体提供的它的增加的体积，可以使靶向制剂在新的容量下发挥功能。

10 在某些实施方案中，化合物的靶向制剂能够结合于非-免疫球蛋白靶分子或者结合于免疫球蛋白结合位点外面的免疫球蛋白靶分子。因此，在这些实施方案中，靶向制剂对非-抗体是特异性的或者对抗体是特异性的，但结合于其结合位点外面的抗体。在一个优选方法中，催化抗体可以被修饰为特异性结合于生物分子的化合物。

15 抗体靶向化合物的抗体部分可包括整个抗体或者独特的抗体片段并且可以具有衍生自各种动物种类例如非-人免疫球蛋白或者人免疫球蛋白的序列，后者包括人抗体、人源化抗体或者人嵌合抗体。

也提供生产本发明的抗体靶向化合物的方法。在一个实施方案中，含靶向制剂和/或生物制剂的制剂-接头化合物连接于含与抗体结合位点共价反应的反应基团的接头。在另一种方法中，制备抗体-接头化合物，其中接头包括与所述一种或者更多种靶向制剂或者生物制剂反应的反应基团。在另一种方法中，这些制剂和抗体每一个可以连接于含有相适配的反应基团的接头，以便当两个接头共价结合时形成抗体靶向化合物。

25 另外提供含靶向制剂、生物制剂或者两者皆有之的药物-接头化合物，它们可以共价结合于抗体结合位点。在某些实施方案中，接头包含使靶向制剂共价结合于抗体结合位点的反应基团。抗体结合位点的键可以是结合位点的活性氨基酸的侧链。在某些实施方案中，

活性氨基酸为赖氨酸，而接头反应基团为酮、二酮、 β -内酰胺、琥珀酰亚胺活性酯、卤代酮、内酯、酸酐、环氧化物、醛、卤化物、磺酸酯、磷酸酯、胍、脒、亚胺、烯胺、缩酮、缩醛或者马来酰亚胺。

- 5 药物-接头化合物的各种化学特征被描述。在一个实施方案中，接头具有通式 X-Y-Z，其中 X 为含 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 中任一个的原子的线性或者分支连接链，或者它们的盐，并且包含介于 2-100 个单元之间的重复的醚单元；Y 为任选且为单一的或者稠合的 5 或者 6 元高-(homo-)或者杂碳环的饱和的或者不饱和的
10 定位于 Z 的 1-20 个原子的环；且 Z 为使一个或者更多个靶向制剂共价连接于抗体结合位点的活性氨基酸侧链的反应基团。当在靶向制剂-接头化合物中包含一个以上的靶向制剂或者生物制剂时，靶向制剂可以连接于 X 或者 Y 或连接于 X 和 Y。

15 另外也提供用于非共价连接于抗体结合位点的靶向制剂-接头-抗原化合物。这些化合物包括两种或者更多种靶向制剂、两种或者更多种生物制剂或者至少两种制剂，其中一种为靶向制剂且另一种为生物制剂。这些制剂借助接头共价连接于抗体识别的抗原。接头和抗原的多种化学特征被公开。

20 另外也提供修饰抗体的方法，抗体呈现低的或者无法检测到的对具体靶分子的结合亲和力，以使抗体增加对具体的靶分子的结合特异性。在一个实施方案中，对具体靶分子特异的一种或者更多种靶向制剂或者生物制剂共价连接于抗体结合位点，以生成抗体靶向化合物。以这样的方式连接制剂，以保留它们的结合具体靶分子的能力。在某些这样的实施方案中，共价连接之前的抗体对小于约 1×10^5
25 摩尔/升的靶分子具有亲和性。共价连接之后，靶向化合物可以对大于约 1×10^6 摩尔/升的靶分子呈现亲和性。

另外也提供改变靶向制剂或者生物制剂的至少一种物理或者生物学性质的方法。在一个实施方案中，制剂共价连接于抗体结合位

点以生成抗体靶向化合物。通过修饰接头的一种或者更多种化学性质，也提供修饰抗体靶向化合物的一种或者更多种物理或者生物学性质的方法。在某些实施方案中，所修饰的物理或者生物学性质包括药动学、药效学、免疫原性、结合亲和力、降解易敏性、溶解度、亲脂性、亲水性、疏水性、稳定性和刚性。

也提供使生物学活性传递至细胞、胞外基质生物分子或者个体的流体生物分子的方法。在一种方法中，将本发明的抗原靶向化合物(其对细胞、胞外基质生物分子或者流体生物分子具有生物学活性和特异性)给予个体。在另一种方法中，对细胞、组织胞外基质生物分子或者流体生物分子具有特异性的本发明的制剂-接头-抗原化合物和对抗原特异性的抗体被分别给予个体并且当制剂-接头-抗原化合物与抗体结合位点非共价相关时，体内形成抗体靶向制剂。

另外提供治疗或者预防个体的疾病或病症的方法，其中疾病或病症包括表达靶分子的细胞、组织或者流体。在一种方法中，给予个体治疗有效量的本发明的抗体靶向化合物。在另一种方法中，分别给予个体治疗有效量的本发明制剂-接头-抗原化合物和对抗原特异性的抗体，并且当制剂-接头-抗原化合物与抗体结合位点非共价相关时，体内形成抗体靶向制剂。在两个方法中，抗体靶向化合物或者制剂-接头-抗原化合物对靶分子是特异性的，并且化合物或者抗体包括有效抵御疾病或病症的生物学活性。

也进一步提供在个体中使细胞或者胞外基质造影的方法，其中细胞或者胞外基质表达靶分子。在一种方法中，本发明的抗体靶向化合物连接于可检测的标记物并且给予个体。在另一种方法中，分别给予个体制剂-接头-抗原化合物和对抗原特异性的抗体，并且当制剂-接头-抗原化合物与抗体结合位点非共价相关时，体内形成抗体靶向制剂。在两个方法中，标记物可以连接于抗体、靶向制剂和/或生物制剂。

另外提供减少存在于表面的微生物细胞或者病毒颗粒的感染性

的方法。按照这些方法，表面与有效量的本发明抗体靶向化合物接触，其中抗体靶向化合物包括对所述微生物细胞或者病毒颗粒上的受体特异性的靶向制剂或者生物制剂。

5 也提供筛选受体的激动剂或者拮抗剂的化学文库的方法。方法包括使化学文库的各自成员连接于抗体结合位点，然后对结合受体或者对受体与该受体的配体之间的结合的抑制测试抗体连接的文库。

10 另外提供采用本发明的抗体靶向化合物的各种免疫分析。在一个检测或者测量样品中分析物的实施方案中，本发明包括本发明的抗体靶向化合物的用途，其中对分析物的抗体特异性是由靶向制剂引起，该制剂共价连接于抗体结合位点。在另一个实施方案中，包括采用对分析物特异性的抗体测定分析物存在的直接或者间接结合分析，本发明包括采用对分析物特异性的抗体测定分析物的存在，其中抗体特异性是由对分析物特异性的非抗体靶向制剂引起，分析物在抗体结合位点连接于活性氨基酸。

15 另外也提供抑制或者减少靶向制剂或者生物制剂穿透细胞膜的能力的方法。在这些方法中，通过共价连接于抗体结合位点，形成抗体靶向化合物，抗体自身并不穿透细胞膜到达靶向制剂或者生物制剂，其中所述抗体连接于所述靶向制剂的键或者生物制剂减少或者抑制制剂穿透细胞膜的能力。

20 另外提供介导细胞内活性药物的细胞内传递的方法。在这些方法中，制备抗体靶向化合物，其中所述化合物包括通过接头共价连接于抗体结合位点的一种或者更多种靶向制剂或者一种或者更多种生物制剂或者两者。靶向制剂或者生物制剂的特征在于它们结合于细胞受体并且介导制剂的内活化(internalization)。抗体靶向化合物也
25 包括有细胞内活性的药物。当表达受体的细胞接触抗体靶向化合物时，发生细胞内药物传递。接触导致抗体靶向制剂的内活化和所述药物的细胞内传递。在某些实施方案中，细胞内活性药物为前药，

当所述药物接触细胞内室时，它们变得具有活性。抗体靶向化合物可以包括细胞内运输信号，以使内活化的抗体靶向化合物导向具体的细胞内室。

5 本发明另外提供药用组合物或者药物，它们包含本发明的抗体靶向化合物和药学上可接受的载体。

图的简述

10 图 1 显示小图 A-E 为 RGD 肽模拟物而小图 F 为 RGD 肽的示例性的整联蛋白靶向制剂。核心结构得自如下：美国专利 6335330 号(小图 A)、美国专利 5693636 号(小图 B)、美国专利 6040311 号(小图 C)和美国专利 6001117 号(小图 E)。

15 图 2 显示具有非-分支接头的靶向制剂-接头化合物的通用图式(小图 A)以及小图 B (SCS-873)、小图 C (PST 抑制剂二酮基(diketo)接头；化合物 26)、小图 D (TAK-799 二酮基接头；化合物 27)和小图 E (叶酸配体二酮接头；化合物 28)中的具体实施方案。

图 3 显示具有分支接头和两个相同靶向制剂的靶向制剂-接头化合物的实施方案的通用图式(小图 A)以及小图 B (整联蛋白靶向制剂二酮基接头；化合物 29)和小图 C (整联蛋白靶向制剂二酮基接头；化合物 30)中的具体实施方案。分支点为接头的连接链部分。

20 图 4 显示具有分支接头和两个不同靶向制剂的靶向制剂-接头化合物的实施方案的通用图式(小图 A)以及小图 B (整联蛋白靶向和叶酸靶向制剂二酮基接头；化合物 31)中的具体实施方案。分支点为接头的连接链部分。

25 图 5 显示具有分支接头和两个不同靶向制剂的靶向制剂-接头化合物的通用图式的实施方案(小图 A)以及小图 B (整联蛋白靶向制剂二酮基接头；化合物 32)中的具体实施方案。分支点为接头的识别基团部分。

图 6 显示接头反应基团的结构。结构 A-C 与反应亲核基团(例如

赖氨酸或者半胱氨酸侧链)在抗体结合位点形成可逆共价键(结构 A 可以形成不可逆共价键 X 为 N 且如果 R_1 和 R_3 形成环状结构的一部分)。 R_1 和 R_2 和 R_3 在结构 A-C 中表示取代基, 所述取代基可以为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或者它们的盐。X 为 N、C、Si 或者任何其它的杂原子。这些取代基也可以包括基团例如烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基或磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基、磷酸炔基。如在结构 B 和 C 中所图示说明的, R_2 和 R_3 可以为环状, 而 X 可以为杂原子。结构 D-G 与反应亲核基团(例如赖氨酸或者半胱氨酸侧链)在抗体的结合位点形成不可逆共价键。在这些结构中, R_1 和 R_2 表示 C、O、N、卤化物和离去基团例如甲磺酰基或甲苯磺酰基。

图 7 显示适于用抗体的活性氨基酸侧链反应修饰的各种亲电试剂。关键: (A) 酰基 β -内酰胺; (B) 简单二酮; (C) 琥珀酰亚胺活性酯; (D) 马来酰亚胺; (E) 具有接头的卤代乙酰胺; (F) 卤代酮; (G) 环己基二酮; 及(H) 醛。R 指可以包含靶向制剂、接头或者抗体的其它的结构, 而 X 指卤素。

图 8 显示接头识别基团(Y)的结构, 位于反应基团部分与接头的连接链部分之间。小图 A 显示接头中识别基团 Y 的关系(参见图 2)。小图 B-D 显示 Y 至 Z 的距离, 环上的取代基和环成员原子。

图 9 显示接头的连接链(X)的结构, 如在小图 A 中所示, 其一端直接连接于靶向制剂(参见图 2)。取代基 R_2 - R_4 可为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或其盐, 并且可以包括基团例如烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基、磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基、磷酸炔基以及碳环或者杂环单或者稠和的饱和或者不饱和环结构。小图 B: R_1 为 O 和 R_2 为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或其盐。在结构 B 和 C 中的连接链, n、r 或者 m

为 1-100。在结构 D 和 E 中, n 为 1、2、4 或者更优选为 3。

图 10 显示流程 1, 用于 SCS-873 的胺前体、靶向制剂 3 或者 SCS-胺的合成流程, 关键: (a) BBr_3 , CH_2Cl_2 , -20°C , 2 h; (b) DMF, 室温- 80°C , 3 h; (c) BnCOCl , 饱和 NaHCO_3 水溶液, 乙醚; (d) TBDPSCl, 咪唑, DMF, 16 h; (e) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, (*o*-tol) $_3\text{P}$, *i*-Pr $_2\text{EtN}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CN}$, 回流, 3 h; (f) 20% (w/w) Pd-C (10%), H_2 , EtOH-AcOH (1:1), 36 h; (g) TBAF, THF, 室温, 1 h; (h) DEAD, PPh_3 , THF-苯(3:1), 16 h; (i) 20% (w/w) Pd-C (10%), 环己烯-*i*-PrOH (1:1), 90°C , 12 h; (j) i. 2 N NaOH 水溶液, MeOH-THF (1:1), 16 h, ii. TFAA, 苯甲醚, CH_2Cl_2 , 0°C , 2 h。

图 11 显示流程 2, 一条用于制备化合物 4 的合成流程(R = 丁氧基羧基氨基己酰基-衍生物)。关键: (a) DMF, 室温; (b) EDC, HOBT, DMF; (c) 0.01 M 在 DMSO 中, 130°C ; (d) TFAA, 苯甲醚, 二氯甲烷; (e) DMF; (f) EDC, HOBT, DMF; (g) (i) 步骤 d, (ii) 2 M NaOH, MeOH-THF (1:1)。

图 12 显示流程 3, 用于制备化合物 SCS-873 和 SCS-1655 的合成流程。

图 13 显示流程 4, 用于制备化合物 SCS-864 和 SCS-789 的合成流程, 关键: (a) Et_3N , DMF, 室温, 16 小时。

图 14 显示采用具有马来酰亚胺-二酮反应基团的接头形成靶向制剂-接头化合物的流程。

本发明的详细描述

本发明提供各种抗体靶向化合物, 其中靶向制剂和/或生物制剂共价或者非共价连接于抗体结合位点上。当连接一种或者更多种靶向制剂时, 应连接至少一种靶向制剂以使它能够结合它的靶。这可以通过以下的方式来实现, 即通过它对靶的结合特异性起作用的方式连接靶向制剂和通过靶向制剂离抗体结合位点的足够距离, 以使

它能够结合到它的靶而无抗体的空间位阻。这可以通过采用合适的接头和在前面更详细讨论的连接策略来实现。

5 当生物制剂也不是靶向制剂时，在连接于一种或者更多种生物制剂后，优选抗体保留至少某些抗原结合特异性。由于连接的生物制剂，其中一种或者更多种生物制剂连接于抗体结合位点的抗体化合物可以呈现生物学活性，如果这样的制剂在连接抗体时是生物学有效的话。这可以通过各种策略例如通过使抗体结合位点连接于生物制剂上不影响生物学活性的位置来达到。另一个策略是使生物制剂位置远离抗体，以使生物制剂能够结合于活性必需的另一个分子而10 而没有通过抗体的空间位阻。得到连接于抗体结合位点的一种或者更多种生物制剂的生物学活性的其它策略对本领域技术人员是熟知的。在某些实施方案中，生物制剂的生物学活性直到制剂自抗体结合位点释放出来才会被认识。这可以在某些实施方案中得到，尽管不稳定的键的帮助在前面被进一步讨论。

15 在某些实施方案中，共价连接之前存在的抗体的天然抗原结合特异性在共价连接之后将基本不被修饰。换言之，在它共价连接之前，由一种或者更多种靶向制剂或者一种或者更多种生物制剂的共价连接得到的抗体化合物可以以相似的亲和性结合于相同的抗原。在其它的实施方案中，共价连接之前的抗体的结合特异性在共价20 连接之后基本上被修饰。由共价连接产生的基本上被修饰的抗体结合特异性可由于共价连接的抗体结合抗原基本上减少的能力或者共价连接的抗体结合抗原的基本上增加的能力所致。在某些实施方案中，抗原结合位点对抗原的结合有足够的减少，以致抗体的最初抗原结合特异性被有效地消除。在某些实施方案中，对抗原的抗原结合位25 点有足够的减少，以致抗体的最初抗原结合特异性被有效消除并且被共价结合于抗体结合位点的靶向制剂的特异性有效替代。在抗体的结合特异性被靶向制剂的结合特异性有效替代的某些实施方案中，在共价连接于靶向制剂后，抗体对大于约 1×10^{-6} 摩尔/升的靶分

子呈现亲和性。

5 尽管不希望被任何理论束缚，基本上减少的结合抗原的抗体可以由靶向制剂或者生物制剂空间阻碍抗原与抗体结合位点接触引起。另外，如果通过共价键修饰的抗体结合位点的氨基酸侧链对抗原结合是重要的，可以得到基本上减少的抗原结合。当靶向制剂或者生物制剂不空间阻碍抗原与抗体结合位点接触时，可以得到基本上增加的结合抗原的抗体，并且经共价键修饰的抗体结合位点的氨基酸侧链对抗原结合是重要的。

10 本发明的靶向化合物可以包含抗体或者具有单一结合位点例如 Fab 或者 Fab' 抗体片段的抗体片段。在这样的情况下，靶向制剂将连接于抗体分子的单一结合位点。如果靶分子的抗体或者抗体片段包含两个或者更多的结合位点，至少一个结合位点将包含共价连接的靶向制剂。在某些情况下，抗体的所有或者大多数结合位点能够共价连接于靶向制剂。如果抗体的多结合位点要连接靶向制剂，结合位点全部具有相同连接于其上的靶向制剂或者可以具有连接于相同抗体的不同的靶向制剂。应易于理解，可使多靶向制剂共价连接于单一抗体结合位点。按照靶向制剂在多聚体中的特异性，这样的多聚体靶向制剂可以为异多聚体的或者同多聚体的。

20 在此使用的“靶向制剂”或者“靶向成分”指识别、结合或者粘合于位于例如细胞、组织(胞外基质)、流体、有机体或者其亚群的靶分子的靶部分的部分。靶向制剂及其靶分子表示分子的结合对，后者通过各种分子力包括例如离子键、共价键、疏水键、范德华力和氢键中的任一种彼此相互作用，以使所述对具有彼此特异性结合的性质。特异性结合意指结合对在它们不结合另一个分子的情况下呈现相互结合。结合对的实例为生物素-抗生物素蛋白、激素-受体、受体-配体、酶-底物、IgG-蛋白 A、抗原-抗体等。靶向制剂及其关联的靶分子彼此呈现显著的相关性。按照本领域熟知的方法，通过测定平衡相关常数(或者结合常数)，可以评价这种相关性。根据 $K_d =$

25

$k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} 为解离速度常数, k_{on} 为相关速度常数和 K_d 为平衡常数) 计算亲和性。

通过在各种浓度(c)下测量标记配体的结合部分(r), 于平衡下可以测定亲和性。采用 Scatchard 方程式: $r/c = K(n-r)$ 对数据作图:

5 其中

r = 在平衡时已结合配体的摩尔数/受体的摩尔数;

c = 平衡时游离配体的浓度;

k = 平衡时相关常数; 和

n = 每受体分子的配体结合位点数目

10 通过图解分析法, 在 Y-轴上对 r/c 相对于 X-轴上的 r 作图, 因此产生 Scatchard 点。亲和性为曲线的负斜率。通过使已结合标记的配体与未标记的过量配体竞争可以测定 k_{off} (参见例如美国专利 6316409 号)。靶向制剂对其靶分子的亲和性优选为至少约 1×10^{-6} 摩尔/升, 更优选为至少约 1×10^{-7} 摩尔/升, 甚至更优选为至少约 1×10^{-8} 摩尔/升, 也甚至更优选为至少约 1×10^{-9} 摩尔/升, 并且最优选至少约 1×10^{-10} 摩尔/升。

20 靶向制剂包括(但不限于) 5000 道尔顿或者更小的小分子有机化合物, 例如药物、蛋白质、肽、肽模拟物、糖蛋白、蛋白聚糖、类脂、糖脂、磷脂、脂多糖、核酸、蛋白聚糖、碳水化合物等。靶向制剂可以包括熟知的治疗化合物, 包括抗肿瘤药物。抗肿瘤靶向制剂可以包括 targpaclitaxel(紫杉醇)、柔红霉素、多柔比星、去甲柔红霉素、4'-表阿霉素、4-脱甲氧基阿霉素、11-脱氧柔红霉素、13-脱氧柔红霉素、阿霉素-14-苯甲酸酯、阿霉素-14-辛酸酯、阿霉素-14-萘乙酸酯、长春碱、长春新碱、丝裂霉素 C、N-甲基丝裂霉素 C、博来霉素 A₂、二脱氮杂四氢叶酸、氨基喋呤、甲氨喋呤、秋水仙素和顺铂等。

25 抗微生物药物包括氨基糖苷, 包括庆大霉素、抗病毒化合物例如利福平、3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)和阿昔洛韦、抗真菌药例如唑类包括氟康唑、多烯类(plyre)大环内酯类例如两性霉素 B 和克念

菌素、抗寄生虫化合物例如锑剂等。激素靶向制剂包括毒素例如白喉毒素、细胞因子例如 CSF、GSF、GMCSF、TNF、促红细胞生成素、免疫调节剂或者细胞因子例如干扰素或者白细胞介素、神经多肽、生殖激素例如 HGH、FSH 或者 LH、甲状腺激素、神经递质例如乙酰胆碱、及激素受体例如雌激素受体。

在某些优选实施方案中，靶向制剂不为抗体。在其它的优选实施方案中，靶向制剂不为金属螯合物。与天然免疫球蛋白相比较，靶向制剂优选为小分子。靶向制剂，包括使靶向制剂共价结合于抗体结合位点的氨基酸残基所必需的任何连接部分，优选为至少约 300 道尔顿体积，并且优选可为至少 400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000、3500、4000、4500 或者甚至 5000 道尔顿体积，甚至尽可能更大的体积。

本发明的靶向化合物中合适的靶向制剂可以是蛋白质或者肽。“多肽”、“肽”和“蛋白质”可以相互交换使用表示氨基酸残基的聚合体。如在此使用的，这些术语应用于氨基酸聚合体，其中一种或者更多种氨基酸残基是相应的天然来源的氨基酸的人工化学类似物。这些术语也应用于天然来源的氨基酸聚合体。氨基酸可以以 L 或者 D 构型存在，只要保留肽的结合功能。肽可以具有可变化的长度，但一般长度介于 4-200 个氨基酸之间。肽可以是环状，在肽内部两个非-相邻氨基酸之间具有分子内键，例如主链-主链、侧链-主链和侧链-侧链环合。通过本领域熟知的方法可以制备环肽。参见美国专利第 6013625 号。

对靶分子呈现结合活性的蛋白或者肽靶向制剂是本领域熟知的。例如，靶向制剂可以为病毒肽细胞融合抑制剂。这可包括 T-20 HIV-1 gp41 融合抑制剂，其靶向 HIV 感染细胞的融合受体(对 T-20，参见 Kang 等的美国专利第 6281331 号和 6015881 号；Nagashima 等，J. Infectious Diseases 183: 1121, 2001；对其它的 HIV 抑制剂参见 Barney

的美国专利第 6020459 号和 Jeffs 等的 WO 0151673A2)、RSV 细胞融合抑制剂(参见 Antczak 的 WO 0164013A2 和 McKimm-Breschkin, *Curr. Opin. Invest. Drugs* 1: 425-427, 2000 (VP-14637)、肺病毒属细胞融合抑制剂(参见 Nitz 等 WO 9938508A1)等。靶向制剂也包括肽激素或者肽激素类似物, 例如 LHRH、铃蟾肽/胃泌素释放肽、生长抑素(例如, RC-121 八肽)等, 它们可以用于靶向各种癌症, 如卵巢、乳房、前列腺、小细胞肺癌、结肠直肠、胃和胰腺癌中的任何一种。参见例如 Schally 等, *Eur. J. Endocrinology*, 141: 1-14, 1999。

采用噬菌体文库体内靶向也可以鉴定适用于本发明靶向化合物的肽靶向制剂, 噬菌体文库显示肽序列的随机文库(参见例如 Arap 等, *Nature Medicine*, 2002 8(2): 121-7; Arap 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002 99(3):1527-1531; Trepel 等, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002 6(3): 399-404)。

在某些实施方案中, 靶向制剂对整联蛋白特异性。整联蛋白为杂化二聚体跨膜糖蛋白复合物, 它作为细胞粘附事件和信号传导过程起作用。整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 在多种细胞上表达并且已显示介导几种生物学有关的过程, 包括破骨细胞粘附于骨基质、血管平滑肌细胞迁移和血管生成。整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂同样可用于治疗几种人类疾病, 包括涉及新生血管形成的疾病例如类风湿性关节炎、癌症和眼科疾病。

整联蛋白的合适的靶向制剂包括 RGD 肽或者肽模拟物或者非-RGD 肽或者肽模拟物。如在此使用的, “Arg-Gly-Asp 肽” 或者 “RGD 肽” 打算指具有有一种或者更多种含 Arg-Gly-Asp 的序列的肽, 此序列可以作为 “Arg-Gly-Asp 受体家族”, 例如整联蛋白的受体结合位点起作用。包括 α 和 β 亚基的整联蛋白, 包括各种类型, 包括: $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_8\beta_1$ 、 $\alpha_9\beta_1$ 、 $\alpha_{10}\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 、 $\alpha_D\beta_2$ 、 $\alpha_D\beta_2$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_v\beta_8$ 、 $\alpha_x\beta_2$ 、 $\alpha_{IIIb}\beta_3$ 、 $\alpha_{IELb}\beta_7$ 等。序列

RGD 存在于几种基质蛋白中并且为细胞经整联蛋白结合于基质的靶。血小板含大量的蛋白 GP II_b/III_a 的 RGD-细胞表面受体, 通过与其它的血小板和损伤血管的内皮细胞表面相互作用, 其主要承担冠状动脉血栓形成的发展。术语 RGD 肽也包括为其功能等价物的氨基酸(例如 RLD 或者 KGD), 前提是它们与相同的 RGD 受体相互作用。采用例如自动肽合成仪, 例如由 Applied Biosystems 公司(Foster City, Calif)制造的那些自动肽合成仪, 通过本领域熟知的方法由氨基酸可以合成含 RGD 序列的肽。

如在此使用的, “非-RGD” 肽指为结合其配体(例如纤连蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白等), 但不包括 RGD 结合位点的整联蛋白的拮抗剂或者激动剂的肽。非-RGD 整联蛋白肽对 $\alpha_v\beta_3$ (参见例如美国专利第 5767071 号和 5780426 号)以及其它的整联蛋白例如 $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)、 $\alpha_4\beta_7$ (参见例如美国专利第 6365619 号; Chang 等, *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*, 12:159-163 (2002); Lin 等, *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*, 12:133-136 (2002))等是已知的。

整联蛋白靶向制剂可以为肽模拟物激动剂或者拮抗剂, 其优选为 RGD 肽或者非-RGD 肽的肽模拟物激动剂或者拮抗剂。如在此使用的, 术语“肽模拟物”为能够模拟或者拮抗天然母体肽的生物学作用的含非-肽结构元素的化合物。RGD 肽的肽模拟物为保留 RGD 氨基酸序列的类似肽链药效团的有机分子, 但其在结合位点序列缺乏氨基酸或者肽键。同样地, 非-RGD 肽的肽模拟物为保留非-RGD 结合位点序列的类似肽链药效团的有机分子, 但其在结合位点序列缺乏氨基酸或者肽键。“药效团”为特殊的三维排列的官能团, 其需要化合物产生具体的应答或者具有所需的活性。术语“RGD 肽模拟物”意指包括含由有机/非-肽结构支持的 RGD 药效团的分子的化合物。应理解 RGD 肽模拟物(或者非-RGD 肽模拟物)可以为更大分子的一部分, 其本身包括肽键连接的常规或者修饰的氨基酸。

RGD 肽模拟物是本领域熟知的，并已按整联蛋白例如 GPIIb/IIIa、 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 描述(参见例如 Miller 等, J. Med. Chem. 2000, 43:22-26 和国际专利申请书 WO 0110867、WO 9915178、WO 9915170、WO 9815278、WO 9814192、WO 0035887、WO 9906049、
5 WO 9724119 和 WO 9600730; 也参见 Kumar 等, Cancer Res. 61:2232-2238 (2000))。许多这样的化合物对一种以上的整联蛋白是特异性的。RGD 肽模拟物一般基于核心或者模板(也称作“纤连蛋白受体拮抗剂模板”), 它通过核心一端的酸性基团和另一端的碱性基团的间隔基连接。酸性基团通常为羧酸官能团而碱性基团一般为含 N 部分例如
10 咪或者胍。通常, 核心结构加入酸性部分与碱性氮部分之间的一种刚性间距的形式, 并且含一种或者更多种环状结构(例如, 吡啶、吡唑等)或者酰胺键, 以用于这一目的。对纤连蛋白受体拮抗剂, RGD 肽模拟物的酸性基团与碱性基团的氮之间通常存在约 12-15 个, 更优选 13 或者 14 个, 插入的共价键存在(借助最短的分子内途径)。对玻
15 连蛋白受体拮抗剂而言, 酸性部分与碱性部分之间插入的共价键数目通常更少, 为 2-5 个, 优选 3 或者 4 个。可以选择具体的核心以得到纤连蛋白拮抗剂模板的酸性部分与吡啶的氮原子之间的合适的间距。通常, 纤连蛋白拮抗剂在酸性部分(例如放出质子或者接受电子
20 对的原子)与碱性部分(例如接受质子或者给予电子对)之间应具有约 16 埃(1.6 nm)的分子内距离, 而玻连蛋白拮抗剂在酸性与碱性中心之间应具有约 14 埃(1.4 nm)的分子内距离。在美国专利第 6159964 号中可以发现自纤连蛋白受体模拟物转变为纤连蛋白受体模拟物的另外的描述。

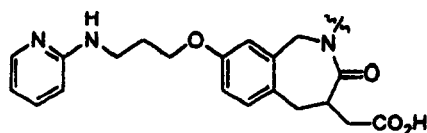
肽模拟物 RGD 核心可以包括含 0-6 个双键和含 0-6 个选自 N、
25 O 和 S 的杂原子的 5-11 元芳族或者非芳族单-或者多环系统。环系统可为未取代的或者可以在碳或者氮原子上被取代。具有用于玻连蛋白结合的合适的取代基的优选核心结构包括单环和双环基团, 例如在 WO 98/14192 中描述的苯并氮杂草、在 U.S. 6239168 号中描述的

苯并二氮杂草和在 U.S. 6008213 中描述的稠合三环。

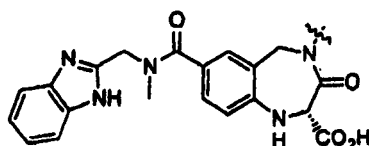
美国专利号 6159964 含该文件的表 1 中的参考文献的广泛条目，其公开了 RGD 肽模拟物核心结构(称作纤维蛋白原模板)，后者可以用于制备 RGD 肽模拟物。优选的玻连蛋白 RGD 和纤连蛋白 RGD 肽模拟物在以下美国专利号中公开：

6,335,330; 5,977,101; 6,088,213; 6,069,158; 6,191,304; 6,239,138;
6,159,964; 6,117,910; 6,117,866; 6,008,214; 6,127,359; 5,939,412; 5,693,636;
6,403,578; 6,387,895; 6,268,378; 6,218,387; 6,207,663; 6,011,045; 5,990,145;
6,399,620; 6,322,770; 6,017,925; 5,981,546; 5,952,341; 6,413,955; 6,340,679;
6313,119; 6,268,378; 6,211,184; 6,066,648; 5,843,906; 6,251,944; 5,952,381;
5,852,210; 5,811,441; 6,114,328; 5,849,736; 5,446,056; 5,756,441; 6,028,087;
6,037,343; 5,795,893; 5,726,192; 5,741,804; 5,470,849; 6,319,937; 6,172,256;
5,773,644; 6,028,223; 6,232,308; 6,322,770; 5,760,028。

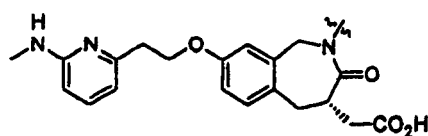
示例性的 RGD 肽模拟物整联蛋白靶向制剂以下表示为化合物 1、2 和 3，并且可以用于制备本发明的整联蛋白靶向化合物。在这三个化合物中，接头如对七元环的氮指明的那样连接。其它的 RGD 肽模拟物整联蛋白靶向制剂包括化合物 33，其中 P 和 L 为碳或者氮。接头可以为 R1 或者 R2，而 R3 基团包括碱基例如-NH 基团。在某些实施方案中，R3 基团如在结构 1、2 或者 33 中所示。在某些实施方案中，R3 基团包括杂环基，例如苯并咪唑、咪唑、吡啶基等。在某些这样的实施方案中，R3 为烷氧基，例如丙氧基等，其由被烷基氨基例如甲基氨基等取代的杂环基取代，而在其它的实施方案中，R3 为烷氧基，例如丙氧基等，由杂环基氨基取代，例如由吡啶基氨基等例如 2-吡啶基氨基取代。在其它的实施方案中，R3 为式-C(=O)Rb 的基团，其中 Rb 选自-N(烷基)-烷基-杂环基，例如-N(Me)-CH₂-苯并咪唑基等。



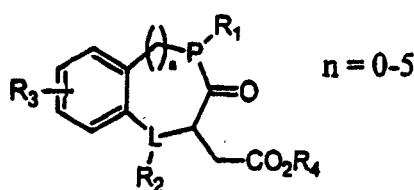
1



2



3



31

在图 1 中显示了其它的示例性整联蛋白肽模拟物靶向制剂和肽靶向制剂。接头可为 R_1 、 R_2 、 R_3 中的任一个，其中 R_4 可以是接头或者可水解基团，例如烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基或磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基、磷酸炔基等。本领域技术人员应该容易地意识到其它的整联蛋白激动剂和拮抗剂模拟物 (mimetics) 也可以用于本发明的靶向化合物。

靶向化合物的靶向制剂结合的靶分子优选为非免疫球蛋白分子或者为免疫球蛋白分子，其中靶向部分处于免疫球蛋白结合位点的外面。这并不打算从本发明的化合物中排除，作为抗原起作用并因此结合于免疫球蛋白结合位点的那些靶向制剂。在此包括这样的靶

向制剂只要所述靶向制剂也结合于非免疫球蛋白分子和/或位于免疫球蛋白分子结合位点外部的靶部分。通常，靶分子可以是任何类型的分子，包括有机物、无机物、蛋白质、类脂、碳水化合物、核酸等。

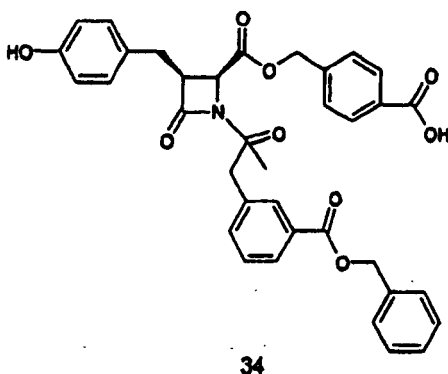
5 靶分子优选为生物分子例如蛋白质、碳水化合物、类脂或者核酸。靶分子可与细胞(“细胞表面表达的”)、或者其它的颗粒(“颗粒表面表达的”)例如病毒有关，或者可以是细胞外的。如果与细胞或者颗粒有关，靶分子优选以使靶向化合物的靶向制剂与人的流体相的表面受体接触这样的方式在细胞或者颗粒表面表达。

10 在某些优选实施方案中，靶分子为占据优势地或者全部地与病理状况或者疾病细胞、组织或者流体有关。因此，本发明抗体靶向化合物的靶向制剂可以用于通过靶向细胞传递靶向化合物至染病组织、胞外基质生物分子或者流体生物分子。在下文实施例中公开的示例性的靶分子包括整联蛋白(实施例1)、细胞因子受体(实施例2、
15 3和7)、细胞因子(实施例4)、维生素受体(实施例5)、细胞表面酶(实施例6)和 HIV-1 病毒和 HIV-1 病毒感染细胞(实施例8和11)等。

 在其它优选实施方案中，靶分子与感染因子有关并表达在微生物细胞的表面或者病毒颗粒的表面。因此，靶向制剂可结合于细胞表面表达的或者颗粒表达的感染因子的抗体靶向组合物通过使微生物制剂靶向人体内部或者个体表面(例如皮肤)可以用作抗微生物药。
20 在后者情况下，本发明化合物可以局部使用。

 对微生物靶分子特异性的抗体靶向制剂体外也可以用作抗微生物药。因此，提供减少存在于表面的微生物细胞或者病毒颗粒感染的方法。某些方法包括使微生物细胞或者病毒颗粒的表面与有效量的本发明靶向化合物接触。这样方法中的靶向化合物包括对微生物
25 细胞或者病毒颗粒上的受体特异性的靶向制剂。可应用的表面为体外任何表面，例如 counter top、避孕套等。

本发明的靶向分子的另一个优选靶分子为前列腺特异性抗原 (PSA)，一种与各种疾病状态包括前列腺癌、乳腺癌和骨转移有关的丝氨酸蛋白酶。已知结合于 PSA 活性部位的 PSA 特异性抑制剂。参见 Adlington 等, *J. Med. Chem.*, 2001, 44:1491-1508 和 Anderson 的 WO 98/25895。作为化合物 34 的 PST 特异性抑制剂显示如下。



靶向制剂，除它的结合靶分子能力以外，可以以具有一种或者更多种生物学活性为特征，每一活性特征在于对细胞器官或者有机体的功能的可检测的生物学影响。因此，除了为靶向制剂以外，这样的化合物可被认为是生物制剂。例如，以上作为化合物 1、2、3 和 33 所示的整联蛋白靶向制剂不仅靶向于整联蛋白，而且具有整联蛋白拮抗剂生物学活性。然而，在某些实施方案中，靶向制剂可以为纯的没有生物学活性的结合制剂。

本发明的靶向化合物包括共价连接于抗体结合位点的靶向制剂。这样的靶向化合物可以具有一种或者更多种与靶向化合物有关的生物学活性。生物学活性可以为靶向制剂本身的内在特征或者可以通过不同于靶向化合物中的靶向制剂的生物制剂提供。生物制剂可以与靶向化合物的其它分子或者部分共价或者非-共价相关联，尽管共价键为优选。通过本领域熟知的方法，生物制剂可以连接于靶向制剂、抗体，或者两者。例如，参见 Kiaris 等, *Eur. J. Cancer* 37:620-628 (2001) 和 Schally 等, *Eur. J. Endocrin.* 141:1-14 (1989)，它描述肽激素靶向制剂与多柔比星之间的各种缀合物。也参见 Canevari 等, *Ann Oncol* 1994 Oct; 5(8): 698-701; Rihova, *Folia Microbiol (Praha)* 1995; 40(4):

367-84; Vitetta, Princess Takamatsu Symp 1988; 19: 333-40; 和 Ghose 等, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1987; 3(4): 263-359。因此, 在某些实施方案中, 本发明的抗体-靶向制剂靶向化合物可以包括以具有内在生物学活性的靶向制剂的形式存在的功能成分。在这样的实施方案中, 靶向制剂连接于抗体结合位点或者抗体片段并且靶向制剂为呈现生物学活性的功能成分。在其它的实施方案中, 靶向化合物包括连接于抗体结合位点或者抗体片段的靶向制剂, 并且也包括分开的功能成分, 后者优选通过共价键附着或者连接于靶向化合物。

采用在特定条件下不稳定的键, 靶向制剂或者生物制剂能连接于本发明的抗体靶向化合物。不稳定键可以处于抗体与靶向制剂或者生物制剂之间, 如果接头存在, 不稳定键可以处于抗体与接头之间, 靶向制剂或者生物制剂与接头之间, 接头之内, 或者它们的组合中。

不稳定接头包括可逆共价键、pH 敏感键(酸或碱敏感)、酶敏感键、降解敏感键、光敏感键等以及它们的组合。这些特征也是可被认为是稳定接头类型的前药的特征。先前已设计各种不稳定接头。例如, 如在美国专利第 5498729 号中描述的, 采用具有经水解缓慢降解的羧酸部分的化合物可以形成前药。

不稳定接头的具体设计可用于指导生物制剂在它到达其预定的靶后释放。例如, 键可以被设计为在具体的细胞内室或其中抗体靶向化合物可以聚集的细胞外室直接释放。酸不稳定接头, 例如顺式-乌头酸接头, 可以有利于不同细胞内室的酸性环境例如在受体介导的胞饮和溶酶体期间遇到的核内体。参见 Shen 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1981) 102:1048-1054; Yang 等, J. Natl. Canc. Inst. (1988) 80:1154-1159。在接头的末端内或在接头的末端的肽间隔臂可用于影响靶向制剂或生物制剂通过肽酶例如溶酶体肽酶的作用的释放。参见例如 Trouet 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (1982) 79, 626-629。

依它们用途的内容而定, 具体的靶向制剂可以或者不可以具有

生物学活性。例如，当药物共价连接于抗体并且以无细胞形式应用于DNA时，治疗药物多柔比星(其为DNA嵌入剂)可以为用于双链DNA的靶向制剂。然而，对于细胞可不认为多柔比星是靶向制剂，除非化合物能够被细胞摄取，则该药物共价连接于抗体。在后者情况下，如果药物能够接近在细胞核中的DNA，多柔比星摄取后可具有生物学活性。

生物制剂功能成分包括(但不限于)小分子药物(约5000道尔顿或者更小的药用有机化合物)、有机分子、蛋白质、肽、肽模拟物、糖蛋白、蛋白聚糖、类脂糖脂、磷脂、脂多糖、核酸、蛋白聚糖、碳水化合物等。生物制剂可以为抗肿瘤药、抗微生物药、激素、效应物等。这样的化合物包括熟知的治疗化合物，例如抗肿瘤药物紫杉醇、柔红霉素、多柔比星、去甲柔红霉素、4'-表阿霉素、4-去甲氧基阿霉素、11-脱氧柔红霉素、13-脱氧柔红霉素、阿霉素-14-苯甲酸酯、阿霉素-14-辛酸酯、阿霉素-14-茶乙酸酯、长春碱、长春新碱、丝裂霉素C、N-甲基丝裂霉素C、博来霉素A₂、二脱氮杂四氢叶酸、氨基喋呤、甲氨基喋呤、秋水仙素和顺铂等。抗微生物药物包括氨基糖苷，包括庆大霉素、抗病毒化合物例如利福平、3'-叠氮基-3'-脱氧胸苷(AZT)和阿昔洛韦、抗真菌药例如唑类包括氟康唑、多烯类大环内酯类例如两性霉素B和克念菌素、抗寄生虫化合物例如锑剂等。激素可包括毒素例如白喉类毒素、细胞因子例如CSF、GSF、GMCSF、TNF、促红细胞生成素、免疫调节剂或者细胞因子例如干扰素或者白细胞介素、神经多肽、生殖激素例如HGH、FSH或者LH、甲状腺激素、神经递质例如乙酰胆碱、激素受体例如雌激素受体。也包括非甾体抗炎药，例如吲哚美辛、乙酰水杨酸、布洛芬、舒林酸、吡罗昔康和萘普生及麻醉药或者镇痛药。也包括例如那些用于成像以及用于治疗放射性同位素。

用于本发明的靶向化合物的生物制剂功能成分可以是天然来源的或者合成的。生物制剂以其天然状态可为生物学活性的，或者无

生物学活性的或者以潜在的前体状态存在并在当生物制剂的部分被水解、裂解或者另外修饰时获得生物学或治疗活性。采用本发明的抗体靶向化合物，前药能够在细胞表面或者细胞内传递，然后其在那里可被激活。关于这一点，生物制剂可以为“前药”，意指前药分子能够通过它们结构的某些化学或者酶促修饰而转变为药物(活性治疗化合物)。在前药方法中，自前药的组织特异性激活可以得到部位特异性药物传递，这是通过对组织独特的酶的代谢或者在更高的浓度(与其它的组织相比较)下呈现的结果；因此，它更有效地激活前药。

如先前描述的，通过裂解光敏感接头或者经激活光敏感酶(酰基酶水解)，光动力学治疗可被用来激活前药(参见美国专利第 5114851 和 5218137 号)。光动力学治疗也可以用于在药物活性不需要的部位(例如在非-靶向组织)使药物迅速失活。共价修饰药物以形成前药的各种方法是本领域熟知的。

靶向制剂直接或通过接头的帮助可共价连接于抗体连接部位。可选择合适的接头以提供靶向制剂与抗体连接部位之间的足够距离，以使靶向制剂能够结合于它的靶分子。这个距离依几个因素而定，包括：例如抗体结合位点的最外面与结合位点的活性侧链之间的距离及靶向制剂的性质。一般地，接头长度应为约 5-10 埃(0.5-1 nm)之间，10 埃(1.0 nm)或 10 埃以上为更优选，如果氨基酸侧链非常邻近结合位点的最外面部分和/或靶向制剂或者生物制剂包括可以作为接头的一部分起作用的片段，则长度约 3 埃(0.3 nm)的更短的接头可为足够的。

按照线性原子的数目也可以观察接头的长度(通过采用最短的途径计算环状部分例如芳族环等)。在这种测量下的接头长度一般为约 10-200 个原子并且更通常为约 30 个或 30 个以上的原子，尽管 2 或者更多个原子的更短的接头可能是足够的，如果活性氨基酸侧链非常邻近结合位点的最外面部分的话。通常，带有至少约 9 个原子的

线性序列段的接头是足够的。其它的接头考虑包括对生成的靶向化合物或靶向制剂-接头的物理或者药动学性质的作用、溶解度、亲脂性、亲水性、疏水性、稳定性(或多或少的稳定性以及计划的降解作用)、刚性、柔性、免疫原性、抗体结合的调节、与靶向制剂的化学适配性、掺入胶束或者脂质体的能力等。

在其中接头存在于抗体结合部位之间的靶向化合物中,通过几种方法可制备靶向制剂。在一种方法中,用接头可合成靶向制剂-接头化合物和/或生物制剂-接头化合物,所述接头包括一种或更多种被设计用于与抗体的结合部位上的氨基酸侧链共价反应的反应基团。

10 在接头反应基团与氨基酸侧链形成共价键的条件下,制剂-接头化合物和抗体组合。

在另一种方法中,通过合成包含抗体和接头的抗体-接头化合物,其中接头包括一种或者更多种设计用于与靶向制剂或生物制剂的合适的化学部分共价反应的反应基团,可以实现连接。靶向制剂或生物制剂可需要被修饰以提供用于与接头反应基团反应的合适的部分。

15 在接头反应基团共价连接于靶向和/或生物制剂的条件下,抗体-接头和靶向制剂和/或生物制剂被结合。

形成本发明的抗体靶向化合物的另一种方法采用双重接头设计。在一个实施方案中,合成制剂-接头化合物,其包含靶向制剂和/或生物制剂和带有反应基团的接头。也可合成抗体-接头化合物,它包含抗体和接头,后者带有易于与第一步骤的制剂-接头的反应基团反应的化学部分。然后,在接头共价结合,形成抗体靶向化合物的条件下,这两个含接头的化合物结合。

20

在另一个实施方案中,合成抗体-接头化合物,接头包含抗体和带有反应基团的接头。也可制备靶向制剂和/或生物制剂-接头化合物,它含制剂和接头,后者带有易于与第一步骤的抗体-接头的反应基团反应的化学部分。然后,在接头共价结合,形成抗体靶向化合物的条件下,这两个含接头的化合物结合。在此使用的涉及化学部

25

分的“易敏的(易于)”指化学部分将与适配的反应基团共价结合。因此，亲电基团易于与亲核基团共价结合，反之亦然。

如讨论的那样，接头可以首先缀合于靶向制剂，然后靶向制剂-接头缀合于抗体结合位点。或者，接头可以首先缀合于抗体结合位点，然后抗体-接头缀合于靶向制剂。本领域熟知的各种方法能够用于使接头与靶向制剂或者抗体结合位点连接。可参与连接的示例性功能基团包括例如酯、酰胺、醚、磷酸酯、氨基、酮基、脘、胍、亚胺、烯胺、磷酸酯、磷酸酯、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、掩蔽或者保护的二酮(例如缩酮)、内酰胺、卤代酮、醛、硫代氨基甲酸酯、硫代酰胺、硫代酯、硫化物、二硫化物、磷酰胺、磺酰胺、脘、硫脘、氨基甲酸酯、碳酸酯、羟基酰胺等。

接头包括来自以下基团 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)的任何原子或其盐。接头也可以包括基团例如烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基或磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基、磷酸炔基。接头也可以包括一个或者更多个环结构。如在此使用的“环结构”包括碳环的高或者杂单或者稠合的饱和或者不饱和环结构。以上基团和环的组合也可以存在于本发明的靶向化合物的接头中。

用于制备本发明靶向化合物的未分支接头的实施方案的一般性设计示于图 2A 中。接头具有下式：



其中 X 为连接链，Y 为识别基团和 Z 为反应基团。图 2B-E 显示各种带有已鉴定的接头 X、Y 和 Z 部分的靶向制剂-接头化合物。接头可以为线性或者分支的。在某些实施方案中，接头具有 5-200 或者 10-200 个原子之间的线性序列段，尽管在其它的实施方案中，可使用更长的接头长度。一种或者更多种靶向制剂可连接于 X。在某些实施方案中，当连接一个以上的靶向制剂并且使用分支接头时，靶向制剂

中的某些可以连接于接头的不同分支。然而，应理解在本发明的化合物中使用的接头可以具有一种或者更多种识别基团、一种或者更多种反应基团和一种或者更多种连接链及它们的组合。连接链可以自另一个连接链分支或者自识别基团分支。

5 接头的连接链 X 包括来自基团 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)的任何原子或其盐。X 也可以包括基团如烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基或磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基、磷酸炔基。在某些实施方案中，X 可包括一种或者更多种环
10 结构。在一个优选实施方案中，X 包括介于 2-100 单位之间的重复的醚单元。X 的各种实施方案示于图 9 中。

 接头的识别基团 Y 为任选的且如果存在则定位于反应基团与连接链之间。在优选的实施方案中，Y 由 1-20 个来自 Z 的原子定位。尽管不希望受任何理论束缚，但确信识别基团使反应基团合适定位
15 于抗体结合位点来起作用，以使它可以与活性氨基酸侧链反应。图 8 显示各种示例性的识别基团，其带有一种或者更多种 5 或者 6 个原子的高或者杂环结构。也可使用更大的环结构。一种或者更多种靶向制剂可连接于 Y。在某些实施方案中，接头可用于使靶向制剂与 Y 连接。在使用两种或者更多种靶向制剂的实施方案中，一个或者更
20 多个可连接于 X 和 Y 两者。一种以上的靶向制剂也可连接于 Y。

 接头反应基团 Z 包括任何亲核基团或者亲电基团。在一个优选实施方案中，Z 能够与抗体的活性侧链形成共价键。在某些实施方案中，Z 包括一个或者更多种 C=O，基团被排列以形成二酮、酰基 β -内酰胺、活性酯、卤代酮、环己基二酮基、醛或者马来酰亚胺。其它基团可包括内酯、酸酐和 α -卤代乙酰胺或环氧化物。可共价结合
25 于抗体结合位点的反应性亲核基团(例如赖氨酸或者半胱氨酸侧链)的示例性接头亲电反应基团包括酰基 β -内酰胺、简单二酮、琥珀酰亚胺活性酯、马来酰亚胺、带有接头的卤代乙酰胺、卤代酮、环己基

二酮、醛、脘、脞、亚胺、烯胺、磷酸酯、磷酯、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、掩蔽或者保护的二酮(例如缩酮)、内酰胺、磺酸酯等、掩蔽的 C=O 基团例如亚胺、缩酮、缩醛和任何其它已知的亲电基。优选接头反应基团包括一种或者更多种 C=O, 基团被排列以形成酰基 β -内酰胺、简单二酮、琥珀酰亚胺活性酯、马来酰亚胺、带有接头的卤代乙酰胺、卤代酮、环己基二酮或者醛。

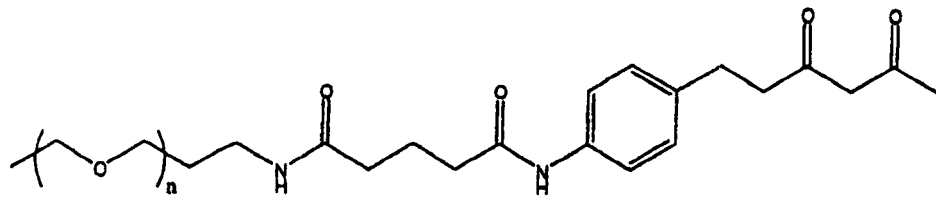
Z 可以为形成可逆或者不可逆共价键的基团。在某些实施方案中, 采用二酮 Z 基团例如在图 6 中所示的那些基团, 可以形成可逆共价键。在图 6 的结构 A-C 中的 R_1 和 R_2 和 R_3 表示取代基, 其可以为 C、H、N、O、P、S、Si、卤素(F、Cl、Br、I)或其盐。这些取代基也可以包括基团例如烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基或磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基、磷酸炔基。 R_2 和 R_3 也可以形成如在结构 B 和 C 中所示的环结构。图 6 中的 X 可为杂原子。形成可逆共价键的其它的 Z 基团包括二酮、脘、亚胺及在图 7 的结构 B 和 G 中所示的其它反应基团。图 7 也包括其它优选的接头反应基团的结构。

与抗体结合位点形成不可逆共价键的 Z 反应基团包括在图 6 中的结构 D-G 和在图 7 中的 A、C 和 D。这样的结构用于使靶向制剂-接头不可逆连接于抗体结合位点的活性亲核基团(例如赖氨酸或者半胱氨酸侧链)。

应理解以上描述的可逆和不可逆共价键化学也可应用于在接头不存在下使靶向制剂或者生物制剂连接于抗体或者使靶向制剂或者生物制剂连接于接头(例如接头的连接链)。例如, 通过在接头或者靶向制剂上放入合适的反应基团 Z 型元素例如合适的亲核基团或者亲电基团及在两者的其它部分放入合适的反应部分例如氨基或者巯基, 靶向制剂可与接头连接以形成靶向制剂-接头。

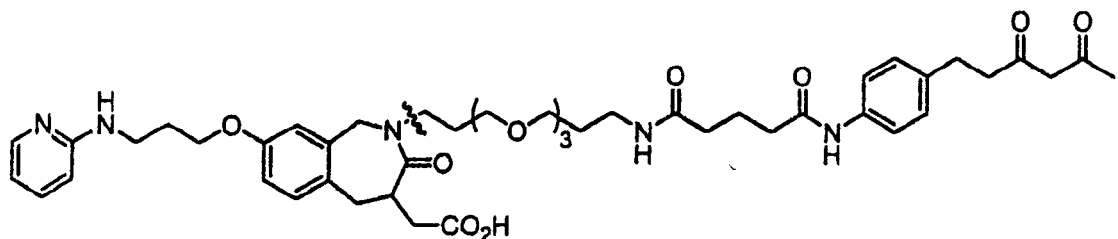
用于本发明靶向化合物和用于制备靶向制剂-接头化合物的优选

接头包括作为 Z 的 1,3-二酮反应基团。另一优选接头为其中连接链 X 包含介于 2-100 个单位之间的重复醚单元的接头。用位于来自反应基团 Z 的优选 1-20 个原子定位的 Y，其中存在识别基团 Y 的接头为优选。连接整联蛋白靶向 RGD 肽模拟物部分的核心(例如以上描述的那些)的这样的接头可具有如下所示的结构 28，其中 n 为 1-100 或者更多且优选为 1、2 或者 4，更优选为 3。在某些实施方案中，接头为重复出现的聚合物例如聚乙二醇。



35

选择靶向制剂中可固有存在的接头反应基团或者类似这样的反应基团以用于与特定的抗体结合。例如，经醛缩酶抗体修饰的化学部分可以为酮、二酮、 β -内酰胺、活性酯卤代酮、内酯、酸酐、马来酰亚胺、 α -卤代乙酰胺、环己基二酮、环氧化物、醛、脘、胍、亚胺、烯胺、磷酸酯、磷酰胺、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、掩蔽或者保护的二酮(例如缩酮)、内酰胺、卤代酮、醛等。1,3-二酮构型例如在化合物 SCS-873 (参见如下)或者 SCS-864(参见如下)中所示的二酮，作为经醛缩酶抗体修饰的底物为特别优选的。



靶向制剂

具有 1,3 二酮基的接头

SCS873

链。在某些实施方案中，分支接头的每一分支包含 5-100 个原子之间的线性序列段。例如，在图 3-5 中公开的结构显示带有两种连接于接头的不同分支的靶向制剂的分支接头的实施方案，接头具有 1,3-二酮作为活性基团。如在这些实施方案中所示，分支点可以处于连接链

5 或者处于识别基团中(如果存在)。

在此使用的“抗体”包括免疫球蛋白，它为 B 细胞及其变体以及 T 细胞受体(TcR)的产物，TcR 为 T 细胞及其变体的产物。免疫球蛋白为含一种或者更多种基本上由免疫球蛋白 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因以及无数免疫球蛋白可变区基因基本编码的多肽

10 的蛋白。轻链分类为 κ 或者 λ 。重链归为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或者 ϵ 类，后者依次分别定义免疫球蛋白种类，IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。重链的亚类也是已知的。例如，人体内的 IgG 重链可以为 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 亚类中的任一种。

已知典型免疫球蛋白结构单位包含四聚体。每一四聚体由两个

15 相同对的多肽链组成，每对具有一个“轻链”(约 25 kD)和一个“重链”(约 50-70 kD)。每一链的 N-末端定义约 100-110 个或者更多个主要担负抗原识别的氨基酸的可变区。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指这些轻链和重链。

抗体作为全长完整抗体或者作为各种由多种肽酶或者化学物消化产生的良好特征的片段存在。因此，例如，胃蛋白酶在铰链区的二硫键下消化抗体以产生 $F(ab')_2$ ，它是 Fab 的二聚体，其本身为通过二硫键连接于 V_H-CH_1 的轻链。在温和的条件下可以还原 $F(ab')_2$ 以断裂铰链区的二硫键，因而可使 $F(ab')_2$ 二聚体转变为 Fab' 单体。Fab' 单体必须为带有部分铰链区的 Fab 片段(参见，Fundamental

20

25 Immunology, W. E. Paul 编辑, Raven Press, N. Y.(1993), 用于更详细地描述其它抗体片段)。而按照完整抗体消化定义各种抗体片段，本领域技术人员应意识到可以重新化学合成或者采用重组 DNA 方法合成各种抗体片段中的任一种。因此，如在此使用的术语抗体也包

括由整个抗体修饰或重新化学合成产生的抗体片段或者通过采用重组 DNA 方法学得到的抗体和片段。

5 T 细胞受体(TcR)为由 α 或 β 链组成或(在少数 T 细胞上)由 γ 或者 δ 链组成的二硫键合的杂化二聚体(heterodimer)。两条链一般以装配抗体铰链区的氨基酸的较短延伸的序列段(stretch)恰好在 T 细胞质膜的外面被二硫键合。每一 TcR 链由一个抗体样可变区($V\alpha$ 或 $V\beta$)和一个恒定区($C\alpha$ 或 $C\beta$)组成。全长 TcR 具有约 95 kDa 的分子量,带有大小在 35-47 kDa 之间变化的各自的链。也包括在 TCR 含义中的还有受体的蛋白,例如能够采用本领域熟知的方法作为可溶性蛋白产生的这一受体的可变区。例如,美国专利 6080840 号描述了通过把 TcR 的细胞内结构域剪接至 Thy-1 糖基磷脂酰肌醇(GPI)膜锚序列制备的可溶性 T 细胞受体(TcR)。在 CD3 不存在下,这个分子表达在细胞表面上并且可通过用磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC)从膜中裂解。基本如在美国专利第 5216132 号描述的,通过使 TcR 可变

10 结构域与抗体重链 CH_2 或 CH_3 结构域偶合,或者通过 Schusta 等 Nature Biotech. 18, 754-759 (2000)或者 Holler 等 Proc. Natl. Acad. Sci(USA)97:5387-5392 (2000)描述的可溶性 TcR 单链,也可以制备可溶性 TcR。TcR “抗体”作为可溶性产物可以用于替代抗体,以制备本发明化合物。采用以上对抗体讨论的相同的方法,根据 CDR 区和

15 其它的构架残基可以鉴定 TcR 的结合位点。

重组抗体可以为常规全长抗体,来自蛋白酶消化的已知抗体片段、独特的抗体片段例如 Fv 或者单链 Fv(scFv),缺失结构域的抗体等。Fv 抗体为大约 50 Kd 大小并且包含轻链和重链的可变区。单链 Fv (“scFv”)多肽为共价连接的 $V_H::V_L$ 杂化二聚体,后者可以自包括 V_H -和 V_L -编码的序列在内的核酸表达,或者直接加入或者通过肽

25 编码的接头加入。参见 Huston 等(1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。使天然聚集的但自抗体 V 区化学分离的轻和重链多肽转变为折叠为三维结构的 scFv 分子,其结构基本上与抗原结合位

点的结构类似。参见美国专利第 5091513、5132405 和 4956778 号。

结合位点指抗体分子参与抗原结合的部分。抗原结合位点由重 (“H”) 和轻 (“L”) 链的 N-末端可变 (“V”) 区的氨基酸残基形成。抗体可变区含三个称作 “高变区” 或者称作 “互补性决定区” (CDRs) 的高度趋异的序列段, 它们在称为 “构架区” (FRs) 的更保守的侧翼序列段之间插入。在抗体分子中, 轻链的三个高变区(LCDR1、LCDR2 和 LCDR3)和重链的三个高变区(HCDR1、HCDR2 和 HCDR3)在三维空间彼此相对排列以形成抗原结合表面或者袋。因此, 抗体结合位点表示组成抗体的 CDRs 的氨基酸和组成结合位点袋的任何构架残基。

采用本领域熟知的方法, 可测定在组成结合位点的具体抗体中氨基酸残基的同一性。例如, 抗体 CDRs 可被鉴定为最初由 Kabat 等 (参见, “免疫学问题的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”, E. Kabat 等, U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G and Wu, TT(2001), Kabat 数据库及其应用: 未来方向(Kabat Database and its applications: future directions). Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>)限定的高变区。也可以把 CDRs 的位置鉴定为最初由 Chothia 和其它人描述的结构环状(loop)结构(参见 Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901(1987), Chothia 等, Nature 342, 877(1989), 和 Tramontano 等, J. Mol. Biol. 215, 175 (1990))。其它的方法包括 “AbM 定义”, 该方法为 Kabat 和 Chothia 之间的折衷办法并且采用 Oxford Molecular’s AbM 抗体建模软件(now Accelrys)或者由 Macallum 等 (“抗体抗原相互作用: 接触分析和结合位点拓扑学(Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography)”, J Mol Biol. 1996 Oct 11; 262(5): 732-45)描述的衍化。以下图表基于多种已知的定义鉴定 CDRs。

| Loop | Kabat | AbM | Chothia | 接触 |
|---------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| L1 | L24 -- L34 | L24 -- L34 | L24 -- L34 | L30 -- L36 |
| L2 | L50 -- L56 | L50 -- L56 | L50 -- L56 | L46 -- L55 |
| L3 | L89 -- L97 | L89 -- L97 | L89 -- L97 | L89 -- L96 |
| H1 | H31 -- H35B | H26 -- H35B | H26 -- H32..34 | H30 -- H35B |
| (Kabat 编号) | | | | |
| H1 | H31 -- H35 | H26 -- H35 | H26 -- H32 | H30 -- H35 |
| (Chothia 编号) | | | | |
| H2 | H50 -- H65 | H50 -- H58 | H52 -- H56 | H47 -- H58 |
| H3 | H95 -- H102 | H95 -- H102 | H95 -- H102 | H93 -- H101 |

一般指南如下，借此人们可以鉴定仅来自序列的抗体中的 CDRs:

LCDR1:

起始-约残基 24。

5 之前的残基总是 Cys。

之后的残基总是 Trp。通常 TRP 之后跟随 TYR-GLN，但是也可以后接 LEU-GLN、PHE-GLN，或者 TYR-LEU。

长度为 10-17 个残基。

10 LCDR2:

起始-L1 末端之后 16 个残基。

之前的序列一般为 ILE-TYR，但是也可以为 VAL-TYR、ILE-LYS，或者 ILE-PHE。

长度一般为 7 个残基。

15

LCDR3:

起始为 L2 末端之后 33 个残基。

之前的残基为 Cys。

之后的序列为 PHE-GLY-X-GLY。

20

长度一般为 7-11 个残基。

HCDR1:

起始-在约残基 26 (CYS 之后 4 个残基) [Chothia/AbM 定义]

随后 Kabat 定义起始 5 个残基。

5 之前的序列为 CYS-X-X-X。

之后的残基为 TRP，一般之后为 VAL，但之后也可以为 ILE 或者 ALA。

长度为在 AbM 定义下的 10-12 个残基，而 Chothia 定义排除最后 4 个残基。

10

HCDR2:

起始-以 CDR-H1 的 Kabat/AbM 定义的末端之后的 15 个残基。

之前的序列一般为 LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO: 1)但许多变异是可能的。

15 之后的序列为 LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA。

长度为在 Kabat 定义下的 16-19 个残基(较早时候 AbM 定义末端 7 个残基)。

20

HCDR3:

起始-CDR-H2 末端之后的 33 个残基(CYS 后的两个残基)。

之前的序列为 CYS-X-X (一般为 CYS-ALA-ARG)。

之后的序列为 TRP-GLY-X-GLY。

长度为 3-25 个残基。

25

采用本领域熟知的方法例如分子搭模(modeling)和 X-射线结晶图形学，可以测定具体抗体中的氨基酸残基的同一性，这些残基在 CDRs 外部，尽管如此，却通过具有为结合位点的衬部分的侧链组成结合位点的部分(即，可获得通过结合位点的连接)。参见例如 Riechmann

等, (1988) *Nature*, 332: 323-327。醛缩酶抗体小鼠 mAb 38C2(其具有接近但处于 HCDR3 外部的活性赖氨酸)为这样抗体的实例。

例如, 当残基由存在于首先被鉴定以制备抗体的淋巴细胞中的核苷酸编码时, 抗体结合位点的反应性残基与抗体可以为天然相关的。或者, 通过故意突变可以产生氨基酸残基, 以编码特定的残基(参见例如 Meares 等的 WO 01/22922)。在另一种方法中, 氨基酸残基或者其活性元素(例如亲核氨基或者巯基)可以连接在抗体结合位点中的氨基酸残基。因此, 在此使用的“通过在抗体结合位点中的氨基酸残基”出现的与抗体的共价连接意指可以直接对抗体结合位点的氨基酸残基进行连接或者通过连接抗体结合位点的氨基酸残基的侧链的化学部分进行连接。

如讨论的那样, 能够用于制备本发明的抗体靶向化合物的抗体需要抗体结合位点中的活性侧链。活性侧链可以存在或者通过在任

何抗体中突变定位。催化抗体为这样抗体的优选来源。这样的抗体包括醛缩酶抗体、 β -内酰胺酶抗体、酯酶抗体、酰胺酶抗体等。

在抗体结合位点的活性赖氨酸可以共价连接于与靶向制剂或者接头-靶向制剂相关的酮、二酮、 β -内酰胺、活性酯卤代酮、内酯、酸酐、马来酰亚胺、环氧化物、醛、脒、胍、亚胺、烯胺、磷酸酯、磷酸酯、环氧化物、氮丙啶、硫代环氧化物、掩蔽或者保护的二酮(例如缩酮)、内酰胺、卤代酮、醛等。示例性的和优选的这样的抗体为醛缩酶抗体例如小鼠单克隆抗体 mAb 38C2 及其它类催化抗体以及这样抗体的合适的人源化和嵌合形式。小鼠 mAb 38C2 为由反应性免疫作用和机械模拟天然醛缩酶的一类新的催化抗体的原型(Barbas 等, *Science* 278, 2085-2092, 1997)。采用天然醛缩酶的烯胺机制, 通过活性赖氨酸, 这些抗体催化羟醛和逆羟醛反应(Wagner 等, *Science* 270, 1797-1800, 1995; Barbas 等, *Science* 278, 2085-2092, 1997; Zhong 等, *Angew. Chem. Int.* 第 38 版, 3738-3741, 1999; Karlstrom 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 973878-3883, 2000)。除它们在合成有机化学(例如

Hoffmann 等, 1998, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 2768-2779; Sinha 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14603-14608, 1998)中的多用性和效力以外, 醛缩酶抗体已用于作为抗癌策略在体外和体内激活喜树碱、多柔比星和依托泊昔前药(Shabat 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6925-6930, 1999 和 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7528-7533, 2001)。

在另一个实例中, 抗体结合位点的活性氨基酸可以为活性半胱氨酸、丝氨酸或者酪氨酸残基。例如, 得到的抗体可以与含马来酰亚胺的成分或者其它的硫醇-反应基团例如碘代乙酰胺、芳基卤化物、二巯基化物等形成共价键。如由 Janda 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91, 2532-2536, (1994)描述的, 可以在硫代酯酶催化抗体中发现活性半胱氨酸。对其它的酯酶抗体参见 Wirsching 等, *Science* 270:1775-82 (1995)。通过本领域熟知的方法, 包括使抗体结合位点残基突变以对活性氨基酸编码或者使带有含反应基团的接头的抗体结合位点中的氨基酸侧链化学衍化, 可以制备含活性氨基酸的抗体。

通过常规免疫作用、体内活性免疫作用, 或者通过体外活性选择, 例如用噬菌体展示(display), 可以得到适合在此使用的抗体。在人或者在其它的动物种类中可以产生抗体。可以修饰得自动物种类之一的抗体以反映另一种类的动物。例如, 人嵌合抗体为那些其中抗体的至少一个区来自人免疫球蛋白的抗体。一般应理解人嵌合抗体具有得自带有得自人的恒定区的非-人动物例如啮齿动物的可变区。与之相反, 人源化抗体采用得自带有大多数或者所有可变构架区和所有的得自人免疫球蛋白的恒定区的非-人抗体的 CDRs。通过本领域熟知的方法, 包括 CDR 移植方法(参见例如美国专利第 5843708、6180370、5693762、5585089、5530101 号)、链改组策略(参见例如美国专利第 5565332 号, Rader 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:8910-8915)、分子模建策略(美国专利第 5639641 号)等, 可以制备嵌合和人源化抗体。

不像抗体的常规化学衍生化那样, 衍生自活性免疫法的那些抗

体可在它们的结合位点于特定位置被特异性标记，便于快速和可控制备同源产物。另外，不像抗体的化学衍生化那样，那些衍生自采用 1,3-二酮的活性免疫法的化学衍生化是可逆的。由于这种可逆性，通过与共价结合半抗原 JW (Wagner 等, 1995, Science 270, 1797-800) 或者相关化合物竞争，可自抗体释放结合于 mAb 38C2 的靶向化合物的二酮衍生物。这使之可在不良反应情况下体内迅速中和缀合物。或者，例如与醛缩酶抗体和靶向化合物的 β -内酰胺衍生物的非可逆共价结合是可能的。不像常规抗-半抗原抗体那样，共价二酮结合抗体具有优点，即二酮与抗体之间形成的共价键对 pH 大的变化是稳定的，极限最低是 pH 3 或者最高为 pH 11。这样的 pH 变迁不会自抗体释放靶向化合物。这对肿瘤靶向是有利的，因为与正常组织相比较，肿瘤一般呈现减少的 pH。使共价连接于它们的靶向制剂的共价结合抗体的增加的稳定性应在制剂、传递和长期贮存方面提供另外的有利条件。

采用本领域熟知的技术，可制备本发明的靶向化合物。一般地，合成也是功能成分(生物制剂)的靶向制剂为第一个步骤。然后将靶向制剂(在这个情况下也为功能成分)衍生化用于连接成分(接头)的键合，然后其与抗体接合。本领域技术人员应该容易地意识到所采用的具体合成步骤应依三种成分的精确性质而定。

借助实例，作为第一个步骤，如在流程 1 (图 10) 和 2 (图 11) 中所示，分别制备作为化合物 15 和 4 所示的靶向制剂-接头化合物，作为如在以上化合物 1 和 2 中所示的整联蛋白靶向制剂的衍生化形式。通过加入接头(连接成分)的部分，将化合物 15 和 4 衍生化 (相对于化合物 1 和 2)。流程 3 (图 12) 显示另外的合成步骤，通过这些步骤具有二酮反应部分的完全接头被加入到衍生化的靶向制剂化合物 15，以得到靶向化合物 SCS-873 和 SCS-1655。

如在图 10 (流程 1) 和图 11 (流程 2) 中所示，分别合成如化合物 15 和 4 所示的整联蛋白靶向成分。如在流程 3 (图 12) 中所示，带有二酮

反应性部分的接头被引入到这些靶分子中，以形成靶向化合物-接头分子 SCS-873 和 SCS-1655。自化合物 14 开始以三个步骤实现 SCS-873 的合成。如在流程 1 中所示，在 Et₃N 存在下，在 CH₃CN-DMF 中将化合物 14 转变为化合物 15 并使粗产物与二酮化合物 23 的 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)-酯反应。经硅胶(CH₂Cl₂-MeOH, 9:1)纯化得到纯的 SCS-873。

以五个步骤(流程 2 和 3)自 14 合成化合物 SCS-1655。使化合物 14 中的 BOC 基团的脱保护，随后与二价接头 24 的 NHS 酯反应，得到化合物 25，然后使后者脱保护且如上与 23 反应，得到 SCS-1655。

整联蛋白靶向成分-接头分子 SCS-864 和 SCS-789 的合成示于流程 4 (图 13)中。以一个步骤自化合物 4 (图 13, 流程 4)分别合成 SCS-864 和 SCS-789。用合适的活化 NHS-酯可实现化合物 4 的连接。

能够用 0.5 当量的醛缩酶抗体例如 mAb 38C2 温育靶向制剂-接头化合物，例如其中接头包括二酮反应性部分的 SCS-864、SCS-873 和 SCS-1655，以产生抗体靶向化合物。下面陈述另外的实例。

也提供共价结合于抗体结合位点的靶向制剂-接头化合物。当靶向制剂通过接头连接于抗体时，接头具有足够的长度以使靶向制剂结合于靶分子。在某些实施方案中，靶向制剂-接头化合物包括对带有式 X-Y-Z 的接头的靶分子具有特异性的一种或者更多种靶向制剂。接头成分 X、Y 和 Z 的组成如上所述。如果两种或者更多种靶向制剂被包含在靶向制剂-接头化合物中，各种靶向制剂可以直接连接于接头或者接头可用连接于不同接头分支的靶向制剂分支。

也提供能够与抗体结合位点非共价结合的靶向制剂-接头化合物。这一化合物能够用于与合适的抗体缀合以形成本发明的靶向化合物。这样的靶向制剂-接头化合物含两种或者更多种通过接头共价连接于由抗体识别的抗原的靶向制剂。当靶向制剂通过接头连接于抗体时，接头可以为线性或者分支的并且应该具有足够的长度以使靶向制剂结合于靶分子。

在某些实施方案中，接头包括 C、H、N、O、P、S、Si、F、Cl、Br 和 I 的任一种或其盐。接头也可以包括基团例如烷基、链烯基、炔基、氧代烷基、氧代链烯基、氧代炔基、氨基烷基、氨基链烯基、氨基炔基、磺基烷基、磺基链烯基或磺基炔基、磷酸烷基、磷酸链烯基、磷酸炔基。接头也可以包括一个或者更多个环结构。以上基团和环的组合也可以存在于本发明靶向化合物的接头中。在某些实施方案中，接头具有 2-200 个原子的线性序列段，尽管在其它的实施方案中，可使用更长的接头长度。一种或者更多种靶向制剂可连接于接头，并且如果使用分支接头，靶向制剂中的某些可以连接于接头的不同分支。

在某些实施方案中，靶向制剂-接头化合物的靶向制剂为生物学活性的而在其它的实施方案中，靶向制剂-接头化合物另外包括分开的生物制剂，后者优选共价连接于靶向制剂。在某些实施方案中，采用用于使靶向制剂连接于接头的基本相同方法或者采用本领域熟知的其它的方法，生物制剂可以连接于靶向制剂或者连接于接头。

接头的抗原可为任何抗原，后者能够由可以得到的抗体结合。抗原为本领域熟知的并且包括有机化合物、药物、生物分子例如蛋白质、肽、肽模拟物、糖蛋白、蛋白聚糖、类脂、糖脂、核酸、碳水化合物等以及这些分子的组合。

本发明也包括修饰抗体结合位点以对特定的靶分子产生结合特异性的方法。这样的方法包括使抗体结合位点中的活性氨基酸侧链与其中靶向制剂对靶分子具特异性的靶向制剂-接头化合物的接头上的化学部分共价结合。接头的化学部分与靶向制剂距离足够远以致于当靶向制剂-接头化合物共价结合于抗体结合位点时，靶向制剂可结合于靶分子。一般地，应不考虑抗体对靶分子的特异性。在一个优选实施方案中，共价结合之前的抗体对小于约 1×10^{-5} 摩尔/升的靶分子将具有亲和性。然而，抗体共价结合于靶向制剂-接头化合物之后，修饰的抗体对靶分子优选具有至少约 1×10^{-6} 摩尔/升，更优选为

至少约 1×10^{-7} 摩尔/升，甚至更优选为至少 1×10^{-8} 摩尔/升，也甚至更优选为至少 1×10^{-9} 摩尔/升，最优选至少约 1×10^{-10} 摩尔/升的亲中性。

5 本发明也包括改变靶向制剂、生物制剂或者接头的至少一种物理或者生物学特性的方法。方法包括如上描述的使靶向制剂或者生物制剂共价连接于抗体结合位点。在某些实施方案中，靶向制剂或者生物制剂通过接头连接于抗体结合位点，其特性如上描述。该方法特别用于连接 5 Kd 或者更小的小靶向或者生物制剂。然而，该方法也用于更大的这样的分子。靶向制剂或者生物制剂的性质可包括
10 结合亲合力、降解易敏性(例如经蛋白酶)、药动学、药效学、免疫原性、溶解度、亲脂性、亲水性、疏水性、稳定性(更大或者更小的稳定性以及按计划的降解)、刚性、柔性、抗体结合的调节等。

如在此使用的，药动学指一段时间内所给予的化合物在血清中的浓度。药效学指一段时间内所给予的化合物在靶和非靶组织中的
15 浓度和在靶组织(效力)和非-靶组织(毒性)中的效应。例如，在药动学或者药效学中的改善可被设计用于具体的靶向制剂或者生物制剂，例如采用不稳定键或者通过修饰任何接头的化学性质(使溶解性、载荷量等变化)。

可以修饰本发明的抗体靶向化合物的生物学特性以得到改善的
20 药学特性或者其他特性。这可以通过改变靶向制剂或者生物制剂、接头或者抗体的一种或者更多种化学性质来实现。一个优选的方法是化学修饰接头的一种或者更多种化学性质。通过改变包含接头的化合物的化学性质，技术人员能够得到改善的特征，例如在药动学、药效学、溶解性、免疫原性等方面的改善。

25 本发明的靶向化合物具有许多种用途。例如，靶向化合物的抗体部分一般可以延长更小体积的靶向制剂的体内半衰期。通过增加由靶向化合物的抗体部分提供的效应物功能(例如补体介导的效应物功能)，可以增加特定靶向制剂的生物学效价。另外，靶向制剂，通

过连接于抗体提供的其增加的体积，可以使靶向制剂在它的其它方面不能这样做的情况下作为竞争性抑制剂起作用。因此，一方面，本发明提供增加靶向制剂有效的循环半衰期的方法。方法包括采用以上阐述的连接基团使靶向制剂连接于抗体。另一方面，本发明提供使抗体重新定向(redirecting)于特异性靶的方法。方法包括通过以

5 上陈述的接头使抗体连接于靶向制剂。

本发明也提供治疗或者预防个体内疾病或病症的方法，其中所述疾病或病症包括表达靶分子的细胞、组织或者流体。方法包括给予受治疗者例如患者治疗有效量的本发明靶向化合物。受治疗者可以

10 是动物例如哺乳动物。在某些实施方案中，受治疗者为人。化合物可包括生物制剂，它与靶向制剂相同或者不同并且可以采用在此描述的任何形式或者活性。在某些优选实施方案中，靶分子为整联蛋白且疾病为癌症。整联蛋白表达在癌症中的关系是本领域熟知的(参见例如美国专利第 5753230 和 5766591 号，此公开通过引用结合到

15 本文中)。对在人体内的治疗用途，人、人源化或者人嵌合抗体优选作为靶向化合物的抗体成分。如果要求激动剂活性，带有人 IgG4 恒定区的抗体也是优选的。

除治疗应用外，本发明的抗体靶向化合物也可以用于如在本领域中熟知的细胞例如肿瘤细胞或者组织(例如胞外基质生物分子)成

20 像。因此，提供在个体体内使细胞或者组织(例如细胞外基质生物分子)成像的方法。在这样的方法中，细胞或者组织表达靶分子。方法包括给予患者本发明的连接于可检测的标记物的抗体靶向化合物。用于这样方法的

可检测的标记物可为放射性同位素或者可以为非-放射性同位素，例如可用于核磁共振(NMR)成像。在后者情况下，技术人员可以使抗体靶向制剂连接于螯合物，例如基本如 Simkins 等, Nat. Med., 4(5): 623-6 (1998)中描述的必须的顺磁金属钆的二亚乙基三胺五乙酸盐(DTPA)。

25

对 SCS-873 和 38C2 的混合物结合于人卡波西肉瘤 SLK 细胞进

行了研究。SCS-873 有效介导 38C2 的细胞表面结合。在 SCS-873 不存在下，未检测到 38C2 的结合。对照实验证实 1,3-二酮部分是 SCS-873 结合 38C2 所需要的。在分别独立 i.p.和 i.v.注射之后，SCS-873 和 38C2 体内形成整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 靶向缀合物。在这些实验中，通过结合于 38C2, SCS-873 的循环半衰期被延长两个数量级以上。SCS-873 和 38C2 的组合有效抑制人卡波西肉瘤的小鼠模型中的肿瘤生长，而 SCS-873 或者 38C2 单独是效果较少的或者完全无效。

本发明也提供使生物学活性靶向细胞、组织(例如细胞外基质生物分子)或者患者流体中的生物分子的方法。方法包括给予患者靶向化合物，后者包括对细胞、组织细胞外基质生物分子或者流体生物分子具有特异性的靶向制剂。靶向制剂共价连接于抗体结合位点的氨基酸残基。在某些实施方案中，接头用于使靶向制剂连接于抗体。靶向制剂可不为抗体。在某些实施方案中，化合物具有生物学活性，而在其它的实施方案中，不为靶向制剂的生物学活性分子作为化合物的成分被包括在内。或者，靶向化合物的成分部分可以分开给予，然后体内形成共价化合物。在这样一种方法中，靶向制剂可以包括接头/反应部分或者抗体结合位点可以被适当修饰，以共价结合于靶向制剂。

本发明的整联蛋白靶向化合物可作为药剂或药物给予，所述药剂或药物包括用药学上可接受的载体配制的本发明的靶向化合物。因此，化合物可以用于药物或药用组合物的制备。本发明的药用组合物可以配制为非肠道给药的溶液或者冻干粉末。通过加入合适的稀释剂或者其它的药学上可接受的载体，可以临用前将粉末重新构成。液体制剂可以为缓冲溶液、等渗水溶液。粉剂也可以以干燥形式喷雾。合适的稀释剂的实例为正常的等渗盐水，标准的 5%葡萄糖水溶液或者缓冲的乙酸钠或乙酸铵溶液。这样的制剂特别适用于非肠道给药，但也可用于口服给药或者包含在用于吹入或吸入的计量吸入器或者喷雾器中。它可以需要加入赋形剂例如聚乙烯吡咯烷酮、

明胶、羟基纤维素、阿拉伯胶、聚乙二醇、甘露糖醇、氯化钠或者枸橼酸钠。

或者，整联蛋白靶向化合物可以被装胶囊、压片或者制备成乳剂或者糖浆剂，以用于口服给药。可以加入药学上可接受的固体或者液体载体以增强或者稳定组合物，或者便于于组合物的制备。固体载体包括淀粉、乳糖、硫酸钙二水合物、白土、硬脂酸镁或者硬脂酸、滑石粉、果胶、阿拉伯胶、琼脂或者明胶。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、盐水和水。载体也可以包括缓释材料例如单硬脂酸甘油酯或者二硬脂酸甘油酯，单独或与石蜡一起使用。固体载体的量可变化但优选应介于每剂量单位约 20 mg-1 g 之间。按照常规药学技术，包括研磨、混合、制粒和压制，可制备药用制剂，必要时，用于片剂形式、或者研磨、混合和填充硬明胶胶囊形式。当使用液体载体时，制剂应为糖浆、酏剂、乳剂或者含水或非水混悬剂的形式。对直肠给药，本发明化合物可以与赋形剂例如可可脂、甘油、明胶或者聚乙二醇组合并模压成栓剂。

本发明的化合物可以被配制包括其它的医学上有用的药物或者生物制剂。化合物也可以与用于本发明化合物涉及的疾病或病症的其它药物或者生物制剂联合给予。

如在此使用的术语“有效量”指足以提供高的足以在其接受者中产生有益作用的浓度的剂量。对任何具体的患者，具体的治疗有效剂量水平应依各种因素而定，包括受治疗的疾病、疾病的严重性、具体化合物的活性、给药途径、化合物的清除率、治疗持续时间、用于与化合物联合或者共同给予的药物、患者的年龄、体重、性别、饮食和一般健康状况和在医学领域和科学领域中熟知的因素。重视各种通常的考虑以确定“治疗有效量”是本领域技术人员已知的并在例如 Gilman 等, Goodman 和 Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第 8 版, Pergamon Press, 1990; 和 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版, Mack Publishing 公司, Easton, Pa.,

1990 中被描述。剂量水平一般处于约 0.001 至最多可达 100 mg/kg/天范围内；通常使用约 0.05 至最多可达 10 mg/kg/天范围内的水平。化合物可以经非肠道例如血管内、静脉、动脉内、肌内、皮下等给予。也可以经口、鼻、直肠、经皮或者通过气溶胶吸入给药。组合物可以
5 可以作为大剂量或者缓慢输入给予。

将抗体-靶向制剂缀合物给予具有免疫能力的个体可以导致抑制缀合物的抗体的产生。这样的抗体可以涉及抗体本身，例如包括抗体基因型可变区以及涉及靶向制剂或者用于使靶向制剂与抗体缀合的任何接头。通过本领域熟知的方法，例如通过基于长链聚乙二醇
10 (PEG)的间隔区段等连接于抗体-靶向制剂，可以寻求减少抗体-靶向制剂缀合物的免疫原性。已知长链 PEG 和其它的聚合物具有其掩蔽外源性抗原决定部位的能力，导致显示外源性抗原决定部位的治疗蛋白的免疫原性减少(Katre 等, 1990, *J. Immunol.* 144, 209-213; Francis 等, 1998, *Int. J. Hematol.* 68, 1-18)。值得注意的是，PEG 也可作为接头，
15 因此在本发明的靶向化合物中提供接头功能并减少免疫原性的两种作用。作为选择，或者另外，已给予抗体-靶向制剂缀合物的个体可被给予免疫抑制剂例如环孢素 A、抗-CD3 抗体等。

另外提供筛选用于受体激动剂或者拮抗剂的化学文库的方法。方法包括使化学文库的各成员连接于抗体结合位点并然后测试抗体
20 连接的文库对受体的结合作用或者受体与受体的配体之间的结合的抑制作用。通过这一方法，本发明的抗体靶向化合物对高通量筛选提供新的方式以鉴定候选者小分子化学物质，例如药物肽模拟物、有机化合物等，它们例如作为拮抗剂或者激动剂起作用。相对小体积的有用的候选者化学分子一般需要间接筛选例如置换或者竞争方
25 式。如在此提供的，通过使在文库中的各药物连接于抗体结合位点，技术人员能够建立在抗体方式上的化学文库。

通过合成带有合适的含特殊的接头部分的接头的化学候选者，可以制备抗体结合位点-标记的文库，所述特殊的接头部分被设计为

与特定的抗体共价相互作用。这样的接头可以包括用于与在结合位点包括活性赖氨酸的醛缩酶抗体缀合的二酮部分。本领域技术人员应易于理解，在此描述的其它的接头和接头部分(例如生物素)明显可用于这一目的。

- 5 例如，在受体测定或者细胞生物测定中，其中通过检测连接的抗体可以监测文库中每一化合物的结合，可采用如此制备的抗体结合位点-标记的化学文库。通过本领域熟知的抗体检测方法，可以实现每一化合物的抗体部分的检测。例如，抗体可以连接于检测部分例如酶、荧光团、放射性同位素等。也可以采用间接系统例如生物素-链霉抗生物素。能够在细胞或者不纯的抗原例如病毒溶胞产物以及在纯化的抗原上筛选这些文库。例如，采用如在蛋白凝胶上进行的溶胞产物作为靶，集中分析具体的凝胶谱带，可以测试文库结合或者抑制结合的作用。在受体在细胞上表达的情况下，通过检测所述结合或者抑制结合的下游的细胞信号事件发生(或者如在抑制事件下不发生)，可测定结合或者结合的抑制作用。辅以本领域熟知的报道基因可检测下游的细胞信号(参见美国专利第 5618720 和 5670113 号)。

20 筛选抗体标记的化学文库可以容易地适用于高通量设备。筛选可以在体外或者体内进行。另外，生物展示文库例如肽噬菌体文库可以用来制备抗体结合位点-标记的文库。在这样的情况下，连接于接头部分(例如二酮)的位点可为文库对生物载体的融合点。

也提供测定样品中分析物的量的免疫测定方法。这样的方法包括：

- 25 (a) 在含样品的培养基中，在分析物与至少一种对分析物具有特异性的抗体之间形成复合物；
 (b) 分析培养基以检测复合物的量；和
 (c) 使复合物的量与样品中分析物的量相关。

这样的方法也可以包括与至少一种对分析物具有特异性的抗体

形成复合物。通过对共价连接于抗体结合位点的活性氨基酸的分析物具有特异性的非-抗体靶向制剂提供抗体的特异性。因此，本发明的抗体靶向化合物可用于检测和测量样品中分析物的量的免疫测定，如先前用常规制备的多克隆或者单克隆抗体所进行的。这样的测定是本领域熟知的并包括 RIA、EIA、Western、ELISA 等。测定类型可以为竞争性或者非-竞争性的并且可以为直接的或者间接的。抗体靶向化合物能够用于液相和/或能够结合于固相载体。载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、天然和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖、磁铁矿物质等。载体的性质可以是溶解的或者不溶解的。抗体靶向化合物可以以本领域熟知的各种方式中的任一种进行可检测性标记。美国专利第 4659678、4780423 和 4298685 号为这样测定的示例。

按照常规术语，通过在含样品的培养基中形成分析物与至少一种对分析物具有特异性的抗体之间的复合物，可测定样品中分析物的量。然后分析培养基以测定所形成的复合物的量。最后，使形成的复合物的量与样品中分析物的量相关。如已经描述的，这一通法可采用许多形式，例如直接和间接的、均匀的或者不均匀的，以及竞争性和非竞争性的。在所有情况下，本发明的抗体靶向化合物可以用于替代由常规制备的抗体提供的功能。

也提供直接或者间接结合测定，其中采用对分析物特异性的抗体测定分析物的存在。在这样的方法中，采用对分析物特异性的抗体测定分析物的存在。抗体特异性由对分析物特异性的非-抗体靶向制剂引起，且靶向制剂共价连接于在抗体结合位点的活性氨基酸。因此，本发明的抗体靶向化合物能够用于替代常规制备的抗体的定量测定。

显而易见，本发明的化合物不仅在人体医学治疗和诊断中而且在兽医学、农业、环境和其它的学科中发现应用。

也提供抑制或者减少靶向制剂或者生物制剂穿透细胞膜的能力

的方法。在这些方法中，通过使其本身不穿透细胞膜的抗体结合位点共价连接于靶向制剂或者生物制剂，形成抗体靶向化合物，其中所述抗体连接于所述靶向制剂或者生物制剂减少或者抑制药剂穿透细胞膜的能力。未导向细胞表面内在化受体的抗体为不穿透细胞膜的抗体的优选来源。

5 另外提供介导细胞内活性药物的细胞内传递的方法。在这些方法中，制备抗体靶向化合物，其中所述化合物包含通过接头共价连接抗体结合位点的一种或者更多种靶向制剂或者一种或者更多种生物制剂或者两者。靶向制剂或者生物制剂其特征在于它们结合于细胞受体并且介导药物的内在化。抗体靶向化合物也包含细胞内具有活性的药物。当表达受体的细胞接触抗体靶向化合物时，细胞内药物传递发生。接触导致抗体靶向制剂的内在化和所述药物细胞内的传递。

10 这个方法用途有利于受体介导的胞吞作用(即受体介导的内在化)以在细胞内传递抗体靶向化合物。介导结合配体内在化的细胞表面受体为本领域所熟知并且包括例如整联蛋白、HER2、EGF受体、叶酸受体等。内在化试验易于得到并且能够采用荧光检测方法评价。

20 在某些实施方案中，当所述药物接触细胞内室时，细胞内活性药物为变得有活性的前药。抗体靶向化合物可以包括以使内在化抗体靶向化合物导向特定细胞内室的细胞内运输信号。许多蛋白含一种或者更多种用作运输信号或者使蛋白靶向于正确的细胞内位点的靶向序列。目标上的受体也可以参与运输过程。

25 使蛋白和其它的化合物导向不同的细胞内位点例如内质网、核内体、高尔基体或者细胞核等的序列为本领域所熟知。例如，内质网运输信号包括KDEL或者KKXX序列、高尔基体运输信号包括GRIP结构域(参见Munro等, Curr Biol 9:377-379, 1999), 溶酶体运输信号(得自高尔基体)包括甘露糖-6-磷酸修饰的寡糖，以及核定位运输信号，后者包括一种或者两种短的正电荷序列，例如赖氨酸或者精氨酸富

集(参见 Penco 等, *Biotech Appl Biochem* 34:151-159 2001)。

通过以下阐述本发明优选实施方案的实施例阐述本发明的多用性, 但不以任何方式限制权利要求或者说明书。

5 实施例 1: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的 RGD 肽模拟物靶向制剂的抗体靶向化合物

基于 RGD 肽模拟物的二酮接头衍生物与小鼠 mAb 38C2 的活性赖氨酸之间的可逆共价键的形成, 可形成整联蛋白靶向化合物。小鼠 mAb 38C2 为由反应性免疫作用和机械模拟天然醛缩酶产生的一类新的催化抗体的原型(Barbas 等, *Science* 278, 2085-2092, 1997)。采用天然醛缩酶的烯胺机制, 通过活性赖氨酸, 这些抗体催化醛醇和逆醛醇(retro-aldol)反应(Wagner 等, *Science* 270, 1797-1800, 1995; Barbas 等, *Science* 278, 2085-2092, 1997; Zhong 等, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 3738-3741, 1999)。除它们在合成有机化学中的多用性和有效性以外, 10 醛缩酶抗体作为抗癌策略已被用于喜树碱、多柔比星和依托泊昔前药体内外的活化(Shabat 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6925-6930, 1999; Shabat 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7528-7533, 2001)。这些抗体的另外的特征, 即它们共价结合二酮的能力在很大程度上仍未进行探索。

20 所采用的 RGD 肽模拟物(参见化合物 1)对人整联蛋白具有特异性, 在 0.9 nM 下对 $\alpha_v\beta_3$ 和在 0.6 nM 下对 $\alpha_v\beta_5$ 具有高的结合亲合性(特异性通过最小 $\alpha_{\text{ITB}}\beta_3$ 结合呈现)(Miller 等, 同上)。如上所述制备化合物 1 的二酮接头修饰的形式, 命名为 SCS-873。

25 对 $\alpha_v\beta_3$ 或者 $\alpha_v\beta_5$ 结合具有已知活性的肽模拟物 RGD 拮抗剂是合乎需要的, 因为这些化合物当中的某些化合物结合小鼠和人整联蛋白。这样种类的交叉反应性提供人体试验前的动物血管形成模型的临床前体内研究。另外, 靶向化合物可以用于治疗卡波齐氏肉瘤, 后者与 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白有关。

通过以下方法，将 SCS-873 连接于抗体 38C2：将在磷酸缓冲盐水(10 mg/ml)中的 1 毫升抗体 38C2 加入到 12 微升的 SCS-873 的 10 mg/mL 储备液中并在临用前于室温下把生成的混合物维持温度 2 小时。

- 5 评价 SCS-873 和 38C2 的混合物与 SLK 细胞的结合。SCS-873 有效介导 38C2 的细胞表面结合。在 SCS-873 不存在下，可检测到 38C2 的不结合。对照组实验证实需要接头的二酮部分使 SCS-873 与 38C2 结合。已测定 SCS-873 可保留整联蛋白靶向成分的整联蛋白特异性，即未检测到在 ELISA 上结合 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ，而对 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_3$ 的结合是强烈的。用 SCS-873 和 38C2 制备的靶向化合物的独立的腹膜内和静脉注射相对于每一成分单独注射进入小鼠体内证实了体内整联蛋白的靶向性。在这些实验中，通过结合 38C2，SCS-873 的血清半衰期延长 2 个数量级以上。未结合于抗体的游离 SCS-873 仅有数分钟的血清半衰期，而几天后还可从来自眼血中的血清样品中检测出抗体和
- 10 小分子的结合。

15 **实施例 2：含共价连接于醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的作为靶向制剂的 IL-4 的抗体靶向化合物**

- 在其它的人内皮肿瘤细胞中，卡波西肉瘤肿瘤细胞表达白介素-4 (IL-4)受体，后者用由 IL-4 组成的重组嵌合蛋白和称为假单胞杆菌属内毒素的细菌毒素的截短形式可被靶向靶子(Husain 等, 1999, Nat. Med. 5, 817-822)。基于这些研究，制备用于使 mAb 38C2 靶向卡波西肉瘤肿瘤细胞的 IL-4 靶向化合物。采用赖氨酸活性部分例如 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)，把带有二酮反应基团的接头缀合于 IL-2 的赖氨酸侧链上。或者，带有加入的游离半胱氨酸的重组 IL-4 被用来缀合于
- 20 半胱氨酸活性部分例如马来酰亚胺。为减少与靶向化合物的接头部分有关的免疫原性，一端的二酮反应基团与另一端的 NHS 或者马来酰亚胺基团之间的间隔区(即接头连接链)为聚乙二醇(PEG)链。已知
- 25 长链 PEG 和其它的聚合物，它们具有掩蔽外源性抗原决定部位的能

力，导致显示外源性抗原决定部位作用的治疗蛋白的免疫原性减少 (Katre 等, 1990, *J. Immunol.* **144**, 209-213; Francis 等, 1998, *Int. J. Hematol.* **68**, 1-18)。为避免交联抗体的清除，不多于 1-2 个二酮应缀合于 IL-4 (Rehlaender 和 Cho, 1998, *Pharm. Res.* **15**, 1652-1656)。其它的白介素例如 IL-2 可用于替代 IL-4 作为靶向制剂。当 IL-4 能够主要用作靶向调节时，由于通过它连接于抗体得到的白介素的延长的血清半衰期，可由 IL-2 受体产生引起增强其药理作用(Lussow 等, 1996, *Transplantation* **62**, 1703-1708)。

实施例 3: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的作为靶向制剂的 VEGF-R2 结合肽的抗体靶向化合物

血管内皮生长因子(VEGF)为肿瘤血管形成的关键调节子。通过低氧诱导，经肿瘤中的 VEGF mRNA 转录诱导 VEGF 表达的正调节。通过肿瘤产生和释放后，VEGF 弥散至靠近预先存在的血管的内皮细胞，其显示 VEGF (VEGFR)受体。VEGF 结合两个酪氨酸激酶受体，VEGFR-1 和 VEGFR-2，它们主要表达在内皮细胞上。内皮细胞的激活与 VEGF 结合于 VEGFR-2 有关，而 VEGFR-1 可能作为调节 VEGF 局部浓度的虚拟目标(decoy)受体起作用(Neufeld 等, 1999, *FASEB J.* **13**, 9-22)。激活后，内皮细胞增殖，直接向肿瘤迁移，最后缠绕并相互连接形成新的血管。干扰 VEGF 和 VEGFR-2 相互作用的抗-血管形成药是癌症治疗的理想候选者(Klohs 和 Hamby, 1999, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 544-549)。通过肽库的噬菌体展示，Binetruy-Tournaire 等(2000, *EMBO J.* **19**, 1525-1533)鉴定结合线性肽 ATWLPPR (SEQ ID NO: 2)的 VEGFR-2。ATWLPPR (SEQ ID NO: 2)有效干扰 VEGF 结合 VEGFR-2 并抑制 VEGF 介导的血管形成。

通过合成在氨基或者羧基末端带有另外的 Cys 残基的肽，制备含 VEGFR-2 结合肽的抗体靶向化合物，分别导致带有序列 ATWLPPRC (SEQ ID NO: 3)和 CATWLPPR (SEQ ID NO: 4)的肽。这些硫醇修饰的肽与马来酰亚胺/二酮接头反应(图 14)，产生肽-接头-

二酮和二酮基-接头-肽。用 mAb 38C2 温育这些二酮衍生物，导致 VEGFR-2 肽与抗体结合位点之间的共价连接。得到的抗体-VEGFR-2 化合物用于靶向例如在肿瘤血管形成中表达 VEGFR-2 的内皮细胞。化合物延长肽的半衰期并使其配备抗体效应物功能。

5 **实施例 4: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的作为靶向制剂的中和 RNA 适体(aptamer)的抗体靶向化合物**

采用 SELEX(指数富集的配体系统进化技术(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment))的方法，已生成对各种分子靶的 RNA 和 DNA 适体(Jayasena, 1999, *Clin. Chem.* **45**, 1628-1650)。例如,描述了包括约 25 个核苷酸且以 100-pM 范围内的亲和性结合 VEGF 的 2'-氟代嘧啶 RNA 适体(Ruckman 等, 1999, *J. Biol. Chem.* **32**, 20556-20567)。像在先前实例中描述的肽那样，发现所述适体干扰 VEGF 和 VEGFR-2 之间的相互作用。

15 采用市场上可以得到的硫醇-衍生化核苷酸例如 5'-磷酸硫醇酯，制备含 VEGF RNA 适体的抗体靶向化合物。磷酸硫醇酯基团为用硫原子替代氧原子中的一个的修饰磷酸酯基团。RNA 适体中的硫醇-修饰的核苷酸与马来酰亚胺二酮反应(例如图 14)，产生 RNA 适体靶向-二酮接头化合物。或者，采用市场上可以得到的氨基修饰基团，把伯氨基引入 RNA 适体。用 RNA 适体中伯氨基标记的核苷酸与具有 N-羟基琥珀酰亚胺二酮作为反应基团的接头反应。用 mAb 38C2 温育这些二酮衍生物，导致 RNA 适体与抗体结合位点之间的共价连接。得到的抗体-RNA 适体 VEGFR-2 靶向化合物用于靶向例如在肿瘤血管形成中表达 VEGFR-2 的内皮细胞。化合物延长 RNA 适体的半衰期并使其配有抗体效应物功能。

25 **实施例 5: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的作为靶向制剂的叶酸的抗体靶向化合物**

叶酸受体通过胞吞作用介导叶酸的被摄取进入细胞。它在多种上皮肿瘤细胞上过度表达(Leamon 和 Low, 2001, *Drug Discov. Today* **6**,

44-51)。例如,大于90%的卵巢癌表达叶酸受体(Sudimack and Lee, 2000, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **41**, 147-162)。涉及叶酸受体的单克隆抗体,例如 Mov18 和 Mov19, 已作为用于卵巢癌治疗的药物被评价(Coney 等, 1994, *Cancer Res.* **54**, 2448-2455; Molthoff 等, 1997, *Cancer* **80**, 2712-2720)。过度表达叶酸受体的癌细胞的叶酸-介导的靶向为另一个策略(Leamon 和 Low, 2001, *Drug Discov. Today* **6**, 44-51)。例如, 化学治疗剂如美登素类(Ladino 等, 1997, *Int. J. Cancer* **73**, 859-864)缀合于叶酸以用于选择性化学治疗。

使含有用在图 2E 中所示的二酮衍生化的叶酸的靶向制剂-接头化合物连接于 mAb 38C2 并且用于靶向卵巢癌细胞。因为, 除叶酸受体以外, 大多数卵巢肿瘤细胞也表达整联蛋白 $\alpha_v \beta_3$ 和/或 $\alpha_v \beta_5$, 双重靶向化合物可以被用于治疗。用单个二酮基接头一起衍生含叶酸和 RGD 肽模拟物拮抗剂的靶向制剂-接头化合物, 形成在图 4B 中所示的双重靶向化合物。靶向制剂-接头连接于 mAb 38C2 并可用于靶向卵巢癌细胞。

实施例 6: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的作为靶向制剂的前列腺酸磷酸酶或者前列腺特异性抗原抑制剂的抗体靶向化合物

前列腺酸磷酸酶(PAP)和前列腺特异性抗原(PSA), 一种丝氨酸蛋白酶, 在前列腺肿瘤细胞的细胞表面上表达并被用作前列腺癌的标记。长期以来认为涉及 PAP 和 PSA 的 Mabs 是前列腺癌疗法的有前景的药物(Chang 等, 1999, *Curr. Opin. Urol.* **9**, 391-395)。最近, 已报道为 PAP 特异性抑制剂的小合成分子(Beers 等, 1996, *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 1693-1701)和 PSA (Adlington 等, 2001, *J. Med. Chem.* **44**, 1491-1508)。在鉴定特异性小合成分子或者肽靶向制剂后, 对前列腺肿瘤细胞特异的其它的细胞表面酶, 例如最近鉴定的丝氨酸蛋白酶 hepsin (Magee 等, 2001, *Cancer Res.* **61**, 5692-5696), 也可被用作靶。

用二酮接头使含 PAP 和/或 PSA 抑制剂的靶向制剂-接头化合物衍生化, 形成在图 2C 中所示的化合物。靶向制剂-接头连接于 mAb 38C2 并用于靶向前列腺癌。

5 **实施例 7: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的血小板生成素模拟肽或者血小板生成素受体的小分子激动剂的抗体靶向化合物**

10 细胞表面血小板生成素受体(cMpl, TPOR)为造血生长因子受体超家族的一个成员。血小板生成素(TPO), 结合于血小板生成素受体的细胞因子, 在巨核细胞生成和血小板产生中起重要作用。在治疗学上, 重组 TPO 正在临床进行实验, 以用于治疗因化学治疗引起的血小板减少和骨质转移。作为治疗化合物, TPO 具有相对短的体内半衰期和制备及制剂的缺点。

15 可制备 TPO 靶向制剂抗体化合物以治疗因化学治疗引起的血小板减少和骨质转移。用另外的 Cys 残基加至氨基末端以产生 CIEGPTLRQWLAARA (SEQ ID NO: 6), 合成具有序列 IEGPTLRQWLAARA(SEQ ID NO: 5)的 TPO 模拟肽 AF12505, 已报道后者可模拟重组 TPO 的活性(Cwirla 等, 1997, *Science*, 276:1696-9)。然后使这个硫醇标记的肽与马来酰亚胺/二酮接头(图 14)反应, 产生 TPO 肽-接头(二酮)化合物。用 mAb 38C2 温育这个二酮衍生物, 生成抗体-TPO 受体靶向化合物。

20 体外试验用于证实靶向抗体结合活细胞表达 TPOR 的并且刺激以比肽 AF12505 更大程度的巨核细胞克隆形成。其它的 TPO 模拟肽为本领域已知的并且也可用作 TPO 受体靶向制剂。另外, Kimura 等 (*FEBS Lett*, 1998, 428(3):250-4)最近描述的带有 TPO 受体结合的小分子模拟物也可以用于制备 TPOR 靶向化合物。

25 以上方法能够类似地应用于采用具有增加治疗效力的 EPO 靶向模拟物靶向促红细胞生成素(EPO)受体(Middleton 等, *J. Biol. Chem.*,

1999, 274(20):14163-9; Johnson 等, *Nephrol Dial Transplant.*, 2000, 15(9):1274-7)。

实施例 8: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的结合 HIV-1 包膜蛋白的 T-20 肽或小分子的抗体靶向化合物

5 T-20, N-乙酰基 1-

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO: 7), 一种对应于 HIV-1 包膜蛋白的跨膜亚单位区的合成肽, 在小于 2 ng/ml 的浓度下体外阻断细胞融合和病毒进入。当静脉给予时, T-20 (单一疗法), 该肽降低血浆 HIV RNA 水平, 证实在体内可成功
10 阻断病毒进入。与现行批准的抗-逆转录病毒方案相比较, 给予 T-20 提供有效的抑制 HIV 复制的作用(Kilby 等, *Nat. Med.*, 1998, 4(11): 1302-7)。这个肽类药物具有约 2 小时的短的体内半衰期的缺点。

可产生采用 T-20 肽作为靶向制剂的抗体靶向化合物以增加 T-20 的效价、效力和半衰期。用羧基末端的另外的 Cys 残基合成 T-20 肽,
15 得到具有序列 N-乙酰基-

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFC (SEQ ID NO: 8)的修饰的 T-20 肽。这个硫醇标记的肽然后与马来酰亚胺/二酮接头反应(图 14), 产生 T-20-Cys-接头化合物。用 Ab 38C2 温育这个靶向制剂-二酮接头, 导致肽与抗体之间的共价连接。体外试验证实了靶向抗体确证的在抑制 HIV-1 进入和感染中的增加的效力。
20

除靶向 HIV-1 包膜蛋白的肽以外, 结合包膜蛋白的各种小分子已被描述。例如, 桦木酸衍生物 IC9564 为有效的抗-人免疫缺陷病毒(抗-HIV)化合物, 它能抑制 HIV 主要的分离物和实验室所采用的毒菌株。实验证据提示 HIV-1 gp120 在 IC9564 的抗-HIV-1 活性中起重要作用(Holz-Smith 等, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2001, 45 (1): 60-6)。通过增加效价、半衰期和通过直接免疫杀灭基于所选择抗体恒定
25 区的 HIV-1 染病细胞, 制备其中 IC9564 为靶向制剂的抗体靶向化合物, 期待该化合物具有超过 IC9564 本身的增加的活性。类似地, HIV-1

包膜糖蛋白 gp41 核心结构的最新 X-射线晶体衍射图测定可开辟新的途径，以发现对 HIV-1 感染和 AIDS 的化学治疗学的抗病毒药。通过加入二酮臂和共价连接抗体，也可以改善化合物对接进入 gp41 核心的疏水腔的最佳拟似和与靶点最大可能的相互作用。几个这种类型的化合物已被鉴定(Debnath 等, *J. Med. Chem.*, 1999, 42(17):3203-9)。

实施例 9: 通过抗体的转基因表达和给予靶向制剂-接头衍生物的抗体靶向化合物的体内形成

本发明的靶向化合物的体内形成在本发明的方法范围内。在一种方法中，自诱导型转基因体内产生 mAb 38C2 并给予靶向制剂-接头衍生物(例如二酮接头)。采用基因传递载体，例如腺病毒，能够把 cDNAs 编码的 mAb 38C2 轻和重链或者单链片段引入到宿主机体内以建立抗体转基因。这个方法在治疗中使之增加柔性。例如，患有
10 一般风险的癌症患者实际检测疾病之前选择接受转基因。一旦癌症被诊断，活性抗体(例如 mAb 38C2)的表达被引入患者体内，并且给予靶向制剂-接头衍生物(例如二酮接头)，其中靶向制剂被特别设计为用于靶向和影响所诊断的癌症。理想地，转基因引入和给予药物两者均口服完成，因此避免住院期。

实施例 10: 具有改善检测性的抗体靶向化合物文库

通过对结合情况的可利用的检测可以得到的试验，经常阻碍小分子或者肽拮抗剂、激动剂或者简单结合分子的筛选。经常需要置换或者竞争试验，其中小分子与结合靶点的其它分子置换或者竞争。对特异性靶分子必须频繁地进行具体设计测试。直接检测结合于细胞表面或者蛋白的小分子经常是不可能的。

通过制备为抗体靶向化合物的形式的文库可着手解决这个问题。为此目的，用所附的反应基团例如二酮或者高亲和性标记物例如生物素可合成小分子文库。已标记分子与靶温育使结合情况的检测简单和敏感，它采用酶-联的或者荧光标记的抗体(例如对二酮的 38C2)或者链霉抗生物素(对生物素)实现。易于采用这些类型的测定，
25

以用于化合物和肽文库的高通量筛选。这种直接筛选已标记分子的优点是检测方法敏感并且使超过可能的细胞表面分子和蛋白或者其它的可溶性蛋白靶的多样性标准化。一旦鉴定，接头臂的连接部位不须设计，因为它预先存在于标记的分子中。因此，直接加入共价结合的抗体以提供新的治疗剂。在生物素标记物用于检测的情况下，生物素臂易于交换为二酮臂，以用于直接加入可提供新治疗剂的共价结合的抗体。如果文库是生物展示文库，例如肽噬菌体文库，二酮臂的连接位点为肽文库残基连接于噬菌体包被蛋白的点。

实施例 11: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的结合 HIV-1 的包膜蛋白的 TAK-779 小分子的抗体靶向化合物

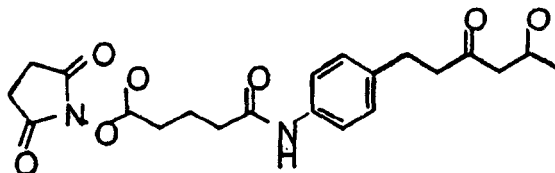
β -趋化因子受体 CCR5 对抑制巨噬细胞-向性的(采用 CCR5 或者 R5) HIV-1 复制为有吸引力的靶，因为具有非功能性受体(在 CCR5 编码区的纯合 32-bp 缺失)的个体似乎是正常的，但对 R5 HIV-1 感染的个体具有抗性。TAK-779 为低分子量(Mr 531.13)非肽 CCR5 拮抗剂(Baba 等, (1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5698-5703)。通过用二酮基接头使 TAK-779 衍生化，得到在图 2D 中所示的化合物，制备靶向制剂-接头化合物。用 Mab 38C2 温育二酮基-TAK-779 化合物，生成抗体 CCR5 靶向化合物(基于 TAK-799)。这个化合物呈现高的效力和对 R5 HIV-1 复制的选择性抑制及对 CCR5 表达的细胞的结合特异性。抗体 CCR5 靶向化合物也呈现超过 TAK-799 本身的增加的效价、增加的生物学效果和增加的血清半衰期。

与共价结合抗体反应也可修饰其它的 CCR5 拮抗剂(Shiraishi 等, 2000, *J. Med. Chem.*, 43, 2049-2063)，以产生本发明的靶向化合物。采用这种方法也可以修饰广泛范围内的趋化因子受体拮抗剂。

实施例 12: 含共价连接醛缩酶单克隆抗体 38C2 的结合位点的 LHRH 肽的抗体靶向化合物

使[D-Lys6] LH-RH 拮抗剂 Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (SEQ ID NO: 9)(100 微摩尔)溶于 1 mL 无水 DMF 中。

加入 1 当量的 NHS-二酮接头(化合物 25)，并搅拌过夜。真空蒸发溶剂，经 HPLC 纯化产物。得到的[D-Lys6] LH-RH-二酮接头化合物直接用于偶合抗体 38C2。得到的共价-修饰的抗体特异性结合于已知表达 LH-RH 受体的 OV-1063 人上皮卵巢癌系。



36

5

10

因此，参照以上描述的代表性实施方案本发明已被广泛公开和阐述。本领域技术人员应意识到对本发明可以做各种改进而不背离其精神和范围。所有的公开、专利申请书和授权的专利在此通过引用结合到本文中，如同每一各自的公开、专利申请书和授权的专利被特别和各自指明通过引用全部结合到本文中一样。但排除通过引用结合到本文中所包含的与本公开相抵触的定义。在此显示的所有结构被构思以提供所有的对映体和互变异构体。

图 1

靶向制剂 (T) — 连接链 (X)

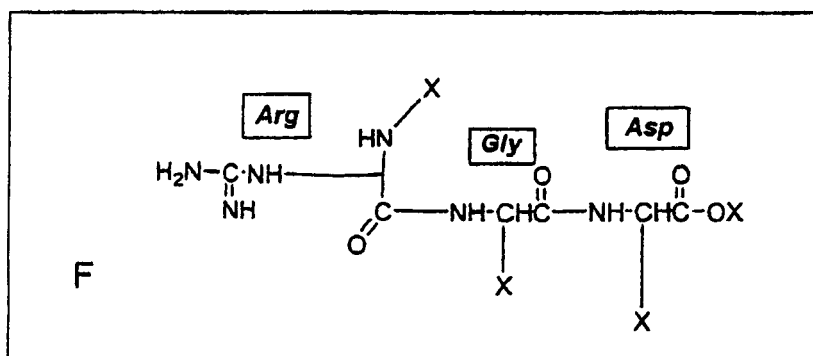
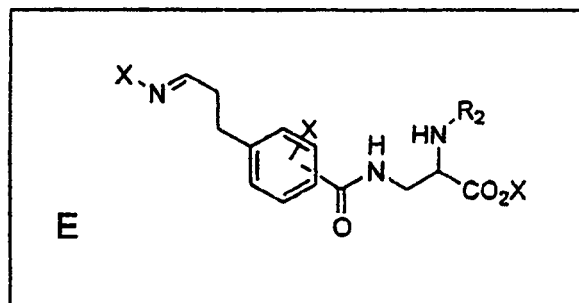
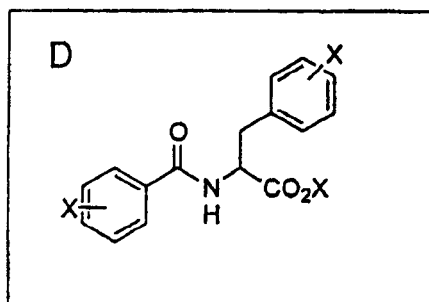
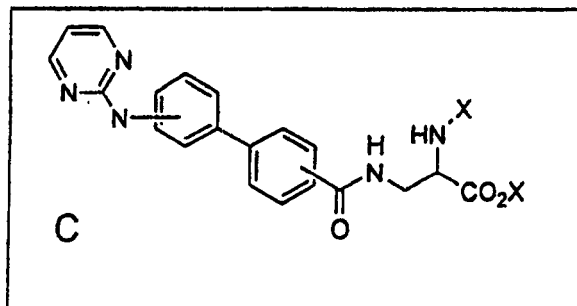
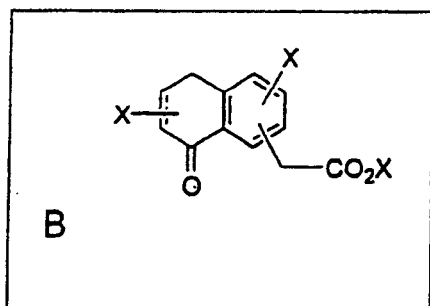
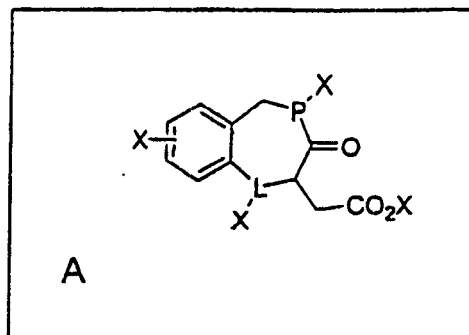


图 2

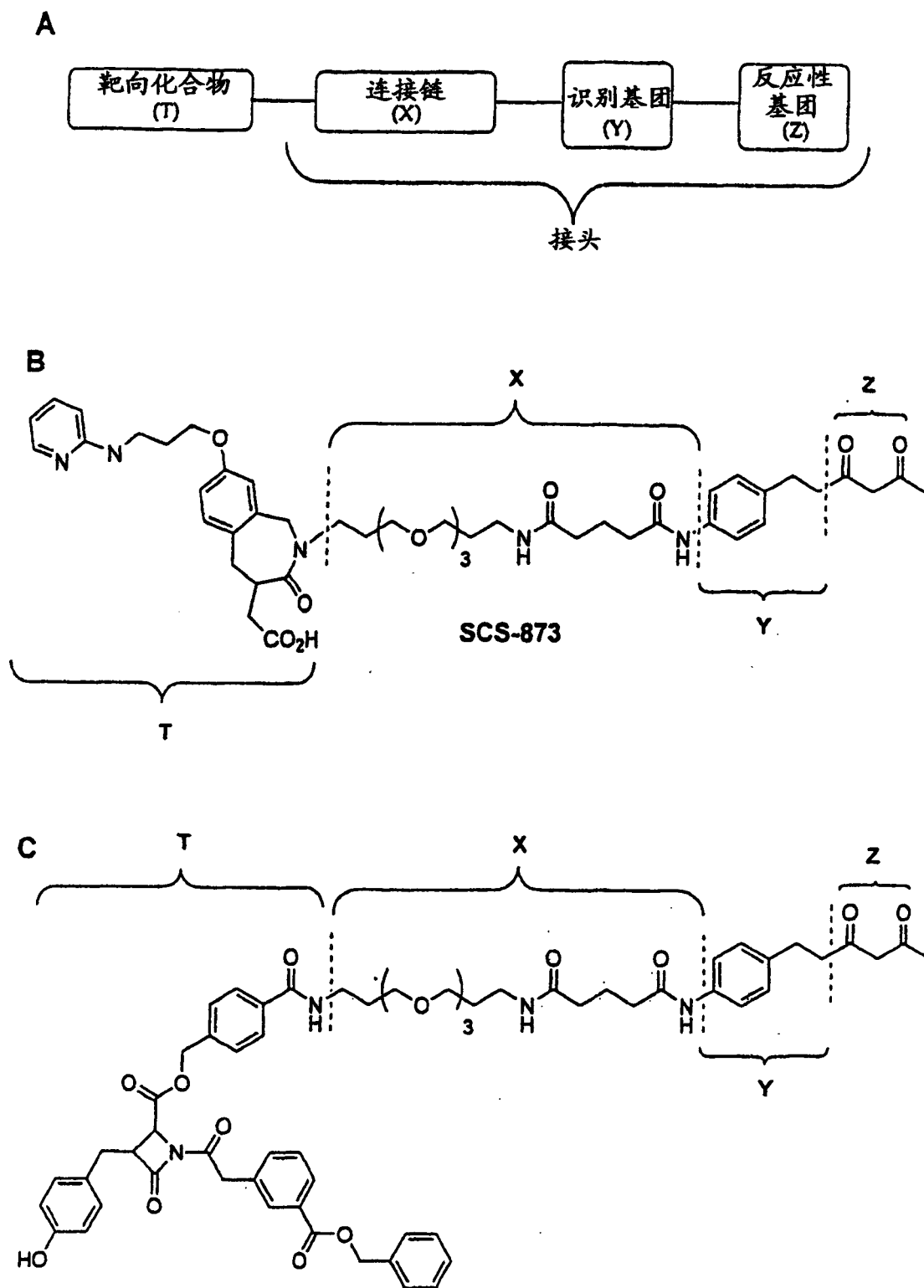


图 2 (续)

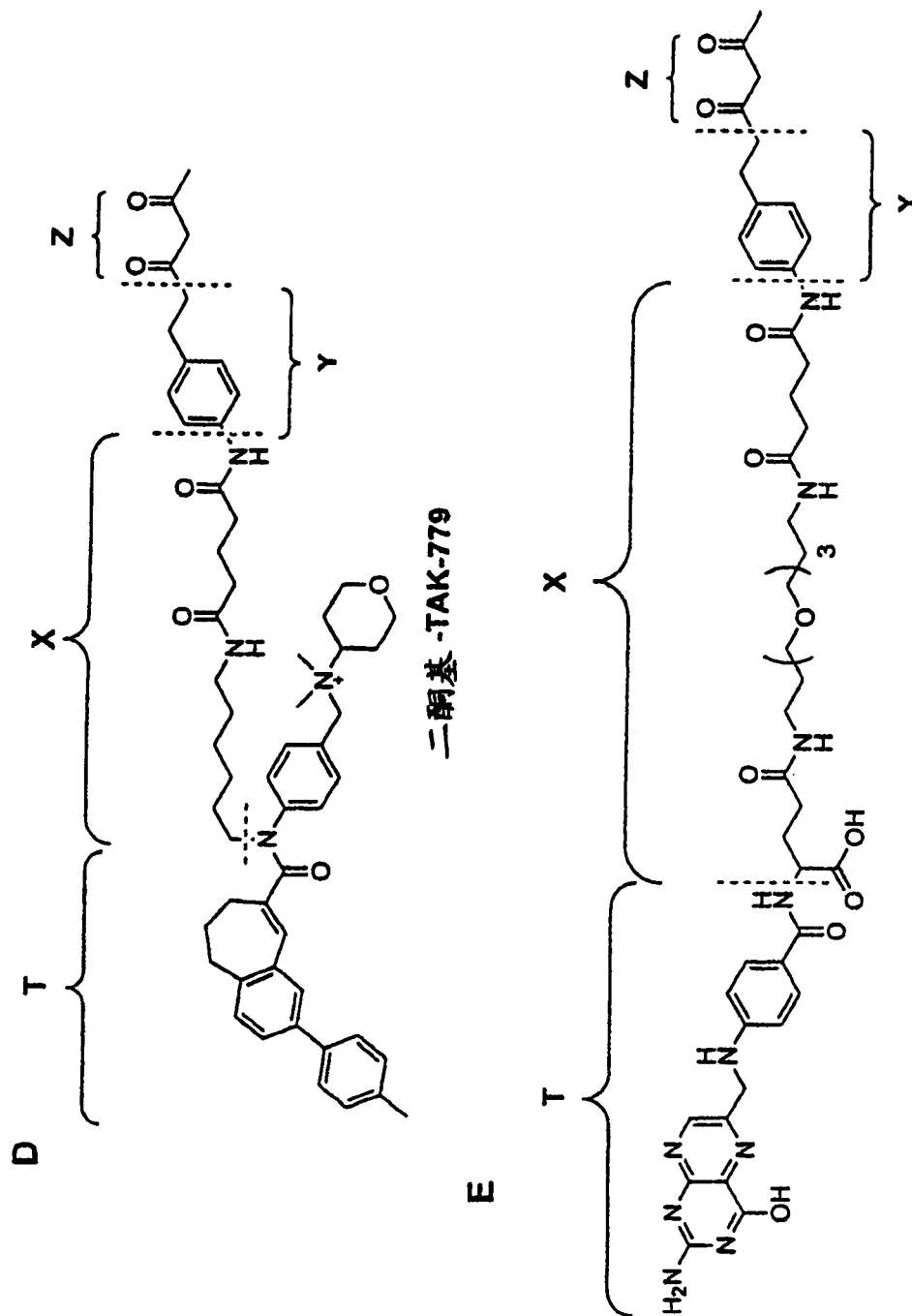
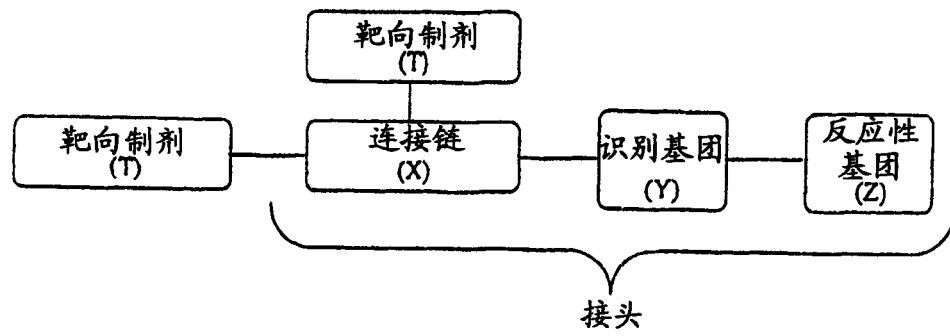
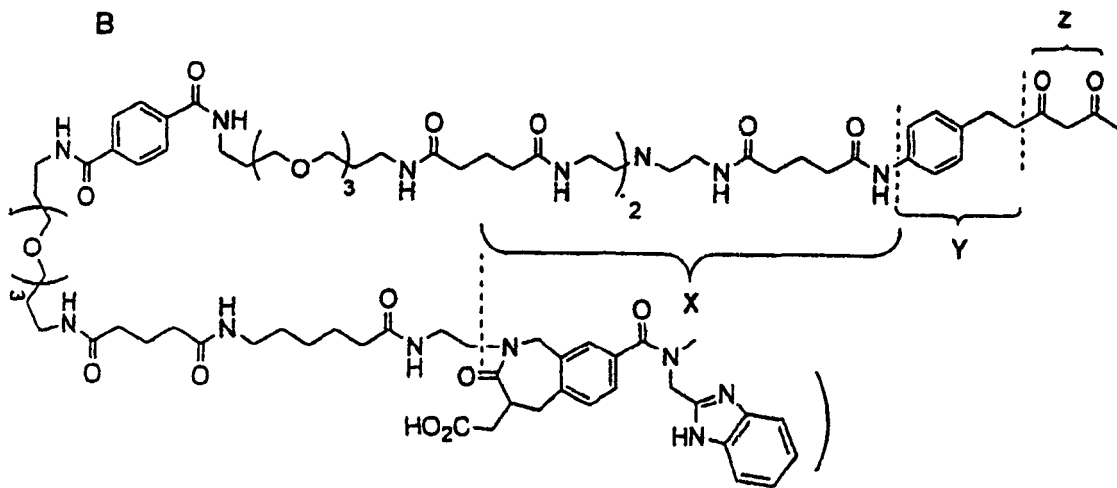


图 3

A



B



C

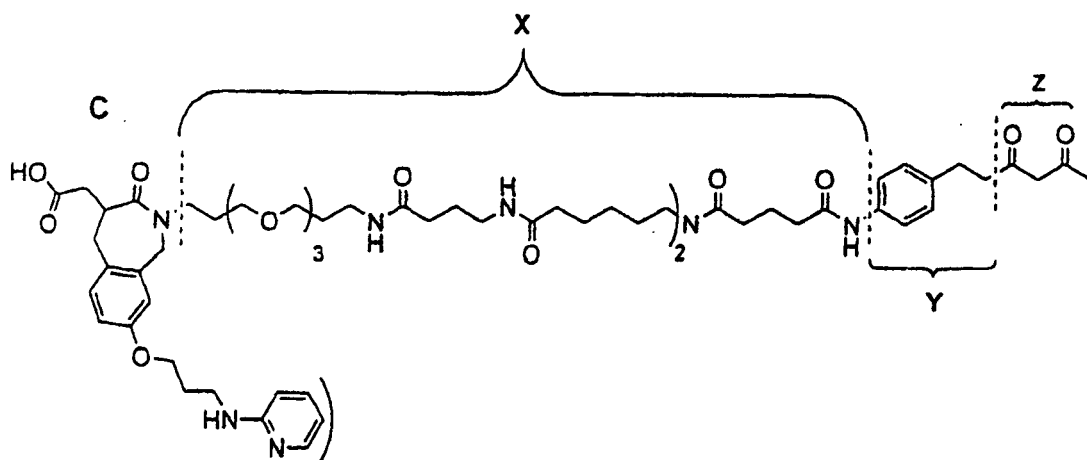
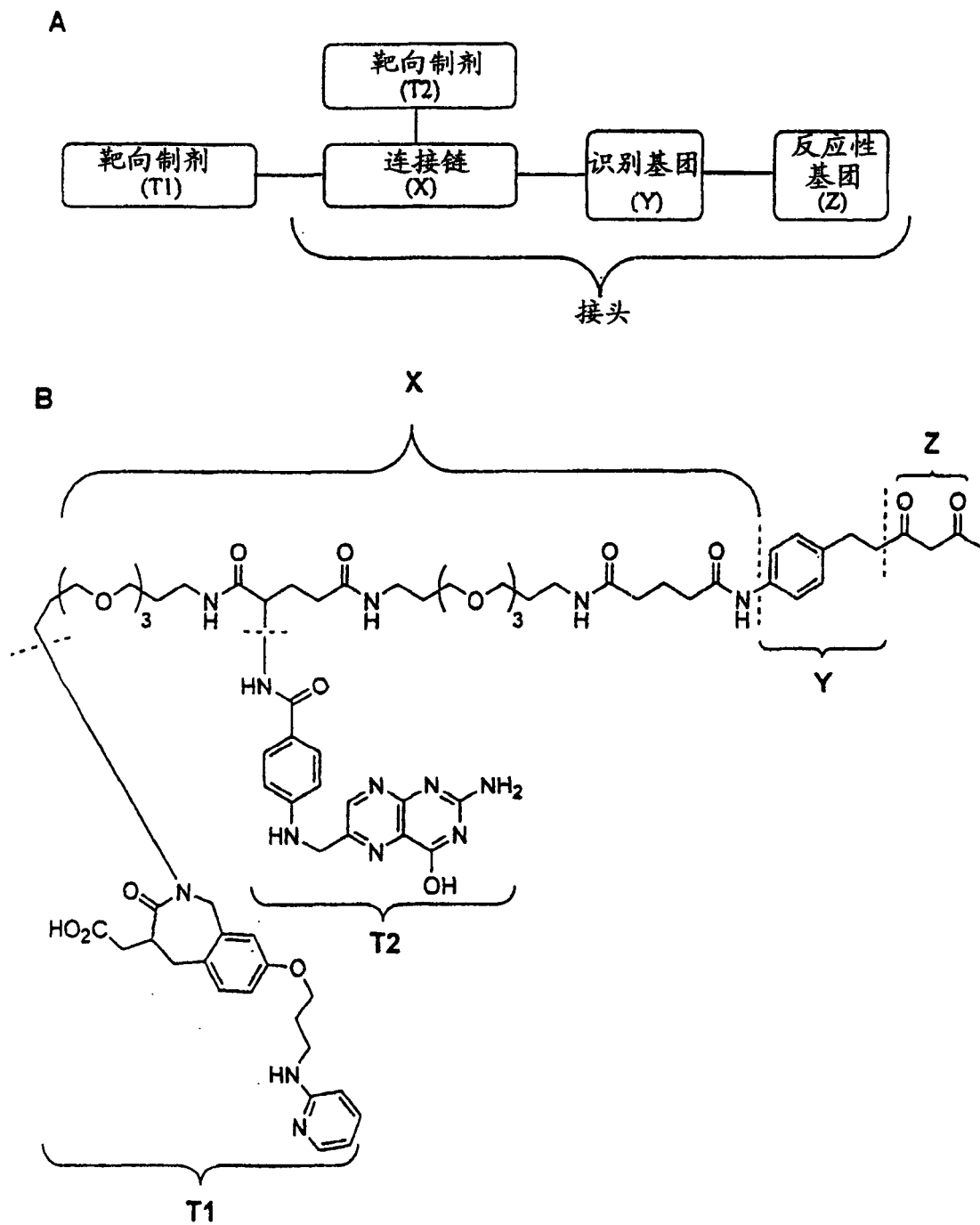


图 4



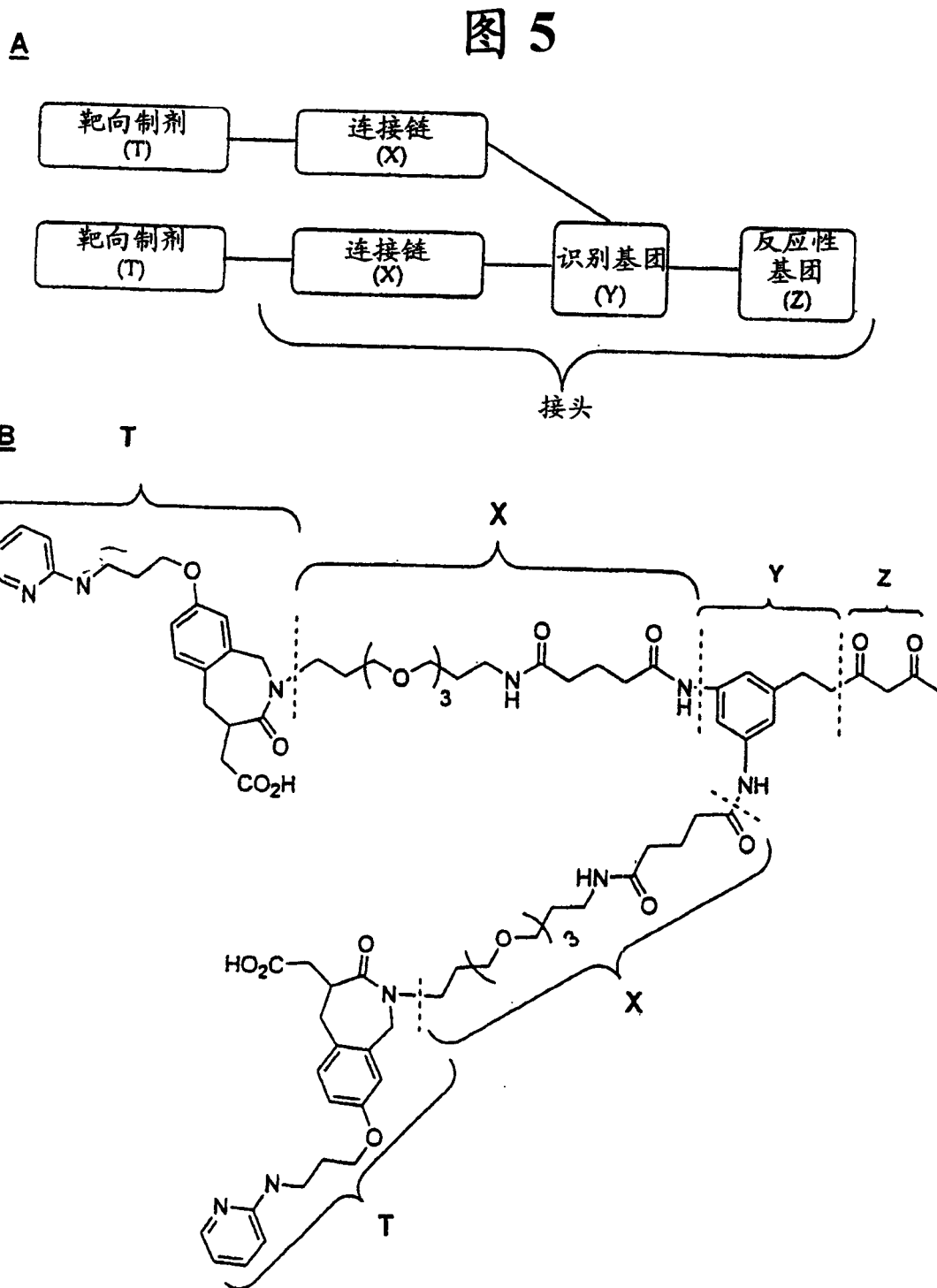


图 6

接头反应性基团(Z)

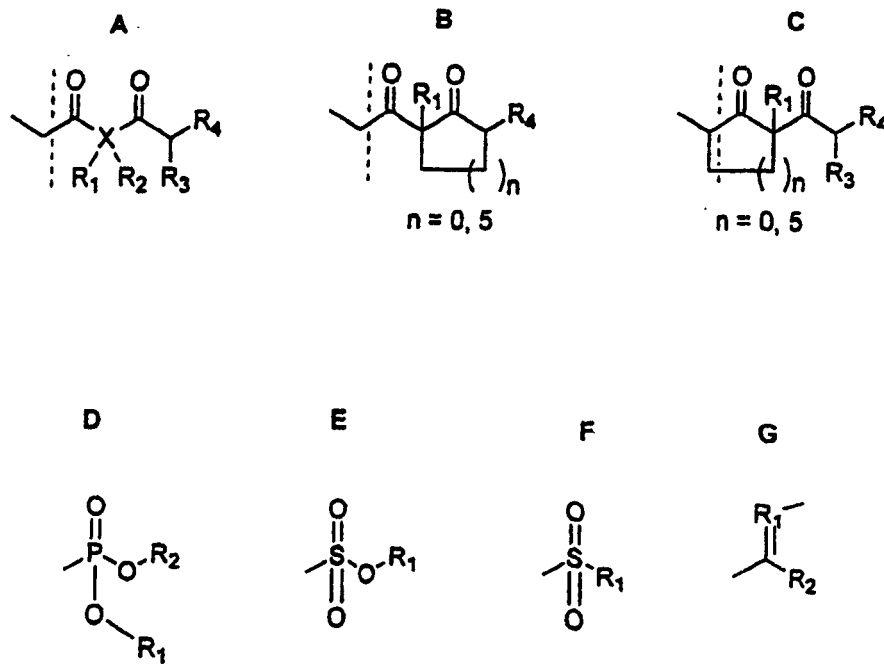


图 7

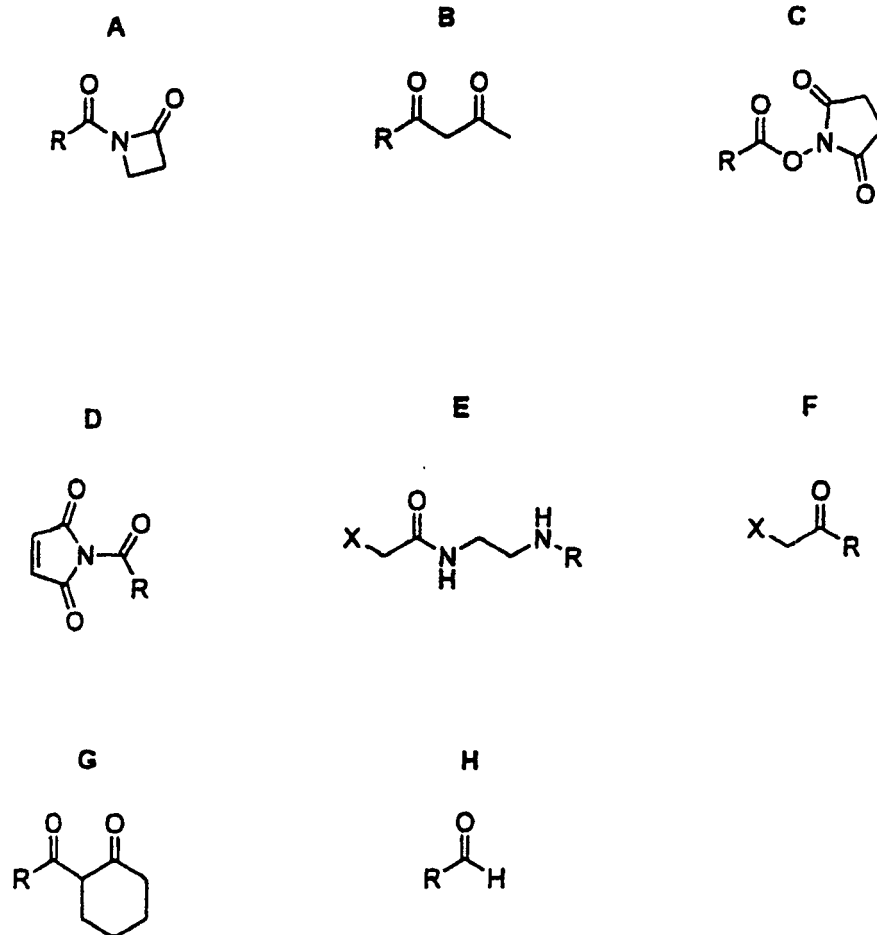


图 8

接头识别基团(Y)

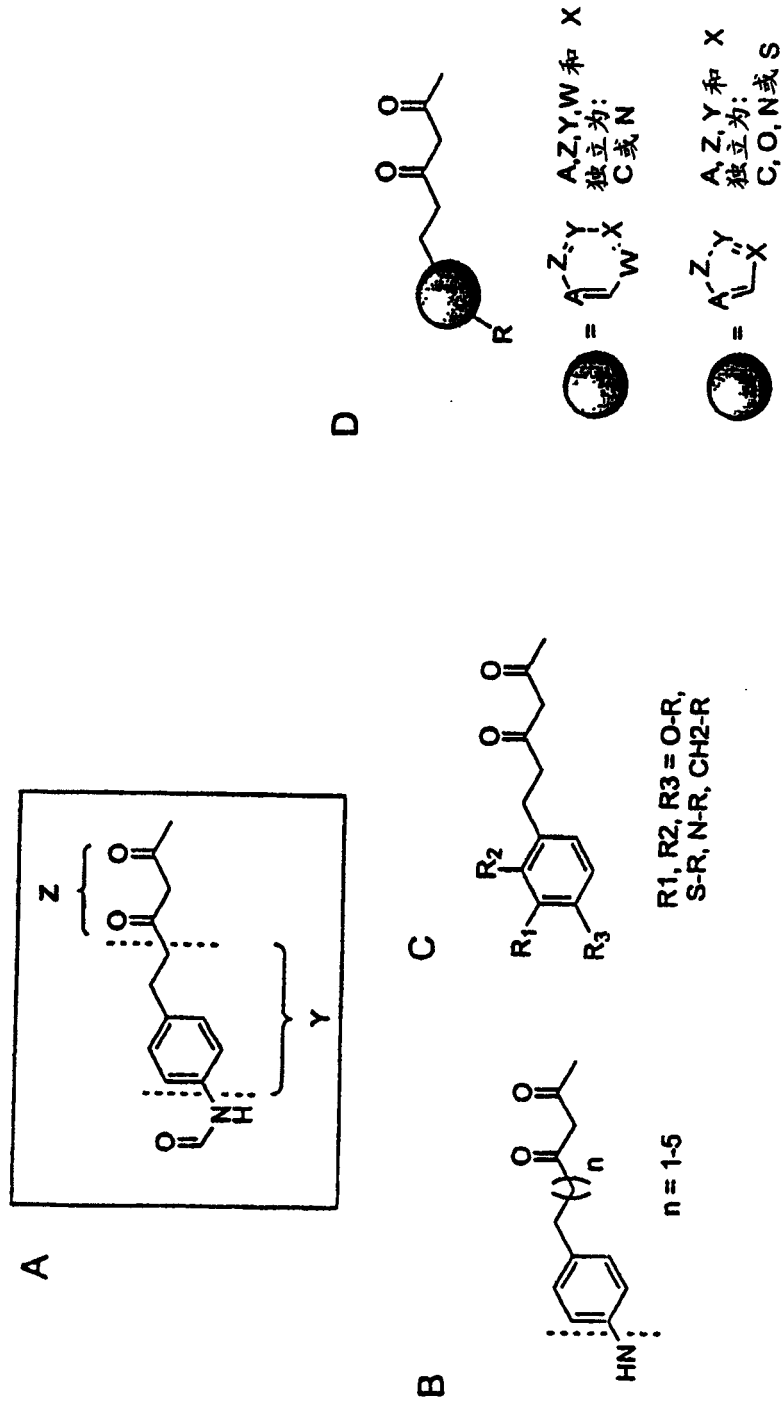
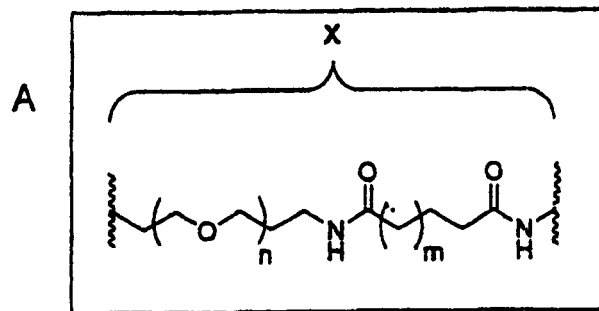
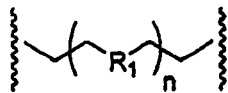


图 9

接头连接链(X)

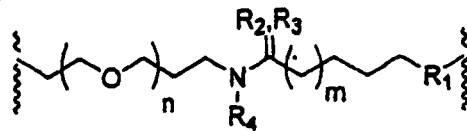


B

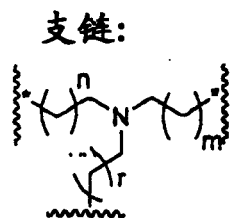


$R_1 = O, CH_2, NR_1R_2,$
 $Si, S, S(O), S(O)_2$

D



C



E

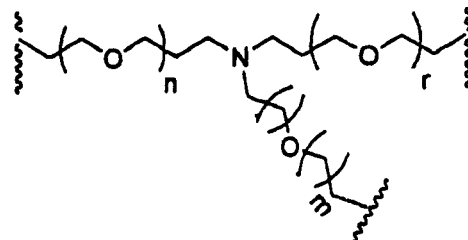


图 10 (流程 1)

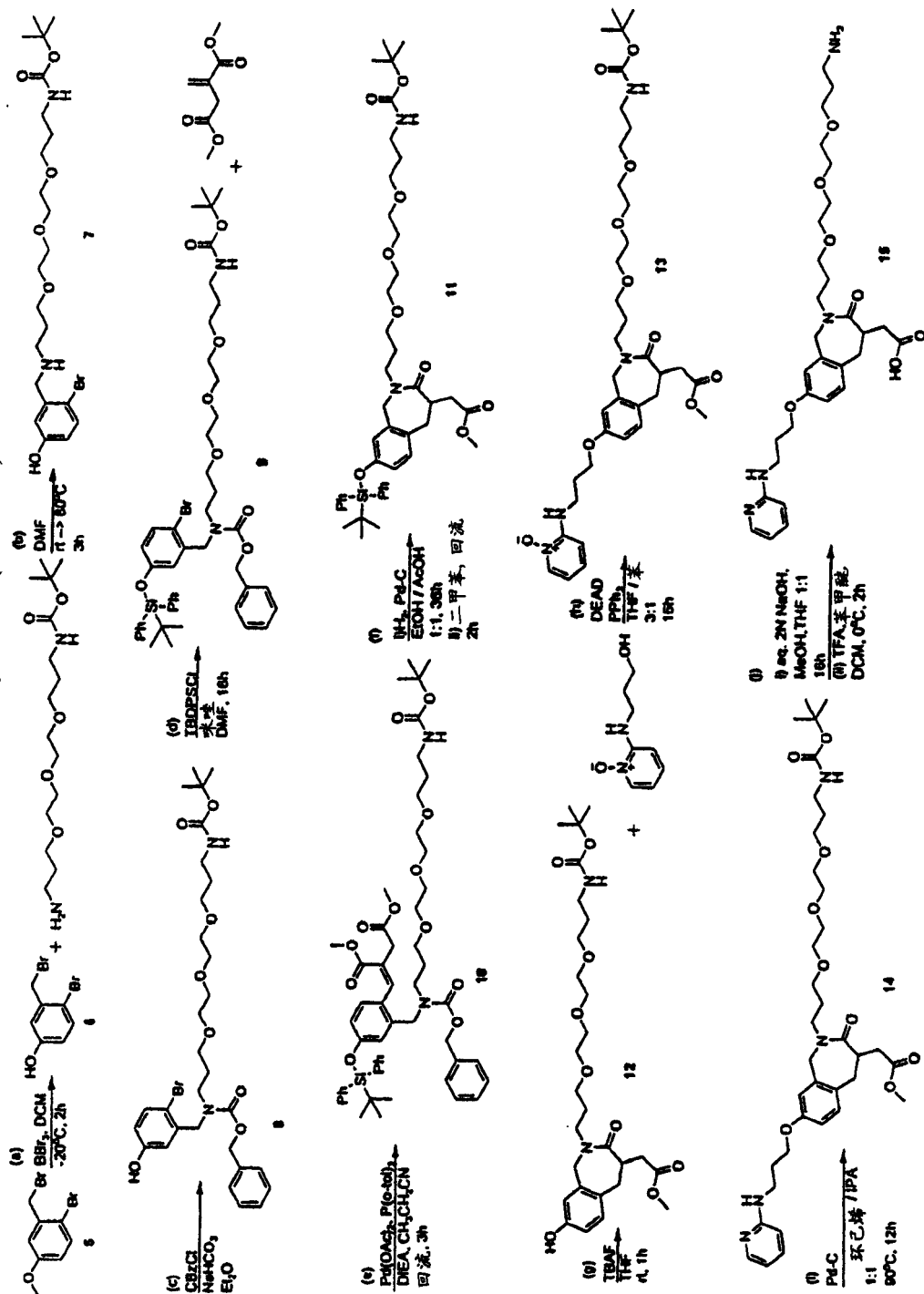


图 12 (流程 3)

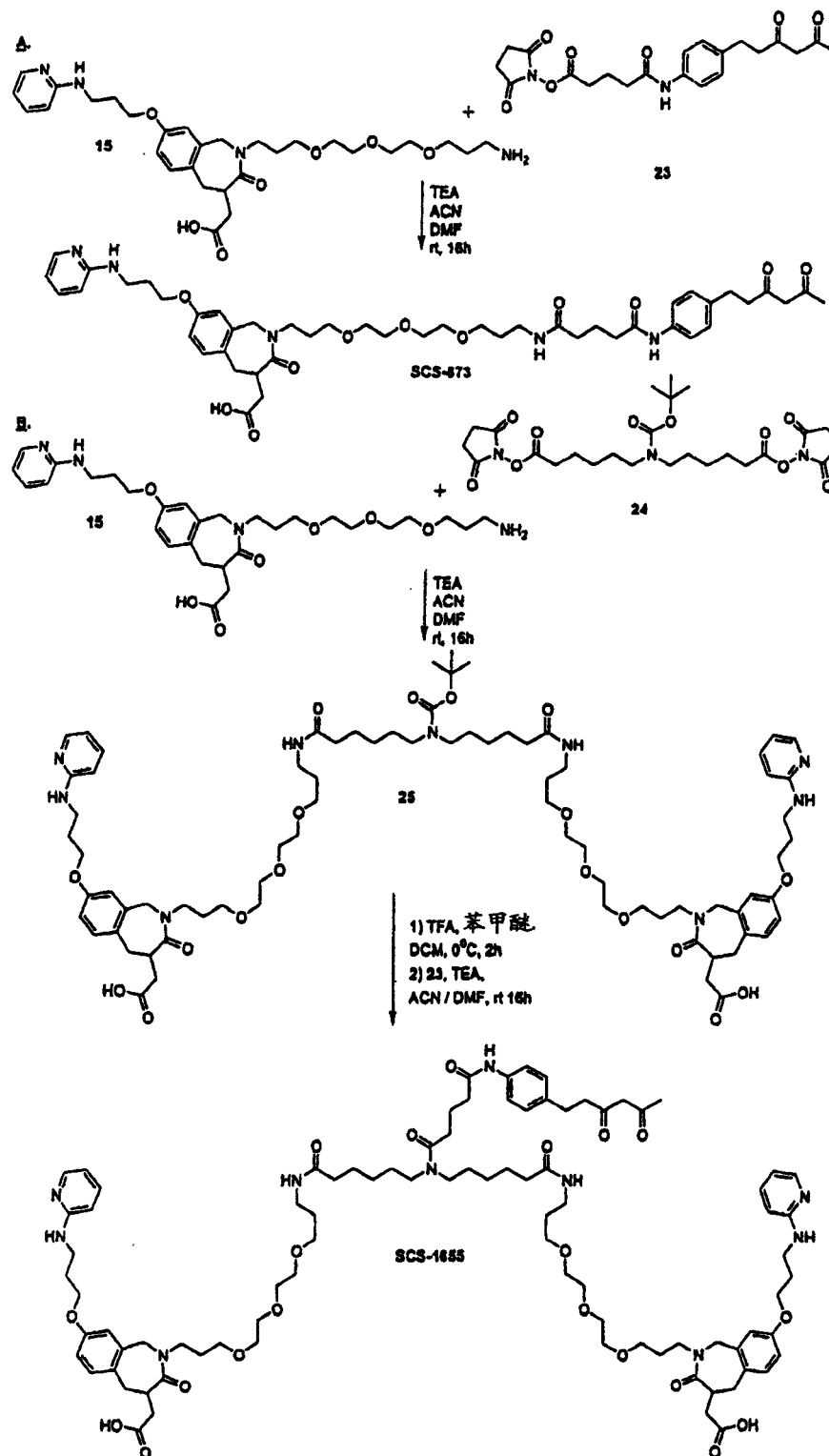
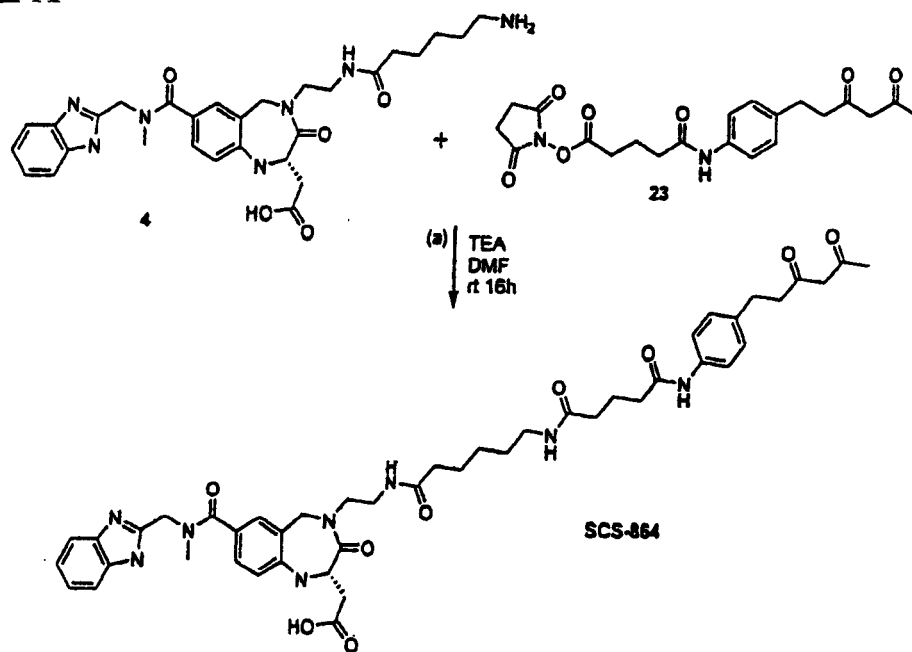


图 13 (流程 4)

反应 A



反应 B

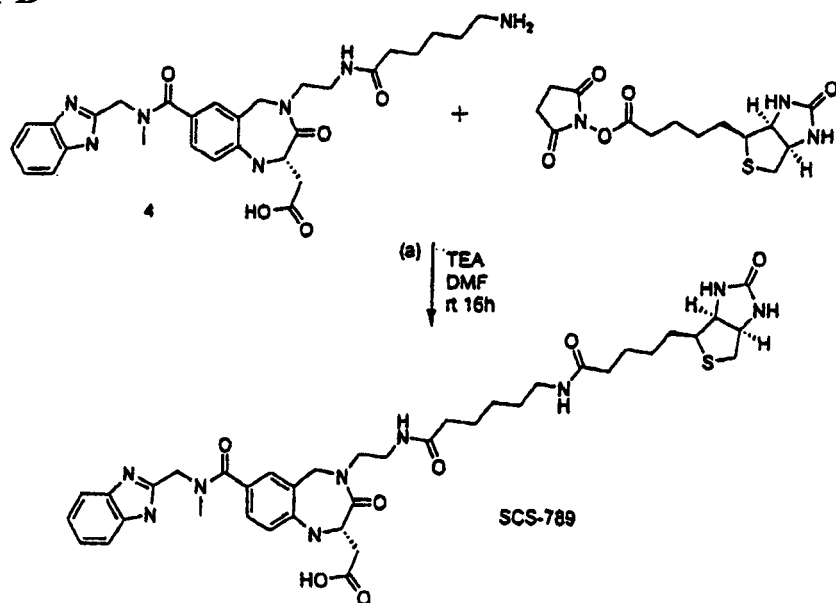
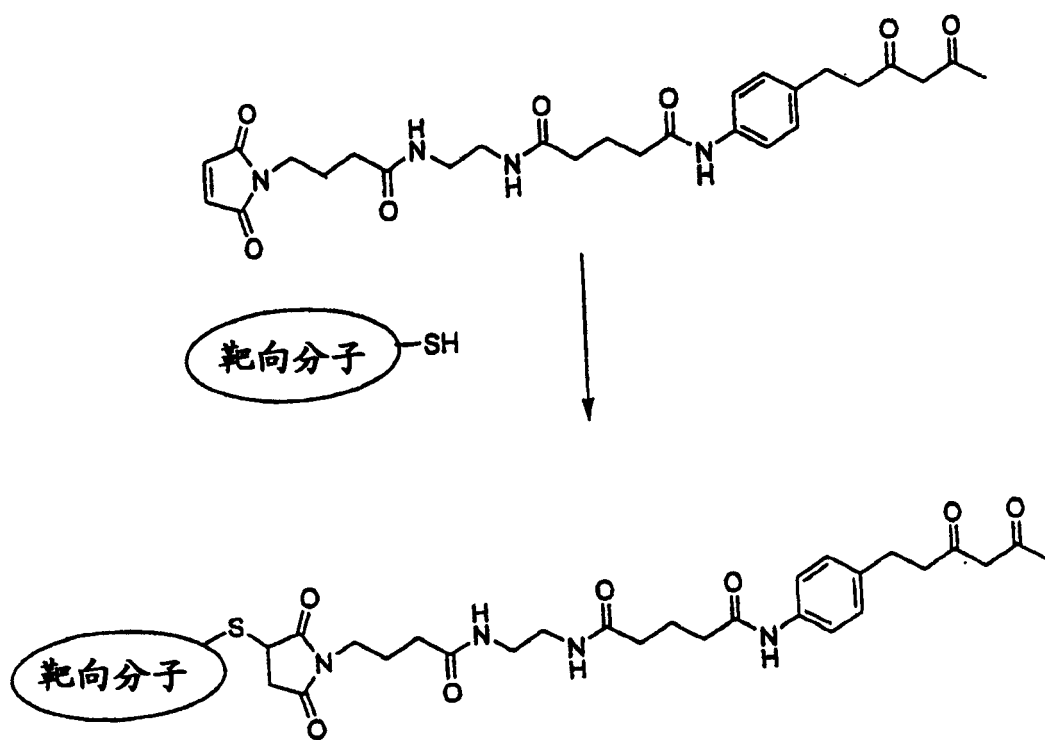


图 14



| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 抗体靶向化合物 | | |
| 公开(公告)号 | CN1606454A | 公开(公告)日 | 2005-04-13 |
| 申请号 | CN02825631.X | 申请日 | 2002-10-22 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 斯克里普斯研究学院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 斯克里普斯研究学院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 斯克里普斯研究学院 | | |
| [标]发明人 | CF巴巴斯 C拉德尔 SC辛哈 R莱纳 | | |
| 发明人 | C·F·巴巴斯 C·拉德尔 S·C·辛哈 R·莱纳 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K39/395 A61K47/48 A61K49/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 C07K16/40 G01N33/15 G01N33/566 C07K16/00 C12N15/00 | | |
| CPC分类号 | A61K47/54 A61K47/545 A61K47/642 A61K47/66 A61K47/6813 A61K47/6871 A61K47/6881 A61K47/6889 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 B82Y5/00 C07D475/04 C07K14/005 C07K16/40 C12N9/0002 C12N2740/16022 A61K49/0058 C07K5/0817 C07K7/06 C07K14/47 C07K14/5406 C07K14/575 C07K14/71 C12N15/115 | | |
| 优先权 | 60/344614 2001-10-22 US 60/412455 2002-09-19 US | | |
| 其他公开文献 | CN100560131C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供抗体靶向化合物，其中通过将靶向制剂共价或非共价连接于抗体结合位点已经将抗体的特异性重新编程。通过这个方法，共价修饰的抗体对靶向制剂呈现结合特异性。化合物可以具有由靶向制剂或分开的生物制剂提供的生物学活性。提供本发明化合物的各种用途。

