(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117769439 A
(43)申请公布日 2024.03.26

(21)申请号 202280035160.2
(22)申请日 2022.03.25
(30)优先权数据
63/166,710 2021.03.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.11.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/021985 2022.03.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/204536 EN 2022.09.29
(71)申请人 博尔特生物治疗药物有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 G·勃兰特 R·库迪尔卡
B·萨芬娜
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

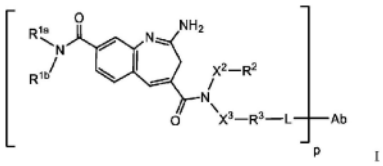
权利要求书7页 说明书82页
序列表66页

(54)发明名称

2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓免疫缀合物及其用途

(57)摘要

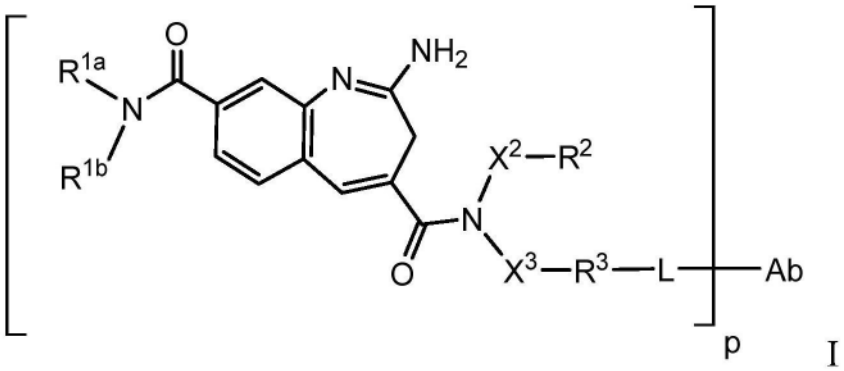
本发明提供式I的免疫缀合物,其包含通过与一种或多种2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓衍生物缀合而连接的抗体。本发明还提供了包含反应性官能团的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓衍生物中间体组合物。此类中间体组合物是用于通过接头或连接部分形成所述免疫缀合物的合适底物。本发明进一步提供了用所述免疫缀合物治疗癌症的方法。



I

CN 117769439 A

1.一种免疫缀合物,其包含通过接头共价连接至一个或多个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分的抗体,并且具有式I:



或其药学上可接受的盐,

其中:

Ab是抗体,其中所述抗体与选自PD-L1、HER2、CEA和TROP2的靶标结合;

p是1至8的整数;

X^2和X^3独立地选自由以下组成的组:键、C(=O)、C(=O)N(R^5)、O、N(R^5)、S、S(O)$_2$和S(O)$_2$N(R^5);

R^{1a}、R^{1b}和R^2独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_3-C_{12}碳环基、C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基和C_1-C_{20}杂芳基;或者R^{1a}和R^{1b}形成五或六元杂环基环;

R^3选自由以下组成的组:

-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O)*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O)O-(C_3-C_{12}碳环基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-S(O_2)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-(C_2-C_9杂环基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-O-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_3-C_{12}碳环基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_6-C_{20}芳基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_6-C_{20}芳基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_2-C_9杂环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-N(R^5)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-*;

-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_3-C_{12}碳环基二基)-*;

-(C_3-C_{12}碳环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_3-C_{12}碳环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_3-C_{12}碳环基二基)-NR^5-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

-(C_6-C_{20}芳基二基)-*;

-(C_6-C_{20}芳基二基)-N(R^5)-*;

-(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_2-C_{20}杂环基二基)-*;

-(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

-(C_2-C_{20}杂环基二基)-*;

-(C_2-C_9杂环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_2-C_9杂环基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-O-*;以及

-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

其中星号*指示接头L的连接位点;

或者R^2和R^3一起形成5或6元杂环基环;

R^5独立地选自由以下组成的组:H、C_6-C_{20}芳基、C_3-C_{12}碳环基、C_6-C_{20}芳基二基、C_1-C_{12}烷基和C_1-C_{12}烷基二基,或者两个R^5基团一起形成5或6元杂环基环;

R^{5a}选自由以下组成的组:C_6-C_{20}芳基和C_1-C_{20}杂芳基;

L选自由以下组成的组:

-C(=O)-PEG-;

-C(=O)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

-C(=O)-PEG-O-;

-C(=O)-PEG-O-C(=O)-;

-C(=O)-PEG-C(=O)-;

-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-;

-C(=O)-PEG-N(R^6)-;

-C(=O)-PEG-N(R^6)-C(=O)-;

-C(=O)-PEG-N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-;

-C(=O)-PEG-N^+(R^6)$_2$-PEG-C(=O)-PEP-;

-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-;

-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-;

-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-;

-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O);

-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

-琥珀酰亚胺基-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-O-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-O-C(=O)-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-C(=O)-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-;

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

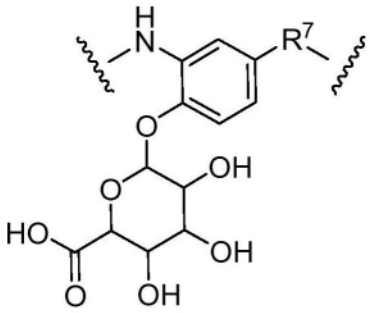
-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-;和

-琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

R^6独立地为H或C_1-C_6烷基;

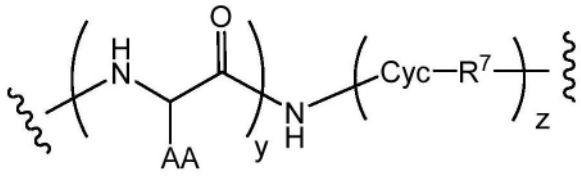
PEP具有下式:-$(CH_2CH_2O)_n$-$(CH_2)_m$-,m是1至5的整数,并且n是2至50的整数;

Gluc具有下式:



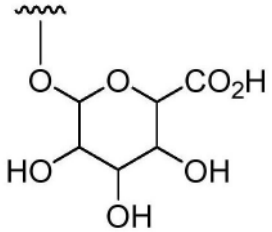
;

PEP具有下式:



其中AA独立地选自天然或非天然氨基酸侧链,或一个或多个AA与相邻的氮原子形成5元环脯氨酸氨基酸,并且波浪线指示连接点;

Cyc选自C_6-C_{20}芳基二基和C_1-C_{20}杂芳基二基,其任选地被一个或多个选自以下的基团取代:F、Cl、NO_2、-OH、-OCH_3和具有以下结构的葡糖醛酸:



;

R^7选自由以下组成的组:-CH(R^8)O-、-CH_2-、-CH_2N(R^8)-和-CH(R^8)O-C(=O)-,其中R^8选自

H、C_1-C_6烷基、C(=O)-C_1-C_6烷基和-C(=O)N(R^9)$_2$,其中R^9独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{12}烷基和-(CH_2CH_2O)$_n$-(CH_2)$_m$-OH,其中m是1至5的整数,并且n是2至50的整数,或者两个R^9基团一起形成5或6元杂环基环;

y是2至12的整数;

z是0或1;并且

烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳环基、碳环基二基、杂环基、杂环基二基、杂芳基和杂芳基二基独立地且任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代:F、Cl、Br、I、-CN、-CH_3、-CH_2CH_3、-CH=CH_2、-C≡CH、-C≡CCH_3、-$CH_2CH_2CH_3$、-CH(CH_3)$_2$、-CH_2CH(CH_3)$_2$、-CH_2OH、-CH_2OCH_3、-CH_2CH_2OH、-C(CH_3)$_2$OH、-CH(OH)CH(CH_3)$_2$、-C(CH_3)$_2CH_2$OH、-CH(OH)CH_2OH、-$CH_2CH_2SO_2CH_3$、-CH_2OP(O)(OH)$_2$、-CH_2F、-CHF_2、-CF_3、-CH_2CF_3、-CH_2CHF_2、-CH(CH_3)CN、-C(CH_3)$_2$CN、-CH_2CN、-CH_2NH_2、-$CH_2NHSO_2CH_3$、-CH_2NHCH_3、-CH_2N(CH_3)$_2$、-CO_2H、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-CO_2C(CH_3)$_3$、-COCH(OH)CH_3、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-CON(CH_3)$_2$、-C(CH_3)$_2CONH_2$、-NH_2、-NHC H_3、-N(CH_3)$_2$、-$NHCOCH_3$、-N(CH_3)$COCH_3$、-NHS(O)$_2CH_3$、-N(CH_3)C(CH_3)$_2CONH_2$、-N(CH_3)CH_2CH_2S(O)$_2CH_3$、-NHC(=NH)H、-NH C(=NH)CH_3、-NHC(=NH)NH_2、-NHC(=O)NH_2、-NO_2、=O、-OH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-$OCH_2CH_2OCH_3$、-OCH_2CH_2OH、-OCH_2CH_2N(CH_3)$_2$、-O(CH_2CH_2O)$_n$-(CH_2)$_m$$CO_2$H、-O($CH_2CH_2$O)$_n$H、-$OCH_2$F、-$OCHF_2$、-$OCF_3$、-OP(O)(OH)$_2$、-S(O)$_2$N($CH_3$)$_2$、-$SCH_3$、-S(O)$_2CH_3$和-S(O)$_3$H。

2.如权利要求1所述的免疫缀合物,其中所述抗体是具有结合PD-L1的抗原结合结构域的抗体构建体。

3.如权利要求2所述的免疫缀合物,其中所述抗体选自由以下组成的组:阿特朱单抗、度伐利尤单抗和阿维鲁单抗,或它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物。

4.如权利要求1所述的免疫缀合物,其中所述抗体是具有结合HER2的抗原结合结构域的抗体构建体。

5.如权利要求4所述的免疫缀合物,其中所述抗体选自由以下组成的组:曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,或它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物。

6.如权利要求1所述的免疫缀合物,其中所述抗体是具有结合CEA的抗原结合结构域的抗体构建体。

7.如权利要求6所述的免疫缀合物,其中所述抗体是拉贝珠单抗或其生物仿制药或改良型生物相似性药物。

8.如权利要求1所述的免疫缀合物,其中所述抗体是具有结合TROP2的抗原结合结构域的抗体构建体。

9.如权利要求8所述的免疫缀合物,其中所述TROP2抗体是单克隆抗体。

10.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中R^{1a}和R^{1b}独立地选自由以下组成的组:任选取代的C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基和C_1-C_{20}杂芳基。

11.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中R^{1a}是任选取代的C_6-C_{20}芳基并且R^{1b}是H。

12.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中R^{1a}和R^{1b}形成五或六元杂环基环。

13.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中X^2和X^3各自是键,并且R^2和R^3独立地选自由以下组成的组:C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_{12}烷基)、-(C_1-C_{12}烷基二基)-OR^5、-(C_1-C_8烷基

二基)-N(R^5)CO_2R^5、-(C_1-C_{12}烷基)-OC(O)N(R^5)$_2$、-O-(C_1-C_{12}烷基)-N(R^5)CO_2R^5和-O-(C_1-C_{12}烷基)-OC(O)N(R^5)$_2$。

14.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中X^2是键,并且R^2是C_1-C_{12}烷基。

15.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中X^3是O并且R^3是-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*。

16.如权利要求15所述的免疫缀合物,其中R^3是-$CH_2CH_2CH_2NH$-。

17.如权利要求15所述的免疫缀合物,其中L是-C(=O)-PEG-C(=O)-。

18.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中L包含PEG。

19.如权利要求18所述的免疫缀合物,其中n是10并且m是1。

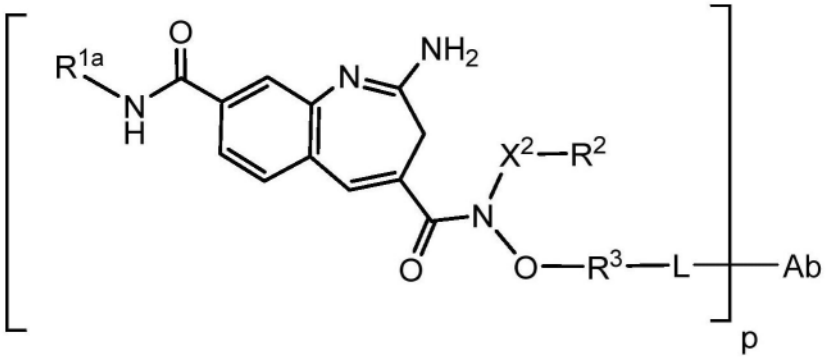
20.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中AA_1和AA_2独立地选自天然存在的氨基酸的侧链。

21.如权利要求20所述的免疫缀合物,其中AA_1或AA_2与相邻氮原子形成5元环脯氨酸氨基酸。

22.如权利要求20所述的免疫缀合物,其中AA_1和AA_2独立地选自由以下组成的组:H、-CH_3、-$CH(CH_3)_2$、-$CH_2(C_6H_5)$、-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、-$CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$、-$CHCH(CH_3)CH_3$、-CH_2SO_3H和-$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

23.如权利要求22所述的免疫缀合物,其中AA_1是-$CH(CH_3)_2$,并且AA_2是-$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

24.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其具有式Ia:



Ia。

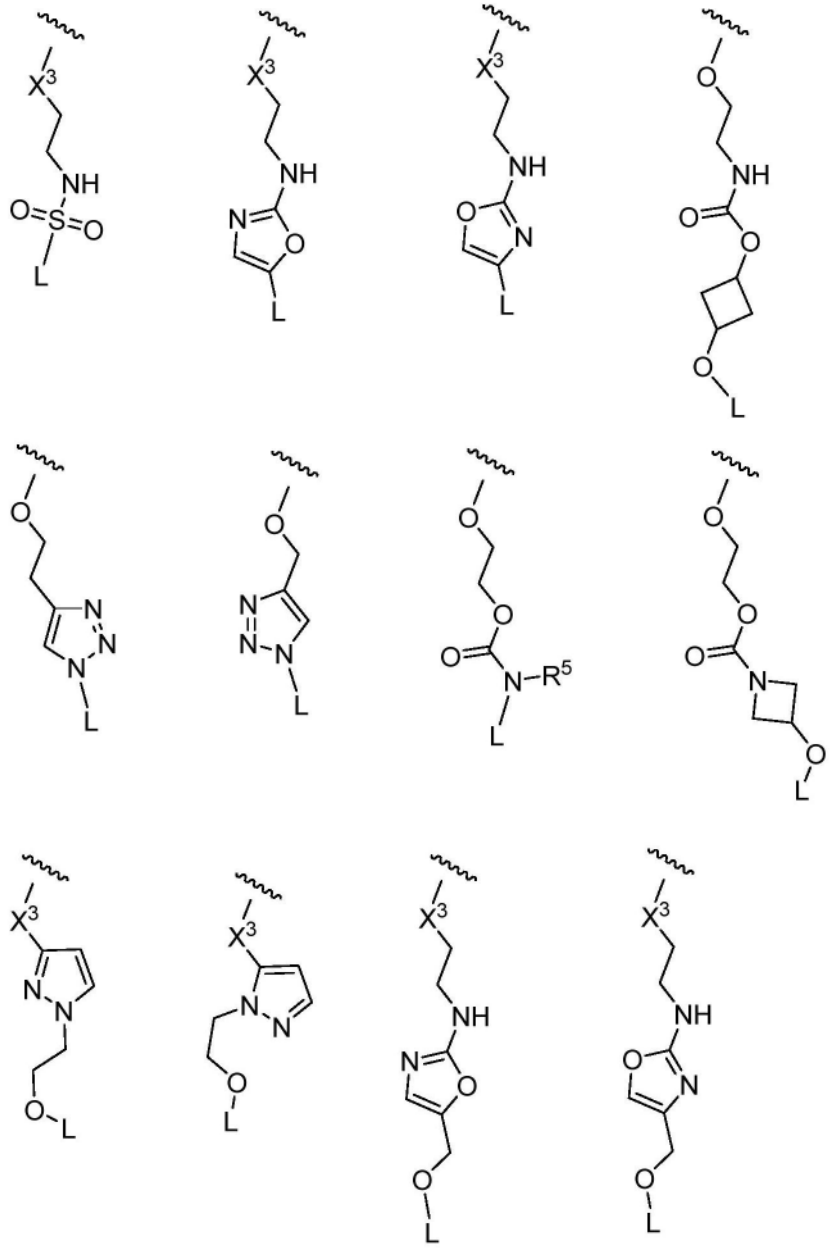
25.如权利要求24所述的免疫缀合物,其中R^{1a}是选自以下的基团:任选取代的C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基和C_1-C_{20}杂芳基。

26.如权利要求25所述的免疫缀合物,其中R^{1a}是嘧啶基或吡啶基。

27.如权利要求24所述的免疫缀合物,其中X^2是键,并且R^2是C_1-C_{12}烷基。

28.如权利要求24所述的免疫缀合物,其中R^3是-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*。

29.如权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中X^3-R^3-L选自由以下组成的组:



其中所述波浪线指示与N的连接点。

30.如权利要求29所述的免疫缀合物,其中L包含PEG。

31.如权利要求30所述的免疫缀合物,其中n是10并且m是1。

32.一种2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物,其选自表2a和表2b。

33.一种免疫缀合物,其通过将抗体与选自表2a和表2b的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物缀合而制备。

34.一种药物组合物,其包含治疗有效量的根据权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物和一种或多种药学上可接受的稀释剂、媒剂、载体或赋形剂。

35.一种用于治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的根据权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物,其中所述癌症选自膀胱癌、泌尿道癌、尿路上皮癌、肺癌、非小细胞肺癌、默克尔细胞癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌和乳腺癌。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述癌症对由TLR7和/或TLR8激动所诱导的促炎反

应敏感。

37.如权利要求35所述的方法,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌。

38.如权利要求35所述的方法,其中所述默克尔细胞癌癌症是转移性默克尔细胞癌。

39.如权利要求35所述的方法,其中所述癌症是胃食管连接部腺癌。

40.一种制备权利要求1至9中任一项所述的式I的免疫缀合物的方法,其中将权利要求32所述的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头与所述抗体缀合。

41.根据权利要求1至9中任一项所述的免疫缀合物用于治疗癌症的用途,所述癌症选自膀胱癌、泌尿道癌、尿路上皮癌、肺癌、非小细胞肺癌、默克尔细胞癌、结肠癌、结直肠癌、胃癌和乳腺癌。

2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓免疫缀合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本非临时申请要求于2021年3月26日提交的美国临时申请号63/166,710的优先权权益,该美国临时申请以引用方式全文并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交,并且据此全部内容以引用方式并入的序列表。所述ASCII副本创建于2022年3月25日,名称为17019_015WO1_SL.txt,且大小为85,369字节。

技术领域

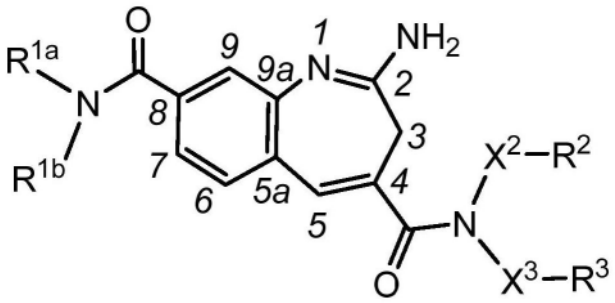
[0005] 本发明总体上涉及一种免疫缀合物,所述免疫缀合物包含与一个或多个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓分子缀合的抗体。

背景技术

[0006] 需要用于递送抗体和树突细胞/髓样细胞佐剂以到达难以接近的肿瘤和/或以扩大癌症患者和其他受试者的治疗选项的新组合物和方法。本发明提供了此类组合物和方法。

发明内容

[0007] 本发明总体上涉及免疫缀合物,其包含通过与一种或多种2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓衍生物缀合而连接的抗体。本发明进一步涉及包含反应性官能团的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓衍生物中间体组合物。此类中间体组合物是用于形成免疫缀合物的合适底物,其中抗体可通过接头L与具有下式的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分的4位共价结合:

[0008] 

[0009] 其中R^3连接至接头L。3H-苯并[b]氮杂卓结构的位置根据IUPAC惯例编号。X^{2-3}和R^{1-3}取代基如本文所定义。

[0010] 所述抗体与选自由以下组成的组的靶标结合:PD-L1、HER2、TROP2和CEA。

[0011] 本发明进一步涉及此类免疫缀合物在疾病,特别是癌症的治疗中的用途。

[0012] 本发明的一个方面是一种免疫缀合物,所述免疫缀合物包含共价连接至接头的抗体,所述接头共价连接至一个或多个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分。

[0013] 本发明的另一方面是一种2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物。

[0014] 本发明的另一方面是一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的免疫缀合物,所述免疫缀合物包含通过与一个或多2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分缀合而连接的抗体。

[0015] 本发明的另一方面是免疫缀合物用于治疗癌症的用途,所述免疫缀合物包含通过与一个或多个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分缀合而连接的抗体。

[0016] 本发明的另一方面是一种通过将一个或多个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分与抗体缀合来制备免疫缀合物的方法。

具体实施方式

[0017] 现在将详细参考本发明的某些实施方案,其实施例在所附的结构和化学式中说明。虽然将结合列举的实施方案描述本发明,但将要理解的是,它们并不旨在将本发明限于这些实施方案。相反,本发明旨在涵盖所有的替代、修改和等同方案,这些可以被包括在如权利要求所限定的本发明的范围内。

[0018] 本领域技术人员将会认识到,许多方法和材料类似或等同于本文描述的那些,它们可用于实践本发明。本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0019] 定义

[0020] 术语“Toll样受体”和“TLR”是指高度保守的哺乳动物蛋白家族中的任何成员,所述成员识别病原体相关分子模式并充当先天免疫中的关键信号传导元件。TLR多肽共有特征结构,所述特征结构具有富含亮氨酸的重复序列的胞外结构域、跨膜结构域和参与TLR信号传导的胞内结构域。

[0021] 术语“Toll样受体7”和“TLR7”是指与公众可获得的TLR7序列(例如,人TLR7多肽的GenBank登录号AAZ99026或鼠TLR7多肽的GenBank登录号AAK62676)共享至少约70%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多序列同一性的核酸或多肽。

[0022] 术语“Toll样受体8”和“TLR8”是指与公众可获得的TLR7序列(例如,人TLR8多肽的GenBank登录号AAZ95441或鼠TLR8多肽的GenBank登录号AAK62677)共享至少约70%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多序列同一性的核酸或多肽。

[0023] “TLR激动剂”是直接或间接与TLR(例如,TLR7和/或TLR8)结合以诱导TLR信号传导的物质。TLR信号传导的任何可检测到的差异可指示激动剂刺激或激活TLR。信号传导差异可被表现为例如靶基因表达、信号转导组分的磷酸化、下游元件如核因子-κB(NF-κB)的细胞内定位、某些组分(如IL-1受体相关激酶(IRAK))与其它蛋白质或细胞内结构的缔合或诸如激酶(如丝裂原激活蛋白激酶(MAPK))的组分的生物化学活性的变化。

[0024] “抗体”是指包含来自免疫球蛋白基因或其片段的抗原结合区(包括互补决定区(CDR))的多肽。术语“抗体”具体涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和表现出所需生物活性的抗体片段。示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有通过二硫键连接的一条“轻”(约25kDa)链和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链由被称为免疫球蛋白结构域的结构域组成。这些结构域按大小和功能分为不同的类别,例如轻链和重链上的可变结构域或区域(分别为V_L和V_H)以及轻链和重链上的恒定结构域或区域(分别为C_L和C_H)。每条链的N-末端界定了具有约100至110个或更多个氨基酸的可变区,被称为互补位,主要负责抗

原识别,即抗原结合结构域。轻链被分类为κ或λ。重链被分类为γ、μ、α、δ或ε,它们分别又定义了免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。IgG抗体是由四条肽链组成的约150kDa的大分子。IgG抗体含有约50kDa的两条相同的γ类重链和约25kDa的两条相同的轻链,因此具有四聚体四级结构。两条重链彼此连接,并通各自通过二硫键与轻链连接。所得四聚体具有两个相同的半体,它们一起形成Y样形状。叉的每一端含有相同的抗原结合结构域。人有四个IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4),它们按在血清中的丰度顺序命名(即,IgG1是最丰度的)。通常,抗体的抗原结合结构域在与癌细胞结合的特异性和亲和力方面将最为关键。

[0025] "双特异性"抗体(bsAb)是将两个不同表位与癌症结合的抗体(Suurs F.V.等人(2019)Pharmacology&Therapeutics 201:103-119)。双特异性抗体可以接合免疫细胞来破坏肿瘤细胞、向肿瘤递送有效负载和/或阻断肿瘤信号传导途径。靶向特定抗原的抗体包括具有至少一个靶向特定抗原的抗原结合区的双特异性或多特异性抗体。在一些实施方案中,靶向单克隆抗体是具有至少一个靶向肿瘤细胞的抗原结合区的双特异性抗体。此类抗原包括但不限于:间皮素、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、HER2、TROP2、CEA、EGFR、5T4、连接素4、CD19、CD20、CD22、CD30、CD70、B7H3、B7H4(也称为08E)、蛋白酪氨酸激酶7(PTK7)、磷脂酰肌醇聚糖-3、RG1、岩藻糖基-GM1、CTLA-4和CD44(WO 2017/196598)。

[0026] 靶向特定抗原的抗体包括具有至少一个靶向特定抗原的抗原结合区的双特异性或多特异性抗体。在一些实施方案中,靶向单克隆抗体是具有至少一个靶向肿瘤细胞的抗原结合区的双特异性抗体。此类抗原包括CD47、SIRPα、Dectin-2、PD-1和PD-L1。

[0027] "抗体构建体"是指包含(i)抗原结合结构域和(ii)Fc结构域的抗体或融合蛋白。

[0028] 术语"免疫缀合物"是指经由接头与佐剂部分共价键合的抗体构建体。免疫缀合物允许在结合靶抗原的同时靶向递送活性佐剂部分。

[0029] "佐剂"是指能够在暴露于所述佐剂的受试者中引发免疫应答的物质。短语"佐剂部分"是指如本文所述例如通过接头与抗体构建体共价键合的佐剂。佐剂部分可在与抗体构建体键合的同时或在将免疫缀合物施用于受试者后从抗体构建体切割(例如,酶促切割)后引发免疫应答。

[0030] 在一些实施方案中,结合剂是结合抗原的抗体"片段",所述片段是这样的构建体,所述构建体至少包含单独的抗体的抗原结合区,或所述抗原结合区和与所述抗原结合区一起构成所述抗原结合构建体的其他组分。许多不同类型的抗体"片段"是本领域中已知的,包括例如(i)Fab片段,其是由V_L、V_H、C_L和CH_1结构域组成的单价片段,(ii)$F(ab')_2$片段,其是包含在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段,(iii)由抗体的单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,(iv)Fab'片段,其是采用温和还原条件破坏$F(ab')_2$片段的二硫桥产生的,(v)二硫化物稳定的Fv片段(dsFv),和(vi)单链Fv(scFv),其是通过合成接头连接的Fv片段的两个结构域(即,V_L和V_H)组成的单价分子,所述合成接头使得两个结构域能够作为单个多肽链合成。

[0031] 抗体或抗体片段可以是更大构建体的一部分,例如抗体片段与另外的区域的缀合物或融合构建体。例如,在一些实施方案中,抗体片段可以与如本文所述的Fc区融合。在其他实施方案中,抗体片段(例如,Fab或scFv)可以是嵌合抗原受体或嵌合T细胞受体的一部分,例如通过与跨膜结构域(任选地使用居间接头或"茎"(例如,铰链区))和任选的细胞间信号传导结构域融合。例如,抗体片段可以与T细胞受体的γ链和/或δ链融合,以提供结合

PD-L1的T细胞受体样构建体。在又一实施方案中,抗体片段是包含CD1或CD3结合结构域和接头的双特异性T细胞接合物(BiTE)的一部分。

[0032] “半胱氨酸突变抗体”是这样的抗体,在所述抗体中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。半胱氨酸突变抗体可以通过抗体工程化方法从亲本抗体制备(Junutula等人,(2008b)Nature Biotech.,26(8):925-932;Dornan等人(2009)Blood 114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;US2012/0121615;WO 2009/052249)。半胱氨酸残基通过工程化半胱氨酸位点处的反应性半胱氨酸硫醇基团提供佐剂(诸如TLR激动剂)与抗体的位点特异性缀合,但不会干扰免疫球蛋白折叠和装配或改变抗原结合和效应子功能。半胱氨酸突变抗体可以以一致的免疫缀合物化学计量与TLR激动剂-接头化合物缀合(例如,在具有单个工程化的突变半胱氨酸位点的抗体中有每抗体至多两个TLR激动剂部分)。TLR激动剂-接头化合物具有反应性亲电子基团以与半胱氨酸突变抗体的游离半胱氨酸硫醇基团特异性反应。

[0033] “表位”意指与抗原结合结构域结合的抗原的任何抗原决定簇或表位决定簇(即,在抗原结合结构域的互补位处)。抗原决定簇通常由分子的化学活性表面组群组成,如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0034] 术语“Fc受体”或“FcR”是指与抗体的Fc区结合的受体。Fc受体主要有三类:(1)与IgG结合的Fcγ R,(2)与IgA结合的FcαR,和(3)与IgE结合的FcεR。Fcγ R家族包括若干成员,如Fcγ I(CD64)、Fcγ RIIA(CD32A)、Fcγ RIIB(CD32B)、Fcγ RIIIA(CD16A)和Fcγ RIIIB(CD16B)。Fcγ 受体在其对IgG的亲和力方面不同,并且对IgG亚类(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)也具有不同的亲和力。

[0035] 如本文所用,短语“免疫检查点抑制剂”是指抑制免疫检查点分子的活性的任何调节剂。免疫检查点抑制剂可包括但不限于免疫检查点分子结合蛋白、小分子抑制剂、抗体(包括具有至少一个靶向免疫检查点蛋白的抗原结合区的双特异性和多特异性抗体,例如,不专门靶向免疫检查点蛋白的双特异性或多特异性抗体,以及作为双重免疫调节剂的抗体(同时靶向两个免疫调节靶点),这会导致抑制性靶标的阻断、抑制性细胞的耗尽和/或效应细胞的激活);靶向肿瘤的免疫调节剂(通过靶向肿瘤抗原和共刺激分子诸如CD40或4-1BB,指导对肿瘤浸润免疫细胞进行有效的共刺激);NK细胞重定向器(通过靶向肿瘤抗原和CD16A,将NK细胞重定向到恶性细胞);或T-细胞重定向器(通过靶向肿瘤抗原和CD3,将T细胞重定向至恶性细胞))、抗体衍生物(包括Fc融合体、Fab片段和scFv)、抗体-药物缀合物、反义寡核苷酸、siRNA、适体、肽和肽模拟物。

[0036] 如本文所提到的核酸或氨基酸序列“同一性”可通过将所关注的核酸或氨基酸序列与参考核酸或氨基酸序列进行比较来确定。同一性百分比是与所关注的最佳比对的序列与参考序列之间相同(即,是同一)的核苷酸或氨基酸残基数除以最长序列的长度(即,所关注的序列或参考序列任一者的长度,以较长者为准)。可以使用可获得的软件程序进行序列的比对和同一性百分比的计算。这类程序的示例包括CLUSTAL-W、T-Coffee和ALIGN(用于核酸和氨基酸序列的比对)、BLAST程序(例如,BLAST 2.1、BL2SEQ、BLASTp、BLASTn等)和FASTA程序(例如,FASTA3x、FASTM和SSEARCH)(用于序列比对和序列相似性搜索)。序列比对算法还公开于例如以下文献中:Altschul等人,J.Molecular Biol.,215(3):403-410(1990);Beigert等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,106(10):3770-3775(2009);Durbin等人编著,

Biological Sequence Analysis:Probalistic Models of Proteins and Nucleic Acids,Cambridge University Press,Cambridge,UK(2009);Soding,Bioinformatics,21(7):951-960(2005);Altschul等人,Nucleic Acids Res.,25(17):3389-3402(1997);和Gusfield,Algorithms on Strings,Trees and Sequences,Cambridge University Press,Cambridge UK(1997))。序列的同一性百分比(%)也可以例如计算为100×[(同一的位置)/min(TG_A,TG_B)],其中TG_A和TG_B是在使TG_A和TG_B最小化的比对中肽序列A和B中的残基数和内部缺口位置的总和。参见例如Russell等人,J.Mol Biol.,244:332-350(1994)。

[0037] 结合剂包含一起形成抗原结合位点的Ig重链和轻链可变区多肽。重链和轻链可变区中的每一者为包含通过框架区连接的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)。结合剂可以是本领域中已知的包含Ig重链和轻链的多种类型的结合剂中的任一种。例如,结合剂可以是抗体、结合抗原的抗体"片段"或T细胞受体。

[0038] "生物仿制药"是指已获批准的抗体构建体,其具有的活性性质类似于例如先前批准的靶向PD-L1的抗体构建体,诸如阿特珠单抗(TECENTRIQ™,Genentech,Inc.)、度伐利尤单抗(IMFINZI™,AstraZeneca)和阿维鲁单抗(BAVENCIO™,EMD Serono,Pfizer);先前批准的靶向HER2的抗体构建体,诸如曲妥珠单抗(HERCEPTIN™,Genentech,Inc.)和帕妥珠单抗(PERJETA™,Genentech,Inc.);或靶向CEA的抗体,诸如拉贝珠单抗(CEA-CIDETM、MN-14、hMN14、Immunomedics)CAS注册号219649-07-7)。

[0039] "改良型生物相似性药物(biobetter)"是指经批准的抗体构建体,其是对先前批准的抗体构建体(例如阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗和拉贝珠单抗)的改进。改良型生物相似性药物可相对于先前批准的抗体构建体具有一种或多种修饰(例如,改变的聚糖谱或独特的表位)。

[0040] "氨基酸"是指可以掺入肽、多肽或蛋白质中的任何单体单元。氨基酸包括天然存在的α-氨基酸及其立体异构体以及非天然(非天然存在的)氨基酸及其立体异构体。给定氨基酸的"立体异构体"是指具有相同分子式和分子内键但键和原子的三维排列不同的异构体(例如,L-氨基酸和相应的D-氨基酸)。氨基酸可以被糖基化(例如,N-连接的聚糖、O-连接的聚糖、磷酸聚糖、C-连接的聚糖或糖基磷脂酰肌醇化)或去糖基化。氨基酸在本文中可以用通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号表示。

[0041] 天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些以及后来经修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。天然存在的α-氨基酸包括但不限于丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu)、苯丙氨酸(Phe)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)、甲硫氨酸(Met)、天冬酰胺(Asn)、脯氨酸(Pro)、谷氨酰胺(Gln)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)及其组合。天然存在的α-氨基酸的立体异构体包括但不限于D-丙氨酸(D-Ala)、D-半胱氨酸(D-Cys)、D-天冬氨酸(D-Asp)、D-谷氨酸(D-Glu)、D-苯丙氨酸(D-Phe)、D-组氨酸(D-His)、D-异亮氨酸(D-Ile)、D-精氨酸(D-Arg)、D-赖氨酸(D-Lys)、D-亮氨酸(D-Leu)、D-甲硫氨酸(D-Met)、D-天冬酰胺(D-Asn)、D-脯氨酸(D-Pro)、D-谷氨酰胺(D-Gln)、D-丝氨酸(D-Ser)、D-苏氨酸(D-Thr)、D-缬氨酸(D-Val)、D-色氨酸(D-Trp)、D-酪氨酸(D-Tyr)及其组合。

[0042] 天然存在的氨基酸包括通过翻译后修饰在蛋白质中形成的那些,如瓜氨酸(Cit)。

[0043] 非天然(非天然存在的)氨基酸包括但不限于以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的L-或D-构型的氨基酸类似物、氨基酸模拟物、合成氨基酸、N-取代的甘氨酸和N-甲基氨基酸。例如,“氨基酸类似物”可以是具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即,与氢键合的碳、羧基、氨基)但具有修饰的侧链基团或修饰的肽主链的非天然氨基酸,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜和甲硫氨酸甲基锍。“氨基酸模拟物”是指具有这样的结构的化学化合物,所述结构不同于氨基酸的一般化学结构,但其以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用。

[0044] “接头”是指将化合物或材料中的两个或更多个部分共价键合的官能团。例如,连接部分可用来将免疫缀合物中的佐剂部分与抗体构建体共价键合。

[0045] “连接部分”是指将化合物或材料中的两个或更多个部分共价键合的官能团。例如,连接部分可用来将免疫缀合物中的佐剂部分与抗体共价键合。用于将连接部分与蛋白质及其它材料连接的有用的键包括但不限于酰胺、胺、酯、氨基甲酸酯、脲、硫醚、硫代氨基甲酸酯、硫代碳酸酯和硫脲。

[0046] “二价”是指含有用于连接两个官能团的两个连接点的化学部分;多价连接部分可具有用于连接进一步的官能团的另外的连接点。二价基团可以用后缀“二基”表示。例如,二价连接部分包括二价聚合物部分如二价聚(乙二醇)、二价环烷基、二价杂环烷基、二价芳基和二价杂芳基。“二价环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基”是指具有用于共价连接分子或材料中的两个部分的两个连接点的环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基。环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基可以是取代的或未取代的。环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0047] 波浪线(“ ”)表示特定化学部分的连接点。如果指定的化学部分存在有两条波浪线(“ ”),则应理解该化学部分可以双向使用,即从左到右或从右到左阅读。在一些实施方案中,存在有两条波浪线(“ ”)的特定部分被认为用作从左到右阅读。

[0048] “烷基”是指具有所示碳原子数的直链(straight/linear)或支链饱和脂肪族基团。烷基可包括任何数目的碳,例如一至十二个。烷基的示例包括但不限于甲基(Me,$-CH_3$)、乙基(Et,$-CH_2CH_3$)、1-丙基(n-Pr,正丙基,$-CH_2CH_2CH_3$),2-丙基(i-Pr,异丙基,$-CH(CH_3)_2$)、1-丁基(n-Bu,正丁基,$-CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-甲基-1-丙基(i-Bu,异丁基,$-CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基(s-Bu,仲丁基,$-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu,叔丁基,$-C(CH_3)_3$)、1-戊基(正戊基,$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-戊基($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-戊基($-CH(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-2-丁基($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-丁基($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$)、3-甲基-1-丁基($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$)、2-甲基-1-丁基($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)、1-己基($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-己基($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$)、3-己基($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$)、2-甲基-2-戊基($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-戊基($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$)、4-甲基-2-戊基($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$)、3-甲基-3-戊基($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-3-戊基($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$)、2,3-二甲基-2-丁基($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$)、3,3-二甲基-2-丁基($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$、1-庚基、1-辛基等。烷基可以是取代的或未取代的。“取代的烷基”可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、氧代(=O)、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0049] 术语“烷基二基”是指二价烷基。烷基二基的示例包括但不限于亚甲基($-CH_2-$)、亚

乙基(-CH_2CH_2-)、亚丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)等。烷基二基也可以被称为“亚烷基”。

[0050] “烯基”是指具有指示的碳原子数和至少一个碳-碳双键sp2的直链(线性)或支链不饱和脂族基团。烯基可包括两个至约12个或更多的碳原子。烯基是具有“顺式”和“反式”取向或替代而言“E”和“Z”取向的基团。示例包括但不限于乙烯基(ethylenyl/vinyl,-CH=CH_2)、烯丙基(-$CH_2CH=CH_2$)、丁烯基、戊烯基及其异构体。烯基基团可以是取代的或未取代的。“取代的烯基”可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、氧代(=O)、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0051] 术语“亚烯基”或“烯基二基”是指直链或支链二价烃基。示例包括但不限于亚乙烯基(ethylenylene/vinylene,-CH=CH-)、烯丙基(-$CH_2CH=CH$-)等。

[0052] “炔基”是指具有指示的碳原子数和至少一个碳-碳三键sp的直链(线性)或支链不饱和脂族基团。炔基可包括两个至约12个或更多的碳原子。例如,C_2-C_6炔基包括但不限于乙炔基(-C≡CH)、丙炔基(炔丙基,-CH_2C≡CH)、丁炔基、戊炔基、己炔基及其异构体。炔基可以是取代的或未取代的。“取代的炔基”可以被一个或多个选自卤代、羟基、氨基、氧代(=O)、烷基氨基、酰氨基、酰基、硝基、氰基和烷氧基的基团取代。

[0053] 术语“亚炔基”或“炔基二基”是指二价炔基。

[0054] 术语“碳环”、“碳环基”、“碳环状环”和“环烷基”是指饱和或部分不饱和的单环、稠合双环或桥接多环状环体系,其含有3至12个环原子,或所示原子数。饱和单环碳环状环包括例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环辛基。饱和双环和多环碳环状环包括例如降冰片烷、[2.2.2]双环辛烷、十氢萘和金刚烷。碳环基团也可以是部分不饱和的,在环中具有一个或多个双键或三键。部分不饱和的代表性碳环基团包括但不限于环丁烯、环戊烯、环己烯、环己二烯(1,3-异构体和1,4-异构体)、环庚烯、环庚二烯、环辛烯、环辛二烯(1,3-异构体、1,4-异构体和1,5-异构体)、降冰片烯和降冰片二烯。

[0055] 术语“环烷基二基”是指二价环烷基。

[0056] “芳基”是指通过从母体芳族环体系的单个碳原子上移除一个氢原子得到的6-20个碳原子(C_6-C_{20})的一价芳族烃基。芳基可以是单环的,稠合以形成双环或三环基团,或通过键连接以形成联芳基。代表性的芳基包括苯基、萘基和联苯基。其它芳基包括具有亚甲基连接基团的苄基。一些芳基具有6至12个环成员,如苯基、萘基或联苯基。其它芳基具有6至10个环成员,如苯基或萘基。

[0057] 术语“亚芳基”或“芳基二基”意指通过从母体芳族环体系的两个碳原子上移除两个氢原子得到的6-20个碳原子(C_6-C_{20})的二价芳族烃基。一些芳基二基在示例性结构中表示为“Ar”。芳基二基包括包含与饱和、部分不饱和的环或芳族碳环状环稠合的芳族环的双环基团。典型的芳基二基包括但不限于衍生自苯(苯基二基)、取代的苯、萘、蒽、亚联苯基、亚茚基、亚茚满基、1,2-二氢萘、1,2,3,4-四氢萘基等的基团。芳基二基基团也称为“亚芳基”,并且任选地被一个或多个本文所述的取代基取代。

[0058] 术语“杂环”、“杂环基”和“杂环状环”在本文中可互换使用,并且是指饱和或部分不饱和(即,在环内具有一个或多个双键和/或三键)的3至约20个环原子的碳环基团,其中至少一个环原子是选自氮、氧、磷和硫的杂原子,其余环原子是C,其中一个或多个环原子任选地被一个或多个下述取代基独立地取代。杂环可以是具有3至7个环成员(2至6个碳原子和1至4个选自N、O、P和S的杂原子)的单环或具有7至10个环成员(4至9个碳原子和1至6个选

自N、O、P和S的杂原子)的双环,例如:双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]体系。杂环描述于Paquette,Leo A.;“Principles of Modern Heterocyclic Chemistry”(W.A.Benjamin,New York,1968),特别是第1章、第3章、第4章、第6章、第7章和第9章;“The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A series of Monographs”(John Wiley&Sons,New York,1950至今),特别是第13卷、第14卷、第16卷、第19卷和第28卷;和J.Am.Chem.Soc.(1960)82:5566中。“杂环基”还包括其中杂环基团与饱和的、部分不饱和的环或芳族碳环或杂环环稠合的基团。杂环环的示例包括但不限于吗啉-4-基、哌啶-1-基、哌嗪基、哌嗪-4-基-2-酮、哌嗪-4-基-3-酮、吡咯烷-1-基、硫代吗啉-4-基、S-二氧代硫吗啉-4-基、氮杂环辛烷-1-基、氮杂环丁烷-1-基、八氢吡啶并[1,2-a]吡嗪-2-基、[1,4]二氮杂环庚烷-1-基、吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢哌喃基、二氢哌喃基、四氢噻喃基、哌啶基、吗啉基、硫吗啉基、噻烷基、哌嗪基、高哌嗪基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、高哌啶基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧氮杂环庚烷基、二氮杂环庚烷基、硫氮杂环庚烷基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氢吲哚基、2H-哌喃基、4H-哌喃基、二噁烷基、1,3-二氧戊环基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫戊环基、二氢哌喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡唑烷基咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂双环[3.1.0]己烷基、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷基、氮杂双环[2.2.2]己烷基、3H-吲哚基喹嗪基和N-吡啶基脲。螺杂环基部分也包括在此定义的范围内。螺杂环基部分的示例包括氮杂螺[2.5]辛烷基和氮杂螺[2.4]庚烷基。其中2个环原子被氧代(=O)部分取代的杂环基团的示例有嘧啶酮基和1,1-二氧代-硫代吗啉基。本文的杂环基团任选独立地被一个或多个本文所述的取代基取代。

[0059] 术语“杂环基二基”是指3至约20个环原子的二价饱和或部分不饱和(即,在环内具有一个或多个双键和/或三键)碳环基团,其中至少一个环原子是选自氮、氧、磷和硫的杂原子,剩余的环原子是C,其中一个或多个环原子任选独立地被一个或多个如所述的取代基取代。5元和6元杂环基二基的示例包括吗啉基二基、哌啶基二基、哌嗪基二基、吡咯烷基二基、二噁烷基二基、硫代吗啉基二基和S-二氧代硫代吗啉基二基。

[0060] 术语“杂芳基”是指5、6或7元环的单价芳族基团,并且包括5-20个原子的稠环体系(其中的至少一个是芳族的),含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。杂芳基的示例有吡啶基(包括例如2-羟基吡啶基)、咪唑基、咪唑并吡啶基、嘧啶基(包括例如4-羟基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噁唑基、噻唑基、噁二唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、四氢异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲嗪基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、噻二唑基、呋咱基、苯并呋咱基、苯并苯硫基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、萘啶基和呋喃并吡啶基。杂芳基任选独立地被一个或多个本文所述的取代基取代。

[0061] 术语“杂芳基二基”是指5、6或7元环的二价芳族基团,并且包括5-20个原子的稠环系(其中的至少一个稠环系是芳族的),所述稠环系含有一个或多个独立地选自氮、氧和硫的杂原子。5元和6元杂芳基二基的示例包括吡啶基二基、咪唑基二基、嘧啶基二基、吡唑基二基、三唑基二基、吡嗪基二基、四唑基二基、呋喃基二基、噻吩基二基、异噁唑基二基二基、噻唑基二基、噁二唑基二基、噁唑基二基、异噻唑基二基和吡咯基二基。

[0062] 杂环或杂芳基基团在可能的情况下可以是碳(碳连接)或氮(氮连接)键合的。举例

而非限制,碳键合的杂环或杂芳基键合在吡啶的2、3、4、5或6位;哒嗪的3、4、5或6位;嘧啶的2、4、5或6位;吡嗪的2、3、5或6位;呋喃、四氢呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的2、3、4或5位;噁唑、咪唑或噻唑的2、4或5位;异噁唑、吡唑或异噻唑的3、4或5位;氮丙啶的2或3位;氮杂环丁烷的2、3或4位;喹啉的2、3、4、5、6、7或8位;或异喹啉的1、3、4、5、6、7或8位。

[0063] 举例而非限制,氮键合的杂环或杂芳基键合在氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲唑的1位;异吲哚或异吲哚啉的2位;吗啉的4位;和咔唑或β-咔啉的9位。

[0064] 术语“卤代”和“卤素”本身或作为另一取代基的一部分是指氟、氯、溴或碘原子。

[0065] 术语“羰基”本身或作为另一取代基的一部分是指C(=O)或-C(=O)-,即碳原子与氧双键键合,并与具有羰基的部分中的两个其它基团结合。

[0066] 如本文所用,短语“季铵盐”是指已被烷基取代基(例如,C_1-C_4烷基,如甲基、乙基、丙基或丁基)季铵化的叔胺。

[0067] 术语“治疗(treat/treatment/treating)”是指成功治疗或改善损伤、病理、疾患(例如,癌症)或症状(例如,认知障碍)的任何标志,包括任何客观或主观参数,如减轻;缓解;减少症状或使患者更容易忍受症状、损伤、病理或疾患;降低症状进展的速率;减少症状或疾患的频率或持续时间;或者在一些情况下预防症状发作。症状的治疗或改善可基于任何客观或主观参数,包括例如身体检查的结果。

[0068] 术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”在本文中用于指这样的细胞,其表现出自主的、不受调控的生长,使得细胞表现出以细胞增殖显著失控为特征的异常生长表型。在本发明的上下文中用于检测、分析和/或治疗的所关注的细胞包括癌细胞(例如,来自患有癌症的个体的癌细胞)、恶性癌细胞、转移前癌细胞、转移性癌细胞和非转移性癌细胞。几乎每种组织的癌症都是已知的。短语“癌症负担”是指受试者体内的癌细胞数量或癌症体积。减少癌症负担相应地是指减少受试者体内的癌细胞数量或癌细胞体积。如本文所用的术语“癌细胞”是指是癌细胞(例如,来自个体可以被治疗的任何癌症,例如分离自患有癌症的个体)或来源于癌细胞(例如,癌细胞的克隆)的任何细胞。例如,癌细胞可来自已确立的癌细胞系,可以是分离自患有癌症的个体的原代细胞,可以是来自分离自患有癌症的个体的原代细胞的子代细胞等。在一些实施方案中,该术语也可以指癌细胞的一部分,如癌细胞的亚细胞部分、细胞膜部分或细胞裂解物。许多类型的癌症是本领域技术人员已知的,包括实体肿瘤如癌、肉瘤、成胶质细胞瘤、黑素瘤、淋巴瘤和骨髓瘤,以及循环癌如白血病。

[0069] 如本文所用,术语“癌症”包括任何形式的癌症,包括但不限于实体瘤癌症(例如,皮肤癌、肺癌、前列腺癌、乳腺癌、胃癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤、平滑肌肉瘤、头颈部鳞状细胞癌、黑素瘤和神经内分泌癌)和液体癌(例如,血液癌);癌;软组织肿瘤;肉瘤;畸胎瘤;黑素瘤;白血病;淋巴瘤;和脑癌,包括微小残留病,并且包括原发性肿瘤和转移性肿瘤两者。

[0070] “PD-L1表达”是指在细胞表面上具有PD-L1受体的细胞。如本文所用,“PD-L1过表达”是指与对应的非癌细胞相比具有更多PD-L1受体的细胞。

[0071] “HER2”是指蛋白质人表皮生长因子受体2。

[0072] “HER2表达”是指在细胞表面上具有HER2受体的细胞。例如,细胞可以具有在细胞

表面上的约20,000至约50,000个HER2受体。如本文所用,“HER2过表达”是指具有大于约50,000个HER2受体的细胞。例如,与对应的非癌细胞(例如,约1百万个或2百万个HER2受体)相比,细胞的HER2受体数量为2、5、10、100、1,000、10,000、100,000或1,000,000倍。估计HER2在约25%至约30%的乳腺癌中过表达。

[0073] “TROP2表达”是指在细胞表面上具有HER2受体的细胞。如本文所用,“TROP2表达”是指与对应的正常非癌细胞相比具有更多TROP2受体的细胞。据估计,TROP2在约74%的乳腺癌、72%的结直肠癌、和64%的肺癌以及其他器官类型的癌症中过表达。

[0074] 癌症的“病理学”包括损害患者健康的所有现象。这包括但不限于异常或不可控的细胞生长、转移、干扰邻近细胞的正常功能、以异常水平释放细胞因子或其它分泌产物、抑制或加重炎症或免疫反应、瘤形成、癌前病变、恶性肿瘤,以及侵袭周围或远处的组织或器官,如淋巴结。

[0075] 如本文所用,短语“癌症复发”和“肿瘤复发”及其语法变型是指肿瘤或癌细胞在癌症诊断后的进一步生长。特别地,当在癌组织中发生进一步的癌细胞生长时,可能发生了复发。类似地,“肿瘤扩散”发生在肿瘤细胞散布到局部或远处组织和器官时,因此,肿瘤扩散涵盖肿瘤转移。当肿瘤生长局部扩散以通过压迫、破坏或阻止正常器官功能损害受累组织的功能时,就会发生“肿瘤侵袭”。

[0076] 如本文所用,术语“转移”是指癌性肿瘤在器官或身体部位中的生长,其与原始癌性肿瘤的器官没有直接联系。转移将被理解为包括微转移,其是在与原始癌性肿瘤的器官没有直接联系的器官或身体部位中存在不可检测量的癌细胞。转移也可以被定义为过程的若干步骤,如癌细胞从原始肿瘤部位离开,以及癌细胞迁移和/或侵入身体的其它部位。

[0077] 短语“有效量”和“治疗有效量”是指诸如免疫缀合物的物质产生施用的治疗效果的剂量或量。确切的剂量将取决于治疗的目的,并且将可由本领域技术人员采用已知的技术确定(参见例如,Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms(第1-3卷,1992);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Pickar,Dosage Calculations(1999);Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第11版(McGraw-Hill,2006);和Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,(Pharmaceutical Press,London,2012))。在癌症的情况下,治疗有效量的免疫缀合物可减少癌细胞的数量;缩小肿瘤尺寸;抑制(即,在一定程度上减缓且优选停止)癌细胞向外周器官的浸润;抑制(即,在一定程度上减缓且优选停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。就免疫缀合物可以阻止现有癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度而言,其可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗,功效可以例如通过评定疾病进展时间(time to disease progression,TTP)和/或确定反应率(response rate,RR)来测量

[0078] “接受者”、“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”可互换使用,并且是指需要诊断、治疗或疗法的任何哺乳动物受试者(例如,人)。用于治疗目的的“哺乳动物”是指被归类为哺乳动物的任何动物,包括人、家养动物和农场动物以及动物园动物、赛场动物或宠物动物,如狗、马、猫、母牛、绵羊、山羊、猪、骆驼等。在某些实施方案中,哺乳动物是人。

[0079] 本发明的上下文中的短语“协同佐剂”或“协同组合”包括两种免疫调节剂的组合,如受体激动剂、细胞因子和佐剂多肽,其组合相对于任一者的单独施用引发免疫的协同效

应。特别地,本文公开的免疫缀合物包含要求保护的佐剂和抗体构建体的协同组合。这些协同组合在施用后引发更大的免疫效应,例如相对于不存在其它部分的情况下施用抗体构建体或佐剂。进一步地,与单独施用抗体构建体或佐剂时相比,可以施用的免疫缀合物的量减少(如通过作为免疫缀合物的一部分施用的抗体构建体的总数量或佐剂的总数量来测量)。

[0080] 如本文所用,术语"施用"是指对受试者进行肠胃外、静脉内、腹膜内、肌内、肿瘤内、病灶内、鼻内或皮下施用、口服施用、作为栓剂施用、局部接触、鞘内施用或植入缓释装置,例如微型渗透泵。

[0081] 如本文用于修饰数值的术语"约"和"大约"表示围绕该数值的紧密范围。因此,如果"X"是所述值,则"约X"或"大约X"表示0.9X至1.1X的值,例如0.95X至1.05X或0.99X至1.01X。提到"约X"或"大约X"具体表示至少值X、0.95X、0.96X、0.97X、0.98X、0.99X、1.01X、1.02X、1.03X、1.04X和1.05X。因此,"约X"和"大约X"旨在教导和提供对例如"0.98X"的权利要求限制的书面描述支持。

[0082] 抗体

[0083] 本发明的免疫缀合物包含抗体。本发明的实施方案的范围包括本文所述的抗体构建体或抗原结合结构域的功能变体。如本文所用的术语"功能变体"是指具有与亲本抗体构建体或抗原结合结构域具有实质或显著序列同一性或相似性的抗原结合结构域的抗体构建体,所述功能变体保留了其作为变体的抗体构建体或抗原结合结构域的生物活性。功能变体涵盖例如本文所述的抗体构建体或抗原结合结构域(亲本抗体构建体或抗原结合结构域)的那些变体,所述变体保留以与亲本抗体构建体或抗原结合结构域相似程度、相同程度或相比较高程度地识别表达PD-L1、HER2、CEA或TROP2的靶细胞的能力。

[0084] 关于抗体构建体或抗原结合结构域,功能变体与所述抗体构建体或抗原结合结构域在氨基酸序列上可以例如是至少约30%、约50%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多同一的。

[0085] 功能变体可例如包含具有至少一个保守氨基酸取代的亲本抗体构建体或抗原结合结构域的氨基酸序列。替代地或另外地,功能变体可包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本抗体构建体或抗原结合结构域的氨基酸序列。在这种情况下,优选非保守氨基酸取代不干扰或抑制功能变体的生物活性。非保守氨基酸取代可增强功能变体的生物学活性,使得与亲本抗体构建体或抗原结合结构域相比,功能变体的生物学活性增加。

[0086] 本发明的抗体构建体或抗原结合结构域的氨基酸取代优选是保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是本领域中已知的,并且包括这样的氨基酸取代,其中具有某些物理和/或化学特性的氨基酸被交换为具有相同或相似化学或物理特性的另一种氨基酸。例如,保守氨基酸取代可以是酸性/带负电荷的极性氨基酸取代为另一种酸性/带负电荷的极性氨基酸(例如,Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸取代为另一种具有非极性侧链的氨基酸(例如,Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Cys、Val等)、碱性/带正电荷的极性氨基酸取代为另一种碱性/带正电荷的极性氨基酸(例如,Lys、His、Arg等)、具有极性侧链的不带电荷的氨基酸取代为另一种具有极性侧链的不带电荷的氨基酸(例如,Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr等)、具有β-支链侧链的氨基酸取代为另一种具有β-支链侧链的氨基酸(例如,Ile、Thr和Val)、具有芳族侧链的氨基酸取代为另一种具有芳族侧链的氨基酸(例如,His、Phe、Trp和Tyr)等。

[0087] 抗体构建体或抗原结合结构域可基本上由本文所述的一个或多个指定氨基酸序列组成,使得其它组分(例如,其它氨基酸)不实质性改变抗体构建体或抗原结合结构域功能变体的生物活性。

[0088] 在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体含有经修饰的Fc区,其中所述修饰调节Fc区与一种或多种Fc受体的结合。

[0089] 在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体(例如,与至少两个佐剂部分缀合的抗体)在Fc区含有一个或多个修饰(例如,氨基酸插入、缺失和/或取代),与Fc区中缺乏突变的天然抗体相比,所述一个或多个修饰导致与一种或多种Fc受体(例如,Fcγ RI(CD64)、Fcγ RIIA(CD32A)、Fcγ RIIB(CD32B)、Fcγ RIIIA(CD16a)和/或Fcγ RIIIB(CD16b))的结合受到调节(例如,增加的结合或减少的结合)。在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体在Fc区含有减少抗体的Fc区与Fcγ RIIB的结合的一个或多个修饰(例如,氨基酸插入、缺失和/或取代)。在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体在抗体的Fc区中含有一个或多个修饰(例如,氨基酸插入、缺失和/或取代),其减少抗体与Fcγ RIIB的结合,同时与在Fc区中缺乏突变的天然抗体相比维持与Fcγ RI(CD64)、Fcγ RIIA(CD32A)和/或FcRγ IIIA(CD16a)相同的结合或与之结合增加。在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体在Fc区中含有增加抗体的Fc区与Fcγ RIIB的结合的一个或多个修饰。

[0090] 在一些实施方案中,通过抗体的Fc区中相对于抗体的天然Fc区的突变提供受调节的结合。突变可以在CH2结构域、CH3结构域或其组合中。“天然Fc区”与“野生型Fc区”同义,并且包含与见于自然界中的Fc区的氨基酸序列同一或与见于天然抗体(例如,西妥昔单抗)中的Fc区的氨基酸序列同一的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区、天然序列人IgG2 Fc区、天然序列人IgG3 Fc区和天然序列人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。天然序列Fc包括Fc的各种同种异型(Jefferis等人,(2009)mAbs,1(4):332-338)。

[0091] 在一些实施方案中,Fc区中导致与一种或多种Fc受体的结合受到调节的突变可包括以下突变中的一者或多者:SD(S239D)、SDIE(S239D/I332E)、SE(S267E)、SELF(S267E/L328F)、SDIE(S239D/I332E)、SDIEAL(S239D/I332E/A330L)、GA(G236A)、ALIE(A330L/I332E)、GASDALIE(G236A/S239D/A330L/I332E)、V9(G237D/P238D/P271G/A330R)和V11(G237D/P238D/H268D/P271G/A330R),和/或在以下氨基酸处的一个或多个突变:E233、G237、P238、H268、P271、L328和A330。用于调节Fc受体结合的另外的Fc区修饰描述于例如US2016/0145350以及US 7416726和US 5624821中,上述专利文献特此以引用的方式全文并入。

[0092] 在一些实施方案中,免疫缀合物的抗体的Fc区被修饰以具有与天然未修饰的Fc区相比改变的Fc区糖基化模式。

[0093] 人免疫球蛋白在每条重链的Cγ2结构域中的Asn297残基处被糖基化。这种N-连接的寡糖由核心七糖N-乙酰葡糖胺4甘露糖3(GlcNAc4Man3)组成。已知用内切糖苷酶或PNG酶F移除七糖导致抗体Fc区的构象变化,这可显著降低与激活Fcγ R的抗体结合亲和力,并导致效应子功能降低。核心七糖通常用半乳糖、二等分GlcNAc、岩藻糖或唾液酸修饰,这会有差别地影响Fc与激活和抑制性Fcγ R的结合。另外,已证明α2,6-唾液酸化增强体内抗炎活性,而去岩藻糖基化导致Fcγ RIIIa结合改善,并使抗体依赖性细胞毒性和抗体依赖性吞噬作用增加10倍。特定的糖基化模式因此可用于控制炎症效应子功能。

[0094] 在一些实施方案中,改变糖基化模式的修饰是突变。例如,在Asn297处的取代。在一些实施方案中,Asn297突变为谷氨酰胺(N297Q)。在例如美国专利7,416,726以及美国专利申请公布2007/0014795和2008/0286819中描述了用调节Fcγ R调控的信号传导的抗体来控制免疫反应的方法,上述专利文献特此以引用的方式全文并入。

[0095] 在一些实施方案中,免疫缀合物的抗体被修饰成以非天然存在的糖基化模式含有工程化Fab区。例如,可以对杂交瘤进行基因工程化以分泌具有特定突变的无岩藻糖基化mAb、去唾液酸化mAb或去糖基化Fc,所述特定突变使得能够增加FcRγ IIIa结合和效应子功能。在一些实施方案中,免疫缀合物的抗体被工程化为无岩藻糖基化的。

[0096] 在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体的整个Fc区与不同的Fc区交换,从而使抗体的Fab区与非天然Fc区缀合。例如,西妥昔单抗的Fab区通常包含IgG1 Fc区,可以与IgG2、IgG3、IgG4或IgA缀合,或者纳武单抗的Fab区通常包含IgG4 Fc区,可以与IgG1、IgG2、IgG3、IgA1或IgG2缀合。在一些实施方案中,具有非天然Fc结构域的Fc修饰的抗体还包含一个或多个氨基酸修饰,如IgG4 Fc内的S228P突变,其调节所述Fc结构域的稳定性。在一些实施方案中,具有非天然Fc结构域的Fc修饰的抗体还包含一个或多个本文所述的调节Fc与FcR结合的氨基酸修饰。

[0097] 在一些实施方案中,当与天然未修饰的抗体相比时,调节Fc区与FcR结合的修饰不改变抗体的Fab区与其抗原的结合。在其他实施方案中,与天然未修饰的抗体相比,调节Fc区与FcR结合的修饰还增加抗体的Fab区与其抗原的结合。

[0098] 在示例性实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗体构建体,所述抗体构建体包含特异性识别和结合PD-L1的抗原结合结构域。

[0099] 程序性死亡配体1(PD-L1、分化簇274、CD274、B7-同源物1、或B7-H1)属于B7蛋白超家族,并且是程序性细胞死亡蛋白1(PD-1、PDCD1、分化簇279、或CD279)的配体。PD-L1还可以与B7.1(CD80)相互作用,并且这种相互作用被认为抑制T细胞启动。PD-L1/PD-1轴在抑制适应性免疫反应中发挥着重要作用。更具体地,据信PD-L1与其受体PD-1的接合会递送抑制T细胞的活化和增殖的信号。与PD-L1结合并阻止配体与PD-1受体结合的试剂防止这种免疫抑制,并且因此可以在需要时增强免疫应答,诸如用于治疗癌症或感染。PD-L1/PD-1途径也有助于预防自体免疫,并且因此针对PD-L1的激动剂或递送免疫抑制有效负载的试剂可能有助于治疗自身免疫性疾患。

[0100] 几种靶向PD-L1的抗体已被开发用于治疗癌症,包括阿特朱单抗(TECENTRIQ™)、度伐利尤单抗(IMFINZI™)和阿维鲁单抗(BAVENCIO™)。然而,仍然需要新的PD-L1结合剂,包括以高亲和力结合PD-L1并有效阻止PD-L1/PD-1信号传导的剂,以及可以将治疗有效负载递送至表达PD-L1的细胞的剂。此外,需要新的PD-L1结合剂来治疗自身免疫性疾患和感染。

[0101] 提供了将TLR激动剂、2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓有效负载递送至表达PD-L1的细胞的方法,所述方法包括向所述细胞或包含所述细胞的哺乳动物施用免疫缀合物,所述免疫缀合物包含共价连接至接头的抗PD-L1抗体,所述接头共价连接至一个或多个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分。

[0102] 还提供了一种用于增强或降低或抑制哺乳动物中的免疫应答的方法,以及一种用于治疗哺乳动物中对PD-L1抑制有响应的疾病、疾患或病症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用PD-L1免疫缀合物。

[0103] 本发明提供了一种PD-L1抗体,所述PD-L1抗体包含免疫球蛋白重链可变区多肽和免疫球蛋白轻链可变区多肽。所述PD-L1抗体特异性结合PD-L1。所述抗体的结合特异性允许靶向表达PD-L1的细胞,例如,以将治疗有效负载递送至此类细胞。在一些实施方案中,所述PD-L1抗体结合人PD-L1。然而,还涵盖结合任何PD-L1片段、同源物或旁系同源物的抗体。

[0104] 在一些实施方案中,所述PD-L1抗体结合PD-L1,而基本上不抑制或阻止PD-L1与其受体PD-1结合。然而,在其他实施方案中,PD-L1抗体可以完全或部分地阻断(抑制或阻止)PD-L1与其受体PD-1的结合,使得该抗体可用于抑制PD-L1/PD-1信号传导(例如,用于治疗目的)。所述抗体或抗原结合抗体片段可以是对PD-L1单特异性的,或者可以是双特异性的或多特异性的。例如,在二价或多价抗体或抗体片段中,结合结构域可以是不同的,靶向相同抗原的不同表位或靶向不同抗原。构建多价结合构建体的方法是本领域中已知的。双特异性和多特异性抗体是本领域中已知的。此外,可以提供双体抗体、三体抗体或四体抗体,所述双体抗体、三体抗体或四体抗体是多肽链的二聚体、三聚体或四聚体,各自包含通过肽接头连接至V_L的V_H,所述肽接头太短以至于不允许在同一多肽链上V_H与V_L之间配对,从而驱动不同V_H-V_L多肽链上的互补结构域之间的配对,以生成具有两个、三个或四个功能性抗原结合位点的多聚体分子。此外,可以生成作为具有两个不同可变结构域的小scFv片段的双scFv片段,以产生能够结合两个不同表位的双特异性双scFv片段。Fab二聚体(Fab2)和Fab三聚体(Fab3)可以使用遗传工程方法产生,以创建基于Fab片段的多特异性构建体。

[0105] 所述PD-L1抗体可以是人抗体、非人抗体、人源化抗体或嵌合抗体或对应的抗体片段,或者可以从人抗体、非人抗体、人源化抗体或嵌合抗体或对应的抗体片段获得。“嵌合”抗体是通常包含人恒定区和非人可变区的抗体或其片段。“人源化”抗体是通常包含人抗体支架但在至少一个CDR(例如,1个、2个、3个、4个、5个或所有六个CDR)中具有非人来源氨基酸或序列的单克隆抗体。

[0106] PD-L1抗体可以是内化的,如在WO 2021/150701中所述并以引用方式并入本文,或者PD-L1抗体可以是非内化的,如在WO 2021/150702中所述并以引用方式并入本文。

[0107] 在示例性实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗体构建体,所述抗体构建体包含特异性识别和结合HER2的抗原结合结构域。

[0108] 许多抗HER2单克隆抗体已获得批准并正在进行临床开发(Costa,RLB等人(2020)Breast Cancer 6(10):1-11。

[0109] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗HER2抗体,诸如通过实施例201的方法制备的那些抗体。在本发明的一个实施方案中,本发明的免疫缀合物的抗HER2抗体包括人源化抗HER2抗体,例如huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7和huMAb4D5-8,如在US 5821337的表3中所述,该专利以引用方式具体并入本文。这些抗体含有人框架区和与HER2结合的鼠抗体(4D5)的互补决定区。人源化抗体huMAb4D5-8也称为曲妥珠单抗,其以商品名HERCEPTIN™(Genentech,Inc.)商购可得。

[0110] 曲妥珠单抗(CAS180288-69-1,HERCEPTIN®,huMAb4D5-8,rhuMAb HER2,Genentech)是一种重组DNA来源的IgG1κ单克隆抗体,其是鼠抗HER2抗体(4D5)的人源化形式,在基于细胞的测定中以高亲和力(Kd=5nM)与HER2的胞外结构域选择性结合(US 5677171;US 5821337;US 6054297;US 6165464;US 6339142;US 6407213;US 6639055;US

6719971;US 6800738;US 7074404;Coussens等人(1985)Science 230:1132-9;Slamon等人(1989)Science244:707-12;Slamon等人(2001)New Engl.J.Med.344:783-792)。

[0111] 在本发明的实施方案中,抗体构建体或抗原结合结构域包含曲妥珠单抗的CDR区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体还包含曲妥珠单抗的框架区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体还包含曲妥珠单抗的一个或两个可变区。

[0112] 在本发明的另一实施方案中,本发明的免疫缀合物的抗HER2抗体包括人源化抗HER2抗体,例如人源化2C4,如US 7862817中所述。示例性人源化2C4抗体有帕妥珠单抗(CAS登记号380610-27-5)、PERJETA™(Genentech,Inc.)。帕妥珠单抗是一种HER二聚化抑制剂(HDI),并且用于抑制HER2与其它HER受体(如EGFR/HER1、HER2、HER3和HER4)形成活性异二聚体或同二聚体的能力。参见例如Harari和Yarden,Oncogene 19:6102-14(2000);Yarden和Sliwkowski.Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37(2001);Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9(2003);Cho等人,Nature 421:756-60(2003);和Malik等人,Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7(2003)。PERJETA™被批准用于治疗乳腺癌。

[0113] 在本发明的实施方案中,抗体构建体或抗原结合结构域包含帕妥珠单抗的CDR区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体还包含帕妥珠单抗的框架区。在本发明的实施方案中,抗HER2抗体进一步包含帕妥珠单抗的一个或两个可变区。

[0114] 玛格妥昔单抗(MGAH22,MARGENZA™,MacroGenics,Inc.),CAS注册号1350624-75-7,是FDA批准的抗HER2单克隆抗体。玛格妥昔单抗的Fc区经优化以增加与激活Fc γ R的结合,但减少与免疫效应细胞上的抑制性Fc. γ .R的结合(Nordstrom,JL等人(2011)Breast Cancer Res.13(6):R123;Rugo,HS等人(2021)JAMA Oncol.;7(4):573-584;Markham,A.(2021)Drugs 81:599-604)。玛格妥昔单抗被FDA批准用于治疗患有复发或难治性晚期乳腺癌的患者,所述患者的肿瘤表达通过免疫组织化学检测的2+水平的HER2,并且通过FIS H检测缺乏HER2基因扩增的证据。

[0115] HT-19是另一种抗HER2单克隆抗体,其与人HER2中不同于曲妥珠单抗或帕妥珠单抗的表位的表位结合。HT-19显示为可与曲妥珠单抗相媲美地抑制HER2信号传导,并且与曲妥珠单抗和帕妥珠单抗联合增强HER2降解。XMT-1522是包含HT-19抗体的抗体-药物缀合物(Bergstrom D.A.等人,(2015)Cancer Res.;75:LB-231)。

[0116] 在示例性实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗体构建体,所述抗体构建体包含特异性识别和结合CEA的抗原结合结构域。癌胚抗原相关的细胞粘附分子5(CEACAM5)也被称为CD66e(分化簇66e),是癌胚抗原(CEA)基因家族的成员。

[0117] 癌胚抗原(CEA、CD66e、CEACAM5)的表达升高已经牵涉到肿瘤形成的多种生物学方面,尤其是肿瘤细胞粘附、转移、细胞免疫机制的阻断、和具有抗凋亡功能。CEA是细胞表面抗原,并且也被用作许多癌的血液标志物。拉贝珠单抗(CEA-CIDETM,Immunomedics,CAS注册号219649-07-7),也被称为MN-14和hMN14,是一种人源化IgG1单克隆抗体并且已被研究用于治疗结直肠癌(Blumenthal,R.等人(2005)Cancer Immunology Immunotherapy 54(4):315-327)。与喜树碱类似物缀合的拉贝珠单抗(戈维替康拉贝珠单抗,IMMU-130)靶向CEA,并且正在患有复发性或难治性转移性结直肠癌的患者中进行研究(Sharkey,R.等人,(2018),Molecular Cancer Therapeutics17(1):196-203;Dotan,E.等人,(2017),Journal of Clinical Oncology35(9):3338-3346)。还有,已经在临床试验中评估了与^{131}I缀合的拉

贝珠单抗用于治疗结肠癌及其他实体恶性肿瘤(Sharkey,R.等人,(1995),Cancer Research(增刊)55(23):5935s-5945s;Liersch,T.等人(2005),Journal of Clinical Oncology 23(27):6763-6770;Sahlmann,C.-O.等人(2017),Cancer 123(4):638-649)。

[0118] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含如US 6676924中公开的hMN-14/拉贝珠单抗SEQ ID NO.1的可变轻链(VLκ),该专利文献出于此目的以引用的方式并入本文。

[0119] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKPGKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIK SEQ ID NO.1

[0120] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hMN-14/拉贝珠单抗SEQ ID NO.2至SEQ ID NO.8(US 6676924)的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:1)。

[0121]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	2
CDR-L1	KASQDVGTSVA	24-34	11	3
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15	4
CDR-L2	WTSTRHT	50-56	7	5
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC	57-88	32	6
CDR-L3	QQYSLYRS	89-96	8	7
LFR4	FGQGTKVEIK	97-106	10	8

[0122] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含如US 6676924中公开的hMN-14/拉贝珠单抗SEQ ID NO.9的可变重链(VH),该专利文献出于此目的以引用的方式并入本文。

[0123] EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFDFTTYWMSWVRQAPGKGLEWVAEIHPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPVTVSS SEQ ID NO.9

[0124] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hMN-14/拉贝珠单抗SEQ ID NO.10至SEQ ID NO.16(US 6676924)的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:9)。

[0125]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSSSGFDFT	1-30	30	10
CDR-H1	TYWMS	31-35	5	11
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	14	12
CDR-H2	EIHPDSSTINYAPSLKD	50-66	17	13
HFR3	RFTISRDNSKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCAS	67-98	32	14
CDR-H3	LYFGFPWFAY	99-108	10	15
HFR4	WGQGTPVTVSS	109-119	11	16

[0126] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含如US 8642742中公开的hPR1A3 SEQ ID NO.17的可变轻链(VLκ),该专利文献出于此目的以引用

的方式并入本文。

[0127] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPG KAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQYYTYPLFTFGQGTKLEIK SEQ ID NO.17

[0128] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hPR1A3 SEQ ID NO.18至SEQ ID NO.24(US 8642742)的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:17)。

[0129]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	18
CDR-L1	KASAAVGTYVA	24-34	11	19
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	35-49	15	20
CDR-L2	SASYRKR	50-56	7	21
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYC	57-88	32	22
CDR-L3	HQYYTYPLFT	89-98	10	23
LFR4	FGQGTKLEIK	99-108	10	24

[0130] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hPR1A3 SEQ ID NO.25至SEQ ID NO.31(US 8642742)的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:130)。

[0131]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFT	1-30	30	25
CDR-H1	EFGMN	31-35	5	26
HFR2	WVRQAPGQGLEWMG	36-49	14	27
CDR-H2	WINTKTGEATYVEEFKG	50-66	17	28
HFR3	RVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCAR	67-98	32	29
CDR-H3	WDFAYYVEAMDY	99-110	12	30
HFR4	WGQGTTVTVSS	111-121	11	31

[0132] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含如US 7232888中公开的hMFE-23SEQ ID NO.32的可变轻链(VLκ),该专利文献出于此目的以引用的方式并入本文。

[0133] ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIACSASSSVSYMHWFQQKPGK SPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSG TDYSLTISSMQPEDAATYYC QQRSSYPLTFGGGTKLEIK SEQ ID NO.32

[0134] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hMFE-23SEQ ID NO.33至SEQ ID NO.40(US 7232888)的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列。所述实施方案包括LFR1的两种变体SEQ ID NO.:33和SEQ ID NO.:34(按出现顺序分别公开为SEQ ID NO 32和SEQ ID NO 172的全长序列)。

[0135]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSASVGDRVNIAC	1-23	23	33
LFR1	EIVLTQSPSSMSASVGDRVNIAC	1-23	23	34
CDR-L1	SASSSVSYMH	24-33	10	35
LFR2	WFQQKPGKSPKLWIY	34-48	15	36
CDR-L2	STSNLAS	49-55	7	37
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSMQ PEDAATYYC	56-87	32	38
CDR-L3	QQRSSYPLT	88-96	9	39

[0136]

LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	40

[0137] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含hMFE-23SEQ ID NO.41的可变重链(VH)(US 7232888)。

[0138] QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQGPGQRLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKA TFTTDTSANTAYLGLSSLRPEDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS SEQ ID NO.41

[0139] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hMFE-23SEQ ID NO.42至SEQ ID NO.49(US 7232888)的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列。所述实施方案包括HFR1的两种变体SEQ ID NO.:42和SEQ ID NO.:43(按出现顺序分别公开为SEQ ID NO 41和SEQ ID NO 173的全长序列)。

[0140]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKAS GFNIK	1-30	30	42
HFR1	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKAS GFNIK	1-30	30	43
CDR-H1	DSYMH	31-35	5	44
HFR2	WLRQGPGQRLEWIG	36-49	14	45
CDR-H2	WIDPENGDTEYAPKFQG	50-66	17	46
HFR3	KATFTTDTSANTAYLGLSSLRPEDTA VYYCNE	67-98	32	47
CDR-H3	GTPTGPYYFDY	99-109	11	48
HFR4	WGQGTLVTVSS	110-120	11	49

[0141] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含SM3E SEQ ID NO.50的可变轻链(VLκ)(US 7232888)。

[0142] ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIACSASSSVPYMHWLQQKPGKSPKLLIYLTSNLASGVPSRFSGSGSGT DYSLTISSVQPEDAATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK SEQ ID NO.50

[0143] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含SM3E SEQ ID NO.51至SEQ ID NO.56和SEQ ID NO.38至SEQ ID NO.39(US 7232888)的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列。所述实施方案包括LFR1的两种变体SEQ ID NO.:51和SEQ

ID NO.:52(按出现顺序分别公开为SEQ ID NO 50和SEQ ID NO 174的全长序列)。

[0144]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIAC	1-23	23	51
LFR1	EIVLTQSPSSMSVSVGDRVTIAC	1-23	23	52
CDR-L1	SASSSVPYMH	24-33	10	53
LFR2	WLQQKPGKSPKLLIY	34-48	15	54
CDR-L2	LTSNLAS	49-55	7	55
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISSVQPEDAATYYC	56-87	32	56
CDR-L3	QQRSSYPLT	88-96	9	39
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	40

[0145] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含NP-4/阿西莫单抗SEQ ID NO.57的可变轻链

[0146] QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVTYIHWYQQKPGSSP KSWIYATSNLASGVPARFSGSGSG TSYSLTISRVEAEDAATYYCQ HWSSKPPTFGGGTKLEIK SEQ ID NO.57

[0147] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含NP-4/阿西莫单抗SEQ ID NO.58至SEQ ID NO.64的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:57)。

[0148]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	QTVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	1-23	23	58
CDR-L1	RASSSVTYIH	24-33	10	59
LFR2	WYQQKPGSSPKSWIY	34-48	15	60
CDR-L2	ATSNLAS	49-55	7	61

[0149]

LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	56-87	32	62
CDR-L3	QHWSSKPPT	88-96	9	63
LFR4	FGGGTKLEIK	97-106	10	64

[0150] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含NP-4/阿西莫单抗SEQ ID NO.65的可变重链(VH)。

[0151] EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYYMNWVRQPPGKALEWLGFIGNKANGYTTEYSASVKG RFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTLTVSS SEQ ID NO.65.

[0152] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含NP-4SEQ ID NO.66至SEQ ID NO.72的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:65)。

[0153]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFT	1-30	30	66
CDR-H1	DYYMN	31-35	5	67
HFR2	WVRQPPGKALEWLG	36-49	14	68
CDR-H2	FIGNKANGYTTEYSASVKG	50-68	19	69
HFR3	RFTISRDKSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCTR	69-100	32	70
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	71
HFR4	WGQGTTLTVSS	111-121	11	72

[0154] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含如US 7776330中公开的M5A/hT84.66 SEQ ID NO.73的可变轻链(VLκ),该专利文献出于此目的以引用的方式并入本文。

[0155] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNEDPYTFGQGTKVEIK SEQ ID NO.73

[0156] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含M5A/hT84.66 SEQ ID NO.74至SEQ ID NO.80(US 7776330)的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:73)。

[0157]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC	1-23	23	74
CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	24-38	15	75
LFR2	WYQQKPGKAPKLLIY	39-53	15	76
CDR-L2	RASNLES	54-60	7	77
LFR3	GVPSRFSGSGSRTDFTLTISSLQPEDFATYYC	61-92	32	78
CDR-L3	QQTNEDPYT	93-101	9	79
LFR4	FGQGTKVEIK	102-111	10	80

[0158] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含M5A/hT84.66 SEQ ID NO.81的可变重链(VH)(US 7776330)。

[0159] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYMHWVRQAPGKGLEWVARIDPANGNSKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS SEQ ID NO.81

[0160] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含M5A/hT84.66 SEQ ID NO.82至SEQ ID NO.88(US 7776330)的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:81)。

[0161]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNIK	1-30	30	82
CDR-H1	DTYMH	31-35	5	83
HFR2	WVRQAPGKGLEWVA	36-49	14	84
CDR-H2	RIDPANGNSKYADSVKG	50-66	17	85

[0162]

HFR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCAP	67-98	32	86
CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	99-110	12	87
HFR4	WGQGTLVTVSS	111-121	11	88

[0163] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含如US 9617345中公开的hAb2-3 SEQ ID NO.89的可变轻链(VLκ),该专利文献出于此目的以引用的方式并入本文。

[0164] DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCRASENIFSYLAWYQQKPGK SPKLLVYNTRTLAEGVPSRFSGSGS GTDFSLTISSLQPEDFATYYC QHHYGTPFTFGSGTKLEIK SEQ ID NO.89

[0165] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hAb2-3 SEQ ID NO.90至SEQ ID NO.96(US 9617345)的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:89)。

[0166]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC	1-23	23	90
CDR-L1	RASENIFSYLA	24-34	11	91
LFR2	WYQQKPGKSPKLLVY	35-49	15	92
CDR-L2	NTRTLAE	50-56	7	93
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDF ATYYC	57-88	32	94
CDR-L3	QHHYGTPFT	89-97	9	95
LFR4	FGSGTKLEIK	98-107	10	96

[0167] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含SEQ ID NO.97的可变重链(VH)(US 9617345)。

[0168] EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASGFVFSSYDMSWVRQTPE RGLEWVAYISSGGGITYAPSTVKGR FTVSRDNAKNTLYLQMNSLT SEDTAVYYCAAHYFGSSGPFAYWGQGTLVTVSS SEQ ID NO.97

[0169] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含hAb2-3 SEQ ID NO.98至SEQ ID NO.104的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:97)。

[0170]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLQESGPGLVKPGGSLSLSCAASG FVFS	1-30	30	98
CDR-H1	SYDMS	31-35	5	99
HFR2	WVRQTPERGLEWVA	36-49	14	100
CDR-H2	YISSGGGITYAPSTVKG	50-66	17	101
HFR3	RFTVSRDNAKNTLYLQMNSLTSEDT AVYYCAA	67-98	32	102
CDR-H3	HYFGSSGPFAY	99-109	11	103
HFR4	WGQGTLVTVSS	110-120	11	104

[0171] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含如US 9982063中公开的A240VL-B9VH/AMG-211SEQ ID NO.105的可变轻链(VLκ),该专利文献出于此目的以引用的方式并入本文。

[0172] QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRRGINVGAYSIYWYQQKP GSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVSSR FSASKDASANAGILLISGLQS EDEADYYCMIWHSGASAVFGGGTKLTVL SEQ ID NO.105

[0173] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含A240VL-B9VH/AMG-211SEQ ID NO.106至SEQ ID NO.112(US 9982063)的轻链CDR(互补决定区)或轻链构架(LFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:105)。

[0174]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
LFR1	QAVLTQPASLSASPGASASLTC	1-22	22	106
CDR-L1	TLRRGINVGAYSIY	23-36	14	107
LFR2	WYQQKPGSPPQYLLR	37-51	15	108
CDR-L2	YKSDSDKQQGS	52-62	11	109
LFR3	GVSSRFSASKDASANAGILLISGLQSE DEADYYC	63-96	34	110
CDR-L3	MIWHSGASAV	97-106	10	111

[0175]

LFR4	FGGGTKLTVL	107-116	10	112

[0176] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含B9VH SEQ ID NO.113的可变重链(VH)(US 9982063)。

[0177] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFIRNKANGGTTEYAASVKG RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS SEQ ID NO.113

[0178] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含SEQ ID NO.114至SEQ ID NO.121(US 9982063)的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列。所述实施方案包括CDR-H2的两种变体SEQ ID NO.:117和SEQ ID NO.:118(按出现顺序分别公开为SEQ ID NO 113和SEQ ID NO 175的全长序列)。

[0179]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVS	1-30	30	114
CDR-H1	SYWMH	31-35	5	115
HFR2	WVRQAPGKGLEWVG	36-49	14	116
CDR-H2	FIRNKANGGTTEYAASVKG	50-68	19	117
CDR-H2	FIRNKANSGTTEYAASVKG	50-68	19	118
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	69-100	32	119
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	120
HFR4	WGQGTTVTVSS	111-121	11	121

[0180] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含E12VH SEQ ID NO.122的可变重链(VH)(US 9982063)。

[0181] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVSSYWMHWVRQAPGKGLEWVGFILNKANGGTTEYAASVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS SEQ ID NO.122

[0182] 在本发明的实施方案中,靶向CEA的抗体构建体或抗原结合结构域包含SEQ ID NO.123至SEQ ID NO.129(US 9982063)的重链CDR(互补决定区)或重链构架(HFR)序列(全长序列公开为SEQ ID NO:122)。

[0183]

区域	序列片段	残基	长度	SEQ ID NO.
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTVS	1-30	30	123
CDR-H1	SYWMH	31-35	5	124
HFR2	WVRQAPGKGLEWVG	36-49	14	125
CDR-H2	FILNKANGGTTEYAASVKG	50-68	19	126
HFR3	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	69-100	32	127
CDR-H3	DRGLRFYFDY	101-110	10	128
HFR4	WGQGTTVTVSS	111-121	11	129

[0184] 在本发明的实施方案中,CEA靶向抗体构建体或抗原结合结构域包含PR1A3 VH SEQ ID NO.130的可变重链(VH)(US 8642742)。

[0185] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS SEQ ID NO.130

[0186] 在示例性实施方案中,本发明的免疫缀合物包含抗体构建体,所述抗体构建体包含特异性识别和结合TROP2的抗原结合结构域。

[0187] 肿瘤相关钙信号转导器2(TROP2)是由TACSTD2基因编码的跨膜糖蛋白(Linnenbach AJ等人(1993)Mol Cell Biol.13(3):1507-15;Calabrese G等人(2001)Cytogenet Cell Genet.92(1-2):164-5)。它是一种在许多癌症中差异表达的细胞内钙信号转导器。它向细胞发信号通知自我更新、增殖、侵袭和存活率。它具有干细胞样品质。

TROP2在许多正常组织中表达,但相反,它在许多癌症中过表达(Ohmachi T等人,(2006)Clin.Cancer Res.,12(10),3057-3063;Muhlmann G等人,(2009)J.Clin.Pathol.,62(2),152-158;Fong D等人,(2008)Br.J.Cancer,99(8),1290-1295;Fong D等人,(2008)Mod.Pathol.,21(2),186-191;Ning S等人,(2013)Neurol.Sci.,34(10),1745-1750)。TROP2的过表达具有预后意义。已经提出了几种与TROP2相互作用的配体。TROP2经由不同的途径向细胞发信号,并在转录上受到几种转录因子的复杂网络的调节。TROP2的过表达具有预后意义。已经提出了几种与TROP2相互作用的配体。TROP2经由不同的途径向细胞发信号,并在转录上受到几种转录因子的复杂网络的调节。

[0188] 人TROP2(TACSTD2:肿瘤相关钙信号转导器2、GA733-1、EGP-1、M1S1;以下称为hTROP2)是由323个氨基酸残基组成的单次跨膜1型细胞膜蛋白。虽然先前已提出参与对于人类滋养层和癌细胞来说常见的免疫抵抗的细胞膜蛋白的存在(Faulk W P等人(1978),Proc.Natl.Acad.Sci.75(4):1947-1951),但是在人类绒毛膜癌细胞系中由针对细胞膜蛋白的单克隆抗体所识别的抗原分子被鉴定并指定为TROP2,作为在人类滋养层中表达的分子之一(Lipinski M等人(1981),Proc.Natl.Acad.Sci.78(8),5147-5150)。这种分子也被指定为由小鼠单克隆抗体GA733识别的肿瘤抗原GA733-1(Linnenbach A J等人,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.86(1),27-31),所述小鼠单克隆抗体GA733是通过用由小鼠单克隆抗体RS7-3G11识别的胃癌细胞系或上皮糖蛋白(EGP-1;Basu A等人,Int.J.Cancer,62(4),472-479(1995))进行免疫获得的,所述小鼠单克隆抗体RS7-3G11是通过用非小细胞肺癌细胞进行免疫获得的。然而,在1995年,TROP2基因被克隆,并且所有这些分子被证实是相同的分子(Fornaro M等人,(1995)Int.J.Cancer,62(5),610-618)。hTROP2的DNA序列和氨基酸序列可在公共数据库上获得并且可以例如以登录号NM_002353和NP_002344(NCBI)进行参考。

[0189] 响应于此类暗示与癌症的关联的信息,迄今为止已经建立了多种抗hTROP2抗体并研究了它们的抗肿瘤效应。在这些抗体中,公开了例如在裸小鼠异种移植模型中本身表现出抗肿瘤活性的未缀合抗体(WO 2008/144891;WO 2011/145744;WO 2011/155579;WO 2013/077458)以及与细胞毒性药物一起表现出作为ADC的抗肿瘤活性的抗体(WO 2003/074566;WO 2011/068845;WO 2013/068946;US 7,999,083)。然而,其活性的强度或覆盖范围仍然不足,并且对hTROP2作为治疗靶点的医学需求尚未得到满足。

[0190] 癌细胞中的TROP2表达已经与耐药性相关。若干种策略靶向癌细胞上的TROP2,包括抗体、抗体融合蛋白、化学抑制剂、纳米粒子等。使用这些各种治疗性治疗进行的体外研究和临床前研究已导致了对小鼠体外和体内的肿瘤细胞生长的显著抑制。临床研究已经探索了Trop2作为预后生物标记物和逆转耐药的治疗靶点两者的潜在应用。

[0191] 戈沙妥珠单抗(TRODELVY®,Immunomedics,IMMU-132)是一种包含与拓扑异构酶抑制剂药物连接的TROP2定向抗体的抗体-药物缀合物,适用于治疗已经接受过至少两次先前疗法的成年患者的转移性三阴性乳腺癌(mTNBC)。戈沙妥珠单抗中的TROP2抗体缀合至伊立替康的活性代谢产物SN-38(US2016/0297890;WO 2015/098099)。

[0192] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hRS7(人源化RS7)的轻链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:131至SEQ ID NO:133(US 7238785;US 7420040,以引用方式并入本文)。

[0193]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	KASQDVSIAVA	131
CDR-L2	SASYRYT	132
CDR-L3	QQHYITPLT	133

[0194] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hRS7(人源化RS7)的重链CDR(互补决定区)序列SEQ IDNO:134至SEQ ID NO:136(US 7238785;US 9797907;US 9382329;WO 2020/142659,各自以引用方式并入本文)。

[0195]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	NYGMN	134
CDR-H2	WINTYTGEPTYTDDFKG	135
CDR-H3	GGFGSSYWYFDV	136

[0196] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含AR47A6.4.2的重链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:134、SEQ ID NO:137、SEQ ID NO:138(US 7420040,以引用方式并入本文)。

[0197]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	NYGMN	134
CDR-H2	WINTKTGEPTYAEEFKG	137
CDR-H3	GGYGSSYWYFDV	138

[0198] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含人源化KM4097的轻链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:139至SEQ ID NO:141(US2012/0237518,以引用方式并入本文)。

[0199]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	KSSQSLLNSGNQQNYLA	139
CDR-L2	GASTRES	140
CDR-L3	QSDHIYPYT	141

[0200] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含人源化KM4097的重链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:142至SEQ ID NO:144(US2012/0237518,以引用方式并入本文)。

[0201]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	IYWLG	142
CDR-H2	NIFPGSAYINYNEKFKG	143
CDR-H3	EGSNSGY	144

[0202] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hTINA1-H1L1的轻链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:132、SEQ ID NO:133、SEQ ID NO:145(US10,227,417,以引用方式并入本文)。

[0203]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	KASQDVSTAVA	145
CDR-L2	SASYRYT	132

CDR-L3	QQHYITPLT	133

[0204] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hTINA1-H1L1的重链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:146至SEQ ID NO:148(US10,227,417,以引用方式并入本文)。

[0205]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	TAGMQ	146
CDR-H2	WINTHSGVPKYAEDFKG	147
CDR-H3	SGFGSSYWYFDV	148

[0206] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hTINA1-H1L1的轻链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:149至SEQ ID NO:151(US 8871908,以引用方式并入本文)。

[0207]

区域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASKSVSTS(X1)YSYMH	149

[0208]

	其中 X1 是 G、L 或 N	
CDR-L2	LASNLES	150
CDR-L3	QHSRELPYT	151

[0209] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hTINA1-H1L1的重链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:152至SEQ ID NO:157(US 8871908,以引用方式并入本文)。

[0210]

区域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYGVH	152
CDR-H1	GGSISSY	153
CDR-H1	GGSISSYGVH	154
CDR-H2	VIWT(X1)G(X2)TDYNSALM(X3) 其中 X1 是 G 或 S; X2 是 S 或 V; X3 是 S 或 G	155
CDR-H2	WT(X1)G(X2) 其中 X1 是 G 或 S; X2 是 S 或 V	156
CDR-H3	DGDYDRYTMDY	157

[0211] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hTINA1-H1L1的轻链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:150、SEQ ID NO:151、SEQ ID NO:158(US 8871908,以引用方式并入本文)。

[0212]

区域	CDR序列片段	SEQ ID NO:
CDR-L1	RASKSVSTSGYSYMH	158
CDR-L2	LASNLES	150
CDR-L3	QHSRELPYT	151

[0213] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体构建体或抗原结合结构域包含hTINA1-H1L1的重链CDR(互补决定区)序列SEQ ID NO:152至SEQ ID NO:154、SEQ ID NO:157、SEQ ID NO:159、SEQ IDNO:160(US 8871908,以引用方式并入本文)。

[0214]

区域	CDR 序列片段	SEQ ID NO:
CDR-H1	SYGVH	152
CDR-H1	GGSISSY	153
CDR-H1	GGSISSYGVH	154
CDR-H2	VIWTSGVTDYNSALMG	159
CDR-H2	WTSGV	160
CDR-H3	DGDYDRYTMDY	157

[0215] 在本发明的实施方案中,免疫缀合物包含具有选自SEQ ID NO:161至SEQ ID NO:163的轻链序列的半胱氨酸突变抗体。

[0216]

序列:	突变位点	SEQ ID NO:
KADYECHKVYA	LC K188C	161
YEKHKCYACEV	LC V191C	162
QLKSGCASVVC	LC T129C	163

[0217] 在本发明的实施方案中,半胱氨酸突变的靶向TROP2的抗体包含SEQ ID NO:164的重链(HC)。

[0218] QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYTDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARGGFGSSYWYFDVWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0219] SEQ ID NO.164

[0220] 在本发明的实施方案中,靶向TROP2的抗体的轻链(LC)选自SEQ ID NO:165至SEQ ID NO:167。

[0221]

重链	Cys 突变位点	SEQ ID NO:
DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYIT PLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE CHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	LC K188C	165
DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYIT PLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKCYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	LC V191C	166
DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYIT PLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGCASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	LC T129C	167

[0222] 在本发明的实施方案中,免疫缀合物包含具有SEQ ID NO:168的重链序列的半胱氨酸突变抗体。

[0223]

序列:	Cys 突变位点	SEQ ID NO:
TVSSACTKGPS	HC S119C	168

[0224] 在本发明的实施方案中,半胱氨酸突变的靶向TROP2的抗体的轻链(LC)具有SEQ ID NO:169的序列。

[0225] DIQLTQSPSSLSASVGDRVSITCKASQDVSIAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQHYITPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0226] SEQ ID NO:169

[0227] 在本发明的实施方案中,半胱氨酸突变的靶向TROP2的抗体的重链(HC)具有SEQ ID NO:170的序列。

[0228] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGDTFTNHYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGHTGYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREAVAGPMDVWGQGTTVTVSSACTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST

YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0229] SEQ ID NO:170

[0230] 在一些实施方案中,抗体构建体进一步包含Fc结构域。在某些实施方案中,抗体构建体是抗体。在某些实施方案中,抗体构建体是融合蛋白。抗原结合结构域可以是单链可变区片段(scFv)。单链可变区片段(scFv)是截短的Fab片段,包括经由合成肽与轻抗体链的V结构域连接的抗体重链的可变(V)结构域,可采用常规的重组DNA技术产生。类似地,二硫键稳定化的可变区片段(dsFv)可以通过重组DNA技术制备。抗体构建体或抗原结合结构域可包含抗PD-L1抗体、抗HER2抗体或抗CEA抗体的抗原结合结构域的一个或多个可变区(例如,两个可变区),每个可变区包含CDR1、CDR2和CDR3。

[0231] 在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体含有经修饰的Fc区,其中所述修饰调节Fc区与一种或多种Fc受体的结合。

[0232] 在一些实施方案中,通过包含能够结合TGFβ1的转化生长因子β1(TGFβ1)受体或其片段来修饰Fc区。例如,受体可以是TGFβ受体II(TGFβRII)。在一些实施方案中,TGFβ受体是人TGFβ受体。在一些实施方案中,IgG具有与TGFβRII细胞外结构域(ECD)的C末端融合,如US 9676863中所述,该专利文献并入本文。“Fc接头”可用于将IgG连接至TGFβRII胞外结构域,例如G4S4G Fc接头(SEQ ID NO:171)。Fc接头可以是短的柔性肽,其允许进行分子的正确三维折叠,与此同时维持与靶标的结合特异性。在一些实施方案中,TGFβ受体的N末端与抗体构建体的Fc融合(有或没有Fc接头)。在一些实施方案中,抗体构建体重链的C末端与TGFβ受体融合(有或没有Fc接头)。在一些实施方案中,抗体构建体重链的C末端赖氨酸残基突变为丙氨酸。

[0233] 在一些实施方案中,免疫缀合物中的抗体是糖基化的。

[0234] 在一些实施方案中,免疫缀合物的抗体是半胱氨酸工程化抗体,其通过在工程化半胱氨酸可用于缀合并且对缀合反应性,但不扰乱免疫球蛋白折叠和装配或改变抗原结合和效应子功能的位点处的半胱氨酸取代来提供佐剂与抗体的位点特异性缀合(Junutula等人,2008bNature Biotech.,26(8):925-932;Dornan等人(2009)Blood 114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;US2012/0121615;WO 2009/052249)。“半胱氨酸工程化抗体”或“半胱氨酸工程化抗体变体”是这样的抗体,在所述抗体中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。半胱氨酸工程化抗体可以以均匀化学计量(例如,在具有单个工程化的半胱氨酸位点的抗体中,每抗体至多两个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓部分)缀合至2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物(式II)上的硫醇反应性亲电子基团诸如马来酰亚胺。

[0235] 在一些实施方案中,半胱氨酸工程化抗体用于制备免疫缀合物。免疫缀合物可具有在如通过Kabat编号进行编号的轻链上的位点(诸如149-赖氨酸位点(LC K149C))或重链上的位点(诸如122-丝氨酸位点(HC S122C))处引入的反应性半胱氨酸硫醇残基。在其他实施方案中,半胱氨酸工程化抗体具有在重链的118-丙氨酸位点(EU编号)(HC A118C)处引入的半胱氨酸残基。此位点替代地按顺序编号法编号为121,或者按Kabat编号法编号为114。在其他实施方案中,半胱氨酸工程化抗体具有引入到以下中的半胱氨酸残基:(i)根据Kabat编号在G64C、R142C、K188C、L201C、T129C、S114C或E105C处的轻链;(ii)根据Kabat编

号的D101C、V184C、T205C或S122C处的重链;或(iii)其他半胱氨酸突变抗体,并且如在Bhakta,S.等人,(2013)“Engineering THIOMABs for Site-Specific Conjugation of Thiol-Reactive Linkers”,Laurent Ducry(编辑),Antibody-Drug Conjugates,Methods in Molecular Biology,第1045卷,第189-203页;WO 2011/156328;US 9000130中所述。

[0236] 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓佐剂化合物

[0237] 本发明的免疫缀合物包含2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓佐剂部分。本文所述的佐剂部分是引发免疫应答的化合物(即,免疫刺激剂)。一般地,本文所述的佐剂部分是TLR激动剂。TLR是负责启动脊椎动物的先天免疫反应的I型跨膜蛋白。TLR识别来自细菌、病毒和真菌的多种病原体相关分子模式,并且作为抵御入侵病原体的第一道防线。由于细胞表达以及它们启动的信号传导途径的差异,TLR引发重叠但不同的生物反应。一旦参与(例如,通过天然刺激或合成TLR激动剂),TLR就引发信号转导级联,从而导致通过衔接蛋白骨髓分化初级反应基因88(MyD88)激活核因子-κB(NF-κB)和募集IL-1受体相关激酶(IRAK)。IRAK的磷酸化然后导致TNF受体相关因子6(TRAF6)的募集,这导致NF-κB抑制剂I-κB的磷酸化。结果,NF-κB进入细胞核并引发启动子含有NF-κB结合位点的基因(如细胞因子)的转录。调控TLR信号传导的另外模式包括含有TIR结构域的衔接子诱导干扰素-β(TRIF)依赖性诱导TNF-受体相关因子6(TRAF6)和经由TRIF和TRAF3激活MyD88非依赖性途径,导致干扰素反应因子三(IRF3)的磷酸化。类似地,MyD88依赖性途径也激活若干IRF家族成员,包括IRF5和IRF7,而TRIF依赖性途径也激活NF-κB途径。

[0238] 通常,本文所述的佐剂部分是TLR7和/或TLR8激动剂。TLR7和TLR8均在单核细胞和树突细胞中表达。在人中,TLR7也在浆细胞样树突细胞(pDC)和B细胞中表达。TLR8主要在骨髓来源的细胞中表达,即单核细胞、粒细胞和髓样树突细胞。TLR7和TLR8能够检测细胞内“外来”单链RNA的存在,作为应对病毒入侵的手段。用TLR8激动剂处理表达TLR8的细胞可导致产生高水平的IL-12、IFN-γ、IL-1、TNF-α、IL-6及其它炎性细胞因子。类似地,用TLR7激动剂刺激表达TLR7的细胞如pDC可导致产生高水平的IFN-α及其它炎性细胞因子。TLR7/TLR8接合及由此所致的细胞因子产生可激活树突细胞及其他抗原呈递细胞,驱动多种先天和获得性免疫反应机制,从而导致肿瘤破坏。

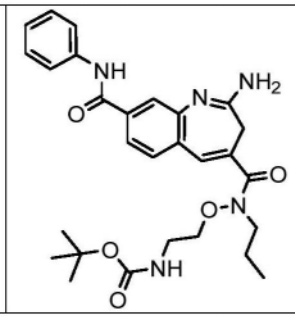
[0239] 本发明的例示性化合物(2Am4CBza)显示在表1中。每种化合物通过质谱法表征并显示为具有所示质量。根据实施例203测量了针对表达人TLR7或人TLR8的HEK293 NFKB报告细胞的活性。

[0240] 表1 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓化合物(2Am4CBza)

[0241]

2Am4CBza 编号	结构	MW

[0242]

2Am4CBza-1		521.6

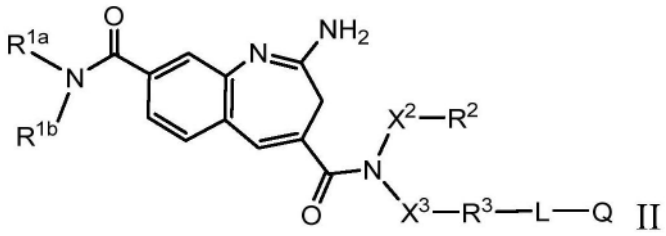
[0243] 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物S

[0244] 通过抗体与2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的缀合来制备本发明的免疫缀合物。2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物包含共价连接至接头单元L和反应性亲电子基团Q的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓(2Am4CBza)部分。所述接头单元包含影响免疫缀合物的稳定性、渗透性、溶解度和其他药代动力学、安全性和功效特性的官能团和亚基。接头单元包括反应性官能团,所述反应性官能团与抗体的反应性官能团反应,即缀合。例如,抗体的亲核基团(诸如赖氨酸侧链氨基)与2Am4CBza-接头化合物的亲电子反应性官能团反应,以形成免疫缀合物(IC)。还有,例如,抗体的半胱氨酸硫醇与2Am4CBza-接头化合物的马来酰亚胺或溴乙酰胺基团反应以形成免疫缀合物。

[0245] 适用于2Am4CBza-接头化合物的反应性亲电子官能团包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯和N-羟基磺基琥珀酰亚胺(磺基-NHS)酯(胺反应性);碳二亚胺(胺和羧基反应性);羟甲基膦(胺反应性);马来酰亚胺(硫醇反应性);卤代乙酰胺诸如N-碘乙酰胺(硫醇反应性);芳基叠氮化物(伯胺反应性);氟化芳基叠氮化物(经由碳-氢(C-H)插入而为反应性的);五氟苯基(PFP)酯(胺反应性);四氟苯基(TFP)酯或磺基四氟苯基(磺基TFP)酯(胺反应性);亚氨酸酯(胺反应性);异氰酸酯(羟基反应性);乙烯基砜(硫醇、胺和羟基反应性);吡啶基二硫化物(硫醇反应性);和二苯甲酮衍生物(经由C-H键插入而为反应性的)。另外的试剂包括但不限于在Hermanson,Bioconjugate Techniques,第2版,Academic Press,2008中描述的那些。

[0246] 本发明为免疫缀合物的设计、制备和使用方面的限制和挑战提供了解决方案。一些接头可能在血流中不稳定,从而在靶细胞中内化之前释放出不可接受的量的佐剂/药物(Khot,A.等人(2015)Bioanalysis7(13):1633-1648)。其它接头可提供在血流中的稳定性,但细胞内释放的有效性可能会受到负面影响。提供所需细胞内释放的接头通常在血流中稳定性差。或者说,血流稳定性和细胞内释放通常是逆相关的。此外,在标准缀合过程中,抗体上加载的佐剂/药物部分的量(即载药量)、缀合反应中形成的聚集物的量和可以获得的最终纯化缀合物的产量是相互关联的。例如,聚集物形成通常与同抗体缀合的佐剂/药物部分及其衍生物的当量数正相关。在高载药量下,必须去除所形成的聚集体以用于治疗应用。因此,载药量介导的聚集体形成会降低免疫缀合物产率,并可能使过程成比例放大变得困难。

[0247] 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的例示性实施方案包括式II:

[0248] 

[0249] 其中

[0250] X^2和X^3独立地选自由以下组成的组:键、C(=O)、C(=O)N(R^5)、O、N(R^5)、S、S(O)$_2$和S(O)$_2$N(R^5);

[0251] R^{1a}、R^{1b}、和R^2独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_3-C_{12}碳环基、C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基和C_1-C_{20}杂芳基;

[0252] R^3选自由以下组成的组:

[0253] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0254] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O)*;

[0255] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O)O-(C_3-C_{12}碳环基二基)-*;

[0256] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

[0257] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-*;

[0258] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-S(O_2)-*;

[0259] -(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-(C_2-C_9杂环基二基)-*;

[0260] -(C_1-C_{12}烷基二基)-O-*;

[0261] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_3-C_{12}碳环基二基)-*;

[0262] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_6-C_{20}芳基二基)-*;

[0263] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_6-C_{20}芳基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0264] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_6-C_{20}芳基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0265] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_2-C_9杂环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0266] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-N(R^5)-*;

[0267] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

[0268] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-*;

[0269] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0270] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-*;

[0271] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0272] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0273] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-NR^5-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0274] -(C_6-C_{20}芳基二基)-*;

[0275] -(C_6-C_{20}芳基二基)-N(R^5)-*;

[0276] -(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0277] -(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_2-C_{20}杂环基二基)-*;

[0278] -(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0279] -(C_2-C_{20}杂环基二基)-*;

[0280] -(C_2-C_9杂环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0281] -(C_2-C_9杂环基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0282] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

[0283] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0284] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-O-*;以及

[0285] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0286] 其中星号*指示接头L的连接位点;

[0287] R^5独立地选自由以下组成的组:H、C_6-C_{20}芳基和C_1-C_{12}烷基,或者两个R^5基团一起形成5或6元杂环基环;

[0288] R^{5a}选自由以下组成的组:C_6-C_{20}芳基和C_1-C_{20}杂芳基;

[0289] L-Q选自由以下组成的组:

[0290] Q-C(=O)-PEG-;

[0291] Q-C(=O)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

[0292] Q-C(=O)-PEG-O-;

[0293] Q-C(=O)-PEG-O-C(=O)-;

[0294] Q-C(=O)-PEG-C(=O)-;

[0295] Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-;

[0296] Q-C(=O)-PEG-N(R^6)-;

[0297] Q-C(=O)-PEG-N(R^6)-C(=O)-;

[0298] Q-C(=O)-PEG-N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-;

[0299] Q-C(=O)-PEG-N^+(R^6)$_2$-PEG-C(=O)-PEP-;

[0300] Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

[0301] Q-C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

[0302] Q-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-;

[0303] Q-C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-;

[0304] Q-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-;

[0305] Q-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

[0306] Q-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O);

[0307] Q-C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

[0308] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-;

[0309] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

[0310] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-O-;

[0311] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-O-C(=O)-;

[0312] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-;

[0313] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-;

[0314] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-C(=O)-;

[0315] Q-(CH_2)$_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-;

[0316] Q-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-;

[0317] Q-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

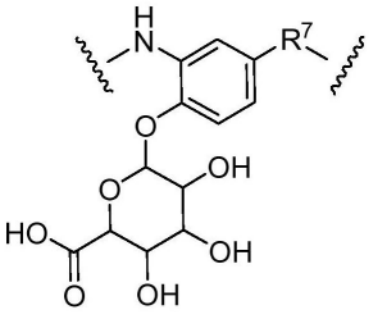
[0318] Q-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-;以及

[0319] Q-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

[0320] R^6独立地为H或C_1-C_6烷基;

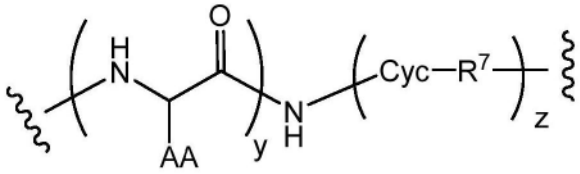
[0321] PEP具有下式:-$(CH_2CH_2O)_n$-$(CH_2)_m$-,其中m是1至5的整数,并且n是2至50的整数;

[0322] Gluc具有下式:

[0323] 

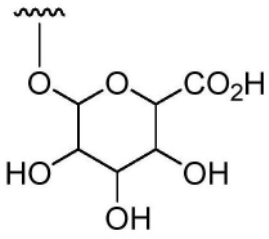
;

[0324] PEP具有下式:

[0325] 

[0326] 其中AA独立地选自天然或非天然氨基酸侧链,或一个或多个AA与相邻的氮原子形成5元环脯氨酸氨基酸,并且波浪线指示连接点;

[0327] Cyc选自C_6-C_{20}芳基二基和C_1-C_{20}杂芳基二基,其任选地被一个或多个选自以下的基团取代:F、Cl、NO_2、-OH、-OCH_3和具有以下结构的葡糖醛酸:

[0328] 

;

[0329] R^7选自由以下组成的组:-CH(R^8)O-、-CH_2-、-CH_2N(R^8)-、和-CH(R^8)O-C(=O)-,其中R^8选自H、C_1-C_6烷基、C(=O)-C_1-C_6烷基、和-C(=O)N(R^9)$_2$,其中R^9独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{12}烷基和-$(CH_2CH_2O)_n$-$(CH_2)_m$-OH,其中m是1至5的整数,并且n是2至50的整数,或者两个R^9基团一起形成5或6元杂环基环;

[0330] y是2至12的整数;

[0331] z是0或1;

[0332] Q选自由以下组成的组:被一个或多个独立地选自F、Cl、NO_2和SO_3^-的基团取代的N-羟基琥珀酰亚胺基、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺和苯氧基;并且

[0333] 烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳环基、碳环基

二基、杂环基、杂环基二基、杂芳基和杂芳基二基独立地且任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代:F、Cl、Br、I、-CN、-CH_3、-CH_2CH_3、-CH=CH_2、-C≡CH、-C≡CCH_3、-$CH_2CH_2CH_3$、-$CH(CH_3)_2$、-$CH_2CH(CH_3)_2$、-CH_2OH、-CH_2OCH_3、-CH_2CH_2OH、-$C(CH_3)_2OH$、-$CH(OH)CH(CH_3)_2$、-$C(CH_3)_2CH_2OH$、-$CH(OH)CH_2OH$、-$CH_2CH_2SO_2CH_3$、-$CH_2OP(O)(OH)_2$、-CH_2F、-CHF_2、-CF_3、-CH_2CF_3、-CH_2CHF_2、-$CH(CH_3)CN$、-$C(CH_3)_2CN$、-CH_2CN、-CH_2NH_2、-$CH_2NHSO_2CH_3$、-CH_2NHCH_3、-$CH_2N(CH_3)_2$、-CO_2H、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-$CO_2C(CH_3)_3$、-$COCH(OH)CH_3$、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-$CON(CH_3)_2$、-$C(CH_3)_2CONH_2$、-NH_2、-NHC H_3、-$N(CH_3)_2$、-$NHCOCH_3$、-$N(CH_3)COCH_3$、-$NHS(O)_2CH_3$、-$N(CH_3)C(CH_3)_2CONH_2$、-$N(CH_3)CH_2CH_2S(O)_2CH_3$、-NHC(=NH)H、-NH C(=NH)$CH_3$、-NHC(=NH)$NH_2$、-NHC(=O)$NH_2$、-$NO_2$、=O、-OH、-$OCH_3$、-$OCH_2CH_3$、-$OCH_2CH_2OCH_3$、-$OCH_2CH_2OH$、-$OCH_2CH_2N(CH_3)_2$、-$O(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_mCO_2H$、-$O(CH_2CH_2O)_nH$、-$OCH_2F$、-$OCHF_2$、-$OCF_3$、-$OP(O)(OH)_2$、-$S(O)_2N(CH_3)_2$、-$SCH_3$、-$S(O)_2CH_3$、和-$S(O)_3H$。

[0334] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中R^{1a}和R^{1b}独立地选自由以下组成的组:任选取代的C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基、和C_1-C_{20}杂芳基。

[0335] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中R^{1a}是任选取代的C_6-C_{20}芳基并且R^{1b}是H。

[0336] 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中X^2和X^3均是键,并且R^2和R^3独立地选自C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_{12}烷基)、-(C_1-C_{12}烷基二基)-OR^5、-(C_1-C_8烷基二基)-$N(R^5)CO_2R^5$、-(C_1-C_{12}烷基)-$OC(O)N(R^5)_2$、-O-(C_1-C_{12}烷基)-$N(R^5)CO_2R^5$、和-O-(C_1-C_{12}烷基)-$OC(O)N(R^5)_2$。

[0337] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中X^2是键,并且R^2是C_1-C_{12}烷基。

[0338] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中X^3是O并且R^3是-(C_1-C_{12}烷基二基)-$N(R^5)$-*。

[0339] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中R^3是-$CH_2CH_2CH_2NH$-。

[0340] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中L是-C(=O)-PEG-C(=O)-。

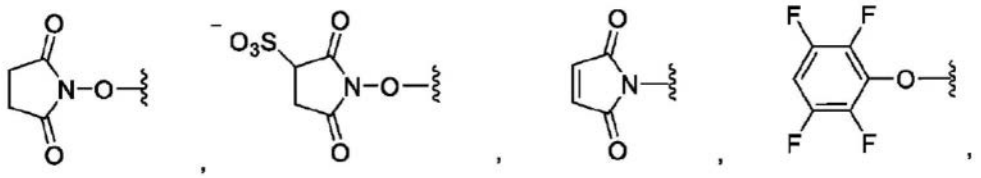
[0341] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中AA_1和AA_2独立地选自天然存在的氨基酸的侧链。

[0342] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中AA_1或AA_2与相邻氮原子形成5元环脯氨酸氨基酸。

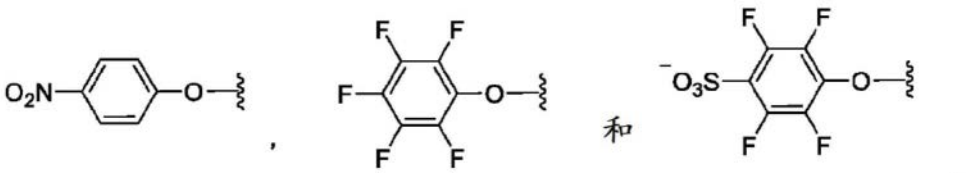
[0343] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中AA_1和AA_2独立地选自H、-CH_3、-$CH(CH_3)_2$、-$CH_2(C_6H_5)$、-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、-$CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$、-$CHCH(CH_3)CH_3$、-CH_2SO_3H、和-$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

[0344] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中AA_1是-$CH(CH_3)_2$,并且AA_2是-$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

[0345] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中Q选自:



[0346]

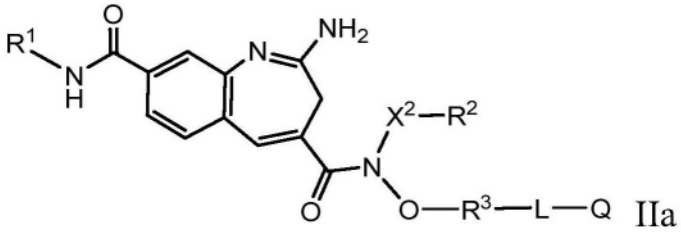


[0347] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中Q是被一个或多个F取代的苯氧基。

[0348] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中Q是2,3,5,6-四氟苯氧基。

[0349] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案包括其中Q是2,3,5,6-四氟,4-磺酸酯-苯氧基。

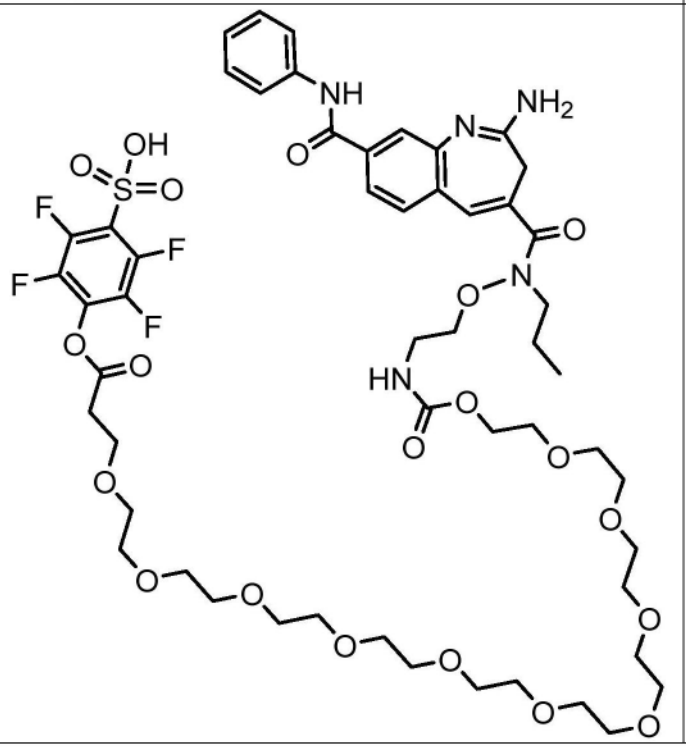
[0350] 式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案具有式IIa：

[0351] 

[0352] 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头化合物的示例性实施方案选自表2。每种化合物通过质谱法表征并显示为具有指示的质量。

[0353] 表2a 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头(2Am4CBza-L)式II化合物

[0354]

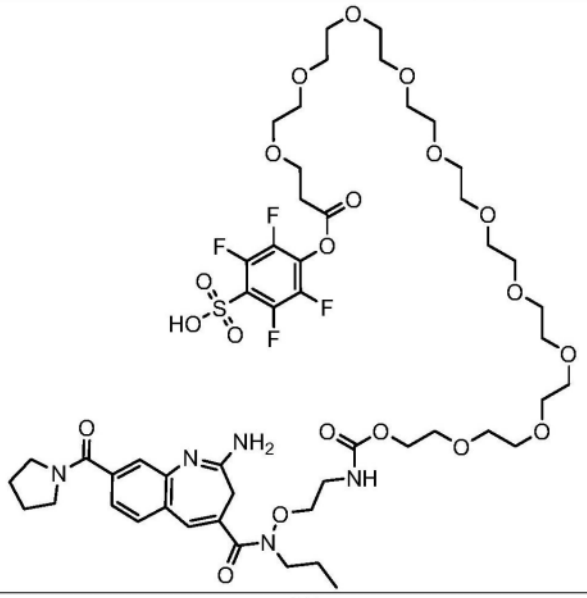
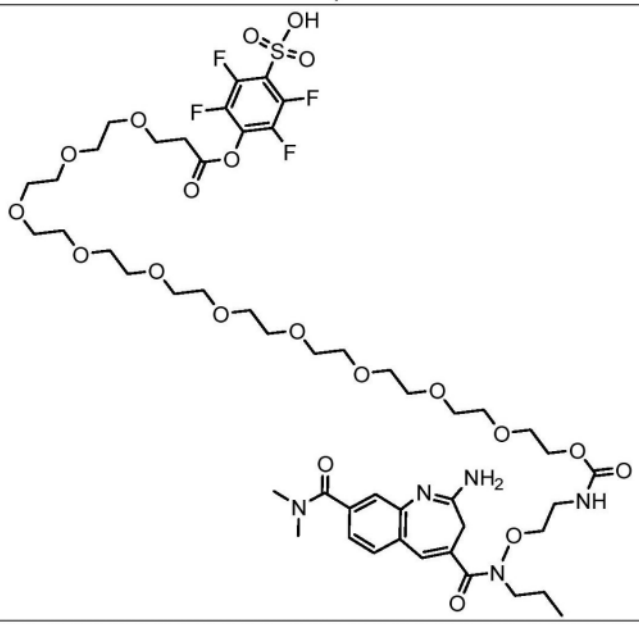
2Am4CBza-L	结构	MW
2Am4CBza-L-1		1206.2

[0355] 表2b 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头(2Am4CBza-L)式II化合物

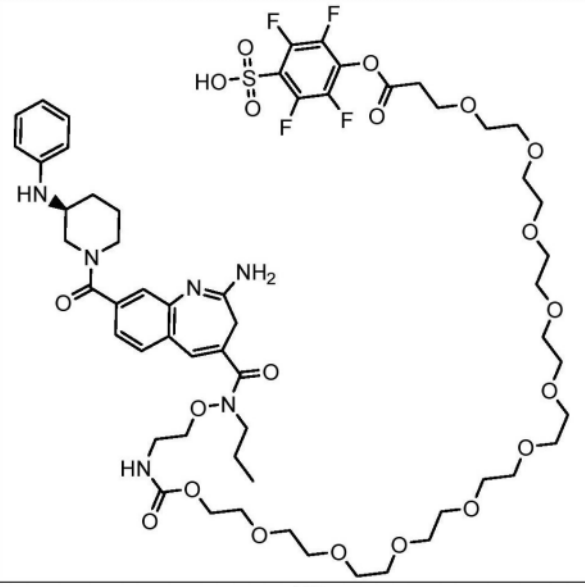
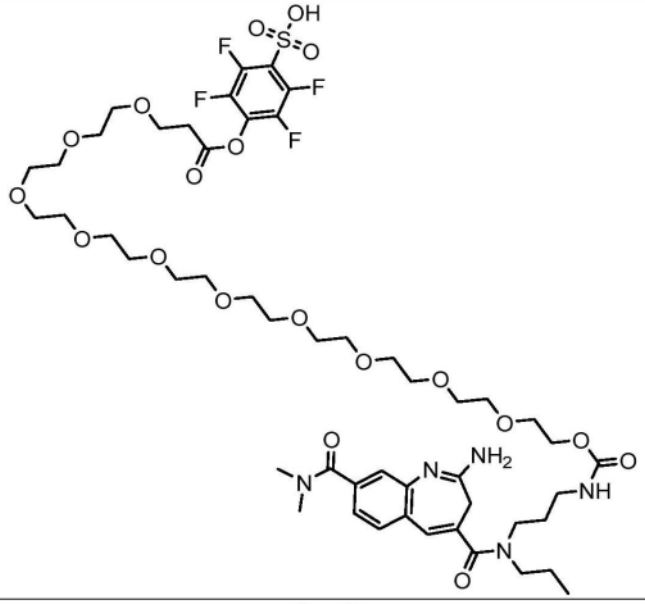
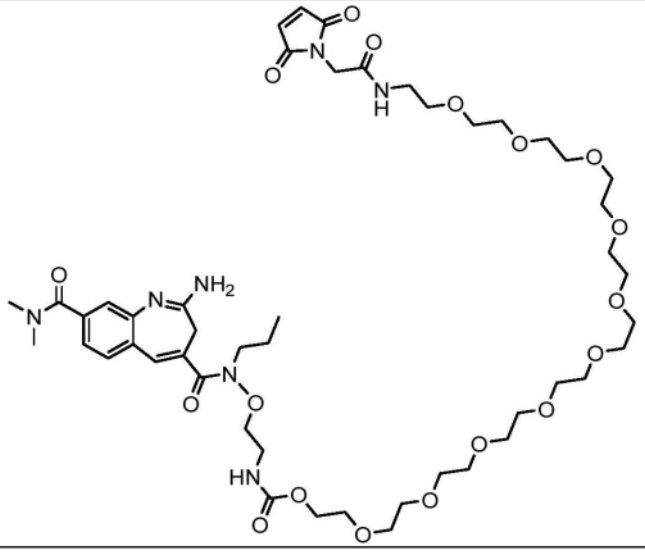
[0356]

2Am4CBza-L	结构	MW

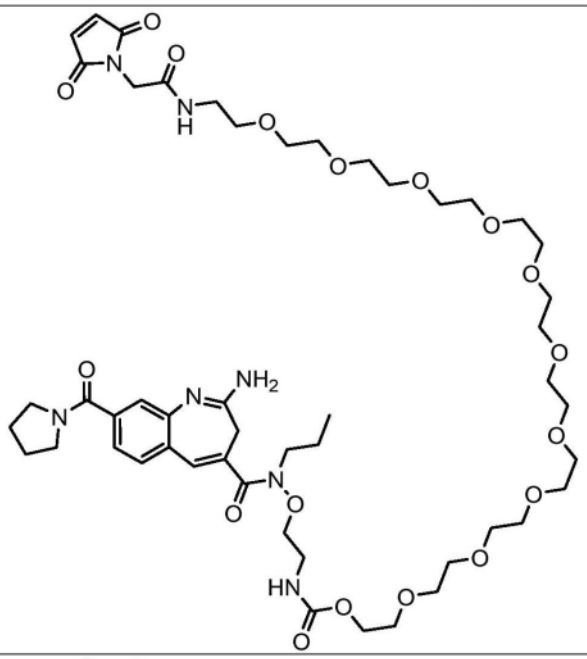
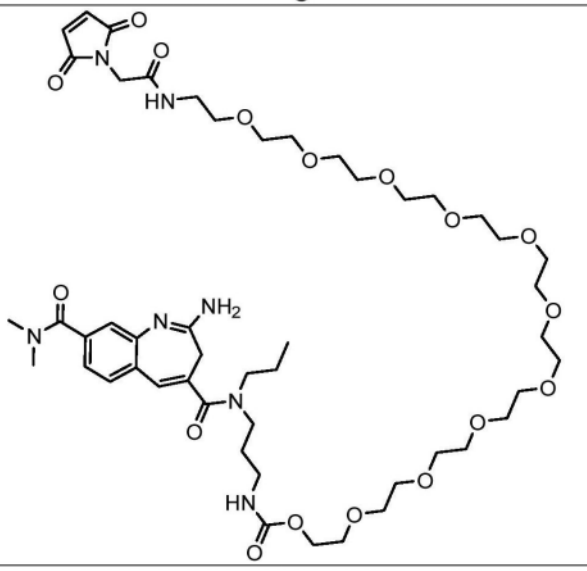
[0357]

2Am4CBza-L-2		1184.2
2Am4CBza-L-3		1158.2

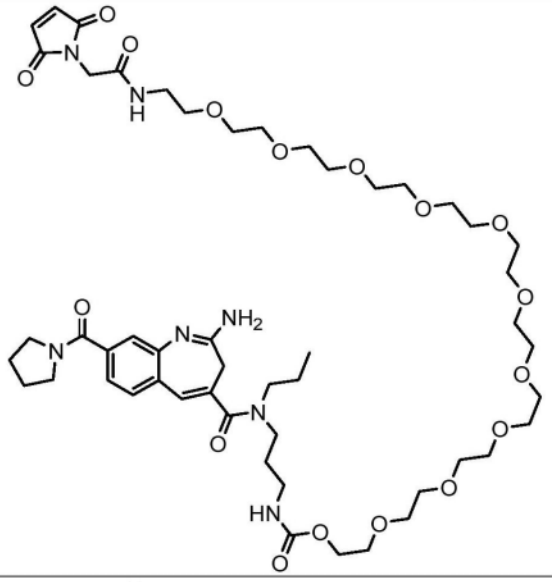
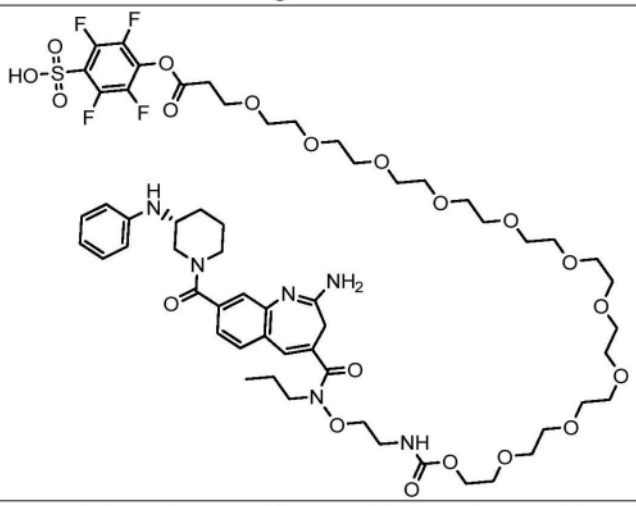
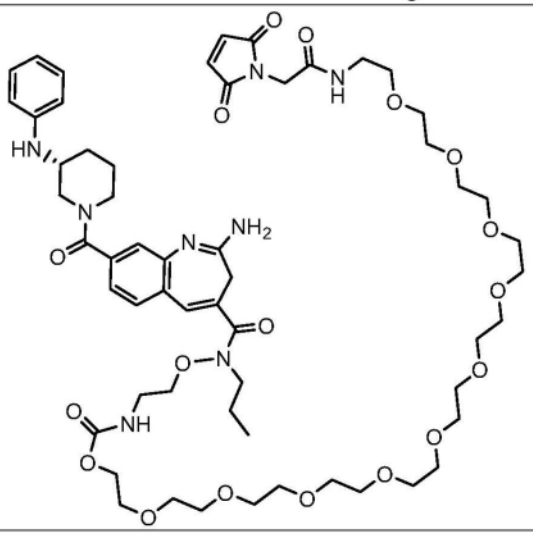
[0358]

2Am4CBza-L-4		1289.3
2Am4CBza-L-5		1156.2
2Am4CBza-L-6		1038.2

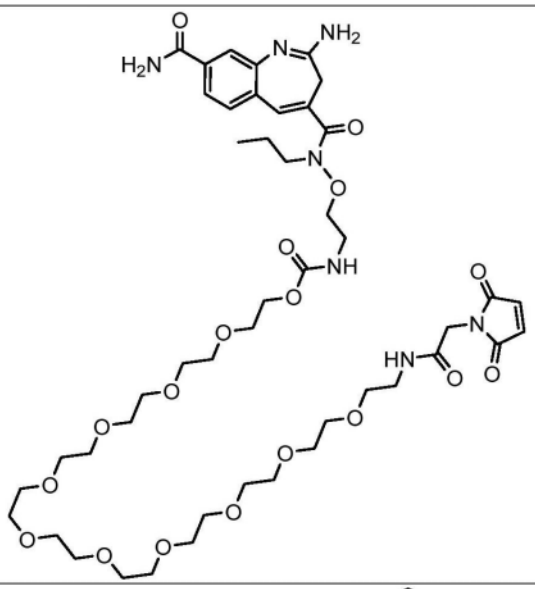
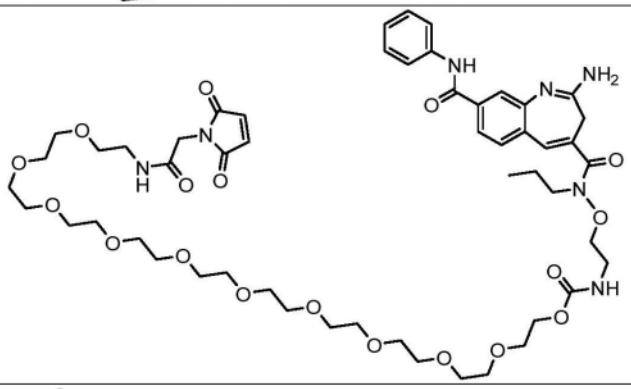
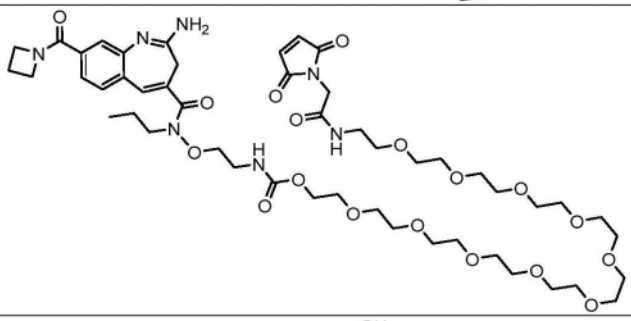
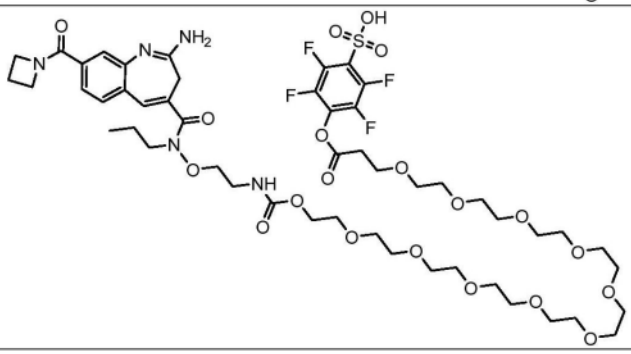
[0359]

2Am4CBza-L-7		1064.2
2Am4CBza-L-8		1036.2

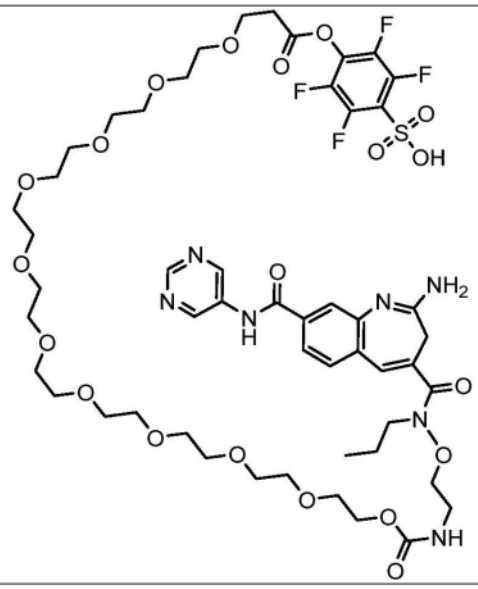
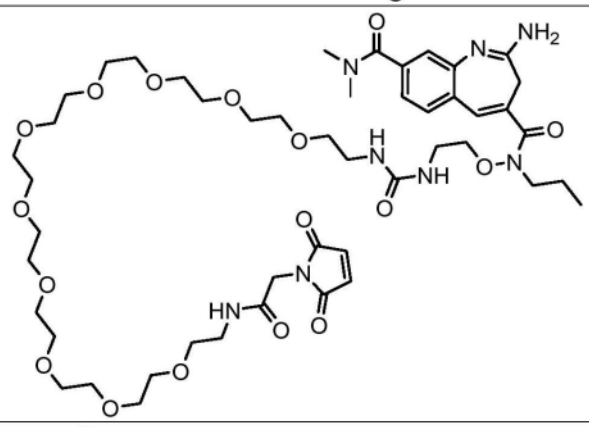
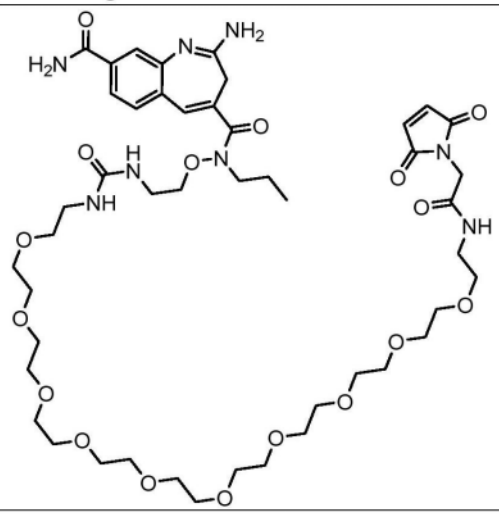
[0360]

2Am4CBza-L-9		1062.2
2Am4CBza-L-10		1289.3
2Am4CBza-L-11		1169.3

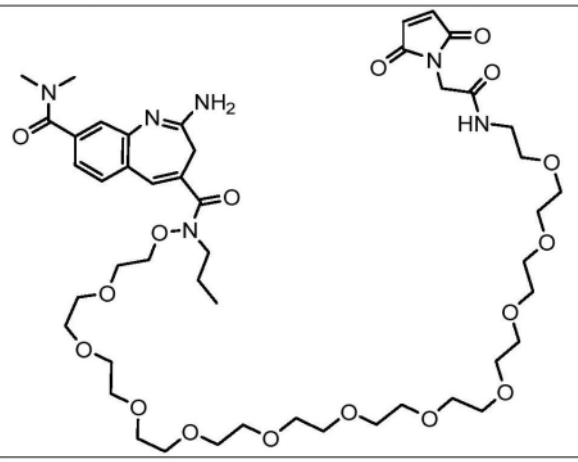
[0361]

2Am4CBza-L-12		1010.1
2Am4CBza-L-13		1086.2
2Am4CBza-L-14		1050.2
2Am4CBza-L-15		1170.2

[0362]

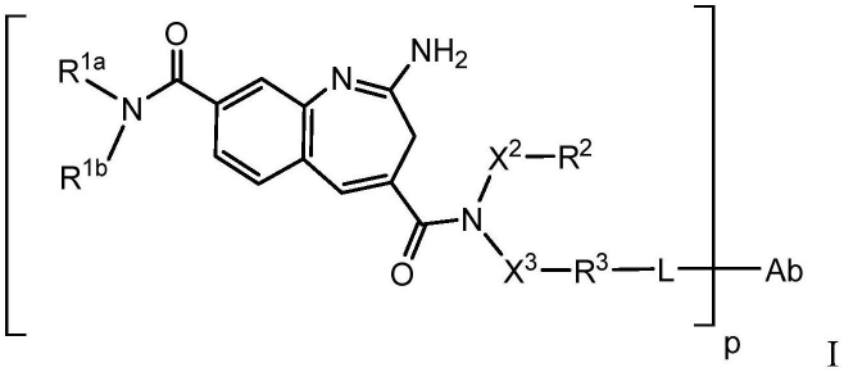
2Am4CBza-L-16		1208.2
2Am4CBza-L-17		1037.2
2Am4CBza-L-18		1009.1

[0363]

2Am4CBza-L-19		995.1

[0364] 免疫缀合物

[0365] 免疫缀合物的示例性实施方案包含通过接头共共价连接至一个或多个2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓(2Am4CBza)部分的抗体并且具有式I：

[0366] 

[0367] 或其药学上可接受的盐，

[0368] 其中：

[0369] Ab是抗体，其中所述抗体与选自PD-L1、HER2、CEA、和TROP2的靶标结合；

[0370] p是1至8的整数；

[0371] X^2和X^3独立地选自由以下组成的组：键、C(=O)、C(=O)N(R^5)、O、N(R^5)、S、S(O)$_2$和S(O)$_2$N(R^5)；

[0372] R^{1a}、R^{1b}和R^2独立地选自由以下组成的组：H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_6烯基、C_2-C_6炔基、C_3-C_{12}碳环基、C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基和C_1-C_{20}杂芳基；或者R^{1a}和R^{1b}形成五或六元杂环基环；

[0373] R^3选自由以下组成的组：

[0374] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*；

[0375] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O)*；

[0376] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O)O-(C_3-C_{12}碳环基二基)-*；

[0377] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*；

[0378] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-*；

[0379] -(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-S(O_2)-*；

[0380] -(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-(C_2-C_9杂环基二基)-*；

[0381] -(C_1-C_{12}烷基二基)-O-*；

[0382] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_3-C_{12}碳环基二基)-*；

[0383] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_6-C_{20}芳基二基)-*;

[0384] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_6-C_{20}芳基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0385] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_2-C_9杂环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0386] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-N(R^5)-*;

[0387] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

[0388] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-*;

[0389] -(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0390] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-*;

[0391] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0392] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0393] -(C_3-C_{12}碳环基二基)-NR^5-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0394] -(C_6-C_{20}芳基二基)-*;

[0395] -(C_6-C_{20}芳基二基)-N(R^5)-*;

[0396] -(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0397] -(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-(C_2-C_{20}杂环基二基)-*;

[0398] -(C_6-C_{20}芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0399] -(C_2-C_{20}杂环基二基)-*;

[0400] -(C_2-C_9杂环基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0401] -(C_2-C_9杂环基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0402] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-*;

[0403] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*;

[0404] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-(C_1-C_{12}烷基二基)-O-*;以及

[0405] -(C_1-C_{20}杂芳基二基)-N(R^5)-C(=NR^{5a})-N(R^5)-*;

[0406] 其中星号*指示接头L的连接位点;

[0407] 或者R^2和R^3一起形成5或6元杂环基环;

[0408] R^5独立地选自由以下组成的组:H、C_6-C_{20}芳基、C_3-C_{12}碳环基、C_6-C_{20}芳基二基、C_1-C_{12}烷基和C_1-C_{12}烷基二基,或者两个R^5基团一起形成5或6元杂环基环;

[0409] R^{5a}选自由以下组成的组:C_6-C_{20}芳基和C_1-C_{20}杂芳基;

[0410] L选自由以下组成的组:

[0411] -C(=O)-PEG-;

[0412] -C(=O)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

[0413] -C(=O)-PEG-O-;

[0414] -C(=O)-PEG-O-C(=O)-;

[0415] -C(=O)-PEG-C(=O)-;

[0416] -C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-;

[0417] -C(=O)-PEG-N(R^6)-;

[0418] -C(=O)-PEG-N(R^6)-C(=O)-;

[0419] -C(=O)-PEG-N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-;

[0420] -C(=O)-PEG-N^+(R^6)$_2$-PEG-C(=O)-PEP-;

[0421] -C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

[0422] -C(=O)-PEG-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

[0423] -C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-;

[0424] -C(=O)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-;

[0425] -C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-;

[0426] -C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

[0427] -C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-C(=O);

[0428] -C(=O)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

[0429] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-;

[0430] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-C(=O)-Gluc-;

[0431] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-O-;

[0432] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-O-C(=O)-;

[0433] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-;

[0434] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-;

[0435] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-N(R^5)-C(=O)-;

[0436] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-C(=O)-PEP-;

[0437] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)N(R^6)-PEG-SS-(C_1-C_{12}烷基二基)-OC(=O)-;

[0438] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)-;

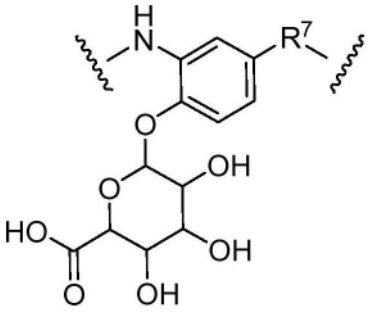
[0439] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-;和

[0440] -琥珀酰亚胺基-$(CH_2)_m$-C(=O)-PEP-N(R^6)-(C_1-C_{12}烷基二基)N(R^6)C(=O)-(C_2-C_5单杂环基二基)-;

[0441] R^6独立地为H或C_1-C_6烷基;

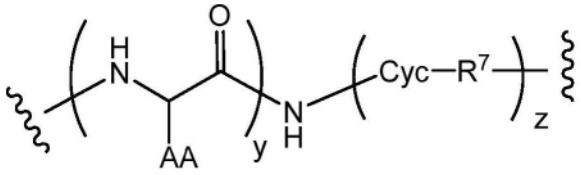
[0442] PEP具有下式:-$(CH_2CH_2O)_n$-$(CH_2)_m$-;m是1至5的整数,并且n是2至50的整数;

[0443] Gluc具有下式:

[0444] 

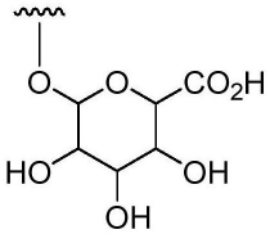
;

[0445] PEP具有下式:

[0446] 

[0447] 其中AA独立地选自天然或非天然氨基酸侧链,或一个或多个AA与相邻的氮原子形成5元环脯氨酸氨基酸,并且波浪线指示连接点;

[0448] Cyc选自C_6-C_{20}芳基二基和C_1-C_{20}杂芳基二基,其任选地被一个或多个选自以下的基团取代:F、Cl、NO_2、-OH、-OCH_3和具有以下结构的葡糖醛酸:

[0449]  ;

[0450] R^7选自由以下组成的组:-CH(R^8)O-、-CH_2-、-CH_2N(R^8)-和-CH(R^8)O-C(=O)-,其中R^8选自H、C_1-C_6烷基、C(=O)-C_1-C_6烷基和-C(=O)N(R^9)$_2$,其中R^9独立地选自由以下组成的组:H、C_1-C_{12}烷基和-(CH_2CH_2O)$_n$-(CH_2)$_m$-OH,其中m是1至5的整数,并且n是2至50的整数,或者两个R^9基团一起形成5或6元杂环基环;

[0451] y是2至12的整数;

[0452] z是0或1;并且

[0453] 烷基、烷基二基、烯基、烯基二基、炔基、炔基二基、芳基、芳基二基、碳环基、碳环基二基、杂环基、杂环基二基、杂芳基和杂芳基二基独立地且任选地被一个或多个独立地选自以下的基团取代:F、Cl、Br、I、-CN、-CH_3、-CH_2CH_3、-CH=CH_2、-C≡CH、-C≡CCH_3、-$CH_2CH_2CH_3$、-CH(CH_3)$_2$、-CH_2CH(CH_3)$_2$、-CH_2OH、-CH_2OCH_3、-CH_2CH_2OH、-C(CH_3)$_2$OH、-CH(OH)CH(CH_3)$_2$、-C(CH_3)$_2CH_2$OH、-CH(OH)CH_2OH、-$CH_2CH_2SO_2CH_3$、-CH_2OP(O)(OH)$_2$、-CH_2F、-CHF_2、-CF_3、-CH_2CF_3、-CH_2CHF_2、-CH(CH_3)CN、-C(CH_3)$_2$CN、-CH_2CN、-CH_2NH_2、-$CH_2NHSO_2CH_3$、-CH_2NHCH_3、-CH_2N(CH_3)$_2$、-CO_2H、-$COCH_3$、-CO_2CH_3、-CO_2C(CH_3)$_3$、-COCH(OH)CH_3、-$CONH_2$、-$CONHCH_3$、-CON(CH_3)$_2$、-C(CH_3)$_2CONH_2$、-NH_2、-NHC H_3、-N(CH_3)$_2$、-$NHCOCH_3$、-N(CH_3)$COCH_3$、-NHS(O)$_2CH_3$、-N(CH_3)C(CH_3)$_2CONH_2$、-N(CH_3)CH_2CH_2S(O)$_2CH_3$、-NHC(=NH)H、-NH C(=NH)CH_3、-NHC(=NH)NH_2、-NHC(=O)NH_2、-NO_2、=O、-OH、-OCH_3、-OCH_2CH_3、-$OCH_2CH_2OCH_3$、-OCH_2CH_2OH、-OCH_2CH_2N(CH_3)$_2$、-O(CH_2CH_2O)$_n$-(CH_2)$_m$$CO_2$H、-O($CH_2CH_2$O)$_n$H、-$OCH_2$F、-$OCHF_2$、-$OCF_3$、-OP(O)(OH)$_2$、-S(O)$_2$N($CH_3$)$_2$、-$SCH_3$、-S(O)$_2CH_3$、和-S(O)$_3$H。

[0454] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中抗体是具有结合PD-L1的抗原结合结构域的抗体构建体。

[0455] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中抗体选自由以下组成的组:阿特朱单抗、度伐利尤单抗和阿维鲁单抗,或它们的生物仿制药(biosimilar)或改良型生物相似性药物(biobetter)。

[0456] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中抗体是具有结合HER2的抗原结合结构域的抗体构建体。

[0457] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中抗体选自由以下组成的组:曲妥珠单抗和帕妥珠单抗,或它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物。

[0458] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中抗体是具有结合CEA的抗原结合结构域的抗体构建体。

[0459] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中抗体是拉贝珠单抗或其生物仿制药或改良型生物相似性药物。

[0460] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中抗体是具有结合TROP2的抗原结合结构域的抗体构建体。

[0461] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中Trop2抗体是单克隆抗体。

[0462] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R^{1a}和R^{1b}独立地选自由以下组成的组:任选取代的C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基、和C_1-C_{20}杂芳基。

[0463] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R^{1a}是任选取代的C_6-C_{20}芳基并且R^{1b}是H。

[0464] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X^2和X^3均是键,并且R^2和R^3独立地选自C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_{12}烷基)、-(C_1-C_{12}烷基二基)-OR^5、-(C_1-C_8烷基二基)-$N(R^5)CO_2R^5$、-(C_1-C_{12}烷基)-$OC(O)N(R^5)_2$、-O-(C_1-C_{12}烷基)-$N(R^5)CO_2R^5$、和-O-(C_1-C_{12}烷基)-$OC(O)N(R^5)_2$。

[0465] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X^2是键,并且R^2是C_1-C_{12}烷基。

[0466] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X^3是O并且R^3是-(C_1-C_{12}烷基二基)-$N(R^5)$-*。

[0467] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R^3是-$CH_2CH_2CH_2NH$-。

[0468] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L是-C(=O)-PEG-C(=O)-。

[0469] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中L包括PEG,并且其中n是10并且m是1。

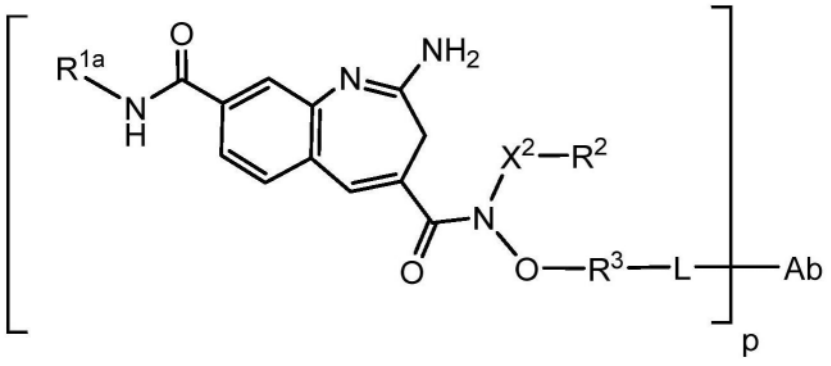
[0470] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中AA_1和AA_2独立地选自天然存在的氨基酸的侧链。

[0471] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中AA_1或AA_2与相邻氮原子形成5元环脯氨酸氨基酸。

[0472] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中AA_1和AA_2独立地选自H、-CH_3、-$CH(CH_3)_2$、-$CH_2(C_6H_5)$、-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、-$CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$、-$CHCH(CH_3)CH_3$、-CH_2SO_3H和-$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

[0473] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中AA_1是-$CH(CH_3)_2$,并且AA_2是-$CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$。

[0474] 所述免疫缀合物的示例性实施方案具有式Ia:

[0475] 

Ia。

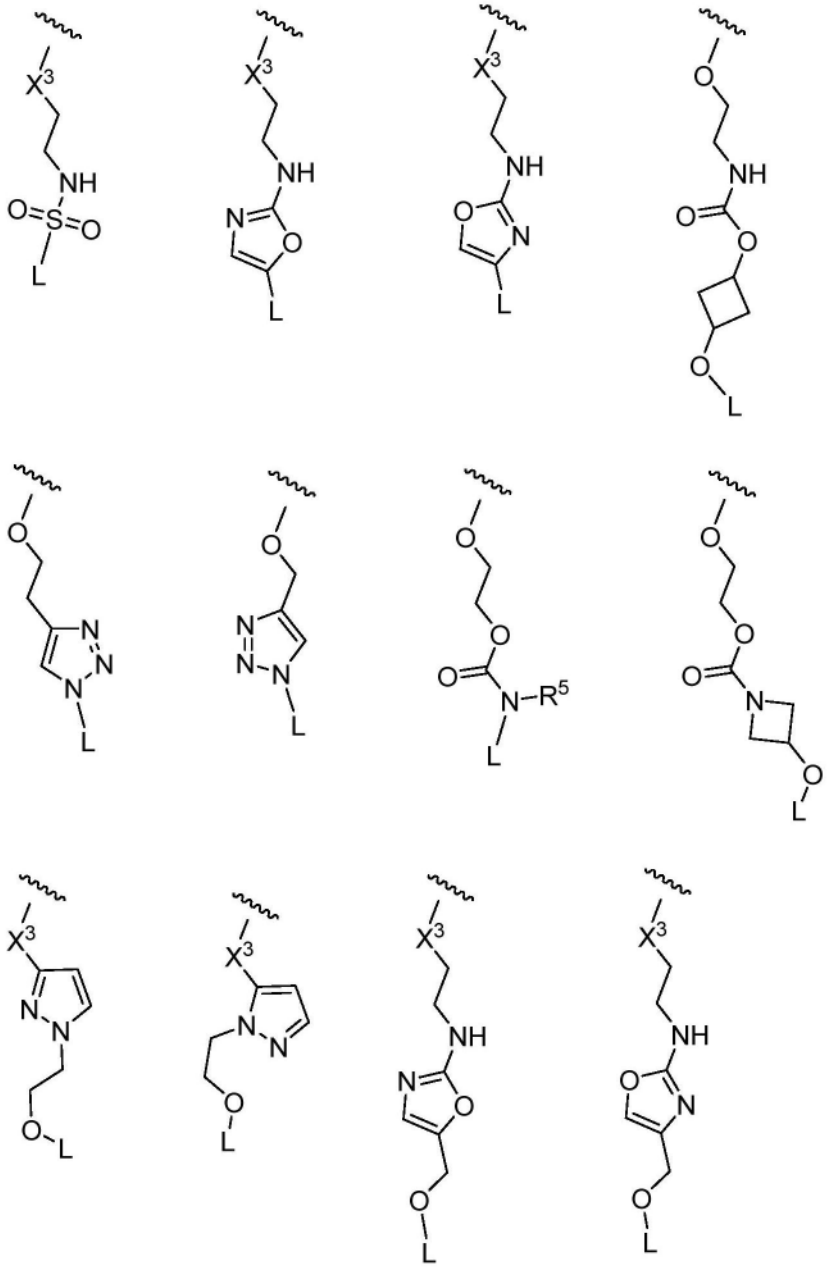
[0476] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R^{1a}是选自以下的基团:任选取代的C_6-C_{20}芳基、C_2-C_9杂环基和C_1-C_{20}杂芳基。

[0477] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R^{1a}是嘧啶基或吡啶基。

[0478] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X^2是键,并且R^2是C_1-C_{12}烷基。

[0479] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中R^3是-(亚C_1-C_{12}烷基二基)-N(R^5)-*。

[0480] 式Ia的免疫缀合物的示例性实施方案包括其中X^3-R^3-L选自由以下组成的组:

[0481] 

[0482] 其中所述波浪线指示与N的连接点。

[0483] 本发明包括具有式I实施方案的特征的所有合理且可操作的组合和排列。

[0484] 在某些实施方案中,本发明的免疫缀合物化合物包括具有免疫刺激活性的那些免疫缀合物化合物。本发明的抗体-药物缀合物向肿瘤组织选择性地递送有效剂量的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓药物,由此可以实现更大的选择性(即,更低的有效剂量),与此同时相对于未缀合的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓增大治疗指数(“治疗窗口”)。

[0485] 载药量由p表示,即式I的免疫缀合物中每抗体的2Am4CBza部分的数量。载药(2Am4CBza)量的范围可以是每抗体1至约8个药物部分(D)。式I的免疫缀合物包括与范围从

1个至约8个的药物部分缀合的抗体的混合物或集合。在一些实施方案中,可与抗体缀合的药物部分的数目受限于反应性或可用的氨基酸侧链残基如赖氨酸和半胱氨酸的数目。在一些实施方案中,通过本文所述的方法将游离半胱氨酸残基引入到抗体氨基酸序列中。在此类方面中,p可以是1、2、3、4、5、6、7或8及其范围,诸如1至8或2至5。在任何此类方面中,p和n相等(即,p=n=1、2、3、4、5、6、7或8,或它们之间的某个范围)。式I的示例性抗体-药物缀合物包括但不限于具有1、2、3或4个工程化半胱氨酸氨基酸的抗体(Lyon,R.等人,(2012)Methods in Enzym.502:123-138)。在一些实施方案中,一个或多个游离半胱氨酸残基已经存在于抗体中从而形成链内二硫键,而无需使用工程化,在这种情况下存在的游离半胱氨酸残基可用于使抗体与药物缀合。在一些实施方案中,在抗体的缀合之前使抗体暴露于还原条件,以便产生一个或多个游离半胱氨酸残基。

[0486] 对于一些免疫缀合物,p可受限于抗体上的连接位点的数目。例如,在连接是半胱氨酸硫醇的情况下,如在本文所述的某些示例性实施方案中,抗体可具有仅一个或有限数目的半胱氨酸硫醇基团,或者可具有仅一个或有限数目的可与药物连接的足够反应性的硫醇基团。在其他实施方案中,抗体中的一个或多个赖氨酸氨基基团对于与式II的2Am4CBza-接头化合物缀合可以是可用的和反应性的。在某些实施方案中,更高的载药量(例如p>5)可能导致某些抗体-药物缀合物的聚集、不溶、毒性或细胞渗透性的丧失。在某些实施方案中,免疫缀合物的平均载药量范围是1至约8;约2至约6;或约3至约5。在某些实施方案中,使抗体经受变性条件以展现反应性亲核基团,诸如赖氨酸或半胱氨酸。

[0487] 可以以不同的方式控制免疫缀合物的载量(药物/抗体比率),例如通过:(i)限制2Am4CBza-接头中间体化合物相对于抗体的摩尔过量,(ii)限制缀合反应时间或温度,和(iii)部分或限制性还原变性条件以优化抗体反应性。

[0488] 要理解的是,在抗体的多于一个亲核基团与药物反应的情况下,则所得产物是具有与抗体连接的一个或多个药物部分的分布的抗体-药物缀合物化合物的混合物。可以通过双重ELISA抗体测定由混合物计算每抗体的药物的平均数,所述双重ELISA抗体测定特异于抗体并且特异于药物。可以通过质谱法来鉴定混合物中的单独免疫缀合物分子,并通过HPLC例如疏水性相互作用色谱法来分离(参见例如,McDonagh等人(2006)Prot.Engr.Design&Selection 19(7):299-307;Hamblett等人(2004)Clin.Cancer Res.10:7063-7070;Hamblett,K.J.等人“Effect of drug loading on the pharmacology,pharmacokinetics,and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate,”文摘号624,American Association for Cancer Research,2004Annual Meeting,2004年3月27-31日,Proceedings of the AACR,第45卷,2004年3月;Alley,S.C.等人“Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates,”文摘号627,American Association for Cancer Research,2004Annual Meeting,2004年3月27-31日,Proceedings of the AACR,第45卷,2004年3月)。在某些实施方案中,可以通过电泳或色谱法从缀合混合物中分离具有单一加载值的均质免疫缀合物。

[0489] 式I的免疫缀合物的示例性实施方案选自表3a和表3b的免疫缀合物。在癌细胞与经cDC富集的原代细胞分离物的共培养物中,表3a和表3b的某些免疫缀合物诱导细胞因子IL-12p70的分泌,这与产生针对癌症的免疫反应有关。研究了靶向艰难梭菌(Clostridium difficile)毒素B的与bezlotox(贝洛托舒单抗)的免疫缀合物IC-28和IC-33作为同种型、

非肿瘤结合对照。根据实施例203的方法进行体外免疫缀合物活性的评定。

[0490] 表3a免疫缀合物(IC)

[0491]

IC 号	2Am4CBza-接头 表 2a	Ab 抗原	DAR	cDC 激活 (IL-12p70 分泌)-EC_{50} (nM)
IC-1	2Am4CBzaL-1	CEA.9-G1fhL2 CEA	2.7	
IC-2	2Am4CBzaL-1	曲妥珠单抗 HER2	2.5	1.3

[0492] 表3b免疫缀合物(IC)

[0493]

IC 号	2Am4CBza-接头 表 2a 至表 2b	Ab 抗原	DAR	cDC 激活 (IL-12p70 分泌)-EC_{50} (nM)
IC-3	2Am4CBzaL-1	阿维鲁单抗 PD-L1	1.8	
IC-4	2Am4CBzaL-1	PDL1.107-G1f PD-L1	2.0	
IC-5	2Am4CBzaL-1	PDL1.53-IgG1f PD-L1	1.8	
IC-6	2Am4CBzaL-1	PDL1.96-G1f PD-L1	2.1	
IC-7	2Am4CBzaL-1	PDL1.110-G1f PD-L1	2.0	
IC-8	2Am4CBzaL-1	PDL1.116-G1f PD-L1	2.1	
IC-9	2Am4CBzaL-1	曲妥珠单抗 HER2	2.4	1.5
IC-10	2Am4CBzaL-5	曲妥珠单抗 HER2	2.4	
IC-11	2Am4CBzaL-4	曲妥珠单抗 HER2	2.6	
IC-12	2Am4CBzaL-7	曲妥珠单抗 HER2	4.1	1.2
IC-13	2Am4CBzaL-8	曲妥珠单抗 HER2	4.2	
IC-14	2Am4CBzaL-9	曲妥珠单抗 HER2	4.1	
IC-15	2Am4CBzaL-6	曲妥珠单抗 HER2	4.2	1.8
IC-16	2Am4CBzaL-3	曲妥珠单抗 HER2	2.6	2.0

[0494]

IC-17	2Am4CBzaL-10	曲妥珠单抗 HER2	2.2	
IC-18	2Am4CBzaL-11	曲妥珠单抗 HER2	3.9	5.1
IC-19	2Am4CBzaL-12	曲妥珠单抗 HER2	3.8-4.1	1.5
IC-20	2Am4CBzaL-14	曲妥珠单抗 HER2	3.2	
IC-21	2Am4CBzaL-6	TROP2.1-G1f TROP2	3.2、4.1	0.9
IC-22	2Am4CBzaL-12	TROP2.1-G1f TROP2	3.3	
IC-23	2Am4CBzaL-1	TROP2.1-G1f TROP2	2.3	
IC-24	2Am4CBzaL-15	TROP2.1-G1f TROP2	2.4	
IC-25	2Am4CBzaL-16	TROP2.1-G1f TROP2	2.4	
IC-26	2Am4CBzaL-18	TROP2.1-G1f TROP2	4.1	
IC-27	2Am4CBzaL-17	TROP2.1-G1f TROP2	3.4、4.2	1.8
IC-28	2Am4CBzaL-6	bezlotox-G1f 艰难梭菌	4.5	
IC-29	2Am4CBzaL-6	TROP2.3-G1f TROP2	4.1	0.7
IC-30	2Am4CBzaL-6	TROP2.5-G1f TROP2	3.3	1.1
IC-31	2Am4CBzaL-19	TROP2.5-G1f TROP2	3.2	
IC-32	2Am4CBzaL-13	PDL1.110-G1f PD-L1	3.1	0.6
IC-33	2Am4CBzaL-13	bezlotox-G1f 艰难梭菌	3.9	

[0495] 免疫缀合物的药物组合物

[0496] 本发明提供了一种组合物,例如药学上或药理学上可接受的组合物或制剂,其包含多种如本文所述的免疫缀合物和任选的用于其的载体,例如药学上或药理学上可接受的载体。所述组合物中的免疫缀合物可以是相同的或不同的,即所述组合物可包含具有与抗体构建体上的相同位置连接的相同数目的佐剂的免疫缀合物和/或具有与抗体构建体上的不同位置连接的相同数目的2Am4CBza佐剂的免疫缀合物、具有与抗体构建体上的相同位置连接的不同数目的佐剂的免疫缀合物或具有与抗体构建体上的不同位置连接的不同数目的佐剂的免疫缀合物。

[0497] 在示例性实施方案中,包含免疫缀合物化合物的组合物包含免疫缀合物化合物的混合物,其中所述免疫缀合物化合物的混合物中每抗体的平均载药(2Am4CBza)量为约2至约5。

[0498] 本发明的免疫缀合物的组合物的平均佐剂与抗体构建体比率可为约0.4至约10。技术人员将认识到,在包含本发明的多种免疫缀合物的组合物中,与抗体构建体缀合的2Am4CBza佐剂的数量可能因免疫缀合物而异,因此,可以将佐剂与抗体构建体(例如,抗体)的比率测量为平均值,所述比率可以称为药物与抗体的比率(DAR)。可以通过任何合适的手段评定佐剂与抗体构建体(例如,抗体)比率,所述手段中的许多手段是本领域中已知的。

[0499] 来自缀合反应的免疫缀合物的制剂中的每个抗体的平均佐剂部分数(DAR)可以通过常规方法来表征,如质谱法、ELISA测定和HPLC。也可以确定以p表示的免疫缀合物在组合物中的定量分布。在一些情形下,可以通过诸如反相HPLC或电泳的方法实现均质免疫缀合物的分离、纯化和表征,其中p是来自具有其它载药量的免疫缀合物的某一值。

[0500] 在一些实施方案中,组合物还包含一种或多种药学上或药理学上可接受的赋形剂。例如,本发明的免疫缀合物可以被配制成用于肠胃外施用,如IV施用或施用到体腔或器官的内腔中。或者,可以肿瘤内注射免疫缀合物。用于注射的组合物将通常包括免疫缀合物溶解于药学上可接受的载体中的溶液。可以使用的可接受的媒介物和溶剂当中有水和一种或多种盐如氯化钠的等渗溶液,例如林格氏溶液。此外,无菌不挥发油可常规用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸同样可用于制备注射剂。这些组合物理想地是无菌的,并且通常不含不期望的物质。可以通过常规的熟知灭菌技术对这些组合物进行灭菌。组合物可以含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,如pH调节和缓冲剂、毒性调节剂,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。

[0501] 组合物可含有任意合适浓度的免疫缀合物。组合物中免疫缀合物的浓度可以广泛变化,并且将根据选择的特定施用模式和患者的需要,主要基于流体体积、粘度、体重等来选择。在某些实施方案中,注射用溶液制剂中的免疫缀合物的浓度范围将是约0.1%(w/w)至约10%(w/w)。

[0502] 用免疫缀合物治疗癌症的方法

[0503] 本发明提供了治疗癌症的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如本文所述的免疫缀合物(例如,作为如本文所述的组合物),所述有需要的受试者例如为患有癌症并需要治疗所述癌症的受试者。所述方法包括施用治疗有效量的选自表3的免疫缀合物(IC)。

[0504] 预期本发明的免疫缀合物可用于治疗各种过度增殖性疾病或疾患,例如以肿瘤抗原的过表达为特征的过度增殖性疾病或疾患。示例性的过度增殖性病症包括良性或恶性实体肿瘤和血液学病症,如白血病和淋巴样恶性肿瘤。

[0505] 在另一方面中,提供了用作药物的免疫缀合物。在某些实施方案中,本发明提供了用于治疗个体的方法的免疫缀合物,所述方法包括向所述个体施用有效量的所述免疫缀合物。在一个此类实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如本文所述。

[0506] 在另外的方面中,本发明提供免疫缀合物在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,所述药物用于治疗癌症,所述方法包括向患有癌症的个体施用有效量的所述药物。在一个此类实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的至少一种另外的治疗剂,例如,如本文所述。

[0507] 癌是起源于上皮组织的恶性肿瘤。上皮细胞覆盖身体的外表面,内衬于内腔,并形成腺体组织的衬里。癌的示例包括但不限于腺癌(始于腺(分泌)细胞的癌症,如乳腺癌、胰腺癌、肺癌、前列腺癌、胃癌、胃食管连接部癌和结肠癌)肾上腺皮质癌;肝细胞癌;肾细胞癌;卵巢癌;原位癌;导管癌;乳腺癌;基底细胞癌;鳞状细胞癌;移行细胞癌;结肠癌;鼻咽癌;多房囊性肾细胞癌;燕麦细胞癌;大细胞肺癌;小细胞肺癌;非小细胞肺癌;等等。前列腺、胰腺、结肠、脑(通常作为继发性转移)、肺、乳腺和皮肤中均可发现癌。在一些实施方案中,用于治疗非小细胞肺癌的方法包括施用含有能够结合PD-L1的抗体构建体(例如,阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物)的免疫缀合物。在一些实施方案中,用于治疗乳腺癌的方法包括施用含有能够结合PD-L1的抗体构建体(例如,阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物)的免疫缀合物。在一些实施方案中,用于治疗三阴性乳腺癌的方法包括施用含有能够结合PD-L1的抗体构建体(例如,阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物)的免疫缀合物。

[0508] 软组织肿瘤是一组来源于结缔组织的高度多样化的罕见肿瘤。软组织肿瘤的示例包括但不限于腺泡状软组织肉瘤;血管瘤样纤维组织细胞瘤;软骨粘液样纤维瘤;骨骼软骨肉瘤;骨外粘液样软骨肉瘤;透明细胞肉瘤;促结缔组织增生性小圆细胞瘤;隆突性皮肤纤维肉瘤;子宫内膜间质肿瘤;尤因肉瘤;纤维瘤病(硬纤维瘤);婴儿型纤维肉瘤;胃肠道间质瘤;骨巨细胞瘤;腱鞘巨细胞瘤;炎性肌纤维母细胞瘤;子宫平滑肌瘤;平滑肌肉瘤;脂肪母细胞瘤;典型脂肪瘤;梭形细胞或多形性脂肪瘤;非典型脂肪瘤;软骨样脂肪瘤;高分化脂肪肉瘤;粘液样/圆细胞脂肪肉瘤;多形性脂肪肉瘤;粘液样恶性纤维组织细胞瘤;高度恶性纤维组织细胞瘤;粘液纤维肉瘤;恶性周围神经鞘瘤;间皮瘤;神经母细胞瘤;骨软骨瘤;骨肉瘤;原始神经外胚层肿瘤;腺泡状横纹肌肉瘤;胚胎型横纹肌肉瘤;良性或恶性神经鞘瘤;滑膜肉瘤;埃文氏瘤(Evan's tumor);结节性筋膜炎;韧带样型纤维瘤病;孤立性纤维瘤;隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP);血管肉瘤;上皮样血管内皮瘤;腱鞘巨细胞瘤(TGCT);色素沉着绒毛结节性滑膜炎(PVNS);纤维发育不良;粘液纤维肉瘤;纤维肉瘤;滑膜肉瘤;恶性周围神经鞘瘤;神经纤维瘤;软组织多形性腺瘤;以及来源于成纤维细胞、肌成纤维细胞、组织细胞、血管细胞/内皮细胞和神经鞘细胞的瘤形成。

[0509] 肉瘤是一种罕见类型的癌症,其起源于间充质来源的细胞,例如身体的骨骼或软组织,包括软骨、脂肪、肌肉、血管、纤维组织或其他结缔或支持组织。不同类型的肉瘤基于癌症形成的位置。例如,骨肉瘤在骨骼中形成,脂肪肉瘤在脂肪中形成,且横纹肌肉瘤在肌肉中形成。肉瘤的示例包括但不限于阿斯金瘤;葡萄状肉瘤;软骨肉瘤;尤因氏肉瘤;恶性血管内皮瘤;恶性神经鞘瘤;骨肉瘤;和软组织肉瘤(例如,肺泡样软组织肉瘤;血管肉瘤;叶状囊肉瘤隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP);硬纤维瘤;促结缔组织增生性小圆细胞瘤;上皮样肉瘤;骨骼外软骨肉瘤;骨骼外骨肉瘤;纤维肉瘤;胃肠道间质瘤(GIST);血管外皮细胞瘤;血管内皮瘤(更通常称为“血管肉瘤”);卡波西肉瘤;平滑肌肉瘤;脂肪肉瘤;淋巴管肉瘤;恶性周围神经鞘瘤(MPNST);神经纤维肉瘤;滑膜肉瘤;和未分化多形性肉瘤)。

[0510] 畸胎瘤是一种类型的生殖细胞肿瘤,其可含有若干不同类型的组织(例如,可包括源自任何和/或所有三个胚层的组织:内胚层、中胚层和外胚层),包括例如毛发、肌肉和骨骼。畸胎瘤最常发生在女性的卵巢、男性的睾丸和儿童的尾椎骨中。

[0511] 黑素瘤是始于黑素细胞(产生黑色素的细胞)的癌症形式。黑素瘤可始于痣(皮肤黑素瘤),但也可始于其它有色素组织,如眼睛或肠。

[0512] 默克尔细胞癌是一种罕见的皮肤癌,其通常表现为面部、头部或颈部的肉色或蓝红色结节。默克尔细胞癌也称为皮肤的神经内分泌癌。在一些实施方案中,用于治疗默克尔细胞癌的方法包括施用含有能够结合PD-L1的抗体构建体(例如,阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物)的免疫缀合物。在一些实施方案中,当施用发生时,默克尔细胞癌已经转移。

[0513] 白血病是在形成血液的组织如骨髓中开始的癌症,并且导致产生大量异常的血细胞并进入血流。例如,白血病可起源于通常在血流中成熟的骨髓源性细胞。白血病针对疾病发展和进展的有多快速(例如,急性与慢性)以及受影响的白细胞类型(例如,骨髓与淋巴)来命名。髓样白血病也称为骨髓性或成髓细胞白血病。淋巴样白血病也称为淋巴母细胞或淋巴细胞白血病。淋巴样白血病细胞可聚集在淋巴结中,所述淋巴结会肿胀。白血病的示例包括但不限于急性髓样白血病(AML)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性髓样白血病(CML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。

[0514] 淋巴瘤是始于免疫系统的细胞的癌症。例如,淋巴瘤可起源于通常在淋巴系统中成熟的骨髓源性细胞。有两种基本类别的淋巴瘤。一种类别的淋巴瘤是霍奇金淋巴瘤(HL),其特征是存在被称为里德-斯德伯格氏细胞的细胞类型。HL目前有6种公认的类型。霍奇金淋巴瘤的示例包括结节硬化典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、混合细胞性CHL、淋巴细胞耗竭型CHL、富淋巴细胞型CHL和结节性淋巴细胞为主型HL。

[0515] 另一种类别的淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤(NHL),其包括大量不同的免疫系统细胞的癌症。非霍奇金淋巴瘤可进一步分成具有惰性(缓慢生长)病程的癌症和具有侵袭性(快速生长)病程的癌症。NHL目前有61种公认的类型。非霍奇金淋巴瘤的示例包括但不限于AIDS相关淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、伯基特样淋巴瘤(小非裂细胞淋巴瘤)、慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、肝脾γ-δT细胞淋巴瘤、T细胞白血病、淋巴母细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、鼻T细胞淋巴瘤、小儿淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、转化淋巴瘤、治疗相关的T细胞淋巴瘤和华氏巨球蛋白血症。

[0516] 脑癌包括脑组织的任何癌症。脑癌的示例包括但不限于神经胶质瘤(例如,成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤等)、脑膜瘤、垂体腺瘤和前庭神经鞘瘤、原始神经外胚层瘤(髓母细胞瘤)。

[0517] 本发明的免疫缀合物可以单独使用或与疗法中的其它剂组合使用。例如,免疫缀合物可以与至少一种另外的治疗剂如化学治疗剂共同施用。这类组合疗法涵盖组合施用(其中在同一或分开的制剂中包括两种或更多种治疗剂)和单独施用,在后一种情况下,免疫缀合物的施用可以在另外的治疗剂和/或佐剂的施用之前、同时和/或之后进行。免疫缀合物也可以与放射疗法组合使用。

[0518] 可以通过任意合适的方式施用本发明的免疫缀合物(和任何另外的治疗剂),包括肠胃外、肺内和鼻内施用,并且如果需要局部治疗,则进行病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。可以通过任意合适的途径给药,例如通过注射,如

静脉内或皮下注射,这部分地取决于施用是短暂的还是长期的。本文考虑包括但不限于在各种时间点单次或多次施用、推注施用和脉冲输注的各种给药方案。

[0519] 已知阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药及它们的改良型生物相似性药物可用于治疗癌症,特别是乳腺癌,尤其是三阴性(雌激素受体、孕激素受体和过量HER2蛋白测试呈阴性)乳腺癌、膀胱癌和默克尔细胞癌。本文所述的免疫缀合物可用于治疗如阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药及它们的改良型生物相似性药物所用于的相同类型的癌症,尤其是乳腺癌,尤其是三阴性(雌激素受体、孕激素受体和过量HER2蛋白测试呈阴性)乳腺癌、膀胱癌和默克尔细胞癌。

[0520] 使用任何合适的给药方案,诸如用于阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药及它们的改良型生物相似性药物的给药方案,以任何治疗有效量向有需要的受试者施用免疫缀合物。例如,所述方法可包括施用免疫缀合物以向受试者提供约100ng/kg至约50mg/kg的剂量。免疫缀合物剂量的范围可以是约5mg/kg至约50mg/kg、约10μg/kg至约5mg/kg或约100μg/kg至约1mg/kg。免疫缀合物剂量可以为约100、200、300、400或500μg/kg。免疫缀合物剂量可以为约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg。免疫缀合物剂量也可以在这些范围之外,这取决于特定的缀合物以及所治疗的癌症的类型和严重程度。施用的频率范围可以从每周单剂量至多剂量,或更频繁。在一些实施方案中,约每月一次至约每周五次施用免疫缀合物。在一些实施方案中,每周一次施用免疫缀合物。

[0521] 在另一方面中,本发明提供预防癌症的方法。所述方法包括向受试者施用治疗有效量的免疫缀合物(例如,如上所述的组合物的形式)。在某些实施方案中,受试者易患某种要预防的癌症。例如,所述方法可包括施用免疫缀合物以向受试者提供约100ng/kg至约50mg/kg的剂量。免疫缀合物剂量的范围可以是约5mg/kg至约50mg/kg、约10μg/kg至约5mg/kg或约100μg/kg至约1mg/kg。免疫缀合物剂量可以为约100、200、300、400或500μg/kg。免疫缀合物剂量可以为约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg。免疫缀合物剂量也可以在这些范围之外,这取决于特定的缀合物以及所治疗的癌症的类型和严重程度。施用的频率范围可以从每周单剂量至多剂量,或更频繁。在一些实施方案中,约每月一次至约每周五次施用免疫缀合物。在一些实施方案中,每周一次施用免疫缀合物。

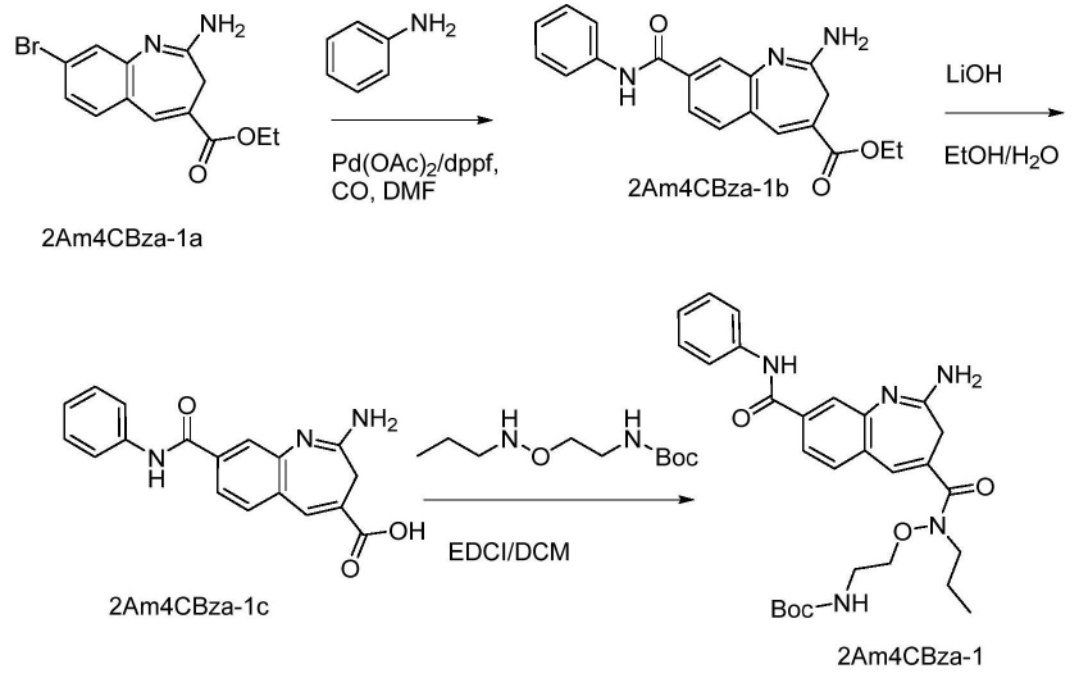
[0522] 本发明的一些实施方案提供治疗如上所述的癌症的方法,其中所述癌症是乳腺癌。乳腺癌可起源于乳房的不同区域,并且已经表征了许多不同类型的乳腺癌。例如,本发明的免疫缀合物可用于治疗导管原位癌;浸润性导管癌(例如,管状癌;髓样癌;粘液癌;乳头状癌;或乳腺筛状癌);小叶原位癌;浸润性小叶癌;炎症性乳腺癌;和其他形式的乳腺癌,诸如三阴性(雌激素受体、孕激素受体和过量HER2蛋白测试呈阴性)乳腺癌。在一些实施方案中,用于治疗乳腺癌的方法包括施用含有能够结合HER2(例如,曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物)和PD-L1(例如,阿特珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗、它们的生物仿制药或改良型生物相似性药物)的抗体构建体的免疫缀合物。在一些实施方案中,用于治疗结肠癌肺癌、肾癌、胰腺癌、胃癌和食道癌的方法包括施用含有能够结合CEA或过表达CEA的肿瘤的抗体构建体(例如,拉贝珠单抗、其生物仿制药或改良型生物相似性药物)的免疫缀合物。

[0523] 在一些实施方案中,所述癌症对由TLR7和/或TLR8诱导的促炎性反应敏感。

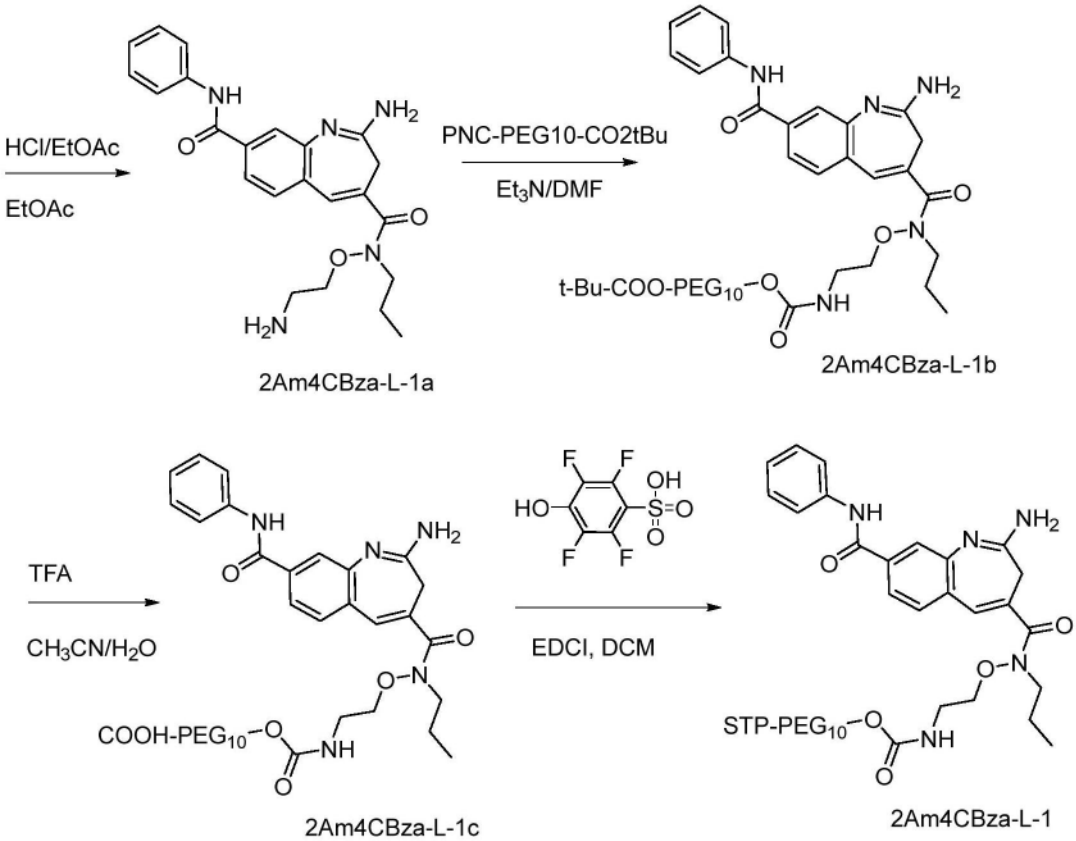
[0524] 实施例

[0525] 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓化合物(2Am4CBza)和中间体的制备

[0526] 实施例1 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸2Am4CBza-L-1的合成



[0527]



[0528] 2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酸乙酯2Am4CBza-1b的制

备

[0529] 在N_2下向2-氨基-8-溴-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酸乙酯2Am4CBza-1a(2g,6.47mmol(毫摩尔),1当量)和苯胺(3.01g,32.3mmol,2.95mL,5当量)在DMF(20mL)中的溶液中加入Pd(OAc)$_2$(218mg,970umol(毫摩尔),0.15当量)、DPPF(610mg,1.10mmol,0.17当量)和TEA(3.27g,32.3mmol,4.50mL,5当量)。将悬浮液在真空下脱气,并用一氧化碳气体CO吹扫几次。将混合物在CO(50psi)和80℃下搅拌12h。将反应混合物过滤并减压浓缩。将残余物用H_2O(60mL)稀释,并用EtOAc(50mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(30mL×3)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并减压浓缩。将残余物通过柱色谱法(SiO_2,石油醚/乙酸乙酯=1/0至0/1)以及然后(SiO_2,EtOAc/MeOH=1/0至10/1)纯化以得到呈黄色固体的2Am4CBza-1b(0.82g,2.35mmol,36.28%产率)。

[0530] 2 2-氨基-8-(苯氨基甲酰基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酸2Am4CBza-1c的制备

[0531] 向2Am4CBza-1b(810mg,2.32mmol,1当量)在EtOH(8mL)中的溶液中加入LiOH.H_2O(486.40mg,11.59mmol,5当量)在H_2O(2mL)中的溶液。将混合物在20℃搅拌3h,然后用1N HCl调节至pH=6-7,并真空浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex luna C18 250*50mm*10um;流动相:[水(0.05%HCl)-ACN];B%:5%-35%,10min)纯化以得到呈白色固体的2Am4CBza-1c(180mg,560.17umol,24.16%产率)。^{1}H NMR(DMSO-d_4,400MHz)δ12.43(s,1H),10.49(s,1H),10.09(s,1H),9.07(br s,1H),7.99(d,J=8.4Hz,1H),7.96-7.93(m,2H),7.87-7.83(m,1H),7.79(d,J=7.6Hz,2H),7.38(t,J=7.6Hz,2H),7.16-7.11(m,1H),3.52(s,2H)。

[0532] N-[2-[[2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基]氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-1的制备

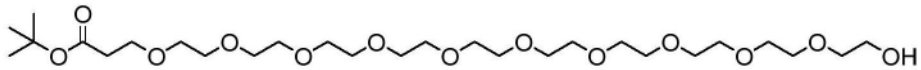
[0533] 在N_2下于25℃向2Am4CBza-1c(100mg,311umol,1当量)和N-[2-(丙氨基氧基)乙基]氨基甲酸叔丁酯(88.3mg,405umol,1.3当量)在DCM(3mL)和DMA(1.5mL)中的混合物中加入EDCI(238mg,1.24mmol,4当量),然后在25℃下搅拌1小时。将混合物真空浓缩以去除DCM,将残余物用H_2O(10mL)稀释,然后用$NaHCO_3$水溶液将混合物的pH调节至约8,用乙酸乙酯(20mL*3)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL)洗涤,用无水Na_2SO_4干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过制备型HPLC柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:15%-45%,8min纯化以得到呈白色固体的2Am4CBza-1(80mg,153umol,49.28%产率)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ8.03-7.93(m,2H),7.77(d,J=8.0Hz,1H),7.74-7.67(m,2H),7.52(s,1H),7.39(t,J=8.0Hz,2H),7.24-7.14(m,1H),3.95(t,J=5.2Hz,2H),3.76(t,J=7.2Hz,2H),3.43(s,2H),3.27(t,J=5.2Hz,2H),1.78(sxt,J=7.2Hz,2H),1.37(s,9H),1.00(t,J=7.2Hz,3H)。

[0534] 2-氨基-N4-(2-氨基乙氧基)-N8-苯基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-1a的制备

[0535] 在25℃下向2Am4CBza-1(80mg,153umol,1当量)在EtOAc(1mL)中的混合物中一次性加入HCl/EtOAc(4M,3mL,78.0当量),然后在25℃下搅拌1小时。将混合物真空浓缩以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-1a(70mg,152.85umol,99.66%产率,HCl)。

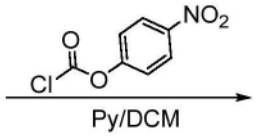
[0536] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(4-硝基苯氧基)羰基氧乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯PNC-PEG10-

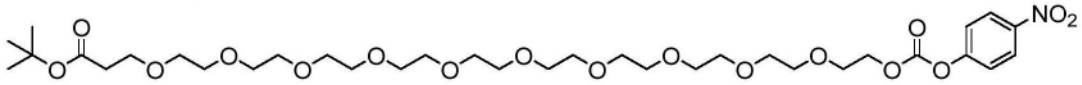
CO2tBu的制备



HO-PEG10-CO2tBu

[0537]





PNC-PEG10-CO2tBu

[0538] 在0℃下向3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯HO-PEG10-CO2tBu(1g,1.70mmol,1.0当量)和(4-硝基苯基)碳酰氯(378mg,1.87mmol,1.1当量)的混合物在DCM(20mL)中的溶液中添加吡啶(202mg,2.56mmol,206uL,1.5当量)。将混合物在25℃下搅拌2小时。用1M HCl将混合物的pH调节至约4。将所述残余物倒入冰-水(w/w=1/1)(100mL)中并搅拌10min。将水相用DCM(50mL×3)萃取。将合并的有机相用无水Na_2SO_4干燥,过滤并真空浓缩。将残余物经硅胶色谱(柱高:250mm,直径:100mm,100-200目硅胶,石油醚/乙酸乙酯=1/0:0/1,乙酸乙酯/甲醇=1/0:2/1)纯化,以得到呈无色油状物的PNC-PEG10-CO2tBu(650mg,865umol,50.73%产率)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ8.38-8.27(m,2H),7.54-7.45(m,2H),4.47-4.42(m,2H),3.80-3.53(m,40H),2.53-2.44(m,2H),1.50-1.41(m,9H)。

[0539] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯2Am4CBza-L-1b的制备

[0540] 在N_2下于25℃向2Am4CBza-L-1a(70mg,153umol,1当量,HCl)和PNC-PEG10-CO2tBu(126mg,168umol,1.1当量)在DMF(2.5mL)中的混合物中加入Et_3N(38.7mg,382umol,2.5当量),然后在25℃下搅拌1小时。将混合物过滤并通过制备型HPLC柱:Phenomenex luna C18 100*40mm*5um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:15%-55%,8min纯化以得到呈无色油状物的2Am4CBza-L-1b(70mg,67.7umol,44.28%产率)。

[0541] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸2Am4CBza-L-1c的制备

[0542] 在N_2下于25℃向2Am4CBza-L-1b(70mg,67.7umol,1当量)在CH_3CN(1mL)和H_2O(1mL)中的混合物中加入TFA(77.2mg,677umol,10当量),然后在80℃搅拌2小时。在0℃用$NaHCO_3$水溶液将混合物的pH调节至约5,然后用DCM/i-PrOH=3/1(10mL*3)萃取。将合并的有机相用无水Na_2SO_4干燥,过滤并真空浓缩以得到呈淡黄色油状物的2Am4CBza-L-1c(65mg,66.46umol,98.18%产率)。

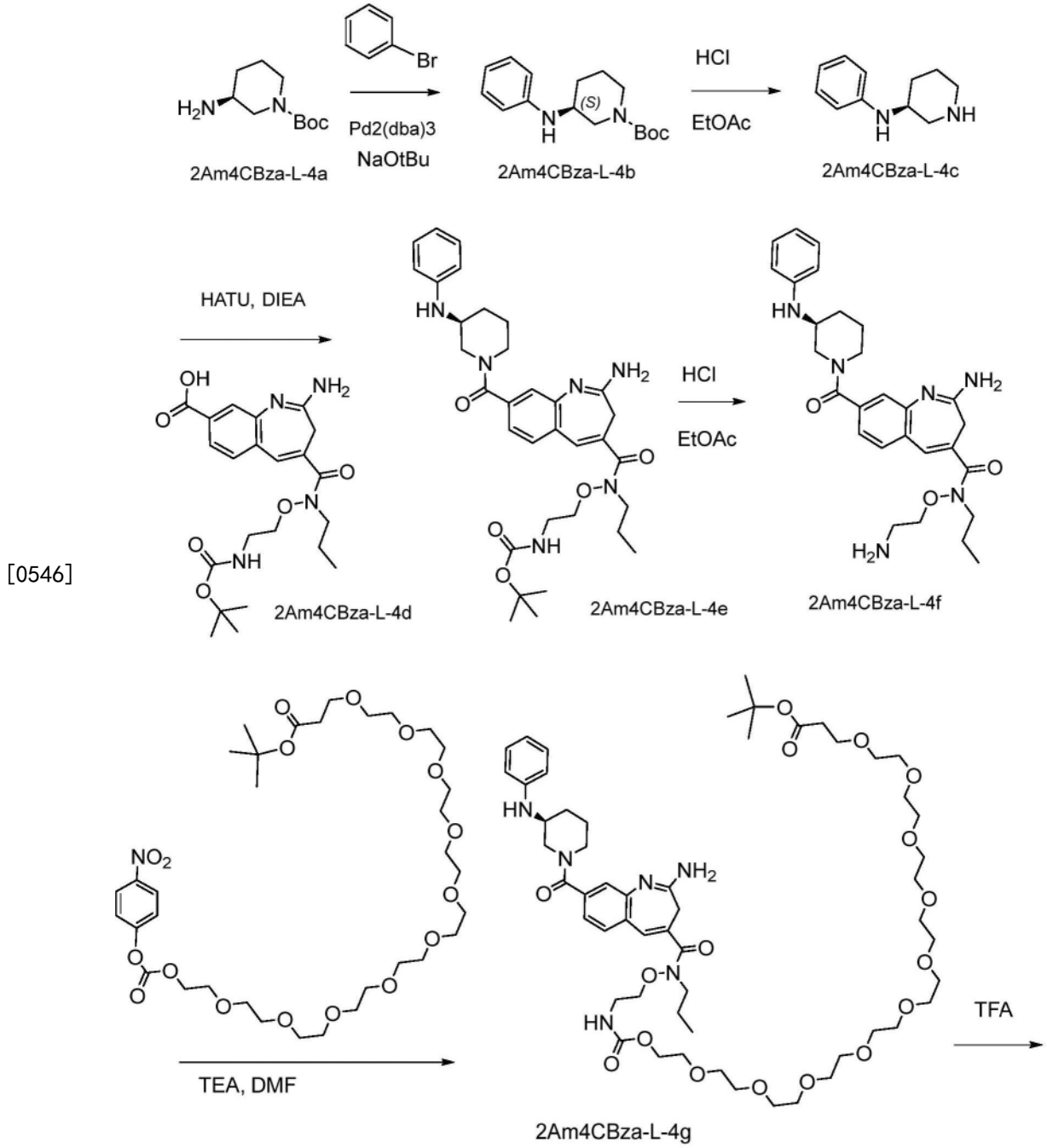
[0543] 2Am4CBza-L-1的制备

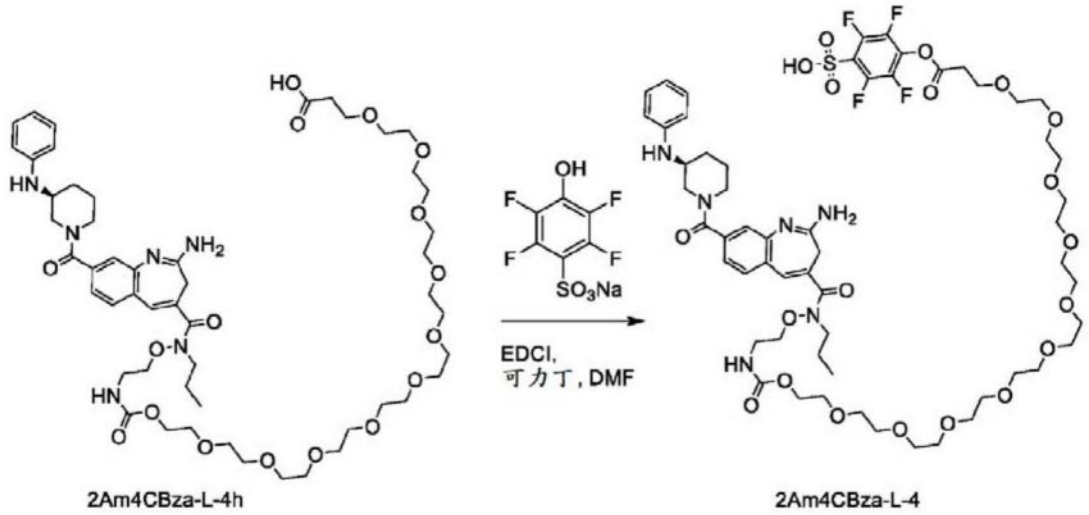
[0544] 在N_2下于25℃向2Am4CBza-L-1c(60mg,61.34umol,1当量)和2,3,5,6-四氟-4-羟基-苯磺酸钠STP(49.3mg,184umol,3当量)在DCM(2mL)和DMA(0.5mL)中的混合物中加入

EDCI(35.3mg,184umol(微摩尔),3当量),然后在25℃下搅拌1小时。将混合物真空浓缩,然后通过制备型HPLC柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:15%-40%,8min纯化以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-1(40mg,33.16umol,54.06%产率)。^{1}HNMR(MeOD,400MHz)δ8.06-7.95(m,2H),7.73(dd,J=5.0,7.6Hz,3H),7.49-7.43(m,1H),7.45(s,1H),7.38(t,J=8.0Hz,2H),7.23-7.13(m,1H),3.98(t,J=5.0Hz,2H),3.85(t,J=5.6Hz,2H),3.80(br d,J=4.4Hz,2H),3.75(t,J=7.2Hz,2H),3.66-3.54(m,38H),3.51-3.42(m,4H),2.96(t,J=6.0Hz,2H),1.77(sxt,J=7.2Hz,2H),1.00(t,J=7.2Hz,3H)。HPLC:99.47%(220nm),99.31%(254nm)。LC/MS[M+H]1206.4(计算值);LC/MS[M+H]1206.7(实测值)。LC/MS[M+H]1206.4(计算值);LC/MS[M+H]1206.7(实测值)。

[0545] 实施例4 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-[(3S)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸2Am4CBza-L-4的合成

[0546]


Br
Pd2(dba)3
NaOtBu
HCl
EtOAc
HATU, DIEA
TEA, DMF
TFA
2Am4CBza-L-4a
2Am4CBza-L-4b
2Am4CBza-L-4c
2Am4CBza-L-4d
2Am4CBza-L-4e
2Am4CBza-L-4f
2Am4CBza-L-4g

[0547] 

[0548] (3S)-3-苯胺基哌啶-1-甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-4b的制备

[0549] 在N_2下于20℃向(3S)-3-苯胺基哌啶-1-甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-4a(1.00g,4.99mmol,1.0当量)和溴苯(780mg,4.99mmol,526uL,1.0当量)在甲苯(10.0mL)中的溶液中加入叔丁醇钠NaOtBu(580mg,5.99mmol,1.2当量)、2-(2-二环已基膦酰基苯基)-N,N-二甲基苯胺(140mg,349umol,0.07当量)和三(二亚苄基丙酮)二钯(0)$Pd_2(dba)_3$,CAS注册号51364-51-3(230mg,249umol,0.05当量)。将混合物于100℃搅拌24h。将混合物用水(30mL)稀释,并用EtOAc(30mL×3)萃取。将有机层用盐水(20mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将残余物通过闪速硅胶色谱法(ISCO;12gSepaFlash二氧化硅闪蒸塔,洗脱液为0-50%乙酸乙酯/石油醚,梯度:45mL/min)纯化以得到呈淡黄色固体的2Am4CBza-L-4b(1.2g,4.34mmol,86.9%产率)。^{1}H NMR(CDCl$_3$,400MHz)δ7.18(dd,J=7.6,8.4Hz,2H),6.77-6.60(m,3H),4.09-3.95(m,1H),3.83-3.62(m,2H),3.45-3.33(m,1H),3.09(br d,J=9.6Hz,1H),2.98-2.78(m,1H),2.04-1.94(m,1H),1.80-1.71(m,1H),1.65-1.53(m,2H),1.46(s,9H)。LC/MS[M+H]277.2(计算值);LC/MS[M+H]277.2(实测值)。

[0550] (3S)-N-苯基哌啶-3-胺2Am4CBza-L-4c的制备

[0551] 向2Am4CBza-L-4b(1.20g,4.34mmol,1.0当量)在EtOAc(5.00mL)中的溶液中加入HCl/EtOAc(4M,18.0mL,17.0当量)。将混合物在20℃下搅拌1h。将混合物浓缩以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-4c(900mg,3.61mmol,83.1%产率,2HCl)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ7.59-7.52(m,2H),7.49-7.41(m,3H),3.94(tt,J=4.0,10.8Hz,1H),3.62-3.54(m,1H),3.40(d,J=12.0Hz,1H),3.20(t,J=11.6Hz,1H),3.04(dt,J=3.2,12.4Hz,1H),2.26-2.07(m,2H),1.93-1.78(m,2H)。LC/MS[M+H]177.2(计算值);LC/MS[M+H]177.2(实测值)。

[0552] 2Am4CBza-L-4e的制备

[0553] 向2-氨基-4-[2-(叔丁氧羰基氨基)乙氧基-丙基-氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂卓-8-甲酸2Am4CBza-L-4d(250mg,559umol,1.0当量)在DMF(1.00mL)中的溶液中加入HATU(210mg,559umol,1.0当量)、DIEA(290mg,2.24mmol,390uL,4.0当量)和(3S)-N-苯基哌啶-3-胺2Am4CBza-L-4c(130mg,603umol,1.08当量,HCl),然后在0℃下搅拌1h。将混合物过滤并通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna80*30mm*3um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:5%-50%,8min)纯化,以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-4e(160mg,222umol,39.7%产率,TFA)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ7.76-7.38(m,3H),7.36-7.15(m,2H),7.11-6.90(m,2H),

6.63-6.42(m,2H),3.95-3.92(m,2H),3.89-3.61(m,4H),3.60-3.32(m,4H),3.28-3.23(m,2H),3.08-2.96(m,1H),2.20-1.94(m,2H),1.84-1.67(m,4H),1.38(s,9H),0.99(t,J＝7.6Hz,3H)。LC/MS[M+H]605.3(计算值);LC/MS[M+H]605.3(实测值)。

[0554] 2-氨基-N-(2-氨基乙氧基)-8-[(3S)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-正丙基-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酰胺2Am4CBza-L-4f的制备

[0555] 向2Am4CBza-L-4e(90.0mg,125umol,1.0当量,TFA)在EtOAc(5.00mL)中的溶液中加入HCl/EtOAc(4M,10.0mL,319.0当量)。将混合物在20℃下搅拌1h,然后浓缩以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-4f(78.0mg,粗品,2HCl)。LC/MS[M+H]505.3(计算值);LC/MS[M+H]505.3(实测值)。

[0556] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-[(3S)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯2Am4CBza-L-4g的制备

[0557] 向2Am4CBza-L-4f(70.0mg,121umol,1.0当量,2HCl)在DMF(1.00mL)中的溶液中加入Et_3N(50.0mg,484umol,70.0uL,4.0当量)和3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(4-硝基苯氧基)羰氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯(90.0mg,121umol,1.0当量)。将混合物在0℃下搅拌1h,然后用水(10mL)稀释并用EtOAc(20mL×3)萃取。将有机层用盐水(10mL)洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩,以得到呈淡黄色油状物的2Am4CBza-L-4g(200mg,粗品)。LC/MS[M+H]1117.6(计算值);LC/MS[M+H]1117.6(实测值)。

[0558] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-[(3S)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸2Am4CBza-L-4h的制备

[0559] 向2Am4CBza-L-4g(200mg,179umol,1.0当量)在CH_3CN(1.00mL)和H_2O(1.00mL)中的溶液中加入TFA(200mg,1.79mmol,130uL,10.0当量),然后在80℃下搅拌1h。将混合物浓缩以得到残余物。将残余物通过制备型HPLC柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:5%-40%,8min纯化以得到呈无色油状物的2Am4CBza-L-4h(50mg,42.5umol,23.7%产率,TFA)。LC/MS[M+H]1061.5(计算值);LC/MS[M+H]1061.5(实测值)。

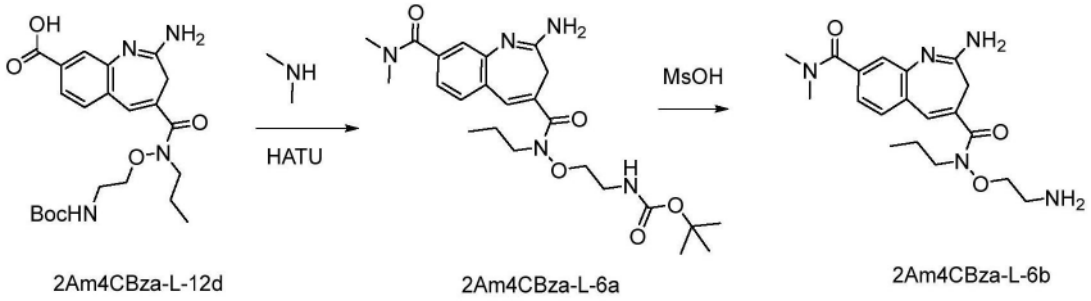
[0560] 2Am4CBza-L-4的制备

[0561] 向2Am4CBza-L-4h(40.0mg,34.0umol,1.0当量,TFA)和2,3,5,6-四氟-4-羟基-苯磺酸(33.5mg,136umol,4.0当量)在DCM(2.00mL)和DMA(0.20mL)中的溶液中加入EDCI(30.0mg,136umol,4.0当量),然后在20℃下搅拌1h。将混合物浓缩以得到残余物。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:15%-50%,8min)纯化以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-4(21mg,14.9umol,43.9%产率,TFA)。^1H NMR(MeOD,400MHz)δ7.67-7.24(m,5H),7.17-6.96(m,2H),6.71-6.41(m,2H),3.99-3.94(m,2H),3.90-3.80(m,6H),3.77-3.71(m,4H),3.65-3.58(m,38H),3.54-3.47(m,4H),2.97(t,J＝6.0Hz,2H),2.22-1.95(m,2H),1.85-1.68(m,4H),1.03-0.97(m,3H)。LC/MS[M+H]1289.5(计算值);LC/MS[M+H]1289.5(实测值)。

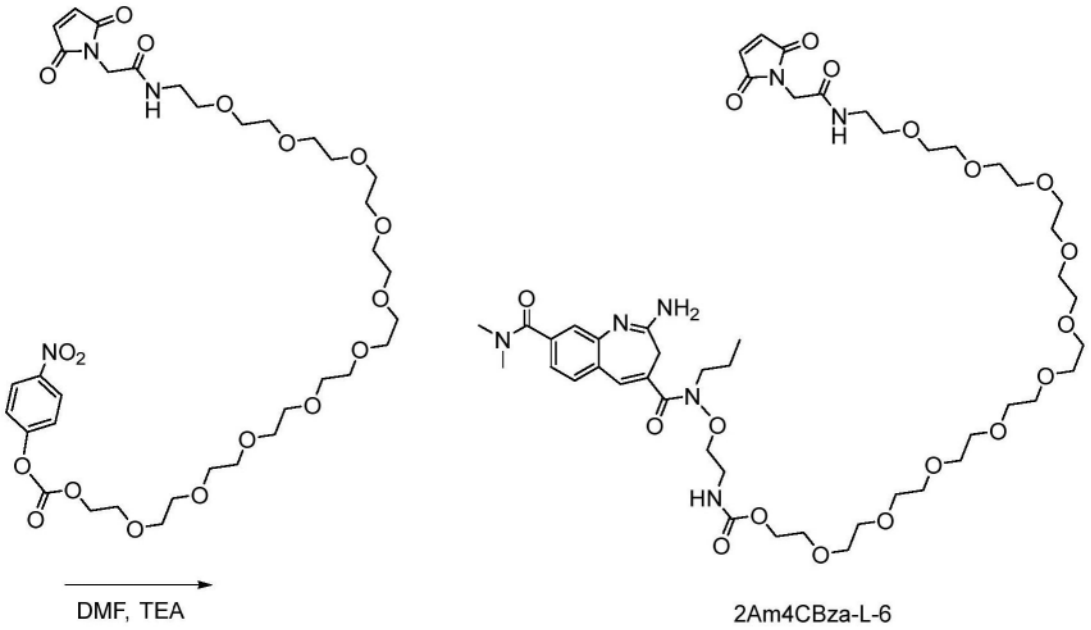
[0562] 实施例6(2-((2-氨基-8-(二甲基氨基甲酰基)-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-羧

酰氨基)氧基)乙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-酯2Am4CBza-L-6的合成

[0563]



[0564]



[0565] (2-((2-氨基-8-(二甲基氨基甲酰基)-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-6a的制备

[0566] 使2-氨基-4-((2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)(丙基)氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-8-甲酸2Am4CBza-L-12d与二甲胺和HATU反应以得到2Am4CBza-L-6a。LC/MS[M+H]474.27(计算值);LC/MS[M+H]474.45(实测值)。

[0567] 2-氨基-N4-(2-氨基乙氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-6b的制备

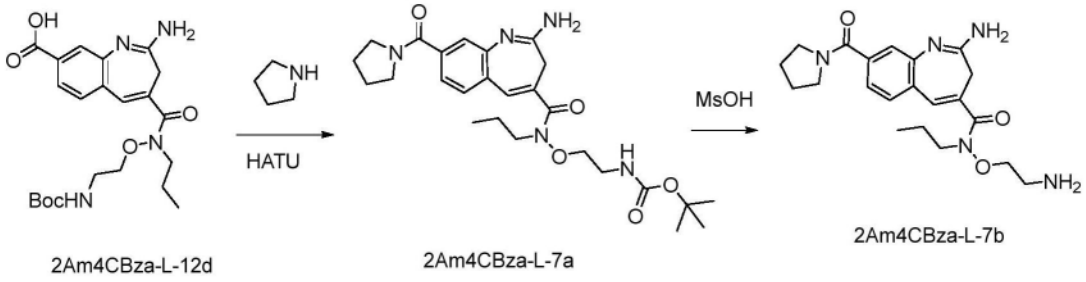
[0568] 使2Am4CBza-L-6a与甲磺酸反应以得到2Am4CBza-L-6b。LC/MS[M+H]374.22(计算值);LC/MS[M+H]374.36(实测值)。

[0569] 2Am4CBza-L-6的制备

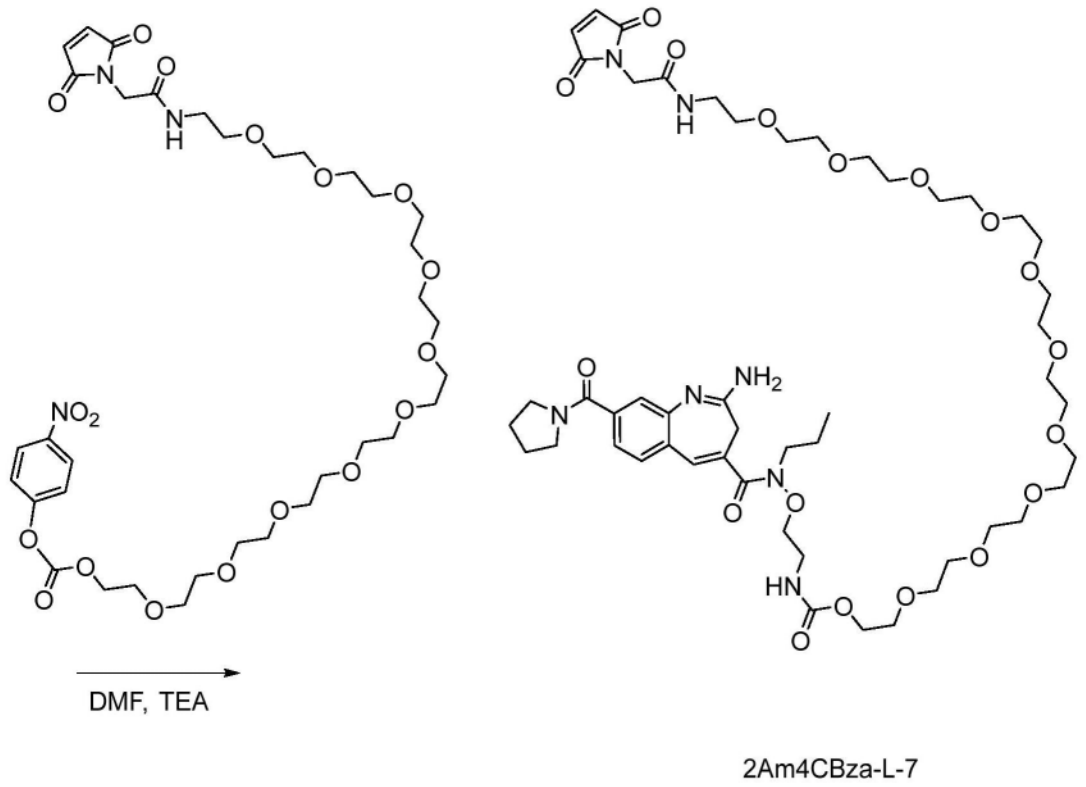
[0570] 向2Am4CBza-L-6b在DMF中的溶液中添加DIEA和(4-硝基苯基)碳酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯,然后在25℃下搅拌1h。将混合物用TFA猝灭直至pH=约6。然后将混合物过滤,通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:5%-35%,8min)纯化,以得到2Am4CBza-L-6。LC/MS[M+H]1038.52(计算值);LC/MS[M+H]1038.63(实测值)。

[0571] 实施例7(2-((2-氨基-正丙基-8-(吡咯烷-1-羰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺

基)氧基)乙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-基酯2Am4CBza-L-7的合成



[0572]



[0573] (2-((2-氨基-正丙基-8-(吡咯烷-1-羰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-7a的制备

[0574] 使2-氨基-4-((2-((叔丁氧基羰基)氨基)乙氧基)(丙基)氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-8-甲酸2Am4CBza-L-12d与吡咯烷和HATU反应以得到2Am4CBza-L-7a。LC/MS[M+H]500.29(计算值);LC/MS[M+H]500.48(实测值)。

[0575] 2-氨基-N-(2-氨基乙氧基)-正丙基-8-(吡咯烷-1-羰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺2Am4CBza-L-7b的制备

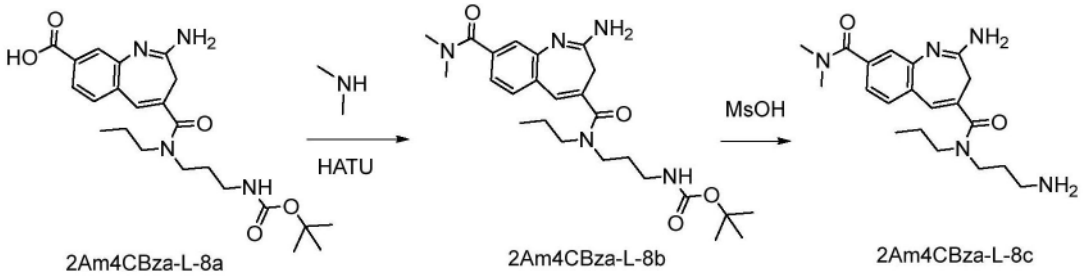
[0576] 使2Am4CBza-L-7a与甲磺酸反应以得到2Am4CBza-L-7b。LC/MS[M+H]400.23(计算值);LC/MS[M+H]400.39(实测值)。

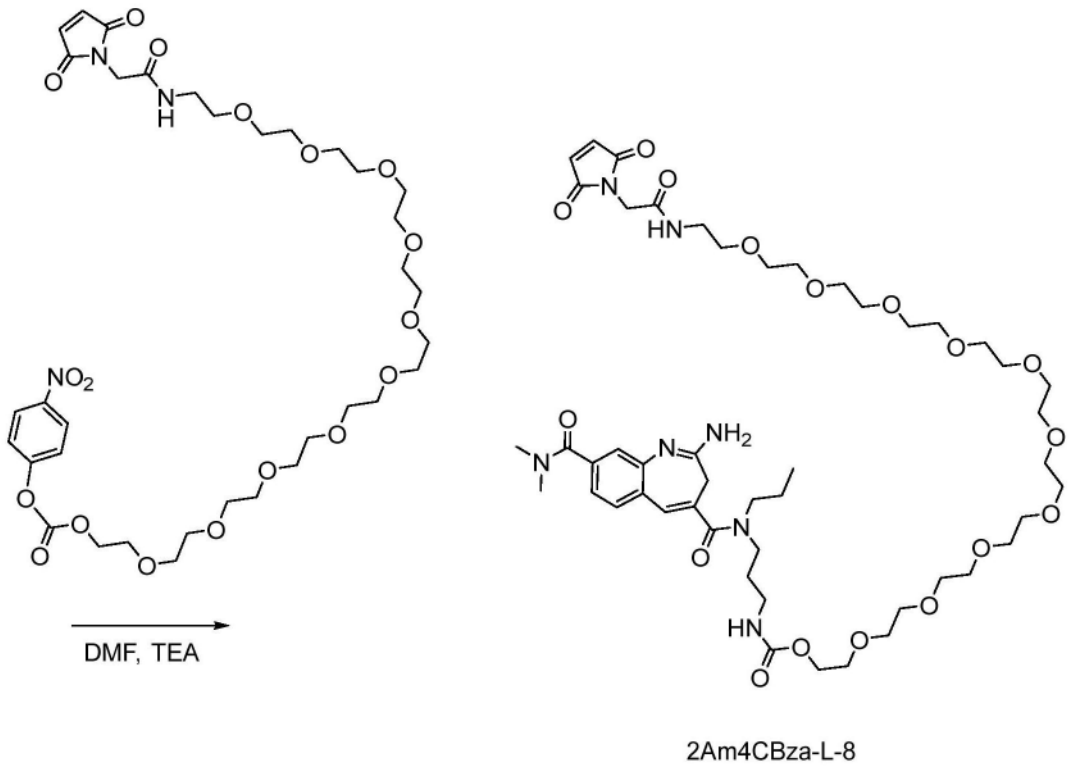
[0577] 2Am4CBza-L-7的制备

[0578] 向2Am4CBza-L-7b在DMF中的溶液中添加DIEA和(4-硝基苯基)碳酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯,然后在25℃下搅拌1h。将混

合物用TFA猝灭直至pH＝约6。然后将混合物过滤,通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:5%-35%,8min)纯化,以得到2Am4CBza-L-7。LC/MS[M+H]1064.54(计算值);LC/MS[M+H]1064.67(实测值)。

[0579] 实施例8(3-(2-氨基-8-(二甲基氨基甲酰基)-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)丙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-基酯2Am4CBza-L-8的合成

[0580] 

[0581] 

[0582] (3-(2-氨基-8-(二甲基氨基甲酰基)-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)丙基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-8b的制备

[0583] 使2-氨基-4-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)(丙基)氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-8-甲酸2Am4CBza-L-8a与二甲胺和HATU反应以得到2Am4CBza-L-8b。LC/MS[M+H]472.29(计算值);LC/MS[M+H]472.56(实测值)。

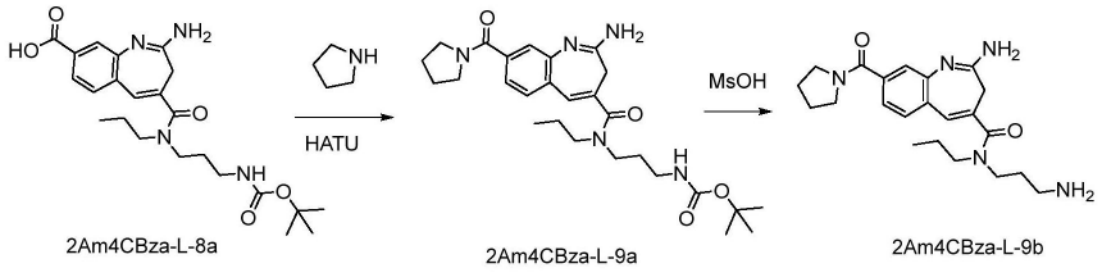
[0584] 2-氨基-N4-(3-氨基丙基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-8c的制备

[0585] 使2Am4CBza-L-8b与甲磺酸反应以得到2Am4CBza-L-8c。LC/MS[M+H]372.24(计算值);LC/MS[M+H]372.34(实测值)。

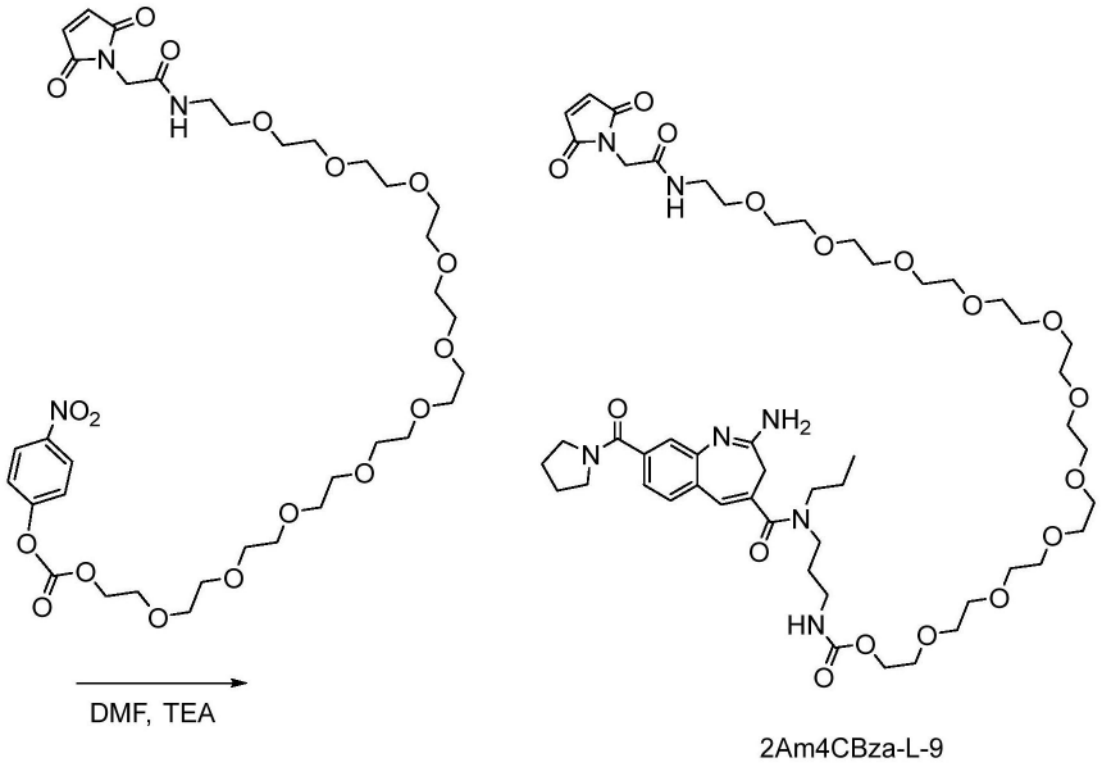
[0586] 2Am4CBza-L-8的制备

[0587] 向2Am4CBza-L-8c在DMF中的溶液中添加DIEA和(4-硝基苯基)碳酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯,然后在25℃下搅拌1h。将混合物用TFA猝灭直至pH＝约6。然后将混合物过滤,通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:5%-35%,8min)纯化,以得到2Am4CBza-L-8。LC/MS[M+H]1036.54(计算值);LC/MS[M+H]1036.60(实测值)。

[0588] 实施例9(3-(2-氨基-正丙基-8-(吡咯烷-1-羰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-羧酰氨基)丙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-基酯2Am4CBza-L-9的合成



[0589]



[0590] (3-(2-氨基-正丙基-8-(吡咯烷-1-羰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)丙基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-9a的制备

[0591] 使2-氨基-4-((3-((叔丁氧基羰基)氨基)丙基)(丙基)氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-8-甲酸2Am4CBza-L-8a与吡咯烷和HATU反应以得到2Am4CBza-L-9a。LC/MS[M+H]498.31(计算值);LC/MS[M+H]498.44(实测值)。

[0592] 2-氨基-N-(3-氨基丙基)-正丙基-8-(吡咯烷-1-羰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺2Am4CBza-L-9b的制备

[0593] 使2Am4CBza-L-9a与甲磺酸反应以得到2Am4CBza-L-9b。LC/MS[M+H]398.26(计算值);LC/MS[M+H]398.37(实测值)。

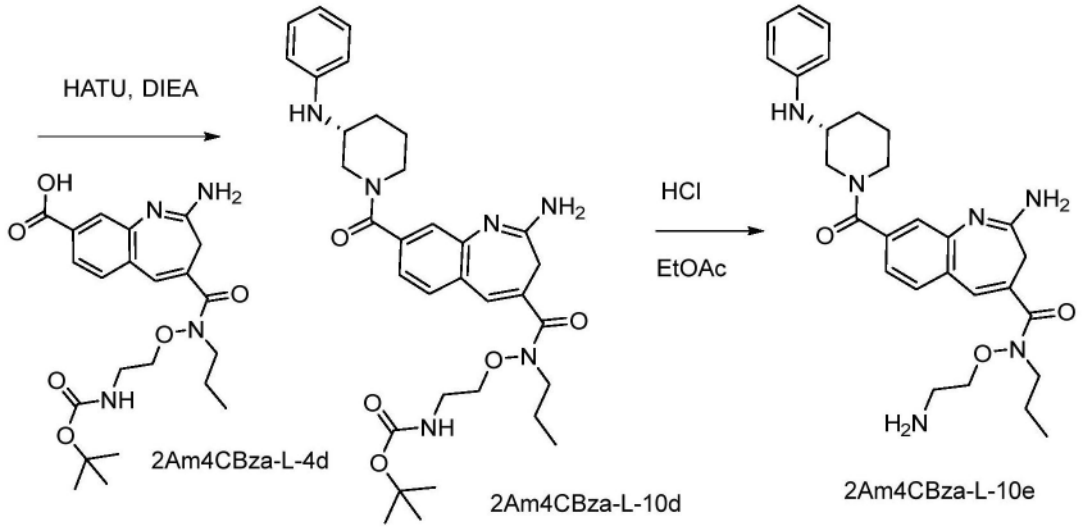
[0594] (3-(2-氨基-正丙基-8-(吡咯烷-1-羰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-羧酰氨基)丙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-基酯的制备

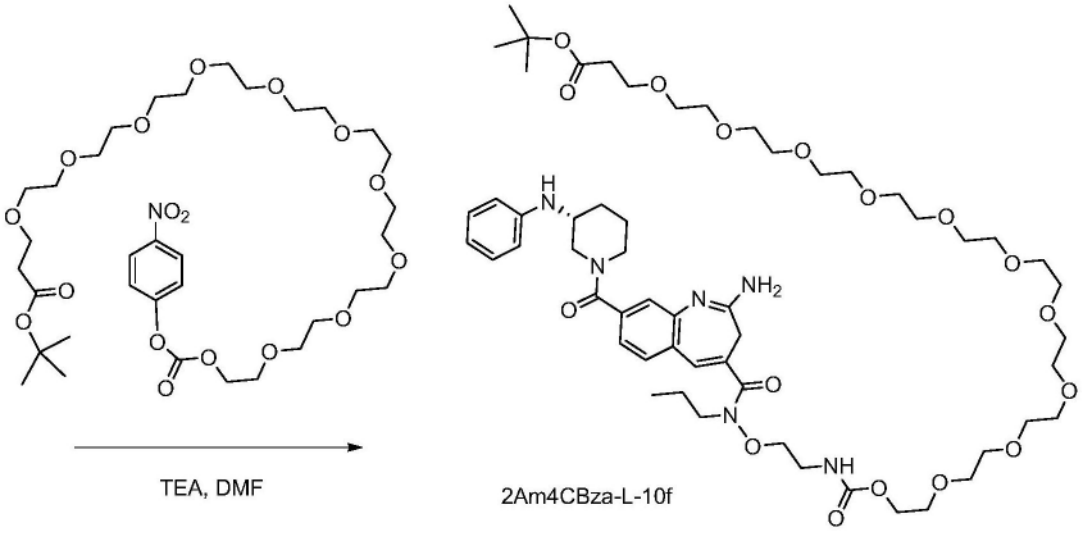
[0595] 向2Am4CBza-L-9b在DMF中的溶液中添加DIEA和(4-硝基苯基)碳酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯,然后在25℃下搅拌1h。将混合物用TFA猝灭直至pH＝约6。然后将混合物过滤,通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:5%-35%,8min)纯化,以得到2Am4CBza-L-9。LC/MS[M+H]1062.56(计算值);LC/MS[M+H]1062.20(实测值)。

[0596] 实施例10 4-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酰氧基]-2,3,5,6-四氟-苯磺酸2Am4CBza-L-10的合成

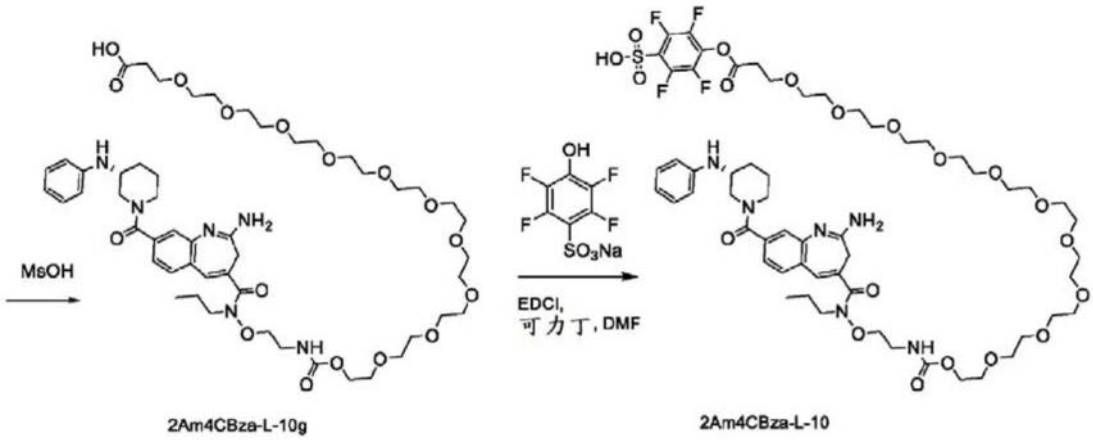
Br
Pd2(dba)3
NaOtBu
HCl
EtOAc
2Am4CBza-L-10a
2Am4CBza-L-10b
2Am4CBza-L-10c

[0597]


HATU, DIEA
HCl
EtOAc
2Am4CBza-L-4d
2Am4CBza-L-10d
2Am4CBza-L-10e


TEA, DMF
2Am4CBza-L-10f

[0598]


MsOH
EDCI,
可力丁, DMF
2Am4CBza-L-10g
2Am4CBza-L-10

[0599] (3R)-3-苯胺基哌啶-1-甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-10b的制备

[0600] 在N_2下向(3R)-3-氨基哌啶-1-羧酸叔丁酯2Am4CBza-L-10a(1g,4.99mmol,1.0当量)和溴苯(784mg,4.99mmol,526uL,1.0当量)在甲苯(10mL)中的溶液中加入2-(2-二环己基膦酰基苯基)-N,N-二甲基苯胺(138mg,349umol,0.07当量)、2-甲基丙-2-醇钠、叔丁醇钠(576mg,5.99mmol,1.2当量)和$Pd_2(dba)_3$(228mg,250umol,0.05当量)。将悬浮液在真空下脱气并用N_2吹扫数次,然后在100℃搅拌10h。将反应混合物减压浓缩以得到残余物,将所述残余物用H_2O(30mL)稀释并用EtOAc(30mL×3)萃取,将合并的有机相用盐水(15mL)洗涤,用无水Na_2SO_4干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法纯化,用石油醚:乙酸乙酯=1:0-0:1洗脱以得到呈无色油状物的2Am4CBza-L-10b(900mg,3.26mmol,65.2%产率)。1H NMR($CDCl_3$,400MHz)δ7.22-7.17(m,2H),6.77-6.67(m,3H),4.09-3.96(m,1H),3.77-3.70(m,1H),3.42-3.34(m,1H),3.12-2.82(m,1H),3.02-2.82(m,1H),2.04-1.98(m,1H),1.79-1.71(m,1H),1.63-1.52(m,4H),1.46(s,9H)。LC/MS[M+H]277.2(计算值);LC/MS[M+H]277.2(实测值)。

[0601] (3R)-N-苯基哌啶-3-胺2Am4CBza-L-10c的制备

[0602] 向2Am4CBza-L-10b(900mg,3.26mmol,1.0当量)在EtOAc(5mL)中的溶液中加入HCl/EtOAc(4M,16.3mL,20.0当量),然后在20℃下搅拌2h。将反应混合物真空浓缩以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-10c(650mg,2.61mmol,80.1%产率,2HCl)。1H NMR($CDCl_3$,400MHz)δ7.52-7.47(m,2H),7.43-7.32(m,3H),3.96-3.85(m,1H),3.56(br d,J=12.0Hz,1H),3.43-3.36(m,1H),3.19-3.10(m,1H),3.03(dt,J=2.8,12.2Hz,1H),2.25-2.08(m,2H),1.92-1.77(m,2H)。

[0603] N-[2-[[2-氨基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基]氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-10d的制备

[0604] 在N_2下在0℃向2-氨基-4-[2-(叔丁氧羰基氨基)乙氧基-丙基-氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂-8-甲酸2Am4CBza-L-4d(250mg,560umol,1.0当量)、HATU(234mg,616umol,1.1当量)和DIEA(290mg,2.24mmol,390uL,4.0当量)在DMF(3mL)中的溶液中加入(3R)-N-苯基哌啶-3-胺(209mg,840umol,1.5当量,2HCl)。将混合物在20℃下搅拌3h。将反应混合物过滤并真空浓缩。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:10%-45%,8min)纯化以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-10d(220mg,306umol,54.7%产率,TFA)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ7.58-7.52(m,1H),7.52-7.43(m,1H),7.43-7.38(m,1H),7.36-7.30(m,1H),7.24-7.16(m,1H),6.97(br t,J=7.2Hz,1H),6.91-6.76(m,1H),6.58-6.49(m,1H),6.44(br d,J=7.4Hz,1H),3.93(br s,2H),3.84-3.57(m,4H),3.55-3.35(m,4H),3.28-3.23(m,2H),3.07-2.97(m,1H),2.22-1.97(m,2H),1.86-1.65(m,4H),1.38(s,9H),1.01-0.96(m,3H)。LC/MS[M+H]605.3(计算值);LC/MS[M+H]605.3(实测值)。

[0605] 2-氨基-N-(2-氨基乙氧基)-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-正丙基-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酰胺2Am4CBza-L-10e的制备

[0606] 向2Am4CBza-L-10d(220mg,364umol,1.0当量)在EtOAc(3mL)中的溶液中加入HCl/EtOAc(4M,1.82mL,20.0当量),然后在20℃下搅拌2h。将反应混合物真空浓缩以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-10e(170mg,294umol,80.9%产率,2HCl)。LC/MS[M+H]505.3(计算值);

LC/MS[M+H]505.2(实测值)。

[0607] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯2Am4CBza-L-10f的制备

[0608] 在0℃下向2Am4CBza-L-10e(90mg,156umol,1.0当量,2HCl)和DIEA(80.6mg,623umol,109uL,4.0当量)在DMF(2mL)中的溶液中加入3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(4-硝基苯氧基)羰氧基乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸叔丁酯(117mg,156umol,1.0当量),然后在20℃下搅拌2h。将反应混合物过滤并真空浓缩,将残余物用H_2O(10mL)稀释并用EtOAc(10mL×3)萃取,将合并的有机相用盐水(10mL×3)洗涤,用无水Na_2SO_4干燥并真空浓缩以得到呈白色固体获得的2Am4CBza-L-10f(160mg,143umol,91.9%产率)。LC/MS[M+H]1117.6(计算值);LC/MS[M+H]1117.6(实测值)。

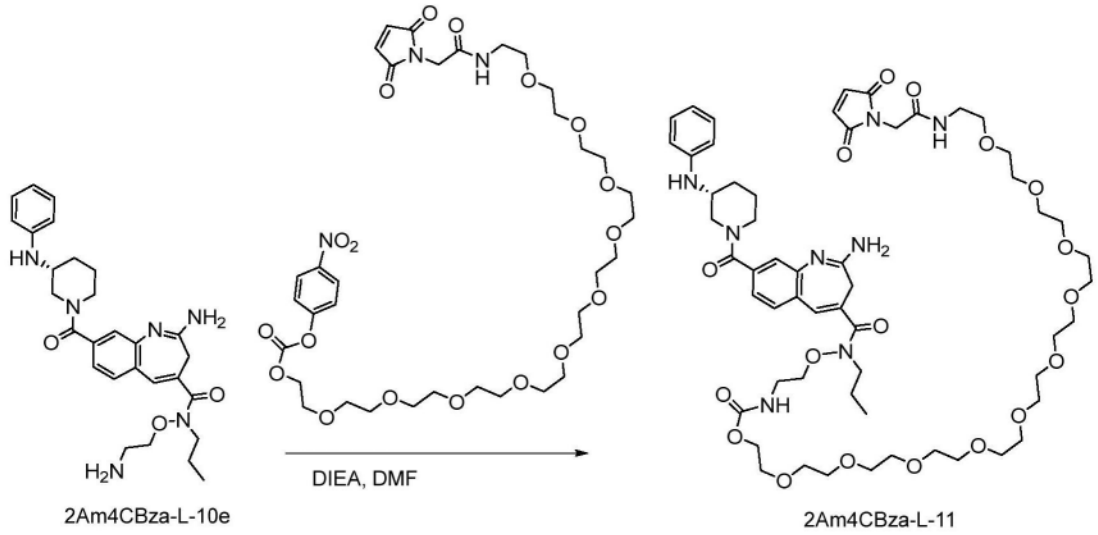
[0609] 3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-氨基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基氨基甲酰氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]丙酸2Am4CBza-L-10g的制备

[0610] 向2Am4CBza-L-10f(130mg,116umol,1.0当量)在DCM(2mL)中的溶液中加入甲磺酸(111mg,1.16mmol,82.8uL,10.0当量),然后在N_2气氛下在20℃搅拌2h。将反应混合物过滤并减压浓缩以得到残余物,将所述残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna80*30mm*3um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:15%-45%,8min)纯化以得到呈轻质无色油状物的2Am4CBza-L-10g(80mg,75.4umol,64.8%产率)。LC/MS[M+H]1061.6(计算值);LC/MS[M+H]1061.6(实测值)。

[0611] 2Am4CBza-L-10的制备

[0612] 向2Am4CBza-L-10g(70mg,65.9umol,1.0当量)和2,3,5,6-四氟-4-羟基-苯磺酸钠(70.7mg,264umol,4.0当量)在DCM(1.5mL)和DMA(0.5mL)中的溶液中加入EDCI(50.6mg,264umol,4.0当量),然后在20℃下搅拌1h。将反应混合物过滤并减压浓缩以得到残余物。将残余物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:15%-45%,8min)纯化以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-10(25.1mg,19.5umol,29.5%产率)。^{1}H NMR(MeOD-d_4,400MHz)δ7.73-7.63(m,1H),7.60-7.42(m,3H),7.41-7.25(m,3H),7.15-7.03(m,1H),6.72-6.60(m,1H),4.00-3.94(m,2H),3.90-3.82(m,4H),3.74(br t,J=7.2Hz,2H),3.65-3.57(m,40H),3.51(br d,J=4.0Hz,2H),3.45-3.38(m,2H),3.27-3.14(m,2H),3.00-2.96(m,2H),2.21-2.08(m,1H),1.81-1.69(m,4H),0.99(t,J=7.6Hz,3H)。LC/MS[M+H]1289.5(计算值);LC/MS[M+H]1289.5(实测值)。

[0613] 实施例11N-[2-[[2-氨基-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基]-丙基-氨基]氧乙基]氨基甲酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯2Am4CBza-L-11的合成

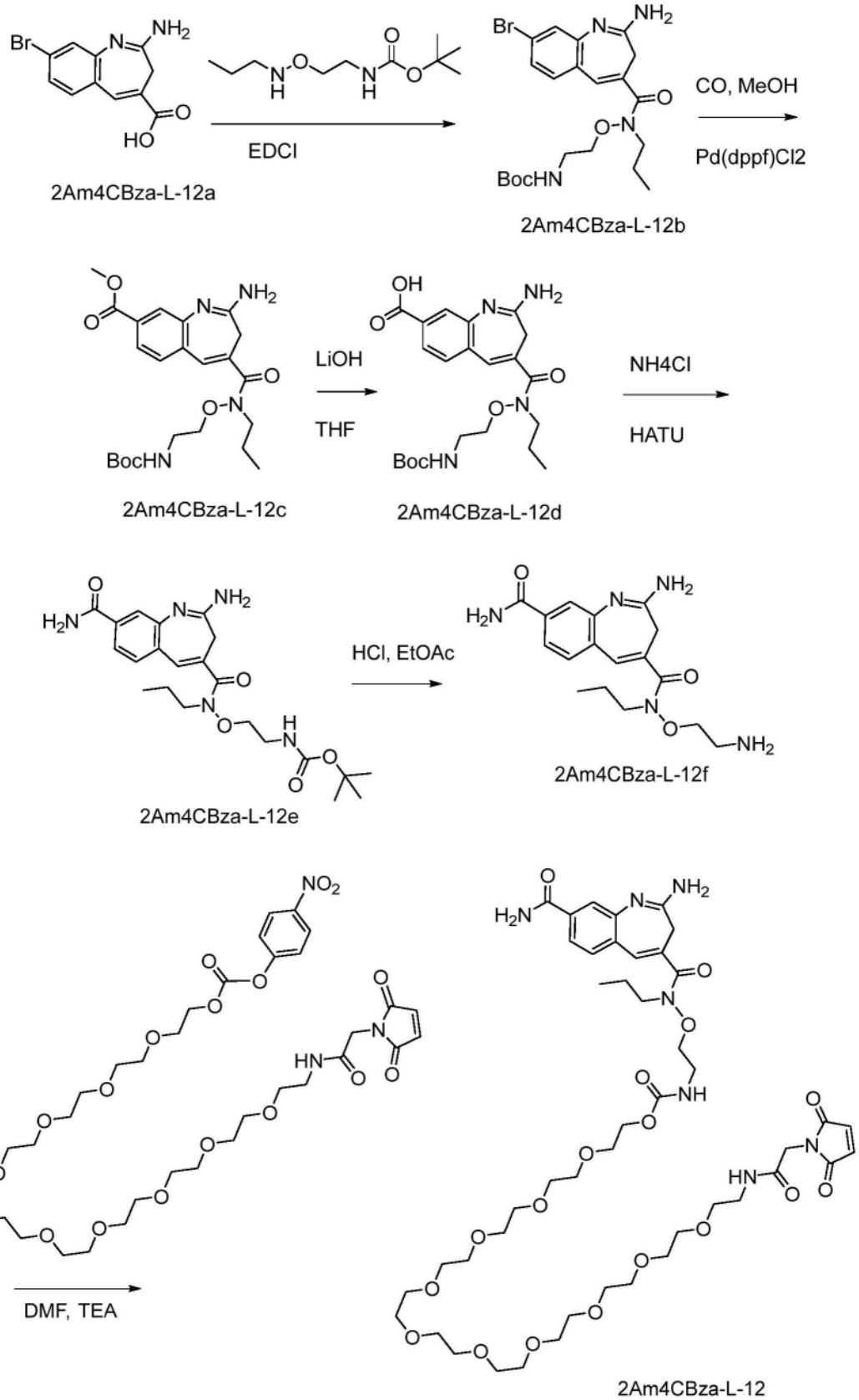
[0614] 

2Am4CBza-L-10e 2Am4CBza-L-11

[0615] 向2-氨基-N-(2-氨基乙氧基)-8-[(3R)-3-苯胺基哌啶-1-羰基]-正丙基-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酰胺2Am4CBza-L-10e(50.0mg,86.5umo l,1.0当量,2HCl)在DMF(1.00mL)中的溶液中加入DIEA(50.0mg,346umol,60.0uL,4.0当量)和(4-硝基苯基)碳酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯(70.0mg,86.5umol,1.0当量),然后在20℃下搅拌1h。将混合物过滤并通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:15%-40%,8min)纯化,以得到呈淡黄色油状物的2Am4CBza-L-11(23mg,17.9umol,20.7%产率,TF A)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ7.75-7.16(m,4H),7.07-6.79(m,4H),6.62-6.39(m,2H),4.17(s,2H),4.04-3.85(m,4H),3.81-3.72(m,4H),3.72-3.56(m,38H),3.56-3.51(m,4H),3.48-3.34(m,6H),3.17-3.05(m,1H),2.26-1.93(m,2H),1.85-1.65(m,4H),1.00(t,J=7.6Hz,3H)。LC/MS[M+H]1169.6(计算值);LC/MS[M+H]1169.6(实测值)。

[0616] 实施例12(2-((2-氨基-8-氨基甲酰基-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-羧酰氨基)氧基)乙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-基酯2Am4CBza-L-12的合成

[0617]



[0618] N-[2-[(2-氨基-8-溴-3H-1-苯并氮杂卓-4-羰基)-丙基-氨基]氧乙基]氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-12b的制备

[0619] 在N_2下在0℃向2-氨基-8-溴-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酸2Am4CBza-L-12a(8.08g,

28.7mmol,1.0当量)在DCM(50mL)和DMA(50mL)中的混合物中加入甲磺酸(2.76g,28.7mmol,2.05mL,1.0当量)、N-[2-(丙氨基氧基)乙基]氨基甲酸叔丁酯(6.9g,31.6mmol,1.1当量)和EDCI(22.0g,115mmol,4.0当量),然后在此温度下搅拌2h。将混合物浓缩以去除DCM,并用水(100mL)稀释。然后加入Na2CO3水溶液将混合物的pH调节至约8。将水相用EtOAc(100mL×3)萃取。将有机层用盐水洗涤,经Na_2SO_4干燥,过滤并浓缩。将粗产物用MTBE(15mL)和石油醚(100mL)在0℃下研磨0.5小时,以得到呈黄色固体的2Am4CBza-L-12b(11g,22.85mmol,79.52%产率)。^{1}H NMR(DMSO-d_6,400MHz)δ7.27(d,J=8.4Hz,1H),7.14(d,J=2.0Hz,1H),7.08-7.01(m,2H),7.01-6.87(m,2H),6.85-6.82(m,1H),3.80(t,J=5.6Hz,2H),3.57(t,J=7.2Hz,2H),3.09-3.05(m,2H),2.76(s,2H),1.67-1.56(m,2H),1.31(s,9H),0.87(t,J=7.6Hz,3H)。LC/MS[M+H]481.1(计算值);LC/MS[M+H]481.1(实测值)。

[0620] 2-氨基-4-[2-(叔丁氧羰基氨基)乙氧基-丙基-氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂卓-8-甲酸甲酯2Am4CBza-L-12c的制备

[0621] 在N_2下向2Am4CBza-L-12b(8g,16.6mmol,1.0当量)在MeOH(100mL)中的溶液中加入Pd(dppf)Cl_2(1.22g,1.66mmol,0.1当量)和Et_3N(5.04g,49.9mmol,6.94mL,3.0当量)。将悬浮液在真空下脱气,并用CO吹扫几次。将混合物在CO(50psi)和80℃下搅拌12小时。将混合物过滤并浓缩。将残余物通过硅胶色谱(柱高:250mm,直径:100mm,100-200目硅胶,乙酸乙酯/MeOH=1/0、10/1)纯化,以得到呈黄色固体的2Am4CBza-L-12c(5g,10.86mmol,65.33%产率)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ7.81(d,J=1.6Hz,1H),7.63(dd,J=1.6,8.0Hz,1H),7.46(d,J=8.0Hz,1H),7.27(s,1H),3.94-3.86(m,5H),3.73-3.69(m,2H),3.31(s,2H),3.23(t,J=5.2Hz,2H),1.81-1.70(m,2H),1.35(s,9H),0.97(t,J=7.6Hz,3H)。LC/MS[M+H]461.2(计算值);LC/MS[M+H]461.1(实测值)。

[0622] 2-氨基-4-[2-(叔丁氧羰基氨基)乙氧基-丙基-氨基甲酰基]-3H-1-苯并氮杂卓-8-甲酸2Am4CBza-L-12d的制备

[0623] 在25℃下一次性向2Am4CBza-L-12c(4g,8.69mmol,1.0当量)在THF(30mL)和H_2O(30mL)中的混合物中加入LiOH.H_2O(547mg,13.0mmol,1.5当量),然后在此温度下搅拌2h。将混合物用HCl水溶液(1M)猝灭直至pH=约6。然后将混合物用水(30mL)稀释,并用EtOAc(50mL×3)萃取。将有机层用盐水洗涤,经Na2SO4干燥,过滤并浓缩。将混合物通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:5%-40%,8min)纯化以得到呈黄色固体的2Am4CBza-L-12d(3.3g,7.39mmol,85.09%产率)。^{1}H NMR(MeOD,400MHz)δ8.13(s,1H),7.92(d,J=7.6Hz,1H),7.59(d,J=8.0Hz,1H),7.46(s,1H),3.97-3.92(m,2H),3.75(t,J=7.2Hz,2H),3.31-3.30(m,2H),3.26(t,J=5.2Hz,2H),1.83-1.71(m,2H),1.35(s,9H),0.99(t,J=7.6Hz,3H)。LC/MS[M+H]447.2(计算值);LC/MS[M+H]447.2(实测值)。

[0624] 2-((2-氨基-8-氨基甲酰基-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-12e的制备

[0625] 使2Am4CBza-L-12d与氯化铵和HATU反应以得到2Am4CBza-L-12e。LC/MS[M+H]446.24(计算值);LC/MS[M+H]446.43(实测值)。

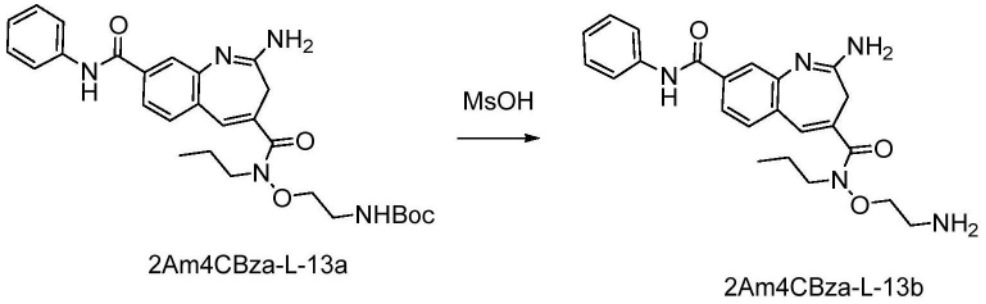
[0626] 2-氨基-N4-(2-氨基乙氧基)-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-12f的制备

[0627] 使2Am4CBza-L-12e与盐酸在乙酸乙酯中反应以得到2Am4CBza-L-12f。LC/MS[M+H]346.19(计算值);LC/MS[M+H]346.35(实测值)。

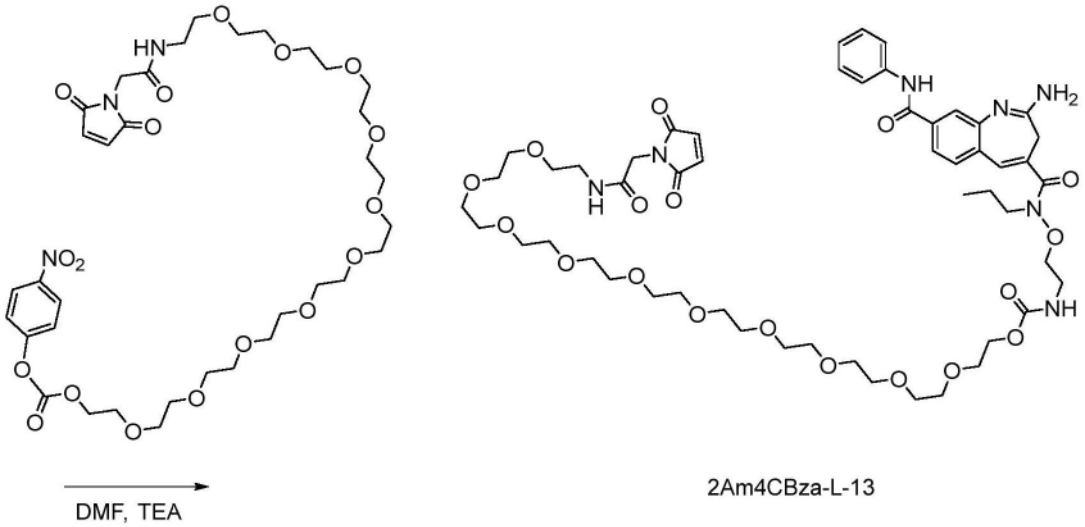
[0628] 2Am4CBza-L-12的制备

[0629] 向2Am4CBza-L-12f在DMF中的溶液中加入DIEA和(4-硝基苯基)碳酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯,然后在25℃下搅拌1h。将混合物用TFA猝灭直至pH为约6。然后将混合物过滤,通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:5%-35%,8min)纯化,以得到2Am4CBza-L-12。LC/MS[M+H]1010.49(计算值);LC/MS[M+H]1010.71(实测值)。

[0630] 实施例13(3-(2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)丙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-基酯2Am4CBza-L-13的合成



[0631]



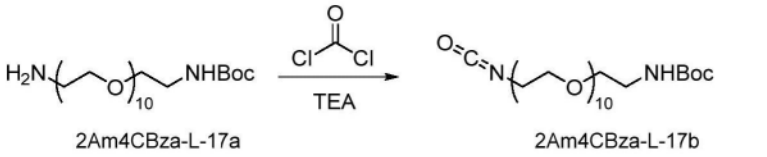
[0632] 2-氨基-N4-(2-氨基乙氧基)-N8-苯基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-13b的制备

[0633] 使(2-((2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)氧基)乙基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-13a与甲磺酸反应以得到2Am4CBza-L-13b。LC/MS[M+H]422.22(计算值);LC/MS[M+H]422.39(实测值)。

[0634] (3-(2-氨基-8-(苯基氨基甲酰基)-正丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4-甲酰胺基)丙基)氨基甲酸1-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-2-氧代-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-十氧杂-3-氮杂三十五烷-35-基酯的制备

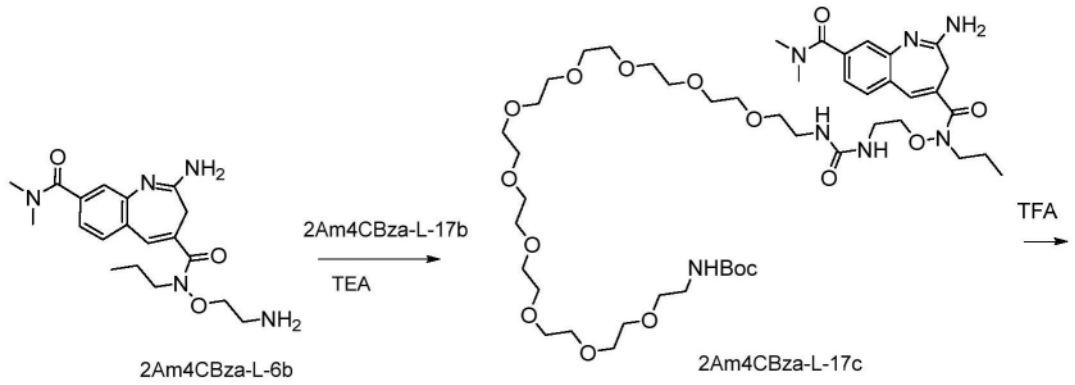
[0635] 向2Am4CBza-L-13b在DMF中的溶液中加入DIEA和(4-硝基苯基)碳酸2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙酯,然后在25℃下搅拌1h。将混合物用TFA猝灭直至pH为约6。然后将混合物过滤,通过制备型HPLC(柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:5%-35%,8min)纯化,以得到2Am4CBza-L-13。LC/MS[M+H]1086.52(计算值);LC/MS[M+H]1086.73(实测值)。

[0636] 实施例17 2-氨基-N4-((40-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-4,39-二氧代-8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十氧杂-3,5,38-三氮杂四十烷基)氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-17的合成

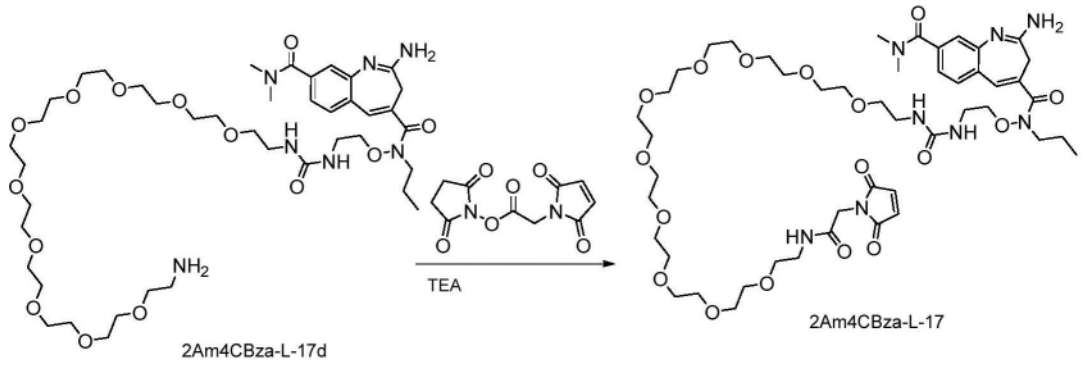


2Am4CBza-L-17a 2Am4CBza-L-17b

[0637]



2Am4CBza-L-6b 2Am4CBza-L-17c



2Am4CBza-L-17d

[0638] (32-异氰酸根合-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧杂三十二烷基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-17b的制备

[0639] 向(32-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧杂三十二烷基)氨基甲酸叔丁酯2Am4CBza-L-17a(0.15g,0.25mmol,1当量)在DCM中的溶液中添加TEA(0.348ml,2.5mmol,10当量),之后添加光气(0.892ml,1.4M的甲苯溶液,0.25mmol,1当量)。通过LCMS监测反应混合物,浓缩,并通过反相HPLC纯化,以得到2Am4CBza-L-17b(78mg,0.125mmol,50%)。LC/MS[M+H]627.37(计算值);LC/MS[M+H]627.64(实测值)。

[0640] (39-(2-氨基-8-(二甲基氨基甲酰基)-3H-苯并[b]氮杂卓-4-羰基)-34-氧代-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,38-十一氧杂-33,35,39-三氮杂四十二烷基)氨基甲酸叔丁酯

2Am4CBza-L-17c的制备

[0641] 向2-氨基-N4-(2-氨基乙氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-6b(1当量)和2Am4CBza-L-17b(1当量)在DMF中的混合物中加入TEA(10当量)。将反应在室温下搅拌,然后用水稀释并通过反相HPLC纯化,以得到2Am4CBza-L-17c。LC/MS[M+H]1000.58(计算值);LC/MS[M+H]1000.91(实测值)。

[0642] 2-氨基-N4-((37-氨基-4-氧代-8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-十氧杂-3,5-二氮杂三十七烷基)氧基)-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-苯并[b]氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-17d的制备

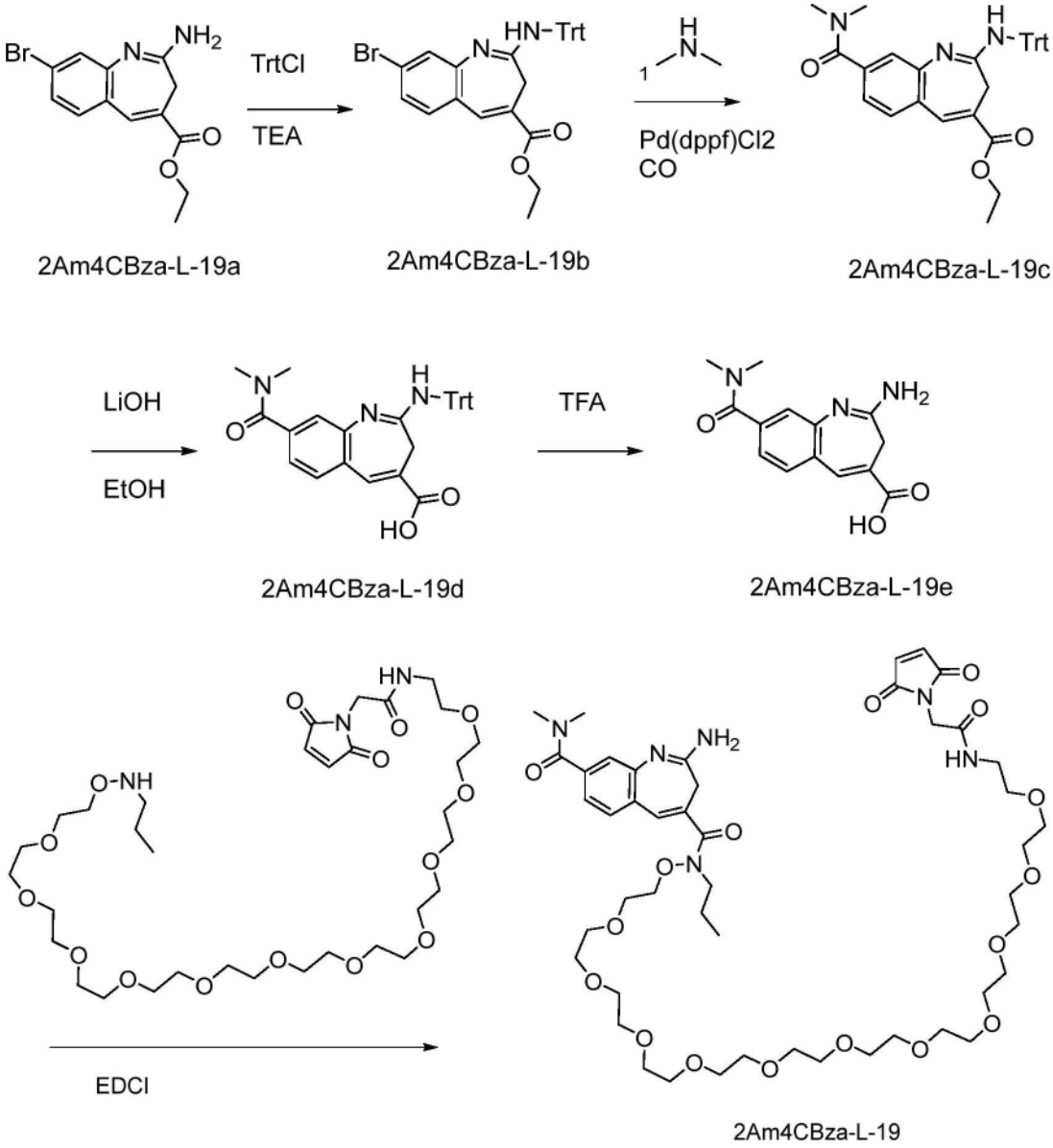
[0643] 将2Am4CBza-L-17c(48mg,0.052mmol,1当量)溶解在微量TFA中。15分钟后,将反应混合物浓缩,以得到作为TFA盐的2Am4CBza-L-17d。LC/MS[M+H]900.53(计算值);LC/MS[M+H]900.83(实测值)。

[0644] 2Am4CBza-L-17的制备

[0645] 向2Am4CBza-L-17c(1当量)在DMF中的溶液中加入TEA(12.8当量),之后加入2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙酸2,5-二氧杂吡咯烷-1-酯(1.28当量)。将反应混合物浓缩,用1%TFA水溶液稀释,并通过反相HPLC纯化,以得到2Am4CBza-L-17。LC/MS[M+H]1037.54(计算值);LC/MS[M+H]1037.84(实测值)。

[0646] 实施例19 2-氨基-N4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[[2-(2,5-二氧吡咯-1-基)乙酰基]氨基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]-N8,N8-二甲基-N4-丙基-3H-1-苯并氮杂卓-4,8-二甲酰胺2Am4CBza-L-19的合成

[0647]



[0648] 8-溴-2-(三苯甲基氨基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酸乙酯2Am4CBza-L-19b的制备

[0649] 向2-氨基-8-溴-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酸乙酯2Am4CBza-L-19a(3g,9.70mmol,1当量)在DCM(20mL)中的溶液中加入TrtCl(4.06g,14.6mmol,1.5当量)和Et_3N(2.95g,29.1mmol,4.05mL,3当量)。将混合物在50℃下搅拌12小时。将所得混合物倒入冰-水(w/w=1/1)(30mL)中并搅拌10min。将水相用DCM(20mL×3)萃取。将合并的有机相用无水Na_2SO_4干燥,过滤并真空浓缩。将粗产物用MTBE在25℃下研磨5min,以得到呈黄色固体的2Am4CBza-L-19b(4g,7.25mmol,74.75%产率)。LC/MS[M+H]551.1(计算值);LC/MS[M+H]551.1(实测值)。

[0650] 8-(二甲基氨基甲酰基)-2-(三苯甲基氨基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-羧酸乙酯2Am4CBza-L-19c的制备

[0651] 将2Am4CBza-L-19b(2g,3.63mmol,1当量)、N-甲基甲胺、二甲胺(1.48g,18.2mmol,1.66mL,5当量,HCl)、Et_3N(3.67g,36.3mmol,5.05mL,10当量)、Pd(dppf)Cl_2(266mg,363umol,0.1当量)在DMF(30mL)中的混合物脱气,并用一氧化碳CO(3.63mmol,1当量)吹扫3次,然后将混合物在CO(50psi)气氛下在80℃搅拌12小时。将所述混合物倒入冰-水(w/w=

1/1)(30mL)中并搅拌10min。将水相用乙酸乙酯(20mL×3)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL×3)洗涤,用无水Na_2SO_4干燥,过滤并真空浓缩。将残余物通过硅胶色谱(柱高:250mm,直径:100mm,100-200目硅胶,石油醚/乙酸乙酯=1/0、1/1)纯化,以得到呈黄色固体的2Am4CBza-L-19c(900mg,1.66mmol,45.61%产率)。LC/MS[M+H]544.2(计算值);LC/MS[M+H]544.4(实测值)。

[0652] 8-(二甲基氨基甲酰基)-2-(三苯甲基氨基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-羧酸2Am4CBza-L-19d的制备

[0653] 向2Am4CBza-L-19c(800mg,1.47mmol,1当量)在EtOH(15mL)和H_2O(8mL)中的溶液中加入$LiOH.H_2O$(247mg,5.89mmol,4当量)。将混合物在20℃下搅拌12小时。用HCl(1M)将混合物的pH调节至约6,然后真空浓缩以去除EtOH。加入水(20mL)并从混合物中沉淀出所需的白色固体,过滤以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-19d(750mg,1.45mmol,98.85%产率)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ8.19(s,1H),7.69(s,1H),7.35(d,J=8.4Hz,1H),7.29-7.19(m,12H),7.17-7.09(m,3H),6.83(dd,J=1.6,1.6Hz,1H),6.35(d,J=1.6Hz,1H),3.00(s,2H),2.91(s,3H),2.80(s,3H)。LC/MS[M+H]516.2(计算值);LC/MS[M+H]516.4(实测值)。

[0654] 2-氨基-8-(二甲基氨基甲酰基)-3H-1-苯并氮杂卓-4-甲酸2Am4CBza-L-19e的制备

[0655] 向2Am4CBza-L-19d(750mg,1.45mmol,1当量)在DCM(10mL)中的溶液中加入TFA(1.66g,14.6mmol,1.08mL,10当量),然后在50℃下搅拌12小时。将混合物真空浓缩。将粗产物用MTBE在20℃下研磨5min,以得到呈白色固体的2Am4CBza-L-19e(550mg,1.42mmol,97.62%产率,TFA)。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δ7.90(s,1H),7.73(d,J=8.0Hz,1H),7.44-7.36(m,2H),3.50(s,2H),3.00(s,3H),2.93(s,3H)。LC/MS[M+H]274.1(计算值);LC/MS[M+H]274.1(实测值)。

[0656] 2Am4CBza-L-19的制备

[0657] 向2Am4CBza-L-19e(52.3mg,191umol,0.8当量)和2-(2,5-二氧吡咯-1-基)-N-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(丙氨基氧基)乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙氧基]乙基]乙酰胺(200mg,239umol,1.0当量,MsOH)在DCM(3mL)和DMA(1mL)中的溶液中加入EDCI(229mg,1.20mmol,5.0当量)。将混合物在25℃下搅拌0.5小时。将反应混合物减压浓缩以去除DCM。将残余物过滤并通过制备型HPLC(TFA条件;柱:Phenomenex Luna 80*30mm*3um;流动相:[水(TFA)-ACN];B%:10%-35%,8min)纯化以得到呈淡黄色油状物的2Am4CBza-L-19(59.3mg,59.6umol,24.9%产率)。1H NMR(MeOD,400MHz)δ7.65(d,J=8.4Hz,1H),7.48-7.44(m,2H),7.36(s,1H),6.89(s,2H),4.17(s,2H),4.07-4.03(m,2H),3.75(t,J=7.2Hz,2H),3.68-3.53(m,40H),3.50-3.45(m,2H),3.44-3.35(m,4H),3.28-3.23(m,2H),3.13(s,3H),3.05(s,3H),1.78(sxt,J=7.2Hz,2H),1.01(t,J=7.6Hz,3H)。LC/MS[M+H]995.5(计算值);LC/MS[M+H]995.5(实测值)。

[0658] 实施例201免疫缀合物(IC)的制备

[0659] 为了制备赖氨酸缀合的免疫缀合物,使用G-25SEPHADEX™脱盐柱(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)或Zeba™旋转脱盐柱(Thermo Fisher Scientific),将抗体以缓冲液交换到含有100mM硼酸、50mM氯化钠、1mM乙二胺四乙酸的pH 8.3的缀合缓冲液中。然后使用缓冲液

将洗脱液各自调节至约1-10mg/ml的浓度,然后无菌过滤。将抗体预温热至20-30℃,并与溶解在二甲亚砜(DMSO)或二甲基乙酰胺(DMA)中至5至20mM的浓度的2-20(例如,7-10)摩尔当量的四氟苯基(TFP)或磺酸四氟苯基(磺基TFP)酯、式II的2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头(2Am4CBza-L)化合物快速混合。使反应在30℃下进行约16小时,并通过在pH 7.2的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中平衡的两个连续的G-25脱盐柱或Zeba™自旋脱盐柱上运行将免疫缀合物(IC)从反应物中分离出来,以提供表3a和表3b的免疫缀合物(IC)。使用与XEVO™ G2-XS TOF质谱仪(Waters Corporation)连接的H级ACQUITY™ UPLC(Waters Corporation,Milford,MA)上的C4反相柱,通过液相色谱质谱分析确定佐剂-抗体比率(DAR)。

[0660] 为了制备半胱氨酸缀合的免疫缀合物,使用Zeba™旋转脱盐柱(Thermo Fisher Scientific)将抗体以缓冲液交换到含有PBS(pH 7.2)与2mM EDTA的缀合缓冲液中。使用2-4摩尔过量的三(2-羧乙基)膦(TCEP)或二硫苏糖醇(DTT)在37℃下还原链间二硫化物30分钟-2小时。使用用缀合缓冲液预平衡的Zeba™旋转脱盐柱移除过量的TCEP或DTT。使用缀合缓冲液将经缓冲液交换的抗体的浓度调节至大约5mg/ml至20mg/ml,并进行无菌过滤。将马来酰亚胺-2Am4CBza-L化合物溶解在二甲亚砜(DMSO)或二甲基乙酰胺(DMA)中至5至20mM的浓度。为了缀合,将抗体与10摩尔当量至20摩尔当量的马来酰亚胺-2Am4CBza-L混合。在一些情形下,添加至多20%(v/v)的附加DMA或DMSO以提高马来酰亚胺-2Am4CBza-L在缀合缓冲液中的溶解度。使反应在20℃下进行大约30min至4小时。使用两个连续的Zeba™自旋脱盐柱使所得缀合物脱离未反应的马来酰亚胺-2Am4CBza-L纯化。将所述柱用pH 7.2的磷酸盐缓冲盐水(PBS)预平衡。使用与XEVO™ G2-XS TOF质谱仪(Waters Corporation)连接的H级ACQUITY™ UPLC(Waters Corporation,Milford,MA)上的C4反相柱,通过液相色谱质谱分析估计佐剂与抗体比率(DAR)。

[0661] 为了缀合,可以将抗体溶解在本领域中已知将不会对抗体的稳定性或抗原结合特异性产生不利影响的水性缓冲系统中。可以使用磷酸盐缓冲盐水。将2Am4CBza-L化合物溶解在包含至少一种如本文别处所述的极性非质子溶剂的溶剂体系中。在一些此类方面中,将2Am4CBza-L在pH 8的Tris缓冲液(例如,50mM Tris)中溶解至浓度为约5mM、约10mM、约20mM、约30mM、约40mM或约50mM及其范围,诸如约5mM至约50mM或约10mM至约30mM。在一些方面中,将2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓-接头中间体溶解在DMSO(二甲亚砜)、DMA(二甲基乙酰胺)、乙腈或另一种合适的偶极非质子溶剂中。

[0662] 或者在缀合反应中,可以将当量过量的2Am4CBza-L溶液稀释,并与抗体溶液合并。2Am4CBza-L溶液可以合适地用至少一种极性非质子溶剂和至少一种极性质子溶剂稀释,所述极性质子溶剂的示例包括水、甲醇、乙醇、正丙醇和乙酸。2Am4CBza-L中间体与抗体的摩尔当量可以为约1.5:1、约3:1、约5:1、约10:1、约15:1或约20:1及其范围,例如约1.5:1至约20:1、约1.5:1至约15:1、约1.5:1至约10:1、约3:1至约15:1、约3:1至约10:1、约5:1至约15:1或约5:1至约10:1。可以通过本领域中已知的方法诸如LC-MS合适地监测反应的完全。缀合反应通常在约1小时至约16小时的范围内完全。在反应完全后,可以向反应混合物中添加试剂以猝灭反应。如果抗体硫醇基团正在与硫醇反应性基团(诸如2Am4CBza-L-接头中间体的马来酰亚胺)反应,则未反应的抗体硫醇基团可与封端试剂反应。合适的封端试剂的示例是乙基马来酰亚胺。

[0663] 在缀合之后,可以通过本领域中已知的纯化方法将免疫缀合物纯化并与未缀合的

反应物和/或缀合物聚集体分离,所述纯化方法例如但不限于尺寸排阻色谱法、疏水相互作用色谱法、离子交换色谱法、色谱聚焦、超滤、离心超滤、切向流过滤及其组合。例如,纯化之前可以稀释免疫缀合物,如在pH 5的20mM琥珀酸钠中稀释。将经稀释的溶液施加到阳离子交换柱上,接着用例如至少10个柱体积的pH5的20mM琥珀酸钠洗涤。可以合适地用缓冲液如PBS洗脱缀合物。

[0664] 实施例202HEK报告子测定

[0665] 表达人TLR7或人TLR8的HEK293报告细胞购自Invivogen,并遵循供应商方案进行细胞繁殖和实验。简言之,使细胞在补充有10%FBS、吉欧霉素和杀稻瘟菌素的DMEM中在5% CO_2下生长至80-85%汇合。然后将细胞以4×10^4个细胞/孔接种在96孔平板中,其中底物含有HEK检测培养基和免疫刺激性2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂卓化合物,例如表1的那些。使用酶标仪在620-655nm波长下测量活性。

[0666] 实施例203体外免疫缀合物活性的评定

[0667] 本实施例显示了本发明的免疫缀合物,包括表3a和表3b的那些,有效引发免疫激活,并且因此可用于治疗癌症。

[0668] a)人抗原呈递细胞的分离:使用含有针对CD14、CD16、CD40、CD86、CD123和HLA-DR的单克隆抗体的ROSETTESEP™人单核细胞富集混合物(Stem Cell Technologies,Vancouver,Canada),通过密度梯度离心从获自健康血液供体的人外周血(Stanford Blood Center,Palo Alto,California)中负向选择人髓样抗原呈递细胞(APC)。随后使用EASYSEP™人单核细胞富集试剂盒(Stem Cell Technologies)经由负向选择将不成熟的APC纯化至>90%纯度,所述试剂盒不含CD16耗竭,含有针对CD14、CD16、CD40、CD86、CD123和HLA-DR的单克隆抗体。

[0669] b)髓样APC激活测定:在96孔板(Corning,Corning,NY)中孵育2×10^5个APC,所述96孔板含有iscove改良杜氏培养基IMDM(Lonza),所述培养基补充有10%FBS、100U/mL青霉素、100μg/mL(微克/毫升)链霉素、2mM L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、非必需氨基酸以及(在指出的情况下)各种浓度的未缀合(裸)抗体和本发明的免疫缀合物,包括表3a和表3b的那些(如根据上述实施例制备)。在18小时后经由ELISA分析无细胞上清液,以测量作为促炎反应的读数的TNFα分泌。

[0670] c)PBMC激活测定:通过密度梯度离心从获自健康献血者的人外周血(Stanford Blood Center,Palo Alto,California)中分离人外周血单核细胞。在96孔板(Corning,Corning,NY)中将PBMC在以10:1效应细胞与靶细胞比率与表达CEA的肿瘤细胞(例如MKN-45、HPAF-II)的共培养物中孵育。用各种浓度的未缀合(裸)抗体和本发明的免疫缀合物(如根据上述实施例制备)刺激细胞。使用LegendPlex™试剂盒,根据制造商指南(BioLegend®,San Diego,CA)通过细胞因子珠粒阵列分析无细胞上清液。

[0671] d)人常规树突细胞的分离:通过密度梯度离心从获自健康献血者的人外周血(Stanford Blood Center,Palo Alto,California)中负向选择人常规树突细胞(cDC)。简言之,首先通过使用ROSETTESEPTM人CD3耗竭混合物(Stem Cell Technologies,Vancouver,Canada)从细胞制剂中移除T细胞来富集细胞。然后使用EASYSEP™人髓样DC富集试剂盒(Stem Cell Technologies)经由负向选择进一步富集cDC。

[0672] e)cDC激活测定:将8×104个APC与表达ISAC靶抗原的肿瘤细胞以10:1的效应子

(cDC)与靶标(肿瘤细胞)比率共培养。将细胞在含有RPMI-1640培养基的96孔板(Corning,Corning,NY)中孵育,所述培养基补充有10%FBS和(在指出的情况下)各种浓度的本发明指示的免疫缀合物(如根据上述实施例制备)。过夜孵育约18小时之后,收集无细胞上清液,并使用BioLegend LEGENDPLEX细胞因子珠粒阵列分析细胞因子分泌(包括TNFα)。

[0673] 除了所描述的利用不同的髓样群体的测定之外,还可以采用各种筛选测定法来测量髓样细胞类型的激活。这些可包括以下:分离自健康供体血液的单核细胞、M-CSF分化的巨噬细胞、GM-CSF分化的巨噬细胞、GM-CSF+IL-4单核细胞源性树突细胞、分离自健康供体血液的常规树突细胞(cDC)和极化至免疫抑制状态的髓样细胞(也称为髓样源性抑制细胞或MDSC)。MDSC极化细胞的示例包括向免疫抑制状态分化的单核细胞,如M2a MΦ(IL4/IL13)、M2c MΦ(IL10/TGFb)、GM-CSF/IL6 MDSC和肿瘤培养的单核细胞(TEM)。可以使用肿瘤条件培养基(例如786.O、MDA-MB-231、HCC1954)进行TEM分化。原代肿瘤相关髓样细胞还可以包括存在于解离的肿瘤细胞悬浮液中的原代细胞(Discovery Life Sciences)。

[0674] 对所述髓样细胞群的激活的评定可以作为单一培养物或作为与表达所关注的抗原的细胞的共培养物执行,所述免疫缀合物(IC)可经由抗体的CDR区与所述所关注的抗原结合。在孵育18-48小时之后,可通过使用流式细胞术上调细胞表面共刺激分子或通过测量分泌的促炎细胞因子来评定激活。对于细胞因子测量,收获无细胞上清液,并采用流式细胞术通过细胞因子珠粒阵列(例如来自Biolegend的LegendPlex)进行分析。

[0675] 本文引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请和专利)以引用的方式特此并入,其程度如同指示每个参考文献单独且具体地以引用的方式并入,并且在本文中全文阐述。

序列表
<110> 博尔特生物治疗药物有限公司
<120> 2-氨基-4-甲酰胺-苯并氮杂草免疫缀合物及其用途
<130> 17019.015WO1
<140>
<141>
<150> 63/166,710
<151> 2021-03-26
<160> 175
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 1

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

<210> 2
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 2
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20
<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 3
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ser Val Ala
1 5 10
<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 4
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 5

Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
1 5
<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 6
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 7
Gln Gln Tyr Ser Leu Tyr Arg Ser
1 5
<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 8
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 9
<211> 119

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 9

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

<210> 10
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser Ser Gly Phe Asp Phe Thr
20 25 30

<210> 11
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 11
Thr Tyr Trp Met Ser
1 5
<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 12
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10
<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 13
Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15
Asp
<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”

<400> 14
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15
Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Ser
20 25 30
<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 15
Leu Tyr Phe Gly Phe Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 16
Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 17
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr

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

<210> 18
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 19
Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala
1 5 10

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 20
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 21
Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg
1 5
<210> 22
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 22
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 23
His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr
1 5 10
<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 24
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 25
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 26
Glu Phe Gly Met Asn
1 5
<210> 27

<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 27
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10
<210> 28
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 28
Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 29
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 29
Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15
Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 30
Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 31
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 32
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 32
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 33
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 33
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys
20

<210> 34
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 34
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys
20

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 35
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 36
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 37
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 38
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 39
Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5
<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 40
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 41
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 41
Gln Val Lys Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser
20 25 30
Tyr Met His Trp Leu Arg Gln Gly Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gly Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Glu Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 42
Gln Val Lys Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 43
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 43
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 44
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 44

Asp Ser Tyr Met His
1 5
<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 45
Trp Leu Arg Gln Gly Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10
<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 46
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly
<210> 47
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 47
Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Leu Gly
1 5 10 15
Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Glu
20 25 30
<210> 48

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 48
Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 49
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 50
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 50
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met
20 25 30
His Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu

65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 51
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 51
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys
20
<210> 52
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 52
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys
20
<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 53
Ser Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Met His
1 5 10
<210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 54
Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 55
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 56
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 57

<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 57

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

<210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 58

```
Gln Thr Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1               5                  10                  15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
            20
```

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 59
Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His
1 5 10
<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 60
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ser Trp Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 61
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 62
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 62
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 63
Gln His Trp Ser Ser Lys Pro Pro Thr
1 5
<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 64
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 65
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 65
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45
Gly Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 66
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 67
Asp Tyr Tyr Met Asn
1 5

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 68
Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10
<210> 69
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 69
Phe Ile Gly Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 70
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 70
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg
20 25 30
<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成

肽”

<400> 71

Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 72

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 72

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 73

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”

<400> 73

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

<210> 74

<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 74
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20
<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 75
Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His
1 5 10 15
<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 76
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 77
Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5
<210> 78
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 78
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 79
Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5
<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 80

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 81
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 81

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

<210> 82
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 82

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys

20 25 30

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 83
Asp Thr Tyr Met His
1 5
<210> 84
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 84
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10
<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 85
Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 86
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 86
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Pro
20 25 30
<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 87
Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr
1 5 10
<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 88
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”

<400> 89

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

<210> 90
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 90

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 91

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 92
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 92
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr
1 5 10 15
<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 93
Asn Thr Arg Thr Leu Ala Glu
1 5
<210> 94
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 94
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30
<210> 95
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 95
Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
1 5
<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 96
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 97
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 97
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 98
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 98
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser
20 25 30
<210> 99
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 99
Ser Tyr Asp Met Ser
1 5
<210> 100
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 100
Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 101
Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Ala Pro Ser Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 102
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 102
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30
<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 103
His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Pro Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 104
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 104
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 105
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 105
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Ala Ser Leu Thr Cys Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala
20 25 30
Tyr Ser Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr
35 40 45
Leu Leu Arg Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser Gly Val
50 55 60
Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala Gly Ile
65 70 75 80
Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95
Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
100 105 110
Leu Thr Val Leu
115
<210> 106
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 106
Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Ala Ser Leu Thr Cys
20
<210> 107
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 107
Thr Leu Arg Arg Gly Ile Asn Val Gly Ala Tyr Ser Ile Tyr
1 5 10
<210> 108
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 108
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Leu Arg
1 5 10 15
<210> 109
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 109
Tyr Lys Ser Asp Ser Asp Lys Gln Gln Gly Ser

1 5 10

<210> 110
<211> 34
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成多肽”
<400> 110

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Ala Ser Lys Asp Ala Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15
Gly Ile Leu Leu Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
20 25 30
Tyr Cys

<210> 111
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 111

Met Ile Trp His Ser Gly Ala Ser Ala Val
1 5 10

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 112

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 113
<211> 121

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 113

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

<210> 114
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 114

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5				10						15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Val	Ser		
			20					25					30		

<210> 115
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 115
Ser Tyr Trp Met His
1 5
<210> 116
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 116
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10
<210> 117
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 117
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 118
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 118
Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ser Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 119
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 119
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 120
Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 121
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 121
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 122
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 122

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

<210> 123
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 123

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser
20 25 30

<210> 124

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 124
Ser Tyr Trp Met His
1 5
<210> 125
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 125
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10
<210> 126
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 126
Phe Ile Leu Asn Lys Ala Asn Gly Gly Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 127
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 127
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30
<210> 128
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 128
Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 129
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 130
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 130
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

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

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 131
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala
1 5 10

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 132
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 133
<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 133
Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
1 5
<210> 134
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 134
Asn Tyr Gly Met Asn
1 5
<210> 135
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 135
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 136
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成

肽”

<400> 136

Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 137

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 137

Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 138

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 138

Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”

<400> 139

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Gln Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 140
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 140
Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5
<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 141
Gln Ser Asp His Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5
<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”
<400> 142
Ile Tyr Trp Leu Gly
1 5
<210> 143
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 143

Asn Ile Phe Pro Gly Ser Ala Tyr Ile Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 144

Glu Gly Ser Asn Ser Gly Tyr
1 5

<210> 145

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 145

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 146

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述:合成肽”

<400> 146

Thr Ala Gly Met Gln
1 5

<210> 147
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 147
Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 148
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 148
Ser Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10
<210> 149
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<220>
<221> 变体
<222> (10)..(10)
<223> /替换="L" 或 "N"
<220>
<221> 位点
<222> (1)..(15)
<223> /注释="序列中给出的变体残基

相对于变体位置注释中的那些变体残基
没有优先性″
<400> 149
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15
<210> 150
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 150
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5
<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 151
Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5
<210> 152
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 152
Ser Tyr Gly Val His
1 5
<210> 153

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 153
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
1 5
<210> 154
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 154
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Gly Val His
1 5 10
<210> 155
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<220>
<221> 变体
<222> (5)..(5)
<223> /替换="S"
<220>
<221> 变体
<222> (7)..(7)
<223> /替换="V"
<220>
<221> 变体

<222> (16)..(16)
<223> /替换="G"
<220>
<221> 位点
<222> (1)..(16)
<223> /注释="序列中给出的变体残基
相对于变体位置注释中的那些变体残基
没有优先性"
<400> 155
Val Ile Trp Thr Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
1 5 10 15
<210> 156
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述:合成
肽"
<220>
<221> 变体
<222> (3)..(3)
<223> /替换="S"
<220>
<221> 变体
<222> (5)..(5)
<223> /替换="V"
<220>
<221> 位点
<222> (1)..(5)
<223> /注释="序列中给出的变体残基
相对于变体位置注释中的那些变体残基
没有优先性"
<400> 156
Trp Thr Gly Gly Ser
1 5
<210> 157
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 157
Asp Gly Asp Tyr Asp Arg Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 158
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 158
Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15
<210> 159
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 159
Val Ile Trp Thr Ser Gly Val Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Met Gly
1 5 10 15
<210> 160
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 160

Trp Thr Ser Gly Val
1 5
<210> 161
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 161
Lys Ala Asp Tyr Glu Cys His Lys Val Tyr Ala
1 5 10
<210> 162
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 162
Tyr Glu Lys His Lys Cys Tyr Ala Cys Glu Val
1 5 10
<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 163
Gln Leu Lys Ser Gly Cys Ala Ser Val Val Cys
1 5 10
<210> 164
<211> 451
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 164

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Phe Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190
Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450

<210> 165
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 165
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Cys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 166
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 166
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Cys Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 167
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 167
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Cys Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 168
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 168
Thr Val Ser Ser Ala Cys Thr Lys Gly Pro Ser
1 5 10

<210> 169
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 169
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

<210> 170
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 170
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Asn His

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly His Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Val Ala Gly Pro Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Cys Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
肽”
<400> 171
Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 172
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 172
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Asn Ile Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 173
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 173

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Leu Arg Gln Gly Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gly Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Asn Glu Gly Thr Pro Thr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 174
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 174

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

<210> 175
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述:合成
多肽”
<400> 175

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

Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Leu Arg Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120