(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118647407 A
(43)申请公布日 2024.09.13

(21)申请号 202380018643.6
(22)申请日 2023.01.25
(30)优先权数据
63/303,446 2022.01.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/061218 2023.01.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/147329 EN 2023.08.03
(71)申请人 基因泰克公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 D·P·苏瑟林 D·张
S·A·贝克-道克瑞
P·S·德拉戈维奇
(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10页 说明书95页

(54)发明名称

抗体缀合的化学降解诱导剂及其方法

(57)摘要

本文描述的主题涉及本文被称为化学降解诱导剂(CIDE)以及抗体缀合的CIDE(Ab-CIDE)的分子,其中所述Ab-CIDE包含通过接头共价结合至所述CIDE的抗体,其中所述CIDE可进一步共价结合至磷酸酯部分,并且涉及所述分子在治疗其中靶向蛋白质降解有益的疾病和病症中的用途。

CN 118647407 A

1.一种缀合物,其具有以下化学结构:

$Ab-(L1-D)_j$,

其中,

D为具有以下结构的CIDE:

E3LB－L2－PB,

其中,

E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体,

其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质;

L2为共价结合至E3LB和PB的接头;

PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团;

其中,至少一个磷酸酯部分共价结合至D;

Ab为共价结合至L1的抗体;

L1为共价结合至Ab和D的接头;并且

j具有约1至约16的值。

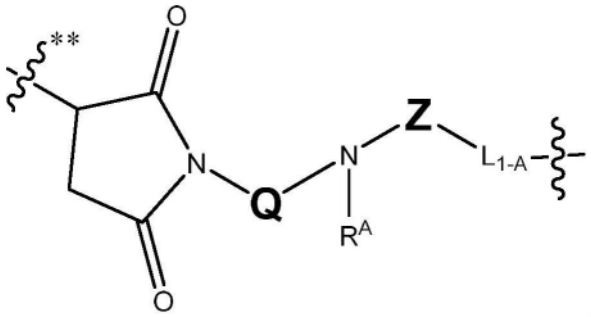
2.根据权利要求1所述的缀合物,其中一个磷酸酯部分在所述E3LB或所述PB处共价结合至D。

3.根据权利要求1或2所述的缀合物,其中L1为共价结合至Ab和共价结合至D的所述PB的拟肽接头。

4.根据权利要求1或2所述的缀合物,其中L1为共价结合至Ab和共价结合至D的所述E3LB的拟肽接头。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的缀合物,其中L1选自由以下项组成的组:

i)



,

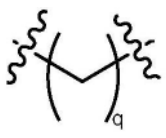
其中, 指示与Ab的连接点;

Z为$-(CH_2)_p-$或$-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_p-CH_2-$,其中p为1、2、3、4、5或6;

R^A为氢、C_{1-6}烷基或$-(CH_2)_v-$芳基,其中,v为0或1;

Q选自由以下项组成的组:

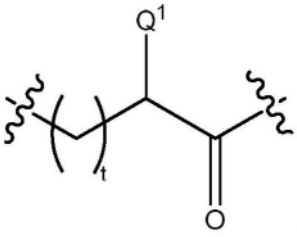
a)



其中,q为1、2、3或4;并且

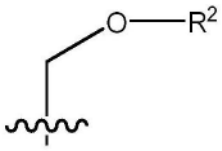
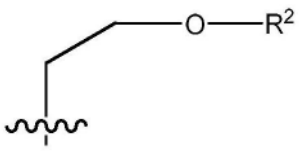
,

b)

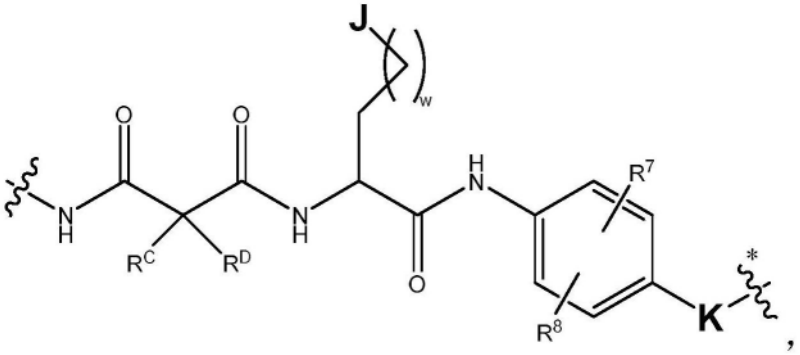


其中,t为0、1、2、3或4;并且

,

Q^1为氢、或,其中R^2为氢、卤代(C_{1-6})烷基或C_{1-6}烷基;并且

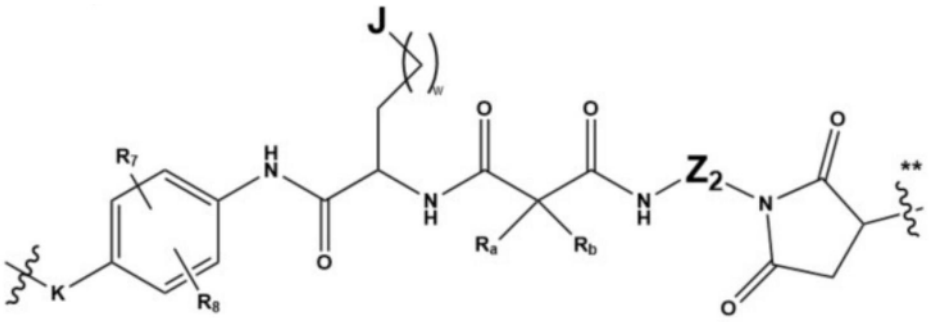
L_{1-A}为:



,

其中,指示与D的连接点;以及

ii)



,

其中指示与Ab的连接点;

Z_2为C_{1-12}亚烷基或-$[CH_2]_g$-O-$[CH_2]_h$-,其中g和h各自独立地为0、1或2;

w为0、1、2、3、4或5;

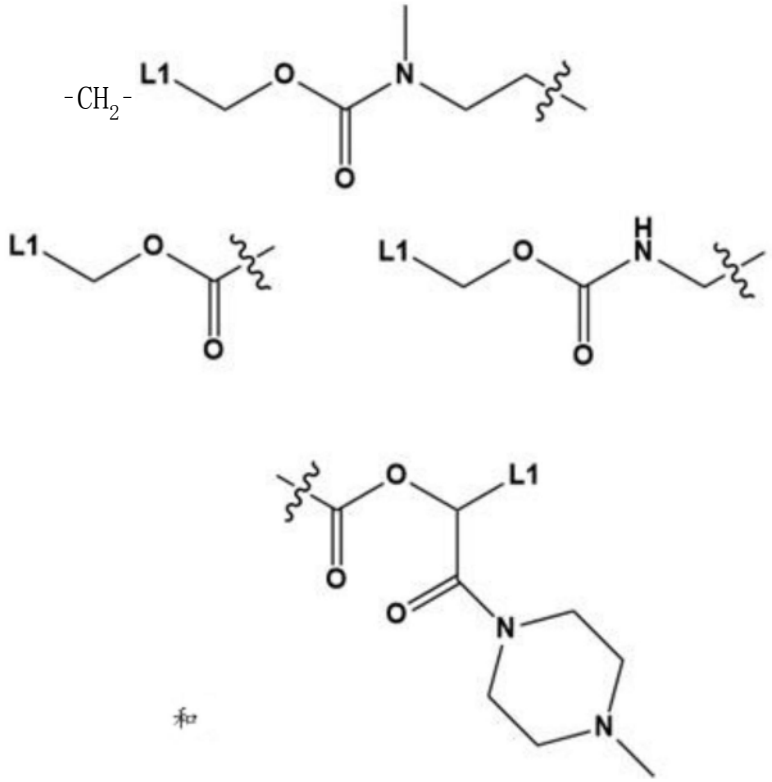
J选自由以下项组成的组:C_{1-5}烷基、-N(R_x)(R_y)、-C(O)NH_2、-NH-C(O)-NH_2和-NHC(=NH)NH_2,其中,R_x和R_y各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基;

K选自由以下项组成的组:C_{1-3}亚烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH_2-O-C(O)-、-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-和-CH_2-O-C(O)-R-$[CH_2]_q$-O-,其中R为氢、C_{1-3}烷基、N(R_x)(R_y)、-O-N(R_x)(R_y)或C(O)-N(R_x)(R_y),其中q为0、1、2或3,并且其中R_x和R_y各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基,或者R_x和R_y与它们各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基;

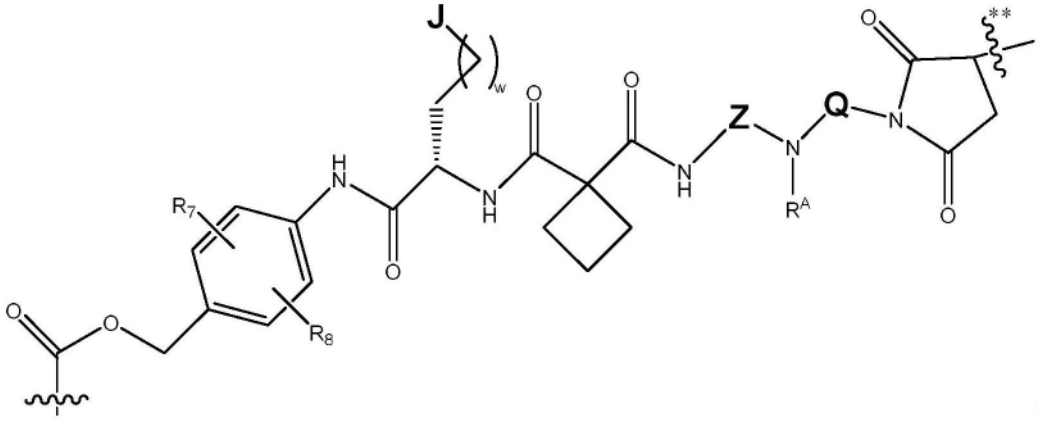
R_a、R_b、R^C和R^D各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基，或者R_a和R_b与它们各自所连接的碳一起形成任选地取代的C_{3-6}环烷基；并且

R_7和R_8各自独立地为氢、卤代、C_{1-5}烷基、C_{1-5}烷氧基或羟基。

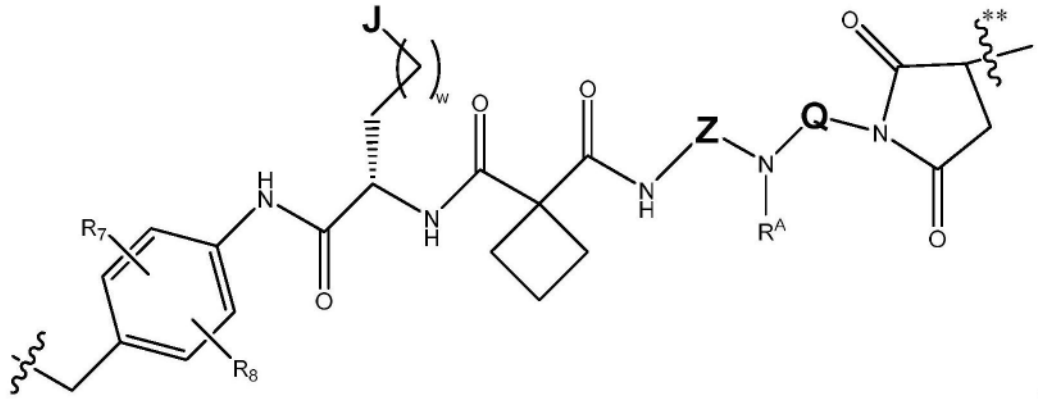
6.根据权利要求5所述的缀合物，其中L1的K选自由以下项组成的组：



7.根据权利要求1至5中任一项所述的缀合物，其中L1选自由以下项组成的组：



和



。

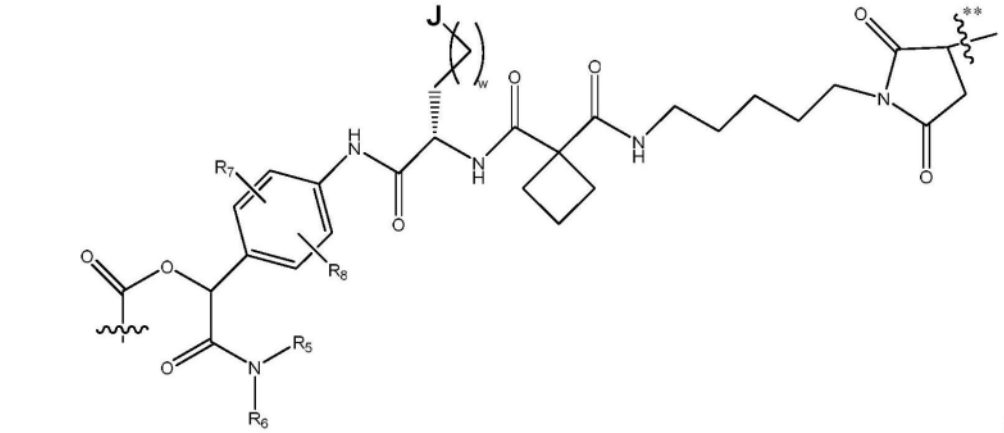
8.根据权利要求5至7中任一项所述的缀合物,其中R_7和R_8各自为氢。

9.根据权利要求5至8中任一项所述的缀合物,其中Z为-$(CH_2)_p$-。

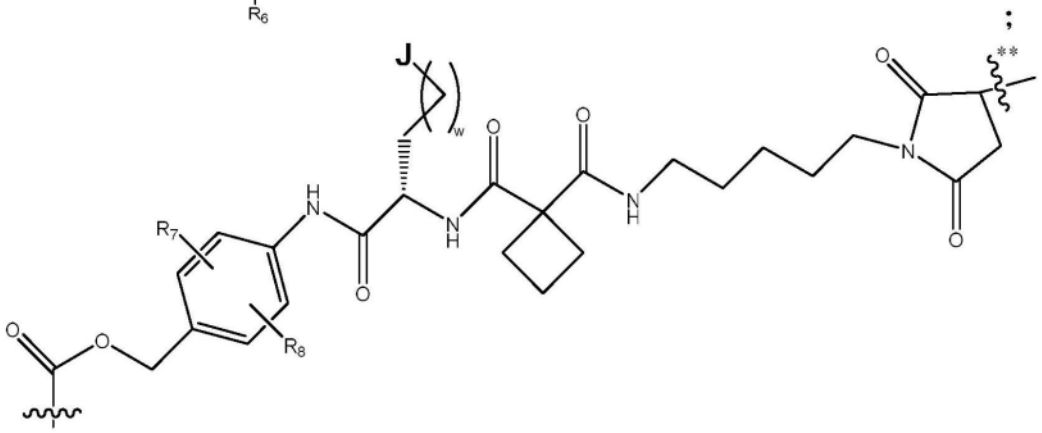
10.根据权利要求5至9中任一项所述的缀合物,其中w为2或3,并且J为-$N(CH_3)_2$或-NH(CO)NH。

11.根据权利要求5至10中任一项所述的缀合物,其中Q为-CH_2-CH_2-。

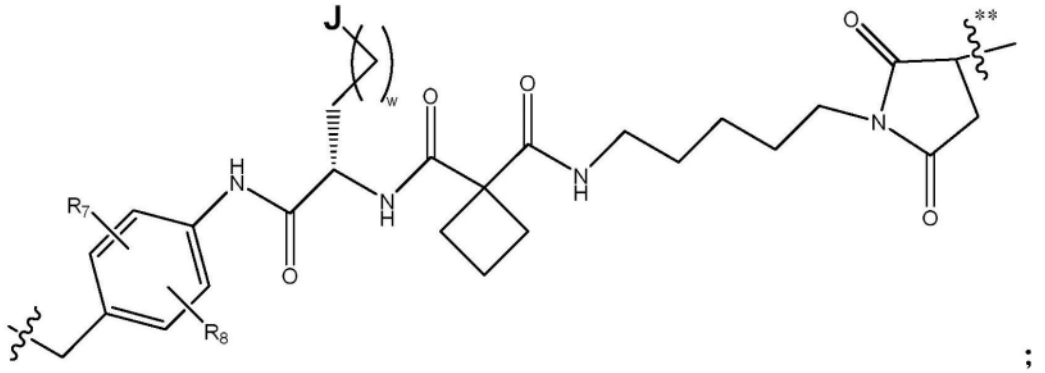
12.根据权利要求1至5中任一项所述的缀合物,其中L1选自由以下项组成的组:



；



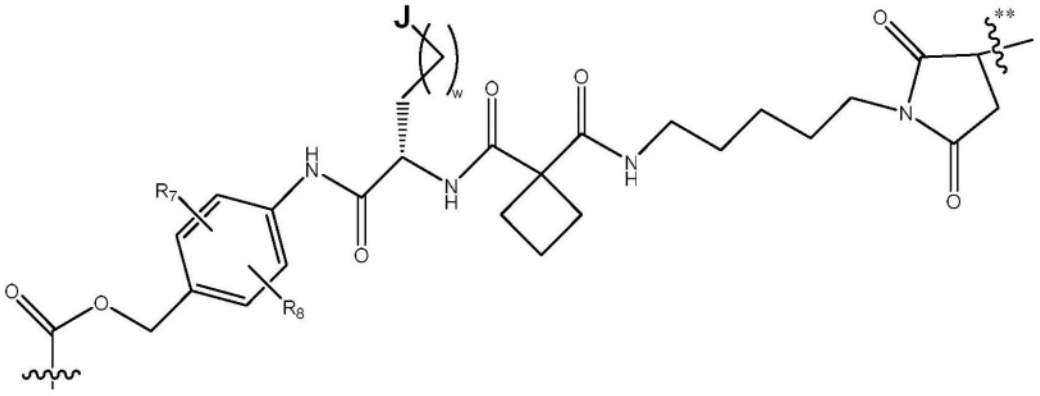
；和



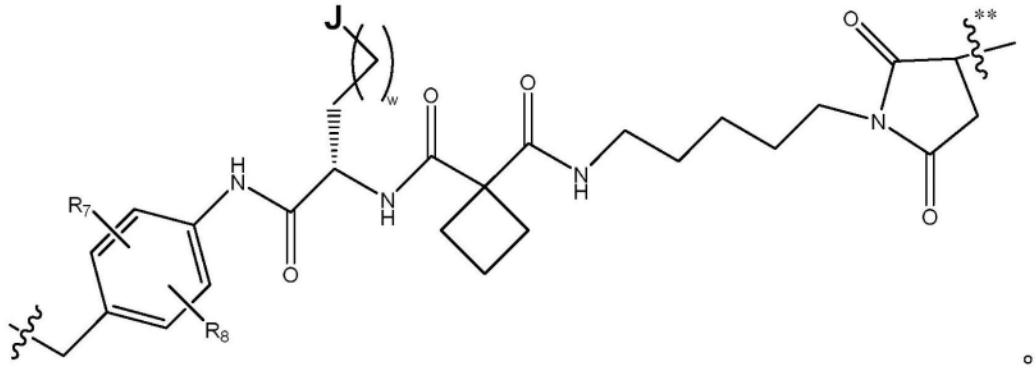
；

其中，R_5和R_6独立地为氢或C_{1-5}烷基；或者R_5和R_6与它们各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基。

13.根据权利要求12所述的缀合物，其中L1选自由以下项组成的组：



；和

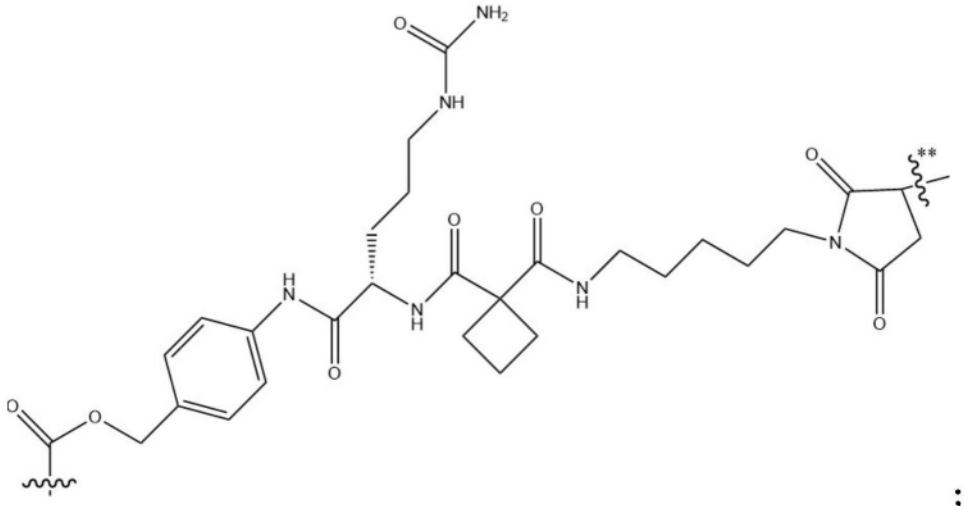


。

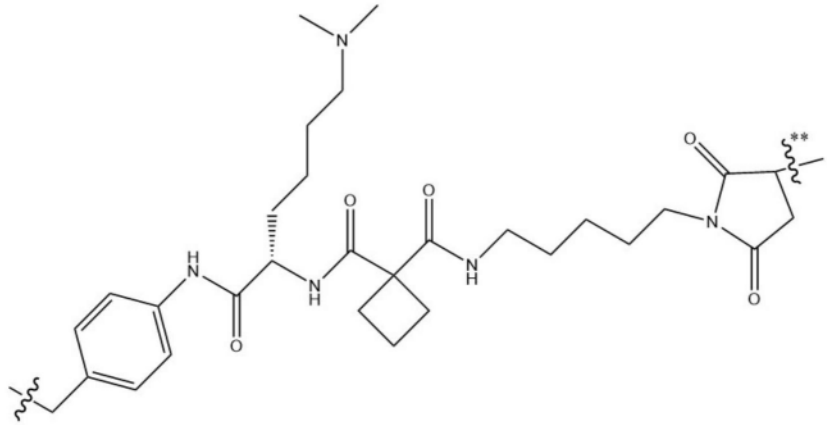
14.根据权利要求12或13所述的缀合物,其中J为—NH-C(O)-NH_2或—$N(CH_3)_2$。

15.根据权利要求12至14中任一项所述的缀合物,其中w为2并且J为—NH-C(O)-NH_2;或者w为3并且J为—$N(CH_3)_2$。

16.根据权利要求12至15中任一项所述的缀合物,其中L1具有以下结构:



；或



。

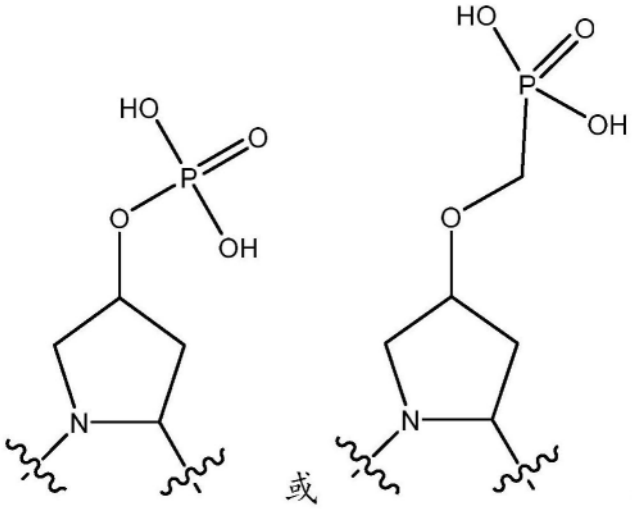
17.根据权利要求1至16中任一项所述的缀合物,其中所述磷酸酯部分选自由以下项组成的组:

-(P=O)(OH)$_2$、-CH_2O(P=O)(OH)$_2$、-(P=O)(OH)O(P=O)(OH)$_2$和-CH_2-O(P=O)(OH)O(P=O)(OH)$_2$。

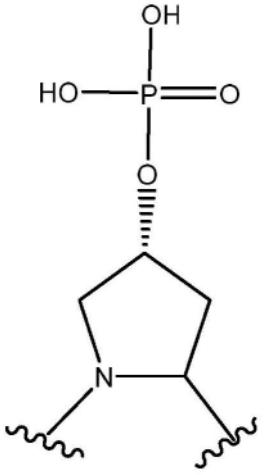
18.根据权利要求1至17中任一项所述的缀合物,其中所述E3LB包含羟脯氨酸残基。

19.根据权利要求18所述的缀合物,其中所述磷酸酯部分通过所述羟脯氨酸残基的氧共价结合至E3LB。

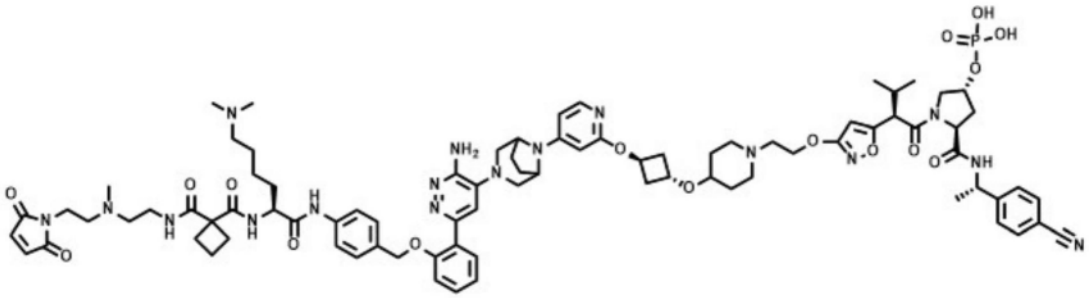
20.根据权利要求19所述的缀合物,其中所述E3LB包含:

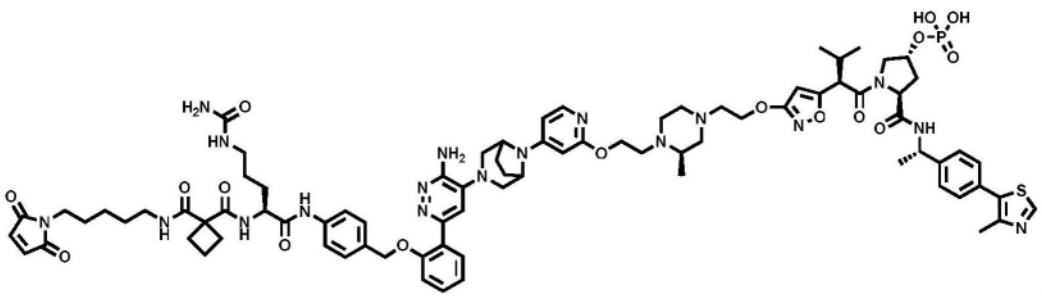


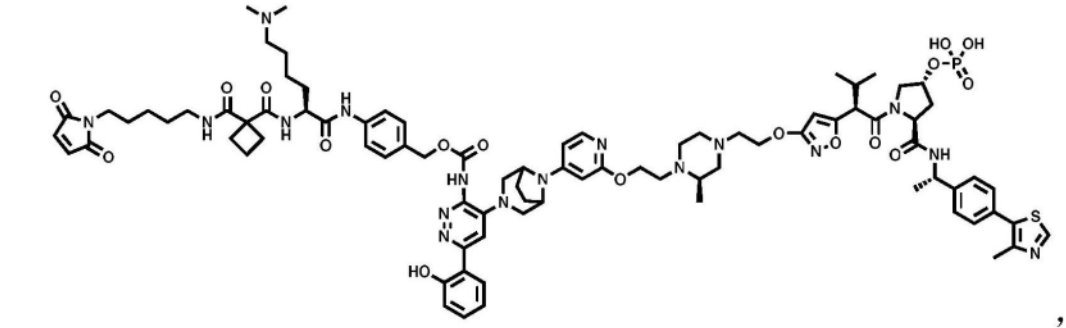
21.根据权利要求20所述的缀合物,其中所述E3LB包含:



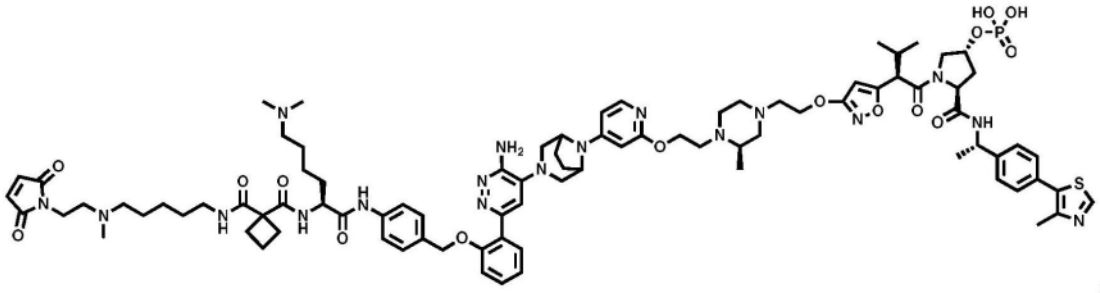
22.根据权利要求1至21中任一项所述的缀合物,其中所述抗体所缀合的L1－D为选自由以下项组成的组的化合物的残基:



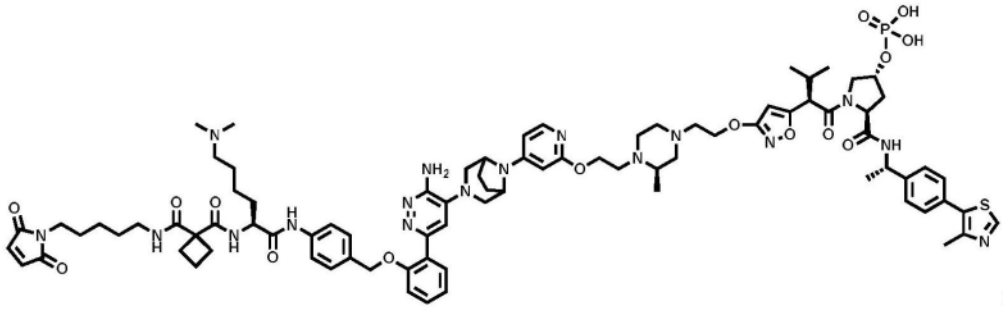




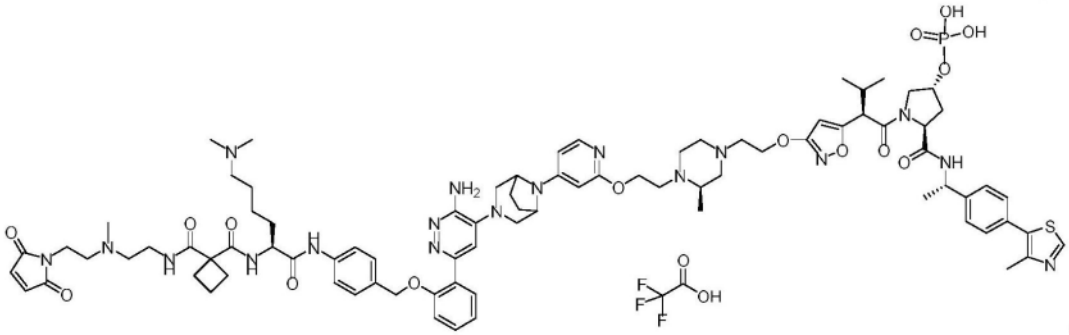
，



，



和



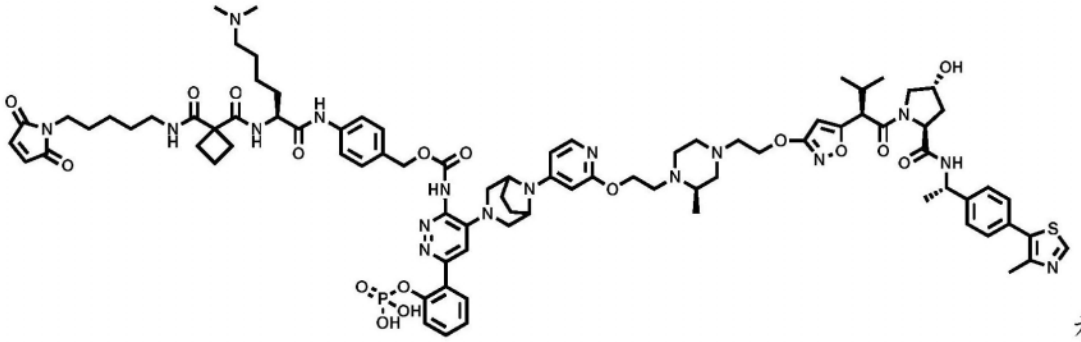
。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的缀合物,其中所述PB包含羟基苯基部分。

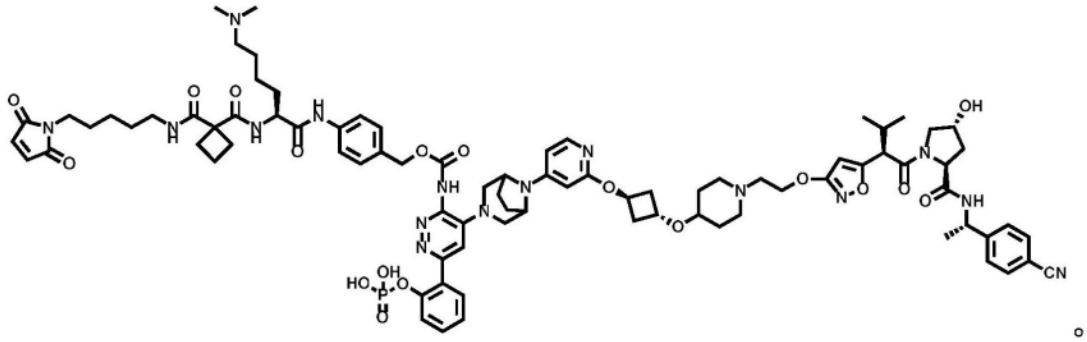
24.根据权利要求23所述的缀合物,其中所述磷酸酯部分通过所述羟基苯基部分的氧共价结合至PB。

25.根据权利要求24所述的缀合物,其中所述PB为BRM配体。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的缀合物,其中所述抗体所缀合的L1－D为选自由以下项组成的组的化合物的残基:



和



。

27.一种药物组合物,其包含根据权利要求1至26中任一项所述的缀合物以及一种或多种药用赋形剂。

28.一种治疗有需要的人的疾病的方法,所述方法包括向所述人施用有效量的根据权利要求1至26中任一项所述的缀合物或根据权利要求27所述的药物组合物。

29.根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病为癌症。

30.根据权利要求29所述的方法,其中所述癌症是BRM依赖性的。

31.根据权利要求29或30所述的方法,其中所述癌症为非小细胞肺癌。

32.一种降低受试者的靶蛋白质的水平的方法,所述方法包括向所述受试者施用根据权利要求1至26中任一项所述的缀合物或根据权利要求27所述的药物组合物,其中所述PB部分结合所述靶蛋白质,其中泛素连接酶引起所述结合的靶蛋白质的降解,并且其中所述靶蛋白质的所述水平被降低。

抗体缀合的化学降解诱导剂及其方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年1月26日提交的美国临时专利申请号63/303,446的权益,该临时专利申请的公开内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文描述的主题总体上涉及降解剂缀合物,此类降解剂缀合物包含用于促进靶蛋白质的细胞内降解的抗体-蛋白分解-靶向嵌合体分子(antibody-proteolysis-targeting chimera molecule)。

背景技术

[0004] 细胞维持和正常功能需要细胞蛋白质的受控降解。例如,调节蛋白的降解触发细胞周期中的事件,诸如DNA复制、染色体分离等。因此,此类蛋白质降解影响细胞的增殖、分化和死亡。

[0005] 虽然蛋白质的抑制剂可阻断或降低细胞中的蛋白质活性,但细胞中的蛋白质降解也可降低活性或完全去除靶蛋白质。因此,利用细胞的蛋白质降解途径可提供降低或去除蛋白质活性的手段。细胞的主要降解途径之一被称为泛素-蛋白酶体系统。在该系统中,蛋白质被蛋白酶体通过使该蛋白质泛素化而标记进行降解。蛋白质的泛素化是通过结合至蛋白质并且将泛素分子添加至该蛋白质中的E3泛素连接酶完成的。E3泛素连接酶为包括E1和E2泛素连接酶的途径的一部分,这使得E3泛素连接酶可将泛素添加至蛋白质中。

[0006] 为利用这种降解途径,称为化学降解诱导剂(CIDE)的分子构建体将E3泛素连接酶与待靶向降解的蛋白质结合在一起。为促进蛋白质被蛋白酶体降解,CIDE包含结合至E3泛素连接酶的基团以及结合至待降解的蛋白质靶标的基团。这些基团通常与接头连接。该CIDE可使E3泛素连接酶与蛋白质邻近,从而使其泛素化并且标记以降解。然而,CIDE相对较大的尺寸可能给靶向递送造成问题,并且导致不良特性,诸如快速代谢/清除、短半衰期和低生物利用度。

[0007] 本领域持续需要改善CIDE,包括增强CIDE向含有蛋白质靶标的细胞的靶向递送。本文描述的主题解决了本领域中的这个以及其他缺点。

发明内容

[0008] 本公开涉及一种通过接头缀合或共价连接至抗体的CIDE。在某些实施例中,CIDE经磷酸化。在某些实施例中,将抗体共价连接至CIDE的接头为拟肽接头。在另一方面,磷酸酯部分用作缀合物的前药。

[0009] 在某些实施例中,通过拟肽接头缀合或共价连接至抗体的CIDE具有以下化学结构:

[0010] $Ab-(L1-D)_j$,

[0011] 其中Ab为抗体;L1为接头;D为CIDE;并且j为1与16之间的整数。在此类方面,至少

一个磷酸酯部分共价结合至D。在某些实施例中,L1为拟肽接头。

[0012] 在某些实施例中,D为具有以下结构的CIDE:E3LB－L2－PB,其中E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合配体;L2为共价结合至E3LB和PB的接头;并且PB为共价结合至L2的蛋白质结合基团。在这些实施例的一个方面,磷酸酯部分在D的E3LB和/或PB处共价结合至D。在这些实施例的一个方面,单个磷酸酯部分在D的E3LB或PB处共价结合至D。

[0013] 在某些实施例中,E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质。

[0014] 在某些实施例中,磷酸酯部分共价结合至D的E3LB。

[0015] 在某些实施例中,磷酸酯部分共价结合至D的PB。

[0016] 在某些实施例中,L1共价结合至D的PB,并且磷酸酯部分共价结合至D的E3LB。

[0017] 在某些实施例中,L1共价结合至D的PB,并且磷酸酯部分共价结合至D的PB。

[0018] 在某些实施例中,E3LB包含羟脯氨酸残基,并且磷酸酯部分共价结合至该羟脯氨酸残基。

[0019] 在某些实施例中,PB包含羟基苯基部分,并且磷酸酯部分共价结合至该羟基苯基部分。

[0020] 在某些实施例中,PB为BRM蛋白质。

[0021] 在某些实施例中,本文描述的主题涉及一种药物组合物,该药用组合物包含如本文所述的Ab-L1-CIDE以及一种或多种药用赋形剂。

[0022] 在某些实施例中,本文描述的主题涉及如本文所述的Ab-L1-CIDE在通过向受试者施用包含Ab-L1-CIDE的药物组合物来治疗病症和疾病的方法中的用途。

[0023] 在某些实施例中,本文描述的主题为一种制备Ab-L1-CIDE的方法。

[0024] 在某些实施例中,本文描述的主题涉及一种制品,该制品包括包含Ab-L1-CIDE的药物组合物、容器以及指示该药物组合物可用于治疗疾病或病症的包装插页或标签。

[0025] 其他实施例也在本文中得到全面描述。

具体实施方式

[0026] 本文公开了抗体缀合的化学降解诱导剂(“抗体缀合的CIDE”、“Ab-L1-CIDE”或“Ab-CIDE”),其包含共价结合至CIDE和共价结合至抗体的接头(诸如拟肽接头),并且可用于靶向蛋白质降解。特定而言,本公开涉及抗体缀合的CIDE,其含有结合至希佩尔-林道E3泛素连接酶的配体以及结合靶蛋白质(诸如BRM)的部分,使得靶蛋白质置于与泛素连接酶邻近以实现降解,从而调节靶蛋白质的量。在某些实施例中,磷酸酯部分共价结合至CIDE。

[0027] 本文描述的主题利用抗体靶向以将CIDE导向靶细胞或组织。如本文所述,已显示将抗体连接至CIDE以形成Ab-CIDE可将CIDE递送至靶细胞或组织。如本文所示,例如在实例中,表达抗原的细胞可由抗原特异性Ab-CIDE靶向,从而Ab-CIDE的CIDE部分被细胞内递送至靶细胞。进一步,包含针对未在细胞上发现的抗原的抗体的CIDE可能不会导致CIDE向细胞的大量细胞内递送。

[0028] 所公开的Ab-CIDE包含共价连接至接头1(L1)(诸如拟肽接头)的抗体,该接头在任何可用的连接点处共价连接至CIDE,其中CIDE包含E3泛素连接酶结合(E3LB)部分,其中E3LB部分识别作为VHL的E3泛素连接酶蛋白,接头2(L2)将E3LB部分共价连接至蛋白质结合部分(PB),该蛋白质结合部分为识别靶蛋白质的部分。在某些实施例中,磷酸酯部分共价结

合至CIDE。因此,本文描述的主题可用于降解并由此调节蛋白质活性,以及治疗与蛋白质活性有关的疾病和病症。在实施例中,磷酸化Ab-CIDE导致出乎意料地增强的体内靶标降解。

[0029] 现在将在下文中更全面地描述本发明所公开的主题。然而,本发明所公开的主题所涉及的领域的技术人员受益于前述说明书中给出的教导内容,将想到本文描述的本发明所公开的主题的许多修改形式和其他实施例。因此,应当理解,本发明所公开的主题不限于所公开的具体实施例,并且修改形式和其他实施例旨在包括在所附权利要求的范围内。换句话说,本文描述的主题涵盖所有替换、修改和等同形式。如果并入的文献、专利和类似材料中的一项或多项与本申请有所不同或矛盾(包括但不限于定义的术语、术语用法、描述的技术等),则以本申请为准。除非另有定义,否则本文所用的所有科学技术术语具有本领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用以其全文并入本文。

[0030] I.定义

[0031] 术语“CIDE”是指化学降解诱导剂,其为蛋白水解靶向嵌合体分子,通常具有以下三种组分:E3泛素连接酶结合基团(E3LB)、接头L2和蛋白质结合基团(PB)。在某些实施例中,CIDE经磷酸化。

[0032] 如本文所用,术语“磷酸化”是指共价结合至磷酸酯部分的CIDE,其形成磷酸化CIDE。

[0033] 如本文所用,术语“磷酸酯部分”是指含有单个磷酸酯及其盐的化学基团。磷酸酯部分的实例包括-(P=O)(OH)$_2$、-CH$_2$O(P=O)(OH)$_2$、

[0034] -(P=O)(OH)O(P=O)(OH)$_2$和-CH$_2$-O(P=O)(OH)O(P=O)(OH)$_2$、及其盐。

[0035] 术语“残基”、“部分”、“组成部分”或“基团”是指与另一组分共价结合或连接的组分。术语“组分”在本文中也用于描述此类残基、部分、组成部分或基团。举例而言,化合物的残基将使该化合物的一个或多个原子(例如氢或羟基)经共价键替代,从而使该残基与CIDE、L1-CIDE或Ab-L1-CIDE的另一组分结合。例如,“CIDE的残基”是指与一个或多个基团诸如接头L2共价连接的CIDE,其本身可任选地进一步连接至抗体。

[0036] 术语“共价结合”或“共价连接”是指通过共享一对或多对电子而形成的化学键。

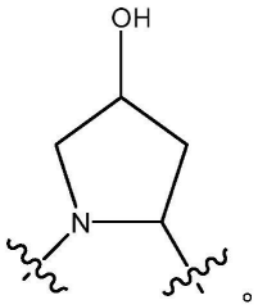
[0037] 术语“蛋白质结合基团”或“PB”是指能够结合至靶蛋白质或其他目标多肽靶标的小分子或其他化合物的残基。在本文描述的缀合物分子中,PB结合至靶标,其将靶标置于与泛素连接酶邻近,使得可以发生通过泛素连接酶的蛋白质或多肽的降解。因此,本文描述的缀合物可包括任何PB,只要其共价结合至L2并且与目标靶标相互作用或结合至该目标靶标。小分子靶蛋白质结合部分的非限制性实例包括结合BRM(BRAHMA)、BRG1、AKT、HPK1、IRE1、Tau和雄激素受体(AR)的化合物、Hsp90抑制剂、激酶抑制剂、MDM2抑制剂、靶向人BET含溴区结构域的蛋白质的化合物、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂(诸如KDM5)、血管生成抑制剂、免疫抑制化合物以及靶向芳烃受体(AHR)的化合物等等。在某些实施例中,本文描述的CIDE和经缀合的CIDE不限于PB的类型。在某些实施例中,本文描述的CIDE和经缀合的CIDE不限于PB的类型,其中PB共价结合至L2;并且,CIDE或经缀合的CIDE包含磷酸酯部分和L1拟肽接头。

[0038] 术语“包含羟基苯基部分”等是指将共价结合至苯基基团的羟基基团或此类部分的残基作为其结构的一部分而含有的PB化合物。在某些实施例中,含有羟基苯基(酚)基团

或其残基的化合物结合至BRM。

[0039] 术语“E3连接酶结合(E3LB)配体”是指能够结合希佩尔-林道(VHL)E3泛素连接酶的分子。术语“VCB E3泛素连接酶”、“希佩尔-林道(或VHL)E3泛素连接酶”、“VHL”和“泛素连接酶”总体上均描述针对本文描述的缀合物的E3LB部分的靶标酶结合位点。VCB E3是一种与E2泛素缀合酶组合引起泛素与靶蛋白质上的赖氨酸结合的蛋白质;E3泛素连接酶靶向特定的蛋白质底物,以被蛋白酶体降解。因此,单独的E3泛素连接酶或与E2泛素结合酶复合的E3泛素连接酶负责将泛素转移至靶蛋白质。在某些实施例中,本文描述的CIDE和经缀合的CIDE不限于E3LB的类型。在某些实施例中,本文描述的CIDE和经缀合的CIDE不限于E3LB的类型,其中E3LB共价结合至L2;并且CIDE或经缀合的CIDE包含磷酸酯部分,并且进一步共价连接至L1拟肽接头。

[0040] 术语“包含羟脯氨酸残基”等是指E3LB化合物含有具有以下结构的基团或基团的残基作为其结构的一部分:

[0041] 

。

[0042] 作为E3连接酶结合(E3LB)配体的化合物在本领域中是已知的。

[0043] 如本文所用的术语“接头”、“接头单元”或“连接子”意指包含将CIDE部分共价连接至抗体、或将CIDE的残基、组成部分、部分、基团或组分连接至CIDE的另一残基、组成部分、部分、基团或组分的一个或多个原子的链的化学部分。在各种实施例中,接头为二价基团,将其指定为接头1、接头2、L1或L2。

[0044] 如本文所用的术语“拟肽”或PM是指非肽化学部分。肽是通过肽(酰胺)键连接的氨基酸单体的短链,所述肽键为当一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基反应时形成的共价化学键。最短的肽是二肽(由通过单个肽键连接的2个氨基酸组成),其次为三肽、四肽等。拟肽化学部分包括非氨基酸化学部分。拟肽化学部分还可包含被一个或多个由非氨基酸化学单元隔开的一个或多个氨基酸。拟肽化学部分在其化学结构的任何部分中可以不含有两个或更多个通过肽键连接的相邻氨基酸。“拟肽接头”为分子结合至CIDE和结合至抗体的部分。可用的拟肽接头在本领域中是已知的,并且本文公开了其他接头。

[0045] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且特别涵盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出期望的生物活性(Miller等人(2003)Jour.of Immunology 170:4854-4861)。抗体可以是鼠抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或衍生自其他物种的抗体。抗体是免疫系统产生的能够识别并且结合至特异性抗原的蛋白质(Janeway,C.,Travers,P.,Walport,M.,Shlomchik(2001)Immuno Biology,第5版,Garland Publishing,New York)。靶抗原通常具有多个结合位点,也称为表位,被多个抗体上的CDR(互补决定区)识别。特异性结合至不同表位的每种抗体具有不同的结构。因此,一种抗原可以具有多于一种的相应抗体。抗体包括全长免疫球蛋白分

子或全长免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即包含免疫特异性结合目标靶标的抗原或其一部分的抗原结合位点的分子,此类靶标包括但不限于癌细胞或产生与自身免疫病相关联的自身免疫性抗体的细胞。本文公开的免疫球蛋白可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。免疫球蛋白可衍生自任何物种。然而,在一个方面,免疫球蛋白为人、鼠或兔来源的免疫球蛋白。

[0046] 如本文所用的术语“抗体片段”包含全长抗体的一部分,通常为全长抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$和Fv片段;双体抗体;线性抗体;微型抗体(Olafsen等人(2004)Protein Eng.Design&Sel.17(4):315-323),由Fab表达文库产生的片段、抗独特型(抗Id)抗体、CDR(互补决定区)和上述中任一项(其免疫特异性地结合癌症细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原)的表位结合片段、单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0047] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,即,除了可能存在的少量天然存在的突变,该抗体群包含的单个抗体是相同的。单克隆抗体对单个抗原位点具有高特异性。此外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除特异性以外,单克隆抗体的优势还在于它们可以在不受其他抗体污染的情况下合成。修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本文所述主题使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等人(1975)Nature,256:495描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法制备(参见例如:US 4816567;US 5807715)来制备。单克隆抗体还可以使用(例如)以下文献中所述的技术从噬菌体抗体文库中分离得到:Clackson等人(1991)Nature,352:624-628;Marks等人(1991)J.Mol.Biol.,222:581-597。

[0048] 本文中的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列以及这些抗体的片段相同或同源,只要它们表现出所需的生物活性即可(US 4816567;和Morrison等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855)。本文中的目标嵌合抗体包括“灵长类化”抗体,此类“灵长类化”抗体包含来源于非人灵长类动物(例如,旧大陆猴、猿等)的可变结构域抗原结合序列以及人恒定区序列。

[0049] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,在该抗体中重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同的来源或物种。

[0050] 抗体的“类别”是指抗体的重链所具有的恒定结构域或恒定区的类型。抗体主要分为五类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些抗体中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。

[0051] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映了结合对的成员(例如,抗体和抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力一般可由解离常数(Kd)表示。亲和力可通过本领域已知的常用方法(包括

本文描述的那些方法)来测量。下文描述用于测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施例。在某些实施例中,如本文所述的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤5nm、≤4nM、≤3nM、≤2nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小,例如10^{-8}M至10^{-13}M,例如10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0052] 如本文所用的术语"游离半胱氨酸氨基酸"是指已被改造进入亲本抗体,具有硫醇官能团(-SH)并且不配对为分子内或分子间二硫键的半胱氨酸氨基酸残基。如本文所用的术语"氨基酸"是指甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺或瓜氨酸。

[0053] "患者"或"个体"或"受试者"是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如,牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类动物(例如,人和非人灵长类动物诸如猴)、兔以及啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施例中,患者、个体或受试者是人。在一些实施例中,患者可以是"癌症患者",即罹患一种或多种癌症症状或有罹患一种或多种癌症症状的风险的患者。

[0054] "患者群体"指一组癌症患者。此类群体可用于证明具有统计学意义的药物有效性和/或安全性。

[0055] 术语"癌症"和"癌性"是指或描述哺乳动物中通常以细胞生长/增殖不受控制为特征的生理状况。"肿瘤"包含一个或多个癌细胞。癌症的实例在本文其他地方提供。

[0056] 如本文所用,"治疗(treatment)"(及其语法变型,诸如"治疗(treat)"或"治疗(treating)")是指试图改变所治疗个体的自然进程的临床干预,并且可以是为了预防或在临床病理学的进程期间进行。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、降低疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、以及缓解或改善预后。在一些实施例中,本文描述的主题的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0057] 药剂(例如药物制剂)的"有效量"是指在必要的剂量和时间段下有效实现所需治疗或预防结果的量。例如,用于治疗癌症的有效量的药物可减少癌细胞数;减小肿瘤大小;抑制(即,在一定程度上减缓并且优选地停止)癌细胞浸润周围器官;抑制(即,在一定程度上减缓并且优选地停止)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联的一种或多种症状。在某种程度上,药物可阻止生长和/或杀死既存癌细胞,它可以抑制细胞生长和/或具有细胞毒性。有效量可延长无进展存活(例如,如通过实体瘤临床疗效评价标准(RECIST)或CA-125变化所衡量)、导致客观缓解(包括部分缓解(PR)或完全缓解(CR))、增加总存活时间和/或改善一种或多种癌症症状(例如,如通过FOSI所评定)。

[0058] 如本文所用,术语"治疗有效量"意指与未接受该量的相应受试者相比导致治疗疾病、病症或副作用、或者降低疾病或疾患的进展率的任何量。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量。为用于治疗,可以将治疗有效量的Ab-CIDE及其盐作为原料化学品施用。另外,活性成分可以呈现为药物组合物。

[0059] 术语"药物制剂"是指处于允许包含在其中的活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对于将被施用该制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制剂。

[0060] "药用赋形剂"是指药物制剂中除活性成分外的对受试者无毒的成分。药用赋形剂

包括但不限于缓冲剂、载体、稳定剂或防腐剂。

[0061] 如本文所用,短语“药用盐”是指分子的药用有机或无机盐。示例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、盐酸盐、溴酸盐、碘酸盐、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸酯、单宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对-甲苯磺酸盐和巴莫酸盐(即1,1’-亚甲基-二-(2-羟基-3-萘甲酸))盐。药用盐可涉及包含另一种分子,诸如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其他抗衡离子。抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分。此外,药用盐在其结构中可以具有一个以上的带电原子。其中多个带电原子是药用盐的一部分的实例可具有多个抗衡离子。因此,药用盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

[0062] 其他非药用盐可用于制备本文描述的化合物,并且应将其视为形成本主题的另一方面。这些盐,诸如草酸盐或三氟乙酸盐,虽然本身并非药用盐,但可用于制备用作获得本文描述的化合物及其药用盐的中间体的盐。

[0063] 如本文所用的术语“烷基”是指具有一至十二个碳原子的任何长度的饱和直链或支链单价烃基(C_1-C_6),其中该烷基可以任选地独立地经下文描述的一个或多个取代基取代。在另一个实施例中,烷基含有一个、两个、三个、四个或五个碳原子。烷基基团的实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(-$CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)等。

[0064] “芳基”是指具有单环(例如,单环)或多环(例如,双环或三环)的芳族碳环基团,包括稠合体系。如本文所用,芳基具有6个至20个环碳原子(即,C_6-C_{20}芳基)、6个至12个环碳原子(即,C_6-C_{12}芳基)、6个至10个环碳原子(即,C_6-C_{10}芳基)。芳基基团的实例包括例如苯基、萘基、芴基和蒽基。

[0065] “杂芳基”是指具有单个环、多个环或多个稠环且具有独立地选自氮、氧和硫的一个或多个环杂原子的芳族基团。如本文所用,杂芳基包括1个至20个环碳原子(即,C_1-C_{20}杂芳基)、3个至12个环碳原子(即,C_3-C_{12}杂芳基)、或3个至8个碳环原子(即,C_3-C_8杂芳基)以及独立地选自氮、氧和硫的1个至5个环杂原子、1个至4个环杂原子、1个至3个环杂原子、1个至2个环杂原子、或1个环杂原子。在某些情况下,杂芳基包括9至10元环体系、6至10元环体系、5至10元环体系、5至7元环体系或5至6元环体系,各体系独立地具有独立地选自氮、氧和硫的1个至4个环杂原子、1个至3个环杂原子、1个至2个环杂原子或1个环杂原子。杂芳基基团的实例包括例如吖啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并吲哚基、苯并呋喃基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并萘呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻吩基(苯并苯硫基)、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咔唑基、噌啉基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基、吲哚基、吲唑基、异吲哚基、异喹啉基、异噁唑基、萘啶基、噁二唑基、噁唑基、1-氧化吡啶基、1-氧化嘧啶基、1-氧化吡嗪基、1-氧化哒嗪基、吩嗪基、酞嗪基、蝶啶

基、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、喹啉基、奎宁环基、异喹啉基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基和三嗪基。稠合杂芳环的实例包括但不限于苯并[d]噻唑基、喹啉基、异喹啉基、苯并[b]苯硫基、吲唑基、苯并[d]咪唑基、吡唑并[1,5-a]吡啶基和咪唑基[1,5-a]吡啶基,其中杂芳基可经由稠合体系的任一环连接。具有单个或多个稠环且含有至少一个杂原子的任何芳族基团均被视为杂芳基,而与分子的其余部分的连接(即,通过稠环的任一者)无关。杂芳基不涵盖如上文中所定义的芳基或与之重叠。

[0066] 如本文所用的术语“亚烷基”是指具有一至十二个碳原子的任意长度的饱和直链或支链二价烃基(C_1-C_{12}),其中亚烷基可以任选地独立地经下文描述的一种或多种取代基取代。在另一个实施例中,亚烷基含有一个至八个碳原子(C_1-C_8)或一个至六个碳原子(C_1-C_6)。亚烷基基团的实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。

[0067] 术语“碳环”、“碳环基”、“碳环”和“环烷基”是指作为单环的具有3至5个碳原子(C_3-C_5)的单价非芳族、饱和或部分不饱和环。单环碳环的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基等。碳环基基团可任选地经一个或多个烷基基团独立地取代。

[0068] “杂环”、“杂环的”、“杂环烷基”或“杂环基”是指具有单环或多个稠环的饱和或部分不饱和基团,包括稠合、桥接或螺环体系,并且具有3至20个环原子,包括1至10个杂原子。这些环原子选自由碳、氮、硫或氧所组成的组,其中,在稠环体系中,环中的一者或多者可为环烷基、芳基或杂芳基,前提条件是连接点通过非芳族环实现。在某些实施例中,杂环基团的氮和/或硫原子任选地经氧化以提供N-氧化物、-S(O)-或-SO_2-部分。杂环的实例包括但不限于氮杂环丁烷、二氢吲哚、吲唑、喹嗪、咪唑烷、咪唑啉、哌啶、哌嗪、二氢吲哚、1,2,3,4-四氢异喹啉、噻唑烷、吗啉基、硫代吗啉基(thiomorpholinyl)(也称为硫杂吗啉基(thiamorpholinyl))、1,1-二氧代硫代吗啉基、哌啶基、吡咯烷、四氢呋喃基等。杂环基可经取代,如WO2014/100762中所述。

[0069] 术语“手性”是指具有与镜像配偶体不重叠性的分子,而术语“非手性”是指与其镜像配偶体可重叠的分子。术语“立体异构体”是指具有相同化学组成,但原子或基团在空间的排列不同的化合物。“非对映体”是指具有两个或更多个手性中心并且其分子并非彼此镜像的立体异构体。非对映体具有不同的物理性质,例如熔点、沸点、光谱特性和反应性。非对映体的混合物可以在高分离度分析程序(诸如电泳和色谱法)下分离。“对映体”是指化合物的两种立体异构体,这两种立体异构体是彼此不可重叠的镜像。本文中所用的立体化学定义和约定大致遵循:S.P.Parker编,McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;以及Eliel,E.和Wilen,S.,Stereochemistry of Organic Compounds(1994)John Wiley&Sons,Inc.,New York。许多有机化合物以旋光形式存在,即它们具有旋转平面偏振光平面的能力。在描述旋光化合物时,前缀D和L或者R和S用于表示分子围绕其手性中心的绝对构型。前缀d和l或者(+)和(-)用于表示化合物对平面偏振光的旋转的符号,其中(-)或l表示该化合物是左旋的。带有(+)或d前缀的化合物是右旋的。对于给定化学结构,这些立体异构体除了互为镜像外,是完全相同的。特定的立体异构体也可以被称为对映体,并且此类异构体的混合物通常被称为对映体混合物。对映体的50:

50混合物称为外消旋混合物或外消旋体,其可能在化学反应或过程中没有立体选择或立体特异性的情况下发生。术语“外消旋混合物”和“外消旋体”是指两种无旋光性的对映体种类的等摩尔混合物。

[0070] 本文其他地方可提供另外的定义和缩略语。

[0071] II.化学降解诱导剂

[0072] 本公开涉及一种通过接头缀合或共价连接至抗体的CIDE。本公开涉及一种通过拟肽接头缀合或共价连接至抗体的CIDE。在某些实施例中,CIDE经磷酸化。在另一方面,磷酸酯部分用作缀合物的前药。

[0073] 在实施例中,CIDE具有以下结构:E3LB－L2－PB,其中E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合配体;L2为共价结合至E3LB和PB的接头;并且PB为共价结合至L2的蛋白质结合基团。在各方面,磷酸酯部分共价结合至CIDE(D)的E3LB和/或PB。

[0074] 在某些实施例中,E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质。

[0075] 在某些实施例中,磷酸酯部分共价结合至D的E3LB。

[0076] 在某些实施例中,磷酸酯部分共价结合至D的PB。

[0077] 在某些实施例中,L1共价结合至D的PB,并且磷酸酯部分共价结合至D的E3LB。

[0078] 在某些实施例中,L1共价结合至D的PB,并且磷酸酯部分共价结合至D的PB。

[0079] 在某些实施例中,E3LB包含羟脯氨酸残基,并且磷酸酯部分共价结合至羟脯氨酸残基。

[0080] 在某些实施例中,PB包含羟基苯基部分,并且磷酸酯部分共价结合至该羟基苯基部分。

[0081] 在某些实施例中,PB为BRM蛋白质。

[0082] 在某些实施例中,通过拟肽接头L1缀合或共价连接至抗体的CIDE具有下式:

[0083] $Ab－(L1－D)_j$,

[0084] 其中Ab为抗体;L1为接头;D为CIDE;并且j为1与16之间的整数。在此类方面,至少一个磷酸酯部分共价结合至D。

[0085] 以下部分进一步详细描述包含Ab-CIDE的以上组分。为获得具有一种或多种特性(包括强效功效和期望的治疗指数)的Ab-CIDE,提供以下组分:

[0086] 1.抗体(Ab)

[0087] 如本文所述,抗体例如单克隆抗体(mAB)用于将CIDE递送至靶细胞,例如表达该抗体靶向的特定蛋白质的细胞。Ab-CIDE的抗体部分可靶向表达抗原的细胞,从而通常通过内吞作用将抗原特异性Ab-CIDE细胞内递送至靶细胞。在一些情况下,胞饮作用或类似的非特异性吸收途径可能导致抗原表达或非抗原表达细胞内对Ab-CIDE的一般细胞吸收。本文描述的Ab-CIDE及其使用方法有利地利用抗体对细胞表面识别和/或对Ab-CIDE内吞作用,以将CIDE部分递送至细胞内。抗体在WO2020/086858中有所描述,该专利通过引用以其整体并入本文。

[0088] 在特定实施例中,抗体可以经突变以降低效应子功能。调节Fc效应子功能的突变的实例包括LALAPG突变和NG2LH突变。

[0089] 在特定实施例中,抗体为如先前在WO2016/04856中描述的THIOMAB™。进一步,设想到组合,使得任何抗体靶标均可结合THIOMAB™突变与或不与包括LALAPG或NG2LH突变的任

何Fc效应子调节的任何适合的组合。

[0090] 抗体可为人抗体,例如,如以下文献中一般性所述:van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001);以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)。抗体可为来源于文库的抗体。本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并且筛选此类文库以获得具有所需结合特征的抗体。此类方法的综述参见,例如,Hoogenboom等人,收录于Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,Totowa,NJ,2001),并且其进一步描述参见,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,收录于Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0091] 抗体可为嵌合抗体和人源化抗体。人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且进一步描述于例如以下文献中:Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述"表面再塑");Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述"FR改组");以及Osbourn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的"导向选择"方法)。

[0092] 抗体可为多特异性抗体,例如双特异性抗体。如本文所用的术语"多特异性抗体"是指包含具有多表位特异性的抗原结合结构域的抗体(即,能够结合至一个分子上的两个或更多个不同表位,或者能够结合至两个或更多个不同分子上的表位)。如本文所用的术语"双特异性抗体"是包含抗原结合结构域的多特异性抗体,其能够特异性结合至一个生物分子上的两个不同表位,或者能够特异性结合至两个不同生物分子上的表位。双特异性抗体在本文中也可以被称为具有"双重特异性"或为"双重特异性的"。示例性双特异性抗体可以结合蛋白质和任何其他抗原两者。制备多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见:Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983);WO 93/08829;以及Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991))和"杵臼(knob-in-hole)"工程(参见例如,美国专利号5,731,168;WO2009/089004;US2009/0182127;US2011/0287009;Marvin和Zhu,Acta Pharmacol.Sin.(2005)26(6):649-658;以及Kontermann(2005)Acta Pharmacol.Sin.,26:1-9)。多特异性抗体也可以通过以下方法制备:工程静电控制效应来制备抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004A1);交联两个或多个抗体或片段(参见例如,美国专利号4,676,980;以及Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用"双抗体"技术制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如,Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及按照例如Tutt等人J.Immunol.147:60(1991)所述的方法制备三特异性抗体。本文还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点

的工程抗体,包括“章鱼抗体”或“双可变结构域免疫球蛋白”(DVD)(参见例如,US 2006/0025576A1;以及Wu等人Nature Biotechnology(2007))。本文的抗体或片段也包括“双重作用FAb”或“DAF”,其包含结合至靶蛋白质以及另一种不同抗原的抗原结合位点(参见例如,US2008/0069820)。

[0093] 抗体可为抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fv和scFv片段以及下文描述的其他片段。有关某些抗体片段的综述,参见Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如,Pluckthün,The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994);另外参见WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。对于包含挽救受体结合表位残基并且具有延长的体内半衰期的Fab片段和$F(ab')_2$片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);以及Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。关于三体抗体和四体抗体的描述也可参见Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)。单结构域抗体为包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施例中,单结构域抗体为人单结构域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见例如,美国专利号6,248,516B1)。抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由重组宿主细胞产生。

[0094] 抗体可为抗体变体。在某些实施例中,设想到本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,前提条件是最终构建体具有期望的特征,例如抗原结合。

[0095] 可使用重组方法和组合物来生产抗体,例如美国专利号4,816,567中所述。现在参考抗体亲和力,在实施例中,抗体结合至一个或多个肿瘤相关抗原或细胞表面受体。

[0096] 在某些实施例中,肿瘤相关抗原或细胞表面受体选自CD71、Trop2、MSLN、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、STEAP1、HER2、CD33和CD22。这样,在某些实施例中,Ab-CIDE可包含选自以下项的抗体:抗Ly6E抗体、抗NaPi2b抗体、抗CD22抗体、抗CD71抗体、抗Trop2抗体、抗MSLN抗体、抗EpCAM抗体、抗Steap1抗体、抗CD33抗体、抗CLL1抗体、抗CD123抗体和抗HER2抗体。

[0097] 特定抗体包括但不限于:

[0098] i.抗Ly6E抗体

[0099] 在某些实施例中,Ab-CIDE可包含抗Ly6E抗体:Ly6E(淋巴细胞抗原6复合体基因座E;Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1);NP_002337.1;NM_002346.2;de Nooij-van Dalen,A.G.等人(2003)Int.J.Cancer 103(6),768-774;Zammit,D.J.等人(2002)Mol.Cell.Biol.22(3):946-952;WO 2013/17705。

[0100] Ly6E为一种由GPI连接、长度为131个氨基酸、约8.4kDa的功能未知的蛋白质,无已知的结合配偶体。其最初被鉴定为在小鼠的未成熟胸腺细胞,胸腺髓质上皮细胞中表达的转录物(Mao等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93:5910-5914)。在一些实施例中,本文描述的主题提供的Ab-CIDE包含在PCT公开号WO 2013/177055中描述的抗Ly6E抗体。

[0101] ii.抗NaPi2b抗体

[0102] 在某些实施例中,Ab-CIDE包含抗NaPi2b抗体:Napi2b(Napi3b、NAPI-3B、NPTIIb、SLC34A2、溶质载体家族34(磷酸钠)、成员2、II型钠依赖性磷酸盐转运蛋白3b,Genbank登录号NM_006424)J.Biol.Chem.277(22):19665-19672(2002),Genomics 62(2):281-284(1999);Feild,J.A.等人(1999)Biochem.Biophys.Res.Commun.258(3):578-582);WO2004022778(权利要求2);EP1394274(实施例11);WO2002102235(权利要求13;第326页);EP875569(权利要求1;第17-19页);WO200157188(权利要求20;第329页);WO2004032842(实施例IV);WO200175177(权利要求24;第139-140页);交叉引用:MIM:604217;NP_006415.1;NM_006424_1。

[0103] iii.抗CD22抗体

[0104] 在某些实施例中,Ab-CIDE可包含抗CD22抗体:CD22(B细胞受体CD22-B同种型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814,Genbank登录号AK026467);Wilson等人(1991)J.Exp.Med.173:137-146;WO2003072036(权利要求1;图1);交叉引用:MIM:107266;NP_001762.1;NM_001771_1

[0105] iv.抗CD71抗体

[0106] 在某些实施例中,Ab-CIDE可包含抗CD71抗体。CD71(转铁蛋白受体)是一种完整的膜糖蛋白,在细胞摄取铁中起重要作用。众所周知,它是细胞增殖和活化的标志物。虽然造血系统中的所有增殖细胞都表达CD71,但CD71已被认为是一种有用的红细胞相关抗原。在一个实施例中,抗CD71抗体描述于:WO2016081643中,其全文以引用方式并入本文。

[0107] v.抗Trop2抗体

[0108] 在某些实施例中,Ab-CIDE可包含抗Trop2抗体。Trop2(滋养细胞抗原2)是一种跨膜糖蛋白,为多种癌症中存在表达差异的细胞内钙信号转导蛋白。它向细胞发出自我更新、增殖、侵袭和存活的信号。Trop 2又成为细胞表面糖蛋白Trop-2/Trop2、胃肠道肿瘤相关抗原GA7331、胰腺癌标志物蛋白GA733-1/GA733、膜成分染色体1表面标志物1M1S1、上皮糖蛋白-1、EGP-1、CAA1、胶滴状角膜营养不良GDLD和TTD2。在以上实施例中的任一项中,Ab-CIDE的抗Trop2抗体可为人源化的。在一个实施例中,抗Trop2抗体描述于US-2014/0377287和US-2015/0366988中,其各自全文以引用方式并入本文。

[0109] vi.抗MSLN抗体

[0110] 在某些实施例中,Ab-CIDE可包含抗MSLN抗体。MSLN(间皮素)是一种糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞表面蛋白,可用作细胞黏附蛋白。MSLN又称为CAK1和MPF。这种蛋白质在上皮间皮瘤、卵巢癌和特定鳞状细胞癌中过度表达。在以上实施例中的任一项中,Ab-CIDE的抗MSLN抗体可为人源化的。在一个实施例中,抗MSLN抗体为h7D9.v3,其描述参见Scales,S.J.等人,Mol.Cancer Ther.2014,13(11),2630-2640,该文献全文以引用方式并入本文。

[0111] vii.抗EpCAM抗体

[0112] 在某些实施例中,Ab-CIDE可包含抗EpCAM抗体。在一个方面,Ab-CIDE的抗体可以是针对在多种细胞或组织类型上发现的蛋白质的抗体。此类抗体的实例包括EpCAM。上皮细胞黏附分子(EpCAM)是一种跨膜糖蛋白,其介导上皮细胞中不依赖Ca2+的同型细胞间黏附(Litvinov,S.等人(1994)Journal of Cell Biology 125(2):437-46)。EpCAM又称为DIAR5、EGP-2、EGP314、EGP40、ESA、HNPCC8、KS1/4、KSA、M4S1、MIC18、MK-1、TACSTD1、TROP1,

还参与细胞信号传导(Maetzel,D.等人(2009)Nature Cell Biology 11(2):162-71)、迁移(Osta,WA等人(2004)Cancer Res.64(16):5818-24)、增殖和分化(Litvinov,S.等人(1996)Am J Pathol.148(3):865-75)。另外,EpCAM通过其上调c-myc、e-fabp和细胞周期蛋白A和E的能力而具有致癌潜力(Munz,M.等人(2004)Oncogene 23(34):5748-58)。由于EpCAM仅在上皮和上皮来源的赘生物中表达,因此EpCAM可用作多种癌症的诊断标志物。换句话说,Ab-CIDE可以用来将CIDE递送到许多细胞或组织,而不是像使用靶向抗体时那样递送给特定的细胞类型或组织类型。

[0113] viii.抗Steap1抗体

[0114] 在某些实施例中,Ab-CIDE包含抗STEAP1抗体。STEAP1(前列腺六跨膜上皮抗原,Genbank登录号NM_0 12449)Cancer Res.6 1(15),5857-5860(2001);Hubert,R.S.等人(1999)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.96(25):14523-14528);WO2004065577(权利要求6);WO2004027049(图1L);EP1394274(实例11);WO2004016225(权利要求2);WO2003042661(权利要求12);US2003 157089(实例5);US2003185830(实例5);US2003064397(图2);WO200289747(实例5;第618-619页);WO2003022995(实例9;图13A,实例53;第173页,实例2;图2A);

[0115] viii.抗Steap2抗体

[0116] 在某些实施例中,Ab-CIDE包含抗STEAP2抗体。STEAP2(HGNC 8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前列腺癌相关基因1、前列腺癌相关蛋白质1、前列腺六跨膜上皮抗原2、前列腺六跨膜蛋白质,Genbank登录号AF455138)Lab.Invest.82(11):1573 1582(2002));WO2003087306;US2003064397(权利要求1;图1);WO200272596(权利要求13;第54-55页);WO200172962(权利要求1;图4B);WO2003 104270(权利要求11);WO2003 104270(权利要求16);US2004005598(权利要求22);WO2003042661(权利要求12);US2003060612(权利要求12;图10);WO200226822(权利要求23;图2);WO200216429(权利要求12;图10);交叉引用:GF22655488;AAN04080.1;AF455138_Iix.抗Her2抗体

[0117] 在Ab-CIDE中,包含抗HER2抗体。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗HER2抗体包含人源化抗HER2抗体。在一些实施例中,Ab-CIDE包含人源化HER2抗体,也称为曲妥珠单抗,可以商品名HERCEPTIN®商购获得。在另一个实施例中,Ab-CIDE的抗HER2抗体包含人源化抗HER2抗体,例如,人源化2C4,如US7862817中所述。示例性人源化2C4抗体为帕妥珠单抗,可以商品名PERJETA®商购获得。

[0118] x.抗CD33抗体

[0119] 在某些实施例中,Ab-CIDE包含抗CD33抗体。CD33,即唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素家族的一种成员,是一种67kDa的糖基化跨膜蛋白。除定型的骨髓单核细胞和红系祖细胞以外,CD33还可以在大多数髓样和单核细胞白血病细胞上表达。在最早的多能干细胞、成熟的粒细胞、淋巴样细胞或非造血细胞上未发现它(Sabbath等人,(1985).Clin.Invest.75:756-56;Andrews等人,(1986)Blood 68:1030-5)。CD33在其胞质尾上包含两个酪氨酸残基,每个酪氨酸残基后跟疏水残基,类似于在许多抑制性受体中看到的基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。

[0120] 2.接头(L1)

[0121] 如本文所述,接头(L1)为可用于将一个或多个CIDE部分(D)连接至抗体(Ab)以形

成Ab-CIDE的双功能或多功能部分。在一些实施例中,可使用具有反应性官能团的接头(L1)来制备Ab-CIDE,以共价连接至CIDE和抗体。例如,在一些实施例中,抗体(Ab)的半胱氨酸硫醇可与接头的反应性官能团或接头L1-CIDE基团形成键以制备Ab-CIDE。

[0122] i.拟肽接头

[0123] 在某些实施例中,Ab-CIDE的接头(L1)为非肽拟肽接头,其可被溶酶体酶切割。在此类实施例中,非肽接头像肽一样起作用并且可以被溶酶体蛋白酶有效地切割。例如,可以将二肽中间的酰胺键(例如Val-Cit)替代为酰胺模拟物;和/或可将整个氨基酸(例如,Val-Cit二肽中的缬氨酸氨基酸)替代为非氨基酸部分(例如,环烷基二羰基结构(例如,环大小为4或5的环烷基))。

[0124] 在某些实施例中,L1为具有下式的拟肽接头:

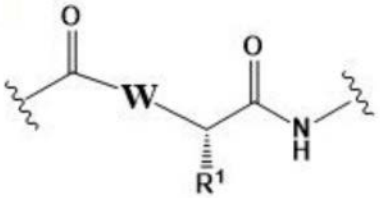
[0125] —Str—(PM)—Sp—,

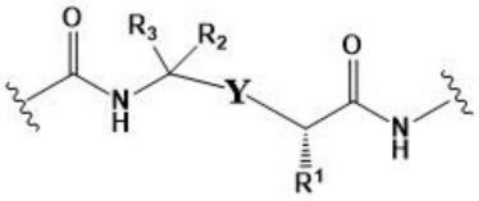
[0126] 其中:

[0127] Str为共价连接至Ab的拉伸单元;

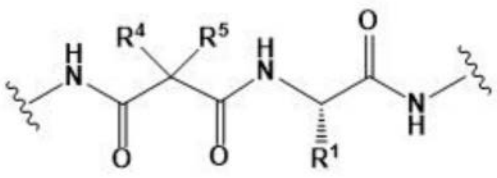
[0128] Sp为键或共价连接至CIDE部分的间隔单元;并且

[0129] PM为选自由以下项组成的组的非肽化学部分:



[0130]  其中

和



,

[0131] W为-NH-杂环烷基-或杂环烷基;

[0132] Y为杂芳基、芳基、-C(O)C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烷基-NH_2、C_1-C_6亚烷基-NH-CH_3、C_1-C_6亚烷基-N-$(CH_3)_2$、C_1-C_6烯基或C_1-C_6亚烷基基团;

[0133] 每个R^1独立地为C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烯基、(C_1-C_{10}烷基)NHC(NH)NH_2或(C_1-C_{10}烷基)NHC(O)NH_2-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$;-$CH_2CH_2CH_2CH_2NH$-CH_3;和-$CH_2CH_2CH_2CH_2N$-$(CH_3)_2$;

[0134] R^3和R^2各自独立为H、C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烯基、芳基烷基或杂芳基烷基,或者R^3和R^2

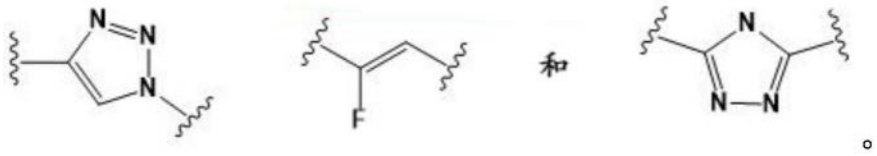
可一起形成C_3-C_7环烷基;并且

[0135] R^4和R^5各自独立为C_1-C_{10}烷基、C_1-C_{10}烯基、芳基烷基、杂芳基烷基、(C_1-C_{10}烷基)OCH_2-,或者R^4和R^5可形成C_3-C_7环烷基环。

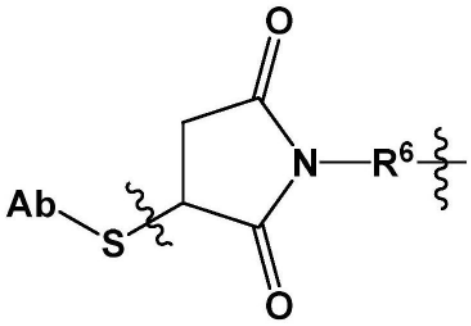
[0136] L1可通过E3LB、L2或PB基团中的任一者连接至CIDE。

[0137] 在某些实施例中,Y为杂芳基;并且R^4与R^5一起形成环丁基环。

[0138] 在某些实施例中,Y为选自由以下项组成的组的部分:

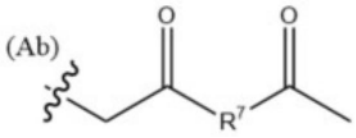
[0139] 

[0140] 在某些实施例中,Str为由下式表示的化学部分:

[0141] 

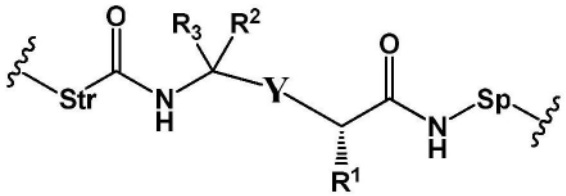
[0142] 其中R^6选自由以下项组成的组:C_1-C_{10}亚烷基、C_1-C_{10}烯基、C_3-C_8环烷基、(C_1-C_8亚烷基)O-和C_1-C_{10}亚烷基-C(O)N(R^a)-C_2-C_6亚烷基,其中每个亚烷基可被选自由以下项组成的组的一个至五个取代基取代:卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷基氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砜、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基、C_3-C_8环烷基、C_4-C_7杂环烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和杂芳基,每个R^a独立地为H或C_1-C_6烷基;Sp为—Ar—R^b—,其中Ar为芳基或杂芳基,R^b为(C_1-C_{10}亚烷基)O-。当马来酰亚胺经由迈克尔加成与抗体上暴露的Cys残基反应时,可发生与抗体的缀合。暴露的Cys残基可通过分子工程人工引入和/或通过链间二硫键的还原产生。

[0143] 在某些实施例中,Str具有下式:

[0144] 

[0145] 其中R^7选自C_1-C_{10}亚烷基、C_1-C_{10}烯基、(C_1-C_{10}亚烷基)O-、N(R^c)-(C_2-C_6亚烷基)-N(R^c)和N(R^c)-(C_2-C_6亚烷基);其中每个R^c独立地为H或C_1-C_6烷基;Sp为—Ar—R^b—,其中Ar为芳基或杂芳基,R^b为(C_1-C_{10}亚烷基)O-或Sp-C_1-C_6亚烷基-C(O)NH-。

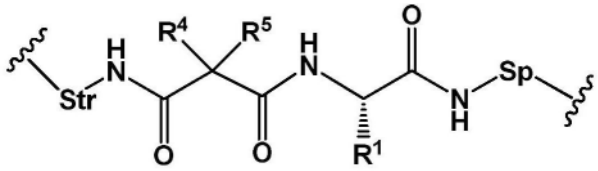
[0146] 在实施例中,L1为由下式表示的非肽化学部分

[0147] 

[0148] R^1为C_1-C_6烷基、C_1-C_6烯基、(C_1-C_6烷基)NHC(NH)NH_2或(C_1-C_6烷基)NHC(O)NH_2;

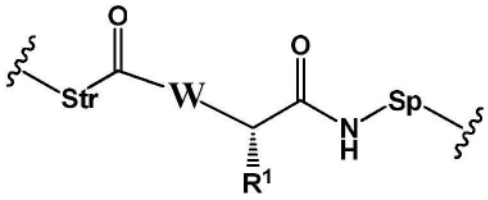
[0149] R^3和R^2各自独立为H或C_1-C_{10}烷基。

[0150] 在实施例中,L1为由下式表示的非肽化学部分

[0151] 

[0152] R^1为C_1-C_6烷基、(C_1-C_6烷基)NHC(NH)NH_2或(C_1-C_6烷基)NHC(O)NH_2;R^4与R^5一起形成C_3-C_7环烷基环。

[0153] 在实施例中,L1为由下式表示的非肽化学部分

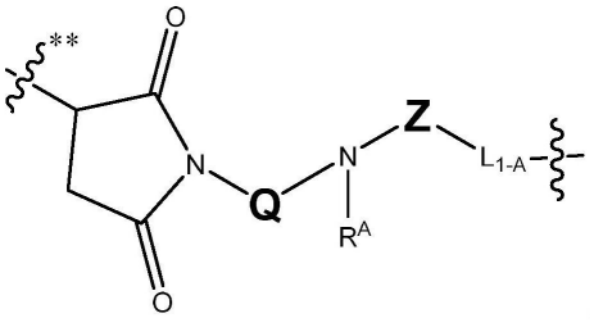
[0154] 

[0155] R^1为C_1-C_6烷基、(C_1-C_6烷基)NHC(NH)NH_2或(C_1-C_6烷基)NHC(O)NH_2,并且W如上文中所定义。

[0156] 在一些实施例中,接头可为拟肽接头,诸如WO2015/095227、WO2015/095124或WO2015/095223中所述的那些,这些专利各自通过引用以其整体并入本文。

[0157] 在某些实施例中,L1选自由以下项组成的组:

[0158] i)

[0159] ,

[0160] 其中指示与Ab的连接点;

[0161] Z为-$(CH_2)_p$-或-CH_2-(CH_2-O-CH_2)$_p$-CH_2-,其中p为1、2、3、4、5或6;

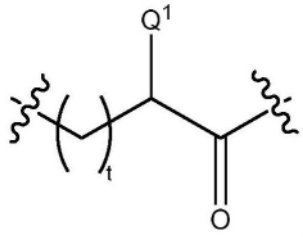
[0162] R^A为氢、C_{1-6}烷基或-$(CH_2)_v$-芳基,其中v为0或1;诸如苯基或苄基;

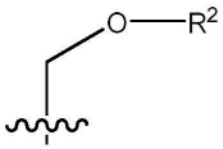
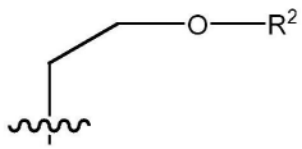
[0163] Q选自由以下项组成的组:

[0164] a)

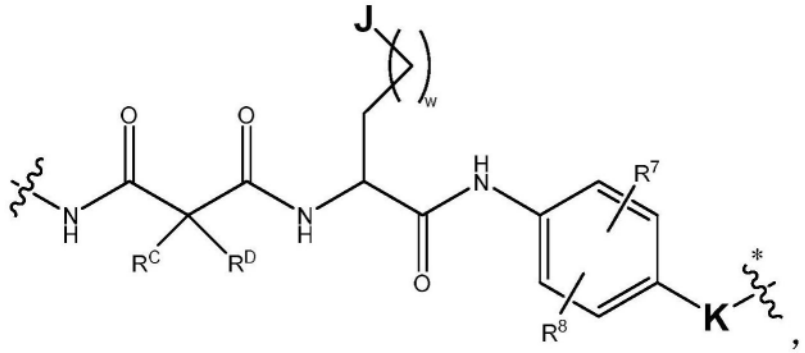
[0165] 其中,q为1、2、3或4;并且,

[0166] b)

[0167]  其中t为0、1、2、3或4；

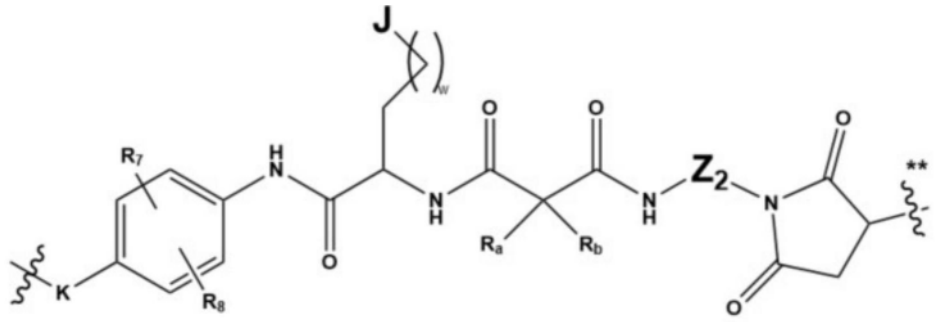
[0168] Q^1为氢、 或  其中R^2为氢、卤代(C_{1-6})烷基或C_{1-6}烷基；并且

[0169] L_{1-A}为：

[0170] 

[0171] 其中， 指示与D的连接点；并且

[0172] ii)

[0173] 

[0174] 其中 指示与Ab的连接点；

[0175] Z_2为C_{1-12}亚烷基或-$[CH_2]_g$-O-$[CH_2]_h$-，其中g和h各自独立地为0、1或2；

[0176] w为0、1、2、3、4或5；

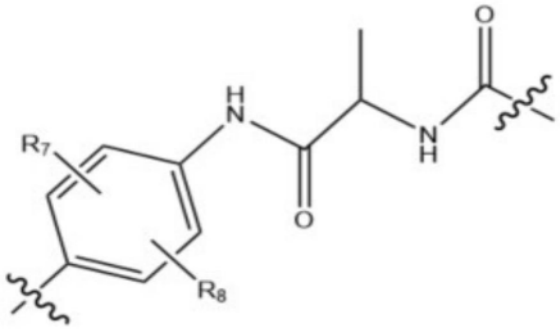
[0177] J选自由以下项组成的组：C_{1-5}烷基、-N(R_x)(R_y)、-C(O)NH_2、-NH-C(O)-NH_2和-NHC(=NH)NH_2，其中，R_x和R_y各自独立地共选自氢和C_{1-3}烷基；

[0178] K选自由以下项组成的组：C_{1-3}亚烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH_2-O-C(O)-、-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-和-CH_2-O-C(O)-R-$[CH_2]_q$-O-，其中R为氢、C_{1-3}烷基、N(R_x)(R_y)、-O-N(R_x)(R_y)或C(O)-N(R_x)(R_y)，其中q为0、1、2或3，并且其中R_x和R_y各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基，或者R_x和R_y与它们各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基；

[0179] R_a、R_b、R^C和R^D各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基，或者R_a和R_b或R^C和R^D与它们各自所连接的碳一起形成任选地取代的C_{3-6}环烷基；并且

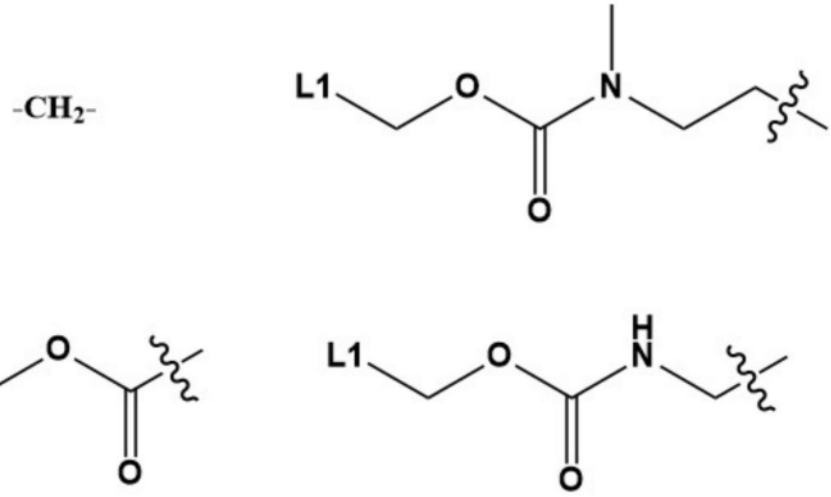
[0180] R_7和R_8各自独立地为氢、卤代、C_{1-5}烷基、C_{1-5}烷氧基或羟基。

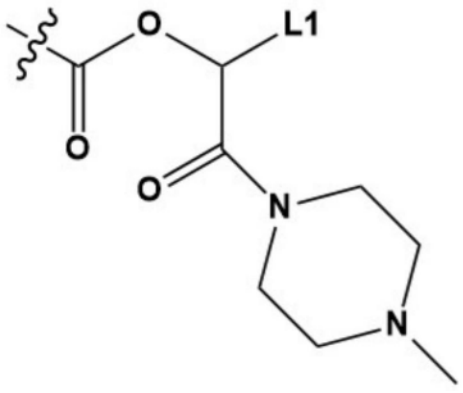
[0181] 在L_{1-A}的某些实施例中，当w为0并且J为甲基时，L_{1-A}包含：

[0182] 

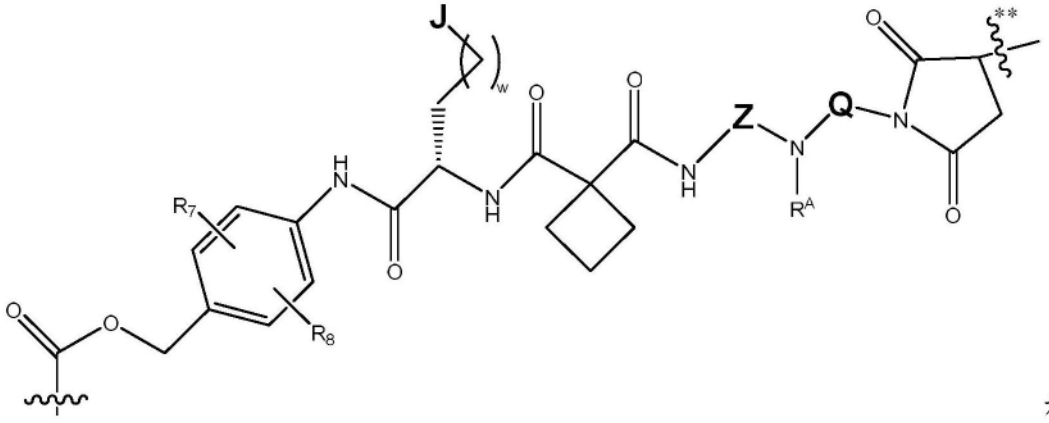
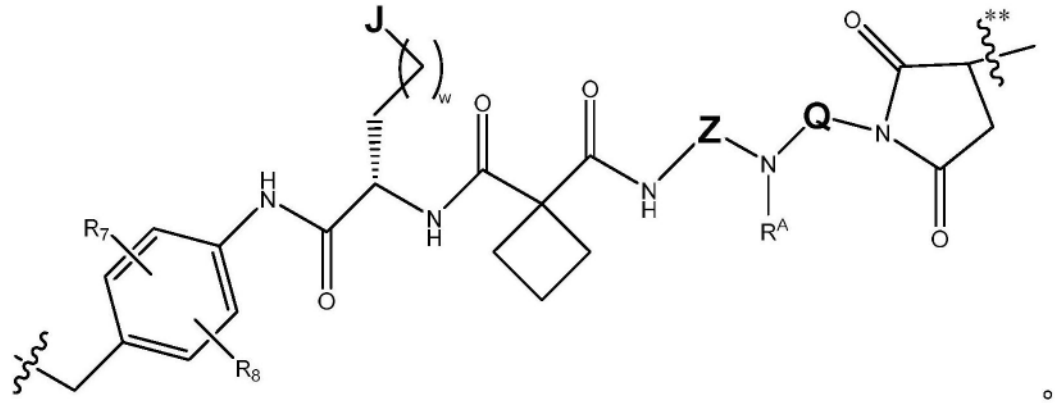
。

[0183] 在某些实施例中，L1的K选自由以下项组成的组：

[0184] 



[0185] 在某些实施例中，L1选自由以下项组成的组：

[0186] 
和

。

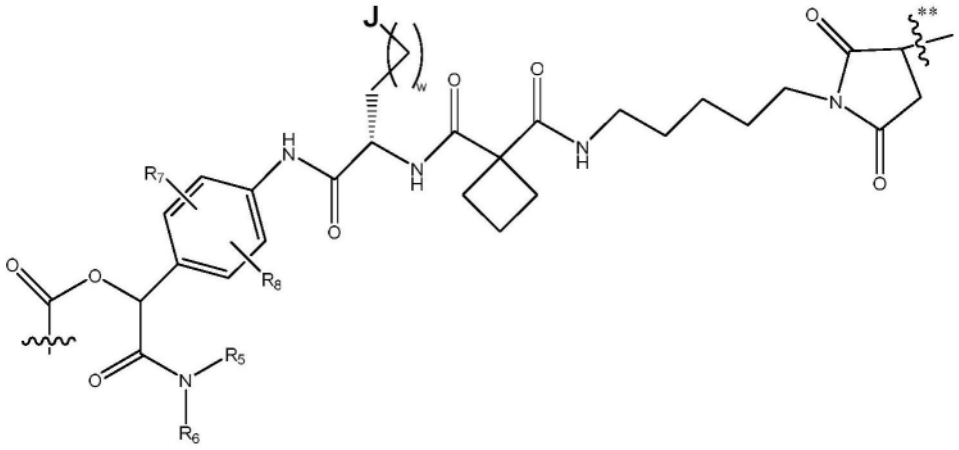
[0187] 在某些实施例中,R_7和R_8各自为氢。

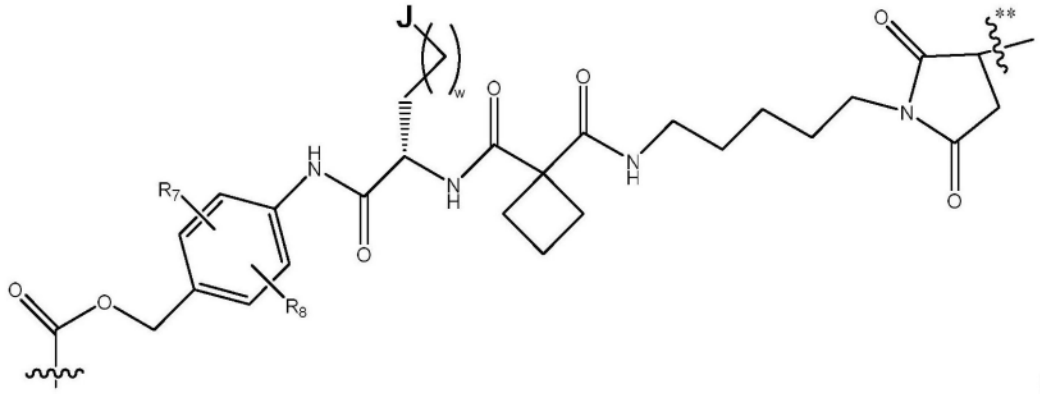
[0188] 在某些实施例中,Z为-$(CH_2)_p$-。

[0189] 在某些实施例中,w为2或3,并且J为-$N(CH_3)_2$或-NH(CO)NH。

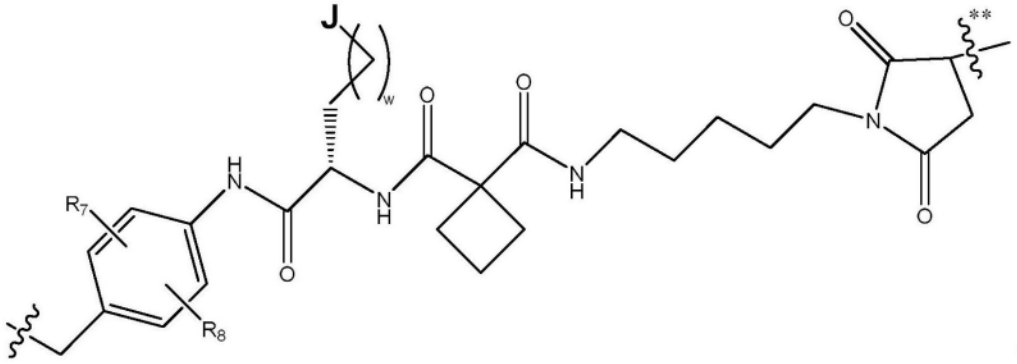
[0190] 在某些实施例中,Q为-CH_2-CH_2-。

[0191] 在某些实施例中,L1选自由以下项组成的组:

[0192] 
;

[0193] 

；和

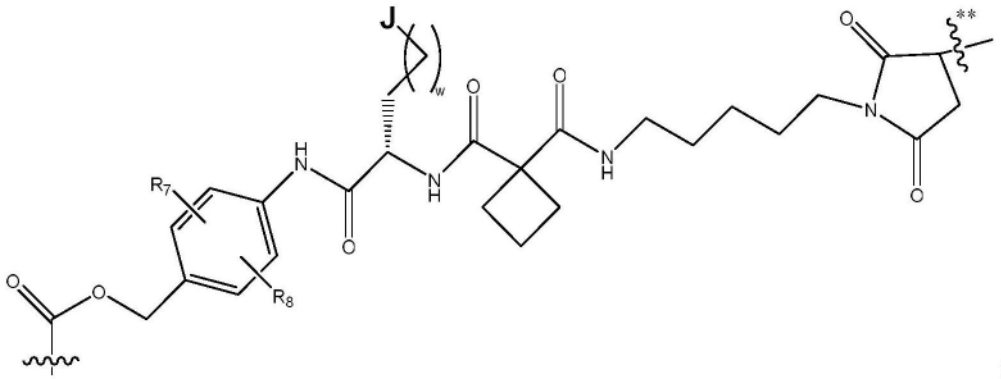


；

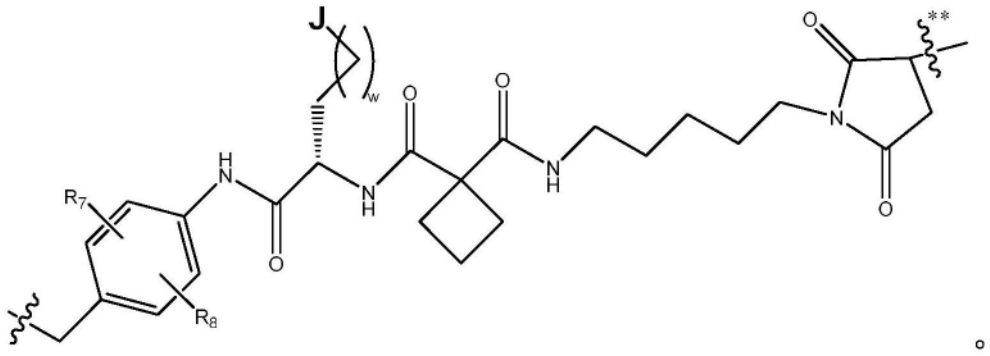
[0194] 其中，

[0195] R_5和R_6独立地为氢或C_{1-5}烷基；或者R_5和R_6与它们各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基。

[0196] 在某些实施例中，L1为选自由以下项组成的组的拟肽接头：

[0197] 

；和



。

[0198] 在某些实施例中，J为—NH-C(O)-NH_2或—N$(CH_3)_2$。

[0199] 在某些实施例中，其中w为2并且J为—NH-C(O)-NH_2；或者w为3并且J为—N$(CH_3)_2$。

[0200] ii.其他接头

[0201] 在某些实施例中,L1可为肽接头或其他接头。可被溶酶体酶(诸如组织蛋白酶B)水解的肽接头,诸如缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit),已被用于使药物与抗体连接(US 6,214,345)。它们很有用,部分原因在于它们在体循环中的相对稳定性以及在肿瘤中有效释放药物的能力。

[0202] 在一个方面,接头的羰基基团连接至CIDE中的胺基基团。还应注意,连接至Ab的硫原子为来自抗体中的半胱氨酸的硫基团。在另一方面,接头L1具有能够与抗体上存在的游离半胱氨酸反应以形成共价键的官能团。此类反应性官能团的非限制性实例包括马来酰亚胺、卤代乙酰胺、a-卤代乙酰基、活化的酯诸如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酸酐、酰氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯。参见例如,Klussman等人(2004),Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773的第766页的缀合方法,以及本文的实例。

[0203] 在一些实施例中,接头具有能够与抗体上存在的亲电子基团反应的官能团。此类亲电子基团的实例包括但不限于醛和酮羰基基团。在一些实施例中,接头的反应性官能团的杂原子可与抗体上的亲电子基团反应,并且形成与抗体单元的共价键。此类反应性官能团的非限制性实例包括但不限于酰肼、肟、氨基、肼、硫代氨基脲、肼甲酸酯和芳基酰肼。

[0204] 接头可包含一种或多种接头组分。示例性接头组分包括6-马来酰亚胺基己酰基("MC")、马来酰亚胺基丙酰基("MP")、缬氨酸-瓜氨酸("val-cit"或"vc")、丙氨酸-苯丙氨酸("ala-phe")、对氨基苄氧基羰基(a"PAB")、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶硫基)戊酸酯("SPP")和4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯("MCC")。各种接头组分在本领域中是已知的,其中一些如下文所述。

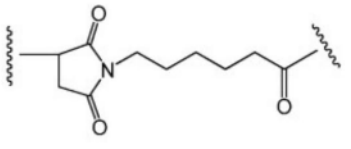
[0205] 接头可为促进CIDE的释放的"可切割接头"。非限制性示例性可切割接头包括酸不稳定的接头(例如,包含腙)、蛋白酶敏感的(例如,肽酶敏感的)接头、光不稳定的接头或含二硫化物的接头(Chari等人,Cancer Research 52:127-131(1992);US 5208020)。

[0206] 在某些实施例中,接头具有下式:

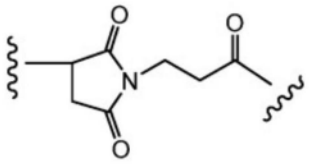
[0207] $$—A_a—W_w—Y_y—$$,

[0208] 其中A为"拉伸单元",并且a为0至1的整数;W为氨基酸单元,并且w为0至12的整数;Y为"间隔单元",并且y为0、1或2。此类接头的示例性实施例描述于美国专利号7,498,298中。

[0209] 在一些实施例中,接头组分包含将抗体与另一接头组分或CIDE部分连接的"拉伸单元"。非限制性示例性拉伸单元如下所示(其中波浪线指示与抗体、CIDE或其他接头组分共价连接的位点):

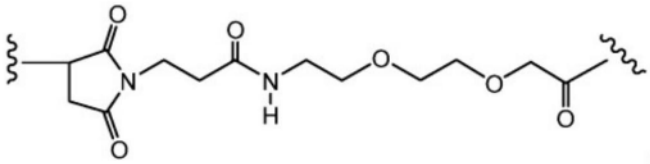


MC

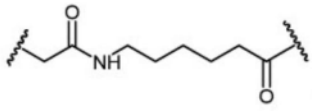


MP

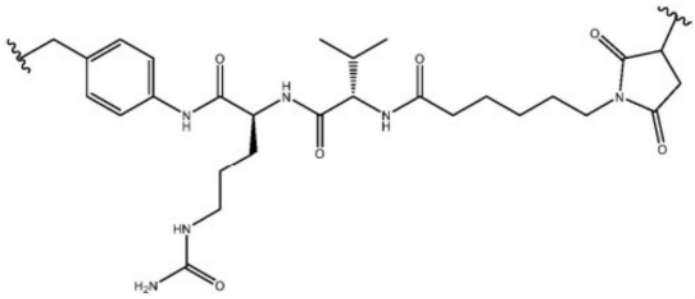
[0210]



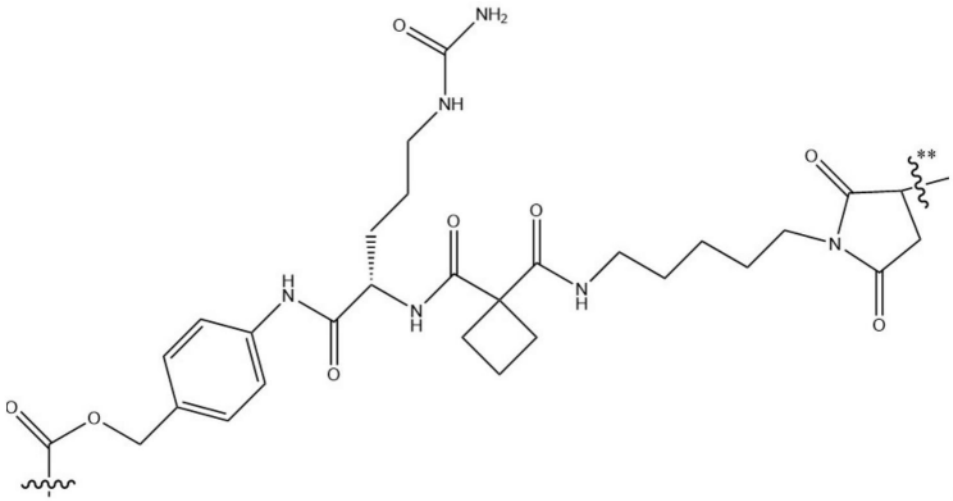
mPEG



[0211] 在某些实施例中,接头为:

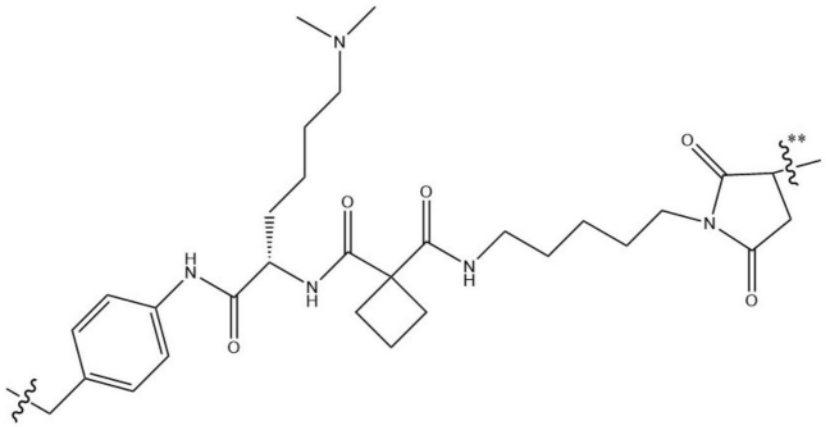
[0212] 

[0213] 在某些实施例中,L1具有以下结构:

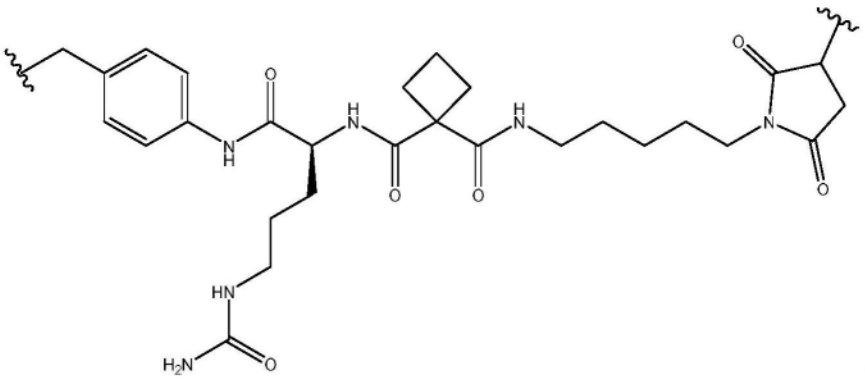


;

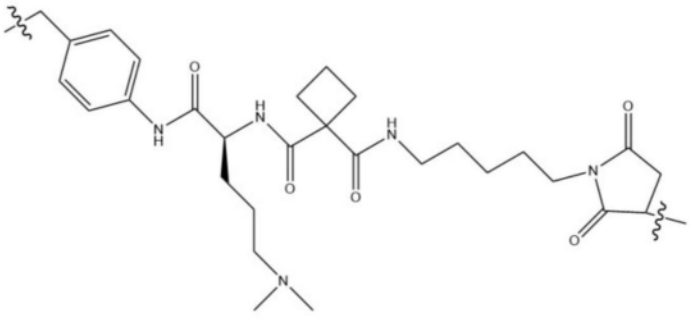
[0214]



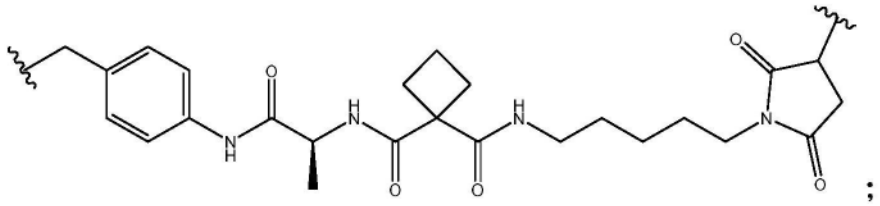
;



;



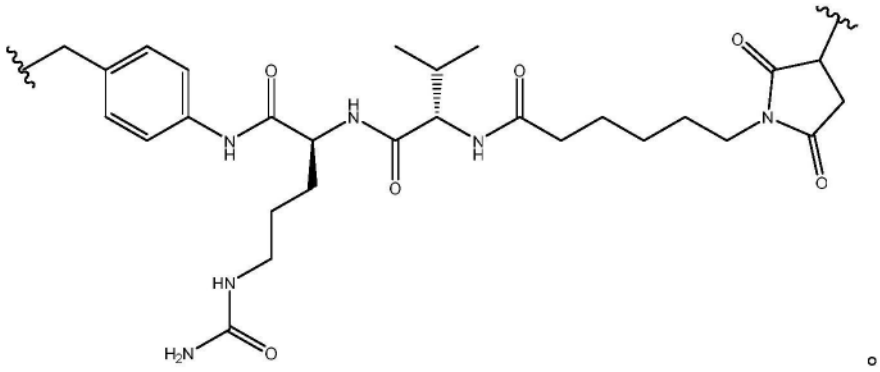
;



；

或

[0215]



。

[0216] 3.CIDE(“D”)

[0217] 可用的CIDE具有上述通式。在某些实施例中,CIDE或Ab结合的CIDE表现出期望的特性,诸如细胞靶向以及蛋白质靶向和降解。在某些实施例中,Ab-L1-CIDE呈现出0.0001至小于约2.0、或小于约1.0、或小于约0.8、或小于约0.7、或小于约0.6、或小于约0.5、或小于约0.4、或小于约0.3、或小于约0.2的DC50(μg/mL)。在某些实施例中,Ab-L1-CIDE呈现出至少70、75、80、85、90、95、96、97、98或99的DCmax。在某些实施例中,靶蛋白质降解显著高于对比物。

[0218] CIDE包括具有以下组分的那些。

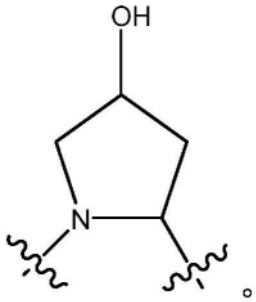
[0219] a.E3泛素连接酶结合基团(E3LB)

[0220] E3泛素连接酶(其中600多种在人体中已知)使泛素化具有底物特异性。存在结合至这些连接酶的已知配体。如本文所述,E3泛素连接酶结合基团为可结合作为希佩尔-林道(VHL)的E3泛素连接酶的肽或小分子。

[0221] 一种特定的E3泛素连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤抑制因子,其为E3连接酶复合体VCB的底物识别亚基,也由延伸蛋白B和C、Cul2和Rbx1组成。VHL的主要底物是低氧诱导因子1α(HIF-1α),这是一种转录因子,其可响应低氧水平上调基因,诸如促血管生成生长因子VEGF和红细胞诱导的细胞因子促红细胞生成素。

[0222] 在某些实施例中,本文的主题涉及一种包含羟脯氨酸残基并且具有下式的E3LB部分:

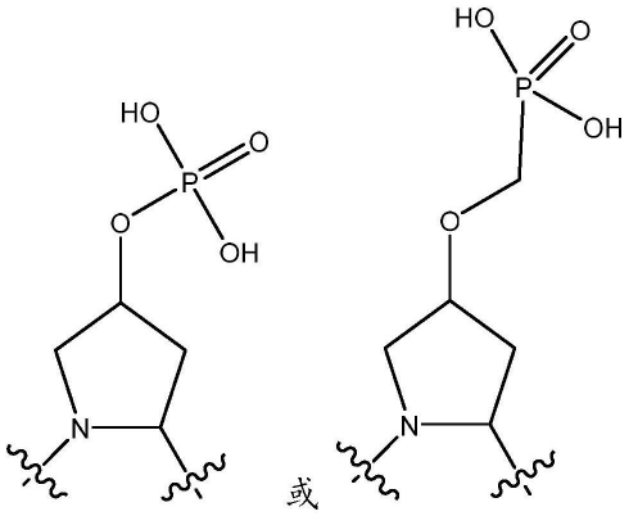
[0223]



。

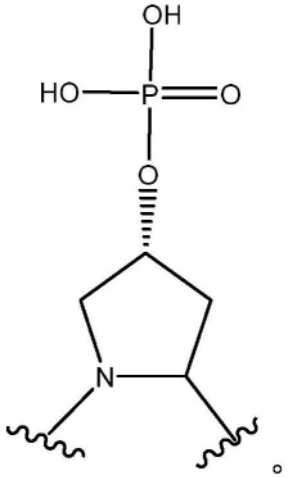
[0224] 在某些实施例中,本文的主题涉及一种包含磷酸酯部分的E3LB部分。

[0225] 在某些实施例中,E3LB包含:

[0226] 

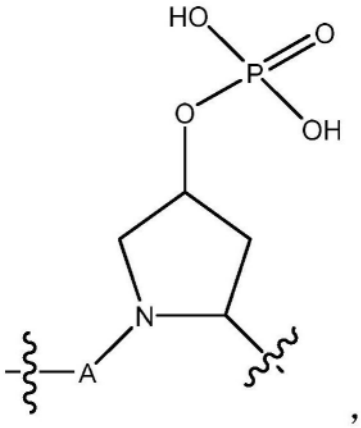
。

[0227] 在某些实施例中,E3LB包含:

[0228] 

。

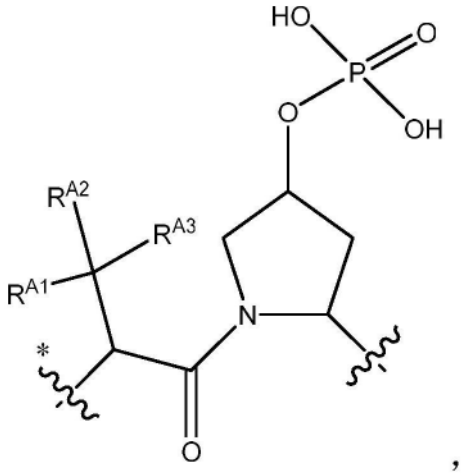
[0229] 在某些实施例中,E3LB包含:

[0230] 

,

[0231] 其中,A为共价结合至L2的基团。

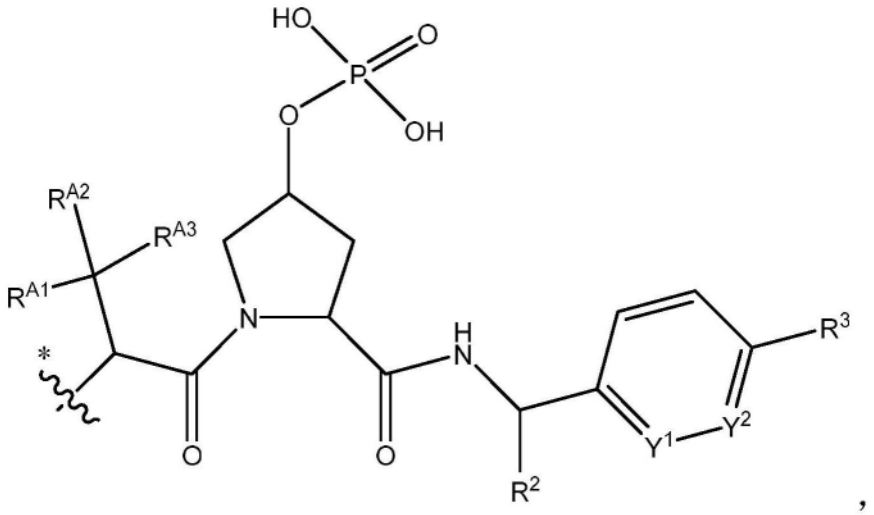
[0232] 在某些实施例中,E3LB包含:

[0233] 

[0234] 其中，为与L2的连接点，并且

[0235] R^{A1}、R^{A2}和R^{A3}各自独立地为氢或C_{1-5}烷基；或者R^{A1}、R^{A2}和R^{A3}中的两者与它们各自所连接的碳一起形成C_{1-5}环烷基。

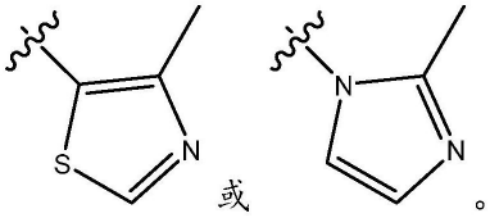
[0236] 在某些实施例中，E3LB包含：

[0237] 

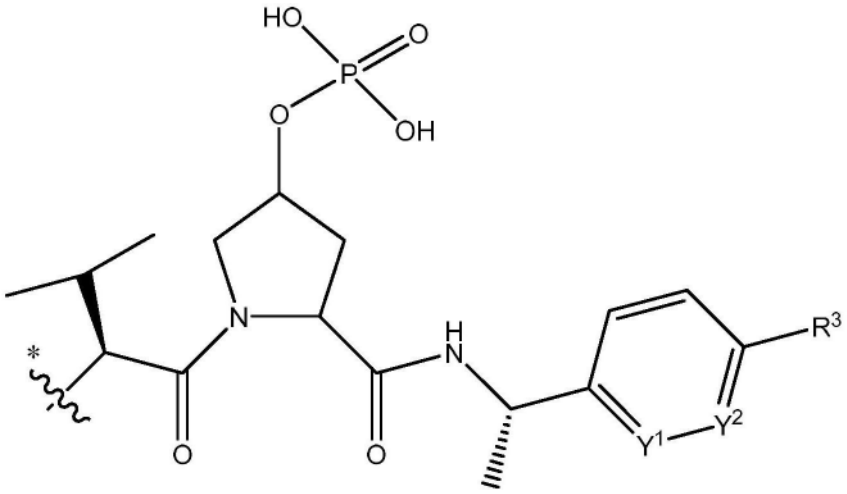
[0238] 其中，

[0239] R^2为氢或C_{1-5}烷基；

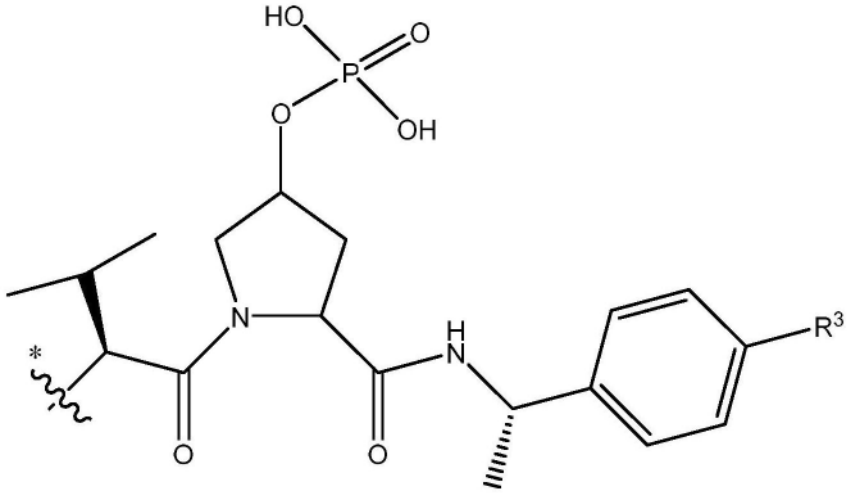
[0240] Y^1和Y^2各自为-CH，或者Y^1和Y^2中的一者为-CH并且另一者为N；并且

[0241] R^3为氰基、或。

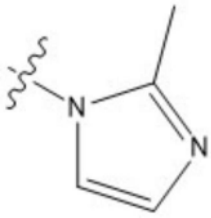
[0242] 在某些实施例中，E3LB包含：

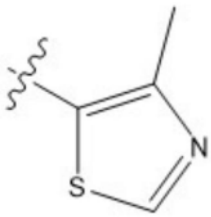
[0243] 

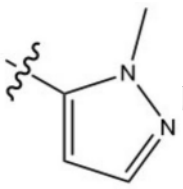
[0244] 在某些实施例中,E3LB包含:

[0245] 

[0246] 在某些实施例中,E3LB具有其中R_3为氰基的结构。

[0247] 在某些实施例中,E3LB具有其中R_3为的结构。

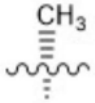
[0248] 在某些实施例中,E3LB具有其中R_3为的结构。

[0249] 在某些实施例中,E3LB具有其中R_3为的结构。

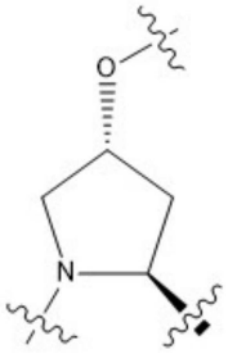
[0250] 在某些实施例中,E3LB具有其中R_2为氢、甲基、乙基或丙基的结构。

[0251] 在某些实施例中,E3LB具有其中R_2为甲基的结构。

[0252] 在某些实施例中,E3LB具有其中R_2为

[0253] 的结构。

[0254] 在某些实施例中,E3LB的羟脯氨酸部分具有以下结构:

[0255] 。

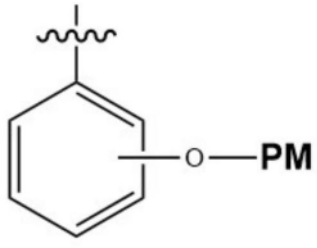
[0256] E3LB部分的至少一个末端包含与L2部分共价连接或能够与之共价连接的部分,并且至少一个末端包含与L1部分共价连接或能够与之共价连接的部分。例如,E3LB部分终止于-NHCOOH部分,该部分可通过酰胺键共价连接至L2部分。

[0257] 在本文描述的任何方面或实施例中,如本文所述的E3LB可以是其药用盐、对映体、非对映体、溶剂化物或多晶型物。

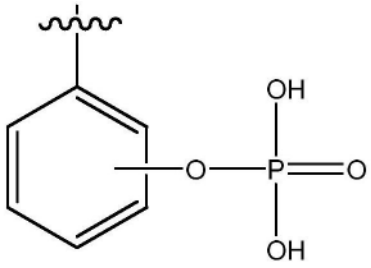
[0258] b.蛋白质结合基团(PB)

[0259] "蛋白质结合基团"或"PB"是指能够结合至靶蛋白质或其他目标多肽靶标的小分子或其他化合物的残基。PB结合至靶标或以其他方式与靶标相互作用,其将靶标置于与泛素连接酶邻近,使得可以发生通过泛素连接酶的蛋白质或多肽的降解。PB可以为任何分子,只要其共价结合至L2并且与目标靶标相互作用或结合至该目标靶标。小分子靶蛋白质结合部分的非限制性实例包括结合BRM(BRAHMA)的化合物、Hsp90抑制剂、激酶抑制剂、MDM2抑制剂、靶向人BET含溴区结构域的蛋白质的化合物、HDAC抑制剂、人赖氨酸甲基转移酶抑制剂、血管生成抑制剂、免疫抑制化合物以及靶向芳烃受体(AHR)的化合物等等。在某些实施例中,本文描述的CIDE和经缀合的CIDE不限于PB的类型。在某些实施例中,本文描述的CIDE和经缀合的CIDE不限于PB的类型,其中PB共价结合至L2;并且,CIDE或经缀合的CIDE包含磷酸酯部分和L1拟肽接头。

[0260] 在某些实施例中,CIDE的PB部分为小分子,其包含通过羟基苯基残基的氧共价结合至磷酸酯部分的羟基苯基残基。在这一方面,PB包含下式:

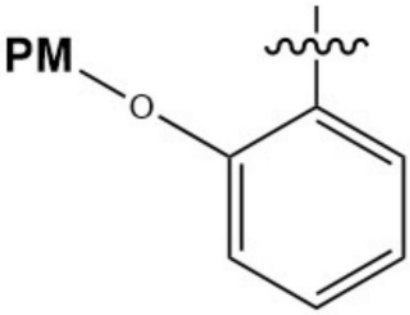
[0261] ,

[0262] 其中PM为磷酸酯部分。共价结合至磷酸酯部分的羟基苯基残基的一个实例为:

[0263] 

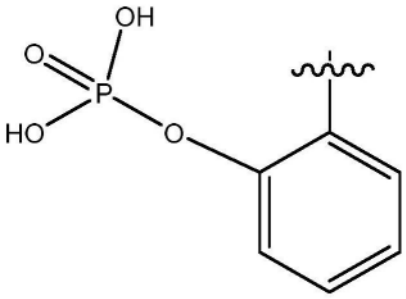
。

[0264] 在某些实施例中,PB结合在以下邻位:

[0265] 

。

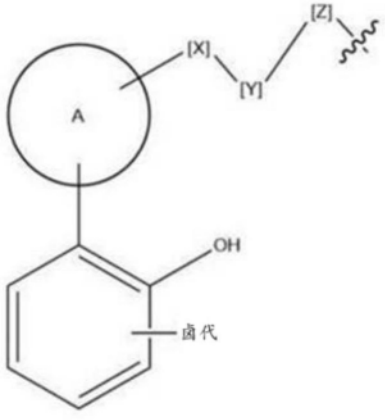
[0266] 此类结构的一个实例为包含下式的PB:

[0267] 

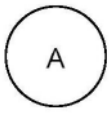
。

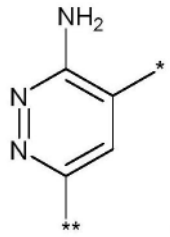
[0268] 在某些实施例中,CIDE的PB部分为结合至BRM的小分子部分,包括BRM的所有变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体。BRM也称为亚家族A、成员2、SMARCA2和BRAHMA。此类小分子靶蛋白质结合部分还包括这些组合物的药用盐、对映异构体、溶剂化物和多晶型物,以及可以靶向目标蛋白质的其他小分子。本文描述的CIDE可包含已知BRM结合化合物的任何残基,此类结合化合物包括WO2019/195201中公开的那些,该专利全文以引用方式并入本文。

[0269] 在某些实施例中,BRM结合化合物为式I化合物:

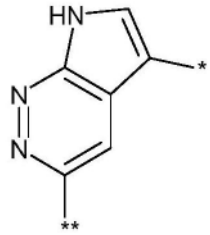
[0270] 

(I),

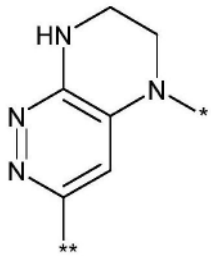
[0271] 或其立体异构体或互变异构体,或前述任一者的药用盐,其中:选自由以下项组成的组:

[0272] 

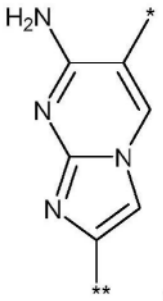
(a) ;



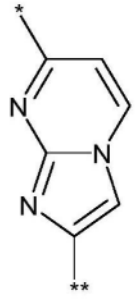
(b) ;



(c) ;

[0273] 

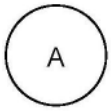
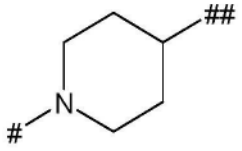
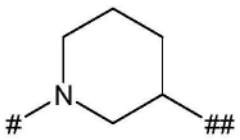
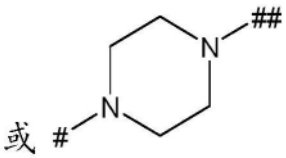
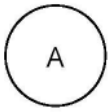
(d) ;和



(e) ,

[0274] 其中,对于(a)至(e),*指示与[X]的连接点,或者,如果[X]不存在,则*指示与[Y]的连接点并且**指示与苯基环的连接点;并且其中:

[0275] (i)[X]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,

[0276] 前提条件是,当为(a)时,[X]并非、或,其中#表示与的连接点并且##表示与L2的连接点,

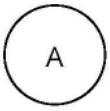
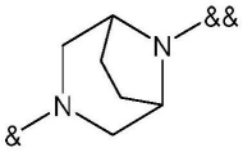
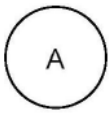
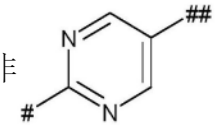
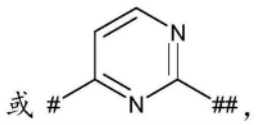
[0277] [Y]不存在,并且

[0278] [Z]不存在;或者

[0279] (ii)[X]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,其中[X]的3元至15元杂环基任选地经一个或多个-OH或C_{1-6}烷基取代,

[0280] [Y]不存在,并且

[0281] [Z]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,

[0282] 前提条件是,当为(a)并且[X]为时,其中&表示与的连接点并且&&表示与[Z]的连接点,则[Z]并非或,其中#表示与[X]的连接点,并且##表示与L2的连接点;或者

[0283] (iii)[X]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,

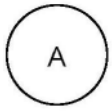
[0284] [Y]为亚甲基,其中[Y]的亚甲基任选地经一个或多个甲基基团取代,并且

[0285] [Z]为3元至15元杂环基;或者

[0286] (iv)[X]不存在,

[0287] [Y]为亚乙烯基,其中[Y]的亚乙烯基任选地经一个或多个卤代取代,并且

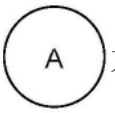
[0288] [Z]为5元至20元杂芳基,

[0289] 前提条件是,为(a)、(b)、(d)或(e);或者

[0290] (v)[X]不存在,

[0291] [Y]为亚乙炔基,并且

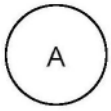
[0292] [Z]为5元至20元杂芳基,

[0293] 前提条件是,为(a)、(b)、(d)或(e);或者

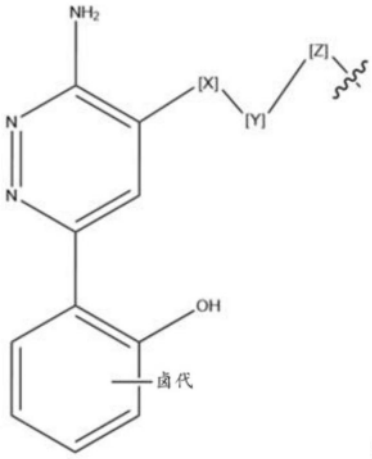
[0294] (vi)[X]不存在,

[0295] [Y]为环丙基或环丁基,并且

[0296] [Z]为5元至20元杂芳基,

[0297] 前提条件是，为(a)、(b)、(d)或(e)。

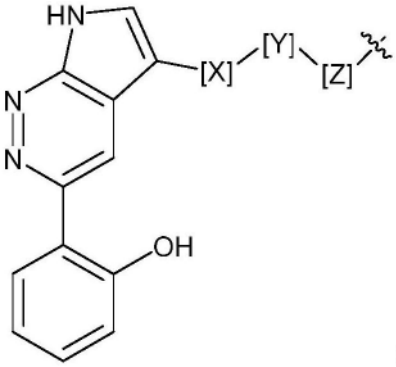
[0298] 在某些实施例中，BRM结合化合物为式(I-A)化合物：

[0299] 

(I-A)，

[0300] 或其立体异构体或互变异构体，或前述任一者之药用盐，其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

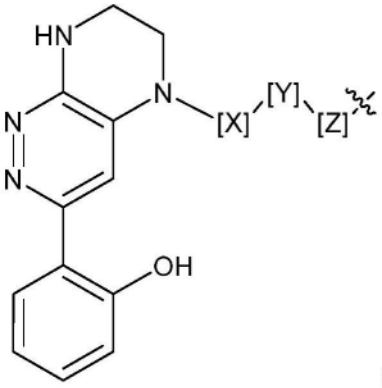
[0301] 在某些实施例中，BRM结合化合物为式(I-B)化合物：

[0302] 

(I-B)，

[0303] 或其立体异构体或互变异构体，或前述任一者之药用盐，其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

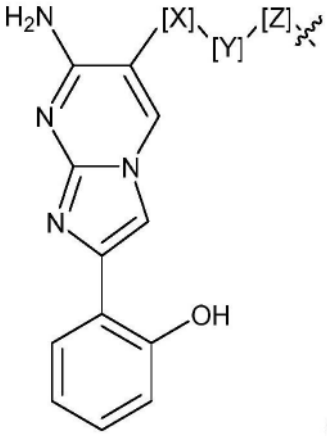
[0304] 在某些实施例中，BRM结合化合物为式(I-C)化合物：

[0305] 

(I-C)，

[0306] 或其立体异构体或互变异构体，或前述任一者之药用盐，其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

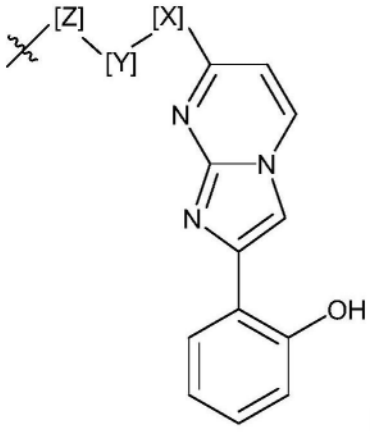
[0307] 在某些实施例中,BRM结合化合物为式(I-D)化合物:

[0308] 

(I-D),

[0309] 或其立体异构体或互变异构体,或前述任一者之药用盐,其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

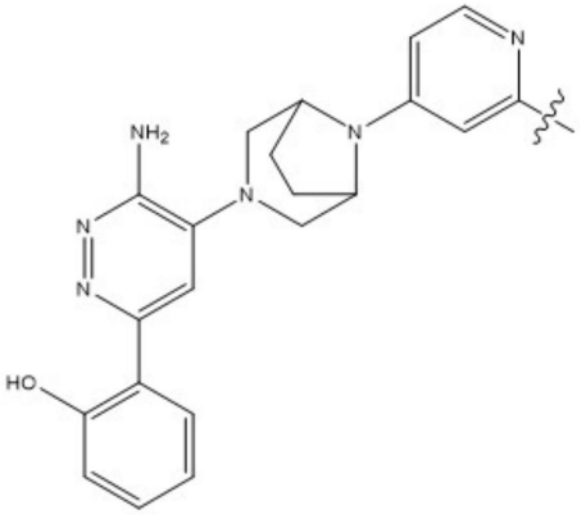
[0310] 在某些实施例中,BRM结合化合物为式(I-E)化合物:

[0311] 

(I-E),

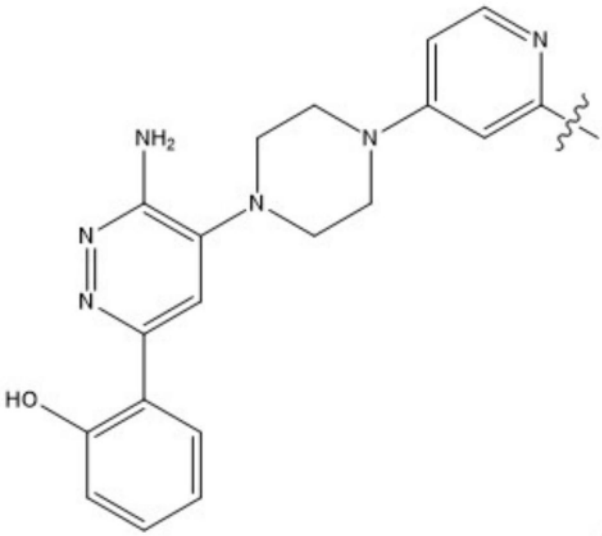
[0312] 或其立体异构体或互变异构体,或前述任一者之药用盐,其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

[0313] 在某些实施例中,CIDE的PB(BRM)部分具有以下结构:



或

[0314]



，

[0315] 其中，为与L2的连接点。

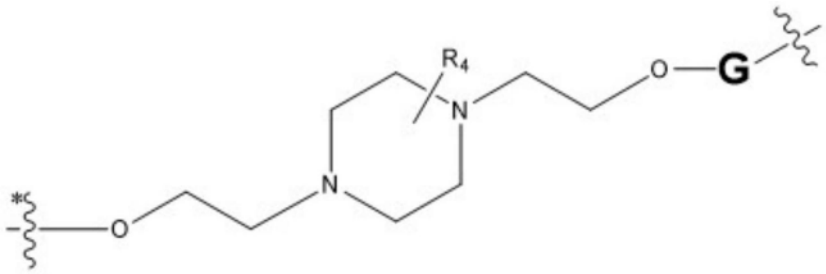
[0316] c.接头L2

[0317] 如本文所述的CIDE的E3LB和PB部分可以与接头(L2、接头L2、接头-2)连接。在某些实施例中，接头L2共价结合至E3LB部分并且共价结合至PB部分，由此构成CIDE。

[0318] 在某些实施例中，L2部分可选自WO2019/195201中公开的接头，该专利全文以引用方式并入本文。

[0319] 尽管E3LB基团和PB基团可通过任何对接头的化学性质合适且稳定的基团共价连接至接头基团，但在某些方面，L2通过酰胺、酯、硫酯、酮基、氨基甲酸酯(尿烷)或醚独立地共价键合至E3LB基团和PB基团，每个基团均可插入E3LB基团和PB基团上的任何位置，以使E3LB基团与泛素连接酶结合并且PB基团与待降解的靶蛋白质诸如BRM结合。换句话说，如本文所示，接头可设计并且连接至E3LB和PB以调节E3LB和PB与其相应的结合配偶体的结合。

[0320] 在某些实施例中，L2为共价结合至E3LB和PB的接头，该L2具有下式：

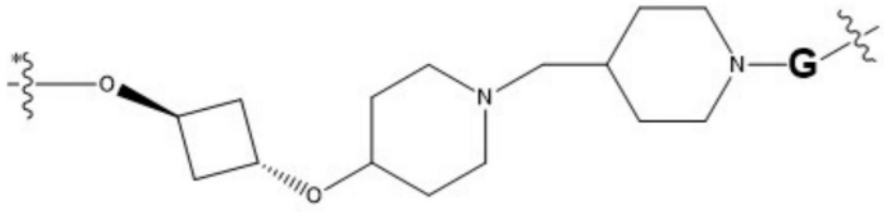
[0321] 

L2a

，

[0322] 其中，

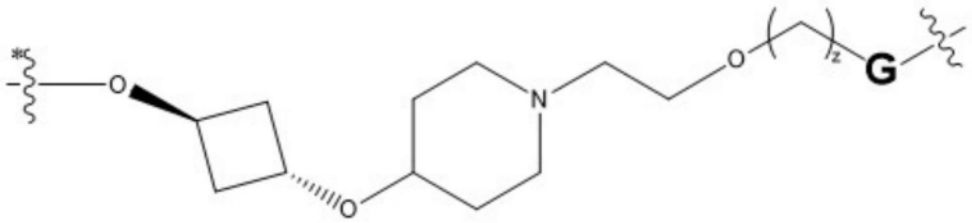
[0323] R_4为氢或甲基，



L2b

或

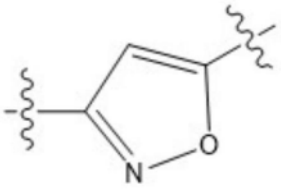
[0324]



L2c

[0325] 其中，

[0326] z为1或0，

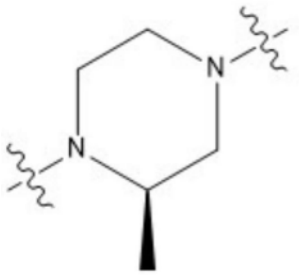
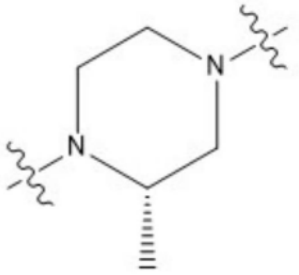
[0327] G为或—C(O)NH—；并且

[0328] 为与CIDE的连接点，诸如直接结合至PB。

[0329] 在L2a的某些实施例中，R_4为氢。

[0330] 在L2a的某些实施例中，R_4为甲基。

[0331] 在L2a的某些实施例中，R_4为甲基，使得甲基相对于其所连接的哌嗪取向如下：

[0332]  或 。

[0333] 在L2c的某些实施例中,z为0。

[0334] 在L2c的某些实施例中,z为1。

[0335] 现在参考Ab-CIDE,Ab-CIDE可包含单一抗体,其中该单一抗体可具有一个以上的CIDE,每个CIDE通过接头L1共价连接至抗体。“CIDE载量”为每个抗体中CIDE部分的平均数量。CIDE载量可在每个抗体(Ab)1至16个CIDE(D)的范围内。即,在Ab-CIDE式Ab－(L1－D)$_j$中,j具有约1至约16、约1至约8、约1至约5、约1至约4、或约1至约3的值。通过接头L1共价连接至抗体的每个CIDE可为相同或不同的CIDE,并且与共价连接至抗体的任何其他L1可具有相同类型或不同类型的接头。在某些实施例中,Ab为经半胱氨酸工程化的抗体,并且j为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16。

[0336] 通过缀合反应得到的Ab-CIDE制剂中每个抗体的CIDE的平均数量可通过常规方法诸如质谱、ELISA测定、电泳和HPLC进行表征。也可以确定以j表示的Ab-CIDE的定量分布。通过ELISA,可以确定特定Ab-CIDE制剂中j的平均值(Hamblett等人(2004)Clin.Cancer Res.10:7063-7070;Sanderson等人(2005)Clin.Cancer Res.11:843-852)。但是,p值的分布无法通过ELISA的抗体-抗原结合和检测限制来辨别。同样,用于检测Ab-CIDE的ELISA测定不能确定CIDE部分在何处与抗体连接,诸如重链或轻链片段或特定的氨基酸残基。在一些情况下,在其中j为由具有其他CIDE载量的Ab-CIDE得到的特定值的均相Ab-CIDE的分离、纯化和表征可通过反相HPLC或电泳等方法实现。

[0337] 对于一些Ab-CIDE,j可能受到抗体上连接位点数量的限制。例如,抗体可以仅具有一个或几个半胱氨酸硫醇基团,或者可以仅具有一个或几个具有足够反应性的硫醇基团,接头可通过此类硫醇基团连接。Ab上连接L1-D的另一个反应性位点是赖氨酸残基的胺官能团。j的值包括约1至约16、约1至约8、约1至约5、约1至约4、约1至约3的值以及其中j等于2的情况。在一些实施例中,本文描述的主题涉及任何Ab-CIDE,其中j为约1、2、3、4、5、6、7或8。

[0338] 一般而言,在缀合反应期间,少于理论最大值的CIDE部分缀合至抗体。抗体可含有例如许多不与接头L1-CIDE基团(L1-D)或接头试剂反应的赖氨酸残基。仅最具反应性的赖氨酸基团可与胺反应性接头试剂反应。而且,仅最具反应性的半胱氨酸硫醇基可以与硫醇反应性的接头试剂或接头L1-CIDE基团反应。一般而言,抗体不包含许多(如有的话)可以连接至CIDE部分的游离的反应性半胱氨酸硫醇基团。化合物的抗体中的大多数半胱氨酸硫醇残基以二硫键形式存在,并且必须在部分或完全还原条件下用还原剂(诸如二硫苏糖醇(DTT)或TCEP)还原。然而,DAR的CIDE载量(CIDE/抗体比,“DAR”)可通过几种不同的方式进行控制,其中包括:(i)限制接头L1-CIDE基团或接头试剂相对于抗体的摩尔过量,(ii)限制缀合反应时间或温度,以及(iii)针对半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制还原条件。

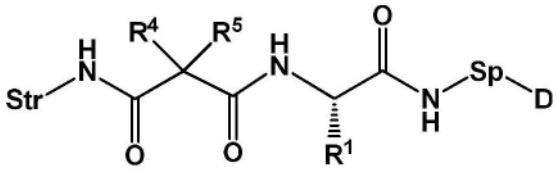
[0339] III.L1-CIDE化合物

[0340] 本文描述的CIDE可共价连接至接头L1以制备L1-CIDE基团。这些化合物具有以下通式：

[0341] L1－D，

[0342] 其中D为具有结构E3LB－L2－PB的CIDE；其中，E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合基团；L2为共价结合至E3LB和PB的接头；PB为共价结合至L2的靶蛋白质结合基团；并且L1为共价结合至D的拟肽接头。这些组分中每一者的有用的基团如上所述。在某些实施例中，CIDE经磷酸化。

[0343] 在某些实施例中，L1如本文其他地方所述，包括拟肽接头。在这些实施例中，L1-CIDE具有下式：

[0344] 

[0345] 其中

[0346] Str为拉伸单元；

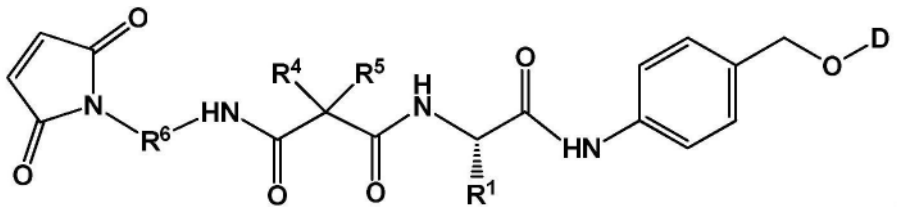
[0347] Sp为共价连接至D(即CIDE部分)的键或间隔单元；

[0348] R^1为C_1-C_{10}烷基、(C_1-C_{10}烷基)NHC(NH)NH_2或(C_1-C_{10}烷基)NHC(O)NH_2；

[0349] R^4和R^5各自独立地为C_1-C_{10}烷基、芳基烷基、杂芳基烷基、(C_1-C_{10}烷基)OCH_2-，或者R^4和R^5可形成C_3-C_7环烷基环；

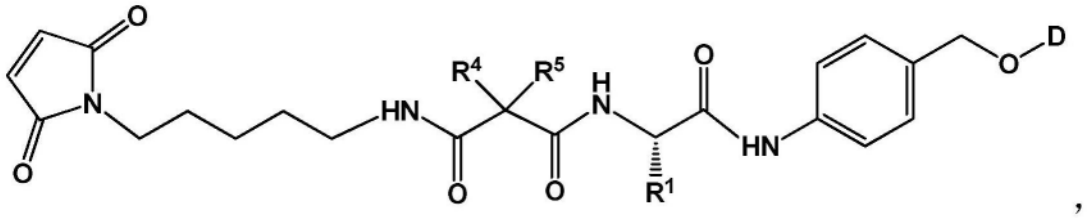
[0350] D为CIDE部分。

[0351] 一种L1-CIDE化合物可由下式表示：

[0352] 

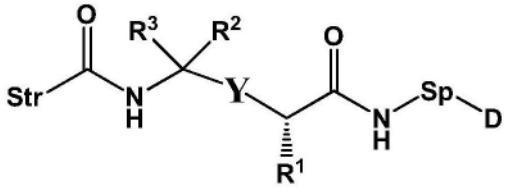
[0353] 其中R_6为C_1-C_{10}亚烷基；R^4和R^5一起形成C_3-C_7环烷基环，并且D为CIDE部分。

[0354] 一种L1-CIDE化合物可由下式表示：

[0355] 

[0356] 其中R^1、R^4和R^5如本文其他地方所述，并且D为CIDE部分。

[0357] 一种L1-CIDE化合物可由下式表示：

[0358] 

[0359] 其中

[0360] Str为拉伸单元;

[0361] Sp为共价连接至D(即CIDE部分)的任选的间隔单元;

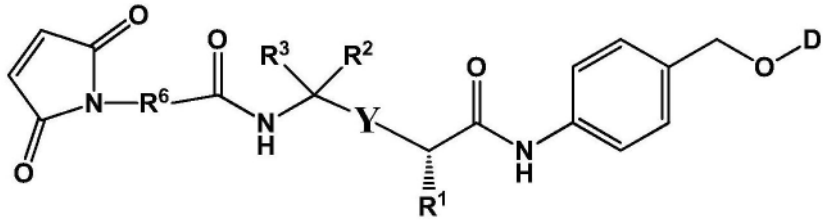
[0362] Y为杂芳基、芳基、-C(O)C_1-C_6亚烷基、C_1-C_6亚烷基-NH_2、C_1-C_6亚烷基-NH-CH_3、C_1-C_6亚烷基-N-$(CH_3)_2$、C_1-C_6烯基或C_1-C_6亚烷基基团;

[0363] R^1为C_1-C_{10}烷基、(C_1-C_{10}烷基)NHC(NH)NH_2或(C_1-C_{10}烷基)NHC(O)NH_2;

[0364] R^3和R^2各自独立地为H、C_1-C_{10}烷基、芳基烷基或杂芳基烷基,或者R^3和R^2一起可形成C_3-C_7环烷基;并且

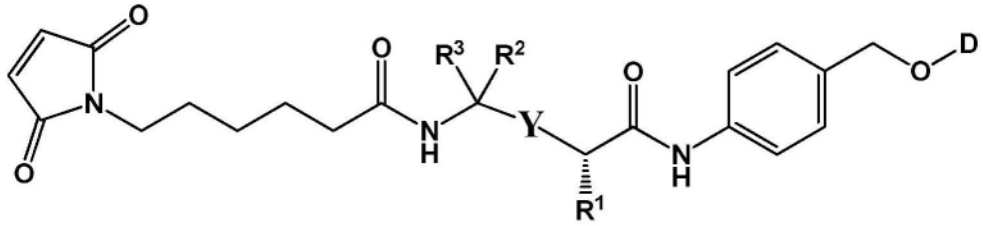
[0365] D为CIDE部分。

[0366] 一种L1-CIDE化合物可由下式表示:

[0367] 

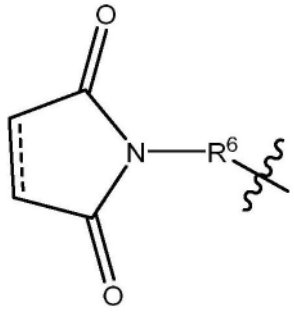
[0368] 其中,R^6为C_1-C_{10}亚烷基,并且R^1、R^2和R^3如本文其他地方所述,并且D为CIDE部分。

[0369] 一种L1-CIDE化合物可由下式表示:

[0370] 

[0371] 其中R^1、R^2和R^3如本文其他地方所述,并且D为CIDE部分。

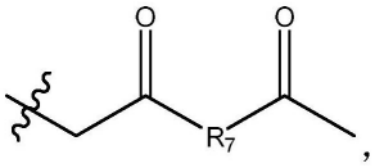
[0372] 在以上L1-CIDE化合物中的任一者中,Str可具有下式:

[0373] ,

[0374] 其中R^6选自由以下项组成的组:C_1-C_{10}亚烷基、C_3-C_8环烷基、O-(C_1-C_8亚烷基)和C_1-C_{10}亚烷基-C(O)N(R^a)-C_2-C_6亚烷基,其中每个亚烷基可以被选自由以下项组成的组的一个至五个取代基取代:卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷基氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砜、羟基、烷氧基、酯、羧酸、烷硫基、C_3-C_8环烷基、C_4-C_7杂环烷基芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和杂芳基;每个R^a独立地为H或C_1-C_6烷基;Sp为—Ar—R^b—,其中Ar为芳基或杂芳基,R^b为(C_1-C_{10}亚烷基)O-。

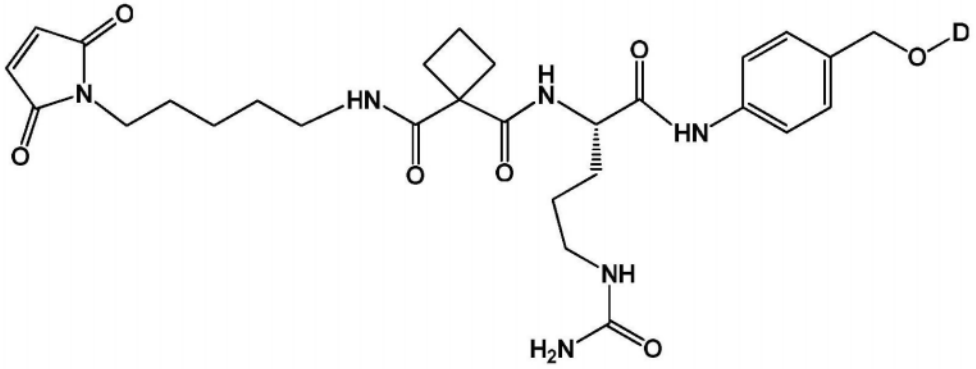
[0375] 在某些L1-CIDE化合物中,R^6为C_1-C_{10}亚烷基,Sp为—Ar—R^b—,其中Ar为芳基,R^b为(C_1-C_6亚烷基)O-;或者R_6为-$(CH_2)_q$,其中q为1至10;

[0376] 在以上L1-CIDE化合物中的任一者中,Str可具有下式:

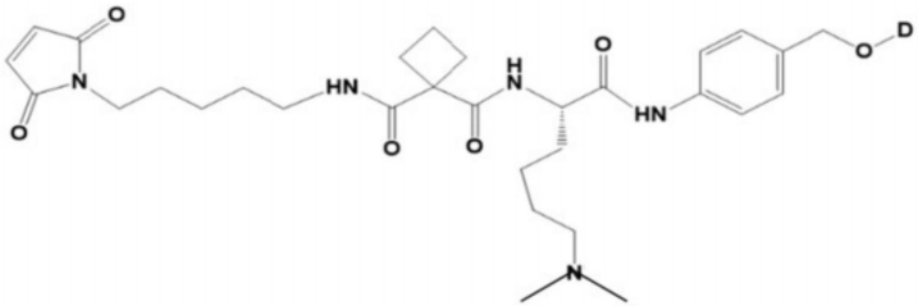
[0377] 

[0378] 其中,指示与能够缀合至抗体的部分的连接,R^7选自C_1-C_{10}亚烷基、C_1-C_{10}亚烷基-O、N(R^c)-(C_2-C_6亚烷基)-N(R^c)和N(R^c)-(C_2-C_6亚烷基);其中每个R^c独立地为H或C_1-C_6烷基;Sp为—Ar—R^b—,其中Ar为芳基或杂芳基,R^b为(C_1-C_{10}亚烷基)O-;或者其中R^6为C_1-C_{10}亚烷基,Sp为—Ar—R^b—,其中Ar为芳基,R^b为(C_1-C_6亚烷基)O-。

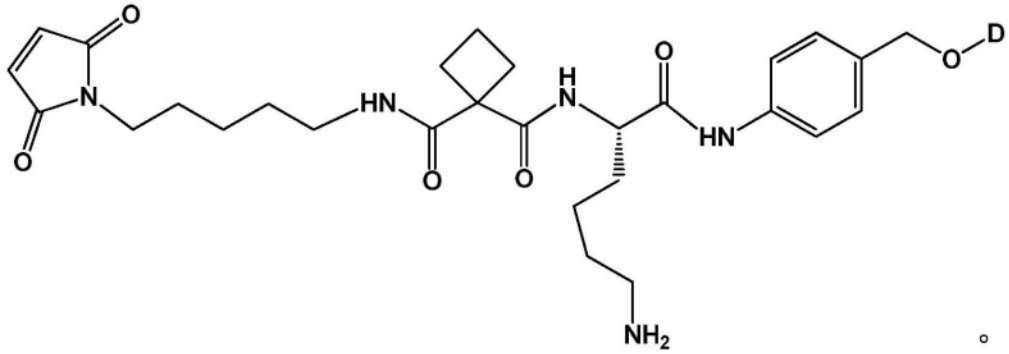
[0379] 一种L1-CIDE可具有下式,其中在每种情况下,D为CIDE部分:



;

[0380] 

和



。

[0381] Ab-CIDE可包括PB、E3LB、Ab、L1和L2的任意组合;本领域技术人员将理解,L1和L2连接点可以变化,只要当L1存在时,CIDE、L1-CIDE或Ab-L1-CIDE包含共价结合至PB或E3LB的磷酸酯基团以及拟肽接头。进一步,部分接头诸如—Str—(PM)—Sp—可互换。另外,部分接头L1可互换。

[0382] 现在参考如本文所述的Ab-CIDE和L1-CIDE化合物,这些化合物可以固体或液体形式存在。在固态下,它可以结晶或非结晶形式存在,或作为它们的混合物存在。技术人员将理解,可以形成用于结晶或非结晶化合物的药用溶剂化物。在结晶溶剂化物中,在结晶期间将溶剂分子掺入晶格中。溶剂化物可涉及非水性溶剂,诸如但不限于乙醇、异丙醇、DMSO、乙酸、乙醇胺或乙酸乙酯,或者它们可涉及水作为掺入晶格中的溶剂。其中水作为掺入晶格中的溶剂的溶剂化物通常称为“水合物”。水合物包括化学计量的水合物以及含有可变量的水的组合物。本文描述的主题包括所有此类溶剂化物。

[0383] 技术人员将进一步理解,本文描述的以结晶形式存在的某些化合物和Ab-CIDE(包括其各种溶剂化物)可表现出多态性(即在不同晶体结构中发生的能力)。这些不同的晶体形式通常称为“多晶型物”。本文公开的主题包括所有此类多晶型物。多晶型物具有相同的化学组成,但在堆积、几何排列和结晶固态的其他描述性特性方面有所不同。因此,多晶型物可能具有不同的物理特性,诸如形状、密度、硬度、可变形性、稳定性及溶解特性。多晶型物通常表现出不同的熔点,IR光谱和X射线粉末衍射图,此类特性可用于鉴定。技术人员将认识到,例如可以通过改变或调节用于制备化合物的反应条件或试剂来产生不同的多晶型物。例如,温度、压力或溶剂的变化可以得到多晶型物。另外,在某些条件下,一种多晶型物可自发转化为另一种多晶型物。

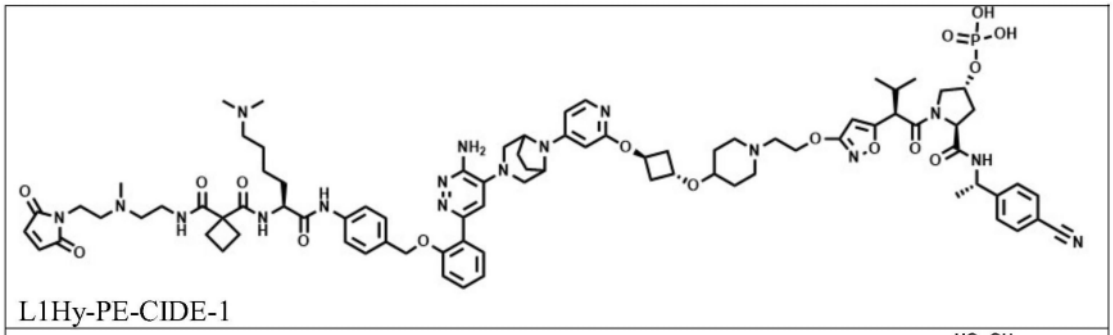
[0384] 本文描述的化合物和Ab-CIDE或其盐可以以立体异构体形式存在(例如,它含有一个或多个不对称碳原子)。各种立体异构体(对映体和非对映体)及其混合物包括在本文公开的主题的范围内。同样,应当理解,式(I)化合物或盐可以以除式中所示的结构以外的互变异构形式存在,并且也包括在本文公开的主题的范围内。应当理解,本文公开的主题包括本文描述的特定组的所有组合和子集。本文公开的主题的范围包括立体异构体的混合物以及纯化的对映体或对映异构体/非对映异构体富集的混合物。应当理解,本文公开的主题包括上文所定义的特定组的所有组合和子集。

[0385] 本文公开的主题还包括本文描述的化合物的同位素标记的形式,但事实上,一个或多个原子被原子质量或质量数不同于自然界中通常发现的原子质量或质量数的原子所替代。可掺入本文描述的化合物及其药用盐的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素,诸如^{2}H、^{3}H、^{11}C、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F、^{36}Cl、^{123}I和^{125}I。

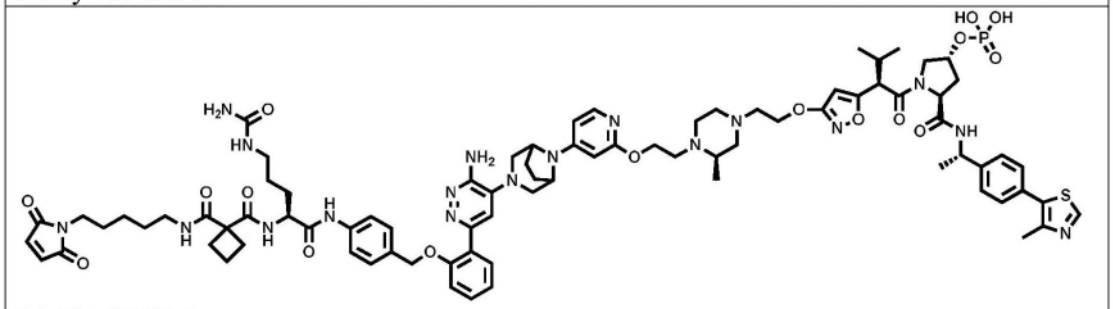
[0386] 含有上述同位素和/或其他原子的其他同位素的如本文所公开的化合物和Ab-CIDE及药用盐在本文公开的主题的范围内。本文公开了同位素标记的化合物,例如其中掺入有放射性同位素(诸如^{3}H、^{14}C)的那些化合物,可用于药物和/或底物组织分布测定。常用氚化(即^{3}H)和碳-14(即^{14}C)同位素,因为它们易于制备和检测。^{11}C和^{18}F同位素可用于PET(正电子发射断层扫描),而^{125}I同位素可用于SPECT(单光子发射计算机断层扫描),所有这些都可用于脑成像。进一步,用较重的同位素诸如氘(即,^{2}H)取代可以提供由于代谢稳定性更高(例如,体内半衰期增加或剂量减少要求)而带来的某些治疗优势,因此在一些情况下可能是优选的。同位素标记的化合物通常可通过执行以下方案和/或实例中公开的程序(通过将非同位素标记的试剂取代为容易获得的同位素标记的试剂)来制备。

[0387] 在某些实施例中,本文描述的主题包括以下L1-CIDE:

[0388]

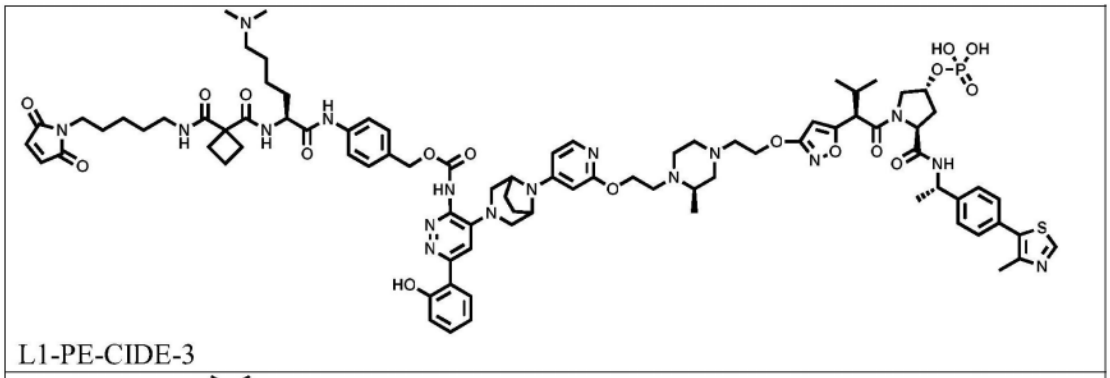


L1Hy-PE-CIDE-1

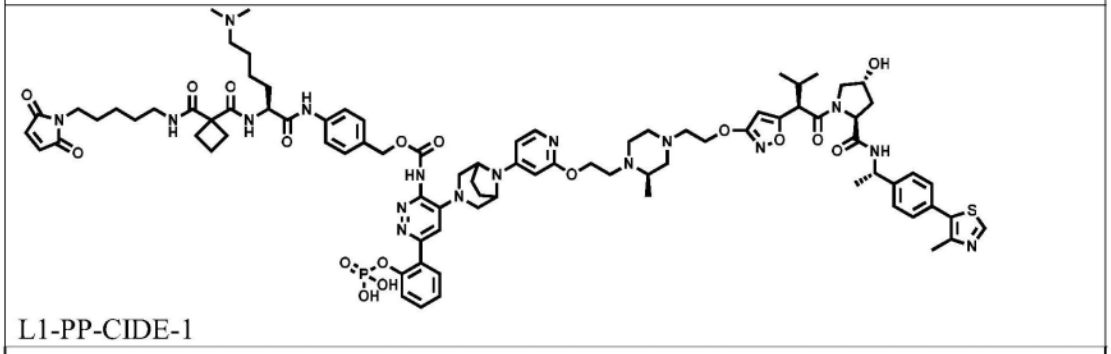


L1-PE-CIDE-2

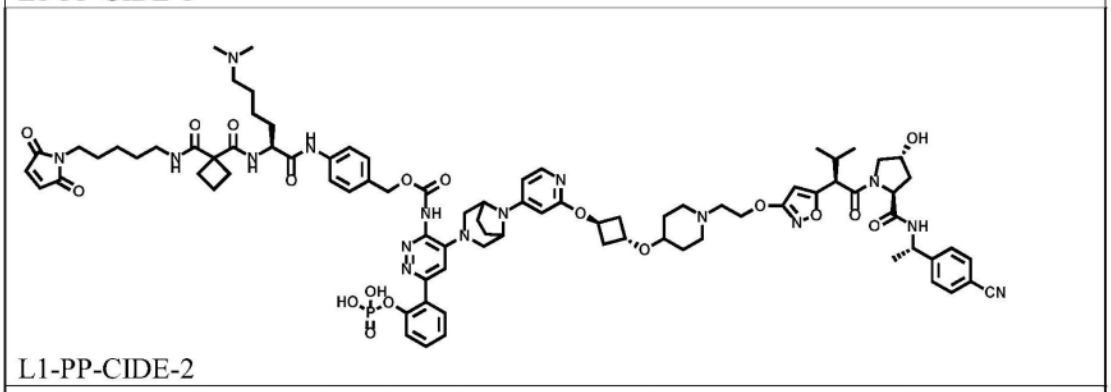
[0389]



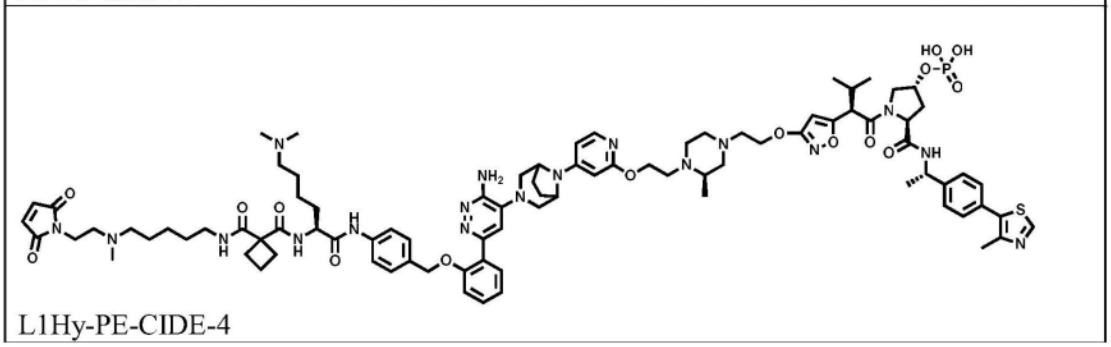
L1-PE-CIDE-3



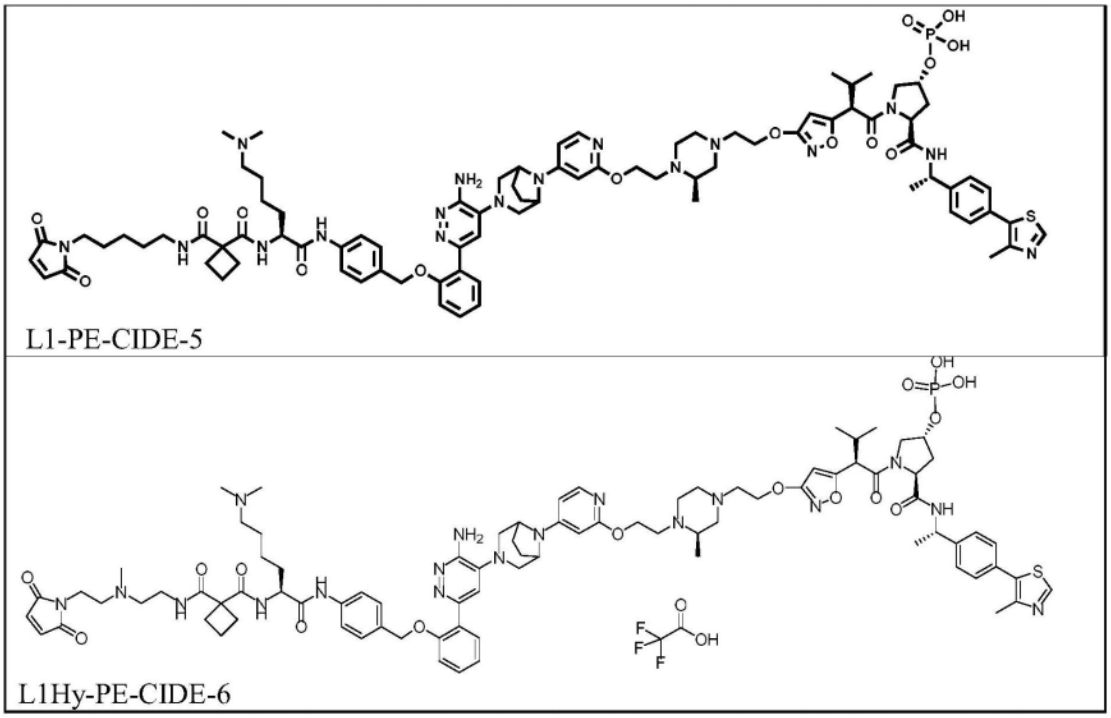
L1-PP-CIDE-1



L1-PP-CIDE-2



L1Hy-PE-CIDE-4

[0390] 

[0391] 在实施例中,L1Hy-PE-CIDE-1、L1-PE-CIDE-2、L1-PE-CIDE-3、L1Hy-PE-CIDE-4、L1-PE-CIDE-5、L1Hy-PE-CIDE-6、L1-PP-CIDE-1和L1-PP-CIDE-2中的至少一者缀合至抗体。在实施例中,至少一种L1Hy-PE-CIDE-1缀合至抗体。在实施例中,至少一种L1-PE-CIDE-2结合至抗体。在实施例中,至少一种L1-PE-CIDE-3结合至抗体。在实施例中,至少一种L1Hy-PE-CIDE-4缀合至抗体。在实施例中,至少一种L1-PE-CIDE-5结合至抗体。在实施例中,至少一种L1Hy-PE-CIDE-6缀合至抗体。在实施例中,至少一种L1-PP-CIDE-1结合至抗体。在实施例中,至少一种L1-PP-CIDE-2结合至抗体。

[0392] 本文公开的主题包括以下非限制性实施例:

[0393] 1.一种缀合物,其具有以下化学结构:

[0394] $Ab-(L1-D)_j$,

[0395] 其中,

[0396] D为具有以下结构的CIDE:

[0397] E3LB—L2—PB,

[0398] 其中,

[0399] E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体,

[0400] 其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质;

[0401] L2为共价结合至E3LB和PB的接头;

[0402] PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团;

[0403] 其中,至少一个磷酸酯部分共价结合至D;

[0404] Ab为共价结合至L1的抗体;

[0405] L1为共价结合至Ab和D的接头;并且

[0406] j具有约1至约16的值。

[0407] 2.根据实施例1所述的缀合物,其中一个磷酸酯部分在E3LB或PB处共价结合至D。

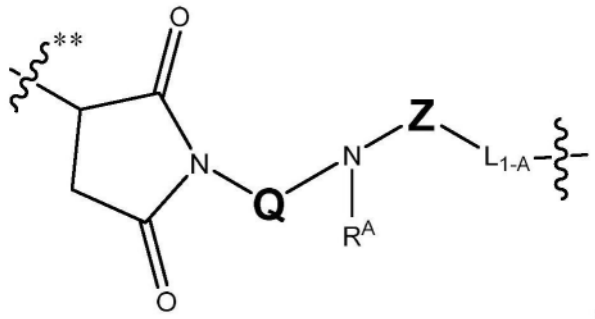
[0408] 3.根据实施例1或2所述的缀合物,其中L1为共价结合至Ab和共价结合至D的PB的

拟肽接头。

[0409] 4.根据实施例1或2所述的缀合物,其中L1为共价结合至Ab和共价结合至D的E3LB的拟肽接头。

[0410] 5.根据实施例1、2、3或4所述的缀合物,其中L1选自由以下项组成的组:

[0411] i)

[0412] 

,

[0413] 其中指示与Ab的连接点;

[0414] Z为-$(CH_2)_p$-或-CH_2-$(CH_2$-O-$CH_2)_p$-CH_2-,其中p为1、2、3、4、5或6;

[0415] R^A为氢、C_{1-6}烷基或-$(CH_2)_v$-芳基,其中v为0或1(诸如苯基或苄基);

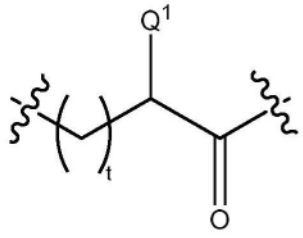
[0416] Q选自由以下项组成的组:

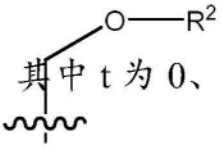
[0417] a)

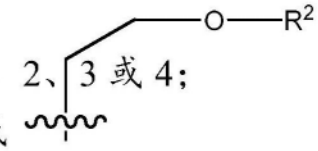
[0418] 

其中,q为1、2、3或4;并且
,

[0419] b)

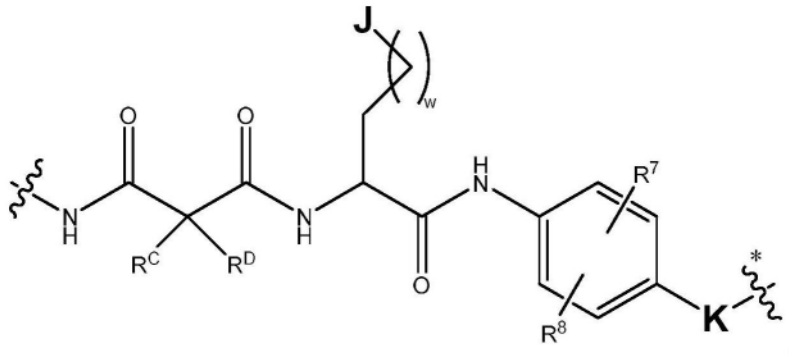
[0420] 

,其中t为0、1、2、3或4;
Q^1为氢、

或

,其中R^2为氢、卤代(C_{1-6})烷基或C_{1-6}烷基;并且

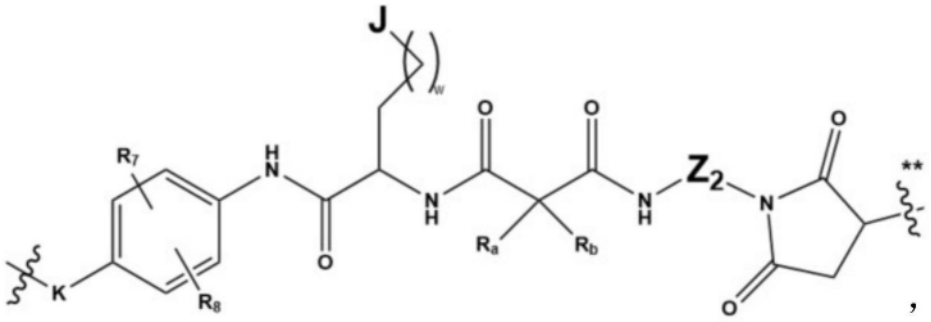
[0421] L_{1-A}为:

[0422] 

,其中指示与D的连

接点;并且

[0423] ii)

[0424] 

[0425] 其中  指示与Ab的连接点;

[0426] Z_2为C_{1-12}亚烷基或-$[CH_2]_g$-O-$[CH_2]_h$-,其中g和h各自独立地为0、1或2;

[0427] w为0、1、2、3、4或5;

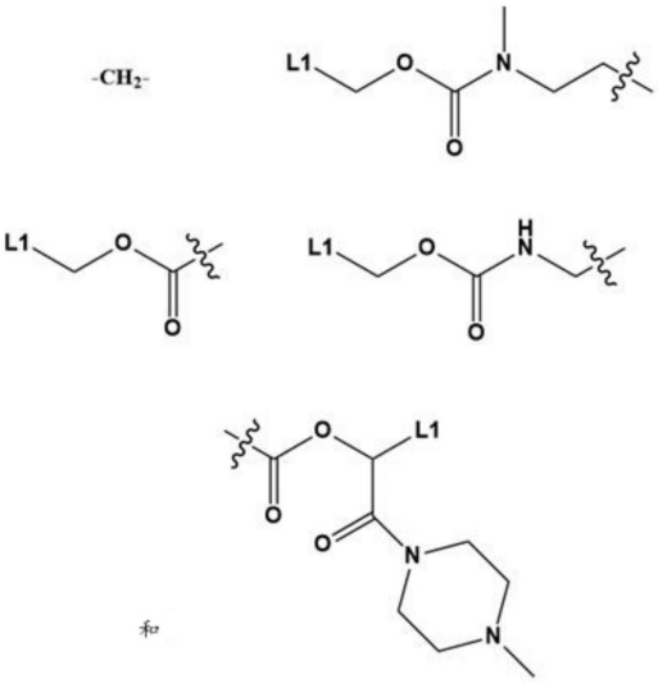
[0428] J选自由以下项组成的组:C_{1-5}烷基、-N(R_x)(R_y)、-C(O)NH_2、-NH-C(O)-NH_2和-NHC(=NH)NH_2,其中,R_x和R_y各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基;

[0429] K选自由以下项组成的组:C_{1-3}亚烷基、-CH(R)-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH_2-O-C(O)-、-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-和-CH_2-O-C(O)-R-$[CH_2]_q$-O-,其中R为氢、C_{1-3}烷基、N(R_x)(R_y)、-O-N(R_x)(R_y)或C(O)-N(R_x)(R_y),其中q为0、1、2或3,并且其中R_x和R_y各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基,或者R_x和R_y与它们各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基;

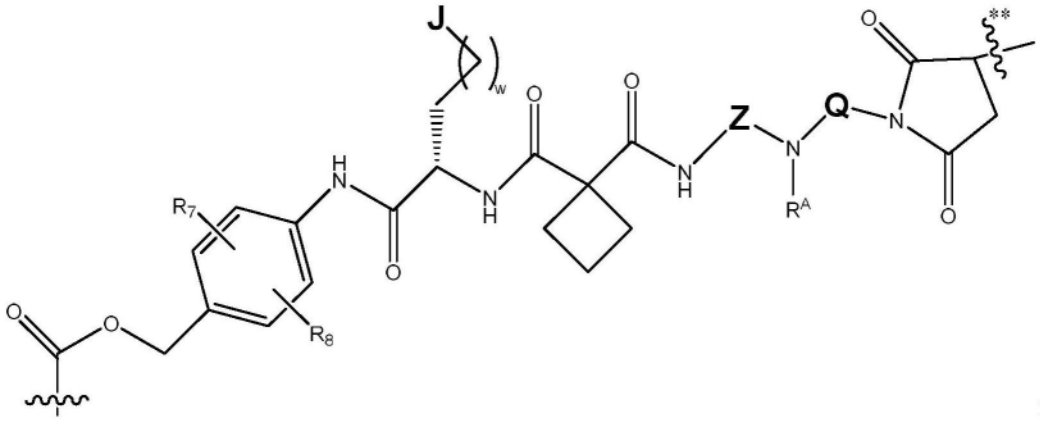
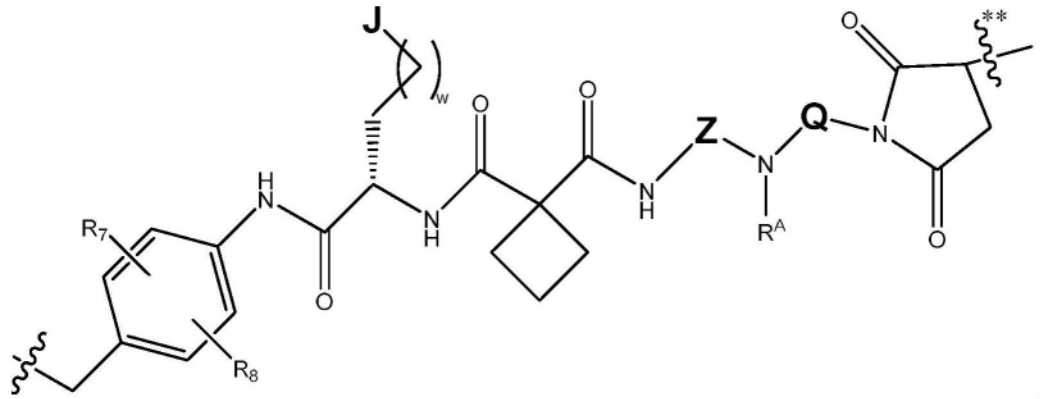
[0430] R_a、R_b、R^C和R^D各自独立地选自氢和C_{1-3}烷基,或者R_a和R_b与它们各自所连接的碳一起形成任选地取代的C_{3-6}环烷基;并且

[0431] R_7和R_8各自独立地为氢、卤代、C_{1-5}烷基、C_{1-5}烷氧基或羟基。

[0432] 6.根据实施例5所述的缀合物,其中L1的K选自由以下项组成的组:

[0433] 

[0434] 7.根据实施例1、2、3、4或5所述的缀合物,其中L1选自由以下项组成的组:

[0435] 
和

。

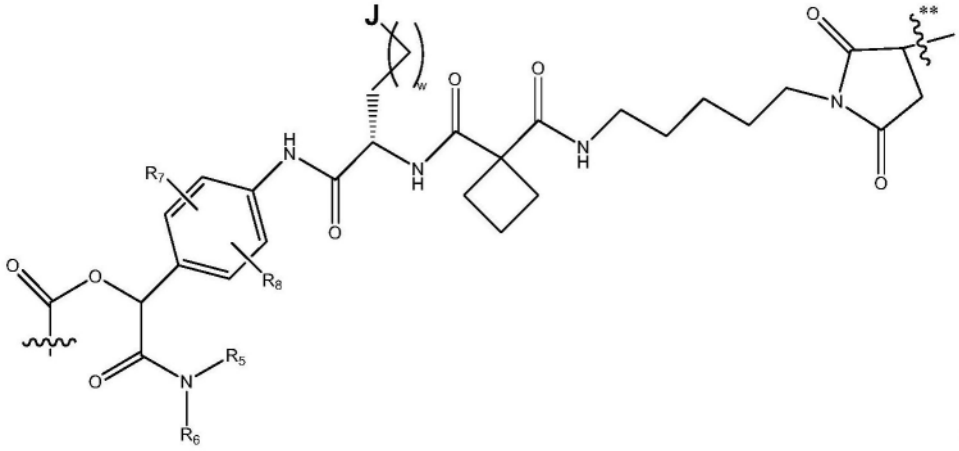
[0436] 8.根据实施例7所述的缀合物,其中R_7和R_8各自为氢。

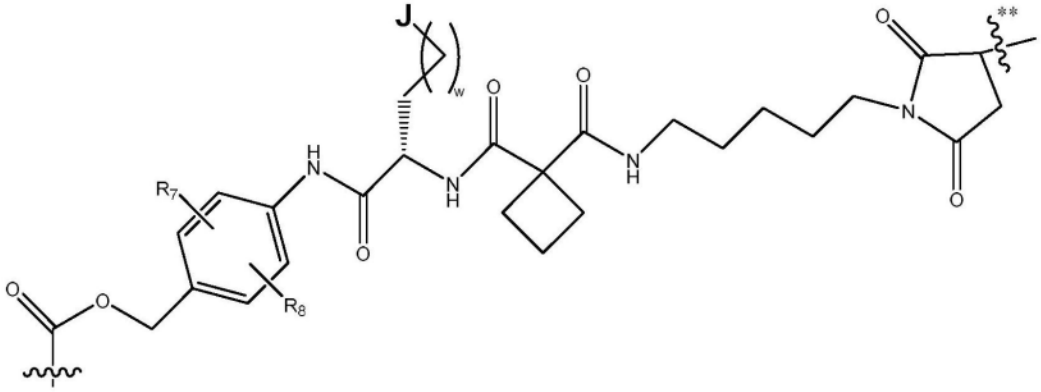
[0437] 9.根据实施例8所述的缀合物,其中Z为-$(CH_2)_p$-。

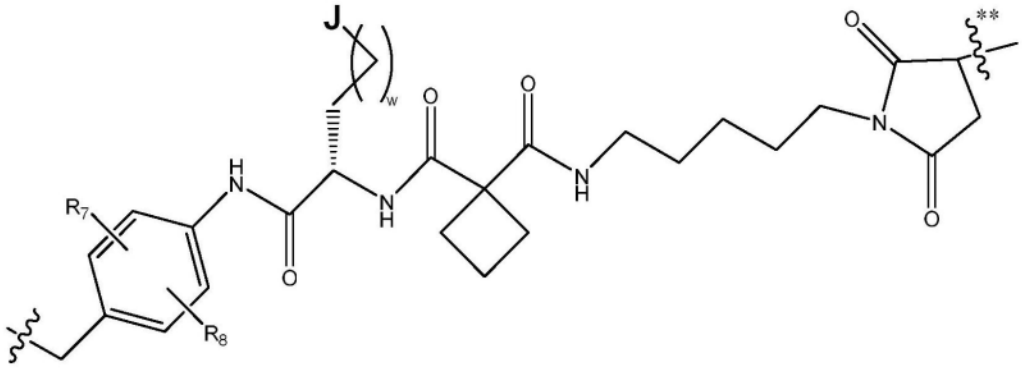
[0438] 10.根据实施例9所述的缀合物,其中w为2或3,并且J为-$N(CH_3)_2$或-NH(CO)NH。

[0439] 11.根据实施例10所述的缀合物,其中Q为-CH_2-CH_2-。

[0440] 12.根据实施例1、2、3、4或5所述的缀合物,其中L1选自由以下项组成的组:

[0441] 
;

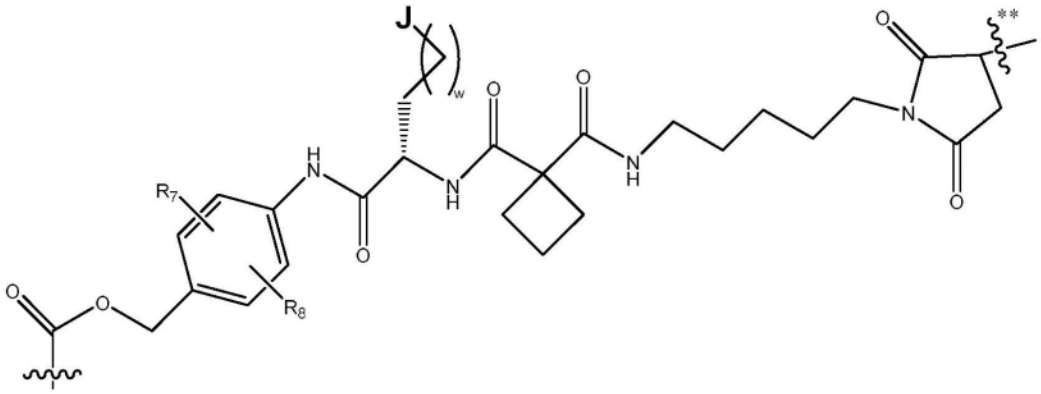
[0442] ；和

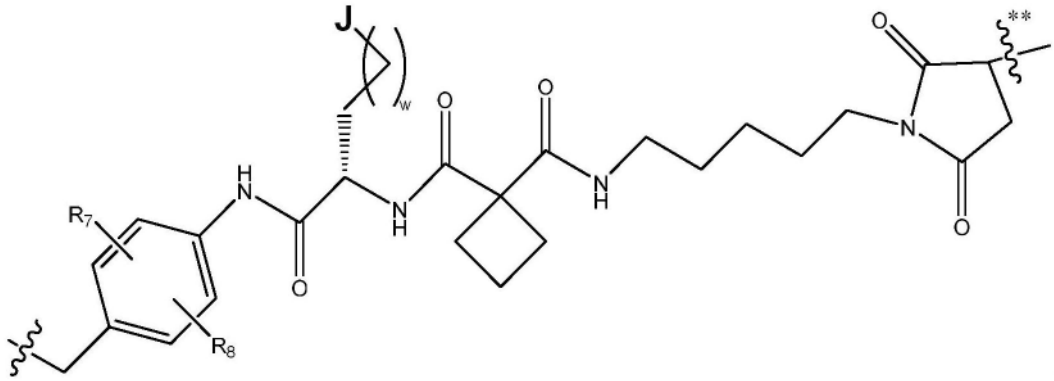
；

[0443] 其中，

[0444] R_5和R_6独立地为氢或C_{1-5}烷基；或者R_5和R_6与它们各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基。

[0445] 13.根据实施例12所述的缀合物，其中L1选自由以下项组成的组：

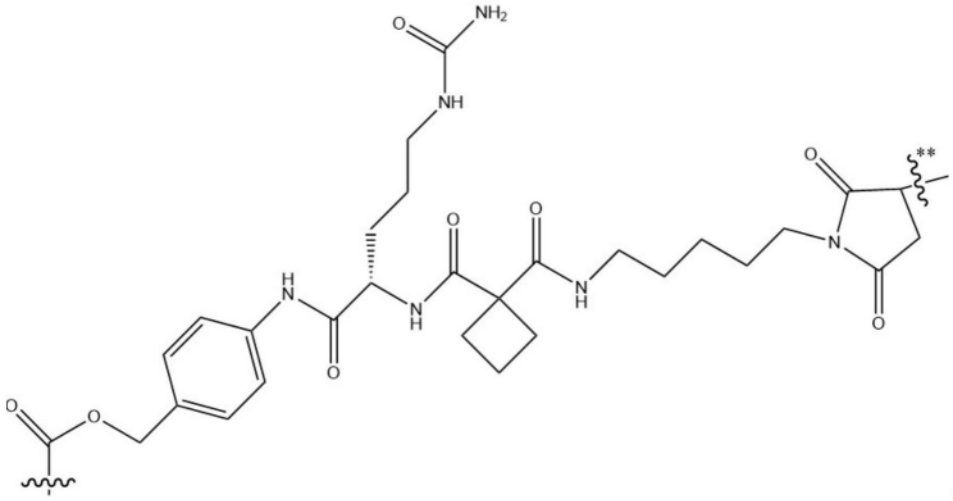
[0446] ；和

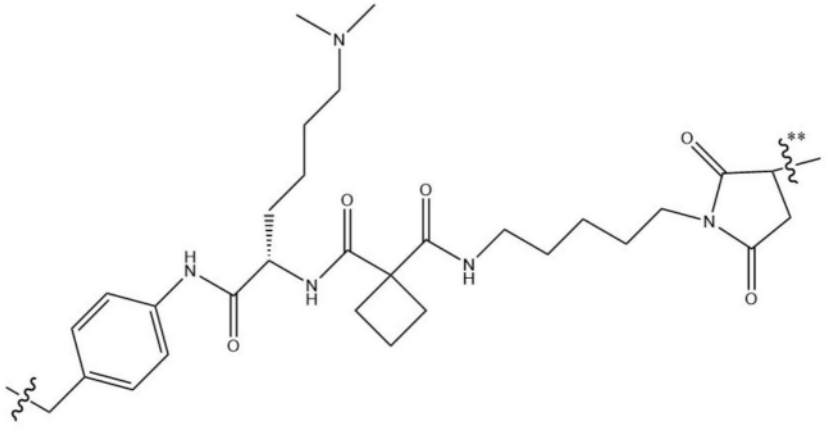
[0447] 。

[0448] 14.根据实施例13所述的缀合物，其中J为—NH-C(O)-NH_2或—$N(CH_3)_2$。

[0449] 15.根据实施例14所述的缀合物,其中w为2并且J为—NH-C(O)-NH_2;或者w为3并且J为—$N(CH_3)_2$。

[0450] 16.根据实施例15所述的缀合物,其中L1具有以下结构:

[0451] ；或

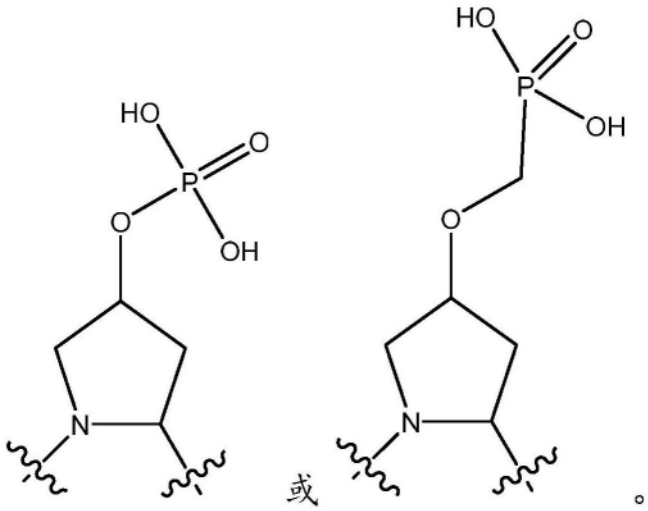
。

[0452] 17.根据实施例1至16中任一项所述的缀合物,其中磷酸酯部分选自由以下项组成的组:-(P=O)$(OH)_2$、-CH_2O(P=O)$(OH)_2$、-(P=O)(OH)O(P=O)$(OH)_2$和-CH_2-O(P=O)(OH)O(P=O)$(OH)_2$。

[0453] 18.根据实施例1至17中任一项所述的缀合物,其中E3LB包含羟脯氨酸残基。

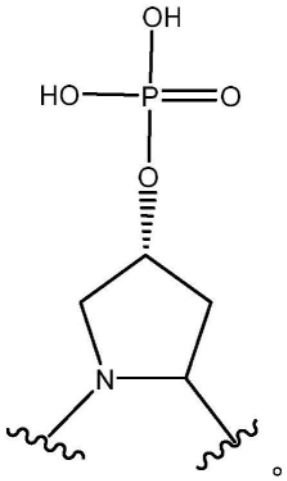
[0454] 19.根据实施例18所述的缀合物,其中磷酸酯部分通过羟脯氨酸残基的氧共价结合至E3LB。

[0455] 20.根据实施例19所述的缀合物,其中E3LB包含:

[0456] 

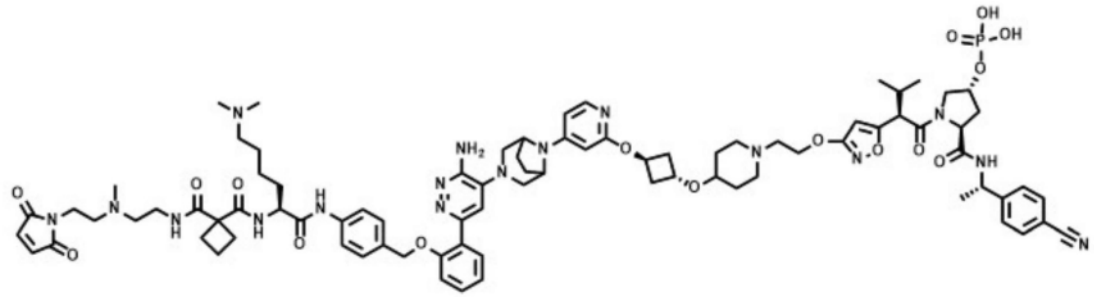
。

[0457] 21.根据实施例20所述的缀合物,其中E3LB包含:

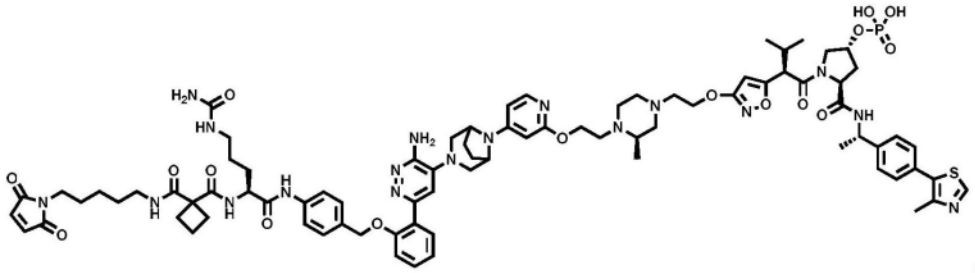
[0458] 

。

[0459] 22.根据实施例21所述的缀合物,其中抗体所缀合的L1－D为选自由以下项组成的组的缀合物:

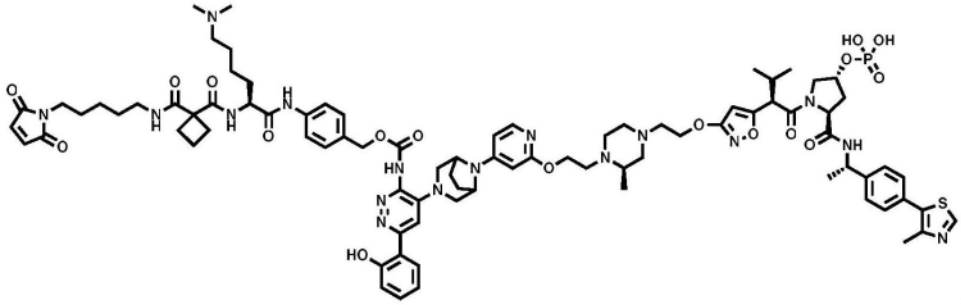


,

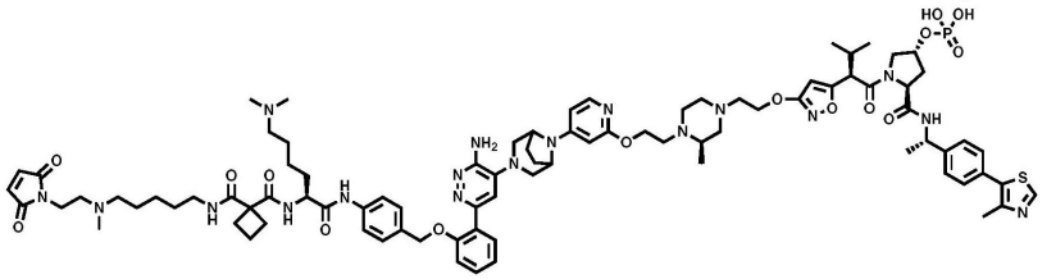


,

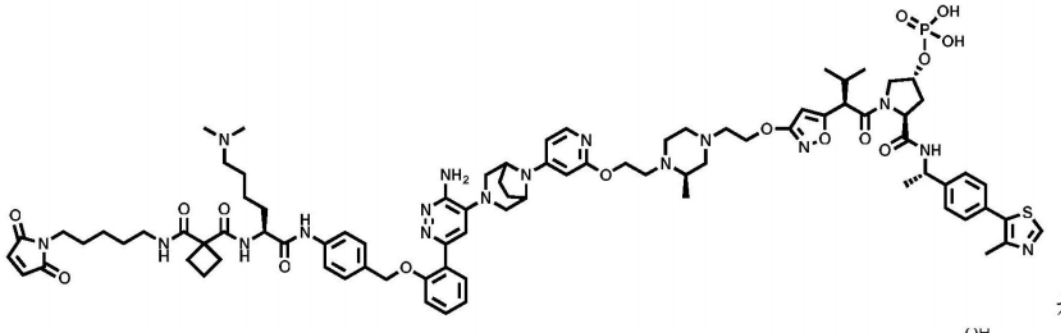
[0460]



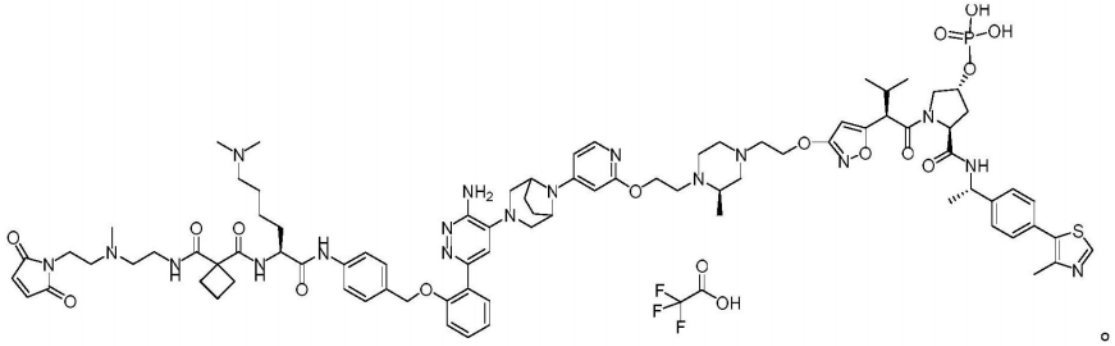
,



,

[0461] 

和



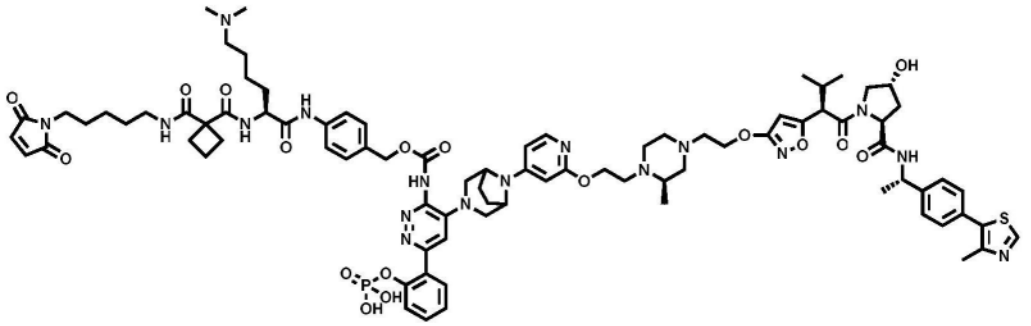
。

[0462] 23.根据实施例1至22中任一项所述的缀合物,其中PB包含羟基苯基部分。

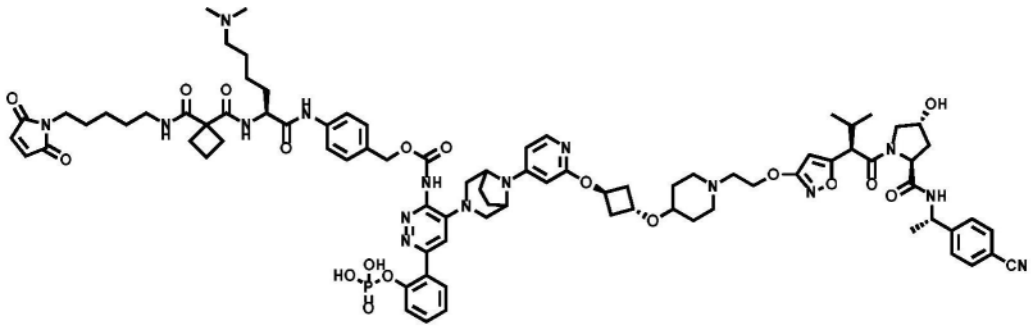
[0463] 24.根据实施例23所述的缀合物,其中磷酸酯部分通过羟基苯基部分的氧共价结合至PB。

[0464] 25.根据实施例24所述的缀合物,其中PB为BRM配体。

[0465] 26.根据实施例25所述的缀合物,其中抗体所缀合的L1－D为选自由以下项组成的组的缀合物:

[0466] 

和



[0467] 27.一种药物组合物,其包含根据实施例1至26中任一项所述的缀合物以及一种或多种药用赋形剂。

[0468] 28.一种治疗有此需要的人的疾病的方法,该方法包括向所述人施用有效量的根据实施例1至26中任一项所述的缀合物或根据实施例27所述的组合物;或者一种根据实施

例1至26中任一项所述的缀合物(或其组合物)或根据实施例27所述的组合物,其用于治疗有此需要的人的疾病;或者,根据实施例1至26中任一项所述的缀合物(或其组合物)或根据实施例27所述的组合物用于制造药物的用途,该药物用于治疗有此需要的人的疾病。

[0469] 29.根据实施例28所述的方法,其中疾病为癌症。

[0470] 30.根据实施例29所述的方法,其中癌症是BRM依赖性的。

[0471] 31.根据实施例30所述的方法,其中癌症为非小细胞肺癌。

[0472] 32.一种降低个体的靶蛋白质的水平的方法,该方法包括:

[0473] 向所述受试者施用根据实施例1至26中任一项所述的缀合物或根据实施例27所述的组合物,其中所述PB部分结合所述靶蛋白质,其中泛素连接酶引起所述结合的靶蛋白质的降解,其中所述靶蛋白质的水平被降低。

[0474] 在实施例中,所公开的化合物具有以下化学结构:

[0475] L1－D,

[0476] 其中,

[0477] L1为共价结合至D的拟肽接头;并且

[0478] D为具有以下结构的CIDE:

[0479] E3LB－L2－PB,

[0480] 其中,

[0481] E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体,其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质,并且其中E3LB包含具有通过羟基脯胺酸残基的氧共价结合至E3LB的磷酸酯部分的羟脯胺酸残基,

[0482] PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团,并且

[0483] L2为共价结合至E3LB和PB的接头。

[0484] 在实施例中,所公开的化合物具有以下化学结构:

[0485] L1－D,

[0486] 其中,

[0487] L1为共价结合至D的拟肽接头;并且

[0488] D为具有以下结构的CIDE:

[0489] E3LB－L2－PB,

[0490] 其中

[0491] E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体,其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质,

[0492] PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团,其中PB包含具有通过羟基苯基部分的氧共价结合至PB的磷酸酯部分的羟基苯基部分,并且

[0493] L2为共价结合至E3LB和PB的接头。

[0494] 在实施例中,所公开的化合物具有以下化学结构:

[0495] L1－D,

[0496] 其中,

[0497] L1为共价结合至D的拟肽接头;并且

[0498] D为具有以下结构的CIDE:

[0499] E3LB－L2－PB，

[0500] 其中E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体，其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质，并且其中E3LB包含羟脯氨酸残基；

[0501] PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团，其中PB包含羟基苯基部分；并且

[0502] L2为共价结合至E3LB和PB的接头，

[0503] 其中磷酸酯部分通过PB的羟基苯基部分的氧共价结合，或者磷酸酯部分通过E3LB的羟脯氨酸残基的氧共价结合。

[0504] 在实施例中，所公开的缀合物具有以下化学结构：

[0505] $Ab－(L1－D)_j$，

[0506] 其中，

[0507] D为具有以下结构的CIDE：

[0508] E3LB－L2－PB，

[0509] 其中，

[0510] E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体，其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质，并且其中E3LB包含具有通过羟基脯胺酸残基的氧共价结合的磷酸酯部分的羟脯胺酸残基，

[0511] PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团，并且

[0512] L2为共价结合至E3LB和PB的接头；

[0513] Ab为共价结合至L1的抗体；

[0514] L1为共价结合至Ab和D的拟肽接头；并且

[0515] j具有约1至约16的值。

[0516] 在实施例中，所公开的缀合物具有以下化学结构：

[0517] $Ab－(L1－D)_j$，

[0518] 其中，

[0519] D为具有以下结构的CIDE：

[0520] E3LB－L2－PB，

[0521] 其中

[0522] E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体，其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质，

[0523] PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团，其中PB包含具有通过羟基苯基部分的氧共价结合的磷酸酯部分的羟基苯基部分，并且

[0524] L2为共价结合至E3LB和PB的接头；

[0525] Ab为共价结合至L1的抗体；

[0526] L1为共价结合至Ab和D的拟肽接头；并且

[0527] j具有约1至约16的值。

[0528] 在实施例中，所公开的缀合物具有以下化学结构：

[0529] $Ab－(L1－D)_j$，

[0530] 其中，

[0531] D为具有以下结构的CIDE:

[0532] E3LB－L2－PB,

[0533] 其中,E3LB为共价结合至L2的E3连接酶结合(E3LB)配体,其中E3连接酶为希佩尔-林道(VHL)肿瘤阻抑蛋白质,并且其中E3LB包含羟脯氨酸残基;

[0534] L2为共价结合至E3LB和PB的接头;并且

[0535] PB为共价结合至L1和共价结合至L2的蛋白质结合基团,其中PB包含羟基苯基部分;

[0536] Ab为共价结合至L1的抗体;

[0537] L1为共价结合至Ab和D的拟肽接头;并且

[0538] j具有约1至约16的值,

[0539] 其中磷酸酯部分通过PB的羟基苯基部分的氧共价结合,或者磷酸酯部分通过E3LB的羟脯氨酸残基的氧共价结合。

[0540] IV.制剂

[0541] 可制备如本文所述的治疗性Ab-L1-CIDE的药物制剂用于肠胃外施用,例如与药用肠胃外载体一起并且可以单位剂量注射形式推注、静脉内、肿瘤内注射。具有期望纯度的Ab-CIDE任选地与一种或多种药用赋形剂(Remington's Pharmaceutical Sciences(1980)第16版,Osol,A.编),以用于复溶的冻干制剂形式或水溶液的形式混合。

[0542] Ab-L1-CIDE可根据标准药学实践配制为药物组合物。根据该方面,本文提供了一种药物组合物,该药物组合物包含与一种或多种药用赋形剂缔合的Ab-L1-CIDE。

[0543] 典型制剂是通过将Ab-L1-CIDE与赋形剂(诸如载体和/或稀释剂)混合来制备的。合适的载体、稀释剂和其他赋形剂是本领域技术人员众所周知的,并且包括诸如碳水化合物、蜡、水溶性和/或可溶胀聚合物的材料、亲水或疏水材料、明胶、油、溶剂、水等。所用的特定载体、稀释剂或其他赋形剂将取决于施用Ab-L1-CIDE的手段和目的。溶剂通常基于本领域技术人员认为向哺乳动物施用安全(GRAS)的溶剂来选择。

[0544] 一般而言,安全溶剂为无毒水性溶剂,诸如水以及其他可溶于或混溶于水中的无毒溶剂。合适的水性溶剂包括水、乙醇、丙二醇、聚乙二醇(例如,PEG 400、PEG 300)等以及它们的混合物。可接受的稀释剂、载体、赋形剂和稳定剂在所用的剂量和浓度下对受体无毒,并且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如,锌蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0545] 制剂还可以包含一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、湿润剂、润滑剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、抗氧化剂、不透明剂、助流剂、加工助剂、着色剂、甜味剂、加香剂、调味剂和其他已知的添加剂,以提供美观的Ab-L1-CIDE的展示或有助于药物产品的制造。可使

用常规的溶解和混合程序来制备制剂。

[0546] 可通过在环境温度下以适当的pH值和期望的纯度与生理上可接受的载体(即,在所采用的剂量和浓度下对受体无毒的载体)混合以进行配制。制剂的pH主要取决于化合物的具体用途和浓度,但是可以在约3至约8的范围内。一个合适的实施例为pH 5的乙酸盐缓冲剂中的制剂。

[0547] Ab-L1-CIDE制剂可为无菌的。特定而言,待用于体内施用的制剂必须为无菌的。此类灭菌通过无菌过滤膜过滤很容易实现。

[0548] Ab-L1-CIDE通常可作为固体组合物、冻干制剂或作为水溶液储存。

[0549] 包含Ab-L1-CIDE的药物组合物可按符合良好医疗实践的方式(即用量、浓度、时间表、疗程、媒介物和施用途径)来配制、给药和施用。在这种情况下要考虑的因素包括所治疗的特定疾患、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病症、疾患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用的时间安排以及执业医师已知的其他因素。待施用的化合物的“治疗有效量”将受此类考虑因素的约束,并且是预防、改善或治疗凝血因子介导的疾患所需的最小量。该量优选地低于对宿主有毒或使宿主显著地更易出血的量。

[0550] Ab-L1-CIDE可配制成药物剂型,以提供易于控制的药物剂量并且使患者能够遵守规定的方案。根据用于施用药物的方法,可以以多种方式包装用于施用的药物组合物(或制剂)。一般而言,用于分配的物品包括其中以适当形式沉积有药物制剂的容器。合适的容器为本领域技术人员众所周知的,并且包括诸如瓶(塑料瓶和玻璃瓶)、小袋、安瓿、塑料袋、金属圆筒等材料。容器还可以包括干预防护组件,以防止不慎接触包装的内容物。另外,容器上贴有描述容器内容物的标签。标签还可包括适当的警告。

[0551] 药物组合物可为无菌注射制剂的形式,诸如无菌注射水性或油质悬浮液。该悬浮液可根据已知技术使用上面已经提到的那些合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂来配制。无菌可注射制备物也可以是无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(诸如1,3-丁二醇)中的无菌可注射溶液或悬浮液。无菌可注射制备物也可以制成冻干粉。可采用的可接受的媒介物和溶剂为水、林格氏液和等渗氯化钠溶液。此外,通常可采用无菌固定油作为溶剂或悬浮介质。为此,可采用任何温和的固定油,其中包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸诸如油酸同样可以用于注射剂的制备中。

[0552] 可与载体物质组合以产生单一剂型的Ab-L1-CIDE的量将根据所治疗的宿主和特定的施用方式而变化。例如,用于人口服施用的延时释放制剂可含有约1mg至1000mg与适当和方便量的载体物质复配的活性物质,该载体物质可占总组合物的约5%至约95%(重量:重量)。药物组合物可制成提供易于测量的施用量。例如,用于静脉内输注的水溶液可每毫升溶液包含约3μg至500μg活性成分,以便可以约30mL/h的速率输注合适的体积。

[0553] 适于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性无菌注射溶液,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和溶质,从而使制剂与预期接受者的血液等渗,以及水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂和增稠剂。

[0554] 制剂可以包装在单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿瓶和小瓶中,并且可以在冷冻干燥(冻干)条件下储存,仅需要在使用前添加注射用无菌液体载体(例如水)。临时注射溶液和悬浮液由前述类型的无菌粉末、颗粒和片剂进行制备。优选的单位剂量制剂为那些包含每日剂量或单位每日亚剂量(如上文所引述)或其适当比例的活性成分的制剂。

[0555] 本发明的主题进一步提供了兽用组合物,所述兽用组合物包含至少一种如上定义的活性成分以及兽用载体。兽用载体为可用于施用组合物的材料,并且可以为固态、液态或气态材料,这些材料在兽医领域是惰性的或可接受的,并且与活性成分相容。这些兽用组合物可以经肠胃外或通过任何其他预期途径施用。

[0556] V.适应症和治疗方法

[0557] 设想到本文公开的Ab-L1-CIDE可用于治疗多种疾病或疾患。本文还提供了用于治疗的Ab-L1-CIDE或包含Ab-L1-CIDE的组合物。在一些实施例中,本文提供了用于治疗或预防如本文所公开的疾病和疾患的Ab-L1-CIDE或包含Ab-L1-CIDE的组合物。本文还提供了Ab-L1-CIDE或包含Ab-L1-CIDE的组合物在疗法中的用途。在一些实施例中,本文提供了Ab-L1-CIDE用于治疗或预防如本文所公开的疾病和疾患的用途。本文还提供了Ab-L1-CIDE或包含Ab-L1-CIDE的组合物在制造用于治疗或预防如本文所公开的疾病和疾患的药物中的用途。

[0558] 一般而言,待治疗的疾病或疾患为靶蛋白质依赖性疾病或疾患,例如过度增殖性疾病(诸如癌症)。本文中待治疗的癌症的实例包括BRM依赖性癌症。在某些实施例中,癌症为非小细胞肺癌。

[0559] 在某些实施例中,本文描述的主题涉及一种降低受试者的靶蛋白质的量的方法,该方法包括向受试者施用如本文所述的Ab-L1-CIDE或包含如本文所述的Ab-L1-CIDE的组合物,其中PB部分结合靶蛋白质,其中泛素连接酶引起结合的靶蛋白质的降解,其中靶蛋白质的水平被降低。

[0560] Ab-L1-CIDE可通过适合于待治疗病症的任何途径施用。Ab-L1-CIDE通常将经肠胃外施用,即输注、皮下、肌内、静脉内、皮内、鞘内和硬膜外施用。

[0561] Ab-L1-CIDE可在疗法中单独使用或与其他药剂组合使用。例如,Ab-L1-CIDE可与至少一种另外的治疗剂共同施用。上述此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包含在同一组合物或单独的制剂中)以及分开施用,在分开施用的情况下,Ab-L1-CIDE的施用可以在施用另外的治疗剂和/或佐剂之前、同时和/或之后发生。Ab-L1-CIDE也可与放射疗法组合使用。

[0562] Ab-L1-CIDE(和任何另外的治疗剂)可通过任何合适的方式施用,包括肠胃外、肺内和鼻内施用,并且如果需要局部治疗,则可以采用病灶内施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可通过任何合适的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射,部分取决于施用是短暂的还是长期的。本文设想到各种给药计划,包括但不限于在各个时间点处的单次或多次施用、推注施用,以及脉冲输注。

[0563] 为了预防或治疗疾病,Ab-L1-CIDE的适当剂量(当单独使用或与一种或多种另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、Ab-L1-CIDE的类型、疾病的严重程度和病程、施用Ab-L1-CIDE用于预防还是治疗目的、先前的治疗、患者的病史和对Ab-L1-CIDE的应答以及主治医师的酌处权。Ab-L1-CIDE适合一次或在一系列治疗中施用于患者。根据疾病的类型和严重程度的不同,约1μg/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg至10mg/kg)的Ab-L1-CIDE可为例如通过一次或多次单独施用或通过连续输注而施用于患者的初始候选剂量。根据上述因素,一种典型的日剂量可在约1μg/kg至100mg/kg或更多的范围内。对于数天或更长时间的重复施用,取决于病症,治疗通常会持续直至出现期望的疾病症状阻抑。Ab-L1-CIDE的

一种示例性剂量将在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此,可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或它们的任意组合)的一种或多种剂量。此类剂量可以间歇地施用,例如每周或每三周施用(例如,使得患者接受约两个至约二十个、或例如约六个剂量)。可施用初始较高的负荷剂量,随后施用一种或多种较低剂量。然而,可以使用其他给药方案。通过常规技术和测定可以容易地监测该疗法的进展。

[0564] 本文描述的方法包括降解靶蛋白质的方法。在某些实施例中,方法包括向受试者施用Ab-L1-CIDE,其中靶蛋白质被降解。蛋白质的降解水平可为约1%至约5%;或约1%至约10%;或约1%至约15%;或约1%至约20%;约1%至约30%;或约1%至约40%;约1%至约50%;或约10%至约20%;或约10%至约30%;或约10%至约40%;或约10%至约50%;或至少约1%;或至少约10%;或至少约20%;或至少约30%;或至少约40%;或至少约50%;或至少约60%;或至少约70%;或至少约80%;或至少约90%;或至少约95%;或至少约99%。

[0565] 本文描述的方法包括减少肿瘤组织(诸如非小细胞肺癌)增殖的方法。在某些实施例中,方法包括向受试者施用Ab-L1-CIDE,其中肿瘤组织的增殖减少。减少的程度可为约1%至约5%;或约1%至约10%;或约1%至约15%;或约1%至约20%;约1%至约30%;或约1%至约40%;约1%至约50%;或约10%至约20%;或约10%至约30%;或约10%至约40%;或约10%至约50%;或至少约1%;或至少约10%;或至少约20%;或至少约30%;或至少约40%;或至少约50%;或至少约60%;或至少约70%;或至少约80%;或至少约90%;或至少约95%;或至少约99%。

[0566] VI.制品

[0567] 在另一方面,本文描述了制品(例如,药盒),所述制品含有用于治疗上述疾病和疾患的材料。该药盒包括包含Ab-L1-CIDE的容器。该药盒可进一步包括在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包括的说明,其含有涉及此类治疗产品的使用的有关适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。

[0568] 合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡罩包装等。“小瓶”为适合于容纳液体或冻干制备物的容器。在一个实施例中,小瓶为一次性小瓶,例如带有瓶塞的20cc一次性小瓶。容器可以由各种材料诸如玻璃或塑料形成。容器可以容纳对病症治疗有效的Ab-L1-CIDE或其制剂,并且可以具有无菌进入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或带有皮下注射针可刺穿的塞子的小瓶)。

[0569] 组合物中的至少一种活性剂为Ab-L1-CIDE。标签或包装插页指示该组合物用于治疗所选择的病症(诸如癌症)。此外,标签或包装插页可以指示要治疗的患者是患有诸如过度增殖性疾患、神经变性、心脏肥大、疼痛、偏头痛或神经外伤性疾患或事件的疾患的患者。在一个实施例中,标签或包装插页指示包含Ab-L1-CIDE的组合物可用于治疗由异常细胞生长引起的疾患。标签或包装插页也可指示该组合物可用于治疗其他疾病。替代性地或另外地,制品可进一步包括第二容器,该第二容器包含药用缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏液和葡萄糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户角度所需的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0570] 药盒可进一步包括Ab-L1-CIDE和第二药物制剂(如果存在)的施用指导。例如,如果药盒包括包含Ab-L1-CIDE的第一组合物和第二药物制剂,则药盒可进一步包括向有此需

要的患者同时、按顺序或分开施用第一药物组合物和第二药物组合物的说明。

[0571] 在另一实施例中,药盒适用于递送固体口服形式的Ab-L1-CIDE,诸如片剂或胶囊剂。此类药盒优选地包括许多单位剂量。此类药盒可包括具有按照其预期用途的次序定向的剂量的卡。此类药盒的一个实例为“泡罩包装”。泡罩包装在包装行业中是众所周知的,并且广泛用于包装药物单位剂型。如果需要,可例如以数字、字母或其他标记的形式或用指定治疗时间表中可以施用剂量的日期的日历插入事件提供记忆辅助。

[0572] 根据一个实施例,药盒可包括(a)其中含有Ab-L1-CIDE的第一容器;以及任选的(b)其中含有第二药物制剂的第二容器,其中该第二药物制剂包含具有抗过度增殖活性的第二化合物。替代性地或另外地,药盒可进一步包括第三容器,该第三容器包含药用缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏液和葡萄糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户角度所需的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0573] 在其中药盒包括Ab-L1-CIDE和第二治疗剂的某些其他实施例中,该药盒可包含用于容纳单独的组合物的容器(诸如分开的瓶子或分开的箔包装),但是,单独的组合物也可以容纳在单个不分开的容器中。通常,药盒包括用于施用单独组分的说明。当单独的组分优选地以不同的剂型(例如,口服和肠胃外)施用时,以不同的剂量间隔施用时,或者当处方医师希望滴定组合的各种组分时,药盒形式是特别有利的。

[0574] VII.制备缀合物的方法

[0575] 合成路线

[0576] 本文描述的主题还涉及由L1-CIDE制备CIDE、L1-CIDE和Ab-L1-CIDE的方法。一般而言,该方法包括使抗体或其变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体与L1-CIDE在其中抗体共价结合至L1-CIDE上任何可用的连接点的条件下接触,其中制备了Ab-L1-CIDE。本文描述的主题还涉及由Ab-L1部分(即与L1共价连接的抗体、或其变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体)制备Ab-L1-CIDE的方法,该方法包括在一定条件下使CIDE与Ab-L1在其中CIDE共价结合至Ab-L1上任何可用的连接点的条件下接触,其中制备了Ab-L1-CIDE。该方法可以进一步包括Ab-L1-CIDE的常规分离和纯化。

[0577] CIDE、L1-CIDE和Ab-L1-CIDE以及本文描述的其他化合物可通过以下合成路线合成,该合成路线包括(特别是鉴于本文所包含的描述)与化学领域公知的工艺类似的工艺,以及以下描述的用于其他杂环的那些工艺:Comprehensive Heterocyclic Chemistry II,Katritzky和Rees编,Elsevier,1997,例如第3卷;Liebigs Annalen der Chemie,(9):1910-16,(1985);Helvetica Chimica Acta,41:1052-60,(1958);Arzneimittel-Forschung,40(12):1328-31,(1990)。起始材料通常可从商业来源获得,诸如Aldrich Chemicals(Milwaukee,WI),或易于使用本领域技术人员众所周知的方法制备(例如,通过以下通常所述的方法进行制备:Louis F.Fieser和Mary Fieser,Reagents for Organic Synthesis,v.1-23,Wiley,N.Y.(1967-2006);或Beilsteins Handbuch der organischen Chemie,4,Aufl.编,Springer-Verlag,Berlin,包括增刊(还可通过Beilstein在线数据库获得))。

[0578] 可用于合成本文描述的CIDE、L1-CIDE和Ab-L1-CIDE以及其他化合物的合成化学转化和保护基团方法(保护和脱保护)以及必要的试剂和中间体在本领域中是已知的,并且包括例如以下文献中描述的那些:R.Larock,Comprehensive Organic Transformations,

VCH Publishers(1989);T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,第3版,John Wiley and Sons(1999);以及L.Paquette编,Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis,John Wiley and Sons(1995),及其后续版本。在制备CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE以及其他化合物时,可能需要保护中间体的远端官能团(例如,伯胺或仲胺)。此类保护的需求将根据远端官能度的性质以及制备方法的条件而有所不同。合适的氨基保护基团包括乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧基羰基(BOC)、苄氧基羰基(CBz或CBZ)和9-芴基亚甲基氧羰基(Fmoc)。本领域技术人员容易确定是否需要此类保护。有关保护基团及其使用的一般说明,参见:T.W.Greene,Protective Groups in Organic Synthesis,John Wiley&Sons,New York,1991。

[0579] 一般程序和实例提供了制备本文描述的CIDE、L1-CIDE和Ab-L1-CIDE以及其他化合物的示例性方法。本领域技术人员将认识到,可以使用其他合成路线以合成Ab-L1-CIDE和化合物。尽管在方案、一般程序、实例中描绘和讨论了具体的起始材料和试剂,但是可容易替代为其他起始材料和试剂以提供各种衍生物和/或反应条件。此外,根据本公开,可使用本领域技术人员众所周知的常规化学方法进一步修饰通过所述方法制备的许多示例性化合物。

[0580] 一般而言,Ab-L1-CIDE可通过以下方法来制备:按照WO 2013/055987、WO 2015/023355、WO 2010/009124、WO 2015/095227的程序将CIDE与L1接头试剂连接以制备L1-CIDE,然后使L1-CIDE与本文描述的任何抗体或其变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体(包括经半胱氨酸工程化的抗体)结合。替代性地,Ab-CIDE可通过以下方法来制备:首先将本文描述的抗体或其变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体(包括经半胱氨酸工程化的抗体)与L1接头试剂连接,然后使其与任何CIDE缀合。

[0581] 以下合成路线描述了制备CIDE、L1-CIDE和Ab-L1-CIDE以及其他化合物及其组分的示例性方法。本文其他地方公开了用于制备CIDE、L1-CIDE和Ab-L1-CIDE以及其他化合物及其组分的其他合成路线。

[0582] 1.经半胱氨酸工程化的抗体

[0583] 经半胱氨酸工程化的抗体(THIOMABs™)可使用标准方法经重组表达和纯化,并且一般而言可如下所述通过还原和再氧化进行制备以用于缀合。

[0584] 经重组表达的全长半胱氨酸改造的单克隆抗体(THIOMAB™抗体)带有半胱氨酸加合物(胱氨酸),或者由于细胞培养条件而在经工程化的半胱氨酸上被谷胱甘肽化。如此,由标准哺乳动物细胞系纯化的THIOMAB™抗体不能缀合至Cys反应性接头L1-CIDE中间体。可以通过用还原剂诸如DTT(克莱兰试剂,二硫苏糖醇)或TCEP(三(2-羧基乙基)膦盐酸盐;Getz等人(1999)Anal.Biochem.第273卷:73-80;Soltec Ventures,Beverly,MA)处理,随后用温和的氧化剂(诸如脱氢抗坏血酸)重新形成链间二硫键(再氧化),使半胱氨酸工程化的抗体具有反应性以与本文描述的L1-PCIDE中间体缀合。将在CHO细胞中表达的全长半胱氨酸工程化的单克隆抗体(THIOMAB™抗体)(Gomez等人(2010)Biotechnology and Bioeng.105(4):748-760;Gomez等人(2010)Biotechnol.Prog.26:1438-1445)还原,例如在室温在50mM Tris(pH 8.0)和2mM EDTA中用约50倍过量的DTT过夜还原,其去除Cys和谷胱甘肽加合物并且减少抗体的链间二硫键。通过反相LCMS使用PLRP-S柱监测加合物的去除。

[0585] 去除Cys和谷胱甘肽加合物后,THIOMAB™抗体可通过本领域中公知的方法纯化,此

类方法包括本文所阐述的阳离子交换色谱。可通过添加至少四倍体积的10mM琥珀酸盐(pH 5)并且用10％乙酸滴定直至pH为大约5,对还原的THIOMAB™进行稀释和酸化。随后可将pH降低并且经稀释的THIOMAB™抗体加载到HiTrap S阳离子交换柱上,用几倍柱体积的10mM乙酸钠(pH 5)洗涤,并且用50mM Tris(pH 8.0)、150mM氯化钠洗脱。可通过再氧化,在亲本Mab中存在的半胱氨酸残基之间重建二硫键。将上述洗脱的经还原的THIOMAB™抗体用15X脱氢抗坏血酸(DHAA)处理约3小时,或者替代性地,用200nM至2mM硫酸铜水溶液($CuSO_4$)在室温处理过夜。可以使用本领域已知的其他氧化剂(即氧化试剂)和氧化条件。环境空气氧化也可能是有效的。这种温和的部分再氧化步骤以高保真度有效形成链内二硫键。可通过反相LCMS使用PLRP-S柱监测再氧化。可将再氧化的THIOMAB™抗体用琥珀酸盐缓冲剂(如上所述)稀释以使pH达到大约5,随后如上所述在S柱上进行纯化,不同之处在于用10mM琥珀酸盐(pH 5)、300mM氯化钠(缓冲剂B)和10mM琥珀酸盐(pH 5)(缓冲剂A)的梯度进行洗脱。可向经洗脱的Thiomab™抗体中加入EDTA至最终浓度为2mM。如有必要,可浓缩THIOMAB™以达到超过5mg/mL的最终浓度。所得THIOMAB™抗体储存于-20℃或-80℃,准备用于缀合。可在6200系列TOF或QTOF Agilent LC/MS上进行液相色谱/质谱分析。样品在加热至80℃的PRLP-S® 1000A微孔柱(50mm×2.1mm,Polymer Laboratories,Shropshire,UK)上进行色谱分离。可使用30％至40％B(溶剂A:含有0.05％TFA的水,溶剂B:含有0.04％TFA的乙腈)的线性梯度,并且使用电喷雾离子源直接电离洗脱液。通过MassHunter软件(Agilent)采集数据并且进行解卷积。在LC/MS分析之前,可将抗体(50微克)用PNGase F(2单位/ml;PROzyme,San Leandro,CA)在37℃处理2小时以去除N-连接的碳水化合物。

[0586] 替代性地,可将抗体用LysC(每50μg(微克)抗体0.25μg)在37℃部分消化15分钟,以得到Fab和Fc片段,用于通过LCMS进行分析。

[0587] 2.接头L1-CIDE基团与抗体的缀合

[0588] 在将接头L1-PCIDE化合物缀合至抗体的一种方法中,经上述还原和再氧化程序后,将经半胱氨酸工程化的抗体(THIOMAB™抗体)在10mM琥珀酸盐(pH 5)、150mM NaCl、2mM EDTA中用1M Tris调节pH至pH 7.5至8.5。将过量的约3摩尔至20当量的具有硫醇反应性基团的接头-PCIDE中间体(例如,马来酰亚胺或4-硝基吡啶基二硫化物或甲烷硫代磺酰基(MTS)二硫化物)在具有或不具有丙二醇的情况下溶于DMF或DMA中,然后加入经还原、再氧化和pH调节的抗体中。将反应在室温或37℃孵育并且监测直至完成(1小时至约24小时),如通过反应混合物的LC-MS分析所确定的。反应完成后,可通过一种方法或几种方法的任意组合纯化缀合物,目的是去除残留的未反应的L1-PCIDE中间体和聚集蛋白质(如果以显著的量存在)。例如,可将缀合物用10mM组氨酸-乙酸盐(pH 5.5)稀释,直至最终pH值为大约5.5,然后通过S阳离子交换色谱使用连接至Akta纯化系统(GE Healthcare)的HiTrap S柱或S maxi离心柱(Pierce)进行纯化。替代性地,可将缀合物可通过凝胶过滤色谱,使用连接至Akta纯化系统的S200柱或Zeba离心柱纯化。替代性地,透析可用于去除未反应或过量的接头药物。可使用凝胶过滤或透析法,将THIOMAB™抗体PCIDE缀合物用含有240mM蔗糖的20mM组氨酸/醋酸盐(pH 5)配制。可将纯化的缀合物通过离心超滤浓缩,和/或在无菌条件下通过0.2μm过滤器过滤,并且冷冻储存。通过BCA测定法表征Ab-L1-PCIDE以确定蛋白质浓度,通过分析型SEC(体积排阻色谱)进行聚集分析,并且用赖氨酸C内肽酶(LysC)处理或使用标准程序进行还原后进行LC-MS分析以计算DAR。

[0589] 使用Shodex KW802.5色谱柱,以0.75ml/min流速的包含0.25mM氯化钾和15％IPA的0.2M磷酸钾(pH 6.2)对缀合物进行体积排阻色谱分析。通过280nm处洗脱的峰面积吸光度的积分来确定缀合物的聚集状态。

[0590] 可使用Agilent QTOF 6520ESI仪器对Ab-L1-PCIDE进行LC-MS分析。例如,在37℃,将Ab-L1-PCIDE用1:500w/w胞内蛋白酶Lys C(Promega)在Tris(pH 7.5)中处理30min。将所得切割片段加载到加热至80℃的1000Å(埃)、8μm(微米)PLRP-S(高度交联聚苯乙烯)柱上,并且用在5分钟内由30％B增加至40％B的梯度洗脱。流动相A为含有0.05％TFA的H_2O,流动相B为含有0.04％TFA的乙腈。流速为0.5ml/min。在电喷雾电离和MS分析之前,通过在280nm处的UV吸光度检测来监测蛋白质洗脱。通常可以实现对未缀合的Fc片段、残留的未缀合Fab和药物化Fab的色谱分离。使用Mass Hunter™软件(Agilent Technologies)对获得的m/z谱图解卷积以计算抗体片段的质量数。可对解卷积的LCMS谱图中的峰进行分配和定量。通过计算对应于PCIDE-缀合抗体的一个或多个峰相对于观察到的所有峰的强度比值,计算出PCIDE与抗体的比率(DAR)。

[0591] 3.制备E3LB-L2中间体的L2至E3LB的一般合成偶联

[0592] 在某些实施例中,首先使L2与第一合适的溶剂、第一碱和第一偶联试剂接触以制备第一溶液。在某些实施例中,在室温(约25℃)使L2与第一合适的溶剂、第一碱和第一偶联试剂接触持续约15分钟。然后使E3LB与所述第一溶液接触。

[0593] 在某些实施例中,在室温(约25℃)时E3LB与第一溶液接触持续约一小时。然后将溶液浓缩并且任选地纯化。

[0594] 在某些实施例中,L2与第一碱与第一偶联试剂的摩尔比为约1:4:1.19。在某些实施例中,L2与第一碱与第一偶联试剂的摩尔比为约1:2:0.5、约1:3:1、约1:4:2、约1:5:3或约1:6:4。

[0595] 在某些实施例中,L2与E3LB的摩尔比为约1:1。在某些实施例中,L2与E3LB的摩尔比为约1:0.5、约1:0.75、约1:2或约0.5:1。

[0596] 4.将E3LB-L2中间体偶联至PB的一般合成方法

[0597] 在某些实施例中,将E3LB-L2中间体偶联至PB以制备CIDE。在某些实施例中,首先使PB与第二合适的溶剂、第二碱和第二偶联试剂接触。在某些实施例中,接触在室温(约25℃)持续约10分钟。然后使溶液与E3LB-L2中间体接触。在某些实施例中,在室温(约25℃)时第二溶液与E3LB-L2中间体接触持续约1小时。然后将溶液浓缩并且任选地纯化以制备CIDE。

[0598] 在某些实施例中,PB与第二碱与第二偶联试剂的摩尔比为约1:4:1.2。在某些实施例中,PB与第二碱与第二偶联试剂的摩尔比为约1:3:0.75、约1:5:1、约1:3:2或约1:5:3。

[0599] 在某些实施例中,PB与E3LB-L2中间体的摩尔比为约1:1。在某些实施例中,PB与E3LB-L2中间体的摩尔比为约1:0.5、约1:0.75、约1:2或约0.5:1。

[0600] 5.将CIDE偶联至L1以制备L1-CIDE的一般合成方法

[0601] 在某些实施例中,使CIDE与L1和第三碱在第三合适的溶剂中接触以制备溶液。在某些实施例中,接触在约(约25℃)持续约2小时。然后可任选地将溶液纯化以制备L1-CIDE。

[0602] 在某些实施例中,CIDE与L1的摩尔比为约1:4。在某些实施例中,CIDE与L1的摩尔比为约1:1、1:2、1:3、1:5、1:6、1:7或约1:8。

[0603] 6.将L1-CIDE偶联至抗体的一般合成方法

[0604] 在某些实施例中,使L1-CIDE与硫醇和第四合适的溶剂接触以形成第四溶液。然后使该溶液与抗体接触以制备缀合物。在某些实施例中,

[0605] 在某些实施例中,硫醇为马来酰亚胺或4-硝基吡啶基二硫化物。在某些实施例中,合适的溶剂选自由二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺和丙二醇组成的组。

[0606] 在某些实施例中,L1-CIDE与硫醇反应性基团的摩尔比为约3:1至约20:1。

[0607] 在某些实施例中,使包含L1-CIDE、硫醇反应性基团和合适的溶剂的溶液与抗体接触持续约1小时至约24小时。在某些实施例中,包含L1-CIDE的溶液、硫醇反应性基团和合适的溶剂与抗体的接触在约室温(约25℃)至约37℃进行。

[0608] 在上述一般方法的某些实施例中,合适的溶剂为极性非质子溶剂,选自由以下项组成的组:二甲基甲酰胺、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、二甲基亚砜和碳酸丙烯酯。

[0609] 在上述一般方法的某些实施例中,碱选自由N,N-二异丙基乙胺(DIEA)、三乙胺和2,2,2,6,6-四甲基哌啶组成的组。在某些实施例中,偶联试剂选自由以下项组成的组:1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化六氟磷酸盐(HATU)、(苯并三唑-1-基氧基)三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐(BOP)、(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷磷六氟磷酸盐(PyAOP)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)、O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)、O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HCTU)、O-(N-琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(TSTU)、O-(5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚氨基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TNTU)、O-(1,2-二氢-2-氧代-1-吡啶基-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸盐(TPTU)和羰基二咪唑(CDI)。

[0610] 在上述一般方法的某些实施例中,接触持续约30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、20小时、40小时、60小时或72小时。

[0611] 在上述一般方法的某些实施例中,接触在约20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃、30℃、31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃、42℃、43℃、44℃、45℃、46℃、47℃、48℃、49℃、50℃、60℃C、70℃、80℃、90℃或100℃进行。

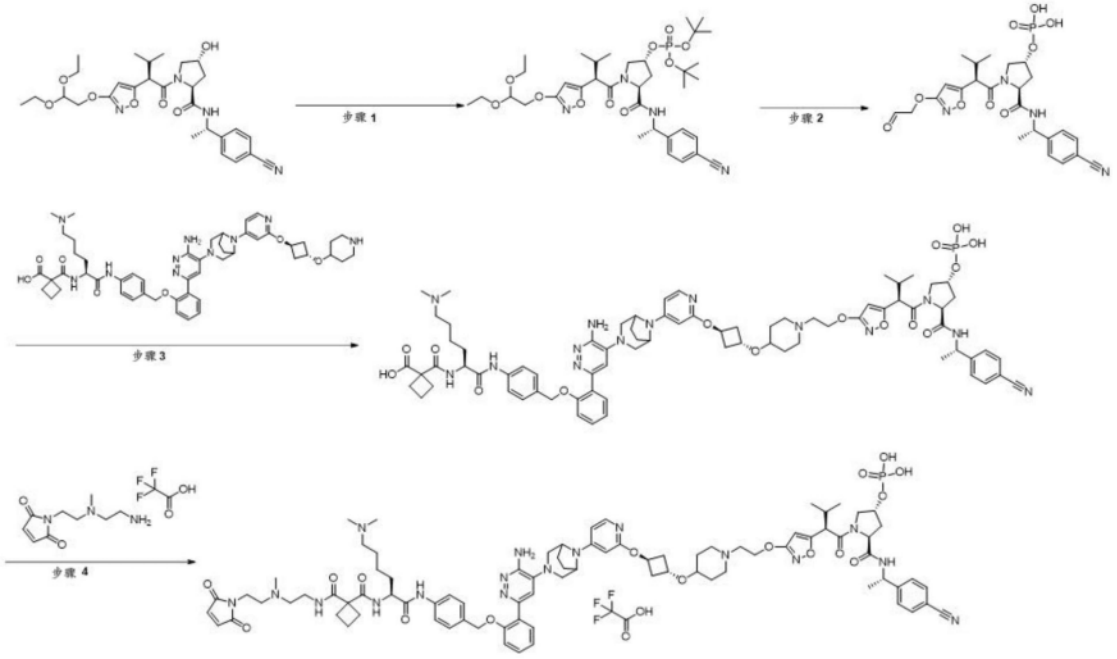
[0612] 以下实例以说明的方式而非以限制的方式提供。

[0613] 实例

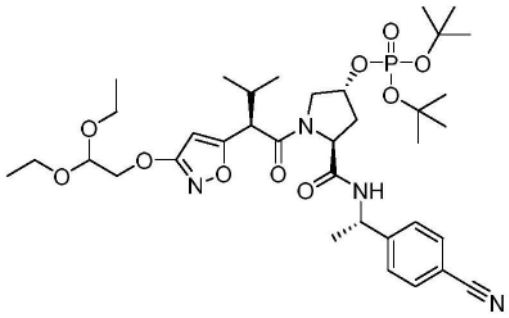
[0614] 实例1

[0615] L1Hy-PE-CIDE-1的合成

[0616] L1Hy-PE-CIDE-1:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-(4-((1r,3R)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)氨基)乙基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

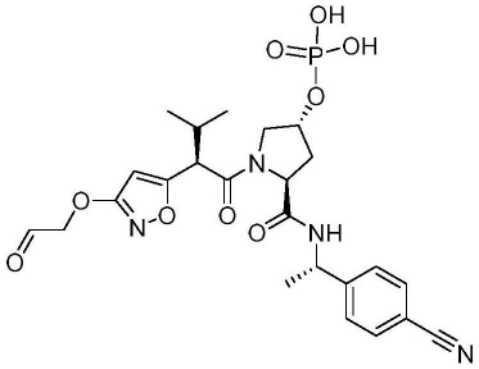
[0617] 

[0618] 步骤1:((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)吡咯烷-3-基)磷酸二叔丁酯

[0619] 

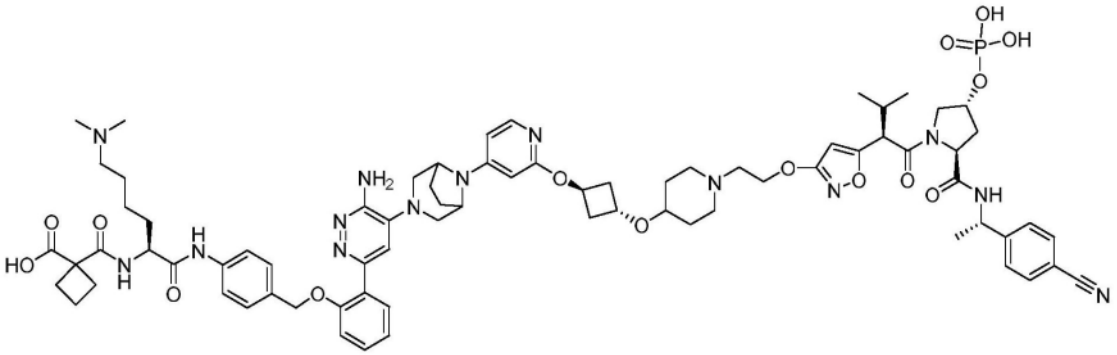
[0620] 在氮气下,在0℃向(2S,4R)-N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺(500mg,0.921mmol)和1H-四唑(6.1mL,0.45M,在ACN中)在THF(15mL)中的溶液加入二异丙基亚磷酰胺二叔丁酯(511mg,1.84mmol)。将所得溶液在室温搅拌过夜。然后在-30℃加入t-BuOOH(5M,在癸烷中)(0.74mL,3.69mmol),并且在室温搅拌5h。将反应用$NaHSO_3$淬灭。将所得溶液用EtOAc萃取,并且将有机层合并。有机层经无水硫酸钠干燥,并且在真空下浓缩。将残余物通过硅胶快速色谱(梯度:0%至87%乙酸乙酯/石油醚)纯化,以得到420mg(产率62%)标题化合物,其为无色油状物。LC-MS:(ESI,m/z):$[M+H]^+$=735。

[0621] 步骤2:(3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯

[0622] 

[0623] 在氮气下,将((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)吡咯烷-3-基)磷酸二叔丁酯(70.0mg,0.100mmol)在HCOOH(0.5mL)和水(0.5mL)中的溶液在60℃搅拌1h。将溶液在真空下浓缩,以得到50mg(粗制)标题化合物,其为固体。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]$^+$=549。

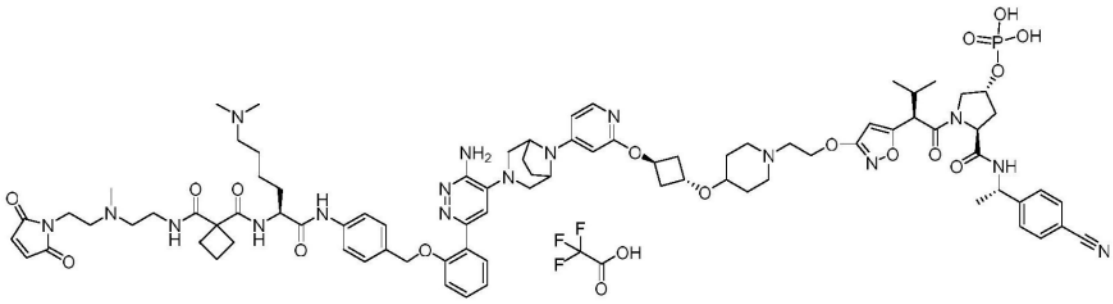
[0624] 步骤3:1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0625] 

[0626] 在氮气下,将(3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(62.8mg,0.115mmol)、1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(哌啶-4-基氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(56.0mg,0.0602mmol)、CH_3COONa(14.9mg,0.182mmol)在甲醇(1.5mL)和二氯甲烷(0.5ml)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(5.6mg,0.0891mmol),并且在室温搅拌3小时。将反应通过水淬灭。将反应混合物在真空下浓缩。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%ACN的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到60mg(产率65%)标题化合物,其为白色固体。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]$^+$=1464。

[0627] 步骤4:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-(4-((1r,3R)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)氨基)乙基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-基)乙氧基)异噁

唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

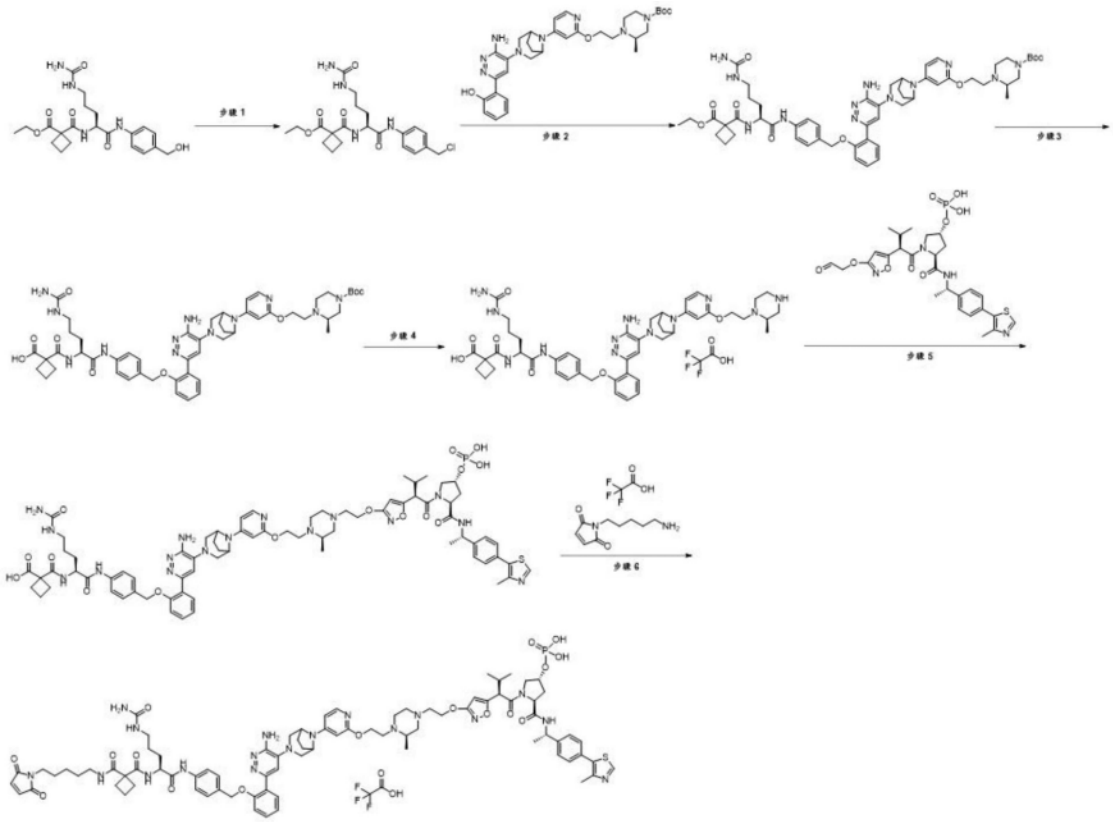
[0628] 

[0629] 在室温向1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(60.0mg,0.0410mmol)、1-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(10.5mg,粗品)和DIPEA(54.2mg,0.420mmol)在DMF(1mL)中的溶液加入HATU(18.7mg,0.0492mmol)。将反应在室温搅拌10分钟。将粗品通过制备型HPLC(柱:Xselect CSH C18 OBD柱30×150mm5μm,n;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在12min内由14%增加至23%,保持23%B;波长:254/220nm;R_{T1}(min):11.75min)纯化,以得到20.3mg(产率30%)L1Hy-PE-CIDE-1,其为白色固体。LC-MS:(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1643。^1H NMR(300MHz,DMSO-d_6)δ10.24(s,1H),9.67(s,1H),8.56(d,J=7.3Hz,1H),8.12(s,1H),7.88-7.73(m,4H),7.68-7.49(m,4H),7.49-7.25(m,6H),7.20-6.80(m,4H),6.61(s,1H),6.21-5.95(m,2H),5.30-5.00(m,3H),4.90(t,J=6.9Hz,1H),4.76(s,1H),4.52-4.27(m,7H),3.76-3.67(m,6H),3.55-3.40(m,9H),3.30-3.20(m,5H),3.15-2.95(m,5H),2.81(s,3H),2.73(s,6H),2.45-2.30(m,9H),2.01-1.54(m,15H),1.49-1.20(m,5H),0.94(d,J=6.4Hz,3H),0.79(d,J=7.0Hz,3H)。

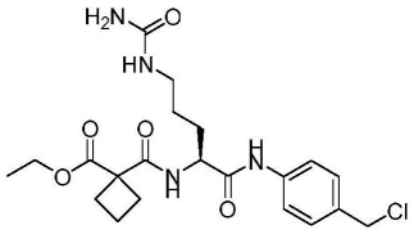
[0630] 实例2

[0631] L1-PE-CIDE-2的合成

[0632] L1-PE-CIDE-2:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

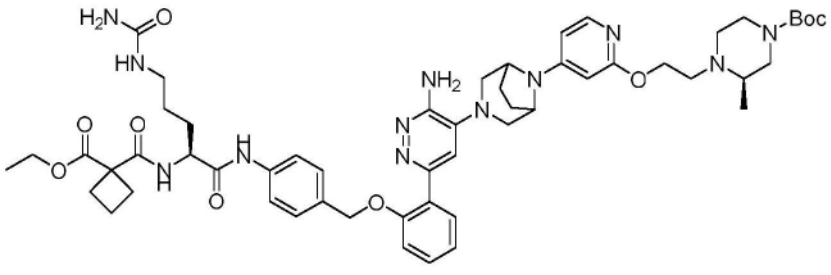
[0633] 

[0634] 步骤1:(S)-1-((1-((4-(氯甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯

[0635] 

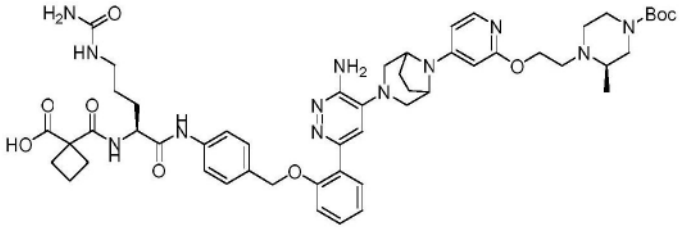
[0636] 在0℃向(S)-1-((1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(1.00g,2.30mmol)在THF(10mL)中的溶液加入$SOCl_2$(0.830g,6.97mmol)。将反应在室温搅拌1h。在0℃加入MeOH以淬灭反应。使溶剂蒸发,并且将粗品通过硅胶快速色谱(溶剂梯度:含有0%至10%MeOH的DCM)纯化,以得到910mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=453。

[0637] 步骤2:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0638] 

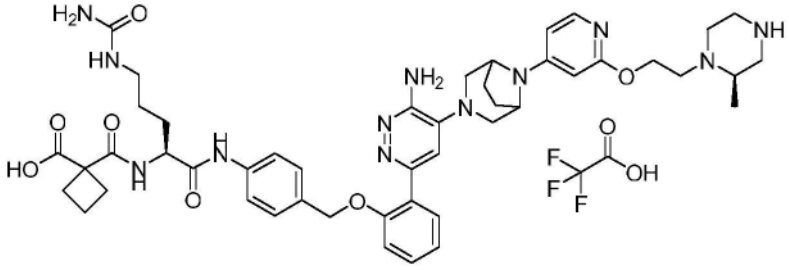
[0639] 在氮气下,在0℃向(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.15g,1.86mmol)和Cs_2CO_3(1.22g,3.74mmol)在DMF(10mL)中的溶液加入(S)-1-((1-((4-(氯甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(850mg,1.87mmol)。将反应在0℃搅拌15min。加入EtOAc并且用水进行洗涤。有机层经无水Na_2SO_4干燥,并且在真空下浓缩。将粗品通过硅胶快速色谱(溶剂梯度:含有0%至15%MeOH的DCM)纯化,以得到690mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1034。

[0640] 步骤3:1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(叔丁氧基羰基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0641] 

[0642] 将(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(690mg,0.670mmol)和$LiOH \cdot H_2O$(84.2mg,2.00mmol)在THF(10mL)和水(10mL)中的溶液在室温搅拌1h。将粗品通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到600mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1006。

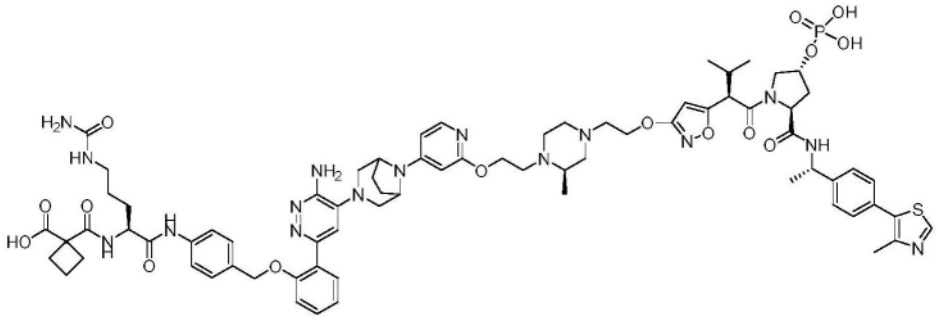
[0643] 步骤4:1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0644] 

[0645] 将1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(叔丁氧基羰基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(300mg,0.300mmol)在含有5%HFIP的TFA(9mL)中的溶液在室温搅拌1h。使溶剂蒸发,并且将粗品直接用于下一步骤中。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=906。

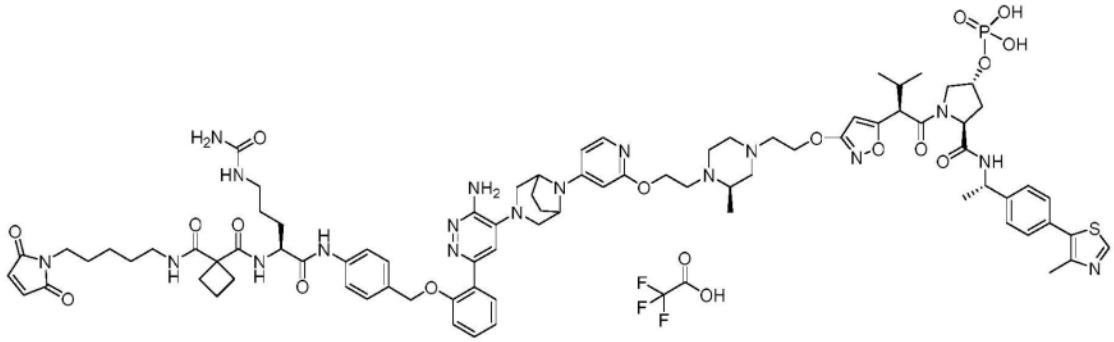
[0646] 步骤5:1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨

基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0647] 

[0648] 将1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(2,2,2-三氟乙酸盐)(来自最后一步的粗品)、(3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(309mg,0.498mmol)和NaOAc(60.0mg,0.731mmol)在MeOH(10mL)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(32.0mg,0.510mmol),并且在室温搅拌1h。将粗品通过预填充的C18柱(含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到324mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1510。

[0649] 步骤6:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0650] 

[0651] 将1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(324mg,0.210mmol)、1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(90.9mg,粗品)、HATU(106mg,0.280mmol)和DIPEA(277mg,2.15mmol)在DMF中的溶液在室温搅拌15min。将粗品通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:Xselect CSH C18 OBD柱30×150mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流

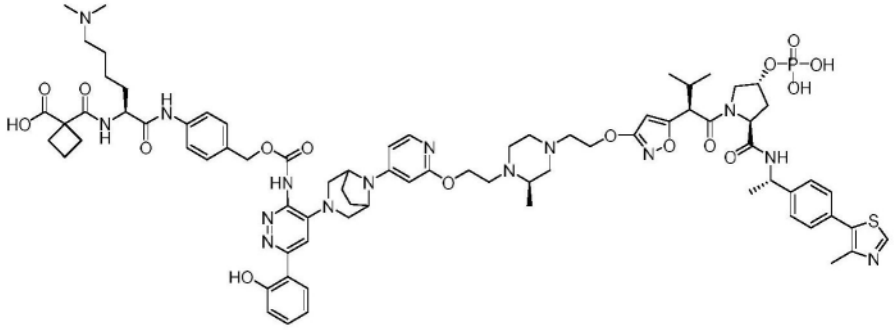
速:60mL/min;梯度:B在10min内由19%B增加至32%B,保持32%B;254/220nm;R_T(min):10,以得到173.7mg L1-PE-CIDE-2,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1674。^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6,ppm)δ10.18(s,1H),9.00(d,J=1.8Hz,1H),8.47(d,J=7.7Hz,1H),7.91(d,J=6.4Hz,1H),7.82(q,J=8.0,6.7Hz,2H),7.67(d,J=8.3Hz,2H),7.58(d,J=7.8Hz,2H),7.53-7.25(m,8H),7.16(t,J=7.5Hz,1H),6.98(s,3H),6.71(s,1H),6.35(s,1H),6.12(s,1H),6.01(s,1H),5.44(s,1H),5.10(s,2H),4.92(t,J=7.2Hz,1H),4.83-4.70(m,2H),4.58(s,2H),4.47(s,2H),4.45-4.30(m,3H),3.78-3.67(m,11H),3.40-3.35(m,4H),3.25-3.17(m,3H),3.13-3.05(m,5H),3.00-2.92(m,2H),2.85-2.75(m,1H),2.50-2.28(m,9H),2.10-1.85(m,4H),1.79-1.70(m,3H),1.69(s,1H),1.53-1.30(m,9H),1.27-1.10(m,5H),0.98(d,J=6.5Hz,3H),0.85-0.75(m,3H)。

[0652] 实例3

[0653] L1-PE-CIDE-3的合成

[0654] L1-PE-CIDE-3:4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基(6-(2-羟基苯基)-4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酸盐(2,2,2-三氟乙酸盐)

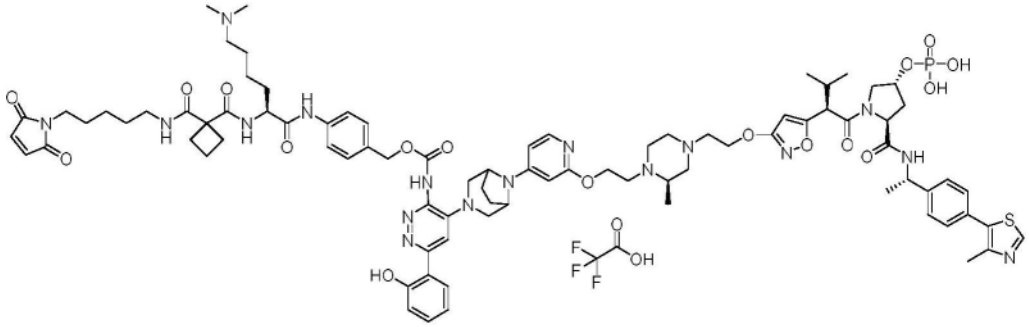
[0655] 步骤1:1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((6-(2-羟基苯基)-4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0656] 

[0657] 在氮气下,将1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((6-(2-羟基苯基)-4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(50.0mg,0.0527mmol)、与实例3a中所述相同的INT、(3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(26.0mg,0.0419mmol)、HOAc(9.5mg,0.157mmol)在MeOH(3mL)和DCM(1ml)中的溶液在30℃搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(6.6mg,0.105mmol),并且在30℃搅拌0.5h。将反应溶液在真空下浓缩。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%CH_3OH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到23.0mg标题化合物,其为白色固体。LCMS

(ESI)[M+H]$^+$=1553。

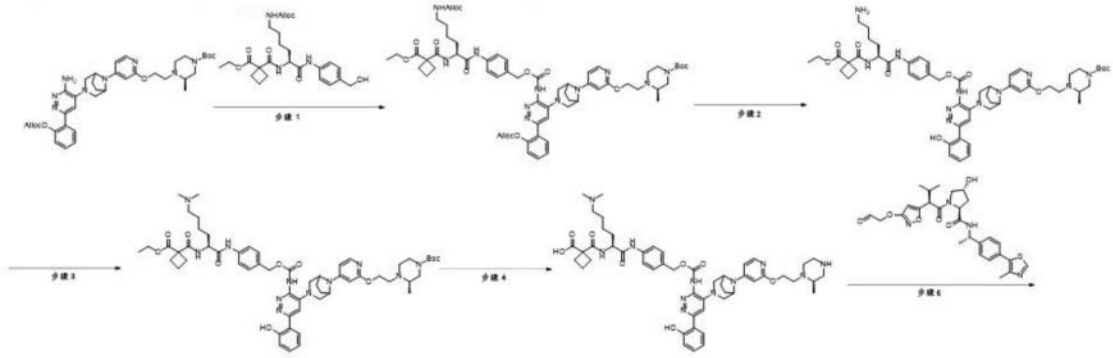
[0658] 步骤2:4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基(6-(2-羟基苯基)-4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0659] 

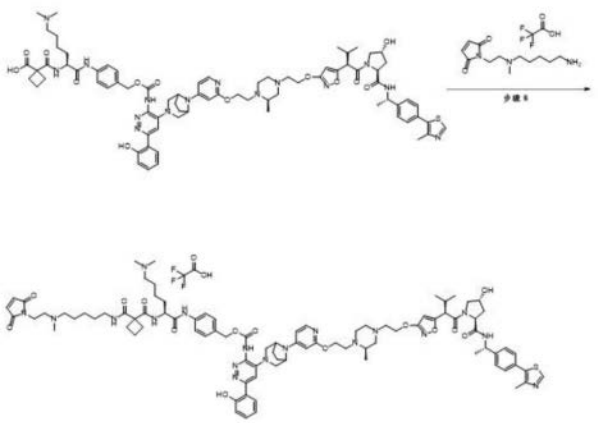
[0660] 将1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((6-(2-羟基苯基)-4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(23.0mg,0.0148mmol)、1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(5.5mg,粗品)、HATU(7.3mg,0.0192mmol)和DIPEA(19.8mg,0.153mmol)在DMF(1mL)中的溶液在室温搅拌10min。将粗品通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:Xselect CSH C18 OBD柱30×150mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在12min内由18%增加至30%,保持30%B;波长:254/220nm;R_T(min):11,以得到8.7mg L1-PE-CIDE-3,其为白色固体。LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1717。^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6,ppm)δ10.15(s,1H),10.07(s,1H),9.37(br,1H),8.95(s,1H),8.48(d,J=7.6Hz,1H),8.00-7.80(m,4H),7.66-7.57(m,3H),7.49-7.28(m,6H),7.02-6.89(m,4H),6.78(d,J=7.1Hz,1H),6.44(s,1H),6.10(s,1H),5.10(s,2H),4.89(t,J=6.9Hz,1H),4.80(s,1H),4.73(s,2H),4.50-4.30(m,6H),3.85-3.63(m,9H),3.52-3.45(m,3H),3.35(t,J=7.0Hz,3H),3.20-2.98(m,8H),2.90-2.70(m,8H),2.48-2.34(m,9H),1.93(s,4H),1.83-1.55(m,6H),1.49-1.32(m,8H),1.28-1.13(m,6H),0.94(d,J=6.4Hz,3H),0.85-0.74(m,3H)。

[0661] 实例3a

[0662] 4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)氨基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基(4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

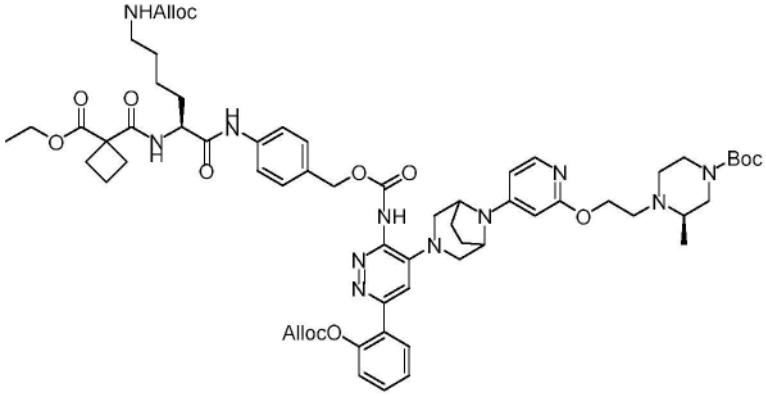


[0663]



[0664] 步骤1:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-(((烯丙基氧基)羰基)氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

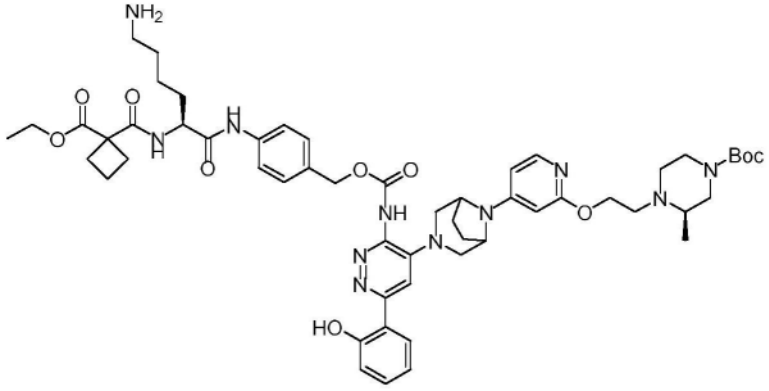
[0665]



[0666] 在氮气下,在0℃向(3R)-4-(2-((4-(3-(6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)-3-氨基哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(500mg,0.714mmol)、(S)-1-((6-(((烯丙基氧基)羰基)氨基)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(1.05g,2.15mmol)和DIPEA(554mg,4.29mmol)在DCM(15mL)中的溶液加入三光气(109mg,0.367mmol)在DCM(1mL)中的溶液。将反应在室温搅拌2h。将溶剂在真空下浓缩。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%CH_3CN的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到480mg(产率55%)标题化合物,其为白色固体。LC-MS:(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1216。

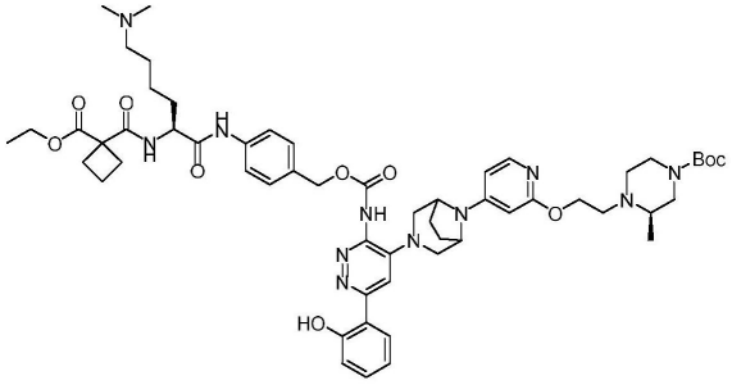
[0667] 步骤2:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-氨基-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-

1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0668] 

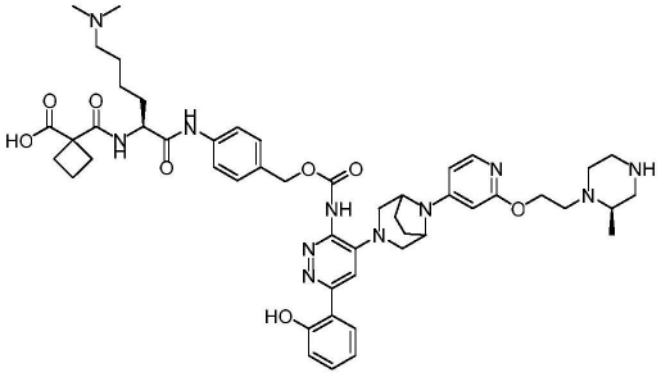
[0669] 在氮气下,在室温向(3R)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-(((烯丙基氧基)羰基)氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(400mg,0.329mmol)、吡咯烷(234mg,3.29mmol)在DCM(5mL)中的溶液加入Pd(PPh$_3$)$_4$(76.0mg,0.0658mmol)。将反应在室温搅拌1h。将反应混合物用DCM(100mL)稀释并且用水洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥,并且在真空下浓缩,以得到390mg(粗制)标题化合物,其为黄色固体。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]$^+$=1048。

[0670] 步骤3:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0671] 

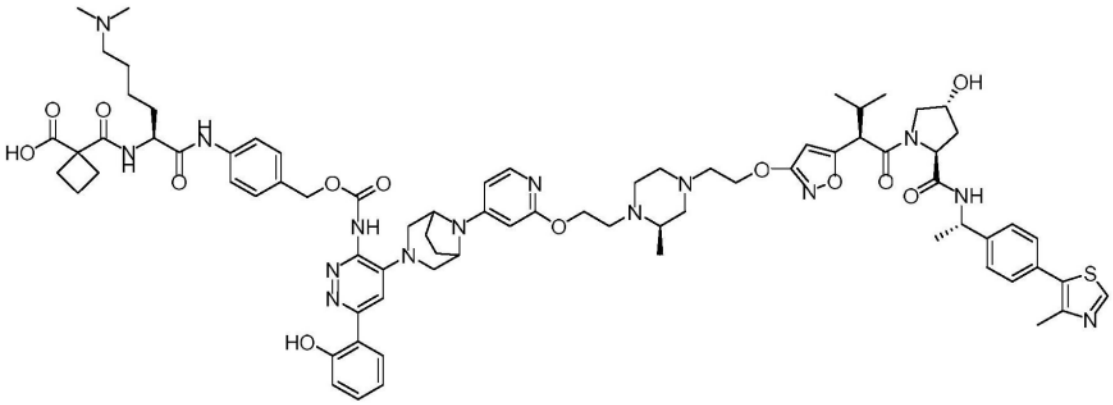
[0672] 将(3R)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-氨基-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(465mg,0.440mmol)和37%水性CH_2O(465mg,5.73mmol)在CH_3OH(5mL)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(140mg,2.22mmol),并且在室温搅拌1h。将反应通过水(0.2mL)淬灭。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到260mg(产率54%)标题化合物,其为白色固体。LC-MS:(ESI,m/z):[M]$^+$=1077。

[0673] 步骤4:1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((6-(2-羟基苯基)-4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0674] 

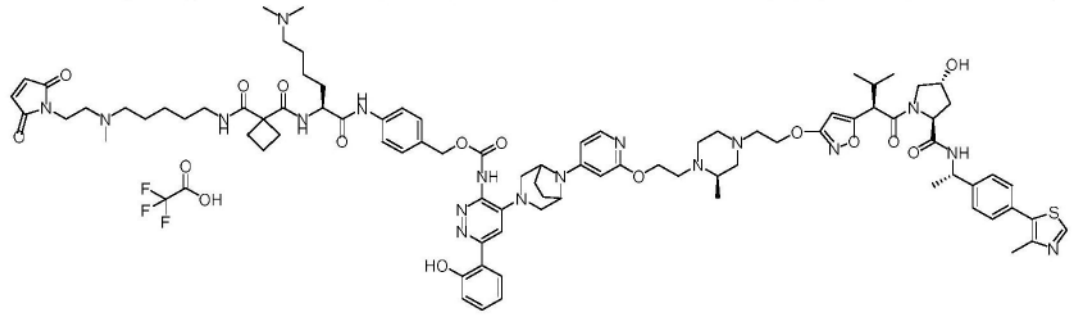
[0675] 将(3R)-4-(2-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(75.0mg,0.0697mmol)和LiOH•H_2O(8.4mg,0.210mmol)在THF(5mL)和水(5mL)中的溶液在室温搅拌1h。将溶剂在真空下浓缩。然后加入含有5%TFA的HFIP(3mL),并且将溶液在室温搅拌1h。将溶剂在真空下浓缩。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到55.0mg(产率83%)标题化合物,其为白色固体。LC-MS:(ESI,m/z):$[M]^+$=949。

[0676] 步骤5:1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0677] 

[0678] 在氮气下,将1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((6-(2-羟基苯基)-4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(20.0g,0.0211mmol)、(2S,4R)-4-羟基-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-甲酰胺(19.4mg,0.0359mmol)和NaOAc(4.0mg,0.0488mmol)在甲醇(1.5mL)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(5.2mg,0.0827mol),并且在室温搅拌3h。将反应溶液在真空下浓缩。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%CH_3OH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到18mg(产率58%)标题化合物,其为白色固体。LC-MS:(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1473。

[0679] 步骤6:4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)氨基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基(4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

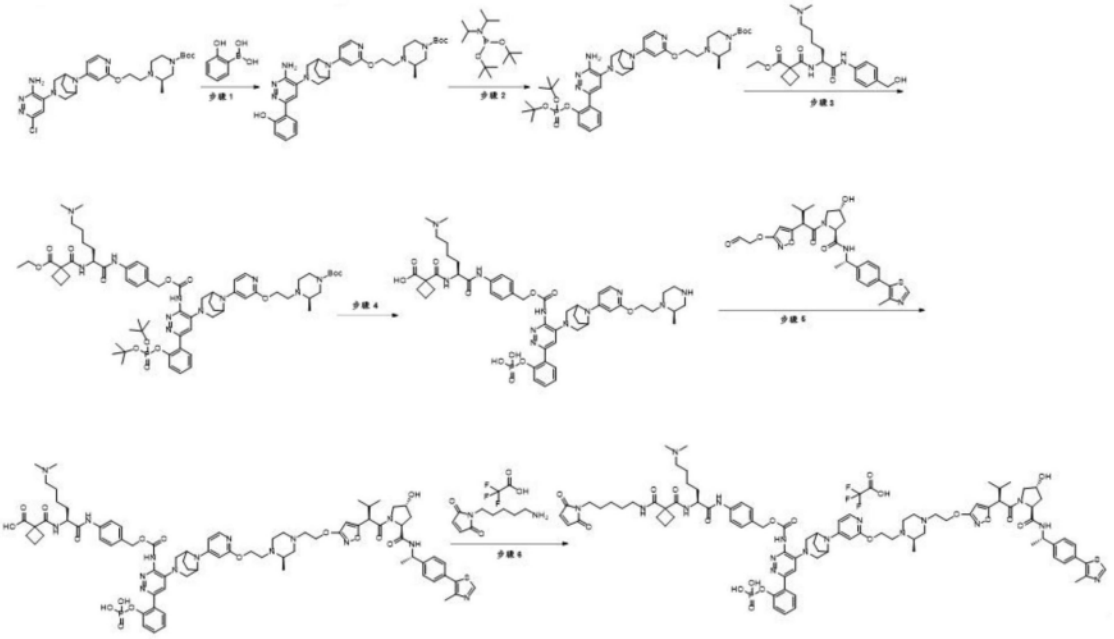
[0680] 

[0681] 在室温向1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(40.0mg,0.0272mmol)、1-(2-((5-氨基戊基)(甲基)氨基)乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(9.70mg,粗品)和DIPEA(35.1mg,0.272mmol)在DMF(1mL)中的溶液加入HATU(13.5mg,0.0355mmol)。将反应在室温搅拌10min。将粗品通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:XSelect CSH Fluoro Phenyl,30×150mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在10min由15%增加至20%;波长:254/220nm;R_T(min):10.5,以得到13.0mg(产率28.3%)目标化合物,其为黄色固体。LC-MS:(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1808。^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d_6,ppm)δ10.09(s,1H),9.97(s,1H),9.50(s,2H),8.88(d,J=1.3Hz,1H),8.30(d,J=7.7Hz,1H),8.00-7.80(m,4H),7.58-7.50(m,3H),7.39-7.16(m,7H),6.96(s,2H),6.84(ddd,J=11.0,7.0,2.3Hz,2H),6.65(d,J=6.6Hz,1H),6.29(s,1H),6.00(s,1H),5.01(s,2H),4.95-4.80(m,1H),4.59(s,2H),4.37(s,2H),4.35-4.21(m,4H),4.21-4.15(m,2H),3.59-3.48(m,6H),3.40-3.30(m,4H),3.27-2.97(m,14H),2.89(s,4H),2.70-2.60(m,9H),2.45-2.34(m,4H),2.30-2.19(m,2H),2.17-2.03(m,2H),2.05-1.83(m,5H),1.83-1.66(m,5H),1.66-1.49(m,4H),1.34(d,J=7.1Hz,3H),1.25(d,J=7.0Hz,3H),1.20-1.10(m,6H),0.85(d,J=6.6Hz,3H),0.69(dd,J=10.7,6.6Hz,3H)。

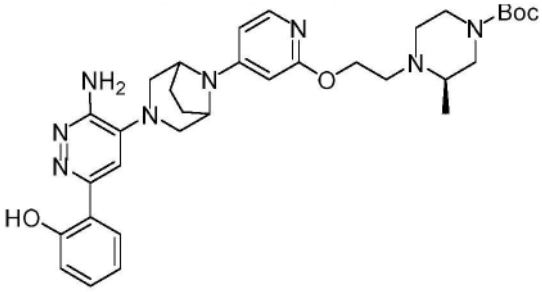
[0682] 实例4

[0683] L1-PP-CIDE-1的合成

[0684] L1-PP-CIDE-1:6-(8-氯-4-(2-(二甲基氨基)乙基)-2-((四氢-1H-吡咯嗪-7a(5H)-基)甲氧基)-5,6-二氢-4H-[1,4]氧氮呼基[5,6,7-de]喹唑啉-9-基)-4-甲基-5-(三氟甲基)吡啶-2-胺(2,2,2-三氟乙酸盐)

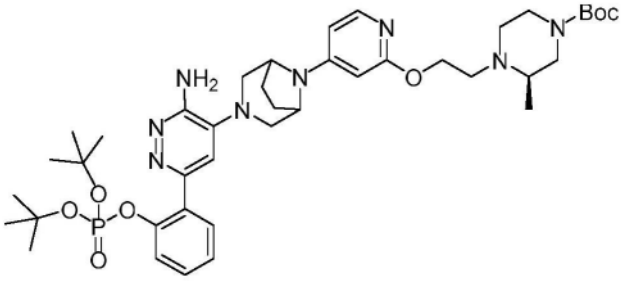
[0685] 

[0686] 步骤1:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯



在氮气下,将(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-氯哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(3.00g,5.37mmol,由基因泰克提供)、2-羟基苯基硼酸(0.890g,6.46mmol)、$Pd(PPh_3)_4$(1.24g,1.08mmol)和K_2CO_3(2.23g,16.1mmol)在二噁烷(37.5mL)和H_2O(7.5mL)中的溶液在100℃搅拌1h。将反应用水稀释,并且用DCM萃取。合并的有机层经无水Na_2SO_4干燥,并且在减压下浓缩。将所获得的粗产物通过硅胶快速色谱(溶剂梯度:0%至10%MeOH/DCM)纯化,以得到2.26g(产率68%)标题化合物,其为黄色固体。LCMS(ESI,m/z):$[M+H]^+$=617。

[0687] 步骤2:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((二-叔丁氧基磷酰基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

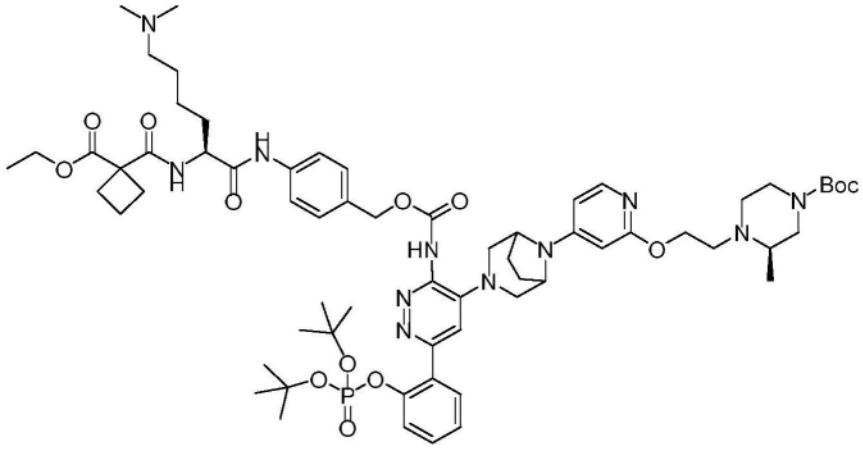
[0688] 

[0689] 在氮气下,在0℃向(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,

8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(500mg,0.811mmol)和1H-四唑(5.4mL,0.45M,在ACN中)在THF(10mL)中的溶液中逐滴加入二异丙基亚磷酰胺二叔丁酯(1.35g,4.86mmol)。将反应在0℃搅拌1h。然后在-30℃加入t-BuOOH(5M,在癸烷中)(0.64mL,3.20mmol),并且在-30℃搅拌30min。然后将混合物在室温搅拌过夜。将反应混合物倒入$NaHSO_3$水溶液中,并且用EtOAc萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,经无水Na_2SO_4干燥,并且在减压下浓缩。将所获得的粗产物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%ACN的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到140mg(产率21%)标题化合物,其为黄色油状物。LCMS(ESI,m/z):$[M+H]^+$=809。

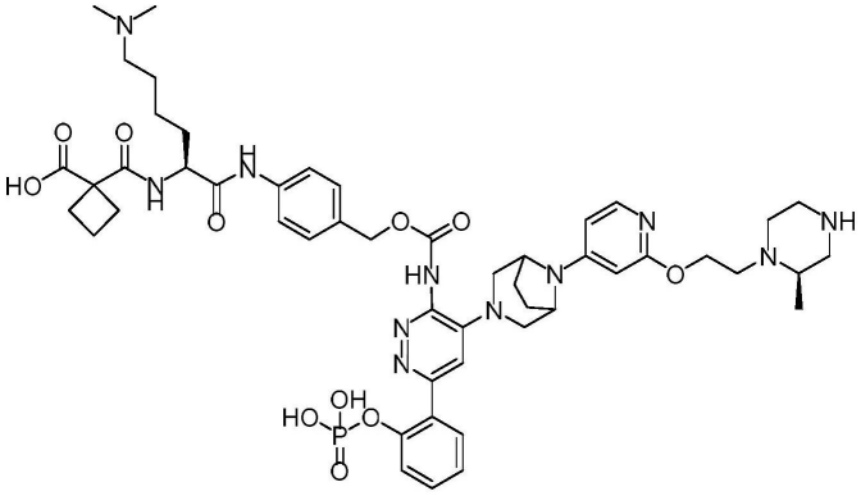
[0690] 步骤3:(3R)-4-(2-((4-(3-(6-(2-((二叔丁氧基膦酰基)氧基)苯基)-3((((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0691]



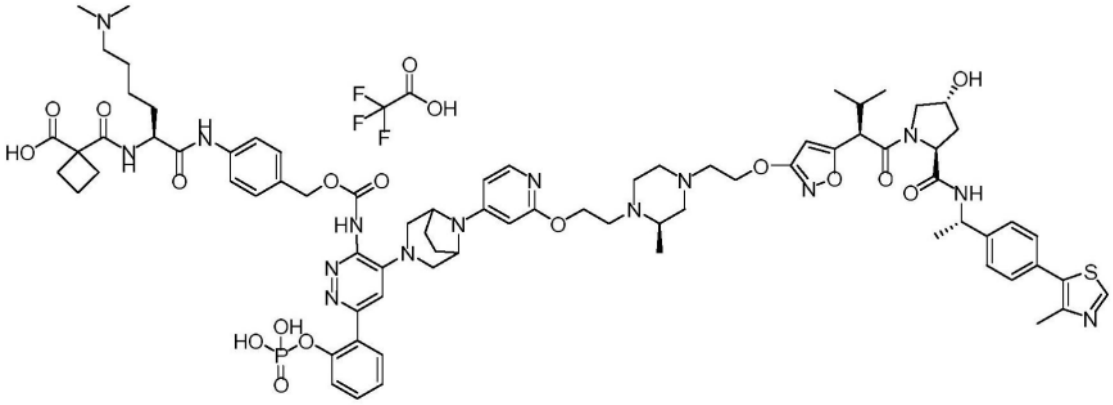
[0692] 在氮气下,在0℃向(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((二叔丁氧基磷酰基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(120mg,0.148mmol)、(S)-1-((6-(二甲基氨基)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(225mg,0.518mmol)和DIPEA(303mg,2.34mmol)在THF(5mL)中的溶液加入三光气(79.8mg,0.269mmol)。将反应在室温搅拌30min。然后将反应混合物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到35mg标题化合物,其为黄色固体。LCMS(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1269。

[0693] 步骤4:1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0694] 

[0695] 在氮气下,在室温向(3R)-4-(2-((4-(3-(6-(2-((二叔丁氧基磷酰基)氧基)苯基)-3-((((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(35.0mg,0.0280mmol)在THF(0.3mL)中的溶液加入LiOH•H_2O(3.5mg,0.0850mmol)在H_2O(0.3mL)中的溶液。将反应在室温搅拌1h。将所得混合物在真空下浓缩。然后加入浓HCl(0.33mL)在H_2O(0.67mL)中的溶液,并且在室温搅拌10min。将所得混合物在0℃用饱和$NaHCO_3$溶液碱化至pH=8,并且通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到13mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1029。

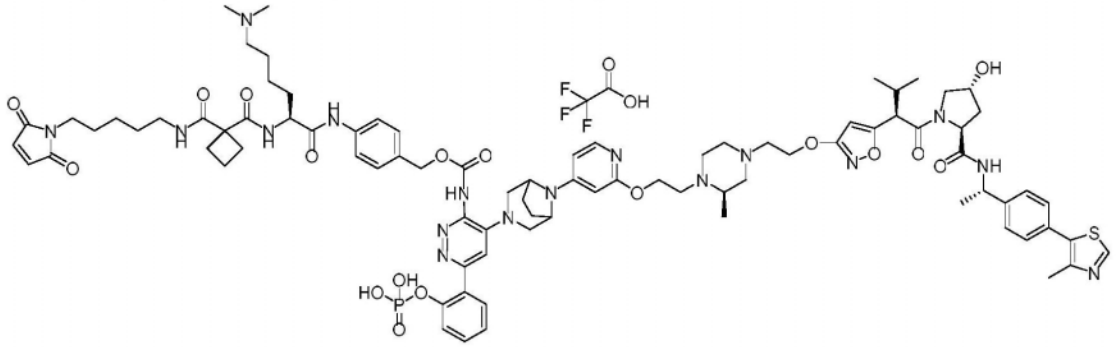
[0696] 步骤5:1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0697] 

[0698] 在氮气下,将1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(18.0mg,0.0180mmol)、(2S,4R)-4-羟基-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)

异噁唑-5-基)丁酰基)-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-甲酰胺(9.5mg,0.0180mmol)和HOAc(2.1mg,0.0360mmol)在DCM(0.75mL)和MeOH(0.25mL)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(1.7mg,0.0260mmol),并且在室温搅拌0.5h。将粗品通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:Xselect CSH C18 OBD柱30×150mm 5μm,n;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在12min内由11%增加至23%,保持23%B;波长:254/220nm;R_T(min):12;以得到6mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1553。

[0699] 步骤6:4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基(4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0700] 

[0701] 在氮气下,在室温向1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-((4-((((4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(2,2,2-三氟乙酸盐)(6.0mg,0.00400mmol)、1-(5-氨基戊基)吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(0.9mg,粗品)和DIPEA(5.0mg,0.0400mmol)在DMF(0.8mL)中的溶液中加入HATU(1.9mg,0.00500mmol)。将反应在室温搅拌10min。将所得混合物通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:XBridge Prep C18 OBD柱,30×100mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在11min内由15%增加至33%,保持33%B;波长:254/220nm;R_T(min):11,以得到2.7mg L1-PP-CIDE-1,其为白色固体。

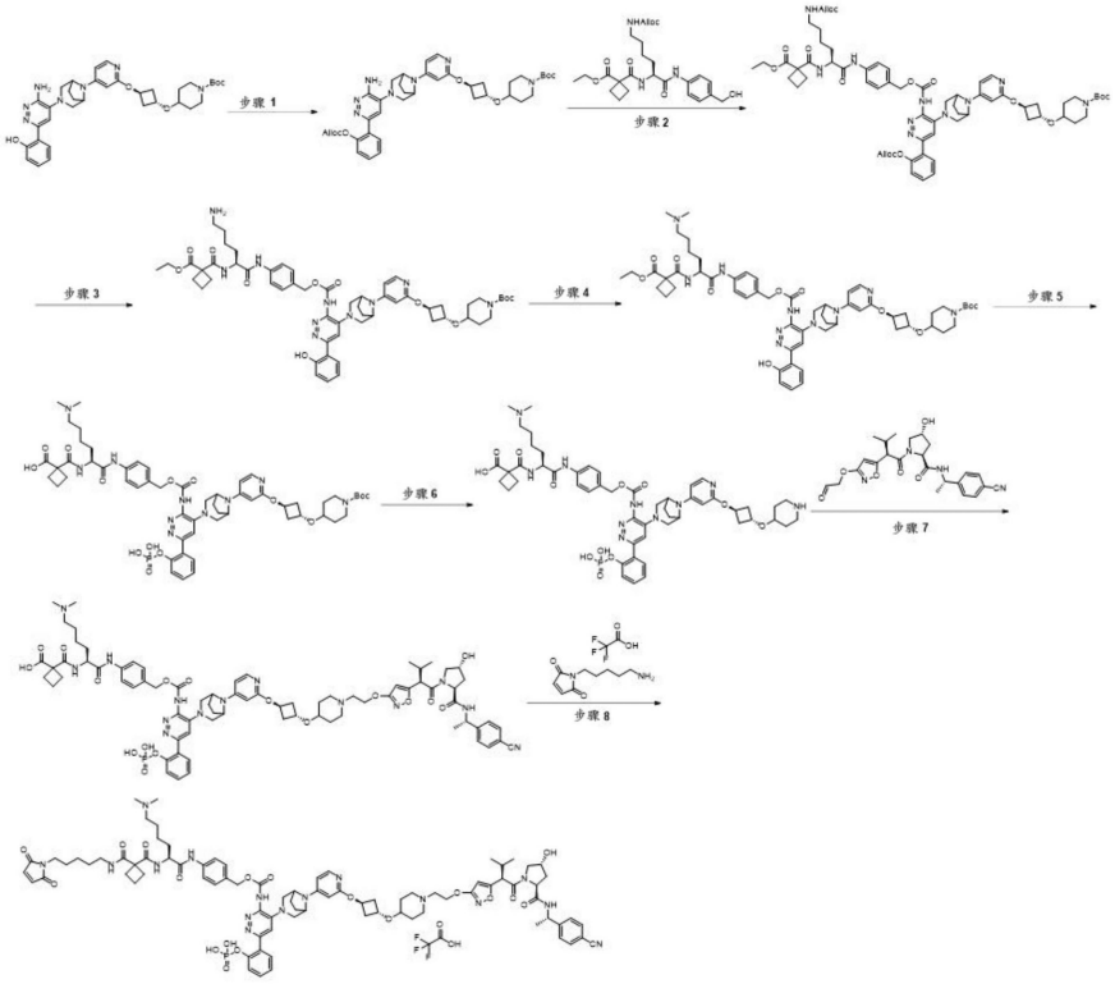
[0702] LCMS(ESI,m/z):$[M+H]^+$=1717。^1H NMR(300MHz,DMSO-d_6,ppm)δ10.14(d,J=11.3Hz,2H),8.97(s,1H),8.40(d,J=7.7Hz,1H),8.00-7.85(m,2H),7.82-7.75(s,1H),7.70-7.60(m,3H),7.60-7.57(m,1H),7.57-7.42(m,6H),7.35-7.30(m,1H),6.93(s,2H),6.66(d,J=6.6Hz,1H),6.31(s,1H),6.10(s,1H),5.10(s,2H),4.94-4.83(m,1H),4.58(s,2H),4.46(s,2H),4.43-4.32(m,4H),4.30-4.25(m,2H),3.70-3.59(m,6H),3.50-3.40(m,3H),3.40-3.30(m,4H),3.31-2.92(m,12H),2.79-2.65(m,6H),2.50-2.35(m,7H),2.37-2.05(m,1H),2.10-2.00(m,1H),1.90(s,3H),1.86-1.56(m,6H),1.50-1.40(m,4H),1.35(d,

J＝7.0Hz,4H),1.25-1.14(m,6H),1.05-0.90(m,3H),0.90-0.75(m,3H)。

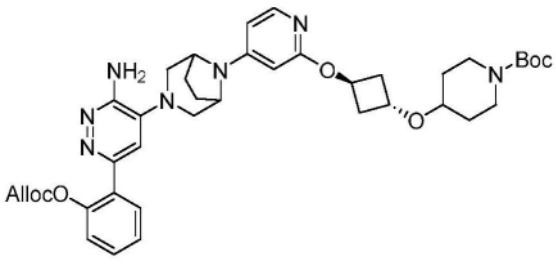
[0703] 实例5

[0704] L1-PP-CIDE-2的合成

[0705] L1-PP-CIDE-2:4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基(4-(8-(2-((1R,3r)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

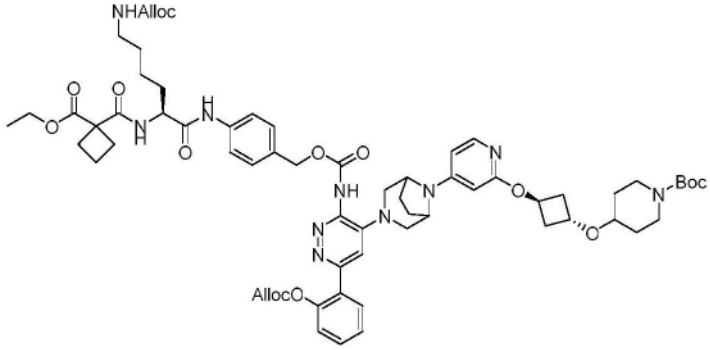
[0706] 

[0707] 步骤1:4-((1r,3r)-3-((4-(3-(6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)-3-氨基哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯

[0708] 

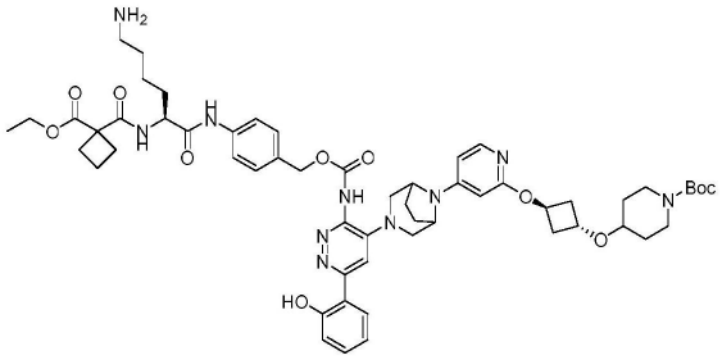
[0709] 在氮气下,在0℃向4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)吡啶-1-甲酸叔丁酯(535mg,0.832mmol)和DIPEA(967mg,7.48mmol)在DCM(6mL)中的溶液加入氯甲酸烯丙酯(350mg,2.91mmol)。将反应在室温搅拌30min。将粗品通过硅胶快速色谱(溶剂梯度:含有0%至10%MeOH的DCM)纯化,以得到410mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)[M+H]$^+$=728。

[0710] 步骤2:4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-(((烯丙基氧基)羰基)氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯

[0711] 

[0712] 在氮气下,在0℃向4-((1r,3r)-3-((4-(3-(6-(2-(((烯丙基氧基)羰基)氧基)苯基)-3-氨基哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(440mg,0.605mmol)和(S)-1-((6-(((烯丙基氧基)羰基)氨基)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(921mg,1.81mmol)和DIPEA(468mg,3.63mmol)在THF(5mL)中的溶液加入三光气(89.8mg,0.302mmol)。将反应在室温搅拌0.5h。然后在0℃加入另一份三光气(36.0mg,0.121mmol),并且在室温搅拌0.5h。在0℃加入NH_4Cl水溶液以淬灭反应。将溶剂在真空下浓缩。将粗品通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%ACN的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到280mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1244。

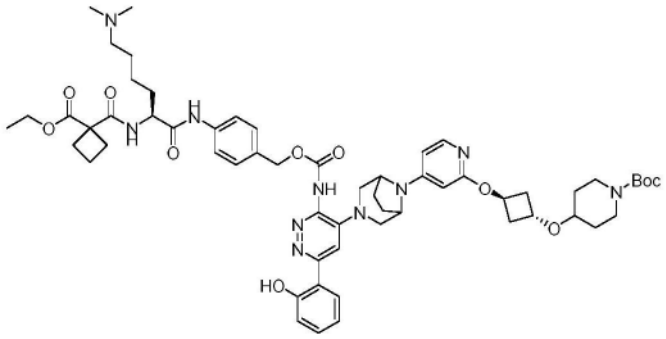
[0713] 步骤3:4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-氨基-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯

[0714] 

[0715] 在氮气下,在室温向4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-氨基-2-(1-(乙氧

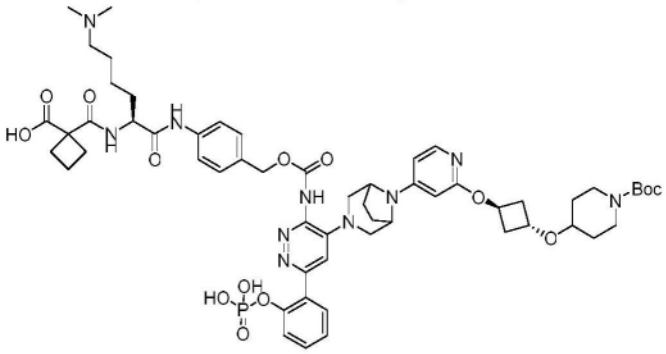
基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(260mg,0.209mmol)和吡咯烷(148mg,2.09mmol)在DCM(5mL)中的溶液加入$Pd(PPh_3)_4$(24.1mg,0.0208mmol)。将反应在室温搅拌1h。加入水,并且用DCM萃取三次。将有机层合并,经无水Na_2SO_4干燥并且在真空下浓缩,以得到310mg(粗制)标题化合物,将其直接用于下一步骤中。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1076。

[0716] 步骤4:4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯

[0717] 

[0718] 将4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-氨基-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(310mg,粗品)和水性CH_2O(37%)(259mg,3.19mmol)在MeOH(3mL)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(75.9mg,1.21mmol),并且在室温搅拌1h。将粗品通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%的MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到120mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1104。

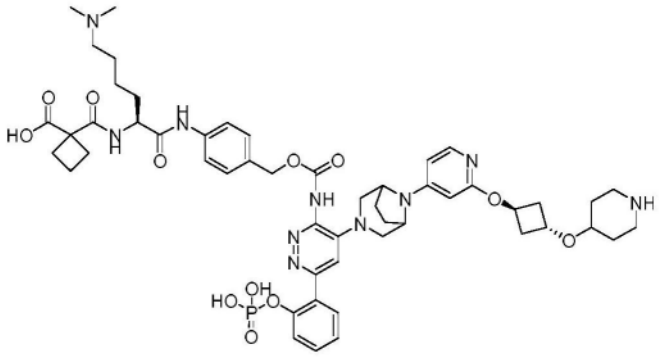
[0719] 步骤5:1-(((2S)-1-((4-((((4-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(叔丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0720] 

[0721] 在氮气下,在-60℃向4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-((((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(120mg,0.108mmol)在THF(3mL)中的溶液加入TMSOK在THF(1M,2mL)中的溶液。然后

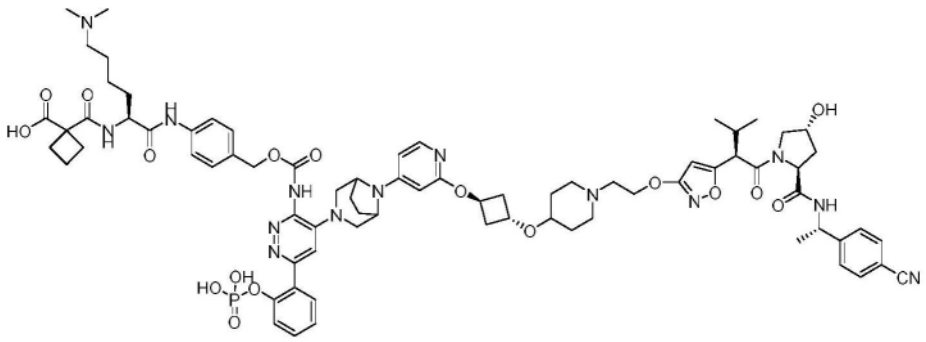
在-60℃加入$POCl_3$(165mg,1.08mmol)。将反应在-60℃搅拌20min。然后在-60℃加入含有NaOH(80.0mg,2.00mmol)的H_2O(1.6mL),并且在室温搅拌4h。将粗品通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到65.0mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1156。

[0722] 步骤6:1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-氧代-1-((4-((((6-(2-(膦酰氧基)苯基)-4-(8-(2-((1r,3r)-3-(哌啶-4-基氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0723] 

[0724] 将1-(((2S)-1-((4-((((4-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(叔丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(65.0mg,0.056mmol)在含有5%TFA的HFIP(6.1mL)溶液中的溶液在室温搅拌15min。使溶剂蒸发,并且通过预填充的C18柱(含有0%至100%ACN的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到58.0mg标题化合物,其为黄色油状物。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1055。

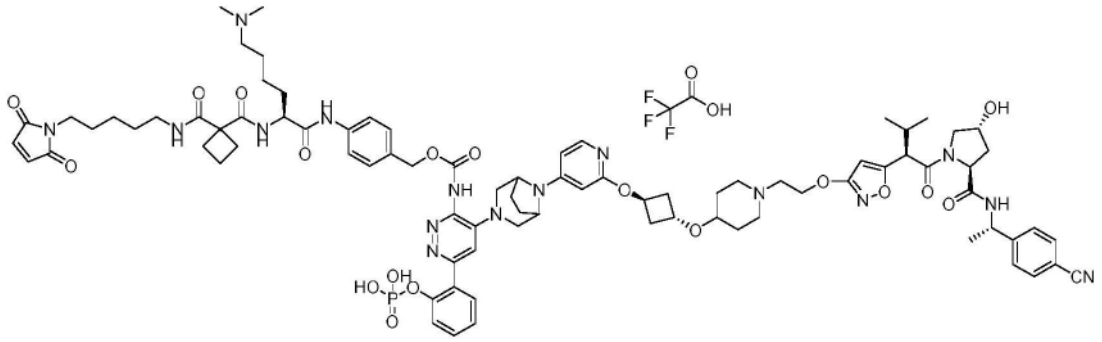
[0725] 步骤7:1-(((2S)-1-((4-((((4-(8-(2-((1R,3r)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0726] 

[0727] 将1-(((2S)-6-(二甲基氨基)-1-氧代-1-((4-((((6-(2-(膦酰氧基)苯基)-4-(8-(2-((1r,3r)-3-(哌啶-4-基氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(58.0mg,0.055mmol)、(2S,4R)-N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羟基-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)吡咯烷-2-甲酰胺(73.5mg,0.157mmol)和HOAc

(6.6mg,0.11mmol)在MeOH(1mL)和DCM(3mL)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(5.1mg,0.083mmol),并且在室温搅拌0.5h。将粗品通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至100%MeOH的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到44.0mg标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1508。

[0728] 步骤8:4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基(4-(8-(2-((1R,3r)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0729] 

[0730] 将1-(((2S)-1-((4-((((4-(8-(2-((1R,3r)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁烷基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(膦酰氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(44.0mg,0.0292mmol)和1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(19.9mg,粗品)、HATU(14.4mg,0.0378mmol)和DIPEA(37.7mg,0.290mmol)在DMF(0.8mL)中的溶液在室温搅拌10min。将粗品通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:XBridge Shield RP18 OBD柱,30×150mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在20min内由15%增加至25%,保持25%B;波长:254/220nm;R_T(min):20,以得到13.6mg L1-PP-CIDE-2,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1672。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6,ppm)δ10.19(s,2H),9.45(s,1H),8.50(d,J=7.3Hz,1H),7.95-7.85(m,3H),7.83-7.76(m,3H),7.72-7.64(m,2H),7.62-7.49(m,2H),7.48-7.30(m,5H),7.24-6.98(m,3H),6.72(s,1H),6.20(s,1H),6.15(s,1H),5.24-5.09(m,3H),4.91(q,J=7.2Hz,1H),4.69(s,2H),4.53(d,J=5.1Hz,2H),4.47-4.24(m,5H),3.70-3.60(m,7H),3.45 -3.40(m,2H),3.38-3.34(m,2H),3.19-3.06(m,6H),3.05-2.98(m,3H),2.75(d,J=3.8Hz,6H),2.46-2.35(m,6H),2.30-2.20(m,1H),2.09-1.99(m,2H),1.99-1.85(m,5H),1.84-1.56(m,8H),1.54-1.41(m,5H),1.40-1.27(m,5H),1.26-1.13(m,3H),1.01-0.93(m,3H),0.87-0.72(m,3H)。

[0731] 实例6

[0732] L1Hy-PE-CIDE-4的合成

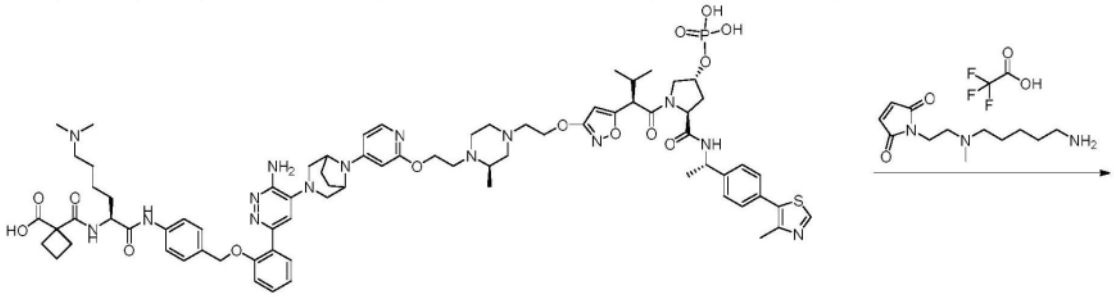
[0733] L1Hy-PE-CIDE-4:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-

(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)氨基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

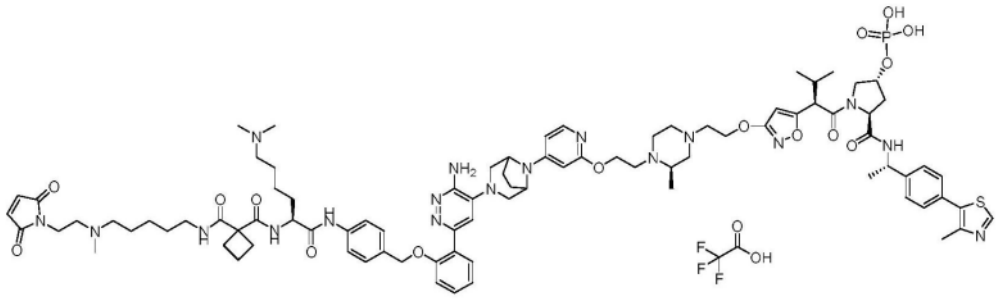
[0734] 步骤1:((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)磷酸二叔丁酯。在氮气下,在0℃向(2S,4R)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-甲酰胺(500mg,0.81mmol)和1H-四唑(5.4mL,0.45M,在ACN中)在THF(5mL)中的溶液逐滴加入二异丙基亚磷酰胺二叔丁酯(451mg,1.63mmol)。将反应在室温搅拌过夜。然后在-30℃加入tBuOOH(0.4mL,5M,在癸烷中),并且在-30℃搅拌30min。然后将混合物在室温搅拌4小时。将反应用NaHSO3水溶液淬灭,并且用EtOAc萃取。将合并的有机层用水和盐水洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥,并且在真空下浓缩。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至70%ACN的水(0.05%NH4HCO3))纯化,以得到340mg(51%)标题化合物,其为黄色油状物。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]+=807。

[0735] 步骤2:(3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯在氮气下,将((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)磷酸二叔丁酯(150mg,0.185mmol)在HCOOH(0.5mL)和水(0.5mL)中的溶液在60℃搅拌1h。将溶液在真空下浓缩,以得到121mg(粗制)标题化合物,其为固体。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]+=695。

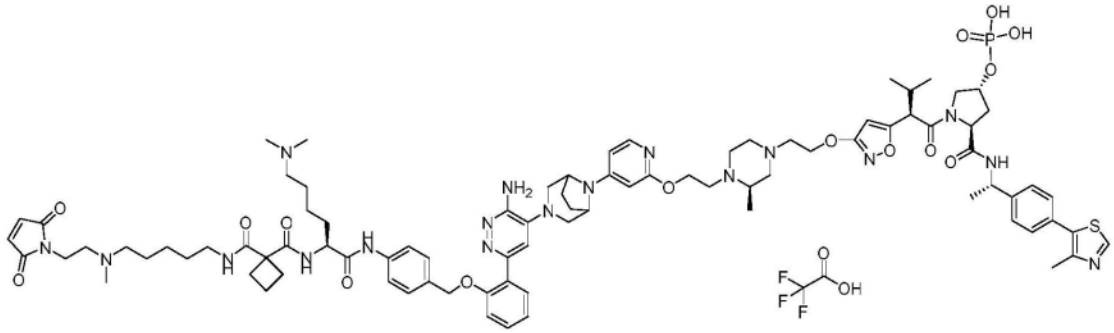
[0736] 步骤3:1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸



[0737]



[0738] 步骤1:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)氨基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)



[0739]

[0740] 将1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(40.0mg,0.0265mmol)、1-(2-((5-氨基戊基)(甲基)氨基)乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(10.7mg,粗产物)、HATU(12.1mg,0.0318mmol)和DIPEA(34.2mg,0.265mmol)在DMF(0.8mL)中的溶液在室温搅拌10min。将粗品通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:XSelect CSH Fluoro Phenyl,30×150mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在7min内由6%增加至36%;波长:254nm;R_T(min):6.5,以得到7.0mg L1Hy-PE-CIDE-4,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1730。^1H NMR(400MHz,DMSO-d_6,ppm)δ10.23(s,1H),9.00(d,J=1.8Hz,1H),8.48(d,J=7.7Hz,1H),7.93-7.83(m,3H),7.67(d,J=8.3Hz,2H),7.59(d,J=7.9Hz,

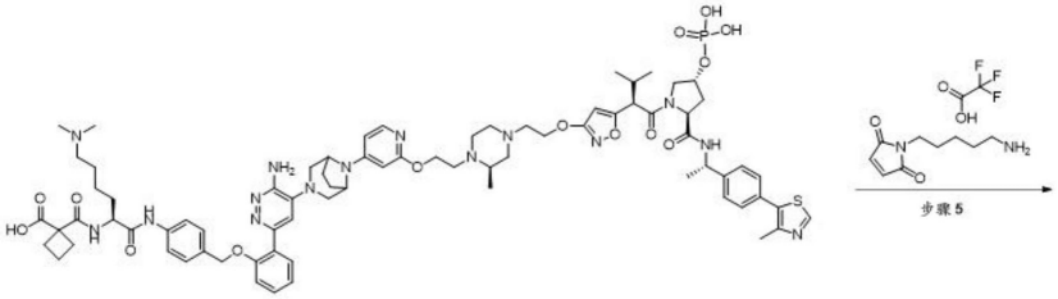
1H),7.56(s,1H),7.49-7.31(m,7H),7.18-7.07(m,3H),6.90(br,1H),6.64(s,1H),6.26(s,1H),6.11(s,1H),5.10(s,2H),4.92(t,J＝7.1Hz,1H),4.82-4.70(m,2H),4.48(s,5H),4.41-4.33(m,3H),3.80-3.65(m,6H),3.15-2.96(m,18H),2.79(s,4H),2.73(s,6H),2.50-2.35(m,9H),2.05-1.85(m,6H),1.78-1.65(m,3H),1.65-1.40(m,8H),1.39(d,J＝6.9Hz,3H),1.35-1.18(m,7H),0.98(d,J＝6.5Hz,3H),0.90-0.75(m,3H)。

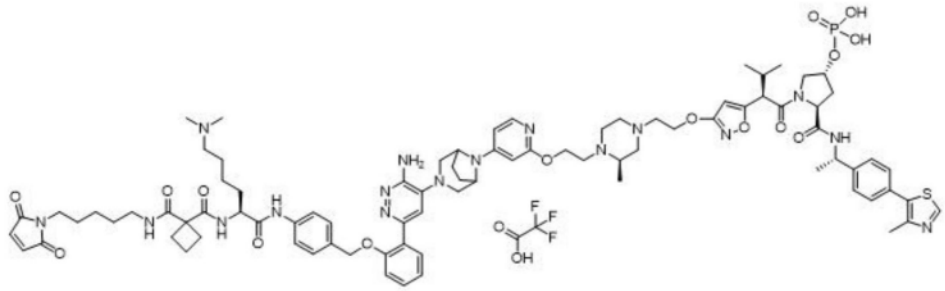
[0741] 实例7

[0742] L1-PE-CIDE-5的合成

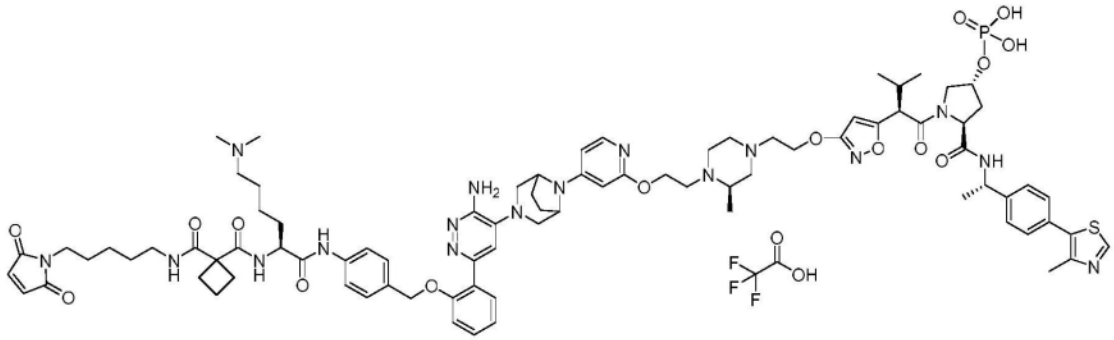
[0743] L1-PE-CIDE-5:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0744]





[0745] 步骤1:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

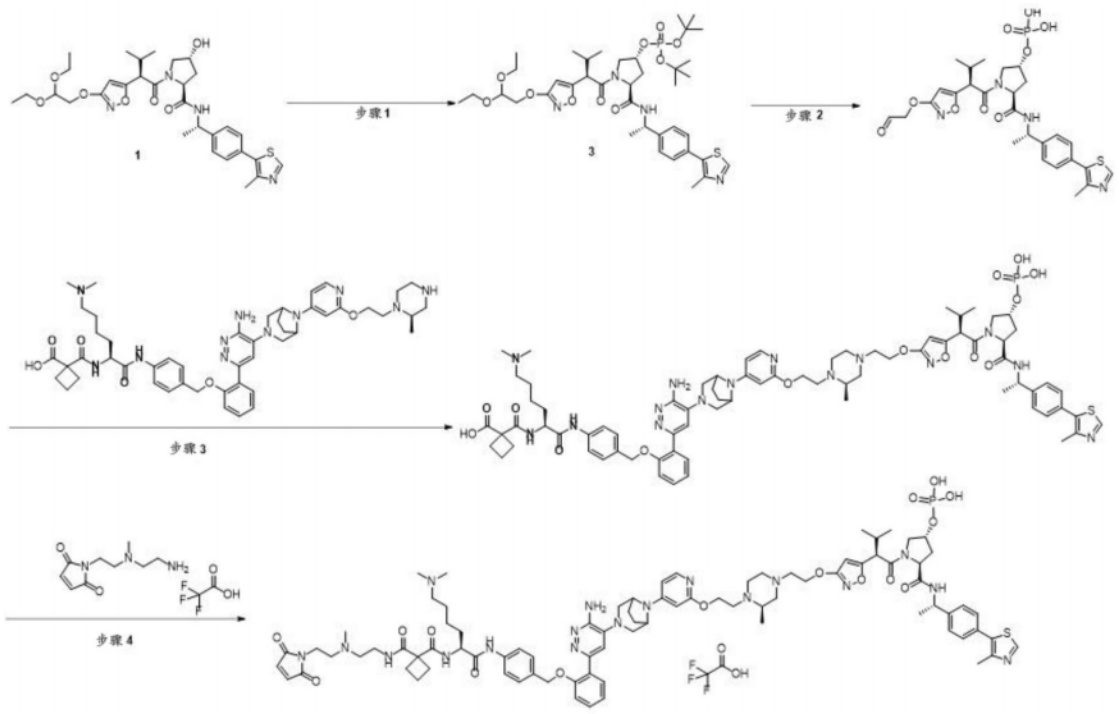
[0746] 

[0747] 将1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(180mg,0.119mmol,合成描述于L1-PE-CIDE-4中)、1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(45.0mg,粗品)、HATU(60.6mg,0.159mmol)和DIPEA(158mg,1.22mmol)在DMF(3mL)中的溶液在室温搅拌5min。将反应溶液通过制备型HPLC用以下条件纯化:柱:XSelect CSH Prep C18OBD柱,19×250mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:MeOH;流速:25mL/min;梯度:B在11min内由46%增加至57%,保持57%B;波长:254/220nm;R_T(min):8.75,以得到66.6mg L1-PE-CIDE-5,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1673。^1H NMR(300MHz,DMSO-d_6,ppm)δ10.21(s,1H),9.50(s,1H),9.00(d,J=1.7Hz,1H),8.49(d,J=7.6Hz,1H),8.01-7.84(m,3H),7.67(d,J=8.3Hz,2H),7.59(dd,J=8.2,6.1Hz,2H),7.52-7.25(m,7H),7.21-7.08(m,2H),6.99(s,2H),6.73(d,J=6.7Hz,1H),6.37(s,1H),6.12(s,1H),5.10(s,2H),4.92(t,J=7.3Hz,1H),4.85-4.73(m,2H),4.60(s,3H),4.51-4.33(m,6H),3.85-3.70(m,7H),3.55-3.45(m,2H),3.40 -3.30(m,4H),3.25 -2.95(m,9H),2.90 -2.70(m,7H),2.47-2.30(m,9H),2.10-1.85(m,5H),1.85-1.54(m,6H),1.53-1.29(m,8H),1.27-1.10(m,5H),0.98(d,J=6.5Hz,3H),0.90-0.73(m,3H)。

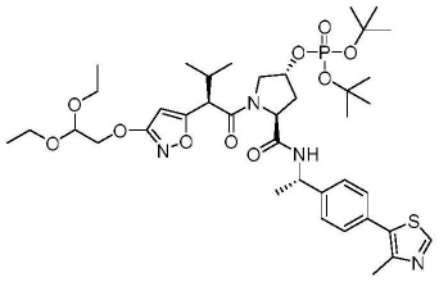
[0748] 实例8

[0749] L1Hy-PE-PCIDE-6的合成

[0750] (3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((2-((2-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲基)氨基)乙基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

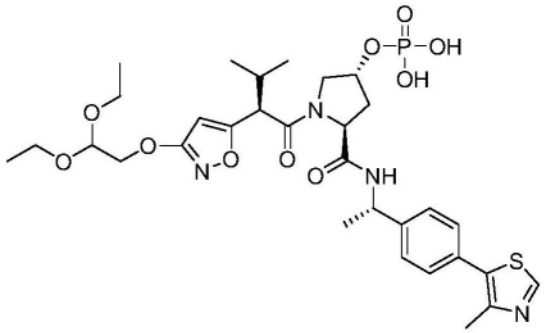
[0751] 

[0752] 步骤1:((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)磷酸二叔丁酯

[0753] 

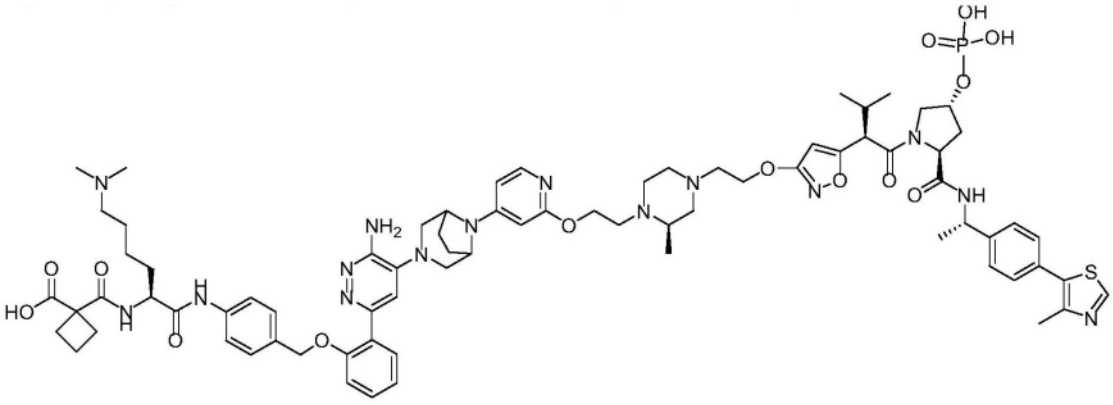
[0754] 在氮气下,在0℃向(2S,4R)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-甲酰胺(500mg,0.81mmol)和1H-四唑(5.4mL,0.45M,在ACN中)在THF(5mL)中的溶液逐滴加入二异丙基亚磷酰胺二叔丁酯(451mg,1.63mmol)。将反应在室温搅拌过夜。然后在-30℃加入tBuOOH(0.4mL,5M,在癸烷中),并且在-30℃搅拌30min。然后将混合物在室温搅拌4小时。将反应用$NaHSO_3$水溶液淬灭,并且用EtOAc萃取。将合并的有机层用水和盐水洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥,并且在真空下浓缩。将残余物通过预填充的C18柱(溶剂梯度:含有0%至70%ACN的水(0.05%NH_4HCO_3))纯化,以得到340mg(51%)标题化合物,其为黄色油状物。LC-MS:(ESI,m/z):$[M+H]^+$=807。

[0755] 步骤2:(3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯

[0756] 

[0757] 在氮气下,将((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)磷酸二叔丁酯(150mg,0.185mmol)在HCOOH(0.5mL)和水(0.5mL)中的溶液在60℃搅拌1h。将溶液在真空下浓缩,以得到121mg(粗制)标题化合物,其为固体。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]$^+$=695。

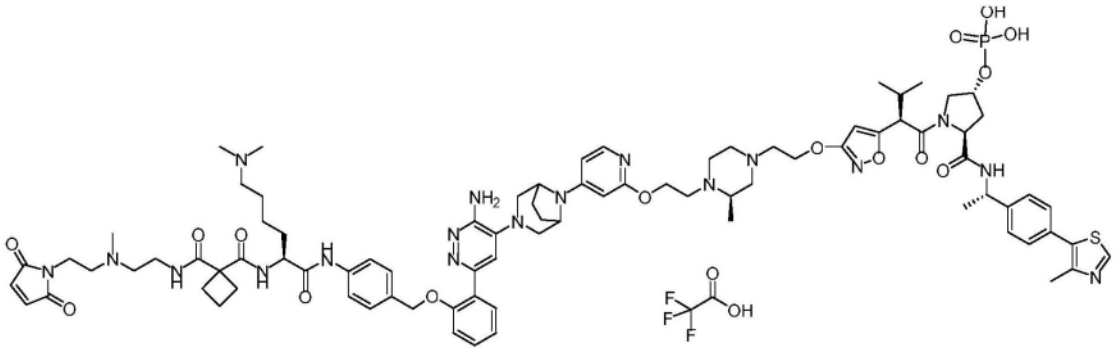
[0758] 步骤3:1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

[0759] 

[0760] 将1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(100mg,0.110mmol)、(3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(121mg,0.190mmol)和NaOAc(13.6mg,0.170mmol)在甲醇(1.2mL)和二氯甲烷(0.4mL)中的溶液在室温搅拌1h。然后加入$NaBH_3CN$(34.7mg,0.550mmol),并且在室温搅拌0.5小时。加入水以淬灭反应。将溶剂在真空下浓缩。将产物通过制备型HPLC(柱:YMC-Actus Triart C18 ExRS,30×150mm,5μm;流动相A:水(10mmol/L NH_4HCO_3),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在9min内由36%增加至60%,保持60%B;波长:254/220nm;RT1(min):7.63)纯化,以得到30.0mg(产率18%)标题化合物,其为白色固体。LCMS(ESI)[M+H]$^+$=1509。

[0761] 步骤4:(3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-((2-((2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)(甲

基)氨基)乙基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酰胺基)己酰胺基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基二氢磷酸酯(2,2,2-三氟乙酸盐)

[0762] 

[0763] 在室温向1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基-4-(2-((5-((R)-3-甲基-1-((2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(膦酰氧基)吡咯烷-1-基)-1-氧代丁烷-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(30.0mg,0.0200mmol)、1-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(12.3mg,粗品)和DIPEA(25.6mg,0.200mmol)在DMF(1mL)中的溶液加入HATU(9.07mg,0.0200mmol)。将反应在室温搅拌10分钟。将粗品通过制备型HPLC(柱:Xselect CSH C18 OBD柱30×150mm,5μm;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:B在10min内由12%增加至24%,保持24%B;波长:254/220nm;RT1(min):10)纯化,以得到8.70mg(产率24%)L1Hy-PE-CIDE-6,其为白色固体。LCMS(ESI)$[M+H]^+$=1688。^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d6)δ10.26(s,1H),8.99(s,1H),8.50(d,J=7.5Hz,1H),8.15(t,1H),7.87(d,J=6.5Hz,2H),7.65(d,J=8.3Hz,2H),7.61-7.51(m,2H),7.50-7.30(m,8H),7.20-6.90(m,5H),6.62(s,1H),6.14(s,1H),5.99(s,1H),5.09(s,2H),4.92(t,J=7.2Hz,1H),4.79(s,1H),4.55-4.25(m,8H),3.80-3.65(m,8H),3.25-2.95(m,17H),2.70(s,3H),2.62(s,6H),2.48-2.38(m,9H),2.20-1.55(m,13H),1.52-1.30(m,5H),1.30-1.15(m,4H),0.85(d,J=6.4Hz,3H),0.85-0.70(m,3H)。

[0764] 实例9

[0765] L1-CIDE与抗体的缀合

[0766] 将10mM琥珀酸盐(pH 5)、150mM NaCl、2mM EDTA中的经半胱氨酸工程化的抗体(THIOMAB^{TM})的pH用1M Tris调节至pH 7.5至8.5。将3至16当量的L1-CIDE(含有硫醇反应性马来酰亚胺基团)溶于DMF或DMA中(浓度=10mM),并且将其加入经还原、再氧化和pH调节的抗体中。将反应在室温或37℃孵育并且监测直至完成(1小时至约24小时),如通过反应混合物的LC-MS分析所确定的。反应完成时,将Ab-CIDE通过一种或几种方法的任意组合纯化,目的在于去除剩余的未反应的接头-药物中间体和聚集蛋白(如果以显著的量存在)。

[0767] 在一个实例中,将Ab-CIDE用10mM组氨酸-乙酸盐(pH 5.5)稀释,直至最终pH值为大约5.5,然后使用连接至Akta纯化系统(GE Healthcare)的HiTrap S柱、或S maxi离心柱

(Pierce)通过S阳离子交换色谱纯化。替代性地,将Ab-CIDE使用连接至Akta纯化系统的S200柱、或Zeba离心柱通过凝胶过滤色谱纯化。将透析用于纯化缀合物。

[0768] 使用凝胶过滤或透析法,将THIOMAB™Ab-CIDE用含有240mM蔗糖的20mM组胺酸/乙酸盐(pH 5)配制。将纯化的Ab-CIDE通过离心超滤浓缩,并且在无菌条件下通过0.2μm过滤器过滤,并且在-20℃冷冻储存。

[0769] 实例10

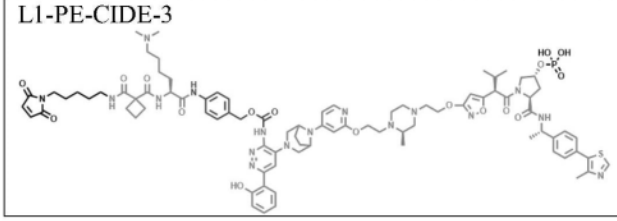
[0770] 用于确定DC50和Dmax的细胞测定

[0771] 将HCC515和H1944细胞分别以4000个细胞/孔和2500个细胞/孔的密度接种到384孔板中。第二天,加入Ab-CIDE。经药物处理24h后,将细胞用4%甲醛固定15分钟。将板用PBS洗涤三次。将细胞用IF封闭溶液(10%FCS、1%BSA、0.1%Triton、0.01%叠氮化物、X-100,在PBS中)孵育。1.5h后,加入在IF封闭缓冲剂中稀释2倍的一抗溶液:加入BRM(Cell signaling目录号11966,1:2000)。将板在4℃孵育过夜。第二天早上,将细胞用PBS洗涤三次。然后将细胞用二抗(兔-Alexa 488A21206(1:2000))在室温避光孵育1h。将Hoechst H3570以1:5000加入孔中,并且将板继续孵育30分钟。将板用PBS洗涤3次,并且在Opera Phenix™高内涵筛选系统上成像。使用核染色作为遮蔽物,对核BRM平均信号强度进行量化。

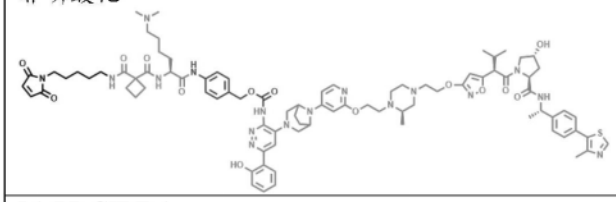
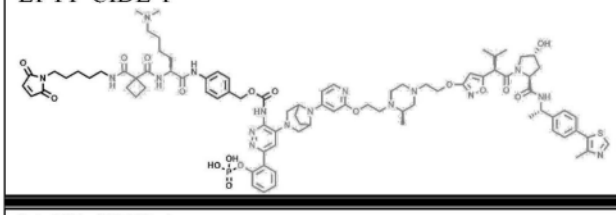
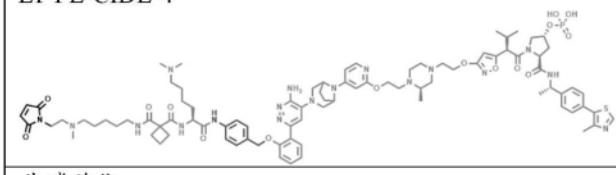
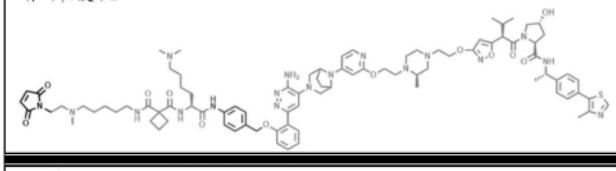
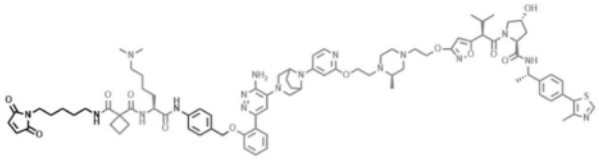
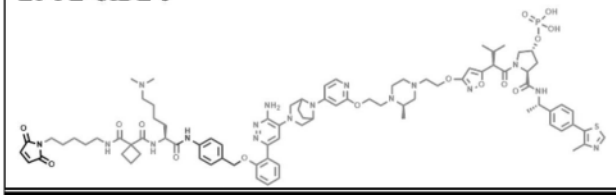
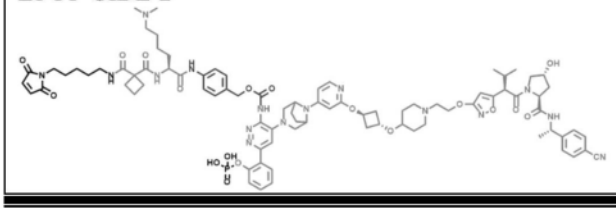
[0772] 数据显示于下表1中。数据证明本文公开的抗体靶向策略取得成功。阴性对照:抗TROP2不与NCI-H1944细胞相互作用,而抗TfR2则与该细胞相互作用。数据显示,几种Ab-L1-CIDE具有所需的低DC50和所需的高DCmax值。

[0773] 表1.

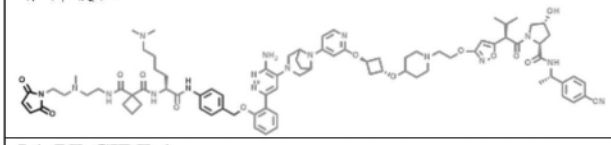
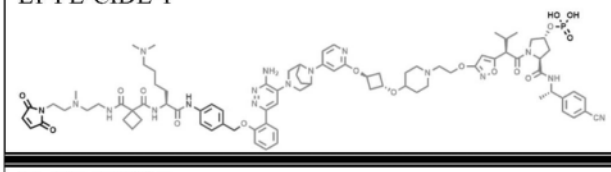
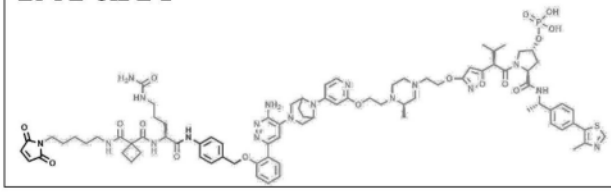
[0774]

L1-CIDE	靶标	DAR	DC50 mg/mL (NCI-H1944)	DCmax (NCI-H1944)	BRM deg (%, 96 h)	BRM deg /剂量
L1-PE-CIDE-3 	TfR2	6.18	0.269	87	87	8.7

[0775]

非磷酸化 	TfR2	5.60	ND	ND	96	9.6
L1-PP-CIDE-1 	TfR2	5.89	0.42	90	ND	ND
L1-PE-CIDE-4 	TfR2	5.77	0.26	88	90	9
非磷酸化 	TfR2	5.41	0.15	74	84	8.4
非磷酸化 	TfR2	5.98	0.11	90	ND	ND
L1-PE-CIDE-5 	TfR2	5.80	0.19	89	ND	ND
L1-PP-CIDE-2 	TfR2	13.75	0.14	75	ND	ND

[0776]

非磷酸化 	TfR2	13.75	0.14	75	ND	ND
L1-PE-CIDE-1 	TfR2	13.13	ND	42	ND	ND
L1-PE-CIDE-2 	Trop 2	6.00	ND	ND	ND	ND

[0777] 实例11

[0778] PLAU和KRT80抑制体内测定

[0779] PLAU抑制为衡量与PLAU基因相关联的mRNA转录物响应于BRM降解剂处理下的阻抑的量度。BRM活性控制该转录物的产生。KRT80为BRM降解的下游标志物。因此,PLAU测定和KRT80测定两者均为体内BRM降解的量度。

[0780] PK/PD HCC515肿瘤测定:在HCC515人非小细胞肺癌的小鼠异种移植模型中评估抗CD71-BRM Ab-CIDE的PK/PD效应。HCC515细胞获自基因泰克细胞系库。该细胞系使用Promega PowerPlex 16系统的短串联重复(STR)分析进行验证,并且与细胞系的外部STR配置文件进行了比较,以确认细胞系的家系。

[0781] 为建立模型,将肿瘤细胞(500万个,在0.1mL Hank平衡盐溶液中)皮下接种到雌性C.B-17SCID小鼠(Charles River Laboratories)的侧腹。当肿瘤达到所需体积(200至300mm3)时,将小鼠随机分为n=5组,每组具有相似的肿瘤大小分布,并且通过尾静脉接受单次静脉内注射载体(组氨酸缓冲液)或测试物。所有抗CD71-BRM Ab-CIDE和未缀合的抗体均在组氨酸缓冲液(20mM组氨酸乙酸盐pH 5.5、240mM蔗糖、0.02%吐温20)中配制。未缀合的BRM CIDE在10%羟丙基-β-环糊精、50mM乙酸钠(pH 4)中配制。

[0782] 给药后四天,将小鼠处以安乐死并且收集肿瘤和全血。将肿瘤切除并且分成两等份,然后在液氮中快速冷冻。将一份用于测量释放的BRM CIDE的水平,并且将另一份用于评估对下游PD标志物的调节。在麻醉手术下通过末端心脏穿刺收集全血,并且将其置于含有肝素锂的试管中。将血液置于湿冰上,直至离心(收集后15min内)。样品在4℃以10,000rpm离心5min,并且收集血浆,将其置于干冰上,并且储存在-70℃,直至分析接头稳定性和总抗体药代动力学。

[0783] 针对KRT80和PLAU的qRT-PCR测定:对于qRT-PCR,在Bullet Blender(Next Advance)中,将15mg至30mg冷冻组织在300ul裂解缓冲剂中经搅拌均质化。RNA通过MagMax mirVana总RNA分离试剂盒(Applied Biosystems)进行制备。使用Taqman一步RT-PCR预混液试剂盒(ThermoFisher Scientific),用FAM探针(ThermoFisher Scientific)检测基因表达水平。使用7900HT SDS(ThermoFisher Scientific)进行分析。相对于管家基因GusB(2-

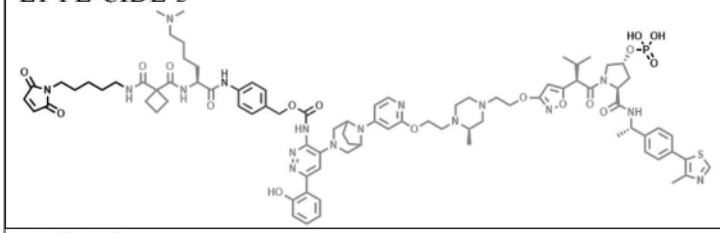
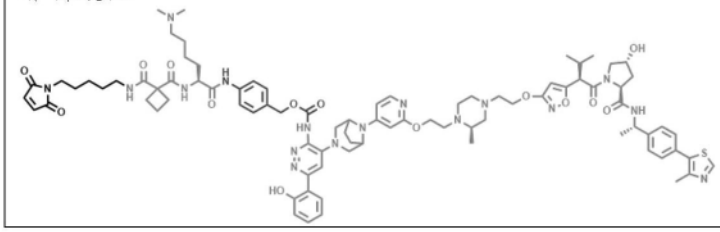
ΔCt)呈现表达水平。

[0784]

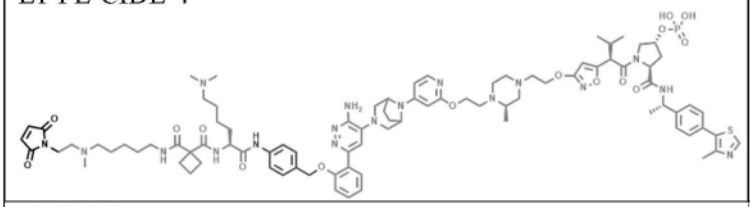
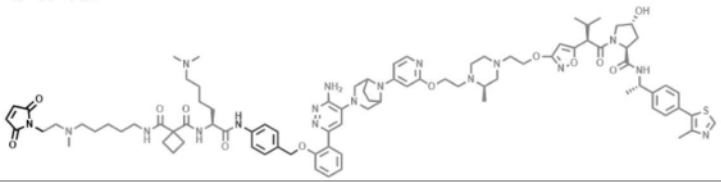
GusB	Hs00939627_m1
Plau	Hs01547051_g1
KRT80	Hs01372363_g1
IL32	Hs00992441_m1

[0785] 数据显示于表2中。

[0786]

L1-CIDE	PLAU 抑制 (%)	KRT80 抑制 (%)
L1-PE-CIDE-3 	96	70
非磷酸化 	89	42

[0787]

L1-PE-CIDE-4 	83	34
非磷酸化 	65	9

[0788] 已努力确保所用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应考虑到一些实验误差和偏差。

[0789] 本领域技术人员将认识到,与本文描述的方法和材料相似或等同的许多方法和材料可用于实践本文描述的主题。本发明决不仅限于所述的方法和材料。

[0790] 除非另外定义,否则本文所用的技术及科学术语与本主题所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。

[0791] 在本说明书和权利要求书中,除非上下文另有要求,否则“包括”、“包含”和“含有”这些词是在非排他性意义上使用的。应当理解,本文描述的实施例包括“由……组成”和/或“基本上由……组成”实施例。

[0792] 如本文中所用,术语“约”在涉及数值时,意在涵盖指定的量的各种变化,在一些实施例中涵盖指定的量±50%,在一些实施例中涵盖指定的量±20%;在一些实施例中涵盖指定的量±10%,在一些实施例中涵盖指定的量±5%,在一些实施例中涵盖指定的量±1%,在一些实施例中涵盖指定的量±0.5%,在一些实施例中涵盖指定的量±0.1%,因为此类变化适于执行所公开的方法或采用所公开的组合物。

[0793] 在提供数值范围的情况下,应当理解,除非上下文另有明确规定,否则在该范围的上限与下限之间的每个中间值(到下限的单位的十分之一)以及所指定范围内的任何其他指定值或中间值均涵盖在本文内。这些小范围的上限和下限可独立地包括在该较小范围内,并且也涵盖在本文内,以所指定范围内任何明确排除的限值为准。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,还包括排除那些包括的限值中的一者或两者的范围。

[0794] 对于本主题所涉及的本领域技术人员而言,在受益于上文的描述和相关附图中所提出的教导的情况下,将想到本文阐述的本发明的许多修改形式和其他实施例。因此,应当理解,本主题不限于所公开的特定实施例,并且修改形式和其他实施例旨在包括在所附权利要求的范围内。尽管本文采用了特定的术语,但这些术语仅在通用和描述性的意义上使用,而非出于限制的目的。