



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116249556 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 09

(21) 申请号 202180060539.4

(22) 申请日 2021.07.20

(30) 优先权数据

63/054,757 2020.07.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/042280 2021.07.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/020288 EN 2022.01.27

(71) 申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 P·S·德拉格维奇

S·A·贝克·多克雷 T·H·皮洛

D·张

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 邵红 徐志明

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61K 47/65 (2017.01)

A61K 31/504 (2006.01)

A61K 31/501 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书24页 说明书171页

序列表31页 附图16页

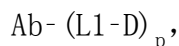
(54) 发明名称

降解BRM的抗体缀合化学诱导剂及其方法

(57) 摘要

本文所述的主体涉及靶向BRM以进行降解的抗体-CIDE缀合物(Ab-CIDE)、包含它们的药物组合物以及它们在治疗BRM降解有益的疾病和病状中的用途。

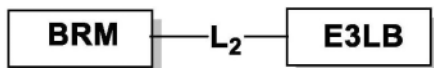
1. 一种具有以下结构的缀合物:



其中,

Ab为抗体;

D为CIDE或其前药,具有以下结构:



其中,

BRM为BRM结合化合物的残基,

E3LB为E3连接酶结合化合物的残基,并且

L2为共价连接BRM与E3LB的部分;

L1为将Ab共价连接至BRM、E3LB或L2中的一者的接头-1;并且

p为1至16。

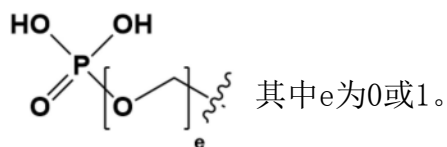
2. 根据权利要求1所述的缀合物,其中L1与E3LB共价结合。

3. 根据权利要求2所述的缀合物,其中所述前药为具有与BRM共价结合的磷酸酯部分的CIDE。

4. 根据权利要求1所述的缀合物,其中L1与BRM共价结合。

5. 根据权利要求4所述的缀合物,其中所述前药为具有与E3LB共价结合的磷酸酯部分的CIDE。

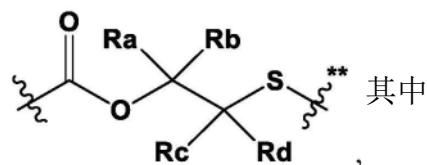
6. 根据权利要求3或5中任一项所述的缀合物,其中所述磷酸酯部分具有以下结构:



7. 根据权利要求1所述的缀合物,其中L1与L2共价结合。

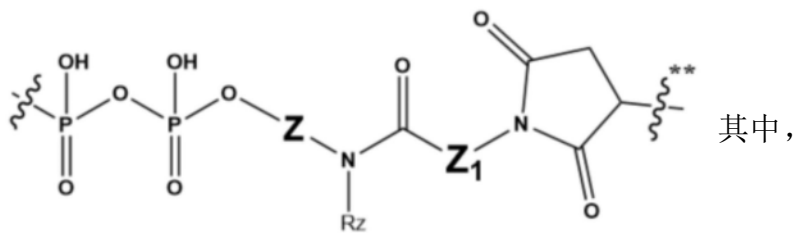
8. 根据权利要求1所述的缀合物,其中L1选自由以下项组成的组:

i) L1a



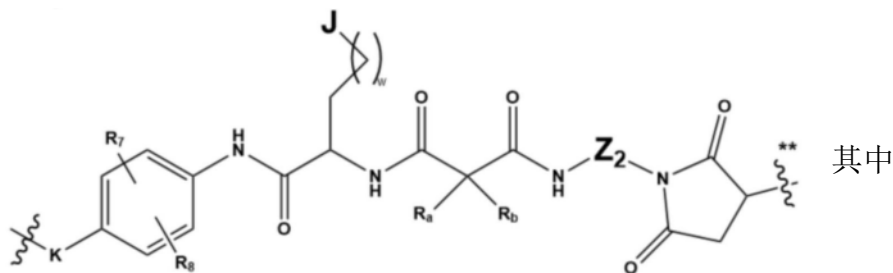
其中 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 独立地选自由H、任选地取代的支链或直链 C_1 - C_5 烷基和任选地取代的 C_3 - C_6 环烷基组成的组,或者 R^a 和 R^b 或 R^c 和 R^d 与它们所结合的碳原子一起形成任选地取代的 C_3 - C_6 环烷基环或3元至6元杂环烷基环;

ii) L1b



其中,

Z和Z₁各自独立地为C₁₋₁₂亚烷基或--[CH₂]_g-[-O-CH₂]_h-,其中g为0、1或2,并且h为1至5;
R_z为H或C₁₋₃烷基;以及
iii)L1c



其中

Z₂为C₁₋₁₂亚烷基或-[CH₂]_g-[-O-CH₂]_h-,其中g为0、1或2,并且h为1至5;
w为1、2、3、4或5;

J为-N(R_x)(R_y)-、-C(O)NH₂-、-NH-C(O)-NH₂-、-NH-NH-NH₂-,其中,R_x和R_y各自独立地选自氢和C₁₋₃烷基;

K选自-CH₂-、-CH(R)-、-CH(R)-O-、-C(O)-、-C(O)-O-CH(R)-、-CH₂-O-C(O)-、-CH₂-O-C(O)-NH-、-O-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-、-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-、-CH₂-O-C(O)-NH-CH₂-、-CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_q-O-、-CH₂-O-C(O)-R-[CH₂]_q-,其中^表示与CIDE的连接,其中R为氢、C₁₋₃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R_x和R_y各自独立地选自氢和C₁₋₃烷基,或者R_x和R_y与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;

Ra和Rb各自独立地选自氢和C₁₋₃烷基,或者Ra和Rb与各自所连接的氮一起形成任选地取代的C₃₋₆环烷基;并且

R₇和R₈各自独立地为氢、卤代、C₁₋₅烷基、C₁₋₅烷氧基或羟基。

9. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1a与E3LB共价结合。

10. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1b与E3LB或BRM共价结合。

11. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1c与E3LB、BRM或L2共价结合。

12. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1b与E3LB共价结合。

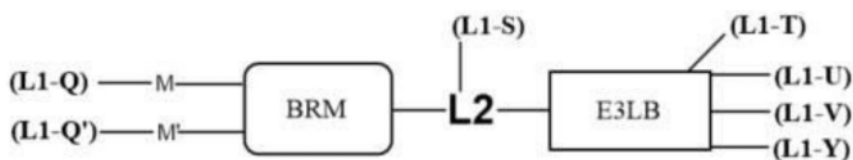
13. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1b与BRM共价结合。

14. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1c与E3LB共价结合。

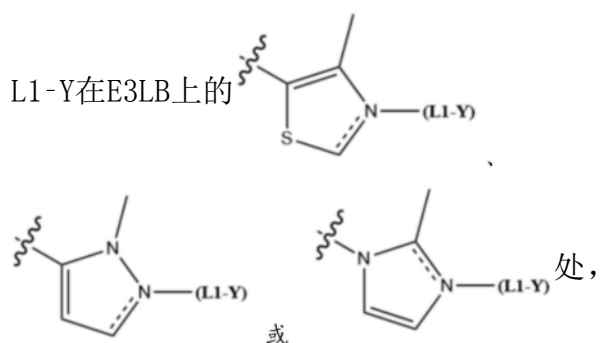
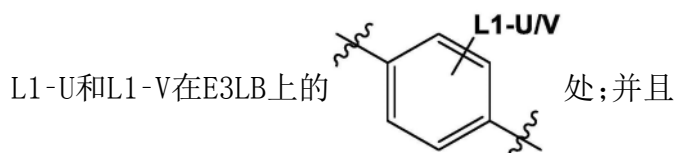
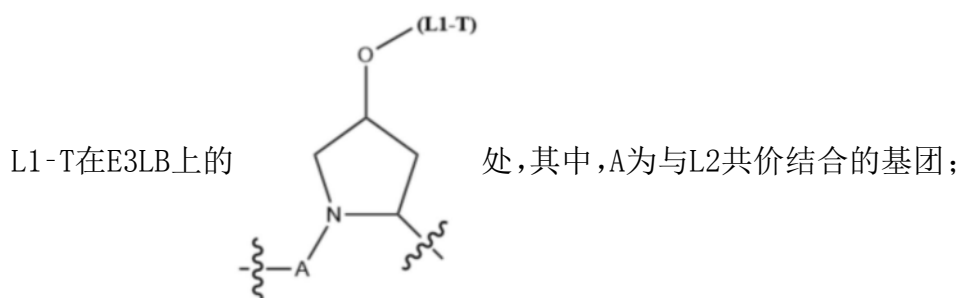
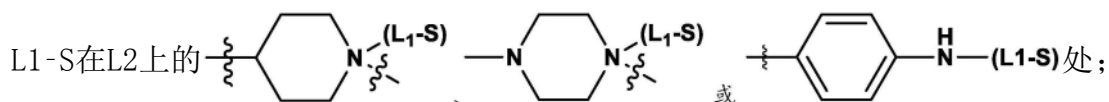
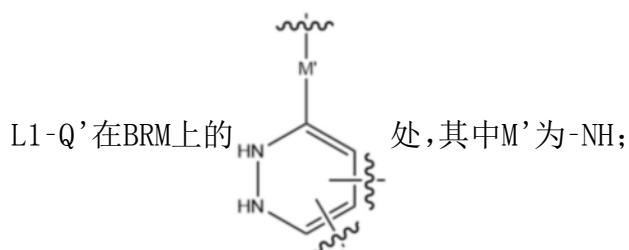
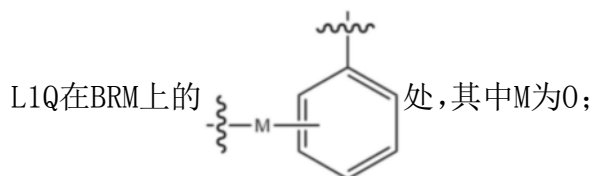
15. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1c与BRM共价结合。

16. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1c与L2共价结合。

17. 根据权利要求1所述的缀合物,其中D具有以下结构:

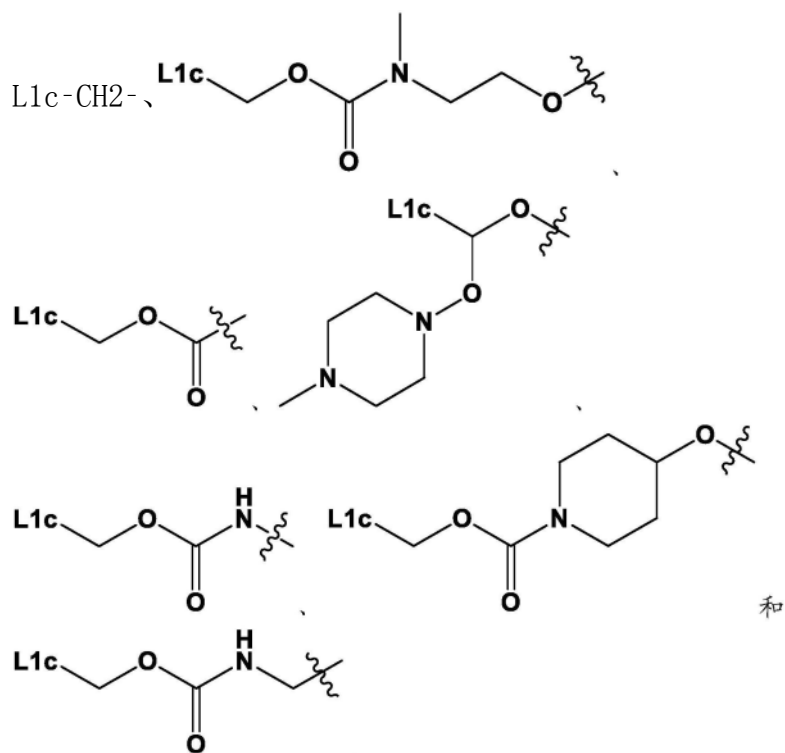


其中L1连接在选自以下的一个连接点处:L1-Q、L1-Q'、L1-S、L1-T以及任选的L1-U、L1-V和L1-Y,如果存在的话,其中

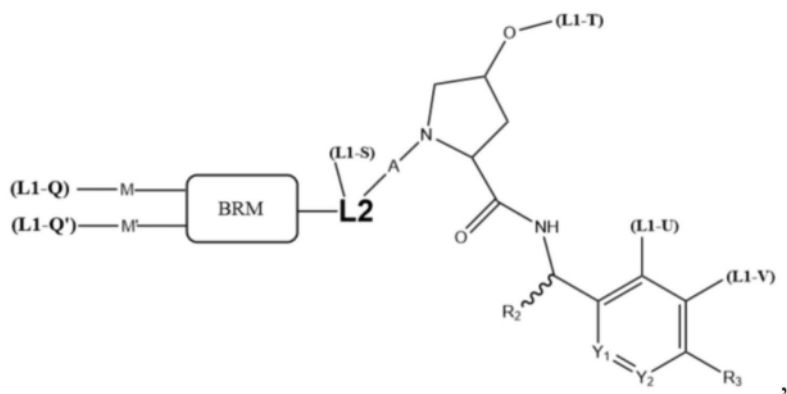


其中,  为单键或双键。

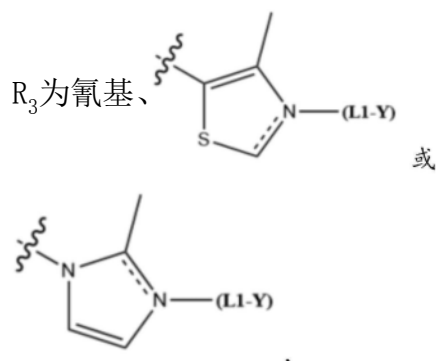
18. 根据权利要求8所述的缀合物,其中L1c的K选自由以下项组成的组:



19. 根据权利要求17所述的缀合物,其具有以下结构:

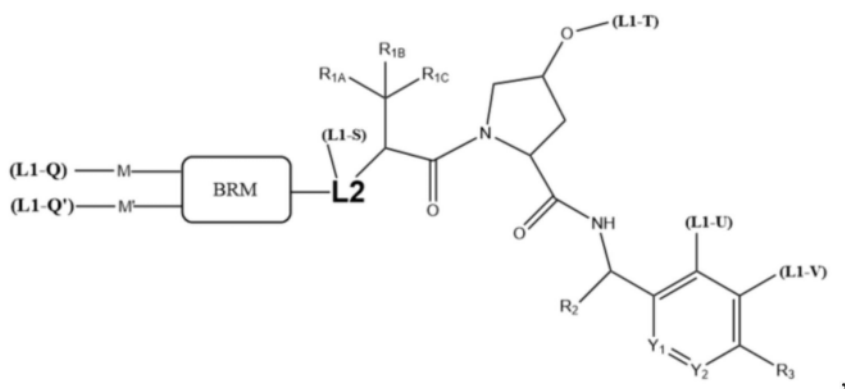


其中:



其中, $\equiv$ 为单键或双键。

20. 根据权利要求19所述的缀合物,其具有以下结构:



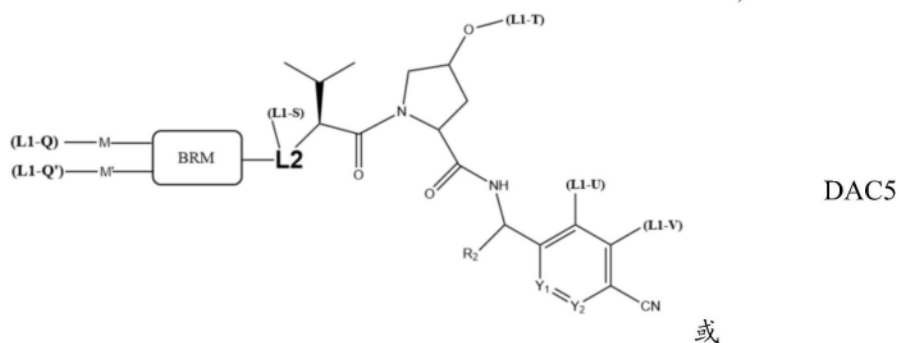
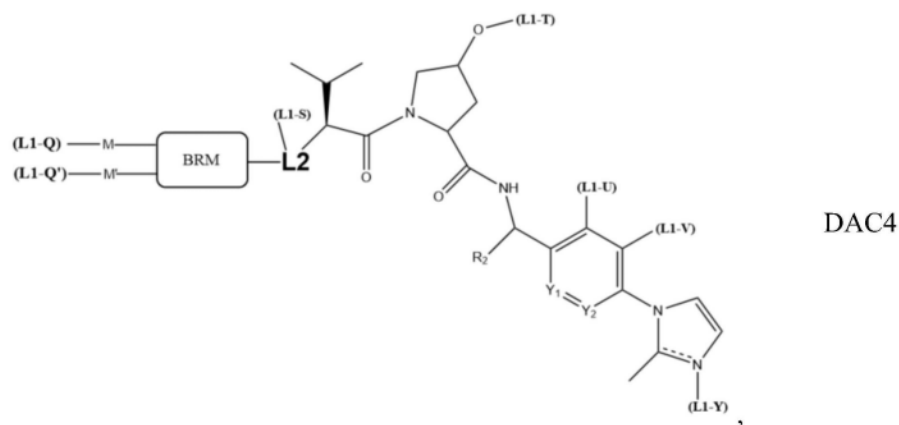
其中, R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基;或者

R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 中的两者与各自所连接的碳一起形成 C_{1-5} 环烷基。

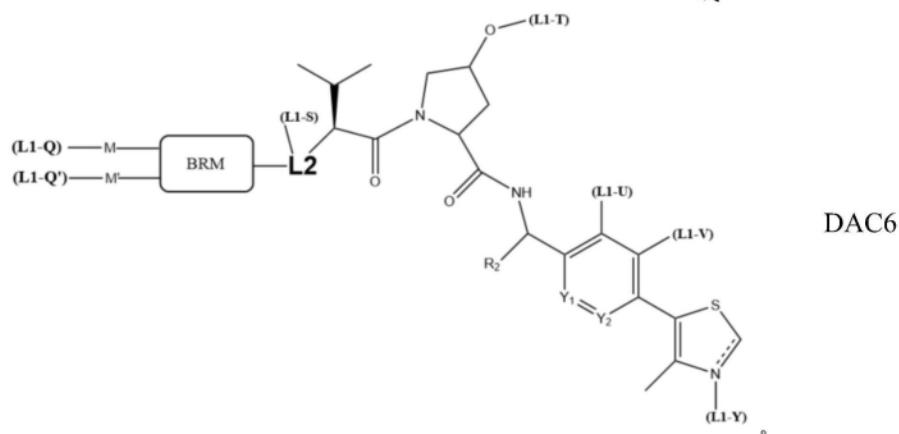
21. 根据权利要求20所述的缀合物, 其中 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地为氢或甲基。

22. 根据权利要求21所述的缀合物, 其中 R_{1A} 和 R_{1B} 各自为甲基。

23. 根据权利要求22所述的缀合物, 其具有以下结构:

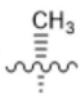


或



24. 根据权利要求23所述的缀合物, 其中 R_2 为氢、甲基、乙基或丙基。

25. 根据权利要求24所述的缀合物, 其中 R_2 为甲基。

26. 根据权利要求25所述的缀合物, 其中 R_2 与E3LB结合为 。

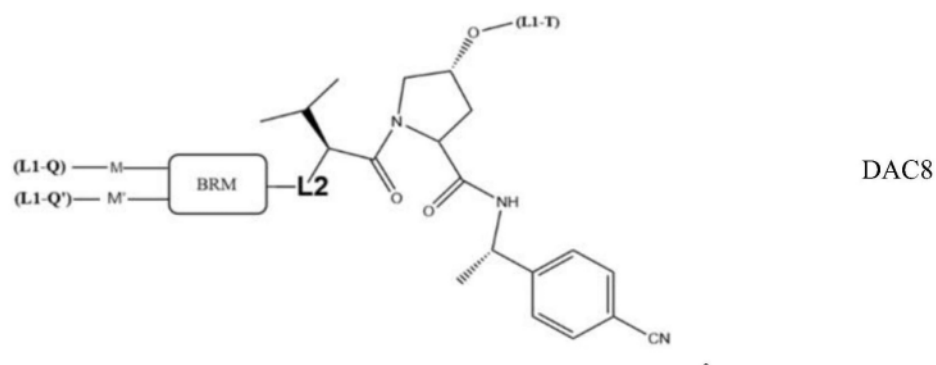
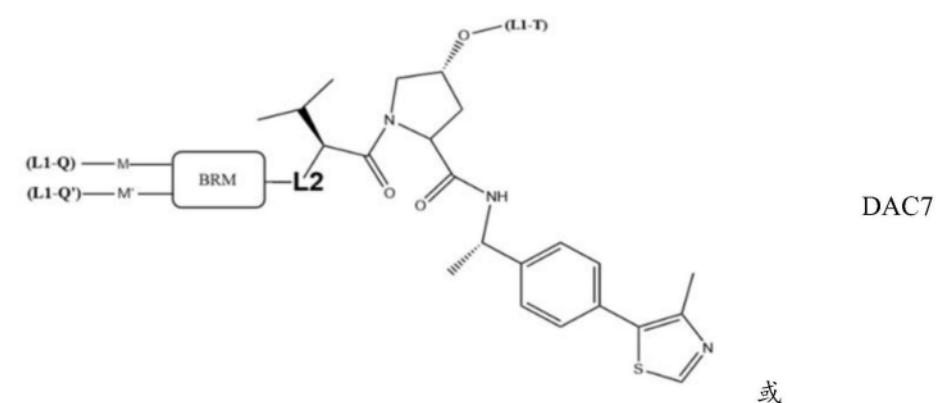
27. 根据权利要求23所述的缀合物, 其中 Y_1 和 Y_2 各自为-CH。

28. 根据权利要求23所述的缀合物, 其中 Y_1 为N, 并且 Y_2 为-CH。

29. 根据权利要求23所述的缀合物, 其中 Y_1 为-CH, 并且 Y_2 为N。

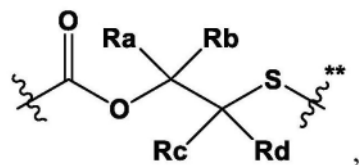
30. 根据权利要求23所述的缀合物, 其中L1连接在L1-Q、L1-Q'或L1-T处。

31. 根据权利要求30所述的缀合物, 其具有以下结构:



32. 根据权利要求17所述的缀合物, 其中:

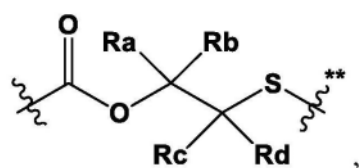
L1连接在L1-T处, 并且为



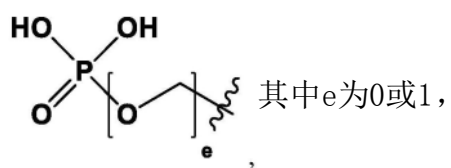
其中, R_a 、 R_b 、 R_c 和 R_d 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基。

33. 根据权利要求17所述的缀合物, 其中:

L1连接在L1-T处, 并且为



其中,Ra、Rb、Rc和Rd各自独立地选自氢和C₁₋₃烷基;并且
具有以下结构的磷酸酯部分:

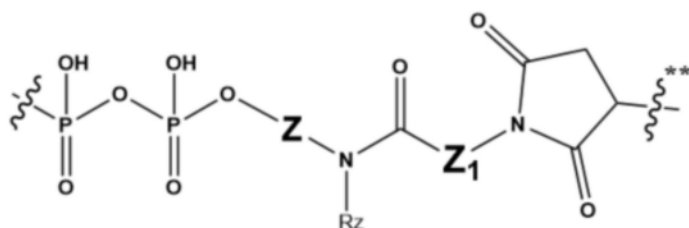


与BRM共价结合。

34. 根据权利要求17所述的缀合物, 其中:

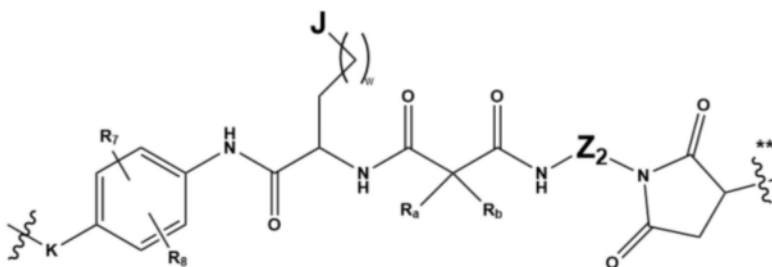
L1连接在L1-T处并且选自由以下项组成的组:

ii) L1b



和

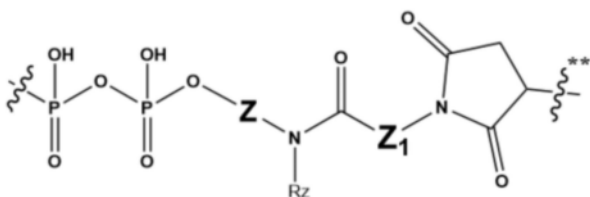
iii) L1c



35. 根据权利要求17所述的缀合物, 其中:

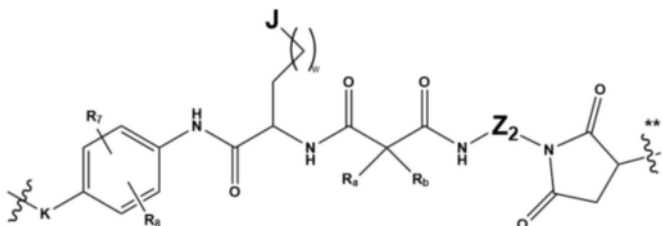
L1连接在L1-T处并且选自由以下项组成的组:

ii) L1b



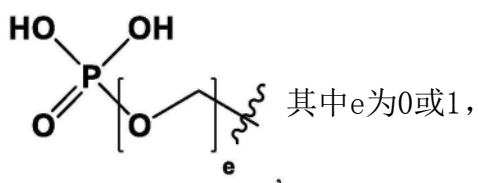
和

iii) L1c



并且具有以下结构的磷酸酯部分:

;

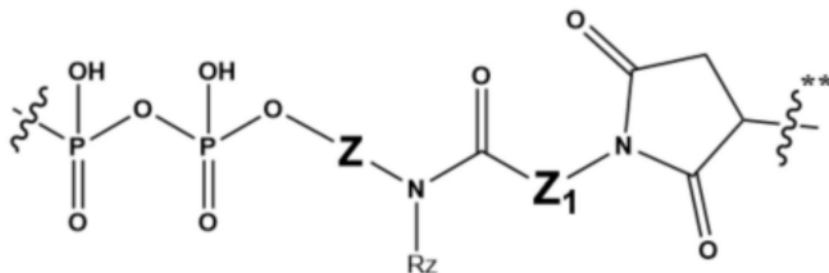


与BRM共价结合。

36. 根据权利要求17所述的缀合物, 其中:

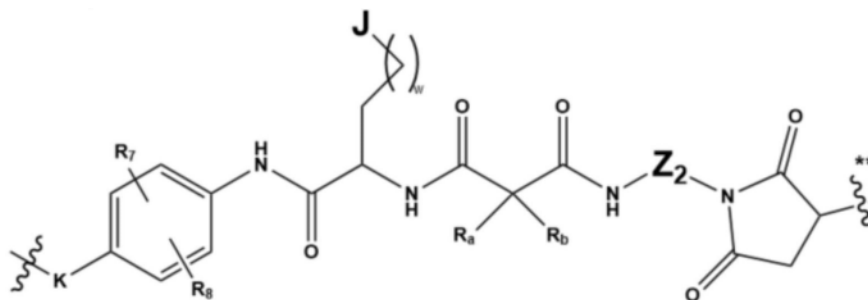
L1连接在L1-Q处并且选自由以下项组成的组:

ii) L1b



和

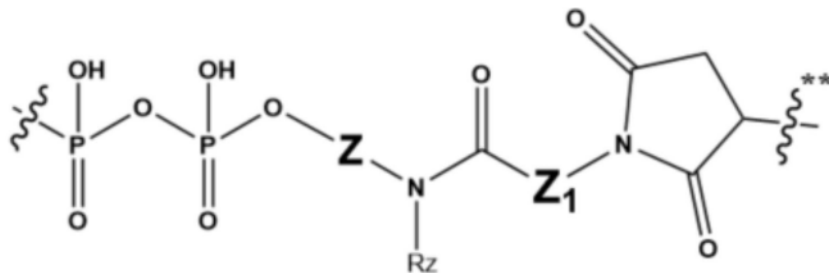
iii) L1c



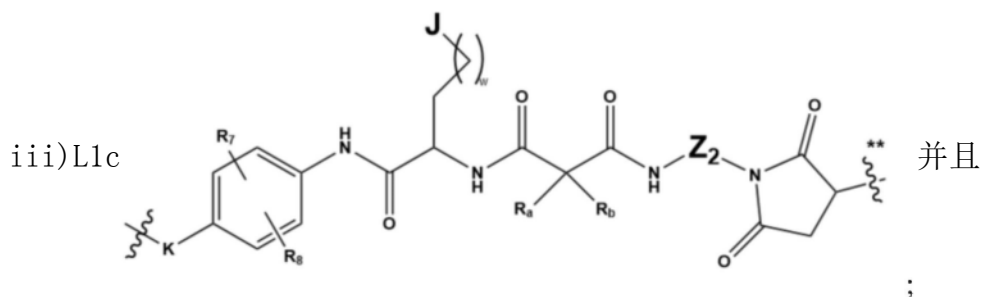
37. 根据权利要求17所述的缀合物, 其中:

L1连接在L1-Q处并且选自由以下项组成的组:

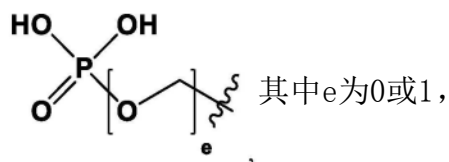
ii) L1b



和



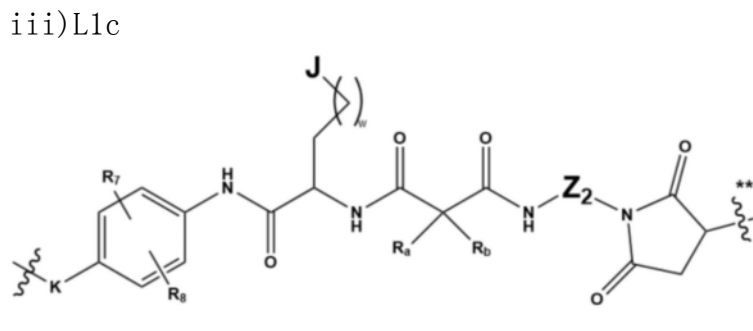
具有以下结构的磷酸酯部分：



与BRM共价结合。

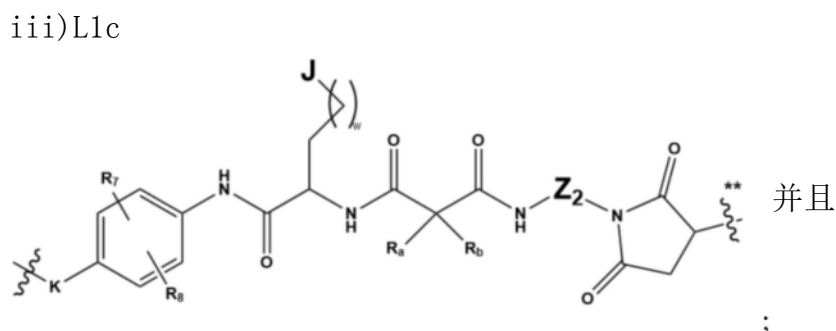
38. 根据权利要求17所述的缀合物，其中：

L1连接在L1-Q'处并且具有以下结构：

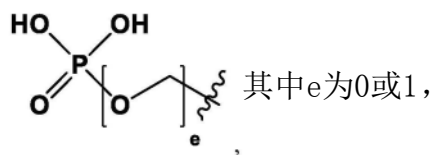


39. 根据权利要求17所述的缀合物，其中：

L1连接在L1-Q'处并且具有以下结构：



具有以下结构的磷酸酯部分：



与E3LB共价结合。

40. 根据权利要求8所述的缀合物，其中：

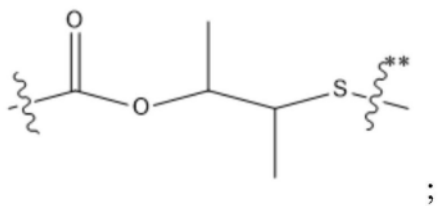
Z和Z₁各自独立地选自-(CH₂)₁₋₆-和-[CH₂]_g-[-O-CH₂]_h-, 其中g为0、1或2, 并且h为1至5。

41. 根据权利要求8所述的缀合物，其中：

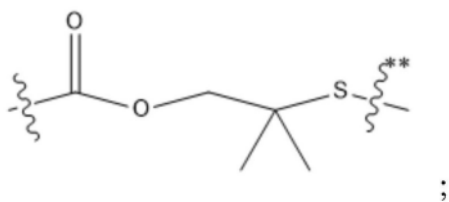
Z_2 选自 $-(CH_2)_{1-6}-$ 和 $-[CH_2]_g-[O-CH_2]_h-$, 其中 g 为 0、1 或 2, 并且 h 为 1 至 5。

42. 根据权利要求 8 所述的缀合物, 其中 $L1$ 选自由以下项组成的组:

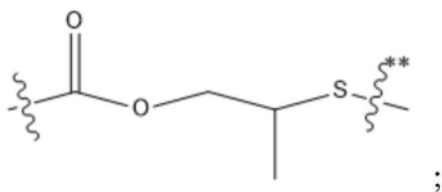
L1a-i)



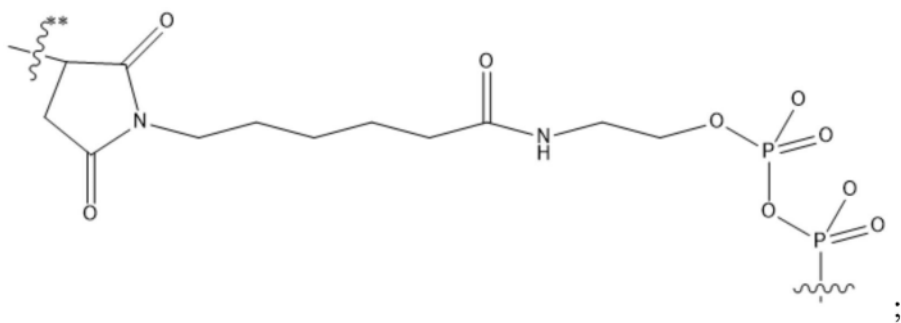
L1a-ii)



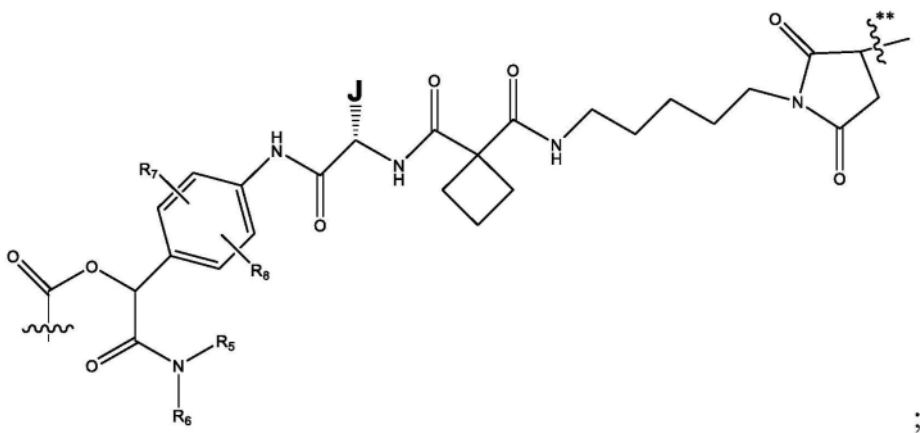
L1a-iii)



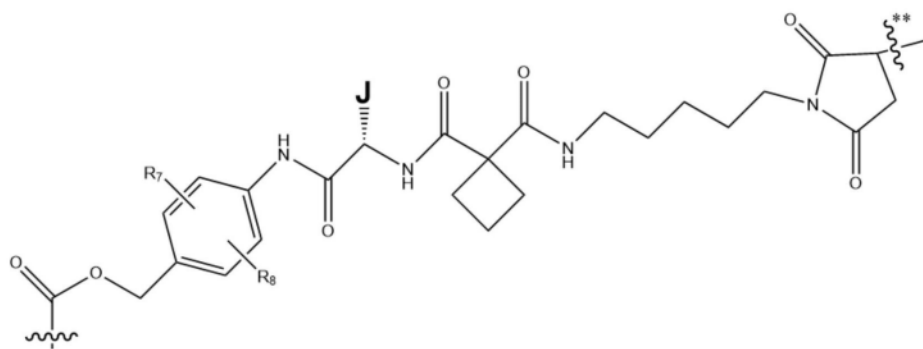
L1b-i)



L1c-i)

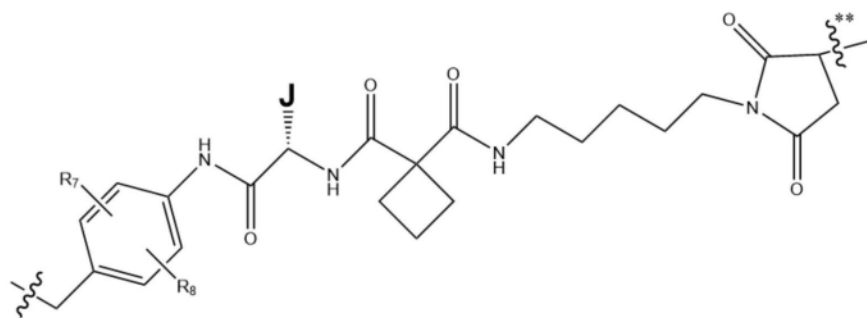


L1c-ii)



;

L1c-iii)



;

其中,

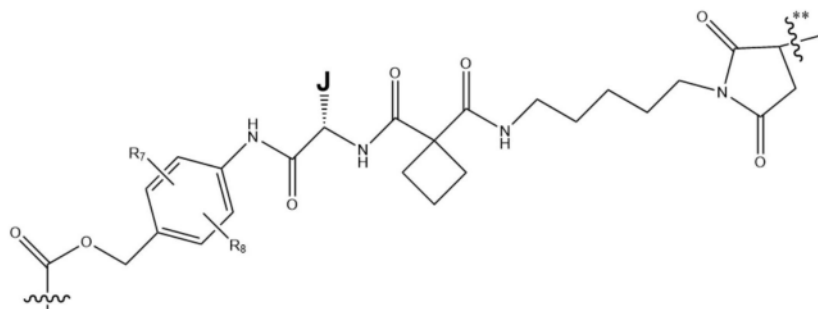
J为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$; 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

$\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

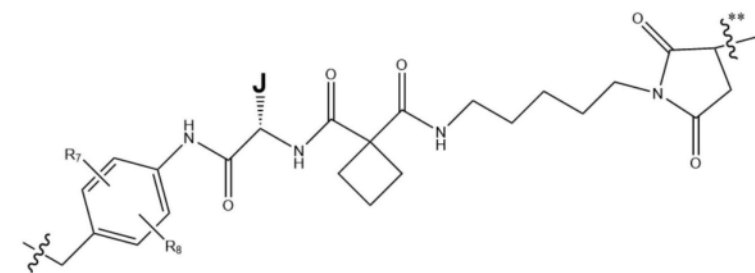
R_5 和 R_6 独立地为氢或 C_{1-5} 烷基;或者 R_5 和 R_6 与各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基;并且

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。

43. 根据权利要求42所述的缀合物, 其中L1选自由以下项组成的组:



或



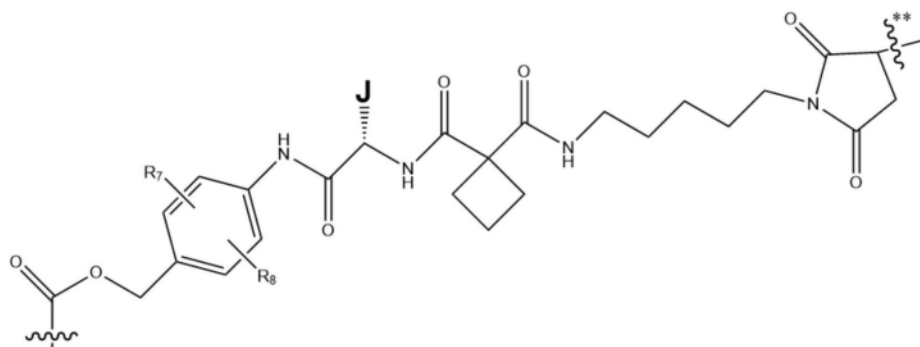
其中,

J为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$; 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$; 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。

44. 根据权利要求43所述的缀合物, 其中J为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$ 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 。

45. 根据权利要求43所述的缀合物, 其中L1具有以下结构:

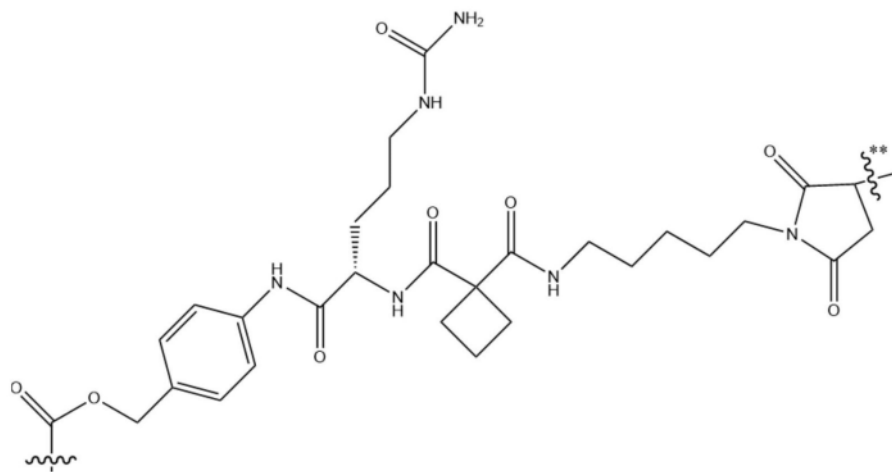


其中,

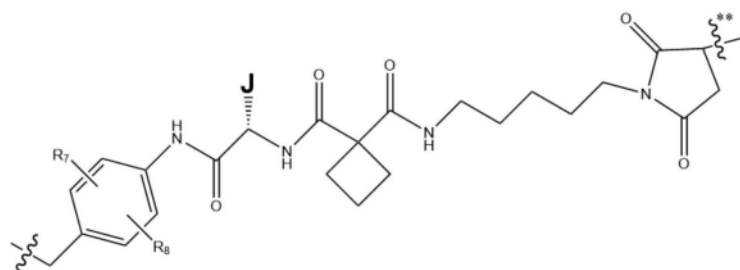
J为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$; 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$; 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。

46. 根据权利要求45所述的缀合物, 其中L1具有以下结构:



47. 根据权利要求43所述的缀合物, 其中接头-1具有以下结构:

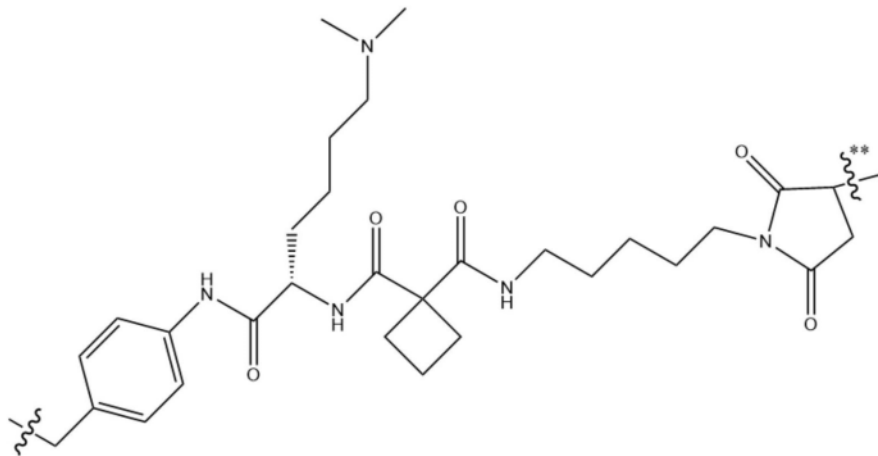


其中,

J为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$; 或
 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; 并且

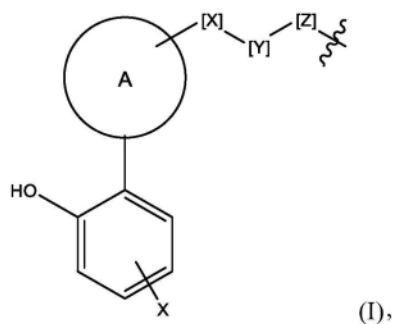
R_7 和 R_8 各自独立地为氢、卤代、 C_{1-5} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基或羟基。

48. 根据权利要求47所述的缀合物, 其中L1具有以下结构:



49. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中:

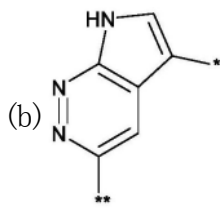
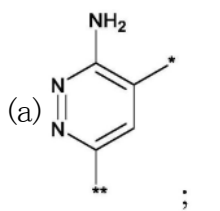
 为具有式I结构的BRM结合化合物的残基:

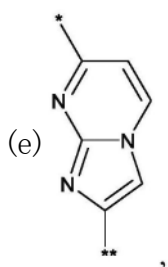
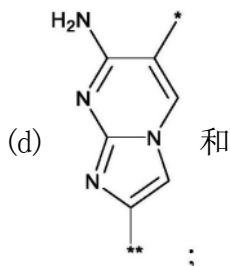
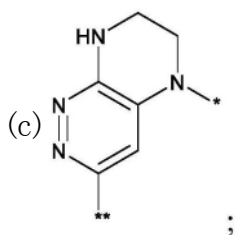


(I),

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: 其中X为氢或卤素;

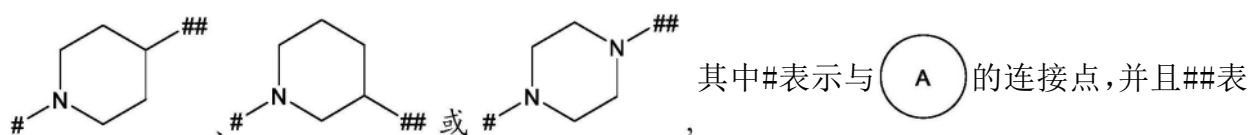
 选自由以下项组成的组:





其中,对于(a)至(e),*表示与[X]的连接点,或者,如果[X]不存在,*表示与[Y]的连接点,并且**表示与苯环的连接点;并且其中:

(i) [X]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,条件是,当  为(a)时,则[X]不是



示与L2的连接点,

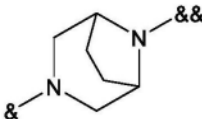
[Y]不存在,并且

[Z]不存在;或者

(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元杂环基任选地被一个或多个-OH或C₁₋₆烷基取代,

[Y]不存在,并且

[Z]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,

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]不是



连接点,并且##表示与L2的连接点;或者

(iii) [X]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,

[Y]为亚甲基,其中[Y]的亚甲基任选地被一个或多个甲基基团取代,并且
 [Z]为3元至15元杂环基;或者
 (iv) [X]不存在,
 [Y]为亚乙烯基,其中[Y]的亚乙烯基任选地被一个或多个卤代取代,并且
 [Z]为5元至20元杂芳基,

条件是,  为(a)、(b)、(d)或(e);或者

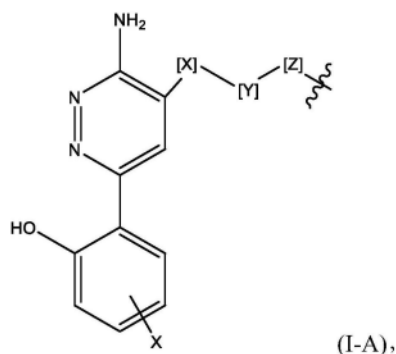
(v) [X]不存在,
 [Y]为亚乙炔基,并且
 [Z]为5元至20元杂芳基,

条件是,  为(a)、(b)、(d)或(e);或者

(vi) [X]不存在,
 [Y]为环丙基或环丁基,并且
 [Z]为5元至20元杂芳基,

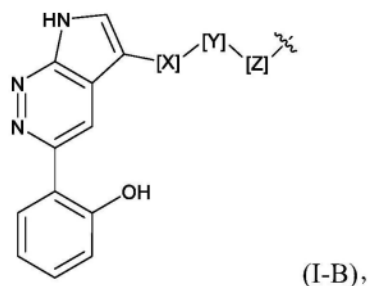
条件是,  为(a)、(b)、(d)或(e)。

50. 根据权利要求49所述的缀合物,其中BRM结合化合物的所述残基为式(I-A)化合物:



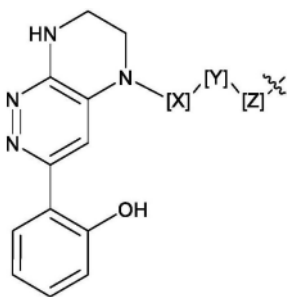
或其立体异构体或互变异构体,或其药用盐。

51. 根据权利要求49所述的缀合物,其中BRM结合化合物的所述残基为式(I-B)化合物:



或其立体异构体或互变异构体,或其药用盐。

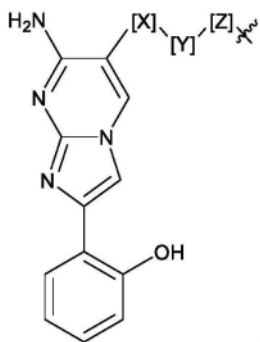
52. 根据权利要求49所述的缀合物,其中BRM结合化合物的所述残基为式(I-C)化合物:



(I-C),

或其立体异构体或互变异构体,或其药用盐。

53. 根据权利要求49所述的缀合物,其中BRM结合化合物的所述残基为式(I-D)化合物:

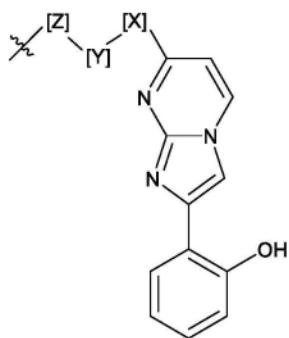


其中X为氢或卤素,

(I-D),

或其立体异构体或互变异构体,或其药用盐。

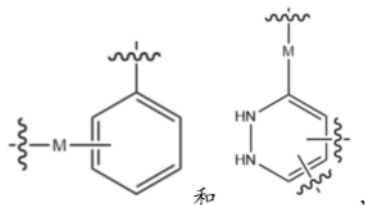
54. 根据权利要求49所述的缀合物,其中BRM结合化合物的所述残基为式(I-E)化合物:



(I-E),

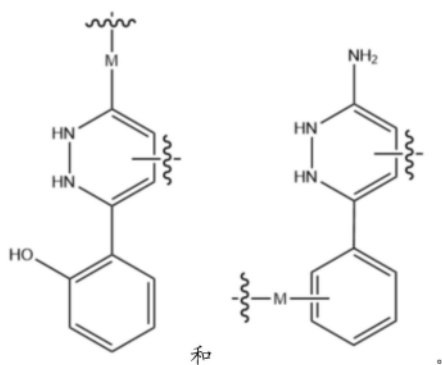
或其立体异构体或互变异构体,或其药用盐。

55. 根据权利要求49所述的缀合物,其中BRM结合化合物的所述残基包含选自由以下项组成的组的至少一个部分:

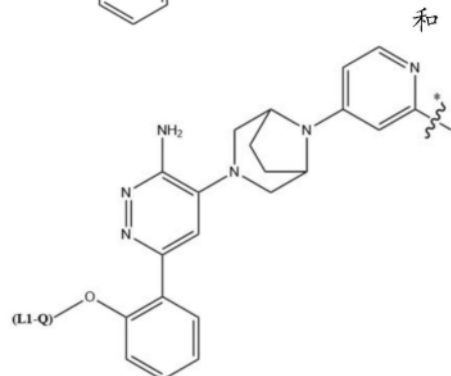
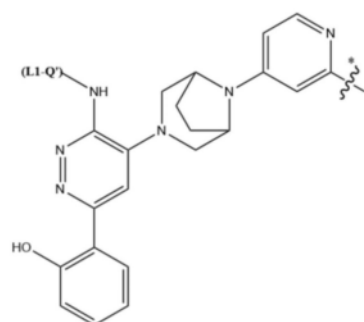
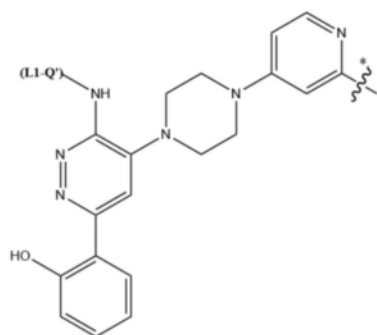
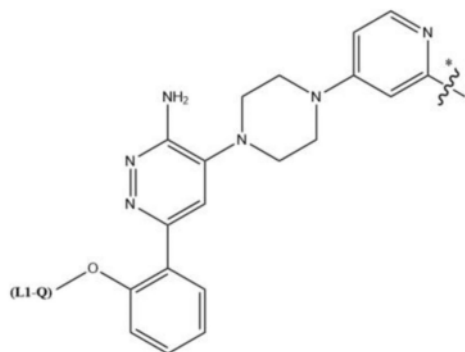


其中,M为-NH或氧并且与L1-Q共价结合。

56. 根据权利要求55所述的缀合物,其中BRM结合化合物的所述残基包含选自由以下项组成的组的部分:



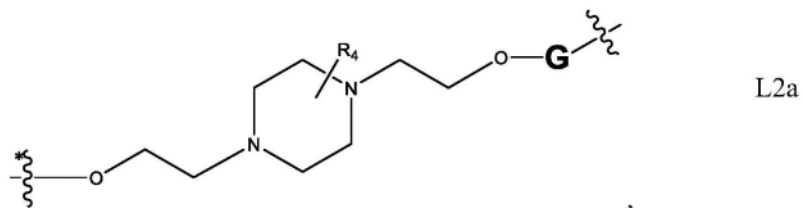
57. 根据权利要求56所述的缀合物, 其中BRM为以下项的残基:



其中,  为与L2的连接点。

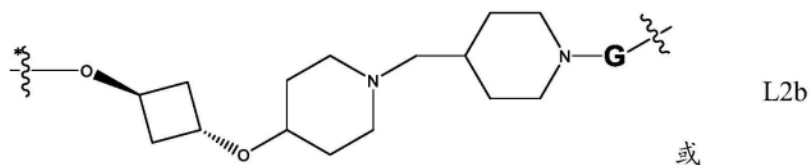
58. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中:

L2为与E3LB和BRM共价结合的接头-2, 所述L2具有下式:

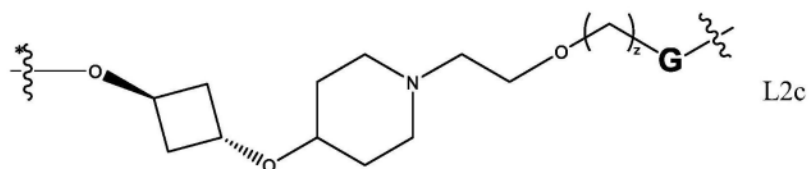


其中,

R_4 为氢或甲基,

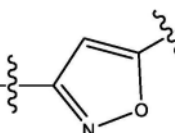


或



其中,

z 为1或0,

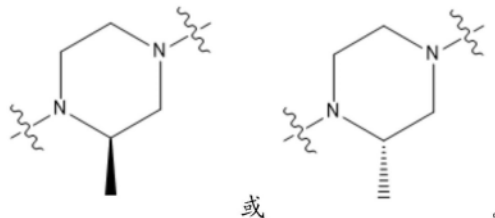
G为  或 $-C(=O)NH-$; 并且

 为与BRM的连接点。

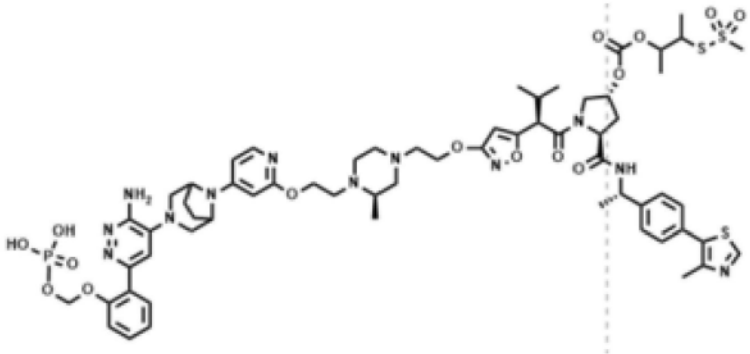
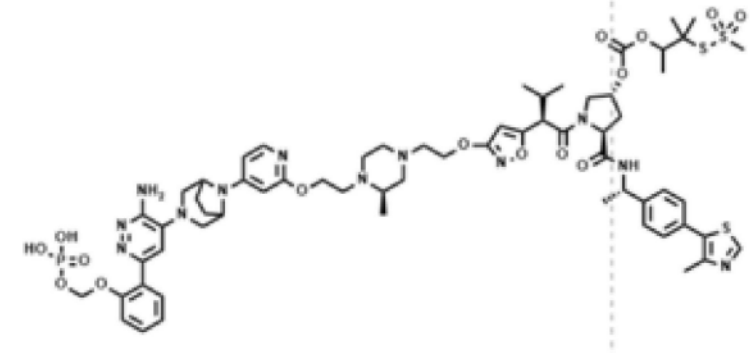
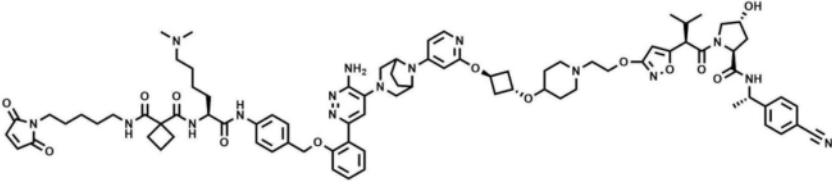
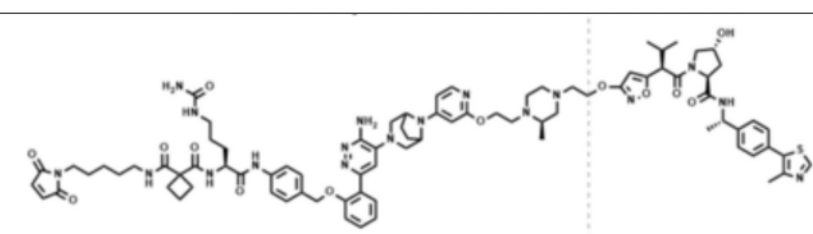
59. 根据权利要求58所述的缀合物, 其中 R_4 为氢。

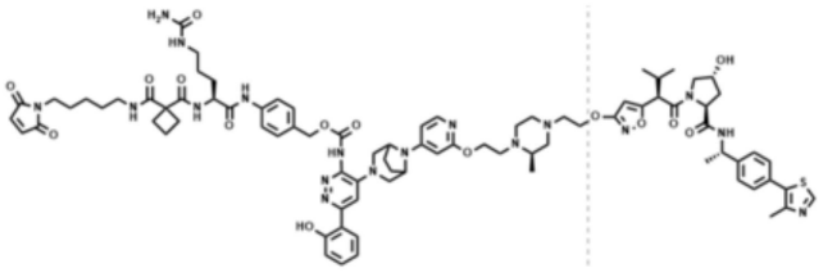
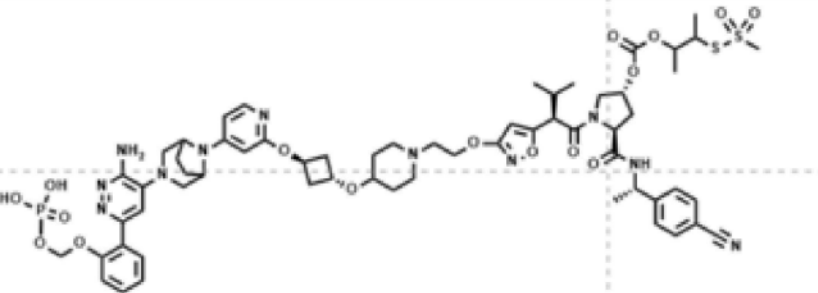
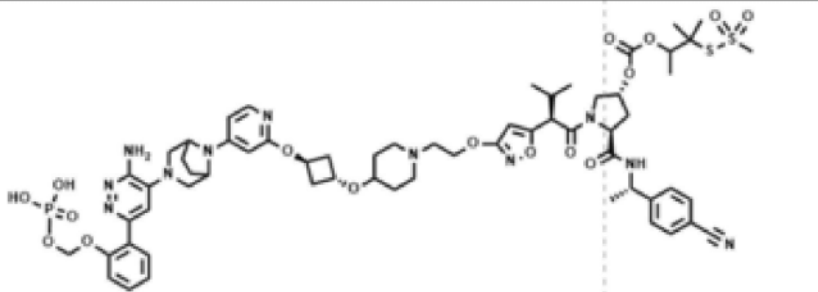
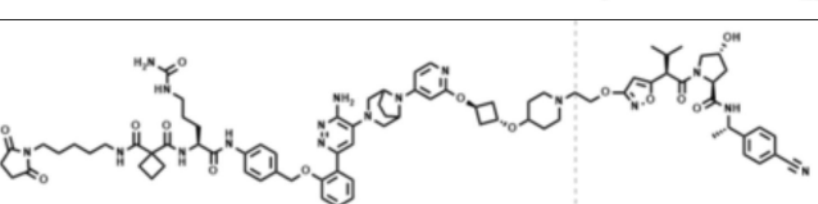
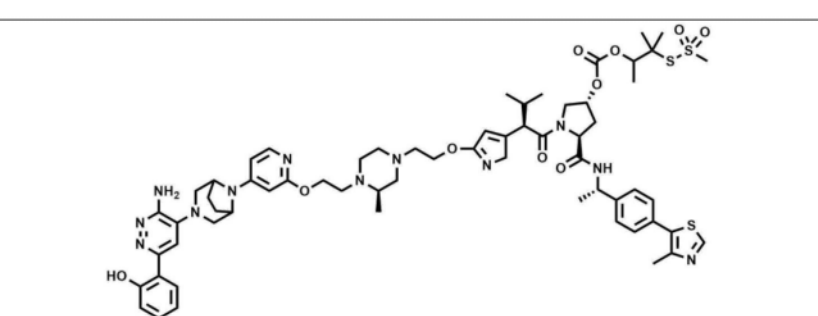
60. 根据权利要求58所述的缀合物, 其中 R_4 为甲基。

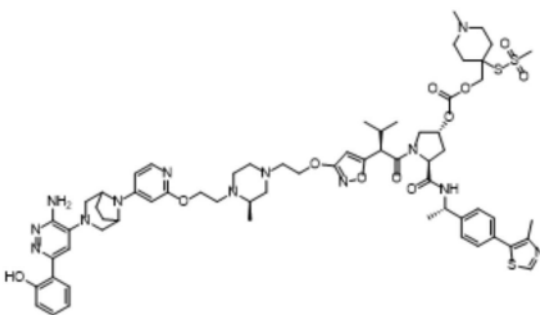
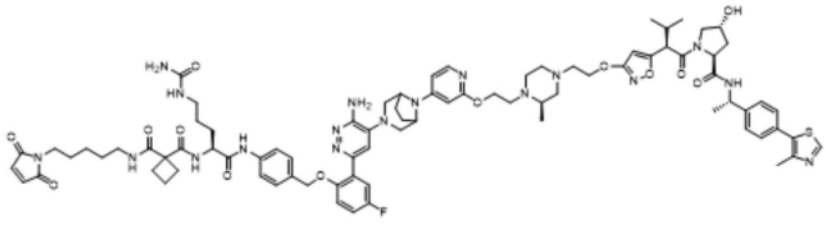
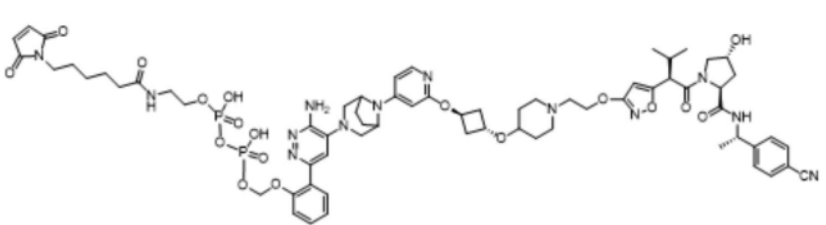
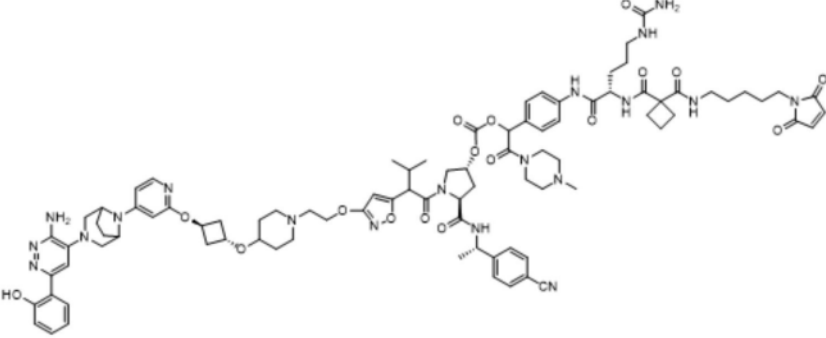
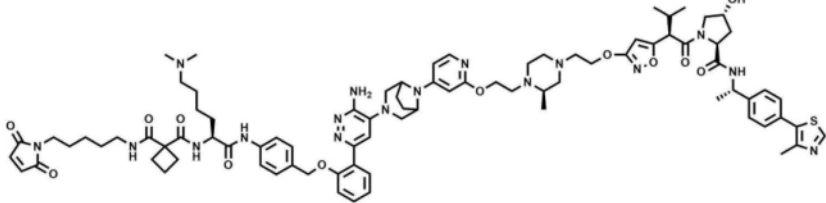
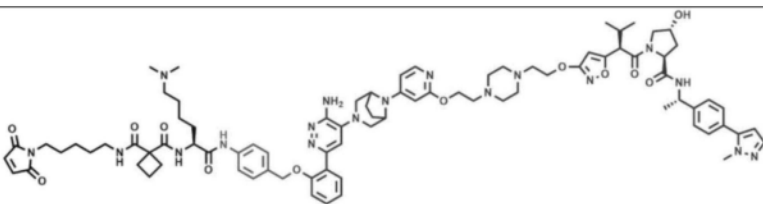
61. 根据权利要求60所述的缀合物, 其中 R_4 为甲基, 如下所示:



62. 根据权利要求1所述的缀合物, 其选自由以下项组成的组:

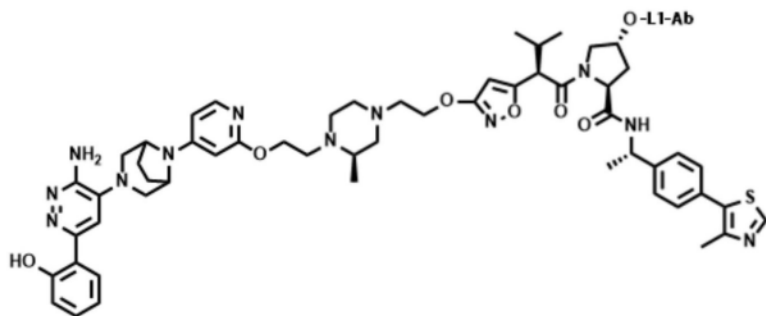
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-10, a complex molecule featuring a pyridine ring, a piperazine ring, a morpholine ring, a thiazole ring, and a sulfonamide group, connected by various linkers.	L1- CIDE- BRM1 -10
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-9, a complex molecule featuring a pyridine ring, a piperazine ring, a morpholine ring, a thiazole ring, and a sulfonamide group, connected by various linkers.	L1- CIDE- BRM1 -9
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-19, a complex molecule featuring a pyridine ring, a piperazine ring, a morpholine ring, a thiazole ring, and a sulfonamide group, connected by various linkers.	L1- CIDE- BRM1 -19
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-13, a complex molecule featuring a pyridine ring, a piperazine ring, a morpholine ring, a thiazole ring, and a sulfonamide group, connected by various linkers.	L1- CIDE- BRM1 -13

 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-20, a complex molecule featuring a central pyridine ring connected to various functional groups, including a hydroxyl group, a carboxylic acid, and a sulfonamide.	L1- CIDE- BRM1 -20
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-11, a complex molecule featuring a central pyridine ring connected to various functional groups, including a hydroxyl group, a carboxylic acid, and a sulfonamide.	L1- CIDE- BRM1 -11
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-12, a complex molecule featuring a central pyridine ring connected to various functional groups, including a hydroxyl group, a carboxylic acid, and a sulfonamide.	L1- CIDE- BRM1 -12
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-14, a complex molecule featuring a central pyridine ring connected to various functional groups, including a hydroxyl group, a carboxylic acid, and a sulfonamide.	L1- CIDE- BRM1 -14
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-7, a complex molecule featuring a central pyridine ring connected to various functional groups, including a hydroxyl group, a carboxylic acid, and a sulfonamide.	L1- CIDE- BRM1 -7

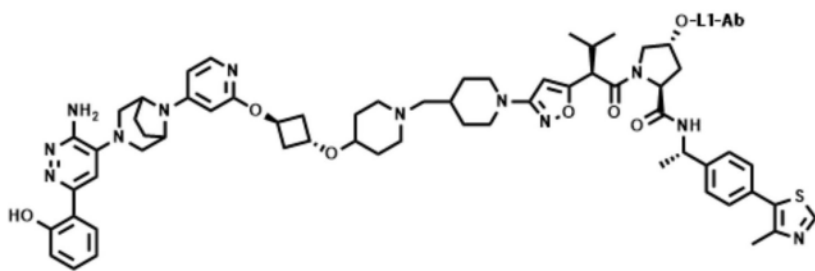
	L1- CIDE- BRM1 -8
	L1- CIDE- BRM1 -16
	L1- CIDE- BRM1 -17
	L1- CIDE- BRM1 -18
	L1- CIDE- BRM1 -21
	L1- CIDE- BRM1 -22

o

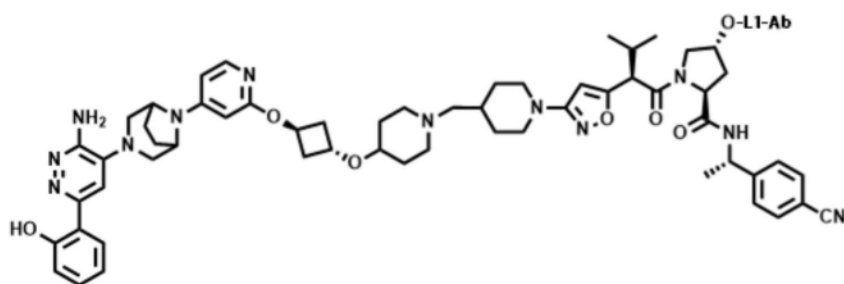
63. 根据权利要求1所述的缀合物,其选自由以下项组成的组:



1-L2a

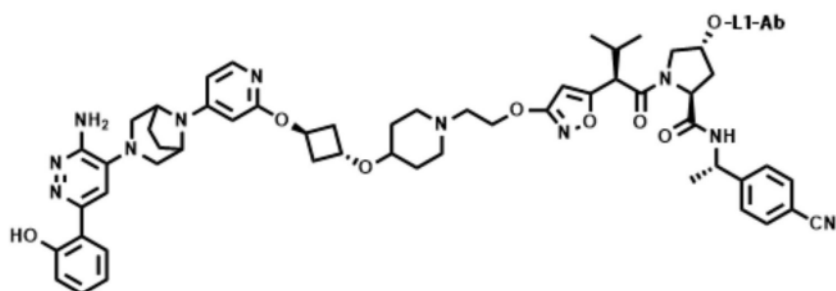


2-L2b



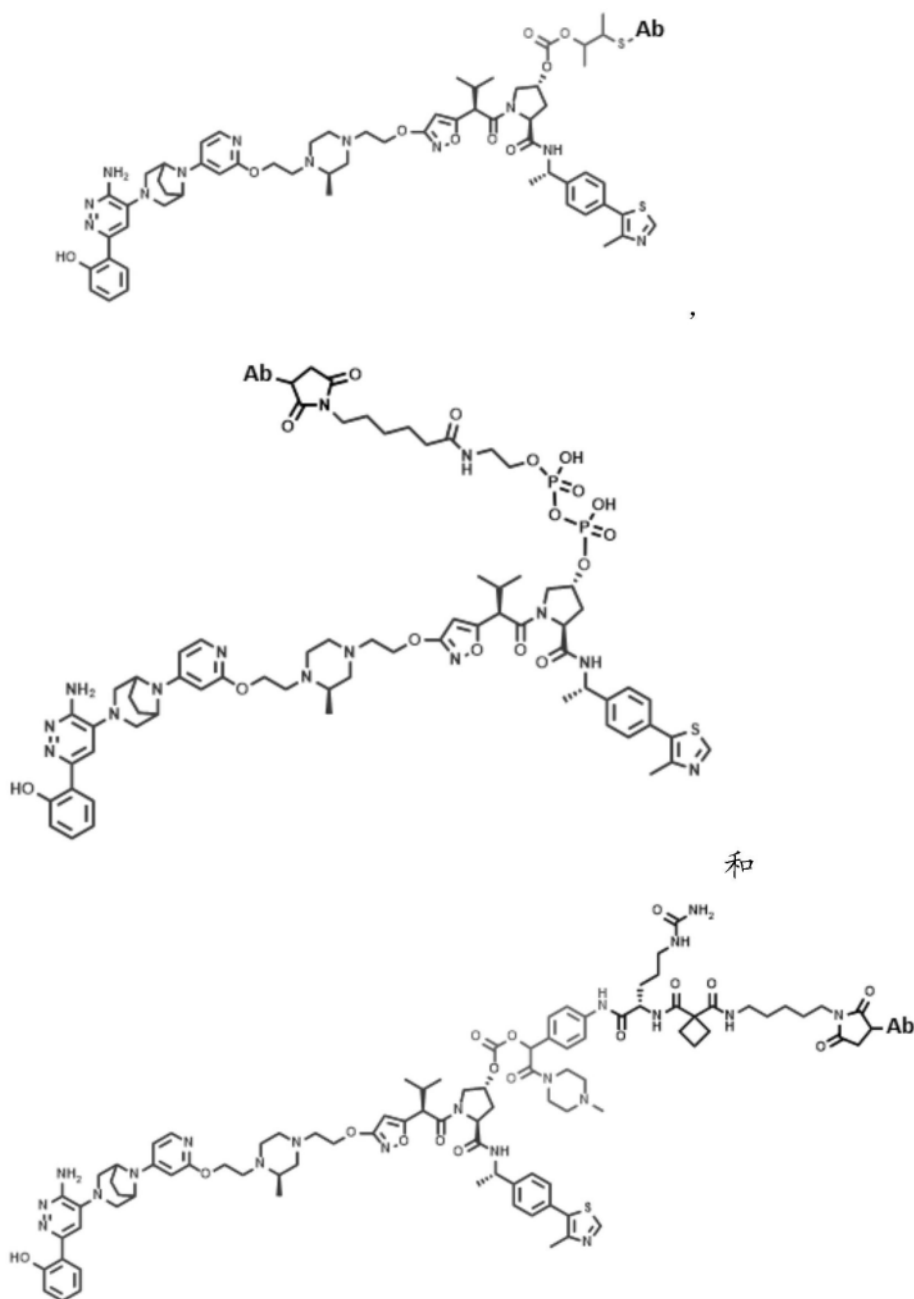
3-L2b

和



4-L2c

64. 根据权利要求1所述的缀合物,其选自由以下项组成的组:



65. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中p具有约5至约14的值。
66. 根据权利要求1所述的缀合物, 其中p具有约5至约10的值。
67. 一种药物组合物, 其包含根据权利要求1所述的缀合物以及一种或多种药用赋形剂。
68. 一种治疗有此需要的人的疾病的方法, 其包括向所述人施用有效量的根据权利要求1所述的缀合物或根据权利要求47所述的组合物。
69. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述疾病为癌症。
70. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述癌症是BRM依赖性的。
71. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述癌症为非小细胞肺癌。
72. 一种降低受试者的靶BRM蛋白质水平的方法, 其包括:
向所述受试者施用根据权利要求1所述的缀合物或根据权利要求69所述的组合物, 其

中所述BRM部分结合所述靶BRM蛋白质,其中泛素连接酶实现所述结合的靶BRM蛋白质的降解,其中所述BRM靶蛋白的水平降低。

降解BRM的抗体缀合化学诱导剂及其方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年7月21日提交的美国专利申请第63/054,757号的优先权和权益,该专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 序列表的正式副本通过EFS-Web以ASCII格式的序列表的形式通过电子方式提交,其文件名为P36010-WO_SL.txt,创建于2021年7月20日,大小为44,936字节,与说明书同时提交。该ASCII格式的文档中包含的序列表是说明书的一部分,其全部内容以引用的方式并入本文。

技术领域

[0005] 本文所述的主体总体上涉及包含抗体-蛋白质水解-靶向嵌合分子的降解剂缀合物,其可用于促进靶BRM蛋白质的细胞内降解。

背景技术

[0006] 细胞维持和正常功能需要细胞蛋白质的受控降解。例如,调节蛋白质的降解会触发细胞周期中的事件,例如DNA复制,染色体分离等。因此,这种蛋白质降解会影响细胞的增殖、分化和死亡。

[0007] 尽管蛋白质抑制剂可以阻止或降低细胞中的蛋白质活性,但细胞中蛋白质降解也可以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以提供减少或去除蛋白质活性的手段。细胞的主要降解途径中的一者已知是泛素-蛋白酶体系统。在该系统中,通过泛素化蛋白质来标记,蛋白质被蛋白酶体降解。蛋白质的泛素化是通过与蛋白质结合并将泛素分子添加到蛋白质的E3泛素连接酶完成的。E3泛素连接酶是包括E1和E2泛素连接酶的途径的一部分,这使E3泛素连接酶可将泛素添加到蛋白质中。

[0008] 为了利用这种降解途径,称为化学降解诱导剂(CIDE)的分子结构将E3泛素连接酶与待降解的蛋白质结合在一起。为了促进蛋白酶体降解蛋白质,CIDE包括与E3泛素连接酶结合的基团和与待降解的蛋白质靶结合的基团。这些基团通常与接头连接。该分子CIDE可以使E3泛素连接酶与蛋白质接近,从而使其泛素化并标记用于降解。然而,CIDE相对较大的尺寸可能给靶向递送造成问题,并且会导致不良特性,例如快速代谢/清除、短半衰期和低生物利用度。

[0009] 本领域持续需要改善CIDE,包括增强CIDE向包含蛋白质靶的细胞的靶向递送。本文描述的主题解决了本领域中的这个和其他缺点。

发明内容

[0010] 在一方面,本文所述的主体涉及缀合或共价连接的Ab-CIDE,其中连接Ab-CIDE的以下组分的共价键的位置:抗体(Ab)、接头1(L1)、接头2(L2),蛋白质结合基团(PB)和E3连接酶结合基团(E3LB)可以根据需要进行定制,以制备具有所需性质的Ab-CIDE,诸如效价、

体内药代动力学、稳定性和溶解性。

[0011] 在一方面,本文描述的主题涉及具有以下化学结构的Ab-CIDE:

[0012] $\text{Ab}-(\text{L1-D})_p$,

[0013] 其中,

[0014] Ab为抗体;

[0015] D为CIDE或其前药,具有以下结构:



[0017] 其中,

[0018] BRM为BRM结合化合物的残基,

[0019] E3LB为E3连接酶结合化合物的残基,并且

[0020] L2为共价连接BRM与E3LB的部分;

[0021] L1为将Ab共价连接至BRM、E3LB或L2中的一者的接头-1;并且

[0022] p为1至16。

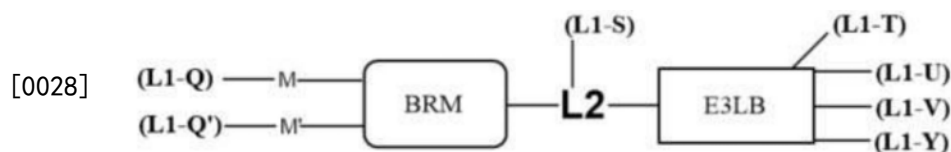
[0023] 在另一方面,本文描述的主题涉及具有以下化学结构的Ab-CIDE:

[0024] $\text{Ab}-(\text{L1-D})_p$,

[0025] 其中,

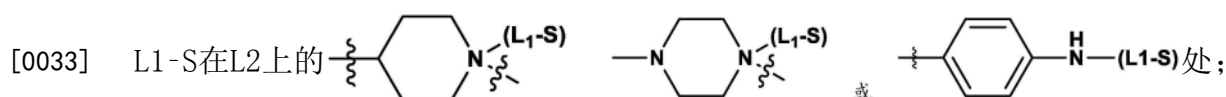
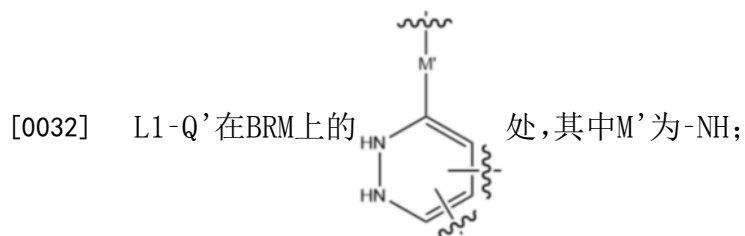
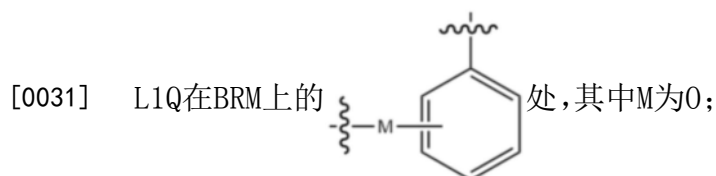
[0026] Ab为抗体;

[0027] D为CIDE或其前药,具有以下结构:

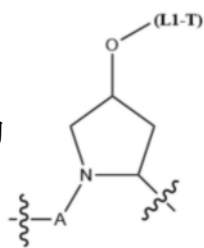


[0029] 其中L1连接在选自以下的一个连接点处:L1-Q、L1-Q'、L1-S、

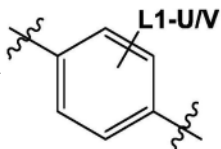
[0030] L1-T以及任选的L1-U、L1-V和L1-Y,如果存在的话,其中



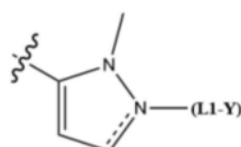
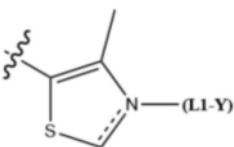
[0034] L1-T在E3LB上的 处,其中,A为与L2共价结合的基团;



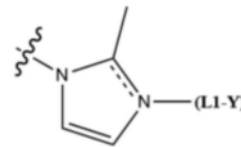
[0035] L1-U和L1-V在E3LB上的 处;并且



[0036] L1-Y在E3LB上的 处,



或



其中, 为单键或双键。

[0037] 在另一方面,本文描述的主题涉及具有以下化学结构的Ab-CIDE:

[0038] Ab- (L1-D)_p,

[0039] 其中,

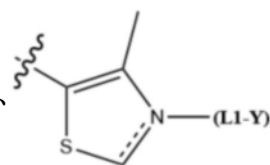
[0040] Ab为抗体;

[0041] D为CIDE或其前药,具有以下结构:

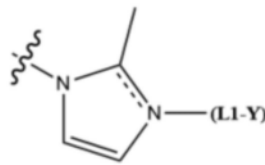


[0043] 其中:

[0044] R₃为氰基、



或



[0045] 其中, 为单键或双键。

[0046] 在另一方面,本文描述的主题涉及具有以下化学结构的Ab-CIDE:

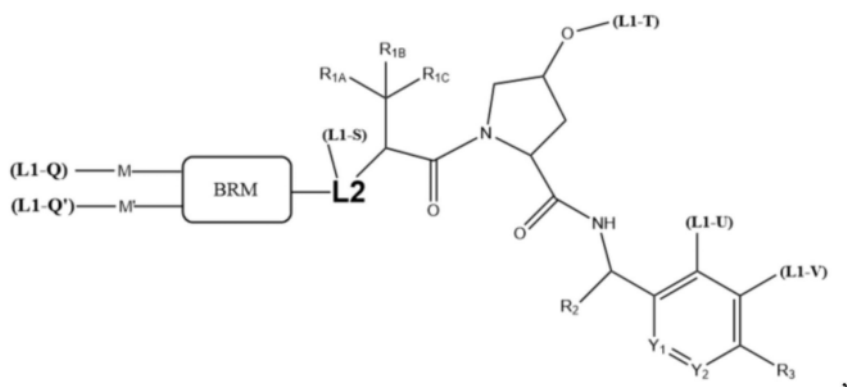
[0047] Ab- (L1-D)_p,

[0048] 其中,

[0049] Ab为抗体;

[0050] D为CIDE或其前药,具有以下结构:

[0051]



[0052] 其中, R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基; 或者 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 中的两者与各自所连接的碳一起形成 C_{1-5} 环烷基。

[0053] 在另一方面, 本文描述的主题涉及具有以下化学结构的 Ab-CIDE:

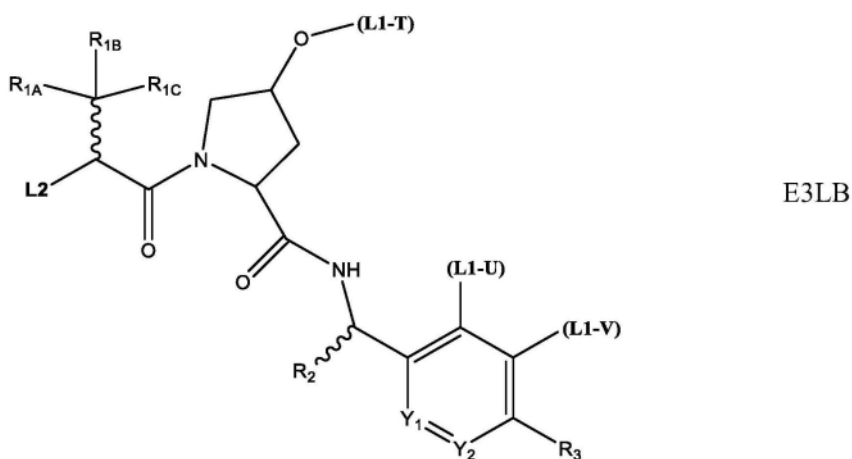
[0054] Ab-(L1-D)_p,

[0055] 其中,

[0056] D 为具有 E3LB-L2-PB 结构的 CIDE;

[0057] E3LB 与 L2 共价结合, 所述 E3LB 具有下式:

[0058]

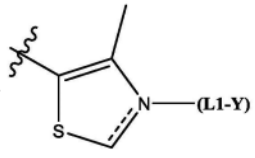
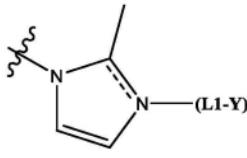


[0059] 其中,

[0060] R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基; 或者 R_{1A} 、 R_{1B} 和

[0061] R_{1C} 中的两者与各自所连接的碳一起形成 C_{1-5} 环烷基;

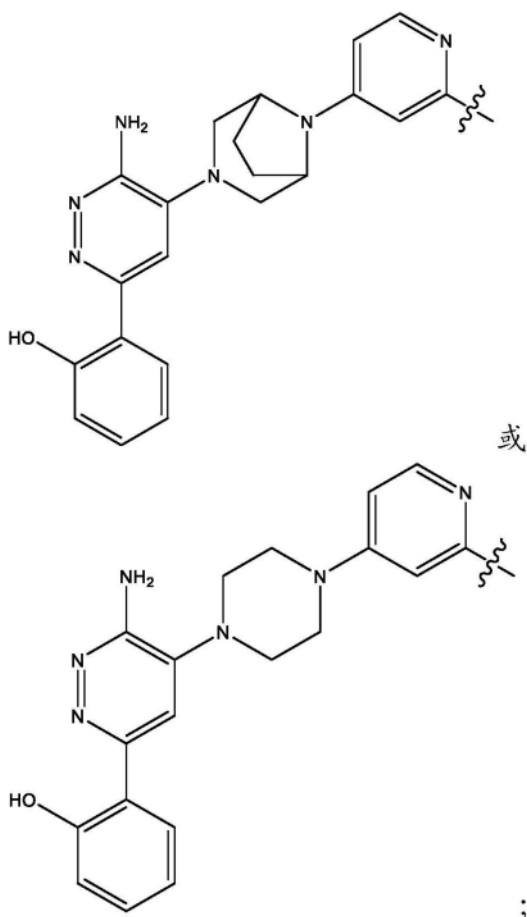
[0062] R_2 为 C_{1-5} 烷基;

[0063] R_3 选自自由氰基、 和  组成的组, 其中,  为单键

或双键;

[0064] Y_1 和 Y_2 中的一者为 -CH, Y_1 和 Y_2 中的另一者为 -CH 或 N;

[0065] L2 为与 E3LB 和 PB 共价结合的接头, 所述 L2 具有下式:



[0076] Ab为与至少一个L1共价结合的抗体,L1为接头;

[0077] L1-T、L1-U和L1-V各自独立地为氢或与Ab和D共价结合的L1接头;

[0078] L1-Y为氢或与Ab和D共价结合的L1接头;

[0079] q为1或0;

[0080] 并且,

[0081] p的值为约1至约8。

[0082] 本文描述的主题的另一方面是一种药物组合物,其包含Ab-CIDE和一种或多种药用赋形剂。

[0083] 本文描述的主题的另一方面是Ab-CIDE在通过向受试者施用包含Ab-CIDE的药物组合物来治疗症状和疾病的方法中的用途。

[0084] 本文描述的主题的另一方面是一种制备Ab-CIDE的方法。

[0085] 本文描述的主题的另一方面是一种制品,其包括包含Ab-CIDE的药物组合物、容器和指示该药物组合物可用于治疗疾病或症状的包装说明书或标签页。

[0086] 其他实施例也在本文中得到全面描述。

附图说明

[0087] 图1A和图1B示出了示例性Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1在细胞水平测定中具有活性。

[0088] 图2A和图2B示出了示例性Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3在细胞水平测定中具有

活性。

[0089] 图3A至图3L示出了示例性Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1的剂量和抗原依赖性抗肿瘤活性。

[0090] 图4A至图4L示出了示例性Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3的剂量和抗原依赖性抗肿瘤活性。数据与Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1的数据形成对比。

[0091] 图5示出了BRM和BRG1降解与示例性Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1的抗肿瘤活性相关。

[0092] 图6示出了BRM和BRG1降解与示例性Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3的抗肿瘤活性相关性较低。所有通道均用于Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-3,但**表示用于Ab-CIDE-L1a-BRM1-1的通道。

[0093] 图7示出了抗体连接策略可以调节CIDE的活性。数据显示,尽管CIDE-BRM1-3通常比CIDE-BRM1-1更有效,但是示例性Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1提供比未缀合的CIDE-BRM1-3更强的BRM降解。所有通道均用于Ab-CIDE Ab-L1a-CIDE-BRM1-1,但**表示用于Ab-CIDE-L1a-BRM1-3的通道。

[0094] 图8至图12描绘了本文所述的一些抗体连接策略。

具体实施方式

[0095] 本文公开了抗体-化学降解诱导剂(“CIDE”)缀合物,其在本文中称为Ab-CIDE,其可用于BRM(也称为SMARCA2)的靶向蛋白质降解以及相关疾病和病症的治疗。特别地,本公开涉及与抗体缀合的CIDE,其一端包含结合至Von Hippel-Lindau E3泛素连接酶的配体,并且另一端包含结合BRM(靶蛋白质)的部分,使得靶蛋白质置于泛素连接酶附近以实现降解,从而调节BRM。如本文所述,对接头的连接策略和类型进行调节,并且报告的数据显示,此类调节对于CIDE对BRM的活性可以产生有利影响。

[0096] 本文所述的主体利用抗体靶向将CIDE引导至靶细胞或组织。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,例如在实施例中,表达抗原的细胞可以被抗原特异性的Ab-CIDE靶向,由此Ab-CIDE的CIDE部分被细胞内递送至靶细胞。包含针对未在细胞上发现的抗原的抗体的CIDE不会导致CIDE向细胞的大量细胞内递送。

[0097] 因此,本文所述的主体涉及导致靶蛋白质泛素化和随后蛋白质降解的Ab-CIDE组合物。该组合物包含与接头1(L1)共价连接的抗体,该接头在任何可用的连接点与CIDE共价连接,其中CIDE包含E3泛素连接酶结合(E3LB)部分,其中该E3LB部分识别E3泛素连接酶蛋白质(VHL),接头2(L2)将E3LB部分与蛋白质结合部分(PB)共价连接,该蛋白质结合部分为识别靶蛋白质BRM或SMARCA2的部分。本文所述的主体可用于降解并因此调节蛋白质活性,以及治疗与蛋白质活性有关的疾病和症状。

[0098] 现在将在下文中更全面地描述本发明所公开的主题。然而,对于当前公开的主题所涉及的本领域技术人员而言,在受益于上文描述中所提出的教导的情况下,将想到本文阐述的当前公开的主题的许多变型例(modification)和其他实施例。因此,应当理解的是,当前公开的主题不限于所公开的特定实施例,并且变型例和其他实施例旨在包括在所附权利要求要求的范围内。换言之,本文所描述的主题涵盖所有备选方案、变型方案和等同方案。如

果所合并文献、专利和类似材料中的一者或多者与本申请不同或矛盾,包括但不限于定义的术语、术语用法、描述的技术或类似内容,以本申请为准。除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语所具有的含义与本领域普通技术人员通常理解的含义相同。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用以其全文合并于本文。

[0099] I. 定义

[0100] 术语“CIDE”是指化学降解诱导剂,其为蛋白质水解靶向嵌合分子,通常具有如下三个组分:E3泛素连接酶结合基团(E3LB)、接头L2和蛋白质结合基团(PB)。

[0101] 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该等残基、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)被共价键取代,从而使该残基与CIDE、L1-CIDE或Ab-CIDE的另一组分结合。例如,“CIDE的残基”是指与一个或多个基团例如接头L2共价连接的CIDE,其本身可以任选地进一步与抗体连接。

[0102] 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。

[0103] 如本文所用,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,所述肽键即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),然后是三肽、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分隔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不包含两个或更多个通过肽键连接的相邻氨基酸。

[0104] 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学活性(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。抗体是由免疫系统产生的能够识别并结合特定抗原的蛋白质。(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。与不同表位特异性结合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性疾病相关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。免疫球蛋白可以来源于任何物种。然而,一方面,免疫球蛋白是人、鼠或兔来源的。

[0105] 如本文所用,术语“抗体片段”包括全长抗体的一部分,通常是其抗原结合或可变区。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。

[0106] 本文所使用的术语“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,或可以通过重组DNA方法制备(参见例如:US 4816567、US 5807715)。“单克隆抗体”还可使用(例如)以下文献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。

[0107] 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学活性即可(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,其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。

[0108] 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。

[0109] 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。存在五大类抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁,以及IgA₂。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 。

[0110] 如本文所用,术语“完整抗体”是包含VL和VH结构域以及轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的抗体。恒定结构域可为天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。完整抗体可具有一种或多种“效应子功能”,其是指可归因于抗体的Fc恒定区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物学活性。抗体效应子功能的例子包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;以及下调细胞表面受体,例如B细胞受体和BCR。

[0111] 如本文所用,术语“Fc区”意指免疫球蛋白重链的C末端区,该C末端区包含恒定区的至少一部分。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施例中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非本文另有说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等人所述(Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生与公众服务部,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达,1991)。

[0112] 如本文所用,术语“框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基之外的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下四个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常在VH(或VL)中以如下序列出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0113] 术语“全长抗体”、“完整抗体”及“全抗体”在本文中可互换地用于指代具有基本上类似于天然抗体结构的结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0114] “人抗体”是这样的抗体,该抗体具有的氨基酸序列对应于由人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列,或来源于利用人抗体全套库或其他人抗体编码序列的非人源的抗体的氨基酸序列。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0115] “人源化”抗体是指这样的嵌合抗体,其包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基。在某些实施例,人源化抗体将基本上包含所有的至少一个,通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR,并且所有或基本上所有的FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。“人源化形式”的抗体,例如,非人抗体,是指已经进行过人源化的抗体。

[0116] “分离的抗体”为已从其自然环境的组分中分离的抗体。在一些实施例中,通过例如电泳(例如,SDS-PAGE、等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如,离子交换或反相HPLC)测定,将抗体纯化至大于95%或99%的纯度。关于评估抗体纯度的方法的综述,参见例如,Flatman et al., J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0117] “分离的核酸”是指已从其天然环境的组分中分开的核酸分子。分离的核酸包括这样的核酸分子,其包含在通常含有核酸分子的细胞中,但该核酸分子存在于染色体外或与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0118] “编码抗体的分离的核酸”是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子,包括在单一载体或单独的载体中的此类核酸分子,以及存在于宿主细胞中一个或多个位置的此类核酸分子。

[0119] “裸抗体”是指不缀合至异源部分(例如,细胞毒性部分)或放射性标记的抗体。裸抗体可存在于药物制剂中。

[0120] “天然抗体”是指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由经二硫键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N端至C端,每条重链均具有可变区(VH),亦称为可变重链结构域或重链可变结构域,随后为三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,自N末端至C末端,各轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链结构域或轻链可变结构域,继之以恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以归属于两种类型中的一种,该两种类型称为卡帕(κ)和兰姆达(λ)。

[0121] 相对于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在比对候选序列与参考多肽序列并引入空位(如果必要的话)以实现最大的序列同一性百分比之后,并且在不考虑将任何保守取代作为序列同一性的组成部分的情况下,候选序列中的氨基酸残基与参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。然而,为了本文的目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2来生成氨基酸序列同一性%的值。ALIGN-2序列比较计算机程序由基因泰克公司(Genentech, Inc.)编写,并且源代码已经与用户文档一起提交到U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559,在那里以美国版权登记号TXU510087注册。ALIGN-2程序可从基因泰克公司(Genentech, Inc., South San Francisco, California)公开获得,或者可以从所述源代码编译。ALIGN-2程序应经编译以在UNIX操作

系统上使用,所述UNIX操作系统包括数字UNIX V4.0D。所有序列比较参数均由ALIGN-2程序设置并且不变。

[0122] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A与给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性% (其可以替代地表达为给定氨基酸序列A具有或包含与给定氨基酸序列B的某一氨基酸序列同一性%) 计算如下:

[0123] $100 \times \frac{X}{Y}$

[0124] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序对A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,而其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别指明,否则本文所使用的所有氨基酸序列同一性%的值是如前一段中所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0125] 根据其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将完整抗体分为不同的“类别”。存在五大类完整免疫球蛋白抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的若干可以进一步分为“亚类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类别的抗体的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。Ig形式包括铰链修饰或无铰链形式(Roux等人(1998) J. Immunol. 161:4083-4090;Lund等人(2000) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256;US 2005/0048572;US 2004/0229310)。

[0126] 如本文所用,术语“人共有框架”是指这样的框架,其表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基。一般而言,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自于可变结构域序列的亚组。一般而言,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD (1991),第1-3卷中所述的亚组。在一个实施例中,对于VL,该亚组是如Kabat等人,出处同上中的亚组 κ I。在一个实施例中,对于VH,该亚组是如Kabat等人,出处同上中的亚组III。

[0127] 出于本文目的的“受体人框架”是这样的框架,其包含来源于如下所定义的人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变结构域(VL) 框架或重链可变结构域(VH) 框架的氨基酸序列。“来源于”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含与所述人免疫球蛋白框架或人共有框架相同的氨基酸序列,或者其可以包含氨基酸序列变化。在一些实施例中,氨基酸变化的数量为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少,或2个或更少。在一些实施例中,VL受体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0128] 如本文所用,术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为VH和VL) 通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守框架区(FR) 和三个高变区(HVR)。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,page 91(2007))。单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可分别使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域来进行分离,以筛选互补VL或VH结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J. Immunol. 150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0129] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指在序列上高变及/或形成结构上限定的环

(“高变环”)的抗体可变结构域区域中的任一个。通常,天然四链抗体包含六个HVR:三个在VH中(H1、H2、H3),三个在VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自高变环及/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基具有最高的序列可变性及/或参与抗原识别。示例性高变环发生在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处。(Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。示例性CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)发生在L1的氨基酸残基24-34、L2的氨基酸残基50-56、L3的氨基酸残基89-97、H1的氨基酸残基31-35B、H2的氨基酸残基50-65,以及H3的氨基酸残基95-102处。(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 美国卫生与公众服务部, 国立卫生研究院, 马里兰州贝塞斯达(1991))。除VH中的CDR1外, CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”, 其是与抗原接触的残基。SDR包含在被称为缩短CDR或a-CDR的CDR区域内。示例性a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2和a-CDR-H3)发生在L1的氨基酸残基31-34、L2的氨基酸残基50-55、L3的氨基酸残基89-96、H1的氨基酸残基31-35B、H2的氨基酸残基50-58, 以及H3的氨基酸残基95-102处。(参见Almagro和Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008))。除非另外指明, 否则可变结构域中的HVR残基和其他残基(例如, FR残基)在本文中根据Kabat等人, 出处同上编号。

[0130] “效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区、随着抗体同种型的变化而变化的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC); Fc受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(例如, B细胞受体)的下调; 以及B细胞活化。

[0131] 术语“表位”是指抗体结合的抗原分子上的特定位点。

[0132] “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的亲和力一般可以由解离常数(Kd)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量, 包括本文所述的那些方法。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, 本文所述抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 5\text{nM}$ 、 $\leq 4\text{nM}$ 、 $\leq 3\text{nM}$ 、 $\leq 2\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低, 例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M , 例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0133] “亲和力成熟的”的抗体是指在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体, 与不具有此类改变的亲本抗体相比, 此类改变导致了抗体对抗原的亲和力的改善。

[0134] 如本文所用, 术语“载体”是指能够载运与其相链接的另一核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体, 以及并入其已被引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0135] 如本文所用, 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, 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。

[0136] 如本文所用,术语“接头”,“接头单元”或“连接子”是指包含原子链的化学部分,该原子链将CIDE部分与抗体共价连接,或将CIDE的残基、组成部分、部分、基团或组分与CIDE的另一残基、组成部分、部分、基团或组分共价连接。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。

[0137] “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,该患者或个体或受试者为人。在一些实施例中,患者可以是“癌症患者”,即患有的一种或多种癌症症状或有患一种或多种癌症症状的风险的患者。

[0138] “患者人群”是指一组癌症患者。这样的人群可用于证明统计学上显著的药物功效和/或安全性。

[0139] 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。

[0140] 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中进行。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,本文所述主题的抗体用于延迟疾病的发展或减缓疾病的进展。

[0141] 与一种或多种其他药物“同时”施用的药物是在同一治疗周期内,在与一种或多种其他药物的治疗的同一天,以及任选地与一种或多种其他药物同时施用。例如,对于每3周进行一次癌症治疗,在3周周期的第1天施用同时施用的每种药物。

[0142] 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,药物的治疗癌症有效量可减少癌细胞数;减小肿瘤大小;抑制(即,在一定程度上减缓和优选地停止)癌细胞浸润周围器官;抑制(即,在一定程度上减缓和优选地停止)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癌症相关的一种或多种症状。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。有效量可以延长无进展生存期(例如,根据实体瘤的应答评估标准,RECIST或CA-125改变来衡量),导致客观应答(包括部分应答,PR或完全应答,CR),增加总存活时间,和/或改善一种或多种癌症症状(例如,通过FOSI评估)。

[0143] 如本文所用,术语“治疗有效量”是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,或降低疾病或病症的进展率的任何量。该术语在其范围内还包括有效增强正常生理功能的量。为了用于治疗,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,活性成分可以作为药物组合物存在。

[0144] 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制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制剂。

[0145] “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。

[0146] 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、葡萄糖醛酸盐、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。药用盐可包括包含另一种分子,例如乙酸根离子、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以具有多个抗衡离子。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。

[0147] 其他非药用盐可用于制备本文所述的化合物,并且应将其视为形成本主题的另一方面。这些盐,例如草酸或三氟乙酸盐,虽然本身不是药用,但可用于制备用于获得本文所述化合物及其药用盐的中间体的盐。

[0148] 如本文所用,术语“烷基”是指具有一至五个碳原子的任何长度的饱和直链或支链单价烃基(C_1-C_5),其中烷基可以任选地被下述一个或多个取代基独立地取代。在另一个实施例中,烷基为一个、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、二级丁基、 $-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu、三级丁基、 $-C(CH_3)_3$)、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。

[0149] 如本文所用,术语“亚烷基”是指具有一至十二个碳原子的任何长度的饱和的直链或支链二价烃基(C_1-C_{12}),其中亚烷基可任选地被下述一个或多个取代基独立地取代。在另一实施例中,亚烷基含有一至八个碳原子(C_1-C_8)或一至六个碳原子(C_1-C_6)。亚烷基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。

[0150] 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。碳环基基团可以任选地被一个或多个烷基基团独立地取代。

[0151] “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、硫或氧组成的组,其中,在稠合环系中,环中的一个或多个可以是环烷基、芳基或杂芳基,条件是连接点通过非芳香环。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、二氢吡啶、吡啶、喹啉、咪唑烷、咪唑啉、哌啶、哌嗪、二氢吡啶、1,2,3,4-四氢异喹啉、噻唑烷、吗啉基、硫代吗啉基(thiomorpholinyl)(也称为硫代吗啉基(thiamorpholinyl))、1,1-二氧化硫代吗啉基、哌啶基、吡咯烷、四氢呋喃基等。杂环基基团可如W02014/100762中所述被取代。

[0152] 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。

[0153] 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。

[0154] “非对映异构体”表示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。非对映异构体的混合物可以在高分辨率分析程序(诸如电泳和色谱法)下分离。

[0155] “对映异构体”是指化合物的两种立体异构体,所述两种立体异构体是彼此不可重叠的镜像。

[0156] 本文中所用的立体化学定义和约定大致遵循:S.P.Parker编辑,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活性形式存在,即它们具有旋转平面偏振光平面的能力。在描述光学活性化合物时,前缀D和L或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(+)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。对于既定化学结构,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异构体,并且此类异构体的混合物通常被称为对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物称为外消旋混合物或外消旋物,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“外消旋物”是指两种无旋光活性的对映体种类的等摩尔混合物。

[0157] 本文中的其他术语、定义和缩写包括:野生型(“WT”);半胱氨酸改造的突变抗体(“thio”);轻链(“LC”);重链(“HC”);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-苯丙氨酸苯丙氨酸(“ala-phe”),对氨基苄基(“PAB”)和对氨基苄氧基羰基(“PABC”);重链的A118C(EU编号)=A121C(顺序编号)=A114C(Kabat编号)轻链的K149C(Kabat编号)。这里还提供了其它的定义和缩写。

[0158] II. 化学降解诱导剂

[0159] 可以将化学降解诱导剂(CIDE)分子与抗体缀合,以形成“Ab-CIDE”缀合物。所述抗体经由接头(L1)缀合至CIDE(“D”),其中所述CIDE包含泛素E3连接酶结合基团(“E3LB”)、接头(“L2”)和蛋白质结合基团(“PB”)。Ab-CIDE分子的通式为:

[0160] $Ab-(L1-D)_p$,

[0161] 其中D为具有结构E3LB-L2-PB的CIDE;其中E3LB是与L2共价结合的E3连接酶结合基团。L2是与E3LB和PB共价结合的接头;PB是与L2共价结合的蛋白质结合基团。Ab是与L1共价结合的抗体;L1是与Ab和D共价结合的接头;p的值为约1至约50。变量p反映抗体可以连接至一个或多个L1-D基团。在一个实施例中,p为约1至8。在另一实施例中,p为约2。

[0162] 以下章节描述了组成Ab-CIDE的组分。为了获得具有有效功效和所需治疗指数的Ab-CIDE,提供了以下组分。

[0163] 1. 抗体(Ab)

[0164] 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的抗体部分可以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。虽然包含针对细胞表面上未发现的抗原的抗体的Ab-CIDE可能导致CIDE部分进入所述细胞的特异性细胞内递送降低,但Ab-CIDE仍可能发生胞饮作用。本文所述的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。

[0165] 在特定的实施例中,抗体是thiomab,如下文详述。Thiomab可以具有经调节的Fc效应子,例如LALAPG或NG2LH突变。此外,考虑到组合,使得任何抗体靶标(CD71、Trop2、MSLN、NaPi2b、Ly6E、EpCAM和CD22)可以与thiomab突变与任何Fc效应子调节(包括LALAPG或NG2LH突变)的任何合适组合组合。

[0166] a. 人抗体

[0167] 在某些实施例中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。对人抗体的一般性描述可参见:van Dijk和van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74 (2001) 和Lonberg, Curr.Opin.Immunol.20:450-459 (2008)。

[0168] 可以通过以下方式来制备人抗体:将免疫原施用于转基因动物,所述转基因动物已被修饰以响应于抗原激发而产生具有人可变区的完整人抗体或完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,所述全部或部分人免疫球蛋白基因座替代内源性免疫球蛋白基因座,或者在动物的染色体外存在或随机整合至动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。关于从转基因动物得到人抗体的方法的综述,参见Lonberg, Nat.Biotech.23:1117-1125 (2005)。另见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HUMAB®技术的美国专利号5,770,429;描述K-MMOUSE®技术的美国专利号7,041,870,以及描述VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自此类动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0169] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系。(参见,例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 以及Boerner等人, J.Immunol.,147:86 (1991))。通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也可参见如下描述:Li等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562 (2006)。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826 (描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4):265-268 (2006) (描述了人-人杂交瘤) 中描述的那些方法。人类杂交瘤技术(Trioma技术)也描述于Vollmers和Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3):927-937 (2005) 和Vollmers和Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3):185-91 (2005) 中。

[0170] 人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生。然后将此类可变结构域序列与预期的人恒定结构域结合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0171] b. 源自文库的抗体

[0172] 可以通过筛选组合文库中具有一种或多种所需活性的抗体来分离用于Ab-CIDE的

抗体。例如,本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并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等人主编,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主编,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)。

[0173] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的所有组成成分通过聚合酶链式反应(PCR)单独克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以从该噬菌体文库中筛选抗原结合噬菌体,如以下文献所述:Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)。噬菌体通常将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或Fab片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。替代地,可以克隆初始组库(例如,来自人)以提供针对广泛的非自身抗原和自身抗原的抗体的单一来源,而无需任何免疫,如以下文献所述:Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)。最后,还可通过以下方式合成初始文库:克隆来自干细胞的未重排的V基因区段;以及使用含有随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区域并完成体外重排,如以下文献所述:Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括,例如:美国专利号5,750,373,和美国公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0174] 在本文中从人抗体文库分离出的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0175] c.嵌合抗体和人源化抗体

[0176] 在某些实施例中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体如以下文献所述:例如美国专利号第4,816,567号和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)。在一个实例中,嵌合抗体包括非人可变区(例如,来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体为其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0177] 在某些实施例中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包括一个或多个可变结构域,其中HVR(例如(CDR(或其部分)))来源于非人抗体,而FR(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0178] 综述了人源化抗体及其制备方法,如以下文献所述:例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008),又如以下文献所述:例如,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 et al., Methods 36:43-60 (2005) (描述“FR改组”); 和 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)。

[0179] 可用于人源化的人框架区包括但不限于: 使用“最佳拟合”方法选择的框架区 (参见, 例如, Sims 等人, J. Immunol. 151:2296 (1993年)); 源自轻链或重链可变区特定亚组的人抗体的共有序列的框架区 (参见, 例如, Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); 和 Presta 等人, J. Immunol., 151:2623 (1993)); 人成熟 (体细胞突变) 框架区或人种系框架区 (参见, 例如, Almagro 和 Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)); 和来自筛选 FR 文库的框架区 (参见, 例如, Baca 等人, J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 和 Rosok 等人, J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996))。

[0180] d. 多特异性抗体

[0181] 在某些实施例中, 本文提供的抗体是多特异性抗体, 例如双特异性抗体。如本文所用, 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, 能够结合一个分子上的两个或更多个不同表位, 或能够结合两个或更多个不同分子上的表位)。

[0182] 在一些实施例中, 多特异性抗体是对至少两个不同的抗原结合位点具有结合特异性的单克隆抗体 (例如双特异性抗体)。在一些实施例中, 多特异性抗体的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以结合一个相同分子内的两个表位 (分子内结合)。例如, 多特异性抗体的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以结合同一蛋白质分子上的两个不同表位。在某些实施例中, 多特异性抗体结合的两个不同表位是通常不被一种单特异性抗体 (例如常规抗体或一个免疫球蛋白单可变结构域) 在同一时间结合的表位。在一些实施例中, 多特异性抗体的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以结合位于两个不同分子内的表位 (分子间结合)。例如, 多特异性抗体的第一抗原结合结构域可以结合一个蛋白质分子上的一个表位, 而多特异性抗体的第二抗原结合域可以结合不同蛋白质分子上的另一表位, 从而使这两个分子交联。

[0183] 在一些实施例中, 多特异性抗体 (诸如双特异性抗体) 的抗原结合结构域包含两个 VH/VL 单元, 其中第一 VH/VL 单元与第一表位结合, 第二 VH/VL 单元与第二表位结合, 其中每个 VH/VL 单元包含重链可变结构域 (VH) 和轻链可变结构域 (VL)。这样的多特异性抗体包括但不限于全长抗体, 具有两个或多个 VL 和 VH 结构域的抗体, 和抗体片段 (诸如 Fab、Fv、dsFv、scFv、双体抗体、双特异性双体抗体和三抗体, 已共价或非共价连接的抗体片段)。进一步包含重链可变区的至少一部分和/或轻链可变区的至少一部分的 VH/VL 单元也可以称为“臂 (arm)”、“半体 (hemimer)”或“半抗体 (half antibody)”。在一些实施例中, 半体包括重链可变区的足够部分, 以实现与第二半体形成分子内二硫键。在一些实施例中, 半体包括杆突变 (knob mutation) 或臼突变 (hole mutation), 例如, 以实现与包含互补臼突变或杆突变的第二半体或半抗体的异二聚化。杆突变和臼突变将在以下进一步讨论。

[0184] 在某些实施例中, 本文提供的多特异性抗体可以是双特异性抗体。如本文所用, 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, 其能够特异性结合一个生物分子上的两个不同表位或能够特异性结合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”。示例性的双特异性抗体可以结合蛋白质和任何其他抗原。在某些实施例中, 结合特异性中的一者是针对蛋白质的, 而另一个

是针对CD3的。参见,例如,美国专利号5,821,337。在某些实施例中,双特异性抗体可以结合相同蛋白质分子的两个不同表位。在某些实施例中,双特异性抗体可以结合两个不同蛋白质分子上的两个不同表位。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于表达蛋白质的细胞。可以将双特异性抗体制成长抗体或抗体片段。

[0185] 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Cuellar,Nature 305:537(1983),WO 93/08829,和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,W02009/089004,US2009/0182127,US2011/0287009,Marvin和Zhu,Acta Pharmacol.Sin. (2005) 26(6):649-658;和Kontermann(2005)Acta Pharmacol.Sin., 26:1-9)。如本文所用,术语“杵臼(knob-into-hole)”或“KnH”技术是指通过在其相互作用的界面将突起(杵)引入一个多肽并将腔(臼)引入其他多肽,从而引导在体内或体外将两个多肽配对在一起的技术。例如,已在抗体的Fc:Fc结合界面、CL:CH1界面或VH/VL界面中引入KnH(参见,例如,US 2011/0287009;US2007/0178552;WO 96/027011;WO 98/050431;Zhu等人,1997,Protein Science 6:781-788;以及W02012/106587)。在一些实施例中,在多特异性抗体的制备过程中,KnH驱动两个不同的重链配对在一起。例如,在其Fc区中具有KnH的多特异性抗体可以进一步包含与各自Fc区连接的单个可变结构域,或进一步包含与相似或不同的轻链可变结构域配对的不同的重链可变结构域。KnH技术还可以用于将两个不同的受体胞外域或包含不同靶标识别序列的任何其他多肽序列配对在一起(例如,包括亲和体、肽体和其他Fc融合体)。

[0186] 如本文所用,术语“杵突变”是指在多肽与另一多肽相互作用的界面将突起(杵)引入多肽的突变。在一些实施例中,其他多肽具有臼突变。

[0187] 如本文所用,术语“臼突变”是指在多肽与另一多肽相互作用的界面将腔(臼)引入多肽的突变。在一些实施例中,其他多肽具有杵突变。

[0188] “突起”是指至少一条氨基酸侧链,其从第一多肽的界面突出,因此可定位在相邻界面(即第二多肽的界面)的补偿腔中,以稳定异源多聚体,从而例如比同多聚体形成更倾向于异多聚体形成。突起可以存在于原始界面中,或者可以合成引入(例如,通过改变编码界面的核酸)。在一些实施例中,编码第一多肽的界面的核酸被改变以编码突起。为此,用编码至少一个“输入”氨基酸残基(其具有比原始氨基酸残基更大的侧链体积)的核酸替换在第一多肽的界面中编码至少一个“原始”氨基酸残基的核酸。应当理解,可以有多于一个的原始和相应的输入残基。各种氨基残基的侧链体积显示在,例如,US2011/0287009的表1中。引入“突起”的突变可以称为“杵突变”。

[0189] 在一些实施例中,用于形成突起的输入残基是选自精氨酸(R)、苯基丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)的天然存在的氨基酸残基。在一些实施例中,输入残基是色氨酸或酪氨酸。在一些实施例中,用于形成突起的原始残基具有小的侧链体积,诸如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0190] “腔”是指从第二多肽的界面凹入的至少一个氨基酸侧链,因此在第一多肽的相邻界面上容纳相应的突起。腔可以存在于原始界面中,或者可以合成引入(例如,通过改变编码界面的核酸)。在一些实施例中,编码第二多肽的界面的核酸被改变以编码腔。为此,用编码至少一个“输入”氨基酸残基(其具有比原始氨基酸残基更小的侧链体积)的DNA替换在第

二多肽的界面中编码至少一个“原始”氨基酸残基的核酸。应当理解,可以有多于一个的原始和相应的输入残基。在一些实施例中,用于形成腔的输入残基是选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)的天然存在的氨基酸残基。在一些实施例中,输入残基是丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在一些实施例中,用于形成腔的原始残基具有大的侧链体积,诸如酪氨酸、精氨酸、苯基丙氨酸或色氨酸。引入“腔”的突变可以称为“白突变”。

[0191] 突起在腔中是“可定位的”,这表示突起和腔分别在第一多肽和第二多肽的界面上的空间位置以及突起和腔的大小使得突起可以位于腔中而不显著干扰界面上第一多肽和第二多肽的正常缔合。由于突起(诸如Tyr、Phe和Trp)通常未从界面的轴垂直延伸,而是具有优选的构象,因此,在一些实例中,突起与相应腔的对齐可能取决于基于以下内容对突起/腔对进行建模的方法:三维结构,诸如通过X射线晶体学或核磁共振(NMR)获得的三维结构。这可以使用本领域广泛接受的技术来实现。

[0192] 在一些实施例中,IgG1恒定区中的杆突变是T366W(EU编号)。在一些实施例中,IgG1恒定区中的白突变包括一种或多种选自T366S、L368A和Y407V(EU编号)的突变。在一些实施例中,IgG1恒定区中的白突变包括T366S、L368A和Y407V(EU编号)。

[0193] 在一些实施例中,IgG4恒定区中的杆突变是T366W(EU编号)。在一些实施例中,IgG4恒定区中的白突变包括一种或多种选自T366S、L368A和Y407V(EU编号)的突变。在一些实施例中,IgG4恒定区中的白突变包括T366S、L368A和Y407V(EU编号)。

[0194] 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造抗体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和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。

[0195] 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))。本文抗体或片段也包括“双重作用FAB”或“DAF”,其包含与靶蛋白和另一不同抗原的抗原结合位点结合(参见,例如,US 2008/0069820)。

[0196] e. 抗体片段

[0197] 在某些实施例中,本文提供的抗体是抗体片段。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主编,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994);另见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。

[0198] 双体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);和

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)。

[0199] 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,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc., Waltham,MA;参见,例如,美国专利号6,248,516B1)。

[0200] 抗体片段可以通过各种技术制备,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(例如,大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所述。

[0201] f. 抗体变体

[0202] 在某些实施例中,考虑了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为来制备。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,条件是最终构建体具有期望特征,例如,抗原结合。

[0203] g. 重组方法和组合物

[0204] 可以使用重组方法和组合物来产生抗体,例如,如在美国专利号4,816,567中所述。在一个实施例中,提供了编码本文所述的抗体的分离的核酸。此类核酸可以编码包括抗体的VL的氨基酸序列和/或包括抗体的VH的氨基酸序列(例如,抗体的轻链和/或重链)。在进一步的实施例中,提供了包括此类核酸的一种或多种载体(例如,表达载体)。在进一步的实施例中,提供了包括此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施例,宿主细胞包括以下项(例如,已被用以下转化):(1)包含核酸的载体,所述核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列;或(2)第一载体和第二载体,所述第一载体包含核酸,所述核酸编码抗体的VL的氨基酸序列,所述第二载体包含核酸,所述核酸编码包含抗体的VH的氨基酸序列。在一个实施例中,宿主细胞是真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施例中,提供了一种制备抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养包括如上提供的编码所述抗体的核酸的宿主细胞,以及任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)中回收所述抗体。

[0205] 对于抗体重组生产,将编码抗体的核酸(例如,如上所述)分离并插入至一个或多个载体中以用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序来容易地对此类核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0206] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见,例如,美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(另见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,B.K.C.主编,Humana Press,Totowa,NJ(2003),第245-254页,描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。)抗体可在表达后可溶性级分中从细菌细胞糊中分离,并且可以进一步纯化。

[0207] 除了原核生物外,诸如丝状真菌或酵母等真核微生物也是用于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,所述真核微生物包括这样的真菌和酵母菌株,其糖基化途径已经“人源化”,从而使得产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,

Nat.Biotech.22:1409-1414(2004);和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0208] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了许多可以与昆虫细胞一起使用的杆状病毒株,特别是用于转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0209] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见,例如,美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0210] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例包括:由SV40(COS-7)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾系(例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)所述的293或293细胞;幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞(例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述);MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));以及骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo主编,Humana Press, Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0211] 现在参考抗体亲和力,在实施例,抗体与一个或多个肿瘤相关抗原或细胞表面受体结合。在实施例,肿瘤相关抗原或细胞表面受体选自CD71、Trop2、MSLN、NaPi2b、Ly6E、EpCAM和CD22。

[0212] 如本文所述,Ab-CIDE可包含抗体,例如选自以下项的抗体:

[0213] i. 抗Ly6E抗体

[0214] Ly6E(淋巴细胞抗原6复合物基因座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。

[0215] 在某些实施例中,Ab-CIDE可以包含抗Ly6E抗体。淋巴细胞抗原6复合物基因座E(Ly6E),也称为视黄酸诱导基因E(RIG-E)和干细胞抗原2(SCA-2)。它是一种GPI连锁,131个氨基酸的长度,约8.4kDa的蛋白质,功能未知,没有已知的结合伴侣。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。

[0216] 在一些实施例中,本文描述的主题提供包含抗Ly6E抗体的Ab-CIDE,该抗Ly6E抗体包含选自以下项的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0217] 一方面,本文描述的主题提供了包含抗体的Ab-CIDE,该抗体包含选自以下项的至

少一个、至少两个或所有三个VH HVR序列：(a)HVR-H1，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；(b)HVR-H2，其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列；和(c)HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在另一个实施例中，该抗体包含：(a)HVR-H1，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；(b)HVR-H2，其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列；和(c)HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0218] 在另一方面，本文描述的主题提供了包含抗体的Ab-CIDE，该抗体包含选自以下项的至少一个、至少两个或所有三个VL HVR序列：(a)HVR-L1，其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列；(b)HVR-L2，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；和(c)HVR-L3，其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。在一个实施例中，该抗体包含：(a)HVR-L1，其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列；(b)HVR-L2，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；和(c)HVR-L3，其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0219] 在另一方面，Ab-CIDE包含抗体，该抗体包含：(a) VH结构域，其包含选自以下项的至少一个、至少两个或所有三个VH HVR序列：(i)HVR-H1，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；(ii)HVR-H2，其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列；和(iii)HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列；和(b) VL结构域，其包含选自以下项的至少一个、至少两个或所有三个VL HVR序列：(i)HVR-L1，其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列，(ii)HVR-L2，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列，和(c)HVR-L3，其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0220] 在另一方面，本文描述的主题提供了包含抗体的Ab-CIDE，该抗体包含：(a)HVR-H1，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；(b)HVR-H2，其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列；(c)HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列；(d)HVR-L1，其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列；(e)HVR-L2，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；和(f)HVR-L3，其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0221] 在上述任一实施例中，Ab-CIDE的抗Ly6E抗体是人源化的。在一个实施例中，抗Ly6E抗体包含上述任一实施例中的HVR，并且还包含人受体框架，例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0222] 在另一方面，Ab-CIDE的抗Ly6E抗体包含重链可变结构域(VH)序列，该VH序列与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施例中，与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的VH序列包含相对于参考序列的取代(例如保守取代)、插入或缺失，但是包含该序列的抗Ly6E抗体保留了与Ly6E结合的能力。在某些实施例中，在SEQ ID NO:8中，共有1至10个氨基酸被取代、插入及/或缺失。在某些实施例中，在SEQ ID NO:8中，共有1至5个氨基酸被取代、插入及/或缺失。在某些实施例中，取代、插入或缺失发生在HVR之外的区域(即，在FR中)。任选地，抗Ly6E抗体包含SEQ ID NO:8的VH序列，包括该序列的翻译后修饰。在一具体实施例中，VH包含一、二或三个选自以下项的HVR：(a)HVR-H1，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列，(b)HVR-H2，其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列，和(c)HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0223] 在另一方面，提供了Ab-CIDE的抗Ly6E抗体，其中该抗体包含轻链可变结构域(VL)，该VL与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施例中，与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有

至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的VL序列包含相对于参考序列的取代(例如保守取代)、插入或缺失,但是包含该序列的抗Ly6E抗体保留了与Ly6E结合的能力。在某些实施例中,在SEQ ID NO:7中,共有1至10个氨基酸被取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,在SEQ ID NO:7中,共有1至5个氨基酸被取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,该取代、插入或缺失发生在HVR之外的区域(即,在FR中)。任选地,抗Ly6E抗体包含SEQ ID NO:7的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体的实施例中,VL包含选自以下项的一个、两个或三个HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

[0224] 在另一方面,提供了包含抗Ly6E抗体的Ab-CIDE,其中该抗体包含如以上提供的任何实施例中的VH和如以上提供的任何实施例中的VL。

[0225] 在一个实施例中,提供了一种Ab-CIDE,其中该抗体分别包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:7的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0226] 在另一方面,本文提供了包含与本文提供的抗Ly6E抗体结合相同表位的抗体的Ab-CIDE。例如,在某些实施例中,提供一种Ab-CIDE,其包含与抗Ly6E抗体(分别包含SEQ ID NO:8的VH序列和SEQ ID NO:7的VL序列)结合相同表位的抗体。

[0227] 在另一方面,根据以上任一实施例的Ab-CIDE的抗Ly6E抗体是单克隆抗体,包括人抗体。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗Ly6E抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双体抗体或F(ab')₂片段。在另一实施例中,该抗体是基本上全长的抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或本文定义的其他抗体类型或同种型。在一些实施例中,Ab-CIDE包含抗Ly6E抗体,该抗体包含重链和轻链,该重链和轻链分别包含SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9的氨基酸序列。

[0228] ii.抗NaPi2b抗体

[0229] 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;W02004022778(权利要求2);EP1394274(实施例11);W02002102235(权利要求13;第326页);EP875569(权利要求1;第17-19页);W0200157188(权利要求20;第329页);W02004032842(实施例IV);W0200175177(权利要求24;第139-140页);交叉引用:MIM:604217;NP_006415.1;NM_006424_1。

[0230] 在某些实施例中,Ab-CIDE包含抗NaPi2b抗体。

[0231] 在一些实施例中,本文描述的是包含抗NaPi2b抗体的Ab-CIDE,该抗NaPi2b抗体包含选自以下项的至少一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0232] 一方面,本文描述的是包含抗体的Ab-CIDE,该抗体包含选自以下项的至少一个、至少两个或所有三个VH HVR序列:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在另一个实施例中,该抗体包含:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;(b)HVR-H2,

其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0233] 在另一方面,本文描述的是包含抗体的Ab-CIDE,该抗体包含选自以下项的至少一个、至少两个或所有三个VL HVR序列:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在一个实施例中,该抗体包含:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0234] 在另一方面,Ab-CIDE包含抗体,该抗体包含:(a)VH结构域,其包含选自以下项的至少一个、至少两个或所有三个VH HVR序列:(i)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;(ii)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;和(iii)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;和(b)VL结构域,其包含选自以下项的至少一个、至少两个或所有三个VL HVR序列:(i)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,(ii)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0235] 在另一方面,本文描述的是包含抗体的Ab-CIDE,该抗体包含:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;和(f)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0236] 在上述任一实施例中,Ab-CIDE的抗NaPi2b抗体是人源化的。在一个实施例中,抗NaPi2b抗体包含上述任一实施例中的HVR,并且还包含人受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。

[0237] 在另一方面,Ab-CIDE的抗NaPi2b抗体包含重链可变结构域(VH)序列,该VH序列与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施例中,与SEQ ID NO:54的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列包含相对于参考序列的取代(例如,保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗NaPi2b抗体保留与NaPi2b结合的能力。在某些实施例中,在SEQ ID NO:17中,共有1至10个氨基酸被取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,在SEQ ID NO:17中,共有1至5个氨基酸被取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,取代、插入或缺失发生在HVR之外的区域(即,在FR中)。任选地,抗NaPi2b抗体包含SEQ ID NO:17的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一具体实施例中,VH包含一、二或三个选自以下项的HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列,(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列,和(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0238] 在另一方面,提供了Ab-CIDE的抗NaPi2b抗体,其中该抗体包含轻链可变结构域(VL),该VL与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在某些实施例中,与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列包含相对于参考序列的取代换(例如,保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗NaPi2b抗体保留与抗NaPi2b结合的能力。在某些实施例中,在SEQ ID NO:18中,共有1至10个氨基酸被取代、插入及/或缺失。在某些实施例中,在SEQ ID NO:18中,共有1至5个氨基酸被取代、插

入及/或缺失。在某些实施例中,该取代、插入或缺失发生在HVR之外的区域(即,在FR中)。任选地,抗NaPi2b抗体包含SEQ ID NO:18的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体的实施例中,VL包含选自以下项的一个、两个或三个HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列;(b)HVR-L2,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列;和(c)HVR-L3,其包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0239] 在另一方面,提供了包含抗NaPi2b抗体的Ab-CIDE,其中该抗体包含如以上提供的任何实施例中的VH和如以上提供的任何实施例中的VL。

[0240] 在一个实施例中,提供了一种Ab-CIDE,其中该抗体分别包含SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0241] 在另一方面,本文提供了包含与本文提供的抗NaPi2b抗体结合相同表位的抗体的Ab-CIDE。例如,在某些实施例中,提供一种Ab-CIDE,其包含与抗NaPi2b抗体(分别包含SEQ ID NO:17的VH序列和SEQ ID NO:18的VL序列)结合相同表位的抗体。

[0242] 在另一方面,根据以上任一实施例的Ab-CIDE的抗NaPi2b抗体是单克隆抗体,包括人抗体。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗NaPi2b抗体是抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双体抗体或F(ab')₂片段。在另一实施例中,该抗体是基本上全长的抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或本文定义的其他抗体类型或同种型。

[0243] iii. 抗CD22抗体

[0244] CD22(B细胞受体CD22-B同工型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814, Genbank登录号AK026467);Wilson等人(1991)J.Exp.Med.173:137-146;W02003072036(权利要求1;图1);交叉引用:MIM:107266;NP_001762.1;NM_001771_1。

[0245] 在某些实施例中,Ab-CIDE可包含抗CD22抗体,其包含三个轻链高变区(HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3)和三个重链高变区(HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3)。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗CD22抗体包含三个轻链高变区和三个重链高变区(SEQ ID NO:19-24),其序列如下所示。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗CD22抗体包含SEQ ID NO:25的可变轻链序列和SEQ ID NO:26的可变重链序列。在一个实施例中,本发明的Ab-CIDE的抗CD22抗体包含SEQ ID NO:27的轻链序列和SEQ ID NO:28的重链序列。

[0246] iv. 抗CD71抗体

[0247] 在某些实施例中,Ab-CIDE可以包含抗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,但是,CD71已被认为是一种有用的红细胞相关抗原。在上述任一实施例中,Ab-CIDE的抗CD71抗体是人源化的。

[0248] 在一个实施例中,抗CD71抗体包含NG2LH修饰,该修饰为N297G突变与降低/消除IgG1 mAb效应子功能的IgG2下铰链区的组合。在另一个实施例中,抗CD71抗体包含用于与接头结合的工程化的Cys残基。在一个实施例中,缺乏所有这些变化的亲本IgG1 mAb的描述参见:W02016081643,其全文以引用方式并入本文。

[0249] 在实施例中,抗CD71抗体为抗huTfR1.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH ABP1AA25970(高亲和力DAR6)。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗CD71抗体包含:SEQ ID NO:30的轻链序列和SEQ ID NO:29的重链序列。

[0250] 在实施例中,抗CD71抗体为抗huTfR2.hIgG1.LC.K149C.HC.L174C.Y373C.NG2LH

ABP1AA25969(低亲和力DAR6)。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗CD71抗体包含:SEQ ID NO:32 =的轻链序列和SEQ ID NO31的重链序列。

[0251] 在实施例中,抗CD71抗体为抗huTfR1.hIgG1.LC.K149C.NG2LH ABP1AA30139(高亲和力DAR2)。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗CD71抗体包含:SEQ ID NO:34的轻链序列和SEQ ID NO33的重链序列。

[0252] 在实施例中,抗CD71抗体为抗huTfR2.hIgG1.LC.K149C.NG2LH ABP1AA30140(低亲和力DAR2)。在一个实施例中,Ab-CIDE的抗CD71抗体包含:SEQ ID NO:36的轻链序列和SEQ ID NO35的重链序列。

[0253] v.抗Trop2抗体

[0254] 在某些实施例中,Ab-CIDE可以包含抗Trop2抗体。Trop2(滋养细胞抗原2)是一种跨膜糖蛋白,是一种在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。在上述任一实施例中,Ab-CIDE的抗Trop2抗体是人源化的。在一个实施例中,抗Trop2抗体的描述参见US-2014/0377287和US-2015/0366988,其各自全文以引用方式并入本文。

[0255] vi.抗MSLN抗体

[0256] 在某些实施例中,Ab-CIDE可以包含抗MSLN抗体。MSLN(间皮素)是一种糖基磷脂酰肌醇锚定细胞表面蛋白,可用作细胞粘附蛋白。MSLN也称为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。在上述实施例中的任一项中,Ab-CIDE的抗MSLN抗体经人源化。在一个实施例中,抗MSLN抗体是h7D9.v3,其描述参见Scales,S.J.等人,Mol.Cancer Ther.2014,13(11),2630-2640,其全文以引用方式并入本文。

[0257] vii.抗EpCAM抗体

[0258] 在某些实施例中,Ab-CIDE可以包含抗EpCAM抗体。在一方面,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。上皮细胞粘附分子(EpCAM)是一种跨膜糖蛋白,其介导上皮细胞中不依赖Ca²⁺的同型细胞间粘附(Litvinov,S.等人(1994)Journal of Cell Biology 125(2):437-46)。也称为DIAR5、EGP-2、EGP314、EGP40、ESA、HNPCC8、KS1/4、KSA、M4S1、MIC18、MK-1、TACSTD1、TROP1,EpCAM也参与细胞信号传导(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 JPathol.148(3):865-75)。另外,EpCAM通过上调c-myc、e-fabp和细胞周期蛋白A和E的能力而具有致癌能力(Munz,M.等人(2004)Oncogene23(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可以用作各种癌症的诊断标记。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。

[0259] 1.抗体亲和力

[0260] 在某些实施例中,本文提供的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 50\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 5\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$,并且任选地为 $\geq 10^{-13}\text{M}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0261] 在一个实施例中,通过用Fab形式的目标抗体及其抗原进行放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量Kd,如以下测定所述。Fab对抗原的溶液结合亲和力是通过在一系列未标记的抗原滴定存在下用最小浓度的(^{125}I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原来测量的(参见,例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了确定用于测定的条件,用含5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)的50mM碳酸钠溶液(pH 9.6)将MICROTITER[®]多孔板(Thermo Scientific)包被过夜,并且随后在室温(大约23 $^{\circ}\text{C}$)下将其用含2% (w/v)牛血清白蛋白的PBS溶液阻断二至五小时。在非吸附板(Nunc# 269620)中,将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与目标Fab的系列稀释液混合(例如,与Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997))中抗VEGF抗体Fab-12的评估相一致)。接着将目标Fab孵育过夜;然而,孵育可持续更长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以在室温孵育(例如,一小时)。然后去除溶液并用在PBS中的0.1%聚山梨酯20(吐温-20[®])洗涤所述板八次。当板已干燥时,添加150 μl /孔的闪烁体(MICROSCINT-20[™]; Packard),并且在TOPCOUNT[™] γ 计数器(Packard)上对板计数十分钟。选择给出小于或等于20%最大结合的各Fab的浓度以用于竞争性结合测定中。

[0262] 根据另一实施例,在25 $^{\circ}\text{C}$,用经固定化的抗原CM5芯片,在约10个响应单位(RU)下,使用BIACORE[®]-2000或BIACORE[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ),通过表面等离子体共振测定来测量Kd。简言之,根据供应商说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。将抗原用10mM醋酸钠pH 4.8稀释至5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (约0.2 μM),之后以5 $\mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流量进行注射以获得大约10响应单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原之后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,在25 $^{\circ}\text{C}$,以约25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速注射在含有0.05%聚山梨酯20(TWEEN 20[™])表面活性剂(PBST)的PBS中的Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE[®] Evaluation Software 3.2版),通过同时拟合缔合与解离传感器图来计算缔合速率(kon)与解离速率(koff)。平衡解离常数(Kd)计算为比率koff/kon。参见例如, Seyforth等人, J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。若通过上述表面等离子体共振测定得出缔合速率超过106M $^{-1}\text{s}^{-1}$,则可通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率,即如在分光计诸如配备止流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO[™]分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯所测得的,在浓度渐增的抗原存在下,测量在25 $^{\circ}\text{C}$ PBS pH 7.2中的20nM抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或减少。

[0263] 2. 接头(L1)

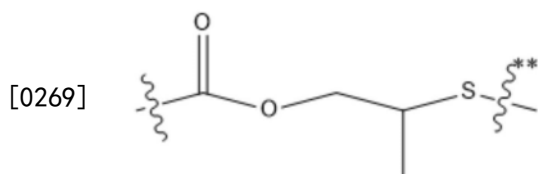
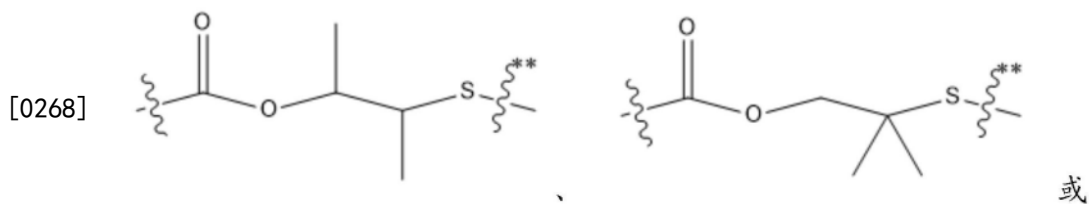
[0264] 如本文所述,“接头”(L1,接头1)是双功能或多功能部分,其可用于将一个或多个CIDE部分(D)连接至抗体(Ab)以形成Ab-CIDE。在一些实施例中,可以使用具有反应性官能团的L1来制备Ab-CIDE,所述反应性官能团用于共价连接到CIDE和抗体。例如,在一些实施例中,抗体(Ab)的半胱氨酸硫醇可与接头的反应性官能团或接头L1-CIDE基团形成键以制备Ab-CIDE。特别地,接头的化学结构可对Ab-CIDE的功效和安全性均具有显著影响(Ducry& Stump, Bioconjugate Chem, 2010, 21, 5-13)。选择正确的接头会影响药物正确递送至靶细

胞的预期细胞区室。

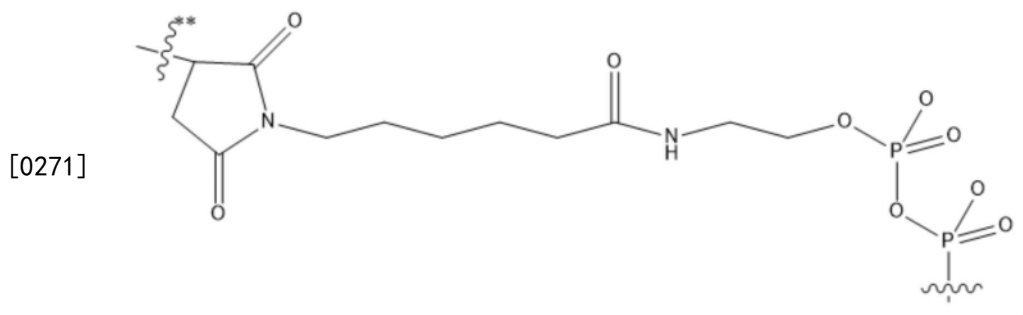
[0265] 在某些实施例中,L1接头可为自消除接头。

[0266] 在某些实施例中,L1接头选自由L1a、L1b和L1c组成的组:

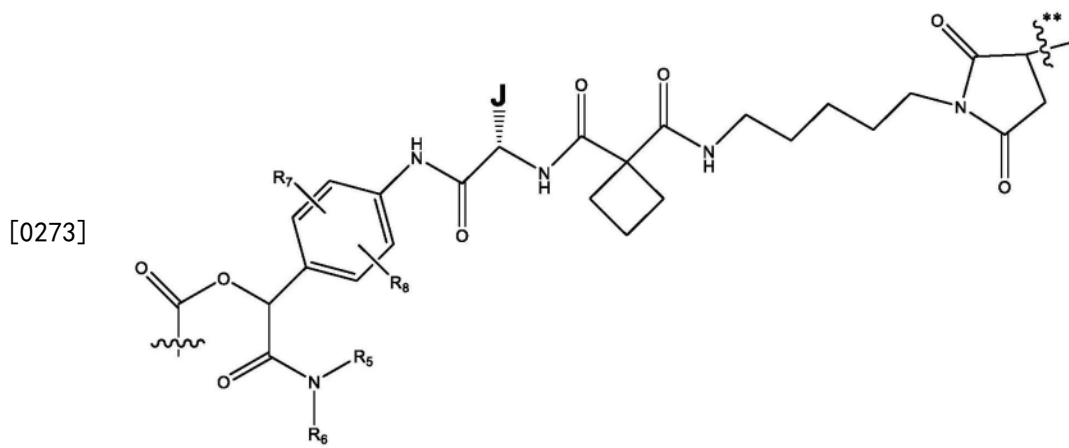
[0267] L1a的实例:



[0270] L1b的实例:



[0272] L1c的实例:



[0274] 其中,

[0275] J为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

[0276] NH_2 ; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$; 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

[0277] $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

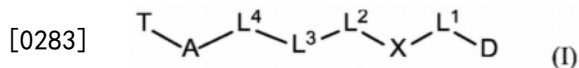
[0278] R_5 和 R_6 独立地为氢或 C_{1-5} 烷基; 或者 R_5 和 R_6 与各自所连接的氮一起形成任选地取代的5元至7元杂环基;

[0279] 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;

[0280] 并且其中  为与Ab的连接点。

[0281] 在某些实施例中,L1接头为亲水性自消除接头。这些类型的L1接头的实例的描述参见W02014/100762,该专利全文以引用方式并入本文。L1接头包括但不限于式I-XII。

[0282] 本公开提供了式(I)的L1接头:



[0284] 或其盐、溶剂化物或立体异构体;

[0285] 其中:

[0286] D为药物部分或CIDE;

[0287] T为靶向部分,诸如抗体;

[0288] X为亲水性自消除接头;

[0289] L¹与L¹不同,并且为键、第二自消除接头或环化自消接头;

[0290] L²为键或第二自消除接头;

[0291] 其中,如果L¹为第二自消除接头或环化自消接头,则L为键;

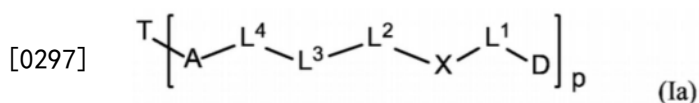
[0292] 其中,如果L²为第二自消除接头,则L¹为键;

[0293] L³为肽接头;

[0294] L⁴为键或间隔基;以及

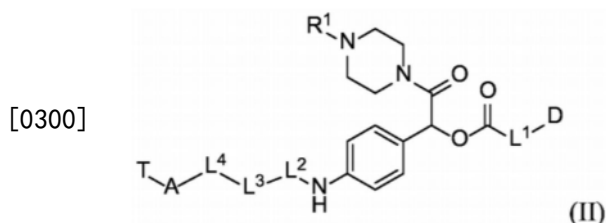
[0295] A为酰基单元。

[0296] 在一些实施例中,提供了式(1a)的L1接头:



[0298] 或其盐或溶剂化物或立体异构体;其中D、T、X、L¹、L²、L³、L⁴和A如式(I)所定义,并且p为1至20。在一些实施例中,p为1至8。在一些实施例中,p为1至6。在一些实施例中,p为1至4。在一些实施例中,p为2至4。在一些实施例中,p为1、2、3或4。

[0299] 本公开还提供了式(II)的L1接头:



[0301] 或其盐、溶剂化物或立体异构体;

[0302] 其中:

[0303] D为药物部分或CIDE;

[0304] T为靶向部分或抗体;

[0305] R¹为氢、未取代或取代的C₁₋₃烷基、或未取代或取代的杂环基;

[0306] L¹为键、第二自消除接头或环化自消接头;2

[0307] L²为键、第二自消除接头;

[0308] 其中,如果L¹为第二自消除接头或环化自消接头,则L²为键;

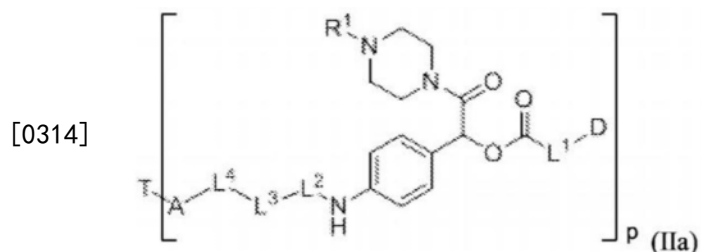
[0309] 其中,如果 L^1 为第二自消除接头,则 L^2 为键;

[0310] L^3 为肽接头;

[0311] L^4 为键或间隔基;以及

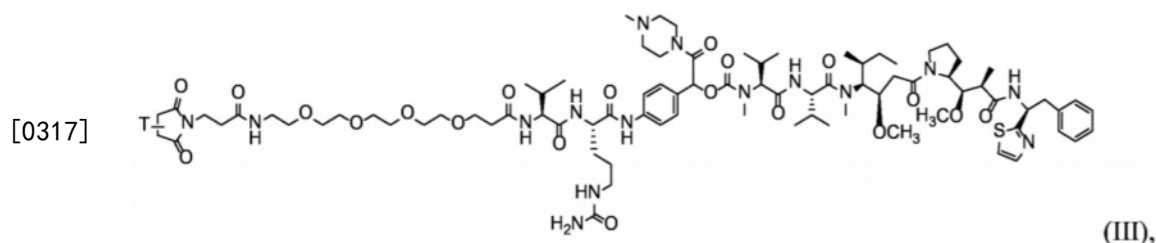
[0312] A为酰基单元。

[0313] 在一些实施例中,提供了式(IIa)的 L^1 接头:



[0315] 或其盐或溶剂化物或立体异构体;其中D、T、 L^1 、 L^2 、 L^3 、 L^4 和A如式(II)所定义,并且p为1至20。在一些实施例中,p为1至8。在一些实施例中,p为1至6。在一些实施例中,p为1至4。在一些实施例中,p为2至4。在一些实施例中,p为1、2、3或4。

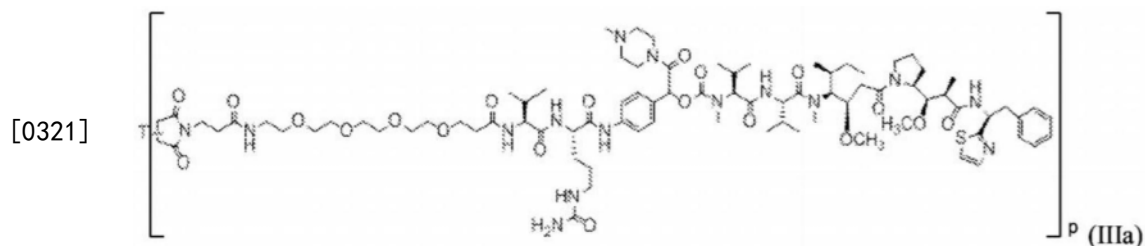
[0316] 本公开还提供了式(III)的 L^1 接头:



[0318] 或其盐、溶剂化物或立体异构体;

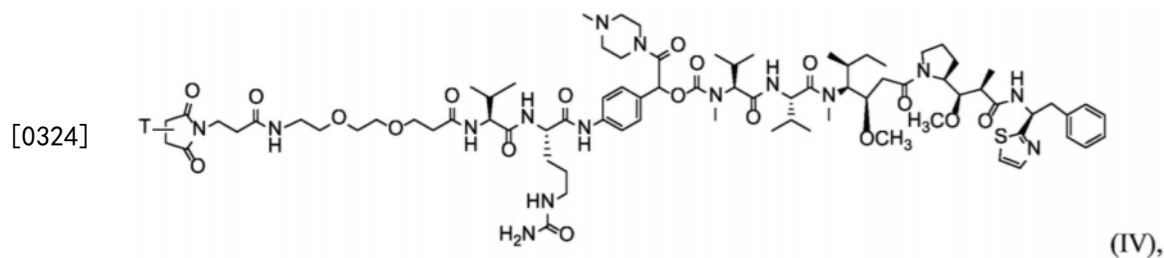
[0319] 其中T为靶向部分。

[0320] 在一些实施例中,提供了式(IIIa)的 L^1 接头:



[0322] 或其盐或溶剂化物或立体异构体;其中T为靶向部分,并且p为1至20。在一些实施例中,p为1至8。在一些实施例中,p为1至6。在一些实施例中,p为1至4。在一些实施例中,p为2至4。在一些实施例中,p为1、2、3或4。

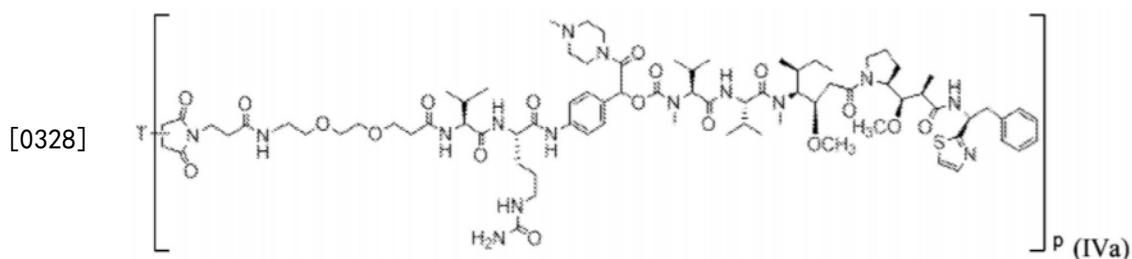
[0323] 本公开提供了式(IV)的 L^1 接头:



[0325] 或其盐、溶剂化物或立体异构体;

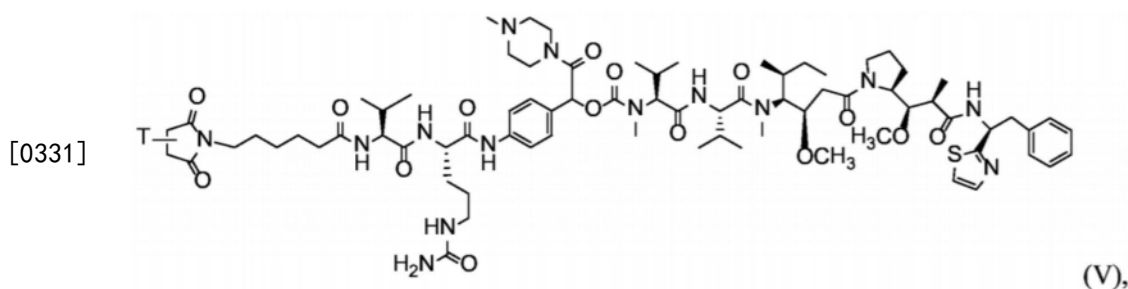
[0326] 其中T为靶向部分。

[0327] 在一些实施例中,提供了式(IVa)的L1接头:



[0329] 或其盐或溶剂化物或立体异构体;其中T为靶向部分,并且p为1至20。在一些实施例中,p为1至8。在一些实施例中,p为1至6。在一些实施例中,p为1至4。在一些实施例中,p为2至4。在一些实施例中,p为1、2、3或4。

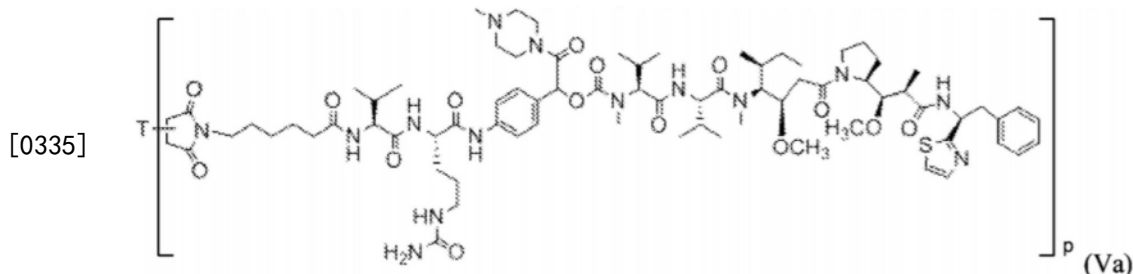
[0330] 本公开提供了式(V)的L1接头:



[0332] 或其盐、溶剂化物或立体异构体;

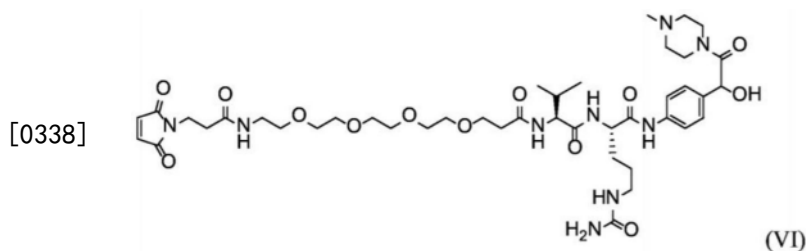
[0333] 其中T为靶向部分。

[0334] 在一些实施例中,提供了式(Va)的L1接头:



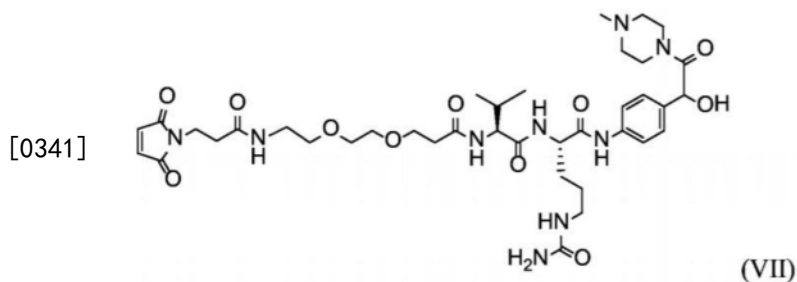
[0336] 或其盐或溶剂化物或立体异构体;其中T为靶向部分,并且p为1至20。在一些实施例中,p为1至8。在一些实施例中,p为1至6。在一些实施例中,p为1至4。在一些实施例中,p为2至4。在一些实施例中,p为1、2、3或4。

[0337] 本公开提供了式(VI)的L1接头:



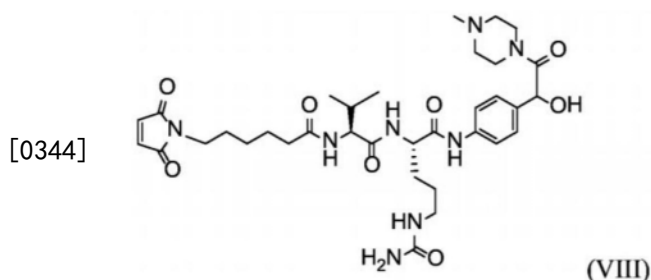
[0339] 或其盐或溶剂化物。

[0340] 本公开提供了式(VII)的L1接头:

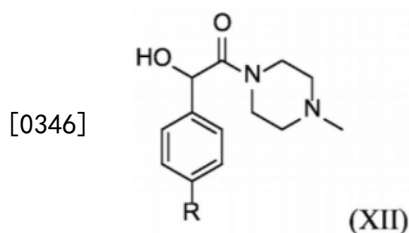


[0342] 或其盐或溶剂化物。

[0343] 本公开提供了式(VIII)的L1接头：



[0345] 本公开提供了式(XII)的L1接头：



[0347] 或其盐或溶剂化物或立体异构体；其中R为NO₂或NH₂。

[0348] 在某些实施例中，L1接头通常也可分为两类：可裂解的（诸如肽、腙 (hydrazone) 或二硫化物）或不可裂解的（诸如硫醚）。如果接头是不可裂解的接头，则其在E3LB部分上的位置应使其不干扰VHL结合。具体地，不可裂解的接头在VHL结合结构域的脯氨酸的羟基位置不被共价连接。可以被溶酶体酶（例如组织蛋白酶B）水解的肽接头，例如缬氨酸-瓜氨酸 (Val-Cit) 已用于使药物与抗体连接 (US 6,214,345)。它们之所以特别有用，部分是由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。但是，以天然肽为代表的化学空间是有限的；因此，理想的是具有各种非肽接头，其作用类似于肽并且可以被溶酶体蛋白酶有效地裂解。非肽结构的更多样性可以产生肽接头没有提供的有益的有益特性。本文提供了用于接头L1的不同类型的非肽接头，其可以被溶酶体酶裂解。

[0349] a. 拟肽接头

[0350] 本文提供了溶酶体酶可切割的用于Ab-CIDE的不同类型的非肽、拟肽接头。例如，将二肽中间的酰胺键（例如Val-Cit）替换为酰胺模拟物；和/或整个氨基酸（例如，Val-Cit二肽中的缬氨酸氨基酸）被非氨基酸部分（例如，环烷基二羰基结构（例如，环大小=4或5））替换。

[0351] 当L1是拟肽接头时，其由下式表示

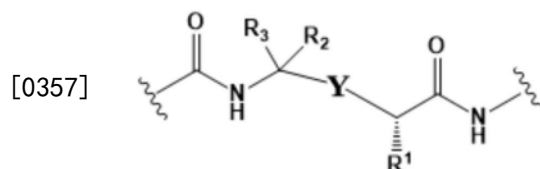
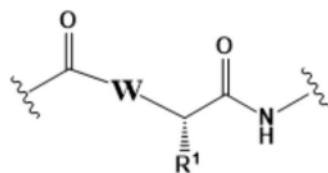
[0352] —Str—(PM)—Sp—，

[0353] 其中：

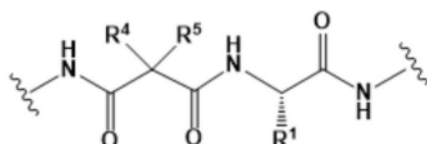
[0354] Str为与Ab共价连接的拉伸单元；

[0355] Sp为与CIDE部分共价连接的键或间隔单元；并且

[0356] PM为非肽化学部分，其选自由以下项组成的组：



和



[0358] W为-NH-杂环烷基-或杂环烷基；

[0359] Y为杂芳基、芳基、-C(O)C₁-C₆亚烷基、C₁-C₆亚烷基-NH₂、C₁-C₆亚烷基-NH-CH₃、C₁-C₆亚烷基-N-(CH₃)₂、C₁-C₆烯基或C₁-C₆亚烷基；

[0360] 每个R¹独立地为C₁-C₁₀烷基、C₁-C₁₀烯基、(C₁-C₁₀烷基)NHC(NH)NH₂或(C₁-C₁₀烷基)NHC(O)NH₂；

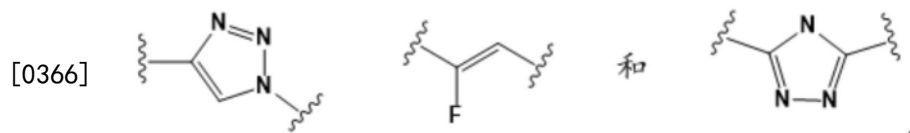
[0361] R³和R²各自独立地为H、C₁-C₁₀烷基、C₁-C₁₀烯基、芳烷基或杂芳烷基，或者R³和R²可一起形成C₃-C₇环烷基；并且

[0362] R⁴和R⁵各自独立地是C₁-C₁₀烷基、C₁-C₁₀烯基、芳烷基、杂芳烷基、(C₁-C₁₀烷基)OCH₂-，或R⁴和R⁵可以形成C₃-C₇环烷基环。

[0363] 注意，L1可以通过E3LB、L2或PB基团中的任何一个连接到CIDE。

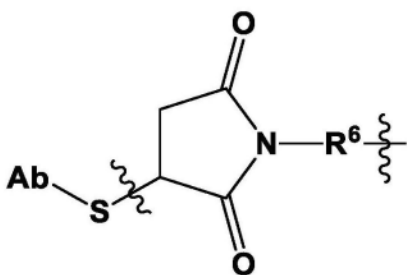
[0364] 在实施例中，Y为杂芳基；R⁴和R⁵一起形成环丁基环。

[0365] 在实施例中，Y是选自由以下项组成的组的部分：



[0367] 在实施例中，Str是由下式表示的化学部分：

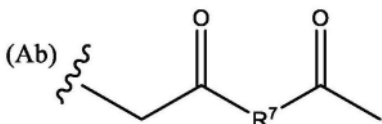
[0368]



[0369] 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，其中每个亚烷基可以被选自由以下项组成的组的一至五个取代基取代：卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷基氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、甲酸、烷硫基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_4 - C_7 杂环烷基、芳基、芳烷基、杂芳烷基和杂芳基，每个 R^a 独立地是H或 C_1 - C_6 烷基； Sp 是—Ar— R^b —，其中Ar是芳基或杂芳基， R^b 是 $(C_1$ - C_{10} 亚烷基)O-。当马来酰亚胺通过迈克尔加成与抗体上暴露的Cys残基发生反应时，可以发生与抗体的偶联。暴露的Cys残基可以通过分子工程人工引入和/或通过链间二硫键的还原产生)

[0370] 在实施例中，Str具有下式：

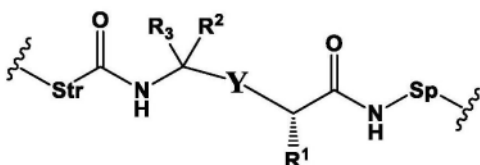
[0371]



[0372] 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 独立地是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-。

[0373] 在实施例中，L1是由下式表示的非肽化学部分

[0374]

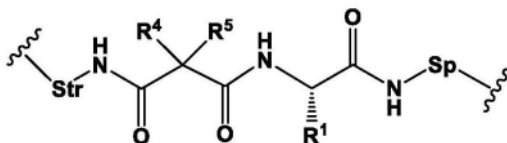


[0375] R^1 是 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烯基、 $(C_1$ - C_6 烷基)NHC(NH)NH₂或 $(C_1$ - C_6 烷基)NHC(O)NH₂；

[0376] R^3 和 R^2 各自独立地是H或 C_1 - C_{10} 烷基。

[0377] 在实施例中，L1是由下式表示的非肽化学部分

[0378]

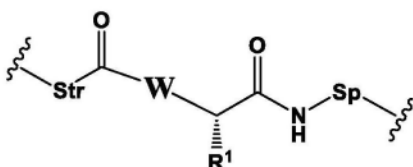


[0379] R^1 是 C_1 - C_6 烷基、 $(C_1$ - C_6 烷基)NHC(NH)NH₂或 $(C_1$ - C_6 烷基)NHC(O)NH₂；

[0380] R^4 和 R^5 一起形成 C_3 - C_7 环烷基环。

[0381] 在实施例中，L1是由下式表示的非肽化学部分

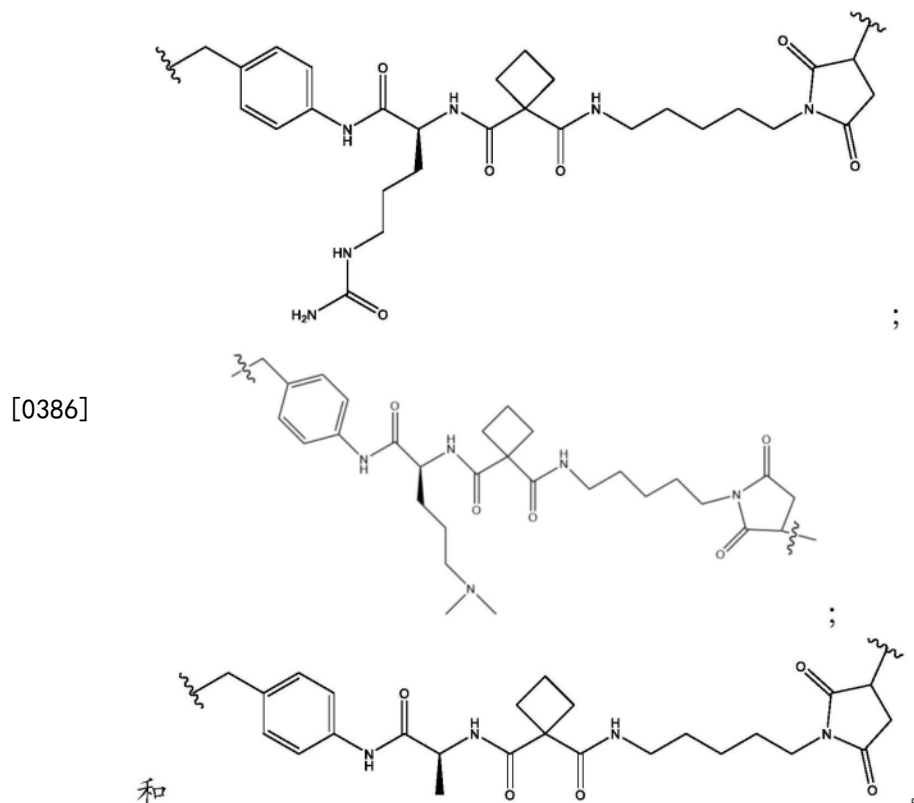
[0382]



[0383] R^1 是 C_1 - C_6 烷基、 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(NH)NH_2$ 或 $(C_1$ - C_6 烷基) $NHC(O)NH_2$ ，而W如上述所定义。

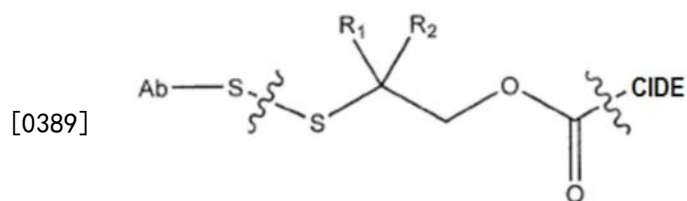
[0384] 在一些实施例中，接头可以是模拟肽接头，其描述诸如参见W02015/095227、W02015/095124或W02015/095223，其各自全文以引用方式并入本文。

[0385] 在某些实施例中，接头选自由以下项组成的组：

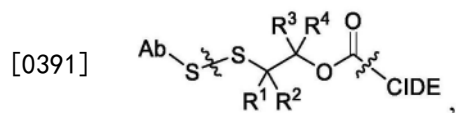


[0387] b. 非拟肽接头

[0388] 在一方面，可以按如下方式将接头L1与抗体和CIDE共价结合：



[0390] 在一方面，接头L1与抗体形成二硫键，并且该接头具有以下结构：



[0392] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 独立地选自由H、任选地取代的支链或直链 C_1 - C_5 烷基和任选地取代的 C_3 - C_6 环烷基组成的组，或者 R^1 和 R^2 或 R^3 和 R^4 与它们所结合的碳原子一起形成任选地取代的 C_3 - C_6 环烷基环或3元至6元杂环烷基环。

[0393] 在一方面，接头的羰基与CIDE中的胺基连接。还应注意，与Ab连接的硫原子是来自抗体中半胱氨酸的巯基。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、

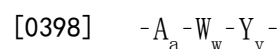
α -卤代乙酰基、活化的酯(例如琥珀酰亚胺酯)、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酞酐、酰氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯。参见例如, Klussman等人(2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773的第766页的缀合方法, 以及本文的实例。

[0394] 在一些实施例中, L1接头具有能够与抗体上存在的亲电子基团反应的官能团。这种亲电基团的实例包括但不限于醛和酮羰基。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基团反应, 并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、肼羧酸酯和芳基酰肼。

[0395] L1接头可包含一个或多个接头组分。示例性的接头组分包括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-琥珀酰亚胺基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羧酸酯(“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。

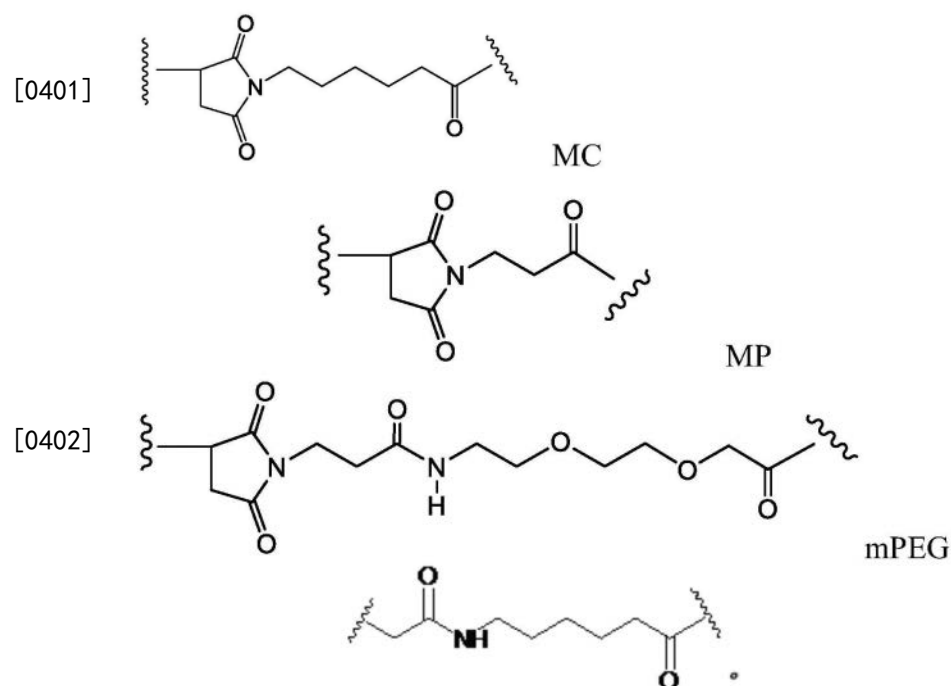
[0396] L1接头可以是“可裂解的接头”, 以促进CIDE的释放。非限制性示例性可裂解的接头包括酸不稳定的接头(例如, 包含脞)、蛋白酶敏感的(例如, 肽酶敏感的)接头、光不稳定的接头或含二硫化物的接头(Chari等人, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); 美国专利号5208020)。

[0397] 在某些实施例中, 接头具有下式:

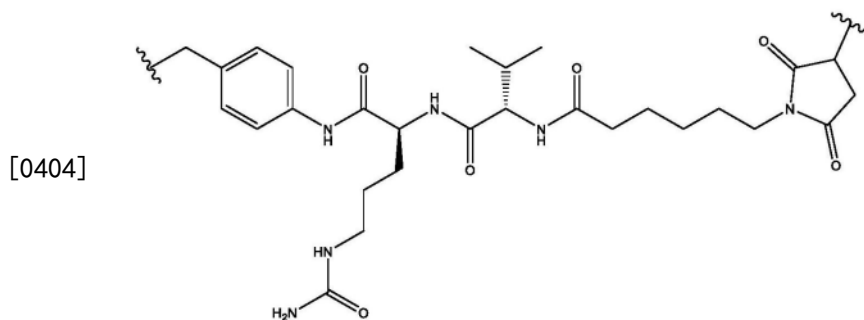


[0399] 其中A为“拉伸单元”, 并且a为0至1的整数; W为“氨基酸单元”, 并且w为0至12的整数; Y为“间隔单元”, 并且y为0、1或2。在美国专利号7,498,298中描述了此类接头的示例性实施例。

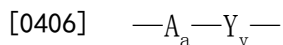
[0400] 在一些实施例中, L1接头组分包含将抗体与另一接头组分或CIDE部分连接的“拉伸单元”。非限制性示例性拉伸单元如下所示(其中波浪线表示与抗体、CIDE或其他接头组分共价连接的位点):



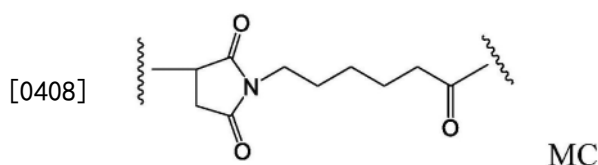
[0403] 在某些实施例中,接头为:



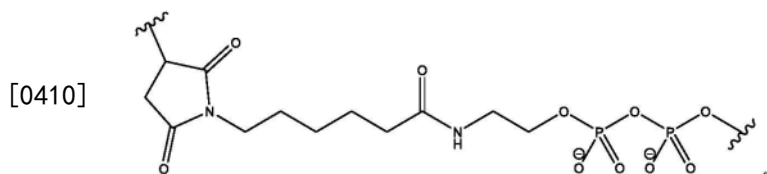
[0405] 在某些实施例中,接头具有下式:



[0407] 其中A和Y如上定义。在某些实施例中,间隔单元Y可以是磷酸酯,例如单磷酸酯或二磷酸酯。在某些实施例中,拉伸组分A包含:



[0409] 在某些实施例中,接头为:



[0411] 3.CIDE (“D”)

[0412] 有用的CIDE具有上述通式。

[0413] 有用的Ab-L1-CIDE和未结合的降解剂表现出理想的特性,例如细胞靶向、蛋白质靶向和降解。在某些实施例中,Ab-L1-CIDE呈现出0.0001到小于约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DC_{max}。

[0414] CIDE包括具有以下组分的那些。

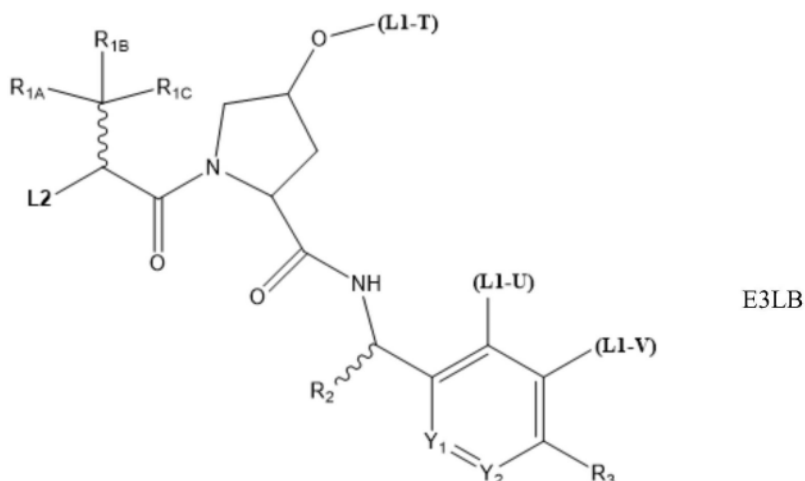
[0415] a.E3泛素连接酶结合基团 (E3LB)

[0416] E3泛素连接酶(在人类中已知有600多种)赋予泛素化底物特异性。存在与这些连接酶结合的已知配体。如本文所述,E3泛素连接酶结合基团是可以结合作为von Hippel-Lindau (VHL)的E3泛素连接酶的肽或小分子。

[0417] 特定的E3泛素连接酶是von Hippel-Lindau (VHL) 肿瘤抑制因子,它是E3连接酶复合物VCB的底物识别亚基,它也由延伸蛋白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。

[0418] 在一方面,本文的主题涉及CIDE的E3LB部分,其具有以下化学结构:

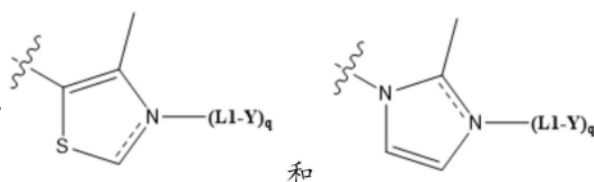
[0419]



[0420] 其中, R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基; 或者 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 中的两者与各自所连接的碳一起形成 C_{1-5} 环烷基;

[0421] R_2 为 C_{1-5} 烷基;

[0422] R_3 选自由氰基、



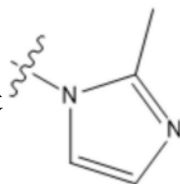
单键或双键; 并且 q 为 1 或 0;

[0423] Y_1 和 Y_2 中的一者为 $-CH$, Y_1 和 Y_2 中的另一者为 $-CH$ 或 N ;

[0424] 其中, $L1-T$ 、 $L1-U$ 、 $L1-V$ 和 $L1-Y$ 各自独立地如本文别处所述; 并且 $L2$ 如本文别处所述。

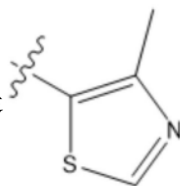
[0425] 在某些实施例中, E3LB 具有其中 R_3 是氰基的结构。

[0426] 在某些实施例中, E3LB 具有其中 R_3 是



的结构。

[0427] 在某些实施例中, E3LB 具有其中 R_3 是

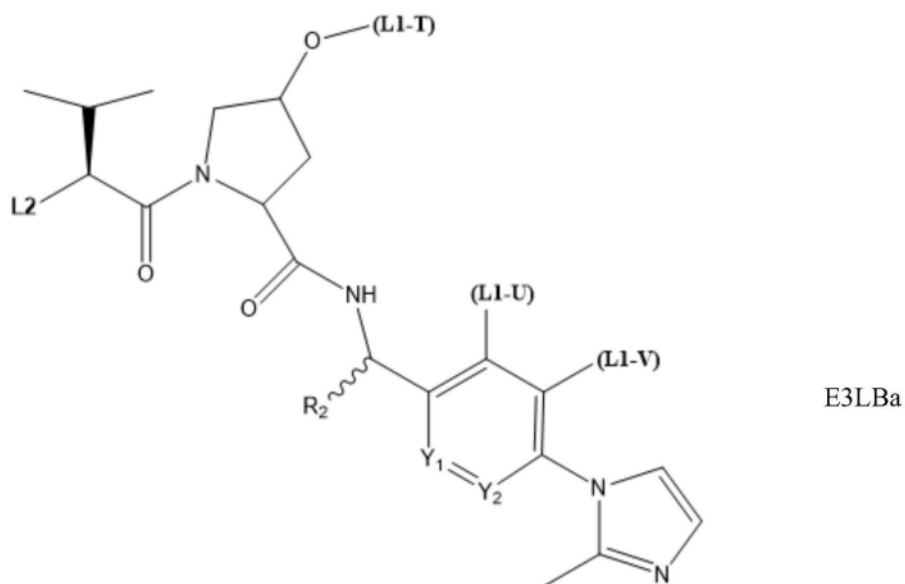


的结构。

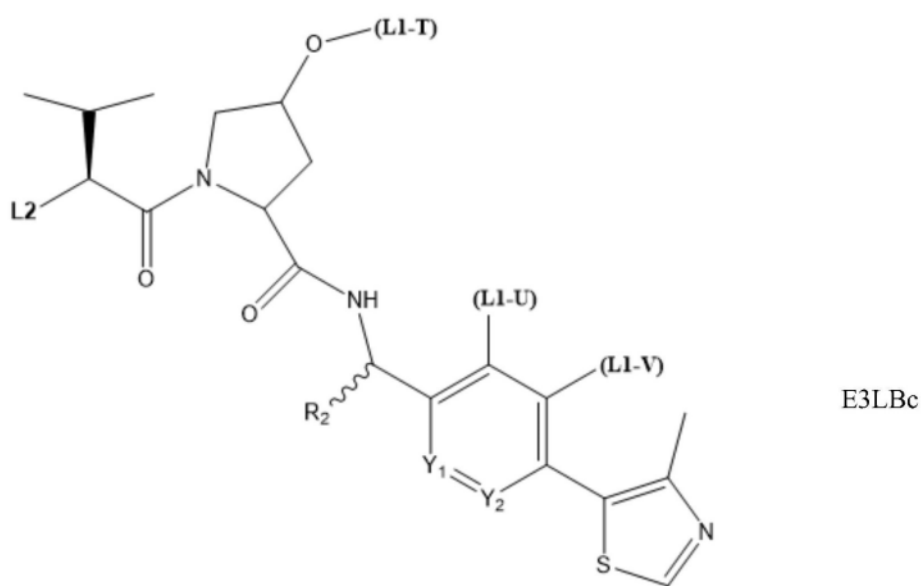
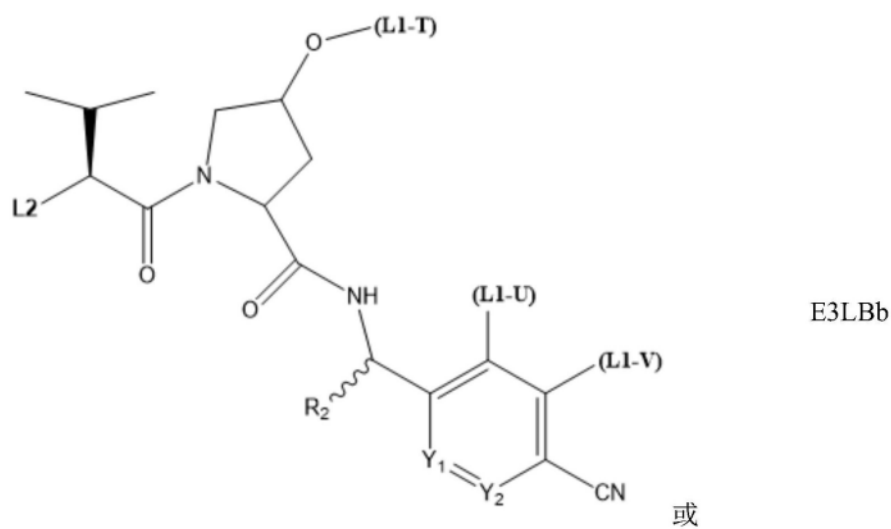
[0428] 在某些实施例中, E3LB 具有其中 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地是氢或甲基的结构。

[0429] 在某些实施例中, E3LB 具有其中 R_{1A} 和 R_{1B} 各自为甲基的结构。

[0430] 在某些实施例中, E3LB 具有下式之一:



[0431]



[0432]

[0433] 在某些实施例中, E3LB具有其中 R_2 是氢、甲基、乙基或丙基的结构。

[0434] 在某些实施例中,E3LB具有其中R₂是甲基的结构。

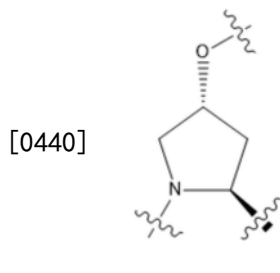
[0435] 在某些实施例中,E3LB具有其中R₂是  的结构。

[0436] 在某些实施例中,E3LB具有其中Y₁和Y₂各自为-CH的结构。

[0437] 在某些实施例中,E3LB具有其中Y₁是N并且Y₂是-CH的结构。

[0438] 在某些实施例中,E3LB具有其中Y₁是-CH并且Y₂是N的结构。

[0439] 在某些实施例中,E3LB的脯氨酸部分具有以下结构:



[0441] E3LB部分具有至少一个末端带有与L2部分共价连接或可以与之共价连接的部分,和至少一个末端带有与L1部分共价连接或可以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与L2部分共价连接。

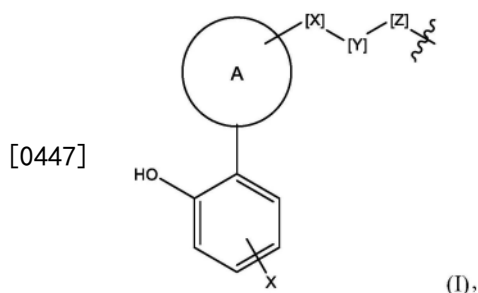
[0442] 在本文所述的任何方面或实施例中,本文所述的E3LB可以是其药用盐、对映异构体、非对映异构体、溶剂化物或多晶型物。另外,在本文所述的任何方面或实施例中,本文所述的E3LB可直接通过键或通过化学接头与PB偶联。

[0443] b.BRM蛋白质结合基团(PB)

[0444] CIDE的PB部分是BRM结合的小分子部分,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。这样的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、溶剂化物和晶型物,以及可以靶向目标蛋白质的其他小分子。

[0445] 本文所述的CIDE或DAC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W02019/195201中公开的那些,该专利全文以引用方式并入本文。

[0446] 在某些实施例中,BRM结合化合物是式I化合物:

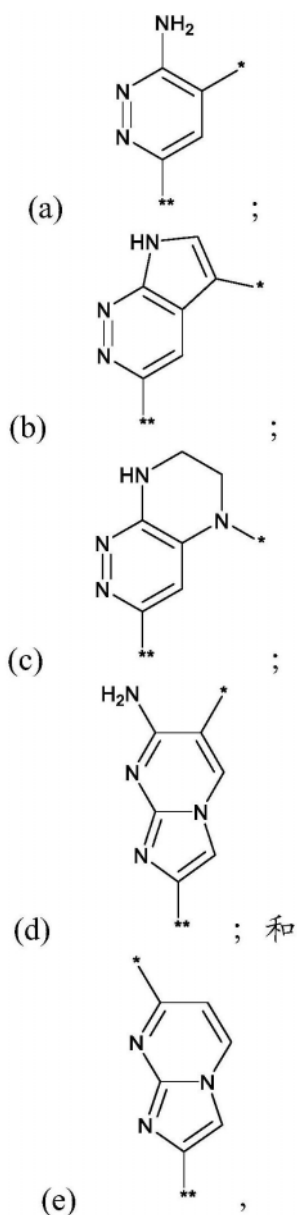


[0448] 或其立体异构体或互变异构体,或前述任一者的药用盐,其中:

[0449] 其中X为氢或卤素;

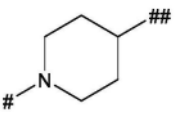
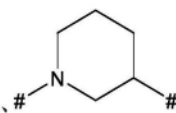
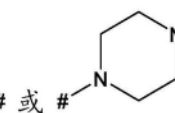
[0450]  选自由以下项组成的组:

[0451]



[0452] 其中,对于(a)至(e),*表示与[X]的连接点,或者,如果[X]不存在,*表示与[Y]的连接点,并且**表示与苯环的连接点;并且其中:

[0453] (i) [X]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基,

[0454] 条件是,当  为(a)时,则[X]不是  ,  或  ,

其中#表示与  的连接点,并且##表示与L2的连接点,

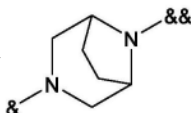
[0455] [Y]不存在,并且

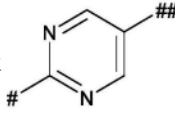
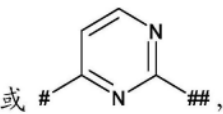
[0456] [Z]不存在;或者

[0457] (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元杂环基任选地被一个或多个-OH或C₁₋₆烷基取代,

[0458] [Y]不存在,并且

[0459] [Z]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基，

[0460] 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]不是  或 ，其中#表示与[X]的连接点，并且##表示与L2的连接点；或者

[0461] (iii) [X]为3元至15元杂环基或5元至20元杂芳基，

[0462] [Y]为亚甲基，其中[Y]的亚甲基任选地被一个或多个甲基基团取代，并且

[0463] [Z]为3元至15元杂环基；或者

[0464] (iv) [X]不存在，

[0465] [Y]为亚乙烯基，其中[Y]的亚乙烯基任选地被一个或多个卤代取代，并且

[0466] [Z]为5元至20元杂芳基，

[0467] 条件是， 为(a)、(b)、(d)或(e)；或者

[0468] (v) [X]不存在，

[0469] [Y]为亚乙炔基，并且

[0470] [Z]为5元至20元杂芳基，

[0471] 条件是， 为(a)、(b)、(d)或(e)；或者

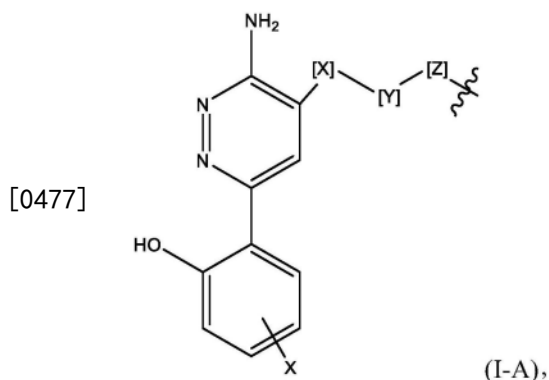
[0472] (vi) [X]不存在，

[0473] [Y]为环丙基或环丁基，并且

[0474] [Z]为5元至20元杂芳基，

[0475] 条件是， 为(a)、(b)、(d)或(e)。

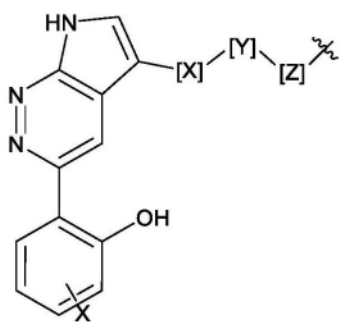
[0476] 在某些实施例中，BRM结合化合物是式(I-A)化合物：



[0478] 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X为氢或卤代，并且其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

[0479] 在某些实施例中，BRM结合化合物是式(I-B)化合物：

[0480]

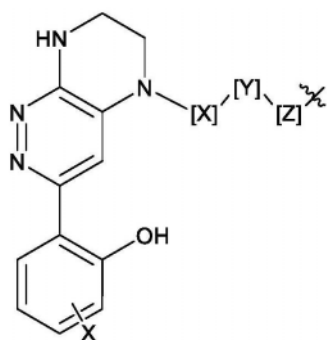


(I-B),

[0481] 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X为氢或卤代,并且其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

[0482] 在某些实施例中,BRM结合化合物是式(I-C)化合物:

[0483]

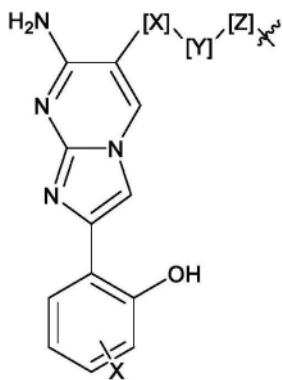


(I-C),

[0484] 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X为氢或卤代,并且其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

[0485] 在某些实施例中,BRM结合化合物是式(I-D)化合物:

[0486]

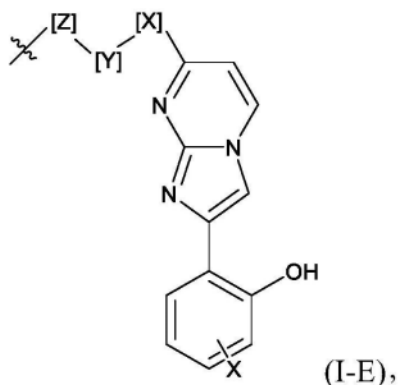


(I-D),

[0487] 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X为氢或卤代,并且其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

[0488] 在某些实施例中,BRM结合化合物是式(I-E)化合物:

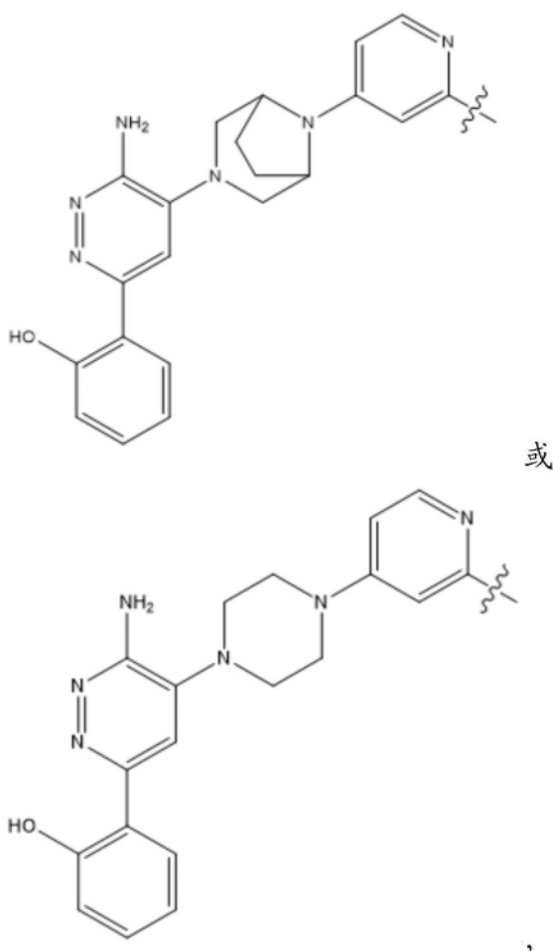
[0489]



[0490] 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X为氢或卤代,并且其中[X]、[Y]和[Z]如上文针对式(I)化合物所定义的。

[0491] 在某些实施例中,CIDE的PB(BRM)部分具有以下结构:

[0492]



[0493] 其中, 为与L2的共价连接点。

[0494] c. 接头L2

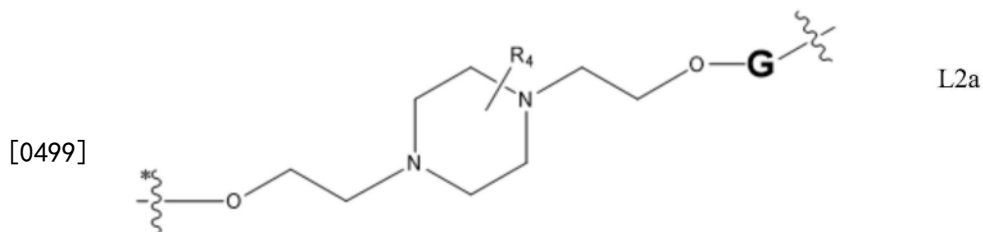
[0495] 如本文所述的CIDE的E3LB和PB部分可以与接头(L2、接头L2、接头-2)连接。在某些实施例中,接头L2与E3LB部分共价结合并与PB部分共价结合,从而构成CIDE。

[0496] 在某些实施例中,L2部分可以选自W02019/195201中公开的接头,该专利全文以引用方式并入本文。

[0497] 尽管E3LB基和PB基可以通过对接头的化学性质合适和稳定的任何基团与接头共

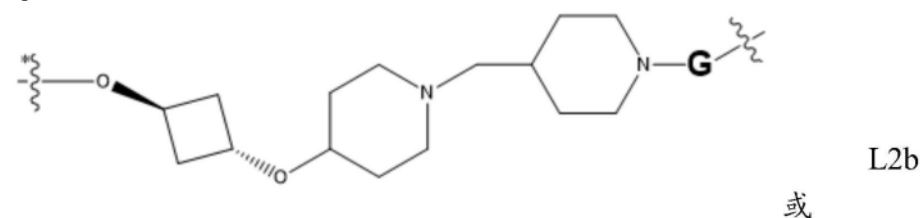
价连接,在某些方面,L2通过酰胺、酯、硫酯、酮基、氨基甲酸酯(尿烷)或醚独立地与E3LB基和PB基共价键合,每个基团都可以插入E3LB和PB基上的任何位置,以使E3LB基与泛素连接酶结合,而PB基与待降解的BRM靶蛋白质结合。换言之,如本文所示,接头可以设计并连接至E3LB和PB,以调控E3LB和PB与它们各自的结合配偶体的结合。

[0498] 在某些实施例中,L2为与E3LB和PB共价结合的接头,该L2具有下式:

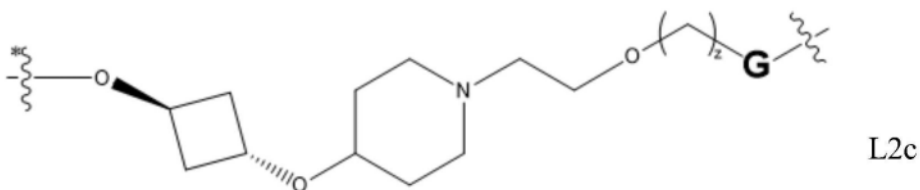


[0500] 其中,

[0501] R_4 为氢或甲基,

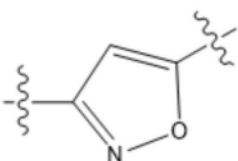


[0502]



[0503] 其中,

[0504] z 为一或零,

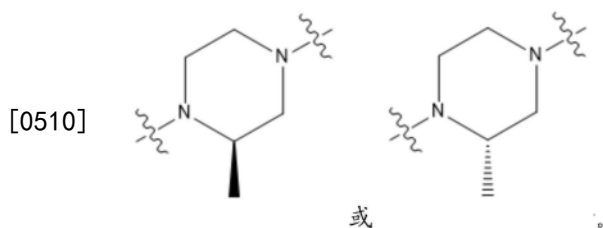
[0505] G为  或 $-C(=O)NH-$; 并且

[0506]  为与PB的连接点。

[0507] 在L2a的某些实施例中, R_4 为氢。

[0508] 在L2a的某些实施例中, R_4 为甲基。

[0509] 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定位如下:



[0511] 在L2c的某些实施例中,z为零。

[0512] 在L2c的某些实施例中,z为一。

[0513] 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与抗体共价连接。“CIDE载量”是每个抗体的CIDE部分的平均数。每个抗体(Ab)的CIDE载量范围可能是1至20个CIDE(D)。即,在Ab-CIDE式, $Ab-(L1-D)_p$ 中, p具有从约1至约20、从约1至约8、从约1至约5、从约1至约4或从约1至约3的值。通过接头L1与抗体共价连接的每个CIDE可以是相同或不同的CIDE,并且可以具有与任何其它共价连接至抗体的L1相同或不同类型的接头。在某些实施例中,Ab是半胱氨酸改造的抗体,并且p约为2。

[0514] 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。也可以测定以p表示的Ab-CIDE的定量分布。通过ELISA,可以确定特定Ab-CIDE制剂中p的平均值(Hamblett等人(2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson等人(2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852)。然而,通过抗体-抗原结合和ELISA的检测限制不能辨别p值的分布。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,例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p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。

[0515] 对于一些Ab-CIDE, p可能受抗体上结合位点数量的限制。例如,抗体可仅具有一个或几个半胱氨酸硫醇基,或者可仅具有一个或几个具有足够高的反应性的硫醇基团,通过这些基团可连接接头。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。p值包括从约1至约20、从约1至约8、从约1至约5、从约1至约4、从约1至约3的值,其中p等于2。在一些实施例中,本文所述的主题针对任何Ab-CIDE,其中p为约1、2、3、4、5、6、7或8。

[0516] 通常,在缀合反应过程中,数量少于理论最大值的CIDE部分与抗体缀合。抗体可以包含例如许多不与接头L1-CIDE基(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可与胺反应性接头剂反应。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剂或接头L1-CIDE基反应。通常,抗体不包含许多(如果有的话)可与CIDE部分连接的游离和反应性半胱氨酸硫醇基。化合物抗体中的大多数半胱氨酸硫醇残基以二硫键形式存在,必须在部分或完全还原条件下用还原剂(如二硫苏糖醇(DTT)或TCEP)还原。但是,可以通过几种不同的方式来控制CAR的CIDE载量(CIDE/抗体比,“CAR”),包括:(i)限制接头L1-CIDE基或接头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)部分或限制半胱氨酸硫醇修饰的还原条件。

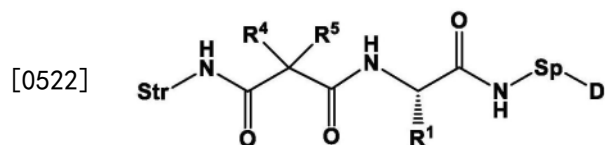
[0517] III. L1-CIDE化合物

[0518] 可将本文所述的CIDE共价连接至接头L1以制备L1-CIDE基。这些化合物具有以下通式:

[0519] (L1-D),

[0520] 其中D是具有结构E3LB-L2-PB的CIDE;其中E3LB是与L2共价结合的E3连接酶结合基团。L2是与E3LB和PB共价结合的接头;PB是与L2共价结合的BRM蛋白质结合基团。并且L1是与D共价结合的接头。这些组分中每一个的有用基团如上所述。

[0521] 在特定的实施例中,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:



[0523] 其中

[0524] Str是拉伸单元;

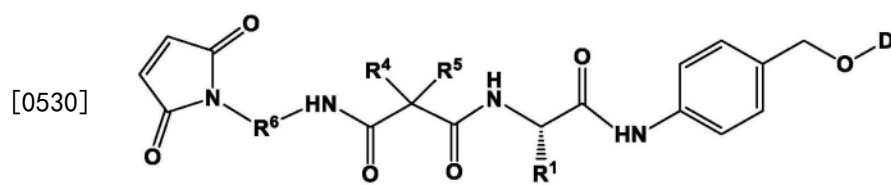
[0525] Sp是与D即CIDE部分共价连接的键或间隔单元;

[0526] R^1 为 C_1 - C_{10} 烷基、 $(C_1-C_{10})NHC(NH)NH_2$ 或 $(C_1-C_{10})NHC(O)NH_2$;

[0527] R^4 和 R^5 各自独立地是 C_1 - C_{10} 烷基、芳烷基、杂芳烷基、 $(C_1-C_{10})OCH_2-$,或者 R^4 和 R^5 可以形成 C_3 - C_7 环烷基环;

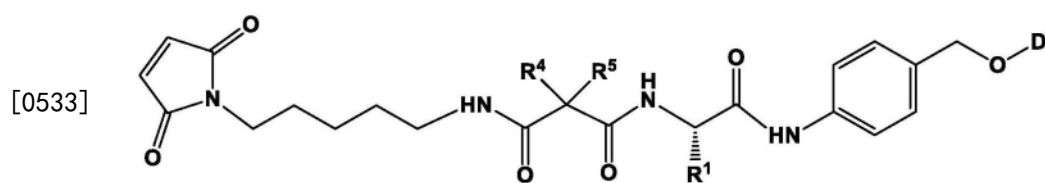
[0528] D是CIDE部分。

[0529] L1-CIDE化合物可由下式表示:



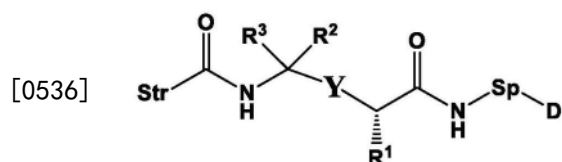
[0531] 其中 R_6 是 C_1 - C_{10} 亚烷基; R^4 和 R^5 一起形成 C_3 - C_7 环烷基环,并且D是CIDE部分。

[0532] L1-CIDE化合物可由下式表示:



[0534] 其中 R^1 、 R^4 和 R^5 如本文其它地方所述,并且D是CIDE部分。

[0535] L1-CIDE化合物可由下式表示:



[0537] 其中

[0538] Str是拉伸单元;

[0539] Sp是与D即CIDE部分共价连接的任选的间隔单元;

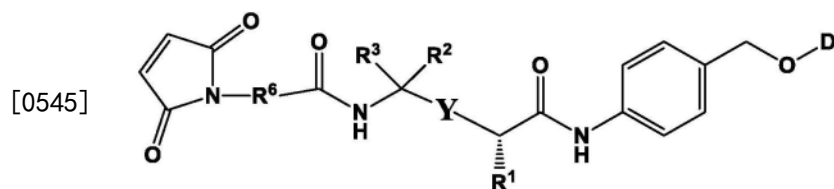
[0540] Y为杂芳基、芳基、 $-C(O)C_1-C_6$ 亚烷基、 C_1-C_6 亚烷基- NH_2 、 C_1-C_6 亚烷基- $NH-CH_3$ 、 C_1-C_6 亚烷基-N- $(CH_3)_2$ 、 C_1-C_6 烯基或 C_1-C_6 亚烷基;

[0541] 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) $NHC(O)NH_2$;

[0542] R^3 和 R^2 各自独立地是H、 C_1 - C_{10} 烷基、芳烷基或杂芳烷基,或者 R^3 和 R^2 可一起形成 C_3 - C_7 环烷基;并且

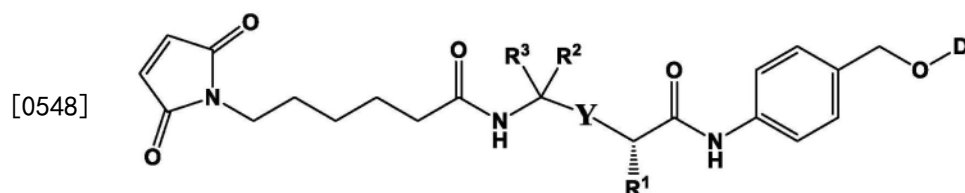
[0543] D是CIDE部分。

[0544] L1-CIDE化合物可由下式表示:



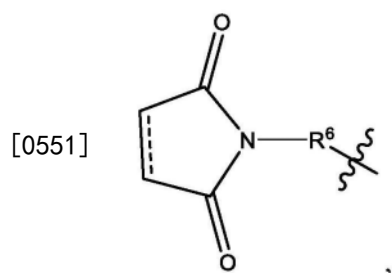
[0546] 其中 R^6 是 C_1 - C_{10} 亚烷基,并且 R^1 、 R^2 和 R^3 如本文其它地方所述,并且D是CIDE部分

[0547] L1-CIDE化合物可由下式表示:



[0549] 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 如本文其它地方所述,并且D是CIDE部分。

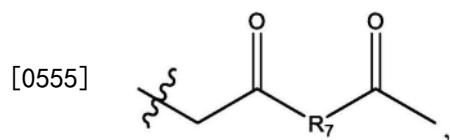
[0550] 在上述任一L1-CIDE化合物中,Str可以具有下式:



[0552] 其中 R^6 选自由 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 亚烷基组成的组,其中每个亚烷基可以被选自由以下项组成的组的一至五个取代基取代:卤代、三氟甲基、二氟甲基、氨基、烷基氨基、氰基、磺酰基、磺酰胺、亚砷、羟基、烷氧基、酯、甲酸、烷硫基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_4 - C_7 杂环烷基芳基、芳烷基、杂芳烷基和杂芳基;每个 R^a 独立地是H或 C_1 - C_6 烷基;Sp是—Ar— R^b —,其中Ar是芳基或杂芳基, R^b 是(C_1 - C_{10} 亚烷基)O-。

[0553] 在某些L1-CIDE化合物中, R^6 是 C_1 - C_{10} 亚烷基,Sp是—Ar— R^b —,其中Ar是芳基, R^b 是(C_1 - C_6 亚烷基)O-;或者 R_6 是— $(CH_2)_q$ —是1-10;

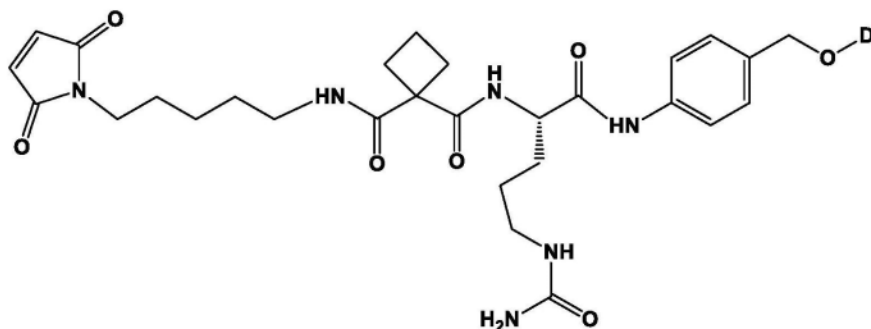
[0554] 在上述任一L1-CIDE化合物中,Str可以具有下式:



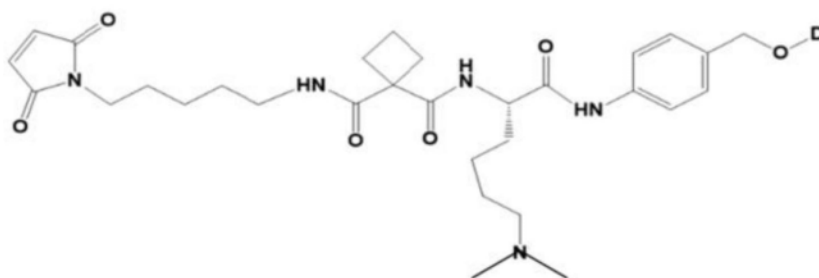
[0556] 其中, 表示能够与抗体缀合的部分, R^7 选自由 C_1 - C_{10} 亚烷基、 C_1 - C_{10} 亚烷基-O、N(R^c)-(C_2 - C_6 亚烷基)-N(R^c)和N(R^c)-(C_2 - C_6 亚烷基)组成的组;其中每个 R^c 独立地为H或 C_1 - C_6 烷基;

[0557] 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^b 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^- 。

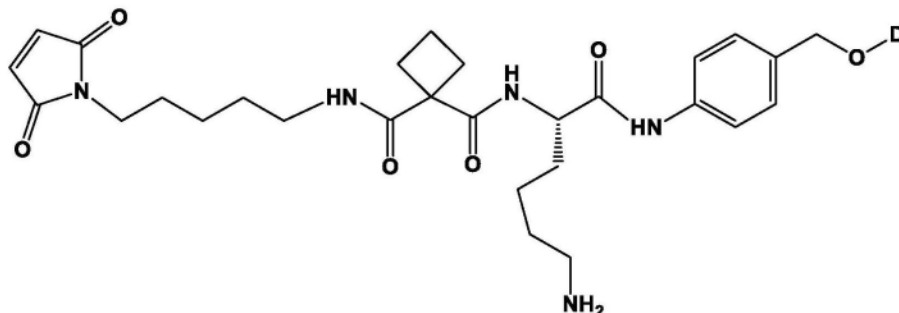
[0558] L1-CIDE可具有下式，其中在每种情况下， D 是CIDE部分：



[0559]



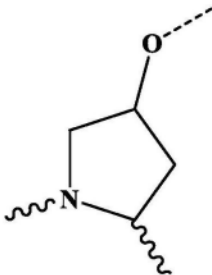
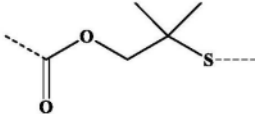
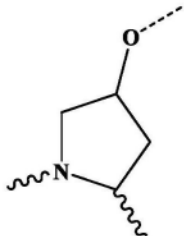
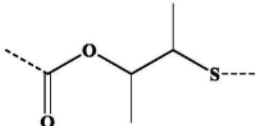
[0560] 并且



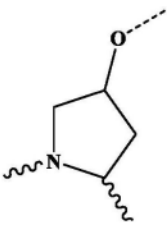
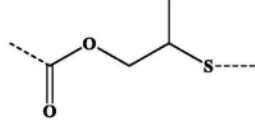
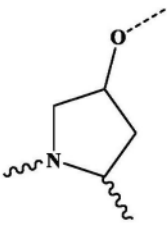
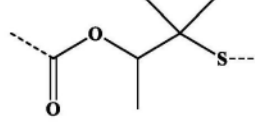
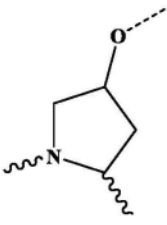
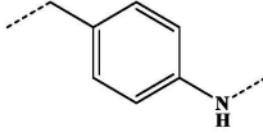
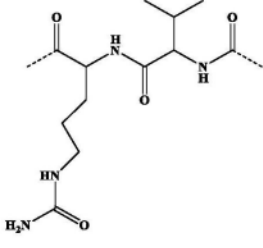
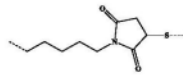
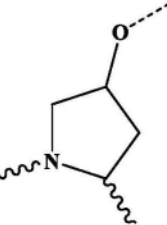
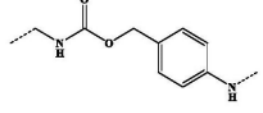
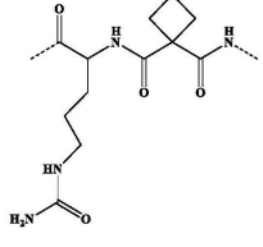
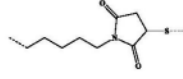
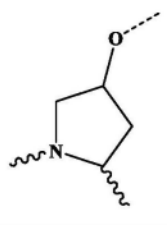
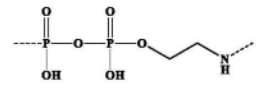
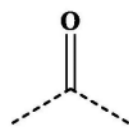
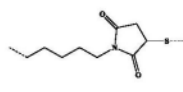
[0562] 现在参考CIDE的PB基，在特定实施例中，PB如本文别处所述。现在参考CIDE的E3LB基，E3LB如本文别处所述。Ab-CIDE可以包括PB、E3LB、Ab、L1和L2的任意组合。

[0563] 鉴于本文公开的主题，本领域技术人员将理解，L1和L2的连接点可以变化。此外，部分接头，例如 $-Str-(PM)-Sp-$ 可以互换。另外，部分接头L1可以互换。与CIDE、抗体和与其它可互换的接头连接的L1接头的非限制性实例包括但不限于表1-L1中所示的那些。

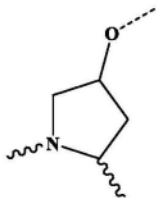
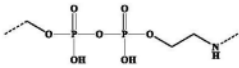
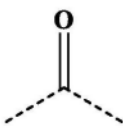
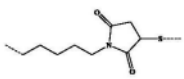
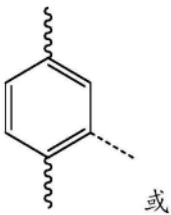
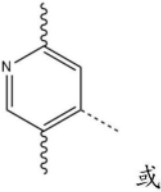
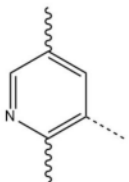
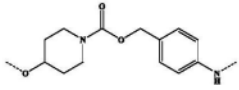
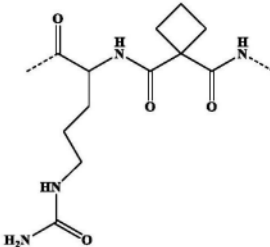
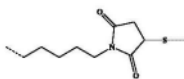
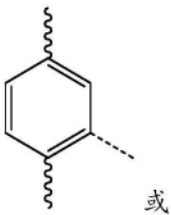
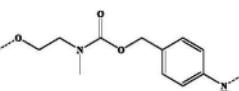
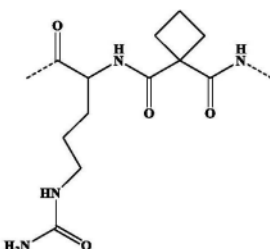
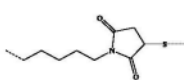
[0564]

L1 所连接的 CIDE 部分	L1 的 CIDE 连接部分	L1 的接头部分	L1 的抗体连接 部分
E3LB 残基 	NA		NA
E3LB 残基 	NA		NA

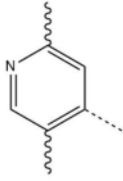
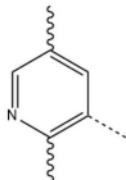
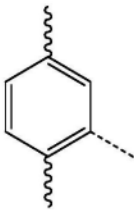
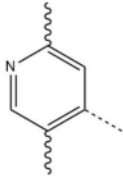
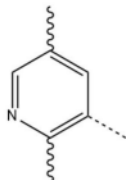
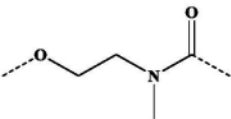
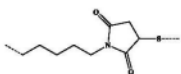
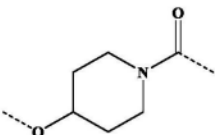
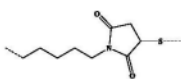
[0565]

E3LB 残基 	NA		NA
E3LB 残基 	NA		NA
E3LB 残基 			
E3LB 残基 			
E3LB 残基 			

[0566]

E3LB 残基 			
E3LB 残基  或  或 			
E3LB 残基  或			

[0567]

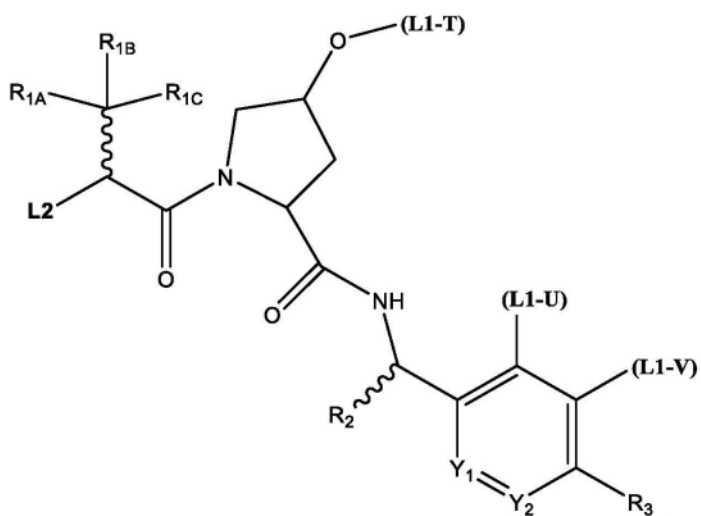
 或 			
E3LB 残基  或  或 		NA	
E3LB 残基		NA	

[0568]

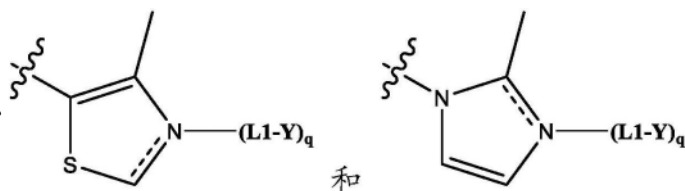
E3LB 残基 			
L2 与蛋白质结合基团——任何可用位置			

[0569] 在某些实施例中,接头L1可以在不同的位置L1-T、L1-U、L1-V和L1-Y(从R₃基团)与E3LB残基共价连接:

[0570]



[0571] R_3 选自自由氰基、



组成的组,其中,

----是单个或双键;

[0572] Ab为与至少一个L1共价结合的抗体,L1为接头;

[0573] L1-T、L1-U和L1-V各自独立地为氢或与Ab和D共价结合的L1接头;

[0574] L1-Y为氢或与Ab和D共价结合的L1接头;并且

[0575] q 为1或0。

[0576] 接头L1可以连接至抗体的任何位置,只要接头L1与抗体之间的共价键为二硫键即可。

[0577] 在实施例中,抗体Ab各自经由接头L1与一至八个化学降解诱导剂(CIDE)D缀合。

[0578] $Ab-(L1-D)_p$,其中 p 为1至8

[0579] D包含通过接头L2与靶蛋白质结合(PB)配体连接的E3连接酶结合(E3LB)配体,如下所示:

[0580] $E3LB-L2-PB$

[0581] 在实施例中,L1与抗体的改造的Cys残基的硫形成二硫键以将CIDE连接至Ab。

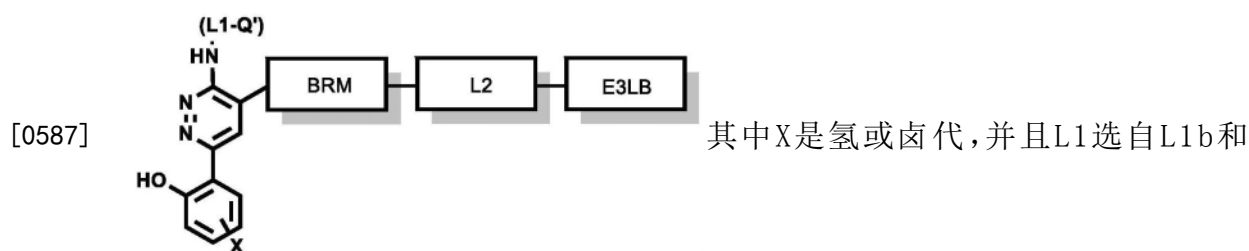
[0582] 在实施例中,抗体通过L1连接至CIDE的E3LB配体。

[0583] 在实施例中,L1连接至CIDE的E3LB配体的E3LB配体残基。

[0584] 例如,在实施例中,L1在连接点(L1-Q)处与BRM的一部分共价结合,如下所示:

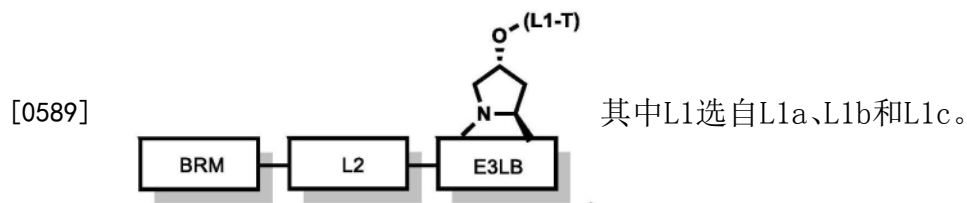


[0586] 在实施例中,L1在连接点(L1-Q')处与BRM的一部分共价结合,如下所示:



L1c。

[0588] 在实施例中,L1在连接点(L1-Q')处与E3LB的一部分共价结合,如下所示:



[0590] 现在参考本文所述的Ab-CIDE和L1-CIDE化合物,它们可以固体或液体形式存在。在固态下,它可以以结晶或非结晶形式或其混合物形式存在。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,在结晶过程中将溶剂分子掺入到晶格中。溶剂化物可以涉及非水溶剂,例如但不限于乙醇、异丙醇、DMSO、乙酸、乙醇胺或乙酸乙酯,或者它们可以涉及水作为掺入到晶格中的溶剂。其中水作为掺入到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这样的溶剂化物。

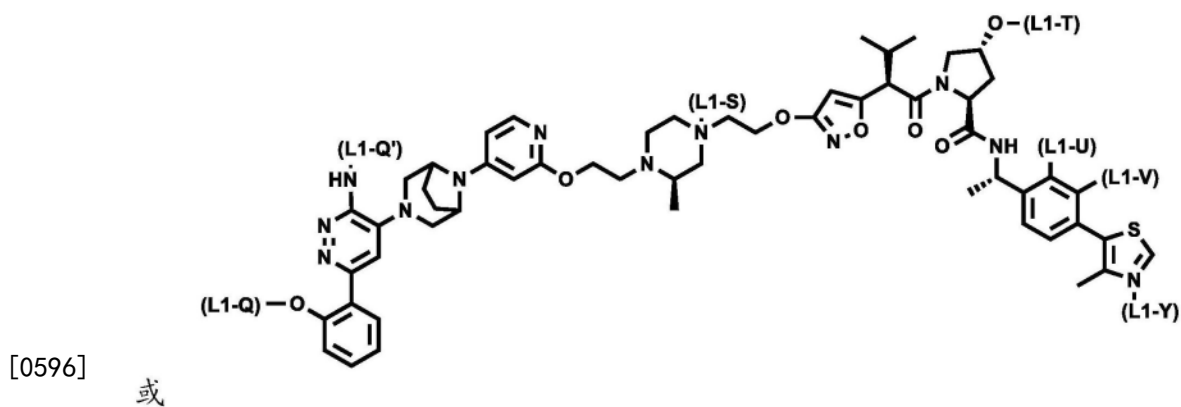
[0591] 本领域技术人员将进一步理解,本文所述的某些以结晶形式存在的化合物和Ab-CIDE,包括其各种溶剂化物,可表现出多态性(即在不同晶体结构中发生的能力)。这些不同的晶体形式通常称为“多晶型物”。本文公开的主题包括所有这样的多晶型物。多晶型物具有相同的化学组成,但在堆积、几何排列和结晶固态的其它描述性性质有所不同。因此,多晶型物可具有不同的物理性质,例如形状、密度、硬度、可变形性、稳定性和溶解性质。多晶型物通常表现出不同的熔点,IR光谱和X射线粉末衍射图,可用于鉴定。本领域技术人员将理解,例如可以通过改变或调节用于制备化合物的反应条件或试剂来产生不同的多晶型物。例如,温度、压力或溶剂的变化可以导致多晶型物。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。

[0592] 本文所述的化合物和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(对映异构体和非对映异构体)及其混合物包括在本文所公开的主题范围内。同样,应当理解,式(I)化合物或盐可以除式中所示的结构以外的互变异构形式存在,并且也包括在本文所公开的主题范围内。应当理解,本文所公开的主题包括本文所述的特定组的所有组合和子集。本文所公开的主题范围包括立体异构体的混合物以及纯化的对映异构体或对映体/非对映体富集的混合物。应当理解,本文所公开的主题包括本文上述定义的特定组的所有组合和子集。

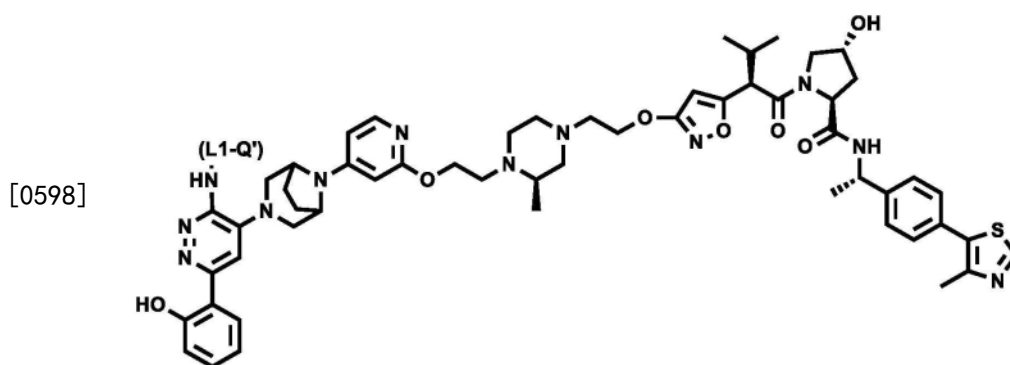
[0593] 本文所公开的主题还包括本文所述的化合物的同位素标记的形式,但事实上,一个或多个原子被原子质量或质量数不同于自然界中通常发现的原子质量或质量数的原子所取代。可掺入本文所述的化合物及其药用盐的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟、碘和氯的同位素,诸如 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 、 ^{123}I 和 ^{125}I 。

[0594] 包含前述同位素和/或其他原子的其他同位素的本文公开的化合物和Ab-CIDE及其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(例如 ^3H 、 ^{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(即 ^3H)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。进一步地,用较重的同位素诸如氙(即, ^2H)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,因此在某些情况下是优选的。同位素标记的化合物通常可以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替换为容易获得的同位素标记的试剂)来制备。

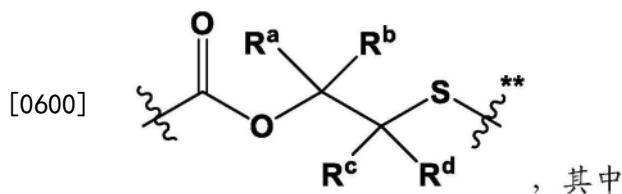
[0595] 在一些实施例中,D为



[0597] 其中L1在选自由以下项组成的组的一个连接点处与D共价连接:L1-Q、L1-Q'、L1-S、L1-T、L1-U、L1-V和L1-Y。应当理解,L1-Q、L1-Q'、L1-S、L1-T、L1-U、L1-V和L1-Y中不是L1的连接点的每一个都保留其原始价态。例如,如果L1连接在L1-Q'处,则其不连接在L1-Q、L1-S、L1-T、L1-U、L1-V或L1-Y,并且D具有以下结构:



[0599] 在某些实施例中,L1为L1a,其具有以下结构:



[0601] R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 各自独立地选自由H、任选地取代的支链或直链 C_1 - C_5 烷基和任选地取代的 C_3 - C_6 环烷基组成的组,或者 R^a 和 R^b 或 R^c 和 R^d 与它们所结合的碳原子一起形成任选地取代的 C_3 - C_6 环烷基环或3元至6元杂环烷基环,并且其中 为与Ab的连接点。

[0602] 在实施例中,L1a连接在L1-T处,并且 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 中的至少一者为甲基。

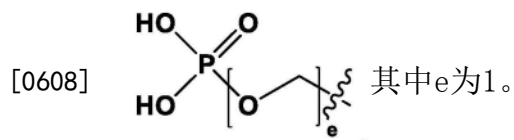
[0603] 在实施例中,L1a连接在L1-T处,并且 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 中的至少两者为甲基。

[0604] 在实施例中, L1a连接在L1-T处, 并且 R^a 和 R^c 各自为甲基, 并且 R^b 和 R^d 各自为氢。

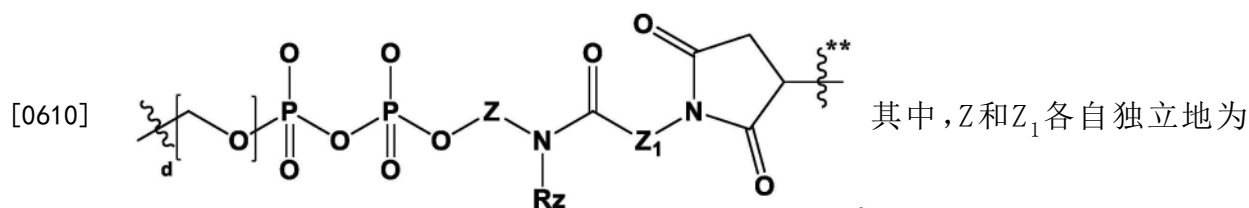
[0605] 在实施例中, L1a连接在L1-T处, 并且 R^a 、 R^c 和 R^d 各自为甲基, 并且 R^b 为氢。

[0606] 在实施例中, L1a连接在L1-T处, 并且 R^a 和 R^b 各自为氢, 并且 R^c 和 R^d 与它们结合的碳原子结合形成任选地取代的3元至6元杂环烷基环。在实施例中, 3元至6元杂环烷基环为任选地取代的哌啶环。在实施例中, 哌啶环被甲基取代。

[0607] 在实施例中, L1a连接在L1-T处, 其中 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 中的至少两者为甲基; 并且磷酸酯部分连接在L1-Q处, 其中磷酸酯部分具有以下结构:



[0609] 在某些实施例中, L1为L1b, 其具有以下结构:



C_{1-12} 亚烷基或 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$, 其中g为0、1或2, 并且h为1至5; R_z 为H或 C_{1-3} 烷基; d为0、1

或2; 并且其中 为与Ab的连接点。

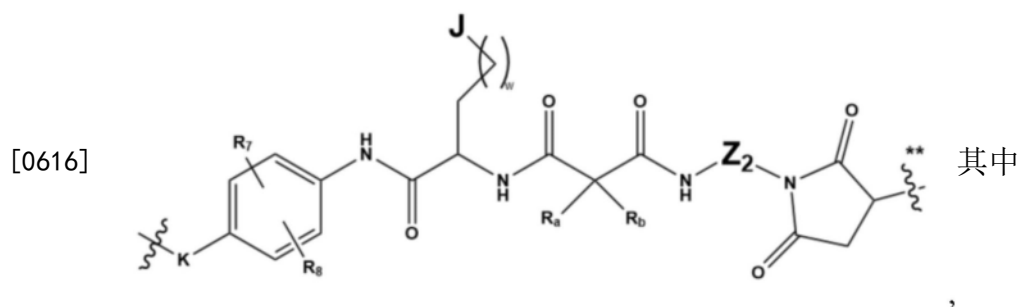
[0611] 在实施例中, Z和 Z_1 各自独立地为 C_{1-12} 亚烷基, R_z 为氢, 并且d为0或1。

[0612] 在实施例中, Z为 C_2 亚烷基, 并且 Z_1 为 C_5 亚烷基, R_z 为氢, 并且d为0或1。

[0613] 在实施例中, L1b连接在L1-Q处, 并且d为1。

[0614] 在实施例中, L1b连接在L1-T处, 并且d为0。

[0615] 在某些实施例中, L1为L1c, 其具有以下结构:



[0617] Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基或 $-[CH_2]_g-[-O-CH_2]_h-$, 其中g为0、1或2, 并且h为1至5;

[0618] w为0、1、2、3、4或5, 并且其中 为与Ab的连接点;

[0619] J为氢、 $-N(R_x)(R_y)$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-NH-C(O)-NH_2$ 、 $-NH-C(=NH)-NH_2$, 其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基, 其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基;

[0620] K选自 $-CH_2-$ 、 $-CH(R)-$ 、 $-CH(R)-O-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-O-CH(R)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-$ 、 $-O-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$ 、 $-C(L1c)-C(O)-NR_xR_y-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-O-$ 、 $-CH_2-O-C(O)-R-[CH_2]_q-$, 其中 $\wedge$ 表示与CIDE的连接, 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 R_x 和 R_y 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基,或 R_x 和 R_y 与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;

[0621] R_a 和 R_b 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基,或者 R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成任选地取代的 C_{3-6} 环烷基;和

[0622] 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。

[0623] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为2,J为 $-NH-C(O)-NH_2$, R_a 和 R_b 与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。

[0624] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基,w为2,J为 $-NH-C(O)-NH_2$, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成任选地取代的 C_4 环烷基,并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0625] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为2,J为 $-NH-C(O)-NH_2$,K为 $-CH_2-O-C(O)-$, R_a 和 R_b 与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。

[0626] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基,w为2,J为 $-NH-C(O)-NH_2$,K为 $-CH_2-O-C(O)-$, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成任选地取代的 C_4 环烷基,并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0627] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为3,J为 $-N(R_x)(R_y)$,其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基、 R_a 和 R_b 与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。

[0628] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基,w为3,J为 $-N(R_x)(R_y)$,其中 R_x 和 R_y 各自为甲基, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成 C_4 环烷基,并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0629] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为3,J为 $-N(R_x)(R_y)$,其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基、K为 $-CH_2-$, R_a 和 R_b 与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。

[0630] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基,w为3,J为 $-N(R_x)(R_y)$,其中 R_x 和 R_y 各自为甲基,K为 $-CH_2-$, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成 C_4 环烷基,并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0631] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为0,J为氢, R_a 和 R_b 与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。

[0632] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基,w为0,J为氢, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成 C_4 环烷基,并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0633] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为0,J为氢,K为 $-CH_2-$, R_a 和 R_b 与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。

[0634] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基,w为0,J为氢,K为 $-CH_2-$, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成 C_4 环烷基,并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0635] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为2,J为 $-NH-C(O)-NH_2$, R_a 和 R_b 与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。

[0636] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基,w为2,J为 $-NH-C(O)-NH_2$, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成任选地取代的 C_4 环烷基,并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0637] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基,w为2,J为 $-NH-C(O)-NH_2$,K为 $-CH(R)-O-C(O)-$,其中R为 $C(O)-N(R_x)(R_y)$,其中 R_x 和 R_y 与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 和 R_b 与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。

[0638] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基, w 为 2, J 为 $-NH-C(O)-NH_2$, K 为 $-CH(R)-O-C(O)-$, 其中 R 为 $C(O)-N(R_x)(R_y)$, 其中 R_x 和 R_y 与各自所连接的氮一起形成任选地取代的哌嗪, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成任选地取代的 C_4 环烷基, 并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0639] 在实施例中, Z_2 为 C_{1-12} 亚烷基, w 为 3, J 为 $-N(R_x)(R_y)$, 其中 R_x 和 R_y 各自独立地选自氢和 C_{1-3} 烷基, K 为 $-CH_2-O-C(O)-$, R_a 和 R_b 与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。

[0640] 在实施例中, Z_2 为 C_5 亚烷基, w 为 3, J 为 $-N(R_x)(R_y)$, 其中 R_x 和 R_y 各自为甲基, K 为 $-CH_2-O-C(O)-$, R_a 和 R_b 与各自所连接的碳一起形成 C_4 环烷基, 并且 R_7 和 R_8 各自独立地为氢。

[0641] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-Q$ 处, 并且 K 为 $-CH_2-$ 。

[0642] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-Q'$ 处, 并且 K 为 $-CH_2-O-C(O)-$ 。

[0643] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-S$ 处, 并且 K 为 $-CH_2-$ 。

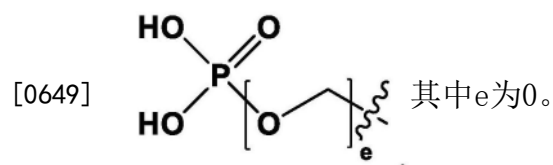
[0644] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-T$ 处, 并且 K 为 $-CH(R)-O-C(O)-$, 其中 R 为 $C(O)-N(R_x)(R_y)$, 其中 R_x 和 R_y 与各自所连接的氮一起形成任选地取代的 5 元至 7 元杂环基。

[0645] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-U$ 处。

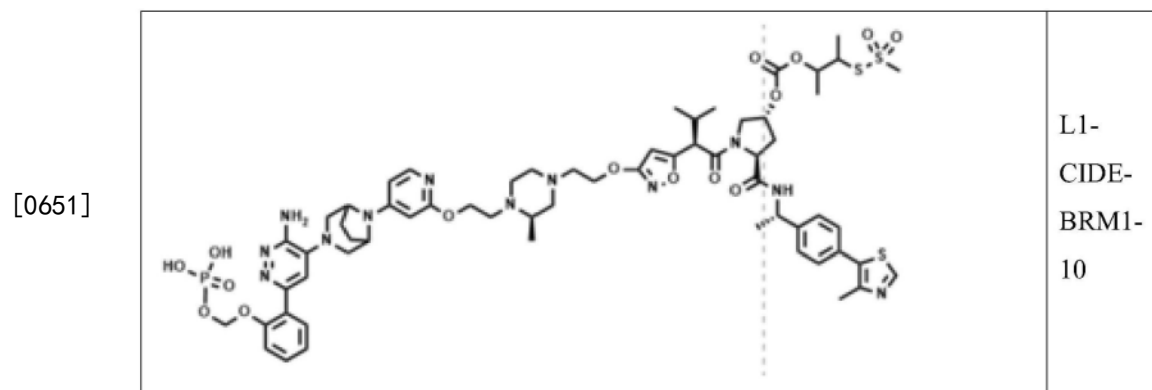
[0646] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-V$ 处。

[0647] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-Y$ 处, 并且 K 为 $-CH_2-$ 。

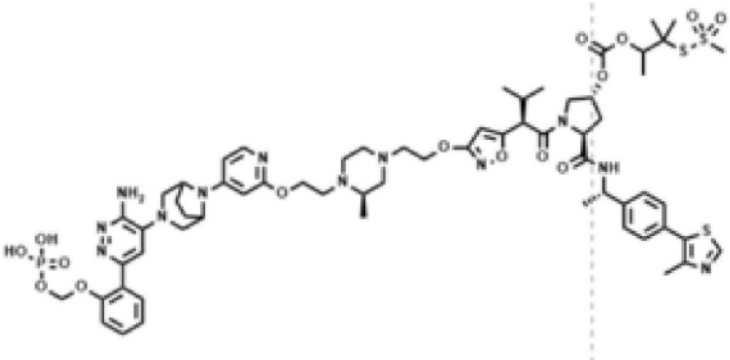
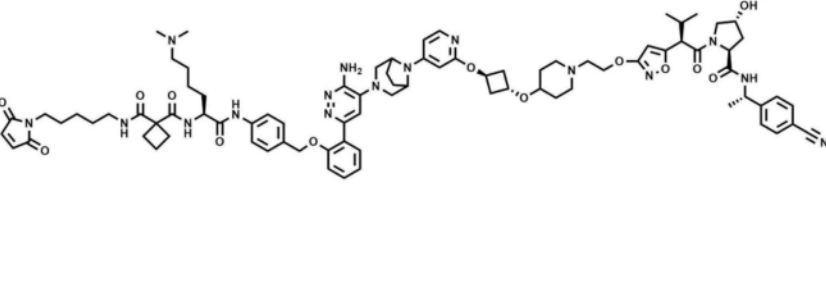
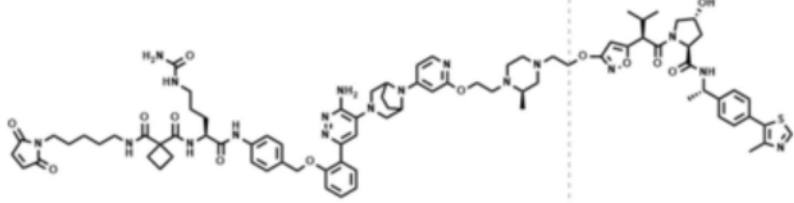
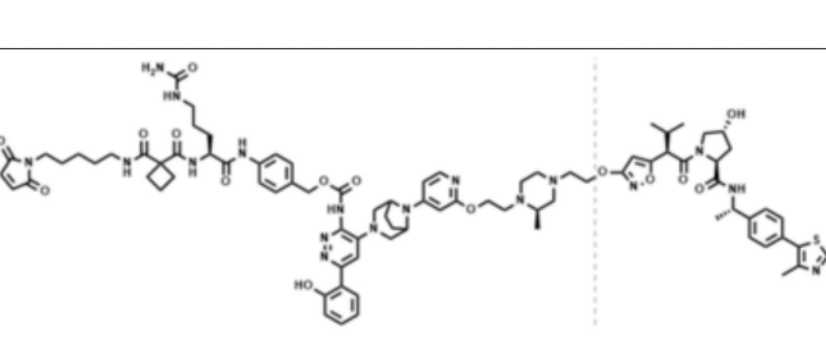
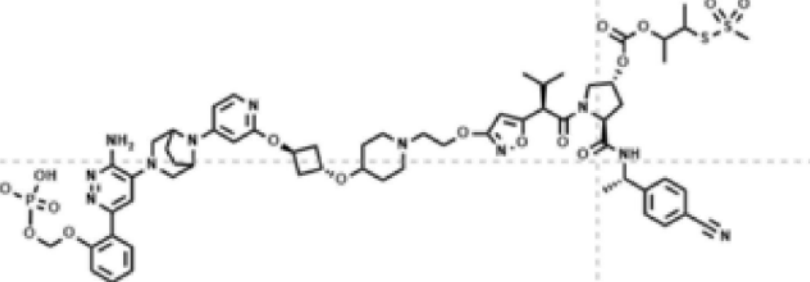
[0648] 在实施例中, $L1c$ 连接在 $L1-Q$ 处, 其中 K 为 $-CH_2-$; 并且磷酸酯部分连接在 $L1-T$ 处, 其中磷酸酯部分具有以下结构



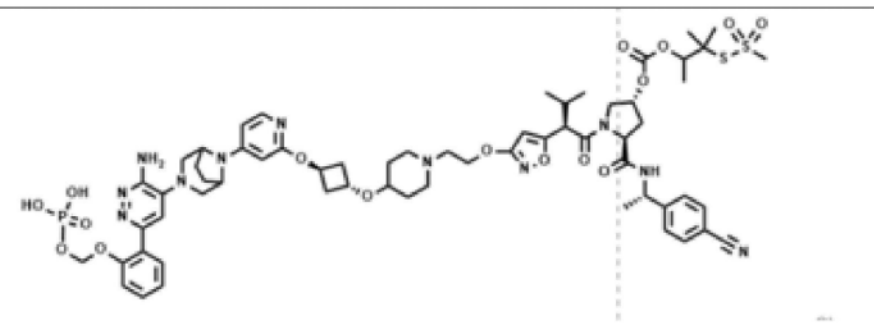
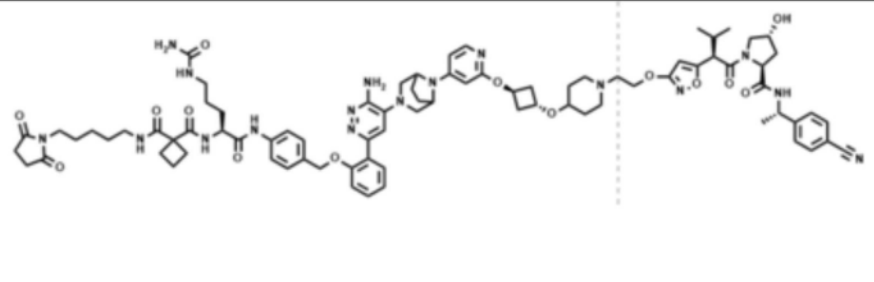
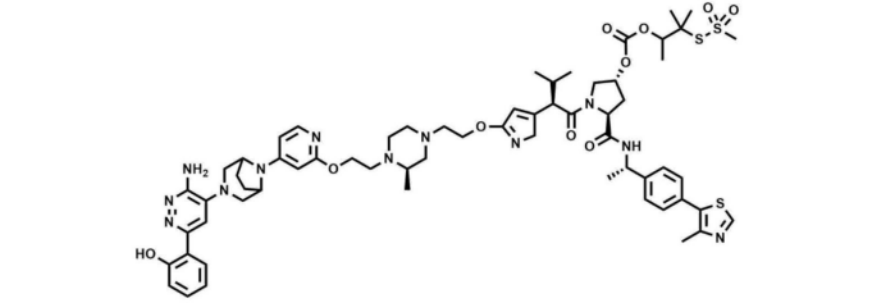
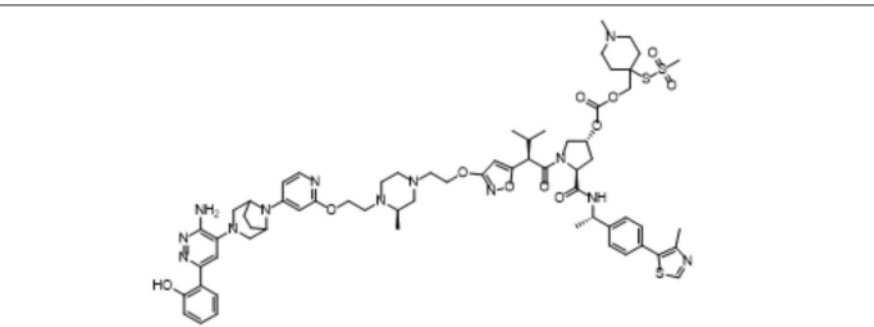
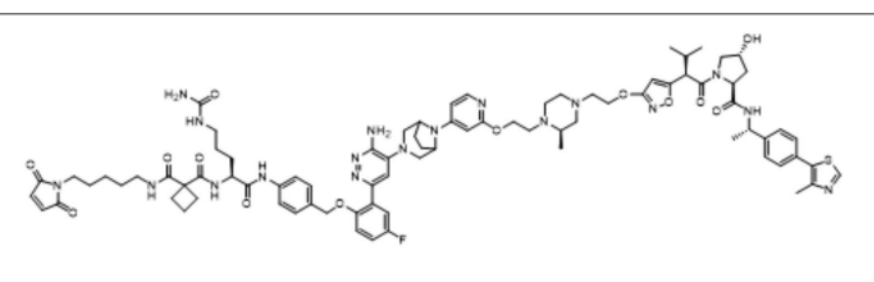
[0650] 在某些实施例中, 本文描述的主题包括以下 $L1-CIDE$ 。



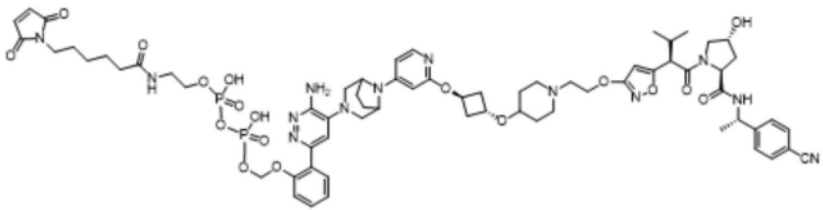
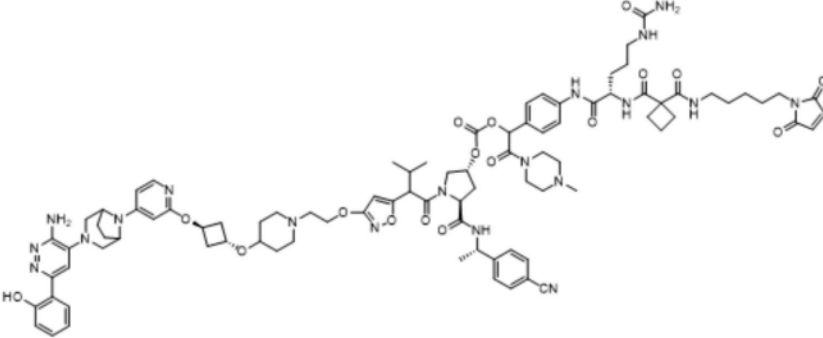
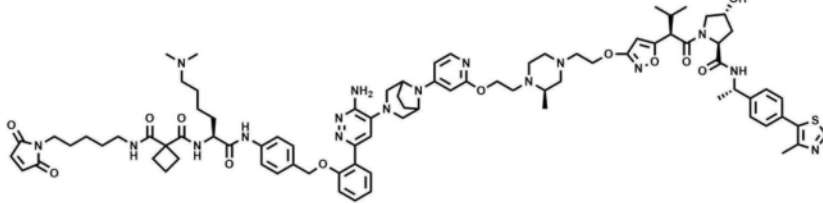
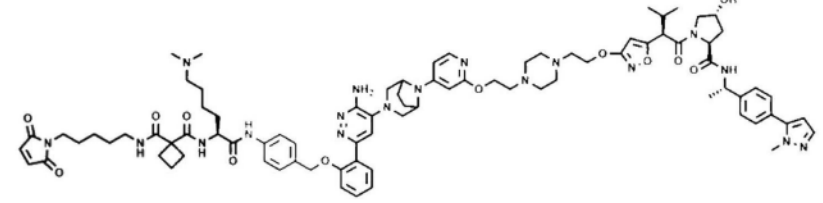
[0652]

	L1- CIDE- BRM1- 9
	L1- CIDE- BRM1- 19
	L1- CIDE- BRM1- 13
	L1- CIDE- BRM1- 20
	L1- CIDE- BRM1- 11

[0653]

 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-12, featuring a complex molecule with a pyridine ring, a sulfonamide group, and a nitrile group.	L1-CIDE-BRM1-12
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-14, featuring a complex molecule with a pyridine ring, a sulfonamide group, and a nitrile group.	L1-CIDE-BRM1-14
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-7, featuring a complex molecule with a pyridine ring, a sulfonamide group, and a nitrile group.	L1-CIDE-BRM1-7
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-8, featuring a complex molecule with a pyridine ring, a sulfonamide group, and a nitrile group.	L1-CIDE-BRM1-8
 Chemical structure of L1-CIDE-BRM1-16, featuring a complex molecule with a pyridine ring, a sulfonamide group, and a nitrile group.	L1-CIDE-BRM1-16

[0654]

	L1- CIDE- BRM1- 17
	L1- CIDE- BRM1- 18
	L1- CIDE- BRM1- 21
	L1- CIDE- BRM1- 22

[0655] 本文公开的主题包括以下非限制性实施例：

[0656] 1. 一种具有如下化学结构的缀合物

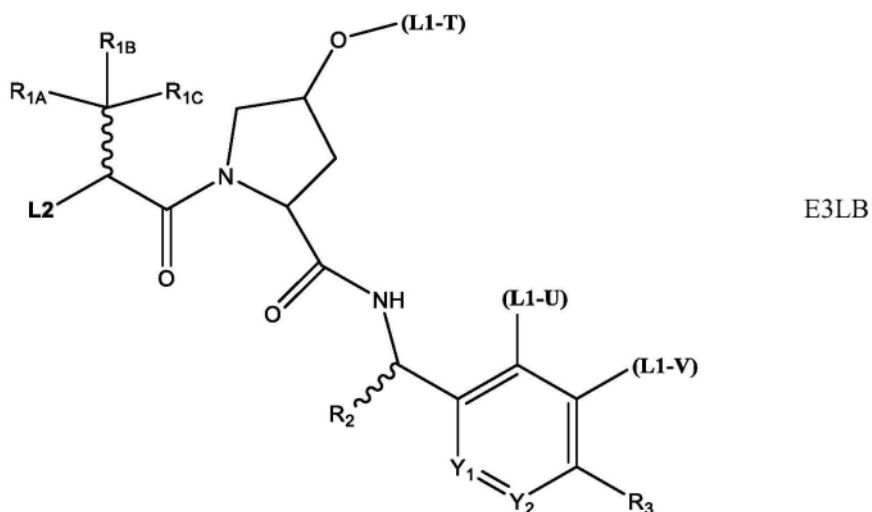
[0657] $\text{Ab}-(\text{L1-D})_p$ ，

[0658] 其中，

[0659] D为具有E3LB-L2-PB结构的CIDE；

[0660] E3LB与L2共价结合，所述E3LB具有下式：

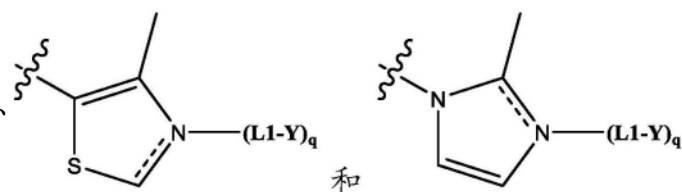
[0661]



[0662] 其中,

[0663] R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地为氢或 C_{1-5} 烷基;或者 R_{1A} 、 R_{1B} 和[0664] R_{1C} 中的两者与各自所连接的碳一起形成 C_{1-5} 环烷基;[0665] R_2 为 C_{1-5} 烷基;

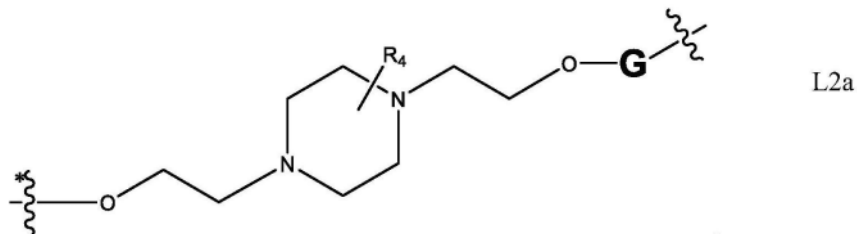
[0666]

 R_3 选自由氰基、

[0667] 组成的组,其中,----为单键或双键;

[0668] Y_1 和 Y_2 中的一者为-CH, Y_1 和 Y_2 中的另一者为-CH或N;[0669] L_2 为与E3LB和PB共价结合的接头,所述 L_2 具有下式:

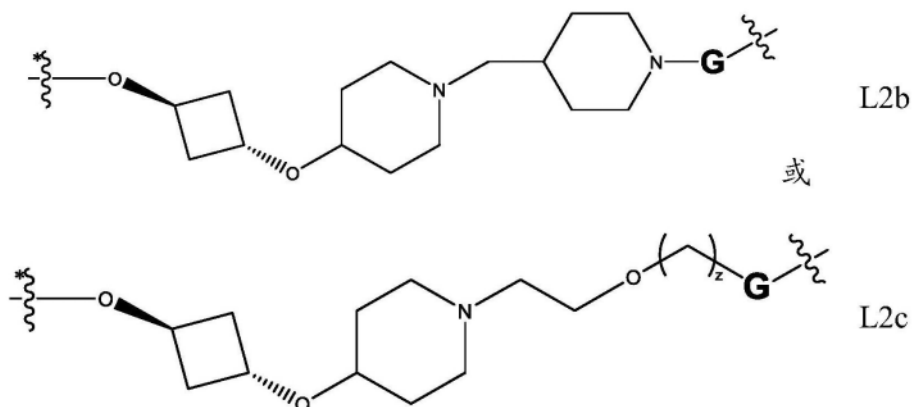
[0670]



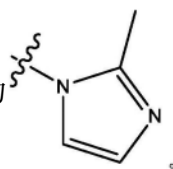
[0671] 其中,

[0672] R_4 为氢或甲基,

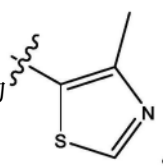
[0673]



[0688] 3. 根据实施例1所述的缀合物, 其中 R_3 为



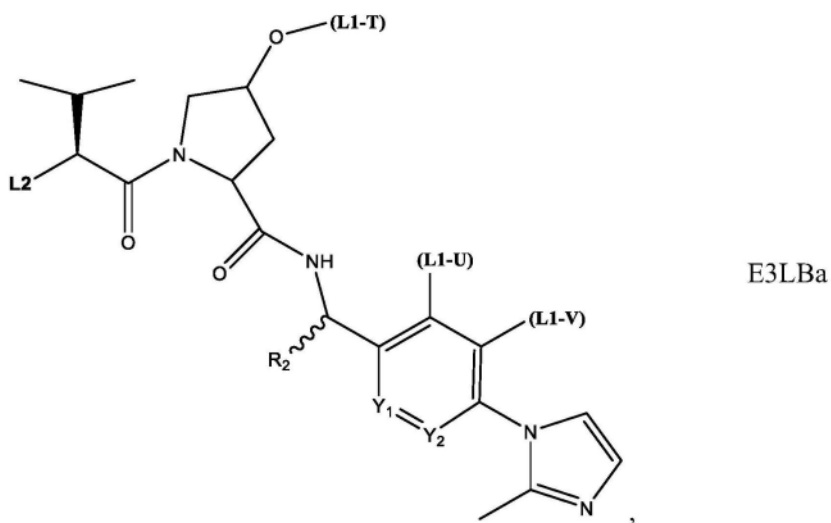
[0689] 4. 根据实施例1所述的缀合物, 其中 R_3 为



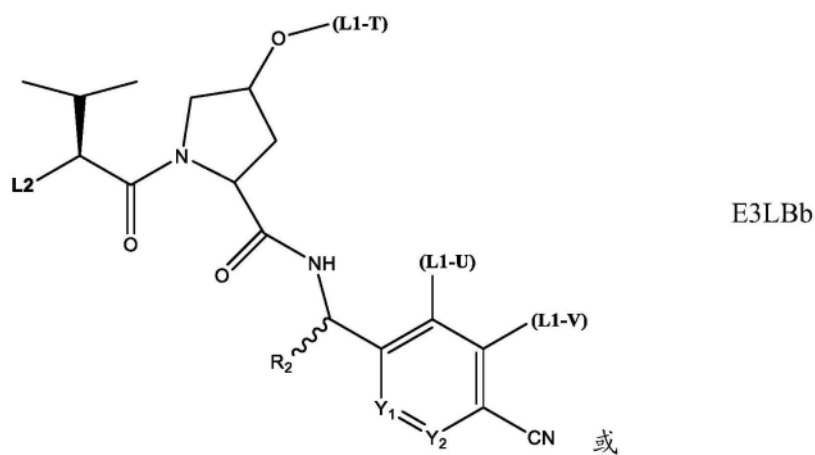
[0690] 5. 根据实施例1所述的缀合物, 其中 R_{1A} 、 R_{1B} 和 R_{1C} 各自独立地为氢或甲基。

[0691] 6. 根据实施例5所述的缀合物, 其中 R_{1A} 和 R_{1B} 各自为甲基。

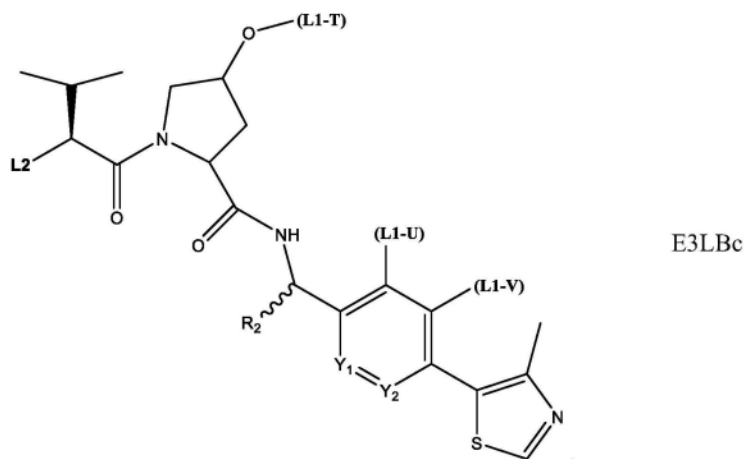
[0692] 7. 根据实施例6所述的缀合物, 其中E3LB具有下式:



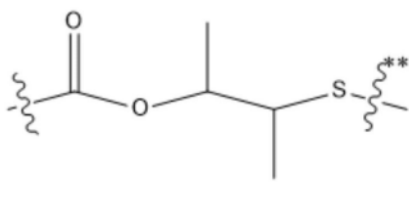
[0693]



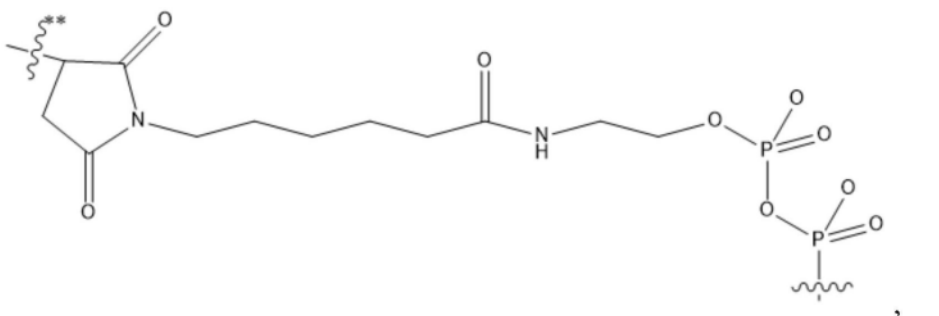
[0694]



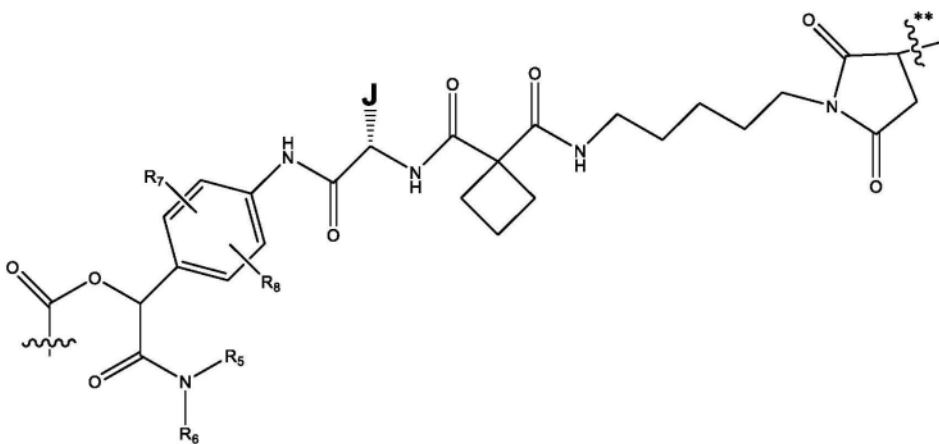
[0695] 8. 根据实施例1所述的缀合物, 其中在各个实例中, L1独立地为选自由以下项组成的组的接头:



[0696]



[0697]

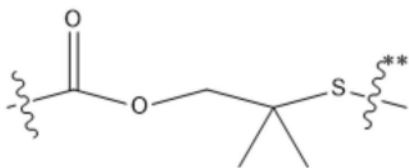


[0698] 其中,

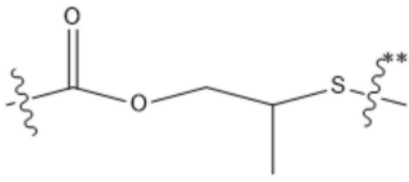
[0699] J为 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$; 或 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

[0700] R_5 和 R_6 独立地为氢或 C_{1-5} 烷基; 或者 R_5 和 R_6 与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;

[0701] 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；



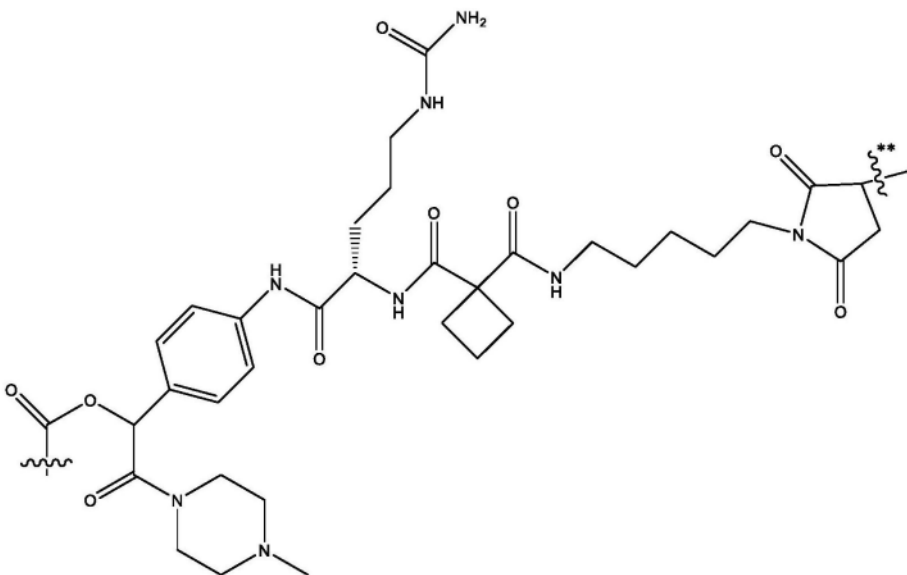
[0702]



[0703] 并且其中  为与Ab的连接点。

[0704] 9. 根据实施例8所述的缀合物,其具有以下结构:

[0705]

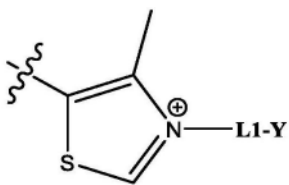


[0706] 10. 根据实施例1所述的缀合物,其中L1-T为接头。

[0707] 11. 根据实施例1所述的缀合物,其中L1-U或L1-V为接头。

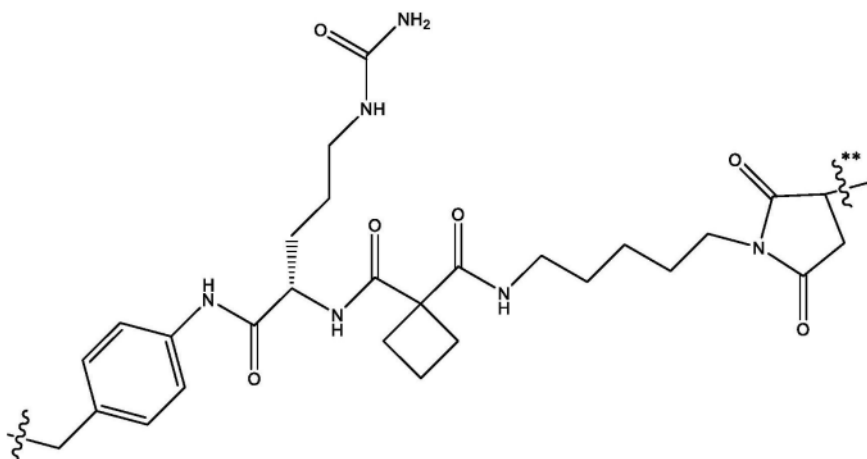
[0708] 12. 根据实施例1所述的缀合物,其中L1-Y为接头,并且q为1。

[0709]



[0710] 13. 根据实施例12所述的缀合物,其中L1-Y具有以下结构,

[0711]



[0712] 14. 根据实施例1所述的缀合物, 其中

[0713] L1-T为接头;

[0714] L1-U和L1-T各自为氢; 并且

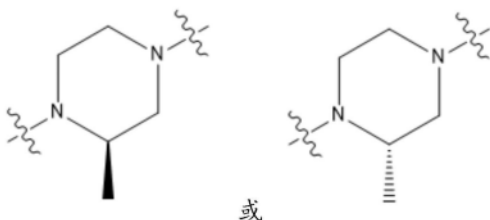
[0715] q为零。

[0716] 15. 根据实施例1所述的缀合物, 其中z为零。

[0717] 16. 根据实施例1所述的缀合物, 其中z为一。

[0718] 17. 根据实施例1所述的缀合物, 其中R₂为氢、甲基、乙基或丙基。[0719] 18. 根据实施例17所述的缀合物, 其中R₂为甲基。[0720] 19. 根据实施例18所述的缀合物, 其中R₂与E3LB结合作为[0721] 20. 根据实施例1所述的缀合物, 其中Y₁和Y₂各自为-CH。[0722] 21. 根据实施例1所述的缀合物, 其中Y₁为N并且Y₂为-CH。[0723] 22. 根据实施例1所述的缀合物, 其中Y₁为-CH并且Y₂为N。[0724] 23. 根据实施例1所述的缀合物, 其中R₄为氢。[0725] 24. 根据实施例1所述的缀合物, 其中R₄为甲基。[0726] 25. 根据实施例24所述的缀合物, 其中R₄为甲基, 如下所示:

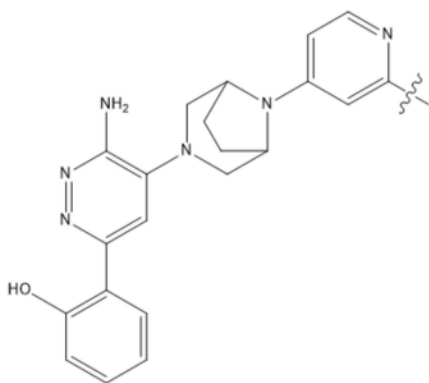
[0727]



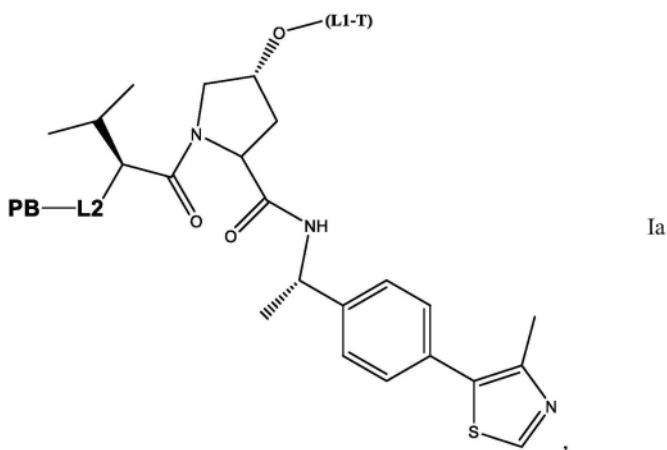
[0728] 26. 根据实施例1所述的缀合物, 其中Ab是与选自由CD71、Trop2、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、MSLN和CD22组成的组的一种或多种多肽结合的抗体。

[0729] 27. 根据实施例26所述的缀合物, 其中Ab是与选自由CD71和Trop2组成的组的一种或多种多肽结合的抗体。

[0730] 28. 根据实施例1所述的缀合物, 其中PB是与L2共价结合的蛋白质结合基团, 具有以下结构:



[0732] 29. 根据实施例1所述的缀合物, 其具有式Ia:

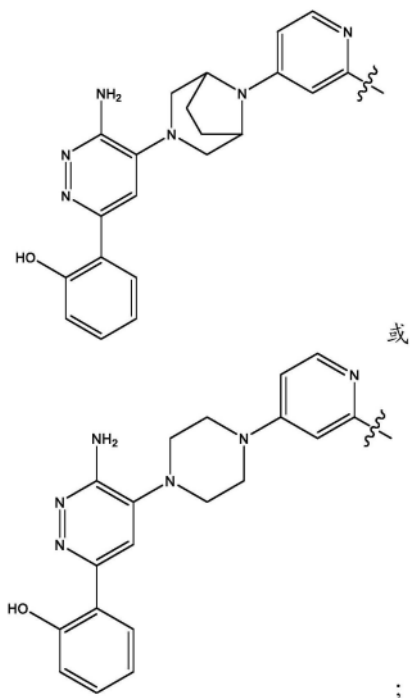


[0734] 其中，

[0735] L1-T为与Ab共价结合的接头;

[0736] Ab是与选自由CD71、Trop2、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、MSLN和CD22组成的组的一种或多种多肽结合的抗体。

[0737] PB为与L2共价结合的蛋白质结合基团,其具有以下结构:

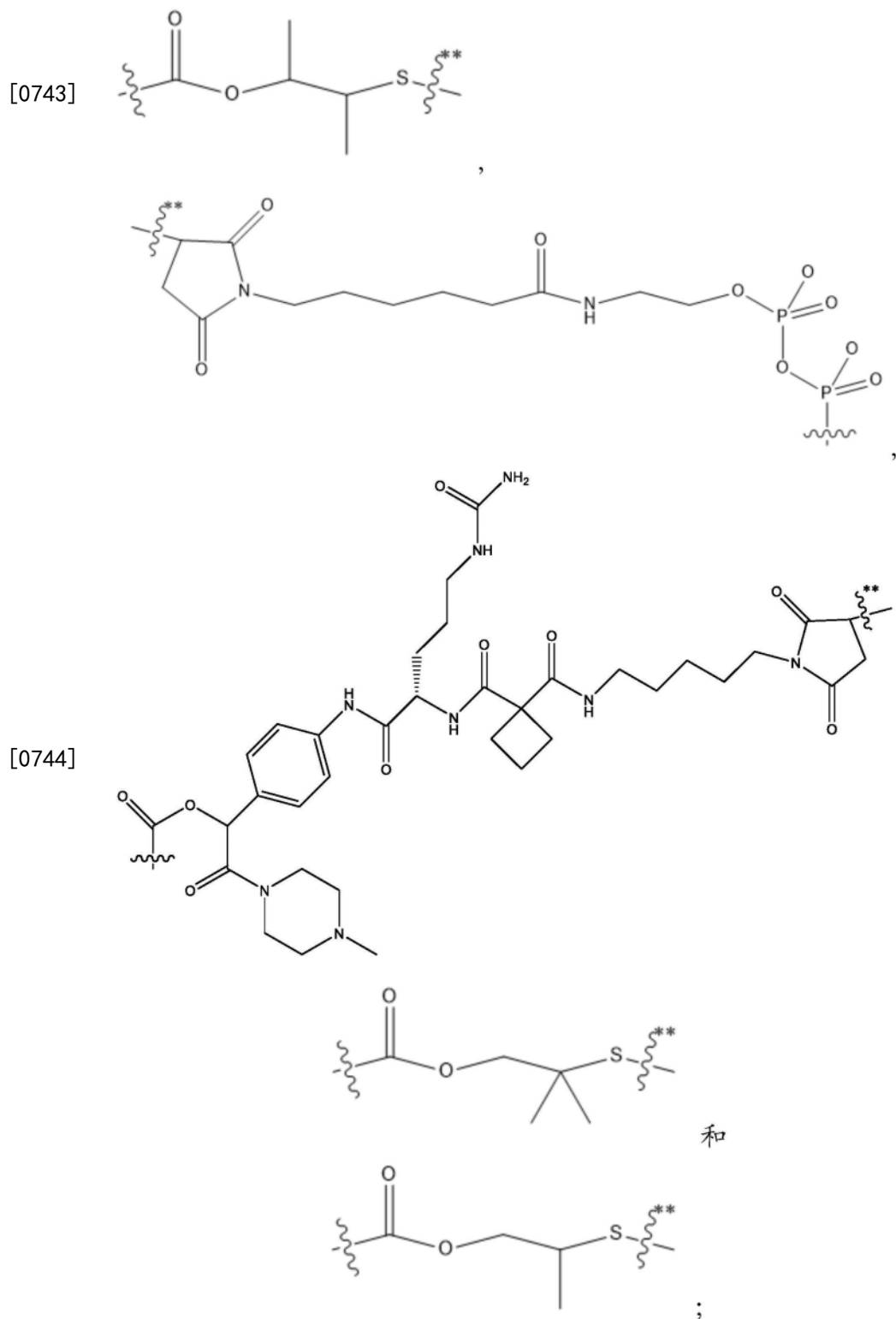


[0739] L2选自自由L2a、L2b和L2c组成的组；

[0740] 并且，

[0741] p的值为约4至约8。

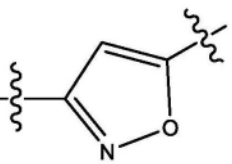
[0742] 30. 根据实施例29所述的缀合物，其中L1-T为接头，其选自自由以下项组成的组：



[0745] 其中， 为与Ab的连接点。

[0746] 31. 根据实施例29所述的缀合物, 其中L2为L2a。

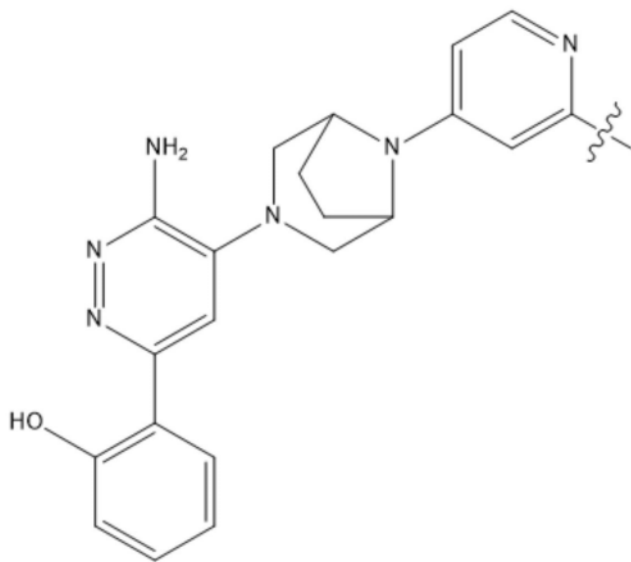
[0747] 32. 根据实施例31所述的缀合物, 其中G为



[0748] 33. 根据实施例31所述的缀合物, 其中R₄为甲基。

[0749] 34. 根据实施例29所述的缀合物, 其中PB为:

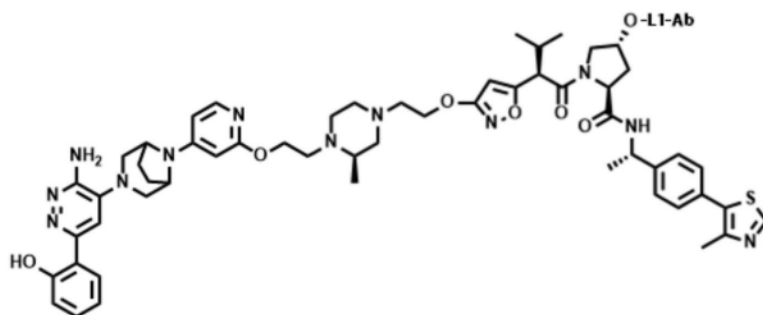
[0750]



[0751] 35. 根据实施例29所述的缀合物, 其中p具有约5至约7的值。

[0752] 36. 根据实施例1所述的缀合物, 其具有以下结构:

[0753]



1-L2a



2



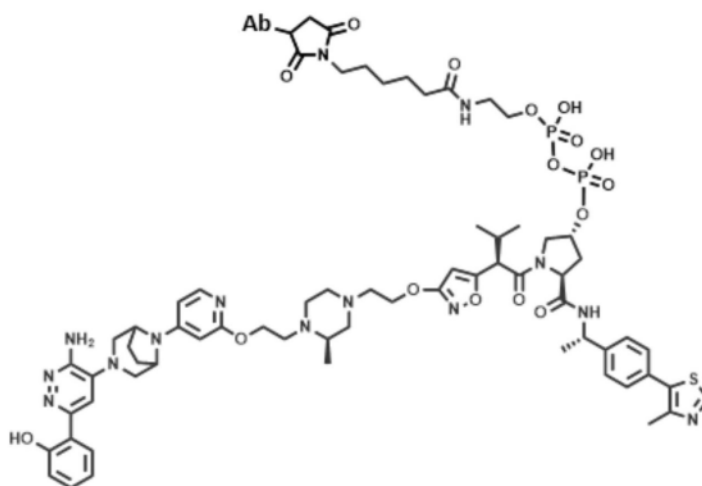
和



6

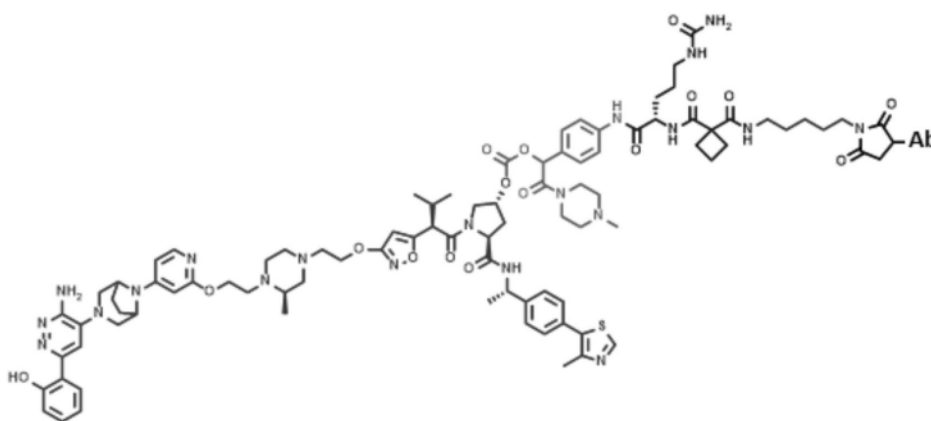
[0755] 37. 根据实施例1所述的缀合物,其具有以下结构:





[0757]

和



[0758] 38. 一种药物组合物,其包含根据实施例1所述的缀合物以及一种或多种药用赋形剂。

[0759] 39. 一种治疗有此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实施例1所述的缀合物或根据实施例38所述的组合物。

[0760] 40. 根据实施例39所述的方法,其中所述疾病为癌症。

[0761] 41. 根据实施例40所述的方法,其中所述癌症是BRM依赖性的。

[0762] 42. 根据实施例40所述的方法,其中所述癌症为非小细胞肺癌。

[0763] 43. 一种降低受试者的靶BRM蛋白质水平的方法,其包括:

[0764] 向所述受试者施用根据实施例1所述的缀合物或根据实施例38所述的组合物,其中所述PB部分结合所述靶BRM蛋白质,其中泛素连接酶影响所述结合的靶BRM蛋白质的降解,其中所述BRM靶蛋白质的水平降低。

[0765] IV. 制剂

[0766] 可以制备如本文所述的治疗性Ab-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. 主编),以用于复溶的冻干制剂形式或水溶液的形式混合。

[0767] Ab-CIDE可以根据标准药学实践配制为药物组合物。根据该方面,提供了一种药物组合物,其包含与一种或多种药用赋形剂结合的Ab-CIDE。

[0768] 通过将Ab-CIDE与赋形剂(诸如载体和/或稀释剂)混合来制备典型的制剂。合适的载体、稀释剂和其它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。所使用的特定载体、稀释剂或其他赋形剂将取决于Ab-CIDE被施用的方式和目的。通常基于本领域技术人员公认对哺乳动物施用安全的溶剂(GRAS)来选择溶剂。

[0769] 通常,安全溶剂是无毒的水性溶剂,例如水和其他可溶于水或与水混溶的无毒溶剂。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)等及其混合物。可接受的稀释剂、载体、赋形剂和稳定剂在使用的剂量和浓度下对受体无毒,包括缓冲液,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;间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白质、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,锌蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0770] 制剂还可包含一种或多种缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、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-CIDE展示或有助于药物产品的制备。可使用常规的溶解和混合程序来制备制剂。

[0771] 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,但是可在约3至约8的范围内。在pH 5的乙酸盐缓冲液中的制剂是合适的实施例。

[0772] Ab-CIDE制剂可以是无菌的。特别地,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。

[0773] Ab-CIDE通常可作为固体组合物、冻干制剂或作为水溶液储存。

[0774] 包含Ab-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。在这种情况下需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。

[0775] Ab-CIDE可配制成药物剂型,以提供易于控制的药物剂量并使患者能够遵循处方。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)。通常,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。合适的容器是本领域技术人员熟知的,并且包括诸如瓶(塑料和玻璃)、小袋、安瓿、塑料袋、金属圆筒等之类的材料。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,容器上设置有描述容器内

容物的标签。标签上还可能包括适当的警告。

[0776] 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。无菌可注射制剂也可以是无菌注射液或悬浮液,其处于非毒性的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂(诸如1,3-丁二醇)中。无菌可注射制剂还可制备为冻干粉末。可采用的可接受的媒介物和溶剂为水、林格溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的固定油传统上可用作溶剂或悬浮介质。对于这一目的,可采用任何温和的固定油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,脂肪酸诸如油酸可同样用于制备可注射物。

[0777] 可与载体物质组合以产生单一剂型的Ab-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1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)。可以制备药物组合物以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3 μ g至500 μ g活性成分,以便可以约30mL/h的速率输注合适的体积。

[0778] 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。

[0779] 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、颗粒和片剂制备。优选的单位剂量制剂是含有如本文上文所述的每日剂量或单位每日亚剂量的,或其适当分数的活性成分的那些。

[0780] 本发明的主题进一步提供了兽用组合物,其包含至少一种如上定义的活性成分以及兽用载体。兽用载体是可用于施用组合物的材料,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肠胃外或通过任何其他预期途径施用。

[0781] V. 适应症和治疗方法

[0782] 预期本文公开的Ab-CIDE可用于治疗与BRM相关的各种疾病或病症。本文还提供了用于治疗或预防本文所公开的疾病和病症的Ab-CIDE或包含Ab-CIDE的组合物。本文还提供了Ab-CIDE或包含Ab-CIDE的组合物在治疗中的用途。在一些实施例中,本文提供了Ab-CIDE用于治疗或预防本文所公开的疾病和病症的用途。本文还提供了Ab-CIDE或包含Ab-CIDE的组合物在制备用于治疗或预防本文所公开的疾病和病症的药物中的用途。

[0783] 通常,待治疗的疾病或病症是BRM依赖性疾病或病症,例如过度增生性疾病(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。

[0784] 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BRM蛋白质的水平的方法,该方法包括:

[0785] 向受试者施用如本文所述的Ab-CIDE或包含如本文所述的Ab-CIDE的组合物,其中PB部分结合靶BRM蛋白质,其中泛素连接酶影响结合的靶BRM蛋白质的降解,其中该BRM靶蛋白的水平降低。

[0786] 在某些实施例中,包含抗NaPi2b抗体的Ab-CIDE(例如上述那些)用于治疗实体瘤(例如卵巢)的方法。在某些实施例中,包含抗CD71、Trop2、NaPi2b、Ly6E、EpCAM、MSLN或CD22抗体的Ab-CIDE用于治疗肿瘤或癌症的方法。

[0787] Ab-CIDE可通过适合于待治疗病症的任何途径施用。Ab-CIDE通常以胃肠外施用,即输注、皮下、肌内、静脉内、皮内、鞘内和硬膜外施用。

[0788] Ab-CIDE可以在治疗中单独使用或与其他药剂组合使用。例如,Ab-CIDE可与至少一种另外的治疗剂共同施用。上述此类联合疗法涵盖联合施用(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-CIDE的施用可以在施用附加治疗剂和/或佐剂之前、同时和/或之后发生。Ab-CIDE也可以与放射疗法结合使用。

[0789] Ab-CIDE(和任何另外的治疗剂)可以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。给药可以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。本文考虑了各种给药时间安排,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。

[0790] 为了预防或治疗疾病,Ab-CIDE的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他药物联合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、Ab-CIDE的类型、疾病的严重程度和病程、施用Ab-CIDE用于预防还是治疗目的、先前的治疗、患者的病史和对Ab-CIDE的应答以及主治医师的酌处权。Ab-CIDE适当地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1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg--10mg/kg)的Ab-CIDE可以是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。取决于上述因素,一种典型的日剂量的范围可以为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。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发生期望的疾病症状抑制。Ab-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(或它们的任何组合)的一种或多种剂量。此类剂量可以间歇施用,例如每周或每三周施用(例如,使得患者接受约两次至约二十次,或例如约六次剂量)。可以施用初始较高的负荷剂量,之后施用一次或多次较低剂量。然而,其他剂量方案可能有用。这种疗法的进展易于通过常规的技术和测定法来监测。

[0791] 本文所述的方法包括降解靶蛋白质的方法。在某些实施例中,所述方法包括向受试者施用Ab-CIDE,其中所述靶蛋白质被降解。蛋白质的降解水平可以是约1%至约5%;或约1%至约10%;或约1%至约15%;或约1%至约20%;或约1%至约30%;或约1%至约40%;或约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%。

[0792] 本文所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,所述方法包括向受试者施用Ab-CIDE,其中肿瘤组织的增殖减少。减少的水平可以是约1%至约5%;或约1%至约10%;或约1%至约15%;或约1%至约20%;或约1%至约30%;或约1%至约40%;或约1%至约50%;或约10%至约20%;或约10%至约30%;或约10%至约

40%；或或约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%。

[0793] VI. 制品

[0794] 在另一方面，本文描述的是一种制品（例如试剂盒），其含有用于治疗上述疾病和病症的材料。该试剂盒包括包含Ab-CIDE的容器。该试剂盒可进一步包含在容器上或与容器相关的标签或包装说明书。术语“包装说明书”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。

[0795] 合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、泡罩包装等。“小瓶”是适合于容纳液体或冻干制剂的容器。在一个实施例中，小瓶是一次性小瓶，例如带塞子的20cc一次性小瓶。容器可以由多种材料形成诸如玻璃或塑料。容器可以容纳对病症治疗有效的Ab-CIDE或其制剂，并且可以具有无菌入口（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）。

[0796] 组合物中的至少一种活性剂是Ab-CIDE。标签或包装说明书表明化合物用于治疗所选择的病症，诸如癌症。另外，标签或包装说明书可以指示要治疗的患者是患有诸如过度增殖性病症、动脉粥样硬化、神经变性、心脏肥大、疼痛、偏头痛或神经外伤性疾病或事件的病症的患者。在一个实施例中，标签或包装说明书指示包含Ab-CIDE的组合物可用于治疗由异常细胞生长引起的病症。标签或包装说明书也可表明该组合物可用于治疗其他病症。可替代地或另外地，制品可进一步包括第二容器，该第二容器盛有药用缓冲液，诸如抑菌性注射用水（BWFI）、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。所述药盒可以还包括从商业和用户的角度所需的其他物质，包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0797] 试剂盒可进一步包含Ab-CIDE和第二药物制剂（如果存在）的施用指导。例如，如果试剂盒包括包含Ab-CIDE的第一组合物和第二药物制剂，则试剂盒可以进一步包含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。

[0798] 在另一实施例中，试剂盒适用于递送固体口服形式的Ab-CIDE，诸如片剂或胶囊剂。此类试剂盒优选地包括许多单位剂量。此类试剂盒可包括具有按照其预期用途的次序定向的剂量的卡。此类试剂盒的实例是泡罩包装。泡罩包装在包装工业中是众所周知的，并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。

[0799] 根据一个实施例，试剂盒可包含(a)其中装有Ab-CIDE的第一容器；以及任选的(b)其中装有第二药物制剂的第二容器，其中所述第二药物制剂包含具有抗过度增殖活性的第二化合物。可替代地或另外地，试剂盒可进一步包括第三容器，该第三容器盛有药用缓冲液，诸如抑菌性注射用水（BWFI）、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。所述药盒可以还包括从商业和用户的角度所需的其他物质，包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0800] 在其中试剂盒包含Ab-CIDE和第二治疗剂的某些其他实施例中，所述试剂盒可以包含用于容纳单独的组合物容器（例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容器中。通常，试剂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,以不同的剂量间隔施用,或者当处方医师希望滴定组合的各种组分时,试剂盒形式是特别有利的。

[0801] VII. 制备缀合物的方法

[0802] 合成路线

[0803] 本文描述的主题还涉及由L1-CIDE制备CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE的方法。一般而言,该方法包括在一定条件下使抗体、或其变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体与L1-CIDE接触,其中抗体与L1-CIDE上任何可用的连接点共价结合,其中制备了Ab-CIDE。本文所述的主题还涉及由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-CIDE的方法,该方法包括在一定条件下使CIDE与Ab-L1接触,其中CIDE与Ab-L1上任何可用的连接点共价结合,其中制备了Ab-CIDE。该方法可以进一步包括Ab-CIDE的常规分离和纯化。

[0804] CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE和本文所述的其它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主编,Elsevier,1997,例如第3卷;Liebig's 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公知的方法制备(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主编), 或Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. 编辑Springer-Verlag, Berlin, 包括增刊(还通过Beilstein在线数据库获得))。

[0805] 可用于合成本文所述的CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE和其它化合物的合成化学转化和保护基方法(保护和脱保护)以及必要的试剂和中间体是本领域已知的,包括例如以下文献中所描述的那些:R. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第3版, John Wiley和Sons (1999); 和L. Paquette编辑, Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, John Wiley和Sons (1995) 及其后续版本。在制备CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE和其它化合物时,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)。对于是否需要这种保护是本领域技术人员容易确定的。有关保护基团及其用途的常规说明,参见T.W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991。

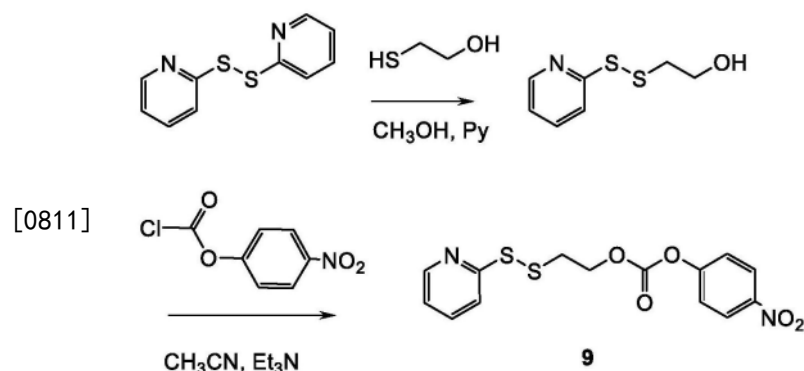
[0806] 一般程序和实例提供了制备本文所述的CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE以及其它化合物的示例性方法。本领域技术人员应当理解,可以使用其他合成路线以合成Ab-CIDE和化合物。尽管在方案、一般程序、实例中描述和讨论了特定的起始材料和试剂,但是可容易替代为其他起始材料和试剂以提供各种衍生物和/或反应条件。此外,根据本公开,可使用本领域的技术人员熟知的常规化学方法进一步修饰通过所述方法制备的许多示例性化合物。

[0807] 通常,可以根据WO 2013/055987、WO 2015/023355、WO 2010/009124、WO 2015/095227的程序,通过将CIDE与L1接头剂连接来制备Ab-CIDE,以制备L1-CIDE,并使L1-CIDE与本文所述的任何抗体或其变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体(包括半胱氨酸改造的抗体)缀合。可替代地,可以通过首先将本文所述的抗体或变体、突变、剪接变体、插入/缺失和融合体(包括半胱氨酸改造的抗体)与L1接头剂连接,并使其与任何CIDE缀合来制备Ab-CIDE。

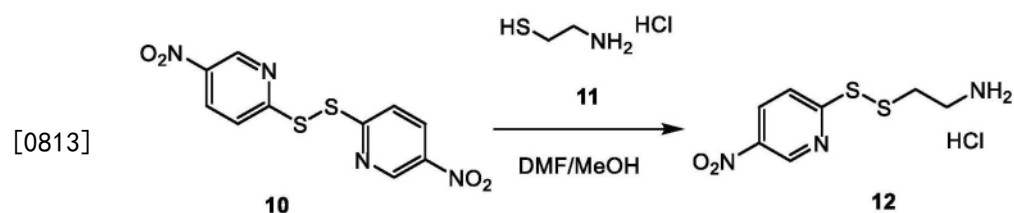
[0808] 以下合成路线描述了制备CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE以及其它化合物和组分的示例性方法。本文其他地方公开了用于制备CIDE、L1-CIDE和Ab-CIDE以及其它化合物和组分的其它合成路线。

[0809] 1. 接头L1

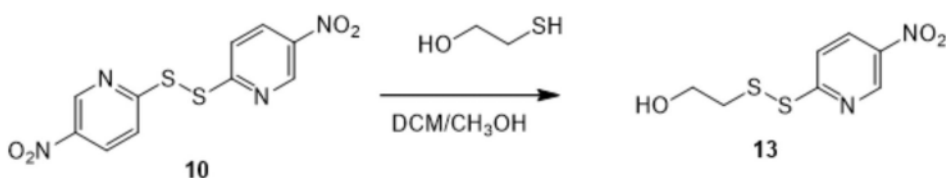
[0810] 关于接头L1,方案1-4描绘了到示例性接头L1经二硫化物连接至抗体Ab的合成路线。Ab通过二硫键连接至L1,而CIDE通过CIDE上任何可用的连接点连接至L1。



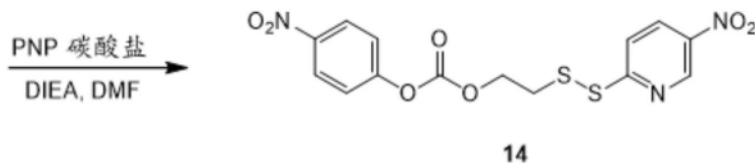
[0812] 参考方案1,在室温使1,2-二(吡啶-2-基)二硫烷和2-巯基乙醇在吡啶和甲醇中反应,得到2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙醇。在三乙胺和乙腈中用氯甲酸4-硝基苯酯酰化,得到4-硝基苯基2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙基碳酸酯9。



[0814] 参考方案2,向含1,2-双(5-硝基吡啶-2-基)二硫烷10(1.0g,3.22mmol)的无水DMF/MeOH(25mL/25mL)的混合物中添加HOAc(0.1mL),然后添加2-氨基乙硫醇盐酸盐11(183mg,1.61mmol)。反应混合物在室温搅拌过夜,真空浓缩以除去溶剂,将残余物用DCM(30mL×4)洗涤,以得到淡黄色固体状2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)乙胺盐酸盐12(300mg,69.6%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ9.28(d,J=2.4Hz,1H),8.56(dd,J=8.8,2.4Hz,1H),8.24(s,4H),8.03(d,J=8.8Hz,1H),3.15-3.13(m,2H),3.08-3.06(m,2H)。



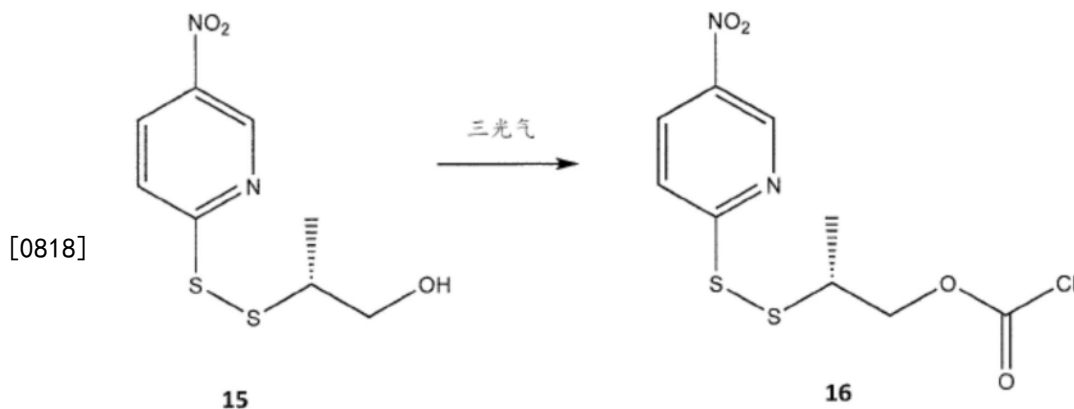
[0815]



方案 3

[0816] 参考方案3,在 N_2 下,将含1,2-双(5-硝基吡啶-2-基)二硫烷10(9.6g,30.97mmol)和2-巯基乙醇(1.21g,15.49mmol)的无水DCM/ CH_3OH (250mL/250mL)溶液在室温下搅拌24小时。在真空下浓缩混合物后,将残余物用DCM(300mL)稀释。添加 MnO_2 (10g),并将混合物在室温再搅拌0.5h。将混合物通过硅胶柱色谱法纯化(DCM/MeOH=100/1至100/1),以得到棕色油状2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)乙醇13(2.2g,61.1%)。 ^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 9.33(d, $J=2.8$ Hz,1H),8.38-8.35(dd, $J=9.2,2.8$ Hz,1H),7.67(d, $J=9.2$ Hz,1H),4.10(t, $J=7.2$ Hz,1H),3.81-3.76(q,2H),3.01(t, $J=5.2$ Hz,2H)。

[0817] 向含13(500mg,2.15mmol)的无水DMF(10mL)的溶液中添加DIEA(834mg,6.45mmol),随后添加PNP碳酸酯(双(4-硝基苯基)碳酸酯,1.31g,4.31mmol)。将反应溶液在室温下搅拌4小时,并将混合物通过制备型HPLC(FA)纯化,以得到浅棕色油状4-硝基苯基2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)乙基碳酸酯14(270mg,33.1%)。 ^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ 9.30(d, $J=2.4$ Hz,1H),8.43-8.40(dd, $J=8.8,2.4$ Hz,1H),8.30-8.28(m,2H),7.87(d, $J=8.8$ Hz,1H),7.39-7.37(m,2H),4.56(t, $J=6.4$ Hz,2H),3.21(t, $J=6.4$ Hz,2H)。



[0818]

方案 4

[0819] 参考方案4,在0℃(冰/丙酮)和氩气气氛下,将硫酰氯(2.35mL,1.0M在DCM中的溶液,2.35mmol)滴加到含5-硝基吡啶-2-硫醇(334mg,2.14mmol)在干燥DCM(7.5mL)中的搅拌悬浮液中。反应混合物从黄色悬浮液变为黄色溶液,使其温热至室温,然后搅拌2小时,然后通过真空蒸发除去溶剂,得到黄色固体。将固体重新溶于DCM(15mL)中,并在0℃在氩气气氛下用含(R)-2-巯基丙-1-醇(213mg,2.31mmol)的干燥DCM(7.5mL)的溶液逐滴处理。使反应混合物温热至室温并搅拌20小时,此时通过LC/MS分析显示在保留时间1.41分钟形成大量

产物(ES⁺)m/z 247 ([M+H]⁺, 约100%相对强度)。过滤除去沉淀物,并将滤液真空蒸发,得到橙色固体,将其用H₂O(20mL)处理,并用氢氧化铵溶液碱化。将混合物用DCM(3×25mL)萃取,并将合并的萃取物用H₂O(20mL)、盐水(20mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤并真空蒸发,得到粗产物。通过快速色谱法(以1%的增量进行梯度洗脱:100% DCM至98:2v/v DCM/MeOH)纯化,得到油状(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)丙-1-醇15为(111mg,产率21%)。

[0820] 在20℃,向三光气溶液,即含Cl₃COCOOCCl₃,Sigma Aldrich,CAS Reg.No.32315-10-9(241mg,0.812mmol)的DCM(10mL)中滴加含(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)丙-1-醇15(500mg,2.03mmol)和吡啶(153mg,1.93mmol)的DCM(10mL)溶液。将反应混合物在20℃搅拌30min后,将其浓缩,无需进一步纯化即可直接使用(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫烷基)丙基氯甲酸酯16通过氯甲酸酯基共价连接至CIDE上任何可用的基团。

[0821] 2. 半胱氨酸改造的抗体

[0822] 对于通过还原和再氧化进行缀合的半胱氨酸改造的抗体,它们通常可以如下制备。轻链氨基酸根据Kabat(Kabat等人,Sequences of proteins of immunological interest,(1991)第5版,US Dept of Health and Human Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)进行编号。重链氨基酸根据EU编号系统进行编号(Edelman等人(1969)Proc.Natl.Acad.of Sci.63(1):78-85),注明为Kabat系统的除外。使用单字母氨基酸缩写。

[0823] 在CHO细胞中表达的全长半胱氨酸改造的单克隆抗体(THIOMABTM抗体)带有半胱氨酸加合物(胱氨酸),或由于细胞培养条件而在经改造半胱氨酸上被谷胱甘肽化。如此,从CHO细胞纯化的THIOMABTM抗体不能与Cys反应性接头L1-CIDE中间体缀合。通过用还原剂诸如DTT(Cleland试剂,二硫苏糖醇)或TCEP(三(2-羧乙基)膦盐酸盐;Getz等人(1999)Anal.Biochem.第273卷:73-80;Soltec Ventures,Beverly,MA),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),可使半胱氨酸工程化改造的抗体与本文所述的L1-CIDE中间体缀合反应。将在CHO细胞中表达的全长半胱氨酸改造的单克隆抗体(THIOMABTM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,这可以除去Cys和谷胱甘肽加合物以及减少抗体的链间二硫键。使用PLRP-S色谱柱通过反相LCMS监测加合物的去除。通过将还原的THIOMABTM抗体添加至至少四体积的10mM琥珀酸钠,pH 5缓冲液进行稀释和酸化。

[0824] 可替代地,通过将抗体添加至至少四体积的10mM琥珀酸盐,pH 5缓冲液,并用10%的乙酸滴定直至pH约为五,来稀释和酸化抗体。随后将pH值降低的并稀释的THIOMABTM抗体加载到HiTrap S阳离子交换柱上,用数倍柱体积的10mM乙酸钠,pH 5洗涤,并用50mM Tris,pH 8.0,150mM氯化钠洗脱。通过进行再氧化,在亲本Mab中存在的半胱氨酸残基之间重新建立了二硫键。将上述洗脱的还原的THIOMABTM抗体在室温下用15X脱氢抗坏血酸(DHAA)处理约3小时,或者可替代地,用200nM至2mM硫酸铜水溶液(CuSO₄)处理过夜。可以使用本领域已知的其它氧化剂(即氧化试剂)和氧化条件。周围空气氧化也可能是有效的。这种温和的部分再氧化步骤可以高保真度有效地形成链内二硫键。使用PLRP-S色谱柱通过反相LCMS监测再氧化。如上所述,将再氧化的THIOMABTM抗体用琥珀酸盐缓冲液稀释至pH约为5,并如上所述在S柱上进行纯化,不同的是进行梯度洗脱:10mM琥珀酸盐,pH 5,300mM氯化钠(缓冲液

B), 10mM琥珀酸盐, pH 5的溶液(缓冲液A)。向洗脱的Thiomab™抗体中, 添加EDTA达到终浓度2mM, 并在必要时进行浓缩, 以使其终浓度超过5mg/mL。将准备缀合的所得THIOMAB™抗体等分保存在-20℃或-80℃。液相色谱/质谱分析是在6200系列TOF或QTOF Agilent LC/MS上进行的。将样品在加热到80℃的PRLP-S®, 1000 Å微孔色谱柱(50mm×2.1mm, Polymer Laboratories, Shropshire, UK)上进行色谱分离。采用线性梯度30-40% B(溶剂A: 含0.05% TFA的水溶液, 溶剂B: 含0.04% TFA的乙腈), 使用电喷雾源直接离子化洗脱液。使用MassHunter软件(Agilent)对数据进行收集和解卷积。在LC/MS分析之前, 将抗体或缀合物(50微克)用PNGase F(2单位/mL; PR0zyme, San Leandro, CA)在37℃下处理2小时, 以除去N-连接的碳水化合物。

[0825] 可替代地, 将抗体或缀合物在37℃用LysC(0.25μg/50μg(微克)抗体或缀合物)部分消化15分钟, 得到Fab和Fc片段, 用于LCMS分析。去卷积的LCMS光谱中的峰被指定并定量。通过计算对应于CIDE-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CIDE与抗体的比率(CAR)。

[0826] 3. 接头L1-CIDE基与抗体的缀合

[0827] 在将接头L1-CIDE化合物与抗体缀合的一种方法中, 经过上述还原和再氧化步骤后, 用1M Tris将含半胱氨酸改造的抗体(THIOMAB™抗体)的10mM琥珀酸盐, pH 5, 150mM NaCl, 2mM EDTA的pH调节至pH7.5-8.5。将过量(约3摩尔至20当量)的具有硫醇反应性基团的接头-CIDE中间体(例如, 马来酰亚胺或4-硝基吡啶二硫化物或甲烷硫代磺酰基(MTS)二硫化物)溶于DMF、DMA或丙二醇中, 并添加到还原的、再氧化的并且pH调节后的抗体中。将反应在室温或37℃温育并监测直至完成(1至约24小时), 如通过对反应混合物的LC-MS分析确定的。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-CIDE中间体和聚集蛋白质(如果存在的水平很高)。例如, 可以用10mM组氨酸乙酸盐(pH 5.5)稀释缀合物, 直到最终pH值约为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阳离子交换色谱法纯化。可替代地, 可以使用连接至Akta纯化系统的S200柱或Zeba离心柱, 通过凝胶过滤色谱法纯化缀合物。可替代地, 可以使用透析。使用凝胶过滤或透析将THIOMAB™抗体CIDE缀合物配制到20mM His/乙酸盐(pH 5), 240mM蔗糖中。通过离心超滤浓缩纯化的缀合物, 并在无菌条件下通过0.2μm过滤器过滤, 然后冷冻保存。通过BCA测定表征Ab-CIDE以确定蛋白质浓度, 分析SEC(尺寸排阻色谱)进行聚集分析, 用赖氨酸C内肽酶(LysC)处理后进行LC-MS以计算CAR。

[0828] 使用Shodex KW802.5色谱柱, 以0.75mL/min流速的具有0.25mM氯化钾和15% IPA的0.2M磷酸钾(pH 6.2)对缀合物进行尺寸排阻色谱分析。通过积分在280nm处洗脱的峰面积吸光度来确定缀合物的聚集状态。

[0829] 可以使用Agilent QTOF 6520ESI仪器对Ab-CIDE进行LC-MS分析。例如, 将CAR用含1:500w/w胞内蛋白酶Lys C(Promega)的Tris(pH 7.5)在37℃处理30min。将所得的裂解片段加载到加热至80℃的1000Å(埃), 8μm(微米)PLRP-S(高度交联聚苯乙烯)色谱柱上, 并在5分钟内用30% B至40% B的梯度洗脱。流动相A为0.05% TFA的H₂O溶液, 并且流动相B为0.04% TFA的乙腈溶液。流速为0.5mL/min。在电喷雾离子化和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。通常可以实现未缀合Fc片段、残留的未缀合Fab和药物化Fab的色谱分辨。使用Mass Hunter™软件(Agilent Technologies)对获得的m/z光谱进行

解卷积,以计算抗体片段的质量。

[0830] 一般合成方法

[0831] 下面描述制备具有化学结构 $\text{Ab}-(\text{L1-D})_p$ 的缀合物的一般方法。

[0832] 1.1将L2与E3LB偶联以制备E3LB-L2中间体的一般合成方法

[0833] 在某些实施例中,首先将L2与第一合适溶剂、第一碱和第一偶联剂接触以制备第一溶液。在某些实施例中,在室温(约25℃),将L2与第一合适溶剂、第一碱和第一偶联剂接触持续约15分钟。然后将E3LB与所述第一溶液接触。

[0834] 在某些实施例中,在室温(约25℃),将E3LB与第一溶液接触持续约一个小时。然后将溶液浓缩并任选地纯化。

[0835] 在某些实施例中,L2与第一碱与第一偶联剂的摩尔比为约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。

[0836] 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。

[0837] 1.2将E3LB-L2中间体与PB偶联以制备CIDE的一般合成方法

[0838] 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,首先将PB与第二合适溶剂、第二碱和第二偶联剂接触。在某些实施例中,所述接触在室温(约25℃)进行约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℃),将第二溶液与E3LB-L2中间体接触持续约1小时。然后将溶液浓缩并任选地纯化以制备CIDE。

[0839] 在某些实施例中,PB与第二碱与第二偶联剂的摩尔比为约1:4:1.2。在某些实施例中,PB与第二碱与第二偶联剂的摩尔比为约1:3:0.75、约1:5:1、约1:3:2或约1:5:3。

[0840] 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。

[0841] 1.3将CIDE与L1偶联以制备L1-CIDE的一般合成方法

[0842] 在某些实施例中,将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,所述接触在约(约25℃)进行约2小时。然后可以任选地将溶液纯化以制备L1-CIDE。

[0843] 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。

[0844] 1.4将L1-CIDE与抗体偶联的一般合成方法

[0845] 在某些实施例中,将L1-CIDE与硫醇和第四合适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,所述

[0846] 在某些实施例中,硫醇是马来酰亚胺或4-硝基吡啶二硫化物。在某些实施例中,合适溶剂选自二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺和丙二醇组成的组。

[0847] 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。

[0848] 在某些实施例中,将包含L1-CIDE、硫醇反应性基团和合适溶剂的溶液与抗体接触持续约1至约24小时。在某些实施例中,在约室温(约25℃)至约37℃,使包含L1-CIDE、硫醇反应性基团和合适溶剂的溶液与抗体接触持续。

[0849] 在上述一般方法的某些实施例中,合适的溶剂是极性非质子溶剂,选自由二甲基甲酰胺、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、二甲基亚砷和碳酸亚丙酯组成的组。

[0850] 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)。

[0851] 在一个优选的实施例中,溶剂是二甲基甲酰胺,碱是N,N-二异丙基乙胺,并且偶联剂是HATU。

[0852] 在上述一般方法的某些实施例中,所述接触持续约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。

[0853] 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℃、70℃、80℃、90℃或100℃进行。

[0854] 以下实例仅以说明而非限制的方式提供。

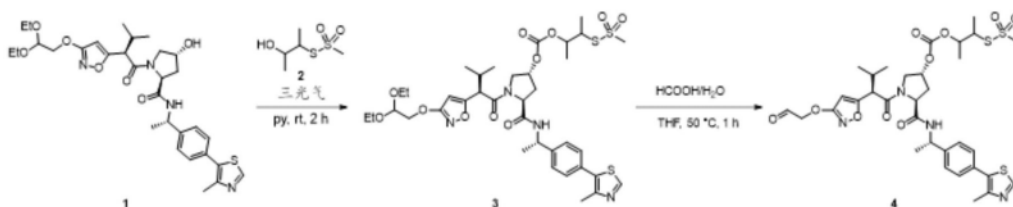
[0855] 实例

[0856] 除非另有说明,否则所有化合物均为烯烃异构体的混合物(约1:1)。括号中列出的¹³C共振代表特定化合物的主要异构体的烯烃异构体和/或N-Me 酰胺键的旋转异构体。

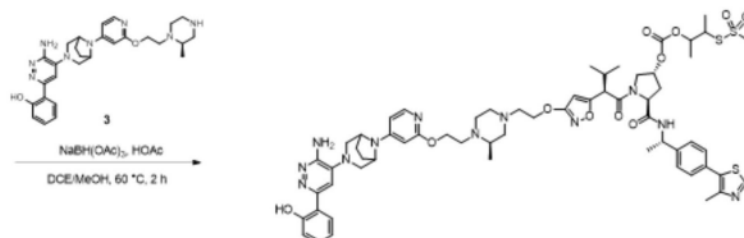
[0857] 合成实例1

[0858] L1-CIDE-BRM1-1的合成

[0859] L1-CIDE-BRM1-1通过以下方案(方案1)合成:



[0860]



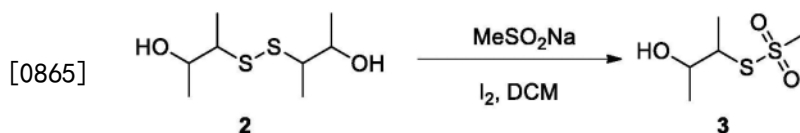
方案 1

[0861] 3,3'-二硫烷二基双(丁-2-醇)分以下两步合成:



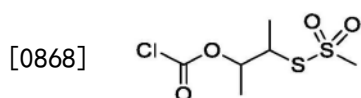
[0863] 向23℃的含3-巯基丁-2-醇(2.0g, 19mmol)的无水二氯甲烷(40mL)溶液中添加 MnO_2 (2.46g, 28mmol)。将反应混合物在23℃搅拌1h, 然后过滤。将滤液在真空下浓缩以得到无色油状3,3'-二硫烷二基双(丁-2-醇)(1.97g, 99%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.13-4.08和3.83-3.78(m, 2H), 2.94-2.91和2.82-2.78(m, 2H), 2.38-2.26和2.14-2.02(m, 2H), 1.35-1.22(m, 12H)。

[0864] S-(3-羟基丁-2-基)甲硫代磺酸盐, 下列化合物3(即上述方案1中的化合物2)的合成方法如下:



[0866] 向含3,3'-二硫烷二基双(丁-2-醇)(1.97g, 9.36mmol)的23℃无水二氯甲烷(50mL)溶液中添加甲磺酸钠(1.91g, 18.7mmol)和碘(2.38g, 9.36mmol)。将反应混合物在23℃避光搅拌1天, 然后过滤。浓缩滤液, 并且利用硅胶色谱法纯化残余物(用含0至5% MeOH的DCM溶液洗脱), 以得到浅黄色油状S-(3-羟基丁-2-基)甲硫代磺酸盐(1.20g, 70%)。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 4.13-4.11和3.96-3.93(m, 1H), 3.77-3.73和3.51-3.47(m, 1H), 3.42和3.39(s, 3H), 2.04和1.96(brs, 1H), 1.53和1.42(d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.33和1.23(d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H)。

[0867] S-(3-((氯羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成。



[0869] 在23℃, 向含S-(3-羟基丁-2-基)甲硫代磺酸盐(300mg, 1.63mmol)和吡啶(516mg,

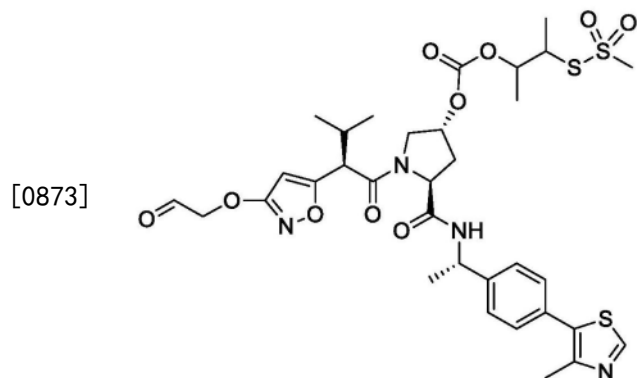
6.51mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液中添加含三光气(242mg,0.81mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液。将反应在23℃搅拌30分钟。将反应混合物浓缩至干以得到黄色油状标题化合物(380mg,95%),其直接用于下一步。

[0870] S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐

[0871] 在23℃,向含(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[上述实例1方案中的化合物1;有关制备方法,参见US 2020/0038378第293-294页(页码顶部)。]

(300mg,0.49mmol)和4 Å MS(100mg)的无水二氯甲烷(5mL)的混合物中于23℃缓慢添加三乙胺(198mg,1.95mmol)和含S-(3-((羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(362mg,1.46mmol)的无水二氯甲烷(2mL)溶液。将混合物在23℃搅拌16小时,然后在减压下浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化残余物(在石油醚中的0-70%乙酸乙酯),以得到白色固体状标题化合物(120mg,30%)。LCMS(ESI)m/z:825.3[M+H]⁺。

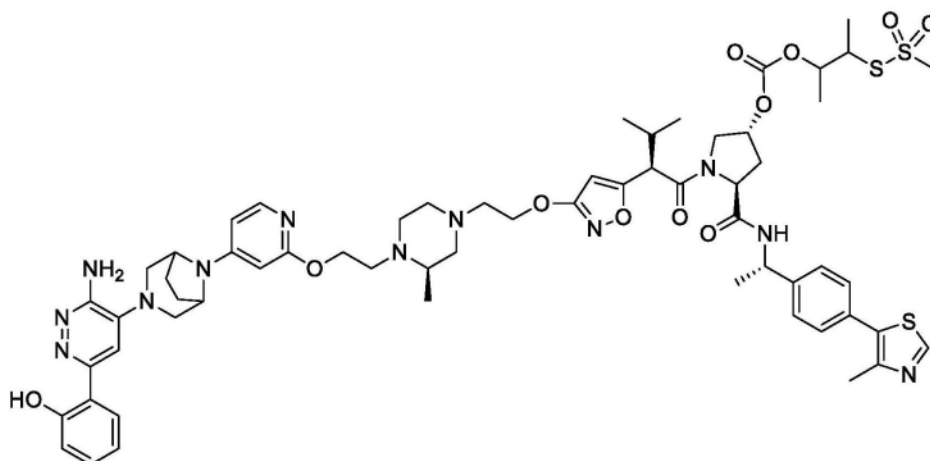
[0872] S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



[0874] 在23℃,向S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(120mg,0.15mmol)的溶液中添加含甲酸(2mL,2mmol)的水(1mL)溶液。将混合物在50℃搅拌1小时,然后浓缩以得到黄色油状标题化合物(105mg,96%)。LCMS(ESI)m/z:751.2[M+H]⁺。

[0875] S-(3-((((3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((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-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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成

[0876]

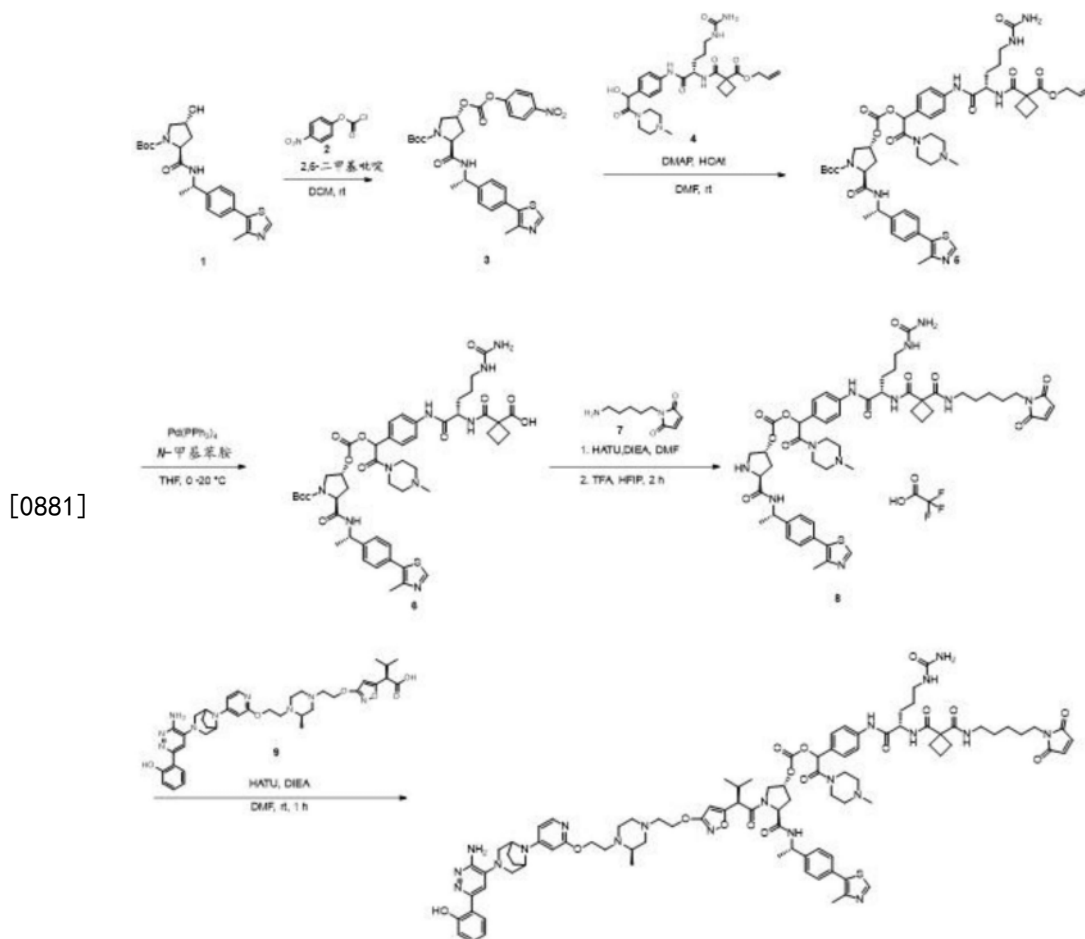


[0877] 向含S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(105mg,0.14mmol)和2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)吡嗪-3-基)苯酚[上述实例1方案中的化合物3。这是以下实例4方案中的化合物4。](73mg,0.14mmol)和H₂OAc(0.2-0.3mL)的二氯甲烷(2mL)和甲醇(2mL)的23℃溶液中添加NaBH(OAc)₃(593mg,2.80mmol)。将反应混合物在23℃搅拌3小时,然后浓缩。利用制备型TLC纯化残余物(含8%甲醇的二氯甲烷),以得到白色固体状标题化合物(48mg,27%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ 14.21-14.08(m,1H),9.01-8.97(m,1H),8.59-8.46(m,1H),7.92(d,J=4.8Hz,1H),7.79(d,J=6.0Hz,1H),7.55-7.33(m,5H),7.28-7.19(m,1H),6.96-6.79(m,2H),6.60-6.48(m,1H),6.18-6.08(m,2H),6.05-5.91(m,2H),5.24-5.11(m,1H),4.99-4.86(m,2H),4.57-4.44(m,2H),4.43-4.35(m,1H),4.31-4.17(m,4H),3.94-3.79(m,2H),3.77-3.67(m,2H),3.61-3.51(m,2H),3.29-3.23(m,4H),3.21-3.14(m,3H),3.04-2.93(m,3H),2.87-2.78(m,1H),2.64-2.58(m,3H),2.48-2.41(m,3H),2.38-2.31(m,2H),2.20-2.16(m,2H),2.07-1.82(m,2H),1.49-1.21(m,10H),1.06-0.90(m,6H),0.88-0.76(m,3H);LCMS(ESI)m/z:1251.0[M+H]⁺。

[0878] 合成实例2

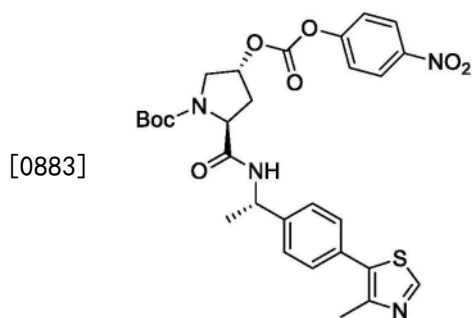
[0879] L1-CIDE-BRM1-2的合成

[0880] L1-CIDE-BRM1-2通过以下方案(方案2)合成:



方案 2

[0882] (2S,4R)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯的合成



[0884] 在23℃,向含氯甲酸4-硝基苯酯(1.68g,8.34mmol)和(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-甲酸叔丁酯(参见上述实例方案2中的化合物1;有关制备方法,参见J.Med.Chem.2019,62,941或J.Med.Chem.2014,57,8657)(3.0g,6.95mmol)的无水二氯甲烷(80mL)的混合物中添加2,6-二甲基吡啶(1.12g,10.4mmol)。将反应混合物在23℃搅拌18小时,然后浓缩,以得到黄色固体状标题化合物(4.0g,99%)。将该材料直接用于下一步。LCMS(ESI)m/z:597.2[M+H]⁺。

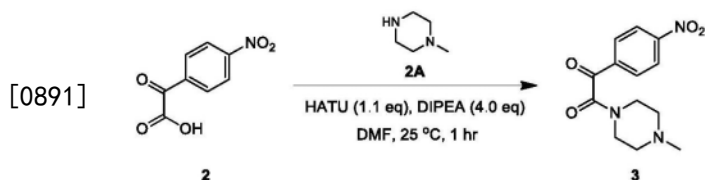
[0885] 化合物4,方案2:通过方案2a合成1-(((2S)-1-((4-(1-羟基-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸烯丙酯



[0888]

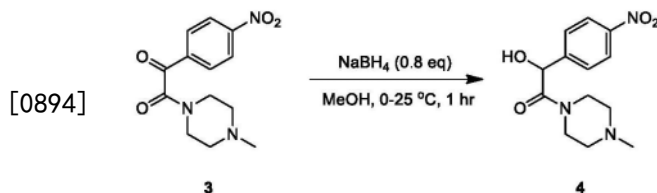
Reaction scheme showing the conversion of 4-nitroacetophenone (1) to 4-nitrobenzoic acid (2) using SeO_2 (2.5 eq) in pyridine at 95°C for 1 hr.

[0890] ii. 制备方案2a的化合物3的一般程序



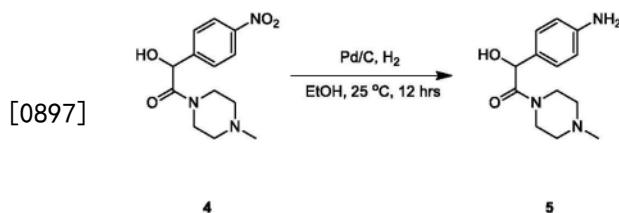
[0892] 平行进行两次反应。向23℃的含化合物2(140g, 538mmol)的DMF(700mL)溶液中添加化合物2A(54g, 538mmol)、HATU(225g, 592mmol)和DIPEA(278g, 2.15mol)。将混合物在23℃搅拌1小时。然后合并两次反应进行后处理。将合并的反应混合物用DCM(3.00L)稀释,并用盐水(1.00L x 3)进行洗涤。将有机层用Na₂SO₄干燥,过滤并在减压下浓缩。利用柱色谱法纯化残余物(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=50/1至0/1),以得到黄色固体状化合物3(200g, 产率67%)。

[0893] iii. 制备方案2a的化合物4的一般程序



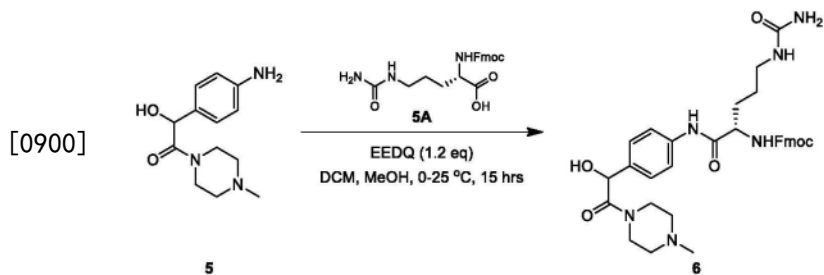
[0895] 在0℃向含化合物3(184g, 531mmol)的MeOH(1.30L)溶液中添加NaBH₄(16.1g, 425mmol)。将混合物升温至23℃并在该温度下搅拌1小时。将反应混合物在减压下浓缩,并将残余物用水稀释,用HCl(1M)调节至pH=7,并用EtOAc(1.00L x 3)萃取。将合并的有机层以Na₂SO₄干燥,过滤,并在减压下浓缩。利用柱色谱法纯化残余物(SiO₂, 二氯甲烷/甲醇=100/1至10/1)。在23℃,将粗制品用EtOH(500mL)研磨10分钟,以得到黄色固体状化合物4(161g, 产率54%)。¹H NMR: (400MHz, DMSO-d₆): δ8.24(d, J=8.4Hz, 2H), 7.64(d, J=8.4Hz, 2H), 6.14(d, J=6.4Hz, 1H), 5.60(d, J=6.0Hz, 1H), 3.57-3.47(m, 2H), 3.43(s, 2H), 2.23(s, 2H), 2.12(s, 5H)。

[0896] iv. 制备方案2a的化合物5的一般程序



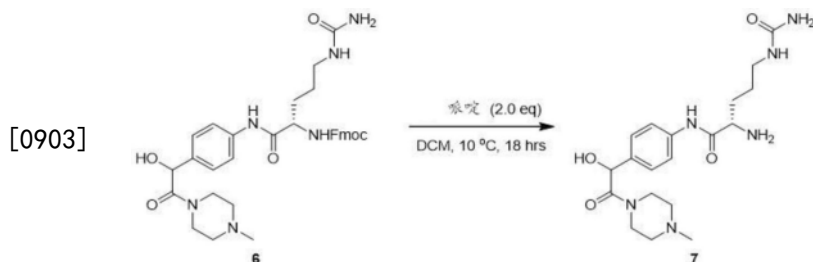
[0898] 平行进行四次反应。在N₂气氛下,向含化合物4(40g, 143mmol)的EtOH(600mL)溶液中添加Pd/C(8.50g, 10%)。将悬浮液脱气,并用H₂吹扫3次。将混合物在H₂(15psi)下于23℃搅拌12小时。然后合并四次反应进行后处理。将合并的反应混合物过滤并将滤饼用MeOH(1.00L)洗涤。将合并的滤液和洗涤液在减压下浓缩以得到黄色固体状化合物5(140g, 产率98%)。¹H NMR: (400MHz, CD₃OD): δ7.11(d, J=8.4Hz, 2H), 6.72(d, J=8.4Hz, 2H), 5.29(s, 1H), 3.74(s, 1H), 3.62-3.49(m, 1H), 3.47-3.35(m, 2H), 2.48(s, 1H), 2.35-2.25(m, 2H), 2.22(s, 3H), 1.90(s, 1H)。

[0899] v. 制备方案2a的化合物6的一般程序



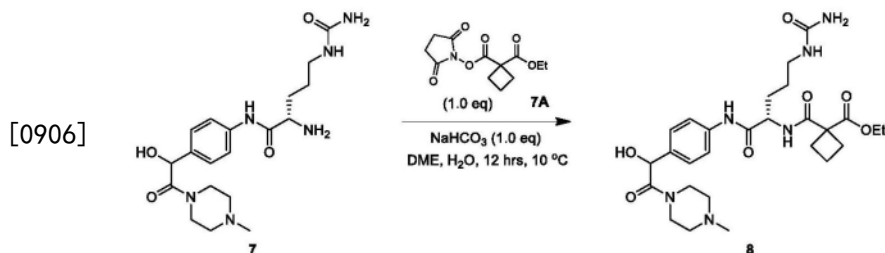
[0901] 在0℃,向含Fmoc-L-瓜氨酸(化合物5A)(95g,239mmol)和化合物5(72g,287mmol)的MeOH(350mL)和DCM(700mL)的溶液中添加一份EEDQ(71g,287mmol)。将混合物升温至23℃,并在N₂下于该温度下搅拌15小时。将反应混合物减压浓缩。在15℃,将粗制品用MTBE(1.00L)研磨2小时,以得到橙色固体状化合物6(185g,粗制品)。

[0902] vi.制备方案2a的化合物7的一般程序



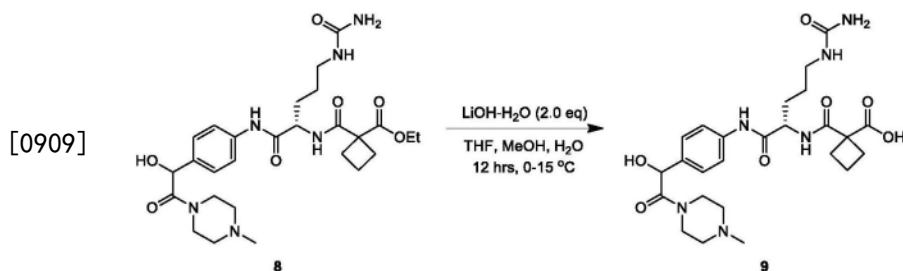
[0904] 在10℃,向含化合物6(190g,302mmol)的DCM(1.40L)溶液中添加哌啶(52g,604mmol)。将混合物在10℃搅拌18小时,然后在减压下浓缩。利用柱色谱法纯化残余物(SiO₂,二氯甲烷/甲醇=100/1至3/1),以得到黄色油状化合物7(85g,产率68%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD): δ 7.65(d,J=8.4Hz,2H),7.37(d,J=8.4Hz,2H),5.43(s,1H),3.68(s,1H),3.62(d,J=4.0Hz,1H),3.53-3.44(m,2H),3.24-3.06(m,2H),2.81(d,J=5.2Hz,2H),2.45(s,1H),2.36-2.25(m,2H),2.22(s,3H),1.97(s,1H),1.86-1.75(m,1H),1.68-1.54(m,6H)。

[0905] vii.制备方案2a的化合物8的一般程序



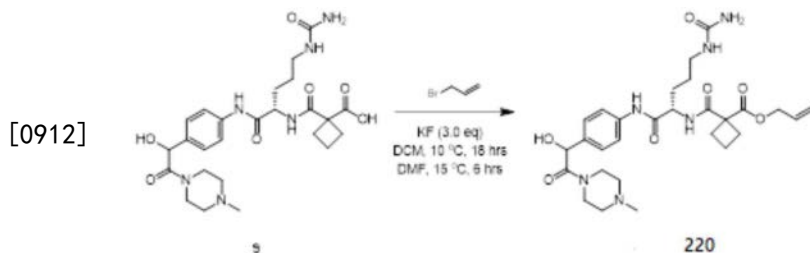
[0907] 向10℃的含化合物7(76g,187mmol)的DME(470mL)和H₂O(290mL)的溶液中添加化合物7A(63g,234mmol)和NaHCO₃(20g,234mmol)。将混合物在10℃搅拌12h,然后在减压下浓缩。利用柱色谱法纯化残余物(SiO₂,二氯甲烷/甲醇=10/1至3/1),以得到黄色固体状化合物8(92g,产率70%)。

[0908] viii.制备方案2a的化合物9的一般程序



[0910] 在0℃,向含化合物8(63g,112mmol)的THF(190mL)和MeOH(95mL)的搅拌溶液中添加含LiOH·H₂O(9.43g,225mmol)的H₂O(190mL)溶液。将反应混合物升温至15℃,并在该温度下搅拌12小时。然后将反应混合物减压浓缩。通过反相HPLC(0.1% TFA条件)纯化残余物,以得到白色固体状化合物9(50g,产率81%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD):δ7.68(d,J=7.6Hz,2H),7.37(d,J=8.4Hz,2H),5.48(s,1H),4.50-4.53(m,1H),3.78(s,2H),3.69-3.56(m,1H),3.27-3.10(m,5H),2.79(s,3H),2.71-2.62(m,2H),2.60-2.50(m,2H),2.17-2.07(m,1H),2.06-2.03(m,4H),2.03-1.97(m,1H),1.97-1.86(m,1H),1.74-1.78(m,1H),1.69-1.53(m,2H)。

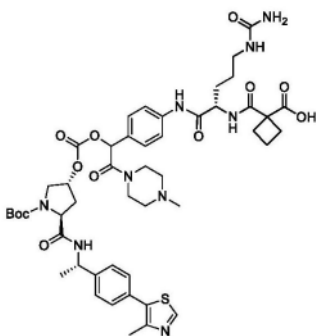
[0911] ix. 制备方案2的化合物4的一般程序(220)



[0913] 向15℃的含化合物9(70g,131mmol)的DMF(350mL)溶液中添加KF(23g,394mmol)和Bu₄NHSO₄(12.5g,36.8mmol)。然后在15℃滴加3-溴丙-1-烯(398g,3.29mol),并将混合物在该温度下再搅拌6小时。过滤反应混合物,并且在减压下浓缩滤液。利用制备型HPLC纯化残余物(色谱柱:Phenomenex luna c18 250mm*100mm*10um;流动相:[水(0.1%TFA)-ACN];B%:0%-20%,30分钟),以得到白色固体状220(26g,产率34%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD):δ7.69(d,J=8.4Hz,2H),7.39(d,J=8.4Hz,2H),6.02(s,1H),5.75(d,J=10.0Hz,2H),5.49(s,1H),4.50-4.54(m,1H),4.34-4.09(m,1H),4.03(s,2H),3.96-3.51(m,3H),3.50-3.33(m,3H),3.26-3.06(m,6H),2.75-2.49(m,4H),2.22-2.08(m,1H),2.06-1.87(m,2H),1.81-1.72(m,1H),1.70-1.52(m,2H)。LCMS:(M+H⁺=573.3)

[0914] 化合物6,方案2:1-(((2S)-1-((4-(1-(((3R,5S)-1-(叔-丁氧基羰基)-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)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸的合成

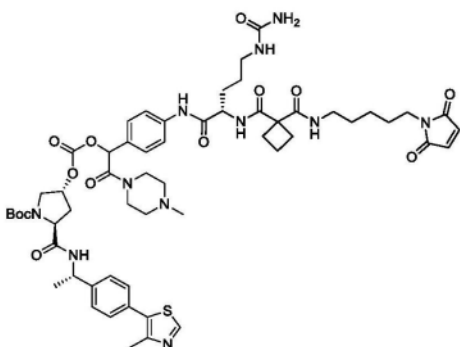
[0915]



[0916] 在23℃,向含(2S,4R)-4-(((1-(4-((S)-2-(1-((烯丙氧基)羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(76mg,0.07mmol)和1,3-二甲基嘧啶-2,4,6-(1H,3H,5H)-三酮(58mg,0.37mmol)的二氯甲烷(5mL)和甲醇(5mL)的溶液中添加Pd(PPh₃)₄(17mg,0.01mmol)。将反应混合物在23℃在氮气气氛下搅拌10小时,然后浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物(色谱条件如下:柱:Phenomenex Gemini-NX 80*30mm*3μm,流动相:(25-45%)水(10mM NH₄HCO₃)-ACN),以得到黄色固体状标题化合物(50mg,69%)。LCMS(ESI)m/z:990.6[M+H]⁺。

[0917] (2S,4R)-4-(((1-(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)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯的合成

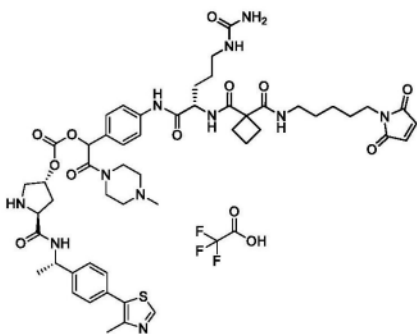
[0918]



[0919] 在23℃,向含1-(((2S)-1-((4-(1-((((3R,5S)-1-(叔-丁氧基羰基)-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)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸(69mg,0.07mmol)和1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(16mg,0.08mmol)的DMF(8mL)的混合物中添加N,N-二异丙基乙胺(0.03mL,0.21mmol)和HATU(32mg,0.08mmol)。将反应混合物在23℃搅拌16小时,然后浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5μm,(25-45%)水(0.075%TFA)-ACN),以得到白色固体状标题化合物(67mg,84%)。LCMS(ESI)m/z:1155.6[M+H]⁺。

[0920] 化合物7,方案2:1-(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)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基((3R,5S)-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)碳酸酯2,2,2-三氟乙酸酯的合成

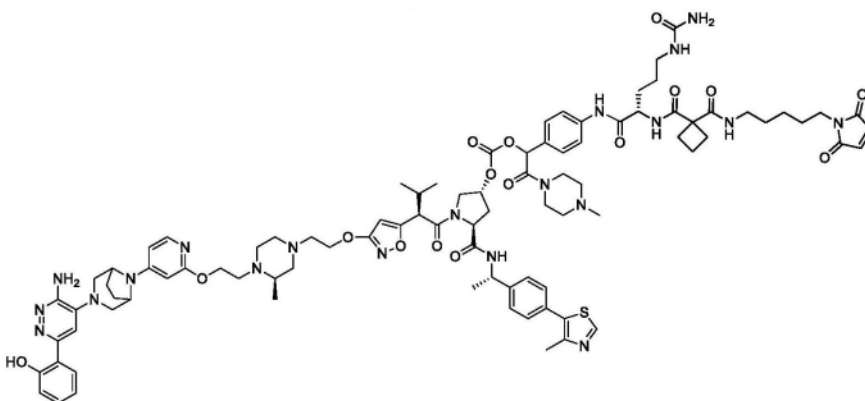
[0921]



[0922] 将含(2S,4R)-4-(((1-(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)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(67.4mg,0.06mmol)的5% TFA的HFIP(2mL,0.06mmol)溶液在23℃搅拌1.5小时。浓缩反应混合物,以得到黄色油状标题化合物(62mg,99.9%)。LCMS (ESI) m/z : 1054.7[M+H]⁺。

[0923] L1-CIDE-BRM1-2: (3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((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-基)乙氧基)异噻唑-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(1-(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)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)碳酸酯的合成

[0924]



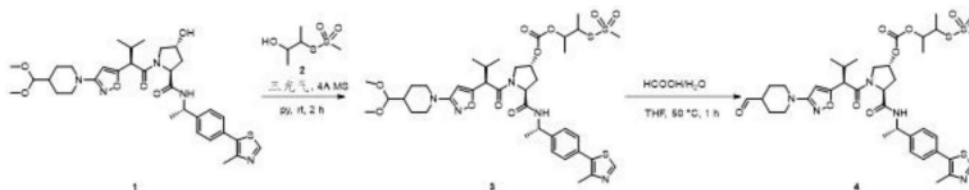
[0925] 在23℃,向含1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)碳酸酯2,2,2-三氟乙酸酯(62mg,0.06mmol)和(2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噻唑-5-基)-3-甲基丁酸(50mg,0.07mmol)的DMF(2.5mL)的混合物中添加N,N-二异丙基乙胺(0.03mL,0.18mmol)和HATU(27mg,0.07mmol)。将反应混合物在23℃搅拌16小时,然后浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物(色谱条件如下:柱:Phenomenex Gemini-NX 80*30mm*3um;流动相:(26-46%)水(10mM NH₄HCO₃)-ACN)纯化,以得到白色固体状标题化合物(44mg,42%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD): δ 8.88-8.83(m,1H),7.80-7.75(m,1H),7.75-7.65(m,3H),7.49-7.32(m,7H),7.25-7.19(m,1H),6.93-6.84(m,2H),6.76(s,1H),

6.75-6.71 (m, 1H), 6.57-6.54 (m, 1H), 6.29-6.19 (m, 2H), 5.25-5.21 (m, 1H), 4.98-4.93 (m, 2H), 4.64-4.62 (m, 2H), 4.51 (s, 3H), 4.41-4.27 (m, 3H), 4.23-4.08 (m, 1H), 4.01-3.89 (m, 1H), 3.79-3.54 (m, 4H), 3.48-3.40 (m, 2H), 3.27-3.16 (m, 4H), 3.15-3.03 (m, 4H), 2.97-2.85 (m, 2H), 2.83-2.69 (m, 4H), 2.61-2.51 (m, 3H), 2.50-2.33 (m, 8H), 2.29-2.17 (m, 6H), 2.14-2.11 (m, 3H), 1.93 (s, 4H), 1.75 (s, 1H), 1.62-1.45 (m, 9H), 1.35-1.23 (m, 4H), 1.16-1.10 (m, 3H), 1.09-0.92 (m, 3H), 0.92-0.80 (m, 3H); LCMS (ESI) m/z : 1764.8 $[M+H]^+$.

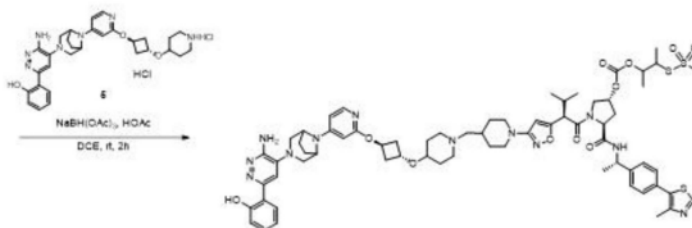
[0926] 合成实例3

[0927] L1-CIDE-BRM1-3的合成

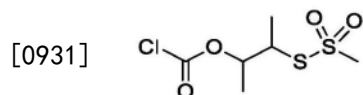
[0928] L1-CIDE-BRM1-3通过以下方案(方案3)合成:



[0929]

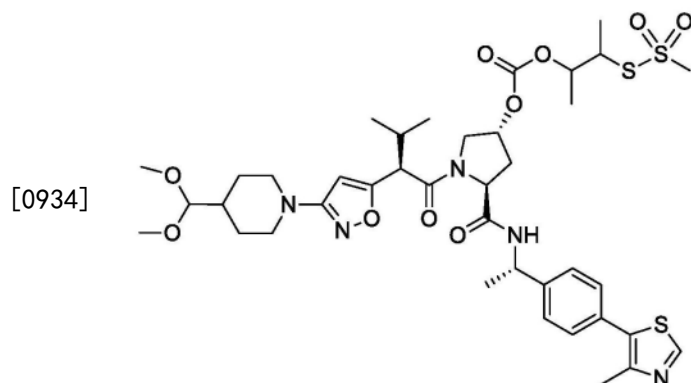


[0930] S-(3-((氯羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



[0932] 在23℃向含S-(3-羟基丁-2-基)甲硫代磺酸盐(300mg, 1.63mmol)的二氯甲烷(2mL)和吡啶(516mg, 6.51mmol)的溶液中添加含三光气(242mg, 0.81mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液。将反应在23℃搅拌30min,然后浓缩至干,以得到黄色油状标题化合物(380mg, 95%)。将该材料直接用于下一步。

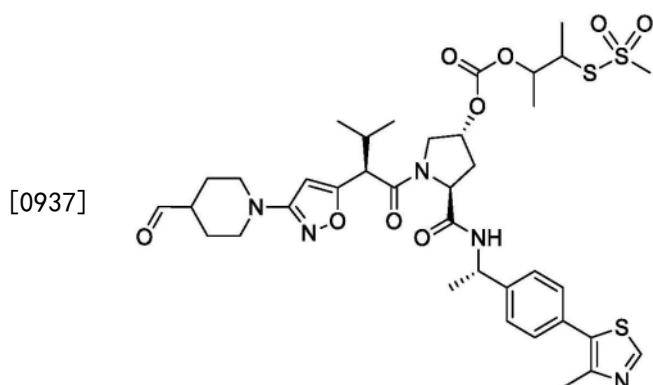
[0933] S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噁唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



[0935] 向23℃的含(2S,4R)-1-((R)-2-(3-(4-甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-

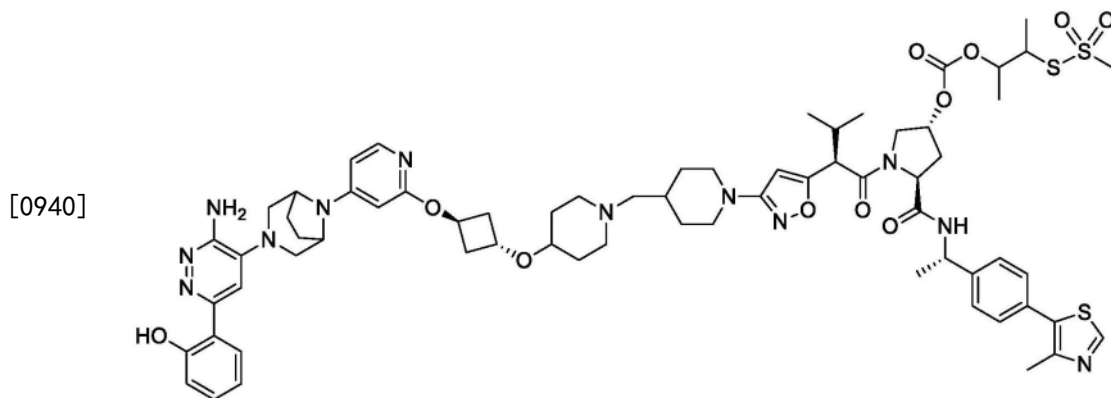
甲基丁酰基-4-羟基-N-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-甲酰胺(250mg, 0.39mmol) (参见上述方案3中的化合物1;其制备方法的描述参见US 2020/0038378第451-452页,其全文以引用方式并入本文)和4 Å MS(50mg)的二氯甲烷(2mL)混合物中添加吡啶(0.09mL, 1.17mmol)和含S-(3-(((氯羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(220mg, 0.89mmol)的二氯甲烷(1mL)溶液。将反应在23℃搅拌30分钟,然后浓缩。利用硅胶柱快速色谱法纯化残余物(含0-60%二氯甲烷的乙酸乙酯),以得到白色固体状标题化合物3(130mg, 39%)。LCMS(ESI) m/z :850.3[M+H]⁺。

[0936] S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(4-甲酰基哌啶-1-基)异噻唑-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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



[0938] 将含S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噻唑-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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(130mg, 0.15mmol)的水(1mL)和甲酸(3mL)的溶液在50℃搅拌2小时。然后将反应混合物浓缩,以得到黄色油状标题化合物(120mg, 98%)。LCMS(ESI) m/z :804.3[M+H]⁺。

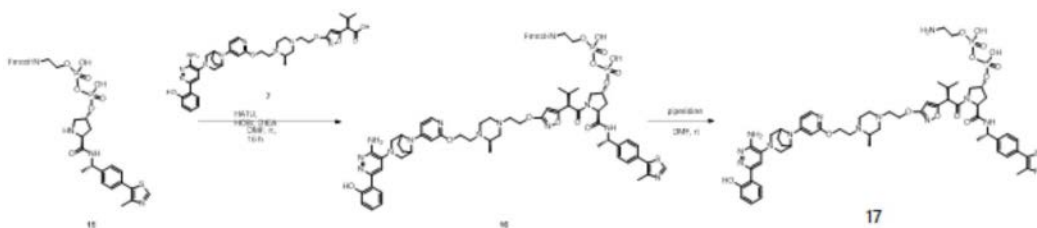
[0939] L1-CIDE-BRM1-3:S-(3-((((3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(4-((4-(反式-3-(4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-基)甲基)哌啶-1-基)异噻唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



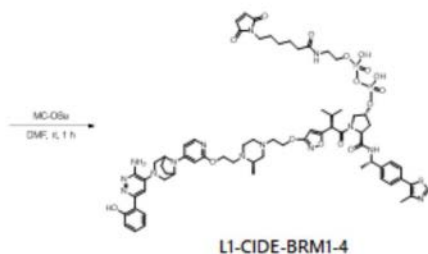
[0941] 向含S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(4-甲酰基哌啶-1-基)异噻唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧

[0944] L1-CIDE-BRM1-4通过以下方案(方案4)合成:



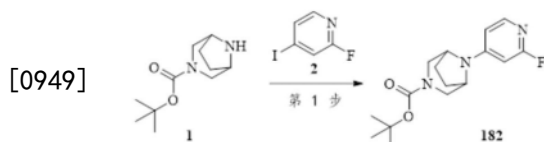


[0946]



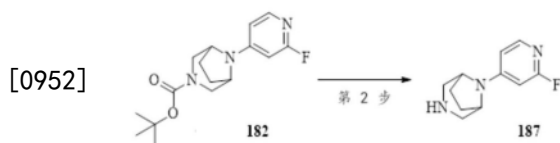
[0947] 化合物1,方案4:

[0948] 步骤1:182的制备。



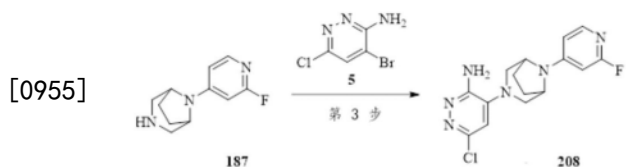
[0950] 将2-氟-4-碘吡啶 (2) (52g, 230mmol) 添加到含3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-甲酸叔丁酯 (1) (37g, 175mmol)、叔丁醇钠 (26g, 265mmol)、氟化钾 (17g, 284mmol) 和xantphos (4.8g, 8.2mmol) 在1,4-二噁烷 (750mL) 中的磁力搅拌混合物的单颈2L圆底烧瓶中。将混合物用氮气吹扫15分钟,然后添加三(二亚苺基丙酮)二钯 (0) (3.7g, 4.0mmol)。反应烧瓶配备带氮气入口的冷凝器,并置于预热至110℃的油浴中。在氮气氛下于110℃搅拌1.25小时后,将所得棕色/红色悬浮液冷却至23℃并通过硅藻土过滤。用Et₂O洗涤滤饼,并将合并的滤液和洗涤液在减压下浓缩成红色油状物 (127g)。将粗物质通过快速色谱法 (使用0-40% EtOAc/DCM) 纯化,以得到黄色泡沫状固体182 (56g, 约100%)。

[0951] 步骤2:187的制备。



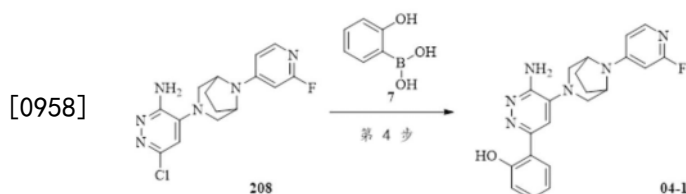
[0953] 在23℃,在50分钟内将含4M HCl的1,4-二噁烷 (220mL, 880mmol) 溶液添加到单颈2L圆底烧瓶内的含182 (56g, 约175mmol) 的MeCN (650mL) 的磁力搅拌溶液中。将混合物在23℃搅拌1小时,在此期间该混合物变成黄色/橙色悬浮液。将反应混合物浓缩成黄色固体,并在23℃将该物质用Et₂O (1000mL) 研磨1小时。将混合物过滤,并将收集的材料在减压下干燥,以得到黄色粉末状tri-HCl盐187 (61g)。将盐悬浮在DCM (1000mL) 中,并用饱和NaHCO₃水溶液 (500mL) 缓慢中和。分离各层,并将水相用DCM (2x 500mL) 进一步萃取。将合并的有机相用饱和NaCl (250mL) 洗涤,经无水Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩,以得到黄色固体状187的游离碱 (32g, 86%)。注意:确保NaHCO₃溶液充分饱和和以防止水相中的产物损失。

[0954] 步骤3:208的制备。



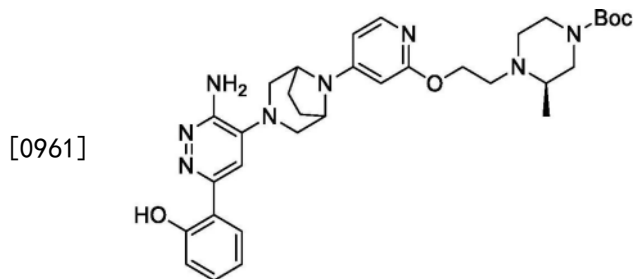
[0956] 在23℃,将1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(5)(3.0mL,20mmol)添加到1LErlenmeyer烧瓶中含187(30g,145mmol)3-氨基-4-溴-6-氯吡嗪(44g,209mmol)和N,N-二异丙基乙胺(80mL,460mmol)的无水DMF(300mL)的磁力搅拌溶液中。将该溶液均匀分配至两个450mL可密封圆底烧瓶中,然后在设定为100℃的油浴中磁力搅拌23小时。将澄清的红色反应混合物合并,并在高真空下浓缩成棕色残余物(107g)。残余物通过快速色谱法(使用0-5%MeOH/DCM)纯化两次,以得到黄色固体状208与一当量的N,N-二异丙基乙胺(20g,30%)的络合物。该络合物含有大约72重量%208(约15g 208)。

[0957] 步骤4:04-1的制备。



[0959] 在23℃,将2-羟基苯基硼酸(9.0g,65mmol)添加到单颈2L圆底烧瓶中,该烧瓶中包含208胺络合物(17g,37mmol)和碳酸钾(16g,113mmol)在1,4-二噁烷(600mL)与去离子水(120mL)的混合物中的磁力搅拌混合物。将混合物用氮气吹扫30分钟,然后添加RuPhos-Pd-G3(1.8g,2.1mmol)。烧瓶配备带氮气入口的冷凝器,并置于预热至100℃的油浴中。在氮气气氛下于100℃搅拌23小时后,将所得深红色溶液冷却至23℃,并在减压下浓缩为棕色固体(40g)。该粗物质的¹H NMR分析表明,04-1为主要产物。将上述材料与来自较早批次的具有类似纯度的6.8g粗制04-1合并。通过快速色谱法(使用0-100% EtOAc/DCM)纯化合并的批次,随后通过进一步色谱法(使用0-10% MeOH/DCM洗脱)纯化,以得到黄色固体状纯度为98%(通过HPLC测得)的04-1。将固体用Et₂O研磨,通过过滤收集,并在减压下干燥以得到黄色粉末状04-1(8.0g,合并产率47%)。

[0960] 化合物3,方案4:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡嗪-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-甲酸叔丁酯的合成

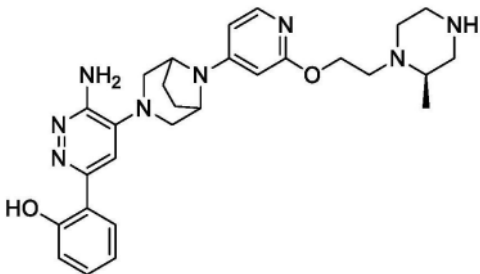


[0962] 在23℃,向含2-(6-氨基-5-(8-(2-氟吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)吡嗪-3-基)苯酚(1.5g,3.82mmol)(参见上述方案4中的化合物1)和氢化钠(60%,在矿物油溶液中;0.46g,11.47mmol)的THF(20mL)溶液中滴加(R)-4-(2-羟基乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(参见上述方案4中的化合物2;另见W02011/28685第88页第89列的合成路线,其全文以引用方式并入本文)(1.87g,7.64mmol)。然后将混合物在60℃搅拌12小时。冷

却至23℃后,将反应用水(100mL)稀释,并将所得混合物用乙酸乙酯(150mL×3)萃取。将合并的有机层用盐水(100mL)洗涤,经无水硫酸钠干燥并过滤。浓缩滤液,并且利用硅胶柱快速色谱法纯化残余物(含0-5%甲醇的DCM),以得到灰色固体状标题化合物(1.2g,64%)。LCMS (ESI) m/z : 617.6 $[M+H]^+$ 。

[0963] 化合物4,方案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)苯酚的合成

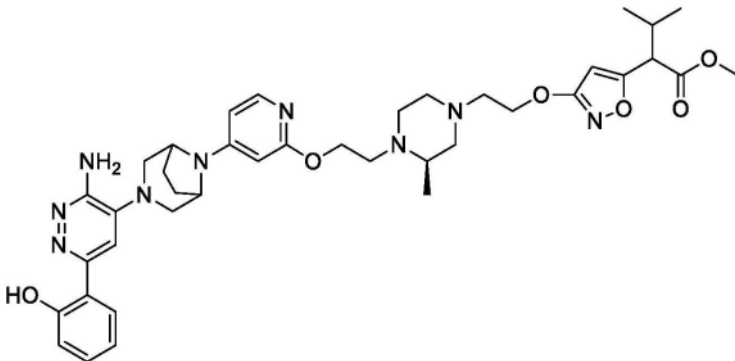
[0964]



[0965] 向含(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(1.2g,1.95mmol)的乙酸乙酯(10mL)的23℃溶液中添加4M HCl/EtOAc(20mL,1.95mmol)。将混合物在23℃搅拌16小时,然后浓缩。将利用硅胶柱快速色谱法纯化残余物(含0-10% MeOH(1% $NH_3 \cdot H_2O$)的DCM),以得到黄色固体状标题化合物(900mg,90%)。

[0966] 甲基2-(3-(2-((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-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸酯的合成

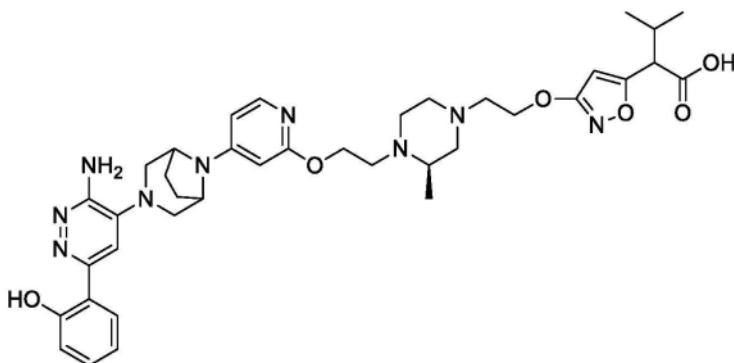
[0967]



[0968] 在23℃,向含 $NaBH(OAc)_3$ (746mg,3.48mmol)、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)苯酚(900mg,1.74mmol)和3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酸甲酯(参见上述方案4中的化合物5;参见US 2020/0038378第428页的合成路线,其全文以引用方式并入本文)(463mg,1.92mmol)的甲醇(10mL)和二氯甲烷(10mL)的溶液中添加乙酸钠(712mg,8.71mmol)。将反应混合物在23℃搅拌16小时,然后浓缩。利用硅胶柱快速色谱法纯化残余物(含0-10% MeOH的DCM),以得到黄色固体状标题化合物(1.0g,77%)。LCMS (ESI) m/z : 742.6 $[M+H]^+$ 。

[0969] 化合物6,方案4:2-(3-(2-((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-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸的合成

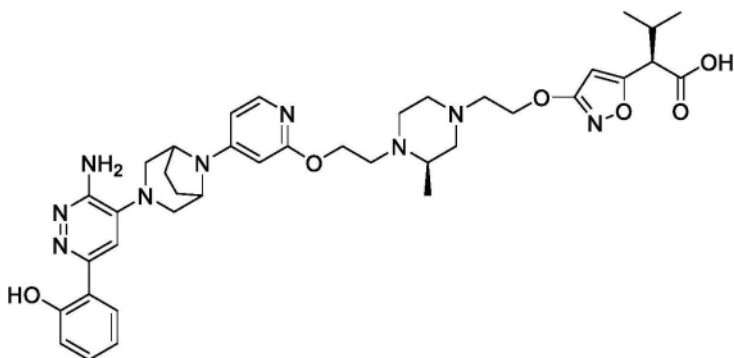
[0970]



[0971] 向含甲基2-(3-(2-((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-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸酯(1.0g,1.35mmol)的水(6mL)和甲醇(6mL)的23℃溶液中添加单水氢氧化锂(3mg,6.74mmol)。将混合物在23℃搅拌16小时,然后浓缩以得到黄色固体状标题化合物(980mg)。LCMS (ESI) m/z :728.3[M+H]⁺。

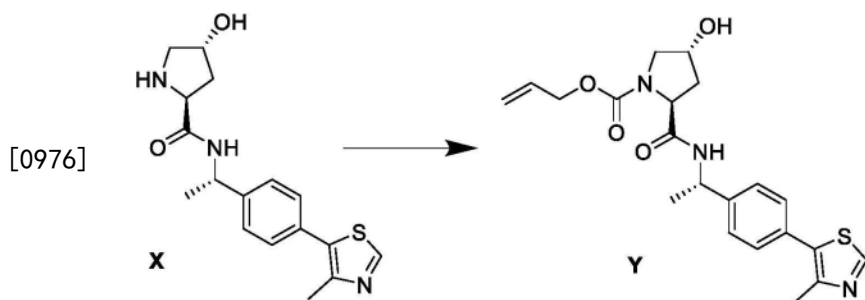
[0972] 化合物7,方案4:(2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸的合成

[0973]



[0974] 通过手性SFC(DAICEL CHIRALPAK AD(250mm*50mm,10um)0.1%NH₃H₂O,IPA,18%)分离2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)异噁唑-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)异噁唑-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸(900mg,1.24mmol),以得到第一峰(2S)-2-(3-(2-((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-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸(400mg,44%)和第二峰(2R)-2-(3-(2-((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-基)乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸(450mg,50%),两者均为白色固体状。

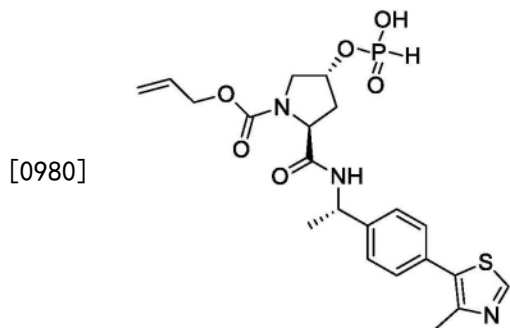
[0975] 化合物15的合成,方案4:



[0977] 方案4的化合物8 (以下称为化合物Y) 的制备。((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸烯丙酯的合成。

[0978] 将氯甲酸烯丙酯(485mg, 4.02mmol)添加到0℃的含(2S,4R)-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(参见例如上述化合物1;制备方法的描述参见:J.Med.Chem.2019,62,941)(1.65g, 3.83mmol)和NaHCO₃(1.61g, 19.2mmol)的1:1THF:H₂O的混合物(34mL)中。将所得混合物升温至25℃并在该温度下搅拌12小时。用水(50mL)稀释后,反应混合物用EtOAc(3x 50mL)萃取,并将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤,并浓缩。利用硅胶柱快速色谱法纯化残余物(使用含0-3% MeOH的DCM洗脱),以得到灰色固体状(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-甲酸烯丙酯(参见上述化合物Y)(1.60g, 81%)。LCMS(10-80, AB, 7.0min):RT=2.57min, m/z=537.1[M+Na]⁺。

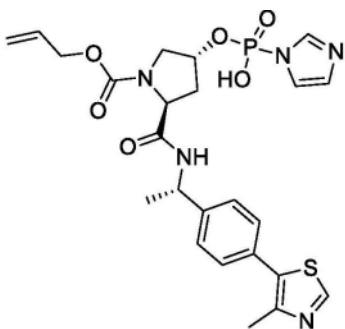
[0979] 方案4的化合物9的制备。(2S,4R)-4-((羟基氢磷酰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸烯丙酯



[0981] 在-78℃,向含(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-甲酸烯丙酯(2.0g, 4.81mmol)的THF(30mL)溶液中添加含PCl₃(1.67mL, 19.3mmol)的THF(5mL)和含Et₃N(4.03mL, 29mmol)的THF(3mL)。将反应混合物在-78℃搅拌20分钟,然后升温至23℃。将所得混合物在23℃搅拌12小时,然后用水(20mL)和NaHCO₃(5mL)水溶液淬灭。在23℃搅拌10分钟后,将混合物用1N HCl酸化至pH=3,随后在减压下浓缩。利用硅胶柱快速色谱法纯化残余物(含0-10%甲醇的DCM),以得到无色固体状目标化合物(1.5g, 65%)。LCMS(ESI)m/z:480.2[M+H]⁺。

[0982] 方案4的化合物10的制备。(2S,4R)-4-((羟基(1H-咪唑-1-基)磷酰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸烯丙酯的合成

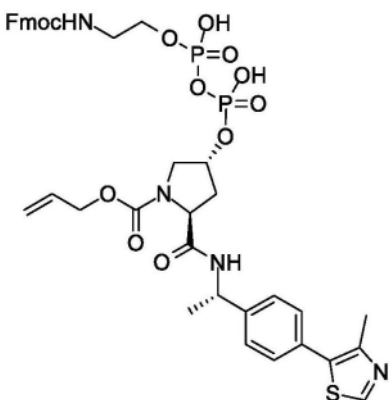
[0983]



[0984] 在23℃,向含(2S,4R)-4-((羟基氢磷酰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸烯丙酯(600mg,1.25mmol)和Et₃N(0.52mL,3.75mmol)的CCl₄(8mL)和乙腈(8mL)的23℃溶液中添加1-(三甲基甲硅烷基)-1H-咪唑(0.53g,3.75mmol)。将反应混合物在23℃搅拌40分钟,然后浓缩。将残余物用MTBE/EtOAc=5/1(3mL)研磨,过滤收集所得沉淀物,用MTBE(3mL)洗涤并风干得到标题化合物(680mg,99%)。LCMS(ESI)m/z:546.3[M+H]⁺。

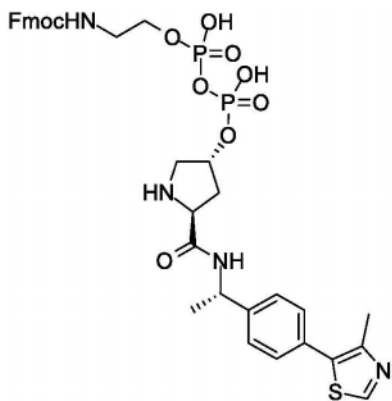
[0985] 方案4的化合物10的制备。(2S,4R)-4-((((2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)乙氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸烯丙酯的合成

[0986]

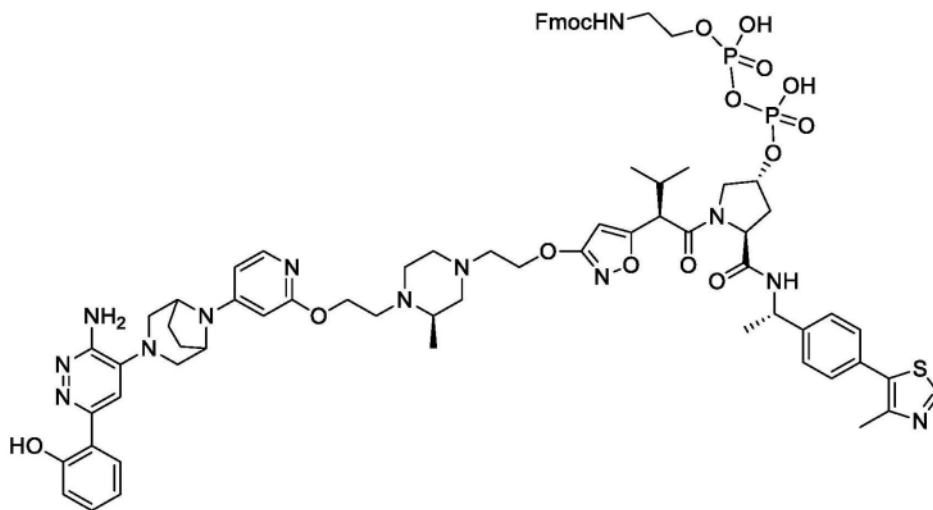


[0987] 向含(2S,4R)-4-((羟基(1H-咪唑-1-基)磷酰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸烯丙酯(600mg,1.1mmol)和(9H-芴-9-基)甲基(2-(膦酰氧基)乙基)氨基甲酸酯(上述方案4中的化合物12);制备方法的描述参见J.Org.Chem.2007,72,3116.) (400mg,1.1mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(13mL)的23℃溶液中添加含1M氯化锌的Et₂O(5.5mL,5.5mmol)。将反应混合物在23℃搅拌12小时,然后浓缩。利用硅胶柱快速色谱法纯化残余物(含0-30%甲醇(3% NH₃·H₂O)的DCM),以得到黄色固体状标题化合物(340mg,37%)。LCMS(ESI)m/z:814.3[M+H]⁺。

[0988] 化合物15,方案4:(9H-芴-9-基)甲基(2-((羟基((羟基(((3R,5S)-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)氧基)磷酰基)氧基)磷酰基)氧基)乙基)氨基甲酸酯的合成

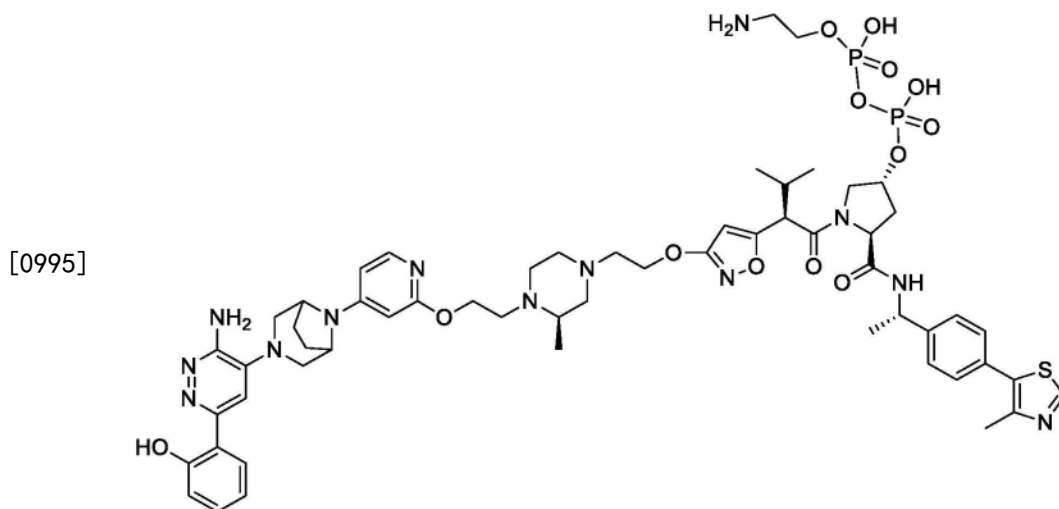


[0991] 化合物16, 方案4: (9H-芴-9-基) 甲基 (2-(((((((3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)异噻唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)乙基)氨基甲酸酯的合成



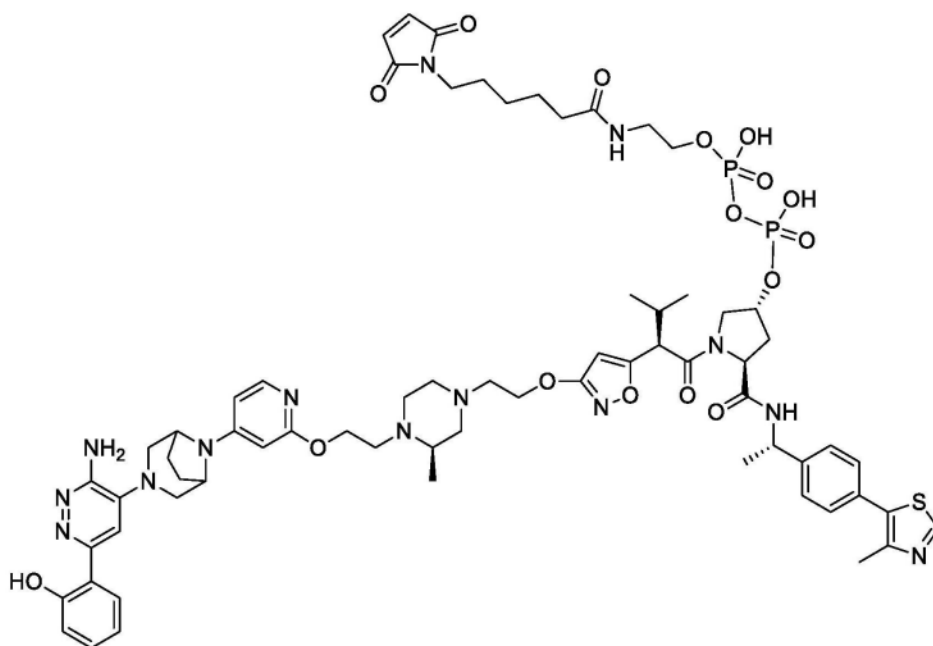
131

[0994] 化合物17, 方案4: [2-氨基乙氧基(羟基)磷酰基][(3R, 5S)-1-[(2R)-2-[3-[2-[(3R)-4-[2-[[4-[3-[3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡嗪-4-基]-3, 8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基]-2-吡啶基]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-[[[(1S)-1-[4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基]乙基]氨基甲酰基]吡咯烷-3-基]磷酸氢盐的合成



[0997] L1-CIDE-BRM1-4: [(3R,5S)-1-[2-[3-[2-[(3R)-4-[2-[[4-[3-[3-氨基-6-(2-羟
基苯基)吡嗪-4-基]-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基]-2-吡啶基]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-[[(1S)-1-[4-(4-甲基噻唑-5-基)
苯基]乙基]氨基甲酰基]吡咯烷-3-基][2-[6-(2,5-二氧代吡咯-1-基)己酰基氨基]乙氧
基-羧基-磷酸基]磷酸氢盐的合成

[0998]



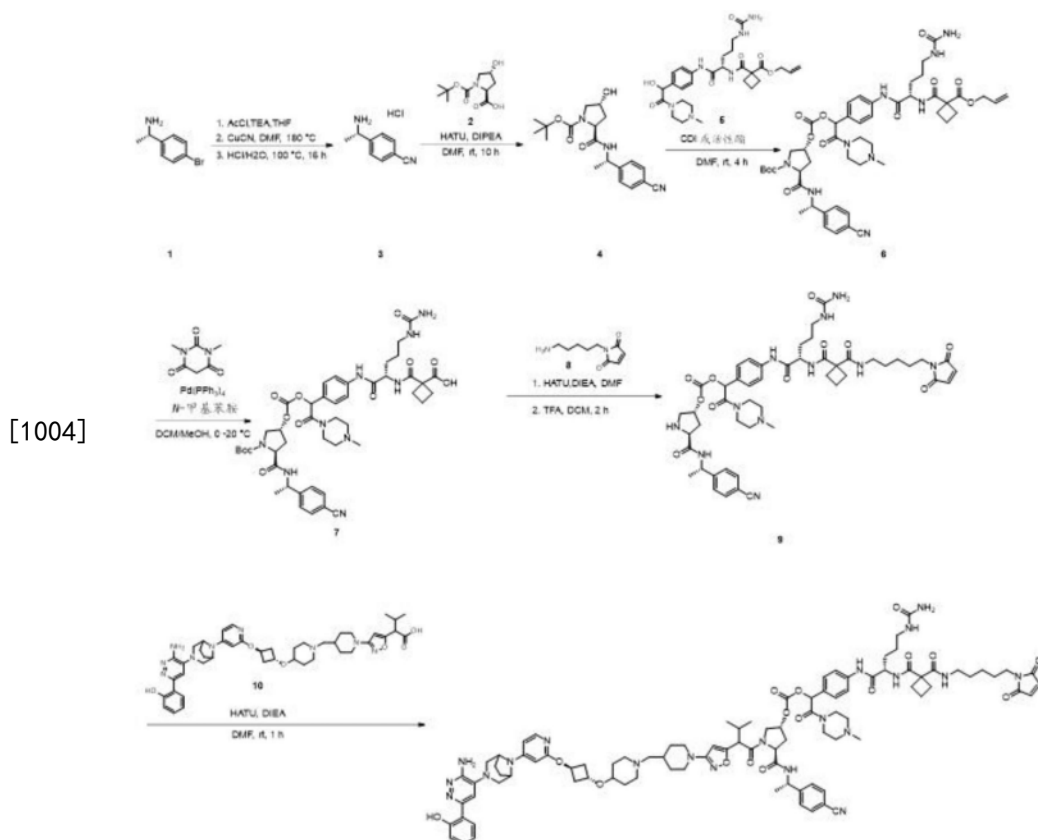
[0999] 向含[2-氨基乙氧基(羟基)磷酰基][(3R,5S)-1-[2-[3-[2-[(3R)-4-[2-[[4-[3-[3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡嗪-4-基]-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基]-2-吡啶基]氧基]乙基]-3-甲基-哌嗪-1-基]乙氧基]异噁唑-5-基]-3-甲基-丁酰基]-5-[[[(1S)-1-[4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基]乙基]氨基甲酰基]吡咯烷-3-基]磷酸氢盐(50mg,0.04mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(2mL)的23℃溶液中添加1-(6-(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)-6-氧代己基)-1H-吡咯-2,5-二酮(24mg,0.08mmol)和N,N-二异丙基乙胺(0.01mL,0.08mmol)。将混合物在23℃搅拌1小时,然后通过制备型HPLC(Phenomenex Gemini-NX 80*30mm*3umto,17-47%水(10mM NH_4HCO_3)-ACN)直接纯化,以得到白色固体状标题化合物(7.9mg,14%)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.98-8.95 (m, 1H), 8.60-8.41 (m, 1H), 7.94-7.90 (m, 1H), 7.79-7.75 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.45-7.30 (m, 4H), 7.23-7.20 (m, 1H), 6.99-6.94 (m, 2H), 6.88-6.80 (m, 2H), 6.54-6.50 (m, 1H), 6.14-6.10 (m, 1H), 5.98-5.96 (m, 2H), 4.89-4.86 (m, 2H), 4.54-4.35 (m, 3H), 4.26-4.21 (m, 4H), 3.95-3.71 (m, 5H), 3.24-3.21 (m, 1H), 3.04-2.98 (m, 3H), 2.82-2.75 (m, 1H), 2.69-2.64 (m, 1H), 2.45-2.42 (m, 5H), 2.36-2.31 (m, 1H), 2.18-2.15 (m, 2H), 2.07-1.92 (m, 5H), 1.79 (s, 12H), 1.46-1.44 (m, 5H), 1.38-1.35 (m, 3H), 1.26-1.22 (m, 3H), 1.16-1.14 (m, 2H), 0.99-0.95 (m, 6H), 0.89

[1000] -0.76 (m, 4H); LCMS (ESI) m/z : 1438.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

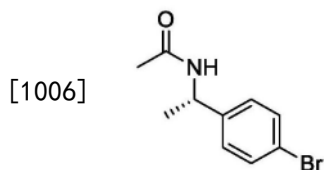
[1001] 合成实例5

[1002] L1-CIDE-BRM1-5的合成

[1003] L1-CIDE-BRM1-2通过以下方案(方案5)合成:

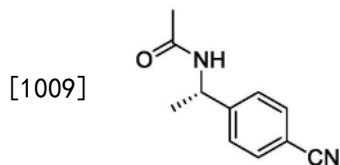


[1005] (S)-N-(1-(4-溴苯基)乙基)乙酰胺的合成



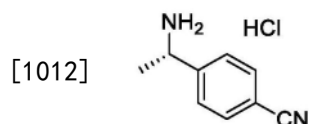
[1007] 在 0°C ，将乙酰氯(2.35g, 30mmol)滴加到含(S)-1-(4-溴苯基)乙胺(5.0g, 25mmol)和 Et_3N (3.8g, 37.49mmol)的THF(50mL)溶液中。将反应在该温度下搅拌2.5小时，然后在EtOAc(50mL $\times$ 3)和饱和NaCl溶液(50mL)之间分配。合并的有机层经硫酸钠干燥，过滤并浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化残余物(含0-50% EtOAc的石油醚)，以得到白色固体状标题化合物(4.0g, 66%)。LCMS(ESI) m/z : 241.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[1008] (S)-N-(1-(4-氰基苯基)乙基)乙酰胺的合成



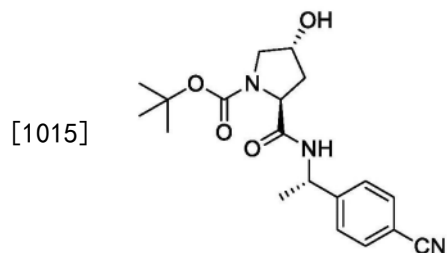
[1010] 将含氰化铜(I)(1.78g, 20mmol)和(S)-N-(1-(4-溴苯基)乙基)乙酰胺(4.0g, 16.5mmol)混合物的N,N-二甲基甲酰胺(40mL)回流24小时。冷却至 23°C 后，过滤混合物，并浓缩滤液。在 23°C 将残余物添加到饱和 NaHCO_3 水溶液(80mL)中并搅拌10分钟。然后添加饱和次氯酸钠水溶液，并在 23°C 继续搅拌24小时。混合物用EtOAc(70mL $\times$ 3)萃取，并将合并的有机层用水(70mL $\times$ 3)洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并浓缩，以得到黄色固体状标题化合物(2.7g, 87%)。LCMS(ESI) m/z : 189.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[1011] (S)-4-(1-氨基乙基)苯甲腈盐酸盐的合成



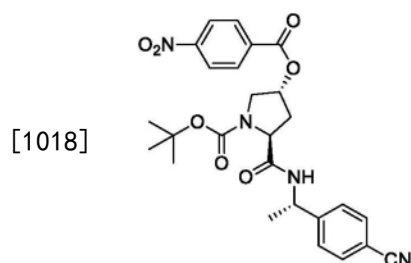
[1013] 将含(S)-N-(1-(4-氰基苯基)乙基)乙酰胺(2.4g, 12.8mmol)和2M HCl水溶液(20mL, 12.8mmol)的溶液在100℃搅拌24小时。将反应溶液冷却至23℃, 然后浓缩以得到黄色固体状标题化合物(1.8g, 97%)。LCMS (ESI) m/z: 147.1 [M+H]⁺。

[1014] 化合物4, 方案5: (2S, 4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-甲酸叔丁酯的合成



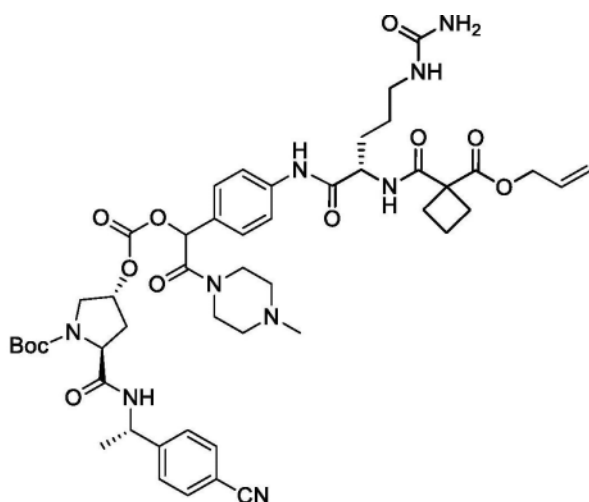
[1016] 向23℃的含(S)-4-(1-氨基乙基)苯甲腈盐酸盐(1.6g, 11mmol)和(2S, 4R)-1-(叔丁氧基羰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸(2.8g, 12mmol)的混合物的N,N-二甲基甲酰胺(50mL)中添加N,N-二异丙基乙胺(4.3g, 33mmol)和HATU(1.63g, 12mmol)。将反应在23℃搅拌16小时, 然后浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化残余物(含50-100%乙酸乙酯的二氯甲烷), 以得到黄色固体状标题化合物(1.7g, 43%)。LCMS (ESI) m/z: 360.1 [M+H]⁺。

[1017] (2S, 4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-((4-硝基苯甲酰基)氧基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯的合成



[1019] 在23℃, 向含氯甲酸4-硝基苯酯(1.68g, 8.3mmol)和(2S, 4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(3.0g, 7.0mmol)的无水二氯甲烷(80mL)的混合物中添加2,6-二甲基吡啶(1.1g, 10.43mmol)。将反应混合物在23℃搅拌18小时, 然后浓缩以得到黄色固体状标题化合物(437mg, 产率99.8%)。LCMS (ESI) m/z: 597.2 [M+H]⁺。化合物6, 方案5: (2S, 4R)-4-(((1-(4-((S)-2-(1-(烯丙氧基)羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯的合成

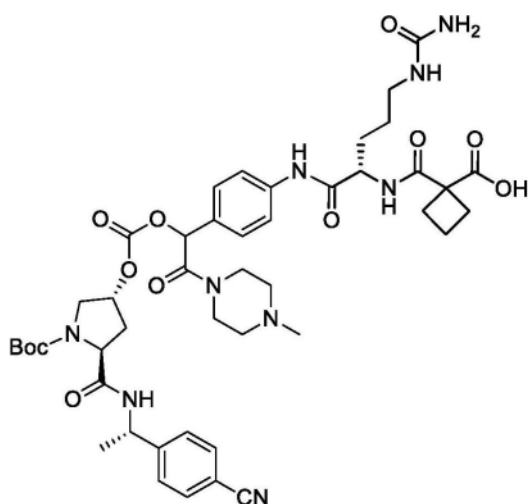
[1020]



[1021] 向23℃的含叔丁基(2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-((4-硝基苯甲酰基)氧基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(437mg,0.83mmol)和1-(((2S)-1-((4-(1-羟基-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸烯丙酯(334mg,0.58mmol)的混合物的无水N,N-二甲基甲酰胺(10mL)中添加DMAP(203mg,1.67mmol)。将反应混合物在40℃搅拌18小时,然后冷却至23℃并过滤。将滤液通过制备型HPLC(Xtimate C18 150*40mm*5um/水(0.225%FA)-ACN,18-48%)直接纯化,以得到黄色固体状标题化合物(65mg,8%)。LCMS(ESI)m/z:958.6[M+H]⁺。

[1022] 化合物7,方案5:1-(((2S)-1-((4-(1-(((3R,5S)-1-(叔-丁氧基羰基)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸的合成

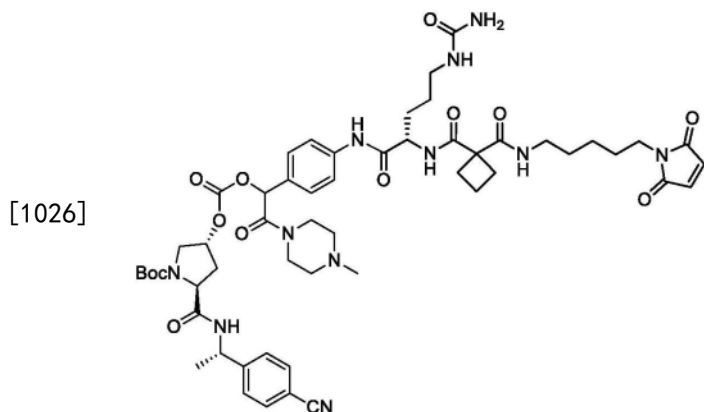
[1023]



[1024] 在23℃向含(2S,4R)-4-(((1-(4-((S)-2-(1-((烯丙氧基)羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(65mg,0.07mmol)和1,3-二甲基嘧啶-2,4,6(1H,3H,5H)-三酮(53mg,0.34mmol)的二氯甲烷(3mL)和甲醇(3mL)的溶液中添加Pd(PPh₃)₄(16mg,0.01mmol)。将反应混合物在氮气气氛下于23℃搅拌10小时然后浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物(色谱条件如下:柱:Phenomenex Gemini-NX 80*30mm*3um,流动相:(24-50%)水(10mM NH₄HCO₃)-ACN,以得到红色固体状标题化合物(40mg,64%)。LCMS

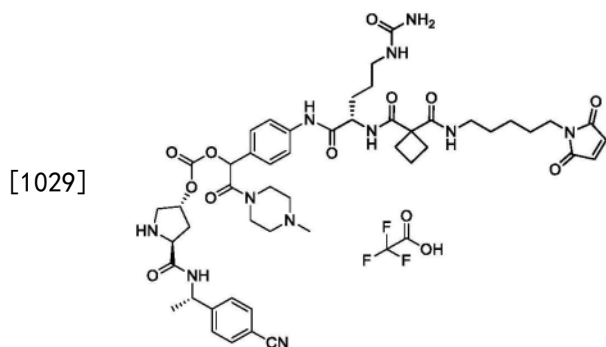
(ESI) m/z : 918.6 $[M+H]^+$ 。

[1025] 化合物9, 方案5: (2S, 4R) - 2 - (((S) - 1 - (4-氰基苯基) 乙基) 氨基甲酰基) - 4 - (((1 - (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) 环丁烷甲酰氨基) - 5-脲基戊酰胺基) 苯基) - 2 - (4-甲基哌嗪-1-基) - 2-氧代乙氧基) 羰基) 氧基) 吡咯烷-1-甲酸叔丁酯的合成



[1027] 向含23℃的1 - (((2S) - 1 - ((4 - (1 - (((((3R, 5S) - 1 - (叔-丁氧基羰基) - 5 - (((S) - 1 - (4-氰基苯基) 乙基) 氨基甲酰基) 吡咯烷-3-基) 氧基) 羰基) 氧基) - 2 - (4-甲基哌嗪-1-基) - 2-氧代乙基) 苯基) 氨基) - 1-氧代-5-脲基戊-2-基) 氨基甲酰基) 环丁烷甲酸 (40mg, 0.04mmol) 和1 - (5-氨基戊基) - 1H-吡咯-2, 5-二酮 (10mg, 0.05mmol) 的N,N-二甲基甲酰胺 (4mL) 混合物中添加N,N-二异丙基乙胺 (0.02mL, 0.13mmol) 和HATU (20mg, 0.05mmol)。将反应混合物在23℃搅拌16小时, 然后浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物 (Boston Green ODS 150*30mm*5um, 水 (0.075% TFA) - ACN, 20% - 50%), 以得到蓝色固体状标题化合物 (31mg, 65%)。LCMS (ESI) m/z : 1082.7 $[M+H]^+$ 。

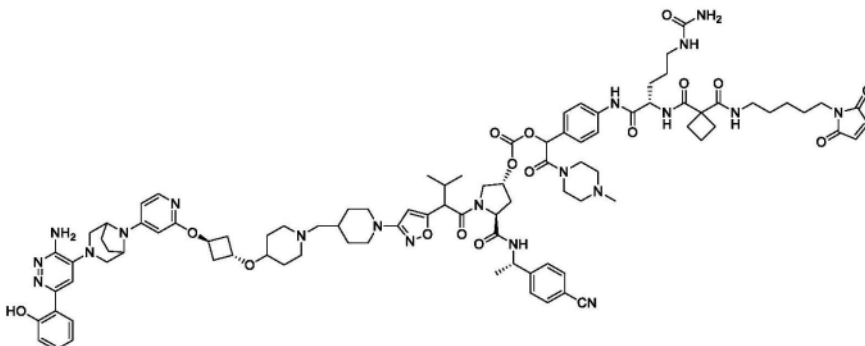
[1028] (3R, 5S) - 5 - (((S) - 1 - (4-氰基苯基) 乙基) 氨基甲酰基) 吡咯烷-3-基 (1 - (4 - ((S) - 2 - (1 - ((5 - (2, 5-二氧代-2, 5-二氢-1H-吡咯-1-基) 戊基) 氨基甲酰基) 环丁烷甲酰氨基) - 5-脲基戊酰胺基) 苯基) - 2 - (4-甲基哌嗪-1-基) - 2-氧代乙基) 碳酸酯2, 2, 2-三氟乙酸酯的合成



[1030] 将含 (2S, 4R) - 2 - (((S) - 1 - (4-氰基苯基) 乙基) 氨基甲酰基) - 4 - (((1 - (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) 环丁烷甲酰氨基) - 5-脲基戊酰胺基) 苯基) - 2 - (4-甲基哌嗪-1-基) - 2-氧代乙氧基) 羰基) 氧基) 吡咯烷-1-甲酸叔丁酯 (30.5mg, 0.03mmol) 的5% TFA的HFIP (3mL) 溶液在23℃搅拌1.5小时。然后将反应混合物浓缩, 以得到粉色油状标题化合物 (28mg, 99%)。LCMS (ESI) m/z : 982.7 $[M+H]^+$ 。

[1031] L1-CIDE-BRM-1-5: (3R,5S)-1-(2-(3-(4-(反式-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡啶-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)甲基)哌啶-1-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(1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)碳酸酯的合成

[1032]

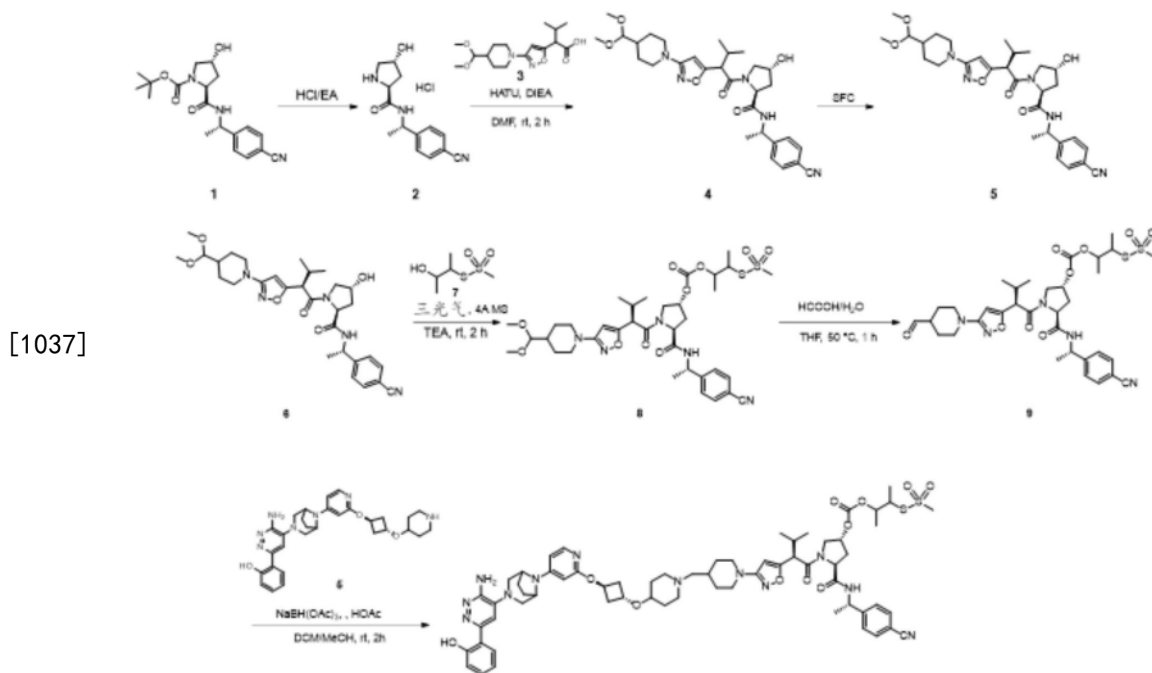


[1033] 在23℃,向含(3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基(1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)苯基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)碳酸酯2,2,2-三氟乙酸酯(28mg,0.03mmol)和2-(3-(4-((4-(反式-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-基)甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸(27mg,0.03mmol)的DMF(3mL)的混合物中添加N,N-二异丙基乙胺(0.01mL,0.08mmol)和HATU(13mg,0.03mmol)。将混合物在23℃搅拌4小时,然后浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物(色谱条件如下:柱:Phenomenex Gemini-NX 80*30mm*3um;流动相:(18-36%)水(10mM NH_4HCO_3)-ACN,以得到白色固体状标题化合物(23mg,31%)。¹H NMR(400MHz, CD_3OD): δ 7.80-7.58(m,6H),7.57-7.34(m,5H),7.24-7.21(m,1H),6.96-6.84(m,2H),6.80-6.73(m,1H),6.56-6.54(m,1H),6.33-6.20(m,1H),6.17-6.03(m,1H),5.27-5.19(m,1H),5.14-5.12(m,1H),4.62-4.60(m,5H),4.54-4.51(m,3H),4.42-4.39(m,1H),4.17-3.86(m,2H),3.84-3.76(m,1H),3.74-3.64(m,3H),3.63-3.50(m,4H),3.48-3.43(m,3H),3.38-3.35(m,2H),3.25-3.22(m,2H),3.26-3.18(m,1H),3.17-3.00(m,4H),2.86-2.83(m,2H),2.59-2.55(m,6H),2.48-2.35(m,7H),2.29-2.12(m,8H),2.09-1.86(m,8H),1.85-1.68(m,1H),1.79-1.75(m,5H),1.67-1.52(m,7H),1.51-1.43(m,2H),1.41-1.23(m,9H),1.10-0.94(m,3H),0.93-0.81(m,3H);LCMS(ESI)m/z:1772.9[M+H]⁺。

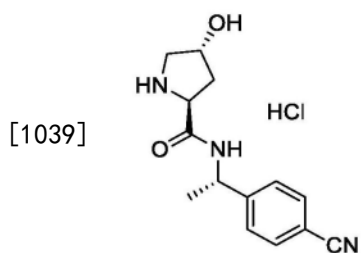
[1034] 合成实例6

[1035] L1-CIDE-BRM1-6的合成

[1036] L1-CIDE-BRM1-6通过以下方案(方案6)合成:

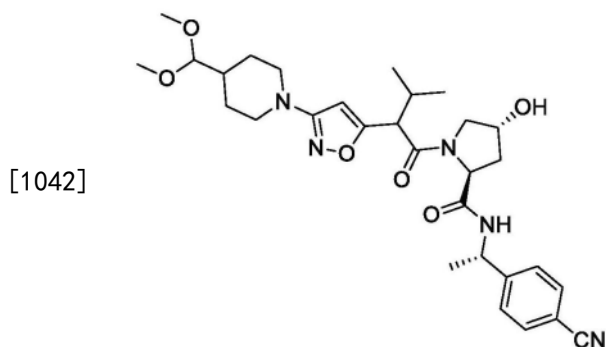


[1038] (2S,4R)-N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺盐酸盐的合成



[1040] 向含(2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(参见上述方案5中的化合物4)(2.0g,5.56mmol)的乙酸乙酯的(5mL)的23℃溶液中添加4M HCl(10mL;通过将干燥HCl气体在无水EtOAc中鼓泡来制备)。将反应混合物在23℃搅拌16小时,然后浓缩以得到白色固体状标题化合物(1.4g,97%)。

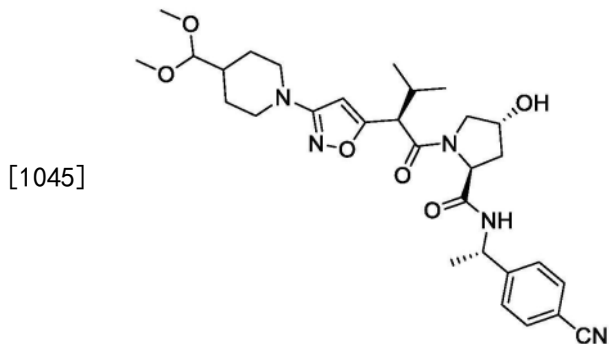
[1041] 化合物4,方案6:(2S,4R)-N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-(2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺的合成



[1043] 向含(2S,4R)-N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺盐酸盐(900mg,3.47mmol)和2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酸(参见上述方案6中的化合物3;参见US 2020/0038378第450页公开的合成路线,其全文以引用方式并入本文)(1.4g,3.43mmol)的无水N,N-二甲基甲酰胺(20mL)的23℃溶液中添加DIEA

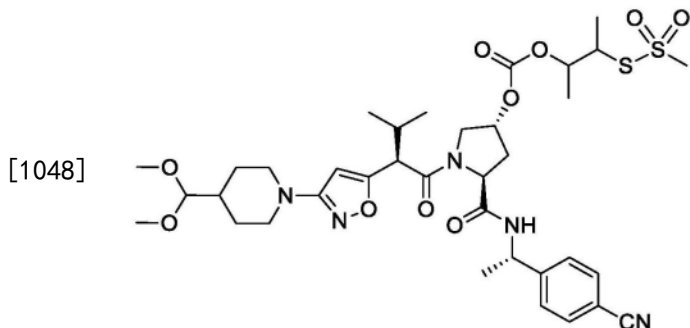
(1.71mL, 10.29mmol) 和 HATU (2.0g, 5.15mmol)。将混合物在 23℃ 搅拌 2 小时, 然后将其分配在水 (100mL) 和乙酸乙酯 (100mL×3) 之间。将合并的有机层用盐水 (50mL×2) 洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 然后将其浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化残余物 (含 0-100% 乙酸乙酯的石油醚), 以得到无色油状标题化合物 (2.0g, 98%)。LCMS (ESI) m/z : 568.3 $[M+H]^+$ 。

[1044] 化合物 5, 方案 6: (2S, 4R) -N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺的合成



[1046] 通过手性 SFC (DAICEL CHIRALPAK OD (250mm×30mm, 10μm); (20%) 0.1% $NH_3 \cdot H_2O$, EtOH) 分离 (2S, 4R) -N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((S)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺 (2g, 3.52mmol) 得到第一峰 (2S, 4R) -N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((S)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺 (400mg, 20%) 和第二峰 (2S, 4R) -N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺 (700mg, 35%), 两者均为白色固体状。 ^1H NMR (400MHz, $DMSO-d_6$): δ 8.49 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.82-7.76 (m, 2H), 7.50-7.44 (m, 2H), 6.11 (s, 1H), 5.13 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 4.93-4.89 (m, 1H), 4.36-4.31 (m, 1H), 4.27-4.25 (s, 1H), 4.07 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 3.72-3.53 (m, 4H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.26 (s, 6H), 2.76-2.67 (m, 2H), 2.25-2.16 (m, 1H), 2.08-1.96 (m, 1H), 1.79-1.61 (m, 4H), 1.44-1.33 (m, 3H), 1.30-1.19 (m, 2H), 0.98-0.89 (m, 3H), 0.84-0.74 (m, 3H)。

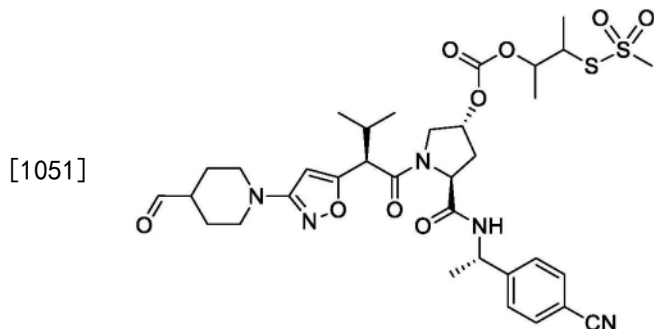
[1047] 化合物 8, 方案 6: S-(3-((((3R, 5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



[1049] 向含 (2S, 4R) -N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺 (300mg, 0.53mmol) 和 4 Å MS (100mg) 的无水二氯甲烷 (3mL) 的 23℃ 混合物中缓慢添加含 S-(3-((氯羰基)氧基)

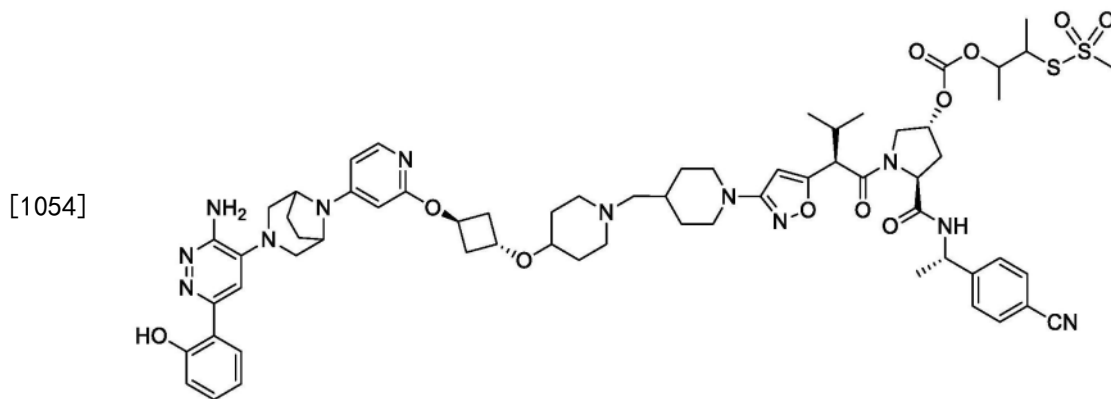
丁-2-基)甲硫代磺酸盐(参见上述方案6中的化合物7或上述方案1中的化合物2)(391mg, 1.59mmol)的二氯甲烷(2mL)和含Et₃N(214mg, 2.11mmol)的无水二氯甲烷(3mL)。将反应在23℃搅拌16小时,然后过滤。浓缩滤液,并利用硅胶快速色谱法纯化残余物(含0-70%乙酸乙酯的石油醚),以得到白色固体状标题化合物(200mg, 49%)。LCMS(ESI)m/z:778.1[M+H]⁺。

[1050] 化合物9,方案6:S-(3-((((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-2-(3-(4-甲酰基哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



[1052] 在23℃,向含S-(3-((((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-2-(3-(4-(二甲氧基甲基)哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(100mg, 0.13mmol)的THF(1mL)溶液中添加甲酸(1mL)和水(3mL)。将混合物在50℃搅拌16小时,然后冷却至23℃并浓缩,以得到黄色油状标题化合物(80mg, 85%)。LCMS(ESI)m/z:732.0[M+H]⁺。

[1053] L1-CIDE-BRM1-6:S-(3-((((3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(4-((4-(反式-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)哌啶-1-基)甲基)哌啶-1-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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐的合成



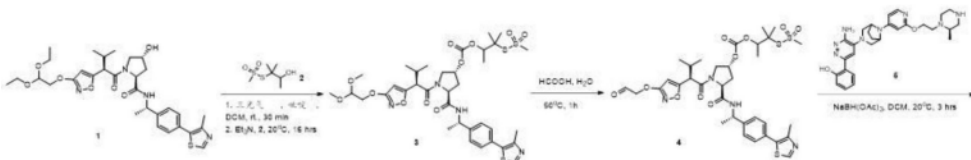
[1055] 向含S-(3-((((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-2-(3-(4-甲酰基哌啶-1-基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(80mg, 0.11mmol)和2-(6-氨基-5-(8-(2-(3-(哌啶-4-基氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯酚盐酸盐(参见上述方案6中的化合物5;参见US 2020/0038378第306-307页的合成路线,其全文以引用方式并入本文)(60mg, 0.11mmol)和HOAc(0.2mL)的二氯甲烷(1mL)和甲醇(1mL)的23℃溶液中添加

NaBH(OAc)₃ (232mg, 1.09mmol)。将反应混合物在23℃搅拌3小时,然后浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5um(水(0.225%FA)-ACN,15-45%)),以得到白色固体状标题化合物(35mg,26%)。经制备型HPLC(FA)纯化后,所需产物为FA盐。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ8.55-8.53(m,1H),8.17-8.15(m,1H),7.91(d,J=7.6Hz,1H),7.81-7.75(m,3H),7.51-7.44(m,3H),7.23-7.20(m,1H),6.89-6.82(m,2H),6.54-6.51(m,1H),6.12(d,J=8.8Hz,2H),5.97(s,2H),5.26-5.07(m,2H),5.01-4.85(m,2H),4.51-4.46(m,2H),4.38-4.27(m,2H),3.87-3.80(m,2H),3.59-3.56(m,3H),3.54-3.52(m,3H),3.28-3.24(m,1H),3.03-2.99(m,2H),2.76-2.70(m,2H),2.36-2.31(m,2H),2.19-2.09(m,4H),2.01-1.94(m,4H),1.80-1.62(m,5H),1.45-1.32(m,9H),1.27-1.25(m,1H),1.14-1.02(m,2H),0.95-0.89(m,3H),0.88-0.70(m,3H);LCMS(ESI)m/z:1259.1[M+H]⁺。

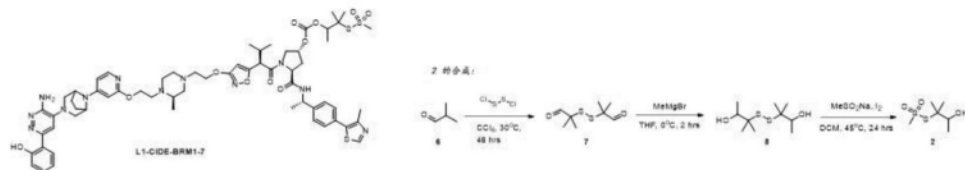
[1056] 合成实例7

[1057] L1-CIDE-BRM1-7的合成

[1058] 方案:

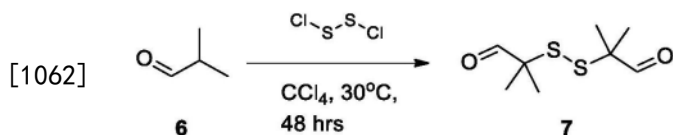


[1059]



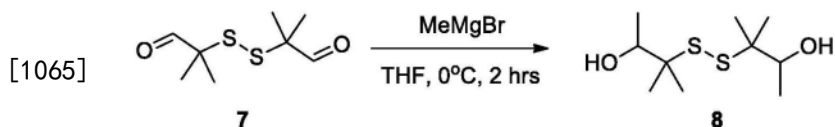
[1060] 实验:

[1061] 制备化合物7的一般程序:



[1063] 在氮气气氛下于50℃,向异丁醛(2.7mL,29.6mmol)在四氯化碳(10mL)中的搅拌溶液中滴加二氯化二硫(1.2mL,14.8mmol)。将反应于30℃在氮气流中再搅拌48小时以除去释放的氯化氢。TLC(含25%乙酸乙酯的石油醚,R_f=0.5)表明反应完成。将溶液在真空下蒸馏并通过快速色谱法(用含25%乙酸乙酯的石油醚洗脱)纯化,以得到无色油状2-[(1,1-二甲基-2-氧代-乙基)二硫烷基]-2-甲基-丙醛(3000mg,98.2%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ =9.09(s,2H),1.37(s,12H)。

[1064] 制备化合物8的一般程序:

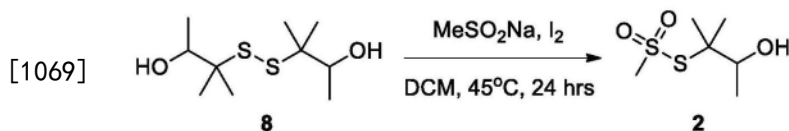


[1066] 在0℃,在5分钟内向含2,2'-二硫烷二基双(2-甲基丙烷)(1500.0mg,7.3mmol)的四氢呋喃(30mL)溶液中滴加甲基溴化镁(9.7mL,29.1mmol)。将混合物在0℃搅拌2小时。

[1067] TLC(含20%乙酸乙酯的石油醚, $R_f = 0.5$)表明反应完成。将混合物用饱和 NH_4Cl 水

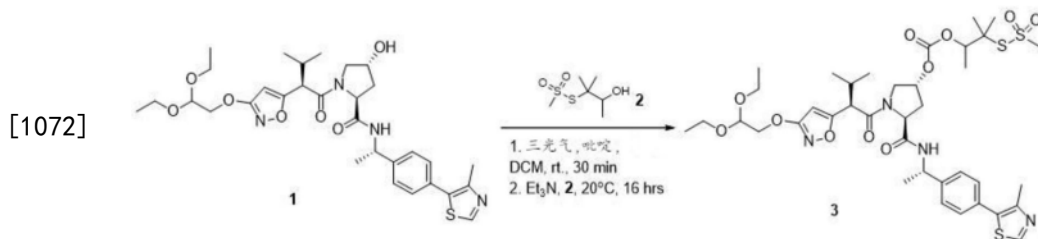
溶液(10mL)淬灭,并用EtOAc(20mL x 3)萃取。将合并的有机相用水(20mL)和盐水(10mL)洗涤,经Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩以得到黄色油状3-[(2-羟基-1,1-二甲基-丙基)二硫烷基]-3-甲基-丁-2-醇(1370mg,79%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d): δ =3.77-3.74(m,1H),1.31(s,6H),1.26(d,J=2.4Hz,3H),1.19(d,J=6.4Hz,3H)。

[1068] 制备化合物2的一般程序:



[1070] 在25℃,向含2-甲基-2-[(5-硝基-2-吡啶基)二硫烷基]丙-1-醇(5983.8mg,22.99mmol)的二氯甲烷(50mL)溶液中添加3-[(2-羟基-1,1-二甲基-丙基)二硫烷基]-3-甲基-丁-2-醇(1370.0mg,5.75mmol)和碘(2917mg,11.49mmol)。将反应混合物在45℃搅拌24小时。TLC(含33% EtOAc的石油醚R_f=0.4)显示反应已完成。将混合物过滤,并且将滤液在真空中浓缩,然后通过快速色谱法(用含0-50% EtOAc的石油醚洗脱)纯化,以得到黄色油状3-甲基-3-甲基磺酰基硫烷基-丁-2-醇(460mg,产率40.4%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d): δ =4.14-4.09(m,1H),3.42(s,3H),1.68(s,3H),1.45(s,3H),1.29(d,J=6.4Hz,3H)。

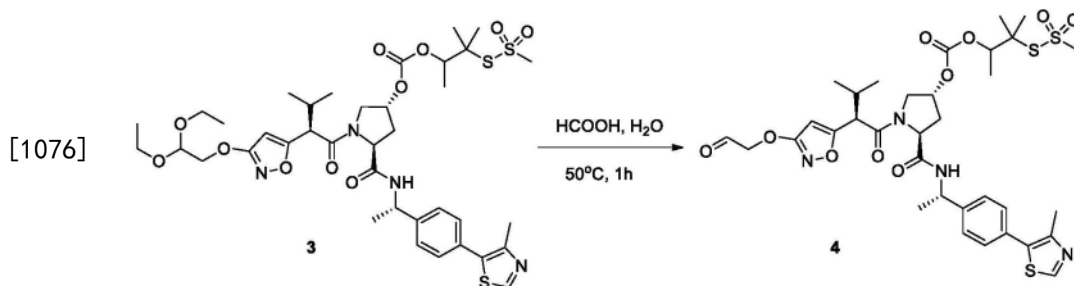
[1071] 制备化合物3的一般程序:



[1073] 向含三光气(112.3mg,0.38mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液中添加含3-甲基-3-甲基磺酰基硫烷基-丁-2-醇(150.0mg,0.76mmol)和吡啶(239.3mg,3.03mmol)的二氯甲烷(2mL)溶液,将反应在25℃搅拌30分钟。将反应混合物浓缩至干得到粗制品,其直接用于下一步。

[1074] 向无水二氯甲烷(2mL)溶液中的上述粗制品中添加4 Å MS(100mg),然后在20℃缓慢添加含三乙胺(32.9mg,0.33mmol)和化合物1(50.0mg,0.08mmol)的无水二氯甲烷(2mL)溶液,并且再搅拌16小时。将残余物浓缩,并通过硅胶快速色谱法(使用含0-70%乙酸乙酯的石油醚进行洗脱)纯化,以得到白色固体状化合物3(64mg,93.8%)。LCMS(5-95,AB,1.5min):RT=0.974min,m/z=839.3[M+H]⁺。

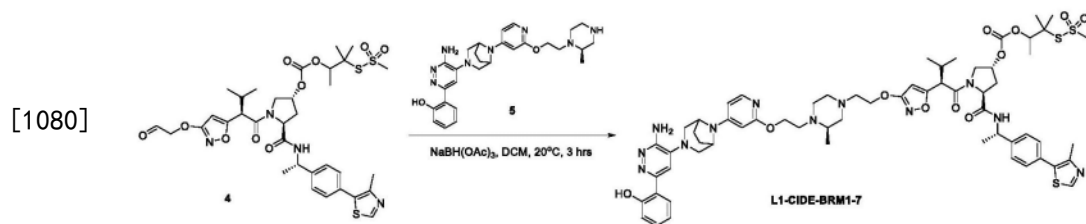
[1075] 制备化合物4的一般程序:



[1077] 将化合物3(50.0mg,0.06mmol)在甲酸(2mL)和水(2mL)中的溶液在50℃搅拌1小时。浓缩反应混合物,以得到黄色固体状化合物4(45mg,98.7%),其直接用于下一步。

[1078] LCMS (5-95, AB, 1.5min): $R_T = 0.848\text{min}$, $m/z = 765.2 [M+H]^+$ 。

[1079] 制备L1-CIDE-BRM1-7的一般程序:



[1081] 向含化合物4 (45.0mg, 0.06mmol) 的二氯甲烷 (2mL) 溶液中添加化合物5 (33.1mg, 0.06mmol) 和三乙酰氧基硼氢化钠 (249.4mg, 1.18mmol)。将反应混合物在20℃搅拌3小时。将混合物浓缩, 并通过TLC (含8% MeOH的DCM) 纯化, 以得到白色固体状L1-CIDE-BRM1-7 (15.0mg, 19.4%)。

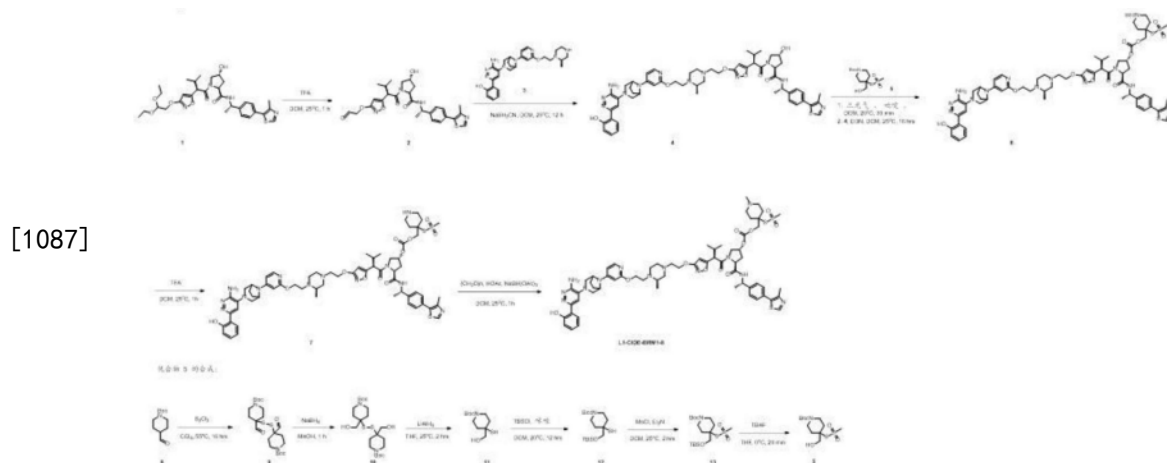
[1082] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4): $\delta = 8.88$ (s, 1H), 7.81-7.75 (m, 2H), 7.49-7.41 (m, 5H), 7.24-7.20 (m, 1H), 6.92-6.87 (m, 2H), 6.57 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 1H), 6.22 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.01 (d, $J = 3.2\text{Hz}$, 1H), 5.28-5.24 (m, 1H), 5.05-5.02 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.53-4.49 (m, 3H), 4.36-4.31 (m, 4H), 4.04-3.90 (m, 2H), 3.67-3.65 (m, 1H), 3.46-3.43 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.16-3.03 (m, 4H), 2.95-2.91 (m, 2H), 2.78-2.72 (m, 3H), 2.68-2.63 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.39-2.33 (m, 2H), 2.26-2.23 (m, 2H), 2.19-2.06 (m, 4H), 1.59-1.52 (m, 7H), 1.46 (d, $J = 4.0\text{Hz}$, 2H), 1.40-1.29 (m, 6H), 1.14 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H), 1.05 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H), 0.88 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 3H)。

[1083] LCMS (5-95, AB, 1.5min): $R_T = 0.829\text{min}$, $m/z = 633.5 [M/2+H]^+$ 。HRMS (5-95AB): $m/z = 1265.5126 [M+H]^+$ 。

[1084] 合成实例8

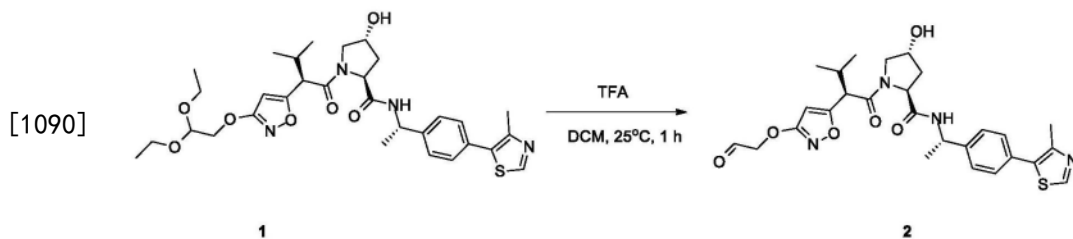
[1085] L1-CIDE-BRM1-8的合成

[1086] 方案:



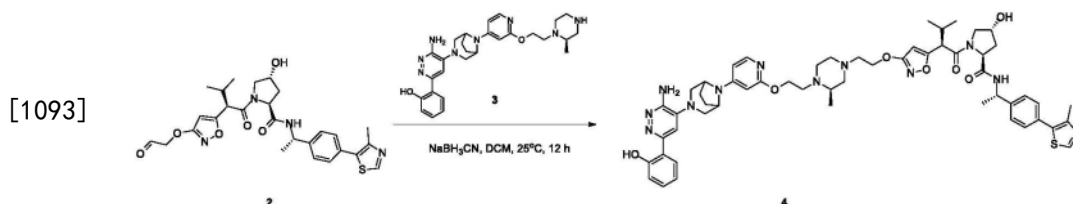
[1088] 实验:

[1089] 制备化合物2的一般程序:



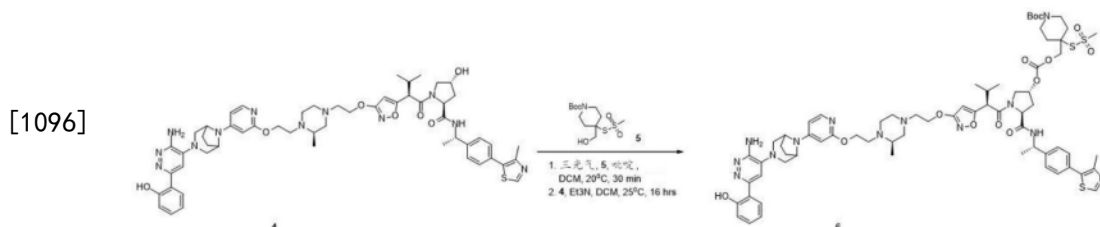
[1091] 将含化合物1 (120.00mg, 0.20mmol) 的二氯甲烷 (2.00mL) 和三氟乙酸 (0.40mL) 溶液在25℃搅拌1小时。TLC (含10% MeOH的DCM, $R_f=0.6$) 显示大部分起始材料已消耗, 并形成了新斑点。然后向混合物中添加水 (3.00mL) 并用饱和 NaHCO_3 (8.00mL) 调节至 $\text{pH}=9$ 。然后将混合物用二氯甲烷 (15mL $\times$ 3) 萃取。浓缩有机层, 以得到白色固体状粗制化合物2 (90.00mg, 85.3%)。LCMS (5-95, AB, 1.5min): $R_T=0.789\text{min}$, $m/z=541.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[1092] 制备化合物4的一般程序:



[1094] 向含化合物3 (75.50mg, 0.14mmol) 和化合物2 (90.00mg, 0.14mmol) 的甲醇 (5.00mL) 和二氯甲烷 (5.00mL) 的溶液中添加氰基硼氢化钠 (12.9mg, 0.20mmol) 和乙酸钠 (16.80mg, 0.20mmol)。将混合物在25℃搅拌12小时。TLC (含12% MeOH的DCM, $R_f=0.6$) 显示大部分起始材料已消耗, 并形成了新斑点。过滤混合物, 并将滤液浓缩并通过制备型TLC (含12% MeOH的DCM溶液) 纯化, 以得到白色固体状化合物4 (40.00mg, 28.1%)。LCMS (5-95, AB, 1.5min): $R_T=0.755\text{min}$, $m/z=1041.2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[1095] 制备化合物6的一般程序:

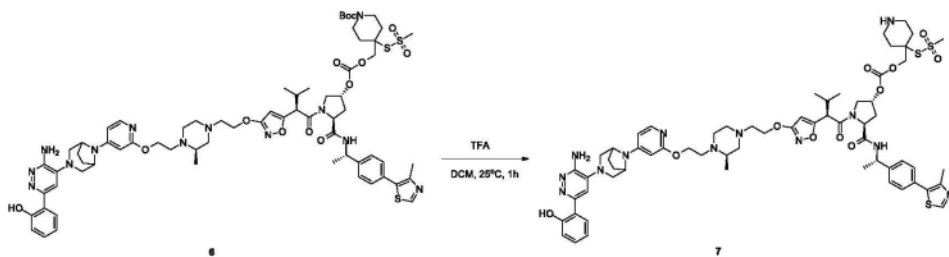


[1097] 向含三光气 (18.3mg, 0.062mmol) 和4A分子筛的二氯甲烷 (2.0mL) 的混合物中添加含4-(羟甲基)-4-甲基磺酰基硫烷基-哌啶-1-甲酸叔丁酯 (20.0mg, 0.062mmol) 和吡啶 (0.02mL, 0.184mmol) 的二氯甲烷 (2.0mL) 溶液。将反应混合物在20℃搅拌30分钟。浓缩反应混合物得到粗制品, 其直接用于下一步。

[1098] 向含上述粗制品和4 Å MS (100mg) 的无水二氯甲烷 (5.00mL) 中添加含N,N-二异丙基乙胺 (0.02mL, 0.09mmol) 和化合物4 (30.00mg, 0.03mmol) 的无水N,N-二甲基甲酰胺 (2.00mL) 溶液中。将混合物在25℃搅拌16小时。TLC (含11% MeOH的DCM, $R_f=0.6$) 显示大部分起始材料已消耗, 并形成了新斑点。将混合物过滤并浓缩以得到粗制品, 将其通过制备型TLC (含11% MeOH的DCM) 纯化以得到淡黄色固体状化合物6 (25.00mg, 62.3%)。LCMS (10-80, AB, 7.0min): $R_T=3.096\text{min}$, $m/z=697.1$ $[\text{M}/2+\text{H}]^+$ 。

[1099] 制备化合物7的一般程序:

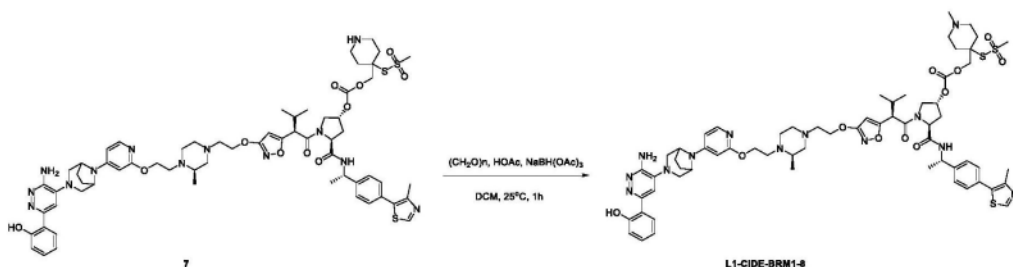
[1100]



[1101] 向含化合物6 (20.00mg, 0.01mmol) 的二氯甲烷 (1.00mL) 溶液中添加三氟乙酸 (0.80mL, 10.38mmol)。将混合物在25℃搅拌1小时。将混合物浓缩以得到粗制品7, 其作为TFA盐直接用于下一步。

[1102] 制备L1-CIBE-BRM1-8的一般程序:

[1103]

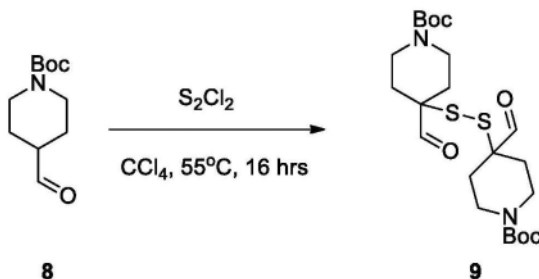


[1104] 向含甲醛 (4.3mg, 0.14mmol) 和化合物7 (20.20mg, 0.01mmol) 的二氯甲烷 (2mL) 和甲醇 (1mL) 的溶液中添加乙酸 (1.00mg)。将混合物在25℃搅拌30分钟。然后, 添加三乙酰氧基硼氢化钠 (9.2mg, 0.04mmol)。将混合物在25℃搅拌1小时。然后将混合物用DCM (15mL) 稀释并且用饱和NaHCO₃ (5mL) 洗涤, 并浓缩有机层, 然后利用反相色谱法纯化残余物 (含乙腈14-44/0.225% FA的水溶液), 以得到白色固体状L1-CIBE-BRM1-8 (3.60mg, 18.2%)。

[1105] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ = 8.99 (s, 1H), 8.49 (d, J = 8.0Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.0Hz, 1H), 7.78 (d, J = 6.0Hz, 1H), 7.49-7.36 (m, 6H), 7.22-7.20 (m, 1H), 6.88-6.85 (m, 2H), 6.54-6.52 (m, 1H), 6.13 (d, J = 8.0Hz, 2H), 5.97-5.94 (m, 2H), 5.25-5.21 (m, 1H), 4.93-4.89 (m, 1H), 4.52-4.43 (m, 6H), 4.26-4.21 (m, 6H), 3.87 (br s, 1H), 3.72 (d, J = 9.2Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.02-2.96 (m, 4H), 2.61 (br s, 4H), 2.46-2.33 (m, 10H), 2.20-2.14 (m, 6H), 1.96-1.89 (m, 10H), 1.38 (d, J = 7.2Hz, 3H), 0.99-0.95 (m, 6H), 0.81 (d, J = 6.4Hz, 3H)。LCMS (5-95, AB, 1.5min): R_T = 0.781min, m/z = 1306.5 [M+H]⁺。

[1106] 制备化合物9的一般程序:

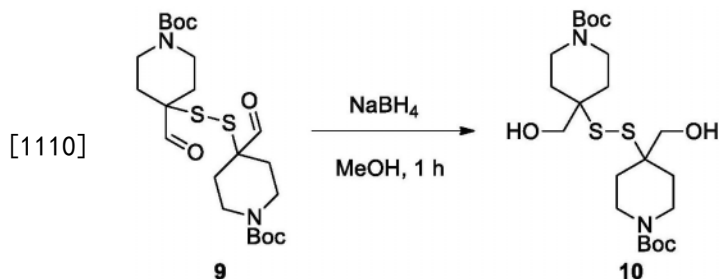
[1107]



[1108] 在55℃向含4-甲酰基-1-哌啶甲酸叔丁酯 (9870.7mg, 46.28mmol) 的四氯化碳 (150mL) 的混合物中添加二氯化二硫 (1.48mL, 18.51mmol), 将混合物在55℃搅拌16小时, TLC (含10%甲醇的二氯甲烷, R_f = 0.5) 指示反应完成。过滤混合物, 并且在真空中浓缩有机层。向残余物中添加水 (30mL) 并用二氯甲烷 (3x50mL) 萃取, 合并有机层并用Na₂SO₄干燥, 过

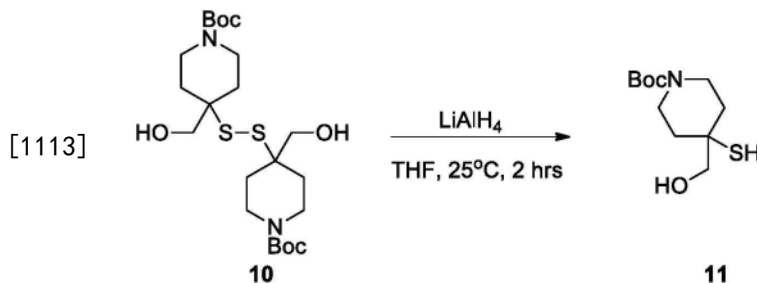
滤并浓缩得到粗制品,其通过制备型TLC(含10%甲醇的二氯甲烷, $R_f=0.5$)纯化,以得到白色固体状4-[(1-叔丁氧基羰基-4-甲酰基-4-哌啶基)二硫烷基]-4-甲酰基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(5.5g,60.8%)。 ^1H NMR(400MHz,氯仿-d): $\delta=9.06(\text{s},2\text{H}), 3.73(\text{br s},4\text{H}), 3.18-3.11(\text{m},4\text{H}), 2.07-2.02(\text{m},4\text{H}), 1.74-1.69(\text{m},4\text{H}), 1.46(\text{s},18\text{H})$ 。

[1109] 制备化合物10的一般程序:



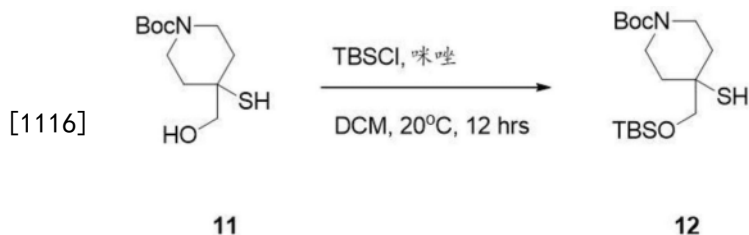
[1111] 向含4-[(1-叔丁氧基羰基-4-甲酰基-4-哌啶基)二硫烷基]-4-甲酰基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(3000.0mg,6.14mmol)的甲醇(40mL)的混合物中添加硼氢化钠(696.7mg,18.42mmol),将混合物在25℃搅拌1小时,TLC(含10%甲醇的二氯甲烷, $R_f=0.5$)显示新斑点,通过添加水(30mL)终止反应,并用二氯甲烷(3x30mL)萃取所得混合物,合并有机层并用 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩以得到粗制品,该粗制品通过硅胶色谱法(用含0-3%甲醇的二氯甲烷洗脱)纯化,以得到白色固体状4-[[1-叔丁氧基羰基-4-(羟甲基)-4-哌啶基]二硫烷基]-4-(羟甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(3000mg,99%)。 ^1H NMR(400MHz,氯仿-d): $\delta=3.75-3.72(\text{m},4\text{H}), 3.59(\text{s},4\text{H}), 3.32-3.26(\text{m},4\text{H}), 1.75-1.67(\text{m},8\text{H}), 1.46(\text{s},18\text{H})$ 。

[1112] 制备化合物11的一般程序:



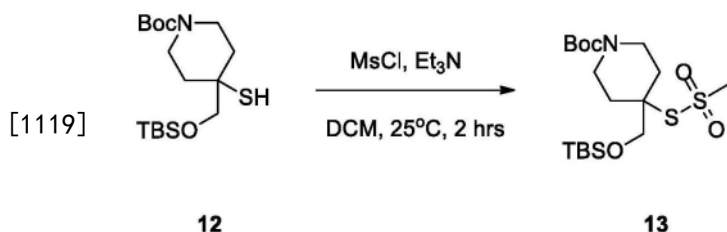
[1114] 向氢化铝锂(1232.4mg,32.47mmol)在四氢呋喃(40mL)的悬浮液中滴加含4-[[1-叔丁氧基羰基-4-(羟甲基)-4-哌啶基]二硫烷基]-4-(羟甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(3200.0mg,6.49mmol)的四氢呋喃(40mL)溶液。将形成的混合物在氮气下于25℃搅拌2小时。将反应用 NH_4Cl 水溶液(10mL)淬灭,并用乙酸乙酯(30mL x 3)萃取。有机层用无水硫酸钠干燥,在真空下浓缩,以得到粗制品4-(羟甲基)-4-巯基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(2700mg,100%),其直接用于下一步。 ^1H NMR(400MHz,氯仿-d): $\delta=3.96-3.92(\text{m},2\text{H}), 3.52(\text{s},2\text{H}), 3.27-3.21(\text{m},2\text{H}), 1.64-1.61(\text{m},4\text{H}), 1.47(\text{s},9\text{H})$ 。

[1115] 制备化合物12的一般程序:



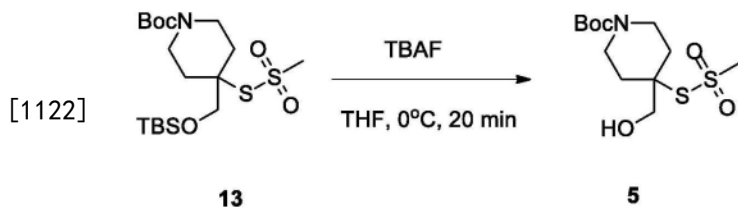
[1117] 向含咪唑 (1783.5mg, 26.2mmol) 和 4-(羟甲基)-4-硫基-哌啶-1-甲酸叔丁酯 (2700.0mg, 10.92mmol) 的二氯甲烷 (40mL) 溶液中添加含叔丁基二甲基氯硅烷 (2467.8mg, 16.37mmol) 的二氯甲烷 (40mL)。将混合物在 20°C 连续搅拌 12 小时。TLC (含 20% 乙酸乙酯的石油醚, $R_f=0.58$) 表明反应完成。然后将混合物用水 (20mL) 洗涤, 有机层经无水硫酸钠干燥并在真空下浓缩, 使用硅胶色谱法纯化粗制品 (含 10% 乙酸乙酯的石油醚, $R_f=0.58$), 以得到 4-[[叔丁基(二甲基)硅基]氧甲基]-4-硫基-哌啶-1-甲酸叔丁酯 (3800mg, 96.3%)。 ^1H NMR (400MHz, 氯仿): $\delta=3.96-3.92(\text{m}, 2\text{H}), 3.52(\text{s}, 2\text{H}), 3.20-3.13(\text{m}, 2\text{H}), 1.72-1.65(\text{m}, 2\text{H}), 1.52-1.49(\text{m}, 2\text{H}), 1.45(\text{s}, 9\text{H}), 0.90(\text{s}, 9\text{H}), 0.06(\text{s}, 6\text{H})$ 。

[1118] 制备化合物 13 的一般程序:



[1120] 在 N_2 保护下, 向含甲磺酰氯 (2.51g, 21.91mmol) 的二氯甲烷 (20mL) 溶液中滴加含 4-[[叔丁基(二甲基)硅基]氧甲基]-4-硫基-哌啶-1-甲酸叔丁酯 (3.8g, 10.51mmol) 和三乙胺 (5.45mL, 42.03mmol) 的二氯甲烷 (20mL) 溶液。将混合物在 25°C 搅拌 2 小时。TLC (含 20% 乙酸乙酯的石油醚, $R_f=0.3$) 显示新斑点。将反应用水 (30mL) 淬灭, 并用二氯甲烷 (30mL $\times$ 3) 萃取。将有机层浓缩并通过硅胶柱纯化 (用含 0-10% 乙酸乙酯的石油醚洗脱), 以得到白色固体状 4-[[叔丁基(二甲基)硅基]氧甲基]-4-甲基磺酰基硫烷基-哌啶-1-甲酸叔丁酯 (1670mg, 36.1%)。 ^1H NMR (400MHz, 氯仿): $\delta=3.94-3.88(\text{m}, 4\text{H}), 3.39(\text{s}, 3\text{H}), 3.26-3.20(\text{m}, 1\text{H}), 1.99-1.95(\text{m}, 2\text{H}), 1.86-1.80(\text{m}, 2\text{H}), 1.46(\text{s}, 9\text{H}), 0.91(\text{s}, 9\text{H}), 0.10(\text{s}, 6\text{H})$ 。LCMS (5-95, AB, 1.5min): $R_T=1.126\text{min}, m/z=340.1[\text{M}-100+\text{H}]^+$ 。

[1121] 制备化合物 5 的一般程序:

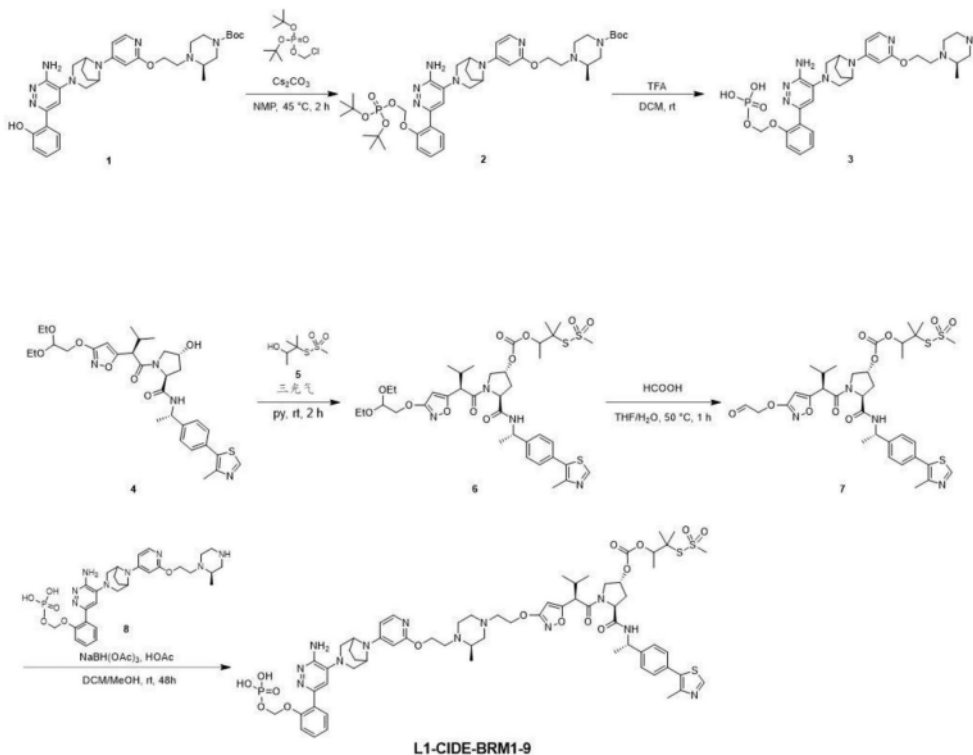


[1123] 向含 4-[[叔丁基(二甲基)硅基]氧甲基]-4-甲基磺酰基硫烷基-哌啶-1-甲酸叔丁酯 (1500.00mg, 3.41mmol) 的四氢呋喃 (10.0mL) 溶液中添加四丁基氟化铵 (5.12mL, 5.12mmol, 在 THF 中为 1mol/L)。将混合物在 0°C 搅拌 20 分钟。TLC (含 60% EtOAc 的石油醚, $R_f=0.4$) 显示大部分起始原料已消耗。向混合物中添加 EtOAc (70mL), 将有机层用水 (25mL $\times$ 2)、盐水 (25mL) 洗涤, 并浓缩有机层以得到粗制品, 将该粗制品通过硅胶柱快速色谱法 (用

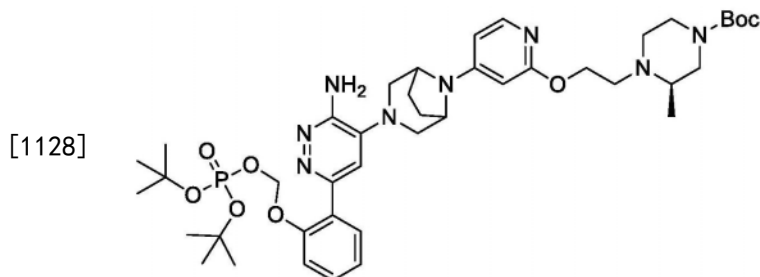
含0-60% EtOAc的石油醚洗脱)纯化,以得到无色油状4-(羟甲基)-4-甲基磺酰基硫烷基-哌啶-1-甲酸叔丁酯(670.00mg,60.4%)。¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ =3.96(s,2H),3.89-3.85(m,2H),3.43(s,3H),3.31-3.28(m,2H),2.12-2.08(m,2H),1.82-1.76(m,2H),1.47(s,9H)。

[1124] 合成实例9

[1125] L1-CIDE-BRM1-9的合成



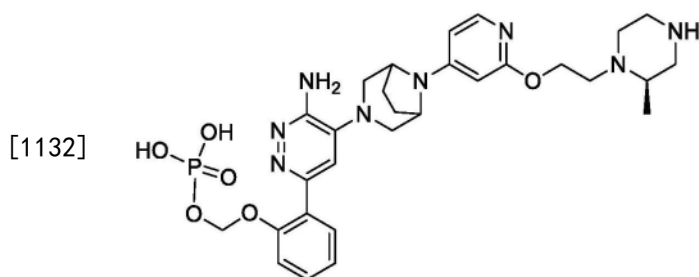
[1127] 步骤1: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((二-叔-丁氧基磷酰基)氧基)甲氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯



[1129] 向含(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(300mg,0.49mmol)的1-甲基吡咯烷-2-酮(8.0mL)溶液中添加碳酸铯(0.32g,0.97mmol)和二-叔-丁基氯甲基磷酸酯(0.19g,0.73mmol)。将反应混合物在45°C搅拌12小时。将反应混合物用水(20mL)淬灭,并用乙酸乙酯(20mL x 3)萃取。将合并的有机层用盐水(10mL x 2)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤,并且在减压下浓缩以得到残余物。利用硅胶色谱法纯化残余物(硅胶,100-200目,含0-2%甲醇的二氯甲烷),以得到黄色油状标题化合物(200mg,产率49%)。

[1130] LCMS(ESI)m/z:839.3[M+H]⁺。

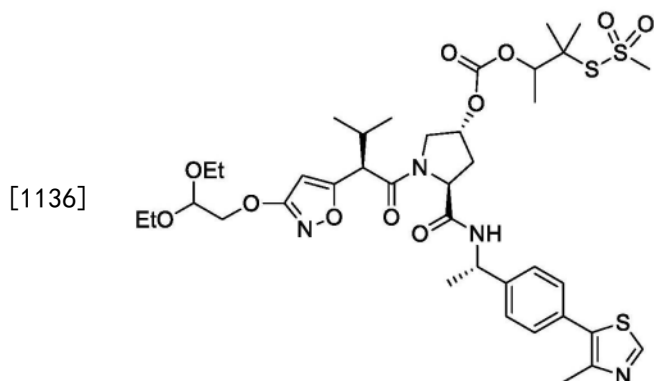
[1131] 步骤2: (2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基磷酸二氢盐



[1133] 向(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-(((二叔丁氧基磷酰基)氧基)甲氧基)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(200mg,0.24mmol)溶液中添加含5%三氟乙酸的六氟异丙醇(5.0mL)。将反应混合物在20℃搅拌3小时。将反应浓缩,并通过Column Boston Green ODS 150*30mm*5um(经水(0.225%甲酸)-乙腈(5%-35%))纯化,以得到黄色固体状标题化合物(100mg,产率56.6%)。

[1134] LCMS(ESI) m/z :627.3[M+H]⁺。

[1135] 步骤3:S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲硫代磺酸盐

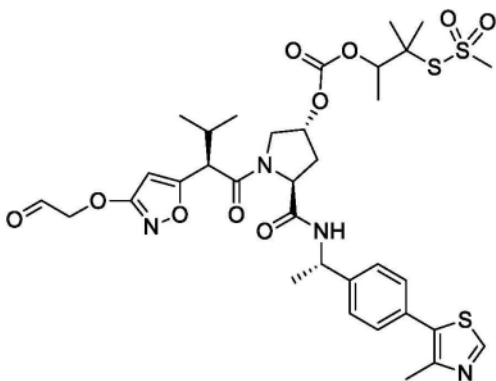


[1137] 在20℃,在16小时内向含(2S,4R)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基-N-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)吡咯烷-2-甲酰胺(380mg,0.62mmol)和三乙胺(250mg,2.47mmol)和4 Å MS(50mg)的无水二氯甲烷(5.0mL)的混合物中缓慢添加S-(3-((羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲硫代磺酸盐(322mg,1.24mmol)。将混合物通过制备型TLC(含7%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化,以得到白色固体状标题化合物(150mg,28.9%)。

[1138] LCMS(ESI) m/z :839.7[M+H]⁺。

[1139] 步骤4:S-(2-甲基-3-((((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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐

[1140]

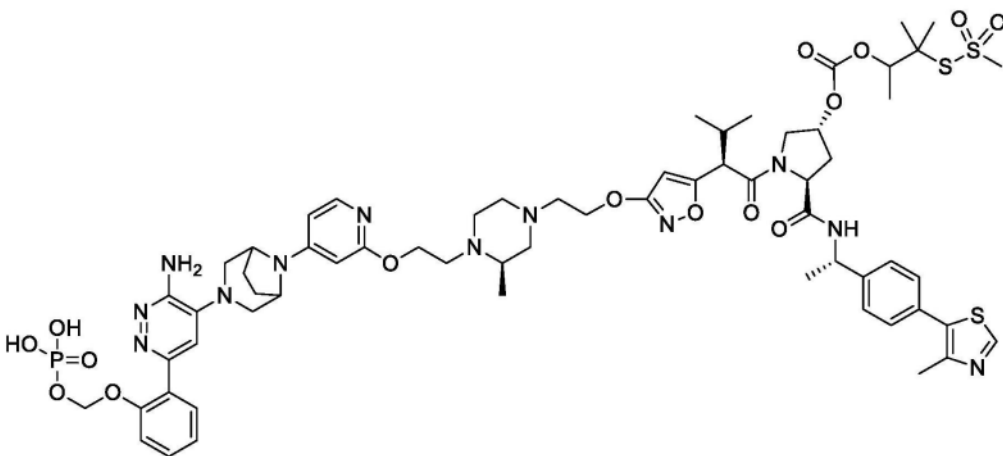


[1141] 将含S-(3-((((3R,5S)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲硫代磺酸盐(150mg,0.18mmol)的水(3.0mL)和甲酸(8.0mL)的溶液在50℃搅拌2小时。将反应混合物浓缩至干,得到白色固体状标题化合物(135mg,产率98.7%)。

[1142] LCMS(ESI) m/z :765.5[M+H]⁺。

[1143] 步骤5:S-(3-((((3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((膦酰氧基)甲氧基)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)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲硫代磺酸盐

[1144]



[1145] 向含(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)甲基磷酸二氢盐(138mg,0.19mmol)和S-(2-甲基-3-((((3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((SS)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(130mg,0.17mmol)的二氯甲烷(5.0mL)和甲醇(5.0mL)的溶液中添加三乙酰氧基硼氢化钠(720mg,3.40mmol)。将反应混合物在40℃搅拌48小时。将反应混合物通过Column Welch Xtimate C18 150*25mm*5um(经水(0.225%甲酸)-乙腈20-50%)纯化,以得到白色固体状标题化合物(54.2mg,21.3%)。

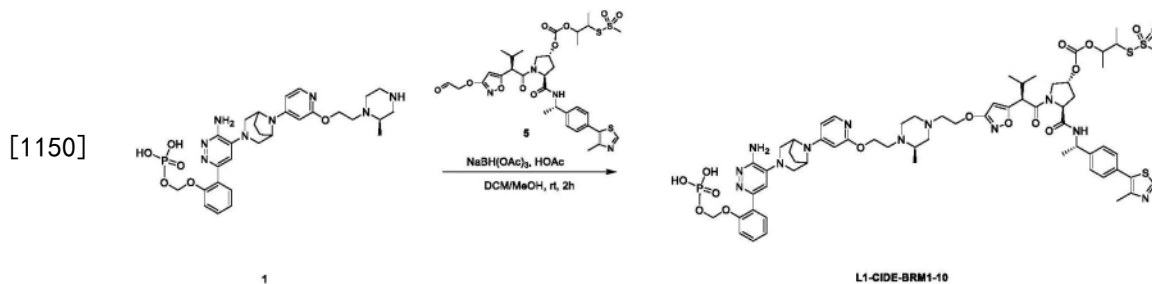
[1146] LCMS(ESI) m/z :1375.5[M+H]⁺。

[1147] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ (ppm)8.98(s,1H),8.52(d,J=8.0Hz,1H),8.14(s,2H),

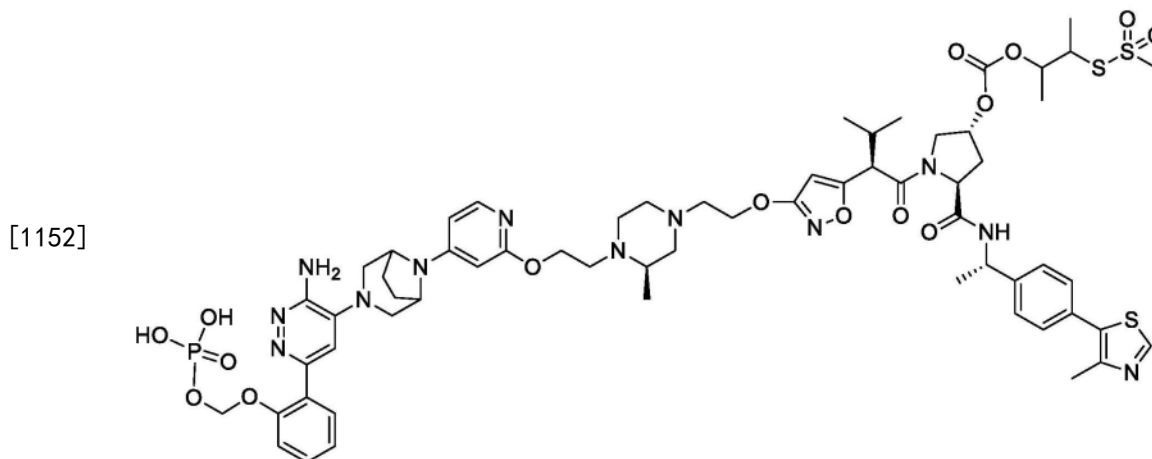
7.74(d, J=6.0Hz, 1H), 7.61(d, J=8.0Hz, 1H), 7.47-7.30(m, 5H), 7.29-7.24(m, 1H), 7.03(t, J=7.2Hz, 1H), 6.50(d, J=6.0Hz, 1H), 6.26(s, 1H), 6.12(d, J=2.4Hz, 1H), 5.79-5.75(m, 1H), 5.51-5.46(m, 2H), 5.23-5.18(m, 1H), 5.06-4.85(m, 3H), 4.48-4.35(m, 5H), 4.26-4.23(m, 2H), 3.89-3.83(m, 2H), 3.75-3.71(m, 2H), 3.09-2.99(m, 5H), 2.97-2.87(m, 4H), 2.84-2.77(m, 3H), 2.73-2.71(m, 2H), 2.46-2.44(m, 3H), 2.30-2.11(m, 5H), 2.05-1.94(m, 3H), 1.57-1.35(m, 9H), 1.33-1.22(m, 6H), 1.11-1.04(m, 4H), 0.98-0.91(m, 3H), 0.86-0.77(m, 3H)。

[1148] 合成实例10

[1149] L1-CIDE-BRM1-10的合成



[1151] 步骤1: S-(((((3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-((3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((磷酸氧基)甲氧基)苯基)吡啶-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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐



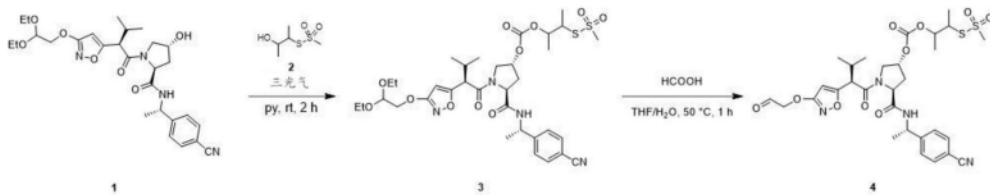
[1153] 向含S-(((((3R,5S)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)-5-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(100mg, 0.13mmol)和(2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)吡啶-3-基)苯氧基)甲基磷酸二氢盐(99.2mg, 0.16mmol)的二氯甲烷(1.00mL)和甲醇(1.00mL)的溶液中添加三乙酰氧基硼氢化钠(615mg, 2.9mmol)。将反应混合物在20℃搅拌3小时。将混合物通过Column Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3um(经水(0.225%甲酸)-乙腈10%-40%)纯化,以得到白色固体状标题化合物(110mg, 51.4%)。

[1154] LCMS(ESI)m/z: 1375.5 [M+H]⁺。

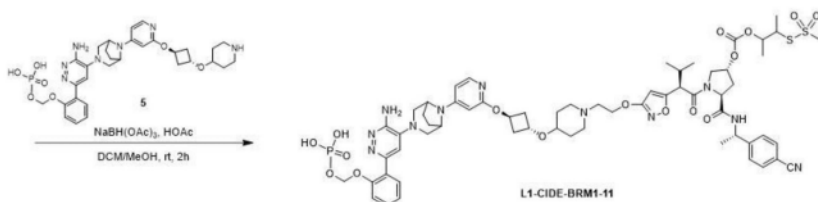
[1155] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8.99 (s, 1H), 8.51 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 8.15 (s, 2H), 7.82-7.72 (m, 1H), 7.64 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.52-7.32 (m, 6H), 7.30-7.24 (m, 1H), 7.08-7.03 (m, 1H), 6.56-6.46 (m, 1H), 6.33-6.30 (m, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.91-5.86 (m, 1H), 5.55-5.50 (m, 2H), 5.21-5.18 (m, 1H), 4.98-4.87 (m, 2H), 4.51-4.31 (m, 5H), 4.30-4.22 (m, 2H), 3.91-3.84 (m, 2H), 3.77-3.73 (m, 2H), 3.58-3.51 (m, 2H), 3.18-3.11 (m, 4H), 3.07-2.97 (m, 4H), 2.95-2.81 (m, 5H), 2.79-2.72 (m, 2H), 2.47-2.45 (m, 3H), 2.37-2.14 (m, 5H), 2.10-1.88 (m, 3H), 1.48-1.23 (m, 9H), 1.20-1.05 (m, 3H), 0.98-0.93 (m, 3H), 0.88-0.76 (m, 3H)。

[1156] 合成实例11

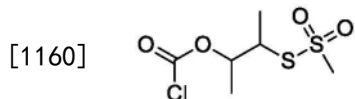
[1157] L1-CIDE-BRM1-11的合成



[1158]

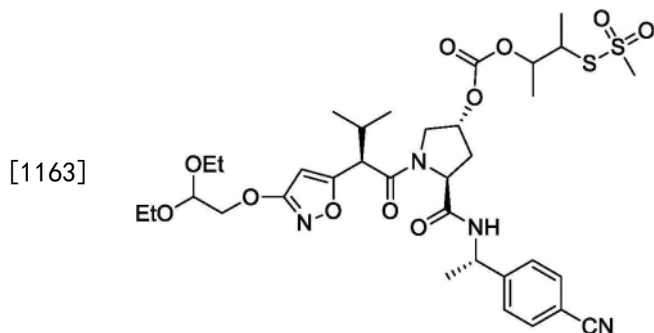


[1159] 步骤1:S-(3-((氯羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐



[1161] 向含S-(3-羟基丁-2-基)甲硫代磺酸盐 (200mg, 1.09mmol) 和吡啶 (343mg, 4.34mmol) 的二氯甲烷 (4.0mL) 溶液中添加含三光气 (129mg, 0.43mmol) 的二氯甲烷 (2.0mL)。将反应混合物在25℃搅拌30分钟。将反应混合物浓缩至干,以得到黄色油状标题化合物 (250mg, 产率93.4%), 直接用于下一步。

[1162] 步骤2:S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐

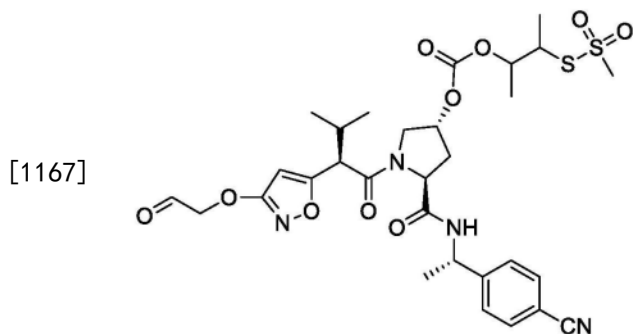


[1164] 在20℃,在16小时内向含(2S,4R)-N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((R)-2-(3-

(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(260mg, 0.48mmol)、三乙胺(194mg, 1.92mmol)和4 Å MS(80mg)的无水DCM(4.0mL)的混合物中缓慢添加含S-(3-(((氯羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(250mg, 1.01mmol)的无水二氯甲烷(2.0mL)。过滤反应混合物并将滤液通过快速色谱法(硅胶, 100-200目, 含0-70%乙酸乙酯的石油醚)纯化, 以得到黄色油状标题化合物(150mg, 41.6%)。

[1165] LCMS (ESI) m/z : 752.9 $[M+H]^+$ 。

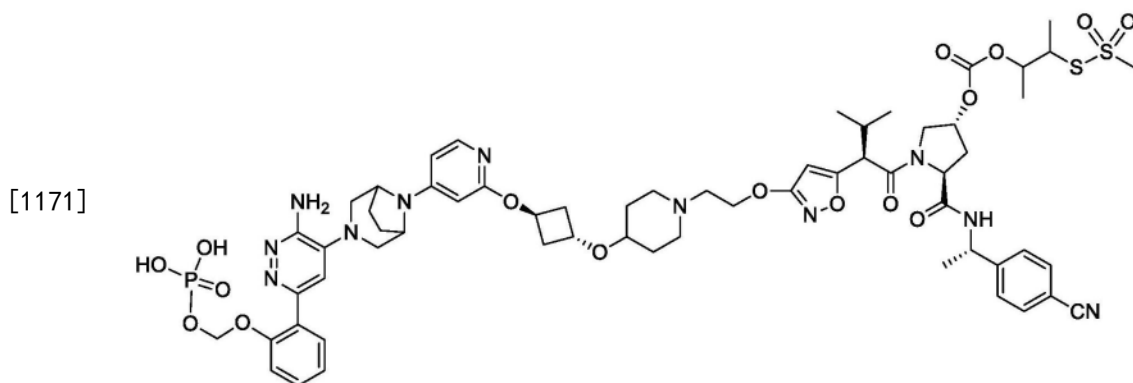
[1166] 步骤3: S-(3-((((3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噁唑-5-基)丁酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐



[1168] 将含S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(150mg, 0.20mmol)的甲酸(5.0mL)和水(1.0mL)的溶液在50℃搅拌16小时。将反应混合物浓缩至干, 以得到黄色油状标题化合物(100mg, 产率73.9%)。

[1169] LCMS (ESI) m/z : 679.5 $[M+H]^+$ 。

[1170] 步骤4: S-(3-((((3R,5S)-1-((2R)-2-(3-(2-(4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((磷酸氧基)甲氧基)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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐



[1172] 向含(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)磷酸二氢甲酯(169mg, 0.22mmol)和S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)丁-2-基)甲硫代磺酸盐(150mg, 0.22mmol)的二氯甲烷(5.0mL)和甲醇(5.0mL)的溶液中添加三乙酰氧

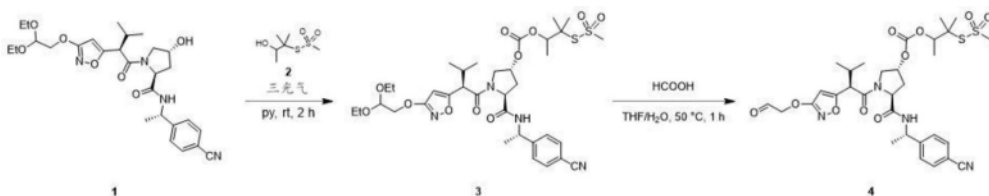
基硼氢化钠(1.40g, 6.63mmol)。将反应混合物在20℃搅拌48小时。将反应混合物通过Column Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3um(经水(0.225%甲酸)-乙腈10-40%)纯化,以得到白色固体状标题化合物(25.6mg, 产率8.8%)。

[1173] LCMS (ESI) m/z : 659.1 $[M/2+H]^+$ 。

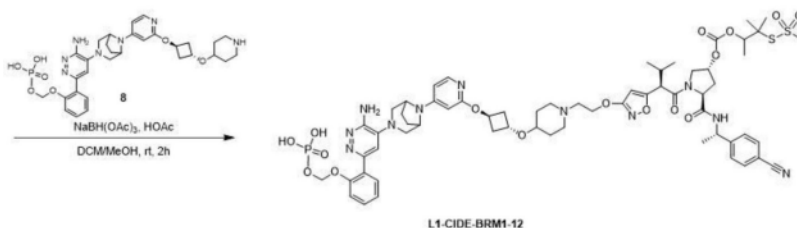
[1174] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8.58 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.82-7.74 (m, 3H), 7.55 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.50-7.43 (m, 3H), 7.39-7.34 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15-7.09 (m, 1H), 6.54-6.51 (m, 1H), 6.37-6.21 (m, 2H), 6.16-6.10 (m, 2H), 5.57-5.52 (m, 2H), 5.18-5.12 (m, 2H), 4.99-4.87 (m, 2H), 4.52-4.44 (m, 2H), 4.40-4.22 (m, 4H), 3.87-3.82 (m, 2H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.60-3.50 (m, 2H), 3.15-3.00 (m, 2H), 2.96-2.79 (m, 4H), 2.69-2.64 (m, 1H), 2.35-2.18 (m, 9H), 2.16-2.09 (m, 2H), 2.02-1.74 (m, 6H), 1.53-1.23 (m, 12H), 0.95-0.91 (m, 3H), 0.85-0.74 (m, 3H)。

[1175] 合成实例12

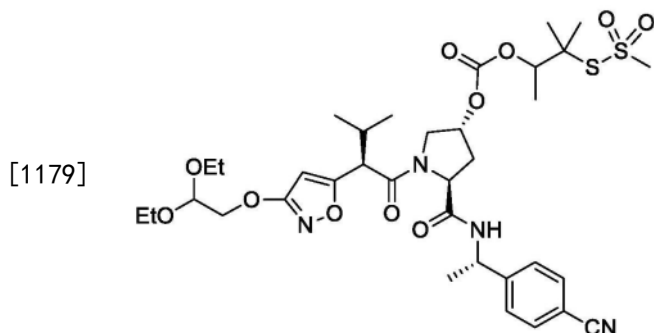
[1176] L1-CIDE-BRM1-12的合成



[1177]



[1178] 步骤1:S-(3-((((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)氧基)羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲硫代磺酸盐



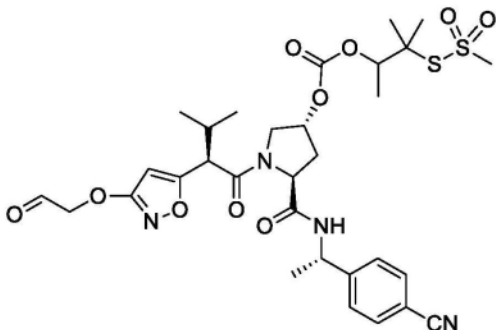
[1180] 在20℃,在16小时内向含(2S,4R)-N-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)-1-((R)-2-(3-(2,2-二乙氧基乙氧基)异噁唑-5-基)-3-甲基丁酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酰胺(300mg, 0.55mmol)、吡啶(175mg, 2.21mmol)和4 Å MS(100mg)的无水二氯甲烷(5.0mL)的混合物中缓慢添加含S-(3-((氯羰基)氧基)-2-甲基丁-2-基)甲硫代磺酸盐(259mg, 1.00mmol)的无水二氯甲烷(2mL)。将反应混合物通过制备型TLC(含7%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化,以得到

白色固体状标题化合物(60.0mg, 14.2%)。

[1181] LCMS (ESI) m/z : 722.1 $[M+H]^+$ 。

[1182] 步骤3: S- (3- (((((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) 氧基) 羰基) 氧基) -2-甲基丁-2-基) 甲硫代磺酸盐

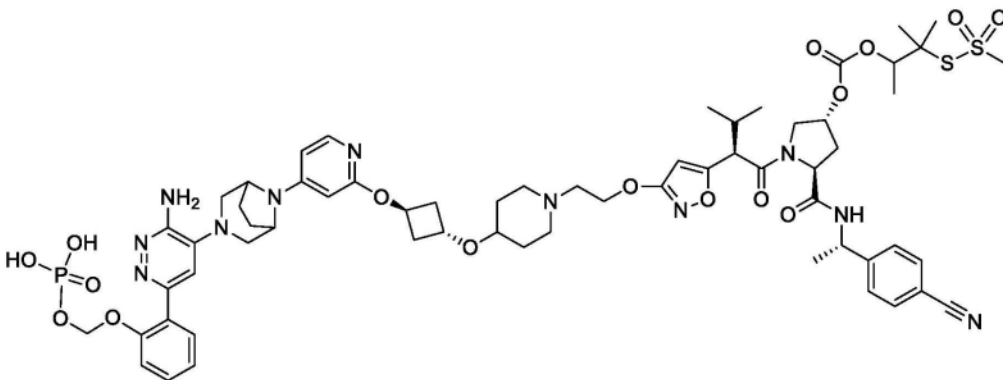
[1183]



[1184] 含S- (3- (((((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) 氧基) 羰基) 氧基) -2-甲基丁-2-基) 甲硫代磺酸盐 (60.0mg, 0.08mmol) 的水 (1.00mL) 和甲酸 (5.00mL) 的溶液。将反应混合物在50℃搅拌2小时。将所得残余物浓缩, 以得到白色固体状标题化合物 (50mg, 92.2%)。LCMS (ESI) m/z : 693.2 $[M+H]^+$ 。

[1185] 步骤4: S- (3- (((((3R, 5S) -1- ((2R) -2- (3- (2- (4- ((1r, 3r) -3- ((4- (3- (3-氨基-6- (2- ((磷酸氧基) 甲氧基) 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) 氧基) 羰基) 氧基) -2-甲基丁-2-基) 甲硫代磺酸盐

[1186]



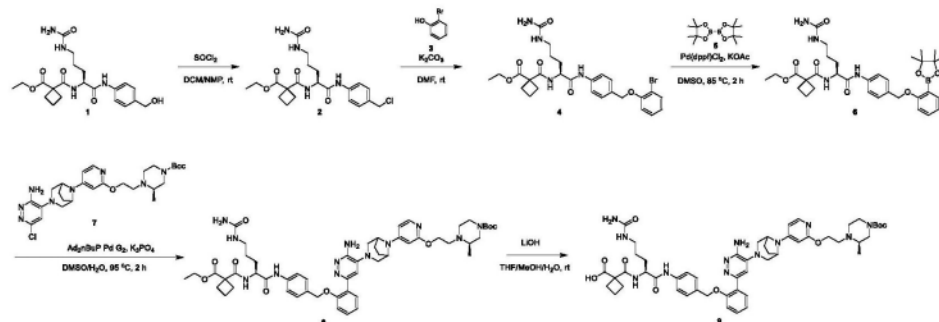
[1187] 向含(2- (6-氨基-5- (8- (2- ((1r, 3r) -3- (哌啶-4-基氧基) 环丁氧基) 吡啶-4-基) -3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基) 哒嗪-3-基) 苯氧基) 磷酸二氢甲酯 (138.51mg, 0.18mmol) 和S- (3- (((((3R, 5S) -5- ((S) -1- (4-氰基苯基) 乙基) 氨基甲酰基) -1- ((R) -3-甲基-2- (3- (2-氧代乙氧基) 异噁唑-5-基) 丁酰基) 吡咯烷-3-基) 氧基) 羰基) 氧基) -2-甲基丁-2-基) 甲硫代磺酸盐 (125mg, 0.18mmol) 的二氯甲烷 (5.00mL) 和甲醇 (5.00mL) 的溶液中添加三乙酰氧基硼氢化钠 (38.0mg, 0.18mmol)。将反应混合物在20℃搅拌36小时。将反应混合物通过Column Welch Xtimate C18 150*25mm*5um (经水 (0.225% 甲酸) -乙腈17-47%) 纯化, 以得到白色固体状标题化合物 (15.9mg, 产率50.4%)。

[1188] LCMS (ESI) m/z : 666.1 $[M/2+H]^+$ 。

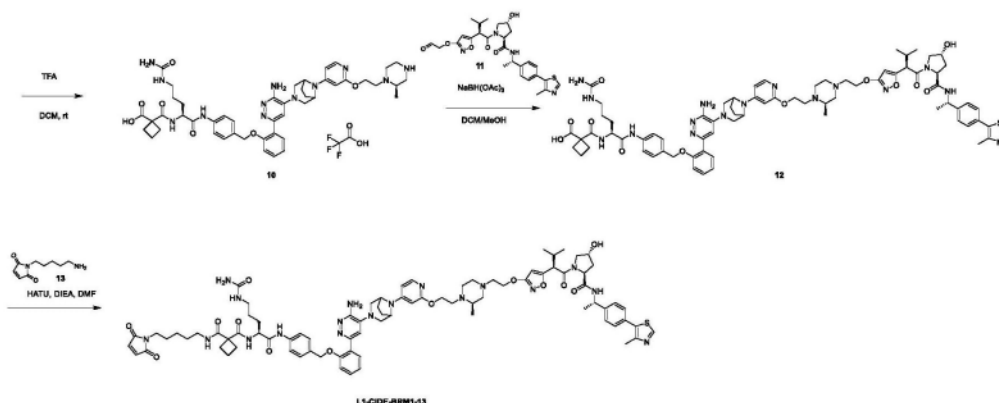
[1189] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 8.61-8.56 (m, 1H), 7.81-7.73 (m, 3H), 7.57-7.42 (m, 4H), 7.38-7.32 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.15-7.08 (m, 1H), 6.54-6.50 (m, 1H), 6.29-6.25 (m, 2H), 6.15-6.10 (m, 2H), 5.58-5.52 (m, 2H), 5.22-5.11 (m, 2H), 5.04-5.01 (m, 1H), 4.94-4.91 (m, 1H), 4.49-4.45 (m, 2H), 4.41-4.36 (m, 1H), 4.28-4.25 (m, 3H), 3.90-3.82 (m, 2H), 3.75-3.71 (m, 2H), 3.56-3.51 (m, 1H), 3.10-2.82 (m, 5H), 2.31-2.18 (m, 7H), 2.16-2.09 (m, 2H), 2.02-1.77 (m, 5H), 1.56-1.40 (m, 11H), 1.39-1.20 (m, 8H), 1.16-1.12 (m, 1H), 0.95-0.91 (m, 3H), 0.85-0.76 (m, 4H)。

[1190] 合成实例13

[1191] L1-CIDE-BRM1-13的合成

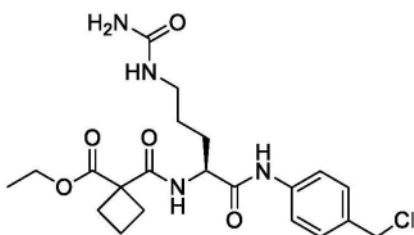


[1192]



[1193] 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)环丁烷甲酸乙酯

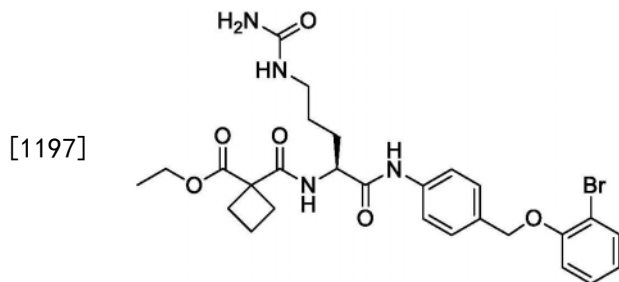
[1194]



[1195] 在25℃向含(S)-1-((1-((4-(羟甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯(1.4g, 3.22mmol)的二氯甲烷(50.0mL)和NMP(1.0mL)的溶液中添加亚硫酰氯(0.70mL, 9.67mmol)。将反应混合物在25℃搅拌3小时。将反应混合物通过快速色谱法(硅胶, 100-200目, 含0-5%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化, 以得到黄色油状标题化合物(1.40g, 产率96%)。

[1196] 步骤2: (S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-

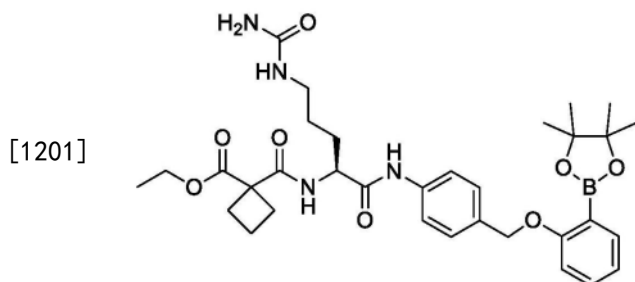
基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯



[1198] 在25℃向含(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)环丁烷甲酸乙酯(1.40g, 3.09mmol)和碳酸钾₃(1.07g, 7.73mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(60mL)溶液中添加2-溴苯酚(0.54mL, 4.64mmol)。将反应在25℃搅拌3小时。将反应用水(30.0mL)稀释,并用二氯甲烷(50.0mL x 3)萃取。将合并的有机层用盐水(20.0mL x 2)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,并将其浓缩至干。利用快速色谱法纯化残余物(硅胶, 100-200目, 含0-5%甲醇的二氯甲烷),以得到白色固体状标题化合物(1.1g, 产率60%)。

[1199] LCMS (ESI) m/z: 590.7 [M+H]⁺。

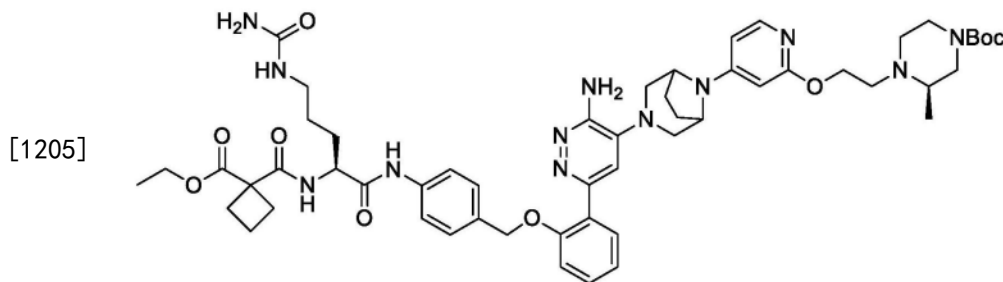
[1200] 步骤3: (S)-1-((1-氧代-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯



[1202] 向含(S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯(1.10g, 1.87mmol)和双(频哪醇合)二硼(711mg, 2.80mmol)的二甲基亚砜(20.0mL)溶液中添加Pd(dppf)Cl₂(137mg, 0.19mmol)和醋酸钾(549mg, 5.60mmol)。将混合物在N₂下于100℃搅拌3小时。混合物粗制品直接用于下一步。

[1203] LCMS (ESI) m/z: 637.1 [M+H]⁺。

[1204] 步骤4: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)苯基)吡啶-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

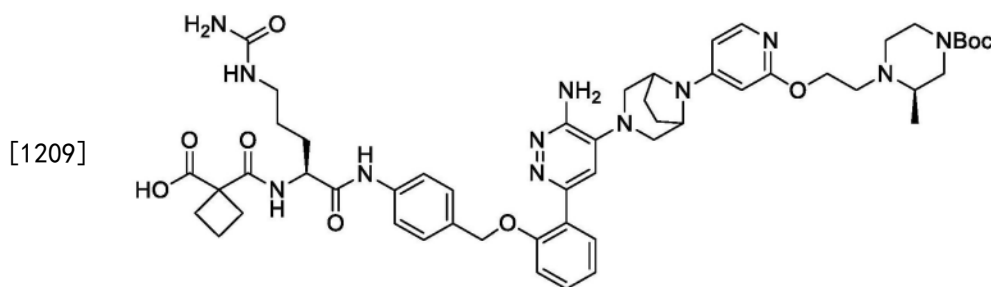


[1206] 向含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-氯吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(750mg, 1.28mmol)和正磷酸

三钾(814mg, 3.84mmol)的二甲基亚砜(15.0mL)和H₂O(1.00mL)的溶液中添加氯[(二(1-金刚烷基)-正丁基膦)-2-(2-氨基联苯)]钯(II)(171mg, 0.26mmol)和(S)-1-((1-氧代-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯(832mg, 1.31mmol)。将混合物在N₂下于100℃搅拌3小时。将反应通过硅胶柱色谱法(硅胶, 100-200目, 含0-15%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化, 以得到黑色油状标题化合物(400mg, 产率28%)。

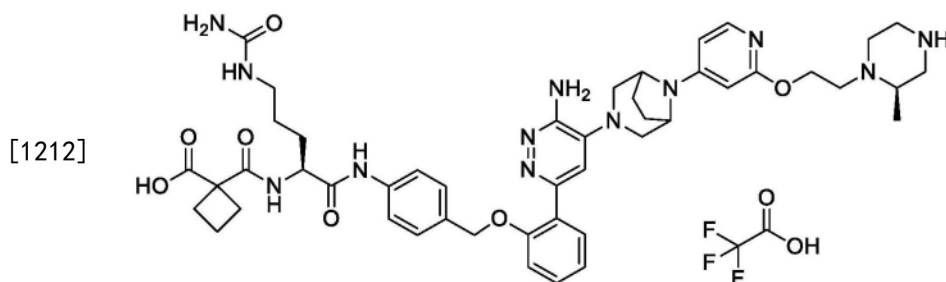
[1207] LCMS(ESI)m/z:1251.0[M+H]⁺。

[1208] 步骤5:1-(((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)环丁烷甲酸



[1210] 向含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷甲酰氨基)-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(400mg, 0.39mmol)的甲醇(5.0mL)和水(2.0mL)的溶液中添加单水氢氧化锂(92.7mg, 3.87mmol)。将混合物在N₂下于25℃搅拌3小时。将反应混合物浓缩至干, 以得到黑色固体状标题化合物(300mg, 产率77.1%)。LCMS(ESI)m/z:1005.6[M+H]⁺。

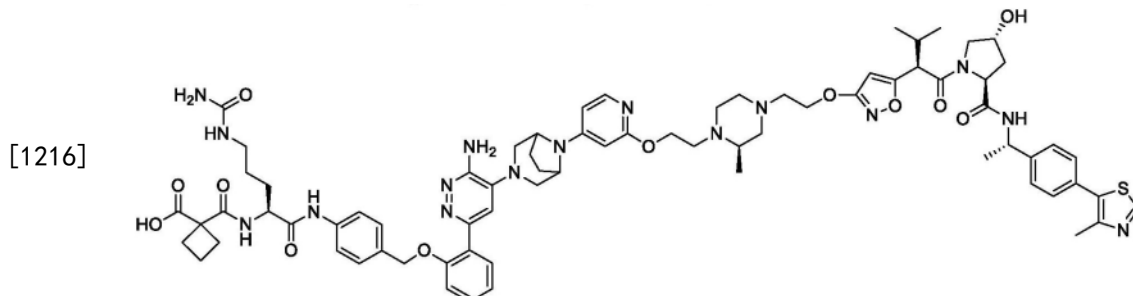
[1211] 步骤6:1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯



[1213] 向含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)环丁烷甲酸(300mg, 0.3mmol)的二氯甲烷(20.0mL)溶液中添加三氟乙酸(0.20mL, 3.00mmol)。将溶液在20℃搅拌5小时, 然后浓缩至干。利用制备型HPLC纯化粗制品, 所用条件如下:(色谱柱:Welch Xtimate C18 100*40mm*3um;流动相:12-42%水(0.075%三氟乙酸-乙腈), 以得到白色固体状标题化合物(89mg, 32.9%)。

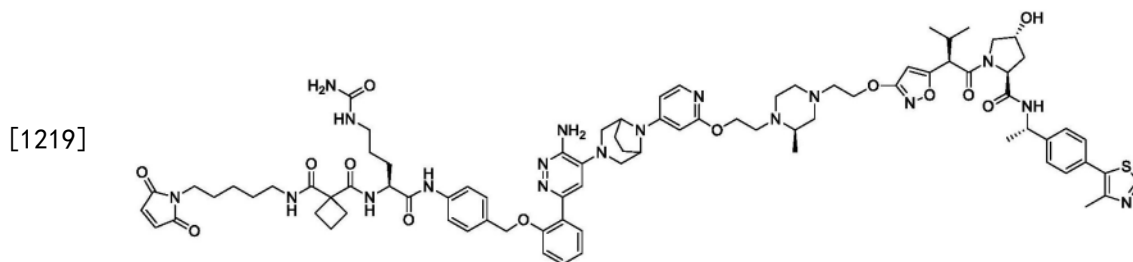
[1214] LCMS (ESI) m/z : 905.5 $[M+H]^+$ 。

[1215] 步骤7: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-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)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)环丁烷甲酸



[1217] 向含(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(86.02mg, 0.16mmol)和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)环丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯(96.0mg, 0.11mmol)的二氯甲烷(1.50mL)和甲醇(1.50mL)的溶液中添加氰基硼氢化钠(13.6mg, 0.21mmol)。将反应混合物在20℃搅拌3小时。所得溶液通过Phenomenex Gemini-NX 80*40mm*3um(乙腈17-47%/0.05% $NH_3 \cdot H_2O$ 水溶液)纯化,以得到白色固体状标题化合物(89.0mg, 产率58.7%)。LCMS (ESI) m/z : 1429.9 $[M+H]^+$ 。

[1218] 步骤8: N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-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)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)-N-(5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)环丁烷-1,1-二甲酰胺



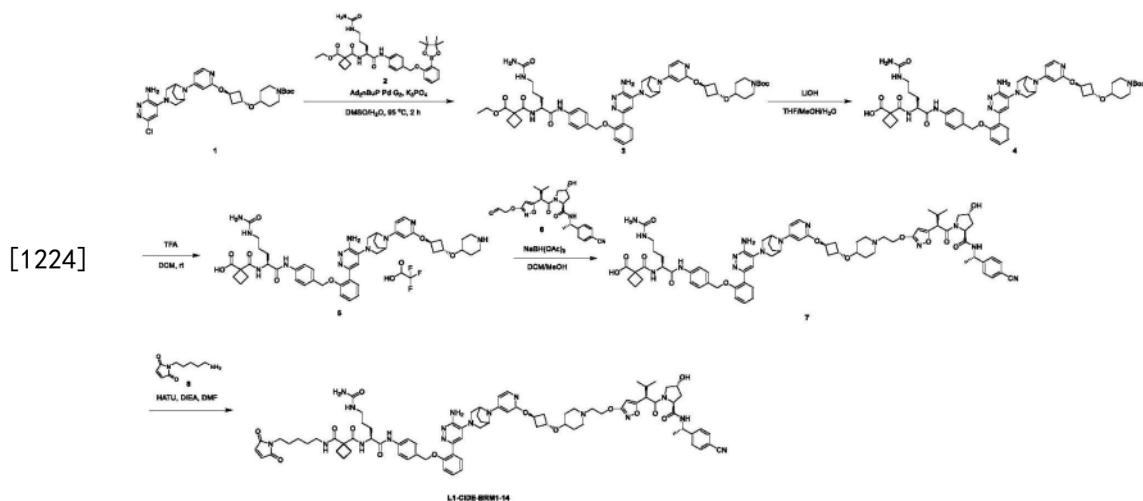
[1220] 向含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸(50.0mg, 0.03mmol)和1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮2,2,2-三氟乙酸(12.4mg, 0.04mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(4.0mL)的混合物中添加N,

N-二异丙基乙胺(0.02mL,0.10mmol)和2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(16.0mg,0.04mmol)。将混合物在25℃搅拌3小时。通过油泵将反应混合物浓缩至干。利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5um,水(0.075%三氟乙酸)-乙腈,20-50%),以得到白色固体状标题化合物(33.6mg,59.7%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆):δ(ppm) 10.19(s,1H),9.02-8.86(m,1H),8.39(d,J=8.0Hz,1H),7.94(d,J=6.8Hz,1H),7.87-7.78(m,2H),7.65(d,J=8.0Hz,2H),7.51-7.41(m,5H),7.36(d,J=6.8Hz,5H),7.29-7.09(m,1H),6.97(s,2H),6.76(s,1H),6.42(s,1H),6.15-5.96(m,2H),5.07(s,2H),4.93-4.86(m,1H),4.71-4.60(m,2H),4.52-4.24(m,9H),3.66(s,4H),3.33(d,J=7.2Hz,5H),3.09-2.96(m,8H),2.45(s,3H),2.42-2.34(m,4H),2.29-2.14(m,2H),2.04(d,J=11.2Hz,3H),1.91(s,2H),1.83-1.55(m,5H),1.51-1.30(m,9H),1.19(d,J=5.8Hz,5H),0.96(d,J=6.4Hz,3H),0.86-0.75(m,3H)。

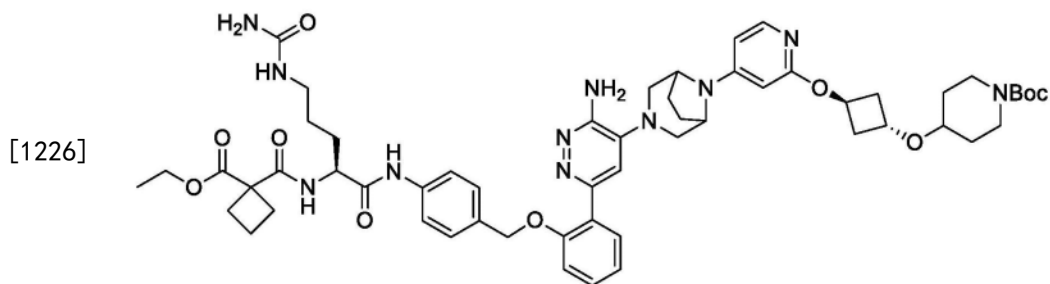
[1221] LCMS(ESI)m/z:797.5[M/2+H]⁺。

[1222] 合成实例14

[1223] L1-CIDE-BRM1-14的合成



[1225] 步骤1:4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷甲酰氨基)-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)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯

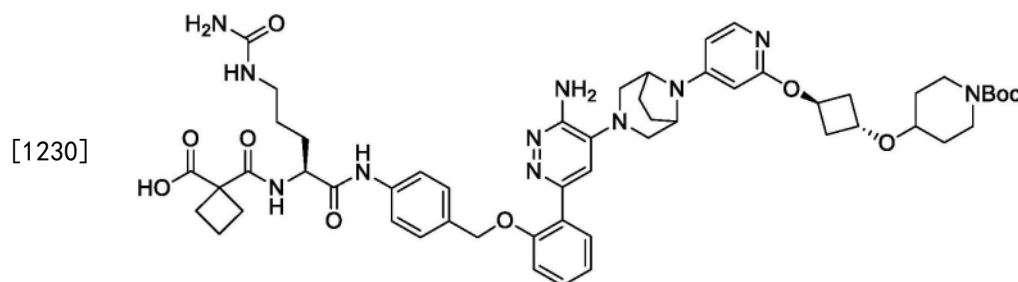


[1227] 向含4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-氯哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯(450mg,0.77mmol)和正磷酸三钾(0.19mL,2.3mmol)的二甲基亚砜(20mL)溶液中添加氯[(二(1-金刚烷基)-正丁基膦)-2-(2-氨基联苯)]钯(II)(103mg,0.15mmol)和(S)-1-((1-氧代-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰

基)环丁烷甲酸乙酯(977mg, 1.54mmol)。将混合物在N₂下于100℃搅拌3小时。将反应混合物用水(10mL)稀释,并用二氯甲烷(20mL x 3)萃取。将有机相用盐水(30mL x 2)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,以得到黑色固体状标题化合物(400mg, 49.1%)。

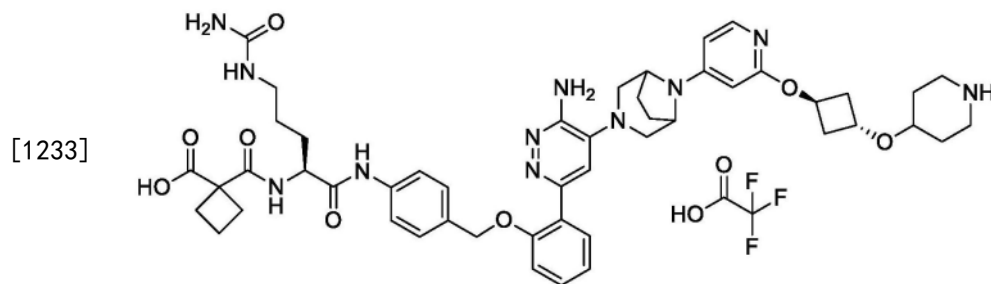
[1228] LCMS (ESI) m/z: 1060.7 [M+H]⁺。

[1229] 步骤2: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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)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)环丁烷甲酸



[1231] 向含4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷甲酰氨基)-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)环丁氧基)哌啶-1-甲酸丁酯(450mg, 0.42mmol)的甲醇(5.0mL)和水(2.0mL)的溶液中添加单水氢氧化锂(102mg, 4.24mmol)。将混合物在25℃搅拌3小时。浓缩反应混合物,以得到黑色固体状标题化合物(438mg, 产率97.5%)。LCMS (ESI) m/z: 1032.6 [M+H]⁺。

[1232] 步骤3: 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)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯

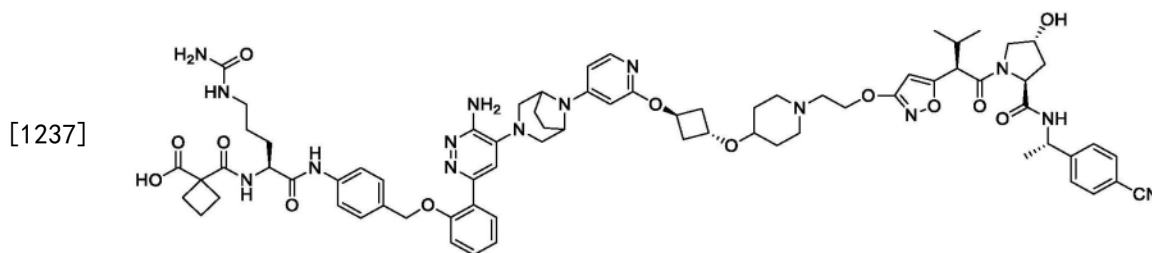


[1234] 向含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(叔丁氧基羰基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸(400mg, 0.39mmol)的二氯甲烷(4.0mL)的混合物中添加三氟乙酸(0.30mL, 3.90mmol)。将混合物在20℃搅拌5小时。将反应浓缩至干,并利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5um, 水(0.075%三氟乙酸)-乙腈12%-42%),以得到标题化合物(360mg, 产率88.9%)。

[1235] LCMS (ESI) m/z: 932.6 [M+H]⁺。

[1236] 步骤4: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-

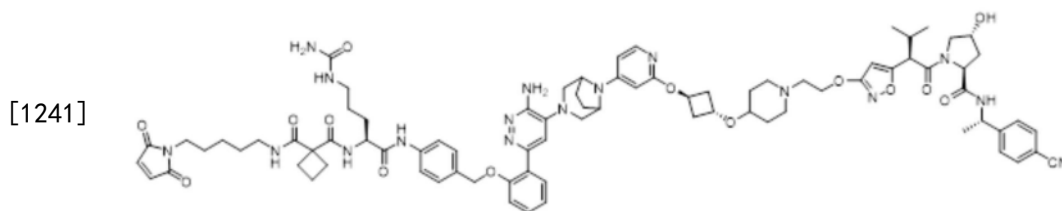
1-氧代丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸



[1238] 向含(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(313.21mg,0.5800mmol)和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)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯(360mg,0.39mmol)的二氯甲烷(0.50mL)和甲醇(0.50mL)的溶液中添加氰基硼氢化钠(49.3mg,0.77mmol)和乙酸钠(6.00mg,0.07mmol),以及一滴乙酸。将反应混合物在20℃搅拌3小时。利用Phenomenex Gemini-NX 80*40mm*3um纯化残余物(乙腈17-47/0.05% NH₃H₂O水溶液,20%-50%),以得到白色固体状标题化合物(250mg,46.7%)。

[1239] LCMS(ESI)m/z:1384.8[M+H]⁺。

[1240] 步骤5:N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-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)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)-N-(5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)环丁烷-1,1-二甲酰胺



[1242] L1-CIDE-BRM1-14

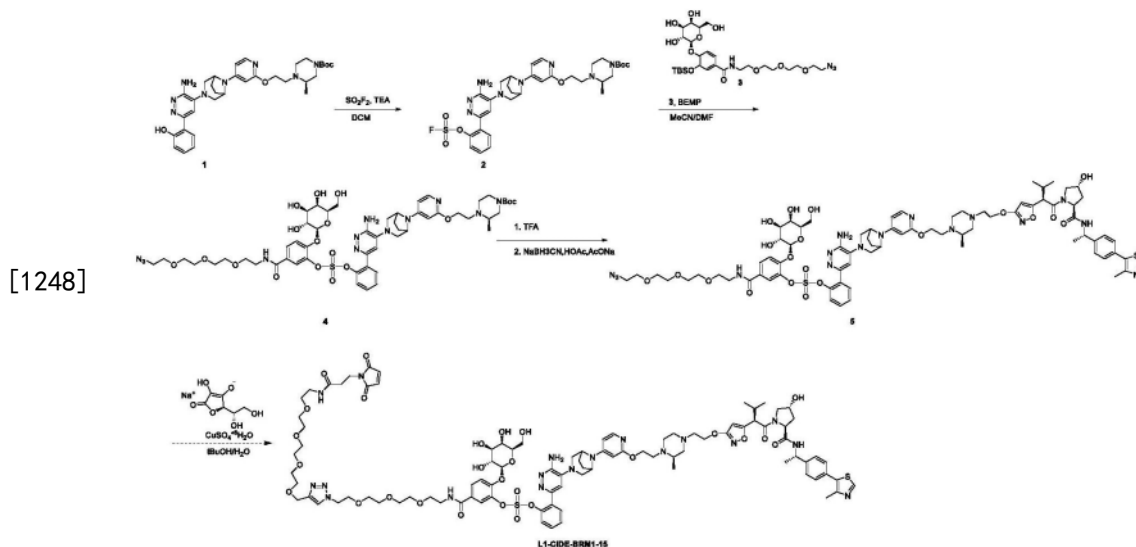
[1243] 向含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸(50.0mg,0.04mmol)和1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮2,2,2-三氟乙酸酯(12.8mg,0.04mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(4.00mL)的混合物中添加N,N-二异丙基乙胺(0.02mL,0.1100mmol)、2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(16.5mg,0.04mmol)。将混合物在25℃搅拌3小时。混合物通过油泵浓缩。利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5um,水(0.075%三氟乙酸)-乙腈20%-50%),以得到白色固体状标题化合物(38.5mg,65.4%)。

[1244] LCMS (ESI) m/z : 775.3 $[M/2+H]^+$ 。

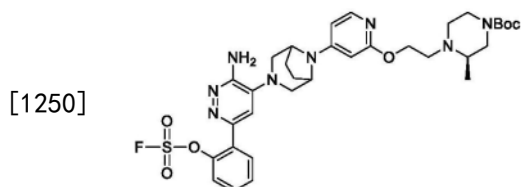
[1245] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10.19 (s, 1H), 9.02-8.86 (m, 1H), 8.39 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J=6.8$ Hz, 1H), 7.87-7.78 (m, 2H), 7.65 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.51-7.41 (m, 5H), 7.36 (d, $J=6.8$ Hz, 5H), 7.29-7.09 (m, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.15-5.96 (m, 2H), 5.07 (s, 2H), 4.93-4.86 (m, 1H), 4.71-4.60 (m, 2H), 4.52-4.24 (m, 9H), 3.66 (s, 4H), 3.33 (d, $J=7.2$ Hz, 5H), 3.09-2.96 (m, 8H), 2.45 (s, 3H), 2.42-2.34 (m, 4H), 2.29-2.14 (m, 2H), 2.04 (d, $J=11.2$ Hz, 3H), 1.91 (s, 2H), 1.83-1.55 (m, 5H), 1.51-1.30 (m, 9H), 1.19 (d, $J=5.8$ Hz, 5H), 0.96 (d, $J=6.4$ Hz, 3H), 0.86-0.75 (m, 3H)。

[1246] 合成实例15

[1247] L1-CIDE-BRM1-15的合成

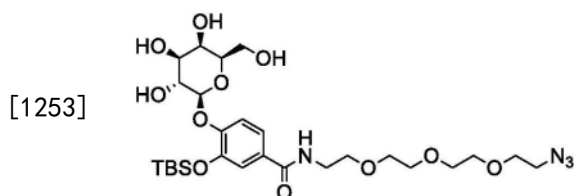


[1249] 步骤1: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((氟磺酰基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯



[1251] 在 SO_2F_2 气球下,将含(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, 0.81mmol)的二氯甲烷(3.0mL)溶液于0℃搅拌16小时。浓缩混合物,以得到黄色油状标题化合物(566mg, 99.8%)。该粗品直接用于下一步。LCMS (ESI) m/z : 713.5 $[M+Na]^+$ 。

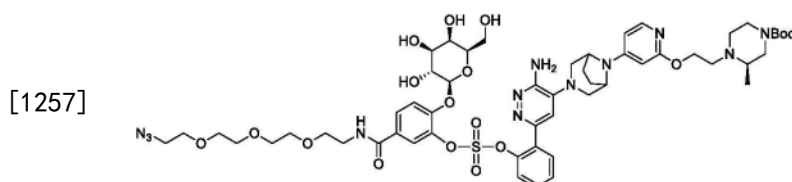
[1252] 步骤2: N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-((叔-丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-4-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯甲酰胺



[1254] 向含N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-羟基-4-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯甲酰胺(320mg, 0.70mmol)的二氯甲烷(10.0mL)溶液中添加2,6-二甲基吡啶(0.24mL, 2.09mmol)和叔-丁基二甲基甲硅烷基三氟甲磺酸酯(0.32mL, 1.40mmol),并在0℃搅拌2小时。将反应浓缩并利用Column Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3um纯化残余物(经水(0.05% $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ +10mM NH_4HCO_3)-乙腈(35%-65%)),以得到白色固体状标题化合物(140mg, 35%)。

[1255] LCMS (ESI) m/z : 573.4 $[M+H]^+$ 。

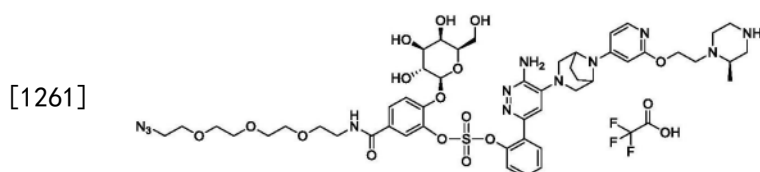
[1256] 步骤3: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-(((5-((2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯氧基)磺酰基)氧基)苯基)吡嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯



[1258] 将含1M 2-叔丁基亚氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基-全氢-1,3,2-二氮杂磷的乙腈(0.86mL, 0.86mmol)溶液、(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((氟磺酰基)氧基)苯基)吡嗪-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(300mg, 0.43mmol)和N-(2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)-3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)-4-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯甲酰胺(274mg, 0.43mmol)的乙腈(5.0mL)溶液和N,N-二甲基甲酰胺(1.00mL)的溶液在24℃搅拌16小时。将粗混合物浓缩至干,将残余物通过制备型HPLC (Welch Xtimate C18 150*25mm*5um/水(10mM NH_4HCO_3)-乙腈/40-70%)纯化,以得到白色固体状标题化合物(200mg, 产率39%)。

[1259] LCMS (ESI) m/z : 1195.6 $[M+H]^+$ 。

[1260] 步骤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)吡嗪-3-基)苯基(5-((2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)硫酸盐2,2,2-三氟乙酸酯



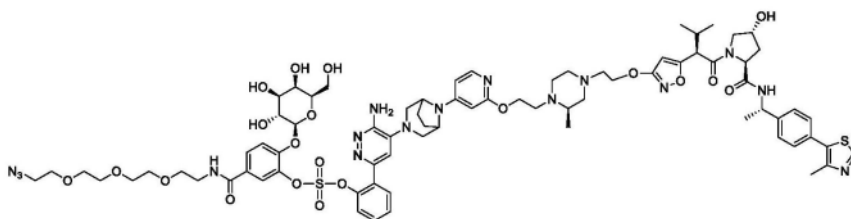
[1262] 将含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-(((5-((2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)硫酸盐2,2,2-三氟乙酸酯

基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯氧基)磺酰基)氧基)苯基)吡啶-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(205mg,0.17mmol)的5%三氟乙酸的六氟异丙醇(6.00mL)溶液在15℃搅拌2小时。浓缩混合物以得到白色固体状标题化合物(207mg,99.8%)。该粗品直接用于下一步。

[1263] LCMS (ESI) m/z : 1095.4 $[M+H-TFA]^+$ 。

[1264] 步骤4: 2-(6-氨基-5-(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-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)吡啶-3-基)苯基(5-((2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯

[1265]



[1266] 向含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)吡啶-3-基)苯基(5-((2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯2,2,2-三氟乙酸酯(207mg,0.17mmol)和(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(184mg,0.34mmol)的甲醇(1.00mL)和二氯甲烷(1.00mL)的溶液中添加氰基硼氢化钠(11.8mg,0.19mmol)和乙酰氧基钠(42.1mg,0.51mmol)。将反应在20℃搅拌3小时。将粗制品通过制备型HPLC(Welch Xtimate C18 150*25mm*5um/水(10mM NH_4HCO_3)-乙腈/30-60%)纯化,以得到白色固体状标题化合物(145mg,52.3%)。LCMS (ESI) m/z : 810.9 $[1/2M+H]^+$ 。

[1267] 步骤5: 2-(6-氨基-5-(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-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)吡啶-3-基)苯基(5-((2-(2-(2-(2-(4-(17-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-15-氧代-2,5,8,11-四氧杂-14-氮杂十七烷基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯

[1268]

The chemical structure of L1-CIDE-BRM1-15 is a complex molecule featuring several interconnected functional groups. It includes a long polyether chain, a pyrazole ring, a succinimide, a glucose moiety, a sulfonamide group, a benzothiazine system, a piperazine, a furan, a pyrrolidine, and a thienothiopyran derivative.

L1-CIDE-BRM1-15

[1269] 在0℃,将含2-(6-氨基-5-(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-2-基)异噻唑-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)哒嗪-3-基)苯基(5-((2-(2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-2-(((2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)硫酸酯(45.0mg,0.03mmol)和3-(2,5-二氧化代吡咯-1-基)-N-[2-[2-[2-(2-丙-2-炔氧基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙基]丙酰胺(20.0mg,0.05mmol)的二甲基亚砜(1.00mL)和水(1.00mL)的溶液中添加含硫酸铜(12.4mg,0.06mmol)的水(0.2mL)溶液和含抗坏血酸钠(11.01mg,0.06mmol)的水(0.2mL)溶液。将反应在N₂气氛下于26℃搅拌1小时。将粗制品通过制备型HPLC(Welch Xtimate C18 100*40mm*3um/水(0.075%三氟乙酸)-乙腈/15-45%)纯化,以得到白色固体状标题化合物(22.6mg,40.6%)。

[1270] LCMS (ESI) m/z : 1001.9 $[1/2M+H]^+$.

[1271] 合成实例16

[1272] L1-CIDE-BRM1-16的合成

[1273]

1

2

3

4

5

6

7

8

9

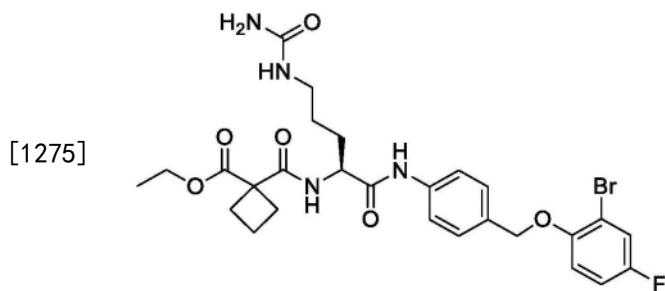
10

11

12

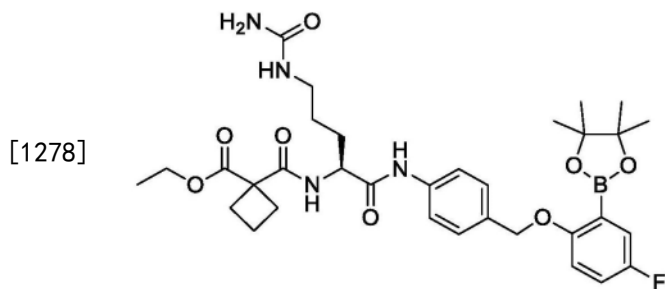
L1-ODE-BRM1-16

[1274] 步骤1: (S) -1-((1-((4-((2-溴-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯



[1276] 在25℃,向含(S)-1-((1-((4-(chloro甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯(1.00g,2.21mmol)和碳酸钾(0.76g,5.52mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(60.0mL)溶液中添加2-溴-4-氟-苯酚(0.63g,3.31mmol)。将反应在25℃搅拌3小时。将反应混合物用水(30.0mL)稀释,并用二氯甲烷(50mL x 3)萃取。将合并的有机相用盐水(20mL x 2)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,并将其浓缩至干。利用快速色谱法纯化残余物(硅胶,100-200目,含0-5%甲醇的二氯甲烷),以得到白色固体状标题化合物(1.2g,89.5%)。

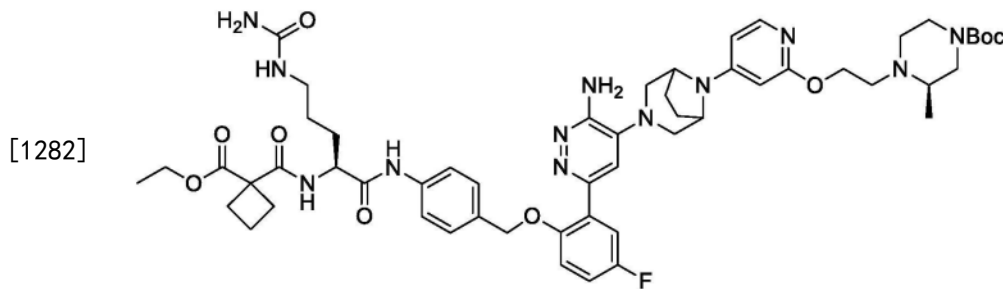
[1277] 步骤2:(S)-1-((1-((4-((4-氟-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯



[1279] 向含(S)-1-((1-((4-((2-溴-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸乙酯(1.00g,1.65mmol)和4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-二(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(627mg,2.47mmol)的1,4-二噁烷(5.0mL)溶液中添加1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁二氯化钯(120mg,0.16mmol)和乙酸钠(485mg,4.94mmol)。将混合物在N₂下于100℃搅拌3小时。混合物粗制品直接用于下一步。

[1280] LCMS(ESI)m/z:655.4[M+H]⁺。

[1281] 步骤3:(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)-5-氟苯基)吡啶-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

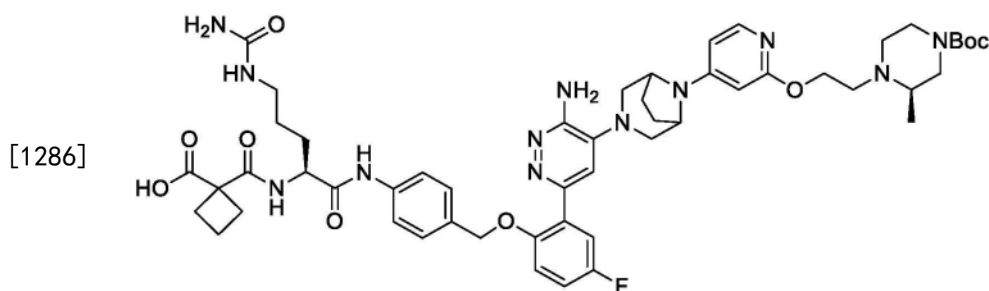


[1283] 向含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-氯吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.11g,1.99mmol)和碳酸钾

(0.38mL, 4.58mmol)的二甲基亚砜(5mL)溶液中添加[2-(2-氨基苯基)苯基]-氯-钯;双(1-金刚烷基)-丁基-膦(102.15mg, 0.15mmol)和(S)-1-((1-((4-((4-氟-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-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)环丁烷甲酸乙酯(1.00g, 1.53mmol)。将反应混合物在N₂下于100℃搅拌3小时。将反应通过快速色谱法(硅胶, 100-200目, 含0-10%甲醇的二氯甲烷溶液)纯化, 以得到黑色固体状标题化合物(360mg, 22.4%)。

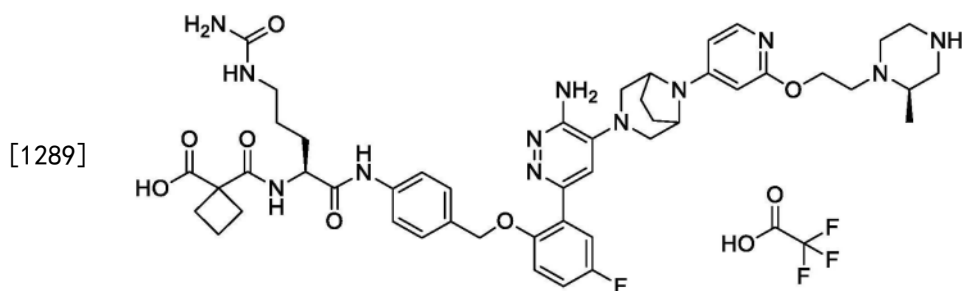
[1284] LCMS(ESI)m/z: 1095 [M+H]⁺。

[1285] 步骤4: 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)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸



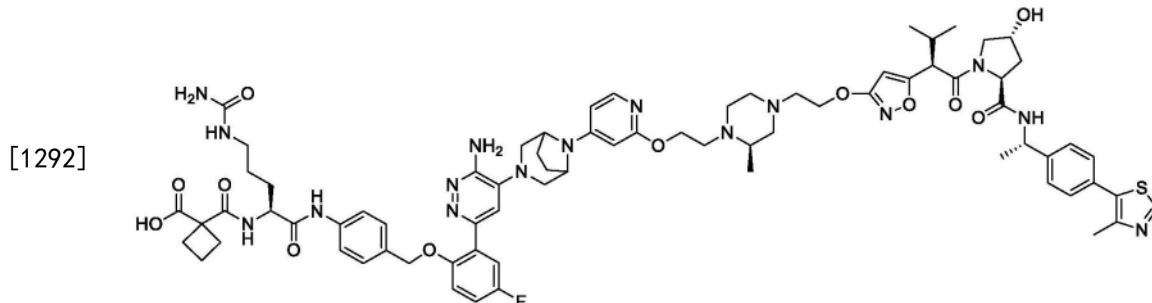
[1287] 向含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)-5-氟苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(360mg, 0.34mmol)的四氢呋喃(2.00mL)、甲醇(5.0mL)和水(2.00mL)的溶液中添加单水氢氧化锂(41.0mg, 1.71mmol)。将反应混合物在N₂气氛下于100℃搅拌3小时。将反应混合物浓缩至干, 以得到白色固体状标题化合物(350mg, 99.9%)。

[1288] 步骤5: 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)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯



[1290] 向含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)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸(340mg, 0.33mmol)的二氯甲烷(5.0mL)溶液中添加三氟乙酸(0.05mL, 0.66mmol)。将反应混合物在20℃搅拌3小时。将反应混合物浓缩至干, 并利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5um, 水(0.075%三氟乙酸)-乙腈12%-42%), 以得到白色固体状标题化合物(80mg, 26.1%)。

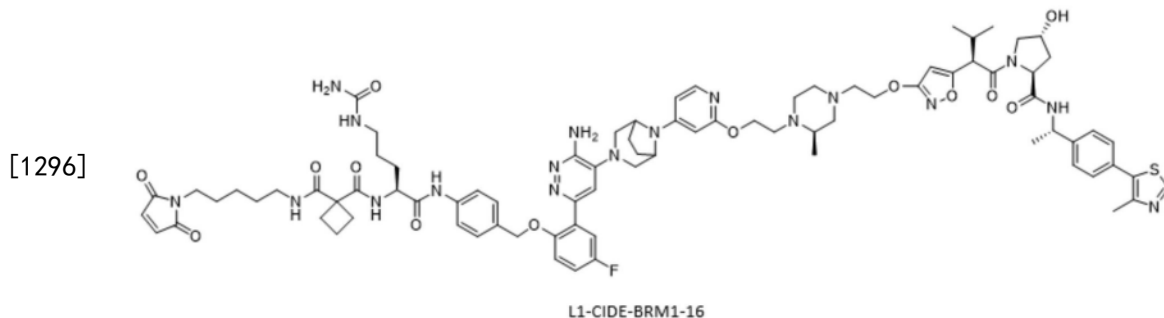
[1291] 步骤6: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)异噻唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸



[1293] 向含(2S,4R)-4-羟基-1-((R)-3-甲基-2-(3-(2-氧代乙氧基)异噻唑-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(70.3mg,0.13mmol)和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)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸2,2,2-三氟乙酸酯(80.0mg,0.09mmol)的二氯甲烷(0.6mL)和甲醇(0.6mL)的溶液中添加氰基硼氢化钠(11.1mg,0.17mmol)和乙酸钠(6.0mg,0.07mmol)以及一滴乙酸。将反应混合物在20℃搅拌3小时。利用Phenomenex Gemini-NX 80*40mm*3um纯化所得残余物(乙腈17-47/0.05%NH₃H₂O水溶液),以得到白色固体状标题化合物(80mg,产率63.8%)。

[1294] LCMS(ESI)m/z:1448.8[M+H]⁺。

[1295] 步骤7: N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-2-基)异噻唑-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)哒嗪-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)-N-(5-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)环丁烷-1,1-二甲酰胺



[1297] 向含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-2-基)异噻唑-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)哒嗪-3-基)-4-氟苯氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-

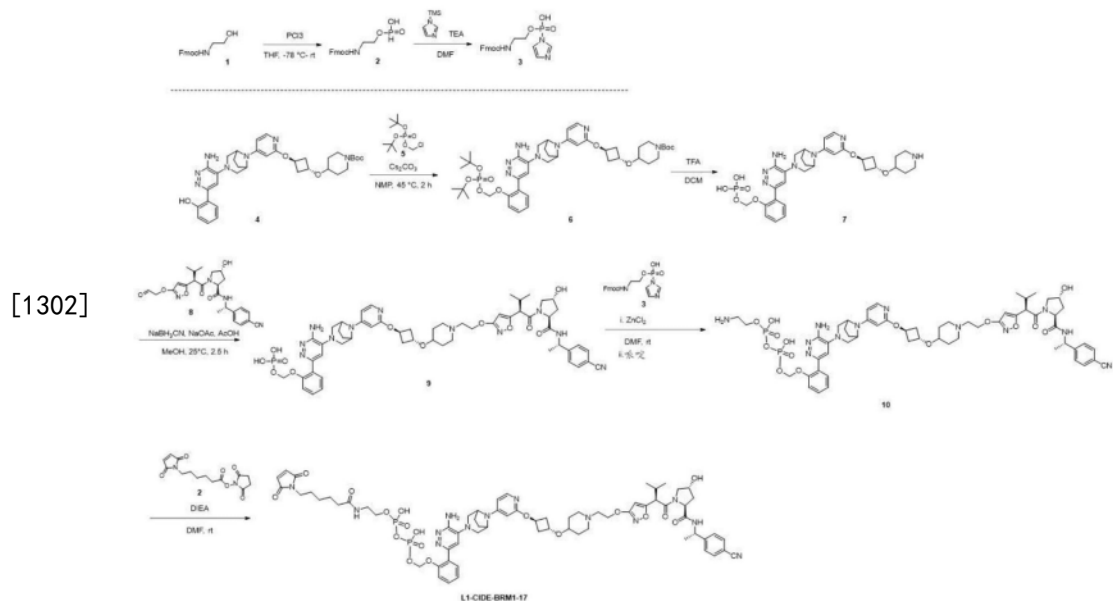
5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸(80.0mg, 0.06mmol)和1-(5-氨基戊基)吡咯-2, 5-二酮; 2,2,2-三氟乙酸(19.6mg, 0.07mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(4.00mL)的混合物中添加2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(25.2mg, 0.07mmol)、N,N-二异丙基乙胺(0.03mL, 0.1700mmol)。将反应混合物在25℃搅拌3小时。通过油泵将反应混合物浓缩至干。利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5um, 水(0.075%三氟乙酸)-乙腈20%-50%), 以得到白色固体状标题化合物(68.2mg, 75%)。

[1298] LCMS (ESI) m/z : 806.7 $[M/2+H]^+$.

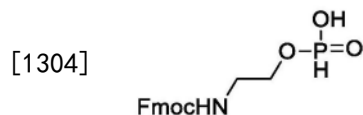
[1299] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10.19 (s, 1H) , 9.02-8.86 (m, 1H) , 8.39 (d, J=8.0Hz, 1H) , 7.94 (d, J=6.8Hz, 1H) , 7.87-7.78 (m, 2H) , 7.65 (d, J=8.0Hz, 2H) , 7.51-7.41 (m, 5H) , 7.36 (d, J=6.8Hz, 5H) , 7.29-7.09 (m, 1H) , 6.97 (s, 2H) , 6.76 (s, 1H) , 6.42 (s, 1H) , 6.15-5.96 (m, 2H) , 5.07 (s, 2H) , 4.93-4.86 (m, 1H) , 4.71-4.60 (m, 2H) , 4.52-4.24 (m, 9H) , 3.66 (s, 4H) , 3.33 (d, J=7.2Hz, 5H) , 3.09-2.96 (m, 8H) , 2.45 (s, 3H) , 2.42-2.34 (m, 4H) , 2.29-2.14 (m, 2H) , 2.04 (d, J=11.2Hz, 3H) , 1.91 (s, 2H) , 1.83-1.55 (m, 5H) , 1.51-1.30 (m, 9H) , 1.19 (d, J=5.8Hz, 5H) , 0.96 (d, J=6.4Hz, 3H) , 0.86-0.75 (m, 3H) 。

[1300] 合成实例17

[1301] L1-CIDE-BRM1-17的合成



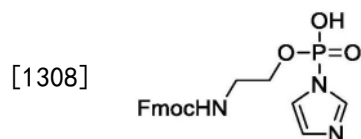
[1303] 步骤1: (9H-芴-9-基)甲基(2-((羟基氢磷酰基)氧基)乙基)氨基甲酸酯



[1305] 在-78℃,向含(9H-芴-9-基)甲基(2-羟乙基)氨基甲酸酯(1.0g,3.53mmol)的四氢呋喃溶液(3.00mL)中添加含三氯化磷(0.73mL,8.44mmol)的四氢呋喃(5.0mL)和含三乙胺(1.1mL,7.89mmol)的四氢呋喃(3.0mL)。将反应混合物在-78℃搅拌20分钟,然后升温至25℃。将所得混合物在25℃搅拌12小时。将混合物用水(20mL)稀释,并用乙酸乙酯(10mL x 3)萃取。将有机相用盐水(20mL x 2)洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩,以得到白色固体状标题化合物(1.20g,97.9%)。

[1306] LCMS (ESI) m/z : 695.3 $[2M+H]^+$ 。

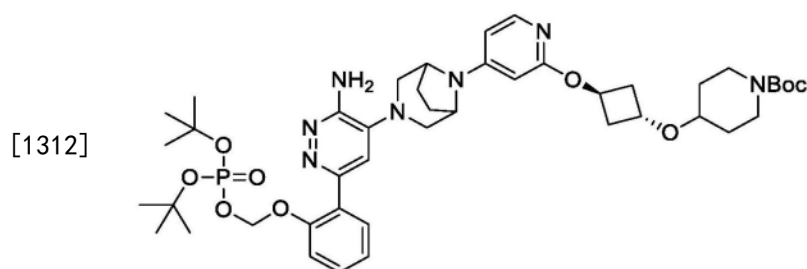
[1307] 步骤2: (9H-芴-9-基) 甲基 (2-((羟基(1H-咪唑-1-基) 磷酰基) 氧基) 乙基) 氨基甲酸酯



[1309] 在25℃, 向含(9H-芴-9-基) 甲基 (2-((羟基氢磷酰基) 氧基) 乙基) 氨基甲酸酯(0.50g, 1.44mmol) 和三乙胺(0.6mL, 4.32mmol) 的四氯化碳(5.0mL) 和乙腈(5.0mL) 的溶液中添加1-(三甲基甲硅烷基)-1H-咪唑(0.61g, 4.32mmol)。将反应混合物在25℃搅拌40分钟。将混合物用甲醇(0.1mL) 处理并在25℃搅拌10分钟。除去溶剂, 将残余物用甲基叔丁基醚/乙酸乙酯=5/1(3.0mL) 洗涤, 过滤沉淀并用叔丁基醚(3.00mL) 洗涤, 得到黄色油状标题化合物(590mg, 产率99.1%)。

[1310] LCMS (ESI) m/z : 414.3 $[M+H]^+$ 。

[1311] 步骤3: 4-((1r, 3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-(((二-叔-丁氧基磷酰基) 氧基) 甲氧基) 苯基) 吡啶-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



[1313] 向含4-((1r, 3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基) 吡啶-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(1.70g, 2.64mmol) 的N,N-二甲基甲酰胺(36.0mL) 中溶液添加碳酸铯(1.72g, 5.28mmol) 和二叔丁基氯甲基磷酸酯(1.02g, 3.96mmol)。将反应混合物在70℃搅拌12小时。将反应混合物用水(150mL) 淬灭, 并用乙酸乙酯萃取(80mL x 3)。将合并的有机层用盐水(100mL x 2) 洗涤, 经无水硫酸钠干燥, 过滤, 并在减压下浓缩至干。利用硅胶色谱法纯化残余物(石油醚/乙酸乙酯=100:1至50:1), 以得到无色油状标题化合物(1.05g, 产率45.9%)。

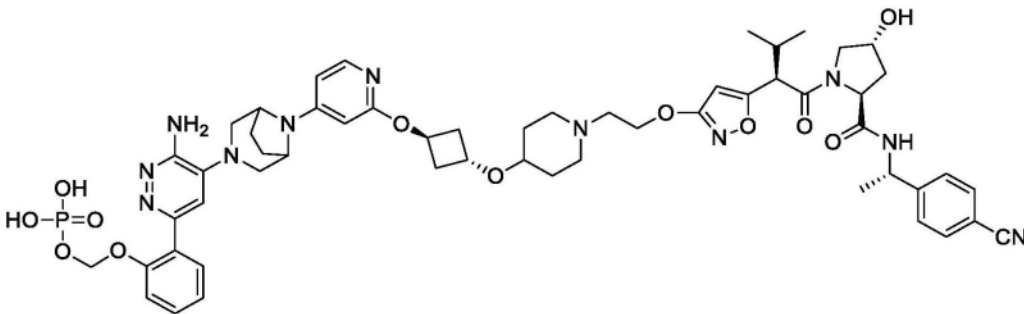
[1314] LCMS (ESI) m/z : 866.4 $[M+H]^+$ 。

[1315] 步骤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) 吡啶-3-基) 苯氧基) 甲基二氢磷酸盐2,2,2-三氟乙酸



[1318] LCMS (ESI) m/z : 654.4 $[M+H]^+$.

[1320]

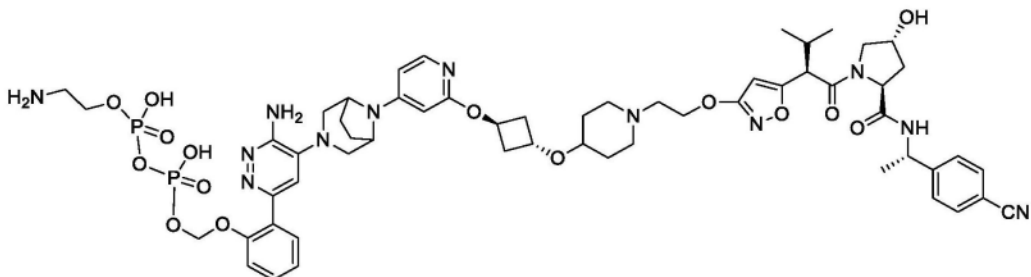


[1322] 步骤6: (9H-芴-9-基) 甲基 (2-((((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1r,3r)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)乙基)氨基甲酸酯



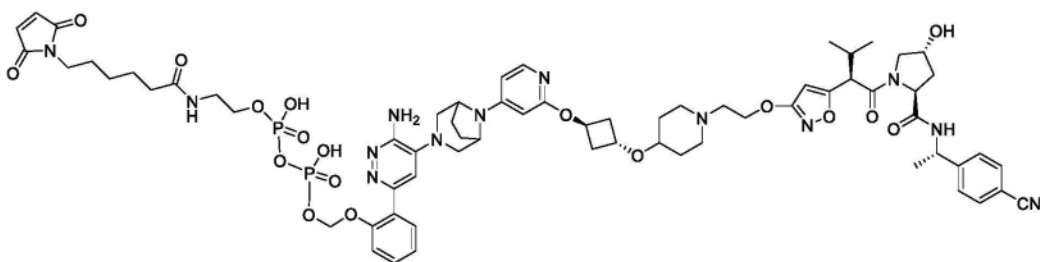
[1325] LCMS (ESI) m/z : 726.7 $[M/2+H]^+$.

[1327]



[1329] LCMS (ESI) m/z : 1229.7 $[M+H]^+$.

174



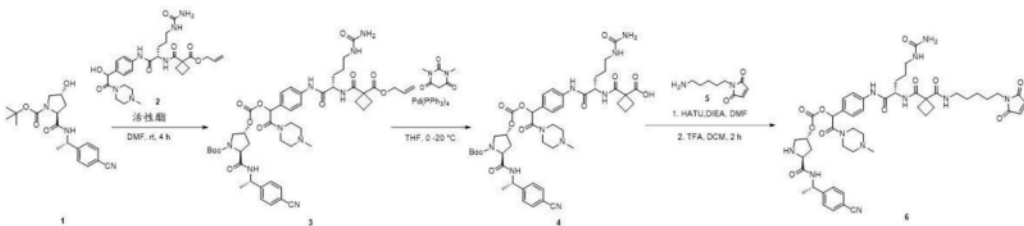
L1-CIDE-BRM1-17

[1332] 向含2-氨基乙氧基(羟基)磷酰基[2-[6-氨基-5-[8-[2-[3-[[1-[2-[5-[外消旋-(1R)-2-甲基-1-[外消旋-(2S,4R)-4-羟基-2-[[外消旋-(1S)-1-(4-氰基苯基)乙基]氨基甲酰基]吡咯烷-1-羰基]丙基]异噁唑-3-基]氧乙基]-4-哌啶基]氧基]环丁氧基]-4-吡啶基]-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基]哒嗪-3-基]苯氧基]磷酸氢甲酯(120mg, 0.10mmol)的无水四氢呋喃(12.0mL)的混合物中添加N,N-二异丙基乙胺(18.7uL, 0.11mmol),然后添加2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(33.1mg,0.11mmol)。将反应溶液在25℃搅拌16小时。将溶液过滤,并浓缩至干。利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150*30mm*5um,水(0.075%三氟乙酸)-乙腈20%-50%),以得到白色固体状标题化合物(60.8mg,36.8%)。

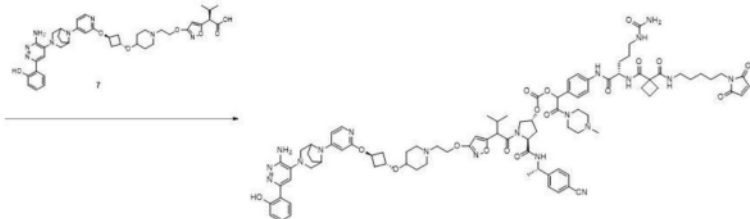
[1333] LCMS (ESI) m/z : 1423.0 $[M+H]^+$.

[1334] 合成实例18

[1335] L1-CIDE-BRM1-18的合成

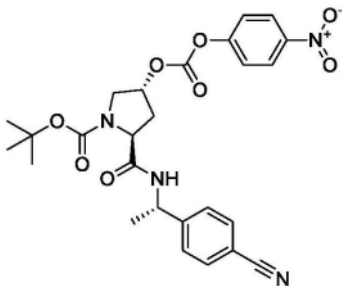


[1336]



L1-CIDE-BRM1-18

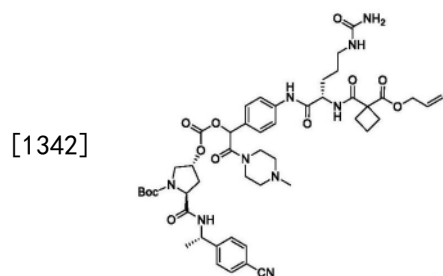
[1337] 步骤1: (2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯



[1339] 向含 (2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-甲酸叔丁酯 (1.00g, 2.78mmol) 的二氯甲烷 (10.0mL) 的混合物中添加 2,6-二甲基吡啶 (0.49mL, 4.17mmol) 和氯甲酸 4-硝基苯酯 (673mg, 3.34mmol)。将反应混合物在 25℃ 搅拌 18 小时。浓缩粗制混合物以得到黄色固体状标题化合物 (1.46g, 36.8%)。该粗制品立即用于下一步。

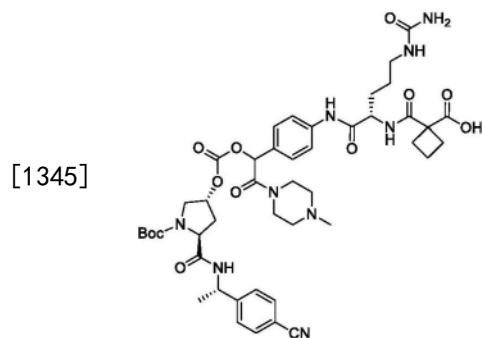
[1340] LCMS (ESI) m/z : 425.1 $[M-Boc+H]^+$ 。

[1341] 步骤 2: (2S,4R)-4-(((1-(4-((S)-2-(1-((烯丙氧基)羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯



[1343] 向含 (2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯 (1.46g, 2.78mmol) 和 1-(((2S)-1-((4-(1-羟基-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸烯丙酯 (1.59g, 2.78mmol) 的 N,N-二甲基甲酰胺 (15.0mL) 的混合物中添加 4-二甲基氨基吡啶 (680mg, 5.56mmol)。将反应混合物在 25℃ 搅拌 18 小时。将粗制品过滤并通过制备型 HPLC (Phenomenex Gemini-NX 80*30mm*3um/水 (10mM NH_4HCO_3)-乙腈/10%-80%) 纯化, 以得到黄色固体状标题化合物 (400mg, 15%)。LCMS (ESI) m/z : 958.5 $[M+H]^+$ 。

[1344] 步骤 3: 1-(((2S)-1-((4-(1-(((3R,5S)-1-(叔-丁氧基羰基)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸

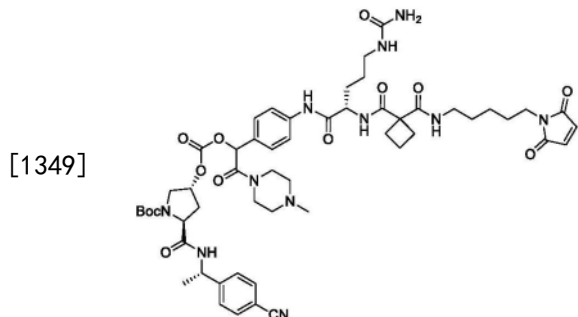


[1346] 在 25℃, 向含 (2S,4R)-4-(((1-(4-((S)-2-(1-((烯丙氧基)羰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯 (260mg, 0.27mmol) 和 1,3-二甲基嘧啶-2,4,6-(1H,3H,5H)-三酮 (212mg, 1.36mmol) 的二氯甲烷 (2.00mL) 和甲醇 (2.00mL) 的溶液中添加四(三苯基膦)钯 (62.7mg, 0.05mmol)。将反应混合物在氮气气氛下于 25℃ 搅拌 16 小时。浓缩粗制品, 并在以下条件下通过制备型 HPLC 纯化该粗制品: 柱: Phenomenex

Gemini-NX 80*30mm*3um,流动相:水(10mM NH_4HCO_3)-乙腈10%-80%,以得到黄色固体状标题化合物(110mg,产率44.2%)。

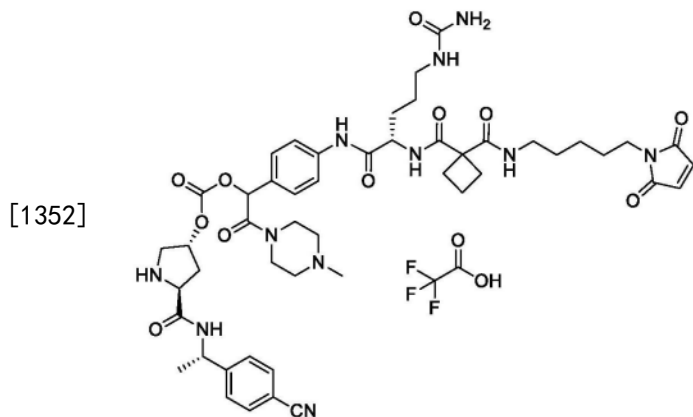
[1347] LCMS (ESI) m/z : 918.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[1348] 步骤4: (2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(((1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙氧基)羰基)氧基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯



[1350] 向含1-(((2S)-1-((4-(1-((((3R,5S)-1-(叔-丁氧基羰基)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基)氧基)羰基)氧基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基甲酰基)环丁烷甲酸(110mg,0.12mmol)和1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮2,2,2-三氟乙酸(43.0mg,0.15mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(3mL)的混合物中添加N,N-二异丙基乙胺(0.06mL,0.36mmol)和2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(54.7mg,0.14mmol)。将反应混合物在25℃搅拌3h。通过油泵浓缩混合物。利用制备型HPLC纯化残余物(Boston Green ODS 150×30mm×5um,水(0.075%TFA)-乙腈28%-58%),以得到白色固体状标题化合物(90mg,69.4%)。LCMS (ESI) m/z : 1082.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[1351] 步骤5: (3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基(1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)碳酸酯2,2,2-三氟乙酸酯

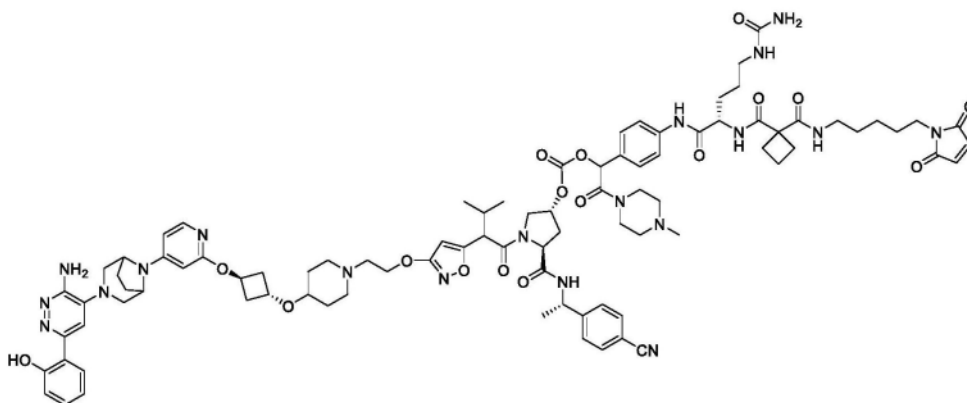


[1353] 向含(2S,4R)-2-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-(((1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧乙氧基)羰基)氧基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯

(90mg, 0.08mmol) 的含5%三氟乙酸的六氟异丙醇(5mL)溶液在25℃搅拌2小时。将混合物浓缩,以得到黄色油状标题化合物(91.0mg, 产率99.8%)。LCMS (ESI) m/z : 982.4 $[M-TFA+H]^+$ 。

[1354] 步骤6: (3R,5S)-1-(2-(3-(2-(4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡嗪-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(1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊酰胺基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)碳酸酯

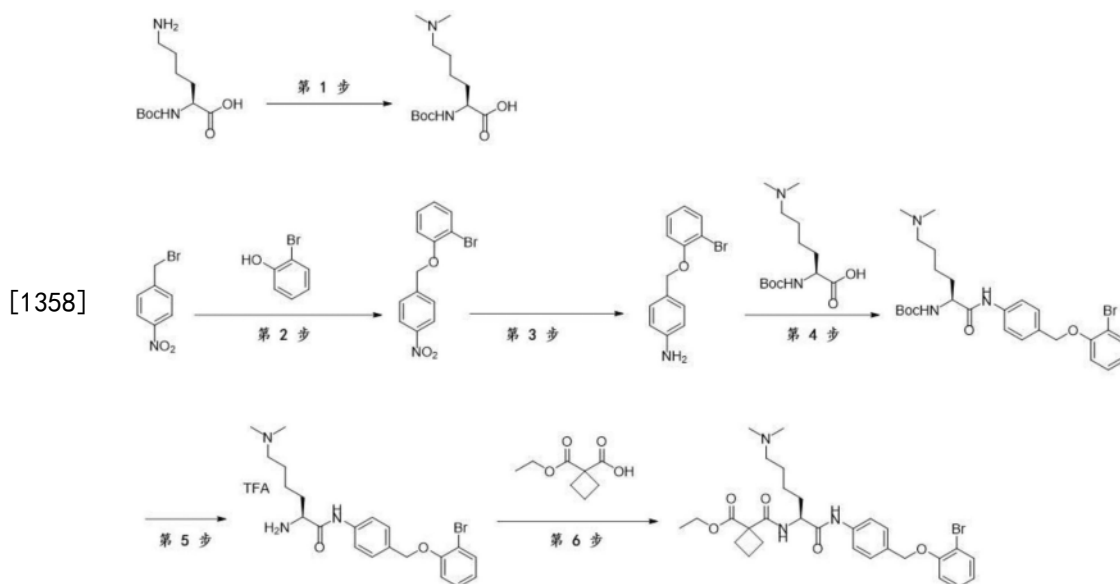
[1355]



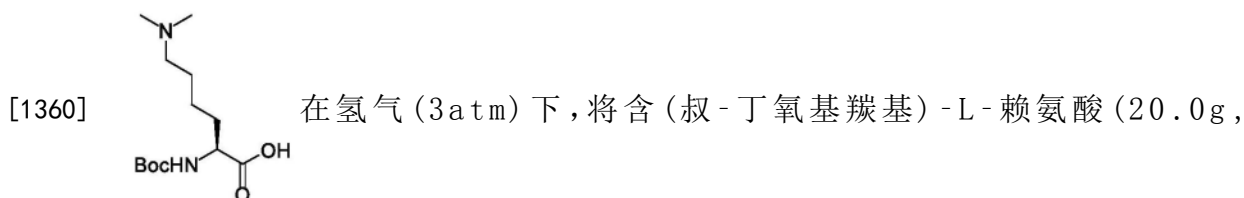
L1-CIDE-BRM1-18

[1356] 向含(3R,5S)-5-(((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-3-基(1-(4-((S)-2-(1-((5-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)氨基甲酰基)环丁烷甲酰氨基)-5-脲基戊烷氨基)苯基)-2-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-氧代乙基)碳酸酯2,2,2-三氟乙酸酯(91.0mg, 0.08mmol)和2-(3-(2-(4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-羟基苯基)吡嗪-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-甲基丁酸(81.5mg, 0.11mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(2.50mL)的混合物中添加N,N-二异丙基乙胺(0.08mL, 0.50mmol)和2-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(41.0mg, 0.11mmol)。将混合物在25℃搅拌16小时。浓缩后,粗制品通过制备型HPLC在以下条件下纯化:柱:Welch Xtimate C18 100*40mm*3um(经水(0.075%三氟乙酸)-乙腈15-45%),以得到白色固体状标题化合物(80.6mg, 产率52%)。LCMS (ESI) m/z : 860.4 $[1/M+H]^+$

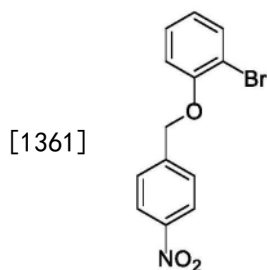
[1357] 中间体1: (S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯



[1359] 步骤1: N^2 -(叔-丁氧基羰基)- N^6,N^6 -二甲基-L-赖氨酸



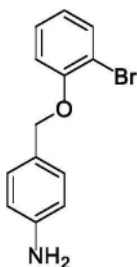
81.2mmol)、 CH_2O (12.2g, 162mmol) 和 Pd/C (2.00g) 的甲醇 (100mL) 溶液在室温下搅拌4小时。过滤后, 在减压条件下浓缩滤液。将残余物用 Et_2O 洗涤。通过过滤收集固体, 以得到白色固体状20.6g (产率92%) 标题化合物。LCMS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 275$ 。步骤2: 1-溴-2-((4-硝基苄基)氧基)苯



[1362] 将2-溴苯酚 (52.6g, 304mmol), 1-(溴甲基)-4-硝基苯 (65.7g, 304mmol) 和 K_2CO_3 (83.9g, 608mmol) 的DMF (700mL) 溶液在室温下搅拌1小时。添加 EtOAc , 并用水洗涤3次。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥并在真空下浓缩, 以得到73.8g (产率78%) 黄色固体状标题化合物。 ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.34-8.24 (m, 2H), 7.81-7.70 (m, 2H), 7.62 (dd, $J=7.9, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.36 (ddd, $J=8.3, 7.3, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.20 (dd, $J=8.3, 1.5\text{Hz}$, 1H), 6.94 (td, $J=7.6, 1.4\text{Hz}$, 1H), 5.39 (s, 2H)。

[1363] 步骤3: 4-((2-溴苯氧基)甲基)苯胺

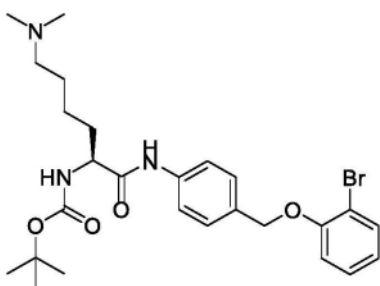
[1364]



[1365] 在氮气下,于0℃向含1-溴-2-((4-硝基苄基)氧基)苯(43.0g,139.5mmol)和 K_2CO_3 (115g,837mmol)的乙腈(800mL)和水(400mL)的溶液中分批添加 $Na_2S_2O_4$ (242g,1395mmol)。将混合物在室温搅拌6小时。使用EtOAc将产物萃取一次。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥并在真空下浓缩,以得到35g(粗制品)黄色固体状标题化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 278$ 。

[1366] 步骤4: (S) - (1 - ((4 - ((2 - 溴苯氧基) 甲基) 苯基) 氨基) - 6 - (二甲基氨基) - 1 - 氧代己 - 2 - 基) 氨基甲酸叔丁酯

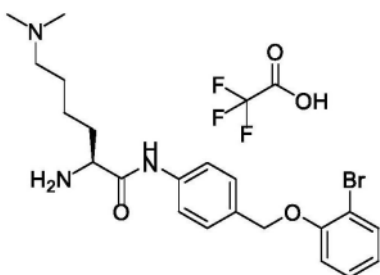
[1367]



[1368] 在氮气下,于25℃向含 N^2 - (叔 - 丁氧基羰基) - N^6 , N^6 - 二甲基 - L - 赖氨酸(13.3g, 48.4mmol)和NMM(10.3g, 96.9mmol)的四氢呋喃(200mL)溶液中滴加 - 氯甲酸异丁酯(7.91g, 58.1mmol)。将反应在25℃搅拌0.5小时。然后在-25℃添加含4 - ((2 - 溴苯氧基) 甲基) 苯胺(16.1g, 粗制品)的四氢呋喃(120mL)溶液。将反应混合物在室温搅拌4小时。将溶剂在真空下浓缩。添加DCM并用水洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥,并且在真空中浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化残余物(梯度:0-9% MeOH/DCM),以得到白色固体状6.70g(产率25%)标题化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 534$ 。

[1369] 步骤5: (S) - 2 - 氨基 - N - (4 - ((2 - 溴苯氧基) 甲基) 苯基) - 6 - (二甲基氨基) 己酰胺(2, 2, 2 - 三氟乙酸盐)

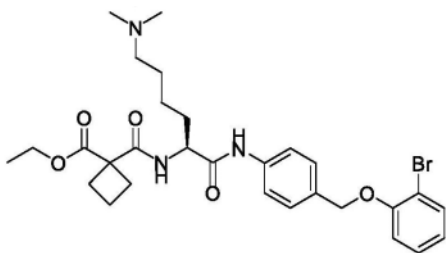
[1370]



[1371] 将含(S) - (1 - ((4 - ((2 - 溴苯氧基) 甲基) 苯基) 氨基) - 6 - (二甲基氨基) - 1 - 氧代己 - 2 - 基) 氨基甲酸叔丁酯(4.00g, 7.48mmol)的5% TFA/HFIP(50mL)溶液在室温下搅拌3小时。将溶剂在真空下浓缩,并将其直接用于下一步。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 434$ 。

[1372] 步骤6: (S) - 1 - ((1 - ((4 - ((2 - 溴苯氧基) 甲基) 苯基) 氨基) - 6 - (二甲基氨基) - 1 - 氧代己 - 2 - 基) 氨基甲酰基) 环丁烷 - 1 - 甲酸乙酯

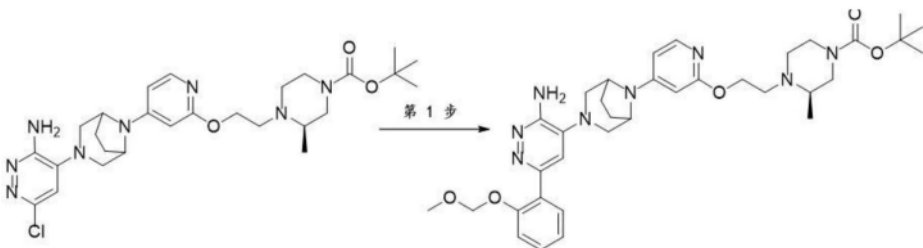
[1373]



[1374] 在0℃,向含(S)-2-氨基-N-(4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)-6-(二甲基氨基)己酰胺(2,2,2-三氟乙酸盐)(来自步骤5的粗制品)、1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酸(1.55g, 8.98mmol)和DIPEA(9.65g, 74.8mmol)的DMF(20mL)溶液中添加HATU(3.41g, 8.98mmol)。在室温下,将混合物搅拌0.5小时。利用预填充的C18柱纯化粗制品(梯度:0-100% MeOH水溶液(0.05% NH_4HCO_3)),以得到红色固体状2.70g(产率61%)标题化合物。LCMS(ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 588$ 。 ^1H NMR(300MHz, DMSO- d_6) δ 9.87(s, 1H), 7.72(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 7.54-7.42(m, 3H), 7.30(d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 7.21(ddd, $J=8.8, 7.3, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.07(dd, $J=8.4, 1.5\text{Hz}$, 1H), 6.77(td, $J=7.6, 1.4\text{Hz}$, 1H), 5.02(s, 2H), 4.30(q, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 4.00(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 2.35-2.21(m, 2H), 2.03(t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 1.96(s, 6H), 1.80-1.41(m, 4H), 1.30-1.14(m, 6H), 1.06(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H)。

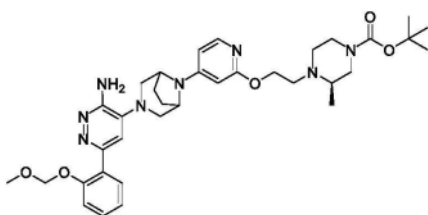
[1375] 中间体5: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[1376]



[1377] 步骤1: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-(甲氧基甲氧基)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

[1378]

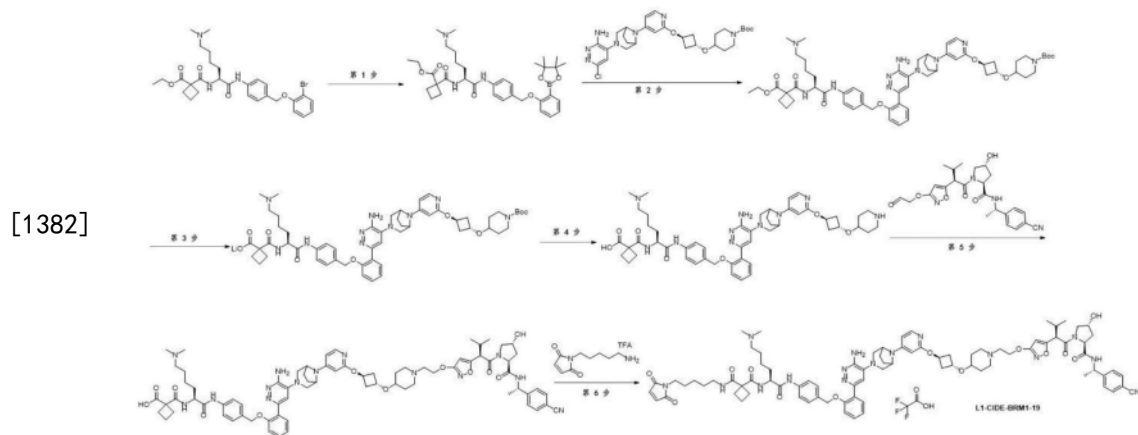


[1379] 在氮气下,于100℃将含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-氯哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1.00g, 1.79mmol)、(2-(甲氧基甲氧基)苯基)有机硼酸(391mg, 2.15mmol)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (413mg, 0.358mmol)和 K_2CO_3 (741mg, 5.37mmol)的二噁烷(10mL)和水(2mL)的溶液搅拌1小时。用水稀释反应物,并且用二氯甲烷萃取。合并有机层,经无水硫酸钠干燥并在真空下浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化残余物(梯度:0%-10%甲醇/二氯甲烷),以得到670mg(产率57%)黄色固体状标题化合物。LC-MS: (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 661$ 。 ^1H NMR(300MHz, DMSO- d_6) δ 7.76(d, $J=5.9\text{Hz}$, 1H), 7.58(dd, $J=7.6, 1.8\text{Hz}$, 1H), 7.34(ddd, $J=9.0, 7.3, 1.8\text{Hz}$, 1H), 7.18-7.01(m, 3H), 6.51(dd, $J=6.1, 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.12(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 5.72(s, 2H), 5.14(s, 2H), 4.47

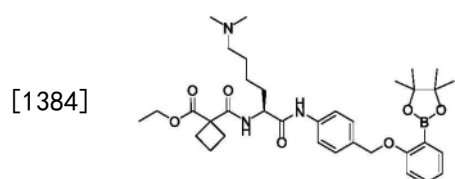
(s, 2H), 4.25 (t, J=6.1Hz, 2H), 3.53 (d, J=12.8Hz, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.14-2.67 (m, 8H), 2.64-2.56 (m, 1H), 2.46-2.36 (m, 1H), 2.32-2.22 (m, 1H), 2.22-2.13 (m, 2H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.96 (d, J=6.2Hz, 3H)。

[1380] 合成实例19

[1381] L1-CIDE-BRM1-19的合成

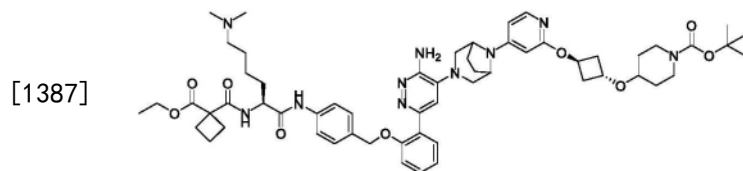


[1383] 步骤1: (S)-1-((6-(二甲基氨基)-1-氧代-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯



[1385] 在氮气下,于80℃将含(S)-1-((1-((4-((2-溴苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(500mg,0.852mmol)、 B_2Pin_2 (649mg,2.55mmol)、 $Pd(dppf)Cl_2$ (124mg,0.170mmol)和KOAc(250mg,2.55mmol)的1,4-二噁烷(5mL)溶液搅拌2小时。将反应用DCM稀释,并用水进行洗涤。有机层经无水硫酸钠干燥并真空浓缩。利用硅胶快速色谱法纯化残余物(梯度:0%-20% MeOH/DCM(含有0.3%7MNH₃/MeOH)),以得到390mg(产率72%)黄色固体标题化合物。LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 636$ 。

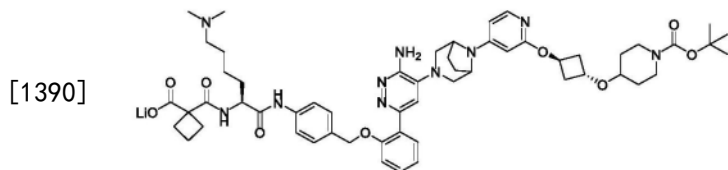
[1386] 步骤2: 4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯



[1388] 在氮气下,于95℃将含(S)-1-((6-(二甲基氨基)-1-氧代-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(390mg,0.614mmol)、4-((1r,3r)-3-((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)环丁氧基)哌啶-1-甲酸叔丁酯

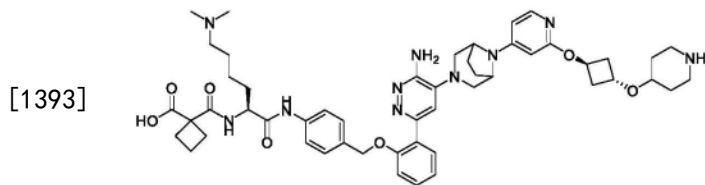
(395mg, 0.676mmol)、 $\text{Ad}_2\text{nBuPPdG2}$ (41.0mg, 0.061mmol) 和 K_2CO_3 (260mg, 1.22mmol) 的二噁烷 (5.0mL) 和 H_2O (1.2mL) 的溶液搅拌2小时。将所得溶液用水稀释,并用EtOAc萃取。有机层在真空下浓缩。利用预填充的C18柱纯化残余物(溶剂梯度:0-100% MeOH水溶液 (0.1% NH_4HCO_3)),以得到310mg (产率47%) 白色固体状标题化合物。LC-MS: (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1060$ 。

[1389] 步骤3: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸锂



[1391] 将含4-((1r,3r)-3-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)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-甲酸叔丁酯(270mg, 0.255mmol) 和 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (32.1mg, 0.765mmol) 的THF (2mL) 和 H_2O (2mL) 的溶液在室温下搅拌1小时。在真空下浓缩所得混合物。该产物直接用于下一步。LC-MS: (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1032$ 。

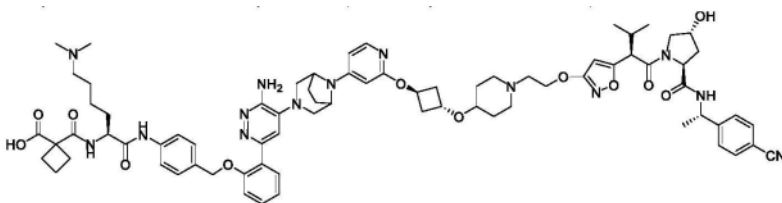
[1392] 步骤4: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1r,3r)-3-(哌啶-4-基氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸



[1394] 将含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸锂(由上一步所得的粗制品)的TFA (0.75mL) 和HFIP (14mL) 的溶液在室温下搅拌30分钟。真空下浓缩所得混合物。利用预填充的C18柱纯化所得的粗制品(溶剂梯度:0-100% MeOH水溶液 (0.1% NH_4HCO_3)),以得到170mg (产率71%) 黄色固体状标题化合物。LC-MS: (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+ = 932$ 。

[1395] 步骤5: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-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-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

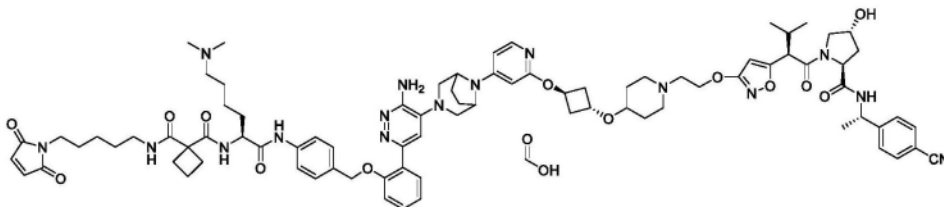
[1396]



[1397] 在氮气下,将含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-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(170.0mg, 0.183mmol)、(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(111mg, 0.237mmol)和HOAc(21.9mg, 0.365mmol)的DCM(1.5mL)和MeOH(0.5mL)的溶液在室温下搅拌1小时。然后在0℃添加NaBH₃CN(17.3mg, 0.274mmol),并在室温下搅拌30分钟。用水淬灭反应。将所得溶液在真空下浓缩。利用预填充的C18柱纯化所得粗制品(梯度:0-100% MeOH水溶液(0.05% NH₄HCO₃)),以获得180mg(产率71%)白色固体状标题化合物。LC-MS:(ESI, m/z):[M+H]⁺=1384。

[1398] 步骤5:N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-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-2-基)-N-(5-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)环丁烷-1,1-二甲酰胺(甲酸盐)

[1399]



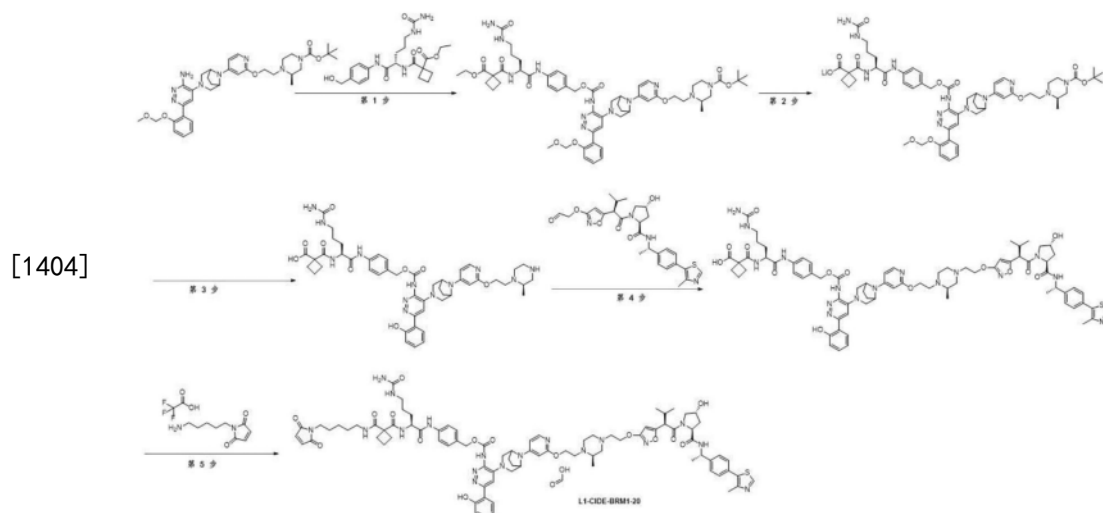
[1400] 在室温下,向含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-((1R,3R)-3-((1-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-2-((S)-1-(4-氰基苯基)乙基)氨基甲酰基)-4-羟基吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)哌啶-4-基)氧基)环丁氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(65.0mg, 0.047mmol)、1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(25.6mg,粗制品)和DIPEA(90.9mg, 0.705mmol)的DMF(1.5mL)溶液中添加HATU(21.4mg, 0.056mmol)。将所得溶液在室温下搅拌30分钟。所得溶液通过制备型HPLC(Xselect CSH F-苯基OBD柱,19x 250mm 5μm;流动相A:水(0.05%FA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:7分钟内从2% B增长到29% B;254nm;R_{T1}:6.5min)),以得到5.9mg(产率8%)白色固体状L1-CIDE-BRM1-19。LC-MS:(ESI, m/z):[M+H]⁺=1548。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ10.24(s, 1H), δ8.47(d, J=7.4Hz, 1H), 8.17(s, 1H), 7.93-7.54(m, 8H), 7.55-7.30(m, 5H), 7.26-7.09(m, 2H), 7.08-6.87(m, 3H), 6.43-5.88(m, 3H), 5.59(s, 2H), 5.22-4.86(m, 5H), 4.50-4.12(m, 8H), 3.72-3.54(m, 3H), 3.13-2.97(m, 4H), 2.63(s, 6H), 2.45-2.35(m, 5H), 2.25-2.02(m, 16H), 2.02-1.56(m, 11H), 1.57-1.25(m,

13H), 1.29-1.12(m, 4H), 0.95(d, J=6.8Hz, 3H), 0.79(d, J=6.8Hz, 3H)。

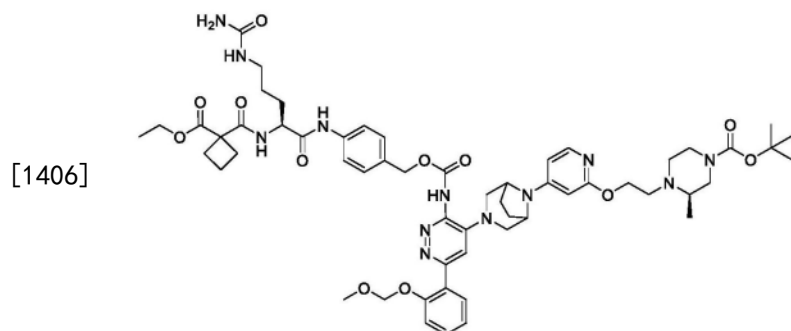
[1401] 合成实例20

[1402] L1-CIDE-BRM1-20的合成

[1403] 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-甲酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)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-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(甲酸盐)



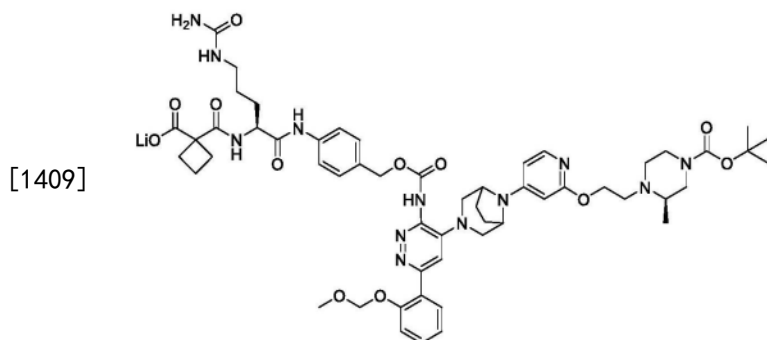
[1405] 步骤1: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯



[1407] 在氮气下,于0℃向含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-(甲氧基甲氧基)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(500mg,0.756mmol,由Genetech提供)、(S)-1-((1-((4-(羟甲基)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(986mg,2.26mmol,由Genetech提供)和DIPEA(488mg,3.78mmol)的THF(25mL)溶液中添加三光气(85.5mg,0.288mmol)。将反应在室温下搅拌0.5小时。蒸发溶剂并利用硅胶快速色谱法纯化残余物(梯度:0%-13%甲醇/二氯甲烷),然后通过预填充的C18柱纯化(溶剂梯度:0-100%ACN水溶液(0.05% NH₄HCO₃)),以得到191mg(22%)白色固体状标题化合物。LC-MS: (ESI, m/z): [M+H]⁺=1122。

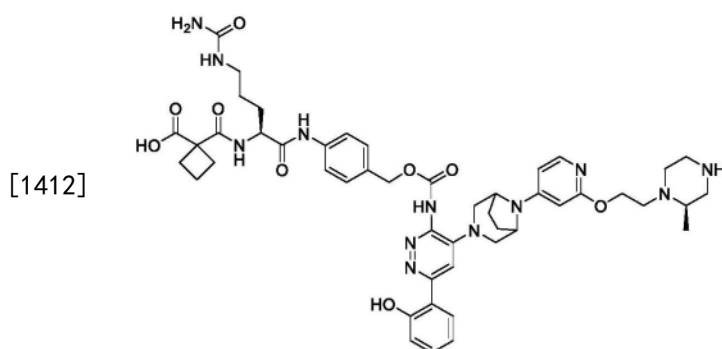
[1408] 步骤2: 1-(((2S)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((R)-4-(叔-丁氧基羰基)-2-甲基哌

噻-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-(甲氧基甲氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)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-甲酸锂



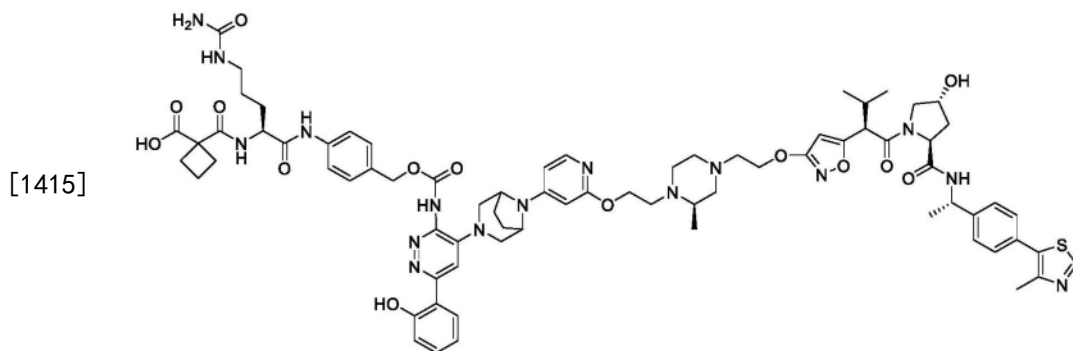
[1410] 将含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-(((4-((S)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苄基)氧基)羰基)氨基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(130mg,0.115mmol)和LiOH(14.0mg,0.350mmol)的THF(3mL)和水(3mL)的溶液在室温下搅拌1小时。真空除去THF,然后冻干,以得到140mg(粗制品)白色固体状标题化合物。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]⁺=1094。

[1411] 步骤3:1-(((2S)-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-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸



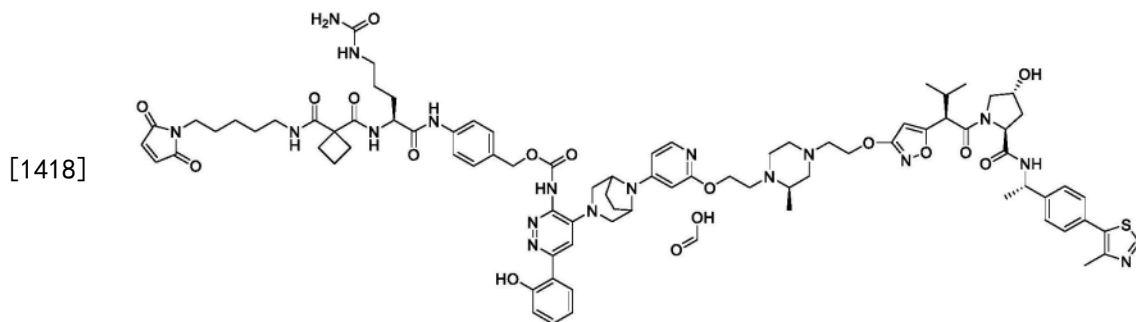
[1413] 在氮气下,将含1-(((2S)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((R)-4-(叔丁氧基羰基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-(甲氧基甲氧基)苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)乙基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸锂(240mg,0.219mmol)的浓HCl(2mL)、THF(2mL)和异丙醇(2mL)的溶液在室温下搅拌0.5小时。反应液在减压下浓缩,并通过预填充的C18柱纯化剩余水溶液(溶剂梯度:0-100%ACN水溶液(0.05% NH₄HCO₃)),以得到150mg黄色固体状标题化合物。LC-MS:(ESI,m/z):[M+H]⁺=949。

[1414] 步骤4:1-(((2S)-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-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-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸



[1416] 在氮气下,将含1-(((2S)-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-5-脲戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(150mg, 0.158mmol)、(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(112mg, 0.207mmol)、CH₃COOH(19.8mg, 0.329mmol)的甲醇(3mL)和DCM(1mL)的溶液在30℃搅拌1小时。然后添加NaBH₃CN(19.5mg, 0.513mmol),并在30℃搅拌0.5小时。将反应溶液在真空下浓缩。利用预填充的C18柱纯化残余物(溶剂梯度:0-100%甲醇水溶液(0.05% NH₄HCO₃)),以得到180mg(77%)黄色固体状标题化合物。LC-MS: (ESI, m/z): [M+H]⁺=1474。

[1417] 步骤5:4-((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-甲酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)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-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(甲酸盐)



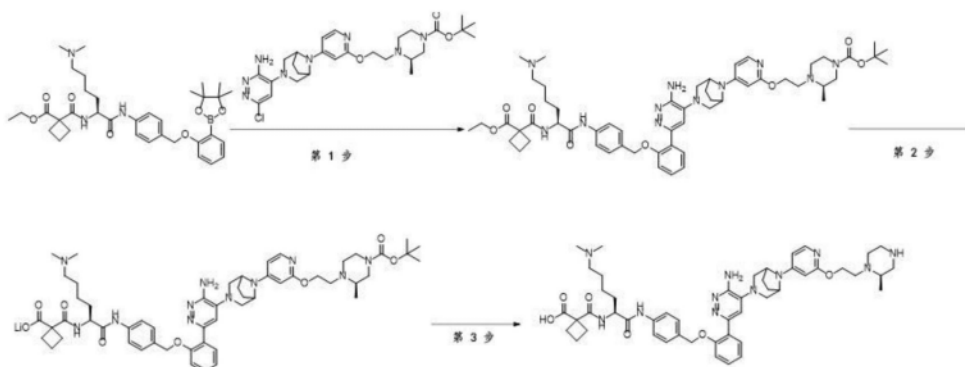
[1419] 在室温下,向含1-(((2S)-1-((4-(((4-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)-6-(2-羟基苯基)哒嗪-3-基)氨基甲酰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(180mg, 0.122mmol)、1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸盐)(67mg,粗制品)和DIPEA(158mg, 1.22mmol)的DMF(3mL)溶液中添加HATU(67.0mg, 0.176mmol)。将反应在室温下搅拌1小时。通过制备型HPLC纯化所得溶液(柱:XBridge Prep OBD C18柱,30*150mm,5μm;流动相A:水(0.1% FA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:7分钟内从8% B增长到38% B;波长:

254nm; R_{T1} (min): 6.5min), 以得到49.7mg (产率24.0%) 白色固体状L1-CIDE-BRM1-20。LC-MS: (ESI, m/z): $[M+H]^+ = 1638$ 。 ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 13.39 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.40 (d, J=7.7Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.03 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.82 (dd, J=8.0, 5.8Hz, 3H), 7.70-7.61 (m, 3H), 7.51-7.41 (m, 2H), 7.41-7.28 (m, 5H), 6.96 (d, J=16.1Hz, 4H), 6.54 (d, J=6.1Hz, 1H), 6.17 (s, 1H), 6.10 (s, 1H), 5.96 (dd, J=10.3, 4.5Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.09 (d, J=5.3Hz, 3H), 4.91 (t, J=7.1Hz, 1H), 4.50-4.34 (m, 4H), 4.32-4.28 (m, 5H), 3.74-3.61 (m, 2H), 3.55-3.40 (m, 4H), 3.39-3.35 (m, 3H), 3.19-2.89 (m, 9H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.48-2.38 (m, 9H), 2.23-2.12 (m, 1H), 2.10-1.95 (m, 2H), 1.88 (s, 4H), 1.80-1.70 (m, 4H), 1.68-1.57 (m, 1H), 1.52-1.30 (m, 10H), 1.28-1.16 (m, 2H), 1.10-0.90 (m, 6H), 0.82 (d, J=6.6Hz, 3H)。

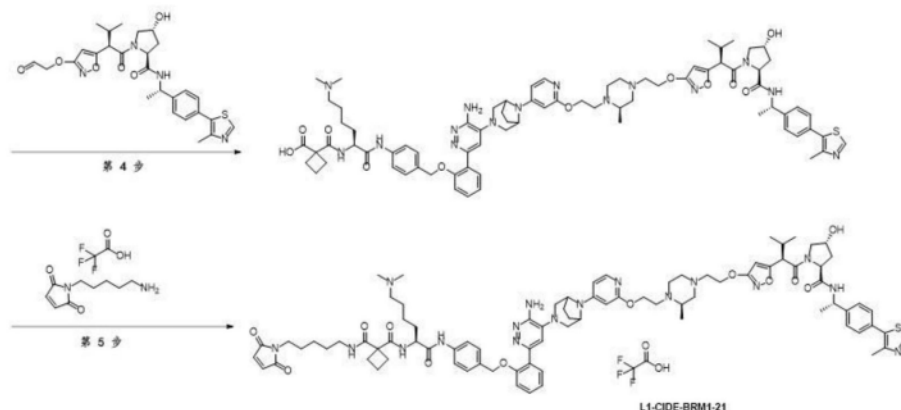
[1420] 合成实例21

[1421] L1-CIDE-BRM1-21的合成

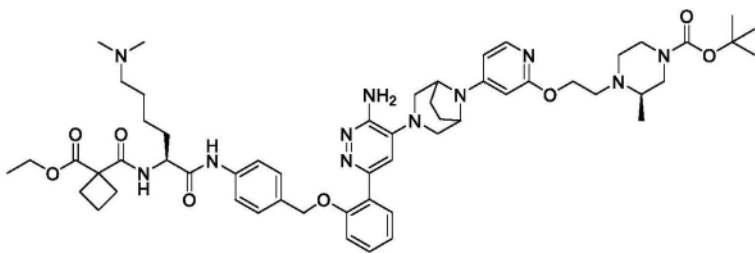
[1422] N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(2-((5-((R)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-(((S)-1-(4-(4-甲基噻唑-5-基)苯基)乙基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)异噁唑-3-基)氧基)乙基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)-N-(5-(2,5-二氧化)-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)戊基)环丁烷-1,1-二甲酰胺; 2,2,2-三氟乙酸



[1423]

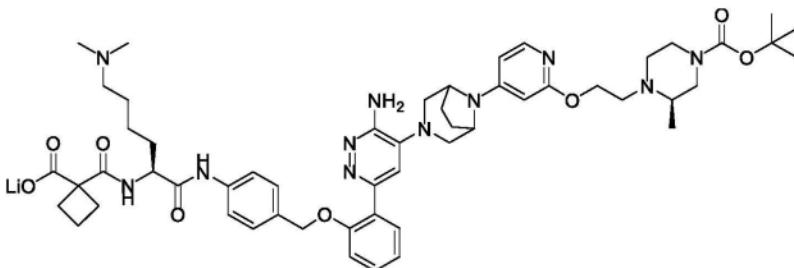


[1424] 步骤1: (3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((4-((S)-6-(二甲基氨基)-2-(1-(乙氧基羰基)环丁烷-1-甲酰氨基)己酰氨基)苄基)氧基)苯基)哒嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧基)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯



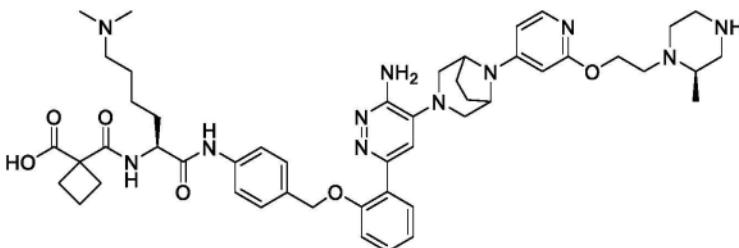
[1426] 在氮气下,于95℃将含(S)-1-((6-(二甲基氨基)-1-氧代-1-((4-((2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)己烷-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸乙酯(316mg,0.570mmol)、(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-氯吡嗪-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-基)吡啶-2-基)氧)乙基)-3-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯(538.8mg,0.850mmol)、 K_3PO_4 (240mg,1.13mmol)和 $Ad_2nBuPPdG2$ (37.8mg,0.0600mmol)的1,4-二噁烷(4mL)和水(1mL)的溶液搅拌3小时。添加水,用EtOAc萃取3次。合并有机溶剂,并在真空下浓缩。利用预填充的C18柱纯化残余物(溶剂梯度:0-100% ACN水溶液(0.05% NH_4HCO_3))纯化残余物,以得到230mg(产率39%)红色固体状标题化合物。LCMS(ESI) $[M+H]^+ = 1032$

[1427] 步骤2: 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)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸锂



[1429] 将含(3R)-4-(2-((4-(3-(3-氨基-6-(2-((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)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(210mg, 0.200mmol)和LiOH·H₂O(25.6mg, 0.610mmol)的四氢呋喃(3mL)和水(1mL)的溶液在室温下搅拌1小时。在真空下浓缩溶剂,以得到254mg(粗制品)黄色固体状标题化合物。

[1430] 步骤3: 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-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸

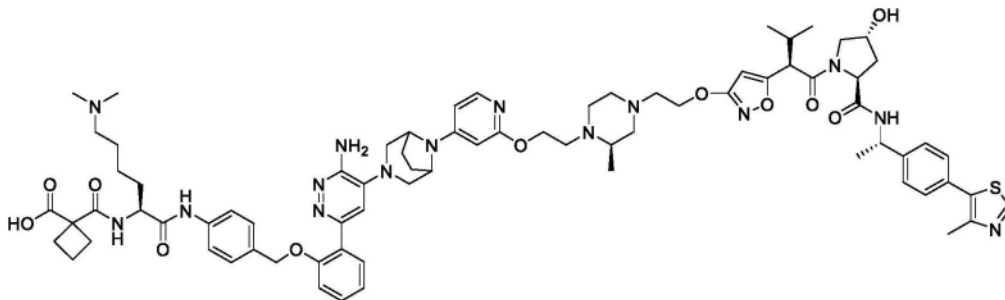


[1432] 将含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(8-(2-(2-((R)-4-(叔-丁氧基羰基)-2-甲基哌嗪-1-基)乙氧基)吡啶-4-基)-3,8-二氮杂双环[3.2.1]辛烷-3-基)哒嗪-3-基)苯氧

基) 甲基) 苯基) 氨基) -6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基) 氨基甲酰基) 环丁烷-1-甲酸锂 (254mg, 0.250mmol) 的5% TFA/HFIP (20mL) 溶液在室温下搅拌3小时。将溶剂在真空下浓缩。利用预填充的C18柱纯化残余物(溶剂梯度: 0-100% MeOH水溶液 (0.05% NH_4HCO_3)) 纯化残余物, 以得到102mg (产率44%) 红色固体状标题化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 905$ 。

[1433] 步骤4: 1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-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) 哒嗪-3-基) 苯氧基) 甲基) 苯基) 氨基) -6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基) 氨基甲酰基) 环丁烷-1-甲酸

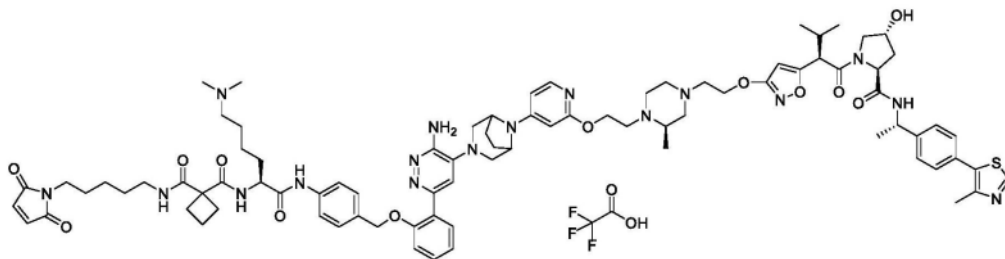
[1434]



[1435] 将含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-2-基) 氨基甲酰基) 环丁烷-1-甲酸 (102mg, 0.110mmol), (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 (61.0mg, 0.110mmol) 和 CH_3COOH (13.6mg, 0.230mmol) 的甲醇 (1.2mL) 和二氯甲烷 (0.4mL) 的溶液在室温下搅拌1小时。然后添加 NaBH_3CN (21.3mg, 0.340mmol), 并在室温下搅拌0.5小时。添加水以淬灭反应。将溶剂在真空下浓缩。利用预填充的C18柱纯化残余物(溶剂梯度: 0-100% MeOH水溶液 (0.05% NH_4HCO_3)), 以得到黄色固体状80.0mg (产率49%) 标题化合物。LCMS (ESI) $[M+H]^+ = 1429$ 。

[1436] 步骤4: N-((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-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) 哒嗪-3-基) 苯氧基) 甲基) 苯基) 氨基) -6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基) -N-(5-(2,5-二氧代)-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基) 戊基) 环丁烷-1,1-二甲酰胺 (2,2,2-三氟乙酸盐)

[1437]



[1438] 在室温下, 向含1-(((2S)-1-((4-((2-(6-氨基-5-(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-2-基)异噻唑-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)哒嗪-3-基)苯氧基)甲基)苯基)氨基)-6-(二甲基氨基)-1-氧代己-2-基)氨基甲酰基)环丁烷-1-甲酸(60.0mg,0.0400mmol)、1-(5-氨基戊基)-1H-吡咯-2,5-二酮(2,2,2-三氟乙酸)(23.0mg,粗制品)和DIPEA(163mg,1.26mmol)的DMF(2mL)的溶液中添加HATU(24.0mg,0.0600mmol)。将反应在室温下搅拌0.5小时。通过制备型HPLC(柱:XBridge Prep Phenyl OBD色谱柱,19*250mm,5 μ m;流动相A:水(0.05%FA),流动相B:ACN;流速:25mL/min;梯度:10分钟内从17% B增长到25% B,25% B;波长:254nm; R_{T1} (min):8.77)。然后将其通过制备型HPLC(柱:Xselect CSH C18 OBD柱30*150mm 5 μ m;流动相A:水(0.05%TFA),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:8分钟内从13% B增长到38% B,38% B;波长:254/220nm; RT_1 (min):8)纯化,以得到5.0mg(产率7%)黄色固体L1-CIDE-BRM1-21。LCMS(ESI) $[M+H]^+ = 1593$ 。 ^1H NMR(300MHz,DMSO- d_6) δ 10.21(s,1H),9.53(s,1H),8.99(s,1H),8.39(d,J=7.8Hz,1H),7.95-7.80(m,3H),7.67(d,J=8.1Hz,2H),7.63-7.50(m,2H),7.50-7.43(m,8H),7.19-7.08(m,1H),7.10-6.90(m,3H),6.64(s,1H),6.25(s,1H),6.11(s,1H),5.09(s,2H),4.91(t,J=7.1Hz,1H),4.48(br,4H),4.41-4.30(m,4H),3.73-3.65(m,6H),3.47-3.31(m,7H),3.13-2.88(m,12H),2.75(d,J=4.4Hz,7H),2.48-2.38(m,8H),2.25-2.15(m,1H),2.05-1.59(m,11H),1.50-1.29(m,8H),1.31-1.11(m,6H),0.96(d,J=6.4Hz,3H),0.87-0.76(m,3H)。

[1439] 合成实例22

[1440] L1-CIDE与抗体的缀合

[1441] 用1M Tris将含半胱氨酸改造的抗体(THIOMABTM)的10mM琥珀酸盐,pH 5,150mM NaCl,2mM EDTA的pH调节至pH 7.5-8.5。将3-16当量的L1-CIDE(含有硫醇反应性马来酰亚胺基)溶于DMF或DMA(浓度=10mM)中,并添加到经还原、再氧化和pH调节的抗体中。将反应在室温或37℃温育,并监测直至反应完成(1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Ab-CIDE,目的是去除残留的未反应的接头药物中间体和聚集的蛋白质(如果存在的水平较高)。在一个实例中,用10mM组氨酸乙酸盐(pH 5.5)稀释Ab-CIDE,直到最终pH值约为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阳离子交换色谱法纯化。可替代地,使用连接至Akta纯化系统的S200柱或Zeba离心柱,通过凝胶过滤色谱法纯化Ab-CIDE。透析用于纯化缀合物。

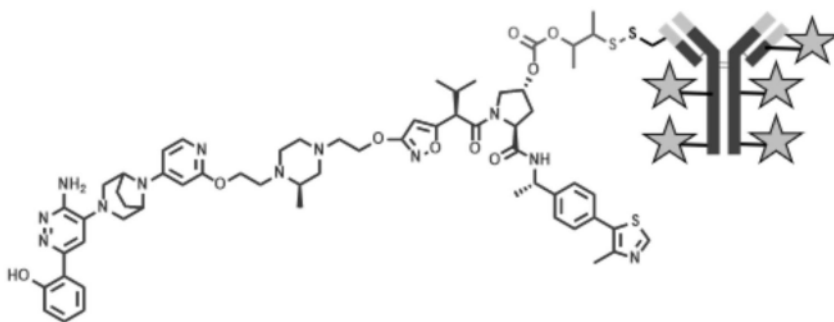
[1442] 使用凝胶过滤或透析将THIOMABTMAb-CIDE配制到含240mM蔗糖的20mM His/乙酸盐(pH 5)中。纯化的Ab-CIDE通过离心超滤浓缩,并在无菌条件下通过0.2 μ m过滤器过滤,并在-20℃冷冻保存。

[1443] 生物实例1:

[1444] 细胞水平测定

[1445] BRM的免疫荧光检测

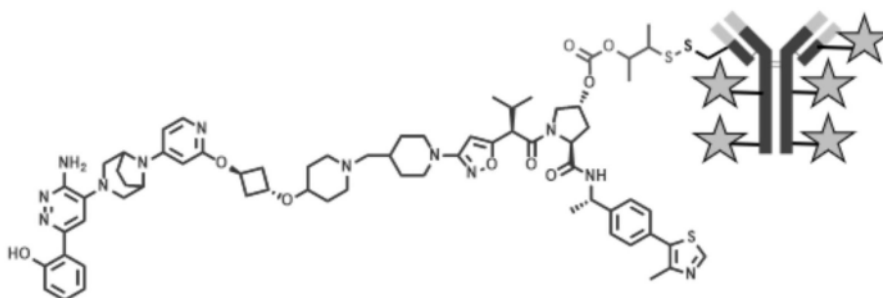
[1446]



Ab-L1a-CIDE-BRM1-1

[1447] 与CD22的缀合具有5.8的DAR。与EpCAM的缀合具有5.9的DAR。

[1448]



Ab-L1a-CIDE-BRM1-3

[1449] 与CD22的缀合具有5.8的DAR。与EpCAM的缀合具有5.9的DAR。CD-22: 硫基Hu抗CD22 10F4v3高DAR[LC:K149C HC:Y373CHC:L174C]MeMe二硫化物BRM CIDE; EpCAM: 硫基Hu抗Her2 7C2高DAR[LC:K149C HC:L174C HC:Y373C]MeMe二硫化物BRM CIDE

[1450] 图1a和图1b显示了Ab-L1a-CIDE-BRM1-1的活性。图2a和图2b显示了Ab-L1a-CIDE-BRM1-3的活性。

[1451] 生物实例2:

[1452] PK/PD BJBAB肿瘤测定

[1453] 在BJAB-luc人非霍奇金淋巴瘤的小鼠异种移植模型中评估抗CD22-BRM Ab-CIDE的PK/PD效应。BJAB-luc从Genentech细胞系库中获取。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。

[1454] 为建立模型, 将肿瘤细胞 (2000万个, 在0.2mL 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 (300-400mm³) 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CD22-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、pH4中配制而成。

[1455] 给药后四天, 将小鼠安乐死并收集肿瘤和全血。将肿瘤切除并分成两等份, 然后在液氮中快速冷冻。一份用于测量释放的BRM CIDE的水平, 另一份用于评估下游PD标记的调节。在麻醉手术下通过末端心脏穿刺收集全血, 并将其放入含有肝素锂的试管中。将血样置于湿冰上直至离心 (收集后15分钟内)。样品在4℃以10,000rpm离心5分钟, 并收集血浆, 将

其置于干冰上,并储存在-70℃,直到分析接头稳定性和总抗体药代动力学。

[1456] 异种移植组织的蛋白质印迹

[1457] 在干冰上将冷冻组织切成15-30mg的块,然后转移到1.5mL Eppendorf安全锁管中(带有一个3.2mm (NextAdvance (3.2mm,SSB32)) 不锈钢珠)。添加RIPA缓冲液(350uL)(补充有0.5M NaCl和新添加的1xHalt蛋白酶和磷酸酶抑制剂),并将样品管放入Bullet Blender组织匀浆器中。样品以最高速度均质化3分钟。样品管在4℃在台式离心机中以最高速度离心5分钟,并将裂解物转移到新样品管中。使用Pierce BCA蛋白质分析测定蛋白质浓度。蛋白裂解物用样品缓冲液和还原剂制备,并在95℃培育3分钟。蛋白质(12ug)在3-8% Tris乙酸盐凝胶上用tris-乙酸盐电泳缓冲液分离,然后使用iBlot转移装置(25V,10分钟)转移到硝酸纤维素膜上。在用含5%乳的TBS-T封闭膜30分钟后,以1/1000添加一抗。针对SMARCA2 (BRM) (兔,Cell signaling technologies目录号11966)和HDAC1 (小鼠,Cell signaling technologies目录号5356)对膜进行印迹,并在摇杆上4℃培育过夜。第二天,在室温下用TBS-T在摇床上洗涤膜30分钟,更换洗涤缓冲液至少3次。然后将膜与1/5000在TBS-T中的Licor secondary在室温下在摇床上培育1小时。用TBS-T洗涤印迹1小时,更换洗涤缓冲液至少6次。在Licor成像系统上捕捉图像。

[1458] 进行鼠肿瘤测定。表1显示了研究组和参数。

[1459] 表1.BJAB肿瘤(CB17-SCID小鼠),PK/PD研究

[1460]

组	化合物	mg/kg	频率	途径	PD 时间点	小鼠数量
1	载体对照	NA	一次	IV	96 h	5
2	未缀合的 mAb 对照	10	一次	IV	96 h	5
3	CD22-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	1	一次	IV	96 h	5
4	EpCAM-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	1	一次	IV	96 h	5
5	CD22-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	10	一次	IV	96 h	5
6	EpCAM-L1a-CIDE-BRM1-1 DAR6	10	一次	IV	96 h	5
7	CD22-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	1	一次	IV	96 h	5
8	HER2-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	1	一次	IV	96 h	5
9	CD22-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	10	一次	IV	96 h	5
10	HER2-L1a-CIDE-BRM1-3 DAR6	10	一次	IV	96 h	5
11	CIDE-BRM1-3 未缀合的对照	20	一次	IV	96 h	5

[1461] • 将肿瘤组织分为2份,分别用于(1)BRM、BRG、PBRM1 PD和(2)肿瘤PK

[1462] • 血浆PK时间点与上面列出的PD时间点相同

[1463] • 抗体缀合物,IV制剂:组氨酸缓冲液,剂量体积=5mL/kg

[1464] • CIDE-BRM1-3,IV制剂:10% HP-b-CD和50mM乙酸钠水溶液(pH 4.0),剂量体积=5mL/kg

[1465] Ab-L1a-CIDE-BRM1-1的剂量和抗原依赖性抗肿瘤活性如图3A-3L所示,Ab-L1a-CIDE-BRM1-3的剂量和抗原依赖性抗肿瘤活性如图4A-4L所示。

[1466] 生物实例3:

[1467] 靶蛋白降解测定

[1468] 关于改进的PD响应的数据报告。图5示出的数据表明Ab-L1a-CIDE-BRM1-1、BRM和BRG1的降解与抗肿瘤活性相关。图6示出的数据表明,Ab-L1a-CIDE-BRM1-3、BRM和BRG1的降

解与抗肿瘤活性的相关性较低。图7示出的数据表明,抗体缀合策略增加降解活性。获得这些数据的时间点皆为96小时。Ab-L1a-CIDE-BRM1-1的降解程度高于未缀合的CIDE-BRM1-3,而两种化合物在未缀合形式的细胞测定中具有相似的BRM降解特性(WO2019195201中描述的CIDE-BRM1-3与CIDE-BRM1-1测定)。该效应表明本文所述的连接策略可以调节降解特性。

[1469] 生物实例4:

[1470] 用于确定DC50和Dmax的细胞测定

[1471] 在两个细胞系中进行细胞水平测定,以测定Ab-L1-CIDE的DC50和Dmax。BJAB、HCC515和H1944细胞分别以5000、4000和2500个细胞/孔的密度接种在384孔板中。第二天,添加Ab-CIDE。经药物处理24小时后,将细胞用4%甲醛固定15分钟。将孔板用PBS洗涤三次。将细胞与IF封闭溶液(10% FCS、1% BSA、0.1% Triton、0.01% 叠氮化物、X-100的PBS溶液)一起培育。1.5小时后,添加在IF封闭缓冲液中稀释2X的一抗溶液:添加了BRM(Cell signaling目录号11966,1:2000)。将孔板在4℃培育过夜。第二天早上,用PBS洗涤细胞三次。然后将细胞用二抗(兔-Alexa 488A21206(1:2000))在室温下避光培育1小时。将Hoechst H3570以1:5000添加到孔中,并将孔板继续培育30分钟。将孔板用3xPBS洗涤,并在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。

[1472] 数据示出于下表2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gD和抗TROP2不与NCI-H1944细胞相互作用,而抗TfR2则与该细胞相互作用。抗gD进一步不与HCC515细胞相互作用,而抗TfR2和抗TROP2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Dmax值。

[1473] 表2.

Ab-L1-CIDE-BRM	靶	DAR	NCI-H1944		HCC515	
			DC50 (μ g/ml)	Dmax	DC50 (μ g/ml)	Dmax
噬基 Hu 抗 gD 5B6 高 DAR [HC:L174C:HC:Y373C:LC:K149C] diMe Me 二硫化物 BRM 降解剂 phos Ab-L1-CIDE-BRM1-9	gD	5.66	1.56	95	0.59	93
噬基 Hu 抗 TfR2.NG2LH 高 DAR [HC:L174C:HC:Y373C:LC:K149C] diMe Me 二硫化物 BRM 降解剂 phos Ab-L1-CIDE-BRM1-9	TfR2	5.87	0.74	94	0.12	96
噬基 Hu 抗 gD 5B6 LALA.PG 高 DAR [LC:K149C:HC:Y373C:HC:L174C] MC-sqCit-BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-20	gD	5.90	9.37	93	2.65	94
噬基 Hu 抗 TfR2.LALAPG 高 DAR [LC:K149C:HC:Y373C:HC:A140C] MC-sqCit-BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-20	TfR2	6.14	0.10	95	0.02	95
噬基 Hu 抗 TROP2 LALA.PG 高 DAR [LC:K149C:HC:Y373C:HC:A140C] MC-sqCit-BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-20	TROP2	6.00	6.45	93	<0.01	95

[1474]

噬基 Hu 抗 gD 5B6 LALA.PG 高 DAR [LC:K149C:HC:Y373C:HC:A140C] MC-sqDML-BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-19	gD	5.89	NA	32	7.60	86
噬基 Hu 抗 TfR2.LALA.PG 高 DAR [LC:K149C:HC:Y373C:HC:A140C] MC-sqDML-BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-19	TfR2	5.79	0.36	80	0.33	84
噬基 Hu 抗 TROP2 LALA.PG 高 DAR [LC:K149C:HC:Y373C:HC:A140C] MC-sqDML-BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-19	TROP2	5.73	NA	23	>50	82

噬基 Hu 抗 gD 5B6 高 DAR [HC:L174C:HC:Y373C:LC:K149C] MC-gluc BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-15	gD	5.96	>10	NA	>10	NA
噬基 Hu 抗 TfR2.NG2LH 高 DAR [HC:L174C:HC:Y373C:LC:K149C] MC-gluc BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-15	TfR2	5.97	>10	NA	>10	NA
噬基 Hu 抗 TROP2 高 DAR [HC:L174C:HC:Y373C:LC:K149C] MC-gluc BRM 降解剂 Ab-L1-CIDE-BRM1-15	TROP2	5.93	>10	NA	>10	NA

噬基 Hu 抗 TfR1.NG2LH.FcRn null 高 DAR [HC:L174C:HC:Y373C:LC:K149C] MC-sqCit BRM CIDE Ab-L1-CIDE-BRM1-13	TfR1	5.96	0.07	77	未测量	
--	------	------	------	----	-----	--

[1475] 生物实例5:

[1476] 溶酶体释放测定

[1477] 运行溶酶体释放测定以测量在模拟细胞内环境的环境中降解剂从L1部分的释放。为了使降解剂在结合BRM并将其运送到泛素连接酶方面具有活性,首先必须释放L1。

[1478] 该测定使用与BRM结合化合物结合的L1运行,命名为“L1-BRM1-#”,对应于各自的CIDE。该测试确定L1与BRM部分的共价连接是否发生裂解。接头药物(10 μ M)与人肝溶酶体(0.17mg/mL)和半胱氨酸(5mM)在100mM柠檬酸缓冲液(pH 5.5)中培育24小时。通过Q Exactive Orbitrap质谱仪对样品进行分析,其中使用含有(A) 0.1%甲酸水溶液和(B) 0.1%甲酸乙腈溶液的LC流动相进行梯度洗脱。

[1479] 测定结果显示于下表3中。结果表明,L1与BRM部分的直接链接策略在细胞环境中释放。一种缀合物L1-CIDE-BRM1-15不包含本文所述的接头-1类型的抗体接头。在测试的DAC中,L1-CIDE-BRM1-15未在溶酶体提取物中释放降解剂。这一发现支持将降解剂选择性连接至Ab的策略,例如本文描述的接头1类型的L1接头。

[1480] 表3.

L1-BRM	从溶酶体提取物中释放
L1-BRM1-15 (来自 CIDE-BRM1-15 的 BRM)	否
L1-BRM1-9 (来自 CIDE-BRM1-9 的 BRM)	是
L1-BRM1-13 (来自 CIDE-BRM1-13 的 BRM)	是
L1-BRM1-20 (来自 CIDE-BRM1-20 的 BRM)	是

[1482] *“否”表示在37 $^{\circ}$ C在溶酶体提取物中培育24小时后观察到<15%的游离药物。“是”表示在37 $^{\circ}$ C在溶酶体提取物中培育24小时后观察到>50%的游离药物。

[1483] 已努力确保所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但应考虑到一些实验误差和偏差。

[1484] 本领域的技术人员将认识到许多与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料,可用于实施本文所述的发明。本发明决不仅限于所述的方法和材料。

[1485] 除非另外定义,否则本文所用的所有科学技术术语的含义与本主题所属领域普通技术人员通常理解的含义相同,并且与下述文献一致:Singleton等人(1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology,第2版,J.Wiley&Sons,New York,NY;and Janeway,C.,Travers,P.,Walport,M.,Shlomchik(2001) Immunobiology,第5版,Garland Publishing,New York.

[1486] 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。应理解的是,本文描述的实施例包括“由实施例组成”和/或“基本上由实施例组成”。

[1487] 如本文中所使用的术语“约”,当涉及数值时,是指包括从指定量起的变化,在一些实施例中包括指定量的 $\pm 50\%$,在一些实施例中包括指定量的 $\pm 20\%$,在一些实施例中包括指定量的 $\pm 10\%$,在一些实施例中包括指定量的 $\pm 5\%$,在一些实施例中包括指定量的 $\pm$

1%，在一些实施例中包括指定量的 $\pm 0.5\%$ ，在一些实施例中包括指定量的 $\pm 0.1\%$ ，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。

[1488] 若提供数值的范围，则应理解的是，介于该范围上限与下限之间的每个中间值(到下限的单位的十分之一，除非上下文另外明确规定)以及所指定范围内的任何其他指定值或中间值，均涵盖在本文之内。这些小范围的上限和下限可独立地包括在该较小范围内，并且也涵盖在本文之内，以所指定范围内任何明确排除的限值为准。在规定范围包括一个或两个限制的情况下，还包括排除那些包括的限制中的一个或两个的范围。

[1489] 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变型例和其他实施例。因此，应当理解的是，本主题不限于所公开的特定实施例，并且变型例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，但是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使用。

序列表

<110> 基因泰克公司 (Genentech, Inc.)
<120> 降解 BRM 的抗体缀合化学诱导剂及其方法
<130> P36010-W0
<140>
<141>
<150> 63/054,757
<151> 07-21-2020
<160> 36
<170> PatentIn 3.5 版
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 1

[0001]

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr Ser Val Asn
1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

[0002]

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Asp Tyr Tyr Val Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

[0003]

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Phe Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

[0004] Tyr Tyr Thr Ser Asn Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10

<211> 450

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

[0005] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
65 70 75 80

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Phe Asn Tyr Ala Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
	115							120					125				
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
	130						135					140					
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165					170						175		
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
[0006]	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210						215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
			260						265						270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275						280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290						295						300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

[0007] Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe Ala Met Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 18

<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe
1 5 10

[0008]

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0009] Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser
20 25 30

Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

[0010]

Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn

1 5 10

[0011]

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 25
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

[0012]

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 26
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser

	20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe	50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	
[0013]			
<210>	27		
<211>	219		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	27		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser	20	25	30
Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala	35	40	45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			

65						70						75						80
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly			
				85					90					95				
Ser	Gln	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
				100					105					110				
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu			
				115					120					125				
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe			
				130					135					140				
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Cys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln			
				145					150					155				
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser			
				165					170					175				
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu			
				180					185					190				
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser			
				195					200					205				
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
				210					215									
<210> 28																		
<211> 450																		
<212> PRT																		
<213> 智人																		
<400> 28																		
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly			
				5					10					15				
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Glu	Phe	Ser	Arg	Ser			

[0014]

	20	25	30
	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35	40	45
	Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe		
	50	55	60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr		
	65	70	75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln		
	100	105	110
[0015]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	115	120	125
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
	130	135	140
	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
	145	150	155 160
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
	165	170	175
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
	180	185	190
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195	200	205
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210	215	220

	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	
	225	230 235 240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	
		245 250 255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	
		260 265 270
	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	
		275 280 285
	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	
		290 295 300
	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	
		305 310 315 320
[0016]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	
		325 330 335
	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	
		340 345 350
	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	
		355 360 365
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	
		370 375 380
	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	
		385 390 395 400
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	
		405 410 415
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	
		420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 29

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 huTfR1, hIgG1, LC, K149C, HC, L174C, Y373C, NG2LH 重链

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

[0017]

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
	130						135					140					
	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	
	145					150				155						160	
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Cys	Gln	Ser	Ser	
					165				170						175		
	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	
				180					185					190			
	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
		195					200						205				
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
	210						215					220					
[0018]	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
				245						250					255		
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
				260					265					270			
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
		275					280						285				
	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
	290						295					300					
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305				310						315					320	
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				325						330					335		

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Cys Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

[0019]

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 30

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 huTfR1, hIgG1, LC, K149C, HC, L174C, Y373C, NG2LH 轻链

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

	Tyr	Asp	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65				70					75					80		
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Leu	
					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	
				100					105					110			
	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	
		115						120					125				
	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	
		130					135						140				
[0020]	Lys	Val	Gln	Trp	Cys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	
	145					150					155					160	
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
					165					170						175	
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	
					180				185					190			
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	
		195						200					205				
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys											
		210															
	<210>	31															
	<211>	445															
	<212>	PRT															
	<213>	人工序列															
	<220>																
	<223>	抗 huTfR2. hIgG1. LC. K149C. HC. L174C. Y373C. NG2LH 重链															

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0021] 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Cys Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	
	195							200					205				
	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	
	210						215					220					
	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	
	225					230					235					240	
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	
				245						250					255		
	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	
			260						265					270			
	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	
		275					280						285				
[0022]	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	
	290						295					300					
	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	
	305				310					315					320		
	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				325						330					335		
	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
			340						345					350			
	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
		355						360					365				
	Gly	Phe	Cys	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
	370						375					380					
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
	385					390					395					400	

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 32

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 huTfR2, hIgG1, LC, K149C, HC, L174C, Y373C, NG2LH 轻链

<400> 32

[0023]

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

[0024] Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 33

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 huTfR1, hIgG1, LC, K149C, NG2LH 重链

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe

	50	55	60	
	Lys Ser Arg Ala Thr	Leu Thr Val Asp Lys	Ser Ala Ser Thr Ala Tyr	
	65	70	75	80
	Met Glu Leu Ser Ser	Leu Arg Ser Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
		85	90	95
	Ala Arg Gly Thr Arg	Ala Tyr His Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Met Val	
	100	105	110	
	Thr Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly Pro Ser	Val Phe Pro Leu Ala	
	115	120	125	
	Pro Ser Ser Lys Ser	Thr Ser Gly Gly Thr	Ala Ala Leu Gly Cys Leu	
	130	135	140	
[0025]	Val Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro Val Thr	Val Ser Trp Asn Ser Gly	
	145	150	155	160
	Ala Leu Thr Ser Gly	Val His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln Ser Ser	
		165	170	175
	Gly Leu Tyr Ser Leu	Ser Ser Val Val Thr	Val Pro Ser Ser Ser Leu	
	180	185	190	
	Gly Thr Gln Thr Tyr	Ile Cys Asn Val Asn	His Lys Pro Ser Asn Thr	
	195	200	205	
	Lys Val Asp Lys Lys	Val Glu Pro Lys Ser	Cys Asp Lys Thr His Thr	
	210	215	220	
	Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Pro Val Ala	Gly Pro Ser Val Phe Leu	
	225	230	235	240
	Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg Thr Pro Glu	
		245	250	255

	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys	
	260	265 270
	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys	
	275	280 285
	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	
	290	295 300
	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	
	305	310 315 320
	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys	
	325	330 335
	Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	
	340	345 350
[0026]	Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	
	355	360 365
	Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln	
	370	375 380
	Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly	
	385	390 395 400
	Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	
	405	410 415
	Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn	
	420	425 430
	His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	435	440 445
	<210> 34	
	<211> 214	
	<212> PRT	

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 huTfR1, hIgG1, LC, K149C, NG2LH 轻链

<400> 34

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

[0027] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 35

<211> 445

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 huTfR2. hIgG1. LC. K149C. NG2LH 重链

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0028]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

	115	120	125
	Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu		
	130	135	140
	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly		
	145	150	155 160
	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
	165	170	175
	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu		
	180	185	190
	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr		
	195	200	205
[0029]	Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr		
	210	215	220
	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu		
	225	230	235 240
	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
	245	250	255
	Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
	260	265	270
	Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
	275	280	285
	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
	290	295	300
	Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
	305	310	315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

[0030] Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗 huTfR2. hIgG1. LC. K149C. NG2LH 轻链

<400> 36

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val

35	40	45
Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65	70	75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu 85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala 100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly 115	120	125
[0031]		
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala 130	135	140
Lys Val Gln Trp Cys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln 145	150	155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser 165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr 180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser 195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210		

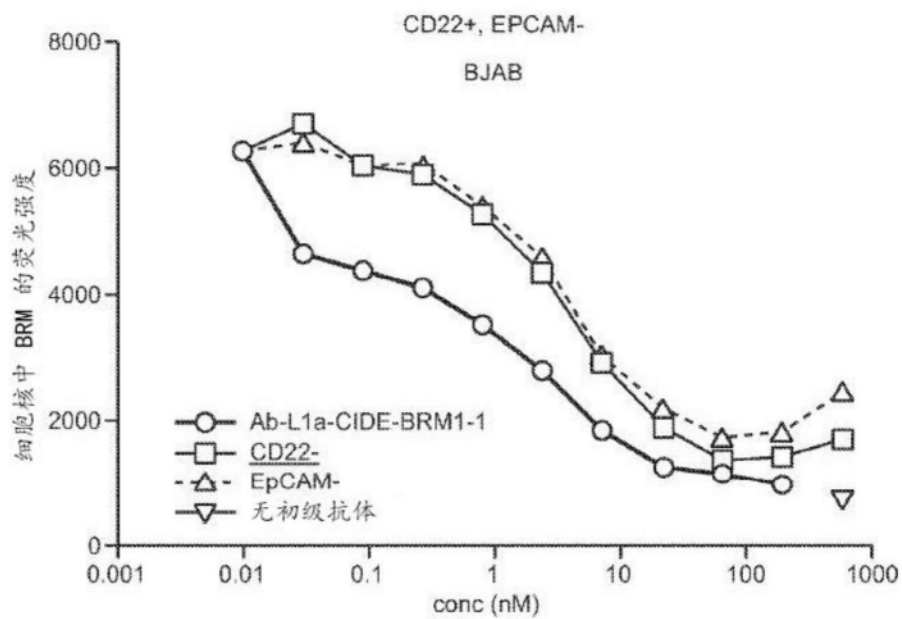


图1A

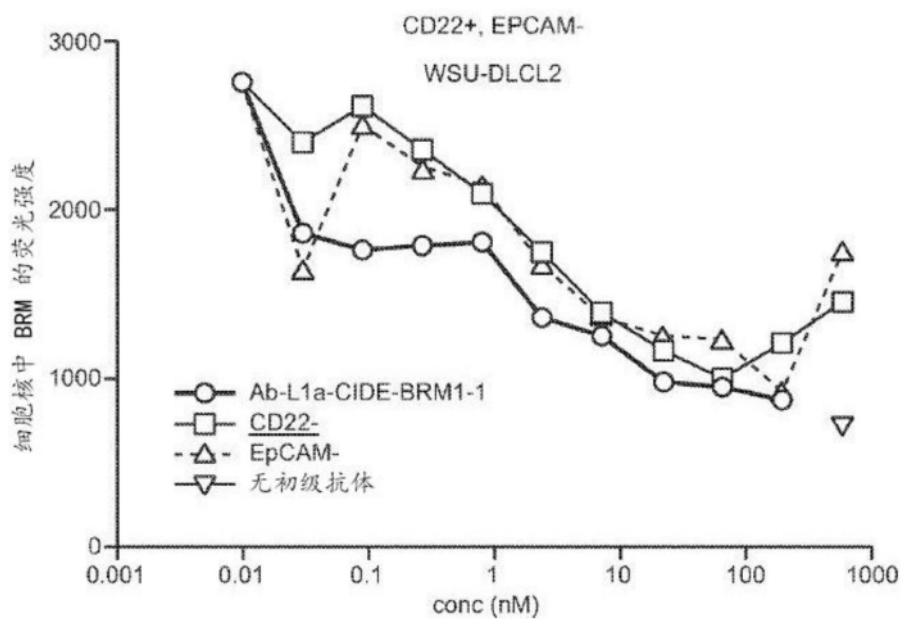


图1B

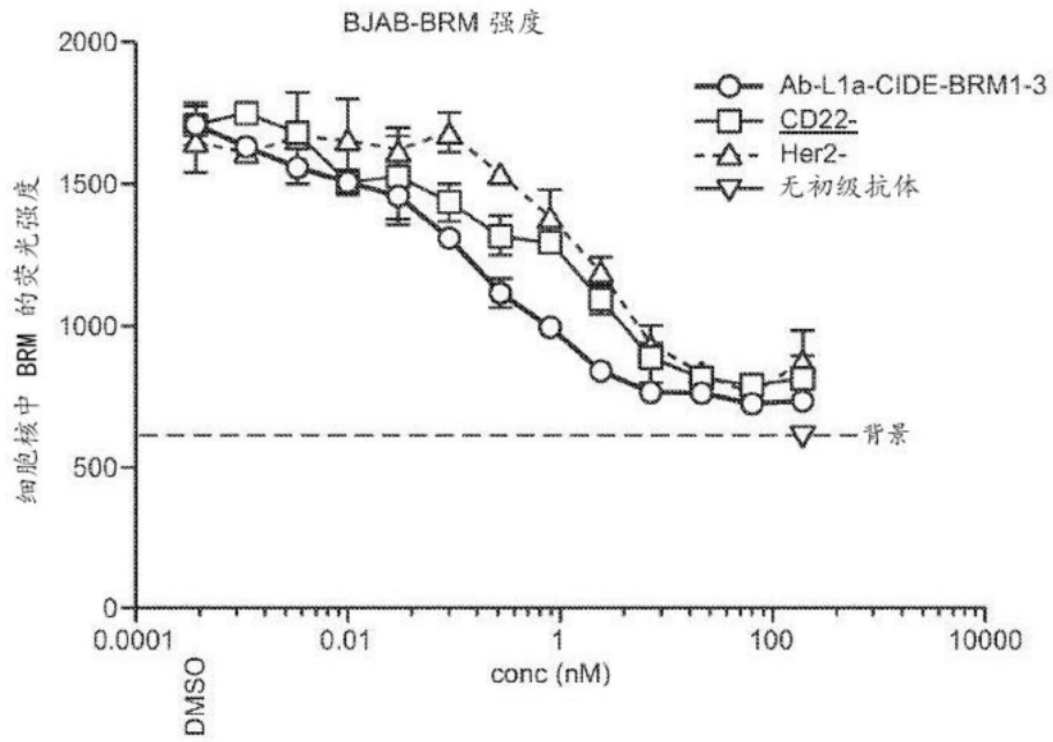


图2A

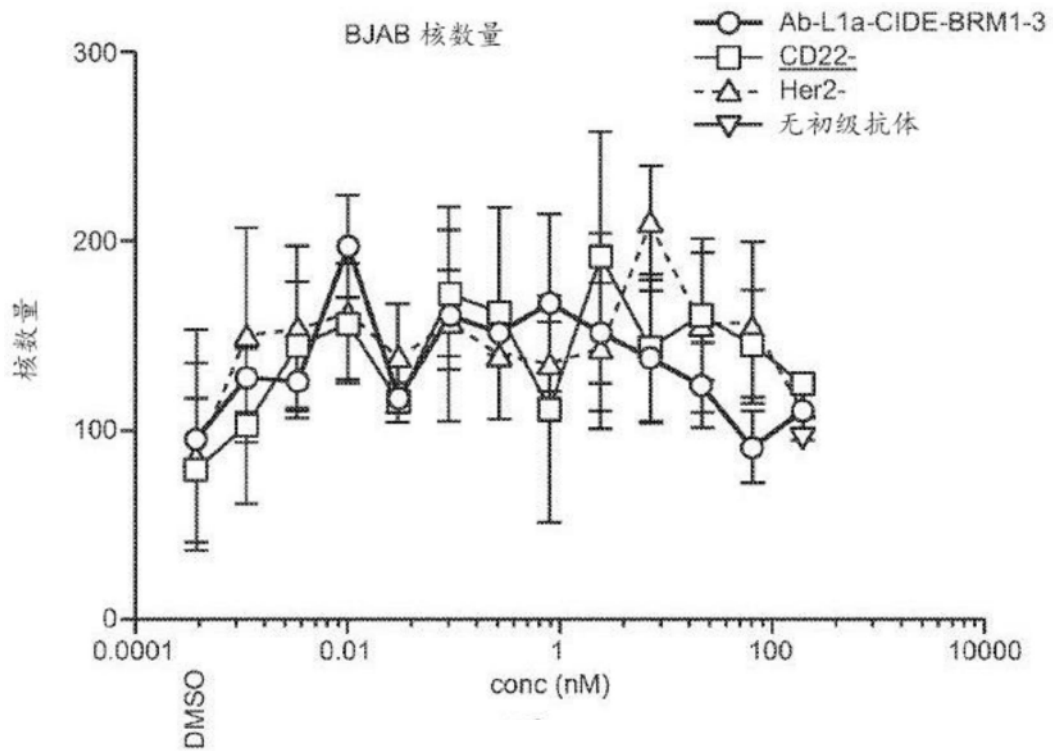


图2B

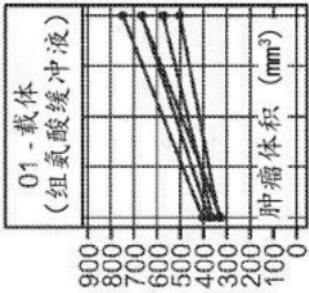


图3A

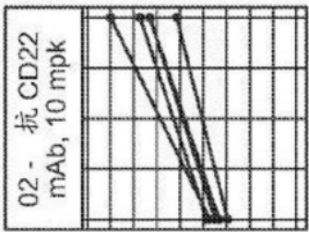


图3B

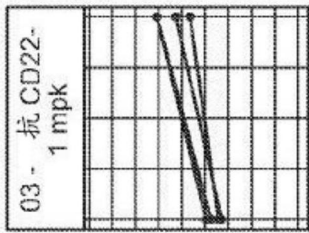


图3C

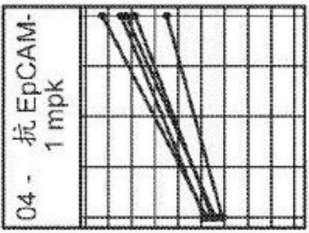


图3D

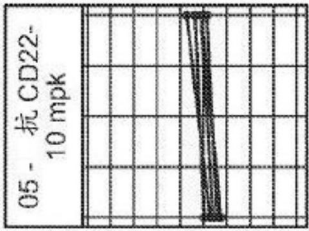


图3E

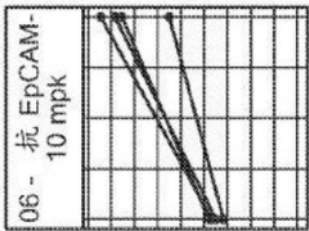


图3F

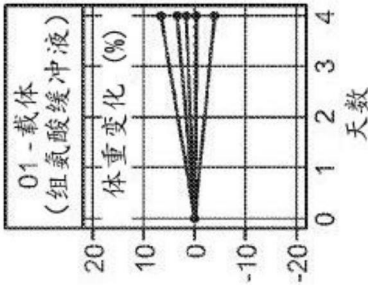


图3G

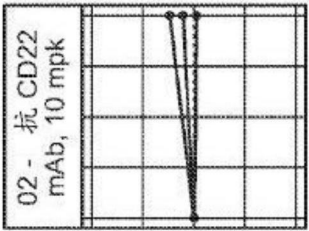


图3H

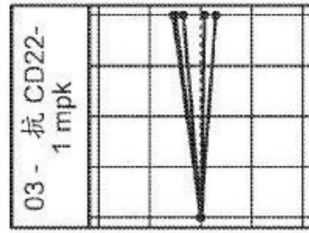


图3I

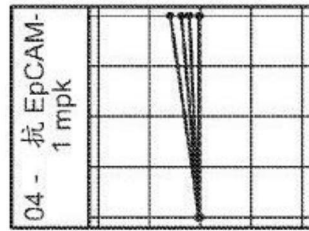


图3J

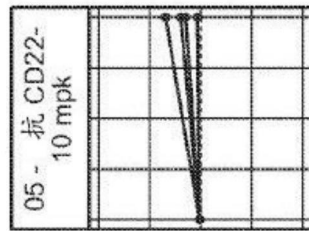


图3K

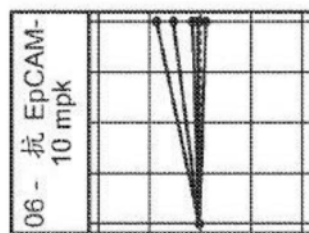


图3L

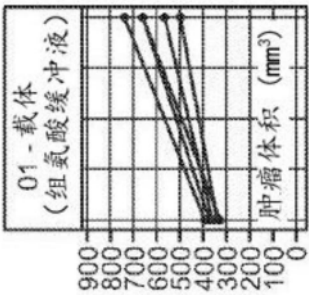


图4A

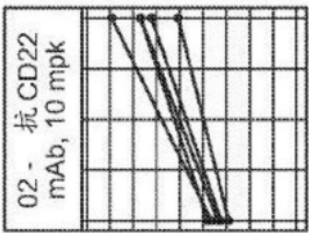


图4B

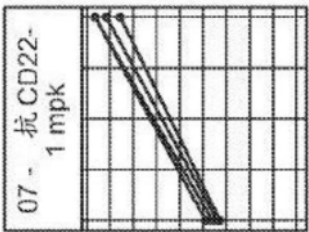


图4C

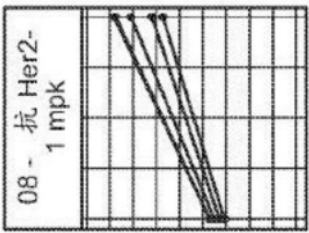


图4D

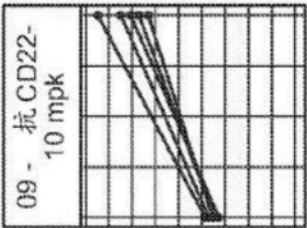


图4E

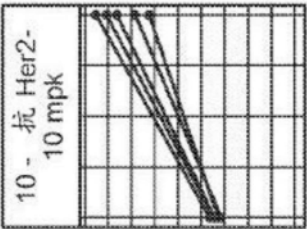


图4F

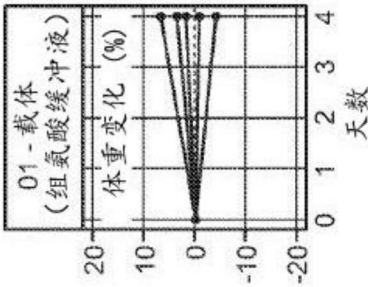


图4G

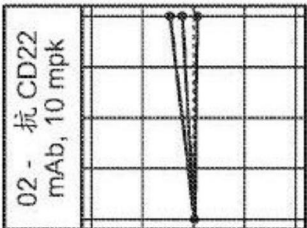


图4H

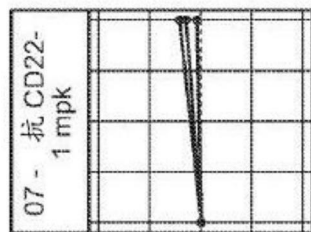


图4I

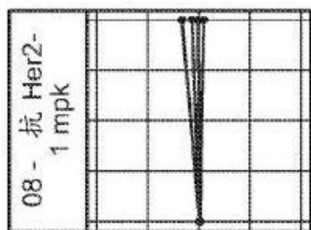


图4J

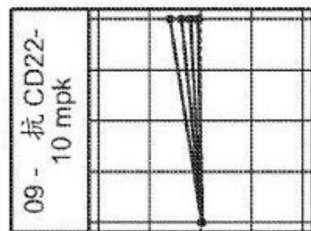


图4K

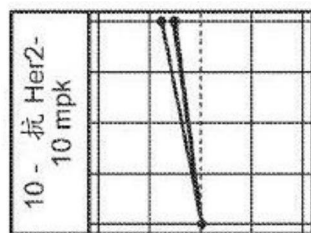


图4L

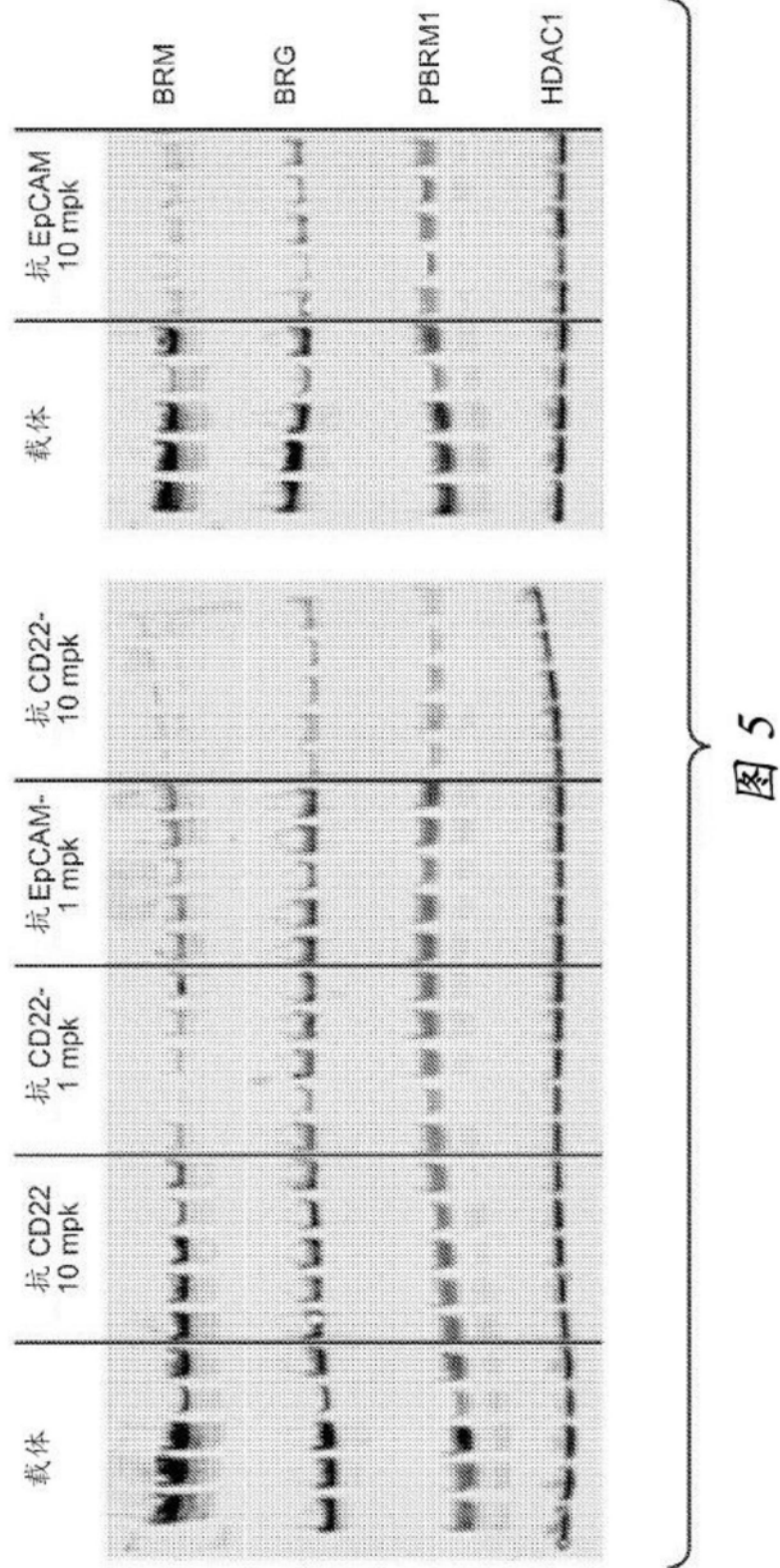


图5

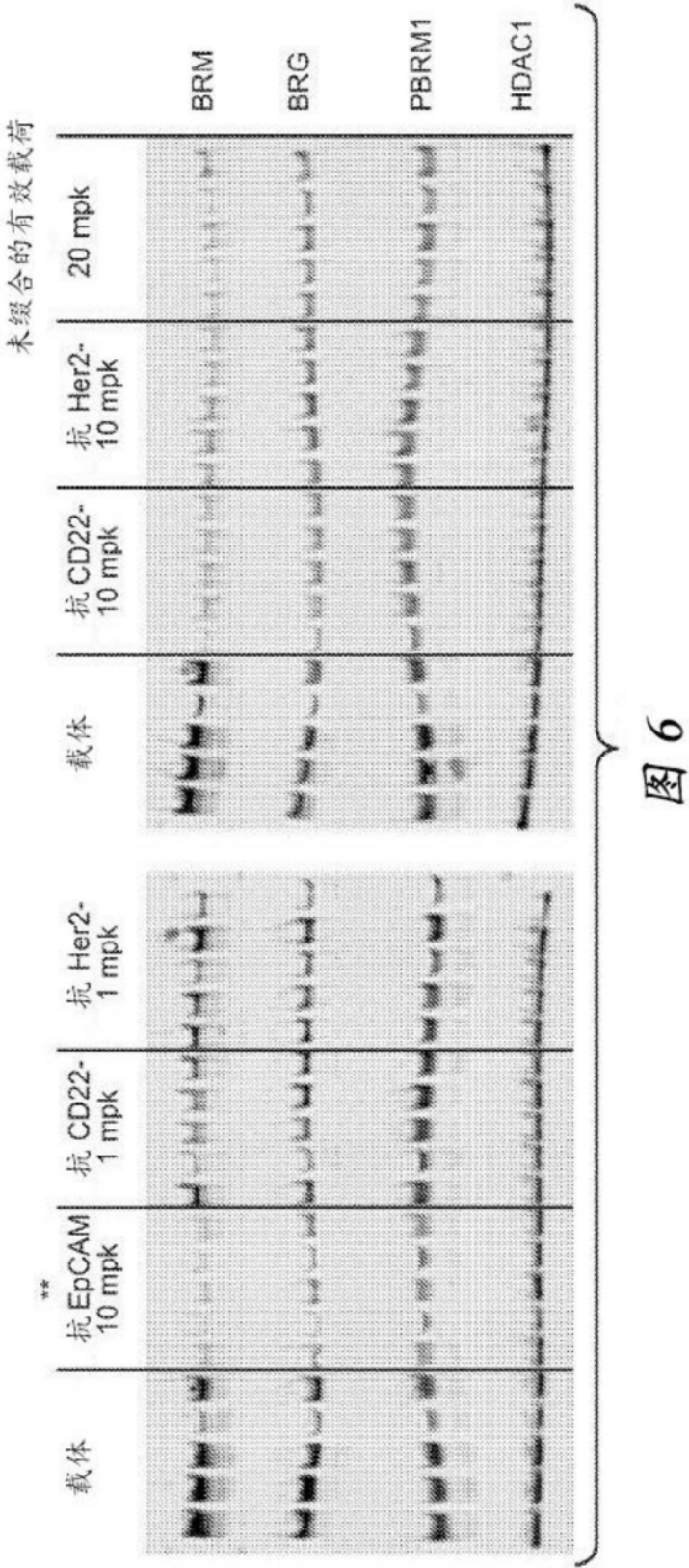


图6

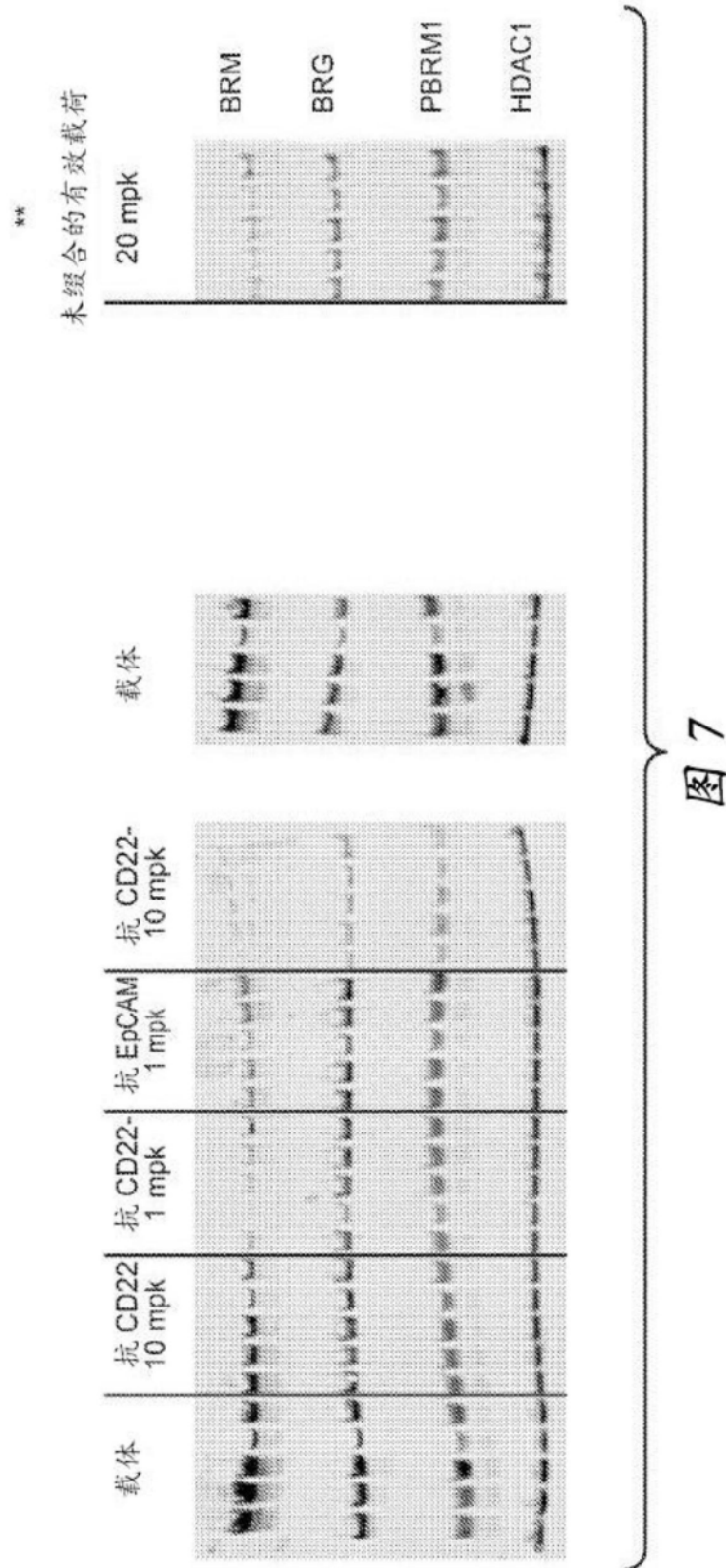


图7

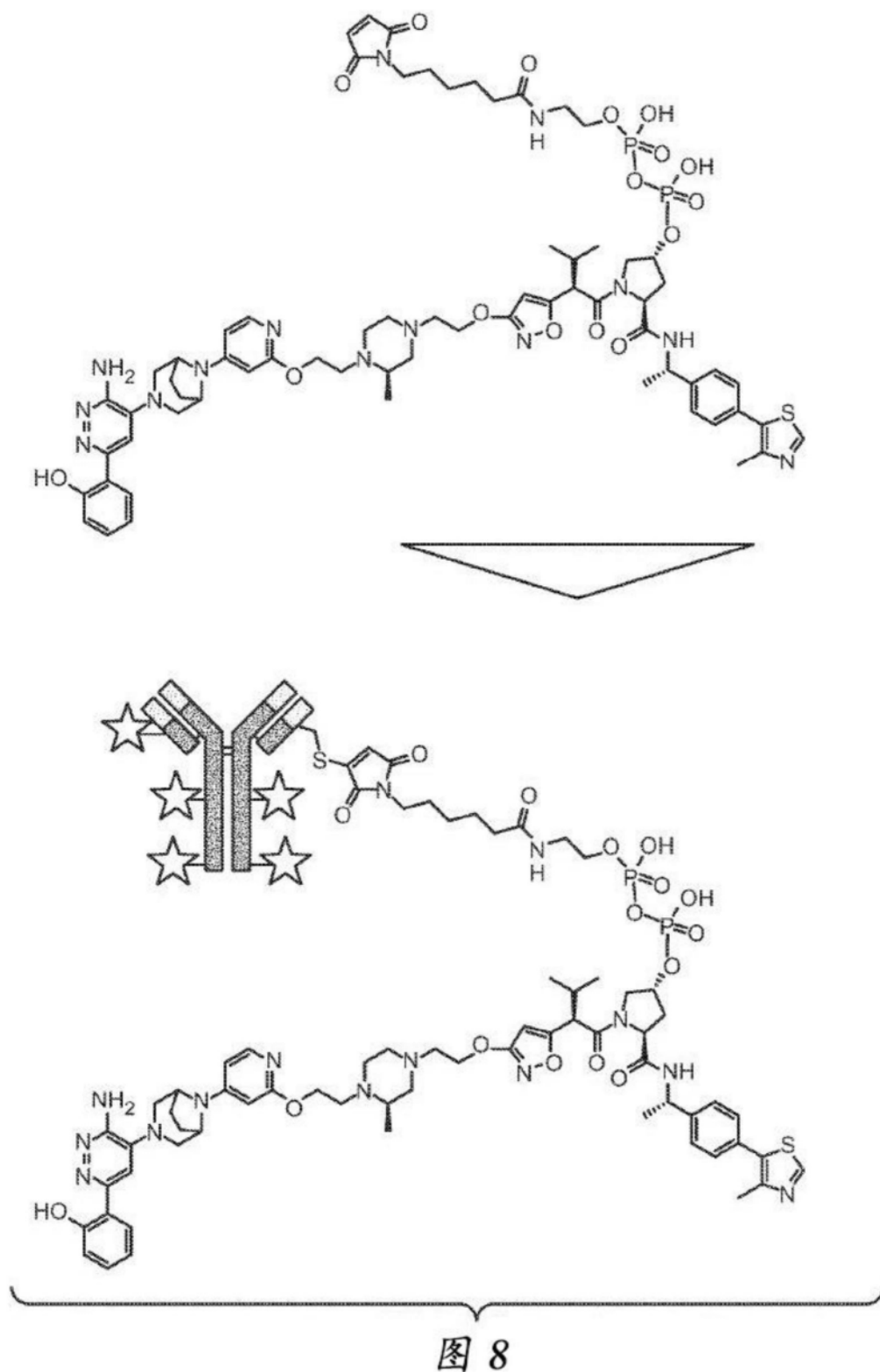


图8

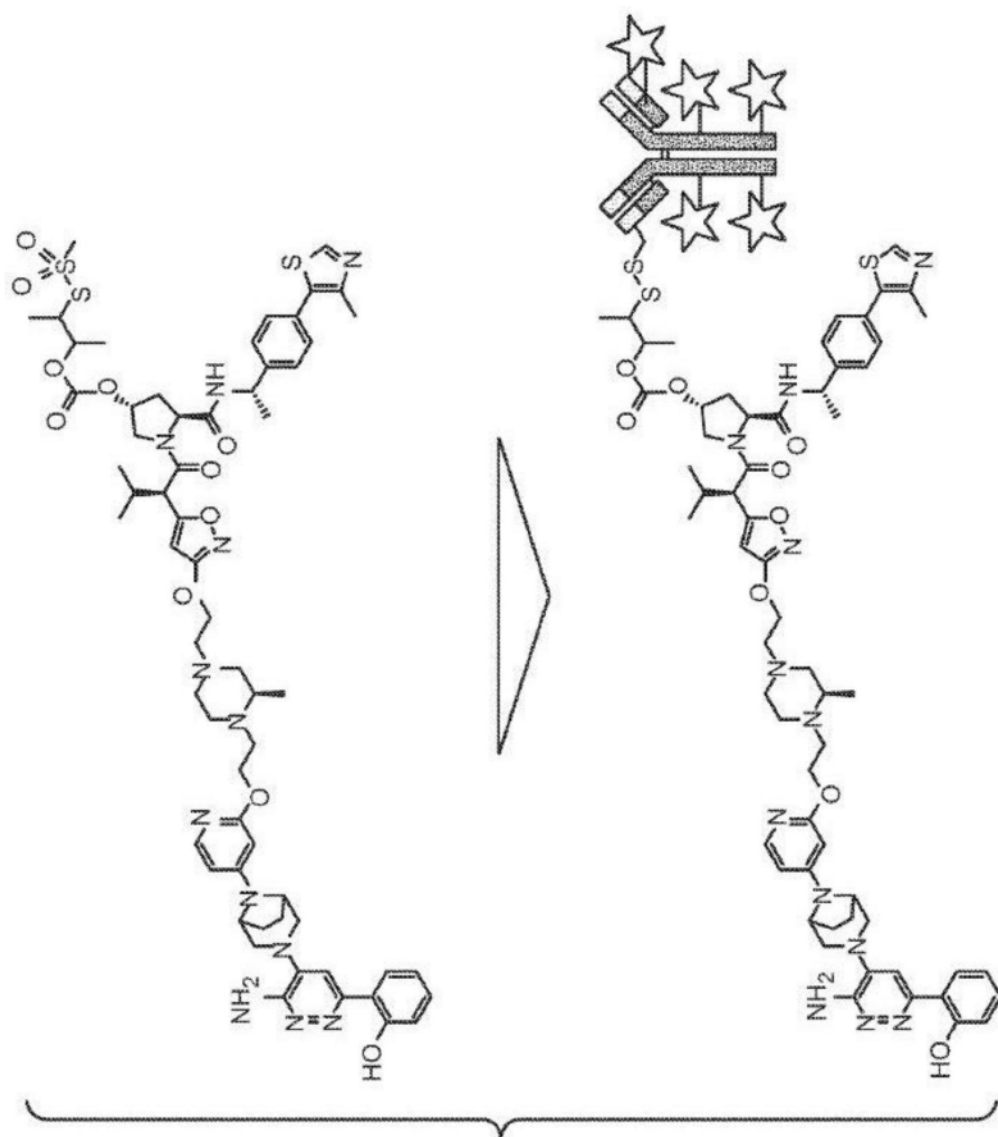


图9

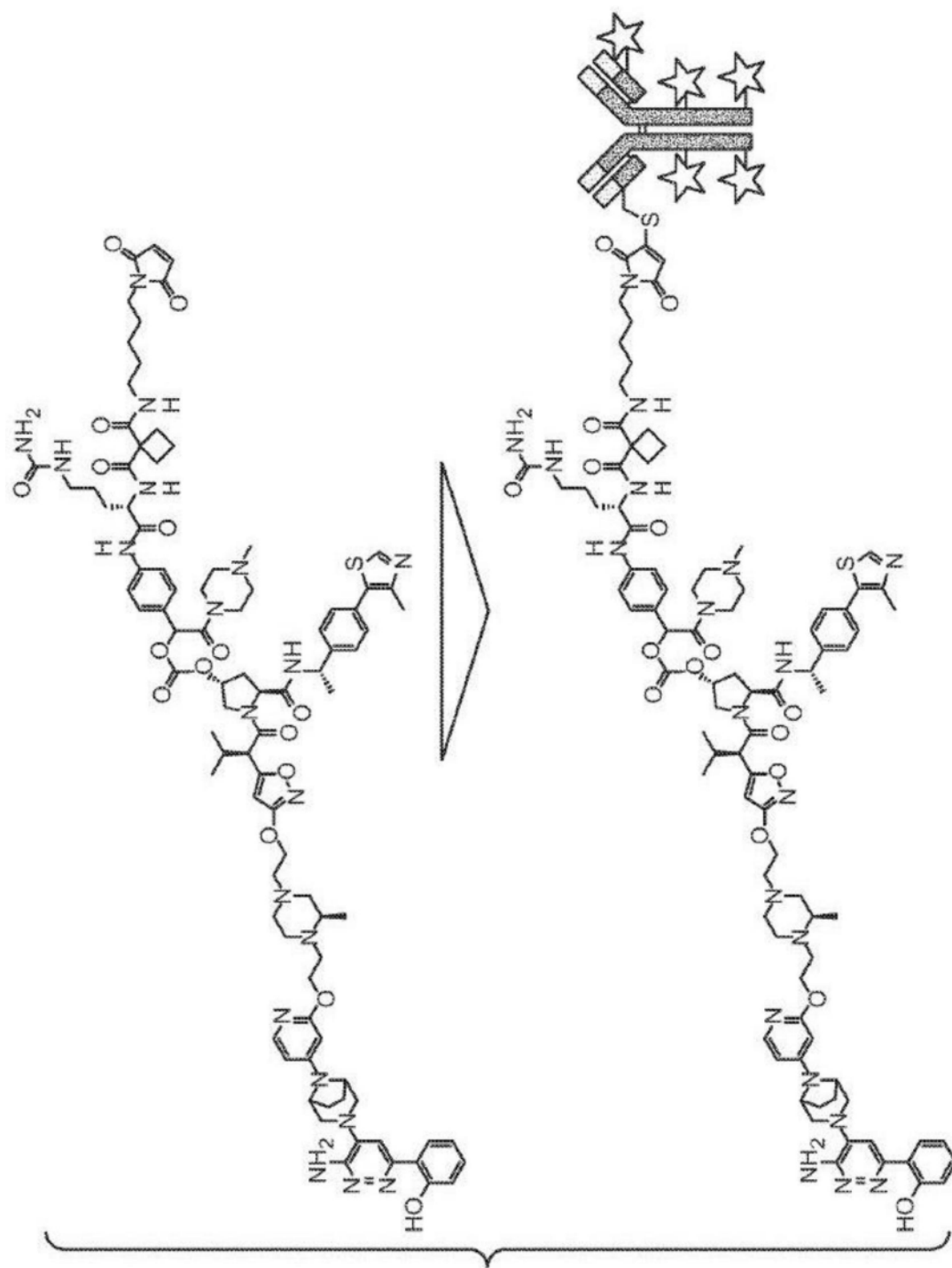


图10

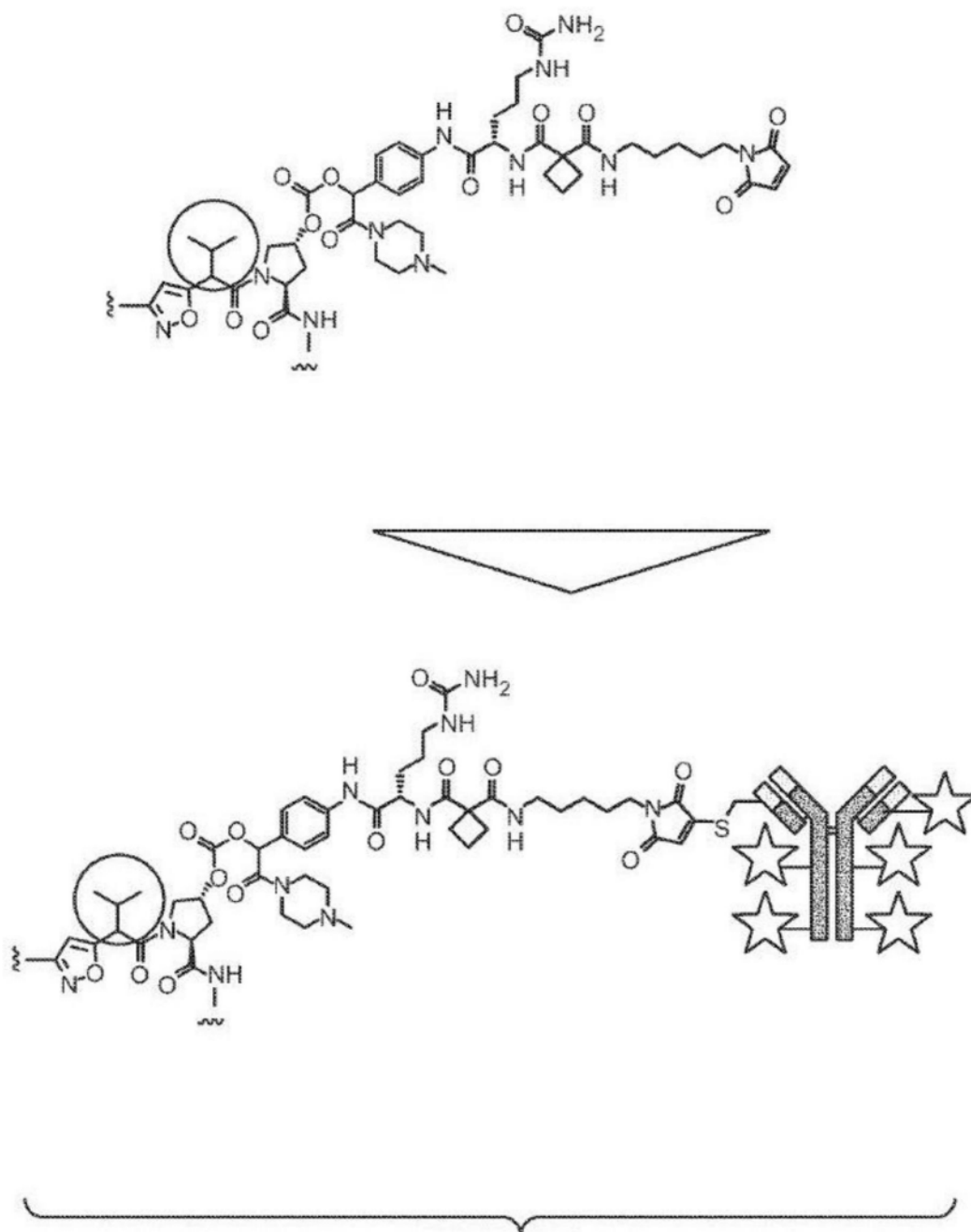


图 11

图11

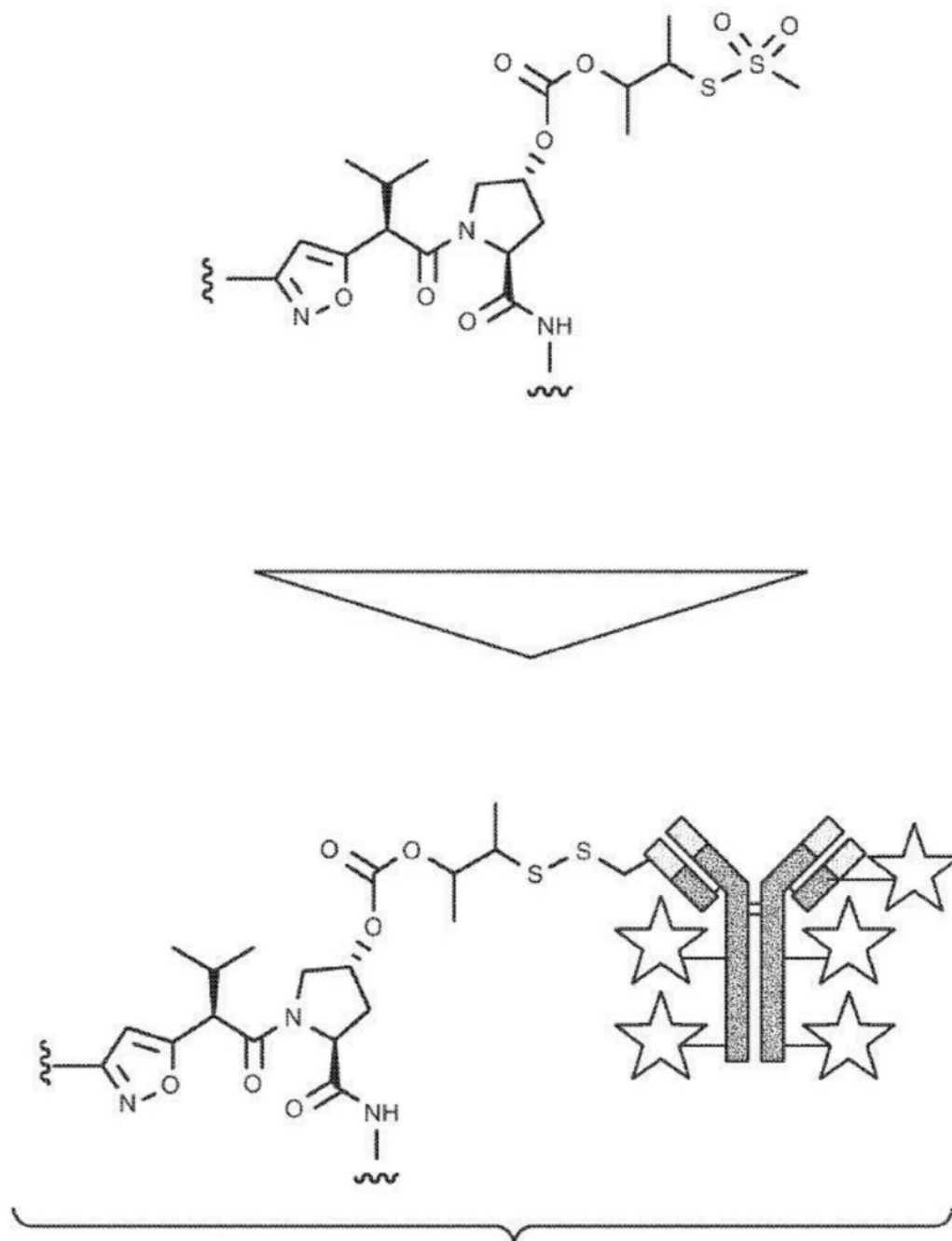


图 12

图12