



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115645544 A

(43) 申请公布日 2023.01.31

(21) 申请号 202211405532.4

A61K 38/12 (2006.01)

(22) 申请日 2017.05.31

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/343,825 2016.05.31 US

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201780033085.5 2017.05.31

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 7/64 (2006.01)

(71) 申请人 索伦托药业有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·朱 张红 A·哈桑诺夫

G·陈

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理人 赵昊 张梦倩

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

权利要求书7页 说明书25页 附图9页

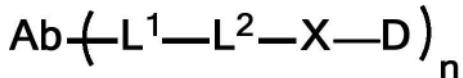
(54) 发明名称

具有鹅膏毒肽的衍生物作为药物的抗体药物缀合物

(57) 摘要

公开了缀合至靶向抗体的鹅膏蕈碱的衍生物，以形成ADC(抗体药物缀合物)。

1. 一种具有式I结构的抗体药物缀合物(ADC)

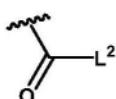
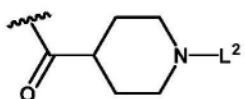
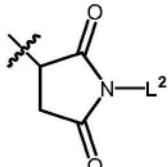
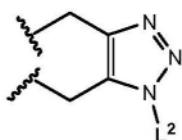
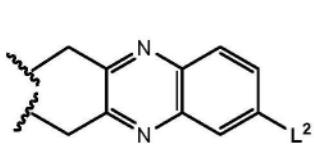


(I)

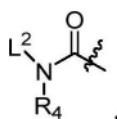
或其药学上可接受的盐，

其中：

Ab是单克隆抗体；

 $\text{L}^1 - \text{L}^2$ 是选自由以下各项组成的组的连接物：

由此波浪线指示与Ab的附接点；

 $\text{L}^2 - \text{X}$ 具有结构其中R₄是氢、C₁₋₆烷基、或-(CH₂CH₂O)_m-，其中m是1-24的整数，由此波浪线指示

与D的附接点；

L^2 是选自由以下各项组成的组的连接物：单个氨基酸、具有长度为2-10个氨基酸的肽、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、PAB(对氨基苄基)、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Ala-Ala-Asn-PAB、-R₆OC(O)NR₅-、-R₈-S-S-R₇、或其组合，其中R₅选自由以下各项组成的组：氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、或其组合；R₆选自由以下各项组成的组：氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、PAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Ala-Ala-Asn-PAB、或其组合；R₇选自由以下各项组成的组：C₂₋₆亚烷基、-(CH₂CH₂O)_m-；R₈选自由以下各项组成的组：氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、取代的C₁₋₆亚烷基、-C(O)NH-、-C(O)-NH-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-NHC(O)-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-(CH₂CH₂O)_m-、PAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Ala-Ala-Asn-PAB或其组合；

其中R₉选自由以下各项组成的组：氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-(CH₂)p-SO₃H、C(O)NH-(CH₂)p-CO₂H、-NHC(O)-(CH₂)p-SO₃H、-NHC(O)-(CH₂)p-CO₂H或其组合；

R₁₀和R₁₁各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、C₁₋₆烷基或其组合；其中-R₆OC(O)NR₅-通过R₅或R₆连接至L¹；其中-R₈-S-S-R₇-通过R₈连接至L¹；

D是衍生自鹅膏蕈碱的药物部分活性剂，并且选自由以下各项组成的组：α-鹅膏蕈碱、

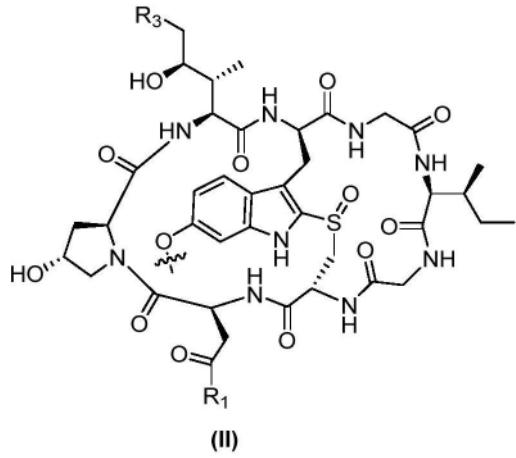
β -鹅膏蕈碱、 γ -鹅膏蕈碱和 ε -鹅膏蕈碱；并且

n是1-10的整数；

m是1-24的整数；

并且p是1-6的整数。

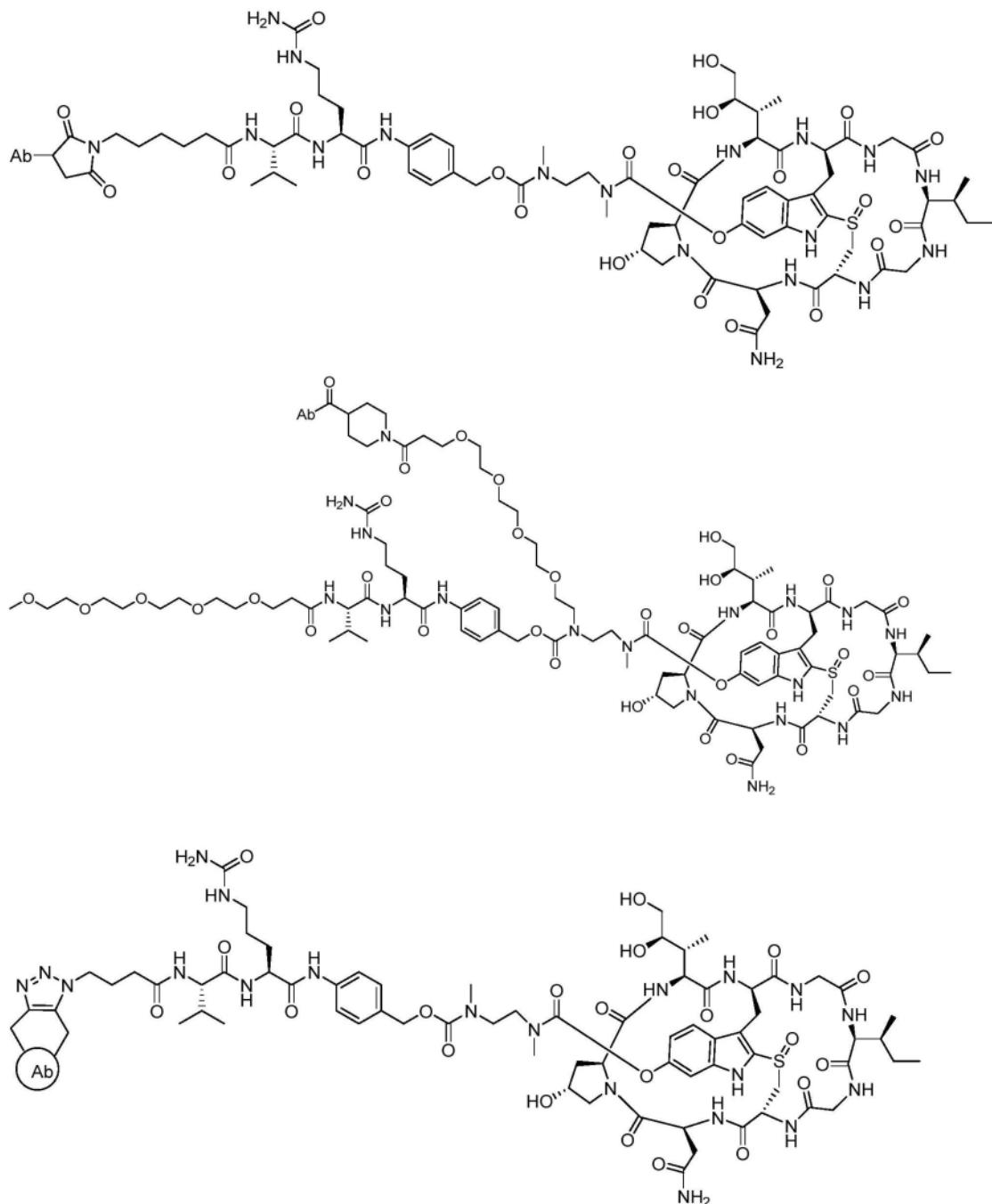
2. 权利要求1的ADC，其中D具有式II的结构：

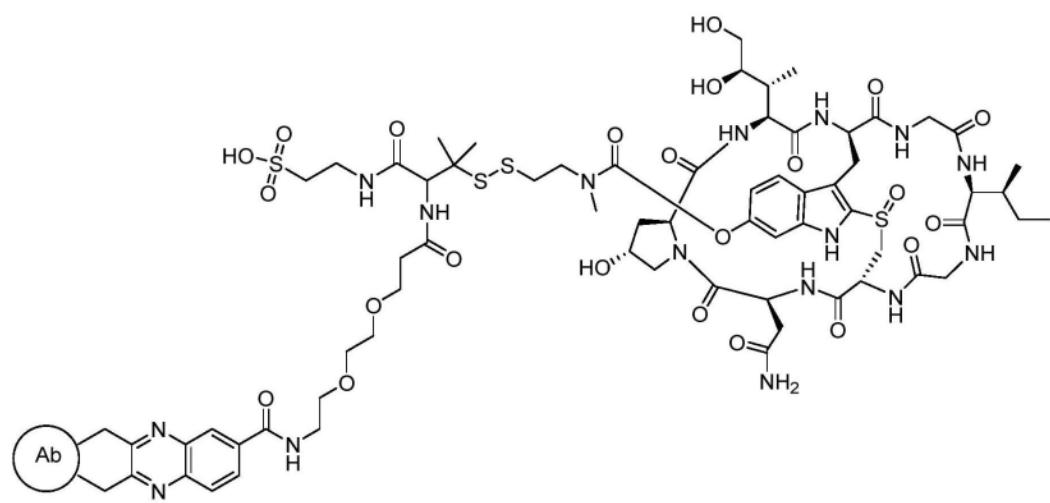
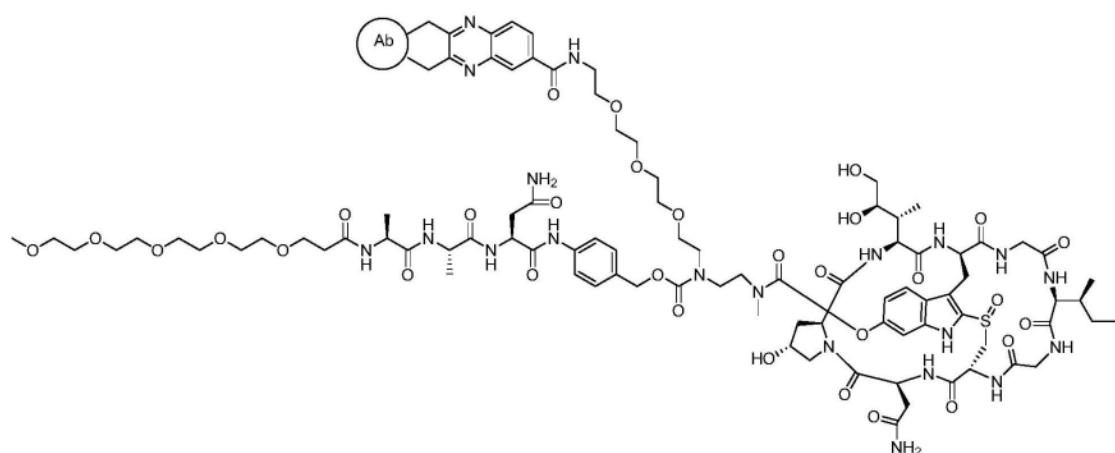
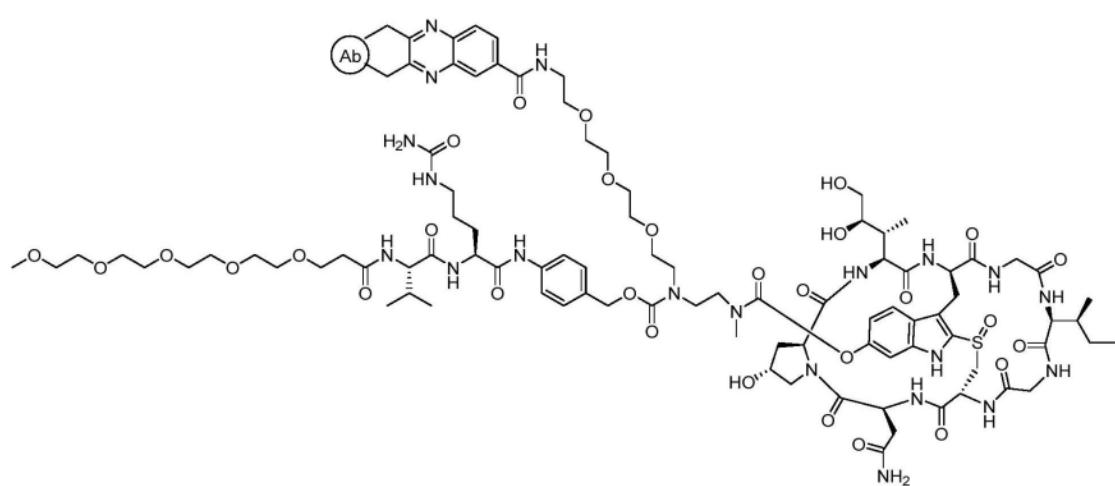


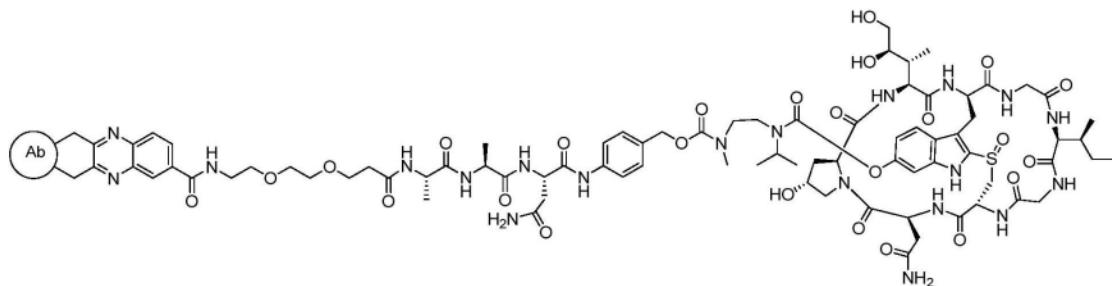
由此波浪线指示与X的附接点；

其中R₁是NH₂或OR₂，其中R2是H或C1-C10烷基，并且其中R3是H或OH。

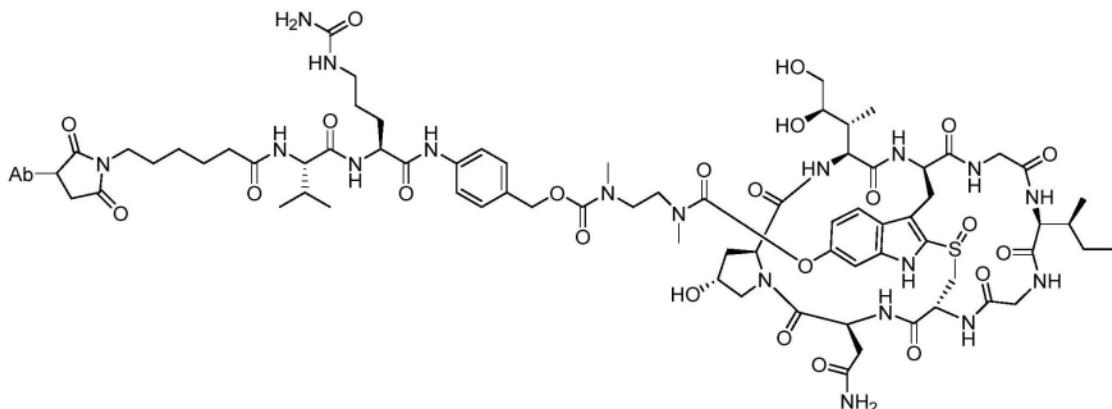
3. 权利要求1的ADC，其中该ADC选自由以下各项组成的组：



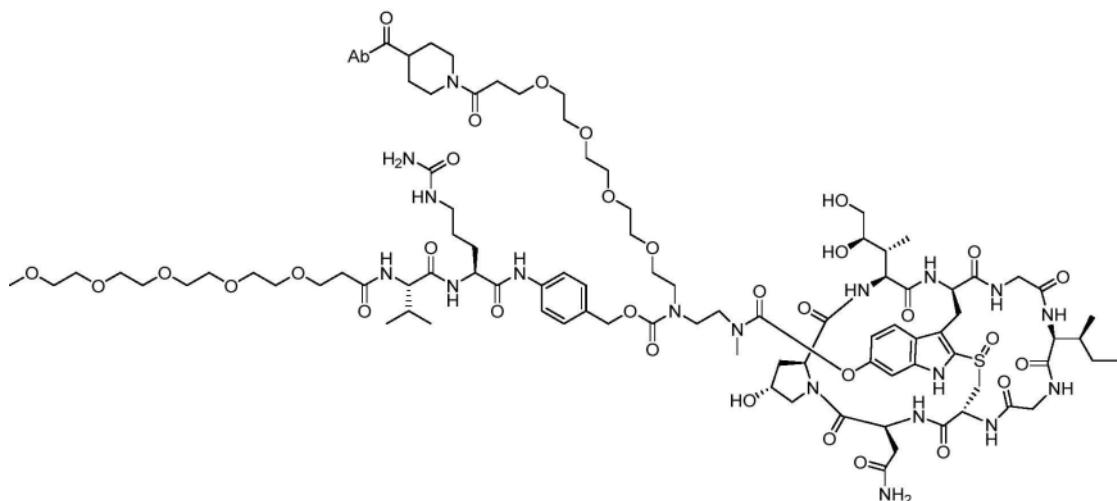




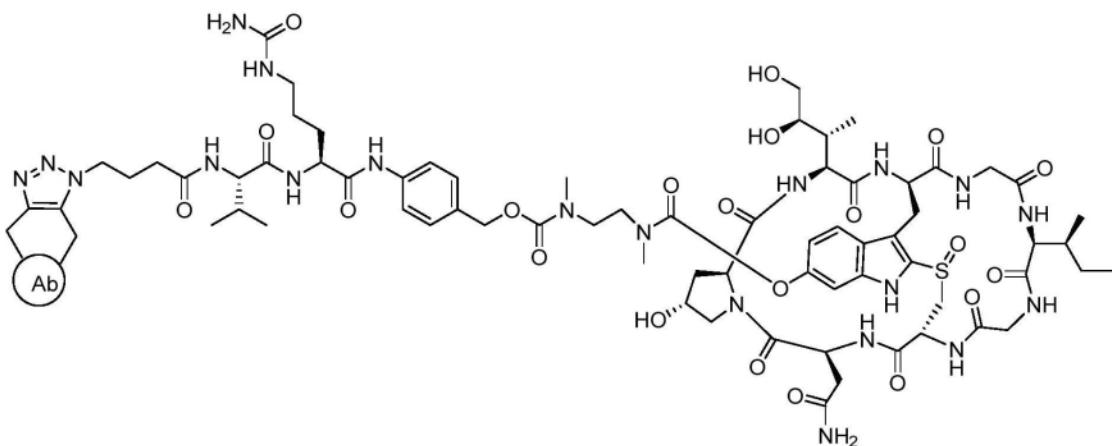
4. 具有以下式的ADC:



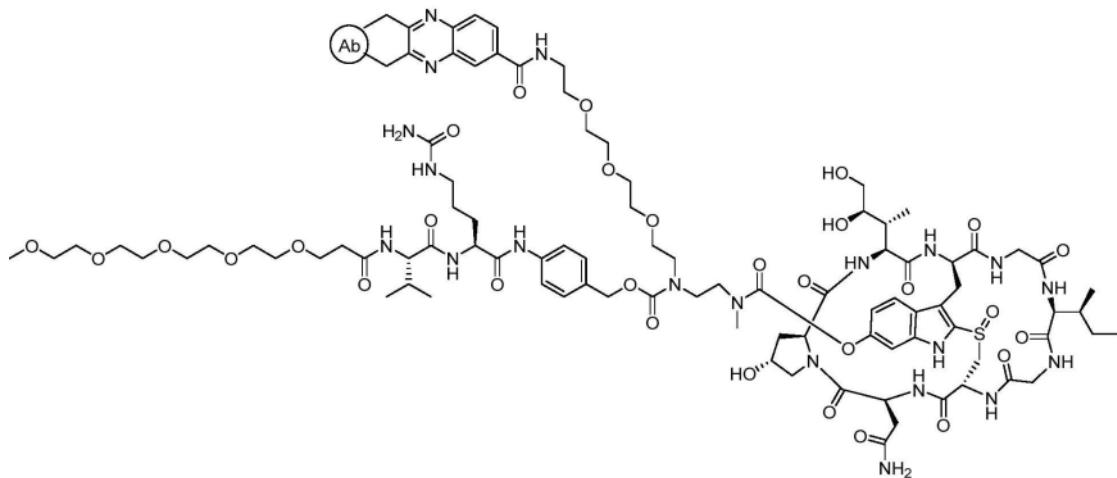
5. 具有以下式的ADC:



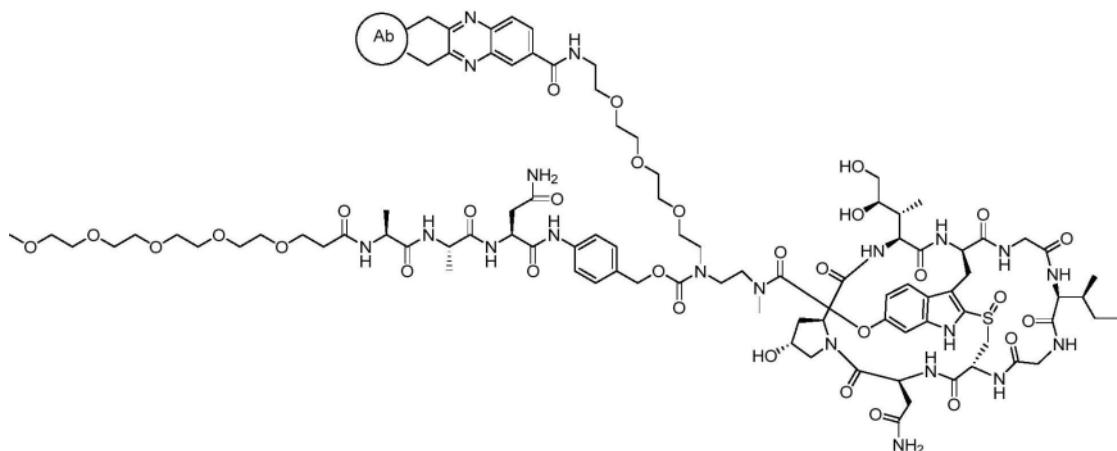
6. 具有以下式的ADC:



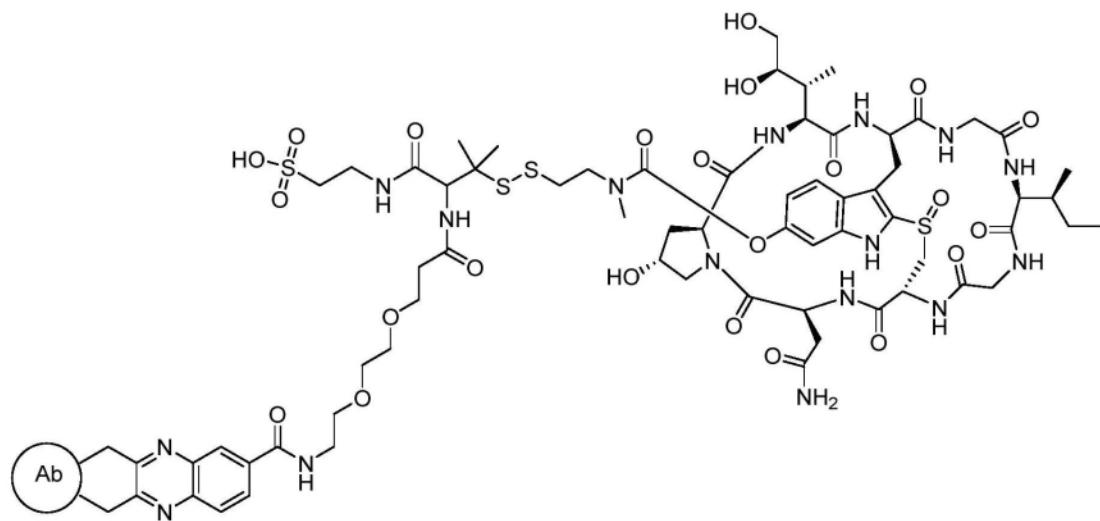
7. 具有以下式的ADC:



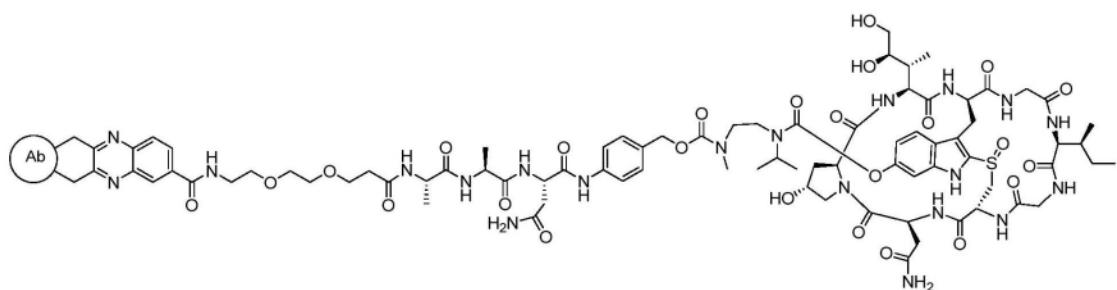
8. 具有以下式的ADC:



9. 具有以下式的ADC:



10. 具有以下式的ADC:



具有鹅膏毒肽的衍生物作为药物的抗体药物缀合物

[0001] 本申请是申请号为201780033085.5、申请日为2017年5月31日、发明名称为“具有鹅膏毒肽的衍生物作为药物的抗体药物缀合物”的中国发明专利申请的分案申请，原申请为国际申请号为PCT/US2017/035206的国家阶段申请，该国际申请要求2016年5月31日提交的美国临时专利申请62/343,825的优先权，将其内容通过引用并入本文。

技术领域

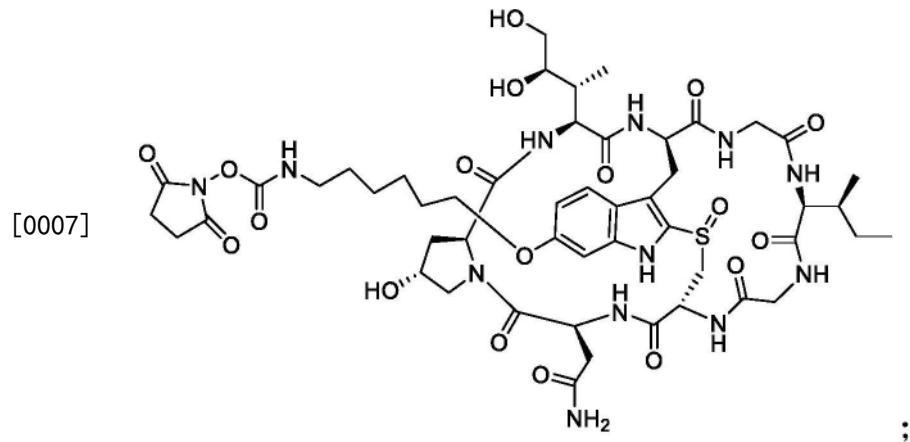
[0002] 本公开文本提供了缀合至靶向抗体的鹅膏蕈碱的衍生物，以形成ADC(抗体药物缀合物)。

[0003] 发明背景

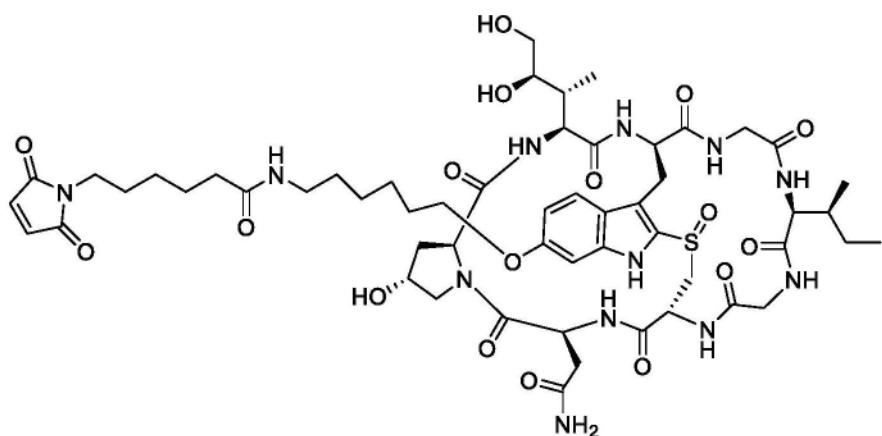
[0004] 鹅膏毒肽是具有8个氨基酸单元的刚性双环肽。这些化合物是从多种蘑菇物种(例如，伞形毒蕈(Amanita phalloides)(也称为绿色死帽菇(green death cap mushroom)、纹缘盔孢伞(Galerina marginata)、肉褐鳞环柄菇(Lepiota brunneo-incamata))中分离的或是合成制备的。不同的蘑菇物种含有不同量的不同鹅膏毒肽家族成员。已知该家族的成员 α -鹅膏蕈碱是真核RNA聚合酶II(EC2.7.7.6)的抑制剂，并且在较小程度上，是RNA聚合酶III的抑制剂，从而抑制转录和蛋白质生物合成。Wieland(1983) Int.J.Pept.Protein Res.22 (3) :257-276。 α -鹅膏蕈碱非共价结合至RNA聚合酶II并且缓慢解离，使酶回收不太可能。认为转录的延长抑制可诱导细胞凋亡。

[0005] 示例性的鹅膏毒肽包括

[0006] WO 2012/041504

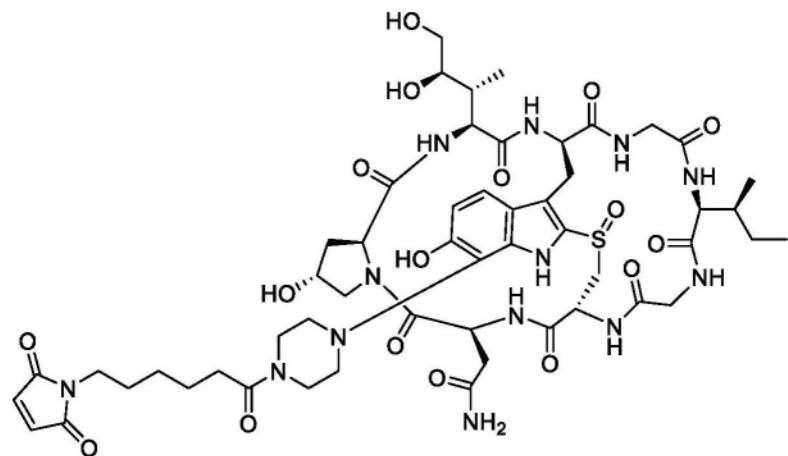


[0008]



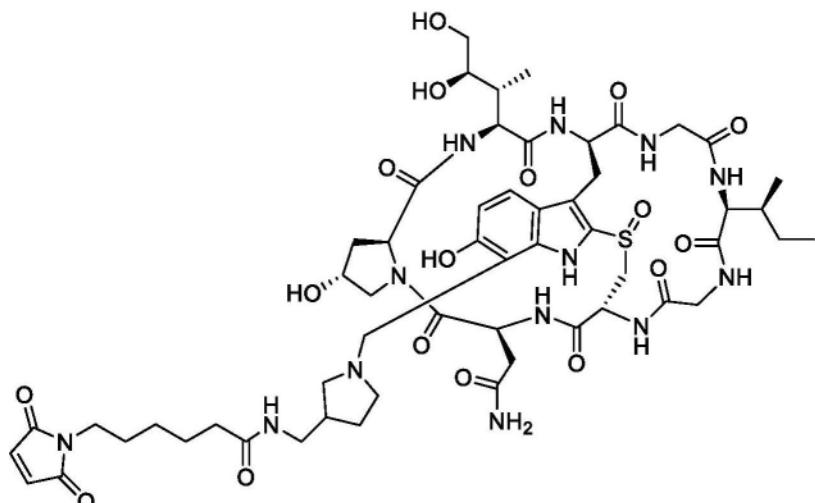
;

[0009] WO 2014/043403



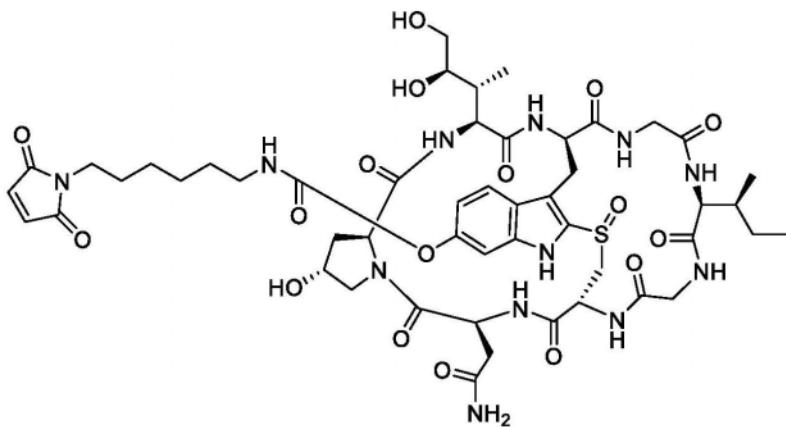
;

[0010]



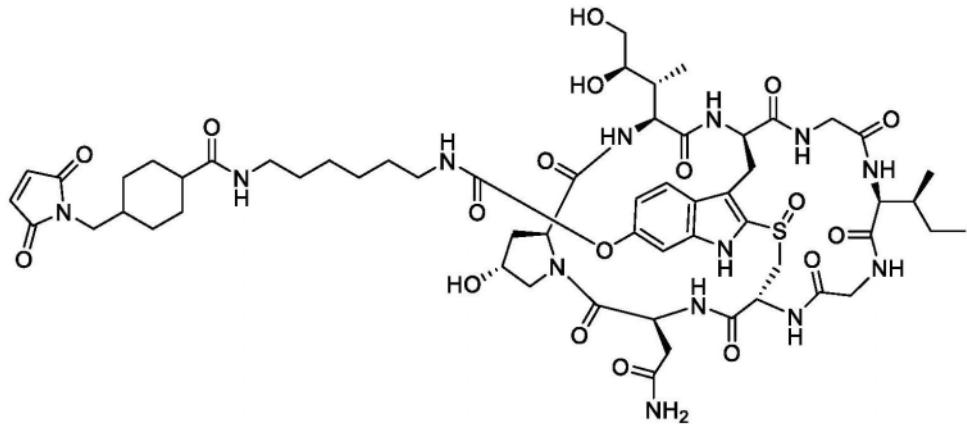
;

[0011] WO 2014/043403



(实施例79) 和

[0012]



(实施例

80)。

[0013] 抗体-药物缀合物(ADC)用于局部递送细胞毒性剂或细胞抑制剂(包括杀死或抑制肿瘤细胞的药物)的用途允许将药物部分靶向递送至肿瘤以及其中的细胞内累积。Syrigos和Epenetos (1999) Anticancer Res. 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Delivery Rev. 26:151-172; 美国专利号4,975,278; Baldwin等人 (1986) Lancet (Mar. 15, 1986) :603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy:A Review," 在Monoclonal Antibodies' 84: Biological and Clinical Applications中,A.Pinchera等人(编辑),第475-506页。这种类型的递送机制有助于最小化可能从全身性施用未缀合的药物试剂发生的对正常细胞的毒性。毒素可通过各种机制(包括微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制)引起它们的细胞毒性和细胞抑制作用。多克隆抗体和单克隆抗体均已被报道为可用于这些策略。Rowland等人 (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87。用于抗体-毒素缀合物的毒素包括放射性同位素,细菌毒素如白喉毒素,植物毒素如蓖麻毒素,真菌毒素如鹅膏毒肽(WO 2010/115629、WO 2012/041504或WO 2012/119787),和小分子毒素如格尔德霉素(Mandler等人 (2000) J.Natl.Cancer Inst. 92 (19) :1573-1581; Mandler等人 (2000) Bioorg.Med.Chem.Lett. 10: 1025-1028; Mandler等人 (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、美登木素生物碱(EP 1391213; Liu等人 (1996) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623)、卡里奇霉素(Lode等人 (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman等人 (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)、道诺霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland等人 (1986),同上)。

[0014] 若干种抗体-药物缀合物在临床试验中已示出有希望的抗癌结果,包括

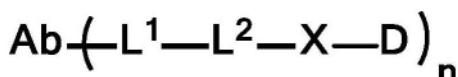
ZEVALIN® (替伊莫单抗, 百健艾迪公司 (Biogen/Idec)) , 一种由经由硫脲连接物-螯合剂与¹¹¹In或⁹⁰Y放射性同位素连接的鼠 IgG1κ单克隆抗体(针对正常和恶性B淋巴细胞的表面上发现的CD20抗原) 构成的抗体-放射性同位素缀合物。

[0015] 抗体-药物缀合物(ADC)用于局部递送细胞毒性剂或细胞抑制剂(包括杀死或抑制肿瘤细胞的药物)的用途允许将药物部分靶向递送至肿瘤以及其中的细胞内累积。这种类型的递送机制有助于最小化可能从全身性施用未缀合的药物试剂发生的对正常细胞的毒性。毒素可通过各种机制(包括微管蛋白结合)引起它们的细胞毒性和细胞抑制作用。

[0016] 因此,仍然需要具有所希望的药学性质的有效RNA聚合酶抑制剂抗体缀合物。

发明内容

[0017] 本公开文本提供了用于ADC(抗体药物缀合物)结构中的改进的鹅膏毒肽衍生物。更具体地,本公开文本提供了具有式I结构的抗体药物缀合物(ADC)



[0018]

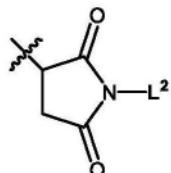
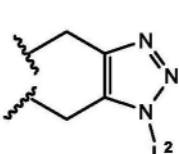
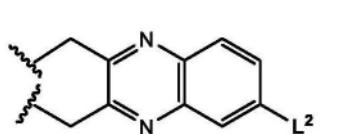
(I)

[0019] 或其药学上可接受的盐,

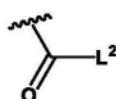
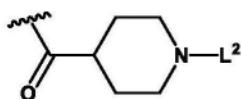
[0020] 其中:

[0021] Ab是单克隆抗体;

[0022] L¹-L²是选自由以下各项组成的组的连接物:



[0023]



[0024] 由此波浪线指示与Ab的附接点;

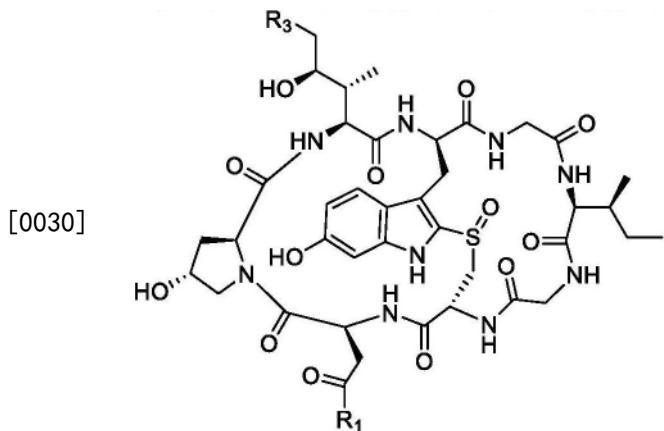
[0025] L²-X是具有结构

[0026] 的连接物, 其中R₄是氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂CH₂O)_m-或其组合, 并且

[0027] m是1-24的整数;

[0028] 其中波浪线指示与D的附接点

[0029] D是衍生自鹅膏毒肽的药物部分活性剂, 并且选自由具有以下结构的α-鹅膏蕈碱、β-鹅膏蕈碱、γ-鹅膏蕈碱和ε-鹅膏蕈碱组成的组:



[0031]

名称	R1	R3
α-鹅膏蕈碱	NH ₂	OH
β-鹅膏蕈碱	OH	OH
γ-鹅膏蕈碱	NH ₂	H
ε-鹅膏蕈碱	OH	H

[0032] n是1-10的整数；

[0033] L²是选自由以下各项组成的组的连接物：氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、PAB(对氨基苄基)、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Ala-Ala-Asn-PAB、-R₆OC(O)NR₅-、-R₈-S-S-R₇以及其组合，

[0034] 其中R₅选自由以下各项组成的组：氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-以及其组合；

[0035] R₆选自由以下各项组成的组：氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、PAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Ala-Ala-Asn-PAB以及其组合；

[0036] R₇是C₂₋₆亚烷基或-(CH₂CH₂O)_m-；

[0037] R₈选自由以下各项组成的组：氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、取代的C₁₋₆亚烷基、-C(O)NH-、-C(O)-NH-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-NHC(O)-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-(CH₂CH₂O)_m-、PAB、Val-Cit-PAB、Val-Ala-PAB、Ala-Ala-Asn-PAB以及其组合；

[0038] 其中R₉选自由以下各项组成的组：氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-(CH₂)_p-SO₃H、C(O)NH-(CH₂)_p-CO₂H、-NHC(O)-(CH₂)_p-SO₃H、-NHC(O)-(CH₂)_p-CO₂H以及其组合；

[0039] R₁₀和R₁₁各自独立地选自由以下各项组成的组：氢、C₁₋₆烷基以及其组合；

[0040] 其中-R₆OC(O)NR₅-通过R₅或R₆连接至L¹；

[0041] 其中-R₈-S-S-R₇-通过R₈连接至L¹；

[0042] m是1-24的整数；并且

[0043] p是1-6的整数。

[0044] 在另一方面，具有式I结构的化合物中的L²是选自由以下各项组成的组的连接物：氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、PAB(对氨基苄基)、-Val-Cit-PAB-、-Val-Ala-PAB-、-Ala-Ala-Asn-PAB-、-R₆OC(O)NR₅-、-R₈-S-S-R₇以及其组合，

[0045] 其中R₅选自由以下各项组成的组:氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-以及其组合;

[0046] R₆选自由以下各项组成的组:氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、PAB、-Val-Cit-PAB-、-Val-Ala-PAB-、-Ala-Ala-Asn-PAB-以及其组合;

[0047] R₇是C₂₋₆亚烷基或-(CH₂CH₂O)_m-;

[0048] R₈选自由以下各项组成的组:氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、取代的C₁₋₆亚烷基、-C(O)NH-、-C(O)-NH-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-NHC(O)-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-(CH₂CH₂O)_m-、PAB、-Val-Cit-PAB-、-Val-Ala-PAB-、-Ala-Ala-Asn-PAB-以及其组合;

[0049] 其中R₉选自由以下各项组成的组:氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-(CH₂)_p-SO₃H、C(O)NH-(CH₂)_p-CO₂H、-NHC(O)-(CH₂)_p-SO₃H、-NHC(O)-(CH₂)_p-CO₂H以及其组合;

[0050] R₁₀和R₁₁各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、C₁₋₆烷基以及其组合;

[0051] 其中-R₆OC(O)NR₅-通过R₅或R₆连接至L¹;

[0052] 其中-R₈-S-S-R₇-通过R₈连接至L¹;

[0053] m是1-24的整数;并且

[0054] p是1-6的整数,其中其余值如以上对式I所描述的。

[0055] 在又另一方面,具有式I结构的化合物中的L²是选自由以下各项组成的组的连接物:氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NH(4-苯基)CH₂0-、-Val-Cit-NH(4-苯基)CH₂0-、-Val-Ala-NH(4-苯基)CH₂0-、-Ala-Ala-Asn-NH(4-苯基)CH₂0-、-R₆OC(O)NR₅-、-R₈-S-S-R₇-以及其组合;

[0056] 其中R₅选自由以下各项组成的组:氢、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-以及其组合;

[0057] R₆选自由以下各项组成的组:氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、-(CH₂)_p-、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NH(4-苯基)CH₂-、-Val-Cit-NH(4-苯基)CH₂-、-Val-Ala-NH(4-苯基)CH₂-、-Ala-Ala-Asn-NH(4-苯基)CH₂-以及其组合;

[0058] R₇是C₂₋₆亚烷基或-(CH₂CH₂O)_m-;

[0059] R₈选自由以下各项组成的组:氨基酸、由高达10个氨基酸组成的肽、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、取代的C₁₋₆亚烷基、-C(O)-NH-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-NHC(O)-CHR₉-CR₁₀R₁₁-、-(CH₂CH₂O)_m-、-PAB-、-Val-Cit-NH(4-苯基)CH₂-、-Val-Ala-NH(4-苯基)CH₂-、-Ala-Ala-Asn-NH(4-苯基)CH₂-以及其组合;

[0060] 其中R₉选自由以下各项组成的组:氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆亚烷基、-(CH₂CH₂O)_m-、-C(O)NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-(CH₂)_p-SO₃H、C(O)NH-(CH₂)_p-CO₂H、-NHC(O)-(CH₂)_p-SO₃H、-NHC(O)-(CH₂)_p-CO₂H以及其组合;

[0061] R₁₀和R₁₁各自独立地选自由以下各项组成的组:氢、C₁₋₆烷基以及其组合;

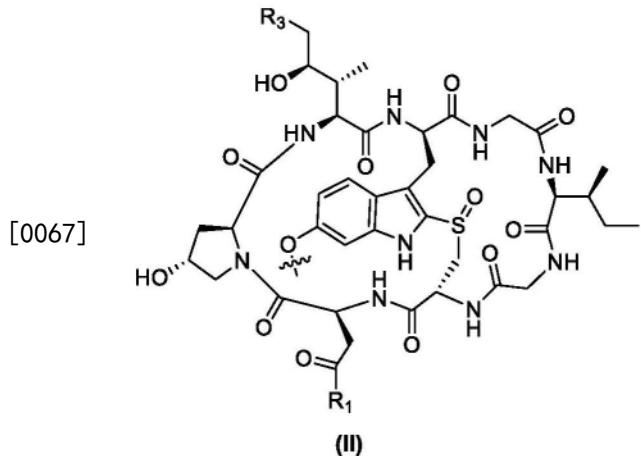
[0062] 其中-R₆OC(O)NR₅-通过R₆连接至L¹;

[0063] 其中-R₈-S-S-R₇-通过R₈连接至L¹;

[0064] m是1-24的整数;并且

[0065] p是1-6的整数,其中其余值如以上对式I所描述的。

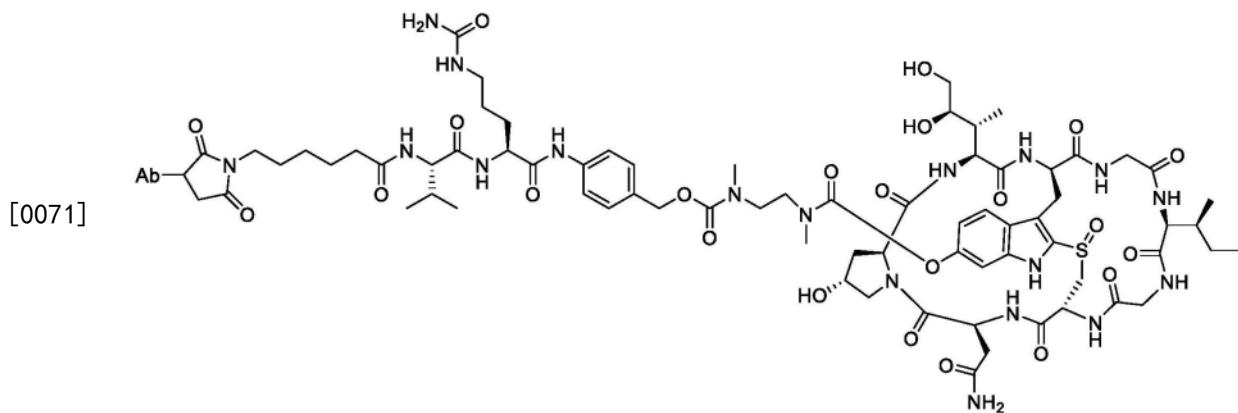
[0066] 优选地,D具有式II的结构:

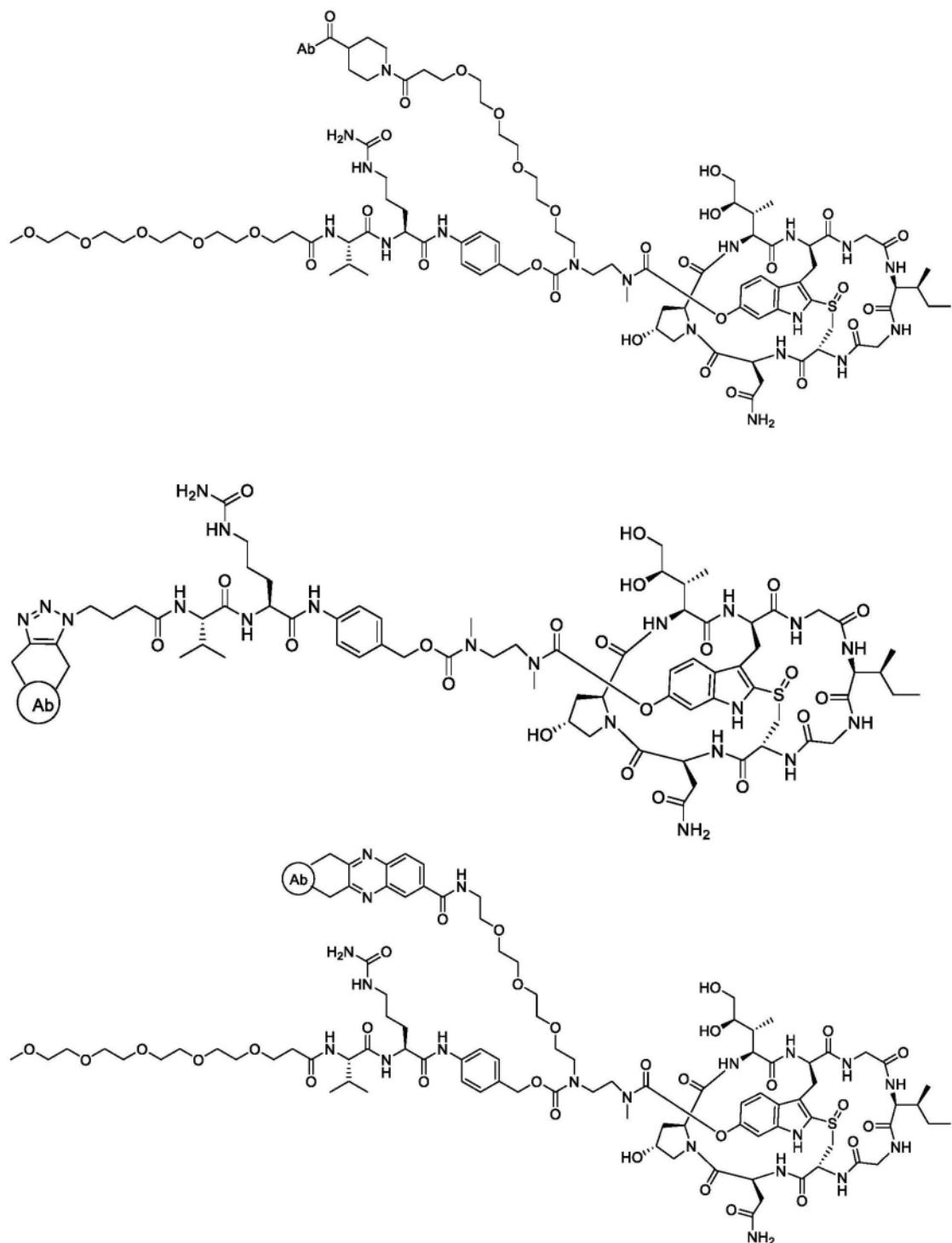


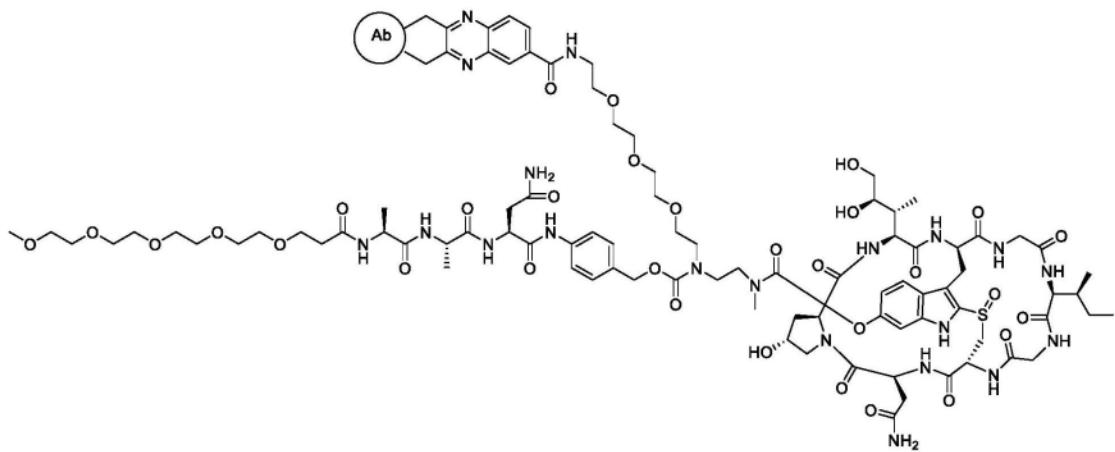
[0068] 由此波浪线指示与X的附接点;

[0069] 其中R₁是NH₂或OR₂,其中R₂是H或C₁-C₁₀烷基,并且其中R₃是H或OH。

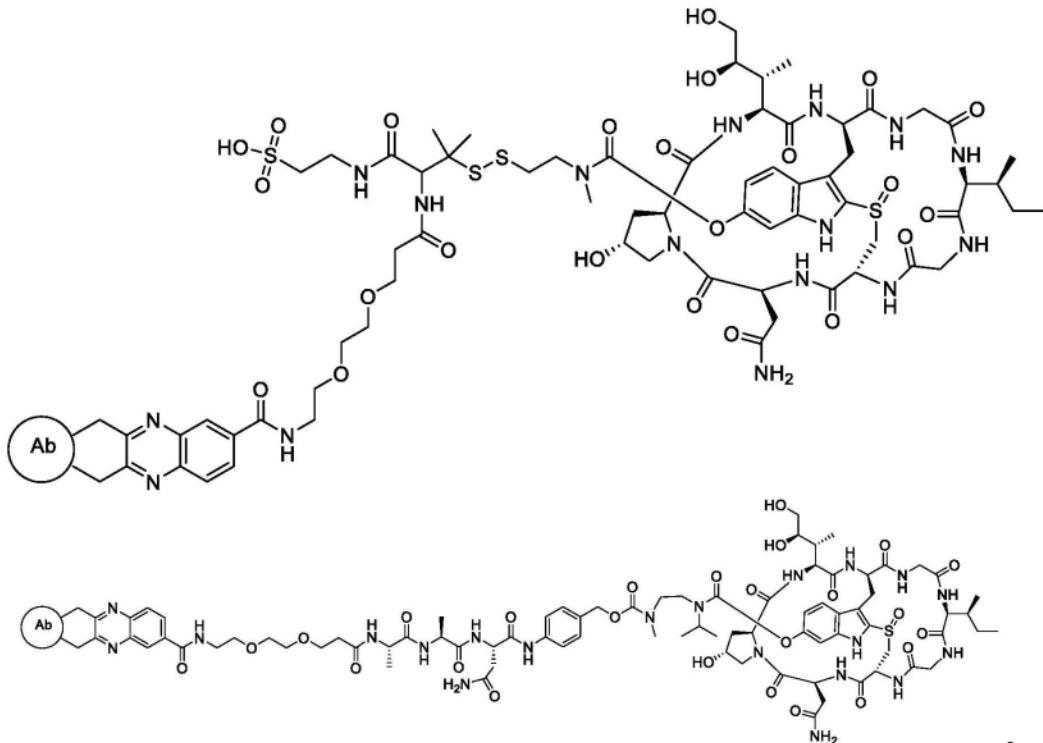
[0070] 优选地,所公开的ADC选自由以下各项组成的组:







[0073]



[0074] 附图简述

[0075] 图1示出了ADC A (22) 和ADC B对四种细胞系的体外细胞毒性的比较,图1的四幅小图中的每一幅中一个细胞系。

[0076] 图2示出了ADC24的体外细胞毒性(参见表2)。

[0077] 图3示出了ADC22(参见表2)对各种细胞系的体外细胞毒性。

[0078] 图4示出了ADC 26对各种细胞系的体外细胞毒性。

[0079] 图5示出了ADC 27对各种细胞系的体外细胞毒性。

[0080] 图6示出了ADC 25对各种细胞系的体外细胞毒性。

[0081] 图7示出了ADC 29对各种细胞系的体外细胞毒性。

[0082] 图8示出了cMet/EGFR-22、cMet-22和Nimo-22在H292异种移植物中的功效:与PBS对照组相比,cMet/EGFR-22和Nimo-22显著地抑制了H292肿瘤生长。

[0083] 图9示出了对于化合物29的肿瘤大小比较。与PBS对照组相比,cMet/EFFR-22和Nimo-22显著地降低了肿瘤大小/重量。Nimo-22有一些完全的肿瘤消退(7只小鼠中有4只没有肿瘤)。

[0084] 图10示出了未观察到显著的cMet/EGFR-22、cMet-22、Nimo-22处理相关的体重损失。

[0085] 图11示出了与PBS对照组相比,cMet/EGFR-23、cMet-23和Nimo-23处理的组显示出显著减少的肿瘤体积。

[0086] 图12示出了与PBS对照组相比,cMet/EGFR-23、cMet-23和Nimo-23处理的组显示出显著降低的肿瘤重量。

[0087] 图13示出了在cMet-23、cMet/EGFR-23和Nimo-23处理的组中未观察到体重损失。

[0088] 图14示出了3mg/kg或1mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-25在H1975异种移植物中没有显著的肿瘤生长抑制。

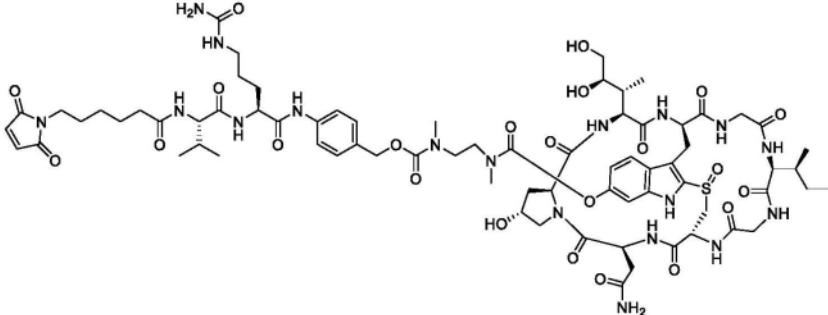
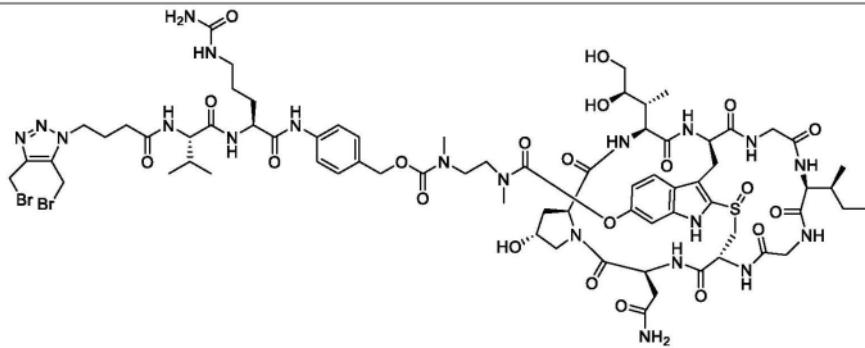
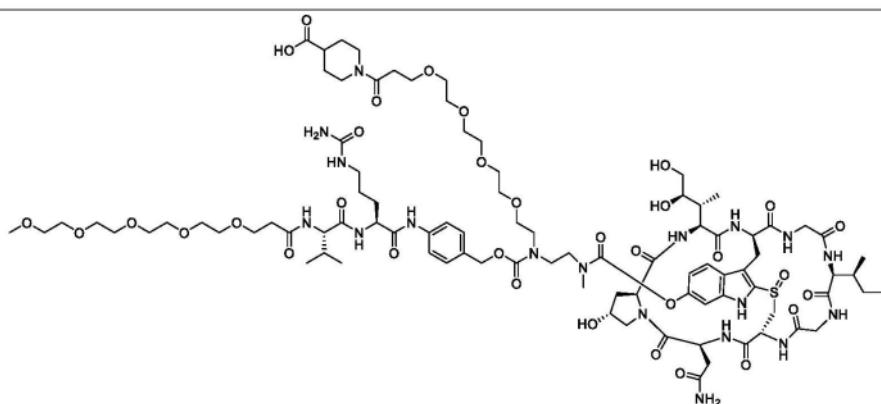
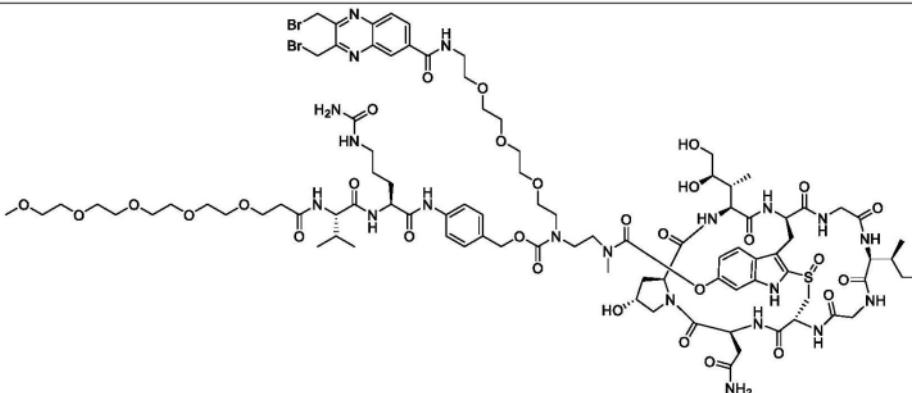
[0089] 图15示出了3mg/kg或1mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-27、或单剂量的cMet-27在HCC827异种移植物中没有显著的肿瘤生长抑制。

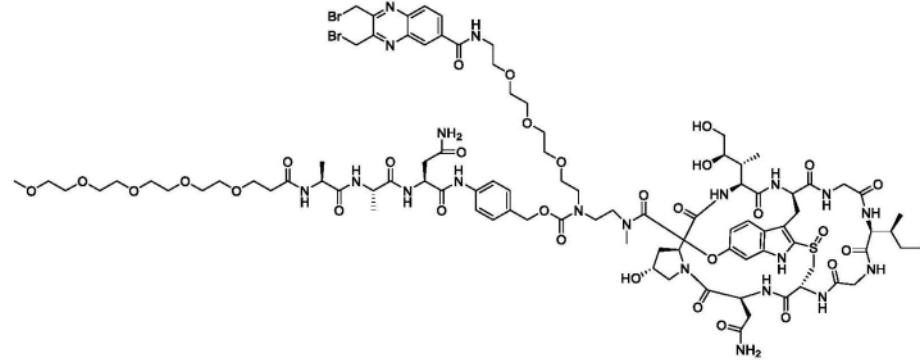
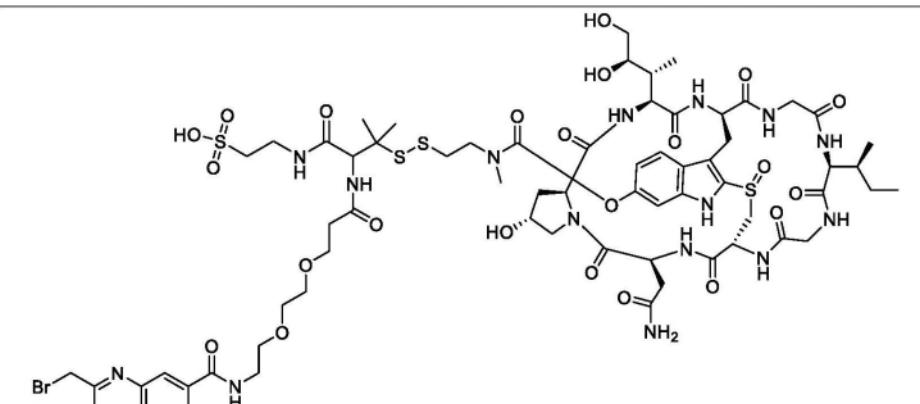
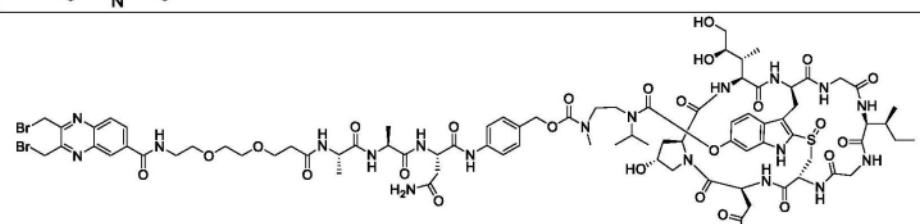
[0090] 图16示出了在研究期间用3mg/kg或1mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-ADC27或0.3mg/kg的单剂量的cMet-ADC27没有观察到显著的体重损失。

[0091] 发明详述

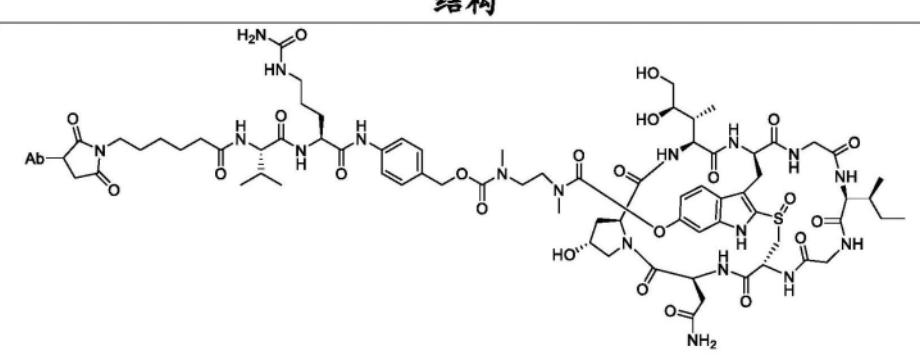
[0092] 表1:合成的化合物的例子(“Ab”代表抗体)。

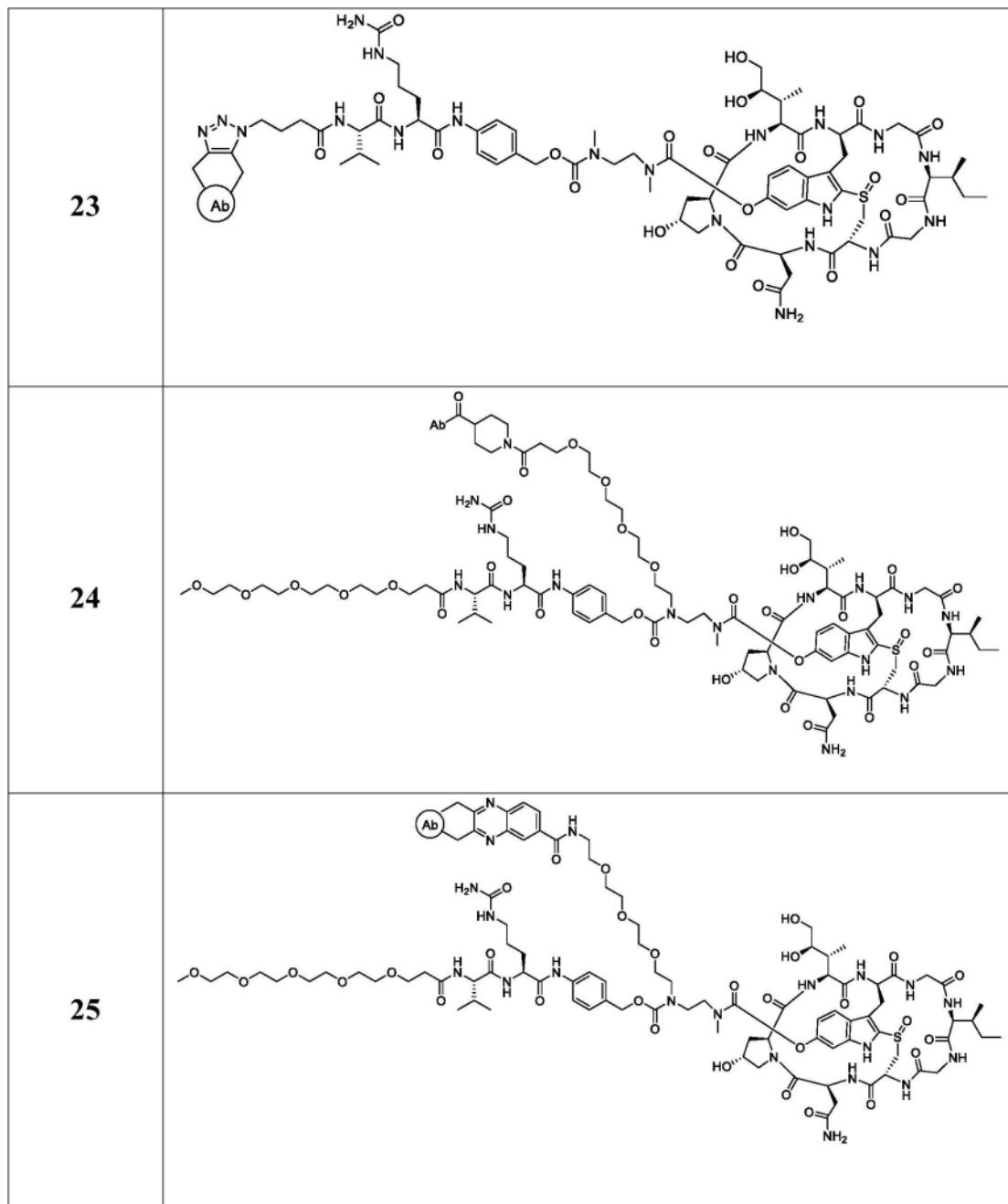
化合物#	结构
[0093]	

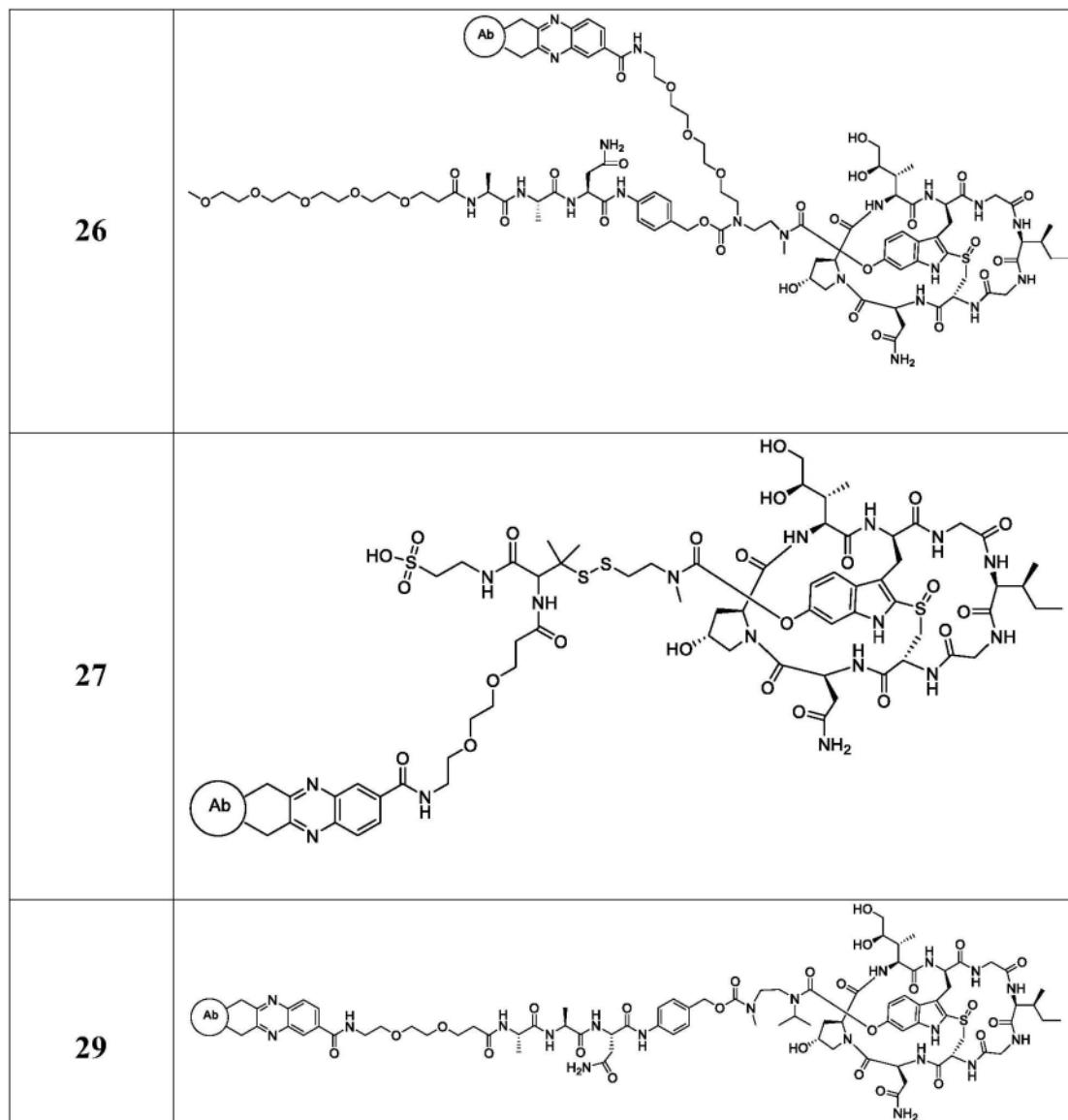
	6	
	8	
[0094]	10	
	14	

17	
[0095] 21	
28	

[0096] 表2:式I的抗体药物缀合物的例子

化合物#	结构
[0097] 22	





[0100] 定义

[0101] 如本文所用,常见的有机物缩写定义如下:

[0102] Ac 乙酰基

[0103] aq. 水溶液

[0104] BOC或Boc 叔丁氧基羰基

[0105] Bu 正丁基

[0106] °C 以摄氏度为单位的温度

[0107] Cit 瓜氨酸

[0108] DCM 二氯甲烷

[0109] DEPC 氯基磷酸二乙酯

[0110] DIC 二异丙基碳二亚胺

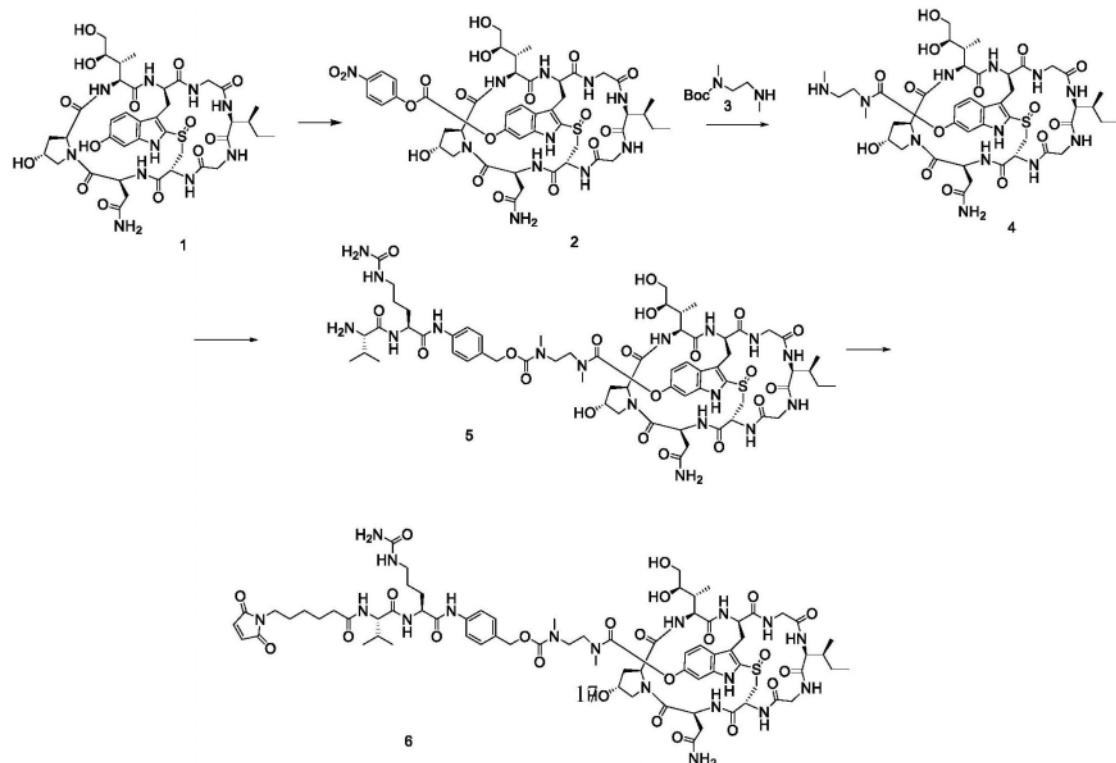
[0111] DIEA 二异丙基乙胺

[0112] DMA N,N'-二甲基乙酰胺

[0113] DMF N,N'-二甲基甲酰胺

- [0114] DMSO 二甲基亚砜
- [0115] EDC 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺
- [0116] Et 乙基
- [0117] EtOAc 乙酸乙酯
- [0118] Eq 当量
- [0119] Fmoc 9-芴甲氧基羰基
- [0120] g 克
- [0121] h 小时
- [0122] HATU 2-(1H-7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯
- [0123] HOBT N-羟基苯并三唑
- [0124] HOSu N-羟基琥珀酰亚胺
- [0125] HPLC 高效液相色谱法
- [0126] LC/MS 液相色谱法-质谱法
- [0127] Me 甲基
- [0128] MeOH 甲醇
- [0129] MeCN 乙腈
- [0130] mL 毫升
- [0131] MS 质谱法
- [0132] PAB 对氨基苄基
- [0133] RP-HPLC 反相HPLC
- [0134] RT 室温
- [0135] t-Bu 叔丁基
- [0136] TEA 三乙胺
- [0137] Tert,t 叔
- [0138] TFA 三氟乙酸
- [0139] THF 四氢呋喃
- [0140] TLC 薄层色谱法
- [0141] μL 微升
- [0142] 在使用时,连字符(-)表示基团附接到所定义的变量上的点。在左侧的连字符指示与式(I)的左侧结构组分的连接性,并且在右侧的连字符指示与式(I)的右侧结构组分的连接性。例如,除非另外指明,当 L_2 被定义为 $-\text{(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m-$ 时,这意味着至 L^1 的附接是在 $-\text{CH}_2$ 碳处,并且至X的附接是在氧原子处。
- [0143] 通用合成程序.-由酸形成活化酯(例如NHS)
- [0144] 将酸溶解在DCM(二氯甲烷)中,并且如果必要的话,添加DMF(N,N' -二甲基甲酰胺)以帮助溶解。添加N-羟基琥珀酰亚胺(1.5当量),然后添加EDC.HCl(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺)(1.5当量)。将反应混合物在室温下搅拌1h,直至大部分酸被消耗。通过RP-HPLC监测反应进程。然后将混合物用DCM稀释,并依次用柠檬酸(水溶液10%)和盐水洗涤。将有机层干燥并浓缩至干燥。任选通过RP-HPLC或硅胶柱色谱法纯化粗产物。
- [0145] 实施例1

[0146] 化合物6的制备



[0147]

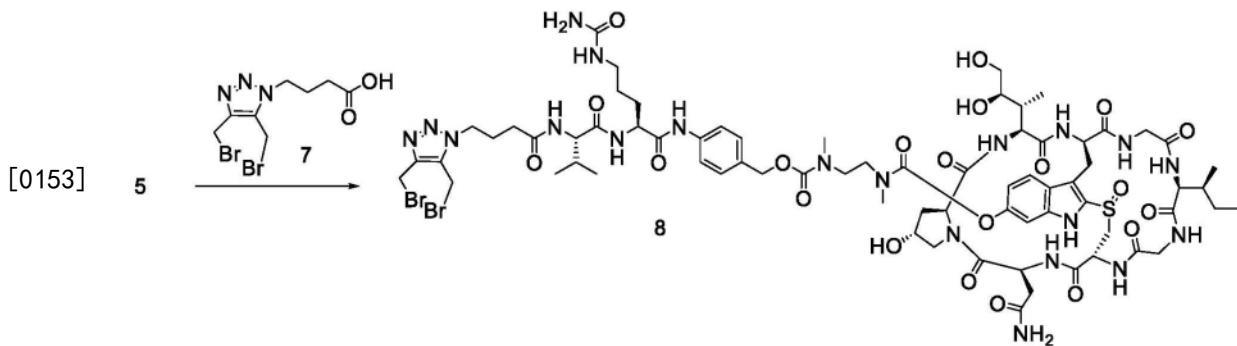
[0148] 向 α -鹅膏蕈碱1 (46mg, 50 μmol)于无水二甲基亚砜(DMSO) (1mL)中的溶液中添加双(4-硝基酚)碳酸酯(17mg, 55 μmol)，然后添加二异丙基乙胺(DIEA, 10 μL)。将混合物在室温下搅拌30分钟。添加化合物3(12mg)，然后添加DIEA(10 μL)。LC/MS表明在1h后消耗了所有化合物2。在减压下除去所有溶剂，并且将残余物用在二氯甲烷(DCM)中的三氟乙酸(TFA)(20%，v/v, 2mL)处理。在30分钟后浓缩反应混合物，并且通过反相HPLC纯化残余物，以在冷冻干燥后得到呈TFA盐形式的为白色固体的化合物4(45mg, 78%)。MS: m/z 1033.4 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

[0149] 将化合物4(45mg)溶解于无水二甲基甲酰胺(DMF, 1mL)中，并且添加9-芴基甲氧基羰基-缬氨酸-瓜氨酸-(4-氨基苄基)-(4-硝基苯基)碳酸酯(Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP, 38mg)，然后添加DIEA(20 μL)。将混合物在室温下搅拌2h。LC/MS分析指示反应完成。添加哌啶(50 μL)，并且在2h后，通过添加乙酸(200 μL)中和反应混合物。通过反相HPLC直接纯化粗混合物，以在冷冻干燥后得到呈TFA盐形式的为白色固体的化合物5(48mg, 80%)。MS: m/z 1438.7 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

[0150] 向化合物5(16mg, 10 μmol)于DMF(1mL)中的搅拌溶液中添加N- ϵ -马来酰亚胺基己酰氧基琥珀酰亚胺酯(4mg)，然后添加DIEA(4 μL)。将混合物在室温下搅拌2h。将粗反应混合物注入制备型HPLC柱中进行纯化。在冷冻干燥后，得到为白色固体的化合物6。(12mg)。MS: m/z 1631.8 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

[0151] 实施例2

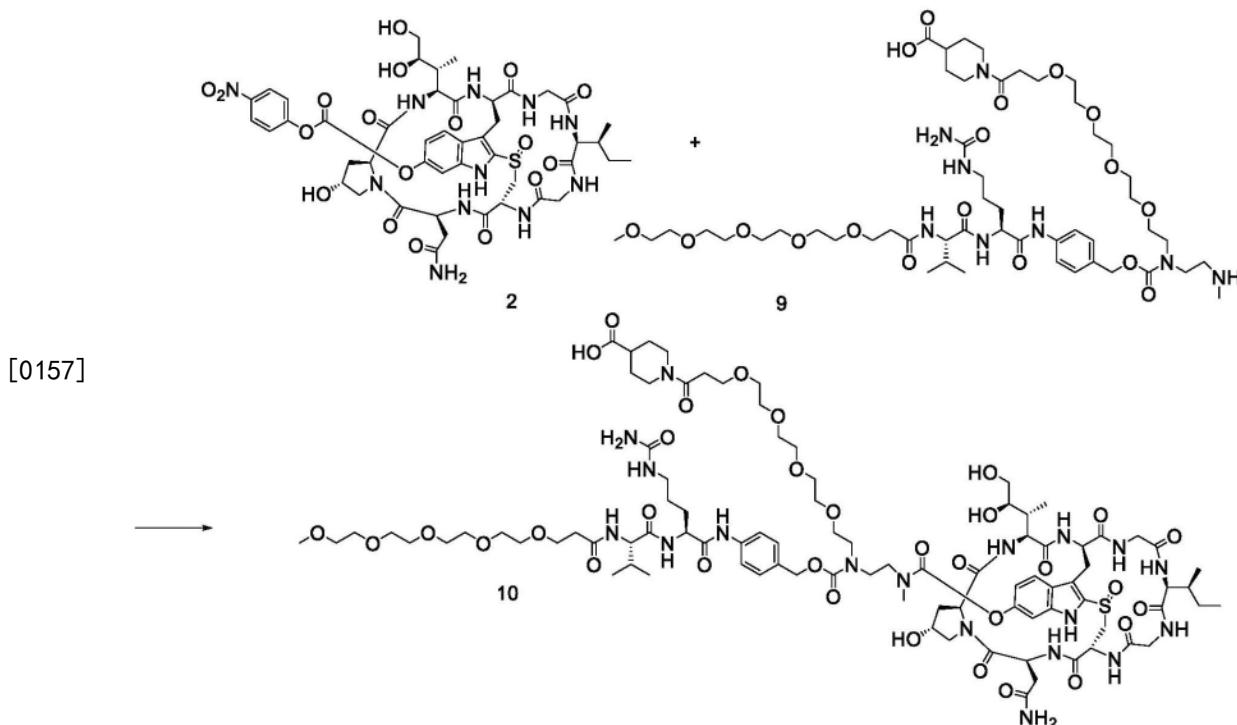
[0152] 化合物8的制备：



[0154] 向化合物5(16mg,10 μmol)于DMF(1mL)中的搅拌溶液中添加酸7(6mg),然后添加二异丙基碳二亚胺(5 μL)。将混合物在室温下搅拌2h。将粗反应混合物注入制备型HPLC柱中进行纯化。在冷冻干燥后,得到为白色固体的化合物8。(8mg)。MS: m/z 1761.8 ($M+\text{H}^+$)。

[0155] 实施例3

[0156] 化合物10的制备:

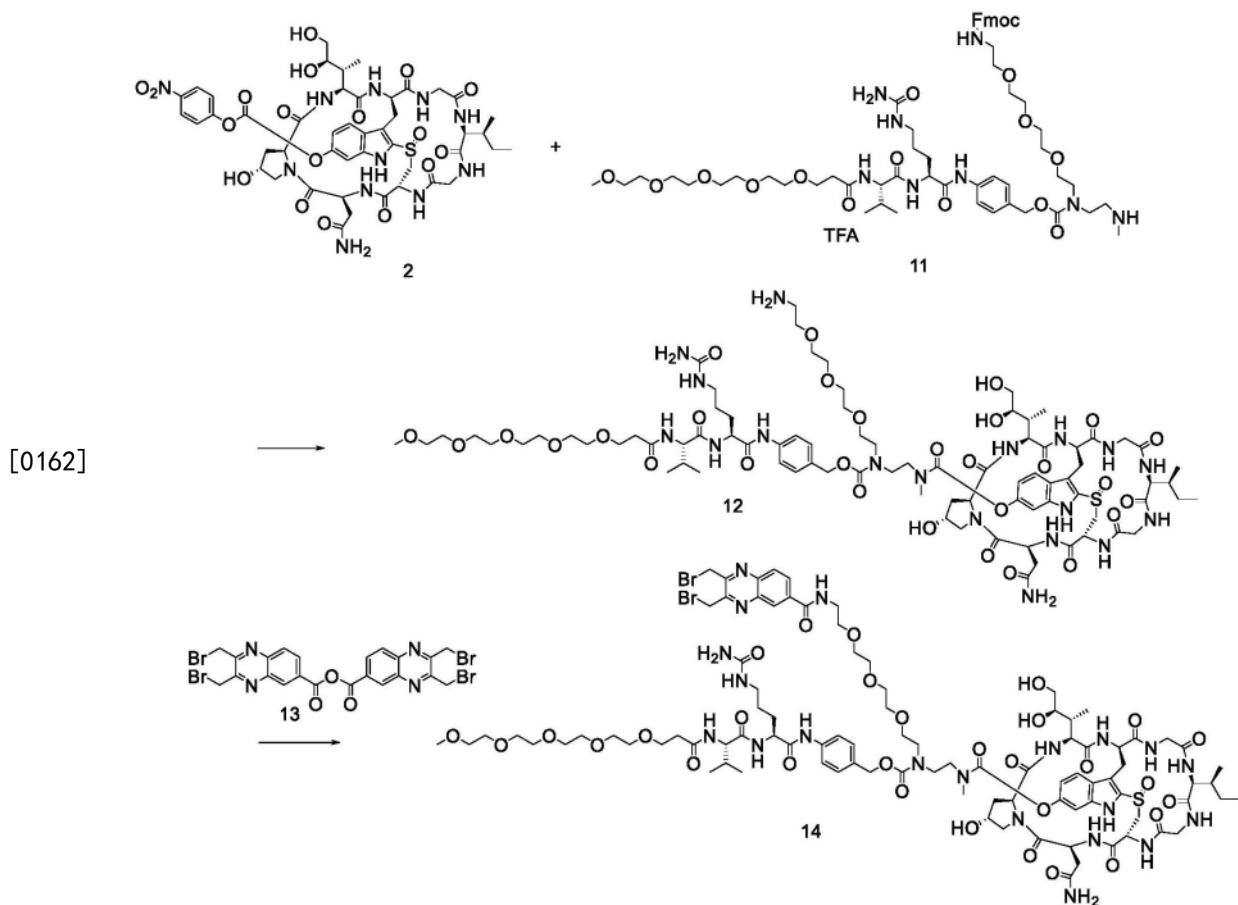


[0158] 向化合物2(30 μmol)于DMSO(1mL)中的搅拌溶液中添加胺9(40mg),然后添加DIEA(15 μL)。将混合物在室温下搅拌16h。将粗反应混合物注入制备型HPLC柱中进行纯化。在冷冻干燥后,得到为白色固体的化合物10。(32mg)。MS: m/z 2046.2 ($M+\text{H}^+$)。

[0159] 在缀合至抗体之前,按照通用程序将化合物10转化为相应的活化酯。

[0160] 实施例4

[0161] 化合物14的制备:

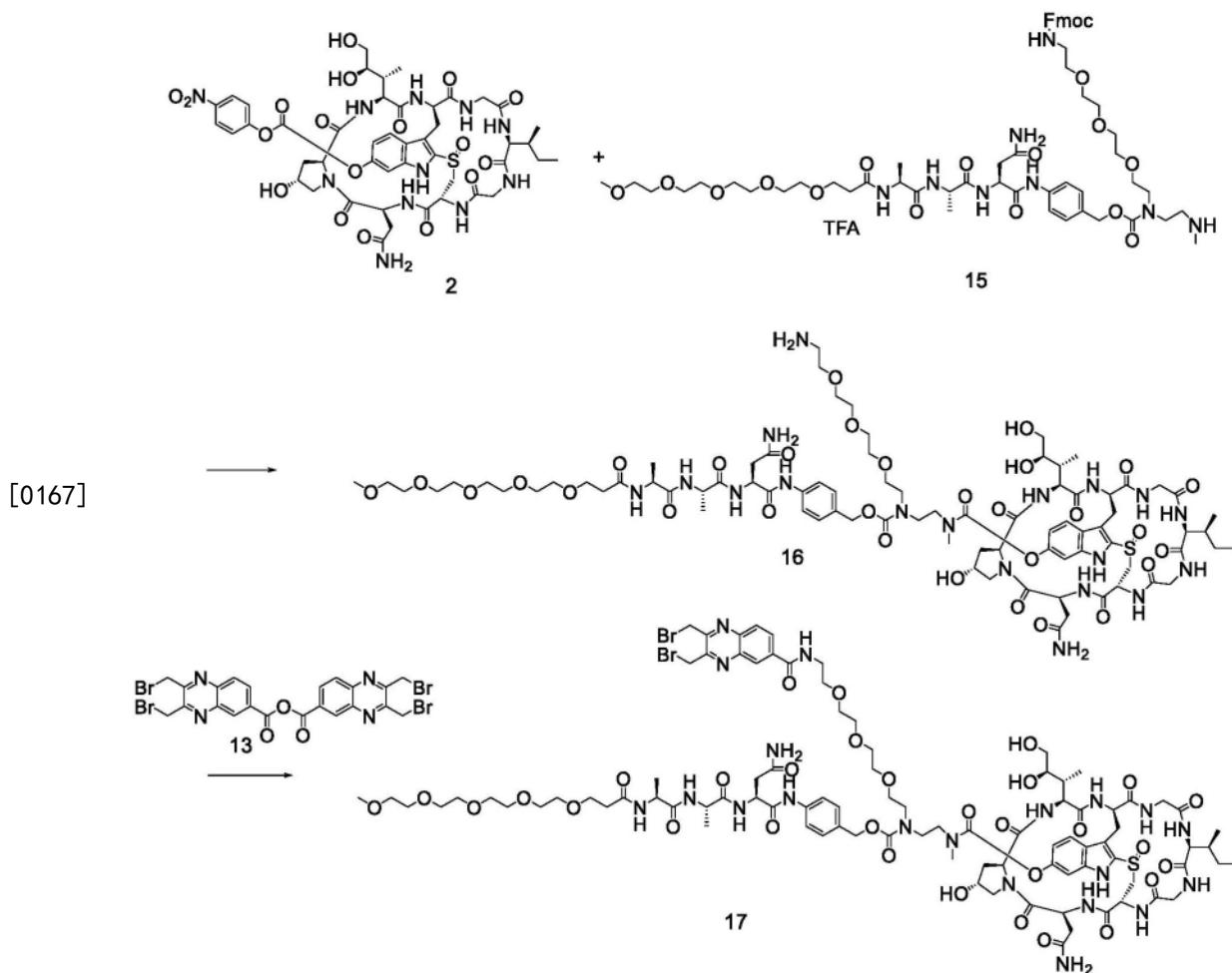


[0163] 向化合物2 (50 μmol) 于DMSO (1mL) 中的搅拌溶液中添加在DMF (1mL) 中的胺11 (65mg) , 然后添加DIEA (20 μL) 。将混合物在室温下搅拌16h。添加哌啶 (100 μL) 。在30分钟后, 通过反相HPLC直接纯化混合物, 得到作为白色固体的呈TFA盐形式的化合物12 (54mg) 。MS: m/z 1862.1 ($\text{M}+\text{H}^+$) 。

[0164] 将化合物12 (20mg) 溶解于DMF (1mL) 中。添加酸酐13 (11mg) , 然后添加DIEA (5 μL) 。将反应混合物在室温下搅拌5分钟, 并且通过反相HPLC纯化, 以在冷冻干燥后得到为白色固体的化合物14 (19mg) 。MS:m/z 2203.9 ($\text{M}+\text{H}^+$) 。

[0165] 实施例5

[0166] 化合物17的制备:

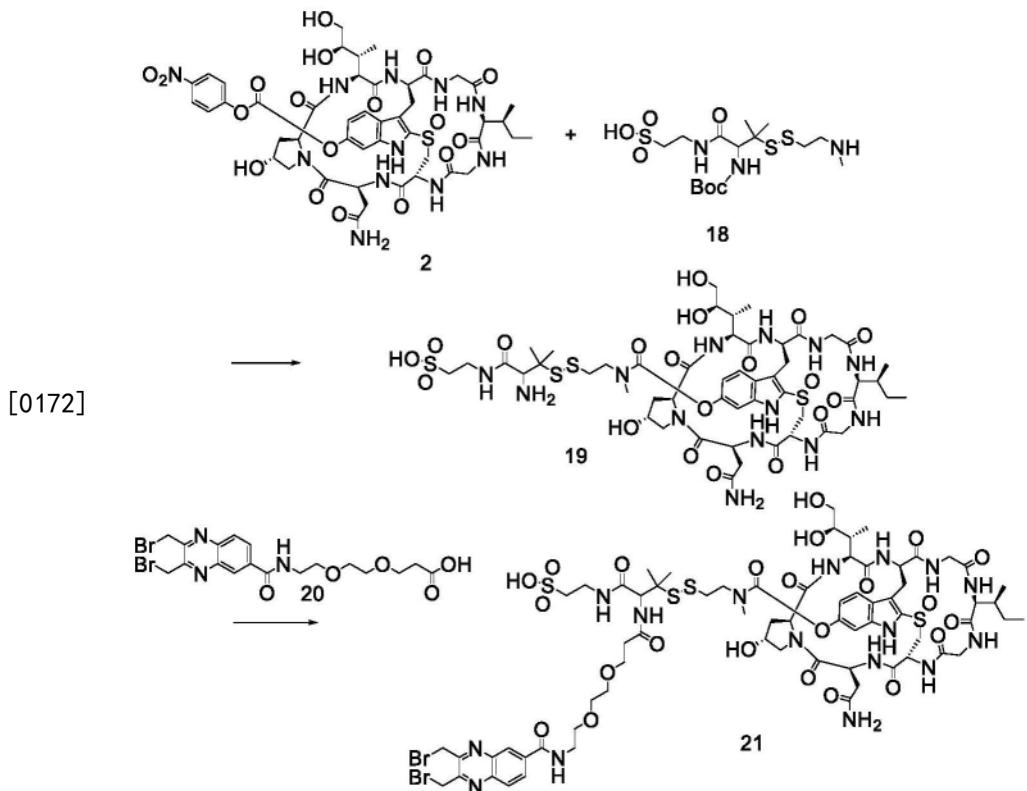


[0167] [0168] 向化合物2(50 μmol)于DMSO(1mL)中的搅拌溶液中添加在DMF(1mL)中的胺15(65mg),然后添加DIEA(20 μL)。将混合物在室温下搅拌16h。添加哌啶(100 μL)。在30分钟后,通过反相HPLC直接纯化混合物,得到作为白色固体的呈TFA盐形式的化合物16(49mg)。MS:
 m/z 1862.3 ($M+\text{H}^+$)。

[0169] 将化合物16(20mg)溶解于DMF(1mL)中。添加酸酐13(11mg),然后添加DIEA(5 μL)。将反应混合物在室温下搅拌5分钟,并且通过反相HPLC纯化,以在冷冻干燥后得到为白色固体的化合物17(20mg)。MS: m/z 2204.1 ($M+\text{H}^+$)。

[0170] 实施例6

[0171] 化合物21的制备:

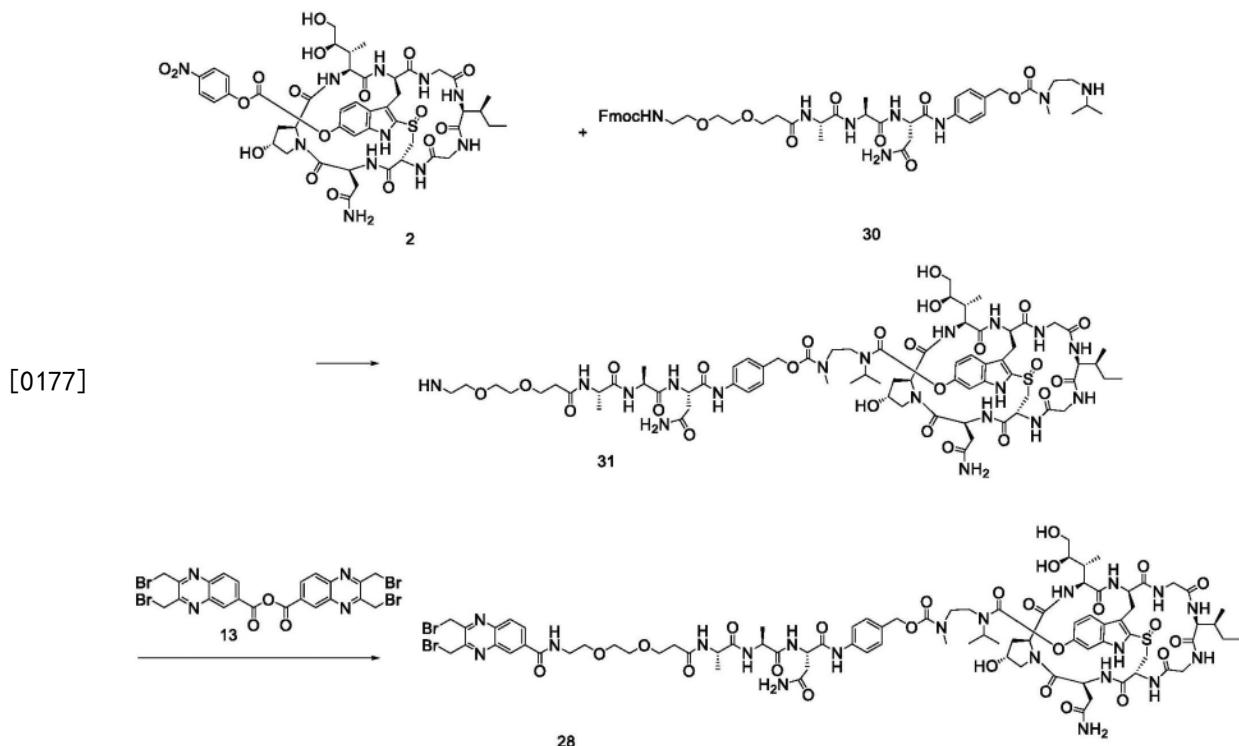


[0173] 向化合物2(50μmol)于DMSO(1mL)中的搅拌溶液中添加在DMF(1mL)中的胺15(25mg),然后添加DIEA(20μL)。将混合物在室温下搅拌5h。在减压下除去溶剂,并且将残余物溶解于20% TFA/DCM(2mL)中。在30分钟后,通过反相HPLC直接纯化混合物,得到作为白色固体的化合物19(31mg)。MS:m/z 1309.5 ($M+NH_4^+$)。

[0174] 向化合物19(25mg,20μmol)于DMF(1mL)中的搅拌溶液中添加酸20(16mg),然后添加二异丙基碳二亚胺(8μL)。将混合物在室温下搅拌2h。将粗反应混合物注入制备型HPLC柱中进行纯化。在冷冻干燥后,得到为白色固体的化合物21。(12mg)。MS:m/z 1791.4 ($M+H^+$)。

[0175] 实施例7

[0176] 化合物28的制备:

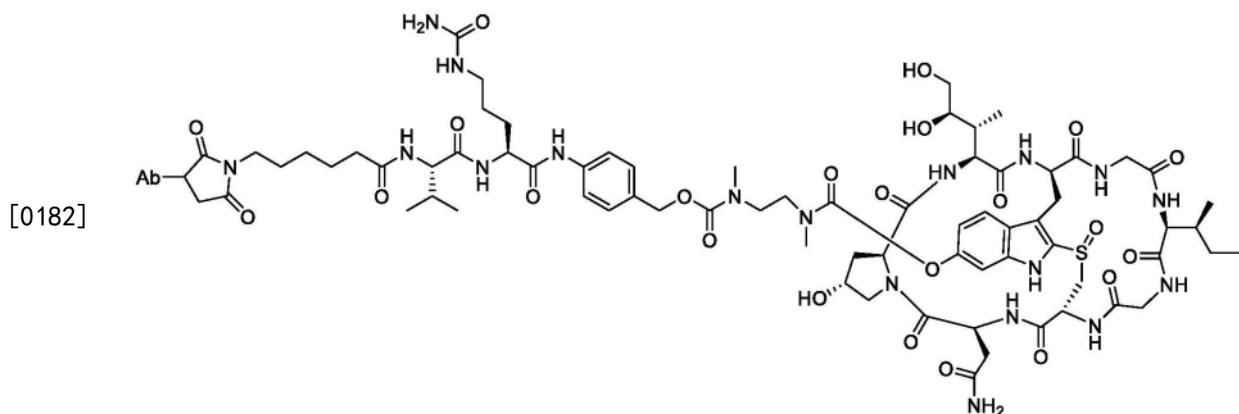


[0178] 向化合物2(50μmol)于DMSO(1mL)中的搅拌溶液中添加在DMF(1mL)中的胺30(46mg,50μmol),然后添加DIEA(20μL)。将混合物在室温下搅拌16h。添加哌啶(100μL)。在30分钟后,通过反相HPLC直接纯化混合物,得到作为白色固体的呈TFA盐形式的化合物31(25mg)。MS:m/z 1640.5 (M+H⁺)。

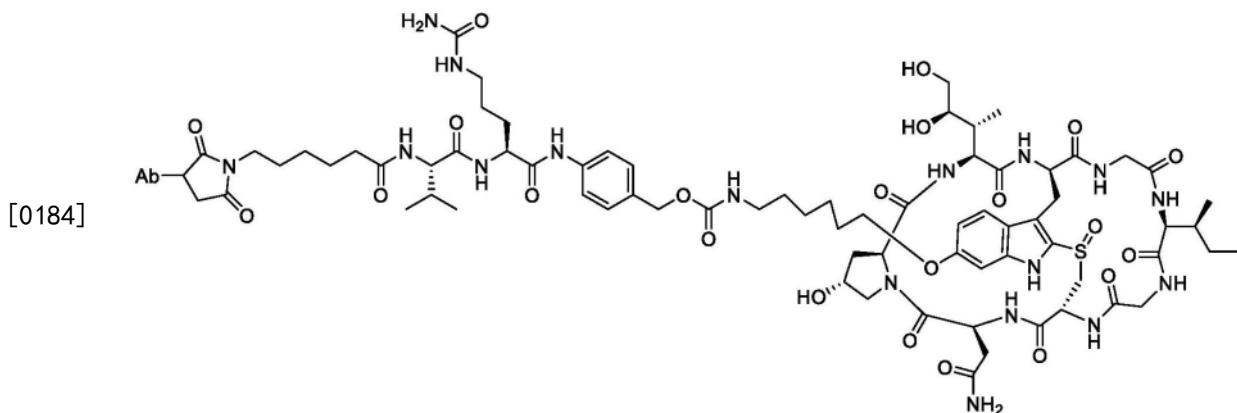
[0179] 将化合物31(20mg,11.4μmol)溶解在DMF(1mL)中。添加酸酐13(8mg),然后添加DIEA(5μL)。将反应混合物在室温下搅拌5分钟,并且通过反相HPLC纯化,以在冷冻干燥后得到为白色固体的化合物28(16mg)。MS:m/z 1981.9 (M+H⁺)。

[0180] 实施例8

[0181] 该实施例提供了比较研究,比较了下面示出为“A”和“B”的两种不同的鹅膏蕈碱缀合物。



[0183] 鹅膏蕈碱抗体缀合物结构A(ADC 22)



[0185] 鹅膏蕈碱抗体缀合物结构B

[0186] 进行比较研究以评价鹅膏蕈碱抗体缀合物结构A(其中 α -鹅膏蕈碱经由可裂解的氨基甲酸酯键附接至连接物)(在本公开文本中报道)以及鹅膏蕈碱抗体缀合物结构B(其中 α -鹅膏蕈碱通过非可裂解的醚键附接)(在WO 2012/041504中报道)在各种体外细胞杀伤测定中的功效(图1四个不同细胞系的四个小图)。在测试的所有4个Her-2阳性细胞系中,ADC A完全优于ADC B。

[0187] 实施例9

[0188] 该实施例提供了在指定细胞中体外测量的指定药物缀合抗体的EC50测定(nM)的结果。使用的抗体是抗HER2 IgG类抗体。将具有不同Her2表达水平(如下表中用正号或负号所示)的七种乳腺癌细胞系铺板在96孔板中。将ADC连续稀释并加入到细胞中处理5天。在研究结束时,通过普洛麦格公司(Promega)的CellTitreGlo测量细胞增殖。确定EC50(以nM计)作为50%细胞生长抑制的浓度。成功化合物的选择标准包括高功效,例如杀伤具有靶受体的高表达的细胞系,其中EC50小于3nM。而且,成功的候选物应该具有低毒性和良好的治疗窗口,如通过具有靶受体的低表达的对照细胞系(MDA468)的相对低的杀伤确定的。选择ADC 22(图3)和ADC 24(图2)作为具有高功效和良好的治疗窗口的成功候选物。

[0189] 实施例10

[0190] 该实施例提供了在指定细胞中体外测量的本文所述的指定ADC的EC50测定(nM)的结果。所使用的抗体靶向细胞表面上的受体酪氨酸激酶。将具有不同受体表达水平(如下表中用正号或负号所示)的八种癌细胞系铺板在96孔板中。将ADC连续稀释并加入到细胞中处理5天。在研究结束时,通过普洛麦格公司(Promega)的CellTitreGlo测量细胞增殖。EC50(以nM计)如下所示,并且确定为50%细胞生长抑制的浓度。成功化合物的选择标准包括高功效,例如杀伤具有靶受体的高表达的细胞系,其中EC50小于3nM。而且,成功的候选物应该具有低毒性和良好的治疗窗口,如通过具有靶受体的低表达的对照细胞系(T-47D)的相对低的杀伤确定的。ADC 25(图6)在细胞系H1993、HCC827、SNU-5和H292中显示出良好的细胞杀伤功效,但在Hs746T、EBC-1和U87中未显示出功效。它显示出良好的治疗窗口,因为它没有杀伤阴性对照细胞系T-47D。ADC 26(图4)在H1993和SNu-5中显示出良好的细胞杀伤活性。但是,它在其他6种细胞系中没有活性。ADC 27(图5)在H1993(EC50=11pM)和SNu-5(EC50=75pM)中显示出优异的细胞杀伤活性。它还在Hs746T(EC 50=0.4nM)中显示出良好的功效。ADC 29(图7)在细胞系Hs746T中显示出良好的细胞杀伤功效,但在EBC-1、U87、HCC827、H1993和T-47中未显示出功效。

[0191] 实施例11

[0192] 该实施例提供了在裸鼠中H292、HCC827和H1975人异种移植肿瘤生长模型中缀合有小分子22、23、25或27的ADC的功效结果。从ATCC获得HCC827、H292、H1975细胞系。将细胞在具有10% FBS (Seradigm 1500-500) 和青霉素链霉素(康宁(Corning) 30-002-CI) 的 RPMI 1640 1X (康宁10-041-CV) 培养基中于37°C在5%二氧化碳湿润的环境中培养。将细胞培养2周的时间并且在收获前传代4次。用0.25%胰蛋白酶(康宁25-050-CI) 收获细胞。在注射之前, 将HCC827细胞混合于1:1比率的HBSS (Hank's平衡盐溶液; Ward's 470180-784) 和基质胶(康宁354234) 混合物中, 并且将每0.2ml 7百万个细胞皮下注射到每只小鼠的右上侧腹。将H292细胞重新悬浮于HBSS中, 并且将每0.2ml 5百万个细胞皮下注射到每只小鼠的右上侧腹。将H1975细胞重新悬浮于HBSS中, 并且将每0.2ml 3百万个细胞皮下注射到每只小鼠的右上侧腹。

[0193] 贯穿这些研究使用5-7周龄的雌性Nu/Nu小鼠(Charles River)。

[0194] 在收到后, 在具有受控环境的房间中将小鼠每笼饲养5只小鼠。随意提供啮齿动物食物和水。在开始给药之前72小时使小鼠适应实验室条件。在适应期间监测动物的健康状况。通过组编号和研究编号鉴别每个笼, 并且通过耳标分别鉴别小鼠。

[0195] 研究设计和给药方案如表3所示。

[0196] 表3

肿瘤模型	组	每组动物		处理体积/途径	剂量/频率
[0197]	H292	1	7	PBS	200 μl/静脉内 0 mg/kg, 单剂量
		2	7	cMet/EGFR-22	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量
		3	7	cMet-22	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量
		4	7	Nimo-22	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量
	HCC827	1	7	PBS	200 μl/静脉内 0 mg/kg, 单剂量
		2	7	cMet/EGFR-23	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量
		3	7	cMet-23	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量
		4	7	Nimo-23	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量
[0198]	H1975	1	8	PBS	200 μl/静脉内 0 mg/kg, 单剂量
		2	8	cMet/EGFR-25	200 μl/静脉内 1 mg/kg, 单剂量
		3	8	cMet/EGFR-25	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量
	HCC827	1	8	PBS	200 μl/静脉内 0 mg/kg, 单剂量
		2	8	cMet-27	200 μl/静脉内 0.3 mg/kg, 单剂量
		3	8	cMet/EGFR-27	200 μl/静脉内 1 mg/kg, 单剂量
		4	8	cMet/EGFR-27	200 μl/静脉内 3 mg/kg, 单剂量

[0199] 通过在接种后第5-7天开始使用数字卡尺测量肿瘤宽度和长度来监测肿瘤生长，

并且每周追踪两次，直至肿瘤体积达到约 $100\text{-}250\text{mm}^3$ 。使用以下公式计算肿瘤体积：体积(mm^3)=[长度(mm) \times 宽度(mm) 2]/2。一旦将肿瘤分级至所希望的体积，将动物随机化，并且剔除具有非常大或小的肿瘤的小鼠。将小鼠分成多个组，每组具有如研究设计中所指示的动物数。然后用研究设计中所指示的剂量的PBS或缀合有22、23、25或27的抗体静脉内处理(0.2ml/动物)小鼠。监测肿瘤生长，并且当对照组的平均肿瘤负荷超过 2000mm^3 时，处死每组小鼠。

[0200] 在整个实验期间每周两次测量肿瘤体积以确定TGI(肿瘤生长抑制%)。通过电力秤每周测量每只小鼠的体重两次。对组平均值和标准差进行计算，并且进行统计学分析(采用邓尼特多重比较检验的单向方差分析；GraphPad Prism 6.0)。将所有处理组与PBS组进行比较。P<0.05被认为是统计学上有意义的。

[0201] 与PBS处理的对照组相比，3mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-22和Nimo-22处理显著抑制H292肿瘤生长。虽然cMet-22在处理之后的前10天抑制肿瘤生长，但肿瘤在10天后恢复生长(图8和图9)。在该研究中，3mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-22和cMet-22在处理之后3-6天显示出皮疹，并且在第6天至第14天之间显示出干燥、干裂皮肤。那些皮肤问题在第14天后恢复。在研究期间没有观察到显著的处理相关的体重损失。(图10)。尽管在cMet/EGFR-22处理组中在第一周期间有体重损失，但体重损失是短暂的并且小于总体重的10%。此外，与PBS处理的对照组相比，动物恢复体重并且整体更健康。

[0202] 与PBS处理的对照组相比，3mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-23、cMet-23或Nimo-23处理各自显著抑制H292肿瘤生长(图11和图12)。在cMet-23、cMet/EGFR-23和Nimo-23处理的组(3mg/kg)中未观察到体重损失(图13)。

[0203] 3mg/kg或1mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-25在H1975异种移植物中没有显著的肿瘤生长抑制(图14)。3mg/kg或1mg/kg的单剂量的cMet/EGFR-27、或0.3mg/kg的单剂量的cMet-27在HCC827异种移植物中没有显著的肿瘤生长抑制(图15)。在研究期间未观察到显著的体重损失(图16)。

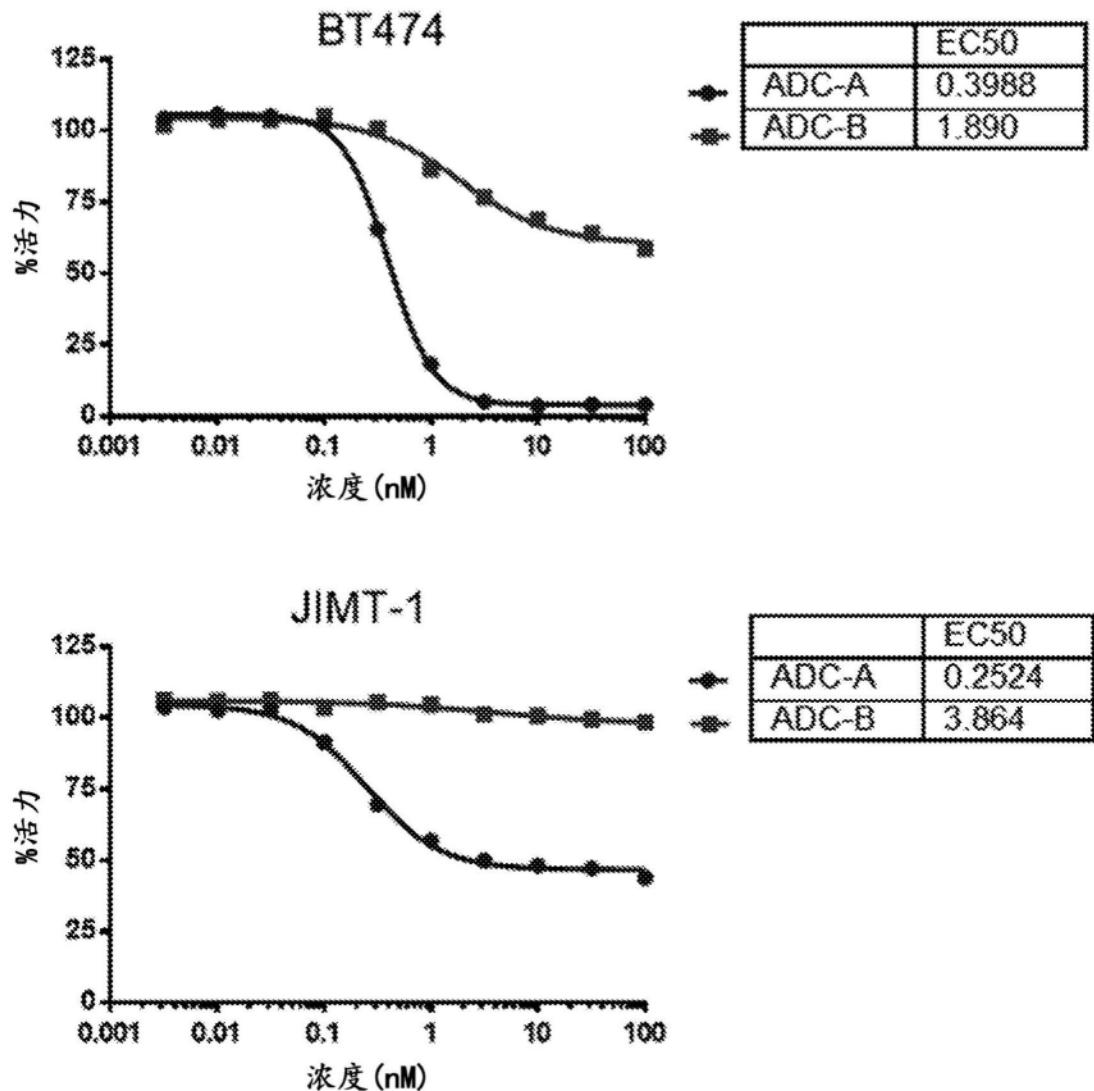


图1

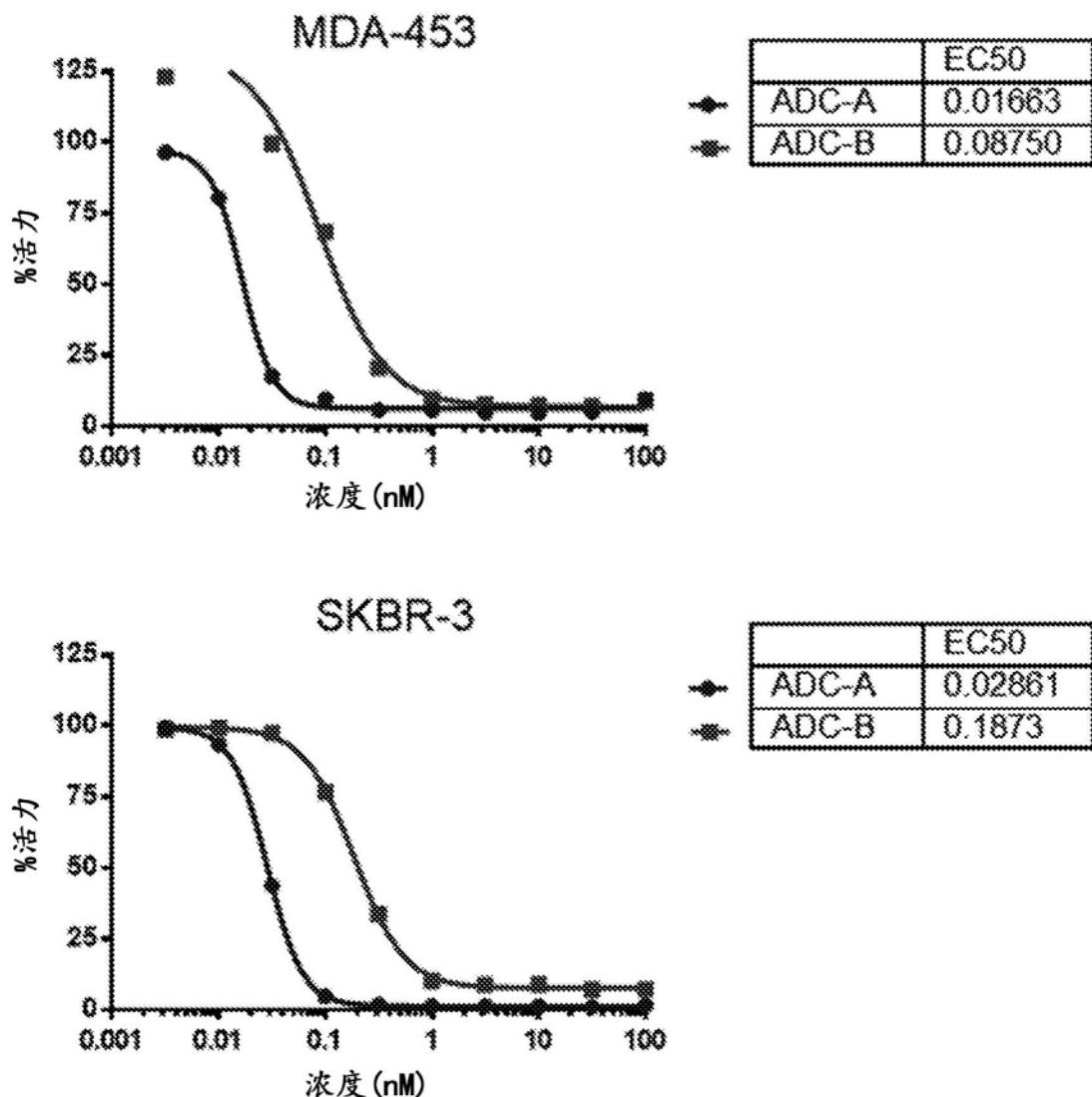


图1续

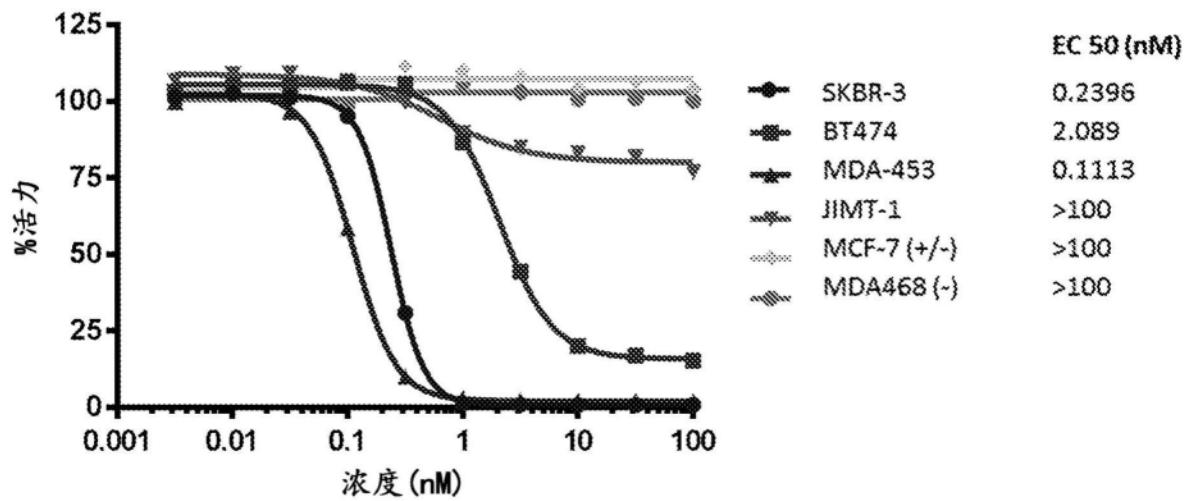


图2

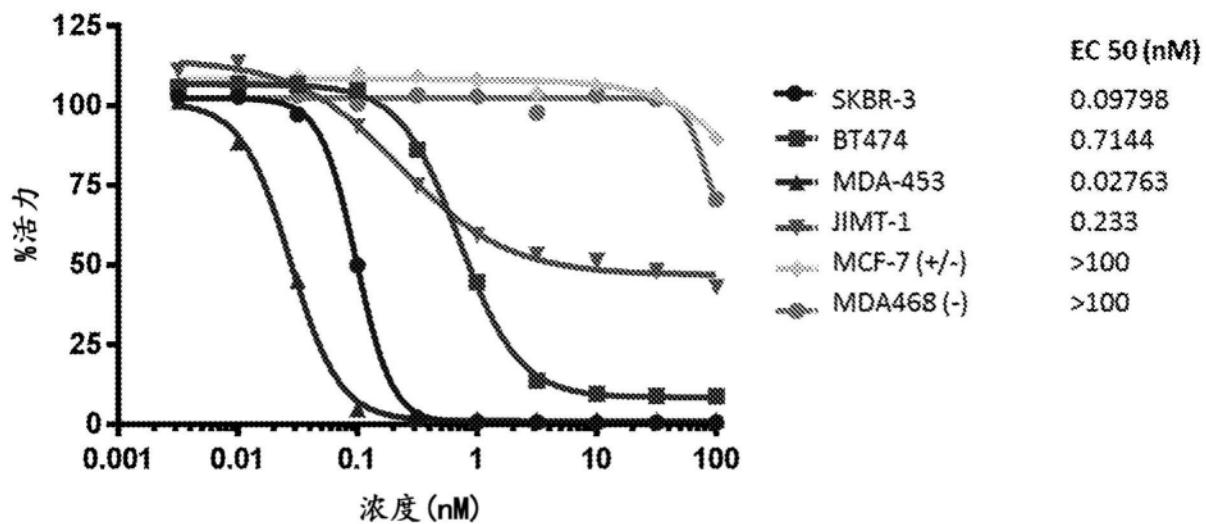


图3

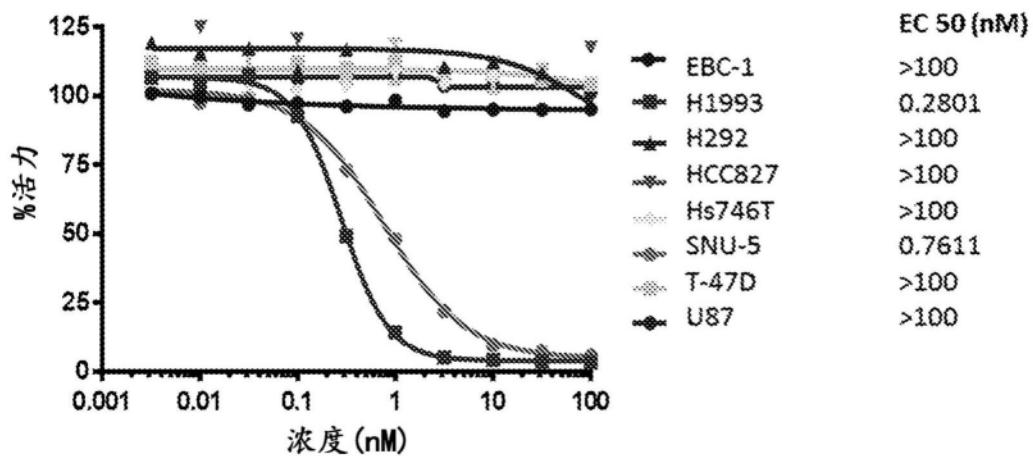


图4

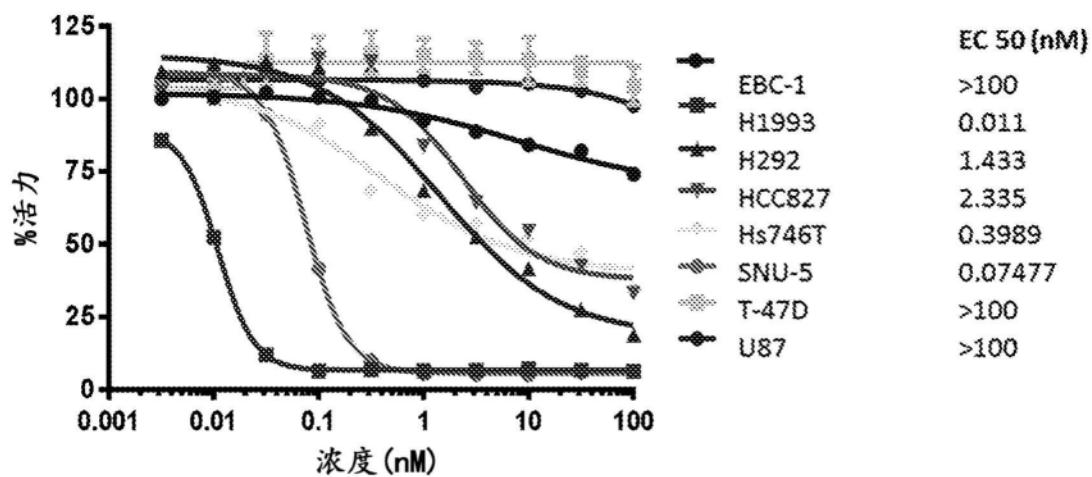


图5

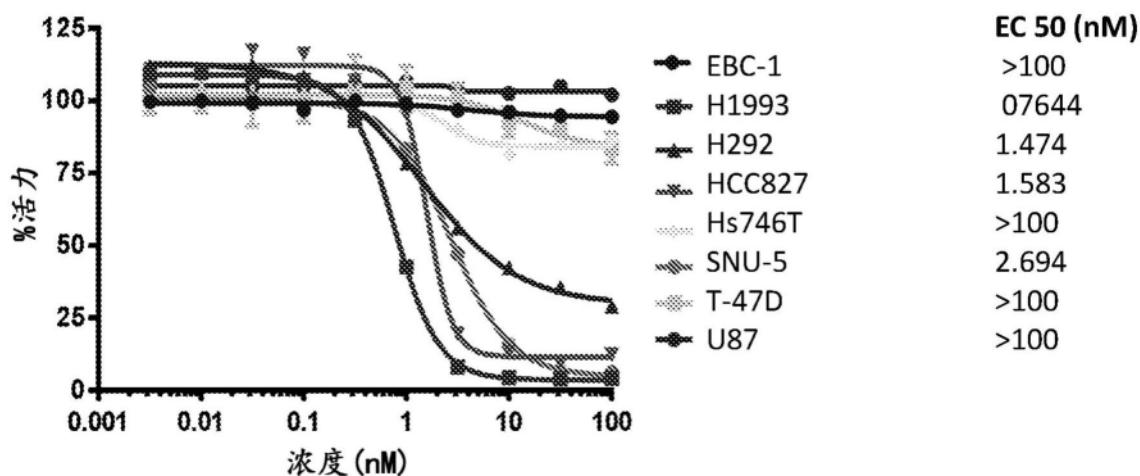


图6

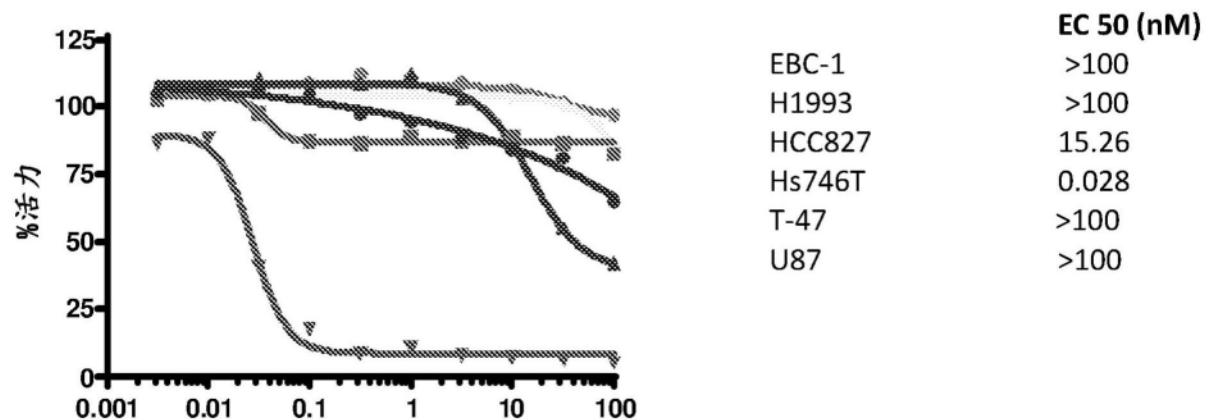
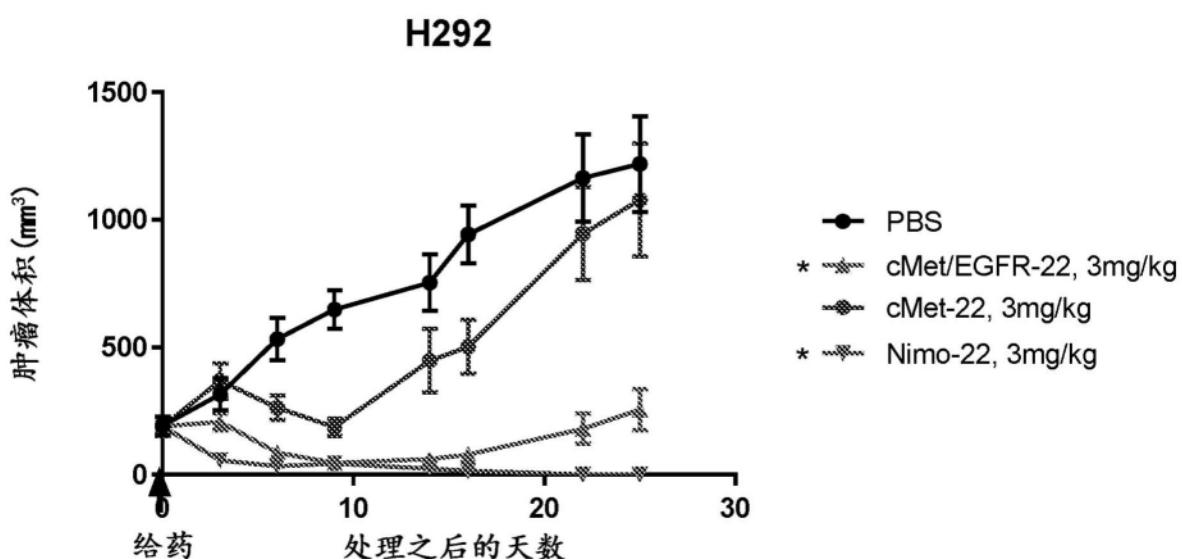
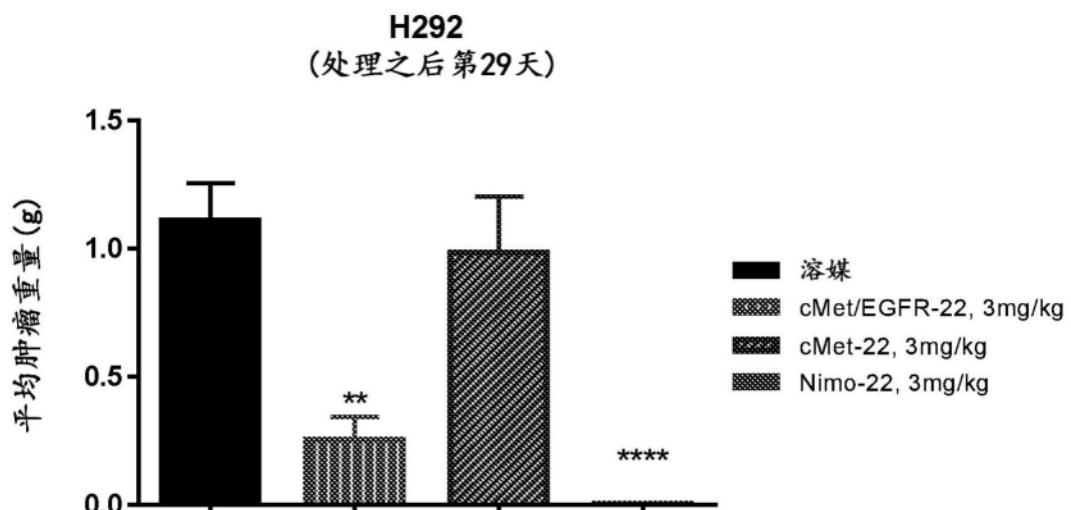


图7



* p<0.05. 与对照组相比的单向方差分析，多重比较

图8



* p<0.05. 与对照组相比的单向方差分析，多重比较

图9

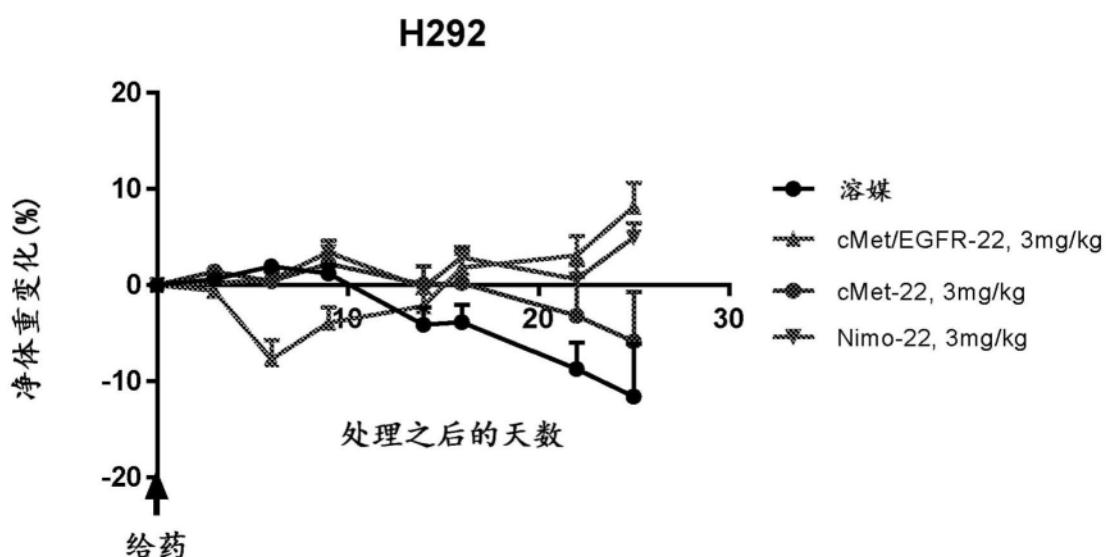


图10

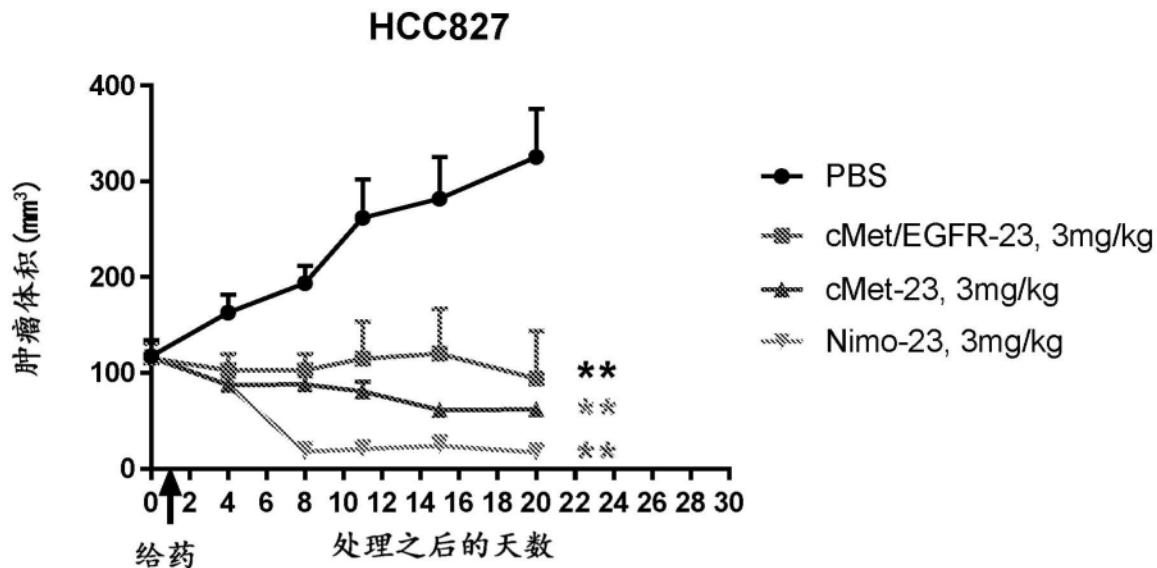
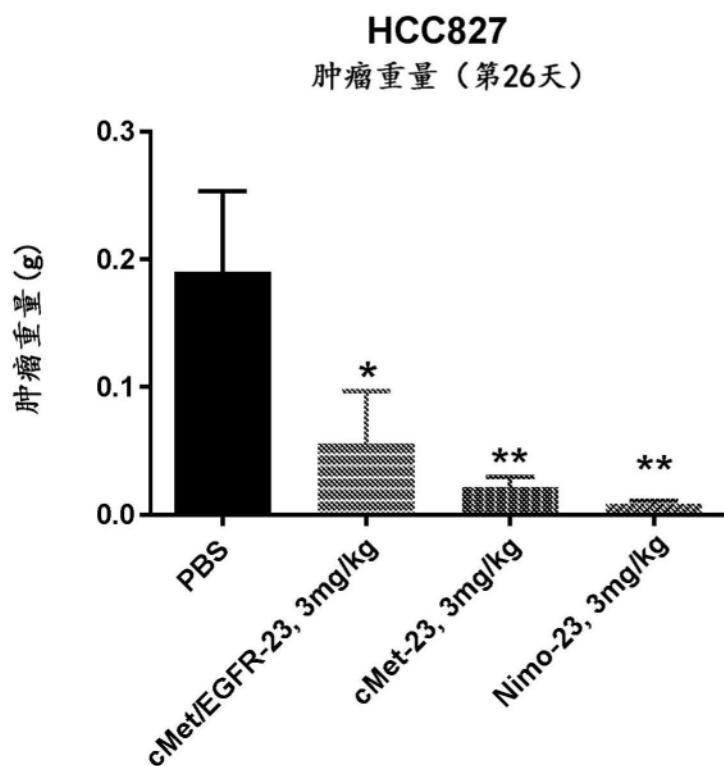


图11



* $P < 0.05$, ** 相对溶媒, 采用事后邓尼特多重比较检验的单向方差分析

图12

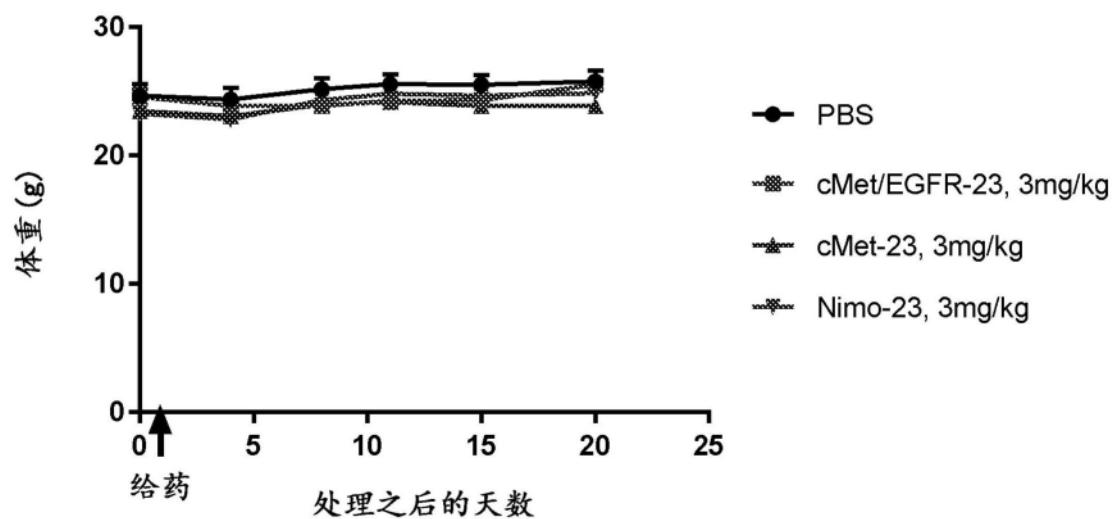
HCC827

图13

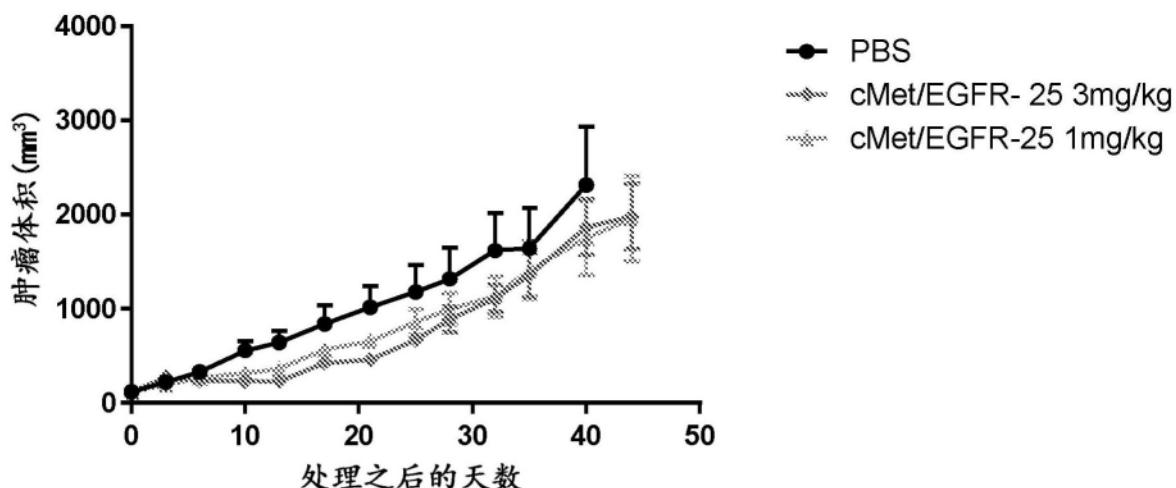
H1975

图14

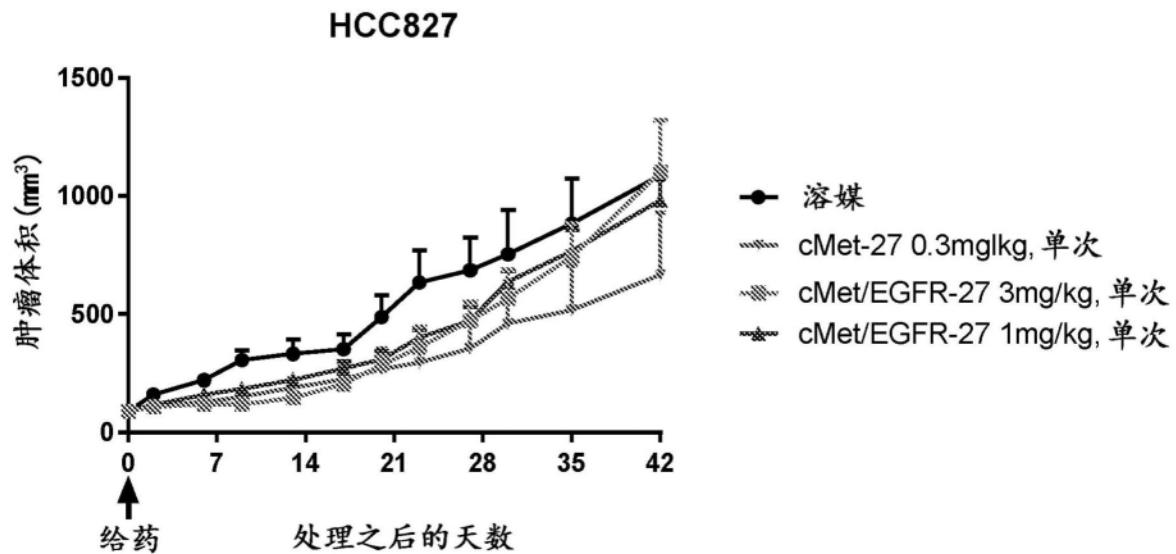


图15

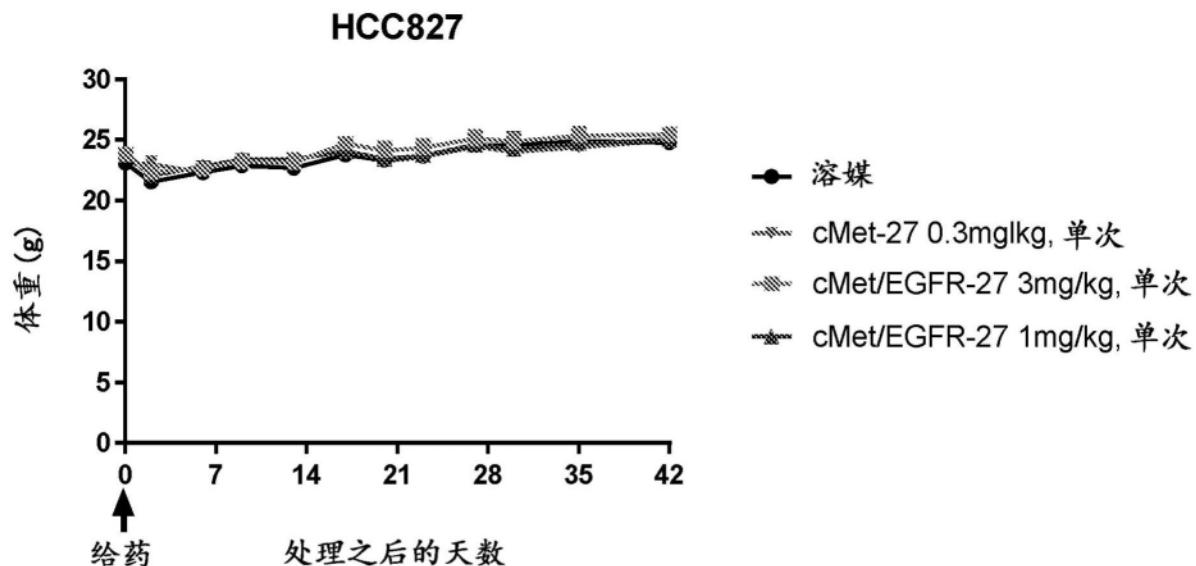


图16