(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119997982 A
(43)申请公布日 2025.05.13

(21)申请号 202380064729.2
(22)申请日 2023.09.08
(30)优先权数据
22194959.7 2022.09.09 EP
22194984.5 2022.09.09 EP
2305541.1 2023.04.14 GB
2305546.0 2023.04.14 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.03.07
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2023/052318 2023.09.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/052684 EN 2024.03.14
(71)申请人 迈里克斯制药有限公司
地址 英国
申请人 帝国理工学院创新有限公司
(72)发明人 R·卡尔 R·索拉里 E·W·塔特 A·S·贝尔 R·博纳特
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 杨春刚 黄革生
(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07D 471/04(2006.01)

权利要求书29页 说明书90页
序列表（电子公布） 附图22页

(54)发明名称

包含NMT抑制剂的抗体药物偶联物及其用途

(57)摘要

本发明涉及包含通过连接子与抗体偶联的NMT抑制剂的ADC,及相关用途。

CN 119997982 A

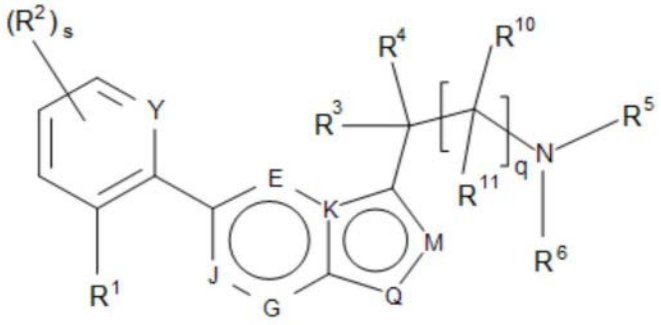
1.一种抗体药物偶联物(ADC),其包含通过连接子与抗体偶联的NMT抑制剂,或其盐。

2.根据权利要求1所述的ADC的盐。

3.根据权利要求1或2所述的盐,其为药学上可接受的盐。

4.根据权利要求1所述的ADC。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(I)的化合物:



(I)

或其盐,

其中:

Y选自由-CH-、-C(R^2)-和-N-组成的组;

R^1为式-X-L-A的基团;

X代表-O-;

L代表-$(CH_2)_m$-;

m为1、2或3;

A为6-10元芳族碳环或5-10元芳族杂环,所述芳族碳环或杂环任选地被1、2或3个取代基取代,每个取代基独立地选自由以下组成的组:-F、-Cl、-Br、-OCH_3、-OCF_3、-CN、任选地被至多3个卤素、羟基或-OC_{1-4}烷基取代的-C_{1-6}烷基、-S(O)$_2C_{1-4}$烷基、-S(O)$_2C_{1-4}$烷基、-C(O)N(R^9)$_2$、-C(O)N(R^{13})C_{1-4}烷基OC_{1-4}烷基、-C(O)N(C_{1-4}烷基OC_{1-4}烷基)$_2$、-CH_2C(O)N(R^9)$_2$、-CH_2C(O)N(R^{13})C_{1-4}烷基OC_{1-4}烷基、-CH_2C(O)N(C_{1-4}烷基OC_{1-4}烷基)$_2$、-S(O)$_2$NHC_{1-4}烷基、-S(O)$_2$N(C_{1-4}烷基)$_2$、-NHC_{1-4}烷基、-N(C_{1-4}烷基)$_2$、-NHC(O)C_{1-4}烷基、-NHC(O)CF_3、-NHS(O)$_2C_{1-4}$烷基、CH_2N(R^{13})$_2$、CH_2N(R^{13})C(O)C_{1-4}烷基、CH_2N(R^{13})S(O)$_2C_{1-4}$烷基、-CH_2S(O)$_2C_{1-4}$烷基和CO_2H;

s为0、1、2或3;

每个R^2独立地选自由以下组成的组:-F、-Cl、-Br、-OCH_3、-OCF_3、-CN、任选地被至多3个卤素或羟基取代的-C_{1-4}烷基、-S(O)C_{1-4}烷基、-S(O)$_2C_{1-4}$烷基、-S(O)$_2$NHC_{1-4}烷基、-S(O)$_2$N(C_{1-4}烷基)$_2$、-NHC_{1-4}烷基、-N(C_{1-4}烷基)$_2$、-NHC(O)C_{1-4}烷基、-NHC(O)CF_3和-NHS(O)$_2C_{1-4}$烷基;

q为0或1;

R^3为氢或甲基;R^4为氢或甲基;

R^5为氢;R^6为氢或任选地被至多3个-F、-Cl、-Br、-OH、-OCH_3、-OCF_3或-CN基团取代的C_{1-6}烷基;

当存在时,R^{10}为氢或甲基;

当存在时,R^{11}为氢或甲基;

或者R^3基团与R^5基团及其间的原子形成由其间的原子与键、或其间的原子与-$(CHR^a)_r$-

构成的3至7元非芳族杂环;或者R^{10}基团与R^5基团及其间的原子形成由其间的原子与-$(CHR^a)_r$-构成的3至7元非芳族杂环;

r为1、2、3、4或5;R^a为氢或甲基;

每个R^7独立地选自由氢、卤素、C_{1-4}烷氧基和任选地被1、2或3个卤素取代的C_{1-4}烷基组成的组;并且

R^8选自氢和C_{1-4}烷基;

每个R^9独立地选自由氢和C_{1-4}烷基组成的组,或者两个R^9基团和它们所键合的N形成4至7元非芳族杂环,所述杂环任选地包含1或2个选自N、O和S的其他杂原子;

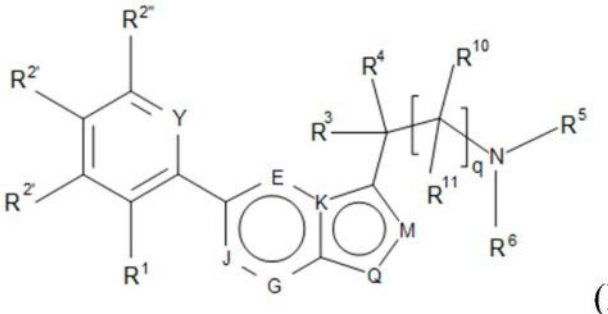
每个R^{13}独立地选自由氢和C_{1-4}烷基组成的组;且其中:

i)E、J和G各自为C(R^7),K为碳,Q为N(R^8),且M为氮;

ii)E、J和G各自为C(R^7),且K、Q和M各自为氮;或

iii)E、J、G和M各自为C(R^7),且K和Q各自为氮。

6.根据权利要求5所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(IA^^)的化合物:



(IA^^)

或其盐,

其中:

R^1为式-X-L-A的基团;

A为4-吡唑基,所述吡唑基任选地被至多3个选自甲基和-C(O)N$(CH_3)_2$的取代基取代;

X为-O-;

L为-$(CH_2)_m$-;

m为2;

$R^{2'}$选自由氟或氯(优选氟)组成的组;

$R^{2''}$选自由氢、氟或氯组成的组;

q为0;

R^3为氢或甲基;

R^4为氢或甲基;

R^5为氢;

R^6为氢或甲基;或

所述R^3基团和所述R^6基团以及其间的原子形成由其间的原子和键组成的3至7元非芳族杂环;

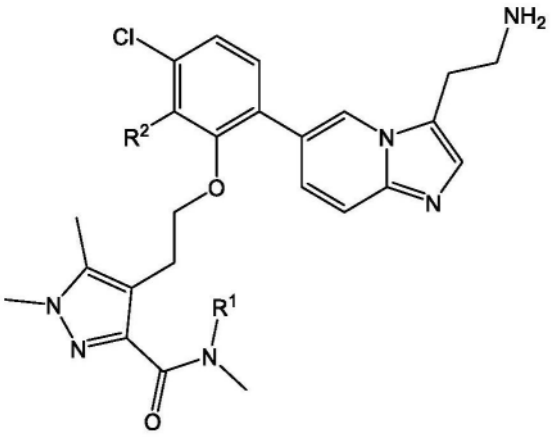
E、J、G、K、Q和M为:

i)E、J和G各自为CH,K为碳,Q为N(R^8),M为氮;且R^8为氢或甲基;或

ii)E、J、G和M各自为CH,且K和Q各自为氮;

条件是,A被不超过一个-C(O)N(CH$_3$)$_2$基团取代。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(II)的化合物:



(II),

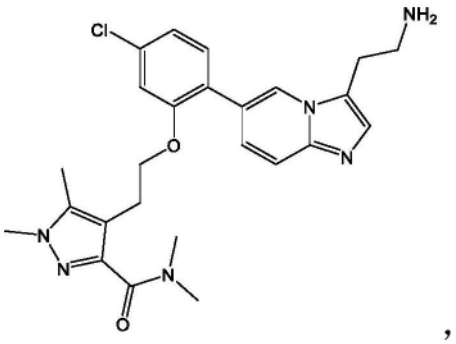
或其盐,

其中:

R^1为H或-CH$_3$;并且

R^2为H或F。

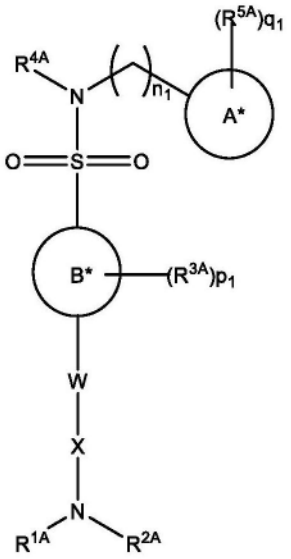
8.根据权利要求7所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为4-(2-{2-[3-(2-氨基乙基)咪唑并[1,2-a]吡啶基-6-基]-5-氯苯氧基}乙基)-N,N,1,5-四甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺:



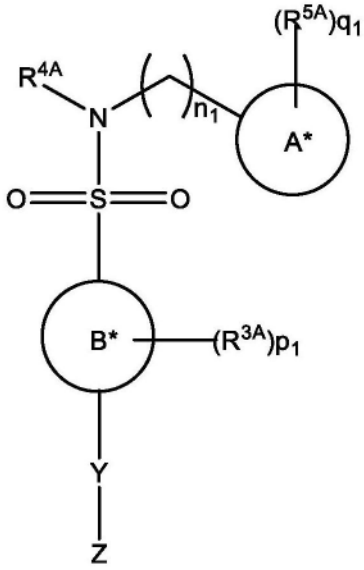
,

或其盐。

9.根据权利要求1至4中任一项所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(III)或(IV)的化合物:



(III)；或



(IV)

或其盐，

其中：

n_1为0、1、2、3、4、5或6；

环A*为任选地被取代的含氮芳基，其中环A*中每个可取代的碳或氮任选且独立地被一个或多个R^{5A}取代，并且其中如果环A*包含-NH-部分，则所述氮可以任选地被C_{1-6}烷基(例如甲基)取代；且其中R^{4A}和环A*可与它们所连接的原子一起形成环状基团，

环B*为任选地被取代的芳基或杂芳基，其中环B*中每个可取代的碳或杂原子任选且独立地被一个或多个R^{3A}取代；

W和X中的一个可以不存在，且W和X独立地选自R^{11A}、任选地被R^{11A}取代的烃基(例如，C_{1-8}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)和任选地被R^{12A}取代的-$(CH_2)_{k1}$-杂环基；k_1为0、1、2、3、4、5或6；

R^{1A}为氢；

R^{2A}、R^{3A}、R^{4A}和R^{5A}独立地选自氢、R^{12A}、任选地被R^{12A}取代的烃基(例如，C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)和任选地被一个或多个R^{12A}取代的-$(CH_2)_{L1}$-杂环基；其中R^{2A}与W或X一起可形成任选地被一个或多个R^{12A}取代的杂环；并且其中R^{3A}和R^{5A}中的一个或多个与它们所连接的原子一起可形成任选地被R^{12A}取代的碳环，例如杂环基；L_1为0、1、2、3、4、5或6；

其中：

每个R^{11A}和R^{12A}独立地选自卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基、氧代、=NR^{13A}、-OR^{13A}、-SR^{13A}、-C(O)R^{13A}、-C(O)OR^{13A}、-OC(O)R^{13A}、-$NR^{13A}COR^{14A}$、-$NR^{13A}CON(R^{13A})_2$、-$NR^{13a}COR^{14a}$、-$NR^{13a}CO_2R^{14A}$、-S(O)R^{13A}、-$S(O)_2R^{13A}$、-$SON(R^{13A})_2$、-$NR^{13A}S(O)_2R^{14A}$；-CSR^{13A}、-$N(R^{13A})R^{14A}$、-C(O)$N(R^{13A})R^{14A}$、-$SO_2N(R^{13A})R^{14A}$和R^{15A}；

R^{13A}和R^{14A}各自独立地选自氢或R^{15A}；

R^{15A}选自烃基(例如C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)、碳环基和-$(CH_2)_{m1}$-杂环基，且每个R^{15A}任选且独立地被卤素、氰基、氨基、羟基、C_{1-6}烷基或环烷基和C_{1-6}烷氧基中的一个或多个取代；

m_1为0、1、2、3、4、5或6;

p_1为0、1、2、3或4;R^{4A}的值可以相同或不同;并且

q_1为0、1、2、3或4;其中R^{5A}的值可以相同或不同;

Y和Z中的一个或两者可以不存在,且独立地选自氢、R^{16A}、任选地被R^{16A}取代的烃基(例如C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)和任选地被R^{16A}取代的-$(CH_2)_{r1}$杂环基,其中每个R^{16A}独立地选自卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基、氧代、=NR^{17A}、-OR^{17A}、-SR^{17A}、-C(O)R^{17A}、-C(O)OR^{17A}、-OC(O)R^{17A}、-$NR^{17A}COR^{18A}$、-$NR^{17A}CON(R^{18A})_2$、-$NR^{17A}COR^{18A}$、-$NR^{17A}CO_2R^{18A}$、-S(O)R^{17A}、-S(O)$_2R^{17A}$、-$SON(R^{17A})_2$、-$NR^{17A}S(O)_2R^{18A}$;-CSR^{17A}、-$N(R^{17A})R^{18A}$、-C(O)$N(R^{17A})R^{18A}$、-$SO_2N(R^{17A})R^{18A}$和R^{19A};r_1为0、1、2、3、4、5或6;

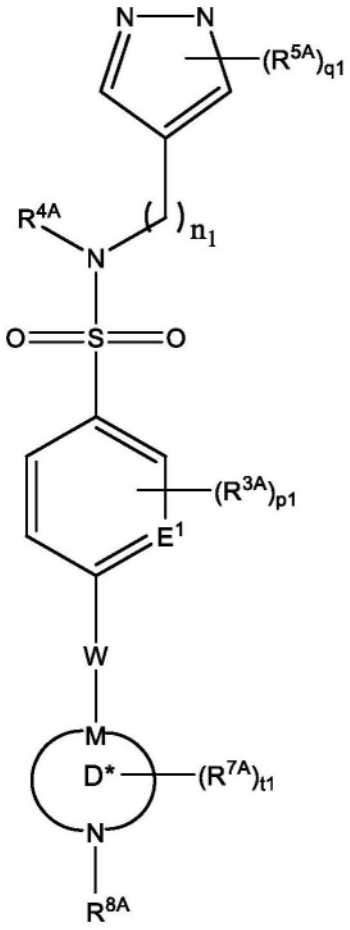
其中:

R^{17A}和R^{18A}各自独立地选自氢或R^{19A};

R^{19A}选自烃基(例如C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)、碳环基和-$(CH2)_{s1}$-杂环基,且每个R^{19A}任选且独立地被卤素、氰基、氨基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基中的一个或多个取代;并且

s_1为0、1、2、3、4、5或6。

10.根据权利要求9所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(IIIa)的化合物:



(IIIa)

或其盐,

其中:

n_1为0或1;

E^1为C;

W为(1-4C)烃基、芳基(例如苯基)或杂芳基基团(例如吡啶基);

M选自C和N;

R^{3A}、R^{4A}和R^{5A}独立地选自氢、R^{12A}和任选地被R^{12A}取代的(1-3C)烃基;

R^{12A}独立地选自卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基、氧代、-OR^{13A}、-SR^{13A}、-C(O)R^{13A}、-C(O)OR^{13A}、-OC(O)R^{13A}、-$NR^{13A}COR^{14A}$和R^{15A};

R^{13A}和R^{14A}各自独立地选自氢或(1-4C)烃基(例如甲基);

环D*为任选地被取代的含氮6或7元杂环,其中环D*中每个可取代的碳或氮任选且独立地被一个或多个R^{7A}取代;

R^{7A}独立地选自氢、(1-4C)烃基、卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基或氧代;

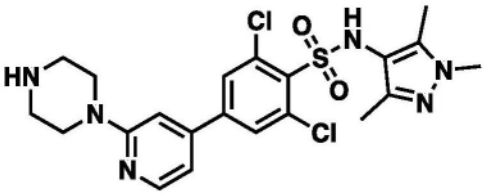
R^{8A}为氢;

p_1为0、1或2,其中R^{4A}的值可以相同或不同;

q_1为3,其中R^{5A}的值可以相同或不同;且

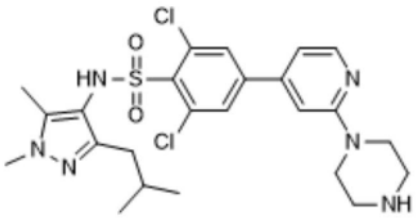
t_1为0、1或2,其中R^{7A}的值可以相同或不同。

11.根据权利要求10所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为(2,6-二氯-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-N-(1,3,5-三甲基-1H-吡唑-4-基)-苯磺酰胺):



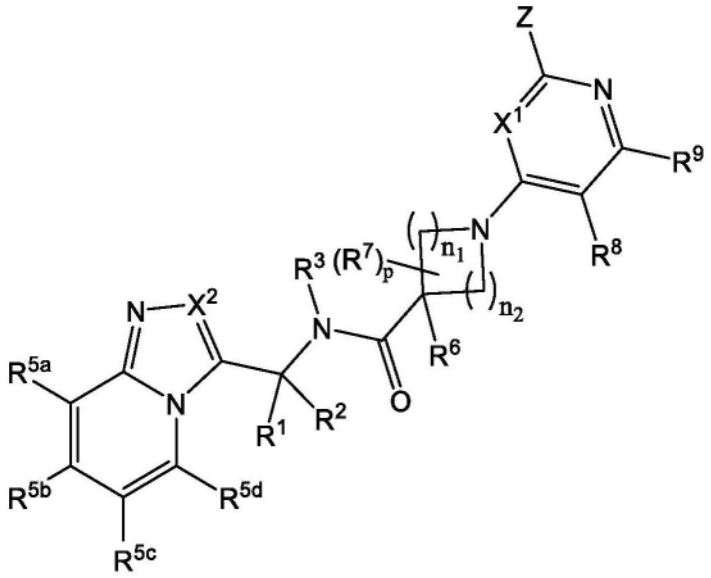
或其盐。

12.根据权利要求10所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为2,6-二氯-N-(5-异丁基-1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基(-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-苯磺酰胺:



或其盐。

13.根据权利要求1至4中任一项所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(V)的化合物:



式(V)

或其盐，

其中：

n_1为1或2；n_2为1或2；

X^1选自由CR^x和N组成的组；

当存在时，R^x选自由以下组成的组：氢、卤素和任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

R^1选自由以下组成的组：氢；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组；且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

R^2选自由以下组成的组：氢；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组；且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

或R^1和R^2连接在一起，使得它们与它们所连接的原子一起形成C_{3-6}环烷基或包含1个选自由O和N组成的组的杂原子的3至6元非芳族杂环基，其中所述C_{3-6}环烷基或3至6元非芳族杂环基任选地被1或2个取代基取代，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

R^3选自由以下组成的组：氢；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

或R^1和R^3连接在一起，使得它们与它们所连接的原子一起形成包含1个N杂原子的3至6元非芳族杂环基，其中所述3至6元非芳族杂环基任选地被1或2个取代基取代，每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

X^2选自由CR^4和N组成的组；

当存在时，R^4选自由以下组成的组：氢；卤素；及任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3、-OCF_3和-NR^aR^b组成的组；

R^{5a}和R^{5d}独立地选自由以下组成的组:氢;卤素;任选地被1、2或3个取代基取代的甲基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的甲氧基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;

R^{5b}和R^{5c}独立地选自由以下组成的组:氢;卤素;任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{1-4}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;任选地被1、2或3个取代基取代的$-OC_{1-4}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、$-CH_3$、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;

或R^{5b}和R^{5c}连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成6元芳基或包含1个或2个选自由S、O和N组成的组的杂原子的5或6元芳族杂环基,其中所述6元芳基或5或6元芳族杂环基任选地被1个或2个取代基取代,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;

R^6选自由氢和甲基组成的组;

当存在时,每个R^7为任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{1-4}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;

R^8选自由以下组成的组:氢;卤素;-OH;-CN;任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{1-4}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组;任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{3-6}$环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、$-CH_3$、-OH、-CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组;任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{1-4}$烯基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的$-OC_{1-4}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组;

R^9选自由氢和任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{1-4}$烷基组成的组,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、$-OCH_3$和$-OCF_3$组成的组;或

R^8和R^9连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成6元芳基、C_{5-6}环烷基、或包含1或2个选自N、O和S的杂原子的5或6元芳族杂环基,并且其中所述6元芳基、C_{5-6}环烷基或5至6元芳族杂环基任选地被1、2或3个取代基取代,每个取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;-OH;-CN;任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{1-4}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的$-OC_{1-4}$烷基,每个取代基独立地选自由-卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组;

p为0、1或2;

Z为5至13元非芳族杂环基,其包含1、2或3个选自N、O和S的杂原子,其中至少一个杂原子为N,并且其中所述5至13元非芳族杂环基任选地被1、2、3或4个取代基取代,每个取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;任选地被1、2或3个取代基取代的$-C_{1-6}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH及任选地被1、2或3个卤素取代的$-OC_{1-3}$烷基组成的组;任选地被1、2或3个取代基取代的$-O-C_{1-6}$烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH及任选地被1、2或3个卤素取代的$-O-C_{1-3}$烷基组成的组;NR^cR^d;和任选地被1、2或3个取代基取代的C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的$-O-C_{1-3}$烷基组成的组;或

当两个取代基位于相邻的环位置上时,它们可以连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成C_{3-6}环烷基或包含1个选自O和N的杂原子的4至6元非芳族杂环基,其中所述C_{3-6}环烷基或4至6元非芳族杂环基任选地被1或2个取代基取代,每个取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-O-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-O-C_{1-3}烷基组成的组;

R^c为氢;

R^d选自由以下组成的组:氢;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

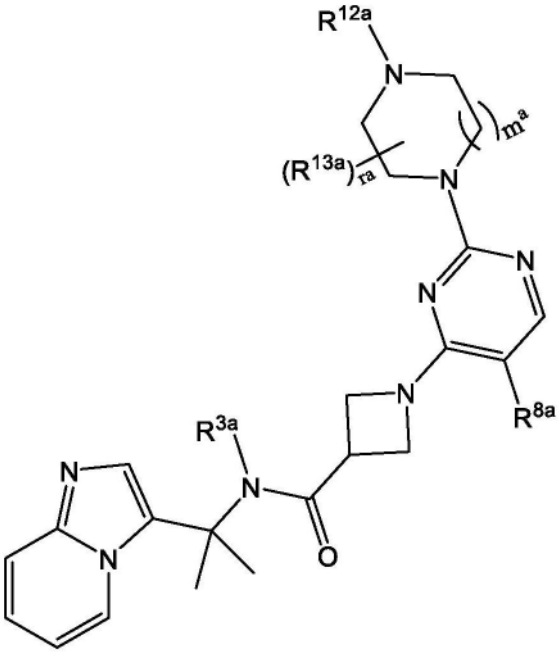
或Z为-$NR^{10}R^{11}$,其中

R^{10}为氢;并且

R^{11}为包含1、2或3个选自N、O和S的杂原子的5至10元非芳族杂环基,其中至少一个杂原子为N,并且其中所述5至10元非芳族杂环基任选地被1、2、3或4个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;-OH;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-OC_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;并且

当存在时,每个R^a和R^b独立地选自由氢和-C_{1-4}烷基组成的组。

14.根据权利要求13所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(Vq)的化合物:



(Vq)

或其盐,

其中:

R^{3a}为H或任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

R^{8a}为卤素或任选地被1、2或3个取代基取代的C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

ra为0、1或2;

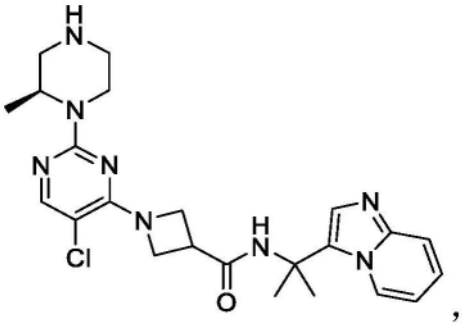
m^a为1或2;

R^{12a}为氢;并且

当存在时,每个R^{13a}独立地选自由以下组成的组:任选地被1、2或3个取代基取代的C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组;或

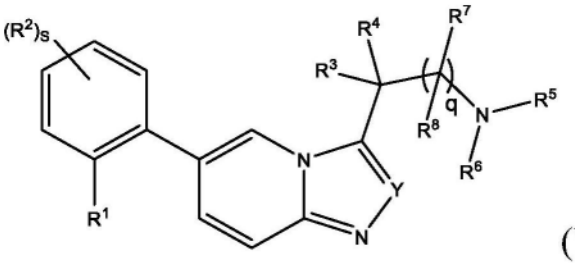
当ra为2且两个R^{13a}基团位于相邻的环位置上时,所述两个R^{13a}连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成任选地被1或2个取代基取代的C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组。

15.根据权利要求13或14所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为(S)-1-(5-氯-2-(2-甲基哌嗪-1-基)嘧啶-4-基)-N-(2-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)丙-2-基)氮杂环丁烷-3-甲酰胺:



或其盐。

16.根据权利要求1至4中任一项所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为式(VI)的化合物:



(VI)

或其盐,

其中:

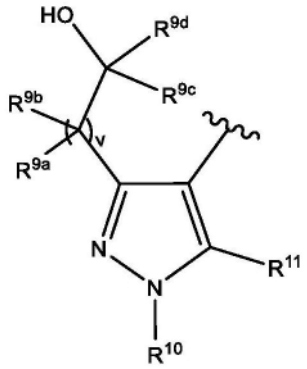
R^1为式O-L-A的基团;

L为-$(CHR^{12})_m$-;

每个R^{12}独立地为H或C_{1-4}烷基;

m为1、2或3;

A为：



v为0、1或2；

R^{9a}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基；

R^{9b}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基；

R^{9c}为C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基；

R^{9d}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基；

R^{10}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基；

R^{11}为H、卤代基、CN、C_{1-4}烷基、C_{1-4}卤代烷基、C_{1-4}烷氧基或C_{1-4}卤代烷氧基；

s为0、1、2或3；

每个R^2独立地为F、Cl、Br、任选地被至多3个卤素基团取代的C_{1-4}烷基、OCH_3或OCF_3；

Y为CH或C_{1-4}烷基；

R^3为H或C_{1-4}烷基；

R^4为H或C_{1-4}烷基；

R^5为H；

R^6为H或C_{1-4}烷基；

q为0或1；

R^7为H或甲基；

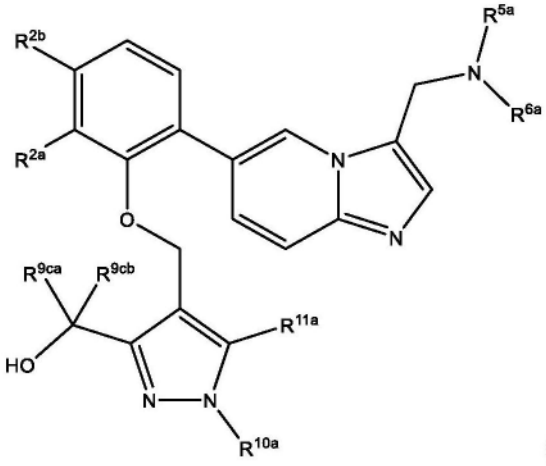
R^8为H或甲基；

或R^3与R^6及其间的原子形成由其间的原子与键、或其间的原子与$-(CHR^a)_r-$构成的3至7元非芳族杂环；或者R^7基团与R^6基团及其间的原子形成由其间的原子与$-(CHR^a)_r-$构成的3至7元非芳族杂环；

r为1、2、3、4或5；并且

R^a为氢或甲基。

17.根据权利要求16所述的ADC或其盐，其中所述NMT抑制剂为式(VIA)的化合物：



(VIA),

或其盐,

其中:

R^{2a}为H或F;

R^{2b}为F;

R^{5a}为H;

R^{6a}为H或甲基;

R^{9ca}为甲基、异丙基或叔丁基;

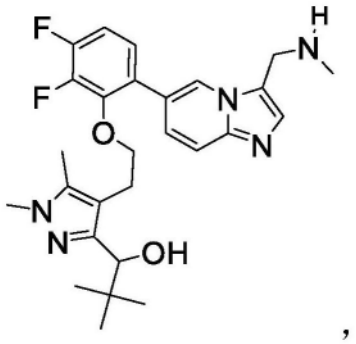
R^{9cb}为H或甲基;

R^{10a}为甲基;并且

R^{11a}为甲基;

条件是,当R^{2a}为H时,R^{9cb}为H。

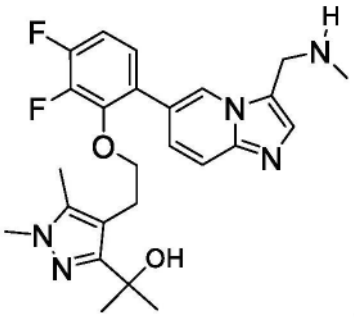
18.根据权利要求16或17所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂为1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}-2,2-二甲基丙-1-醇:



,

或其盐。

19.根据权利要求16或17所述的ADC或其盐,其为2-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}丙-2-醇:



或其盐。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的ADC或其盐,其中所述连接子为可裂解的连接子。

21.根据权利要求20所述的ADC或其盐,其中所述连接子可被酶裂解。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的ADC或其盐,其中所述连接子具有下式(VII):

$-A_a-W_w-Y_y-$(式(VII))

其中:

A为第一延伸单元,当存在时,其与所述抗体的链末端(如N末端)或氨基酸侧链的官能团形成共价键;

a为0或1;

每个W独立地为氨基酸单元或葡糖苷酸单元,当A和/或Y不存在时,其分别与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团和/或所述NMT抑制剂的官能团形成共价键;

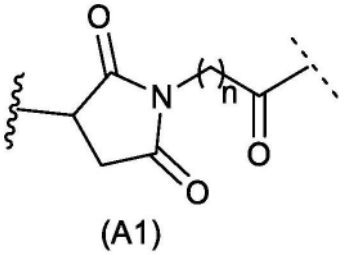
当W为氨基酸时,w为1至12;

当W为葡糖苷酸单元时,w为1或2;

Y为第二延伸单元,当存在时,其与所述NMT抑制剂的官能团形成共价键;并且

y为0或1。

23.根据权利要求22所述的ADC或其盐,其中A具有式(A1):



(A1)

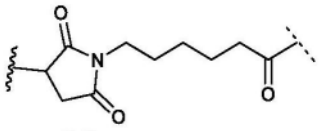
其中:

n为1至6;

表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团的连接点;且

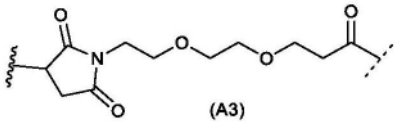
表示与W的连接点。

24.根据权利要求23所述的ADC或其盐,其中A为



(A2)。

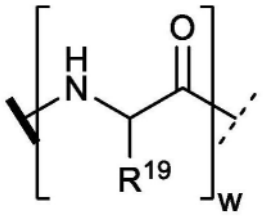
25.根据权利要求22所述的ADC或其盐,其中A为



(A3)。

26.根据权利要求22至25中任一项所述的ADC或其盐,其中每个W为氨基酸。

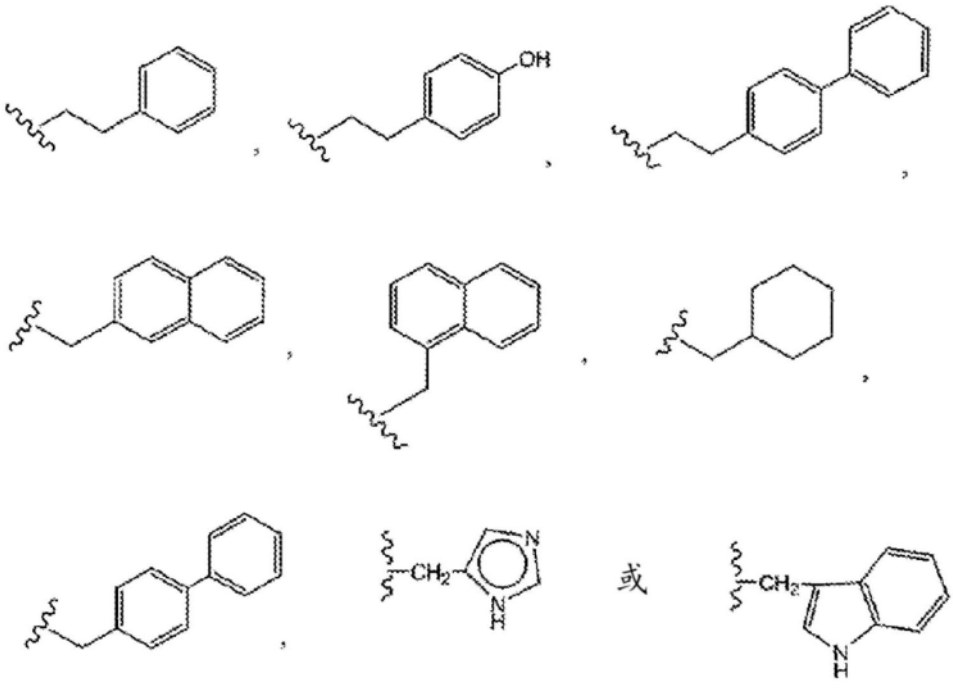
27.根据权利要求26所述的ADC或其盐,其中每个W具有式(WI):



(WI),

其中w如前所定义;并且

R^{19}为H、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、CH_2OH、CH(OH)Me、CH_2CH_2Sme、$CH_2C(O)Sme$、$CH_2C(O)NH_2$、$CH_2C(O)OH$、$CH_2CH_2C(O)NH_2$、$CH_2CH_2C(O)OH$、$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_3NH_2$、$(CH_2)_3NHC(O)Me$、$(CH_2)_3NHCHO$、$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_4NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)Me$、$(CH_2)_4NHCHO$、$(CH_2)_3NHC(O)NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)NH_2$、$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基、苯基、



;

其中↖表示与A(当存在时)或所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团的

连接点;且

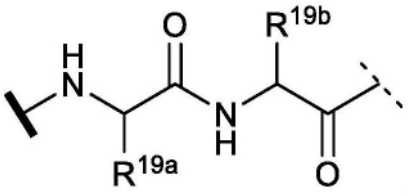
⁄ 表示与Y(当存在时)或所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

28.根据权利要求27所述的ADC或其盐,其中至少一个R^{19}为异丙基。

29.根据权利要求27所述的ADC或其盐,其中至少一个R^{19}为$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$。

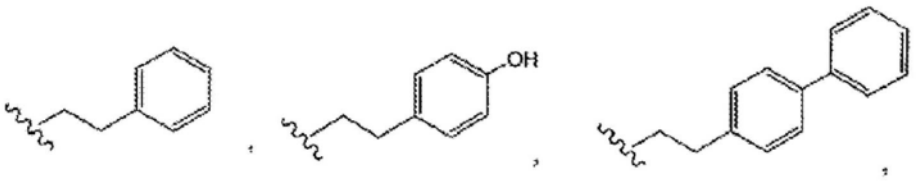
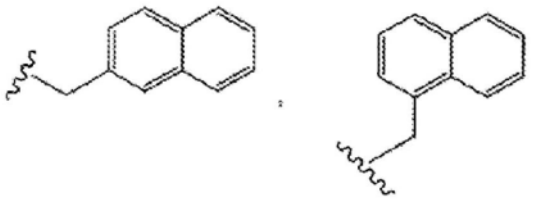
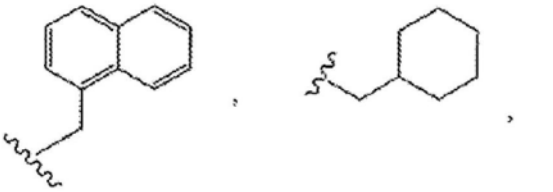
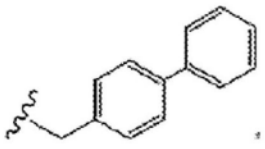
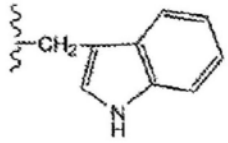
30.根据权利要求22至29中任一项所述的ADC或其盐,其中w为2。

31.根据权利要求22至30中任一项所述的ADC或其盐,其中(W)w具有式(WII):


(WII),

其中:

R^{19a}为H、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、CH_2OH、CH(OH)Me、2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基、苯基、





或

并且

;

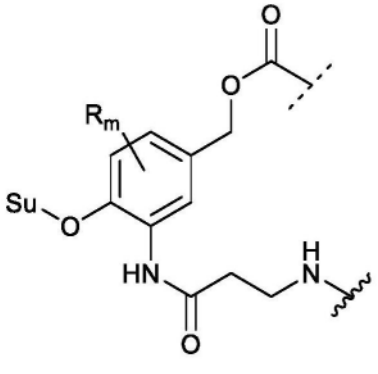
R^{19b}为CH_2CH_2Sme、$CH_2C(O)Sme$、$CH_2C(O)NH_2$、$CH_2C(O)OH$、$CH_2CH_2C(O)NH_2$、$CH_2CH_2C(O)OH$、$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_3NH_2$、$(CH_2)_3NHC(O)Me$、$(CH_2)_3NHCHO$、$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_4NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)Me$、$(CH_2)_4NHCHO$、$(CH_2)_3NHC(O)NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)NH_2$或$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$。

32.根据权利要求31所述的ADC或其盐,其中R^{19a}为异丙基。

33.根据权利要求31或32所述的ADC或其盐,其中R^{19b}为$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$。

34.根据权利要求22所述的ADC或其盐,其中每个W均为葡糖苷酸单元。

35.根据权利要求34所述的ADC或其盐,其中(W)w具有式(WIII):



(WIII),

其中:

R为H、卤代基、CN或NO_2;

m为0、1、2或3;

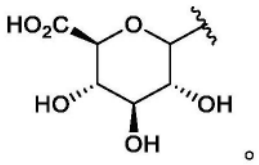
Su为糖部分;

其中 表示与A(当存在时)或所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团的连接点;并且

表示与Y(当存在时)或所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

36.根据权利要求35所述的ADC或其盐,其中m为0。

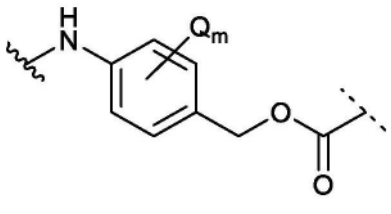
37.根据权利要求35或36所述的ADC或其盐,其中Su具有下式:



。

38.根据权利要求34至37中任一项所述的ADC或其盐,其中y为0。

39.根据权利要求22至33中任一项所述的ADC或其盐,其中y为1并且Y具有式(Y1):



(Y1),

其中:

每个Q独立地为卤代基、NO_2、CN、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}烷氧基或C_{1-6}卤代烷氧基;

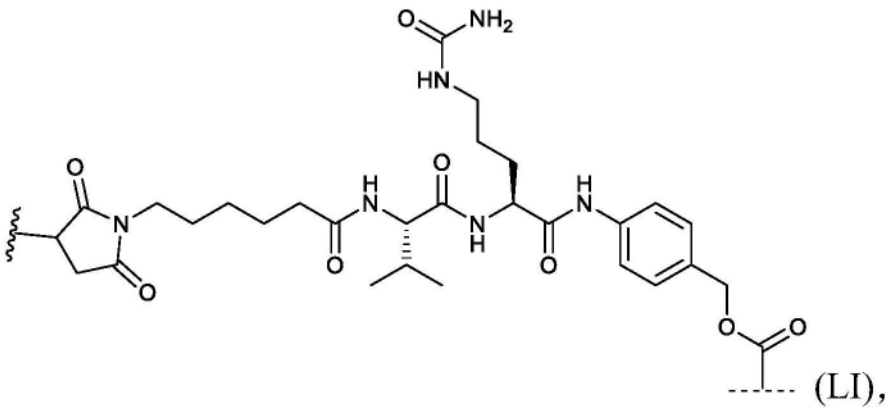
m为0至4;

其中 表示与W的连接点;并且

表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

40.根据权利要求39所述的ADC或其盐,其中m为0。

41.根据权利要求22所述的ADC或其盐,其中所述连接子具有式(LI):

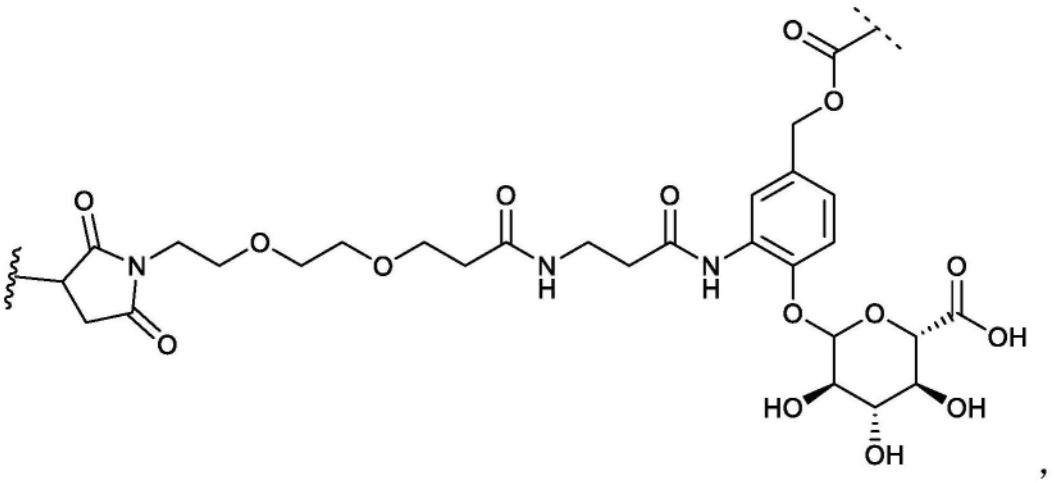


(LI),

其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;并且

表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

42.根据权利要求22所述的ADC,其中所述连接子具有式(LII):

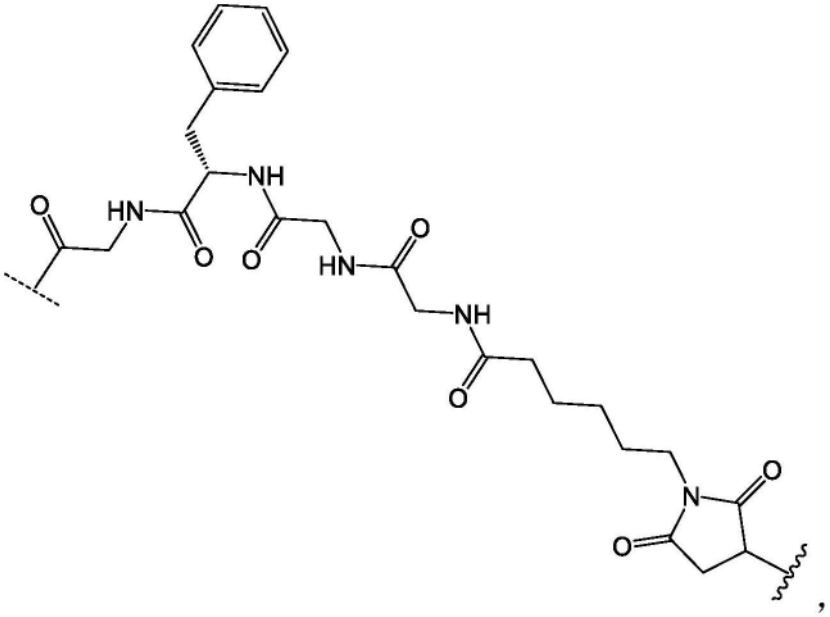


,

其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;并且

表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

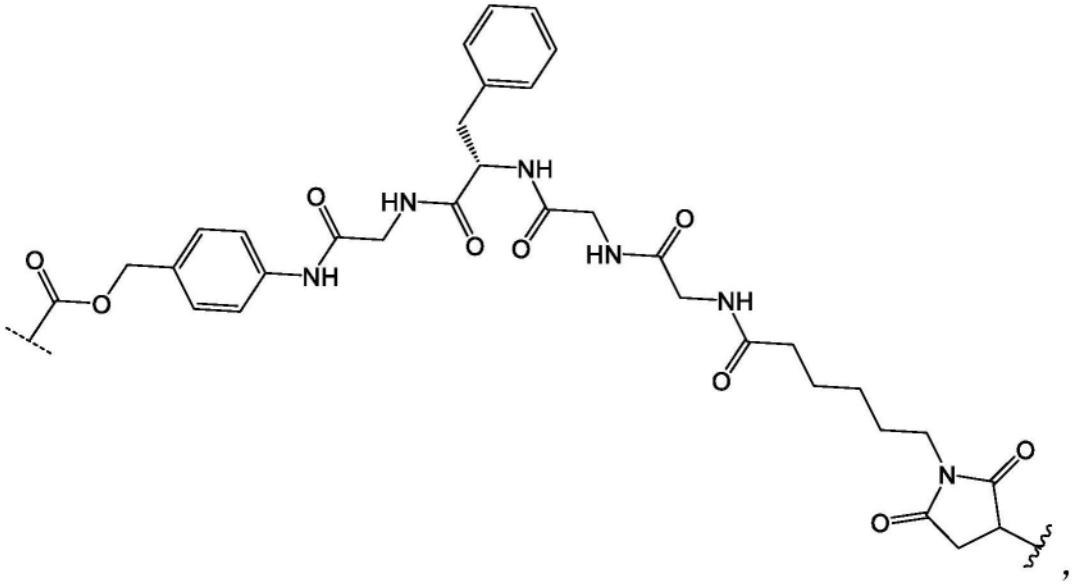
43.根据权利要求20或21所述的ADC,其中所述连接子具有式(LIII):



其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;并且

表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

44.根据权利要求20或21所述的ADC,其中所述连接子具有式(LIV):



其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;并且

表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

45.根据权利要求22至44中任一项所述的ADC或其盐,其中所述抗体的所述氨基酸侧链上的所述官能团为巯基。

46.根据权利要求22至44中任一项所述的ADC或其盐,其中所述NMT抑制剂上的所述官能团为氨基或醇,例如氨基。

47.根据权利要求1至46中任一项所述的ADC或其盐,其中所述抗体为人源化抗体、嵌合抗体、人抗体或抗体片段。

48.根据权利要求47所述的ADC或其盐,其中所述抗体与HER2结合。

49.根据权利要求48所述的ADC或其盐,其中所述抗体为曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、玛格妥昔单抗、厄妥索单抗、MM-111、HER2Bi-aATCs、MCLA-128、ZW25、MDX-210、阿多-曲妥珠单抗或fam-曲妥珠单抗。

50.根据权利要求49所述的ADC或其盐,其中所述抗体为曲妥珠单抗。

51.根据权利要求47所述的ADC或其盐,其中所述抗体与CD20结合。

52.根据权利要求51所述的ADC或其盐,其中所述抗体为利妥昔单抗。

53.根据权利要求47所述的ADC或其盐,其中所述抗体与Trop-2结合。

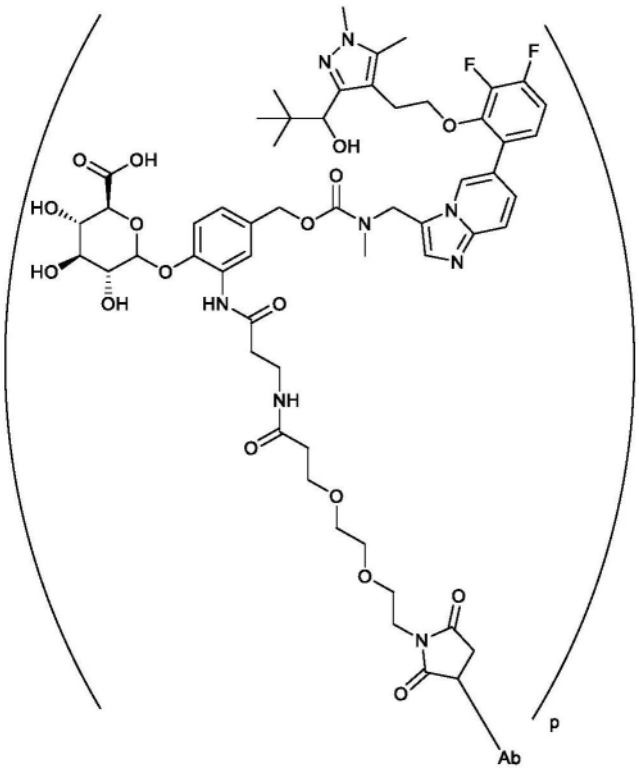
54.根据权利要求53所述的ADC或其盐,其中所述抗体为沙西妥珠单抗。

55.根据权利要求47所述的ADC或其盐,其中所述抗体与B7-H3结合。

56.根据权利要求55所述的ADC或其盐,其中所述抗体为伊非那他单抗。

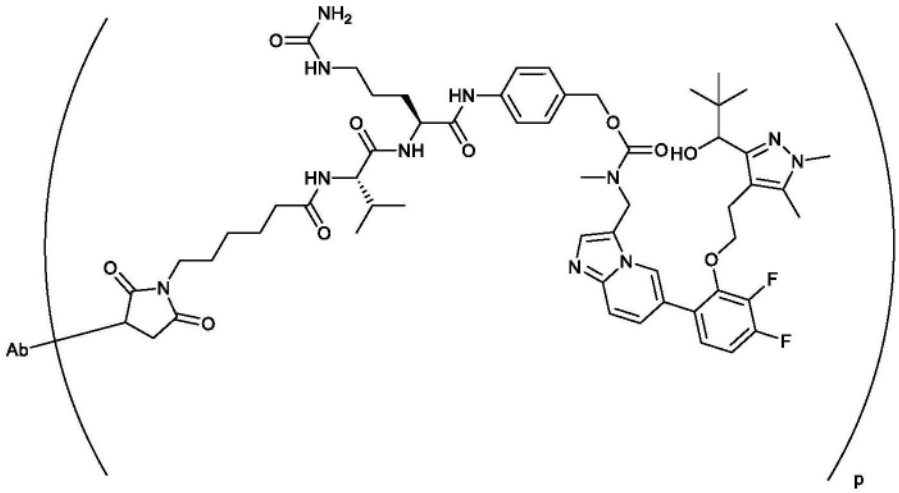
57.根据权利要求1至56中任一项所述的ADC或其盐,其中NMT抑制剂/抗体的载药量(p)为1至10个NMT抑制剂/抗体,例如2至6、4至6、8至10或6至8个NMT抑制剂/抗体。

58.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



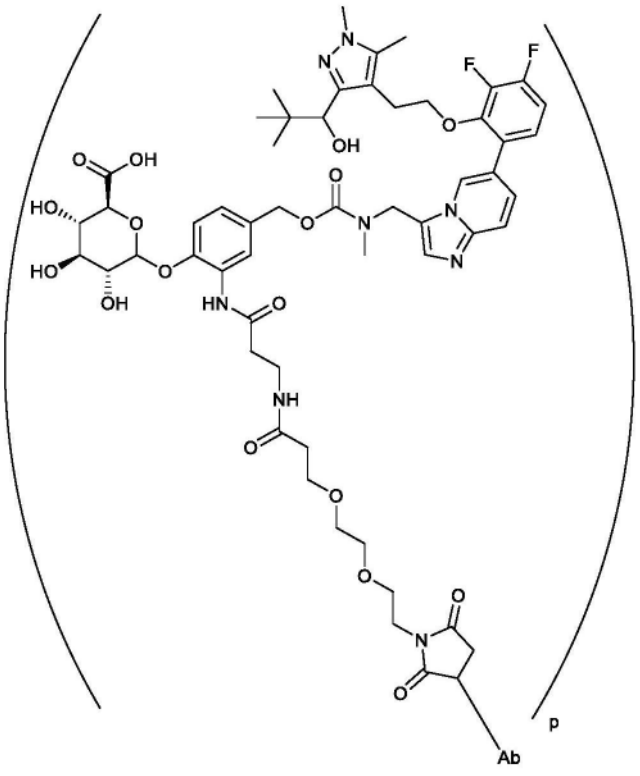
或其盐,其中Ab为如权利要求1至56中任一项所定义的抗体,例如所述抗体为曲妥珠单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

59.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



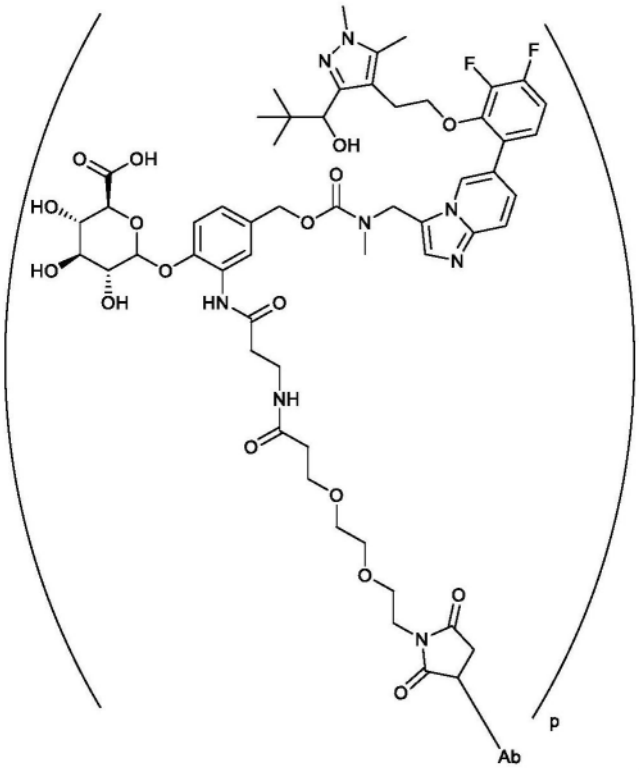
或其盐,其中Ab为如权利要求1至56中任一项所定义的抗体,例如所述抗体为曲妥珠单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

60.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



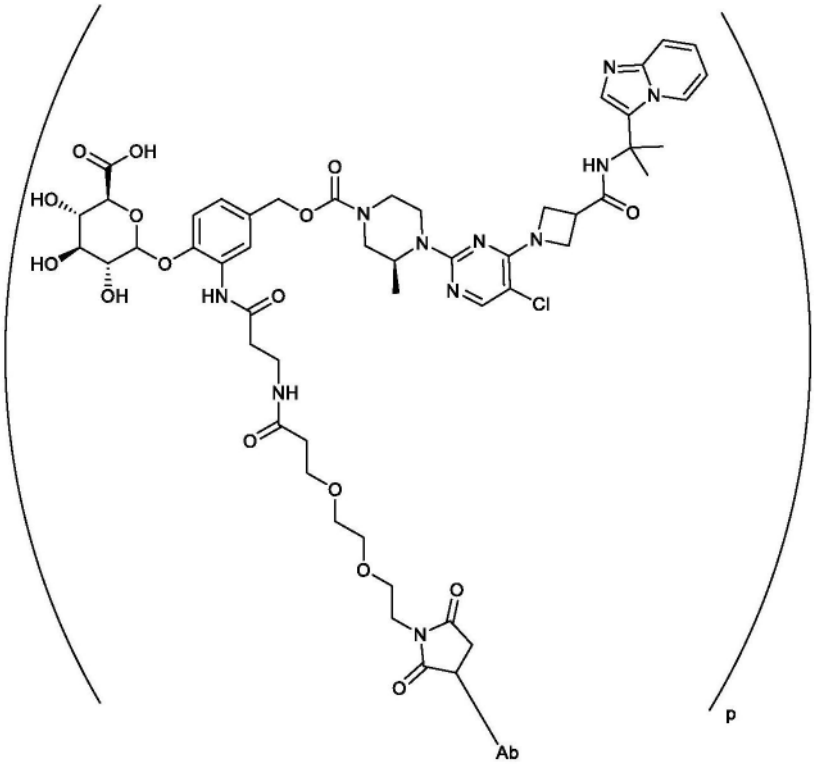
或其盐,其中Ab为沙西妥珠单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

61.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



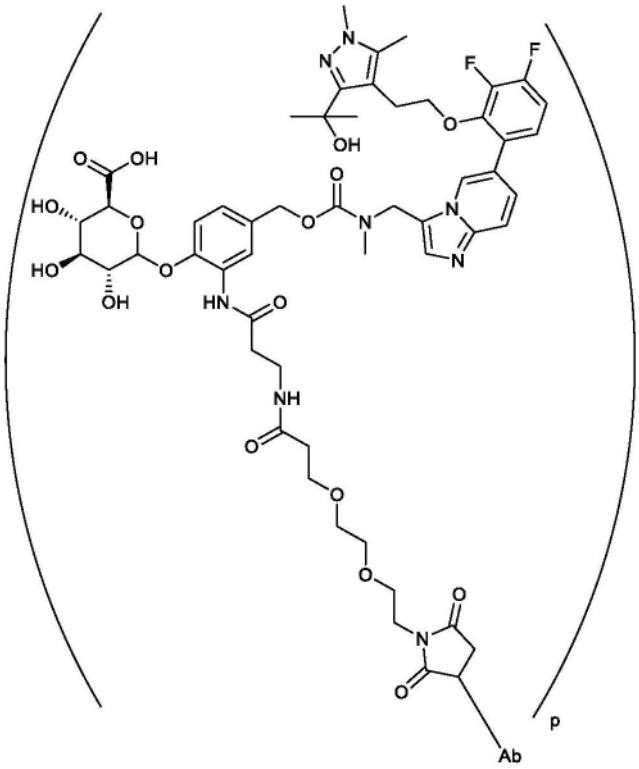
或其盐,其中Ab为伊非那他单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

62.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



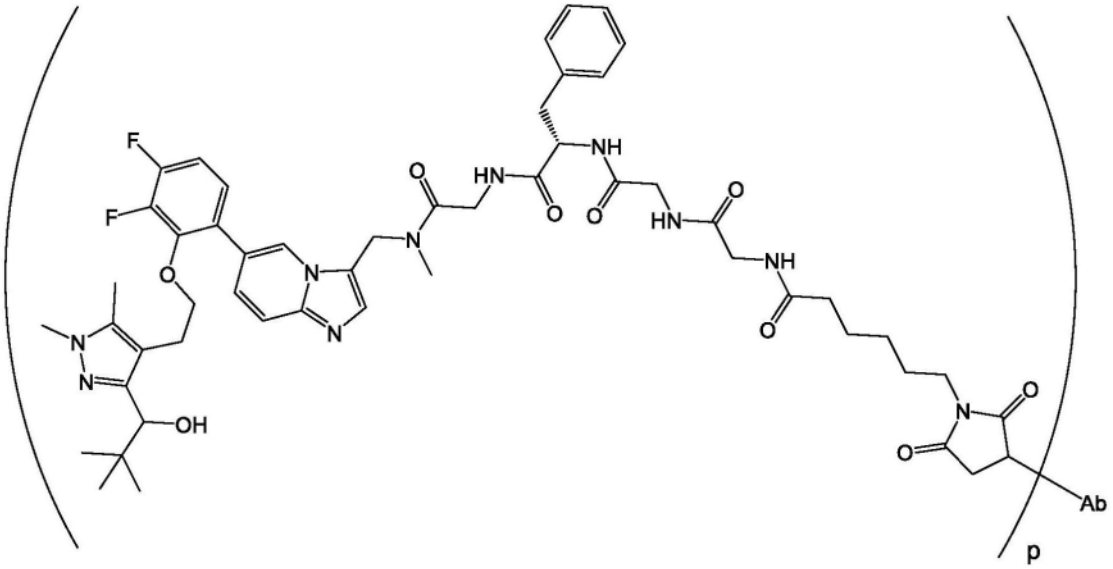
其中Ab为如权利要求1至56中任一项所定义的抗体,例如所述抗体为曲妥珠单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

63.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



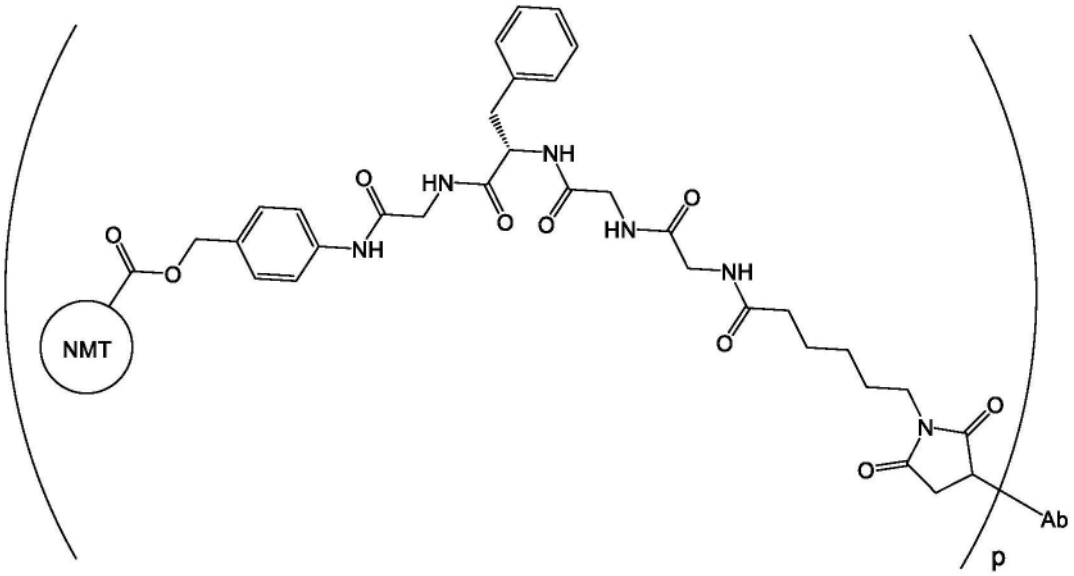
其中Ab为如权利要求1至56中任一项所定义的抗体,例如所述抗体为曲妥珠单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

64.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



其中Ab为如权利要求1至56中任一项所定义的抗体,例如所述抗体为曲妥珠单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

65.根据权利要求1至57中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐包含下式:



其中Ab为如权利要求1至56中任一项所定义的抗体,例如所述抗体为曲妥珠单抗,并且p为如权利要求57所定义的NMT抑制剂的载药量。

66.根据权利要求58至65中任一项所述的ADC或其盐,其中所述ADC或其盐通过所述抗体上氨基酸侧链上的巯基与所述抗体结合。

67.一种药物组合物,其包含根据权利要求3至66中任一项所述的ADC或其药学上可接受的盐。

68.根据权利要求3至66中任一项所述的ADC或其药学上可接受的盐,其用作药物。

69.根据权利要求68所述的ADC或其药学上可接受的盐,其用于预防或治疗其中抑制N-肉豆蔻酰转移酶提供治疗或预防效果的疾病或病症。

70.根据权利要求3至66中任一项所述的ADC或其药学上可接受的盐在制造用于预防或治疗其中抑制N-肉豆蔻酰转移酶提供治疗或预防效果的疾病或病症的药物中的用途。

71.一种预防或治疗受试者的其中抑制N-肉豆蔻酰转移酶提供治疗或预防效果的疾病或病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的根据权利要求3至66中任一项所述的ADC或其药学上可接受的盐。

72.根据权利要求69使用的所述ADC或其药学上可接受的盐、根据权利要求70所述的用途或根据权利要求71所述的方法,其中所述疾病或病症为过度增殖性病症,并且其中所述过度增殖性病症为癌症。

73.根据权利要求72使用的所述ADC或其药学上可接受的盐、用途或方法,其中所述癌症为结直肠癌、胆囊癌、脑肿瘤、淋巴瘤(例如B细胞淋巴瘤或弥漫性大B细胞淋巴瘤)、白血病(例如AML)或神经母细胞瘤。

74.根据权利要求72使用的所述ADC或其药学上可接受的盐、用途或方法,其中所述癌症为血液系统恶性肿瘤(例如淋巴瘤,特别是B细胞淋巴瘤(例如高级别套区淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤)、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)或白血病(例如慢性淋巴细胞白血病、AML和B急性淋巴细胞白血病))或实体瘤(例如脑癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结直肠癌、胆囊癌、肾癌或肝癌,或母细胞瘤(例如神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤或胶质母细胞瘤))。

75.根据权利要求72使用的所述ADC或其药学上可接受的盐、用途或方法,其中所述癌

症表达HER2蛋白,例如选自由以下组成的组:肺癌、尿路上皮癌、结直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌和阴茎癌。

76.一种药物偶联物或其盐和/或溶剂化物,其包含NMT抑制剂和连接子,其中所述连接子包含能够与抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团例如巯基形成共价键的基团。

77.根据权利要求76所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其具有下式:

A_a-W_w-Y_y-NMT(式(X))

或其盐和/或溶剂化物,

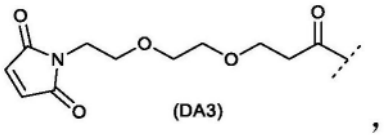
其中:

A为第一延伸单元,其存在时包含能够与抗体的链末端(如N末端)或氨基酸侧链上的官能团例如巯基形成共价键的基团;

NMT为如权利要求1至19中任一项所定义的NMT抑制剂;并且

a、W、w、Y和y如权利要求22至59中任一项所定义。

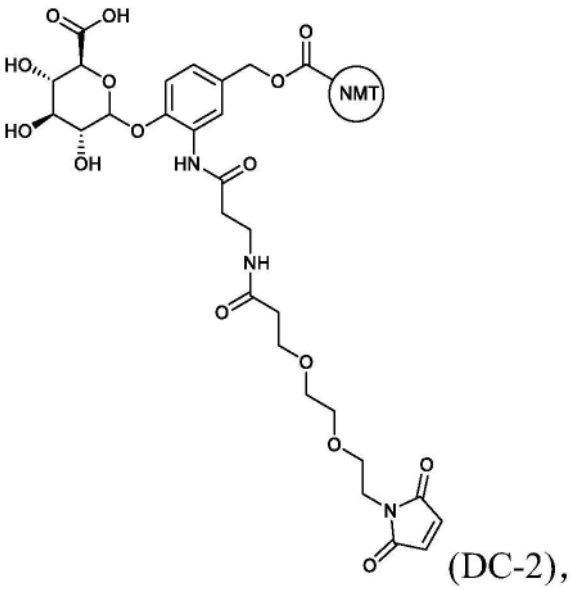
78.根据权利要求77所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其中A为



,

其中⁄表示与W的连接点。

79.根据权利要求76至78中任一项所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其中所述药物偶联物具有式(DC-2):

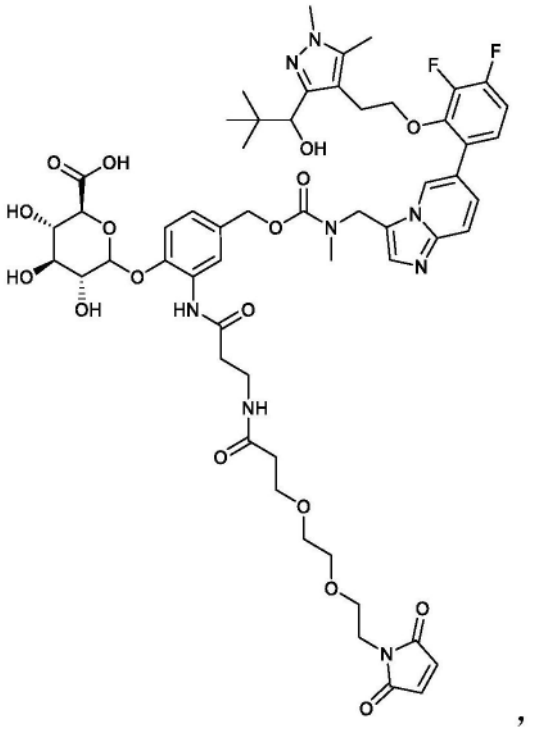


(DC-2),

或其盐和/或溶剂化物,其中NMT为如权利要求1至19中任一项所定义的NMT抑制剂,特别是如权利要求16至19中任一项所定义的NMT抑制剂。

80.根据权利要求76至79中任一项所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其为(1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲

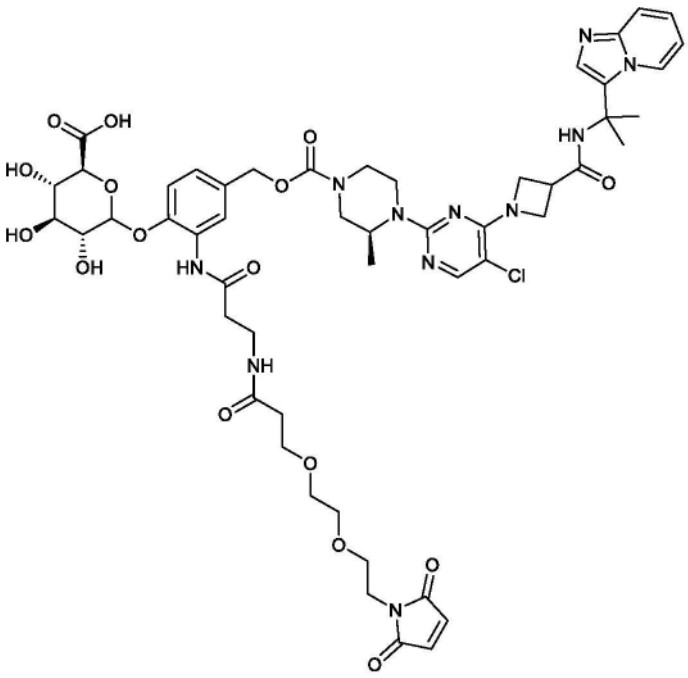
基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}-2-[3-(3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙酰氨基)丙酰氨基]苯氧基)-3,4-二羟基-2-甲基环己烷-1-甲酸：



，

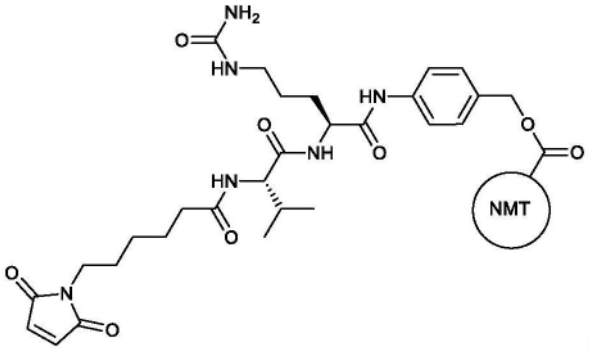
或其盐和/或溶剂化物。

81.根据权利要求76至79中任一项所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其为：



或其盐和/或溶剂化物。

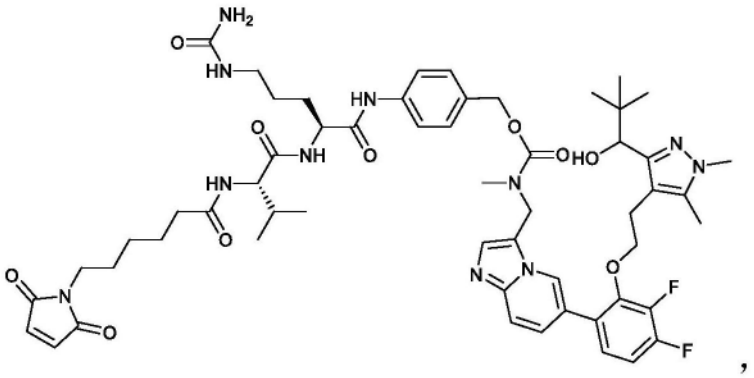
82.根据权利要求76至77中任一项所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其中所述药物偶联物具有式(DC-1)：



(DC-1),

或其盐和/或溶剂化物,其中NMT为如权利要求1至19中任一项所定义的NMT抑制剂,特别是如权利要求16至19中任一项所定义的NMT抑制剂。

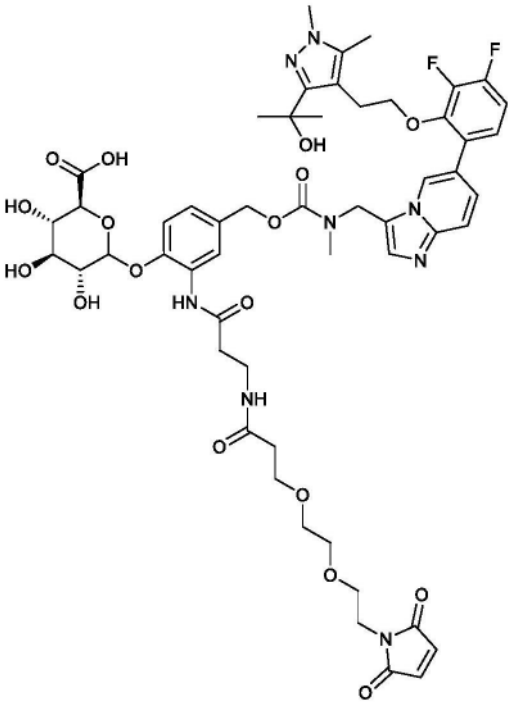
83.根据权利要求76、77或82所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其为N-{[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}-N-甲基氨基甲酸{4-[(2S)-5-(氨基甲酰氨基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基]-3-甲基丁酰氨基]戊酰氨基]苯基}甲基酯:



,

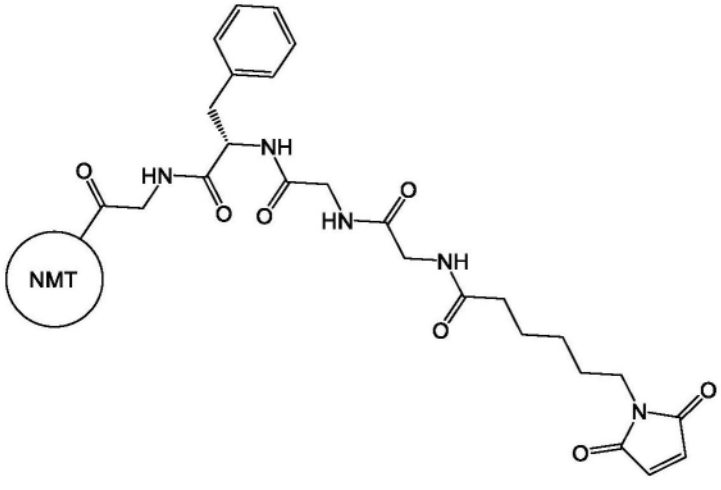
或其盐和/或溶剂化物。

84.根据权利要求76至79中任一项所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其为:



或其盐和/或溶剂化物。

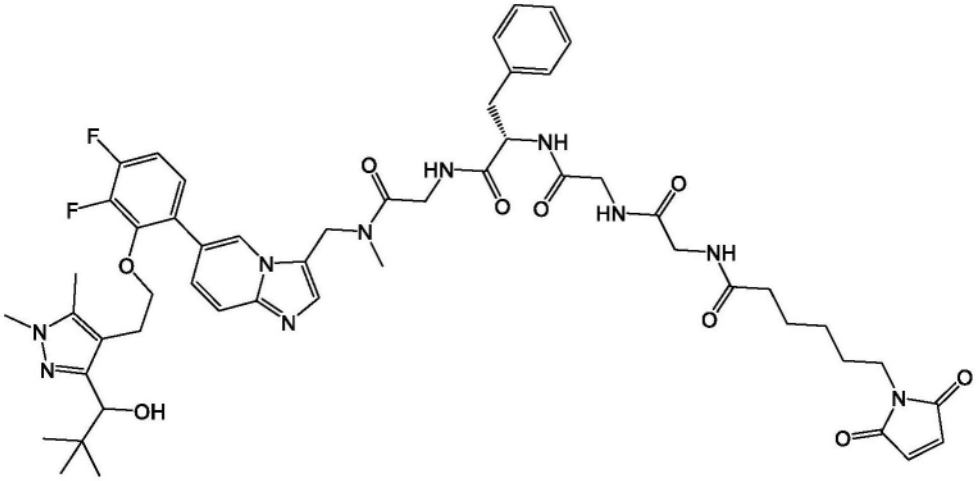
85.根据权利要求76至77中任一项所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其中所述药物偶联物具有式(DC-5):



(DC-5),

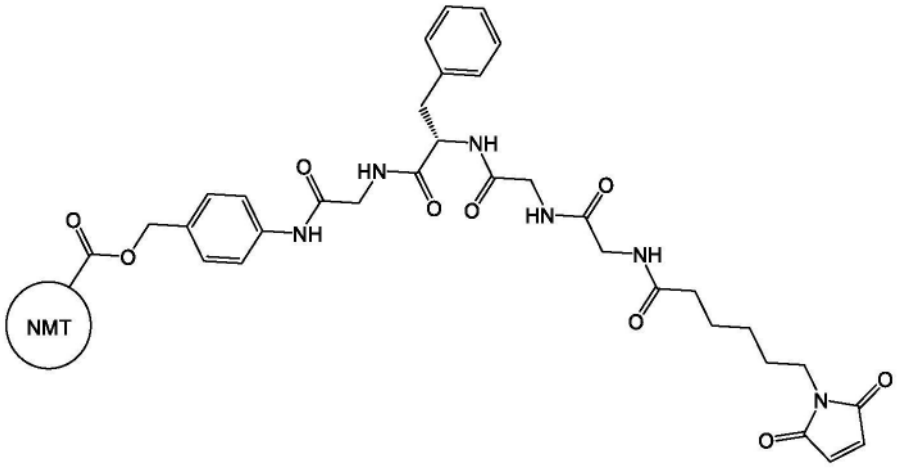
或其盐和/或溶剂化物,其中NMT为如权利要求1至19中任一项所定义的NMT抑制剂,特别是如权利要求16至19中任一项所定义的NMT抑制剂。

86.根据权利要求85所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其为:



或其盐和/或溶剂化物。

87.根据权利要求76至77中任一项所述的药物偶联物、其盐和/或溶剂化物,其中所述药物偶联物具有式(DC-6):



(DC-6),

或其盐和/或溶剂化物,其中NMT为如权利要求1至19中任一项所定义的NMT抑制剂,特别是如权利要求16至19中任一项所定义的NMT抑制剂。

88.根据权利要求76至87中任一项所述的药物偶联物的盐。

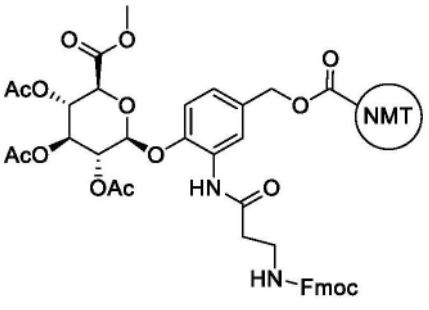
89.根据权利要求76至87中任一项所述的药物偶联物的溶剂化物。

90.根据权利要求76至87中任一项所述的药物偶联物的盐的溶剂化物。

91.根据权利要求76至87中任一项所述的药物偶联物。

92.一种化合物,其选自由以下组成的组:

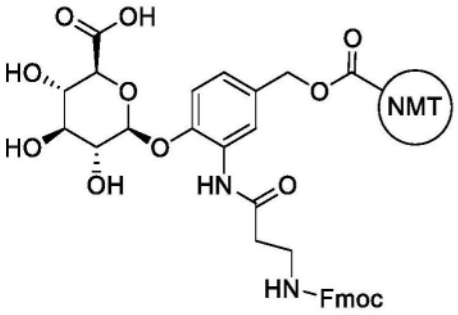
-式(ADC-I)的化合物:



且

(ADC-I);

-式(ADC-II)的化合物：



(ADC-II),

或其任一者的盐和/或溶剂化物，

其中NMT为如权利要求1至19中任一项所定义的NMT抑制剂,特别是如权利要求16至19中任一项所定义的NMT抑制剂。

包含NMT抑制剂的抗体药物偶联物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及包含人N-肉豆蔻酰转移酶(人NMT)的抑制剂的新型抗体药物偶联物(ADC)。本发明还尤其涉及将此类ADC用作药物,特别是用于治疗或预防癌症等过度增殖性病症。

背景技术

[0002] 抗体疗法已被证实可用于靶向治疗癌症、免疫和血管生成病症患者(Carter,P.(2006)Nature Reviews Immunology 6:343-357)。使用抗体药物偶联物(ADC),即免疫偶联物,来局部递送细胞毒性剂或细胞抑制剂,即在癌症治疗中杀死或抑制肿瘤细胞的药物,将药物部分靶向递送至肿瘤,并在其中的细胞内积累,而全身施用这些未偶联的药物制剂可能会对正常细胞产生不可接受的毒性水平(Xie等人(2006)Expert.Opin.Biol.Ther.6(3):281-291;Kovtun等人(2006)Cancer Res.66(6):3214-3121;Law等人(2006)Cancer Res.66(4):2328-2337;Wu等人(2005)Nature Biotech.23(9):1137-1145;Lambert J.(2005)Current Opin.in Pharmacol.5:543-549;Hamann P.(2005)Expert Opin.Ther.Patents 15(9):1087-1103;Payne,G.(2003)Cancer Cell 3:207-212;Trail等人(2003)Cancer Immunol.Immunother.52:328-337;Syrigos和Epenetos(1999)Anticancer Research 19:605-614)。

[0003] 由此寻求最大的疗效和最小的毒性。设计和改进ADC的努力集中于单克隆抗体(mAb)的选择性以及药物作用机制、药物连接、药物/抗体比率(载药量)和药物释放特性(Junutula等人,2008b Nature Biotech.,26(8):925-932;Dornan等人(2009)Blood 114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;WO2009/052249;McDonagh(2006)Protein Eng.Design&Sei.19(7):299-307;Doronina等人(2006)Bioconj.Chem.17:114-124;Erickson等人(2006)Cancer Res.66(8):1-8;Sanderson等人(2005)Clin.Cancer Res.11:843-852;Jeffrey等人(2005)J.Med.Chem.48:1344-1358;Hamblett等人(2004)Clin.Cancer Res.10:7063-7070)。药物部分可以通过微管蛋白结合、DNA结合、蛋白酶体和/或拓扑异构酶抑制等机制发挥细胞毒性和细胞抑制作用。一些细胞毒药物在与大抗体或蛋白质受体配体偶联时往往无活性或活性较低。

[0004] N-肉豆蔻酰转移酶(NMT)是一种单体酶,在真核生物中普遍存在。NMT催化肉豆蔻酸(一种饱和的14碳脂肪酸)从肉豆蔻酰辅酶A(myr-CoA)到含有N端甘氨酸的蛋白质底物的不可逆共翻译转移,并形成酰胺键(Farazi,T.A.,G.Waksman和J.I.Gordon,J.Biol.Chem.,2001.276(43):第39501-39504页)。

[0005] 人NMT有两种类型,人NMT1(HsNMT1)和人NMT2(HsNMT2)。抑制人NMT已被建议作为治疗或预防各种疾病或病症的靶点,例如过度增殖性病症(例如癌症,例如人结直肠癌、胆囊癌、脑肿瘤,以及淋巴瘤,如B细胞淋巴瘤)(Resh MD.1993.Biochern.Biophys.Acta1115,307-22;Bertiaume LG,Beuachamp E,WO2017011907),以及病毒感染,如HIV(Gottlinger HG,Sodroski JG,Haseltine WA.1989.Proc.Nat.Acad.Sci.USA 86:5781-85;Bryant ML,

Ratner L.1990.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:523-27)和人鼻病毒(HRV)(Davis MP,Bottley,G,Beales LP,Killington,RA,Rowlands DJ,Tuthill,TJ,2008Journal of Virology 82 4169-4174;Mousnier A,Bell AS,Swieboda DP,Morales-Sanfrutos J,Perez-Dorado I,Brannigan JA,Newman J,Ritzefeld M,Hutton,JA,Guedan A,Asfor AS,Robinson,SW,Hopkins-Navratilova I,Wilkinson AJ,Johnston SL,Leatherbarrow RJ,Tuthill TJ,Solari R,Tate EW 2018Nature Chemistry 10(6)599-606),Corbic Ramljak I,Stanger J,Real-Hohn A.Dreier D,Wimmer L.,Redlberger-Fritz M,Fischl W,Klingel K,Mihovilovic MD,Blaas D,Kowalski H,PLOS Pathogens 14(8):e1007203。由于NMT在生物系统中的蛋白质运输、介导蛋白质-蛋白质相互作用、稳定蛋白质结构和信号转导中发挥着关键作用,抑制HsNMT1和/或HsNMT2酶有可能破坏多蛋白质通路。尽管预计人NMT抑制剂将同时抑制HsNMT1和HsNMT2,但人们认为它们的治疗和/或预防活性主要源于对HsNMT1的抑制。人们认为上述特性有利于降低例如在治疗或预防微生物感染和过度增殖性病症时产生耐药性的风险。

[0006] NMT中有两个已知的结合口袋。一个是myr-CoA结合口袋,另一个是肽结合口袋。迄今为止报道的大多数NMT抑制剂都靶向肽结合口袋。

[0007] 先前已经公开了可作为NMT抑制剂的化合物,例如参见WO00/37464(Roche)、WO2010/026365(邓迪大学(University of Dundee))、WO2013/083991(Imperial Innovations Limited)、WO2017/001812(Imperial Innovations Limited)、WO2020/128473(Imperial College Innovations Limited)、WO2020/128475(Imperial College Innovations Limited)和WO2022/058745(Imperial College Innovations Limited等等)。已经公开了NMT抑制剂的具体用途,例如参见WO2022/090746(Imperial College Innovations Limited等等)和WO2022/082306(Pacylex Pharmaceuticals Inc.)。

[0008] 然而,仍然还需要保留偶联的药物部分的功效,同时控制毒性的其他ADC。

[0009] 令人惊讶的是,本发明人现已发现包含NMT抑制剂的ADC表现出强大的细胞毒活性,且不良副作用(例如体重减轻)最小。预计这些特性将使本发明的ADC特别适合用作治疗或预防癌症等过度增殖性疾病的药物。

发明内容

[0010] 本发明提供了一种抗体药物偶联物(ADC),其包含通过连接子与抗体偶联的NMT抑制剂,或其盐(本文称为“本发明的ADC”)。

[0011] 本发明的ADC可以盐的形式提供。合适地,本发明的ADC以药学上可接受的盐的形式提供。合适地,提供了本发明的ADC。

[0012] 本发明还提供了一种包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[0013] 本发明还提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐,用作药物。

[0014] 本发明还提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐,用于预防或治疗其中抑制N-肉豆蔻酰转移酶提供治疗或预防效果的疾病或病症(例如癌症)。

[0015] 本发明还提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐用于制造预防或治疗其中抑制N-肉豆蔻酰转移酶提供治疗或预防效果的疾病或病症(例如癌症)的药物的用途。

[0016] 本发明还提供了一种预防或治疗受试者的其中抑制N-肉豆蔻酰转移酶提供治疗

或预防效果的疾病或病症(例如癌症)的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本发明的ADC或其药学上可接受的盐。

附图说明

[0017] 图1:显示在小鼠异种移植研究中用曲妥珠单抗(2.5mg/kg)、ADC实施例1(2.5mg/kg)或NMT抑制剂1(2mg/kg)治疗对肿瘤体积的影响。

[0018] 图2:显示在小鼠异种移植研究中用曲妥珠单抗(5mg/kg)、ADC实施例1(5mg/kg)或NMT抑制剂1(2mg/kg)治疗对肿瘤体积的影响。

[0019] 图3:显示在小鼠异种移植研究中用曲妥珠单抗(2.5mg/kg)、ADC实施例1(2.5mg/kg)或NMT抑制剂1(2mg/kg)治疗对小鼠体重的影响。

[0020] 图4:显示在小鼠异种移植研究中用曲妥珠单抗(5mg/kg)、ADC实施例1(5mg/kg)或NMT抑制剂1(2mg/kg)治疗对小鼠体重的影响。

[0021] 图5:显示在小鼠胃癌异种移植模型中用2.5mg/Kg曲妥珠单抗、2.5mg/Kg ADC实施例1、2.5mg/Kg德曲妥珠单抗(trastuzumab deruxtecan)和5mg/Kg同种型对照抗体治疗对肿瘤体积的影响。

[0022] 图6:显示在小鼠胃癌异种移植模型中用5mg/Kg曲妥珠单抗、5mg/Kg ADC实施例1、5mg/Kg德曲妥珠单抗和5mg/Kg同种型对照抗体治疗对肿瘤体积的影响。

[0023] 图7A:显示生物学实施例3(和图5,2.5mg/kg(mpk))中描述的实验之后小鼠体重的变化百分比。

[0024] 图7B:显示生物学实施例3(和图6,5mg/kg(mpk))中描述的实验之后小鼠体重的变化百分比。

[0025] 图8-图11:显示不同浓度(50nM、3.13nM、0.2nM和0nM)的曲妥珠单抗与NMT抑制剂1的偶联物(ADC实施例1;图8)、曲妥珠单抗(图9)、德曲妥珠单抗(图10)和同种型对照(同种型对照IgG与NMT抑制物1的偶联物;图11)对HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞毒性体外评估结果。嘌呤霉素被用作阳性细胞毒性对照。

[0026] 图12-图15:显示不同浓度(50nM、3.13nM、0.2nM和0nM)的曲妥珠单抗与NMT抑制剂1的偶联物(ADC实施例1;图12)、曲妥珠单抗(图13)、德曲妥珠单抗(图14)和同种型对照(同种型对照IgG与NMT抑制剂1的偶联物;图15)对HER2阴性乳腺癌细胞系MCF7的细胞毒性体外评估结果。嘌呤霉素被用作阳性细胞毒性对照。

[0027] 图16:显示不同浓度(12.5nM、3.13nM、0.78nM、0.2nM和0.05nM)的曲妥珠单抗与NMT抑制剂1的偶联物(ADC实施例1)、曲妥珠单抗、参考实施例1(曲妥珠单抗与一甲基澳瑞他汀E(monomethyl auristatin E,MMAE)的偶联物)、同种型对照和德曲妥珠单抗对HER2阴性乳腺癌细胞系MCF7的体外“旁观者效应”结果。

[0028] 图17:显示不同浓度(12.5nM、3.13nM、0.78nM、0.2nM和0.05nM)的曲妥珠单抗与NMT抑制剂1的偶联物(ADC实施例1)、曲妥珠单抗、参考实施例1(曲妥珠单抗与一甲基澳瑞他汀E(MMAE)的偶联物)、同种型对照和德曲妥珠单抗对HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的体外“旁观者效应”结果。

[0029] 图18-图27:显示ADC实施例1-5对一组细胞系(包括BT474(图18)、JIMT 1(图19)、NCI N87(图20)、NCI H292(图21)、IM95-m(图22)、ZR-75-30(图23)、NCI H2170(图24)、

LNCaP(图25)、C42(图26)和VCaP(图27))的体外细胞毒性评估结果,其中每个图中提供各种比较物(例如沙西妥珠单抗(sacituzumab)、曲妥珠单抗、伊非那他单抗(ifinatamab)、NMT抑制剂1和同种型对照)。

[0030] 图28-图43:显示使用CellTiter-Glo(CTG)发光细胞活力测定,供试品同种型对照、ADC实施例1、星形孢菌素、曲妥珠单抗和德曲妥珠单抗作为单一药剂对胃癌类器官系细胞活力的影响的结果,如下所示:GA0429B(图28)、GA6877B(图29)、GA6894B(图30)、GA2434B(图31)、GA3102B(图32)、GA0119B(图33)、GA0091B(图34)、GA6815B(图35)、GA0098B(图36)、GA6833B(图37)、GA0087B(图38)、GA2109B(图39)、GA3055B(图40)、GA6866B(图41)、GA0060B(图42)和GA6891B(图43)。

[0031] 图44a-b:显示生物学实施例9中所述的20mg/Kg组中血液学标志物的平均(+/-SEM)水平,已归一化为基线(给药前)值。

[0032] 图45:显示生物学实施例10中小鼠的体重减轻。

[0033] 图46:显示生物学实施例10中结束时,对于每个剂量,动物血液中AST(天冬氨酸转氨酶)、ALT(丙氨酸转氨酶)、ALP(碱性磷酸酶)、LDH(乳酸脱氢酶)、CK(肌酸激酶)和GGT(γ-谷氨酰转移酶)的平均值(从左到右)。

[0034] 图47:显示生物学实施例10中结束时,对于每个剂量,动物血液中LYM、MON、NEU、RBC、HGB和PLT细胞的平均值(从左到右)。

[0035] 图48:显示在小鼠LNCaP前列腺癌异种移植模型中用伊非那他单抗(5mg/kg和10mg/kg)、伊非那他单抗-DXd(5mg/kg和10mg/kg)、ADC实施例4(5mg/kg和10mg/kg)和媒介物对照治疗对肿瘤体积的影响。

[0036] 图49:显示在小鼠LNCaP前列腺癌异种移植模型中用伊非那他单抗(5mg/kg和10mg/kg)、伊非那他单抗-DXd(5mg/kg和10mg/kg)、ADC实施例4(5mg/kg和10mg/kg)和媒介物对照治疗对体重的影响。

[0037] 图50:显示在小鼠VCaP前列腺癌异种移植模型中用伊非那他单抗(5mg/kg)、伊非那他单抗-DXd(5mg/kg)、ADC实施例4(2.5mg/kg、5mg/kg和10mg/kg)和媒介物对照治疗对肿瘤体积的影响。

[0038] 图51:显示在小鼠VCaP前列腺癌异种移植模型中用伊非那他单抗(5mg/kg)、伊非那他单抗-DXd(5mg/kg)、ADC实施例4(2.5mg/kg、5mg/kg和10mg/kg)和媒介物对照治疗对体重的影响。

[0039] 图52:显示在小鼠JIMT-1乳腺癌异种移植模型中用沙西妥珠单抗(5mg/kg)、沙西妥珠单抗-戈维替康(sacituzumab govitecan)(5mg/kg)(加上在研究第27天和第34天添加的ADC实施例3,5mg/kg)以及ADC实施例3(5mg/kg)和媒介物对照治疗对肿瘤体积的影响。

[0040] 图53:显示在小鼠JIMT-1乳腺癌异种移植模型中用沙西妥珠单抗(2.5mg/kg)、沙西妥珠单抗-戈维替康(2.5mg/kg,加上在研究第27天添加的ADC实施例3,5mg/kg)以及ADC实施例3(2.5mg/kg)和媒介物对照治疗对肿瘤体积的影响。

[0041] 图54:显示在小鼠JIMT-1乳腺癌异种移植模型中用沙西妥珠单抗(5mg/kg)、沙西妥珠单抗-戈维替康(5mg/kg)(加上在研究第27天和第34天添加的ADC实施例3,5mg/kg)以及ADC实施例3(5mg/kg和10mg/kg)和媒介物对照治疗对体重的影响。

[0042] 图55:显示在小鼠JIMT-1乳腺癌异种移植模型中用沙西妥珠单抗(2.5mg/kg)、沙

西妥珠单抗-戈维替康(2.5mg/kg,加上在研究第27天添加的ADC实施例3,5mg/kg)以及ADC实施例3(2.5mg/kg)和媒介物对照治疗对体重的影响。

[0043] 图56:显示了不同浓度(50nM、3.13nM、0.2nM和0nM)的曲妥珠单抗与NMT抑制剂1的偶联物(ADC实施例8)对HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞毒性的体外评估结果。嘌呤霉素被用作阳性细胞毒性对照。

[0044] 图57:显示了不同浓度(50nM、3.13nM、0.2nM和0nM)的曲妥珠单抗与NMT抑制剂1的偶联物(ADC实施例8)对HER2阴性乳腺癌细胞系MCF7的细胞毒性的体外评估结果。嘌呤霉素被用作阳性细胞毒性对照。

[0045] 序列表

[0046] SEQ ID NO:1-曲妥珠单抗轻链的氨基酸序列

[0047] SEQ ID NO:2-曲妥珠单抗重链的氨基酸序列

[0048] SEQ ID NO:3-利妥昔单抗轻链的氨基酸序列

[0049] SEQ ID NO:4-利妥昔单抗重链的氨基酸序列

[0050] SEQ ID NO:5-伊非那他单抗轻链的氨基酸序列

[0051] SEQ ID NO:6-伊非那他单抗重链的氨基酸序列

[0052] SEQ ID NO:7-沙西妥珠单抗轻链的氨基酸序列

[0053] SEQ ID NO:8-沙西妥珠单抗重链的氨基酸序列

具体实施方式

[0054] 本文所用的术语“烃基”应理解为意指任何化合物直链或支链的饱和、不饱和或部分不饱和的烃基团。“烃基”基团的合适实例可以包括例如“烷基”、“烯基”、“炔基”和/或“卤代烷基”基团,其各自如下文所定义。

[0055] 本文所用的术语“烷基”应理解为意指直链和支链饱和烃基团。“烷基”基团的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、戊基和己基。在无支链的烷基基团中,优选甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基。在支链烷基基团中,可提及的是叔丁基、异丁基、1-乙基丙基和1-乙基丁基。

[0056] 术语“C_{m-n}”或“(m-nC)基团”单独使用或作为前缀使用时,是指具有m至n个碳原子的任何基团。

[0057] 本文所用的术语“烯基”意指具有至少一个碳碳双键的直链和支链不饱和烃基团。烯基基团的实例包括乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基和己烯基。优选的烯基基团包括乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基和丁-2-烯基。

[0058] 本文所用的术语“炔基”意指具有至少一个碳碳三键的直链和支链不饱和烃基团。炔基基团的实例包括乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基和己炔基。优选的炔基基团包括乙炔基、1-丙炔基和2-丙炔基。

[0059] 本文所用的术语“碳环基”(或“碳环”)意指任何3至13元碳环系统,其可以是饱和的、部分不饱和的或芳族的。碳环系统可以是单环的,也可以含有一个以上的环(例如,环系统可以是双环的)。单环饱和碳环的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基。双环饱和碳环的实例包括双环辛烷、双环壬烷、双环癸烷(十氢化萘)和双环辛烷。饱和碳环的另一个实例是金刚烷。单环不饱和碳环的实例包括环丁烯、环戊烯、环戊二烯、环己

烯。芳族碳环的实例包括苯基和萘基。芳族碳环的更多实例包括四氢萘基(四氢化萘)和茚满。

[0060] 本文所用的术语“环烷基”意指环系统中的饱和基团。环烷基基团可为单环或双环的。例如,双环基团可以是稠合的或桥接的。单环环烷基基团的实例包括环丙基、环丁基和环戊基。单环环烷基基团的其他实例为环已基、环庚基和环辛基。双环环烷基基团的实例包括双环[2.2.1]庚-2-基。优选地,环烷基基团是单环的。

[0061] 本文所用的术语“卤素”或“卤代基”意指氟、氯、溴或碘。特别优选为氟、氯和溴。

[0062] 本文所用的术语“卤代烷基”意指具有卤素取代基的烷基基团,术语“烷基”和“卤素”应理解为具有上述含义。类似地,术语“二卤代烷基”意指具有两个卤素取代基的烷基基团,而术语“三卤代烷基”意指具有三个卤素取代基的烷基基团。卤代烷基基团的实例包括氟甲基、氯甲基、溴甲基、氟甲基、氟丙基和氟丁基;二卤代烷基基团的实例包括二氟甲基和二氟乙基;三卤代烷基基团的实例包括三氟甲基和三氟乙基。

[0063] 本文所用的术语“杂环基”(或杂环)意指芳族或非芳族碳原子环状基团,其中一至四个碳原子被一个或多个独立地选自氮、氧或硫的杂原子替换。杂环基(或杂环)基团可以是例如单环或双环。在双环杂环基(或杂环)基团中,每个环可以有一个或多个杂原子,或者仅在其中一个环中存在杂原子。杂原子可以是S、O或N,优选为O或N。

[0064] 单环非芳族杂环基(或杂环)的实例包括氮杂环丙烷基、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、哌啶基、哌嗪基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基和氮杂环庚烷基。

[0065] 单环芳族杂环基(或杂环)基团的实例包括呋喃基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、噻唑基、咪唑基、噁二唑基、噻二唑基、吡啶基、三唑基、三嗪基、四唑基、哒嗪基、异噻唑基、异噁唑基、吡嗪基、吡唑基和嘧啶基。

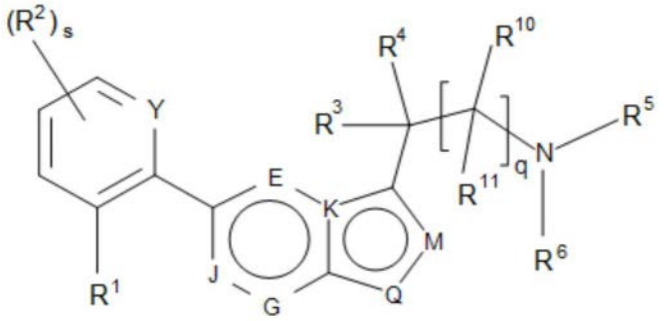
[0066] 双环芳族杂环基(或杂环)的实例包括喹喔啉基、喹唑啉基、吡啶并吡嗪基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、萘啶基、喹啉基、苯并呋喃基、吲哚基、苯并噻唑基、噁唑基[4,5-b]吡啶基、吡啶并嘧啶基、异喹啉基和苯并二噁唑。双环芳族杂环基基团的更多实例包括其中一个环是芳族的而另一个环是非芳族的那些基团,例如二氢苯并呋喃基、茚满基、吲哚啉基、异吲哚啉基、四氢异喹啉基、四氢喹啉基和苯并氮杂环庚烷基。

[0067] 术语“任选取代的”是指被取代的以及未被取代的基团、结构或分子。术语“其中R^1基团中的一个/任意CH、CH_2、CH_3基团或杂原子(即NH)任选地被取代”合适地意指R^1基团的氢基团中的(任意)一个被相关的规定基团取代。

[0068] 当任选的取代基选自“一个或多个”基团时,应理解,该定义包括所有取代基从指定基团之一中选择,或取代基从两个或更多个指定基团中选择。

[0069] NMT抑制剂

[0070] 如上所述,本发明的ADC包含NMT抑制剂。在一个实施方案中,NMT抑制剂为式(I)的化合物:

[0071] 

(I)

[0072] 或其盐,

[0073] 其中:

[0074] Y选自由-CH-、-C(R^2)-和-N-组成的组;

[0075] R^{1}为式-X-L-A的基团;

[0076] X代表-O-;

[0077] L代表-(CH$_2$)$_m$-;

[0078] m为1、2或3;

[0079] A为6-10元芳族碳环或5-10元芳族杂环,所述芳族碳环或杂环任选地被1、2或3个取代基取代,每个取代基独立地选自由以下组成的组:-F、-Cl、-Br、-OCH$_3$、-OCF$_3$、-CN、

[0080] 任选地被至多3个卤素、羟基或-OC$_{1-4}$烷基取代的-C$_{1-6}$烷基、-S(O)C$_{1-4}$烷基、-S(O)$_2$C$_{1-4}$烷基、-C(O)N(R^9)$_2$、-C(O)N(R^{13})C$_{1-4}$烷基OC$_{1-4}$烷基、-C(O)N(C$_{1-4}$烷基OC$_{1-4}$烷基)$_2$、-CH$_2$C(O)N(R^9)$_2$、-CH$_2$C(O)N(R^{13})C$_{1-4}$烷基OC$_{1-4}$烷基、-CH$_2$C(O)N(C$_{1-4}$烷基OC$_{1-4}$烷基)$_2$、-S(O)$_2$NHC$_{1-4}$烷基、-S(O)$_2$N(C$_{1-4}$烷基)$_2$、-NHC$_{1-4}$烷基、-N(C$_{1-4}$烷基)$_2$、-NHC(O)C$_{1-4}$烷基、-NHC(O)CF$_3$、-NHS(O)$_2$C$_{1-4}$烷基、CH$_2$N(R^{13})$_2$、CH$_2$N(R^{13})C(O)C$_{1-4}$烷基、CH$_2$N(R^{13})S(O)$_2$C$_{1-4}$烷基、-CH$_2$S(O)$_2$C$_{1-4}$烷基和CO$_2$H;

[0081] s为0、1、2或3;

[0082] 每个R^{2}独立地选自由以下组成的组:-F、-Cl、-Br、-OCH$_3$、-OCF$_3$、-CN、任选地被至多3个卤素或羟基取代的-C$_{1-4}$烷基、-S(O)C$_{1-4}$烷基、-S(O)$_2$C$_{1-4}$烷基、-S(O)$_2$NHC$_{1-4}$烷基、-S(O)$_2$N(C$_{1-4}$烷基)$_2$、-NHC$_{1-4}$烷基、-N(C$_{1-4}$烷基)$_2$、-NHC(O)C$_{1-4}$烷基、-NHC(O)CF$_3$和-NHS(O)$_2$C$_{1-4}$烷基;

[0083] q为0或1;

[0084] R^{3}为氢或甲基;R^{4}为氢或甲基;

[0085] R^{5}为氢;R^{6}为氢或任选地被至多3个-F、-Cl、-Br、-OH、-OCH$_3$、-OCF$_3$或-CN基团取代的C$_{1-6}$烷基;

[0086] 当存在时,R^{10}为氢或甲基;

[0087] 当存在时,R^{11}为氢或甲基;

[0088] 或者R^{3}基团和R^{5}基团以及其间的原子形成由其间的原子和键、或其间的原子和-(CHR^a)$_r$-组成的3至7元非芳族杂环;或者R^{10}基团和R^{5}基团以及其间的原子形成由其间的原子和-(CHR^a)$_r$-组成的3至7元非芳族杂环;

[0089] r为1、2、3、4或5;R^{a}为氢或甲基;

[0090] 每个R^{7}独立地选自由氢、卤素、C$_{1-4}$烷氧基和任选地被1、2或3个卤素取代的C$_{1-4}$烷基组成的组;并且

[0091] R^8选自氢和C_{1-4}烷基;

[0092] 每个R^9独立地选自由氢和C_{1-4}烷基组成的组,或者两个R^9基团和它们所键合的N形成4至7元非芳族杂环,所述杂环任选地包含1或2个选自N、O和S的其他杂原子;

[0093] 每个R^{13}独立地选自由氢和C_{1-4}烷基组成的组;并且其中

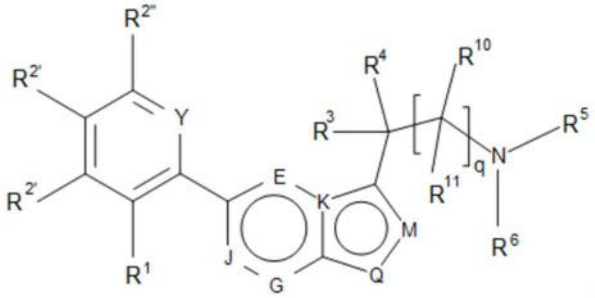
[0094] i)E、J和G各自为C(R^7),K为碳,Q为N(R^8),且M为氮;

[0095] ii)E、J和G各自为C(R^7),且K、Q和M各自为氮;或

[0096] iii)E、J、G和M各自为C(R^7),且K和Q各自为氮。

[0097] 合适地,式(I)的化合物或其盐通过N(R^5)(R^6)基团连接至连接子。

[0098] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为式(IA^^)的化合物:

[0099] 

(IA^^)

[0100] 或其盐,

[0101] 其中:

[0102] R^1为式-X-L-A的基团;

[0103] A为4-吡唑基,所述吡唑基任选地被至多3个选自甲基和-C(O)N(CH_3)$_2$的取代基取代;

[0104] X为-O-;

[0105] L为-(CH_2)$_m$-;

[0106] m为2;

[0107] $R^{2'}$选自由氟或氯(优选氟)组成的组;

[0108] $R^{2''}$选自由氢、氟或氯组成的组;

[0109] q为0;

[0110] R^3为氢或甲基;

[0111] R^4为氢或甲基;

[0112] R^5为氢;

[0113] R^6为氢或甲基;或

[0114] R^3基团和R^6基团以及其间的原子形成由其间的原子和键组成的3至7元非芳族杂环;

[0115] E、J、G、K、Q和M为:

[0116] i)E、J和G各自为CH,K为碳,Q为N(R^8),M为氮;且R^8为氢或甲基;或

[0117] ii)E、J、G和M各自为CH,且K和Q各自为氮;

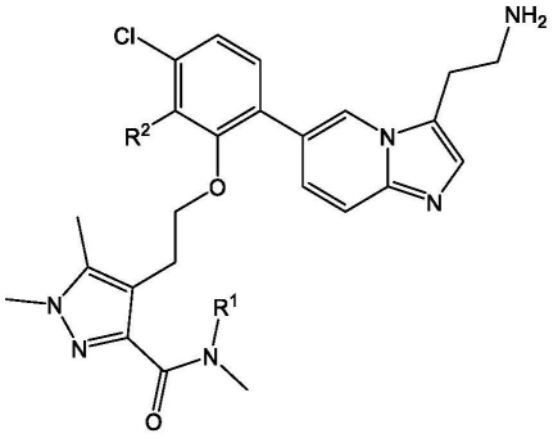
[0118] 条件是,A被不超过一个-C(O)N(CH_3)$_2$基团取代。

[0119] 合适地,式(IA^^)的化合物或其盐通过N(R^5)(R^6)基团连接至连接子。

[0120] WO2017/001812中公开了式(I)和式(IA^^)的化合物,其全部内容通过引用并入本

文,以描述NMT抑制剂的合成和活性。

[0121] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为式(II)的化合物:

[0122] 

(II),

[0123] 或其盐,

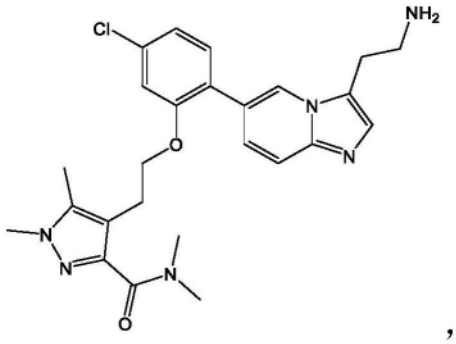
[0124] 其中:

[0125] R^1为H或$-CH_3$;并且

[0126] R^2为H或F。

[0127] 合适地,式(II)的化合物或其盐通过NH_2基团连接至连接子。

[0128] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为4-(2-{2-[3-(2-氨基乙基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基]-5-氯苯氧基}乙基)-N,N,1,5-四甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺:

[0129] 

,

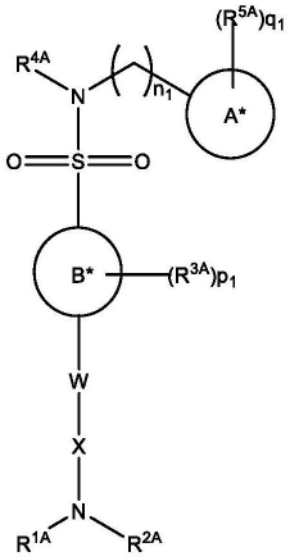
[0130] 或其盐。

[0131] 合适地,化合物4-(2-{2-[3-(2-氨基乙基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基]-5-氯苯氧基}乙基)-N,N,1,5-四甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺或其盐通过NH_2基团连接至连接子。

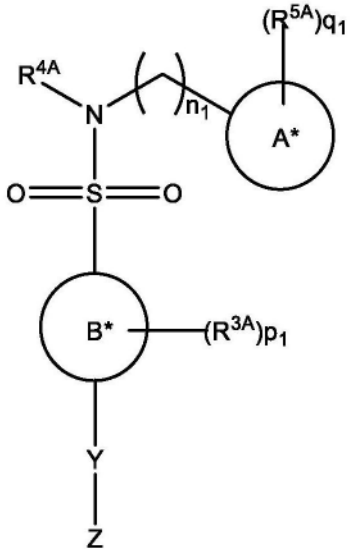
[0132] WO2020/128473中公开了式(II)的化合物和4-(2-{2-[3-(2-氨基乙基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基]-5-氯苯氧基}乙基)-N,N,1,5-四甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺,其全部内容通过引用并入本文,以描述NMT抑制剂的合成和活性。

[0133] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为式(III)或(IV)的化合物:

[0134]



(III)；或



(IV)

[0135] 或其盐，

[0136] 其中：

[0137] n_1为0、1、2、3、4、5或6；

[0138] 环A*是任选地被取代的含氮芳基，其中环A*中每个可取代的碳或氮任选且独立地被一个或多个R^{5A}取代，并且其中如果环A*含有-NH-部分，则所述氮可以任选地被C_{1-6}烷基(例如甲基)取代；并且其中R^{4A}和环A*可与它们所连接的原子一起形成环状基团，

[0139] 环B*为任选地被取代的芳基或杂芳基，其中环B*中每个可取代的碳或杂原子任选且独立地被一个或多个R^{3A}取代；

[0140] W和X中的一个可以不存在，且W和X独立地选自R^{11A}、任选地被R^{11A}取代的烃基(例如，C_{1-8}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)和任选地被R^{12A}取代的-$(CH_2)_{k1}$-杂环基；k_1为0、1、2、3、4、5或6；

[0141] R^{1A}为氢；

[0142] R^{2A}、R^{3A}、R^{4A}和R^{5A}独立地选自氢、R^{12A}、任选地被R^{12A}取代的烃基(例如，C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)和任选地被一个或多个R^{12A}取代的-$(CH_2)_{L1}$-杂环基；其中R^{2A}与W或X一起可形成任选地被一个或多个R^{12A}取代的杂环；并且其中R^{3A}和R^{5A}中的一个或多个与它们所连接的原子一起可形成任选地被R^{12A}取代的碳环，例如杂环基；L_1为0、1、2、3、4、5或6；

[0143] 其中：

[0144] 每个R^{11A}和R^{12A}独立地选自卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基、氧代、=NR^{13A}、-OR^{13A}、-SR^{13A}、-C(O)R^{13A}、-C(O)OR^{13A}、-OC(O)R^{13A}、-$NR^{13A}COR^{14A}$、-$NR^{13A}CON(R^{13A})_2$、-$NR^{13a}COR^{14a}$、-$NR^{13a}CO_2R^{14A}$、-S(O)R^{13A}、-$S(O)_2R^{13A}$、-$SON(R^{13A})_2$、-$NR^{13A}S(O)_2R^{14A}$；-CSR^{13A}、-$N(R^{13A})R^{14A}$、-$C(O)N(R^{13A})R^{14A}$、-$SO_2N(R^{13A})R^{14A}$和R^{15A}；

[0145] R^{13A}和R^{14A}各自独立地选自氢或R^{15A}；

[0146] R^{15A}选自烃基(例如C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)、碳环基和-$(CH_2)_{m1}$-杂环基，且每个R^{15A}任选且独立地被卤素、氰基、氨基、羟基、C_{1-6}烷基或环烷基和C_{1-6}烷氧基中的一个或多个取代；

[0147] m_1为0、1、2、3、4、5或6；

[0148] p_1为0、1、2、3或4；R^{4A}的值可以相同或不同；并且

[0149] q_1为0、1、2、3或4；其中R^{5A}的值可以相同或不同；

[0150] Y和Z中的一个或两个可以不存在，独立地选自氢、R^{16A}、任选地被R^{16A}取代的烃基(例如C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)和任选地被R^{16A}取代的-$(CH_2)_{r1}$-杂环基，其中每个R^{16A}独立地选自卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基、氧代、=NR^{17A}、-OR^{17A}、-SR^{17A}、-C(O)R^{17A}、-C(O)OR^{17A}、-OC(O)R^{17A}、-$NR^{17A}COR^{18A}$、-$NR^{17A}CON(R^{18A})_2$、-$NR^{17A}COR^{18A}$、-$NR^{17A}CO_2R^{18A}$、-S(O)R^{17A}、-$S(O)_2R^{17A}$、-$SON(R^{17A})_2$、-$NR^{17A}S(O)_2R^{18A}$；-CSR^{17A}、-$N(R^{17A})R^{18A}$、-C(O)$N(R^{17A})R^{18A}$、-$SO_2N(R^{17A})R^{18A}$和R^{19A}；r_1为0、1、2、3、4、5或6；

[0151] 其中：

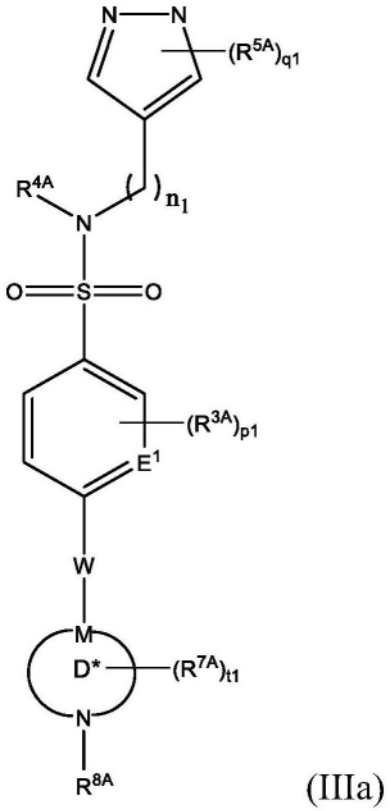
[0152] R^{17A}和R^{18A}各自独立地选自氢或R^{19A}；

[0153] R^{19A}选自烃基(例如C_{1-6}烷基、烯基、炔基或卤代烷基)、碳环基和-$(CH2)_{s1}$-杂环基，且每个R^{19A}任选且独立地被卤素、氰基、氨基、羟基、C_{1-6}烷基和C_{1-6}烷氧基中的一个或多个取代；并且

[0154] s_1为0、1、2、3、4、5或6。

[0155] 合适地，式(III)的化合物或其盐通过N(R^{1A})(R^{2A})基团连接至连接子。或者，当Z为-$N(R^{17A})R^{18A}$时，式(IV)的化合物或其盐合适地通过Z与连接子连接，或当Z不存在且Y为-$N(R^{17A})R^{18A}$时，合适地通过Y与连接子连接。

[0156] 在一个实施方案中，NMT抑制剂是式(IIIa)的化合物：

[0157] 

(IIIa)

[0158] 或其盐，

[0159] 其中：

[0160] n_1为0或1；

[0161] E^1为C；

[0162] W为(1-4C)烃基、芳基(例如苯基)或杂芳基基团(例如吡啶基)；

[0163] M选自C和N；

[0164] R^{3A}、R^{4A}和R^{5A}独立地选自氢、R^{12A}和任选地被R^{12A}取代的(1-3C)烃基；

[0165] R^{12A}独立地选自卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基、氧代、-OR^{13A}、-SR^{13A}、-$C(O)R^{13A}$、-$C(O)OR^{13A}$、-$OC(O)R^{13A}$、-$NR^{13A}COR^{14A}$和R^{15A}；

[0166] R^{13A}和R^{14A}各自独立地选自氢或(1-4C)烃基(例如甲基)；

[0167] 环D*为任选地被取代的含氮6或7元杂环,其中环D*中每个可取代的碳或氮任选且独立地被一个或多个R^{7A}取代；

[0168] R^{7A}独立地选自氢、(1-4C)烃基、卤素、三氟甲基、氰基、硫代、硝基或氧代；

[0169] R^{8A}为氢；

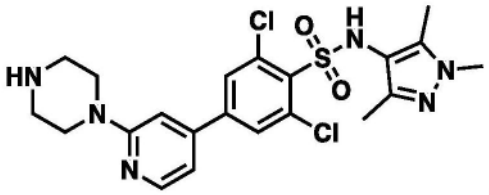
[0170] p_1为0、1或2,其中R^{4A}的值可以相同或不同；

[0171] q_1为3,其中R^{5A}的值可以相同或不同;并且

[0172] t_1为0、1或2,其中R^{7A}的值可以相同或不同。

[0173] 合适地,式(IIIa)的化合物或其盐通过NR^{8A}基团连接至连接子。

[0174] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为(2,6-二氯-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-N-(1,3,5-三甲基-1H-吡唑-4-基)-苯磺酰胺)：

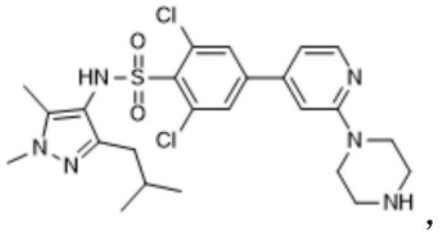
[0175] 

，

[0176] 或其盐。

[0177] 合适地,(2,6-二氯-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-N-(1,3,5-三甲基-1H-吡唑-4-基)-苯磺酰胺)或其盐通过哌嗪基环的NH基团连接至连接子。

[0178] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为2,6-二氯-N-(5-异丁基-1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基(-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-苯磺酰胺：

[0179] 

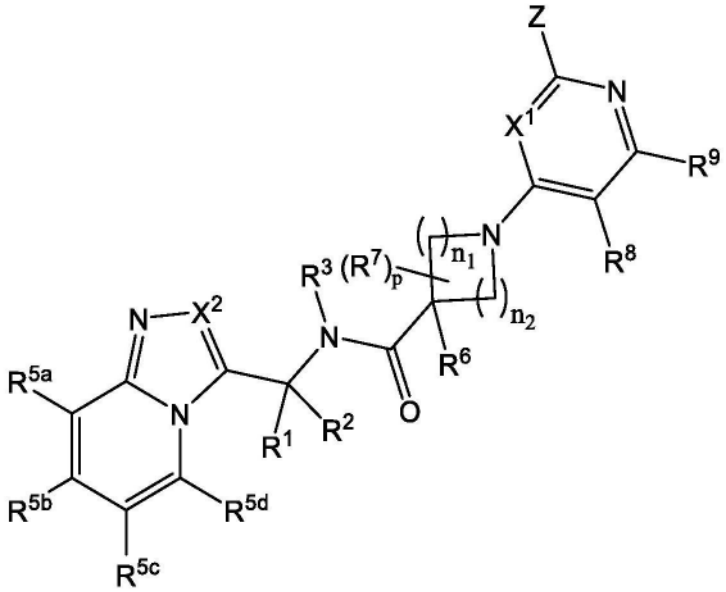
，

[0180] 或其盐。

[0181] 合适地,2,6-二氯-N-(5-异丁基-1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基(-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-苯磺酰胺或其盐通过哌嗪基环的NH基团连接至连接子。

[0182] 式(III)、(IV)、(IIIa)的化合物、(2,6-二氯-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-N-(1,3,5-三甲基-1H-吡唑-4-基)-苯磺酰胺)和2,6-二氯-N-(5-异丁基-1,3-二甲基-1H-吡唑-4-基(-4-(2-哌嗪-1-基-吡啶-4-基)-苯磺酰胺公开于WO2010/026365中,其全部内容通过引用并入本文,以描述NMT抑制剂的合成和活性。

[0183] 在一个实施方案中,NMT抑制剂是式(V)的化合物:

[0184] 

式(V)

[0185] 或其盐,

[0186] 其中:

[0187] n_1为1或2;n_2为1或2;

[0188] X^1选自由CR^x和N组成的组;

[0189] 当存在时,R^x选自由以下组成的组:氢、卤素和任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0190] R^1选自由以下组成的组:氢;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0191] R^2选自由以下组成的组:氢;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0192] 或R^1和R^2连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成C_{3-6}环烷基或包含1个选自由O和N组成的组的杂原子的3至6元非芳族杂环基,其中所述C_{3-6}环烷基或3至6元非芳族杂环基任选地被1或2个取代基取代,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0193] R^3选自由以下组成的组:氢;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0194] 或R^1和R^3连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成包含1个N杂原子的3至6元非芳族杂环基,其中所述3至6元非芳族杂环基任选地被1或2个取代基取代,每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0195] X^2选自由CR^4和N组成的组;

[0196] 当存在时，R^4选自由以下组成的组：氢；卤素；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3、-OCF_3和-NR^aR^b组成的组；

[0197] R^{5a}和R^{5d}独立地选自由以下组成的组：氢；卤素；任选地被1、2或3个取代基取代的甲基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；且任选地被1、2或3个取代基取代的甲氧基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

[0198] R^{5b}和R^{5c}独立地选自由以下组成的组：氢；卤素；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；任选地被1、2或3个取代基取代的-OC_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；且任选地被1、2或3个取代基取代的C_{3-6}环烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

[0199] 或R^{5b}和R^{5c}连接在一起，使得它们与它们所连接的原子一起形成6元芳基或包含1个或2个选自由S、O和N组成的组的杂原子的5或6元芳族杂环基，其中所述6元芳基或5或6元芳族杂环基任选地被1个或2个取代基取代，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

[0200] R^6选自由氢和甲基组成的组；

[0201] 当存在时，每个R^7为任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；

[0202] R^8选自由以下组成的组：氢；卤素；-OH；-CN；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OH、-CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烯基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组；且任选地被1、2或3个取代基取代的-OC_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、CN和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组；

[0203] R^9选自由氢和任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基组成的组，每个取代基独立地选自由卤素、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组；或

[0204] R^8和R^9连接在一起，使得它们与它们所连接的原子一起形成6元芳基、C_{5-6}环烷基、或包含1个或2个选自N、O和S的杂原子的5或6元芳族杂环基，并且其中所述6元芳基、C_{5-6}环烷基或5至6元芳族杂环基任选地被1、2或3个取代基取代，每个取代基独立地选自由以下组成的组：卤素；-OH；-CN；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组；且任选地被1、2或3个取代基取代的-OC_{1-4}烷基，每个取代基独立地选自由-卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的甲氧基组成的组；

[0205] p为0、1或2；

[0206] Z为5至13元非芳族杂环基，其包含1、2或3个选自N、O和S的杂原子，其中至少一个杂原子为N，并且其中所述5至13元非芳族杂环基任选地被1、2、3或4个取代基取代，每个取代基独立地选自由以下组成的组：卤素；任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH及任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组；任选地被1、2或3个取代基取代的-OC_{1-6}烷基，每个取代基独立地选自由卤素、-OH及任选地被1、2或

3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;NR^cR^d;和任选地被1、2或3个取代基取代的C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;或当两个取代基位于相邻的环位置上时,它们可以连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成C_{3-6}环烷基或包含1个选自O和N的杂原子的4至6元非芳族杂环基,其中所述C_{3-6}环烷基或4至6元非芳族杂环基任选地被1或2个取代基取代,每个取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-OC_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;

[0207] R^c为氢;

[0208] R^d选自由以下组成的组:氢;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OH、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0209] 或Z为-$NR^{10}R^{11}$,其中

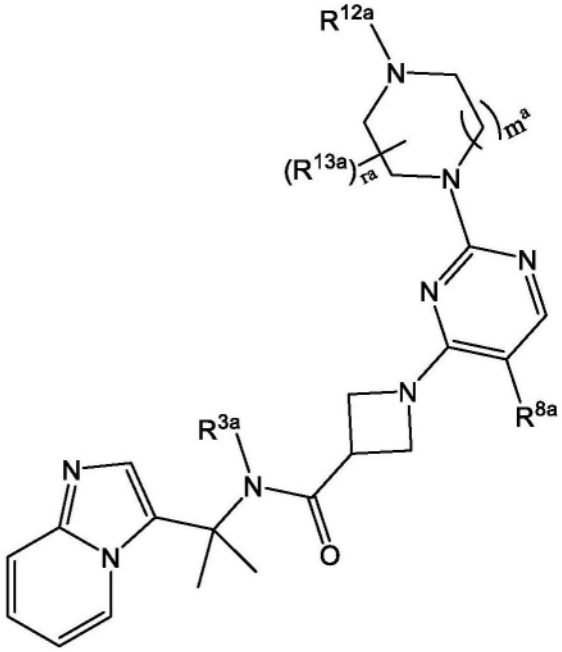
[0210] R^{10}为氢;并且

[0211] R^{11}为包含1、2或3个选自N、O和S的杂原子的5至10元非芳族杂环基,其中至少一个杂原子为N,并且其中所述5至10元非芳族杂环基任选地被1、2、3或4个取代基取代,所述取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;-OH;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的-OC_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组;并且

[0212] 当存在时,每个R^a和R^b独立地选自由氢和-C_{1-4}烷基组成的组。

[0213] 合适地,式(V)的化合物通过基团Z中存在的氮原子连接至连接子,例如,当基团Z为5至13元非芳族杂环基时,通过氮环原子,当基团Z为5至13元非芳族杂环基时,通过基团Z中存在的NR^cR^d基团,或通过-$NR^{10}R^{11}$连接至连接子。本领域技术人员将理解,为了使连接子连接至基团Z(例如在式(V)的化合物中以及本文其他地方)中存在的氮原子,基团Z中存在的氮原子必须连接至至少一个氢原子,即,氮原子不能是叔氨基的一部分。在化合物(例如基团Z)与连接子之间形成的偶联物中,基团Z中的N-H共价键被N-连接子共价键替换。

[0214] 在一个实施方案中,NMT抑制剂是式(Vq)的化合物:

[0215] 

(Vq)

[0216] 或其盐,

[0217] 其中:

[0218] R^{3a}为H或任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0219] R^{8a}为卤素或任选地被1、2或3个取代基取代的C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;

[0220] ra为0、1或2;

[0221] m^a为1或2;

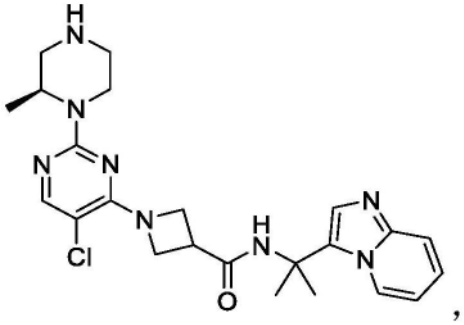
[0222] R^{12a}为氢;并且

[0223] 当存在时,每个R^{13a}独立地选自由以下组成的组:任选地被1、2或3个取代基取代的C_{1-4}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OCH_3和-OCF_3组成的组;且任选地被1、2或3个取代基取代的C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-CH_3、-OCH_3和-OCF_3组成的组;或

[0224] 当ra为2且两个R^{13a}基团位于相邻的环位置上时,所述两个R^{13a}连接在一起,使得它们与它们所连接的原子一起形成任选地被1或2个取代基取代的C_{3-6}环烷基,每个取代基独立地选自由以下组成的组:卤素;任选地被1、2或3个取代基取代的-C_{1-6}烷基,每个取代基独立地选自由卤素、-OH和任选地被1、2或3个卤素取代的-OC_{1-3}烷基组成的组。

[0225] 合适地,式(Vq)的化合物或其盐通过NR^{12a}基团连接至连接子。

[0226] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为(S)-1-(5-氯-2-(2-甲基哌嗪-1-基)嘧啶-4-基)-N-(2-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)丙-2-基)氮杂环丁烷-3-甲酰胺(本文称为“NMT抑制剂26”):

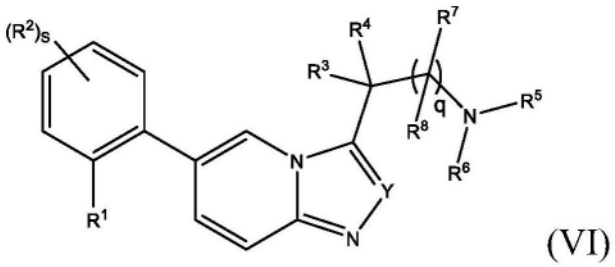
[0227] 

[0228] 或其盐。

[0229] 合适地,(S)-1-(5-氯-2-(2-甲基哌嗪-1-基)嘧啶-4-基)-N-(2-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)丙-2-基)氮杂环丁烷-3-甲酰胺通过哌嗪基环的NH基团连接至连接子。

[0230] 式(V)、式(Vq)的化合物和(S)-1-(5-氯-2-(2-甲基哌嗪-1-基)嘧啶-4-基)-N-(2-(咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)丙-2-基)氮杂环丁烷-3-甲酰胺公开于WO2022/058745中,其全部内容通过引用并入本文,以描述NMT抑制剂的合成和活性。具体而言,NMT抑制剂26可以按照WO2022/058745中的实施例129所述制备。

[0231] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为式(VI)的化合物:

[0232] 

(VI)

[0233] 或其盐,

[0234] 其中:

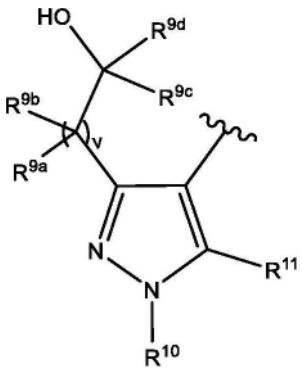
[0235] R^1为式O-L-A的基团;

[0236] L为-$(CHR^{12})_m$-;

[0237] 每个R^{12}独立地为H或C_{1-4}烷基;

[0238] m为1、2或3;

[0239] A为:

[0240] 

[0241] v为0、1或2;

[0242] R^{9a}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基;

[0243] R^{9b}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基;

[0244] R^{9c}为C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基;

[0245] R^{9d}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基;

[0246] R^{10}为H、C_{1-4}烷基或C_{1-4}卤代烷基;

[0247] R^{11}为H、卤代基、CN、C_{1-4}烷基、C_{1-4}卤代烷基、C_{1-4}烷氧基或C_{1-4}卤代烷氧基;

[0248] s为0、1、2或3;

[0249] 每个R^2独立地为F、Cl、Br、任选地被至多3个卤素基团取代的C_{1-4}烷基、OCH_3或OCF_3;

[0250] Y为CH或C_{1-4}烷基;

[0251] R^3为H或C_{1-4}烷基;

[0252] R^4为H或C_{1-4}烷基;

[0253] R^5为H;

[0254] R^6为H或C_{1-4}烷基;

[0255] q为0或1;

[0256] R^7为H或甲基;

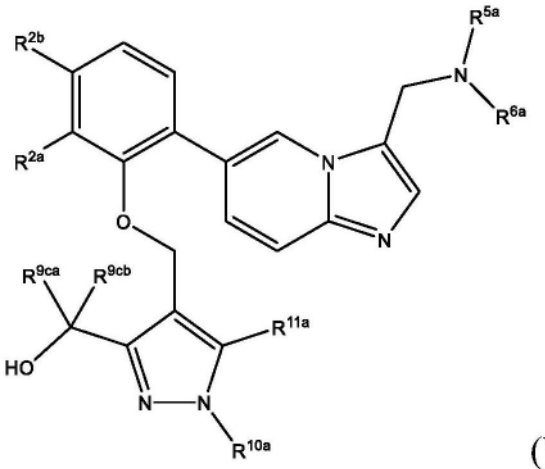
[0257] R^8为H或甲基;

[0258] 或R^3和R^6以及其间的原子形成由其间的原子和键、或其间的原子和-$(CHR^a)_r$-组成的3至7元非芳族杂环;或者R^7基团和R^6基团以及其间的原子形成由其间的原子和-$(CHR^a)_r$-组成的3至7元非芳族杂环;

[0259] r为1、2、3、4或5;并且

[0260] R^a为氢或甲基。

[0261] 合适地,式(VI)的化合物或其盐通过N(R^5)(R^6)基团连接至连接子。在一个实施方案中,NMT抑制剂为式(VIA)的化合物:

[0262] 

(VIA),

[0263] 或其盐,

[0264] 其中:

[0265] R^{2a}为H或F;

[0266] R^{2b}为F;

[0267] R^{5a}为H;

[0268] R^{6a}为H或甲基;

[0269] R^{9ca}为甲基、异丙基或叔丁基;

[0270] R^{9cb}为H或甲基;

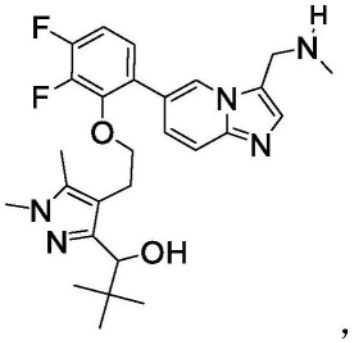
[0271] R^{10a}为甲基;并且

[0272] R^{11a}为甲基;

[0273] 条件是,当R^{2a}为H时,R^{9cb}为H。

[0274] 合适地,式(VIA)的化合物或其盐通过N(R^{5a})(R^{6a})基团连接至连接子。

[0275] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}-2,2-二甲基丙-1-醇:

[0276] 

[0277] 或其盐。

[0278] 合适地,1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}-2,2-二甲基丙-1-醇或其盐通过NH(Me)基团连接至连接子。

[0279] 在一个实施方案中,NMT抑制剂为2-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}丙-2-醇:

[0280] 

[0281] 或其盐。

[0282] 合适地,2-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}丙-2-醇或其盐通过NH(Me)基团连接至连接子。

[0283] 式(VI)、式(VIA)的化合物、1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}-2,2-二甲基丙-1-醇和2-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}丙-2-醇公开于欧洲专利申请22194959.7号,所述专利申请的全部内容通过引用并入本文,以描述NMT抑制剂的合成和活性。所述化合物还可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如本文公开的用于合成NMT抑制剂1的方法。

[0284] 在本发明的一个实施方案中,NMT抑制剂以盐的形式提供。在一个实施方案中,NMT抑制剂以药学上可接受的盐的形式提供。在一个实施方案中,提供了NMT抑制剂。

[0285] 连接子

[0286] 连接子通过共价键将抗体连接到NMT抑制剂。连接子是双官能或多官能的部分,可用于连接一种或多种NMT抑制剂和抗体以形成本发明的ADC。连接子可以在细胞外部,即细胞外,是稳定的,或者可以通过酶活性、水解或其他代谢条件裂解。在一个实施方案中,连接子是可裂解的连接子,例如可被酶(特别是溶酶体酶)裂解的连接子。

[0287] 本发明的ADC可以方便地使用具有与NMT抑制剂和抗体结合的反应性官能团的连接子来制备。抗体的半胱氨酸硫醇或胺,例如链末端(例如N末端),或氨基酸侧链(例如赖氨酸),可与连接子(例如马来酰亚胺)的官能团形成键。

[0288] 连接子优选在细胞外是稳定的。在运输或递送到细胞之前,本发明的ADC优选是稳定的并且保持完整,即抗体保持与NMT抑制剂连接。连接子在靶细胞外是稳定的,并且可以在细胞内以某一有效速率被裂解。有效的连接子将:(i)保持抗体的特定结合特性;(ii)允许偶联物或药物部分在细胞内递送;(iii)保持稳定和完整,即不被裂解,直到偶联物被递送或运输到其目标位点;和(iv)一旦裂解,保持NMT抑制剂的细胞毒性、细胞杀伤作用或细胞抑制作用。ADC的稳定性可以通过标准分析技术来测量,例如质谱、HPLC和分离/分析技术LC/MS。衍生化研究(未显示数据)使申请人得出结论,本发明的ADC不具有NMT抑制活性,因此NMT抑制活性是通过裂解连接子释放NMT抑制剂来实现的。

[0289] 抗体和药物部分的共价连接需要连接子具有两个反应性官能团,即反应意义上的二价性。已知二价连接子试剂可用于连接两个或更多个功能性或生物活性部分,例如肽、核酸、药物、毒素、抗体、半抗原和报告基团,并且已描述了其产生偶联物的方法(Hermanson,G.T.(1996)Bioconjugate Techniques;Academic Press:New York,第234-242页)。

[0290] 连接子可以被调节凝聚、溶解性或反应性的基团取代。例如,磺酸酯取代基可增加试剂的水溶性,并促进连接子试剂与抗体或药物部分的偶联反应,或促进连接子和NMT抑制剂与抗体或连接子和抗体与NMT抑制剂的偶联反应,根据用于制备ADC的合成路线而定。

[0291] 在一个实施方案中,连接子单元具有式(VII):

[0292] $-A_a-W_w-Y_y-$(式(VII))

[0293] 其中:

[0294] A为第一延伸单元,当存在时,其与抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团形成共价键;

[0295] a为0或1;

[0296] 每个W独立地为氨基酸单元或葡糖苷酸单元,当A和/或Y不存在时,其分别与抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团和/或NMT抑制剂的官能团形成共价键;

[0297] 当W为氨基酸单元时,w为1至12;

[0298] 当W为葡糖苷酸单元时,w为1或2;

[0299] Y为第二延伸单元,当存在时,其与NMT抑制剂的官能团形成共价键;并且

[0300] y为0或1。

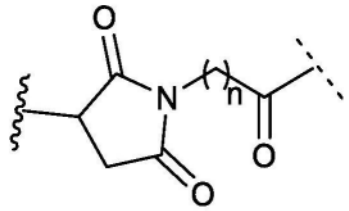
[0301] NMT抑制剂与第二延伸单元(Y)(当存在时)形成共价键,或当Y不存在时,则与氨基酸单元或葡糖苷酸单元(W)形成共价键。合适地,NMT抑制剂上的官能团是氨基或醇,例如氨基。当NMT抑制剂通过氨基形成共价键时,氨基必须具有可用的氢原子,以便与连接子中相应的官能团(例如羰基)发生反应,即氨基不能是叔氨基。

[0302] 第一延伸单元

[0303] 当存在时,延伸单元(A)能够将抗体连接到氨基酸单元或葡糖苷酸单元(W)。在这方面,抗体具有可以与延伸单元的官能团形成键的官能团,例如抗体的氨基酸侧链的官能团。抗体上可以存在的有用官能团(无论是天然的还是通过化学操作的)包括但不限于巯基(-SH)、氨基、羟基、羧基、碳水化合物的异头羟基和羧基。在一些实施方案中,抗体官能团是巯基和/或氨基,尤其是巯基。巯基可以通过还原抗体的分子内二硫键来产生。巯基还可以利用2-亚氨基硫杂环戊烷(Traut试剂)或另一种巯基生成试剂通过抗体赖氨酸部分的氨基的反应来生成。

[0304] 在一个实施方案中,第一延伸单元与抗体的硫原子形成键。硫原子可以来自抗体的巯基。

[0305] 在一个实施方案中,延伸单元(A)具有式(A1):

[0306] 

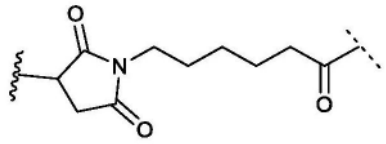
(A1),

[0307] 其中:

[0308] n为1至6;

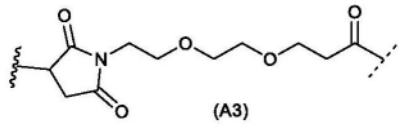
[0309] 表示与抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团的连接点;表示与W的连接点。

[0310] 在一个实施方案中,A为(A2):

[0311] 

(A2)。

[0312] 在一个实施方案中,A为(A3):

[0313] 

(A3)。

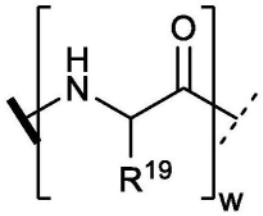
[0314] 氨基酸和葡糖苷酸单元

[0315] 每个W独立地为氨基酸单元或葡糖苷酸单元,当A和/或Y不存在时,其分别与抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团和/或NMT抑制剂的官能团形成共价键。

[0316] 在一些实施方案中,每个W独立地为氨基酸单元。在此类实施方案中,w为1至12,例如1、2或3,尤其为2。

[0317] 在一些实施方案中,氨基酸单元可以被一种或多种酶例如肿瘤相关的蛋白酶裂解,从而在暴露于细胞内蛋白酶例如溶酶体酶时促进NMT抑制剂从ADC中释放(Doronina等人(2003)Nat.Biotechnol.21:778-784)。

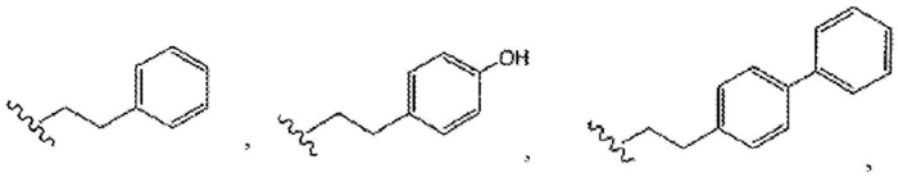
[0318] 在一个实施方案中,每个W具有式(WI):

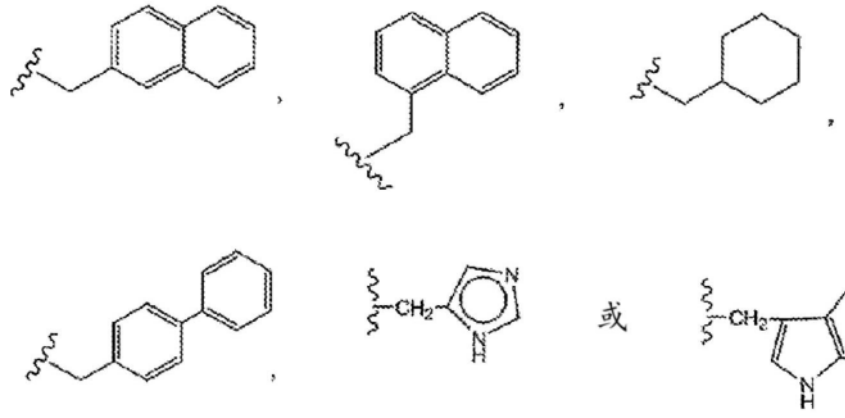
[0319] 

(WI)，

[0320] 其中w如前所定义；且

[0321] R^{19}为H、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、CH_2OH、CH(OH)Me、CH_2CH_2SMe、$CH_2C(O)SMe$、$CH_2C(O)NH_2$、$CH_2C(O)OH$、$CH_2CH_2C(O)NH_2$、$CH_2CH_2C(O)OH$、$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_3NH_2$、$(CH_2)_3NHC(O)Me$、$(CH_2)_3NHCHO$、$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_4NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)Me$、$(CH_2)_4NHCHO$、$(CH_2)_3NHC(O)NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)NH_2$、$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基、苯基、



[0322] 

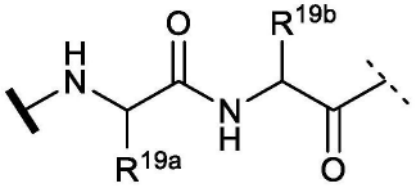
；

[0323] 其中\表示与A(当存在时)或所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链官能团的连接点；且

[0324] ⋰表示与Y(当存在时)或所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

[0325] 在一个实施方案中，至少一个R^{19}为异丙基。在一个实施方案中，至少一个R^{19}为$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$。

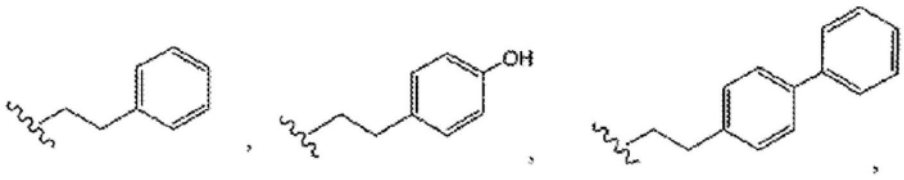
[0326] 在一个实施方案中，(W)w具有式(WII)：

[0327] 

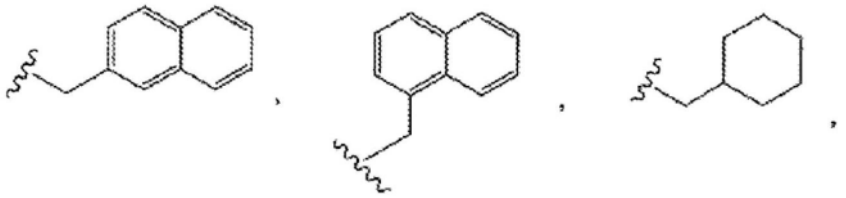
(WII)，

[0328] 其中：

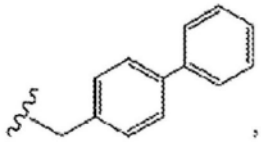
[0329] R^{19a}为H、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、CH_2OH、CH(OH)Me、2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基、苯基、

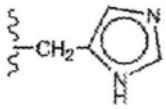


[0330]

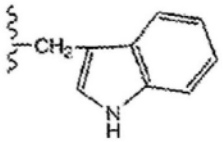


[0331]





或



且

;

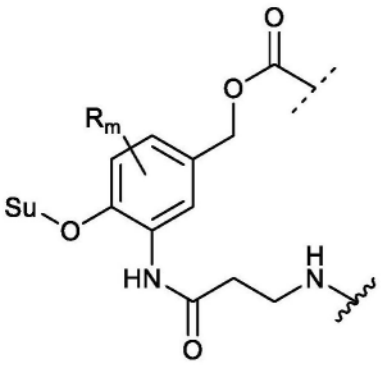
[0332] R^{19b}为CH_2CH_2SMe、$CH_2C(O)SMe$、$CH_2C(O)NH_2$、$CH_2C(O)OH$、$CH_2CH_2C(O)NH_2$、$CH_2CH_2C(O)OH$、$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_3NH_2$、$(CH_2)_3NHC(O)Me$、$(CH_2)_3NHCHO$、$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$(CH_2)_4NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)Me$、$(CH_2)_4NHCHO$、$(CH_2)_3NHC(O)NH_2$、$(CH_2)_4NHC(O)NH_2$或$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$。

[0333] 在一个实施方案中,R^{19a}为异丙基。在一个实施方案中,R^{19b}为$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$。

[0334] 在一个实施方案中,每个W均为葡糖苷酸单元。在此类实施方案中,w为1或2,尤其为1。葡糖苷酸单元包括可被β-葡糖苷酸酶裂解的位点。

[0335] 在一个实施方案中,W(特别是(W)w)具有式(WIII):

[0336]



(WIII),

[0337] 其中:

[0338] R为H、卤代基、CN或NO_2;

[0339] m为0、1、2或3;

[0340] Su为糖部分;

[0341] 其中 ~ 表示与A(当存在时)或所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链的官能团的连接点;且

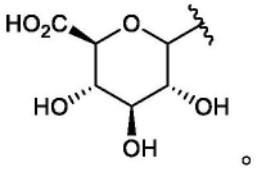
[0342] ⋰表示与Y(当存在时)或所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

[0343] 在一个实施方案中,R为H。在第二实施方案中,R为卤代基。在第三实施方案中,R为CN。在第四实施方案中,R为NO_2。

[0344] 在一个实施方案中,m为0。在第二实施方案中,m为1。在第三实施方案中,m为2。在第四实施方案中,m为3。

[0345] 在一个实施方案中,糖部分(Su)是环状己糖,例如吡喃糖,或环状戊糖,例如呋喃糖。在一个实施方案中,吡喃糖是葡糖苷酸或己糖。合适地,糖部分处于β-D构象。在一个实施方案中,吡喃糖是β-D-葡糖苷酸部分(即,β-D-葡糖醛酸通过可被β-葡糖苷酸酶裂解的糖苷键连接至W的剩余部分)。在一个实施方案中,糖部分是未被取代的(例如,天然存在的环状己糖或环状戊糖)。在一个实施方案中,糖部分是取代的β-D-葡糖苷酸(例如,被一个或多个基团(例如氢、羟基、卤素、硫、氮或C_{1-6}烷基)取代的葡糖醛酸)。

[0346] 在一个实施方案中,Su具有下式:

[0347] 

。

[0348] 第二延伸单元

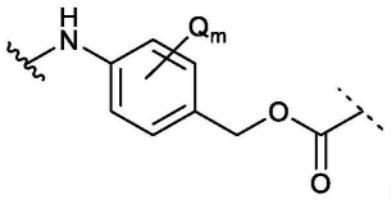
[0349] 当存在时,第二延伸单元(Y)通过与NMT抑制剂的官能团形成共价键将W连接到NMT抑制剂。例如,Y可以包含羰基,所述羰基可以与NMT抑制剂的氨基官能团形成共价键。当NMT抑制剂通过氨基形成共价键时,氨基必须具有可用的氢原子,以便与Y的相应官能团(例如羰基)发生反应,即氨基不能是叔氨基。第二延伸单元可能是"自毁"或"非自毁"基团。

[0350] "非自毁"延伸单元是指在ADC被酶促(例如,蛋白水解)裂解后,部分或全部延伸单元仍然与药物部分结合。非自毁的间隔单元的实例包括但不限于甘氨酸延伸单元和甘氨酸-甘氨酸延伸单元。还考虑了易受序列特异性酶促裂解影响的肽延伸单元的其他组合。例如,通过肿瘤细胞相关的蛋白酶将含有甘氨酸-甘氨酸延伸单元的ADC进行酶促裂解将导致甘氨酸-甘氨酸-NMT抑制剂部分从ADC的其余部分上释放。在一个此类实施方案中,甘氨酸-甘氨酸-NMT抑制剂部分然后在肿瘤细胞中经历水解步骤,因此从NMT抑制剂部分上裂解甘氨酸-甘氨酸间隔单元。

[0351] "自毁"间隔单元允许释放NMT抑制剂,而无需单独的水解步骤。

[0352] 当W为氨基酸单元时,y合适地为1。当W为葡糖苷酸单元时,y合适地为0。

[0353] 在一个实施方案中,第二延伸单元(Y)具有式(Y1):

[0354] 

(Y1),

[0355] 其中:

[0356] 每个Q独立地为卤代基、NO_2、CN、C_{1-6}烷基、C_{1-6}卤代烷基、C_{1-6}烷氧基或C_{1-6}卤代烷氧基;

[0357] m为0至4;

[0358] 其中 表示与W的连接点;且

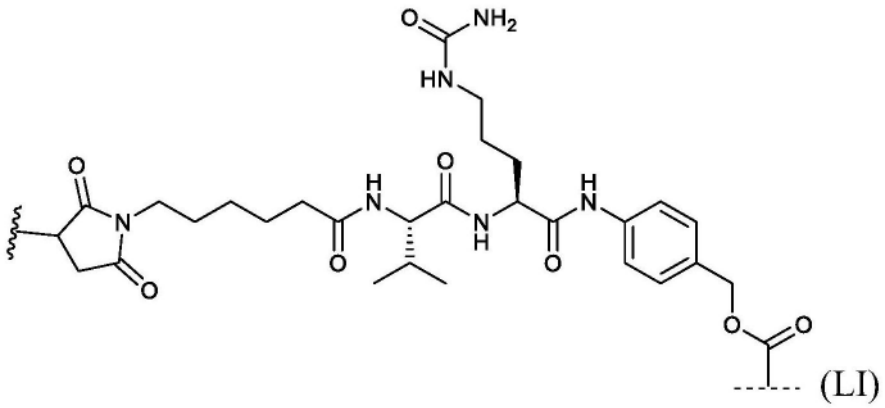
[0359] 表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

[0360] 在一个实施方案中,m不为零并且至少一个Q为卤代基。在第二实施方案中,m不为零并且至少一个Q为NO_2。在第三实施方案中,m不为零并且至少一个Q为CN。在第四实施方案中,m不为零并且至少一个Q为C_{1-6}烷基。在第五实施方案中,m不为零并且至少一个Q为C_{1-6}卤代烷基。在第六实施方案中,m不为零并且至少一个Q为C_{1-6}烷氧基。在第七实施方案中,m不为零并且至少一个Q为C_{1-6}卤代烷氧基。

[0361] 在一个实施方案中,m为0。在第二实施方案中,m为1。在第三实施方案中,m为2。在第四实施方案中,m为3。在第五实施方案中,m为4。

[0362] 自毁延伸单元的合适实例还包括但不限于电子上类似于对氨基苄醇及其衍生物(例如式(Y1)(参见例如US2005/0256030 A1))的芳族化合物,例如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999)Bioorg.Med.Chem.Lett.9:2237)和邻氨基苄缩醛或对氨基苄缩醛。间隔基在酰胺键水解后进行环化,诸如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等人,Chemistry Biology,1995,2,223);合适取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系统(Storm等人J.Amer.Chem.Soc.,1972,94,5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等人J.Org.Chem.,1990,55,5867)。消除在甘氨酸a位取代的含胺药物(Kingsbury等人,J.Med.Chem.,1984,27,1447)也是ADC中有用的自毁延伸单元的实例。

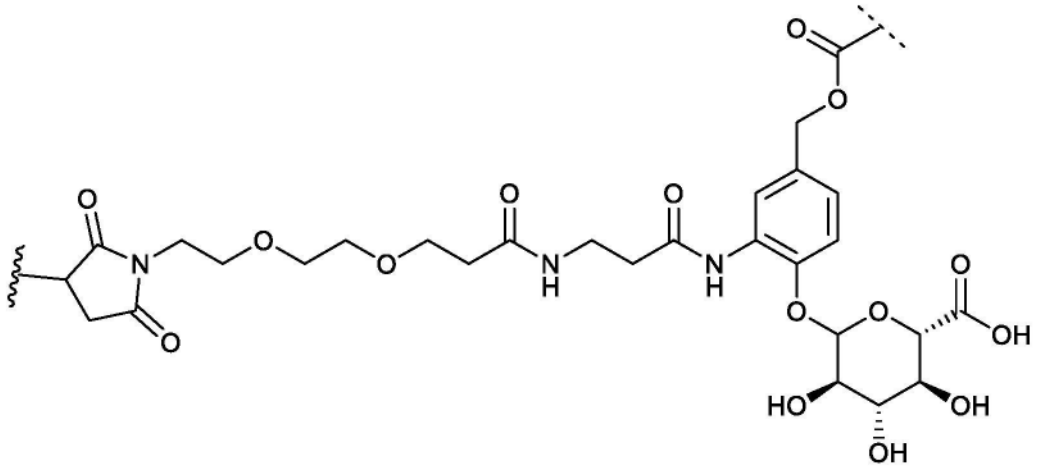
[0363] 在一个实施方案中,连接子具有式(LI):

[0364] 

[0365] 其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;且

[0366] 表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

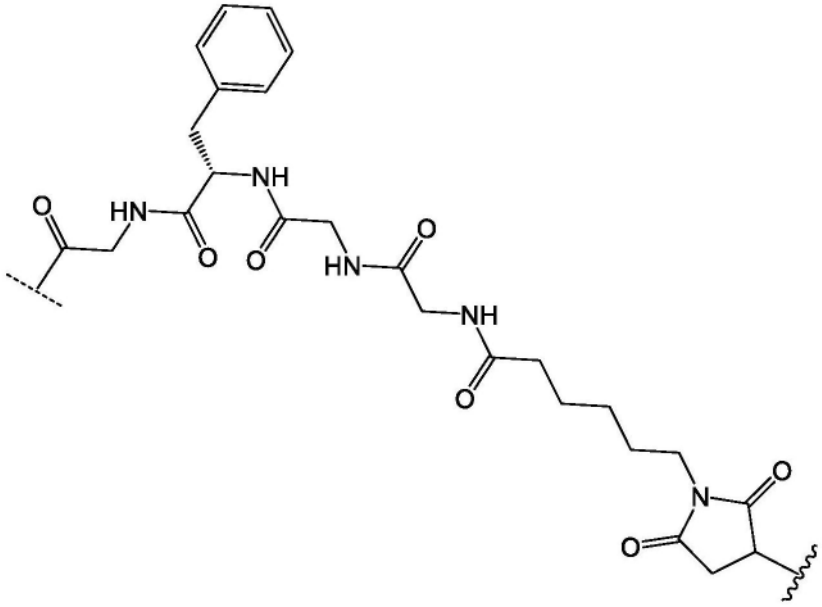
[0367] 在一个实施方案中,连接子具有式(LII):

[0368] 

[0369] 其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;且

[0370] 表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

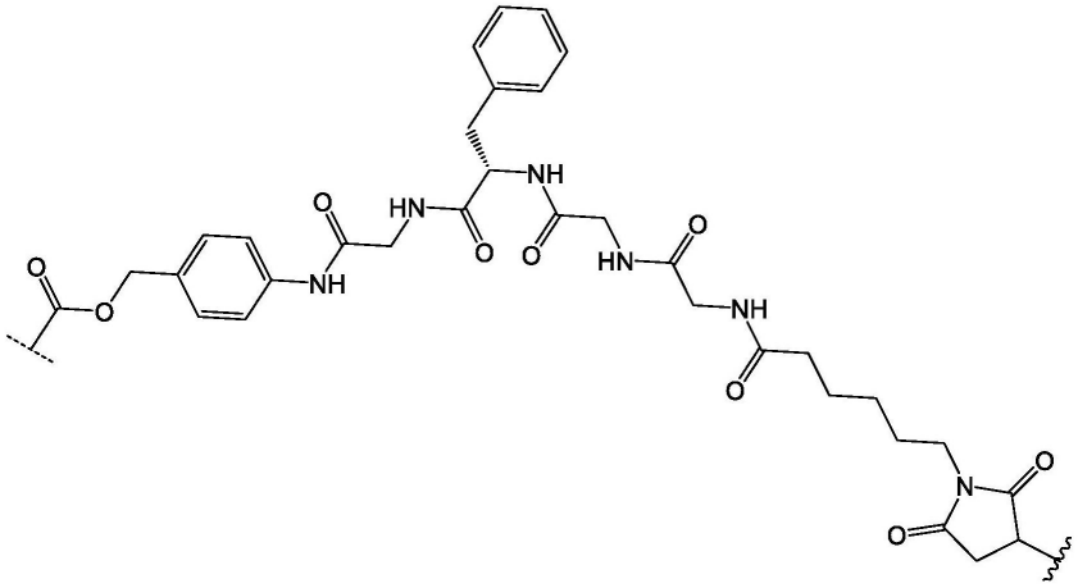
[0371] 在一个实施方案中,连接子具有式(LIII):

[0372] 

[0373] 其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;且

[0374] 表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

[0375] 在一个实施方案中,连接子具有式(LIV):

[0376] 

[0377] 其中 表示与所述抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团的连接点;且

[0378] 表示与所述NMT抑制剂的官能团的连接点。

[0379] 抗体

[0380] 本文所用术语“抗体”涉及单克隆抗体、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)、完整抗体和抗体片段,只要它们表现出期望的生物学活性即可。抗体可以为鼠的、人的、人源化的、嵌合的、或源于其他物种的抗体。抗体是由能够识别和结合特异性抗原的免疫系统所产生的蛋白质。(Janeway,C.,Travers,P.,Walport,M.,Shlomchik(2001)Immuno Biology,第5版,Garland Publishing,New York)。靶抗原通常具有由多种抗体上的CDR所识别的许多结合位点,也称为表位。每种特异性结合不同表位的抗体均具有不同的结构。因此,一种抗原可具有一种以上的相应抗体。抗体包含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抗原的抗原结合位点或其部分的分子,此类靶包括但不限于癌细胞或产生与自身免疫疾病相关的自身免疫抗体的细胞。免疫球蛋白可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)、任何类(例如lgG1、lgG2、lgG3、lgG4、lgA1和lgA2)或任何亚类、或任何同种异型(例如人G1m1、G1m2、G1m3、非G1m1[即,除G1m1以外的任何同种异型]、G1m17、G2m23、G3m21、G3m28、G3m11、G3m5、G3m13、G3m14、G3m10、G3m15、G3m16、G3m6、G3m24、G3m26、G3m27、A2m1、A2m2、Km1、Km2和Km3)的免疫球蛋白分子。免疫球蛋白可以来自任何物种,包括人、鼠或兔来源。

[0381] “抗体片段”包括全长抗体的一部分,通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab’、F(ab’)2和scFv片段;双抗体;线性抗体;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)和上述任何一种与癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原免疫特异性结合的表位结合片段、单链抗体分子;且由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0382] 本文所用术语“单克隆抗体”是指从基本上同质抗体的群体获得的抗体,即,包含该群体的各个抗体是相同的,除了可以微量存在的可能的天然存在的突变。单克隆抗体具有高度特异性(针对单一抗原位点)。另外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其特异性之外,单克隆

抗体的优点在于它们可以被合成但不被其他抗体所污染。修饰语“单克隆”指示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特性并且不应解释为需要通过任何特定方法产生该抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人(1975)Nature 256:495首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法(参见US 4816567)制备。单克隆抗体也可以利用Clackson等人(1991)Nature,352:624-628;Marks等人(1991)J.Mol.Biol.,222:581-597描述的技术由噬菌体抗体库分离,或由携带完全人类免疫球蛋白系统的转基因小鼠分离(Lonberg(2008)Curr.Opinion 20(4):450-459)。

[0383] 本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,而链的其余部分与源于另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,以及此类抗体的片段,只要其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)。嵌合抗体包含“灵长类化(primatized)”抗体,其包含源于非人灵长类(例如,旧世界猴(old world Monkey)或猿)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0384] 本文中的“完整抗体”为包含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。完整抗体可以具有一种或多种“效应子功能”,其是指可归因于抗体Fc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。抗体效应子功能的实例包括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);吞噬作用和细胞表面受体例如B细胞受体和BCR的下调。

[0385] 依据其重链恒定结构域的氨基酸序列,可将完整抗体指定为不同的“类别”。有五种主要类别的完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可以被进一步划分成“亚类”(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同抗体类别的重链恒定结构域分别称为α、δ、ε、γ和μ。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0386] 抗体的所需生物活性合适地包括与癌症相关抗原结合。所述结合合适地为特异性结合,即抗体优先与所述癌症相关抗原结合并且不显著地与其他抗原或蛋白质(例如BSA)结合。

[0387] 如本文所用,癌症相关抗原是由癌细胞表达的抗原。所述癌细胞可以是肿瘤细胞或血癌细胞,例如B细胞或T细胞。因此,针对癌细胞表达的抗原的抗体与所述癌细胞结合并(不受理论的限制)通过NMT抑制剂的作用和/或抗体介导的细胞毒作用(ADCC)来介导细胞死亡。癌症相关抗原有时可能由非癌细胞表达,但优选由癌细胞优先表达。癌症相关抗原的一个实例为HER2。HER2尤其在某些乳腺癌细胞上表达。癌症相关抗原的另一实例为CD20。CD20在某些B细胞上表达,包括某些B细胞淋巴瘤细胞。

[0388] 如本文所用,“结合至HER2”用于表示抗体与HER2的结合亲和力高于非特异性配偶体,例如牛血清白蛋白(BSA,Genbank登录号CAA76847,版本号CAA76847.1 GI:3336842,记录更新日期:2011年1月7日下午02:30)。在一些实施方案中,在生理条件下测量时,抗体与HER2结合的缔合常数(Ka)是该抗体与BSA的缔合常数的至少2、3、4、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000、104、105或106倍。本发明的抗体能够以高亲和力结合HER2。例如,在一些实施方案中,抗体能够以等于或小于约10^{-6}M(例如1x 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、

10^{-12}、10^{-13}或10^{-14})的KD与HER2结合。

[0389] 如本文所用,HER2是指人表皮生长因子受体2。在一个实施方案中,HER2多肽对应于Genbank登录号AAA75493,版本号AAA75493.1GI:306840,记录更新日期:2010年6月23日上午08:47。在一个实施方案中,编码HER2多肽的核酸对应于Genbank登录号M11730,版本号M11730.1GL183986,记录更新日期:2010年6月23日上午08:47。

[0390] 抗体的修饰

[0391] 本文公开的抗体可以被修饰,例如,使它们对人受试者的免疫原性更低。这可以通过本领域技术人员所熟悉的多种技术来实现。下面将更详细地描述其中一些技术。

[0392] 人源化

[0393] 降低非人抗体或抗体片段体内免疫原性的技术包括所谓的“人源化”技术。“人源化抗体”是指包含人抗体的修饰的可变区的至少一部分的多肽,其中可变区的一部分(优选地,显著少于完整的人类可变结构域的部分)已被来自非人类物种的相应序列取代,并且其中修饰的可变区连接至另一种蛋白质的至少另一部分(优选地,人抗体的恒定区)。表述“人源化抗体”包括人人抗体源抗体,其中一个或多个互补决定区(“CDR”)氨基酸残基和/或一个或多个框架区(“FW”或“FR”)氨基酸残基被来自啮齿动物或其他非中类似位点的氨基酸残基取代。表述“人源化抗体”还包括免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段,其包含基本上具有人免疫球蛋白氨基酸序列的FR和基本上具有非人免疫球蛋白氨基酸序列的CDR。

[0394] “人源化”形式的非人(例如,鼠类)抗体为含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。或者,从另一个角度来看,人源化抗体是一种人抗体,它还包含来自非人(例如鼠)抗体的选定序列来代替人序列。人源化抗体可以包括来自相同或不同物种的保守氨基酸取代或非天然残基,但不会显著改变其结合和/或生物活性。此类抗体是含有来自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。

[0395] 人源化技术有多种,包括“CDR移植”、“导向选择”、“去免疫化”、“表面再塑”(也称为“饰面”)、“复合抗体”、“人递呈肽段优化(Human String Content Optimisation)”和框架改组。

[0396] CDR移植

[0397] 在这种技术中,人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体),其中受体抗体的互补决定区(CDR)的残基被具有所需特性的非人类物种(供体抗体)(例如小鼠、大鼠、骆驼、牛、山羊或兔)的CDR残基所取代(实际上,非人源CDR被“移植”到人源框架上)。在某些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基会被相应的非人类残基取代(例如,当某个FR残基对抗原结合有显著影响时就会发生这种情况)。

[0398] 另外,人源化抗体可以包含既不存在于受体抗体中也不存在于输入的CDR或构架序列中的残基。进行这些修饰是为了进一步改进和最大化抗体性能。因此,通常人源化抗体将包含至少一个及在一方面两个可变结构域的全部,其中所有或所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的那些高变环且全部或基本全部的FR区为人免疫球蛋白序列的那些FR区。所述人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,或人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分。

[0399] 导向选择

[0400] 所述方法由以下组成:将特异性针对特定表位的所给非人抗体的VH或VL结构域与

人源VH或VL库相结合,并针对目标抗原选择特定的人源V结构域。然后将选定的人源VH与VL库相结合,生成全人源VHxVL组合。该方法描述于Nature Biotechnology(N.Y.)12,(1994)899-903中。

[0401] 复合抗体

[0402] 在此方法中,人抗体的两个或多个氨基酸序列片段组合在最终的抗体分子中。它们是由多个人源VH和VL序列片段组合来构建,所述组合限制或避免最终复合抗体V区中的人T细胞表位。在需要时,通过将有助于或编码T细胞表位的V区片段与避免T细胞表位的替代片段交换,可以限制或避免T细胞表位。此方法在US2008/0206239A1中有描述。

[0403] 去免疫化

[0404] 此方法涉及从治疗性抗体(或其他分子)的V区中去除人(或其他第二物种)的T细胞表位。通过例如与MHC结合基序数据库(例如托管于www.wehi.edu.au上的"基序"数据库)进行比较,分析治疗性抗体V区序列中是否存在MHC II类结合基序。或者,可使用计算线程方法(如由Altuvia等人(J.Mol.Biol.249 244-250(1995))设计的那些方法)来识别MHC II类结合基序;在这些方法中,测试来自V区序列的连续重叠肽与MHC II类蛋白的结合能。然后可以将这些数据与有关成功呈递肽的其他序列特征的信息相结合,例如两亲性、Rothbard基序以及蛋白酶B和其他加工酶的裂解位点。

[0405] 一旦鉴定出潜在的第二种物种(例如人)T细胞表位,就会通过改变一个或多个氨基酸将其消除。修饰的氨基酸通常位于T细胞表位本身内,但也可能根据蛋白质的一级或二级结构与表位相邻(因此,在一级结构中可能不相邻)。最典型的改变是通过替换的方式,但在某些情况下,氨基酸的添加或删除会更合适。

[0406] 所有的改变都可以通过重组DNA技术来实现,因此最终的分子可以通过使用定点诱变等成熟的方法从重组宿主表达来制备。然而,使用蛋白质化学或任何其他分子改变的方法也是可能的。

[0407] 表面再塑

[0408] 此方法包括:

[0409] (a)通过构建非人抗体可变区的三维模型来确定非人(例如啮齿动物)抗体(或其片段)可变区的构象结构;

[0410] (b)使用相对可及性分布,从足够数量的非人和人抗体可变区重链和轻链的X射线晶体结构生成序列比对,以给出一组重链和轻链框架位置,其中比对位置在足够数量的非人抗体重链和轻链中98%是相同的;

[0411] (c)使用步骤(b)中生成的框架位置集,为要人源化的非人抗体定义一组重链和轻链表面暴露的氨基酸残基;

[0412] (d)从人抗体氨基酸序列中鉴定出一组与步骤(c)中定义的表面暴露氨基酸残基最接近相同的重链和轻链表面暴露氨基酸残基,其中来自人抗体的重链和轻链是或不是天然配对的;

[0413] (e)在待人源化非人抗体的氨基酸序列中,用步骤(d)中鉴定的重链和轻链表面暴露的氨基酸残基组取代步骤(c)中定义的重链和轻链表面暴露的氨基酸残基组;

[0414] (f)构建步骤(e)中指定的取代所产生的非人抗体的可变区的三维模型;

[0415] (g)通过比较步骤(a)和(f)中构建的三维模型,鉴定步骤(c)或(d)中鉴定的集合

中的任何氨基酸残基,所述氨基酸残基位于待人源化的非人抗体的互补决定区的任何残基的任何原子的5埃范围内;且

[0416] (h)将步骤(g)中鉴定的任何残基从人氨基酸残基改变为原始的非人氨基酸残基,从而定义一组非人抗体人源化的表面暴露氨基酸残基;条件是步骤(a)不必首先进行,但必须在步骤(g)之前进行。

[0417] 超人源化

[0418] 该方法将非人源序列与功能性人类种系基因库进行比较。选择那些编码与非人源序列相同或密切相关的典型结构的人类基因。选择那些在CDR内同源性最高的人类基因作为FR供体。最后,将非人源CDR移植到这些人源FR上。此方法在专利WO 2005/079479 A2中进行了描述。

[0419] 人递呈肽段优化

[0420] 此方法将非人类(例如小鼠)序列与人类种系基因库进行比较,并将差异评分为人递呈肽段(HSC),从而在潜在MHC/T细胞表位水平上量化序列。然后通过最大化其HSC而不是使用全局同一性量度来生成多个不同的人源化变体(在Molecular Immunology,44,(2007)1986-1998中描述),从而对目标序列进行人源化。

[0421] 框架改组

[0422] 非人抗体的CDR框内融合于包含所有已知重链和轻链人类种系基因框架的cDNA池。然后通过例如筛选噬菌体展示抗体库来选择人源化抗体。这在Methods 36,43-60(2005)中有描述。

[0423] 在一个实施方案中,根据本发明使用已知用于治疗或预防癌症的抗体。可用于治疗癌症的抗体的实例包括但不限于曲妥珠单抗,其是一种用于治疗转移性乳腺癌患者的人源化抗HER2单克隆抗体(Stebbing,J.,Copson,E.和O'Reilly,S."Herceptin(trastuzamab)in advanced breast cancer"Cancer Treat Rev(2000).26,287-90;Miller等人(2003)Journal of Immunology 170,4854-4861);且利妥昔单抗,其是一种用于治疗非霍奇金淋巴瘤患者的嵌合抗CD20单克隆抗体。进一步的实例包括:奥戈伏单抗(oregovomab)(OvaRex,AltaRex Corporation,MA),一种用于治疗卵巢癌的鼠源抗体;Panorex(Glaxo Wellcome,NC),一种用于治疗结直肠癌的鼠源IgG2a抗体;BEC2(hnClone Systems Inc.,NY),一种用于治疗肺癌的鼠源IgG抗体;IMC-C225(Imclone Systems Inc.,NY),一种用于治疗头颈癌的嵌合IgG抗体;Vitaxin(Medhnmune,Inc.,MD),一种用于治疗肉瘤的人源化抗体;坎帕斯(Campath)1/H(Leukosite,MA),一种用于治疗慢性淋巴细胞白血病(CLL)的人源化IgGi抗体;Smart MI95(Protein Design Labs,Inc.,CA)为一种用于治疗急性髓细胞白血病(AML)的人源化IgG抗体;LymphoCide(Immunomedics,Inc.,NJ),一种用于治疗非霍奇金淋巴瘤的人源化IgG抗体;Smart ID 10(Protein Design Labs,Inc.,CA),一种用于治疗非霍奇金淋巴瘤的人源化抗体;Oncolym(Techniclone,Inc.,CA),一种用于治疗非霍奇金淋巴瘤的鼠源抗体;Allomune(BioTransplant,CA),一种用于治疗霍奇金病或非霍奇金淋巴瘤的人源化抗CD2 mAh;anti-VEGF(Genentech,Inc.,CA),一种用于治疗肺癌和结直肠癌的人源化抗体;CEAcide(Immunomedics,NJ),一种用于治疗结直肠癌的人源化抗CEA抗体;IMC-1C11(ImClone Systems,NJ),一种用于治疗结直肠癌、肺癌和黑色素瘤的抗KDR嵌合抗体;西妥昔单抗(ImClone,NJ),一种用于治疗表皮生长因子阳性癌症的抗

EGFR嵌合抗体。与CD20结合的抗体的更多实例包括奥瑞珠单抗、奥妥珠单抗(obinutuzumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、托西莫单抗(tositumomab)和乌妥昔单抗(ublituximab)。

[0424] 其他可用于治疗癌症的抗体包括但不限于针对下列癌症相关抗原的抗体:CA125(卵巢)、CA15-3(癌症)、CAI9-9(癌症)、L6(癌症)、Lewis Y(癌症)、Lewis X(癌症)、甲胎蛋白(癌症)、CA 242(结直肠)、胎盘碱性磷酸酶(癌症)、前列腺特异性抗原(前列腺)、前列腺酸性磷酸酶(前列腺)、表皮生长因子(癌症)、MAGE-1(癌症)、MAGE-2(癌症)、MAGE-3(癌症)、MAGE-4(癌症)、抗转铁蛋白受体(癌症)、p97(黑色素瘤)、MUC1-KLH(乳腺癌)、CEA(结直肠)、gp100(黑色素瘤)、MARTI(黑色素瘤)、PSA(前列腺)、IL-2受体(T细胞白血病和淋巴瘤)、CD19(B细胞淋巴瘤)、CD20(非霍奇金淋巴瘤)、CD52(白血病)、CD33(白血病)、CD22(淋巴瘤)、人绒毛膜促性腺激素(癌)、CD38(多发性骨髓瘤)、CD40(淋巴瘤)、粘蛋白(癌症)、P21(癌症)、MPG(黑色素瘤)和Neu致癌基因产物(癌症)。一些特定的有用的抗体包括但不限于BR96 mAb(Trail,P.A.,Willner,D.,Lasch,S.J.,Henderson,A.J.,Hofstead,S.J.,Casazza,A.M.,Firestone,R.A.,Hellstrom,I.,Hellstrom,K.E.,“Cure of Xenografited Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates”Science 1993,261,212-215)、BR64(Trail,PA,Willner,D,Knipe,J.,Henderson,A.J.,Lasch,S.J.,Zoeckler,M.E.,Trailsmith,M.D.,Doyle,T.W.,King,H.D.,Casazza,A.M.,Braslawsky,G.R.,Brown,J.P.,Hofstead,S.J.,(Greenfield,R.S.,Firestone,R.A.,Mosure,K.,Kadow,D.F.,Yang,M.B.,Hellstrom,K.E.和Hellstrom,I.“Effect of Linker Variation on the Stability,Potency,and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates”Cancer Research 1997,57,100-105,针对CD40抗原的mAb,例如S2C6 mAb(Francisco,J.A.,Donaldson,K.L.,Chace,D.,Siegall,C.B.和Wahl,A.F.“Agonistic properties and in vivo antitumor activity of the anti-CD-40antibody,SGN-14”Cancer Res.2000,60,3225-3231),针对CD70抗原的mAb,例如1F6 mAb,以及针对CD30抗原的mAb,例如AGIO(Bowen,M.A.,Olsen,K.J.,Cheng,L.,Avila,D.和Podack,E.R.“Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT”J.Immunol.,151,5896-5906,1993)。许多其他与肿瘤相关抗原结合的内化抗体也可用于本发明,并已被综述过(Franke,A.E.,Sievers,E.L.,和Scheinberg,D.A.,“Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leukemia:a review”Cancer Biother Radiopharm.2000,15,459-76;Murray,J.L.,“Monoclonal antibody treatment of solid tumors:acoming of age”Semin Oncol.2000,27,64-70;Breitling,F.,和Dubel,S.,Recombinant Antibodies,John Wiley,and Sons,New York,1998)。

[0425] 可用于治疗癌症的其他抗体包括Tong等人Molecules 2021,26,5847,https://doi.org/10.3390/molecules26195847,和Coats等人,Clin Cancer Res 2019;25:5441-8中公开的抗体,所述文献的全部内容出于定义抗体的目的通过引用并入本文。

[0426] 在一个实施方案中,抗体选自由以下组成的组:吉妥珠单抗、本妥昔单抗(brentuximab)、阿多-曲妥珠单抗(ado-trastuzumab)、fam-曲妥珠单抗、奥英妥珠单抗(inotuzumab)、泊洛妥珠单抗(polatuzumab)、阿西妥珠单抗(acituzumabab)、沙西妥珠单抗、贝兰他单抗(belantamab)、朗妥昔单抗(ioncastuximab)、替索单抗(tisotumab)、英达

妥昔单抗(indatuximab)、那妥昔单抗(naratuximab)和迪妥昔珠单抗(depatuxizumab)。

[0427] 在另一实施方案中,抗体为沙西妥珠单抗。或者,抗体是伊非那他单抗。

[0428] 合适地,抗体选自由曲妥珠单抗、利妥昔单抗、沙西妥珠单抗和伊非那他单抗组成的组。

[0429] 在一个实施方案中,抗体是人源化抗体、嵌合抗体、人抗体或抗体片段。

[0430] 在一个实施方案中,抗体与HER2结合。在一个实施方案中,抗体是曲妥珠单抗、帕妥珠单抗(pertuzumab)、玛格妥昔单抗(margetuximab)、厄妥索单抗(ertumaxomab)、MM-111、HER2Bi-aATCs、MCLA-128、ZW25、MDX-210、阿多-曲妥珠单抗和fam-曲妥珠单抗。合适地,抗体是曲妥珠单抗。在一个实施方案中,抗体是具有曲妥珠单抗的6个CDR的抗体。曲妥珠单抗包含SEQ ID NO:2的重链和SEQ ID NO:1的轻链。

[0431] 在一个实施方案中,抗体与CD20结合。合适地,抗体是利妥昔单抗。在一个实施方案中,抗体是具有利妥昔单抗的6个CDR的抗体。利妥昔单抗包含SEQ ID NO:4的重链和SEQ ID NO:3的轻链。

[0432] 在一个实施方案中,抗体与选自由以下组成的组的抗原结合:CLDN18、FOLR1、EGFR、Nectin-4、CD22、c-MET、CD19、CEACAM5、间皮素、PSMA、ROR1、TF、TNF-BCAM、TROP2、VTCN1、5T4癌胚抗原、AXL、CD276、CD30、CD38、IL3RA、NaPi2b、BRAF、Cadherin-6、CD37、CD70、DLK1、ENPP3、EpCAM、HER3、LRRC15、PD-L1、PTK7、STING、TEM1、TOP1和VEGF。

[0433] 在一个实施方案中,抗体与Claudin 18的成员结合,特别是与Claudin 18.2结合,并且例如包含所述抗体的ADC可以用于治疗胃癌。在一个实施方案中,癌症表达Claudin 18的一个或多个成员,特别是Claudin 18.2。

[0434] 在一个实施方案中,抗体与叶酸受体结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗卵巢癌和子宫内膜癌。在此实施方案中,合适的抗体是米妥昔单抗(mirvetuximab)。在一个实施方案中,癌症表达叶酸受体。

[0435] 在一个实施方案中,抗体与EGF受体或EGF受体家族的成员结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗多种类型的上皮细胞癌。在一个实施方案中,癌症表达EGF受体。

[0436] 在一个实施方案中,抗体与Nectin 4结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗尿路上皮癌、膀胱癌、胰腺癌、三阴性乳腺癌、非小细胞肺癌、胃癌、食道癌或卵巢癌。在此实施方案中,合适地,抗体为恩诺单抗(enfortumab)。在一个实施方案中,癌症表达Nectin 4。

[0437] 在一个实施方案中,抗体与CD22结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗非霍奇金淋巴瘤。在一个实施方案中,癌症表达CD22。

[0438] 在一个实施方案中,抗体与c-MET结合,并且例如包含所述抗体的ADC可以用于治疗非小细胞肺癌(NSCLC)。在一个实施方案中,癌症表达c-MET。

[0439] 在一个实施方案中,抗体与Trop-2结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗转移性三阴性乳腺癌和转移性尿路上皮癌。在此实施方案中,合适的抗体是沙西妥珠单抗。在一个实施方案中,癌症表达Trop-2。沙西妥珠单抗包含SEQ ID NO:8的重链和SEQ ID NO:7的轻链。

[0440] 在一个实施方案中,抗体与组织因子结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗先前治疗过的复发性或转移性宫颈癌。在此实施方案中,合适地,抗体为替索单抗。在一

个实施方案中,癌症表达组织因子。

[0441] 在一个实施方案中,抗体与CD276(B7-H3)结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗前列腺癌。在此实施方案中,合适地,抗体为伊非那他单抗。在一个实施方案中,癌症表达CD276(B7-H3)。伊非那他单抗包含SEQ ID NO:6的重链和SEQ ID NO:5的轻链。

[0442] 在一个实施方案中,抗体与受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗各种血液学和实体恶性肿瘤。在一个实施方案中,癌症表达酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)。

[0443] 在一个实施方案中,抗体与BCMA结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗多发性骨髓瘤。在一个实施方案中,癌症表达BCMA。

[0444] 在一个实施方案中,抗体与PSMA结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗前列腺癌。在一个实施方案中,癌症表达PSMA。

[0445] 在一个实施方案中,抗体与CEACAM5结合,并且例如包含所述抗体的ADC可以用于治疗晚期非小细胞肺癌(NSCLC)。在一个实施方案中,癌症表达CEACAM5。

[0446] 在一个实施方案中,抗体与间皮素结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌、胃癌和非小细胞肺肿瘤。在一个实施方案中,癌症表达间皮素。

[0447] 在一个实施方案中,抗体与AXL结合,并且例如包含所述抗体的ADC可用于治疗多种实体肿瘤,包括非小细胞肺癌(NSCLC)和三阴性乳腺癌(TNBC)。在此实施方案中,合适地,抗体为enapotamab。在一个实施方案中,癌症表达AXL。

[0448] 载药量

[0449] 载药量(称为变量“p”)是每一抗体对应的NMT抑制剂的平均数量。当本发明的化合物与半胱氨酸残基结合时,载药量范围可以是每一抗体1至10个NMT抑制剂,即其中1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个NMT抑制剂共价连接至抗体。偶联物的组成包括与1至10个NMT抑制剂偶联的抗体的集合。

[0450] 在通过偶联反应制备ADC的过程中,每一抗体对应的NMT抑制剂的平均数量可以通过常规方法来表征,例如UV、反相HPLC、HIC、质谱、ELISA测定和电泳。也可以根据p确定ADC的数量分布。通过ELISA,可以确定特定ADC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,由于抗体-抗原结合和ELISA的检测限制,p(NMT抑制剂)值的分布无法辨别。此外,用于检测ADC的ELISA测定不能确定药物部分与抗体的连接位置,例如重链或轻链片段,或特定的氨基酸残基。在一些情况下,均匀的ADC(其中p为具有其他NMT抑制剂载药量的ADC的某一值)的分离、纯化和表征可以通过诸如反相HPLC或电泳的方法来实现。这些技术也适用于其他类型的偶联物。

[0451] 对于一些ADC,p可能受到抗体上连接位点数量的限制。例如,抗体可以仅具有一个或几个半胱氨酸硫醇基团,或者可以仅具有一个或几个充分反应性硫醇基团,通过所述基团可以连接连接子。较高载药量(例如p>5)可能导致凝聚、不溶性、毒性或丧失某些ADC的细胞渗透性。

[0452] 通常,在偶联反应期间与抗体偶联的NMT抑制剂的量少于理论最大值。抗体可以包含例如许多不与NMT抑制剂-连接子中间体或连接子试剂反应的赖氨酸残基。只有反应性最强的赖氨酸基团才可以与胺反应性连接子试剂发生反应。此外,只有反应性最强的半胱氨

酸硫醇基团(例如巯基)才可以与硫醇反应性连接子试剂发生反应。一般来说,抗体不含有很多(如果有的话)可能与NMT抑制剂连接的游离和反应性半胱氨酸硫醇基团。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。ADC的负载可以用数种不同的方式控制,包括:(i)限制NMT抑制剂-连接子中间体或连接子试剂相对于抗体的摩尔过量,(ii)限制偶联反应时间或温度,和(iii)部分或限制的半胱氨酸硫醇修饰的还原条件。

[0453] 某些抗体具有可还原的链间二硫键,即半胱氨酸桥。可通过用还原剂诸如DTT(二硫苏糖醇)处理使得抗体具有反应性以与连接子试剂偶联。理论上,每个半胱氨酸桥将因此形成两个反应性硫醇亲核体。可以通过使赖氨酸与2-亚氨基硫烷(Traut试剂)反应,将另外的亲核基团引入抗体,导致胺转化为硫醇。可以通过对一个、两个、三个、四个或更多个半胱氨酸残基进行工程改造(例如,制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变抗体)将反应性硫醇基团引入抗体。US 7521541教导了通过引入反应性半胱氨酸氨基酸来对抗体进行工程改造。可在抗体的反应位点处对半胱氨酸氨基酸进行工程改造,其不形成链内或分子间二硫键(Junutula等人,2008,Nature Biotech.,26(8):925-932;Dornan等人(2009)Blood 114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;WO2009/052249)。工程改造的半胱氨酸硫醇可以与本发明的具有硫醇反应性亲电基团的连接子试剂或药物连接子试剂(例如马来酰亚胺或α-卤代酰胺)发生反应,形成具有半胱氨酸工程改造抗体和NMT抑制剂部分的ADC。因此可以设计、控制和了解NMT抑制剂部分的位置。由于工程改造的半胱氨酸硫醇基团通常与硫醇反应性连接子试剂或药物连接子试剂发生高产率反应,因此可以控制NMT抑制剂负载。对IgG抗体进行工程改造,通过在重链或轻链的单个位点进行取代来引入半胱氨酸氨基酸,从而在对称抗体上产生两个新的半胱氨酸。可以实现接近2的NMT抑制剂负载和接近均质的偶联产物ADC。

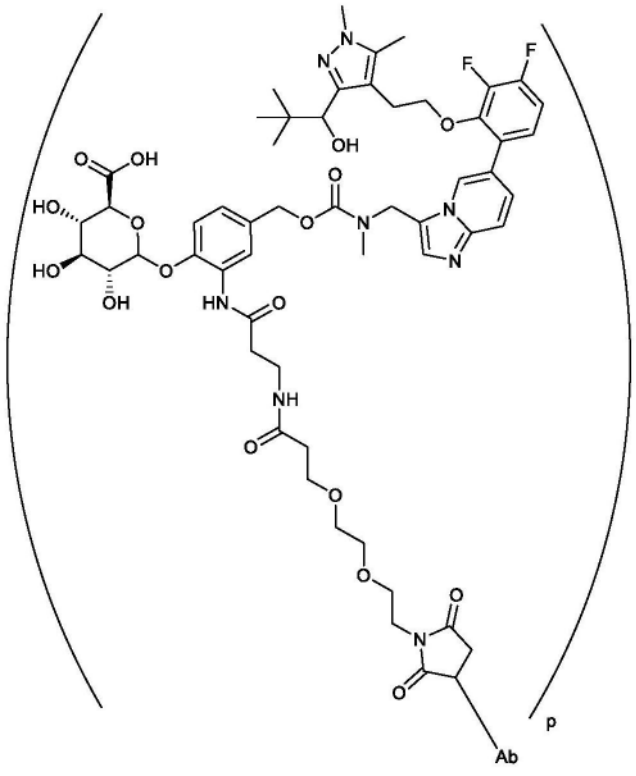
[0454] 或者,可以通过对抗体进行工程改造使其重链和/或轻链中含有非天然氨基酸来实现位点特异性偶联,如Axup等人((2012),Proc Natl Acad Sci USA.109(40):16101-16116)所述。非天然氨基酸提供了额外的优势,可以设计正交化学反应来连接连接子试剂和NMT抑制剂。

[0455] 当抗体的一个以上亲核或亲电基团与NMT抑制剂-连接子中间体或连接子试剂以及随后的NMT抑制剂发生反应时,所得产物为ADC化合物的混合物,其中与抗体连接的NMT抑制剂的分布为1、2、3等。液相色谱法(例如聚合反相(PLRP)和疏水相互作用(HIC))可通过NMT抑制剂负载值分离混合物中的各化合物。可以分离具有单一NMT抑制剂负载值(p)的ADC制剂,但是,这些单一负载值ADC可能仍然是异质混合物,因为NMT抑制剂可以通过连接子附着在抗体的不同位点。

[0456] 因此,本发明的ADC包括ADC化合物的混合物,其中抗体具有一个或多个NMT抑制剂部分,并且其中NMT抑制剂部分可以在各种氨基酸残基处附着到抗体上。

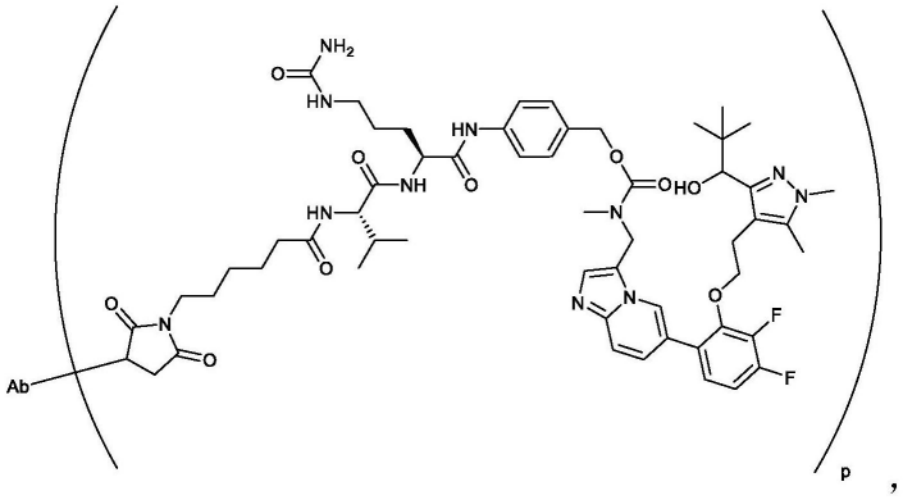
[0457] 在一个实施方案中,NMT抑制剂/抗体的载药量(p)为1至10个NMT抑制剂/抗体。合适地,载药量(p)为2和6、4和6、8和10、或6和8个NMT抑制剂/抗体之间。

[0458] 在一个实施方案中,本发明的ADC包括下式:

[0459] 

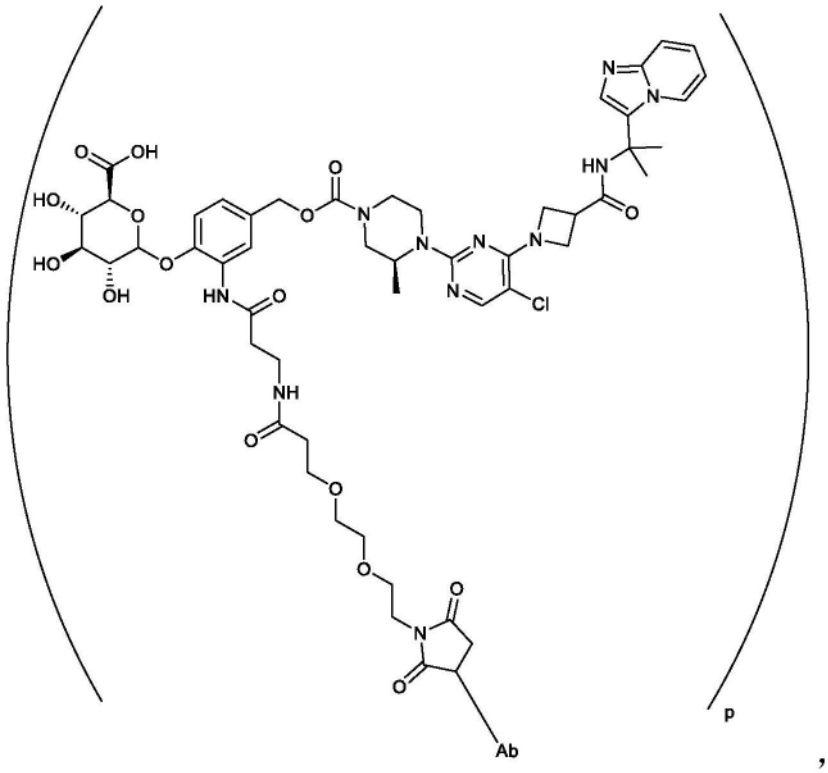
[0460] 其中Ab为如本文定义的抗体并且p如本文定义。合适地,本发明的ADC或其盐通过抗体上半胱氨酸氨基酸侧链上的巯基与抗体结合。合适地,抗体为曲妥珠单抗或利妥昔单抗,尤其是曲妥珠单抗。或者,抗体为沙西妥珠单抗。或者,抗体是伊非那他单抗。合适地,p介于1至10之间,例如p介于2和6之间、4和6之间、8和10之间、或6和8之间。最合适地,p例如约为5。

[0461] 在一个实施方案中,本发明的ADC包括下式:

[0462] 

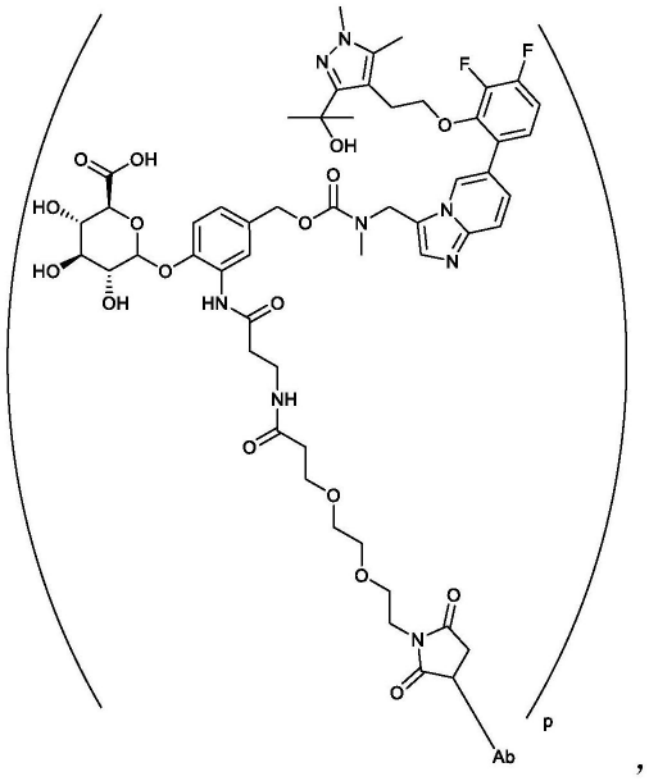
[0463] 其中Ab为如本文定义的抗体并且p如本文定义。合适地,本发明的ADC或其盐通过抗体上半胱氨酸氨基酸侧链上的巯基与抗体结合。合适地,抗体为曲妥珠单抗或利妥昔单抗,尤其是曲妥珠单抗。或者,抗体为沙西妥珠单抗。或者,抗体是伊非那他单抗。合适地,p介于1至10之间,例如p介于2和6之间、4和6之间、8和10之间、或6和8之间。最合适的是,p例如约为5。

[0464] 在一个实施方案中,本发明的ADC包括下式:

[0465] 

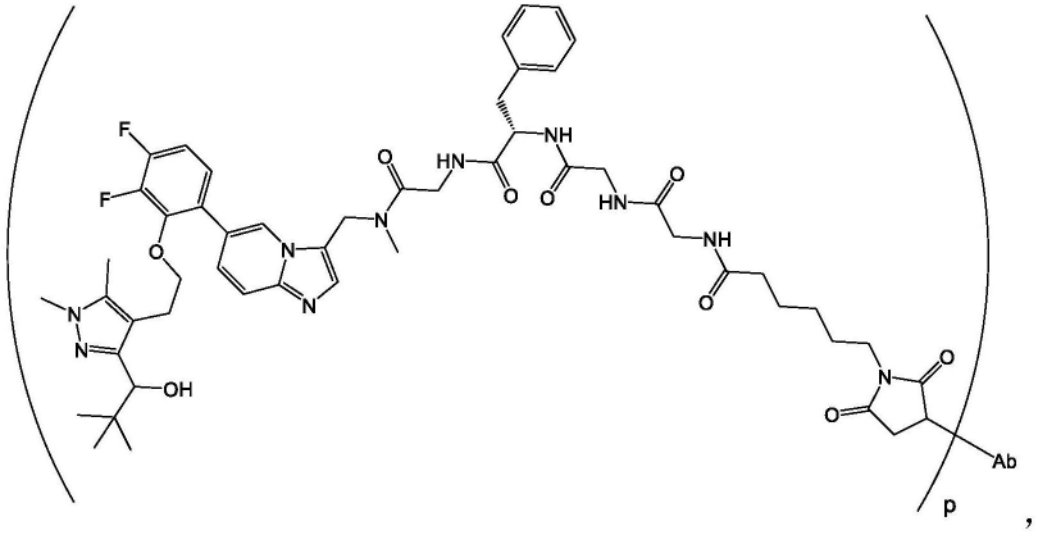
[0466] 其中Ab为如本文定义的抗体并且p如本文定义。合适地,本发明的ADC或其盐通过抗体上半胱氨酸氨基酸侧链上的巯基与抗体结合。合适地,抗体为曲妥珠单抗或利妥昔单抗,尤其是曲妥珠单抗。合适地,p介于1至10之间,例如p介于2和6之间、4和6之间、8和10之间、或6和8之间。最合适地,p例如约为5。

[0467] 在一个实施方案中,本发明的ADC包括下式:

[0468] 

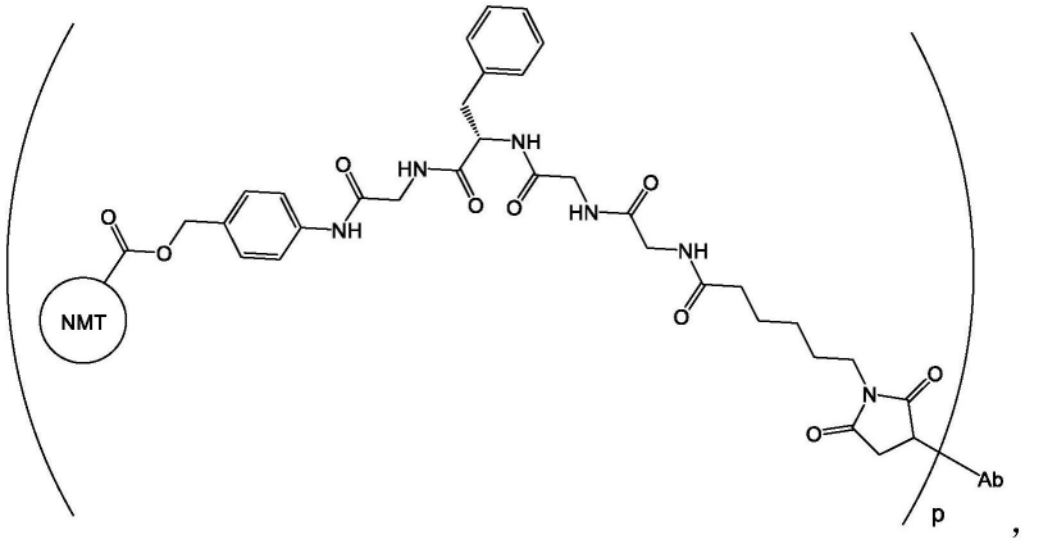
[0469] 其中Ab为如本文定义的抗体并且p如本文定义。合适地,本发明的ADC或其盐通过抗体上半胱氨酸氨基酸侧链上的巯基与抗体结合。合适地,抗体为曲妥珠单抗或利妥昔单抗,尤其是曲妥珠单抗。或者,抗体为沙西妥珠单抗。或者,抗体是伊非那他单抗。合适地,p介于1至10之间,例如p介于2和6之间、4和6之间、8和10之间、或6和8之间。最合适地,p例如约为5。

[0470] 在一个实施方案中,本发明的ADC包括下式:

[0471] 

[0472] 其中Ab为如本文定义的抗体并且p如本文定义。合适地,本发明的ADC或其盐通过抗体上半胱氨酸氨基酸侧链上的巯基与抗体结合。合适地,抗体为曲妥珠单抗或利妥昔单抗,尤其是曲妥珠单抗。或者,抗体为沙西妥珠单抗。或者,抗体是伊非那他单抗。合适地,p介于1至10之间,例如p介于2和6之间、4和6之间、8和10之间、或6和8之间。最合适地,p例如约为5。

[0473] 在一个实施方案中,本发明的ADC包括下式:

[0474] 

[0475] 其中Ab为如本文定义的抗体并且p如本文定义。NMT是一种NMT抑制剂。合适地,NMT抑制剂是式(VI)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂是式(VIA)的化合物或其盐。合适地,本发明的ADC或其盐通过抗体上半胱氨酸氨基酸侧链上的巯基与抗体结合。合适地,抗体为曲妥珠单抗或利妥昔单抗,尤其是曲妥珠单抗。或者,抗体为沙西妥珠单抗。或者,抗体是伊

非那他单抗。合适地,p介于1至10之间,例如p介于2和6之间、4和6之间、8和10之间、或6和8之间。最合适地,p例如约为5。

[0476] 药物偶联物

[0477] 本发明的ADC可以使用随后共价结合抗体的药物偶联物或其盐和/或溶剂化物来制备。因此,在一个实施方案中,提供了药物偶联物或其盐和/或溶剂化物,其包含能够与抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团例如巯基形成共价键的基团。

[0478] 在一个实施方案中,药物偶联物具有下式:

[0479] A_a-W_w-Y_y-NMT(式(X))

[0480] 或其盐和/或溶剂化物,

[0481] 其中:

[0482] A为第一延伸单元,其存在时包含能够与抗体的链末端(如N末端)或氨基酸侧链上的官能团例如巯基形成共价键的基团;

[0483] NMT是如上定义的NMT抑制剂;且

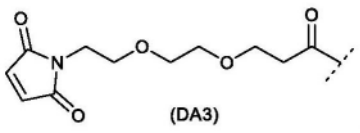
[0484] a、W、w、Y和y如上所定义。

[0485] 应当理解,本文公开的关于式(VII)的ADC的优选情况和实施方案同样适用于式(X)的药物偶联物。

[0486] NMT抑制剂与第二延伸单元(Y)(当存在时)形成共价键,或当Y不存在时,则与氨基酸单元或葡糖苷酸单元(W)形成共价键。合适地,NMT抑制剂上的官能团是氨基或醇,例如氨基。当NMT抑制剂通过氨基形成共价键时,所述氨基必须具有可用的氢原子,以便与连接子中、具体地第二延伸单元(Y)中的相应的官能团(例如羰基)发生反应,或者当Y不存在时,与氨基酸单元或葡糖苷酸单元(W)发生反应,即氨基不能是叔氨基。

[0487] 在一个实施方案中,能够与抗体的链末端(例如N末端)或氨基酸侧链上的官能团形成共价键的基团是马来酰亚胺部分。

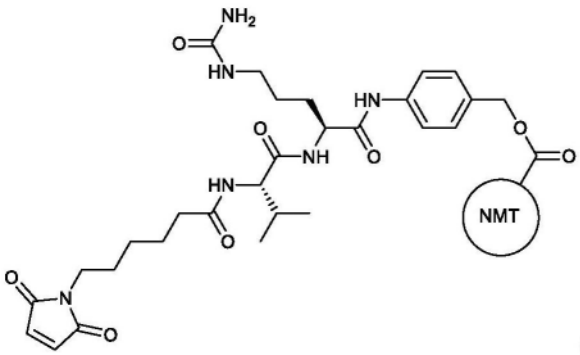
[0488] 在一个实施方案中,A为:

[0489] 

,

[0490] 其中 表示与W的连接点。

[0491] 在一个实施方案中,药物偶联物是式(DC-1)的化合物:

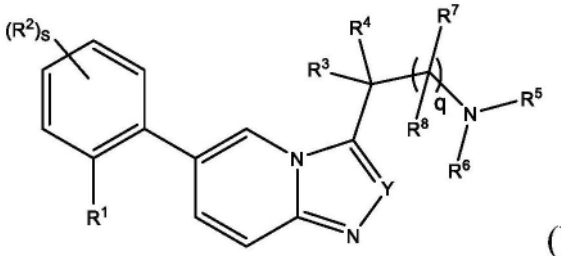
[0492] 

(DC-1),

[0493] 或其盐和/或溶剂化物,其中为NMT抑制剂。合适地,NMT抑制剂是式(VI)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂是式(VIA)的化合物或其盐。

[0494] 本领域技术人员应当理解,本文所用的短语“为NMT抑制剂”是指NMT抑制剂(例如包含用于连接到连接子的合适官能团(例如氨基(其包含氢原子)或醇(-OH))的NMT抑制剂)与连接子上的合适官能团(例如羰基)反应而形成连接子-NMT抑制剂共价键后剩余的部分。

[0495] 当NMT抑制剂为式(VI)的化合物时,本文公开的任一实施方案中的表示:

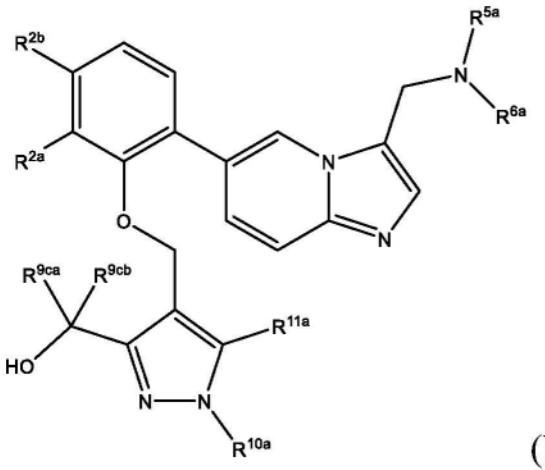
[0496] 

(VI)

[0497] 其中所有变量如上所定义;

[0498] 其中R_5和R_6中的一个基团不存在,使得N原子可与连接子形成共价键。

[0499] 类似地,当NMT抑制剂为式(VIA)的化合物时,本文公开的任一实施方案中的表示:

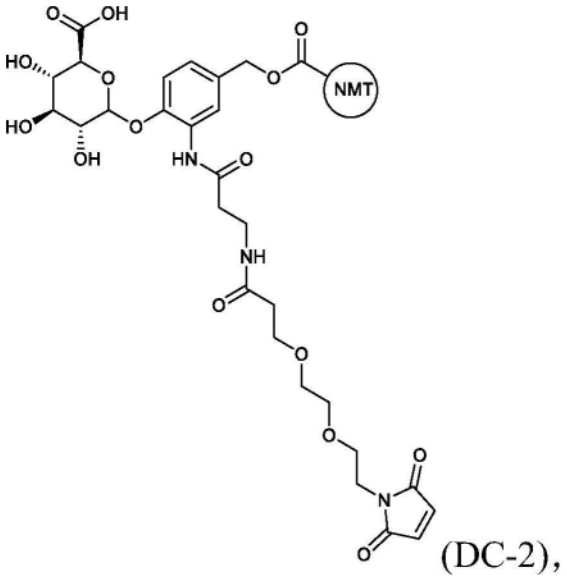
[0500] 

(VIA),

[0501] 其中所有变量如上所定义;

[0502] 其中R_5和R_6中的一个基团不存在,使得N原子可与连接子形成共价键。

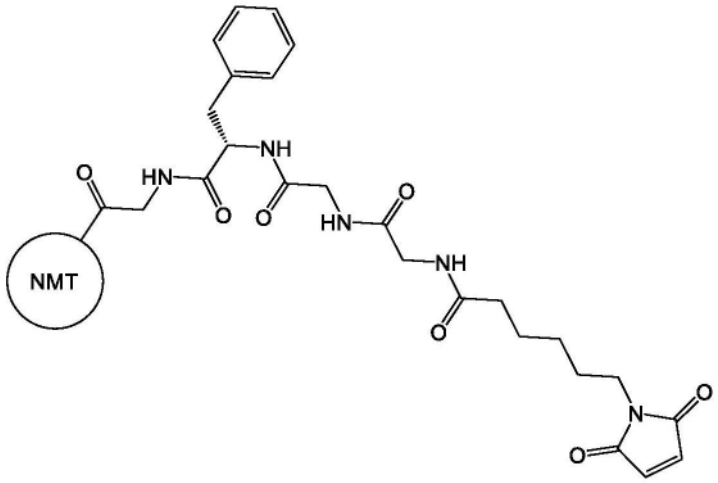
[0503] 在一个实施方案中,药物偶联物具有式(DC-2):

[0504] 

(DC-2),

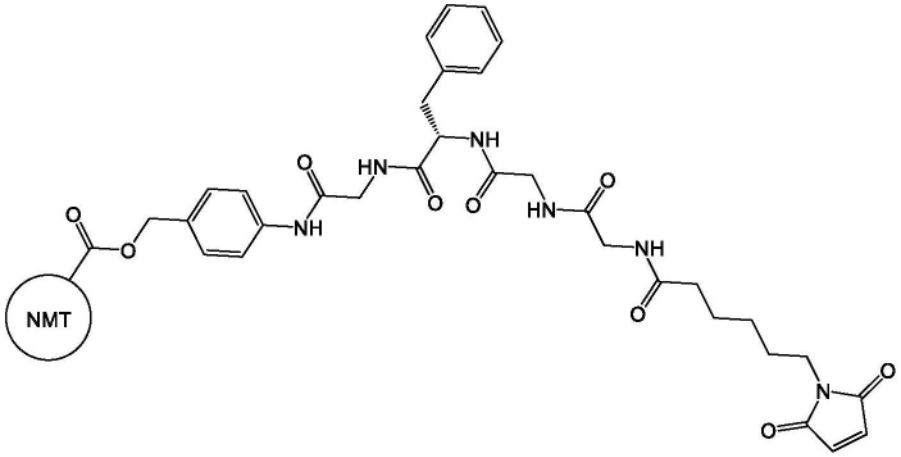
[0505] 或其盐和/或溶剂化物,其中(NMT)为NMT抑制剂。合适地,NMT抑制剂是式(VI)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂是式(VIA)的化合物或其盐。

[0506] 在一个实施方案中,药物偶联物是式(DC-5)的化合物:

[0507] 

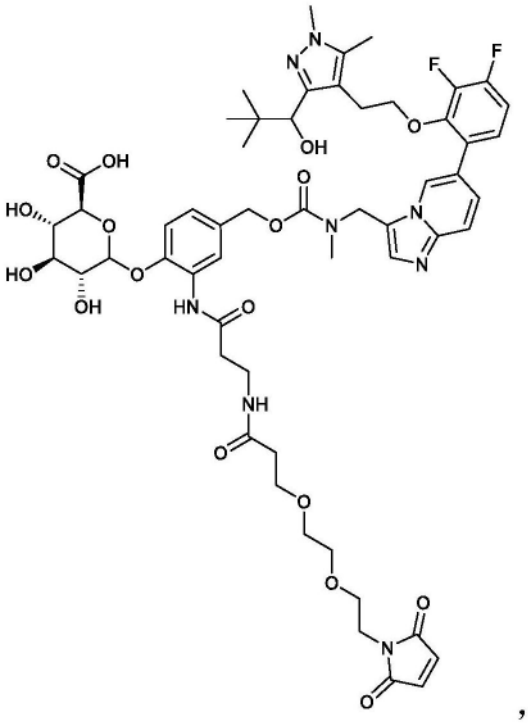
[0508] 或其盐和/或溶剂化物,其中(NMT)为NMT抑制剂。合适地,NMT抑制剂是式(VI)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂是式(VIA)的化合物或其盐。

[0509] 在一个实施方案中,药物偶联物是式(DC-6)的化合物:

[0510] 

[0511] 或其盐和/或溶剂化物,其中(NMT)为NMT抑制剂。合适地,NMT抑制剂是式(VI)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂是式(VIA)的化合物或其盐。

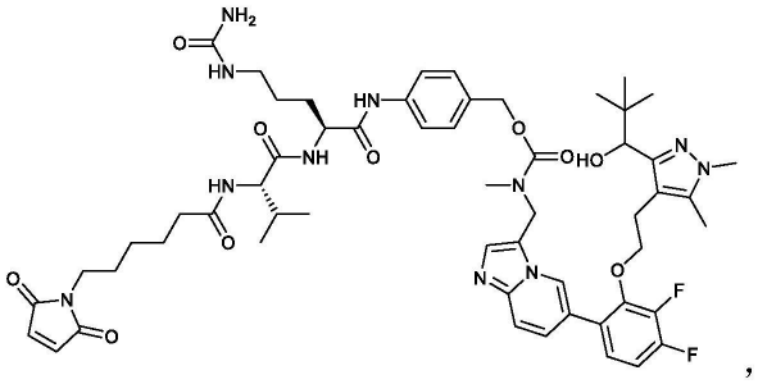
[0512] 在一个实施方案中,药物偶联物为(1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}-2-[3-(3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙酰氨基)丙酰氨基]苯氧基)-3,4-二羟基-2-甲基环己烷-1-甲酸:

[0513] 

,

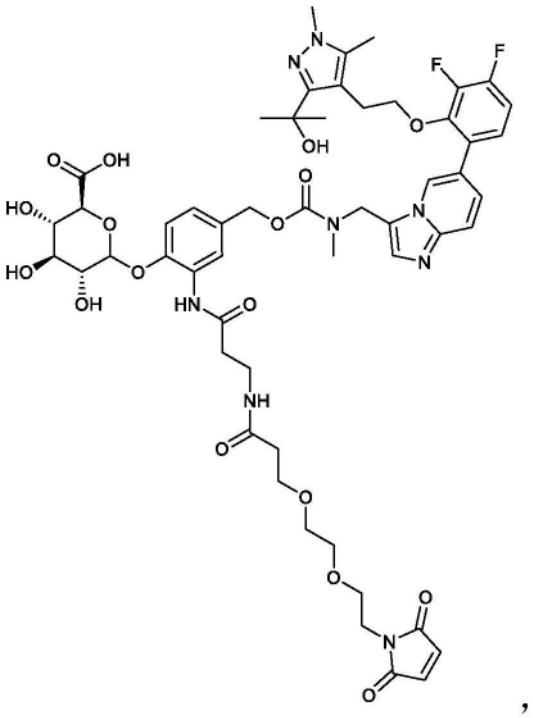
[0514] 或其盐和/或溶剂化物。

[0515] 在一个实施例中,药物偶联物是N-{[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}-N-甲基氨基甲酸{4-[(2S)-5-(氨基甲酰氨基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基]-3-甲基丁酰氨基]戊酰氨基]苯基}甲基酯:

[0516] 

[0517] 或其盐和/或溶剂化物。

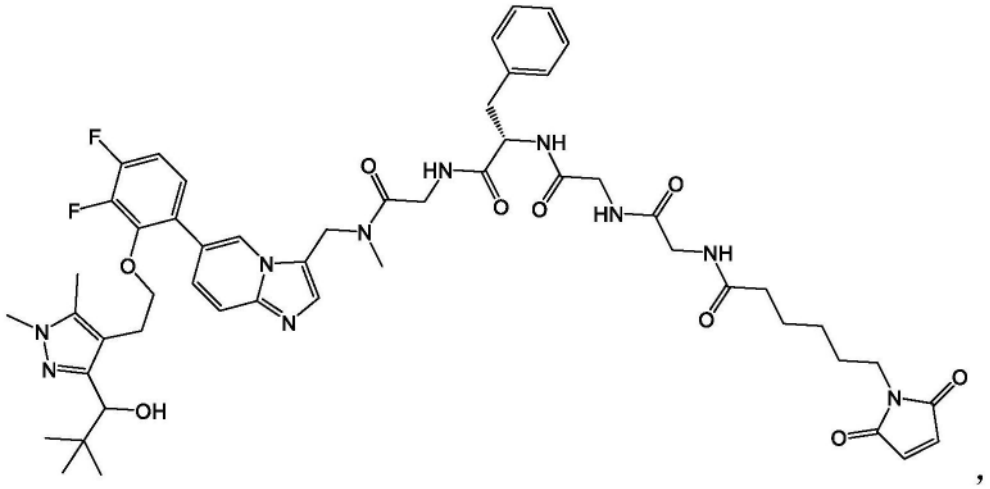
[0518] 在一个实施方案中,药物偶联物为(1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(2-羟基丙-2-基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}-2-[3-(3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙酰氨基)丙酰氨基]苯氧基)-3,4-二羟基-2-甲基环己烷-1-甲酸:

[0519] 

[0520] 或其盐和/或溶剂化物。

[0521] 在一个实施方案中,药物偶联物为N-[({[(1-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-

[0522] 2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)甲基]氨基甲酰基}-2-苯基乙基)氨基甲酰基]甲基}氨基甲酰基)甲基]-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺:

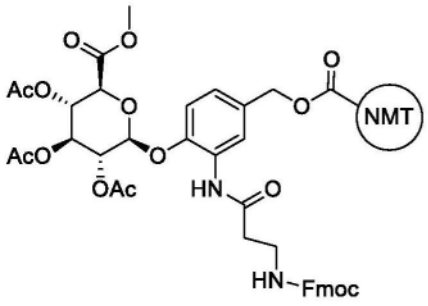
[0523] 

[0524] 或其盐和/或溶剂化物。

[0525] 药物偶联物可以盐的形式提供。药物偶联物以溶剂化物的形式提供。药物偶联物可以盐的溶剂化物形式提供。合适地,提供了药物偶联物。

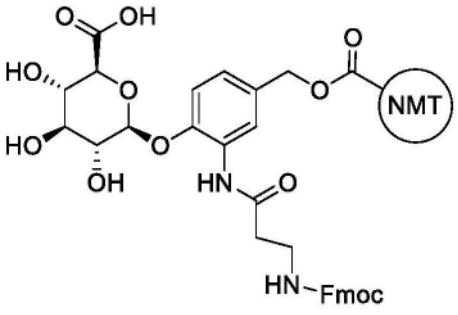
[0526] 本发明还提供了可用于制备药物偶联物的中间体化合物。

[0527] 在一个实施方案中,提供了化学式(ADC-I)的化合物:

[0528] 
(ADC-I),

[0529] 或其盐和/或溶剂化物,其中NMT为NMT抑制剂。合适地,NMT抑制剂是式(VI)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂是式(VIA)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂为1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}-2,2-二甲基丙-1-醇,或其盐。

[0530] 在一个实施方案中,提供了化学式(ADC-II)的化合物:

[0531] 
(ADC-II),

[0532] 或其盐和/或溶剂化物,其中NMT为NMT抑制剂。合适地,NMT抑制剂是式(VI)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂是式(VIA)的化合物或其盐。合适地,NMT抑制剂为1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}-2,2-二甲基丙-1-醇,或其盐。

[0533] 在一个实施方案中,本发明提供一种选自由以下组成的组的化合物:

[0534] 碳酸{4-[(2S)-5-(氨基甲酰氨基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基]-3-甲基丁酰氨基]戊酰氨基]苯基}甲基酯4-硝基苯基酯;

[0535] (1S,2R,3S,4R,5R)-5-[2-(3-{[(9H-芴-9-基氧基)羰基]氨基}丙酰胺)-4-({[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基}甲基)苯氧基]-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸;

[0536] (1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}-2-(3-{[(9H-芴-9-基氧基)羰基]氨基}丙酰氨基)苯氧基)-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸;和

[0537] (1S,2R,3S,4R,5R)-5-[2-(3-氨基丙酰氨基)-4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}苯氧基]-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸,

[0538] 或其任一者的盐和/或溶剂化物。

[0539] 应当理解,为了在医疗中使用,本发明的ADC的盐应该是药学上可接受的。本发明的ADC的非药学上可接受的盐可用于其他情况,例如在制备本发明的ADC期间使用。本领域技术人员将清楚了解合适的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括Berge等人(1977)描述的那些。此类药学上可接受的盐包括酸和碱加成盐。药学上可接受的酸加成盐可以与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸或磷酸)和有机酸(例如琥珀酸、马来酸、乙酸、富马酸、柠檬酸、酒石酸、苯甲酸、对甲苯磺酸、甲磺酸或萘磺酸)形成。举例而言,在本发明的ADC的分离中可以使用其他盐,例如草酸盐或甲酸盐,并且其包括在本发明的范围内。

[0540] 本发明的某些ADC可以与一当量或多当量的酸形成酸加成盐。本发明的范围内包括所有可能的化学计量和非化学计量形式。

[0541] 应当理解,本发明涵盖本发明ADC的所有异构体,包括所有几何、互变异构和光学形式,及其混合物(例如外消旋混合物)。当本发明的ADC中存在额外的手性中心时,本发明的范围内包括所有可能的非对映异构体,包括其混合物。不同的异构形式可以通过常规方法彼此分离或拆分,或者任何给定的异构体可以通过常规合成方法或通过立体定向或不对称合成获得。

[0542] 本公开包括本文提供的本发明的ADC的所有同位素形式,无论其形式为(i)其中给定原子序数的所有原子均具有自然界中占主导地位的质量数(或质量数的混合)(本文中称为“天然同位素形式”),还为(ii)其中一个或多个原子被具有与自然界中占主导地位的原子相同的原子序数但质量数与后者的质量数不同的原子取代(本文中称为“非天然变体同位素形式”)。据了解,原子可能自然地以不同质量数的混合物的形式存在。术语“非天然变体同位素形式”还包括这样的实施方案,其中具有自然界中不太常见的质量数的给定原子序数的原子(本文中称为“不常见同位素”)的比例相对于自然存在的同位素有所增加,例如按该原子序数的原子数量计增加到>20%、>50%、>75%、>90%、>95%或>99%的水平(后一种实施方案称为“同位素富集变体形式”)。术语“非天然变体同位素形式”还包括不常见同位素的比例相对于天然存在的同位素的比例减少的实施例。同位素形式可能包括放射性形式(即它们包含放射性同位素)和非放射性形式。放射性形式通常是同位素富集的变体形式。

[0543] 因此,本发明的ADC的非天然变体同位素形式可以在一个或多个原子中包含一种或多种人造或罕见的同位素,例如氘(^{2}H或D)、碳-11(^{11}C)、碳-13(^{13}C)、碳-14(^{14}C)、氮-13(^{13}N)、氮-15(^{15}N)、氧-15(^{15}O)、氧-17(^{17}O)、氧-18(^{18}O)、磷-32(^{32}P)、硫-35(^{35}S)、氯-36(^{36}Cl)、氯-37(^{37}Cl)、氟-18(^{18}F)、碘-123(^{123}I)、碘-125(^{125}I),或者可以在一个或多个原子中包含与自然界中占主导地位的比例相比,比例增加的所述同位素。

[0544] 例如,包含放射性同位素的非天然变体同位素形式可用于药物和/或底物组织分布研究。放射性同位素氚(即^{3}H)和碳-14(即^{14}C)由于其易于掺入且易于检测,因此特别适用于此目的。掺入氘即^{2}H或D的非天然变体同位素形式可由于代谢稳定性更高而带来某些治疗优势,例如体内半衰期增加或剂量需求减少,此在一些情况下可为优选的。此外,可以制备非天然变体同位素形式,其包含正电子发射同位素,例如^{11}C、^{18}F、^{15}O和^{13}N,其可用于正电子发射断层扫描(PET)研究以检查底物受体占有率。

[0545] 在一个实施方案中,本发明的ADC或其盐以天然同位素形式提供。

[0546] 在一个实施方案中,本发明的ADC或其盐以非天然变体同位素形式提供。在具体实施方案中,非天然变体同位素形式是指在本发明ADC或其盐的一个或多个原子的化学结构中明确存在氢时掺入氘(即^{2}H或D)的形式。在一个实施方案中,本发明的ADC或其盐的原子处于非放射性的同位素形式。在一个实施方案中,本发明的ADC或其盐的一个或多个原子处于具有放射活性的同位素形式。合适地,放射性同位素是稳定同位素。合适地,非天然变体同位素形式是药学上可接受的形式。

[0547] 在一个实施方案中,提供了本发明的ADC或其盐,其中化合物的单个原子以非天然变体同位素形式存在。在另一个实施方案中,提供了本发明的ADC或其盐,其中两个或多个原子以非天然变体同位素形式存在。

[0548] 非天然同位素变体形式通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过本文描述的方法(例如,与随附实施例中描述的用于制备天然同位素形式的方法类似的方法)来制备。因此,可以通过使用合适的同位素变体(或标记)试剂代替实施例中所用的正常试剂来制备非天然同位素变体形式。由于本发明的ADC意图用于药物组合物,因此很容易理解,它们各自优选以基本上纯的形式提供,例如至少60%纯的,更合适地至少75%纯的,优选至少85%纯的,尤其是至少98%纯的(%是以重量为基准)。不纯的化合物制剂可用于制备药物组合物中所用的更纯的形式。

[0549] 一般而言,本发明的ADC可以根据本领域技术人员已知的有机合成技术以及下面列出的代表性方法、实施例中的方法及其修改形式来制备。

[0550] 本发明的ADC的用途

[0551] 本文使用的术语“预防”或“防止”是指提前提供,因此可能涉及预防受试者的疾病或病症的症状或防止患病受试者的疾病或病症症状复发,并且不限于完全预防病症。

[0552] 本文使用的术语“治疗”包括控制、缓解、减少或调节疾病状态或其症状。

[0553] 人NMT的抑制

[0554] 如上所述,抑制人NMT已被认为是治疗或预防各种疾病或病症的目标。本发明提供了包含人NMT抑制剂的ADC。本文使用的术语“人NMT抑制剂”意图涵盖与人NMT结合的任何部分。合适地,人NMT为HsNMT1。所述抑制剂可以充当竞争性抑制剂,或部分竞争性抑制剂。所述抑制剂可能在myr-CoA结合口袋或肽结合口袋与人NMT结合(或通过另一种机制抑制人

NMT)。由于本发明的ADC或其药学上可接受的盐包含为人NMT抑制剂的NMT抑制剂,因此预期在NMT抑制剂从本发明的ADC中细胞内释放后,NMT抑制剂会通过肽结合口袋合适地结合并抑制人NMT。

[0555] 因此,本发明的ADC或其药学上可接受的盐有望用于治疗或预防与人NMT活性相关的疾病或病症,或有望用于治疗或预防通过靶向人NMT活性而产生的疾病或病症,例如癌症等过度增殖性疾病。因此,本发明提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐用作药物。

[0556] 还提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐,用于治疗或预防其中抑制人NMT提供治疗或预防效果的疾病或病症。在一个实施方案中,提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐,用于治疗其中抑制人NMT提供治疗效果的疗疾病或病症。在一个实施方案中,提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐,用于预防其中抑制人NMT提供预防效果的疗疾病或病症。

[0557] 本发明还提供了一种治疗或预防受试者的疾病或病症的方法,其中抑制人NMT可在受试者(例如哺乳动物,例如人类)中提供治疗或预防效果,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的ADC、或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载剂。本发明还提供了一种治疗受试者的疾病或病症的方法,其中抑制人NMT可在受试者(例如哺乳动物,例如人类)中提供治疗效果,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的ADC、或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载剂。本发明还提供了一种预防受试者的疾病或病症的方法,其中抑制人NMT可在受试者(例如哺乳动物,例如人类)中提供预防效果,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本发明的ADC、或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载剂。

[0558] 本发明还提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐用于制造药物的用途,所述药物用于治疗或预防其中抑制人NMT提供治疗或预防效果的疾病或病症。本发明还提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐用于制造药物的用途,所述药物用于治疗其中抑制人NMT提供治疗效果的疾病或病症。本发明还提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐用于制造药物的用途,所述药物用于预防其中抑制人NMT提供预防效果的疾病或病症。

[0559] 过度增殖性病症

[0560] 由于本发明的ADC具有细胞毒活性,因此预期本发明的ADC或其药学上可接受的盐可用于治疗或预防过度增殖性病症。

[0561] 因此,本发明提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐,用于治疗或预防过度增殖性病症。在一个尤其合适的实施方案中,本发明的ADC或其药学上可接受的盐用于治疗过度增殖性病症。

[0562] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐在制造用于治疗或预防过度增殖性病症的药物中的用途。在一个尤其合适的实施方案中,本发明提供了本发明的ADC或其药学上可接受的盐在制造用于治疗过度增殖性病症的药物中的用途。

[0563] 在一个实施方案中,本发明提供了一种治疗或预防受试者的过度增殖性病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的本发明的ADC或其药学上可接受的盐。在一个尤其合适的实施方案中,本发明提供了一种治疗受试者的过度增殖性病症方法,所述方法包括施用治疗有效量的本发明的ADC或其药学上可接受的盐。

[0564] 在一个实施方案中,过度增殖性病症为癌症。

[0565] 在一个实施方案中,癌症是选自由以下组成的组的血液系统恶性肿瘤:淋巴瘤(例如B细胞淋巴瘤,特别是选自由高级别套区淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤组成的组的淋巴瘤)、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)、白血病(例如选自慢性淋巴细胞白血病、AML和B急性淋巴细胞白血病的白血病)和黑色素瘤(例如选自由浅表扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、无黑色素黑色素瘤和肢端雀斑样痣性黑素瘤组成的组的黑色素瘤)。

[0566] 癌症可以另外地或可替代地是选自由脑癌、肺癌、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌或乳腺侵袭性癌)、前列腺癌、卵巢癌、结直肠癌(例如结肠癌)、胆囊癌、肾癌和肝癌组成的组的实体肿瘤。例如,癌症可以是卵巢浆液性囊腺癌、食道癌、肺鳞状细胞癌、肺腺癌、膀胱尿路上皮癌、子宫癌肉瘤、胃腺癌、乳腺侵袭性癌或肝细胞癌。在一个合适的实施方案中,癌症是乳腺癌,例如三阴性乳腺癌或乳腺侵袭性癌。在一个合适的实施方案中,癌症是脑癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、胆囊癌或肾癌。在某些实施方案中,癌症是乳腺癌、结肠癌或胆囊癌。

[0567] 癌症还可以另外或替代地是母细胞瘤,特别是神经母细胞瘤,例如视网膜母细胞瘤、胶质母细胞瘤、小细胞肺癌或星形细胞瘤。

[0568] 在特别合适的实施方案中,癌症可以选自由以下组成的组:血液系统恶性肿瘤(例如淋巴瘤,特别是B细胞淋巴瘤(例如高级别套区淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤)、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)或白血病(例如慢性淋巴细胞白血病、AML和B-急性淋巴细胞白血病))、实体瘤(例如脑、肺、乳腺(例如三阴性乳腺癌或乳腺侵袭性癌)、前列腺、卵巢、结直肠(例如结肠)、胆囊、肾或肝癌、或神经母细胞瘤(例如视网膜母细胞瘤、胶质母细胞瘤、小细胞肺癌或星形细胞瘤)),和黑色素瘤(例如浅表扩散性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、无黑色素黑色素瘤和肢端雀斑样痣性黑素瘤)。

[0569] 在合适的实施方案中,癌症可以选自由以下组成的组:弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、AML以及B急性淋巴细胞白血病。在合适的实施方案中,癌症可以选自由以下组成的组:弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、神经母细胞瘤、AML、B急性淋巴细胞白血病和乳腺癌。在合适的实施方案中,癌症可以选自由以下组成的组:弥漫性大B细胞淋巴瘤、神经母细胞瘤、B急性淋巴细胞白血病和三阴性乳腺癌。在合适的实施方案中,癌症可以选自由以下组成的组:弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、AML、B急性淋巴细胞白血病和三阴性乳腺癌。在合适的实施方案中,癌症可以选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、AML、B急性淋巴细胞白血病和三阴性乳腺癌。在合适的实施方案中,癌症可以选自由以下组成的组:多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤和三阴性乳腺癌。

[0570] 在一个合适的实施方案中,癌症表达HER2蛋白,即癌症含有细胞表面具有HER2蛋白的细胞。HER2蛋白在多种肿瘤中过度表达,可以采用本领域中常用的方法进行评估,例如采用免疫组织化学染色(IHC)评估HER2蛋白的过度表达,或采用荧光原位杂交(FISH)评估HER2基因的扩增。

[0571] 合适地,表达HER2蛋白的癌症选自由以下组成的组:肺癌、尿路上皮癌、结直肠癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃癌(例如胃腺癌)、胃肠道间质瘤、宫颈癌、食道癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌、子宫

癌、唾液腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌和阴茎癌,例如乳腺癌。

[0572] 在一个实施方案中,癌症为HER2阳性乳腺癌。

[0573] 在一个合适的实施方案中,癌症表达CD20。癌细胞的CD20表达可以使用本领域中常用的方法来评估,例如免疫组织化学染色(IHC)。合适地,表达CD20的癌症是淋巴瘤(例如高级别套区淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、浆母细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤或伯基特淋巴瘤)、骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)或白血病(例如慢性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病(AML)或B急性淋巴细胞白血病)。

[0574] 在一个合适的实施方案中,癌症是如WO2020/128475中所述的MYC成瘾癌症,所述文献的全部内容出于定义MYC成瘾癌症的目的通过引用并入本文。

[0575] 组合疗法

[0576] 尽管本发明的ADC或其药学上可接受的盐可以用作药物中的唯一活性成分,但是本发明的ADC或其药学上可接受的盐也可以与一种或多种其他治疗剂组合使用。因此,本发明还提供本发明的ADC或其药学上可接受的盐组合另一种治疗剂。所述另一种治疗成分可以同时、顺序或分开施用。本发明还提供了一种由多个部分构成的试剂盒,所述多个部分包含:(a)第一药物组合物,其包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载剂;和(b)第二药物组合物,其包含另一种治疗剂和药学上可接受的载剂。此类另外的治疗剂可以是本发明的ADC或其药学上可接受的盐。

[0577] 本发明的ADC或其药学上可接受的盐可以与一种或多种另外的治疗剂组合使用,所述另外的治疗剂可用于治疗或预防过度增殖性病症,例如癌症或其中抑制人NMT提供治疗或预防效果的另一疾病或病症。此类组合的各组分可在治疗过程期间在不同时间分开地施用或以分开的或单一的组合形式同时施用。本发明因此应被理解为包括同时或交替治疗的所有此类方案,并且术语“施用”应被相应地解释。应当理解,本发明的ADC或其药学上可接受的盐与用于治疗或预防疾病或病症(其中抑制人NMT提供治疗或预防作用)的其他治疗剂的组合范围原则上包括与用于治疗或预防疾病或病症(其中抑制人NMT提供治疗或预防作用)的任何药物组合物的任何组合。

[0578] 另外的治疗剂当与本发明的ADC或其药学上可接受的盐组合使用时,可以使用例如《医师用药手册(Physicians’Desk Reference)》(PDR)中针对该药剂指示的量,或者由本领域普通技术人员以其他方式确定的量。当本发明的ADC或其药学上可接受的盐与一种或多种另外的治疗剂组合使用时,无论是同时使用还是顺序使用,以下组合比率和剂量范围是合适的:当与另一种治疗剂组合使用时,所使用的本发明的ADC或其药学上可接受的盐与另一种治疗剂的重量比可以例如在约10:1至约1:10的范围内。

[0579] 在一个实施方案中,当本发明的ADC或其药学上可接受的盐用于治疗或预防癌症时,本发明的ADC或其药学上可接受的盐可以与一种或多种另外的治疗剂同时或顺序组合使用,用于治疗或预防癌症。更合适地,当本发明的ADC或其药学上可接受的盐用于治疗癌症时,本发明的ADC或其药学上可接受的盐可以与一种或多种另外的治疗剂同时或顺序组合使用,用于治疗癌症。

[0580] 可以与NMT抑制剂组合施用的其他治疗剂的合适但非限制性实例包括一种或多种其他化疗剂。

[0581] 合适地,化疗剂选自由以下组成的组:氟尿嘧啶(5-FU)、帕妥珠单抗、太平洋紫杉

醇、卡铂、顺铂、吉西他滨、卡培他滨、伊立替康(CPT-11)、太平洋紫杉醇、多西他赛、培美曲塞、索拉非尼、长春花碱、长春瑞滨、依维莫司、坦螺旋霉素(tanespimycin)、贝伐单抗、奥沙利铂、拉帕替尼、恩美曲妥珠单抗(ado-trastuzumab emtansine,TDM1)或国际公布WO 2003/038043号中描述的药物、LH-RH类似物(例如亮丙瑞林或戈舍瑞林)、磷酸雌莫司汀、雌激素拮抗剂(例如他莫昔芬或雷洛昔芬)和芳族酶抑制剂(例如阿那曲唑、来曲唑或依西美坦)。

[0582] 此类联合治疗可以通过同时、顺序或分开给予本发明的ADC或其药学上可接受的盐和一种或多种其他治疗剂来实现。此类组合产品可采用任何合适剂量范围内,例如本文所述的剂量范围的本发明的ADC或其药学上可接受的盐,而其他药物活性剂可在其批准的剂量范围内。

[0583] 剂量和制剂

[0584] 本领域技术人员应当理解,本发明的ADC或其药学上可接受的盐的合适剂量以及包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐的组合物的合适剂量可因患者而异。确定最优剂量一般将涉及在治疗益处的水平和任何风险或有害副作用之间进行平衡。所选剂量水平将取决于多种因素,包括但不限于具体ADC的活性、施用途径、施用时间、ADC的排泄速率、治疗持续时间、组合使用的其他药物、ADC和/或材料、病情严重程度,以及患者的物种、性别、年龄、体重、病情、一般健康状况和既往病史。ADC的量和施用途径将最终由内科医生、兽医或临床医生酌定,但是总体上所选剂量将在作用部位获得局部浓度,实现所需效果而不导致大致上有害或有毒的副作用。

[0585] 施用可在整个治疗过程中以一次剂量、连续或间歇地(例如在合适的时间间隔下,以分剂量)实现。确定最有效施用方式和剂量的方法为本领域技术人员熟知并将随着用于治疗的制剂、治疗目的、所治疗的靶细胞和所治疗的受试者而变化。单次或多次施用可根据由施治的内科医生、兽医或临床医生选择的剂量水平和模式来执行。

[0586] 通常,ADC的合适剂量在每天每千克受试者体重约100ng至约25mg(更典型地约1μg至约10mg)的范围内。当ADC为盐、酯、酰胺、前药等时,施用量基于母体ADC来计算,因此待使用的实际重量成比例增加。

[0587] 在一个实施方案中,本发明的ADC或其药学上可接受的盐按照以下剂量方案施用于人类患者:约100mg,每日3次。在一个实施方案中,本发明的ADC或其药学上可接受的盐按照以下剂量方案施用于人类患者:约150mg,每日2次。在一个实施方案中,本发明的ADC或其药学上可接受的盐按照以下剂量方案施用于人类患者:约200mg,每日2次。在一个实施方案中,本发明的ADC或其药学上可接受的盐按照以下剂量方案施用于人类患者:约50或约75mg,每日3或4次。在一个实施方案中,本发明的ADC或其药学上可接受的盐按照以下剂量方案施用于人类患者:约100或约125mg,每日2次。

[0588] 上述剂量可适用于本发明的ADC或其药学上可接受的盐(包括NMT抑制剂和抗体连接子)或适用于所提供的NMT抑制剂的有效量,例如连接子裂解后可释放的NMT抑制剂的量。

[0589] 为预防或治疗疾病,本发明ADC的合适剂量将取决于如上文所定义的欲治疗疾病的类型、疾病的严重性和病程、所述分子是出于预防还是治疗的目的施用、既往疗法、患者的临床病史和对抗体的反应,以及主治医生的判断。本发明的ADC或其药学上可接受的盐适合一次或通过一系列治疗施用给患者。根据疾病的类型和严重程度,约1μg/kg至15mg/kg

(例如0.1-20mg/kg)的本发明ADC或其药学上可接受的盐是施用于患者的初始候选剂量,例如无论是否通过一次或多次分开的施用或者通过连续输注。典型的日剂量范围可以为约1μg/kg至100mg/kg或更多,这取决于上面提到的因素。施用于患者的本发明的ADC或其药学上可接受的盐的示例性剂量在约0.1至约10mg/kg患者体重的范围内。对于几天或更长时间内的重复施用(根据病情而定),维持治疗直到疾病症状发生所需的抑制。示例性给药方案包括施用约4mg/kg的初始负载剂量,然后每周、每两周或每三周施用本发明的ADC或其药学上可接受的盐的额外剂量的过程。可以使用其他的给药方案。通过常规技术和测定容易监控这种治疗的进程。

[0590] 虽然活性成分可以单独施用,但优选其存在于药物制剂或组合物中。因此,本发明提供了一种药物制剂或组合物,其包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载剂(本文统称为"载剂"材料)。本发明的药物组合物可以采用药物制剂的形式。

[0591] 因此,在一个实施方案中,本发明提供了包含本发明ADC或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载剂的药物组合物。

[0592] 在一个实施方案中,提供了包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物,用于治疗或预防如本文所述的疾病或病症。在一个实施方案中,提供了包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物,用于治疗如本文所述的疾病或病症。在一个实施方案中,提供了包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物,用于预防如本文所述的疾病或病症。

[0593] 在进一步的实施方案中,提供了一种治疗或预防如本文所述的疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物。在进一步的实施方案中,提供了一种治疗如本文所述的疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物。在进一步的实施方案中,提供了一种预防如本文所述的疾病或病症的方法,其包括向有需要的受试者施用有效量的包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物。本发明的药物组合物可以采用如下所述的药物制剂的形式。

[0594] 本发明还提供了包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物在制造用于治疗或预防本文所述疾病或病症的药物中的用途。本发明还提供了包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物在制造用于治疗本文所述疾病或病症的药物中的用途。本发明还提供了包含本发明的ADC或其药学上可接受的盐(例如药学上可接受的盐)的药物组合物在制造用于预防本文所述疾病或病症的药物中的用途。

[0595] 合适地,疾病或病症是过度增殖性病症,例如癌症。在一个合适的实施方案中,癌症是表达HER2蛋白的癌症。

[0596] 本发明的ADC或其药学上可接受的盐可以通过静脉内、皮肤、肌肉内或皮下注射或输注来施用。活性成分将以肠胃外可接受的水溶液的形式存在,所述溶液无热原并且具有合适的pH值、等渗性和稳定性。本领域的技术人员完全能够根据需要使用例如等渗媒介物

(例如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸林格氏注射液)、防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂来制备合适的溶液。

[0597] 在一个实施方案中,药物组合物还包含其他活性剂,例如其他治疗剂或预防剂。

[0598] 合适的载剂、稀释剂、赋形剂等可以在标准药学文本中找到。参见例如《药物添加剂手册》第2版(M.Ash和I.Ash编辑),2001(Synapse Information Resources,Inc.,Endicott,New York,USA)、《雷明顿药物科学》第20版,Lippincott,Williams&Wilkins出版,2000;且《药物赋形剂手册》第2版,1994。

[0599] 本发明的另一个方面涉及制备药物组合物的方法,包括将本发明的至少一种[11C]-放射标记ADC或其药学上可接受的盐与本领域技术人员熟知的一种或多种其他药学上可接受的成分(例如载剂、稀释剂、赋形剂等)混合。如果配制成离散单元(例如片剂等),则每个单元含有预定量(剂量)的活性化合物。

[0600] 如本文所用的术语“药学上可接受的”涉及在合理医学判断范围内适用于与相关受试者(例如,人)的组织接触地使用而没有过量毒性、刺激性、过敏反应、或其他问题或并发症、与合理的利益/风险比相称的化合物、成分、材料、组合物、剂型等。每种载剂、稀释剂、赋形剂等从与制剂的其他成分相容的角度上看也必须为“可接受的”。

[0601] 制剂可以通过制药领域熟知的任何方法制备。这些方法包括将本发明的ADC或其药学上可接受的盐与构成一种或多种辅助成分的载剂结合的步骤。通常,通过将本发明的ADC或其药学上可接受的盐与载剂(例如,液体载剂、细分的固体载剂等)均匀且紧密地结合,然后使产品成型(如果需要),以此来制备制剂。

[0602] 适用于肠胃外给药(例如通过注射或输注)的制剂包括水性或非水性、等渗、无热原、无菌液体(例如溶液、悬浮液),其中活性成分溶解、悬浮或以其他方式提供(例如在脂质体或其他微粒中)。此类液体还可含有其他药学上可接受的成分,例如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、悬浮剂、增稠剂和溶质,使得制剂与预期接受者的血液(或其他相关体液)等渗。赋形剂的实例包括,例如,水、醇、多元醇、甘油、植物油等。用于在此类制剂中使用的合适的等渗载剂的实例包括氯化钠注射液、林格氏溶液或乳酸化林格氏注射液。通常,本发明的ADC或其药学上可接受的盐在液体中的浓度为约1ng/ml至约10μg/ml,例如约10ng/ml至约1μg/ml。制剂可存在于单位剂量或多剂量密封容器中,例如,安瓿和小瓶,并且可存储于冷冻干燥(冻干)条件下,只需要在即将使用之前添加无菌液体载剂,例如注射用水。临时注射溶液和混悬液可由无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0603] 制剂可制备为提供快速或缓慢释放;立即、延迟、定时或持续释放;或其组合。

[0604] 在一些实施方案中,本发明的ADC或其药学上可接受的盐可以口服施用。口服施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉末或液体形式。片剂可包含固体载剂或佐剂。液体药物组合物通常包含液体载剂,例如水、石油、动物或植物油、矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液,葡萄糖或其他糖类溶液,或乙二醇,丙二醇或聚乙二醇等二醇类。胶囊可以包含固体载剂,例如明胶。

[0605] 在一个合适的实施方案中,通过输注或注射,特别是注射推注进行施用。

[0606] 本发明的ADC或其药学上可接受的盐有望表现出以下一种或多种有利特性:

[0607] -体内细胞毒活性,例如在生物实施例2的小鼠异种移植模型中所展现的;且

[0608] -体内耐受性,例如在生物实施例2、3、10、11、12和13的小鼠异种移植模型以及生

物实施例9的猴子模型中所展现的;

[0609] -对各种癌细胞系的体外细胞毒性,例如生物实施例4、6、7和14中所示;

[0610] -与已知对照相比,对胃癌类器官的功效有所改善,如生物实施例8中所示;且

[0611] -如生物实施例6中所示,旁观者效应有所改善。

[0612] 所述特性有望使本发明的ADC或其药学上可接受的盐适用于治疗或预防(例如治疗)过度增殖性病症,例如癌症或其中抑制人NMT提供治疗或预防效果的其他疾病或病症。

[0613] 实施例

[0614] 缩略词

[0615] ALT 丙氨酸转氨酶

[0616] AST 天冬氨酸转氨酶

[0617] ALP 碱性磷酸酶

[0618] GGT γ-谷氨酰转移酶

[0619] CK 肌酸激酶

[0620] LDH 乳酸脱氢酶

[0621] TP 总蛋白

[0622] ALB 白蛋白

[0623] GLO 球蛋白

[0624] A/G 白蛋白/球蛋白比率

[0625] TBIL 总胆红素

[0626] BU 血尿素氮

[0627] CRE 肌酸酐

[0628] BUN/C 血尿素氮/肌酸酐比值

[0629] GLU 葡萄糖

[0630] CHO 胆固醇

[0631] TG 甘油三酯

[0632] Na 钠

[0633] K 钾

[0634] C1 氯化物

[0635] Ca 钙

[0636] P 磷酸酯

[0637] WBC 白细胞

[0638] ABNEUT中性粒细胞

[0639] ABLYMP淋巴细胞

[0640] ABMONO单核细胞

[0641] ABBASO嗜碱性粒细胞

[0642] ABEOS 嗜酸性粒细胞

[0643] PLT 血小板

[0644] MPV 平均血小板体积

[0645] RBC 红细胞

[0646] HCT 血细胞比容

[0647] HGB 血红蛋白

[0648] MCV 平均红细胞体积

[0649] MCH 平均红细胞血红蛋白

[0650] MCHC 平均红细胞血红蛋白浓度

[0651] ABRETIC网织红细胞

[0652] QW每周一次

[0653] 实施例化合物的合成

[0654] 一般实验细节

[0655] LC-MS

[0656] 需要在碱性条件下纯化的化合物通常在配备有YMC Actus Triart C18 5μm(20x 250mm)柱或Gemini NX 5μm C18(100x 30mm)柱的LC-MS系统上,使用含有20mM碳酸氢铵的乙腈水溶液的梯度洗脱(30分钟内10-45%,然后95%乙腈持续2分钟)进行纯化。

[0657] HPLC

[0658] 某些化合物的纯度通过TyeEclipse Extend或XDB 5μm C18(150x 4.6mm)、Xbridge 5μm C18(100x 4.6mm)、Zorbax Extend 5μm C18(150x 4.6mm)或Shimadzu L柱2ODS 5μm C18(150x4.6mm)柱,使用含有10mM乙酸铵的乙腈水溶液的梯度洗脱15分钟(HPLC B)、17分钟(B1)和18分钟(B3)来确定。

[0659] 某些化合物的纯度通过分析型HPLC来确定,使用Poroshell 1202.7μm EC18(100x 4.6mm)、Luna Omega Polar 3μm C18(100x 4.6mm)、Xbridge 5μm C18(150x 4.6mm)或Sunfire 5μm C18(100x 4.6mm),使用含有0.05%三氟乙酸的乙腈水溶液梯度洗脱12分钟(HPLC A)、14分钟(A1)或17分钟(A2)和16分钟(A4)来进行。

[0660] 某些化合物的纯度通过分析型HPLC来确定,使用Gemini NX 3μm C18(100x 4.6mm)柱,使用含有0.05%甲酸的乙腈水溶液梯度洗脱16分钟(A6)来进行。

[0661] NMR

[0662] ^{1}H NMR和^{13}C谱分别在室温下在400MHz和101MHz仪器上记录,除非另有说明,否则均参考残留溶剂信号。数据呈现如下:化学位移(ppm)、积分、多重性(br=宽峰、s=单峰、d=双峰、t=三重峰、q=四重峰、p=五重峰、m=多重峰)和耦合常数(Hz)。

[0663] ADC测试方法

[0664] SEC-HPLC

[0665] 色谱柱:TOSOH TSKgel G3000SWXL 7.8mm x 30cm 5μm颗粒(MERCK808541)与安全保护柱(MERCK 822858)相结合,配有GFC3000 4x3mm柱芯(Phenomenex);缓冲液:0.2M磷酸盐,0.25MKCl,10% IPA;梯度:25℃下等度,0.5ml/min。上样量约为10μg,单体和浓度由214nm信号决定。单体基于峰积分报告,[ADC]mg/mL基于抗体校准曲线。

[0666] 用于残留NMT抑制剂的RP-HPLC

[0667] 色谱柱:Kinetex® 2.6μm C8 100 Å,LC色谱柱50x 4.6mm,(Phenomex 00B-4497-E0);流动相A 0.05% TFA的水溶液;流动相B0.05% TFA的CAN溶液;梯度为60℃下2ml/min:

[0668]

时间	%B
0.00	5
8.00	95
8.10	100
9.00	100
9.10	5
10.00	5

[0669] 50μl样品(ADC或PBS/PS20基质)+2μl 5M NaCl+150μl冷MeOH(来自-20C冷冻箱)。在-20℃下孵育30分钟。在4℃下以21,000g离心30分钟。萃取125μl上清液并与125μl WFI混合。将其中100μl注入Kinetex柱上。在214nm处分析数据,并根据相关NMT抑制剂-连接子的外部校准曲线估算样品中残留的NMT抑制剂。结果表示为游离相对于游离和结合的百分比,使用ADC浓度和计算的DAR来确定结合的NMT抑制剂的量。

[0670] 用于平均DAR(药物抗体比率)计算的HIC-HPLC

[0671] 此方法可以作为PLRP-HPLC方法的替代方法来确定平均DAR。

[0672] 色谱柱:TOSOH丁基-NPR 4.6mm x 3.5cm,2.5μm粒径(Merck822855);流动相A:1.5M(NH4)2SO4,25mM NaPi,pH 6.95±0.05;流动相B:25mM NaH2PO4 pH 6.95±0.05+25% IPA;梯度为25℃0.8ml/min:

[0673]

时间	%B
0	0
12	100
12.1	0
18	0

[0674] 装载柱芯。10μg并报告结果/在214nm处进行分析。

[0675] 用于平均DAR计算的RP-HPLC

[0676] 色谱柱-PLRP-S2.1mm x 5cm,5μm(Agilent PL1912-1502);流动相A:0.1% TFA的水溶液;流动相B:0.1% TFA的乙腈溶液;梯度:80℃,1mL/min:

[0677]

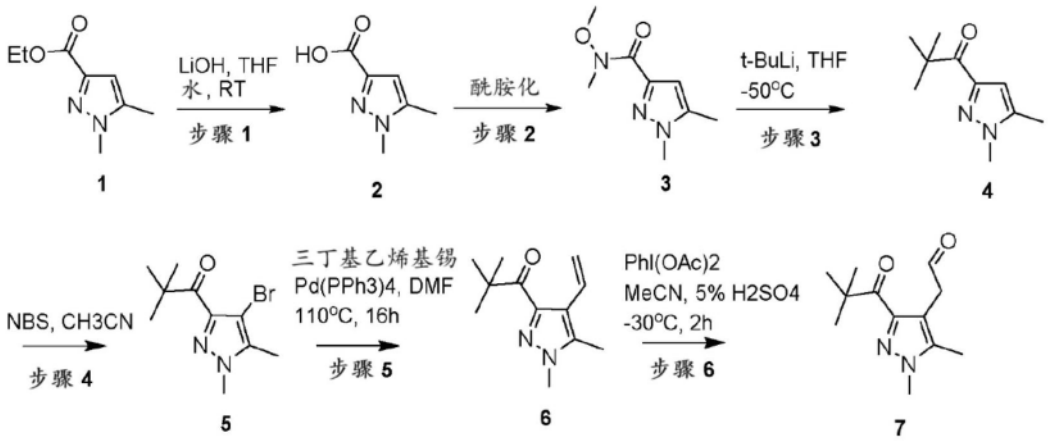
时间	%B
0	22.5
2	22.5
21.5	49.5
22.5	90.0
26.5	90.0
27.5	22.5
32.0	22.5

[0678] 将约10ug样品(ADC)+5μl 0.1M DTT用0.5M Tris,pH 8.0补足至50μL,在37℃下孵育15分钟。然后用49%水、49%乙腈、2%甲酸将样品按1:1(+50μL)稀释。然后将20uL此溶液注入RP-HPLC柱上。在214nm处分析数据并计算平均DAR。

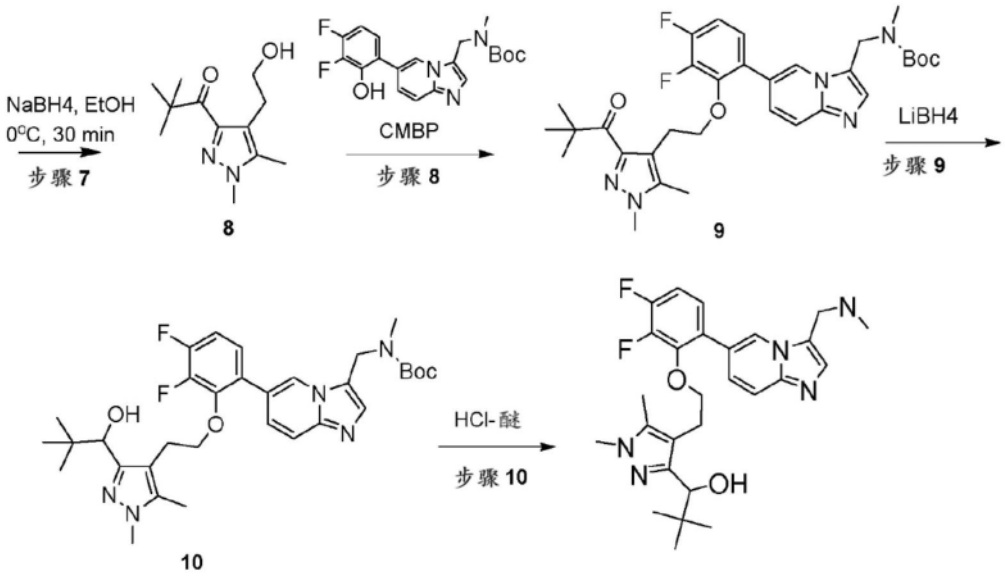
[0679] 内毒素动力显色测定

[0680] 采用Endosafe PTS内毒素系统通过动力显色LAL测定来确定内毒素。将ADC用LAL试剂水稀释10倍。所有样品均在0.01-1EU/mL柱芯上进行分析。将EU/mL值除以ADC[P]mg/mL即可转换为EU/mg。

[0681] NMT抑制剂1的制备:1-(4-(2-(2,3-二氟-6-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇



[0682]



[0683] 步骤1-中间体(2):1,5-二甲基-1H-吡唑-3-甲酸

[0684] 操作步骤:在室温下,向1,5-二甲基-1H-吡唑-3-甲酸乙酯(中间体(1))(20.0g,118.984mmol)在THF:水(4:1)(280ml,70ml)中的溶液中加入乙醇(0.4ml)和LiOH.H2O(9.985g,237.968mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。TLC/LCMS显示SM完全耗尽。在0℃下用3N HCl溶液(pH约2)酸化反应混合物并用乙酸乙酯萃取。将有机层经无水硫酸钠干燥,并浓缩,得到1,5-二甲基-1H-吡唑-3-甲酸(2),为浅黄色固体(16g,99%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 12.42(s,1H),6.45(s,1H),3.77(s,3H),2.25(s,3H)。

[0685] 步骤2-中间体(3):N-甲氧基-N,1,5-三甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺

[0686] 操作步骤:向1,5-二甲基-1H-吡唑-3-甲酸(中间体(2))(16.6g,118.571mmol)在四氢呋喃(350.0ml)中的搅拌溶液中加入N,O-二甲基羟胺盐酸盐(17.34g,177.857mmol)。加入三乙胺(82.633ml,592.857mmol)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(34.095g,177.857mmol)和1-羟基苯并三唑(24.032g,177.857mmol),并将反应混合物在室

温下搅拌16小时。检查TLC,显示有产物形成。将反应物用碳酸氢钠溶液洗涤,并用乙酸乙酯萃取。将有机层用水、盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩。粗品使用DCM中的5% MeOH溶液经combiflash纯化,得到N-甲氧基-N,1,5-三甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺(3),为浅黄色固体(15.0g,69.05%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 6.41(s,1H),3.76(s,3H),3.67(s,3H),3.32(s,3H),2.26(s,3H);LCMS(NH4Oac:CAN):M+H=184Rt=2.17分钟,运行5分钟。

[0687] 步骤3-中间体(4):1-(1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮

[0688] 操作步骤:将N-甲氧基-N,1,5-三甲基-1H-吡唑-3-甲酰胺(中间体(3))(15.0g,81.922mmol)在四氢呋喃(150.0ml)中的搅拌溶液冷却至-50℃,并在-50℃下加入叔丁基锂(1.7M戊烷溶液)(96.379ml,163.844mmol)。然后将反应混合物在-50℃下搅拌2小时。检查TLC,显示有产物形成,并且用饱和NH4Cl溶液淬灭反应混合物。将混合物用乙酸乙酯稀释,并用水、盐水溶液洗涤。分离有机层,经无水硫酸钠干燥并在减压下浓缩。将粗品使用DCM中的5% MeOH溶液通过combiflash色谱法纯化,得到1-(1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(4),为浅黄色固体(6.0g,40.63%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 6.45(s,1H),3.79(s,3H),2.25(s,3H),1.31(s,9H);LCMS(HCOOH:CAN):M+H=181,Rt=1.86分钟,运行3分钟。

[0689] 步骤4-中间体(5):1-(4-溴-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮

[0690] 操作步骤:在冰冷条件下,向1-(1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(中间体(4))(6.0g,33.309mmol)在乙腈(100.0ml)中的溶液中分批加入N-溴琥珀酰亚胺(6.191g,34.975mmol)。将所得反应混合物在RT下搅拌16小时。检查TLC和LCMS,显示有产物形成。然后将反应混合物用乙酸乙酯稀释并用饱和NaHCO3溶液、水和盐水溶液洗涤。将有机层经无水硫酸钠干燥并真空浓缩,得到1-(4-溴-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(5),为黄色固体化合物(8.0g,92.68%),其无需纯化即可用于下一步骤。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 3.86(s,3H),2.25(s,3H),1.30(s,9H);LCMS(NH4Oac:CAN):M+H=259,Rt=3.59分钟,运行5分钟。

[0691] 步骤5-中间体(6):1-(1,5-二甲基-4-乙烯基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮

[0692] 操作步骤:在室温下,向1-(1,5-二甲基-4-乙烯基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(中间体(5))(7.0g,27.129mmol)在无水N,N-二甲基甲酰胺(100.0ml)中溶液中加入三丁基乙烯基锡(17.2ml,54.257mmol)。然后用氩气吹扫反应混合物15分钟,并添加Pd(PPh3)4(3.133g,2.713mmol)。将反应混合物在110℃搅拌16小时。检查TLC,显示起始原料已被消耗并且形成了所需产物。然后将反应混合物用乙酸乙酯稀释并用氟化钾溶液洗涤,将沉淀物通过滤芯过滤并用水和盐水洗涤,经硫酸钠干燥并浓缩。将粗产物通过柱色谱法(100-200)在10%乙酸乙酯-己烷中纯化,得到1-(1,5-二甲基-4-乙烯基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(6)(5.0g,89.35%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 6.96-6.89(m,1H),5.29-5.20(m,2H),3.82(s,3H),2.31(s,3H),1.30(s,9H);LCMS(HCOOH:CAN):M+H=207,Rt=2.19分钟,运行3分钟。

[0693] 步骤6-中间体(7):2-(1,5-二甲基-3-新戊酰基-1H-吡唑-4-基)乙醛

[0694] 操作步骤:在-30℃下,向1-(1,5-二甲基-4-乙烯基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(中间体(6))(4.1g,19.903mmol)和(二乙酰氧基碘)苯(6.729g,20.898mmol)在乙

腈(60.0ml)中的溶液中逐滴加入5%硫酸(3.525ml)。将混合物在-30℃搅拌1小时。反应完成后,将残余物用乙酸乙酯处理并用饱和碳酸氢钠溶液、水和盐水溶液洗涤。将水层用乙酸乙酯反萃取,将合并的有机层经无水硫酸钠干燥,过滤并真空浓缩,得到2-(1,5-二甲基-3-新戊酰基-1H-吡唑-4-基)乙醛(7)(2.7g,61.03%)。此级分无需纯化即可用于下一步骤。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 9.49(s,1H),3.82(s,3H),3.65(s,2H),2.17(s,3H),1.30(s,9H);LCMS(NH4Oac:CAN):M+H=223,Rt=1.86分钟,运行3分钟。

[0695] 步骤7-中间体(8):1-(4-(2-羟乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮

[0696] 操作步骤:在冰冷条件下,向2-(1,5-二甲基-3-新戊酰基-1H-吡唑-4-基)乙醛(中间体(7))(2.7g,12.162mmol)在乙醇(60.0ml)中的溶液中分批加入硼氢化钠(0.460g,12.162mmol)。将反应混合物在0℃下搅拌30分钟。反应完成后,用碳酸氢钠溶液猝灭混合物并用乙酸乙酯稀释,用水、盐水洗涤,真空浓缩得到粗品。将此批次使用DCM中的2% MeOH溶液通过combi flash纯化,得到1-(4-(2-羟基乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(8)(2.1g,76.98%),为无色油状物。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 4.46(t,1H),3.77(s,3H)3.36(t,2H),2.69(t,2H),2.17(s,3H),1.30(s,9H);LCMS(HCOOH:CAN):M+H=225,Rt=1.81分钟,运行3分钟。

[0697] 步骤8-中间体(9):((6-(2-(2-(1,5-二甲基-3-新戊酰基-1H-吡唑-4-基)乙氧基)-3,4-二氟苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)甲基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯

[0698] 操作步骤:在室温下,向1-(4-(2-羟乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-酮(中间体(8))(2.3g,10.268mmol)和((6-(3,4-二氟-2-羟基苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)甲基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯(3.994g,10.268mmol)在甲苯(40.0ml)中搅拌溶液中加入CMBP(5.382ml,20.536mmol),并将反应混合物在110℃下搅拌16小时。TLC和LCMS显示产物形成,将反应混合物用乙酸乙酯稀释,用水、盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥并减压浓缩。将粗品用5%MeOH-DCM通过combiflash纯化,得到((6-(2-(2-(1,5-二甲基-3-新戊酰基-1H-吡唑-4-基)乙氧基)-3,4-二氟苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)甲基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯(9),为棕色粘稠胶状物(3.0g,49.05%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 8.50-8.42(brs,1H),7.62(s,1H),7.53(d,1H),7.30-7.15(m,3H),4.76(s,2H),3.92(t,2H),3.67(s,3H),2.81(t,2H),2.67(s,3H),1.86(s,3H),1.32(s,9H),1.19(s,9H);LCMS(HCOOH:CAN):M+H=596,Rt=1.75分钟,运行5分钟。

[0699] 步骤9-中间体(10):((6-(3,4-二氟-2-(2-(3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)乙氧基)苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)甲基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯

[0700] 操作步骤:向((6-(2-(2-(1,5-二甲基-3-新戊酰基-1H-吡唑-4-基)乙氧基)-3,4-二氟苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)甲基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯(中间体(9))(2.5g,4.202mmol)在甲醇(25.0ml)中的溶液中加入硼氢化锂(0.458g,21.008mmol)。将混合物在环境温度下搅拌5小时。反应完成后,蒸发溶剂,用DCM稀释并用碳酸氢钠溶液、水、盐水洗涤。将有机层经硫酸钠干燥并浓缩得到粗产物。将粗产物用DCM中的5%MeOH溶液通过制备型TLC纯化,得到((6-(3,4-二氟-2-(2-(3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)乙氧基)苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)甲基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯(10)

(1.9g,75.66%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 8.55-8.45(brs,1H),7.63(s,1H),7.60(d,1H),7.38(d,1H),7.35-7.25(brs,2H),4.78(s,2H),4.60(d,1H),4.07(d,1H),3.92-3.88(m,1H),3.84-3.78(m,1H),3.52(s,3H),2.80-2.70(m,1H),2.68(s,3H),2.60-2.52(brs,1H),1.78(s,3H),1.34(s,9H),0.74(s,9H);LCMS(NH4Oac:CAN):M+H=598,Rt=3.75分钟,运行5分钟。

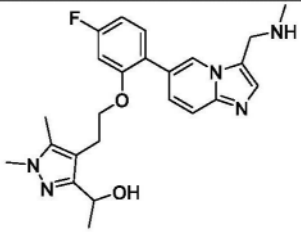
[0701] 步骤10-NMT抑制剂1:1-(4-(2-(2,3-二氟-6-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇

[0702] 操作步骤:在0℃下,向((6-(3,4-二氟-2-(2-(3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)乙氧基)苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基)甲基)(甲基)氨基甲酸叔丁酯(10)(1.2g,2.009mmol)在乙醚(10.0ml)中的溶液中加入2M HCl在二乙醚(40.0ml)中的溶液。将反应混合物在室温下搅拌3小时。TLC和LCMS显示起始原料已被消耗。将反应混合物减压蒸发以获得粗品。将粗品与乙醚一起研磨并冻干,得到1-(4-(2-(2,3-二氟-6-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇,为浅黄色固体(HCl盐)(1.04g,96.93mmol,49%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)d 10.02-9.96(brs,2H),9.26(s,1H),8.44(s,1H)8.08(d,1H),7.98(d,1H),7.64(t,1H),7.46-7.40(m,1H),4.75(s,3H),4.16(s,1H),3.97(t,2H),3.71(s,3H),2.87-2.80(m,1H),2.72-2.65(m,1H),2.60(s,3H),2.09(s,3H),0.76(s,9H);LCMS(HCOOH:CAN):M+H=498,Rt=2.54分钟,运行5分钟;HPLC RT(B3)8.739分钟。

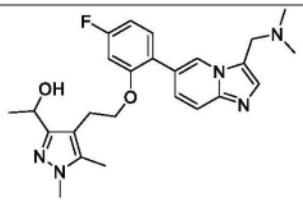
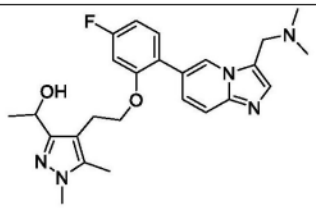
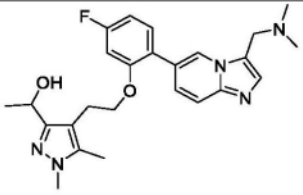
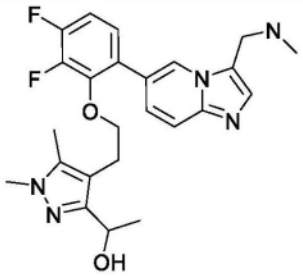
[0703] 使用与针对NMT抑制剂1所描述的方法类似的方法制备以下化合物:

[0704] 表1:NMT抑制剂

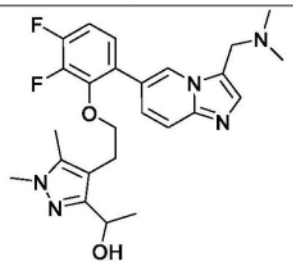
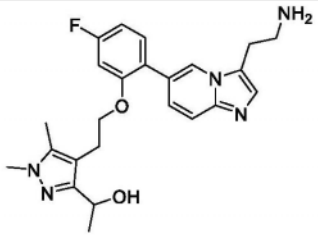
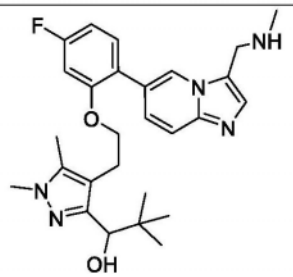
[0705]

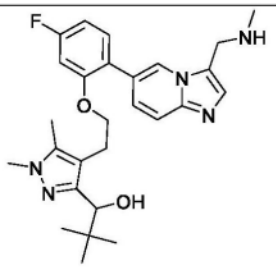
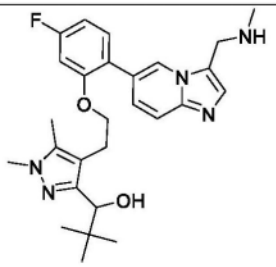
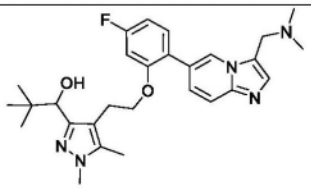
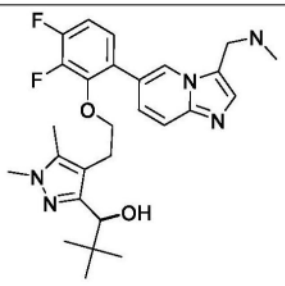
NMT抑制剂	化学名称	结构	表征数据
2	1-{4-[2-(5-氟-2-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}乙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 9.54 (s, 2H), 9.16 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.11 (d, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.69 (t, 1H), 7.15 (d, 1H), 6.99 (t, 1H), 4.73 (t, 2H), 4.68-4.62 (m, 2H), 4.13

[0706]

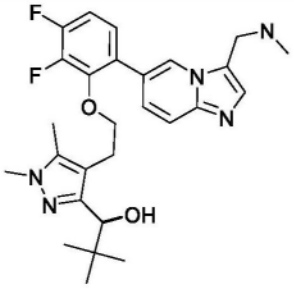
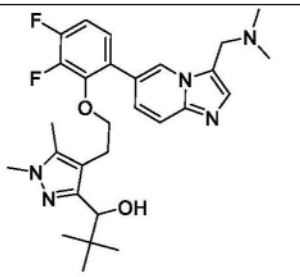
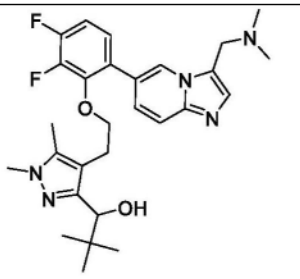
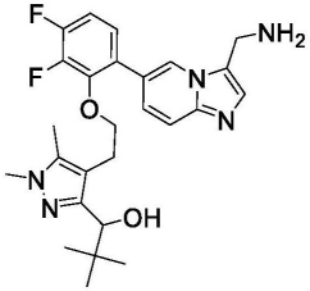
NMT 抑制剂	化学名称	结构	表征数据
			(t, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.87-2.82 (m, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.29 (d, 3H)。
3	1-(4-(2-(2-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)乙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.48 (s, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.42 (t, 1H), 7.32 (d, 1H), 7.03 (d, 1H), 6.88 (t, 1H), 4.84 (d, 1H), 4.66 (t, 1H), 4.08 (t, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 2.89-2.79 (m, 2H), 2.14 (s, 6H), 1.87 (s , 3H), 1.29 (d, 3H)。
4	(异构体 1) 1-(4-(2-(2-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)乙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 9.54 (s, 2H), 9.16 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.11 (d, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.69 (t, 1H), 7.15 (d, 1H), 6.99 (t, 1H), 4.73 (t, 2H), 4.68-4.62 (m, 2H), 4.13 (t, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.87-2.82 (m, 2H), 2.64 (t, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.29 (d, 3H)。
5	(异构体 2) 1-(4-(2-(2-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)乙-1-醇		
6	1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}乙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 9.95-9.80 (brs, 2H), 9.22 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.92 (d, 1H), 7.62 (t, 1H), 7.44-7.37 (m, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.57-4.51 (m, 2H), 4.03

[0707]

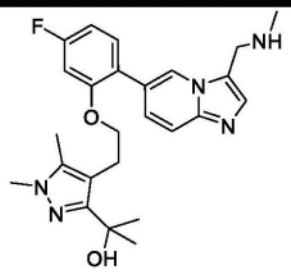
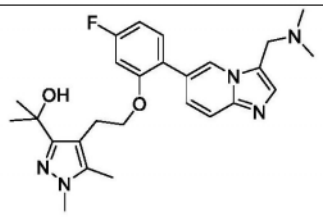
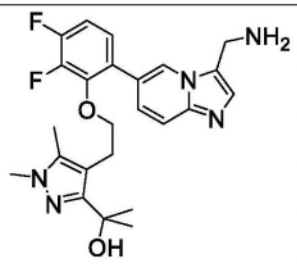
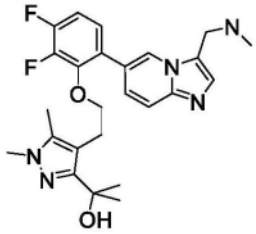
NMT 抑制剂	化学名称	结构	表征数据
			(t, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.75-2.66 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.19 (d, 3H)。
7	1-(4-(2-(6-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-2,3-二氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)乙-1-醇		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) d 8.49 (s, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.37-7.25 (m, 3H), 4.77-4.67 (m, 1H), 4.61-4.51 (m, 1H), 3.95 (t, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.51 (s, 3H), 2.73 (t, 2H), 2.14 (s, 6H), 1.79 (s, 3H), 1.21 (d, 3H)。
8	1-(4-(2-(2-(3-(2-氨基乙基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)乙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.95 (s, 1H), 8.19 (brs, 3H), 8.15 (s, 1H), 8.07 (d, 1H), 8.00 (d, 1H), 7.55 (t, 1H), 7.14 (d, 1H), 6.96 (t, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.13 (t, 2H), 3.62 (s, 3H), 3.44 (t, 2H), 3.19 (s, 2H), 2.88-2.81 (m, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.28 (d, 3H)。
9	1-(4-(2-(5-氟-2-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) d 10.06-9.65 (m, 2H), 9.20 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.17 (d, 1H), 8.01 (d, 1H), 7.75 (t, 1H), 7.17 (d, 1H), 6.99 (t, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.26 (s, 1H), 4.18-4.04 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.01-2.91 (m, 1H), 2.83-2.72 (m, 1H), 2.62

NMT 抑制剂	化学名称	结构	表征数据
			(s, 3H), 2.07 (s, 3H), 0.86 (s, 9H)。
10	(异构体 1) 1-(4-(2-(5-氟-2-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) d 9.79 (bs, 2H), 9.20 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.17 (d, 1H), 8.01 (d, 1H), 7.74 (t, 1H), 7.19-7.14 (m, 1H), 7.02-6.94 (m, 1H), 4.74 (bs, 2H), 4.25 (s, 1H), 4.18-4.07 (m, 2H), 3.68 (s, 3H), 2.99-2.89 (m, 1H), 2.81-2.71 (m, 1H), 2.62 (t, 3H), 2.06 (s, 3H), 0.85 (s, 9H)。
11	(异构体 2) 1-(4-(2-(5-氟-2-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		
[0708] 12	1-(4-(2-(2-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) d 8.50 (s, 1H), 7.57 (d, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.43 (t, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.05 (d, 1H), 6.88 (t, 1H), 4.85 (d, 1H), 4.22 (d, 1H), 4.13-3.98 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.56 (s, 3H), 3.01-2.89 (m, 1H), 2.77-2.67 (m, 1H), 2.15 (s, 6H), 1.90 (s, 3H), 0.87 (s, 9H)。
13	(异构体 1): 1-(4-(2-(2,3-二氟-6-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) d 9.83 (bs, 2H), 9.23 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.97 (d, 1H), 7.62 (t, 1H), 7.47-7.38 (m, 1H), 4.74 (s, 2H), 4.11 (s, 1H),

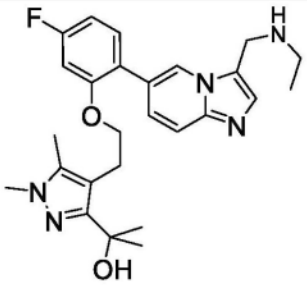
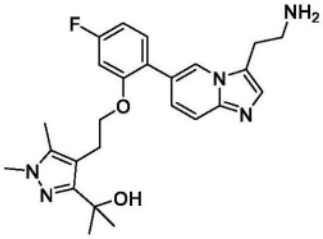
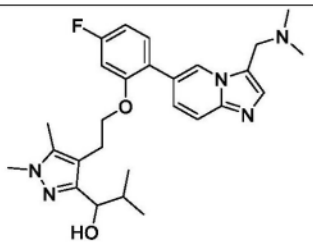
[0709]

NMT 抑制剂	化学名称	结构	表征数据
14	(异构体 2): 1-(4-(2-(2,3-二氟-6-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		3.97 (t, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.88-2.78 (m, 1H), 2.73-2.52 (m, 4H), 2.04 (s, 3H), 0.76 (s, 9H)。
15	(异构体 1)1-(4-(2-(6-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-2,3-二氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) d 8.53 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.38 (d, 1H), 7.32-7.24 (m, 2H), 4.635 (d, 1H), 4.08 (d, 1H), 3.99-3.91 (m, 1H), 3.88-3.82 (m, 1H), 3.74 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 2.88-2.75 (m, 1H), 2.69-2.59 (m, 1H), 2.14 (s, 6H), 1.80 (s, 3H), 0.76 (s, 9H)。
16	(异构体 2)1-(4-(2-(6-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-2,3-二氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		
17	1-(4-(2-(6-(3-(氨基甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-2,3-二氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2,2-二甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 9.18 (s, 1H), 8.95-8.77 (m, 3H), 8.35 (s, 1H), 8.08 (d, 1H), 7.97 (d, 1H), 7.58 (t, 1H), 7.48-7.35 (m, 1H), 4.77 (s, 2H), 4.12 (s, 1H), 4.03-3.94 (m, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.91-2.78 (m, 1H), 2.72-2.61 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 0.77(s, 9H)。

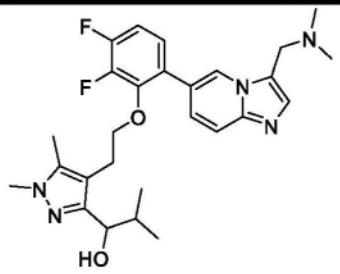
[0710]

NMT 抑制剂	化学名称	结构	表征数据
18	2-(4-(2-(5-氟-2-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)丙-2-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.51 (s, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.43 (t, 1H), 7.32 (d, 1H) 7.04 (d, 1H), 6.87 (t, 1H), 4.80 (s, 1H), 4.11 (t, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 2.94 (t, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.87 (s , 3H), 1.40 (s, 6H)。
19	2-(4-(2-(2-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)丙-2-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.49 (s, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.42 (t, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.04 (d, 1H), 6.88 (t, 1H), 4.80 (s, 1H), 4.10 (t, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 2.94 (t, 2H), 2.15 (s, 6H), 1.87 (s , 3H), 1.39 (s, 6H)。
20	2-[4-(2-{6-[3-(氨基甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基]-2,3-二氟苯氧基}乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基]丙-2-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.54 (s, 1H), 7.55 (d,1H), 7.47 (s, 1H) 7.31 (m, 3H), 4.66 (brds, 1H) 4.07 (s, 2H), 3.95 (t, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.40 (brds,1H), 1.81 (s, 3H), 1.28(s, 6H)。
21	2-(4-(2-(2,3-二氟-6-(3-((甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)丙-2-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.52 (s, 1H), 7.55 (d, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.35-7.25 (m, 3H), 4.64 (s, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.95 (d, 2H), 3.49 (s,

[0711]

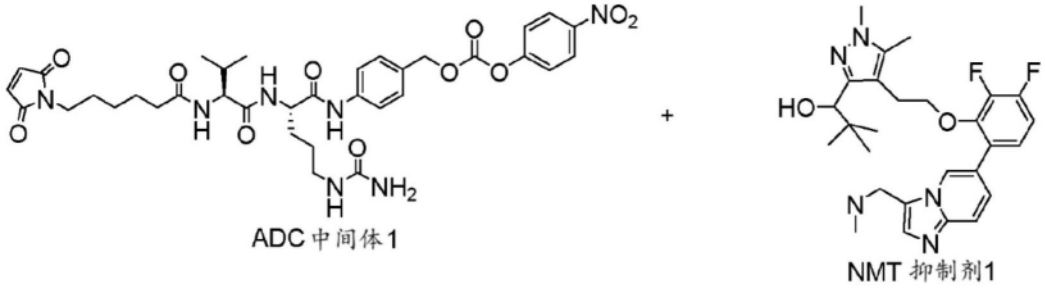
NMT 抑制剂	化学名称	结构	表征数据
			3H), 2.83 (t, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.28 (s, 6H)。
22	2-{4-[2-(2-{3-[(乙基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}-5-氟苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}丙-2-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.51 (s, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.43 (t, 1H), 7.32 (d, 1H) 7.05 (d, 1H), 6.878 (t, 1H), 4.80 (s, 1H), 4.12 (t, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.54 (s, 3H), 2.94 (t, 2H), 2.55 (q,2H) 2.26(s, 3H), 1.87 (s , 3H), 1.40 (s, 6H), 1.01(t, 3H)。
23	2-(4-(2-(2-(3-(2-氨基乙基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)丙-2-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.41 (s, 1H), 7.52 (d, 1H), 7.44-7.41 (m, 2H), 7.28 (d, 1H), 7.06 (d, 1H), 6.86 (t, 1H), 4.89-4.85 (brs, 1H), 4.11 (t, 2H), 3.54 (s, 3H), 2.97-2.87 (m, 6H), 1.90 (s, 3H), 1.40 (s, 6H)。
24	1-(4-(2-(2-(3-((二甲基氨基)甲基)咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基)-5-氟苯氧基)乙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基)-2-甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.46 (s, 1H), 7.53 (d, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.40 (t, 1H), 7.30 (d, 1H), 7.01 (d, 1H), 6.85 (t, 1H), 4.82 (d, 1H), 4.11-3.94 (m, 3H), 3.70 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 2.88-2.71 (m, 2H), 2.12 (s, 6H), 1.98-1.81 (m, 4H), 0.91 (d, 3H), 0.63 (d, 3H)。

[0712]

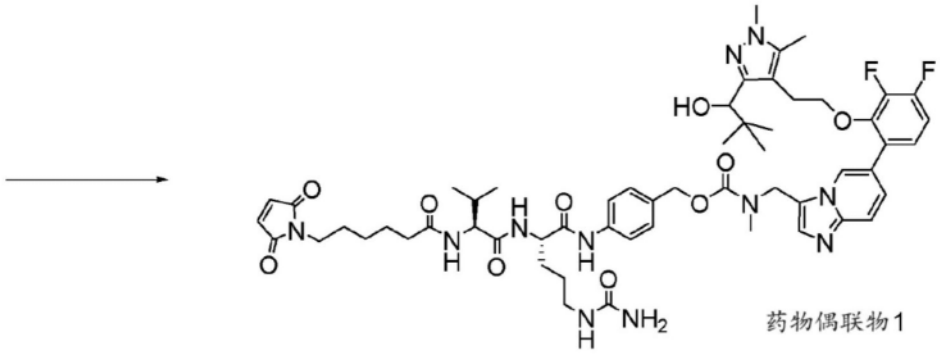
NMT抑制剂	化学名称	结构	表征数据
25	1-{4-[2-(2,3-二氟-6-{3-[(甲基氨基)甲基]咪唑并[1,2-a]吡啶-6-基}苯氧基)乙基]-1,5-二甲基-1H-吡唑-3-基}-2-甲基丙-1-醇		^{1}H NMR (d6-DMSO, 400 MHz) δ 8.55 (s, 1H), 7.56 (d, 1H), 7.51(s, 1H), 7.31(m, 3H), 4.72 (s, 1H), 4.03(s,2H), 3.94 (m,2H), 3.88 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 2.72 (t, 2H), 2.26 (s, 3H), 0.84 (d, 3H), 0.52 (d, 3H)。

[0713] NMT抑制剂1至25可以根据欧洲专利申请22194959.7号中公开的方法制备,所述专利申请的全部内容通过引用并入本文以描述NMT抑制剂的合成和活性。

[0714] 药物偶联物1的合成:N-{[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}-N-甲基氨基甲酸{4-[(2S)-5-(氨基甲酰氨基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基]-3-甲基丁酰氨基]戊酰氨基]苯基}甲基酯:



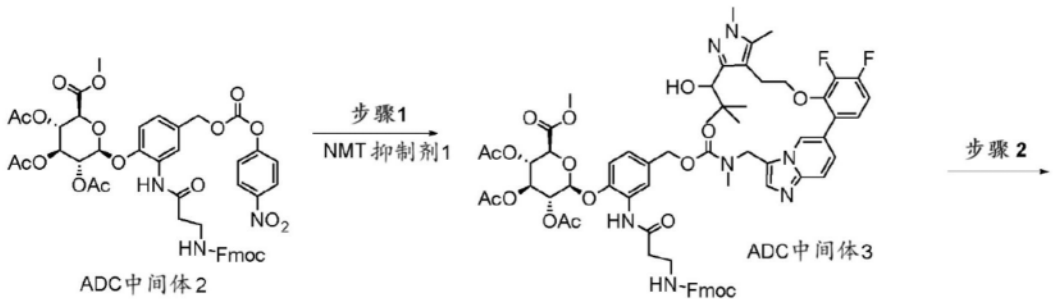
[0715]



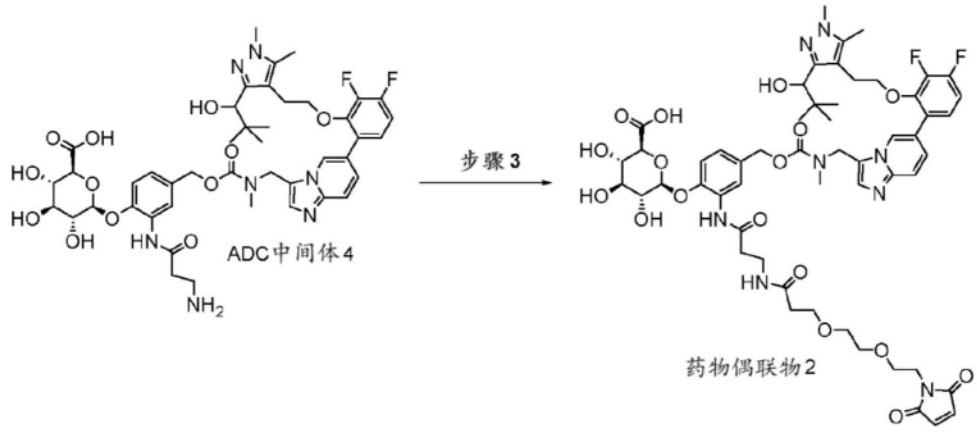
[0716] 向碳酸{4-[(2S)-5-(氨基甲酰氨基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲基酯4-硝基苯基酯水合物(ADC中间体1,如Synlett,2009,No.18,pp 3050-3051中所述使用标准碳酸酯形成条件由市售的(N-[(1S)-1-{[(1S)-4-(氨基甲酰氨基)-1-{[4-(羟甲基)苯基]氨基甲酰基}丁基]氨基甲酰基}-2-甲基丙基]-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺制备,12mg,16mmol)在无水DMF(2mL)中的溶液中加入NMT抑制剂1(8mg,16mmol),然后加入DIEA(8.4mL)和HOAt(1mg),并在室温(22℃)下搅拌反应物。16小时后,将混合物直接通过RP-HPLC纯化,得到N-

{[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}-N-甲基氨基甲酸{4-[(2S)-5-(氨基甲酰氨基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基]-3-甲基丁酰氨基]戊酰氨基]苯基}甲基酯(药物偶联物1),冻干后为白色固体(10.5mg)。药物偶联物1可用于使用本领域技术人员已知且本文描述的方法(例如针对ADC实施例1或ADC实施例2描述的方法)通过与抗体反应来制备ADC。

[0717] 药物偶联物2的合成:(1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}--2-[3-(3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙酰氨基)丙酰氨基]苯氧基)-3,4-二羟基-2-甲基环己烷-1-甲酸(水合物)



[0718]



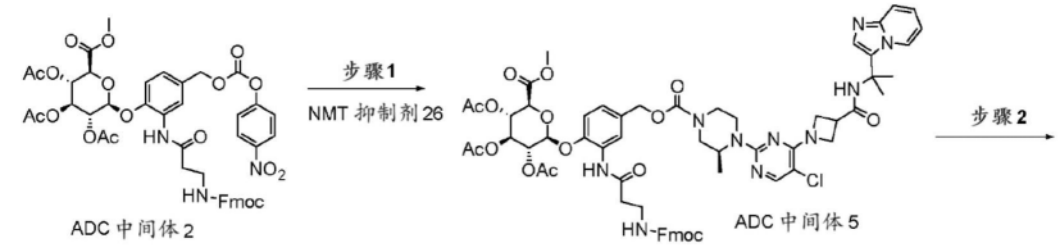
[0719] 步骤1:向(1S,2R,3S,4R,5R)-5-[2-(3-{[(9H-芴-9-基氧基)羰基]氨基}丙酰氨基)-4-({[(4-硝基苯氧基)羰基]氧基}甲基)苯氧基]-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸(ADC中间体2,100mg,0.11mmol)(Bioconjugate Chem.,2006,17,831-840)在无水DMF(2mL)中的溶液中加入NMT抑制剂1(50mg),然后加入DIEA(40mL)和HOAt(3mg),并在室温(22℃)下搅拌反应物。16小时后,将混合物直接通过RP-HPLC纯化,得到(1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}-2-(3-{[(9H-芴-9-基氧基)羰基]氨基}丙酰氨基)苯氧基)-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸(ADC中间体3),冻干后为白色固体(107mg)。

[0720] 步骤2:将(1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}-2-(3-{[(9H-芴-9-基氧基)羰基]氨基}丙酰氨基)苯氧基)-2,

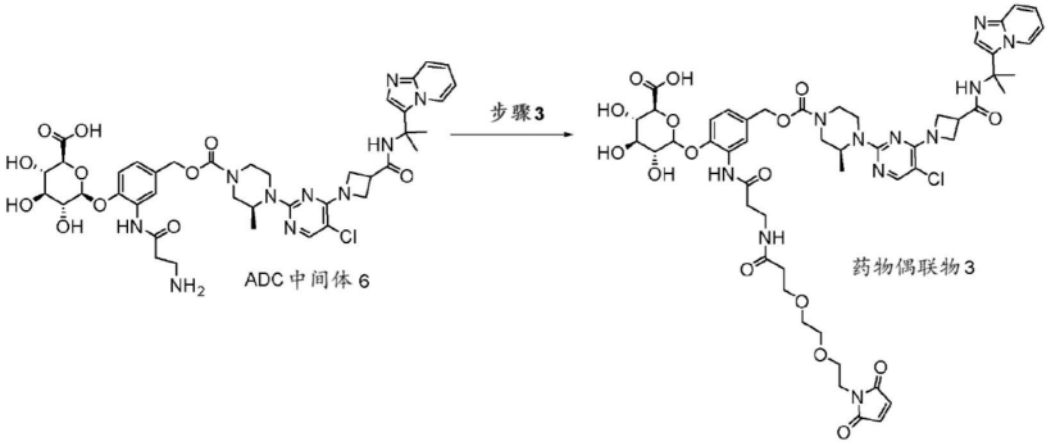
3,4-三羟基环己烷-1-甲酸(ADC中间体3,105mg)溶解于乙腈/水(6/4,v/v,4mL)中,并在室温下逐滴加入NaOH(1N,水溶液,0.5mL)。将混合物在室温下搅拌8小时。加入HCl(4N二噁烷溶液,0.1mL),混合物经RP-HPLC纯化,得到(1S,2R,3S,4R,5R)-5-[2-(3-氨基丙酰氨基)-4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}苯氧基]-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸(ADC中间体4),冻干后为白色固体(TFA盐,42mg)。

[0721] 步骤3:向(1S,2R,3S,4R,5R)-5-[2-(3-氨基丙酰氨基)-4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}苯氧基]-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸(ADC中间体4,40mg)在乙腈/水(6/4,v/v,2mL)中的溶液中加入Mal-PEG2-OSu(15mg),然后加入DIEA(14mL)。将反应混合物在室温下搅拌1小时,用RP-HPLC直接纯化,得到(1S,2R,3S,4R,5R)-5-(4-{[({[6-(3,4-二氟-2-{2-[3-(1-羟基-2,2-二甲基丙基)-1,5-二甲基-1H-吡唑-4-基]乙氧基}苯基)咪唑并[1,2-a]吡啶-3-基]甲基}(甲基)氨基甲酰基)氧基]甲基}-2-(3-{[(9H-芴-9-基氧基)羰基]氨基}丙酰氨基)苯氧基)-2,3,4-三羟基环己烷-1-甲酸水合物(药物偶联物2),冻干后为白色固体(36mg)。

[0722] 药物偶联物3的合成



[0723]



[0724] 步骤1:向ADC中间体2(Bioconjugate Chem.,2006,17,831-840)在无水DMF中的溶液中加入NMT抑制剂26,然后加入DIEA和HOAt,并在室温(22℃)下搅拌反应物。16小时后,将混合物直接通过RP-HPLC纯化,得到ADC中间体5,冻干后为白色固体。

[0725] 步骤2:将ADC中间体5溶解于乙腈/水(6/4,v/v)中,并在室温下逐滴加入NaOH(1N,水溶液)。将混合物在室温下搅拌8小时。加入HCl(4N二噁烷溶液),将混合物经RP-HPLC纯化,冻干后得到白色固体(ADC中间体6)。

[0726] 步骤3:向ADC中间体6在乙腈/水(6/4,v/v)中的溶液中加入Mal-PEG2-OSu,然后加

入DIEA。将反应混合物在室温下搅拌1小时,直接用RP-HPLC纯化,冻干后得到药物偶联物3,为白色固体。

[0727] ADC实施例1-曲妥珠单抗-NMT抑制剂ADC(DAR 5)的制备

[0728] 购买曲妥珠单抗并复原为25mg/mL溶液。在还原和偶联之前,加入5%v/v的500mM Tris,25mM EDTA,pH 8.5来调节pH值。从10mM水中原液中添加相对于抗体2.5摩尔当量的TCEP(三(2-羧乙基)膦),并将抗体还原90分钟。从10mM DMA(二甲基乙酰胺)中原液中添加8摩尔当量的药物偶联物2,并使还原的抗体偶联60分钟。从10mM水中原液中添加8摩尔当量的NAC(N-乙酰半胱氨酸)以猝灭未反应的药物偶联物2,并使其反应20分钟。使用在PBS中平衡的Superdex 200PG柱通过制备型SEC(尺寸排阻色谱法)纯化偶联物。将含有蛋白质的级分汇集起来,并在A级层流下通过合适大小的0.2μm PES过滤器(直接色谱/FIL-S-PES-022-13-100-S)进行最终过滤。对最终产品取样进行QC测试-通过SEC-HPLC测定单体和[ADC]mg/ml,通过PLRP测定平均DAR,通过RP-HPLC测定残留NMT抑制剂1,并且通过Endosafe动力显色法测定内毒素。

[0729] ADC实施例2-利妥昔单抗-NMT抑制剂ADC(DAR 5)的制备

[0730] 购买利妥昔单抗的10mg/mL溶液。在还原和偶联之前,加入5%v/v的500mM Tris,25mM EDTA,pH 8.5来调节pH值。从10mM水中原液中添加相对于抗体2.7摩尔当量的TCEP(三(2-羧乙基)膦),并将抗体还原120分钟。从10mM DMA(二甲基乙酰胺)中原液中添加8摩尔当量的药物偶联物2,并使还原的抗体偶联60分钟。从10mM水中原液中添加8摩尔当量的NAC(N-乙酰半胱氨酸)以猝灭未反应的药物偶联物2,并使其反应20分钟。使用在30mM组氨酸、0.25M蔗糖100mM NaCl中平衡的Superdex 200PG柱,通过制备型SEC(尺寸排阻色谱法)纯化偶联物。将含有蛋白质的级分汇集起来,并在A级层流下通过合适大小的0.2μm PES过滤器(直接色谱/FIL-S-PES-022-13-100-S)进行最终过滤。对最终产品取样进行QC测试-通过SEC-HPLC测定单体和[ADC]mg/ml,通过PLRP测定平均DAR,通过RP-HPLC测定残留NMT抑制剂1,通过Endosafe动力显色分析法测定内毒素。

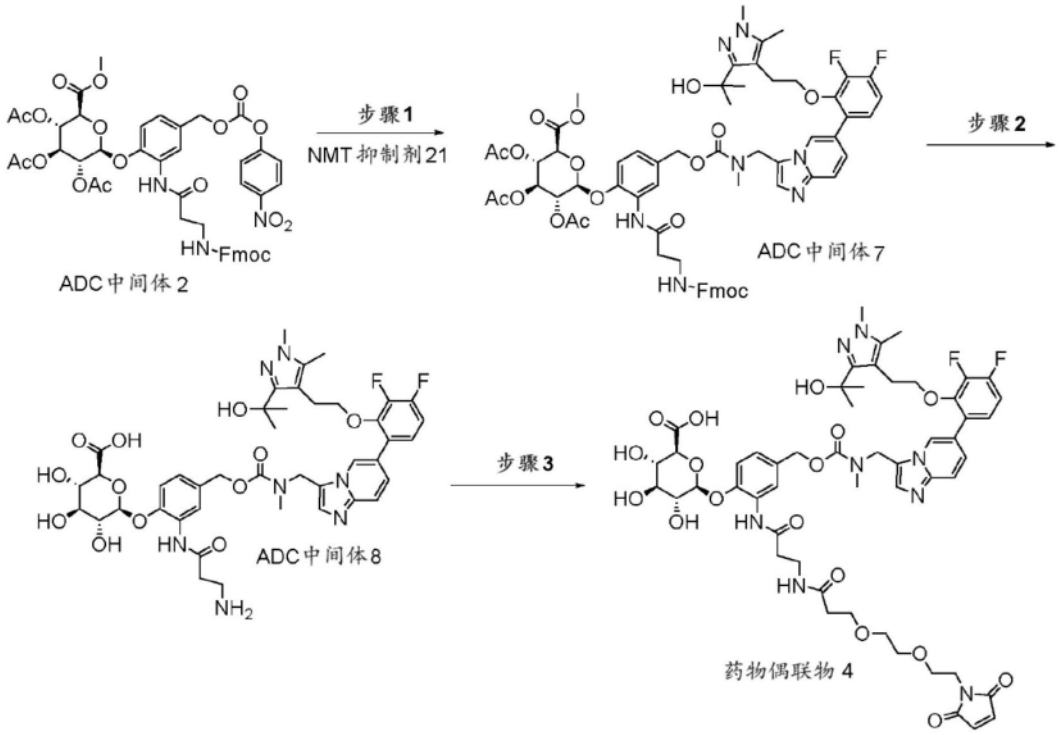
[0731] ADC实施例3采用与ADC实施例1所述相同的方法制备,只是使用沙西妥珠单抗代替曲妥珠单抗作为抗体。

[0732] ADC实施例4采用与ADC实施例1所述相同的方法制备,只是使用伊非那他单抗代替曲妥珠单抗作为抗体。

[0733] ADC实施例5采用与ADC实施例1相同的方法制备,只是使用药物偶联物3代替药物偶联物2。

[0734] ADC实施例6的制备

[0735] ADC实施例6是使用药物偶联物4制备的。药物偶联物4的制备方法与药物偶联物2相同,只是使用NMT抑制剂21代替NMT抑制剂1:

[0736] 

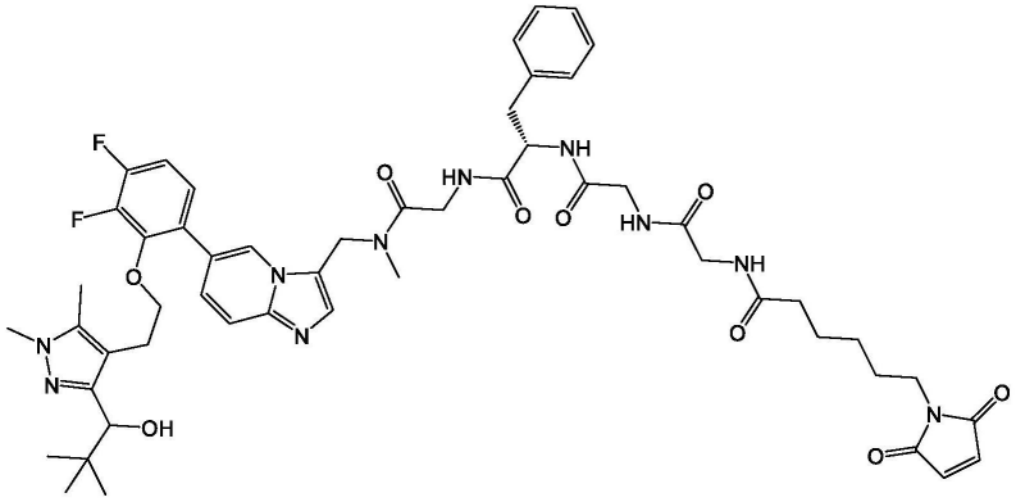
[0737] 其中步骤1至3如针对药物偶联物2所述。

[0738] 购买赫赛汀(曲妥珠单抗)并复原成25.6mg/mL溶液。在还原和偶联之前,加入5%v/v的500mM Tris,25mM EDTA(pH 8.5)来调节pH。从5mM在水中的原液中添加相对于抗体2.55摩尔当量的TCEP(三(2-羧乙基)膦),并将抗体放置还原120分钟。在偶联之前,用PBS将还原的mAb以1/3稀释。从DMA(二甲基乙酰胺)中的10mM原液中添加8摩尔当量的药物偶联物4,并使还原的抗体偶联90分钟。从100mM的水中的原液中添加8摩尔当量的NAC(N-乙酰半胱氨酸)以猝灭未反应的药物偶联物4,并使其反应20分钟。使用G25树脂(NAP25柱)将偶联物缓冲液交换到PBS中,然后以1mg碳:1mg ADC的比例加入活性炭,并在室温下在10rpm的滚筒搅拌机上孵育过夜。然后将偶联物在4000xG下旋转15分钟以使碳粒化,然后去除上清液(ADC)并通过0.2uM PES过滤器过滤。然后使用Amicon15装置通过透析过滤来进一步纯化和浓缩偶联物,其中在缓冲液交换中使用6x透析体积(DV)的PBS(pH 7.4)。然后将偶联物在A级层流下通过13mm 0.2μm PES过滤器(直接色谱/FIL-S-PES-022-13-100-S)进行最终过滤,然后配制成0.02%PS80。对最终产品取样进行QC测试-通过SEC HPLC检测单体和[ADC]mg/ml,通过PLRP检测平均DAR,通过RP-HPLC检测残留毒素,通过Endosafe检测内毒素。

[0739] ADC实施例7的制备

[0740] ADC实施例7采用与ADC实施例1所述相同的方法制备,只是使用了药物偶联物5,其中所用的连接子为GGFG。

[0741] 药物偶联物5的结构:

[0742] 

[0743] 其可使用与药物偶联物2相同的方法制备。

[0744] ADC实施例8的制备

[0745] 购买赫赛汀(曲妥珠单抗)并复原成25.6mg/mL溶液。在还原和偶联之前,加入5%v/v的500mM Tris,25mM EDTA(pH 8.5)来调节pH。从5mM在水中的原液中添加相对于抗体2.55摩尔当量的TCEP(三(2-羧乙基)膦),并将抗体放置还原120分钟。在偶联之前,用PBS将还原的mAb以1/3稀释。从DMA(二甲基乙酰胺)中的10mM原液中添加8摩尔当量的药物偶联物1,并使还原的抗体偶联90分钟。从100mM的水中的原液中添加8摩尔当量的NAC(N-乙酰半胱氨酸)以猝灭未反应的药物偶联物1,并使其反应20分钟。使用G25树脂(NAP25柱)将偶联物缓冲液交换到PBS中,然后以1mg碳:1mg ADC的比例加入活性炭,并在室温下在10rpm的滚筒搅拌机上孵育过夜。然后将偶联物在4000xG下旋转15分钟以使碳粒化,然后去除上清液(ADC)并通过0.2uM PES过滤器过滤。然后使用Amicon15装置通过透析过滤进一步纯化和浓缩偶联物,其中在缓冲液交换中使用6x透析体积(DV)的PBS(pH 7.4)。然后将偶联物在A级层流下通过13mm 0.2μm PES过滤器(直接色谱/FIL-S-PES-022-13-100-S)进行最终过滤,然后配制成0.02%PS80。对最终产品取样进行QC测试-通过SEC HPLC检测单体和[ADC]mg/ml,通过HIC检测平均DAR,通过RP-HPLC检测残留毒素,通过Endosafe检测内毒素。

[0746] 生物学实施例1:HsNMT1和SU-DHL-10测定

[0747] HSNMT1 IC_{50}

[0748] 某些NMT抑制剂的IC_{50}值是使用基于通过7-二乙氨基-3-(4-马来酰亚胺基苯基)-4-甲基香豆素检测CoA的基于灵敏荧光的测定测量的,如Goncalves,V.等人,Analytical Biochemistry,2012,421,342-344和Goncalves,V.等人,J.Med.Chem,2012,55,3578中所述。

[0749] SU-DHL-10细胞系中的细胞毒性

[0750] 在SU-DHL-10细胞系(人B细胞淋巴瘤)中对某些NMT抑制剂进行了测试。预计在此测定中表现出功效的化合物可用作治疗或预防癌症等过度增殖性病症的剂。

[0751] 将细胞接种于96孔微孔板中,并用化合物或顺铂(作为阳性对照)以9个逐渐增加的浓度进行处理,技术重复三次。在每种细胞系中处理72小时后测定测试化合物和顺铂的IC_{50}。

[0752] 1.第1天,将90μL各种细胞悬浮液(细胞数量范围为5,000-8,000个细胞/孔)接种

到96孔板(Corning)的孔中。需要接种的细胞数量已经预先确定。

[0753] 2.将所有装有细胞的96孔板放入37℃、5% CO_2的培养箱中过夜。

[0754] 3.第2天,在显微镜下观察细胞,确保用媒介物对照处理的细胞状况良好。

[0755] 4.以所需最终浓度的10倍制备测试化合物和顺铂的稀释系列。将10μL/孔的10X化合物溶液加入相应的板中。所有板的最终体积为100μL/孔。最终DMSO浓度为0.1%。

[0756] 5.第5天(孵育72小时后),向每个孔中加入50μL CTG试剂。

[0757] 6.将内容物在轨道振荡器上混合5分钟,以促进细胞裂解。

[0758] 7.将板在室温下孵育10分钟以稳定发光信号。

[0759] 使用EnVision多标记酶标仪记录发光。使用GraphPad Prism 8.0来进行数据分析。

[0760] 为了计算IC_{50},使用具有S形浓度响应的非线性回归模型生成浓度响应曲线。用于计算活细胞的%的公式如下所示,IC_{50}由GraphPad Prism 8.0自动生成。

[0761] $$活细胞\% = \left(\frac{Lum_{供试品} - Lum_{培养基对照}}{Lum_{未处理} - Lum_{培养基对照}}\right) \times 100\%$$

[0762] (Lum供试品=供试品处理孔中的发光;Lum未处理=媒介物处理孔中的发光;Lum培养基对照=仅含有培养基而不含细胞的孔中的发光;Lum未处理-Lum培养基对照设为100%)。

[0763] 结果

[0764] 上述HsNMT1和SU-DHL-10实验的结果如下表2所示:

[0765] 表2:生物学实施例1的结果

[0766]

NMT抑制剂	HsNMT1 IC_{50}(nM)	SU-DHL-10IC_{50}(nM)
1	2.1	0.6
2	2.2	15.3
3	-	-
4	-	9.4
5	-	12
6	2.2	5.9
7	-	5.0
8	9	-
9	-	0.7
10	-	0.6
11	-	2.0
12	-	0.9
13	-	0.7
14	-	0.4
15	-	1.2
16	-	0.2
17	2.0	1.0

18	1.9	5.3
19	-	-
20	2.0	12.0
21	-	0.4
22	3.0	9
23	-	-
24	-	0.7
25	2.0	1.0

[0767] 生物学实施例1的结果表明,测试的NMT抑制剂化合物是HsNMT1的抑制剂,并显示出强大的体外细胞毒性活性。

[0768] 生物学实施例2:原位乳腺癌异种移植模型

[0769] 在肿瘤接种前一天,对NOD/SCID小鼠在右侧腹皮下植入雌激素丸(17β-雌二醇,60天释放,0.36mg)。然后在第-8天对,对每只小鼠在右乳腺脂肪垫中接种1×10^7个活BT474乳腺癌细胞,所述细胞悬浮于0.2mL磷酸盐缓冲溶液与matrigel的混合物(1:1)中。当研究第0天的肿瘤体积平均为149.78mm^3时,将小鼠分配到治疗组。第二天开始给药,所有动物均静脉注射曲妥珠单抗、NMT抑制剂1或ADC实施例1。研究于研究第35天终止。每周对小鼠给药一次,连续四周,单独使用媒介物(第1组)、2.5mg/Kg曲妥珠单抗(第2组)、5mg/Kg曲妥珠单抗(第3组)、2.5mg/Kg ADC实施例1(第4组)或5mg/Kg ADC实施例1(第5组),或2mg/Kg NMT抑制剂1,连续给药2天,随后休息5天(第6组)。每组由10只小鼠组成。每周测量小鼠的肿瘤体积三次,并使用公式$0.5(LxW^2)$计算肿瘤体积。图1和图2显示了每次测量时每个研究组的平均肿瘤体积(+SEM),以末次观察值结转形式绘制。使用双因素方差分析对截至研究第23天(此后,其中一个研究组中失去超过50%的动物;第2组)第1、2、3、4和5组的肿瘤读数进行统计分析,或者当组中有值缺失时拟合Mixed-Effects模型(PRISM GraphPad Software Inc.)。对第6组的统计分析一直进行到第13天(此时由于观察到的体重显著减轻,研究终止)。使用GraphPad Prism中的ROUT异常值分析,第5组中的一只小鼠在所有时间点被确定为异常值(在5%置信水平下),因此被排除在分析之外。

[0770] ΔTGI%=((C)平均值-(C0)平均值))-((T)平均值-(T0)平均值))/((C)平均值-(C0)平均值)x100%,其中T是测量日治疗组的平均肿瘤体积,T0是研究第0天的平均肿瘤体积。C是测量日对照组1小鼠的平均肿瘤体积,C0是研究第0天的平均肿瘤体积。

[0771] 在研究期间,每周测量所有动物的体重三次。在整个研究过程中,动物均被给予Diet Gel。图3和图4呈现了给药阶段各组的平均体重。

[0772] 结果

[0773] 单独使用曲妥珠单抗或ADC实施例1对肿瘤大小的治疗结果在表3中以肿瘤生长抑制百分比表示,在图1和图2中以肿瘤体积(mm^3)表示。图1和图2还描绘了单独用NMT抑制剂1治疗的小鼠的肿瘤体积,但由于观察到治疗组体重明显减轻,这项研究提前终止。

[0774] 表3:肿瘤生长抑制

[0775]

组别	治疗	第 23 天肿瘤生长抑制%
1	媒介物	-
2	曲妥珠单抗 2.5 mg/kg	3.6%
3	曲妥珠单抗 5mg/kg	46%
4	ADC 实施例 1 2.5mg/kg	55%
5	ADC 实施例 1 5mg/kg	109%

[0776] 与接受曲妥珠单抗2.5mg/kg(第2组;p<0.0001)治疗的动物相比,接受ADC实施例1 2.5mg/kg(第4组)治疗的小鼠的肿瘤体积显著减小(图1)。此外,与用曲妥珠单抗5mg/kg治疗的动物(第3组;p<0.0001)相比,用ADC实施例1 5.0mg/kg治疗的动物(第5组)的肿瘤体积显著减小(图2)。与用ADC实施例1 2.5mg/kg(第4组;p<0.0001)治疗的动物相比,用ADC实施例1 5.0mg/kg(第5组)治疗的小鼠的肿瘤体积显著减小(参见表3)。与用2.0mg/Kg NMT抑制剂1治疗的小鼠相比,用ADC实施例1 5.0mg/kg(第5组)治疗的小鼠的肿瘤体积显著减小。用NMT抑制剂1 2.0mg/kg(第6组)治疗的小鼠的肿瘤大小减小(见图1和2),但由于该研究组中观察到的体重显著减轻,因此研究在第13天停止。剂量为2.5mg/kg的ADC实施例1在该时间点与NMT抑制剂1(第4组,见图1)相比效果大致相同,但剂量为5.0mg/kg的ADC实施例1效果更佳(图2)。以2.5mg/kg剂量施用ADC实施例1时递送的NMT抑制剂1的剂量比单独给药的NMT抑制剂1低约100倍,这意味着ADC实施例1在体内的效力比NMT抑制剂1高约100倍。

[0777] 图3和图4显示了单独使用曲妥珠单抗、单独使用NMT抑制剂1或ADC实施例1治疗对小鼠体重的影响。用曲妥珠单抗或ADC实施例1治疗的小鼠与媒介物对照没有显著差异,而第6组(NMT抑制剂1)小鼠的体重显著下降(图3和图4),随后由于观察到体重显著减轻,本研究提前终止。

[0778] 生物学实施例3:胃癌异种移植模型

[0779] 本研究的目的是临床前评估抗体药物偶联物(ADC实施例1)在雌性BALB/c裸鼠中治疗皮下NCI-N87人胃异种移植模型的体内治疗效果。

[0780] 在本研究中,对143只小鼠在右侧腹皮下接种1×10^7个活NCI-N87肿瘤细胞,这些肿瘤细胞悬浮在0.1mL PBS与Matrigel(1:1)混合液中,以促进肿瘤发展。研究第0天,102只小鼠被分配到9个治疗组,此时肿瘤体积平均为168.08mm^3。第二天开始给药,给动物静脉注射媒介物对照、曲妥珠单抗、ADC实施例1、德曲妥珠单抗和与NMT抑制剂1偶联的同种型对照抗体(同种型对照)。研究在研究第28天终止。每周对小鼠给药一次,持续两周,分别给予媒介物对照(第1组)、2.5mg/Kg曲妥珠单抗(第2组)、5mg/Kg曲妥珠单抗(第3组)、2.5mg/Kg ADC实施例1(第4组)、5mg/Kg ADC实施例1(第5组)、2.5mg/Kg德曲妥珠单抗(第6组)、5mg/Kg德曲妥珠单抗(第7组)或5mg/Kg同种型对照抗体(第8组)。

[0781] 表4:给药方案汇总

[0782]

组别	治疗	剂量 mg/Kg (mpk)	给药计划	TGI 研究第 28 天
1	媒介物	-	QW x 2 周	

[0783]

2	曲妥珠单抗	2.5	QW x 2 周	123.08
3	曲妥珠单抗	5	QW x 2 周	167.70
4	ADC 实施例 1	2.5	QW x 2 周	153.55
5	ADC 实施例 1	5	QW x 2 周	224.01
6	德曲妥珠单抗	2.5	QW x 2 周	71.66
7	德曲妥珠单抗	5	QW x 2 周	140.71
8	同种型对照-ADC	5	QW x 2 周	-

[0784] 每周测量小鼠的肿瘤体积三次,并使用公式0.5(LxW2)计算肿瘤体积。图5和图6显示了每次测量时每个研究组的平均肿瘤体积(+SEM)。

[0785] ΔTGI%＝((C)平均值-(C0)平均值))-((T)平均值-(T0)平均值))/((C)平均值-(C0)平均值)x100%,其中T是测量日治疗组的平均肿瘤体积,T0是研究第0天的平均肿瘤体积。C是测量日对照组1小鼠的平均肿瘤体积,C0是研究第0天的平均肿瘤体积。

[0786] 在研究期间,每周测量所有动物的体重三次。在整个研究过程中,动物均被给予Diet Gel。图7A(2.5mpk研究)和7B(5mpk研究)呈现了给药期间每组的平均体重。

[0787] 结果

[0788] 在第1组(媒介物对照)中,有3/10只动物出现显著体重减轻(>10%);第2组(2.5mg/Kg曲妥珠单抗)中,有1只动物出现显著体重减轻;第3组(5mg/Kg曲妥珠单抗)中,有1只动物出现显著体重减轻;所有小鼠在下次测量时体重均恢复。在任何其他组中均未观察到明显的体重减轻。

[0789] 与单独使用媒介物(第1组)相比,所有浓度(2.5mg/kg或5mg/kg)下用曲妥珠单抗、ADC实施例1和德曲妥珠单抗治疗的小鼠的肿瘤体积均显著减小($p<0.0001$)。同种型对照ADC(第8组;$p=0.7935$)与单独使用媒介物(第1组)相比没有显著差异。

[0790] 用曲妥珠单抗5mg/kg(第3组;$p<0.0001$)和ADC实施例1 5mg/kg(第5组;$p<0.0001$)治疗的小鼠与用曲妥珠单抗2.5mg/kg(第2组)治疗的小鼠相比,肿瘤体积显著减小。用德曲妥珠单抗2.5mg/kg(第6组;$p<0.0001$)和同种型对照-ADC(第8组;$p<0.0001$)治疗的小鼠与第2组(曲妥珠单抗2.5mg/kg)相比,肿瘤体积明显较高。与曲妥珠单抗2.5mg/kg(第2组)相比,ADC实施例1 2.5mg/kg(第4组;$p=0.8757$)和德曲妥珠单抗5mg/kg(第7组;$p=0.9965$)之间没有显著差异。

[0791] 用ADC实施例1 5mg/kg(第5组;$p<0.0001$)治疗的小鼠与用曲妥珠单抗5mg/kg(第3组)治疗的小鼠相比,肿瘤体积显著减小。第3组(曲妥珠单抗5mg/Kg)和第4组(ADC实施例1 2.5mg/kg)之间没有显著差异。除此以外,所有其他组(第6-8组)的肿瘤体积均明显大于第3组(曲妥珠单抗5mg/kg)。

[0792] 用ADC实施例1 5mg/kg(第5组;$p<0.0001$)治疗的小鼠与用ADC实施例1 2.5mg/kg(第4组)治疗的小鼠相比,肿瘤体积显著减小。第4组和第7组(德曲妥珠单抗5mg/kg,$p=0.9932$)之间没有显著差异。除此以外,所有其他组(第6组和第8组)的肿瘤体积均明显高于第4组(ADC实施例1 2.5mg/kg)。

[0793] 用ADC实施例1 5mg/kg治疗的第5组小鼠的肿瘤体积与所有其他组相比明显较低($p<0.0001$)。

[0794] 与2.5mg/kg德曲妥珠单抗(第6组)相比,用5mg/kg德曲妥珠单抗(第7组,p<

0.0001)治疗的小鼠的肿瘤体积显著减小。与第6组相比,第8组的肿瘤体积明显较大(p<0.0001)。

[0795] 用同种型对照-ADC(第8组;p<0.0001)治疗的小鼠的肿瘤体积明显高于第7组(德曲妥珠单抗5mg/kg)。

[0796] 与媒介物组(第1组)相比,除第8组外,所有治疗组的肿瘤生长抑制(TGI)均明显增加。当比较所有治疗组的肿瘤生长抑制时,用5.0mg/kg ADC实施例1治疗最有效(第5组;TGI=224.01%)。

[0797] TGI%=((C)平均值-(C0)平均值))-((T)平均值-(T0)平均值))/((C)平均值-(C0)平均值)x100%,其中T是测量日治疗组的平均肿瘤体积,T0是研究第0天的平均肿瘤体积。C是测量日对照组1小鼠的平均肿瘤体积,C0是研究第0天的平均肿瘤体积。

[0798] 生物学实施例4:体外评估与NMT抑制剂1偶联的曲妥珠单抗对HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞毒性

[0799] 曲妥珠单抗与NMT抑制剂1偶联(ADC实施例1),并在体外测定中测试其针对HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞毒性活性。将细胞接种于96孔板中,融合率为10%(BT474为8000)。第二天,用在含有250nM Sytox Green的培养基中的50nM、3.3nM和0.2nM的ADC实施例1以及对照处理细胞。在IncuCyte S3中每隔四小时对平板进行一次成像,持续十天。使用IncuCyte软件2022A收集并分析%相(融合)和绿色(Sytox Green)的图像。在细胞处于对数期增殖时,数据表示为随时间推移以相面积(μm^2)作归一化的绿色面积。

[0800] 图8至11表明,ADC实施例1在0.2nM浓度下有效诱导BT474细胞的细胞杀伤,而裸的曲妥珠单抗和与NMT抑制剂1偶联的同种型对照IgG在这些条件下无法杀伤BT474细胞。德曲妥珠单抗也能有效杀伤BT474细胞,但在这些条件下其效果不如ADC实施例1。包括嘌呤霉素作为阳性细胞毒性对照。

[0801] 生物学实施例5:体外评估与NMT抑制剂1偶联的曲妥珠单抗对HER2阴性乳腺癌细胞系MCF7的细胞毒性

[0802] 曲妥珠单抗与NMT抑制剂1偶联(ADC实施例1),并在体外测定中测试其针对HER2阴性乳腺癌细胞系MCF7的细胞毒性活性。将细胞接种于96孔板中,融合率为10%(MCF7为2000)。第二天,用在含有250nM Sytox Green的培养基中的50nM、3.3nM和0.2nM的ADC实施例1以及对照处理细胞。在IncuCyte S3中每隔四小时对平板进行一次成像,持续十天。使用IncuCyte软件2022A收集并分析%相(融合)和绿色(Sytox Green)的图像。在细胞处于对数期增殖时,数据表示为随时间推移以相面积(μm^2)作归一化的绿色面积。

[0803] 图12至15显示ADC实施例1、与NMT抑制剂1偶联的同种型对照IgG、曲妥珠单抗或德曲妥珠单抗在这些条件下无法在高达50nM的浓度下诱导对HER2阴性MCF7细胞的细胞杀伤。这是意料之中的,因为曲妥珠单抗靶向HER2阳性细胞。包括嘌呤霉素作为阳性细胞毒性对照。

[0804] 生物学实施例6:与NMT抑制剂1偶联的曲妥珠单抗的体外“旁观者效应”

[0805] 对HER2阴性MCF7细胞用pHIV eGFP(Addgene质粒21373)稳定转导并通过流式细胞术分选以获得100%GFP阳性(绿色荧光蛋白)的细胞群。两次传代后,将eGFP阳性MCF7细胞以1:1的比率与野生型MCF7细胞(每种1000个细胞)或HER2阳性BT474细胞接种在96孔板中。在培养基(50% MCF7和50% BT474细胞培养基)中,用ADC实施例1、参考实施例1(曲妥珠单

抗-一甲基瑞奥西汀E(MMAE))、同种型对照(如上所述定义)、德曲妥珠单抗或裸曲妥珠单抗(浓度为12.5nM、3.13nM、0.78nM、0.2nM和0.05nM)以及对照处理细胞。在IncuCyte S3中每隔四小时对细胞进行一次成像,持续十天。使用IncuCyte软件2022A收集并分析%绿色(eGFP+MCF7)的图像。数据以绿色面积%(μm^2)表示,作为第9天eGFP+MCF7融合度的量度。

[0806] 图16显示,eGFP+MCF7细胞与野生型MCF7共培养时,与ADC实施例1孵育9天,没有发生显著的细胞毒性,与任何对照或参考标准也没有发生显著的细胞毒性。这是意料之中的,因为曲妥珠单抗靶向HER2阳性细胞。然而,当eGFP+MCF7细胞与HER2阳性BT474细胞共培养时(图17),GFP信号显著丢失,这与旁观者杀伤eGFP+MCF7细胞相对应。在所测试的3种ADC(ADC实施例1、参考实施例1、德曲妥珠单抗)中,ADC实施例1在诱导旁观者杀伤方面最有效,ADC参考实施例1的效果居第二,而德曲妥珠单抗效果最差。裸曲妥珠单抗和与NMT抑制剂1偶联的同种型对照IgG被用作对照,并且均未诱导任何旁观者杀伤。

[0807] 生物学实施例7:与NMT抑制剂1偶联的抗体的细胞毒性的体外评估

[0808] 将NMT抑制剂1按照所述与曲妥珠单抗偶联(ADC实施例1)和与沙西妥珠单抗偶联(ADC实施例3)。将NMT抑制剂26与曲妥珠单抗偶联(ADC实施例5)。测试了ADC实施例1、3和5针对一组细胞系(包括BT474、JIMT 1、NCI N87、NCI H292、IM95-m、ZR-75-30和NCI H2170)的细胞毒性活性(图18至24)。

[0809] NMT抑制剂1按照所述与伊非那他单抗偶联(ADC实施例4),并测试其针对包括LNCaP、C42和VCaP在内的一组前列腺癌细胞系的细胞毒性活性(图25至27)。将细胞以设定的初始密度接种于96孔平底板中的合适的生长培养基中。24小时后,添加每种测试化合物的连续稀释液,浓度范围为10nM至0.001nM的NMT抑制剂1,或50nM至0.005nM的各种ADC。暴露144小时后,通过CellTiter-Glo2.0溶液细胞活力测定测量细胞增殖。使用以下公式计算终点时相对于DMSO媒介物对照的活力的抑制百分比(经过空白校正、时间零点校正和化合物浓度的对数变换):

[0810] 活力%=(处理细胞第6天的发光-空白)-(第0天的发光-空白)/(媒介物处理细胞第6天的发光平均值-空白)-(第0天的发光-空白)

[0811] 结果

[0812] 表5显示了如上所述量化的细胞活力抑制情况,其定义为绝对IC50(响应减少一半时的抑制剂浓度)或相对IC50(使曲线下降到曲线顶部和底部平台之间中间位置所需的浓度)。图18至27显示了每种细胞系的完整浓度响应曲线(平均值+/-SEM)。

[0813] 表5:细胞活力的抑制

[0814]

细胞系	ADC 实施例	绝对 IC50 (nM)	相对 IC50 (nM)
BT474	实施例 1	0.172	0.255
BT474	实施例 5	2.712	1.334
JIMT 1	实施例 1	52.07	4.625
JIMT 1	实施例 3	0.486	0.247
NCI N87	实施例 1	0.791	0.475
NCI N87	实施例 3	3.999	0.799
NCI H292	实施例 3	0.544	0.269
IM95-m	实施例 3	0.423	0.323
ZR-75-30	实施例 1	<0.2	0.253
ZR-75-30	实施例 5	0.18	0.393
NCI H2170	实施例 1	1.581	0.946
NCI H2170	实施例 3	51.61	11.94
LNCaP	实施例 4	0.154	0.147
C42	实施例 4	1.345	0.343
VCaP	实施例 4	0.158	0.212

[0815] 生物学实施例8:使用CellTiter-Glo(CTG)发光细胞活力测定评估测试样品作为单一剂对胃癌类器官系细胞的活力的影响

[0816] 方法

[0817] 第1天:将患者来源的胃癌类器官(PDXO)剪切成均匀的大小,并将所需数量的类器官与50% Matrigel以1:1的比例混合,以产生适合进行筛选的类器官大小。

[0818] 第0天:类器官接种

[0819] 1.通过将20μl 100x Dispase溶液添加到含有2ml类器官培养基的6孔板的每个孔中,从而收集每个孔中的类器官。

[0820] 2.将板放回培养箱中,37℃培养30分钟。

[0821] 3.从所有孔中收集类器官,并通过预湿的100μm过滤器吸入50ml塑料管中。

[0822] 4.所有孔都通过100μm过滤器过滤后,再通过预湿的20μm过滤器过滤液流。

[0823] 5.倒置20μm过滤器并在新的50ml管中回收类器官。

[0824] 6.收集类器官并将其重新悬浮在相应的培养基中。对类器官进行计数以获得浓度。

[0825] 7.用培养基调节细胞浓度至合适浓度。

[0826] 8.添加Matrigel至最终浓度为5%v/v,并将类器官悬浮液放在冰上。

[0827] 9.使用Multidrop分配器将40μL细胞悬浮液和相应的培养基按照以下接种密度添加到384孔板中:

[0828]

编号	类器官系	接种密度
1	GA0429B	300/孔
2	GA6877B	120/孔
3	GA6894B	320/孔
4	GA2434B	250/孔
5	GA3102B	250/孔
6	GA0119B	500/孔
7	GA0091B	300/孔
8	GA6815B	400/孔
9	GA0098B	350/孔
10	GA6833B	350/孔
11	GA0087B	300/孔
12	GA2109B	350/孔

[0829]

13	GA3055B	300/孔
14	GA6866B	300/孔
15	GA0060B	100/孔
16	GA6891B	350/孔

[0830] 10.在添加化合物并进行第0天读数之前,将筛选板放回培养箱中。设置了两个重复板。一个用于第0天的读数(T0),另一个用于终点的读数。

[0831] 第0天:化合物治疗和第0天基线CTG(cell titre glo)读数

[0832] 11.根据药物稀释方案和板图通过Tecan D300e添加测试样品

[0833] 12.将筛选板放回培养箱中。

[0834] 13.对于第0天读数板,每孔添加40μL CTG 3D并在Envision板读数器上读取发光信号。

[0835] 第6天:终点CTG读数。

[0836] 1.在测定结束时读取测定板上的发光CTG信号:通过Multidrop分配器向每个孔中添加40μL CTG 3D,在平板振荡器上混合内容物5分钟,然后在室温下黑暗条件下孵育平板30分钟。在Envision平板读取器上读取发光信号。

[0837] 使用GraphPad Prism以图形方式显示数据。为了计算绝对IC50,使用具有可变斜率的S形剂量响应的非线性回归模型拟合浓度-响应曲线。计算存活率的公式如下所示,并根据GraphPad Prism生成的剂量响应曲线计算绝对IC50。

[0838] 存活率(%)=(Lum供试品-Lum培养基对照)/(Lum媒介物对照-Lum培养基对照)×100%。

[0839] 将胃癌类器官与一定浓度范围的以下物质孵育5或6天:(1)同种型对照ADC,(2)ADC实施例1,(3)作为阳性对照的星形孢菌素,(4)曲妥珠单抗或(5)德曲妥珠单抗(曲妥珠单抗-DXd)。表6显示了IC50(μM)、最大抑制率(%)和曲线下面积。

[0840] 表6:类器官研究的结果

[0841]

编号	模型名称	编号	供试品	IC50 (μM)	最大抑制率 (%)	AUC(曲线下面积)
1	GA0429B	1	同种型对照	0.0064	89.31	299.5734
		2	ADC 实施例 1	0.0005	96.1	190.0932
		3	星形孢菌素	0.0054	99.92	170.8729
		4	曲妥珠单抗	>0.05	7.66	NA
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	41.08	340.3922
2	GA6877B	1	同种型对照	0.0147	85.54	348.8528
		2	ADC 实施例 1	0.0008	96.86	213.6828
		3	星形孢菌素	0.0059	99.99	175.472
		4	曲妥珠单抗	>0.05	40.47	328.7294
		5	曲妥珠单抗-DXd	0.0004	80.47	196.3687
3	GA6894B	1	同种型对照	0.0109	99.04	339.4386
		2	ADC 实施例 1	0.0044	98.02	284.3133
		3	星形孢菌素	0.0085	100.01	230.6577
		4	曲妥珠单抗	>0.05	28.1	338.0717
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	44.79	320.9681
4	GA2434B	1	同种型对照	>0.05	16.66	372.6593
		2	ADC 实施例 1	>0.05	36.66	378.1264
		3	星形孢菌素	0.0239	99.86	226.6809
		4	曲妥珠单抗	>0.05	27.95	368.0264
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	21.96	374.6871
5	GA3102B	1	同种型对照	0.0446	51.88	358.0517
		2	ADC 实施例 1	0.0029	72.15	285.1367
		3	星形孢菌素	0.0106	99.71	200.7667
		4	曲妥珠单抗	>0.05	13.75	362.8386
		5	曲妥珠单抗-DXd	0.0007	90.24	215.0035
6	GA0119B	1	同种型对照	>0.05	54.4	384.4805
		2	ADC 实施例 1	0.0187	59.37	373.0805
		3	星形孢菌素	0.0089	99.89	212.2837
		4	曲妥珠单抗	>0.05	12.83	382.5737
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	26.83	364.6999
7	GA0091B	1	同种型对照	>0.05	17.83	425.8
		2	ADC 实施例 1	>0.05	18.13	462.2
		3	星形孢菌素	0.0222	99.29	199.9

[0842]

		4	曲妥珠单抗	>0.05	17.54	402.9
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	-4.07	459.8
8	GA6815B	1	同种型对照	0.0156	71.42	371.8204
		2	ADC 实施例 1	0.0007	89.66	245.5017
		3	星形孢菌素	0.0158	99.01	194.3428
		4	曲妥珠单抗	0.0019	64.47	284.7039
		5	曲妥珠单抗-DXd	0.0004	63.4	246.891
9	GA0098B	1	同种型对照	>0.05	28.61	408.2
		2	ADC 实施例 1	>0.05	25.23	385.3
		3	星形孢菌素	0.0221	99.46	239.6
		4	曲妥珠单抗	>0.05	15.3	389.5
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	8.49	399.6
10	GA6833B	1	同种型对照	0.0115	96.15	353.3708
		2	ADC 实施例 1	0.0068	93.75	305.6923
		3	星形孢菌素	0.0053	100.02	158.1701
		4	曲妥珠单抗	>0.05	32.44	311.5796
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	30.23	347.9672
11	GA0087B	1	同种型对照	0.0492	71.07	435.2
		2	ADC 实施例 1	0.0226	78.92	485.0
		3	星形孢菌素	0.0029	98.04	113.2
		4	曲妥珠单抗	>0.05	35.31	447.7
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	42.94	330.3
12	GA2109B	1	同种型对照	0.0162	89.6	334.7632
		2	ADC 实施例 1	0.0093	93.34	314.0499
		3	星形孢菌素	0.0393	99.99	233.3136
		4	曲妥珠单抗	>0.05	34.63	365.1782
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	18.41	376.8581
13	GA3055B	1	同种型对照	0.0079	93.85	297.0282
		2	ADC 实施例 1	0.0046	94.46	275.49
		3	星形孢菌素	0.0033	98.42	144.7132
		4	曲妥珠单抗	>0.05	43.3	343.8818
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	32.59	365.9383
14	GA6866B	1	同种型对照	0.0065	81.77	326.5628
		2	ADC 实施例 1	0.0004	88.15	189.9801
		3	星形孢菌素	0.0061	99.97	201.1356
		4	曲妥珠单抗	0.0073	62.62	304.9903
		5	曲妥珠单抗-DXd	0.0004	85.3	192.9042
15	GA0060B	1	同种型对照	0.0127	97.1	381.1712
		2	ADC 实施例 1	0.0037	98.82	289.755
		3	星形孢菌素	0.0006	99.99	85.1
		4	曲妥珠单抗	>0.05	34.19	348.9219
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	36.69	330.4667
16	GA6891B	1	同种型对照	0.0173	73.24	392.3645

[0843]

		2	ADC 实施例 1	0.0022	78.99	304.6253
		3	星形孢菌素	0.009	99.57	174.0868
		4	曲妥珠单抗	>0.05	-1.19	440.8762
		5	曲妥珠单抗-DXd	>0.05	-4.87	442.4096

[0844] 16个胃癌类器官结果的浓度响应曲线如图28至43所示。数据显示了用与NMT抑制剂1偶联的同种型对照、ADC实施例1、德曲妥珠单抗(DXd)和曲妥珠单抗治疗后的类器官活力(平均值+/-SEM)。

[0845] 结果显示,在大多数胃癌类器官中,ADC实施例1最有效,如其与对照相比的IC50值所示。在某些类器官中,ADC实施例1具有与曲妥珠单抗-DXd相当的活性,如IC50值所示。

[0846] 生物学实施例9:雄性食蟹猴中单次静脉注射ADC实施例1后的最大耐受剂量研究

[0847] 此项MTD研究中采用了6只常规非首次用于实验的雄性食蟹猴。进行该研究的服务提供商实验室已获得国际实验室动物护理评估和认证协会(AAALAC)的证书。本研究的动物护理和使用申请已提交给服务提供商的机构动物护理和使用委员会(IACUC)审批。IACUC审查了此协议是否符合其TSPIACUC政策和程序。猴子在运往服务提供商的设施之前,需在供应商处隔离至少2周。对动物进行针对结核病、疱疹B、猿猴获得性免疫缺陷病毒(SIV)、猿猴逆转录病毒(SRV)、猿猴T细胞淋巴细胞病毒(STLV)、志贺氏菌和沙门氏菌的活动性感染筛查,并评估其正常血液学和临床化学参数。进行了血清学检测或粪便分析以寻找寄生虫的证据。

[0848] 将动物随机分成3组,每组2只动物,并根据表7通过缓慢静脉注射(5分钟)施用供试品ADC实施例1。

[0849] 表7:生物学实施例9的给药方案

[0850]

组别	治疗	剂量水平 (mg/kg/天)	雄性动物的数量

[0851]

1	ADC 实施例 1	5	2
2		10	2
3		20	2

[0852] 根据表8对动物在生存期间进行评估。

[0853] 表8:生物学实施例9的评估方案

[0854]

操作步骤	频率
笼边观察	每日两次,给药后 2 小时再观察一次(仅限第 1 天)
详细的临床观察	首次给药前以及此后 6 天内每天
体重	首次给药前以及此后 6 天内每天
定性食物消耗	每日,定性
临床病理学(临床化学、血液学和凝血)	第 1 天给药前、第 2 天给药后以及第 7 天或第 11 天研究终止前

[0855] 在以下几天从每只研究动物采集血液样本:给药前一天(第1天)、研究第2天和终

止时(第7天或第11天)。在采集样本进行临床病理学分析之前,使动物禁食过夜。通过穿刺外周血管收集血液样本。对血液样本进行处理并进行血液学、临床生物化学和凝血分析。5、10和20mg/Kg剂量各组均耐受性良好,并且血液学或临床化学参数没有发生显著变化。尤其是5和10mg/Kg组均未显示出任何变化。图44a和44b显示了20mg/Kg组的代表性数据。具体来说,将血液学标志物的平均(+/-SEM)水平绘制为基线(给药前)值的标准化值。第7天未观察到任何变化,而第11天观察到的变化相对较小,不显著。

[0856] 生物学实施例10:ADC实施例1在未荷瘤雌性CD1小鼠中的体内耐受性研究

[0857] 本研究的目的是评估ADC实施例1在雌性CD1小鼠中的体内耐受性。每天测量体重,并在结束时收集每只动物的终末全血和血清,以测量全血细胞计数和血液生物化学指标。

[0858] 24只小鼠被随机分成4组,第二天开始给药。所有动物均经静脉内单剂量注射PBS(第1组:媒介物对照)或ADC实施例1(第2、3和4组;25、50或100mg/kg)。研究于第7天终止。测量了每日食物摄入量,并在研究结束时对所有动物和2只未接受过实验的动物进行了全面尸检。

[0859] 在研究第5天观察到第4组(ADC实施例1 100mg/kg)的3只动物出现显著体重减轻(>10%),并且第4组在第6天终止研究(图45)。在任何其他组中均未观察到明显的体重减轻(图45),并且未观察到研究中的任何动物的临床观察结果。

[0860] 在研究结束时,从所有动物采集全血用于全血细胞计数(CBC),并采集血清用于血液生化测试。图46显示了结束时动物血液中AST(天冬氨酸转氨酶)、ALT(丙氨酸转氨酶)、ALP(碱性磷酸酶)、LDH(乳酸脱氢酶)、CK(肌酸激酶)和GGT(γ-谷氨酰转移酶)的平均值。仅第4组(100mg/Kg)出现明显变化。图47显示了终止时动物血液中的细胞平均值:LYM(淋巴细胞)、MON(单核细胞)、NEU(中性粒细胞)、RBC(红细胞)、HGB(血红蛋白)和PLT(血小板)。仅在第4组(ADC实例1 100mg/Kg)中观察到明显变化。

[0861] 结论是,ADC实施例1在小鼠中单次IV剂量高达50mg/Kg后耐受性良好,该剂量是生物学实施例2和3中观察到的有效剂量的10倍。

[0862] 生物学实施例11:LNCaP前列腺癌异种移植模型。

[0863] 该研究的目的是评估ADC实施例4在荷有LNCaP肿瘤的雄性NOD SCID小鼠中的疗效。

[0864] 共使用84只5-8周龄、体重25-30g的雄性NOD SCID小鼠进行研究。将$1x10^7$个LNCaP肿瘤细胞(存活率为78%、融合率为大约70-80%)皮下植入雄性NOD SCID小鼠侧腹。当肿瘤达到约80-100mm^3时,将动物分配到治疗组,如下表9所示,每组分配10只小鼠,每组具有相似的肿瘤体积平均值和分布。对小鼠用单独的媒介物、未偶联的伊非那他单抗、伊非那他单抗-德鲁替康(ifinatamab-deruxtecan)(伊非那他单抗-DXd)或ADC实施例4进行治疗。

[0865] 表9:生物学实施例11的给药方案

[0866]

组别	*n*	治疗	剂量	途径	给药频率
1	10	媒介物(PBS + 0.02% PS80)	-	IV	Q7D(共三剂)
2	10	伊非那他单抗	10 mg/kg	IV	Q7D(共三剂)
3	10	伊非那他单抗	5 mg/kg	IV	Q7D(共三剂)
4	10	伊非那他单抗-DXd	10 mg/kg	IV	Q7D(共三剂)
5	10	伊非那他单抗-DXd	5 mg/kg	IV	Q7D(共三剂)
6	10	ADC 实施例 4	10 mg/kg	IV	Q7D(共三剂)
7	10	ADC 实施例 4	5 mg/kg	IV	Q7D(共三剂)

[0867] 观察时间:35天。

[0868] 剂量:所有IV剂量均为5mL/kg

[0869] 在研究过程中,未观察到对任何剂量的不良反应,且每组的平均体重保持在治疗前水平的10%以内(图49)。

[0870] 在研究的各个时间点都观察到体重减轻>10%的个别病例。第一只动物接受治疗后三周,多所有小鼠都提供DietGel,以减轻体重减轻。没有动物因为体重减轻而提前被安乐死,这些体重减轻的情况可能与肿瘤负荷有关。

[0871] 在研究的第28天,接受三次Q7D剂量10mg/kg的ADC实施例4的动物表现出比接受媒介物对照治疗的动物显著更高的平均体重(单因素方差分析,Dunnett's p=0.0046)。此时,其他治疗组的体重与媒介物组无显著差异。

[0872] 出于福祉关切,两只动物被提前处死。第一只动物在用10mg/kg伊非那他单抗治疗的第26天被安乐死,而第二只动物在用5mg/kg伊非那他单抗-DXd治疗的第33天被安乐死。两只动物均因呼吸运动失调而主要被实施安乐死。每只动物尸检均记录到大型自发性胸腺肿瘤。

[0873] 在研究期间,媒介物治疗组的肿瘤稳步生长,到研究第28天达到平均体积752±89.4mm^3。

[0874] 第28天,以10mg/kg或5mg/kg的伊非那他单抗治疗对LNCaP肿瘤体积没有显著影响,接受该疗法的动物的肿瘤生长曲线与单独用媒介物治疗的动物大致相似(图48,表10)。

[0875] 与媒介物对照相比,用10mg/kg伊非那他单抗-DXd治疗到第28天时LNCaP肿瘤的平均体积显著减小。接受这种疗法的动物的肿瘤生长率大多低于对照动物。剂量为5mg/kg的伊非那他单抗-DXd较小程度地减缓了LNCaP肿瘤的生长(图48,表10)。

[0876] 所有以10mg/kgADC实施例4给药的动物在开始治疗后三周内均显示肿瘤消退(图48,表10),与媒介物相比,该疗法从第7天起显著减少平均肿瘤体积(TV)(曼-惠特尼检验(Mann-Whitney))。到第28天,每个肿瘤均已消退至治疗开始时体积的≤25%。

[0877] 同样,与对照组相比,接受5mg/kg ADC实施例4的动物在第7天至第28天的肿瘤体积显著减少(曼-惠特尼检验)。到第28天,除一只动物外,所有动物的肿瘤体积都低于治疗开始时的记录值。

[0878] 表10.治疗组的肿瘤体积比较。

[0879] 通过克鲁斯卡尔-沃利斯检验(Kruskal-Wallis)和Dunn多重比较计算出相对于媒

介物对照的调整后p值。TGI％＝((C)平均值-(C0)平均值))-((T)平均值-(T0)平均值))/((C)平均值-(C0)平均值)x100％,其中T是测量日治疗组的平均肿瘤体积,T0是研究第0天的平均肿瘤体积。C是测量日对照组1小鼠的平均肿瘤体积,C0是研究第0天的平均肿瘤体积。

[0880]

治疗组	第 28 天肿瘤体积(mm^3，平均值±SEM)	与媒介物相比的调整后 p 值 (TV)	肿瘤生长抑制 (TGI, %)
G1： 媒介物	752.4 ± 89.4	-	-
G2： 伊非那他单抗，10 mg/kg, IV; Q7D (x3)	666.56 ± 103.2	>0.9999 (ns)	13.0
G3： 伊非那他单抗，5 mg/kg, IV; Q7D (x3)	551.4 ± 73.1	>0.9999 (ns)	30.6
G4： 伊非那他单抗-DXd，10 mg/kg, IV; Q7D (x3)	259.5 ± 50.3	0. 0251 (*)	75.0
G5： 伊非那他单抗-DXd，5 mg/kg, IV; Q7D (x3)	364.6 ± 51.7	0. 1836 (ns)	58.8
G6： ADC 实施例 4，10 mg/kg, IV; Q7D (x3)	10.1 ± 2.3	<0.0001 (****)	112.4
G7： ADC 实施例 4，5 mg/kg, IV; Q7D (x3)	63.2 ± 16.4	<0.0001 (****)	104.4

[0881] 生物学实施例12:VCaP前列腺癌异种移植模型。

[0882] 本研究的目的为临床前评估ADC实施例4在未阉割雄性CB17/SCID小鼠中治疗皮下VCaP人前列腺癌异种移植模型的体内治疗效果。

[0883] 在本研究中,在研究第-20天,对144只小鼠在右前侧腹区皮下接种$1x10^7$个活VCaP肿瘤细胞,这些肿瘤细胞悬浮在0.1mL PBS与Matrigel(1:1)混合物中,以供肿瘤发展。当研究第0天的肿瘤体积平均为约162.16mm^3时,将80只小鼠分配到8个治疗组。第二天开始给药,所有动物均静脉给药ADC实施例4、伊非那他单抗-德鲁替康(伊非那他单抗-Dxd)或未偶联的伊非那他单抗。所有小鼠均接受两剂测试剂,分别在研究第1天和研究第8天。研究在研究第30天终止。

[0884] 8个组分配如下:

[0885] 第1组媒介物对照

[0886] 第2组未偶联的伊非那他单抗5mpk

[0887] 第3组未偶联的伊非那他单抗2.5mpk

[0888] 第4组伊非那他单抗-德鲁替康5mpk

[0889] 第5组伊非那他单抗-德鲁替康2.5mpk

[0890] 第6组ADC实施例4 10mpk

[0891] 第7组ADC实施例4 5mpk

[0892] 第8组ADC实施例4 2.5mpk

[0893] 在研究中,所有动物均未观察到明显的体重减轻(图51)。

[0894] 与单独使用媒介物(第1组)相比时,用所有浓度的ADC实施例4(第8组,2.5mg/kg;第7组,5mg/kg;和第6组,10mg/kg)治疗的小鼠的肿瘤体积显著减小(p<0.0001)。伊非那他单抗-Dxd 5mg/kg(第4组;p=0.0078)与单独使用媒介物(第1组)相比显示出明显更大的肿瘤体积,而伊非那他单抗-Dxd 2.5mg/kg(第5组;p=0.8127)和两种浓度的未偶联伊非那他单抗(第2组,p=0.1104;和第3组,p=0.6703)与单独使用媒介物(第1组)相比没有显著差异,见图50。

[0895] 与所有其他治疗组(第2-5组;p<0.0001)相比,用所有三个浓度的ADC实施例4(第6组,10mg/kg;第7组,5mg/kg;和第8组,2.5mg/kg)治疗的小鼠的肿瘤体积均显著减小。还存在剂量响应的证据,第6组(10mg/kg)的肿瘤体积减少最多,然后是第7组(5mg/kg),接着是第8组(2.5mg/kg);各组之间均有显著差异(p<0.0001),见图50。

[0896] 用伊非那他单抗-Dxd 2.5mg/kg(第5组)治疗的小鼠与第2、3和4组(分别为未偶联的伊非那他单抗5mg/kg、未偶联的伊非那他单抗2.5mg/kg、伊非那他单抗-Dxd 5mg/kg)的小鼠的肿瘤体积没有显著差异。用伊非那他单抗-Dxd 5mg/kg(第4组)治疗的小鼠的肿瘤体积明显高于用未偶联的伊非那他单抗5mg/kg(第2组,p=0.0002)和未偶联的伊非那他单抗2.5mg/kg(第3组,p=0.0216)治疗的小鼠,见图50。

[0897] 与媒介物组(第1组)相比,所有治疗组的肿瘤生长抑制(ΔTGI)均明显增加。当比较所有治疗组的肿瘤生长抑制时,用10mg/kg和5mg/kg ADC实施例4进行的治疗最有效(第6组,ΔTGI=114.03%;和第7组,ΔTGI=114.69%),见表11。

[0898] 表11.生物学实施例12的给药方案和结果

[0899]

组别	治疗描述	供试品剂量 (mg/kg)	给药计划	ΔTGI (研究第 17 天)
1	媒介物 – PBS + 0.02% PS80 pH 7.4	-	QW x 2 周	-
2	未偶联的伊非那他单抗	5	QW x 2 周	12.44
3	未偶联的伊非那他单抗	2.5	QW x 2 周	8.47
4	伊非那他单抗-DXd	5	QW x 2 周	2.86
5	伊非那他单抗-DXd	2.5	QW x 2 周	5.24
6	ADC 实施例 4	10	QW x 2 周	114.03
7	ADC 实施例 4	5	QW x 2 周	114.69
8	ADC 实施例 4	2.5	QW x 2 周	108.31

[0900] 生物学实施例13:JIMT-1乳腺癌异种移植模型。

[0901] 本研究的目的是临床前评估ADC实施例3在雌性NOD/SCID小鼠中的皮下JIMT-1人乳腺异种移植模型治疗中的体内治疗效果。

[0902] 在本研究中,在研究第-15天,对128只小鼠在右前侧腹区皮下接种5x10^{6}个活JIMT-1肿瘤细胞,这些肿瘤细胞悬浮在0.1mL PBS中,以促进肿瘤发展。当研究第0天的肿瘤体积平均为约160.66mm^{3}时,将80只小鼠分配到8个治疗组。第二天开始给药,对所有动物均静脉给药ADC实施例3、沙西妥珠单抗-戈维替康或未偶联的沙西妥珠单抗。研究于研究第60个天终止。8个组分配如下:

[0903] 第1组媒介物对照

[0904] 第2组未偶联的沙西妥珠单抗5mpk

[0905] 第3组未偶联的沙西妥珠单抗2.5mpk

[0906] 第4组沙西妥珠单抗5mpk(ADC实施例3,第27天和第34天添加5mg/kg)

[0907] 第5组沙西妥珠单抗2.5mpk(ADC实施例3,第27天添加5mg/kg)

[0908] 第6组ADC实施例3 10mpk

[0909] 第7组ADC实施例3 5mpk

[0910] 第8组ADC实施例3 2.5mpk

[0911] 在第7组中观察到一只动物体重明显减轻(>10%)。在研究的任何其他组中均未观察到体重明显减轻,参见图54和55。在研究的第10天,发现第2组中的一只动物死亡。

[0912] 与单独使用媒介物(第1组)相比时,用所有浓度的ADC实施例3(第8组,2.5mg/kg;第7组,5mg/kg;和第6组,10mg/kg)治疗的小鼠的肿瘤体积显著减小($p<0.0001$)。两种浓度的沙西妥珠单抗(第4组,5mg/kg,$p<0.0001$;第5组,2.5mg/kg,$p=0.0348$)与单独使用媒介物(第1组)相比,肿瘤体积均显著减小。当与单独媒介物(第1组)相比时,第2组(5mg/kg,$p=0.0028$)中使用未偶联的沙西妥珠单抗后肿瘤体积显著减小,但第3组(2.5mg/kg,$p=0.0586$)没有显著差异。5mg/kg和10mg/kg组的数据如图52所示。2.5mg/kg组的数据如图53所示。

[0913] 与所有其他治疗组(第2-5组;$p<0.0001$)相比,用所有三个浓度的ADC实施例3(第6组,10mg/kg;第7组,5mg/kg;和第8组,2.5mg/kg)治疗的小鼠的肿瘤体积均显著减小。也有剂量响应的证据,与第8组(2.5mg/kg)相比,第6组(10mg/kg)和第7组(5mg/kg)显示出最大的肿瘤体积减少($p<0.0001$)。

[0914] 虽然与未偶联的沙西妥珠单抗第2组(5mg/kg,$p=0.0097$)和第3组(2.5mg/kg,$p=0.0499$)相比,第4组沙西妥珠单抗-戈维替康5mg/kg显示肿瘤体积显著减小,但第5组(沙西妥珠单抗-戈维替康,2.5mg/kg)与第2组($p=0.8424$)和第3组($p=0.9995$)之间没有显著差异。第2组(5mg/kg)和第3组(2.5mg/kg)两种浓度的未偶联的沙西妥珠单抗之间也没有显著差异,$p=0.9837$。然而,第4组(5mg/kg)和第5组(2.5mg/kg)两种浓度的沙西妥珠单抗-戈维替康之间存在显著差异,$p=0.3802$。

[0915] 与媒介物组(第1组)相比,所有治疗组的肿瘤生长抑制(ΔTGI)均明显增加。当比较所有治疗组的肿瘤生长抑制时,用10mg/kg和5mg/kg ADC实施例3进行的治疗最有效(第6组,ΔTGI=121.55%;和第7组,ΔTGI=122.04%)。

[0916] 由于用沙西妥珠单抗戈维替康治疗在第4组中仅部分有效,因此在研究第27天和第34天以5mpk IV施用额外剂量的ADC实施例3。与媒介物对照相比,这导致肿瘤体积显著减少(见图52)。第5组还在研究第27天接受了一剂ADC实施例3(IV,5mpk)(参见图53),尽管未观察到显著响应。

[0917] 表12.生物学实施例13的给药方案和结果

[0918]

组别	治疗描述	供试品剂量 (mg/kg)	给药计划	ΔTGI (研究第 28 天)
1	媒介物(PBS + 0.02%聚山梨醇酯 80, pH 7.4)	-	QW x 2 周	-
2	未偶联的沙西妥珠单抗	5	QW x 2 周	14.44

[0919]

3	未偶联的沙西妥珠单抗	2.5	QW x 2 周	12.11
4	沙西妥珠单抗-戈维替康	5	QW x 2 周	23.39
5	沙西妥珠单抗-戈维替康	2.5	QW x 2 周	13.13
6	ADC 实施例 3	10	QW x 2 周	121.55
7	ADC 实施例 3	5	QW x 2 周	122.04
8	ADC 实施例 3	2.5	QW x 2 周	74.76

[0920] 生物学实施例14:体外评估与NMT抑制剂1偶联的曲妥珠单抗对HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞毒性

[0921] 曲妥珠单抗与NMT抑制剂1偶联(ADC实施例8),并在体外测定中测试其针对HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞毒性活性。将细胞接种于96孔板中,融合率为10％(BT474为8000)。第二天,用在含有250nM Sytox Green的培养基中的50nM、3.13nM和0.2nM的ADC实施例8以及对照处理细胞。在IncuCyte S3中每隔四小时对平板进行一次成像,持续十天。使用IncuCyte软件2022A收集并分析％相(融合)和绿色(Sytox Green)的图像。在细胞处于对数期增殖时,数据表示为随时间推移以相面积(μm^2)作归一化的绿色面积。

[0922] 图56显示,ADC实施例8在0.2nM浓度下有效诱导BT474细胞的细胞杀伤,而裸曲妥珠单抗和与NMT抑制剂1偶联的同种型对照IgG在这些条件下无法杀伤BT474细胞(参见图9和11)。德曲妥珠单抗也能有效杀伤BT474细胞,但在这些条件下其效果不如ADC实施例8(参见图10)。包括嘌呤霉素作为阳性细胞毒性对照。

[0923] 生物学实施例15:体外评估与NMT抑制剂1偶联的曲妥珠单抗对HER2阴性乳腺癌细胞系MCF7的细胞毒性

[0924] 曲妥珠单抗与NMT抑制剂1偶联(ADC实施例8),并在体外测定中测试其针对HER2阴性乳腺癌细胞系MCF7的细胞毒性活性。将细胞接种于96孔板中,融合率为10％(MCF7为2000)。第二天,用在含有250nM Sytox Green的培养基中的50nM、3.13nM和0.2nM的ADC实施例8以及对照处理细胞。在IncuCyte S3中每隔四小时对平板进行一次成像,持续十天。使用IncuCyte软件2022A收集并分析％相(融合)和绿色(Sytox Green)的图像。在细胞处于对数期增殖时,数据表示为随时间推移以相面积(μm^2)作归一化的绿色面积。

[0925] 图13、14、15和57表明,ADC实施例8、与NMT抑制剂1偶联的同种型对照IgG、曲妥珠

单抗或德曲妥珠单抗在这些条件下无法在高达50nM的浓度下诱导对HER2阴性MCF7细胞的细胞杀伤。这是意料之中的,因为曲妥珠单抗靶向HER2阳性细胞。包括嘌呤霉素作为阳性细胞毒性对照。

[0926] 结论

[0927] 生物学实施例1的结果表明,测试的NMT抑制剂化合物是HsNMT1的抑制剂,并显示出强大的体外细胞毒性活性。

[0928] 生物学实施例2的结果表明,当与NMT抑制剂1相比时,本发明测试的ADC表现出强效的体内细胞毒性活性并且具有改善的体内耐受性。

[0929] 生物学实施例3的结果证明,本发明的测试ADC,即ADC实施例1,在抑制胃癌异种移植小鼠模型中的肿瘤生长方面表现出比其他治疗组更好的疗效(参见表4),并且没有观察到显著的体重减轻。

[0930] 生物学实施例4的结果表明,本发明的测试ADC,即ADC实施例1,有效诱导HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞杀伤。与其他测试化合物:曲妥珠单抗、德曲妥珠单抗和同种型对照相比,本发明的ADC在诱导细胞杀伤方面更有效。

[0931] 生物学实施例6的结果表明,在与HER2阳性BT474细胞共培养的eGFP+MCF7细胞中,与其他ADC和对照相比,ADC实施例1在诱导旁观者杀伤方面最有效。

[0932] 生物学实施例7的结果表明,本发明的各种ADC(特别是ADC实施例1和3-5)对一系列癌细胞系具有细胞毒性活性,如细胞活力测定所测量。如图18至27中的数据所示,本发明的各种ADC(特别是ADC实施例1和3-5)与相应的对照相比具有改善的细胞毒性。

[0933] 生物学实施例8的结果显示,在大多数胃癌类器官中,ADC实施例1最有效,如其与对照相比的IC50值所示。在某些类器官中,ADC实施例1具有与曲妥珠单抗-DXd相当的活性,如IC50值所示。

[0934] 生物学实施例9的结果表明,ADC实施例1在猴子模型中耐受性良好,即使在最高剂量20mg/kg/天下,血液学或临床化学参数也没有发生显著变化。

[0935] 生物学实施例10的结果表明,对小鼠单次IV给药高达50mg/Kg的剂量后,ADC实施例1的耐受性良好,该剂量是生物学实施例2和3中观察到的有效剂量的10倍。

[0936] 生物学实施例11的结果表明,在LNCaP前列腺癌异种移植模型中,小鼠对5mg/kg和10mg/kg剂量的ADC实施例4均具有良好的耐受性。接受这些剂量的ADC实施例4的动物表现出肿瘤体积显著减少,而单独使用伊非那他单抗治疗对肿瘤体积没有显著影响。ADC实施例4在两种剂量下的表现也优于伊非那他单抗-DXd。

[0937] 生物学实施例12的结果表明,在VCaP人前列腺癌异种移植模型中,小鼠对2.5mg/kg、5mg/kg和10mg/kg剂量的ADC实施例4均具有良好的耐受性。ADC实施例4比伊非那他单抗-Dxd和未偶联的伊非那他单抗更多地减少了肿瘤体积。确实,使用未偶联的伊非那他单抗与单独使用媒介物相比没有显著差异。与对照相比,ADC实施例4导致肿瘤生长抑制最多,见表11。

[0938] 生物学实施例13的结果表明,在JIMT-1人乳腺癌异种移植模型中,小鼠对2.5mg/kg、5mg/kg和10mg/kg剂量的ADC实施例3均具有良好的耐受性。与所有其他治疗组相比,用所有三个浓度的ADC实施例3治疗的小鼠的肿瘤体积均显著减小,表12中的ΔTGI结果也显示了这一点,其中ADC实施例3导致肿瘤生长抑制最多。

[0939] 生物学实施例14的结果表明,本发明的测试ADC,即ADC实施例8,有效诱导HER2阳性乳腺癌细胞系BT474的细胞杀伤。与其他测试化合物:曲妥珠单抗、德曲妥珠单抗和同种型对照相比,本发明的ADC在诱导细胞杀伤方面更有效。

[0940] 因此,总体而言,特别是在治疗癌症等过度增殖性病症方面,本发明的ADC有望用作药物。

[0941] 在整个说明书和下面的权利要求书中,除非上下文另外要求,否则词语“comprise(包含)”和诸如“comprises(包含)”和“comprising(包含)”的变型应理解为包含规定的整数、步骤、整数的组或步骤的组但不排除任何其他整数、步骤、整数的组或步骤的组。

[0942] 本文引用的所有专利和专利申请和均通过引用以其整体并入本文。

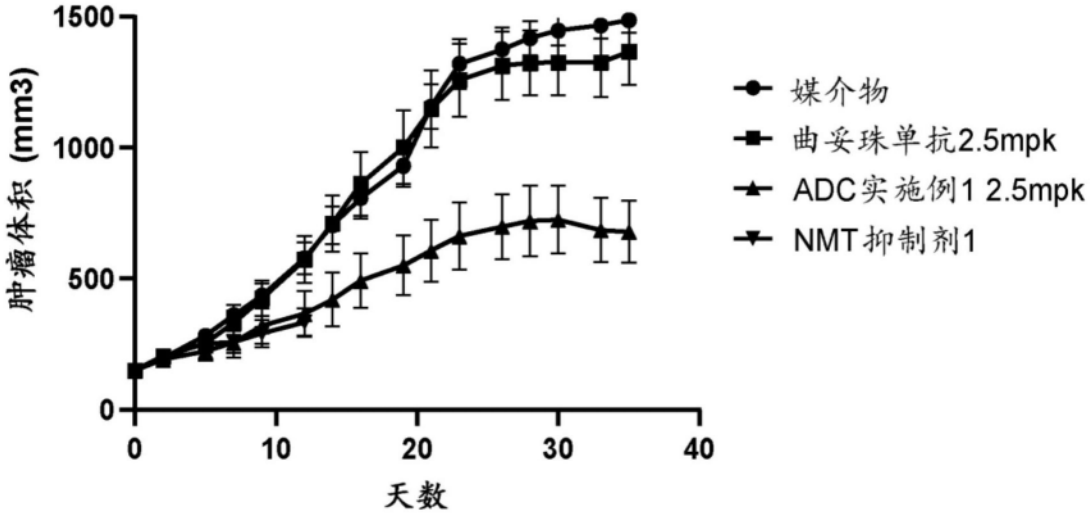

1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
0
10
20
30
40
天数
媒介物
曲妥珠单抗2.5mpk
ADC实施例1 2.5mpk
NMT抑制剂1

图1

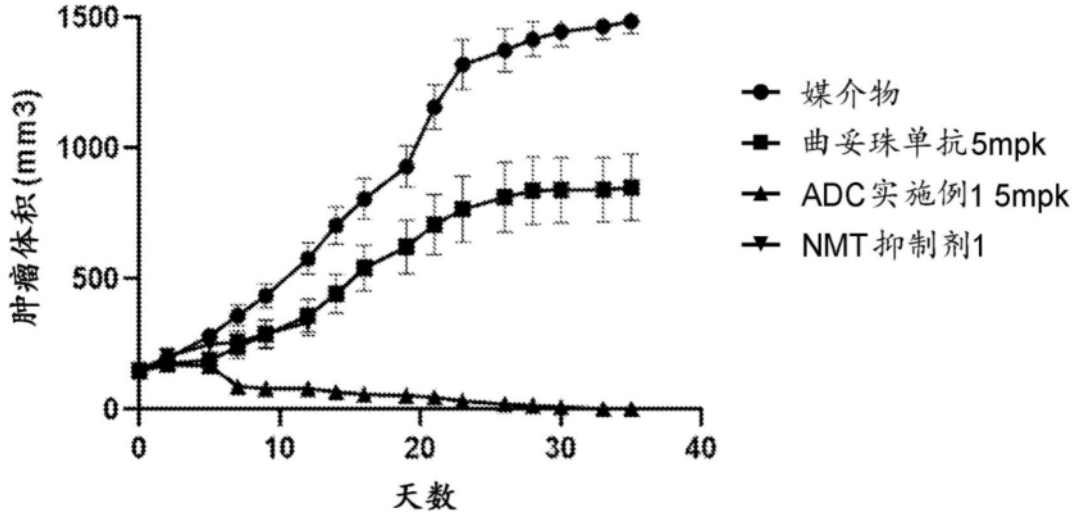

1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
0
10
20
30
40
天数
媒介物
曲妥珠单抗5mpk
ADC实施例1 5mpk
NMT抑制剂1

图2

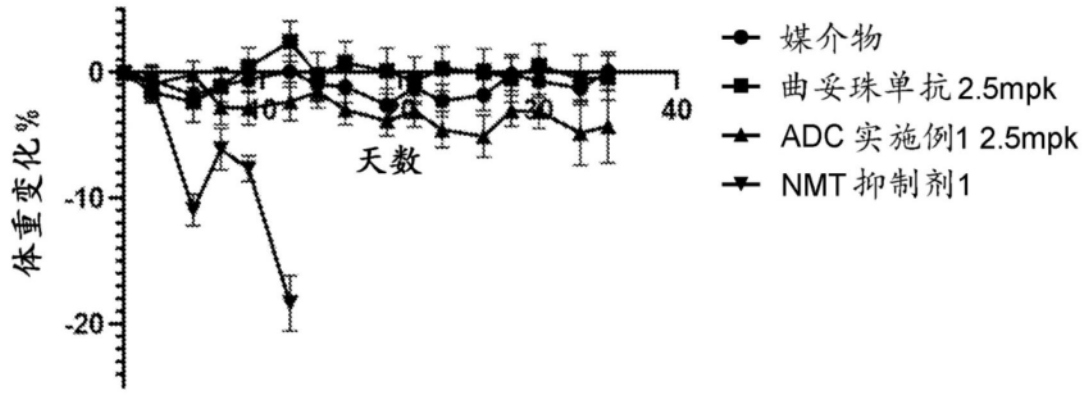

0
-10
-20
体重变化%
10
20
40
天数
媒介物
曲妥珠单抗2.5mpk
ADC 实施例1 2.5mpk
NMT抑制剂1

图3

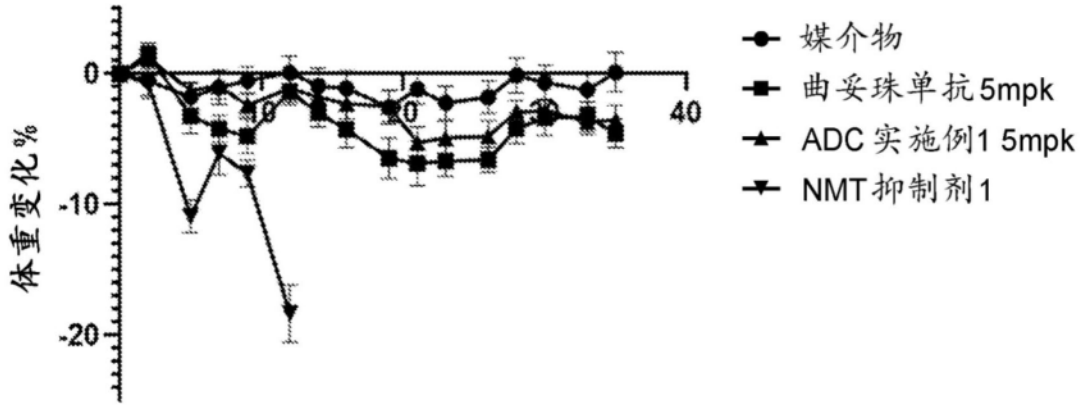

体重变化%
0
-10
-20
0
10
20
30
40
媒介物
曲妥珠单抗5mpk
ADC 实施例1 5mpk
NMT抑制剂1

图4

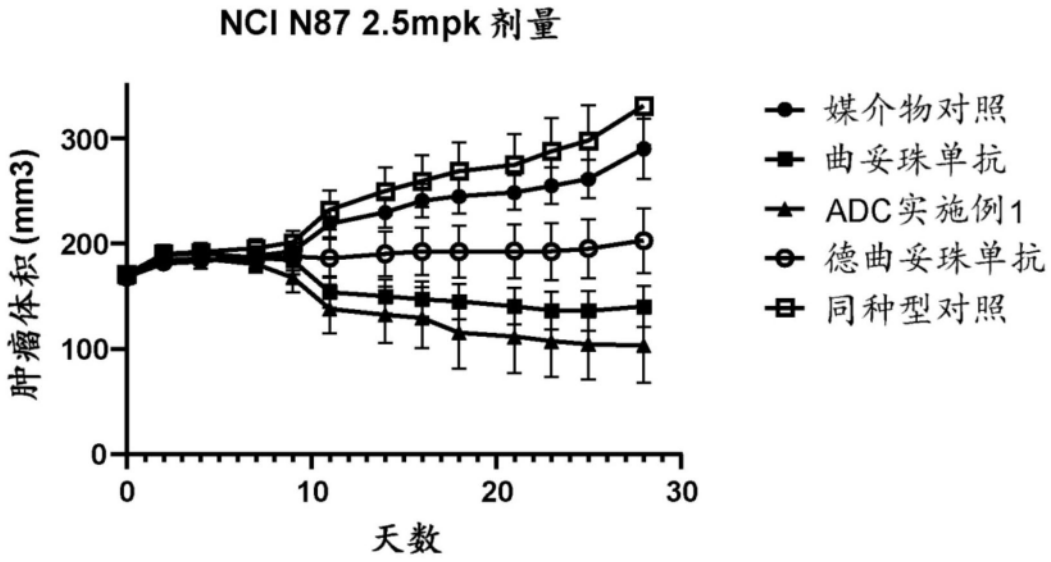

NCI N87 2.5mpk 剂量
肿瘤体积 (mm3)
300
200
100
0
0
10
20
30
天数
媒介物对照
曲妥珠单抗
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
同种型对照

图5

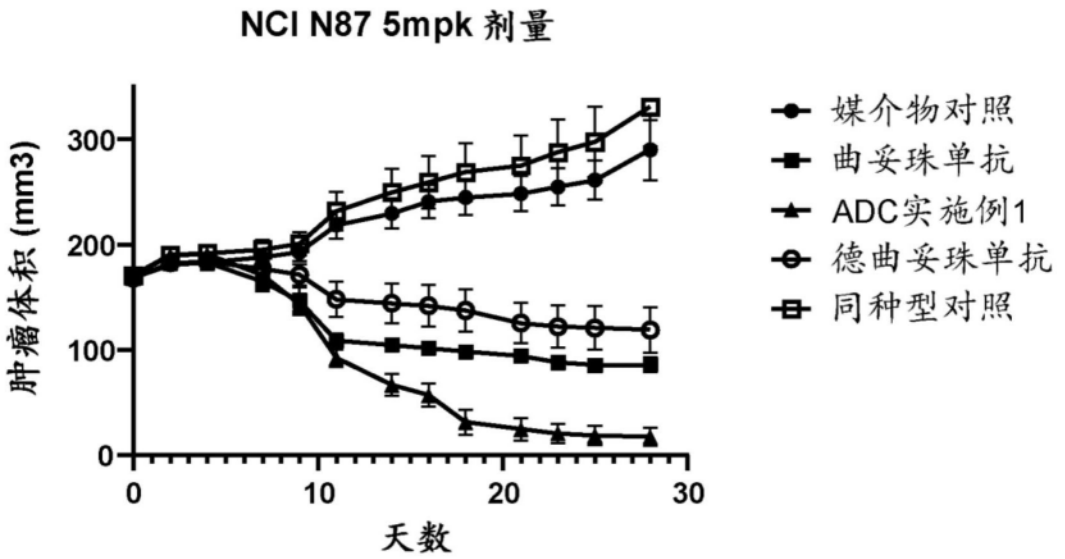

NCI N87 5mpk 剂量
肿瘤体积 (mm3)
300
200
100
0
0
10
20
30
天数
媒介物对照
曲妥珠单抗
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
同种型对照

图6

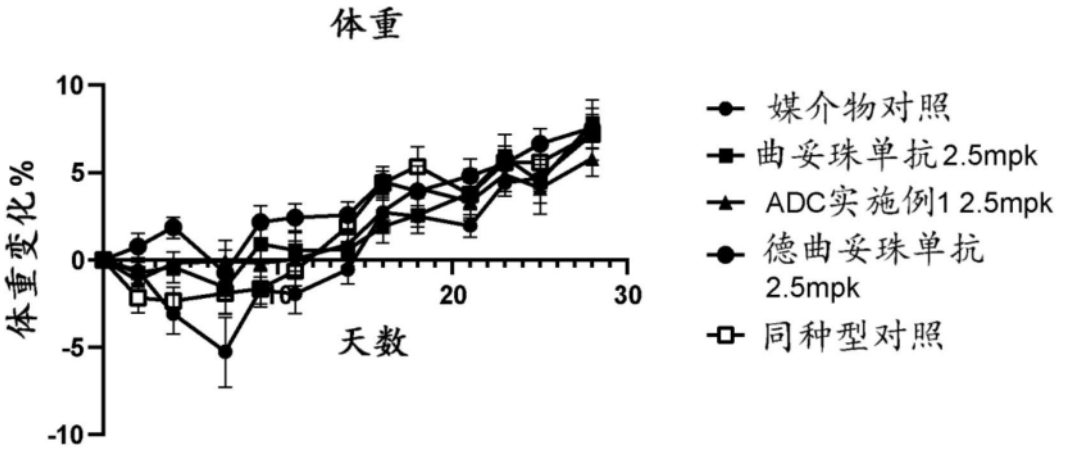

体重
体重变化%
10
5
0
-5
-10
20
30
天数
媒介物对照
曲妥珠单抗2.5mpk
ADC实施例1 2.5mpk
德曲妥珠单抗
2.5mpk
同种型对照

图7A

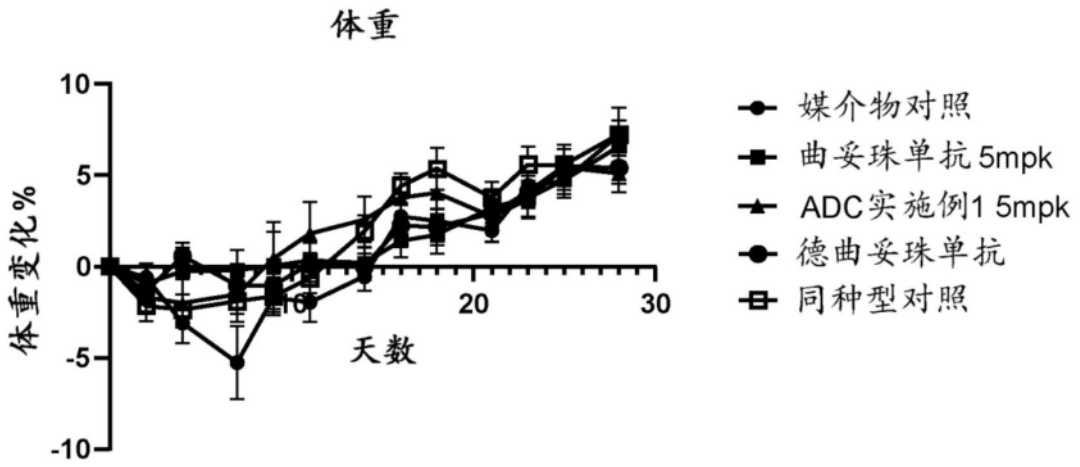

体重
体重变化%
天数
媒介物对照
曲妥珠单抗5mpk
ADC实施例1 5mpk
德曲妥珠单抗
同种型对照

图7B

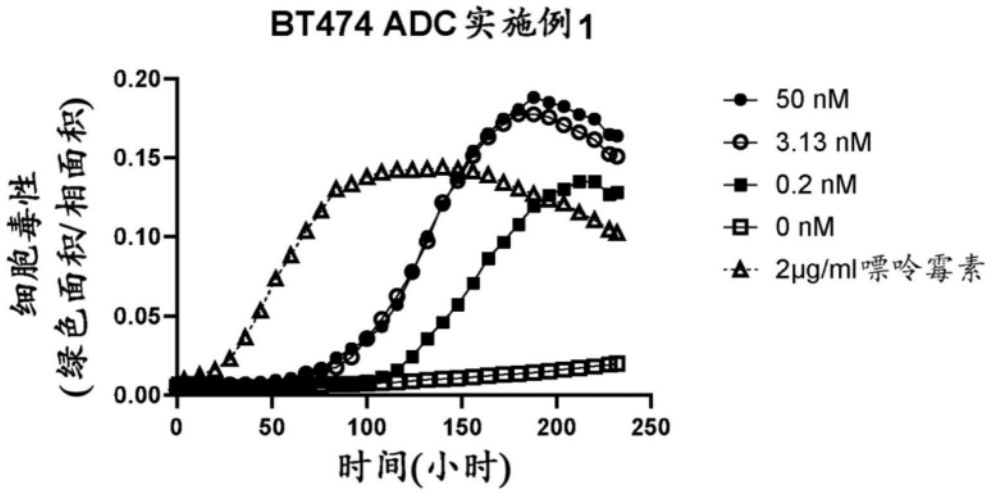

BT474 ADC实施例1
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml喘呤霉素

图8

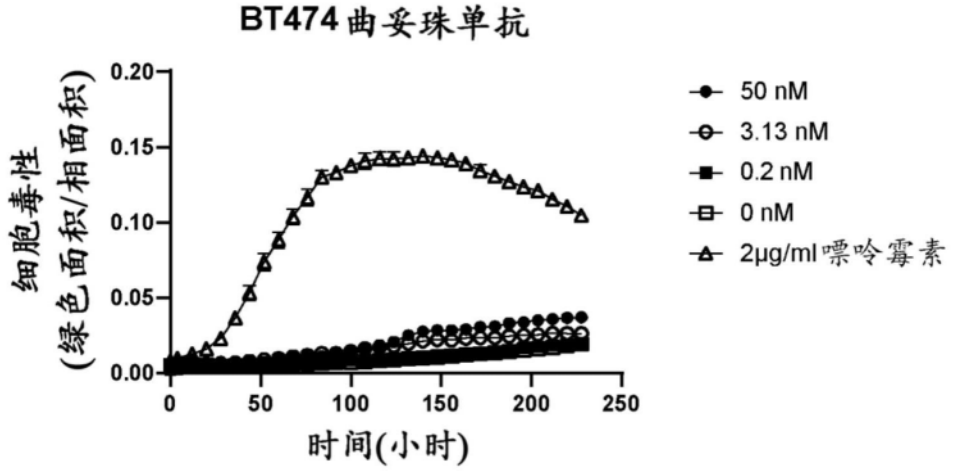

BT474曲妥珠单抗
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml喘呤霉素

图9

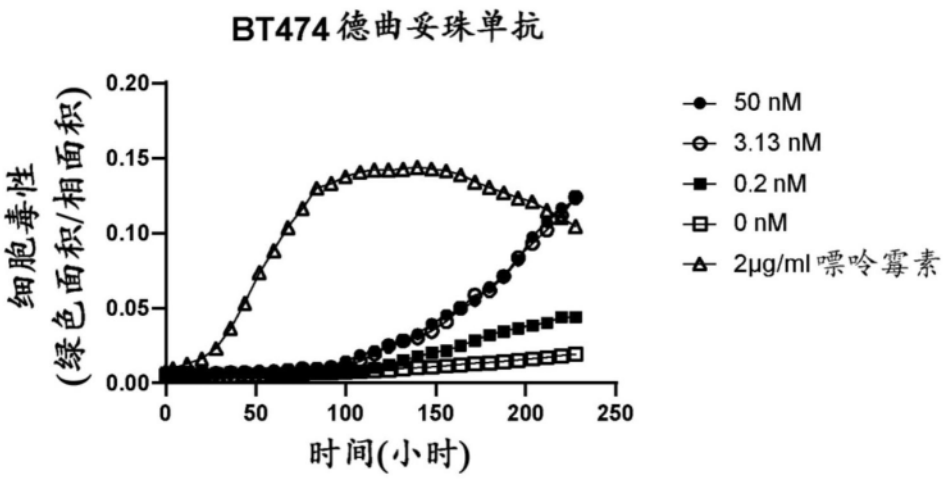

BT474德曲妥珠单抗
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
50
100
150
200
250
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 喂吟霉素

图10

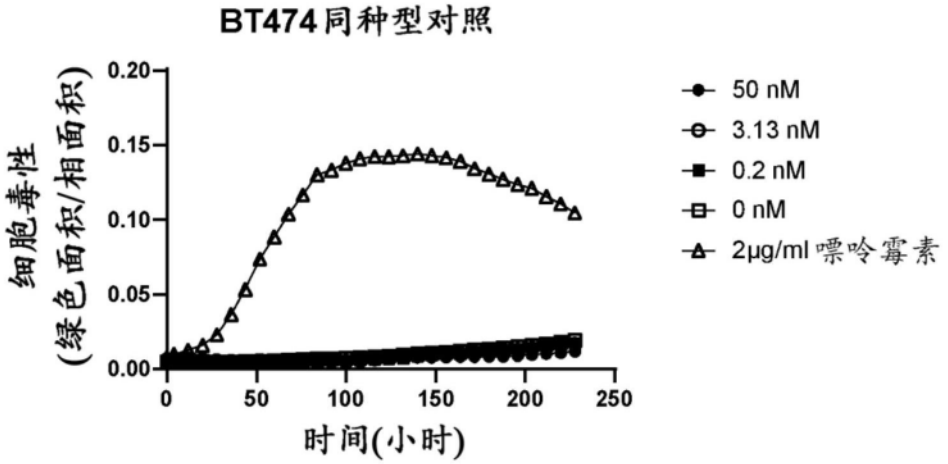

BT474同种型对照
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
50
100
150
200
250
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 喂吟霉素

图11

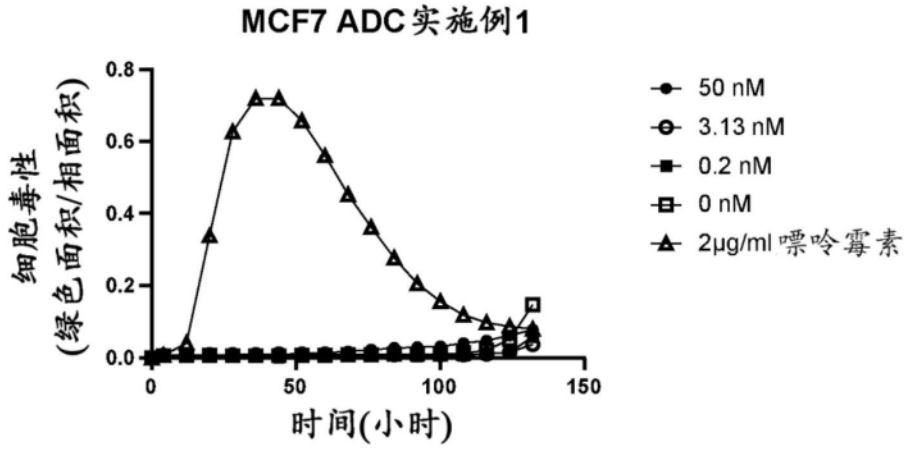

MCF7 ADC实施例1
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
50
100
150
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 喂吟霉素

图12

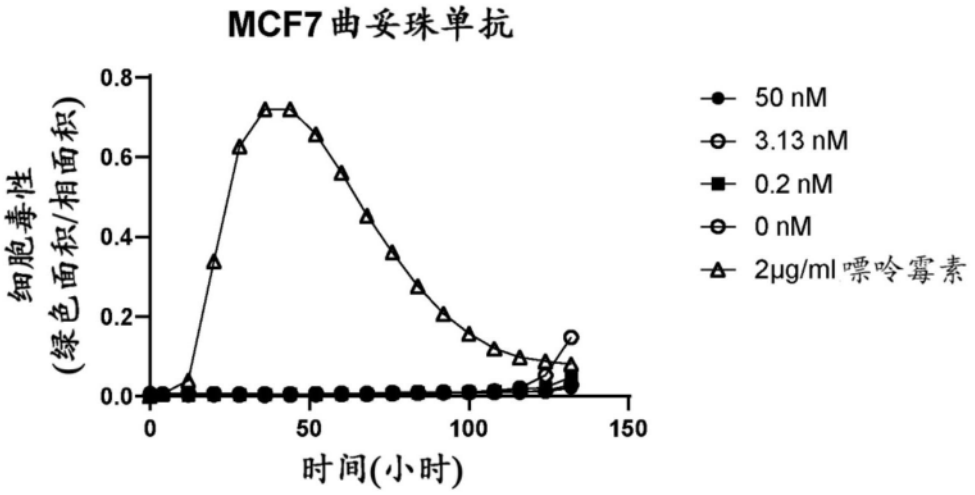

MCF7曲妥珠单抗
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
50
100
150
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 嘌呤霉素

图13

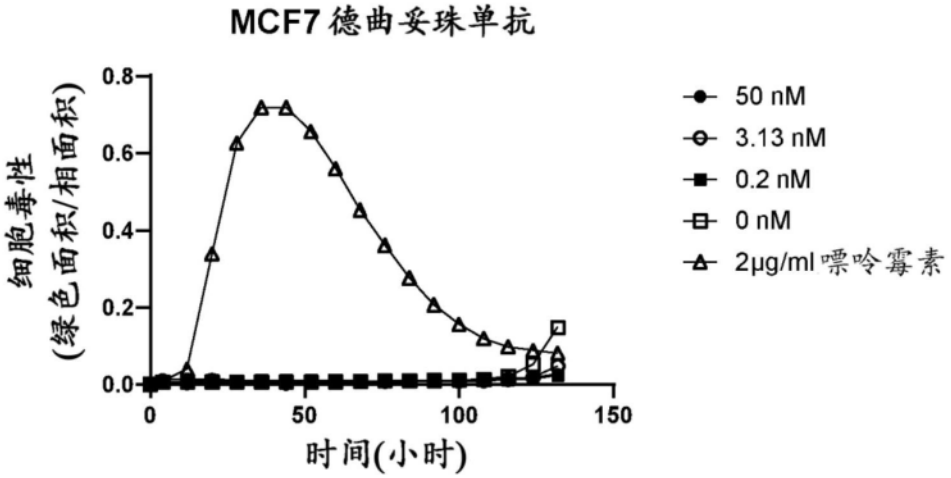

MCF7德曲妥珠单抗
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
50
100
150
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 嘌呤霉素

图14

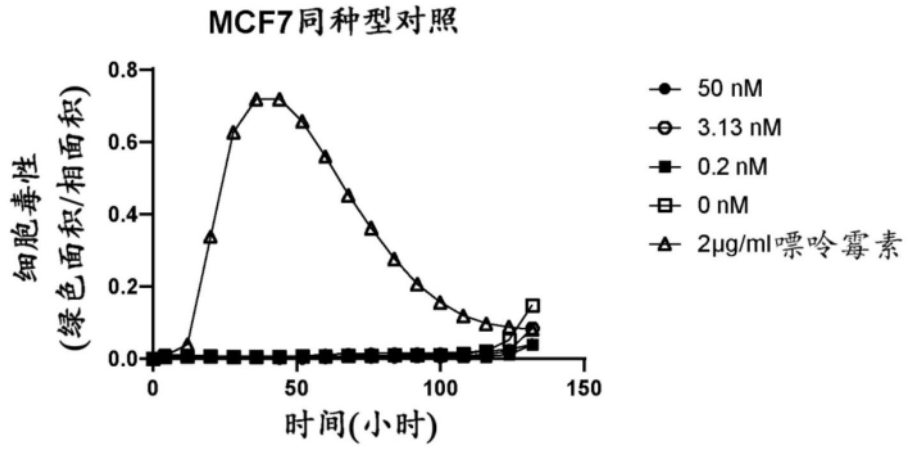

MCF7同种型对照
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
50
100
150
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 嘌呤霉素

图15

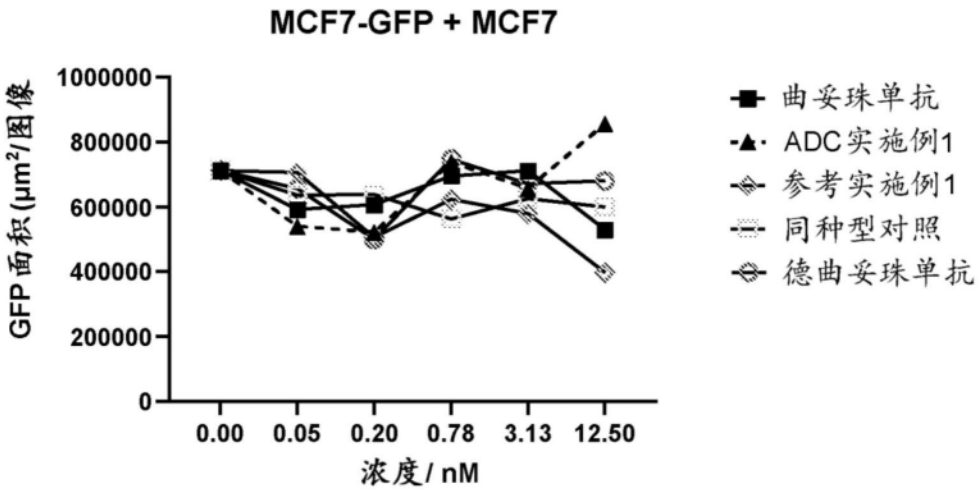

MCF7-GFP + MCF7
GFP面积(μm²/图像)
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.00
0.05
0.20
0.78
3.13
12.50
浓度/ nM
曲妥珠单抗
ADC实施例1
参考实施例1
同种型对照
德曲妥珠单抗

图16

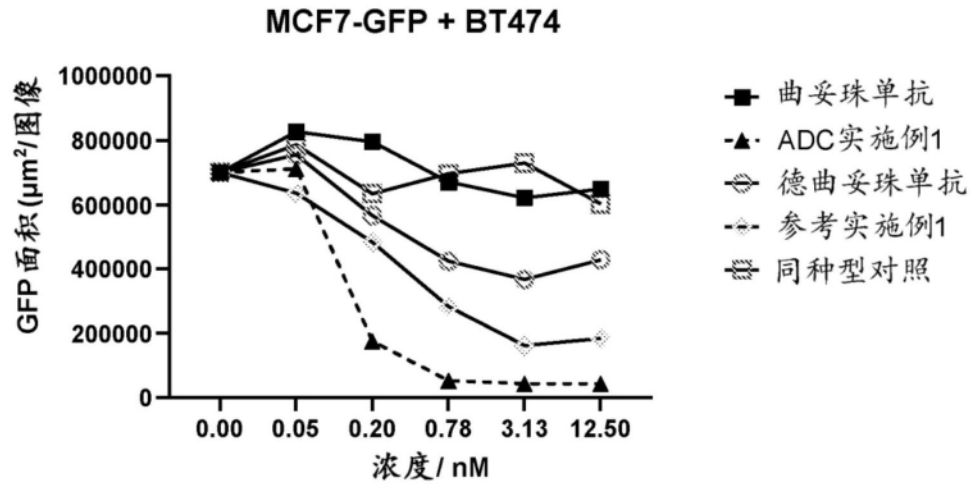

MCF7-GFP + BT474
GFP面积(μm²/图像)
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.00
0.05
0.20
0.78
3.13
12.50
浓度/ nM
曲妥珠单抗
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
参考实施例1
同种型对照

图17

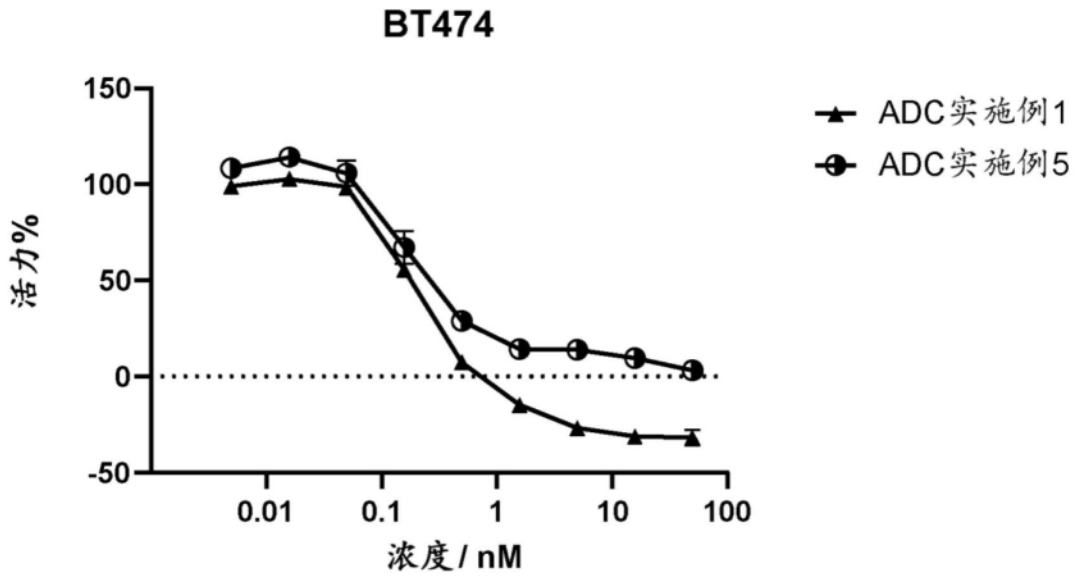

BT474
150
100
50
0
-50
活力%
0.01
0.1
1
10
100
浓度 / nM
ADC实施例1
ADC实施例5

图18

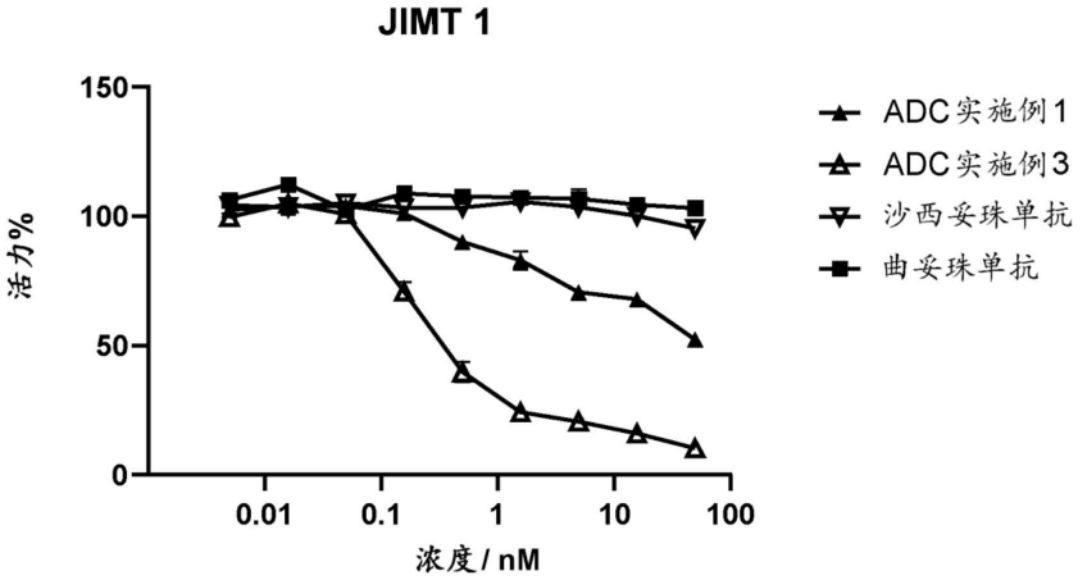

JIMT 1
150
100
50
0
活力%
0.01
0.1
1
10
100
浓度 / nM
ADC实施例1
ADC实施例3
沙西妥珠单抗
曲妥珠单抗

图19

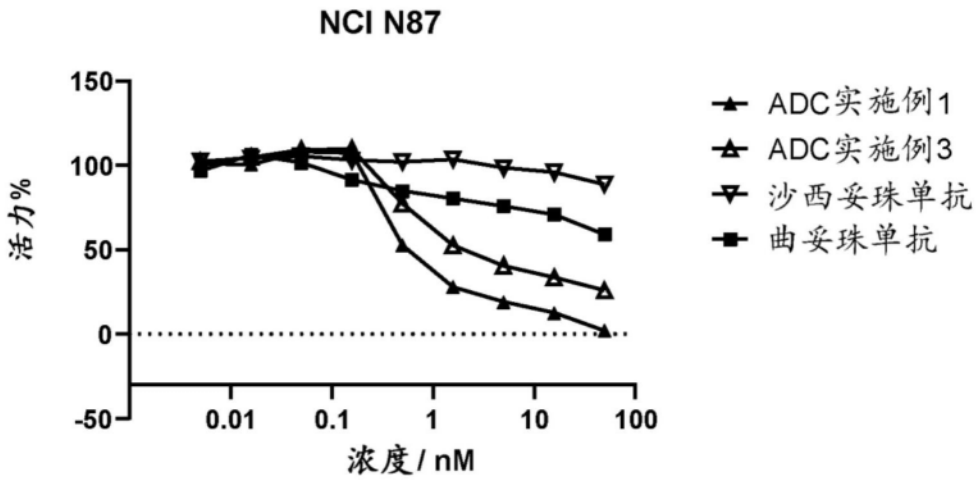

NCI N87
150
100
50
0
-50
活力%
0.01
0.1
1
10
100
浓度 / nM
ADC实施例1
ADC实施例3
沙西妥珠单抗
曲妥珠单抗

图20

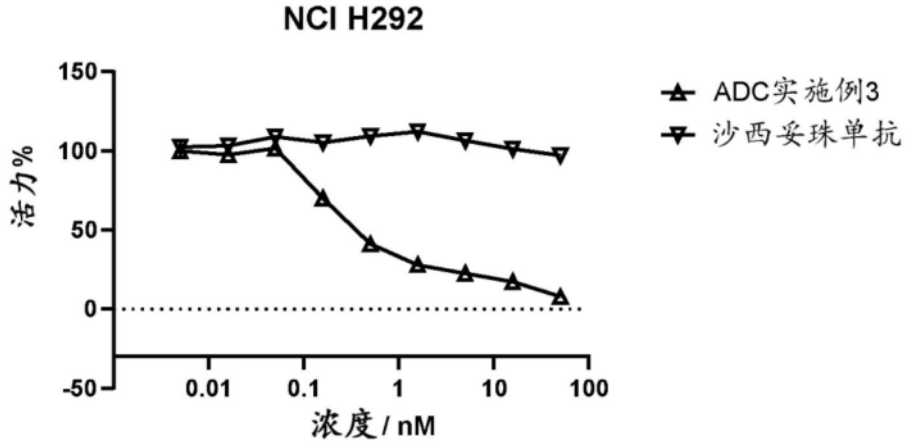

NCI H292
150
100
50
0
-50
活力%
0.01
0.1
1
10
100
浓度 / nM
ADC实施例3
沙西妥珠单抗

图21

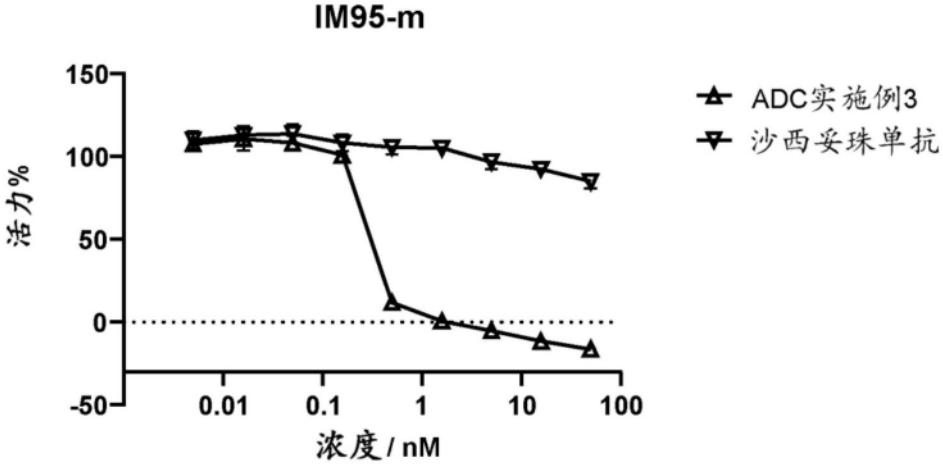

IM95-m
150
100
50
0
-50
活力%
0.01
0.1
1
10
100
浓度 / nM
ADC实施例3
沙西妥珠单抗

图22

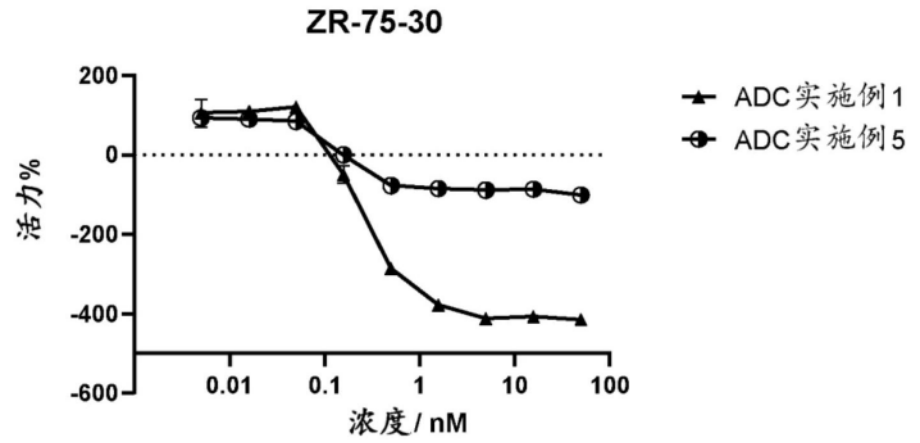

ZR-75-30
200
0
-200
-400
-600
活力%
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
ADC实施例1
ADC实施例5

图23

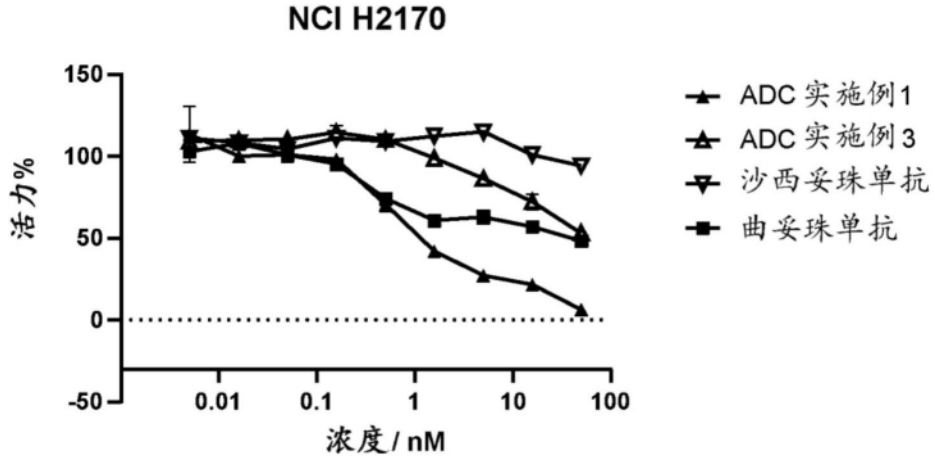

NCI H2170
150
100
50
0
-50
活力%
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
ADC 实施例1
ADC 实施例3
沙西妥珠单抗
曲妥珠单抗

图24

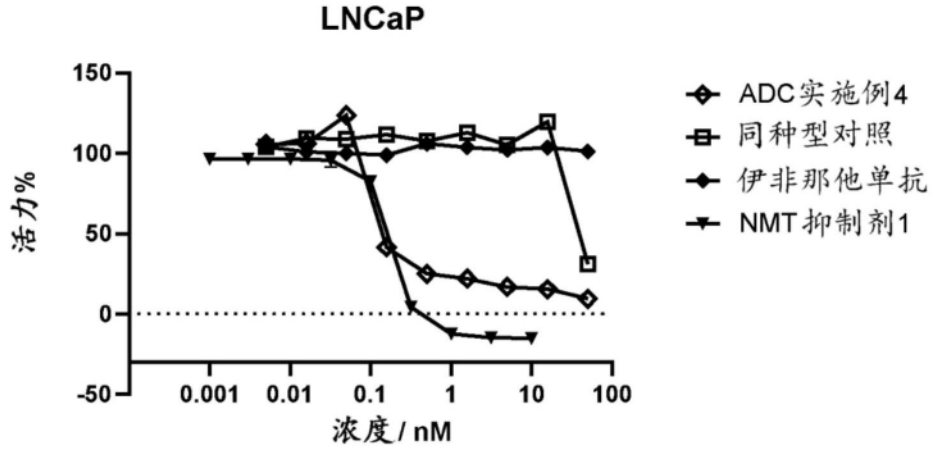

LNCaP
150
100
50
0
-50
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
ADC实施例4
同种型对照
伊非那他单抗
NMT抑制剂1

图25

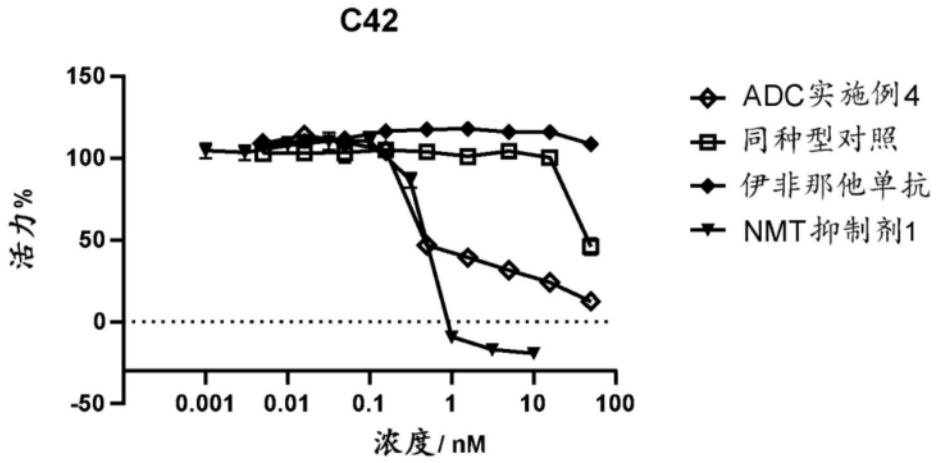

C42
150
100
50
0
-50
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
ADC实施例4
同种型对照
伊非那他单抗
NMT抑制剂1

图26

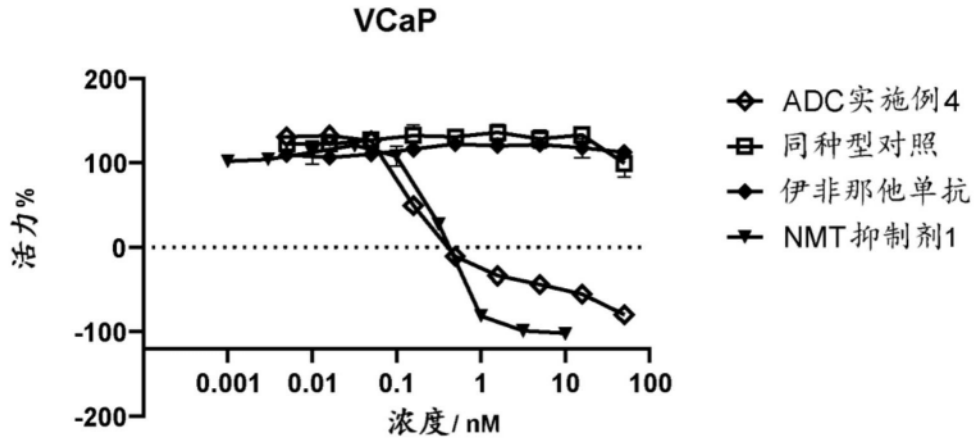

VCaP
200
100
0
-100
-200
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
ADC实施例4
同种型对照
伊非那他单抗
NMT抑制剂1

图27

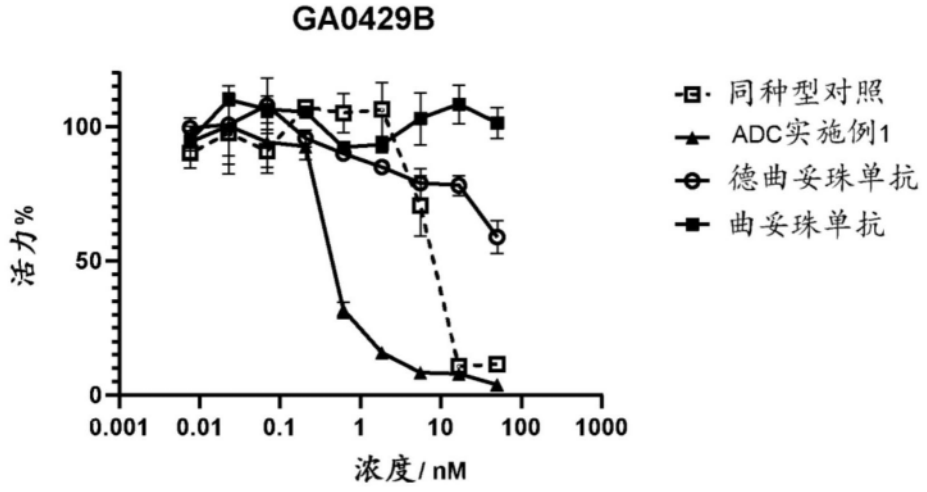

GA0429B
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图28

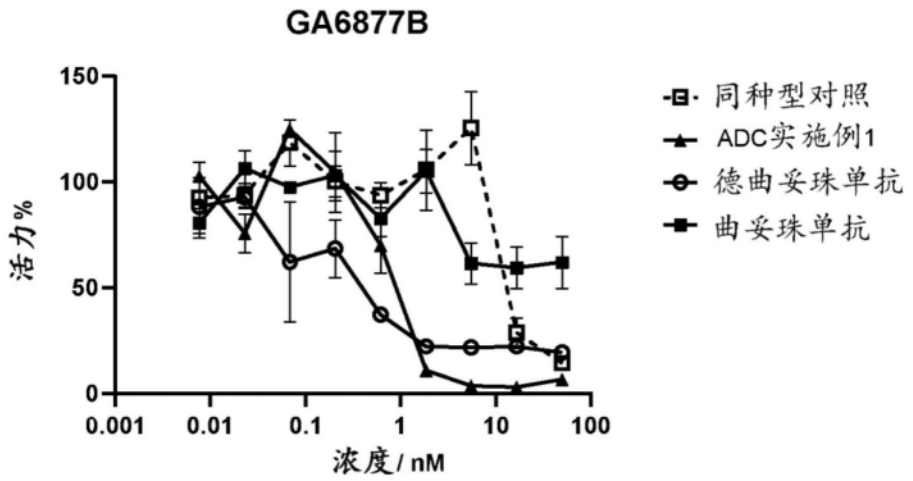

GA6877B
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/ nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图29

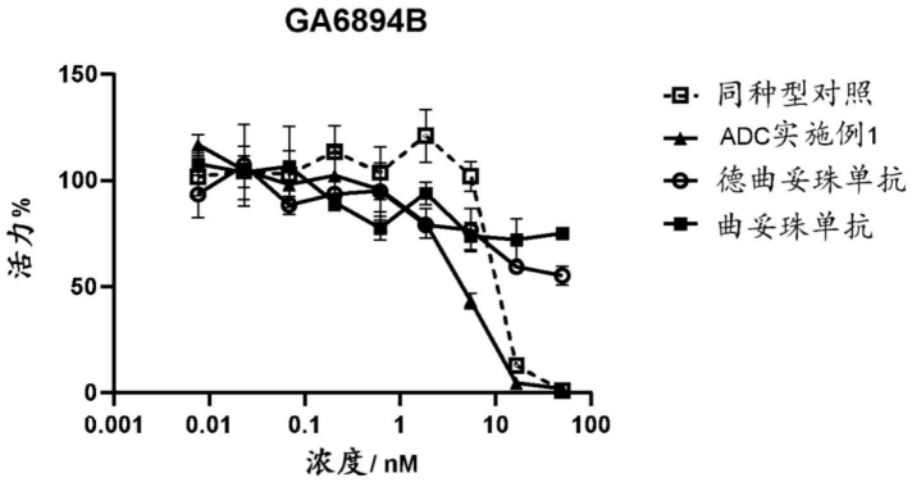

GA6894B
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/ nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图30

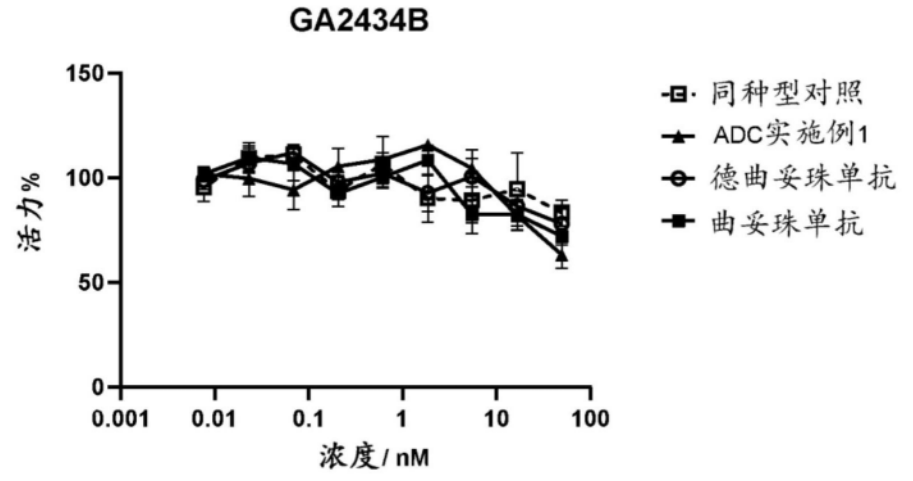

GA2434B
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/ nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图31

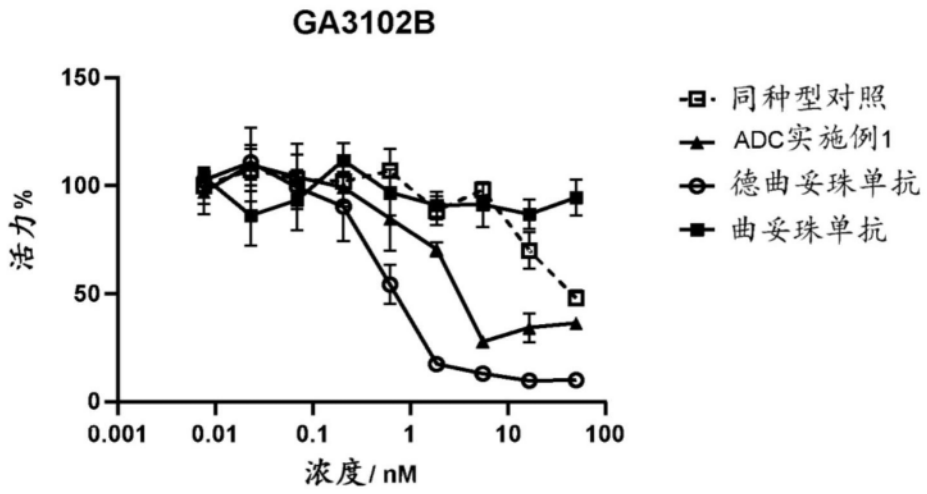

GA3102B
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图32

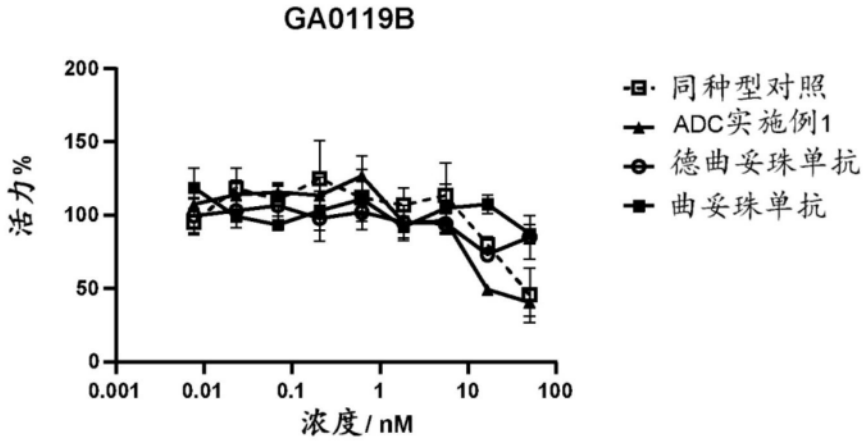

GA0119B
200
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图33

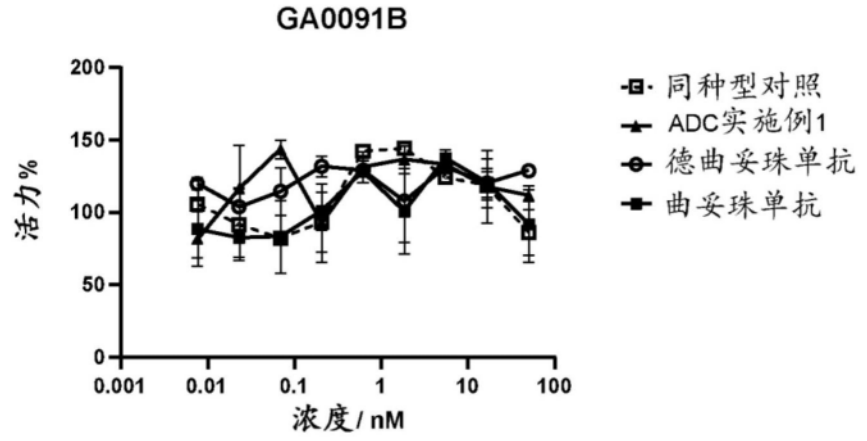

GA0091B
200
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图34

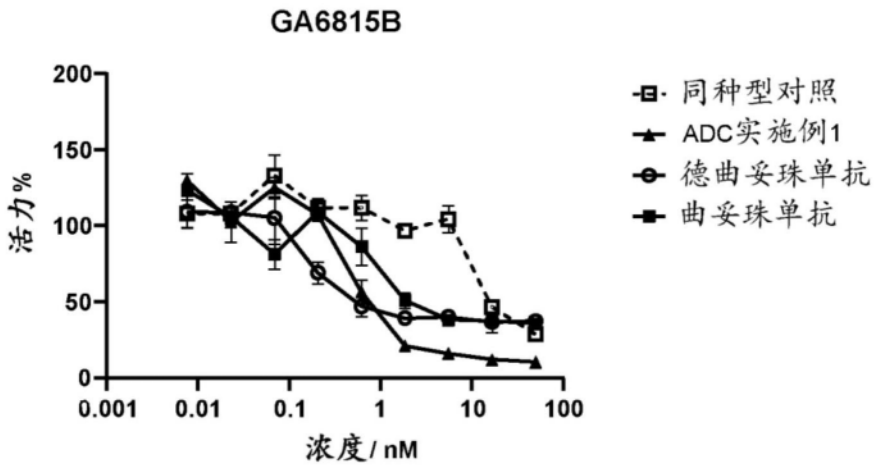

GA6815B
200
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图35

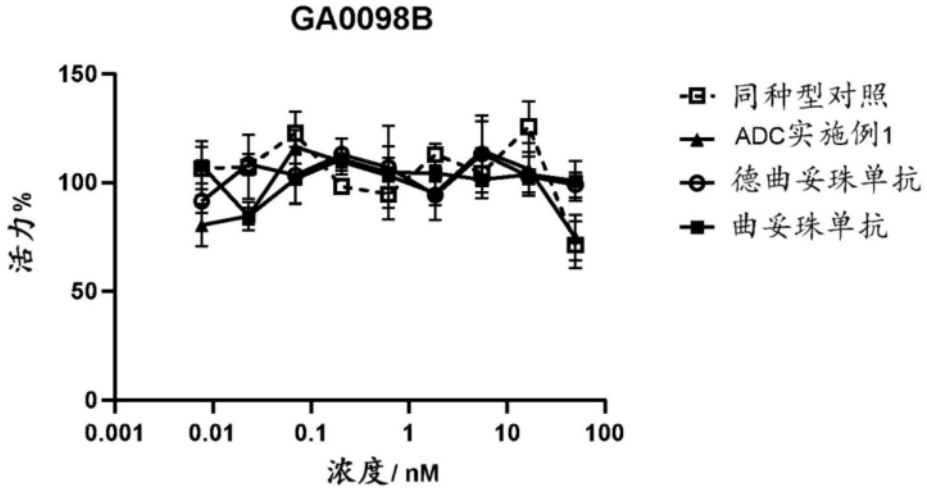

GA0098B
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图36

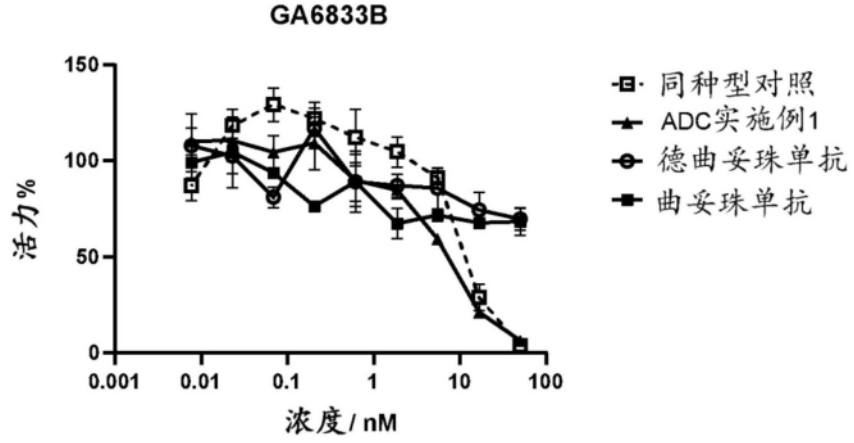

GA6833B
150
100
50
0
活力%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图37

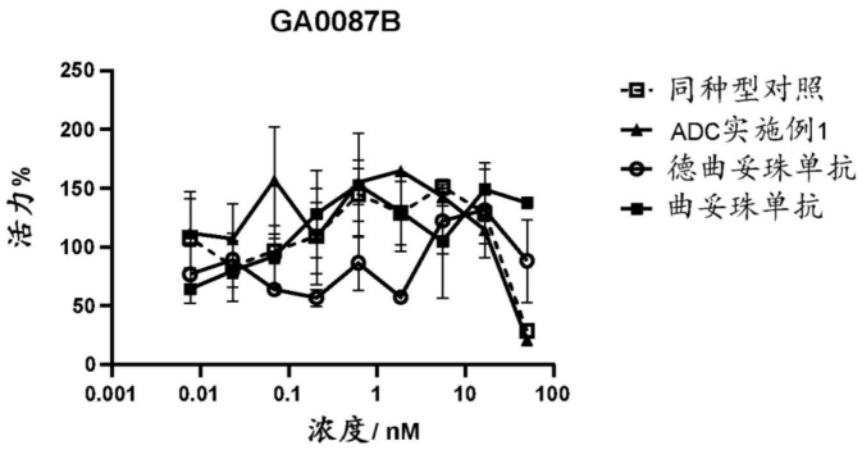

GA0087B
活力%
250
200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图38

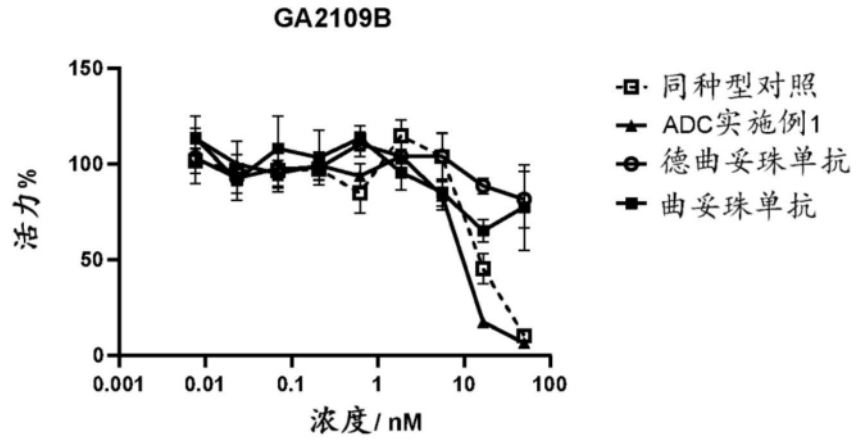

GA2109B
活力%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图39

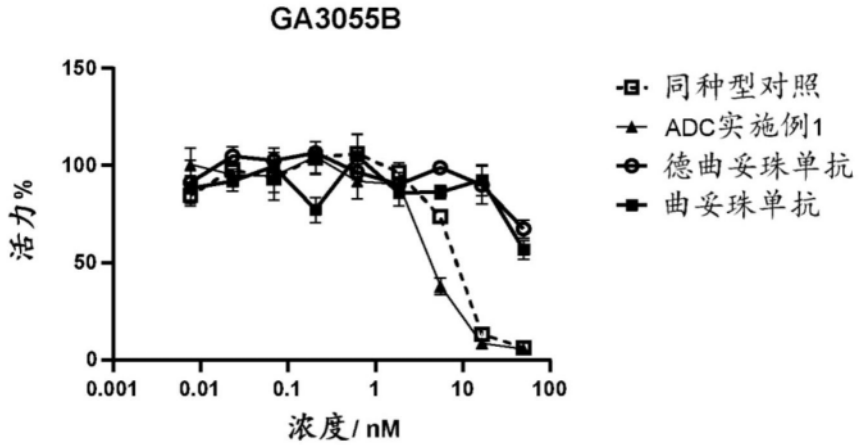

GA3055B
活力%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图40

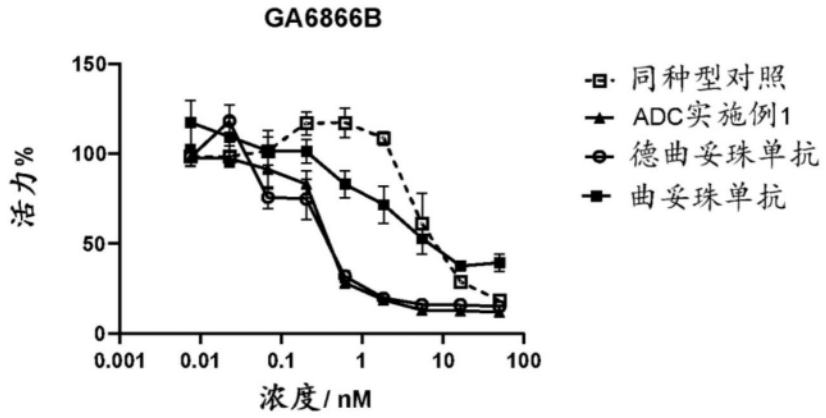

GA6866B
活力%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/ nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图41

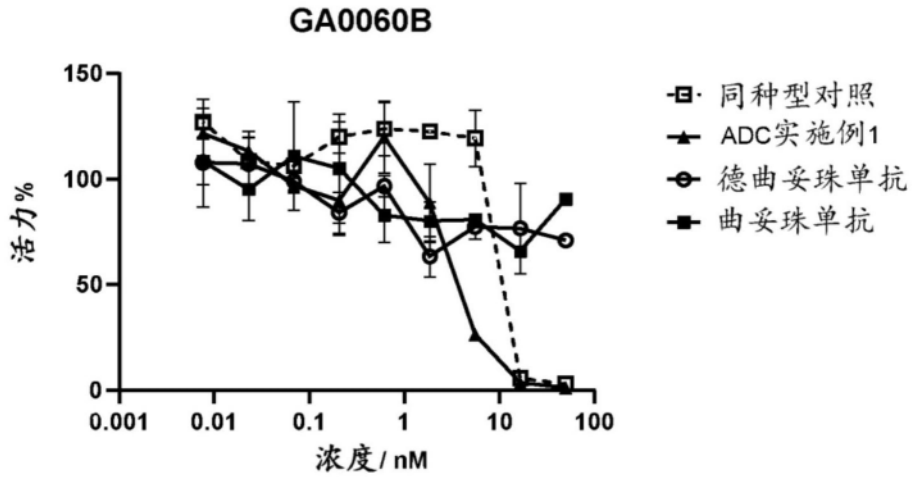

GA0060B
活力%
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/ nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图42

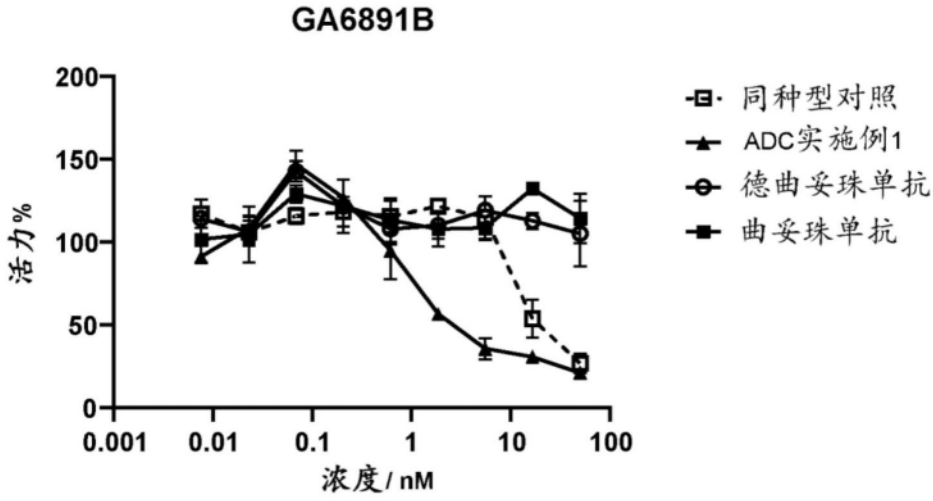

GA6891B
活力%
200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
浓度/ nM
同种型对照
ADC实施例1
德曲妥珠单抗
曲妥珠单抗

图43

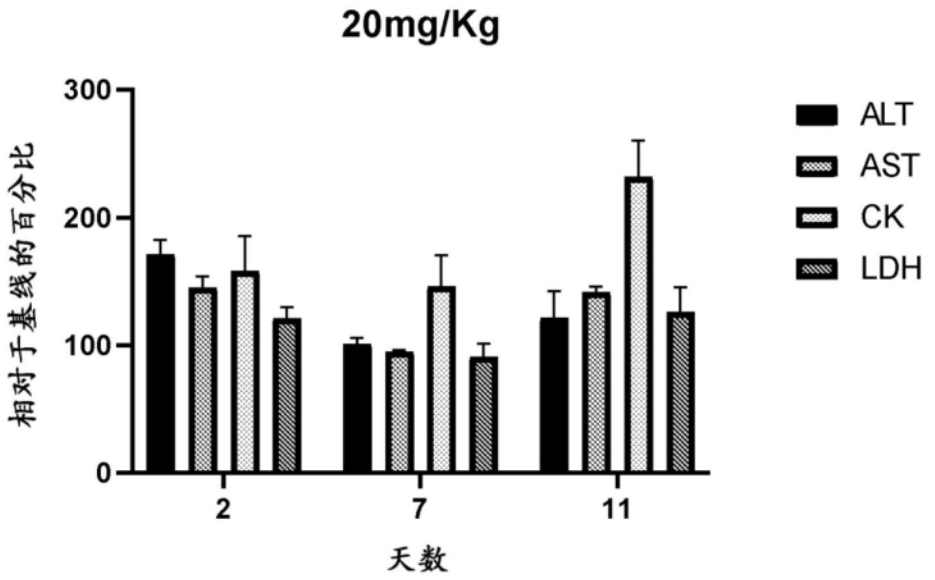

20mg/Kg
300
200
100
0
相对于基线的百分比
2
7
11
天数
ALT
AST
CK
LDH

图44a

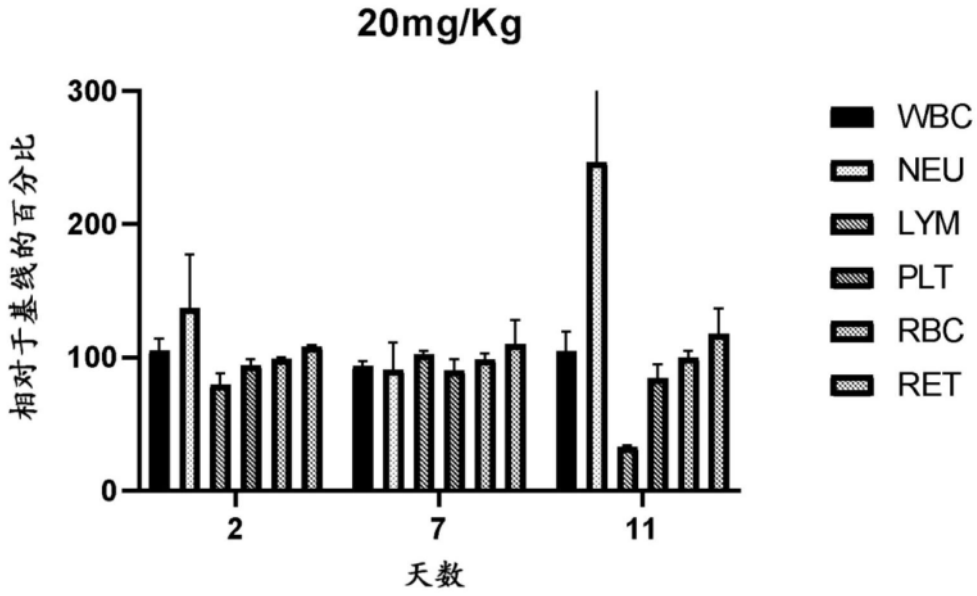

20mg/Kg
300
200
100
0
相对于基线的百分比
2
7
11
天数
WBC
NEU
LYM
PLT
RBC
RET

图44b

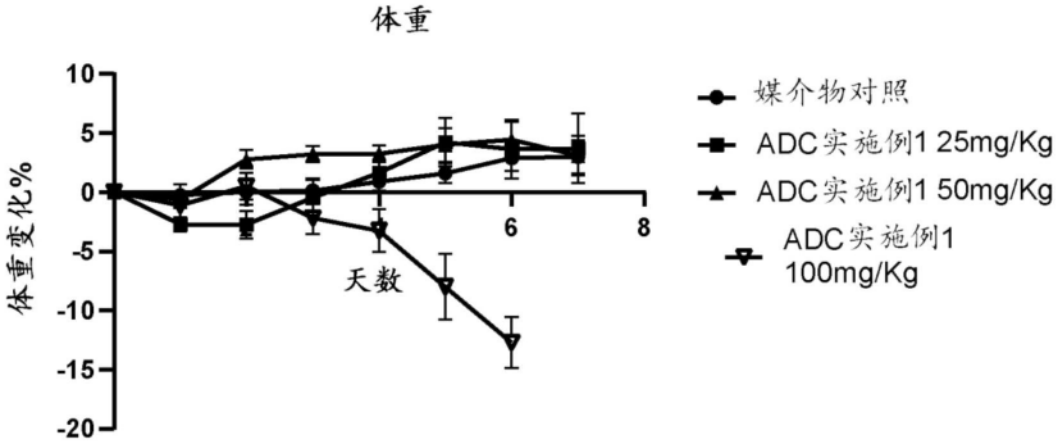

体重
体重变化%
10
5
0
-5
-10
-15
-20
6
8
天数
媒介物对照
ADC实施例1 25mg/Kg
ADC实施例1 50mg/Kg
ADC实施例1
100mg/Kg

图45

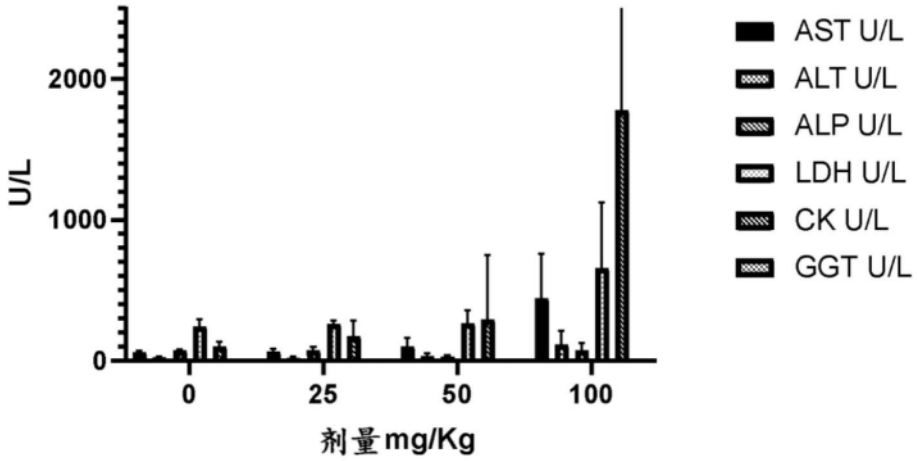

U/L
2000
1000
0
0
25
50
100
剂量mg/Kg
AST U/L
ALT U/L
ALP U/L
LDH U/L
CK U/L
GGT U/L

图46

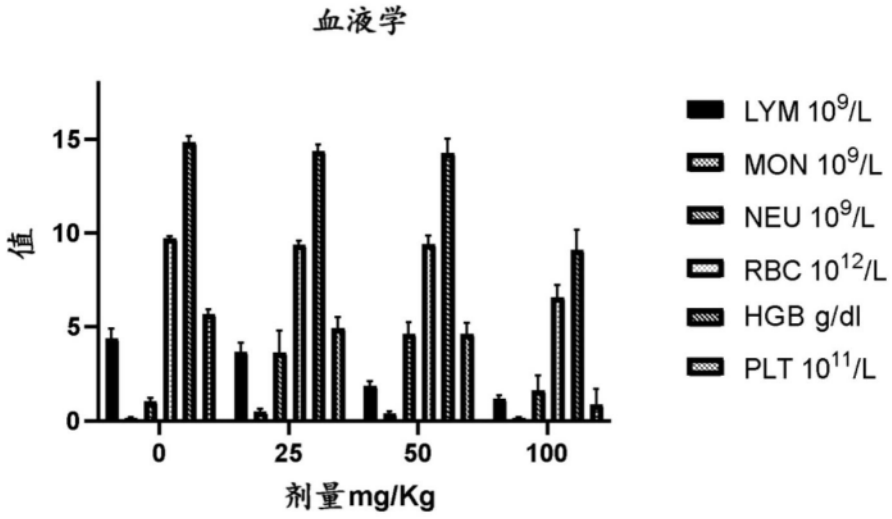

血液学
值
15
10
5
0
0
25
50
100
剂量mg/Kg
LYM 10^9/L
MON 10^9/L
NEU 10^9/L
RBC 10^12/L
HGB g/dl
PLT 10^11/L

图47

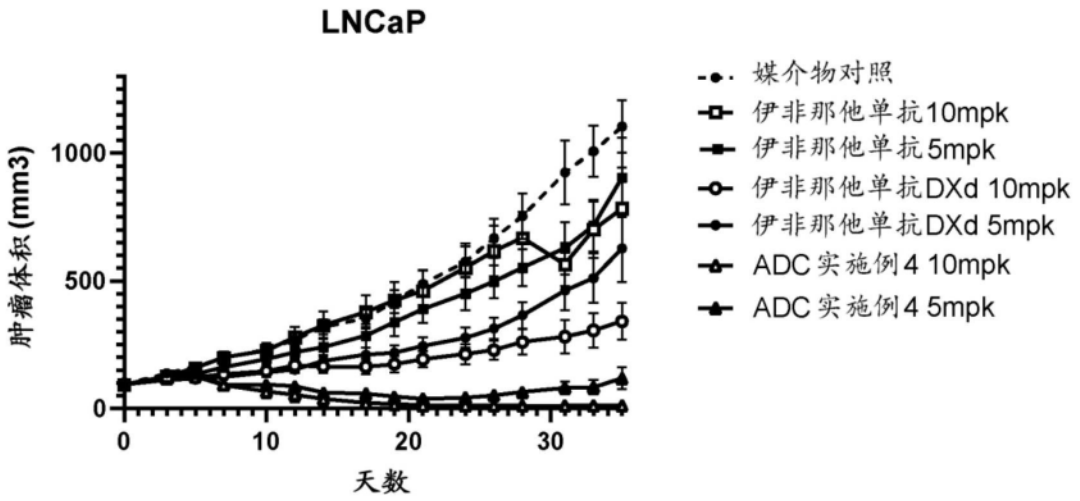

LNCaP
肿瘤体积(mm3)
1000
500
0
0
10
20
30
天数
媒介物对照
伊非那他单抗10mpk
伊非那他单抗5mpk
伊非那他单抗DXd 10mpk
伊非那他单抗DXd 5mpk
ADC 实施例4 10mpk
ADC 实施例4 5mpk

图48

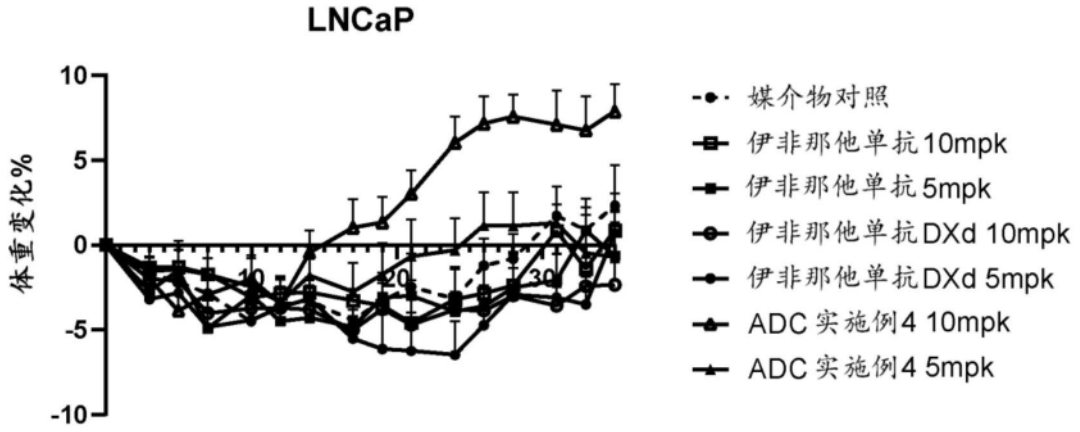

LNCaP
体重变化%
10
5
0
-5
-10
媒介物对照
伊非那他单抗10mpk
伊非那他单抗5mpk
伊非那他单抗DXd 10mpk
伊非那他单抗DXd 5mpk
ADC 实施例4 10mpk
ADC 实施例4 5mpk

图49

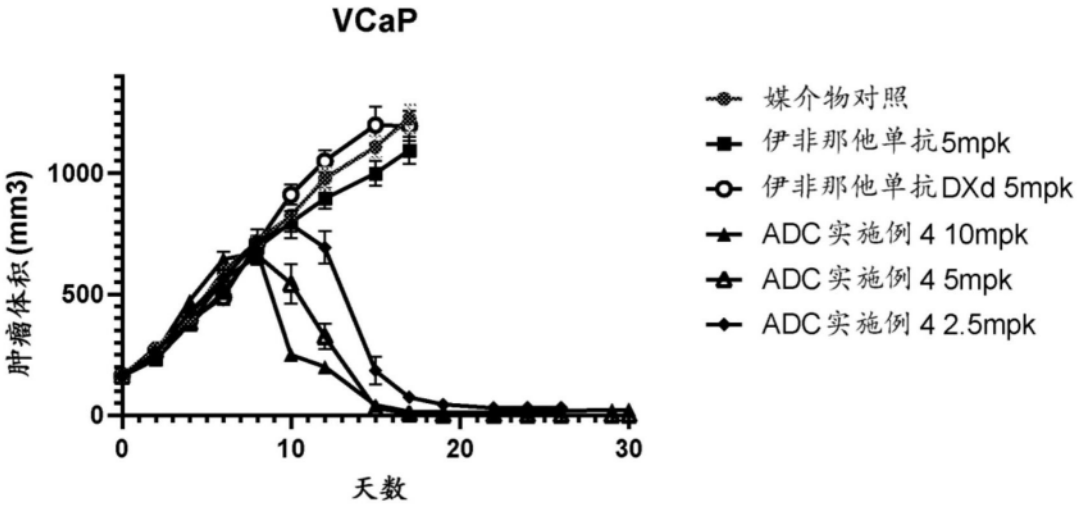

VCaP
肿瘤体积(mm3)
1000
500
0
0
10
20
30
天数
媒介物对照
伊非那他单抗5mpk
伊非那他单抗DXd 5mpk
ADC 实施例 4 10mpk
ADC 实施例 4 5mpk
ADC 实施例 4 2.5mpk

图50

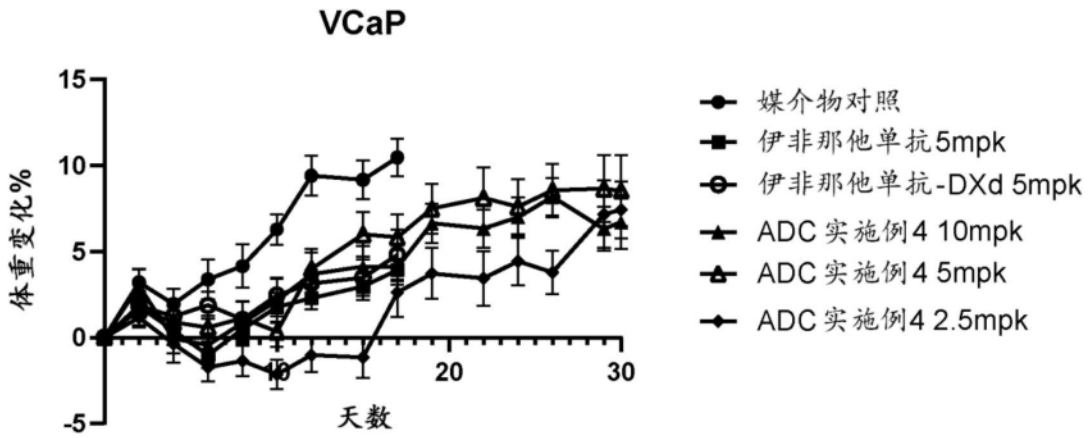

VCaP
体重变化%
15
10
5
0
-5
20
30
天数
媒介物对照
伊非那他单抗5mpk
伊非那他单抗-DXd 5mpk
ADC 实施例4 10mpk
ADC 实施例4 5mpk
ADC 实施例4 2.5mpk

图51

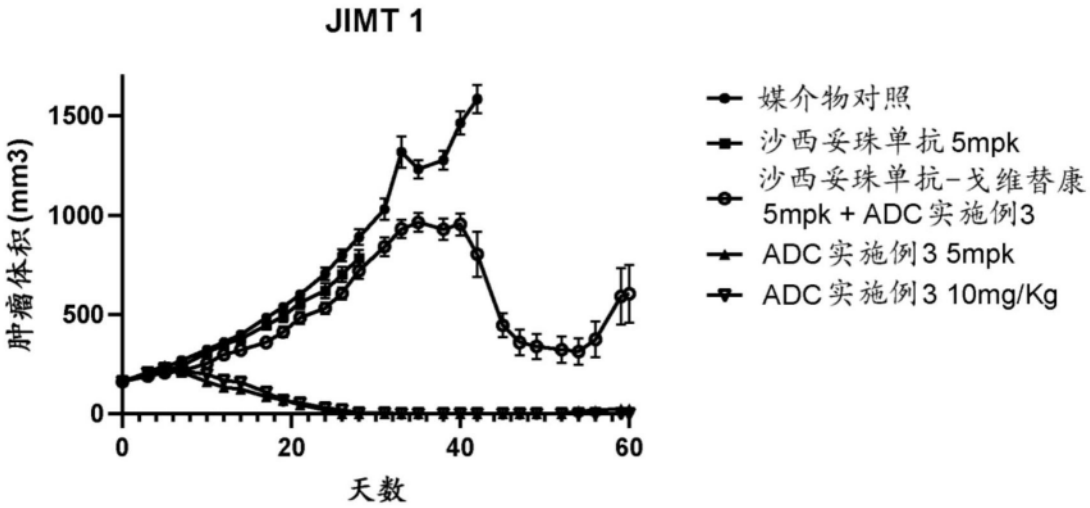

JIMT 1
肿瘤体积(mm3)
1500
1000
500
0
0
20
40
60
天数
媒介物对照
沙西妥珠单抗 5mpk
沙西妥珠单抗-戈维替康 5mpk + ADC 实施例3
ADC 实施例3 5mpk
ADC 实施例3 10mg/Kg

图52

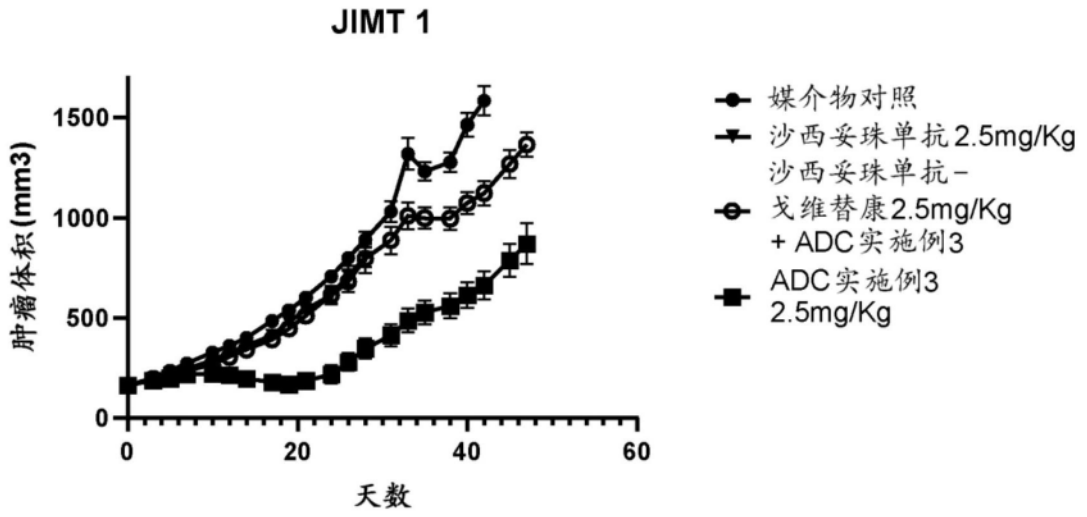

JIMT 1
肿瘤体积(mm3)
1500
1000
500
0
0
20
40
60
天数
媒介物对照
沙西妥珠单抗2.5mg/Kg
沙西妥珠单抗-戈维替康2.5mg/Kg + ADC实施例3
ADC实施例3 2.5mg/Kg

图53

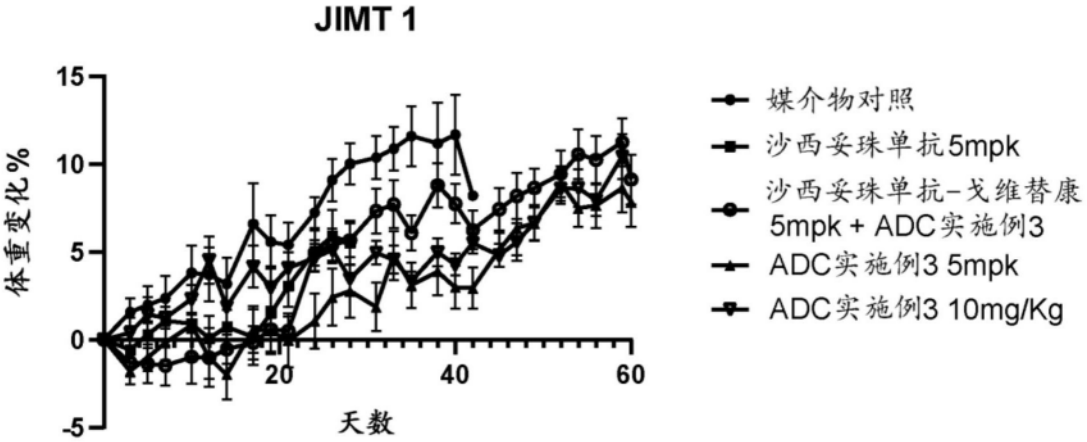

JIMT 1
体重变化%
15
10
5
0
-5
20
40
60
天数
媒介物对照
沙西妥珠单抗5mpk
沙西妥珠单抗-戈维替康5mpk + ADC实施例3
ADC实施例3 5mpk
ADC实施例3 10mg/Kg

图54

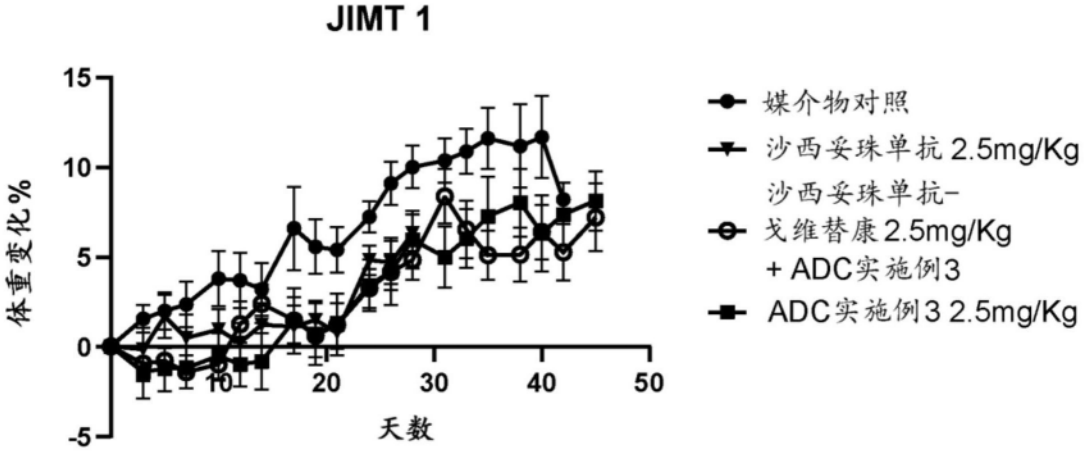

JIMT 1
体重变化%
15
10
5
0
-5
10
20
30
40
50
天数
媒介物对照
沙西妥珠单抗2.5mg/Kg
沙西妥珠单抗-戈维替康2.5mg/Kg + ADC实施例3
ADC实施例3 2.5mg/Kg

图55

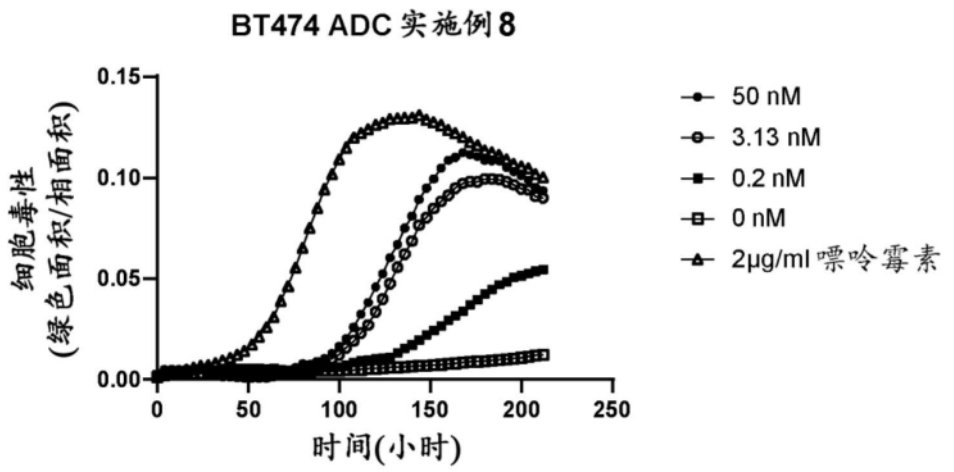

BT474 ADC 实施例 8
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.15
0.10
0.05
0.00
0
50
100
150
200
250
时间(小时)
50 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 喂吟霉素

图56

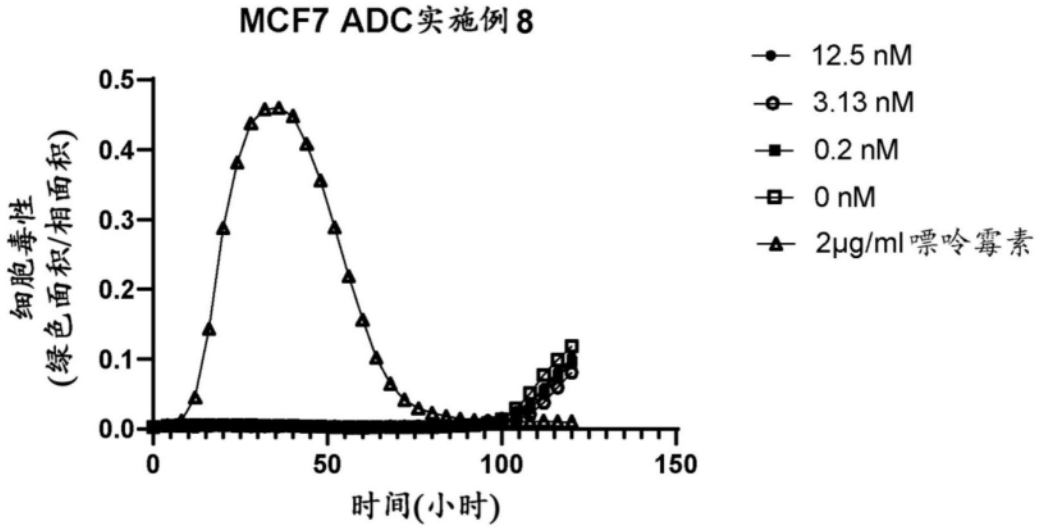

MCF7 ADC实施例 8
细胞毒性
(绿色面积/相面积)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
50
100
150
时间(小时)
12.5 nM
3.13 nM
0.2 nM
0 nM
2μg/ml 喂吟霉素

图57